



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114423787 B

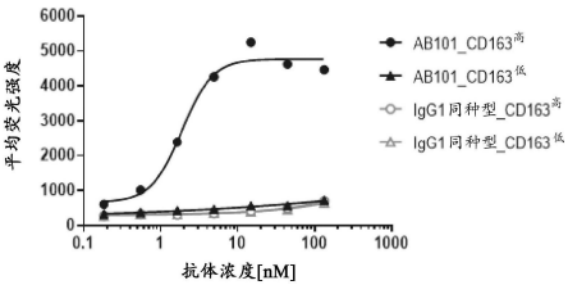
(45) 授权公告日 2025. 01. 24

(21) 申请号 202080065955.9
(22) 申请日 2020.07.17
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 114423787 A
(43) 申请公布日 2022.04.29
(30) 优先权数据
 62/876,580 2019.07.19 US
 62/876,579 2019.07.19 US
 62/878,265 2019.07.24 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2022.03.18
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2020/042668 2020.07.17
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02021/016128 EN 2021.01.28
(73) 专利权人 昂科里斯庞斯公司
 地址 美国华盛顿州
(72) 发明人 卡默尔·D·普里

席德达斯·强卓斯卡拉
莫莉莎·L·康奈力
蓝迪·M·席梦思
泰瑞尔·T·史密斯
马克·E·布雷努
彼得·普罗伯斯特
(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 王玮玮 郑霞
(51) Int.Cl.
 C07K 16/28 (2006.01)
 C12N 5/0786 (2006.01)
 A61K 39/395 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
(56) 对比文件
 CN 102686612 A,2012.09.19
 CN 106459182 A,2017.02.22
 审查员 刘婷
 权利要求书2页 说明书94页
 序列表52页 附图33页

(54) 发明名称
 免疫调节性抗体及其使用方法

(57) 摘要
 本文提供了抗体及其使用方法。如本文公开的抗体与细胞上(诸如巨噬细胞上)的CD163+结合。这些抗体可用于治疗方法,诸如治疗癌症的方法。



1. 一种抗体,所述抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO: 8具有至少90%同一性的重链可变区(V_H)和与氨基酸序列SEQ ID NO: 7具有至少90%同一性的轻链可变区(V_L),其中所述 V_H 包含氨基酸序列SEQ ID NO: 4的互补决定区(CDR) H1,氨基酸序列SEQ ID NO: 5的CDR H2,和氨基酸序列SEQ ID NO: 6的CDR H3;并且,所述 V_L 包含氨基酸序列SEQ ID NO: 1的CDR L1,氨基酸序列SEQ ID NO: 2的CDR L2,和氨基酸序列SEQ ID NO: 3的CDR L3,并且其中所述抗体与人类CD163蛋白特异性结合。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述 V_L 与所述氨基酸序列SEQ ID NO: 7具有至少95%同一性。

3. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述 V_L 与所述氨基酸序列SEQ ID NO: 7具有至少99%同一性。

4. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述 V_L 与所述氨基酸序列SEQ ID NO: 7相同。

5. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述 V_H 与所述氨基酸序列SEQ ID NO: 8具有至少95%同一性。

6. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述 V_H 与所述氨基酸序列SEQ ID NO: 8具有至少99%同一性。

7. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述 V_H 与氨基酸序列SEQ ID NO: 8相同。

8. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述 V_L 与所述氨基酸序列SEQ ID NO: 7具有至少95%同一性且其中所述 V_H 与所述氨基酸序列SEQ ID NO: 8具有至少95%同一性。

9. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述 V_L 与所述氨基酸序列SEQ ID NO: 7具有至少99%同一性且所述 V_H 与所述氨基酸序列SEQ ID NO: 8具有至少99%同一性。

10. 根据权利要求1所述的抗体,所述抗体还包含人类重链恒定区或人类轻链恒定区。

11. 根据权利要求10所述的抗体,其中所述人类重链恒定区是IgG1或IgG4或其片段。

12. 根据权利要求1所述的抗体,其中重链与氨基酸序列SEQ ID NO: 10具有至少80%同一性,并且轻链与氨基酸序列SEQ ID NO: 9具有至少80%同一性。

13. 根据权利要求1所述的抗体,所述抗体包含人类可变框架区和鼠恒定区。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的抗体,其中所述抗体为重组抗体。

15. 一种抗体,所述抗体包含氨基酸序列SEQ ID NO: 8的重链可变区(V_H)和氨基酸序列SEQ ID NO: 7的轻链可变区(V_L),其中所述抗体与人类CD163蛋白特异性结合。

16. 一种抗体,所述抗体包含重链序列,所述重链序列包含氨基酸序列SEQ ID NO: 4的互补决定区(CDR) H1,氨基酸序列SEQ ID NO: 5的CDR H2,和氨基酸序列SEQ ID NO: 6的CDR H3;以及轻链序列,所述轻链序列包含氨基酸序列SEQ ID NO: 1的CDR L1,氨基酸序列SEQ ID NO: 2的CDR L2,和氨基酸序列SEQ ID NO: 3的CDR L3,其中所述抗体与人类CD163蛋白特异性结合。

17. 根据权利要求16所述的抗体,所述抗体还包含人类重链恒定区或人类轻链恒定区。

18. 根据权利要求17所述的抗体,其中所述人类重链恒定区是IgG1或IgG4或其片段。

19. 根据权利要求16所述的抗体,其中重链与氨基酸序列SEQ ID NO: 10具有至少80%同一性,并且轻链与氨基酸序列SEQ ID NO: 9具有至少80%同一性。

20. 根据权利要求16所述的抗体,所述抗体包含人类可变框架区和鼠恒定区。

21. 根据权利要求15-20中任一项所述的抗体,其中所述抗体是重组抗体。

22. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1-21中任一项所述的抗体和药学上可接受的赋形剂。

23. 根据权利要求1-21中任一项所述的抗体用于制备用于治疗人类受试者的癌症的药物的用途,其中所述癌症通过人类受试者的肿瘤相关巨噬细胞上存在CD163来表征。

24. 根据权利要求23所述的用途,其中所述癌症是肺癌。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述肺癌是肺上皮癌或肺腺癌。

26. 根据权利要求1-21中任一项所述的抗体用于制备用于治疗人类受试者的肺癌的药物的用途。

27. 根据权利要求26所述的用途,其中所述肺癌是肺上皮癌或肺腺癌。

28. 根据权利要求26-27中任一项所述的用途,其中当所述药物被使用时,另外的抗癌疗法被施用至所述人类受试者。

29. 根据权利要求28所述的用途,其中所述另外的抗癌疗法是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法及其组合。

30. 根据权利要求29所述的用途,其中所述另外的抗癌疗法是免疫疗法。

31. 根据权利要求30所述的用途,其中所述免疫疗法是包含检查点抑制剂的组合物。

免疫调节性抗体及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年7月19日提交的美国临时申请第62/876,580号、2019年7月19日提交的美国临时申请第62/876,579号和2019年7月24日提交的美国临时申请第62/878,265号的优先权和权益,其中每一项的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 公开内容的概述

[0004] 本文提供了可用于治疗癌症和其他紊乱的抗体,包括抗原结合片段和其他抗原结合多肽。在一些实施方案中,抗体与M2和M2样免疫抑制性巨噬细胞特异性结合但不与M1和M1样抗肿瘤巨噬细胞特异性结合。公开的抗体与M2和M2样肿瘤相关巨噬细胞结合并调节肿瘤相关M2和M2样巨噬细胞的物理和功能特征,以减轻肿瘤微环境的免疫抑制并增加细胞毒性T细胞活化和增殖,其促进肿瘤细胞杀伤。本公开内容的抗体分子与M2和M2样巨噬细胞表面上表达的人类CD163特异性结合。

[0005] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的重链可变区(VH)。

[0006] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的重链可变区(VH)。

[0007] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少95%同一性的重链可变区(VH)。

[0008] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少99%同一性的重链可变区(VH)。

[0009] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少100%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少80%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少95%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少99%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少100%同一性的轻链可变区(VL)。

[0010] 在某些实施方案中,本文公开了与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少80%同一性的轻链可变区(VL)。

[0011] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:具有至少90%同一性的轻链可变区(VL)。

[0012] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:具有至少95%同一性的轻链可变区(VL)。

[0013] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:具有至少99%同一性的轻链可变区(VL)。

[0014] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含与氨基酸序列SEQ ID

N0:具有至少100%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少95%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少99%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少100%同一性的重链可变区(VH)。

[0015] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的重链可变区(V_H)和与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少80%同一性的轻链可变区(V_L)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少85%同一性的轻链可变区(V_L)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的轻链可变区(V_L)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少95%同一性的轻链可变区(V_L)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少99%同一性的轻链可变区(V_L)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少100%同一性的轻链可变区(V_L)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少85%同一性的重链可变区(V_H)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的重链可变区(V_H)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少95%同一性的重链可变区(V_H)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少99%同一性的重链可变区(V_H)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少100%同一性的重链可变区(V_H)。

[0016] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含重链序列,重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少80%同一性的互补决定区(CDR)H1,与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少80%同一性的CDR H2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的CDR H3;以及轻链序列,轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少80%同一性的CDR L1,与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少80%同一性的CDR L2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少80%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含轻链序列,轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少85%同一性的CDR L1,与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少85%同一性的CDR L2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少85%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含轻链序列,轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的CDR L1,与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的CDR L2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少90%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含轻链序列,轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少95%同一性的CDR L1,与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少95%同一性的CDR L2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含轻链序列,轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少99%同一性的CDR L1,与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少99%同一性的CDR L2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少99%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含轻链序列,轻链序列包含与

氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少100%同一性的CDR L1,与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少100%同一性的CDR L2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少100%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含重链序列,重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少85%同一性的CDR H1,与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少85%同一性的CDR H2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少85%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含重链序列,重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少90%同一性的CDR H1,与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少90%同一性的CDR H2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少90%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含重链序列,重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少95%同一性的CDR H1,与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少95%同一性的CDR H2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含重链序列,重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少99%同一性的CDR H1,与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少99%同一性的CDR H2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少99%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含重链序列,重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少100%同一性的CDR H1,与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少100%同一性的CDR H2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少100%同一性的CDR H3。

[0017] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含重链序列,重链序列包含以下中的至少一个:与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少80%同一性的互补决定区(CDR) H1,与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少80%同一性的CDR H2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的CDR H3。

[0018] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含重链序列,重链序列包含以下中的至少一个:与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少90%同一性的互补决定区(CDR) H1,与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少90%同一性的CDR H2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少90%同一性的CDR H3。

[0019] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含重链序列,重链序列包含以下中的至少一个:与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少95%同一性的互补决定区(CDR) H1,与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少95%同一性的CDR H2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的CDR H3。

[0020] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含重链序列,重链序列包含以下中的至少一个:与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少99%同一性的互补决定区(CDR) H1,与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少99%同一性的CDR H2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少99%同一性的CDR H3。

[0021] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含重链序列,重链序列包含以下中的至少一个:与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少100%同一性的互补决定区(CDR) H1,与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少100%同一性的CDR H2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少100%同一性的CDR H3。

[0022] 在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含轻链序列,轻链序列包含以下中的至少一个:与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少80%同一性的互补决定区(CDR) L1,与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少80%同一性的CDR L2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少

80%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,CDR L1与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少90%同一性,CDR L2与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少90%同一性,并且CDR L3与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少90%同一性。在一些实施方案中,CDR L1与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少95%同一性,CDR L2与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少95%同一性,并且CDR L3与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少95%同一性。在一些实施方案中,CDR L1与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少99%同一性,CDR L2与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少99%同一性,并且CDR L3与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少99%同一性。在一些实施方案中,CDR L1与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少100%同一性,CDR L2与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少100%同一性,并且CDR L3与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少100%同一性。在一些实施方案中,轻链可变区(VL)与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少80%同一性。

[0023] 在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少80%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的重链可变区(VH)。

[0024] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含轻链序列,轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少80%同一性的互补决定区(CDR)L1,与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少80%同一性的CDR L2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少80%同一性的CDR L3。

[0025] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含轻链序列,轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的互补决定区(CDR)L1,与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的CDR L2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少90%同一性的CDR L3。

[0026] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含轻链序列,轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少95%同一性的互补决定区(CDR)L1,与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少95%同一性的CDR L2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的CDR L3。

[0027] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含轻链序列,轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少99%同一性的互补决定区(CDR)L1,与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少99%同一性的CDR L2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少99%同一性的CDR L3。

[0028] 在某些实施方案中,本文公开了抗体或重组抗体,其包含轻链序列,轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:1具有至少100%同一性的互补决定区(CDR)L1,与氨基酸序列SEQ ID NO:2具有至少100%同一性的CDR L2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:3具有至少100%同一性的CDR L3。

[0029] 在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含重链序列,重链序列包含以下中的至少一个:与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少80%同一性的互补决定区(CDR)H1,与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少80%同一性的CDR H2,和与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,CDR H1与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少90%同一性,CDR H2与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少90%同一性,并且CDR H3与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少90%同一性。在一些实施方案中,CDR H1与氨基酸序列SEQ ID NO:4

具有至少95%同一性,CDR H2与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少95%同一性,并且CDR H3与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少95%同一性。在一些实施方案中,CDR H1与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少99%同一性,CDR H2与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少99%同一性,并且CDR H3与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少99%同一性。在一些实施方案中,CDR H1与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少100%同一性,CDR H2与氨基酸序列SEQ ID NO:5具有至少100%同一性,并且CDR H3与氨基酸序列SEQ ID NO:6具有至少100%同一性。在一些实施方案中,重链可变区 (VH) 与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少80%同一性。

[0030] 在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的重链可变区 (VH)。在一些实施方案中,轻链可变区 (VL) 与氨基酸序列SEQ ID NO:7具有至少80%同一性。

[0031] 在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含人类重链恒定区或人类轻链恒定区。在一些实施方案中,人类重链恒定区是IgG1或IgG4或其片段。在一些实施方案中,重链与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少80%同一性。在一些实施方案中,轻链与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少80%同一性。在一些实施方案中,其中重链与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少80%同一性。在一些实施方案中,重链与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少80%同一性。在一些实施方案中,重链与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少80%同一性。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含人类可变框架区和鼠恒定区。在一些实施方案中,抗体或重组抗体还包含鼠重链恒定区或鼠轻链恒定区。在一些实施方案中,抗体或鼠重链恒定区是IgG2A。在一些实施方案中,重链与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%同一性。在一些实施方案中,重链与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%同一性。在一些实施方案中,轻链与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少80%同一性。在一些实施方案中,抗体或重组抗体是包含以下的抗体片段:单条重链、单条轻链、Fab、Fab'、F(ab')、F(ab')₂、Fd、scFv、可变重结构域、可变轻结构域、可变NAR结构域、双特异性scFv、双特异性Fab2、三特异性Fab3、单链结合多肽、dAb片段或双抗体(diabody)。

[0032] 在一些实施方案中,抗体或重组抗体与免疫抑制性人类骨髓细胞上表达的CD163蛋白特异性结合,其中抗体或重组抗体与骨髓细胞的结合促进免疫细胞功能,如通过以下参数中的一种或两种测量:(i)CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;和(ii)CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖。在一些实施方案中,其中CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化被测量为IFN- γ 、TNF- α 或穿孔蛋白或其任何组合的增加的水平。在一些实施方案中,免疫抑制性人类骨髓细胞是巨噬细胞或骨髓来源的抑制性细胞。在一些实施方案中,免疫细胞功能是肿瘤微环境中的。在一些实施方案中,肿瘤微环境是体内的。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与人类巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合,其中抗体与巨噬细胞的结合增加肿瘤微环境中的免疫刺激活性。在一些实施方案中,肿瘤微环境是体内的。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与巨噬细胞的结合减少巨噬细胞的免疫抑制活性。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与巨噬细胞的结合减少巨噬细胞的肿瘤促进活性。在一些实施方案中,巨噬细胞是肿瘤相关巨噬细胞。在一些实施方案中,抗体或重组抗体改变巨噬细胞上至少一种标志物的表达。在一些实施方案中,CD163蛋白是CD163糖型(glycoform of CD163)。在一些实施方案中,CD163蛋白是150kDa CD163糖型。在一些实施方案中,抗体不与由人类巨噬细胞表达的130kDa CD163糖型特异性结合。

[0033] 在一些实施方案中,抗体或重组抗体具有能够与Fc受体结合的恒定结构域。在一些实施方案中,Fc受体在巨噬细胞上表达。在一些实施方案中,抗体或重组抗体具有包含以下的抗体片段:单条重链、单条轻链、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、scFv、可变重结构域、可变轻结构域、可变NAR结构域、双特异性scFv、双特异性Fab2、三特异性Fab3、单链结合多肽、dAb片段或双抗体。在一些实施方案中,人类巨噬细胞上的至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15。在一些实施方案中,人类巨噬细胞是M2巨噬细胞或M2样巨噬细胞。在一些实施方案中,人类巨噬细胞是M2a、M2b、M2c或M2d巨噬细胞。在一些实施方案中,CD163蛋白是包含由巨噬细胞表达的至少一种其他蛋白的细胞表面复合物的组分。在一些实施方案中,至少一种其他蛋白是半乳凝素-1蛋白、LILRB2蛋白、酪蛋白激酶II蛋白或其任何组合。在一些实施方案中,在与CD163蛋白结合后,抗体或重组抗体被人类巨噬细胞内化。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合对巨噬细胞没有细胞毒性。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进CD4⁺T细胞活化、CD4⁺T细胞增殖、或CD4⁺T细胞活化和增殖两者。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进CD4⁺T细胞对CD69、ICOS、OX40、PD1、LAG3、CTLA4或其任何组合的表达。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进CD8⁺T细胞活化、CD8⁺T细胞增殖、或CD8⁺T细胞活化和增殖两者。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进CD8⁺T细胞对ICOS、OX40、PD1、LAG3、CTLA4或其任何组合的表达。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合减少肿瘤微环境中的免疫抑制。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进细胞毒性淋巴细胞介导的癌细胞杀伤。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进NK细胞介导的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进T细胞对IL-2的表达。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合增加CD4⁺T细胞、CD196⁺T细胞、CXCR3⁺T细胞、CCR4⁺T细胞或其任何组合。

[0034] 在一些实施方案中,与CD163的结合减少由巨噬细胞引起的肿瘤微环境中的免疫抑制。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与人类巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合,其中结合导致以下作用中的至少一种:(a)巨噬细胞对至少一种标志物的表达减少,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;(b)抗体被巨噬细胞内化;(c)CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;(d)CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;(e)促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中,结合导致:(a)至(e)中的两种或更多种;(a)至(e)中的三种或更多种;(a)至(e)中的四种或更多种;或(a)至(e)中的所有。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与肿瘤微环境中的CD163⁺免疫抑制性骨髓细胞特异性结合,其中结合减少对肿瘤微环境中的细胞毒性T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的抑制。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与人类肿瘤相关巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合并减少巨噬细胞对CD16、CD64、TLR2、Siglec-15或其组合的表达,用于在治疗癌症的方法中使用。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与巨噬细胞的结合调节肿瘤微环境中的细胞的免疫功能。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与巨噬细胞的结合促进抗肿瘤免疫功能。

[0035] 在一些实施方案中,抗体或重组抗体与包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CD163表位特异性结合。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CD163表位特异性结合。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CD163表位特异性结合。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与包含氨基酸序列

SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20中的每一个的CD163表位特异性结合。在一些实施方案中,抗体或重组抗体以1nM至100nM的 K_D 与CD163特异性结合。在一些实施方案中,抗体或重组抗体以1nM至50nM的 K_D 与CD163特异性结合。在一些实施方案中,抗体或重组抗体以1nM至10nM的 K_D 与CD163特异性结合。在一些实施方案中,CD163是人类CD163。在一些实施方案中,抗体或重组抗体以1nM至100nM的 K_D 与M2c巨噬细胞特异性结合。在一些实施方案中,抗体或重组抗体以1nM至50nM的 K_D 与M2c巨噬细胞特异性结合。在一些实施方案中,抗体或重组抗体以1nM至10nM的 K_D 与M2c巨噬细胞特异性结合。在一些实施方案中,M2c巨噬细胞是人类M2c巨噬细胞。

[0036] 在某些实施方案中,本文公开了组合物,其包含抗体或重组抗体和赋形剂。

[0037] 在某些实施方案中,本文公开了药物组合物,其包含前述实施方案中任一项的抗体或重组抗体和药学上可接受的载体。

[0038] 在某些实施方案中,本文公开了前述实施方案中任一项的抗体或重组抗体用于制备用于治疗人类受试者的癌症的药物的用途。

[0039] 在某些实施方案中,本文公开了前述实施方案中任一项的抗体或重组抗体用于制备减少患有癌症的人类受试者中肿瘤相关巨噬细胞的免疫抑制的药物的用途。

[0040] 在某些实施方案中,本文公开了前述实施方案中任一项的抗体或重组抗体用于制备促进患有癌症的人类受试者中T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的药物的用途。

[0041] 在某些实施方案中,本文公开了促进免疫细胞功能的方法,该方法包括:向有相应需要的个体施用前述实施方案中任一项的抗体或重组抗体,并且促进免疫细胞功能,如通过以下参数中的一种或两种测量:(i) $CD4^+$ T细胞、 $CD8^+$ T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;和(ii) $CD4^+$ T细胞、 $CD8^+$ T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖。在一些实施方案中, $CD4^+$ T细胞、 $CD8^+$ T细胞、NK细胞或其任何组合的活化被测量为IFN- γ 、TNF- α 或穿孔蛋白或其任何组合的增加的水平。在一些实施方案中,免疫抑制性人类骨髓细胞是巨噬细胞。在一些实施方案中,免疫抑制性人类骨髓细胞是骨髓来源的抑制性细胞。在一些实施方案中,抗体或重组抗体是前述实施方案中任一项的抗体或重组抗体。

[0042] 在某些实施方案中,本文公开了治疗有相应需要的个体的癌症的方法,该方法包括向个体施用治疗有效量的前述实施方案中任一项的抗体或重组抗体,从而治疗个体的癌症。

[0043] 在某些实施方案中,本文公开了治疗有相应需要的个体的癌症的方法,该方法包括向个体施用治疗有效量的前述实施方案中任一项的抗体或重组抗体,由此减少个体中的肿瘤相关巨噬细胞的免疫抑制。

[0044] 在某些实施方案中,本文公开了治疗有相应需要的个体的癌症的方法,该方法包括向个体施用治疗有效量的前述实施方案中任一项的抗体或重组抗体,由此增加个体中的T细胞的介导的肿瘤细胞杀伤。

[0045] 在某些实施方案中,本文公开了减少有相应需要的个体中的肿瘤相关巨噬细胞的肿瘤促进活性的方法,该方法包括向个体施用对调节肿瘤微环境中的 $CD4^+$ T细胞活化、 $CD4^+$ T细胞增殖、 $CD8^+$ T细胞活化、 $CD8^+$ T细胞增殖或其任何组合有效的量的前述实施方案中任一项的药物组合物。

[0046] 在某些实施方案中,本文公开了促进有相应需要的个体中的淋巴细胞介导的肿瘤

细胞杀伤的方法,该方法包括向个体施用有效量的前述实施方案中任一项的抗体或重组抗体或前述实施方案中任一项的药物组合物。

[0047] 在一些实施方案中,该方法还包括促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中,癌症是肺癌或肉瘤。在一些实施方案中,肺癌是肺上皮癌(lung carcinoma)或肺腺癌。在一些实施方案中,该方法还包括向个体施用另外的抗癌治疗剂或抗癌疗法。在一些实施方案中,另外的抗癌疗法是手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法和细胞因子疗法及其组合。在一些实施方案中,另外的抗癌疗法是免疫疗法。在一些实施方案中,免疫疗法是包含检查点抑制剂的组合物。

[0048] 在某些实施方案中,本文公开了调节肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞活性的方法,该方法包括使肿瘤相关巨噬细胞与抗体或重组抗体接触,该抗体或重组抗体与表达CD163的人类巨噬细胞结合,并包含以下作用中的至少一种:(a)抗体的结合减少巨噬细胞上至少一种标志物的表达,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;(b)抗体与CD163蛋白结合后,抗体被人类巨噬细胞内化;(c)抗体的结合对巨噬细胞没有细胞毒性;(d)抗体或重组抗体的结合通过CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合产生IFN- γ 、TNF- α 、穿孔蛋白或其任何组;(e)抗体或重组抗体的结合促进CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;(f)抗体或重组抗体的结合促进CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;和(g)抗体或重组抗体的结合促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中,结合导致:(a)至(g)中的两种或更多种;(a)至(g)中的三种或更多种;(a)至(g)中的四种或更多种;(a)至(g)中的五种或更多种;(a)至(g)中的六种或更多种;或(a)至(g)中的所有。

[0049] 在一些实施方案中,该方法发生在肿瘤微环境中。在一些实施方案中,该方法发生在体内。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与巨噬细胞的结合调节肿瘤微环境中的细胞的免疫功能。在一些实施方案中,抗体或重组抗体与巨噬细胞的结合促进抗肿瘤免疫功能。在一些实施方案中,抗体或重组抗体包含恒定结构域并且恒定结构域与Fc受体结合。在一些实施方案中,Fc受体在巨噬细胞上表达。在一些实施方案中,该方法还包括使抗体或重组抗体在与CD163蛋白结合后被人类巨噬细胞内化。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合对人类巨噬细胞没有细胞毒性。在一些实施方案中,该方法还包括促进CD4⁺T细胞对CD69、ICOS、OX40、PD1、LAG3、CTLA4或其任何组合的表达。在一些实施方案中,该方法还包括促进CD8⁺T细胞对ICOS、OX40、PD1、LAG3、CTLA4或其任何组合的表达。在一些实施方案中,该方法包减少肿瘤微环境中的免疫抑制。在一些实施方案中,该方法包括促进细胞毒性淋巴细胞介导的癌细胞杀伤。在一些实施方案中,该方法包括促进NK细胞介导的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中,该方法包括促进T细胞对IL-2的表达。在一些实施方案中,该方法包括增加CD4⁺T细胞、CD196⁺T细胞、CXCR3⁺T细胞、CCR4⁺T细胞或其任何组合。

[0050] 在某些实施方案中,本文公开了与免疫抑制性人类骨髓细胞上表达的CD163蛋白特异性结合的抗体,其中抗体与骨髓细胞的结合促进免疫细胞功能,如通过以下参数中的一种或两种测量:(i)CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;和(ii)CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖。在一些实施方案中,免疫抑制性人类骨髓细胞是巨噬细胞或骨髓来源的抑制性细胞。在一些实施方案中,CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化被测量为IFN- γ 、TNF- α 或穿孔蛋白或其任何组合的产生的增加。

[0051] 在某些实施方案中,本文公开了与人类巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合的抗体,其中抗体与巨噬细胞的结合促进免疫细胞功能,如通过以下参数中的一种或两种测量:(i) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;和(ii) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖。在一些实施方案中,免疫细胞功能是肿瘤微环境中的。在一些实施方案中,肿瘤微环境是体内的。在一些实施方案中,CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化被测量为IFN- γ 、TNF- α 或穿孔蛋白或其任何组合的增加的产生。

[0052] 在某些实施方案中,本文公开了与人类巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合的抗体,其中抗体与巨噬细胞的结合增加肿瘤微环境中的免疫刺激活性。在一些实施方案中,肿瘤微环境是体内的。在一些实施方案中,抗体与巨噬细胞的结合减少巨噬细胞的免疫抑制活性。在一些实施方案中,抗体与巨噬细胞的结合减少巨噬细胞的肿瘤促进活性。在一些实施方案中,巨噬细胞是肿瘤相关巨噬细胞。在一些实施方案中,抗体改变巨噬细胞上至少一种标志物的表达。在一些实施方案中,CD163蛋白是CD163糖型。在一些实施方案中,CD163蛋白是150kDa CD163糖型。在一些实施方案中,抗体不与由人类巨噬细胞表达的130kDa CD163糖型特异性结合。在一些实施方案中,抗体具有能够与Fc受体结合的恒定结构域。在一些实施方案中,Fc受体在巨噬细胞上表达。在一些实施方案中,抗体片段包含单条重链、单条轻链、Fab、Fab'、F(ab')、F(ab')₂、Fd、scFv、可变重结构域、可变轻结构域、可变NAR结构域、双特异性scFv、双特异性Fab₂、三特异性Fab₃、单链结合多肽、dAb片段或双抗体。在一些实施方案中,人类巨噬细胞上的至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15。在一些实施方案中,人类巨噬细胞是M2巨噬细胞或M2样巨噬细胞。在一些实施方案中,人类巨噬细胞是M2a、M2b、M2c或M2d巨噬细胞。在一些实施方案中,CD163蛋白是包含由巨噬细胞表达的至少一种其他蛋白的细胞表面复合物的组分。在一些实施方案中,至少一种其他蛋白是半乳凝素-1蛋白、LILRB2蛋白、酪蛋白激酶II蛋白或其任何组合。在一些实施方案中,在与CD163蛋白结合后,抗体被人类巨噬细胞内化。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合对巨噬细胞没有细胞毒性。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进CD4⁺T细胞活化、CD4⁺T细胞增殖、或CD4⁺T细胞活化和增殖两者。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进CD4⁺T细胞对CD69、ICOS、OX40、PD1、LAG3、CTLA4或其任何组合的表达。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进CD8⁺T细胞活化、CD8⁺T细胞增殖、或CD8⁺T细胞活化和增殖两者。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进CD8⁺T细胞对ICOS、OX40、PD1、LAG3、CTLA4或其任何组合的表达。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合减少肿瘤微环境中的免疫抑制。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进细胞毒性淋巴细胞介导的癌细胞杀伤。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进NK细胞介导的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合促进T细胞对IL-2的表达。在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合增加CD4⁺T细胞、CD196⁺T细胞、CXCR3⁺T细胞、CCR4⁺T细胞或其任何组合。在一些实施方案中,与CD163的结合减少由巨噬细胞引起的肿瘤微环境中的免疫抑制。

[0053] 在某些实施方案中,本文公开了与人类巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合的抗体,其中结合导致以下作用中的至少一种:(a) 巨噬细胞对至少一种标志物的表达减少,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;(b) 抗体被巨噬细胞内化;(c) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;(d) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任

何组合的增殖；和(e)促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中，结合导致：(a)至(e)中的两种或更多种；(a)至(e)中的三种或更多种；(a)至(e)中的四种或更多种；或(a)至(e)中的所有。在一些实施方案中，CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化被测量为IFN- γ 、TNF- α 或穿孔蛋白或其任何组合的增加的产生。

[0054] 在某些实施方案中，本文公开了与肿瘤微环境中的CD163⁺免疫抑制性骨髓细胞特异性结合的抗体，其中结合减少对肿瘤微环境中的细胞毒性T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的抑制。

[0055] 在某些实施方案中，本文公开了抗体，该抗体与人类肿瘤相关巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合并减少巨噬细胞对CD16、CD64、TLR2、Siglec-15或其组合的表达，用于在治疗癌症的方法中使用。在一些实施方案中，抗体与巨噬细胞的结合调节肿瘤微环境中的细胞的免疫功能。在一些实施方案中，抗体与巨噬细胞的结合促进抗肿瘤免疫功能。

[0056] 在一些实施方案中，组合物包含根据如本文公开的任何实施方案的抗体和赋形剂。

[0057] 在一些实施方案中，药物组合物包含根据如本文公开的任何实施方案的抗体和药学上可接受的载体。

[0058] 在一些实施方案中，如本文公开的抗体的用途是用于制备用于治疗人类受试者的癌症的药物。

[0059] 在一些实施方案中，如本文公开的抗体的用途是用于制备减少患有癌症的人类受试者中的肿瘤相关巨噬细胞的免疫抑制的药物。

[0060] 在一些实施方案中，如本文公开的抗体的用途是用于制备促进患有癌症的人类受试者中的T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的药物。

[0061] 在某些实施方案中，本文公开了促进免疫细胞功能的方法，该方法包括：使抗体与免疫抑制性人类骨髓细胞上表达的CD163蛋白特异性结合；并促进免疫细胞功能，如通过以下参数中的一种或两种测量：(i) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化；和(ii) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖。在一些实施方案中，免疫抑制性人类骨髓细胞是巨噬细胞。在一些实施方案中，免疫抑制性人类骨髓细胞是骨髓来源的抑制性细胞。在一些实施方案中，抗体是如本文描述的任何实施方案。

[0062] 在某些实施方案中，本文公开了治疗有相应需要的个体的癌症的方法，该方法包括向个体施用治疗有效量的本文公开的实施方案中任一项的抗体，从而治疗个体的癌症。

[0063] 在某些实施方案中，本文公开了治疗有相应需要的个体的癌症的方法，该方法包括向个体施用治疗有效量的本文公开的实施方案中任一项的抗体，由此减少个体中的肿瘤相关巨噬细胞的免疫抑制。

[0064] 在某些实施方案中，本文公开了治疗有相应需要的个体的癌症的方法，该方法包括向个体施用治疗有效量的本文公开的实施方案中任一项的抗体，由此增加个体中的T细胞介导的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中，癌症是肺癌或肉瘤。在一些实施方案中，肺癌是肺上皮癌或肺腺癌。

[0065] 在某些实施方案中，本文公开了减少有相应需要的个体中的肿瘤相关巨噬细胞的肿瘤促进活性的方法，该方法包括向个体施用对调节肿瘤微环境中的CD4⁺T细胞活化、CD4⁺T细胞增殖、CD8⁺T细胞活化、CD8⁺T细胞增殖或其任何组合有效的量的本文公开的药物组合

物。在一些实施方案中,该方法还包括促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。

[0066] 在某些实施方案中,本文公开了促进有相应需要的个体中的淋巴细胞介导的肿瘤细胞杀伤的方法,该方法包括向个体施用有效量的本文公开的实施方案中任一项的药物组合物。

[0067] 在某些实施方案中,本文公开了调节肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞活性的方法,该方法包括使肿瘤相关巨噬细胞与抗体接触,该抗体与表达CD163的人类巨噬细胞结合,并包含以下作用中的至少一种:(a) 抗体的结合减少巨噬细胞上至少一种标志物的表达,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;(b) 抗体与CD163蛋白结合后,抗体被人类巨噬细胞内化;(c) 抗体的结合对巨噬细胞没有细胞毒性;(d) 抗体的结合促进CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;(e) 抗体的结合促进CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;和(f) 抗体的结合促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中,结合导致:(a) 至(f) 中的两种或更多种;(a) 至(f) 中的三种或更多种;(a) 至(f) 中的四种或更多种;(a) 至(f) 中的五种或更多种;或(a) 至(f) 中的所有。在一些实施方案中,CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化被测量为IFN- γ 、TNF- α 、穿孔蛋白或其任何组合的产生的增加。在一些实施方案中,该方法发生在肿瘤微环境中。在一些实施方案中,该方法发生在体内。在一些实施方案中,抗体与巨噬细胞的结合调节肿瘤微环境中的细胞的免疫功能。在一些实施方案中,抗体与巨噬细胞的结合促进抗肿瘤免疫功能。在一些实施方案中,抗体包含恒定结构域并且恒定结构域与Fc受体结合。在一些实施方案中,Fc受体在巨噬细胞上表达。在一些实施方案中,该方法还包括在使抗体与CD163蛋白结合后被人类巨噬细胞内化。

[0068] 在一些实施方案中,与CD163蛋白的结合对人类巨噬细胞没有细胞毒性。

[0069] 在一些实施方案中,该方法还包括促进CD4⁺T细胞对CD69、ICOS、OX40、PD1、LAG3、CTLA4或其任何组合的表达。在一些实施方案中,该方法还包括促进CD8⁺T细胞对ICOS、OX40、PD1、LAG3、CTLA4或其任何组合的表达。在一些实施方案中,该方法包减少肿瘤微环境中的免疫抑制。在一些实施方案中,该方法包括促进细胞毒性淋巴细胞介导的癌细胞杀伤。

[0070] 在一些实施方案中,该方法包括促进NK细胞介导的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中,该方法包括促进T细胞对IL-2的表达。在一些实施方案中,该方法包括增加CD4⁺T细胞、CD196⁺T细胞、CXCR3⁺T细胞、CCR4⁺T细胞或其任何组合。

[0071] 附图简述

[0072] 本公开内容的新颖的特征特别地在所附权利要求书中阐述。通过参考以下详细描述和附图将获得对本公开内容的特征和优点的更好理解,该详细描述阐述了其中利用了本公开内容的原理的说明性实施方案,在附图中:

[0073] 图1示出AB101抗体与人类MDSC群体的结合。

[0074] 图2示出AB101与CD163^高细胞的结合。

[0075] 图3示出与同种型(isotype)对照相比,AB101与人类M2c、M1和M0的结合。

[0076] 图4示出AB101与人类外周血T细胞、B细胞、NKT细胞、中性粒细胞、单核细胞和树突状细胞的结合,其中同种型对照以灰色示出,并且AB101结合以黑色示出。

[0077] 图5示出AB101不与人类原代细胞组结合,人类原代细胞组包括小气道上皮细胞(SAEC)、肾近端小管上皮细胞(RPTEC)、肺微血管内皮细胞(HMVEC)、脐静脉内皮细胞

(HUVEC)、主动脉平滑肌细胞(AOSMC)和角质形成细胞。

[0078] 图6A示出基于免疫沉淀后样品的质谱法分析,AB102的最高的20种靶。

[0079] 图6B示出基于免疫沉淀后样品的质谱法分析,AB102的最高的细胞表面靶。

[0080] 图6C示出基于免疫沉淀后AB102和ISO(同种型阴性对照)样品的质谱法分析,与ISO相比,AB102的最高的细胞表面靶。

[0081] 图7示出AB102免疫共沉淀的CD163的明显更高分子量的糖型。

[0082] 图8示出AB101、AB102和对照CD163抗体与huCD163的结合,而同种型对照未显示可察觉的结合。

[0083] 图9示出与确实与鼠CD163结合的可商购的抗muCD163抗体相比,AB101和对照抗huCD163抗体均未与重组鼠CD163结合。

[0084] 图10示出与用山羊对照多克隆抗体处理未阻断AB101的结合相比,用多克隆抗CD163抗体预处理M2c巨噬细胞阻断AB101抗体的结合。

[0085] 图11示出与用山羊对照多克隆抗体处理未阻断对照单克隆抗huCD163抗体的结合相比,用多克隆抗CD163抗体预处理M2c巨噬细胞阻断对照单克隆抗-huCD163抗体的结合。

[0086] 图12示出与加扰siRNA(siScramb)处理或未用siRNA处理的M2c巨噬细胞相比,用针对CD163的siRNA处理极化的M2c巨噬细胞大幅减少AB102抗体的结合,并且代表三个重复。

[0087] 图13示出CD163的siRNA敲低减少AB102抗体的结合,用针对FCGR2A+FCGR3A(3个供体中的1个)、FCGR2C或FCGR3A的siRNA敲低后AB102抗体的结合略有降低,但用siCD206、siCD163L1、siPPIA、siLGALS1、siLGALS3、siLILRB2和siUPAR敲低后没有AB102结合减少的证据。

[0088] 图14示出用LPS处理培养的M2巨噬细胞导致AB101抗体和对照抗CD163抗体两者的结合丧失。

[0089] 图15示出在用AB101抗体处理骨髓细胞后增加的IL-2产生。

[0090] 图16示出极化期间的AB101抗体处理促进CD4⁺T细胞增殖。

[0091] 图17示出极化期间的AB101抗体处理促进CD8⁺T细胞增殖。

[0092] 图18示出在极化期间(在图上标记“前”)、极化后(在图上标记“后”)或在组合的极化期间和极化后(在图上标记“前和后”),当与同种型抗体处理相比时,用AB101抗体处理导致增强的IL-2产生。

[0093] 图19示出用AB101抗体处理M2巨噬细胞减少CD16、CD64、钙网蛋白和Siglec-15的表达。

[0094] 图20示出与同种型对照相比,用AB101处理M2c细胞增加Th1/Th2比率。

[0095] 图21示出与同种型对照相比,用AB101处理M2c细胞增加CD4⁺T细胞上的CD69的表达。

[0096] 图22示出与同种型对照相比,用AB101处理M2c细胞增加CD4⁺T细胞上的ICOS的表达。

[0097] 图23示出与同种型对照相比,用AB101处理M2c细胞增加CD4⁺T细胞上的OX40的表达。

[0098] 图24示出与同种型对照相比,在存在BiTE的情况下增加的CTL导致增加的Raji肿

瘤细胞杀伤。

[0099] 图25示出AB102抗体的内化与商业抗CD163抗体(R&D Systems MAB1607-100)大致同样良好,并且AB101抗体的内化比商业CD163抗体的内化多约2倍。

[0100] 图26示出30天内针对A549肿瘤绘制的肿瘤体积。箭头指示注射抗体处理。每个点代表来自7只小鼠的平均测量值。误差线表示平均值的标准误差(SEM)。使用Mann-Whitney检验计算统计学显著性。

[0101] 图27示出30天内针对H1975肿瘤绘制的肿瘤体积。箭头指示注射抗体处理。每个点代表来自7只小鼠的平均测量值。误差线表示平均值的标准误差(SEM)。使用Mann-Whitney检验计算统计学显著性。

[0102] 图28示出用于评估AB101处理对T细胞增殖和IL-2产生的作用的M2c/T细胞共培养测定的实验设计。

[0103] 图29示出在M2c/T细胞共培养测定中,在M2c巨噬细胞极化期间用AB101处理使T细胞增殖恢复。

[0104] 图30示出在M2c/T细胞共培养测定中,在M2c巨噬细胞极化期间用AB101处理使OKT3活化的T细胞的IL-2分泌增强。

[0105] 图31示出在M2c/T细胞共培养测定中,在前方案、前/后方案和后方案用AB101处理使CD8⁺T细胞增殖增加。

[0106] 图32示出在M2c/T细胞共培养测定中,在前方案、前/后方案和后方案用AB101处理使个体受试者的CD8⁺T细胞增殖增加。

[0107] 图33示出AB101处理使来自多于一名受试者的M2c/T细胞共培养物中的CD8⁺T细胞增殖增强。

[0108] 图34示出在M2c/T细胞共培养测定中,AB101处理使来自多于一个受试者的CD4⁺T细胞增殖增强。

[0109] 图35示出在M2c/T细胞共培养期间,AB101处理使来自多于一个人类的T细胞的IL-2产生增强。

[0110] 图36示出在M2c/T细胞共培养测定中,AB101在增强T细胞增殖方面比AB104和AB102同种型更有效。

[0111] 图37示出在前/后方案和后方案,AB101而不是AB104挽救CD8⁺T细胞增殖免于M2c介导的免疫抑制。

[0112] 图38示出在M2c/T细胞共培养测定中,AB101使CD8⁺T细胞的细胞因子应答恢复。

[0113] 图39示出AB101挽救CD4⁺T细胞IFN- γ 、TNF- α 和穿孔蛋白应答免于M2c巨噬细胞介导的免疫抑制。

[0114] 图40示出AB101处理增强CD8⁺T细胞的细胞毒活性。

[0115] 图41示出AB101处理增强BiTE®辅助的CD8⁺T细胞的细胞毒活性。

[0116] 图42示出AB101处理增强非HLA限制性CD8⁺T细胞的细胞毒活性。

[0117] 图43示出AB101处理减轻M2c细胞介导的免疫抑制并诱导活化的CD4⁺T细胞的独特表达模式。

[0118] 图44示出AB101处理减轻M2c巨噬细胞免疫抑制并增强CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的活化。

[0119] 图45示出活化的CD4⁺T细胞的CXCR3表达。

[0120] 图46示出在M2c巨噬细胞极化期间,AB101处理减少M2c巨噬细胞对CD16、CD64、Siglex-15和TLR2的表达。

[0121] 图47示出基于胃蛋白酶消化的与huCD163结合的AB101的变化概况。

[0122] 图48示出基于猪笼草蛋白酶II (Nepenthesin II) 消化的与huCD163结合的AB101的变化概况。

[0123] 图49示出基于HDX-MS研究的AB101与人类CD163 ECD结合的示意图。

[0124] 图50示出AB101结合由SRCR结构域1-5组成的截短的CD163 ECD。

[0125] 图51示出人类CD163与食蟹猴CD163的比对。信号序列。黑色条下的序列表示9个SRCR结构域,并且序列上方的灰色线表示共有序列。基于通过在HDX-MS中观察到的保护确定的AB101结合表位示出受保护的区域和暴露的区域。序列下方的实心条表示猪笼草蛋白酶II保护的区域。序列下方的轮廓框表示胃蛋白酶保护的区域。序列下方的斜线框表示胃蛋白酶暴露的区域。序列下方的垂直条纹框表示猪笼草蛋白酶II暴露的区域。人类CD163的位置323处的赖氨酸(K)和食蟹猴CD163的谷氨酸(E)用方框表示。

[0126] 图52示出AB101结合人类和食蟹猴E323K突变体,但不结合野生型食蟹猴CD163 ECD。

[0127] 图53示出AB101与人类CD163结合的SPR检测。用(A) EDTA或(B) 含钙的运行缓冲液将AB101系列稀释成不同浓度。然后将GHI/61以30 μ l/min的流量、6.25/12.5/25/50/100/200 μ g/ml的浓度、300s的接触时间和600s的解离时间注入到流动池2中。

[0128] 图54示出GHI/61与人类CD163结合的SPR检测。用(A) EDTA或(B) 含钙的运行缓冲液将抗CD163克隆GHI/61系列稀释成不同浓度。然后将GHI/61以30 μ l/min的流量、3.125/6.25/12.5/25/50/100 μ g/ml的浓度、300s的接触时间和600s的解离时间注入到流动池2中。

[0129] 图55示出CD163与AB101结合的SPR检测。用含钙的运行缓冲液将人类CD163蛋白系列稀释成不同浓度。然后将CD163蛋白以30 μ l/min的流量、1.25/2.5/5.0/10.0/20.0/40.0 μ g/ml的浓度、300s的接触时间和600s的解离时间注射到流动池2中。

[0130] 图56示出AlphaLisa测定中AB101与可溶性CD163的结合。将AB101(圆)或同种型对照(三角)以指示浓度与750nM CD163-His一起孵育1h。结合通过AlphaLisa用生物素化的抗hIgG1 mAb、链霉亲和素受体和镍供体珠进行定量。符号代表五个独立测量的平均值 $\pm$ 标准误差。用1位点和2位点饱和结合模型进行曲线拟合(GraphPad Prism)。(R²=0.92)。(A)线性和(B)对数x轴比例尺。

[0131] 图57示出AB101与M2c巨噬细胞的结合。M2c巨噬细胞用含有0.5mg/ml人类IgG1的严格FACS封闭缓冲液封闭,并且然后用指示浓度的AB101(圆)或同种型对照(三角)染色30min。AlexaFluor 647标记的AB101和同种型对照与M2c巨噬细胞的结合通过荧光强度进行定量并报告为gMFI。符号代表四个研究受试者的平均值 $\pm$ 标准误差。用2位点饱和结合模型进行曲线拟合(GraphPad Prism)。(R²=0.99)。(A)线性和(B)对数x轴比例尺。

[0132] 公开内容的详述

[0133] 本文公开了与CD163⁺细胞特异性结合的抗体。在一些实施方案中,CD163⁺细胞是免疫抑制性骨髓细胞。在一些实施方案中,CD163⁺细胞是表达人类CD163的骨髓细胞。在一些实施方案中,CD163⁺细胞是肿瘤细胞。在一些实施方案中,CD163⁺免疫抑制性骨髓细胞是人

类巨噬细胞。在一些实施方案中,人类CD163⁺免疫抑制性巨噬细胞是M2或M2样巨噬细胞。在一些实施方案中,免疫抑制性骨髓细胞是骨髓来源的抑制性细胞(MDSC)。在一些实施方案中,人类巨噬细胞表达高水平的CD163(CD163^高)。相比之下,其他人类造血细胞或原代非免疫人类细胞不表达CD163。例如,M1和M1样巨噬细胞不表达CD163。

[0134] 暴露于某些炎性细胞因子或微生物相关分子模式的单核细胞和巨噬细胞分化为促炎性(M1或M1样)或抗炎性M2或M2样巨噬细胞。M1和M2是用于将体外活化的巨噬细胞分别定义为促炎性(当用IFN- γ 和脂多糖经典活化时)或抗炎性(当用IL-4或IL-10替代活化时)的分类,而在体内或离体具有M1或M2表型的巨噬细胞被定义为M1样或M2样巨噬细胞。在一些实施方案中,M2巨噬细胞通过它们暴露于某些细胞因子而产生。在一些实施方案中,M2巨噬细胞通过IL-4、IL-10、IL-13或其组合分化。

[0135] M2巨噬细胞的亚型包括M2a、M2b、M2c和M2d亚型。M2a巨噬细胞由IL-4和IL-13诱导,引起上调的CD163、精氨酸酶-1、甘露糖受体MRC1(CD206)的表达、MHC II系统的抗原呈递以及IL-10和TGF- β 的产生,导致组织再生并抑制促炎性分子以防止炎症反应。M2b巨噬细胞产生IL-1、IL-6、IL-10、TNF- α 作为对免疫复合物的应答。M2c巨噬细胞由IL-10、转化生长因子 β (TGF- β)和糖皮质激素暴露诱导,并产生IL-10和TGF- β ,导致对炎症反应的抑制。M2d亚型被活化作为对IL-6和腺苷的应答。

[0136] M2巨噬细胞具有对应于M2巨噬细胞及其亚型的功能和表型。M2样巨噬细胞是任何在体内或离体具有M2巨噬细胞功能或表型特征的子集的巨噬细胞。

[0137] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体对免疫抑制性骨髓细胞(特别是肿瘤相关巨噬细胞,诸如M2和M2样巨噬细胞)具有高亲和力(avidity)和特异性结合。在一些实施方案中,抗体与来自人类原发性肺肿瘤的M2和M2样TAM特异性结合。在一些实施方案中,如本文公开的抗体与M1或M1样巨噬细胞没有可察觉的结合。M1活化的巨噬细胞表达转录因子诸如干扰素调节因子(IRF5)、 κ 轻多肽基因增强子的核因子(NF- κ B)、激活蛋白(AP-1)和STAT1。M1巨噬细胞分泌促炎性细胞因子诸如IFN- γ 、IL-1、IL-6、IL-12、IL-23和TNF α 。M1巨噬细胞具有对应于M1巨噬细胞的功能和表型。M1样巨噬细胞是任何在体内或者离体具有M1巨噬细胞功能或表型特征的子集的巨噬细胞。

[0138] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体不与原代人类细胞结合。在一些实施方案中,本公开内容的抗体不与造血干细胞、白细胞、T细胞、B细胞、NK细胞和粒细胞结合。

[0139] 肿瘤相关巨噬细胞(TAM)是一类异质性巨噬细胞,大量存在于实体瘤的微环境中。大多数证据表明,TAM具有肿瘤促进表型,表现为参与肿瘤细胞增殖、肿瘤血管生成、运动性和侵袭、转移、抗癌药物耐受性和肿瘤免疫逃避。

[0140] 肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)中的细胞毒性T细胞的直接肿瘤细胞杀伤在免疫系统的抗肿瘤功能中起重要作用。然而,肿瘤微环境(TME)中的TAM抑制T细胞介导的抗肿瘤免疫应答。TAM具有免疫抑制性转录谱并表达包括IL-10和转化生长因子 β (TGF β)在内的因子。在人类中,TAM已被显示通过肝细胞癌中程序性死亡配体1(PD-L1)和卵巢癌中的B7同系物的表面呈递直接抑制T细胞功能,其在T细胞上分别激活程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)。PD-1和CTLA4的抑制信号是免疫检查点,并且这些抑制性受体与其配体的结合抑制T细胞受体信号传导和T细胞细胞毒功能,并促进T细胞凋亡。HIF-1 α 诱导TAM来抑制T细胞功能。CD163已被鉴定为仅在TAM上表达的免疫抑制性分子,并

且可能是癌症免疫疗法的潜在治疗靶。

[0141] 根据TAM的功能特征,包括TAM与T辅助细胞(CD4⁺)型Th1和Th2的关系,TAM一般落入两个类别,M1样抗肿瘤巨噬细胞和M2样免疫抑制性巨噬细胞。M1巨噬细胞是“经典”模型,并且可以通过IFN- γ 和先天免疫活化物诸如病原相关分子模式(PAMP)(例如,脂多糖(LPS))或损伤相关分子模式(DAMP)以及炎性细胞因子(例如,肿瘤坏死因子- α (TNF- α))产生。此外,经由CD40-CD40配体途径的T细胞依赖性巨噬细胞活化诱导M1分化。M1巨噬细胞具有促炎、杀菌和细胞毒性功能。这些巨噬细胞促进Th1细胞的抗原依赖性诱导以及Th1和CD8⁺T细胞的活化。M1样抗肿瘤巨噬细胞对T细胞的细胞毒活性的促进对于肿瘤细胞消除是至关重要的。在一些实施方案中,M1样抗肿瘤巨噬细胞的特征在于通过流式细胞术测量的表面标志物表达,并且具有CD80⁺CD86⁺CD163^{低/-}或CD206^{低/-}表型。M1巨噬细胞分泌IL-12和低水平的IL-10和/或TGF- β 。

[0142] 相比之下,M2样免疫抑制性巨噬细胞是一种“替代”或“非经典”活化模型,其可以通过IL-4或IL-10在体外生成,是抗炎的,并促进伤口愈合和组织修复。在一些实施方案中,M2样免疫抑制性巨噬细胞是由单核细胞来源的巨噬细胞极化的并被肿瘤分泌的因子募集。M2样免疫抑制性巨噬细胞是参与TAM的促肿瘤功能的主要巨噬细胞类型,TAM的促肿瘤功能包括促进肿瘤生长、转移和免疫逃避。M2样巨噬细胞表达表面标志物CD15、CD23、CD64、CD68、CD163^高、CD204^高、CD206^高和/或其他M2巨噬细胞标志物,通过流式细胞术确定。M2巨噬细胞分泌高水平的IL-10和TGF- β 1和低水平的IL-12。

[0143] 在许多肿瘤类型中,TAM浸润水平具有显著的预后价值。TAM已被与各种各样肿瘤的不良预后相联系。例如,已经发现具有更多M2样肿瘤相关巨噬细胞的乳腺癌患者具有更高级别的肿瘤、更大的微血管密度和更低的总存活期。具有更多M1样抗肿瘤TAM的患者表现出相反的效果。

[0144] 因此,仍然有需要鉴定改进治疗癌症的免疫治疗的化合物和方法。

[0145] CD163(清道夫受体富含半胱氨酸的1型蛋白M130;血红蛋白清道夫受体)是一种细胞表面蛋白,其作为血红蛋白-触珠蛋白复合物的清道夫受体起作用,并保护组织免受游离血红蛋白介导的氧化损伤。已经报道了CD163蛋白的四种亚型,分子量分别为125,451Da、125,982Da、121,609Da和124,958Da。亚型1是CD163的最普遍的亚型,分子量为125,451Da,并且由包含细胞外结构域、跨膜区段和胞质尾的1115个氨基酸残基多肽组成。细胞外结构域包含九个富含半胱氨酸的重复结构域。CD163蛋白的亚型1具有四个N连接的糖基化位点,并且在M2巨噬细胞中CD163蛋白在还原条件下的SDS-PAGE中显示出在~150kDa和~130kDa处的两个不同的条带。

[0146] CD163 mRNA表达一般仅限于骨髓细胞,但也由某些人类癌症表达。TAM上的CD163表达已被与免疫抑制性M2样表型相关联,这已被显示与癌症的不良临床结果相关。CD163是人类和鼠肉瘤中的巨噬细胞的促肿瘤活化所必需的。还已报道CD163是巨噬细胞清道夫受体并促进免疫抑制。在一些实施方案中,血红蛋白-触珠蛋白复合物与CD163的相互作用诱导免疫抑制性细胞因子IL-10的分泌和血红素-加氧酶-1(HO-1)的表达。HO-1产生抗炎性代谢物Fe²⁺、CO和胆绿素。

[0147] 在人体中可溶性CD163经由胞外域脱落发生,并被报道具有抗炎特性,诸如下调T细胞应答,包括由植物凝集素(PHA)或12-O-十四烷酰佛波醇-13-乙酸酯(TPA)刺激的淋巴

细胞增殖。

[0148] 靶向CD163的抗体已显示出调节表达CD163的巨噬细胞的先天免疫应答。例如,针对CD163的抗体RM3/1抗体是针对人类单核细胞产生的小鼠单克隆IgG1(κ 轻链)。RM3/1抗体与人类CD163的富含半胱氨酸的结构域9结合,减少LPS诱导的TNF α ,并增强巨噬细胞的IL-10分泌。

[0149] 某些术语

[0150] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与要求保护的主体所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。一般来说,本文描述的结合以下使用的命名和以下的技术是本领域熟知且常用的那些:免疫学、肿瘤学、细胞和组织培养、分子生物学、以及蛋白和寡核苷酸或多核苷酸化学和杂交。应理解,前述一般描述和以下详细描述仅是示例性和说明性的,而不限任何要求保护的主体。本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应解释为限制所描述的主题。

[0151] 如本文使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指代物,除非上下文另外清楚指明。因此,例如,提及“一种抗体”包括多于一种抗体,并且在一些实施方案中提及“一种抗体”包括多种抗体,等等。

[0152] 如本文使用的,所有数值或数值范围包括在这样的范围内或包含这样的范围的整数和在范围内或包含范围内的值或整数的分数,除非上下文另外清楚指明。因此,例如,提及90%-100%的范围,包括91%、92%、93%、94%、95%、95%、97%等,以及91.1%、91.2%、91.3%、91.4%、91.5%等,92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5%等,以此类推。在另一实例中,提及1-5,000倍的范围包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍等,以及1.1、1.2、1.3、1.4、1.5倍等,2.1、2.2、2.3、2.4、2.5倍等,以此类推。

[0153] 如本文使用的,“约”某数字是指包括该数字和从低于该数字10%到高于该数字10%的范围。“约”某范围是指低于该范围下限10%跨越到高于该范围上限10%。

[0154] “百分比同一性”和“%同一性”是指两个序列(核苷酸或氨基酸)在比对中的相同位置处具有相同残基的程度。例如,“氨基酸序列与SEQ ID NO:Y X%相同”是指氨基酸序列与SEQ ID NO:Y的%同一性,并且被详细说明为该氨基酸序列中X%的残基与SEQ ID NO:Y中公开的序列的残基相同。一般来说,采用计算机程序进行这样的计算。比较和比对序列对的示例性程序包括ALIGN(Myers和Miller,Comput Appl Biosci.1988 Mar;4(1):11-7)、FASTA(Pearson和Lipman,Proc Natl Acad Sci U S A.1988Apr;85(8):2444-8;Pearson,Methods Enzymol.1990;183:63-98)和有空位的BLAST(Altschul等人,Nucleic Acids Res.1997Sep 1;25(17):3389-40)、BLASTP、BLASTN或GCG(Devereux等人,Nucleic Acids Res.1984 Jan11;12(1Pt 1):387-95)。

[0155] 如本文使用的,“抗体”是指结合抗原的蛋白。抗体通常在每个重链和轻链中包含可变结构域和恒定结构域。相应地,大多数抗体具有重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),它们一起形成抗体结合抗原的部分。每个可变结构域内有三个互补决定区(CDR),它们在重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)中形成环并接触抗原的表面。“抗体”包括但不限于,多克隆抗体、单克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、天然抗体、人源化抗体、人类抗体、嵌合抗体、合成抗体、重组抗体、杂交抗体、突变抗体、嫁接抗体、抗体片段(例如,全长抗体的一部分,通常是抗原结合片段或其可变区,例如,Fab片

段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段和 Fv 片段) 以及体外产生的具有抗原结合活性的抗体。该术语还包括单链抗体, 例如, 单链 Fv (sFv 或 scFv) 抗体, 其中可变重链和可变轻链连接在一起 (直接或通过肽接头) 以形成连续多肽。

[0156] 如本文使用的, “互补决定区 (CDR)” 是指抗体中与特定抗原结合的可变链部分。可以使用多于一种方法来定义 CDR。当前技术利用对 CDR 长度和位置有不同定义的不同编号方案。例如, Kabat 编号方案基于序列比对并使用给定氨基酸位置的 “可变性参数” (在给定位点处的不同氨基酸的数目除以在该位置处最常出现的氨基酸的频率) 来预测 CDR。另一方面, Chothia 编号方案是基于结构的编号方案, 其中对比抗体晶体结构将环结构定义为 CDR。Martin 编号方案侧重于非常规长度的不同框架区的结构比对。IMGT 编号方案是基于来自完整参考基因数据库 (包括整个免疫球蛋白超家族) 的序列比对的标准化编号系统。Honneger 编号方案 (Aho's) 基于可变区的 3D 结构的结构比对, 并使用结构上保守的 C α 位置来推断框架和 CDR 长度。本领域技术人员将注意到 CDR 的定义将根据所使用的方法而变化。对于本文公开的序列考虑了定义 CDR 的任何方法。

[0157] 术语 “接受者”、“个体”、“受试者”、“宿主” 和 “患者” 在本文中可互换使用, 并且指需要诊断、治疗或疗法的任何哺乳动物受试者, 特别是人类。用于治疗目的的 “哺乳动物” 是指归类为哺乳动物的任何动物, 包括人类、家养动物和农场动物以及实验室动物、动物园动物、运动动物或宠物动物, 诸如狗、马、猫、牛、绵羊、山羊、猪、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猴等。在一些实施方案中, 哺乳动物是人类。

[0158] 如本文使用的, 术语 “治疗 (treatment)”、“治疗 (treating)” 等, 在一些情况下, 是指为了获得某种效果的目的而施用某种剂或进行某种程序。在一些实施方案中, 该效果在完全或部分预防疾病或其症状方面是预防性的, 和/或在实现部分或完全治愈疾病和/或疾病的症状方面是治疗性的。如本文使用的, “治疗” 包括治疗哺乳动物特别是人类的疾病或紊乱 (例如, 癌症), 并且包括: (a) 预防疾病或疾病的症状在易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病 (例如, 包括与原发疾病相关或由原发疾病引起的疾病) 的受试者中发生; (b) 抑制疾病, 即阻止其发展; 和 (c) 减轻疾病, 即引起疾病消退。在一些实施方案中, 治疗是指在治疗或改善或预防癌症方面的任何成功征象, 包括任何客观或主观的参数, 诸如症状的减少、缓解、减弱或者使疾病状况对受试者更耐受; 减缓退化或衰退的速率; 或者使退化的终点不那么虚弱。症状的治疗或改善基于一种或更多种客观或主观的参数; 包括医师检查的结果。相应地, 术语 “治疗” 包括施用本公开内容的化合物或剂, 以预防或延迟、减轻或阻止或抑制与疾病 (例如, 癌症) 相关的症状或状况的发展。术语 “治疗作用” 是指减少、消除或预防受试者的疾病、疾病的症状或疾病的副作用。如果在接受治疗量的本公开内容的抗体后, 患者显示出疾病或紊乱的参数或症状的可观察到和/或可测量到的变化, 诸如, 在治疗癌症的情况下, 如离体评估的肿瘤细胞杀伤活性增加、血液中免疫抑制性分泌因子水平降低、肿瘤体积或质量降低、肿瘤活检中细胞毒性淋巴细胞和 Th1 样 T 细胞数量增加、发病率或死亡率减少、生活质量因素改善、或与疾病或紊乱的参数或症状相关的任何客观指标改善, 则受试者的疾病或紊乱被 “治疗”。在一些实施方案中, 参数包括免疫冷肿瘤转化为免疫热肿瘤, 例如通过增加肿瘤活检中的细胞毒性淋巴细胞数量以及 T 细胞活化标志物 (CD69、ICOS、OX40 等), 或降低肿瘤活检中 TAM 的 CD16、CD64、TLR2、Siglec-15 的表达。

[0159] 在一些实施方案中, “诱导响应” 是指减轻或减少受试者的疾病的病征或症状, 并

且特别地包括但不限于,存活期的延长。

[0160] 术语“亲合力(avidity)”是指两种或更多种剂的复合物在稀释后对解离的抗性。

[0161] 在一些实施方案中,抗体“效应子功能”是指可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)并且随抗体同种型而变化的那些生物活性。

[0162] “Fc受体”或“FcR”是指与抗体的Fc区结合的受体。

[0163] 如本文使用的“人类效应细胞”是指表达一种或更多种FcR并执行效应子功能的白细胞。例如,该细胞至少表达Fc γ RIII并执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人类白细胞的实例包括但不限于,外周血单个核细胞(PBMC)、NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、细胞毒性T细胞和中性粒细胞。

[0164] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在存在补体的情况下靶细胞的裂解。经典补体途径的活化通过补体系统的第一组分(C1q)与结合其同源抗原的抗体(适合亚类的抗体)结合而启动。为了评估补体活化,进行例如CDC测定。

[0165] “内化”的抗体是在与哺乳动物细胞上的抗原(例如,细胞表面多肽或受体)结合后被细胞摄取(即,进入)的抗体。内化性抗体包括抗体片段、人类或嵌合抗体和抗体缀合物。在一些情况下,抗体的内化(例如,诸如本文公开的)改变细胞的生物学,引起其改变其功能。

[0166] “抗原结合结构域”、“抗原结合区”或“抗原结合位点”是抗体的一部分,其包含与抗原相互作用并贡献抗体对抗原的特异性和亲和力。对于与其抗原特异性结合的抗体,这将包括抗体的至少一个CDR结构域的至少一部分。

[0167] 抗体的抗原结合区称为“互补位”,其结合抗原决定簇,即抗原的“表位”,也就是抗原分子中能够被抗体结合的部分。在一些实施方案中,抗原物质具有可被抗体识别的一个或更多个部分,即多于一个表位,并且因此单个抗原物质被不同的抗体特异性结合,每个抗体对不同的表位具有特异性。在一些实施方案中,表位包含抗原的非连续部分。例如,在多肽中,在该多肽的一级序列中不连续但在该多肽的三级和四级结构中彼此足够靠近以被抗原结合蛋白结合的氨基酸残基构成表位。

[0168] “抗体片段”包含完整抗体的一部分。在一些实施方案中,抗体片段包含完整抗体的抗原结合区或可变区。

[0169] 术语“抗体的抗原结合部分”、“抗原结合片段”、“抗原结合结构域”、“抗体片段”在本文中可互换使用,以指抗体的保留与抗原特异性结合的能力的一个或更多个片段。包括在这些术语中的抗体片段的非限制性实例包括但不限于,(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,含有通过铰链区处的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH结构域组成的Fd片段;(iv) 含有抗体单臂的VL和VH结构域的Fv片段;(v) 含有VH结构域的dAb片段(Ward等人,Nature 341(6242):544-6(1989));和(vi) 分离的CDR。还包括包含单条重链和单条轻链的“半(one-half)”抗体。其他形式的单链抗体诸如双抗体也包括在本文中。

[0170] 如本文使用的“功能抗体片段”在上下文中是指不仅结合抗体的抗原而且具有表征完整抗体的功能属性的抗体片段。例如,如果抗体的功能依赖于具有能够实现效应子功能(诸如ADCC)的Fc结构域的功能,则功能片段将具有这样的功能。假设当本公开内容的抗体包含与巨噬细胞Fc受体(诸如在一些实施方案中的CD16(Fc γ RIIIa)或CD64(Fc γ RI))结

合的Fc部分时,本公开内容的抗体在调节肿瘤相关巨噬细胞的功能状态或重新定向或抑制M2状态巨噬细胞方面是有效的。

[0171] 措辞抗体的“功能片段或类似物”是与全长抗体具有共同的定性的生物学活性的化合物。例如,抗IgE抗体的功能片段或类似物是结合IgE免疫球蛋白以阻止或大幅减少这样的分子与高亲和力受体Fc γ RI结合的能力的抗体功能片段或类似物。

[0172] “抗原结合蛋白”是包含含有抗体的抗原结合部分的蛋白,任选地也包含允许抗原结合部分采取促进抗原结合蛋白与抗原结合的构象的支架或框架部分。

[0173] “完整”抗体是包含抗原结合位点以及C_L和至少重链恒定结构域C_H1、C_H2和C_H3的抗体。在一些实施方案中,恒定结构域是天然序列恒定结构域(例如,人类天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。

[0174] 如本文使用的术语“重组抗体”是指包含第一抗体的抗原结合结构域(诸如,例如CDR、VH区或完整轻链)和来自一种或更多种其他抗体或蛋白的结构域的抗体。嵌合抗体、杂交抗体的和人源化抗体是重组抗体的实例。

[0175] “CDR嫁接抗体”是包含源自一种物种的抗体或同种型的一个或更多个CDR和相同或不同物种的另一种抗体或同种型的框架的抗体。

[0176] 术语“人类抗体”包括具有一个或更多个源自人类免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的所有抗体。在一种实施方案中,抗体的所有可变结构域和恒定结构域都源自人类免疫球蛋白序列(称为“完全人类抗体”)。

[0177] 如本文使用的,术语“亲和力(affinity)”是指两种剂可逆结合的平衡常数并表示为K_D。在一种实施方案中,抗体或其抗原结合片段对CD163表现出如通过以下K_D(平衡解离常数)测量的结合亲和力:在10⁻⁶M或更小的范围内,或范围低至10⁻¹⁶M或更低,(例如,约10⁻⁷M、10⁻⁸M、10⁻⁹M、10⁻¹⁰M、10⁻¹¹M、10⁻¹²M、10⁻¹³M、10⁻¹⁴M、10⁻¹⁵M、10⁻¹⁶M或更小)。在某些实施方案中,本文描述的抗体以小于或等于10⁻⁴M,小于或等于约10⁻⁵M、小于或等于约10⁻⁶M、小于等于10⁻⁷M、或小于或等于10⁻⁸M的K_D与huCD163多肽特异性结合。

[0178] 术语“优先结合”或“特异性结合”意指抗体或其片段以比其结合无关氨基酸序列更大的亲和力与表位结合,并且如果与含有该表位的其他多肽交叉反应,则在它们被配制用于人类使用的施用水平是无毒性的。在一些实施方案中,这样的亲和力比抗体或其片段对无关氨基酸序列的亲和力大至少1倍、大至少2倍、大至少3倍、大至少4倍、大至少5倍、大至少6倍、大至少7倍、大至少8倍、大至少9倍、大10倍、大至少20倍、大至少30倍、大至少40倍、大至少50倍、大至少60倍、大至少70倍、大至少80倍、大至少90倍、大至少100倍或大至少1000倍。

[0179] 术语“特异性”是指其中抗体将不会优先与含有被抗体识别的表位的抗原以外的分子结合的情况。该术语也适用于例如抗原结合结构域对由许多抗原携带的特定表位具有特异性的情况,在这种情况下,携带抗原结合结构域的抗体或其抗原结合片段将能够与携带该表位的不同抗原结合。

[0180] 如本文使用的,如果抗体以可检测到的水平(优选地以大于或等于约10⁴M⁻¹,或大于或等于约10⁵M⁻¹,大于或等于约10⁶M⁻¹,大于或等于约10⁷M⁻¹,或大于或等于10⁹M⁻¹的亲和力常数K_a)与抗原反应,则称抗体对抗原具有“免疫特异性”或“特异性”或与抗原“特异性结合”。

[0181] 如本文使用的,术语“单特异性”是指含有对一种特定表位表现出优先亲和力的抗体的抗体组合物。在一些实施方案中,单特异性抗体制品由约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或99.9%的对特定抗原具有特异性结合活性的抗体组成。

[0182] 术语“多肽”以其常规含义即以氨基酸序列使用。多肽不限于特定长度的产物。肽、寡肽和蛋白包括在多肽的定义内,并且这些术语在本文中可互换使用,除非另外特别指明。该术语也不指或排除多肽的表达后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等,以及本领域已知的其他修饰,天然存在的和非天然存在的。在一些实施方案中,多肽是完整蛋白或其子序列。在本公开内容的抗体的上下文中,感兴趣的特定多肽是包含CDR并且能够结合人类M2巨噬细胞或由这样的细胞表达的CD163蛋白的氨基酸子序列。

[0183] 如本文使用的,“基本上纯”和“基本上不含”是指含有少于例如约20%或更少的外来物质、约10%或更少的外来物质、约5%或更少的外来物质、约4%或更少的外来物质、约3%或更少的外来物质、约2%或更少的外来物质、或约1%或更少的外来物质的溶液或悬浮液。

[0184] 术语“分离的”是指基本上不含其他细胞物质和/或化学品的蛋白(例如,抗体)、核酸或其他物质。在一些实施方案中,本公开内容的抗体或其抗原结合片段和核酸是分离的。在一些实施方案中,本公开内容的抗体或其抗原结合片段和核酸是基本上纯的。

[0185] 当应用于多肽时,“分离的”一般意指与一起天然存在的其他蛋白和核酸分开的多肽。优选地,多肽也与用于纯化它的物质诸如抗体或凝胶基质(聚丙烯酰胺)分离。在一些情况下,该术语意指多肽或其一部分,鉴于其来源或操作,所述多肽或其一部分:(i)存在于宿主细胞中作为表达载体的一部分的表达产物;或(ii)连接到它在自然界中连接的那些蛋白或其他化学部分之外的蛋白或其他化学部分;或(iii)在自然界中不存在,例如,通过向蛋白附加或添加至少一个疏水部分而进行化学操作使得蛋白呈自然界中不存在的形式的蛋白。“分离的”还意指以下蛋白:(i)化学合成的;或(ii)在宿主细胞中表达并从相关蛋白和污染蛋白中纯化的。

[0186] 如本文使用的术语“有效量”是指如本文描述的抗体或其抗原结合部分的量,其足以诱导应答,例如,当施用至受试者时,如本文描述的,足以实现与巨噬细胞活性或TAM活性相关的疾病的治疗、预后或诊断。本文提供的抗体的治疗有效量,当单独或组合使用时,将取决于抗体和组合物的相对活性(例如,在抑制肿瘤细胞生长方面)并取决于所治疗的受试者和疾病状况、受试者的体重和年龄、疾病状况的严重程度、施用方式等而变化,在一些情况下,抗体的治疗有效量由本领域普通技术人员容易地确定。

[0187] 术语“治疗有效量”一般是指有效“治疗”受试者或哺乳动物的疾病或紊乱的抗体或药物的量。在一些实施方案中,本文描述的组合物以通过以可适用于任何医学治疗的合理益处/风险比率抑制如本文描述的疾病或紊乱而有效产生一些期望的治疗效果的量施用至受试者。治疗有效量是在器官或组织中实现至少部分期望的治疗或预防效果的量。带来对疾病或紊乱的预防和/或治疗性治疗所需的抗体的量本身不是固定的。在一些实施方案中,施用的抗体的量随疾病类型、疾病的广泛性和罹患疾病或紊乱的哺乳动物的尺寸而变化。当与涉及在受试者出现疾病或紊乱的症状后施用治疗剂的治疗方法结合使用时,术语“治疗有效的”意指在治疗后,疾病或紊乱的一种或更多种病征或症状得到改善或消除。

[0188] 措辞“药学上可接受的”是指当向人类施用生理学上可耐受并且通常不产生过敏或类似的不良反应(诸如胃部不适、头晕等)的分子实体和组合物。

[0189] 术语“接触”在本文中定义为使如本文提供的组合物与如本文描述的细胞、器官、组织或流体物理接近的方式。

[0190] 免疫调节性抗体

[0191] 在某些实施方案中,本文公开了与人类CD163⁺细胞上表达的CD163蛋白特异性结合的抗体。在一些实施方案中,CD163⁺细胞是免疫抑制性骨髓细胞。在一些实施方案中,免疫抑制性骨髓细胞是人类巨噬细胞。在一些实施方案中,本文公开的抗体的结合改变人类巨噬细胞上至少一种标志物的表达。

[0192] 在一些实施方案中,本文公开的抗体与人类M2或M2样免疫抑制性巨噬细胞上表达的人类CD163(huCD163)蛋白结合。在一些实施方案中,抗体与CD163蛋白特异性结合,该CD163蛋白是约140kDa的huCD163糖型。在一些实施方案中,抗体与huCD163的细胞外结构域3特异性结合。在一些实施方案中,抗体与huCD163的细胞外结构域4特异性结合。在一些实施方案中,抗体与huCD163的细胞外结构域3和细胞外结构域4特异性结合。在一些实施方案中,抗体与huCD163特异性结合,导致huCD163的构象变化。在一些实施方案中,humCD163的构象变化使humCD163的细胞外结构域2、5和9暴露。在一些实施方案中,抗体不与较低分子量(约115kDa)的huCD163糖型特异性结合。

[0193] 在一些实施方案中,本文公开的抗体与人类CD163⁺免疫抑制性骨髓细胞结合,并引起表征M2或M2样免疫抑制性巨噬细胞(诸如M2c巨噬细胞)的某些细胞标志物的表达的改变,表明巨噬细胞向非免疫抑制性或较少免疫抑制性以及较多抗肿瘤状态的功能分化。在一些实施方案中,本文公开的抗体与M2或M2样免疫抑制性巨噬细胞结合,并引起表征M2或M2样巨噬细胞的某些细胞标志物的表达降低,表明巨噬细胞向改变的分化状态功能分化。在一些实施方案中,本文公开的抗体减少CD163⁺免疫抑制性骨髓细胞对CD16、CD64、TLR2和Siglec-15中的一种或更多种的表达。

[0194] 在一些实施方案中,本文公开的抗体与CD163⁺免疫抑制性骨髓细胞的结合导致CD163⁺免疫抑制性骨髓细胞的功能变化。在一些实施方案中,本文公开的抗体与CD163⁺免疫抑制性骨髓细胞的结合导致M2或M2样免疫抑制性巨噬细胞中标志物表达的变化。在一些实施方案中,抗体结合的CD163⁺免疫抑制性骨髓细胞的功能变化导致与其他细胞(诸如效应T细胞)的相互作用改变,这随后改变它们对靶肿瘤细胞的影响和与靶肿瘤细胞的相互作用。

[0195] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体减少由肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞引起的免疫抑制。在一些实施方案中,肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞的免疫抑制的减少对应于免疫刺激的增加,例如,促进T细胞活化、T细胞增殖、NK细胞活化、NK细胞增殖或其任何组合的产生。在一些实施方案中,T细胞活化和/或NK细胞活化导致T细胞和/或NK细胞的IFN- γ 、TNF- α 、穿孔蛋白或其组合的产生的增加。在一些实施方案中,本公开内容的抗体增加免疫刺激,例如,促进T细胞活化、T细胞增殖、NK细胞活化、NK细胞增殖或其任何组合的产生。在一些实施方案中,T细胞活化和/或NK细胞活化导致T细胞和/或NK细胞的IFN- γ 、TNF- α 、穿孔蛋白或其组合的产生的增加。在一些实施方案中,本公开内容的抗体与人类巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合,其中人类巨噬细胞在结合抗体之前具有第一免疫抑制活性并在结合抗体之后具有第二免疫抑制活性,并且其中第二免疫抑制活性低于第一

免疫抑制活性。在各种实施方案中,第一和第二免疫抑制活性各自是非零的。

[0196] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体促进T细胞活化和增殖。在一些实施方案中,抗体使T细胞群体偏向抗肿瘤T细胞表型。在一些实施方案中,抗体减少或阻断骨髓细胞对T细胞活化的抑制。在一些实施方案中,抗体减少TAM抑制T细胞活化的能力,导致更大的T细胞刺激和IL-2产生。在一些实施方案中,抗体阻断TAM抑制T细胞活化的能力,导致更大的T细胞刺激和IL-2产生。

[0197] 在一些实施方案中,本文公开的抗体减少骨髓对T细胞增殖的抑制。在一些实施方案中,抗体减少TAM抑制CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞活化和增殖。在一些实施方案中,抗体减少TAM对Th1细胞增殖的抑制。增殖的T细胞在CD4⁺T细胞上表现出增强的活化标志物的表达。

[0198] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体改变M2极化的巨噬细胞,使得巨噬细胞表现出减轻M2巨噬细胞免疫抑制作用的M1样表型。在一些实施方案中,本文描述的抗体影响单核细胞来源的巨噬细胞向较少免疫抑制性和较多抗肿瘤的分化状态的分化。

[0199] 在一些实施方案中,本文提供了与人类巨噬细胞上表达的人类CD163蛋白(huCD163)特异性结合并减少巨噬细胞对CD16、CD64、TLR2或Siglec-15中至少一种的表达的抗体。在一些实施方案中,人类巨噬细胞是肿瘤相关免疫抑制性巨噬细胞。在一些实施方案中,人类巨噬细胞是M2样免疫抑制性巨噬细胞。

[0200] 在一些实施方案中,本文公开的抗体与巨噬细胞表达的CD163蛋白结合,所述CD163蛋白作为包含由巨噬细胞表达的至少一种其他蛋白的复合物的组分。在一些实施方案中,该复合物是细胞表面复合物。在一些实施方案中,该复合物包含选自半乳凝素-1蛋白、LILRB2蛋白和酪蛋白激酶II蛋白的至少一种其他蛋白。

[0201] 在一些实施方案中,本文公开的抗体与巨噬细胞上的CD163蛋白结合并被巨噬细胞内化。

[0202] 在一些实施方案中,本文公开的抗体对与其结合的巨噬细胞没有细胞毒性。

[0203] 在一些实施方案中,本文公开的抗体促进CD4⁺T细胞活性或增殖。在一些实施方案中,抗体促进CD4⁺T细胞对CD69、ICOS、OX40、PD1、LAG3或CTLA4的表达。

[0204] 在一些实施方案中,本文公开的抗体促进CD8⁺T细胞活性或增殖。在一些实施方案中,抗体促进CD8⁺T细胞对ICOS、OX40、PD1、LAG3或CTLA4的表达。

[0205] 在一些实施方案中,本文公开的抗体通过促进CD8⁺T细胞活性或增殖而促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。在一些实施方案中,抗体促进细胞毒性淋巴细胞介导的癌细胞杀伤。在一些实施方案中,抗体促进NK细胞介导的肿瘤细胞杀伤。

[0206] 在一些实施方案中,本文公开的抗体促进T细胞对IL-2的表达。在一些实施方案中,本公开内容的抗体与CD163蛋白的结合增加CD4⁺T细胞、CD196⁻T细胞、CXCR3⁺T细胞、CCR4⁺T细胞或其任何组合。在一些实施方案中,抗体增加CD4⁺CD196⁻CXCR3⁺CCR4⁺T细胞。

[0207] 在一些实施方案中,本文公开的抗体具有与巨噬细胞上表达的Fc受体结合的恒定结构域。在一些实施方案中,抗体特异性结合huCD163并具有与Fc受体结合的恒定结构域。在一些实施方案中,抗体具有与CD163⁺免疫抑制性骨髓细胞上表达的Fc受体(诸如CD16(Fc γ RIIIa)或CD64(Fc γ RI))结合的恒定结构域。在一些实施方案中,huCD163和Fc受体在同一细胞上表达。在一些实施方案中,huCD163和Fc受体在不同细胞上表达。在一些实施方案中,抗体可变结构域特异性结合huCD163并且抗体恒定结构域同时结合Fc受体。

[0208] 在某些实施方案中,本文公开了与人类M2和M2样巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合的抗体,其中所述结合导致以下作用中的至少一种:

[0209] (a) 人类巨噬细胞对至少一种标志物的表达减少,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;

[0210] (b) 抗体被人类巨噬细胞内化;

[0211] (c) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;

[0212] (d) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;和

[0213] (e) 促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。

[0214] 在某些实施方案中,本文公开了与人类M2和M2样巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合的抗体,其中所述结合导致以下作用中的至少两种:

[0215] (a) 人类巨噬细胞对至少一种标志物的表达减少,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;

[0216] (b) 抗体被人类巨噬细胞内化;

[0217] (c) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;

[0218] (d) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;和

[0219] (e) 促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。

[0220] 在某些实施方案中,本文公开了与人类M2和M2样巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合的抗体,其中所述结合导致以下作用中的至少三种:

[0221] (a) 人类巨噬细胞对至少一种标志物的表达减少,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;

[0222] (b) 抗体被人类巨噬细胞内化;

[0223] (c) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;

[0224] (d) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;和

[0225] (e) 促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。

[0226] 在某些实施方案中,本文公开了与人类M2和M2样巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合的抗体,其中所述结合导致以下作用中的至少四种:

[0227] (a) 人类巨噬细胞对至少一种标志物的表达减少,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;

[0228] (b) 抗体被人类巨噬细胞内化;

[0229] (c) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;

[0230] (d) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;和

[0231] (e) 促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。

[0232] 在某些实施方案中,本文公开了与人类M2和M2样巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合的抗体,其中所述结合导致以下作用中的至少五种:

[0233] (a) 人类巨噬细胞对至少一种标志物的表达减少,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;

[0234] (b) 抗体被人类巨噬细胞内化;

[0235] (c) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;

[0236] (d) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;和

[0237] (e) 促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。

[0238] 在一些实施方案中,本文公开的抗体与肿瘤相关巨噬细胞(TAM)群体中的人类CD163⁺免疫抑制性骨髓细胞选择性结合,其中抗体与M2巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合并减少TAM群体的免疫抑制活性。

[0239] 在一些实施方案中,本文公开的抗体与肿瘤微环境中的人类CD163⁺免疫抑制性骨髓细胞选择性结合,其中抗体与M2巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合并减少M2巨噬细胞介导的抑制。在一些实施方案中,本文公开的抗体是人类的、人源化的或嵌合的。在一些实施方案中,本文公开的抗体是其如描述地结合的抗原结合片段。

[0240] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体是完整的免疫球蛋白分子,诸如,例如,人类抗体,以及人源化Ig分子中含有抗原结合位点(即,互补位)的那些部分或单条重链和单条轻链,包括本领域已知的那些部分,如Fab、Fab'、F(ab')、F(ab')₂、Fd、scFv、可变重结构域、可变轻结构域、可变NAR结构域、双特异性scFv、双特异性Fab2、三特异性Fab3、单链结合多肽、dAb片段、双抗体和也称为抗原结合片段的其他。在构建免疫球蛋白分子或其片段时,在一些实施方案中,可变区或其部分与一个或更多个恒定区或其部分融合、连接或以其他方式连接以产生本文描述的任何抗体或其片段。因此,在一些实施方案中,以上描述的抗体中的任何一种的抗原结合片段是Fab、Fab'、Fd、F(ab')₂、Fv、scFv、单链结合多肽(例如,具有Fc部分的scFv)或如本文描述的其任何其他功能片段。

[0241] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体属于任何免疫球蛋白类别,并因此,在一些实施方案中,具有 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ 重链。在一些实施方案中, γ 链是 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 或 $\gamma 4$ 。在一些实施方案中, α 链是 $\alpha 1$ 或 $\alpha 2$ 。

[0242] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体是IgG免疫球蛋白。在一些实施方案中,本公开内容的抗体属于任何IgG亚类。在一些实施方案中抗体是IgG1。

[0243] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含为 κ 或 λ 的可变轻链。在一些实施方案中, λ 链属于包括例如 $\lambda 1$ 、 $\lambda 2$ 、 $\lambda 3$ 和 $\lambda 4$ 在内的任何亚型。在一些实施方案中,轻链是 κ 。

[0244] 在一些实施方案中,本文公开的抗体包含人类可变框架区和人类恒定区。在一些实施方案中,抗体包含人类轻链可变框架区和人类轻链恒定区。在一些实施方案中,抗体包含人类重链可变框架区和人类重链恒定区。在一些实施方案中,抗体包含人类轻链可变框架区、人类轻链恒定区、人类重链可变框架区和人类重链恒定区。

[0245] 在一些实施方案中,人类重链恒定区是IgG1或IgG4或其片段。在一些实施方案中,重链恒定区是人类IgG1。具有IgG1的抗体的一种实例是AB101。AB101包含含有SEQ ID NO:9的轻链和含有SEQ ID NO:10的重链,如下面的实施例1中描述的。

[0246] 在一些实施方案中,重链恒定区是具有减少的ADCC功能的人类IgG1(即,Fc无效抗体)。本公开内容的示例性Fc无效抗体是AB102。AB102包含含有SEQ ID NO:9的轻链和含有SEQ ID NO:11的重链,AB102含有AB101的可变区,并且其中重链恒定区是Fc无效形式的人类IgG1。AB102在下面的实施例中进一步描述。

[0247] 在一些实施方案中,重链恒定区是经修饰以增强ADCC功能的人类IgG1。本公开内容的具有增强的ADCC功能的示例性抗体是AB103。AB103包含含有SEQ ID NO:9的轻链和含有SEQ ID NO:12的重链,AB103含有AB101的可变区,并且其中重链恒定区是增强ADCC形式的人类IgG1。

[0248] 在一些实施方案中,重链恒定区是人类IgG4。本公开内容的具有IgG4的示例性抗体是AB104。AB104包含含有SEQ ID NO:9的轻链和含有SEQ ID NO:13的重链,AB104含有AB101的可变区,并且其中重链恒定区是人类IgG4。

[0249] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含人类可变框架区和鼠恒定区。在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含人类重链可变框架区和鼠重链恒定区。在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含人类轻链可变框架区、鼠轻链恒定区、人类重链可变框架区和鼠重链恒定区。

[0250] 在一些实施方案中,重链恒定区是鼠IgG2A。具有鼠IgG2A的抗体的一种实例是AB211。AB211包含含有SEQ ID NO:14的轻链和含有SEQ ID NO:15的重链,AB211含有AB101的人类可变区,并且其中重链恒定区是Fc无效形式的鼠IgG1并且轻链恒定区是鼠 κ 。AB211在下面的实施例中进一步描述。

[0251] 在一些实施方案中,重链恒定区是鼠IgG2A。具有鼠IgG2A重链的抗体的一种实例是AB212。AB212包含含有SEQ ID NO:14的轻链和含有SEQ ID NO:16的重链,AB212含有AB101的人类可变区,并且其中重链恒定区是鼠IgG2a并且轻链恒定区是鼠 κ 。AB212在下面的实施例中进一步描述。

[0252] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段与M2巨噬细胞上表达的CD163蛋白的结合部分(例如,5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或其中的任何数字)或完全地调节这样的M2巨噬细胞的生物学功能。抗体或抗原结合片段的活性,例如,使用体外测定和/或在体内使用本领域公认的测定来确定,诸如本文描述的其他本领域已知的那些。

[0253] 在一些实施方案中,如果需要,则进一步修饰本公开内容的抗体以改变抗体的特定特性同时保留期望的功能性。例如,在一种实施方案中,修饰本公开内容的抗体以改变抗体的药代动力学特性,包括但不限于,体内稳定性、溶解性、生物可利用度或半衰期。

[0254] 在一些实施方案中,本文描述的抗体具有约1pM至约10pM、约10pM至约20pM、约1pM至约29pM、约30pM至约40pM、约10pM至约100pM或约20pM至约500pM的解离常数(Kd)。

[0255] 在一些实施方案中,本文描述的抗体具有小于约500pM、小于约400pM、小于约300pM、小于约200pM、小于约100pM、小于约75pM、小于约50pM、小于约30pM、小于约25pM、小于约20pM、小于约18pM、小于约15pM、小于约10pM、小于约7.5pM、小于约5pM、小于约2.5pM或小于约1pM的解离常数(Kd)。

[0256] 在一些实施方案中,本文描述的抗体对huCD163蛋白或肽具有约 10^{-9} 到约 10^{-14} 、约 10^{-10} 到约 10^{-14} 、约 10^{-11} 到约 10^{-14} 、约 10^{-12} 到约 10^{-14} 、约 10^{-13} 到约 10^{-14} 、约 10^{-10} 到约 10^{-11} 、约 10^{-11} 到约 10^{-12} 、约 10^{-12} 到约 10^{-13} 或 10^{-13} 到约 10^{-14} M的亲合力。

[0257] 在一些实施方案中,本文描述的抗体具有多于一个结合位点。在一些实施方案中,结合位点彼此相同。在一些实施方案中,结合位点彼此不同。天然存在的人类免疫球蛋白通常具有两个相同的结合位点,而工程化抗体,例如,具有两个或更多个不同的结合位点。

[0258] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体是双特异性或多特异性的。双特异性抗体是对至少两个不同表位具有结合特异性的抗体。在一些实施方案中,示例性双特异性抗体与单个抗原的两个不同表位结合。在一些实施方案中,其他这样的抗体组合了第一抗原结合位点与针对第二抗原的结合位点。在一些实施方案中,双特异性抗体结合至少两个不同

的表位并具有与Fc受体结合的恒定结构域。在一些实施方案中,双特异性抗体对一个或多个表位的结合与双特异性抗体的恒定结构域对Fc受体的结合是同时的。

[0259] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体具有两个或更多个化合价,其也称为多价。在一些实施方案中,本公开内容的抗体是三特异性的。在一些实施方案中,多价抗体比二价抗体被表达与抗体结合的抗原的细胞更快内化(和/或分解代谢)。在一些实施方案中,本公开内容的抗体是具有三个或更多个抗原结合位点的多价抗体(例如,四价抗体)。在一些实施方案中,本公开内容的多价抗体通过编码抗体多肽链的核酸的重组表达产生。在一些实施方案中,多价抗体包含二聚化结构域和三个或更多个抗原结合位点。在一些实施方案中,二聚化结构域包含Fc区或铰链区(或由Fc区或铰链区组成)。在这种情况下,抗体将包含Fc区和Fc区的氨基末端的三个或更多个抗原结合位点。在一些实施方案中,本文的多价抗体包含约三个至约八个(但优选四个)抗原结合位点。多价抗体包含至少一条多肽链(并且优选两条多肽链),其中多肽链包含两个或更多个可变区。例如,多肽链包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc,其中VD1为第一可变区,VD2为第二可变区,Fc为Fc区的一条多肽链,X1和X2代表氨基酸或多肽,并且n是0或1。在一些实施方案中,多肽链各自独立地包含: V_H-C_H1 -柔性接头- V_H-C_H1 -Fc区域链;或 $V_H-C_H1-V_H-C_H1$ -Fc区链。在一些实施方案中,本文的多价抗体还包含至少两个(并且优选四个)轻链可变区多肽。在一些实施方案中,本文的多价抗体包含约二个至约八个轻链可变区多肽。在一些实施方案中,本文描述的轻链可变区多肽包含轻链可变区。在一些实施方案中,本文描述的轻链可变区多肽还包含C_L结构域。

[0260] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体被构建为折叠成多价形式,这在一些实施方案中改进了结合亲和力、特异性和/或增加了在血液中的半衰期。多价形式的抗体,例如,通过本领域已知的技术制备。

[0261] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体是对靶蛋白特异性的SMIP或结合结构域免疫球蛋白融合蛋白。这些构建体是包含融合到实现抗体效应子功能必需的免疫球蛋白结构域的抗原结合结构域的单链多肽。

[0262] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体包含单链结合多肽,该单链结合多肽具有结合本文公开的表位的重链可变区和/或轻链可变区,并且任选地具有免疫球蛋白Fc区。这样的分子是单链可变片段(scFv),任选地通过免疫球蛋白Fc区的存在而具有效应子功能或增加的半衰期。

[0263] 抗CD163抗体

[0264] 在某些实施方案中,本文提供了与CD163蛋白特异性结合的抗体。在一些实施方案中,CD163结合抗体包含至少一条重链和至少一条轻链。在一些实施方案中,CD163结合抗体包含至少一条包含重链可变结构域(VH)的重链和至少一条包含轻链可变结构域(VL)的轻链。每个VH和VL包含三个互补决定区(CDR)。VH和VL和CDR的氨基酸序列决定抗体的抗原结合特异性和抗原结合强度。VH和VL结构域总结于表1中。轻链和重链总结于表2中。CDR的氨基酸序列总结于表3中。

[0265] 在一些实施方案中,本文公开的抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,本文公开的抗体是抗原结合片段。在一些实施方案中,本文公开的抗体选自完整免疫球蛋白、scFv、Fab、F(ab')₂或二硫键连接的Fv。在一些实施方案中,本文公开的抗体是IgG或IgM。在一些实施方案中,本文公开的抗体是人源化的。在一些实施方案中,本文公开的抗体是嵌合的。

[0266] 抗CD163抗体可变结构域

[0267] 表1.抗CD163可变结构域序列。

表1: 抗CD163可变结构域序列		
	序列	SEQ ID NO:
[0268] 轻链可变结构域	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTPRGTFGQGTKVEIKR	7
重链可变结构域	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYSEYYYYGMDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF	8

[0269] 在某些实施方案中,本文公开了包含轻链可变结构域(VL)的抗体,轻链可变结构域(VL)具有与SEQ ID NO:7列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL具有与SEQ ID NO:7列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL具有与SEQ ID NO:7列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0270] 在某些实施方案中,本文公开了包含重链可变结构域(VH)的抗体,重链可变结构域(VH)具有与SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH具有与SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH具有与SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0271] 在某些实施方案中,本文公开了包含轻链可变结构域(VL)和重链可变结构域(VH)的抗体,轻链可变结构域(VL)具有与SEQ ID NO:7列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链可变结构域(VH)具有与SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL具有与SEQ ID NO:7列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且VH具有与SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL具有与SEQ ID NO:7列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且VH具有与SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0272] 抗CD163抗体轻链和重链

[0273] 表2.抗CD163轻链和重链序列

[0274]

表2: 抗CD163轻链和重链序列		
	序列	SEQ ID NO:
AB101、 AB102、AB103 或AB104轻链 (hIgG1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTPRGTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	9
AB101重链 (hIgG1)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
Ab102重链 (hIgG1 ADCC 无效)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDVWGQ	11

表2: 抗CD163轻链和重链序列

	序列	SEQ ID NO:
	GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
AB103重链 (hIgG1 eADCC)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	12
AB104重链 (hIgG4)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY TCNVDHKPSNTKVDKRVE SKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	13
AB211或 AB212轻链 (muc)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTPRGTFGQGTKVEIKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVV CFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSM SSTLTITKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	14
AB211重链 (mulgG2A)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDVWGQ GTTVTVSSKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPV TLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPP KIKDVLMSLSPIVTCVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPA PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMP EDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKN WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	15

[0275]

表2: 抗CD163轻链和重链序列

[0276]

	序列	SEQ ID NO:
AB212重链 (mulgG2A ADCC无效)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGY YSEYYYYGMDVWGQ GTTVTVSSKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPV TLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKCPPCKCPAPNLEGGPSVFIFPP KIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMMSGKAFACAVNNKDLPA PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMP EDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKN WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	16

[0277] 在某些实施方案中,本文公开了包含轻链的抗体,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0278] 在某些实施方案中,本文公开了包含重链的抗体,重链具有与SEQ ID NO:10列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:10列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:10列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0279] 在某些实施方案中,本文公开了包含重链的抗体,重链具有与SEQ ID NO:11列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:11列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:11列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0280] 在某些实施方案中,本文公开了包含重链的抗体,重链具有与SEQ ID NO:12列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:12列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:12列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0281] 在某些实施方案中,本文公开了包含重链的抗体,重链具有与SEQ ID NO:13列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:13列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:13列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0282] 在某些实施方案中,本文公开了包含轻链和重链的抗体,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链具有与SEQ ID NO:10列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨

基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:10列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:10列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0283] 在某些实施方案中,本文公开了包含轻链和重链的抗体,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链具有与SEQ ID NO:11列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:11列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:11列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0284] 在某些实施方案中,本文公开了包含轻链和重链的抗体,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链具有与SEQ ID NO:12列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:12列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:12列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0285] 在某些实施方案中,本文公开了包含轻链和重链的抗体,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链具有与SEQ ID NO:13列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:13列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:13列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0286] 在某些实施方案中,本文公开了包含轻链的抗体,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0287] 在某些实施方案中,本文公开了包含重链的抗体,重链具有与SEQ ID NO:15列出

的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0288] 在某些实施方案中,本文公开了包含重链的抗体,重链具有与SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0289] 在某些实施方案中,本文公开了包含轻链和重链的抗体,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链具有与SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0290] 在某些实施方案中,本文公开了包含轻链和重链的抗体,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链具有与SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0291] 示例性抗CD163互补决定区

[0292] 表3.抗CD163 CDR序列

表3: 抗CD163 CDR序列		
	序列	SEQ ID NO:
[0293]	轻链CDR1	RASQSISSYLN
	轻链CDR2	AASSLQS
	轻链CDR3	QQSYSTPRGT
	重链CDR1	SYAMH
	重链CDR2	VISYDGSNKYYADSVKG
	重链CDR3	ENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDV

[0294] 在某些实施方案中,本文公开了包含以下中的至少一个的抗体:具有与SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的轻链CDR1,具有与SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的轻链CDR2,和具有与SEQ ID NO:3列出的

氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的轻链CDR3。在一些实施方案中,与CD163结合的抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR1,具有与SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR2,和具有与SEQ ID NO:3列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR3。在一些实施方案中,与CD163结合的抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1,具有与SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2,和具有与SEQ ID NO:3列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0295] 在某些实施方案中,本文公开了包含以下中的至少一个的抗体:具有与SEQ ID NO:4列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的重链CDR,具有与SEQ ID NO:5列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的重链CDR2,具有与SEQ ID NO:6列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,与CD163结合的抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:4列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR1,具有与SEQ ID NO:5列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR2,具有与SEQ ID NO:6列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,与CD163结合的抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:4列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR1,具有与SEQ ID NO:5列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR2,具有与SEQ ID NO:6列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR3。

[0296] 在某些实施方案中,本文公开了包含以下中的至少一个的抗体:具有与SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的轻链CDR1,具有与SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的轻链CDR2,具有与SEQ ID NO:3列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的轻链CDR3,具有与SEQ ID NO:4列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的重链CDR1,具有与SEQ ID NO:5列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的重链CDR2,和具有与SEQ ID NO:6列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,与CD163结合的抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR1,具有与SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR2,具有与SEQ ID NO:3列出的氨

氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR3,具有与SEQ ID NO:4列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR1,具有与SEQ ID NO:5列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR2,和具有与SEQ ID NO:6列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,与CD163结合的抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1,具有与SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2,具有与SEQ ID NO:3列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3,具有与SEQ ID NO:4列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR1,具有与SEQ ID NO:5列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR2,和具有与SEQ ID NO:6列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR3。

[0297] 结合亲和力和免疫反应性

[0298] 抗体或其抗原结合片段的结合亲和力(affinity)和/或亲合力(avidity)通过修饰框架区来改进。用于修饰框架区的任何合适的方法是本领域已知的并在本文中被考虑。对待改变的一个或更多个相关框架氨基酸位置的选择取决于许多标准。用于选择待改变的相关框架氨基酸的一种标准是,例如,供体分子和受体分子之间氨基酸框架残基的相对差异。使用这种方法选择待改变的相关框架位置具有避免残基决定中的任何主观偏差或残基对CDR结合亲和力贡献的任何偏差的优点。

[0299] 在一些实施方案中,结合相互作用表现为与一个或更多个CDR的一个或更多个氨基酸残基的分子间接触。抗原结合涉及,例如,CDR或CDR对,或在一些情况下, V_H 链和 V_L 链的多达所有六个CDR的相互作用。

[0300] 抗体或抗原结合片段的结合亲和力和亲合力可以通过表面等离子体共振 (SPR) 测量、AlphaLisa测定或平衡解离常数 (K_D) 的流式细胞术测量。

[0301] 本文公开了以0.1nM至1000nM的 K_D 与人类CD163特异性结合的抗体。在一些实施方案中,抗体以约0.1nM至约500nM、约0.1nM至约100nM、约0.1nM至约50nM、约0.1nM至约20nM、约0.1nM至约10nM、约0.1nM至约5nM、约0.1nM至约2nM、约0.1nM至约1nM、约0.1nM至约0.5nM、约0.5nM至约1000nM、约0.5nM至约500nM、约0.5nM至约100nM、约0.5nM至约50nM、约0.5nM至约20nM、约0.5nM至约10nM、约0.5nM至约5nM、约0.5nM至约2nM、约0.5nM至约1nM、约1nM至约1000nM、约1nM至约500nM、约1nM至约100nM、约1nM至约50nM、约1nM至约20nM、约1nM至约10nM、约1nM至约5nM、约1nM至约2nM、约2nM至约1000nM、约2nM至约500nM、约2nM至约100nM、约2nM至约50nM、约2nM至约20nM、约2nM至约10nM、约2nM至约5nM、约5nM至约1000nM、约5nM至约500nM、约5nM至约100nM、约5nM至约50nM、约5nM至约20nM、约5nM至约10nM、约10nM至约1000nM、约10nM至约500nM、约10nM至约100nM、约10nM至约50nM、约10nM至约20nM、约20nM至约1000nM、约20nM至约500nM、约20nM至约100nM、约20nM至约50nM、约50nM至约1000nM、约50nM至约500nM、约50nM至约100nM、约100nM至约500nM、约100nM至约1000nM、约

500nM至约1000nM的 K_D 与人类CD163特异性结合。在一些实施方案中,抗体以1.8nM、12nM、45nM或89nM的 K_D 与人类CD163特异性结合。

[0302] 本文公开的抗体与骨髓清道夫受体CD163结合,骨髓清道夫受体CD163在肿瘤相关巨噬细胞(TAM)上高表达并已在来自不同来源的不同肿瘤细胞上检测到。在肿瘤组织中CD163的表达与不良预后有关。本文公开的抗体与IL-10极化的M2c巨噬细胞之间的结合亲和力通过流式细胞术测定来测量。

[0303] 本文公开了以0.1nM至1000nM的 K_D 与M2c巨噬细胞特异性结合的抗体。在一些实施方案中,抗体以约0.1nM至约500nM、约0.1nM至约100nM、约0.1nM至约50nM、约0.1nM至约20nM、约0.1nM至约10nM、约0.1nM至约5nM、约0.1nM至约2nM、约0.1nM至约1nM、约0.1nM至约0.5nM、约0.5nM至约1000nM、约0.5nM至约500nM、约0.5nM至约100nM、约0.5nM至约50nM、约0.5nM至约20nM、约0.5nM至约10nM、约0.5nM至约5nM、约0.5nM至约2nM、约0.5nM至约1nM、约1nM至约1000nM、约1nM至约500nM、约1nM至约100nM、约1nM至约50nM、约1nM至约20nM、约1nM至约10nM、约1nM至约5nM、约1nM至约2nM、约2nM至约1000nM、约2nM至约500nM、约2nM至约100nM、约2nM至约50nM、约2nM至约20nM、约2nM至约10nM、约2nM至约5nM、约5nM至约1000nM、约5nM至约500nM、约5nM至约100nM、约5nM至约50nM、约5nM至约20nM、约5nM至约10nM、约10nM至约1000nM、约10nM至约500nM、约10nM至约100nM、约10nM至约50nM、约10nM至约20nM、约20nM至约1000nM、约20nM至约500nM、约20nM至约100nM、约20nM至约50nM、约50nM至约1000nM、约50nM至约500nM、约50nM至约100nM、约100nM至约500nM、约100nM至约1000nM、约500nM至约1000nM的 K_D 与M2c巨噬细胞特异性结合。在一些实施方案中,抗体以7.7nM的 K_D 与M2c巨噬细胞特异性结合。

[0304] 结合表位

[0305] 抗体表位可以是线性肽序列(即“连续的”)或可以由不连续的氨基酸序列组成(即“构象的”或“不连续的”)。在一些实施方案中,抗体识别一种或更多种氨基酸序列;因此,一个表位定义多于一种不同的氨基酸序列。抗体识别的表位例如通过本领域技术人员熟知的肽映射和序列分析技术来确定。结合相互作用表现为与CDR的一个或更多个氨基酸残基的分子间接触。

[0306] 人类CD163蛋白是在人类中由CD163基因编码的蛋白。人类CD163的氨基酸序列为:

[0307] MSKLRMVLLDSGSADFRRHFVNLSPTITVLLLSACFVTSSLGGTDKELRLVDGENKCSGRVEVKV
QEEWGTVCNNGWSMEAVSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVSCRGNESALWDCKHDGWGKHSNCTHQ
QDAGVTCSDGSNLEMRLTRGGNMCSGRIEIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSGSSNFGEGSGP
IWFDDLICNGNESALWNCKHQGWGKHNCDAEDAGVICSKGADLSLRLVDGVTECSGRLEVRFQGEWGTICDDGWD
SYDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDVSVCQGHEPAIWQCKHHEWGKHYCNHEDAGVTCSDGSDLE
LRLRGGGSRCACTVEVEIQRLLGKVCDRGWGLKEADVVCRLGCGSALKTSYQVYSKIQATNTWFLSSCNGNETS
LWDCKNWQWGLTCDHYEEAKITCSAHREPRLVGGDIPCSGRVEVKHGDWGSICDSDFSLEAASVLCRELQCGTV
VSILGGAHFGEENGQIWAEEFQCEGHESLSLCPVAPRPEGTCSHSRDVGVCVSRYTEIRLVNGKTPCEGRVELKT
LGAWGSLCNSHWDIEDAHVLCQQLKCGVALSTPGGARFGKNGNQIWRHMFHCTGTEQHMGDCPVTALGASLCPSEQ
VASVICSGNQSQTLSSCNSSSLGPTRPTIPEESAVACIESGQLRLVNGGGRCAGRVEIYHEGSWGTICDDSWDLSD
AHVVCRQLGCGEAINATGSAHFGEGTGPIWLDEMCKNGKESRIWQCHSHGWGQQNCRHKEDAGVICSEFMSLRLTS
EASREACAGRLEVFYNGAWGTVGKSSMSETTVGVVCRQLGCADKKGKINPASLDKAMSIPMWVDNVQCPKGPDTLWQ

CPSSPWEKRLASPSEETWITCDNKIRLQEGPTSCSGRVEIWHGGSWGTVCDDSWDLDDAQVVCQQLGCGPALKAFK
EAEFGQGTGPIWLNEVKCKGNESSLWDCPARRWGHSECGHKEDA AVNCTDISVQKTPQKATTGRSSRQSSFI AVGI
LGVVLLAIFVALFFLTKRRRQRQLAVSSRGENLVHQIQYREMNSCLNADDLDLMNSSGGHSEPH (SEQ ID NO:
17)。

[0308] 本文公开了与人类CD163中的表位特异性结合的抗体。在一些实施方案中,本文公开的抗体与包含非连续性氨基酸序列的表位结合。在一些实施方案中,抗体与包含氨基酸序列IGRVNASKGFGHIWLDVSCQGHEPAI (SEQ ID NO:18) 的人类CD163的表位结合。在一些实施方案中,抗体与包含氨基酸序列VVCRLGCGSA (SEQ ID NO:19) 的人类CD163的表位结合。在一些实施方案中,抗体与包含氨基酸序列WDCKNWQWGGLTCD (SEQ ID NO:20) 的人类CD163的表位结合。在一些实施方案中,抗体与包含SEQ ID NO:18-20的氨基酸序列的人类CD163的表位结合。

[0309] 本文还公开了与本文公开的表位特异性结合的另外的抗体。与本文公开的表位特异性结合的这些另外的抗体或其抗原结合片段可以使用本领域已知的技术来鉴定。例如,计算方法用于设计表位特异性抗体。Nimrod等人,Computational Design of Epitope-Specific Functional Antibodies,Cell Reports 25,2121-2131,Nov.20,2018,(通过引用并入本文)。另一种方法可以用于从与抗原结合的抗体的文库中鉴定与特定表位结合的抗体,诸如以下:首先将非典型氨基酸(ncAA) p-苯甲酰基-L-苯丙氨酸(pBpa) 和p-叠氮基-L-苯丙氨酸(pAzF) 掺入靶表位中,并且然后选择在紫外线照射后与ncAA掺入的表位交联的抗体。因为只有当抗体和表位之间的距离足够近时才会发生交联,所以本方法可以有效地选择与靶表位特异性结合的抗体。Chen等人Epitope-directed antibody selection by site-specific photocrosslinking,Science Advances,Vol.6,no.14,eaaz7825,01Apr 2020(通过引用并入本文)。

[0310] 抗体的修饰

[0311] 在一些情况下,出于各种目的使用本领域已知的技术,诸如,例如,通过添加聚乙二醇(PEG),来修饰抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,PEG修饰(PEG化)导致以下中的一种或更多种:改进的循环时间、改进的溶解性、改进的蛋白水解耐受性、减少的抗原性和免疫原性、改进生物可利用度、减少的毒性、改进的稳定性和更容易的配制。

[0312] 在一些情况下,当抗原结合片段不含Fc部分时,将Fc部分添加到(例如,重组地)该片段,例如,以增加向受试者施用抗原结合片段在血液循环中的半衰期。适当的Fc区的选择和掺入这样的片段的方法是本领域已知的。例如,通过使用本领域已知的常规技术,将IgG的Fc区掺入感兴趣的多肽以便增加其循环半衰期但不丧失其生物活性。在一些实施方案中,进一步修饰抗体的Fc部分以增加向受试者施用抗原结合片段在血液循环中的半衰期。修饰,例如,使用本领域的常规手段来确定。

[0313] 另外,在一些实施方案中,产生或表达抗体及其抗原结合片段使得它们在其复合N-糖苷连接的糖链上不含岩藻糖。已知从复合N-糖苷连接的糖链中去除岩藻糖会增加抗体和抗原结合片段的效应子功能,包括但不限于,抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。类似地,在一些情况下,结合表位的抗体或其抗原结合片段在其C末端附接至源自任何抗体同种型(例如,IgG、IgA、IgE、IgD和IgM) 和任何同种型亚类(特别是IgG1、IgG2、IgG3和IgG4) 的免疫球蛋白重链的全部或一部分。

[0314] 另外,在一些实施方案中,本文描述的抗体或抗原结合片段还被修饰使得它们能够穿过血脑屏障。本文描述的抗体或抗原结合片段的这样的修饰允许用于治疗脑疾病诸如多形性成胶质母细胞瘤 (GBM)。允许蛋白诸如抗体或抗原结合片段穿过血脑屏障的示例性修饰在美国专利公布2007/0082380中描述。

[0315] 免疫球蛋白的糖基化已被显示对其效应子功能、结构稳定性和从抗体产生细胞的分泌具有显著影响。负责这些特性的碳水化合物基团一般附接到抗体的恒定 (C) 区。例如, IgG在C_H2结构域中的天冬酰胺297处的糖基化对IgG活化补体依赖性细胞裂解的经典途径的全部能力是必需的 (Tao和Morrison, *J Immunol* 143:2595(1989))。IgM在C_H3结构域中的天冬酰胺402处的糖基化对抗体的正确组装和细胞裂解活性是必需的 (Muraoka和Shulman, *J Immunol* 142:695(1989))。对IgA抗体的C_H1和C_H3结构域中如位置162和419的糖基化位点的去除导致细胞内降解和对分泌的至少90%的抑制 (Taylor和Wall, *Mol Cell Biol* 8:4197(1988))。另外,在一些实施方案中,产生或表达抗体及其抗原结合片段使得它们在其复合N-糖苷连接的糖链上不含岩藻糖。已知从复合N-糖苷连接的糖链中去除岩藻糖会增加抗体和抗原结合片段的效应子功能,包括但不限于,抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒性 (CDC)。在一些实施方案中,这些“去岩藻糖基化”抗体和抗原结合片段通过利用本领域已知的分子克隆技术的各种系统产生,包括但不限于,已经基因工程化使其不再含有将岩藻糖纳入复合N-糖苷连接糖链中所必需的酶和生物化学途径的转基因动物、转基因植物或细胞系 (也称为岩藻糖基转移酶敲除动物、植物或细胞)。被工程化为岩藻糖基转移酶敲除细胞的细胞的非限制性实例包括CHO细胞、SP2/0细胞、NS0细胞和YB2/0细胞。

[0316] 也已经观察到免疫球蛋白在可变 (V) 区中的糖基化。Sox和Hood报道,约20%的人类抗体在V区被糖基化 (*Proc Natl Acad Sci USA* 66:975(1970))。V结构域的糖基化被认为是由V区序列中N连接的糖基化信号Asn-Xaa-Ser/Thr的偶然出现引起,并且在本领域中尚未被认为在免疫球蛋白功能中起作用。

[0317] 在一些情况下,可变结构域框架残基处的糖基化改变抗体与抗原的结合相互作用。本公开内容包括选择人源化免疫球蛋白链的框架或CDR中有限数量的氨基酸进行突变 (例如,通过残基的取代、缺失或添加) 以增加抗体亲和力的标准。

[0318] 在一些实施方案中,在抗体的Fc区或含Fc的多肽中去除或引入半胱氨酸残基,从而消除或增加该区域中的链间二硫键形成。在一些实施方案中,使用这样的方法产生的同源二聚体特异性结合剂或抗体表现出改进的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。

[0319] 已经显示,CDR内的序列引起抗体与MHC II类结合并在一些情况下触发不需要的辅助T细胞应答。在一些实施方案中,保守取代允许抗体保留结合活性但减少其触发不需要的T细胞应答的能力。在一种实施方案中,去除重链或轻链的N末端的20个氨基酸中的一个或多个。

[0320] 在一些实施方案中,产生具有改变的碳水化合物结构的抗体分子,导致改变的效应子活性,包括表现出改进的ADCC活性的岩藻糖基化不存在或减少的抗体分子。本领域已知各种方法以完成这一点。例如,ADCC效应子活性是通过抗体分子与Fc γ RI II受体的结合介导的,这已被显示依赖于C_H2结构域的Asn-297处的N-连接糖基化的碳水化合物结构。与

天然岩藻糖基化抗体相比,非岩藻糖基化抗体以增加的亲和力结合Fc γ RIII受体并更有效地触发Fc γ RIII介导的效应子功能。一些宿主细胞株,例如Lec13或大鼠杂交瘤YB2/0细胞系天然产生具有较低岩藻糖基化水平的抗体。二等分碳水化合物(bisected carbohydrate)的水平增加(例如通过在过表达GnTIII酶的细胞中重组产生抗体)也已被确定增加ADCC活性。在一些实施方案中,两个岩藻糖残基中仅一个不存在足以增加ADCC活性。

[0321] 抗体的共价修饰也包括在本文中。在一些实施方案中,如果可适用,则抗体的共价修饰通过化学合成或通过对抗体的酶促裂解或化学裂解来进行。在一些实施方案中,其他类型的共价修饰通过使靶向的氨基酸残基与能够与所选侧链或N末端或C末端残基反应的有机衍生剂反应来引入。

[0322] 半胱氨酰残基最常与 α -卤代乙酸酯(和相应的胺)(诸如氯乙酸或氯乙酰胺)反应以生成羧甲基或羧酰胺甲基衍生物。半胱氨酰残基也通过与以下反应来衍生化:溴三氟丙酮、 α -溴- β -(5-咪唑基(imidazolyl))丙酸、氯乙酰磷酸酯、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基2-吡啶基二硫化物、对氯汞苯甲酸酯、2-氯汞-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑。

[0323] 在一些实施方案中,组氨酰残基通过在pH 5.5-7.0与焦碳酸二乙酯反应来衍生化,因为该剂对组氨酰侧链是相对特异性的。在一些实施方案中,对溴苯甲酰基溴也是可用的;在一些实施方案中,反应在pH 6.0在0.1M二甲基砷酸钠中进行。

[0324] 在一些实施方案中,赖氨酰和氨基末端残基与琥珀酸酐或其他羧酸酐反应。用这些剂来衍生化具有逆转赖氨酰残基的电荷的作用。用于使含 α -氨基的残基衍生化的其他合适的试剂包括亚氨酸酯类,诸如甲基吡啶亚胺酸酯、磷酸吡哆醛、吡哆醛、氯硼氢化物、三硝基苯磺酸、O-甲基异脲、2,4-戊二酮和转氨酶催化的与乙醛酸的反应。

[0325] 在一些实施方案中,精酰残基通过与一种或数种常规试剂(诸如苯基乙二醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和茚三酮)反应来修饰。由于胍官能团的高pKa,因此精氨酸残基的衍生化要求反应在碱性条件下进行。此外,在一些实施方案中,这些试剂与赖氨酸基团以及精氨酸 ϵ -氨基基团反应。

[0326] 在一些实施方案中,由于对将光谱标记引入到酪氨酰残基的特别的兴趣,通过与芳族重氮鎓化合物或四硝基甲烷反应对酪氨酰残基进行特异性修饰。在一些实施方案中,最常见的是,N-乙酰咪唑和四硝基甲烷分别用于形成O-乙酰基酪氨酰物质和3-硝基衍生物。使用 ^{125}I 或 ^{131}I 碘化酪氨酰残基来制备用于放射免疫测定的标记蛋白。

[0327] 羧基侧基(天冬氨酰或谷氨酰)通过与碳二亚胺($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$)反应进行特定修饰,其中R和R'是不同的烷基(alkyl)基团,碳二亚胺例如1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳二亚胺或1-乙基-3-(4-氮阳离子-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。此外,天冬氨酰残基和谷氨酰残基通过与铵离子反应转化为天冬酰胺酰残基和谷氨酰胺酰残基。

[0328] 在一些实施方案中,谷氨酰胺酰残基和天冬酰胺酰残基分别脱酰胺化为相应的谷氨酰残基和天冬氨酰残基。这些残基在中性或碱性条件下脱酰胺。

[0329] 其他修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酰残基或苏氨酰残基的羟基基团的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基基团的甲基化、N末端胺的乙酰化以及任何C末端羧基基团的酰胺化。

[0330] 另一种类型的共价修饰包括将糖苷化学或酶促偶联到特定结合剂或抗体。这些程序不需要在具有进行N连接或O连接糖基化的糖基化能力的宿主细胞中产生多肽或抗体。在一些实施方案中,取决于所使用的偶联模式,将糖附接至(a)精氨酸和组氨酸,(b)游离羧基基团,(c)游离巯基基团诸如半胱氨酸的那些,(d)游离羟基基团诸如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的那些,(e)芳族残基诸如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些,或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。

[0331] 在一些实施方案中,存在于多肽或抗体上的任何碳水化合物部分的去除被化学或酶促地完成。化学去糖基化包括将抗体暴露于化合物三氟甲磺酸或等效化合物。这种处理导致除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)之外的大部分或所有糖类的裂解,同时保持抗体完整。在一些实施方案中,抗体上碳水化合物部分的酶促裂解通过使用各种内切和外切糖苷酶来实现。

[0332] 另一种类型的共价修饰包括将抗体与各种非蛋白性聚合物中的一种连接,例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、聚氧乙烯化山梨醇、聚氧乙烯化葡萄糖、聚氧乙烯化甘油、聚氧化烯或多糖聚合物诸如葡聚糖。这样的方法是本领域已知的。

[0333] 结合预定多肽抗原的亲和力一般通过将一个或多个突变引入V区框架中(通常在与一个或多个CDR相邻的区域中和/或在一个或多个框架区中)来调节。通常,这样的突变包括引入破坏糖基化位点序列或产生糖基化位点序列但基本上不影响多肽的亲水/疏水(hydrophobic)结构特性的保守氨基酸取代。通常,避免引入脯氨酸残基的突变。

[0334] 效应子功能

[0335] 抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性、Fc受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调和B细胞活化。通常,Fc介导的功能涉及抗体的Fc部分与特定受体分子“Fc受体”或“FcR”的结合,这些受体分子由细胞功能待受到影响的细胞表达。

[0336] IgG被认为是最多功能的免疫球蛋白,因为它在一些实施方案中执行免疫球蛋白分子的所有功能。IgG是血清中的主要Ig,并且也是唯一一类穿过胎盘的Ig。IgG也固定补体,尽管IgG4亚类并不固定补体。巨噬细胞、单核细胞、多形核白细胞(PMN)和一些淋巴细胞具有针对IgG的Fc区的受体。并非所有的亚类都同样好地结合:IgG2和IgG4不与Fc受体结合。与PMN、单核细胞和巨噬细胞上的Fc受体结合的结果是,在一些情况下,细胞现在可以更好地内化抗原。IgG是增强吞噬作用的调理素。IgG与其他类型的细胞上的Fc受体的结合导致其他功能的活化。

[0337] 在某些实施方案中,FcR是天然序列人类FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体的FcR(gamma(“ γ ”)受体),并且包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化性受体”)和Fc γ RIIB(“抑制性受体”),它们具有相似的氨基酸序列,主要区别在于其细胞质结构域。活化性受体Fc γ RIIA在其细胞质域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制性受体Fc γ RIIB在其细胞质域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。

[0338] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指一种细胞毒性形式,其中分泌的Ig与某些细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的Fc受体(FcR)结合,使得这些细胞毒性效应细胞能够与携带抗原的靶细胞特异性结合,并随后以

细胞毒素杀伤靶细胞。抗体“武装”细胞毒性细胞,并且是这样的杀伤所需的。介导ADCC的主要细胞中,NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。为了评估感兴趣分子的ADCC活性,在一些实施方案中进行体外ADCC测定。可用于这样的测定的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。

[0339] 可选或另外地,在一些实施方案中,感兴趣分子的ADCC活性在体内,例如,在动物模型中评估。

[0340] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体与M2样巨噬细胞的表面膜蛋白结合并被M2样巨噬细胞内化。这种内化过程被认为参与观察到的这些细胞的功能性免疫抑制特征的改变,即细胞从M2状态分化为微弱的活化状态(subtly activated state),而不杀伤它们或抑制它们的增殖。在一些实施方案中,在内化后,抗体降低免疫抑制性可溶性因子的表达,同时使刺激或促进T细胞(包括CD4⁺辅助性T细胞和细胞毒性淋巴细胞)活性或增殖的可溶性因子的表达增加。

[0341] 对于某些治疗性应用,采用内化过程用于杀伤表达CD163蛋白的靶细胞或降低表达CD163蛋白的靶细胞的活性或增殖的目的。内化的抗体分子的数量将足以或足够杀伤细胞或抑制其生长,尤其是癌细胞。取决于抗体或抗体缀合物的效力,在一些情况下,单个抗体分子被摄取到细胞中足以杀伤抗体结合的靶细胞。例如,某些毒素具有高效的杀伤力,使得与抗体缀合的毒素的一个分子的内化就足以杀伤靶细胞。

[0342] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或抗原结合片段与治疗部分、成像或可检测部分或亲和标签缀合或连接。用于缀合或连接多肽的方法是本领域熟知的。化合物和标记之间的缔合(结合)包括本领域已知的任何方式,包括但不限于,共价和非共价相互作用、化学缀合以及重组技术。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段被缀合至亲和标签(例如,纯化标签)或被重组工程化为具有亲和标签(例如,纯化标签)。亲和标签,诸如,例如聚组氨酸(例如,His6)标签是本领域中常规的。

[0343] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段还包含可检测部分。检测,例如,在体外、在体内或者离体完成。使用抗体或其抗原结合片段用于,例如,由巨噬细胞表达的huCD163蛋白的检测和/或确定(定量、定性等)的体外测定包括但不限于,例如,ELISA、RIA和蛋白印迹。在一些实施方案中,抗体的抗原的体外检测、诊断或监测通过从受试者获得样品(例如,血液样品)并在例如标准ELISA测定中测试该样品而发生。

[0344] 在某些实施方案中,本文还公开了包含如本文公开的抗体和载体的组合物。

[0345] 药物组合物

[0346] 在某些实施方案中,本文公开了包含本文公开的抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0347] 这样的组合物可用于体外或体内分析,或者在药物组合物的情况下,用于体内或离体施用至受试者以用所公开的抗体治疗受试者。

[0348] 在一些实施方案中,赋形剂是本领域技术人员已知的载体、缓冲剂、稳定剂或其他合适的物质。这样的物质应是无毒性的并且不应干扰活性成分的功效。载体或其他物质的确切性质将取决于施用途径。

[0349] 在一些实施方案中,包含通过本文所述方法鉴定的抗体或抗原结合片段的药物制剂通过将具有期望纯度的蛋白与任选的生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合,以

冻干制剂或水溶液的形式制备用于储存(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol, A. Ed. (1980))。可接受的载体或稳定剂是在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒性的那些,并且包括:缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵,苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯基吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;盐形成抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如**TWEEN®**、**PLURONICS®**或聚乙二醇(PEG)。在某些实施方案中,药物组合物包含5mg/mL-200mg/mL之间的浓度的抗体;优选在10mg/mL-100mg/mL之间。

[0350] 可接受的载体对施用的受试者是生理学上可接受的,并保留与其一起施用/在其中施用的化合物的治疗特性。可接受的载体及其制剂一般描述于例如以下中:Remington's Pharmaceutical Sciences,同上。一种示例性载体是生理盐水。如本文使用的措辞“药学上可接受的载体”意指药学上可接受的物质、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料,参与将主题化合物从身体的一个器官或一部分的施用部位向身体的另一个器官或一部分运载或运输或在体外测定系统中运载或运输。在与制剂的其他成分相容并且对施用至的受试者无损伤的意义上,每种载体是“可接受的”。可接受的载体也不应改变主题化合物的具体活性。

[0351] 在另一种实施方案中,本文公开的药物组合物还包含可接受的添加剂,以改进组合物中化合物的稳定性和/或控制组合物的释放速率。可接受的添加剂不改变主题化合物的比活性。示例性的可接受的添加剂包括但不限于,糖,诸如甘露醇、山梨醇、葡萄糖、木糖醇、海藻糖、山梨糖、蔗糖、半乳糖、葡聚糖、右旋糖、果糖、乳糖及其混合物。在一些实施方案中,可接受的添加剂与可接受的载体和/或赋形剂诸如右旋糖组合。可选地,示例性的可接受的添加剂包括但不限于,表面活性剂,诸如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80,以增加肽的稳定性并减少溶液的胶凝。在一些实施方案中,表面活性剂以溶液的0.01%至5%的量添加到组合物中。这样的可接受的添加剂的添加增加组合物在储存中的稳定性和半衰期。

[0352] 在一种实施方案中,本文公开的药物组合物含有等渗缓冲剂诸如磷酸盐、乙酸盐或TRIS缓冲液,与张力剂诸如多元醇、山梨醇、蔗糖或氯化钠组合,其增加张度并进行稳定化。在一种实施方案中,张度剂以约5%的量存在于组合物中。

[0353] 在另一种实施方案中,本文公开的药物组合物包含0.01%至0.02%wt/vol的表面活性剂,以便防止聚集并用于稳定化。

[0354] 在另一种实施方案中,本文公开的药物组合物的pH范围为4.5-6.5或4.5-5.5。

[0355] 在一些实施方案中,本文公开的药物组合物也含有被治疗的适应症所必需的多于一种活性化合物,诸如不会相互产生不利影响的具有互补活性的那些。例如,治疗方法还提供免疫抑制剂。这样的分子以对所意图的目的有效的量合适地组合存在。

[0356] 在一些实施方案中,将活性成分包埋在例如通过凝聚(coacervation)技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如分别包埋在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,包埋在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗滴乳液(macroemulsions)中。这样的技术公开于以下中:Remington's Pharmaceutical Sciences,同上。

[0357] 本文还设想了抗体的悬浮液和晶体形式;制备悬浮液和晶形的方法是本领域技术人员已知的。

[0358] 在一些实施方案中,本文公开的药物组合物是无菌的。在一些实施方案中,本文公开的药物组合物通过常规、熟知的灭菌技术进行灭菌。例如,灭菌由通过无菌过滤膜过滤容易地完成。在一些实施方案中,将所得溶液包装用于使用或在无菌条件下过滤并冻干,在施用前将冻干制剂与无菌溶液组合。

[0359] 在一些实施方案中,采用冷冻干燥以稳定多肽用于长期储存,诸如当多肽在液体组合物中相对不稳定时。

[0360] 在一些实施方案中,一些赋形剂,诸如,例如多元醇(包括甘露醇、山梨醇和甘油);糖(包括葡萄糖和蔗糖);和氨基酸(包括丙氨酸、甘氨酸和谷氨酸),作为冷冻干燥产品的稳定剂。在一些实施方案中,多元醇和糖也用于保护多肽免受冷冻和干燥诱导的损伤,并增强在干燥状态下储存期间的稳定性。在一些实施方案中,糖在冷冻干燥过程和储存期间都是有效的。其他类别的分子,包括单糖和二糖以及聚合物诸如PVP,也已被报道为冻干产品的稳定剂。

[0361] 对于注射,在一些实施方案中,本文公开的药物组合物是适于与以上描述的适当溶液重构的粉末。这些的实例包括但不限于,冷冻干燥粉末、旋转干燥粉末或喷雾干燥粉末、无定形粉末、颗粒、沉淀物或微粒。对于注射,组合物任选地含有稳定剂、pH调节剂、表面活性剂、生物可利用度调节剂和这些的组合。

[0362] 在一些实施方案中制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适的实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,其中基质呈成型物品的形式,例如,膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(甲基丙烯酸-2-羟乙酯)或聚(乙烯醇))、聚丙烯交酯(参见,例如,美国专利第3,773,919号)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如Lupron Depot.TM.(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙立德组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。聚合物诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸使得使分子释放能够超过100天,而某些水凝胶使蛋白释放较短的时间段。在一些实施方案中,虽然包封的抗体在体内长时间保留,但它们由于暴露于37°C的水分而变性或聚集,导致生物活性的损失和免疫原性的可能变化。在一些情况下,为稳定化设计的合理策略取决于所涉及的机制。例如,如果发现聚集机制是通过硫代-二硫化物交换形成分子间S-S键,则在一些情况下通过修饰巯基残基、由酸性溶液冻干、控制水分含量、使用适当的添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0363] 在一些实施方案中,将本文公开的药物组合物设计为如本文描述的短效、快速释放、长效或持续释放。在一种实施方案中,将本文公开的药物组合物配制用于受控释放或用于缓慢释放。

[0364] 药物组合物,例如,通过注射施用,包括但不限于,皮下、玻璃体内、皮内、静脉内、动脉内、腹膜内、脑脊内或肌内注射。本文设想了用于配制用于每种注射类型的组合物的赋形剂和载体。以下描述仅是实例性的,并不意在限制组合物的范围。用于注射的组合物包括

但不限于,水溶液(在水溶性的情况下)或分散体以及用于临时制备无菌的可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J.) 或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在一些实施方案中,载体是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。维持流动性,例如,通过使用包衣诸如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持要求的粒径,以及通过使用表面活性剂。抗菌剂和抗真菌剂包括,例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸和硫柳汞。在一些实施方案中,组合物中包含等渗剂,例如,糖、多元醇诸如甘露醇、山梨醇和氯化钠。在一些实施方案中,将所得的溶液包装用于原样使用或冻干;一些实施方案中,冻干的制品以后在施用前在与无菌溶液组合。对于静脉内注射或在患病部位注射,活性成分将是不含热原且具有合适的pH、等渗性和稳定性的肠胃外可接受的水性溶液形式。本领域技术人员能够很好地使用,例如,等渗媒介物诸如氯化钠注射液、林格氏注射液或乳酸林格氏注射液制备合适的溶液。在一些实施方案中,按需要包含防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。在一些实施方案中,无菌可注射溶液通过以下来制备:将所需量的活性成分根据与上文列举的成分中的一种或组合一起掺入适当的溶剂中,然后过滤灭菌。通常,通过将活性成分掺入到包含基础分散介质和来自上文列举的那些的所需的其他成分的无菌媒介物中来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分加上来自其先前无菌过滤的溶液的任何另外的所需成分的粉末。

[0365] 在一些实施方案中,组合物常规地静脉内施用,例如,诸如通过注射单位剂量。对于注射,在一些实施方案中,活性成分是基本上不含热原且具有合适的pH、等渗性和稳定性的肠胃外可接受的水性溶液形式。在一些实施方案中,人们使用例如等渗媒介物(诸如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液)制备合适的溶液。在一些实施方案中,按需要包含防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。另外,在一些实施方案中组合物经由气溶胶化施用。(Lahn等人, *Int Arch Allergy Immunol* 134:49-55 (2004))。

[0366] 对于肠胃外施用,将抗体连同药学上可接受的肠胃外媒介物配制成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。这样的媒介物的实例是水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5%人类血清白蛋白。也使用非水性媒介物诸如非挥发性油和油酸乙酯。脂质体用作载体。媒介物含有少量添加剂,诸如增强等渗性和化学稳定性的物质,例如缓冲剂和防腐剂。抗体通常以约1mg/mL至10mg/mL的浓度配制在这样的媒介物中。

[0367] 在一种实施方案中,将本文公开的药物组合物冻干,例如,以增加储存中的保质期。当考虑将组合物用于本文提供的药物或任何方法时,在一些实施方案中,设想组合物基本上不含热原,使得组合物在施用至人类受试者时不会引起炎症反应或不安全的过敏反应。测试组合物的热原和制备基本上不含热原的组合物是本领域普通技术人员熟知的,并且在一些实施方案中使用可商购的试剂盒完成。

[0368] 在一些实施方案中,可接受的载体含有稳定、增加或延迟吸收或清除的化合物。这样的化合物包括,例如,碳水化合物,诸如葡萄糖、蔗糖或葡聚糖;低分子量蛋白;减少肽的清除或水解的组合物;或赋形剂或其他稳定剂和/或缓冲剂。延迟吸收的剂包括,例如,单硬脂酸铝和明胶。在一些实施方案中,去污剂也用于稳定或增加或降低药物组合物包括脂质体载体的吸收。为了防止消化,在一些实施方案中,将化合物与组合物复合,使其对酸水解

和酶促水解具有抗性,或者在一些实施方案中,化合物复合在适当的抗性载体诸如脂质体中。保护化合物免于消化的方法是本领域已知的。

[0369] 在一些实施方案中,组合物以与剂量制剂相容的方式并以治疗有效量施用。待施用的量取决于待治疗的受试者、受试者的免疫系统利用活性成分的能力以及期望的结合能力的程度。待施用的需要的活性成分的精确量取决于专业人员的判断并且对每个个体是独特的。初始施用和加强注射的合适方案也是可变的,但以初始施用随后通过后续注射或其他施用以一个或多个小时的间隔重复给药为典型。可选地,设想了足以在血液中维持浓度的连续静脉内输注。

[0370] 在一些实施方案中,本公开内容提供了本文描述的组合物制备用于治疗本文描述的状况、疾病或紊乱的药物的用途。在一些实施方案中,药物基于需要治疗的受试者的身体特征配制,并且基于状况、疾病或紊乱的阶段配制为单一或多于一种制剂。在一些实施方案中,药物被包装在具有适当标签的合适的包装中用于向医院和诊所分配,其中标签用于指示治疗患有本文描述的疾病的受试者。在一些实施方案中,药物被包装为单一或多于一种单位。在一些实施方案中,组合物的剂量和施用的说明书与包装一起如以下描述地被包含。本公开内容还涉及包含本文描述的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体的药物。

[0371] 在一些实施方案中,组合物(本文描述的抗体或抗原结合片段)根据待治疗的状况单独施用或与第二组合物组合同时或顺序施用。在一种实施方案中,第二治疗性治疗是抗癌疗法或抗癌治疗性的。当施用两种或更多种组合物时,组合物,例如,以组合(顺序或同时)施用。在一些实施方案中,组合物以单剂量或多于一次剂量施用。

[0372] 在一些实施方案中,当配制用于向人类受试者施用时,组合物被配制为不含热原。测试组合物的热原和制备不含热原的药物组合物是本领域普通技术人员熟知的。

[0373] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段被配制用于向受试者以任何合适的途径施用,包括但不限于注射。注射包括,例如,皮下、腹膜、静脉内注射、肌肉注射或脊髓注射到脑脊液(CSF)中。在一些实施方案中,在一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个或更多个注射部位施用。在一种实施方式中,经由六个注射部位施用。

[0374] 对于体内应用,接触例如经由以任何合适的方式向受试者施用组合物(诸如本文描述的)发生。在一些实施方案中,本文描述的抗体通过任何合适的方式全身或局部施用,包括经由肠胃外、皮下、腹膜内、脑脊内、肺内和鼻内施用,并且如果期望局部治疗,则病灶内施用。肠胃外途径包括,例如,静脉内、动脉内、腹膜内、硬膜外、肌肉和鞘内施用。在一些实施方案中,这样的施用是如推注(bolus)、连续输注或脉冲输注。在一些实施方案中,部分地取决于施用是短暂的还是长期的,组合物通过注射被施用。也设想施用方法的其他方式,包括表面施用,特别是经皮、经粘膜、直肠、口服或局部施用,例如,通过放置在期望部位附近的导管。

[0375] 治疗和使用方法

[0376] 在某些实施方案中,本文公开了治疗有相应需要的个体的癌症的方法,该方法包括向个体施用本文公开的抗体。在一些实施方案中,本公开内容提供了如本文描述的抗体用于制备用于治疗人类受试者的癌症的药物的用途。在一些实施方案中,抗体与人类肿瘤相关巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合并减少巨噬细胞对CD16、CD64、TLR2或Siglec-15中至少一种的表达。

[0377] 在某些实施方案中,本文公开了调节有相应需要的受试者中的免疫活性的方法,该方法包括向所述受试者施用本文描述的抗体。在一些实施方案中,抗体与人类肿瘤相关巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合并减少巨噬细胞对CD16、CD64、TLR2或Siglec-15中至少一种的表达。

[0378] 在某些实施方案中,本文公开了治疗有病理性或不当升高的M2巨噬细胞水平(例如,相对于可用于促进受试者中免疫介导的肿瘤细胞杀伤的水平的不适当升高)的受试者的方法,该方法包括向所述受试者施用本文描述的抗体。在一些实施方案中,抗体与人类肿瘤相关巨噬细胞上表达的CD163蛋白特异性结合并减少巨噬细胞对CD16、CD64、TLR2或Siglec-15中至少一种的表达。

[0379] 在一些实施方案中,抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的轻链CDR1,具有与SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的轻链CDR2,和具有与SEQ ID NO:3列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的轻链CDR3。在一些实施方案中,抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR1,具有与SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR2,和具有与SEQ ID NO:3列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR3。在一些实施方案中,抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1,具有与SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2,和具有与SEQ ID NO:3列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0380] 在一些实施方案中,抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:4列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的重链CDR1,具有与SEQ ID NO:5列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的重链CDR2,具有与SEQ ID NO:6列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:4列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR1,具有与SEQ ID NO:5列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR2,具有与SEQ ID NO:6列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:4列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR1,具有与SEQ ID NO:5列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR2,具有与SEQ ID NO:6列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR3。

[0381] 在一些实施方案中,抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的轻链CDR1,具有与SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列

至少约70%相同的氨基酸序列的轻链CDR2,具有与SEQ ID NO:3列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的轻链CDR3,具有与SEQ ID NO:4列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的重链CDR1,具有与SEQ ID NO:5列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的重链CDR2,和具有与SEQ ID NO:6列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR1,具有与SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR2,具有与SEQ ID NO:3列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR3,具有与SEQ ID NO:4列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR1,具有与SEQ ID NO:5列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR2,和具有与SEQ ID NO:6列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,抗体包含以下中的至少一个:具有与SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1,具有与SEQ ID NO:2列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2,具有与SEQ ID NO:3列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3,具有与SEQ ID NO:4列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR1,具有与SEQ ID NO:5列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR2,和具有与SEQ ID NO:6列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR3。

[0382] 在一些实施方案中,抗体包含轻链可变结构域(VL),轻链可变结构域(VL)具有与SEQ ID NO:7列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL具有与SEQ ID NO:7列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL具有与SEQ ID NO:7列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0383] 在一些实施方案中,抗体包含重链可变结构域(VH),重链可变结构域(VH)具有与SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH具有与SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH具有与SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0384] 在一些实施方案中,抗体包含轻链可变结构域(VL)和重链可变结构域(VH),轻链可变结构域(VL)具有与SEQ ID NO:7列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链可变结构域(VH)具有与SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。

在一些实施方案中,VL具有与SEQ ID NO:7列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且VH具有与SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,VL具有与SEQ ID NO:7列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且VH具有与SEQ ID NO:8列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0385] 在一些实施方案中,抗体包含轻链,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0386] 在一些实施方案中,抗体包含重链,重链具有与SEQ ID NO:10列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:10列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:10列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0387] 在一些实施方案中,抗体包含重链,重链具有与SEQ ID NO:11列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:11列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:11列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0388] 在一些实施方案中,抗体包含重链,重链具有与SEQ ID NO:12列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:12列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:12列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0389] 在一些实施方案中,抗体包含重链,重链具有与SEQ ID NO:13列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:13列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:13列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0390] 在一些实施方案中,抗体包含轻链和重链,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链具有与SEQ ID NO:10列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:10列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一

些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:10列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0391] 在一些实施方案中,抗体包含轻链和重链,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链具有与SEQ ID NO:11列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:11列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:11列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0392] 在一些实施方案中,抗体包含轻链和重链,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链具有与SEQ ID NO:12列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:12列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:12列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0393] 在一些实施方案中,抗体包含轻链和重链,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链具有与SEQ ID NO:13列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:13列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:9列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:13列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0394] 在一些实施方案中,抗体包含轻链,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0395] 在一些实施方案中,抗体包含重链,重链具有与SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0396] 在一些实施方案中,抗体包含重链,重链具有与SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链具有与SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0397] 还在一些实施方案中,抗体包含轻链和重链,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链具有与SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:15列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0398] 在一些实施方案中,抗体包含轻链和重链,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列,重链具有与SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列至少约70%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,并且重链具有与SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链具有与SEQ ID NO:14列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列,并且具有重链与SEQ ID NO:16列出的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0399] 在一些实施方案中,本公开内容提供了如本文描述的抗体用于制备减少患有癌症的人类受试者中的肿瘤相关巨噬细胞的免疫抑制的药物的用途。

[0400] 在一些实施方案中,本公开内容提供了如本文描述的抗体用于制备促进患有癌症的人类受试者中的T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的药物的用途。

[0401] 在一些实施方案中,本公开内容提供了治疗患有癌症的人类受试者的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文描述的抗体,由此减少受试者中的肿瘤相关巨噬细胞的免疫抑制。

[0402] 在一些实施方案中,本公开内容提供了治疗患有癌症的人类受试者的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文描述的抗体,由此增加受试者中的T细胞介导的肿瘤细胞杀伤。

[0403] 在某些实施方案中,本文公开了功能性重新定向肿瘤相关巨噬细胞以减少患有癌症的患者中的免疫抑制的方法,该方法包括向患者施用一定量的包含本文描述的抗体的药物组合物,其对改进肿瘤微环境中的CD4⁺或CD8⁺T细胞活性或增殖是有效的。

[0404] 在某些实施方案中,本文公开了促进有相应需要的人类受试者中的淋巴细胞介导的肿瘤细胞杀伤的方法,该方法包括向受试者施用有效量的包含如本文描述的抗体的药物组合物。

[0405] 在某些实施方案中,本文公开了调节肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞活性的方法,该方法包括使肿瘤相关巨噬细胞与本文公开的抗体接触,其中该方法导致以下作用中的至少一种:

[0406] (a) 人类巨噬细胞对至少一种标志物的表达减少,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;

[0407] (b) 抗体被人类巨噬细胞内化;

[0408] (c) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;

[0409] (d) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;和

[0410] (e) 促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。

[0411] 在某些实施方案中,本文公开了调节肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞活性的方法,该方法包括使肿瘤相关巨噬细胞与本文公开的抗体接触,其中该方法导致以下作用中的至少两种:

[0412] (a) 人类巨噬细胞对至少一种标志物的表达减少,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;

[0413] (b) 抗体被人类巨噬细胞内化;

[0414] (c) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;

[0415] (d) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;和

[0416] (e) 促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。

[0417] 在某些实施方案中,本文公开了调节肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞活性的方法,该方法包括使肿瘤相关巨噬细胞与本文公开的抗体接触,其中该方法导致以下作用中的至少三种:

[0418] (a) 人类巨噬细胞对至少一种标志物的表达减少,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;

[0419] (b) 抗体被人类巨噬细胞内化;

[0420] (c) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;

[0421] (d) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;和

[0422] (e) 促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。

[0423] 在某些实施方案中,本文公开了调节肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞活性的方法,该方法包括使肿瘤相关巨噬细胞与本文公开的抗体接触,其中该方法导致以下作用中的至少四种:

[0424] (a) 人类巨噬细胞对至少一种标志物的表达减少,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;

[0425] (b) 抗体被人类巨噬细胞内化;

[0426] (c) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;

[0427] (d) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;和

[0428] (e) 促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。

[0429] 在某些实施方案中,本文公开了调节肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞活性的方法,该方法包括使肿瘤相关巨噬细胞与本文公开的抗体接触,其中该方法导致以下作用中的至少五种:

[0430] (a) 人类巨噬细胞对至少一种标志物的表达减少,其中至少一种标志物是CD16、CD64、TLR2或Siglec-15;

[0431] (b) 抗体被人类巨噬细胞内化;

[0432] (c) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的活化;

[0433] (d) CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、NK细胞或其任何组合的增殖;和

[0434] (e) 促进肿瘤微环境中的肿瘤细胞杀伤。

[0435] 在一些实施方案中,本文公开的方法减少骨髓细胞对CD8⁺T细胞活化和增殖的抑制。

[0436] M2向M1巨噬细胞极化是指藉以改变本公开内容的M2或M2样巨噬细胞使得所得的巨噬细胞具有与M1或M1样巨噬细胞相关的某些功能或表型属性的过程。在一些实施方案中,当M2或M2样巨噬细胞不再表达CD163时它被极化。

[0437] 在一些实施方案中,抗体减少骨髓细胞对CD19-CD3 BiTE介导的CD8⁺T细胞的Raji细胞杀伤的抑制。

[0438] 在一些实施方案中,抗体减少骨髓细胞对CAR⁺T细胞介导的癌细胞杀伤的抑制。

[0439] 在一些实施方案中,抗体减少骨髓细胞对NK细胞介导的通过ADCC的癌细胞杀伤的抑制。

[0440] 在一些情况下,本文公开的任何方法还包括向所述受试者施用另外的抗癌疗法。抗癌疗法包括但不限于手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法和细胞因子疗法及其组合。在一种实施方案中,抗体或其抗原结合片段和抗癌疗法同时或顺序地施用。

[0441] 在一些实施方案中,另外的抗癌疗法是免疫疗法。在一些实施方案中,免疫疗法是包含检查点抑制剂的组合物。在一些实施方案中,另外的抗癌疗法是免疫检查点抑制剂。

[0442] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于在被怀疑包含表达huCD163的巨噬细胞的细胞样品中鉴定表达huCD163的巨噬细胞的体外或离体方法,该方法包括使细胞样品与本文描述的抗体接触并测量与样品中的细胞的结合,阳性信号指示样品中存在表达huCD163的巨噬细胞。

[0443] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于鉴定细胞样品中的人类M2c巨噬细胞的方法,该方法包括使包含被怀疑包含人类M2c巨噬细胞的血细胞的细胞样品与如本文描述的抗体接触并测量与样品中的细胞的结合,阳性信号指示样品中存在人类M2c巨噬细胞。在一些实施方案中,细胞样品包括从人类受试者获得的细胞。在一些实施方案中,细胞样品包括培养的细胞。在一些实施方案中,用于检测样品中M2细胞的方法包括使用抗体或片段,该抗体或片段在结合时不被细胞内化,但保持与细胞外部结合以有助于检测。

[0444] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于鉴定细胞样品中表达huCD163的癌细胞的方法,该方法包括使包含被怀疑包含表达huCD163的癌细胞的细胞的细胞样品与本文描述的抗体接触并测量与样品中的细胞的结合,阳性信号指示样品中存在表达huCD163的癌细胞。在一些实施方案中,细胞样品包括从人类受试者获得的细胞。在一些实施方案中,细胞样品包括培养的细胞。

[0445] 在一些实施方案中,本公开内容提供了调节M2c巨噬细胞上细胞表面标志物表达的方法。在一些实施方案中,CD16 (Fc γ RIIa)、CD64 (Fc γ RI)、Siglec-15和TLR2中的至少

一种的表达降低。在一些实施方案中,CD16、CD64、Siglec-15和TLR2的表达降低。

[0446] 在一些实施方案中,本公开内容提供了减少骨髓细胞对T细胞活化的抑制的方法。在一些实施方案中,该方法诱导T细胞的增加的IL-2产生。在一些实施方案中,本公开内容提供了用于增加Th1细胞增殖的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供了用于增加增殖T细胞中Th1细胞比例的方法。在这些方面的每一个中,该方法包括在体内施用如本文描述的抗体,或在体外或离体使抗体与复合免疫细胞系统接触,其中巨噬细胞和效应T细胞以及任选的肿瘤靶细胞被允许以重演或模拟体内相互作用的方式相互作用。

[0447] 在一些实施方案中,本公开内容提供了减少骨髓细胞对T细胞增殖的抑制的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供了用于增加CD4⁺细胞增殖或CD8⁺T细胞增殖或两者的方法。

[0448] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于增加有相应需要的患者中T细胞对CD69、ICOS、OX40、PD-1、LAG3和CTLA4中的至少一种的表达的方法。在一些实施方案中,该方法增加CD4⁺T细胞对CD69、ICOS、OX40、PD-1、LAG3和CTLA4中的至少一种的表达。在一些实施方案中,该方法增加CD8⁺T细胞对ICOS、OX40、PD-1、LAG3和CTLA4中的至少一种的表达。

[0449] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于增加癌细胞杀伤的方法。在一些实施方案中,细胞毒性淋巴细胞(CTL)对癌细胞的杀伤增加。在一些实施方案中,T细胞介导的对MHC错配癌细胞的杀伤增加。

[0450] 在一些实施方案中,本公开内容提供了用于使骨髓细胞与本文描述的抗体接触以减少巨噬细胞介导的对CD8⁺T细胞活化或CD8⁺T细胞增殖的抑制的方法。在一些实施方案中,抗体与包含M0巨噬细胞的骨髓细胞接触。在一些实施方案中,抗体与包含M2巨噬细胞的骨髓细胞接触。在一些实施方案中,抗体与包含M0和M2巨噬细胞的骨髓细胞接触。

[0451] 在一些实施方案中,本公开内容提供了治疗患有肺癌的人类患者的方法,该方法包括向患者施用有效量的如本文描述的抗体。在一些实施方案中,肺癌是上皮癌或腺癌。在一些实施方案中,肺癌是非小细胞肺癌。

[0452] 当受试者经历疾病的病征或症状的部分或全部缓解或减少时,本公开内容的有效响应实现,并且在癌症治疗的情况下,特别地包括,但不限于,治愈、缓解、延长存活期、或其他客观响应。在一些实施方案中,取决于预后因素包括复发次数、疾病阶段和其他因素,预期的无进展存活时间以数月至数年测量。延长存活期包括但不限于至少1个月(mo.)、约至少2个月、约至少3个月、约至少4个月、约至少6个月、约至少1年、约至少2年、约至少3年等。总存活期也被测量,例如,以数月至数年。可选地,在一些实施方案中,有效响应是受试者的症状保持静态。治疗适应症的进一步指示在下文更详细地描述。

[0453] 在一些实施方案中,在不期望的疾病或紊乱的症状表现之前,以预防性方法进行疗剂的施用,使得疾病或紊乱被预防或可选地延迟其进展。因此,当与预防性方法结合使用时,术语“治疗有效”意指在治疗后,更少数量的受试者(平均而言)发展不期望的疾病或紊乱或症状严重程度进展。

[0454] 在一些实施方案中,变化因素包括组合物中活性成分的量、组合物配方和施用方式,以提供对实现每个受试者期望的治疗响应有效的而不对受试者有过度毒性的活性成分的量。所选的剂量水平将取决于各种因素,包括采用的特定化合物的活性、施用途径、施用时间、采用的特定化合物的排泄或代谢率、治疗的持续时间、与采用的特定组合物组合使用

的其他药物、化合物和/或物质、被治疗的受试者的年龄、性别、体重、状况、一般健康、饮食、和先前病史以及医学领域中熟知的类似的因素。

[0455] 在一些实施方案中,将本文描述的抗体和抗原结合片段以不同剂量并在不同时间框架内施用至受试者。非限制性剂量包括约0.01mg/kg、约0.05mg/kg、约0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg、约20mg/kg、约30mg/kg、约40mg/kg、约50mg/kg、约60mg/kg、约70mg/kg、约80mg/kg、约90mg/kg、约100mg/kg、约125mg/kg、约150mg/kg、约175mg/kg、约200mg/kg或之间的任何整数。另外,在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段的剂量以每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每4周一次、每6周一次、每8周一次、每12周一次,或其中周次的任何组合施用。还设想了给药周期,诸如,例如,每周一次或两次施用抗体或其抗原结合片段持续4周,然后两周不进行治疗。本公开内容内也设想了另外的给药周期包括,例如,本文描述的剂量和周周期的不同组合。

[0456] 在一些实施方案中,组合物的治疗有效量是变化的并取决于疾病的严重程度和被治疗的受试者的体重和一般状态,但一般范围为每次应用约1.0 μ g/kg至约100mg/kg体重、或约10 μ g/kg至约30mg/kg,或约0.1mg/kg至约10mg/kg或约1mg/kg至约10mg/kg。取决于对紊乱或状况的响应和受试者对治疗的耐受性,根据需要施用可以是每日一次、数日一次、每周一次、每月两次、每月一次或更高或更低的频繁。在一些实施方案中,需要在较长的时间段内维持剂量,诸如4周、5周、6周、7周、8周、10周或12周或更长时间,直到出现对紊乱症状的期望抑制,并且根据需要调整剂量。这种疗法的进展通过常规技术和测定容易地进行监测。

[0457] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体在生理溶液中以0.01mg/kg至100mg/kg之间的剂量范围以每日一次至每周一次至每月一次的频率范围(例如,每日一次、每两日一次、每三日一次,或每周2次、3次、4次、5次或6次)静脉内施用,优选地剂量范围为0.1mg/kg至45mg/kg、0.1mg/kg至15mg/kg、或0.1mg/kg至10mg/kg,以每周2次或3次的频率,或最多45mg/kg每月一次。

[0458] 当受试者经历疾病的病征或症状的部分或全部缓解或减轻并特别地包括但不限于存活期的延长时,响应被实现。取决于预后因素包括复发次数、疾病阶段和其他因素,预期的无进展存活时间例如以数月至数年测量。延长存活期包括但不限于至少1个月(mo)、约至少2个月(mo)、约至少3个月、约至少4个月、约至少6个月、约至少1年、约至少2年、约至少3年或更长的时间。在一些实施方案中,总存活期也以数月至数年测量。在一些实施方案中,受试者的症状保持静态或减少。

[0459] 在一些情况下,本领域具有普通技术的医师或兽医容易地确定和规定所需组合物的有效量(ED_{50})。例如,医师或兽医可以以低于实现期望的治疗效果所需水平的水平开始组合物中采用的化合物的剂量,并逐渐增加剂量直到实现期望的效果。可选地,在一些实施方案中剂量保持恒定。

[0460] 在一些实施方案中,其他抗体、小分子治疗剂和/或其他剂在单独的组合物中被组合用于同时或顺序地施用。在一种实施方案中,同时施用包括同时施用或彼此相隔30分钟内施用一种或更多种组合物。在一些实施方案中,施用发生在相同或不同部位。

[0461] 在一些实施方案中,这样的成分的毒性和治疗功效在细胞培养物或实验动物中通过标准制药学程序确定,例如,用于确定 LD_{50} (对群体的50%致死的剂量)和 ED_{50} (对群体的

50%治疗有效的剂量)。在一些实施方案中,毒性作用和治疗作用之间的剂量比率为治疗指数,并且它被表示为 LD_{50}/ED_{50} 比率。在一些实施方案中,虽然使用表现出毒性副作用的化合物,但应注意设计将这样的化合物靶向受影响的组织部位的递送系统,以使对健康细胞的潜在损害最小化,从而减少副作用。

[0462] 在一些实施方案中,从细胞培养测定和动物研究获得的数据用于配制用于人类的剂量范围。这样的化合物的剂量优选地落在包括 ED_{50} 而几乎无毒性或无毒性的循环浓度的范围内。在一些实施方案中,取决于采用的剂型和利用的施用途径,剂量在该范围内变化。在一些实施方案中,对于本公开内容的方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量最初根据细胞培养测定估计。在一些实施方案中,以动物模型配制剂量以实现包括如在细胞培养物中确定的 IC_{50} (即,实现半最大抑制的测试化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。血浆中的水平,例如,通过高效液相色谱法测量。这样的信息,在一些情况下,用于更精确地确定在人类中有用的剂量。

[0463] 在一些实施方案中本公开内容提供了治疗患有癌症的患者的方法,该方法包括向患者施用治疗有效量的如本文描述的抗体并且还包用选自手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法的抗癌疗法治疗受试者。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段和另一种抗癌疗法同时或顺序地施用。

[0464] 诊断产品和方法

[0465] 在一些实施方案中,本文公开了检测样品或受试者中的huCD163蛋白或M2巨噬细胞以评估患者的治疗状态或诊断与M2巨噬细胞或TAM的活性关联或相关的疾病或紊乱的方法,诸如本文描述的那些疾病和紊乱。

[0466] 在对细胞或组织的可溶性huCD163蛋白、huCD163蛋白的表达、或M2巨噬细胞的存在或活性的体内检测、诊断或监测中,受试者被施用如本文描述的抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段与可检测部分结合。在一些实施方案中,可检测部分使用本领域公认的以下方法可视化:诸如但不限于,磁共振成像(MRI)、荧光、放射成像、由内窥镜、腹腔镜或血管内导管提供的光源(即,经由光活性剂的检测)、光扫描、正电子发射断层成像术(PET)扫描、全身核磁共振(NMR)、放射闪烁照相法、单光子发射计算机断层成像术(SPECT)、靶向近红外区域(NIR)扫描、X射线、超声。用于使用这样的方法检测化合物的标记也是本领域已知的。在一些实施方案中,可检测部分的可视化允许检测、诊断和/或监测与M2巨噬细胞活性或表达huCD163蛋白的另一种细胞的活性相关的状况或疾病。利用对期望的靶蛋白(即huCD163蛋白)特异性的抗体的另外的诊断测定是本领域已知的并且也在本文中被设想。

[0467] 对于体外检测方法,待从受试者获得的样品包括但不限于,血液、组织活检样品和来自其的流体。

[0468] 因此,本公开内容提供了抗体及其抗原结合片段,其可用于检测或诊断与疾病或紊乱相关的M2巨噬细胞或TAM巨噬细胞的水平,潜在地指示对治疗性治疗的需要。在其他实施方案中,抗体还包含第二剂。在一些实施方案中,这样的剂是分子或部分诸如,例如,报告分子或可检测的标记。用于这样的检测方法的可检测的标记/部分是本领域已知的并且在下文更详细地描述。例如,报告分子是使用测定检测的任何部分。与多肽缀合的报告分子的非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、生色团、发

光分子、光亲和分子、着色颗粒或配体,诸如生物素。在一些实施方案中,可检测的标记包括由于其特定的功能特性和/或化学特征而被检测的化合物和/或元素,它们的使用允许它们附接的多肽被检测,和/或如果需要的话进一步定量。许多适合的可检测(成像)剂是本领域已知的,用于附接至多肽的方法也是如此。

[0469] 在一些实施方案中,多肽与各种各样的荧光染料、猝灭剂和半抗原诸如荧光素、R-藻红蛋白和生物素缀合。在一些实施方案中,缀合发生在多肽合成期间或多肽合成和纯化之后。

[0470] 可选地,在一些实施方案中,抗体、抗原结合片段或结合蛋白与荧光部分缀合。将多肽与荧光部分(例如,R-藻红蛋白、异硫氰酸荧光素(FITC)等)缀合是,例如,使用本领域公认技术完成的。用于特定应用(诸如荧光显微术、流式细胞术、荧光激活细胞分选(FACS)等)的许多可商购的荧光染料和染料缀合试剂盒是可商购的。

[0471] 在一种非限制性实施方案中,抗体抗原结合片段与可检测的标记缔合(缀合),可检测的标记诸如放射性核素、染料、成像剂或用于与抗原结合的免疫检测的荧光剂,其用于在体外和/或体内使抗体与M2巨噬细胞或者可溶性或结合的huCD163蛋白的结合可视化。

[0472] 放射性标记的非限制性实例包括,例如, ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{67}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{71}Ge 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{77}As 、 ^{77}Br 、 ^{81}Rb 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 $^{87\text{m}}\text{Sr}$ 、 ^{90}Y 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{100}Pd 、 ^{101}Rh 、 ^{103}Pb 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{119}Sb 、 ^{121}Sn 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{128}Ba 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{131}Cs 、 ^{143}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Eu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{191}Os 、 ^{193}Pt 、 ^{194}Ir 、 ^{197}Hg 、 ^{199}Au 、 ^{203}Pb 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 和 ^{213}Bi 。在一些实施方案中,使用抗体成像领域已知的常规化学将放射性标记物附接至化合物。放射性标记的化合物可用于体外诊断技术和体内放射成像技术和放射免疫疗法。

[0473] 在一些实施方案中,本文描述的抗体和抗原结合片段的组合物也用作非治疗剂(例如,作为亲和纯化剂)。

[0474] 抗体技术

[0475] 如本领域技术人员将理解的,本文的抗体及其制备和使用方法的一般描述也适用于个体抗体多肽成分和抗体片段。

[0476] 本公开内容的抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。然而,在优选的实施方案中,它们是单克隆的。在特定实施方案中,本公开内容的抗体是人类抗体。产生多克隆抗体和单克隆抗体的方法是本领域已知的。

[0477] 在一些实施方案中,测试使用这样的方法产生的结合由M2巨噬细胞表达的huCD163的抗体、抗原结合片段和其他蛋白的结合亲和力、亲合力和调节能力中的一种或更多种。

[0478] 在一些实施方案中,利用常规方法来鉴定与huCD163蛋白结合的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,评估抗体和抗原结合片段的结合亲和力、结合速率、解离速率和亲合力中的一种或更多种。这样的参数的测量,例如,使用包括但不限于以下的测定来完成:酶联免疫吸附测定(ELISA)、ELISpot测定、Scatchard分析、表面等离子体共振(例如,BIACORE)分析等、竞争结合测定等等。在一种非限制性实施方案中,ELISA测定用于测量与huCD163蛋白结合的特定抗体或抗原结合片段的结合能力。表面等离子体共振技术在Liljeblad等人,Glyco J 17:323-9(2000)中描述。

[0479] 在一些实施方案中,使用本领域可用的载体和方法重组产生根据本公开内容的抗体,如以下进一步描述的。在一些实施方案中,人类抗体也通过体外活化的B细胞产生(参见美国专利第5,567,610号和第5,229,275号)。

[0480] 在一些实施方案中,人类抗体在能够在不存在内源性免疫球蛋白产生的情况下产生完整的人类抗体库的转基因动物(例如,小鼠)中产生。例如,已描述在嵌合和种系突变小鼠中的抗体重链连接区(J_H)基因的纯合缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。将人类种系免疫球蛋白基因阵列转移到这样的种系突变小鼠中导致在抗原攻击时产生人类抗体。参见,例如,Jakobovits等人,Proc Natl Acad Sci USA,90:2551(1993);Jakobovits等人,Nature 362:255-58(1993);Bruggemann等人,Year in Immunol.,7:33(1993);美国专利第5,545,806号、第5,569,825号、第5,591,669;美国专利第5,545,807号和WO 97/17852。在一些实施方案中,这样的动物被遗传工程化以产生包含本公开内容的多肽的人类抗体。

[0481] 例如,使用本领域已知的方法,诸如通过饱和硫酸铵沉淀、优球蛋白沉淀方法、己酸方法、辛酸方法、离子交换色谱法(DEAE或DE52),或使用抗Ig柱或蛋白A、G或L柱的亲和色谱法,从培养物上清液或腹水(如果在动物中产生抗体)分离和纯化抗体。

[0482] 如以上所述,本公开内容还提供了抗体片段。在某些情况下,使用抗体片段而不是完整抗体具有优势。例如,在一些实施方案中,较小尺寸的片段允许快速清除,并导致对某些组织诸如实体瘤的改进的接近。抗体片段的实例包括:Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0483] 已经开发了各种技术来生产抗体片段。传统上,这些片段是经由完整抗体的蛋白水解消化获得的(参见,例如,Morimoto等人,J Biochem Biophys Methods 1992 24(1-2):107-17;和Brennan等人,Science 1985 229:81)。然而,在一些实施方案中,这些片段现在由重组宿主细胞直接产生。在一些实施方案中,Fab、Fv和ScFv抗体片段都在大肠杆菌中表达并从大肠杆菌分泌,从而允许这些片段的大量的容易的产生。在一些实施方案中,Fab'-SH片段直接从大肠杆菌中回收并化学偶联以形成 $F(ab')_2$ 片段(Carter等人,Bio/Technology 10:163-167(1992))。根据另一种方法,在一些实施方案中, $F(ab')_2$ 片段直接从重组宿主细胞培养物中分离。包含取自IgG的Fc区的 C_H2 结构域的两个环的补救受体结合表位的具有增加的体内半衰期的Fab和 $F(ab')_2$ 片段在美国专利第5,869,046和第6,121,022号中描述。用于产生抗体片段的其他技术对技术人员将是明显的。

[0484] 在其他实施方案中,选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185;美国专利第5,571,894号和第5,587,458号。Fv和sFv是不含恒定区的具有完整结合位点的仅有的物类。因此,它们适于在体内利用期间减少非特异性结合。在一些实施方案中,构建sFv融合蛋白以在sFv的氨基末端或羧基末端产生效应蛋白的融合。参见Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 同上。在一些实施方案中,抗体片段也是“线性抗体”,例如,如例如美国专利第5,641,870中描述的。在一些实施方案中,这样的线性抗体片段是单特异性或双特异性的。

[0485] 用于制备双特异性或其他多特异性抗体的方法是本领域已知的并且包括化学交联、亮氨酸拉链的使用(Kostelny等人,J Immunol 148:1547-53(1992));双抗体技术(Hollinger等人,Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-8(1993));scFv二聚体[Gruber等人,J Immunol 152:5368(1994)],线性抗体(Zapata等人,Protein Eng 8:1057-62(1995));和

螯合重组抗体(Neri等人,J Mol Biol 246:367-73(1995))。

[0486] 全长双特异性抗体的传统产生是基于两条免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条链具有不同的特异性(Millstein等人,Nature 305:537-9(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机组合,这些杂交瘤(四源杂交瘤)产生十种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。对正确分子的纯化,例如,通过亲和色谱法完成。类似的程序在W0 93/08829和Traunecker等人,EMBO J 10:3655-9(1991)中公开。

[0487] 根据不同的方法,具有期望的结合特异性(抗体-抗原组合位点)的抗体可变区与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。优选地,融合是与Ig重链恒定结构域,包含至少部分的铰链, C_H2 区和 C_H3 区。优选地,第一重链恒定区(C_H1)含有用于轻链键合所需的位点,存在于至少一种融合中。将编码免疫球蛋白重链融合体和(如果期望)免疫球蛋白轻链的DNA插入到单独的表达载体中,并共转染到合适的宿主细胞中。当构建中使用的四条多肽链的不相等比率提供期望的双特异性抗体的最佳产率时,这为在实施方案中调整四种多肽片段的相互比例方面提供了更大的灵活性。然而,当至少两条多肽链以相等比率的表达导致高产率或当该比率对期望的链组合的产率没有显著影响时,可以将两条或所有四条多肽链的编码序列插入到单个表达载体中。

[0488] 双特异性抗体由例如一臂中具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。这种不对称结构有助于从不需要的免疫球蛋白链组合中分离期望的双特异性化合物,因为仅在双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链,提供了容易的分离方式。该方法在W0 94/04690中公开。对于产生双特异性抗体的进一步细节,参见,例如,Suresh等人,Methods Enzymol 121:210(1986)。

[0489] 在一些实施方案中,根据美国专利第5,731,168号中描述的另一种方法,将一对抗体分子之间的界面工程化,以使从重组细胞培养物中回收的异源二聚体的百分比最大化。优选的界面包括 C_H3 结构域的至少一部分。在该方法中,来自第一抗体分子的界面的一个或更多个小氨基酸侧链被较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似尺寸的补偿“腔”。这提供了增加异源二聚体而不是其他不需要的终产物诸如同源二聚体的产率的机制。

[0490] 双特异性抗体包括交联或“异源缀合”抗体。例如,异源缀合物中的抗体中的一个与亲和素偶联,另一个与生物素偶联。例如,已提出这样的抗体将免疫系统细胞靶向不需要的细胞(美国专利第4,676,980号),并用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/20373和EP 03089)。在一些实施方案中,使用任何方便的交联方法制备异源缀合抗体。合适的交联剂是本领域中熟知的,并且与一些交联技术一起在美国专利第4,676,980号中公开。另一种方法设计为通过在scFv的C末端添加链霉亲和素编码序列来制备四聚体。链霉亲和素由四个亚基组成,因此当scFv-链霉亲和素折叠时,四个亚基缔合以形成四聚体(Kipriyanov等人,Hum Antibodies Hybridomas6(3):93-101(1995))。

[0491] 在一些实施方案中,根据用于制备双特异性抗体的另一种方法,将一对抗体分子之间的界面工程化,以便使从重组细胞培养物中回收的异源二聚体的百分比最大化。一种界面包含抗体恒定结构域的 C_H3 结构域的至少一部分。在该方法中,来自第一抗体分子的界

面的一个或更多个小氨基酸侧链被较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似尺寸的补偿“腔”。这提供了增加异源二聚体而不是其他不需要的终产物诸如同源二聚体的产率的机制。参见WO 96/27011。

[0492] 文献中也描述了用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如,使用化学连接制备双特异性抗体。Brennan等人,Science 229:81(1985)描述了其中完整抗体被蛋白水解裂解以产生F(ab')₂片段的程序。这些片段在存在二硫醇复合剂亚砷酸钠的情况下被还原,以稳定邻位二硫醇,并防止分子间二硫化物的形成。然后将产生的Fab'片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原将Fab'-TNB衍生物中的一种重新转化为Fab'-硫醇,并与等摩尔量的另一种Fab'-TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。在一些实施方案中,产生的双特异性抗体用作酶的选择性固定的剂。

[0493] 最近的进展促进了Fab'-SH片段从大肠杆菌的直接回收,Fab'-SH片段被例如化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby等人,J Exp Med 175:217-25(1992)描述了人源化双特异性抗体F(ab')₂分子的产生。每种Fab'片段由大肠杆菌单独分泌,并经历体外定向化学偶联以形成双特异性抗体。由此形成的双特异性抗体能够与过表达ErbB2受体的细胞和正常人类T细胞结合,以及触发人类细胞毒性淋巴细胞针对人类乳腺肿瘤靶的裂解活性。

[0494] 还描述了直接从重组细胞培养物制备和分离双特异性抗体片段的各种技术。例如,已经使用亮氨酸拉链来产生双特异性抗体。Kostelny等人,J Immunol 148(5):1547-53(1992)。来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合相连至两种不同抗体的Fab'部分。抗体同源二聚体在铰链区被还原以形成单体,并且然后再氧化以形成抗体异源二聚体。在一些实施方案中,该方法用于产生抗体异源二聚体。

[0495] 抗体的鉴定和制备

[0496] 在一些实施方案中,编码抗体、其可变区或其抗原结合片段的多核苷酸序列使用常规测序技术来确定,并被亚克隆到表达载体中以用于抗体的重组产生。这通过从受试者(例如,癌症患者)的血液中获得单个核细胞来完成;从单个核细胞产生B细胞克隆;将B细胞诱导成为产生抗体的浆细胞;并筛选浆细胞产生的上清液以确定其是否含有抗体。在一些实施方案中,使用类似方法完成对具有本公开内容的抗体的特异性的其他抗体的鉴定。例如,在鉴定出产生抗体的B细胞克隆后,进行逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)以克隆编码抗体可变区或其部分的DNA。然后将这些序列亚克隆到适于重组产生人类抗体的表达载体中。在一些实施方案中,通过确定抗体或重组抗体结合M2细胞或表达由M2细胞表达的人类CD163多肽的其他细胞的能力来确认结合特异性。

[0497] 在本文描述的方法的特定实施方案中,对从外周血或淋巴结分离的B细胞进行分选,例如,基于它们是CD19阳性的,并在例如96孔、384孔或1536孔配置中,以例如低至每个孔单细胞特异性铺板。细胞被诱导以分化为产生抗体的细胞,例如浆细胞,并收获培养物上清液,并使用例如FMAT或FACS分析来测试与在其表面上表达靶多肽的细胞的结合。然后阳性孔经历全孔RT-PCR以扩增由克隆子代浆细胞表达的IgG分子的重链可变区和轻链可变区。将所得的编码重链可变区和轻链可变区或其部分的PCR产物亚克隆到人类抗体表达载体中用于重组表达。然后测试所得重组抗体以确认其原始结合特异性,并在一些实施方案中进一步测试针对其他细胞或蛋白的交叉反应性。

[0498] 因此,在一种实施方案中,鉴定抗体的方法如下实施。首先,将全长或约全长的CD163 cDNA转染到细胞系中用于表达CD163多肽。其次,测试个体人类血浆或血清样品中结合细胞表达的多肽的抗体。并且最后,表征源自血浆或血清阳性个体的MAb与相同细胞表达的CD163多肽的结合。此时在一些实施方案中对MAb的精细特异性进行进一步确定。

[0499] 在一些实施方案中,根据本领域可用的方法和本文描述的方法,包括使用对人类抗体多肽的保守区特异的引物通过聚合酶链式反应进行扩增,从表达抗体的细胞分离编码本公开内容的抗体或其部分的多核苷酸。例如,根据W0 92/02551;美国专利第5,627,052号;或Babcook等人,Proc Natl Acad Sci USA 93:7843-48(1996)中描述的分子生物学技术,从B细胞克隆轻链可变区和重链可变区。在某些实施方案中,对编码由表达抗体的克隆子代浆细胞表达的IgG分子的重链可变区和轻链可变区两者的所有或一部分的多核苷酸进行亚克隆和测序。在一些实施方案中,所编码的多肽的序列根据多核苷酸序列容易地被确定。

[0500] 使用本领域已知的程序和本文描述的程序,将编码本公开内容的多肽的分离的多核苷酸亚克隆到表达载体中,以重组产生本公开内容的抗体和多肽。

[0501] 在一些实施方案中,抗体(或其片段)与CD163多肽或M2细胞的结合特性一般使用免疫检测方法来确定和评估,包括,例如,基于免疫荧光的测定,诸如免疫组织化学(IHC)和/或荧光激活细胞分选(FACS)。在一些实施方案中,免疫测定方法包括对照和程序以确定抗体是否与CD163多肽或M2巨噬细胞特异性结合,并且不识别对照细胞,例如,M1细胞,或被转染以表达对照蛋白的宿主细胞或与它们交叉反应。

[0502] 在血清预筛选以鉴定产生针对CD163多肽或针对M2巨噬细胞或TAM的抗体的患者之后,本公开内容的方法通常包括从先前从患者或受试者获得的生物样品中分离或纯化B细胞。在一些实施方案中,患者或受试者当前或之前已被诊断为患有或怀疑患有癌症或感兴趣的特定疾病,或者患者或受试者被认为没有癌症或疾病。通常,患者或受试者是哺乳动物,并且在特定实施方案中是人类。在一些实施方案中,生物样品是包含B细胞的任何样品,包括但不限于,淋巴结或淋巴结组织、胸腔积液、外周血、腹水、肿瘤组织或脑脊液(CSF)。在一些实施方案中,B细胞从不同类型的生物样品中分离,诸如肿瘤活检或受特定疾病影响的其他生物样品。然而,在一些实施方案中,应理解包含B细胞的任何生物样品用于本公开内容的任何实施方案。

[0503] 分离后,B细胞被诱导以产生抗体,例如,通过在支持B细胞增殖或发育成浆细胞(plasmacyte)、浆母细胞或浆细胞(plasma cell)的条件下培养B细胞。然后筛选抗体,通常使用高通量技术,以鉴定与靶抗原例如特定组织、细胞或多肽特异性结合的抗体。在某些实施方案中,特异性抗原,例如,抗体结合的细胞表面多肽是未知的,而在其他实施方案中,抗体特异性结合的抗原是已知的。

[0504] 在一些实施方案中,根据本公开内容,B细胞通过本领域已知和可用的任何方式从生物样品例如,肿瘤、组织、外周血或淋巴结样品中分离。B细胞通常基于其细胞表面存在B细胞特异性标志物(例如,CD19、CD138和/或表面IgG)通过FACS进行分选。然而,在一些实施方案中采用本领域已知的其他方法,诸如,例如,使用CD19磁珠或IgG特异性磁珠进行柱纯化,然后从柱洗脱。然而,在一些实施方案中,利用任何标志物对B细胞进行磁分离导致某些B细胞的损失。因此,在某些实施方案中,不分选分离的细胞,而是将从肿瘤分离的Ficoll纯

化的单个核细胞直接铺板至每孔适当或期望数量的特异性。

[0505] 为了鉴定产生抗体的B细胞,B细胞通常以低密度(例如,每孔单个细胞特异性,每孔1-10个细胞,每孔10-100个细胞,每孔1-100个细胞,每孔少于10个细胞,或每孔少于100个细胞)在多孔板或微量滴定板中,例如,在96孔、384孔或1536孔配置中铺板。在一些实施方案中,当B细胞以每孔多于一个细胞的密度初始铺板时,则本公开内容的方法包括随后稀释被鉴定为产生抗原特异性抗体的孔中的细胞直至达到每孔单个细胞特异性的步骤,从而有助于鉴定产生抗原特异性抗体的B细胞。在一些实施方案中,将细胞上清液或其一部分和/或细胞冷冻并储存用于将来的测试和之后抗体多核苷酸的回收。

[0506] 在某些实施方案中,B细胞在有利于B细胞产生抗体的条件下培养。例如,在有利于B细胞增殖和分化的条件下培养B细胞,以得到产生抗体的浆母细胞、浆细胞(plasmacyte)或浆细胞(plasmacyte)。在特定实施方案中,在存在B细胞有丝分裂原诸如脂多糖(LPS)或CD40配体的情况下培养B细胞。在一种特定实施方案中,通过将B细胞与饲细胞和/或其他B细胞活化剂诸如CD40配体一起培养,使B细胞分化为产生抗体的细胞。

[0507] 在一些实施方案中,使用本领域可用的常规方法,包括本文描述的那些,测试细胞培养物上清液或从其获得的抗体与靶抗原结合的能力。在特定实施方案中,使用高通量方法测试培养物上清液中与靶抗原结合的抗体的存在。例如,B细胞在多孔微量滴定皿中培养,使得使用机器人板处理器用于同时对多于一个细胞上清液进行采样,并测试与靶抗原结合的抗体的存在。在特定的实施方案中,抗原与珠(例如,顺磁性珠或乳胶珠)结合以促进抗体/抗原复合物的捕获。在其他实施方案中,抗原和抗体被荧光标记(用不同的标记)并且进行FACS分析以鉴定与靶抗原结合的抗体的存在。在一种实施方案中,使用FMAT™分析和仪器(Applied Biosystems,Foster City,Calif.)确定抗体结合。FMAT是用于高通量筛选的荧光宏观共聚焦平台,其使得能够使用活细胞或珠进行混合及读取、非放射性测定。

[0508] 在比较抗体与特定靶抗原(例如,生物样品诸如癌组织或细胞或感染原)的结合和抗体与对照样品(例如,生物样品诸如正常细胞、来自另一物种、不同癌组织或细胞或不同感染原的比较细胞)的结合时,在一些实施方案中,如果与结合对照样品的量相比,与特定靶抗原结合的抗体多至少两倍、至少三倍、至少五倍或至少十倍,则认为抗体优先结合特定靶抗原。

[0509] 在一些实施方案中,编码抗体链、其可变区或其片段的多核苷酸利用本领域可用的任何手段从细胞中分离。在一种实施方案中,使用寡核苷酸引物利用聚合酶链式反应(PCR)例如逆转录PCR(RT-PCR)来分离多核苷酸,该寡核苷酸引物使用本领域可用的常规程序与重链或轻链编码多核苷酸序列或其互补序列特异性结合。在一种实施方案中,阳性孔经历全孔RT-PCR以扩增由克隆子代浆细胞表达的IgG分子的重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中,根据本领域的常规程序,对这些PCR产物测序,并且然后将编码重链可变区和轻链可变区或其部分的产物亚克隆到人类抗体表达载体中,并重组表达(参见,例如,美国专利第7,112,439号)。在一些实施方案中,编码如本文描述的M2巨噬细胞特异性抗体或其片段的核酸分子根据用于核酸切下、连接、转化和转染的各种熟知程序中的任何进行增殖和表达。因此,在某些实施方案中,优选在原核宿主细胞诸如大肠杆菌中表达抗体片段(参见,例如,Pluckthun等人,Methods Enzymol 178:497-515(1989))。在某些其他实施方案中,抗体或其抗原结合片段的表达优选在真核宿主细胞诸如酵母(例如,酿酒酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*S. pombe*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、动物细胞(包括哺乳动物细胞)或植物细胞中。合适的动物细胞的实例包括但不限于,骨髓瘤、COS、CHO或杂交瘤细胞。植物细胞的实例包括烟草细胞、玉米细胞、大豆细胞和水稻细胞。在一些实施方案中,通过本领域普通技术人员已知的方法并基于本公开内容,设计用于在特定宿主系统中表达外源序列的核酸载体,并且然后插入编码肿瘤特异性抗体(或其片段)的多核苷酸序列。调节元件将根据特定宿主而变化。

[0510] 在一些实施方案中,含有编码可变区和/或恒定区的多核苷酸的一种或更多种可复制表达载体被制备并用于转化适合的细胞系,例如,非生产骨髓瘤细胞系诸如小鼠NS0系,或者细菌诸如大肠杆菌,其中将发生抗体的产生。为了获得有效的转录和翻译,每个载体中的多核苷酸序列应包含适当的调节序列,特别是可操作地连接至可变区序列的启动子和前导序列。

[0511] 以这种方式产生抗体的特定方法一般是熟知的并被常规使用。例如,由以下描述的分子生物学程序:Sambrook等人,Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989; 另参见Sambrook等人, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (2001)。虽然不是必需的,但在某些实施方案中,对编码重组抗体的多核苷酸区域测序。DNA测序例如以本领域已知的任何方式或使用本领域已知的任何系统进行。基本测序技术在例如,Sanger等人,Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463(1977)和Amersham International plc测序手册(并包括对其的改进)中描述。

[0512] 在特定实施方案中,然后测试所得重组抗体或其片段以确认其原始特异性,并在一些实施方案中进一步测试交叉反应性,例如与相关多肽的交叉反应性。在特定实施方案中,使用常规方法测试根据本文描述的方法鉴定或产生的抗体的内化能力或其他效应子功能。

[0513] 包装、试剂盒和预填充容器

[0514] 本文还提供了包含一种或更多种以上描述的化合物的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒在合适的容器装置(container means)中包含如本文描述的抗体或其抗原结合片段。

[0515] 在一些实施方案中,提供了包含本文描述的组合物容器装置。在一些实施方案中,容器装置是容纳例如液体或冻干组合物的任何合适的容器,包括但不限于小瓶、注射器、瓶、静脉内(IV)袋或安瓿。在一些实施方案中,注射器容纳适于注射到受试者体内的任何体积的液体,包括但不限于0.5cc、1cc、2cc、5cc、10cc或更多。

[0516] 本文提供了试剂盒,其包含本文描述的一种组合物或更多种组合物。在一些实施方案中,本文提供了用于治疗患有癌症的受试者的试剂盒,所述试剂盒包含如本文描述的抗体和抗癌疗法。

[0517] 在一些实施方案中,本文提供了用于治疗癌症的试剂盒,所述试剂盒包含如本文描述的抗体和附于容器或与容器一起包装的标签,该标签描述抗体与抗癌疗法组合的用途。

[0518] 在一些实施方案中,本文提供了用于治疗癌症的试剂盒,所述试剂盒包含抗癌疗法和附于容器或与容器一起包装的标签,该标签描述抗癌疗法与如本文描述的抗体的用途。

[0519] 在一些实施方案中,试剂盒的容器装置一般将包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、安瓿、注射器、静脉内(IV)袋、和/或其他容器装置,在其中放置和/或优选地合适地等分至少一种多肽。本文提供了包含本文描述的组合物容器装置的。

[0520] 在一些实施方案中,试剂盒包含用于商业销售的紧密封闭的用于容纳至少一种融合蛋白、可检测部分、报告分子的装置和/或其他试剂容器。在一些实施方案中,这样的容器包括在其中保存期望的小瓶的注射和/或吹塑模制的塑料容器。在一些实施方案中,试剂盒也包括印刷的材料以用于试剂盒中的材料的用途。

[0521] 在一些实施方案中,包装和试剂盒另外包含药物制剂中的缓冲剂、防腐剂和/或稳定剂。在一些实施方案中,将试剂盒的每种组分封装在单独的容器内并且所有的不同容器可以在单个包装内。在一些实施方案中,公开内容的试剂盒设计成用于冷藏或室温储存。

[0522] 另外,在一些实施方案中,制剂含有稳定剂以增加试剂盒的保质期并且包括,例如,牛血清白蛋白(BSA)。在一些实施方案中,在组合物被冻干的情况下,试剂盒含有另外的溶液制剂以重构冻干制剂。可接受的重构溶液是本领域熟知的并且包括,例如,药学上可接受的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0523] 在一些实施方案中,包装和试剂盒还包含用于测定诸如例如ELISA测定的一种或更多种组分。本申请中待测试的样品包括,例如,血液、血浆、组织切片和分泌物、尿液、淋巴液及其产物。在一些实施方案中,包装和试剂盒还包含用于收集样品的一种或更多种组件(例如,注射器、杯、拭子等)。

[0524] 在一些实施方案中,包装和试剂盒还包含指定由美国FDA或类似监管机构要求的信息的标签,例如,产品描述、施用的量和方式和/或治疗指示。本文提供的包装可以包含如本文描述的任何组合物。

[0525] 术语“包装材料”是指容纳试剂盒的组分的物理结构。在一些实施方案中,包装材料维持组分无菌,并且由通常用于这样的目的的材料(例如,纸、波纹纤维、玻璃、塑料、箔、安瓿等)制成。在一些实施方案中,标签或包装插页包含适当的书面说明书。因此,在一些实施方案中,试剂盒另外包含用于以本公开内容的任何方法使用试剂盒组分的标签或说明书。在一些实施方案中,试剂盒包含包装或分配器中的化合物以及用于以本文描述的方法施用化合物的说明书。

[0526] 在仍另外的实施方案中,试剂盒还包含抗癌疗法的容器装置。

[0527] 在一些实施方案中说明书包含用于实施本文描述的任意的任何的方法(包括治疗方法)的说明。在一些实施方案中,说明书另外包含令人满意的临床终点或发生的任何不良症状的指示,或监管机构(诸如食品和药物管理局(Food and Drug Administration))要求的用于人类受试者的另外的信息。

[0528] 在一些实施方案中,说明书在“印刷品”上,例如,在试剂盒内或贴到试剂盒的纸或纸板上,或在贴到试剂盒或包装材料的标签上,或附于含有试剂盒的组分的小瓶或管。在一些实施方案中,说明书另外地包含在计算机可读介质上,诸如,例如,CD-ROM、DVD、闪存设备、固态存储器、磁盘和磁盘设备、磁带、云计算系统和服务器等。在一些情况下,程序和说明书永久地、基本上永久地、半永久地或非暂时性地编码在介质上。

[0529] 本文提供了包含本文描述的组合物容器装置的。在一些实施方案中,容器装置是容纳液体或冻干组合物的任何合适的容器,包括但不限于小瓶、注射器、瓶、静脉内(IV)袋

或安瓿。在一些实施方案中,注射器容纳适于注射到受试者体内的任何体积的液体,包括但不限于0.5cc、1cc、2cc、5cc、10cc或更多。

[0530] 本文提供了包含本文描述的组合物试剂盒。在一些实施方案中,本文提供了用于治疗癌症的试剂盒,所述试剂盒包含如本文描述的抗体与抗癌治疗剂的组合。

[0531] 在一些实施方案中,本文提供了用于治疗癌症的试剂盒,所述试剂盒包含如本文描述的抗体和附于容器或与容器一起包装的标签,该标签描述抗体或其抗原结合片段与抗癌疗法的用途。

[0532] 在一些实施方案中,本文提供了用于治疗癌症的试剂盒,所述试剂盒包含抗癌疗法和附于容器或与容器一起包装的标签,该标签描述抗癌疗法与如本文描述的抗体的用途。

实施例

[0533] 本公开内容将在以下实施例中进一步说明,提供这些实施例仅用于说明目的,并不意图以任何方式限制本公开内容。

[0534] 实施例1-鉴定和克隆

[0535] 分离并克隆了由响应检查点抑制剂抗PD-1治疗的患者产生的与人类骨髓来源的抑制性细胞(MDSC)特异性结合的抗体。进一步研究了这些单克隆抗体的免疫调节特性,目的是鉴定具有靶向和逆转MDSC的免疫抑制性作用的治疗潜力的抗体,从而增强肿瘤清除。

[0536] 鉴定并选择对免疫检查点抑制剂获得部分或完全响应至少6个月的癌症患者,经由I-STAR平台进行记忆B细胞库分析。该平台利用短期B细胞培养系统来研究记忆B细胞库。基于CD19和IgG表面表达,从每个供体患者的一千万个外周血单个核细胞(PBMC)中分离出多于15,000个记忆B细胞。然后,在促进B细胞活化、增殖、终末分化和抗体分泌的条件下,将这些记忆B细胞以约1个细胞/孔接种到40个384孔微量滴定板中。1个细胞/孔的铺板密度允许单个B细胞克隆的扩增,使得可以从每个培养孔重构真正的抗体重链和轻链对。使用高通量和小型化的多重流式细胞术测定,筛选与MDSC结合的每个孔中的分泌IgG抗体。鉴定出49个阳性B细胞克隆。将根据MDSC结合谱和抗体可变区序列排序的抗体的选定子集测序、克隆并表达为重组IgG1,用于进一步体外表征。

[0537] 来自产生MDSC特异性抗体的B细胞克隆的免疫球蛋白基因的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),使用家族特异性引物组通过RT-PCR扩增进行扩增。将来自阳性家族特异性PCR反应的VH区或VL区克隆的库(pool)克隆到表达载体中的人类IgG1恒定结构域序列的上游,从而产生与B细胞克隆产生的抗体具有相同结合特征的功能抗体。设计DNA质粒并要求GenScript,NJ,USA进行恒定区的基因合成。这些质粒组合了所有可能的重链和轻链家族特异性对,并用于瞬时转染HEK293细胞。在基于流动的MDSC结合测定中筛选含有分泌的重组抗体的所有转染子上清液。对于每孔含有多于一个B细胞克隆的孔,如先前描述地扩增和表达多于一个VH和VL结构域序列。然后使用MDSC筛选来鉴定重演了如混合培养物中发现的抗体观察到的结合活性的重链和轻链组合库。所有结合性mAb的VH和轻VL可变区的DNA序列使用由maxipreps(GenScript来源并且Macherey Nagel扩增的质粒)纯化的DNA通过多次测序反应确认。

[0538] 从MDSC筛选鉴定出一个B细胞克隆(种系ID(Germline ID)为重链VH3.30-3/IGHG1

和轻链VK1.012)并命名为AB101,AB101包含含有SEQ ID NO:9的轻链和含有SEQ ID NO:10的重链。从其获得克隆的供体是被诊断为患有非小细胞肺癌(NSCLC)的患者。该患者具有化学疗法进行性疾病,并且然后在抗PD-1治疗后具有完全缓解,并且在抽血时仍在接受治疗。从测序证实该B细胞克隆孔只具有一种重链和一种轻链。如对来自单个B细胞克隆的分泌IgG抗体观察到的,重演的抗体对MDSC也具有明显的双模式(bimodal)结合,表明抗体靶在MDSC的选定亚群上高表达。参见图1。来自以宽松阻断(10 μ g/mL的重组Fc阻断剂(Abcam))和严格阻断(10 μ g/mL的来自Abcam的重组Fc阻断剂+1 μ g/mL的抗CD16、抗CD32和抗CD64抗体)条件对两种MDSC供体进行重演筛选的结果显示出AB101与人类MDSC的剂量依赖性饱和结合,其中在宽松阻断条件下IC50为约10nM。在严格阻断条件下,AB101的总体结合降低,如MFI降低表明的。

[0539] CD163是来自单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞的标志物。体外分化的MDSC上的CD163的表达被报道是双模式的。假设AB101的双模式结合可能与CD163表达相关。为了检验该假设,产生体外MDSC(参见实施例11)并如实施例8中描述地用抗CD163抗体(BioLegend 333611)和用AF647缀合的AB101共染色,并通过FACS分析结合。首先将细胞门控为CD163高或低,并且然后检查与不同浓度的AB101或人类IgG1同种型对照的结合。AB101抗体结合的细胞亚群是CD163^高细胞。参见图2。

[0540] 实施例2-自体单核细胞和T细胞的分离

[0541] 本实施例示出自体单核细胞和T细胞的分离。使用本领域常用的技术获得人类单核细胞和T细胞。在血小板单采术(plateletpheresis)收集过程中,从被捕获在集成室(称为LeukoReduction系统(LRS)室)中的白细胞(WBC)分离人类单核细胞和T细胞。通过标准密度梯度离心(FicollTMPaque Premium1.073,GE Healthcare No.17-5449-52)从LRS样品纯化外周血单个核细胞(PBMC)。弃去上清液,并将沉淀(pellet)重悬于20mL EasySepTM缓冲液(StemCell Technologies No.20144)中,用于PBMC计数以及单核细胞和T细胞的进一步分离。

[0542] 使用EasySep人类单核细胞分离试剂盒(Stem Cell No.19359)按照制造商的说明书分离单核细胞。

[0543] 分别使用人类CD3⁺T细胞分离试剂盒(StemCell 19051)、EasySepTM人类CD4⁺T细胞分离试剂盒(StemCell No.17952)、EasySepTM人类CD8⁺T细胞分离试剂盒(StemCell No.17953)按照制造商的说明书分离总CD3⁺T细胞、CD4⁺T细胞或CD8⁺T细胞。这些负选择试剂盒使用抗体标记不需要的细胞类型进行去除,允许从样品分离期望的靶细胞。

[0544] 实施例3-AB101与免疫抑制性骨髓细胞的特异性结合

[0545] 为了评估特异性,在不同细胞类型(包括如实施例11和以下描述产生的MDSC、免疫抑制性M2c和促炎M1巨噬细胞)上测试了与远红光荧光染料AF647缀合的本发明的抗体(抗体AB101)的结合。另外,评估了来自健康供体的PBMC的单独免疫群体的抗体结合。对于这些研究中的每一项,使用了至少3个单独的供体。使用标准程序使用Ficoll梯度从血液中分离PBMC。为了区分免疫细胞群体,然后将PBMC细胞针对造血谱系标志物(CD45-BV421(BD 642275)、CD3-BV510(BD 563109)、CD11c-PE-Cy7(BD561356)、CD14-FITC(BD 347493)、CD20-APC-Cy7(BD 562643)、CD56-PE(BD 347747)和CD66c(BD 551478))进行染色。单独的谱系群体通过以下表达模式进一步表征并评估与AB101的结合:T细胞CD45⁺CD3⁺、B细胞CD45

$^{+}CD20^{+}$ 、单核细胞 $CD45^{+}CD14^{+}$ 、NK细胞 $CD45^{+}SSC^{低}CD14^{-}CD3^{-}CD56^{+}$ 、粒细胞 $CD45^{+}SSC^{高}CD14^{-}CD66^{+}$ 和树突状细胞 $CD45^{+}CD14^{-}CD66^{-}CD11c^{+}$ 。还评估了抗体与包括以下的原代人类非免疫细胞 (Lonza) 的结合: 小气道上皮细胞 (SAEC, #CC-2547)、肾近端小管上皮细胞 (RPTEC, #CC-2553)、肺微血管内皮细胞 (HMVEC, #CC-2527)、脐静脉内皮细胞 (HUVEC, #C2519A)、主动脉平滑肌细胞 (AOSMC, #CC2571) 和角质形成细胞 (#00192627)。按照制造商的说明书在细胞类型专用培养基和条件下培养这些细胞直到60%-70%汇合, 然后收获以通过流式细胞术测试抗体结合 (图4和图5)。

[0546] 体外单核细胞MDSC通过标准方法从分离的单核细胞产生: 第0天, 单核细胞以 1.5×10^5 个/ cm^2 在RPMI 1640 (Hyclone SH30027.02, 不含血清) 中铺板, 在5% CO_2 和37℃ 孵育1小时, 然后用预温热的RPMI洗涤, 然后向细胞添加MDSC培养基 (RPMI+10% FBS (Hyclone SH30070.03) +50ng/mL GM-CSF (R&D Systems 215-GM-010) +50ng/mL IL-6 (R&D Systems206-IL-010), 每个T75瓶20mL)。然后将细胞在5% CO_2 、37℃ 中培养7天, 不更换培养基。7天后, 通过以下步骤收获细胞: 用PBS (Hyclone SH30028.03) +2mM EDTA洗涤2次, 然后以每个T75瓶15mL添加冷的巨噬细胞解离溶液 (PromoCell C-41330), 然后在2-8℃ 孵育40min。通过手掌敲击瓶来取出细胞, 收集并用PBS+2mM EDTA 1:1稀释。通过以 $450 \times g$ 离心15min将细胞沉淀在锥形管中, 用PBS+2mM EDTA洗涤一次, 计数并以 1×10^7 个/mL重悬于FACS封闭缓冲液 (PBS+1% FBS+0.1 μ g/mL Fc阻断剂 (Abcam Ab90285) 用于宽松染色条件, 或PBS+1% FBS+Fc阻断剂+0.01 μ g/mL CDR阻断剂 (针对FcR CD16、CD32和CD64的抗体; 分别为BD Biosciences 556617、557333和555525) 用于严格染色条件) 中。将细胞在室温 (RT) 在FACS封闭缓冲液中孵育20分钟 (min), 然后在4℃ 孵育30min。然后将细胞用FACS缓冲液+5% BSA (Sigma A3059) 稀释至 1×10^6 个细胞/mL, 并将40 μ L的细胞 (4×10^4 个细胞) 等分到孔中用于染色。将一抗 (20 μ g/mL、6 μ g/mL、2 μ g/mL、0.75 μ g/mL、0.25 μ g/mL、0.08 μ g/mL和0.02 μ g/mL的AB101或6 μ g/mL的人类IgG1同种型对照) 添加至细胞, 并在室温孵育90min。细胞用250 μ L/孔的FACS缓冲液+5% BSA洗涤3次。APC山羊抗人类IgG二抗 (Jackson IR 109-136-097) 以1:250在FACS缓冲液+BSA+e780存活力染料 (以1:1000稀释) 中制备, 并添加至细胞 (每孔50 μ L)。在4℃ 孵育45分钟后, 将细胞在250 μ L FACS缓冲液中洗涤3次。然后在室温将细胞在100 μ L/孔的4% PFA中固定10-15min, 用250 μ L FACS缓冲液洗涤一次, 以 $650 \times g$ 沉淀5min, 然后重悬于100 μ L的FACS缓冲液中, 用于流式细胞术分析。

[0547] AB101抗体与人类免疫抑制性骨髓细胞 (M2c巨噬细胞和单核细胞MDSC) 结合, 如图3所示, 其绘制了M2c、M1和M0上的AB101或同种型染色的MFI。AB101抗体不与B细胞、T细胞和NK细胞以及粒细胞结合, 如图4所示, 其示出与同种型对照 (灰色曲线) 相比, AB101对T细胞、B细胞和NKT细胞、中性粒细胞、单核细胞和树突状细胞 (黑色曲线) 的染色, 并且AB101抗体不与非免疫细胞诸如SAEC、RPTEC、HMVEC、HUVEC、AOSMC和角质形成细胞结合, 如图5所示。因此, AB101抗体与表达CD163的免疫抑制性骨髓细胞特异性结合而不影响其他免疫细胞或非免疫细胞。

[0548] 实施例4-AB101 Fc无效抗体免疫沉淀CD163多肽

[0549] 本实施例显示使用Fc无效抗体对CD163的免疫沉淀, 该Fc无效抗体在IgG1序列中包含AB101可变结构域, 该IgG1序列经修饰以大幅减少抗体与Fc受体的结合 (Fc无效), 该Fc无效抗体命名为AB102, 包含含有SEQ ID NO:9的轻链和含有SEQ ID NO:11的重链。基于

Klockenbusch和Kast,J Biomed Biotechnol文章ID 927585(2010)进行免疫沉淀(IP)。抗体在更经典的交联IP方法中在多聚甲醛(PFA)固定之前添加,或在双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS3)交联之前添加,然后进行IP。

[0550] 对于涉及使用PFA方法交联的IP,从人类血液分离单核细胞,并且然后使用实施例2和实施例11的方案极化为M2细胞,M2巨噬细胞在与巨噬细胞解离溶液(巨噬细胞解离溶液DXF; PromoCell, No. C-41330)在37℃孵育~10min后从板解离,在孵育期间细胞变圆(rounded up)并开始解离。用力敲击瓶以促进细胞解离。解离后,通过向细胞添加FACS缓冲液来猝灭巨噬细胞解离溶液。将细胞以 $300 \times g$ 沉淀10min,并且去除上清液。将细胞沉淀重悬于30mL的含有5% BSA(w/v)和1mM EDTA pH 8.0的PBS中,并在冰上孵育30min。

[0551] 将细胞分成6个等分试样,每等分试样 15×10^6 个细胞(每等分试样5mL),并且将生物素化的抗体添加到每个等分试样。两个等分试样各接受50μg的小鼠IgG1抗hCD163(R&D, No. MAB1607),两个等分试样各接受100μg的同种型对照抗体IS02(以Fc无效框架),并且两个等分试样各接受100μg的测试抗体AB102(在IgG1序列中包含AB101可变结构域,IgG1序列经修饰以大幅减少抗体与Fc受体的结合(Fc无效))。将细胞在4℃孵育1小时(hr),并且偶尔通过将管倒置温和混合。将细胞以 $300 \times g$ 沉淀5min,并用PBS-EDTA洗涤3次,并且然后重悬于5mL PBS(不含镁或钙;HyClone, No. SH30028.02)中。将多聚甲醛(5mL 0.8%的PFA)添加到每个管中,得到0.4%最终PFA浓度。在室温将细胞在PFA中孵育5min,伴随温和摇动。细胞通过以 $800 \times g$ 离心5min沉淀,并且去除上清液。将细胞重悬于10mL含有1.25M甘氨酸的冰冷的PBS中以猝灭。细胞以 $800 \times g$ 沉淀5min,并且重悬于冰冷的PBS中。将细胞以 $800 \times g$ 沉淀5min,并且重悬于1.0mL含有1×蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液中(ThermoFisher Scientific, No. 89900)。将细胞在冰上孵育2hr,并且然后通过2mL Dounce匀浆器15次。

[0552] 将细胞裂解物在吊桶离心机中离心以沉淀细胞核,并且上清液用于IP。将蛋白裂解物(50μL)留作输入级分,并将2.0mL含有1×蛋白酶抑制剂的冷PBS添加到剩余的上清液中。将Dynabeads MyOne链霉亲和素(250μL)(ThermoFisher Scientific, No. 65601)添加至每个样品,并将它们在4℃旋转过夜。次日用StemCell磁体收集珠并且去除上清液。在4℃将珠用5mL Paro缓冲液I、5mL Paro缓冲液II和5mL Paro缓冲液III依次洗涤5分钟(Oncotarget. 2017; 8(7):11105-11113)。然后将珠用冷PBS洗涤3次,并且最后重悬于100μL PBS中并冷冻于-80℃。

[0553] 珠通过质谱法进行分析。该分析一般按照Yan等人,Mol Cell Proteomics 10(3): M110.005611(2011)描述的方法进行。在该方法中,在60℃使用6M胍、150mM Tris缓冲液(pH 8.3)持续搅拌3hr进行甲醛交联的逆转和蛋白从链霉亲和素珠的洗脱。将上清液在含有10mM三(2-羧乙基)-膦(TCEP)和50mM氯乙酰胺(CAA)的相同缓冲液在95℃进行变性、还原和烷基化,持续10min。然后将样品稀释10×,并各自用1.3μg胰蛋白酶在37℃过夜消化。将肽通过C18小柱(C18 cartridge)清洁。从C18小柱洗脱AB102 IP的一个重复和抗CD163 IP的一个重复用于直接MS/MS分析。在C18小柱上,将AB102 IP的一个重复和抗CD163的一个重复与PBS缓冲液pH 7.5中的0.1M甲醛-d₂、0.4M氰基硼氢化钠孵育1小时以标记重二甲基化(d₄),并将IS02(Fc无效) IP的两个重复与PBS缓冲液pH 7.5中的0.1M甲醛、0.4M氰基硼氢化钠孵育1小时以标记轻二甲基化(d₀)。然后用0.1%三氟乙酸(TFA)洗涤C18小柱并用80%乙腈(ACN)洗脱。将d₀/d₄二甲基化肽重悬于缓冲液A(20% ACN, 0.1% TFA)中,并且然后混合。

使用机构内制备的微毛细管HPLC强阳离子交换柱(SCX) (200mm×20cm;Proteomix SCX 3 μ m, Sepax Technologies) 将肽分级。将肽装载到以缓冲液A平衡的微毛细管柱上,并用缓冲液A洗涤。结合的肽用20 μ L含有30%、50%的缓冲液B(800mM甲酸铵,20%ACN,pH 2.8)的缓冲液A洗脱,然后用缓冲液D(0.5M乙酸铵,50%ACN) 20 μ L洗脱。所有样品均通过Speed-Vac干燥并通过Thermo-Oritrap-Fusion直接分析。通过Comet搜索引擎(<https://sourceforge.net/projects/comet-ms/>) 针对人类UniProt数据库检索谱。对于去甲基化标记,使用N末端和Lys侧链上的28.03Da (对于d0二甲基化) 和32.06Da (对于d4二甲基化) 的差异修饰。

[0554] 重/轻样品使用强阳离子交换柱(200mm×20cm;Proteomix SCX 3 μ m, Sepax Technologies) 运行通过串联(in-line)HPLC柱,并使用Thermo-Oritrap-Fusion进行MS/MS。对于重标记的和轻标记的样品,仅纳入完全甲基化的谱。鉴定出89种蛋白,其中所有肽都含有重同位素,表明蛋白是在AB102 IP中而不是在阴性对照中鉴定出的。在AB102 IP特有的89种蛋白中,12种被认为可能在细胞表面上:CD163、RIPK1、NEUA、SLC31、LRP8、SLIT1、RAF1、ILK、ATRN1、MCA32、FNBP2和LRRN3。另一种蛋白TNFR5被发现具有两个重甲基化肽和一个未甲基化肽(IP来源未知),表明它也可能也是AB102 IP独有的。

[0555] 通过质谱法单独分析来自AB102 IP的一个重复和对照抗CD163 IP的一个重复的肽。在AB102 IP中鉴定出的360种蛋白中,它们中的45种被筛选为潜在地膜结合或分泌的。在其他数据集中鉴定出的蛋白中,在AB102IP中发现了以下蛋白:CD163、半乳凝素-1、半乳凝素-3和肽基-脯氨酰顺反异构酶A(PPIA)。报道与CD163直接相互作用的酪蛋白激酶IIb也在该数据集中被鉴定出。

[0556] 对于使用BS3方法交联进行的IP,通过将上清液从瓶收集到250mL离心管中来收获巨噬细胞。将冷的巨噬细胞解离溶液(30mL) 添加到每个瓶并在4℃孵育45min。然后用刮刀刮瓶并将细胞收集到250mL离心管中,并以650×g离心10min。抽吸培养基,将细胞沉淀留在管中。然后将细胞重悬于20mL冷PBS+2mM EDTA中。

[0557] 然后用PBS+2mM EDTA将细胞稀释至 1×10^7 个细胞/mL,并分成40%、40%和20%总体积的三个体积。将AB102(2.5mg) 添加到40%级分中的一种。将Fc无效框架的抗PDL1抗体(2.5mg) 添加到另一个40%级分,其为阳性对照。将同种型对照(Fc无效框架的IS02, 1.25mg) 添加到20%级分,其为阴性对照。将每个级分在4℃温和混合孵育2hr。然后将它们以650×g离心10min,并小心地倾去上清液。将每个沉淀重悬于15mL PBS+EDTA中,并且然后以650×g离心10min。然后重复该洗涤步骤。接下来小心地去除洗涤缓冲液而不扰动沉淀。将来自40%级分的沉淀重悬于2mL交联缓冲液中。将来自20%级分的沉淀重悬于1mL交联缓冲液中。将50mM储备浓度的BS3按每个小瓶8mg溶解于70 μ L超纯水中。将BS3(60 μ L/mL细胞) 添加到每种重悬的细胞级分中,得到3mM最终浓度的BS3,并通过旋转温和混合每种细胞级分。然后将细胞级分在冰上孵育1小时,每10分钟旋转以混合。BS3孵育后,将15mL猝灭溶液直接添加至细胞并在室温孵育15分钟。将细胞以1200×g离心15min,并小心地倾去猝灭缓冲液。如先前描述的,将沉淀用PBS+EDTA洗涤1次。然后通过将20mL的裂解缓冲液(Pierce™ IP裂解缓冲液#87788) 添加到每种40%级分中和将10mL添加到20%级分中并且随后在冰上孵育15min来裂解细胞。然后将细胞裂解物在4℃以13,000×g离心10min。

[0558] 制备MabSelect SuRe树脂(GE Healthcare Life Sciences, No.17543801) 用于制

备的细胞的IP和蛋白纯化。将Sterile Mab Select Sure用20个柱体积(CV)的无菌PBS平衡。150微升Mab Select SuRe用于AB102和阳性对照样品,并且75 μ L用于ISO样品。然后将无菌且平衡的MabSelect SuRe树脂转移到50mL锥形管。离心后,将上清液添加到装有制备的MabSelect SuRe树脂的管。样品在4 $^{\circ}$ C颠倒(end-over-end)混合孵育过夜。次日,允许样品在冰上静置10min。将MabSelect SuRe树脂通过移液管转移到一次性滴液柱中。将树脂用20个柱体积的无菌PBS洗涤。在洗脱之前,将柱置于收集管中并在Eppendorf台式微型离心机中以9,000rpm离心30秒(s)以去除多余的液体。将塞子(stopper)置于柱的底部。通过将1个柱体积的50mM甘氨酸pH 2.5作为洗脱缓冲液添加到带塞子的柱,并用移液管混合,然后允许混合物在室温孵育8min,从树脂洗脱样品。(从每个样品中取出总体积(树脂和洗脱缓冲液)的十分之一,并留置用于通过蛋白印迹分析确定交联。参见下文)。剩余的样品通过添加1/10体积的2M Tris pH 8.0进行中和。通过从柱底部取下塞子并立即将滴液柱置于1.8mL Eppendorf离心管中来收集洗脱液。将柱组装体在台式微型离心机单元中以9,000rpm的速度离心30s。通过将1/10洗脱体积的无菌2M Tris pH 8.0添加到洗脱级分来中和洗脱液。重复洗脱方案以确保完全洗脱蛋白。将洗脱级分储存于-80 $^{\circ}$ C直到蛋白印迹确认交联。

[0559] 用于确认交联的蛋白印迹分析

[0560] 将保留的洗脱级分与Laemmli样品缓冲液(Bio-Rad, No.161-0747)+10%2-巯基乙醇混合。将样品在90 $^{\circ}$ C加热10分钟。将样品装载到4%-12%Bis-Tris梯度聚丙烯酰胺凝胶上。凝胶在200V运行80min。运行后,将凝胶转移至PVDF蛋白印迹膜,并在4 $^{\circ}$ C在25V运行过夜。次日上午,将印迹在室温用SuperBlock(ThermoFisher Scientific, No.37515)封闭3hr。封闭后,将膜在SuperBlock中洗涤1次。在4 $^{\circ}$ C用1:1000抗人类IgG HRP探测蛋白印迹过夜。次日,用PBST洗涤印迹4次,每次洗涤10min。用PBS洗涤蛋白印迹1次,持续10min。然后用SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate(ThermoFisher Scientific, No.34076)将蛋白印迹显影。曝光后,蛋白印迹显示出清晰的超迁移(super-shift)条带,代表AB102的阳性交联。还观察到阳性对照抗体的交联条带。如预期的,没有观察到ISO的分子量迁移。

[0561] 然后将样品的剩余部分进行丙酮沉淀,在SDS-PAGE凝胶上运行,其中,然后切下交联条带并制备用于质谱法评估。将洗脱样品(AB101、ISO和上述阳性对照)解冻。将四倍洗脱液体体积的冷(-20 $^{\circ}$ C)丙酮添加到每个样品。然后将样品剧烈涡旋并在-20 $^{\circ}$ C孵育1hr。将样品以15,000 $\times$ g离心10min。倾去上清液,小心不要扰动沉淀。将沉淀在速度真空仪(speed vac)中干燥5min或直至液体蒸发。将沉淀重悬于15 μ L/管中并混合直至溶解。将每种条件的洗脱液合并。添加样品装载缓冲液+10%2-巯基乙醇,并将样品在90 $^{\circ}$ C加热5min。每个样品保留5微升用于SYPRO Ruby蛋白凝胶染色(ThermoFisher Scientific, No.S12000)分析。将全部剩余体积的样品装载到4%-12%Bis-Tris梯度聚丙烯酰胺凝胶上,并在200V在凝胶上运行80min。将凝胶从盒中取出并用质谱级水洗涤3 $\times$ 10min。然后将凝胶用Safe Stain blue染色1hr。倾去染色液,并且然后用质谱级水通过2次洗涤将凝胶脱色,每次洗涤30min。用乙醇(EtOH)广泛喷洒手术刀和镊子,然后将交联条带从凝胶上切下并置于无菌Eppendorf管中。管中填充足够的无菌超纯水以覆盖凝胶切片,包装在湿冰上,并运送到MS Bioworks。

[0562] 由MS Bioworks进行质谱法分析。对于质谱法,所有各提交样品均使用ProGest机

器人 (DigiLab) 通过用胰蛋白酶凝胶内消化进行处理, 首先用25mM碳酸氢铵洗涤, 然后用乙腈洗涤, 在60℃用10mM二硫苏糖醇还原, 然后用50mM碘乙酰胺在室温还原, 用胰蛋白酶 (Promega) 在37℃消化4hr, 并且然后用甲酸猝灭, 将消化物汇集和分析, 无需进一步处理。然后使用与ThermoFisher Fusion Lumos接口的Waters M-Class NanoAcquity HPLC系统通过纳米LC-MS/MS分析每个消化的样品。将肽装载到捕获柱上, 并以350nL/min在75μm分析柱上洗脱; 两个柱都填充了Luna C18树脂 (Phenomenex, No.00C-4041-E0)。质谱仪以数据依赖模式运行, 对于MS和MS/MS, Orbitrap以60,000FWHM和15,000FWHM运行, 并且循环时间为3s。启用高级峰值确定 (Advanced Peak Determination)。使用4hr仪器时间/样品。对于由MS Bioworks处理的数据, 使用Mascot (Matrix Science) 的本地副本用以下参数检索数据: 酶: 胰蛋白酶/P; 数据库: SwissProt Human (正向和反向串联加常见的潜在污染物); 固定修饰: 脲甲基 (C); 可变修饰: 氧化 (M)、乙酰基 (N-末端)、焦-Glu (N-末端Q)、脱酰胺 (N/Q); 质量值: 单同位素; 肽质量容差: 10ppm; 片段质量容差: 0.02Da; 和最大错过裂解 (Max Missed Cleavage): 2。将Mascot DAT文件解析到Scaffold (Proteome Software) 中用于验证、过滤和创建每个样品的非冗余列表。数据以1%的蛋白和肽FDR过滤, 并且要求每个蛋白至少两个独特的肽。将谱丰度因子 (SAF) 转换为归一化的谱丰度因子 (NSAF), 用于估算给定样品中蛋白的相对丰度以及样品之间给定蛋白的相对丰度。

[0563] 对来自MS Bioworks的BS3交联数据中观察到的蛋白的检查不支持以上涉及PFA的IP中鉴定出的靶的完整列表。在重数据和轻数据两者中都发现半乳凝素-3, 并且在轻数据集中具有更大的代表。在重数据和轻数据两者中都发现半乳凝素-1, 并且仅3/5的肽标记有重同位素。未观察到LILRB2。未观察到uPAR。在重数据和轻数据两者中都发现了PPIA, 并且PPIA在两者中有几乎相等的代表。图6A示出AB102的20种最高的靶。图6B示出AB102的最高的细胞表面靶。图6C示出与同种型阴性对照 (ISO) 相比, AB102的最高的细胞表面靶。在使用BS3交联剂用AB102免疫沉淀的细胞表面蛋白中, CD163具有最高的谱丰度因子 (SAF)。根据PFA和BS3方法两者, CD163被AB102免疫沉淀。SAF = 每种靶的针对蛋白尺寸 (分子量) 归一化的谱计数, 并且图6A和图6B中的SAF值是每种靶的AB102减去同种型对照的SAF的值。

[0564] 实施例5-Fc无效框架的AB101抗体免疫沉淀CD163糖型

[0565] 糖基化是影响蛋白构象、稳定性和功能的高度调节的翻译后修饰, 并且它在建立蛋白-蛋白相互作用 (即, 配体与共同源受体的结合) 中起着关键作用。AB102抗体, 以及延伸到AB101, 对明显更高分子量的CD163糖型具有特异性, 这潜在地影响CD163与免疫抑制性巨噬细胞活性所必需的其他蛋白的相互作用。

[0566] AB101 Fc无效抗体在IgG1序列中包含AB101可变结构域并命名为AB102, 该IgG1序列经修饰以大幅减少抗体与Fc受体的结合 (Fc无效)。对于通过蛋白印迹和SYPRO Ruby蛋白凝胶染色的分析, 将12μL的4×NuPAGE LDS样品缓冲液 (ThermoFisher, No.NP0007) 和10% 2-巯基乙醇添加来自实施例4的PBS-珠的25μL等分试样, 并在95℃孵育25min。样品在4%-12%Bis-Tris梯度聚丙烯酰胺凝胶上运行。对于直接可视化, 将凝胶按照制造商的说明书用SYPRO Ruby蛋白凝胶染料染色。对于蛋白印迹, 将蛋白在4℃以20V过夜转移到PVDF膜上。次日上午, 将膜在5.0mL SuperBlock (ThermoFisher, No.37515; 无Tween 20) 中封闭1hr。将抗CD163一抗 (山羊IgG多克隆; R&D, No.AF1607) 以1μg/mL的浓度添加到膜。在一抗中孵育约3hr (在室温摇动) 后, 将膜用约5mL PBST洗涤3次, 每次洗涤5分钟。洗涤后, 将含有1:

10,000 (v/v) HRP缀合的抗山羊F(ab')₂特异性二抗(不同供应商)的5mL SuperBlock(无Tween 20)添加到膜,并在室温孵育约1hr。与二抗孵育后,将膜用5mL PBST洗涤3次,每次洗涤约5min。根据制造商的说明书,使用SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate用FotoDyne Analyst Luminary Convertible transilluminator FX工作站对膜进行成像。

[0567] 如图7所示,AB102免疫沉淀了明显更高分子量的CD163糖型。由箭头指示的双重带(doublet)中的两条条带表现为不同的CD163糖型。

[0568] 实施例6-AB101与人类而非小鼠的重组CD163蛋白结合

[0569] 本实施例显示AB101与人类而非小鼠的重组CD163蛋白结合。使用ELISA确定AB101与加His标签的重组人类CD163(R&D Systems, No.1607-CD-050)和重组鼠CD163(R&D Systems, No.7435-CD-050)蛋白的结合。将重组蛋白在PBS中稀释至5μg/mL,并以每孔25μL添加到384孔高结合ELISA板(Greiner Bio-One, No.781061),并在4℃孵育过夜。使用BioTek ELx405 Select微孔板洗涤器(洗涤程序ELISA_384_PBS_3×_wash)将板用PBS洗涤三次,并且然后用90μL/孔的封闭缓冲液(2%脱脂奶粉/PBS+0.05% Tween 20)在室温封闭1hr。

[0570] 封闭后,将每孔25μL的一抗添加到板,并在室温孵育1hr。测试抗体为AB101;对照抗huCD163抗体是鼠IgG1框架的可商购的抗体(R&D Systems, #MAB1607);同种型对照是人类IgG1、人类Fc无效和鼠IgG1框架的具有已知的特异性的专有的mAb。一抗结合后,使用EL405x(洗涤程序ELISA_384_PBS_3×_wash)用PBS洗涤板三次。针对抗huCD163抗体的二抗是山羊抗小鼠IgG F(ab')₂HRP(Jackson ImmunoResearch, No.115-035-072),并且针对AB101和AB102的二抗是山羊抗人类IgG F(ab')₂HRP(Jackson ImmunoResearch, No.109-035-097)。将二抗在2%脱脂奶粉/PBS中稀释到1:2500,并且将每孔25μL添加到各板,并在室温孵育1hr。使用EL405x(洗涤程序ELISA_384_PBS_4×_wash)用PBS洗涤板4次。去除最后一次洗涤液后,添加25μL/孔的纯Ultra-TMB,并将板在室温孵育10-15min,避光。显影后,通过添加每孔25μL的0.3M HCl停止反应,并使用SpectraMax M5e仪器在450nm处读取板。

[0571] 如图8所示,在该测定中AB101、AB102和对照CD163抗体与huCD163结合,而同种型对照没有显示出可察觉的结合。AB101和对照抗huCD163抗体均未与重组鼠CD163结合,而可商购的抗muCD163抗体如预期的结合(图9)。

[0572] 实施例7-多克隆抗CD163抗体阻断AB101与M2c巨噬细胞的结合

[0573] 本实施例显示多克隆抗CD163抗体阻断AB101与M2c细胞的结合。为了检查AB101与M2c细胞上的CD163的结合的特异性,使用针对人类CD163的商业多克隆抗体进行了阻断实验。

[0574] 将收获的M2c细胞重悬于FACS缓冲液(含有2mM EDTA的PBS)(ThermoFisher No.15575-038)中(每100μL 100万个细胞)并且添加适当体积的人类Fc阻断剂(每100万个细胞10μg的重组人类Fc阻断剂)。将细胞在室温孵育20min。山羊抗huCD163多克隆抗体(R&D, #AF1607)和山羊对照多克隆抗体(Sigma, #PP40)以200μg/mL的最终浓度添加,并在室温孵育1hr。将细胞用FACS缓冲液稀释至100万个细胞/mL的最终体积,并将40μL/孔转移到v底聚丙烯不透明96孔板。

[0575] 添加Alexa Fluor® 647标记的AB101和APC标记的抗huCD163抗体(R&D Systems, #

FAB1607A),并将细胞在4℃孵育90min。通过使用multidrop将250μL的含有5%BSA的FACS缓冲液添加到每个孔来洗涤细胞,以350×g离心5min,并去除缓冲液。洗涤步骤重复2次,并且洗涤体积为300μL FACS缓冲液。将50μL含有存活力染料e780(1:1000稀释)的FACS缓冲液添加到每个孔,并将板在室温孵育20min。然后通过使用multidrop将250μL的FACS缓冲液添加到每个孔来洗涤细胞,以350×g离心5min,并去除缓冲液。将FACS缓冲液(75μL)添加到每个孔,并使用BD Canto II流式细胞仪进行样品分析。

[0576] 用多克隆抗CD163抗体预处理M2c巨噬细胞阻断了AB101抗体(图10)和对照单克隆抗huCD163抗体(图11)与M2c巨噬细胞的结合。用山羊对照多克隆抗体预处理M2c巨噬细胞没有阻断AB101抗体(图10)和对照单克隆抗huCD163抗体(图11)与M2c巨噬细胞的结合。

[0577] 实施例8-极化后人类M2c巨噬细胞中CD163的siRNA敲低减少AB102的结合

[0578] 本实施例显示极化后人类M2c巨噬细胞中CD163的siRNA敲低减少AB102的结合。本实施例中使用的方法基于Troegeler等人,Immunol Cell Biol 92:699-708(2014)。

[0579] 分离的单核细胞(来自三个供体)分别以每孔 1.5×10^6 个细胞在6孔板中铺板。在第4天,去除培养基并将含有10%FBS、100ng/ml M-CSF(Peprotech No.300-25)和50ng/mL IL-10(Peprotech No.200-10)的新鲜X-VIVO培养基添加到每个孔。在第6天,去除培养基,并用含有10%FBS的温热的X-VIVO培养基洗涤细胞两次。将1毫升X-VIVO培养基+10%FBS添加到每个孔,并将细胞放回培养箱,同时制备siRNA转染溶液。

[0580] 测试了以下人类ON-TARGETplus siRNA-SMARTpool试剂(Dharmacon):CD163(Cat.No.L-007847-00-0005)、SCRAM(Cat.No.D-001810-10-05)、CD206(Cat.No.L-011730-00-0005)、CD163L1(Cat.No.L-008024-00-0005)、PPIA(Cat.No.L-004979-04-0005)、FCGR2A(Cat.No.L-014152-00-0005)、FCGR3A(Cat.No.L-016308-00-0005)、LGALS1(Cat.No.L-011718-00-0005)、LGALS3(Cat.No.L-010606-00-0005)、LILRB2(Cat.No.L-020017-00-0005)、FCGR2C(Cat.No.L-027340-02-0005)和UPAR(Cat.No.L-006388-00-0005)。

[0581] 为了准备siRNA转染,使用ON-TARGETplus SMART siRNA库制备200μM主储液。将冻干的寡核苷酸(每种5nmol)重悬于25μL的1×Thermo siRNA缓冲液(Thermo No.B002000)中。将等分试样储存于-80℃。然后用细胞级超纯水(Hyclone No.SH3052902)稀释这些主储液来制备20μM工作液。为了制备主混合物(足够用于6孔板的6个孔),混合以下试剂:120μL 20μM siRNA库(最终浓度200nM)、270μL的HiPerFect(Qiagen No.301705)和2.64mL温热的RPMI(不含FBS或其他添加剂)。siSCRAM(加扰siRNA)的主混合物含有以下量:720μL 20μM siSCRAM、1.23mL HiPerFect和12.1mL RPMI。将混合物合并,并在室温孵育15min,通过倒置定期混合。在临使用前,将管短暂离心,并将siRNA混合物(495μL/孔)逐滴添加到细胞。温和摇动板以混合,并且然后在37℃孵育6hr。孵育后,添加2mL的含有10%FBS和IL-10(最终浓度50ng/mL)和M-CSF(Peprotech No.300-25;最终浓度50μg/mL)的X-VIVO培养基。次日更换培养基(其中保持IL-10和M-CSF)以去除转染试剂和任何死亡细胞。

[0582] 在第8天,将巨噬细胞取出并用抗体染色用于流式细胞术,或者裂解用于RT-qPCR。

[0583] 对于用于流式细胞术的那些巨噬细胞,使用以下方法。用巨噬细胞解离溶液收获siRNA处理的M2巨噬细胞,在4℃在解离溶液中孵育45min,并且然后从板温和刮下。将巨噬细胞解离溶液替换为含有0.2mM EDTA和0.1%HSA的冷PBS-/- (不含钙和镁的PBS;Hyclone

No.SH30028.02)。将细胞以 $650 \times g$ 离心沉降5min,并且然后将每百万个细胞重悬于0.5mL冷的封闭溶液(FACS缓冲液+10%NGS+10 μ g的人类IgG Fc片段蛋白(Abcam No.ab90285))中。对细胞计数,并将平均 1×10^6 个/mL用于进一步计算。将细胞在室温孵育15min(以增加FcR结合),然后在冰上孵育30min以完全封闭。将未染色细胞的等分试样留作补偿对照。将e780存活力染料(ThermoFisher eBioscience No.65-0865-18)以1:1000的最终稀释度添加到剩余部分。将细胞等分到96孔板中(每孔40 μ L),并将10 μ L的抗体溶液添加到每孔。在FACS缓冲液中以100 μ g/mL的起始浓度制备抗体,并在FACS缓冲液中系列稀释。添加抗体后,每组细胞用抗体组(与AF647缀合的Fc无效框架的AB101和与BV421缀合的商业抗CD163抗体[BioLegend No.333612])和同种型组(与AF647缀合的Fc无效框架的IS02和与BV421缀合的商业mIgG1)进行测试。最终抗体浓度范围为20 μ g/mL至0.3 μ g/mL。将细胞在一抗中在4 $^{\circ}$ C孵育1hr,然后以 $450 \times g$ 沉淀,并用150 μ L PBS-EDTA洗涤三次。沉淀后,然后将细胞重悬于100 μ L 4%多聚甲醛(在PBS-/-中)中,并在室温孵育15min(避光)。固定后,将细胞以 $650 \times g$ 离心沉降5min,并用PBS-EDTA洗涤一次。将细胞重悬于100 μ L PBS-EDTA中,并在4 $^{\circ}$ C过周末储存(避光)。然后将细胞在BD Canto II仪器上通过流式细胞术进行分析。

[0584] 收获第二组细胞用于在RT-qPCR测定中使用,如下所示。在缓冲液RLT中收获细胞,并使用Qiagen RNeasy试剂盒(Qiagen No.74104)包括QIAshredders(Qiagen No.79654)来分离RNA。洗脱后,使用SuperScript III第一链合成系统(Invitrogen No.18080051)用RNA制备cDNA。向1.5 μ g RNA添加不含RNA酶的水至10 μ L的最终体积。向其添加5 μ L DNA酶I主混合物((每个样品)=1.5 μ L 10 $\times$ DNA酶I缓冲液+2 μ L不含RNA酶的水+1.5 μ L DNA酶I酶)。将样品充分混合并在室温孵育15min。孵育后,添加1.5 μ L EDTA溶液以停止反应,将样品在65 $^{\circ}$ C孵育10min(以使酶失活),并且然后放回冰中冷却。将dNTP(1.5 μ L)和寡dT(1.5 μ L)添加到每个样品中并充分混合。将样品在65 $^{\circ}$ C孵育5min,并且然后放回冰中2min。样品冷却后,将13 μ L的样品移至新管,并将+RT主混合物(7 μ L)添加到每管。向剩余的7.5 μ L样品添加-RT主混合物(3.5 μ L)用作阴性对照样品。对于+RT主混合物(每个样品):4 μ L 5 $\times$ 第一链缓冲液、1 μ L 0.1M DTT、1 μ L RNaseOUT和1 μ L SuperScript III逆转录酶(上述SuperScript III系统的所有部分)。对于-RT主混合物,SuperScript III酶被替换为不含RNA酶的水。

[0585] 将样品充分混合并在25 $^{\circ}$ C孵育5min。孵育后,将样品在50 $^{\circ}$ C孵育30min,然后在55 $^{\circ}$ C孵育30min,并且然后在70 $^{\circ}$ C孵育15min。然后在继续之前将样品冷却至4 $^{\circ}$ C并保存在冰上。使用前,将20 μ L不含RNA酶的水添加到+RT样品,并将10 μ L不含RNA酶的水添加到-RT样品,以稀释cDNA用于RT-qPCR。

[0586] 对于qPCR,将2 μ L稀释的cDNA与0.2 μ L的每种引物(10 μ M储液浓度)、2.6 μ L不含RNA酶的水和5 μ L 2 $\times$ SYBR Green qPCR混合物(BioRad No.1725271)混合。使用未处理的对照细胞的稀释系列制成标准曲线。使用默认设置(包括温度解链曲线)在StepOne qPCR仪器上运行样品。将样品针对作为内部对照的Rp117a的扩增进行归一化。

[0587] 如图12(代表三个重复)所示,与加扰siRNA(siSCRAM)或无siRNA处理的M2c巨噬细胞相比,用针对CD163的siRNA处理极化的M2c巨噬细胞大幅减少AB102抗体的结合。

[0588] 实施例9-siRNA敲低后AB102与极化的人类M2c巨噬细胞的结合

[0589] 本实施例显示在使用不同siRNA进行siRNA敲低后,AB102与极化的人M2c巨噬细胞的结合。

[0590] 从全血分离单核细胞,以每孔 1.5×10^6 个细胞铺板(6孔板),并如以上实施例8中描述的在M2极化条件下培养。在第6天,更换培养基并添加100ng/mL M-CSF和50ng/mL IL-10。

[0591] 在第8天用不同siRNA进行siRNA处理,如先前描述的(参见实施例8)。次日抽吸培养基以去除转染试剂和任何死亡细胞,并添加新鲜培养基(仍含有IL-10和M-CSF)。在第10天,对siRNA处理的细胞进行FACS分析,并在缓冲液RLT中收获第二组细胞用于RT-qPCR(参见实施例8)。将数据归一化,用AB102与siSCRAM处理的M2c的结合几何MFI作为100%,并用同种型对照抗体与未处理的M2c的结合几何MFI作为0%。

[0592] CD163的siRNA敲低减少AB102抗体的结合。相比之下,没有观察到用siCD206、siCD163L1、siPPIA、siLGALS1、siLGALS3、siLILRB2或siUPAR敲低后AB102结合减少的证据,除了针对FCGR2A+FCGR3A(3个供体中的1个)、FCGR2C或FCGR3A的siRNA略有降低,如图13所示。事实上,AB102的结合强度在若干种siRNA条件中增加。RT-qPCR显示出对靶的强烈敲低。

[0593] 实施例10-LPS诱导的M2c巨噬细胞细胞表面上CD163表达降低减少AB101与巨噬细胞的结合

[0594] 本实施例表明,在LPS诱导CD163脱落(shed)后,AB101与M2c巨噬细胞的结合减少。如实施例2中描述地分离单核细胞,并在100 μ L/孔含有10%FBS、50ng/mL M-CSF和50ng/mL IL-10的X-VIVO培养基中,以 1×10^4 个细胞/孔在组织培养处理的平底96孔板中铺板。在第7天,将一半的细胞用10ng/mL LPS(来自大肠杆菌(E.coli)O111:B4的脂多糖;Sigma No.L5293-2ML)处理24hr。使用未缀合的一抗、抗CD163抗体(R&D Systems MAB1607-100)和AB101的滴定来标记细胞,根据先前描述的方法,使用每种抗体的8个5倍系列稀释,从200nM起始。将Alexa **Fluor**®647 AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗人类IgG F(ab')₂片段抗体用作二抗(Jackson ImmunoResearch 109-606-006)。细胞通过流式细胞术进行分析。

[0595] 如图14所示,用LPS处理培养的M2c巨噬细胞导致AB101抗体和对照抗CD163抗体两者的结合的丧失。

[0596] 实施例11-AB101阻断骨髓细胞对T细胞活化(IL-2产生)和增殖的抑制

[0597] 本实施例显示AB101阻断骨髓细胞对T细胞活化(IL-2产生)和增殖的抑制。

[0598] 为了评估减轻M2巨噬细胞介导的对T细胞活化的抑制的能力,从人类单核细胞产生M0、M1和M2c巨噬细胞。在以下三种处理方案下将M0巨噬细胞与AB101或同种型对照一起培养:1)在从M0到M2c巨噬细胞的极化期间,在存在AB101(或同种型对照抗体)的情况下(第5-7天,“前”条件),2)极化后,在存在AB101(或同种型抗体)的情况下(第7天开始,“后”条件),或3)组合1和2的条件(极化“前”和“后”)。

[0599] M0巨噬细胞的产生。在第0天,来自单独供体的单核细胞(如实施例2中描述地分离)在M0培养基(X-VIVO培养基+10%FBS+100ng/mL M-CSF)中以 2.5×10^5 个细胞/孔在96孔组织培养板中铺板,并在37°C、5%CO₂孵育5天。

[0600] M0巨噬细胞向M1或M2c巨噬细胞的极化。5日龄的M0巨噬细胞通过在M0培养基+100ng/mL IL-10(Peprotech No.200-10)中培养细胞向M2c极化,并通过在M0培养基+100ng/mL IFN- γ (Peprotech No.300-03)中培养被极化为M1。对于用AB101或IgG1同种型对照处理的细胞,将这些抗体以20 μ g/mL添加到M2c培养基中。在第6天,对于M1巨噬细胞,倾去培养基并添加新鲜的M0培养基+100ng/mL IFN- γ +1ng/mL LPS(来自大肠杆菌O111:B4的

脂多糖;Sigma No.L5293-2ML)。

[0601] 来自自体供体的PBMC用于分离CD8⁺T细胞(如实施例2中描述的)。将T细胞接铺到T75瓶中,在X-VIVO+10%FBS中过夜,直到与巨噬细胞共培养的那天(第7天)。

[0602] 允许使用染料稀释液通过流式细胞术追踪多于一代的CellTrace™ Violet Proliferation Dye试剂盒(ThermoFisher No.C34557)用于在共培养之前对T细胞进行染色。根据制造商的方案进行CellTrace™染色。

[0603] 在第7天,从铺板的巨噬细胞去除上清液,并用100μL的X-VIVO培养基+10%FBS+0.5μg/mL OKT3替换培养基。巨噬细胞在37℃、5%CO₂孵育1hr。从瓶中收获T细胞,并且在不存在或存在AB101(20μg/mL)或同种型对照(20μg/mL)的情况下,以100μL/孔中115,000个T细胞(115万个/mL)重悬于平底96孔板中,用于“极化前/后”和“极化后”处理。将T细胞以100μL的体积添加到巨噬细胞,以提供200μL/孔的最终体积和0.25μg/mL OKT3的最终浓度。将板在37℃、5%CO₂孵育24hr。在第8天,收集上清液。使用CisBio HTRF IL-2试剂盒(No.62HIL02PEG)根据带有以下修改的制造商方案测量IL-2水平:在低容量384孔板(Greiner Bio-One No.784075)中进行测定;所有体积减半;并将板短暂离心以将气泡带到表面。

[0604] 如图15所示,AB101抗体阻断骨髓细胞抑制T细胞活化的能力,如增加的IL-2产生所证明的,IL-2是T细胞刺激和增殖的标志物。细胞在极化(用IL-10处理)期间用AB101或同种型对照处理,即“前”条件。

[0605] 在第10天,将来自每个96孔板的共培养的T细胞转移到V型底96孔板(ThermoFisher No.249946),并通过以300×g离心2min沉淀。将沉淀重悬于100μL PBS中的e780存活染料(eBiosciences No.65-0865-14)(0.5μL/mL)中,并在室温在黑暗中孵育10min。

[0606] 在e780染色后,通过添加150μL FACS缓冲液(1×PBS+2mM EDTA+1%FBS)洗涤细胞,并以300×g离心2min。去除上清液。将细胞沉淀重悬于50μL/孔FACS封闭剂(人类TruStain FcX™[Fc受体阻断溶液;BioLegend No.422302]以5μL/100μL在FACS缓冲液中)中,并在4℃孵育30min。

[0607] 使用含有APC标记的抗CD8抗体(BD Pharmingen No.561953)以1:50稀释(最终浓度为1:100)和以1:50稀释的FITC标记的抗CD14抗体(最终浓度为1:100)(BD No.347493)的FACS封闭剂制备抗体混合物(2×)。以50μL/孔添加该抗体混合物,并在冰上在黑暗中孵育30min。染色液用150μL/孔FACS缓冲液洗涤。将细胞以300×g沉淀2min。去除上清液,并将细胞在25μL的4%PFA中在冰上在黑暗中固定15min。添加75μL/孔的PBS,然后在流式细胞仪上分析。

[0608] 如图16和图17所示,在极化期间用AB101处理,AB101抗体允许OKT3分别诱导的CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖。此外,如图18所示,在极化后、在与CD3⁺T细胞共培养期间(在图上标记“后”)或在组合的极化期间和极化后(在图上标记“前和后”),当与同种型抗体处理相比时,用AB101抗体处理导致IL-2产生增强。这些结果表明AB101与M2c巨噬细胞的结合减轻M2c介导的对T细胞增殖和IL-2产生的抑制。AB101处理在用IL-10极化期间是有效的,克服了组成性抑制信号;在M2c极化后是有效的,M2c极化代表了体内肿瘤微环境中的抑制性TAM。

[0609] 实施例12-M2c表面标志物表达的减少

[0610] 本实施例显示了用AB101处理后M2c表面标志物表达的减少。

[0611] 分离单核细胞(如实施例2中描述的),并在存在AB101或同种型对照抗体的情况下使单核细胞极化为M2c巨噬细胞(如实施例11中描述的)。然后按照实施例11中描述的方案将细胞染色用于表面标志物表达的抗体表型分析。下图展示了用AB101或同种型对照抗体处理M2c巨噬细胞后巨噬细胞表面表达的归一化的中值荧光强度(MFI)。使用e780可固定存活力染料对活细胞进行门控。通过将AB101处理的细胞的MFI除以用同种型对照处理的M2c细胞的MFI来计算归一化的MFI。然后将样品归一化为M2c对照的百分比,以显示表面标志物表达的相对变化。对来自7个供体的数据进行平均,并使用双因素ANOVA进行统计。

[0612] 如图19所示,在极化期间用AB101抗体对M2巨噬细胞“前”处理减少CD16、CD64、钙网蛋白和Siglec-15的表达。CD16(Fc γ RIIa)是低亲和力IgG受体,在M2抑制性巨噬细胞上高表达。CD64(Fc γ RI)是高亲和力的IgG受体,也在M2上高表达。Siglec-15是含有ITIM的跨膜蛋白,参与免疫抑制,在抑制性巨噬细胞上特异性表达。

[0613] 在用同种型对照抗体处理的M2c细胞中未观察到这些标志物的变化。类似地,评估了PD-L1、CD11b、CD14、CD32、CD163、CD206、HLA-DR、CD204、CD33、CD80、CD86、HLA-DR、DP、DQ、CD48、MARCO、LILRB2、CD172a (SIRP α)、IL10R和IL18R的表面表达,但对于AB101处理未观察到这些标志物表达的变化。

[0614] 实施例13-AB101处理的M2c巨噬细胞使OKT-3活化的T细胞偏向Th1表型

[0615] 本实施例显示,AB101处理的M2c巨噬细胞诱导OKT3刺激的T细胞表达Th1相关表面标志物。数据表明,AB101处理M2c细胞抑制M2c介导的免疫抑制并调节抗肿瘤Th1细胞的活化。

[0616] 肿瘤微环境中的骨髓细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)已被显示协调抑制免疫应答,这促进肿瘤生长。通常,这种作用可以被视为使T细胞偏向较低的Th1/Th2比率(例如,使T细胞偏向Th2表型)。因此,我们假设AB101将影响TAM与肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)之间的对话(cross-talk),从而减轻TAM对TIL的抑制作用。

[0617] 在存在或不存在AB101和同种型对照的情况下评估Th1与Th2辅助细胞的比率。在第5天(“前”=极化期间)和第7天(极化“后”,共培养期间)用AB101或同种型对照处理M2c巨噬细胞。从第7天开始,处理的M2c巨噬细胞与OKT3刺激的CD3⁺T细胞共培养3天,以允许T细胞增殖。T细胞增殖后,在第10天,从共培养物取出T细胞并用细胞表面标志物抗体组染色,以确定Th1向Th2偏向的比率。在表面标志物和细胞存活力染色后,固定T细胞并通过流式细胞术分析Th1或Th2标志物的存在。组1用于确定Th1/Th2的比率、Th17和Treg,而组2用于确定T细胞活化和衰竭。

[0618] 获得单核细胞并将其培养成巨噬细胞,并使巨噬细胞极化,如先前实施例中描述的。

[0619] 根据制造商的说明书使用StemCell CD3⁺负选择试剂盒,如实施例2中描述地获得CD3⁺T细胞。

[0620] 如实施例11中描述的,将巨噬细胞和T细胞共培养三天。

[0621] 在第10天,根据实施例11中描述的方法,使用如以下表4中列出的抗体混合物标记细胞。

[0622] 使用剩余的50 μ L/孔的封闭缓冲液以2 $\times$ 制备抗体混合物,组1抗体以1:50(最终浓

度为1:100),并且组2抗体以1:50(最终浓度为1:100)。

[0623] 表4.用于评估T细胞的Th1/Th2、Th17(组1)和衰竭/活化(组2)的抗体混合物。

	抗体组1: Th1/Th2、Th17	抗体组2: 衰竭/活化
[0624] 表面标志物	CD4 - PE (BD Pharmingen No. 55347) CD69 - PE-Cy7 (BioLegend No. 104511) CD25 - APC (BioLegend No. 101909) CD127 - BV510 (BD BIOSCIENCE NO. 563086) CXCR3 - PerCP-Cy5.5 (BioLegend No. 126513) CD194 (CCR4) - BV421 (BioLegend No. 359413) CD196 (CCR6) - BV510 (BioLegend No. 353423)	CD4 - PE (BD Pharmingen No. 55347) CD8 - APC (BIOLEGEND No. 344721) LAG3 - BV421 (BioLegend No. 369313) OX40 - BV510 (BioLegend No. 745040) PD-1 - PerCP-Cy5.5 (BioLegend No. 135207) ICOS - PE-Cy7 (BioLegend No. 329805) CTLA4 - FITC (eBioscience 11-1529-42)
标志物鉴定	Th1: CD4 ⁺ 、CD69 ⁺ 、CD196 ⁻ 、CXCR3 ⁺ 、CCR4 ⁻ Th2: CD4 ⁺ 、CD196 ⁻ 、CXCR3 ⁻ 、CCR4 ⁺ Treg: CD4 ⁺ 、CD25 ⁺ 、CD127 ⁻ Th17: CD4 ⁺ 、CD196 ⁺ 、CXCR3 ⁻ 、CCR4 ⁺	活化: ICOS ⁺ 、OX-40 ⁺ 衰竭: LAG-3 ⁺ 、PD-1 ⁺ 、CTLA-4 ⁺ Th T细胞: CD4 ⁺ Tc T细胞: CD8 ⁺

[0625] 体外骨髓细胞M2c细胞对共培养中的活化T细胞具有免疫抑制作用,其中M2c抑制T细胞增殖并使T细胞偏向Th2表型。

[0626] 用AB101处理减轻M2c细胞的抑制作用,导致受刺激的T细胞产生IL-2、增殖的能力(如实施例11所示),并使它们偏向活化的Th1、促炎表型。图20示出与同种型对照相比,用AB101处理M2c细胞增加Th1/Th2比率,表明M2c细胞的AB101处理引起T细胞偏向Th1表型。此外,图21示出与同种型对照相比,用AB101处理M2c细胞增加CD4⁺T细胞上CD69的表达,表明当用AB101处理M2c细胞时,M2C细胞的AB101处理引起CD4⁺T细胞偏向Th1表型。图22和图23示出与同种型对照相比,用AB101处理M2c细胞分别增加CD4⁺T细胞上ICOS和OX40的表达,表明M2c细胞的AB101处理引起增殖的CD4⁺T细胞具有增强的活化标志物表达。

[0627] 实施例14-骨髓细胞对CD19-CD3双特异性T细胞衔接器介导的CD8⁺T细胞杀伤Raji细胞的抑制的减少

[0628] 本实施例显示AB101处理减少骨髓细胞对CD19-CD3 BiTE介导的CD8⁺T细胞杀伤Raji细胞的抑制。使用双特异性T细胞衔接器(BiTE)抗体(针对人类CD19和人类CD3的双特异性抗体;InvivoGen Bimab-hcd19cd3),对比同种型对照抗体评估AB101的肿瘤细胞杀伤。在第5天(极化期间,“前”)和第7天(极化后共培养期间,“后”),用AB101或同种型对照处理M2c巨噬细胞。从第7天开始与T细胞共培养持续3天以允许T细胞增殖。在第10天,从与巨噬细胞的共培养物中取出T细胞,并且随后在肿瘤细胞上孵育,+/-BiTE抗体以促进细胞毒性T淋巴细胞(CTL)与肿瘤细胞之间的接触。用BiTE抗体处理后,将肿瘤细胞染色,用于通过流式细胞术分析存活力。

[0629] 如实施例11中描述地培养单核细胞并使巨噬细胞极化。如实施例11中描述地获得CD8⁺T细胞。使用描述的方法将巨噬细胞(25,000个细胞/孔)与CD8⁺T细胞(115,000个细胞/孔)共培养三天。

[0630] 在第10天,使用实施例11中描述的方法用CellTrace Violet对Raji细胞(ATCC

No.CCL-86)和K562细胞(ATCC No.CCL-243)进行染色。然后在平底96孔组织培养板中,将肿瘤细胞以100k个细胞/孔重悬于M0培养基中。将一些未染色和染色的细胞留作流式分析的单染色对照。

[0631] 在第10天,使用StemCell CD8负选择试剂盒从T细胞/巨噬细胞共培养物中分离CD8⁺T细胞。将回收的T细胞铺到Raji和K562细胞板中,每孔100μL。将双特异性抗体以10ng/mL的最终浓度和220μL/孔的最终体积添加到每个Raji和K562板(一些孔没有BiTE,作为对照)。细胞在BiTE处理中在37℃、5%CO₂培养过夜。

[0632] 在第11天,将细胞置于新的V底板中,并以300×g离心2min。从所有板收集上清液并转移到新的V底96孔板中,然后将其密封并储存于-80℃用于以后的细胞因子分析。将细胞重悬于FACS缓冲液(PBS+1%FBS)中,并用抗CD8抗体、抗CD14抗体(以排除非靶细胞)和e780存活染料染色,如实施例11中描述的。染色后,将细胞用FACS缓冲液冲洗,用4%PFA固定,并重悬于PBS中用于流式细胞术分析。CellTrace Violet标记的肿瘤细胞通过细胞内纳入的可固定存活染料eFluor 780来评估肿瘤细胞死亡。与无BiTE对照孔相比将eFluorTM 780染料阳性的细胞绘制为死亡百分比。

[0633] 与同种型对照相比,用AB101处理减轻M2c巨噬细胞的抑制作用,这允许增加的T细胞增殖。在存在BiTE的情况下,与同种型对照相比,增加的CTL导致增加的Raji肿瘤细胞杀伤,如图24所示。K562用作阴性对照,并且显示在杀伤方面没有增加(+BiTE抗体)。

[0634] 实施例15-抗体被人类原代M2c巨噬细胞内化

[0635] 在第0天,将单核细胞(参见实施例2)以1×10⁵个/孔在100μL(1×10⁶个/mL)的M0培养基中在光学清晰底96孔组织培养板中铺板,以分化为巨噬细胞。在第5天,将板旋转以去除漂浮的细胞并温和抽吸培养基。巨噬细胞在100μL/孔M2c培养基中极化为M2c,如先前实施例中描述的。

[0636] 在第6天,使用Alexa FluorTM 647抗体标记试剂盒(Invitrogen No.A20186)标记抗体。每种抗体(100μg)在50μL PBS中稀释至2mg/mL。测试的抗体如下:AB101 huIgG1和AB102 huIgG1 ADCC无效;CD163小鼠单克隆IgG1抗体(R&D Systems MAB1607-100);和同种型对照:IS01 huIgG1或IS02人类Fc无效框架。

[0637] 将来自试剂盒的整小瓶A-647羧基琥珀酰亚胺酯重悬于150μL PBS中。将A-647溶液的等分试样(50μL)添加到每管稀释抗体中,现在为1mg/mL,并将混合物在室温在黑暗中孵育45min。

[0638] 洗涤Zebra脱盐柱(Thermo 87766),通过首先剪断底部并以4,100rpm离心1min以去除储存缓冲液。然后用300μL PBS洗涤柱两次(以4,100rpm离心1min),并用300μL PBS洗涤一次(以4,100rpm离心2min)。将柱置于新的琥珀色管(amber tube)中并单独装载抗体。然后将柱以4,100rpm离心2min,以1mg/mL洗脱Alexa-647标记的抗体。

[0639] 在第7天,通过轻弹从培养板去除含有FBS的培养基,并用250μL冷PBS洗涤板两次,然后添加90μL的X-VIVO培养基(含有20μg/mL未标记的IS01IgG1抗体用于阻断Fc受体,用于用标记的AB101、IS01和抗CD163抗体(R&D Systems MAB1607-100)染色)或不含未标记的IS01阻断剂的培养基(用于用AB102和IS02染色)。将细胞在37℃、5%CO₂孵育30min,然后以5μg/mL的最终浓度添加标记的抗体。孵育1hr后,去除培养基并用250μL冷FACS缓冲液洗涤细胞,然后添加4%PFA(BD Cytofix/Cytoperm No.554722),在室温在黑暗中持续10min。细

胞组分的复染剂通过将每mL 2滴/mL NucBlue™ (Molecular Probes No.R37605) 和 ActinGreen™ (Molecular Probes No.R37110) 添加到1×Perm缓冲液 (BD Perm/Wash No.554723, 1:10稀释于水中) 制备。轻弹板以去除固定液并添加复染剂溶液 (20μL/孔)。染色在室温在黑暗中进行20min。然后通过添加250μL/孔PBS洗涤细胞, 将PBS去除并用50μL/孔PBS替换。使用Cellomics仪器对细胞进行成像。

[0640] 这些数据是由cellomics确定的细胞内的平均荧光值 (AF647的平均环平均强度 (mean ring average intensity in AF647))。细胞由DAPI染色的细胞核 (NucBlue) 和FITC标记的细胞骨架 (ActinGreen) 定义和检测。图25示出至少4个单独供体的代表性结果。在所有情况下, 同种型对照抗体没有内化, 并且AB102抗体与商业抗CD163抗体 (R&D Systems MAB1607-100) 的内化程度相同。AB101 (IgG1) 抗体的内化是AB102 (Fc无效) 或商业CD163抗体的约2倍。

[0641] 实施例16-AB101抑制人类肺癌异种移植模型中的肿瘤生长

[0642] 测试AB101在人类肺癌异种移植模型中的体内肿瘤生长抑制。与对照组相比, AB101处理后肿瘤尺寸和重量显著减少, 并且脾中CD8⁺T细胞的比例以及CD8⁺T细胞上的T细胞活化标志物ICOS和OX40的表面表达相应增加。对于CD4⁺T细胞没有观察到差异。这些结果表明AB101促进CD8⁺T细胞活化和增殖, 与先前实施例所示的体外研究一致。此外, CD11b⁺细胞的比例增加。CD11b存在于单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、树突状细胞和自然杀伤细胞上。综上所述, 这些发现表明AB101可能具有增强免疫应答以控制肿瘤负荷的治疗应用。

[0643] 为了确定AB101的治疗潜力, 使用支持人类CD34⁺造血干细胞植入和多谱系免疫细胞群体重建的NSG-SGM3小鼠品系 (The Jackson Laboratory) 测试AB101在体内减少肿瘤生长方面的有效性。

[0644] A549 (人类肺上皮癌, p53野生型) 和NCI-H1975 (人类肺腺癌, p53突变的, p.R273H) 的冷冻等分试样购自ATCC (分别为cat#CCL-185和CRL-5908)。A549细胞在补充有10%胎牛血清 (FBS; Corning, cat#35-010-CV) 和1%青霉素-链霉素 (pen/strep, HyClone, cat#SV30010) 的F-12K培养基 (ATCC No.30-2004) 中生长。H1975细胞在含有10%FBS和1%Pen/Strep的RPMI (HyClone, cat#SH30096.02) 中培养。细胞在37℃/5%CO₂扩增用于多于一次传代, 然后皮下注射到小鼠中。

[0645] NSG-SGM3小鼠被移植了两个人类脐带血单位, 由Jackson Laboratory进行, 如先前描述的Shultz等人, Nat Rev Immunol 7 (2): 118-30 (2007) [PubMed: 17259968]; Shultz等人, Nat Rev Immunol 12 (11): 786-98 (2012) [PubMed: 23059428]; Ishikawa等人, Curr Top Microbiol Immunol 324: 87-94 (2008) [PubMed: 18481454]; Pearson等人, Curr Protoc Immunol; Chapter 15: Unit 15.21 (2008) [PubMed: 18491294]。这些小鼠中的两只生病并被安乐死。在到达机构后, 允许这些小鼠适应5天。在第6天对每只小鼠的右侧腹和左侧腹剃毛。

[0646] 在第7天, 从培养物中收获A549和H1975细胞, 用PBS (不含Ca²⁺或Mg²⁺的磷酸盐缓冲盐水; HyClone No.SH30028.02) 洗涤3次, 并以5×10⁶个细胞/mL的密度重悬于Corning Matrigel®膜基质 (Fisher Scientific No.CB-40234C) 中。以100μL Matrigel中5×10⁵个细胞的剂量, 将A549细胞注射到每只小鼠的右侧腹中, 同时将H1975细胞注射到每只小鼠的左侧腹中。

[0647] 注射后5天,通过数字卡尺(Fisher Scientific No.NC0649232)测量肿瘤。肿瘤达到 $50-75\text{mm}^3$ (肿瘤体积 = $(W(2) \times L)/2$) 后,然后使用基于网络的随机发生器应用(<https://www.randomizer.org/>)将小鼠随机化并分成2组(如以下所示),每组7只小鼠:

[0648] (1) 同种型对照抗体 (IS01 Hu IgG1);

[0649] (2) AB101抗体 (Hu IgG1);

[0650] 小鼠在随机化当天开始接受抗体处理并在之后每三天一次接受抗体处理。每只小鼠每次处理经由腹膜内注射接受 $100\mu\text{L}$ PBS中的 $200\mu\text{g}$ 的同种型对照或AB101。在周一、周三和周五测量肿瘤尺寸直到第26天。显示致命发病迹象的任何小鼠被记录并立即安乐死。在第26天处死小鼠。收获肿瘤和脾用于进一步分析。

[0651] 将分离的肿瘤称重,并通过去除脂肪区域、纤维区域和坏死区域以及切成 $2-4\text{mm}$ 的块进行处理。将处理过的肿瘤添加到含有肿瘤解离酶混合溶液(肿瘤解离试剂盒,小鼠; MACS Miltenyi Biotec, No.130-096-730)的gentleMACS C管(MACS Miltenyi Biotec, No.130-096-334)中。使用gentleMACS解离器(MACS Miltenyi Biotec, No.130-093-235)解离细胞,并且然后在 $5\%\text{CO}_2$ 和 95% 的湿度孵育 30min 。将细胞沉淀,重悬于PBS中,并使用 $100\mu\text{m}$ 细胞过滤器(Corning No.352360)过滤。通过流式细胞术分析解离的单个细胞。

[0652] 将脾进行处理并通过挤压通过细胞过滤器解离成单个细胞。 10mL 注射器柱塞头用于去除任何脂肪组织和纤维组织。将脾细胞沉淀并重悬于PBS中用于通过流式细胞术分析。

[0653] 来自肿瘤和脾的骨髓细胞和T细胞使用流式细胞术用以下表5所示的抗体混合物组进行定量。使用e780存活力染料(eBiosciences No.65-0865-14;1:500在PBS中)评估细胞存活力。将细胞与e780一起在FACS缓冲液(PBS+ $1\%\text{FBS}$ + 1mM EDTA(Fisher Scientific No.15575-038))中在 4°C 孵育 10min ,然后用一抗或同种型对照抗体染色。然后用 $200\mu\text{L}$ 的FACS缓冲液洗涤细胞,并在 $25\mu\text{L}$ Fc Block(FACS缓冲液 $5\mu\text{L}/\text{mL}$ Fc Block(BioLegend No.422302))中在 4°C 封闭 30min 。将抗体染色剂(参见以下表5)添加($25\mu\text{L}$)到细胞,并在 4°C 在黑暗中再孵育 30min 。将细胞洗涤3次,然后进行FACS分析。

[0654] 表5. 抗体混合物组

[0655]	骨髓组1	来源	来源编号
	抗CD11b-APC	BD Biosciences	550019
	抗CD16-PE	BioLegend	302007
	抗CD64-Pacific Blue	BioLegend	305018
	抗HLA-DR-PerCP-Cy5.5	BioLegend	361710
	抗CD80-FITC	BioLegend	305206
	抗LILRB2-PE-Cy7	BioLegend	338711
	骨髓组2	来源	来源编号
	抗CD11b-APC	BD Biosciences	550019
	抗CD86-BV510	BD Biosciences	563697
	抗PD-L1-BV421	BioLegend	329714
	抗CD83-PE-Cy7	BioLegend	305325
	抗CD163-FITC	BD Biosciences	3563697
	抗ICOSL-PE	BioLegend	309403

T细胞组1	来源	来源编号
抗CD4-FITC	BioLegend	300505
抗CD194 (CCR4) -BV421	BioLegend	359413
抗CD196 (CCR6) -BV510	BioLegend	353423
抗CXCR3-PerCP-Cy5.5	BioLegend	126513
抗CD69-PE-Cy7	BioLegend	104511
抗CD25-APC	BioLegend	101909
抗IL-7Ra-PE	BioLegend	135013
T细胞组2	来源	来源编号
CD8-APC	BD Biosciences	561953
抗LAG-3-BV421	BioLegend	369313
抗OX40-BV510	BD Biosciences	745040
抗PD-1-PerCP-Cy5.5	BioLegend	135207
抗ICOS-PE-Cy7	BioLegend	329805
抗CTLA4-PE	BioLegend	106305

[0656] 与同种型对照抗体相比,AB101处理显著减少A549和H1975肿瘤生长。图26和图27分别示出绘制30天内的A549和H1975肿瘤的肿瘤体积。箭头指示注射抗体处理。每个点代表来自7只小鼠的平均测量值。误差线表示平均值的标准误差 (SEM)。使用Mann-Whitney检验计算统计学显著性。

[0657] 在同种型对照中,A549肿瘤和H1975肿瘤的体积随时间增加。然而,与同种型对照相比,在接受AB101处理的小鼠中,A549肿瘤表现出较慢的生长,而H1975肿瘤在第17天显示消退,并且此后生长保持稳定。在第5天 (D5) 随机化时,同种型对照和AB101的平均A549肿瘤体积分别为 63.6mm^3 和 63mm^3 ,并且在第26天 (D26),同种型对照的平均肿瘤体积为 378mm^3 ,而AB101的平均肿瘤体积为 198mm^3 。类似地,在第5天,同种型对照和AB101的H1975肿瘤体积分别为57.8和34.2,并且在第26天,同种型对照的平均肿瘤体积为 164.4mm^3 ,而AB101的平均肿瘤体积为 57.4mm^3 。

[0658] AB101处理显著减少A549肿瘤和H1975肿瘤两者的肿瘤尺寸。在第26天,切下肿瘤并称重。相对于同种型对照,AB101使A549肿瘤的尺寸减少49% (平均肿瘤重量:同种型对照为538.2mg,并且AB101为273.0mg, $p=0.003$),并使H1975肿瘤减少60% (平均肿瘤重量:同种型对照为217.2mg,并且AB101为85.6mg, $p=0.0009$)。

[0659] AB101处理显著增加脾中 CD8^+ T细胞和骨髓细胞相对于总活细胞的比例。 CD8^+ T细胞的平均百分比从同种型对照的1.3增加到AB101的3.3,并使 CD11b^+ 细胞的平均百分比从同种型对照的2.1显著增加到AB101的4。

[0660] AB101处理还显著增强脾中人类 CD8^+ T细胞上活化标志物的表达。 CD8^+ T细胞上ICOS表达的平均MFI从同种型对照的318增加到AB101的841,并且OX40表达的平均MFI从同种型对照的586增加到AB101的1561。

[0661] 实施例17-M2c/T细胞共培养测定中AB101减轻M2c介导的对T细胞的免疫抑制

[0662] 为了评估AB101是否可以调节TME中癌症介导的免疫逃避,将人类PBMC来源的T细胞与自体免疫抑制性M2c巨噬细胞一起培养。在三种处理方案下评估了挽救抗CD3抗体

(OKT3)活化的T细胞免于M2c介导的免疫抑制的AB101免疫调节活性,其中T细胞增殖和IL-2产生作为治疗功效的读出。图28示出实验设计。

[0663] 为了确定AB101是否干扰M2样肿瘤相关巨噬细胞的产生,在存在AB101或同种型对照的情况下,将M0巨噬细胞极化为M2c巨噬细胞(“前”方案)。在与T细胞共培养之前将处理抗体洗掉。为了评估AB101处理是否挽救T细胞免于M2c介导的免疫抑制,在存在M2c巨噬细胞和AB101或的同种型对照的情况下,在M2c/T细胞共培养期间,用抗CD3抗体活化T细胞(“后”方案)。为了模拟体内免疫治疗,将前方案和后方案组合(前/后)。

[0664] 在第一组实验中,用来自三个健康受试者的人类单核细胞来源的巨噬细胞和T细胞评估AB101对M2c极化的作用。在存在用AB101或同种型对照处理的自体M2c巨噬细胞的情况下,用OKT3活化CD4⁺和CD8⁺T细胞。与单独的M2c巨噬细胞共培养的OKT3刺激的T细胞用于评估M2c介导的免疫抑制。T细胞与IFN- γ +LPS极化的M1巨噬细胞共培养提供了最佳的T细胞活化的量度。没有OKT3活化的情况下,M2c/T细胞共培养类似于静息T细胞。图29示出,相对于同种型对照,AB101处理显著增强了CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖,分别使分裂细胞从7%增加至54%($P<0.01$)和从21%增加至83%($P<0.05$)。M1巨噬细胞和AB101处理的M2c巨噬细胞诱导相似水平的增殖。此外,图30示出当与来自AB101处理的M2c组或幼稚(naïve)M2c组的活化的T细胞的IL-2分泌相比时,对M2c巨噬细胞的AB101预处理显著增加来自所有三个研究受试者的活化的T细胞的IL-2产生。来自与AB101处理的M2c巨噬细胞共培养的IL-2水平类似或高于与M1巨噬细胞共培养中达到的水平。如预期的,没有OKT3活化的情况下,与M2c共培养的T细胞没有产生可检测到的IL-2水平。

[0665] 接下来,评估了在前方案、前/后方案和后方案下AB101处理对CD8⁺T细胞/M2c共培养物的影响。该实验是用来自三个健康受试者的PBMC进行的。在存在M2c巨噬细胞的情况下,来自3个研究受试者的CD3⁺T细胞用抗CD3抗体(OKT3,0.25 μ g/mL)活化。在极化期间,M2c巨噬细胞用AB101(20 μ g/mL)、人类IgG1同种型对照(20 μ g/mL)或单独的培养基处理(前,共培养前)。在抗CD3抗体刺激后72h收获T细胞,并通过流式细胞术对增殖进行定量。M2c、AB101和IgG1同种型对照处理组的P值通过Dunnett's T3多重比较检验来计算($p<0.05$,*; $p<0.01$,**; $p<0.001$,***)。

[0666] 图31示出在前方案和后方案下,当与同种型对照组相比时,AB101处理显著增强CD8⁺T细胞增殖($p<0.05$)。当与相应的同种型对照组值相比时,Ab101前方案和后方案使分裂的CD8⁺T细胞的百分比分别从23%增加至42%和从26%增加至47%。在AB101前/后组中观察到CD8⁺T细胞增殖的最大增加,为49%分裂的CD8⁺T细胞,相比于同种型对照前/后对照组的22%分裂的CD8⁺T细胞($p=0.062$)。

[0667] 图32示出单个研究受试者的相应的IL-2数据。当与单独的M2c和同种型对照组相比时,AB101处理组中的所有三个受试者均显著增加CD8⁺T细胞的IL-2产生。M2c/T细胞共培养的前/后组合处理实现了最高的IL-2分泌。三种AB101处理方案的增殖和IL-2数据表明,AB101不仅影响M2c细胞的极化,还减轻T细胞/M2c共培养期间M2c介导的免疫抑制。

[0668] 图33和图34示出前和前/后AB101处理的汇总的增殖数据。AB101对CD8⁺T细胞的增殖比对CD4⁺T细胞增殖的影响更大。相对于相应的同种型对照值,AB101处理分别在前方案($n=16$, $p<0.001$)和前/后方案($n=13$, $p<0.001$)下显著增强CD8⁺T细胞的增殖相应。当与同种型处理的M2c巨噬细胞相比时,CD4⁺T细胞响应于AB101前方案和前/后方案增殖,分裂细

胞的百分比从31%增加至44% (前, $n=18$, $p<0.01$) 和从42%增加至49% (前/后, $n=14$, $p<0.05$)。

[0669] 图35示出在M2c细胞极化期间用AB101处理也显著增强M2c/T细胞共培养测定中T细胞的IL-2产生。前处理AB101组中的T细胞产生显著更高水平的IL-2, 具有292ng/mL的中值, 几乎是来自相应同种型对照处理组中T细胞的104ng/mL的三倍高 ($n=21$, $p<0.0001$)。AB101前/后处理使T细胞产生333ng/mL的IL-2应答, 比来自同种型对照处理的M2c/T细胞共培养物的227ng/mL高50%; 然而, 这种差异并没有达到显著性。

[0670] 实施例18-在恢复与M2c巨噬细胞共培养的T细胞的T细胞增殖和细胞因子应答方面, AB101比AB104更有效

[0671] 为了确定AB101介导的免疫抑制减轻是否需要与M2c巨噬细胞表达的Fc受体相互作用, 我们在M2c/T细胞共培养测定中评估了AB101-IgG4 (AB104) 和AB101-IgG1 Fc无效 (AB102) 同种型。AB101 IgG1-Fc区与M2c巨噬细胞上的CD64、CD32和CD16结合, 而IgG1Fc无效同种型与Fc γ 受体的结合很小。与IgG1 Fc区类似, IgG4 Fc区对CD64具有纳摩尔的亲和力, 但通常不与CD32或CD16 Fc受体结合。用来自5个研究受试者的细胞, 将AB101、AB102和AB104同种型减轻M2c介导的对T细胞增殖的免疫抑制的能力进行比较。

[0672] 从4个 (CD8⁺T细胞) 和5个 (CD4⁺T细胞) 人类受试者分离的T细胞, 在存在M2c巨噬细胞的情况下用抗CD3抗体 (OKT3, 0.25 μ g/mL) 活化。M2c/T细胞共培养物在前/后方案下用20 μ g/mL指定的AB101的同种型处理。单独的M2/T细胞共培养用作M2c介导的免疫抑制的对照。在抗CD3抗体刺激后72h收获T细胞, 并通过流式细胞术对增殖进行定量。符号代表单个研究受试者。P值通过比较指定处理组的成对双尾t检验来计算 ($p<0.05$, *, ns, 不显著)。

[0673] 图36示出AB101前/后方案显著 ($p<0.05$) 增强抗CD3抗体活化的CD8⁺和CD4⁺T细胞的平均增殖, 当与IgG1同种型对照相比时 (52%至78%CD8⁺T细胞; 46%至65%CD4⁺T细胞), 并且当与AB102相比时 (52%至78%CD8⁺T细胞; 42%至65%CD4⁺T细胞)。当与各自的同种型对照相比时, AB104和AB102处理仅略微增强T细胞的增殖性应答。相对于IgG4同种型对照组, 只有AB104处理组中的CD4⁺T细胞的增殖性应答达到显著性 (39%至47%分裂细胞, $p<0.05$)。

[0674] 图37示出当与IgG1同种型对照 (40%分裂细胞, $p<0.05$) 和AB104处理 (41%分裂细胞, $p<0.05$) 相比时, AB101前/后方案对OKT3介导的CD8⁺T细胞增殖具有强烈且显著的刺激作用 (70%分裂细胞)。另外, 当与同种型对照 (27%分裂细胞, $p<0.05$) 或AB104处理 (20%分裂细胞, $p<0.05$) 相比时, AB101后方案展示出显著增强的CD8⁺T细胞增殖 (54%分裂细胞)。在前/后方案或后方案中, 相比于IgG4同种型对照, AB104处理没有显著提高增殖性应答。

[0675] 在M2c/T细胞共培养期间的AB101处理 (后方案) 减轻了M2c介导的免疫抑制, 并诱导了抗CD3抗体活化的CD8⁺T细胞的有效细胞因子应答。在存在M2c巨噬细胞的情况下, 从3个研究受试者分离的CD8⁺T细胞用抗CD3抗体 (OKT3, 0.25 μ g/mL) 活化。M2c/T细胞共培养物在后方案下用20 μ g/mL的AB101、人类IgG1同种型对照、AB104、人类IgG4同种型对照和单独的培养基 (M2c) 进行处理。在抗CD3抗体刺激后72h取出上清液, 并通过基于磁珠的免疫测定定量细胞因子分泌。P值通过比较指定处理组的成对双尾t检验来计算 ($p<0.05$, *, $p<0.01$, **, $p<0.001$, ***; ns, 不显著)。

[0676] 图38示出当与IgG1同种型对照相比时, AB101显著增强所有研究受试者的IFN- γ

和穿孔蛋白水平。表6示出与IgG1同种型对照值相比,AB101处理组的平均IFN- γ 、穿孔蛋白和IL-6水平增加,从530pg/mL增加至1600pg/mL (IFN- γ)、从210pg/mL增加至1900pg/mL (穿孔蛋白) 和从203pg/mL增加至690pg/mL (IL-6)。此外,AB101处理使3个研究受试者中的2个的TNF- α 分泌恢复,与相应的IgG1同种型对照值相比显著增加,从60pg/mL增加至830pg/mL和从1pg/mL增加至120pg/mL。如表6所示,AB101前/后方案通过诱导穿孔蛋白和所测试的细胞因子的类似的细胞因子水平证实了对后方案组观察到的结果。在任何的处理组中,AB104都没有减轻M2c介导的免疫抑制。在所有处理条件下,评估的M2c共培养物中的IL-10水平处于测定的检测下限。

[0677] 表6.AB101挽救CD8⁺T细胞细胞因子应答免于M2c巨噬细胞介导的免疫抑制

CD8 ⁺ T细胞的细胞因子分泌 [pg/mL]											
细胞因子		对照		前/后方案				后方案			
		无抗体		AB101		AB104		AB101		AB104	
		M1	M2	抗体	同种型	抗体	同种型	抗体	同种型	抗体	同种型
IL-6	平均值	243	27	744	62	12	51	686	203	22	77
	SEM	113	16	222	36	5	28	201	86	21	53
IL10	平均值	4	20	26	11	9	13	20	16	10	13
	SEM	4	10	17	0	5	3	10	3	7	3
IFN- γ	平均值	3016	259	1730	461	14	134	1615	531	17	220
	SEM	1209	295	1441	549	5	153	1439	632	2	255
TNF- α	平均值	53	14	330	23	2	12	312	31	2	14
	SEM	24	15	310	25	1	12	272	32	2	15
穿孔蛋白	平均值	220	91	2459	144	57	72	1912	213	48	73
	SEM	129	34	1945	124	8	24	1494	147	19	23

[0679] AB101后方案和前/后方案M2c/CD4⁺T细胞共培养物的相应的细胞因子和穿孔蛋白结果在图39和表7中示出。在存在M2c巨噬细胞的情况下,从3个健康研究受试者分离的CD4⁺T细胞用抗CD3抗体(OKT3, 0.25 μ g/mL)活化。M2c/T细胞共培养物在后处理方案下用AB101 (20 μ g/mL)、人类IgG1同种型对照 (20 μ g/mL)、AB104 (20 μ g/mL)、人类IgG4同种型对照 (20 μ g/mL) 和单独的培养基 (M2c) 进行处理。在抗CD3抗体刺激后72h取出上清液,并通过基于磁珠的免疫测定定量细胞因子分泌。P值通过比较指定处理组的成对双尾t检验来计算 ($p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; ns: 不显著)。

[0680] 当与IgG1同种型对照和AB104相比时,AB101显著增强所有研究受试者的IFN- γ 、TNF- α 和穿孔蛋白水平。与IgG1同种型对照值相比,AB101处理组的平均IFN- γ 、TNF- α 、穿孔蛋白和IL-6水平增加,从770pg/mL增加至1700pg/mL (IFN- γ)、从420pg/mL增加至1400pg/mL (TNF- α)、从220pg/mL增加至780pg/mL (穿孔蛋白) 和从1300pg/mL增加至5100pg/mL (IL-6)。AB101前/后方案通过诱导穿孔蛋白和所测试的细胞因子的相似细胞因子水平证实了对后方案组观察到的结果。当与IgG4同种型对照组的相应的水平相比时,AB104没有增强细胞因子或穿孔蛋白应答。

[0681] 表7.AB101挽救CD4⁺T细胞细胞因子应答免于M2c巨噬细胞介导的免疫抑制

CD4 ⁺ T细胞的细胞因子分泌 [pg/mL]											
细胞因子		对照		前/后方案				后方案			
		无抗体		AB101		AB104		AB101		AB104	
		M1	M2	抗体	同种型	抗体	同种型	抗体	同种型	抗体	同种型
IL-6	平均值	372	112	5039	1092	1015	940	5129	1330	1101	738
	SEM	205	33	1813	236	214	362	2372	388	380	153
IL10	平均值	93	67	576	232	171	132	533	218	164	129
	SEM	50	35	171	106	53	35	103	106	68	67
IFN- γ	平均值	4202	84	1609	721	562	416	1678	774	588	366
	SEM	1012	53	251	291	176	96	195	345	255	194
TNF- α	平均值	175	133	1356	424	427	500	1377	423	417	419
	SEM	95	82	402	70	70	95	261	59	87	121
穿孔蛋白	平均值	117	64	685	173	122	99	776	224	138	94
	SEM	58	5	195	50	33	9	231	103	48	34

[0683] 总之,AB101挽救T细胞细胞因子应答免于M2c介导的免疫抑制以及AB104同种型缺乏功效表明,AB101功能可能需要AB101 Fc受体相互作用。

[0684] 实施例19-AB101处理增强CD8⁺T细胞的细胞毒活性

[0685] 为了确定AB101是否增强TME中CD8⁺T细胞的肿瘤细胞的杀伤,评估了在存在M2c巨噬细胞的情况下用抗CD3抗体刺激的CD8⁺T细胞的细胞毒活性。在这项研究中,肿瘤抗原特异性、T细胞介导的肿瘤细胞杀伤用双特异性T细胞衔接器 (BiTE®) 技术取代。BiTE抗体是融合蛋白,由两种单克隆抗体的可变结构域组成,被设计成桥接癌细胞与CTL。一个可变结构域靶向癌细胞表面上的抗原,并且另一个可变结构域与T细胞表面上的CD3接合。在BiTE®抗体的双臂结合后,T细胞和癌细胞被迫彼此靠近。结果,在T细胞和癌细胞之间产生细胞裂解性突触,从T细胞释放穿孔蛋白和颗粒酶,并且发生肿瘤细胞死亡。

[0686] CD19-CD3 BiTE抗体用于评估AB101在T细胞介导的表达BiTE的CD19靶的Raji B细胞淋巴瘤细胞的肿瘤细胞杀伤中的功效。对M2c/CD8⁺T细胞共培养物的AB101处理减轻M2c介导的免疫抑制,并且可以扩增和增强CD8⁺T细胞的细胞裂解活性。在不存在BiTE的情况下,CD8⁺T细胞也可以通过同种异体HLA限制性细胞裂解来杀死Raji细胞。不表达BiTE或HLA的K562细胞(慢性骨髓白血病细胞系)被纳入用于评估CD8⁺T细胞的非HLA限制性细胞死亡。

[0687] M2c巨噬细胞和自体人类原代CD8⁺T细胞的共培养物用抗CD3抗体活化并扩增3天。在前方案、前/后方案和后方案下,共培养物用AB101 (20 μ g/mL)、人类IgG1同种型对照 (20 μ g/mL) 或单独的培养基处理。在前方案和后方案下,仅在M2c极化期间和M2c T细胞共培养期间分别添加治疗性抗体。P值通过分别比较AB101与M2c和同种型对照处理组的成对双尾t检验来计算 ($p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, ***; $p < 0.0001$, ****; ns: 不显著)。关于细胞毒性读出的M2/T细胞共培养测定的工作流程在图28中示出。

[0688] 图40示出在存在CD19-CD3BiTE®抗体的情况下,当与同种型对照相比时,在M0巨噬细胞向M2巨噬细胞极化期间或M2c/T细胞共培养期间AB101处理显著增强Raji细胞的杀伤。Raji细胞死亡的百分比在前方案下从66%增加至77% ($p < 0.01$),在前/后方案下从64%增加至83% ($p < 0.001$),并且在后方案下从65%增加至82% ($p < 0.01$)。RajiBiTE®杀伤测定具有小的动态范围和高背景,并且与M2c细胞一起培养的静息CD8⁺T细胞(灰色条,黑色圆)杀伤71%的Raji细胞。

[0689] 应注意,AB101处理还增加靶向K562癌细胞的非HLA限制性CD8⁺T细胞的细胞毒活

性。与相关同种型对照值相比,对M2c巨噬细胞和T细胞的前/后和后AB101处理使肿瘤细胞杀伤在前/后条件下从12%增强至41% ($p<0.01$),并且在后条件下从13%增强至36% ($p<0.05$)。

[0690] 接下来,评估了AB101对来自一组人类受试者的CD8⁺T细胞的细胞毒活性的影响。来自8个研究受试者的CD8⁺T细胞在存在自体M2c巨噬细胞、含有抗CD3抗体(OKT3, 0.25 μ g/mL)的情况下繁殖。在前方案、前/后方案和后方案下,单独的M2c巨噬细胞和共培养物用AB101 (20 μ g/mL)、人类IgG1同种型对照(20 μ g/mL)或单独的培养基处理。在抗CD3抗体刺激后72h收获T细胞,并在存在或不存在CD19-CD3 BiTE抗体的情况下与Raji细胞一起培养。在细胞裂解测定建立后18h,通过流式细胞术确定Raji细胞的细胞死亡。P值通过分别比较AB101与M2c和人类IgG1同种型对照处理组的成对双尾t检验来计算 ($p<0.01$, **; $p<0.001$, ***)。

[0691] 如图41所示,当与人类IgG1同种型对照组相比时,AB101前/后处理使BiTE®辅助的CD8⁺T细胞介导的Raji细胞杀伤从49.5%显著增加至63.5% ($p<0.001$)。在没有BiTE的情况下,来自AB101组的CD8⁺T细胞使Raji细胞的细胞裂解从35%增强至43% ($p<0.01$)。

[0692] 接下来,评估了AB101对非HLA限制性CD8⁺T细胞的细胞毒活性的影响。来自8个研究受试者的CD8⁺T细胞在存在自体M2c巨噬细胞、含有抗CD3抗体(OKT3, 0.25 μ g/mL)的情况下繁殖。在前方案、前/后方案和后方案下,单独的M2c巨噬细胞和共培养物用AB101 (20 μ g/mL)、人类IgG1同种型对照(20 μ g/mL)或单独的培养基处理。在抗CD3抗体刺激后72h收获T细胞并与K562细胞一起培养。在测定建立后18h通过流式细胞术确定K562细胞的细胞死亡。P值通过分别比较AB101与M2c和人类IgG1同种型对照处理组的成对双尾t检验来计算 ($p<0.01$, **)。

[0693] 图42示出在K562杀伤测定中,AB101处理对细胞裂解性CD8⁺T细胞活性具有最强的影响。AB101处理组的平均细胞死亡是人类IgG1同种型对照组的两倍高,使平均K562杀伤分别从14%增加至29% ($p<0.01$)。

[0694] 实施例20-AB101调节与M2c巨噬细胞共培养的T细胞上趋化因子受体的表达

[0695] 为了确定AB101是否改变CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的活化状态,在M2c/T细胞共培养测定中评估了趋化因子受体和活化或衰竭标志物的表达,如图28所示。

[0696] 将抗CD3抗体活化的T细胞与极化期间用AB101或同种型对照处理的自体M2c细胞共培养。与幼稚M2c或IFN- γ LPS活化的M1巨噬细胞共培养的抗CD3抗体活化的T细胞被分别纳入作为免疫抑制和免疫活化的对照。将没有抗CD3抗体活化的静息T细胞与M2c巨噬细胞共培养。抗CD3抗体活化三天后,通过流式细胞术分析T细胞。流式细胞术染色组1(表8)包括针对活化标志物(CD25和CD69)、静息T细胞标志物CD127以及通常用于区分CD4⁺T细胞亚群的趋化因子受体CXCR3、CCR4(CD194)和CCR6(CD196)的抗体。流式细胞术抗体组2(表8)包括T细胞活化和衰竭标志物LAG3、OX40、PD-1、ICOS和CTLA-4。

[0697] 在存在M2c巨噬细胞的情况下,从3个研究受试者分离的T细胞用抗CD3抗体(OKT3, 0.25 μ g/mL)活化。M2c/T细胞共培养物在M2c极化期间用AB101 (20 μ g/mL)、人类IgG1同种型对照(20 μ g/mL)或单独的培养基处理。M1/T细胞共培养物被纳入作为阳性对照。在抗CD3抗体刺激后72h收获上清液用于流式细胞术。热图代表所有研究受试者的组合处理组的FlowSOM聚类分析。

[0698] CD4⁺T细胞的表型使用流式细胞术组1来评估,并且FlowJo FlowSOM插件用于无偏倚聚类。如图43所示,来自所有M2c/T细胞共培养组的CD4⁺T细胞的FlowSOM聚类鉴定出具有不同表面标志物表达水平的8个聚类(编号为0-7)。聚类1代表静息T细胞,并且聚类6类似于活化的Th1样T细胞。

[0699] 表8.用于评估CD4⁺T细胞亚型上趋化因子受体表达和衰竭/活化标志物的抗体组

[0700]		抗体组1: T细胞表型分析组	抗体组2: 衰竭/活化
	表面标志物	CD4 - FITC CD69 - PE-Cy7 CD25 - APC CD127 - PE CXCR3 - PerCP-Cy5.5 CD194 (CCR4) - BV421 CD196 (CCR6) - BV510	CD4 - FITC CD8 - APC LAG3 - BV421 OX40 - BV510 PD-1 - PerCP-Cy5.5 ICOS - PE-Cy7 CTLA4 - PE

[0701] AB101处理如何影响CD4⁺T细胞比例的可视化代表性实例在表9和图43中示出,与M2c细胞共培养的没有抗CD3抗体活化的大多数(平均值=74%)T细胞是见于聚类1中(来自3个研究受试者中的3个)。聚类1细胞具有静息表型,CD69、CXCR3、CCR4或CD25表达低或不表达,并且CD127表达升高。在存在免疫活化性的M1极化的巨噬细胞的情况下,大多数T细胞(57%,所有3个受试者的平均值)采取活化表型,其特征在于CXCR3的高表达和CCR4、CD127、CCR6以及活化标志物CD25和CD69的低表达(聚类2)。M1共培养物也诱导具有升高的CD25、CXCR3和CCR4表达的独特的较小亚群(聚类7,与M1共培养的T细胞的21%)。M2c细胞对共培养中的抗CD3抗体活化的CD4⁺T细胞具有免疫抑制作用,其中46%的T细胞在静息表型聚类1中。此外,单独的M2c组的T细胞的32%见于活化的T细胞表型聚类2中。

[0702] 表9.AB101调节活化的CD4⁺T细胞在FlowSOM聚类中的分布

FlowSOM 聚类	CD4 ⁺ T细胞在FlowSOM聚类中的分布[%]									
	静息T细胞 M2c		M2c + OKT3		同种型对照 M2c + OKT3		AB101 M2c + OKT3		M1 + OKT3	
	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM	平均值	SEM
0	1.7	0.3	3.3	0.9	3.0	0.7	5.9	1.6	2.9	0.8
1	73.1	7.8	46.3	2.9	51.3	1.6	12.3	7.3	8.9	3.7
2	19.8	5.7	31.9	5.3	27.4	1.9	40.5	9.8	55.6	6.1
3	1.3	0.8	4.3	1.5	4.2	0.7	14.0	4.5	1.1	0.5
4	2.9	0.8	9.6	1.7	8.7	1.5	16.0	3.0	3.3	0.5
5	0.2	0.0	0.3	0.1	0.2	0.1	0.6	0.1	3.9	1.3
6	0.4	0.2	3.3	0.5	4.4	1.8	9.3	1.0	3.4	0.8
7	0.7	0.3	1.0	0.1	0.9	0.1	1.4	0.1	20.8	1.5

[0704] 图43示出来自同种型对照组的抗CD3抗体活化的CD4⁺T细胞与来自相应的单独的M2c组的T细胞具有相似的分布谱,其中平均51%的T细胞在聚类1中,并且27%的T细胞在聚类2中(表9)。

[0705] 相比之下,用AB101处理减轻了M2c极化的巨噬细胞的抑制作用。与同种型对照相比,AB101使共有聚类2的活化表型的T细胞的比例从27%显著增强至40% (p<0.05)。此外,AB101使共有静息细胞表型的细胞比例从51%显著降低至13% (聚类1;p<0.0001)。这种分布类似于在存在M1巨噬细胞的情况下受到刺激的T细胞的表型模式。

[0706] 当与同种型对照组相比时,用AB101处理也使聚类3、4和6升高。如图43所示,在3个被评估的受试者中的2个中,相对于各自的M2c和同种型对照,这3个聚类的差异达到显著性

($p < 0.0001$)。

[0707] 聚类3和聚类4由CXCR3的高表达、CCR4的中表达和CD127的存在以及活化标志物CD69的高表达(聚类3)或低表达(聚类4)定义。聚类3的表型不与M1或静息T细胞共有,这似乎是AB101处理所独有的。

[0708] 聚类6代表活化的Th1样T细胞的表型,具有CXCR3和CD69的高表达以及CCR4和CCR6的极小表达。AB101处理使聚类6中T细胞比例的平均百分比从同种型处理组的4.4%增加至9.3%(表9)。

[0709] 总之,通过M2c共培养扩增的CD4⁺T细胞表型的FlowSOM分析表明,AB101处理减轻了M2c介导的免疫抑制,并且诱导了由CXCR3和CCR4的表达突出的独特T细胞表型的表达。AB101处理也使M2c共培养物中活化的Th1样CXCR3⁺T细胞的比例增加。

[0710] 为了进一步研究AB101阻断M2c介导的抑制导致T细胞活化增强的能力,评估了CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的活化和衰竭标志物LAG3、OX40、PD-1、ICOS和CTLA-4。通过FlowSOM对CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞进行聚类,鉴定出5个CD4⁺聚类(编号为0-4)和4个CD8⁺聚类(编号为0-3)。

[0711] 聚类0(CD4⁺T细胞)和聚类3(CD8⁺T细胞)中LAG3、OX40、PD-1和CTLA-4的低表达指示静息表型。聚类1(CD4⁺T细胞)和聚类3(CD8⁺T细胞)中PD-1和ICOS的增加的表达代表本研究中的活化表型(图44)。

[0712] 聚类0(ICOS⁺PD-1⁻LAG3⁻CTLA4⁻OX40⁻)代表未刺激的CD4⁺T细胞的90%,并且聚类3(ICOS^低PD-1⁻LAG3⁻CTLA4⁻OX40⁻)代表与M2c巨噬细胞一起培养但没有抗CD3抗体活化的静息CD8⁺T细胞的93%(图44)。当与M2c极化的巨噬细胞共培养或用同种型对照处理时,抗CD3抗体活化的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞主要落入相应的静息聚类0(CD4⁺T细胞的65%)和聚类3(CD8⁺T细胞的64%),证实了M2c细胞介导的免疫抑制。

[0713] 当与单独的M2c或同种型对照处理组相比时,AB101显著增强CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的活化。AB101处理组中CD4⁺T细胞的82%和CD8⁺T细胞的93%见于各自的活化的T细胞表型聚类1(ICOS^高PD-1⁺LAG3⁻CTLA4⁻OX40^低)和聚类0(ICOS^高PD-1⁺LAG3^低CTLA4⁻OX40^低)中,与M1极化的巨噬细胞共培养的T细胞共有。

[0714] 实施例21-AB101调节m2c表面标志物的表达

[0715] 在M2c/T细胞共培养测定中,在M0向M2c巨噬细胞极化期间,AB101处理挽救了抗CD3抗体活化的T细胞免于M2c介导的免疫抑制。为了确定AB101是否调节M2c上的表面标志物和免疫检查点的表达,在存在AB101或同种型对照(20 μ g/mL)的情况下,用IL-10使5日龄的M0巨噬细胞向M2c巨噬细胞极化,并且然后用一组巨噬细胞表型分析抗体染色。将流式细胞术谱与幼稚、未处理的M2c细胞和LPS+IFN- γ 极化的M1巨噬细胞进行比较。M2c巨噬细胞表达M2c标志物CD163、CD206和Mer-TK, Fc γ 受体CD16、CD32、CD64,模式识别受体TLR2, TNFR家族成员CD40。如预期的,在IFN- γ 处理后,当与M2c巨噬细胞相比时, M1巨噬细胞表达更高水平的HLA-II类和检查点配体PD-L1。相比之下, M2c巨噬细胞比M1巨噬细胞显示出更高水平的免疫抑制性配体Siglec-15和LILRB2。所评估的表面标志物、共刺激分子和受体CD86、CD91、CD150、钙网蛋白、Dectin-1、TIM4和TLR4在M2c细胞上不表达。

[0716] 为了进一步分析活化的CD4⁺T细胞的CXCR3表达, FlowSOM聚类3至6基于其CXCR3⁺CD69⁺CD25⁺T细胞表型被组合。所得的表型的比例在图45中以饼图示出,并代表图45的表中

的表型。

[0717] 当与同种型处理组相比时,AB101处理使表达活化标志物CD69和CD25的活化的CXCR3⁺,CD4⁺T细胞的比例从18%增加至40%。OR2572和M2c单独处理组具有相当的分布谱。

[0718] 为了定量AB101对表面标志物表达的调节作用,AB101处理的M2c细胞上的表型分析抗体的mMFI值针对来自多达10个研究受试者的同种型对照(nMFIiso)或未处理的、幼稚M2c巨噬细胞(nMFIM2c)上的相应的标志物进行归一化(图46)。相对于同种型对照处理的M2c细胞,AB101诱导CD16(34%nMFIiso,p<0.0001)和CD64(30%nMFIiso,p<0.0001)的高度显著的减少,以及TLR2(66%nMFIiso,p<0.05)的显著降低。当AB101 M2c表面标志物MFI针对幼稚M2c巨噬细胞归一化时,观察到类似的趋势。对于CD16(44%nMFIM2c,p<0.001)、CD64(30%nMFIM2c,p<0.0001)、TLR2(63%nMFIM2c,p<0.05)和Siglec-15(66%nMFIM2c,p<0.05),来自AB101处理的巨噬细胞的表面标志物的nMFI_{M2c}显著减少。当与M2c巨噬细胞对照相比时,AB101处理使HLA-II类的表达增强,但没有显著影响CD163、CD206、MerkTK、LILRB2和PD-L1的表达。

[0719] 总之,在M2c巨噬细胞极化期间,AB101处理使先天受体TLR2和检查点配体Siglec-15的表达减少。此外,它抑制IL-10诱导的M2c细胞上的CD16和CD64的上调。

[0720] 实施例22-AB101结合使对CD163的SRCR结构域3和4中的区域的保护增加(较慢的HD交换)并使结构域2、5和9中的区域暴露(较快的HD交换)

[0721] 进行比较性HDX研究以检查IgG结合对CD163的影响。由于大量的肽源自复合物中存在的过量的抗体,因此许多导致许多肽在m/z和保留时间方面重叠。最终,在过滤掉噪音和重叠的肽后,胃蛋白酶数据中的一组最终的107种肽对应于74%的覆盖率,并且平均冗余为1.28。对于猪笼草蛋白酶II数据集,最终过滤的肽计数为230种,对应于87%的覆盖率,并且平均冗余为2.8。当将两种蛋白酶的数据集组合时,总序列覆盖率为93%,并且平均冗余为4.1。

[0722] 氢/氘交换质谱法:将重组人类CD163(rhCD163)的起始储备溶液在磷酸盐缓冲盐水(PBS)pH 7.2中稀释至0.36mg/mL。内部交换报告物:将四肽PPPF或三肽YPI添加到每种溶液中以得到1μM的最终浓度。抗体复合样品以相同方法制备,但包含1.38mg/mL的AB101,这对应于rhCD163的3倍摩尔过量。将这些工作溶液在22℃孵育并在4℃储存1天,然后开始氘交换反应。将10μL的工作蛋白溶液稀释10倍至90μL氘化HBS缓冲液中:(20mM HEPES,pH 7.2,150mM NaCl,2mM CaCl₂,95%D₂O)并在22℃孵育3sec、15sec、1min、5min、30min、4hr或20hr。氘化HBS还含有0.2μg/mL缓激肽,以在所有实验中提供完全氘化的参考化合物,以便监测反交换(back-exchange)。另一个样品在37℃孵育20小时,作为高度氘化样品。将交换的样品添加到等体积(100μL)的冰冷猝灭缓冲液中:1M TCEP、0.2%甲酸(FA),最终pH值为2.5。样品在乙醇-干冰浴(-60℃)中快速冷冻,并且随后储存于-80℃直至LC-MS分析。未氘化的参考样品除了稀释到水性HBS缓冲液中之外相同地制备。

[0723] 用固定化胃蛋白酶处理样品:将冷冻样品在5℃块上解冻4分钟,然后注射到装载环。将装载的样品通过定制的填充胃蛋白酶柱(猪胃蛋白酶固定于POROS 20-AL树脂上;2.1×50mm柱),保持在12℃和200μL/min的0.1%三氟乙酸(TFA)和2%乙腈(ACN)流。将消化的肽片段捕获到Waters XSelect CSH C18 XP VanGuard Cartridge(2.1×5mm,2.5μm)上。在5分钟的装载、消化和捕获后,使用3%至40%梯度的溶剂B在分析柱(Waters CSH 1×

100mm, 1.7 μ m, 130Å) 上分离肽9分钟 (A: 0.1% FA、0.025% TFA、2% ACN; B) ACN中的0.1% FA)。LC系统与Waters Synapt G2-Si耦合, 在能够实现离子迁移分离的300-2000的m/z范围内进行全扫描。源条件被优化为使去溶剂化期间的氘损失最小化。在所有LC-MS运行之前和结束时运行未氘化样品。在分析分离步骤中, 一系列250 μ L注射液用于清洗胃蛋白酶柱: 1) 0.1% Fos-12和0.1% TFA; 2) 0.1% TFA中的2M GndHCl; 3) 10% 乙酸、10% 乙腈、5% 异丙醇。每次梯度后, 用一系列250 μ L注射液洗涤捕获柱: 1) 10% FA; 2) 30% 三氟乙醇; 3) 80% 甲醇; 4) 66% 异丙醇、34% ACN; 5) 80% ACN。在捕获洗涤期间, 分析柱用三个快速梯度清洗。这些清洗步骤对于确保分析的每种肽的遗留水平低于5%是必需的。

[0724] 用固定化猪笼草蛋白酶II蛋白酶进行样品处理: 除了固定在POROS20-AL上的猪笼草蛋白酶II蛋白酶用于在线消化步骤外, 重复上述样品处理。

[0725] 为了首先确保未结合状态和抗体结合状态的交换和采样条件相同, 我们首先检查了内部标准肽的交换谱。对于这两个数据集, 没有配体的数据集和抗体结合数据集之间的PPPI和YPI标准是一致的, 确保条件一致, 甚至可以将细微的变化解释为由蛋白结构和/或动力学的改变引起。此外, 掺入氘化缓冲液中的完全氘化的缓激肽显示出相同的氘水平, 确保每个数据集内的样品之间的反向交换水平没有变化。

[0726] 抗体结合未结合状态之间的HDX动力学的比较用于评估抗原响应于抗体结合的全程变化。胃蛋白酶和猪笼草蛋白酶II数据集的变化总结在图50和图51中示出。根据响应于抗体结合的HDX动力学是否有小变化 (单个时间点的小变化) 或大变化 (超过两个标准偏差或在数个时间点观察到), 将变化着色到一级序列上。我们注意到, 对于这些比较, 我们只利用了通过重复之间的标准偏差评估为统计学显著的变化, 同时确保覆盖几乎相同区域的所有重叠肽是一致的。通过这些标准, 我们确保我们只从数据集中做出最保守的推论。

[0727] 在图47示出的胃蛋白酶数据集中, 有两个位点在抗体结合后显示出增加的保护。一个位点包含糖肽271-285, 它在数个时间点显示出保护的急剧增加, 并且数个覆盖C末端相邻区域286-299的肽, 它们还显示出交换动力学的显著降低。第二个位点包含残基405-418内的三个肽, 它们显示出保护的轻微增加。大量的肽在抗体结合后显示出灵活性的增加 (更快的交换)。最引人注目的是残基125-139和479-488, 而在残基887-910和918-933处观察到更细微的增加。

[0728] 图48中示出的猪笼草蛋白酶II数据集总体上显示出与用胃蛋白酶观察到的那些相似的变化。保护的最大增加在残基279-286处是明显的, 紧邻其N末端的区域 (271-278) 显示出小幅增加。残基408-415也在抗体结合后显示出保护的小幅增加。与胃蛋白酶数据中一样, 遍及蛋白的大部分有灵活性的增加。在残基471-483处观察到灵活性的最大增加, 遍及蛋白的更多部分有较小的变化。这些数据集一致性强烈表明OR2805的表位位于残基279-285内, 并且还可能包含相邻序列 (279-299) 以及残基405-418。也可能涉及HDX-MS未观察到的其他区域。

[0729] 与胃蛋白酶数据中非常相似, 在猪笼草蛋白酶II数据集中蛋白的大部分也有灵活性的增加。在残基471-483处观察到灵活性的最大增加, 遍及蛋白的更多部分有较小的变化 (图49)。总体上, 提出的表位远端的大变化与抗体结合后的大规模变构作用一致。表位远端的所有变化都变得更加暴露的事实表明抗体结合使遍及蛋白的一些二级结构松散, 这可能是通过影响与相邻蛋白结构域的相互作用引起的。在N末端和C末端结构域两者处观察到变

化的事实表明该蛋白在其天然 (没有配体的) 构象中具有数个结构域间相互作用。

[0730] 图49示出AB101与人类CD163 ECD结合的作用的示意性总结。在存在AB101的情况下,结构域SRCR 3和4内的区域受到保护而不发生质子-氘交换。在AB101结合后,伴随着结构域3和4中交换的减少, SRCR结构域2、5和9展示出增加的交换,表明更多地暴露于溶剂。

[0731] 实施例23-AB101结合截短的人类CD163 ECD SRCR结构域1-5片段

[0732] 人类CD163的细胞外结构域在SRCR结构域5之后被截短并保留C末端组氨酸标签。该CD163 ECD片段在HEK293-6E细胞中表达并使用IMAC方法纯化,如图50所示。AB101以如表10中指示的亚纳摩尔浓度的EC50结合截短的ECD,然而如预期的, RM3/1并不结合。RM3/1结合表位已被映射到SRCR结构域8和9。截短的CD163 ECD SRCR 1-5包含通过HDX-MS鉴定为含有AB101结合表位的结构域3和4。AB101保持与SRCR 1-5的结合进一步支持来自HDX-MS研究的表位鉴定结果。

[0733] 表10. 与截短的CD163 ECD SRCR 1-5结合的AB101、RM3/1、EDHu-1和215927的EC50值。

EC50 (nM)				
抗原	AB101 R11	RM3/1	EDHu-1	215927
[0734] huCD163 ECD	0.26	0.061	0.052	0.017
huCD163 SRCR 1-5	0.76	---	0.050	0.020
SRCR 1-5 / ECD比率	2.9	---	0.96	1.17

[0735] 实施例24-AB101与人类而非食蟹猴的重组CD163 ECD蛋白结合并且食蟹猴CD163 ECD中的单点突变E323K赋予与人类CD163 ECD相当的AB101结合

[0736] 在实施例6中,使用固定在塑料上的重组CD163蛋白进行的ELISA测定,根据26个单独实验中的14点剂量响应曲线,确定AB101与重组人类的结合具有0.52nM的几何平均EC50值。AB101未显示出与重组鼠CD163的结合,而可商购的大鼠抗 μ CD163抗体 (Thermo Fisher Scientific#14-1631-82) 如预期地结合。

[0737] 由于AB101未能结合鼠CD163以及与人类CD163的氨基酸序列同一性低 (72.9%), 因此关注指向临床前毒理学研究中经常使用的第二种物种,即非人灵长类 (NHP) 食蟹猴。食蟹猴CD163与人类CD163共有96.5%的氨基酸序列同一性。在HEK293-6E细胞中产生具有C末端8个组氨酸标签的人类和食蟹猴CD163 ECD,每升瞬时转染第7天的CM产生约1mg至2mg的纯化蛋白。图51示出人类与食蟹猴CD163蛋白的比对。

[0738] 凭借鉴定CD163上的结合表位的HDX-MS结果、以及人类和食蟹猴CD163之间的显著序列同一性以及AB101不结合食蟹猴CD163的知识,允许鉴定出SRCR结构域3中涉及AB101结合的关键残基。人类CD163中位置323处的赖氨酸残基在所有考虑用于毒理学研究的潜在非人类物种中是谷氨酸残基 (图51)。该位置位于通过HDX-MS确定的SRCR结构域3的AB101结合表位的中心。将食蟹猴位置323处的谷氨酸定点突变为赖氨酸,赋予食蟹猴CD163 ECD与AB101结合的EC50接近于AB101与人类CD163 ECD结合的EC50 (图52)。这种功能获得结果强烈指示位置323处的赖氨酸在AB101结合表位中。

[0739] 实施例25-通过SPR分析AB101与人类CD163的结合亲和力

[0740] 表面等离子体共振 (SPR) 测量用于确定在不同运行缓冲液条件下AB101和抗CD163克隆GHI/61与人类CD163的结合 (AB101亲合力测量)。

[0741] 使用Biacore T200仪器(GE Healthcare Life Sciences)对AB101和抗CD163克隆GHI/61与人类CD163的结合进行SPR分析。使用胺偶联试剂盒(GE Healthcare Life Sciences)将纯化的重组CD163蛋白直接固定在芯片(Serie S-type CM5)上。进行pH筛选(10mM乙酸钠pH 5.5/5.0/4.5/4.0)以确定用于胺偶联固定的合适浓度和pH。选择乙酸钠(pH 5.5)作为CD163偶联到传感器芯片CM5的最佳条件。偶联到CM5芯片上的CD163蛋白的量为80RU(0.08ng/mm²)。

[0742] 用于实验的运行缓冲液:缓冲液(1)10mM Hepes、150mM NaCl、3.0mM EDTA和0.05%Tween 20,pH 7.4;缓冲液(2)10mM Hepes、150mM NaCl、3.0mM CaCl₂、1.0mM EGTA和0.005%Tween 20,pH 7.4。

[0743] 将MAb溶解在运行缓冲液中。对于AB101,使用30μl/min的流量、6.25/12.5/25/50/100/200μg/ml的浓度、300s接触时间和600s解离时间产生传感图。对于GHI/61,使用30μl/min的流量、3.125/6.25/12.5/25/50/100μg/ml的浓度、300s接触时间和600s解离时间产生传感图。流动池用10mM甘氨酸-HCl,pH 3.0(GE Healthcare Life Sciences)再生。数据分析在Biacore T200计算机上并用Biacore T200评估软件进行。

[0744] 已经显示GHI/61和其他抗CD163抗体与人类CD163的结合依赖于游离钙。GHI/61在不含钙缓冲液中比在含钙缓冲液中对CD163具有更高的亲和力。为了确定AB101结合是否是钙依赖性的,我们在含2mM钙的缓冲液或不含钙的EDTA缓冲液中对AB101与固定化人类CD163的结合进行SPR测量。如表11和图53所示,AB101在含钙缓冲液中具有更强的结合亲和力,K_D为45nM,相比于不含钙的EDTA缓冲液中弱2倍的亲和力(K_D=89nM)。相比之下,SPR测量观察到GHI/61在含钙缓冲液和EDTA缓冲液中与CD163结合的K_D值分别为63nM和12nM(图54和表11)。

[0745] 表11.AB101与固定化人类CD163的SPR结合结果

缓冲液	抗体与固定化人类CD163的结合					
	AB101			GHI/61		
	K _D [nM]	k _a [M ⁻¹ s ⁻¹]	K _d [s ⁻¹]	K _D [nM]	k _a [M ⁻¹ s ⁻¹]	K _d [s ⁻¹]
钙	45	1.678 × 10 ⁴	7.544 × 10 ⁻⁴	63	0.732 × 10 ⁴	4.668 × 10 ⁻⁴
EDTA	89	1.280 × 10 ⁴	11.39 × 10 ⁻⁴	12	1.476 × 10 ⁴	1.783 × 10 ⁻⁴

[0747] SPR结果证实了先前报道的GHI/61发现,并表明AB101与人类CD163的最佳结合可能需要生理钙浓度。

[0748] 接下来,我们在含钙缓冲液中对CD163与固定化AB101的结合亲和力进行SPR测量,并观察到12nM的K_D(图55和表12)。当相比于AB101与固定化CD163结合的相应K_a(1.678 × 10⁴M⁻¹s⁻¹)时,CD163与固定化AB101的结合具有3.7倍高的6.213 × 10⁴(M⁻¹s⁻¹)的k_a。

[0749] 表12.人类CD163与固定化AB101的SPR结合结果

人类CD163与AB101的结合			
缓冲液	K _D [nM]	k _a [M ⁻¹ s ⁻¹]	K _d [s ⁻¹]
钙	12	6.213 × 10 ⁴	7.895 × 10 ⁻⁴

[0751] 总之,SPR测量确定了在存在2mM游离钙的情况下AB101与CD163的12nM结合亲和力和45nM亲和力。

[0752] 实施例26-通过AlphaLISA分析AB101与溶液中人类CD163蛋白的结合

[0753] AB101与溶液中人类CD163的结合亲和力通过AlphaLisa测定来确定。

[0754] 该测定由具有C末端上10个组氨酸的标签的人类可溶性CD163、生物素化抗hIgG1、链霉亲和素受体珠和镍供体珠组成。

[0755] 通过在不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 $1 \times \text{PBS}$ 中的0.5%BSA中系列稀释AB101和同种型对照来进行测定,起始滴定浓度为1500nM。CD163在相同的缓冲液中稀释到1500nM的浓度。

[0756] AB101与人类CD163的结合将AB101或同种型对照系列稀释液以 $5\mu\text{l}$ /孔的体积添加到 $5\mu\text{l}$ /孔的人类CD163中,用铝板密封器密封并在室温温和摇动孵育1小时。

[0757] AB101的检测:AB101使用 $1 \times \text{AlphaLISA}$ 免疫测定测定缓冲液中的2.5nM生物素化抗人类IgG1抗体以 $5\mu\text{l}$ /孔的体积与 $10\mu\text{l}$ 结合混合物进行检测。将板密封并在室温温和摇动孵育1小时。

[0758] 受体珠的结合:在抗体检测步骤之后,将 $5\mu\text{l}$ 的 $1 \times \text{AlphaLISA}$ 免疫测定测定缓冲液中的 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉亲和素受体珠添加到每个孔,然后将板密封并在室温温和摇动孵育1小时。

[0759] 供体珠的结合:接下来,将 $5\mu\text{l}$ 的 $1 \times \text{AlphaLISA}$ 免疫测定测定缓冲液中的 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 镍供体珠添加到每个孔,然后将板密封并在室温温和摇动孵育1小时。

[0760] 使用Envision读板器根据制造商的方案读板,并使用GraphPad Prism 8分析数据以计算 K_d 。

[0761] AB101与CD163结合的AlphaLisa测量值在30nM的AB101时达到饱和(图56)。通过组合5个独立测量值的1个位点饱和结合模型确定 K_d 为1.8nM(表13)。2个位点饱和结合模型为较低的AB101浓度提供了更好的曲线拟合。

[0762] 表13.AB101与可溶性CD163蛋白的结合的AlphaLisa测量值

AB101与可溶性CD163的结合			
独立测定	1个位点结合模型		
	EC_{50} [nM]	最大值	R^2
1	4.1	31000	0.99
2	1.5	37000	0.97
3	1.9	52000	0.98
4	1.7	48000	0.99
5	0.51	44000	0.98
平均值	1.9	42400	
SD	1.3	8444	
几何平均值	1.6	41692	

[0764] 实施例27-AB101与M2c巨噬细胞的结合

[0765] 为了确定AB101与细胞上表达的CD163的结合动力学,我们对来自4个研究受试者的免疫抑制性M2c巨噬细胞进行结合研究。

[0766] 评估AB101与来自4个健康人类受试者(39岁女性、24岁男性、39岁男性和54岁男性)的M2c巨噬细胞的结合。从购自BloodWorks的LeukoPaks中分离单核细胞。

[0767] 在第7天,将M2c细胞在巨噬细胞解离溶液DXF中在室温孵育15分钟,并且从瓶中取出到X-VIVO-15™培养基中。离心后,将细胞用PBS洗涤一次,并重悬于Zombie UV活/死染色

剂(1:500)中,在室温持续20分钟。然后用FACS缓冲液洗涤细胞,并重悬于FACS封闭剂(含有10%FBS和0.5mg/ml人类IgG1的FACS缓冲液)中,在室温持续20分钟。将封闭缓冲液中的细胞以 2.5×10^4 个细胞/孔转移到386孔板,并将滴定的抗体以 $2 \times$ 最终测定浓度直接添加到每个孔。将细胞与抗体一起在室温孵育20min。将细胞用FACS缓冲液洗涤三次,然后重悬于FACS缓冲液中用于在Symphony流式细胞仪(BD Biosciences)上采集。

[0768] AB101与M2c巨噬细胞的结合表现出双模式结合曲线(图57),表明AB101与Fc受体的结合可能影响与M2c细胞上表达的CD163的结合。计算出的1个位点特异性饱和结合曲线中的AB101的 K_d 值在表14中示出。通过1个位点模型计算的AB101与CD163的结合的 K_d 值为7.7nM,并且Bmax为46103gMFI ($R^2=0.91$)。两个位点曲线拟合建模提供了更好的曲线拟合($R^2=0.98$)。

[0769] 表14. AB101与人类M2c巨噬细胞结合的平衡结合

人类 受试者ID	AB101的结合动力学		
	1个位点结合模型		
	K_d [nM]	Bmax	R^2
W	7.2	45800	0.93
X	6.6	41700	0.91
Y	8.1	45400	0.91
Z	8.9	51513	0.93
平均值	7.7	46103	
SD	1.0	4051	
几何平均值	7.7	45972	

[0771] 尽管已经详细描述了本公开内容及其优点,但应理解,在本文中进行各种变化、替换和改变而不脱离如所附权利要求书限定的本公开内容的精神和范围。

序列表

<110> 昂科里斯庞斯公司

<120> 免疫调节性抗体及其使用方法

<130> 56382-703.601

<140> PCT/US2020/042668

<141> 2020-07-17

<150> 62/878,265

<151> 2019-07-24

<150> 62/876,579

<151> 2019-07-19

<150> 62/876,580

<151> 2019-07-19

<160> 28

[0001]

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1

5

10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 2

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 3

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Gly Thr

1 5 10

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 4

Ser Tyr Ala Met His

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 5

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

[0002]

Gly

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 6

Glu	Asn	Val	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Phe	Trp	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Glu
1				5					10					15	

Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
				20			

[0003]

<210> 7

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 7

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
			20					25						30	

Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40						45		

Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 8

<211> 166

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0004]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asn Val Arg Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr
100 105 110

Ser Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
115 120 125

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
130 135 140

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
145 150 155 160

[0005] Leu Val Lys Asp Tyr Phe
165

<210> 9

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50						55					60					
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
	65					70					75					80	
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Arg	
					85					90						95	
	Gly	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	
				100					105						110		
	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	
			115					120						125			
[0006]	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	
		130					135					140					
	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	
	145					150					155					160	
	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
					165					170					175		
	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
				180					185						190		
	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
		195						200					205				
	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
		210					215										

<210> 10

<211> 463

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0007] Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asn Val Arg Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr
100 105 110

Ser Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
115 120 125

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
130 135 140

	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	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	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
	210						215					220				
[0008]	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
	225					230					235					240
	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
					245					250					255	
	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				260					265					270		
	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
			275					280					285			
	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
	290					295					300					
	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
	305					310					315					320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400

[0009] Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 11

<211> 463

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0010]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asn Val Arg Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr
100 105 110

Ser Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
115 120 125

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
130 135 140

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
	210	215	220
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
	225	230	235
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val			
	245	250	255
[0011]			
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
	260	265	270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
	275	280	285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
	290	295	300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
	305	310	315
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
	325	330	335
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile			

340

345

350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

[0012]

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 12

<211> 463

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

[0015] His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 13

<211> 460

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50						55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70					75				80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Arg	Glu	Asn	Val	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Phe	Trp	Ser	Gly	Tyr	Tyr
				100						105					110	
	Ser	Glu	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr
			115					120					125			
[0016]	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	
	Pro	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					
[0017]	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

<210> 14

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0018] <220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Asp Ala
100 105 110

Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
115 120 125

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
145 150 155 160

[0019] Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 15

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0020]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asn Val Arg Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr
100 105 110

Ser Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
115 120 125

Val Thr Val Ser Ser Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala
130 135 140

Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly

	165	170	175
Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp			
	180	185	190
Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro			
	195	200	205
Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys			
	210	215	220
Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro			
225	230	235	240
Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe			
	245	250	255
[0021]			
Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro			
	260	265	270
Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val			
	275	280	285
Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr			
	290	295	300
Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala			
305	310	315	320
Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys			
	325	330	335
Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser			

340

345

350

Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro
355 360 365

Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val
370 375 380

Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly
385 390 395 400

Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
420 425 430

[0022]

Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
435 440 445

Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 16

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro
195 200 205

Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
210 215 220

Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro
225 230 235 240

Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro
260 265 270

[0024]

Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val
275 280 285

Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
290 295 300

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala
305 310 315 320

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Ala Phe Ala Cys
325 330 335

Ala Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser
340 345 350

Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro
355 360 365

Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val
370 375 380

Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly
385 390 395 400

Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
420 425 430

Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
435 440 445

Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
450 455 460

[0025]

<210> 17

<211> 1121

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 17

Met Ser Lys Leu Arg Met Val Leu Leu Glu Asp Ser Gly Ser Ala Asp
1 5 10 15

Phe Arg Arg His Phe Val Asn Leu Ser Pro Phe Thr Ile Thr Val Val
20 25 30

Leu Leu Leu Ser Ala Cys Phe Val Thr Ser Ser Leu Gly Gly Thr Asp
35 40 45

Lys Glu Leu Arg Leu Val Asp Gly Glu Asn Lys Cys Ser Gly Arg Val
50 55 60

	Glu	Val	Lys	Val	Gln	Glu	Glu	Trp	Gly	Thr	Val	Cys	Asn	Asn	Gly	Trp
	65					70					75					80
	Ser	Met	Glu	Ala	Val	Ser	Val	Ile	Cys	Asn	Gln	Leu	Gly	Cys	Pro	Thr
					85					90					95	
	Ala	Ile	Lys	Ala	Pro	Gly	Trp	Ala	Asn	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	Gly	Arg
					100					105					110	
	Ile	Trp	Met	Asp	His	Val	Ser	Cys	Arg	Gly	Asn	Glu	Ser	Ala	Leu	Trp
					115					120					125	
	Asp	Cys	Lys	His	Asp	Gly	Trp	Gly	Lys	His	Ser	Asn	Cys	Thr	His	Gln
					130					135				140		
[0026]	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Thr	Cys	Ser	Asp	Gly	Ser	Asn	Leu	Glu	Met	Arg
	145									150				155		160
	Leu	Thr	Arg	Gly	Gly	Asn	Met	Cys	Ser	Gly	Arg	Ile	Glu	Ile	Lys	Phe
					165						170				175	
	Gln	Gly	Arg	Trp	Gly	Thr	Val	Cys	Asp	Asp	Asn	Phe	Asn	Ile	Asp	His
					180						185				190	
	Ala	Ser	Val	Ile	Cys	Arg	Gln	Leu	Glu	Cys	Gly	Ser	Ala	Val	Ser	Phe
					195						200				205	
	Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Gly	Pro	Ile	Trp	Phe	Asp
					210						215				220	
	Asp	Leu	Ile	Cys	Asn	Gly	Asn	Glu	Ser	Ala	Leu	Trp	Asn	Cys	Lys	His
					225						230				235	240

	Gly	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ser	Tyr	Gln	Val	Tyr	Ser	Lys	Ile	Gln	Ala	
				420					425					430			
	Thr	Asn	Thr	Trp	Leu	Phe	Leu	Ser	Ser	Cys	Asn	Gly	Asn	Glu	Thr	Ser	
			435					440						445			
	Leu	Trp	Asp	Cys	Lys	Asn	Trp	Gln	Trp	Gly	Gly	Leu	Thr	Cys	Asp	His	
		450					455						460				
	Tyr	Glu	Glu	Ala	Lys	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	His	Arg	Glu	Pro	Arg	Leu	
	465					470					475					480	
	Val	Gly	Gly	Asp	Ile	Pro	Cys	Ser	Gly	Arg	Val	Glu	Val	Lys	His	Gly	
				485						490					495		
[0028]	Asp	Thr	Trp	Gly	Ser	Ile	Cys	Asp	Ser	Asp	Phe	Ser	Leu	Glu	Ala	Ala	
				500					505					510			
	Ser	Val	Leu	Cys	Arg	Glu	Leu	Gln	Cys	Gly	Thr	Val	Val	Ser	Ile	Leu	
			515					520						525			
	Gly	Gly	Ala	His	Phe	Gly	Glu	Gly	Asn	Gly	Gln	Ile	Trp	Ala	Glu	Glu	
		530					535						540				
	Phe	Gln	Cys	Glu	Gly	His	Glu	Ser	His	Leu	Ser	Leu	Cys	Pro	Val	Ala	
	545					550					555					560	
	Pro	Arg	Pro	Glu	Gly	Thr	Cys	Ser	His	Ser	Arg	Asp	Val	Gly	Val	Val	
				565						570					575		
	Cys	Ser	Arg	Tyr	Thr	Glu	Ile	Arg	Leu	Val	Asn	Gly	Lys	Thr	Pro	Cys	
				580					585					590			

	Glu Gly Arg Val Glu Leu Lys Thr Leu Gly Ala Trp Gly Ser Leu Cys	
	595	600 605
	Asn Ser His Trp Asp Ile Glu Asp Ala His Val Leu Cys Gln Gln Leu	
	610	615 620
	Lys Cys Gly Val Ala Leu Ser Thr Pro Gly Gly Ala Arg Phe Gly Lys	
	625	630 635 640
	Gly Asn Gly Gln Ile Trp Arg His Met Phe His Cys Thr Gly Thr Glu	
		645 650 655
	Gln His Met Gly Asp Cys Pro Val Thr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Cys	
		660 665 670
[0029]	Pro Ser Glu Gln Val Ala Ser Val Ile Cys Ser Gly Asn Gln Ser Gln	
	675	680 685
	Thr Leu Ser Ser Cys Asn Ser Ser Ser Leu Gly Pro Thr Arg Pro Thr	
	690	695 700
	Ile Pro Glu Glu Ser Ala Val Ala Cys Ile Glu Ser Gly Gln Leu Arg	
	705	710 715 720
	Leu Val Asn Gly Gly Gly Arg Cys Ala Gly Arg Val Glu Ile Tyr His	
		725 730 735
	Glu Gly Ser Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Ser Trp Asp Leu Ser Asp	
		740 745 750
	Ala His Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Glu Ala Ile Asn Ala	
	755	760 765

	Thr	Gly	Ser	Ala	His	Phe	Gly	Glu	Gly	Thr	Gly	Pro	Ile	Trp	Leu	Asp	
	770						775					780					
	Glu	Met	Lys	Cys	Asn	Gly	Lys	Glu	Ser	Arg	Ile	Trp	Gln	Cys	His	Ser	
	785					790					795					800	
	His	Gly	Trp	Gly	Gln	Gln	Asn	Cys	Arg	His	Lys	Glu	Asp	Ala	Gly	Val	
					805						810					815	
	Ile	Cys	Ser	Glu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Leu	Thr	Ser	Glu	Ala	Ser	Arg	
				820					825						830		
	Glu	Ala	Cys	Ala	Gly	Arg	Leu	Glu	Val	Phe	Tyr	Asn	Gly	Ala	Trp	Gly	
		835						840					845				
[0030]	Thr	Val	Gly	Lys	Ser	Ser	Met	Ser	Glu	Thr	Thr	Val	Gly	Val	Val	Cys	
	850						855						860				
	Arg	Gln	Leu	Gly	Cys	Ala	Asp	Lys	Gly	Lys	Ile	Asn	Pro	Ala	Ser	Leu	
	865					870						875				880	
	Asp	Lys	Ala	Met	Ser	Ile	Pro	Met	Trp	Val	Asp	Asn	Val	Gln	Cys	Pro	
					885					890					895		
	Lys	Gly	Pro	Asp	Thr	Leu	Trp	Gln	Cys	Pro	Ser	Ser	Pro	Trp	Glu	Lys	
				900					905						910		
	Arg	Leu	Ala	Ser	Pro	Ser	Glu	Glu	Thr	Trp	Ile	Thr	Cys	Asp	Asn	Lys	
		915						920					925				
	Ile	Arg	Leu	Gln	Glu	Gly	Pro	Thr	Ser	Cys	Ser	Gly	Arg	Val	Glu	Ile	
	930						935					940					

	Trp	His	Gly	Gly	Ser	Trp	Gly	Thr	Val	Cys	Asp	Asp	Ser	Trp	Asp	Leu
	945					950					955					960
	Asp	Asp	Ala	Gln	Val	Val	Cys	Gln	Gln	Leu	Gly	Cys	Gly	Pro	Ala	Leu
					965					970						975
	Lys	Ala	Phe	Lys	Glu	Ala	Glu	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Gly	Pro	Ile	Trp
				980					985						990	
	Leu	Asn	Glu	Val	Lys	Cys	Lys	Gly	Asn	Glu	Ser	Ser	Leu	Trp	Asp	Cys
			995					1000						1005		
	Pro	Ala	Arg	Arg	Trp	Gly	His	Ser	Glu	Cys	Gly	His	Lys	Glu	Asp	
		1010					1015						1020			
[0031]	Ala	Ala	Val	Asn	Cys	Thr	Asp	Ile	Ser	Val	Gln	Lys	Thr	Pro	Gln	
		1025					1030						1035			
	Lys	Ala	Thr	Thr	Gly	Arg	Ser	Ser	Arg	Gln	Ser	Ser	Phe	Ile	Ala	
		1040					1045						1050			
	Val	Gly	Ile	Leu	Gly	Val	Val	Leu	Leu	Ala	Ile	Phe	Val	Ala	Leu	
		1055					1060						1065			
	Phe	Phe	Leu	Thr	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Gln	Arg	Leu	Ala	Val	
		1070					1075						1080			
	Ser	Ser	Arg	Gly	Glu	Asn	Leu	Val	His	Gln	Ile	Gln	Tyr	Arg	Glu	
		1085					1090						1095			
	Met	Asn	Ser	Cys	Leu	Asn	Ala	Asp	Asp	Leu	Asp	Leu	Met	Asn	Ser	
		1100					1105						1110			

Ser Gly Gly His Ser Glu Pro His
1115 1120

<210> 18

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 18

Ile Gly Arg Val Asn Ala Ser Lys Gly Phe Gly His Ile Trp Leu Asp
1 5 10 15

Ser Val Ser Cys Gln Gly His Glu Pro Ala Ile
20 25

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

[0032]

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 19

Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Ser Ala
1 5 10

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 20

Trp Asp Cys Lys Asn Trp Gln Trp Gly Gly Leu Thr Cys Asp
1 5 10

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的 6xHis 标签

<400> 21

His His His His His His

1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的 8xHis 标签

<400> 22

His His His His His His His His

1 5

[0033]

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的 10xHis 标签

<400> 23

His His His His His His His His His His

1 5 10

<210> 24

<211> 1015

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 24

	Gly	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Glu	Asn	Lys	Cys	Ser
	1			5					10						15	
		Gly	Arg	Val	Glu	Val	Lys	Val	Gln	Glu	Glu	Trp	Gly	Thr	Val	Cys
				20					25						30	Asn
	Asn	Gly	Trp	Ser	Met	Glu	Ala	Val	Ser	Val	Ile	Cys	Asn	Gln	Leu	Gly
				35					40						45	
	Cys	Pro	Thr	Ala	Ile	Lys	Ala	Pro	Gly	Trp	Ala	Asn	Ser	Ser	Ala	Gly
				50					55						60	
	Ser	Gly	Arg	Ile	Trp	Met	Asp	His	Val	Ser	Cys	Arg	Gly	Asn	Glu	Ser
	65					70					75					80
[0034]	Ala	Leu	Trp	Asp	Cys	Lys	His	Asp	Gly	Trp	Gly	Lys	His	Ser	Asn	Cys
					85					90					95	
	Thr	His	Gln	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Thr	Cys	Ser	Asp	Gly	Ser	Asn	Leu
					100					105					110	
	Glu	Met	Arg	Leu	Thr	Arg	Gly	Gly	Asn	Met	Cys	Ser	Gly	Arg	Ile	Glu
					115					120					125	
	Ile	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Trp	Gly	Thr	Val	Cys	Asp	Asp	Asn	Phe	Asn
					130					135					140	
	Ile	Asp	His	Ala	Ser	Val	Ile	Cys	Arg	Gln	Leu	Glu	Cys	Gly	Ser	Ala
	145					150					155					160
	Val	Ser	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Gly	Pro	Ile
					165					170					175	

	Trp	Phe	Asp	Asp	Leu	Ile	Cys	Asn	Gly	Asn	Glu	Ser	Ala	Leu	Trp	Asn	
					180				185					190			
	Cys	Lys	His	Gln	Gly	Trp	Gly	Lys	His	Asn	Cys	Asp	His	Ala	Glu	Asp	
				195				200					205				
	Ala	Gly	Val	Ile	Cys	Ser	Lys	Gly	Ala	Asp	Leu	Ser	Leu	Arg	Leu	Val	
		210					215				220						
	Asp	Gly	Val	Thr	Glu	Cys	Ser	Gly	Arg	Leu	Glu	Val	Arg	Phe	Gln	Gly	
	225					230				235					240		
	Glu	Trp	Gly	Thr	Ile	Cys	Asp	Asp	Gly	Trp	Asp	Ser	Tyr	Asp	Ala	Ala	
					245				250					255			
[0035]	Val	Ala	Cys	Lys	Gln	Leu	Gly	Cys	Pro	Thr	Ala	Val	Thr	Ala	Ile	Gly	
				260				265					270				
	Arg	Val	Asn	Ala	Ser	Lys	Gly	Phe	Gly	His	Ile	Trp	Leu	Asp	Ser	Val	
		275					280					285					
	Ser	Cys	Gln	Gly	His	Glu	Pro	Ala	Val	Trp	Gln	Cys	Lys	His	His	Glu	
		290				295				300							
	Trp	Gly	Lys	His	Tyr	Cys	Asn	His	Asn	Glu	Asp	Ala	Gly	Val	Thr	Cys	
	305				310				315				320				
	Ser	Asp	Gly	Ser	Asp	Leu	Glu	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	
				325				330				335					
	Cys	Ala	Gly	Thr	Val	Glu	Val	Glu	Ile	Gln	Arg	Leu	Leu	Gly	Lys	Val	
				340				345				350					

	Gly	Val	Val	Cys	Ser	Arg	Tyr	Thr	Glu	Ile	Arg	Leu	Val	Asn	Gly	Lys	
	530						535					540					
	Thr	Pro	Cys	Glu	Gly	Arg	Val	Glu	Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Ala	Trp	Gly	
	545					550					555					560	
	Ser	Leu	Cys	Asn	Ser	His	Trp	Asp	Ile	Glu	Asp	Ala	His	Val	Leu	Cys	
				565					570						575		
	Gln	Gln	Leu	Lys	Cys	Gly	Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Pro	Gly	Gly	Ala	Arg	
				580					585						590		
	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Gly	Gln	Ile	Trp	Arg	His	Met	Phe	His	Cys	Thr	
			595					600							605		
[0037]	Gly	Thr	Glu	Gln	His	Met	Gly	Asp	Cys	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Gly	Ala	
	610						615						620				
	Ser	Leu	Cys	Pro	Ser	Glu	Gln	Val	Ala	Ser	Val	Ile	Cys	Ser	Gly	Asn	
	625					630					635					640	
	Gln	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Ser	Cys	Asn	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Pro	Thr	
					645					650					655		
	Arg	Pro	Thr	Ile	Pro	Glu	Glu	Ser	Ala	Val	Ala	Cys	Ile	Glu	Ser	Gly	
					660					665					670		
	Gln	Leu	Arg	Leu	Val	Asn	Gly	Gly	Gly	Arg	Cys	Ala	Gly	Arg	Val	Glu	
				675					680					685			
	Ile	Tyr	His	Glu	Gly	Ser	Trp	Gly	Thr	Ile	Cys	Asp	Asp	Ser	Trp	Asp	
	690						695						700				

	Leu Ser Asp Ala His Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Glu Ala	
	705 710 715 720	
	Ile Asn Ala Thr Gly Ser Ala His Phe Gly Glu Gly Thr Gly Pro Ile	
	725 730 735	
	Trp Leu Asp Glu Met Lys Cys Asn Gly Lys Glu Ser Arg Ile Trp Gln	
	740 745 750	
	Cys His Ser His Gly Trp Gly Gln Gln Asn Cys Arg His Lys Glu Asp	
	755 760 765	
	Ala Gly Val Ile Cys Ser Glu Phe Met Ser Leu Arg Leu Thr Ser Glu	
	770 775 780	
[0038]	Ala Ser Arg Glu Ala Cys Ala Gly Arg Leu Glu Val Phe Tyr Asn Gly	
	785 790 795 800	
	Ala Trp Gly Thr Val Gly Lys Ser Ser Met Ser Glu Thr Thr Val Gly	
	805 810 815	
	Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Ala Asp Lys Gly Lys Ile Asn Pro	
	820 825 830	
	Ala Ser Leu Asp Lys Ala Met Ser Ile Pro Met Trp Val Asp Asn Val	
	835 840 845	
	Gln Cys Pro Lys Gly Pro Asp Thr Leu Trp Gln Cys Pro Ser Ser Pro	
	850 855 860	
	Trp Glu Lys Arg Leu Ala Ser Pro Ser Glu Glu Thr Trp Ile Thr Cys	
	865 870 875 880	

Asp Asn Lys Ile Arg Leu Gln Glu Gly Pro Thr Ser Cys Ser Gly Arg
885 890 895

Val Glu Ile Trp His Gly Gly Ser Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Ser
900 905 910

Trp Asp Leu Asp Asp Ala Gln Val Val Cys Gln Gln Leu Gly Cys Gly
915 920 925

Pro Ala Leu Lys Ala Phe Lys Glu Ala Glu Phe Gly Gln Gly Thr Gly
930 935 940

Pro Ile Trp Leu Asn Glu Val Lys Cys Lys Gly Asn Glu Ser Ser Leu
945 950 955 960

[0039]

Trp Asp Cys Pro Ala Arg Arg Trp Gly His Ser Glu Cys Gly His Lys
965 970 975

Glu Asp Ala Ala Val Asn Cys Thr Asp Ile Ser Val Gln Lys Thr Pro
980 985 990

Gln Lys Ala Thr Thr Gly Arg Ser Ser Arg Gln Ser Ser His His His
995 1000 1005

His His His His His His His
1010 1015

<210> 25

<211> 1009

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 25

Ser Ser Leu Gly Gly Thr Asp Lys Glu Leu Arg Leu Val Asp Gly Glu
1 5 10 15

	Asn	Lys	Cys	Ser	Gly	Arg	Val	Glu	Val	Lys	Val	Gln	Glu	Glu	Trp	Gly	
					20				25						30		
	Thr	Val	Cys	Asn	Asn	Gly	Trp	Ser	Met	Glu	Ala	Val	Ser	Val	Ile	Cys	
			35					40						45			
	Asn	Gln	Leu	Gly	Cys	Pro	Thr	Ala	Ile	Lys	Ala	Pro	Gly	Trp	Ala	Asn	
		50					55					60					
	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	Gly	Arg	Ile	Trp	Met	Asp	His	Val	Ser	Cys	Arg	
	65					70					75					80	
	Gly	Asn	Glu	Ser	Ala	Leu	Trp	Asp	Cys	Lys	His	Asp	Gly	Trp	Gly	Lys	
					85					90					95		
[0040]	His	Ser	Asn	Cys	Thr	His	Gln	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Thr	Cys	Ser	Asp	
				100					105						110		
	Gly	Ser	Asn	Leu	Glu	Met	Arg	Leu	Thr	Arg	Gly	Gly	Asn	Met	Cys	Ser	
			115					120					125				
	Gly	Arg	Ile	Glu	Ile	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Trp	Gly	Thr	Val	Cys	Asp	
		130					135					140					
	Asp	Asn	Phe	Asn	Ile	Asp	His	Ala	Ser	Val	Ile	Cys	Arg	Gln	Leu	Glu	
	145					150					155					160	
	Cys	Gly	Ser	Ala	Val	Ser	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Glu	Gly	
				165					170						175		
	Ser	Gly	Pro	Ile	Trp	Phe	Asp	Asp	Leu	Ile	Cys	Asn	Gly	Asn	Glu	Ser	
			180						185					190			

	Ala Leu Trp Asn Cys Lys His Gln Gly Trp Gly Lys His Asn Cys Asp	
	195	200 205
	His Ala Glu Asp Ala Gly Val Ile Cys Ser Lys Gly Ala Asp Leu Ser	
	210	215 220
	Leu Arg Leu Val Asp Gly Val Thr Glu Cys Ser Gly Arg Leu Glu Val	
	225	230 235 240
	Arg Phe Gln Gly Glu Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Asp Ser	
		245 250 255
	Tyr Asp Ala Ala Val Ala Cys Lys Gln Leu Gly Cys Pro Thr Ala Val	
		260 265 270
[0041]	Thr Ala Ile Gly Arg Val Asn Ala Ser Lys Gly Phe Gly His Ile Trp	
	275	280 285
	Leu Asp Ser Val Ser Cys Gln Gly His Glu Pro Ala Ile Trp Gln Cys	
	290	295 300
	Lys His His Glu Trp Gly Lys His Tyr Cys Asn His Asn Glu Asp Ala	
	305	310 315 320
	Gly Val Thr Cys Ser Asp Gly Ser Asp Leu Glu Leu Arg Leu Arg Gly	
		325 330 335
	Gly Gly Ser Arg Cys Ala Gly Thr Val Glu Val Glu Ile Gln Arg Leu	
		340 345 350
	Leu Gly Lys Val Cys Asp Arg Gly Trp Gly Leu Lys Glu Ala Asp Val	
	355	360 365

Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Ser Ala Leu Lys Thr Ser Tyr Gln
370 375 380

Val Tyr Ser Lys Ile Gln Ala Thr Asn Thr Trp Leu Phe Leu Ser Ser
385 390 395 400

Cys Asn Gly Asn Glu Thr Ser Leu Trp Asp Cys Lys Asn Trp Gln Trp
405 410 415

Gly Gly Leu Thr Cys Asp His Tyr Glu Glu Ala Lys Ile Thr Cys Ser
420 425 430

Ala His Arg Glu Pro Arg Leu Val Gly Gly Asp Ile Pro Cys Ser Gly
435 440 445

[0042] Arg Val Glu Val Lys His Gly Asp Thr Trp Gly Ser Ile Cys Asp Ser
450 455 460

Asp Phe Ser Leu Glu Ala Ala Ser Val Leu Cys Arg Glu Leu Gln Cys
465 470 475 480

Gly Thr Val Val Ser Ile Leu Gly Gly Ala His Phe Gly Glu Gly Asn
485 490 495

Gly Gln Ile Trp Ala Glu Glu Phe Gln Cys Glu Gly His Glu Ser His
500 505 510

Leu Ser Leu Cys Pro Val Ala Pro Arg Pro Glu Gly Thr Cys Ser His
515 520 525

Ser Arg Asp Val Gly Val Val Cys Ser Arg Tyr Thr Glu Ile Arg Leu
530 535 540

	Val	Asn	Gly	Lys	Thr	Pro	Cys	Glu	Gly	Arg	Val	Glu	Leu	Lys	Thr	Leu	
	545					550					555					560	
	Gly	Ala	Trp	Gly	Ser	Leu	Cys	Asn	Ser	His	Trp	Asp	Ile	Glu	Asp	Ala	
					565					570					575		
	His	Val	Leu	Cys	Gln	Gln	Leu	Lys	Cys	Gly	Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Pro	
				580					585						590		
	Gly	Gly	Ala	Arg	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Gly	Gln	Ile	Trp	Arg	His	Met	
			595					600						605			
	Phe	His	Cys	Thr	Gly	Thr	Glu	Gln	His	Met	Gly	Asp	Cys	Pro	Val	Thr	
	610						615					620					
[0043]	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Leu	Cys	Pro	Ser	Glu	Gln	Val	Ala	Ser	Val	Ile	
	625					630					635					640	
	Cys	Ser	Gly	Asn	Gln	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Ser	Cys	Asn	Ser	Ser	Ser	
				645						650					655		
	Leu	Gly	Pro	Thr	Arg	Pro	Thr	Ile	Pro	Glu	Glu	Ser	Ala	Val	Ala	Cys	
				660					665					670			
	Ile	Glu	Ser	Gly	Gln	Leu	Arg	Leu	Val	Asn	Gly	Gly	Gly	Arg	Cys	Ala	
			675					680					685				
	Gly	Arg	Val	Glu	Ile	Tyr	His	Glu	Gly	Ser	Trp	Gly	Thr	Ile	Cys	Asp	
	690						695					700					
	Asp	Ser	Trp	Asp	Leu	Ser	Asp	Ala	His	Val	Val	Cys	Arg	Gln	Leu	Gly	
	705					710						715				720	

	Cys Gly Glu Ala Ile Asn Ala Thr Gly Ser Ala His Phe Gly Glu Gly	
	725	730 735
	Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asp Glu Met Lys Cys Asn Gly Lys Glu Ser	
	740	745 750
	Arg Ile Trp Gln Cys His Ser His Gly Trp Gly Gln Gln Asn Cys Arg	
	755	760 765
	His Lys Glu Asp Ala Gly Val Ile Cys Ser Glu Phe Met Ser Leu Arg	
	770	775 780
	Leu Thr Ser Glu Ala Ser Arg Glu Ala Cys Ala Gly Arg Leu Glu Val	
	785	790 795 800
[0044]	Phe Tyr Asn Gly Ala Trp Gly Thr Val Gly Lys Ser Ser Met Ser Glu	
	805	810 815
	Thr Thr Val Gly Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Ala Asp Lys Gly	
	820	825 830
	Lys Ile Asn Pro Ala Ser Leu Asp Lys Ala Met Ser Ile Pro Met Trp	
	835	840 845
	Val Asp Asn Val Gln Cys Pro Lys Gly Pro Asp Thr Leu Trp Gln Cys	
	850	855 860
	Pro Ser Ser Pro Trp Glu Lys Arg Leu Ala Ser Pro Ser Glu Glu Thr	
	865	870 875 880
	Trp Ile Thr Cys Asp Asn Lys Ile Arg Leu Gln Glu Gly Pro Thr Ser	
	885	890 895

Cys Ser Gly Arg Val Glu Ile Trp His Gly Gly Ser Trp Gly Thr Val
 900 905 910

Cys Asp Asp Ser Trp Asp Leu Asp Asp Ala Gln Val Val Cys Gln Gln
 915 920 925

Leu Gly Cys Gly Pro Ala Leu Lys Ala Phe Lys Glu Ala Glu Phe Gly
 930 935 940

Gln Gly Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asn Glu Val Lys Cys Lys Gly Asn
 945 950 955 960

Glu Ser Ser Leu Trp Asp Cys Pro Ala Arg Arg Trp Gly His Ser Glu
 965 970 975

[0045]

Cys Gly His Lys Glu Asp Ala Ala Val Asn Cys Thr Asp Ile Ser Val
 980 985 990

Gln Lys Thr Pro Gln Lys Ala Thr Thr Gly Arg Ser Ser Arg Gln Ser
 995 1000 1005

Ser

<210> 26

<211> 1009

<212> PRT

<213> 食蟹猴(Macaca fascicularis)

<400> 26

Ser Ser Leu Gly Gly Thr Thr Lys Glu Leu Arg Leu Val Asp Gly Glu
 1 5 10 15

	Asn	Lys	Cys	Ser	Gly	Arg	Val	Glu	Val	Lys	Val	Gln	Glu	Glu	Trp	Gly	
					20				25						30		
	Thr	Val	Cys	Asn	Asn	Gly	Trp	Ser	Met	Glu	Ala	Val	Ser	Val	Ile	Cys	
			35					40						45			
	Asn	Gln	Leu	Gly	Cys	Pro	Thr	Ala	Ile	Lys	Ala	Thr	Gly	Trp	Ala	Asn	
		50						55						60			
	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	Gly	Arg	Ile	Trp	Met	Asp	His	Val	Ser	Cys	Arg	
	65					70					75					80	
	Gly	Asn	Glu	Ser	Ala	Leu	Trp	Asp	Cys	Lys	His	Asp	Gly	Trp	Gly	Lys	
					85					90					95		
[0046]	His	Ser	Asn	Cys	Thr	His	Gln	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Thr	Cys	Ser	Asp	
				100					105						110		
	Gly	Ser	Asp	Leu	Glu	Met	Arg	Leu	Thr	Asn	Gly	Gly	Asn	Lys	Cys	Ser	
			115						120					125			
	Gly	Arg	Ile	Glu	Ile	Lys	Phe	Gln	Gly	Gln	Trp	Gly	Thr	Val	Cys	Asp	
		130						135					140				
	Asp	Asn	Phe	Asn	Ile	Asp	His	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Lys	Gln	Leu	Glu	
	145					150						155				160	
	Cys	Gly	Ser	Ala	Val	Ser	Phe	Ser	Gly	Ser	Ala	Asn	Phe	Gly	Glu	Gly	
					165					170					175		
	Ser	Gly	Pro	Ile	Trp	Phe	Asp	Asp	Leu	Ile	Cys	Ser	Gly	Asn	Glu	Ser	
					180					185					190		

	Ala	Leu	Trp	Asn	Cys	Lys	His	Gln	Gly	Trp	Gly	Lys	His	Asn	Cys	Asp	
	195							200						205			
	His	Ala	Glu	Asp	Ala	Gly	Val	Ile	Cys	Ser	Lys	Gly	Ala	Asp	Leu	Ser	
	210						215					220					
	Leu	Arg	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Thr	Glu	Cys	Ser	Gly	Arg	Leu	Glu	Val	
	225					230					235				240		
	Arg	Phe	Gln	Gly	Glu	Trp	Gly	Thr	Ile	Cys	Asp	Asp	Gly	Trp	Asp	Ser	
				245						250					255		
	His	Asp	Ala	Ala	Val	Ala	Cys	Lys	Gln	Leu	Gly	Cys	Pro	Thr	Ala	Ile	
			260						265					270			
[0047]	Thr	Ala	Ile	Gly	Arg	Val	Asn	Ala	Ser	Glu	Gly	Phe	Gly	His	Ile	Trp	
	275						280						285				
	Leu	Asp	Ser	Val	Ser	Cys	Gln	Gly	His	Glu	Pro	Ala	Val	Trp	Gln	Cys	
	290						295					300					
	Lys	His	His	Glu	Trp	Gly	Lys	His	Tyr	Cys	Asn	His	Asn	Glu	Asp	Ala	
	305					310				315					320		
	Gly	Val	Thr	Cys	Ser	Asp	Gly	Ser	Asp	Leu	Glu	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	
				325						330				335			
	Gly	Gly	Ser	Arg	Cys	Ala	Gly	Thr	Val	Glu	Val	Glu	Ile	Gln	Arg	Leu	
				340					345					350			
	Leu	Gly	Lys	Val	Cys	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Leu	Lys	Glu	Ala	Asp	Val	
		355						360					365				

	Val	Cys	Arg	Gln	Leu	Gly	Cys	Gly	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ser	Tyr	Gln	
	370						375					380					
	Val	Tyr	Ser	Lys	Ile	Gln	Ala	Thr	Asn	Thr	Trp	Leu	Phe	Leu	Ser	Ser	
	385					390					395					400	
	Cys	Asn	Gly	Asn	Glu	Thr	Ser	Leu	Trp	Asp	Cys	Lys	Asn	Trp	Gln	Trp	
					405					410					415		
	Gly	Gly	Leu	Thr	Cys	Asp	His	Tyr	Glu	Glu	Ala	Lys	Ile	Thr	Cys	Ser	
				420					425						430		
	Ala	His	Arg	Glu	Pro	Arg	Leu	Val	Gly	Gly	Asp	Ile	Pro	Cys	Ser	Gly	
			435					440						445			
[0048]	Arg	Val	Glu	Val	Lys	His	Gly	Asp	Thr	Trp	Gly	Ser	Val	Cys	Asp	Ser	
	450						455					460					
	Asp	Phe	Ser	Leu	Glu	Ala	Ala	Ser	Val	Leu	Cys	Arg	Glu	Leu	Gln	Cys	
	465					470					475					480	
	Gly	Thr	Val	Val	Ser	Ile	Leu	Gly	Gly	Ala	His	Phe	Gly	Glu	Gly	Asn	
					485					490					495		
	Gly	Gln	Ile	Trp	Ala	Glu	Glu	Phe	Gln	Cys	Glu	Gly	His	Glu	Ser	His	
					500					505					510		
	Leu	Ser	Leu	Cys	Pro	Val	Ala	Pro	Arg	Pro	Glu	Gly	Thr	Cys	Ser	His	
					515				520					525			
	Ser	Arg	Asp	Val	Gly	Val	Val	Cys	Ser	Arg	Tyr	Thr	Glu	Ile	Arg	Leu	
	530						535						540				

	Val	Asn	Gly	Lys	Thr	Pro	Cys	Glu	Gly	Arg	Val	Glu	Leu	Lys	Thr	Leu	
	545					550					555					560	
	Asp	Ala	Trp	Gly	Ser	Leu	Cys	Asn	Ser	His	Trp	Asp	Ile	Glu	Asp	Ala	
					565					570					575		
	His	Val	Leu	Cys	Gln	Gln	Leu	Lys	Cys	Gly	Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Pro	
				580					585						590		
	Gly	Gly	Ala	His	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Gly	Gln	Val	Trp	Arg	His	Met	
			595					600						605			
	Phe	His	Cys	Thr	Gly	Thr	Glu	Gln	His	Met	Gly	Asp	Cys	Pro	Val	Thr	
	610						615					620					
[0049]	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Leu	Cys	Pro	Ser	Gly	Gln	Val	Ala	Ser	Val	Ile	
	625					630					635					640	
	Cys	Ser	Gly	Asn	Gln	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Ser	Cys	Asn	Ser	Ser	Ser	
				645						650					655		
	Leu	Gly	Pro	Thr	Arg	Pro	Thr	Ile	Pro	Glu	Glu	Ser	Ala	Val	Ala	Cys	
			660						665					670			
	Ile	Glu	Ser	Gly	Gln	Leu	Arg	Leu	Val	Asn	Gly	Gly	Gly	Arg	Cys	Ala	
			675					680					685				
	Gly	Arg	Val	Glu	Ile	Tyr	His	Glu	Gly	Ser	Trp	Gly	Thr	Ile	Cys	Asp	
	690						695					700					
	Asp	Ser	Trp	Asp	Leu	Ser	Asp	Ala	His	Val	Val	Cys	Arg	Gln	Leu	Gly	
	705					710						715				720	

	Cys Gly Glu Ala Ile Asn Ala Thr Gly Ser Ala His Phe Gly Glu Gly	
	725	730 735
	Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asp Glu Met Lys Cys Asn Gly Lys Glu Ser	
	740	745 750
	Arg Ile Trp Gln Cys His Ser His Gly Trp Gly Gln Gln Asn Cys Arg	
	755	760 765
	His Lys Glu Asp Ala Gly Val Ile Cys Ser Glu Phe Met Ser Leu Arg	
	770	775 780
	Leu Thr Ser Glu Ala Ser Arg Glu Ala Cys Ala Gly Arg Leu Glu Val	
	785	790 795 800
[0050]	Phe Tyr Asn Gly Ala Trp Gly Ser Val Gly Arg Ser Ser Met Ser Glu	
	805	810 815
	Thr Thr Val Gly Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Ala Asp Lys Gly	
	820	825 830
	Lys Ile Asn Pro Ala Ser Leu Asp Lys Ala Met Ser Ile Pro Met Trp	
	835	840 845
	Val Asp Asn Val Gln Cys Pro Lys Gly Pro Asp Thr Leu Trp Gln Cys	
	850	855 860
	Pro Ser Ser Pro Trp Glu Lys Arg Leu Ala Arg Pro Ser Glu Glu Thr	
	865	870 875 880
	Trp Ile Thr Cys Asp Asn Lys Ile Arg Leu Gln Glu Gly Pro Thr Ser	
	885	890 895

Cys Ser Gly Arg Val Glu Ile Trp His Gly Gly Ser Trp Gly Thr Val
900 905 910

Cys Asp Asp Ser Trp Asp Leu Asn Asp Ala Gln Val Val Cys Gln Gln
915 920 925

Leu Gly Cys Gly Pro Ala Leu Lys Ala Phe Lys Glu Ala Glu Phe Gly
930 935 940

Gln Gly Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asn Glu Val Lys Cys Lys Gly Asn
945 950 955 960

Glu Ser Ser Leu Trp Asp Cys Pro Ala Arg Arg Trp Gly His Asn Glu
965 970 975

[0051] Cys Gly His Lys Glu Asp Ala Ala Val Asn Cys Thr Asp Ile Ser Ala
980 985 990

His Lys Thr Pro Gln Lys Ala Pro Thr Gly His Thr Ser Arg Gln Ser
995 1000 1005

Ser

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 27

Pro Pro Pro Phe

1

<210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0052] <220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 28
Pro Pro Pro Ile
1

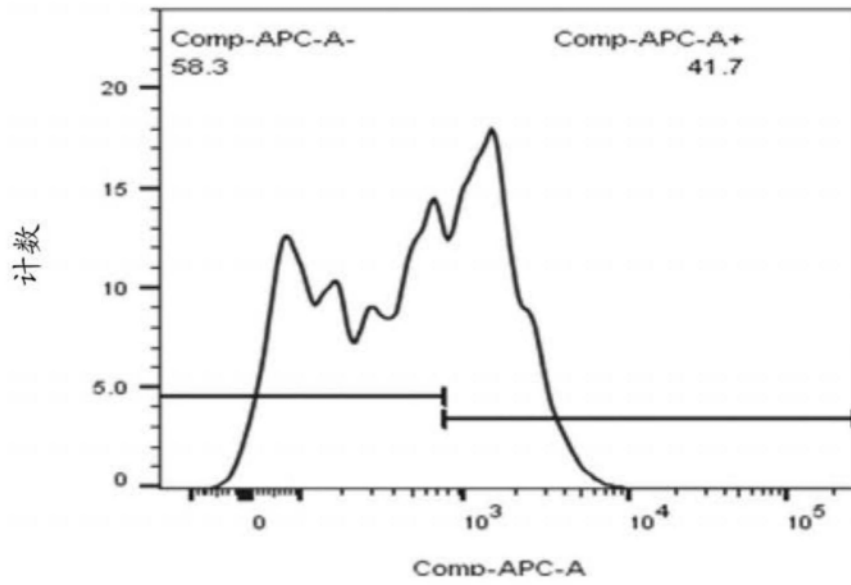


图1

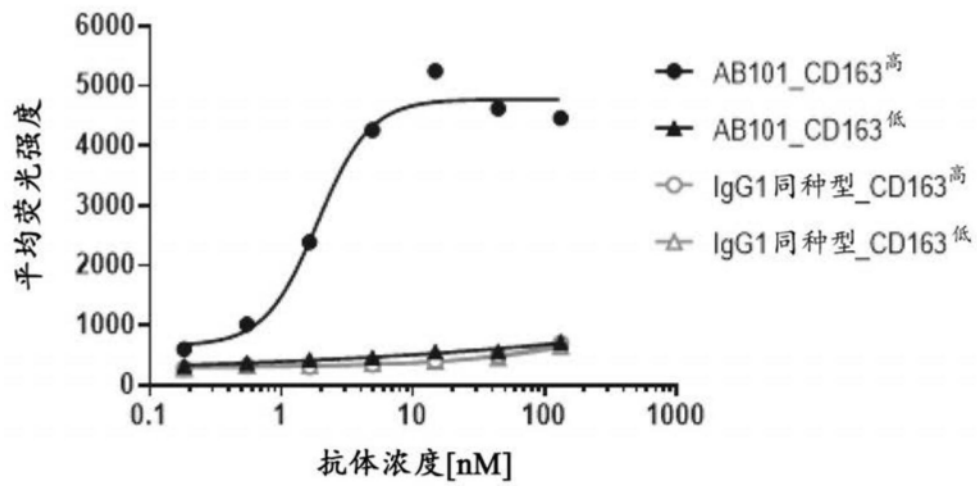


图2

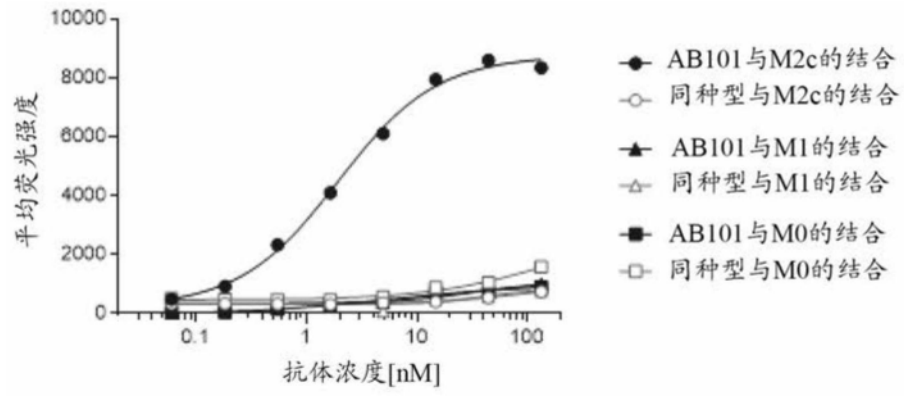


图3

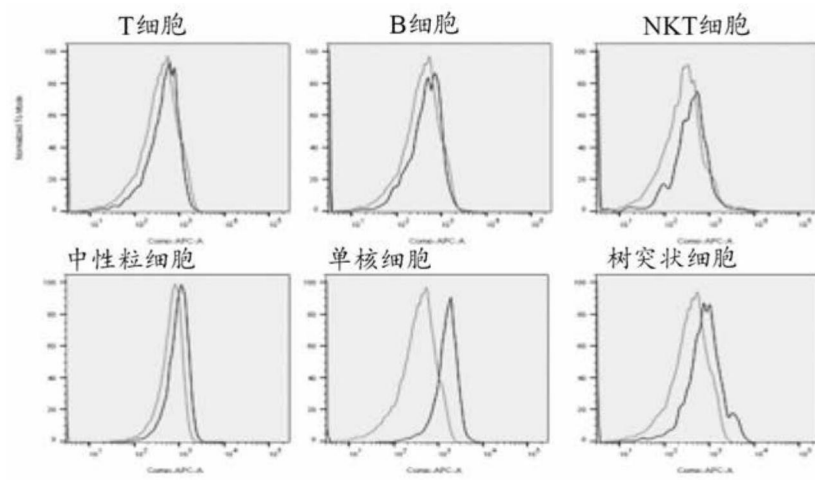


图4

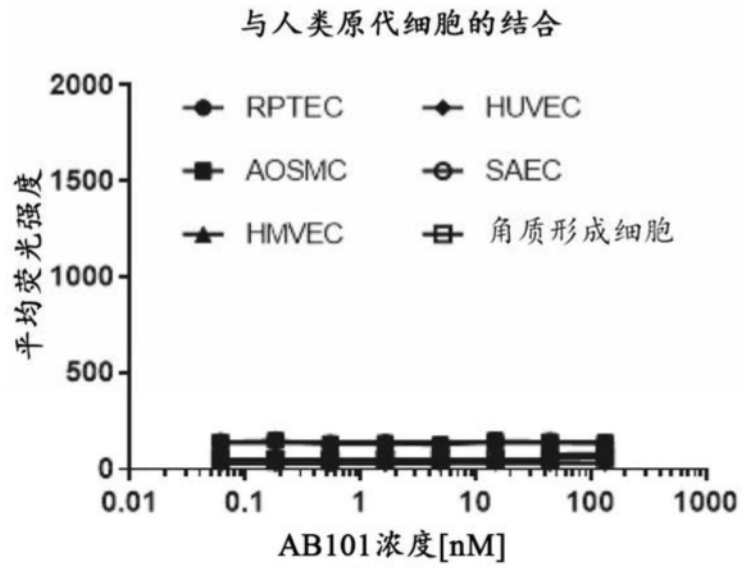


图5

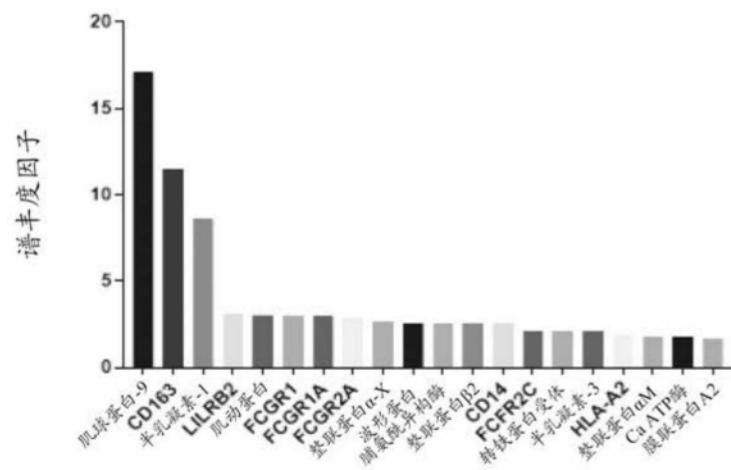


图6A

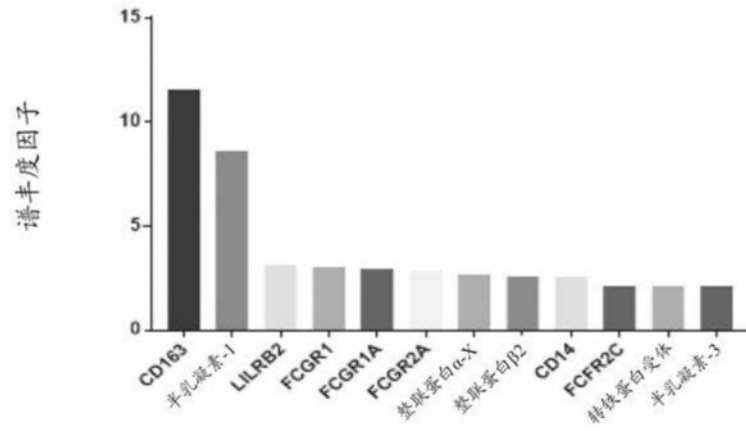


图6B

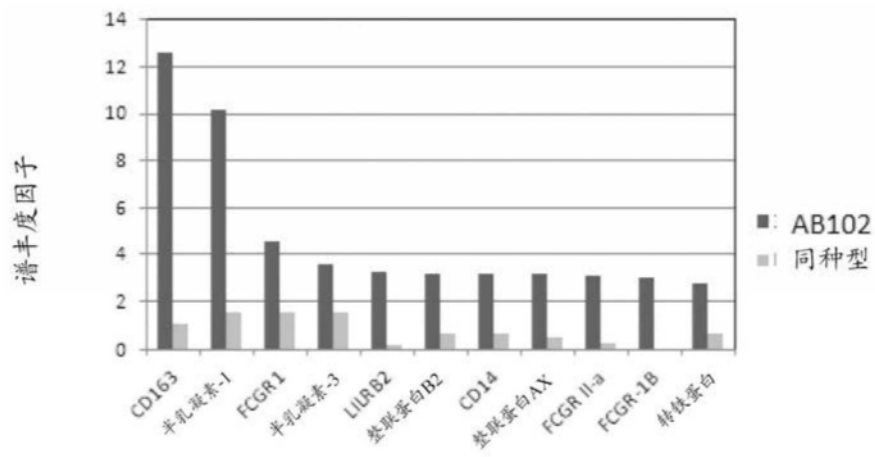


图6C

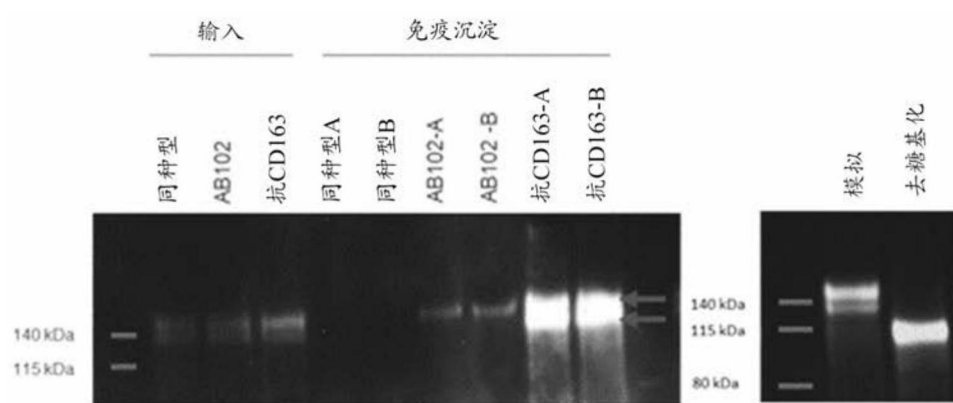


图7

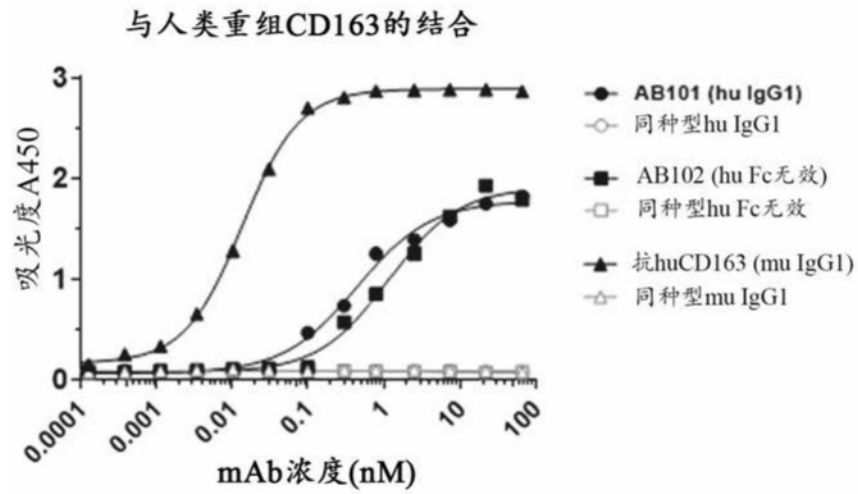


图8

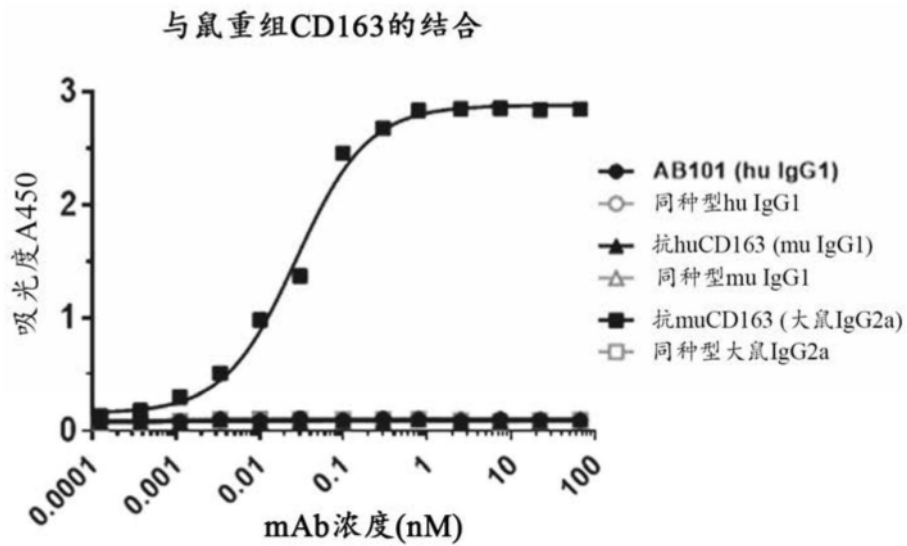


图9

AB101与抗CD163 pAb处理的M2c的结合

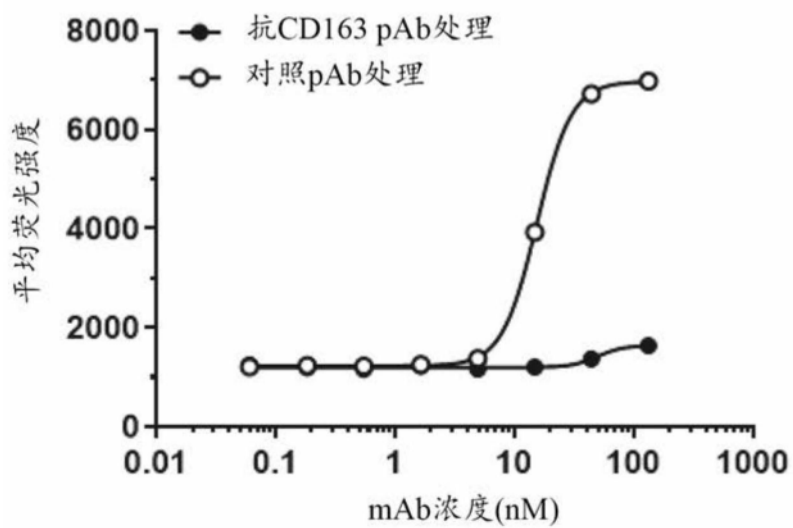


图10

抗huCD163 mAb与抗CD163 pAb处理的M2c的结合

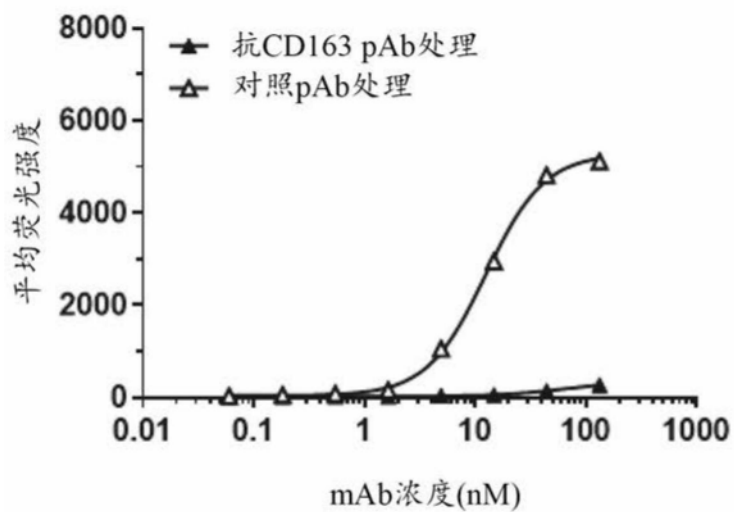


图11

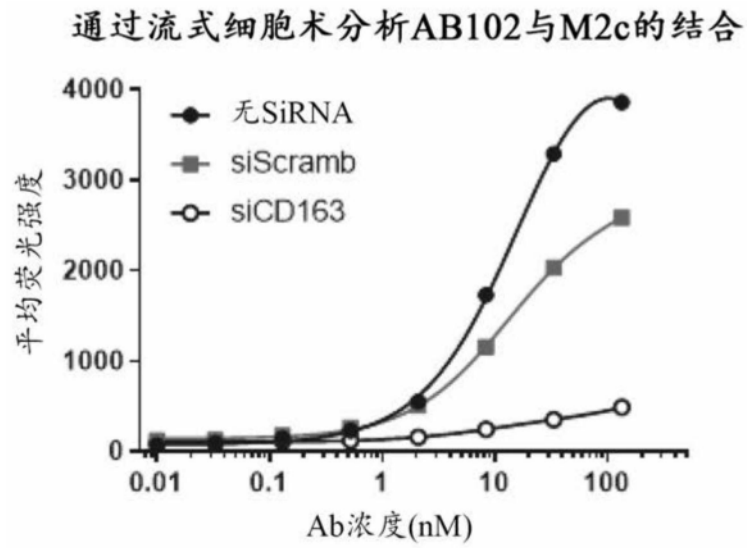


图12

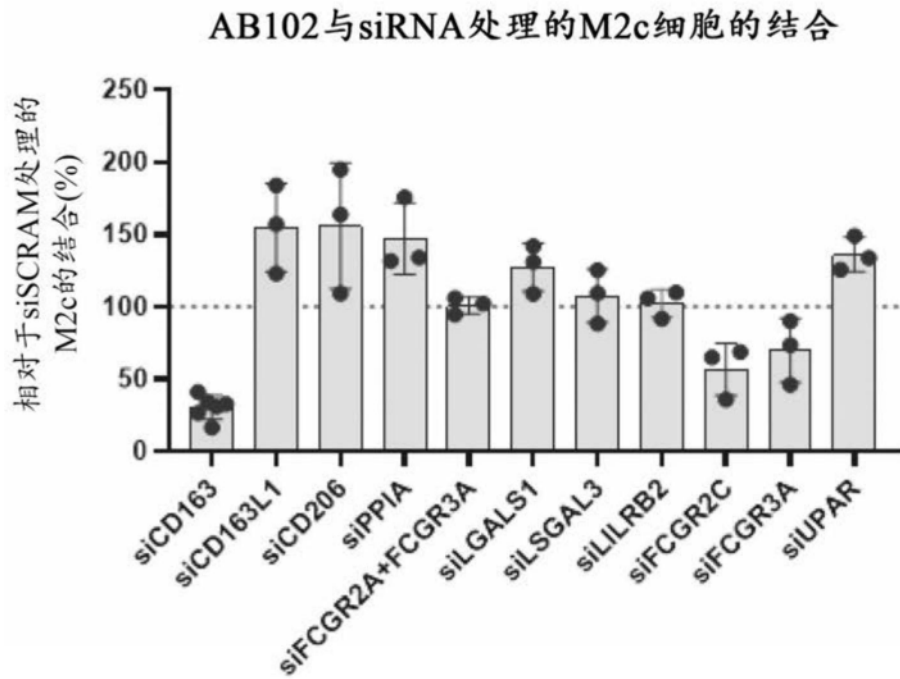


图13

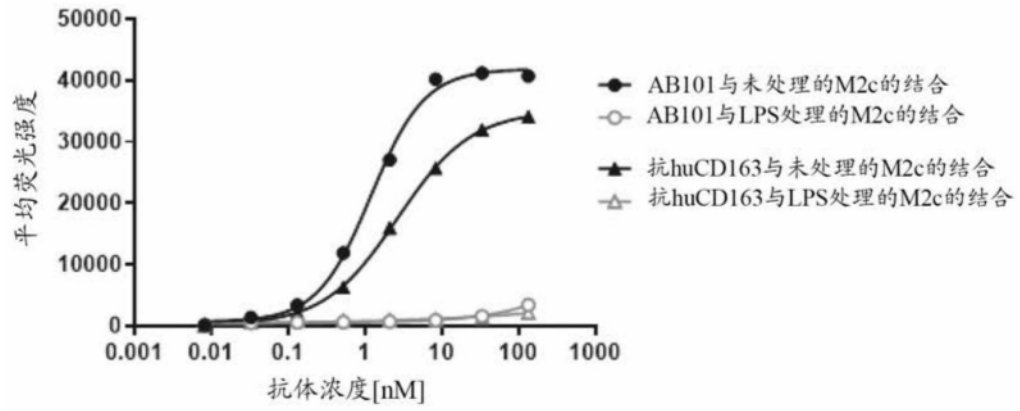


图14

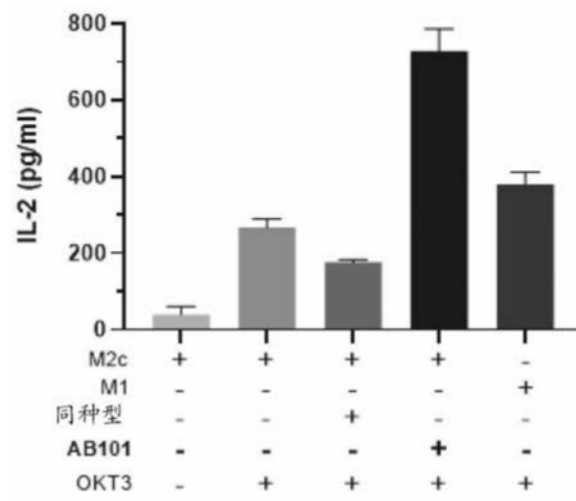


图15

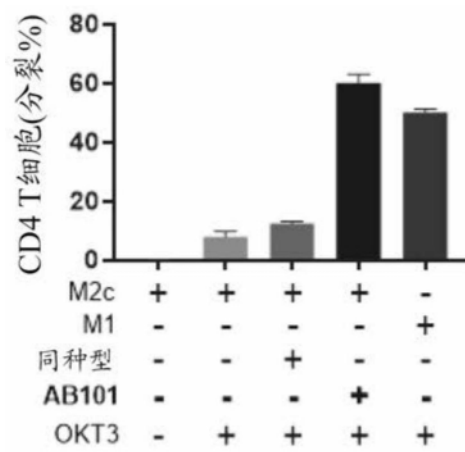


图16

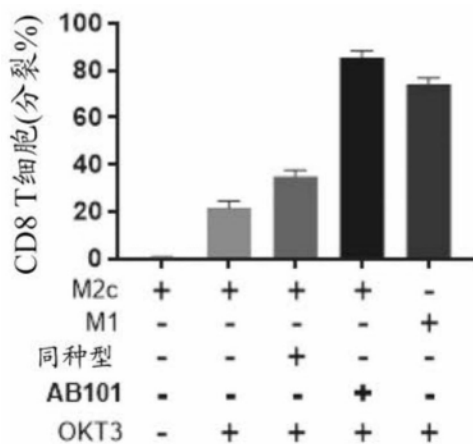


图17

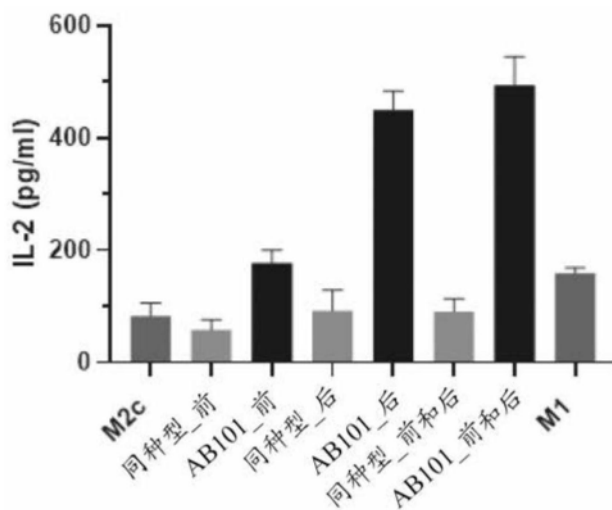


图18

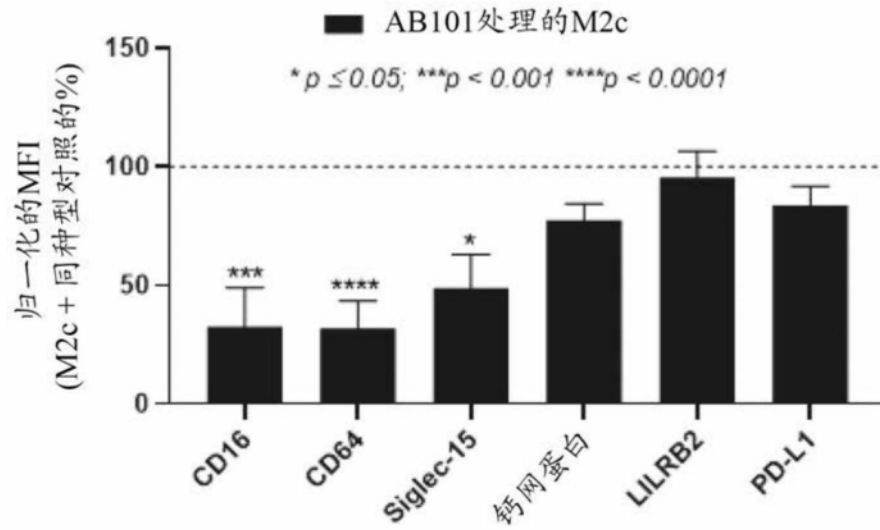


图19

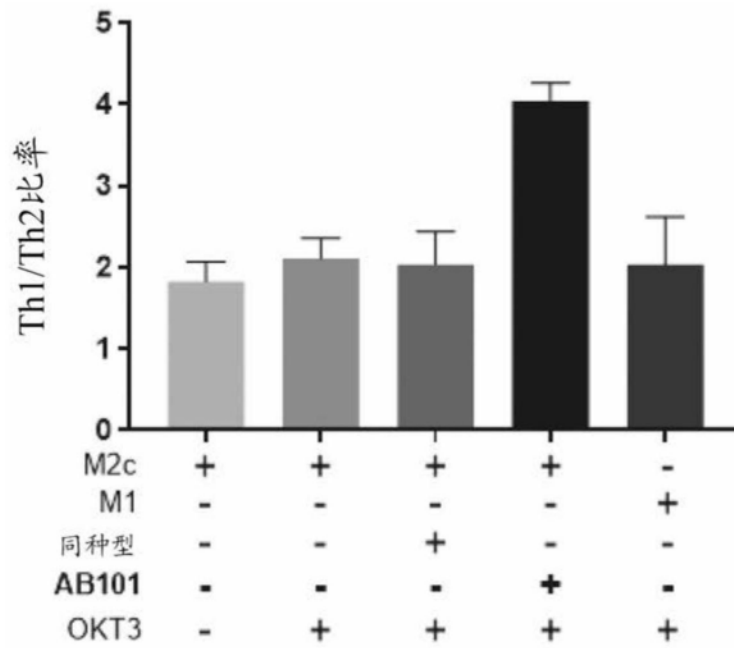


图20

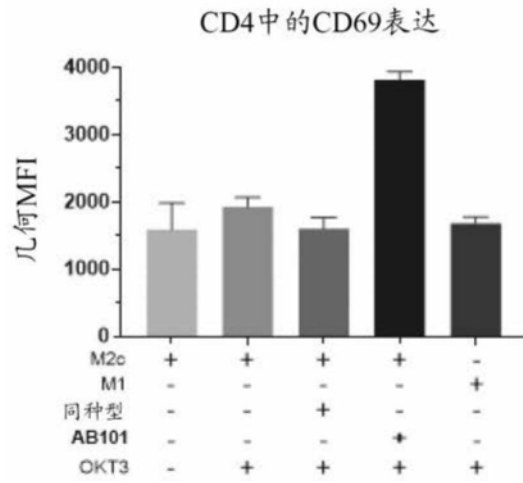


图21

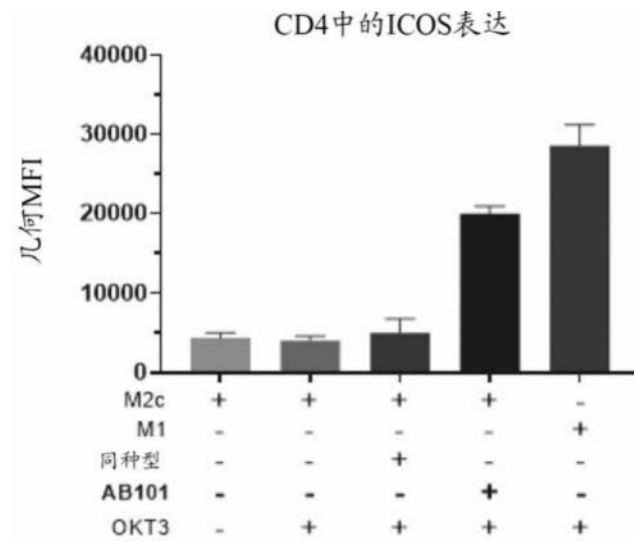


图22

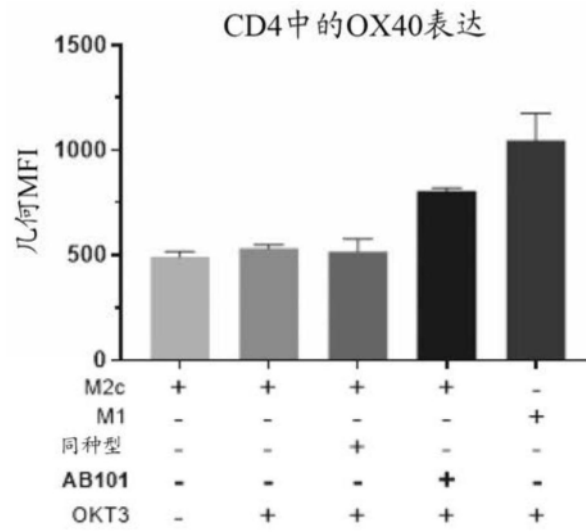


图23

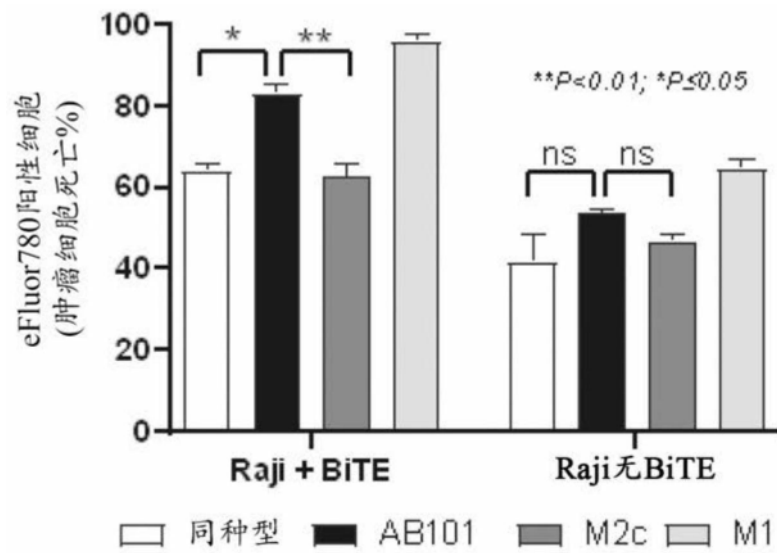


图24

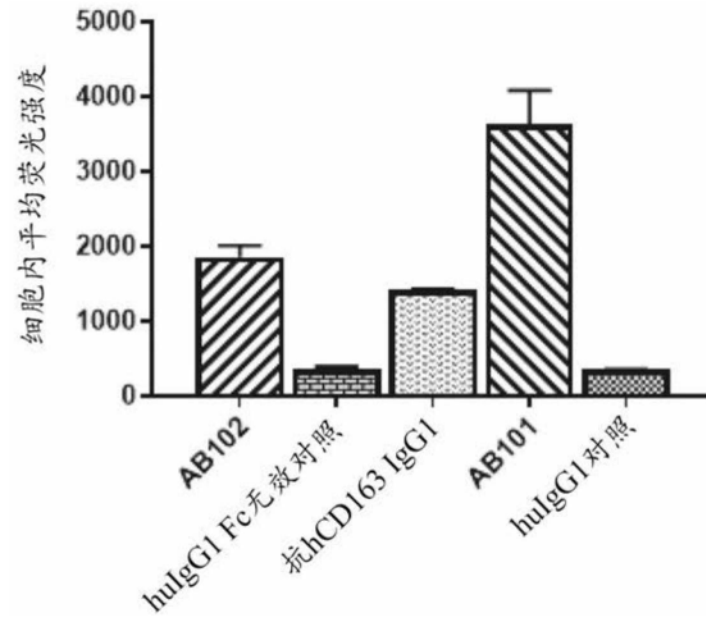


图25

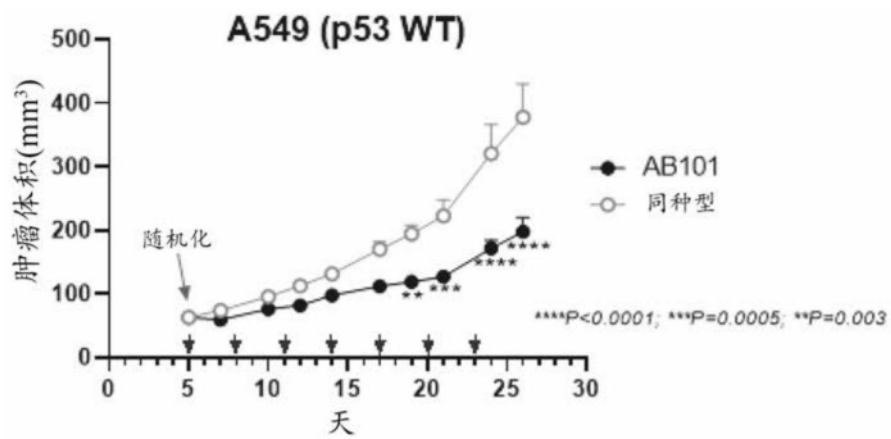


图26

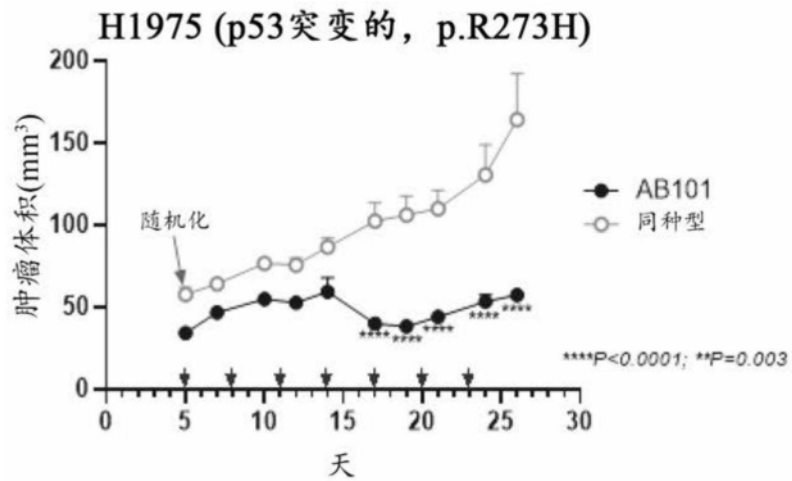


图27

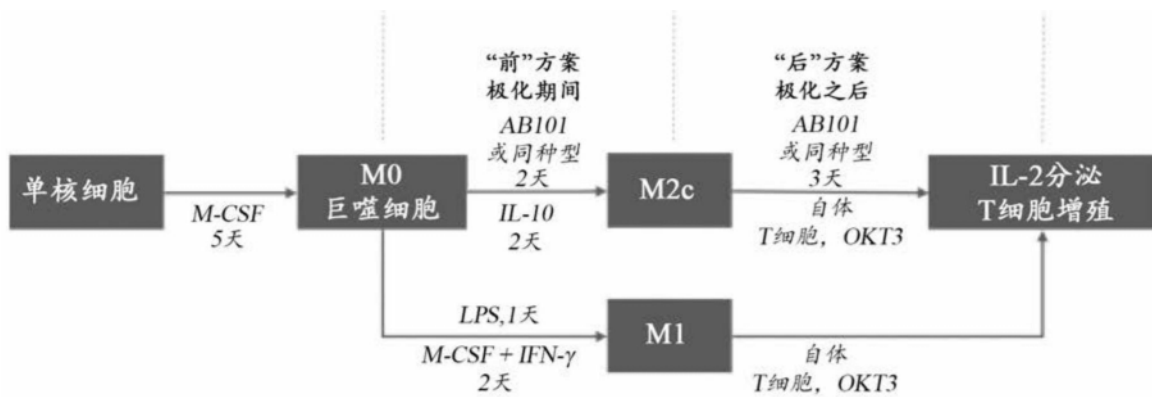


图28

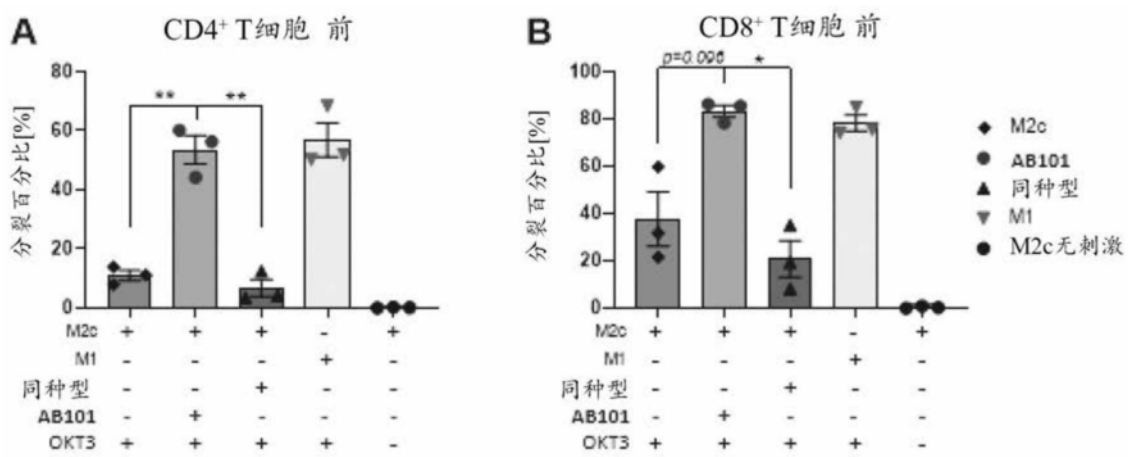


图29

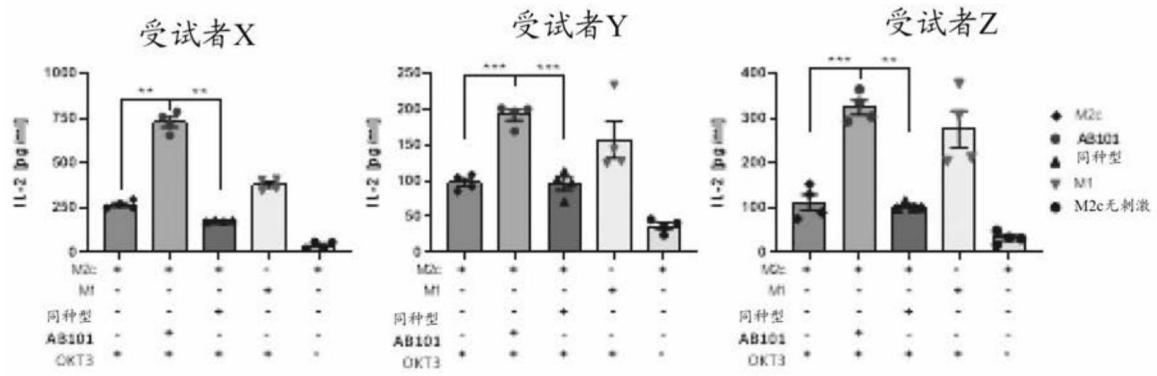


图30

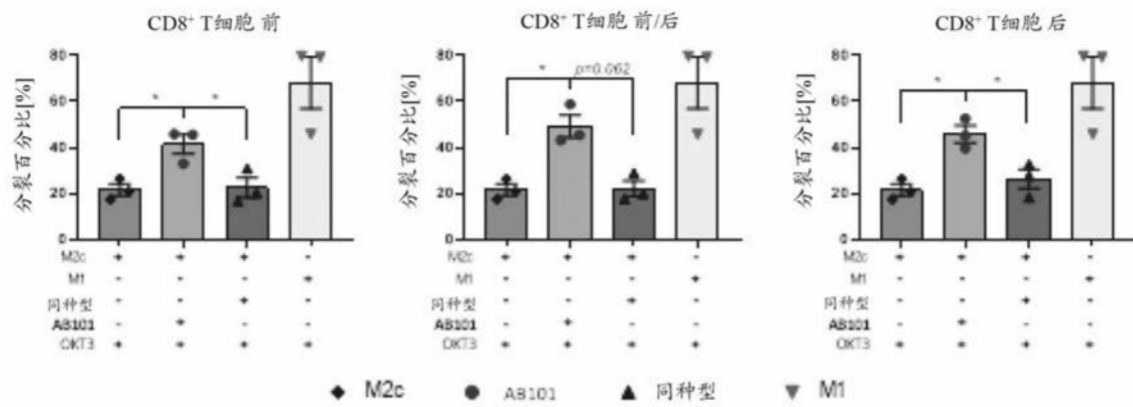


图31

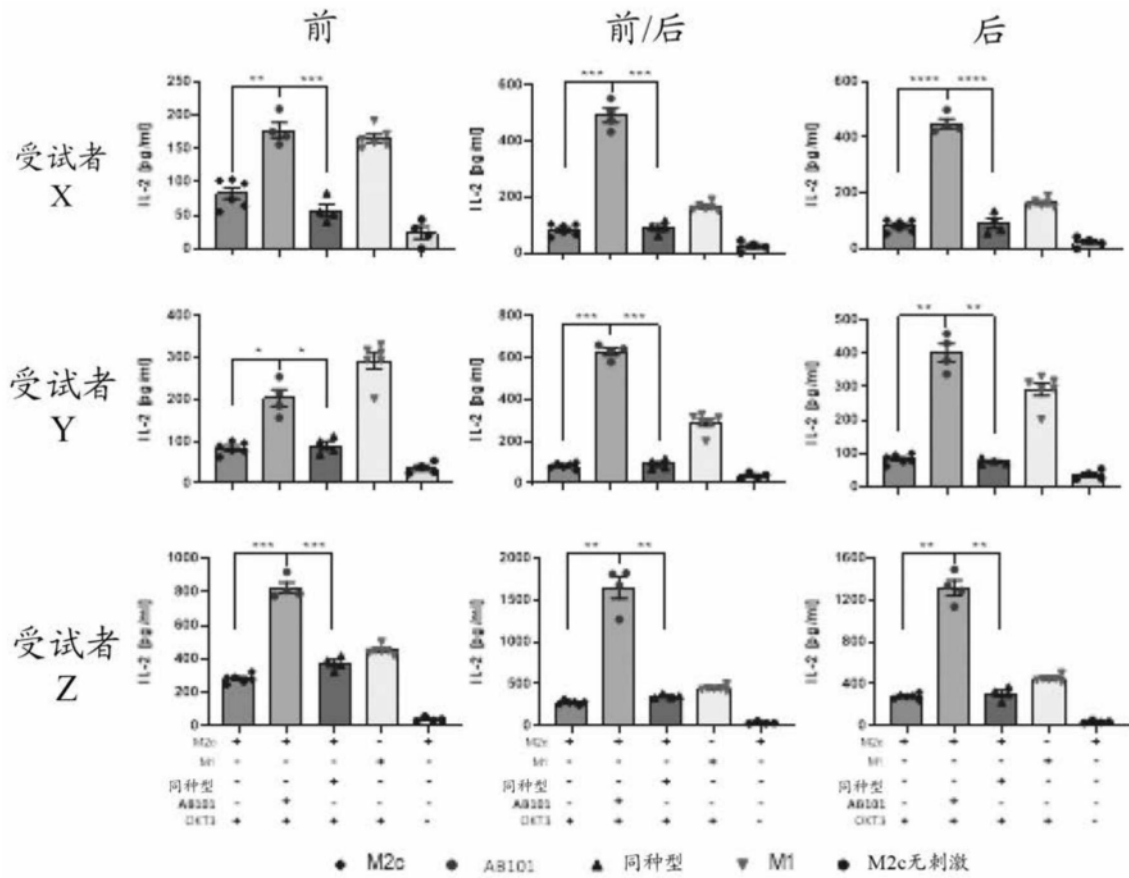


图32

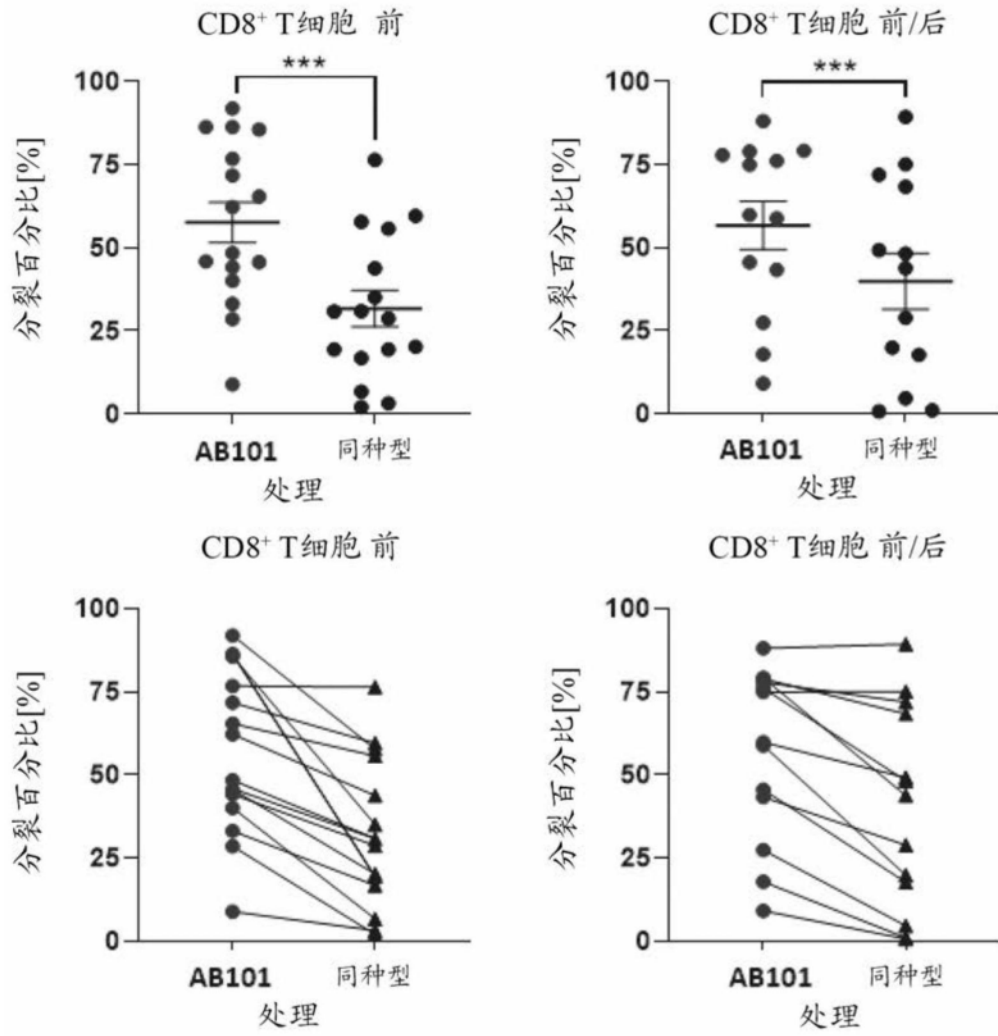


图33

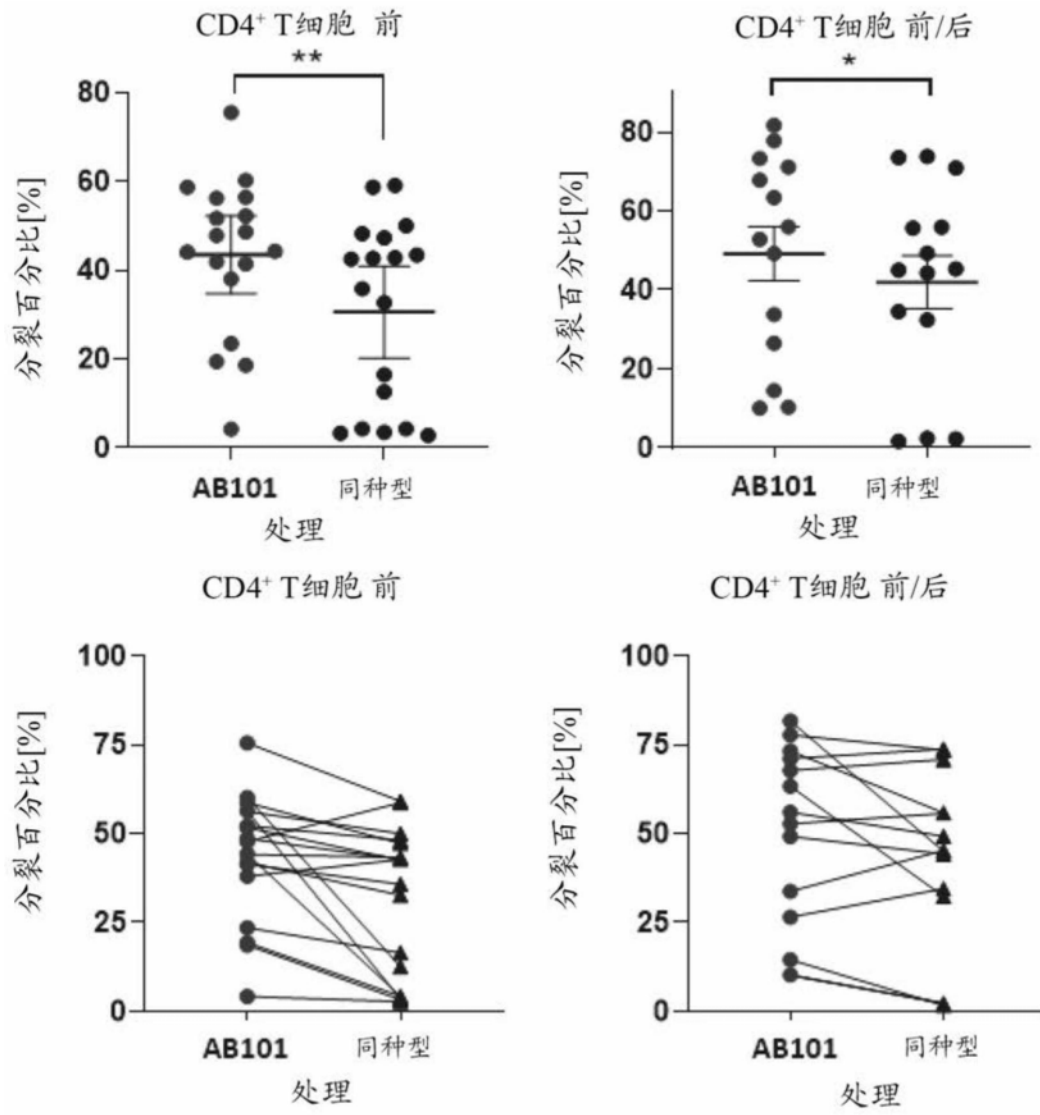


图34

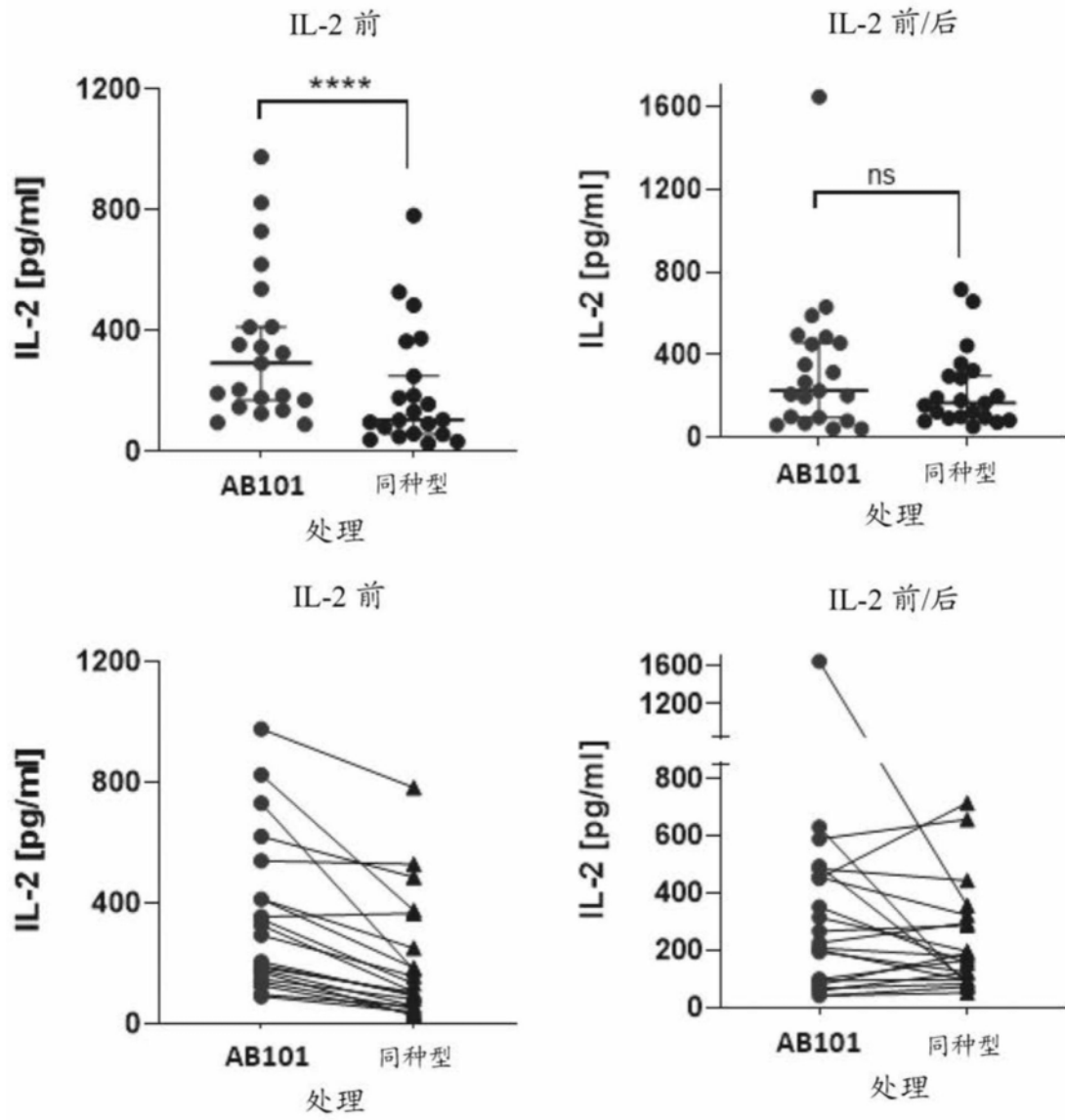


图35

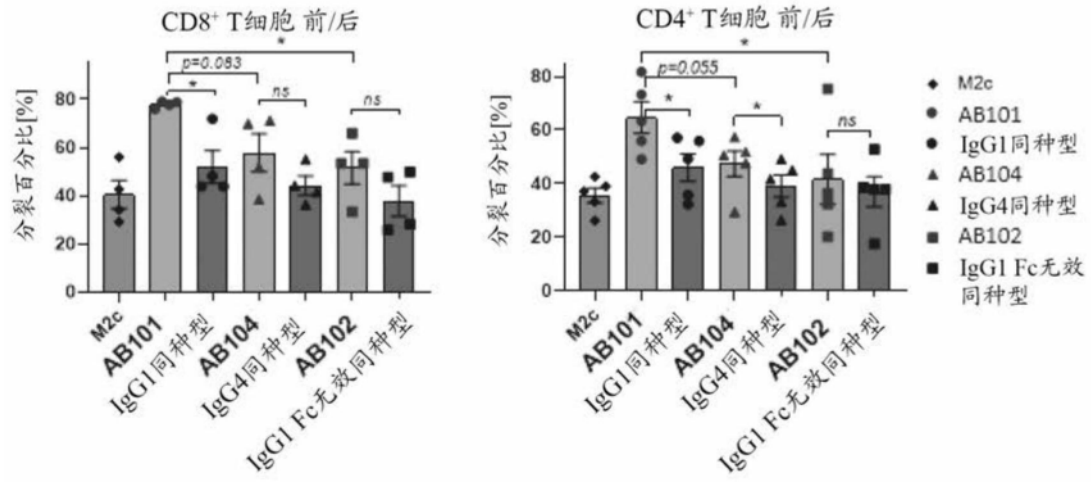


图36

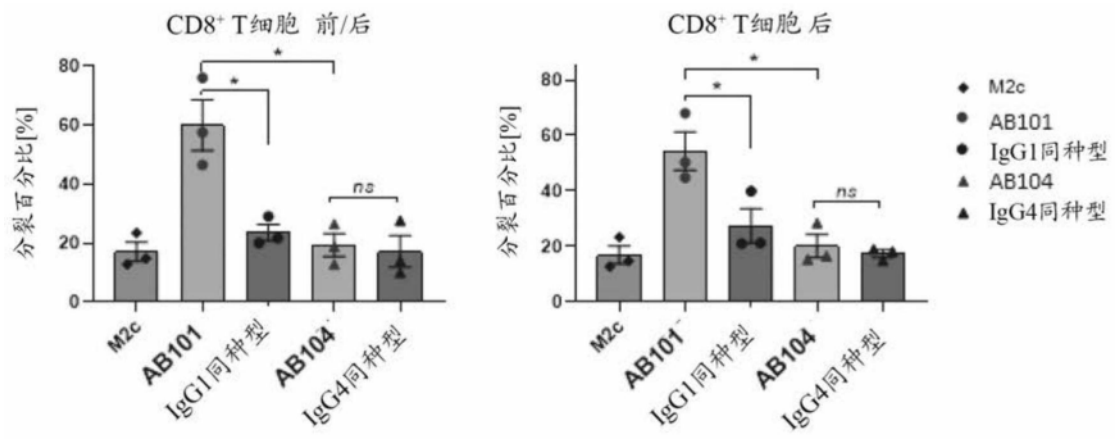


图37

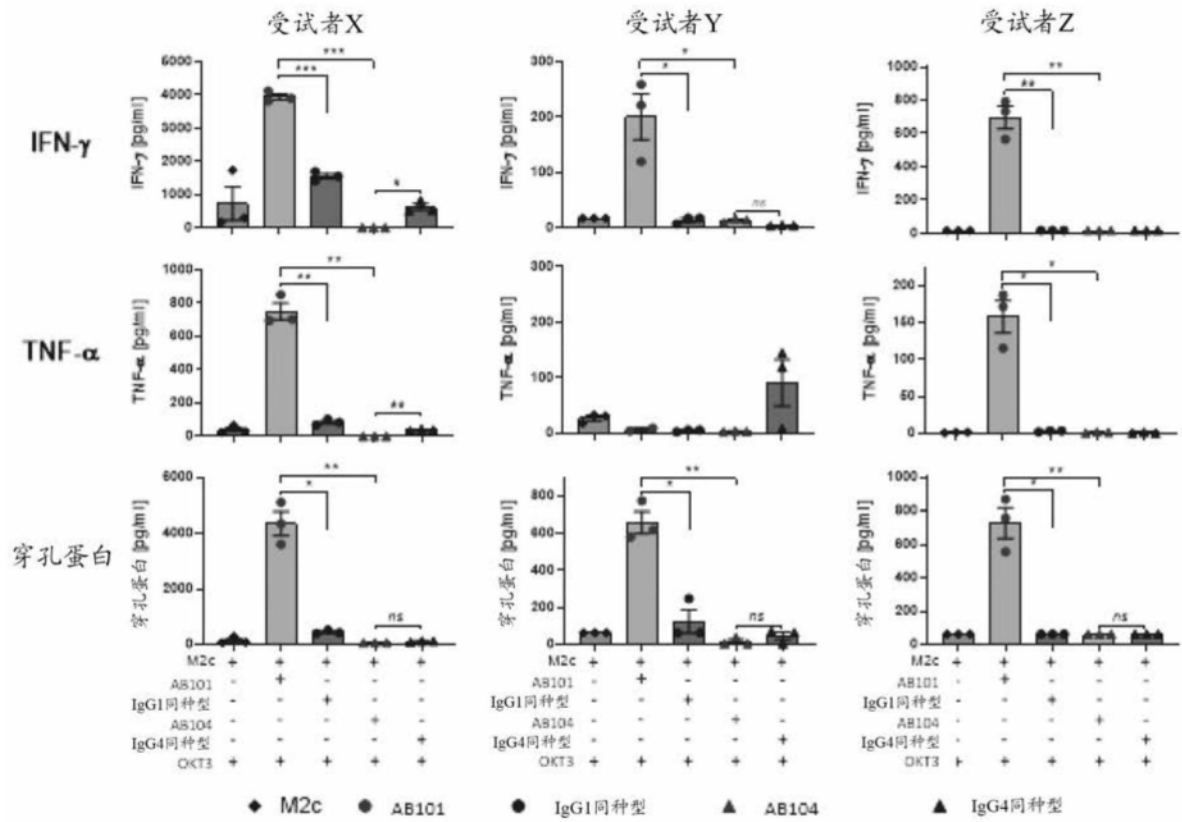


图38

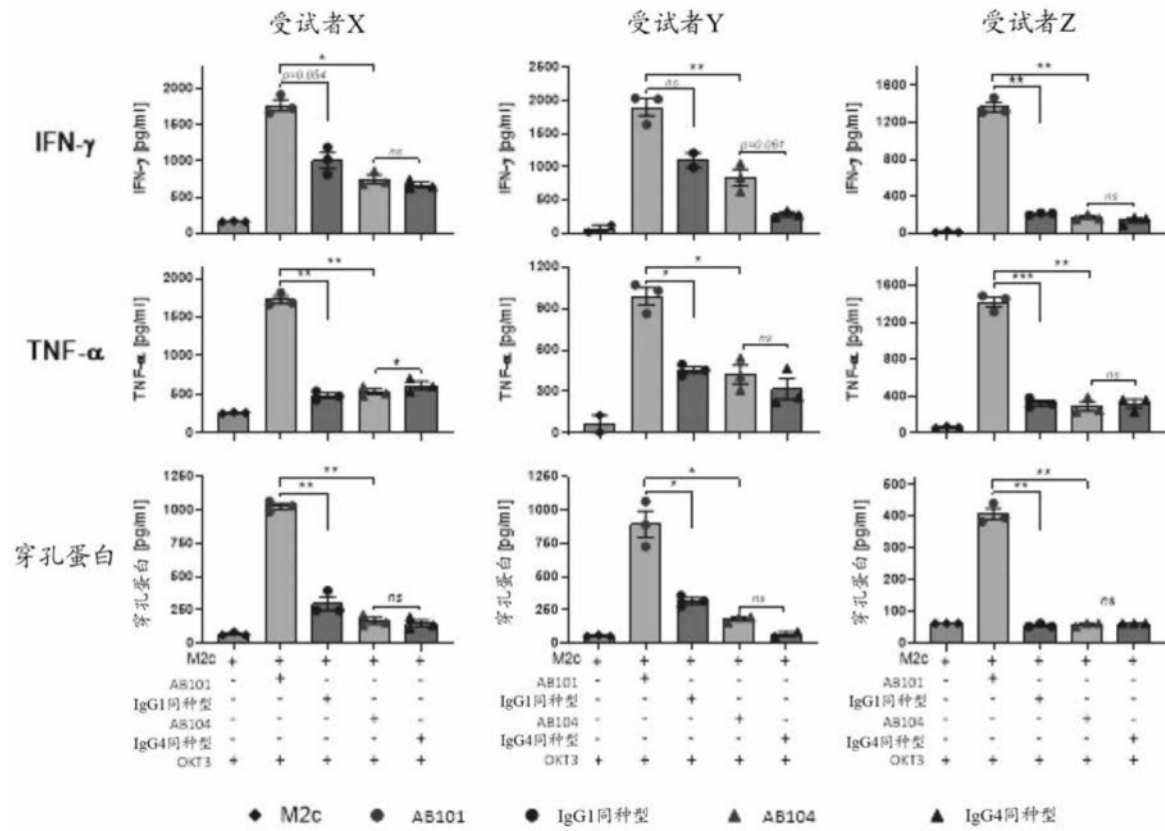


图39

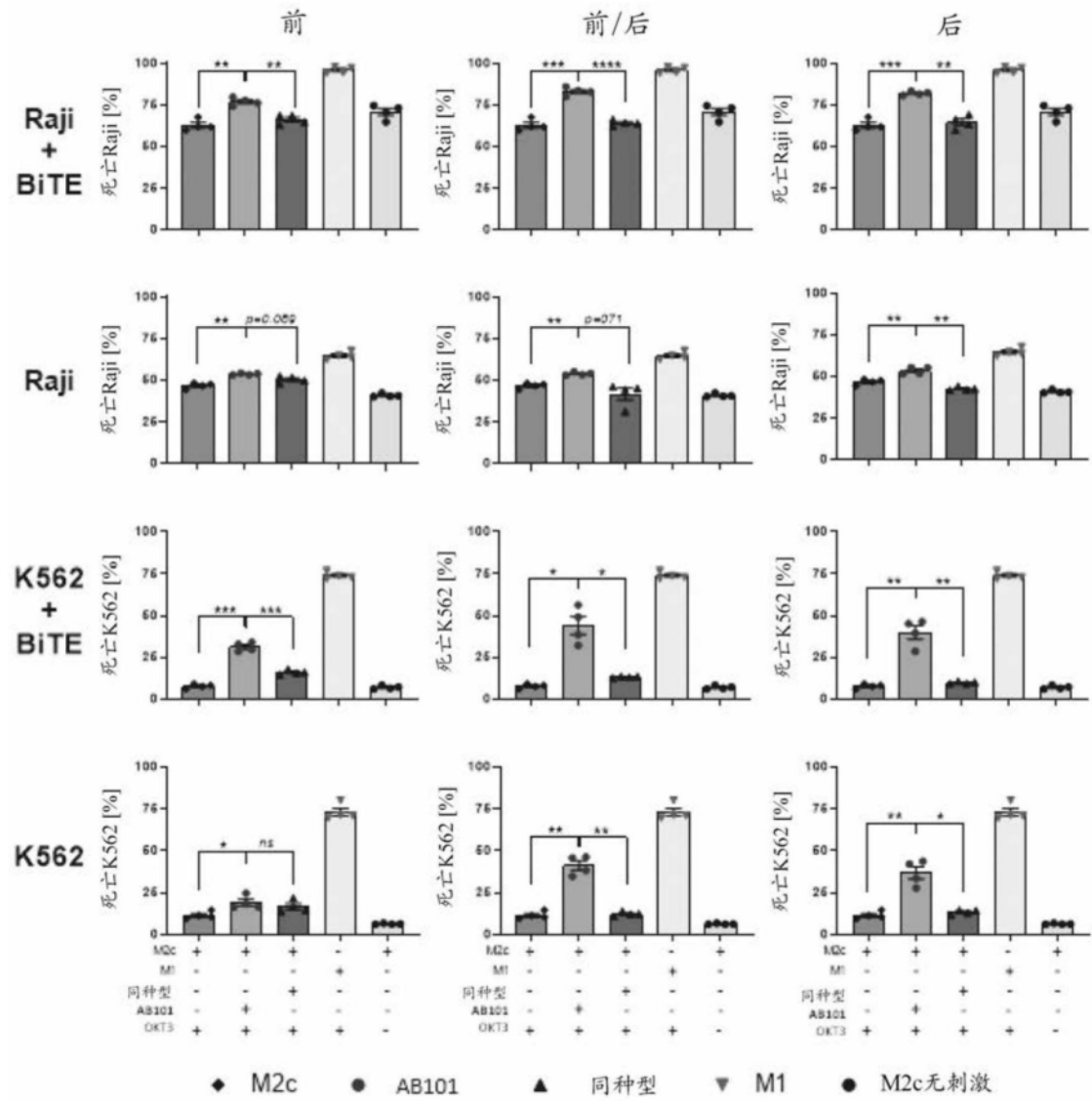


图40

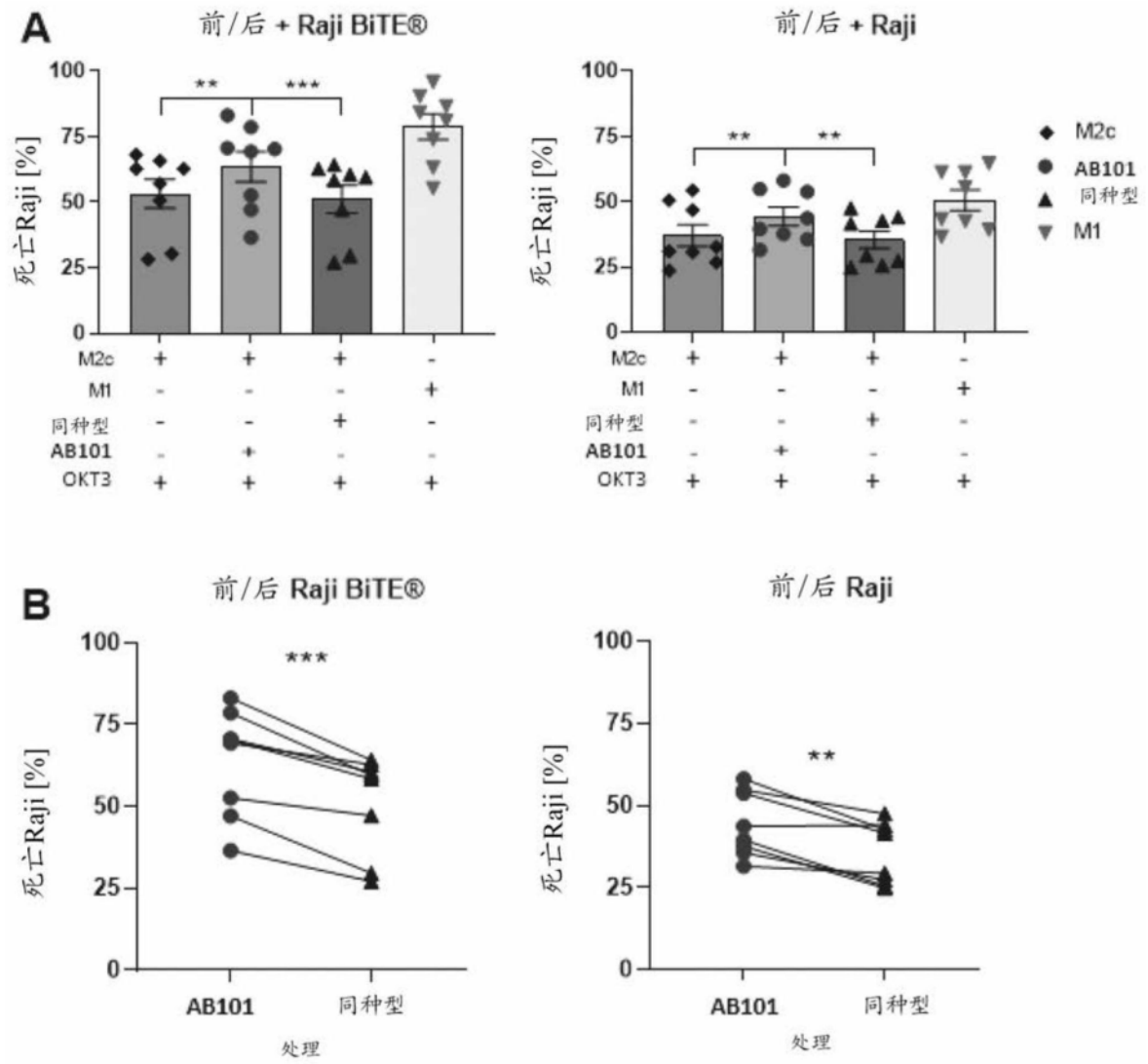


图41

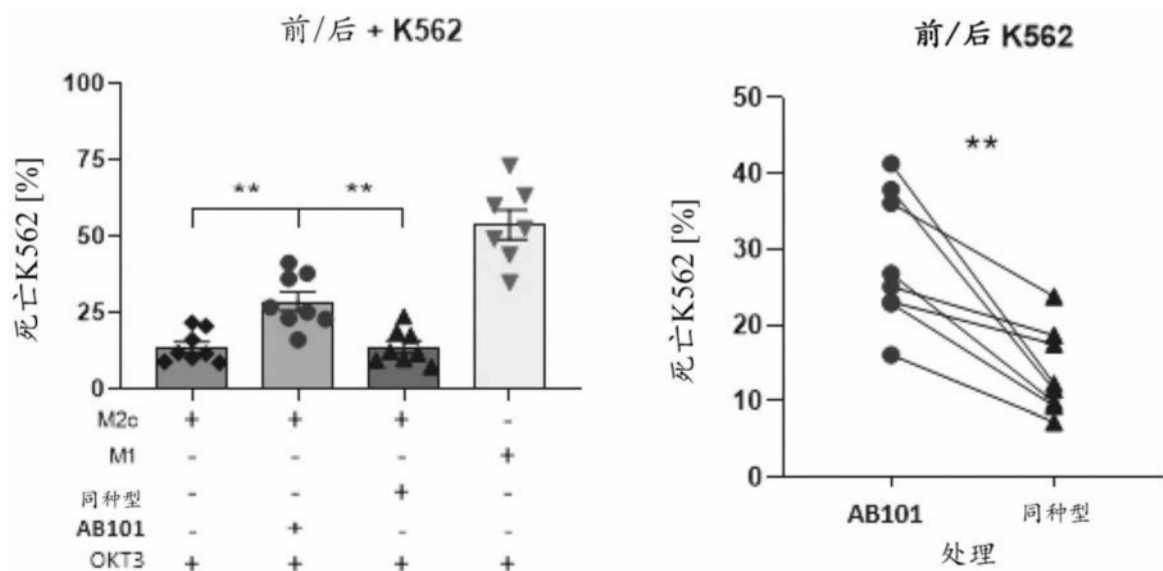
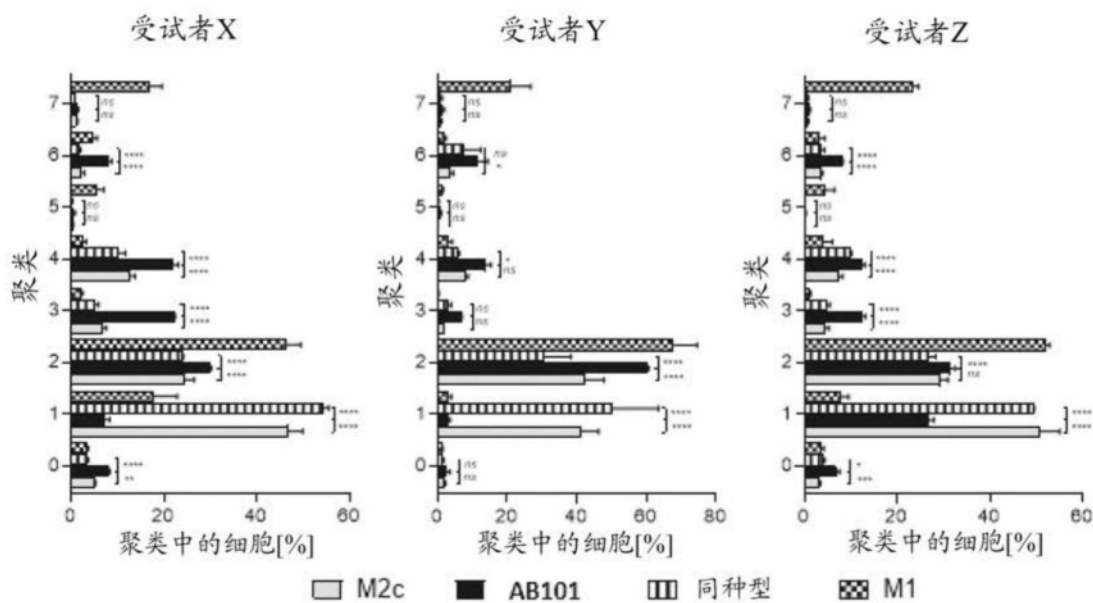


图42



FlowSOM 聚类	表型	CD4 ⁺ T 细胞状态
1	CD127 ⁺ , CCR6 ⁻ , CD25 ⁻ , CCR4 ⁻ , CXCR3 ⁻ , CD69 ⁻	静息
0	CD127 ⁺ , CCR6 ⁺ , CD25 ^低 , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁻ , CD69 ^低	活化
2	CD127 ⁻ , CCR6 ⁺ , CD25 ⁺ , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ^低	活化
3	CD127 ⁺ , CCR6 ⁺ , CD25 ⁺ , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺	活化
4	CD127 ⁺ , CCR6 ⁺ , CD25 ^低 , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ^低	活化
5	CD127 ⁻ , CCR6 ^低 , CD25 ^高 , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺	活化
6	CD127 ⁻ , CCR6 ⁺ , CD25 ^低 , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺	活化
7	CD127 ⁻ , CCR6 ⁺ , CD25 ^高 , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ⁻	活化

图43

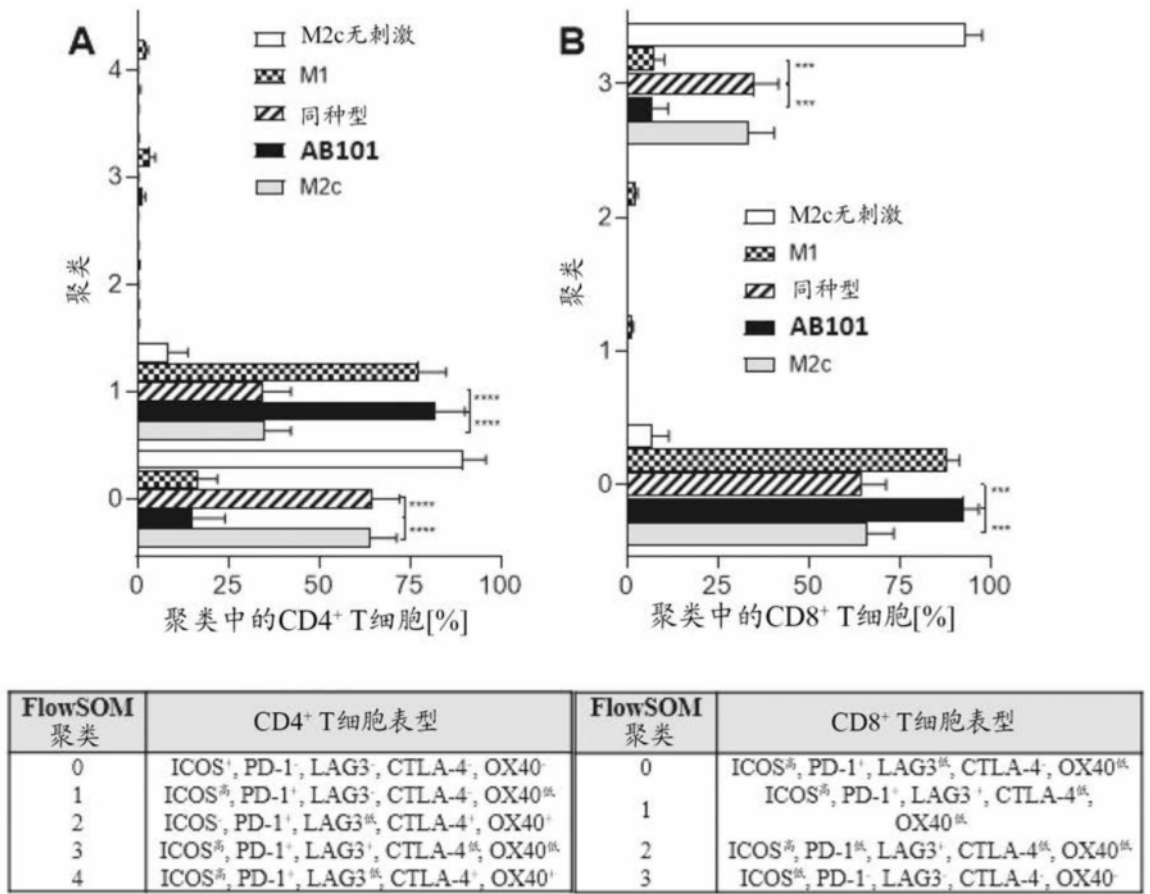
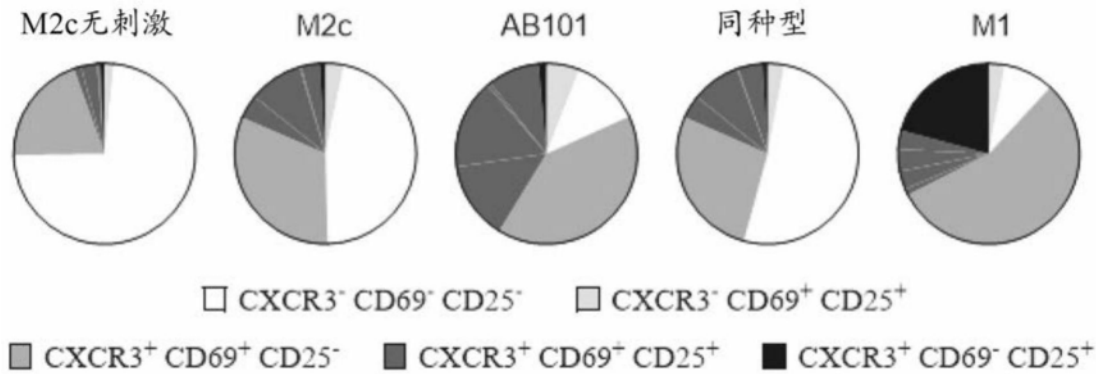


图44



CD4 ⁺ T 细胞状态	CXCR3 表达	表型	FlowSOM 聚类
静息	无	CXCR3 ⁻ , CD69 ⁻ , CD25 ⁻	1
活化	无	CXCR3 ⁻ , CD69 ⁺ , CD25 ⁻	0
活化	有	CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺ , CD25 ⁻	2
活化	有	CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺ , CD25 ⁺	3-6
活化	有	CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺ , CD25 ⁺	7

图45

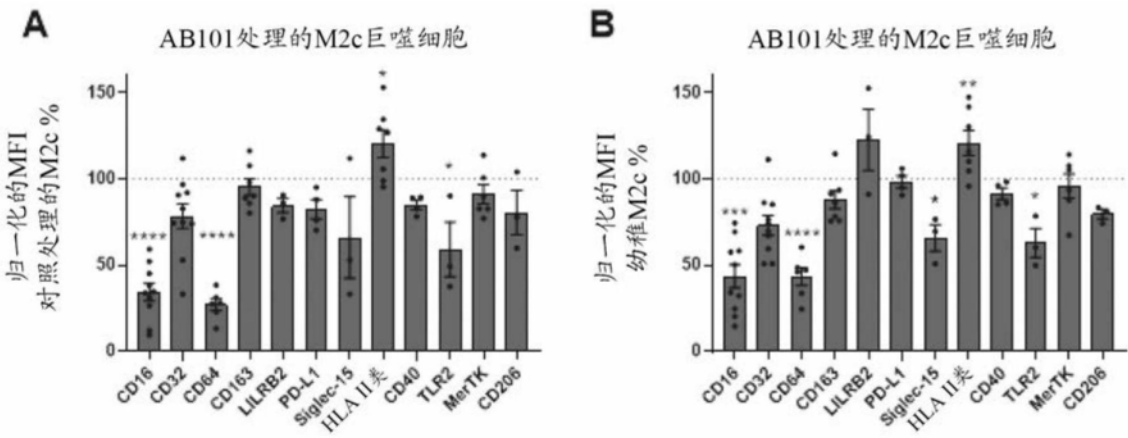


图46

10	20	30	40	50	60
GTDKELRLVD	GENKCSGRVE	VKVQEEWGT	CNNGWSMEAV	SVICNQLGCP	TAIKAPGWAN
70	80	90	100	110	120
SSAGSGRIWM	DHVSCRGNES	ALWDCKHDGW	GKHSNCTHQQ	DAGVTCSDGS	NLEMRLTRGG
130	140	150	160	170	180
NMCSGRIEIK	FQGRWGTVC	DNFNIDHASV	ICRQLECGSA	VSFSGSSNFG	EGSGPIWFDD
190	200	210	220	230	240
LICNGNESAL	WNCKHQGWGK	HNCDAEDAG	VICSKGADLS	LRLVDGVTEC	SGRLEVRFQG
250	260	270	280	290	300
EWGTICDDGW	DSYDAAVACK	QLGCPTAVTA	IGRVNASKGF	GHIWLDSVSC	QGHEPAVWQC
310	320	330	340	350	360
KHHEWGKHYC	NHNEDAGVTC	SDGSDLELRL	RGGGSRCACT	VEVEIQRLLG	KVCDRGWGLK
370	380	390	400	410	420
EADVVCRLG	CGSALKTSYQ	VYSKIQATNT	WFLSSCNGN	ETSLWDCKNW	QWGGGLTCDHY
430	440	450	460	470	480
EEAKITCSAH	REPRLVGGDI	PCSGRVEVKH	GDTWGSICDS	DFSLEAASVL	CRELQCGTVV
490	500	510	520	530	540
SILGGAHFGE	GNGQIWAEFF	QCEGHESHLS	LCPVAPRPEG	TCSHSRDVG	VCSRYTEIRL
550	560	570	580	590	600
VNGKTPCEGR	VELKTLGAWG	SLCNSHWDIE	DAHVLCQQLK	CGVALSTPGG	ARFGKNGQI
610	620	630	640	650	660
WRHMFHCTGT	EQHMGDCPVT	ALGASLCPSE	QVASVICSGN	QSQTLSSCNS	SSLGPTRPTI
670	680	690	700	710	720
PEESAVACIE	SGQLRLVNGG	GRCAGRVEIY	HEGSGWTICD	DSWDLSDAHV	VCRQLGCGEA
730	740	750	760	770	780
INATGSAHFG	EGTGPIWLDE	MKCNGKESRI	WQCHSHGWGQ	QNCRHKEDAG	VICSEFMSLR
790	800	810	820	830	840
LTSEASREAC	AGRLEV FYNG	AWGTVGKSSM	SETTVGVVCR	QLGCADKGKI	NPASLDKAMS
850	860	870	880	890	900
IPMWVDNVQC	PKGPDTLWQC	PSSPWEKRLA	SPSEETWITC	DNKIRLQEGP	TSCSGRVEIW
910	920	930	940	950	960
HGGSWGTVCD	DSWDLDDAQV	VCQQLGCGPA	LKAFKEAEFG	QGTGPIWLNE	VKCKGNESSL
970	980	990	1000	1010	
WDCPARRWGH	SECCHKEDAA	VNCTDISVQK	TPQKATTGRS	SRQSSHHHHH	HHHHH

更多灵活性

更受保护

未变化

图47

10	20	30	40	50	60
GTDKELRLVD	GENKCSGRVE	VKVQEEWGT	CNNGWSMEAV	SVICNQLGCP	TAIKAPGWAN
70	80	90	100	110	120
SSAGSGRIWM	DHVS CRGNES	ALWDCKHDGW	GKHSNCTHQ	DAGVTCSDGS	NLEMRLTRGG
130	140	150	160	170	180
NMCSGRIEIK	FQGRWGTVCD	DNFNIDHASV	ICRQLECGSA	VSFSGSSNFG	EGSGPIWFDD
190	200	210	220	230	240
LICNGNESAL	WNCKHQGWGK	HNCDAEDAG	VICSKGADLS	LRLVDGVTEC	SGRLEVRFQG
250	260	270	280	290	300
EWGTICDDGW	DSYDAAVACK	QLGCPTAVTA	IGRVNASKGF	GHIWLDSVSC	QGHEPAVWQC
310	320	330	340	350	360
KHHEWGXHYC	NHNEDAGVTC	SDGSDLELRL	RGGGSRCACT	VEVEIQRLLG	KVCDRGWGLK
370	380	390	400	410	420
EADVVCRLQG	CGSALKTSYQ	VYSKIQATNT	WFLFLSSCNGN	ETSLWDCKNW	QWGGLTCDHY
430	440	450	460	470	480
EEAKITCSAH	REPRLVGGDI	PCSGRVEVKH	GDTWGSICDS	DFSLEAASVL	CRELQCGTVV
490	500	510	520	530	540
SILGGAHFGE	GNGQIWAEFF	QCEGHESHLS	LCPVAPRPEG	TCSHSRDVG	VCSRYTEIRL
550	560	570	580	590	600
VNGKTPCEGR	VELKTLGAWG	SLCNSHWDIE	DAHVLCQQLK	CGVALSTPGG	ARFGKGNQGI
610	620	630	640	650	660
WRHMFHCTGT	EQHMGDCPVT	ALGASLCPSE	QVASVICSGN	QSQTLSSCNS	SSLGPTRPTI
670	680	690	700	710	720
PEESAVACIE	SGQLRLVNGG	GRCAGRVEIY	HEGSGWTICD	DSWDLSDAHV	VCRQLGCGEA
730	740	750	760	770	780
INATGSAHFG	EGTGPIWLDE	MKCNGKESRI	WQCHSHGWGQ	QNCRHKEDAG	VICSEFMSLR
790	800	810	820	830	840
LTSEASREAC	AGRLEV FYNG	AWGTVGKSSM	SETTVGVVCR	QLGCADKGKI	NPASLDKAMS
850	860	870	880	890	900
IPMWVDNVQC	PKGPDTLWQC	PSSPWEKRLA	SPSEETWITC	DNKIRLQEGP	TSCSGRVEIW
910	920	930	940	950	960
HGGSWGTVCD	DSWDLDDAQV	VCQQLGCGPA	LKAFKEAEFG	QGTGPIWLNE	VKCKGNESSL
970	980	990	1000	1010	
WDCPARRWGH	SECGHKEDAA	VNCTDISVQK	TPQKATTGRS	SRQSSHHHHH	HHHHH

更多灵活性

更受保护

未变化

图48

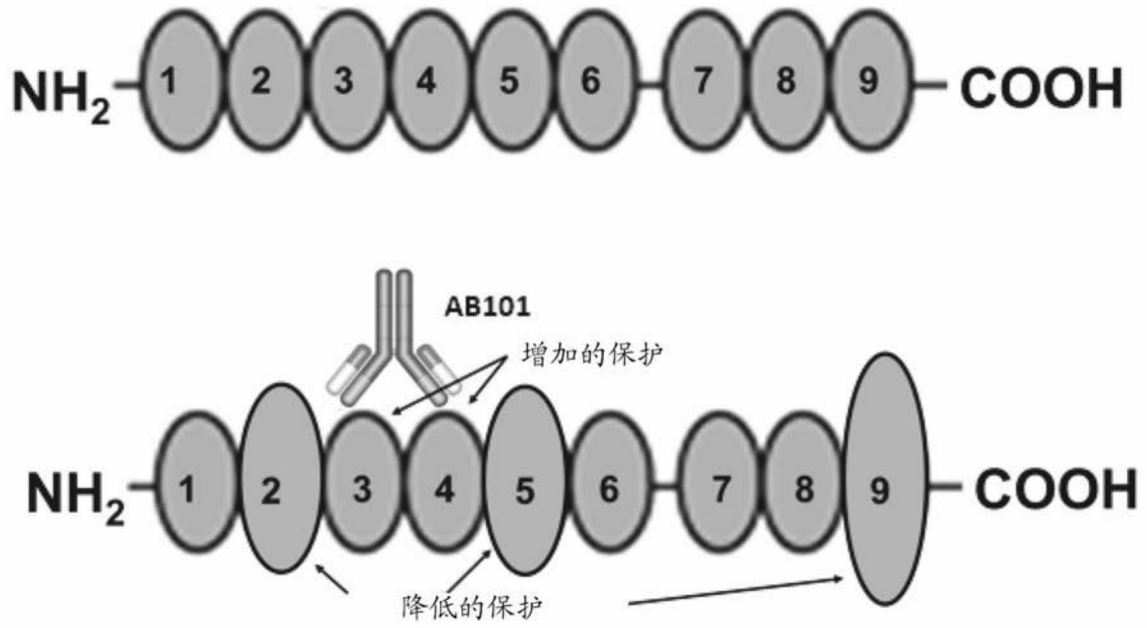


图49

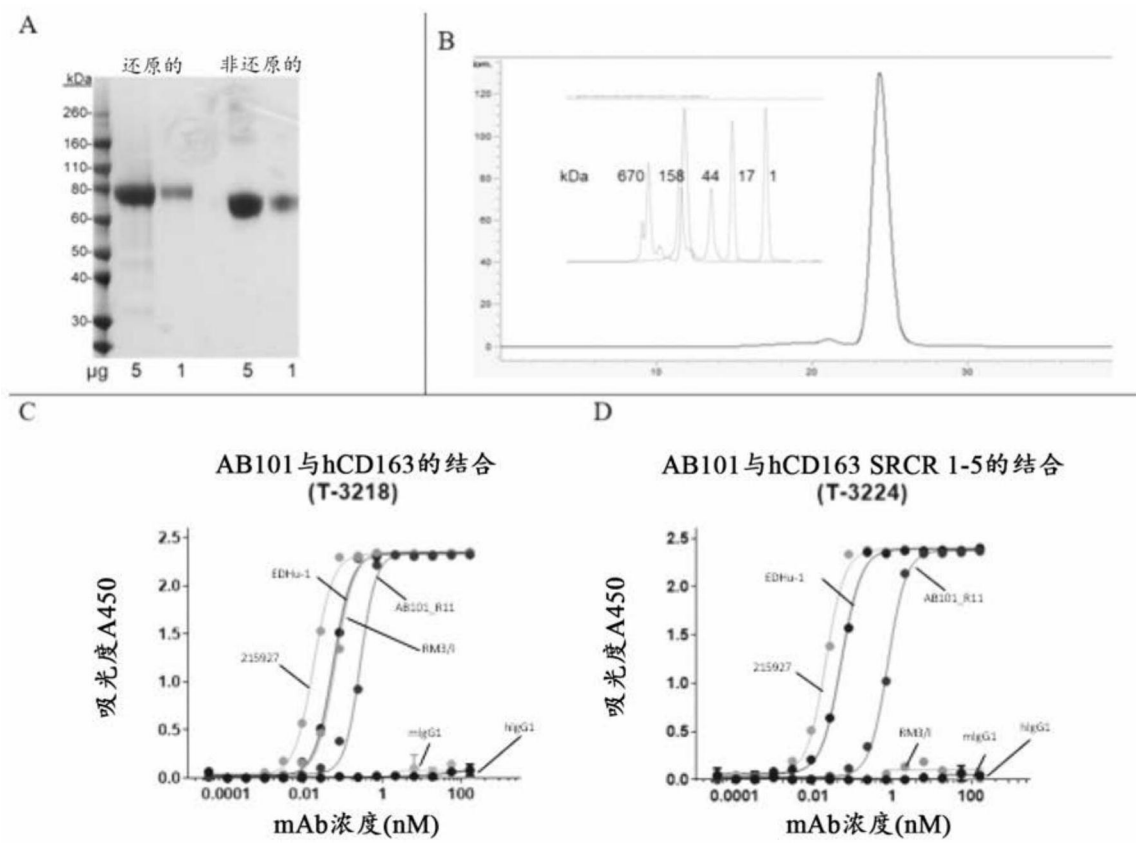


图50



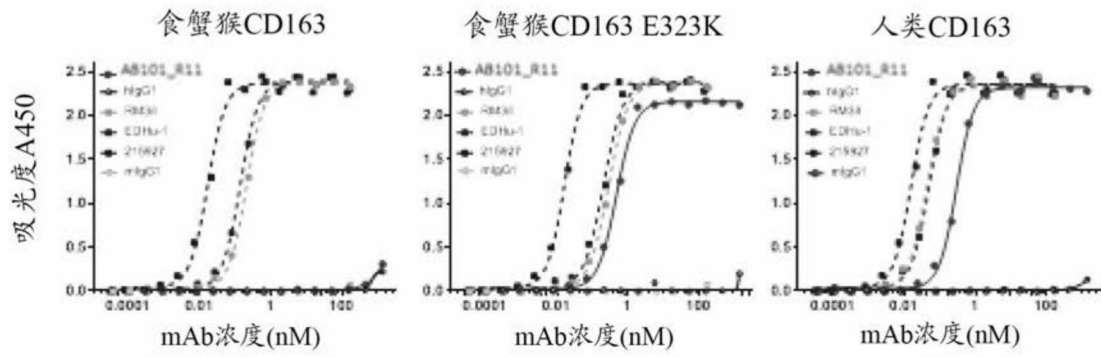


图52

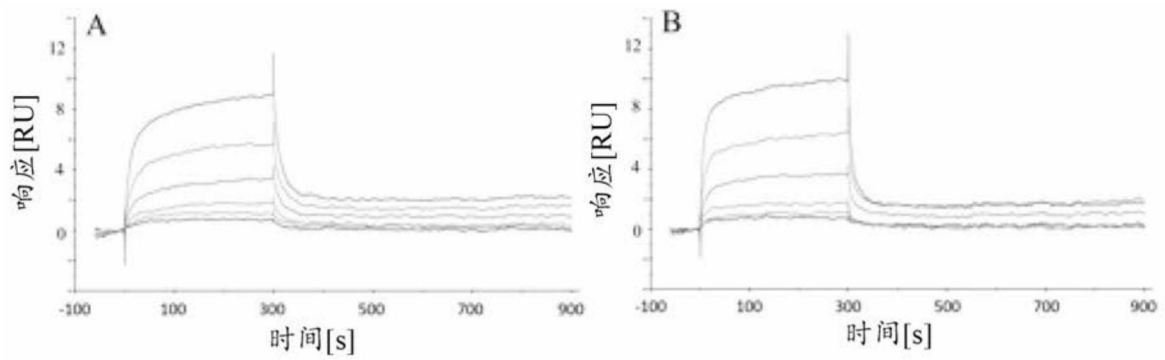


图53

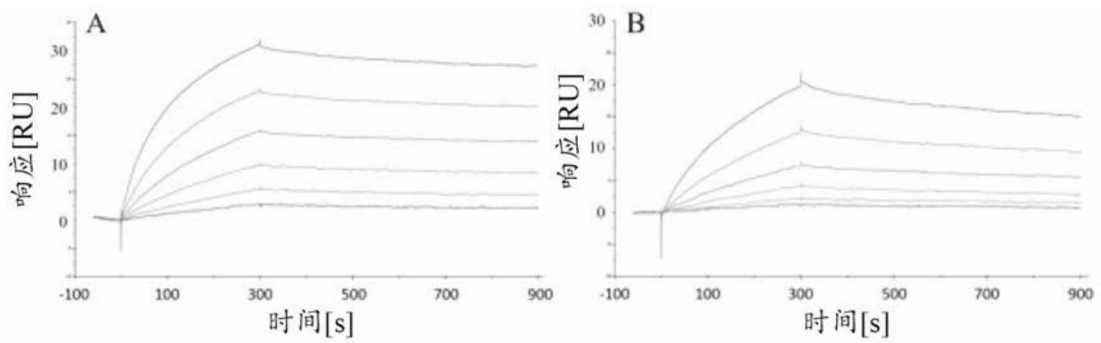


图54

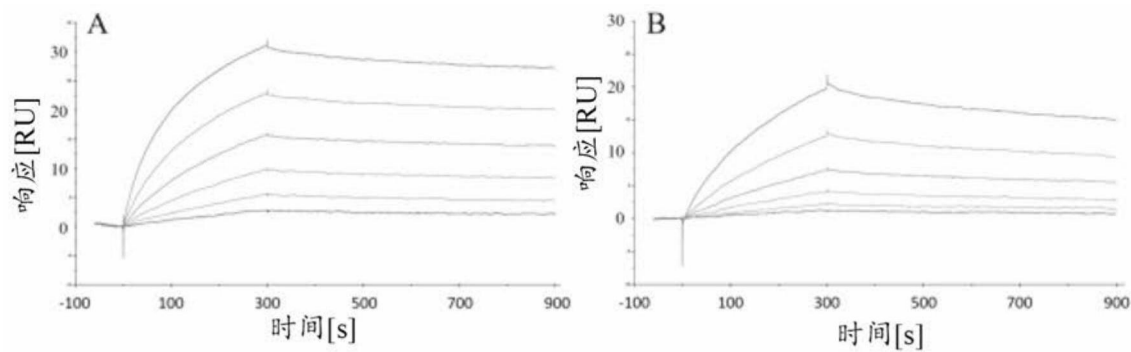


图55

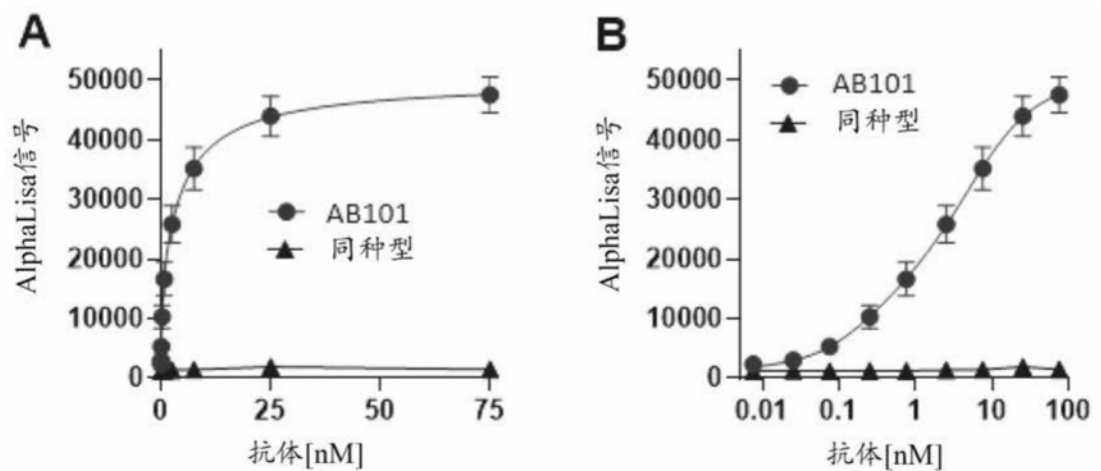


图56

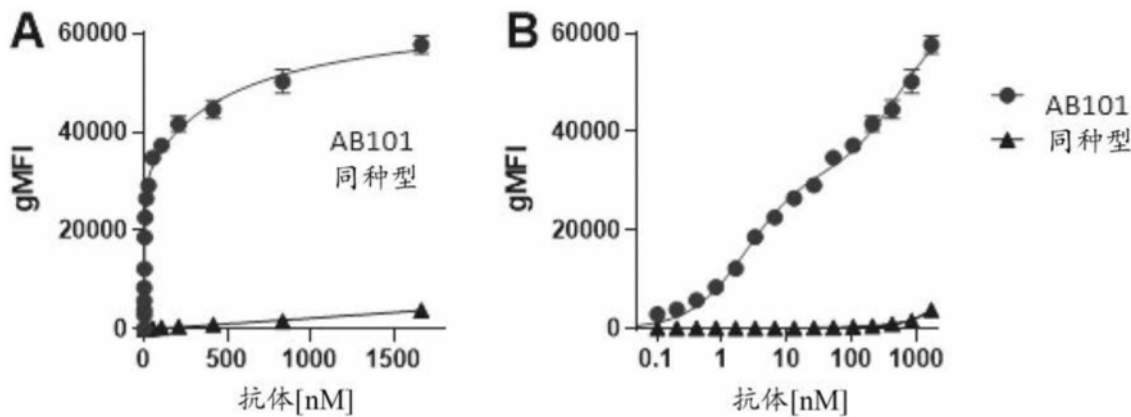


图57