



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 110709422 B

(45) 授权公告日 2023. 12. 26

(21) 申请号 201880037326.8  
(22) 申请日 2018.04.19  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
    申请公布号 CN 110709422 A  
(43) 申请公布日 2020.01.17  
(30) 优先权数据  
    62/487,061 2017.04.19 US  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
    2019.12.05  
(86) PCT国际申请的申请数据  
    PCT/US2018/028315 2018.04.19  
(87) PCT国际申请的公布数据  
    W02018/195283 EN 2018.10.25  
(73) 专利权人 马伦戈治疗公司  
    地址 美国马萨诸塞州  
(72) 发明人 A.洛 B.E.瓦什 S.J.马奥科  
(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 武晶晶  
(51) Int.Cl.  
    C07K 16/28 (2006.01)  
    A61K 39/00 (2006.01)  
(56) 对比文件  
    WO 2011106528 A1,2011.09.01  
    WO 2013192596 A2,2013.12.27

US 2013344070 A1,2013.12.26  
US 2020071417 A1,2020.03.05  
CN 113164777 A,2021.07.23  
TW 201702270 A,2017.01.16  
EP 3108897 A1,2016.12.28  
董志伟.基因工程抗体.《抗体工程》.北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,2002,  
    Zheng X et al.Redirecting tumor-associated macrophages to become tumoricidal effectors as a novel strategy for cancer therapy.《Oncotarget》.2017,第8卷(第29期),  
    Ryder M et al..Genetic and pharmacological targeting of CSF-1/CSF-1R inhibits tumor-associated macrophages and impairs BRAF-induced thyroid cancer progression.《PloS One》.2013,第8卷(第1期),  
    Pradel LP et al.Macrophage Susceptibility to Emactuzumab (RG7155) Treatment.《Mol Cancer Ther》.2016,第15卷(第12期),  
    Vidarsson G et al.IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions.《Front Immunol》.2014,第5卷  
    杜鹏等.抗体药物研发热点分析.《生物产业技术》.2017,  
    审查员 王也

权利要求书5页 说明书86页  
序列表(电子公布) 附图15页

(54) 发明名称  
    多特异性分子及其用途  
(57) 摘要

公开了靶向肿瘤相关巨噬细胞(TAM)或髓样来源抑制细胞(MDSC)的多特异性分子及使用它们的方法。

CN 110709422 B

1. 多特异性抗体分子,其包含:

(i) 抗CSF1R结合部分;和

(ii) 抗CCR2结合部分,

其中所述多特异性抗体分子与CSF1R单价结合,并且所述多特异性抗体分子在体外不抑制CSF1依赖性骨髓来源单核细胞分化,

其中所述抗CSF1R结合部分包含来自以下的重链可变区序列的三个互补决定区(CDR): SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:69,和来自以下的轻链可变区序列的三个CDR: SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:70,和

其中所述抗CCR2结合部分包含来自以下的重链可变区序列的三个互补决定区(CDR): SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54或SEQ ID NO:59,和来自以下的轻链可变区序列的三个CDR: SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:65。

2. 权利要求1的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分是完全抗体或抗原结合片段。

3. 权利要求2的多特异性抗体分子,其中所述完全抗体包括两条完整的重链以及两条完整的轻链。

4. 权利要求2或3的多特异性抗体分子,其中所述抗原结合片段是Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、单结构域抗体或二价抗体(dAb)。

5. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分和/或所述抗CCR2结合部分包含选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重链恒定区或其片段。

6. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分和/或所述抗CCR2结合部分包含能够介导抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)的重链恒定区。

7. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分包含第一重链恒定区,并且所述抗CCR2结合部分包含第二重链恒定区,其中相对于天然存在的重链恒定区,所述第一重链恒定区包含增加所述第一重链恒定区和所述第二重链恒定区的异源二聚化的一个或多个突变,和/或其中相对于天然存在的重链恒定区,所述第二重链恒定区包含增加所述第二重链恒定区和所述第一重链恒定区的异源二聚化的一个或多个突变。

8. 权利要求7的多特异性抗体分子,其中所述第一重链恒定区是第一Fc区,并且所述第二重链恒定区是第二Fc区。

9. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分和/或所述抗CCR2结合部分包含选自kappa或lambda的轻链恒定区的轻链恒定区或其片段。

10. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分包含kappa轻链恒定区或其片段,并且所述抗CCR2结合部分包含lambda轻链恒定区或其片段。

11. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分包含lambda轻链恒定区或其片段,并且所述抗CCR2结合部分包含kappa轻链恒定区或其片段。

12. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分和所述抗CCR2结合部分具有共同的轻链可变区。

13. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其包含抗CSF1R抗体分子和抗CCR2抗体分子,其中:

(i) 所述抗CSF1R抗体分子包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽包含第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL),并且所述第二多肽包含第一重链可变区(VH)、第一重链恒定区1(CH1)和任选地第一CH2和第一CH3,并且

(ii) 所述抗CCR2抗体分子包含第三多肽和第四多肽,其中所述第三多肽包含第二VL和第二CL,并且所述第四多肽包含第二VH、第二CH1和任选地第二CH2和第二CH3。

14. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述多特异性抗体分子与CCR2单价结合。

15. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中:

(i) 所述多特异性抗体分子在存在CCR2的情况下抑制CSF1R,任选地其中当细胞在细胞表面上表达CSF1R和CCR2两者时,所述多特异性抗体分子将所述细胞中CSF1R的活性降低,和/或

(ii) 所述多特异性抗体分子在不存在CCR2的情况下不抑制或基本不抑制CSF1R,任选地其中当细胞在细胞表面上表达CSF1R但不表达CCR2时,所述多特异性抗体分子不降低CSF1R的活性,或者不将CSF1R的活性降低超过2、4、6、8、10或15%。

16. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中:

(i) 所述多特异性抗体分子在存在CSF1R的情况下抑制CCR2,任选地其中当细胞在细胞表面上表达CCR2和CSF1R两者时,所述多特异性抗体分子将所述细胞中CCR2的活性降低,和/或

(ii) 所述多特异性抗体分子在不存在CSF1R的情况下不抑制或基本不抑制CCR2,任选地其中当细胞在细胞表面上表达CCR2但不表达CSF1R时,所述多特异性抗体分子不降低CCR2的活性,或者不将CCR2的活性降低超过2、4、6、8、10或15%。

17. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中

(i) 所述抗CCR2结合部分减少炎性单核细胞向肿瘤的募集;和

(ii) 所述抗CSF1R结合部分减少肿瘤微环境中单核细胞和/或巨噬细胞的成熟和/或存活。

18. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其包含一个或多个另外的结合部分,任选地其中所述第三结合部分是第三IMC结合部分或肿瘤靶向部分。

19. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分包含来自SEQ ID NO:48的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:50的轻链可变区序列的三个CDR。

20. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分包含来自SEQ ID NO:48的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:67的轻链可变区序列的三个CDR。

21. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分包含来自SEQ ID NO:48的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:70的轻链可变区序列的三个CDR。

22. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分包含来自SEQ ID NO:66的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:50的轻链可变区序列的三个CDR。

23. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分包含来自SEQ ID NO:66的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:67的轻链可变区序列的三个CDR。

24. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分包含来自SEQ ID NO:66的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:70的轻链可变区序列的三个CDR。

25. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分包含来自SEQ ID NO:69的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:50的轻链可变区序列的三个CDR。

26. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分包含来自SEQ ID NO:69的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:67的轻链可变区序列的三个CDR。

27. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CSF1R结合部分包含来自SEQ ID NO:69的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:70的轻链可变区序列的三个CDR。

28. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:44的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:45的轻链可变区序列的三个CDR。

29. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:44的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:57的轻链可变区序列的三个CDR。

30. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:44的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:60的轻链可变区序列的三个CDR。

31. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:44的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:63的轻链可变区序列的三个CDR。

32. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:44的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:65的轻链可变区序列的三个CDR。

33. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:54的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:45的轻链可变区序列的三个CDR。

34. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:54的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:57的轻链可变区序列的三个CDR。

35. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:54的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:60的轻链可变区序列的三个CDR。

36. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:54的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:63的轻链可变区序列的三个CDR。

37. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:54的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:65的轻链可变区序列的三个CDR。

38. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:59的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:45的轻链可变区序列的三个CDR。

39. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:59的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:57的轻链可变区序列的三个CDR。

40. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:59的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:60的轻链可变区序列的三个CDR。

41. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:59的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:63的轻链可变区序列的三个CDR。

42. 权利要求1-3中任一项的多特异性抗体分子,其中所述抗CCR2结合部分包含来自SEQ ID NO:59的重链可变区序列的三个CDR和来自SEQ ID NO:65的轻链可变区序列的三个CDR。

43. 分离的核酸分子,其编码权利要求1-42中任一项的多特异性抗体分子。

44. 载体,其包含权利要求43的核酸分子。

45. 细胞,其包含权利要求43的核酸分子或权利要求44的载体。

46. 药物组合物,其包含权利要求1-42中任一项的多特异性抗体分子和药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。

47. 权利要求1-42中任一项的多特异性抗体分子在制备用于治疗受试者中癌症的药物中的用途,其中(a)所述癌症表征为含有肿瘤相关巨噬细胞(TAM)或髓样来源抑制细胞(MDSC), (b)所述癌症与TAM或MDSC的存在相关, (c)TAM或MDSC在所述癌症中和/或形成所述癌症的一部分,或者(d)已经在所述癌症中或附近检测到TAM或MDSC。

48. 权利要求1-42中任一项的多特异性抗体分子在制备用于减少受试者中的TAM或MDSC群的一部分的增殖的药物中的用途。

49. 权利要求1-42中任一项的多特异性抗体分子在制备用于抑制或消耗患有癌症的受试者中的TAM或MDSC群的一部分的药物中的用途。

50. 权利要求47或49的用途,其中所述癌症是实体瘤癌症或转移性病变。

51. 权利要求50的用途,其中所述实体瘤癌症是以下的一种或多种:胰腺癌、乳腺癌、结直肠癌、肺癌、皮肤癌、卵巢癌、肝癌和脑癌。

52. 权利要求51的用途,其中所述胰腺癌是胰腺腺癌,所述肺癌是小细胞或非小细胞肺癌,所述皮肤癌是黑色素瘤,或者所述脑癌是神经胶质瘤。

53. 权利要求47或49的用途,其中所述受试者被鉴定为在所述癌症中或附近具有TAM或MDSC。

## 多特异性分子及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2017年4月19日提交的美国系列号62/487061的优先权,其内容以其整体通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式电子提交并且在此以其整体通过引用并入。2018年4月18日创建的所述ASCII拷贝命名为E2070-7005W0\_SL.txt,并且大小为158,210字节。

[0005] 发明背景

[0006] 公开了靶向肿瘤相关巨噬细胞(TAM)或髓样来源抑制细胞(MDSC)的多特异性分子及使用它们的方法。

[0007] 发明概述

[0008] 本公开尤其涉及新的多特异性分子,其包含:(i)第一免疫抑制性髓样细胞(IMC)结合部分(例如,第一肿瘤相关巨噬细胞(TAM)结合部分;或第一髓样来源抑制细胞(MDSC)结合部分)(例如抗体分子);和(ii)第二IMC结合部分(例如,第一TAM结合部分;或第二MDSC结合部分)(例如抗体分子),其中第一和第二IMC(例如,TAM或MDSC)结合部分是不同的。不受理论的束缚,预期本文公开的多特异性分子消耗TAM和/或MDSC。因此,本文尤其提供了包括上述部分的多特异性分子(例如多特异性抗体分子)、编码它们的核酸、产生上述分子的方法以及使用上述分子治疗癌症的方法。

[0009] 在一方面,本文提供了分离的多特异性例如双特异性分子,其包含:(i)第一免疫抑制性髓样细胞(IMC)结合部分(例如,第一肿瘤相关巨噬细胞(TAM)结合部分;或第一髓样来源抑制细胞(MDSC)结合部分)(例如抗体分子);和(ii)第二IMC结合部分(例如,第二TAM结合部分;或第二MDSC结合部分)(例如抗体分子),其中第一和第二IMC(例如,TAM或MDSC)结合部分是不同的。在一些实施方案中,第一和第二IMC(例如,TAM或MDSC)结合部分与不同的表位结合。在一些实施方案中,第一和第二IMC(例如,TAM或MDSC)结合部分与不同的抗原结合。

[0010] 在一些实施方案中,第一IMC结合部分是第一MDSC结合部分;并且第二IMC结合部分是第二MDSC结合部分。在一些实施方案中,第一IMC结合部分是第一TAM结合部分;并且第二IMC结合部分是第二TAM结合部分。在一些实施方案中,第一TAM结合部分结合CSF1R、CCR2、CXCR2、CD86、CD163、CX3CR1、MARCO、CD204、CD52、叶酸受体beta或PD-L1;并且第二TAM结合部分结合CCR2、CSF1R、CXCR2、CD86、CD163、CX3CR1、MARCO、CD204、CD52、叶酸受体beta或PD-L1。在一些实施方案中,第一TAM结合部分结合CSF1R、CCR2、CXCR2或PD-L1(例如,人CSF1R、CCR2、CXCR2或PD-L1)并且第二TAM结合部分结合CCR2、CSF1R、CXCR2或PD-L1(例如,人CCR2、CSF1R、CXCR2或PD-L1)。在一些实施方案中,第一TAM结合部分结合CSF1R并且第二TAM结合部分结合CCR2。在一些实施方案中,第一TAM结合部分结合CSF1R并且第二TAM结合部分结合CXCR2。在一些实施方案中,第一TAM结合部分结合CCR2并且第二TAM结合部分结合CXCR2。在一些实施方案中,第一TAM结合部分结合CSF1R并且第二TAM结合部分结合PD-L1。

在一些实施方案中,第一TAM结合部分结合CCR2并且第二TAM结合部分结合PD-L1。在一些实施方案中,第一TAM结合部分结合CXCR2并且第二TAM结合部分结合PD-L1。

[0011] 在一些实施方案中,第一TAM结合部分以小于约10nM且更典型地10-100pM的解离常数结合CSF1R、CCR2、CXCR2或PD-L1;并且第二TAM结合部分以小于约10nM且更典型地10-100pM的解离常数结合CCR2、CSF1R、CXCR2或PD-L1。在一些实施方案中,第一TAM结合部分结合CSF1R、CCR2、CXCR2或PD-L1上的构象或线性表位;并且第二TAM结合部分结合CCR2、CSF1R、CXCR2或PD-L1上的构象或线性表位。

[0012] 在一些实施方案中,多特异性分子包含至少两条非连续多肽链。在一些实施方案中,第一IMC结合部分包含第一抗IMC抗体分子和/或第二IMC结合部分包含第二抗IMC抗体分子。在一些实施方案中,第一抗IMC抗体分子和第二抗IMC抗体分子独立地是完全抗体(例如,包括至少一条并优选两条完整的重链,以及至少一条并优选两条完整的轻链的抗体),或抗原结合片段(例如,Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、单结构域抗体或二价抗体(dAb))。

[0013] 在一些实施方案中,第一抗IMC抗体分子和/或第二抗IMC抗体分子包含选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重链恒定区或其片段。

[0014] 在一些实施方案中,第一抗IMC抗体分子和/或第二抗IMC抗体分子包含选自kappa或lambda的轻链恒定区的轻链恒定区或其片段。在一些实施方案中,第一抗IMC抗体分子包含kappa轻链恒定区或其片段,并且第二抗IMC抗体分子包含lambda轻链恒定区或其片段。在一些实施方案中,第一抗IMC抗体分子包含lambda轻链恒定区或其片段,并且第二抗IMC抗体分子包含kappa轻链恒定区或其片段。在一些实施方案中,第一抗IMC抗体分子和第二抗IMC抗体分子具有共同的轻链可变区。

[0015] 在一些实施方案中,多特异性分子进一步包含选自以下的重链恒定区(例如Fc区):IgG1、IgG2和IgG4的重链恒定区,更具体地,人IgG1、IgG2或IgG4的重链恒定区。在一些实施方案中,重链恒定区(例如Fc区)与第一抗IMC抗体分子和第二抗IMC抗体分子之一或两者连接,例如共价连接。在一些实施方案中,重链恒定区(例如Fc区)得以改变,例如突变,以增加或减少以下一项或多项:Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能。在一些实施方案中,例如相对于非工程化的界面,第一重链恒定区和第二重链恒定区(例如Fc区)的界面得以改变,例如突变,以增加或减少二聚化。在一些实施方案中,通过提供具有以下的一项或多项的第一和第二Fc区的Fc界面来增强重链恒定区(例如Fc区)的二聚化:配对的腔-隆起(“突出-进入-空穴(knob-in-a hole)”)、静电相互作用或链交换,使得例如相对于非工程化的界面,形成更大比率的异源多聚体:同源多聚体。在一些实施方案中,重链恒定区(例如Fc区)在选自例如人IgG1的Fc区的以下的一个或多个位置处包含氨基酸取代:347、349、350、351、366、368、370、392、394、395、397、398、399、405、407或409,基于Eu编号系统进行编号。在一些实施方案中,重链恒定区(例如Fc区)包含选自以下的氨基酸取代:T366S、L368A或Y407V(例如,对应于腔或空穴),或T366W(例如,对应于隆起或突出)或其组合,基于Eu编号系统进行编号。

[0016] 在一些实施方案中,相对于天然存在的重链恒定区,重链恒定区(例如Fc区)包含一个或多个增加或减少以下一项或多项的突变:Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能。在一些实施方案中,第一抗IMC抗体分子包含第一重链恒定区(例如第一Fc区),并且第二抗IMC抗体分子包含第二重链恒定区(例如第二Fc区),其中

相对于天然存在的重链恒定区,第一重链恒定区包含增加第一重链恒定区和第二重链恒定区的异源二聚化的一个或多个突变,和/或其中相对于天然存在的重链恒定区,第二重链恒定区包含增加第二重链恒定区和第一重链恒定区的异源二聚化的一个或多个突变。在一些实施方案中,第一和第二重链恒定区(例如,第一和第二Fc区)包含以下的一项或多项:配对的腔-隆起(“突出-进入-空穴”)、静电相互作用或链交换,使得例如相对于天然存在的重链恒定区,形成更大比率的异源多聚体:同源多聚体。在一些实施方案中,第一和/或第二重链恒定区(例如,第一和/或第二Fc区,例如,第一和/或第二IgG1Fc区)在选自以下的一个或多个位置处包含氨基酸取代:347、349、350、351、366、368、370、392、394、395、397、398、399、405、407或409,基于Eu编号系统进行编号。在一些实施方案中,第一和/或第二重链恒定区(例如,第一和/或第二Fc区,例如,第一和/或第二IgG1Fc区)包含选自以下的氨基酸取代:T366S、L368A、Y407V或Y349C(例如,对应于腔或空穴),或T366W或S354C(例如,对应于隆起或突出)或其组合,基于Eu编号系统进行编号。

[0017] 在一些实施方案中,多特异性分子进一步包含接头,例如,在以下一项或多项之间的接头:第一抗IMC抗体分子和第二抗IMC抗体分子,第一抗IMC抗体分子和重链恒定区(例如Fc区),或第二抗IMC抗体分子和重链恒定区。在一些实施方案中,接头选自:可切割的接头、不可切割的接头、肽接头、柔性接头、刚性接头、螺旋接头或非螺旋接头。在一些实施方案中,接头是肽接头。在一些实施方案中,肽接头包含Gly和Ser。

[0018] 在一些实施方案中,重链恒定区(例如Fc区)诱导抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)。

[0019] 在一些实施方案中,第一或第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:69,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:69的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:70,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:70的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。在一些实施方案中,结合CSF1R的抗体分子包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:69,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:69的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代));和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:70,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:70的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代))。

[0020] 在一些实施方案中,第一或第二TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下

的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。在一些实施方案中,结合CCR2的抗体分子包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代));和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代))。

[0021] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:44,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:44的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:45,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:45的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:48,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:48的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:50,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:50的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[0022] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:54,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:54的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:57,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:57的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:66,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:66的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:67,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:67的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[0023] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:54,或密切相关的CDR,例如与SEQ

ID NO:54的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:57,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:57的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:69,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:69的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:70,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:70的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[0024] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:59,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:59的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:60,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:60的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:66,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:66的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:67,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:67的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[0025] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:59,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:59的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:60,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:60的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:69,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:69的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:70,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:70的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[0026] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:62,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:62的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:63,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:63的CDR具有至少一个氨基酸

改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:66,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:66的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:67,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:67的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[0027] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:62,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:62的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:63,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:63的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:69,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:69的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:70,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:70的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[0028] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:64,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:64的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:65,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:65的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:66,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:66的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:67,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:67的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[0029] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:64,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:64的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:65,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:65的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:69,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:69的CDR具有至少

一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:70,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:70的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。

[0030] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:44,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:45,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:45的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:48,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:48的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:50,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:50的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)。

[0031] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:54,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:54的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:57,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:57的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:66,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:66的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:67,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:67的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)。

[0032] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:54,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:54的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:57,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:57的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:69,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:69的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不

超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:70,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:70的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)。

[0033] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:59,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:59的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:60,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:60的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:66,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:66的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:67,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:67的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)。

[0034] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:59,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:59的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:60,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:60的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:69,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:69的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:70,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:70的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)。

[0035] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:62,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:62的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:63,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:66,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:66的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不

超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:67,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:67的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)。

[0036] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:62,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:62的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:63,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:69,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:69的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:70,与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:70的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)。

[0037] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:64,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:65,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:65的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:66,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:66的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:67,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:67的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)。

[0038] 在一个实施方案中,第一TAM结合部分是结合CCR2的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:64,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:64的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:65,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:65的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);并且,第二TAM结合部分是结合CSF1R的抗体分子并且包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:69,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:69的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不

超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代);和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:70,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:70的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代))。

[0039] 在一些实施方案中,第一或第二TAM结合部分是结合PD-L1的抗体分子并且包含来自以下的重链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:111或SEQ ID NO:113,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:111或SEQ ID NO:113的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR;和/或包含来自以下的轻链可变区序列的一个、两个或三个CDR:SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:112或SEQ ID NO:114,或密切相关的CDR,例如与SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:112或SEQ ID NO:114的CDR具有至少一个氨基酸改变,但不超过两个、三个或四个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代)的CDR。在一些实施方案中,结合PD-L1的抗体分子包含以下的重链可变区序列:SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:111或SEQ ID NO:113,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:111或SEQ ID NO:113的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代));和/或包含以下的轻链可变区序列:SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:112或SEQ ID NO:114,或者与之基本相同的氨基酸序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者与SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:112或SEQ ID NO:114的氨基酸序列具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代))。

[0040] 在一些实施方案中,(i)第一IMC结合部分与第一抗原(例如,CSF1R、CCR2、CXCR2、CD86、CD163、CX3CR1、MARCO、CD204、CD52、叶酸受体beta或PD-L1)单价结合,和/或(ii)第二IMC结合部分与第二抗原(例如,CCR2、CSF1R、CXCR2、CD86、CD163、CX3CR1、MARCO、CD204、CD52、叶酸受体beta或PD-L1)单价结合,其中第一抗原与第二抗原不同。

[0041] 在一些实施方案中,(i)多特异性分子与第一抗原(例如,CSF1R、CCR2、CXCR2、CD86、CD163、CX3CR1、MARCO、CD204、CD52、叶酸受体beta或PD-L1)单价结合,和/或(ii)多特异性分子与第二抗原(例如,CCR2、CSF1R、CXCR2、CD86、CD163、CX3CR1、MARCO、CD204、CD52、叶酸受体beta或PD-L1)单价结合,其中第一抗原与第二抗原不同。

[0042] 在一些实施方案中,(i)多特异性分子在存在第二抗原的情况下抑制第一抗原,任选地其中当细胞在细胞表面上表达第一抗原和第二抗原两者时,多特异性分子将细胞中第一抗原的活性降低,例如至少40、50、60、70、80或90%,和/或(ii)多特异性分子在不存在第二抗原的情况下不抑制或基本不抑制第一抗原,任选地其中当细胞在细胞表面上表达第一抗原但不表达第二抗原时,多特异性分子不降低第一抗原的活性,或者不将第一抗原的活性降低超过2、4、6、8、10或15%。

[0043] 在一些实施方案中,(i)多特异性分子在存在第一抗原的情况下抑制第二抗原,任选地其中当细胞在细胞表面上表达第一抗原和第二抗原两者时,多特异性分子将细胞中第二抗原的活性降低,例如至少40、50、60、70、80或90%,和/或(ii)多特异性分子在不存在第一抗原的情况下不抑制或基本不抑制第二抗原,任选地其中当细胞在细胞表面上表达第二抗原但不表达第一抗原时,多特异性分子不降低第二抗原的活性,或者不将第二抗原的活

性降低超过2、4、6、8、10或15%。

[0044] 在一些实施方案中,多特异性分子进一步包含一个或多个另外的结合部分(例如,第三结合部分、第四结合部分(例如,三特异性或四特异性分子))。在一些实施方案中,多特异性分子进一步包含一个或多个另外的结合部分(例如,第三结合部分、第四结合部分(例如,三特异性或四特异性分子))。在一些实施方案中,多特异性分子包含第三TAM结合部分(例如抗体分子),其中第三TAM结合部分与第一和第二TAM结合部分不同。在一些实施方案中,第一TAM结合部分结合人CSF1R,第二TAM结合部分结合人CCR2,并且第三TAM结合部分结合CXCR2。

[0045] 在一些实施方案中,多特异性分子包含作为肿瘤靶向部分的第三结合部分(例如抗体分子)。在一些实施方案中,肿瘤靶向部分结合PD-L1、间皮素、CD47、神经节苷脂2(GD2)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PMSA)、前列腺特异性抗原(PSA)、癌胚抗原(CEA)、Ron激酶、c-Met、未成熟层粘连蛋白受体、TAG-72、BING-4、钙活化的氯通道2、细胞周期蛋白-B1、9D7、Ep-CAM、EphA3、Her2/neu、端粒酶、SAP-1、生存素(Survivin)、NY-ESO-1/LAGE-1、PRAME、SSX-2、Melan-A/MART-1、Gp100/pm117、酪氨酸酶、TRP-1/-2、MC1R、 $\beta$ -连环蛋白、BRCA1/2、CDK4、CML66、纤连蛋白、p53、Ras、TGF- $\beta$ 受体、AFP、ETA、MAGE、MUC-1、CA-125、BAGE、GAGE、NY-ESO-1、 $\beta$ -连环蛋白、CDK4、CDC27、CD47、 $\alpha$ 辅肌动蛋白-4、TRP1/gp75、TRP2、gp100、Melan-A/MART1、神经节苷脂、WT1、EphA3、表皮生长因子受体(EGFR)、CD20、MART-2、MART-1、MUC1、MUC2、MUM1、MUM2、MUM3、NA88-1、NPM、OA1、OGT、RCC、RUI1、RUI2、SAGE、TRG、TRP1、TSTA、叶酸受体 $\alpha$ 、L1-CAM、CAIX、EGFRvIII、gpA33、GD3、GM2、VEGFR、整合素(整合素 $\alpha$ V $\beta$ 3、整合素 $\alpha$ 5 $\beta$ 1)、碳水化合物(Le)、IGF1R、EphA3、TRAILR1、TRAILR2或RANKL。

[0046] 在一些实施方案中,多特异性分子是双特异性分子,其包含第一和第二非连续多肽,其中:(i)第一多肽例如以N-至C-方向包括,第一TAM结合部分(例如抗体分子(例如,第一抗原结构域的第一部分,例如Fab分子的第一VH-CH1)),其与例如第一TAM抗原(例如,CSF1R、CCR2、CXCR2或PD-L1)结合,与促进第一和第二多肽之间缔合的第一结构域(例如,第一免疫球蛋白恒定结构域(例如,如本文所述的第一Fc分子))连接,任选地经由接头连接;(ii)第二多肽例如以N-至C-方向包括第二TAM结合部分(例如抗体分子,例如,与例如第二TAM抗原(例如,CCR2、CSF1R、CXCR2或PD-L1)结合的scFv),与促进第一和第二多肽之间缔合的第二结构域(例如,第二免疫球蛋白恒定结构域(例如,如本文所述的第二Fc分子))连接,任选地经由接头连接;和(iii)第三多肽例如以N-至C-方向包括第一抗原结构域的第二部分,例如Fab的第一VL-CL,其与第一TAM抗原结合,例如,其中第三多肽与第一多肽非共价缔合;和(iv)第四多肽例如以N-至C-方向包括第二抗原结构域的第二部分,例如Fab的第二VL-CL,其与第二TAM抗原结合,例如,其中第四多肽与第二多肽非共价缔合。在一些实施方案中,第一和第二多肽是同源或异源二聚体。

[0047] 在一些实施方案中,多特异性分子是双特异性分子,其中:

[0048] (i)第一TAM结合部分(例如,与第一TAM抗原例如CSF1R、CCR2或CXCR2结合的结合部分)包含第一和第二非连续多肽,并且

[0049] (ii)第二TAM结合部分(例如,与第二TAM抗原例如CSF1R、CCR2或CXCR2结合的结合部分)包含第三和第四非连续多肽,其中:

[0050] (a) 第一多肽例如以N-至C-方向包含第一VH、第一CH1,与促进第一和第三多肽之间缔合的第一结构域(例如第一Fc区)连接,任选地经由接头连接,

[0051] (b) 第二多肽例如以N-至C-方向包含第一VL和第一CL,

[0052] (c) 第三多肽例如以N-至C-方向包含第二VH、第二CH1,与促进第一和第三多肽之间缔合的第二结构域(例如第二Fc区)连接,任选地经由接头连接,并且

[0053] (d) 第四多肽例如以N-至C-方向包含第二VL和第二CL。在一些实施方案中,第一和第二结构域(例如,第一和第二Fc区)形成同源二聚体或异源二聚体。

[0054] 在一方面,本发明提供了分离的多特异性例如双特异性分子,其包含:(i)抗CSF1R结合部分(例如抗CSF1R抗体分子);和(ii)抗CCR2结合部分(例如抗CCR2抗体分子)。不希望受理论的束缚,相对于CSF1R阳性、CCR2阴性细胞或CSF1R阴性、CCR2阳性细胞,抗CSF1R/抗CCR2多特异性分子可以优先结合CSF1R阳性、CCR2阳性细胞。示例性的CSF1R阳性,CCR2阳性细胞包括但不限于肿瘤相关巨噬细胞(TAM)和髓样来源抑制细胞(MDSC)。示例性的CSF1R阳性、CCR2阴性细胞包括但不限于组织驻留巨噬细胞(tissue-resident macrophage)(例如Kupffer细胞)和朗格汉斯细胞。示例性的CSF1R阴性、CCR2阳性细胞包括但不限于T细胞(例如活化的T细胞,例如活化的CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup>T细胞)、NK细胞和嗜中性粒细胞。不希望受理论的束缚,相对于CSF1R阳性、CCR2阴性细胞(例如,组织驻留巨噬细胞(例如Kupffer细胞)或朗格汉斯细胞)或CSF1R阴性、CCR2阳性细胞(例如,活化的T细胞或NK细胞),抗CSF1R/抗CCR2多特异性分子可以优先结合CSF1R阳性、CCR2阳性细胞(例如,促致瘤性TAM或MDSC)。

[0055] 在一些实施方案中,当抗CSF1R/抗CCR2多特异性分子与靶细胞结合时,其可以诱导靶细胞的抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)。在一些实施方案中,抗CSF1R/抗CCR2多特异性分子可以优先结合并减少肿瘤微环境中免疫抑制性髓样细胞(例如TAM或MDSC)的数目,同时保留稳态髓样细胞(例如,组织驻留巨噬细胞(例如Kupffer细胞))和其他抗肿瘤免疫细胞(例如,活化的T细胞和NK细胞)。接受抗CSF1R抗体疗法的患者中的不良事件可以部分归因于稳态髓样细胞的消耗。

[0056] 在一些实施方案中,多特异性分子具有一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或更多个)以下特性:

[0057] (i) 相对于CSF1R阳性、CCR2阴性细胞或CSF1R阴性、CCR2阳性细胞,多特异性分子优先结合CSF1R阳性、CCR2阳性细胞,例如,多特异性分子与CSF1R阳性、CCR2阳性细胞的结合比多特异性分子与CSF1R阳性、CCR2阴性细胞或CSF1R阴性、CCR2阳性细胞的结合强至少2、4、6、8、10、15、20或25倍,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例2中关于图1的方法所测量的;

[0058] (ii) 相对于CSF1R阳性、CCR2阴性细胞,多特异性分子优先结合CSF1R阳性、CCR2阳性细胞,例如,多特异性分子结合CSF1R阳性、CCR2阳性细胞的EC<sub>50</sub>不超过多特异性分子结合CSF1R阳性、CCR2阴性细胞的EC<sub>50</sub>的60、50、40、30、20或10%,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例2中关于图1的方法所测量的;

[0059] (iii) 相对于CSF1R阴性、CCR2阳性细胞,多特异性分子优先结合CSF1R阳性、CCR2阳性细胞,例如,多特异性分子结合CSF1R阳性、CCR2阳性细胞的EC<sub>50</sub>不超过多特异性分子结合CSF1R阴性、CCR2阳性细胞的EC<sub>50</sub>的50、40、30、20、10或5%,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例2中关于图1的方法所测量的;

[0060] (iv) 相对于T细胞、NK细胞、嗜中性粒细胞、组织驻留巨噬细胞(例如Kupffer细胞)或朗格汉斯细胞,多特异性分子优先结合肿瘤相关巨噬细胞(TAM)或髓样来源抑制细胞(MDSC),例如,多特异性分子与TAM或MDSC的结合比多特异性分子与T细胞、NK细胞、嗜中性粒细胞、组织驻留巨噬细胞(例如Kupffer细胞)或朗格汉斯细胞的结合强至少2、4、6、8、10、15、20或25倍,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例6中关于图5的方法所测量的;

[0061] (v) 多特异性分子抑制单核细胞迁移,例如单核细胞趋化蛋白1(MCP1)诱导的单核细胞迁移,例如将MCP1诱导的单核细胞迁移降低至少40、50、60或70%,例如,如使用跨孔板迁移测定法所测量的,例如,如使用实施例3中关于图2的方法所测量的;

[0062] (vi) 多特异性分子抑制巨噬细胞例如骨髓来源巨噬细胞的增殖,例如CSF-1诱导的骨髓来源巨噬细胞的增殖,例如将CSF-1诱导的骨髓来源巨噬细胞的增殖降低至少50、60、70或80%,例如,如使用细胞增殖MTT测定法所测量的,例如,如使用实施例4中关于图3B的方法所测量的;

[0063] (vii) 多特异性分子不抑制或基本不抑制单核细胞例如骨髓来源单核细胞的分化,例如CSF-1诱导的骨髓来源单核细胞的分化,例如不将CSF-1诱导的骨髓来源单核细胞的分化降低超过2、4、6、8或10%,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例5中关于图4的方法所测量的;

[0064] (viii) 多特异性分子消耗抑制性髓样细胞例如TAM或MDSC,例如将体内抑制性髓样细胞例如TAM或MDSC的数目减少至少80、85、90、95、99或99.5%,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例7中关于图6的方法所测量的;

[0065] (ix) 多特异性分子不消耗或基本不消耗组织驻留巨噬细胞(例如Kupffer细胞),例如不将体内组织驻留巨噬细胞(例如Kupffer细胞)的数目减少超过4、6、8、10或15%,例如,如使用免疫组织化学分析所测量的,例如,如使用实施例8中关于图7B和7D的方法所测量的;

[0066] (x) 多特异性分子不抑制或基本不抑制CSF1R阳性、CCR2阴性细胞的CSF-1依赖性细胞存活,例如,不将CSF1R阳性、CCR2阴性细胞的CSF-1依赖性细胞存活降低超过5、10或15%,例如,如使用细胞活力MTT测定法所测量的,例如,如使用实施例9中关于图8A的方法所测量的;

[0067] (xi) 多特异性分子增加体内CD8<sup>+</sup> T细胞肿瘤浸润,例如,增加肿瘤中CD3<sup>+</sup>T细胞中CD8<sup>+</sup> T细胞的百分比至少1.5、2或2.5倍,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例10中关于图9的方法所测量的;

[0068] (xii) 多特异性分子降低体内肿瘤中的Treg频率,例如,将肿瘤中的Treg频率降低至少15、20、25或30%,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例11中关于图10A的方法所测量的;

[0069] (xiii) 多特异性分子增加体内肿瘤中的CD8<sup>+</sup> T细胞/Treg比率,例如,将肿瘤中的CD8<sup>+</sup> T细胞/Treg比率增加至少2.5、3、3.5、4或4.5倍,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例11中关于图10B的方法所测量的;或

[0070] (xiv) 多特异性分子降低肿瘤生长和/或增加荷瘤动物的生存,例如,如使用实施例12中关于图11A和11B的方法所测量的。

[0071] 在一些实施方案中,相对于CSF1R阳性、CCR2阴性细胞或CSF1R阴性、CCR2阳性细胞,多特异性分子优先结合CSF1R阳性、CCR2阳性细胞,例如,多特异性分子与CSF1R阳性、CCR2阳性细胞的结合比多特异性分子与CSF1R阳性、CCR2阴性细胞或CSF1R阴性、CCR2阳性细胞的结合强至少2、4、6、8、10、15、20或25倍,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例2中关于图1的方法所测量的。

[0072] 在一些实施方案中,相对于CSF1R阳性、CCR2阴性细胞,多特异性分子优先结合CSF1R阳性、CCR2阳性细胞,例如,多特异性分子结合CSF1R阳性、CCR2阳性细胞的EC50不超过多特异性分子结合CSF1R阳性、CCR2阴性细胞的EC50的60、50、40、30、20或10%,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例2中关于图1的方法所测量的。

[0073] 在一些实施方案中,相对于CSF1R阴性、CCR2阳性细胞,多特异性分子优先结合CSF1R阳性、CCR2阳性细胞,例如,多特异性分子结合CSF1R阳性、CCR2阳性细胞的EC50不超过多特异性分子结合CSF1R阴性、CCR2阳性细胞的EC50的50、40、30、20、10或5%,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例2中关于图1的方法所测量的。

[0074] 在一些实施方案中,相对于T细胞、NK细胞、嗜中性粒细胞、组织驻留巨噬细胞(例如Kupffer细胞)或朗格汉斯细胞,多特异性分子优先结合肿瘤相关巨噬细胞(TAM)或髓样来源抑制细胞(MDSC),例如,多特异性分子与TAM或MDSC的结合比多特异性分子与T细胞、NK细胞、嗜中性粒细胞、组织驻留巨噬细胞(例如Kupffer细胞)或朗格汉斯细胞的结合强至少2、4、6、8、10、15、20或25倍,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例6中关于图5的方法所测量的。

[0075] 在一些实施方案中,多特异性分子抑制单核细胞迁移,例如单核细胞趋化蛋白1(MCP1)诱导的单核细胞迁移,例如将MCP1诱导的单核细胞迁移降低至少40、50、60或70%,例如,如使用跨孔板迁移测定法所测量的,例如,如使用实施例3中关于图2的方法所测量的。

[0076] 在一些实施方案中,多特异性分子抑制巨噬细胞例如骨髓来源巨噬细胞的增殖,例如CSF-1诱导的骨髓来源巨噬细胞的增殖,例如将CSF-1诱导的骨髓来源巨噬细胞的增殖降低至少50、60、70或80%,例如,如使用细胞增殖MTT测定法所测量的,例如,如使用实施例4中关于图3B的方法所测量的。

[0077] 在一些实施方案中,多特异性分子不抑制或基本不抑制单核细胞例如骨髓来源单核细胞的分化,例如CSF-1诱导的骨髓来源单核细胞的分化,例如不将CSF-1诱导的骨髓来源单核细胞的分化降低超过2、4、6、8或10%,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例5中关于图4的方法所测量的。

[0078] 在一些实施方案中,多特异性分子消耗抑制性髓样细胞例如TAM或MDSC,例如将体内抑制性髓样细胞例如TAM或MDSC的数目减少至少80、85、90、95、99或99.5%,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例7中关于图6的方法所测量的。

[0079] 在一些实施方案中,多特异性分子不消耗或基本不消耗组织驻留巨噬细胞(例如Kupffer细胞),例如不将体内组织驻留巨噬细胞(例如Kupffer细胞)的数目减少超过4、6、8、10或15%,例如,如使用免疫组织化学分析所测量的,例如,如使用实施例8中关于图7B和7D的方法所测量的。

[0080] 在一些实施方案中,多特异性分子不抑制或基本不抑制CSF1R阳性、CCR2阴性细胞

的CSF-1依赖性细胞存活,例如,不将CSF1R阳性、CCR2阴性细胞的CSF-1依赖性细胞存活降低超过5、10或15%,例如,如使用细胞活力MTT测定法所测量的,例如,如使用实施例9中关于图8A的方法所测量的。

[0081] 在一些实施方案中,多特异性分子增加体内CD8<sup>+</sup> T细胞肿瘤浸润,例如,增加肿瘤中CD3<sup>+</sup> T细胞中CD8<sup>+</sup> T细胞的百分比至少1.5、2或2.5倍,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例10中关于图9的方法所测量的。

[0082] 在一些实施方案中,多特异性分子降低体内肿瘤中的Treg频率,例如,将肿瘤中的Treg频率降低至少15、20、25或30%,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例11中关于图10A的方法所测量的。

[0083] 在一些实施方案中,多特异性分子增加体内肿瘤中的CD8<sup>+</sup> T细胞/Treg比率,例如,将肿瘤中的CD8<sup>+</sup> T细胞/Treg比率增加至少2.5、3、3.5、4或4.5倍,例如,如使用流式细胞术分析所测量的,例如,如使用实施例11中关于图10B的方法所测量的。

[0084] 在一些实施方案中,多特异性分子降低肿瘤生长和/或增加荷瘤动物的生存,例如,如使用实施例12中关于图11A和11B的方法所测量的。

[0085] 在一些实施方案中,抗CSF1R结合部分和抗CCR2结合部分独立地是完全抗体(例如,包括至少一条并优选两条完整的重链,以及至少一条并优选两条完整的轻链的抗体),或抗原结合片段(例如,Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、单结构域抗体或二价抗体(dAb))。在一些实施方案中,抗CSF1R结合部分和/或抗CCR2结合部分包含选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重链恒定区或其片段。在一些实施方案中,抗CSF1R结合部分和/或抗CCR2结合部分包含可以介导抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)的重链恒定区。在一些实施方案中,抗CSF1R结合部分包含第一重链恒定区(例如第一Fc区),并且抗CCR2结合部分包含第二重链恒定区(例如第二Fc区),其中相对于天然存在的重链恒定区,第一重链恒定区包含增加第一重链恒定区和第二重链恒定区的异源二聚化的一个或多个突变,和/或其中相对于天然存在的重链恒定区,第二重链恒定区包含增加第二重链恒定区和第一重链恒定区的异源二聚化的一个或多个突变。在一些实施方案中,抗CSF1R结合部分和/或抗CCR2结合部分包含选自kappa或lambda的轻链恒定区的轻链恒定区或其片段。在一些实施方案中,抗CSF1R结合部分包含kappa轻链恒定区或其片段,并且抗CCR2结合部分包含lambda轻链恒定区或其片段。在一些实施方案中,抗CSF1R结合部分包含lambda轻链恒定区或其片段,并且抗CCR2结合部分包含kappa轻链恒定区或其片段。在一些实施方案中,抗CSF1R结合部分和抗CCR2结合部分具有共同的轻链可变区。在一些实施方案中,多特异性分子进一步包含选自以下的重链恒定区(例如Fc区):IgG1、IgG2和IgG4的重链恒定区,更具体地,人IgG1、IgG2或IgG4的重链恒定区。在一些实施方案中,多特异性分子进一步包含能够介导抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)的重链恒定区。

[0086] 在一些实施方案中,多特异性分子包含抗CSF1R抗体分子和抗CCR2抗体分子,其中:

[0087] (i) 抗CSF1R抗体分子包含第一多肽和第二多肽,其中第一多肽包含第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL),并且第二多肽包含第一重链可变区(VH)、第一重链恒定区1(CH1)和任选地第一CH2和第一CH3,并且

[0088] (ii) 抗CCR2抗体分子包含第三多肽和第四多肽,其中第三多肽包含第二VL和第二

CL,并且第四多肽包含第二VH、第二CH1和任选地第二CH2和第二CH3。

[0089] 在一些实施方案中, (i) 抗CSF1R抗体分子与CSF1R单价结合, 和/或(ii) 抗CCR2抗体分子与CCR2单价结合。在一些实施方案中, 多特异性分子与CSF1R单价结合, 和/或与CCR2单价结合。在一些实施方案中, 多特异性分子与CSF1R单价结合并且与CCR2单价结合。

[0090] 在一些实施方案中,

[0091] (i) 多特异性分子在存在CCR2的情况下抑制CSF1R, 任选地其中当细胞在细胞表面上表达CSF1R和CCR2两者时, 多特异性分子将细胞中CSF1R的活性(例如, CSF1R信号传导, 例如, CSF1诱导的CSF1R信号传导)降低, 例如至少40、50、60、70、80或90%, 和/或

[0092] (ii) 多特异性分子在不存在CCR2的情况下不抑制或基本不抑制CSF1R, 任选地其中当细胞在细胞表面上表达CSF1R但不表达CCR2时, 多特异性分子不降低CSF1R的活性(例如, CSF1R信号传导, 例如, CSF1诱导的CSF1R信号传导), 或者不将CSF1R的活性降低超过2、4、6、8、10或15%。

[0093] 在一些实施方案中,

[0094] (i) 多特异性分子在存在CSF1R的情况下抑制CCR2, 任选地其中当细胞在细胞表面上表达CCR2和CSF1R两者时, 多特异性分子将细胞中CCR2的活性降低, 例如至少40、50、60、70、80或90%, 和/或

[0095] (ii) 多特异性分子在不存在CSF1R的情况下不抑制或基本不抑制CCR2, 任选地其中当细胞在细胞表面上表达CCR2但不表达CSF1R时, 多特异性分子不降低CCR2的活性, 或者不将CCR2的活性降低超过2、4、6、8、10或15%。

[0096] 在一方面, 本发明提供了分离的多特异性例如双特异性分子, 其包含:

[0097] (i) 第一结合部分, 其与介导单核细胞(例如炎性单核细胞, 例如 $Ly6C^{Hi}$ CCR2+CX3CR1 $^{Lo}$ 炎性单核细胞)运输的分子结合, 任选地其中第一结合部分与CCR2结合; 和

[0098] (ii) 第二结合部分, 其与介导发炎的组织处的单核细胞和/或巨噬细胞的成熟和/或存活的分子结合, 任选地其中第二结合部分与CSF1R结合。

[0099] 在一方面, 本发明提供了分离的多特异性例如双特异性分子, 其包含:

[0100] (i) 第一结合部分, 其减少炎性单核细胞向肿瘤的募集, 任选地其中第一结合部分结合和/或抑制CCR2; 和

[0101] (ii) 第二结合部分, 其减少肿瘤微环境中单核细胞和/或巨噬细胞的成熟和/或存活, 任选地其中第二结合部分结合和/或抑制CSF1R。

[0102] 在一方面, 本发明提供了分离的多特异性例如双特异性分子, 其包含: (i) 抗CSF1R结合部分(例如抗CSF1R抗体分子); 和(ii) 抗PD-L1结合部分(例如抗PD-L1抗体分子)。

[0103] 在前述方面和实施方案的一些实施方案中, 多特异性分子进一步包含一个或多个另外的结合部分(例如, 第三结合部分, 第四结合部分(例如, 三特异性或四特异性分子), 任选地其中第三结合部分是第三IMC结合部分或肿瘤靶向部分。在一些实施方案中, 肿瘤靶向部分是公开于W02017165464例如W02017165464的108-118页中的肿瘤靶向部分, 该公开以其整体通过引用并入本文。

[0104] 在前述方面和实施方案的一些实施方案中, 多特异性分子进一步包含选自以下的免疫细胞衔接物: T细胞衔接物、NK细胞衔接物、B细胞衔接物、树突状细胞衔接物或巨噬细胞衔接物。在一些实施方案中, 免疫细胞衔接物是公开于W02017165464例如W02017165464

的119-131页中的免疫细胞衔接物,该公开以其整体通过引用并入本文。在一些实施方案中,免疫细胞衔接物结合并活化免疫细胞,例如效应细胞。在一些实施方案中,免疫细胞衔接物结合但不活化免疫细胞,例如效应细胞。

[0105] 在一些实施方案中,免疫细胞衔接物是T细胞衔接物,例如,介导结合及活化T细胞的T细胞衔接物,或介导结合但不活化T细胞的T细胞衔接物。在一些实施方案中,T细胞衔接物结合CD3、TCR $\alpha$ 、TCR $\beta$ 、TCR  $\gamma$ 、TCR $\zeta$ 、ICOS、CD28、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、SLAM、CD2或CD226,例如,T细胞衔接物是抗CD3抗体分子。

[0106] 在一些实施方案中,免疫细胞衔接物是NK细胞衔接物,例如,介导结合及活化NK细胞的NK细胞衔接物,或介导结合但不活化NK细胞的NK细胞衔接物。在一些实施方案中,NK细胞衔接物选自与以下结合(例如活化)的抗体分子,例如抗原结合结构域,或配体:NKp30、NKp40、NKp44、NKp46、NKG2D、DNAM1、DAP10、CD16(例如,CD16a、CD16b或两者)、CRTAM、CD27、PSGL1、CD96、CD100(SEMA4D)、NKp80、CD244(也称为SLAMF4或2B4)、SLAMF6、SLAMF7、KIR2DS2、KIR2DS4、KIR3DS1、KIR2DS3、KIR2DS5、KIR2DS1、CD94、NKG2C、NKG2E或CD160。

[0107] 在一些实施方案中,免疫细胞衔接物是B细胞衔接物,例如,CD40L、OX40L或CD70配体,或与OX40、CD40或CD70结合的抗体分子。在一些实施方案中,免疫细胞衔接物是巨噬细胞衔接物,例如,CD2激动剂;CD40L;OX40L;与OX40、CD40或CD70结合的抗体分子;To11样受体(TLR)的激动剂(例如,TLR4,例如,组成型活性TLR4(caTLR4)或TLR9激动剂);CD47;或STING激动剂。

[0108] 在一些实施方案中,免疫细胞衔接物是树突状细胞衔接物,例如,CD2激动剂、OX40抗体、OX40L、41BB激动剂、To11样受体激动剂或其片段(例如,TLR4,例如,组成型活性TLR4(caTLR4))、CD47激动剂或STING激动剂。

[0109] 在前述方面和实施方案的一些实施方案中,多特异性分子进一步包含细胞因子分子。在一些实施方案中,细胞因子分子选自白介素-2(IL-2)、白介素-7(IL-7)、白介素-12(IL-12)、白介素-15(IL-15)、白介素-18(IL-18)、白介素-21(IL-21)或干扰素gamma,或其片段或变体,或任何上述细胞因子的组合。在一些实施方案中,细胞因子分子是公开于W02017165464例如W02017165464的108-118页中的细胞因子分子,该公开以其整体通过引用并入本文。

[0110] 在前述方面和实施方案的一些实施方案中,多特异性分子进一步包含基质修饰部分。在一些实施方案中,基质修饰部分引起以下一项或多项:降低基质或细胞外基质(ECM)组分的水平或产生;减少肿瘤纤维化;增加间质肿瘤运输;改善肿瘤灌注;扩大肿瘤微脉管系统;降低肿瘤中的间质液压力(IFP);或降低或增强试剂(例如癌症治疗剂或细胞疗法)进入肿瘤或肿瘤脉管系统的渗透或扩散。在一些实施方案中,基质修饰部分是公开于W02017165464例如W02017165464的131-136页中的基质修饰部分,该公开以其整体通过引用并入本文。

[0111] 在另一方面,本文提供了分离的核酸分子,其编码前述权利要求中任一项的多特异性分子(例如抗体)。

[0112] 在另一方面,本文提供了分离的核酸分子,其包含编码本文所述的任何多特异性分子的核苷酸序列,或与之基本同源的核苷酸序列(例如,与之至少95%至99.9%相同)。

[0113] 在另一方面,本文提供了载体,例如表达载体,其包含本文所述的核酸分子的一种

或多种。

[0114] 在另一方面,本文提供了细胞,例如宿主细胞,其包含本文所述的核酸分子或本文所述的载体。

[0115] 在另一方面,本文提供了制备例如产生本文所述的多特异性分子的方法,其包括在合适的条件例如适合于基因表达和/或异源二聚化的条件下,培养本文所述的细胞,例如宿主细胞。

[0116] 在另一方面,本文提供了药物组合物,其包含本文所述的多特异性分子和药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。

[0117] 在另一方面,本文提供了治疗过度增生性病症、癌症、纤维化病症或状况、炎症病症或状况,或自身免疫病症的方法。在一个实施方案中,病症是过度增生性病症,例如过度增生性结缔组织病症(例如过度增生性纤维化疾病)。在一个实施方案中,纤维化(例如过度增生性纤维化)疾病是多系统的或器官特异性的。示例性纤维化疾病包括但不限于多系统性(例如,系统性硬化症、多灶性纤维硬化、骨髓移植接受者中的硬皮移植物抗宿主病、肾源性系统性纤维化、硬皮病)和器官特异性病症(例如,肺、肝、心脏、肾、胰腺、皮肤和其他器官的纤维化)。在其他实施方案中,纤维化疾病选自肝纤维化(例如,肝硬化、NASH和本文所述的其他状况)、肺纤维化(例如IPF)、肾纤维化或骨髓的纤维化(例如,骨髓纤维化)。

[0118] 在另一方面,本文提供了治疗受试者中癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用本文所述的多特异性分子,其中以有效治疗癌症的量施用多特异性分子。

[0119] 在另一方面,本文提供了治疗受试者中癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用本文所述的多特异性分子,其中以有效减少TAM的数目(例如,受试者中肿瘤中或附近的TAM的数目),抑制TAM的增殖(例如,受试者中肿瘤中或附近的TAM的增殖),或者减少或抑制受试者中巨噬细胞浸润到肿瘤中的量施用多特异性分子。

[0120] 在另一方面,本文提供了通过减少TAM群的一部分来治疗受试者中癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用本文所述的多特异性分子,其中以有效抑制或消耗TAM群的一部分的量施用多特异性分子。

[0121] 在另一方面,本文提供了减少受试者中(例如,患有癌症例如实体瘤的受试者中)TAM群的一部分的增殖的方法,其包括向有此需要的受试者施用本文所述的多特异性分子,其中以有效减少TAM群的一部分的增殖的量施用多特异性分子。

[0122] 在另一方面,本文提供了抑制或消耗患有癌症(例如肿瘤)的受试者中TAM群的一部分的方法,其包括向受试者施用本文所述的多特异性分子,其中以有效减少肿瘤浸润巨噬细胞的数目,抑制肿瘤浸润巨噬细胞的增殖,或者减少巨噬细胞浸润到肿瘤中的量施用多特异性分子。

[0123] 在一些实施方案中,癌症是实体瘤癌症或转移性病变。在一些实施方案中,实体瘤癌症是以下的一种或多种:胰腺癌(例如胰腺腺癌)、乳腺癌、结直肠癌、肺癌(例如小细胞或非小细胞肺癌)、皮肤癌(例如黑色素瘤)、卵巢癌、肝癌或脑癌(例如神经胶质瘤)。在一些实施方案中,癌症表征为含有TAM,与TAM的存在相关,TAM在癌症(例如肿瘤)中和/或形成癌症(例如肿瘤)的一部分,或者已经在实体瘤中或附近检测到TAM。

[0124] 在一些实施方案中,方法进一步包括鉴定受试者中癌症(例如肿瘤)中或附近TAM的存在。在一些实施方案中,TAM表达CXCR2和CCR2,CCR2和CSF1R,CSF1R和CXCR2,或CCR2、

CXCR2和CSF1R。

[0125] 在一些实施方案中,方法进一步包括施用第二治疗性治疗。在一些实施方案中,第二治疗性治疗包含治疗剂(例如,化学治疗剂、生物剂、激素疗法)、放射或手术。在一些实施方案中,治疗剂选自:化学治疗剂或生物剂。在一些实施方案中,治疗剂是检查点抑制剂。在一些实施方案中,检查点抑制剂选自下组:抗CTLA4抗体、抗PD1抗体(例如,纳武单抗(Nivolumab)、派姆单抗(Pembrolizumab)或匹地利珠单抗(Pidilizumab))、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗CD160抗体、抗2B4抗体、抗CD80抗体、抗CD86抗体、抗B7-H3(CD276)抗体、抗B7-H4(VTCN1)抗体、抗HVEM(TNFRSF14或CD270)抗体、抗BTLA抗体、抗KIR抗体、抗MHC I类抗体、抗MHC II类抗体、抗GAL9抗体、抗VISTA抗体、抗BTLA抗体、抗TIGIT抗体、抗LAIR1抗体和抗A2aR抗体。

[0126] 在另一方面,本文提供了治疗受试者中癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用本文所述的多特异性分子,其中以有效减少MDSC的数目(例如,受试者中肿瘤中或附近的MDSC的数目),抑制MDSC的增殖(例如,受试者中肿瘤中或附近的MDSC的数目),或者减少或抑制受试者中MDSC浸润到肿瘤中的量施用多特异性分子。

[0127] 在另一方面,本文提供了通过减少MDSC群的一部分来治疗受试者中癌症的方法,其包括向有此需要的受试者施用本文所述的多特异性分子,其中以有效抑制或消耗MDSC群的一部分的量施用多特异性分子。

[0128] 在另一方面,本文提供了减少受试者中(例如,患有癌症例如实体瘤的受试者中)MDSC群的一部分的增殖的方法,其包括向有此需要的受试者施用本文所述的多特异性分子,其中以有效减少MDSC群的一部分的增殖的量施用多特异性分子。

[0129] 在另一方面,本文提供了抑制或消耗患有癌症(例如肿瘤)的受试者中MDSC群的一部分的方法,其包括向受试者施用本文所述的多特异性分子,其中以有效减少MDSC的数目,抑制MDSC的增殖,或者减少MDSC浸润到肿瘤中的量施用多特异性分子。

[0130] 在一些实施方案中,癌症是实体瘤癌症或转移性病变。在一些实施方案中,实体瘤癌症是以下的一种或多种:胰腺癌(例如胰腺腺癌)、乳腺癌、结直肠癌、肺癌(例如小细胞或非小细胞肺癌)、皮肤癌(例如黑色素瘤)、卵巢癌、肝癌或脑癌(例如神经胶质瘤)。在一些实施方案中,癌症表征为含有MDSC,与MDSC的存在相关,MDSC在癌症(例如肿瘤)中和/或形成癌症(例如肿瘤)的一部分,或者已经在实体瘤中或附近检测到MDSC。在一些实施方案中,方法进一步包括鉴定受试者中癌症(例如肿瘤)中或附近MDSC的存在。

[0131] 在一些实施方案中,方法进一步包括施用第二治疗性治疗。在一些实施方案中,第二治疗性治疗包含治疗剂(例如,化学治疗剂、生物剂、激素疗法)、放射或手术。在一些实施方案中,治疗剂选自:化学治疗剂或生物剂。在一些实施方案中,治疗剂是检查点抑制剂。在一些实施方案中,检查点抑制剂选自下组:抗CTLA4抗体、抗PD1抗体(例如,纳武单抗、派姆单抗或匹地利珠单抗)、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗CD160抗体、抗2B4抗体、抗CD80抗体、抗CD86抗体、抗B7-H3(CD276)抗体、抗B7-H4(VTCN1)抗体、抗HVEM(TNFRSF14或CD270)抗体、抗BTLA抗体、抗KIR抗体、抗MHC I类抗体、抗MHC II类抗体、抗GAL9抗体、抗VISTA抗体、抗BTLA抗体、抗TIGIT抗体、抗LAIR1抗体和抗A2aR抗体。

[0132] 在一方面,本文提供了治疗有此需要的受试者中纤维化疾病或病症的方法,其包括向受试者施用有效量的本文公开的多特异性分子,从而治疗纤维化疾病或病症。在一些

实施方案中,纤维化疾病或病症是肺、肝、心脏或脉管系统、肾、胰腺、皮肤、胃肠道、骨髓或造血组织、神经系统、眼的纤维化疾病或病症或其组合。在一些实施方案中,纤维化疾病或病症是肺纤维化(例如特发性肺纤维化(IPF))或肝纤维化(例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH))。

[0133] 在一些实施方案中,纤维化状况的治疗包括减少或抑制以下的一项或多项:组织纤维化的形成或沉积;减少大小、细胞构成(cellularity)(例如成纤维细胞或免疫细胞数)、组成;或纤维化病变的细胞含量;减少纤维化病变的胶原或羟脯氨酸含量;降低纤维发生蛋白的表达或活性;减少与炎症反应相关的纤维化;减少与纤维化相关的体重减轻;或增加生存率。

[0134] 在一些实施方案中,纤维化疾病或病症是原发性纤维化。在一个实施方案中,纤维化疾病或病症是特发性的。在其他实施方案中,纤维化疾病或病症与疾病(例如传染病、炎性疾病、自身免疫性疾病、恶性或癌性疾病和/或结缔性疾病)相关(例如继发于);毒素;损伤(insult)(例如环境危害(例如石棉、煤尘、多环芳烃)、吸烟、伤口);医学治疗(例如手术切口、化学疗法或放射)或其组合。

[0135] 在一方面,本文提供了治疗有此需要的受试者中肝疾病或病症的方法,其包括向受试者施用有效量的本文公开的多特异性分子,从而治疗肝疾病或病症。在一些实施方案中,肝疾病或病症是影响肝的功能或生理的纤维化病症或结缔组织病症。在一个实施方案中,纤维化病症或结缔组织病症可以是系统性的(影响整个身体)、多器官的或器官特异性的(例如肝特异性)。纤维化肝病症的例子包括但不限于肝纤维化(liver fibrosis)(肝纤维化(hepatic fibrosis))、肝硬化和与细胞外基质蛋白(例如胶原)在肝中累积相关的任何病症、肝瘢痕和/或异常肝脉管系统。在一个实施方案中,肝疾病或病症是肝硬化。肝硬化被认为是肝纤维化的末期,涉及再生结节(作为修复过程的结果),并通常伴有肝脉管系统的变形。在其他实施方案中,肝疾病或病症是肝癌。肝癌的实例包括但不限于肝细胞癌(HCC)、原发性肝细胞癌、肝细胞瘤、纤维板层状癌、局灶性结节性增生、胆管肉瘤、肝内胆管癌、血管肉瘤(angiosarcoma)或血管肉瘤(hemangiosarcoma)、肝腺瘤、肝血管瘤、肝癌错构瘤、肝母细胞瘤、婴幼儿血管内皮细胞瘤、肝混合肿瘤、间充质组织肿瘤和肝肉瘤。肝癌也可能与非肝癌症的转移相关,例如乳腺癌、结直肠癌、食道癌、肾癌(kidney cancer)或肾癌(renal cancer)、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、直肠癌、皮肤癌(例如黑色素瘤)、胃癌(gastric cancer)或胃癌(stomach cancer)(包括胃肠癌)和子宫癌。在一个实施方案中,肝疾病或病症是HCC。在某些实施方案中,肝疾病或病症由一种或多种损伤引起,其包括但不限于肝炎症或损害;病毒(例如慢性病毒)感染(例如,乙型肝炎、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、丁型肝炎病毒(肝炎三角洲病毒)、戊型肝炎病毒、EB腺病毒或巨细胞病毒;或寄生虫感染,例如血吸虫病);酗酒;脂肪肝病;代谢性病症(例如,血色素沉着症、糖尿病、肥胖症、高血压、血脂异常、半乳糖血症或糖原贮积病);自身免疫性病症(例如自身免疫性肝炎(AIH)、自身免疫性肝病、狼疮样肝炎、系统性红斑狼疮、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、硬皮病或系统性硬化症);炎性肝病(例如,脂肪性肝炎、原发性硬化性胆管炎(PSC)、溃疡性结肠炎、克罗恩病、炎性肠病);遗传性或先天性肝病(例如,Wilson病、Gilbert病、Byler综合征、格陵兰-爱斯基摩人家族性胆汁淤积、Zellweger综合征、Alagilles综合症(ALGS)、进行性家族性肝内胆汁淤积(PFIC)、alpha 1-抗胰蛋白酶缺乏症、囊性纤维化、印度儿童期肝硬化或遗传性血色

素沉着症);和肝损伤(例如药物毒性、酗酒、局部缺血、营养不良或身体创伤)。在一个实施方案中,肝疾病或病症是脂肪肝(或FLD)、酒精性肝病、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、酒精性脂肪性肝炎、单纯性脂肪变性、Reye综合征和与脂质异常滞留在肝细胞中相关的任何病症。

[0136] 在一方面,本文提供了治疗有此需要的受试者中炎症病症或状况的方法,其包括向受试者施用有效量的本文公开的多特异性分子,从而治疗炎症病症或状况。在一个实施方案中,炎症病症或状况是肾中的炎症病症或状况。在一个实施方案中,炎症病症或状况是狼疮肾炎。

[0137] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域中普通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然类似或等同于本文中描述的那些的方法和材料可以用于本发明的实践或测试中,但是下面描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献以其整体通过引用并入。在发生冲突的情况下,以包括定义的本说明书为准。另外,材料、方法和实例仅仅是说明性的并不旨在是限制性的。

[0138] 根据以下详细描述和权利要求书,本发明的其他特征和优点将是显而易见的。

[0139] 附图简述

[0140] 图1.如通过流式分析所确定的,渐增浓度的UniTI-01与表达mCCR2(圆圈)、mCSF1R(正方形)或mCCR2和mCSF1R两者(三角形)的瞬时转染的ExpiCHO细胞的体外结合。在图1中,针对测试的抗体浓度对荧光百分比(%)进行绘图。

[0141] 图2.渐增浓度的同种型对照(mIgG2a)、抗小鼠CCR2单克隆抗体(aCCR2)或UniTI-01对跨孔细胞培养系统中骨髓来源单核细胞的MCP-1依赖性细胞迁移的影响。

[0142] 图3A和3B.渐增浓度的UniTI-01、抗小鼠CSF1R单克隆抗体(aCSF1R)或同种型对照(mIgG2a)对骨髓来源单核细胞在体外向巨噬细胞的mCSF-1依赖性分化和增殖的影响。图3A是一对流式细胞术图,显示了在存在mCSF1的情况下,在细胞培养的第0天或第4天用抗CCR2抗体和抗CSF1R抗体对骨髓细胞的染色。在图3B中,对每种测试条件的增殖百分比进行绘图。所有抗体均以15 $\mu$ g/ml进行测试。

[0143] 图4.UniTI-01、抗小鼠CSF1R单克隆抗体(aCSF1R)或同种型对照(mIgG2a)对骨髓来源单核细胞的mCSF-1依赖性分化和增殖的影响。所有抗体均以15 $\mu$ g/ml进行测试。

[0144] 图5.如通过流式分析所确定的,渐增浓度的UniTI-01与原发恶性肿瘤内M-MDSC和M2样巨噬细胞的体外结合。图5是一组直方图,显示了使用UniTI-01对CD206+巨噬细胞、M-MDSC、嗜中性粒细胞或CD3+ T细胞的染色。

[0145] 图6.体内施用UniTI-01对EMT6和MC38同基因肿瘤模型中肿瘤内髓样细胞群的影响。

[0146] 图7A-7D.体内施用UniTI-01对EMT6同基因肿瘤模型中Kupffer细胞的影响。图7A和7B分别是用抗体F4/80染色的肿瘤和肝组织的免疫组织化学图。图7C和7D分别是显示肿瘤和肝组织的F4/80阳性面积百分比的图。

[0147] 图8A和8B.UniTI-01对CCR2阴性NFS-60细胞体外CSF-1依赖性细胞存活的影响。在图8A中,针对抗CCR2/抗CSF1R双特异性抗体UniTI-01、二价单特异性抗CSF1R抗体(aCSF1R)或单价单特异性抗CSF1R抗体(mono-aCSF1R)测试的抗体浓度对细胞活力进行绘图。图8B是一对流式细胞术图,显示了用抗CCR2抗体和抗CSF1R抗体对NFS-60细胞的染色,或用同种型

对照抗体对NFS-60细胞的染色。

[0148] 图9.体内施用UniTI-01对EMT6模型的肿瘤中CD8<sup>+</sup> T细胞浸润的影响。图9是显示在指定治疗下肿瘤中CD3<sup>+</sup> T细胞中CD8<sup>+</sup> T细胞百分比的图。

[0149] 图10A和10B.体内施用UniTI-01对MC38模型的肿瘤中Treg频率的影响。图10A是显示在指定治疗下肿瘤中CD4<sup>+</sup> T细胞中FOXP3<sup>+</sup>细胞百分比的图。在图10B中,对每种治疗的肿瘤中的CD8<sup>+</sup> T细胞/Treg比率进行绘图。

[0150] 图11A和11B.在EMT6肿瘤模型中与抗PDL1抗体联合治疗时,UniTI-01显示出抗肿瘤功效、肿瘤消退和提高的生存率。图11A是一组图,显示了每种治疗的肿瘤体积。图11B是显示在指定治疗下生存百分比的图。

[0151] 发明详述

[0152] TAM源于循环单核细胞,并且其募集到肿瘤中是由肿瘤来源的趋化因子驱动的。TAM可以通过引起诸如抑制B和T细胞活化、抑制肿瘤相关抗原呈递、抑制细胞毒性颗粒释放、增加血管生成以及分泌广泛的生长和促血管生成因子等反应来促进肿瘤细胞增殖和转移(例如,Liu et al Cellular&Molecular Immunology (2015)12,1-4;和Noy,Roy et al Immunity,Volume 41,Issue 1,49-61;和Quatromoni et al.Am J Transl Res.2012;4 (4):376-389)。因此,许多具有大量TAM的肿瘤具有增加的肿瘤生长速率、局部增殖和远处转移。因此,消耗TAM或抑制其活性的疗法将是有用的。

[0153] 以下定义某些术语。

[0154] 如本文所用,术语亲本序列的“变体”是指具有与亲本序列基本相同的氨基酸序列的序列或其片段。在一些实施方案中,变体是功能变体。

[0155] 如本文所用,冠词“一个”和“一种”是指冠词的一个或超过一个例如至少一个的语法对象。当在本文中与术语“包含”联合使用时,词语“一个”或“一种”的使用可以意指“一个”,但它也与“一个或多个”、“至少一个”和“一个或超过一个”的含义一致。

[0156] 如本文所用,“约”和“近似”通常意指鉴于测量的性质或精密度,经测量数量的可接受的误差程度。示例性误差程度在给定值范围的百分之20(%)内,通常在10%内,并且更通常在5%内。

[0157] 如本文所用,“抗体分子”是指包含至少一个免疫球蛋白可变区序列的蛋白质,例如免疫球蛋白链或其片段。抗体分子涵盖抗体(例如全长抗体)和抗体片段。在一个实施方案中,抗体分子包含全长抗体或全长免疫球蛋白链的抗原结合片段或功能性片段。例如,全长抗体是天然存在的或通过正常免疫球蛋白基因片段重组过程形成的免疫球蛋白(Ig)分子(例如IgG抗体)。在一些实施方案中,抗体分子是指免疫球蛋白分子的免疫活性抗原结合部分,如抗体片段。抗体片段例如功能性片段是抗体的一部分,例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、可变片段(Fv)、结构域抗体(dAb)或单链可变片段(scFv)。功能性抗体片段结合与由完整(例如全长)抗体识别的抗原相同的抗原。术语“抗体片段”或“功能性片段”也包括由可变区组成的分离的片段,如由重链和轻链的可变区组成的“Fv”片段,或其中轻和重可变区由肽接头连接的重组单链多肽分子(“scFv蛋白”)。在一些实施方案中,抗体片段不包括抗体的不具有抗原结合活性的部分,如Fc片段或单个氨基酸残基。示例性抗体分子包括全长抗体和抗体片段,例如dAb(结构域抗体)、单链、Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>片段以及单链可变片段(scFv)。

[0158] 如本文所用,“免疫球蛋白可变区序列”是指可以形成免疫球蛋白可变区的结构的氨基酸序列。例如,序列可以包括天然存在的可变区的氨基酸序列的全部或一部分。例如,序列可以或可以不包括一个、两个或更多个N末端或C末端氨基酸,或者可以包括可与蛋白质结构的形成相容的其他改变。

[0159] 在一些实施方案中,抗体分子是单特异性的,例如它包含对单一表位的结合特异性。在一些实施方案中,抗体分子是多特异性的,例如它包含多个免疫球蛋白可变区序列,其中第一免疫球蛋白可变区序列对第一表位具有结合特异性,并且第二免疫球蛋白可变区序列对第二表位具有结合特异性。在一些实施方案中,抗体分子是双特异性抗体分子。如本文所用,“双特异性抗体分子”是指对超过一个(例如两个、三个、四个或更多个)表位和/或抗原具有特异性的抗体分子。

[0160] 如本文所用,“抗原”(Ag)是指可以激起免疫应答的分子,所述免疫应答例如涉及某些免疫细胞的活化和/或抗体产生。包括几乎所有蛋白质或肽的任何大分子都可以是抗原。抗原也可以源于基因组重组或DNA。例如,包含编码能够引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA都编码“抗原”。在一些实施方案中,抗原不需要仅由基因的全长核苷酸序列编码,抗原也根本不需要由基因编码。在一些实施方案中,抗原可以被合成,或者可以来源于生物样品例如组织样品、肿瘤样品、细胞或具有其他生物组分的流体。如本文所用,“肿瘤抗原”或可互换地“癌抗原”包括存在于癌症例如癌细胞或肿瘤微环境上或与癌症例如癌细胞或肿瘤微环境相关的可以激起免疫应答的任何分子。如本文所用,“免疫细胞抗原”包括存在于免疫细胞上或与免疫细胞相关的可以激起免疫应答的任何分子。

[0161] 抗体分子的“抗原结合位点”或“结合部分”是指抗体分子例如免疫球蛋白(Ig)分子的参与抗原结合的部分。在一些实施方案中,抗原结合位点由重(H)和轻(L)链的可变(V)区的氨基酸残基形成。重和轻链的可变区内的三个高度相异的链段称为高变区,安置在称为“框架区”(FR)的更保守侧接链段之间。FR是天然地见于免疫球蛋白中高变区之间以及邻近于高变区的氨基酸序列。在一些实施方案中,在抗体分子中,轻链的三个高变区和重链的三个高变区相对于彼此在三维空间中安置以形成抗原结合表面,其互补于所结合的抗原的三维表面。重链和轻链各自的三个高变区称为“互补决定区”或“CDR”。框架区和CDR已例如在Kabat,E.A.,et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242和Chothia,C.et al.(1987)J.Mol.Biol.196:901-917中定义和描述。各可变链(例如可变重链和可变轻链)通常由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端至羧基末端按以下氨基酸顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0162] 如本文所用,“癌症”可以涵盖所有类型的致癌性过程和/或癌性生长。在一些实施方案中,癌症包括原发性肿瘤以及转移性组织或恶性转化细胞、组织或器官。在一些实施方案中,癌症涵盖癌症的所有组织病理和阶段,例如侵袭性/严重性的阶段。在一些实施方案中,癌症包括复发性和/或抗性癌症。术语“癌症”和“肿瘤”可以可互换使用。例如,两个术语均涵盖实体和液体肿瘤。如本文所用,术语“癌症”或“肿瘤”包括恶变前癌症和肿瘤以及恶性癌症和肿瘤。

[0163] 本发明的组合物和方法涵盖具有指定序列,或与之基本相同或类似的序列,例如

与指定序列至少85%、90%、95%相同或更高的序列的多肽和核酸。在氨基酸序列的背景下,术语“基本相同”在本文中用于指含有足够或最小数目的氨基酸残基的第一氨基酸,其i)与第二氨基酸序列中比对的氨基酸残基相同,或ii)是第二氨基酸序列中比对的氨基酸残基的保守性取代,使得第一和第二氨基酸序列可以具有共同结构性结构域和/或共同功能活性。例如,含有共同结构性结构域的氨基酸序列,其与参照序列例如本文提供的序列具有至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性。

[0164] 在核苷酸序列的背景下,术语“基本相同”在本文中用于指含有足够或最小数目的核苷酸的第一核酸序列,其与第二核酸序列中比对的核苷酸相同,使得第一和第二核苷酸序列编码具有共同功能活性的多肽,或编码共同结构性多肽结构域或共同功能性多肽活性。例如,与参照序列例如本文提供的序列具有至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的核苷酸序列。

[0165] 如下进行对序列之间的同源性或序列一致性(术语在本文中可互换使用)的计算。

[0166] 为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的一致性百分比,出于最优比较目的来比对序列(例如可在第一和第二氨基酸或核酸序列之一或两者中引入空位以达成最优比对,并且可以出于比较目的忽视非同源序列)。在优选的实施方案中,出于比较目的比对的参照序列的长度是该参照序列的长度的至少30%,优选至少40%,更优选至少50%、60%,并且甚至更优选至少70%、80%、90%、100%。接着比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在那个位置处是相同的(如本文所用,氨基酸或核酸“一致性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。

[0167] 两个序列之间的一致性百分比是在考虑需要为了两个序列的最优比对引入的空位的数目和每个空位的长度的情况下,由序列享有的相同的位置的数目的函数。

[0168] 可以使用数学算法来实现序列的比较以及确定两个序列之间的一致性百分比。在优选的实施方案中,使用Needleman和Wunsch((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)算法来确定两个氨基酸序列之间的一致性百分比,所述算法已并入GCG软件包(可在<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序中,所述程序使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,以及空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6。在另一优选实施方案中,使用GCG软件包(可在<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序来确定两个核苷酸序列之间的一致性百分比,所述程序使用NWSgapdna.CMP矩阵以及空位权重40、50、60、70或80和长度权重1、2、3、4、5或6。一组特别优选的参数(并且是除非另外规定,否则应使用的一组)是Blossum 62评分矩阵,其中空位罚分12、空位延伸罚分4和移码空位罚分5。

[0169] 可以使用E. Meyers和W. Miller((1989) CABIOS, 4:11-17)的算法来确定两个氨基酸或核苷酸序列之间的一致性百分比,所述算法已并入ALIGN程序(2.0版)中,所述程序使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4。

[0170] 本文所述的核酸和蛋白质序列可以用作“查询序列”已进行针对公共数据库的搜索以例如鉴定其他家族成员或相关序列。此类搜索可以使用Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)进行。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST程序(评分=100,字长=12)进行以获得与本发明的核酸(例如SEQ ID NO:1)分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序(评分=50,字长=3)进行以获得与

本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为出于比较目的获得空位比对,可以如Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402中所述利用空位BLAST。当利用BLAST和空位BLAST程序时,可以使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的缺省参数。参见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0171] 应理解本发明的分子可以具有不对其功能具有实质性影响的另外地保守性或非必需氨基酸取代。

[0172] 术语“氨基酸”意图囊括无论是天然的还是合成的所有分子,其包括氨基官能性与酸官能性两者,并且能够包括在天然存在的氨基酸的聚合物中。示例性氨基酸包括天然存在的氨基酸;其类似物、衍生物和同类物;具有变异侧链的氨基酸类似物;以及任何前述各物中任一个的所有立体异构体。如本文所用,术语“氨基酸”包括D-或L-光学异构体以及肽模拟物两者。

[0173] “保守性氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的氨基酸取代。本领域中已定义具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有beta分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0174] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”(如果是单链)在本文中可互换使用以指任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是线性的或分支的,它可以包含经修饰的氨基酸,并且它可以间插有非氨基酸。该术语也涵盖已修饰的氨基酸聚合物;例如二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作,如与标记组分缀合。多肽可以从天然来源分离,可以通过重组技术从真核或原核宿主产生,或者可以是合成规程的产物。

[0175] 术语“核酸”、“核酸序列”、“核苷酸序列”或“多核苷酸序列”和“多核苷酸”可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)的聚合形式或其类似物。多核苷酸可以为单链或双链,并且如果是单链,则可以为编码链或非编码(反义)链。多核苷酸可以包含经修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。核苷酸的序列可以间插有非核苷酸组分。多核苷酸可以在聚合之后进一步修饰,如通过与标记组分缀合。核酸可以是不存在于自然界中或以非天然排列连接于另一多核苷酸的重组多核苷酸或基因组来源、cDNA来源、半合成来源或合成来源的多核苷酸。

[0176] 如本文所用,术语“分离的”是指物质从其原始或天然环境(例如如果它是天然存在的,则为天然环境)去除。例如,存在于活体动物中的天然存在的多核苷酸或多肽是未分离的,但通过人为干预从天然系统中的一些或全部共存物质分开的同样的多核苷酸或多肽是分离的。此类多核苷酸可以是载体的一部分,和/或此类多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分,并且仍然是分离的,因为此类载体或组合物不是它在自然界中所发现时所处的环境的一部分。

[0177] 如本文所用,术语“免疫抑制性髓样细胞”或“IMC”通常是指促进免疫抑制(例如,在肿瘤微环境中)(例如通过抑制T细胞活化,抑制T细胞活力,促进T调节细胞诱导和募集)的髓样谱系的细胞。免疫抑制性髓样细胞包括,例如肿瘤相关巨噬细胞(TAM)和髓样来源抑

制细胞(MDSC)。

[0178] 如本文所用,术语“肿瘤相关巨噬细胞”或“TAM”通常是指存在于癌症例如肿瘤的微环境中的巨噬细胞。

[0179] 如本文所用,术语“减少TAM”通常是指减少TAM的数目。减少包括减少肿瘤中或肿瘤附近的TAM的数目(例如,与施用本文所述的多特异性分子之前(例如,在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多次施用本文所述的多特异性分子之前)的TAM的数目相比)。减少包括减少TAM的任何数目(例如1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、100%,全部或基本上)(例如,与施用本文所述的多特异性分子之前(例如,在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多次施用本文所述的多特异性分子之前)的TAM的数目相比)。

[0180] 如本文所用,术语“髓样来源抑制细胞”或“MDSC”通常是指能够促进免疫抑制并通常表达CD33、CD11b和CD45的髓样来源的细胞。已经定义了MDSC的各种亚群,例如单核-MDSC(M-MDSC)通常与CD14和CD124的表达以及HLA-DR的低表达相关。在一些实施方案中,MDSC群是MO-MDSC群。多形核MDSC(PMN-MDSC)与CD15、CD66b和CD124的表达以及HLA-DR的不表达相关。未成熟的MDSC(I-MDSC)与CD117和CD34的表达以及LIN和HLA-DR的不表达相关。参见例如Ugel et al. (2015) JCI Vol 125(9),第3365页。

[0181] 如本文所用,术语“CSF1R阳性、CCR2阳性细胞”是指在细胞表面上表达CSF1R和CCR2两者的细胞。术语“CSF1R阳性、CCR2阴性细胞”是指在细胞表面上表达CSF1R而不表达CCR2的细胞。术语“CSF1R阴性、CCR2阳性细胞”是指在细胞表面上表达CCR2但不表达CSF1R的细胞。

[0182] 如本文所用,当结合部分例如抗体分子与靶标上的单一表位结合时,结合部分例如抗体分子与靶标单价结合。在一些实施方案中,结合部分仅包含与靶标的一个抗原结合结构域。在一些实施方案中,结合部分的一个分子仅可以结合靶标的一个分子。

[0183] 如本文所用,当结合部分例如抗体分子与靶标上的两个表位结合时,结合部分例如抗体分子与靶标双价结合。在一些实施方案中,该两个表位是相同的。在一些实施方案中,该两个表位是不同的。在一些实施方案中,结合部分包含与靶标的两个抗原结合结构域。在一些实施方案中,结合分子的一个分子可以结合靶标的两个分子。

[0184] 以下进一步详细描述本发明的各个方面。另外的定义在整个说明书中加以阐述。

[0185] 抗原

[0186] 本公开的TAM靶向抗原包括例如,CSF1R、CCR2、CXCR2、CD68、CD163、CX3CR1、MARCO、CD204、CD52和叶酸受体beta。本文提供了TAM靶向抗原的示例性氨基酸序列。

[0187] CSF1R

[0188] CSF1R(也称为巨噬细胞集落刺激因子1受体)是酪氨酸蛋白激酶,其充当CSF1和IL34的细胞表面受体,并在调节造血前体细胞(尤其是单核吞噬细胞,例如巨噬细胞和单核细胞)的存活、增殖和分化中起重要作用。CSF1R促进响应于IL34和CSF1的促炎性趋化因子的释放,并从而在先天免疫和炎症过程中起重要作用。示例性CSF1R未成熟氨基酸序列在SEQ ID NO:87和88中提供。

[0189] CSF1R未成熟氨基酸序列同等型1(标识符:P07333-1):

[0190] MGPVLLLLLVATAWHGQGIPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNQSVQWGGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYRCTEPGDPLGGSAAIHLVYKDPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGR

PLMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVQKVIPGPPALTLVPAELVRIRGEAAQIV  
CSASSVDVNFDFVLQHNNTKLAIPQQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGNYSCVASNVQGHSTSMFFRVVESAY  
LNLSSSEQNLIQEVTVGEGLNLKVMVEAYPGLQGFWNTYLGPFSHQPEPKLANATTKDTRHTFTLSLPRLPKSEAG  
RYSFLARNPGGWALTFELTLRYPPEVSVIWFINGSGTLLCAASGYPQPNVTWLQCSGHTDRCDEAQLVQVWDDPY  
PEVLSQEPFHKVTVQSLLTVETLEHNQTYECRAHNSVSGSGWAFIPISAGATHPPDEFLLTPVTVVACMSIMALLLL  
LLLLLLYKYKQKPKYQVRWKIIESYEGNSYTFIDPTQLPYNEKWEFPRNNLQFGKTLGAGAFGKVVEATAFGLGKED  
AVLKVAVKMLKSTAHADKEALMSELKIMSHLGQHENIVNLLGACTHGGPVLVITEYCCYGDLLNFLRRKAEAMLGP  
SLSPGQDPEGVDYKNIHLEKKYVRRDSGFSSQGVDTYVEMRPVSTSSNDSFSEQDLKEDGRPLELRDLLHFSSQV  
AQGMAFLASKNCIHRDVAARNVLLTNGHVAKIGDFGLARDIMNDSNYIVKGNARLPVKWMAPEISIFDCVYTVQSDVW  
SYGILLWEIFSLGLNPYPGILVNSKFYKLVKDGQMAQPAFAPKNIYSIMQACWALEPHTRPFTFQQICSFLQEQAQE  
DRRERDYTNLPSSSRSGSGSSSSELEEESSEHLTCCEQGDIAQPLLQPNNYQFC

[0191] SEQ ID NO:87

[0192] CSF1R未成熟氨基酸序列同等型2(标识符:P07333-2):

[0193] MGPVLLLLLVATAWHGQGIPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVNGSVSEWDGPPSPHWTLYSDGSSSIL  
STNNATFQNTGTYRCTEPGDPLGGSAAIHLYVKDPAWPVNLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGR  
PLMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVQKVIPGPPALTLVPAELVRIRGEAAQIV  
CSASSVDVNFDFVLQHNNTKLAIPQQSDFHNNRYQKVLTLNLDQVDFQHAGNYSCVASNVQGHSTSMFFRVVGTGPS  
PSLCPA

[0194] SEQ ID NO:88

[0195] CCR2

[0196] CCR2(也称为C-C趋化因子受体2型)是CCL2、CCL7和CCL13趋化因子的G蛋白偶联受体。已知CCR2在单核细胞/巨噬细胞和T细胞的募集中发挥功能。CCR2在单核细胞和一小亚群的T细胞上表达,并且在小鼠和人中表现出几乎相同的表达模式(Mack et al.J Immunol 2001;166:4697-4704)。示例性CCR2氨基酸序列在SEQ ID NO:89和90中提供。

[0197] CCR2氨基酸序列同等型A(标识符:P41597-1):

[0198] MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVVLILIN  
CKKLKCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEVWFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFFIILLTIDRYLAIVHAV  
FALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGWNNFHTIMRNILGLVLPLLIMVICYS  
GILKTLLRCRNEKKRHRAVRVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTETLGMTHCCI  
NPIIYAFVGEKFRSLFHIALGCRIAPLQKPVCGGPGVRPGKNVKVTTQGLLDGRGKGKSIGRAPEASLQDKEGA

[0199] SEQ ID NO:89

[0200] CCR2氨基酸序列同等型B(标识符:P41597-2):

[0201] MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVVLILIN  
CKKLKCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEVWFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFFIILLTIDRYLAIVHAV  
FALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGWNNFHTIMRNILGLVLPLLIMVICYS  
GILKTLLRCRNEKKRHRAVRVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTETLGMTHCCI  
NPIIYAFVGEKFRRLSVFFRKHITKRFCQKCPVFYRETVDGVTSTNTPSTGEQEVSAAGL

[0202] SEQ ID NO:90

[0203] CXCR2

[0204] CXCR2 (也称为白介素8受体) 是IL8的G蛋白偶联受体, IL8是嗜中性粒细胞趋化因子。IL8与受体的结合引起嗜中性粒细胞的活化。该反应经由激活磷脂酰肌醇钙第二信使系统的G蛋白介导。CXCR2以高亲和力与IL-8结合, 并且还以高亲和力与CXCL3、GRO/MGSA和NAP-2结合。CXCR2在循环的嗜中性粒细胞上高水平表达, 并且对于指导其迁移至炎症部位至关重要(J Clin Invest.2012;122(9):3127-3144)。示例性的CXCR2氨基酸序列在SEQ ID NO:91中提供。

[0205] CXCR2氨基酸序列(标识符:P25025-1):

[0206] MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSTLPFFLLDAAPCEPESLEINKYFVVI IYALVFLLSLLGNSLV  
MLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLP IWAASKVNGWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDRYL  
AIVHATRTLTKRYLVKFI CLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNTANWRMLLRILPQSFGFIVP  
LLIMLFCYGFRTLRTLFKAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPYNLVLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATE  
ILGILHSCLNPLIYAFIGQKFRHGLLKILAIHGLISKDSL PKDSRPSFVGSSSGHTSTTL

[0207] SEQ ID NO:91

[0208] 示例性抗体

[0209] 结合TAM抗原的示例性抗体在整个说明书和下文中提供。示例性抗CSF1R抗体在本文以及在W02009026303A1; W02011123381A1; W02016207312A1; W02016106180A1; US20160220669A1; US20160326254A1; W02013169264A1; W02013087699A1; W02011140249A2; W02011131407A1; W02011123381A1; W02011107553A1; 和W02011070024A1中描述, 其全部以其整体通过引用并入本文。示例性CCR2抗体在本文以及在W02013192596A2; W02010021697A2; W02001057226A1; 和W01997031949A1中描述, 其全部以其整体通过引用并入本文。示例性CXCR2抗体在W02014170317A1和US20160060347(参见, 例如a) SEQ ID NO:14(轻链)和SEQ ID NO:15(重链); b) SEQ ID NO:24(轻链)和SEQ ID NO:25(重链); c) SEQ ID NO:34(轻链)和SEQ ID NO:35(重链); d) SEQ ID NO:44(轻链)和SEQ ID NO:45(重链); e) SEQ ID NO:54(轻链)和SEQ ID NO:55(重链); f) SEQ ID NO:64(轻链)和SEQ ID NO:65(重链); g) SEQ ID NO:74(轻链)和SEQ ID NO:75(重链); h) SEQ ID NO:84(轻链)和SEQ ID NO:85(重链))中描述, 其全部以其整体通过引用并入本文。示例性抗CD163抗体在US20120258107(参见, 例如MAC2158、MAC2-48)中提供, 以其整体通过引用并入本文。示例性抗CD52抗体在US20050152898中描述, 以其整体通过引用并入本文。示例性抗叶酸抗体在US9522196中描述, 以其整体通过引用并入本文。示例性抗CD52抗体在US9522196中描述, 以其整体通过引用并入本文。示例性抗MARCO抗体在W02016196612中描述, 以其整体通过引用并入本文。

[0210] 抗体分子

[0211] 在一个实施方案中, 多特异性分子包含与第一肿瘤相关巨噬细胞(TAM)抗原结合的抗体分子; 和与第二TAM抗原结合的抗体分子。在一些实施方案中, 第一和/或第二TAM抗原是例如哺乳动物的, 例如人的。例如, 抗体分子特异性结合TAM抗原上的表位, 例如线性或构象表位。

[0212] 在一个实施方案中, 多特异性分子包含与第一髓样来源抑制细胞(MDSC)抗原结合的抗体分子; 和与第二MDSC抗原结合的抗体分子。在一些实施方案中, 第一和/或第二MDSC抗原是例如哺乳动物的, 例如人的。例如, 抗体分子特异性结合MDSC抗原上的表位, 例如线

性或构象表位。

[0213] 在一个实施方案中,抗体分子是单特异性抗体分子,并且结合单一表位。例如,具有多个免疫球蛋白可变区序列的单特异性抗体分子,所述多个免疫球蛋白可变区序列各自结合相同的表位。

[0214] 在一个实施方案中,抗体分子是多特异性抗体分子,例如它包含多个免疫球蛋白可变区序列,其中所述多个免疫球蛋白可变区序列的第一免疫球蛋白可变区序列对第一表位具有结合特异性,并且所述多个免疫球蛋白可变区序列的第二免疫球蛋白可变区序列对第二表位具有结合特异性。在一个实施方案中,第一和第二表位在相同的抗原例如相同的蛋白质(或多聚蛋白质的亚基)上。在一个实施方案中,第一和第二表位重叠。在一个实施方案中,第一和第二表位不重叠。在一个实施方案中,第一和第二表位在不同的抗原例如不同的蛋白质(或多聚蛋白质的不同亚基)上。在一个实施方案中,多特异性抗体分子包含第三、第四或第五免疫球蛋白可变区。在一个实施方案中,多特异性抗体分子是双特异性抗体分子、三特异性抗体分子或四特异性抗体分子。

[0215] 在一个实施方案中,多特异性抗体分子是双特异性抗体分子。双特异性抗体对不超过两个抗原具有特异性。双特异性抗体分子的特征在于对第一表位具有结合特异性的第一免疫球蛋白可变区序列和对第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变区序列。在一个实施方案中,第一和第二表位在相同的抗原例如相同的蛋白质(或多聚蛋白质的亚基)上。在一个实施方案中,第一和第二表位重叠。在一个实施方案中,第一和第二表位不重叠。在一个实施方案中,第一和第二表位在不同的抗原例如不同的蛋白质(或多聚蛋白质的不同亚基)上。在一个实施方案中,双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的重链可变区序列和轻链可变区序列以及对第二表位具有结合特异性的重链可变区序列和轻链可变区序列。在一个实施方案中,双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的半抗体和对第二表位具有结合特异性的半抗体。在一个实施方案中,双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的半抗体或其片段和对第二表位具有结合特异性的半抗体或其片段。在一个实施方案中,双特异性抗体分子包含对第一表位具有结合特异性的scFv或Fab或其片段和对第二表位具有结合特异性的scFv或Fab或其片段。

[0216] 在一个实施方案中,抗体分子包含二价抗体(diabody)和单链分子以及抗体的抗原结合片段(例如Fab、F(ab')<sub>2</sub>和Fv)。例如,抗体分子可以包括重(H)链可变区序列(在本文中缩写为VH)和轻(L)链可变区序列(在本文中缩写为VL)。在一个实施方案中,抗体分子包含以下或由以下组成:重链和轻链(在本文中称为半抗体)。在另一个实例中,抗体分子包括两个重(H)链可变区序列和两个轻(L)链可变区序列,从而形成两个抗原结合位点,如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fc、Fd、Fd'、Fv、单链抗体(例如scFv)、单可变区抗体、二价抗体(Dab)(二价且双特异性)和嵌合(例如人源化)抗体,其可以通过修饰整个抗体或使用重组DNA技术重新合成的那些来产生。这些功能性抗体片段保留与它们的相应抗原或受体进行选择结合的能力。抗体和抗体片段可以来自任何抗体类别,包括但不限于IgG、IgA、IgM、IgD和IgE,以及来自任何抗体的亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。抗体分子的制备可以是单克隆的或多克隆的。抗体分子也可以是人抗体、人源化抗体、CDR移植抗体或体外生成的抗体。抗体可以具有选自例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重链恒定区。抗体也可以具有选自例如kappa或lambda的轻链。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中与术语“抗体”可互换使用。

[0217] 抗体分子的抗原结合片段的实例包括：(i) Fab片段，由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段，包含由二硫桥在铰链区处连接的两个Fab片段的二价片段；(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段；(iv) 由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段，(v) 二价抗体(dAb)片段，其由VH结构域组成；(vi) 骆驼科动物或骆驼源化可变区；(vii) 单链Fv(scFv) (参见例如Bird et al. (1988) Science 242:423-426; 和Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883); (viii) 单结构域抗体。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的常规技术获得，并且以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。

[0218] 抗体分子包括完整分子以及其功能性片段。抗体分子的恒定区可以得以改变，例如突变，以修改抗体的特性(例如增加或减少以下的一项或多项：Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能)。

[0219] 抗体分子也可以是单结构域抗体。单结构域抗体可以包括其互补决定区是单结构域多肽的一部分的抗体。实例包括但不限于重链抗体、天然地缺乏轻链的抗体、源于常规4链抗体的单结构域抗体、经工程化改造的抗体和除源于抗体的那些支架以外的单结构域支架。单结构域抗体可以是任何本领域的单结构域抗体或任何未来的单结构域抗体。单结构域抗体可以源于任何物种，包括但不限于小鼠、人、骆驼、美洲驼、鱼、鲨鱼、山羊、兔和牛。根据本发明的另一方面，单结构域抗体是称为缺乏轻链的重链抗体的天然存在的单结构域抗体。此类单结构域抗体例如公开于WO 9404678中。为了清楚起见，源于天然地缺乏轻链的重链抗体的该可变区在本文中称为VHH或纳米抗体以将其与四链免疫球蛋白的常规VH进行区分。此类VHH分子可以源于在骆驼科(Camelidae)物种中例如骆驼、美洲驼、单峰驼、羊驼和原驼中产生的抗体。除骆驼科之外，其他物种也可以产生天然地缺乏轻链的重链抗体；此类VHH在本发明的范围内。

[0220] VH区和VL区可以细分为称为“互补决定区”(CDR)的高变区，其间分散有称为“框架区”(FR或FW)的更保守的区域。

[0221] 框架区和CDR的范围已通过许多方法精确定义(参见Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH出版号91-3242; Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; 以及由Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用的AbM定义)。通常参见例如Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg)。

[0222] 如本文所用，术语“互补决定区”和“CDR”是指抗体可变区内赋予抗原特异性和结合亲和力的氨基酸的序列。一般来说，在每个重链可变区中有三个CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3) 以及每个轻链可变区中有三个CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)。

[0223] 给定CDR的精确氨基酸序列边界可以使用许多已知方案中的任一个来确定，包括由Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (“Kabat”编号方案), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (“Chothia”编号方案) 描述的那些。如本文所用，根据“Chothia”编号方案确定的CDR有时也称为“高变环”。

[0224] 例如，根据Kabat，重链可变区(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31-35 (HCDR1)、50-

65 (HCDR2) 和95-102 (HCDR3); 并且轻链可变区 (VL) 中的CDR氨基酸残基编号为24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和89-97 (LCDR3)。根据Chothia, VH中的CDR氨基酸编号为26-32 (HCDR1)、52-56 (HCDR2) 和95-102 (HCDR3); 并且VL中的氨基酸残基编号为26-32 (LCDR1)、50-52 (LCDR2) 和91-96 (LCDR3)。

[0225] 每个VH和VL通常包括三个CDR和四个FR, 从氨基末端至羧基末端按以下顺序排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0226] 抗体分子可以是多克隆或单克隆抗体。

[0227] 如本文所用, 术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物显示出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。单克隆抗体可以通过杂交瘤技术或通过不使用杂交瘤技术的方法(例如重组方法)来制备。

[0228] 抗体可以以重组方式产生, 例如通过噬菌体展示或通过组合方法来产生。

[0229] 用于生成抗体的噬菌体展示和组合方法在本领域中是已知的(如描述于例如Ladner et al. 美国专利号5,223,409; Kang et al. 国际公开号W0 92/18619; Dower et al. 国际公开号W0 91/17271; Winter et al. 国际公开W0 92/20791; Markland et al. 国际公开号W0 92/15679; Breitling et al. 国际公开W093/01288; McCafferty et al. 国际公开号W0 92/01047; Garrard et al. 国际公开号W0 92/09690; Ladner et al. 国际公开号W0 90/02809; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res19:4133-4137; 和Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982中, 其全部的内容都通过引用并入本文)。

[0230] 在一个实施方案中, 抗体是完全人抗体(例如在已经遗传工程化改造来从人免疫球蛋白序列产生抗体的小鼠中制备的抗体)或非人抗体, 例如啮齿动物(小鼠或大鼠)抗体、山羊抗体、灵长类动物(例如猴)抗体、骆驼抗体。优选地, 非人抗体是啮齿动物(小鼠或大鼠抗体)。产生啮齿动物抗体的方法在本领域中是已知的。

[0231] 人单克隆抗体可以使用携带人免疫球蛋白基因而不是小鼠系统的转基因小鼠来生成。来自感兴趣的抗原免疫的这些转基因小鼠的脾细胞用于产生分泌对来自人蛋白质的表位具有特异性亲和力的人mAb的杂交瘤(参见, 例如Wood et al. 国际申请W0 91/00906; Kucherlapati et al. PCT公开W0 91/10741; Lonberg et al. 国际申请W0 92/03918; Kay et al. 国际申请92/03917; Lonberg, N. et al. 1994 Nature 368:856-859; Green, L. L. et al. 1994 Nature Genet. 7:13-21; Morrison, S. L. et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Bruggeman et al. 1993 Year Immunol 7:33-40; Tuailon et al. 1993 PNAS 90:3720-3724; Bruggeman et al. 1991 Eur J Immunol 21:1323-1326)。

[0232] 抗体分子可以是其中可变区或其一部分例如CDR在非人生物体例如大鼠或小鼠中生成的抗体分子。嵌合抗体、CDR移植抗体和人源化抗体在本发明内。在非人生物体例如大鼠或小鼠中生成, 并然后例如在可变框架或恒定区中经修饰以使降低在人中的抗原性的抗

体分子在本发明内。

[0233] “实际上地人”蛋白质是基本不激起中和抗体应答例如人抗鼠抗体(HAMA)应答的蛋白质。HAMA在许多情况下是有问题的,例如如果抗体分子例如在治疗慢性或复发性疾病状况时重复施用。由于抗体从血清的清除增加(参见例如Saleh et al., Cancer Immunol. Immunother., 32:180-190 (1990))并且也由于潜在的过敏反应(参见例如LoBuglio et al., Hybridoma, 5:5117-5123 (1986)),所以HAMA应答可以使得重复抗体施用潜在无效。

[0234] 嵌合抗体可以通过本领域中已知的重组DNA技术来产生(参见Robinson et al., 国际专利公开PCT/US86/02269;Akira, et al., 欧洲专利申请184,187;Taniguchi, M., 欧洲专利申请171,496;Morrison et al., 欧洲专利申请173,494;Neuberger et al., 国际申请WO 86/01533;Cabilly et al. 美国专利号4,816,567;Cabilly et al., 欧洲专利申请125,023;Better et al. (1988 Science 240:1041-1043);Liu et al. (1987) PNAS 84:3439-3443;Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526;Sun et al. (1987) PNAS 84:214-218;Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005;Wood et al. (1985) Nature 314:446-449;和Shaw et al., 1988, J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559)。

[0235] 人源化抗体或CDR移植抗体将有至少一个或两个但通常全部三个(重和/或轻免疫球蛋白链的)接受体CDR被供体CDR替换。抗体可以用非人CDR的至少一部分替换,或者仅一些CDR可以用非人CDR替换。仅需要替换为与抗原结合所需的数目的CDR。优选地,供体将是啮齿动物抗体例如大鼠或小鼠抗体,并且接受体将是人框架或人共有框架。通常,提供CDR的免疫球蛋白称为“供体”,而提供框架的免疫球蛋白称为“接受体”。在一个实施方案中,供体免疫球蛋白是非人(例如啮齿动物)。接受体框架是天然存在的(例如人)框架或共有框架,或者与之约85%或更高,优选90%、95%、99%或更高相同的序列。

[0236] 如本文所用,术语“共有序列”是指由相关序列的家族中最经常出现的氨基酸(或核苷酸)形成的序列(参见例如Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987))。在蛋白质的家族中,共有序列中每个位置由在家族中那个位置处最经常出现的氨基酸占据。如果两种氨基酸同等经常出现,则任一个都可以包括在共有序列中。“共有框架”是指共有免疫球蛋白序列中的框架区。

[0237] 抗体分子可通过本领域中已知的方法来人源化(参见例如Morrison, S.L., 1985, Science 229:1202-1207, Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214和Queen et al. US 5,585,089、US 5,693,761和US 5,693,762,其全部的内容在此通过引用并入)。

[0238] 人源化抗体分子或CDR移植抗体分子可以通过CDR移植或CDR取代来产生,其中免疫球蛋白链的一个、两个或全部CDR可以被替换。参见例如美国专利5,225,539;Jones et al. 1986 Nature 321:552-525;Verhoeyan et al. 1988 Science 239:1534;Beidler et al. 1988 J. Immunol. 141:4053-4060;Winter US 5,225,539,其全部的内容在此通过引用明确并入。Winter描述了可以用于制备本发明的人源化抗体的CDR移植方法(1987年3月26日提交的英国专利申请GB 2188638A;Winter US 5,225,539),其内容通过引用明确并入。

[0239] 也在本发明的范围内的是其中特定氨基酸已被取代、缺失或添加的人源化抗体分子。用于从供体选择氨基酸的准则描述于US 5,585,089中,例如US 5,585,089的第12-16栏,例如US 5,585,089的第12-16栏,其内容在此通过引用并入。用于人源化抗体的其他技术描

述于1992年12月23日公布的Padlan et al. EP 519596 A1中。

[0240] 抗体分子可为单链抗体。单链抗体(scFv)可以经工程化改造(参见例如Colcher, D. et al. (1999) Ann N Y Acad Sci 880:263-80; 和Reiter, Y. (1996) Clin Cancer Res 2: 245-52)。单链抗体可以得以二聚化或多聚化以生产对相同靶蛋白质的不同表位具有特异性的多价抗体。

[0241] 在其他实施方案中, 抗体分子具有选自以下的重链恒定区: 例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重链恒定区; 特别是选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的(例如人)重链恒定区。在另一个实施方案中, 抗体分子具有选自例如kappa或lambda的(例如人)轻链恒定区的轻链恒定区。恒定区可以得以改变, 例如突变, 以修改抗体的特性(例如, 增加或降低以下的一项或多项: Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能和/或补体功能)。在一个实施方案中, 抗体具有: 效应功能; 并且可以固定补体。在其他实施方案中, 抗体不募集效应细胞; 或固定补体。在另一个实施方案中, 抗体具有降低的结合Fc受体的能力, 或不具有结合Fc受体的能力。例如, 它是不支持与Fc受体结合的同种型或亚型、片段或其他突变体, 例如它具有经诱变或缺失的Fc受体结合区。

[0242] 用于改变抗体恒定区的方法在本领域中是已知的。具有改变的功能, 例如改变的对效应配体(如细胞上的FcR或补体的C1组分)的亲合力的抗体可以通过用不同的残基替换抗体的恒定部分中的至少一个氨基酸残基来产生(参见例如EP 388,151A1、美国专利号5,624,821和美国专利号5,648,260,其全部的内容在此通过引用并入)。可以描述相似类型的改变, 如果其应用于鼠或其他物种免疫球蛋白将降低或消除这些功能。

[0243] 抗体分子可以经衍生化或连接于另一个功能性分子(例如另一个肽或蛋白质)。如本文所用, “衍生化的”抗体分子是已经修饰的抗体分子。衍生化的方法包括但不限于添加荧光部分、放射性核苷酸、毒素、酶或亲和配体如生物素。因此, 本发明的抗体分子意图包括本文所述的抗体的衍生化形式和以其他方式经修饰的形式, 包括免疫粘附分子。例如, 抗体分子可以功能性连接(通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或以其他方式)至一个或多个其他分子实体, 如另一个抗体(例如双特异性抗体或二价抗体)、可检测剂、细胞毒性剂、药剂和/或可以介导抗体或抗体部分与另一个分子(如链霉亲和素核心区或聚组氨酸标签)的缔合的蛋白质或肽。

[0244] 一种类型的衍生化抗体分子通过交联两个或更多个抗体(具有相同类型或不同类型, 例如以创建双特异性抗体)来产生。合适的交联剂包括具有异双官能性, 具有由适当间隔区分隔的两个独特反应性基团的那些(例如间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基丁二酰亚胺酯), 或具有同双官能性的那些(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)。此类连接物可从Pierce Chemical Company, Rockford, Ill获得。

[0245] 多特异性抗体分子

[0246] 在一些实施方案中, 多特异性抗体分子可以包含超过一个抗原结合位点, 其中不同位点对不同抗原具有特异性。在一些实施方案中, 多特异性抗体分子可以结合相同抗原上超过一个(例如两个或更多个)表位。在一些实施方案中, 多特异性抗体分子包含对靶细胞(例如癌细胞)具有特异性的抗原结合位点和对免疫效应细胞具有特异性的不同的抗原结合位点。在一个实施方案中, 多特异性抗体分子是双特异性抗体分子。双特异性抗体分子可以分类成五个不同结构组: (i) 双特异性免疫球蛋白G(BsIgG); (ii) 附有另外的抗原结合

部分的IgG; (iii) 双特异性抗体片段; (iv) 双特异性融合蛋白; 和 (v) 双特异性抗体缀合物。

[0247] BsIgG是对每个抗原为单价的形式。示例性BsIgG形式包括但不限于crossMab、DAF (二合一)、DAF (四合一)、DutaMab、DT-IgG、突出-进入-空穴共同LC、突出-进入-空穴装配、电荷对、Fab臂交换、SEED体 (SEEDbody)、triomab、LUZ-Y、Fcab、 $\kappa\lambda$ 体、正交Fab。参见Spiess et al. Mol. Immunol. 67 (2015): 95-106。示例性BsIgG包括卡妥索单抗 (catumaxomab) (Fresenius Biotech, Trion Pharma, Neopharm), 其含有抗CD3臂和抗EpCAM臂; 以及厄妥玛索单抗 (ertumaxomab) (Neovii Biotech, Fresenius Biotech), 其靶向CD3和HER2。在一些实施方案中, BsIgG包含经工程化改造用于异源二聚化的重链。例如, 重链可以使用“突出-进入-空穴”策略、SEED平台、共同重链 (例如在 $\kappa\lambda$ 体中) 以及使用异源二聚Fc区来进行工程化改造用于异源二聚化。参见Spiess et al. Mol. Immunol. 67 (2015): 95-106。已用于在BsIgG中避免同源二聚体的重链配对的策略包括突出-进入-空穴、双体 (duobody)、azymetric、电荷对、HA-TF、SEED体和差异性蛋白A亲和力。参见同上。BsIgG可以通过在不同的宿主细胞中单独表达组分抗体, 以及随后纯化/装配成BsIgG来产生。BsIgG也可以通过在单一宿主细胞中表达组分抗体来产生。BsIgG可以使用亲和色谱法, 例如使用蛋白A和依序pH洗脱来纯化。

[0248] 附有另外的抗原结合部分的IgG是双特异性抗体分子的另一种形式。例如, 单特异性IgG可以通过将另外的抗原结合单元例如在重链或轻链的N末端或C末端处附于单特异性IgG上来得以工程化改造以具有双特异性。示例性另外的抗原结合单元包括单结构域抗体 (例如可变重链或可变轻链)、经工程化改造的蛋白质支架和配对抗体可变区 (例如单链可变片段或可变片段)。参见同上。所附IgG形式的实例包括双可变结构域IgG (DVD-Ig)、IgG (H)-scFv、scFv-(H) IgG、IgG (L)-scFv、scFv-(L) IgG、IgG (L, H)-Fv、IgG (H)-V、V (H)-IgG、IgG (L)-V、V (L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、zybody和DVI-IgG (四合一)。参见Spiess et al. Mol. Immunol. 67 (2015): 95-106。IgG-scFv的实例是MM-141 (Merrimack Pharmaceuticals), 其结合IGF-1R和HER3。DVD-Ig的实例包括ABT-981 (AbbVie), 其结合IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ ; 以及ABT-122 (AbbVie), 其结合TNF和IL-17A。

[0249] 双特异性抗体片段 (BsAb) 是缺少一些或全部抗体恒定结构域的双特异性抗体分子的形式。例如, 一些BsAb缺少Fc区。在一些实施方案中, 双特异性抗体片段包括由容许BsAb在单一宿主细胞中高效表达的肽接头连接的重和轻链区。示例性双特异性抗体片段包括但不限于纳米抗体、纳米抗体-HAS、BiTE、二价抗体、DART、TandAb、单链二价抗体 (scDiabody)、单链二价抗体-CH3、二价-CH3、三重体 (triple body)、小型抗体 (miniantibody)、微型抗体 (minibody)、TriBi微型抗体、scFv-CH3KIH、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>-scFv2、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、单链二价抗体-Fc、二价抗体-Fc、串联scFv-Fc和胞内抗体 (intrabody)。参见同上。例如, BiTE形式包含串联scFv, 其中组分scFv结合T细胞上的CD3和癌细胞上的表面抗原。

[0250] 双特异性融合蛋白包括与其他蛋白质连接的抗体片段, 例如以添加另外的特异性和/或功能性。双特异性融合蛋白的实例是immTAC, 其包含与识别HLA呈递肽的亲和力成熟的T细胞受体连接的抗CD3scFv。在一些实施方案中, 对接和锁定 (DNL) 方法可以用于生成具有较高价的双特异性抗体分子。此外, 与白蛋白结合蛋白或人血清白蛋白的融合物可以延长抗体片段的血清半衰期。参见同上。

[0251] 在一些实施方案中,化学缀合(例如,抗体和/或抗体片段的化学缀合)可以用于创建BsAb分子。参见同上。示例性双特异性抗体缀合物包括CovX体形式,其中低分子量药物与每个Fab臂或抗体或其片段中的单个反应性赖氨酸位点特异性缀合。在一些实施方案中,缀合改善了低分子量药物的血清半衰期。示例性CovX体是CVX-241 (NCT01004822),其包含与抑制VEGF或Ang2的两种短肽缀合的抗体。参见同上。

[0252] 抗体分子可以通过在宿主系统中重组表达例如至少一种或多种组分来产生。示例性宿主系统包括真核细胞(例如,哺乳动物细胞(例如,CHO细胞)、或昆虫细胞(例如,SF9或S2细胞))和原核细胞(例如,大肠杆菌)。双特异性抗体分子可以通过在不同宿主细胞中单独表达组分并且随后纯化/组装来产生。或者,抗体分子可以通过在单一宿主细胞中表达组分来产生。双特异性抗体分子的纯化可以通过各种方法进行,如亲和色谱法,例如使用蛋白A和依序pH洗脱。在其他实施方案中,亲和标签可以用于纯化,例如含组氨酸的标签、myc标签或链霉亲和素标签。

[0253] 靶向CSF1R的多特异性抗体分子

[0254] 在一方面,本文公开了包含CSF1R结合部分的多特异性抗体分子。在一些实施方案中,CSF1R结合部分包含抗CSF1R抗体分子。示例性抗CSF1R抗体分子序列在WO2009026303A1;WO2011123381A1;WO2016207312A1;WO2016106180A1;US20160220669A1;US20160326254A1;WO2013169264A1;WO2013087699A1;WO2011140249A2;WO2011131407A1;WO2011123381A1;WO2011107553A1;和WO2011070024A1中描述,其全部以其整体通过引用并入本文。在一些实施方案中,CSF1R结合部分包含依米妥珠单抗(emactuzumab)的CDR(例如,一个、两个、三个、四个、五个或全部六个CDR)、VH、VL、重链或轻链序列,或与之基本相同的序列(例如,与之至少95%相同,与之95%至99.9%相同,或者具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代))。在一些实施方案中,CSF1R结合部分包含卡比利珠单抗(cabiralizumab)的CDR(例如,一个、两个、三个、四个、五个或全部六个CDR)、VH、VL、重链或轻链序列,或与之基本相同的序列(例如,与之至少95%相同,与之95%至99.9%相同,或者具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代))。在一些实施方案中,CSF1R结合部分包含AMG820的CDR(例如,一个、两个、三个、四个、五个或全部六个CDR)、VH、VL、重链或轻链序列,或与之基本相同的序列(例如,与之至少95%相同,与之95%至99.9%相同,或者具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代))。在一些实施方案中,CSF1R结合部分包含IMC-CS4的CDR(例如,一个、两个、三个、四个、五个或全部六个CDR)、VH、VL、重链或轻链序列,或与之基本相同的序列(例如,与之至少95%相同,与之95%至99.9%相同,或者具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代))。在一些实施方案中,CSF1R结合部分包含表8中公开的VH或VL氨基酸序列,表8中公开的VH或VL氨基酸序列的CDR或与之基本相同的序列。

[0255] 表8. 示例性抗CSF1R抗体分子序列

[0256]

| SEQ ID NO     | 描述                       | 序列                                                                                                                                    |
|---------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 48 | $\alpha$ mCSF1R VH       | QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSNFMHW<br>IKQQPGNGLEWIGWIYPGDGDTEYNQKFNGKATLTA<br>DKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAVNYGGYVLDAW<br>GQGASVTVSS    |
| SEQ ID NO: 50 | $\alpha$ mCSF1R VL       | EIVLTQSPTTMAASPGEKVTITCRASSSTNYMSWYQQ<br>KSGASPKPWYIYETSKLASGVPDRFSGSGSGTSYSFTIS<br>SMETEDAATYYCHQWSSTPLTFGSGTKLEIK                   |
| SEQ ID NO: 66 | $\alpha$ hCSF1R 依米妥珠单抗VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDISW<br>VRQAPGQGLEWMGVWTDGGTNYAQKLQGRVTMT<br>TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDQRLYFDVW<br>GQGTTVTVSS        |
| SEQ ID NO: 67 | $\alpha$ hCSF1R 依米妥珠单抗VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASEDVNTYVSWY<br>QQKPGKAPKLLIYAASNRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTL<br>TISSLQPEDFATYYCQQSFSYPTFGQGGTKLEIK                  |
| SEQ ID NO: 69 | $\alpha$ hCSF1R 卡比利珠单抗VH | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDNYMI<br>WVRQAPGQGLEWMGDINPYNGGTTFNQKFKGRVTI<br>TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARESPYFSNLY<br>VMDYWGQGTLLTVSS |
| SEQ ID NO: 70 | $\alpha$ hCSF1R 卡比利珠单抗VL | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSVDDYDGDNYM<br>NWYQQKPGQAPRLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTD<br>FTLTISLEPEDFAVYYCHLSNEDLSTFGGGGTKVEIK              |

[0257] 靶向CCR2的多特异性抗体分子

[0258] 在一方面,本文公开了包含CCR2结合部分的多特异性抗体分子。示例性CCR2抗体在本文以及在W02013192596A2;W02010021697A2;W02001057226A1;和W01997031949A1中描述,其全部以其整体通过引用并入本文。在一些实施方案中,CCR2结合部分包含洛扎利珠单抗(plozalizumab)的CDR(例如,一个、两个、三个、四个、五个或全部六个CDR)、VH、VL、重链或轻链序列,或与之基本相同的序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代))。在一些实施方案中,CCR2结合部分包含表9中公开的VH或VL氨基酸序列,表9中公开的VH或VL氨基酸序列的CDR或与之基本相同的序列。

[0259] 表9. 示例性抗CCR2抗体分子序列

| SEQ ID NO            | 描述                      | 序列                                                                                                                                       |
|----------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 44        | $\alpha$ CCR2 MC12 VH   | QVQLQESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTDFSVHWV<br>RQPPGKGLEWMGRIRSEGNTDYN SALKSRLSISRDT S<br>KSQVFLKMNSLQTEDTAIYFCTRGDILGFGYWGQGV<br>MVTVSS        |
| SEQ ID NO: 45        | $\alpha$ CCR2 MC12 VL   | DIVMTQSPLSVSVTPGESASISCRSSKSLHFKGITFV<br>YWYLQKPGQSPQLLIFRMSSSLASGVPDRFSGSGSETD<br>FTLKISRVEAEDVGTYYCGQLLENPYTFGAGTKLELK                 |
| SEQ ID NO: 54        | $\alpha$ hCCR2 洛扎利珠单抗VH | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSAYAMNW<br>VRQAPGKGLEWVGRIRTKNNNYATYYADSVKDRFTI<br>SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTFYGNVW<br>GQGT LVTVSS        |
| [0260] SEQ ID NO: 57 | $\alpha$ hCCR2 洛扎利珠单抗VL | DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSLLDSDGKTF<br>LNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGT<br>DFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTRLE<br>IK            |
| SEQ ID NO: 59        | $\alpha$ hCCR2 D1 VH    | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYHMH<br>WVRQAPGQGLEWMGWINPNSGVTKYAQKFQGRVT<br>MTRDTSINTAYMELSR LRFDDTDVYYCATGGFGYW<br>GEGTLVTVSS           |
| SEQ ID NO: 60        | $\alpha$ hCCR2 D1 VL    | LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGA AW<br>LQQHQGQPPKLLSYRNHNRP SGVSERFSPSRSGDTSS<br>LTITGLQPEDEADYYCLAWDSSLRAFVFGTGTKLTVL                 |
| SEQ ID NO: 62        | $\alpha$ hCCR2 42G7 VH  | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFSSYYMH<br>WVRQAPGQGLEWMGIINPSGGNTSYAQKFQGRVTM<br>TRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCARGGYQLPHG<br>RARAFDMWGQGTMTVTVSS |
| SEQ ID NO: 63        | $\alpha$ hCCR2 42G7 VL  | AIRMTQSPLSLPVT LGQPASISCTSSQSLVYRDGTTYL<br>NWFQQRPGQSPRRLIYKVS NRDSGVPDRFTGSGSGT<br>TFTLTISRVEAEDVGIYYCMQGTHWPLTFGQGTKVEI<br>K           |
| [0261] SEQ ID NO: 64 | $\alpha$ hCCR2 43G12 VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSDYWMSW<br>VRQAPGKGLEWVANIKKDGSVNYYVDSVKGRFTISR<br>DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRFDYWGQGT L<br>VTVSS            |
| SEQ ID NO: 65        | $\alpha$ hCCR2 43G12 VL | QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGA AW<br>LQQHQGHPPKLLFYRNNNRASGISERLSASRSGNTAS<br>LTITGLQPEDEADYYCLTWDSLSVVVFGGGTKLTVL                   |

[0262] 靶向PD-L1的多特异性抗体分子

[0263] 在一方面,本文公开了包含PD-L1结合部分的多特异性抗体分子。在一些实施方案中,PD-L1结合部分包含抗PD-L1抗体分子。示例性抗PD-L1抗体分子序列在W02013079174、W0 2010077634、W02007/005874和US20120039906中描述,其全部以其整体通过引用并入本文。在一些实施方案中,PD-L1结合部分包含度伐鲁单抗(durvalumab)的CDR(例如,一个、两个、三个、四个、五个或全部六个CDR)、VH、VL、重链或轻链序列,或与之基本相同的序列(例如,与之95%至99.9%相同,或者具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个

改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代))。在一些实施方案中,PD-L1结合部分包含阿特利珠单抗(atezolizumab)的CDR(例如,一个、两个、三个、四个、五个或全部六个CDR)、VH、VL、重链或轻链序列,或与之基本相同的序列(例如,与之至少95%相同,与之95%至99.9%相同,或者具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代))。在一些实施方案中,PD-L1结合部分包含阿维鲁单抗(avelumab)的CDR(例如,一个、两个、三个、四个、五个或全部六个CDR)、VH、VL、重链或轻链序列,或与之基本相同的序列(例如,与之至少95%相同,与之95%至99.9%相同,或者具有至少一个氨基酸改变,但不超过五个、十个或十五个改变(例如,取代、缺失或插入,例如保守取代))。在一些实施方案中,PD-L1结合部分包含表10中公开的VH或VL氨基酸序列,表10中公开的VH或VL氨基酸序列的CDR或与之基本相同的序列。

[0264] 表10. 示例性抗PD-L1抗体分子序列

| [0265] | SEQ ID NO      | 描述                      | 序列                                                                                                                         |
|--------|----------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [0266] | SEQ ID NO: 109 | $\alpha$ PD-L1 度伐鲁单抗VH  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTTLTVSS |
|        | SEQ ID NO: 110 | $\alpha$ PD-L1 度伐鲁单抗VL  | EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQKQPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLPWTFGQGTKVEIK             |
|        | SEQ ID NO: 111 | $\alpha$ PD-L1 阿特利珠单抗VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTTLTVSS     |
|        | SEQ ID NO: 112 | $\alpha$ PD-L1 阿特利珠单抗VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQKQPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK                   |
|        | SEQ ID NO: 113 | $\alpha$ PD-L1 阿维鲁单抗VH  | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDDYWGQGTTLTVSS  |
|        | SEQ ID NO: 114 | $\alpha$ PD-L1 阿维鲁单抗VL  | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSTYSSTRVFGTGTGKVTVL                 |

[0267] CDR移植支架

[0268] 在一些实施方案中,抗体分子是CDR移植支架结构域。在一些实施方案中,支架结构域基于纤连蛋白结构域,例如纤连蛋白III型结构域。纤连蛋白III型(Fn3)结构域的总折叠与最小功能性抗体片段即抗体重链的可变区的总折叠密切相关。在Fn3的末端有三个环;BC环、DE环和FG环的位置近似对应于抗体的VH结构域的CDR1、CDR2和CDR3的位置。Fn3不具有二硫键;并因此不同于抗体和它们的片段,Fn3在还原性条件下是稳定的(参见例如W098/56915;W0 01/64942;W0 00/34784)。Fn3结构域可以经修饰(例如使用本文所述的CDR或高变环)或变化,例如以选择结合本文所述的抗原/标志物/细胞的结构域。

[0269] 在一些实施方案中,支架结构域例如折叠结构域基于抗体,例如通过使三个beta链从单克隆抗体的重链可变区缺失来创建的“微型抗体”支架(参见例如Tramontano et al.,1994,J Mol.Recognit.7:9;和Martin et al.,1994,EMBOJ.13:5303-5309)。“微型抗体”可以用于呈现两个高变环。在一些实施方案中,支架结构域是V样结构域(参见例如Coia et al.WO 99/45110)或源于淀粉酶抑制素(tendamistatin)的结构域,所述淀粉酶抑制素是由两个二硫键固持在一起的74残基的六链beta片层夹心(参见例如McConnell and Hoess,1995,J Mol.Biol.250:460)。例如,淀粉酶抑制素的环可以经修饰(例如使用CDR或高变环)或变化,例如以选择结合本文所述的标志物/抗原/细胞的结构域。另一个示例性支架结构域是源于CTLA-4的细胞外结构域的beta夹心结构(参见例如W000/60070)。

[0270] 其他示例性支架结构域包括但不限于T细胞受体;MHC蛋白;细胞外结构域(例如纤连蛋白III型重复序列、EGF重复序列);蛋白酶抑制剂(例如Kunitz结构域、大肠杆菌素(ecotin)、BPTI等);TPR重复序列;三叶结构;锌指结构域;DNA结合蛋白;特别是单体DNA结合蛋白;RNA结合蛋白;酶,例如蛋白酶(特别是失活蛋白酶)、RNA酶;伴侣蛋白,例如硫氧还蛋白和热激蛋白;以及细胞内信号传导结构域(如SH2和SH3结构域)。参见例如US 20040009530和US 7,501,121,通过引用并入本文。

[0271] 在一些实施方案中,支架结构域例如根据以下准则中的一项或多项进行评估和选择:(1)氨基酸序列,(2)若干同源结构域的序列,(3)3维结构,和/或(4)历经一定范围的pH、温度、盐度、有机溶剂、氧化剂浓度的稳定性数据。在一些实施方案中,支架结构域是小的、稳定的蛋白质结构域,例如小于100、70、50、40或30个氨基酸的蛋白质。结构域可以包括一个或多个二硫键或者可以螯合金属例如锌。

[0272] 以下描述本文定义的多功能性分子的示例性结构。示例性结构进一步描述于以下中:Weidle U et al.(2013)The Intriguing Options of Multispecific Antibody Formats for Treatment of Cancer.Cancer Genomics&Proteomics 10:1-18(2013);和 Spiess C et al.(2015)Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies.Molecular Immunology 67:95-106;其每篇的全部内容通过引用并入本文)。

[0273] 异源二聚化抗体分子

[0274] 异源二聚化双特异性抗体基于天然IgG结构,其中两个结合臂识别不同的抗原。使定义的单价(和同时)抗原结合成为可能的IgG来源形式通过强制重链异源二聚化与使轻链错误配对(例如共同轻链)最小化的技术组合来生成。强制重链异源二聚化可以使用例如突出-进入-空穴或链交换工程化结构域(SEED)来获得。

[0275] 突出-进入-空穴

[0276] 如US 5,731,116、US 7,476,724和Ridgway,J.et al.(1996)Prot.Engineering9(7):617-621中所述的突出-进入-空穴广泛涉及:(1)使一个或两个抗体的CH3结构域突变以促进异源二聚化;和(2)在促进异源二聚化的条件下组合突变抗体。“突出”或“隆起”通常通过用较大氨基酸(例如T366Y或T366W)替换亲本抗体中的小氨基酸来创建;“空穴”或“腔”通过用较小氨基酸(例如Y407T、T366S、L368A和/或Y407V)替换亲本抗体中的较大残基来创建,基于Eu编号系统进行编号。

[0277] 链交换工程化结构域(SEED)

[0278] SEED基于IgG1和IgA之间的序列交换以创建优选进行异源二聚化的非相同链。SEED CH3结构域中来自人IgA和IgG的交替序列生成两个不对称但互补的结构域,命名为AG和GA。SEED设计允许高效生成AG/GA异源二聚体,同时不利于AG和GA SEED CH3结构域的同源二聚化。

[0279] 共同轻链和CrossMab

[0280] 轻链错误配对必须得以避免以生成双特异性IgG的同质制剂。一种实现这个目的的方式是通过使用共同轻链原理,即组合共享一个轻链,但仍然具有单独特异性的两个结合剂。另一个选项是CrossMab技术,其通过交换双特异性抗体的一半的Fab中的CH1和CL结构域来避免非特异性L链错误配对。此类交换变体保留结合特异性和亲和力,但使得两个臂如此不同以致L链错误配对得以防止。

[0281] 基于抗体的融合物

[0282] 可以生成含有附接在抗体的N或C末端的另外的结合实体的多种形式。具有单链或二硫键稳定化Fv或Fab的这些融合物导致生成对每个抗原具有二价结合特异性的四价分子。scFv和scFab与IgG的组合使得能够产生可以识别三种或更多种不同抗原的分子。

[0283] 抗体-Fab融合物

[0284] 抗体-Fab融合物是包含针对第一靶标的传统抗体和融合于抗体重链的C末端的针对第二靶标的Fab的双特异性抗体。通常,抗体和Fab将具有共同轻链。抗体融合物可以通过(1)对靶标融合物的DNA序列进行工程化改造,以及(2)将靶标DNA转染至合适的宿主细胞中以表达融合蛋白来产生。似乎抗体-scFv融合物可以在CH3结构域的C末端和scFv的N末端之间由(Gly)-Ser接头进行连接,如由Coloma,J.et al.(1997)Nature Biotech 15:159所述。

[0285] 抗体-scFv融合物

[0286] 抗体-scFv融合物是包含传统抗体和融合于抗体重链的C末端的具有独特特异性的scFv的双特异性抗体。scFv可以直接或通过接头肽,通过scFv的重链与C末端融合。抗体融合物可以通过(1)对靶标融合物的DNA序列进行工程化改造,以及(2)将靶标DNA转染至合适的宿主细胞中以表达融合蛋白来产生。似乎抗体-scFv融合物可以在CH3结构域的C末端和scFv的N末端之间由(Gly)-Ser接头进行连接,如由Coloma,J.et al.(1997)Nature Biotech 15:159所述。

[0287] 可变结构域免疫球蛋白DVD

[0288] 一种相关形式是双可变结构域免疫球蛋白(DVD),其由通过较短接头序列放置在V结构域的N末端的具有第二特异性的VH和VL结构域组成。

[0289] 含Fc实体(小型抗体)

[0290] 含Fc实体,也称为小型抗体,可以通过将scFv与具有不同特异性的抗体的恒定重区结构域3的C末端(CH3-scFv)和/或与铰链区(scFv-铰链-Fc)融合来生成。也可以制备具有与IgG的CH3结构域的C末端融合的二硫键稳定化可变区(不具有肽接头)的三价实体。

[0291] 无Fc双特异性物

[0292] 无Fc双特异性物的特征在于通常具有比含Fc的实体更小的尺寸。该类的常见双特异性物包括Fab-scFv2和Fab-scFv分子。该类还包括例如BiTE(双特异性T细胞衔接物)、二价抗体、TandAb(四价串联抗体)和DART(双亲和力重靶向分子)。BiTE通过经由柔性接头肽融合两个scFv而创建。二价抗体由来自两个不同抗体的两个VH和两个VL结构域组成。通过

将结构域与短接头肽附接来实现仅与另一条链上的互补结构域相互作用,其容许仅与VH和VL结构域配对。连接于第二结合剂的VL的第一结合剂的VH与连接于第一抗体的VL的第二抗体的VH共表达。TandAb分子通过蛋白质的功能性二聚化生成,所述蛋白质由在防止分子内配对的方向中的四个抗体可变H链和L链组成。DART是通过二硫键稳定化的实体,其应用与二价抗体的设计概念类似的设计概念。Kappa/Lambda形式

[0293] 包括lambda轻链多肽和kappa轻链多肽的多特异性分子(例如多特异性抗体分子)可以用于允许异源二聚化。用于生成包含lambda轻链多肽和kappa轻链多肽的双特异性抗体分子的方法公开于2017年9月22日提交的PCT/US2017/53053中,以其整体通过引用并入本文。

[0294] 在一些实施方案中,多特异性分子包括多特异性抗体分子,例如包含两种结合特异性的抗体分子,例如双特异性抗体分子。多特异性抗体分子包括:

[0295] 对第一表位具有特异性的lambda轻链多肽1(LLCP1);

[0296] 对第一表位具有特异性的重链多肽1(HCP1);

[0297] 对第二表位具有特异性的kappa轻链多肽2(KLCP2);和

[0298] 对第二表位具有特异性的重链多肽2(HCP2)。

[0299] 如该术语在本文中所用,“Lambda轻链多肽1(LLCP1)”是指包含足够的轻链(LC)序列的多肽,使得当与同源重链可变区组合时可以介导与其表位的特异性结合和与HCP1的复合。在一个实施方案中,它包含CH1区的全部或片段。在一个实施方案中,LLCP1包含LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4和CH1,或来自其的足够的序列以介导其表位的特异性结合和与HCP1的复合。LLCP1连同它的HCP1提供了对于第一表位的特异性(而KLCP2连同它的HCP2提供了对于第二表位的特异性)。如在本文中其他地方所述,LLCP对HCP1比对HCP2具有更高的亲和力。

[0300] 如该术语在本文中所用,“Kappa轻链多肽2(KLCP2)”是指包含足够的轻链(LC)序列的多肽,使得当与同源重链可变区组合时可以介导与其表位的特异性结合和与HCP2的复合。在一个实施方案中,它包含CH1区的全部或片段。在一个实施方案中,KLCP2包含LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4和CH1,或来自其的足够的序列以介导其表位的特异性结合和与HCP2的复合。KLCP2连同它的HCP2提供了对于第二表位的特异性(而LLCP1连同它的HCP1提供了对于第一表位的特异性)。

[0301] 如该术语在本文中所用,“重链多肽1(HCP1)”是指包含足够的重链(HC)序列例如HC可变区序列的多肽,使得当与同源重链LLCP1组合时可以介导与其表位的特异性结合和与HCP1的复合。在一个实施方案中,它包含CH1区的全部或片段。在一个实施方案中,它包含CH2和/或CH3区的全部或片段。在一个实施方案中,HCP1包含HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4、CH1、CH2和CH3或来自其的足够的序列以:(i)介导它的表位的特异性结合和与LLCP1的复合,(ii)与KLCP2相对比,如本文所述优先与LLCP1复合;和(iii)与HCP1的另一个分子相对比,如本文所述优先与HCP2复合。HCP1连同它的LLCP1提供了对于第一表位的特异性(而KLCP2连同它的HCP2提供了对于第二表位的特异性)。

[0302] 如该术语在本文中所用,“重链多肽2(HCP2)”是指包含足够的重链(HC)序列例如HC可变区序列的多肽,使得当与同源重链LLCP1组合时可以介导与其表位的特异性结合和与HCP1的复合。在一个实施方案中,它包含CH1区的全部或片段。在一个实施方案中,它包含

CH2和/或CH3区的全部或片段。在一个实施方案中，HCP1包含HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4、CH1、CH2和CH3或来自其的足够的序列以：(i) 介导它的表位的特异性结合和与KLCP2的复合，(ii) 与LLCP1相对比，如本文所述优先与KLCP2复合；和(iii) 与HCP2的另一个分子相对比，如本文所述优先与HCP1复合。HCP2连同它的KLCP2提供了对于第二表位的特异性(而LLCP1连同它的HCP1提供了对于第一表位的特异性)。

[0303] 在本文公开的多特异性抗体分子的一些实施方案中：

[0304] LLCP1对HCP1比对HCP2具有更高的亲和力；和/或

[0305] KLCP2对HCP2比对HCP1具有更高的亲和力。

[0306] 在一些实施方案中，LLCP1对HCP1的亲和力比其对HCP2的亲和力足够更大，使得在预选条件下，例如在例如处于pH 7的水性缓冲液中，在例如处于pH 7的盐水中，或在生理条件下存在时：至少75%、80、90、95、98、99、99.5或99.9%的多特异性抗体分子具有与HCP1复合或接合的LLCP1。

[0307] 在本文公开的多特异性抗体分子的一些实施方案中：

[0308] HCP1对HCP2比对HCP1的第二分子具有更大的亲和力；和/或

[0309] HCP2对HCP1比对HCP2的第二分子具有更大的亲和力。

[0310] 在一些实施方案中，HCP1对HCP2的亲和力比其对HCP1的第二分子的亲和力足够更大，使得在预选条件下，例如在例如处于pH 7的水性缓冲液中，在例如处于pH 7的盐水中，或在生理条件下存在时：至少75%、80、90、95、98、99、99.5或99.9%的多特异性抗体分子具有与HCP2复合或接合的HCP1。

[0311] 在另一方面，本文公开了用于制备或产生多特异性抗体分子的方法。该方法包括：在(i) - (iv) 缔合的条件下，

[0312] (i) 提供第一重链多肽(例如包含以下的一个、两个、三个或全部的重链多肽：第一重链可变区(第一VH)、第一CH1、第一重链恒定区(例如第一CH2、第一CH3或两者))；

[0313] (ii) 提供第二重链多肽(例如包含以下的一个、两个、三个或全部的重链多肽：第二重链可变区(第二VH)、第二CH1、第二重链恒定区(例如第二CH2、第二CH3或两者))；

[0314] (iii) 提供lambda链多肽(例如lambda轻可变区(VL $\lambda$ )、lambda轻恒定链(VL $\lambda$ )或两者)，其优选与第一重链多肽(例如第一VH)缔合；和

[0315] (iv) 提供kappa链多肽(例如lambda轻可变区(VL $\kappa$ )、lambda轻恒定链(VL $\kappa$ )或两者)，其优选与第二重链多肽(例如第二VH)缔合。

[0316] 在一些实施方案中，第一和第二重链多肽形成增强异源二聚化的Fc界面。

[0317] 在一些实施方案中，将(i) - (iv) (例如编码(i) - (iv)的核酸)引入到单个细胞，例如单个哺乳动物细胞，例如CHO细胞中。在一些实施方案中，(i) - (iv)在细胞中表达。

[0318] 在一些实施方案中，将(i) - (iv) (例如编码(i) - (iv)的核酸)引入到不同的细胞，例如不同的哺乳动物细胞，例如两个或更多个CHO细胞中。在一些实施方案中，(i) - (iv)在细胞中表达。

[0319] 在一个实施方案中，方法进一步包括纯化细胞表达的抗体分子，例如使用lambda-和/或-kappa-特异性纯化，例如亲和色谱法。

[0320] 在一些实施方案中，方法进一步包括评估细胞表达的多特异性抗体分子。例如，经纯化的细胞表达的多特异性抗体分子可以通过本领域中已知的技术(包括质谱法)进行分

析。在一个实施方案中,经纯化的细胞表达的抗体分子被切割,例如用木瓜蛋白酶消化以产出Fab部分,并且使用质谱法进行评估。

[0321] 在一些实施方案中,方法以高产量产生正确配对的kappa/lambda多特异性例如双特异性抗体分子,例如至少75%、80、90、95、98、99、99.5或99.9%。

[0322] 在其他实施方案中,多特异性例如双特异性抗体分子包括:

[0323] (i) 第一重链多肽(HCP1)(例如包含以下的一个、两个、三个或全部的重链多肽:第一重链可变区(第一VH)、第一CH1、第一重链恒定区(例如第一CH2、第一CH3或两者)),例如其中HCP1结合第一表位;

[0324] (ii) 第二重链多肽(HCP2)(例如包含以下的一个、两个、三个或全部的重链多肽:第二重链可变区(第二VH)、第二CH1、第二重链恒定区(例如第二CH2、第二CH3或两者)),例如其中HCP2结合第二表位;

[0325] (iii) lambda轻链多肽(LLCP1)(例如lambda轻可变区(VL $\lambda$ )、lambda轻恒定链(VL $\lambda$ )或两者),其优选与第一重链多肽(例如第一VH)缔合,例如其中LLCP1结合第一表位;和

[0326] (iv) kappa轻链多肽(KLCP2)(例如lambda轻可变区(VL $\kappa$ )、lambda轻恒定链(VL $\kappa$ )或两者),其优选与第二重链多肽(例如第二VH)缔合,例如其中KLCP2结合第二表位。

[0327] 在一些实施方案中,第一和第二重链多肽形成增强异源二聚化的Fc界面。在一些实施方案中,多特异性抗体分子具有第一结合特异性,其包括与连接于Fc恒定,CH2-CH3结构域的第一重链可变区异源二聚化的杂合VL1-CL1(具有突出修饰)和第二结合特异性,其包括与连接于Fc恒定,CH2-CH3结构域的第二重链可变区异源二聚化的杂合VL $\kappa$ -CL $\kappa$ (具有空穴修饰)

[0328] 包含非连续多肽的多特异性分子

[0329] 在一个实施方案中,多特异性分子不是单一多肽链。

[0330] 在一个实施方案中,抗体分子包括两条完整重链和两条完整轻链。在一个实施方案中,具有至少两条或至少三条非连续多肽链的多特异性分子在至少两条非连续多肽链中包括例如如本文所述的第一和第二重链恒定区(例如第一和第二Fc区)。

[0331] 在实施方案中,多特异性分子是双特异性分子或双功能性分子,其中第一和第二多肽(i)和(ii)是非连续的,例如是两条单独的多肽链。在一些实施方案中,第一和第二多肽(i)和(ii)在例如人IgG1的Fc区的选自以下的一个或多个的位置处包括配对的氨基酸取代:347、349、350、351、366、368、370、392、394、395、397、398、399、405、407或409,基于Eu编号系统进行编号。例如,第一重链恒定区(例如第一Fc区)可以包括选自以下的氨基酸取代:T366S、L368A或Y407V(例如对应于腔或空穴),并且第二重链恒定区(例如第二Fc区)包括T366W(例如对应于隆起或突出),基于Eu编号系统进行编号。在一些实施方案中,第一和第二多肽是异源二聚第一和第二Fc区的第一和第二成员。

[0332] 在一些实施方案中,第一多肽从N至C具有以下构型:

[0333] (a) 结合第一抗原(例如CSF1R)的第一抗原结构域的第一部分(例如Fab分子的第一VH-CH1),与第一重链恒定区(例如与CH3区连接的CH2)(例如第一Fc区)(任选地经由接头)连接;(b) 结合第二抗原(例如CCR2或CXCR2)的第二抗原结构域的第一部分(例如Fab分子的第二VH-CH1),与第二重链恒定区(例如与CH3区连接的CH2)(例如第一Fc区)(任选地经由接头)连接;(c) 第三多肽从N至C具有以下构型:第一抗原结构域的第二部分(例如Fab的

第一VL-CL),其中VL是kappa亚型并且与第一抗原(例如CSF1R)(例如,第一VH-CH1所结合的相同的抗原)结合;(d)第四多肽从N至C具有以下构型:第二抗原结构域的第二部分(例如Fab的第二VL-CL),其中VL是lambda亚型并且与第二抗原(例如癌抗原,例如CCR2或CXCR2)(例如,第二VH-CH1所结合的相同的抗原)结合。

[0334] 在一些实施方案中,第一重链恒定区(例如第一CH2-CH3区)包括例如如本文所述的隆起或突出。在实施方案中,第二重链恒定区(例如第二CH2-CH3区)包括腔或空穴。在一些实施方案中,第一和第二重链恒定区促进双特异性分子的异源二聚化。

[0335] 核酸

[0336] 本发明的特征也在于包含编码如本文所述的抗体分子的重和轻链可变区以及CDR或高变环的核苷酸序列的核酸。例如,本发明的特征在于分别编码选自本文公开的抗体分子的一种或多种的抗体分子的重和轻链可变区的第一和第二核酸。核酸可以包含如本文表格中阐述的核苷酸序列,或与之基本相同的序列(例如,与之至少约85%、90%、95%、99%或更相同的序列,或与本文表格中所示的序列相差不超过3、6、15、30或45个核苷酸的序列)。

[0337] 在某些实施方案中,核酸可以包含编码来自具有如本文表格中阐述的氨基酸序列的重链可变区的至少一个、两个或三个CDR或高变环的核苷酸序列,或与之基本同源的序列(例如,与之至少约85%、90%、95%、99%或更相同,和/或具有一个或多个取代例如保守取代的序列)。在其他实施方案中,核酸可以包含编码来自具有如本文表格中阐述的氨基酸序列的轻链可变区的至少一个、两个或三个CDR或高变环的核苷酸序列,或与之基本同源的序列(例如,与之至少约85%、90%、95%、99%或更相同,和/或具有一个或多个取代例如保守取代的序列)。在另一个实施方案中,核酸可以包含编码来自具有如本文表格中阐述的氨基酸序列的重和轻链可变区的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR或高变环的核苷酸序列,或与之基本同源的序列(例如,与之至少约85%、90%、95%、99%或更相同,和/或具有一个或多个取代例如保守取代的序列)。

[0338] 在某些实施方案中,核酸可以包含编码来自具有如本文表格中阐述的核苷酸序列的重链可变区的至少一个、两个或三个CDR或高变环的核苷酸序列,与之基本同源的序列(例如,与之至少约85%、90%、95%、99%或更相同,和/或能够在本文所述的严格性条件下杂交的序列)。在另一个实施方案中,核酸可以包含编码来自具有如本文表格中阐述的核苷酸序列的轻链可变区的至少一个、两个或三个CDR或高变环的核苷酸序列,或与之基本同源的序列(例如,与之至少约85%、90%、95%、99%或更相同,和/或能够在本文所述的严格性条件下杂交的序列)。在另一个实施方案中,核酸可以包含编码来自具有如本文表格中阐述的核苷酸序列的重和轻链可变区的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR或高变环的核苷酸序列,或与之基本同源的序列(例如,与之至少约85%、90%、95%、99%或更相同,和/或能够在本文所述的严格性条件下杂交的序列)。

[0339] 在另一方面,本申请的特征在于含有本文所述的核酸的宿主细胞和载体。核酸可以存在于在相同宿主细胞或单独宿主细胞中存在的单一载体或单独载体中,如下文更详细描述。

[0340] 载体

[0341] 本文进一步提供了包含编码本文所述的抗体分子的核苷酸序列的载体。在一个实

施方案中,载体包含编码本文所述的抗体分子的核苷酸。在一个实施方案中,载体包含本文所述的核苷酸序列。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、lambda噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。

[0342] 可以采用许多载体系统。例如,一个类别的载体利用源于动物病毒如例如牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录病毒(劳斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)、MMTV或MOMLV)或SV40病毒的DNA元件。另一类别的载体利用源于RNA病毒如塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)、东部马脑炎病毒(Eastern Equine Encephalitis virus)和黄病毒(Flavivirus)的RNA元件。

[0343] 另外,可以通过引入一种或多种允许对经转染的宿主细胞进行选择的标志物来选择已将DNA稳定整合至它们的染色体中的细胞。标志物可以提供例如营养缺陷宿主的原养(protoptropy)、杀生物剂抗性(例如抗生素)、或对重金属如铜的抗性等。可选择标志物基因可以直接连接于待表达的DNA序列,或者通过共转化来引入到相同的细胞中。另外的元件也可以为mRNA的最优合成所需。这些元件可以包括剪接信号以及转录启动子、增强子和终止信号。

[0344] 一旦已制备用于表达的含有构建体的表达载体或DNA序列,表达载体可以转染或引入到适当宿主细胞中。可以采用各种技术以实现这个目的,如例如原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒转导、病毒转染、基因枪、基于脂质的转染或其他常规技术。在原生质体融合的情况下,细胞在培养基中生长,并且针对适当活性加以筛选。

[0345] 用于培养所得的经转染细胞以及用于回收产生的抗体分子的方法和条件是本领域技术人员已知的,并且可以基于本发明描述,根据所采用的特定表达载体和哺乳动物宿主细胞而加以变化或优化。

[0346] 细胞

[0347] 在另一方面,本申请的特征在于含有本文所述的核酸的宿主细胞和载体。核酸可以存在于在相同宿主细胞或单独宿主细胞中存在的单一载体或单独载体中。宿主细胞可以是真核细胞例如哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞,或原核细胞例如大肠杆菌。例如,哺乳动物细胞可以是培养的细胞或细胞系。示例性哺乳动物细胞包括淋巴细胞性细胞系(例如NS0)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、COS细胞、卵母细胞和来自转基因动物的细胞,例如乳腺上皮细胞。

[0348] 本发明还提供了包含编码如本文所述的抗体分子的核酸的宿主细胞。

[0349] 在一个实施方案中,宿主细胞经遗传工程化改造以包含编码抗体分子的核酸。

[0350] 在一个实施方案中,宿主细胞通过使用表达盒得以经遗传工程化改造。短语“表达盒”是指如下核苷酸序列,其能够影响基因在可与此类序列相容的宿主中的表达。此类盒可以包括启动子、具有或不具有内含子的开放阅读框以及终止信号。也可使用必需的或有助于实现表达的另外的因子,如例如诱导型启动子。

[0351] 本发明还提供了包含本文所述的载体的宿主细胞。

[0352] 细胞可以是但不限于真核细胞、细菌细胞、昆虫细胞或人细胞。合适的真核细胞包括但不限于Vero细胞、HeLa细胞、COS细胞、CHO细胞、HEK293细胞、BHK细胞和MDCKII细胞。合适的昆虫细胞包括但不限于Sf9细胞。

[0353] 用途和组合疗法

[0354] 本文所述的多特异性分子(单独或者与第二疗法或第二治疗剂组合)可以用于治疗过度增生性疾病、癌症或纤维化病症。

[0355] 癌症

[0356] 本文所述的方法包括通过使用本文所述的多特异性分子,例如使用本文所述的药物组合物来治疗受试者中的癌症。还提供了用于减轻或改善受试者中癌症的症状的方法,以及用于抑制癌症的生长和/或杀伤一个或多个癌细胞的方法。在一些实施方案中,在用本文所述的或本文所述的药物组合物施用的受试者中,本文所述的方法降低肿瘤的尺寸和/或降低癌细胞的数目。

[0357] 在一些实施方案中,癌症是血液学癌症。在一些实施方案中,血液学癌症是白血病或淋巴瘤。如本文所用,“血液学癌症”是指造血或淋巴组织的肿瘤,例如影响血液、骨髓或淋巴结的肿瘤。示例性血液学恶性肿瘤包括但不限于白血病(例如急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、急性髓样白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性骨髓源性白血病(CML)、毛细胞白血病、急性单核细胞性白血病(AMoL)、慢性髓单核细胞性白血病(CMML)、青少年髓单核细胞性白血病(JMML)或大颗粒淋巴细胞性白血病)、淋巴瘤(例如AIDS相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(例如经典霍奇金淋巴瘤或结节性淋巴细胞优势型霍奇金淋巴瘤)、蕈样真菌病、非霍奇金淋巴瘤(例如B细胞非霍奇金淋巴瘤(例如伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤(CLL/SLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞性淋巴瘤或套细胞淋巴瘤)或T细胞非霍奇金淋巴瘤(蕈样真菌病、间变性大细胞淋巴瘤或前体T淋巴母细胞性淋巴瘤))、原发性中枢神经系统淋巴瘤、Sézary综合征、瓦氏巨球蛋白血症)、慢性骨髓增生性赘生物、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、多发性骨髓瘤/浆细胞赘生物、骨髓发育异常综合征或骨髓发育异常性/骨髓增生性赘生物。

[0358] 在一些实施方案中,癌症是实体癌症。示例性实体癌症包括但不限于卵巢癌、直肠癌、胃癌、睾丸癌、肛区癌症、子宫癌、结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌、食道癌、黑素瘤、卡波西氏肉瘤、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、表皮样癌、宫颈鳞状细胞癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、软组织肉瘤、尿道癌、外阴癌、阴茎癌、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、脊椎轴肿瘤、中枢神经系统(CNS)赘生物、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、所述癌症的转移性病变或其组合。

[0359] 在某些实施方案中,癌症是上皮,间充质或血液学恶性肿瘤。在某些实施方案中,治疗的癌症是实体瘤(例如类癌、癌或肉瘤)、软组织肿瘤(例如血红素恶性肿瘤)和转移性病变,例如本文公开的任何癌症的转移性病变。在一个实施方案中,治疗的癌症是纤维化或促结缔组织增生性实体瘤,例如具有以下一项或多项的肿瘤:受限的肿瘤灌注、压缩的血管、纤维化肿瘤间质或增加的间质液压力。在一个实施方案中,实体瘤选自以下的一种或多种:胰腺癌(例如,胰腺腺癌或胰管腺癌)、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、肺癌(例如,小细胞肺癌(SCLC)或非小细胞肺癌(NSCLC))、皮肤癌、卵巢癌、肝癌、食道癌、子宫内膜癌、胃癌、头部和颈部癌、肾癌或前列腺癌。

[0360] 癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体实例如下所示并且包括:鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、肺癌

(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃 (gastric) 或胃 (stomach) 癌 (包括胃肠癌)、胰腺癌、胶质母细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾 (kidney) 或肾 (renal) 癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌以及头部和颈部癌。术语“癌症”包括原发性恶性细胞或肿瘤 (例如, 其细胞未迁移至受试者体内除原始恶性肿瘤或肿瘤的部位以外的部位的那些) 和继发性恶性细胞或肿瘤 (例如, 由于转移, 恶性细胞或肿瘤细胞迁移至与原始肿瘤部位不同的继发性部位而引起的那些)。

[0361] 癌症或恶性肿瘤的其他实例包括但不限于: 急性儿童淋巴母细胞性白血病、急性淋巴母细胞白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓样白血病、肾上腺皮质癌、成人 (原发性) 肝细胞癌、成人 (原发性) 肝癌、成人急性淋巴细胞性白血病、成人急性髓样白血病、成人霍奇金病、成人霍奇金淋巴瘤、成人淋巴细胞性白血病、成人非霍奇金淋巴瘤、成人原发性肝癌、成人软组织肉瘤、AIDS 相关淋巴瘤、AIDS 相关恶性肿瘤、肛门癌、星形细胞瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑干神经胶质瘤、脑肿瘤、乳腺癌、肾盂和输尿管癌、中枢神经系统 (原发性) 淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤、宫颈癌、儿童 (原发性) 肝细胞癌、儿童 (原发性) 肝癌、儿童急性淋巴母细胞性白血病、儿童急性髓样白血病、儿童脑干神经胶质瘤、儿童小脑星形细胞瘤、儿童脑星形细胞瘤、儿童颅外生殖细胞肿瘤、儿童霍奇金病、儿童霍奇金淋巴瘤、儿童下丘脑和视觉通路神经胶质瘤、儿童淋巴母细胞性白血病、儿童髓母细胞瘤、儿童非霍奇金淋巴瘤、儿童松果体和幕上原始神经外胚层肿瘤、儿童原发性肝癌、儿童横纹肌肉瘤、儿童软组织肉瘤、儿童视觉通路和下丘脑神经胶质瘤、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓源性白血病、结肠癌、皮肤 T 细胞性淋巴瘤、内分泌胰岛细胞癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、上皮癌、食道癌、尤因氏肉瘤及相关肿瘤、外分泌胰腺癌、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌、女性乳腺癌、高雪氏病、胆囊癌、胃癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠肿瘤、生殖细胞肿瘤、妊娠滋养细胞肿瘤、毛细胞白血病、头部和颈部癌、肝细胞癌、霍奇金病、霍奇金淋巴瘤、高丙种球蛋白血症、下咽癌、肠癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、胰岛细胞胰腺癌、卡波西氏肉瘤、肾癌、喉癌、唇和口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴增生性疾病、巨球蛋白血症、男性乳腺癌、恶性间皮瘤、恶性胸腺瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、间皮瘤、转移性隐匿性原发鳞状颈癌、转移性原发鳞状颈癌、转移性鳞状颈癌、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤/浆细胞赘生物、骨髓发育异常综合征、骨髓源性白血病、髓样白血病、骨髓增生性疾病、鼻腔和鼻旁鼻窦、鼻咽癌、神经母细胞瘤、怀孕期间非霍奇金淋巴瘤、非黑色素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、隐匿性原发性转移性鳞状颈癌、口咽癌、骨/恶性纤维肉瘤、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低恶性潜在肿瘤、胰腺癌、副蛋白血症、紫癜、甲状旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、浆细胞赘生物/多发性骨髓瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性肝癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂和输尿管癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、结节病肉瘤、Sezary 综合征、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状颈癌、胃癌、幕上原始神经外胚层和松果体肿瘤、T 细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺瘤、甲状腺癌、肾盂和输尿管的移行性细胞癌, 移行性肾盂和输尿管癌、滋养细胞肿瘤、输尿管和肾盂细胞癌、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视觉通路和下丘脑神经胶质瘤、外阴癌、瓦氏巨球蛋白血症、威尔姆斯肿瘤以及除瘤变外的任何其他位于上列器官系统中的过度增生性疾病。

[0362] 在其他实施方案中,如上所述和本文所述的多特异性分子用于治疗过度增生性病症,例如过度增生性结缔组织疾病(例如过度增生性纤维化疾病)。在一个实施方案中,过度增生性纤维化疾病是多系统性的或器官特异性的。示例性过度增生性纤维化疾病包括但不限于多系统性(例如,系统性硬化症、多灶性纤维硬化、骨髓移植接受者中的硬皮移植物抗宿主病、肾源性系统性纤维化、硬皮病)和器官特异性病症(例如,眼、肺、肝、心脏、肾、胰腺、皮肤和其他器官的纤维化)。在其他实施方案中,病症选自肝硬化或结核。在其他实施方案中,病症是麻风病。

[0363] 在一些实施方案中,以适合于待治疗或预防的疾病的方式施用多特异性分子(或药物组合物)。施用的量和频率将由如患者的状况以及患者的疾病的类型和严重性的因素决定。适当剂量可以通过临床试验确定。例如,当指示“有效量”或“治疗量”时,药物组合物(或多特异性分子)的待施用的精确量可以由医师在考虑在受试者的肿瘤尺寸、感染或转移程度、年龄、重量和状况的个体差异的情况下确定。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以以 $10^4$ 至 $10^9$ 个细胞/kg体重,例如 $10^5$ 至 $10^6$ 个细胞/kg体重的剂量施用,包括那些范围内的所有整数值。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以以这些剂量多次施用。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以使用免疫疗法中所述的输注技术来施用(参见例如Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988)。

[0364] 在一些实施方案中,以胃肠外方式向受试者施用多特异性分子或药物组合物。在一些实施方案中,以静脉内、皮下、肿瘤内、结节内、肌肉内、真皮内或腹膜内方式向受试者施用细胞。在一些实施方案中,直接向肿瘤或淋巴结中施用例如注射细胞。在一些实施方案中,将细胞以输注(例如如Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988中所述)或静脉内推注的形式施用。在一些实施方案中,将细胞以可注射储库制剂(depot formulation)形式施用。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,受试者是人、猴、猪、狗、猫、母牛、绵羊、山羊、兔、大鼠或小鼠。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者是儿科受试者,例如小于18岁,例如小于17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1岁或更小。在一些实施方案中,受试者是成人,例如至少18岁,例如至少19、20、21、22、23、24、25、25-30、30-35、35-40、40-50、50-60、60-70、70-80或80-90岁。

[0365] 肝状况或病症

[0366] 本发明还提供了使用本文所述的多特异性分子或药物组合物治疗肝状况或病症的方法。

[0367] 如本文所用,“肝病疗法”是指用于治疗或预防本文所述的肝病症的疗法或治疗剂,并因此涵盖肝癌疗法和其他肝病症疗法,例如,纤维化肝病症、脂肪肝病、肝炎症病症、自身免疫性肝病以及遗传疾病、酗酒、药物毒性、感染或损伤诱发的肝病症的疗法。

[0368] 肝癌的实例包括:肝细胞癌(HCC)、原发性肝细胞癌、肝细胞瘤、纤维板层状癌、局灶性结节性增生、胆管肉瘤、肝内胆管癌、血管肉瘤(angiosarcoma)或血管肉瘤(hemangiosarcoma)、肝腺瘤、肝血管瘤、肝癌错构瘤、肝母细胞瘤、婴幼儿血管内皮细胞瘤、肝混合肿瘤、间充质组织肿瘤、肝肉瘤。可能转移到肝的癌症包括:乳腺癌、结直肠癌、食道癌、肾癌(kidney cancer)或肾癌(renal cancer)、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、直肠癌、皮肤癌(例如黑色素瘤)、胃癌(gastric cancer)或胃癌(stomach cancer)(包括胃肠癌)和子宫癌。

[0369] 在一个实施方案中,肝病是影响肝的功能或生理的纤维化病症或结缔组织病症。在一个实施方案中,纤维化病症或结缔组织病症可以是系统性的(影响整个身体)、多器官的或器官特异性的(例如肝特异性)。纤维化肝病症的例子包括肝纤维化(liver fibrosis)(hepatic fibrosis)、肝硬化和与细胞外基质蛋白(例如胶原)在肝中累积相关的任何病症、肝瘢痕和/或异常肝脉管系统。肝纤维化由肝炎症或损害引起,其触发了细胞外基质蛋白(包括胶原和疤痕组织)的累积。肝硬化是肝纤维化的末期,涉及再生结节(作为修复过程的结果),并伴有肝脉管系统的变形。肝纤维化病症最常见是由慢性病毒感染(例如,乙型肝炎、丙型肝炎)、酗酒和脂肪肝病引起的。

[0370] 脂肪肝病的实例包括脂肪肝(或FLD)、酒精性肝病、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、酒精性脂肪性肝炎、单纯性脂肪变性、Reye综合征和与脂质异常滞留在肝细胞中相关的任何病症。

[0371] 在一个实施方案中,肝病是NASH。

[0372] 代谢性病症也可以影响肝并引起肝损害。肝或影响肝的代谢性病症的实例包括血色素沉着症、糖尿病、肥胖症、高血压、血脂异常、半乳糖血症或糖原贮积病。

[0373] 肝或影响肝的自身免疫性疾病可以包括系统性病症或主要影响除肝以外的器官,但对肝细胞或肝功能具有继发作用的病症。此类自身免疫性病症的实例包括自身免疫性肝炎(AIH)、自身免疫性肝病、狼疮样肝炎、系统性红斑狼疮、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、硬皮病或系统性硬化症

[0374] 纤维化状况或病症

[0375] 在另一方面,本发明的特征在于治疗或预防受试者中纤维化状况或病症的方法。方法包括以足以降低或抑制受试者中纤维化状况的量,将多特异性分子作为单一药剂或与另一药剂或治疗模式组合地施用于有此需要的受试者。

[0376] 在某些实施方案中,减少纤维化或治疗纤维化状况的包括减少或抑制以下一项或多项:组织纤维化的形成或沉积;减少大小、细胞构成(例如成纤维细胞或免疫细胞数)、组成;或纤维化病变的细胞含量;减少纤维化病变的胶原或羟脯氨酸含量;降低纤维发生蛋白的表达或活性;减少与炎症反应相关的纤维化;减少与纤维化相关的体重减轻;或增加生存率。

[0377] 在某些实施方案中,纤维化状况是原发性纤维化。在一个实施方案中,纤维化状况是特发性的。在其他实施方案中,纤维化状况与疾病(例如传染性疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病、恶性或癌性疾病和/或结缔性疾病)相关(例如继发于);毒素;损伤(insult)(例如环境危害(例如石棉、煤尘、多环芳烃)、吸烟、伤口);医学治疗(例如手术切口、化学疗法或放射)或其组合。

[0378] 在某些实施方案中,纤维化状况是肺的纤维化状况。在某些实施方案中,肺的纤维化状况选自以下的一种或多种:肺纤维化、特发性肺纤维化(IPF)、普通间质性肺炎(UIP)、间质性肺病、隐源性纤维化性肺泡炎(CFA)、支气管扩张和硬皮病肺病。在一个实施方案中,肺的纤维化继发于疾病、毒素、损伤、医学治疗或其组合。例如,肺的纤维化可以与以下的一种或多种相关(例如继发于):疾病过程如石棉肺和矽肺;职业危害;环境污染物;吸烟;自身免疫性结缔组织病症(例如类风湿关节炎、硬皮病和系统性红斑狼疮(SLE));结缔组织病症如结节病;传染性疾病,例如感染,尤其是慢性感染;医学治疗,包括但不限于放射疗法和药

物疗法,例如化学疗法(例如用博来霉素、甲氨蝶呤、胺碘酮、白消安和/或呋喃妥因治疗)。在一个实施方案中,用本发明的方法治疗的肺的纤维化状况与癌症治疗相关(例如继发于),例如癌症的治疗(例如用博来霉素治疗鳞状细胞癌、睾丸癌、霍奇金病)。在一个实施方案中,肺的纤维化状况与自身免疫性结缔组织病症(例如硬皮病或狼疮,例如SLE)相关。

[0379] 肺纤维化可以在疾病过程如石棉肺和矽肺中作为继发效应发生,并且已知在某些职业中更为普遍,例如煤矿工人、轮船工人和喷砂机工,在这些职业中暴露于环境污染物是一种职业危害(Green,FH et al. (2007) *Toxicol Pathol.* 35:136-47)。助于肺纤维化的其他因素包括吸烟和自身免疫性结缔组织病症,例如类风湿关节炎、硬皮病和系统性红斑狼疮(SLE) (Leslie,KO et al. (2007) *Semin Respir Crit Care Med.* 28:369-78;Swigris,JJ et al. (2008) *Chest.* 133:271-80;和Antoniou,KM et al. (2008) *Curr Opin Rheumatol.* 20:686-91)。其他结缔组织病症(如结节病)可以包括肺纤维化作为该疾病的一部分(Paramothayan,S et al. (2008) *Respir Med.* 102:1-9),并且肺的传染性疾病作为感染(尤其是慢性感染)的长期后果可以导致纤维化。

[0380] 肺纤维化也可以是某些医学治疗的副作用,尤其是对胸部进行的放射疗法以及某些药物如博来霉素、甲氨蝶呤、胺碘酮、白消安和呋喃妥因(Catane,R et al. (1979) *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 5:1513-8;Zisman,DA et al. (2001) *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 18:243-52;Rakita,L et al. (1983) *Am Heart J.* 106:906-16;Twohig,KJ et al. (1990) *ClinChest Med.* 11:31-54;和Witten CM. (1989) *Arch Phys Med Rehabil.* 70:55-7)。在其他实施方案中,特发性肺纤维化可以发生在无法确定明确的病因或疾病的情况下。遗传因素在肺纤维化的这些情况中可以起重要作用(Steele,MP et al. (2007) *Respiration* 74:601-8;Brass,DM et al. (2007) *Proc Am Thorac Soc.* 4:92-100和du Bois RM. (2006) *Semin Respir Crit Care Med.* 27:581-8)。

[0381] 在其他实施方案中,肺纤维化包括但不限于与以下相关的肺纤维化:慢性阻塞性肺病(COPD)、急性呼吸窘迫综合征、硬皮病、胸膜纤维化、慢性哮喘、急性肺综合征、淀粉样变性、支气管肺发育不良、卡普兰氏病、德勒综合征、组织细胞增生症X、特发性肺含铁血黄素沉着症、淋巴管肌瘤病、二尖瓣狭窄、多肌炎、肺水肿、肺动脉高压(例如,特发性肺动脉高压(IPH))、尘肺、放射疗法(例如,放射诱发的纤维化)、类风湿病、Shaver病、系统性红斑狼疮、系统性硬化症、热带性肺嗜酸性粒细胞增多症、结节性硬化症、Weber-Christian病、韦格纳肉芽肿病、威普尔氏病或暴露于毒素或刺激物(例如药物,如胺碘酮、博来霉素、白消安、卡莫司汀、氯霉素、六甲胺、甲氨蝶呤、美西麦角(methysergide)、丝裂霉素C、呋喃妥因、青霉素,培洛霉素和心得宁(practolol);吸入滑石粉或粉尘(例如煤粉、二氧化硅)。在某些实施方案中,肺纤维化与肺的炎性病症例如哮喘和/或COPD相关。

[0382] 在某些实施方案中,纤维化状况是肝的纤维化状况。在某些实施方案中,肝的纤维化状况选自以下的一种或多种:脂肪肝病、脂肪变性(例如非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、胆汁淤积性肝病(例如原发性胆汁性肝硬化(PBC))、肝硬化、酒精诱发的肝纤维化、胆管损伤、胆汁纤维化或胆管病变。在其他实施方案中,肝(hepatic)或肝(liver)纤维化包括但不限于与以下相关的肝纤维化:酗酒、病毒感染例如肝炎(例如丙型肝炎、乙型肝炎或丁型肝炎)、自身免疫性肝炎、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、进行性大规模纤维化、暴露于毒素或刺激物(例如酒精、药物和环境毒素)。在本文提供的标题为“肝状况或病症”的小节中提供了

肝状况和病症的另外的实例。

[0383] 在某些实施方案中,纤维化状况是肾的纤维化状况。在某些实施方案中,肾的纤维化状况选自以下的一种或多种:肾纤维化(例如,慢性肾脏纤维化)、与损伤/纤维化相关的肾病变(例如,与糖尿病相关的慢性肾病变(例如,糖尿病性肾病变))、狼疮、肾硬皮病、肾小球肾炎、局灶节段性肾小球硬化症、IgA肾病变、与人慢性肾病(CKD)相关的肾纤维化、慢性进行性肾病变(CPN)、肾小管间质纤维化、输尿管阻塞、慢性尿毒症、慢性间质性肾炎、放射性肾病变、肾小球硬化症、进行性肾小球肾病(PGN)、内皮/血栓性微血管病变损伤、HIV相关肾病变或与暴露于毒素、刺激物或化学治疗剂相关的纤维化。在一个实施方案中,肾的纤维化状况是肾的硬皮病。在一些实施方案中,肾的纤维化状况是移植肾病变、糖尿病性肾病变、狼疮性肾炎、局灶节段性肾小球硬化症(FSGS)、内皮/血栓性微血管病变损伤、肾的硬皮病、HIV相关肾病变(HIVAN)或暴露于毒素、刺激物、化学治疗剂。

[0384] 在某些实施方案中,纤维化状况是骨髓或造血组织的纤维化状况。在某些实施方案中,骨髓的纤维化状况是骨髓的慢性骨髓增生性赘生物的固有特征,例如原发性骨髓纤维化(在本文中也称为原因不明性髓样化生或慢性特发性骨髓纤维化)。在其他实施方案中,骨髓纤维化与恶性状况或由克隆性增生性疾病引起的状况相关(例如继发于)。在其他实施方案中,骨髓纤维化与血液学病症(例如选自以下的一种或多种的血液学病症:真性红细胞增多症、自发性血小板增多症、骨髓发育异常、毛细胞白血病、淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤)、多发性骨髓瘤或慢性骨髓源性白血病(CML))相关。在其他实施方案中,骨髓纤维化与非血液学病症(例如选自以下的非血液学病症:转移至骨髓的实体瘤非、自身免疫性病症(例如系统性红斑狼疮、硬皮病、混合性结缔组织病症或多肌炎)、感染(例如结核或麻风病)或与维生素D缺乏症相关的继发性甲状旁腺功能亢进症)相关(例如,继发于)。在一些实施方案中,纤维化状况是特发性或药物诱发的骨髓纤维化。在一些实施方案中,骨髓或造血组织的纤维化状况与系统性红斑狼疮或硬皮病相关。

[0385] 在其他实施方案中,纤维化状况与麻风病或结核相关。

[0386] 在某些实施方案中,纤维化状况是骨髓的纤维化状况。在某些实施方案中,骨髓的纤维化状况是骨髓纤维化(例如原发性骨髓纤维化(PMF))、髓样化生、慢性特发性骨髓纤维化或原发性骨髓纤维化。在其他实施方案中,骨髓纤维化与选自毛细胞白血病、淋巴瘤或多发性骨髓瘤的一种或多种的血液学病症相关。

[0387] 在其他实施方案中,骨髓纤维化与一种或多种选自以下的骨髓增生性赘生物(MPN)相关:自发性血小板增多症(ET)、真性红细胞增多症(PV)、肥大细胞增多症、慢性嗜酸性粒细胞白血病、慢性嗜中性粒细胞白血病或其他MPN。

[0388] 在一个实施方案中,纤维化病是原发性骨髓纤维化。原发性骨髓纤维化(PMF)(在文献中也称为特发性髓样化生和原因不明性髓样化生)是专能造血祖细胞的克隆性病症(综述于Abdel-Wahab, O. et al. (2009) Annu. Rev. Med. 60:233-45; Varicchio, L. et al. (2009) Expert Rev. Hematol. 2(3):315-334; Agrawal, M. et al. (2010) Cancer 1-15中)。

[0389] 在某些实施方案中,纤维化状况是心脏的纤维化状况。在某些实施方案中,心脏的纤维化状况是心肌纤维化(例如,与以下相关的心肌纤维化:放射性心肌炎、手术规程并发症(例如心肌术后纤维化)、传染性疾病(例如,查加斯病、细菌性、旋毛虫病或真菌性心肌炎);肉芽肿性、代谢性贮积病症(例如心肌病变、血色素沉着症);发育病症(例如心内膜纤

维弹性增生症)；动脉硬化或暴露于毒素或刺激物(例如药物诱发的心肌病变、药物诱发的心脏毒性、酒精性心肌病变、钴中毒或暴露)。在某些实施方案中，心肌纤维化与心脏组织的炎性病症(例如，心肌结节病)相关。在一些实施方案中，纤维化状况是与心肌梗塞相关的纤维化状况。在一些实施方案中，纤维化状况是与充血性心力衰竭相关的纤维化状况。

[0390] 在一些实施方案中，纤维化状况与选自硬皮病或狼疮的自身免疫性疾病相关，例如系统性红斑狼疮。

[0391] 在一些实施方案中，纤维化状况是系统性的。在一些实施方案中，纤维化状况是系统性硬化症(例如，局限性系统性硬化症、弥漫性系统性硬化症或无皮肤表现的系统性硬化症(systemic sclerosis sine scleroderma))、肾源性系统性纤维化、囊性纤维化、慢性移植抗宿主病或动脉粥样硬化。

[0392] 在一些实施方案中，纤维化状况是硬皮病。在一些实施方案中，硬皮病是局部的，例如硬斑病(morphea)或线性硬皮病。在一些实施方案中，状况是系统性硬化症，例如，局限性系统性硬化症、弥漫性系统性硬化症或无皮肤表现的系统性硬化症。

[0393] 在其他实施方案中，纤维化状况影响选自以下的一种或多种的组织：肌肉、肌腱、软骨、皮肤(例如，皮肤表皮或内皮)、心脏组织、血管组织(例如，动脉、静脉)、胰腺组织、肺组织、肝组织、肾组织、子宫组织、卵巢组织、神经组织、睾丸组织、腹膜组织、结肠、小肠、胆道、肠、骨髓、造血组织或眼(例如视网膜)组织。

[0394] 在一些实施方案中，纤维化状况是眼的纤维化状况。在一些实施方案中，纤维化状况是青光眼、黄斑变性(例如年龄相关性黄斑变性)、黄斑水肿(例如糖尿病性黄斑水肿)、视网膜病变(例如糖尿病性视网膜病变)或干眼病。

[0395] 在某些实施方案中，纤维化状况是皮肤的纤维化状况。在某些实施方案中，皮肤的纤维化状况选自以下的一种或多种：皮肤纤维化(例如肥厚性瘢痕、瘢痕疙瘩)、硬皮病、肾源性系统性纤维化(例如，严重肾衰竭患者暴露于钆(通常用作MRI的对比物质)之后的后果)和瘢痕疙瘩。

[0396] 在某些实施方案中，纤维化状况是胃肠道的纤维化状况。在某些实施方案中，纤维化状况选自以下的一种或多种：与硬皮病相关的纤维化；放射诱发的肠纤维化；与前肠炎性病症(如巴雷特食管和慢性胃炎)相关的纤维化和/或与后肠炎性病症(如炎症肠病(IBD)、溃疡性结肠炎和克罗恩病)相关的纤维化。在一些实施方案中，胃肠道的纤维化状况是与硬皮病相关的纤维化。

[0397] 在一个实施方案中，纤维化状况是慢性纤维化状况或病症。在某些实施方案中，纤维化状况与炎性状况或病症相关。

[0398] 在一些实施方案中，纤维化和/或炎性状况是骨髓炎，例如慢性骨髓炎。

[0399] 在一些实施方案中，纤维化状况是淀粉样变性。在某些实施方案中，淀粉样变性与慢性骨髓炎相关。

[0400] 在一些实施方案中，本文所述的一种或多种组合物与一种或多种其他治疗剂组合施用。示例性治疗剂包括但不限于抗纤维蛋白(anti-fibrotics)、皮质类固醇、抗炎药、免疫抑制剂、化学治疗剂、抗代谢物和免疫调节剂。

[0401] 与用于治疗肝纤维化的组合物组合使用的合适治疗剂的实例包括但不限于阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil)，坎地沙坦(candesartan)，秋水仙素，组合的ATG、麦考酚酸

酯 (mycophenolate mofetil) 和他克莫司 (tacrolimus), 组合的环孢素微乳剂 (cyclosporine microemulsion) 和他克莫司, 弹性测定法 (elastometry), 依维莫司 (everolimus), FG-3019, 扶正化癥, GI262570, 甘草甜素 (甘草酸单铵盐、甘氨酸、L-半胱氨酸一盐酸盐), 干扰素 gamma-1b, 厄贝沙坦 (irbesartan), 氯沙坦 (losartan), 奥替普拉 (oltipraz), 0RALIMPACT®, 聚乙二醇化干扰素 alpha-2a, 组合的聚乙二醇化干扰素 alpha-2a 和利巴韦林 (ribavirin), 聚乙二醇化干扰素 alpha-2b (SCH 54031), 组合的聚乙二醇化干扰素 alpha-2b 和利巴韦林, 吡喹酮 (praziquantel), 哌唑嗪 (prazosin), 雷特格韦 (raltegravir), 利巴韦林 (REBETOL®, SCH 18908), 利托那韦 (ritonavir) 加强蛋白酶抑制剂, pentoxyphilline, 他克莫司, 牛磺去氧胆酸 (tauroursodeoxycholic acid), 生育酚, 熊去氧胆酸 (ursodiol), 华法林 (warfarin) 及其组合。

[0402] 组合疗法

[0403] 本文公开的多特异性分子可以与第二治疗剂或规程组合使用。

[0404] 在一些实施方案中, 多特异性分子和第二治疗剂或规程在受试者已诊断患有癌症之后, 例如在癌症已从受试者消除之前施用/进行。在一些实施方案中, 多特异性分子和第二治疗剂或规程同时或并行施用/进行。例如, 当开始递送第二治疗时, 一种治疗的递送仍然在发生, 例如在治疗的施用方面存在重叠。在其他实施方案中, 多特异性分子和第二治疗剂或规程依序施用/进行。例如, 在开始递送另一治疗之前, 一种治疗的递送停止。

[0405] 在一些实施方案中, 组合疗法可以引起比具有单独任一药剂的单一疗法更有效的治疗。在一些实施方案中, 第一和第二治疗的组合比单独第一或第二治疗更加有效 (例如引起症状和/或癌细胞更大减少)。在一些实施方案中, 与在作为单一疗法施用实现相似的效果所通常需要的第一或第二治疗的剂量相比, 组合疗法容许使用较低剂量的第一或第二治疗。在一些实施方案中, 组合疗法具有部分累加作用、完全累加作用或大于累加作用。

[0406] 在一个实施方案中, 多特异性分子与疗法例如癌症疗法 (例如抗癌剂、免疫疗法、光动力疗法 (PDT)、手术和/或放射的一种或多种) 组合施用。术语“化学治疗”、“化学治疗剂”和“抗癌剂”在本文中可互换使用。多特异性分子和疗法例如癌症疗法的施用可以是依序的 (具有或不具有重叠) 或同时的。在疗法 (例如癌症疗法) 的过程期间, 多特异性分子的施用可以是连续的或间歇的。本文所述的某些疗法可以用于治疗癌症和非癌性疾病。例如, 使用本文所述的方法和组合物, 可以增强在癌性和非癌性状况 (例如结核) 中的 PDT 功效 (综述于例如 Agostinis, P. et al. (2011) CA Cancer J. Clin. 61:250-281 中)。

[0407] 抗癌疗法

[0408] 在其他实施方案中, 多特异性分子与低或小分子量化学治疗剂组合施用。示例性低或小分子量化学治疗剂包括但不限于 13-顺式-视黄酸 (异维甲酸 (isotretinoin), ACCUTANE®)、2-CdA (2-氯脱氧腺苷, 克拉屈滨 (cladribine), LEUSTATIN™)、5-阿扎胞苷 (5-azacitidine) (阿扎胞苷, VIDAZA®)、5-氟尿嘧啶 (5-FU, 氟尿嘧啶, ADRUCIL®)、6-巯基嘌呤 (6-MP, 巯基嘌呤, PURINETHOL®)、6-TG (6-巯鸟嘌呤, 巯鸟嘌呤, THIIOGUANINE TABLOID®)、凯素 (abraxane) (蛋白质结合型紫杉醇 (paclitaxel protein-bound))、放线菌素-D (actinomycin-D) (更生霉素 (dactinomycin), COSMEGEN®)、阿利维甲酸

(alitretinoin) (PANRETIN®)、全反式视黄酸(ATRA, 维甲酸(tretinoin), VESANOID®)、六甲蜜胺(altretamine) (六甲基三聚氰胺, HMM, HEXALEN®)、氨甲蝶呤(amethopterin) (甲氨蝶呤(methotrexate), 甲氨蝶呤钠, MTX, TREXALL™, RHEUMATREX®)、阿米福汀(amifostine) (ETHYOL®)、阿糖胞嘧啶(arabinosylcytosine) (Ara-C, 阿糖胞苷(cytarabine), CYTOSAR-U®)、三氧化二砷(TRISENOX®)、天冬酰胺酶(欧文氏菌(Erwinia) L-天冬酰胺酶, L-天冬酰胺酶, ELSPAR®, KIDROLASE®)、BCNU(卡莫司汀(carmustine), BiCNU®)、苯达莫司汀(bendamustine) (TREANDA®)、蓓萨罗丁(bexarotene) (TARGRETIN®)、博来霉素(bleomycin) (BLENOXANE®)、白消安(busulfan) (BUSULFEX®, MYLERAN®)、甲酰四氢叶酸钙(calcium leucovorin) (嗜橙菌因子(Citrovorum Factor), 亚叶酸, 甲酰四氢叶酸)、喜树碱-11(camptothecin-11) (CPT-11, 伊立替康(irinotecan), CAMPTOSAR®)、卡培他滨(capecitabine) (XELODA®)、卡铂(carboplatin) (PARAPLATIN®)、卡莫司汀(carmustine) 糯米纸囊剂(具有卡莫司汀植入物的prolifeprospan 20, GLIADEL®糯米纸囊剂)、CCI-779(坦罗莫司(temsirolimus), TORISEL®)、CCNU(洛莫司汀(lomustine), CeeNU)、CDDP(顺铂(cisplatin), PLATINOL®, PLATINOL-AQ®)、苯丁酸氮芥(chlorambucil) (瘤克宁(leukeran))、环磷酰胺(cyclophosphamide) (CYTOXAN®, NEOSAR®)、达卡巴嗪(dacarbazine) (DIC, DTIC, 咪唑甲酰胺, DTIC-DOME®)、道诺霉素(daunomycin) (柔红霉素(daunorubicin), 盐酸柔红霉素, 盐酸红比霉素(rubidomycinhydrochloride), CERUBIDINE®)、地西他滨(decitabine) (DACOGEN®)、右雷佐生(dexrazoxane) (ZINECARD®)、DHAD(米托蒽醌(mitoxantrone), NOVANTRONE®)、多西他赛(docetaxel) (TAXOTERE®)、多柔比星(doxorubicin) (ADRIAMYCIN®, RUBEX®)、表柔比星(epirubicin) (ELLENCE™)、雌氮芥(estramustine) (EMCYT®)、依托泊苷(etoposide) (VP-16, 磷酸依托泊苷, TOPOSAR®, VEPESID®, ETOPOPHOS®)、氟尿苷(floxuridine) (FUDR®)、氟达拉滨(fludarabine) (FLUDARA®)、氟尿嘧啶(乳膏剂) (CARAC™, EFUDEX®, FLUOROPLEX®)、吉西他滨(gemcitabine) (GEMZAR®)、羟基脲(HYDREA®, DROXIA™, MYLOCEL™)、伊达比星(idarubicin) (IDAMYCIN®)、异环磷酰胺(ifosfamide) (IFEX®)、伊沙匹隆(ixabepilone) (IXEMPRA™)、LCR(新长春碱(leurocristine), 长春新碱(vincristine), VCR, ONCOVIN®, VINCASAR PFS®)、L-PAM(L-溶肉瘤素(L-sarcolysin), 美法仑(melphalan), 苯丙胺酸氮芥, ALKERAN®)、二氯甲基二乙胺(盐酸二氯甲基二乙胺, 氮芥(mustine), 氮芥(nitrogen mustard), MUSTARGEN®)、美斯纳(mesna) (MESNEX™)、丝裂霉素(mitomycin) (丝裂霉素-C, MTC, MUTAMYCIN®)、奈拉滨(nelarabine) (ARRANON®)、奥沙利铂(oxaliplatin) (ELOXATIN™)、紫杉醇(paclitaxel)

(**TAXOL®**, ONXAL™)、培加帕酶 (pegaspargase) (PEG-L-天冬酰胺酶, **ONCOSPAR®**)、培美曲塞 (PEMETREXED) (**ALIMTA®**)、喷司他汀 (pentostatin) (**NIPENT®**)、丙卡巴肼 (procarbazine) (**MATULANE®**)、链脲霉素 (streptozocin) (**ZANOSAR®**)、替莫唑胺 (temozolomide) (**TEMODAR®**)、替尼泊苷 (teniposide) (VM-26, **VUMON®**)、TESPA (硫代磷酰胺, 噻替派 (thiotepa), TSPA, **THIOPLEX®**)、拓扑替康 (topotecan) (**HYCAMTIN®**)、长春花碱 (vinblastine) (硫酸长春花碱, 长春碱 (vincal leukoblastine), VLB, **ALKABAN-AQ®**, **VELBAN®**)、长春瑞滨 (vinorelbine) (酒石酸长春瑞滨, **NAVELBINE®**) 和伏立诺他 (vorinostat) (**ZOLINZA®**)。

[0409] 在另一个实施方案中, 多特异性分子与生物制剂联合施用。可用于治疗癌症的生物制剂在本领域中是已知的, 并且本发明的结合分子可以例如与此类已知生物制剂联合施用。例如, FDA已批准以下生物制剂用于治疗乳腺癌: **HERCEPTIN®** (曲妥珠单抗 (trastuzumab), Genentech Inc., South San Francisco, Calif.; 在HER2阳性乳腺癌中具有抗肿瘤活性的人源化单克隆抗体); **FASLODEX®** (氟维司群 (fulvestrant), AstraZeneca Pharmaceuticals, LP, Wilmington, Del.; 用于治疗乳腺癌的雌激素受体拮抗剂); **ARIMIDEX®** (阿那曲唑 (anastrozole), AstraZeneca Pharmaceuticals, LP; 阻断芳香酶 (制备雌激素需要的酶) 的非类固醇芳香酶抑制剂); **Aromasin®** (依西美坦 (exemestane), Pfizer Inc., New York, N.Y.; 用于治疗乳腺癌的不可逆的类固醇芳香酶失活剂); **FEMARA®** (来曲唑 (letrozole), Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, N.J.; 由FDA批准用以治疗乳腺癌的非类固醇芳香酶抑制剂); 和 **NOLVADEX®** (他莫昔芬 (tamoxifen), AstraZeneca Pharmaceuticals, LP; 由FDA批准用以治疗乳腺癌的非类固醇抗雌激素剂)。本发明的结合分子可以与其组合的其他生物制剂包括: **AVASTIN®** (贝伐单抗 (bevacizumab), Genentech Inc.; 首个FDA批准的设计以抑制血管生成的疗法); 和 **ZEVALIN®** (替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan), Biogen Idec, Cambridge, Mass.; 当前批准用于治疗B细胞淋巴瘤的经放射性标记单克隆抗体)。

[0410] 此外, FDA已批准以下生物制剂用于治疗结直肠癌: **AVASTIN®**; **ERBITUX®** (西妥昔单抗 (cetuximab), ImClone Systems Inc., New York, N.Y., 和 Bristol-Myers Squibb, New York, N.Y.; 是针对表皮生长因子受体 (EGFR) 的单克隆抗体); **GLEEVEC®** (甲磺酸伊马替尼 (imatinib mesylate); 蛋白质激酶抑制剂); 和 **ERGAMISOL®** (盐酸左旋咪唑 (levamisole hydrochloride), Janssen Pharmaceutica Products, LP, Titusville, N.J.; 由FDA在1990年批准作为在患有杜克斯氏C期结肠癌 (Dukes' Stage C colon cancer) 的患者中进行手术切除之后与5-氟尿嘧啶组合的辅助治疗的免疫调节剂)。

[0411] 对于治疗肺癌, 示例性生物制剂包括 **TARCEVA®** (盐酸埃罗替尼 (erlotinib HCL), OSI Pharmaceuticals Inc., Melville, N.Y.; 设计以靶向人表皮生长因子受体1 (HER1) 途径的小分子)。

[0412] 对于治疗多发性骨髓瘤, 示例性生物制剂包括 **VELCADE®** 万珂 (Velcade) (硼

替佐米(bortezomib),Millennium Pharmaceuticals,Cambridge Mass.;蛋白酶体抑制剂)。另外的生物制剂包括**THALIDOMID®**(沙利度胺(thalidomide),Clegene Corporation,Warren,N.J.;免疫调节剂,并且似乎具有多种作用,包括抑制骨髓瘤细胞的生长和存活以及抗血管生成的能力)。

[0413] 另外的示例性癌症治疗性抗体包括但不限于3F8、阿巴伏单抗(abagovomab)、阿德木单抗(adeatumumab)、阿夫土株单抗(afutuzumab)、聚乙二醇阿赛珠单抗(alacizumab pegol)、阿来珠单抗(alemtuzumab) (**CAMPATH®**, **MABCAMPATH®**)、喷替酸阿妥莫单抗(altumomab pentetate) (**HYBRI-CEAKER®**)、麻安莫单抗(anatumomab mafenatox)、安芦珠单抗(anrukinzumab) (IMA-638)、阿泊珠单抗(apolizumab)、阿西莫单抗(arcitumomab) (**CEA-SCAN®**)、巴维昔单抗(bavituximab)、贝妥莫单抗(bectumomab) (**LYMPHOSCAN®**)、贝利木单抗(belimumab) (**BENLYSTA®**, **LYMPHOSTAT-B®**)、贝索单抗(besilesomab) (**SCINTIMUN®**)、贝伐单抗(**AVASTIN®**)、莫坦辛比伐单抗(bivatuzumab mertansine)、博纳吐单抗(blinatumomab)、维多汀布妥昔单抗(brentuximab vedotin)、莫坦辛坎妥珠单抗(cantuzumab mertansine)、喷地肽卡罗单抗(capromab pendetide) (**PROSTASCINT®**)、卡妥索单抗(catumaxomab) (**REMOVAB®**)、CC49、西妥昔单抗(cetuximab) (C225, **ERBITUX®**)、泊西他珠单抗(citatumumab bogatox)、西妥木单抗(cixutumumab)、特曲西坦克利维珠单抗(clivatuzumab tetraxetan)、可那木单抗(conatumumab)、达西珠单抗(dacetuzumab)、地诺单抗(denosumab) (**PROLIA®**)、地莫单抗(detumomab)、伊美昔单抗(ecromeximab)、依决洛单抗(edrecolomab) (**PANOREX®**)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)、西伊匹莫单抗(epitumomab cituxetan)、依帕珠单抗(epratuzumab)、厄妥玛索单抗(ertumaxomab) (**REXOMUN®**)、埃达珠单抗(etaracizumab)、法妥珠单抗(farletuzumab)、芬妥木单抗(figitumumab)、夫苏木单抗(fresolimumab)、加利昔单抗(galiximab)、奥佐米星吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin) (**MYLOTARG®**)、吉瑞昔单抗(girentuximab)、维多汀格勒巴木单抗(glembatumumab vedotin)、异贝莫单抗(ibritumomab) (替伊莫单抗, **ZEVALIN®**)、伊戈伏单抗(igovomab) (**INDIMACIS-125®**)、应妥木单抗(intetumumab)、奥佐米星伊珠单抗(inotuzumab ozogamicin)、伊匹单抗(ipilimumab)、伊妥木单抗(iratumumab)、拉贝珠单抗(labetuzumab) (**CEA-CIDE®**)、来沙木单抗(lexatumumab)、林妥珠单抗(lintuzumab)、鲁卡木单抗(lucatumumab)、鲁西单抗(lumiliximab)、马帕木单抗(mapatumumab)、马妥珠单抗(matuzumab)、米拉珠单抗(milatuzumab)、明瑞莫单抗(minretumomab)、米妥莫单抗(mitumomab)、他托-那考罗单抗(nacolumab tafenatox)、埃托-那普妥莫单抗(naptumomab estafenatox)、奈西妥木单抗(necitumumab)、尼妥珠单抗(nimotuzumab) (**THERACIM®**, **THERALOC®**)、疏诺莫单抗(nofetumomab merpentan) (**VERLUMA®**)、奥法珠单抗(ofatumumab) (**ARZERRA®**)、奥拉单抗

(olaratumab)、莫奥珠单抗(oportuzumab monatox)、奥戈伏单抗(oregovomab) (OVAREX®)、帕尼单抗(panitumumab) (VECTIBIX®)、佩姆莫单抗(pemtumomab) (THERAGYN®)、帕妥珠单抗(pertuzumab) (OMNITARG®)、平妥单抗(pintumomab)、普立木单抗(pritumumab)、雷莫芦单抗(ramucirumab)、雷珠单抗(ranibizumab) (LUCENTIS®)、利妥木单抗(rilotumumab)、利妥昔单抗(rituximab) (MABTHERA®, RITUXAN®)、罗妥木单抗(robatumumab)、喷地肽沙妥莫单抗(satumomab pendetide)、西罗珠单抗(sibrotuzumab)、司妥昔单抗(siltuximab)、松妥珠单抗(sontuzumab)、特曲西坦塔卡珠单抗(tacatuzumab tetraxetan) (AFP-CIDE®)、帕托-他利妥莫单抗(taplitumomab paptox)、替妥莫单抗(tenatumomab)、TGN1412、替西木单抗(ticilimumab) (曲美木单抗(tremelimumab))、替加珠单抗(tigatuzumab)、TNX-650、托西莫单抗(tositumomab) (BEXXAR®)、曲妥珠单抗(trastuzumab) (HERCEPTIN®)、曲美木单抗、西莫白介素-2-妥考妥珠单抗(tucotuzumab celmoleukin)、维妥珠单抗(veltuzumab)、伏洛昔单抗(volociximab)、伏妥莫单抗(votumumab) (HUMASPECT®)、扎鲁木单抗(zalutumumab) (HUMAX-EGFR®)和扎木单抗(zanolimumab) (HUMAX-CD4®)。

[0414] 在其他实施方案中,多特异性分子与病毒性癌症治疗剂组合施用。示例性病毒性癌症治疗剂包括但不限于牛痘病毒(vvDD-CDSR)、表达癌胚抗原的麻疹病毒、重组牛痘病毒(TK缺失加GM-CSF)、西尼卡谷病毒-001(Seneca Valley virus-001)、新城病毒(Newcastle virus)、柯萨奇病毒A21(coxsackie virus A21)、GL-ONC1、EBNA1C末端/LMP2表达嵌合蛋白的重组经修饰安卡拉牛痘(vaccinia Ankara)疫苗、表达癌胚抗原的麻疹病毒、G207溶瘤性病毒、表达p53的经修饰安卡拉牛痘病毒疫苗、OncoVEX GM-CSF经修饰单纯疱疹病毒1、鸡痘病毒疫苗载体、重组牛痘前列腺特异性抗原疫苗、人乳头瘤病毒16/18L1病毒样粒子/AS04疫苗、MVA-EBNA1/LMP2Inj.疫苗、四价HPV疫苗、四价人乳头瘤病毒(6、11、16、18型)重组疫苗(GARDASIL®)、重组鸡痘-CEA(6D)/TRICOM疫苗;重组牛痘-CEA(6D)-TRICOM疫苗、重组经修饰安卡拉牛痘-5T4疫苗、重组鸡痘-TRICOM疫苗、溶瘤性疱疹病毒NV1020、HPV L1VLP疫苗V504、人乳头瘤病毒二价(16和18型)疫苗(CERVARIX®)、单纯疱疹病毒HF10、Ad5CMV-p53基因、重组牛痘DF3/MUC1疫苗、重组牛痘-MUC-1疫苗、重组牛痘-TRICOM疫苗、ALVAC MART-1疫苗、表达人前脑啡肽原(NP2)的复制缺陷性单纯疱疹病毒I型(HSV-1)载体、野生型呼肠孤病毒、呼肠孤病毒3型Dearing(REOLYSIN®)、溶瘤性病毒HSV1716、编码EB病毒(Epstein-Barr virus)靶标抗原的基于经重组修饰的安卡拉牛痘(MVA)的疫苗、重组鸡痘-前列腺特异性抗原疫苗、重组牛痘前列腺特异性抗原疫苗、重组牛痘-B7.1疫苗、rAd-p53基因、Ad5-delta24RGD、HPV疫苗580299、JX-594(胸苷激酶经缺失牛痘病毒加GM-CSF)、HPV-16/18L1/AS04、鸡痘病毒疫苗载体、牛痘-酪氨酸酶疫苗、MEDI-517HPV-16/18VLP AS04疫苗、含有单纯疱疹病毒的胸苷激酶的腺病毒载体TK99UN、HspE7、FP253/氟达拉滨、ALVAC(2)黑色素瘤多抗原治疗性疫苗、ALVAC-hB7.1、金丝雀痘-hIL-12黑色素瘤疫苗、Ad-REIC/Dkk-3、rAd-IFN SCH 721015、TIL-Ad-IFNg、Ad-ISF35和柯萨奇病毒A21(CVA21, CAVATAK®)。

[0415] 在其他实施方案中,多特异性分子与纳米药物组合施用。示例性癌症纳米药物包括但不限于 **ABRAXANE®** (紫杉醇结合的白蛋白纳米粒子)、CRLX101 (缀合于基于环糊精的线性聚合物的CPT)、CRLX288 (多西他赛缀合于可生物降解聚合物聚(乳酸-共-乙醇酸))、阿糖胞苷脂质体(脂质体Ara-C, DEPOCYT™)、柔红霉素脂质体(**DAUNOXOME®**)、多柔比星脂质体(**DOXIL®**, **CAELYX®**)、囊封柠檬酸柔红霉素脂质体(**DAUNOXOME®**)和PEG抗VEGF适体(**MACUGEN®**)。

[0416] 在一些实施方案中,多特异性分子与紫杉醇或紫杉醇制剂例如**TAXOL®**、蛋白质结合的紫杉醇(例如**ABRAXANE®**)组合施用。示例性紫杉醇制剂包括但不限于纳米粒子白蛋白结合的紫杉醇(**ABRAXANE®**,由Abraxis Bioscience销售)、二十二碳六烯酸结合的紫杉醇(DHA-紫杉醇,泰索瑞辛(Taxoprexin),由Protarga销售)、聚谷氨酸结合的紫杉醇(PG-紫杉醇,聚谷氨酸紫杉醇(paclitaxel poliglumex),CT-2103,XYOTAX,由Cell Therapeutic销售)、肿瘤活化的前药(TAP)、ANG105(血管肽素-2结合于三个分子的紫杉醇,由ImmunoGen销售)、紫杉醇-EC-1(结合于erbB2识别肽EC-1的紫杉醇;参见Li et al., Biopolymers (2007) 87:225-230)和葡萄糖缀合的紫杉醇(例如2'-紫杉醇甲基2-葡萄糖基吡喃糖基琥珀酸酯,参见Liu et al., Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters (2007) 17:617-620)。

[0417] 用于治疗癌症的示例性RNAi和反义RNA药剂包括但不限于CALAA-01、siG12D LODER(Local Drug EluteR)和ALN-VSP02。

[0418] 其他癌症治疗剂包括但不限于细胞因子(例如阿地白介素(aldesleukin) (IL-2, 白介素-2, **PROLEUKIN®**)、alpha干扰素 (IFN-alpha, 干扰素alpha, **INTRON® A** (干扰素alpha-2b)、**ROFERON-A®** (干扰素alpha-2a))、阿法依伯汀(Epoetin alfa) (**PROCRIT®**)、非格司亭(filgrastim) (G-CSF, 粒细胞集落刺激因子, **NEUPOGEN®**)、GM-CSF (粒细胞巨噬细胞集落刺激因子, 沙格司亭(sargramostim), **LEUKINE™**)、IL-11 (白介素-11, 奥普瑞白介素(oprelvekin), **NEUMEGA®**)、干扰素alpha-2b (PEG缀合物) (PEG干扰素, PEG-**INTRON™**) 和培非格司亭(pegfilgrastim) (**NEULASTA™**))、激素疗法药剂(例如胺鲁米特(aminoglutethimide) (**CYTADREN®**)、阿那曲唑(anastrozole) (**ARIMIDEX®**)、比卡鲁胺(bicalutamide) (**CASODEX®**)、依西美坦(exemestane) (**AROMASIN®**)、氟羟甲睾酮(flouxymesterone) (**HALOTESTIN®**)、氟他胺(flutamide) (**EULEXIN®**)、氟维司群(fulvestrant) (**FASLODEX®**)、戈舍瑞林(goserelin) (**ZOLADEX®**)、来曲唑(letrozole) (**FEMARA®**)、亮脯利特(leuprolide) (**ELIGARD™**, **LUPRON®**, **LUPRON DEPOT®**, **VIADUR™**)、甲地孕酮(megestrol) (乙酸甲地孕酮, **MEGACE®**)、尼鲁米特(nilutamide) (**ANANDRON®**, **NILANDRON®**)、奥曲肽(octreotide) (乙酸奥曲肽, **SANDOSTATIN®**, **SANDOSTATINLAR®**)、雷洛昔芬(raloxifene) (**EVISTA®**)、罗米司亭(romiplostim) (**NPLATE®**)、他莫昔芬(tamoxifen) (**NOVALDEX®**)和托瑞米

芬 (toremifene) (**FARESTON®**)、磷酸脂酶A2抑制剂 (例如阿那格雷 (anagrelide) (**AGRYLIN®**))、生物反应调节剂 (例如BCG (**THERACYS®**, **TICE®**) 和阿法达贝泊汀 (Darbepoetin alfa) (**ARANESP®**))、靶向疗法药剂 (例如硼替佐米 (bortezomib) (**VELCADE®**))、达沙替尼 (dasatinib) (**SPRYCEL™**)、地尼白介素-2 (denileukin diftitox) (**ONTAK®**)、埃罗替尼 (erlotinib) (**TARCEVA®**)、依维莫司 (everolimus) (**AFINITOR®**)、吉非替尼 (gefitinib) (**IRESSA®**)、甲磺酸伊马替尼 (imatinib mesylate) (STI-571, **GLEEVEC™**)、拉帕替尼 (lapatinib) (**TYKERB®**)、索拉非尼 (sorafenib) (**NEXAVAR®**) 和 SU11248 (舒尼替尼 (sunitinib), **SUTENT®**))、免疫调节剂和抗血管生成剂 (例如CC-5013 (来那度胺 (lenalidomide), **REVLIMID®**) 和沙利度胺 (thalidomide) (**THALOMID®**))、糖皮质类固醇 (例如可的松 (cortisone) (氢化可的松、氢化可的松磷酸钠、氢化可的松琥珀酸钠、**ALA-CORT®**、**HYDROCORT ACETATE®**、磷酸氢可酮 (hydrocortone phosphate) **LANACORT®**、**SOLU-CORTEF®**)、地卡特隆 (decadron) (地塞米松 (dexamethasone)、乙酸地塞米松、地塞米松磷酸钠、**DEXASONE®**、**DIODEX®**、**HEXADROL®**、**MAXIDEX®**)、甲基泼尼松龙 (methylprednisolone) (6-甲基泼尼松龙、乙酸甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙琥珀酸钠、**DURALONE®**、**MEDRALONE®**、**MEDROL®**、**M-PREDNISOL®**、**SOLU-MEDROL®**)、泼尼松龙 (prednisolone) (**DELTA-CORTEF®**、**ORAPRED®**、**PEDIAPRED®**、**PRELONE®**) 和泼尼松 (prednisone) (**DELTASONE®**、**LIQUIDPRED®**、**METICORTEN®**、**ORASONE®**)) 和双膦酸盐 (例如帕米膦酸盐 (pamidronate) (**AREDIA®**) 和唑来膦酸 (zoledronic acid) (**ZOMETA®**))。

[0419] 在一些实施方案中,多特异性分子与酪氨酸激酶抑制剂 (例如受体酪氨酸激酶 (RTK) 抑制剂) 组合使用。示例性酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于表皮生长因子 (EGF) 途径抑制剂 (例如表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂)、血管内皮生长因子 (VEGF) 途径抑制剂 (例如针对VEGF的抗体、VEGF捕获、血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 抑制剂 (例如VEGFR-1抑制剂、VEGFR-2抑制剂、VEGFR-3抑制剂))、血小板来源生长因子 (PDGF) 途径抑制剂 (例如血小板来源生长因子受体 (PDGFR) 抑制剂 (例如PDGFR-β抑制剂))、RAF-1抑制剂、KIT抑制剂和RET抑制剂。在一些实施方案中,与多特异性分子组合使用的抗癌剂选自由下组:阿西替尼 (axitinib) (AG013736)、博舒替尼 (bosutinib) (SKI-606)、西地尼布 (cediranib) (**RECENTIN™**, AZD2171)、达沙替尼 (dasatinib) (**SPRYCEL®**, BMS-354825)、埃罗替尼 (erlotinib) (**TARCEVA®**)、吉非替尼 (gefitinib) (**IRESSA®**)、伊马替尼 (imatinib) (**Gleevec®**, CGP 57148 B, STI-571)、拉帕替尼 (lapatinib) (**TYKERB®**, **TYVERB®**)、来他替尼 (lestaurtinib) (CEP-701)、来那替尼 (neratinib) (HKI-272)、尼罗替尼 (nilotinib) (**TASIGNA®**)、司马沙尼 (semaxanib) (司

马沙尼, SU5416)、舒尼替尼(sunitinib) (**SUTENT®**, SU11248)、托西尼布(toceranib) (**PALLADIA®**)、凡德他尼(vandetanib) (**ZACTIMA®**, ZD6474)、瓦他拉尼(vatalanib) (PTK787, PTK/ZK)、曲妥珠单抗(trastuzumab) (**HERCEPTIN®**)、贝伐单抗(bevacizumab) (**AVASTIN®**)、利妥昔单抗(rituximab) (**RITUXAN®**)、西妥昔单抗(cetuximab) (**ERBITUX®**)、帕尼单抗(panitumumab) (**VECTIBIX®**)、雷珠单抗(ranibizumab) (**Lucentis®**)、尼罗替尼(nilotinib) (**TASIGNA®**)、索拉非尼(sorafenib) (**NEXAVAR®**)、阿来珠单抗(alemtuzumab) (**CAMPATH®**)、奥佐米星吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin) (**MYLOTARG®**)、ENMD-2076、PCI-32765、AC220、乳酸多韦替尼(dovitinib lactate) (TKI258, CHIR-258)、BIBW 2992 (TOVOK™)、SGX523、PF-04217903、PF-02341066、PF-299804、BMS-777607、ABT-869、MP470、BIBF 1120 (**VARGATEF®**)、AP24534、JNJ-26483327、MGCD265、DCC-2036、BMS-690154、CEP-11981、替沃扎尼(tivozanib) (AV-951)、OSI-930、MM-121、XL-184、XL-647、XL228、AEE788、AG-490、AST-6、BMS-599626、CUDC-101、PD153035、培利替尼(pelitinib) (EKB-569)、凡德他尼(vandetanib) (扎替玛(zactima))、WZ3146、WZ4002、WZ8040、ABT-869 (linifanib)、AEE788、AP24534 (泊那替尼(ponatinib))、AV-951 (替沃扎尼)、阿西替尼(axitinib)、BAY 73-4506 (瑞戈非尼(regorafenib))、丙氨酸布立尼布(brivanib alaninate) (BMS-582664)、布立尼布(BMS-540215)、西地尼布(cediranib) (AZD2171)、CHIR-258 (多韦替尼(dovitinib))、CP 673451、CYC116、E7080、Ki8751、马赛替尼(masitinib) (AB1010)、MGCD-265、二磷酸莫替沙尼(motesanib diphosphate) (AMG-706)、MP-470、OSI-930、盐酸帕唑帕尼(Pazopanib Hydrochloride)、PD173074、甲苯磺酸索拉非尼(Bay 43-9006)、SU 5402、TSU-68 (SU6668)、瓦他拉尼(vatalanib)、XL880 (GSK1363089, EXEL-2880)。所选酪氨酸激酶抑制剂选自舒尼替尼、埃罗替尼、吉非替尼或索拉非尼。在一个实施方案中, 酪氨酸激酶抑制剂是舒尼替尼。

[0420] 在一个实施方案中, 多特异性分子与以下的一种或多种组合施用: 抗血管生成剂或血管靶向剂或血管破坏剂。示例性抗血管生成剂包括但不限于VEGF抑制剂(例如抗VEGF抗体(例如贝伐单抗); VEGF受体抑制剂(例如伊曲康唑(itraconazole)); 内皮细胞的细胞增殖和/或迁移的抑制剂(例如羧酰胺基三唑(carboxyamidotriazole)、TNP-470); 血管生成刺激物的抑制剂(例如苏拉明(suramin))等。血管靶向剂(VTA)或血管破坏剂(VDA)设计以损害癌肿瘤的脉管系统(血管), 从而导致中心性坏死(综述于例如Thorpe, P.E. (2004) Clin.Cancer Res.Vol.10:415-427中)。VTA可以是小分子。示例性小分子VTA包括但不限于微管去稳化药物(例如考布他汀A-4磷酸二钠(combretastatin A-4disodium phosphate, CA4P)、ZD6126、AVE8062、Oxi 4503); 和伐地美扎(vadimezan) (ASA404)。

[0421] 免疫检查点抑制剂

[0422] 在其他实施方案中, 本文所述的方法包括与多特异性分子组合使用免疫检查点抑制剂。方法可以在体内用于治疗方案中。

[0423] 在一些实施方案中, 免疫检查点抑制剂抑制检查点分子。示例性检查点分子包括但不限于CTLA4、PD1、PD-L1、PD-L2、TIM3、LAG3、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-

H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14或CD270)、BTLA、KIR、MHCI类、MHCII类、GAL9、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1和A2aR。参见例如Pardoll.Nat.Rev.Cancer 12.4(2012):252-64,通过引用并入本文。

[0424] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是PD-1抑制剂,例如抗PD-1抗体如纳武单抗、派姆单抗或匹地利珠单抗。纳武单抗(也称为MDX-1106、MDX-1106-04、ONO-4538或BMS-936558)是特异性抑制PD1的完全人IgG4单克隆抗体。参见例如US 8,008,449和W02006/121168。派姆单抗(也称为兰罗利珠单抗(Lambrolizumab)、MK-3475、MK03475、SCH-900475或KEYTRUDA®;Merck)是结合PD-1的人源化IgG4单克隆抗体。参见例如Hamid,O.et al.(2013)New England Journal of Medicine369(2):134-44,US8,354,509和W02009/114335。匹地利珠单抗(也称为CT-011或Cure Tech)是结合PD1的人源化IgG1k单克隆抗体。参见例如W02009/101611。在一个实施方案中,PD-1的抑制剂是具有与纳武单抗、派姆单抗或匹地利珠单抗的序列基本相同或相似的序列,例如与之至少85%、90%、95%相同或更高的序列的抗体分子。另外的抗PD1抗体例如AMP 514(Amplimmune)描述于例如US8,609,089、US 2010028330和/或US 20120114649中。

[0425] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂是免疫粘附素,例如与恒定区(例如重链的Fc区)融合的包含PD-1配体(例如PD-L1或PD-L2)的细胞外/PD-1结合部分的免疫粘附素。在实施方案中,PD-1抑制剂是AMP-224(B7-DCIg,例如描述于W02011/066342和W02010/027827中),阻断B7-H1和PD-1之间的相互作用的PD-L2Fc融合可溶性受体。

[0426] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是PD-L1抑制剂,例如抗体分子。在一些实施方案中,PD-L1抑制剂是YW243.55.S70、MPDL3280A、MEDI-4736、MSB-0010718C或MDX-1105。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体是MSB0010718C(也称为A09-246-2;Merck Serono),其是结合PD-L1的单克隆抗体。示例性人源化抗PD-L1抗体描述于例如W02013/079174中。在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是抗PD-L1抗体,例如YW243.55.S70。YW243.55.S70抗体描述于例如W0 2010/077634中。在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是MDX-1105(也称为BMS-936559),其描述于例如W02007/005874中。在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是MDPL3280A(Genentech/Roche),其是针对PD-L1的人Fc优化的IgG1单克隆抗体。参见例如美国专利号:7,943,743和美国公开号:20120039906。在一个实施方案中,PD-L1的抑制剂是具有与YW243.55.S70、MPDL3280A、MEDI-4736、MSB-0010718C或MDX-1105的序列基本相同或相似的序列,例如与之至少85%、90%、95%相同或更高的序列的抗体分子。

[0427] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是PD-L2抑制剂,例如AMP-224(其是阻断PD1和B7-H1之间的相互作用的PD-L2Fc融合可溶性受体)。参见例如W02010/027827和W02011/066342。

[0428] 在一个实施方案中,免疫检查点抑制剂是LAG-3抑制剂,例如抗LAG-3抗体分子。在一些实施方案中,抗LAG-3抗体是BMS-986016(也称为BMS986016;Bristol-Myers Squibb)。BMS-986016和其他人源化抗LAG-3抗体描述于例如US 2011/0150892、W02010/019570和W02014/008218中。

[0429] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是TIM-3抑制剂,例如抗TIM3抗体分子,例如描述于美国专利号:8,552,156、W0 2011/155607、EP 2581113和美国公开号:2014/044728中。

[0430] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是CTLA-4抑制剂,例如抗CTLA-4抗体分子。示例性抗CTLA4抗体包括曲美木单抗(来自Pfizer的IgG2单克隆抗体,先前称为替西木单抗、CP-675,206);和伊匹单抗(也称为MDX-010,CAS号477202-00-9)。其他示例性抗CTLA-4抗体描述于例如美国专利号5,811,097中。

## 实施例

[0431] 以下实施例旨在说明,而不意图以任何方式进行限制。

[0432] 实施例1. 多个 $\alpha$ CCR2/ $\alpha$ CSF1R双特异性抗体分子的生成

[0433] 1. 质粒的构建

[0434] 对编码蛋白质序列的DNA为在中国仓鼠(*Cricetulus griseus*)中表达进行优化,合成,并使用Gateway克隆将其克隆到pcDNA3.4-TOPO(Life Technologies A14697)中。所有构建体含有Ig Kappa前导序列(ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGA(SEQ ID NO:115),METDTLLLVLLLWVPGSTG(SEQ ID NO:116))。使用的核酸序列显示于表1中。

[0435] 表1:示例性抗体的核酸序列

[0436]

| SEQ ID NO    | 描述                       | 核酸序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 1 | $\alpha$ CCR2<br>MC12 VH | CAGGTCCAGCTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACTGGTTCAG<br>CCCTCTCAGACCCCTGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCT<br>TCTCCCTGACCGACTTCTCTGTGCACTGGGTCCGACAGCC<br>TCCAGGCAAAGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCAGATC<br>CGAGGGCAACACCGACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCG<br>GCTGTCTATCAGCAGAGACACCTCCAAGAGCCAGGTGTT<br>CCTGAAGATGAACTCCCTGCAGACCGAGGACACCGCCAT<br>CTATTTCTGCACCAGAGGCGACATCCTCGGCTTCGGCTAT<br>TGGGGACAGGGCGTGATGGTCAACGTTAGCTCT |
| SEQ ID NO: 2 | $\alpha$ CCR2<br>MC12 VL | GACATCGTGATGACCCAGTCTCCACTGTCCGTGTCTGTGA<br>CCCCTGGCGAGTCTGCCTCCATCTCCTGCAGATCCTCCAA<br>GAGCCTGCTGCACTTCAAGGGCATCACCTTCGTGTACTGG<br>TATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCT<br>TCAGAATGTCCAGCCTGGCCTCTGGCGTGCCGATAGATT<br>TTCTGGCTCCGGCTCCGAGACAGACTTCACCTGAAGATC<br>TCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCACCTACTATTGT<br>GGCCAGCTGCTGGAACCCCTACACCTTTGGCGCTGGC<br>ACCAAGCTGGAAGTGAAG                  |
| SEQ ID NO: 3 | R2b CH1                  | GCTCAGACCACCGCTCCTAGCGTGTACCCTTTGGCTCCTG<br>GCTGTGGCGACACCACCTCTTCTACAGTGACCCTGGGCTG<br>TCTGGTCAAGGGCTACTTTCTGAGCCTGTGACCGTGACC<br>TGGAAGTCTGGTGCCCTGTCTCCGACGTGCACACCTTTC<br>CAGCTGTGCTGCAGTCCGGCCTGTACACCTGACATCCTC<br>CGTGACCTCTTCCACCTGGCCTAGCCAGACCGTGACATGC<br>AATGTGGCTCACCTGCCTCCAGCACCAAGGTGGACAAG<br>AAGGTGGAACGGCGG                                                                |
| SEQ ID NO: 4 | R2b CL                   | AGAGCTGACGCTGCCCTACCGTGTCTATCTTCCCTCCAT<br>CCATGGAACAGCTGACCTCTGGCGGAGCTACCGTCGTGT<br>GCTTCGTGAACAATTCTACCCTCGGGACATCTCCGTGAA<br>GTGGAAGATCGACGGCTCTGAGCAGCGAGATGGCGTGCT<br>GGATTCTGTGACCGACCAGGACTCCAAGGACAGCACCTA<br>CTCCATGTCTAGCACCTGAGCCTGACCAAGGTGGAATA<br>CGAGCGGCACAACCTGTATACCTGCGAGGTGGTGCACAA<br>GACCTCCAGCTCTCCCGTGGTCAAGTCTTCAACCGGAAC                                           |

[0437]

|               |                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |                       | GAGTGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 5  | $\alpha$ mCSF1R<br>VH | CAGGTCCAGTTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGTCAAG<br>CCTGGATCCTCCGTGAAGATCTCCTGCAAGGCCTCCGGCT<br>ACACCTTCACCTCCAACCTTCATGCACTGGATCAAGCAGCA<br>GCCCCGGCAACGGCCTGGAATGGATCGGATGGATCTATCC<br>TGCGCAGCGCGACACCGAGTACAACCAGAAGTTCAACGG<br>CAAGGCTACCCTGACCGCCGACAAGTCCTCTTCCACCGCT<br>TACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCTCTGAGGACTCCGCCG<br>TGTACTTCTGCGCCGTGAATTATGGCGGCTACGTGCTGGA<br>TGCTTGGGGCCAAGGCGCTTCTGTGACAGTGTCTCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| SEQ ID NO: 6  | R2a CH1               | GCCGAGACAACCGCTCCTAGCGTTTACCCTCTGGCTCCTG<br>GCACAGCCCTGAAGTCCAACCTCTATGGTCACCCTGGGCT<br>GCCTGGTCAAGGGCTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGAC<br>CTGGAACCTCTGGTGCTCTGTCTAGCGGCGTGACACCTTT<br>CCAGCTGTGCTGCAGAGCGGCCTGTACACCCTGACATCT<br>AGCGTGACCGTGCCTTCCAGCACCTGGTCTAGTCAGGCTG<br>TGACCTGCAACGTGGCCCATCCTGCCTCTTCTACCAAGGT<br>GGACAAGAAAATCGTGCCAGAGAGTGCAAC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| SEQ ID NO: 7  | $\alpha$ mCSF1R<br>VL | GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTACCACCATGGCTGCTA<br>GCCCTGGCGAGAAAGTGACAATTACCTGCCGGGCCTCCT<br>CCTCCACCAACTACATGTCTTGGTATCAGCAGAAGTCCG<br>GCGCCTCTCCTAAGCCTTGGATCTACGAGACATCCAAGCT<br>GGCCTCTGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGCTCC<br>GGCACCTCCTACAGCTTCACCATCTCCAGCATGGAAACA<br>GAGGACGCCGCCACCTACTACTGCCACCAAGTGGTCATCT<br>ACCCCTCTGACCTTTGGCAGCGGCACCAAGCTGGAAATC<br>AAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| SEQ ID NO: 8  | R2a CL                | AGAGCTGACGCCGCTCCTACCGTGTCTATCTTCCCTCCAT<br>CCATGGAACAGCTGACCTCCGGCGGAGCTACCGTCGTGT<br>GTTTCGTGAACAACCTTCTACCCTCGGGACATCTCCGTGAA<br>GTGGAAGATCGACGGCTCTGAGCAGCGAGATGGCGTGCT<br>GGATTCTGTGACCGACCGAGTCCAAGGACAGCACCTTA<br>CTCCATGTCTAGCACCTGAGCCTGACCAAGGTGGAATA<br>CGAGCGGCACAACCTGTATACCTGCGAGGTGGTGACAA<br>GACCTCCAGCTCTCCCGTGGTCAAGTCCTTCAACCGGAAC<br>GAGTGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| SEQ ID NO: 9  | mFc 突出                | ACCATTAAGCCTTGTCTCCTCCATGCAAGTGCCCCGCTCCTA<br>ATCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCATCTTTCCACCTAA<br>GATCAAGGACGTGCTGATGATCTCCCTGTCTCCTATCGTG<br>ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCGAGGATGATCCTGAC<br>GTGCAGATCAGTTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTGAC<br>ACCGCTCAGACCCAGACACACAGAGAGGACTACAACCTCT<br>ACCCTGAGAGTGGTGTCTGCCCTGCCTATCCAGCATCAGG<br>ACTGGATGTCCGGCAAAGAATTCAAGTGCAAAGTGAACA<br>ACAAGGACCTGCCTGCTCCAATCGAGCGGACCATCTCTA<br>AGCCTAAGGGCTCTGTGAGGGCCCCCTCAGGTGTACGTTCT<br>GCCTCCTTGCAGGAAGAGATGACCAAGAAACAAGTGAC<br>ACTGTGGTGCATGGTCAAGACTTCATGCCCGAGGACAT<br>CTACGTGGAATGGACCAACAACGGCAAGACCGAGCTGAA<br>CTACAAGAACACCGAGCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTC<br>CTACTTCATGTACTCCAAGCTGCGCGTCGAGAAGAAGAA<br>CTGGGTCGAGAGAACTCCTACTCCTGCTCCGTGGTGCAC<br>GAGGGCCTGCACAATCACCACACCACCAAGTCCTTCTCTC<br>GGACCCCTGGCAAG |
| SEQ ID NO: 10 | mFc 空穴                | ACCATCAAGCCCTGTCTCCTCCATGCAAGTGCCCCGCTCCTA<br>ATCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCATCTTCCACCTAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

[0438]

|               |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |                                 | GATCAAGGACGTGCTGATGATCTCCCTGTCTCCTATCGTG<br>ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCGAGGATGATCCTGAC<br>GTGCAGATCAGTTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTGCAC<br>ACCGCTCAGACCCAGACACACAGAGAGGACTACAACAGC<br>ACCCTGAGAGTGGTGTCTGCCCTGCCAATCCAGCACCAG<br>GATTGGATGTCCGGCAAAGAATTCAAGTGCAAAGTGAAC<br>AACAAGGACCTGCCTGCTCCAATCGAGCGGACCATCTCT<br>AAGCCTAAGGGCTCTGTGCGGGCTCCCCAAGTTTGTGTTT<br>TGCCTCCACCTGAGGAAGAGATGACCAAGAAACAAGTGA<br>CCCTGTCTTGTGCCGTGACCGACTTCATGCCCCGAGGACAT<br>CTACGTGGAATGGACCAACAATGGCAAGACCGAGCTGAA<br>CTACAAGAACACCGAGCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTC<br>CTACTTCATGGTGTCTAAGCTGCGCGTCGAGAAGAAGAA<br>CTGGGTCGAGAGAACTCCTACTCCTGCTCCGTGGTGCAC<br>GAGGGCCTGCACAATCACCACACCACCAAGTCCCTTCTCTC<br>GGACCCCTGGCAAG                                                                               |
| SEQ ID NO: 11 | $\alpha$ hCCR2<br>洛扎利珠<br>单抗 VH | GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTAAG<br>CCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCT<br>TCACCTTCTCCGCTACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGC<br>TCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGAAGAATCCGGAC<br>CAAGAACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACTCCGT<br>GAAGGACCGGTTACCATCTCTCGGGACGACTCCAAGAA<br>CACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAAAACCGAGGA<br>CACCGCCGTGTACTACTGCACCACCTTCTACGGCAATGGC<br>GTGTGGGGACAGGGCACACTGGTTACCGTTTCTTCCGCCT<br>CCACCAAGGGACCCTCTGTGTTTCCTCTGGCTCCCTCCAG<br>CAAGTCTACCTCTGGTGGAACAGCTGCCCTGGGCTGCCTG<br>GTCAAGGATTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTCTGG                                                                                                                                                                                                                                   |
| SEQ ID NO: 12 | hCH1                            | GCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTT<br>CCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCT<br>GCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGT<br>TTGGAACCTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACACATTT<br>CCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCTCT<br>CTGTCGTGACCGTGCCTTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGAC<br>CTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAA<br>GGTGGACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCCTGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| SEQ ID NO: 13 | hFc 突出                          | GATAAGACCCACACATGTCCTCCATGCCCTGCCCTGAGC<br>TGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTCCCTGTTCCTCCAAAGCC<br>CAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGAC<br>CTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGT<br>GAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAA<br>CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCA<br>CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCATCAGGA<br>CTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAA<br>CAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAA<br>GGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCTCAGGTGTACACACT<br>GCCTCCCTGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTC<br>CCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATC<br>GCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAA<br>CTACAAGACCACCCCTCCCGTGTGGACAGCGACGGCAG<br>CTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGG<br>TGGCAGCAGGGCAATGTGTTAGCTGTAGCGTGATGCAC<br>GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGC<br>CTGTCTCCTGGCAAA |
| SEQ ID NO: 14 | $\alpha$ hCCR2<br>洛扎利珠          | GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGTCTCTGCCCGTGA<br>CATTGGGACAGCCTGCCTCCATCTCCTGCAAGTCCTCTCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

[0439]

|               |                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | 单抗 VL                     | GTCCCTGCTGGACTCTGACGGCAAGACCTTCCTGAACTGG<br>TTCCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCCTAGAAGGCTGATCT<br>ACCTGGTGTCCAAGCTGGATTCTGGCGTGCCGACAGATT<br>CTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTCACCTGAAGATC<br>TCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGT<br>TGGCAGGGCACCCACTTTCCATACACCTTCGGCCAGGGC<br>ACCAGACTGGAAATCAAG                                                                                                                                |
| SEQ ID NO: 15 | hCL<br>(kappa)            | AGAACAGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCACCCT<br>CCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCCTTCTGTCTGTGT<br>GCCTGCTCAACAACCTTCTACCTTCGGGAAGCCAAGGTGC<br>AGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCC<br>AGGAATCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCT<br>ACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTA<br>CGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAAGTGACCCACCA<br>GGGCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGG<br>CGAGTGC                                                       |
| SEQ ID NO: 16 | $\alpha$ hCCR2<br>D1 VH   | GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAA<br>CCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCT<br>ACACCTTTACCGGCTACCACATGCACTGGGTCCGACAGG<br>CTCCAGGACAAGGCTTGGAATGGATGGGCTGGATCAACC<br>CCAACCTCCGGCGTGACCAAATACGCCCAGAAATTCAGG<br>GCAGAGTGACCATGACCAGAGACACCTCCATCAACACCG<br>CCTACATGGAAGTGTCCCGGCTGAGATTCGACGACACCG<br>ACGTGTACTACTGTGCCACCGGCGGCTTTGGCTATTGGGG<br>AGAGGGAACACTGGTCACCGTGTCTCC                                 |
| SEQ ID NO: 17 | $\alpha$ hCCR2<br>D1 VL   | CTGCCCGTGTGACCCAGCCTCCTAGCGTTTCCAAGGGCC<br>TGAGACAGACCGCCACACTGACCTGTACCGGCAACTCTA<br>ACAACGTGGGCAATCAGGGCGCTGCCTGGTTGCAGCAGC<br>ATCAGGGACAGCCTCCAAAGCTGCTGTCTTACCGGAACC<br>ACAACAGACCTAGCGGCGTGTCCGAGCGGTTACGCCCTT<br>CTAGATCTGGCGACACCTCCAGCCTGACCATCACTGGACT<br>GCAGCCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGTCTGGCCTG<br>GGACAGCTCCCTGCGGGCCTTTGTTTTTGGCACCGGCACC<br>AAGCTGACCGTGCTG                                             |
| SEQ ID NO: 18 | hCL<br>(lambda)           | GGACAACCTAAGGCCAATCCTACCGTGACACTGTTCCCTC<br>CATCCTCCGAGGAAGTGCAGGCCAACAAGGCTACCCTCG<br>TGTGCCTGATCTCCGACTTTTACCCTGGCGCTGTGACCGT<br>GGCCTGGAAGGCTGATGGATCTCCTGTGAAGGCTGGCGT<br>GGAAACCACCAAGCCTTCCAAGCAGTCCAACAACAATA<br>CGCCGCCTCCTCCTACCTGTCTCTGACCCCTGAACAGTGG<br>AAGTCCACCGGTCTACAGCTGCCAAGTGACCCATGAG<br>GGCTCCACCGTGGAAGAACCGTGGCTCCTACCGAGTGC<br>TCC                                                            |
| SEQ ID NO: 19 | $\alpha$ hCCR2<br>42G7 VH | CAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAA<br>CCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCCGGCT<br>ACACCTTCTCCAGCTACTACATGCACTGGGTCCGACAGGC<br>CCCTGGACAAGGATTGGAGTGGATGGGCATCATCAACCC<br>CTCTGGCGCAACACCTCTTACGCCCAGAAATTCAGGG<br>CAGAGTGACCATGACCAGAGACACCTCCACCAGCACCGT<br>GTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCCGAGGACACCGC<br>CGTGTACTACTGTGCCAGAGGCGGATACCAGCTGCCTCA<br>CGGTAGAGCCAGAGCCTTCGATATGTGGGGCCAGGGCAC<br>AATGGTCACCGTGTCTCT |
| SEQ ID NO: 20 | $\alpha$ hCCR2<br>42G7 VL | GCCATCAGAATGACCCAGTCTCCACTGAGCCTGCCTGTG<br>ACATTGGGCCAGCCTGCCTCTATCTCCTGCACCTCCTCTC<br>AGTCTCTGGTGTACAGAGATGGCACCACTACCTGAACT                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

[0440]

|               |                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |                          | GGTTCCAGCAGAGGCCTGGCCAGTCTCCTAGACGGCTGA<br>TCTACAAGGTGTCCAACAGAGACTCTGGCGTGCCGACA<br>GATTCACCGGCTCTGGCTCTGGCACCACATTCACCCTGAC<br>CATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCATCTACTA<br>CTGTATGCAGGGCACCCACTGGCCTCTGACCTTTGGCCAG<br>GGAACAAAGGTGGAAATCAAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| SEQ ID NO: 21 | αhCCR2<br>43G12 VH       | GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGATTGGTTCAG<br>CCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGTGGCCTCTGGCT<br>TCACCTTCTCCGACTACTGGATGTCCTGGGTCCGACAGGC<br>TCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGCGCCAACATCAAGAA<br>AGACGGCTCCGTGAACACTACTACGTGGACTCCGTGAAGGG<br>CAGATTACCATCTCTCGGGACAACGCCAAGAAGTCCCT<br>GTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGC<br>CGTGTACTACTGCACCAGATTCGATTACTGGGGCCAGGG<br>CACCTGGTCACAGTGTCTCT                                                                                                                                                                                                                                     |
| SEQ ID NO: 22 | αhCCR2<br>43G12 VL       | CAGGCTGGCTTGACCCAGCCTCCTAGCGTTTCCAAGGGCC<br>TGAGACAGACCGCCACACTGACCTGTACCGGCAACTCTA<br>ACAACGTGGGCAATCAGGGCGCTGCCTGGTTGCAGCAGC<br>ATCAGGGACATCCTCCAAAGCTGCTGTTCTACCGGAACA<br>ACAACAGAGCCTCCGGCATCTCCGAGCGGCTGTCTGCTTC<br>TAGATCCGCAATACCGCCAGCCTGACCATCACTGGACT<br>GCAGCCTGAGGACGAGGCCGACTACTATTGCCTGACCTG<br>GGACTCCTCTCTGTCCGTGGTGGTTTTTGGCGGAGGCACC<br>AAGCTGACAGTGCTG                                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 23 | αhCSF1R<br>依米妥珠<br>单抗 VH | CAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAA<br>CCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCCGGCT<br>ACACCTTTACCAGCTACGACATCTCCTGGGTCCGACAGGC<br>TCCTGGACAAGGCTTGGAATGGATGGGCGTGATCTGGAC<br>CGATGGCGGCACCAATTACGCCCAGAACTGCAGGGCAG<br>AGTGACCATGACCACCGACACCTCTACCTCCACCGCCTAC<br>ATGGAAGTGGGTCCCTGAGATCTGACGACACCGCCGTG<br>TACTACTGCGCCAGAGATCAGCGGCTGTACTTGTATGTGT<br>GGGGCCAGGGCACAAACCGTGACAGTGTCTCT                                                                                                                                                                                                                           |
| SEQ ID NO: 24 | αhCSF1R<br>依米妥珠<br>单抗 VL | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCCGCT<br>CTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCTCCG<br>AGGACGTGAACACCTACGTGTCTGTATCAGCAGAAGC<br>CCGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCTA<br>ACAGATACACCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGG<br>CTCTGGCACCGACTTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGCAG<br>CCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCCTTCA<br>GCTACCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCA<br>AG                                                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 25 | hFc 空穴                   | GATAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGCCCTGCCCTGAAC<br>TGCTGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCAAAGCC<br>CAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGAC<br>CTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGT<br>GAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAA<br>CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACACGA<br>CCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG<br>ACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA<br>ACAAGGCCCTGCCAGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCA<br>AGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCTCAGGTCTGCACCC<br>TGCCTCCCAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGT<br>CCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATAT<br>CGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA<br>ACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCA |

[0441]

|               |                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |                          | GCTTCTTCCTGGTGTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCG<br>GTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTCAGCTGTAGCGTGATGCA<br>CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAG<br>CCTGAGCCCTGGCAAA                                                                                                                                                                                                                                                               |
| SEQ ID NO: 26 | αhCSF1R<br>卡比利珠<br>单抗 VH | CAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAA<br>CCTGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCT<br>ACACCTTTACCGACAACCTACATGATCTGGGTCCGACAGG<br>CTCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGCGACATCAACC<br>CTTACAACGGCGGCACCACCTTCAACCAGAAATTCAAGG<br>GCAGAGTGACCATCACCGCCGACAAGTCTACCTCCACCG<br>CCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCTGAGGACACCG<br>CCGTGTACTACTGCGCCAGAGAGTCCCCTTACTTCTCAA<br>CCTGTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACACTGGT<br>CACAGTGTCTCT |
| SEQ ID NO: 27 | αhCSF1R<br>卡比利珠<br>单抗 VL | GAGATCGTGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACACTGTCACTGT<br>CTCCAGGCGAGAGAGCTACCCTGTCTGCAAGGCTTCTC<br>AGTCCGTGGACTACGACGGCGACAACCTACATGAAGTGGT<br>ATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGACTGCTGATCT<br>ACGCCGCTCCAACTGGAATCTGGCATCCCCGCTAGATT<br>CTCCGGCTCTGGCTCTGGCACAGACTTTACCTGACCATC<br>TCCAGCCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCC<br>ACCTGTCCAACGAGGACCTGTCCACATTTGGCGGAGGCA<br>CCAAGGTGGAAATCAAG                                      |

[0442] 表2. 用于构建ORF的序列

[0443]

| 全长           | 可变           | 恒定           | Fc           |
|--------------|--------------|--------------|--------------|
| SEQ ID NO:28 | SEQ ID NO:1  | SEQ ID NO:3  | SEQ ID NO:9  |
| SEQ ID NO:29 | SEQ ID NO:2  | SEQ ID NO:4  |              |
| SEQ ID NO:30 | SEQ ID NO:5  | SEQ ID NO:6  | SEQ ID NO:10 |
| SEQ ID NO:31 | SEQ ID NO:7  | SEQ ID NO:8  |              |
| SEQ ID NO:32 | SEQ ID NO:11 | SEQ ID NO:12 | SEQ ID NO:13 |
| SEQ ID NO:33 | SEQ ID NO:14 | SEQ ID NO:15 |              |
| SEQ ID NO:34 | SEQ ID NO:16 | SEQ ID NO:12 | SEQ ID NO:13 |
| SEQ ID NO:35 | SEQ ID NO:17 | SEQ ID NO:18 |              |
| SEQ ID NO:36 | SEQ ID NO:19 | SEQ ID NO:12 | SEQ ID NO:13 |
| SEQ ID NO:37 | SEQ ID NO:20 | SEQ ID NO:15 |              |
| SEQ ID NO:38 | SEQ ID NO:21 | SEQ ID NO:12 | SEQ ID NO:13 |
| SEQ ID NO:39 | SEQ ID NO:22 | SEQ ID NO:18 |              |
| SEQ ID NO:40 | SEQ ID NO:23 | SEQ ID NO:12 | SEQ ID NO:25 |
| SEQ ID NO:41 | SEQ ID NO:24 | SEQ ID NO:15 |              |
| SEQ ID NO:42 | SEQ ID NO:26 | SEQ ID NO:12 | SEQ ID NO:25 |
| SEQ ID NO:43 | SEQ ID NO:27 | SEQ ID NO:15 |              |

[0444] 表3. ORF的核酸序列

[0445]

|               | 核酸序列                                                                                                                                                                                            |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 28 | ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br>GCCAGGATCTACAGGACAGGTCCAGCTGCAAGAGTCTGGCCCTG<br>GACTGGTTTCAGCCCTCTCAGACCCTGTCTCTGACCTGTACCGTGT<br>CCGGCTTCTCCCTGACCGACTTCTCTGTGCACTGGGTCCGACAGC |

[0446]

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | CTCCAGGCAAAGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCAGATCCGA<br>GGGCAACACCGACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGTCTA<br>TCAGCAGAGACACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAAC<br>TCCCTGCAGACCGAGGACACCGCCATCTATTTCTGCACCAGAGG<br>CGACATCCTCGGCTTCGGCTATTGGGGACAGGGCGTGATGGTCA<br>CCGTTAGCTCTGCTCAGACCACCGCTCCTAGCGTGATACCCTTTGG<br>CTCCTGGCTGTGGCGACACCACCTCTTCTACAGTGACCCTGGGCT<br>GTCTGGTCAAGGGCTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGACCTGGA<br>ACTCTGGTGCCCTGTCTCCGACGTGCACACCTTTCAGCTGTGC<br>TGCAGTCCGGCCTGTACACCCTGACATCCTCCGTGACCTCTTCCA<br>CCTGGCCTAGCCAGACCGTGACATGCAATGTGGCTCACCTGCC<br>TCCAGCACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACGGCGGACCATTA<br>AGCCTTGTCTCCATGCAAGTGCCCCGCTCCTAATCTGCTCGGAG<br>GCCCTTCCGTGTTTCATCTTTCCACCTAAGATCAAGGACGTGCTGA<br>TGATCTCCCTGTCTCCTATCGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGT<br>CCGAGGATGATCCTGACGTGCAGATCAGTTGGTTCGTGAACAAC<br>GTGGAAGTGCACACCGCTCAGACCCAGACACACAGAGAGGACT<br>ACAACTCTACCCTGAGAGTGGTGTCTGCCCTGCCTATCCAGCATC<br>AGGACTGGATGTCCGGCAAAGAATTCAAGTGCAAAGTGAACAA<br>CAAGGACCTGCCTGCTCCAATCGAGCGGACCATCTCTAAGCCTA<br>AGGGCTCTGTGAGGGCCCCCTCAGGTGTACGTTCTGCCTCCTTGCG<br>AGGAAGAGATGACCAAGAAACAAGTGACACTGTGGTGCATGGT<br>CACAGACTTCATGCCCAGGACATCTACGTGGAATGGACCAACA<br>ACGGCAAGACCGAGCTGAACTACAAGAACACCGAGCCTGTGCTG<br>GACTCCGACGGCTCCTACTTCATGTACTCCAAGCTGCGCGTGCAG<br>AAGAAGAACTGGGTGAGAGAAACTCCTACTCCTGCTCCGTGGT<br>GCACGAGGGCCTGCACAATCACCACACCACCAAGTCCTTCTCTC<br>GGACCCCTGGCAAGTGATGA |
| SEQ ID NO: 29 | ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br>GCCAGGATCTACCGGCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCACTGT<br>CCGTGTCTGTGACCCCTGGCGAGTCTGCCTCCATCTCCTGCAGAT<br>CCTCCAAGAGCCTGCTGCACTTCAAGGGCATCACCTTCGTGTACT<br>GGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTTCA<br>GAATGTCCAGCCTGGCCTCTGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCT<br>CCGGCTCCGAGACAGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGA<br>GCCGAGGACGTGGGCACCTACTATTGTGGCCAGCTGCTGGAAAA<br>CCCCTACACCTTTGGCGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGAGAG<br>CTGACGCTGCCCCTACCGTGTCTATCTTCCCTCCATCCATGGAAC<br>AGCTGACCTCTGGCGGAGCTACCGTCGTGTGCTTCGTGAACAAC<br>TTCTACCCTCGGGACATCTCCGTGAAGTGGAAGATCGACGGCTC<br>TGAGCAGCGAGATGGCGTGCTGGATTCTGTGACCGACCAGGACT<br>CCAAGGACAGCACCTACTCCATGTCTAGCACCTGAGCCTGACC<br>AAGGTGGAATACGAGCGGCACAACCTGTATACCTGCGAGGTGGT<br>GCACAAGACCTCCAGCTCTCCCGTGGTCAAGTCCTTCAACCGGA<br>ACGAGTGCTGATGA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| SEQ ID NO: 30 | ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br>GCCAGGATCTACAGGACAGGTCCAGTTGCAGCAGTCTGGCGCTG<br>AGCTGGTCAAGCCTGGATCCTCCGTGAAGATCTCCTGCAAGGCC<br>TCCGGCTACACCTTCACCTCCAACCTTCATGCACTGGATCAAGCAG<br>CAGCCCGGCAACGGCCTGGAATGGATCGGATGGATCTATCCTGG<br>CGACGGCGACACCGAGTACAACCAGAAGTTCAACGGCAAGGCT<br>ACCCTGACCGCCGACAAGTCCTCTTCCACCGCTTACATGCAGCTG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

[0447]

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | <p>TCCAGCCTGACCTCTGAGGACTCCGCCGTGTA CTCTGCGCCGTG<br/> AATTATGGCGGCTACGTGCTGGATGCTTGGGGCCAAGGCGCTTC<br/> TGTGACAGTGTCTCTGCCGAGACAACCGCTCCTAGCGTTTACCC<br/> TCTGGCTCCTGGCACAGCCCTGAAGTCCA ACTCTATGGTCACCCT<br/> GGGCTGCCTGGTCAAGGGCTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGA<br/> CCTGGA ACTCTGGTGCTCTGTCTAGCGGCGTGCACACCTTCCAG<br/> CTGTGCTGCAGAGCGGCCTGTACACCCTGACATCTAGCGTGACC<br/> GTGCCTTCCAGCACCTGGTCTAGTCAGGCTGTGACCTGCAACGTG<br/> GCCCCATCCTGCCTCTTCTACCAAGGTGGACAAGAAAATCGTGCC<br/> CAGAGAGTGCAACACCATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAGTGCC<br/> CCGCTCCTAATCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTCACTTCCCAC<br/> CTAAGATCAAGGACGTGCTGATGATCTCCCTGTCTCCTATCGTGA<br/> CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCGAGGATGATCCTGACGTGCAG<br/> ATCAGTTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTGCACACCGCTCAGAC<br/> CCAGACACACAGAGAGGACTACAACAGCACCCCTGAGAGTGGTG<br/> TCTGCCCTGCCAATCCAGCACCAAGATTGGATGTCCGGCAAAGA<br/> ATTCAAGTGCAAAGTGAACAACAAGGACCTGCCTGCTCCAATCG<br/> AGCGGACCATCTCTAAGCCTAAGGGCTCTGTGCGGGCTCCCCAA<br/> GTTTGTGTTCTGCCTCCACCTGAGGAAGAGATGACCAAGAAACA<br/> AGTGACCCTGTCTTGTGCCGTGACCGACTTCATGCCCGAGGACAT<br/> CTACGTGGAATGGACCAACAATGGCAAGACCGAGCTGAACTACA<br/> AGAACACCGAGCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTACTTCATG<br/> GTGTCTAAGCTGCGCGTCGAGAAGAAGAACTGGGTGCGAGAGAA<br/> ACTCCTACTCCTGCTCCGTGGTGCACGAGGGCCTGCACAATCACC<br/> ACACCACCAAGTCCTTCTCTCGGACCCCTGGCAAGTGATGA</p> |
| SEQ ID NO: 31 | <p>ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br/> GCCAGGATCTACAGGCGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTACCA<br/> CCATGGCTGCTAGCCCTGGCGAGAAAGTGACAATTACCTGCCGG<br/> GCCTCCTCCTCCACCAACTACATGTCCTGGTATCAGCAGAAGTCC<br/> GGCGCCTCTCCTAAGCCTTGGATCTACGAGACATCCAAGCTGGC<br/> CTCTGGCGTGCCGATAGATTTTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCTC<br/> CTACAGCTTCACCATCTCCAGCATGGAACAGAGGACGCCGCCA<br/> CCTACTACTGCCACCAGTGGTCATCTACCCCTCTGACCTTTGGCA<br/> GCGGCACCAAGCTGGAAATCAAGAGAGCTGACGCCGCTCCTACC<br/> GTGTCTATCTTCCCTCCATCCATGGAACAGCTGACCTCCGGCGGA<br/> GCTACCGTCGTGTGTTTCGTGAACA ACTTCTACCCTCGGGACATC<br/> TCCGTGAAGTGGAAGATCGACGGCTCTGAGCAGCGAGATGGCGT<br/> GCTGGATTCTGTGACCGACCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACT<br/> CCATGTCTAGCACCCCTGAGCCTGACCAAGGTGGAATACGAGCGG<br/> CACAACCTGTATACCTGCGAGGTGGTGCACAAGACCTCCAGCTC<br/> TCCCGTGGTCAAGTCCTTCAACCGGAACGAGTGCTGATGA</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| SEQ ID NO: 32 | <p>ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br/> GCCAGGATCTACAGGCGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAG<br/> GACTGGTTAAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTT<br/> CTGGCTTCACCTTCTCCGCCTACGCCATGAACTGGGTCCGACAGG<br/> CTCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGCGGAAGAATCCGGACCAAG<br/> AACAACA ACTACGCCACCTACTACGCCGACTCCGTGAAGGACCG<br/> GTTACCATCTCTCGGGACGACTCCAAGAACACCCTGTACCTGC<br/> AGATGAACTCCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC<br/> ACCACCTTCTACGGCAATGGCGTGTGGGGACAGGGCACACTGGT<br/> TACCGTTTCTTCCGCCTCCACCAAGGGACCCCTCTGTGTTTCTCT<br/> GGCTCCCTCCAGCAAGTCTACCTCTGGTGGAACAGCTGCCCTGG</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

[0448]

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | <p>GCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTT<br/> GGAACCTCTGGCGCTCTGACATCTGGCGTGACACCTTTCAGCTG<br/> TGCTGCAGTCCTCTGGCCTGTACTCTCTGTCTCCGTCGTGACCG<br/> TGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGA<br/> ACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAAACC<br/> CAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCTGTCTCC<br/> AGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTCTTCTCCAAAGCC<br/> TAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCG<br/> TGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCAGAGTGAAGTTCAAT<br/> TGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGC<br/> CTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTG<br/> CTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAA<br/> GTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGA<br/> CCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTAC<br/> ACCCTGCCTCCATGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTC<br/> CCTGTGGTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGT<br/> GGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACA<br/> ACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCC<br/> AAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTT<br/> CTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCC<br/> AGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAGTGATGA</p> |
| SEQ ID NO: 33 | <p>ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br/> GCCAGGATCTACAGGCGACGTGGTTCATGACACAGAGCCCTCTGT<br/> CTCTGCCCCTGACATTGGGACAGCCTGCCTCCATCTCCTGCAAGT<br/> CCTCTCAGTCCCTGCTGGACTCTGACGGCAAGACCTTCTGAACT<br/> GGTTCCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCCTAGAAGGCTGATCTAC<br/> CTGGTGTCCAAGCTGGATTCTGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGC<br/> TCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAA<br/> AGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGTTGGCAGGGCACCCACT<br/> TTCCATACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGTGGAAATCAAGAGA<br/> ACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCACCTTCCGACGAG<br/> CAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCTGTGCTGCTGTAACAA<br/> CTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAATG<br/> CCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGAC<br/> TCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCAGCACACTGACCCTGTC<br/> CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTG<br/> ACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGG<br/> GGCGAGTGCTGATGA</p>                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 34 | <p>ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br/> GCCAGGATCTACAGGCGAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCG<br/> AAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCTGCAAGGCT<br/> TCTGGCTACACCTTTACCGGCTACCACATGCACTGGGTCCGACAG<br/> GCTCCAGGACAAGGCTTGGAAATGGATGGGCTGGATCAACCCCAA<br/> CTCCGGCGTGACCAATACGCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGA<br/> CCATGACCAGAGACACCTCCATCAACACCGCCTACATGGAACCTG<br/> TCCCGGCTGAGATTCGACGACACCGACGTGTACTACTGTGCCAC<br/> CGGCGGCTTTGGCTATTGGGGAGAGGGAACACTGGTCACCGTGT<br/> CCTCCGCTTCTACCAAGGGACCTCCGTGTTTCTCTGGCTCCTT<br/> CCAGCAAGTCTACCTCCGGTGGAAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTG<br/> GTCAAGGACTACTTTCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCT<br/> GGCGCTCTGACATCCGGCGTGACACCTTTCAGCTGTGCTGCAA<br/> TCCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCTCCGTCTGTGACCGTGCCTTCTA</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

[0449]

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | <p>GCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAG<br/> CCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCCTG<br/> CGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCT<br/> CGGCGGACCTTCTGTGTTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGACAC<br/> CCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG<br/> ATGTGTCTCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTG<br/> GACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGG<br/> AACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG<br/> CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT<br/> GTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCA<br/> AGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACACCCTGCCT<br/> CCATGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCTGTGGTG<br/> CCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGG<br/> AGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCT<br/> GTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACA<br/> GTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTC<br/> CGTGATGCACGAGGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCC<br/> TGTCTCTGTCCCTGGCAAGTGATGA</p> |
| SEQ ID NO: 35 | <p>ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br/> GCCAGGATCTACAGGACTGCCCCTGTTGACCCAGCCTCCTAGCG<br/> TTTCCAAGGGCCTGAGACAGACCGCCACACTGACCTGTACCGGC<br/> AACTCTAACAACGTGGGCAATCAGGGCGCTGCCTGGTTGCAGCA<br/> GCATCAGGGACAGCCTCCAAAGCTGCTGTCTTACCGGAACCACA<br/> ACAGACCTAGCGGCGTGTCCGAGCGGTTACGCCCTTCTAGATCT<br/> GGCGACACCTCCAGCCTGACCATCACTGGACTGCAGCCTGAGGA<br/> CGAGGCCGACTACTATTGTCTGGCCTGGGACAGCTCCCTGCGGG<br/> CCTTTGTTTTTGGCACCGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGACAAC<br/> CTAAGGCCAATCCTACCGTGACACTGTTCCCTCCATCCTCCGAGG<br/> AACTGCAGGCCAACAAGGCTACCCTCGTGTGCCTGATCTCCGAC<br/> TTTTACCCTGGCGCTGTGACCGTGGCCTGGAAGGCTGATGGATCT<br/> CCTGTGAAGGCTGGCGTGGAACCAACCAAGCCTTCCAAGCAGTC<br/> CAACAACAAATACGCCGCCTCCTCCTACCTGTCTCTGACCCCTGA<br/> ACAGTGGAAGTCCCACCGTCTACAGCTGCCAAGTGACCCATG<br/> AGGGCTCCACCGTGGAAGAACCGTGCGTCTACCGAGTGCTCC<br/> TGATGA</p>                                                                        |
| SEQ ID NO: 36 | <p>ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br/> GCCAGGATCTACAGGACAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCG<br/> AAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCT<br/> TCCGGCTACACCTTCTCCAGCTACTACATGCACTGGGTCCGACAG<br/> GCCCCTGGACAAGGATTGGAGTGGATGGGCATCATCAACCCCTC<br/> TGGCGGCAACACCTCTTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGA<br/> CCATGACCAGAGACACCTCCACCAGCACCGTGTACATGGAAGTGT<br/> TCCAGCCTGAGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAG<br/> AGGCGGATACCAGCTGCCTCACGGTAGAGCCAGAGCCTTCGATA<br/> TGTGGGGCCAGGGCACAATGGTCACCGTGTCTCTGTCTCCACC<br/> AAGGGACCTCTGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCCACA<br/> TCCGGTGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTT<br/> CCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACCTCTGGCGCTCTGACATCC<br/> GGCGTGCACACATTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCCTCCGGCCTGTAC<br/> TCTCTGTCTCTGTGCTGACCGTGCCTTCCAGCTCTCTGGGAACC<br/> CAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAA<br/> GGTGGACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCAC</p>                            |

[0450]

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | ACCTGTCCACCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCC<br>GTGTTCCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCT<br>CGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGA<br>GGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG<br>TGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTC<br>CACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATT<br>GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC<br>CCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCC<br>AGCCTAGGGAACCCCAAGTTTACACCCTGCCTCCATGCCGGGAA<br>GAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTCGTGAAGGG<br>CTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCC<br>AGCCAGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCC<br>GACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCC<br>AGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGA<br>GGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCC<br>TGGCAAGTGATGA                                                                                                                                                                                   |
| SEQ ID NO: 37 | ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br>GCCAGGATCTACCGGCGCCATCAGAATGACCCAGTCTCCACTGA<br>GCCTGCCTGTGACATTGGGCCAGCCTGCCTCTATCTCCTGCACCT<br>CCTCTCAGTCTCTGGTGTACAGAGATGGCACCACCTACCTGAACT<br>GGTTCAGCAGAGGCCTGGCCAGTCTCCTAGACGGCTGATCTAC<br>AAGGTGTCCAACAGAGACTCTGGCGTGCCCGACAGATTCACCGG<br>CTCTGGCTCTGGCACCACATTCACCCTGACCATCTCCAGAGTGA<br>AGCCGAGGACGTGGGCATCTACTACTGTATGCAGGGCACCCACT<br>GGCCTCTGACCTTTGGCCAGGGAACAAAGGTGGAAATCAAGCGG<br>ACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCACCTTCCGACGAG<br>CAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCTGTGCTGCTGAACAA<br>CTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAATG<br>CCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGAC<br>TCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCTCCACACTGACCCTGTCC<br>AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAAGTGA<br>CCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGG<br>GCGAGTGCTGATGA                                                                                                                                      |
| SEQ ID NO: 38 | ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br>GCCAGGATCTACAGGCGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAG<br>GATTGGTTTCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGTGGCT<br>CTGGCTTCACCTTCTCCGACTACTGGATGTCCTGGGTCCGACAGG<br>CTCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGCGCCAACATCAAGAAAGAC<br>GGCTCCGTGAACTACTACGTGGACTCCGTGAAGGGCAGATTCAC<br>CATCTCTCGGGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAGATGA<br>ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGA<br>TTCGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACAGTGTCTCTGCT<br>TCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAG<br>TCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA<br>CTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCTCT<br>GACATCTGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGG<br>CCTGTACTCTCTGTCTCTGTCTGTGACCGTGCCTTCCAGCTCTCTG<br>GGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAA<br>CACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAAACCAAGTCTGCGACAAG<br>ACCCACACCTGTCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGA<br>CCTTCCGTGTTCTGTTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATG<br>ATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCT |

[0451]

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | CACGAGGATCCCCAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT<br>GGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGGAACAGTAC<br>AACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA<br>GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC<br>AAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAA<br>GGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCTGCCTCCATGCC<br>GGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTT<br>AAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAA<br>TGGCCAGCCAGAGAACAACACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGG<br>ACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACA<br>AGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATG<br>CACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCT<br>GTCCCTGGCAAGTGATGA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 39 | ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br>GCCAGGATCTACAGGACAGGCTGGCTTGACCCAGCCTCCTAGCG<br>TTTCCAAGGGCCTGAGACAGACCGCCACACTGACCTGTACCGGC<br>AACTCTAACAACGTGGGCAATCAGGGCGCTGCCTGGTTGCAGCA<br>GCATCAGGGACATCCTCCAAAGCTGCTGTTCTACCGGAACAACA<br>ACAGAGCCTCCGGCATCTCCGAGCGGCTGTCTGCTTCTAGATCCG<br>GCAATACCGCCAGCCTGACCATCACTGGACTGCAGCCTGAGGAC<br>GAGGCCGACTACTATTGCCTGACCTGGGACTCCTCTCTGTCCGTG<br>GTGGTTTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTGCTGGGACAGCC<br>TAAGGCCAATCCTACCGTGACACTGTTCCCTCCATCCTCCGAGGA<br>ACTGCAGGCCAACAAGGCTACCCTCGTGTGCCTGATCTCCGACTT<br>TTACCCTGGCGCTGTGACCGTGGCCTGGAAGGCTGATGGATCTC<br>CTGTGAAGGCTGGCGTGGAACCAAGCCTTCCAAGCAGTCC<br>AACAACAAATACGCCGCCTCCTCCTACCTGTCTCTGACCCCTGAA<br>CAGTGGAAGTCCCACCGGTCCTACAGCTGCCAAGTGACCCATGA<br>GGGCTCCACCGTGGAAGAACCGTGGCTCCTACCGAGTGCTCCT<br>GATGA                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| SEQ ID NO: 40 | ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br>GCCAGGATCTACAGGACAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCG<br>AAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCTGCAAGGCT<br>TCCGGCTACACCTTTACCAGCTACGACATCTCCTGGGTCCGACAG<br>GCTCCTGGACAAGGCTTGGAATGGATGGGCGTGATCTGGACCGA<br>TGGCGGCACCAATTACGCCCAGAACTGCAGGGCAGAGTGACCA<br>TGACCACCGACACCTCTACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGCAG<br>TCCCTGAGATCTGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGA<br>TCAGCGGCTGTACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGCACAACCGTGA<br>CAGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGACCCAGCGTTTTCCCTCTGG<br>CTCCATCCTCCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCT<br>GCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGA<br>ACTCTGGCGCTCTGACATCTGGCGTGACACATTCCCTGCTGTGC<br>TGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCCTCTGTGGTTACCGTGC<br>CTTCCTCTAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACC<br>ACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAACCCAA<br>GTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCACCATGTCCTGCTCCAG<br>AACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTCTGTTTCCCTCCAAGCCTA<br>AGGACACCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTG<br>GTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTG<br>GTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCT<br>AGAGAGGAACAGTACAACCTCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCT |

[0452]

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | GACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGT<br>GCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACC<br>ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAACCTCAAGTCTGTAC<br>CCTGCCTCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC<br>TGAGCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCTGATATCGCCGTGG<br>AATGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAAC<br>CCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAA<br>GCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCT<br>CCTGCTCCGTGATGCACGAGGGCCCTGCACAATCACTACACACAG<br>AAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAGTGATGA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| SEQ ID NO: 41 | ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br>GCCAGGATCTACCGGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCT<br>CTCTGTCCGCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGA<br>GCCTCCGAGGACGTGAACACCTACGTGTCCTGGTATCAGCAGAA<br>GCCCCGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCTAACA<br>GATACACCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCA<br>CCGACTTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCG<br>CCACCTACTACTGCCAGCAGTCCTTCAGCTACCCACCTTTGGCC<br>AGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTTCC<br>GTGTTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACA<br>GCTTCTGTTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCTCGGGAAGCC<br>AAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTC<br>CCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACA<br>GCCTGTCCTCCACACTGACCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAG<br>CACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAG<br>CCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGCTGATGA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| SEQ ID NO: 42 | ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br>GCCAGGATCTACAGGACAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCG<br>AAGTGAAGAAACCTGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCT<br>TCTGGCTACACCTTTACCGACAACCTACATGATCTGGGTCCGACAG<br>GCTCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGCGACATCAACCCTTA<br>CAACGGCGGCACCACCTTCAACCAGAAATTCAAGGGCAGAGTGA<br>CCATCACCGCCGACAAGTCTACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGT<br>TCCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG<br>AGAGTCCCCTTACTTCTCCAACCTGTACGTGATGGACTACTGGGG<br>CCAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGAC<br>CCAGCGTTTTCCCTCTGGCTCCATCCTCCAAGTCCACCTCTGGTG<br>GAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAG<br>CCTGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCTCTGACATCTGGCGTG<br>CACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCTCTG<br>TCCTCTGTTCGTGACCGTGCCTTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACC<br>TACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTCGA<br>CAAGAGAGTGGAAACCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTC<br>CACCTTGTCTCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCC<br>TGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCC<br>CTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCA<br>GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAA<br>CGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACA<br>GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGATTGGCTGAAC<br>GGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGC<br>TCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGG<br>AACCTCAAGTCTGTACCCTGCCTCCTAGCCGGGAAGAGATGACC |

[0453]

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | AAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTACCC<br>TTCTGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGA<br>ACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCA<br>TTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCA<br>GCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGC<br>ACAATCACTACACACAGAAGTCTCTGTCTCTGAGCCCCGGCAAG<br>TGATGA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| SEQ ID NO: 43 | ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGT<br>GCCAGGATCTACAGGCGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCA<br>CACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCTACCCTGTCCTGCAAG<br>GCTTCTCAGTCCGTGGACTACGACGGCGACAACCTACATGAAGT<br>GTATCAGCAGAAGCCCCGGCCAGGCTCCTAGACTGCTGATCTACG<br>CCGCCTCCAACCTGGAATCTGGCATCCCCGCTAGATTCTCCGGCT<br>CTGGCTCTGGCACAGACTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTGGAAC<br>CTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCACCTGTCCAACGAGGAC<br>CTGTCCACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGGAC<br>AGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCA<br>GCTGAAGTCTGGCACCGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCT<br>CTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCC<br>TGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCC<br>AAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGACCTGTCCAA<br>GGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCC<br>ATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGC<br>GAGTGCTGATGA |

## [0454] 2. 表达和纯化

[0455] 将质粒共转染到Expi293细胞(Life Technologies A14527)或ExpiCHO细胞(Life Technologies A29127)中。使用1mg的总DNA进行多特异性构建体的转染,该构建体具有1:1突出与空穴重链比例和3:2轻链与重链比例。当需要生物素化时,除了多特异性构建体DNA外,每升还添加250μg的BirA。使用线性25,000Da聚乙烯亚胺(PEI,Polysciences Inc 23966)与总DNA以3:1的比例进行Expi293细胞转染。将DNA和PEI各自添加到50mL的OptiMem(Life Technologies 31985088)培养基中并无菌过滤。将DNA和PEI合并10分钟,然后添加至具有 $1.8-2.8 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞密度和至少95%的活力的Expi293细胞。根据制造商的说明进行ExpiCHO转染。转染后,Expi293细胞在潮湿培养箱中于37℃,8%CO<sub>2</sub>生长5-7天,并且ExpiCHO细胞于32℃,5%CO<sub>2</sub>生长14天。通过于4500x g离心沉淀细胞,并将上清液通过0.2μm膜过滤。将蛋白A树脂(GE 17-1279-03)添加到经过滤的上清液中,并于室温温育1-3小时。将树脂填充到柱中,用3x 10柱体积的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS,Life Technologies 14190-144)洗涤。用20mM柠檬酸盐,100mM NaCl,pH 2.9从柱上洗脱结合的蛋白。必要时,使用PBS的流动缓冲液,在Superdex 200柱上使用配体亲和和/或尺寸排阻色谱法进一步纯化蛋白质。

## [0456] 表4. 氨基酸序列

[0457]

| SEQ ID NO     | 描述                              | 氨基酸序列                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 44 | $\alpha$ CCR2<br>MC12 VH        | QVQLQESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTDFSVHWVR<br>QPPGKGLEWMGRIRSEGNTDYN SALKSRLSISRDTSKS<br>QVFLKMNSLQTEDTAIFYCTRGDILGFGYWGGQVMVT<br>VSS                                                                                                                           |
| SEQ ID NO: 45 | $\alpha$ CCR2<br>MC12 VL        | DIVMTQSPLSVSVTPGESASISCRSSKSLHFKGITFVY<br>WYLQKPGQSPQLLIFRMSSLASGVPDRFSGSGSETDFT<br>LKISRVEAEDVGTYYCGQLLENPYTFGAGTKLELK                                                                                                                                    |
| SEQ ID NO: 46 | R2b CH1                         | AQTTAPSVYPLAPGCGDTTSSTVTLGCLVKGYFPEPVT<br>VTWNSGALSSDVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTSSTWPSQ<br>TVTCNVAHPASSTKVDKKVERR                                                                                                                                                 |
| SEQ ID NO: 47 | R2b CL                          | RADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCVNNFYPRDIS<br>VKWKIDGSEQRDGVLDSDVDQDSKDYSTYSMSSTLSLT<br>KVEYERHNLTYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC                                                                                                                                       |
| SEQ ID NO: 48 | $\alpha$ mCSF1R<br>VH           | QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSNFMHWIK<br>QQPGNGLEWIGWIYPGDGDTEYNQKFNGKATLTADKS<br>SSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAVNYGGYVLDAWGQG<br>ASVTVSS                                                                                                                         |
| SEQ ID NO: 49 | R2a CH1                         | AETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYFPEPVT<br>VTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWS<br>SQAVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRECN                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 50 | $\alpha$ mCSF1R<br>VL           | EIVLTQSPPTMAASPGEKVTITCRASSSTNYMSWYQQK<br>SGASPKPWYETSKLASGVPDRFSGSGSGTSYSFTISSM<br>ETEDAATYYCHQWSSTPLTFGSGTKLEIK                                                                                                                                          |
| SEQ ID NO: 51 | R2a CL                          | RADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCVNNFYPRDIS<br>VKWKIDGSEQRDGVLDSDVDQDSKDYSTYSMSSTLSLT<br>KVEYERHNLTYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC                                                                                                                                       |
| SEQ ID NO: 52 | mFc 突出                          | TIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVT<br>CVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDY<br>NSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIE<br>RTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLWCMVT<br>DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGDSYFMY<br>SKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRT<br>PGK |
| SEQ ID NO: 53 | mFc 空穴                          | TIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVT<br>CVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDY<br>NSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIE<br>RTISKPKGSVRAPQVCVLPPEEEMTKKQVTLSCAVTD<br>FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGDSYFMY<br>KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRT<br>GK   |
| SEQ ID NO: 54 | $\alpha$ hCCR2<br>洛扎利珠<br>单抗 VH | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSAYAMNWV<br>RQAPGKGLEWVGRI RTKNNNYATYYADSVKDRFTISR<br>DDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTFYGNQVWGQG<br>TLVTVSS                                                                                                                         |

[0458]

|               |                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 55 | hCH1                             | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT<br>VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL<br>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC                                                                                                                                                          |
| SEQ ID NO: 56 | hFc 突出                           | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI<br>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLV<br>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY<br>SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL<br>PGX, 其中 X 是 K 或不存在 |
| SEQ ID NO: 57 | $\alpha$ hCCR2<br>洛扎利珠<br>单抗 VL  | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTFLN<br>WFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGGTDF<br>LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTFPYTFGQGTREIK                                                                                                                                                  |
| SEQ ID NO: 58 | hCL<br>(kappa)                   | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK<br>VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS<br>KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                      |
| SEQ ID NO: 59 | $\alpha$ hCCR2<br>D1 VH          | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMH<br>VRQAPGQGLEWMGWINPNSGVTKYAQKFQGRVTMT<br>RDTSTINTAYMELSRLRFDDTDVYYCATGGFGYWGE<br>GTLTVSS                                                                                                                                           |
| SEQ ID NO: 60 | $\alpha$ hCCR2<br>D1 VL          | LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGA<br>AWLQQHQGQPPKLLSYRNHNRPSPGVSEFSPSRSG<br>DTSSLTITGLQPEDEADYYCLAWDSSLRAVFGTGK<br>LTVL                                                                                                                                                |
| SEQ ID NO: 61 | hCL<br>(lambda)                  | GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP<br>GAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSY<br>LSLTPQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS                                                                                                                                                        |
| SEQ ID NO: 62 | $\alpha$ hCCR2<br>42G7 VH        | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYYM<br>HWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGNTSYAQKFQGRV<br>TMTDRDTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGGYQLP<br>HGRARAFDMWGQGTMTVTVSS                                                                                                                                |
| SEQ ID NO: 63 | $\alpha$ hCCR2<br>42G7 VL        | AIRMTQSPLSLPVTLGQPASISCTSSQSLVYRDG<br>TTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRF<br>TSGSGGTFTLTISRVEAEDVGIYYCMQGTHTWPL<br>TFGQGTKEIK                                                                                                                                             |
| SEQ ID NO: 64 | $\alpha$ hCCR2<br>43G12 VH       | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSDYWM<br>SWVRQAPGKGLEWVANIKKDGSVNYYVDSVKGR<br>FTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRFDY<br>WGQGTLVTVSS                                                                                                                                           |
| SEQ ID NO: 65 | $\alpha$ hCCR2<br>43G12 VL       | QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGA<br>AWLQQHQGHPPKLLFYRNNNRASGISERLSASRSG<br>NTASLTITGLQPEDEADYYCLTWDSLSVVVFGG<br>GTLTVL                                                                                                                                                |
| SEQ ID NO: 66 | $\alpha$ hCSF1R<br>依米妥珠<br>单抗 VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYD<br>ISWVRQAPGQGLEWMGVIWTDGGTNYAQKLQGR<br>VTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDQRL<br>YFDVWGQGTTVTVSS                                                                                                                                         |
| SEQ ID NO: 67 | $\alpha$ hCSF1R<br>依米妥珠<br>单抗 VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDVNTYVSW<br>YQQKPGKAPKLLIYAASNRYTGVPFRFSGSGSGT<br>DFLTISLQPEDFATYYCQQSFSYPTFGQGTKEIK                                                                                                                                                          |
| SEQ ID NO: 68 | hFc 空穴                           | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br>YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI<br>EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK                                                                                                       |

[0459]

|               |                          |                                                                                                                                     |
|---------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |                          | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS<br>KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP<br>GX, 其中 X 是 K 或不存在                                |
| SEQ ID NO: 69 | αhCSF1R<br>卡比利珠<br>单抗 VH | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDNYMIW<br>VRQAPGQGLEWMGDINPYNGGTTFNQKFGRVTITAD<br>KSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARESPYFSNLYVMD<br>YWGGQTLTVSS |
| SEQ ID NO: 70 | αhCSF1R<br>卡比利珠<br>单抗 VL | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSVDDYDGDNYMN<br>WYQQKPGQAPRLLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFT<br>LTISSLEPEDFAVYYCHLSNEDLSTFGGGTKVEIK            |

[0460]

表5. 完全重链和轻链的蛋白质序列

[0461]

| 全长            | 可变            | 恒定            | Fc            |
|---------------|---------------|---------------|---------------|
| SEQ ID NO: 71 | SEQ ID NO: 44 | SEQ ID NO: 46 | SEQ ID NO: 52 |
| SEQ ID NO: 72 | SEQ ID NO: 45 | SEQ ID NO: 47 |               |
| SEQ ID NO: 73 | SEQ ID NO: 48 | SEQ ID NO: 49 | SEQ ID NO: 53 |
| SEQ ID NO: 74 | SEQ ID NO: 50 | SEQ ID NO: 51 |               |
| SEQ ID NO: 75 | SEQ ID NO: 54 | SEQ ID NO: 55 | SEQ ID NO: 56 |
| SEQ ID NO: 76 | SEQ ID NO: 57 | SEQ ID NO: 58 |               |
| SEQ ID NO: 77 | SEQ ID NO: 59 | SEQ ID NO: 55 | SEQ ID NO: 56 |
| SEQ ID NO: 78 | SEQ ID NO: 60 | SEQ ID NO: 61 |               |
| SEQ ID NO: 79 | SEQ ID NO: 62 | SEQ ID NO: 55 | SEQ ID NO: 56 |
| SEQ ID NO: 80 | SEQ ID NO: 63 | SEQ ID NO: 58 |               |
| SEQ ID NO: 81 | SEQ ID NO: 64 | SEQ ID NO: 55 | SEQ ID NO: 56 |
| SEQ ID NO: 82 | SEQ ID NO: 65 | SEQ ID NO: 58 |               |
| SEQ ID NO: 83 | SEQ ID NO: 66 | SEQ ID NO: 55 | SEQ ID NO: 68 |
| SEQ ID NO: 84 | SEQ ID NO: 67 | SEQ ID NO: 58 |               |
| SEQ ID NO: 85 | SEQ ID NO: 69 | SEQ ID NO: 55 | SEQ ID NO: 68 |
| SEQ ID NO: 86 | SEQ ID NO: 70 | SEQ ID NO: 58 |               |

[0462]

表6. 用于构建多特异性分子的链的氨基酸序列

[0463]

| SEQ ID NO     | 氨基酸序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 71 | QVQLQESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTDFSVHWVRQPPGKGLE<br>WMGRIRSEGNTDYNALKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIY<br>FCTRGDILGFGYWGGQVMVTVSSAQTTAPSVYPLAPGCGDITSSVT<br>TLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSSDVHTFPAVLQSGLYTLTSSVT<br>SSTWPSQTVTCNVAPASSTKVDKKVERRTIKPCPPCKCPAPNLLG<br>GPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEV<br>HTAQQTHTREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLP<br>APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPECEEMTKKQVTLWCMVTDPMPE<br>DIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVE<br>RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK |
| SEQ ID NO: 72 | DIVMTQSPLSVSVTPGESASISCRSSKSLHFKGITFVYWYLQKPGQS<br>PQLLIFRMSSLASGVPRDFSGSGSETDFTLKISRVEAEDVGTYYCGQ<br>LLENPYTFGAGTKLELKRADAAPTVISIFPSMEQLTSGGATVVCVFN<br>NFYPRDISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKSDSTYSMSSTLSLTK<br>VEYERHNLTYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC                                                                                                                                                                                                                                                 |

[0464]

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 73 | QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSNFMHWIKQQPGNGLE<br>WIGWIYPGDGDTEYNQKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSA<br>VYFCAVNYGGYVLDAGWGQASVTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKS<br>NSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSSGLYTLT<br>SSVTVPSSWSSQAVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRECNTIKPCPPCK<br>CPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS<br>WVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK<br>CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVCVLPPEEEMTKKQVTLSC<br>AVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMVSKLRV<br>EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK                  |
| SEQ ID NO: 74 | EIVLTQSPTTMAASPGEKVTITCRASSSTNYMSWYQQKSGASPKPWI<br>YETSKLASGVDPDRFSGSGSGTSYSFTISSMETEDAATYYCHQWSSTP<br>LTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCVNNFYPR<br>DISVKWKIDGSEQRDGVLDSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKVEYER<br>HNLYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| SEQ ID NO: 75 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSAYAMNWVRQAPGKGL<br>EWVGRIRTKNNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKT<br>EDTAVYYCTTFYGNVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS<br>GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC<br>PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK<br>CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLW<br>CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, 其中 X 是 K<br>或不存在 |
| SEQ ID NO: 76 | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTFLNWFQQRPQG<br>SPRRLIYLVSGLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW<br>QGTHFPYTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN<br>NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLTK<br>ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| SEQ ID NO: 77 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYHMHWRQAPGQG<br>LEWMGWINPNSGVTKYAQKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRLRFD<br>DTDVYYCATGGFGYWGEGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG<br>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC<br>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW<br>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC<br>KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWC<br>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV<br>KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, 其中 X 是 K 或<br>不存在     |
| SEQ ID NO: 78 | LPVLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGAAWLQQHQGQPP<br>KLLSYRNHNRPSPGVSEFSPSRSGDTSSLTITGLQPEDEADYYCLAW<br>DSSLRAVFVGTGKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCL<br>ISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLT<br>PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| SEQ ID NO: 79 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYYMHWRQAPGQG<br>LEWMGIINPSGGNTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED<br>TAVYYCARGGYQLPHGRARAFDMWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFP<br>LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

[0465]

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX，其中 X 是 K 或不存在                                                                                                                                                                               |
| SEQ ID NO: 80 | AIRMTQSPSLSPVTLGQPASISCTSSQSLVYRDGTTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFTGSGSGTFTLTISRVEAEDVGIYYCMQGTHWPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                     |
| SEQ ID NO: 81 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSDYWMSWVRQAPGKGL EWVANIKKDGSVNYYVDSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLR AEDTAVYYCTRFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX，其中 X 是 K 或不存在   |
| SEQ ID NO: 82 | QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLFYRNNNRASGISERLSASRSGNTASLTITGLQPEADYYCLTW DSSLSVVVFVGGGKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS                                                                                                                                                                                                                                                        |
| SEQ ID NO: 83 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDISWVRQAPGQGLEWMGVIWTDGGTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDQRLYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX，其中 X 是 K 或不存在 |
| SEQ ID NO: 84 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDVNTYVSWYQQKPGKAPKLLIYAASNRYTGVPSTRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSFYPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                            |
| SEQ ID NO: 85 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDNYMIWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGGTTFNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARESPYFSNLYVMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK                                                                                                                                            |

[0466]

|               |                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, 其中 X 是 K 或不存在                                                                            |
| SEQ ID NO: 86 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCCKASQSVVDYDGDNYMNWYQQKPGQAPRLLIYAASNLESGIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCHLSNEDLSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |

[0467] 表7. 用于生成 $\alpha$ CCR2/ $\alpha$ CSF1R多特异性分子的序列

[0468]

| 多特异性分子 | 重链1           | 轻链1           | 重链2           | 轻链2           |
|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1      | SEQ ID NO: 71 | SEQ ID NO: 72 | SEQ ID NO: 73 | SEQ ID NO: 74 |
| 2      | SEQ ID NO: 75 | SEQ ID NO: 76 | SEQ ID NO: 83 | SEQ ID NO: 84 |
| 3      | SEQ ID NO: 75 | SEQ ID NO: 76 | SEQ ID NO: 85 | SEQ ID NO: 86 |
| 4      | SEQ ID NO: 77 | SEQ ID NO: 78 | SEQ ID NO: 83 | SEQ ID NO: 84 |
| 5      | SEQ ID NO: 77 | SEQ ID NO: 78 | SEQ ID NO: 85 | SEQ ID NO: 86 |
| 6      | SEQ ID NO: 79 | SEQ ID NO: 80 | SEQ ID NO: 83 | SEQ ID NO: 84 |
| 7      | SEQ ID NO: 79 | SEQ ID NO: 80 | SEQ ID NO: 85 | SEQ ID NO: 86 |
| 8      | SEQ ID NO: 81 | SEQ ID NO: 82 | SEQ ID NO: 83 | SEQ ID NO: 84 |
| 9      | SEQ ID NO: 81 | SEQ ID NO: 82 | SEQ ID NO: 85 | SEQ ID NO: 86 |

[0469] 实施例2.UniTI-01结合表达单独mCCR2、单独mCSF1R或mCCR2和mCSF1R两者的细胞

[0470] 在本实施例和接下来的几个实施例中,对表7中所示的多特异性分子#1(也称为UniTI-01)进行了表征。UniTI-01是抗CCR2/抗CSF1R双特异性抗体。表11中还提供了UniTI-01的可变区和全长序列。在若干实施例中,将双特异性抗体UniTI-01与抗CCR2双价单特异性抗体或抗CSF1R双价单特异性抗体进行了比较。

[0471] 表11. 抗CCR2/抗CSF1R双特异性抗体分子的序列

[0472]

| SEQ ID NO     | 描述                             | 序列                                                                                                                                                                                                            |
|---------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 44 | $\alpha$ CCR2<br>MC12 VH       | QVQLQESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTDFSVHWVR<br>QPPGKGLEWMGRIRSEGNTDYNALKSRLSISRDTSKSQ<br>VFLKMNSLQTEDTAIFYCTRGDILGFGYWGQGVMTVS<br>S                                                                                 |
| SEQ ID NO: 45 | $\alpha$ CCR2<br>MC12 VL       | DIVMTQSPLSVSVTPGESASISCRSSKSLHFKGITFVYW<br>YLQKPGQSPQLLIFRMSSLASGVPDRFSGSGSETDFTLKI<br>SRVEAEDVGTYTCGQLENPYTFGAGTKLELK                                                                                        |
| SEQ ID NO: 71 | 全长<br>$\alpha$ CCR2<br>MC12 重链 | QVQLQESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTDFSVHWVR<br>QPPGKGLEWMGRIRSEGNTDYNALKSRLSISRDTSKSQ<br>VFLKMNSLQTEDTAIFYCTRGDILGFGYWGQGVMTVS<br>SAQTTAPSVYPLAPGCGDTTSTVTLGCLVKGYFPEPVT<br>VTWNSGALSSDVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTSSTWPSQT |

[0473]

|               |                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               |                        | VTCNVAHPASSTKVDKKVERRTIKPCPPCKCPAPNLLG<br>GPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS<br>WVFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW<br>MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP<br>PCEEEMTKKQVTLWCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTEL<br>NYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCS<br>VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK                                                                                                                                                                                                                           |
| SEQ ID NO: 72 | 全长<br>αCCR2<br>MC12 轻链 | DIVMTQSPLSVSVTPGESASISCRSSKSLHFKGITFVYW<br>YLQKPGQSPQLLIFRMSSLASGVPDRFSGSGSETDFTLKI<br>SRVEAEDVGTYTCGQLLENPYTFGAGTKLELKRADAAP<br>TVSIFPPSMEQLTSGGATVVCVFNNFYPRDISVKWKIDG<br>SEQRDGVLDSDVDQDSKSTYSMSSTLSLTKVEYERHN<br>LYTCEVVKHTSSSPVVKSFNRNEC                                                                                                                                                                                                                                                               |
| SEQ ID NO: 48 | αmCSF1R<br>VH          | QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSNFMHWIK<br>QQPGNGLEWIGWIYPGDGDTEYNQKFNGKATLTADKS<br>SSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAVNYGGYVLDAWGQGA<br>SVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| SEQ ID NO: 50 | αmCSF1R<br>VL          | EIVLTQSPTTMAASPGEKVTITCRASSSTNYMSWYQQKS<br>GASPKPWIYETSKLASGVPDRFSGSGSGTSYSFTISSMET<br>EDAATYYCHQWSSTPLTFGSGTKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| SEQ ID NO: 73 | 全长<br>αmCSF1R<br>重链    | QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSNFMHWIK<br>QQPGNGLEWIGWIYPGDGDTEYNQKFNGKATLTADKS<br>SSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAVNYGGYVLDAWGQGA<br>SVTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGY<br>FPEPVTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTP<br>SSTWSSQAVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRECNTIKPCPP<br>CKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDV<br>SEDDPDVQISWVFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS<br>ALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV<br>RAPQVCVLPPEEEMTKKQVTLSCAVTDFMPEDIYVEW<br>TNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMVSKLRVEKKNWV<br>ERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK |
| SEQ ID NO: 74 | 全长<br>αmCSF1R<br>轻链    | EIVLTQSPTTMAASPGEKVTITCRASSSTNYMSWYQQKS<br>GASPKPWIYETSKLASGVPDRFSGSGSGTSYSFTISSMET<br>EDAATYYCHQWSSTPLTFGSGTKLEIKRADAAPT<br>PSMEQLTSGGATVVCVFNNFYPRDISVKWKIDGSEQRD<br>GVLDSDVDQDSKSTYSMSSTLSLTKVEYERHNL<br>YTCEVVKHTSSSPVVKSFNRNEC                                                                                                                                                                                                                                                                         |

[0474] 根据制造商的说明,用小鼠CCR2、小鼠CSF1R或小鼠CCR2和CSF1R两者瞬时转染 ExpiCHO细胞。简而言之,用ExpiCHO细胞以 $5.6-6.3 \times 10^6$ 个细胞/mL的细胞密度和至少95%活力进行转染。对于每次转染,用1mL的OptiPro SFM(Gibco 12309050) 稀释25μg的DNA,并使用spin-X离心管过滤器(Corning8160) 进行过滤。将920μL的OptiPro和80μL的expifectamine的溶液添加到经过滤的DNA,于室温温育1分钟,并然后添加到细胞中。转染的第1天,使用150μL的ExpiCHO增强剂增强细胞。

[0475] 转染的第2天,将细胞用含1%BSA(Sigma)的PBS洗涤,并用于放置96孔V底平板(Biotix AP-0350-9CVS),其中100,000个细胞/孔。将UniTI-01以系列稀释液添加到细胞,并于4℃温育1小时。将板用含有1%BSA的PBS洗涤两次。二抗是山羊抗小鼠Fc生物素抗体(Invitrogen目录号31805)的1:500稀释液,并于4℃与细胞温育45分钟。将板用含有1%BSA的PBS洗涤两次。为了检测,每孔使用 $1.56 \times 10^{-3}$ μg的链霉亲和素-PE(eBioscience目录号12-4317-87),并于4℃温育1小时。在CytoFLEX S(Beckman Coulter)上读取平板。数据计算为PE阳性群体的中值荧光强度对PE阴性群体的中值荧光强度。将数据标准化为总中值荧光

强度的百分比。

[0476] 不受理论的束缚,相对于表达CCR2或CSF1R的细胞,UniTI-01可以优先结合表达CCR2和CSF1R两者的细胞。与双靶标结合增加了UniTI-01对靶细胞的亲合力的假设一致,相对于单阳性细胞,UniTI-01表现出对CCR2和CSF1R双阳性细胞的增强结合(图1)。UniTI-01显示了具有15nM的 $EC_{50}$ 的与仅表达CCR2的细胞结合。对于仅表达CSF1R的细胞,UniTI-01具有1nM的 $EC_{50}$ 。UniTI-01对表达CCR2和CSF1R两者的细胞显示400pM的 $EC_{50}$ 。

[0477] 实施例3.UniTI-01在体外抑制MCP1诱导的骨髓来源单核细胞的迁移

[0478] 从健康Balb/c小鼠的股骨中分离出小鼠骨髓细胞,并在存在mCSF1的情况下持续四天分化为单核细胞。通过流式细胞术分析造血细胞上的CCR2和CSF1R表达来评价单核细胞分化。对分化的细胞进行计数,并分别与不同浓度的同种型(mIgG2a)、抗CCR2和UniTI-01于37℃培养30分钟。随后将经抗体处理的细胞添加到跨孔插入板的上部室上,该板在底部室中包含MCP1(CCL2)。从跨孔板的底部室收集培养基后,对MCP1诱导的迁移进行评价,并通过流式细胞术分析进行细胞数计数。

[0479] 抗CCR2/抗CSF1R双特异性抗体UniTI-01以剂量依赖性方式抑制MCP1诱导的单核细胞穿过跨孔的迁移(图2)。以3.7 $\mu$ M及以上的剂量,单核细胞迁移减少到在不存在趋化因子的情况下观察到的水平(图2)。用抗CCR2抗体处理获得了相似的结果,而用IgG2a处理细胞不影响迁移(图2)。

[0480] 实施例4.UniTI-01在体外抑制mCSF-1依赖性骨髓来源巨噬细胞的增殖

[0481] 从健康Balb/c小鼠的股骨中分离出小鼠骨髓细胞,并在存在mCSF1的情况下持续四天分化为单核细胞。流式细胞术分析显示,在第0天骨髓细胞未明显表达CCR2(图3A;左图)。然而,在存在mCSF1的情况下细胞培养4天后,大部分骨髓细胞分化为表现出CCR2和CSF1R表达的单核细胞(图3A;右图)。对单核细胞进行计数,并在存在mCSF1的情况下铺板在96孔板中。将UniTI-01、抗CSF1R或mIgG2a抗体添加到含有mCSF1的细胞。于37℃温育72小时后,按照制造商的MTT测定法试剂盒方案,通过在OD570的比色读数对细胞增殖代谢活性进行评价。

[0482] mCSF1诱导的单核细胞分化为巨噬细胞,在显微镜下可视化为长的成纤维细胞。在存在mCSF1的情况下,UniTI-01和抗CSF1R抗体阻止巨噬细胞的增殖(图3B)。

[0483] 实施例5.UniTI-01在体外不抑制mCSF-1依赖性骨髓来源单核细胞分化

[0484] 从初始(naive)(非肿瘤携带)Balb/c小鼠的股骨和胫骨两者中提取骨髓细胞。在添加mCSF-1以允许单核细胞分化之前,将UniTI-01、抗CSF1R或mIgG2抗体与新鲜分离的骨髓细胞于37℃预温育30分钟。于37℃温育4天后,收集细胞用于流式细胞术染色以鉴定分化的单核细胞。于4℃用荧光标记的抗体将细胞染色15分钟,然后进行流式细胞术分析。单核细胞门控为活的、CD45<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>、Ly6C<sup>+</sup>、Ly6G<sup>-</sup>细胞。

[0485] 与骨髓前体细胞在第0天不显著表达CCR2的观察结果(图3A)一致,抗CCR2/抗CSF1R双特异性抗体UniTI-01在体外不抑制细胞培养4天后mCSF-1依赖性骨髓来源单核细胞分化(图4)。相比之下,抗CSF1R二价单特异性抗体在体外显著抑制mCSF-1依赖性骨髓来源单核细胞分化(图4)。

[0486] 实施例6.UniTI-01在体外特异性结合原发性肿瘤内M-MDSC和M2样巨噬细胞

[0487] 以500-800mm<sup>3</sup>的体积收获在B6-小白鼠中生长的LLC肿瘤,并于37℃使用liberase

DL+DNA酶I解离30分钟,然后在GentleMacs上进行解离程序m\_imptumor\_01。将单细胞悬液通过70 $\mu$ m滤网过滤,并用荧光标记的抗体对总细胞染色。对于该结合研究,使用Alexa Fluor 647抗体标记试剂盒(ThermoFisher Scientific)标记100 $\mu$ g的UniTI-01,通过Nanodrop确定标记抗体的浓度,并在Facs缓冲液中制备指定的系列稀释液(5 $\mu$ M、1 $\mu$ M、0.1 $\mu$ M、0.01 $\mu$ M)。通过活的CD45+CD11b+Ly6ChighLy6G-门控M-MDSC,通过活的CD45+CD11b+F4/80+CD206+门控M2巨噬细胞,通过活的CD45+CD3+门控CD3+ T细胞,以及通过活的CD45+CD11b+Ly6G+门控嗜中性粒细胞。将细胞在黑暗中冰上染色15分钟,用zombie violet染色以保持活力,然后立即在细胞仪上采集。

[0488] UniTI-01与M2巨噬细胞和M-MDSC的浓度依赖性结合显示于图5中。

[0489] 实施例7.UniTI-01在体内若干小鼠模型中消耗抑制性髓样细胞

[0490] 给小鼠注射MC38结肠癌细胞系(B6小白鼠)或EMT6乳腺癌细胞系(BALB/c小鼠),并且一旦肿瘤达到150-200mm<sup>3</sup>的体积,就将相同的小鼠随机分组为两个分部。一个分部在第1、4、7和10天经由ip途径以20mg/kg的剂量接受20mg/kgUniTI-01的治疗,而另一个以相同的时间表接受PBS(媒介物)。第4次给药后24小时,收获肿瘤用于流式细胞术分析。将肿瘤切成约2mm小块,并于37 $^{\circ}$ C用liberase+DNA酶I解离30分钟,随后在gentleMACs上使用1分钟肿瘤混合程序。通过70 $\mu$ m过滤器过滤制备单细胞悬液并计数。然后将细胞染色用于流式细胞术分析。通过活的CD45+CD11b+Ly6G-Ly6C-F4/80+门控TAM,通过活的CD45+CD11b+Ly6G-Ly6C<sup>高</sup>门控M-MDSC。每个点代表单一小鼠。误差条代表单个小鼠之间的平均值和标准误差。使用Student's t检验计算统计数据。

[0491] 与在实施例6中观察到的与M2巨噬细胞和M-MDSC的结合一致,抗CCR2/抗CSF1R双特异性抗体UniTI-01在EMT6和MC38同基因肿瘤模型两者中均减少了TAM和M-MDSC(图6)。

[0492] 实施例8.UniTI-01在体内消耗肿瘤相关巨噬细胞,但保留Kupffer细胞

[0493] 给Balb/c小鼠注射EMT6同基因乳腺细胞系,并且一旦肿瘤达到150-200mm<sup>3</sup>的体积,就将其随机分组为三个分部。在第1、4、7和10天,一个分部经由ip途径以20mg/kg的剂量接受20mg/kg UniTI-01的治疗,第二分部接受10mg/kg抗CSF1R抗体的治疗,而第三分部接受PBS。第4次给药后24小时,处死小鼠并收获肿瘤和肝,福尔马林固定并石蜡包埋。为了检测肝和肿瘤中的巨噬细胞群,将组织切片用F4/80抗体(Cell Signaling)进行免疫组织化学染色,并通过Envision系统进行检测。通过ImageJ软件分析每肿瘤或肝切片的约10个感兴趣的区域。

[0494] 不希望被理论所束缚,相对于表达CCR2或CSF1R的细胞,UniTI-01可以优先结合表达CCR2和CSF1R两者的细胞,并且相对于表达CCR2和CSF1R两者的肿瘤相关巨噬细胞,可以对不表达CCR2的组织驻留巨噬细胞如肝驻留Kupffer细胞的影响较小。

[0495] 与先前描述的数据(图6)一致,抗CCR2/抗CSF1R双特异性抗体UniTI-01显著消耗肿瘤相关巨噬细胞(图7A和7C)。相比之下,UniTI-01并未明显消耗肝中的组织驻留巨噬细胞(图7B和7D),而抗CSF1R二价单特异性抗体显著减少了两个区室中的巨噬细胞(图7A-7D)。

[0496] 实施例9.UniTI-01在体外不抑制CCR2阴性NFS-60细胞中CSF-1依赖性细胞存活

[0497] 将CCR2阴性、CSF1R阳性NFS-60细胞在存在UniTI-01、单价单特异性抗CSF1R抗体、二价单特异性抗CSF1R抗体或mIgG2抗体的情况下在无酚红培养基中于37 $^{\circ}$ C培养30分钟,随

后添加mCSF-1以保持细胞存活。于37℃温育48小时后,按照制造商的MTT测定法试剂盒方案,通过在OD570的比色读数对细胞活力代谢活性进行评价。

[0498] 如图8A中所示,抗CSF1R二价单特异性抗体(aCSF1R)在高抗体浓度下显著降低了NFS-60细胞的活力。相比之下,抗CCR2/抗CSF1R双特异性抗体UniTI-01或单价单特异性抗CSF1R抗体(mono-aCSF1R)在体外不抑制CCR2阴性NFS-60细胞中依赖性CSF-1的细胞存活(图8A)。不希望受到理论的束缚,该数据表明,与抗CSF1R双价单特异性抗体相比,抗CCR2/抗CSF1R双特异性抗体UniTI-01抑制CCR2阴性、CSF1R阳性细胞的可能性较小,这与图7B和7D中描述的结果一致。为了确认NFS-60不表达CCR2,将细胞用含有BSA的PBS缓冲液以及荧光标记的CSF1R和CCR2的抗体于4℃洗涤20分钟,随后进行流式细胞术分析。如图8B中所示,NFS-60表达CSF1R而不表达CCR2。

[0499] 实施例10.UniTI-01在体内促进EMT6肿瘤中CD8<sup>+</sup> T细胞浸润

[0500] 给Balb/c小鼠注射EMT6同基因乳腺细胞系,并且一旦肿瘤达到150-200mm<sup>3</sup>的体积,就将其随机分组为三个分部。在第1、4、7和10天,一个分部经由ip途径以20mg/kg的剂量接受20mg/kg UniTI-01的治疗,第二分部接受10mg/kg抗PDL1的治疗,而第三分部接受PBS。第4次给药后24小时,处死小鼠并收获肿瘤用于流式细胞术分析。将肿瘤切成约2mm小块,并于37℃用liberase+DNA酶I解离30分钟,随后在gentleMACS上使用1分钟肿瘤混合程序。通过70μm过滤器过滤制备单细胞悬液并计数。然后将细胞染色用于流式细胞术分析。通过在表达CD45和CD3的活CD8细胞上染色对CD8T细胞进行门控。每个点代表单一小鼠肿瘤。误差条代表单个小鼠之间的平均值和标准误差。使用单向方差分析计算统计数据。

[0501] 抗CCR2/抗CSF1R双特异性抗体UniTI-01在体内显著增加了EMT6肿瘤中CD8<sup>+</sup> T细胞浸润(图9)。

[0502] 实施例11.UniTI-01在体内降低EMT6肿瘤中的Treg频率并增加CD8T细胞/Treg比率

[0503] 给B6小白鼠注射MC38同基因结肠细胞系,并且一旦肿瘤达到150-200mm<sup>3</sup>的体积,就将其随机分组为三个分部。在第1、4、7和10天,一个分部经由ip途径以20mg/kg的剂量接受20mg/kg UniTI-01的治疗,第二分部接受10mg/kg抗PDL1的治疗,而第三分部接受PBS。第4次给药后24小时,处死小鼠并收获肿瘤用于通过流式细胞仪的免疫分析。将肿瘤切成约2mm小块,并于37℃用liberase+DNA酶I解离30分钟,随后在gentleMACs上使用1分钟肿瘤混合程序。通过70μm过滤器过滤制备单细胞悬液并计数。然后将细胞染色用于流式细胞术分析。通过对活CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T细胞进行门控来分析T调节细胞。另外,通过对表达CD45和CD3的活CD8细胞染色来门控CD8T细胞。每个点代表单一小鼠肿瘤。误差条代表单个小鼠之间的平均值和标准误差。使用单向方差分析计算统计数据。

[0504] 与用抗PDL1抗体进行的治疗相比,用UniTI-01进行的治疗导致肿瘤中Treg频率的更大降低和CD8<sup>+</sup> T细胞/Treg比率的更大提高(图10A和10B)。

[0505] 实施例12.当与抗PDL1抗体组合使用时,UniTI-01显示抗肿瘤功效、肿瘤消退和提高的生存率

[0506] 在皮下小鼠同基因EMT6乳腺癌模型中测试了UniTI-01与抗PDL1抗体组合的肿瘤生长抑制。在研究开始之前,使约8周大的雌性BALB/c (Jackson Labs)适应3天。以每笼5只动物圈养小鼠,并将一次性笼放在Innovive IVC小鼠架中。在第0天,将先前经测试不含小

鼠病原体的EMT6细胞(小鼠CLEAR小组,Charles River Labs)以 $0.5 \times 10^6$ 个细胞的密度皮下植入BALB/c小鼠的右侧腹。使用数显卡尺每周两次测量和记录两个维度的肿瘤。使用公式宽度 $\times$ 宽度 $\times$ 长度 $\times 0.52$ 计算肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。在植入后第7天测量肿瘤体积后,根据 $77\text{mm}^3$ 的平均肿瘤体积将小鼠随机分组为四个分部。一个分部用PBS处理,第二分部用抗PDL1抗体以 $10\text{mg/kg}$ 的剂量治疗,第三分部用UniTI-01以 $20\text{mg/kg}$ 的剂量治疗,而第四分部用抗PDL1抗体和UniTI-01的组合治疗。所有治疗均经由ip途径进行,并且时间表为每周两次,至多给药4周。给药前,所有药剂均在PBS中新鲜配制。肿瘤体积测量持续长达80天。肿瘤体积数据绘制为平均值 $\pm$ SEM。此外,基于达到 $2000\text{mm}^3$ 的TV的研究终点所需的时间来记录生存率,并绘制为Kaplan Meier曲线。通过对数秩检验确定统计数据,并绘制p值。

[0507] 如图11A和11B中所示,用UniTI-01治疗改善了荷瘤动物的生存。组合UniTI-01和抗PDL1抗体进一步改善了体内抗肿瘤功效、肿瘤消退和生存(图11A和11B)。

[0508] 通过引用并入

[0509] 在本文中提及的所有出版物和专利都在此以其整体通过引用并入,如同每个单独的出版物或专利确切地且单独地指明为通过引用并入。

[0510] 等同实施方案

[0511] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验就确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等同实施方案。此类等同实施方案旨在由所附权利要求所涵盖。

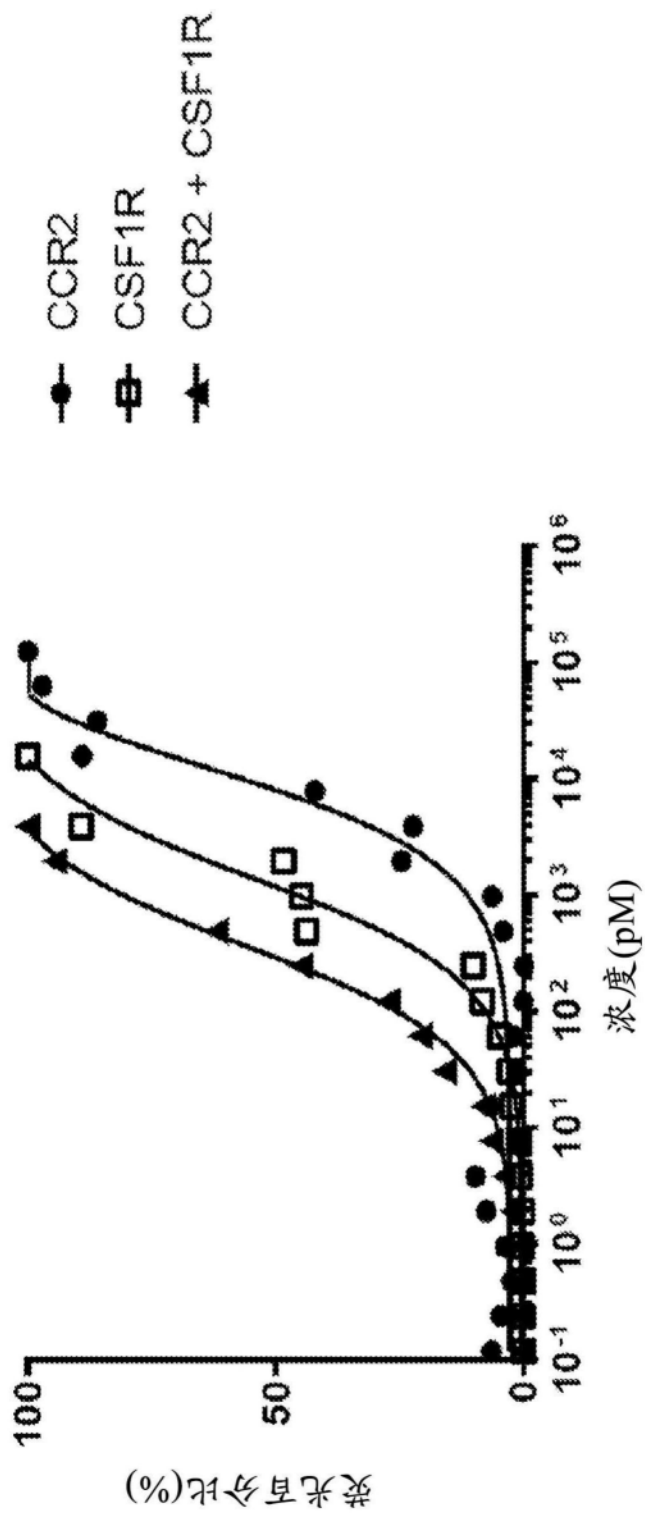


图1

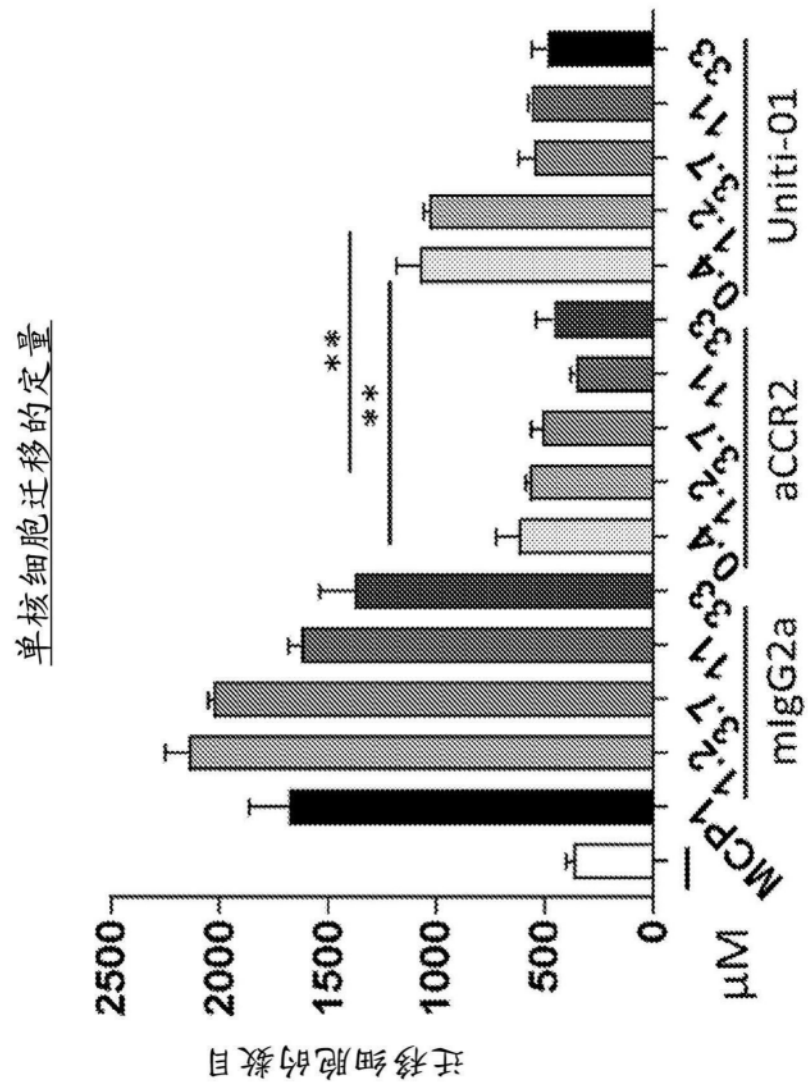


图2

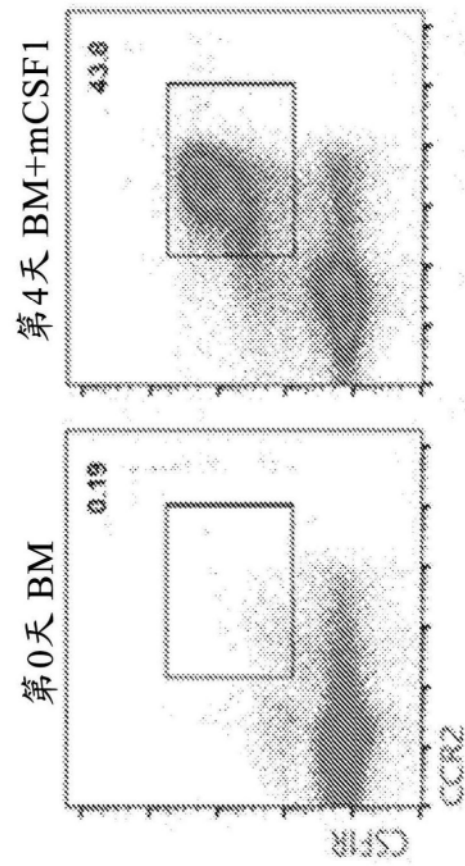


图3A

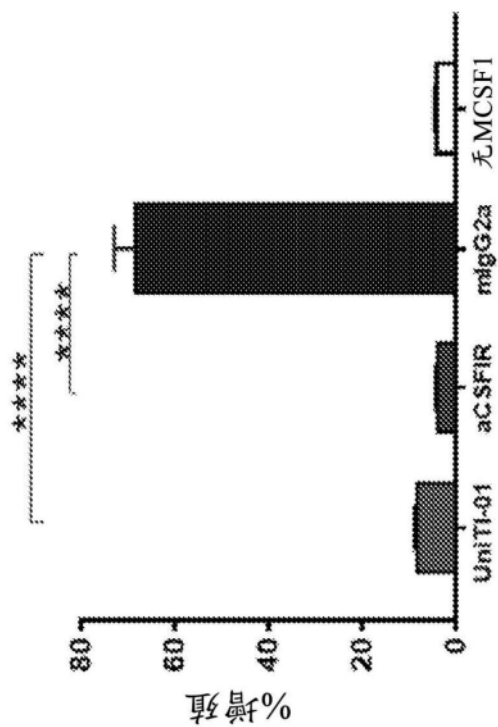


图3B

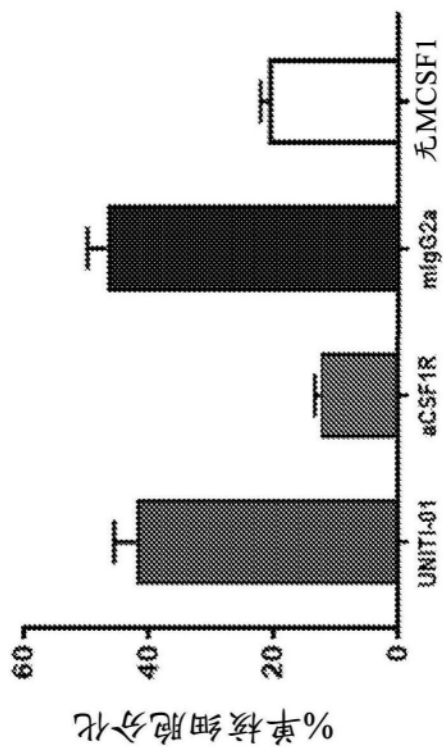


图4

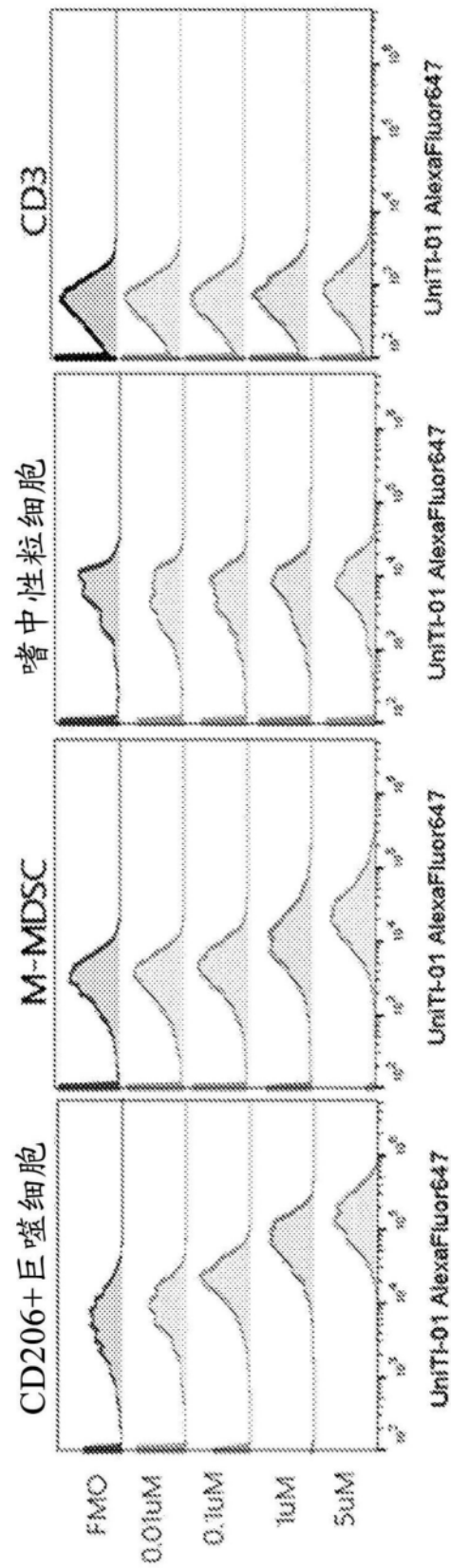


图5

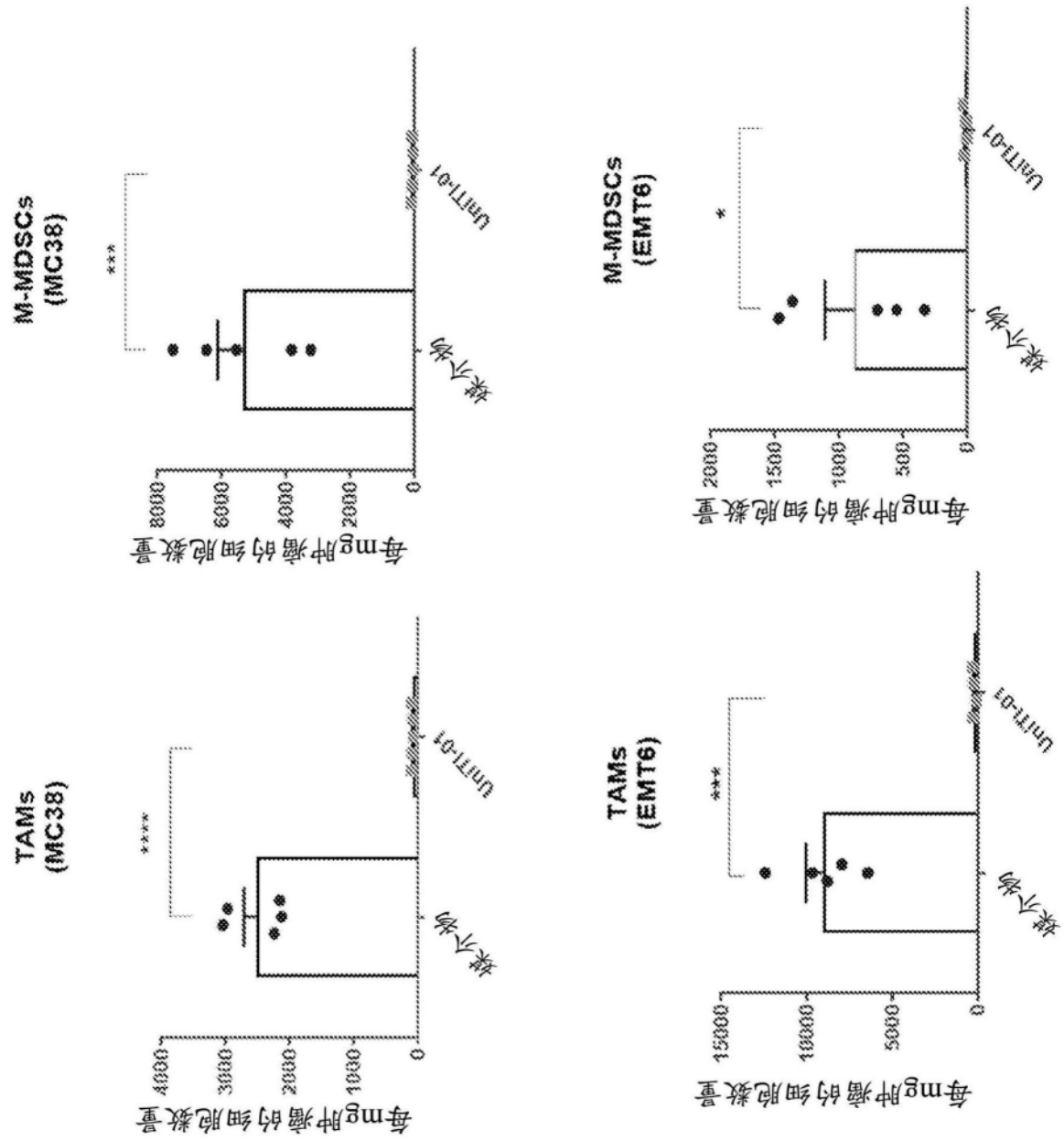


图6

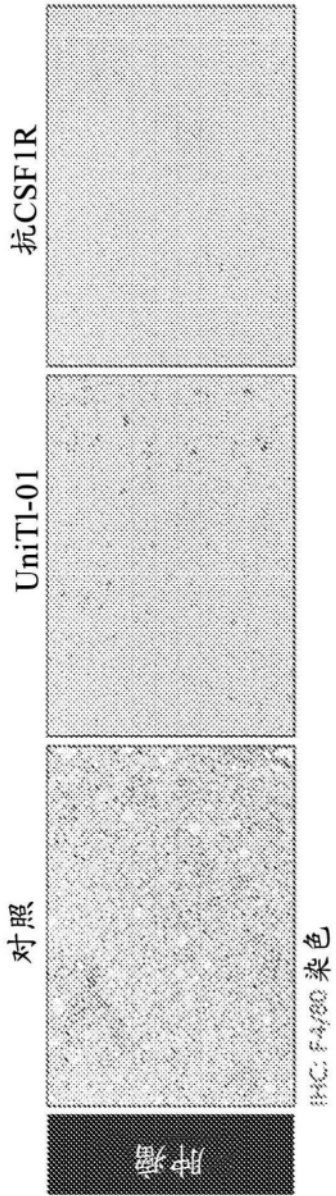


图7A

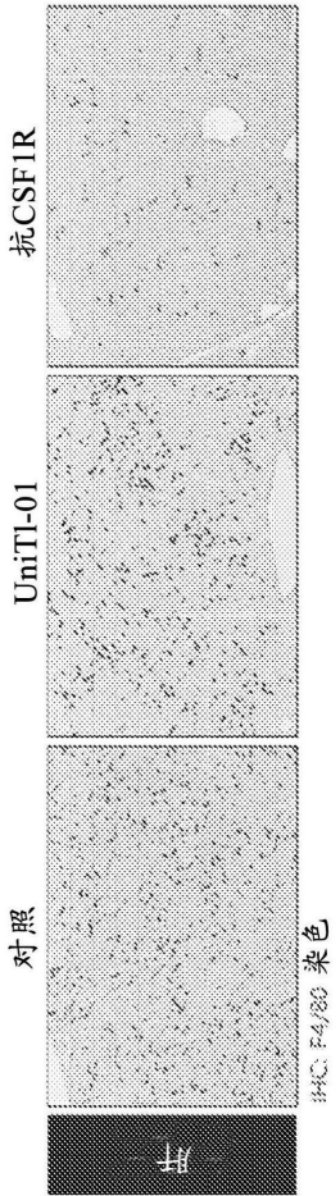


图7B

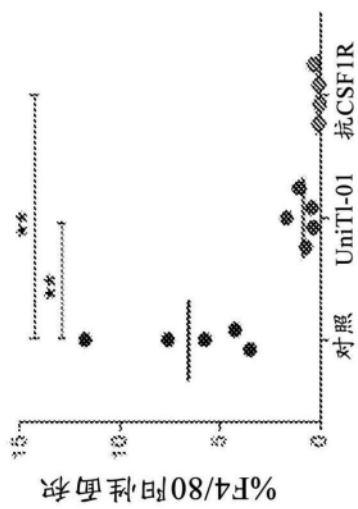


图7C

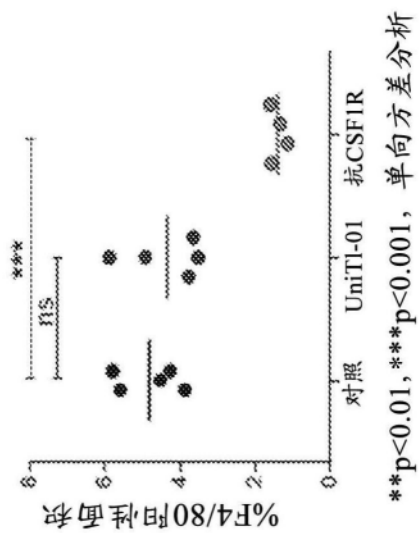


图7D

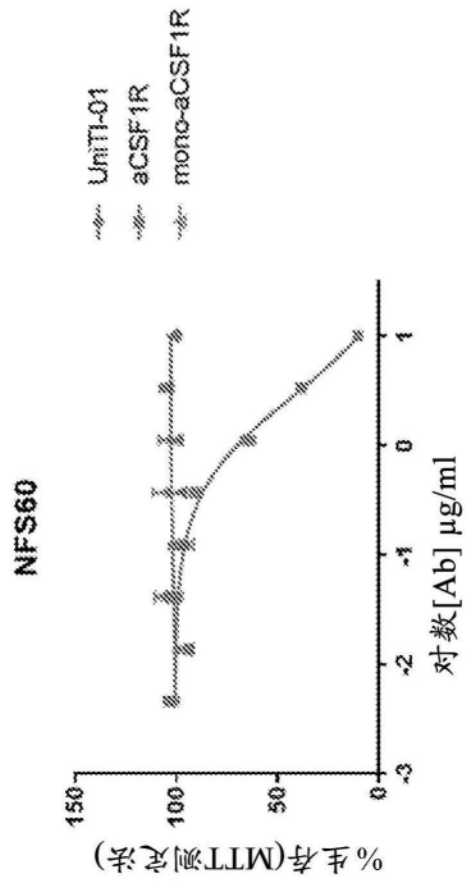


图8A

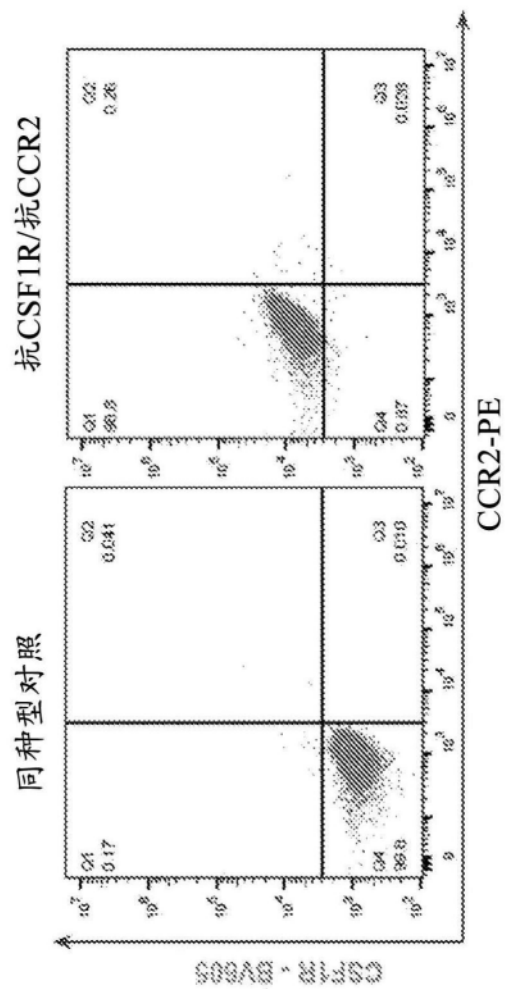


图8B

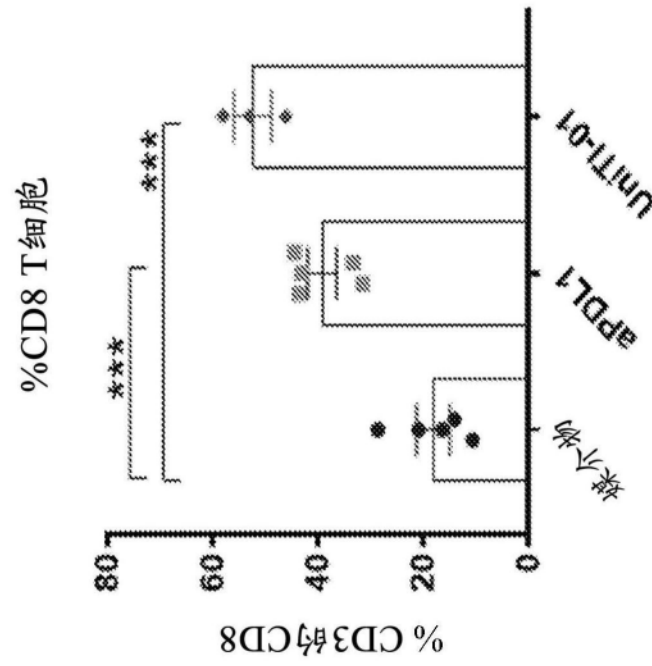


图9

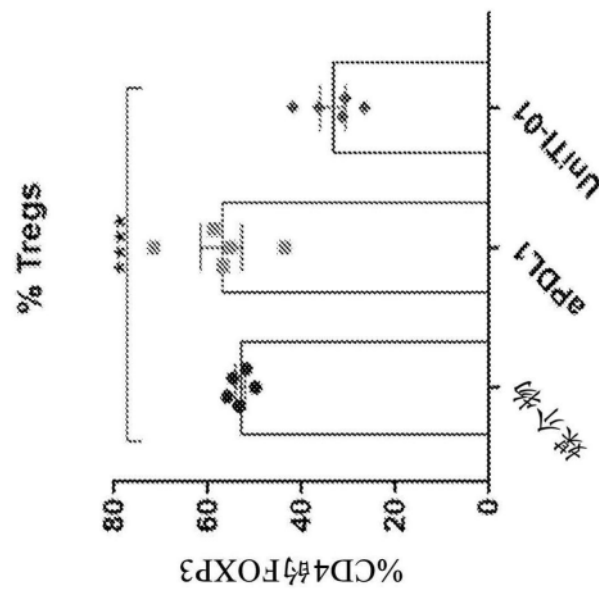


图10A

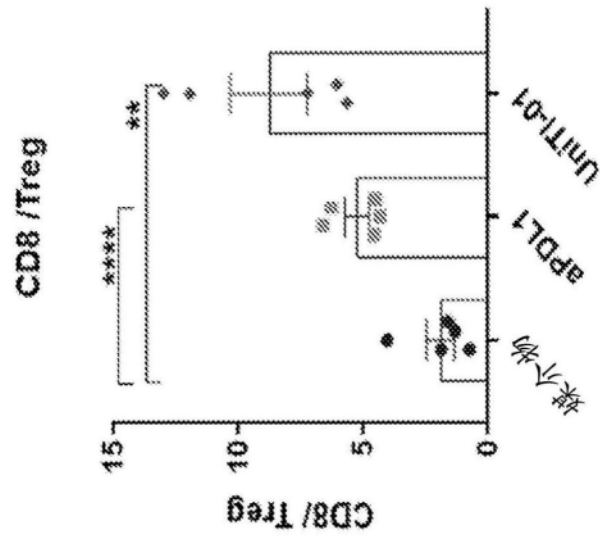


图10B

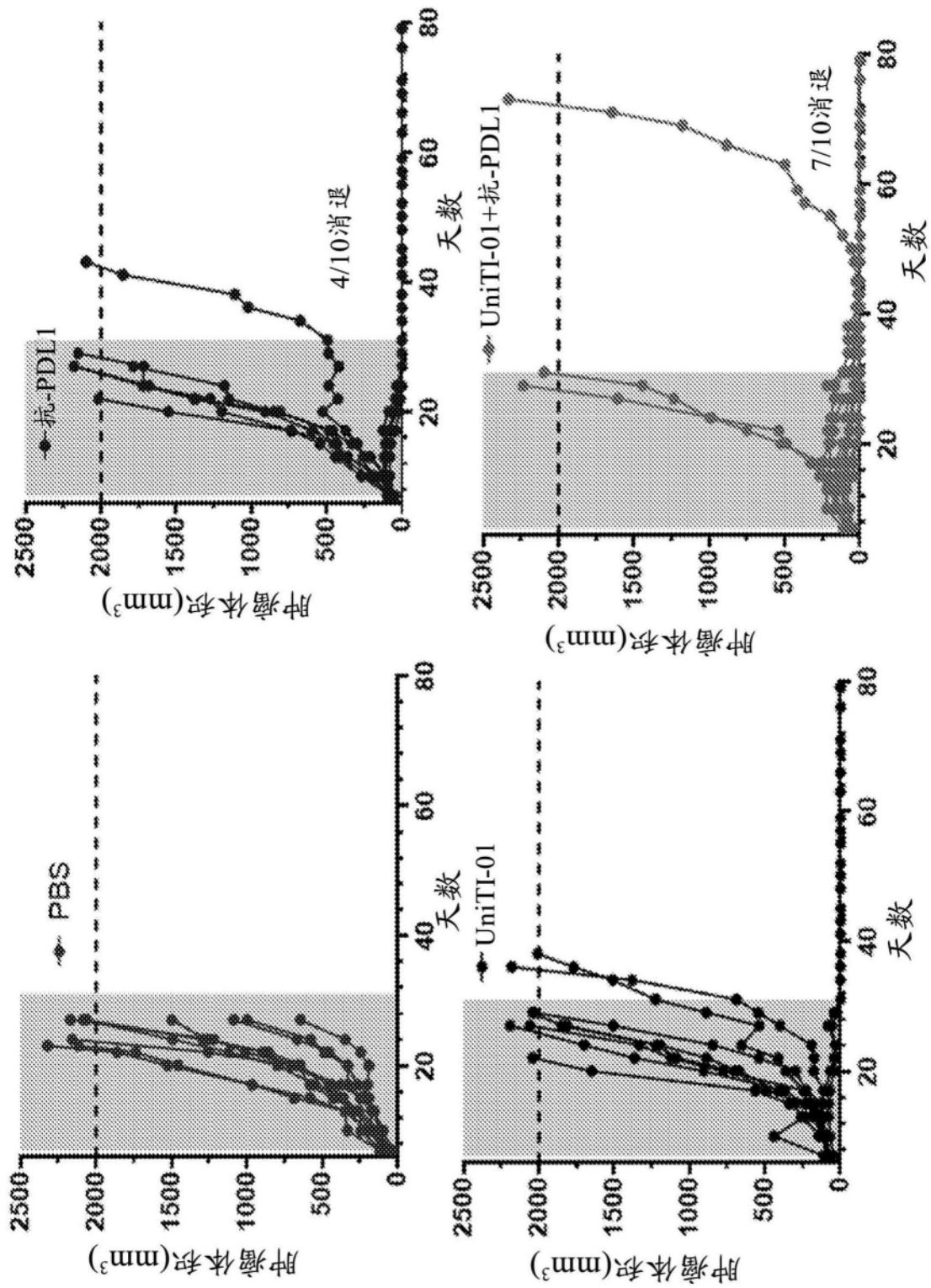


图11A

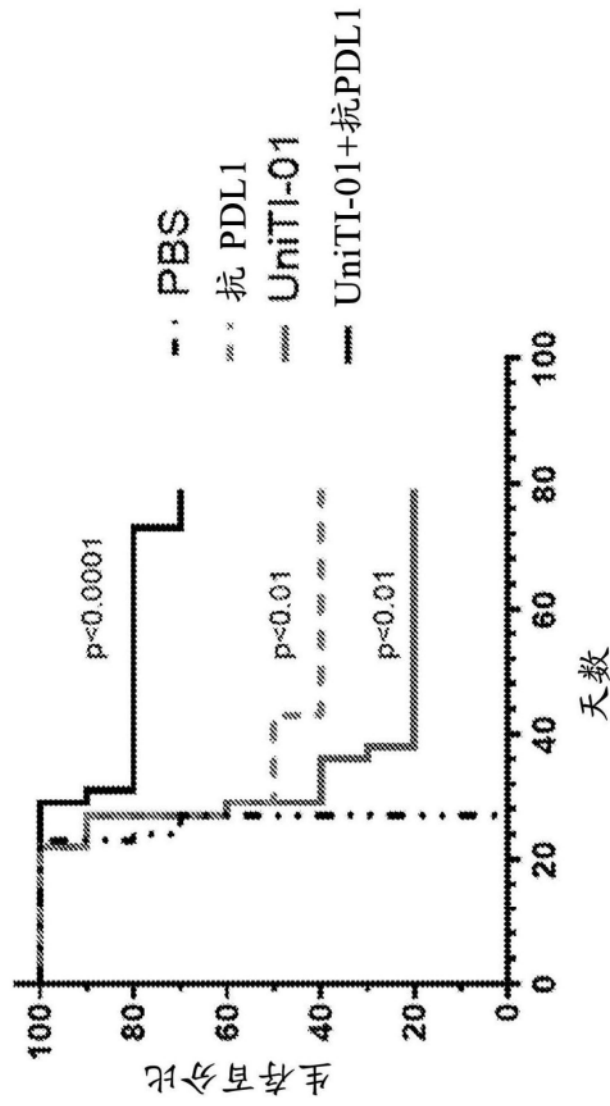


图11B