



(10) 授权公告号 CN 107922480 B

(45) 授权公告日 2022.09.23

(21) 申请号 201680047246.1

(22) 申请日 2016.06.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107922480 A

(43) 申请公布日 2018.04.17

(30) 优先权数据
62/175,152 2015.06.12 US
62/241,701 2015.10.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.02.09

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/037108 2016.06.11

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/201388 EN 2016.12.15

(73) 专利权人 艾利妥
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 K·门罗 H·拉姆
F·阿沃加德里-康纳斯 S·李
W·蒙蒂斯 H·莱茵
A·罗森塔尔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 103261227 A, 2013.08.21
CN 102952191 A, 2013.03.06
CN 1795009 A, 2006.06.28
CN 1078401 A, 1993.11.17
WO 2012074097 A1, 2012.06.07
WO 2011036183 A2, 2011.03.31
US 6350861 B1, 2002.02.26
SUTHERLAND MAY KUNG ET AL. Anti-leukemic activity of lintuzumab (SGN-33) in preclinical models of acute myeloid leukemia.《MABS》.2009,第1卷(第5期),481-490.

审查员 杨添淇

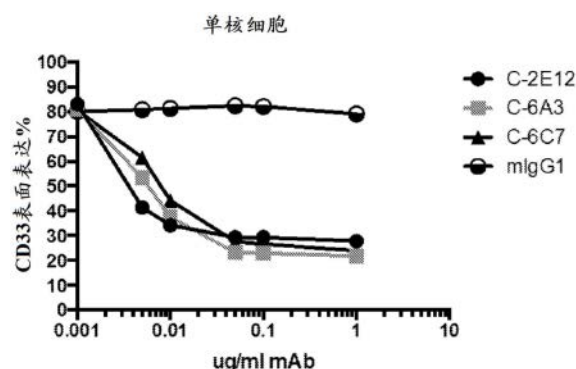
权利要求书2页 说明书193页
序列表120页 附图79页

(54) 发明名称

抗CD33抗体及其使用方法

(57) 摘要

本公开大体上涉及包含抗体的组合物,所述抗体例如特异性地结合CD33蛋白,例如人CD33或哺乳动物CD33内的一个或多个表位的单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、抗体片段等;以及此类组合物在预防、降低风险、或治疗有需要的个体方面的用途。



1. 一种分离的抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,

其中所述轻链可变结构域包含由氨基酸序列SEQ ID NO:10组成的HVR-L1、由氨基酸序列SEQ ID NO:13组成的HVR-L2和由氨基酸序列SEQ ID NO:72组成的HVR-L3;且

其中所述重链可变结构域包含由氨基酸序列SEQ ID NO:231组成的HVR-H1、由氨基酸序列SEQ ID NO:23组成的HVR-H2和由氨基酸序列SEQ ID NO:27组成的HVR-H3。

2. 如权利要求1所述的抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体降低CD33的细胞表面水平。

3. 如权利要求1所述的抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体抑制人CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用。

4. 如权利要求1所述的抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体与以下抗体竞争性地结合至CD33:所述抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包含由氨基酸序列SEQ ID NO:234组成的框架区(FR)1,由氨基酸序列SEQ ID NO:10组成的HVR-L1,由氨基酸序列SEQ ID NO:83组成的FR2,由氨基酸序列SEQ ID NO:13组成的HVR-L2,由氨基酸序列SEQ ID NO:91组成的FR3,由氨基酸序列SEQ ID NO:72组成的HVR-L3,以及由氨基酸序列SEQ ID NO:94组成的FR4,且其中所述重链可变结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:244。

5. 如权利要求1所述的抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体与以下抗体结合相同的CD33表位:所述抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包含由氨基酸序列SEQ ID NO:234组成的FR1,由氨基酸序列SEQ ID NO:10组成的HVR-L1,由氨基酸序列SEQ ID NO:83组成的FR2,由氨基酸序列SEQ ID NO:13组成的HVR-L2,由氨基酸序列SEQ ID NO:91组成的FR3,由氨基酸序列SEQ ID NO:72组成的HVR-L3,以及由氨基酸序列SEQ ID NO:94组成的FR4,且其中所述重链可变结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:244

6. 如权利要求1-5中任一项所述的抗CD33抗体,其中所述抗体属于IgG类别、IgM类别、或IgA类别。

7. 如权利要求6所述的抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体具有IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4同种型。

8. 如权利要求7所述的抗CD33抗体,其中所述抗体结合抑制性Fc受体,任选地,其中所述抑制性Fc受体是抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ IIB)。

9. 如权利要求8所述的抗CD33抗体,其中:

(a) 所述抗CD33抗体具有人IgG1同种型,并且包含在Fc区中的在选自以下组成的组的残基位置处的一个或多个氨基酸取代:N297A、D265A、D270A、L234A、L235A、G237A、P238D、L328E、E233D、G237D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、L234V、L234F、L235E、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D、以及其任何组合,其中所述残基的编号根据EU编号;或者包含在所述Fc区中的在对应于甘氨酸236的位置处的氨基酸缺失;

(b) 所述抗CD33抗体具有人IgG1同种型并且包含IgG2同种型重链恒定结构域1(CH1)和铰链区,任选地其中所述IgG2同种型CH1和铰链区包含氨基酸序列ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPPECP,并且任选地其中所述抗体Fc区包含S267E氨基酸取代、或L328F氨基酸取

代、或两者、和/或N297A或N297Q氨基酸取代,其中所述残基的编号根据EU编号;

(c) 所述抗CD33抗体具有人IgG2同种型,并且包含在所述Fc区中的在选自由以下组成的组的残基位置处的一个或多个氨基酸取代:P238S、V234A、G237A、H268A、H268Q、V309L、A330S、P331S、C214S、C232S、C233S、S267E、L328F、M252Y、S254T、T256E、H268E、N297A、N297Q、A330L、以及其任何组合,其中所述残基的编号根据EU编号;

(d) 所述抗CD33抗体具有人IgG4同种型,并且包含在所述Fc区中的在选自由以下组成的组的残基位置处的一个或多个氨基酸取代:L235A、G237A、S228P、L236E、S267E、E318A、L328F、M252Y、S254T、T256E、E233P、F234V、L234A/F234A、S228P、S241P、L248E、T394D、N297A、N297Q、L235E、以及其任何组合,其中所述残基的编号根据EU编号;或者

(e) 所述抗CD33抗体具有杂合IgG2/4同种型,并且任选地其中所述抗体包含含有人IgG2的氨基酸118至260和人IgG4的氨基酸261至447的氨基酸序列,其中所述残基的编号根据EU或Kabat编号。

10. 如权利要求1-5中任一项所述的抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、或scFv片段。

11. 如权利要求1-5中任一项所述的抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体是鼠抗体、人源化抗体、双特异性抗体、单克隆抗体、多价抗体、偶联抗体、或嵌合抗体。

12. 一种治疗有效量的如权利要求1的抗CD33抗体在制备用于治疗选自由以下组成的组的疾病、病症或损伤的药物中的用途:痴呆、tau蛋白病和感染。

13. 如权利要求12所述的用途,其中所述痴呆是额颞叶痴呆、血管性痴呆或混合型痴呆。

14. 如权利要求12所述的用途,其中所述tau蛋白病是阿尔茨海默氏病。

抗CD33抗体及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年6月12日提交的美国临时申请号62/175,152和2015年10月14日提交的美国临时申请号62/241,701的权益,所述申请中的每一个均特此以引用的方式整体并入。

[0003] 以ASCII文本文件提交序列表

[0004] 以下以ASCII文本文件提交的内容以引用的方式整体并入本文:计算机可读形式(CRF)的序列表(文件名:735022000740SEQLISTING.TXT,记录日期:2016年6月11日,大小:200KB)。

发明领域

[0005] 本公开涉及抗CD33抗体和此类抗体的治疗性用途。

[0006] 发明背景

[0007] 骨髓细胞表面抗原CD33前体(CD33)(还称为唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-3)是在免疫细胞和造血细胞(包括未成熟和成熟骨髓细胞、树突细胞和小神经胶质细胞)上表达的1型免疫球蛋白样跨膜蛋白。(Crocker等人(2007)Nat Rev Immunol.7:255-266;McMillan和Crocker(2008)Carbohydr Res.343:2050-2056;Von Gunten和Bochner(2008)Ann NY Acad Sci.1143:61-82;Handgretinger等人(1993)Immunol Lett.37:223-228;以及Hernández-Caselles等人(2006)J Leukoc Biol.79:46-58)。CD33表达在外周粒细胞和驻留型巨噬细胞上下调至低水平,并且据报道,所述蛋白质在星形胶质细胞、少突胶质细胞、内皮细胞、以及静息T细胞中缺失(Griffin JD.等人,(1984)Leukemia Research第S卷,第4号,第521-534页)。CD33是结合糖蛋白和糖脂的唾液酸残基的凝集素的唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素家族的成员。唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素蛋白的一个潜在的结合靶标是神经节苷脂;即,由连接到唾液酸化聚糖的神经酰胺组成的糖脂。大部分神经节苷脂共享共同的乳糖-神经酰胺核心和一个或多个唾液酸残基。唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素配体的多样性通过在不同的键联中添加其他中性糖和唾液酸以及修饰唾液酸本身来产生。

[0008] 已在人中鉴定了十四种唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素蛋白,并且在小鼠中鉴定了九种唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素蛋白,所述蛋白质由2-17个细胞外Ig结构域构成,所述结构域包括含有唾液酸结合位点的氨基末端V型结构域。唾液酸结合区位于V型Ig样结构域上,所述V型Ig样结构域含有两个芳香族残基和在所有唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素中高度保守的一个精氨酸基序(Crocker等人(2007)Nat Rev Immunol.7:255-266;McMillan和Crocker(2008)Carbohydr Res.343:2050-2056;Von Gunten和Bochner(2008)Ann NY Acad Sci.1143:61-82;May等人(1998)Mol Cell.1:719-728;Crocker等人(1999)Biochem J.341:355-361;以及Crocker和Varki(2001)Trends Immunol.2:337-342)。唾液酸化配体的结合位点已通过共晶体结构进行作图(Attrill等人,(2006)J.Biol.Chem.281:32774-32783;以及Varki等人,Glycobiology,16第1R-27R页)。因为细胞

膜富含唾液酸,所以通过唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素进行的配体结合可以反式和顺式发生,两者均影响其功能性特性。每种唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素对于结合存在于哺乳动物细胞的表面上的多种不同类型的唾液酸化聚糖具有不同的偏好(Crocker等人(2007) *Nat Rev Immunol*.7:255-266;以及Crocker等人(2007) *Nat Rev Immunol*.7:255-266)。大部分CD33相关的唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素(包括唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-3)在其胞质尾中含有一个或多个基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)序列,所述序列使得所述凝集素能够通过募集酪氨酸磷酸酶SHP1和SHP2而作为抑制性受体和免疫功能的负调节物(Crocker等人(2007) *Nat Rev Immunol*.7:255-266;McMillan和Crocker(2008) *Carbohydr Res*.343:2050-2056;以及Von Gunten和Bochner(2008) *Ann NY Acad Sci*.1143:61-82)。某些唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素在其胞质尾中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)序列,所述序列使得所述凝集素能够通过预测募集脾酪氨酸激酶(Syk)而充当活化受体和免疫功能的正调节物(Macauley SM.等人,(2014) *Nature Reviews Immunology* 14,653-666)。唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素蛋白家族与多种人疾病相关联,所述疾病包括自身免疫性、对感染的易感性、多种类型的癌性(包括淋巴瘤、白血病和急性骨髓性白血病)、系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、神经变性病症、哮喘、过敏症、败血症、慢性阻塞性肺病、移植物抗宿主疾病、嗜酸性粒细胞增多症、以及骨质疏松症(Macauley SM.等人,(2014) *Nature Reviews Immunology* 14,653-666)。

[0009] 唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-3 (CD33) 在1988年被克隆(Peiper等人(1988) *Blood*.72:314-321;Simmons和Seed(1988) *J Immunol*.141:2797-2800),并且选择性表达在骨髓中的胚细胞、早幼粒细胞和中幼粒细胞中上被检测到并且通过外周血液中的单核细胞检测(Griffith J.D等人,(1984) *Leukemia Research*第S卷,第4号,第521-534页)。也已报道了在促细胞分裂原或同种异体抗原活化的人T细胞和自然杀伤(NK)细胞的亚组上的表达(Hernández-Caselles T.等人,(2006) *Journal of Leukocyte Biology*.79,46-58)。此外,CD33在急性骨髓性白血病的85%-90%的成人和儿科病例上表达(Griffin,J.D.等人,(1984) *Leuk Res* 8,521-534)。

[0010] CD33含有Ig样C2型(免疫球蛋白样)细胞外结构域和Ig样V型(免疫球蛋白样)细胞外结构域、以及在其胞质结构域中的两个ITIM样基序。已鉴定了CD33的三种选择性剪接形式(同种型),包括较高分子量变体(称为CD33M)以及缺少Ig样V型结构域(配体结合位点)和连接V结构域和C结构域的二硫键的较小同种型CD33m。此外,已报道了CD33的组织特异翻译后修饰(Hernández-Caselles T.等人,(2006) *Journal of Leukocyte Biology*.79,46-58;以及Pérez-Oliva 等人,(2011) *Glycobiol*.21,757-770)。CD33经历通过蛋白激酶C(Grove,K等人,(2002) *Blood* 99,3188-3196)进行的对丝氨酸307(Ser-307)和丝氨酸342(Ser-342)和通过Src家族酪氨酸激酶(诸如LCK)进行的对Tyr-340和Tyr-358的配体诱导的磷酸化(Paul,S.P.等人,(2000) *Blood*96,483-490)。

[0011] 在主要对于其ITIM结构域的Tyr-340、但是也对于Tyr-358的磷酸化之后,CD33结合SHP-2/PTPN11和SHP-1/PTPN6。这些磷酸酶与CD33的结合在CD33与CD64的共价均成(coligation)之后得到增强(Taylor,V.C等人,(1999) *J Biol Chem*.274,11505-11512)。磷酸酶活性与细胞内钙动员减少和多种蛋白质上的酪氨酸磷酸化减少相关联(Ulyanova,T.等人,(1999) *Eur J Immunol*29,3440-3449;Paul,S.P.等人,(2000) *Blood*96,483-490),

并且与部分地通过相邻的活化受体(包括含有ITAM基序的那些受体、模式识别受体、Toll样受体以及损害相关分子模式(DAMP)受体)上的信号传导分子的去磷酸化进行的对信号转导和免疫应答的阻断相关联。CD33的活化还引起原癌基因c-Cbl、Vav和Syk的酪氨酸磷酸化和与所述原癌基因c-Cbl、Vav和Syk的缔合(Balaian,L.等人,(2001).Leuk Res 25,1115-1125)。c-Cbl是E3泛素连接酶并且在活化之后诱导CD33以及视黄酸可诱导的基因的CBL依赖性泛素化和蛋白酶体降解(Taylor等人(1999)J Biol Chem.274:11505-11512;Ulyanova等人(1999)Eur J Immunol.29:3440-3449;Paul等人(2000)Blood.96:483-490;以及Lajaunias等人(2005)Eur J Immunol.35:243-251)。一些但并非所有唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素配体诱导受体下调((Macauley SM.等人,(2014)Nature Reviews Immunology 14,653-666)。配体诱导的受体降解的相似机制已针对酪氨酸激酶受体(Monsonego-Oran等人,(2002)Febs letters 528,83-89;以及Fasen等人,(2008)Cell&Molecular Biology 9.251-266)以及甾体受体(Callige等人,(2005)Mol.Cell.Biol.25.4349-4358;以及Pollenz等人,(2006)Chemico-Biological Interactions.164.49-59)进行了报道。

[0012] 也已显示CD33信号传导的活化与从先天免疫细胞产生促炎细胞因子IL-1 β 、IL-8和TNF- α 的下降相关联。CD33的这些活性似乎通过磷酸肌醇3-激酶(PI3K)的活化介导(Lajaunias F.等人(2005).Eur.J.Immunol.2005.35:243-251)。已提出,包含ITIM的唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体与活化受体之间的缔合可通过结合并桥接这些受体的细胞外配体介导(Macauley SM.等人,(2014)Nature Reviews Immunology 14,653-666)。

[0013] 多项研究指示CD33在调节先天免疫性和介导抑制或限制免疫应答的细胞-细胞相互作用方面的抑制性作用(Crocker等人,(2012)Ann.N Y Acad.Sci.1253,102-111;Pillai等人,(2012)Annu.Rev.Immunol.30,357-392.;von Gunten和Bochner(2008)Ann.N Y Acad.Sci.1143,61-82;Griciuc等人,(2013)Neuron 78,1-13;Ferlazzo等人(2000)Eur J Immunol.30:827-833;Vitale等人(2001)Proc Natl Acad Sci USA.98:5764-5769;以及Herna'ndez-Caselles T.等人,(2006)Journal of Leukocyte Biology.79,46-58)。小鼠中的CD33失活不引起明显的发育、组织学或行为异常;并且CD33缺陷小鼠正常地繁殖,从而指示CD33不是必需基因并且其功能可能限于先天免疫性(Brinkman-Van der Linden等人,(2003)Mol.Cell.Biol.23,4199-4206)。

[0014] 对延伸的同龄组(例如,数千个个体)执行的全基因组关联研究(GWAS)已将CD33中的单核苷酸多态性(SNP)rs3865444^{CC}(又称rs3826656)和rs3865444^{AA}鉴定为迟发性阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)的风险的基因调节剂。次要的纯合等位基因rs3865444^{AA} SNP与全长CD33蛋白水平降低和缺少Ig-V配体结合结构域的CD33同种型的表达增加相关联(Raj T.等人(2014)Human Molecular Genetics)并且显示赋予针对阿尔茨海默氏病(AD)的预防作用。相比之下,纯合rs3865444^{CC}等位基因显示构成AD的风险等位基因,并且与年轻个体和老年个体的外周单核细胞中的全长CD33的细胞表面表达的约7倍增加相关联。杂合rs3865444^{AC}显示出CD33细胞表面表达的3-4倍增加,并且也被认为是AD的风险因素。CD33在小神经胶质细胞和巨噬细胞中在全部三个活化阶段处表达,但是对于年龄对于CD33表面表达没有影响。多态性等位基因rs3865444^{CC}和rs3865444^{AC}也与单核细胞吞噬体外淀粉样蛋白 β 42(A- β 42)肽的能力降低和体内神经炎淀粉样蛋白病变和纤维状淀粉样蛋白增加相关

联。

[0015] 也已针对风险等位基因报道了可具有较少功能性并且无法清除淀粉样蛋白 β 斑的活化的小神经胶质细胞的数量增加,从而指示rs3865444^C等位基因可对于功能性性状起主导作用并且在阿耳茨海默氏病(AD)的症状前阶段的淀粉样蛋白积累方面起作用。虽然rs3865444^C与较大的神经炎淀粉样蛋白斑负荷相关联,但是其不与神经原纤维缠结的负荷相关联(Bradshaw等人,(2013) *Nat. Neurosci.* 16,848-850.)。此SNP位于CD33基因的5' UTR的上游,但是可表现出与位于编码区中的功能性变体的连锁不平衡(Bertram等人(2008) *.Am. J. Hum. Genet.* 83,623-632;Hollingworth等人(2011) *Nat. Genet.* 43,429-435;以及Naj等人(2011) *Nat. Genet.* 43,436-441),其可引起由外显子2编码的配体结合结构域的选择性剪接和去除(Malik等人,(2013) *J. Neurosci.* 33:13320-13325;以及Raj等人,(2014) *Human Molecular Genetics*,23,2729)。已显示CD33 mRNA和蛋白质水平以及CD33阳性小神经胶质细胞的数量在AD大脑中相对于年龄匹配的对照增加。然而,来自rs3865444^{AA}等位基因的携带者的AD大脑小神经胶质细胞仍然与和来自rs3865444^C非保护性等位基因的携带者的AD大脑相比的较低水平的CD33表达和降低水平的不可溶A- β 42肽相关联。

[0016] 已显示CD33免疫反应性小神经胶质细胞的数量增加与阿耳茨海默氏病(AD)病例中的较高的不可溶A- β 42水平和较高淀粉样蛋白斑负荷相关。使用对斑块和缠结病变的半定量组织学测量(Walker等人)已显示在SNPs rs3865444^{CC}(又称rs3826656)与rs3865444^{AA}等位基因之间在病变中没有显著差异(Walker等人,(2015) *Neurobiology of Aging* 36 571-582)。然而,CD33 mRNA的表达增加已与颞叶皮层大脑样品中的AD病变增加相关联(Walker等人,(2015) *Neurobiology of Aging* 36 571-582)。

[0017] 功能的获得和丧失研究指示CD33对于抑制小神经胶质细胞的A- β 42摄取是必要且足够的。另外,唾液酸结合V型免疫球蛋白样(V-Ig)结构域缺失的CD33变体的分析证明唾液酸结合对于CD33介导的对由小神经胶质细胞进行的A- β 42的吞噬作用和清除的抑制是必要的(Perez-Oliva等人,(2011) *Glycobiol.* 21,757-770)。另外,阿尔茨海默氏病的APP/PS1转基因小鼠模型(其中CD33基因被切除)表现出不可溶A- β 42水平和A- β 斑负荷的明显降低(Griciuc等人,(2013) *Neuron* 78,1-13;以及Bradshaw等人,(2013) *Nat. Neurosci.* 16,848-850)。

[0018] 在肿瘤学中,已显示引起CD33的表达降低的CD33变体与儿科急性骨髓性白血病(AML)的提高了的存活率相关联。自缓解期的3年总体存活率对于携带变体rs35112940^{GG}的那些人是84% $\pm$ 8%,这与rs3865444^{AA}变体(与CD33的较低全长表达相关联)具有强连锁不平衡。非保护性等位基因的缓解率是68% $\pm$ 15%。保护性等位基因的携带者也具有较低的复发风险和优异的无病存活期。同样,对于rs12459419的次要变体等位基因(TT)(其与超过46%的全长CD33的较低表达相关联)是纯合的患者比变体CC和CT(52%相对于31%)的携带者更可能具有有利的疾病结果,并且比其他基因型具有显著更低的诊断前CD33表达。甚至在经历使用抗CD33抗体和毒性加利车霉素 γ 衍生物进行治疗的患者中也是这种情况(Mortland等人,(2013) *Clin. Cancer Res.* 1-8)。rs12459419^{TT}等位基因的携带者以及rs12459419^{CT}等位基因的携带者(其显示全长CD33表达的超过25%降低)也显示出降低的阿尔茨海默氏病风险(Malik M.等人(2015) *Human Molecular Genetics*,1-14)。这显示CD33表达或功能性降低在阿尔茨海默氏病和癌症中可能是有益的。然而,没有报道关于抗CD33

抗体在生理相关的原代免疫细胞中下调CD33或阻断CD33配体/受体相互作用的能力的数据。

[0019] CD33的抗体已描述于例如US7,342,110、US7,557,189、US8119787、US 8,337,855、US8,124,069、US5,730,982、US7,695,71、W02012074097、W02004043344、W01993020848、W02012045752、W02007014743、W02003093298、W02011036183、W01991009058、W02008058021、W02011038301、Hoyer等人, (2008) Am. J. Clin. Pathol. 129, 316-323、Rollins-Raval和Roth, (2012) Histopathology 60, 933-942)、Pérez-Oliva 等人, (2011) Glycobiol. 21, 757-770)、Ferlazzo等人 (2000) Eur J Immunol. 30:827-833、Vitale等人, (2001) Proc Natl Acad Sci USA. 98:5764-5769、Jandus等人, (2011) Biochem. Pharmacol. 82, 323-332、O'Reilly和Paulson, (2009) Trends Pharmacol. Sci. 30, 240-248、Jurcic, (2012) Curr Hematol Malig Rep 7, 65-73、以及Ricart, (2011) Clin. Cancer Res. 17, 6417-6427。然而, 这些抗体主要用于检测细胞上的CD33或靶毒素 (诸如加利车霉素 γ 衍生物) 以便杀灭表达CD33的白血病细胞。另外, 没有报道显示抗CD33抗体通过增强抗肿瘤免疫应答治疗不表达CD33的实体瘤细胞的能力的数据。

[0020] 因此, 存在对于用于治疗与不期望的CD33活性相关联的一种或多种疾病、病症和病状的治疗性抗体的需要。

[0021] 本文所引用的所有参考文献 (包括专利、专利申请和公布) 均特此以引用的方式整体并入。

发明概要

[0022] 本公开大体上涉及CD33药剂 (诸如抗CD33抗体) 和使用此类CD33药剂的方法。本文所提供的方法在预防、降低风险、或治疗患有以下疾病的个体方面得到应用: 痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病 (Creutzfeldt-Jakob disease)、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病 (Huntington's disease)、tau蛋白病 (taupathy disease)、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病 (Behcet's disease)、帕金森氏病 (Parkinson's disease)、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征 (Shy-Drager syndrome)、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病 (Paget's disease of bone)、实体和血液癌症、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma)、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病 (ALL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性骨髓性白血病 (CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染 (*Pseudomonas aeruginosa* infection)、

杜氏利什曼原虫感染 (*Leishmania donovani* infection)、B族链球菌感染 (group B *Streptococcus* infection)、空肠弯曲杆菌感染 (*Campylobacter jejuni* infection)、脑膜炎奈瑟氏球菌感染 (*Neisseria meningitidis* infection)、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。本文所提供的方法也在诱导或促进有需要的个体中的一种或多种免疫细胞的存活、成熟、功能性、迁移、或增殖方面得到应用。本文所提供的方法在降低有需要的个体中的以下各项的活性、功能性、或存活方面得到另外的应用：调节性T细胞、肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞、肿瘤包埋的免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、急性骨髓性白血病 (AML) 细胞、慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 细胞、或慢性骨髓性白血病 (CML) 细胞。

[0023] 本公开的某些方面至少部分地基于鉴定能够降低人原代免疫细胞和CD33表达细胞系上的CD33的细胞表面水平和/或能够抑制红细胞上的CD33配体与CD33的结合的抗CD33抗体 (参见, 例如, 实施例1-5)。有利地, 所述抗CD33抗体以65pM至20pM范围内的半数最大有效浓度 (EC_{50}) 降低CD33的细胞水平、以8.0mg/kg至2.0mg/kg范围内的半数最大有效浓度 (EC_{50}) 降低体内CD33的细胞水平、以200pM至10pM范围内的 EC_{50} 结合人细胞 (诸如人树突细胞) 并且对于人CD33具有300pM至10pM范围内的解离常数 (K_D)。

[0024] 因此, 本公开的某些方面涉及一种分离的 (例如, 单克隆) 抗CD33抗体, 其中所述抗CD33抗体降低CD33的细胞水平、或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者。在一些实施方案中, 所述抗CD33抗体表现出以下特性中的一种或多种: a. 对于人CD33的解离常数 (K_D) 低于抗CD33抗体吉妥珠单抗 (gemtuzumab) 的解离常数; b. 以低于抗CD33抗体吉妥珠单抗或林妥珠单抗 (lintuzumab) 的 EC_{50} 的 EC_{50} 结合到人树突细胞; c. 以低于抗CD33抗体吉妥珠单抗或林妥珠单抗的 EC_{50} 的 EC_{50} 降低CD33的细胞水平; d. 对于人CD33具有300pM至10pM范围内的解离常数 (K_D), 其中 K_D 在大约25℃的温度下确定; e. 以200pM至10pM范围内的 EC_{50} 结合人树突细胞, 其中 EC_{50} 在大约4℃的温度下确定; f. 以65pM至20pM范围内的 EC_{50} 降低CD33的细胞水平; 或者g. 以8.0mg/kg至2.0mg/kg范围内的 EC_{50} 降低体内CD33的细胞水平。在一些实施方案中, 对于人CD33的解离常数 (K_D) 小于300pM, 其中 K_D 在大约25℃的温度下确定。在一些实施方案中, K_D 使用单价抗体来确定。在一些实施方案中, K_D 使用呈单价形式的全长抗体来确定。在一些实施方案中, 所述抗CD33抗体以小于200pM的 EC_{50} 结合到人树突细胞, 其中 EC_{50} 在大约4℃的温度下确定。在一些实施方案中, 降低体内CD33的细胞水平的 EC_{50} 使用小鼠来确定。在一些实施方案中, 所述抗CD33抗体以65pM至22pM范围内、或小于22pM的 EC_{50} 降低CD33的细胞水平。在一些实施方案中, 所述抗CD33抗体以以下 EC_{50} 降低CD33的细胞水平: 65pM或更小、60pM或更小、55pM或更小、50pM或更小、45pM或更小、40pM或更小、35pM或更小、30pM或更小、25pM或更小、24pM或更小、23pM或更小、22pM或更小、21pM或更小、20pM或更小、10pM或更小、9pM或更小、8pM或更小、7pM或更小、6pM或更小、或5pM或更小。

[0025] 本公开的其他方面涉及一种分离的 (例如, 单克隆) 抗CD33抗体, 其中所述抗CD33抗体降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者, 并且其中所述抗CD33抗体表现出以下特性中的一种或多种: a. 对于人CD33的解离常数 (K_D) 低于抗CD33抗体吉妥珠单抗的解离常数; b. 以低于抗CD33抗体吉妥珠单抗或林妥珠单抗的 EC_{50} 的 EC_{50} 结合到人树突细胞; c. 以低于抗CD33抗体吉妥珠单抗或林妥珠单抗的 EC_{50} 的 EC_{50} 降低CD33的细胞水平; d. 对于人CD33具有300pM至10pM范围内的解离常数 (K_D), 其中 K_D 在大约25℃的温度下确定; e. 以200pM至10pM范围内的 EC_{50} 结合到人树突细胞, 其中 EC_{50} 在大约4℃的

温度下确定；f. 以65pM至20pM范围内的 EC_{50} 降低CD33的细胞水平；或者g. 以8.0mg/kg至2.0mg/kg范围内的 EC_{50} 降低体内CD33的细胞水平。在一些实施方案中，对于人CD33的解离常数(K_D)小于300pM，其中 K_D 在大约25℃的温度下确定。在一些实施方案中， K_D 使用单价抗体来确定。在一些实施方案中， K_D 使用呈单价形式的全长抗体来确定。在一些实施方案中，所述抗CD33抗体以小于200pM的 EC_{50} 结合到人树突细胞，其中 EC_{50} 在大约4℃的温度下确定。在一些实施方案中，所述抗CD33抗体以65pM至22pM范围内、或小于22pM的 EC_{50} 降低CD33的细胞水平。在一些实施方案中，所述抗CD33抗体以以下 EC_{50} 降低CD33的细胞水平：65pM或更小、60pM或更小、55pM或更小、50pM或更小、45pM或更小、40pM或更小、35pM或更小、30pM或更小、25pM或更小、24pM或更小、23pM或更小、22pM或更小、21pM或更小、20pM或更小、10pM或更小、9pM或更小、8pM或更小、7pM或更小、6pM或更小、或5pM或更小。在一些实施方案中，降低体内CD33的细胞水平的 EC_{50} 使用小鼠来确定。

[0026] 在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体降低CD33的细胞表面水平、降低CD33的细胞内水平、降低CD33的总水平、或其任何组合。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体诱导CD33降解、CD33裂解、CD33内化、CD33脱落、CD33表达的下调、或其任何组合。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体降低CD33的细胞水平而不抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体降低CD33的细胞水平并且抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗体降低体内CD33的细胞水平。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体以约8.0mg/kg至约2.0mg/kg范围内、或小于2.0mg/kg的 EC_{50} 降低体内CD33的细胞水平。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用而不降低CD33的细胞水平。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体抑制CD33的细胞表面簇集。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体抑制一种或多种CD33活性。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述一种或多种CD33活性选自由以下组成的组：(a) CD33结合到含有唾液酸的糖蛋白、含有唾液酸的糖脂、或两者；(b) CD33结合到SHP1或SHP2；(c) 由一种或多种SRC家族酪氨酸激酶诱导的Tyr-340、Tyr-358或两者的磷酸化，任选地，其中所述一种或多种SRC家族酪氨酸激酶选自由Syk、LCK和FYB组成的组；(d) Ser-307、Ser-342或两者的磷酸化，任选地其中所述磷酸化由蛋白激酶C诱导；(e) 调节一种或多种抗炎细胞因子的表达，任选地其中所述一种或多种抗炎细胞因子选自由以下组成的组：IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IL-16、TGF- β 、IL-1Ra、G-CSF、以及TNF、IFN- β 1a、IFN- β 1b、或IL-6的可溶性受体；(f) 调节选自由以下组成的组的一种或多种细胞中一种或多种抗炎细胞因子的表达：巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、以及小神经胶质细胞；(g) 调节一种或多种促炎细胞因子的表达，任选地其中所述一种或多种促炎细胞因子选自由以下组成的组：IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、CRP、IL-33、MCP-1、以及MIP-1 β ；(h) 调节选自由以下组成的组的一种或多种细胞中一种或多种促炎细胞因子的表达：巨噬细胞、树突细胞、骨髓

衍生的树突细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、以及小神经胶质细胞；(i) 调节选自自由以下组成的组的一种或多种蛋白质的表达：C1qa、C1qb、C1qc、C1s、C1r、C4、C2、C3、ITGB2、HMOX1、LAT2、CASP1、CSTA、VSIG4、MS4A4A、C3AR1、GPX1、TyroBP、ALOX5AP、ITGAM、SLC7A7、CD4、ITGAX、PYCARD、CD14、CD16、HLA-DR、以及CCR2；(j) 抑制细胞外信号调节激酶 (ERK) 磷酸化；(k) 减少多种细胞蛋白上的酪氨酸磷酸化；(l) 调节C-C趋化因子受体7 (CCR7) 的表达；(m) 抑制小神经胶质细胞向CCL19和CCL21表达细胞的趋化性；(n) 减少由选自自由以下组成的组的一种或多种细胞诱导的T细胞增殖：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、M2小神经胶质细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、以及M2巨噬细胞；(o) 抑制破骨细胞产生、降低破骨细胞生成的速率、或两者；(p) 降低选自自由以下组成的组的一种或多种细胞的存活：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、以及M2小神经胶质细胞；(q) 减少选自自由以下组成的组的一种或多种细胞的增殖：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、以及M2小神经胶质细胞；(r) 抑制选自自由以下组成的组的一种或多种细胞的迁移：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、以及M2小神经胶质细胞；(s) 降低选自自由以下组成的组的一种或多种细胞的一种或多种功能：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、以及M2小神经胶质细胞；(t) 抑制选自自由以下组成的组的一种或多种细胞的成熟：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、以及M2小神经胶质细胞；(u) 抑制选自自由以下组成的组的清除中的一种或多种类型：凋亡神经元清除、神经组织碎片清除、功能失调突触清除、非神经组织碎片清除、细菌清除、其他异物清除、致病性蛋白清除、致病性肽清除、以及肿瘤细胞清除；任选地其中所述致病性蛋白选自自由以下组成的组：淀粉样蛋白 β 、寡聚淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑、淀粉样蛋白前体蛋白或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72 (染色体9开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白 (ataxin)、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易小体 (Lewy body)、心房利钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关非ATG (RAN) 翻译产物、二肽重复序列 (DPR) 肽、甘氨酸-丙氨酸 (GA) 重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸 (GP) 重复序列肽、甘氨酸-精氨酸 (GR) 重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸 (PA) 重复

序列肽、泛素、以及脯氨酸-精氨酸 (PR) 重复序列肽, 并且所述肿瘤细胞来自选自以下组成的组的癌症: 膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、以及甲状腺癌; (v) 抑制对以下中的一种或多种的吞噬作用: 凋亡神经元、神经组织碎片、功能失调的突触、非神经组织碎片、细菌、其他异物、致病性蛋白、致病性肽、致病性核酸、或肿瘤细胞; 任选地其中所述致病性核酸是反义GGCCCC (G2C4) 重复序列扩增RNA, 所述致病性蛋白选自以下组成的组: 淀粉样蛋白 β 、寡聚淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑、淀粉样蛋白前体蛋白或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72 (染色体9开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易小体、心房利钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关非ATG (RAN) 翻译产物、二肽重复序列 (DPR) 肽、甘氨酸-丙氨酸 (GA) 重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸 (GP) 重复序列肽、甘氨酸-精氨酸 (GR) 重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸 (PA) 重复序列肽、泛素、以及脯氨酸-精氨酸 (PR) 重复序列肽, 并且所述肿瘤细胞来自选自以下组成的组的癌症: 膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、或甲状腺癌; (w) 结合到肿瘤细胞上的CD33配体; (x) 结合到选自以下组成的组的细胞上的CD33配体: 嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、以及巨噬细胞; (y) 抑制由以下中的一种或多种进行的肿瘤细胞杀伤: 小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞; (z) 抑制以下中的一种或多种的抗肿瘤细胞增殖活性: 小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞; (aa) 抑制以下中的一种或多种的抗肿瘤细胞转移活性: 小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞; (bb) 抑制一种或多种含有ITAM基序的受体, 任选地其中所述一种或多种含有ITAM基序的受体选自以下组成的组: TREM1、TREM2、Fc γ R、DAP10、以及DAP12; (cc) 抑制通过一种或多种模式识别受体 (PRR) 进行的信号传导, 任选地其中所述一种或多种PRR选自以下组成的组: 识别病原体相关分子模式 (PAMP) 的受体、识别损害相关分子模式 (DAMP) 的受体、以及其任何组合; (dd) 抑制含有基序D/Ex0-2YxxL/IX6-8YxxL/I (SEQ ID NO:247) 的一种或多种受体; (ee) 抑制通过一种或多种Toll样受体进行的信号传导; (ff) 抑制JAK-STAT信号传导途径; (gg) 抑制活化B细胞的核因子 κ -轻链增强子 (NF κ B); (hh) 含有ITAM基序的受体的去磷酸化; (ii) 调节一种或多种炎性受体的表达, 任选地其中所述一种或多种炎性受体包括CD86并且所述一种或多种炎性受体在以下中的一种或多种上表达: 小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞; (jj) 增加一种或多种CD33依赖性基因的表达; (kk) 破坏的CD33依赖性基因表达的正常化; (ll) 减少一种或多种ITAM依赖性基因的表达, 任选地其中所述一种或多种ITAM依赖性基因通过活化T细胞的核因子 (NFAT) 转录因子活化; (mm) 促进以下中的一种或多种的分化: 免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细

胞、肿瘤相关巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、以及调节性T细胞；(nn) 促进以下中的一种或多种的功能性：免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、以及调节性T细胞；(oo) 增强以下中的一种或多种到肿瘤中的浸润：免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、以及调节性T细胞；(pp) 增加肿瘤中、外周血中或其他淋巴样器官中的促进肿瘤的骨髓/粒细胞性免疫抑制性细胞的数量；(qq) 增强骨髓来源的抑制细胞的促进肿瘤的活性；(rr) 增加肿瘤中或外周血中促进肿瘤细胞因子的表达，任选地其中所述促进肿瘤的细胞因子是TGF- β 或IL-10；(ss) 增加促进肿瘤的FoxP3+调节性T淋巴细胞的肿瘤浸润；(tt) 增强骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的促进肿瘤的活性；(uu) 减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的活化；(vv) 减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性NK细胞的浸润；(ww) 减少具有增强免疫应答的潜力的肿瘤特异性B淋巴细胞的浸润；(xx) 减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的浸润；(yy) 增加肿瘤体积；(zz) 增加肿瘤生长速率；(aaa) 增加肿瘤复发率；(bbb) 降低调节抗肿瘤T细胞应答的一种或多种免疫疗法或一种或多种癌症疫苗的效力，任选地其中所述一种或多种免疫疗法是靶向选自以下组成的组的一种或多种蛋白质的免疫疗法：CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG-3、DR-5、TREM1、TREM2、CSF-1受体、以及其任何组合；(ccc) 抑制PLC γ /PKC/钙动员；以及(ddd) 抑制PI3K/Akt、Ras/MAPK信号传导。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述一种或多种CD33活性选自以下组成的组：(a) CD33结合到含有唾液酸的糖蛋白、含有唾液酸的糖脂、或两者；(b) 调节一种或多种抗炎细胞因子的表达，任选地其中所述一种或多种抗炎细胞因子选自以下组成的组：IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IL-16、TGF- β 、IL-1Ra、G-CSF、以及TNF、IFN- β 1a、IFN- β 1b、或IL-6的可溶性受体；(c) 调节选自以下组成的组的一种或多种细胞中一种或多种抗炎细胞因子的表达：巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、以及小神经胶质细胞；(d) 调节一种或多种促炎细胞因子的表达，任选地其中所述一种或多种促炎细胞因子选自以下组成的组：IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、CRP、IL-33、MCP-1、以及MIP-1- β ；(e) 调节选自以下组成的组的一种或多种细胞中一种或多种促炎细胞因子的表达：巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、以及小神经胶质细胞；(f) 调节选自以下组成的组的一种或多种蛋白质的表达：C1qa、C1qb、C1qc、C1s、C1r、C4、C2、C3、ITGB2、HMOX1、LAT2、CASP1、CSTA、VSIG4、MS4A4A、C3AR1、GPX1、TyroBP、ALOX5AP、ITGAM、SLC7A7、CD4、ITGAX、PYCARD、CD14、CD16、HLA-DR、以及CCR2；(g) 减少由选自以下组成的组的一种或多种细胞诱导的T细胞增殖：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、M2小神经胶质细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、以及M2巨噬细胞；(h) 减少选自以下组成的组的一种或多种细胞的增殖：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、以及M2小神经胶质细胞；(i)

降低选自由以下组成的组的一种或多种细胞的一种或多种功能：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、以及M2小神经胶质细胞；(j) 抑制对以下中的一种或多种的吞噬作用：凋亡神经元、神经组织碎片、功能失调的突触、非神经组织碎片、细菌、其他异物、致病性蛋白、致病性肽、致病性核酸、或肿瘤细胞；任选地其中所述致病性核酸是反义GGCCCC (G2C4) 重复序列扩增RNA，所述致病性蛋白选自由以下组成的组：淀粉样蛋白 β 、寡聚淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑、淀粉样蛋白前体蛋白或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72 (染色体9开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易小体 (Lewy body)、心房利钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关非ATG (RAN) 翻译产物、二肽重复序列 (DPR) 肽、甘氨酸-丙氨酸 (GA) 重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸 (GP) 重复序列肽、甘氨酸-精氨酸 (GR) 重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸 (PA) 重复序列肽、泛素、以及脯氨酸-精氨酸 (PR) 重复序列肽，并且所述肿瘤细胞来自选自由以下组成的组的癌症：膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、或甲状腺癌；(k) 结合到肿瘤细胞上的CD33配体；(l) 结合到选自由以下组成的组的细胞上的CD33配体：嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、以及巨噬细胞；(m) 抑制由以下中的一种或多种进行的肿瘤细胞杀伤：小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞；(n) 抑制以下中的一种或多种的抗肿瘤细胞增殖活性：小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞；(o) 促进以下中的一种或多种的功能性：免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、非致瘤性骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、以及调节性T细胞；(p) 增强以下中的一种或多种到肿瘤中的浸润：免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、非致瘤性CD45⁺CD14⁺骨髓细胞、以及调节性T细胞；(q) 增加肿瘤中、外周血中或其他淋巴样器官中的促进肿瘤的骨髓/粒细胞性免疫抑制性细胞的数量；(r) 增强非致瘤性骨髓来源的抑制细胞和/或非致瘤性CD45⁺CD14⁺骨髓细胞的促进肿瘤的活性；(s) 增强非致瘤性骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) 和/或非致瘤性CD45⁺CD14⁺骨髓细胞的存活；(t) 减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的活化；(u) 减少具有肿瘤杀伤潜力的CD45⁺CD3⁺ T淋巴细胞的活化；(v) 减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性NK细胞的浸润；(w) 减少具有增强免疫应答的潜力的肿瘤特异性B淋巴细胞的浸润；(x) 减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的浸润；(y) 减少CD45⁺CD3⁺ T淋巴细胞的浸润；(z) 增加肿瘤体积；(aa) 增加肿瘤生长速率；以及 (bb) 降低调节抗肿瘤T细胞应答的一种或多种免疫疗法或一种或多种化疗剂和/或癌症疫苗的效力，任选地其中所述一种或多种免疫疗法是靶向选自由以下组成的组的一种或多种蛋白质的免疫疗法：CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-

H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG-3、DR-5、TREM1、TREM2、CSF-1受体、以及其任何组合。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体表现出选自以下组成的组的一种或多种活性：(a) 增加肿瘤浸润CD3⁺ T细胞的数量；(b) 降低非致瘤性CD14⁺骨髓细胞中的CD33的细胞水平，任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞是肿瘤浸润细胞或者任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞存在于血液中；(c) 减少非致瘤性CD14⁺骨髓细胞的数量，任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞是肿瘤浸润细胞或者任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞存在于血液中；(d) 降低一种或多种细胞中的PD-L1水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(e) 降低一种或多种细胞中的PD-12水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(f) 降低一种或多种细胞中的B7-H2水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(g) 降低一种或多种细胞中的B7-H3水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(h) 降低一种或多种细胞中的CD200R水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(i) 降低一种或多种细胞中的CD163水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(j) 降低一种或多种细胞中的CD206水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(k) 降低实体瘤的肿瘤生长速率；(l) 减小肿瘤体积；(m) 增加一种或多种PD-1抑制剂的效力；(n) 增加一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法的效力，任选地其中所述一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法靶向以下中的一种或多种：CTL4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、LAG3、或其任何组合；(o) 增加一种或多种化疗剂的效力，任选地其中所述化疗剂中的一种或多种是吉西他滨、卡培他滨、蒽环类药物(anthracyclines)、多柔比星(Adriamycin[®])、表柔比星(Ellence[®])、紫杉烷类、紫杉醇(Taxol[®])、多西他赛

(Taxotere[®])、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytosan[®])、卡铂(Paraplatin[®])、以及其任何组合；(p) 在非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)存在下增加T细胞的增殖；(q) 抑制非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的分化、存活、和/或一种或多种功能；以及(r) 当偶联到化学毒素或放射性毒素时杀灭实体瘤和相关联的血管中的CD33表达免疫抑制非致瘤性骨髓细胞和/或非致瘤性CD14表达细胞。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体不偶联到药剂，任选地其中所述药剂是药物、毒素、化学治疗剂、或放射性同位素。

[0027] 在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体结合不连续的CD33表位。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述不连续的CD33表位包含两个或更多个肽、三个或更多个肽、四个或更多个肽、五个或更多个肽、六个或更多个肽、七个或更多个肽、八个或更多个肽、九个或更多个肽、或10个或更多个肽。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述肽中的每一个包含五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、10个或更多个、11个或更多个、12个或更多个、13个或更多个、14个或更多个、15个或更多个、16个或更多个、17个或更多个、18个或更多个、19个或更多个、或20个或更多个SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸残基；或五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、10

个或更多个、11个或更多个、12个或更多个、13个或更多个、14个或更多个、15个或更多个、16个或更多个、17个或更多个、18个或更多个、19个或更多个、或20个或更多个哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸残基。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到CD33的构象表位。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-259、19-135、145-228、或229-259内;或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-259、19-135、145-228、或229-259的氨基酸残基内。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到在选自由以下组成的组的氨基酸残基内的一种或多种氨基酸:i.SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、或哺乳动物CD33d蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51的氨基酸残基;ii.SEQ ID NO:1的氨基酸残基48-54、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基48-54的氨基酸残基;iii.SEQ ID NO:1的氨基酸残基88-98、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基88-98的氨基酸残基;iv.SEQ ID NO:1的氨基酸残基110-120、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基110-120的氨基酸残基;v.SEQ ID NO:1的氨基酸残基112-122、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基112-122的氨基酸残基;vi.SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和110-120、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和110-120的氨基酸残基;vii.SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和112-122、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和112-122的氨基酸残基;以及viii.SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122的氨基酸残基。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的选自由以下组成的组的一种或多种氨基酸残基:D18、P19、N20、F21、F44、P46、Y49、Y50、K52、以及N53;或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的选自由以下组成的组的氨基酸残基的一种或多种氨基酸残基:D18、P19、N20、F21、F44、P46、Y49、Y50、K52、以及N53。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的选自由以下组成的组的一种或多种氨基酸残基:Y49、Y50和K52;或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的选自由以下组成的组的氨基酸残基的一种或多种氨基酸残基:Y49、Y50和K52。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49和K52;或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49和K52的氨基酸残基。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49、Y50和K52;或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49、Y50和K52的氨基酸残基。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体与选自由以下组成的组的一种或多种抗体竞争结合到CD33:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、6C7.2、1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、6C7.2、以及其任何组合。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体与选自由以下组成的组的抗体结合基本上相同的CD33表位:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及

6C7.21A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，CD33的细胞水平在选自以下组成的组的原代细胞上测量：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、T细胞、以及巨噬细胞，或在细胞系上测量，并且其中CD33的细胞水平利用体外细胞测定来测量。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述一种或多种CD33配体选自以下组成的组：在红细胞上表达的CD33配体、在细菌细胞上表达的CD33配体、在凋亡细胞上表达的CD33配体、在肿瘤细胞上表达的CD33配体、在病毒上表达的CD33配体、在树突细胞上表达的CD33配体、在神经细胞上表达的CD33配体、在神经胶质细胞上表达的CD33配体、在小神经胶质细胞上表达的CD33配体、在星形胶质细胞上表达的CD33配体、 β 淀粉样蛋白斑上的CD33配体、Tau缠结上的CD33配体、致病性蛋白上的CD33配体、致病性肽上的CD33配体、在巨噬细胞上表达的CD33配体、在自然杀伤细胞上表达的CD33配体、在T细胞上表达的CD33配体、在T辅助细胞上表达的CD33配体、在细胞毒性T细胞上表达的CD33配体、在B细胞上表达的CD33配体、在肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞上表达的CD33配体、在肿瘤包埋的免疫抑制巨噬细胞上表达的CD33配体、在非致瘤性骨髓来源的抑制细胞上表达的CD33配体、在调节性T细胞上表达的CD33配体、分泌粘蛋白、唾液酸、含有唾液酸的糖脂、含有唾液酸的糖蛋白、含有 α -2,6连接的唾液酸的糖脂、含有 α -2,6连接的唾液酸的糖蛋白、含有 α -2,3连接的唾液酸的糖脂、含有 α -2,3连接的唾液酸的糖蛋白、 α -1酸性糖蛋白 (AGP)、CD24蛋白、以及神经节苷脂。

[0028] 在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域，其中所述轻链可变结构域、所述重链可变结构域、或两者包含选自抗体的HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、以及HVR-H3的至少一个、两个、三个、四个、五个、或六个HVR，所述抗体选自以下组成的组：1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.21A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中：(a) HVR-L1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列，HVR-L2包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列，HVR-L3包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列，HVR-H1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列，HVR-H2包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列，并且HVR-H3包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列；(b) HVR-L1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列，HVR-L2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列，HVR-L3包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列，HVR-H1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列，HVR-H2包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列，并且HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列；(c) HVR-L1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列，HVR-L2包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列，HVR-L3包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列，HVR-H1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列，HVR-H2包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列，并且HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列；(d) HVR-L1包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列，HVR-L2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列，HVR-L3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列，HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列，HVR-H2包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列，并且HVR-H3包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列；(e) HVR-L1包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列，HVR-L2包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列，HVR-L3包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列，HVR-H1包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列，HVR-H2包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列，并且HVR-H3包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列；(f) HVR-L1包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列，HVR-L2包含

SEQ ID NO:70的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(g)HVR-L1包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(h)HVR-H1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(i)HVR-H1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(j)HVR-L1包含SEQ ID NO:184的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:185的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:187的氨基酸序列;(k)HVR-L1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:231的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;或者(l)HVR-L1包含SEQ ID NO:228的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:230的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:232的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:233的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包含:(a)HVR-L1,其包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:184、以及SEQ ID NO:228,或包含与选自自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:184、以及SEQ ID NO:228;(b)HVR-L2,其包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12-14、SEQ ID NO:69-71、SEQ ID NO:185、以及SEQ ID NO:229,或包含与选自自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:12-14、SEQ ID NO:69-71、SEQ ID NO:185、以及SEQ ID NO:229;以及(c)HVR-L3,其包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:15-17、SEQ ID NO:72-74和SEQ ID NO:230,或包含与选自自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:15-17、SEQ ID NO:72-74和SEQ ID NO:230;并且其中所述重链可变结构域包含:(a)HVR-H1,其包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:18-21、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:231、以及SEQ ID NO:232,或包含与选自自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:18-21、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:231、以及SEQ ID NO:232;(b)HVR-H2,其包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:22-25、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:186、以及SEQ ID NO:233,或包含与选自自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:22-25、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:186、以及SEQ ID NO:233;以及(c)HVR-H3,其包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:26-29和SEQ ID NO:187,或包含与选自自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:26-29和SEQ ID NO:187。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包含HVR-

L1、HVR-L2、HVR-L3,所述重链可变结构域包含HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,并且其中所述HVR-H3是选自由以下组成的组的抗体的HVR-H3:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3,所述重链可变结构域包含HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,并且其中所述HVR-H3包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:26-29和SEQ ID NO:187,或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:26-29和SEQ ID NO:187。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体包含:轻链可变结构域,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:30-48、SEQ ID NO:112-153、SEQ ID NO:192-202、以及SEQ ID NO:241-243;和/或重链可变结构域,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:49-66、SEQ ID NO:154-183、SEQ ID NO:203-213、以及SEQ ID NO:244-246。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体包含:选自由以下组成的组的抗体的轻链可变结构域:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2;和/或选自由以下组成的组的抗体的重链可变结构域:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。

[0029] 本公开的其他方面涉及一种分离的(例如,单克隆)抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-259、19-135、145-228、或229-259内;或在哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-259、19-135、145-228、或229-259的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到在选自由以下组成的组的氨基酸残基内的一种或多种氨基酸:i.SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51的氨基酸残基;ii.SEQ ID NO:1的氨基酸残基48-54、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基48-54的氨基酸残基;iii.SEQ ID NO:1的氨基酸残基88-98、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基88-98的氨基酸残基;iv.SEQ ID NO:1的氨基酸残基110-120、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基110-120的氨基酸残基;v.SEQ ID NO:1的氨基酸残基112-122、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基112-122的氨基酸残基;vi.SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和110-120、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和110-120的氨基酸残基;vii.SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和112-122、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和112-122的氨基酸残基;以及viii.SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122的氨基酸残基。

[0030] 本公开的其他方面涉及一种分离的(例如,单克隆)抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-

228内;或在哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-228的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到在选自以下组成的组的氨基酸残基内的一种或多种氨基酸:i.SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51的氨基酸残基;ii.SEQ ID NO:1的氨基酸残基48-54、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基48-54的氨基酸残基;iii.SEQ ID NO:1的氨基酸残基88-98、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基88-98的氨基酸残基;iv.SEQ ID NO:1的氨基酸残基110-120、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基110-120的氨基酸残基;v.SEQ ID NO:1的氨基酸残基112-122、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基112-122的氨基酸残基;vi.SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和110-120、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和110-120的氨基酸残基;vii.SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和112-122、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和112-122的氨基酸残基;以及viii.SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122、或哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122的氨基酸残基。

[0031] 本公开的其他方面涉及一种分离的(例如,单克隆)抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的选自以下组成的组的一种或多种氨基酸残基:D18、P1、N20、F21、F44、P46、Y49、Y50、K52、以及N53,或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的选自以下组成的组的氨基酸残基的一种或多种氨基酸残基:D18、P19、N20、F21、F44、P46、Y49、Y50、K52、以及N53。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的选自以下组成的组的一种或多种氨基酸残基:Y49、Y50和K52,或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的选自以下组成的组的氨基酸残基的一种或多种氨基酸残基:Y49、Y50和K52。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49和K52,或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49和K52的氨基酸残基。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49、Y50和K52,或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49、Y50和K52的氨基酸残基。

[0032] 本公开的其他方面涉及一种分离的(例如,单克隆)抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述重链可变结构域、所述轻链可变结构域、或两者包含选自抗体的HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、以及HVR-H3的至少一个、两个、三个、四个、五个、或六个HVR,所述抗体选自以下组成的组:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、6C7.2、1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、6C7.2、以及其任何组合。在一些实施方案中:(a)HVR-L1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;(b)HVR-L1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:

23的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;(c)HVR-L1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;(d)HVR-L1包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;(e)HVR-L1包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;(f)HVR-L1包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(g)HVR-L1包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(h)HVR-H1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(i)HVR-H1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(j)HVR-L1包含SEQ ID NO:184的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:185的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:187的氨基酸序列;(k)HVR-L1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:231的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;或者(l)HVR-L1包含SEQ ID NO:228的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:230的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:232的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:233的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述轻链可变结构域包含:(a)HVR-L1,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:184、以及SEQ ID NO:228,或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:184、以及SEQ ID NO:228;(b)HVR-L2,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12-14、SEQ ID NO:69-71、SEQ ID NO:185、以及SEQ ID NO:229,或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:12-14、SEQ ID NO:69-71、SEQ ID NO:185、以及SEQ ID NO:229;以及(c)HVR-L3,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:15-17、SEQ ID NO:72-74和SEQ ID NO:230,或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:15-17、SEQ ID NO:72-74和SEQ ID NO:230;并且其中所述重链可变结构域包含:(a)HVR-H1,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:18-21、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:231、以及SEQ ID NO:232,或包含与选

自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:18-21、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:231、以及SEQ ID NO:232; (b) HVR-H2,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:22-25、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:186、以及SEQ ID NO:233,或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:22-25、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:186、以及SEQ ID NO:233;以及(c) HVR-H3,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:26-29和SEQ ID NO:187,或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:226-29和SEQ ID NO:187。

[0033] 本公开的其他方面涉及一种分离的(例如,单克隆)抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体包含:轻链可变结构域,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:30-48、SEQ ID NO:112-153、SEQ ID NO:192-202、以及SEQ ID NO:241-243;和/或重链可变结构域,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:49-66、SEQ ID NO:154-183、SEQ ID NO:203-213、以及SEQ ID NO:244-246。本公开的其他方面涉及一种分离的(例如,单克隆)抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体包含:选自由以下组成的组的抗体的轻链可变结构域:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2;和/或选自由以下组成的组的抗体的重链可变结构域:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。本公开的其他方面涉及一种分离的(例如,单克隆)抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体与选自由以下组成的组的一种或多种抗体竞争结合到CD33:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、6C7.2。1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、6C7.2以及其任何组合。本公开的其他方面涉及一种分离的(例如,单克隆)抗CD33抗体,其与选自由以下组成的组的抗体结合基本上相同的CD33表位:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。本公开的其他方面涉及一种分离的(例如,单克隆)抗CD33抗体,其中所述抗CD33抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域,其中所述轻链可变结构域包含:(a) HVR-L1,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:184、以及SEQ ID NO:228,或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:184、以及SEQ ID NO:228; (b) HVR-L2,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12-14、SEQ ID NO:69-71、SEQ ID NO:185、以及SEQ ID NO:229,或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:12-14、SEQ ID NO:69-71、SEQ ID NO:185、以及SEQ ID NO:229;以及(c) HVR-L3,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:15-17、SEQ ID NO:72-74和SEQ ID NO:230,或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:15-17、SEQ ID NO:72-74和SEQ ID NO:230;或者其中所述重链可变结构域包含:(a) HVR-H1,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:18-21、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:231、以及SEQ ID NO:232,或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列:SEQ ID NO:18-21、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:

231、以及SEQ ID NO:232; (b) HVR-H2, 其包含选自以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:22-25、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:186、以及SEQ ID NO:233, 或包含与选自以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列: SEQ ID NO:22-25、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:186、以及SEQ ID NO:233; 以及(c) HVR-H3, 其包含选自以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:26-29和SEQ ID NO:187, 或包含与选自以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列: SEQ ID NO:26-29和SEQ ID NO:187。本公开的其他方面涉及一种分离的(例如, 单克隆)抗CD33抗体, 其中所述抗CD33抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域, 其中所述轻链可变结构域包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3, 所述重链可变结构域包含HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3, 并且其中所述HVR-H3是选自以下组成的组的抗体的HVR-H3: 1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。本公开的其他方面涉及一种分离的(例如, 单克隆)抗CD33抗体, 其中抗CD33抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域, 其中所述轻链可变结构域包含HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3, 所述重链可变结构域包含HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3, 并且其中所述HVR-H3包含选自以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:26-29和SEQ ID NO:187, 或包含与选自以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列: SEQ ID NO:26-29和SEQ ID NO:187。

[0034] 在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中, 所述抗体属于IgG类别、IgM类别、或IgA类别。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中, 所述抗CD33抗体具有IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4同种型。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中, 所述抗体结合抑制性Fc受体。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中, 所述抑制性Fc受体是抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ IIB)。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中: (a) 所述抗CD33抗体具有人IgG1同种型, 并且包含在Fc区中的在选自以下组成的组的残基位置处的一个或多个氨基酸取代: N297A、D265A、D270A、L234A、L235A、G237A、P238D、L328E、E233D、G237D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、L234V、L234F、L235E、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D、以及其任何组合, 其中所述残基的编号根据EU编号, 或包含在Fc区中的在对应于甘氨酸236的位置处的氨基酸缺失; (b) 所述抗CD33抗体具有人IgG1同种型并且包含IgG2同种型重链恒定结构域1(CH1)和铰链区, 任选地其中所述IgG2同种型CH1和铰链区包含氨基酸序列ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDPKPS NTKVDKTVERKCCVECPPCP (SEQ ID NO:214), 并且任选地其中所述抗体Fc区包含S267E氨基酸取代、L328F氨基酸取代或两者、和/或N297A或N297Q氨基酸取代, 其中所述残基的编号根据EU编号; (c) 所述抗CD33抗体具有人IgG2同种型并且包含在Fc区中的在选自以下组成的组的残基位置处的一个或多个氨基酸取代: P238S、V234A、G237A、H268A、H268Q、V309L、A330S、P331S、C214S、C232S、C233S、S267E、L328F、M252Y、S254T、T256E、H268E、N297A、N297Q、A330L、以及其任何组合, 其中所述残基的编号根据EU编号; (d) 所述抗CD33抗体具有人IgG4同种型并且包含在Fc区中的在选自以下组成的组的残基位置处的一个或多个氨基酸取代: L235A、G237A、S228P、L236E、S267E、E318A、L328F、M252Y、S254T、T256E、E233P、

F234V、L234A/F234A、S228P、S241P、L248E、T394D、N297A、N297Q、L235E、以及其任何组合，其中所述残基的编号根据EU编号；或者 (e) 所述抗CD33抗体具有杂合IgG2/4同种型，并且任选地其中所述抗体包含含有人IgG2的氨基酸118至260和人IgG4的氨基酸261至447的氨基酸序列，其中所述残基的编号根据EU编号。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中：(a) 所述抗CD33抗体具有人IgG1同种型，并且包含在Fc区中的在选自由以下组成的组的残基位置处的一个或多个氨基酸取代：N297A、N297Q、D270A、D265A、L234A、L235A、C226S、C229S、P238S、E233P、L234V、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、L234F、L235E、P331S、T394D、A330L、M252Y、S254T、T256E、以及其任何组合，其中所述残基的编号根据EU编号；(b) 所述抗CD33抗体具有人IgG2同种型并且包含在Fc区中的在选自由以下组成的组的残基位置处的一个或多个氨基酸取代：P238S、V234A、G237A、H268A、H268Q、H268E、V309L、N297A、N297Q、A330S、P331S、C232S、C233S、M252Y、S254T、T256E、以及其任何组合，其中所述残基的编号根据EU编号；或者 (c) 所述抗CD33抗体具有人IgG4同种型并且包含在Fc区中的在选自由以下组成的组的残基位置处的一个或多个氨基酸取代：E233P、F234V、L234A/F234A、L235A、G237A、E318A、S228P、L236E、S241P、L248E、T394D、M252Y、S254T、T256E、N297A、N297Q、以及其任何组合，其中所述残基的编号根据EU编号。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中：(a) Fc区还包含在选自由以下组成的组的位置处的一个或多个额外的氨基酸取代：A330L、L234F；L235E、P331S、以及其任何组合，其中所述残基的编号根据EU编号；(b) Fc区还包含在选自由以下组成的组的位置处的一个或多个额外的氨基酸取代：M252Y、S254T、T256E、以及其任何组合，其中所述残基的编号根据EU编号；或者 (c) Fc区还包含根据EU编号的S228P氨基酸取代。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述CD33蛋白是哺乳动物蛋白或人蛋白。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述CD33蛋白是野生型蛋白。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述CD33蛋白是天然存在的变体。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述CD33蛋白在选自由以下组成的组的一种或多种细胞上表达：人树突细胞、人巨噬细胞、人单核细胞、人破骨细胞、人嗜中性粒细胞、人T细胞、人T辅助细胞、人细胞毒性T细胞、人粒细胞、以及人小神经胶质细胞。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体特异性地结合到哺乳动物CD33蛋白、人CD33蛋白、或两者。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体特异性地结合到人CD33蛋白、小鼠CD33蛋白、或两者。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体以pH依赖性方式结合CD33。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体在5.5至8.0范围内的pH下结合CD33。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体在小于5.0的pH下与CD33解离。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体是结合到包含在人CD33蛋白或哺乳动物CD33蛋白上的氨基酸残基的表位的抗体片段。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体是结合到选自由以下组成的组的一种或多种人蛋白的抗体片段：人CD33、人CD33的天然存在的变体、以及人CD33的疾病变体。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗体片段交联到第二抗体片段，所述第二抗体片段结合到选自由以下组成的组的一种或多种人蛋白：人CD33、人CD33的天然存在的变体、以及人CD33的疾病变体。在可与前述实施方案中的任一项组合的

一些实施方案中,所述片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、或scFv片段。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体是鼠抗体。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体是人源化抗体、双特异性抗体、单克隆抗体、多价抗体、偶联抗体、或嵌合抗体。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体是识别第一抗原和第二抗原的双特异性抗体。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述第一抗原是CD33并且所述第二抗原是:(a)有助于跨血脑屏障转运的抗原;(b)有助于跨血脑屏障转运的抗原,其选自由以下组成的组:转铁蛋白受体(TR)、胰岛素受体(HIR)、胰岛素样生长因子受体(IGFR)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1和低密度脂蛋白受体相关蛋白2(LPR-1和LPR-2)、白喉毒素受体、CRM197、美洲驼单结构域抗体、TMEM 30(A)、蛋白转导结构域、TAT、Syn-B、穿膜肽(penetratin)、聚精氨酸肽、血管肽(angiopep peptide)、以及ANG1005;(c)选自由致病性肽或蛋白质和致病性核酸组成的组的致病物质,其中所述致病性肽或蛋白质选自由以下组成的组:淀粉样蛋白 β 、寡聚淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑、淀粉样蛋白前体蛋白或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72(染色体9开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易小体、心房利钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关非ATG(RAN)翻译产物、二肽重复序列(DPR)肽、甘氨酸-丙氨酸(GA)重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸(GP)重复序列肽、甘氨酸-精氨酸(GR)重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸(PA)重复序列肽、泛素、以及脯氨酸-精氨酸(PR)重复序列肽,并且所述致病性核酸是反义GGCCCC(G2C4)重复序列扩增RNA;(d)在免疫细胞上表达的配体和/或蛋白质,其中所述配体和/或蛋白质选自由以下组成的组:CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG、以及磷脂酰丝氨酸;以及(e)在一种或多种肿瘤细胞上表达的蛋白质、脂质、多糖、或糖脂。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体是偶联抗体。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体偶联到可检测的标记物、毒素、或治疗剂。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体偶联到选自由以下组成的组的毒素:蓖麻毒素、蓖麻毒素A-链、多柔比星、柔红霉素、美登木素生物碱、紫杉酚、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞杆菌外毒素(Pseudomonas exotoxin)(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A链、莨菪根毒素A链、 α -帚曲菌素、白树毒素、丝林霉素(mitogellin)、局限曲霉素(restrictocin)、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白(curicin)、巴豆毒蛋白、加利车霉素、肥皂草(Saponaria officinalis)抑制剂、糖皮质激素、奥瑞斯他汀、金霉素、钇、铋、考布他汀(combrestatin)、多卡霉素(duocarmycin)、多拉司它汀(dolastatin)、cc1065、以及顺铂。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体用于与特异性地结合致病物质的一种或多种抗体组合,所述致病物质选自由以下组成的组:致病性肽、致病性蛋白、淀粉样蛋白 β 、寡聚淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑、淀粉样蛋白前体蛋白或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、

C9orf72 (染色体9开放阅读框72)、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易小体、心房利钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关非ATG (RAN) 翻译产物、二肽重复序列 (DPR) 肽、甘氨酸-丙氨酸 (GA) 重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸 (GP) 重复序列肽、甘氨酸-精氨酸 (GR) 重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸 (PA) 重复序列肽、泛素、和脯氨酸-精氨酸 (PR) 重复序列肽、以及其任何组合；或与结合免疫调节蛋白的一种或多种抗体组合，所述免疫调节蛋白选自以下组成的组：CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG、TREM1、TREM2、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-5、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-7、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-11、磷脂酰丝氨酸、致病性核酸、反义GGCCCC (G2C4) 重复序列扩增RNA、以及其任何组合。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体对于人CD33和小鼠CD33具有约100nM至约100pM范围内、或小于100pM的解离常数 (K_D)，并且其中 K_D 在25℃的温度下确定。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体对于人CD33具有约10nM至约500pM范围内、或小于500pM的解离常数 (K_D)，并且其中 K_D 在25℃的温度下确定。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体对于人CD33具有约100nM至约100pM范围内、或小于100pM的解离常数 (K_D)，并且其中 K_D 在25℃的温度下确定。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体对于小鼠CD33具有约100nM至约100pM范围内、或小于100pM的解离常数 (K_D)，并且其中 K_D 在25℃的温度下确定。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中， K_D 使用单价抗体来确定。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中， K_D 使用呈单价形式的全长抗体来确定。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述抗CD33抗体不偶联到药剂，任选地其中所述药剂是药物、毒素、化学治疗剂、或放射性同位素。

[0035] 本公开的其他方面涉及一种包含编码如前述实施方案中任一项所述的抗CD33抗体的核酸序列的分离的核酸。本公开的其他方面涉及一种包含如前述实施方案中任一项所述的核酸的载体。本公开的其他方面涉及一种包含如前述实施方案中任一项所述的载体的宿主细胞。本公开的其他方面涉及一种产生抗CD33抗体的方法，其包括培养如前述实施方案中任一项所述的宿主细胞以产生所述抗CD33抗体。在一些实施方案中，所述方法还包括回收由宿主细胞产生的抗CD33抗体。本公开的其他方面涉及一种通过如前述实施方案中任一项所述的方法产生的分离的抗CD33抗体。本公开的其他方面涉及一种包含如前述实施方案中任一项所述的抗CD33抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0036] 本公开的其他方面涉及一种预防、降低风险、或治疗选自以下组成的组的疾病、病症或损伤的方法：痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经

节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、癌症、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病 (ALL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性骨髓性白血病 (CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌，所述方法包括向有需要的个体施用治疗有效量的降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂。本公开的其他方面涉及一种降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂，其用于预防、降低风险、或治疗选自以下组成的组的疾病、病症或损伤：痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希一德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、癌症、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病 (ALL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性骨髓性白血病 (CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。本公开的其他方面涉及降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂在制造用于预防、降低风险、或治疗选自以下组成的组的疾病、病症或损伤的药品中的用途：痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希一德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾

病、佩吉特氏骨病、癌症、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。在一些实施方案中,所述药剂选自自由以下组成的组:抗体、可溶性CD33受体、CD33-Fc融合蛋白、CD33免疫粘附素、结合一种或多种CD33配体的可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素、反义分子、siRNA、小分子抑制剂、蛋白质、以及肽。在一些实施方案中,所述药剂是分离的抗CD33抗体。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体是如前述实施方案中任一项所述的抗CD33抗体。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述疾病、病症或损伤是癌症。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述药剂抑制选自自由以下组成的组的一种或多种CD33活性:(a)促进以下中的一种或多种的增殖、成熟、迁移、分化和/或功能性:免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、非致瘤性骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、非致瘤性CD14⁺骨髓细胞、以及调节性T细胞;(b)增强以下中的一种或多种到肿瘤中的浸润:免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、非致瘤性骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、以及调节性T细胞;(c)增加肿瘤中、外周血中或其他淋巴样器官中的促进肿瘤的骨髓/粒细胞性免疫抑制性细胞和/或非致瘤性CD14⁺骨髓细胞的数量;(d)增强非致瘤性骨髓来源的抑制细胞和/或非致瘤性CD14⁺骨髓细胞的促进肿瘤的活性;(e)增加肿瘤中或外周血中的促进肿瘤细胞因子的表达,任选地其中所述促进肿瘤细胞因子是TGF- β 或IL-10;(f)增加促进肿瘤的FoxP3⁺调节性T淋巴细胞的肿瘤浸润;(g)减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的活化;(h)减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的浸润;(i)减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性NK细胞的浸润;(j)降低NK细胞的肿瘤杀伤潜力;(k)减少具有增强免疫应答的潜力的肿瘤特异性B淋巴细胞的浸润;(l)增加肿瘤体积;(m)增加肿瘤生长速率;(n)增加转移;(o)增加肿瘤复发率;(p)增加一种或多种PD-1配体的表达;(q)降低调节抗肿瘤T细胞应答的一种或多种免疫疗法或一种或多种癌症疫苗的效力,任选地其中所述一种或多种免疫疗法是靶向选自自由以下组成的组的一种或多种蛋白质的免疫疗法:CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG-3、DR-5、TREM1、TREM2、CSF-1受体、以及其任何组合;(r)抑制PLC γ /PKC/钙动员;(s)抑制PI3K/Akt、Ras/MAPK信号传导;以及(t)降低一种或多种化疗剂的效力,任选地其中所述化疗剂中的一种或多种是吉西他滨、卡培他滨、蒽环类药物、多柔比星(Adriamycin[®])、表柔比星(Ellence[®])、紫杉烷类、紫杉醇(Taxol[®])、多西他赛(Taxotere[®])、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytosan[®])、卡铂(Paraplatin[®])、以及其任何组合。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述药剂表现出选自自由以下组成的组的一种或多种活性:(a)增加肿瘤浸润CD3⁺ T细胞的数量;(b)降低非致瘤性

CD14⁺骨髓细胞中的CD33的细胞水平,任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞是肿瘤浸润细胞或者任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞存在于血液中;(c)减少非致瘤性CD14⁺骨髓细胞的数量,任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞是肿瘤浸润细胞或者任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞存在于血液中;(d)降低一种或多种细胞中的PD-L1水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(e)降低一种或多种细胞中的PD-L2水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(f)降低一种或多种细胞中的B7-H2水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(g)降低一种或多种细胞中的B7-H3水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(h)降低一种或多种细胞中的CD200R水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(i)降低一种或多种细胞中的CD163水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(j)降低一种或多种细胞中的CD206水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(k)降低实体瘤的肿瘤生长速率;(l)减小肿瘤体积;(m)增加一种或多种PD-1抑制剂的效力;(n)增加一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法的效力,任选地其中所述一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法靶向以下中的一种或多种:CTL4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、LAG3、或其任何组合;(o)增加一种或多种化疗剂的效力,任选地其中所述化疗剂中的一种或多种是吉西他滨、卡培他滨、蒽环类药物、多柔比星(Adriamycin[®])、表柔比星(Ellence[®])、紫杉烷类、紫杉醇(Taxol[®])、多西他赛(Taxotere[®])、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytosan[®])、卡铂(Paraplatin[®])、以及其任何组合;(p)在非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)存在下增加T细胞的增殖;以及(q)抑制非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的分化、存活、和/或一种或多种功能;以及(r)当偶联到化学毒素或放射性毒素时杀灭实体瘤和相关联的血管中的CD33表达免疫抑制骨髓细胞和/或CD14表达细胞。

[0037] 本公开的其他方面涉及一种预防、降低风险、或治疗选自由以下组成的组的疾病、病症或损伤的方法:痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、tau蛋白病、感染、以及癌症,所述方法包括向有需要的个体施用治疗有效量的降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂。本公开的其他方面涉及一种降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂,其用于预防、降低风险、或治疗选自由以下组成的组的疾病、病症或损伤:痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、tau蛋白病、感染、以及癌症。本公开的其他方面涉及降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂在制造用于预防、降低风险、或治疗选自由以下组成的组的疾病、病症或损伤的药品中的用途:痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、tau蛋白病、感染、以及癌症。在一些实施方案中,所述药剂选自由以下组成的组:抗体、可溶性CD33受体、CD33-Fc融合蛋白、CD33免疫粘附素、结合一种或多种CD33配体的可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素、反义分子、siRNA、小分子抑制剂、蛋白质、以及肽。在一些实施方案中,所述药剂是分离的抗CD33抗体。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体是如前述

实施方案中任一项所述的抗CD33抗体。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述疾病、病症或损伤是癌症。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述癌症表达CD33。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述癌症选自自由以下组成的组:膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、以及多发性骨髓瘤。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述药剂抑制选自自由以下组成的组的一种或多种CD33活性:(a)促进以下中的一种或多种的增殖、成熟、迁移、分化和/或功能性:免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、非致瘤性骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、非致瘤性CD14⁺骨髓细胞、以及调节性T细胞;(b)增强以下中的一种或多种到肿瘤中的浸润:免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、非致瘤性骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、以及调节性T细胞;(c)增加肿瘤中、外周血中或其他淋巴样器官中的促进肿瘤的骨髓/粒细胞性免疫抑制性细胞和/或非致瘤性CD14⁺骨髓细胞的数量;(e)增加肿瘤中或外周血中的促进肿瘤细胞因子的表达,任选地其中所述促进肿瘤细胞因子是TGF- β 或IL-10;(f)增加促进肿瘤的FoxP3⁺调节性T淋巴细胞的肿瘤浸润;(g)减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的活化;(h)减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的浸润;(i)减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性NK细胞的浸润;(j)降低NK细胞的肿瘤杀伤潜力;(k)减少具有增强免疫应答的潜力的肿瘤特异性B淋巴细胞的浸润;(l)增加肿瘤体积;(m)增加肿瘤生长速率;(n)增加转移;(o)增加肿瘤复发率;(p)增加一种或多种PD-1配体的表达;(q)降低调节抗肿瘤T细胞应答的一种或多种免疫疗法或一种或多种癌症疫苗的效力,任选地其中所述一种或多种免疫疗法是靶向选自自由以下组成的组的一种或多种蛋白质的免疫疗法:CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG-3、DR-5、TREM1、TREM2、CSF-1受体、以及其任何组合;(r)抑制PLC γ /PKC/钙动员;(s)抑制PI3K/Akt、Ras/MAPK信号传导;以及(t)降低一种或多种化疗剂的效力,任选地其中所述化疗剂中的一种或多种是吉西他滨、卡培他滨、蒽环类药物、多柔比星(Adriamycin[®])、表柔比星(Ellence[®])、紫杉烷类、紫杉醇(Taxol[®])、多西他赛(Taxotere[®])、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytosan[®])、卡铂(Paraplatin[®])、以及其任何组合。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述药剂表现出选自自由以下组成的组的一种或多种活性:(a)增加肿瘤浸润CD3⁺T细胞的数量;(b)降低非致瘤性CD14⁺骨髓细胞中的CD33的细胞水平,任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞是肿瘤浸润细胞或者任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞存在于血液中;(c)减少非致瘤性CD14⁺骨髓细胞的数量,任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞是肿瘤浸润细胞或者任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞存在于血液中;(d)降低一种或多种细胞中的PD-L1水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(e)降低一种或多种细胞中的PD-L2水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(f)降低一种或多种细胞中的B7-H2水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(g)降低一种或多种细胞中的B7-H3水平,任选地其

中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) ; (h) 降低一种或多种细胞中的CD200R水平, 任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) ; (i) 降低一种或多种细胞中的CD163水平, 任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) ; (j) 降低一种或多种细胞中的CD206水平, 任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) ; (k) 降低实体瘤的肿瘤生长速率; (l) 减小肿瘤体积; (m) 增加一种或多种PD-1抑制剂的效力; (n) 增加一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法的效力, 任选地其中所述一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法靶向以下中的一种或多种: CTL4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、LAG3、或其任何组合; (o) 增加一种或多种化疗剂的效力, 任选地其中所述化疗剂中的一种或多种是吉西他滨、卡培他滨、蒽环类药物、多柔比星(Adriamycin[®])、表柔比星(Ellence[®])、紫杉烷类、紫杉醇(Taxol[®])、多西他赛(Taxotere[®])、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺

(Cytoxan[®])、卡铂(Paraplatin[®])、以及其任何组合; (p) 在非致瘤性骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) 存在下增加T细胞的增殖; 以及 (q) 抑制非致瘤性骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) 的分化、存活、和/或一种或多种功能; 以及 (r) 当偶联到化学毒素或放射性毒素时杀灭实体瘤和相关联的血管中的CD33表达免疫抑制骨髓细胞和/或CD14表达细胞。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中, 所述疾病、病症或损伤是感染。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中, 所述感染选自由以下组成的组: CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0038] 本公开的其他方面涉及一种预防、降低风险、或治疗癌症的方法, 其包括向有需要的个体施用治疗有效量的降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂。本公开的其他方面涉及一种降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂, 其用于预防、降低风险、或治疗有需要的个体中的癌症。本公开的其他方面涉及降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂在制造用于预防、降低风险、或治疗有需要的个体中的癌症的药品中的用途。在一些实施方案中, 所述药剂选自由以下组成的组: 抗体、可溶性CD33受体、CD33-Fc融合蛋白、CD33免疫粘附素、结合一种或多种CD33配体的可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素、反义分子、siRNA、小分子抑制剂、蛋白质、以及肽。在一些实施方案中, 所述药剂是分离的抗CD33抗体。在一些实施方案中, 所述抗CD33抗体是如前述实施方案中任一项所述的抗CD33抗体。在一些实施方案中, 所述癌症选自由以下组成的组: 膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、以及多发性骨髓瘤。在一些实施方案中, 所述癌症是表达CD33的癌症。在一些实施方案中, 所述癌症包括表达CD33的肿瘤。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中, 所述药剂抑制选自由以下组成的组的一种或多种CD33活性: (a) 促进以下中的一种或多种的增殖、成熟、迁移、分化和/或功能性: 免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、免疫抑

制嗜中性粒细胞、非致瘤性骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、非致瘤性CD14⁺骨髓细胞、以及调节性T细胞；(b) 增强以下中的一种或多种到肿瘤中的浸润：免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、非致瘤性骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、以及调节性T细胞；(c) 增加肿瘤中、外周血中或其他淋巴样器官中的促进肿瘤的骨髓/粒细胞性免疫抑制性细胞和/或非致瘤性CD14⁺骨髓细胞的数量；(d) 增强非致瘤性骨髓来源的抑制细胞和/或非致瘤性CD14⁺骨髓细胞的促进肿瘤的活性(e) 增加肿瘤中或外周血中的促进肿瘤细胞因子的表达，任选地其中所述促进肿瘤的细胞因子是TGF- β 或IL-10；(f) 增加促进肿瘤的FoxP3⁺调节性T淋巴细胞的肿瘤浸润；(g) 减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的活化；(h) 减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的浸润；(i) 减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性NK细胞的浸润；(j) 降低NK细胞的肿瘤杀伤潜力；(k) 减少具有增强免疫应答的潜力的肿瘤特异性B淋巴细胞的浸润；(l) 增加肿瘤体积；(m) 增加肿瘤生长速率；(n) 增加转移；(o) 增加肿瘤复发率；(p) 增加一种或多种PD-1配体的表达；(q) 降低调节抗肿瘤T细胞应答的一种或多种免疫疗法或一种或多种癌症疫苗的效力，任选地其中所述一种或多种免疫疗法是靶向选自以下组成的组的一种或多种蛋白质的免疫疗法：CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG-3、DR-5、TREM1、TREM2、CSF-1受体、以及其任何组合；(r) 抑制PLC γ /PKC/钙动员；(s) 抑制PI3K/Akt、Ras/MAPK信号传导；以及(t) 降低一种或多种化疗剂的效力，任选地其中所述化疗剂中的一种或多种是吉西他滨、卡培他滨、蒽环类药物、多柔比星(Adriamycin[®])、表柔比星(Ellence[®])、紫杉烷类、紫杉醇(Taxol[®])、多西他赛(Taxotere[®])、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytosan[®])、卡铂(Paraplatin[®])、以及其任何组合。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中，所述药剂表现出选自以下组成的组的一种或多种活性：(a) 增加肿瘤浸润CD3⁺ T细胞的数量；(b) 降低非致瘤性CD14⁺骨髓细胞中的CD33的细胞水平，任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞是肿瘤浸润细胞或者任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞存在于血液中；(c) 减少非致瘤性CD14⁺骨髓细胞的数量，任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞是肿瘤浸润细胞或者任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞存在于血液中；(d) 降低一种或多种细胞中的PD-L1水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(e) 降低一种或多种细胞中的PD-L2水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(f) 降低一种或多种细胞中的B7-H2水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(g) 降低一种或多种细胞中的B7-H3水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(h) 降低一种或多种细胞中的CD200R水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(i) 降低一种或多种细胞中的CD163水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(j) 降低一种或多种细胞中的CD206水平，任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)；(k) 降低实体瘤的肿瘤生长速率；(l) 减小肿瘤体积；(m) 增加一种或多种PD-1抑制剂的效力；(n) 增加一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法的效力，任选地其中所述一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法靶向以下中的一种或多种：CTLA4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、

LAG3、或其任何组合；(o) 增加一种或多种化疗剂的效力，任选地其中所述化疗剂中的一种或多种是吉西他滨、卡培他滨、蒽环类药物、多柔比星(Adriamycin[®])、表柔比星(Ellence[®])、紫杉烷类、紫杉醇(Taxol[®])、多西他赛(Taxotere[®])、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytosan[®])、卡铂(Paraplatin[®])、以及其任何组合；(p) 在非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)存在下增加T细胞的增殖；以及(q) 抑制非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的分化、存活、和/或一种或多种功能；以及(r) 当偶联到化学毒素或放射性毒素时杀灭实体瘤和相关联的血管中的CD33表达免疫抑制骨髓细胞和/或CD14表达细胞。

[0039] 本公开的其他方面涉及一种诱导或促进有需要的个体中的一种或多种免疫细胞的存活、成熟、功能性、迁移、或增殖的方法，其包括向所述个体施用治疗有效量的降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂。本公开的其他方面涉及一种降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂，其用于诱导或促进有需要的个体中的一种或多种免疫细胞的存活、成熟、功能性、迁移、或增殖。本公开的其他方面涉及降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂在制造用于诱导或促进有需要的个体中的一种或多种免疫细胞的存活、成熟、功能性、迁移、或增殖的药品中的用途。在一些实施方案中，所述药剂选自自由以下组成的组：抗体、可溶性CD33受体、CD33-Fc融合蛋白、CD33免疫粘附素、结合一种或多种CD33配体的可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素、反义分子、siRNA、小分子抑制剂、蛋白质、以及肽。在一些实施方案中，所述药剂是分离的抗CD33抗体。在一些实施方案中，所述抗CD33抗体是如前述实施方案中任一项所述的抗CD33抗体。在一些实施方案中，所述一种或多种免疫细胞选自自由以下组成的组：树突细胞、巨噬细胞、小神经胶质细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、以及其任何组合。

[0040] 本公开的其他方面涉及一种降低有需要的个体中的以下各项的活性、功能性、或存活的方法：调节性T细胞、肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞、肿瘤包埋的免疫抑制巨噬细胞、非致瘤性骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、急性骨髓性白血病(AML)细胞、慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞、或慢性骨髓性白血病(CML)细胞，所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的结合CD33或与CD33相互作用的药剂。本公开的其他方面涉及一种用于降低有需要的个体中的以下各项的活性、功能性、或存活的结合CD33或与CD33相互作用的药剂：调节性T细胞、肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞、肿瘤包埋的免疫抑制巨噬细胞、非致瘤性骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、急性骨髓性白血病(AML)细胞、慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞、或慢性骨髓性白血病(CML)细胞。本公开的其他方面涉及结合CD33或与CD33相互作用的药剂在制造用于降低有需要的个体中的以下各项的活性、功能性、或存活的药品中的用途：调节性T细胞、肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞、肿瘤包埋的免疫抑制巨噬细胞、非致瘤性骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、急性骨髓性白血病(AML)细胞、慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞、或慢性骨髓性白血病(CML)细胞。在一些实施方案中，所述药剂选自自由以下组成的组：抗体、拮抗剂抗体、惰性抗体、激动剂抗体、CD33配体、CD33配体激动剂片段、CD33免疫粘附素、CD33配体模拟物、可溶性CD33受体、CD33-Fc融合蛋白、结合一种或多种CD33配体的可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、结合一种或多种CD33配体的

唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白、以及小分子化合物。在一些实施方案中,所述药剂是分离的抗CD33抗体或抗CD33抗体偶联物。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体偶联物包含偶联到可检测的标记物、毒素、或治疗剂的抗CD33抗体。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体偶联物包含偶联到选自以下组成的组的毒素的抗CD33抗体:蓖麻毒素、蓖麻毒素A-链、多柔比星、柔红霉素、美登木素生物碱、紫杉酚、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞杆菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲菌素、白树毒素、丝林霉素、局限曲霉素、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、加利车霉素、肥皂草抑制剂、糖皮质激素、奥瑞斯他汀、金霉素、钇、铋、考布他汀、多卡霉素、多拉司它汀、cc1065、以及顺铂。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体是如前述实施方案中任一项所述的不显著降低CD33的细胞表面水平和/或不抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的抗CD33抗体。

[0041] 本公开的其他方面涉及一种在有需要的个体中的一种或多种细胞上降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的分离的抗CD33抗体。本公开的其他方面涉及一种用于在有需要的个体中的一种或多种细胞上降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的分离的抗CD33抗体。本公开的其他方面涉及分离的抗CD33抗体在制造用于在有需要的个体中的一种或多种细胞上降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药品中的用途。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞选自树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、T细胞、以及巨噬细胞;和/或细胞系。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体降低体内CD33的细胞水平。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体以65pM至20pM范围内的 EC_{50} 降低CD33的细胞水平。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体以以下 EC_{50} 降低CD33的细胞水平:65pM或更小、60pM或更小,55pM或更小,50pM或更小,45pM或更小、40pM或更小、35pM或更小、30pM或更小、25pM或更小、24pM或更小、23pM或更小、22pM或更小、21pM或更小、20pM或更小、10pM或更小、9pM或更小、8pM或更小、7pM或更小、6pM或更小、或5pM或更小。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体以65pM至22pM范围内、或小于22pM的 EC_{50} 降低CD33的细胞水平。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体以约8.0mg/kg至约2.0mg/kg范围内的 EC_{50} 降低体内CD33的细胞水平。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体对于人CD33具有300nM至10pM范围内的解离常数(K_D),其中 K_D 在大约25℃的温度下确定。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体对于人CD33具有小于300pM的解离常数(K_D),其中 K_D 在大约25℃的温度下确定。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中, K_D 使用单价抗体来确定。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中, K_D 使用呈单价形式的全长抗体来确定。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体以200pM至10pM范围内的 EC_{50} 结合到人树突细胞,其中 EC_{50} 在大约4℃的温度下确定。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体以小于200pM的 EC_{50} 结合到人树突细胞,其中 EC_{50} 在大约4℃的温度下确定。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体选自以下组成的组:拮抗剂抗

CD33抗体、惰性抗CD33抗体、以及激动剂抗CD33抗体。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体是如前述实施方案中任一项所述的抗CD33抗体。

[0042] 在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述个体包含CD33的变体。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述变体包含选自以下组成的组的一种或多种多态性:(a) SNP rs3865444^{AC}; (b) SNP rs3865444^{CC}; (c) SNP rs35112940^{GG,AA,AG}; (d) SNP rs12459419^{CC,CT或TT};以及其任何组合。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用特异性地结合到抑制性检查点分子的至少一种抗体和/或一种或多种标准或研究性抗癌疗法。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,特异性地结合到抑制性检查点分子的至少一种抗体与所述抗CD33抗体组合施用。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,特异性地结合到抑制性检查点分子的至少一种抗体选自以下组成的组:抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体、抗PD-L2抗体、抗PD-1抗体、抗B7-H3抗体、抗B7-H4抗体、以及抗HVEM抗体、抗B淋巴细胞和T淋巴细胞衰减因子(BTLA)抗体、抗杀伤细胞抑制性受体(KIR)抗体、抗GAL9抗体、抗TIM3抗体、抗A2AR抗体、抗LAG-3抗体、抗磷脂酰丝氨酸抗体、抗CD27抗体、抗TNF α 抗体、抗唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-5抗体、抗唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-7抗体、抗唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9抗体、抗唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-11抗体、拮抗性抗TREM1抗体、拮抗性抗TREM2抗体、以及其任何组合。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述一种或多种标准或研究性抗癌疗法选自以下组成的组:放射疗法、细胞毒性化学疗法、靶向疗法、伊马替尼疗法、曲妥珠单抗疗法、依那西普疗法、过继细胞移植(ACT)疗法、嵌合抗原受体T细胞移植(CAR-T)疗法、疫苗疗法、以及细胞因子疗法。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用特异性地结合到抑制性细胞因子的至少一种抗体。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,特异性地结合到抑制性细胞因子的至少一种抗体与所述抗CD33抗体组合施用。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,特异性地结合到抑制性细胞因子的至少一种抗体选自以下组成的组:抗CCL2抗体、抗CSF-1抗体、抗IL-2抗体、以及其任何组合。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用特异性地结合到刺激性检查点蛋白的至少一种激动性抗体。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,特异性地结合到刺激性检查点蛋白的至少一种激动性抗体与抗CD33抗体组合施用。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,特异性地结合到刺激性检查点蛋白的至少一种激动性抗体选自以下组成的组:激动剂抗CD40抗体、激动剂抗OX40抗体、激动剂抗ICOS抗体、激动剂抗CD28抗体、激动性抗TREM1抗体、激动性抗TREM2抗体、激动剂抗CD137/4-1BB抗体、激动剂抗CD27抗体、激动剂抗糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白GITR抗体、以及其任何组合。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用至少一种刺激性细胞因子。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述至少一种刺激性细胞因子与抗CD33抗体组合施用。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述至少一种刺激性细胞因子选自以下组成的组:IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、CRP、IL-33、MCP-1、MIP-1- β 、以及其任何组合。

[0043] 本公开的其他方面涉及一种选择有需要的受试者以供用结合CD33或与CD33相互作用的药剂治疗的方法,所述方法包括:a.从受试者获得样品;b.检测存在于受试者中的CD33等位基因;以及c.选择受试者以供用结合CD33或与CD33相互作用的药剂治疗,所述受试者具有一种或多种CD33等位基因,其中所述一种或多种CD33等位基因选自由rs3865444^{AC}和rs3865444^{CC}组成的组。本公开的其他方面涉及一种评估有需要的受试者对于结合CD33或与CD33相互作用的药剂的应答性的方法,所述方法包括:a.在向受试者施用抗CD33抗体之前测量从受试者获得的血液样品中的非致瘤性骨髓细胞上的CD45⁺和CD14⁺的表达水平;b.向受试者施用治疗有效量的药剂;以及c.在施用抗CD33抗体之后测量从受试者获得的血液样品中的非致瘤性骨髓细胞上的CD45⁺和CD14⁺的表达水平,其中在施用抗CD33抗体之后非致瘤性骨髓细胞上的CD45⁺CD14⁺水平降低指示受试者对于药剂具有应答性。在一些实施方案中,评估应答性的方法还包括施用一份或多份额外的治疗有效量的药剂。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述药剂选自由以下组成的组:抗体、可溶性CD33受体、CD33-Fc融合蛋白、CD33免疫粘附素、可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素、反义分子、siRNA、小分子抑制剂、蛋白质、以及肽。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述药剂是分离的抗CD33抗体或抗CD33抗体偶联物。在可与前述实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗CD33抗体是如前述实施方案中任一项所述的抗CD33抗体。

[0044] 附图简述

[0045] 图1示出CD33的结构和描绘CD33的结构域结构的方案以及参与磷酸化或泛素化事件或鉴定为相对频繁的非同义单核苷酸多态性(SNP)的个别氨基酸。缩写:CBL:casitas B-谱系淋巴瘤E3泛素连接酶;C2:C2型Ig样结构域;ECS:延伸蛋白B/C-滞蛋白(Cullin)-5SPRY结构域泛素连接酶;P:磷酸-;PKC:蛋白激酶C;SFK:Src家族激酶;SHP-1/2:包含Src同源区2结构域的磷酸酶-1和包含Src同源区2结构域的磷酸酶-2;SOCS3:细胞因子信号传导抑制子3;Ub:泛素;V:V型Ig样结构域。(Cowan等人,(2013)Frontiers in Bioscience18:1311-1334)。

[0046] 图2描绘人CD33(SEQ ID NO:1)与小鼠CD33(SEQ ID NO:2)、大鼠CD33(SEQ ID NO:3)、黑猩猩CD33(SEQ ID NO:4)、恒河猴CD33(SEQ ID NO:5)、狗CD33(SEQ ID NO:6)、牛CD33(SEQ ID NO:7)、以及斑马鱼CD33(SEQ ID NO:8)之间的氨基酸序列比对。星号("*")指示具有单一的完全保守的残基的位置;冒号(":")指示具有强相似特性(在Gonnet PAM 250矩阵中得分>0.5)的组之间的保守;并且句号(".")指示具有弱相似特性(在Gonnet PAM 250矩阵中得分=<0.5)的组之间的保守。

[0047] 图3示出人唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素蛋白(诸如CD33)的聚糖结合特异性。此图示出最常研究的唾液酸化聚糖的最常报道的特异性的汇总。每种唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素的研究内的相对结合指示为++,强结合;+,可检测的结合;以及-,非常弱或不可检测的结合。未示出h唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-8和m唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-F对于6'-硫酸化-唾液酸化-路易斯x(sLex)和h唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9对于6-唾液酸化-sLex的最近报道的强结合偏好。在一些例外(CD22和MAG)的情况下,通过不同的研究人员使用不同的测定法所得的人唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素的

结合特异性研究的结果显著地变化。除测定形式和聚糖接头问题之外,所研究的配体的密度和布置可负责此变化(Varki等人,(2006) *Glycobiol.* 16:1R-27R)。

[0048] 图4示出哺乳动物脑中神经节苷脂的结构和代谢。附图中的神经节苷脂的命名遵循Svennerholm系统(1964) *J.Lipid Res.* 5:145-155(Ariga T等人(2008) *J.Lipid Res.* 49:1157-1175)。

[0049] 图5A描绘证明人原代免疫细胞中的CD33表达的FACS分析的结果。图5B描绘示出CD33抗体1A8对于纯化的CD33-his标记蛋白的结合亲和力的BIAcore传感图。图5C描绘示出CD33抗体2E12对于纯化的CD33-his标记蛋白的结合亲和力的BIAcore传感图。图5D描绘示出CD33抗体2F5对于纯化的CD33-his标记蛋白的结合亲和力的BIAcore传感图。图5E描绘示出CD33抗体6A3对于纯化的CD33-his标记蛋白的结合亲和力的BIAcore传感图。图5F描绘示出CD33抗体6C7对于纯化的CD33-his标记蛋白的结合亲和力的BIAcore传感图。图5G描绘示出CD33抗体吉妥珠单抗对于纯化的CD33-his标记蛋白的结合亲和力的BIAcore传感图。图5H描绘CD33抗体2F5和6C7结合到人原代树突细胞上的CD33的结合曲线。图5I描绘CD33抗体吉妥珠单抗和林妥珠单抗结合到人原代树突细胞上的CD33的结合曲线。

[0050] 图6A和图6B描绘人CD33蛋白上的抗体结合位点。图6A示出利用本公开的抗CD33抗体获得的抗CD33抗体的线性表位结合位点。CD33主链以透明灰色表示呈现。针对抗体鉴定的线性结合区域在附图中列出。图6B描绘针对抗体1A8的不连续表位的结合位点的卡通透视图。不连续结合区域³⁹VPCTFFHPIPYD⁵¹、⁸⁸GRFRL LGDPSOR⁹⁸、以及¹¹⁰RRDNGSYFFRM¹²⁰在附图中列出。图6C描绘对本公开的抗体的野生型CD33与CD33突变体的结合反应性百分比(% WT)。图6D描绘指示抗体结合中涉及的氨基酸残基的CD33模型。

[0051] 图7描绘示出树突细胞上的唾液酸CD3配体在与人原代细胞的混合淋巴细胞反应期间限制T细胞增殖的FACS分析。

[0052] 图8描绘示出树突细胞上的唾液酸CD33配体在混合淋巴细胞反应期间限制T细胞增殖的结果。

[0053] 图9A-图9F描绘示出通过各种刺激诱导的人骨髓细胞上的CD33和CD33配体表达增加的结果。图9A和图9B描绘示出在使用肿瘤上清液进行处理之后人原代树突细胞上的CD33表达增加的结果。图9C和图9D描绘示出在LPS诱导的炎症期间人树突细胞上的CD33表达增加的结果。图9E和图9F描绘示出在LPS诱导的炎症期间人骨髓细胞上的唾液酸表达增加的结果。

[0054] 图10描绘示出从大肠杆菌去除CD33配体的唾液酸酶处理增加通过人原代树突细胞进行的吞噬作用的结果。

[0055] 图11A和图11B描绘示出抗CD33抗体引起通过原代人巨噬细胞进行的对大肠杆菌的吞噬作用增加的结果。图11A描绘生物颗粒对照、mIgG1同种型对照抗体和抗CD33抗体2E12。图11B描绘抗CD33抗体2F5、抗CD33抗体6A3和抗CD33抗体6C7。

[0056] 图12A和图12B描绘来自阿尔茨海默氏病大脑(AD)和健康大脑(非AD)的大脑切片中的CD33配体表达。图12A描绘AD和非AD大脑中的CD33-Fc的免疫组织化学染色。对照IgG1-Fc不结合到这些细胞。图12B描绘对来自5个AD大脑样品和5个非AD大脑样品的CD33-Fc和对照受体染色的单因素ANOVA统计分析的结果,其指示抑制性CD33配体促成AD病变。

[0057] 图13A和图13B描绘来自阿尔茨海默氏病大脑(AD)和健康大脑(非AD)的大脑切片

中的CD33受体表达。图13A描绘AD和非AD大脑切片中与同种型对照相比CD33抗体的免疫组织化学染色。图13B描绘对来自5个AD大脑样品和5个非AD大脑样品的CD33抗体和同种型对照染色的单因素ANOVA统计分析的结果。

[0058] 图14A-图14D描绘培养物中和体内肿瘤细胞中的CD33和抑制性CD33配体的表达。图14A描绘示出抑制性CD33配体的表达在黑素瘤细胞、肺肿瘤细胞和结肠癌细胞中增加大约20倍的结果。图14B描绘示出人免疫细胞中的CD33表达的结果,所述人免疫细胞来自外周血和脾以及细胞浸润物,所述细胞浸润物来自缺少成熟小鼠T细胞、B细胞和NK细胞的移植有人CD45⁺免疫细胞和移植有患者衍生的黑素瘤的免疫缺陷小鼠模型的患者衍生的黑素瘤。图14C描绘示出CD3⁺ T细胞、CD11b⁺免疫细胞和Gr1⁺CD11b⁺免疫细胞中的CD33表达的结果,所述细胞来自脾和来自小鼠肿瘤模型的乳腺癌肿瘤EMT-6的细胞浸润物。图14D描绘示出CD45⁺ T细胞、Gr1⁺细胞和Gr1⁺CD11b⁺免疫细胞中的CD33表达的结果,所述细胞来自脾和来自小鼠肿瘤模型的乳腺癌肿瘤EMT-6的细胞浸润物。所述结果指示CD33和CD33免疫抑制性配体在对多种类型的实体瘤的免疫应答中发挥作用。

[0059] 图15A-图15E描绘示出CD33通过遗传手段被中和的小鼠中的结肠癌肿瘤生长的抑制的结果。图15A描绘具有正常CD33表达的对照小鼠(WT小鼠)。图15B描绘CD33在遗传上失活的小鼠(CD33K0小鼠)。图15C描绘图15A和图15B的结果的汇总,其示出中位肿瘤体积。图15D描绘证明患有结肠癌的CD33K0小鼠比患有结肠癌的对应的WT小鼠更好地存活的Kaplan-Meier存活曲线图。图15E描绘小鼠CD33表达的FACS分析。对来自WT小鼠和CD33K0小鼠的脾和肿瘤、以及初次接受实验的脾执行特定细胞群体分析。所述结果指示阻断CD33功能(遗传上或药理学上)在癌症中引起有益结果。图15F描绘免疫人源化小鼠中的患者衍生的癌症的小鼠模型的PD-1/CD33组合抗体治疗方案。图15G描绘在移植有来自人供体165547112和17509112的免疫干细胞的个体小鼠中进行抗体治疗之后的肿瘤体积。小鼠使用**Keytruda®**(派姆单抗)抗PD-1抗体单独进行治疗或与抗CD33抗体2F5组合进行治疗。图15H描绘在移植来自人供体165547112和17509112的人免疫干细胞的小鼠中使用**Keytruda®**(派姆单抗)抗PD-1抗体单独进行治疗或与抗CD33抗体2F5组合进行治疗25天之后的平均肿瘤体积。图15I描绘在移植有来自人供体165547112、17509112和984480112的免疫干细胞的个体小鼠中使用**Keytruda®**(派姆单抗)抗PD-1抗体单独进行治疗或使用**Keytruda®**(派姆单抗)抗PD-1抗体与抗CD33抗体2F5一起进行治疗之后的肿瘤体积。对于2F5相对于同种型对照,*: $p<0.05$;**: $p<0.01$ ***: $p<0.001$ 。呈现每个治疗组的平均值。误差棒代表SEM。图15J描绘使用**Keytruda®**(派姆单抗)抗PD-1抗体单独进行治疗或与抗CD33抗体2F5组合进行治疗之后小鼠中的平均肿瘤体积。对于2F5相对于同种型对照,*: $p<0.05$;**: $p<0.01$ ***: $p<0.001$ 。呈现每个治疗组的平均值。误差棒代表SEM。图15K描绘在移植来自人供体984480112的人免疫干细胞的小鼠中使用**Keytruda®**(派姆单抗)抗PD-1抗体单独进行治疗或与抗CD33抗体2F5组合进行治疗之后的平均肿瘤体积。图15L描绘在移植来自人供体165547112和17509112的人免疫干细胞的小鼠中使用**Keytruda®**(派姆单抗)抗PD-1抗体单独进行治疗或与抗CD33抗体2F5组合进行治疗28天之后的平均肿瘤体积。图15M描绘使用**Keytruda®**(派姆单抗)抗PD-1抗体单独进行治疗或与抗CD33抗体2F5组合进行治疗的小

鼠的体内肿瘤生长速率。*: $p < 0.01$; +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15N描绘来自使用 **Keytruda®** (派姆单抗) 抗PD-1抗体单独进行治疗或与抗CD33抗体2F5组合进行治疗的小鼠的外周血人 (h) $CD45^+CD14^+$ 骨髓细胞中CD33的细胞表面水平的体内降低。+: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15O描绘来自使用 **Keytruda®** (派姆单抗) 抗PD-1抗体单独进行治疗或与抗CD33抗体2F5组合进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人 (h) $CD45^+CD14^+$ 骨髓细胞中的体内降低。*: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15p描绘来自使用 **Keytruda®** (派姆单抗) 抗PD-1抗体单独进行治疗或与抗CD33抗体2F5组合进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人 (h) $CD45^+CD3^+$ T细胞中的体内增加。对于2F5相对于同种型对照, (*): $p < 0.10$, **: $p < 0.01$, 校正供体和动物处死天数, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15Q描绘来自使用 **Keytruda®** (派姆单抗) 抗PD-1抗体单独进行治疗或与抗CD33抗体2F5组合进行治疗的小鼠的外周血人 (h) $CD45^+CD14^+$ 骨髓细胞中的体内降低。对于2F5相对于同种型对照, ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$, 校正供体和动物处死天数, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15R描绘免疫人源化小鼠中的患者衍生的癌症的小鼠模型的抗CD33抗体治疗方案。图15S描绘使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗之后个体小鼠中的肿瘤体积。对于2F5相对于同种型对照, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ 。呈现每个治疗组的平均值。误差棒代表SEM。图15T描绘使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗之后小鼠中的平均肿瘤体积。对于2F5相对于同种型对照, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ 。呈现每个治疗组的平均值。误差棒代表SEM。图15U描绘使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的体内肿瘤生长速率。对于2F5相对于同种型对照, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15V描绘含有阿尔茨海默氏病CD33等位基因rs3865444A/A等位基因、A/C等位基因和C/C等位基因中的任一个并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的体内肿瘤生长速率。对于2F5相对于同种型对照, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15W描绘含有阿尔茨海默氏病rs3865444C/C等位基因的小鼠的体内肿瘤生长速率。对于2F5相对于同种型对照, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15X描绘含有阿尔茨海默氏病rs3865444A/A等位基因的小鼠的体内肿瘤生长速率。对于2F5相对于同种型对照, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15Y描绘来自使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的外周血人 (h) $CD45^+CD14^+$ 骨髓细胞中CD33的细胞表面水平的体内降低。对于2F5相对于同种型对照, **: $p < 0.001$, 校正供体和动物处死天数, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数

和第三四分位数(第25和第75百分位数)。图15Z描绘含有阿尔茨海默氏病CD33等位基因rs3865444A/A等位基因、A/C等位基因和C/C等位基因中的任一个并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照(Ct1)抗体进行治疗的小鼠的外周血人(h)CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中CD33的细胞表面水平的体内降低。对于2F5相对于同种型对照,***:p<0.001,校正供体和动物处死天数,+:平均值;盒形图中线:中值;盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数(第25和第75百分位数)。图15AA描绘来自含有阿尔茨海默氏病rs3865444C/C等位基因并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照(Ct1)抗体进行治疗的小鼠的外周血人(h)CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中CD33的细胞表面水平的体内降低。对于2F5相对于同种型对照,**:p<0.001,校正供体和动物处死天数,+:平均值;盒形图中线:中值;盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数(第25和第75百分位数)。图15BB描绘含有阿尔茨海默氏病rs3865444A/A等位基因并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照(Ct1)抗体进行治疗的小鼠的外周血人(h)CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中CD33的细胞表面水平的体内降低。“n.s.”:统计学上不显著;+:平均值;盒形图中线:中值;盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数(第25和第75百分位数)。图15CC描绘来自使用抗CD33抗体2F5或同种型对照(Ct1)抗体进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人(h)CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中CD33的细胞表面水平的体内降低。对于2F5相对于同种型对照,**:p<0.001,校正供体和动物处死天数,+:平均值;盒形图中线:中值;盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数(第25和第75百分位数)。图15DD描绘含有阿尔茨海默氏病CD33等位基因rs3865444A/A等位基因、A/C等位基因和C/C等位基因中的任一个并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照(Ct1)抗体进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人(h)CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中CD33的细胞表面水平的体内降低。对于2F5相对于同种型对照,***:p<0.001,校正供体和动物处死天数,+:平均值;盒形图中线:中值;盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数(第25和第75百分位数)。图15EE描绘来自含有阿尔茨海默氏病rs3865444C/C等位基因并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照(Ct1)抗体进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人(h)CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中CD33的细胞表面水平的体内降低。对于2F5相对于同种型对照,***:p<0.001,校正供体和动物处死天数,+:平均值;盒形图中线:中值;盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数(第25和第75百分位数)。图15FF描绘含有阿尔茨海默氏病rs3865444A/A等位基因并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照(Ct1)抗体进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人(h)CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中CD33的细胞表面水平的体内降低。“n.s.”:统计学上不显著;+:平均值;盒形图中线:中值;盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数(第25和第75百分位数)。图15GG描绘来自使用抗CD33抗体2F5或同种型对照(Ct1)抗体进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人(h)CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的体内降低。对于2F5相对于同种型对照,***:p<0.01;***:p<0.001,校正供体和动物处死天数,+:平均值;盒形图中线:中值;盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数(第25和第75百分位数)。图15HH描绘含有阿尔茨海默氏病CD33等位基因rs3865444A/A等位基因、A/C等位基因和C/C等位基因中的任一个并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照(Ct1)抗体进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人(h)CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的体内降低。对于2F5相对于同种型对照,***:p<0.001,校正供体和动物处死天数,+:平均值;盒形图中线:中值;盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数(第25和第75百分位数)。图15II描绘来自含有阿尔茨海默氏病rs3865444C/C等位基因并且使用抗CD33抗

体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人 (h) CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的体内降低。对于2F5相对于同种型对照, **: $p < 0.01$, 校正供体和动物处死天数, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15JJ描绘含有阿尔茨海默氏病CD33等位基因rs3865444A/A等位基因并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人 (h) CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的体内降低。*: $p < 0.05$, 校正供体和动物处死天数, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15KK描绘来自使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人 (h) CD45⁺CD3⁺T细胞中的体内增加。对于2F5相对于同种型对照, (*): $p < 0.10$, **: $p < 0.01$, 校正供体和动物处死天数, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15LL描绘含有阿尔茨海默氏病CD33等位基因rs3865444A/A等位基因、A/C等位基因和C/C等位基因中的任一个并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人 (h) CD45⁺CD3⁺T细胞中的体内增加。对于2F5相对于同种型对照, (*): $p < 0.10$, 校正供体和动物处死天数, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。对于rs3865444A/A等位基因, $p = 0.0042$, 并且对于rs3865444C/C等位基因, $p = 0.59$ 。图15MM描绘来自含有阿尔茨海默氏病rs3865444C/C等位基因并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人 (h) CD45⁺CD3⁺T细胞中的体内增加。“n.s.”: 统计学上不显著; +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15NN描绘含有阿尔茨海默氏病rs3865444A/A等位基因并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的肿瘤浸润人 (h) CD45⁺CD3⁺T细胞中的体内增加。对于2F5相对于同种型对照, **: $p < 0.001$, 校正供体和动物处死天数, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15OO描绘来自使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的外周血人 (h) CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的体内降低。对于2F5相对于同种型对照, *: $p < 0.05$, 校正供体和动物处死天数, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15PP描绘含有阿尔茨海默氏病CD33等位基因rs3865444A/A等位基因、A/C等位基因和C/C等位基因中的任一个并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的外周血人 (h) CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的体内降低。对于2F5相对于同种型对照, *: $p < 0.05$, 校正供体和动物处死天数, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15QQ描绘来自含有阿尔茨海默氏病rs3865444C/C等位基因并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的外周血人 (h) CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的体内降低。对于2F5相对于同种型对照, *: $p < 0.05$, 校正供体和动物处死天数, +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百分位数)。图15RR描绘含有阿尔茨海默氏病rs3865444A/A等位基因并且使用抗CD33抗体2F5或同种型对照 (Ct1) 抗体进行治疗的小鼠的外周血人 (h) CD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的体内降低。“n.s.”: 统计学上不显著; +: 平均值; 盒形图中线: 中值; 盒的上边界和下边界对应于第一四分位数和第三四分位数 (第25和第75百

分位数)。

[0060] 图16A-图16J描绘示出各种原代免疫细胞上的CD33的细胞表面水平降低的结果。图16A-图16C描绘示出使用抗CD33抗体进行处理的人原代小神经胶质细胞上的CD33的细胞表面水平降低的结果。图16A描绘非抗体对照(非mAb)和同种型对照抗体(同种型)。图16B描绘抗CD33抗体1A8(1A8.2)、2E12和2F5。图16C描绘抗CD33抗体6A3和6C7(6C7.2)。图16D描绘示出使用抗CD33抗体2E12、6A3和6C7进行处理的人原代单核细胞上CD33的细胞表面水平的剂量依赖性降低的结果。图16E描绘示出使用抗CD33抗体2E12、6A3和6C7进行处理的人原代树突细胞上CD33的细胞表面水平的剂量依赖性降低的结果。图16F-图16H描绘示出使用去糖基化抗CD33抗体1A8(1A8.2)、2E12、6A3、以及6C7(6C7.2)进行处理的人原代树突细胞上CD33的细胞表面水平降低的结果。图16F描绘从患者供体258获得的人原代树突细胞上CD33的细胞表面水平的降低。图16G描绘从患者供体259获得的人原代树突细胞上CD33的细胞表面水平的降低。图16H描绘来自使用抗CD33抗体处理的供体258和259的细胞之间的细胞表面降低(下调)的变化百分比($\Delta\%$)。图16I和图16J描绘从使用抗CD33抗体2F5或同种型对照抗体(mIgG1)进行处理的表达人IL3、GM-CSF和SCF(NSGS)的NOD-scid IL2Rnull-3/GM/SF、NSG-SGM3、三重转基因NSG-SGM3(NSGS)小鼠分离的人单核细胞中的CD33表达和唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9表达的FACS分析。图16I描绘示出用于减少CD33的细胞表面表达的CD33抗体2F5、6C7、吉妥珠单抗、以及林妥珠单抗的半数最大浓度(EC_{50})的12点滴定曲线。图16J描绘示出用于减少CD11c的细胞表面表达的CD33抗体2F5、6C7和吉妥珠单抗的半数最大浓度(EC_{50})的12点滴定曲线。图16K示出在体内抗体处理之后CD33的细胞表面水平的体内降低。图16L示出非相关受体唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9的表达。唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9用作对照。唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9的细胞表面水平在体内抗体处理之后未改变。图16M示出在使用40mg/kg、8.0mg/kg、1.6mg/kg、或0.3mg/kg CD33抗体2F5进行体内处理之后CD33的细胞表面水平的体内降低。图16N示出在使用40mg/kg、8.0mg/kg、1.6mg/kg、或0.3mg/kg CD33抗体2F5进行体内处理之后对照抗体(唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9)的体内细胞表面水平。

[0061] 图17A描绘在不同抗体浓度下结合到人原代单核细胞的CD33抗体。在附图中,针对每个指示的浓度从左至右按顺序是以下抗体:小鼠同种型对照抗体(mIgG1)、抗CD33抗体2F5(C-2F5)、抗CD33抗体2E12(C-2E12)、抗CD33抗体6A3(C-6A3.1)、抗CD33抗体6C7(C-6C7.2)、人同种型对照抗体(人同种型)、抗CD33抗体C-64、抗CD33抗体吉妥珠单抗、以及抗CD33抗体林妥珠单抗。图17B描绘在使用不同抗体浓度下的CD33抗体进行处理之后人原代单核细胞中CD33的细胞表面水平。图17C描绘在使用不同抗体浓度下的CD33抗体进行处理之后人原代单核细胞中CD14的细胞表面水平。

[0062] 图18A描绘野生型和CD33敲除THP-1细胞中CD33的表达水平。图18B描绘野生型和CD33敲除THP-1细胞中CD14的表达水平。图18C描绘使用不同浓度的LPS或使用IL-6、IL-8和GM-CSF处理的野生型和CD33敲除THP-1细胞中细胞因子的水平。图18D描绘使用不同浓度的LPS或使用IL-6、IL-8和GM-CSF处理的野生型和CD33敲除THP-1细胞中活化标记物的水平。

[0063] 图19A描绘使用抗CD33抗体2F5处理的骨髓来源的抑制细胞(MDSC)中CD33和PD-L1的表达水平。在附图中,“未处理的MDSC”是指未使用抗体处理的细胞,“MDSC+同种型”是指使用同种型对照抗体处理的细胞;并且“MDSC+C-2F5”是指使用抗CD33抗体2F5处理的细胞。

图19B描绘使用同种型对照抗体处理的骨髓来源的抑制细胞(MDSC)与使用抗CD33抗体2F5处理的细胞之间的CD163、CD33、CD206、PD-L2、CD200R、B7H3、以及PD-L1的表达的变化的定量。图19C描绘由未经过处理或使用抗CD33抗体2F5、小鼠同种型对照抗体(mIgG1)、或抗PD-L1抗体(PDL1)处理的骨髓来源的抑制细胞(MDSC)诱导的CD3+T细胞增殖和CD8+T细胞增值的百分比。MDCS与T细胞在宫颈癌细胞条件培养基中进行共同培养。*: $p < 0.01$ 。图19D描绘由未经过处理或使用抗CD33抗体2F5、小鼠同种型对照抗体(mIgG1)、或抗PD-L1抗体(PDL1)处理的骨髓来源的抑制细胞(MDSC)诱导的CD3+T细胞增殖和CD8+T细胞增值的百分比。*: $p < 0.01$ 。MDCS与T细胞在胶质母细胞瘤细胞条件培养基中进行共同培养。

[0064] 图20描绘示出抗CD33抗体选择性地杀灭非致瘤性骨髓来源的抑制细胞的结果。顶行:通过细胞形态进行的活/死设门:使用C-6C7的死细胞门增加。中间行:使用染料对活/死细胞进行设门:染料高阳性细胞是死的,染料低细胞是活的。在6C7处理的细胞中死细胞增加30%。柱状图:示出呈柱状图形式的活/死细胞染料,2F5中没有峰,其他mAb中死细胞的峰。

[0065] 发明详述

[0066] 通用技术

[0067] 本文描述或提到的技术和程序一般是本领域技术人员使用常规方法众所周知并且常用的,如例如以下描述的广泛利用的方法: Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel等人编, (2003)); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press公司); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson、B.D. Hames和G.R. Taylor编(1995)), Harlow和Lane编(1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney编(1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait编, 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis编, 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney) 编, 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather和P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle、J.B. Griffiths、以及D.G. Newell编, 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir和C.C. Blackwell 编); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller和M.P. Calos编, 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis等人编, 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan等人编, 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway和P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty. 编, IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd和C. Dean编, Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow和D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti和J.D. Capra编, Harwood Academic Publishers, 1995); 以及 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita等人编, J.B. Lippincott Company, 1993)。

[0068] 定义

[0069] 如本文所使用,术语“预防”包括针对个体的特定疾病、病症或病况的发生或复发提供防治。个体可能易感染或易患上特定疾病、病症或病况,或有发生此类疾病、病症或病况的风险,但尚未被诊断患有该疾病、病症或病况。

[0070] 如本文所使用,“有发生特定疾病、病症或病况的风险”的个体可能具有或可能不具有可检测的疾病或疾病症状,并且在本文所描述的治疗方法之前,可能展示或可能尚未展示可检测的疾病或疾病症状。“有风险”表示,个体具有一个或多个风险因素,如本领域中所知,该一个或多个风险因素是与特定疾病、病症或病况相关的可测量的参数。具有这些风险因素中的一个或多个的个体发生特定疾病、病症或病况的概率高于不具有这些风险因素中的一个或多个的个体。

[0071] 如本文所使用,术语“治疗”是指被设计用于在临床病理学过程期间改变所治疗的个体的自然病程的临床干预。期望的治疗作用包括降低进展速率、改善或减轻病理状态,及缓解或改善特定疾病、病症或病况的预后。举例来说,如果与特定疾病、病症或病况有关的一种或多种症状减轻或消除,则个体被成功“治疗”。

[0072] “有效量”是指以所需剂量并且在所需时间段内至少有效达成所期望治疗或预防结果的量。有效量可以分一次或多次施用来提供。本文中的有效量可根据以下因素而变化:诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重、以及治疗在个体中引发所需应答的能力。有效量还是其中治疗有益作用超过治疗的任何毒性或有害作用的量。对于预防性用途,有益或所需的结果包括以下结果:诸如消除或降低风险、减轻严重性、或延迟疾病(包括所述疾病的生物化学的、组织学的和/或行为的症状、在所述疾病发展期间呈现的所述疾病的并发症和中间病理学表型)的发作。对于治疗性用途,有益或所需的结果包括以下临床结果:诸如减少由疾病引起的一种或多种症状、提高患有疾病的患者的生活质量、减少治疗疾病所需要的其他药品的剂量、诸如通过靶向来增强另一种药品的作用、延迟疾病进展、和/或延长存活。药物、化合物、或药物组合物的有效量是足以直接或间接实现预防性或治疗性治疗的量。如在临床环境中所理解的,药物、化合物、或药物组合物的有效量可与或可不与另一种药物、化合物、或药物组合物结合来实现。因此,可在施用一种或多种治疗剂的情形中考虑“有效量”,并且如果与一种或多种其他药剂结合可实现或实现了合乎需要的结果,则可考虑以有效量给予单种药剂。

[0073] “治疗有效量”是实现特定疾病、病症或病况的可测量的改善所需的至少最低浓度。治疗有效量在本文中可以根据多种因素而变化,如疾病状态;患者的年龄、性别及体重;以及CD33蛋白拮抗剂在个体体内引起期望的反應的能力。治疗有效量还是CD33蛋白拮抗剂的治疗有益作用超过其任何有毒或有害作用的量。

[0074] 如本文所使用,与另一化合物或组合物“结合”施用包括同时施用和/或在不同时间施用。结合施用还涵盖作为共配制物施用,或作为独立组合物施用,包括以不同给药频率或时间间隔,以及使用相同施用途径或不同施用途径。

[0075] 用于治疗、预防或降低风险目的的“个体”是指归类为哺乳动物的任何动物,包括人、家畜及农畜,以及动物园动物、竞技动物或宠物,如狗、马、兔、牛、猪、仓鼠、沙鼠、小鼠、雪貂、大鼠、猫等。优选个体是人。

[0076] 术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中可与“抗体”互换使用。术语“抗体”在本文中是以最广泛意义使用,并且特别涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特

异性抗体(例如双特异性抗体),及抗体片段,只要这些抗体展现期望的生物活性即可。

[0077] 基本的4链抗体单元是由两条相同轻链(L)和两条相同重链(H)构成的异四聚糖蛋白。 V_H 与 V_L 配对一起形成单一抗原结合位点。有关不同抗体类别的结构和特性,参见例如, Basic and Clinical Immunology,第8版, Daniel P.Stites, Abba I.Terr及 Tristram G.Parslow(编), Appleton&Lange, Norwalk, CT, 1994, 第71页和第6章。

[0078] 来自任何脊椎动物物种的L链基于其恒定结构域的氨基酸序列可以被归为两种明显相异的类型之一,称为kappa(“ κ ”)和lambda(“ λ ”)。取决于重链恒定结构域(CH)的氨基酸序列,可以将免疫球蛋白分为不同类别或同种型。存在五类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG及IgM,具有分别称为alpha(“ α ”)、delta(“ δ ”)、epsilon(“ ϵ ”)、gamma(“ γ ”)及mu(“ μ ”)的重链。 γ 和 α 类别基于CH序列和功能的相对微小差异进一步分成亚类(同种型),例如人表达以下亚类: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的并且大体上描述于例如 Abbas等人, Cellular and Molecular Immunology, 第4版(W.B.Saunders Co., 2000)中。

[0079] “天然抗体”通常是由两条相同轻链(L)和两条相同重链(H)构成的约150,000道尔顿的异四聚糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键连接至重链,但二硫键联的数量在不同免疫球蛋白同种型的重链间有不同。每条重链和轻链还具有规律间隔的链内二硫桥。每条重链在一端具有一个可变结构域(V_H),随后是多个恒定结构域。每条轻链在一端具有一个可变结构域(V_L)并且在其另一端具有一个恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,并且轻链可变结构域与重链可变结构域对齐。据悉,特定氨基酸残基在轻链与重链可变结构域之间形成界面(interface)。

[0080] “分离的”抗体,如本公开的抗CD33抗体,是自其产生环境(例如天然或重组地)的组分鉴定、分离和/或回收的抗体。优选地,分离的多肽不与其产生环境中的所有其它污染组分缔合。其产生环境的污染组分,如由重组转染的细胞产生的那些,是典型地干扰有关抗体的研究、诊断或治疗应用的物质,并且可以包括酶、激素及其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选实施方案中,该多肽将纯化:(1)达到通过例如Lowry法测定的以重量计超过95%,并且在一些实施方案中达到以重量计超过99%的抗体;(2)达到利用转杯式测序仪(spinning cup sequenator)足以获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)使用考马斯蓝(Coomassie blue)或优选银染色,在非还原或还原条件下通过SDS-PAGE测定达到均质。分离的抗体包括在重组T细胞内原位产生的抗体,因为该抗体天然环境中的至少一种组分将不存在。不过,分离的多肽或抗体通常是通过至少一个纯化步骤制备。

[0081] 抗体,如本公开的抗CD33抗体的“可变区”或“可变结构域”是指该抗体重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可以分别称为“ V_H ”和“ V_L ”。这些结构域一般是抗体变化最大的部分(相对于同类别的其它抗体)并且含有抗原结合位点。

[0082] 术语“可变”是指可变结构域的某些区段的序列在抗体间广泛不同的事实,如本公开的抗CD33抗体。 V 结构域介导抗原结合并且确定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性并非均匀分布于整个可变结构域中。取而代之的是,其集中在轻链和重链可变结构域中称为高变区(HVR)的三个区段中。可变结构域中保守程度较高的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含通过三个HVR连接的四个FR区,主要呈 β -折叠构型,这些区域形成了连接 β -折叠结构,并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分的环。每条

链中的HVR是通过FR区紧密保持在一起,并且与来自另一条链的HVR促成了抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人,Sequences of Immunological Interest,第五版,National Institute of Health,Bethesda,MD(1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现各种效应功能,如使抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0083] 如本文所使用,术语“单克隆抗体”是指从基本上均质的抗体群获得的抗体,即,除可能微量存在的可能天然存在的突变和/或翻译后修饰(例如异构化、酰胺化)外,构成该群的个别抗体是相同的,如本公开的抗CD33抗体。单克隆抗体针对一个或多个抗原位点具有高度特异性。在一些实施方案中,本公开的单克隆抗体可以是双特异性抗体。与通常包括针对不同决定基(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相对,每一单克隆抗体是针对一个或多个抗原位点上的单个决定基。修饰语“单克隆”指示抗体是自基本上均质的抗体群获得的性质,而不应解释为需要通过任何特定方法产生该抗体。举例来说,根据本公开使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括例如,噬菌体展示技术(参见例如,Clackson等人,Nature,352:624-628(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Sidhu等人,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 101(34):12467-472(2004);及Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)、杂交瘤法(例如,Kohler和Milstein.,Nature,256:495-97(1975);Hongo等人,Hybridoma,14(3):253-260(1995);Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版,1988);Hammerling等人,Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier,N.Y.,1981))、重组DNA法(参见例如,美国专利号4,816,567)、及用于在动物中产生具有部分或全部的编码人免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因座或基因的人或类人抗体的技术(参见例如,WO 1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO 1991/10741;Jakobovits等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 90:2551(1993);Jakobovits等人,Nature 362:255-258(1993);Bruggemann等人,Year in Immunol.7:33(1993);美国专利号5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425及5,661,016;Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368:812-813(1994);Fishwild等人,Nature Biotechnol.14:845-851(1996);Neuberger,Nature Biotechnol.14:826(1996);及Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995))。

[0084] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“全抗体”可互换使用,指呈基本上完整形式的抗体,如本公开的抗CD33抗体,与抗体片段相对。确切地说,全抗体包括具有重链和轻链(包括Fc区)的那些。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。在一些情况下,完整抗体可以具有一种或多种效应功能。

[0085] “抗体片段”包括完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段;双功能抗体(diabody);线性抗体(参见美国专利5,641,870,实施例2;Zapata等人,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子;及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0086] 木瓜蛋白酶消化抗体,如本公开的抗CD33抗体,产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段;及残留的“Fc”片段,此名称反映容易结晶的能力。Fab片段由完整L链以及H链

的可变区结构域(V_H),和一条重链的第一恒定结构域(C_{H1})组成。每个Fab片段关于抗原结合都是单价的,即,其具有单一抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体得到单一大F(ab')₂片段,该片段大致对应于两个二硫键连接的具有不同抗原结合活性的Fab片段并且仍能够交联抗原。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于,F(ab')片段在 C_{H1} 结构域的羧基末端处含有若干其它残基,包括抗体铰链区中的一或多个半胱氨酸。Fab'-SH在本文中是Fab'片段的名称,其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离硫醇基。F(ab')₂抗体片段最初是以Fab'片段对产生,在这些Fab'片段之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶合也是已知的。

[0087] Fc片段包含通过二硫键保持在一起的两个H链的羧基末端部分。抗体的效应功能是由Fc区中的序列决定,该区域也被某些类型细胞上所见的Fc受体(FcR)所识别。

[0088] “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。这一片段是由紧密非共价缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域形成的二聚体组成。由这两个结构域折叠得到六个高变环(由H和L链各得到3个环),这些高变环提供用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性。不过,即使单一可变结构域(或仅包含对抗原具有特异性的三个HVR的一半Fv)也能够识别并结合抗原,但亲和力低于完整结合位点。

[0089] “单链Fv”,又缩写为“sFv”或“scFv”,是包含连接成单一多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。优选sFv多肽另外包含在 V_H 与 V_L 结构域之间的多肽连接子,所述连接子使sFv能够形成抗原结合所期望的结构。有关sFv的评述,参见Pluckthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994)。

[0090] 抗体,如本公开的抗CD33抗体的“功能片段”包含完整抗体中保持或具有改变的FcR结合能力的一部分,一般包括完整抗体的抗原结合区或可变区,或者抗体的F区。抗体片段的实例包括线性抗体、单链抗体分子及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0091] 术语“双功能抗体”是指通过在 V_H 与 V_L 结构域之间用短连接子(约5-10个残基)构造sFv片段(参看前一段),以使得实现V结构域的链间而非链内配对,由此产生二价片段,即,具有两个抗原结合位点的片段来制备的小抗体片段。双特异性双功能抗体是两个“交叉”sFv片段的异二聚体,其中两个抗体的 V_H 和 V_L 结构域存在于不同多肽链上。双功能抗体较详细地描述于例如EP 404,097;WO 93/11161;及Hollinger等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 90:6444-48(1993)中。

[0092] 如本文所使用,“嵌合抗体”是指这样一种抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体中的相应序列一致或同源,而所述链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体种类或亚类的抗体中的相应序列一致或同源,如本公开的抗CD33抗体,以及此类抗体的片段,只要其展现所希望的生物活性即可(美国专利号4,816,567;Morrison等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,81:6851-55(1984))。本文所关注的嵌合抗体包括PRIMATIZED®抗体,其中该抗体的抗原结合区来源于通过例如用所关注抗原对猕猴进行免疫而产生的抗体。如本文所使用,“人源化抗体”作为“嵌合抗体”的亚组使用。

[0093] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式,如本公开的抗CD33抗体的人源化形式,是含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在一个实施方案中,人源化抗体是这样一种人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的HVR的残基被来自具有所期望的特异性、亲

和力和/或能力的非人物种(供体抗体),如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的HVR的残基置换。在一些情况下,人免疫球蛋白的FR残基被相应的非人残基置换。此外,人源化抗体可以包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以用于进一步改进抗体性能,如结合亲和力。一般来说,人源化抗体将包含至少一个并且典型地两个可变结构域的基本上全部,其中所有或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白序列的高变环,并且所有或基本上所有的FR区是人免疫球蛋白序列的FR区,不过FR区可以包括改善如结合亲和力、异构化、免疫原性等抗体性能的一个或多个单独的FR残基取代。FR中这些氨基酸取代的数量典型地在H链中不超过6个,并且在L链中不超过3个。人源化抗体任选还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地人免疫球蛋白的Fc的至少一部分。有关其它细节,参见例如,Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。另参见例如,Vaswani和Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions23:1035-1038(1995);Hurle和Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994);以及美国专利号6,982,321和7,087,409。

[0094] “人抗体”是氨基酸序列对应于由人产生和/或使用如本文所公开的制备人抗体的任何技术制备的抗体(如本公开的抗CD33抗体)的氨基酸序列的抗体。这一人抗体的定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可以使用本领域中已知的各种技术产生,包括噬菌体展示文库。Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581(1991)。另外,可用于制备人单克隆抗体的方法描述于Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,第77页(1985);Boerner等人,J.Immunol.,147(1):86-95(1991)中。另参见van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)。人抗体可以通过将抗原施用给转基因动物来制备,所述转基因动物经修饰以响应于抗原激发产生此类抗体,但其内源性基因座失能,例如经免疫的xenomice(关于XENOMOUSE™技术,参见例如美国专利号6,075,181和6,150,584)。关于经由人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体,另参见例如,Li等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)。

[0095] 术语“高变区”、“HVR”或“HV”当在本文中使用时,是指抗体可变结构域中序列高变和/或形成结构确定的环的区域,如本公开的抗CD33抗体的所述区域。一般而言,抗体包含六个HVR:三个在VH中(H1、H2、H3),且三个在VL中(L1、L2、L3)。在天然抗体中,H3和L3展示六个HVR的最高多样性,并且确切地说,据信H3在赋予抗体精细特异性方面起到独特作用。参见例如,Xu等人,Immunity 13:37-45(2000);Johnson和Wu,Methods in Molecular Biology 248:1-25(Lo编,Human Press,Totowa,NJ,2003))。实际上,仅由重链组成的天然存在的骆驼抗体在无轻链存在下起作用并且稳定。参见例如,Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-448(1993);及Sheriff等人,Nature Struct.Biol.3:733-736(1996)。

[0096] 本文中使用并且涵盖多种HVR描述。作为EU或Kabat互补决定区(CDR)的HVR基于序列可变性并且是最常用的(Kabat等人,见上文)。而Chothia是指结构环的位置(Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。AbM HVR表示EU或Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,并且被Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。“接触”HVR基于对可用复杂晶体结构的分析。这些HVR各自的残基如下所示。

	环	Kabat	AbM	Chothia	接触
[0097]	L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
	L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
	L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 编号)
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 编号)
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0098] HVR可以包括如下的“延伸的HVR”：VL中的24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2)，及89-97或89-96 (L3)；及VH中的26-35 (H1)、50-65或49-65 (优选实施方案) (H2)，及93-102、94-102或95-102 (H3)。关于这些延伸的HVR定义中的每一种，可变结构域残基都是根据EU或Kabat等人 (见上文) 编号。

[0099] “框架”或“FR”残基是除如本文中所定义的HVR残基以外的那些可变结构域残基。

[0100] 短语“根据EU或Kabat的可变结构域残基编号”或“根据EU或Kabat的氨基酸位置编号”及其变化形式是指EU或Kabat等人 (见上文) 中用于编辑抗体的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这一编号系统，实际的线性氨基酸序列可以含有对应于可变结构域FR或HVR的缩短或插入的较少或额外氨基酸。举例来说，重链可变结构域可以包括在H2的残基52之后的单一氨基酸插入 (根据Kabat的残基52a) 及在重链FR残基82之后的插入残基 (例如根据Kabat的残基82a、82b及82c等)。可以通过将抗体序列同源区与“标准”Kabat编号序列比对来确定给定抗体中残基的EU或Kabat编号。

[0101] 当提到可变结构域中的残基时，一般使用EU或Kabat编号系统 (近似地，轻链的残基1-107及重链的残基1-113) (例如Kabat等人, Sequences of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。当提到免疫球蛋白重链恒定区中的残基时，一般使用“EU或Kabat编号系统”或“EU索引” (例如Kabat等人, 见上文中报导的EU索引)。“根据Kabat的EU索引”是指人IgG1EU抗体的残基编号。除非本文另外声明，否则提到的抗体可变结构域中的残基编号意思指根据Kabat编号系统进行的残基编号。除非本文另外声明，否则提到的抗体恒定结构域中的残基编号意思指根据EU或Kabat编号系统进行的残基编号 (例如参见美国专利公布号2010-280227)。

[0102] 如本文所使用，“接受者人框架”是包含来源于人免疫球蛋白框架或人共有框架的VL或VH框架的氨基酸序列的框架。“来源于”人免疫球蛋白框架或人共有框架的接受者人框架可以包含其相同氨基酸序列，或其可以含有预先存在的氨基酸序列变化。在一些实施方案中，预先存在的氨基酸变化的数量是10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、或2个或更少。当在VH中存在预先存在的氨基酸变化时，优选这些变化仅在位置71H、73H及78H中的三个、两个或一个处发生；例如，在这些位置处的氨基酸残基可以是71A、73T和/或78A。在一些实施方案中，VL接受者人框架的序列与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列一致。

[0103] “人共有框架”是表示所选人免疫球蛋白VL或VH框架序列中最常出现的氨基酸残基的框架。一般而言，人免疫球蛋白VL或VH序列选自可变结构域序列亚群。一般而言，这些

序列亚群是如Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 中的亚群。实例包括对于VL, 该亚群可以是根据Kabat等人(见上文)的亚群 κ I、 κ II、 κ III或 κ IV。另外, 对于VH, 该亚群可以是根据Kabat等人(见上文)的亚群I、亚区II或亚群III。

[0104] 在例如本公开的抗CD33抗体的指定位置处的“氨基酸修饰”是指指定残基的取代或缺失, 或邻近指定残基的至少一个氨基酸残基的插入。“邻近”指定残基的插入意思指在其一个至两个残基范围内插入。该插入可以在指定残基的N末端或C末端。本文中优选的氨基酸修饰是取代。

[0105] “亲和力成熟的”抗体, 如本公开的抗CD33抗体, 是在其一个或多个HVR中具有一个或多个改变使得该抗体对抗原的亲和力较之不具有这些改变的亲本抗体有所改善的抗体。在一个实施方案中, 亲和力成熟的抗体对靶抗原具有纳摩尔浓度或甚至皮摩尔浓度的亲和力。亲和力成熟的抗体通过本领域中已知的程序产生。举例来说, Marks等人, Bio/Technology 10:779-783 (1992) 描述了通过VH和VL结构域改组进行的亲和力成熟。HVR和/或框架残基的随机诱变描述于例如: Barbas等人, Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier等人, Gene 169:147-155 (1995); Yelton等人, J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson等人, J. Immunol. 154 (7):3310-9 (1995); 及Hawkins等人, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)。

[0106] 如本文所使用, 术语“特异性识别”或“特异性结合”是指在包括生物分子的异质分子群存在下确定靶存在的靶与抗体, 如本公开的抗CD33抗体之间, 可测量并且可再现的相互作用, 如吸引或结合。举例来说, 特异性或优先结合到靶或表位的抗体, 如本公开的抗CD33抗体是较之其结合到其它靶或该靶的其它表位, 以较高亲和力、亲合力, 更容易和/或以较长的持续时间结合此靶或表位的抗体。通过阅读此定义, 还应理解, 例如, 特异性或优先结合到第一靶的抗体(或部分)可以或不特异性或优先结合到第二靶。因此, “特异性结合”或“优先结合”未必需要(但其可以包括)排外性结合。特异性结合到靶的抗体可以具有至少约 10^3M^{-1} 或 10^4M^{-1} , 有时约 10^5M^{-1} 或 10^6M^{-1} , 在其它情况下约 10^6M^{-1} 或 10^7M^{-1} 、约 10^8M^{-1} 至 10^9M^{-1} , 或约 10^{10}M^{-1} 至 10^{11}M^{-1} 或更高的缔合常数。可以使用多种免疫测定方式来选择与特定蛋白质特异性免疫反应的抗体。举例来说, 固相ELISA免疫测定常用于选择与蛋白质特异性免疫反应的单克隆抗体。有关可以用于测定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件的说明, 参见例如, Harlow和Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York。

[0107] 如本文所使用, CD33蛋白与第二蛋白质之间的“相互作用”涵盖但不限于, 蛋白质-蛋白质相互作用、物理相互作用、化学相互作用、结合、共价结合及离子结合。如本文所使用, 当抗体破坏、减少或完全消除两种蛋白质之间的相互作用时, 抗体“抑制两种蛋白质之间的相互作用”。当本公开的抗体或其片段结合到两种蛋白质之一时, 该抗体或其片段“抑制两种蛋白质之间的相互作用”。

[0108] “激动剂”抗体或“活化”抗体是在抗体结合抗原之后, 诱导(例如增加)抗原的一种或多种活性或功能的抗体, 如本公开的激动剂抗CD33抗体。

[0109] “阻断”抗体、“拮抗剂”抗体、或“抑制性”抗体是在抗体结合抗原之后抑制或减少(例如, 降低)抗原结合到一种或多种配体和/或在抗体结合抗原之后抑制或减少(例如, 降

低) 抗原的一种或多种活性或功能的抗体, 诸如本公开的抗CD33抗体。在一些实施方案中, 阻断抗体、拮抗剂抗体、或抑制性抗体基本上或完全抑制抗原结合到一种或多种配体和/或抗原的一种或多种活性或功能。

[0110] 抗体“效应功能”是指由抗体Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)引起的生物活性, 并且随抗体同种型而变化。

[0111] 术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C末端区域, 包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能不同, 但人IgG重链Fc区通常被限定为从位置Cys226处的氨基酸残基, 或从Pro230至其羧基末端的链段。例如在抗体产生或纯化期间, 或通过工程改造编码抗体重链的核酸可以去除Fc区的C末端赖氨酸(根据EU或Kabat编号系统的残基447)。因此, 完整抗体的组成可以包含去除所有K447残基的抗体群、未去除K447残基的抗体群, 及具有含有和不含K447残基的抗体的混合物的抗体群。适用于本公开的抗体中的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。

[0112] “天然序列Fc区”包含与自然界中所见Fc区的氨基酸序列一致的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1Fc区(非A和A同种异型); 天然序列人IgG2Fc区; 天然序列人IgG3Fc区; 及天然序列人IgG4Fc区, 以及其天然存在的变体。

[0113] “变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰, 优选一个或多个氨基酸取代而不同于天然序列Fc区的氨基酸序列。优选地, 相较于天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区, 变体Fc区在天然序列Fc区中或亲本多肽的Fc区中具有至少一个氨基酸取代, 例如约一个至约十个氨基酸取代, 并且优选约一个至约五个氨基酸取代。本文中的变体Fc区将优选与天然序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%同源性, 并且最优选与其具有至少约90%同源性, 更优选与其具有至少约95%同源性。

[0114] “Fc受体”或“FcR”描述结合到抗体Fc区的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外, 优选FcR是结合IgG抗体的受体(γ 受体)并且包括Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII亚类的受体, 包括这些受体的等位基因变体和替代性剪接形式, Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化受体”)和Fc γ RIIB(“抑制性受体”), 这些受体具有类似氨基酸序列, 主要差异在于其细胞质结构域。活化受体Fc γ RIIA在其细胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸活化基序(“ITAM”)。抑制性受体Fc γ RIIB在其细胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸抑制基序(“ITIM”)。(参见例如, M. Daëron, Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。FcR评述于Ravetch和Kinet, Annu.Rev.Immunol.9:457-92(1991); Capel等人, Immunomethods 4:25-34(1994); 及de Haas等人, J.Lab.Clin.Med.126:330-41(1995)。其它FcR, 包括将来会鉴定的那些, 都涵盖在本文的术语“FcR”中。FcR还可以增加抗体的血清半衰期。

[0115] 可以例如在表达人FcRn的转基因小鼠或转染的人细胞系中, 或在施用了具有变体Fc区的多肽的灵长类动物中, 对人FcRn高亲和力结合多肽在体内与FcRn的结合和血清半衰期进行测定。WO2004/42072(Presta)描述了与FcR的结合改善或减少的抗体变体。另参见例如, Shields等人, J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。

[0116] 如本文所使用, 关于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”及“同源性”是指在对准候选序列与特定肽或多肽序列并在必要时引入空位以达到最大序列同一性百分比之后, 并且在不将任何保守型取代视为序列同一性的一部分的情况下, 候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。可以通过本领域技能

范围内的多种方式,例如使用公开可用的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR)软件,实现比对以达到测定氨基酸序列同一性百分比的目的。本领域技术人员可以确定适于测量比对的参数,包括本领域内已知在所比较的序列的全长内实现最大比对所需的任何算法。

[0117] 编码抗体,如本公开的抗CD33抗体的“分离的”核酸分子是这样一种核酸分子,该核酸分子是从在产生该核酸分子的环境中通常与其缔合的至少一种污染核酸分子鉴定并分离。优选地,分离的核酸与产生环境有关的所有组分无关。编码本文的多肽和抗体的分离的核酸分子是除在自然界发现的形式或环境外的形式。因此,分离的核酸分子有别于天然存在于细胞中的编码本文的多肽和抗体的核酸。

[0118] 如本文所使用,术语“载体”意图指这样一种核酸分子,该核酸分子能够转运其所连接的另一核酸。一类载体是“质粒”,其指其中可以连接额外DNA区段的环状双链DNA。另一类载体是噬菌体载体。另一类载体是病毒载体,其中可以将额外DNA区段连接至病毒基因组中。某些载体能够在引入这些载体的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体及游离型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非游离型哺乳动物载体)可以在引入宿主细胞之后整合至宿主细胞的基因组中,并由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够引导与其可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为重组表达载体”,或简称为“表达载体”。一般而言,重组DNA技术中利用的表达载体通常是质粒形式。在本说明书中,由于质粒是最常用的载体形式,故“质粒”与“载体”可互换使用。

[0119] “多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换使用,指的是任何长度的核苷酸的聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基,和/或其类似物,或者是可以通过DNA或RNA聚合酶,或通过合成反应并入聚合物中的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸及其类似物。如果存在,则对核苷酸结构的修饰可以在聚合物组装之前或之后进行。核苷酸序列可以间杂有非核苷酸组分。多核苷酸可以包含在合成之后进行的修饰,如与标记偶联。其它类型的修饰包括例如,“加帽”;一个或多个天然存在的核苷酸被类似物取代;核苷酸间修饰,如例如具有不带电荷的键联(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)的修饰和具有带电荷的键联(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的修饰;含有侧接部分,如例如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚L-赖氨酸等)等的修饰;具有插入剂(例如吡啶、补骨脂素等)的修饰;含有螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)的修饰;含有烷化剂的修饰;具有修饰的键联(例如 α 异头核酸等)的修饰;以及多核苷酸的未修饰形式。另外,最初存在于糖中的任何羟基都可以例如被磷酸酯基、磷酸酯基置换;被标准保护基保护;或经过活化以与另外的核苷酸形成另外的键联;或者可以偶联至固体或半固体支撑物。5'和3'末端OH可以被磷酸化或者被胺或具有1至20个碳原子的有机封端基团部分取代。其它羟基也可以被衍生物成标准保护基。多核苷酸也可以含有本领域中一般已知的核糖或脱氧核糖的类似物形式,包括例如,2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基、2'-氟-或2'-叠氨基-核糖、碳环糖类似物、 α -异头糖、差向异构糖(如阿拉伯糖、木糖或来苏糖)、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物,及碱基核苷类似物,如甲基核糖苷。一个或多个磷酸二酯键可以被替代性连接基团置换。这些替代性连接基团包括但不限于,其中磷酸酯被P(O)S(“硫代磷酸酯”)、P(S)S(“二硫代磷酸酯”)、(O)NR₂(“氨基磷酸酯”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“甲缩醛”)置换的实施方案,其中每个R

或R'独立地是H或者任选含有醚(-O-)键联、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基的被取代或未被取代的烷基(1-20个C)。多核苷酸中未必所有键联都是相同的。前述说明适用于本文提到的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0120] “宿主细胞”包括可以作为或已经作为载体的受体以并入多核苷酸插入物的个别细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代,并且该子代可能由于天然突变、意外突变或有意突变而与原始亲本细胞未必完全相同(在形态或基因组DNA互补序列方面)。宿主细胞包括在体内经本公开的多核苷酸转染的细胞。

[0121] 如本文所使用,“载剂”包括在所用剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物无毒的药理学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂。通常,生理学上可接受的载剂是pH缓冲水溶液。生理学上可接受的载剂的实例包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐及其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐平衡离子,如钠;和/或非离子表面活性剂,如TWEENTM、聚乙二醇(PEG)及PLURONICSTM。

[0122] 如本文所用,术语“细胞凋亡”是指细胞内细胞破坏的基因指导过程。细胞凋亡不同于坏死;细胞凋亡包括细胞骨架破裂、细胞质收缩和凝缩、细胞膜的外表面上的磷脂酰丝氨酸的表达和起泡,从而导致形成细胞膜结合囊泡或凋亡小体。所述过程还称为“程序性细胞死亡”。在细胞凋亡期间,观察到特征现象,诸如弯曲的细胞表面、核染色质的凝缩、染色体DNA的断裂、以及线粒体功能丧失。各种已知的技术可用于检测细胞凋亡,诸如使用膜联蛋白V、碘化丙锭对细胞进行染色、DNA断裂测定和YO-PRO-1 (Invitrogen)。在一些实施方案中,可使用膜联蛋白V和碘化丙锭进行染色,并且膜联蛋白V+/PI+、膜联蛋白V+/PI-和膜联蛋白V-/PI+群体的组合百分比可视为死亡细胞。

[0123] 如本文所用,术语“降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂”是指减少(包括显著地)、降低、阻断、抑制、或干扰体外、原位和/或体内CD33(哺乳动物的,诸如人CD33)生物活性的分子。术语“药剂”不暗示任何生物作用的特定机制,并且明确地包括并涵盖与CD33的所有可能的药理学、生理学和生物化学相互作用,不论是直接的或间接的,并且不论与CD33、一种或多种它的配体相互作用、或通过另一种机制、以及它的可通过各种不同的且化学上相异的组合物实现的结果。示例性药剂包括但不限于特异性地结合到CD33的抗CD33抗体、可溶性CD33受体蛋白、可溶性CD33-Fc融合蛋白(例如,CD33免疫粘附素)、结合到CD33配体的可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、结合到CD33配体的唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白(例如,唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素)、针对编码CD33的核酸的反义分子、针对编码CD33的核酸的短干扰RNA(“siRNA”)分子、CD33抑制性化合物、结合到CD33的RNA或DNA适体、以及CD33结构类似物。在一些实施方案中,CD33抑制剂(例如,抗体)结合(与其物理地相互作用)降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂、结合到CD33配体、和/或抑制(减少)CD33合成或产生。在其他实施方案中,本公开抑制剂的药剂结合CD33并且防止其结合到一种或多种CD33配体。在又其他的实施方案中,本公开的药剂减少或消除CD33的表达(即,转录或翻译)。降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种

CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂类型的实例在本文中提供。

[0124] 如本文所用,术语“结合CD33或与CD33相互作用的药剂”是指与CD33蛋白直接地或间接地相互作用的分子。术语“药剂”不暗示任何生物作用的特定机制,并且明确地包括并涵盖与CD33的所有可能的药理学、生理学和生物化学相互作用,不论是直接的或间接的,并且不论与CD33相互作用、或通过另一种机制、以及它的可通过各种不同的且化学上相异的组合物实现的结果。示例性药剂包括但不限于特异性地结合到CD33的抗CD33抗体。

[0125] 如本文所用,术语“RNA干扰”或“RNAi”通常是指其中双链RNA分子或短发夹RNA分子减少或抑制双链RNA分子或短发夹RNA分子与其共享基本上或全部同源性的核酸序列的表达的过程。术语“短干扰RNA”或“siRNA”或“RNAi剂”是指引发RNA干扰的RNA序列。参见Kreutzer等人,WO 00/44895;Zernicka-Goetz等人,WO 01/36646;Fire,WO 99/32619;Mello和Fire,WO 01/29058。如本文所用,siRNA分子包括涵盖化学上修饰的核苷酸和非核苷酸的RNA分子。术语“ddRNAi剂”是指从外源载体转录的DNA指导的RNAi剂。术语“短发夹RNA”或“shRNA”是指具有双链区和环区的RNA结构。在某些实施方案中,ddRNAi剂最初表达为shRNA。

[0126] 如本文所用,术语“适体”是指能够紧密地且特异性地结合到所需分子靶标的异源寡核苷酸,所述分子靶标例如像常见的代谢辅因子(例如,辅酶A、S-腺苷甲硫氨酸等)、蛋白质(例如,补体蛋白C5、抗体等)、或核酸分子中的保守结构元件(例如,对于转录因子的结合是重要的结构等)。适体通常包含DNA或RNA核苷酸序列,所述序列的长度范围是约10至约100个核苷酸、约10至约75个核苷酸、约10至约50个核苷酸、约10至约35个核苷酸、以及约10至约25个核苷酸。合成的DNA或RNA寡核苷酸可使用标准固相亚磷酰胺方法和设备来制备,诸如通过使用3900高通量DNA合成仪TM(可从Applied Biosystems (Foster City,CA)获得)来制备。适体通常并入存在于DNA和RNA中的常见的核苷酸(例如,A、G、C、以及T/U)的衍生物或类似物,包括增加对核酸酶的抗性、结合亲合力、或以其他方式改变其药代动力学特性的主链或键联修饰(例如,肽核酸(PNA)或硫代磷酸酯键联)。示例性修饰在以下中列出:美国专利号6,455,308;4,469,863;5,536,821;5,541,306;5,637,683;5,637,684;5,700,922;5,717,083;5,719,262;5,739,308;5,773,601;5,886,165;5,929,226;5,977,296;6,140,482;以及WIPO公布WO 00/56746和WO 01/14398。用于合成包含此类类似物或衍生物的寡核苷酸的方法公开于例如以上引用的专利公布中和美国专利号6,455,308;5,614,622;5,739,314;5,955,599;5,962,674;6,117,992中;以及WO 00/75372中。

[0127] 如本文所使用,术语“约”是指此技术领域技术人员易于了解的个别值的常见误差范围。提到“约”一个值或参数在本文中包括(并描述)针对该值或参数本身的实施方案。

[0128] 除非上下文另作清楚地指示,否则如本文和所附权利要求书中所使用,单数形式“一个(种)”及“该”包括复数个(种)参照物。举例来说,提到一种“抗体”是提到一种至多种抗体,如摩尔量,并且包括本领域技术人员已知的其等效物等等。

[0129] 应了解,本文所描述的本公开的各方面和实施方案包括“包含”这些方面和实施方案,“由这些方面和实施方案组成”和/或“基本上由这些方面和实施方案组成”。

[0130] 综述

[0131] 本公开涉及降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂(例如,抗CD33抗体)、制备并使用此类药剂(例如,抗CD33抗体)的方法;包含

此类药剂(例如,抗CD33抗体)的药物组合物;编码此类药剂(例如,抗CD33抗体)的核酸;以及包含编码此类药剂(例如,抗CD33抗体)的核酸的宿主细胞。

[0132] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体至少部分地由于抗体抑制CD33与一种或多种天然聚糖配体之间的相互作用的能力而具有一种或多种拮抗性活性。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体可至少部分地由于抗体通过诱导CD33的降解、下调、裂解、受体脱敏、和/或溶酶体靶向减少CD33的细胞表达(例如,细胞表面表达)的能力而具有一种或多种拮抗性活性。在一些实施方案中,抗CD33抗体表现出以下特性中的一种或多种:a.对于人CD33的解离常数(K_D)比抗CD33抗体吉妥珠单抗的解离常数低;b.以低于抗CD33抗体吉妥珠单抗或林妥珠单抗的半数最大有效浓度(EC_{50})的 EC_{50} 结合到人细胞(诸如人树突细胞);c.以低于抗CD33抗体吉妥珠单抗或林妥珠单抗的半数最大有效浓度(EC_{50})的 EC_{50} 降低CD33的细胞水平;d.对于人CD33具有300pM至10pM范围内的解离常数(K_D),例如其中 K_D 在大约25°C的温度下确定;e.以200pM至10pM范围内的半数最大有效浓度(EC_{50})结合到人细胞(诸如人树突细胞),例如其中 EC_{50} 在大约4°C的温度下确定;f.以65pM至20pM范围内的半数最大有效浓度(EC_{50})降低CD33的细胞水平,或者g.以8.0mg/kg至2.0mg/kg范围内的半数最大有效浓度(EC_{50})降低体内CD33的细胞水平。如本文所公开的半数最大有效浓度(EC_{50})是指本公开的抗CD33抗体降低细胞上或细胞中的CD33的细胞水平的浓度或抗体实现与细胞上的CD33的半数最大结合的浓度。

[0133] 有利地,本公开的抗CD33抗体与商业抗CD33抗体(诸如吉妥珠单抗和林妥珠单抗)相比具有对于结合CD33的提高了的 EC_{50} (例如,大约好3倍),并且比商业抗CD33抗体(诸如吉妥珠单抗和林妥珠单抗)更强力地降低细胞表面表达(例如,较低 EC_{50})(例如,大约好5倍)(实施例1和实施例3)。商业可获得的抗CD33抗体吉妥珠单抗的重链可变区的氨基酸序列在SEQ ID NO:248中阐述,并且抗CD33抗体吉妥珠单抗的轻链可变区的氨基酸序列在SEQ ID NO:249中阐述。商业可获得的抗CD33抗体林妥珠单抗的重链可变区的氨基酸序列在SEQ ID NO:250中阐述,并且抗CD33抗体林妥珠单抗的轻链可变区的氨基酸序列在SEQ ID NO:251中阐述。

[0134] 在一些实施方案中,抗体诱导的CD33活性可通过本文所公开的任何技术在体外进行确定或测试(参见,例如,实施例1-5),所述技术包括但不限于针对增加暴露于CD33的抗体的密度测试全长抗CD33抗体的板结合、使抗CD33抗体与二抗交联、使抗CD33抗体与表达一种或多种Fcγ受体(例如,FcγRIIB)的细胞交联、使用在溶液中的CD33抗体、以及使用CD33抗体的Fab片段。

[0135] 本公开的某些方面至少部分地基于鉴定药剂(诸如抗CD33抗体),所述药剂表现出与一种或多种CD33配体竞争结合到CD33的能力和/或降低细胞上的CD33的细胞表面水平的能力,从而引起减少、中和、防止、或遏制一种或多种CD33活性,所述CD33活性包括但不限于抵消通过Src家族酪氨酸激酶(诸如LCK和FYN)进行的Tyr-340和Tyr-358的一种或多种磷酸化;募集并结合到酪氨酸特异性蛋白磷酸酶SHP1和SHP2;募集并结合到PLC-γ1,其充当发动蛋白-1(Dynamin-1)的鸟嘌呤核苷酸交换因子;募集并结合到包含SH2-结构域的蛋白质(例如,Crk1);募集并结合到脾酪氨酸激酶Syk;募集并结合到SH3-SH2-SH3生长因子受体结合蛋白2(Grb2);募集并结合到多种包含SH2的蛋白质;通过蛋白激酶C进行的Ser-307和Ser-342的磷酸化;调节巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生树突细胞、单核细胞、破骨细胞、T细

胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞中一种或多种抗炎细胞因子的表达,所述抗炎细胞因子诸如IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IL-16、TGF- β 、IL-1Ra、G-CSF、以及TNF、IFN- β 1a、IFN- β 1b、或IL-6的可溶性受体;降低细胞内钙动员;调节巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生树突细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞中一种或多种促炎细胞因子的表达,所述促炎细胞因子诸如IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、CRP、IL-33、MCP-1、以及MIP-1- β ;调节一种或多种蛋白质的表达,所述蛋白质选自C1qa、C1qb、C1qc、C1s、C1R、C4、C2、C3、ITGB2、HMOX1、LAT2、CASP1、CSTA、VSIG4、MS4A4A、C3AR1、GPX1、TyroBP、ALOX5AP、ITGAM、SLC7A7、CD4、ITGAX、PYCARD、CD14、CD16、HLA-DR、以及CCR2;抑制细胞外信号调节激酶(ERK)磷酸化;降低多种细胞蛋白质上的酪氨酸磷酸化;调节C-C趋化因子受体7(CCR7)的表达;抑制小神经胶质细胞向CCL19和CCL21表达细胞的趋化性;活化磷酸肌醇3-激酶;减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞和/或小神经胶质细胞的细胞生长;减少通过树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、M2小神经胶质细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、和/或M2巨噬细胞诱导的T细胞增殖;抑制破骨细胞产生、降低破骨细胞生成的速率、或两者;降低嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的存活;降低嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的增殖;抑制嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的迁移;降低嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的一种或多种功能;抑制嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的成熟;增加单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的细胞死亡和细胞凋亡;降低单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的吞噬活性;减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖;减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的总体功能性、含有ITAM的受体的磷酸化;介导ITAM信号传导的信号传导分子的磷酸化;减少模式识别受体的活化;减少To11样受体的活化;减少细胞和蛋白质碎片的清除的损害相关的活化;CD33与其配体中的一种或多种之间的相互作用;CD33与共受体(诸如CD64)之间的相互作用;减少对选自以下的一种或多种类型的清除:凋亡神

神经元清除、神经组织碎片清除、功能失调的突触清除、非神经组织碎片清除、细菌或其他异物清除、致病性蛋白清除、以及肿瘤细胞清除；抑制对以下中的一种或多种的吞噬作用：凋亡神经元、神经组织碎片、功能失调突触、非神经组织碎片、细菌、其他异物、致病性蛋白、致病性肽、致病性核酸、致病性脂质、或肿瘤细胞；抑制对致病性核酸的清除，诸如所述致病性核酸的是反义GGCCCC (G2C4) 重复序列扩增RNA；活化对选自以下的致病性蛋白的清除：淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑、淀粉样蛋白前体蛋白或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72 (染色体9开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易小体、心房利钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关非ATG (RAN) 翻译产物、二肽重复序列 (DPR) 肽、甘氨酸-丙氨酸 (GA) 重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸 (GP) 重复序列肽、甘氨酸-精氨酸 (GR) 重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸 (PA) 重复序列肽、泛素、以及脯氨酸-精氨酸 (PR) 重复序列肽；抑制对选自以下的不同类型的癌症的有益免疫应答：膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、急性骨髓性白血病、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、以及甲状腺癌；抑制对选自以下的不同类型的神经病症的有益免疫应答：痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、特发性震颤、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希一德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、以及多发性硬化症；抑制对选自以下的不同类型的炎性和感染病症的有益免疫应答：狼疮、急性和慢性结肠炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、以及佩吉特氏骨病；结合到肿瘤细胞上的CD33配体；结合到以下细胞上的CD33配体：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、T细胞、嗜中性粒细胞、和/或巨噬细胞；抑制通过以下中的一种或多种进行的肿瘤细胞杀伤：小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞；抑制以下中的一种或多种的抗肿瘤细胞增殖活性：小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞；抑制以下中的一种或多种的抗肿瘤细胞转移活性：小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞；促进免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、或调节性T细胞；抑制一种或多种含有ITAM基序的受体，诸如TREM1、TREM2、Fc γ R、DAP10、以及DAP12；抑制一种或多种含有基序D/Ex0-2YxxL/IX6-8YxxL/I (SEQ ID NO:247) 的受体；抑制通过一种或多种模式识别受体 (PRR) 进行的信号传导，所述受体诸如识别病原体相关分子模式 (PAMP) 的受体和识别损害相关分子模式 (DAMP) 的受体；抑制通过一种或多种Toll样受体进行的信号传导；抑制JAK-STAT信号传导途径；抑制活化B细胞的核因子 κ -轻链增强子

(NFκB) ; 调节一种或多种炎性受体 (诸如CD86) 的表达, 所述一种或多种炎性受体在以下中的一种或多种上表达: 小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞; 增加一种或多种CD33依赖性基因的表达; 破坏的CD33依赖性基因表达的正常化; 以及减少一种或多种ITAM依赖性基因的表达, 诸如NFAT转录因子; 促进以下中的一种或多种的分化: 免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、以及调节性T细胞; 促进以下中的一种或多种的功能性: 免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、以及调节性T细胞; 增强以下中的一种或多种到肿瘤中的浸润: 免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、以及调节性T细胞; 增加肿瘤中、外周血中或其他淋巴样器官中的促进肿瘤的骨髓/粒细胞免疫抑制性细胞的数量; 增强骨髓来源的抑制细胞的促进肿瘤的活性; 增加肿瘤中或外周血中促进肿瘤细胞因子的表达, 所述促进肿瘤的细胞因子诸如TGF-β或IL-10; 增加促进肿瘤的FoxP3⁺调节性T淋巴细胞的肿瘤浸润; 增强骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) 的促进肿瘤的活性; 减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的活化; 减少具有肿瘤杀伤潜力的CD45⁺CD3⁺ T淋巴细胞的活化; 减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性NK细胞的浸润; 减少具有增强免疫应答的潜力的肿瘤特异性B淋巴细胞的浸润; 减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的浸润; 减少CD45⁺CD3⁺ T淋巴细胞的浸润; 增加肿瘤体积; 增加肿瘤生长速率; 增加肿瘤复发率; 降低调节抗肿瘤T细胞应答的一种或多种免疫疗法或一种或化疗剂和/或多种癌症疫苗的效力, 任选地其中所述一种或多种免疫疗法是靶向选自以下的一种或多种蛋白质的免疫疗法: CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG-3、DR-5、TREM1、TREM2、CSF-1受体、以及其任何组合; 抑制PLC γ /PKC/钙动员; 以及抑制PI3K/Akt、Ras/MAPK信号传导。

[0136] 在一些实施方案中, 使用药剂 (诸如CD33阻断抗体) 治疗癌症: (i) 直接地或间接地减少癌症患者的肿瘤中、外周血中和淋巴样器官中积累的促进肿瘤的骨髓/粒细胞免疫抑制性细胞的存活、增殖、成熟、分化、和/或功能性; (ii) 减少癌症患者的肿瘤中、外周血中和其他淋巴样器官中的促进肿瘤的骨髓/粒细胞免疫抑制性细胞的数量; (iii) 阻断骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) 的促进肿瘤的活性; (iv) 减少癌症患者的肿瘤中和外周血中的促进肿瘤的细胞因子 (诸如TGF-β和IL-10) 的表达; (v) 减少肿瘤中的促进肿瘤的FoxP3⁺调节性T淋巴细胞浸润; (vi) 增加通过以下中的一种或多种进行的肿瘤细胞杀伤: 小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞; (vii) 增加以下中的一种或多种抗肿瘤细胞增殖活性: 小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞; (viii) 增加以下中的一种或多种的抗肿瘤细胞迁移活性: 小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞; (ix) 增加一种或多种含有ITAM基序的受体, 诸如TREM1、TREM2、FcγR、DAP10、以及DAP12; (x) 增加通过一种或多种模式识别受体 (PRR) 进行的信号传导, 所述受体诸如识别病原体相关分子模式 (PAMP) 的受体、识别损伤相关分子模式 (DAMP) 的受体、以及其任何组合; (xi) 增加一种或多种含有基序D/Ex0-2YxxL/IX6-8YxxL/I (SEQ ID NO:247) 的受体; (xii) 增加通过一种或多种Toll

样受体进行的信号传导；(xiii) 增加JAK-STAT信号传导途径；(xiv) 增加活化B细胞的核因子 κ -轻链增强子(NF κ B)；(xv) 使含有ITAM基序的受体磷酸化；(xvi) 增加诸如通过活化T细胞的核因子(NFAT) 转录因子活化的一种或多种ITAM依赖性基因的表达；(xvii) 抑制以下中的一种或多种的分化和/或功能性：免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、以及调节性T细胞；(xviii) 减少或抑制以下中的一种或多种到肿瘤中的浸润：免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、以及调节性T细胞；(xix) 减少肿瘤中、外周血中、或其他淋巴样器官中的促进肿瘤的骨髓/粒细胞免疫抑制性细胞的数量；(xx) 减少或抑制骨髓来源的抑制细胞的促进肿瘤的活性；(xxi) 减少肿瘤中或外周血中的促进肿瘤的细胞因子(诸如TGF- β 和IL-10) 的表达；(xxii) 增加具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的活化；(xxiii) 增加具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性NK细胞的浸润，(xxiv) 增加NK细胞的肿瘤杀伤潜力；(xxv) 增加具有增强免疫应答的潜力的肿瘤特异性B淋巴细胞的浸润；(xxvi) 减小或抑制肿瘤体积；(xxvii) 减小或抑制肿瘤生长速率；(xxviii) 减少或抑制转移；(xxix) 减小或抑制肿瘤复发率；(xxx) 增加调节抗肿瘤T细胞应答的一种或多种免疫疗法或一种或多种癌症疫苗的效力，所述一种或多种免疫疗法诸如靶向选自以下组成的组的一种或多种蛋白质的免疫疗法：CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG-3、TREM1、TREM2、CSF1受体、以及其任何组合；(xxxi) 活化PLC γ /PKC/钙动员；以及(xxxii) 活化PI3K/Akt、Ras/MAPK信号传导。在一些实施方案中，本公开的骨髓细胞包括但不限于CD45⁺CD14⁺骨髓细胞、CD14⁺骨髓细胞、以及骨髓来源的抑制细胞(MDSC)。在一些实施方案中，本公开的骨髓细胞是非致瘤性骨髓细胞。

[0137] 免疫抑制细胞有时还称为骨髓来源的抑制细胞(MDSC)。在人中，MDSC可通过标记物的以下组合中的一种限定：(1) CD14⁺HLA-DR^{低/-}，(2) CD14⁺IL4R α ⁺，(3) CD14⁺HLA-DR-IL4R α ⁺，(4) CD34⁺CD14⁺CD11b⁺CD33⁺，(5) CD11b⁺CD14⁺CD33⁺，(6) CD33⁺HLA-DR⁻，(7) Lin⁻HLA-DR⁻，(8) Lin⁻HLA-DR⁻CD33⁺，(9) Lin⁻HLA-DR⁻CD33⁺CD11b⁺，(10) Lin⁻CD33⁺CD11b⁺CD15⁺，(11) Lin⁻HLA-DR⁻CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁺，(12) CD11b⁺CD14⁻CD33⁺，(13) CD11b⁺CD14⁻HLA-DR⁻CD33⁺CD15⁺，(14) CD33⁺HLA-DR⁻CD15⁺，(15) CD15⁺IL4R α ⁺，(16) CD11b⁺CD15⁺CD66b⁺，(17) CD15⁺FSC^低SSC^高，(18) CD15^高CD33⁺，(19) CD11b⁺CD14⁻CD15⁺，(20) CD66b⁺SSC^高，以及(21) CD11b⁺CD15⁺ (还参见Solito S等人Annals of the NY Academy of Sciences, 2014)。在小鼠中，MDSC可通过表面标记物CD45⁺、CD11b⁺、Gr1⁺、和/或IL4R α ⁺的表达来限定。额外的示例性免疫抑制性单核细胞谱系是CD45⁺、CD11b⁺、Gr1^低；以及CD45⁺、CD11c⁺。

[0138] 本公开还涉及结合CD33或与CD33相互作用的药剂，诸如抗CD33抗体。在某些实施方案中，抗CD33抗体不显著降低CD33的细胞表面水平和/或不抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用。

[0139] CD33蛋白

[0140] 在一方面，本公开提供与本公开的CD33蛋白内的区域(诸如表位) 相互作用或以其他方式结合到所述区域的药剂，诸如分离的(例如，单克隆) 抗体。在一些实施方案中，本公开的药剂(诸如本公开的抗CD33抗体) 结合到CD33蛋白并且在结合到CD33蛋白之后调节一种或多种CD33活性，例如与细胞中的CD33表达相关联的活性。本公开的CD33蛋白包括但不

限于哺乳动物CD33蛋白、人CD33蛋白、小鼠CD33蛋白、以及大鼠CD33蛋白。

[0141] CD33被不同地称为CD33分子、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素3、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-3、CD33抗原 (Gp67)、P67、Gp67、唾液酸结合Ig样凝集素3、骨髓细胞表面抗原CD33、或FLJ00391。

[0142] CD33是主要在骨髓谱系细胞 (包括但不限于巨噬细胞、树突细胞、破骨细胞、单核细胞、以及小神经胶质细胞) 上表达的免疫球蛋白样受体。在一些实施方案中, CD33与CD64形成受体信号传导复合物。在一些实施方案中, CD33信号传导导致PI3K或其他细胞内信号的下游抑制。在骨髓细胞上, Toll样受体 (TLR) 信号对于例如在感染应答的情况下抑制CD33活性是重要的。TLR还在病理学炎性应答中发挥关键作用, 例如TLR在巨噬细胞和树突细胞中表达。

[0143] 各种CD33同源物是已知的, 包括但不限于人CD33、小鼠CD33、大鼠CD33、黑猩猩CD33、恒河猴CD33、狗CD33、牛CD33、斑马鱼CD33、鸭嘴兽CD33、以及蜥蜴CD33。人CD33的氨基酸序列在以下阐述为SEQ ID NO:1:

```

      10      20      30      40      50      60
MPLLLLLPLL WAGALAMDPN FWLQVQESVT VQEGLCVLVP CTFHFPIPY Y DKNSPVHGYW

      70      80      90     100     110     120
FREGAIIISRD SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDP SRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM

      130     140     150     160     170     180
ERGSTKYSYK SPQLSVHVT D LTHRPKILIP GTLEPGH SKN LTCSVSWACE QGTPPIFSWL

[0144]    190     200     210     220     230     240
SAAPTSLGPR TTHSSVLIIT PRPQDHGTNL TCQVKFAGAG VTTERTIQLN VTYVPQNPTT

      250     260     270     280     290     300
GIFPGDGSGK QETRAGVVHG AIGGAGVTAL LALCLCLIFF IVKTHRRKAA RTAVGRNDTH

      310     320     330     340     350     360
PTTGSASPKH QKSKSLHGPT ETSSCSGAAP TVEMDEELHY ASLNFHGMNP SKDTSTEYSE

VRTQ

```

[0145] 在一些实施方案中, CD33是包含信号序列的原前蛋白。在一些实施方案中, CD33是成熟蛋白。在一些实施方案中, 成熟CD33蛋白不包含信号序列。在一些实施方案中, 成熟CD33蛋白在细胞上表达。在一些实施方案中, 成熟CD33蛋白在细胞上表达, 诸如在细胞的表面上表达, 所述细胞包括但不限于人树突细胞、人巨噬细胞、人单核细胞、人破骨细胞、人嗜中性粒细胞、人T细胞、人T辅助细胞、人细胞毒性T细胞、人粒细胞、以及人小神经胶质细胞。本公开的药剂 (诸如本公开的抗CD33抗体) 可结合在本文所公开的任何细胞上表达的本公开的任何CD33蛋白。

[0146] 本公开的CD33蛋白 (诸如人CD33) 包含若干结构域, 包括但不限于位于SEQ ID NO:1的氨基酸残基1-17处的信号序列、位于SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-135处的细胞外免疫球蛋白样可变型 (IgV) 结构域、位于SEQ ID NO:1的氨基酸残基145-228处的Ig样C2型结构域、位于SEQ ID NO:1的氨基酸残基260-282处的跨膜结构域、位于SEQ ID NO:1的氨基酸残基338-343处的ITIM基序1、以及位于SEQ ID NO:1的氨基酸残基356-361处的ITIM基序2。如本领域的技术人员将理解的, 本公开的结构域的开始残基和终止残基可根据所使用的计算机建模程序或用于确定结构域的方法而变化。

[0147] 本公开的某些方面提供结合到人CD33或其同源物(包括但不限于哺乳动物CD33蛋白和来自其他物种的Cd33直系同源物)的抗CD33抗体。示例性CD33同源物和直系同源物在表A中列出。

[0148] 表A:CD33同源物和直系同源物

生物体	CD33 登录号
小鼠(小家鼠(<i>Mus musculus</i>))	NCBI 登录号 NP_001104528.1
大鼠(褐家鼠(<i>Rattus norvegicus</i>))	NCBI 登录号 XP_008757645.1
黑猩猩(黑猩猩(<i>Pan troglodytes</i>))	NCBI 登录号 XP_512850.3
恒河猴(猕猴(<i>Macaca mulatta</i>))	NCBI 登录号 XP_001114616.2
[0149] 狗(家犬(<i>Canis familiaris</i>))	NCBI 登录号 XP_005616306.1
牛(家牛(<i>Bos taurus</i>))	NCBI 登录号 XP_005219197.1
斑马鱼(担尼鱼(<i>Danio rerio</i>))	NCBI 登录号 XP_002664698.3
鸭嘴兽(鸭嘴兽(<i>Ornithorhynchus anatinus</i>))	Ensembl 登录号 Contig28422(4-11599)
蜥蜴(安乐蜥(<i>Anolis carolinensis</i>))	Ensembl 登录号 GL343281.1 (1713612-1717084) 和 GL343281.1 (1573835-1580218)

[0150] 因此,如本文所用的本公开的“CD33”蛋白包括但不限于哺乳动物CD33蛋白、人CD33蛋白、灵长类CD33蛋白、小鼠CD33蛋白、以及大鼠CD33蛋白。另外,本公开的抗CD33抗体可结合以下中的一种或多种内的表位:哺乳动物CD33蛋白、人CD33蛋白、灵长类CD33、小鼠CD33蛋白、以及大鼠CD33蛋白。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体可特异性地结合到哺乳动物CD33蛋白、人CD33蛋白、或两者。在某些实施方案中,本公开的抗CD33蛋白可特异性地结合到人CD33、小鼠CD33、或两者。

[0151] 在一些实施方案中,本公开的降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用或结合CD33或与CD33相互作用的药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可以pH依赖性方式结合CD33。在一些实施方案中,本公开的药剂(诸如抗CD33抗体)可在中性pH下结合到CD33并且内化而不与CD33蛋白解离。可替代地,本公开的酸性pH药剂(诸如抗CD33抗体)一旦内化就可与CD33解离,并且然后通过内体/溶酶体途径降解。在某些实施方案中,抗CD33抗体在以下范围的pH下结合CD33:5.5至8.0、5.5至7.5、5.5至7.0、5.5至6.5、5.5至6.0、6.0至8.0、6.5至8.0、7.0至8.0、7.5至8.0、6.0至7.5、6.0至7.0、6.5至7.5。在某些实施方案中,抗CD33抗体在以下范围的pH下与CD33解离:小于6.0、小于5.5、小于

5.0、小于4.5、小于4.0、小于3.5、小于3.0、小于2.5、或小于2.0。

[0152] 在一些实施方案中,本公开的降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用或结合CD33或与CD33相互作用的药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)结合到本公开的野生型CD33蛋白、其天然存在的变体、和/或其疾病变体。

[0153] 在一些实施方案中,本公开的降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用或结合CD33或与CD33相互作用的药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)结合人CD33的变体,其中所述变体包含具有(C)核苷酸的单核苷酸多态性(SNP) rs3865444^C。在一些实施方案中,本公开的降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用或结合CD33或与CD33相互作用的药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)结合人CD33的变体,其中所述变体包含具有(A)核苷酸的SNP rs3865444。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体结合人CD33的变体,其中所述变体包含SNP rs3865444^{AC}或rs3865444^{CC}。

[0154] 在一些实施方案中,本公开的降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用或结合CD33或与CD33相互作用的药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)结合人CD33的变体,其中所述变体包含具有GG核苷酸、AA核苷酸、或AG核苷酸的SNP rs35112940。在一些实施方案中,本公开的降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用或结合CD33或与CD33相互作用的药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)结合人CD33的变体,其中所述变体包含具有CC、CT或TT基因型的SNP rs12459419。在某些实施方案中,受试者对于具有GG核苷酸、CG核苷酸、或CC核苷酸的编码SNP rs1803具有纯合子或杂合子。

[0155] 在一些实施方案中,本公开的降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用或结合CD33或与CD33相互作用的药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)结合到在细胞表面上表达的CD33蛋白,所述细胞包括但不限于人树突细胞、人巨噬细胞、人单核细胞、人破骨细胞、人嗜中性粒细胞、人T细胞、人T辅助细胞、人细胞毒性T细胞、人粒细胞、以及人小神经胶质细胞。在一些实施方案中,本公开的降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用或结合CD33或与CD33相互作用的药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)结合到在细胞表面上表达的CD33蛋白并且在结合到表面表达的CD33蛋白之后调节(例如,诱导或抑制)本公开的至少一种CD33活性。在本公开的一些实施方案中,抗CD33抗体特异性地结合到CD33蛋白。在本公开的一些实施方案中,抗CD33抗体还结合到至少一种额外的唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素蛋白。在一些实施方案中,抗CD33抗体调节至少一种额外的唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素蛋白或表达至少一种额外的唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素蛋白的细胞的一种或多种活性。

[0156] CD33配体

[0157] 本公开的CD33蛋白可与一种或多种CD33配体相互作用(例如,结合到其)。

[0158] 示例性CD33配体包括但不限于唾液酸、含有唾液酸的糖脂、含有唾液酸的糖蛋白、含有 α -2,6连接的唾液酸的糖脂、含有 α -2,6连接的唾液酸的糖蛋白、含有 α -2,3连接的唾液酸的糖脂、含有 α -2,3连接的唾液酸的糖蛋白、 α -1酸性糖蛋白(AGP)、CD24蛋白、神经节苷脂(例如,含有连接到唾液酸化聚糖的神经酰胺的糖脂)、分泌的粘蛋白、在红细胞上表达的CD33配体、在细菌细胞上表达的CD33配体、在凋亡细胞上表达的CD33配体、在肿瘤细胞上表

达的CD33配体、在病毒上表达的CD33配体、在树突细胞上表达的CD33配体、在神经细胞上表达的CD33配体、在神经胶质细胞上表达的CD33配体、在小神经胶质细胞上表达的CD33配体、在星形胶质细胞上表达的CD33配体、 β 淀粉样蛋白斑上的CD33配体、Tau缠结上的CD33配体、致病性蛋白上的CD33配体、致病性肽上的CD33配体、在巨噬细胞上表达的CD33配体、在自然杀伤细胞上表达的CD33配体、在T细胞上表达的CD33配体、在T辅助细胞上表达的CD33配体、在细胞毒性T细胞上表达的CD33配体、在B细胞上表达的CD33配体、在肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞上表达的CD33配体、在肿瘤包埋的免疫抑制巨噬细胞上表达的CD33配体、在骨髓来源的抑制细胞上表达的CD33配体、以及在调节性T细胞上表达的CD33配体。在一些实施方案中，本公开的CD33配体是神经节苷脂。神经节苷脂通常共享共同的乳糖-神经酰胺核心和一个或多个唾液酸残基。

[0159] 合适的CD33配体的另外的实例在图3中描绘。

[0160] 合适的神经节苷脂配体的另外的实例在图4中描绘并且在表B中列出。通常，神经节苷脂是由具有连接在糖链上的一个或多个唾液酸(例如，n-乙酰神经氨酸，NANA)的糖鞘脂构成的分子。

[0161] 表B: 示例性神经节苷脂CD33配体的结构

[0162]

GM2-1 = aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-?)bDGalNAc(1-?)bDGalNAc(1-?)bDGlc(1-1)Cer
GM3 = aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
GM2, GM2a(?) = bDGalpNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer

[0163]

GM2b(?) = aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GM1, GM1a = bDGalp(1-3)bDGalNAc[aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 asialo-GM1, GA1 = bDGalp(1-3)bDGalpNAc(1-4)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 asialo-GM2, GA2 = bDGalpNAc(1-4)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GM1b = aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GD3 = aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GD2 = bDGalpNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GD1a = aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GD1 α = aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-6)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GD1b = bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GT1a = aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GT1, GT1b = aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 OAc-GT1b = aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)aXNeu5Ac9Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GT1c = bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GT3 = aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGal(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GQ1b = aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer
 GGal = aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-1)Cer
 其中:
 aNeu5Ac = 5-乙酰- α -神经氨酸
 aNeu5Ac9Ac = 5,9-二乙酰- α -神经氨酸
 bDGalp = β -D-吡喃半乳糖
 bDGalpNAc = N-乙酰- β -D-吡喃半乳糖
 bDGlc = β -D-吡喃半乳糖
 Cer = 神经酰胺(一般的 N-酰化鞘氨醇(N-acylated sphingoid))

[0164] CD33药剂

[0165] 本公开的某些方面涉及降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂(例如, CD33药剂)。本公开的其他方面涉及结合CD33或与CD33相互作用的药剂(例如, CD33药剂)。在一些实施方案中, 本公开的药剂阻断、抑制、降低、或干扰体外、原位、和/或体内CD33蛋白的一种或多种活性。在一些实施方案中, 本公开的药剂不阻断、抑制、降低、或干扰体外、原位、和/或体内CD33蛋白的一种或多种活性。在一些实施方案中, 本公开的药剂增加、活化或诱导体外、原位、和/或体内CD33蛋白的一种或多种活性。

[0166] 在某些实施方案中, 本公开的药剂是降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂(例如, CD33药剂)。本公开的降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂是具有以下特征中的一种或多种的分子: (1) 抑制或降低一种或多种CD33活性; (2) 抑制或减少CD33与其配体中的一种或多种的结合的能力; (3) 减少CD33表达细胞中的CD33表达(诸如在mRNA水平下和/或在蛋白水平下)的能力; (4) 与CD33蛋白相互作用、结合、或识别CD33蛋白的能力; (5) 特异性地与

CD33蛋白相互作用或结合到CD33蛋白的能力;以及(6)治疗、改善、或预防本文所述或预期的疾病或病症的任何方面的能力。

[0167] 抑制CD33的产生的示例性药剂包括但不限于特异性地抑制CD33合成和/或释放针对CD33的反义分子或针对编码CD33的核酸的短干扰RNA (siRNA) 分子的化合物。抑制一种或多种CD33活性的额外的示例性药剂包括但不限于特异性地结合到CD33蛋白的抗CD33抗体、特异性地抑制一种或多种CD33活性的化合物(诸如小分子抑制剂和/或肽抑制剂)、特异性地抑制CD33结合到一种或多种配体的化合物、CD33结构类似物、或结合CD33的RNA或DNA适体。在一些实施方案中,降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂是变构抑制剂。在一些实施方案中,降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂是原构抑制剂(orthosteric inhibitor)。

[0168] 在某些实施方案中,降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂是小分子抑制剂,包括但不限于小肽或肽样分子、可溶性肽、以及合成的非肽基有机或无机化合物。小分子抑制剂可具有以下中的任一个的分子量:约100至约20,000道尔顿(Da)、约500至约15,000Da、约1000至约10,000Da。用于制备和测试小分子对于一种或多种CD33活性的抑制性作用的方法是本领域熟知的,并且此类方法可用于评估小分子抑制剂对于CD33活性的作用。例如,本文所公开的任何方法和测定可用于筛选降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的小分子抑制剂。

[0169] 在某些实施方案中,降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂是结合CD33或与CD33物理地相互作用的抗CD33抗体。所述抗体对于靶标抗原(例如,CD33)具有纳摩尔或甚至皮摩尔亲和力。在某些实施方案中,所述抗体的 K_D 是约0.05至约100nM。在某些实施方案中,所述抗体的解离常数(K_D)是约0.5至约10nM。例如,所述抗体的 K_D 是以下中的任一个:约100nM、约50nM、约10nM、约9nM、约8nM、约7nM、约6nM、约5nM、约4nM、约3nM、约2nM、约1nM、约500pM、约400pM、约300pM、约200pM、约175pM、约170pM、约169pM、约168pM、约167pM、约166pM、约166.2pM、约165pM、约164pM、约163pM、约162pM、约161pM、约160pM、约150pM、约145pM、约140pM、约139pM、约138pM、约138.2pM、约137pM、约136pM、约135pM、约134pM、约133pM、约132pM、约131pM、约130pM、约120pM、约110pM、约100pM、或约50pM至约2pM、约5pM、约10pM、约15pM、约20pM、或约40pM。在一些实施方案中,对于CD33的解离常数(K_D)在大约25°C的温度下确定。在一些实施方案中, K_D 使用单价抗体(例如,Fab)或呈单价形式的全长抗体来确定。用于制备并选择与CD33相互作用和/或特异性地结合到CD33的方法在本文中进行描述(例如,参见实施例1)。

[0170] 在某些实施方案中,降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂包括能够通过靶向编码CD33的核酸来阻断或减少功能性CD33的表达的至少一种反义分子。CD33的核酸序列是本领域已知的。例如,人CD33可具有如NCBI登录号NM_001082618.1所示的核酸序列,并且小鼠CD33可具有如NCBI登录号NM_001111058.1所示的核酸序列。用于制备反义寡核苷酸分子的方法是已知的,并且此类方法可用于制备特异性地结合CD33mRNA中的一种或多种而不与其他多核苷酸交叉反应的反义寡核苷酸。示例性靶向位点包括但不限于起始密码子、5' 调节区、编码序列(包括任何保守的共有区)、以及3' 未翻译区。在某些实施方案中,反义寡核苷酸的长度是约10至约100个核苷酸、长度约15至约50个核苷酸、长度约18至约25个核苷酸、或更多。在某些实施方案中,寡核苷酸还包含

化学修饰来增加核酸酶抗性等,例如像本领域的技术人员已知的硫代磷酸酯键联和2'-O-糖修饰。

[0171] 在某些实施方案中,降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂包括能够通过靶向编码CD33的核酸来阻断或减少功能性CD33的表达的至少一种siRNA分子。用于制备siRNA分子的方法是本领域熟知的,并且此类方法可用于制备特异性地靶向CD33mRNA而不与其他多核苷酸交叉反应地siRNA分子。siRNA分子可通过诸如通过典型的固相寡核苷酸合成的方法来生成,并且经常并入化学修饰来增加siRNA剂的半衰期和/或效力和/或实现更稳健的递送制剂。可替代地,siRNA分子使用编码用于siRNA的细胞内转录的表达盒的载体来递送。

[0172] 在某些实施方案中,降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂是结合CD33或与CD33物理地相互作用并且阻断CD33与其配体中的一种或多种之间的相互作用的RNA或DNA适体。在某些实施方案中,所述适体包括结合到成熟形式的CD33的至少一种RNA或DNA适体。

[0173] 在某些实施方案中,降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂包括至少一种CD33结构类似物。术语CD33结构类似物是指具有与CD33的三维结构的一部分相似的三维结构并且在体外或体内生理条件下结合到一种或多种CD3配体的化合物,其中所述结合至少部分地抑制CD33生物活性。合适的CD33结构类似物可通过结合到配体(诸如本公开的CD33配体)的CD33的分子建模来设计和合成。CD33结构类似物可以是单体、二聚体、或呈相同或不同结构的任何所需组合的形式来获得提高的亲合力和生物作用的更高级多聚体。在一些实施方案中,所述药剂结合到CD33的某一氨基酸序列或与所述CD33的氨基酸序列相互作用。

[0174] 在某些实施方案中,降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂包括可溶性CD33受体蛋白、可溶性CD33-Fc融合蛋白(例如,CD33免疫粘附素)、结合到CD33配体的可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、结合到CD33配体的唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白(例如,唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素)。在某些实施方案中,此类药剂结合一种或多种CD33配体,并且从而防止给定的CD33与功能性CD33受体之间的相互作用。

[0175] 在某些实施方案中,本公开的药剂是结合CD33或与CD33相互作用的药剂(例如,CD33药剂)。结合CD33或与CD33相互作用的示例性药剂包括但不限于惰性抗CD33抗体、激动剂抗CD33抗体、CD33配体、CD33配体激动剂片段、CD33免疫粘附素、CD33可溶性受体、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白(例如,唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素)、可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、CD33配体模拟物、以及小分子化合物。小分子化合物可具有以下中的任一个的分子量:约100至约20,000道尔顿(Da)、约500至约15,000Da、约1000至约10,000Da。用于制备和测试药剂对于一种或多种CD33活性的作用的方法是本领域熟知的,并且此类方法可用于评估小分子抑制剂对于CD33活性的作用。例如,本文所公开的任何方法和测定可用于筛选结合CD33或与CD33相互作用的小分子抑制剂。

[0176] 测定

[0177] 降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药

剂可使用本领域熟知的方法来鉴定和/或表征,例如像放射性标记的抑制剂测定、光学测定、蛋白质结合测定、生物化学筛选测定、免疫测定、质量转移测量测定、荧光测定、和/或荧光肽裂解测定。

[0178] 结合测定和其他测定

[0179] 在某些实施方案中,降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的药剂可通过本领域熟知的用于检测CD33药剂候选物与CD33的相互作用和/或对CD33的结合亲和力的存在的技术来鉴定。

[0180] 在某些实施方案中,与CD33相互作用的药剂可使用放射性标记的抑制剂测定来鉴定。例如,已知量的放射性标记的药剂候选物可与已知量的固定的CD33和缓冲液一起孵育。随后,可使用缓冲液洗涤固定的CD33,并且使用本领域已知的技术(例如像 γ 计数器)针对剩余存在的放射性标记的CD33药剂候选物测量固定的CD33。指示放射性标记的物质的存在的测量值可指示放射性标记的药剂候选物能够与CD33相互作用和/或结合到CD33。

[0181] 在某些实施方案中,与CD33相互作用的药剂可使用光学技术来鉴定。检测CD33药剂的示例性光学技术可包括例如将CD33连接到比色共振接枝表面,从而由于光必需采用的光路的变化而改变反射光的波长,并且随后当候选药剂实现与CD33相互作用时测量反射光的波长的额外变化。例如,当药剂与CD33一起孵育时所测量的反射光的波长没有变化可指示药剂候选物不能与CD33相互作用。当药剂候选物与CD33一起孵育时所测量的反射光的波长有变化可指示药剂候选物能够结合CD33和/或与CD33相互作用。

[0182] 在某些实施方案中,与CD33相互作用的药剂可使用蛋白质结合测定来鉴定。检测CD33药剂的示例性蛋白质结合测定可包括例如在药剂候选物的存在下的CD33的共免疫沉淀。例如,CD33可在缓冲液中与药剂候选物一起孵育,并且随后在本领域已知的洗涤程序期间可使用特定用于捕集CD33的固定分子(例如像抗CD33抗体)在药剂候选物的存在下捕集CD33并且结合潜在地具有相互作用的药剂候选物的CD33。随后,可释放潜在地具有相互作用的药剂候选物的CD33,并且可基于药剂候选物特征通过例如像质谱法和/或蛋白质印迹的技术来检测药剂候选物的存在。

[0183] 在某些实施方案中,与CD33相互作用的药剂可使用本领域熟知的生物化学和/或免疫测定来鉴定。示例性技术可包括例如使用例如像蛋白质印迹、免疫染色和共免疫沉淀的技术来定量地测量CD33浓度和/或蛋白质半衰期的变化的测定。例如,药剂候选物可与含有CD33样品(诸如表达CD33的细胞)一起孵育,并且随后可在时间进程研究期间的点处测量CD33蛋白质量和/或细胞水平。与对照处理相比蛋白质量、细胞水平和/或蛋白质半衰期的变化可指示CD33药剂候选物可能改变CD33半衰期和/或活性。

[0184] 在某些实施方案中,可使用质量转移测量测定来鉴定与CD33相互作用的药剂。示例性质量转移测量测定可包括例如通过使用仪器(诸如但不限于质谱仪)当药剂候选物与CD33相互作用时来通过测量CD33质量的变化来检测强结合和/或共价结合的CD33药剂的存在。例如,根据药剂候选物相互作用的性质,质量转移测定可对整个蛋白质和/或基于肽的分析来执行。检测到与所述药剂候选物向CD33的增加相关的质量转移可指示药剂候选物可能能够与CD33相互作用或以其他方式抑制CD33。另外,示例性质量转移测量测定可包括例如使用例如像表面等离子共振的技术当药剂候选物与CD33相互作用时检测与相应的药剂候选物质量相关的CD33质量的增加。例如,可测量光的折射率变化并且其与连接到传感器表

面的CD33的质量变化相关。

[0185] 在某些实施方案中,可使用化学交联测定来鉴定与CD33相互作用的CD33药剂。例如,在能够使与CD33相互作用的药剂候选物共价连接到CD33分子的分子交联剂的情况下,药剂候选物可在体内或体外与所述CD33一起孵育。随后,可使用诸如但不限于质谱法和/或蛋白质印迹的技术来鉴定可能能够与CD33相互作用或以其他方式抑制CD33的药剂候选物。例如,检测到与药剂候选物共价地交联的CD33可指示药剂候选物可能能够与CD33相互作用或以其他方式抑制CD33。

[0186] 在某些实施方案中,与CD33相互作用的药剂可使用荧光测定来鉴定。例如,已知量的荧光药剂候选物可与已知量的固定的CD33和缓冲液一起孵育。随后,可使用缓冲液洗涤固定的CD33,并且使用本领域已知的技术(诸如但不限于荧光检测)针对剩余存在的荧光CD33药剂候选物测量固定的CD33。指示荧光物质的存在的测量值可指示荧光药剂候选物能够与CD33相互作用和/或结合到CD33。

[0187] 活性测定

[0188] 本领域已知并且本文所述的测定(例如,实施例1-10)可用于鉴定和测试本公开的CD33药剂的生物活性。在一些实施方案中,提供用于测试CD33药剂调节一种或多种CD33活性的能力的测定。

[0189] 抗CD33抗体

[0190] 本公开的某些方面涉及降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)的抗CD33抗体。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体降低CD33的细胞水平而不抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)而不降低CD33的细胞水平。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体降低CD33的细胞水平并且抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体对于人CD33的解离常数(K_D)低于商业抗CD33抗体(例如,吉妥珠单抗)的解离常数。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体以低于商业抗CD33抗体(例如,吉妥珠单抗或林妥珠单抗)的半数最大有效浓度(EC_{50})的半数最大有效浓度结合到人细胞,诸如树突细胞。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体以低于商业抗CD33抗体(例如,吉妥珠单抗或林妥珠单抗)的半数最大有效浓度(EC_{50})的半数最大有效浓度降低CD33的细胞水平。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体对于人CD33具有300pM至10pM范围内的解离常数(K_D),例如当 K_D 在大约25°C的温度下确定时。在一些实施方案中, K_D 使用单价抗体或呈单价形式的全长抗体来确定。在一些实施方案中,对于人CD33的解离常数(K_D)小于300pM,例如当 K_D 在大约25°C的温度下确定时。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体以200pM至10pM范围内的半数最大有效浓度(EC_{50})结合到人细胞,诸如树突细胞,例如当 EC_{50} 在大约4°C的温度下确定。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体以65pM至20pM范围内的 EC_{50} 降低CD33的细胞水平。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体以8.0mg/kg至2.0mg/kg范围内的 EC_{50} 降低体内CD33的细胞水平。在一些实施方案中,降低体内CD33的细胞水平的 EC_{50} 使用合适的啮齿动物(诸如大鼠或小鼠)来确定。在一些实施方案中,降低体内CD33的细胞水平的 EC_{50} 使用小鼠模型(诸如在实施例3中所描述的小鼠模型)来确定。

[0191] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体对于人CD33的解离常数(K_D)比商业抗

CD33抗体(例如,吉妥珠单抗)对于人CD33的 K_D 低至少10%、至少15%、至少20%、至少20%、至少20%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或更高的百分比。本文所述的任何合适的方法(例如,参见实施例1)可用于确定解离常数(K_D)。在一些实施方案中, K_D 在大约25°C的温度下确定。在一些实施方案中, K_D 使用单价抗体或呈单价形式的全长抗体(例如,使用如在实施例1中所描述的BiaCore测定)来确定。

[0192] 在一些实施方案中,所述抗CD33抗体以一定的半数最大有效浓度(EC_{50})结合到人细胞,诸如原代树突细胞,所述半数最大有效浓度(EC_{50})比商业抗CD33抗体(例如,吉妥珠单抗或林妥珠单抗)的半数最大有效浓度低至少10%、至少15%、至少20%、至少20%、至少20%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少95%、或更高的百分比。本文所述的任何合适的方法(例如,参见实施例1)可用于计算 EC_{50} 。在一些实施方案中, EC_{50} 在大约4°C的温度下确定。

[0193] 在一些实施方案中,所述抗CD33抗体以一定的半数最大有效浓度(EC_{50})降低CD33的细胞水平,所述半数最大有效浓度(EC_{50})比商业抗CD33抗体(例如,吉妥珠单抗或林妥珠单抗)的半数最大有效浓度低至少10%、至少15%、至少20%、至少20%、至少20%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少95%、或更高的百分比。本文所述的任何合适的方法(例如,参见实施例4和实施例45)可用于计算 EC_{50} 。

[0194] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体以一定的半数最大有效浓度(EC_{50})结合到人细胞,诸如原代树突细胞,所述半数最大有效浓度(EC_{50})可小于500pM、小于400pM、小于300pM、小于200pM、小于175pM、小于170pM、小于169pM、小于168pM、小于167pM、小于166pM、小于166.2pM、小于165pM、小于164pM、小于163pM、小于162pM、小于161pM、小于160pM、小于150pM、小于145pM、小于140pM、小于139pM、小于138pM、小于138.2pM、小于137pM、小于136pM、小于135pM、小于134pM、小于133pM、小于132pM、小于131pM、小于130pM、小于120pM、小于110pM、小于100pM、小于90pM、小于80pM、小于70pM、小于60pM、小于50pM、小于40pM、小于30pM、小于20pM、或小于10pM。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体以约300pM至约10pM范围内、或小于10pM的 EC_{50} 结合到人细胞,诸如原代树突细胞。本文所述的任何合适的方法(例如,参见实施例1)可用于计算 EC_{50} 。在一些实施方案中, EC_{50} 在大约4°C的温度下确定。

[0195] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体以一定的半数最大有效浓度(EC_{50})降低CD33的细胞水平,所述半数最大有效浓度(EC_{50})可小于70pM、小于69pM、小于68pM、小于

67pM、小于66pM、小于65pM、小于64pM、小于63pM、小于62pM、小于61pM、小于60pM、小于55pM、小于50pM、小于45pM、小于40pM、小于39pM、小于38pM、小于37pM、小于36pM、小于35pM、小于34.8pM、小于34pM、小于33pM、小于32pM、小于31pM、小于30pM、小于25pM、小于24pM、小于23pM、小于22pM、小于21pM、小于21.5pM、小于20pM、小于19pM、小于18pM、小于17pM、小于16pM、小于15pM、小于14pM、小于13pM、小于12pM、小于11pM、或小于10pM。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体以约65pM至约20pM范围内、或小于20pM的半数最大有效浓度(EC_{50})降低CD33的细胞水平。可使用任何合适的方法(例如,在实施例1和实施例3中所描述的那些方法)来测量如与未施用CD33抗体的对应细胞相比降低细胞中的CD33的细胞水平的半数最大有效浓度(EC_{50})。

[0196] CD33的细胞水平可是指但不限于CD33的细胞表面水平、CD33的细胞内水平和CD33的总水平。在一些实施方案中,降低CD33的细胞水平包括降低CD33的细胞表面水平。如本文所用,如果抗CD33抗体诱导如通过本文所述的或本领域已知的任何体外基于细胞的测定或合适的体内模型(例如,利用测量CD33的细胞表面水平的流式细胞术,诸如荧光激活细胞分选术(FACS))所测量的CD33的细胞表面水平的21%或更多降低,则抗CD33抗体降低CD33的细胞表面水平。在一些实施方案中,降低CD33的细胞水平包括降低CD33的细胞内水平。如本文所用,如果抗CD33抗体诱导如通过本文所述的或本领域已知的任何体外基于细胞的测定或合适的体内模型(例如,免疫染色、蛋白质印迹分析、共免疫沉淀、以及细胞计数)所测量的CD33的细胞内水平的21%或更多降低,则抗CD33抗体降低CD33的细胞内水平。在一些实施方案中,降低CD33的细胞水平包括降低CD33的总水平。如本文所用,如果抗CD33抗体诱导如通过本文所述的或本领域已知的任何体外基于细胞的测定或合适的体内模型(例如,免疫染色、蛋白质印迹分析、共免疫沉淀、以及细胞计数)所测量的CD33的总水平的21%或更多降低,则抗CD33抗体降低CD33的总水平。在一些实施方案中,抗CD33抗体诱导CD33降解、CD33裂解、CD33内化、CD33脱落、和/或CD33表达的下调。在一些实施方案中,CD33的细胞水平利用体外细胞测定在原代细胞(例如,树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、以及巨噬细胞)上或细胞系上测量。

[0197] 在一些实施方案中,与抗CD33抗体不存在的情况下的CD33的细胞水平相比,本公开的抗CD33抗体使CD33的细胞水平降低至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、至少31%、至少32%、至少33%、至少34%、至少35%、至少36%、至少37%、至少38%、至少39%、至少40%、至少41%、至少42%、至少43%、至少44%、至少45%、至少46%、至少47%、至少48%、至少49%、至少50%、至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或更多。

[0198] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体以以 EC_{50} 降低体内CD33的细胞水平:小于40mg/kg、小于35mg/kg、小于30mg/kg、小于25mg/kg、小于20mg/kg、小于15mg/kg、小于10mg/kg、小于9.0mg/kg、小于8.0mg/kg、小于7.0mg/kg、小于6.0mg/kg、小于5.0mg/kg、小于

4.0mg/kg、小于3.0mg/kg、小于2.0mg/kg、小于1.9mg/kg、小于1.8mg/kg、小于1.6mg/kg、小于1.5mg/kg、小于1.4mg/kg、小于1.3mg/kg、小于1.2mg/kg、小于1.1mg/kg、或小于1.0mg/kg。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体以约8.0mg/kg至约2.0mg/kg范围内、或小于2.0mg/kg的 EC_{50} 降低体内CD33的细胞水平。可使用任何合适的方法(例如,在实施例1和实施例3中所描述的那些方法)来测量如与未施用CD33抗体的对应受试者相比降低受试者中(即,体内)的CD33的细胞水平的 EC_{50} 。在一些实施方案中,降低体内CD33的细胞水平的 EC_{50} 使用合适的啮齿动物(诸如大鼠或小鼠)来确定。在一些情况下,降低体内CD33的细胞水平的 EC_{50} 使用小鼠模型(诸如在实施例3中所描述的小鼠模型)来确定。

[0199] 可使用本文所述的或本领域已知的任何体外基于细胞的测定或合适的体内模型来测量CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)的抑制。在一些实施方案中,利用本文所述的或本领域已知的任何体外测定或基于细胞的培养物测定,在饱和抗体浓度(例如,67nM)下,本公开的抗CD33抗体使CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)抑制至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、至少31%、至少32%、至少33%、至少34%、至少35%、至少36%、至少37%、至少38%、至少39%、至少40%、至少41%、至少42%、至少43%、至少44%、至少45%、至少46%、至少47%、至少48%、至少49%、至少50%、至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或更多。

[0200] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体抑制CD33的细胞表面簇集。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体抑制CD33蛋白的一种或多种活性,所述活性包括但不限于抵消通过Src家族酪氨酸激酶(诸如LCK和FYN)进行的Tyr-340和Tyr-358的一种或多种磷酸化;募集并结合到酪氨酸特异性蛋白磷酸酶SHP1和SHP2;募集并结合到PLC- γ 1,其充当发动蛋白-1的鸟嘌呤核苷酸交换因子;募集并结合到包含SH2-结构域的蛋白质(例如,Crk1);募集并结合到脾酪氨酸激酶Syk;募集并结合到SH3-SH2-SH3生长因子受体结合蛋白2(Grb2);募集并结合到多种包含SH2的蛋白质;通过蛋白激酶C进行的Ser-307和Ser-342的磷酸化;调节单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞中以下一种或多种抗炎细胞因子的表达:IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IL-16、TGF- β 、IL-1Ra、G-CSF、以及TNF、IFN- β 1a、IFN- β 1b、或IL-6的可溶性受体;降低细胞内钙动员;调节单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞中以下一种或多种促炎细胞因子的表达:IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、CRP、IL-33、MCP-1、以及MIP-1- β ;调节一种或多种蛋白质的表达,所述蛋白质选自C1qa、C1qb、C1qc、C1s、C1r、C4、C2、C3、ITGB2、HMOX1、LAT2、CASP1、CSTA、VSIG4、MS4A4A、C3AR1、GPX1、TyroBP、ALOX5AP、ITGAM、SLC7A7、CD4、ITGAX、PYCARD、CD14、CD16、HLA-DR、以及CCR2;抑制细胞外信号调节激酶(ERK)磷酸化;降低多种细胞蛋白质上的酪氨酸磷酸化;调节C-C趋化因子受体7

(CCR7)的表达;抑制小神经胶质细胞向CCL19和CCL21表达细胞的趋化性;活化磷酸肌醇3-激酶;减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞和/或小神经胶质细胞的细胞生长;减少通过树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、M2小神经胶质细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、和/或M2巨噬细胞诱导的T细胞增殖;抑制破骨细胞产生、降低破骨细胞生成的速率、或两者;降低嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的存活;降低嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的增殖;抑制嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的迁移;降低嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的一种或多种功能;抑制嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的成熟;增加单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的细胞死亡和细胞凋亡;降低单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的吞噬活性;减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖;减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的总体功能性、含有ITAM的受体的磷酸化;介导ITAM信号传导的信号传导分子的磷酸化;减少模式识别受体的活化;减少Toll样受体的活化;减少细胞和蛋白质碎片的清除的损害相关的活化;CD33与其配体中的一种或多种之间的相互作用;CD33与共受体(诸如CD64)之间的相互作用;减少对选自以下的一种或多种类型的清除:凋亡神经元清除、神经组织碎片清除、功能失调的突触清除、非神经组织碎片清除、细菌或其他异物清除、致病性蛋白清除、以及肿瘤细胞清除;抑制对以下中的一种或多种的吞噬作用:凋亡神经元、神经组织碎片、功能失调突触、非神经组织碎片、细菌、其他异物、致病性蛋白、致病性肽、致病性核酸、致病性脂质、或肿瘤细胞;抑制对致病性核酸的清除,诸如所述致病性核酸的是反义GGCCCC(G2C4)重复序列扩增RNA;活化对选自以下的致病性蛋白的清除:淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑、淀粉样蛋白前体蛋白或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72(染色体9开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易小体、心房利钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白、免疫球蛋白轻链

AL、S-IBM蛋白、重复序列相关非ATG (RAN) 翻译产物、二肽重复序列 (DPR) 肽、甘氨酸-丙氨酸 (GA) 重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸 (GP) 重复序列肽、甘氨酸-精氨酸 (GR) 重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸 (PA) 重复序列肽、泛素、以及脯氨酸-精氨酸 (PR) 重复序列肽；抑制对选自以下的不同类型的癌症的有益免疫应答：膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、急性骨髓性白血病、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、以及甲状腺癌；抑制对选自以下的不同类型的神经病症的有益免疫应答：痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、特发性震颤、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、以及多发性硬化症；抑制对选自以下的不同类型的炎性和感染病症的有益免疫应答：狼疮、急性和慢性结肠炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、以及佩吉特氏骨病；结合到肿瘤细胞上的CD33配体；结合到以下细胞上的CD33配体：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、T细胞、嗜中性粒细胞、和/或巨噬细胞；抑制通过以下中的一种或多种进行的肿瘤细胞杀伤：小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞；抑制以下中的一种或多种的抗肿瘤细胞增殖活性：小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞；抑制以下中的一种或多种的抗肿瘤细胞转移活性：小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞；促进免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、或调节性T细胞；抑制一种或多种含有ITAM基序的受体，诸如TREM1、TREM2、FcγR、DAP10、以及DAP12；抑制一种或多种含有基序D/Ex0-2YxxL/IX6-8YxxL/I (SEQ ID NO:247) 的受体；抑制通过一种或多种模式识别受体 (PRR) 进行的信号传导，所述受体诸如识别病原体相关分子模式 (PAMP) 的受体和识别损害相关分子模式 (DAMP) 的受体；抑制通过一种或多种Toll样受体进行的信号传导；抑制JAK-STAT信号传导途径；抑制活化B细胞的核因子κ-轻链增强子 (NFκB)；抑制PLC γ /PKC/钙动员；抑制PI3K/Akt、Ras/MAPK信号传导；减少一种或多种炎性受体 (诸如CD86) 的表达，所述一种或多种炎性受体在以下中的一种或多种上表达：小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞；增加一种或多种CD33依赖性基因的表达；破坏的CD33依赖性基因表达的正常化；以及减少一种或多种ITAM依赖性基因的表达，诸如NFAT转录因子。

[0201] 在一些实施方案中，本公开的抗CD33抗体表现出CD33蛋白的一种或多种活性，所述活性包括但不限于增加肿瘤浸润CD3⁺ T细胞的数量；降低CD14⁺骨髓细胞中的CD33的细胞水平，所述CD14⁺骨髓细胞诸如肿瘤浸润CD14⁺骨髓细胞和存在于血液中的CD14⁺骨髓细胞；减少CD14⁺骨髓细胞的数量，所述CD14⁺骨髓细胞诸如肿瘤浸润CD14⁺骨髓细胞和存在于血液中的CD14⁺骨髓细胞；降低一种或多种细胞中的PD-L1水平，所述一种或多种细胞诸如骨髓来源的抑制细胞 (MDSC)；降低一种或多种细胞中的PD-L2水平，所述一种或多种细胞诸如骨

髓来源的抑制细胞 (MDSC) ;降低一种或多种细胞中的B7-H2水平,所述一种或多种细胞诸如骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) ;降低一种或多种细胞中的B7-H3水平,所述一种或多种细胞诸如骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) ;降低一种或多种细胞中的CD200R水平,所述一种或多种细胞诸如骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) ;降低一种或多种细胞中的CD163水平,所述一种或多种细胞诸如骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) ;降低一种或多种细胞中的CD206水平,所述一种或多种细胞诸如骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) ;降低实体瘤的肿瘤生长速率;减小肿瘤体积;增加一种或多种PD-1抑制剂的效力;增加一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法的效力,所述一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法诸如靶向以下中的一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法:CTL4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、LAG3、或其任何组合;增加一种或多种化疗剂的效力,任选地其中所述化疗剂中的一种或多种是吉西他滨、卡培他滨、蒽环类药物、多柔比星(Adriamycin[®])、表柔比星(Ellence[®])、紫杉烷类、紫杉醇(Taxol[®])、多西他赛(Taxotere[®])、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytosan[®])、卡铂(Paraplatin[®])、以及其任何组合;在骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) 存在下增加T细胞的增殖;抑制骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) 的分化、存活、和/或一种或多种功能;以及当偶联到化学毒素或放射性毒素时杀灭实体瘤和相关联的血管中的CD33表达免疫抑制非致瘤性骨髓细胞和/或非致瘤性CD14表达细胞。

[0202] 在一些实施方案中,所述抗CD33抗体抑制本公开的CD33蛋白与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合),所述一种或多种CD33配体包括但不限于在红细胞上表达的CD33配体、在细菌细胞上表达的CD33配体、在凋亡细胞上表达的CD33配体、在肿瘤细胞上表达的CD33配体、在病毒上表达的CD33配体、在树突细胞上表达的CD33配体、在神经细胞上表达的CD33配体、在神经胶质细胞上表达的CD33配体、在小神经胶质细胞上表达的CD33配体、在星形胶质细胞上表达的CD33配体、 β 淀粉样蛋白斑上的CD33配体、Tau缠结上的CD33配体、致病性蛋白上的CD33配体、致病性肽上的CD33配体、在巨噬细胞上表达的CD33配体、在自然杀伤细胞上表达的CD33配体、在T细胞上表达的CD33配体、在T辅助细胞上表达的CD33配体、在细胞毒性T细胞上表达的CD33配体、在B细胞上表达的CD33配体、在肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞上表达的CD33配体、在肿瘤包埋的免疫抑制巨噬细胞上表达的CD33配体、在骨髓来源的抑制细胞上表达的CD33配体、在调节性T细胞上表达的CD33配体、分泌粘蛋白、唾液酸、含有唾液酸的糖脂、含有唾液酸的糖蛋白、含有 α -2,6连接的唾液酸的糖脂、含有 α -2,6连接的唾液酸的糖蛋白、含有 α -2,3连接的唾液酸的糖脂、含有 α -2,3连接的唾液酸的糖蛋白、 α -1酸性糖蛋白(AGP)、CD24蛋白、以及神经节苷脂。

[0203] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体结合到本公开的在细胞表面上表达的CD33蛋白,并且裸抗体抑制CD33蛋白与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)。在一些实施方案中,本公开的结合到本发明的CD33蛋白的抗CD33抗体通过降低可用于与细胞表面上或细胞内的这些蛋白质相互作用的CD33的有效水平来抑制CD33蛋白与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)。在一些实施方案中,本公开的结合到本发明的CD33蛋白的抗CD33抗体通过诱导CD33的降解来抑制CD33蛋白与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)。

[0204] 本公开的其他方面涉及不显著降低CD33的细胞表面水平和/或不抑制CD33与一种

或多种CD33配体之间的相互作用的抗CD33抗体。

[0205] 如本文所用,利用本文所述的或本领域已知的任何体外基于细胞的测定或合适的体内模型,与抗CD33抗体不存在的情况下的CD33的细胞水平相比,如果抗CD33抗体使结合到CD33的配体降低小于20%,则抗CD33抗体不显著降低CD33的细胞表面水平。在一些实施方案中,与抗CD33抗体不存在的情况下的CD33的细胞水平相比,本公开的抗CD33抗体使CD33的细胞表面水平降低小于20%、小于19%、小于18%、小于17%、小于16%、小于15%、小于14%、小于13%、小于12%、小于11%、小于10%、小于9%、小于8%、小于7%、小于6%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%、或小于1%。

[0206] 如本文所用,利用本文所述的或本领域已知的任何体外测定或基于细胞的培养物测定,在饱和抗体浓度(例如,67nM)下,如果抗CD33抗体使结合到CD33的配体降低小于20%,则抗CD33抗体不抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)。在一些实施方案中,利用本文所述的或本领域已知的任何体外测定或基于细胞的培养物测定,在饱和抗体浓度(例如,67nM)下,本公开的抗CD33抗体使CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)抑制小于20%、小于19%、小于18%、小于17%、小于16%、小于15%、小于14%、小于13%、小于12%、小于11%、小于10%、小于9%、小于8%、小于7%、小于6%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%、或小于1%。

[0207] 如本文所用,CD33的水平可指编码CD33的基因的表达水平;指编码CD33的一种或多种转录物的表达水平;指CD33蛋白的表达水平;和/或指存在于细胞内和/或细胞表面上的CD33蛋白的量。可使用本领域已知的用于测量基因表达、转录、翻译的水平、和/或蛋白质丰度或定位的任何方法来确定CD33的水平。

[0208] 另外,本公开的抗CD33抗体可用于预防、降低风险、或治疗痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希一德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、和/或流感嗜血杆菌。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体可用于诱导或促进有需要的个体中的一种或多种免疫细胞的存活、成熟、功能性、迁移、或增殖;或用于降低有需要的个体中的以下各项的活性、功能性、或存活:调节性T细胞、肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞、肿瘤包埋的免疫抑制巨噬细胞、骨髓来

源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、急性骨髓性白血病 (AML) 细胞、慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 细胞、和/或慢性骨髓性白血病 (CML) 细胞。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体是单克隆抗体。

[0209] 在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体降低CD33的细胞水平(例如,细胞表面水平、细胞内水平和/或总水平)。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体诱导CD33的下调。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体诱导CD33的裂解。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体诱导CD33的内化。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体诱导CD33的脱落。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体诱导CD33的降解。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体诱导CD33的脱敏。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体充当瞬时活化CD33的配体模拟物。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体充当配体模拟物并且瞬时活化CD33,之后诱导CD33的细胞水平的降低和/或CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)的抑制。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体充当配体模拟物并且瞬时活化CD33,之后诱导CD33的降解。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体充当配体模拟物并且瞬时活化CD33,之后诱导CD33的裂解。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体充当配体模拟物并且瞬时活化CD33,之后诱导CD33的内化。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体充当配体模拟物并且瞬时活化CD33,之后诱导CD33的脱落。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体充当配体模拟物并且瞬时活化CD33,之后诱导CD33表达的下调。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体充当配体模拟物并且瞬时活化CD33,之后诱导CD33的脱敏。

[0210] 在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体是鼠抗体。在一些实施方案中,本公开的分离的抗CD33抗体是人抗体、人源化抗体、双特异性抗体、单克隆抗体、多价抗体、或嵌合抗体。此类抗体的示例性描述存在于整个本公开中。

[0211] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体结合到人CD33或其同源物,包括但不限于哺乳动物CD33蛋白、小鼠CD33蛋白 (NCBI登录号NP_001104528.1)、大鼠CD33蛋白 (NCBI登录号XP_008757645.1)、黑猩猩CD33蛋白 (NCBI登录号XP_512850.3)、恒河猴CD33蛋白 (NCBI登录号XP_001114616.2)、狗CD33蛋白 (NCBI登录号XP_005616306.1)、或牛CD33蛋白 (NCBI登录号XP_005219197.1)。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体特异性地结合到人CD33。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体特异性地结合到小鼠CD33。在一些实施方案中,本公开的抗CD33蛋白可特异性地结合到人CD33和小鼠CD33两者。

[0212] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体是激动剂抗体或拮抗剂抗体,其结合到本公开的在细胞表面上表达的CD33蛋白,并且在结合到表面表达的CD33蛋白之后调节(例如,诱导或抑制)本公开的一种或多种CD33活性。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体是惰性抗体。

[0213] 抗CD33抗体结合区

[0214] 本公开的某些方面提供结合到一种或多种氨基酸的抗CD33抗体,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基19-259、19-135、145-228、或229-259内;或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-259、19-135、145-228、或229-259的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基39-51内,或在CD33同源

物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基48-54内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基48-54的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基88-98内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基88-98的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基110-120内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基110-120的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基112-122内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基112-122的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基39-51、88-98和110-120内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和110-120的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基39-51、88-98和112-122内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和112-122的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基137-147内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基137-147的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的选自以下的一种或多种氨基酸残基:D18、P19、N20、F21、F44、P46、Y49、Y50、K52、以及N53,或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的选自以下的氨基酸残基的一种或多种氨基酸残基:D18、P19、N20、F21、F44、P46、Y49、Y50、K52、以及N53。

[0215] 本公开的其他方面提供抗CD33抗体,所述抗CD33抗体降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合),并且结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基19-228内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-228的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基39-51内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基48-54内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基48-54的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基88-98内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基88-98的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结

合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基110-120内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基110-120的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基112-122内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基112-122的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基39-51、88-98和110-120内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和110-120的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基39-51、88-98和112-122内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和112-122的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基137-147内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基137-147的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的选自以下的一种或多种氨基酸残基:D18、P19、N20、F21、F44、P46、Y49、Y50、K52、以及N53,或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的选自以下的氨基酸残基的一种或多种氨基酸残基:D18、P19、N20、F21、F44、P46、Y49、Y50、K52、以及N53。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的选自Y49、Y50和K52的一种或多种氨基酸残基,或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的选自Y49、Y50和K52的氨基酸残基的一种或多种氨基酸残基。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49和K52,或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49和K52的氨基酸残基。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49、Y50和K52,或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49、Y50和K52的氨基酸残基。

[0216] 本公开的其他方面提供抗CD33抗体,所述抗CD33抗体不显著降低CD33的细胞表面水平和/或不抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合),并且结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基19-259内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-259的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基39-51内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基48-54内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基48-54的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基88-98内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基88-98的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗

体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基110-120内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基110-120的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基112-122内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基112-122的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基39-51、88-98和110-120内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和110-120的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基39-51、88-98和112-122内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98和112-122的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到一种或多种氨基酸,所述一种或多种氨基酸在人CD33 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基137-147内,或在CD33同源物或直系同源物上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基137-147的氨基酸残基内。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体结合到SEQ ID NO:1的选自以下的一种或多种氨基酸残基:D18、P19、N20、F21、F44、P46、Y49、Y50、K52、以及N53,或结合到哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的选自以下的氨基酸残基的一种或多种氨基酸残基:D18、P19、N20、F21、F44、P46、Y49、Y50、K52、以及N53。

[0217] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体可结合构象表位。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体可结合不连续的CD33表位。在一些实施方案中,不连续的CD33表位包含两个或更多个肽、三个或更多个肽、四个或更多个肽、五个或更多个肽、六个或更多个肽、七个或更多个肽、八个或更多个肽、九个或更多个肽、或10个或更多个肽。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体可结合包含一个或多个肽的CD33表位。如本文所公开的,CD33表位可包含一个或多个肽,所述一个或多个肽包含五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、10个或更多个、11个或更多个、12个或更多个、13个或更多个、14个或更多个、15个或更多个、16个或更多个、17个或更多个、18个或更多个、19个或更多个、或20个或更多个SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸残基,或五个或更多个、六个或更多个、七个或更多个、八个或更多个、九个或更多个、10个或更多个、11个或更多个、12个或更多个、13个或更多个、14个或更多个、15个或更多个、16个或更多个、17个或更多个、18个或更多个、19个或更多个、或20个或更多个在哺乳动物CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸序列的氨基酸残基。

[0218] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体竞争性地抑制选自在表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出的任一种抗体中的至少一种抗体的结合。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体竞争性地抑制选自以下的至少一种抗体的结合:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。在一些实施方案中,与本公开的抗CD33抗体不存在的情况下与CD33的结合相比,当所述抗CD33抗体使选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b和6C7.2、以及其任何组合中

的一种或多种抗体与CD33的结合减少约50%至约100%范围内的量时,所述抗CD33抗体与选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b和6C7.2、以及其任何组合中的一种或多种抗体竞争结合到CD33。在一些实施方案中,与本公开的抗CD33抗体不存在的情况下与CD33的结合相比,当所述抗CD33抗体使选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b和6C7.2、以及其任何组合中的一种或多种抗体与CD33的结合减少至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或至少100%时,所述抗CD33抗体与选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b和6C7.2、以及其任何组合中的一种或多种抗体竞争结合到CD33。在一些实施方案中,本公开的使选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b和6C7.2、以及其任何组合中的一种或多种抗体与CD33的结合减少100%的抗CD33抗体指示所述抗CD33抗体基本上完全阻断选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b和6C7.2、以及其任何组合中的一种或多种抗体与CD33的结合。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体和选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b和6C7.2、以及其任何组合中的一种或多种抗体以对应于抗CD33抗体与选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b和6C7.2、以及其任何组合中的一种或多种抗体的以下比率的量存在:10:1比率、9:1比率、8:1比率、7:1比率、6:1比率、5:1比率、4:1比率、3:1比率、2:1比率、1:1比率、0.75:1比率、0.5:1比率、0.25:1比率、0.1:1比率、0.075:1比率、0.050:1比率、0.025:1比率、0.01:1比率、0.0075:比率、0.0050:1比率、0.0025:1比率、0.001:比率、0.00075:1比率、0.00050:1比率、0.00025:1比率、0.0001:比率、1:10比率、1:9比率、1:8比率、1:7比率、1:6比率、1:5比率、1:4比率、1:3比率、1:2比率、1:0.75比率、1:0.5比率、1:0.25比率、1:0.1比率、1:0.075比率、1:0.050比率、1:0.025比率、1:0.01比率、1:0.0075比率、1:0.0050比率、1:0.0025比率、1:0.001比率、1:0.00075比率、1:0.00050比率、1:0.00025比率、或1:0.0001比率。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体以与选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b和6C7.2、以及其任何组合中的一种或多种抗体的量相比约1.5倍至100倍范围内、或大于100倍的量过量存在。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体以与选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b和6C7.2、以及其任何组合中的一种或多种抗体的量相比以下倍数的量过量存在:约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、或100倍。

[0219] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体结合到与选自在表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出的任一种抗体中的至少一种抗体所结合的CD33表位相同或重叠的人CD33的表位。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体结合到与选自以下的至少一种抗体所结合的CD33表位相同或重叠的人CD33的表位:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。

[0220] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体结合选自在表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出的任一种抗体中的至少一种抗体所结合的基本上相同的CD33表位。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体结合选自以下的至少一种抗体所结合的基本上相同的CD33表位:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及

6C7.2。用于对抗体结合的表位进行作图的详细示例性方法提供在Morris (1996) “Epitope Mapping Protocols,”在Methods in Molecular Biology第66卷 (Humana Press,Totowa, NJ) 中。

[0221] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体与选自以下的一种或多种抗体竞争结合到CD33:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、6C7.2、以及其任何组合。

[0222] 可利用本领域已知的任何合适的竞争测定或CD33结合测定(诸如BIAcore分析、ELISA测定、或流式细胞术)来确定抗CD33抗体是否与选自以下的一种或多种抗体竞争结合到CD33:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、6C7.2、以及其任何组合。在示例性竞争测定中,在包含结合到CD33(例如,人或非人灵长类)的第一标记抗体和测试其与第一抗体竞争结合到CD33的能力的第二未标记抗体的溶液中孵育固定的CD33或在细胞表面上表达CD33的细胞。第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照,在包含第一标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中孵育固定的CD33或表达CD33的细胞。在容许第一抗体结合到CD33的条件下孵育之后,去除过量未结合抗体,并且测量与固定的CD33或表达CD33的细胞缔合的标记的量。如果相对于对照样品,与固定的CD33或表达CD33的细胞缔合的标记的量在测试样品中基本上降低,则这指示第二抗体与第一抗体竞争结合到CD33。参见,Harlow和Lane (1988) Antibodies:A Laboratory Manual第14章 (Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。在一些实施方案中,所利用的竞争测定是在实施例2和实施例4中所描述的竞争测定中的一种或多种。

[0223] 抗CD33抗体轻链可变区和重链可变区

[0224] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体包含:(a)轻链可变区,其包含选自抗体中的任一种的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3的至少一个、两个、或三个HVR,所述抗体在表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出或选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、6C7.2、以及其任何组合;和/或(b)重链可变区,其包含选自抗体中的任一种的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3的至少一个、两个、或三个HVR,所述抗体在表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出或选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、6C7.2、以及其任何组合。在一些实施方案中,HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、以及HVR-H3包含如表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中示出的或来自选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、6C7.2、以及其任何组合的抗体的EU或Kabat CDR、Chothia CDR、或接触CDR序列。

[0225] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体包含选自以下的至少一个、两个、三个、四个、五个、或六个HVR:(i)HVR-L1,其包含表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出的或来自选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2的抗体的HVR-L1序列中的任一个的氨基酸序列;(ii)HVR-L2,其包含表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出的或来自选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2的抗体的HVR-L2序列中的任一个的氨基酸序列;(iii)HVR-L3,其包含表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出的或来自选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2的抗体的HVR-L3序列中的任一个的氨基酸序列;(iv)HVR-H1,其包含表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中

列出的或来自选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2的抗体的HVR-H1序列中的任一个的氨基酸序列；(v) HVR-H2，其包含表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出的或来自选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2的抗体的HVR-H2序列中的任一个的氨基酸序列；以及(vi) HVR-H3，其包含表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出的或来自选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2的抗体的HVR-H3序列中的任一个的氨基酸序列。

[0226] 在一些实施方案中，本公开的抗CD33抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域，其中所述轻链可变结构域包含以下中的一个或多个：(a) HVR-L1，其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:184、以及SEQ ID NO:228，或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列：SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:184、以及SEQ ID NO:228；(b) HVR-L2，其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：SEQ ID NO:2-14、SEQ ID NO:69-71、SEQ ID NO:185、以及SEQ ID NO:229，或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列：SEQ ID NO:2-14、SEQ ID NO:69-71、SEQ ID NO:185、以及SEQ ID NO:229；以及(c) HVR-L3，其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：SEQ ID NO:15-17、SEQ ID NO:72-74和SEQ ID NO:230，或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列：SEQ ID NO:15-17、SEQ ID NO:72-74和SEQ ID NO:230；并且/或者其中所述重链可变结构域包含以下中的一个或多个：(a) HVR-H1，其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：SEQ ID NO:18-21、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:231、以及SEQ ID NO:232，或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列：SEQ ID NO:18-21、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:231、以及SEQ ID NO:232；(b) HVR-H2，其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：SEQ ID NO:22-25、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:186、以及SEQ ID NO:233，或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列：SEQ ID NO:22-25、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:186、以及SEQ ID NO:233；以及(c) HVR-H3，其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列：SEQ ID NO:26-29和SEQ ID NO:187，或包含与选自由以下组成的组的氨基酸序列具有至少约90%同源性的氨基酸序列：SEQ ID NO:26-29和SEQ ID NO:187。

[0227] 在一些实施方案中，本公开的抗CD33抗体本公开的抗体包含轻链可变结构域和重链可变结构域，其中：(a) HVR-L1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列，HVR-L2包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列，HVR-L3包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列，HVR-H1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列，HVR-H2包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列，并且HVR-H3包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列；(b) HVR-L1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列，HVR-L2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列，HVR-L3包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列，HVR-H1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列，HVR-H2包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列，并且HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列；(c) HVR-L1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列，HVR-L2包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列，HVR-L3包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列，HVR-H1包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列，HVR-H2包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列，并且HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列；(d) HVR-L1包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列，HVR-L2包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列，HVR-L3包含SEQ ID NO:17的

氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;(e) HVR-L1包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列;(f) HVR-L1包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(g) HVR-L1包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(h) HVR-H1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(i) HVR-H1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;(j) HVR-L1包含SEQ ID NO:184的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:185的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:186的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:187的氨基酸序列;(k) HVR-L1包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:231的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;或者(l) HVR-L1包含SEQ ID NO:228的氨基酸序列,HVR-L2包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列,HVR-L3包含SEQ ID NO:230的氨基酸序列,HVR-H1包含SEQ ID NO:232的氨基酸序列,HVR-H2包含SEQ ID NO:233的氨基酸序列,并且HVR-H3包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0228] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体包含在表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出的或选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2的抗体中的任一种的轻链可变区;和/或在表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出的或选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2的抗体中的任一种的重链可变区。在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体包含:轻链可变区,其包含选自以下中的任一个的氨基酸序列:SEQ ID NO:30-48、SEQ ID NO:112-153、SEQ ID NO:192-202、以及SEQ ID NO:241-243;和/或重链可变结构域,其包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:49-66、SEQ ID NO:154-183、SEQ ID NO:203-213、以及SEQ ID NO:244-246。

[0229] 本公开的抗体中的任一种可由细胞系产生。在一些实施方案中,所述细胞系可以是哺乳动物细胞系。在某些实施方案中,所述细胞系可以是杂交瘤细胞系。在其他实施方案中,所述细胞系可以是酵母细胞系。可使用适于抗体产生的本领域已知的任何细胞系来产生本公开的抗体。用于抗体产生的示例性细胞系在整个本公开中进行描述。

[0230] 在一些实施方案中,所述抗CD33抗体是选自以下的抗CD33单克隆抗体:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。在某些实施方案中,所述抗CD33抗体是拮抗剂抗体。在某些实施方案中,所述抗CD33抗体是激动剂抗体或惰性抗体。

[0231] 抗CD33抗体结合亲和力

[0232] 抗CD33抗体对于人CD33、小鼠CD33、或两者的解离常数 (K_D) 可小于100nM、小于90nM、小于80nM、小于70nM、小于60nM、小于50nM、小于40nM、小于30nM、小于20nM、小于10nM、小于9nM、小于8nM、小于7nM、小于6nM、小于5nM、小于4nM、小于3nM、小于2nM、小于1nM、小于0.9nM、小于0.8nM、小于0.7nM、小于0.6nM、小于0.5nM、小于0.4nM、小于0.3nM、小于0.2nM、小于0.19nM、小于0.18nM、小于0.17nM、小于0.16nM、小于0.15nM、小于0.14nM、小于0.13nM、小于0.12nM、小于0.11nM、小于0.1nM、小于0.05nM、小于0.01nM、或小于0.005nM。在一些实施方案中,所述抗体对于人CD33、小鼠CD33、或两者具有约100nM至约100pM范围内、或小于100pM(即,0.1nM)的解离常数 (K_D)。在一些实施方案中,所述抗体对于人CD33、小鼠CD33、或两者具有约10nM至约500pM范围内、或小于500pM(即,0.5nM)的解离常数 (K_D)。

[0233] 抗CD33抗体对于人CD33和小鼠CD33的解离常数 (K_D) 可小于100nM、小于90nM、小于80nM、小于70nM、小于60nM、小于50nM、小于40nM、小于30nM、小于20nM、小于10nM、小于9nM、小于8nM、小于7nM、小于6nM、小于5nM、小于4nM、小于3nM、小于2nM、小于1nM、小于0.9nM、小于0.8nM、小于0.7nM、小于0.6nM、小于0.5nM、小于0.4nM、小于0.3nM、小于0.2nM、小于0.1nM、小于0.05nM、小于0.01nM、或小于0.005nM。在一些实施方案中,抗CD33抗体对于人CD33蛋白的解离常数在约100nM至约100pM范围内、或小于100pM(即,0.1nM)。在一些实施方案中,抗CD33抗体对于人CD33蛋白的解离常数在约10nM至约500pM范围内、或小于500pM(即,0.5nM)。在一些实施方案中,抗CD33抗体对于小鼠CD33蛋白的解离常数在约100nM至约100pM范围内、或小于100pM(即,0.1nM)。在一些实施方案中,对于CD33的解离常数 (K_D) 在大约25℃的温度下确定。在一些实施方案中, K_D 使用单价抗体(例如,Fab)或呈单价形式的全长抗体来确定。

[0234] 抗CD33抗体对于人CD33和/或小鼠CD33的解离常数 (K_D) 可小于500pM、小于450pM、小于400pM、小于350pM、小于300pM、小于250pM、小于200pM、小于175pM、小于150pM、小于145pM、小于140pM、小于135pM、小于130pM、小于125pM、小于120pM、小于115pM、小于110pM、小于100pM、小于90pM、小于80pM、小于70pM、小于60pM、小于50pM、小于40pM、小于30pM、小于20pM、或小于10pM。在一些实施方案中,抗CD33抗体对于人CD33蛋白的解离常数在约300pM至约10pM范围内、或小于10pM。在一些实施方案中,抗CD33抗体对于人CD33蛋白的解离常数是约300pM或更小。解离常数可通过任何分析技术来确定,所述分析技术包括任何生物化学或生物物理技术,诸如ELISA、表面等离子共振 (SPR)、生物膜干涉测量法(参见,例如, ForteBio的Octet系统)、等温滴定量热法 (ITC)、差示扫描量热法 (DSC)、圆二色性 (CD)、停流分析、以及比色或荧光蛋白熔解分析。在一些实施方案中,对于CD33的解离常数 (K_D) 在大约25℃的温度下确定。在一些实施方案中, K_D 使用单价抗体(例如,Fab)或全长抗体来确定。在一些实施方案中, K_D 使用呈单价形式的全长抗体来确定。利用例如如本文所述的表面等离子共振测定(参见,例如,实施例1)。

[0235] 额外的抗CD33抗体(例如,特异性地结合到本公开的CD33蛋白的抗体)可通过本领域已知的各种测定针对其物理/化学特性和/或生物活性来鉴定、筛选、和/或表征。

[0236] 能够结合Fc γ 受体的抗CD33抗体

[0237] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体保持结合Fc γ 受体的能力。在一些实施方案中,当此类抗体具有与受体活化相容的正确表位特异性时,所述抗体可具有能够使其

簇集并且瞬时刺激例如CD33受体的特征。在一些实施方案中,此类抗体可随后通过诱导CD33降解、CD33脱敏、CD33裂解、CD33内化、CD33脱落、CD33表达的下调、和/或CD33的溶酶体降解而充当CD33表达和/或CD33蛋白的一种或多种活性的长期抑制剂。

[0238] 在体内,本公开的抗CD33抗体可通过多种潜在机制中的任一种或多种来使受体簇集并且瞬时活化CD33。人抗体的一些同种型(诸如IgG2)由于其独特的结构而具有使受体簇集、或使受体保持在簇集构型中、从而瞬时活化受体(诸如CD33)而不结合到Fc受体的固有能力(例如,White等人,(2015) *Cancer Cell* 27,138-148)。

[0239] 在一些实施方案中,其他抗体可通过结合到相邻细胞上的Fcγ受体而使受体(例如,CD33)簇集。在一些实施方案中,抗体的恒定IgG Fc区与Fcγ受体的结合可引起抗体的聚集,并且抗体进而可使所述抗体通过其可变区所结合到的受体聚集(Chu等人(2008) *Mol Immunol*,45:3926-3933;以及Wilson等人,(2011) *Cancer Cell* 19,101-113)。在一些实施方案中,与不引发细胞因子分泌、氧化爆发、吞噬作用增加、以及抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)增强的抑制性Fcγ受体FcγR(FcγRIIB)的结合是使抗体在体内簇集的优选方式,因为与FcγRIIB的结合与不利的免疫应答作用不相关。

[0240] 存在本公开的抗CD33抗体可通过其使受体簇集的其他机制。例如,交联在一起的抗体片段(例如,Fab片段)可用于以与如上所述的结合Fcγ受体的具有Fc区的抗体类似的方式使受体(例如,CD33)簇集。在一些实施方案中,如果交联的抗体片段(例如,Fab片段)诱导受体在细胞表面上簇集并且结合靶标(例如,CD33)上的适当表位,则所述交联的抗体片段可瞬时充当激动剂抗体。

[0241] 因此,在一些实施方案中,本公开的结合CD33蛋白的抗体可包括激动剂抗体,所述激动剂抗体由于其表位特异性而结合CD33并且瞬时活化一种或多种CD33活性,之后所述激动剂抗体例如降低CD33的细胞水平、抑制一种或多种CD33活性、和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)。在一些实施方案中,此类抗体可结合到CD33上的配体结合位点并且瞬时模拟天然配体的作用、或通过结合到不是配体结合位点的一个或多个结构域来刺激靶标抗原转导信号。在一些实施方案中,此类抗体不干扰配体结合。在一些实施方案中,无论抗体结合或不结合到CD33上的配体结合位点,所述抗体均可随后通过诱导CD33降解、CD33脱敏、CD33裂解、CD33内化、CD33脱落、CD33表达的下调、和/或CD33的溶酶体降解而充当CD33表达和/或CD33蛋白的一种或多种活性的长期抑制剂。

[0242] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体是瞬时诱导CD33蛋白的一种或多种活性的瞬时激动剂抗体。在一些实施方案中,所述抗体在结合到细胞中表达的CD33蛋白之后瞬时诱导一种或多种活性。在一些实施方案中,所述CD33蛋白在细胞表面上表达。在一些实施方案中,CD33蛋白的通过本公开的瞬时激动剂抗CD33抗体瞬时诱导的一种或多种活性可包括但不限于通过Src家族酪氨酸激酶(诸如LCK和FYN)进行的Tyr-340和Tyr-358的磷酸化;募集并结合到酪氨酸特异性蛋白磷酸酶SHP1和SHP2;募集并结合到PLC-γ1,其充当发动蛋白-1的鸟嘌呤核苷酸交换因子;募集并结合到包含SH2-结构域的蛋白质(例如,Crk1);募集并结合到脾酪氨酸激酶Syk;募集并结合到SH3-SH2-SH3生长因子受体结合蛋白2(Grb2);募集并结合到多种包含SH2的蛋白质;通过蛋白激酶C进行的Ser-307和Ser-342的磷酸化;调节单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞中以下一种或多种抗炎细胞因子的表达:IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IL-16、TGF-β、IL-1Ra、G-CSF、以及

TNF、IFN- β 1a、IFN- β 1b、或IL-6的可溶性受体；降低细胞内钙动员；调节单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞中以下一种或多种促炎细胞因子的表达：IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、CRP、IL-33、MCP-1、以及MIP-1- β ；调节一种或多种蛋白质的表达，所述蛋白质选自C1qa、C1qb、C1qc、C1s、C1R、C4、C2、C3、ITGB2、HMOX1、LAT2、CASP1、CSTA、VSIG4、MS4A4A、C3AR1、GPX1、TyroBP、ALOX5AP、ITGAM、SLC7A7、CD4、ITGAX、PYCARD、CD14、CD16、HLA-DR、以及CCR2；抑制细胞外信号调节激酶(ERK)磷酸化；降低多种细胞蛋白质上的酪氨酸磷酸化；调节C-C趋化因子受体7(CCR7)的表达；抑制小神经胶质细胞向CCL19和CCL21表达细胞的趋化性；活化磷酸肌醇3-激酶；减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞和/或小神经胶质细胞的细胞生长；减少通过树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、M2小神经胶质细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、和/或M2巨噬细胞诱导的T细胞增殖；抑制破骨细胞产生、降低破骨细胞生成的速率、或两者；降低嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的存活；降低嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的增殖；抑制嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的迁移；降低嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的一种或多种功能；抑制嗜中性粒细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、巨噬细胞、M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞、M2巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、小神经胶质细胞、M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞、和/或M2小神经胶质细胞的成熟；增加单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的细胞死亡和细胞凋亡；降低单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的吞噬活性；减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖；减少单核细胞、巨噬细胞、T细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的总体功能性、含有ITAM的受体的磷酸化；介导ITAM信号传导的信号传导分子的磷酸化；减少模式识别受体的活化；减少To11样受体的活化；减少细胞和蛋白质碎片的清除的损害相关的活化；CD33与其配体中的一种或多种之间的相互作用；CD33与共受体(诸如CD64)之间的相互作用；减少对选自以下的一种或多种类型的清除：凋亡神经元清除、功能失调的突触清除、神经组织碎片清除、非神经组织碎片清除、细菌或其他异物清除、致病性蛋白清除、以及肿瘤细胞清除；抑制对以下中的一种或多种的吞噬作用：凋亡神经元、神经组织碎片、非神经组织碎片、细菌、其他异物、致病性蛋白、致病性肽、致病性核

酸、致病性脂质、或肿瘤细胞；抑制对致病性核酸的清除，诸如所述致病性核酸的是反义GGCCCC (G2C4) 重复序列扩增RNA；活化对选自以下的致病性蛋白的清除：淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑、淀粉样蛋白前体蛋白或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72 (染色体9开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易小体、心房利钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关非ATG (RAN) 翻译产物、二肽重复序列 (DPR) 肽、甘氨酸-丙氨酸 (GA) 重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸 (GP) 重复序列肽、甘氨酸-精氨酸 (GR) 重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸 (PA) 重复序列肽、泛素、以及脯氨酸-精氨酸 (PR) 重复序列肽；抑制对选自以下的不同类型的癌症的有益免疫应答：膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、急性骨髓性白血病、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、以及甲状腺癌；抑制对选自以下的不同类型的神经病症的有益免疫应答：痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、特发性震颤、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希一德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、以及多发性硬化症；抑制对选自以下的不同类型的炎性和感染病症的有益免疫应答：狼疮、急性和慢性结肠炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、以及佩吉特氏骨病；抑制对以下中的一种或多种的吞噬作用：凋亡神经元、神经组织碎片、功能失调的突触、非神经组织碎片、细菌、其他异物、致病性蛋白、致病性肽、致病性核酸、致病性脂质、或肿瘤细胞，其中所述致病性核酸的可以是反义GGCCCC (G2C4) 重复序列扩增RNA，所述致病性蛋白可包括淀粉样蛋白 β 、寡聚淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑、淀粉样蛋白前体蛋白或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72 (染色体9开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易小体、心房利钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关非ATG (RAN) 翻译产物、二肽重复序列 (DPR) 肽、甘氨酸-丙氨酸 (GA) 重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸 (GP) 重复序列肽、甘氨酸-精氨酸 (GR) 重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸 (PA) 重复序列肽、泛素、以及脯氨酸-精氨酸 (PR) 重复序列肽，并且所述肿瘤细胞可形成选自以下的癌症：膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、或甲状腺癌；结合到肿瘤细胞上的CD33配体；结合到以下细胞上的CD33配体：树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、T细胞、嗜中性粒细胞、和/或巨噬细胞；抑制通过

以下中的一种或多种进行的肿瘤细胞杀伤:小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞;抑制以下中的一种或多种的抗肿瘤细胞增殖活性:小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞;抑制以下中的一种或多种的抗肿瘤细胞转移活性:小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞;促进免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、或调节性T细胞;抑制一种或多种含有ITAM基序的受体,诸如TREM1、TREM2、FcγR、DAP10、以及DAP12;抑制一种或多种含有基序D/Ex0-2YxxL/IX6-8YxxL/I (SEQ ID NO:247)的受体;抑制通过一种或多种模式识别受体 (PRR) 进行的信号传导,所述受体诸如识别病原体相关分子模式 (PAMP) 的受体和识别损害相关分子模式 (DAMP) 的受体;抑制通过一种或多种Toll样受体进行的信号传导;抑制JAK-STAT信号传导途径;抑制活化B细胞的核因子κ-轻链增强子 (NFκB);抑制PLC γ /PKC/钙动员;抑制PI3K/Akt、Ras/MAPK信号传导;调节一种或多种炎性受体 (诸如CD86) 的表达,所述一种或多种炎性受体在以下中的一种或多种上表达:小神经胶质细胞、巨噬细胞、树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、或细胞毒性T细胞;增加一种或多种CD33依赖性基因的表达;破坏的CD33依赖性基因表达的正常化;以及减少一种或多种ITAM依赖性基因的表达,诸如NFAT转录因子。本公开的抗CD33抗体可利用本领域已知的和本文所公开的任何合适的技术或测定法针对其瞬时诱导CD33蛋白的一种或多种活性来进行测试。无论此类抗体瞬时诱导的活性如何,此类抗体可随后通过诱导CD33降解、CD33脱敏、CD33裂解、CD33内化、CD33脱落、CD33表达的下调、和/或CD33的溶酶体降解而充当CD33表达和/或CD33蛋白的一种或多种活性的长期抑制剂。在一些实施方案中,所述CD33抗体独立于结合到Fc受体而瞬时诱导CD33蛋白的一种或多种活性。

[0243] 示例性抗体Fc同种型和修饰提供在以下表C中。在一些实施方案中,本公开的能够结合Fc γ 受体的抗CD33抗体具有在以下表C中列出的Fc同种型。

[0244] 表C:能够结合Fc γ 受体的示例性抗CD33抗体Fc同种型

[0245]

Fc 同种型	突变(EU 编号方案)
IgG1	N297A
IgG1	D265A 和 N297A
IgG1	L234A 和 L235A L234A 和 G237A L234A 和 L235A 和 G237A
IgG1	D270A、和/或 P238D、和/或 L328E、和/或 E233D、和/或 G237D 和/或 H268D、和/或 P271G、和/或 A330R
IgG2	V234A 和 G237A
IgG4	L235A 和 G237A 和 E318A
IgG4	S228P 和 L236E
IgG2/4 杂合体	IgG2 aa 118 至 260 和 IgG4 aa 261 至 447 H268Q 和 V309L; 以及 A330S 和 P331S
IgG1	C226S 和 C229S 和 E233P 和 L234V 和 L235A
IgG1	L234F 和 L235E 和 P331S
IgG2	C232S 或 C233S
IgG2	A330S 和 P331S
IgG1	S267E 和 L328F 单独的 S267E
IgG2	S267E 和 L328F
IgG4	S267E 和 L328F
IgG2	具有 κ (轻链)LC 的 WT HC 具有 κ LC 的 HC C127S κ LC C214S κ LC C214S 和 HC C233S κ LC C214S 和 HC C232S 以上所列突变以及 P330S 和 P331S 突变中的任 一种

Fc 同种型	突变(EU 编号方案)
	WT IgG1 的 F(ab') ₂ 片段和以上列出的突变中的任一种
IgG1	用 IgG2 的 CH1 和铰链区取代 IgG1 的恒定重 1 (CH1)和铰链区 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDPHKPS NTKVDKTVR KCCVECPPCP (SEQ ID NO:214) 具有 κ LC
IgG1	以上所列突变中的任一种以及 A330L 和/或 L234F 和/或 L235E 和/或 P331S
IgG1、IgG2 或 IgG4	以上所列突变中的任一种以及 M252Y 和/或 S254T 和/或 T256E
小鼠 IgG1	针对小鼠疾病模型
IgG4	WT

[0247] 除表C中所描述的同种型之外并且不希望受到理论限制,认为结合人中的Fcγ受体 I、IIA、IIC、IIIA、IIIB和/或小鼠中的Fcγ受体I、III和IV的具有人IgG1或IgG3同种型及其突变体(例如,Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 2009,20:685-691)的抗体也可充当瞬时激动剂抗体。

[0248] 在一些实施方案中,Fcγ受体结合抗体属于IgG类别、IgM类别、或IgA类别。在一些实施方案中,Fcγ受体结合抗体具有IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4同种型。

[0249] 在一些实施方案中,Fcγ受体结合抗体具有IgG2同种型。在一些实施方案中,Fcγ受体结合抗体包含人IgG2恒定区。在一些实施方案中,人IgG2恒定区包括Fc区。在一些实施方案中,Fcγ受体结合抗体结合抑制性Fc受体。在某些实施方案中,抑制性Fc受体是抑制性Fc-γ受体IIB(Fcγ IIB)。在一些实施方案中,所述Fc区含有一个或多个修饰。例如,在一些实施方案中,所述Fc区含有一个或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自V234A (Alegre等人,(1994) Transplantation 57:1537-1543.31;Xu等人,(2000) Cell Immunol,200:16-26)、G237A (Cole等人(1999) Transplantation,68:563-571)、H268Q、V309L、A330S、P331S (US 2007/0148167;Armour等人(1999) Eur J Immunol29:2613-2624;Armour等人(2000) The Haematology Journal1 (Suppl.1):27;Armour等人(2000) The Haematology Journal 1 (Suppl.1):27)、C232S、和/或C233S (White等人(2015) Cancer Cell 27,138-148)、S267E、L328F (Chu等人,(2008) Mol Immunol,45:3926-3933)、M252Y、S254T、和/或T256E,其中氨基酸位置根据EU或Kabat编号规定而定。

[0250] 在一些实施方案中,Fcγ受体结合抗体具有IgG2同种型,所述IgG2同种型具有含有C127S氨基酸取代的重链恒定结构域,其中氨基酸位置根据EU或Kabat编号规定而定(White等人,(2015) Cancer Cell 27,138-148;Lightle等人,(2010) PROTEIN SCIENCE 19:

753-762;以及W02008079246)。

[0251] 在一些实施方案中,Fc γ 受体结合抗体具有IgG2同种型,所述IgG2同种型具有含有C214S氨基酸取代的 κ 轻链恒定结构域,其中氨基酸位置根据EU或Kabat编号规定而定(White等人,(2015)Cancer Cell 27,138-148;Lightle等人,(2010)PROTEIN SCIENCE 19:753-762;以及W02008079246)。

[0252] 在某些实施方案中,Fc γ 受体结合抗体具有IgG1同种型。在一些实施方案中,Fc γ 受体结合抗体包含小鼠IgG1恒定区。在一些实施方案中,Fc γ 受体结合抗体包含人IgG1恒定区。在一些实施方案中,人IgG1恒定区包括Fc区。在一些实施方案中,Fc γ 受体结合抗体结合抑制性Fc受体。在某些实施方案中,抑制性Fc受体是抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ IIB)。在一些实施方案中,所述Fc区含有一个或多个修饰。例如,在一些实施方案中,Fc区含有一个或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自N297A(Bolt S等人(1993)Eur J Immunol 23:403-411)、D265A(Shields等人(2001)R.J.Biol.Chem.276,6591-6604)、D270A、L234A、L235A(Hutchins等人(1995)Proc Natl Acad Sci USA,92:11980-11984;Alegre等人,(1994)Transplantation57:1537-1543.31;Xu等人,(2000)Cell Immunol,200:16-26)、G237A(Alegre等人(1994)Transplantation 57:1537-1543.31;Xu等人(2000)Cell Immunol,200:16-26)、P238D、L328E、E233D、G237D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、L234V、L234F、L235E(McEarchern等人,(2007)Blood,109:1185-1192)、P331S(Sazinsky等人,(2008)Proc Natl Acad Sci USA 2008,105:20167-20172)、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、和/或T394D,其中氨基酸位置根据EU或Kabat编号规定而定。

[0253] 在一些实施方案中,所述抗体包含IgG2同种型重链恒定结构域1(CH1)和铰链区(White等人,(2015)Cancer Cell 27,138-148)。在某些实施方案中,IgG2同种型CH1和铰链区包含以下氨基酸序列:ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPEP(SEQ ID NO:214)。在一些实施方案中,抗体Fc区含有S267E氨基酸取代、L328F氨基酸取代、或两者、和/或N297A或N297Q氨基酸取代,其中氨基酸位置根据EU或Kabat编号规定而定。

[0254] 在某些实施方案中,Fc γ 受体结合抗体具有IgG4同种型。在一些实施方案中,Fc γ 受体结合抗体包含人IgG4恒定区。在一些实施方案中,人IgG4恒定区包括Fc区。在一些实施方案中,Fc γ 受体结合抗体结合抑制性Fc受体。在某些实施方案中,抑制性Fc受体是抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ IIB)。在一些实施方案中,所述Fc区含有一个或多个修饰。例如,在一些实施方案中,Fc区含有一个或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自L235A、G237A、S228P、L236E(Reddy等人,(2000)J Immunol,164:1925-1933)、S267E、E318A、L328F、M252Y、S254T、和/或T256E,其中氨基酸位置根据EU或Kabat编号规定而定。

[0255] 在某些实施方案中,Fc γ 受体结合抗体具有杂合IgG2/4同种型。在一些实施方案中,Fc γ 受体结合抗体包含含有人IgG2的根据EU或Kabat编号的氨基酸118至260和人IgG4的根据EU或Kabat编号的氨基酸261-447的氨基酸序列(WO 1997/11971;WO 2007/106585)。

[0256] 在某些实施方案中,所述抗体包含小鼠IgG4恒定区(Bartholomaeus等人(2014)

.J.Immunol.192,2091-2098)。

[0257] 在一些实施方案中,所述Fc区还含有选自以下组成的组的一个或多个额外的氨基酸取代:根据EU或Kabat编号的A330L、L234F;L235E、或P331S;以及其任何组合。

[0258] 惰性抗体

[0259] 本公开的抗CD33抗体的另一种类别是惰性抗体。如本文所用,“惰性”抗体是指特异性地结合其靶标抗原(例如,CD33)但是不调节(例如,降低/抑制或活化/诱导)抗原功能的抗体。例如,在CD33的情况下,惰性抗体不调节CD33的细胞水平,不调节CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合),或者不调节CD33蛋白的一种或多种活性。在一些实施方案中,不具有使CD33在细胞表面上簇集的能力的抗体可以是惰性抗体,即使其具有与受体活化相容的表位特异性。

[0260] 在一些实施方案中,结合CD33蛋白的抗体可包括结合CD33、但是由于其表位特异性或特征而不降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)的抗体。在一些实施方案中,此类抗体可用作例如将毒素(例如,化疗剂)转运到肿瘤细胞中的运载工具(cargo)。此类抗体可优于降低CD33的细胞水平的当前可商购获得的抗CD33抗体,所述当前可商购获得的抗体诸如吉妥珠单抗奥佐米星(zogamicin),其偶联到来自加利车霉素类别的细胞毒性剂并且用于靶向并杀灭急性髓性白血病肿瘤(Naito等人,(2000),Leukemia,14,1436-1443;Ricart(2011)Clin Cancer Res 17;6417-6436;Hamann等人,(2002)Journal:Bioconjugate Chemistry,13,47-58;Beitz等人,(2001)Clin Cancer Res 7;1490-6;以及Malik M.等人(2015)Human Molecular Genetics,1-14.)。在一些实施方案中,本公开的惰性抗CD33抗体可优于商业抗体,所述商业抗体诸如吉妥珠单抗奥佐米星,因为不降低CD33的细胞水平的抗体使CD33完整地留在肿瘤细胞的表面上以用于被额外的毒素偶联的抗体靶向。相比之下,降低CD33的细胞水平的抗体将从细胞表面去除CD33并且导致对肿瘤细胞的保护而不被毒素偶联的抗体另外地靶向。因此,在一些实施方案中,本公开的抗体是结合CD33、但是不能够降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)、或诱导CD33蛋白的一种或多种活性的惰性抗体。

[0261] 降低或不降低细胞上的CD33的细胞水平的抗体可与显示出与一种或多种Fcγ受体的结合减少的惰性Fc区组合。此类Fc区和修饰的实例提供在以下表D中。在一些实施方案中,具有惰性Fc区的抗体具有在以下表D中列出的Fc同种型。

[0262] 拮抗剂抗CD33抗体

[0263] 本公开的抗CD33抗体的第三种类别包括拮抗剂抗体。在一些实施方案中,结合CD33蛋白的抗体可包括降低CD33的细胞水平、抑制CD33和/或一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)、和抑制CD33蛋白的一种或多种活性的拮抗剂抗体。此类抗体通过防止CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)或通过防止在一种或多种CD33配体存在的情况下信号从CD33的细胞外结构域转导到细胞质中来抑制CD33蛋白的一种或多种活性。拮抗剂抗体还可通过降低CD33的细胞表面水平、通过诱导CD33降解、CD33脱敏、CD33裂解、CD33内化、CD33脱落、CD33表达的下调、和/或CD33的溶酶体降解来抑制CD33蛋白的一种或多种活性。在一些实施方案中,此类拮抗剂抗CD33抗体可不瞬时活化CD33。

[0264] 在一些实施方案中,本公开的拮抗剂抗CD33抗体可具有本公开的瞬时激动剂抗CD33抗体的表位特异性,但是具有不能够结合Fcγ受体并且因此不能够例如使CD33瞬时簇

集和活化的Fc结构域。

[0265] 在一些实施方案中,本公开的拮抗剂抗CD33抗体具有但不限于以下活性中的一种或多种:降低CD33蛋白与一种或多种CD33配体(诸如含有唾液酸的糖脂或含有唾液酸的糖蛋白)的结合的能力;降低细胞因子信号传导的抑制子(SOCS)蛋白(例如,SOCS3蛋白)与CD33蛋白的结合的能力;增加CD33蛋白的蛋白酶体降解的能力;减少循环树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、T细胞、和/或小神经胶质细胞的表面上的CD33的功能性表达的能力;降低通过Src家族酪氨酸激酶(诸如LCK和FYN)进行的Tyr-340和Tyr-358的磷酸化的能力;降低对酪氨酸特异性蛋白磷酸酶SHP1和SHP2的募集和结合的能力;降低对充当发动蛋白-1的鸟嘌呤核苷酸交换因子的PLC-g1的募集和结合的能力;降低对Crk1的募集和结合的能力;降低对脾酪氨酸激酶Syk的募集和结合的能力;降低对SH3-SH2-SH3生长因子受体结合蛋白2(Grb2)的募集和结合的能力;降低对多种包含SH2的蛋白质的募集和结合的能力;增加细胞内钙动员的能力;调节促炎细胞因子IL-1 β 、IL-8和TNF- α 的产生的能力;降低磷酸肌醇3-激酶的活化的能力;增加单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、T细胞、和/或小神经胶质细胞的生长的能力;增加单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、T细胞、和/或小神经胶质细胞的存活的能力;增加多种细胞蛋白质上的酪氨酸磷酸化的能力;增加单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和/或小神经胶质细胞的吞噬活性的能力;增加单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、T细胞、和/或小神经胶质细胞的细胞增殖的能力;增加介导ITAM信号传导的信号传导分子的磷酸化的能力;增加模式识别受体的功能的能力;增加Toll样受体的功能的能力;增加损害相关分子模式(DAMP)受体的功能的能力;调节C-C趋化因子受体7(CCR7)的表达的能力;以及增加对细胞和蛋白质碎片的清除的能力。

[0266] 在一些实施方案中,本公开的拮抗剂抗CD33抗体具有显示出与一种或多种Fc γ 受体的结合减少的Fc区。此类Fc区和修饰的实例提供在以下表D中。在一些实施方案中,所述抗体具有在以下表D中列出的Fc同种型。

[0267] 与Fc γ 受体的结合减少的抗体Fc同种型

[0268] 在一些实施方案中,与Fc γ 受体的结合减少的抗CD33抗体具有在以下表D中列出的Fc同种型。

[0269] 表D:与Fc γ 受体的结合减少的示例性抗CD33抗体Fc同种型

[0270]

Fc 同种型	突变(EU 编号方案)
IgG1	N297A 或 N297Q 和/或 D270A
IgG1	D265A 和 N297A
IgG1	L234A 和 L235A
IgG2	V234A 和 G237A
IgG4	F235A 和 G237A 和 E318A E233P 和/或 F234V N297A 或 N297Q
IgG4	S228P 和 L236E S241P S241P 和 L248E S228P 和 F234A 和 L235A
IgG2	H268Q 和 V309L 和 A330S 和 P331S
IgG1	C220S 和 C226S 和 C229S 和 P238S
IgG1	C226S 和 C229S 和 E233P 和 L234V、以及 L235A
IgG1	E233P 和 L234V 和 L235A 和 G236 缺失 P238A D265A N297A A327Q 或 A327G

[0271]

Fc 同种型	突变(EU 编号方案)
	P329A
IgG1	K322A 和 L234A 和 L235A
IgG1	L234F 和 L235E 和 P331S
IgG1 或 IgG4	T394D
IgG2	C232S 或 C233S N297A 或 N297Q
IgG2	V234A 和 G237A 和 P238S 和 H268A 和 V309L 和 A330S 和 P331S
IgG1、IgG2 或 IgG4	δa、b、c、ab、ac、g 修饰
IgG1	以上所列突变中的任一种以及 A330L 或 L234F 和 /或 L235E 和/或 P331S
IgG1、IgG2 或 IgG4	以上所列突变中的任一种以及 M252Y 和/或 S254T 和/或 T256E

[0272] 在某些实施方案中,所述抗CD33抗体具有IgG1同种型。在一些实施方案中,所述抗体包含小鼠IgG1恒定区。在一些实施方案中,所述抗体包含人IgG1恒定区。在一些实施方案中,人IgG1恒定区包括Fc区。在一些实施方案中,所述Fc区含有一个或多个修饰。例如,在一

些实施方案中,所述Fc区含有一个或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。

[0273] 在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自N297A、N297Q (Bolt S等人(1993) Eur J Immunol 23:403-411)、D265A、D270A、L234A、L235A (McEarchern等人,(2007) Blood,109:1185-1192)、C226S、C229S (McEarchern等人,(2007) Blood,109:1185-1192)、P238S (Davis等人,(2007) J Rheumatol,34:2204-2210)、E233P、L234V (McEarchern等人,(2007) Blood,109:1185-1192)、P238A、A327Q、A327G、P329A (Shields RL.等人,(2001) J Biol Chem.276(9):6591-604)、K322A、L234F、L235E (Hezareh等人,(2001) J Virol 75,12161-12168;Oganesyan等人,(2008) .Acta Crystallographica 64,700-704)、P331S (Oganesyan等人,(2008) Acta Crystallographica 64,700-704)、T394D (Wilkinson等人(2013) MAbs5(3):406-417)、A330L、M252Y、S254T、和/或T256E,其中氨基酸位置根据EU或Kabat编号规定而定。在某些实施方案中,所述Fc区还含有在根据EU或Kabat编号规定的对应于甘氨酸236的位置处的氨基酸缺失。

[0274] 在一些实施方案中,所述抗CD33抗体具有IgG1同种型,所述IgG1同种型具有含有根据EU或Kabat编号规定的C220S氨基酸取代的重链恒定区。在一些实施方案中,所述Fc区还含有选自以下的一个或多个额外的氨基酸取代:根据EU或Kabat编号规定的A330L、L234F;L235E、和/或P331S。在某些实施方案中,所述抗CD33抗体具有IgG2同种型。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体包含人IgG2恒定区。在一些实施方案中,人IgG2恒定区包括Fc区。在一些实施方案中,所述Fc区含有一个或多个修饰。例如,在一些实施方案中,所述Fc区含有一个或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自P238S、V234A、G237A、H268A、H268Q、H268E、V309L、N297A、N297Q、V309L、A330S、P331S、C232S、C233S、M252Y、S254T、和/或T256E,其中氨基酸位置根据EU或Kabat编号规定而定 (Vafa O.等人,(2014) Methods 65:114-126)。

[0275] 在某些实施方案中,所述抗CD33抗体具有IgG4同种型。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体包含人IgG4恒定区。在一些实施方案中,人IgG4恒定区包括Fc区。在一些实施方案中,所述Fc区含有一个或多个修饰。例如,在一些实施方案中,所述Fc区含有一个或多个氨基酸取代(例如,相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自E233P、F234V、L235A、G237A、E318A (Hutchins等人(1995) Proc Natl Acad Sci USA,92:11980-11984)、S228P、L234A/F234A、L236E、S241P、L248E (Reddy等人,(2000) J Immunol,164:1925-1933;Angal等人,(1993) Mol Immunol.30(1):105-8;US 8614299B2;Vafa O.等人,(2014) Methods 65:114-126)、T394D、M252Y、S254T、T256E、N297A、和/或N297Q,其中氨基酸位置根据EU或Kabat编号规定而定。

[0276] 在一些实施方案中,所述Fc区还含有选自M252Y、S254T和/或T256E的一个或多个额外的氨基酸取代,其中氨基酸位置根据EU或Kabat编号规定而定。

[0277] 另外的IgG突变

[0278] 在一些实施方案中,本文所述的IgG1变体中的一个或多个可与A330L突变 (Lazar等人,(2006) Proc Natl Acad Sci USA,103:4005-4010)、或L234F、L235E和/或P331S突变 (Sazinsky等人,(2008) Proc Natl Acad Sci USA,105:20167-20172) 中的一个或多个组合来消除补体活化,其中氨基酸位置根据EU或Kabat编号规定而定。在一些实施方案中,本文

所述的IgG变体可与一个或多个突变组合来增强人血清中的抗CD33抗体半衰期(例如,根据EU或Kabat编号规定的M252Y、S254T、T256E突变)(Dall'Acqua等人,(2006) J Biol Chem, 281:23514-23524;以及Strohl等人,(2009) Current Opinion in Biotechnology, 20:685-691)。

[0279] 在一些实施方案中,本公开的IgG4变体可与根据EU或Kabat编号规定的S228P突变(Angal等人,(1993) Mol Immunol, 30:105-108)和/或与Peters等人,(2012) J Biol Chem. 13;287 (29):24525-33)中所描述的一个或多个突变组合来增强抗体稳定化。

[0280] 双特异性抗体

[0281] 本公开的某些方面涉及结合到本公开的CD33蛋白和第二抗原上的一个或多个结构域的双特异性抗体。生成双特异性抗体的方法是本领域熟知的并且在本文中进行描述。在一些实施方案中,本公开的双特异性抗体结合到本公开的CD33蛋白的一个或多个氨基酸残基,诸如人CD33 (SEQ ID NO:1)的一个或多个氨基酸残基或CD33蛋白上的对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基的氨基酸残基。在一些实施方案中,本公开的双特异性抗体识别第一抗原和第二抗原。在一些实施方案中,第一抗原是CD33蛋白或其天然存在的变体。在一些实施方案中,第二抗原也是CD33蛋白或其天然存在的变体。在一些实施方案中,第二抗原是有助于跨血脑屏障转运的抗原(参见,例如,Gabathuler R., Neurobiol. Dis. 37 (2010) 48-57)。此类第二抗原包括但不限于转铁蛋白受体 (TR)、胰岛素受体 (HIR)、胰岛素样生长因子受体 (IGFR)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1和低密度脂蛋白受体相关蛋白2 (LPR-1和LPR-2)、白喉毒素受体、CRM197、美洲驼单结构域抗体、TMEM30 (A)、蛋白转导结构域、TAT、Syn-B、穿膜肽、聚精氨酸肽、血管肽诸如ANG1005 (参见,例如,Gabathuler, 2010)、以及在血脑屏障内皮细胞上富含的其他细胞表面蛋白(参见,例如,Daneman等人, PLoS One. 2010年10月29日; 5 (10):e13741)。在一些实施方案中,第二抗原是致病性蛋白,包括但不限于淀粉样蛋白 β 、寡聚淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑、淀粉样蛋白前体蛋白或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72 (染色体9开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易小体、心房利钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关非ATG (RAN) 翻译产物、二肽重复序列 (DPR) 肽、甘氨酸-丙氨酸 (GA) 重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸 (GP) 重复序列肽、甘氨酸-精氨酸 (GR) 重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸 (PA) 重复序列肽、泛素、以及脯氨酸-精氨酸 (PR) 重复序列肽。在一些实施方案中,第二抗原是在免疫细胞上表达的一种或多种配体和/或蛋白质,包括但不限于CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG-3、DR-5、CD3、以及磷脂酰丝氨酸。在一些实施方案中,第二抗原是在一种或多种肿瘤细胞上表达的蛋白质、脂质、多糖、或糖脂。

[0282] 抗体片段

[0283] 本公开的某些方面涉及结合到本公开的CD33蛋白、CD33蛋白的天然存在的变体、以及CD33蛋白的疾病变体中的一种或多种的抗体片段。在一些实施方案中,所述抗体片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv或scFv片段。

[0284] 在一些实施方案中,所述抗体片段用于与第二CD33抗体和/或与特异性地结合致病性蛋白的一种或多种抗体组合,所述致病性蛋白选自:淀粉样蛋白 β 、寡聚淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑、淀粉样蛋白前体蛋白或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72 (染色体9开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易小体、心房利钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关非ATG (RAN) 翻译产物、二肽重复序列 (DPR) 肽、甘氨酸-丙氨酸 (GA) 重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸 (GP) 重复序列肽、甘氨酸-精氨酸 (GR) 重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸 (PA) 重复序列肽、泛素、和脯氨酸-精氨酸 (PR) 重复序列肽、以及其任何组合;或与结合免疫调节蛋白的一种或多种抗体组合,所述免疫调节蛋白选自由以下组成的组:CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG、DR5、TREM1、TREM2、CSF-1受体、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-5、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-7、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-11、磷脂酰丝氨酸、以及其任何组合。

[0285] 在一些实施方案中,本公开的抗体片段可以是与本公开的抗CD33抗体中的任一种结合相同表位的功能性片段。在一些实施方案中,所述抗体片段是本公开的抗CD33抗体或抗体片段的具有对应全长抗体的相同表位、但是具有远远更小的分子量的小型化形式。此类小型化抗CD33抗体片段可具有更好的脑渗透能力和更短的半衰期,这对于成像和诊断用途是有利的 (参见例如,Lütje S等人,Bioconjug Chem.2014年2月19日;25 (2):335-41;TavaréR等人,Proc Natl Acad Sci U S A.2014年1月21日;111 (3):1108-13;以及Wiehr S等人,Prostate.2014年5月;74 (7):743-55)。因此,在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体片段具有与其对应的全长抗体相比更好的脑渗透和/或具有与其对应的全长抗体相比更短的半衰期。

[0286] 抗体框架

[0287] 本文所述的抗体中的任一种还包含框架。在一些实施方案中,所述框架是人免疫球蛋白框架。例如,在一些实施方案中,抗体 (例如,抗CD33抗体) 包含如任何以上实施方案中的HVR,并且还包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。人免疫球蛋白框架可以是人抗体的一部分,或者非人抗体可通过使用人框架区替换一个或多个内源性框架来人源化。可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区 (参见,例如,Sims等人J.Immunol.151:2296 (1993));衍生自特定亚组的轻链可变区或重链可变区的人抗体的共有序列的框架区 (参见,例如,Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.89:4285 (1992);以及Presta等人J.Immunol.,151:2623 (1993));人成熟 (体细胞突变) 框架区或人种系框架区 (参见,例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633 (2008));以及衍生自筛选FR文库的框架区 (参见,例如,Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684 (1997) 和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618 (1996))。

[0288] 在一些实施方案中,抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含本公开的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3以及在表3A中描绘的轻链可变区的轻链框架区中的一个、两个、三个或四

个。在一些实施方案中,抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含本公开的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3以及在表3B中描绘的重链可变区的重链框架区中的一个、两个、三个或四个。在一些实施方案中,抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含本公开的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3以及在表3A中描绘的轻链可变区的轻链框架区中的一个、两个、三个或四个;并且还包含重链可变区,所述重链可变区包含本公开的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3以及在表3B中描绘的重链可变区的重链框架区中的一个、两个、三个或四个。

[0289] 抗体制备

[0290] 本公开的抗CD33抗体可以涵盖多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体及嵌合抗体、人抗体、抗体片段(例如Fab、Fab'-SH、Fv、scFv及F(ab')₂)、双特异性抗体及多特异性抗体、多价抗体、异源偶联物抗体、偶联抗体、文库来源的抗体、具有改良的效应功能的抗体、含有抗体部分的融合蛋白,及包括抗原识别位点,如具有本公开的CD33蛋白的氨基酸残基的表位的免疫球蛋白分子的任何其它修饰的构型,包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体,及共价修饰的抗体。抗CD33抗体可以是人、鼠、大鼠,或任何其它来源(包括嵌合抗体或人源化抗体)。

[0291] (1) 多克隆抗体

[0292] 多克隆抗体,如抗CD33多克隆抗体,一般是在动物体内通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂而产生。使用双官能试剂或衍生化试剂,例如顺丁烯二酰亚氨基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基偶联)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl₂或R¹N=C=NR(其中R和R¹独立地是低级烷基)将相关抗原(例如本公开的纯化或重组的CD33蛋白)与有待免疫的物种中的免疫原性蛋白质(例如匙孔血蓝蛋白(KLH)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)偶联可为有用的。可以使用的佐剂的实例包括弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant)及MPL-TDM佐剂(单磷脂A、合成海藻糖棒杆菌分支菌酸二酯)。免疫方案可以由本领域技术人员选择,无需过多实验。

[0293] 通过将例如100μg(对于兔)或5μg(对于小鼠)所希望的抗原、免疫原性偶联物或衍生物与3体积弗氏完全佐剂组合并在多个部位皮内注射该溶液,来针对该蛋白质或偶联物对动物进行免疫。一个月后,用初始量的1/5至1/10的含肽或偶联物的弗氏完全佐剂,通过在多个部位皮下注射对动物加强免疫。七至十四天后,对动物抽血并测定血清中的抗体效价。对动物进行加强免疫,直到效价处于稳定水平。偶联物还可以在重组细胞培养物中制备成蛋白质融合物形式。另外,聚集剂,如明矾,也适合增强免疫反应。

[0294] (2) 单克隆抗体

[0295] 单克隆抗体,如单克隆抗CD33抗体,是从基本上均质的抗体群获得,即,构成该群体的单独抗体除可能微量存在的天然存在的突变和/或翻译后修饰(例如异构化、酰胺化)外是相同的。因此,修饰语“单克隆”指示抗体不是分散抗体的混合物的性质。

[0296] 举例来说,可以使用最先由Kohler等人,Nature,256:495(1975)描述的杂交瘤方法,或者可以通过重组DNA方法(美国专利号4,816,567)制备单克隆抗CD33抗体。

[0297] 在杂交瘤方法中,如上文所描述,对小鼠或其它适合宿主动物(如仓鼠)进行免疫以诱发产生或能够产生特异性结合到用于免疫的蛋白质(例如本公开的纯化或重组的CD33蛋白)的抗体的淋巴细胞。或者,可以在体外免疫淋巴细胞。接着,使用适合的融合剂,如聚

乙二醇,使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103页(Academic Press, 1986))。

[0298] 免疫剂将典型地包括抗原蛋白(例如本公开的纯化或重组的CD33蛋白)或其融合变体。一般说来,如果需要人来源的细胞,则使用外周血淋巴细胞(“PBL”),而如果需要非人哺乳动物来源,则使用脾或淋巴结细胞。接着,使用适合融合剂,如聚乙二醇,使淋巴细胞与永生化细胞系融合,以形成杂交瘤细胞。Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), 第59-103页。

[0299] 永生化细胞系通常是经过转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物、牛或人来源的骨髓瘤细胞。通常采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。将由此制备的杂交瘤细胞接种于适合培养基中并使其生长,该培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。举例来说,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤培养基典型地将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤及胸苷(HAT培养基),这些是防止HGPRT缺陷型细胞生长的物质。

[0300] 优选的永生化骨髓瘤细胞是有效融合,支持所选抗体产生细胞稳定高水平产生抗体并且对如HAT培养基等培养基敏感的那些细胞。其中,优选鼠骨髓瘤细胞系,如来源于MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤(获自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA)的那些,以及SP-2细胞及其衍生物(例如X63-Ag8-653)(获自American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA)。也已经描述用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂合骨髓瘤细胞系(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第51-63页(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0301] 测定正在生长杂交瘤细胞的培养基中针对抗原(例如本公开的CD33蛋白)的单克隆抗体的产生情况。优选地,通过免疫沉淀法或通过体外结合测定,如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)测定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0302] 可以测定培养杂交瘤细胞的培养基中针对所希望的抗原(例如本公开的CD33蛋白)的单克隆抗体的存在。优选地,可以通过免疫沉淀法或通过体外结合测定,如放射免疫测定(RIA)或酶联测定(ELISA)测定单克隆抗体的结合亲和力和特异性。这些技术和测定是本领域中已知的。举例来说,可以通过Munson等人, Anal. Biochem., 107:220 (1980)的Scatchard分析测定结合亲和力。

[0303] 在鉴定出产生具有所希望的特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞之后,可以通过限制性稀释程序亚克隆这些克隆并通过标准方法使其生长(Goding, 见上文)。适合此目的的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,可以在哺乳动物中在体内以肿瘤形式使杂交瘤细胞生长。

[0304] 由亚克隆分泌的单克隆抗体宜通过常规免疫球蛋白纯化程序,如蛋白质A-琼脂糖色谱法、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析、亲和色谱法及以上描述的其它方法从培养基、腹水或血清分离。

[0305] 还可以通过重组DNA方法,如美国专利号4,816,567公开并且如上所描述的那些方法制备抗CD33单克隆抗体。编码这些单克隆抗体的DNA易于使用常规程序(例如,通过使用特异性结合到编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡聚核苷酸探针)分离并测序。杂交瘤细胞

用作此类DNA的优选来源。分离后,就可以将DNA置于表达载体中,接着将这些表达载体转染至不会另外产生免疫球蛋白的宿主细胞,如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中,以便在此类重组宿主细胞中合成单克隆抗体。有关在细菌中重组表达编码抗体的DNA的评述文章包括Skerra等人,Curr.Opin.Immunol.,5:256-262(1993)及Plückthun,Immunol.Rev.130:151-188(1992)。

[0306] 在某些实施方案中,可以从使用McCafferty等人,Nature,348:552-554(1990)中所描述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离抗CD33单克隆抗体。Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)及Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)描述了分别从噬菌体文库分离鼠和人抗体。后续公布描述了通过链改组(Marks等人,Bio/Technology,10:779-783(1992)),以及作为构建极大噬菌体文库的策略的组合感染和体内重组(Waterhouse等人,Nucl.Acids Res.,21:2265-2266(1993))来产生高亲和力(纳摩尔浓度(“nM”)范围)人抗体。因此,这些技术可用作传统单克隆抗体杂交瘤技术的替代方案,用于分离具有希望的特异性的单克隆抗体(例如,结合本公开的CD33蛋白的那些抗体)。

[0307] 还可以例如通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源鼠序列(美国专利号4,816,567;Morrison等人,Proc.Natl Acad.Sci.USA,81:6851(1984)),或通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或一部分与免疫球蛋白编码序列共价接合来修饰编码抗体或其片段的DNA。典型地,用此类非免疫球蛋白多肽取代抗体的恒定结构域,或者用其取代抗体的一个抗原组合位点的可变结构域,以产生一个抗原组合位点对抗原具有特异性并且另一个抗原组合位点对不同抗原具有特异性的嵌合二价抗体。

[0308] 本文所描述的单克隆抗体(例如,本公开的抗CD33抗体或其片段)可以是单价的,其制备方法是本领域众所周知的。举例来说,一种方法涉及重组表达免疫球蛋白轻链和修饰的重链。该重链一般在Fc区中任一点处截短以防止重链交联。或者,相关半胱氨酸残基可以用另一氨基酸残基取代或缺失,以防止交联。体外方法也适于制备单价抗体。可以使用本领域中已知的常规技术消化抗体以产生其片段,特别是Fab片段。

[0309] 还可以在体外,使用合成蛋白质化学中的已知方法,包括涉及交联剂的方法制备嵌合或杂合抗CD33抗体。举例来说,可以使用二硫化物交换反应或通过形成硫醚键来构造免疫毒素。适合此目的的试剂的实例包括亚氨基硫醇酯和4-巯基丁酰亚氨酸甲酯。

[0310] (3) 人源化抗体

[0311] 本公开的抗CD33抗体或其抗体片段可以另外包括人源化或人抗体。非人(例如鼠)抗体的人源化形式是含有嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其来源于非人免疫球蛋白的最小序列的片段(如Fab、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂,或抗体的其它抗原结合子序列)。人源化抗体包括来自受体互补决定区(CDR)的残基被来自具有所需特异性、亲和力及容量的非人物种(供体抗体;如小鼠、大鼠或兔)的CDR的残基置换的人免疫球蛋白(受体抗体)。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv骨架残基被相应非人残基置换。人源化抗体还可包含在受体抗体和输入的CDR或骨架序列中都未发现的残基。一般来说,人源化抗体将包含至少一个且典型地两个可变结构域的基本上全部,其中所有或基本上所有的CDR区与非人免疫球蛋白的CDR区对应并且所有或基本上所有的FR区是人免疫球蛋白共有序列的FR区。人源化抗体最佳还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988)

及Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)。

[0312] 用于使非人抗CD33抗体人源化的方法是本领域众所周知的。一般来说,人源化抗体中引入了一或多个来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“输入”残基,这些残基典型地是从“输入”可变结构域获得。人源化可以基本上遵循Winter及同事, Jones等人, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann等人, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen等人, Science 239:1534-1536 (1988)的方法,或通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗体的相应序列来进行。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号4,816,567),其中大体上少于完整人可变结构域被来自非人物种的相应序列取代。实际上,人源化抗体典型地是其中一些CDR残基并且可能一些FR残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代的人抗体。

[0313] 用于制备人源化抗体的人轻链和重链可变结构域的选择对于降低抗原性至关重要。根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知人可变结构域序列的完整文库筛选啮齿动物抗体可变结构域的序列。接着,最接近啮齿动物序列的人序列被接受作为人源化抗体的人骨架(FR)。Sims等人, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia等人, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)。另一方法使用了来源于具有特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列的特定骨架。该骨架可以用于若干不同的人源化抗体。Carter等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); Presta等人, J. Immunol. 151:2623 (1993)。

[0314] 另外,重要的是使人源化的抗体保持对抗原的高亲和力及其它有利的生物特性。为达到此目标,根据优选方法,通过使用亲本序列与人源化序列的三维模型分析亲本序列与各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是常用的并且是本领域技术人员所熟悉的。可用计算机程序说明并展示选定的候选免疫球蛋白序列可能的三维构象结构。检查这些展示允许分析所述残基在候选免疫球蛋白序列功能中的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以此方式,可以从受体序列和输入序列中选出FR残基并组合,以获得所希望的抗体特征,如增加对一种或多种靶抗原(例如本公开的CD33蛋白)的亲和力。一般来说,CDR残基直接并且最充分地参与影响抗原结合。

[0315] 涵盖各种形式的人源化抗CD33抗体。举例来说,人源化抗CD33抗体可以是抗体片段,如Fab,该片段任选与一种或多种细胞毒性剂偶联以便生成免疫偶联物。或者,人源化抗CD33抗体可以是完整抗体,如完整IgG1抗体。

[0316] (4) 人抗体

[0317] 或者,可以产生人抗CD33抗体。举例来说,现可能产生在免疫后能够在无内源免疫球蛋白产生的情况下产生完全人抗体库的转基因动物(例如,小鼠)。嵌合和生殖系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合性缺失会导致内源抗体产生的完全抑制。在所述生殖系突变小鼠中转入人生殖系免疫球蛋白基因阵列将在抗原激发后产生人抗体。参见例如, Jakobovits等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits等人, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann等人, Year in Immunol., 7:33 (1993); 美国专利号5,591,669和W097/17852。

[0318] 或者,可以使用噬菌体展示技术在体外,由来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库产生人抗CD33抗体及抗体片段。McCafferty等人, Nature 348:552-553 (1990); Hoogenboom和Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991)。根据此技术,将抗体V结构域同

框克隆至如M13或fd等丝状噬菌体的主要或次要衣壳蛋白基因中,并在噬菌体粒子的表面上展示为功能性抗体片段。由于丝状粒子含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,故基于抗体功能特性进行的选择还导致选出编码展现这些特性的抗体的基因。因此,该噬菌体模拟B细胞的某些特性。噬菌体展示可以通过多种方式执行,如例如Johnson, Kevin S. 和Chiswell, David J., Curr. Opin. Struct. Biol. 3:564-571 (1993) 中所评述。可以使用若干V基因区段来源进行噬菌体展示。Clackson等人, Nature 352:624-628 (1991) 从来源于免疫小鼠的脾的小型V基因随机组合文库分离出一系列不同的抗噁唑酮抗体。可以构造来自未免疫的人供体的V基因库,并且可以基本上遵循Marks等人, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), 或Griffith等人, EMBO J. 12:725-734 (1993) 所描述的技术分离针对一系列不同抗原(包括自体抗原)的抗体。另参见美国专利号5,565,332和5,573,905。另外,还可以使用酵母展示技术在体外产生人抗CD33抗体及抗体片段(例如WO 2009/036379; WO 2010/105256; WO 2012/009568; US 2009/0181855; US 2010/0056386; 及Feldhaus和Siegel (2004) J. Immunological Methods 290:69-80)。在其它实施方案中,可以使用核糖体展示技术在体外产生人抗CD33抗体及抗体片段(例如,Roberts和Szostak (1997) Proc Natl Acad Sci 94:12297-12302; Schaffitzel等人 (1999) J. Immunological Methods 231:119-135; Lipovsek和Plückthun (2004) J. Immunological Methods 290:51-67)。

[0319] Cole等人和Boerner等人的技术也可用于制备人抗CD33单克隆抗体(Cole等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第77页(1985) 及Boerner等人, J. Immunol. 147 (1):86-95 (1991)。类似地,还可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物(例如小鼠)中来制备人抗CD33抗体,在这些转基因动物中,已经使内源免疫球蛋白基因部分地或完全地失活。在激发之后,观察到人抗体的产生,该抗体在所有方面都紧密地类似于在人所见,包括基因重排、组装及抗体库。此方法描述于例如美国专利号5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016,及以下科学公布中: Marks等人, Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg等人, Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild等人, Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); 及Lonberg和Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)。

[0320] 最后,还可以在体外由活化B细胞产生人抗CD33抗体(参见美国专利号5,567,610和5,229,275)。

[0321] (5) 抗体片段

[0322] 在某些实施方案中,使用抗CD33抗体片段而非全抗CD33抗体具有优点。较小的片段尺寸实现快速清除和更好的脑渗透。

[0323] 已开发出用于产生抗体片段的各种技术。传统上,经由蛋白水解消化完整抗体得到这些片段(参见例如, Morimoto等人, J. Biochem. Biophys. Method. 24:107-117 (1992); 及Brennan等人, Science 229:81 (1985))。不过,现在可以通过重组宿主细胞,例如使用编码本公开的抗CD33抗体的核酸直接产生这些片段。Fab、Fv及scFv抗体片段都可以在大肠杆菌中表达并由其分泌,由此能够直接产生大量这些片段。抗CD33抗体片段还可以从如以上所论述的抗体噬菌体文库分离。或者,可以直接从大肠杆菌回收Fab'-SH片段并以化学方式偶合以形成F(ab')₂片段(Carter等人, Bio/Technology 10:163-167 (1992))。根据另一方法,

可以从重组宿主细胞培养物直接分离 $F(ab')_2$ 片段。美国专利号5,869,046中描述了具有增加体内的半衰期的Fab和 $F(ab')_2$ 抗体片段的产生。在其它实施方案中,所选抗体是单链Fv抗体(scFv)。参见WO 93/16185;美国专利号5,571,894和美国专利号5,587,458。抗CD33抗体片段也可以是“线性抗体”,例如,如美国专利5,641,870中所描述。此类线性抗体片段可以是单特异性或双特异性的。

[0324] (6) 双特异性和多特异性抗体

[0325] 双特异性抗体(BsAb)是对至少两个不同表位,包括在同一或另一蛋白质(例如,一种或多种本公开的CD33蛋白)上的那些表位具有结合特异性的抗体。或者,BsAb的一部分可以用于结合到靶CD33抗原,而另一部分可以与结合到第二蛋白质的臂组合。此类抗体可以来源于全长抗体或抗体片段(例如 $F(ab')_2$ 双特异性抗体)。

[0326] 用于制备双特异性抗体的方法是本领域中已知的。产生全长双特异性抗体的传统方法是基于两个免疫球蛋白重链/轻链对的共表达,其中这两条链具有不同特异性。Millstein等人,Nature,305:537-539(1983)。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,使得这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))产生10种不同抗体分子的潜在混合物,其中仅一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化通常是通过亲和色谱步骤进行,不过这些步骤相当繁琐,并且产物产率较低。WO 93/08829和Traunecker等人,EMBO J.,10:3655-3659(1991)中公开了类似程序。

[0327] 根据不同方法,将具有所希望的结合特异性(抗体-抗原组合位点)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。融合优选是与免疫球蛋白重链恒定结构域进行,包含铰链区、 C_H2 及 C_H3 区的至少一部分。优选具有在至少一种融合物中存在含有轻链结合所需位点的第一重链恒定区(C_H1)。将编码免疫球蛋白重链融合物以及必要时免疫球蛋白轻链的DNA插入独立表达载体中,并将其共转染至适合宿主生物体中。由此在构造中使用不等比率的三个多肽链提供最佳产率的实施方案中为调整这三个多肽片段的相互比例提供较大灵活性。然而,当相等比率的至少两条多肽链的表达产生高产率时,或当这些比率不具有特别意义时,可将两条或全部三条多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0328] 在此方法的优选实施方案中,双特异性抗体由在一臂中的具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链及在另一臂中的杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。已发现,此不对称结构有助于所希望的双特异性化合物与不想要的免疫球蛋白链组合分离,因为在双特异性分子仅一半中免疫球蛋白轻链的存在提供一种容易的分离方式。WO 94/04690中公开此方法。有关产生双特异性抗体的其它详情,参见例如,Suresh等人,Methods in Enzymology 121:210(1986)。

[0329] 根据WO 96/27011或美国专利号5,731,168中所描述的另一方法,可以对一对抗体分子之间的界面进行工程改造以使从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分含量最大。优选的界面包含抗体恒定结构域的 C_H3 区的至少一部分。在此方法中,来自第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸链被大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)置换。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)置换较大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生与较大侧链相同或类似大小的补偿性“空腔”。由此提供相对于如同二聚体等其它不想要的终产物而增加异二聚体产率的机制。

[0330] 由抗体片段产生双特异性抗体的技术已在文献中描述。举例来说,可以使用化学

键联制备双特异性抗体。Brennan等人, Science 229:81 (1985) 描述了蛋白水解裂解完整抗体以产生 $F(ab')_2$ 片段的程序。这些片段在二硫醇络合剂亚砷酸钠存在下被还原以使邻近的二硫醇稳定并防止分子间二硫键的形成。接着,所产生的 Fab' 片段被转化成硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。接着,将 Fab' -TNB衍生物之一再转化成 Fab' -TNB衍生物以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可以用作选择性固定酶的试剂。

[0331] Fab' 片段可以直接从大肠杆菌回收并以化学方式偶合以形成双特异性抗体。Shalaby等人, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) 描述了完全人源化双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的产生。每个 Fab' 片段都是由大肠杆菌单独分泌并在体外经历定向化学偶合以形成双特异性抗体。由此形成的双特异性抗体能够结合到过表达ErbB2受体的细胞和正常人T细胞,并且触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳房肿瘤靶的溶解活性。

[0332] 直接由重组细胞培养物制备和分离二价抗体片段的各种技术已得以描述。举例来说,已经使用亮氨酸拉链制备出二价异二聚体。Kostelny等人, J. Immunol., 148 (5):1547-1553 (1992)。通过基因融合将来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽连接至两种不同抗体的 Fab' 部分。抗体同二聚体在铰链区处还原以形成单体,然后再氧化形成抗体异二聚体。Hollinger等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) 所描述的“双功能抗体”技术提供了制备双特异性/二价抗体片段的替代机制。这些片段包含通过连接子连接至轻链可变结构域(V_L)的重链可变结构域(V_H),该连接子太短而使得同一链上的两个结构域之间无法配对。因此,迫使一个片段的 V_H 和 V_L 结构域与另一片段的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。另外,已报导通过使用单链Fv (sFv) 二聚体制备双特异性/二价抗体片段的另一策略。参见Gruber等人, J. Immunol., 152:5368 (1994)。

[0333] 也涵盖具有超过两个价态的抗体。举例来说,可以制备三特异性抗体。Tutt等人, J. Immunol. 147:60 (1991)。

[0334] 示例性双特异性抗体可结合到给定分子(例如,本公开的CD33蛋白)上的两个不同的表位。可替代地,靶向CD33信号传导组分的臂可与结合到白细胞上的触发分子(诸如T细胞受体分子(例如,CD2、CD3、CD28或B7)、或IgG的Fc受体($Fc\gamma R$),诸如 $Fc\gamma RI$ (CD64)、 $Fc\gamma RII$ (CD32)和 $Fc\gamma RIII$ (CD16))的臂组合,以便使细胞防御机制集中到表达特定蛋白质的细胞。双特异性抗体也可用于使细胞毒性剂定位到表达特定蛋白质的细胞。此类抗体拥有蛋白质结合臂和结合细胞毒性剂或放射性核素螯合剂(诸如EOTUBE、DPTA、DOTA或TETA)的臂。感兴趣的另一种双特异性抗体结合感兴趣的蛋白质并且还结合组织因子(TF)。

[0335] (7) 多价抗体

[0336] 多价抗体可能比二价抗体更快地被表达抗体所结合的抗原的细胞内化(和/或分解代谢)。本公开的抗CD33抗体或其抗体片段可以是具有三个或更多个抗原结合位点(例如四价抗体)的多价抗体(除IgM类别外的类别),这些抗体可以通过重组表达编码抗体多肽链的核酸容易地产生。多价抗体可以包含二聚化结构域及三个或更多个抗原结合位点。优选的二聚化结构域包含Fc区或铰链区。在此情况下,抗体将包含Fc区以及在Fc区的氨基末端的三个或更多个抗原结合位点。本文中优选的多价抗体含有三个至约八个,但优选四个抗原结合位点。多价抗体含有至少一条多肽链(并且优选两条多肽链),其中这一条或多条多肽链包含两个或更多个可变结构域。举例来说,所述一条或多条多肽链可以包含VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc,其中VD1是第一可变结构域,VD2是第二可变结构域,Fc是Fc区的一条多肽

链, X1和X2表示氨基酸或多肽, 并且n是0或1。类似地, 所述一条或多条多肽链可以包含 V_H - C_H1 -柔性连接子- V_H - C_H1 -Fc区链; 或 V_H - C_H1 - V_H - C_H1 -Fc区链。本文中的多价抗体优选另外包含至少两个(并且优选四个)轻链可变结构域多肽。本文中的多价抗体可以例如包含约两个至约八个轻链可变结构域多肽。此处涵盖的轻链可变结构域多肽包含轻链可变结构域并且任选地, 另外包含CL结构域。多价抗体可以识别CD33抗原, 以及但不限于额外抗原A β 肽、抗原或 α 突触核蛋白蛋白质抗原, 或Tau蛋白抗原, 或TDP-43蛋白质抗原, 或朊病毒蛋白抗原, 或亨廷顿蛋白抗原, 或RAN, 翻译产物抗原, 包括由甘氨酸-丙氨酸(GA)、甘氨酸-脯氨酸(GP)、甘氨酸-精氨酸(GR)、脯氨酸-丙氨酸(PA)或脯氨酸-精氨酸(PR)构成的二肽重复(DPR肽), 胰岛素受体、类胰岛素生长因子受体。转铁蛋白受体或有助于抗体跨血脑屏障转移的任何其它抗原。

[0337] (8) 异源偶联物抗体

[0338] 异源偶联物抗体也在本公开的范围内。异源偶联物抗体由两个共价连接的抗体(例如, 本公开的抗CD33抗体或其抗体片段)构成。例如, 异源偶联物中的抗体中的一个可偶合到抗生物素蛋白, 另一个可偶合到生物素。此类抗体已例如被提出使免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利号4,676,980), 并且已用于治疗HIV感染。国际公布号WO 91/00360、WO 92/200373和EP 0308936。预期所述抗体可使用合成蛋白质化学中已知的方法(包括涉及交联剂的那些方法)在体外制备。例如, 免疫毒素可使用二硫化物交换反应或通过形成硫醚键来构建。用于此目的的合适的试剂的实例包括亚氨基硫醇酯和4-巯基丁酰亚氨酸甲酯以及例如在美国专利号4,676,980中所公开的那些试剂。异源偶联物抗体可使用任何便利的交联方法来制备。合适的交联剂是本领域熟知的, 并且与多种交联技术一起公开于美国专利号4,676,980中。

[0339] (9) 效应功能工程改造

[0340] 另外, 可能希望对本公开的抗CD33抗体进行修饰以改变效应功能和/或增加抗体的血清半衰期。举例来说, 可以对恒定区上的Fc受体结合位点进行修饰或突变以去除或降低与某些Fc受体, 如Fc γ RI、Fc γ RII和/或Fc γ RIII的结合亲和力。在一些实施方案中, 通过去除抗体Fc区(例如在IgG的CH₂结构域中)的N-糖基化来减弱效应功能。在一些实施方案中, 如PCT WO 99/58572以及Armour等人, *Molecular Immunology* 40:585-593 (2003); Reddy等人, *J. Immunology* 164:1925-1933 (2000) 中所描述, 通过修饰人IgG的如233-236、297和/或327-331等区域来减弱效应功能。

[0341] 为了增加抗体的血清半衰期, 如美国专利5,739,277中所描述, 可以将挽救受体(salvage receptor)结合表位并入抗体(尤其是抗体片段)中。如本文所使用, 术语“挽救受体结合表位”是指IgG分子(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄)的Fc区中负责增加IgG分子体内血清半衰期的表位。

[0342] (10) 其他氨基酸序列修饰

[0343] 也涵盖有关本公开的抗CD33抗体或其抗体片段的氨基酸序列修饰。举例来说, 可能希望改善这些抗体或抗体片段的结合亲和力和/或其它生物特性。抗体或抗体片段的氨基酸序列变体是通过将适当核苷酸变化引入编码这些抗体或抗体片段的核酸中, 或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如抗体的氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或取代。可进行缺失、插入及取代的任何组合以得到最终构建体, 只要最终构建体具有所希望的特征

(即,能够与本公开的CD33蛋白结合或物理相互作用)。氨基酸变化也可以改变抗体的翻译后加工,如改变糖基化位点的数目或位置。

[0344] 用于鉴定抗CD33抗体中作为优选诱变位置的残基或区域的一种有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham及Wells, Science, 244:1081-1085 (1989) 所述。此处,鉴定一个残基或一组靶残基(例如,带电残基,如arg、asp、his、lys及glu)并用呈中性或带负电的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)置换来影响氨基酸与靶抗原的相互作用。然后,通过将另外的或其它变体引入取代位点或用于取代位点来改进对取代展示功能性敏感性的氨基酸位置。因此,尽管引入氨基酸序列变异的位点是预定的,但突变本身的性质不必是预定的。举例来说,为了分析给定位点处突变的性能,在靶密码子或区域处进行丙氨酸扫描或随机诱变并针对希望的活性筛选所表达的抗体变体。

[0345] 氨基酸序列插入包括长度范围从一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽的氨基(“N”)和/或羧基(“C”)末端融合物,以及具有单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N末端或C末端与增加抗体的血清半衰期的酶或多肽的融合物。

[0346] 另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体在抗体分子中具有至少一个氨基酸残基被不同残基置换。最值得关注的供取代诱变的位点包括高变区,但也涵盖FR变化。保守取代如下表E中标题“优选的取代”下所示。如果这些取代引起生物活性的变化,则可以引入更实质性的变化,在表E中命名为“示例性取代”,或如下文参照氨基酸类别进一步描述,并筛选产物。

[0347] 表E:氨基酸取代

原始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp、lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	Leu

	原始残基	示例性取代	优选取代
[0349]	Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	ile
	Lys (K)	arg; gln; asn	arg
	Met (M)	leu; phe; ile	Leu
	Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
	Pro (P)	ala	ala
	Ser (S)	thr	thr
	Thr (T)	Ser	ser
	Trp (W)	tyr; phe	tyr
	Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
	Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	leu

[0350] 通过选择对维持 (a) 多肽主链在取代区域中的结构, 例如折叠或螺旋构象; (b) 分子在靶位点处的电荷或疏水性; 或 (c) 侧链的体积的影响显著不同的取代来实现抗体生物特性的显著变化。天然存在的残基基于常见侧链特性分成以下各组:

[0351] (1) 疏水性: 正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;

[0352] (2) 中性亲水性: cys、ser、thr;

[0353] (3) 酸性: asp、glu;

[0354] (4) 碱性: asn、gln、his、lys、arg;

[0355] (5) 影响链取向的残基: gly、pro; 及

[0356] (6) 芳香族: trp、tyr、phe。

[0357] 非保守性取代需要将这些类别之一的成员换成另一类别。

[0358] 不参与维持抗体适当构型的任何半胱氨酸残基一般也可以被丝氨酸取代, 以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。反之, 可以将半胱氨酸键添加至抗体中以改善其稳定性 (特别是在抗体是抗体片段, 如Fv片段的情况下)。

[0359] 一类特别优选的取代变体涉及取代亲本抗体 (例如人源化或人抗CD33抗体) 的一个或多个高变区残基。一般来说, 所得到的选择用于进一步开发的变体将具有相对于从其产生这些变体的亲本抗体有所改善的生物特性。用于产生此类取代变体的便利方法涉及使用噬菌体展示进行的亲和力成熟。简单点说, 使若干高变区位点 (例如6-7个位点) 突变以在每一位点处产生所有可能的氨基取代。由此产生的抗体变体自丝状噬菌体粒子以单价方式作为与包装于每一粒子中的M13基因III产物的融合物形式展示。接着, 针对本文所公开的生物活性 (例如结合亲和力) 筛选噬菌体展示的变体。为鉴定供修饰的候选高变区位点, 可以进行丙氨酸扫描诱变以鉴定明显有助于抗原结合的高变区残基。替代地或另外, 分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体与抗原 (例如本公开的CD33蛋白) 之间的接触点可为有益的。此类接触残基及邻近残基是根据本文中详述的技术进行取代的候选物。在产生此类变体后, 就如本文所描述, 使该组变体经历筛选并且可以选出在一种或多种相关测定中具有优良特性的抗体进行进一步开发。

[0360] 抗体的另一类氨基酸变体改变了抗体的初始糖基化模式。改变意思指缺失抗体中所发现的一个或多个碳水化合物部分,和/或添加一个或多个抗体中不存在的糖基化位点。

[0361] 抗体的糖基化典型地是N连接或O连接的。N-连接是指碳水化合物部分连接至天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸)是将碳水化合物部分酶促连接至天冬酰胺侧链的识别序列。因此,在多肽中这些三肽序列中任一种的存在产生了潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖连接至羟基氨基酸,最常见是丝氨酸或苏氨酸,不过也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0362] 在抗体中添加糖基化位点通常通过改变氨基酸序列,以使其含有上述三肽序列(对于N-连接的糖基化位点)中的一个或多个来实现。还可以通过初始抗体中一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基的添加或取代来进行改变(对于O-连接的糖基化位点)

[0363] 编码抗IgE抗体的氨基酸序列变体的核酸分子通过本领域中已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于,从天然来源分离(在天然存在的氨基酸序列变体的情况下),或通过抗体(例如本公开的抗CD33抗体)或抗体片段的预先制备的变体或非变体形式的寡聚核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变及盒式诱变来制备。

[0364] (11) 抗体偶联物

[0365] 本公开的抗CD33抗体或其抗体片段可偶联到可检测的标记物、毒素、或治疗剂。可使用本领域已知的用于使分子(诸如可检测的标记物、毒素、或治疗剂)偶联到抗体的任何合适的方法。

[0366] 例如,药物偶联涉及将生物活性细胞毒性(抗癌)有效负荷或药物与特异性靶向某些肿瘤标志物(例如,在理想情况下,仅在肿瘤细胞中或其上发现的蛋白质)的抗体偶合。抗体追踪体内的这些蛋白质并将其自身连接至癌细胞的表面。抗体与靶蛋白(抗原)之间的生物化学反应触发肿瘤细胞中的信号,肿瘤细胞接着吸收或内化该抗体以及细胞毒素。在ADC内化之后,释放细胞毒性药物并杀灭癌症。由于此靶向作用,理想的情况是,药物较之其它化学治疗剂具有较少副作用并且提供较宽的治疗窗。偶联抗体的技术已经公开并且是本领域中已知的(参见例如,Jane de Lartigue, OncLive, 2012年7月5日; ADC Review on antibody-drug conjugates; 及Ducry等人, (2010). Bioconjugate Chemistry 21(1):5-13)。

[0367] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体可偶联到选自以下的毒素:蓖麻毒素、蓖麻毒素A-链、多柔比星、柔红霉素、美登木素生物碱、紫杉酚、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞杆菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲菌素、白树毒素、丝林霉素、局限曲霉素、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、加利车霉素、肥皂草抑制剂、糖皮质激素、奥瑞斯他汀、金霉素、钇、铋、考布他汀、多卡霉素、多拉司它汀、cc1065、以及顺铂。

[0368] (12) 其他抗体修饰

[0369] 本公开的抗CD33抗体,或其抗体片段可以进一步修饰成含有本领域中已知并且易于得到的额外非蛋白质部分。优选地,适于抗体衍生化的部分是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于,聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、

葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/顺丁烯二酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)及葡聚糖或聚(n-乙炔吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其于水中的稳定性而可能在制造时具有优势。聚合物可以具有任何分子量,并且可以是分支或未分支的。连接至抗体的聚合物的数目可以变化,并且如果连接超过一种聚合物,则这些聚合物可以是相同或不同分子。一般来说,用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可以基于以下考虑来确定:包括但不限于,待改善的抗体的特定特性或功能,抗体衍生物是否会在指定条件下用于疗法等。此类技术和其它适合配制物公开于 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, Alfonso Gennaro编, Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000) 中。

[0370] 结合测定和其他测定

[0371] 可例如通过已知的方法(诸如ELISA、表面等离子共振(SPR)、蛋白质印迹等)针对抗原结合活性测试本公开的抗CD33抗体。

[0372] 在一些实施方案中,可使用竞争测定来鉴定与在表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出的或选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2的抗体中的任一种竞争的抗体。在某些实施方案中,此竞争抗体结合到在表1、表2、表3A、表3B、表6A、以及表6B中列出的或选自1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2的抗体中的任一种所结合的相同的表位(例如,线性或构象表位)。用于对抗体结合的表位进行作图的详细示例性方法提供在 Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," 在 Methods in Molecular Biology 第66卷 (Humana Press, Totowa, NJ) 中。

[0373] 在示例性竞争测定中,在包含结合到CD33(例如,人或非人灵长类)的第一标记抗体和测试其与第一抗体竞争结合到CD33的能力的第二未标记抗体的溶液中孵育固定的CD33或在细胞表面上表达CD33的细胞。第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照,在包含第一标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中孵育固定的CD33或表达CD33的细胞。在容许第一抗体结合到CD33的条件下孵育之后,去除过量未结合抗体,并且测量与固定的CD33或表达CD33的细胞缔合的标记的量。如果相对于对照样品,与固定的CD33或表达CD33的细胞缔合的标记的量在测试样品中基本上降低,则这指示第二抗体与第一抗体竞争结合到CD33。参见, Harlow和Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual 第14章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0374] 核酸、载体和宿主细胞

[0375] 本公开的抗CD33抗体可以使用例如美国专利号4,816,567中所描述的重组方法和组合物产生。在一些实施方案中,提供了具有编码任一本公开的抗CD33抗体的核苷酸序列的分离的核酸。此类核酸可以编码含有抗CD33抗体的VL的氨基酸序列和/或含有该抗体的VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。在一些实施方案中,提供了含有这些核酸的一种或多种载体(例如表达载体)。在一些实施方案中,还提供了含有该核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞含有以下(例如,被以下转导): (1) 包含核酸的载体,该核酸编码含有抗体VL的氨基酸序列及含有抗体VH的氨基酸序列,或(2) 第一载体和第二载体,所述第一载体含有编码含有抗体VL的氨基酸序列的核酸,所述第二载体含有编码含有抗体VH的

氨基酸序列的核酸。在一些实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴系细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。

[0376] 提供了制备本公开的抗CD33抗体的方法。在一些实施方案中,该方法包括在适于表达抗CD33抗体的条件下,培养本公开的宿主细胞,该宿主细胞含有编码该抗体的核酸。在一些实施方案中,随后从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0377] 对于重组产生本公开的抗CD33抗体,分离出编码该抗CD33抗体的核酸,并将其插入一个或多个载体中以进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。此核酸可以使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合到编码抗体重链和轻链的基因的寡聚核苷酸探针)容易地分离并测序。

[0378] 含有编码本文所描述的任何本公开的抗CD33抗体或其片段多肽(包括抗体)的核酸序列的适合载体包括但不限于,克隆载体和表达载体。适合的克隆载体可以根据标准技术构建,或者可以选自本领域中可用的大量克隆载体。尽管所选克隆载体可以根据打算使用的宿主细胞而变化,但有用的克隆载体一般能够自复制,可以具有特定限制性核酸内切酶的单一靶,和/或可以携带可以用于选择含有载体的克隆的标志物的基因。适合的实例包括质粒及细菌病毒,例如pUC18、pUC19、Bluescript(例如pBS SK+)及其衍生物、mpl8、mpl9、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体DNA,及穿梭载体,如pSA3和pAT28。这些和许多其它克隆载体可购自商业供应商,如BioRad、Stratagene及Invitrogen。

[0379] 表达载体一般是含有本公开的核酸的可复制的多核苷酸构建体。表达载体可以在宿主细胞中作为游离基因或作为染色体DNA的整体部分复制。适合的表达载体包括但不限于,质粒、病毒载体,包括腺病毒、腺相关病毒、反转录病毒、粘粒及PCT公布号WO 87/04462中公开的表达载体。载体组分一般可以包括但不限于,以下一种或多种:信号序列;复制起点;一个或多个标志物基因;适合的转录控制元件(如启动子、增强子及终止子)。对于表达(即,翻译),通常还需要一个或多个翻译控制元件,如核糖体结合位点、翻译起始位点及终止密码子。

[0380] 可以通过多种适合手段中的任一种,包括电穿孔;采用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其它物质进行的转染;微弹轰击;脂转染;及感染(例如,当载体是感染物,如牛痘病毒时),将含有所关注核酸的载体引入宿主细胞中。引入载体或多核苷酸的选择将通常取决于宿主细胞的特征。在一些实施方案中,载体包含含有编码本公开的抗CD33抗体的一个或多个氨基酸序列的核酸。

[0381] 适于克隆或表达抗体编码载体的宿主细胞包括原核或真核细胞。举例来说,可以在细菌中产生本公开的抗CD33抗体,特别是在不需要糖基化和Fc效应功能时。关于在细菌中表达抗体片段及多肽(例如,美国专利号5,648,237、5,789,199及5,840,523;及Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,描述在大肠杆菌中表达抗体片段)。表达之后,可以从细菌细胞浆的可溶部分中分离抗体并且可以进一步纯化。

[0382] 除原核生物外,真核微生物如丝状真菌或酵母,也是适于抗体编码载体的克隆或表达宿主,包括糖基化途径已经“人源化”使得所产生的抗体具有部分或完全人糖基化模式的真菌及酵母菌株(例如,Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004);及Li等人,Nat.Biotech.24:210-215(2006))。

[0383] 适于表达糖基化抗体的宿主细胞也可以来源于多细胞生物体(无脊椎动物及脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物及昆虫细胞。已鉴别出可以与昆虫细胞联合使用,特别是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的众多杆状病毒病毒株。植物细胞培养物也可以用作宿主(例如,美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978及6,417,429,描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0384] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。举例来说,可以使用适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它实例是被SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7);人胚肾细胞系(293或293细胞,如例如Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)中所述);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠赛托利氏细胞(sertoli cell)(TM4细胞,如例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人子宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK;布法罗大鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳房肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如例如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述;MRC 5细胞;及FS4细胞。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));及骨髓瘤细胞系,如Y0、NS0及Sp2/0。关于适于产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的评述,参见例如Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0385] CD33活性

[0386] PI3K活化

[0387] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞中表达的CD33蛋白之后诱导PI3K活化。

[0388] PI3K是能够将磷脂酰肌醇(PtdIn)的肌醇环中的3位羟基磷酸化的相关细胞内信号转导激酶家族。PI3K家族基于一级结构、调节及体外脂质底物特异性而分成三个不同类别(类别I、类别II及类别III)。

[0389] 活化的PI3K产生各种3-磷酸化的磷酸肌醇,包括但不限于,PtdIns3P、PtdIns(3,4)P2、PtdIns(3,5)P2及PtdIns(3,4,5)P3。这些3-磷酸化的磷酸肌醇以某一机制起作用,信号传导蛋白通过所述机制被募集到各种细胞膜。这些信号传导蛋白含有磷酸肌醇结合结构域,包括但不限于,PX结构域、普列克底物蛋白(pleckstrin)同源结构域(PH结构域)及FYVE结构域。可使用本领域已知的用于确定PI3K活化的任何方法。

[0390] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)对于预防、降低风险、或治疗与降低的PI3K活性水平相关联的病状和/或疾病是有益的,所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、

眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0391] 细胞因子的调节表达

[0392] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞表面上表达的CD33蛋白之后调节(例如,增加或降低)大脑中的促炎介质。在某些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞中表达的CD33蛋白之后调节细胞因子(例如,促炎介质)的表达和/或调节抗炎介质的表达。

[0393] 炎症是血管组织对有害刺激(诸如病原体、受损细胞或刺激物)的复杂生物应答的一部分。急性炎症的典型体征是疼痛、灼热、发红、以及肿胀。炎症是通过限制损伤位点或通过募集并活化免疫系统的细胞清除感染来保护生物体的免疫应答。炎症性应答在其持续时间和严重性方面受到严格调节和限制以避免对生物体造成损害。炎症可分为急性或慢性。急性炎症由先天免疫应答驱动,所述先天免疫应答最初识别有害刺激并且将来自血液的白细胞募集到损伤组织中。一连串生物化学事件(包括细胞因子和趋化因子释放)传送炎症性应答,其涉及局部血管系统、免疫系统和损伤组织内的各种细胞。慢性炎症是长期且持久的,这导致参与炎症性应答的免疫细胞类型的进行性改变。慢性炎症的特征在于由炎症过程导致的组织的进行性破坏和纤维化。

[0394] 如本文所用,抗炎介质是直接或间接(例如,以抗炎信号传导途径的方式)参与减少、抑制、或失活炎症性应答的机制的蛋白质。可使用本领域已知的用于鉴定和表征抗炎介质的任何方法。抗炎介质的实例包括但不限于细胞因子,诸如IL-4、IL-10、IL-13、IL-35、IL-16、IFN- α 、TGF- β 、IL-1ra、G-CSF、以及IFN- α 或IL-6的可溶性受体。促炎介质的实例包括但不限于细胞因子,诸如IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、CRP、IL-33、MCP-1、以及MIP-1- β 。

[0395] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可调节(例如,增加或降低)细胞因子(诸如IL-1 β 、IL-8和TNF- α)的表达。在某些实施方案中,细胞因子的调节表达发生在巨噬细胞、树突细胞、单核细胞、破骨细胞,皮肤朗格汉斯细胞(Langerhans cells)、库普弗细胞(Kupffer cells)、T细胞、天然杀伤细胞、和/或小神经胶质细胞中。调节表达可包括但不限于基因表达增加、转录表达增加、或蛋白质表达增加。可使用本领域已知的用于确定基因、转录物(例如,mRNA)和/或蛋白质表达的任何方法。例如,可使用Northern印迹分析来确定细胞因子基因表达水平,可使用RT-PCR来确定细胞因子转录的水平,并且可使用蛋白质印迹分析来确定细胞因子蛋白水平。

[0396] 如本文所用,如果细胞因子在使用本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)

治疗的受试者的一种或多种细胞中的表达与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者的一种或多种细胞中表达的相同的细胞因子的表达相比被调节,则所述细胞因子可具有调节的表达。在一些实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者的一种或多种细胞中的细胞因子表达相比,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可使受试者的一种或多种细胞中的细胞因子表达调节至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%、或至少200%。在其他实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者的一种或多种细胞中的细胞因子表达相比,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)使受试者的一种或多种细胞中的细胞因子表达调节至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.15倍、至少2.2倍、至少2.25倍、至少2.3倍、至少2.35倍、至少2.4倍、至少2.45倍、至少2.5倍、至少2.55倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、或至少10倍。

[0397] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)适用于预防、降低风险、或治疗与一种或多种促炎介质的异常水平相关联的病状和/或疾病,所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0398] 促炎介质的调节表达

[0399] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞中表达的CD33蛋白之后调节(例如,增加或降低)促炎介质的表达。

[0400] 如本文所用,促炎介质是直接或间接(例如,以促炎信号传导途径的方式)参与诱导、活化、促进、或以其他方式增加炎症应答的机制的蛋白质。可使用本领域已知的用于鉴定和表征促炎介质的任何方法。

[0401] 促炎介质的实例包括但不限于细胞因子,诸如I型和II型干扰素、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-20家族成员、IL-33、LIF、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-17、IL-18、以及CRP。

[0402] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体可调节促炎介质的功能性表达和/或分泌,所述促炎介质诸如I型和II型干扰素、IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、CRP、IL-33、MCP-1、以及MIP-1- β 。在某些实施方案中,促炎介质的调节表达发生在巨噬细胞、树突细胞、单核细胞、破骨细胞,皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、T细胞、和/或小神经胶质细胞中。调节表达可包括但不限于调节基因表达、调节转录表达、或调节蛋白质表达。可使用本领域已知的用于确定基因、转录物(例如,mRNA)和/或蛋白质表达的任何方法。例如,可使用Northern印迹分析来确定促炎介质基因表达水平,可使用RT-PCR来确定促炎介质转录的水平,并且可使用蛋白质印迹分析来确定促炎介质蛋白水平。

[0403] 在某些实施方案中,促炎介质包括炎性细胞因子。因此,在某些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可调节一种或多种炎性细胞因子的分泌。其分泌可通过本公开的抗CD33抗体调节的炎性细胞因子的实例包括但不限于诸如I型和II型干扰素、IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、CRP、IL-33、MCP-1、以及MIP-1- β 。

[0404] 在某些实施方案中,促炎介质包括炎性受体。因此,在某些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可调节一种或多种炎性受体的表达。其分泌可通过本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)调节的炎性受体的实例包括但不限于CD86、CD80和CD83。

[0405] 如本文所用,如果促炎介质在使用CD33药剂(诸如本公开的激动剂抗CD33抗体)治疗的受试者的一种或多种细胞中的表达与在未使用激动剂抗CD33抗体治疗的对应受试者的一种或多种细胞中表达的相同的促炎介质的表达相比被调节(例如,增加或降低),则所述促炎介质可具有调节的表达。在一些实施方案中,例如与在未使用抗CD33抗体治疗的对应受试者的一种或多种细胞中的促炎介质表达相比,本公开的抗CD33抗体可使受试者的一种或多种细胞中的促炎介质表达调节至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%、或至少200%。在其他实施方案中,例如与在未使用抗CD33抗体治疗的对应受试者的一种或多种细胞中的促炎介质表达相比,抗CD33抗体使受试者的一种或多种细胞中的促炎介质表达调节至少至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.15倍、至少2.2倍、至少2.25倍、至少2.3倍、至少2.35倍、至少2.4倍、至少2.45倍、至少2.5倍、至少2.55倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、或至少10倍。

[0406] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可适用于预

防、降低风险、或治疗与一种或多种促炎介质的异常水平相关联的病状和/或疾病,所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希一德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0407] ERK磷酸化

[0408] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞中表达的CD33蛋白之后诱导细胞外信号调节激酶(ERK)磷酸化。

[0409] 细胞外信号调节激酶(ERK)是参与例如调节分化细胞中的减数分裂、有丝分裂及有丝分裂后功能的广泛表达的蛋白质激酶细胞内信号传导激酶。各种刺激,如生长因子、细胞因子、病毒感染、异三聚体G蛋白偶联受体的配体、转化剂及致癌物质,活化ERK途径。ERK磷酸化引起其激酶活性的活化。

[0410] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)对于预防、降低风险、或治疗与降低的ERK磷酸化水平相关联的病状和/或疾病是有益的,所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希一德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33

的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0411] Syk磷酸化

[0412] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞中表达的CD33蛋白之后诱导脾酪氨酸激酶(Syk)磷酸化。

[0413] 脾酪氨酸激酶(Syk)是通过使若干底物磷酸化、从而有助于形成引起细胞活化和炎性过程的信号传导复合物来在CD33下游起作用的细胞内信号传导分子。

[0414] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)对于预防、降低风险、或治疗与降低的Syk磷酸化水平相关联的病状和/或疾病是有益的,所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0415] CD33磷酸化

[0416] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞中表达的CD33蛋白之后瞬时诱导通过Src家族酪氨酸激酶进行的Tyr-340和Tyr-358的CD33磷酸化,所述Src家族酪氨酸激酶诸如Src、Syk、Fyn、Fgr、Lck、Hck、Blk、Lyn、以及Frk。

[0417] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)对于预防、降低风险、或治疗与降低的CD33磷酸化水平相关联的病状和/或疾病是有益的,所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、

败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0418] 含有ITAM基序的受体的磷酸化

[0419] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞中表达的CD33蛋白之后诱导磷酸化含有ITAM基序的受体,诸如TREM1、TREM2、FcγR、DAP10、以及DAP12。

[0420] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)对于预防、降低风险、或治疗与含有ITAM基序的受体的降低的磷酸化水平相关联的病状和/或疾病是有益的,所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希一德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0421] C-C趋化因子受体7的调节表达

[0422] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞中表达的CD33蛋白之后调节C-C趋化因子受体7(CCR7)的表达。调节(例如,增加或降低)表达可包括但不限于调节基因表达、调节转录表达、或调节蛋白质表达。可使用本领域已知的用于确定基因、转录物(例如,mRNA)和/或蛋白质表达的任何方法。例如,可使用Northern印迹分析来确定抗炎介质基因表达水平,可使用RT-PCR来确定抗炎介质转录的水平,并且可使用蛋白质印迹分析来确定抗炎介质蛋白水平。

[0423] C-C趋化因子受体7(CCR7)是G蛋白偶合受体家族的成员。CCR7在各种淋巴样组织

中表达并且可使B细胞和T细胞活化。在一些实施方案中,CCR7可调节记忆T细胞向次级淋巴样器官(诸如淋巴结)的迁移。在其他实施方案中,CCR7可刺激树突细胞成熟。CCR7是可结合趋化因子(C-C基序)配体CCL19/ELC和CCL21的受体蛋白。

[0424] 如本文所用,如果CCR7在使用本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)治疗的受试者的一种或多种细胞中的表达与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者的一种或多种细胞中表达的CCR7的表达相比被调节(增加或降低),则CCR7可具有调节的表达。在一些实施方案中,例如与在未使用Cd33药剂治疗的对应受试者的一种或多种细胞中的CCR7表达相比,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可使受试者的一种或多种细胞中的CCR7表达调节至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%、或至少200%。在其他实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者的一种或多种细胞中的CCR7表达相比,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)使受试者的一种或多种细胞中的CCR7表达调节至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.15倍、至少2.2倍、至少2.25倍、至少2.3倍、至少2.35倍、至少2.4倍、至少2.45倍、至少2.5倍、至少2.55倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、或至少10倍。

[0425] 在一些实施方案中,CCR7的调节表达发生在巨噬细胞、树突细胞和/或小神经胶质细胞中。CCR7的调节表达可诱导小神经胶质细胞向表达趋化因子CCL19和CCL21的细胞的趋化性。因此,在某些实施方案中,本公开的抗CD33抗体可诱导小神经胶质细胞向CCL19和CCL21表达细胞的趋化性。

[0426] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)适用于预防、降低风险、或治疗与CCR7的异常水平相关联的病状和/或疾病,所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原

虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0427] 免疫相关蛋白的调节表达

[0428] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞中表达的CD33蛋白之后调节PD-L1、PD-L2、B7-H2、B7-H3、CD200R、CD163和/或CD206的表达。调节(例如,增加或降低)表达可包括但不限于调节基因表达、调节转录表达、或调节蛋白质表达。可使用本领域已知的用于确定基因、转录物(例如,mRNA)和/或蛋白质表达的任何方法。例如,可使用Northern印迹分析来确定抗炎介质基因表达水平,可使用RT-PCR来确定抗炎介质转录的水平,并且可使用蛋白质印迹分析来确定抗炎介质蛋白水平。

[0429] 如本文所用,如果PD-L1、PD-L2、B7-H2、B7-H3、CD200R、CD163和/或CD206在使用本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)治疗的受试者的一种或多种细胞中的表达与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者的一种或多种细胞中表达的PD-L1、PD-L2、B7-H2、B7-H3、CD200R、CD163和/或CD206的表达相比被调节,则PD-L1、PD-L2、B7-H2、B7-H3、CD200R、CD163和/或CD206可具有调节的表达。在一些实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者的一种或多种细胞中的PD-L1、PD-L2、B7-H3、CD200R、CD163和/或CD206表达相比,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可使受试者的一种或多种细胞中的PD-L1、PD-L2、B7-H2、B7-H3、CD200R、CD163和/或CD206表达调节至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%、或至少200%。在其他实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者的一种或多种细胞中的PD-L1、PD-L2、B7-H2、B7-H3、CD200R、CD163和/或CD206表达相比,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)使受试者的一种或多种细胞中的PD-L1、PD-L2、B7-H2、B7-H3、CD200R、CD163和/或CD206表达调节至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.15倍、至少2.2倍、至少2.25倍、至少2.3倍、至少2.35倍、至少2.4倍、至少2.45倍、至少2.5倍、至少2.55倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、或至少10倍。

[0430] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)适用于预防、降低风险、或治疗与PD-L1、PD-L2、B7-H2、B7-H3、CD200R、CD163和/或CD206的异常水平相关联的病状和/或疾病,所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化

症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症，包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0431] 骨髓衍生的树突细胞诱导抗原特异性T细胞增殖的能力的增强或正常化

[0432] 在一些实施方案中，本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞中表达的CD33蛋白之后使骨髓衍生的树突细胞诱导抗原特异性T细胞增殖的能力增强和/或正常化。

[0433] 在一些实施方案中，例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者的一种或多种骨髓衍生的树突细胞中骨髓衍生的树突细胞诱导抗原特异性T细胞增殖的能力相比，本公开的CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)可使受试者的一种或多种骨髓衍生的树突细胞中骨髓衍生的树突细胞诱导抗原特异性T细胞增殖的能力增强和/或正常化至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%、或至少200%。在其他实施方案中，例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者的一种或多种骨髓衍生的树突细胞中骨髓衍生的树突细胞诱导抗原特异性T细胞增殖的能力相比，本公开的CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)可使受试者的一种或多种骨髓衍生的树突细胞中骨髓衍生的树突细胞诱导抗原特异性T细胞增殖的能力增强和/或正常化至少至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.15倍、至少2.2倍、至少2.25倍、至少2.3倍、至少2.35倍、至少2.4倍、至少2.45倍、至少2.5倍、至少2.55倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、或至少10倍。

[0434] 在一些实施方案中，本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)对于预防、降低风险、或治疗与骨髓衍生的树突细胞诱导抗原特异性T细胞增殖的降低的或调节异常的能力相关联的病状和/或疾病是有益的，所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、

多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0435] 破骨细胞产生

[0436] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞中表达的CD33蛋白之后诱导破骨细胞产生和/或增加破骨细胞生成的速率。

[0437] 如本文所用,破骨细胞是可通过去除骨组织的矿化基质且破坏有机骨(例如,骨吸收)来去除骨组织的骨细胞类型。破骨细胞可通过骨髓谱系细胞的融合来形成。在一些实施方案中,破骨细胞可通过抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)和组织蛋白酶K的高表达来表征。

[0438] 如本文所用,如果在使用本公开的CD33药剂(诸如拮抗剂抗CD33抗体)治疗的受试者中的破骨细胞生成的速率大于未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的破骨细胞生成的速率,则破骨细胞生成的速率可能增加。在一些实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的破骨细胞生成的速率相比,CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)可使受试者中的破骨细胞生成的速率增加至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%、或至少200%。在其他实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的破骨细胞生成的速率相比,CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)可使受试者中的破骨细胞生成的速率增加至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.15倍、至少2.2倍、至少2.25倍、至少2.3倍、至少2.35倍、至少2.4倍、至少2.45倍、至少2.5倍、至少2.55倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、或至少10倍。

[0439] 如本文所用,如果在使用CD33药剂(诸如本公开的激动剂抗CD33抗体)治疗的受试者中的破骨细胞生成的速率小于未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的破骨细胞生成的速率,则破骨细胞生成的速率可能降低。在一些实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的破骨细胞生成的速率相比,CD33药剂(诸如本公开的激动剂抗CD33抗体)可使受试者中的破骨细胞生成的速率降低至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%、或至少200%。在其他实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的破骨细胞生成的速率相比,CD33药剂(诸如本公开的激

动剂抗CD33抗体)可使受试者中的破骨细胞生成的速率降低至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.15倍、至少2.2倍、至少2.25倍、至少2.3倍、至少2.35倍、至少2.4倍、至少2.45倍、至少2.5倍、至少2.55倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、或至少10倍。

[0440] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)对于预防、降低风险、或治疗与异常骨形成和维持相关联的病状和/或疾病是有益的,所述病状和/或疾病包括骨质疏松症(其与骨密度的病理学降低相关联)和骨质增生疾病(其与骨密度的病理学增加相关联)。

[0441] CD33表达细胞的增殖和存活

[0442] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞上表达的CD33蛋白之后增加树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性细胞、以及小神经胶质细胞的增殖、存活和/或功能。

[0443] 小神经胶质细胞是大脑和脊髓的常驻型巨噬细胞的胶质细胞类型,并且因此充当中枢神经系统(CNS)中的主动免疫防御机制的第一和主要形式。小神经胶质细胞占大脑内总胶质细胞群体的20%。小神经胶质细胞不断清除CNS的斑块、受损神经元和感染物。大脑和脊髓被认为是“免疫特许的”器官,因为它们通过已知为血脑屏障的一系列内皮细胞而与身体其他部分分开,所述血脑屏障防止大多数病原体到达脆弱的神经组织。在感染物直接引入到大脑或穿过血脑屏障的情况下,小神经胶质细胞必须快速反应以便在感染物损害敏感的神经组织之前限制炎症并消灭感染物。由于来自身体其他部分的抗体的不可用性(很少有抗体足够小而穿过血脑屏障),小神经胶质细胞必须能够识别异物、将其吞并并且充当活化T细胞的抗原呈递细胞。因为此过程必须快速进行以防止潜在致命的损害,所以小神经胶质细胞对于CNS中的甚至较小的病理学变化也是极其敏感的。它们部分地由于具有对细胞外钾的甚至较小的变化进行响应的独特的钾通道来实现此敏感性。

[0444] 如本文所用,本公开的巨噬细胞包括但不限于M1巨噬细胞、活化的M1巨噬细胞和M2巨噬细胞。如本文所用,本公开的小神经胶质细胞包括但不限于M1小神经胶质细胞、活化的M1小神经胶质细胞和M2小神经胶质细胞。

[0445] 在一些实施方案中,本公开的抗CD33抗体可增加树突细胞、单核细胞和/或巨噬细胞上的CD80、CD83和/或CD86的表达。

[0446] 如本文所用,如果在使用CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)治疗的受试者中的树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖速率、存活和/或功能大于在未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、T细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖速率、存活和/或功能,则巨噬细胞、树突细胞、单核细胞、T细胞、嗜中性粒细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖速率、存活和/或功能可包括增加的表达。在一些实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、T细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖速率、存活和/或功能相比,CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可使受试者

中的树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、T细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖速率、存活和/或功能增加至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%、或至少200%。在其他实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、T细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖速率、存活和/或功能相比,CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可使受试者中的树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、T细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖速率、存活和/或功能增加至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.15倍、至少2.2倍、至少2.25倍、至少2.3倍、至少2.35倍、至少2.4倍、至少2.45倍、至少2.5倍、至少2.55倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、或至少10倍。

[0447] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)对于预防、降低风险、或治疗与树突细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、T细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖、存活、增加的细胞凋亡和/或功能的降低相关联的病状和/或疾病是有益的,所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0448] 清除和吞噬作用

[0449] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在结合到在细胞中表达的CD33蛋白之后诱导对以下中的一种或多种的清除和/或吞噬作用:凋亡神经元、神经系统的神经组织碎片、功能失调的突触、神经系统的非神经组织碎片、细菌、其他异物、致病性蛋白、致病性肽、致病性核酸、或肿瘤细胞。在某些实施方案中,致病性蛋白包括

但不限于淀粉样蛋白 β 、寡聚淀粉样蛋白 β 、淀粉样蛋白 β 斑、淀粉样蛋白前体蛋白或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72 (染色体9开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易小体、心房利钠因子、胰岛淀粉样蛋白多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样蛋白A、medin、泌乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、抑半胱氨酸蛋白酶蛋白、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关非ATG (RAN) 翻译产物、二肽重复序列 (DPR) 肽、甘氨酸-丙氨酸 (GA) 重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸 (GP) 重复序列肽、甘氨酸-精氨酸 (GR) 重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸 (PA) 重复序列肽、泛素、以及脯氨酸-精氨酸 (PR) 重复序列肽。在某些实施方案中,致病性核酸包括但不限于GGCCCC (G2C4) 重复序列扩增RNA。

[0450] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂 (诸如本公开的抗CD33抗体) 可诱导一种或多种类型的清除,包括但不限于凋亡神经元清除、神经组织碎片清除、非神经组织碎片清除、细菌或其他异物清除、致病性蛋白清除、致病性肽清除、致病性核酸清除、以及肿瘤细胞清除。

[0451] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂 (诸如本公开的抗CD33抗体) 可诱导对以下中的一种或多种的吞噬作用:凋亡神经元、神经组织碎片、非神经组织碎片、细菌、其他异物、致病性蛋白、致病性肽、致病性核酸、和/或肿瘤细胞。

[0452] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂 (诸如本公开的抗CD33抗体) 可在降低的巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 水平的条件下增加通过嗜中性粒细胞、巨噬细胞、树突细胞、单核细胞、和/或小神经胶质细胞进行的吞噬作用。

[0453] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂 (诸如本公开的抗CD33抗体) 对于预防、降低风险、或治疗与凋亡神经元、神经系统的神经组织碎片、失调的突触、神经系统的非神经组织碎片、细菌、其他异物、致病性蛋白相关联的病状和/或疾病是有益的,所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病 (ALL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、慢性骨髓性白血病 (CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0454] CD33依赖性基因表达

[0455] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)可降低CD33依赖性基因的活性和/或表达,并且由此增加与活化免疫系统的信号传导级联相关联的基因表达,诸如与含有ITAM的受体、模式识别受体、Toll样受体、损害相关分子模式(DAMP)受体相关联的基因表达,诸如转录因子的活化T细胞的核因子(NFAT)家族中的一种或多种转录因子。

[0456] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)对于预防、降低风险、或治疗与CD33依赖性基因的高水平相关联的病状和/或疾病是有益的,所述病状和/或疾病包括但不限于痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0457] 免疫细胞的CD33依赖性活化

[0458] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)可增加细胞毒性T细胞、辅助T细胞或两者的活性。在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)对于预防、降低风险、或治疗与细胞毒性T细胞、辅助T细胞或两者的降低的活性相关联的病状和/或疾病是有益的,所述病状和/或疾病包括但不限于肿瘤,包括实体瘤,诸如膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、以及甲状腺癌。

[0459] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)可诱导T细胞、细胞毒性T细胞、CD3⁺ T细胞、辅助T细胞、树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖、存活、活性、和/或数量的增加。在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)在骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的存在下诱导T细胞、细胞毒性T细胞、CD3⁺ T细胞、辅助T细胞、树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖、存活、活性、和/或数量的增加。

[0460] 如本文所用,如果在使用CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)治疗的受试者中的T细胞、细胞毒性T细胞、CD3⁺ T细胞、辅助T细胞、树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖速率、存活、活性、和/或数量大于在未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的T细胞、细胞毒性T细胞、CD3⁺ T细胞、辅助T细胞、树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖速率、存活、活性、和/或数量,则T细胞、细胞毒性T细胞、CD3⁺ T细胞、辅助T细胞、树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖速率、存活、活性、和/或数量可包括增加的速率。在一些实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的T细胞、细胞毒性T细胞、CD3⁺ T细胞、辅助T细胞、树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖、存活、活性、和/或数量的水平相比,CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可使受试者中的T细胞、细胞毒性T细胞、CD3⁺ T细胞、辅助T细胞、树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖、存活、活性、和/或数量增加至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%、或至少200%。在其他实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的T细胞、细胞毒性T细胞、CD3⁺ T细胞、辅助T细胞、树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖、存活、活性、和/或数量的水平相比,CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可使受试者中的T细胞、细胞毒性T细胞、CD3⁺ T细胞、辅助T细胞、树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、破骨细胞、皮肤朗格汉斯细胞、库普弗细胞、和/或小神经胶质细胞的增殖、存活、活性、和/或数量增加至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.15倍、至少2.2倍、至少2.25倍、至少2.3倍、至少2.35倍、至少2.4倍、至少2.45倍、至少2.5倍、至少2.55倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、或至少10倍。

[0461] 嗜中性粒细胞的CD33依赖性活化

[0462] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的激动剂抗CD33抗体)可增加嗜中性粒细胞或两者的活性。在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的激动剂抗CD33抗体)对于预防、降低风险、或治疗与自然杀伤细胞、嗜中性粒细胞或两者的活性的降低的活性相关联的病状和/或疾病是有益的,所述病状和/或疾病包括但不限于肿瘤,包括实体瘤,诸如膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、以及甲状腺癌。

[0463] 肿瘤相关免疫细胞的CD33依赖性抑制

[0464] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的激动剂抗CD33抗体)可降低

活性、降低增殖、降低存活、降低功能性、降低肿瘤或淋巴样器官(例如,脾和淋巴结)的浸润、CD14⁺骨髓细胞的数量、降低肿瘤生长速率、减小肿瘤体积、减少或抑制骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的分化、存活和/或一种或多种功能、和/或促进T调节性细胞或抑制性肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞、或肿瘤相关巨噬细胞、或骨髓来源的抑制细胞的细胞凋亡。在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的激动剂抗CD33抗体)对于预防、降低风险、或治疗与一种或多种类型的免疫抑制细胞的活性相关联的病状和/或疾病是有益的,所述病状和/或疾病包括但不限于肿瘤,包括不表达CD33实体瘤,诸如膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、甲状腺癌、以及表达CD33的血液肿瘤,诸如白血病细胞。

[0465] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)可降低CD14⁺骨髓细胞的数量、降低肿瘤生长速率、减小肿瘤体积、或减少或抑制骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的分化、存活和/或一种或多种功能。

[0466] 在一些实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的CD14⁺骨髓细胞的数量、肿瘤生长速率、肿瘤体积、或骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的分化、存活和/或一种或多种功能的水平相比,CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在受试者中使CD14⁺骨髓细胞的数量降低、使肿瘤生长速率降低、使肿瘤体积减小、或使骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的分化、存活和/或一种或多种功能减少或抑制至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%、或至少200%。在其他实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的对应受试者中的CD14⁺骨髓细胞的数量、肿瘤生长速率、肿瘤体积、或骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的分化、存活和/或一种或多种功能的水平相比,CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可在受试者中使CD14⁺骨髓细胞的数量降低、使肿瘤生长速率降低、使肿瘤体积减小、或使骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的分化、存活和/或一种或多种功能减少或抑制至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.15倍、至少2.2倍、至少2.25倍、至少2.3倍、至少2.35倍、至少2.4倍、至少2.45倍、至少2.5倍、至少2.55倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、或至少10倍。

[0467] 检查点抑制剂疗法的增加的效力

[0468] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)可增加一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法(诸如PD-1抑制剂或靶向CTL4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、和/或LAG3中的一种或多种的疗法)的效力。

[0469] 在一些实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的接受一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法(诸如PD-1抑制剂或靶向CTL4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、和/或LAG3中的一种或多种的疗法)的对应受试者中的此类一种或多种疗法的有效性水平相比,CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可使接受一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法(诸如PD-1抑制剂或靶向CTL4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、和/

或LAG3中的一种或多种的疗法)的受试者中的此类一种或多种疗法的效力增加至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%、或至少200%。在其他实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的接受一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法(诸如PD-1抑制剂或靶向CTL4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、和/或LAG3中的一种或多种的疗法)的对应受试者中的此类一种或多种疗法的有效性水平相比,CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可使接受一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法(诸如PD-1抑制剂或靶向CTL4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、和/或LAG3中的一种或多种的疗法)的受试者中的此类一种或多种疗法的效力增加至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.15倍、至少2.2倍、至少2.25倍、至少2.3倍、至少2.35倍、至少2.4倍、至少2.45倍、至少2.5倍、至少2.55倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、或至少10倍。

[0470] 化疗剂的增加的效力

[0471] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)可增加一种或多种化疗剂的效力,所述一种或多种化疗剂诸如吉西他滨、卡培他滨、蒽环类药物、多柔比星(Adriamycin[®])、表柔比星(Ellence[®])、紫杉烷类、紫杉醇(Taxol[®])、多西他赛(Taxotere[®])、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytosan[®])、和/或卡铂(Paraplatin[®])。

[0472] 在一些实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的接受一种或多种化疗剂的对应受试者中的此类一种或多种疗法的有效性水平相比,CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可使接受一种或多种化疗剂的受试者中的此类一种或多种疗法的效力增加至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少110%、至少115%、至少120%、至少125%、至少130%、至少135%、至少140%、至少145%、至少150%、至少160%、至少170%、至少180%、至少190%、或至少200%。在其他实施方案中,例如与在未使用CD33药剂治疗的接受一种或多种化疗剂的对应受试者中的此类一种或多种疗法的有效性水平相比,CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可使接受一种或多种化疗剂的受试者中的此类一种或多种疗法的效力增加至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.1倍、至少2.15倍、至少2.2倍、至少2.25倍、至少2.3倍、至少2.35倍、至少2.4倍、至少2.45倍、至少2.5倍、至少2.55倍、至少3.0倍、至少3.5倍、至少4.0倍、至少4.5倍、至少5.0倍、至少5.5倍、至少6.0倍、至少6.5倍、至少7.0倍、至少7.5倍、至少8.0倍、至少8.5倍、至少9.0倍、至少9.5倍、或至少10倍。

[0473] 药物组合物

[0474] 可以通过将药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)与适当药学上可接受的载剂或稀释剂组合而将本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)并入多种配制物中以便治疗性施用,并且可以被配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂。此类配制物的实例包括但

不限于,片剂、胶囊、粉末、颗粒、药膏、溶液、栓剂、注射液、吸入剂、凝胶、微球体及气雾剂。取决于所希望的配制物,药物组合物可以包含药学上可接受的无毒载剂或稀释剂,这些载剂或稀释剂是常用于配制供动物或人施用的药物组合物的媒介物。选择的稀释剂不应影响组合的生物活性。此类稀释剂的实例包括但不限于,蒸馏水、缓冲水、生理盐水、PBS、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液及汉克氏溶液(Hank's solution)。本公开的药物组合物或配制物可以另外包含其它载剂、佐剂,或无毒、非治疗性、无免疫原性稳定剂、赋形剂等。这些组合物还可以包含接近生理条件的额外物质,如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂、润湿剂及清洁剂。

[0475] 本公开的药物组合物也可以包含多种稳定剂中的任一种,如抗氧化剂。当药物组合物包含多肽时,该多肽可以与各种众所周知的在体内增强该多肽的稳定性,或以其它方式增强其药理学特性(例如,增加该多肽的半衰期,降低其毒性及增进溶解或吸收)的化合物形成络合物。此类改良或络合剂的实例包括但不限于,硫酸盐、葡糖酸盐、柠檬酸盐及磷酸盐。组合物中的多肽还可以与增强其体内属性的分子形成复合物。此类分子包括但不限于,碳水化合物、多胺、氨基酸、其它肽、离子(例如钠、钾、钙、镁、锰)及脂质。

[0476] 有关适于各种类型施用的配制物的其它实例可以见于Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)中。有关药物递送方法的简要综述,参见Langer, Science 249:1527-1533 (1990)。

[0477] 对于经口施用,施用的活性成分可以呈固体剂型,如胶囊、片剂及粉末;或呈液体剂型,如酏剂、糖浆及混悬液。活性组分可以与无活性成分和粉末状载剂,如葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露糖醇、淀粉、纤维素或纤维素衍生物、硬脂酸镁、硬脂酸、糖精钠、滑石、碳酸镁一起封装于明胶胶囊中。可以添加以提供希望的颜色、味道、稳定性、缓冲能力、分散性或其它已知的期望特征的额外无活性成分的实例是红色氧化铁、硅胶、月桂基硫酸钠、二氧化钛及可食用白墨。可以使用类似稀释剂制备压制片剂。片剂和胶囊都可以被制造成持续释放产品的形式,以在数小时的时间里提供持续药物释放。压制片剂可以包覆糖衣或包覆膜衣以掩盖任何不愉快的味道并保护片剂免受大气影响,或包覆肠衣以在胃肠道中选择性崩解。供经口施用的液体剂型可以含有着色剂和调味剂以增加患者接受度。

[0478] 适于肠胃外施用的配制物包括水性和非水性、等渗无菌注射溶液,这些溶液可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂及使配制物与预定接受者的血液等渗的溶质;以及水性和非水性无菌混悬液,这些混悬液可以包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂及防腐剂。

[0479] 用于配制药物组合物的组分优选具有高纯度并且基本上不含可能有害的污染物(例如,至少是国家食品(NF)级,一般至少是分析级,并且更典型地至少是药品级)。此外,打算体内使用的组合物通常是无菌的。就给定化合物必须在使用前合成来说,所得产品典型地基本上不含在合成或纯化过程期间可能存在的任何可能有毒的物质,特别是任何内毒素。供肠胃外施用的组合物也是无菌的,基本上等渗并且在GMP条件下制备。

[0480] 配制物可以被优化成在脑或中枢神经系统中保持和稳定。当将药剂施用至脑室中时,希望该药剂保持在该隔室中,而不扩散或以其它方式跨过血脑屏障。稳定技术包括与如聚乙二醇、聚丙烯酰胺、中性蛋白质载体等基团交联、多聚化或连接,以便增加分子量。

[0481] 用于增加保持的其它策略包括将本公开的药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)覆埋在生物可降解或生物可蚀性植入物中。治疗活性剂的释放速率受经由聚合物基质运输的速

率及植入物生物降解速率控制。经聚合物阻隔层运输药物还将受化合物溶解性;聚合物亲水性;聚合物交联程度;在吸收水后聚合物膨胀以使聚合物阻隔层更易于透过药物;植入物的几何形状等影响。植入物具有与选作植入部位的区域的大小和形状相称的尺寸。植入物可以是粒子、薄片、贴片、平板、纤维、微胶囊等,并且可以具有与所选插入部位相容的任何大小或形状。

[0482] 植入物可以是单件式的,即,具有活性剂均匀地分布于聚合物基质中,或被包封,在此情况下,活性剂储集层被聚合物基质包封。打算使用的聚合物组合物的选择将随施用部位、希望的治疗时间段、患者耐受性、待治疗疾病的性质等而变化。聚合物的特征将包括在植入部位的生物降解性、与所关注药剂的相容性、易于包封、在生理环境中的半衰期。

[0483] 可以使用的生物可降解聚合物组合物可以是当降解时会产生生理学上可接受的降解产物的有机酯或醚,包括单体。酸酐、酰胺、原酸酯等可以单独使用,或与其它单体组合使用。这些聚合物将是缩合聚合物。聚合物可以是交联或未交联的。值得关注的是羟基脂肪酸聚合物(均聚物或共聚物),及多糖。所关注的聚酯中包括D-乳酸、L-乳酸、外消旋乳酸、羟基乙酸、聚己内酯及其组合的聚合物。通过采用L-乳酸酯或D-乳酸酯,得到缓慢生物降解的聚合物,而利用外消旋物,降解将明显增强。羟基乙酸与乳酸的共聚物特别值得关注,在此情况下,生物降解速率受羟基乙酸与乳酸的比率控制。最快降解的共聚物具有大致相等量的羟基乙酸和乳酸,在此情况下,任一均聚物对降解的抗性较强。羟基乙酸与乳酸的比率还将影响植入物的脆性,在此情况下,对于较大几何形状,将需要柔性较强的植入物。值得关注的多糖是藻酸钙,及官能化纤维素,特别是以不溶于水、约5kD至500kD分子量为特征的羧甲基纤维素酯等。在本公开的植入物中还可以采用生物可降解水凝胶。水凝胶典型地是以能够吸收液体为特征的共聚物材料。可以采用的示例性生物可降解水凝胶描述于Heller:Hydrogels in Medicine and Pharmacy,N.A.Peppes编,第III卷,CRC Press,Boca Raton,Fla.,1987,第137-149页中。

[0484] 药物剂量

[0485] 含有本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)的本公开的药物组合物可以根据已知方法,如以推注方式或通过经一段时间连续输注的静脉内施用、通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、颅内、脊柱内、皮下、关节内、滑膜内、囊内、口服、局部或吸入途径施用给需要用CD33药剂治疗的个体,优选人。

[0486] 本公开的药物组合物的剂量和希望的药物浓度可以取决于预期的特定用途而变化。适当剂量或施用途径的确定在普通技术人员的技能范围内。动物实验为确定人疗法的有效剂量提供了可靠指导。可以遵循Mordenti,J.和Chappell,W.“The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics,”Toxicokinetics and New Drug Development,Yacobi等人编,Pergamon Press,New York 1989,第42-46页中所描述的原理执行有效剂量的种间缩放。

[0487] 对于在体内施用本公开的CD33药剂中的任一种(诸如本公开的抗CD33抗体中的任一种),取决于施用途径,正常剂量可以在每天每kg个体的体重约10ng至约100mg或更高,优选每天约1mg/kg至10mg/kg间变化。对于在数天或更长时间内重复施用,取决于待治疗疾病、病症或病况的严重程度,持续治疗直到达到所希望的症状抑制。

[0488] 示例性给药方案可以包括施用约2mg/kg初始剂量的本公开的CD33药剂(诸如抗

CD33抗体),随后隔周施用约1mg/kg的每周维持剂量。取决于医生希望实现的药物动力学衰减模式,其它剂量方案也可能是有用的。举例来说,本文中涵盖一周向个体给药一至二十一次。在某些实施方案,可以使用在约3 μ g/kg至约2mg/kg范围内(如约3 μ g/kg、约10 μ g/kg、约30 μ g/kg、约100 μ g/kg、约300 μ g/kg、约1mg/kg及约2mg/kg)的剂量。在某些实施方案中,剂量频率是每天三次、每天两次、每天一次、隔天一次、每周一次、每两周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次、每八周一次、每九周一次、每十周一次,或每月一次、每两个月一次、每三个月一次或更长时间。治疗进展易于通过常规技术和测定监测。给药方案,包括施用的CD33药剂,诸如抗CD33抗体,可以与所用剂量无关而随时间变化

[0489] 具体的CD33药剂(诸如具体的抗CD33抗体)的剂量可在已被给予CD33药剂(诸如抗CD33抗体)的一个或多个施用的个体中凭经验确定。个体被给予增量剂量的CD33药剂(诸如抗CD33抗体)。为了评估CD33药剂(诸如抗CD33抗体)的效力,可监测本公开的疾病、病症或病状(例如,额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、癫痫发作、视网膜营养不良、创伤性脑损伤、脊髓损伤、长期抑郁症、动脉粥样硬化性血管疾病、以及正常老化的不合需要的症状)中的任一种的临床症状。

[0490] 取决于例如接受者的生理状况、施用的目的是治疗还是预防,及熟练技术人员已知的其它因素,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)的施用可以是连续的或间歇性的。CD33药剂(诸如抗CD33抗体)的施用可以在预先选择的时间段内是基本上连续的,或者可以是一系列间隔的剂量。

[0491] 有关具体递送剂量和方法的指导提供于文献中;参见例如,美国专利号4,657,760、5,206,344或5,225,212。不同配制物将有效用于不同治疗方法和不同病症,以及意图治疗特定器官或组织的施用可能需要以不同于另一器官或组织的方式递送,都在本公开的范围内。此外,剂量可以通过一次或多次独立施用,或通过连续输注施用。对于在数天或更长时间内重复施用,取决于病况,将持续治疗直至疾病症状发生所希望的抑制。不过,其它给药方案也可能是有用的。此治疗的进展易于通过常规技术和测定进行监测。

[0492] 治疗用途

[0493] 本公开的另外的方面提供调节(例如,活化或抑制)一种或多种CD33活性的方法,其包括但不限于调节(例如,活化或抑制)本公开的CD33蛋白、对酪氨酸特异性蛋白磷酸酶SHP1和SHP2的募集和结合、调节(例如,活化或抑制)对充当发动蛋白-1的鸟嘌呤核苷酸交换因子的PLC- γ 1的募集和结合、调节(例如,活化或抑制)对包含SH2结构域的蛋白质Crk1的募集和结合、调节(例如,活化或抑制)对SH3-SH2-SH3生长因子受体结合蛋白2(Grb2)的募集和结合、调节(例如,活化或抑制)对多种包含SH2的蛋白质的募集和结合、调节(例如,活化或抑制)通过蛋白激酶C进行的Ser-307和Ser-342的磷酸化、调节(例如,活化或抑制)与原癌基因c-Cbl、Vav和Syk的缔合及其活化、调节(例如,活化或抑制)CD33本身以及视黄酸可诱导的基因的Cbl依赖性泛素化和蛋白酶体降解、调节(例如,活化或抑制)细胞内钙动员、调节(例如,活化或抑制)促炎细胞因子IL-1 β 、IL-8和TNF- α 的产生、磷酸肌醇3-激酶的活化、调节(例如,活化或抑制)单核细胞、巨噬细胞、T细胞、嗜中性粒细胞、自然杀伤细胞、树突细胞、肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞、肿瘤相关巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、和/或调节性T细胞、和/或小神经胶质细胞的细胞生长、调节(例如,活化或抑制)单核细胞、巨噬细胞、T细胞、自然杀伤细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、或肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞、免

疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、和/或调节性T细胞、和/或小神经胶质细胞的细胞死亡和细胞凋亡、调节(例如,活化或抑制)多种细胞蛋白上的酪氨酸磷酸化、调节(例如,活化或抑制)单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和/或小神经胶质细胞的吞噬活性、调节(例如,活化或抑制)单核细胞、巨噬细胞、T细胞、天然杀伤细胞、树突细胞和/或小神经胶质细胞的增殖、调节(例如,活化或抑制)单核细胞、巨噬细胞、T细胞、天然杀伤细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞、肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、调节性T细胞、和/或小神经胶质细胞的总体功能性、调节(例如,活化或抑制)含有ITAM的受体的磷酸化、调节(例如,活化或抑制)介导ITAM信号传导的信号传导分子的磷酸化、调节(例如,活化或抑制)模式识别受体的活性、调节(例如,活化或抑制)Toll样受体的活性、或调节(例如,活化或抑制)有需要的个体中的损害相关分子模式(DAMP)受体的活性,所述方法通过向个体施用治疗有效量的本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)来调节(例如,活化或抑制)个体中一种或多种CD33活性。

[0494] 如本文所用,本公开的降低CD33的细胞水平和/或抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可用于预防、降低风险、或治疗痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、和/或流感嗜血杆菌。在一些实施方案中,所述药剂选自抗体、可溶性CD33受体、CD33-Fc融合蛋白、CD33免疫粘附素、结合一种或多种CD33配体的可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素、反义分子、siRNA、小分子抑制剂、蛋白质、以及肽。在一些实施方案中,所述CD33药剂是激动剂抗体。在一些实施方案中,所述CD33药剂是惰性抗体。在一些实施方案中,所述CD33药剂是拮抗剂抗体。

[0495] 在一些实施方案中,本公开提供预防、降低风险、或治疗以下各项的方法:痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、

肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、癌症、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、和/或流感嗜血杆菌,所述方法通过向有需要的个体施用治疗有效量的本公开的降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂来实现。在一些实施方案中,所述药剂选自抗体、可溶性CD33受体、CD33-Fc融合蛋白、CD33免疫粘附素、结合一种或多种CD33配体的可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素、反义分子、siRNA、小分子抑制剂、蛋白质、以及肽。在一些实施方案中,所述药剂是本公开的抗CD33抗体。

[0496] 在一些实施方案中,本公开提供通过向有需要的个体施用治疗有效量的本公开的降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂来预防、降低风险、或治疗癌症的方法。在一些实施方案中,所述药剂选自由以下组成的组:抗体、可溶性CD33受体、CD33-Fc融合蛋白、CD33免疫粘附素、结合一种或多种CD33配体的可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素、反义分子、siRNA、小分子抑制剂、蛋白质、以及肽。在某些实施方案中,所述药剂是本公开的抗CD33抗体。在一些实施方案中,所述药剂抑制选自以下的一种或多种CD33活性:(a)促进以下中的一种或多种的增殖、成熟、迁移、分化和/或功能性:免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、非致瘤性骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、非致瘤性CD14⁺骨髓细胞、以及调节性T细胞;(b)增强以下中的一种或多种到肿瘤中的浸润:免疫抑制树突细胞、免疫抑制巨噬细胞、免疫抑制嗜中性粒细胞、非致瘤性骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、以及调节性T细胞;(c)增加肿瘤中、外周血中或其他淋巴样器官中的促进肿瘤的骨髓/粒细胞性免疫抑制性细胞和/或非致瘤性CD14⁺骨髓细胞的数量;(d)增强非致瘤性骨髓来源的抑制细胞和/或非致瘤性CD14⁺骨髓细胞的促进肿瘤的活性;(e)增加肿瘤中或外周血中的促进肿瘤的细胞因子的表达,任选地其中所述促进肿瘤的细胞因子是TGF- β 或IL-10;(f)增加促进肿瘤的FoxP3⁺调节性T淋巴细胞的肿瘤浸润;(g)减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的活化;(h)减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性T淋巴细胞的浸润;(i)减少具有肿瘤杀伤潜力的肿瘤特异性NK细胞的浸润;(j)降低NK细胞的肿瘤杀伤潜力;(k)减少具有增强免疫应答的潜力的肿瘤特异性B淋巴细胞的浸润;(l)增加肿瘤体积;(m)增加肿瘤生长速率;(n)增加转移;(o)增加肿瘤复发率;(p)增加一种或多种PD-1配体的表达;(q)降低调节

抗肿瘤T细胞应答的一种或多种免疫疗法或一种或多种癌症疫苗的效力,任选地其中所述一种或多种免疫疗法是靶向选自以下组成的组的一种或多种蛋白质的免疫疗法:CD40、OX40、ICOS、CD28、CD137/4-1BB、CD27、GITR、PD-L1、CTLA4、PD-L2、PD-1、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG、DR-5、TREM1、TREM2、CSF-1受体、以及其任何组合;(r)抑制PLC γ /PKC/钙动员;(s)抑制PI3K/Akt、Ras/MAPK信号传导;以及(t)降低一种或多种化疗剂的效力,任选地其中所述化疗剂中的一种或多种是吉西他滨、卡培他滨、蒽环类药物、多柔比星(Adriamycin[®])、表柔比星(Ellence[®])、紫杉烷类、紫杉醇(Taxol[®])、多西他赛

(Taxotere[®])、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytoxan[®])、卡铂(Paraplatin[®])、以及其任何组合。在一些实施方案中,所述药剂表现出选自以下一种或多种活性:(a)增加肿瘤浸润CD3⁺T细胞的数量;(b)降低非致瘤性CD14⁺骨髓细胞中的CD33的细胞水平,任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞是肿瘤浸润细胞或者任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞存在于血液中;(c)减少非致瘤性CD14⁺骨髓细胞的数量,任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞是肿瘤浸润细胞或者任选地其中所述非致瘤性CD14⁺骨髓细胞存在于血液中;(d)降低一种或多种细胞中的PD-L1水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(e)降低一种或多种细胞中的PD-L2水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(f)降低一种或多种细胞中的B7-H2水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(g)降低一种或多种细胞中的B7-H3水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(h)降低一种或多种细胞中的CD200R水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(i)降低一种或多种细胞中的CD163水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(j)降低一种或多种细胞中的CD206水平,任选地其中所述一种或多种细胞是非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC);(k)降低实体瘤的肿瘤生长速率;(l)减小肿瘤体积;(m)增加一种或多种PD-1抑制剂的效力;(n)增加一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法的效力,任选地其中所述一种或多种检查点抑制剂疗法和/或免疫调节疗法靶向以下中的一种或多种:CTL4、腺苷途径、PD-L1、PD-L2、OX40、TIM3、LAG3、或其任何组合;(o)增加一种或多种化疗剂的效力,任选地其中所述化疗剂中的一种或多种是吉西他滨、卡培他滨、蒽环类药物、多柔比星(Adriamycin[®])、表柔比星(Ellence[®])、紫杉烷类、紫杉醇(Taxol[®])、多西他赛(Taxotere[®])、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(Cytoxan[®])、卡铂(Paraplatin[®])、以及其任何组合;(p)在非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)存在下增加T细胞的增殖;以及(q)抑制非致瘤性骨髓来源的抑制细胞(MDSC)的分化、存活、和/或一种或多种功能;以及(r)当偶联到化学毒素或放射性毒素时杀灭实体瘤和相关联的血管中的CD33表达免疫抑制骨髓细胞和/或CD14表达细胞。

[0497] 如本文所公开的,本公开的药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)还可用于诱导和/或促进一种或多种免疫细胞(例如,先天免疫细胞或适应性免疫细胞)的存活、成熟、功能性、迁移、或增殖。在一些实施方案中,本公开提供通过向所述个体施用治疗有效量的本公开的降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的药剂来诱导或促进有需要的个体中的一种或多种免疫细胞的存活、成熟、功能性、迁移、或增殖的

方法。在一些实施方案中,所述药剂选自由以下组成的组:抗体、可溶性CD33受体、CD33-Fc融合蛋白、CD33免疫粘附素、结合一种或多种CD33配体的可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素、反义分子、siRNA、小分子抑制剂、蛋白质、以及肽。在一些实施方案中,所述药剂是本公开的分离的抗CD33抗体。在一些实施方案中,所述一种或多种免疫细胞选自树突细胞、巨噬细胞、小神经胶质细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、以及其任何组合。

[0498] 在一些实施方案中,所述药剂是激动剂抗CD33抗体。在一些实施方案中,所述药剂是本公开的初始充当激动剂并且然后充当长期拮抗剂抗体的瞬时激动剂抗CD33抗体。在一些实施方案中,所述药剂是惰性抗CD33抗体。在一些实施方案中,所述药剂是拮抗剂抗CD33抗体。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体降低CD33的细胞(例如,细胞表面、细胞内、或总)水平。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体诱导CD33的降解。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体诱导CD33的裂解。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体诱导CD33的内化。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体诱导CD33的脱落。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体诱导CD33表达的下调。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(例如,结合)。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体瞬时活化CD33并且然后诱导CD33的降解。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体瞬时活化CD33并且然后诱导CD33的裂解。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体瞬时活化CD33并且然后诱导CD33的内化。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体瞬时活化CD33并且然后诱导CD33的脱落。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体瞬时活化CD33表达并且然后诱导CD33表达的下调。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体瞬时活化CD33并且然后诱导CD33的降低的表达。在某些实施方案中,所述个体具有拥有单核苷酸多态性(SNP) rs3865444CC或AC的CD33变体等位基因。在某些实施方案中,所述个体具有拥有单核苷酸多态性(SNP) 2459419CC或CT的CD33变体等位基因。

[0499] 如本文所用,本公开的结合CD33或与CD33相互作用的药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)还可用于降低以下各项的活性、功能性、或存活:调节性T细胞、肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞、肿瘤包埋的免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、急性骨髓性白血病(AML)细胞、慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞、和/或慢性骨髓性白血病(CML)细胞。在一些实施方案中,本公开提供通过向有需要的个体施用治疗有效量的结合CD33或与CD33相互作用的药剂来降低所述个体中的以下各项的活性、功能性、或存活的方法:调节性T细胞、肿瘤包埋的免疫抑制树突细胞、肿瘤包埋的免疫抑制巨噬细胞、骨髓来源的抑制细胞、肿瘤相关巨噬细胞、急性骨髓性白血病(AML)细胞、慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞、或慢性骨髓性白血病(CML)细胞。在一些实施方案中,所述药剂选自抗体、拮抗剂抗体、惰性抗体、激动剂抗体、CD33配体、CD33配体激动剂片段、CD33免疫粘附素、CD33配体模拟物、可溶性CD33受体、CD33-Fc融合蛋白、结合一种或多种CD33配体的可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、结合一种或多种CD33配体的唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白、以及小分子化合物。在一些实施方案中,所述药剂是本公开的分离的抗CD33抗体或抗CD33抗体偶联物。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体偶联物包括偶联到可检测的标记物、毒素、或治疗剂的抗CD33抗体。

[0500] 如本文所公开的,本公开的抗CD33抗体可用于在体外或体内的一种或多种细胞上

降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者。在一些实施方案中,本公开提供通过向有需要的个体施用治疗有效量的本公开的分离的抗CD33抗体来在所述个体中的一种或多种细胞上降低CD33的细胞水平、抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用、或两者的方法。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体降低体内CD33的细胞水平。

[0501] 如本文所公开的,本公开的抗CD33抗体可用于降低一种或多种细胞和/或细胞系上的CD33的细胞水平,所述一种或多种细胞包括但不限于树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、T细胞、以及巨噬细胞。在一些实施方案中,本公开提供通过向有需要的个体施用治疗有效量的本公开的抗CD33抗体来降低所述个体中的一种或多种细胞上的CD33的细胞水平的方法。在一些实施方案中,所述一种或多种细胞选自树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、T细胞、和巨噬细胞、以及其任何组合。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体降低体内CD33的细胞水平。CD33的细胞水平可是指但不限于CD33的细胞表面水平、CD33的细胞内水平和CD33的总水平。在一些实施方案中,降低CD33的细胞水平包括降低CD33的细胞表面水平。如本文所用,CD33的细胞表面水平可通过本文所述的或本领域已知的任何体外基于细胞的测定或合适的体内模型来测量。在一些实施方案中,降低CD33的细胞水平包括降低CD33的细胞内水平。如本文所用,CD33的细胞内水平可通过本文所述的或本领域已知的任何体外基于细胞的测定或合适的体内模型来测量。在一些实施方案中,降低CD33的细胞水平包括降低CD33的总水平。如本文所用,CD33的总水平可通过本文所述的或本领域已知的任何体外基于细胞的测定或合适的体内模型来测量。在一些实施方案中,抗CD33抗体诱导CD33降解、CD33裂解、CD33内化、CD33脱落、和/或CD33表达的下调。在一些实施方案中,CD33的细胞水平利用体外细胞测定在原代细胞(例如,树突细胞、骨髓衍生的树突细胞、单核细胞、小神经胶质细胞、T细胞、以及巨噬细胞)上或细胞系上测量。

[0502] 本公开的其他方面涉及一种选择有需要的受试者以供使用结合CD33或与CD33相互作用的药剂治疗的方法,所述方法包括:a.从受试者获得样品(例如,血液样品);b.检测存在于受试者中的CD33等位基因;以及c.选择使用结合CD33或与CD33相互作用的药剂治疗的受试者,所述受试者具有一种或多种CD33等位基因,其中所述一种或多种CD33等位基因选自由rs3865444^{AC}和rs3865444^{CC}组成的组。本公开的其他方面涉及一种评估有需要的受试者对于结合CD33或与CD33相互作用的药剂的应答性的方法,所述方法包括:a.在向受试者施用抗CD33抗体之前测量从受试者获得的血液样品中的非致瘤性骨髓细胞上的CD45⁺和CD14⁺的表达水平;b.向受试者施用治疗有效量的药剂;以及c.在施用抗CD33抗体之后测量从受试者获得的血液样品中的非致瘤性骨髓细胞上的CD45⁺和CD14⁺的表达水平,其中在施用抗CD33抗体之后非致瘤性骨髓细胞上的CD45⁺CD14⁺水平降低指示受试者对于药剂具有应答性。可使用用于获得样品(诸如血液样品)的任何合适的方法。另外,应理解,可使用检测CD33变体和/或等位基因的任何已知的方法,诸如SNP分析。在一些实施方案中,评估应答性的方法还包括施用一份或多份额外的治疗有效量的药剂。在一些实施方案中,所述药剂选自以下组成的组:抗体、可溶性CD33受体、CD33-Fc融合蛋白、CD33免疫粘附素、可溶性唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素受体、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-Fc融合蛋白、唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素免疫粘附素、反义分子、siRNA、小分子抑制剂、蛋白质、以

及肽。在一些实施方案中,所述药剂是分离的抗CD33抗体或抗CD33抗体偶联物。在一些实施方案中,所述抗CD33抗体是本公开的抗CD33抗体。在一些实施方案中,所述受试者是人。

[0503] 在一些实施方案中,所述个体具有CD33的变体。在一些实施方案中,所述变体包括但不限于选自以下的一种或多种多态性:(a) SNP rs3865444^{AC}; (b) SNP rs3865444^{CC}; (c) SNP rs35112940^{GG,AA,AG};以及(d) SNP rs12459419^{CC,CT或TT};以及其任何组合。

[0504] 在一些实施方案中,本公开的方法还可涉及CD33药剂(诸如抗CD33抗体或双特异性抗CD33抗体)与以下各项的共施用:结合到模式识别受体的抗体、结合到Toll样受体的抗体、结合到损害相关分子模式(DAMP)受体的抗体、和/或结合到细胞因子的抗体或结合到白细胞介素的抗体)。

[0505] 在一些实施方案中,本公开的方法还可包括向所述个体施用特异性地结合到抑制性检查点分子的至少一种抗体和/或一种或多种标准或研究性抗癌疗法。在一些实施方案中,特异性地结合到抑制性检查点分子的至少一种抗体与所述抗CD33抗体组合施用。在一些实施方案中,特异性地结合到抑制性检查点分子的至少一种抗体选自抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体、抗PD-L2抗体、抗PD-1抗体、抗B7-H3抗体、抗B7-H4抗体、以及抗HVEM抗体、抗B淋巴细胞和T淋巴细胞衰减因子(BTLA)抗体、抗杀伤细胞抑制性受体(KIR)抗体、抗GAL9抗体、抗TIM3抗体、抗A2AR抗体、抗LAG-3抗体、抗磷脂酰丝氨酸抗体、抗CD27抗体、抗TNF α 抗体、抗唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-5抗体、抗唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-7抗体、抗唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9抗体、抗唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-11抗体、拮抗性抗TREM1抗体、拮抗性抗TREM2抗体、以及其任何组合。在一些实施方案中,所述一种或多种标准或研究性抗癌疗法选自放射疗法、细胞毒性化学疗法、靶向疗法、伊马替尼疗法、曲妥珠单抗疗法、依那西普疗法、过继细胞移植(ACT)疗法、嵌合抗原受体T细胞移植(CAR-T)疗法、疫苗疗法、以及细胞因子疗法。

[0506] 在一些实施方案中,本公开的方法还可包括向所述个体施用特异性地结合到抑制性细胞因子的至少一种抗体。在一些实施方案中,特异性地结合到抑制性细胞因子的至少一种抗体与CD33药剂(诸如抗CD33抗体)组合施用。在一些实施方案中,特异性地结合到抑制性细胞因子的至少一种抗体选自抗CCL2抗体、抗CSF-1抗体、抗IL-2抗体、以及其任何组合。

[0507] 在一些实施方案中,本公开的方法还可包括向所述个体施用特异性地结合到刺激性检查点蛋白的至少一种激动性抗体。在一些实施方案中,特异性地结合到刺激性检查点蛋白的至少一种激动性抗体与CD33药剂(诸如抗CD33抗体)组合施用。在一些实施方案中,特异性地结合到刺激性检查点蛋白的至少一种激动性抗体选自激动剂抗CD40抗体、激动剂抗OX40抗体、激动剂抗ICOS抗体、激动剂抗CD28抗体、激动性抗TREM1抗体、激动性抗TREM2抗体、激动剂抗CD137/4-1BB抗体、激动剂抗CD27抗体、激动剂抗糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白GITR抗体、以及其任何组合。

[0508] 在一些实施方案中,本公开的方法还可包括向所述个体施用至少一种刺激性细胞因子。在一些实施方案中,所述至少一种刺激性细胞因子与CD33药剂(诸如抗CD33抗体)组合施用。在一些实施方案中,所述至少一种刺激性细胞因子选自IFN- α 4、IFN- β 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、IFN- γ 、OSM、CNTF、GM-CSF、IL-11、IL-12、IL-17、IL-18、IL-23、CXCL10、IL-33、CRP、IL-33、MCP-1、MIP-1- β 、以及其任何组合。

[0509] 在一些实施方案中,受试者或个体是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如,牛、羊、猫、狗、以及马)、灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物,诸如猴)、兔、以及啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。在一些实施方案中,所述受试者或个体是人。

[0510] 痴呆

[0511] 痴呆是一种非特异性综合症(即,一组征象和症状),表现为先前未受损害的个体的总体认知能力严重丧失,超出可能由正常年龄预期的程度。痴呆可以是由独特的全脑损伤引起的静态痴呆。或者,痴呆可以是进行性的,由于身体损伤或疾病而引起长期减退。尽管痴呆在老年人群中较为常见,但其也可以在65岁前发生。痴呆所影响的认知区域包括但不限于,记忆、注意力持续时间、语言及解决问题的能力。一般来说,在个体被诊断患有痴呆之前,症状必须存在至少六个月。

[0512] 痴呆的示例性形式包括但不限于,额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、语义性痴呆及路易体痴呆。

[0513] 在一些实施方案中,施用本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可预防、降低风险、和/或治疗痴呆。在一些实施方案中,施用CD33药剂(诸如抗CD33抗体)可调节患有痴呆的个体中的一种或多种CD33活性。

[0514] 额颞叶痴呆

[0515] 额颞叶痴呆(FTD)是由脑额叶进行性恶化引起的一种病况。随时间推移,退化可能发展至颞叶。FTD的发病率仅次于阿尔茨海默氏病(AD),在早老性痴呆病例中占20%。FTD的临床特征包括记忆减退、行为异常、性格改变及语言障碍(Cruts,M.和Van Broeckhoven,C.,Trends Genet.24:186-194(2008);Neary,D.等人,Neurology 51:1546-1554(1998);Ratnavalli,E.,Brayne,C.,Dawson,K.&Hodges,J.R.,Neurology 58:1615-1621(2002))。

[0516] 相当大一部分的FTD病例是以常染色体显性方式遗传,但即使是在一个家族中,症状也可能从伴随行为障碍的FTD到原发性进行性失语,乃至皮质基底神经节变性。与大多数神经退化性疾病相同,FTD可以通过患病脑中特定蛋白质聚集体的病理性存在为特征。在历史上,最初关于FTD的说明认识到在神经元纤维缠结或皮克体(Pick body)中存在过度磷酸化的Tau蛋白的神经元内积累。在若干家族中鉴别出Tau蛋白编码基因的突变支持了微管相关蛋白Tau的致病作用(Hutton,M.等人,Nature 393:702-705(1998))。然而,大部分的FTD脑显示无过度磷酸化的Tau积累,而是与泛素(Ub)和TAR DNA结合蛋白(TDP43)展现免疫反应性(Neumann,M.等人,Arch.Neurol.64:1388-1394(2007))。已证明,包含Ub的FTD病例(FTD-U)中大部分携带颗粒蛋白前体基因的突变。

[0517] 在一些实施方案中,施用本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可预防、降低风险、和/或治疗FTD。在一些实施方案中,施用CD33药剂(诸如抗CD33抗体)可调节患有FTD的个体中的一种或多种CD33活性。

[0518] 阿尔茨海默氏病

[0519] 阿尔茨海默氏病(AD)是痴呆最常见的形式。该疾病无法治愈,随着其进展而恶化,并且最终导致死亡。最常在年龄超过65岁的人群中诊断出AD。不过,发病率不太高的早发型阿尔茨海默氏病发病要早得多。

[0520] 阿尔茨海默氏病的常见症状包括行为症状,如难以记住近期事件;认知症状、困惑、易怒及攻击性、情绪波动、语言障碍及长期记忆丧失。随着疾病发展,身体功能丧失,最

终导致死亡。阿尔茨海默氏病在变得完全明显之前发展了未知并且不同量的时间,而且该疾病可以在未诊断情况下进展数年。

[0521] 在一些实施方案中,施用本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可预防、降低风险、和/或治疗阿尔茨海默氏病。在一些实施方案中,施用CD33药剂(诸如抗CD33抗体)可调节患有阿尔茨海默氏病的个体中的一种或多种CD33活性。

[0522] 帕金森氏病

[0523] 帕金森氏病,可以称为特发性或原发性帕金森病、运动功能减退强直综合症(HRS)或震颤性麻痹,是影响运动系统控制的一种神经退化性脑病。脑中产多巴胺细胞的进行性死亡引起帕金森氏病的主要症状。帕金森氏病最常诊断于超过50岁的人群。帕金森氏病在大多数人中是特发性的(成因未知)。不过,遗传因素在该疾病中也起到作用。

[0524] 帕金森氏病的症状包括但不限于,手、臂、腿、颞及面部颤动;肢体和躯干肌肉僵硬;行动缓慢(运动徐缓);姿势不稳;难以步行;神经精神问题;言语或行为改变;抑郁;焦虑;疼痛;精神病;痴呆;幻觉;及睡眠问题。

[0525] 在一些实施方案中,施用本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可预防、降低风险、和/或治疗帕金森氏病。在一些实施方案中,施用CD33药剂(诸如抗CD33抗体)可调节患有帕金森氏病的个体中的一种或多种CD33活性。

[0526] 肌萎缩性侧索硬化症(ALS)

[0527] 如本文所使用,肌萎缩性侧索硬化症(ALS),或运动神经元疾病,或Lou Gehrig病可互换使用,并且指由不同病因引起的以迅速进行性虚弱、肌肉萎缩和肌束颤动、肌痉挛、讲话困难(构音困难)、难以吞咽(吞咽困难)及难以呼吸(呼吸困难)为特征的衰弱性疾病。

[0528] 已证明,颗粒蛋白前体在ALS中起作用(Schymick, JC等人(2007) J Neurol Neurosurg Psychiatry.;78:754-6)而且也保护由致ALS蛋白,如TDP-43引起的损伤(Laird, AS等人(2010). PLoS ONE 5:e13368)。另外,经证实,在脊髓损伤后,NGF前体诱导p75介导的少突胶质细胞和皮质脊髓神经元死亡(Beatty等人, Neuron(2002), 36, 第375-386页;Giehl等人, Proc. Natl. Acad. Sci USA(2004), 101, 第6226-30页)。

[0529] 在一些实施方案中,施用本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可预防、降低风险、和/或治疗ALS。在一些实施方案中,施用CD33药剂(诸如抗CD33抗体)可调节患有肌萎缩性侧索硬化症的个体中的一种或多种CD33活性。

[0530] 亨廷顿氏病

[0531] 亨廷顿氏病(HD)是由亨廷顿基因(HTT)的常染色体显性突变引起的一种遗传性神经退化性疾病。亨廷顿基因内细胞因子-腺嘌呤-鸟嘌呤(CAG)三联体重复序列扩增导致产生由该基因编码的亨廷顿蛋白(Htt)的突变体形式。这一突变亨廷顿蛋白(mHtt)有毒并且导致神经元死亡。亨廷顿氏病的症状最常见于介于35岁与44岁之间的年龄,不过其也可以见于任何年龄。

[0532] 亨廷顿氏病的症状包括但不限于,运动控制问题、急动、随意运动(舞蹈病)、异常眼动、平衡障碍、癫痫发作、咀嚼困难、吞咽困难、认知问题、讲话改变、记忆障碍、思考困难、失眠、疲劳、痴呆、性格改变、抑郁、焦虑及强迫行为。

[0533] 在一些实施方案中,施用本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可预防、降低风险、和/或治疗亨廷顿氏病(HD)。在一些实施方案中,施用CD33药剂(诸如抗CD33抗

体)可调节患有亨廷顿氏病的个体中的一种或多种CD33活性。

[0534] tau蛋白病

[0535] Tau蛋白病,或Tau病是由微管相关蛋白tau在脑内聚集引起的一类神经退化性疾病。阿尔茨海默氏病(AD)是最熟知的tau蛋白病,并且涉及呈不可溶神经原纤维缠结(NFT)形式的神经元内的tau蛋白的积累。其他tau蛋白病和病症包括进行性核上性麻痹、拳击员痴呆(慢性创伤性脑病)、与染色体17连锁的额颞叶痴呆和帕金森神经机能障碍、Lytico-Bodig病(关岛帕金森-痴呆复合征)、缠结为主的痴呆、神经节神经胶质瘤和神经节细胞瘤、脑膜血管瘤病、亚急性硬化性全脑炎、铅中毒脑病、结节性硬化症、哈-斯二氏病(Hallervorden-Spatz disease)、脂褐质沉积症、皮克氏病(Pick's disease)、皮层基底变性、嗜银颗粒病(AGD)、亨廷顿氏病、以及额颞叶变性。

[0536] 在一些实施方案中,施用本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可预防、降低风险、和/或治疗tau蛋白病。在一些实施方案中,施用CD33药剂(诸如抗CD33抗体)可调节患有tau蛋白病的个体中的一种或多种CD33活性。

[0537] 多发性硬化症

[0538] 多发性硬化(MS)又可以称为播散性硬化或播散性脑脊髓炎。MS是脑和脊髓轴突周围的脂肪髓鞘受损,导致脱髓鞘和瘢痕形成以及众多征象和症状的一种炎症性疾病。MS影响脑和脊髓中的神经细胞彼此有效通信的能力。神经细胞通过将电信号(称为动作电位)沿隔离物质(称为髓磷脂)内所含的纤维(称为轴突)向下传送来进行通信。就MS来说,身体自身的免疫系统攻击并损害髓磷脂。当髓磷脂丧失时,轴突不再有效地传导信号。MS通常在青少年时发作,并且较常见于女性。

[0539] MS的症状包括但不限于,感觉改变,如敏感性或麻刺感丧失;刺痛感或麻木,如感觉迟钝和感觉异常;肌肉软弱;阵挛;肌肉痉挛;移动困难;协调和平衡困难,如共济失调;讲话困难,如构音困难,或难以吞咽,如吞咽困难;视力问题,如眼球震颤、视神经炎,包括光幻视和复视;疲劳;急性或慢性疼痛;及排尿和排便困难;不同程度的认知障碍;抑郁或情绪不稳定的情感症状;Uhthoff现象,这是由暴露于高于常温的环境温度引起的现存症状的恶化;及莱尔米特征(Lhermitte's sign),这是在曲颈时蔓延至背部的一种触电感。

[0540] 在一些实施方案中,施用本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可预防、降低风险、和/或治疗多发性硬化症。在一些实施方案中,施用CD33药剂(诸如抗CD33抗体)可调节患有多发性硬化症的个体中的一种或多种CD33活性。

[0541] 癌症

[0542] 本公开的另外的方面提供用于通过向有需要的个体施用治疗有效量的本公开的CD33药剂(诸如本公开的分离的抗CD33抗体)来预防、降低风险、或治疗癌症的方法。在这些方法中可使用本公开的分离的抗体中的任一种。在一些实施方案中,所述分离的抗体是本公开的激动剂抗体。在其他实施方案中,所述分离的抗体是本公开的拮抗剂抗体。在其他实施方案中,所述分离的抗体是本公开的惰性抗体。在其他实施方案中,所述分离的抗体是本公开的抗体偶联物。

[0543] 如本文公开的,已知肿瘤微环境含有异质免疫浸润物,其包括T淋巴细胞、巨噬细胞和骨髓/粒细胞谱系的细胞。肿瘤中的T调节性细胞、肿瘤包埋的免疫抑制骨髓细胞、和/或M2-巨噬细胞的存在和活性与不良预后相关联。相比之下,细胞毒性T细胞的存在和活性

对于癌症疗法是有益的。期望直接或间接增强细胞毒性T细胞的活性并且降低各种免疫抑制细胞的数量和活性的疗法提供显著的治疗性益处。开创性临床前研究已显示靶向免疫抑制细胞的药物(例如,CSF1/CSF1R阻断抗体)与活化细胞毒性T细胞的免疫检查点阻断抗体之间的协同效应,这指示操作两种细胞类型在个体疗法有效性不佳的肿瘤模型中显示效力(Zhu Y;Cancer Res.2014年9月15日;74(18):5057-69)。因此,在一些实施方案中,阻断CD33(其在骨髓细胞(T细胞的亚组)和肿瘤相关免疫细胞上表达)可刺激有益的抗肿瘤免疫应答,从而引起治疗性抗肿瘤免疫应答。

[0544] 在一些实施方案中,用于预防、降低风险、或治疗患有癌症的个体的方法包括向所述个体施用特异性地结合到抑制性检查点分子的至少一种抗体。特异性地结合到抑制性检查点分子的抗体的实例包括但不限于抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体、抗PD-L2抗体、抗PD-1抗体、抗B7-H3抗体、抗B7-H4抗体、以及和抗HVEM抗体、抗-BTLA抗体、抗GAL9抗体、抗TIM3抗体、抗A2AR抗体、抗LAG-3抗体、抗磷脂酰丝氨酸抗体、以及其任何组合。在一些实施方案中,特异性地结合到抑制性检查点分子的至少一种抗体与本公开的CD33药剂(诸如本公开的拮抗剂抗CD33抗体)组合施用。

[0545] 在一些实施方案中,待通过本公开的方法预防或治疗的癌症包括但不限于鳞状细胞癌(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、胃癌或胃癌(包括胃肠癌和胃肠道基质癌)、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、肝细胞癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾脏癌症或肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、黑素瘤、表面散布的黑素瘤、恶性痣性黑素瘤、肢端雀斑样痣性黑素瘤、结节性黑素瘤、多发性骨髓瘤和B细胞淋巴瘤;慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性成淋巴细胞白血病(ALL);多毛细胞白血病;慢性髓细胞性白血病;以及移植后淋巴组织增生性病症(PTLD)、以及与瘰癧病相关联的异常血管增生、水肿(诸如与大脑肿瘤相关联的水肿)、梅格斯氏综合征(Meigs'syndrome)、脑癌以及头颈癌、以及相关转移瘤。在一些实施方案中,所述癌症是结肠直肠癌。在一些实施方案中,所述癌症选自非小细胞肺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肾细胞癌、膀胱癌、卵巢癌、黑素瘤、乳腺癌、胃癌、以及肝细胞癌。在一些实施方案中,所述癌症是三阴性乳腺癌。在一些实施方案中,所述癌症可以是早期癌症或晚期癌症。在一些实施方案中,所述癌症可以是原发性肿瘤。在一些实施方案中,所述癌症可以是衍生自以上癌症类型中的任一种的在第二位点处的转移性肿瘤。

[0546] 在一些实施方案中,本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)可用于预防、降低风险、或治疗癌症,所述癌症包括但不限于膀胱癌乳腺癌、结肠和直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、以及甲状腺癌。

[0547] 在一些实施方案中,本公开提供通过向患有癌症的个体施用治疗有效量的本公开的CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)来预防、降低风险、或治疗所述个体的方法。

[0548] 在一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用特异性地结合到抑制性检查点分子的至少一种抗体和/或另一种标准或研究性抗癌疗法。在一些实施方案中,特异性地结合到抑制性检查点分子的至少一种抗体与CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)组合施用。在一些实施方案中,特异性地结合到抑制性检查点分子的至少一种抗体选自抗PD-L1抗

体、抗CTLA4抗体、抗PD-L2抗体、抗PD-1抗体、抗B7-H3抗体、抗B7-H4抗体、以及抗HVEM抗体、抗B淋巴细胞和T淋巴细胞衰减因子 (BTLA) 抗体、抗杀伤细胞抑制性受体 (KIR) 抗体、抗GAL9抗体、抗TIM3抗体、抗A2AR抗体、抗LAG-3抗体、抗磷脂酰丝氨酸抗体、抗CD27抗体、以及其任何组合。在一些实施方案中,所述标准或研究性抗癌疗法是选自以下中的一种或多种疗法:放射疗法、细胞毒性化学疗法、靶向疗法、伊马替尼(Gleevec®)、曲妥珠单抗(Herceptin®)、过继细胞移植(ACT)、嵌合抗原受体T细胞移植(CAR-T)、疫苗疗法、以及细胞因子疗法。

[0549] 在一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用特异性地结合到抑制性细胞因子的至少一种抗体。在一些实施方案中,特异性地结合到抑制性细胞因子的至少一种抗体与CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)组合施用。在一些实施方案中,特异性地结合到抑制性细胞因子的至少一种抗体选自抗CCL2抗体、抗CSF-1抗体、抗IL-2抗体、以及其任何组合。

[0550] 在一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用特异性地结合到刺激性免疫检查点蛋白的至少一种激动性抗体。在一些实施方案中,特异性地结合到刺激性检查点蛋白的至少一种激动性抗体与CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)组合施用。在一些实施方案中,特异性地结合到刺激性检查点蛋白的至少一种激动性抗体选自激动剂抗CD40抗体、激动剂抗OX40抗体、激动剂抗ICOS抗体、激动剂抗CD28抗体、激动剂抗CD137/4-1BB抗体、激动剂抗CD27抗体、激动剂抗糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白GITR抗体、以及其任何组合。

[0551] 在一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用至少一种刺激性细胞因子。在一些实施方案中,所述至少一种刺激性细胞因子与CD33药剂(诸如本公开的抗CD33抗体)组合施用。在一些实施方案中,所述至少一种刺激性细胞因子选自TNF- α 、IL-6、IL-8、CRP、IL-20家族成员、LIF、OSM、CNTF、IL-11、IL-12、IL-17、IL-18、IFN- α 、IFN- β 、IL-2、IL-18、GM-CSF、G-CSF、以及其任何组合。

[0552] 试剂盒/制品

[0553] 本公开还提供含有本公开的CD33药剂(例如,本文所述的抗CD33抗体)或其功能性片段的试剂盒和/或制品。本公开的试剂盒和/或制品可包括包含本公开的纯化抗体的一个或多个容器。在一些实施方案中,试剂盒和/或制品还包括用于根据本公开的方法使用的说明书。在一些实施方案中,这些说明书包括根据本公开的任何方法施用本公开的CD33药剂(例如,本文所述的抗CD33抗体)来预防、降低风险、或治疗患有选自以下的疾病、病症、或损伤的个体的描述:痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、混合型痴呆、克-雅二氏病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病、Nasu-Hakola病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、类风湿关节炎、伤口愈合、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、肥胖症、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、贝切特氏病、帕金森氏病、路易体痴呆、多系统萎缩、希-德二氏综合征、进行性核上性麻痹、皮层基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、老化疾病、癫痫发作、脊髓损伤、创伤性脑损伤、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身感染、狼疮、关节炎、多发性硬化症、低骨密度、骨质疏松症、骨生成、骨质增生疾病、佩吉特氏骨病、以及癌症,包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、纤维肉瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血

病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、原发性或特发性骨髓纤维化、原发性或特发性脊髓硬化症、骨髓来源的肿瘤、表达CD33的肿瘤、甲状腺癌、感染、CNS疱疹、寄生虫感染、锥虫感染、Cruzi感染、铜绿假单胞菌感染、杜氏利什曼原虫感染、B族链球菌感染、空肠弯曲杆菌感染、脑膜炎奈瑟氏球菌感染、I型HIV、以及流感嗜血杆菌。

[0554] 在一些实施方案中,所述说明书包括如何例如检测个体中、组织样品中、或细胞中的CD33蛋白的描述。所述试剂盒和/或制品还可包括基于鉴定个体是否患有疾病和疾病阶段来选择适于治疗的个体的描述。

[0555] 在一些实施方案中,所述试剂盒和/或制品还可包括本公开的另一种抗体(例如,特异性地结合到抑制性检查点分子地至少一种抗体、特异性地结合到抑制性细胞因子的至少一种抗体、和/或特异性地结合到刺激性检查点蛋白的至少一种激动性抗体)和/或至少一种刺激性细胞因子。在一些实施方案中,所述试剂盒和/或制品还可包括用于根据本公开的任何方法使用与本公开的CD33药剂(例如,本文所述的抗CD33抗体)组合的抗体和/或刺激性细胞因子的说明书、用于根据本公开的任何方法使用与抗体和/或刺激性细胞因子组合的本公开的CD33药剂(例如,本文所述的抗CD33抗体)的说明书、或用于根据本公开的任何方法使用本公开的CD33药剂(例如,本文所述的抗CD33抗体)和抗体和/或刺激性细胞因子的说明书。

[0556] 所述说明书通常包括关于意图治疗的剂量、给药时程和施用途径的信息。所述容器可以是单位剂量、整批包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。提供在本公开的试剂盒和/或制品中的说明书通常是在标签或包装插页上的书面说明书(例如,包括在试剂盒中的纸张),但是机器可读的说明书(例如载于磁盘或存储光盘上的说明书)也是可接受的。

[0557] 标签或包装说明书指示组合物用于治疗例如本公开的疾病。可以提供用于实践本文所描述的任何方法的说明书。

[0558] 本公开的试剂盒和/或制品呈适合包装形式。适合的包装包括但不限于,小瓶、瓶、广口瓶、柔性包装(例如密封Mylar或塑料袋)等。还涵盖与特定装置,如吸入器、经鼻施用装置(例如喷雾器)或输注装置(如微型泵)结合使用的包装。试剂盒和/或制品可以具有无菌入口(例如,该容器可以是一种静脉内溶液袋或具有皮下注射针可刺穿的塞子的小瓶)。该容器也可以具有无菌入口(例如,该容器可以是一种静脉内溶液袋或具有皮下注射针可刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本公开的CD33药剂(例如本文所描述的抗CD33抗体)。该容器可以另外包含第二药物活性剂。

[0559] 试剂盒和/或制品可以任选提供额外组分如缓冲剂,及说明信息。通常,试剂盒包括一个容器及在该容器上或与其相联的标签或包装说明书。

[0560] 诊断性用途

[0561] 本公开的CD33药剂(诸如本公开的分离的抗体(例如,本文所述的抗CD33抗体))也具有诊断性用途。因此,本公开提供使用本公开的抗体或其功能性片段以用于诊断性目的(诸如检测个体中或来源于个体的组织样品中的CD33蛋白)的方法。

[0562] 在一些实施方案中,所述个体是人。在一些实施方案中,所述个体是患有本公开的疾病、病症、或损伤或处于发展本公开的疾病、病症、或损伤的风险的人患者。在一些实施方案中,所述诊断性方法涉及检测生物样品(诸如活组织检查样本、组织、或细胞)中的CD33蛋

白。本公开的CD33药剂(例如,本文所述的抗CD33抗体)与生物样品接触,并且检测抗原结合的抗体。例如,活组织检查样本可使用本文所述的抗CD33抗体染色以便检测和/或定量疾病相关细胞。所述检测方法可涉及抗原结合的抗体的定量。生物样品中的抗体检测可使用本领域已知的任何方法来发生,所述方法包括免疫荧光显微镜法、免疫细胞化学、免疫组织化学、ELISA、FACS分析、免疫沉淀、或微正电子发射断层成像。在某些实施方案中,抗体例如使用¹⁸F进行放射标记并且随后利用微正电子发射断层成像分析进行检测。抗体结合也可通过无创技术在患者中进行定量,所述无创技术诸如正电子发射断层成像(PET)、X射线计算机断层成像、单光子发射计算机断层成像(SPECT)、计算机断层成像(CT)、以及计算机轴向断层成像(CAT)。

[0563] 在其他实施方案中,本公开的分离的抗体(例如,本文所述的抗CD33抗体)可用于检测和/或定量例如取自临床前疾病模型(例如,非人疾病模型)的大脑样本中的小神经胶质细胞。由此,本公开的分离的抗体(例如,本文所述的抗CD33抗体)可用于评价与对照相比,针对神经系统疾病或损伤(诸如额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管性痴呆、癫痫发作、视网膜营养不良、动脉粥样硬化性血管疾病、Nasu-Hakola病、或多发性硬化症)的模型中在治疗之后的治疗性应答。

[0564] 通过参照以下实施例将更全面地理解本公开。然而,不应将这些实施例解释为限制本发明的范围。本公开通篇的所有引用内容都特此以引用的方式明确地并入。

实施例

[0565] 实施例1:抗CD33抗体的产生、识别和表征

[0566] 引言

[0567] 人CD33的氨基酸在以下SEQ ID NO:1中阐述。人CD33包含位于SEQ ID NO:1的氨基酸残基1-17处的信号序列、位于SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-135处的细胞外免疫球蛋白样可变型(IgV)结构域、位于SEQ ID NO:1的氨基酸残基145-228处的Ig样C2型结构域、位于SEQ ID NO:1的氨基酸残基260-282处的跨膜结构域、位于SEQ ID NO:1的氨基酸残基338-343处的ITIM基序1、以及位于SEQ ID NO:1的氨基酸残基356-361处的ITIM基序2。CD33的结构在图1中描绘。CD33的一部分与CD33同源物的比对在图2中示出。

[0568] CD33氨基酸序列(SEQ ID NO:1):

```

      10      20      30      40      50      60
MPLLLLLLPLL WAGALAMDPN FWLQVQESVT VQEGLCVLVP CTFPHPIPIYY DKNSPVHGYW

      70      80      90     100     110     120
FREGAIISRD SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDPSRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM

      130     140     150     160     170     180
ERGSTKYSYK SPQLSVHVT D LTHRPKILIP GTLEPGHSHN LTCSVSWACE QGTPPIFSWL

[0569]      190     200     210     220     230     240
SAAPTSLGPR TTHSSVLIIT PRPQDHGTNL TCQVKFAGAG VTERTIQLN VTYVPQNPTT

      250     260     270     280     290     300
GIFPGDGSGK QETRAGVVHG AIGGAGVTAL LALCLCLIFF IVKTHRRKAA RTAVGRNDTH

      310     320     330     340     350     360
PTTGSASPKH QKSKSLHGPT ETSSCSGAAP TVEMDEELHY ASLNFHGMNP SKDTSTEYSE

VRTQ

```

[0570] 以下实施例的目的在于产生增强树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、T细胞、嗜中性粒细胞、NK细胞和/或小神经胶质细胞的有益作用的CD33结合抗体(例如,拮抗性抗体、CD33特异性抗体)。结合CD33的细胞外结构域、具体地是IgV结构域(SEQ ID NO:1的氨基酸残基19-135)的抗体使用小鼠杂交瘤技术、噬菌体展示技术和酵母展示技术来产生。鉴定抗体并且然后针对其在细胞中和在动物中在体内的以下能力和/或一种或多种功能进行筛选:与CD33配体竞争结合到CD33、诱导CD33下调、诱导CD33脱敏、诱导CD33降解、诱导CD33靶向溶酶体、诱导CD33裂解、调节CD33信号传导,如在以下实施例中所描述的。CD33所结合的示例性配体在图3和图4中描绘。

[0571] 例如,选择靶向IgV结构域(CD33的氨基酸残基19-135的抗CD33抗体。IgV结构域结合到唾液酸靶标,并且此结合可使用所述抗体来阻断。因此,氨基酸残基19-135对应于阻断CD33结合到一种或多种内源性靶标(例如,配体)的抗体的CD33肽靶标。

[0572] 用于鉴定人CD33蛋白内的可用位点的另一种方法是通过选择与CD33M相比在CD33m上不存在的抗体靶向位点,所述位点通常存在于IgV结构域内。CD33m不能够抑制骨髓β肽的清除。用于鉴定可用抗体的另一种方法是选择降低单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、小神经胶质细胞和/或T细胞的细胞表面上的CD33的水平抗体。

[0573] 如本文所述,7种抗CD33抗体被鉴定并表征。

[0574] 结果

[0575] 抗CD33抗体产生

[0576] 免疫程序

[0577] 快速初免法:使用以下程序对四只50天龄的雌性BALB/c小鼠进行免疫。在19天的时间段内给予含有人CD33抗原但是不含佐剂的一系列皮下水性注射液。将小鼠关养在来自Lab Products的通风架系统中。在第19天对全部四只小鼠进行安乐死,并且收获淋巴细胞以用于杂交瘤细胞系生成。

[0578] 标准方法:使用以下程序对四只50天龄的雌性BALB/c或N2B/W小鼠进行免疫。将小鼠关养在来自Lab Products的通风架系统中。使用混合在CpG-ODN佐剂中的人CD33抗原以

25μg蛋白抗原/小鼠(125μL总体积/小鼠)每3周对小鼠进行腹膜内注射。在第二次加强之后七天通过隐静脉切开来进行测试放血。通过间接ELISA测定来测试测试放血(免疫血清),以确定对于融合应答最好的两只小鼠。小鼠可需要第3次和第4次加强以及加强之后7天进行的另一次测试放血以在融合之前评估滴度。当抗体滴度足够高时,通过侧尾静脉对应答最好的两只小鼠给予最终静脉内加强。IV加强之后四天对小鼠进行安乐死以用于融合。收获脾并且在融合过程中使用从脾分离的淋巴细胞来产生杂交瘤。

[0579] 杂交瘤发展

[0580] 按照标准Roche方案,分离淋巴细胞并且在聚乙二醇(PEG 1500)的存在下与鼠SP2/0骨髓瘤细胞融合。使用单步骤克隆方法(HAT选择)培养融合细胞。此方法使用半固体基于甲基纤维素的HAT选择性培养基来将杂交瘤选择和克隆组合到一个步骤中。单细胞衍生的杂交瘤在半固体培养基上生长以形成单克隆集落。在融合事件之后十天,将948个所得的杂交瘤克隆转移到96孔组织培养板并且在含有HT的培养基中生长,直至达到中对数生长(5天)为止。

[0581] 杂交瘤筛选

[0582] 在筛选抗原(初级筛选)上通过间接ELISA测试来自948个杂交瘤的组织培养上清液,并且使用山羊抗IgG/IgM(H&L)-HRP二抗针对IgG和IgM抗体两者进行探测,并且使用TMB底物来显色。将此测定中>0.20D的克隆用于下一轮测试中。在筛选抗原上对阳性培养物进行再测试以确认分泌,并且在非相关抗原(人转铁蛋白)上对阳性培养物进行再测试以消除非特异性或“粘性”mAb并排除假阳性。通过抗体捕获ELISA对感兴趣的全部克隆进行同种型分型以确定它们是IgG同种型或IgM同种型。

[0583] 杂交瘤细胞培养

[0584] 转移到96孔板后,将感兴趣的杂交瘤细胞系维持在24孔培养板中的培养物中32天。这称为稳定性期,并且测试克隆是否保持稳定和分泌。在此稳定期时间期间,由感兴趣的全部克隆制备临时冷冻的细胞系备份以供于-80℃存储(存活6个月)。在此时间段期间针对分泌和特异性周期性地测试杂交瘤。

[0585] 亚克隆

[0586] 对顶部杂交瘤细胞系(克隆)进行亚克隆以确保单克隆性。通过再次使用单步骤克隆系统对亲本克隆进行铺板来执行亚克隆。将24个与90个之间的亚克隆转移到96板培养板。通过间接ELISA和抗体捕获ELISA筛选亚克隆。将每个亲本的顶部亚克隆用于在培养物中进行扩增。对<50%无性系的任何亲本克隆执行第二轮的亚克隆。

[0587] 然后针对CD33结合筛选抗体。针对阻断配体结合的能力和降低多种细胞类型中的CD33的表面水平的能力对结合到人CD33阳性的抗体进行测试。

[0588] 抗体重链和轻链可变结构域序列

[0589] 使用标准技术,确定编码所生成的抗体的轻链可变结构域和重链可变结构域的氨基酸序列。抗体的EU或Kabat轻链CDR序列在表1中阐述。抗体的EU或Kabat重链CDR序列在表2中阐述。抗体的EU或Kabat轻链框架(FR)序列在表3A中阐述。抗体的EU或Kabat重链框架(FR)序列在表3B中阐述。

[0590] 表1:抗CD33抗体的EU或Kabat轻链HVR序列

[0591]

Ab	HVR L1	HVR L2	HVR L3
2F5	RASQSVSTSTYSYMH (SEQ ID NO:10)	YASNLEC (SEQ ID NO:69)	QHSWEIPLT (SEQ ID NO:72)
2F5.1	RASQSVSTSTYSYMH (SEQ ID NO:10)	YASNLES (SEQ ID NO:13)	QHSWEIPLT (SEQ ID NO:72)
3A12	RASKSVSTSGYSYMH (SEQ ID NO:67)	LVSNNLES (SEQ ID NO:70)	NLLLSAHXGAYT (SEQ ID NO:73)
6A3a	RASKSVSTSGHSYMH (SEQ ID NO:11)	LASSLES (SEQ ID NO:14)	QHSRELPLT (SEQ ID NO:17)
6A3b	RASKRVSTSVHSYMH (SEQ ID NO:68)	LASSLES (SEQ ID NO:71)	QHSREVPLT (SEQ ID NO:74)
6C7.2	TLSSQHSTYTIE (SEQ ID NO: 228)	MELKKDGSHSTGD (SEQ ID NO: 229)	GVGDTIKEQFVYV (SEQ ID NO: 230)
1A8	KASQDINKYLS (SEQ ID NO:9)	RANRLVD (SEQ ID NO:12)	LQYDEFPLT (SEQ ID NO:15)
2E12	RASQSVSTSTYSYMH (SEQ ID NO:10)	YASNLES (SEQ ID NO:13)	QRSWEIPLT (SEQ ID NO:16)
2E12.1	RASQSVSTSTYSYMH (SEQ ID NO:10)	YASNLES (SEQ ID NO:13)	QHSWEIPLT (SEQ ID NO:72)
2B4	RPSKRISAYVFSYMH (SEQ ID NO:184)	LSCNLEX(SEQ ID NO:185)	QHSRELPLT (SEQ ID NO:17)

[0592] 表2:抗CD33抗体的EU或Kabat重链HVR序列

[0593]

Ab	HVR H1	HVR H2	HVR H3
2F5	YTFTDYNLH (SEQ ID NO:19)	IGFIYPSNGITGYN (SEQ ID NO:23)	ARSTVDYFDY (SEQ ID NO:27)
2F5.1	KASGYTFTDYNLH (SEQ ID NO: 231)	IGFIYPSNGITGYN (SEQ ID NO:23)	ARSTVDYFDY (SEQ ID NO:27)
3A12a	FTFSNYCMN (SEQ ID: 21)	VAEIRLKSNNYVT (SEQ ID NO:25)	TRDGYYVPFAY (SEQ ID NO:29)
3A12b	FTFSNYCMN (SEQ ID: 21)	VAEIRLKSNNYVTNYV (SEQ ID NO:76)	TRDGYYVPFAY (SEQ ID NO:29)
6A3a	YSFTGYMH (SEQ ID NO:20)	IGINPSTGGTSYN (SEQ ID NO:24)	TRGHYGSYLTFDY (SEQ ID NO:28)
6A3b	YTFTSYWMH (SEQ ID NO:75)	IGNIYPGSISSNYD (SEQ ID NO:77)	TRGHYGSYLTFDY (SEQ ID NO:28)
6C7a	FTFSNYCMN (SEQ ID: 21)	VAEIRLKSNNYVT (SEQ ID NO:25)	TRDGYYVPFAY (SEQ ID NO:29)
6C7b	FTFSNYCMN (SEQ ID: 21)	VAEIRLKSNNYVTNYV (SEQ ID NO:76)	TRDGYYVPFAY (SEQ ID NO:29)
6C7.2	VGSGFTFSNYCMN (SEQ ID NO: 232)	VAEIRLKSNNYVTNYV YC (SEQ ID NO: 233)	TRDGYYVPFAY (SEQ ID NO:29)
1A8	YTFTSYDIN (SEQ ID NO:18)	IGWIFPGDGSTKYN (SEQ ID NO:22)	ARGYHYAMDS (SEQ ID NO:26)
2E12	YTFTDYNLH (SEQ ID NO:19)	IGFIYPSNGITGYN (SEQ ID NO:23)	ARSTVDYFDY (SEQ ID NO:27)
2E12.1	KASGYTFTDYNLH (SEQ ID NO: 231)	IGFIYPSNGITGYN (SEQ ID NO:23)	ARSTVDYFDY (SEQ ID NO:27)

[0594]

Ab	HVR H1	HVR H2	HVR H3
2B4	YTFTSYWMH (SEQ ID NO:75)	IGNIYPGSGSTYYD (SEQ ID NO:186)	TRGHYGNLYLTFDY (SEQ ID NO:187)

[0595] 表3A:小鼠抗CD33抗体的EU或Kabat轻链框架序列

[0596]

Ab	VL FR1	VL FR2	VL FR3	VL FR4
2F5	ZTQSLASLAVSLG QRATMSC (SEQ ID NO:78)	WYQQKPGQPPKLLIK (SEQ ID NO:83)	GVPARFSGSGZGTDFT LNHPVEEEDSATYYC (SEQ ID NO:87)	FGGGTKLEMK (SEQ ID NO:92)
2F5.1	DIVLTQSPASLAV SLGQRATMSC (SEQ ID NO: 234)	WYQQKPGQPPKLLIK (SEQ ID NO:83)	GVPARFSGSGSGTDFT LNHPVEEEDTATYYC (SEQ ID NO:91)	FGAGTKLELK (SEQ ID NO:94)
3A12	DIVLTQSPASLAV SLGQRATISY (SEQ ID NO:79)	WNQQKPGQPPRLLIY (SEQ ID NO:84)	GVPARFSGSGZWDR LPQHPSCGGGCC (SEQ ID NO:88)	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:93)
6A3	DFQIQSLASLVV SMGQRAAISF (SEQ ID NO:80)	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:85)	GVRARFSGSGWGTD FTLNHPVEEEDGATYY C (SEQ ID NO:89)	FGGGTKLEMK (SEQ ID NO:92)
6C7.2	QLVLTQSSSASF LGASAKLTC (SEQ ID NO: 235)	WYQQQLKPPKYV (SEQ ID NO: 236)	GIPDRFSGSSSGAD RYLSISNIQPEDEAIY C (SEQ ID NO: 237)	FGGGTKVTVL (SEQ ID NO: 238)
1A8	CDIKMTQSPSSMY ESLGERVTITC (SEQ ID NO:81)	WLQKPKGKSPKTLIY (SEQ ID NO:86)	GVPSRFSGSGSGQDYS LTISSEYEDMGIIYHC (SEQ ID NO:90)	FGAGTKLELK (SEQ ID NO:94)
2E12	STGDIVLTQSPASL AVSLGQRATMSC (SEQ ID NO:82)	WYQQKPGQPPKLLIK (SEQ ID NO:83)	GVPARFSGSGSGTDFT LNHPVEEEDTATYYC (SEQ ID NO:91)	FGAGTKLELK (SEQ ID NO:94)
2E12.1	DIVLTQSPASLAVS LGQRATMSC (SEQ ID NO: 234)	WYQQKPGQPPKLLIK (SEQ ID NO:83)	GVPARFSGSGSGTDFT LNHPVEEEDTATYYC (SEQ ID NO:91)	FGAGTKLELK (SEQ ID NO:94)
2B4	DLZLTQSLASLVV CMGQRAAISF (SEQ ID NO:188)	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:85)	GVRARLSGRRWVTD FTLNHPAEEEDGATYY C (SEQ ID NO:189)	FGGGTKLEMK (SEQ ID NO:92)

[0597] 表3B:小鼠抗CD33抗体的EU或Kabat重链框架序列

[0598]

Ab	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FR4
2F5	EVQLQSGPELV KPGASVKISCKAS G (SEQ ID NO:95)	WVKLSHGKSLEW (SEQ ID NO:100)	QKFKNKATLTVDNSSSTA YMERLSTSEDSAVYYC (SEQ ID NO:104)	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:108)
2F5.1	EVQLQSGPELV KPGASVKISC (SEQ ID NO: 239)	WVKLSHGKSLEW (SEQ ID NO:100)	QKFKNKATLTVDNSSSTA YMERLSTSEDSAVYYC (SEQ ID NO:104)	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:108)
3A12	EVKLEESGGGLV QPGGSMKLSGCV SG (SEQ ID NO:96)	WVRQSPEKGLEW (SEQ ID NO:101)	ESVKGRFTISRDDSKSRV YLQMNLRGEGDTGFYYC (SEQ ID NO:105)	WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:109)
6A3	QVQLQSGSELV RPGASVKLSCKA SG (SEQ ID NO:97)	WVKQRPGQGLEW (SEQ ID NO:102)	EKFKNKATLTVDTSSTA YMQSSLTSEDSAVYFC (SEQ ID NO:106)	WGHGTTTLTVSS (SEQ ID NO:110)
6C7	EVKLEESGGGLV QPGGSMKLSGCV SG (SEQ ID NO:96)	WVRQSPEKGLEW (SEQ ID NO:101)	ESVKGRFTISRDDSKSRV YLQMNLRGEGDTGFYYC (SEQ ID NO:105)	WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:109)
6C7.2	EVKLEESGGGLV QPGGSMKLSG (SEQ ID NO: 240)	WVRQSPEKGLEW (SEQ ID NO:101)	ESVKGRFTISRDDSKSRV YLQMNLRGEGDTGFY (SEQ ID NO:105)	WGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:109)

[0599]

Ab	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FR4
1A8	QVQLQSGAELV KPGASVKLSCKA SG (SEQ ID NO:98)	WVRQRPEQGLEW (SEQ ID NO:103)	EKFKGKATLTIDKSSNTT YMQSLTSEDSAVYFC (SEQ ID NO:107)	WGQGTSVTSS (SEQ ID NO:111)
2E12	PELVKPGASVKIS CKASG (SEQ ID NO:99)	WVKLSHGKSLEW (SEQ ID NO:100)	QKFKNKATLTVDNSSSTA YMERLSTSEDSAVYYC (SEQ ID NO:104)	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:108)
2E12.1	EVQLQSGPELV KPGASVKISC (SEQ ID NO: 239)	WVKLSHGKSLEW (SEQ ID NO:100)	QKFKNKATLTVDNSSSTA YMERLSTSEDSAVYYC (SEQ ID NO:104)	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:108)
2B4	QVQLQPGSELV RPGASVKLSCKA SG (SEQ ID NO:190)	WVKQRPGQGLEW (SEQ ID NO:102)	EKFKSKATLTVDTSSTGTA YMQSSLTSEDSAVYYC (SEQ ID NO:191)	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:108)

[0600] CD33抗体结合的特征

[0601] CD33抗体的初始表征涉及确定其结合在CHO细胞系上、在人原代单核细胞、人原代树突细胞、以及人原代巨噬细胞上表达的CD33的能力。收获细胞，在96孔板中以 10^6 个/ml铺板，并且在冰中在含有2%FBS、2mM EDTA和10 μ g/ml抗体和Fc阻断试剂的100 μ l PBS中孵育1小时。洗涤细胞两次，并且在冰上在含有2%FBS、2mM EDTA和5 μ g/ml PE偶联的二抗的100 μ l PBS中孵育30分钟。在冷PBS中洗涤细胞两次，并且在BD FACS Canto上通过流式细胞术进行分析。使用FlowJo (TreeStar) 软件版本10.0.7执行数据分析和平均荧光强度(MFI)值的计算。

[0602] FACS染色分析指示CD33在原代骨髓和淋巴样细胞上表达，所述细胞包括人原代单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、CD4⁺ T细胞、以及嗜中性粒细胞(图5A)。

[0603] 表4证明抗体结合到表达重组人CD33(CHO hCD33)的CHO细胞系。CD33抗体所结合的细胞类型的阳性结合百分比和平均荧光强度(MFI)值在表4中列出。结合与亲本CHO细胞系进行比较。在表4中，“同种型”是指同种型mIgG1对照抗体。

[0604] 表4:结合到CHO细胞的CD33抗体

抗体	阳性%		MFI	
	亲本 CHO	CHO hCD33	亲本 CHO	CHO hCD33
1A8	0.15	84.4	359	8830
2B4	0.032	86.8	289	3730
2E12	0.064	87.7	388	10386
2F5	0.065	87	384	9517
3A12	0.081	86.8	350	8304
6A3	0.038	86.9	375	20343
6C7	0.054	86.2	334	8067
同种型	0.076	0.47	396	227

[0607] CD33抗体所结合的细胞类型的阳性结合百分比和平均荧光强度(MFI)值在表5中列出。结合与同种型对照进行比较。所述抗体结合到人原代单核细胞、人原代树突细胞和人原代巨噬细胞。在表5中，“同种型”是指同种型mIgG1对照抗体；并且“DC”是指树突细胞。

[0608] 表5A:结合到人原代细胞的CD33抗体

抗体	阳性%			MFI			
	单核细胞	DC	巨噬细胞	单核细胞	DC	巨噬细胞	
[0609]	1A8	94.00	99.00	96.00	1188	4580	2373
	2B4	59.80	67.80	86.80	495	1683	1987
	2E12	96.70	99.30	97.30	1569	4750	2423
	2F5	97.50	99.00	96.70	1196	4304	2509
	3A12	90.60	98.50	92.80	1024	3426	1891
	6A3	93.10	98.40	92.10	849	3806	1745
	6C7	90.00	97.50	92.20	1053	3363	2085
	同种型	2.38	1.97	4.16	109	861	1220

[0610] 然后确定CD33抗体的表观亲和力常数。在BiaCore T200仪器上在25℃下以10Hz的速率采集SPR数据。使用BiaCore T200评价软件版本2.0执行数据分析。使用HBS-EP+ (100mM HEPES, 1.5M NaCl, 30mM EDTA, 0.5% v/v表面活性剂P20, pH 7.4) 作为运行缓冲液并且用于制备试剂。在固定有抗小鼠IgG的CM5传感器芯片 (GE Healthcare) 上捕集抗CD33抗体1A8、2E12、2F5、6A3、6C7、以及吉妥珠单抗 (20nM) 中的每一种 (60s接触时间, 30μL/min流速, 0s稳定化时间)。然后使20nM组氨酸标记的人CD33 (Sino Biological) 在捕集的抗CD33表面上流过 (120s接触时间, 30μL/min流速, 300s缔合时间)。执行一式两份的单一浓度试验并且通过空白 (0nM抗原) 样品进行分类。使用10mM甘氨酸-HCl, pH 1.7在循环之间再生成芯片表面 (60s接触时间, 30μL/min流速, 60s稳定化时间)。获得所得的SPR信号作为对空白流动细胞执行的测量的应答差异。使用1:1相互作用模型执行单一浓度动力学分析 (Canziani等人 Analytical Biochemistry 325 (2004), 301-307) 来提取每种抗体的缔合速率常数和解离速率常数 (分别是 k_a 和 k_d)。根据 k_d/k_a 比率计算表观亲和力常数 (K_D)。在先前的一组实验中使用多浓度方法 (使用五个浓度的抗原, 加上一个空白) 验证单一浓度分析。结果在图5B-图5G和表5B中描绘。

[0611] 表5B: 结合到人CD33的CD33抗体

抗体	人 CD33 的表观 K_D
1A8	6 nM
2E12	0.4 nM
2F5	0.3 nM
6A3	3 nM
6C7	0.3 nM
吉妥珠单抗	1.1 nM

[0612] 还通过使用范围是大约0.003nM至大约3nM的抗体浓度的结合曲线确定CD33抗体2F5、6C7、吉妥珠单抗、以及林妥珠单抗结合到人原代树突细胞的半数最大有效浓度 (EC_{50})。如图5H所示, CD33抗体以小于200pM的 EC_{50} 结合到人原代树突细胞。具体地, 抗体2F5以138.2pM的 EC_{50} 进行结合, 并且抗体6C7以166.2pM的 EC_{50} 进行结合 (图5H)。相比之下, 商业抗

体吉妥珠单抗和林妥珠单抗分别以612.5pM和845.3pM的 EC_{50} 结合到人原代树突细胞(图5I)。图5H和图5I中的结果证明抗体2F5和6C7以比商业抗体吉妥珠单抗和林妥珠单抗低的 EC_{50} 对于人细胞(例如,原代树突细胞)具有提高的结合。所述结果还指示抗体2F5和6C7与商业抗CD33抗体相比在人原代骨髓细胞中具有提高的靶标接合。

[0614] 抗体人源化

[0615] 抗体人源化用于转化在不同物种中生成的抗体以通过序列和结构关系与人抗体最佳地相似,以便在人施用中防止免疫原性。来自不同物种的抗体共享允许非人抗体的特异性决定区(SDR)移植到人抗体框架上的特征性序列和结构特征。这使得非人抗体保持特异性。人源化过程涉及非人抗体序列和特征(包括框架区和SDR)的鉴定。使用以下准则来对抗体进行人源化:1)非人抗体与已知人抗体之间的框架区的相似性百分比,2)非人抗体与已知人抗体之间的SDR的长度相似性,3)用于生成人抗体的框架区的基因,以及4)人抗体框架在人源化中的先前使用并用作治疗剂。框架区和SDR长度的相似性是重要的,因为差异可生成可改变抗体的特异性的抗体结构差异。已知用于生成人抗体的框架的特定基因对于抗体的稳定性或特异性是有益的或有害的,并且因此被选择性地使用或避免。最后,具有良好半衰期的耐受性很好的先前成功的人源化框架(包括在人治疗剂中使用的那些)是未来成功的人源化的可能候选物。

[0616] 如表6A和表6B所示,对于抗体1A8鉴定四个人源化轻链和重链可变区序列;对于抗体2E12鉴定七个轻链可变区序列和四个重链可变区序列;对于抗体6A3鉴定五个轻链可变区序列和四个重链可变区序列;对于抗体6C7鉴定一个重链可变区序列;并且对于抗体3A12鉴定一个重链可变区序列。在表6A和表6B中,粗体字母指示CDR序列。

[0617] 表6A:人源化轻链可变区

抗体变体	人源化序列
抗体 2F5	2F5
[0618] 2F5V2-30	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASQSVSTSTYSYMHWFQQRPGQSPRRLIYYASNLECGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC QHSWEIPL TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:113)

[0619]

抗体变体	人源化序列
2F5V2-28	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRASQSVSTSTYSYMHWYLQKPG QSPQLLIYYASNLECGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY Y CQHSWEIPL TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:114)
2F5V4-1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKP GQPPKLLIYYASNLECGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAV YY CQHSWEIPL TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:115)
2F5V1-33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYYASNLECGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATY Y CQHSWEIPL TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:116)
2F5V1-5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYYASNLECGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATY Y CQHSWEIPL TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:117)
2F5V3-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKPG QAPRLLIYYASNLECGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQEPEDFAVYY C QHSWEIPL TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:118)
2F5V1-39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYYASNLECGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY Y CQHSWEIPL TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:119)
2F5V1-9	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYYASNLECGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATY Y CQHSWEIPL TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:120)
2F5V3-15	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKP GQAPRLLIYYASNLECGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVY Y CQHSWEIPL TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:121)
2F5V3-20	EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKPG QAPRLLIYYASNLECGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY C QHSWEIPL TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:122)
抗体 3A12	3A12
3A12V2-28	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRASKSVSTSGYSYMHWYLQKPG QSPQLLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY Y CNLLLSAHXGAYT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:124)
3A12V2-30	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCRASKSVSTSGYSYMHWFQQR GQSPRLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YY CNLLLSAHXGAYT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:125)
3A12V4-1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKP GQPPKLLIYLVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY Y CNLLLSAHXGAYT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:126)
3A12V1-33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLVSNLESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATY Y CNLLLSAHXGAYT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:127)
3A12V1-5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLVSNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATY Y CNLLLSAHXGAYT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:128)
3A12V1-39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLVSNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY Y CNLLLSAHXGAYT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:129)

[0620]

抗体变体	人源化序列
3A12V1-9	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLVSNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATY YCNLLLSAHXGAYTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:130)
3A12V3-1 1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKP GQAPRLLIYLVSNLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYY CNLLLSAHXGAYTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:131)
3A12V3-1 5	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKP GQAPRLLIYLVSNLESGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CNLLLSAHXGAYTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:132)
3A12V3-2 0	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKP GQAPRLLIYLVSNLESGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CNLLLSAHXGAYTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:133)
抗体 6A3a	6A3a
6A3aV1-5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCRASKSVSTSGHSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYY CQHSRELPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:44)
6A3aV1-3 9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSVSTSGHSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQHSRELPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:45)
6A3aV2-2 8	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRASKSVSTSGHSYMHWYLQKPG QSPQLLIYLASSLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CQHSRELPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:46)
6A3aV2-3 0	DVVMQSPSLPVTTLGQPASISCRASKSVSTSGHSYMHWFQQR GQSPRRLIYLASSLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCQHSRELPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:47)
6A3aV4-1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGHSYMHWYQQKP GQPPKLLIYLASSLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YCQHSRELPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:48)
抗体 6A3b	6A3
6A3bV2-2 8	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRASKRVSTSVHSYMHWYLQKP GQSPQLLIYLASSLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCQHSREVPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:135)
6A3bV2-3 0	DVVMQSPSLPVTTLGQPASISCRASKRVSTSVHSYMHWFQQR GQSPRRLIYLASSLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCQHSREVPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:136)
6A3bV4-1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKRVSTSVHSYMHWYQQK PGQPPKLLIYLASSLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAV YYCQHSREVPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:137)
6A3bV1-5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCRASKRVSTSVHSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYY CQHSREVPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:138)
6A3bV1-3 9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKRVSTSVHSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQHSREVPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:139)
6A3bV1-9	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASKRVSTSVHSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY CQHSREVPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:140)

[0621]

抗体变体	人源化序列
6A3bV1-33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKRVSTSVHSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYY CQHSREVPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:141)
6A3bV3-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKRVSTSVHSYMHWYQQKP GQAPRLLIYLASSLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYY CQHSREVPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:142)
6A3bV3-20	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASKRVSTSVHSYMHWYQQKP GQAPRLLIYLASSLESGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQHSREVPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:143)
6A3bV3-15	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASKRVSTSVHSYMHWYQQKP GQAPRLLIYLASSLESGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQHSREVPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:144)
抗体 1A8	抗体 1A8
1A8V1-33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINKYLSWYQQKPGKAP KLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCLQ YDEFPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:32)
1A8V1-39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINKYLSWYQQKPGKAP KLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQ YDEFPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:33)
1A8V1-9	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQDINKYLSWYQQKPGKAPK LLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQY DEFPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:145)
1A8V1-5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKASQDINKYLSWYQQKPGKAP KLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCLQ YDEFPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:31)
1A8V3-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKASQDINKYLSWYQQKPGQAPR LLIYRANRLVDGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCLQY DEFPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:34)
1A8V3-15	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDINKYLSWYQQKPGQAP RLIYRANRLVDGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCLQ YDEFPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:146)
1A8V3-20	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCKASQDINKYLSWYQQKPGQAPR LLIYRANRLVDGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCLQY DEFPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:147)
1A8V2-28	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCKASQDINKYLSWYQQKPGQSPQ LLIYRANRLVDGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCL QYDEFPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:148)
1A8V4-1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDINKYLSWYQQKPGQPP KLLIYRANRLVDGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCL QYDEFPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:149)
1A8V2-30	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCKASQDINKYLSWFQQRPGQSPR RLIYRANRLVDGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCL QYDEFPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:150)
抗体 2E12	抗体 2E12
2E12V2-30	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCRASQSVSTSTYSYMHWFQQR GQSPRRLIYYASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCQRSWEIPLTFGQGGTKVEIK (SEQ ID NO:41)

[0622]

抗体变体	人源化序列
2E12V2-28	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRASQSVSTSTYSYMHWYLQKPG QSPQLLIYYASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCQRSWEIPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:40)
2E12V4-1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKP GQPPKLLIYYASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY YCQRSWEIPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:42)
2E12V1-33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYY CQRSWEIPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:38)
2E12V1-5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYYASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQRSWEIPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:36)
2E12V1-9	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYYASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATY YCQRSWEIPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:37)
2E12V1-39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKP GKAPKLLIYYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQRSWEIPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:39)
2E12V3-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKPG QAPRLLIYYASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYC QRSWEIPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:151)
2E12V3-15	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKP GQAPRLLIYYASNLESGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQRSWEIPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:152)
2E12V3-20	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSTSTYSYMHWYQQKPG QAPRLLIYYASNLESGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QRSWEIPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:153)
抗体 2B4	抗体 2B4
2B4V2-28	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRPSKRISAYVFSYMHWYLQKPG QSPQLLIYLSCNLEXGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCQHSRELPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:193)
2B4V2-30	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRPSKRISAYVFSYMHWFQQR GQSPRLIYLSCNLEXGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCQHSRELPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:194)
2B4V4-1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRPSKRISAYVFSYMHWYQQKP GQPPKLLIYLSCNLEXGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAV YYCQHSRELPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:195)
2B4V1-33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSKRISAYVFSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLSCNLEXGVPDRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYY YCQHSRELPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:196)
2B4V1-5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRPSKRISAYVFSYMHWYQQKP GKAPKLLIYLSCNLEXGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQHSRELPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:197)
2B4V3-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRPSKRISAYVFSYMHWYQQKPG QAPRLIYLSCNLEXGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYC QHSRELPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:198)

[0623]

抗体变体	人源化序列
2B4V1-9	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRPSKRISAYVFSYMHWYQQKPG KAPKLLIYLSCNLEXGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYY CQHSRELPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:199)
2B4V1-39	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRPSKRISAYVFSYMHWYQQKPG GKAPKLLIYLSCNLEXGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQHSRELPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:200)
2B4V3-15	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRPSKRISAYVFSYMHWYQQKPG GQAPRLLIYLSCNLEXGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVY YCQHSRELPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:201)
2B4V3-20	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRPSKRISAYVFSYMHWYQQKPG QAPRLLIYLSCNLEXGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQHSRELPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:202)

[0624] 表6B:人源化重链可变区

[0625]

抗体变体	人源化序列
抗体 2F5	抗体 2F5
2F5V1-46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNLHWVRQAPG QGLEWIGFIYPSNGITGYNQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:55)
2F5V5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTDYNLHWVRQMPGK GLEWIGFIYPSNGITGYNPSFQGVITISADKSISTAYLQWSSLKA SDTAMYYCARSTVDYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:58)
2F5V3-23	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYNLHWVRQAPGK GLEWIGFIYPSNGITGYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:57)
2F5V1-69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNLHWVRQAPG QGLEWIGFIYPSNGITGYNQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:56)
2F5V3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYNLHWVRQAPGK GLEWIGFIYPSNGITGYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:155)
2F5V3-30	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGYTFTDYNLHWVRQAPG KGLEWIGFIYPSNGITGYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:156)
2F5V3-7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYNLHWVRQAPGK GLEWIGFIYPSNGITGYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:155)
2F5V4-59	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYTFTDYNLHWIRQPPGKG LEWIGFIYPSNGITGYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARSTVDYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:157)
2F5V3-15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDYNLHWVRQAPGK GLEWIGFIYPSNGITGYNAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLK TEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:158)
2F5V4-30-4	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYTFTDYNLHWIRQPPGKG LEWIGFIYPSNGITGYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARSTVDYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:159)

[0626]

抗体变体	人源化序列
抗体 3A12	抗体 3A12
3A12V3-15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYCMNWVRQAPGK GLEWVAEIRLKSNNYVTNYVAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)
3A12V3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYCMNWVRQAPGK GLEWVAEIRLKSNNYVTNYVDSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:160)
3A12V3-7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYCMNWVRQAPGK GLEWVAEIRLKSNNYVTNYVDSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:160)
3A12V3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYCMNWVRQAPGK GLEWVAEIRLKSNNYVTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:161)
3A12V3-30	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSNYCMNWVRQAPG KGLEWVAEIRLKSNNYVTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:162)
3A12V1-69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFSNYCMNWVRQAPG QGLEWVAEIRLKSNNYVTNYVQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSED TAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:163)
3A12V1-46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSNYCMNWVRQAPG QGLEWVAEIRLKSNNYVTNYVQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:164)
3A12V5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFSNYCMNWVRQMPGK GLEWVAEIRLKSNNYVTNYVPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:165)
3A12V4-59	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFTFSNYCMNWIRQPPGKG LEWVAEIRLKSNNYVTNYVPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:166)
3A12V4-39	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFTFSNYCMNWIRQPPGKG LEWVAEIRLKSNNYVTNYVPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:167)
抗体 6A3a	抗体 6A3a
6A3aV1-46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYMHVWRQAPG QGLEWIGEINPSTGGTSYNQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSL RSED TAVYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:61)
6A3aV1-69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSTGYMHVWRQAPG QGLEWIGEINPSTGGTSYNQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSED TAVYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:62)

[0627]

抗体变体	人源化序列
6A3aV3-23	EVQLLES GGG LVQP GGS LRLSCAASGY SFTGY YMH WVRQAPG KGLEW IGE INPSTGGT SYNDS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SL RAEDTAVYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:63)
6A3aV5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTGY YMH WVRQMPG KGLEW IGE INPSTGGT SYNPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLK ASDTAMYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:64)
抗体 6A3b	抗体 6A3b
6A3bV1-46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMH WVRQAP GQGLEWIGNIYPGSISSNYDQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:169)
6A3bV5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYWMH WVRQMPG KGLEWIGNIYPGSISSNYDPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLK ASDTAMYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:170)
6A3bV3-7	EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGYTFTSYWMH WVRQAPG KGLEWIGNIYPGSISSNYDDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SL RAEDTAVYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:171)
6A3bV1-69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWMH WVRQAPG QGLEWIGNIYPGSISSNYDQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:172)
6A3bV3-48	EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGYTFTSYWMH WVRQAPG KGLEWIGNIYPGSISSNYDDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SL RAEDTAVYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:171)
6A3bV3-23	EVQLLES GGG LVQP GGS LRLSCAASGYTFTSYWMH WVRQAPG KGLEWIGNIYPGSISSNYDDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLR AEDTAVYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:173)
6A3bV3-30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGYTFTSYWMH WVRQAPG KGLEWIGNIYPGSISSNYDDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLR AEDTAVYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:174)
6A3bV4-59	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYTFTSYWMH WIRQPPGK GLEWIGNIYPGSISSNYDPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:175)
6A3bV3-15	EVQLVESGGGLVKP GGS LRLSCAASGYTFTSYWMH WVRQAPG KGLEWIGNIYPGSISSNYDAPVKGRFTISRDD SKNTLYLQMN SLK TEDTAVYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:176)
6A3bV4-30-4	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYTFTSYWMH WIRQPPGK GLEWIGNIYPGSISSNYDPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCTRGHYGSYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:177)
抗体 6C7	抗体 6C7

[0628]

抗体变体	人源化序列
6C7V3-15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYCMNWVRQAPGK GLEWVAEIRLKSNNYVTNYVAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)
6C7V3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYCMNWVRQAPGK GLEWVAEIRLKSNNYVTNYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:160)
6C7V3-7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYCMNWVRQAPGK GLEWVAEIRLKSNNYVTNYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:160)
6C7V3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYCMNWVRQAPGK GLEWVAEIRLKSNNYVTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:161)
6C7V3-30	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSNYCMNWVRQAPG KGLEWVAEIRLKSNNYVTNYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:162)
6C7V1-69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFSNYCMNWVRQAPG QGLEWVAEIRLKSNNYVTNYVQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSED TAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:163)
6C7V1-46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSNYCMNWVRQAPG QGLEWVAEIRLKSNNYVTNYVQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:164)
6C7V5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFTFSNYCMNWVRQMPGK GLEWVAEIRLKSNNYVTNYVPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:165)
6C7V4-59	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFTFSNYCMNWIRQPPGKG LEWVAEIRLKSNNYVTNYVPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:166)
6C7V4-39	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFTFSNYCMNWIRQPPGKG LEWVAEIRLKSNNYVTNYVPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCTRDGYYPFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:167)
抗体 1A8	抗体 1A8
1A8V5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFSTYDINWVRQMPGK GLEWIGWIFPGDGSTKYNPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLK ASDTAMYYCARGYHYAMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:53)
1A8V1-46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYDINWVRQAPGQ GLEWIGWIFPGDGSTKYNQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSL RSED TAVYYCARGYHYAMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:50)
1A8V1-69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSTYDINWVRQAPGQ GLEWIGWIFPGDGSTKYNQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR SED TAVYYCARGYHYAMDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:51)

[0629]

抗体变体	人源化序列
1A8V3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYDINWVRQAPGK GLEWIGWIFPGDGSTKYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYHYAMDSWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:52)
1A8V3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYDINWVRQAPGK GLEWIGWIFPGDGSTKYND SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYHYAMDSWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:178)
1A8V3-7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYDINWVRQAPGK GLEWIGWIFPGDGSTKYND SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYHYAMDSWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:178)
1A8V3-30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGYTFTSYDINWVRQAPGK GLEWIGWIFPGDGSTKYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYHYAMDSWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:179)
1A8V4-59	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYTFTSYDINWIRQPPGKGL EWIGWIFPGDGSTKYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARGYHYAMDSWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:180)
1A8V3-15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTSYDINWVRQAPGK GLEWIGWIFPGDGSTKYNA PVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSL KTEDTAVYYCARGYHYAMDSWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:181)
1A8V4-39	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYTFTSYDINWIRQPPGKGL EWIGWIFPGDGSTKYNP SLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARGYHYAMDSWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:182)
抗体 2E12	抗体 2E12
2E12V1-46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNLHWVRQAPG QGLEWIGFIYPSNGITGYNQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSL RSED TAVYYCARSTVDYFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:55)
2E12V5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTDYNLHWVRQMPGK GLEWIGFIYPSNGITGYNP SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKA SDTAMYYCARSTVDYFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:58)
2E12V1-69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNLHWVRQAPG QGLEWIGFIYPSNGITGYNQKFQGRVTITADESTSTAYMESSLR SEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:56)
2E12V3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYNLHWVRQAPGK GLEWIGFIYPSNGITGYNDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:57)
2E12V3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYNLHWVRQAPGK GLEWIGFIYPSNGITGYNDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:155)
2E12V3-30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGYTFTDYNLHWVRQAPG KGLEWIGFIYPSNGITGYNDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:156)
2E12V3-7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYNLHWVRQAPGK GLEWIGFIYPSNGITGYNDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:155)

[0630]

抗体变体	人源化序列
2E12V4-59	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYTFTDYNLHWIRQPPGKGL LEWIGFIYPSNGITGYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARSTVDYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:157)
2E12V3-15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDYNLHWVRQAPGK GLEWIGFIYPSNGITGYNAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLK TEDTAVYYCARSTVDYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:158)
2E12V4-39	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYTFTDYNLHWIRQPPGKGL LEWIGFIYPSNGITGYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARSTVDYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:183)
抗体 2B4	抗体 2B4
2B4V1-46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTSYWMHWVRQAPG GQGLEWIGNIYPGSGSTYYDQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCTRGHYGNLYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:204)
2B4V5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYWMHWVRQMPG KGLEWIGNIYPGSGSTYYDPSFQGVITISADKSISTAYLQWSSLK ASDTAMYYCTRGHYGNLYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:205)
2B4V3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTTSYWMHWVRQAPG KGLEWIGNIYPGSGSTYYDDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCTRGHYGNLYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:206)
2B4V3-7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTTSYWMHWVRQAPG KGLEWIGNIYPGSGSTYYDDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCTRGHYGNLYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:207)
2B4V3-30	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGYFTTSYWMHWVRQAPG KGLEWIGNIYPGSGSTYYDDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCTRGHYGNLYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:208)
2B4V3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTTSYWMHWVRQAPG KGLEWIGNIYPGSGSTYYDDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCTRGHYGNLYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:209)
2B4V1-69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTTSYWMHWVRQAPG QGLEWIGNIYPGSGSTYYDQKFQGRVTITADESTAYMELSSL RSEDTAVYYCTRGHYGNLYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:210)
2B4V4-59	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYTFTSYWMHWIRQPPGK GLEWIGNIYPGSGSTYYDPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCTRGHYGNLYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:211)
2B4V3-15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYFTTSYWMHWVRQAPG KGLEWIGNIYPGSGSTYYDAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSL KTEDTAVYYCTRGHYGNLYLTFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:212)

抗体变体	人源化序列
[0631] 2B4V4-30-4	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYTFTSYWMHWIRQPPGK GLEWIGNIYPGSGSTYYDPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCTRGHYGNYLTFDYWGGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:213)

[0632] 实施例2:CD33抗体的表位作图

[0633] 测试CD33抗体跨越整个人CD33结合15或25-mer肽的能力。也通过确定其CD33结合区将CD33抗体与参考CD33抗体进行比较。

[0634] 方法

[0635] 基于人CD33的序列 (SEQ ID NO:1) 合成线性15-mer肽,其中具有14个残基重叠。此外,基于人CD33的序列 (SEQ ID NO:1) 或小鼠CD33的序列 (SEQ ID NO:2) 合成线性25-mer肽,其中具有单一残基移位。在基于ELISA的方法中测试CD33抗体与合成的肽中的每一个的结合。在此测定中,将肽阵列与一抗溶液一起孵育(在4℃下孵育过夜)。在洗涤之后,在25℃下将肽阵列与1/1000稀释的抗体过氧化物酶偶联物(SBA,目录号2010-05)一起孵育一小时。在洗涤之后,添加过氧化物酶底物2,2'-连氨基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸酯(ABTS)和2μl/ml的3%H₂O₂。一小时之后,测量显色。使用电荷耦合器件(CCD)照相机和图像处理系统对显色进行定量。

[0636] 使用标准夹心形式分组测定在Forte Bio Octet Red384系统(Pall Forte Bio Corporation, Menlo Park, CA)上执行抗体的表位分组(Epitope binning)(参见Estep等人,(2013)MAbs 5(2):270-8)。将对照抗靶IgG装载至AHQ传感器上并用不相关人IgG1抗体阻断该传感器上未被占据的Fc结合位点。然后,使传感器依序暴露于100nM靶抗原和第二抗靶抗体。使用7.0版ForteBio数据分析软件处理数据。在抗原缔合后该第二抗体的额外结合指示未被占据的表位(非竞争剂),而没有结合指示表位阻断(竞争剂)。

[0637] 可替代地,为了重建靶标分子的表位,合成环状和组合肽的文库。通过与专有亲水性聚合物制剂接枝、接着使用二环己基碳二亚胺(DCC)和N-羟基苯并三唑(HOBt)与叔丁氧羰基-六亚甲基二胺(BocHMDA)反应并且随后使用三氟乙酸(TFA)进行Boc基团的裂解来获得氨基官能化的聚丙烯支持物。使用标准Fmoc肽合成来通过定制改良的JANUS液体处理站(Perkin Elmer)在氨基官能化的固体支持物上合成肽。

[0638] 使用Pepscan的专有的支架上的化学合成肽(Pepscan's proprietary Chemically linked peptides on Scaffolds, CLIPS)技术来进行结构模拟物的合成。CLIPS技术允许将肽构成单环和双环。将CLIPS模板偶合到半胱氨酸残基。将肽中的多个半胱氨酸的侧链偶合到一个或两个CLIPS模板。例如,在碳酸氢铵(20mM, pH 7.8)/乙腈(1:3 (v/v))中溶解0.5mM的mP2CLIPS(2,6-双(溴甲基)吡啶)溶液。将此溶液添加到肽阵列上。CLIPS模板将结合到如存在于肽阵列的固相结合肽中的两个半胱氨酸的侧链(具有3μl孔的455孔板)。在溶液中轻轻摇动肽阵列30至60分钟,同时完全覆盖在溶液中。最后,使用过量的H₂O充分洗涤肽阵列,并且在70℃下在PBS(pH7.2)中的含有1%SDS/0.1%β-巯基乙醇的破坏缓冲液中进行超声处理30分钟,接着在H₂O中再进行超声处理45分钟。以相似的方式制备携带T3CLIPS(2,4,6-三(溴甲基)吡啶)的肽,但是现在使用三个半胱氨酸。

[0639] 环状肽:长度17的约束肽。位置2-16是源自靶标序列的15-mer。天然Cys残基被乙酰氨基甲基(ACM)保护。位置1和17是通过mP2CLIPS部分连接的Cys。

[0640] 组合肽(不连续模拟物):长度33的约束肽。位置2-16和位置18-32是源自具有被ACM保护的天然Cys残基的靶标序列的15-mer肽。位置1、17和33是通过T3CLIPS部分连接的Cys。

[0641] 在基于PEPSCAN的ELISA中测试抗体与合成的肽中的每一个的结合。将肽阵列与由实验优化浓度的测试抗体和阻断溶液构成的测试抗体溶液(例如,在PBS/1%Tween80中的4%马血清、5%卵清蛋白(w/v))一起孵育。在4℃下将肽阵列与测试抗体溶液一起孵育过夜。在使用洗涤缓冲液(1×PBS,0.05%Tween80)充分洗涤之后,在25℃下将肽阵列与1/1000稀释的适当的抗体过氧化物酶偶联物一起孵育一小时。在使用洗涤缓冲液洗涤之后,添加过氧化物酶底物2,2'-连氨基-2-3-乙基苯并噻唑啉磺酸酯(ABTS)和2μl/ml的3% H₂O₂。一小时之后,测量显色。使用电荷耦合器件(CCD)照相机和图像处理系统对显色进行定量。

[0642] 可替代地,使用质谱法来鉴定构象表位。为了在高分辨率的情况下确定抗CD33抗体结合到的CD33蛋白上的构象表位的关键残基,将抗体/抗原复合物与氘化交联剂一起孵育并且经受多酶促蛋白水解裂解。在交联肽富集之后,通过高分辨率质谱(nLC-Orbitrap MS)分析样品,并且使用XQuest软件分析所生成的数据。具体地,通过将等摩尔的CD33抗原和抗体溶液(各自在5μl中是4μM)混合来生成CD33ECD/抗体复合物。在乙腈/水(1:1,v/v)、TFA 0.1%(K200MALDI试剂盒)中将1μl所获得的混合物与由重结晶的芥子酸基质构成的1μl基质(10mg/ml)混合。混合之后,将1μl的每个样品点样在MALDI板(SCOUT 384)上。在室温下结晶之后,将板引入在MALDI质谱仪中并且立即进行分析。以一式三份重复所述分析。以预测的分子量检测代表单体抗体、抗原、和抗体以及抗原/抗体复合物的峰。

[0643] 然后确定构象结合中的表位是否与通过蛋白水解生成的非结构化的C1q肽竞争。具体地,为了确定CD33ECD/抗体复合物是否可与线性肽竞争,使用固定胃蛋白酶消化CD33ECD抗原。将10μM浓度的25μl抗原与5μM固定胃蛋白酶混合,并且在室温下孵育30分钟。孵育时间之后,对样品进行离心并且移取上清液。通过线性模式的高质量MALDI质谱控制蛋白水解的完成。优化胃蛋白酶蛋白水解,以便获得1000-3500Da范围的大量肽。接下来,将通过蛋白水解生成的5μl的抗原肽与5μl的抗体(8μM)混合,并且在37℃下孵育6小时。抗体与CD33抗原肽孵育之后,将5μl的混合物与5μl的完整CD33抗原(4μM)混合,使得最终混合物含有2μM/2μM/2.5μM的CD33/抗体/CD33抗原肽。使用具有标准氮激光器的CovalX's HM3相互作用模块并且集中在范围是0至2000kDa的不同质量上,执行MALDI ToF MS分析。对于所述分析,将以下参数应用于质谱仪:线性和阳性模式;离子源1:20kV;离子源2:17kV;脉冲离子提取:400ns;对于HM3:增益电压:3.14kV;增益电压:3.14kV;加速电压:20kV。为了校准仪器,应用使用胰岛素、BSA和IgG的簇集的外部校准。针对每个样品,分析3个点(300个激光照射/点)。所呈现的光谱对应于300个激光照射的总和。使用Complex Tracker分析软件版本2.0(CovalX公司)分析MS数据。为了鉴定结合到抗体的CD33的构象表位,使用化学交联、高质量MALDI质谱和nLCOrbitrap质谱,在抗原与抗体之间的相互作用界面遵循以下程序。将5μl的样品抗原(4μM浓度)与5μl的样品抗体(4μM浓度)混合,以便获得具有2μM/2μM最终浓度的抗体/抗原混合物。在37℃下孵育混合物180分钟。在第一步骤中,将1mg的二琥珀酰胺辛二酸盐H12(DSS-H12)交联剂与1mg的二琥珀酰胺辛二酸盐D12(DSS-D12)交联剂混合。将2mg所制备的与1ml的DMF混合,以便获得2mg/ml的DSS H12/D12溶液。将先前制备的10μl的抗

体/抗原混合物与所制备的1μl的交联剂d0/d12溶液 (2mg/ml) 混合。将溶液在室温下孵育180分钟, 以便实现交联反应。

[0644] 为了有助于蛋白水解, 需要使存在于蛋白质中的二硫键还原。将交联样品与20μl的碳酸氢铵 (25mM, pH 8.3) 混合。混合之后, 将2.5μl的DTT (500mM) 添加到溶液中。然后在55℃下孵育混合物1小时。孵育之后, 添加2.5μl的碘乙酰胺 (iodoacetamide) (1M), 之后在暗室中在室温下孵育1小时。孵育之后, 通过添加用于蛋白水解的120μl缓冲液来以1/5稀释溶液。将145μl的还原的/烷基化的交联样品与2μl的胰蛋白酶 (Sigma, T6567) 混合。在37℃下孵育蛋白水解混合物过夜。对于α-胰凝乳蛋白酶蛋白水解, 蛋白水解的缓冲液是Tris-HCL100mM, CaCl2 10mM, pH7.8。将145μl的还原的/烷基化的交联复合物与2μl的200μMα-胰凝乳蛋白酶混合并且在30℃下孵育过夜。对于此分析, 使用与Orbitrap质谱组合的nLC。使用Xquest版本2.0和stavrox软件分析交联剂肽。然后鉴定肽和交联氨基酸。

[0645] 结果

[0646] 确定4种抗CD33抗体的CD33结合区。结合区在表7A中列出。图6A和图6B示出人CD33的示意图, 其指示抗CD33抗体所结合的区域。

[0647] 表7A: CD33抗体结合区

抗体	CD33 结合区	SEQ ID:1 的氨基酸区域
3A12	⁴⁸ PYYDKNS ⁵⁴	48-54
6C7		
AF5	¹³⁷ HVTDLTHRPKI ¹⁴⁷	137-147
[0648] 1A8	³⁹ VPCTFFHPIPYD ⁵¹ ,	39-51
	⁸⁸ GRFRL LGDPSR ⁹⁸ ,	88-98
	¹¹⁰ RRDNGSYFFRM ¹²⁰ , 以	110-120
	及 ¹¹² DNGSYFFRMER ¹²²	112-122

[0649] 如表7A所指示的, 抗体3A12、6C7和1A8显示排他地对于CD33的细胞外免疫球蛋白样可变型 (IgV) 结构域内的肽的稳健结合。

[0650] 如表7A所指示的, 抗体3A12和6C7所识别的肽对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基48-54, 并且具有以下氨基酸序列: PYYDKNS。抗体AF5所识别的肽对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基137-147, 并且具有以下氨基酸序列: HVTDLTHRPKI。抗体1A8所识别的肽对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基39-51、88-98、110-120和112-122, 并且具有以下氨基酸序列: VPCTFFHPIPYD、GRFRL LGDPSR、RRDNGSYFFRM、以及DNGSYFFRMER。

[0651] 每种抗体所结合的肽在图6A和图6B中描绘。

[0652] 官能作图

[0653] 使用CD33蛋白的丙氨酸扫描文库执行抗CD33抗体2E12、2F5、6C7、以及6A3的鸟枪诱变表位作图。使编码C-末端V5表位标签的CD33表达构建体 (Uniprot id P20138) 经受高通量丙氨酸扫描诱变以生成综合突变文库 (Davidson和Doranz, (2014) Immunology 143: 13-20)。将代表CD33细胞外结构域的残基8至259中的每一个主要突变为丙氨酸, 而丙氨酸密码子突变为丝氨酸。总体上, 生成252个CD33突变体表达构建体, 进行序列确认并且排列到384孔板中, 每孔一个突变体。

[0654] 将排列在384孔微板中的CD33突变文库克隆单个地转染到HEK-293T细胞中并且使其表达22小时。然后将细胞与在10%正常山羊血清 (NGS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 中稀释的抗CD33抗体孵育。在进行文库筛选之前,使用针对表达野生型CD33 (WT) 的细胞的独立的免疫荧光滴定曲线确定一抗筛选浓度,这鉴定最佳的信噪比 (>5:1) 并且确保信号在线性检测范围内。使用在10%NGS中的3.75µg/ml AlexaFluor488偶联的二抗 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA) 检测抗CD33抗体。使用没有钙或镁的PBS洗涤细胞两次并且使细胞重悬浮在具有0.1%BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 的Cellstripper (Cellgro, Manassas, VA) 中。使用Intellicyt高通量流式细胞仪 (HTFC, Intellicyt, Albuquerque, NM) 检测平均细胞荧光。通过载体转染的对照细胞的荧光测量确定背景荧光。通过减去来自mock转染对照的信号并且归一化到来自野生型CD33转染对照的信号来计算相对于野生型CD33蛋白反应性的针对每种突变体克隆的抗体反应性。

[0655] 如果关键克隆内的突变残基不支持测试抗体的反应性但是支持可商业获得的参考抗体WM53Mab (Biolegend, 目录号:303402) 或额外的抗CD33抗体的反应性,则所述突变残基被鉴定为对于抗CD33抗体表位是重要的。此反筛选策略有助于排除局部错折叠或具有表达缺陷的CD33突变体。

[0656] 图6C描绘平均结合反应性和在筛选中鉴定的所有关键残基的范围。所述范围是一式两份实验结合值之间的差值。一级关键残基以红色显示并且鉴定为其中突变对于测试抗体结合是阴性的 (与WT的结合<30%) 但是对于对照抗体是阳性的 (>80%WT) 的残基。以蓝色显示的残基是额外的二级残基,所述二级残基不满足阈值准则,但是其降低的结合活性和与关键残基的邻近性指示它们可以是抗体表位的一部分 (图6C)。图6D描绘唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-7的IgV结构域的晶体结构模型 (PDB ID 1NK0;Dimasi等人,2004), 其将关键残基指示为红色球体,并且将二级残基指示为蓝色球体。对于抗体结合重要的氨基酸残基以及二级残基在表7B中列出。

[0657] 表7B:参与抗CD33抗体结合的残基

[0658]

抗体	关键 CD33 残基	二级 CD33 残基
2E12	Y ₄₉ 和 K ₅₂	Y ₅₀
2F5	Y ₄₉ 和 K ₅₂	Y ₅₀
6C7	Y ₄₉ 和 K ₅₃	Y ₅₀ 和 K ₅₂
6A3	D ₁₈ ; N ₂₀ ; F ₂₁ ; 以及 P ₄₆	P ₁₉ 和 F ₄₄

[0659] 如表7B所指示的,参与抗体2E12和2F5进行的结合的关键CD33残基对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49和K52;并且参与抗体2E12和2F5进行的结合的二级残基对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y50。参与抗体6C7进行的结合的关键CD33残基对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y49和N53;并且参与抗体6C7进行的结合的二级残基对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基Y50和K52。参与抗体6A3进行的结合的关键CD33残基对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基D18、N20、F21、以及P46;并且参与抗体6A3进行的结合的二级残基对应于SEQ ID NO:1的氨基酸残基P19和F44。

[0660] 实施例3:CD33抗体诱导的体外和体内CD33的细胞表面水平的降低

[0661] CD33的体外表达

[0662] 以下实施例的目的在于测试抗CD33和/或CD33双特异性抗体是否降低单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、和/或小神经胶质细胞上的CD33的细胞表面水平。

[0663] 评价抗CD33抗体降低以下各项上的CD33的细胞表面水平的能力：组织细胞淋巴瘤细胞系U937、以及人原代单核细胞、衍生自外周血单核细胞的人原代树突细胞(DC)、衍生自外周血单核细胞的人原代巨噬细胞、以及衍生自人单核细胞的人原代小神经胶质细胞。

[0664] 根据在Etemad等人,JI (2012),和Ohgidani等人,Scientific Reports (2014)中所描述的方案,通过在具有1%青霉素/链霉素、10ng/ml GM-CSF、10ng/ml M-CSF、10ng/ml β -NGF、100ng/ml CCL-2、100ng/ml IL-34的不含血清的RPMI中进行培养来从外周血单核细胞制备人小神经胶质细胞。当分支形态出现时,在第7-10天收获细胞。使用RosetteSep™单核细胞分离抗体混合物(StemCell Technologies)分离来自外周人血液样品的单核细胞,并且使用GM-CSF和IL-4(PeproTech)分化为树突细胞并且培养5天。将细胞铺板在培养皿上含有10%胎牛血清(Hyclone)的RPMI培养基(Invitrogen)中,并且在37°C下在5%CO₂中进行培养。收集未贴壁细胞,并且用于吞噬作用实验。为了生成巨噬细胞,分离来自外周人血液样品的单核细胞,并且使用50μg/ml M-CSF分化为巨噬细胞或使用100μg/ml GM-CSF和100μg/ml IL-4分化为树突细胞,进行5天。

[0665] 在补充有10%Hyclone FBS、2mM谷氨酰胺、青霉素/链霉素、以及非必需氨基酸的2ml的RPMI中,将细胞样品以200,000个细胞/ml铺板在24孔板中或以500,000个细胞/ml铺板在6孔皿中。以1.0μg/ml添加CD33抗体或对照同种型,并且在37°C下使用5%CO₂孵育24小时。

[0666] 为了评估受体动力学,使抗体结合细胞一小时,进行洗涤并且在24小时和48小时后确定CD33的表面水平。

[0667] 通过FACS分析检测细胞表面受体表达。在黑暗中的冰上将细胞与抗CD33-FITC克隆HIM3-4以及对照表面标记物(U937:唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-5、人单核细胞:CD14、人树突细胞:CD11c、人巨噬细胞:CD11b)一起孵育30分钟。2X在FACS缓冲液(PBS+2% FBS, 2mM EDTA)中洗涤细胞两次,并且在BD FACS Canto上执行流式细胞术。使用TreeStar FlowJo软件分析数据。使用相应荧光团的MFI值将数据计算为在抗体不存在的情况下受体表达的百分比。

[0668] 表8A描绘来自人细胞的CD33细胞表面水平的结果。在表8A中,“同种型”是指同种型mIgG1对照抗体。

[0669] 表8A:CD33抗体降低人细胞上的CD33的细胞表面水平

	CD33 表面表达百分比							
	U937 细胞		单核细胞		DC		巨噬细胞	
	抗体	CD33 %	对照%	CD33 %	CD33 %	对照%	CD33 %	对照%
[0670]	1A8	54.5	100.0	25.9	96.9	16.59	112.19	58.79
	2B4	76.6	99.7	37.5	107.5	43.78	101.49	65.82
	2E12	46.3	93.4	24.0	98.1	16.79	109.58	59.40
	2F5	46.7	90.8	23.3	99.5	15.90	115.96	58.67
	3A12	46.3	100.3	23.3	93.9	15.51	116.23	58.98
	6A3	33.1	99.7	26.0	100.2	16.38	107.77	59.30
	6C7	47.2	100.5	24.1	105.8	15.76	117.15	58.89
	同种型	95.7	101.5	104.5	104.8	70.52	99.15	95.41

[0671] 表8B描绘来自人小神经胶质细胞的CD33细胞表面水平的结果。在表8B中,“同种型”是指同种型mIgG1对照抗体;并且“ND”是指未确定。

[0672] 表8B:CD33抗体降低人小神经胶质细胞上的CD33的细胞表面水平

	CD33 表面表达百分比	
	小神经胶质细胞	
	抗体	CD33% 对照%
[0673]	1A8	26.13 71.02
	2B4	ND ND
	2E12	22.86 58.68
	2F5	24.97 85.77
	3A12	ND ND
	6A3	24.42 89.82
	6C7	23.99 86.19
	同种型	92.12 86.34

[0674] 如表8A和表8B以及图16A-图16H所示,抗体1A8、2E12、2F5、3A12、6A3和6C7、以及在较小程度上的2B4能够降低多种类型的人细胞上的CD33的细胞表面水平。

[0675] 另外,执行体外表面CD33下调研究,其中将CD33抗体2F5、6C7、吉妥珠单抗、以及林妥珠单抗针对12点曲线滴定2倍(图16I)。对对照受体CD11c执行相似的滴定曲线(图16J)。然后如在实施例1中所描述的执行半数最大有效浓度(EC_{50})计算。如图16J所示,使用抗体中的任一种不调节对照受体CD11c的细胞表面表达。所述结果显示CD33抗体2F5以21.47pM的 EC_{50} 降低CD33的细胞表面表达,CD33抗体6C7以34.81pM的 EC_{50} 降低CD33的细胞表面表达,并且商业抗体吉妥珠单抗以107.5pM的 EC_{50} 降低CD33的细胞表面表达(图16I)。所述结果指示抗体2F5和6C7在所测试的大部分浓度下在降低CD33的细胞表面表达方面比商业抗体吉妥珠单抗或林妥珠单抗更强效且稳健(图16I)。

[0676] CD33的体内表达

[0677] 为了测试CD33抗体降低体内CD33的细胞表面水平的能力,利用人源化NSGS小鼠(hu-NSGS)。Hu-NSGS小鼠(也称为NOD-scid IL2Rgnull-3/GM/SF)是在CMV启动子的控制下表达人IL-3、人CSF2和人KITL转基因的转基因NSG小鼠。Hu-NSGS小鼠还移植有人CD34⁺造血干细胞。雌性Hu-NSGS小鼠购自Jax并且移植有人细胞之后15周被利用。小鼠在第0天接受40mg/Kg抗CD33抗体2F5或同种型对照小鼠IgG1抗体(克隆M0PC-21)的腹膜内注射。在第-7天、第1天、第3天和第7天,将血液样品从小鼠抽取到肝素中并且进行处理以用于FACS分析。简而言之,首先将血液样品在冰冷的ACK裂解缓冲液中孵育5分钟以使红细胞裂解,并且然后使用冷PBS充分洗涤。重复此程序两次。然后在Fc阻断溶液的存在下在冰上在抗人CD45-Pe-Cy7、抗小鼠CD45-APC-Cy7、抗人CD3-PerCP-Cy5.5、抗人CD14-FITC、抗人CD11c-PB、抗CD33-PE、抗唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9-APC、以及成活力染料(Life Technologies, Cat#L34957)的存在下在FACS缓冲液(PBS+2%FBS, 2mM EDTA)中孵育细胞,然后使用冷FACS缓冲液洗涤两次。然后获取4%PFA固定的样品。在BD FACS CANTO™ II细胞仪(Becton Dickinson)上获取数据并且使用FlowJo软件进行分析。确定hCD45⁺、hCD14⁺细胞群体中的CD33和抗唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素9的表达水平。

[0678] 如图16K和图16L所示,当与对照抗体处理和预处理水平进行比较时,使用抗CD33抗体2F5的处理能够降低处理的hu-NSGS小鼠的外周血的细胞中的CD33的细胞表面水平。在抗体处理后的第1天CD33表达就降低约80%并且保持很低,直至测试的最后时间点(处理之后7天)为止。作为比较,与预处理水平相比,不相关的表面受体唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9的细胞表面表达保持不变。

[0679] 另外,执行体内表面CD33下调研究,其中对CD33抗体2F5进行滴定以确定降低外周单核细胞上的细胞表面表达的半数最大有效浓度(EC₅₀)。对来自Taconic的NOG人源化小鼠注射40mg/kg、8.0mg/kg、1.6mg/kg、或0.3mg/kg的CD33抗体2F5的单一腹膜内注射。在以下时间点处通过FACS测量CD33和对照受体唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9的细胞表面水平。处理前7天(第-7天)、处理后第1天、以及之后的每周,直至第35天。通过FACS在外周人CD45⁺CD14⁺单核细胞上评估CD33和唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素-9的细胞表面水平。使用第-7天的MFI来设定100%细胞表面表达的基线以计算降低%。如图16M所示,在所测试的所有抗体浓度下,抗体2F5随时间持续降低人源化小鼠中外周单核细胞上的体内CD33的细胞表面水平。在40mg/kg、8.0mg/kg和1.6mg/kg的抗体浓度下观察到CD33的细胞表面水平的50%降低,但是未观察到对照受体的细胞表面水平的50%降低(图16M和图16N)。

[0680] 实施例4:CD33抗体与CD33配体竞争结合到人CD33

[0681] 以下实施例的目的在于测试抗CD33抗体是否识别CD33上的配体结合位点并且与在CD33受体上结合的配体竞争。

[0682] 为了确定哪些抗体与结合到CD33的配体竞争,根据标准方案进行红细胞(RBC)固体粘附测定(Kelm等人, Current Biology, 1994)。红细胞被含有唾液酸的糖蛋白高度装饰,因此抗体阻断RBC结合到固定CD33的能力可用于确定配体干扰。简而言之,将5μg/ml CD33-Fc在RT下过夜涂覆在96孔Immunolon板中,然后使用PBS洗涤,使用结合缓冲液(含有% 0.25BSA 1mM CaCl₂的PBS)阻断一小时。CD33抗体(0.5μg/ml或1.0μg/ml)或Fab(25μg/ml)在RT下在轻轻摇动的情况下结合一小时。去除未结合的抗体之后,将红细胞以3.0x10⁶个细胞/ml的浓度添加到每个孔,并且在RT下孵育一小时。然后使用PBS仔细洗涤未结合的RBC三

次,并且将水添加到每个孔以用于结合的RBC的低渗裂解。将板转移至-80℃持续10分钟,接着转移至37℃持续15分钟。通过过氧化物酶活性检测结合的RBC,接着通过2N硫酸使反应停止。在450nm处检测信号。将数据计算为在抗体不存在的情况下结合到板结合的CD33-Fc的RBC的百分比。

[0683] 配体竞争测定的结果在表9中描绘。在表9中,“同种型”是指同种型mIgG1对照抗体。

[0684] 表9:CD33抗体与配体结合竞争

[0685]

	结合到CD33的RBC百分比
抗体	1.0μg/ml
1A8	10.0
2B4	77.7
2E12	9.2
2F5	11.5
3A12	12.3
6A3	10.8
6C7	10.8
同种型	83.8

[0686] 如表9所示,抗体1A8、2E12、2F5、3A12、6A3和6C7、以及在较小程度上的2B4能够阻断RBC结合到CD33,从而指示所述抗体竞争性结合到CD33上的配体结合位点以及其抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用(即,阻断配体结合到CD33)的能力。

[0687] 实施例5:CD33抗体功能性研究的汇总。

[0688] 表10汇总在以上实施例3和实施例4中所描述的细胞表面表达和配体结合研究的结果。如表10所指示的,存在一类通用的CD33抗体。此类抗体降低CD33的细胞表面水平并且抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用。

[0689] 降低CD33的细胞表面水平并且抑制CD33与一种或多种CD33配体之间的相互作用的此类抗体中的抗体包括:1A8、2B4、2E12、2E12.1、2F5、2F5.1、3A12a、3A12b、6A3a、6A3b、6C7a、6C7b、以及6C7.2。

[0690] 表10:CD33抗体功能性研究

[0691]

抗体	降低细胞表面 CD33	抑制 CD33 配体结合
1A8	+++	+++
2B4	+	+
2E12	+++	+++
2F5	+++	+++
3A12	+++	+++
6A3	+++	+++
6C7	+++	+++

[0692] 实施例6:结合到树突细胞上的CD33的配体抑制T细胞增殖和吞噬作用

[0693] 使用GM-CSF和IL-4从外周血单核细胞分化人树突细胞(DC)并且培养5天。收获未

成熟的(悬浮液)DC并且以200,000个细胞/ml的密度铺板在12孔皿中。使用TNF α (50 μ g/ml)、IL-1 β (50 μ g/ml)、IL-6 (150ng/ml)、以及前列腺素E2 (1 μ g/ml)的细胞因子混合物使DC活化24小时。使用LIN、CD11c、HLA-DR、CD86、以及CD83的可商业获得的抗体(BD Biosciences)通过流式细胞术确定树突细胞成熟。在即将与同种异体分离的T细胞共培养之前,在不含血清的培养基中使用来自霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)的100mU/ml的神经氨酸酶在37 $^{\circ}$ C下对活化的DC进行唾液酸酶处理2小时或不进行处理。通过添加含有血清的培养基来淬灭酶活性,将细胞沉淀并且重悬浮在完全培养基中。将唾液酸酶活化的、未处理活化的、或未活化的DC在1:10的比率下与同种异体CFSE标记的T细胞共培养。将CD3/CD28Dyna1珠粒单独添加到T细胞作为阳性对照。五天之后在BD FACS Canto上通过CFSE稀释液测量T细胞增殖。

[0694] 图7和图8示出树突细胞上的唾液酸在混合淋巴细胞反应(MLR)期间限制T细胞增殖。图8示出正常表达抑制性配体的DC诱导低水平的T细胞增殖(左图),而去除DC上的抑制性配体增加T细胞增殖(右图)。

[0695] 如图7和图8所示,当与未处理活化的DC进行比较时,从活化的DC酶促去除唾液酸增加T细胞增殖。这些结果指示当与同种异体DC共培养时,存在于DC上的唾液酸以抑制性方式作用于T细胞来限制T细胞增殖。这些结果指示阻断T细胞或树突细胞上的CD33的抗体增强T细胞和/或树突细胞功能性。使用CD3/CD28Dyna1珠粒作为阳性对照。此外,这些结果指示阻断唾液酸与DC或任何其他细胞或生物源的相互作用可增加T细胞功能。

[0696] 实施例7:炎性病状诱导骨髓细胞中的CD33表达

[0697] 使用GM-CSF和IL-4从外周血单核细胞分化人树突细胞(DC)并且培养5天。在第5天收获未成熟DC并且与来自B16、Lewis肺、MC38肿瘤上清液的无菌过滤的上清液或10ng/ml LPS共培养。24小时之后,使用直接偶联的CD33-PE抗体通过流式细胞术确定CD33表达。通过在冰上与50 μ g/ml融合到人IgG1-Fc的可溶性CD33孵育30分钟来评估唾液酸配体表达,在人Fc阻断的存在下单独使用IgG1-Fc作为阴性对照。在洗涤步骤并且在冰上与偶联到PE的抗人二抗孵育30分钟之后检测可溶性受体与细胞上的唾液酸的结合。在BD FACS Canto上执行流式细胞术分析。

[0698] 为了引发原代巨噬细胞,分离来自外周人血液样品的人单核细胞,并且直接使用或使用50 μ g/ml M-CSF分化为巨噬细胞,持续5天。为了确定CD33在炎性细胞因子产生中的作用,将人巨噬细胞与各种炎性介质一起培养,并且在细胞上清液中测量细胞因子水平。为了生成巨噬细胞,分离来自外周人血液样品的单核细胞,并且直接使用或使用50 μ g/ml M-CSF分化为巨噬细胞或使用100 μ g/ml GM-CSF和100 μ g/ml IL-4分化为树突细胞,持续5天。将细胞培养5天,并且使用PBS中的1mM EDTA使贴壁细胞脱离。以 10^5 个细胞/孔将细胞铺板在96孔板上并且使其在37 $^{\circ}$ C下粘附4h。然后使用TLR激动剂LPS(马流产沙门氏菌(*Salmonella abortus equi*))或酵母聚糖(酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))在范围是0.01-100ng/ml(LPS)或0.01-100 μ g/ml(酵母聚糖)的浓度下刺激细胞。可替代地,在10ng/ml的细胞因子IL-4或50ng/ml的IFN- γ 的存在下培养巨噬细胞。在刺激之后24小时或48小时收集细胞培养上清液,并且根据制造商的方案通过使用细胞计数珠粒阵列炎症试剂盒(BD)测量TNF α 、IL-6、IL-10、以及MCP-1细胞因子的水平。当使用CD33拮抗性抗体或使用去除抑制性乙二醇配体的酶处理时,期待使用炎性介质LPS或酵母聚糖刺激的巨噬细胞分泌更多炎性细胞因子TNF α 、IL-6、IL-10、以及MCP-1。

[0699] 图9A和图9B示出在暴露于肿瘤上清液之后,人树突细胞上的CD33表达增加。图9C和图9D示出在LPS诱导的炎症期间,人树突细胞上的CD33表达增加。图9E和图9F示出LPS诱导的炎症增加唾液酸(CD33配体)的表达。

[0700] 这些结果指示炎症病状和肿瘤环境导致CD33和唾液酸配体两者的上调。所述结果还证明增加的CD33功能可免疫抑制人原代树突细胞。这些结果指示使用下调或阻断抗体抑制CD33可缓解免疫抑制骨髓来源细胞或肿瘤相关骨髓细胞并且恢复免疫功能。这些结果还指示阻断骨髓细胞上的CD33的抗体增强骨髓细胞功能性。

[0701] 实施例8:在用唾液酸酶处理的情况下树突细胞进行的大肠杆菌吞噬作用增加

[0702] 以下实施例的目的在于测试拮抗性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体是否诱导对来自骨髓谱系的细胞(诸如单核细胞、树突细胞、巨噬细胞以及小神经胶质细胞)中的以下各项的吞噬作用:凋亡神经元、神经组织碎片、非神经组织碎片、细菌、其他异物、以及致病性蛋白(诸如A β 肽、 α 突触核蛋白(alpha synuclain protein)、Tau蛋白、TDP-43蛋白、朊病毒蛋白、亨廷顿蛋白)RNA、翻译产物抗原(包括由甘氨酸-丙氨酸(GA)、甘氨酸-脯氨酸(GP)、甘氨酸-精氨酸(GR)、脯氨酸-丙氨酸(PA)、或脯氨酸-精氨酸(PR)构成的二肽重复序列(DPR肽))。双特异性抗体可以是识别CD33抗原和第二抗原的抗体,所述第二抗原包括但不限于CD3、A β 肽、抗原或 α 突触核蛋白抗原、或Tau蛋白抗原、或TDP-43蛋白抗原、或朊病毒蛋白抗原、或亨廷顿蛋白抗原、或RNA、翻译产物抗原,包括由甘氨酸-丙氨酸(GA)、甘氨酸-脯氨酸(GP)、甘氨酸-精氨酸(GR)、脯氨酸-丙氨酸(PA)、或脯氨酸-精氨酸(PR)构成的二肽重复序列(DPR肽)。

[0703] 使用RosetteSepTM单核细胞分离抗体混合物(StemCell Technologies)分离来自外周人血液样品的单核细胞,并且使用GM-CSF和IL-4(PeproTech)分化为树突细胞并且培养5天。将细胞铺板在培养皿上含有10%胎牛血清(Hyclone)的RPMI培养基(Invitrogen)中,并且在37°C下在5%CO₂中进行培养。收集未贴壁细胞,并且用于吞噬作用实验。

[0704] 为了实施细菌吞噬作用测定,收获树突细胞并且铺板在没有细胞因子的96孔平底板中持续2小时。根据制造商的方案重悬浮pHrodo标记的大肠杆菌生物颗粒并且使用0.2U/ml或0.4U/ml来自霍乱弧菌的唾液酸酶或单独使用PBS在37°C下处理2.5小时。洗涤生物颗粒,重悬浮在RPMI中并且以20 μ g/孔添加。将树突细胞和大肠杆菌细胞混合、沉淀并且在37°C下孵育30分钟。以10 μ M将细胞松弛素D添加到对照孔。在即将进行FACS分析之前,将细胞转移到冰并且在4°C下在FACS缓冲液中洗涤2次。在BD FACS Canto上通过流式细胞术在PE通道中检测pHrodo标记的大肠杆菌吞噬作用。

[0705] 图10示出唾液酸酶处理增加对大肠杆菌的树突细胞介导的吞噬作用。这些结果指示例如降低CD33的细胞表面表达和/或抑制一种或多种CD33配体与CD33的结合的拮抗性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体也可用于诱导或以其他方式增加吞噬作用。

[0706] 图11A和图11B示出CD33抗体2F5和6C7增加巨噬细胞对大肠杆菌的吞噬作用。这些结果指示下调CD33的细胞表面水平的CD33抗体可使巨噬细胞变得更具吞噬性,并且在CD33抗体的存在下增加细菌基质的摄入,但是在同种型对照的存在下并非如此。所述结果还指示由于降低的CD33表达和因此降低的CD33功能,巨噬细胞增加其吞噬功能。

[0707] 实施例9:CD33配体在阿尔茨海默氏病患者的大脑切片中的增加的表达

[0708] 使用生物素酰化的CD33-Fc(R&D)和IgG1-Fc作为阴性对照,通过免疫组织化学检

测正常患者和阿尔茨海默氏病 (AD) 患者的大脑中的唾液酸配体表达。根据制造商的说明书,使用EZ-连接磺基-NHS-生物素 (Thermo Scientific) 使CD33-Fc和对照IgG-Fc蛋白生物素酰化。在振动器上执行IHC程序,过夜孵育除外。将样品在PBS中的10%MeOH、3% H_2O_2 中孵育15分钟,接着在具有4%血清的PBS中洗涤3次。接下来,将样品在PBS中的0.2%triton-X、4%血清、0.019%L-赖氨酸中孵育30分钟,接着在一抗中孵育一小时,然后在具有4%血清的PBS中孵育过夜。在第二天将样品放置在振动器上一小时,接着洗涤3次,然后将样品在ABC缓冲液中孵育一小时并且洗涤3次。使用Vector DAB过氧化物酶试剂盒使样品显色,洗涤3次并且脱水并且使用具有彩色照相机、200倍放大率的尼康90i显微镜成像。使用尼康Elements BR图像分析软件执行定量。

[0709] 图12A和图12B示出唾液酸CD33配体在来自AD患者的大脑切片中上调。通过单因素ANOVA显示,来自5个AD和5个非AD人大脑的数据显示CD33唾液酸配体表达的统计学上显著的增加, $p=0.0002$,与对照试剂IgG1-Fc相比, $p=0.1842$ (图12B)。图13A和图13B示出与正常患者 (非AD) 相比,CD33表达在来自AD患者的大脑切片中增加。图13B中的数据来自5个AD和5个非AD人大脑。

[0710] 遗传数据鉴定与全长CD33表达增加相关联的SNP增加AD风险。图12和图13中所描绘的结果指示除在一些AD大脑中的CD33上调之外,CD33的唾液酸配体在AD大脑中也增加。

[0711] 这些结果指示从细胞表面去除CD33或阻断增加的配体相互作用的抗体可缓解大脑中的小神经胶质细胞或其他骨髓细胞上的抑制性CD33依赖性信号传导并且恢复这些细胞的正常功能,对于阿尔茨海默氏病具有有益作用。

[0712] 实施例10:CD33和CD33配体在癌细胞中的增加的表达和CD33切除的作用

[0713] 体外研究

[0714] 通过在冰上与50 μ g/ml融合到人IgG1-Fc (R&D) 的可溶性CD33受体孵育30分钟来评估B16、Lewis肺和MC38结肠癌细胞上的唾液酸配体表达,在人Fc阻断的存在下单独使用IgG1-Fc作为阴性对照。洗涤步骤并且在冰上与偶联到PE的抗人二抗孵育30分钟之后检测可溶性受体与细胞上的唾液酸的结合。在BD FACS Canto上执行流式细胞术分析。

[0715] 图14A示出抑制性CD33配体的表达在黑素瘤细胞、肺肿瘤细胞和结肠癌细胞中比背景增加至少20倍。不希望受到理论的束缚,在这些肿瘤细胞上鉴定到抑制性唾液酸配体表达指示癌细胞凭借其躲避免疫识别和清除的促成机制。肿瘤细胞上的唾液酸配体可通过在骨髓和淋巴样免疫细胞上表达的CD33介导免疫抑制性相互作用 (图14B-图14D)。这些结果指示从细胞表面去除CD33或阻断增加的配体相互作用的抗体可缓解肿瘤对于免疫系统的抑制性作用并且增强癌症疗法。

[0716] 体内研究

[0717] 为了研究在CD33不存在或存在的情况下的体内MC38结肠癌生长,在侧腹中用在0.1mL PBS中的 1×10^6 个MC38结肠癌细胞皮下攻击8-10周龄的C57BL/6NJ野生型小鼠 (WT; $n=7$) 或CD33敲除的小鼠 (KO; $n=10$)。使用卡尺每3-4天监测肿瘤生长,直至肿瘤达到2000mm³的尺寸为止。

[0718] 为了确定体内CD33的表达,对四周龄的雌性Taconic NOG小鼠进行清髓大约24小时,之后通过静脉内注射移植人胎儿肝脏CD34⁺细胞 (100,000个细胞/小鼠)。通过外周血的流式细胞术监测免疫细胞的重建。移植之后十二周,皮下植入Champions TumorGraftTM黑素

瘤模型。大约8-10周之后,当肿瘤达到150-200mm³的大小时,收获血液、脾和肿瘤细胞并且进行处理以用于在BD FACSCanto™上通过流式细胞术进行分析。执行流式细胞计数分析以确定人(hCD45⁺)免疫系统的不同隔室中的CD33表达。具体地,分析在CD3⁺ T细胞、CD14⁺单核细胞/巨噬细胞和其他CD3-CD14-人免疫细胞细胞中的表达。使用TreeStar的FlowJo软件版本10.0.6分析数据。

[0719] 图14B-图14D示出肿瘤细胞中体内CD33的表达。图14B示出来自外周血和脾以及来自患者来源的黑素瘤的细胞浸润物的人免疫细胞中的CD33表达,所述患者来源的黑素瘤来自缺少成熟小鼠T细胞、B细胞和NK细胞的移植有人CD45⁺免疫细胞和移植有患者来源的黑素瘤的免疫缺陷小鼠模型。图14C示出来自脾和细胞浸润物的CD3⁺ T细胞、CD11b⁺免疫细胞以及Gr1⁺CD11b⁺免疫细胞中的CD33表达,所述细胞浸润物来自小鼠肿瘤模型的乳腺癌肿瘤EMT-6。图14D示出来自脾和细胞浸润物的CD45⁺ T细胞、Gr1⁺细胞以及Gr1⁻CD11b⁻免疫细胞中的CD33表达,所述细胞浸润物来自小鼠肿瘤模型的乳腺癌肿瘤EMT-6。

[0720] 图15A-图15C示出与野生型小鼠相比,CD33K0小鼠具有减小的皮下MC38肿瘤体积。图15D示出证明CD33K0小鼠比野生型小鼠更好地从MC38肿瘤攻击存活的Kaplan-Meier存活数据。

[0721] 图15E证明CD33在来自野生型小鼠(WT)的从脾和肿瘤分离的免疫细胞上表达,但是不在来自CD33K0小鼠的免疫细胞上表达,与天然小鼠相比,CD33在肿瘤攻击的WT小鼠中的脾巨噬细胞/单核细胞CD45⁺CD11b⁺Gr1^低细胞、CD45⁺CD11b⁺Gr1^高骨髓来源的抑制细胞、以及CD11c⁺树突细胞上调。当与WT肿瘤攻击或天然WT小鼠相比,CD33表达还在肿瘤浸润CD45⁺CD11b⁺Gr1^低细胞上增加,与脾CD45⁺CD11b⁺Gr1^高细胞保持相同的水平,在肿瘤浸润CD11c⁺细胞上高度上调,并且在NK细胞上稍微上调。

[0722] 这些结果证明CD33的抑制实现皮下肿瘤的限制生长或限制。所述结果还指示CD33功能抑制了限制肿瘤生长并且使免疫系统经历肿瘤清除的有益免疫应答。这些结果还指示CD33阻断抗体可部分地通过降低肿瘤浸润免疫抑制细胞的数量、改变其功能、和/或增加浸润细胞毒性T细胞、天然杀伤细胞的数量、或增加其他免疫肿瘤清除机制来减少实体瘤生长。CD33抗体可通过减少CD33表达或阻断抑制性唾液酸配体相互作用来做到这一点。如本文所证明的,在肿瘤攻击之后,CD33K0小鼠比WT小鼠更好地存活,从而指示CD33阻断抗体在治疗癌症方面可具有益作用。本文中证明,在肿瘤攻击的小鼠中,与脾CD33⁺细胞相比,肿瘤浸润骨髓细胞使CD33上调,并且与天然小鼠相比,上调甚至更多。

[0723] 抗CD33抗体治疗的体内作用

[0724] 为了测试CD33阻断抗体的有益作用,对野生型(WT)雌性BALB/c小鼠注射同种基因肿瘤,诸如MC38结肠癌、B16黑素瘤、或EMT-6鼠乳腺癌。以0.1mL/小鼠的体积在侧腹中对8-12周龄的小鼠皮下注射在0%基质胶中的5x10⁶个EMT-6肿瘤细胞。基于第1天体重将小鼠随机分到治疗组中。每隔一周测量体重,直至实验终止为止。在第1、4、8、15和22天对接受肿瘤的小鼠单独注射20-100mg/kg的CD33或对照抗体或与抗CTLA4 9H10抗体或抗PD1抗体组合。然后使用卡尺测量每隔一周测量肿瘤大小,直至终止为止。监测不利反应或死亡。对具有>30%体重损失或连续三次测量肿瘤大小>25%体重损失的任何个体动物进行安乐死。实验的终点是2000mm³的肿瘤体积或45天,以先到者为准。可对应答者跟踪更久。当达到终点时,对动物进行安乐死。监测抗体对于肿瘤体积和存活的作用。

[0725] 抗CD33和抗PD-1抗体组合治疗的体内作用

[0726] 将CTG-0202患者来源的黑素瘤肿瘤首先在预研究小鼠中进行传代,之后植入到人源化小鼠。当肿瘤在繁殖小鼠 (stock mice) 中达到1-1.5cm³的体积时,收获肿瘤以用于再植入到预研究小鼠中。对预研究小鼠在左侧腹上单侧地植入肿瘤片段。在第6代时使用CTG-0202黑素瘤肿瘤。

[0727] 使用胎儿肝脏来源的CD34⁺造血细胞 (Champion TumorGraft™黑素瘤模型CTG-0202) 使免疫受损的雌性小鼠 (Taconic N0G) 人源化。在68-74°F (20-23°C) 和30-70%湿度下,将小鼠关在单个HEPA通风笼 (Innocage® IVC, Innovive USA) 中的富集辐照的纸捻的1/8”的玉米棒衬底 (Sheperd) 上,采用12小时白天-夜晚循环。对小鼠随意饲喂水 (反渗透, 2ppm Cl₂), 并且饲喂由19%蛋白质、9%脂肪和4%纤维组成的辐照的测试啮齿动物饮食 (Teklad 2919)。对四十八只人源化小鼠进行植入,并且针对每个实验在植入之后七至十天开始记录预研究肿瘤体积。当肿瘤达到大约80-200mm³的体积时,根据肿瘤体积将小鼠匹配到待用于在第0天开始给药的治疗组或对照组中。对治疗组单独施用抗PD-1抗体 **Keytruda®** (派姆单抗 (pembrolizumab)) 或与抗CD33抗体2F5组合施用。对对照组施用抗PD-1抗体和同种型对照抗体或低亲和力/非配体阻断抗CD33抗体的组合。然后在第0天开始给药。表11和图15F描绘给药时程、给药量和施用途径。

[0728] 表11: 抗体给药时程

	组	N	处理	剂量 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	ROA	时程	总剂量 数量
[0729]	1	8	派姆单抗	5/2.5	5/2.5	IP	q5dx6	6
			CTR mAb	40	3	IP	q5dx6	6
	2	8	派姆单抗	5/2.5	5/2.5	IP	q5dx6	6

[0730]			2F5 mAb	40	3	IP	q5dx6	6

[0731] 在表11中,“N”是指在每个治疗组中重复的数量;“CTR mAb”是指同种型对照抗体或低亲和力/非配体阻断抗CD33抗体;“2F5mAb”是指抗CD33抗体2F5;“ROA”是指施用途径;“IP”是指腹膜内;“q5dx6”是指每五天总计六次施用的给药时程。

[0732] 在第0天开始,每天观察小鼠并且使用电子秤每周两次进行称重。通过数字卡尺每周两次测量肿瘤尺寸,并且针对每个组记录数据,包括个体和平均估计的肿瘤体积 (平均TV ± SEM)。使用公式 (1) 计算肿瘤体积: TV = 宽度² × 长度 × 0.52。在研究完成时,通过公式 (2) 使用初始 (i) 和最终 (f) 肿瘤测量值计算肿瘤生长抑制百分比 (%TGI) 值并且针对每个治疗组 (T) 相对于对照 (C) 进行报告: %TGI = 1 - (T_f - T_i) / (C_f - C_i)。

[0733] 对于连续两次测量报告肿瘤体积 ≤ 第0天测量值的50%的个体小鼠被认为是部分应答者 (PR)。缺少可触知肿瘤 (对于连续两次测量 < 4 × 4 mm²) 的个体小鼠分类为完全应答者 (CR); 持续直至研究完成的CR被认为是无肿瘤存活者 (TFS)。使用公式 (3) 针对媒介物处理组确定肿瘤倍增时间 (DT): DT = (D_i - D_f) * log² / (logTV_i - logTV_f), 其中D = 天数并且TV = 肿瘤体积。使用双因素ANOVA确定肿瘤体积的统计学差异。当对照组的平均肿瘤体积在第28天达到1500mm³时,结束研究。

[0734] 在研究终止时,将收获的肿瘤在冰包装上的培养基中过夜运输并且在第二天进行处理。通过心脏刺穿收集全血样品并且在肝素钠中运输,并且在递送后在第二天进行处理。使用胶原酶在37℃下对肿瘤样品进行处理30min。通过细胞滤器对样品进行解离并且重悬浮在PBS中的2%FBS中。使用ACK裂解缓冲液使全血样品中的红血细胞裂解,并且然后将细胞在PBS中的2%FBS中洗涤两次。使用血细胞计数器对细胞进行计数,并且在冰上使用荧光染料偶联的抗体对一百万个细胞进行染色30min,然后使用PBS中的2%FBS洗涤。使用PBS中的4%多聚甲醛固定细胞。在FACS Canto (BD Biosciences) 上分析所有的染色细胞,并且使用FlowJo软件(TreeStar)分析数据。为了评估受体下调,使用小鼠(m) CD45、人(h) CD45、人(h) CD3、以及人(h) CD14抗体对CD14⁺群体进行设门。为了鉴定肿瘤浸润免疫细胞,根据标准程序使用hCD45、hCD3、hCD4、hCD8、以及hCD14抗体对群体进行设门。

[0735] 图15G和图15H描绘抗CD33抗体2F5作为用于治疗人癌症的治疗剂的临床前效力。抗体2F5是强效的受体下调剂和配体阻断抗体。当与抗PD-1抗体派姆单抗组合施用,抗体2F5显著降低黑素瘤肿瘤中的肿瘤体积(图15G和图15H)。值得注意的是,与同种型对照或较低亲和力/非配体阻断CD33抗体(CTRmAb)组合的派姆单抗不抑制肿瘤生长(图15G和图15H)。

[0736] 如图15I和图15J所示,使用CD33抗体2F5和抗PD-1抗体的组合治疗抑制移植有人免疫干细胞的小鼠中的患者来源的黑素瘤肿瘤模型中的体内肿瘤生长。通过使用R_{lm}()函数的多元线性回归针对供体、在时间0处的肿瘤大小和小鼠重量校正每个时间点处的肿瘤体积。在每个时间点处,通过使用R_{lm}()函数评估统计学显著性。

[0737] 如图15K和图15L所示,使用CD33抗体2F5和抗PD-1抗体的组合治疗抑制患者来源的黑素瘤肿瘤模型中的体内肿瘤生长,所述患者来源的黑素瘤肿瘤模型被植入移植有来自不同人供体(984480112、16554711和17509112)的人免疫干细胞的小鼠中。抗肿瘤作用通过供体显示。

[0738] 如图15M所示,使用CD33抗体2F5和抗PD-1抗体的组合治疗减慢移植有人免疫干细胞的小鼠中的患者来源的黑素瘤肿瘤模型中的体内肿瘤生长速率。使用R_{tumgr}包从第0天至第12天评估肿瘤指数生长,从而校正小鼠重量。通过使用R_{lm}()函数的多元线性回归评估统计学显著性,从而校正供体、动物重量和肿瘤初始体积。

[0739] 如图15N所示,使用CD33抗体2F5和抗PD-1抗体的组合治疗降低来自小鼠肿瘤模型的外周血hCD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的CD33的细胞表面水平,所述小鼠模型移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤。通过使用R_{lm}()函数的多元线性回归评估统计学显著性。

[0740] 如图15O所示,使用CD33抗体2F5和抗PD-1抗体的组合治疗减少移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤的小鼠肿瘤模型中的肿瘤浸润hCD45⁺CD14⁺骨髓细胞的数量。通过使用R_{lm}()函数的多元线性回归评估统计学显著性。

[0741] 如图15P所示,使用CD33抗体2F5和抗PD-1抗体的组合治疗增加移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤的小鼠肿瘤模型中的肿瘤浸润hCD45⁺CD3⁺T细胞的数量。通过使用R_{lm}()函数的多元线性回归评估统计学显著性。

[0742] 如图15Q所示,使用CD33抗体2F5和抗PD-1抗体的组合治疗减少移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤的小鼠肿瘤模型中的外周血hCD45⁺CD14⁺

骨髓细胞的数量。通过使用R lm()函数的多元线性回归评估统计学显著性。

[0743] 抗CD33抗体治疗的体内作用

[0744] 将CTG-0202患者来源的黑素瘤肿瘤首先在预研究小鼠中进行传代,之后植入到人源化小鼠中。当肿瘤在繁殖小鼠中达到1-1.5cm³的体积时,收获肿瘤以用于再植入到预研究小鼠中。使预研究小鼠在左侧腹上单侧地植入有肿瘤片段。在第7代时使用CTG-0202黑素瘤肿瘤。

[0745] 使用胎儿肝脏衍生的CD34⁺造血细胞使免疫受损的雌性小鼠 (Taconic NOG) 人源化。在68-74°F (20-23°C) 和30-70%湿度下,将小鼠关在单个HEPA通风笼 (Innocage® IVC, Innovive USA) 中的富集辐照的纸捻的1/8”的玉米棒衬底 (Sheperd) 上,采用12小时白天-夜晚循环。对小鼠随意饲喂水 (反渗透,2ppm Cl₂),并且饲喂由19%蛋白质、9%脂肪和4%纤维组成的辐照的测试啮齿动物饮食 (Teklad 2919)。对人源化小鼠进行植入,并且针对每个实验在植入之后七至十天开始记录预研究肿瘤体积。当肿瘤达到大约80-200mm³时,根据肿瘤体积将小鼠匹配到待用于给药的治疗组或对照组中,并且在第0天开始给药。

[0746] 对治疗组施用抗CD33抗体2F5。对对照组施用同种型对照抗体。然后在第0天开始给药。表12和图15R描绘给药时程、给药量和施用途径。

[0747] 表12: 抗体给药时程

[0748]	组	N	处理	剂量 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	ROA	时程	总剂量 数量
	1	10	CTR mAb	40	13.5	IP	q4dx6	6
	2	10	2F5 mAb	40	13.5	IP	q4dx6	6

[0749] 在表12中,“N”是指在每个治疗组中重复的数量;“CTR mAb”是指同种型对照抗体或低亲和力/非配体阻断抗CD33抗体;“2F5mAb”是指抗CD33抗体2F5;“ROA”是指施用途径;“IP”是指腹膜内;“q4dx6”是指每四天总计六次施用的给药时程。

[0750] 在第0天开始,每天观察小鼠并且使用电子秤每周两次进行称重。通过数字卡尺每周两次测量肿瘤尺寸,并且针对每个组记录数据,包括个体和平均估计的肿瘤体积 (平均TV ± SEM)。使用公式 (1) 计算肿瘤体积:TV = 宽度² × 长度 × 0.52。在研究完成时,通过公式 (2) 使用初始 (i) 和最终 (f) 肿瘤测量值计算肿瘤生长抑制百分比 (%TGI) 值并且针对每个治疗组 (T) 相对于对照 (C) 进行报告: %TGI = 1 - (T_f - T_i) / (C_f - C_i)。

[0751] 对于连续两次测量报告肿瘤体积 ≤ 第0天测量值的50%的个体小鼠被认为是部分应答者 (PR)。缺少可触知肿瘤 (对于连续两次测量 < 4 × 4mm²) 的个体小鼠分类为完全应答者 (CR);持续直至研究完成的CR被认为是无肿瘤的存活者 (TFS)。使用公式 (3) 针对媒介物处理组确定肿瘤倍增时间 (DT):DT = (D_i - D_f) * log² / (logTV_i - logTV_f),其中D = 天数并且TV = 肿瘤体积。使用双因素ANOVA确定肿瘤体积的统计学差异。在研究期间发生多次收获时间点。根据肿瘤体积 > 1500mm³的终点要求,在第25、32和39天取下小鼠以用于最终研究终止,无论治疗组如何。

[0752] 在研究终止时,将收获的肿瘤在冰包装上的培养基中过夜运输并且在第二天进行处理。通过心脏穿刺收集全血样品并且在肝素钠中运输,并且在递送后在第二天进行处理。使用胶原酶在37°C下对肿瘤样品进行处理30min。通过细胞滤器对样品进行解离并且重悬

浮在PBS中的2%FBS中。使用ACK裂解缓冲液对全血样品中的红血细胞进行裂解,并且然后将细胞在PBS中的2%FBS中洗涤两次。使用血细胞计数器对细胞进行计数,并且在冰上使用荧光染料偶联的抗体对一百万个细胞进行染色30min,然后使用PBS中的2%FBS洗涤。使用PBS中的4%多聚甲醛固定细胞。在FACS Canto (BD Biosciences) 上分析所有的染色细胞,并且使用FlowJo软件(TreeStar) 分析数据。为了评估受体下调,使用小鼠(m) CD45、人(h) CD45、人(h) CD3、以及人(h) CD14抗体对CD14⁺群体进行设门。为了鉴定肿瘤浸润免疫细胞,根据标准程序使用hCD45、hCD3、hCD4、hCD8、以及hCD14抗体对群体进行设门。

[0753] 如图15S和图15T所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗抑制移植有人免疫干细胞的小鼠中的患者来源的黑素瘤肿瘤模型中的体内肿瘤生长。通过使用R_{lm}()函数的多元线性回归针对供体、在时间0处的肿瘤大小和小鼠重量校正每个时间点处的肿瘤体积。在每个时间点处,通过使用R_{lm}()函数评估统计学显著性。

[0754] 如图15U所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗减慢移植有人免疫干细胞的小鼠中的患者来源的黑素瘤肿瘤模型中的体内肿瘤生长速率。使用R_{tumgr}包装从第0天至第11天评估肿瘤指数生长,从而校正小鼠重量。通过使用R_{lm}()函数的多元线性回归评估统计学显著性,从而校正供体、动物重量和肿瘤初始体积。

[0755] 如图15V、图15W和图15X所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗降低肿瘤生长速率,与存在于移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤的小鼠肿瘤模型中CD33单核苷酸多态性(SNP) CD33等位基因rs3865444A/A、A/C或C/C无关。rs3865444C/C等位基因是阿尔茨海默氏病的风险等位基因,而rs3865444A/A等位基因是阿尔茨海默氏病的保护性等位基因。

[0756] 如图15Y所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗降低来自小鼠肿瘤模型的外周血hCD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的CD33的细胞表面水平,所述小鼠肿瘤模型移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤。通过使用R_{lm}()函数的多元线性回归评估统计学显著性。

[0757] 如图15Z、图15AA和图15BB所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗降低来自小鼠肿瘤模型的外周血hCD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的CD33的细胞表面水平,所述小鼠肿瘤模型移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤,其中单核苷酸多态性(SNP) CD33等位基因rs3865444A/A、A/C或C/C存在于小鼠中。CD33细胞表面水平的降低是在阿尔茨海默氏病风险等位基因rs3865444C/C的携带者的小鼠中是统计学上显著的(图15Z和图15AA),但是在是阿尔茨海默氏病保护性等位基因rs3865444A/A的携带者的小鼠中不是统计学上显著的(图15BB)。

[0758] 如图15CCC所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗降低来自移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤的小鼠肿瘤模型的肿瘤浸润hCD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的CD33的细胞表面水平。通过使用R_{lm}()函数的多元线性回归评估统计学显著性。

[0759] 如图15DD、图15EE和图15FF所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗降低来自移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤的小鼠肿瘤模型的肿瘤浸润hCD45⁺CD14⁺骨髓细胞中的CD33的细胞表面水平,其中单核苷酸多态性(SNP) CD33等位基因rs3865444A/A、A/C或C/C存在于小鼠中。CD33细胞表面水平的降低是在阿尔茨海默氏病风险等位基因rs3865444C/C的携带者的小鼠中是统计学上显著的(图15DD和图15EE),但是在

是阿尔茨海默氏病保护性等位基因rs3865444A/A的携带者的小鼠中不是统计学上显著的(图15FF)。

[0760] 如图15GG所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗减少移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤的小鼠肿瘤模型中的肿瘤浸润hCD45⁺CD14⁺骨髓细胞的数量。通过使用R lm()函数的多元线性回归评估统计学显著性。

[0761] 如图15HH、图15II和图15JJ所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗减少移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤的小鼠肿瘤模型中的肿瘤浸润hCD45⁺CD14⁺骨髓细胞的数量,其中单核苷酸多态性(SNP) CD33等位基因rs3865444A/A、A/C或C/C存在于小鼠中。肿瘤浸润hCD45⁺CD14⁺骨髓细胞的降低是在阿尔茨海默氏病风险等位基因rs3865444C/C和阿尔茨海默氏病保护性等位基因rs3865444A/A的携带者的小鼠中是统计学上显著的(图15HH、图15II和图15JJ)。

[0762] 如图15KK所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗增加移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤的小鼠肿瘤模型中的肿瘤浸润hCD45⁺CD3⁺ T骨髓细胞的数量。通过使用R lm()函数的多元线性回归评估统计学显著性。

[0763] 如图15LL、图15MM和图15NN所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗增加肿瘤浸润hCD45⁺CD3⁺ T细胞的数量,与存在于移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤的小鼠肿瘤模型中的CD33单核苷酸多态性(SNP) CD33等位基因rs3865444A/A、A/C或C/C无关。rs3865444C/C等位基因是阿尔茨海默氏病的风险等位基因,而rs3865444A/A等位基因是阿尔茨海默氏病的保护性等位基因。

[0764] 如图1500所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗减少移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤的小鼠肿瘤模型中的外周血hCD45⁺CD14⁺骨髓细胞的数量。通过使用R lm()函数的多元线性回归评估统计学显著性。

[0765] 如图15PP、图15QQ和图15RR所示,单独使用CD33抗体2F5的治疗减少外周血hCD45⁺CD14⁺骨髓细胞的数量,与存在于移植有人免疫干细胞和患者来源的异种移植物CTG-0202黑素瘤肿瘤的小鼠肿瘤模型中的CD33单核苷酸多态性(SNP) CD33等位基因rs3865444A/A、A/C或C/C无关。rs3865444C/C等位基因是阿尔茨海默氏病的风险等位基因,而rs3865444A/A等位基因是阿尔茨海默氏病的保护性等位基因。

[0766] 抗体治疗的体内作用的结论

[0767] 图15F-图15RR中所描绘的结果证明抗CD33抗体2F5作为用于治疗人癌症(例如,黑素瘤)的治疗剂的临床前效力。2F5抗体是强效的受体下调剂和配体阻断抗体。当作为单一疗法(图15R-图15RR)或与抗PD-1抗体组合(图15F-图15Q)施用的2F5抗体显著降低黑素瘤肿瘤中的肿瘤体积和肿瘤生长速率。值得注意的是,单独的同种型对照(或较低亲和力/非配体阻断CD33抗体)或与抗PD-1抗体组合的施用不抑制肿瘤生长。

[0768] 使用CD33抗体单一疗法或与抗PD-1抗体组合治疗的肿瘤浸润免疫细胞群体的分析证明肿瘤浸润CD3⁺ T细胞的数量显著增加(图15P和图15kk-图15NN)。骨髓细胞群体通过CD33抗体单一疗法或与抗PD-1抗体组合来减少(图150、图15Q、图15GG-图15JJ、以及图1500-图15RR)。观察到肿瘤浸润CD14⁺骨髓细胞和外周血iCD14⁺骨髓细胞两者的显著降低。

[0769] 值得注意的是,肿瘤和对肿瘤做出应答的免疫系统两者在此小鼠研究中均是人。小鼠的免疫系统使用一种方法来人源化,通过所述方法,小鼠免疫系统在遗传上被切除并

且使用使骨髓和淋巴样免疫细胞再生并发展的人供体CD34⁺造血干细胞和祖细胞替换。所述肿瘤是患者来源的黑素瘤。所述结果证明人特异性抗CD33抗体(2F5)展示出靶标特异性接合并且降低人CD33的细胞表面水平。CD33的细胞表面水平的下调在外周和肿瘤CD14⁺骨髓细胞上是显著的。因此,对于肿瘤体积、肿瘤生长速率、CD3⁺ T细胞的肿瘤浸润的增加数量、以及CD14⁺细胞的减少数量的任何作用是人骨髓免疫细胞上的CD33的2F5抗体介导的下调的结果。

[0770] 另外,所述结果将用于使肿瘤植入小鼠的免疫系统再生的人供体的CD33基因型考虑在内。在评估已证明是阿尔茨海默氏病风险等位基因的CD33SNP rs3865444时,具有保护性rs3865444A/A等位基因的供体显示与是rs3865444C风险等位基因的携带者的供体相比更低的CD33细胞表面水平和降低的肿瘤生长速率。此外,使用CD33抗体2F5的治疗模拟CD33基因型的表型,因为2F5抗体在两个研究中均降低CD14⁺骨髓细胞上的细胞表面CD33水平并且降低肿瘤生长速率。

[0771] 实施例11:由拮抗性和/或双特异性CD33抗体引起的骨髓细胞中的抗炎细胞因子IL-10的减少

[0772] 此实施例的目的在于测试骨髓衍生的骨髓细胞在使用拮抗性抗CD33和/或CD33双特异性抗体处理并且通过与凋亡细胞共培养或通过相似的刺激使用100ng/ml LPS(Sigma)进行刺激之后是否显示抗炎细胞因子IL-10和其他抗炎介质的降低。

[0773] 如前所述执行人骨髓前体细胞的分离。5天之后改变培养基并且对细胞培养另外的10-11天。24h之后收集上清液并且根据制造商的说明书(R&D Systems)通过IL-10ELISA确定从细胞释放的IL-10和其他抗炎细胞因子的水平(JEM(2005),201:647-657;以及PLoS Medicine(2004),4|Issue 4|e124)。

[0774] 实施例12:通过拮抗性和/或双特异性CD33抗体进行的来自骨髓谱系的细胞中的吞噬作用的诱导

[0775] 此实施例的目的在于测试拮抗性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体是否诱导对来自骨髓谱系的细胞(诸如单核细胞、树突细胞、巨噬细胞以及小神经胶质细胞)中的以下各项的吞噬作用:凋亡神经元、神经组织碎片、非神经组织碎片、细菌、其他异物、以及致病性蛋白(诸如Aβ肽、α突触核蛋白、Tau蛋白、TDP-43蛋白、朊病毒蛋白、亨廷顿蛋白)RNA、翻译产物抗原(包括由甘氨酸-丙氨酸(GA)、甘氨酸-脯氨酸(GP)、甘氨酸-精氨酸(GR)、脯氨酸-丙氨酸(PA)、或脯氨酸-精氨酸(PR)构成的二肽重复序列(DPR肽))。双特异性抗体可以是识别CD33抗原和第二抗原的抗体,所述第二抗原包括但不限于Aβ肽、抗原或α突触核蛋白抗原、或Tau蛋白抗原、或TDP-43蛋白抗原、或朊病毒蛋白抗原、或亨廷顿蛋白抗原、或RNA、翻译产物抗原(包括由甘氨酸-丙氨酸(GA)、甘氨酸-脯氨酸(GP)、甘氨酸-精氨酸(GR)、脯氨酸-丙氨酸(PA)、或脯氨酸-精氨酸(PR)构成的二肽重复序列(DPR肽))。

[0776] 使用RosetteSep单核细胞分离抗体混合物(StemCell Technologies)分离来自外周人血液样品的单核细胞,并且使用50μg/ml M-CSF(PeproTech)分化为树突细胞,持续5天。将细胞铺板在培养皿上含有10%胎牛血清(Hyclone)的RPMI培养基(Invitrogen)中,并且在37℃下在5%CO₂中进行培养。通过轻轻刮擦收集贴壁细胞,并且用于吞噬作用实验。

[0777] 根据在Etemad等人,JI(2012),和Ohgidani等人,Scientific Reports(2014)中所描述的方案,通过在具有1%青霉素/链霉素、10ng/ml GM-CSF、10ng/ml M-CSF、10ng/mlβ-

NGF、100ng/ml CCL-2、100ng/ml IL-34的不含血清的RPMI中进行培养来从外周血单核细胞制备人小神经胶质细胞。当分支形态出现时,在第7-10天收获细胞。

[0778] 为了实施吞噬作用测定,将小神经胶质细胞、巨噬细胞或树突细胞与凋亡神经元、神经组织碎片、非神经组织碎片、细菌、其他异物、以及致病性蛋白一起培养。将神经元培养5-10天,然后以30nM的最终浓度添加冈田酸3h以诱导细胞凋亡。使用CellTracker CM-DiI膜染料(分子探针)标记神经元细胞膜。在孵育之后,洗涤凋亡神经元或吞噬作用的其他靶标两次并且以1:20的效应物/靶标比率下添加到转导的小神经胶质细胞培养物。在添加凋亡神经元之后1h和24h处,在共焦荧光显微镜(Leica)下计数具有吞噬神经元细胞膜的小神经胶质细胞的数量。在60放大率下在不同区域中对凋亡细胞进行计数。通过流式细胞术确认吞噬量。此外,在添加凋亡神经元之后24h、48h、或72h,收集细胞并且用于细胞因子的RT-PCR。

[0779] 为了实施微球珠粒或细菌吞噬作用测定,使用抗CD33激动性抗体处理小神经胶质细胞、巨噬细胞或树突细胞。收获细胞并且铺板在没有细胞因子的96孔平底板中2小时。根据制造商的方案重悬浮pHrodo标记的大肠杆菌生物颗粒并且使用0.2U/ml或0.4U/ml来自霍乱弧菌的唾液酸酶或单独使用PBS在37C下处理2.5小时。洗涤生物颗粒,重悬浮在RPMI中并且以20 μ g/孔添加。将细胞和大肠杆菌混合、铺板并且在37C下孵育30分钟。以10 μ M将细胞松弛素D添加到对照孔。在即将进行FACS分析之前,将细胞转移到冰并且在4C下在FACS缓冲液中洗涤2次。在BD FACS Canto上通过流式细胞术在PE通道中检测pHrodo标记的大肠杆菌吞噬作用。

[0780] 24h之后,添加1.00 μ m的红色荧光微球珠粒(Fluoresbrite多色红色微球; Polysciences公司)持续1h。通过荧光显微镜分析通过小神经胶质细胞进行的对微球珠粒的吞噬作用。此外,从培养板收集小神经胶质细胞并且通过流式细胞术分析。确定具有吞噬珠粒的小神经胶质细胞的百分比。因为吞噬作用在实验之间不同,也确定吞噬作用的相对变化。将数据示为与激动性抗体和对照抗体一起培养的小神经胶质细胞之间的吞噬作用的相对变化。

[0781] 为了实施用于炎症基因转录物的分析的RT-PCR,使用CD33载体或GFP1对照载体转导小神经胶质细胞。然后在皿上培养细胞并且使用抗CD33激动性抗体处理。在24h、48h和72h之后,使用RNeasy微试剂盒(QIAGEN)从小神经胶质细胞分离RNA。还从用sh-CD33RNA、sh-对照RNA、wCD33、GFP2、mtDAP12-GFP、以及GFP1载体转导的小神经胶质细胞收集RNA并且将RNA与凋亡神经元共培养48h。

[0782] 然后执行RNA的逆转录。在ABI Prism 5700序列检测系统(PerkinElmer)上执行通过SYBR Green进行的定量RT-PCR。使用GAPDH的扩增用于样品归一化。扩增方案遵循GeneAmp 5700序列检测系统软件(版本1.3)。对于GAPDH、TNF- α 、IL-1、NOS2、以及TGF- β 转录物的检测,以200nM的最终浓度使用以下正向和反向引物:

[0783] GAPDH正向引物:5'-CTCCACTCACGGCAAATTCAA-3'(SEQ ID NO:218),和GAPDH反向引物:5'-GATGACAAGCTTCCCATTCTCG-3'(SEQ ID NO:219);

[0784] TNF- α 正向引物:5'-CCGTCAGCCGATTGCTATCT-3'(SEQ ID NO:220),和TNF- α 反向引物:5'-ACGGCAGAGAGGAGGTTGACTT-3'(SEQ ID NO:221);

[0785] IL-1 α 正向引物:5'-ACAA-CAAAAAGCCTCGTGCTG-3'(SEQ ID NO:222),和IL-1 α 反

向引物:5'-CCATTGAGGTGGAGAGCTTTCA-3' (SEQ ID NO:223);

[0786] NOS2正向引物:5'-GGCAAACCCAAGGTCTACGTTC-3' (SEQ ID NO 224), NOS2反向引物:5'-TACCTCATTGGCCAGCTGCTT-3' (SEQ ID NO:225);以及

[0787] TGF- β 1正向引物:5'-AGGACCTGGGTGGAAGTGG-3' (SEQ ID NO:226), 和TGF- β 1反向引物:5'-AGTTGGCATGGTAGCCCTTG-3' (SEQ ID NO:227)。

[0788] 为了实施骨髓吞噬作用测定,在20mM下将HiLyteFluor™ 647 (Anaspec) - $\alpha\beta$ - (1-40) 重悬浮在Tris/EDTA (pH 8.2) 中,并且然后在37°C下在黑暗中孵育3天以促进聚集。在低血清(补充有胰岛素的0.5%FBS)、LPS (50ng/ml)、IFN γ (100个单位/ml)、以及抗CD33拮抗性抗体中预处理小神经胶质细胞、巨噬细胞或树突细胞24h,之后添加聚集的荧光标记的 $\alpha\beta$ 肽。添加100nM聚集的HiLyteFluor™ 647- $\alpha\beta$ - (1-40) (ASN NEURO (2010) 2 (3):157-170) 后5h通过流式细胞计数分析确定骨髓吞噬作用和CD33的表面表达。以相似的方式实施对其他致病性蛋白的吞噬作用。

[0789] 实施例13:通过拮抗性CD33抗体和/或双特异性抗体进行的SYK和/或ERK活化的诱导

[0790] 此实施例的目的在于测试激动性抗CD33抗体和/或CD33/双特异性抗体是否诱导Syk和ERK活化。

[0791] 将小神经胶质细胞、巨噬细胞或树突细胞暴露于拮抗性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体1h。在刺激之后,在还原样品缓冲液中使细胞裂解以用于蛋白质印迹分析。通过蛋白质印迹分析 (JEM (2005), 201, 647-657) 通过分别使用抗磷酸化Syk或ERK抗体和抗Syk或ERK抗体的免疫检测 (均根据细胞信号传导技术) 确定ERK的磷酸化和Syk和/或ERK的总量。

[0792] 实施例14:CD33抗体和/或双特异性抗体诱导Syk磷酸化

[0793] 脾酪氨酸激酶 (Syk) 是通过使若干底物磷酸化、从而有助于形成引起细胞活化和炎性过程的信号传导复合物来在CD33下游起作用的细胞内信号传导分子。通过培养人巨噬细胞和人原代树突细胞并且测量细胞提取物中的Syk蛋白的磷酸化状态确定激动剂CD33抗体诱导Syk活化的能力。

[0794] 使人原代树突细胞在1%血清RPMI中饥饿4小时,并且然后使用PBS-EDTA从组织培养皿去除,使用PBS洗涤,并且计数。在冰上使用全长激动剂CD33抗体或对照抗体涂覆细胞15分钟。在使用冷PBS洗涤之后,在山羊抗人IgG的存在下在37°C下孵育细胞,持续指示的时间段。在刺激之后,使用裂解缓冲液 (1% v/v NP-40、50mM Tris-HCl (pH 8.0)、150mM NaCl、1mM EDTA、1.5mM MgCl₂、10%甘油,加上蛋白酶和磷酸酶抑制剂) 使细胞裂解,接着在4°C下以16,000g离心10min以去除不可溶物质。然后使用抗Syk Ab (针对人DC的4D10, Santa Cruz Biotechnology) 使裂解物免疫沉淀。通过SDS-PAGE分级沉淀的蛋白质,转移到PVDF膜并且使用抗磷酸酪氨酸Ab (4G10, Millipore) 进行探测。为了确认所有基质被充分免疫沉淀,使用抗Syk (Novus Biological, 针对人DC) 对免疫印迹进行再探测。使用增强的化学发光 (ECL) 系统 (GE healthcare) 执行可视化,如所描述的 (例如, Peng等人, (2010) Sci Signal., 3 (122):ra38)。

[0795] 实施例15:通过拮抗性CD33抗体和/或双特异性抗体进行的小神经胶质细胞、巨噬细胞、T细胞、以及树突细胞中的CCR7的诱导和向CCL19和CCL21的迁移

[0796] 此实施例的目的在于测试抗CD33抗体和/或CD33/双特异性抗体是否诱导小神经胶质细胞、巨噬细胞和树突细胞中的CCR7和向CCL19和CCL21的迁移。

[0797] 将小神经胶质细胞、巨噬细胞或树突细胞与激动性抗CD33抗体和/或CD33/DAP12双特异性抗体或与对照抗体一起培养。在72h之后收集细胞,使用CCR7特异性抗体进行免疫标记,并且通过流式细胞术进行分析。

[0798] 为了确定增加的CCR7表达的任何功能性结果,执行趋化性测定。使用拮抗性抗CD33抗体和/或CD33/DAP12双特异性抗体通过CD33刺激小神经胶质细胞、巨噬细胞或树突细胞,并且放置在两腔室系统中。对向趋化因子配体CCL19和CCL21迁移的小神经胶质细胞的数量进行定量(JEM(2005),201,647-657)。

[0799] 对于趋化性测定,将小神经胶质细胞、巨噬细胞或树突细胞暴露于拮抗性抗CD33抗体或CD33/双特异性抗体并且使用1 μ g/ml LPS处理。将小神经胶质细胞、巨噬细胞或树突细胞转移到在下部腔室中含有具有100ng/ml CCL19或CCL21(均来自PeproTech)的450 μ l培养基的跨孔系统(3 μ m孔径过滤器;Millipore)的上部腔室中。在1h孵育时间段之后,通过显微镜(JEM(2005),201,647-657)在三个独立的区域中计数迁移到下部腔室的小神经胶质细胞、巨噬细胞或树突细胞的数量。

[0800] 实施例16:通过拮抗性CD33抗体和/或双特异性抗体进行的小神经胶质细胞、巨噬细胞、T细胞、以及树突细胞中的F-肌动蛋白的诱导

[0801] 此实施例的目的在于测试拮抗性抗CD33抗体或CD33双特异性抗体是否诱导小神经胶质细胞、巨噬细胞和树突细胞中的F-肌动蛋白。

[0802] 将用CD33转导或表达CD33的感兴趣的小神经胶质细胞、巨噬细胞或树突细胞和其他细胞添加到培养板并且然后暴露于拮抗性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体或对照抗体。在1h之后,固定细胞,阻断细胞并且然后使用Alexa Fluor 546偶联的鬼笔环肽(分子探针)染色,并且使用荧光染料标记F-肌动蛋白。通过具有40倍物镜的共焦激光扫描显微镜(Leica)采集图像。(JEM(2005),201,647-657)。

[0803] 实施例17:通过拮抗性CD33抗体和/或双特异性抗体进行的破骨细胞产生的诱导和破骨细胞生成速率的增加

[0804] 此实施例的目的在于测试拮抗性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体是否诱导破骨细胞产生并且增加破骨细胞生成的速率。

[0805] 将人单核细胞衍生的单核细胞/巨噬细胞维持在补充有10%FBS (Atlantic Biologicals,Atlanta,GA,USA) 和青霉素-链霉素-谷氨酰胺(Mediatech)的RPMI-1640培养基(Mediatech)或另一种适当的培养基中。将细胞以3000个细胞/孔接种在96孔板中的补充有10%FBS、青霉素-链霉素-谷氨酰胺、50ng/ml RANKL、以及20ng/ml M-CSF的 α -MEM培养基中。将培养基每3天改变一次,暴露于抗CD33拮抗性抗体,并且通过光学显微镜计数多核(至少三核)TRACP⁺破骨细胞的数量并且进行评分。为了确定复杂性和大小,通过核的数量(>10个或3-10个核)对破骨细胞进行计数。还通过使用Image J软件(NIH)测量破骨细胞的表面积。此外,确定破骨细胞基因的表达水平。使用TRIzol试剂(Invitrogen)在不同时间点处从破骨细胞生成培养物提取总RNA。在使用SuperScript III试剂盒(Invitrogen)合成第一链cDNA之后,针对Nfatc1、Acp5、Ctsk、Calcr、以及Ccnd1执行实时定量PCR反应。计算靶标mRNA表达的相对定量并且归一化到亲环蛋白的表达,并且表示为(靶标基因的mRNA/亲环蛋白的

mRNA) 3×10^6 。(J. OF BONE AND MINERAL RESEARCH (2006), 21, 237-245; J Immunol 2012; 188:2612-2621)。

[0806] 可替代地,将巨噬细胞以一式三份孔接种到板上,并且使用RANKL、M-CSF处理并且使用抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体或同种型匹配的对照单克隆抗体处理。将培养基每3天改变一次,直至可见大的多核细胞。在培养物中3天至5天之后,使用在PBS中的3.7%甲醛固定细胞10min。然后将板在PBS中洗涤两次,在50%丙酮和50%乙醇的溶液中孵育30s并且使用PBS洗涤。使用来自Sigma的试剂盒(产品435)针对抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)对细胞进行染色。然后通过光学显微镜对多核(多于两个核)TRAP阳性细胞进行计数,如所描述的(例如,Peng等人,(2010) Sci Signal., 3 (122):ra38)。

[0807] 实施例18:完整动物中针对EAE和双环己酮草酰二胺的体内保护

[0808] 在尾基部中两侧对成年7-9周龄的雌性C57BL/6小鼠(从Charles River Laboratories获得)注射含有100 μ g的髓鞘少突胶质细胞糖蛋白肽35-55(氨基酸MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID NO:215); SeqLab) 和1mg的在不完全弗氏佐剂(Difco)中的结核分枝杆菌H37Ra (Difco) 的200 μ l的接种物。在免疫之后在第0天和在第2天注射百日咳毒素(200ng; List Bio-logical Laboratories)。如下对临床体征进行评分:0,没有临床体征;1,完全无力的尾巴;2,完全无力的尾巴和异常步态;3,一个后肢轻度瘫痪;4,完全后肢轻度瘫痪;以及5,前肢和后肢麻痹或垂死。仅使用在第14天具有疾病发作的小鼠(1或更大的临床评分)用于实验。在第一临床症状的当天或在任何其他所需的时间处对患有EAE疾病的小鼠腹膜内或静脉内注射激动性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体(PLoS Med (2007) 4 (4):e124)。

[0809] 对年轻或老年的野生型(WT)小鼠饲喂含有0.2%双环己酮草酰二胺(CPZ)粉末状草酸双(亚环己基酰肼)(Sigma-Aldrich)的标准饮食(Harlan)持续4周、6周或12周。对于组织学和免疫组织化学分析,在对小鼠灌注4%多聚甲醛(PFA)之后去除大脑,固定在4%PFA中24h,接着浸没在30%蔗糖中24-28h。为了评价髓鞘完整性和损害以及细胞增殖,使用抗MBP (1:100; Abcam, ab7349)、抗dMBP (1:2000; Millipore, ab5864)、抗BAPP (1:100; Invitrogen, 51-2700)、抗SMI-31 (1:1000; Covance, smi-31R)、抗Iba1 (1:600; Wako, 019-19741)、抗BrdU (1:250; Abcam, ab1893)、抗GFAP (1:200; Invitrogen, 13-0300)、抗iNOS (1:100; BD Pharmingen, 610329)、抗LPL (1:400, 来自Dr. G. Olivecrona)以及抗MHC II (1:100; BD Pharmingen, 553549)对炎症切片或小鼠大脑进行染色。对于抗体的行为作用,使用透明聚苯乙烯外壳和计算机化光束器械针对运动活性分析小鼠。分析一般活性变量(总走动、垂直直立活动),连同情绪指数,包括花费的时间、行走的距离和进入。执行一套感觉运动测试以评估平衡(突出部和平台)、强度(倒置的挡板)、协调(杆和倾斜的挡板)以及动作的启动(行走启动)。使用旋转杆方案研究运动协调和平衡(Cantoni等人, Acta Neuropathol (2015) 129 (3):429-47)。

[0810] 实施例19:建立的创伤性脑损伤的动物模型中拮抗性CD33抗体和/或CD33双特异性抗体的治疗性用途的表征

[0811] 在建立的创伤性脑损伤的动物模型中测试拮抗性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体的治疗性用途(Tanaka, Y等人(2013) Neuroscience 231 49-60)。可使用常规小鼠或在细菌人工染色体下或在骨髓启动子下表达人CD33基因的小鼠。例如,使用诱导小神经胶质

细胞和星形胶质细胞的活化的创伤性脑损伤的模型。使用八周或九周龄的雄性C57BL/6J WT小鼠(购自Charles River Laboratories或Jackson Laboratories)。通过腹膜内施用溶解在无菌盐水中的盐酸甲苯噻嗪(8mg/kg)和水合氯醛(300mg/kg)使小鼠麻醉,并且随后放置在立体定位装置(Narishige,Tokyo,Japan)中。在头皮中制作切口并且使脑颅暴露。从颅骨清理骨膜,使用牙钻在右大脑半球上钻孔,并且使用针尖去除硬脑膜。使用具有0.5mm外径的不锈钢插管在右半球中制作纵向刺伤。将插管定位在中线侧面1.3mm和前囟后部1mm处,并且引入到大脑中直至尖端达到2mm的深度为止。然后将插管在尾部移动2mm(前囟3mm),并且然后旋转地移动2mm回到其初始位置。最后将插管从大脑去除并且缝合头皮伤口。然后根据标准程序使用拮抗性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体处理小鼠,并且然后通过组织学和免疫荧光染色和行为测试进行分析。此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0812] 实施例20:毒素诱导的损伤之后的神经炎症和神经元丧失的模型中拮抗性CD33抗体和/或CD33双特异性抗体的治疗性用途的表征

[0813] 在毒素诱导的损伤之后的神经炎症和神经元丧失的模型中测试激动性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体的治疗性用途(Martens,LH等人,(2012) The Journal of Clinical Investigation,122,3955)。使用每天4次腹膜内注射MPTP(1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶)持续2天(4μg/g体重)(Sigma-Aldrich)或PBS处理三月龄的常规小鼠。根据标准方案使用激动性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体处理小鼠,并且然后使用立体学计数进行分析以定量黑质致密部(SNpc)中的多巴胺神经元和小神经胶质细胞,如所描述的。此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0814] 实施例21:老化、癫痫发作、脊髓损伤、视网膜营养不良、额颞叶痴呆、以及阿尔茨海默氏病的动物模型中拮抗性CD33抗体和/或CD33双特异性抗体的治疗性用途的表征

[0815] 在老化、癫痫发作、脊髓损伤、视网膜营养不良、额颞叶痴呆、亨廷顿病、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化症以及阿尔茨海默氏病的动物模型中测试拮抗性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体的治疗性用途,如先前所述的(例如,Beattie,MS等人,(2002) Neuron 36,375-386;Volosin,M等人,(2006) J.Neurosci.26,7756-7766;Nykjaer,A等人,(2005) Curr.Opin.Neurobiol.15,49-57;Jansen,P等人,(2007) Nat.Neurosci.10,1449-1457;Volosin,M等人,(2008) J.Neurosci.28,9870-9879;Fahnestock,M等人,(2001) Mol.Cell Neurosci.18,210-220;Nakamura,K等人,(2007) Cell Death.Differ.14,1552-1554;Yune,T等人,(2007) Brain Res.1183,32-42;Wei,Y等人,(2007) Neurosci.Lett.429,169-174;Provenzano,MJ等人,(2008) Laryngoscope118,87-93;Nykjaer,A等人,(2004) Nature 427,843-848;Harrington,AW等人,(2004) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101,6226-6230;Teng,HK等人,(2005) J.Neurosci.25,5455-5463;Jansen,P等人,(2007) Nat.Neurosci.10,1449-1457;Volosin,M等人,(2008) J.Neurosci.28,9870-9879;Fan,YJ等人,(2008) Eur.J.Neurosci.27,2380-2390;Al-Shawi,R等人,(2008) Eur.J.Neurosci.27,2103-2114;以及Yano,H等人,(2009) J.Neurosci.29,14790-14802)。此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢

病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0816] 实施例22:感染模型中拮抗性CD33抗体和/或CD33双特异性抗体的治疗性用途的表征

[0817] 在感染模型中测试拮抗性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体的治疗性用途。例如,可使用正常小鼠中的单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 或其他感染,如先前所述的(例如,Yin,F等人,(2009) *J.Exp.Med.*,207,117-128)。可使用常规小鼠或在细菌人工染色体下或在骨髓启动子下表达人CD33基因的小鼠。

[0818] 实施例23:炎症疾病的模型中拮抗性CD33抗体和/或CD33双特异性抗体的治疗性用途的表征

[0819] 在炎症疾病的模型中测试拮抗性抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体的治疗性用途。例如,类风湿关节炎或在建立的另一种炎症疾病的模型中(Mizoguchi (2012) *Prog Mol Biol Transl Sci.*,105:263-320;以及Asquith等人,(2009) *Eur J Immunol.*39:2040-4)。此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0820] 实施例24:筛选诱导或抑制CD33和下游信号传导分子的磷酸化的抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体。

[0821] 使用PBS-EDTA从组织培养皿去除细胞(J774、RAW 264.7、BMM细胞、人原代单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、T细胞小神经胶质细胞或破骨细胞),使用PBS洗涤并且进行计数。在冰上或在其他条件下将细胞与抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体或与同种型匹配的对照抗体以1 μ g/10⁶个细胞孵育20min。在冰冷的放射免疫沉淀测定(RIPA)缓冲液中使细胞裂解20min,接着在4 $^{\circ}$ C以16,000g离心10min以去除不可溶物质。使所得的上清液经受与所指示的抗体(DAP12、ERK、或AKT)和蛋白A-或蛋白G-琼脂糖(Sigma)的免疫沉淀反应。使用RIPA缓冲液充分洗涤珠粒,并且通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)使蛋白质分离。然后通过蛋白质印迹将蛋白质转移到硝化纤维膜,与适当的抗体(特异性地识别磷酸化酪氨酸或磷酸化形式的DAP12、ERK、Syk、LCK、FYN、C-Cbl、VAV、或AKT的抗体)一起孵育并且使用增强的化学发光(ECL)系统(Pierce)可视化,如所描述的(例如,Peng等人,(2010) *Sci Signal.*,3(122):ra38)。

[0822] 实施例25:筛选诱导或抑制钙流量的抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体

[0823] 使用含有HEPES的缓冲液[20mM HEPES (pH 7.3)、120mM NaCl、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、5mM KCl、葡萄糖(1mg/ml)、牛血清白蛋白(1mg/ml)]洗涤BMM细胞两次,接着在37 $^{\circ}$ C下在0.05%Pluronic F-127 (Invitrogen)和1 μ M Indo-1AM (Invitrogen)中孵育20min。使用HEPES缓冲液洗涤细胞两次并且然后使用抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体(16 μ g/ml)或使用对照抗体(16 μ g/ml)刺激并且通过分光光度计(PTL Photon Technology International)进行监测。根据制造商的说明书将Indo-1荧光发射转化为钙(Ca²⁺) (例如,Peng等人,(2010) *Sci Signal.*,3(122):ra38)。

[0824] 实施例26:CD33增加巨噬细胞、T细胞和树突细胞的存活

[0825] 为了评价CD33在细胞存活中的作用,在炎症介质的存在下培养人或小鼠巨噬细胞、小神经胶质细胞、T细胞和树突细胞,并且测量细胞存活。

[0826] 通过使用冷PBS冲洗胫骨和股骨骨髓细胞来获得来自CD33WT、Het和KO小鼠的鼠骨

髓前体细胞。在使用PBS一次洗涤之后,使用ACK裂解缓冲液(Lonza)使红细胞裂解,使用PBS洗涤两次并且以 0.5×10^6 个细胞/ml重悬浮在具有指示量的产生巨噬细胞的50ng/ml M-CSF或产生树突细胞的10ng/ml GM-CSF的完全RPMI培养基(10%FCS,青霉素/链霉素,Gln,neAA)中。对于M2型巨噬细胞,向培养细胞添加10ng/ml IL-4。对于M1型巨噬细胞,添加50ng/ml IFN。在一些实施方案中,以 $1 \mu\text{g/ml}$ - 0.01ng/ml 的浓度范围在第5天向细胞培养物添加LPS或酵母聚糖。重组细胞因子购自Peprotech。

[0827] 为了分析骨髓衍生的巨噬细胞的成活力,如上制备细胞并且在MCSF中进行培养。在非组织培养物处理板中,将细胞以 10^5 个/200 μl 铺板在96孔板中(用于使用基于荧光素酶的测定的成活力分析)或以 0.5×10^6 个/1ml铺板在6孔板中(用于台盼蓝排除细胞计数)。在第3天添加含有新鲜M-CSF的培养基。在指示的时间点处,使用3mM EDTA使细胞从板轻轻脱离,并且使用Burker腔室(Burker chamber)进行计数。对于活细胞的FACS分析,在50ng/ml MCSF中培养巨噬细胞6天(+MCSF)或在50ng/ml MCSF中培养巨噬细胞4天,之后去除MCSF,培养额外的36h(-MCSF)。使用CD11b抗体和DAPI对细胞进行染色。对于荧光素酶成活力测定,在梯度浓度的生长因子GMCSF(树突细胞)、MCSF(M1巨噬细胞)、或MCSF+IL-4(M2巨噬细胞)中培养的第5天测量细胞成活力。将细胞与ToxGlo试剂(Promega)一起直接孵育,并且确定荧光素酶活性(发光)。对于在炎性介质IFN、LPS、或酵母聚糖的存在下培养的成活的巨噬细胞的FACS分析,在第5天收集细胞并且使用CD11b抗体和DAPI进行染色。

[0828] 实施例27:CD33增加巨噬细胞上的炎性细胞表面标记物的表达

[0829] 为了确定CD33在炎性标记物表达中的作用,使用各种炎性介质培养巨噬细胞,并且在CD33抗体存在或不存在下测量表面标记物CD86和CD206的表达。

[0830] 将巨噬细胞铺板并且使其在 37°C 下粘附4h,并且以0.01-100ng/ml(LPS)或0.01-10 $\mu\text{g/ml}$ (酵母聚糖)范围内的浓度添加TLR激动剂LPS(马流产沙门氏菌)和酵母聚糖(酿酒酵母)。可替代地,在细胞因子IL-4(10ng/ml)或IFN(0.5-50ng/ml)的存在下培养巨噬细胞。48小时之后在BD FACS Canto上执行CD86和CD206的FACS分析。使用FlowJo(TreeStar)软件版本10.0.7执行数据分析。

[0831] 实施例28:CD33缺陷小鼠中肿瘤生长的分析

[0832] 使用悬浮在100 μl PBS中的肿瘤细胞(例如, 1×10^5 - 1×10^6 个MC38结肠癌细胞、Lewis肺癌细胞、或B16黑素瘤细胞)皮下攻击同龄组的10只CD33野生型(WT)小鼠、CD33杂合(HET)小鼠和CD33敲除(KO)小鼠(性别和年龄匹配的同窝出生小鼠,8周龄(+/-2周))。在植入之前使用异氟烷使动物麻醉。在第4天开始使用卡尺每两周一次监测肿瘤生长以测量肿瘤生长。实验的终点是2000 mm^3 的肿瘤体积或60天。肿瘤生长和存活%是结果测量值。肿瘤摄取和生长速率降低和肿瘤浸润免疫抑制巨噬细胞的数量减少指示CD33KO小鼠中流入肿瘤中的效应T细胞增加。

[0833] 为了确定浸润肿瘤相关免疫抑制巨噬细胞和T细胞的数量,使用6-8只性别和年龄匹配的同窝出生小鼠的组。使用悬浮在200 μl 基质胶(基质胶基质生长因子减少;BD)中的肿瘤细胞(例如, 1×10^5 - 1×10^6 个MC38细胞、Lewis肺细胞、或B16细胞)皮下攻击8周龄(+/-2周)的WT-HET-KO同窝出生小鼠。在植入之前使用异氟烷使动物麻醉。肿瘤注射之后7天和10天,切除基质胶塞,在 37°C 下与1mg/ml胶原酶D(Sigma)一起孵育1小时,解离以获得单细胞悬浮液,并且通过细胞滤器进行过滤。为了确定募集在肿瘤中的T细胞的量和效应T细胞与调节

性T细胞之间的比率,使用抗CD45.2PercpCy5.5、抗CD3-FITC、抗CD8-PE-Cy7、抗CD4-APC、抗FoxP3-PE (BD)、以及DAPI对 5×10^6 个细胞进行染色。为了确定募集到肿瘤中的单核细胞/巨噬细胞谱系细胞的量,使用抗CD45.2PercpCy5.5、抗CD11b-PECY7、抗F4/80-FITC、抗Ly6C/G-APC、抗CD86-PE、以及DAPI对 5×10^6 个细胞进行染色。在BD FACS Canto上获取细胞。使用FlowJo (TreeStar) 软件版本10.0.7执行数据分析。

[0834] 实施例29:CD33抗体和/或双特异性抗体的抗癌作用的分析

[0835] 使用悬浮在100ul PBS中的肿瘤细胞(例如, 1×10^5 至 1×10^6 个MC38细胞、Lewis肺细胞、或B16细胞)皮下攻击10只8周(+/-2周)龄的C57B16/NTac小鼠(常规小鼠或表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子的人CD33基因的小鼠)的组。在植入之前使用异氟烷使动物麻醉。在第2天开始,对小鼠的组每3天腹膜内注射4个剂量200ug的每种拮抗性抗CD33抗体,诸如实施例38和实施例40所描述的那些。在第4天开始使用卡尺每两周一次监测肿瘤生长以测量肿瘤生长。实验的终点是 2000mm^3 的肿瘤体积或60天。肿瘤生长和存活%是结果测量值。肿瘤摄取和生长速率降低、肿瘤浸润免疫抑制巨噬细胞的数量减少、以及效应T细胞流入肿瘤中增加指示阻断抗CD33抗体的抗癌作用。

[0836] 使表达人IL-3、人GM-CSF、人IL-6、人IL-2的免疫缺陷小鼠或免疫缺陷转基因小鼠接种有来自人胎盘、胎儿肝脏、外周血的人免疫细胞,或者还可使用另一种来源用于此类研究(Ito M等人,(2008) Curr Top Microbiol Immunol.;324:53-76;Ito R.等人,(2012) Cellular&Molecular Immunology 9,208-214;Brehm等人,(2010) Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.17(2):120-125;Zhou等人,(2013) Cancer Letters.344,13-19)。此类小鼠可与细胞系肿瘤或患者衍生的人肿瘤异种移植物结合使用(Siolas等人,(2013) Cancer Res.;73(17):5315-5319)。

[0837] 此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0838] 实施例30:将CD33抗体和/或双特异性抗体与针对抑制性检查点蛋白或抑制性细胞因子/趋化因子及其受体的抗体组合的组合疗法的附加抗癌作用的分析

[0839] 用肿瘤细胞皮下攻击15只8周(+/-2周)龄的C57B16/NTac小鼠的组,如在实施例35中所描述的。在植入之前使用异氟烷使动物麻醉。在第2天开始,在第3天、第6天和第9天对小鼠每3天腹膜内注射4个剂量单独的200ug抗CD33抗体或与针对检查点蛋白的抗体(例如,抗PDL1mAb克隆10F.9G2和/或抗CTLA4mAb克隆UC10-4F10-11)组合。治疗组包括抗CD33;抗CTLA4;抗PDL1;抗CD33+抗CTLA4;抗CD33+抗PDL1;以及同种型对照。在第4天开始使用卡尺每两周一次监测肿瘤生长以测量肿瘤生长。实验的终点是 2000mm^3 的肿瘤体积或60天。肿瘤生长和存活%是结果测量值。使用组合疗法肿瘤生长降低和存活%增加指示抗CD33抗体与抗检查点抗体具有相加或协同治疗性作用。针对检查点分子的拮抗性抗体包括针对PDL1、PDL2、PD1、CTLA4、B7-H3、B7-H4、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG-3、以及磷脂酰丝氨酸的抗体。针对抑制性细胞因子的拮抗性抗体包括针对CCL2、CSF-1和IL-2的抗体。使表达人IL-3、人GM-CSF、人IL-6、人IL-12的免疫缺陷小鼠或免疫缺陷转基因小鼠接种有来自人胎盘、胎儿肝脏、外周血的人免疫细胞,或者还可使用另一种来源用于此类研究(Ito M等人,(2008) Curr Top Microbiol Immunol.;324:53-76;Ito R.等人,(2012) Cellular&Molecular Immunology 9,208-214;Brehm等人,(2010) Curr Opin Endocrinol Diabetes

Obes.17 (2):120-125;Zhou等人,(2013) Cancer Letters.344,13-19)。此类小鼠可与细胞系肿瘤或患者来源的人肿瘤异种移植物结合使用(Siolas等人,(2013) Cancer Res.;73 (17):5315-5319)。

[0840] 此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0841] 实施例31:将CD33抗体和/或双特异性抗体与活化刺激性检查点蛋白的抗体组合的组合疗法的附加抗肿瘤作用的分析

[0842] 用肿瘤细胞皮下攻击15只8周(+/-2周)龄的C57B16/NTac小鼠的组,如在实施例35中所描述的。在植入之前使用异氟烷使动物麻醉。在第2天开始,在第3天、第6天和第9天对小鼠每3天腹膜内注射4个剂量单独的200ug抗CD33抗体或与活化刺激性检查点蛋白的激动性抗体(例如,OX40或ICOS mAb)组合。在第4天开始使用卡尺每两周一次监测肿瘤生长以测量肿瘤生长。实验的终点是2000mm³的肿瘤体积或60天。肿瘤生长和存活%是结果测量值。使用组合疗法肿瘤生长降低和存活%增加指示抗CD33抗体与刺激性检查点抗体具有相加或协同治疗性作用。刺激性检查点抗体包括针对CD28、ICOS、CD137、CD27、CD40、以及GITR的激动性/刺激性抗体。

[0843] 使表达人IL-3、人GM-CSF、人IL-6、人IL12的免疫缺陷小鼠或免疫缺陷转基因小鼠接种有来自人胎盘、胎儿肝脏、外周血的人免疫细胞,或者还可使用另一种来源用于此类研究(Ito M等人,(2008) Curr Top Microbiol Immunol.;324:53-76;Ito R.等人,(2012) Cellular&Molecular Immunology 9,208-214;Brehm等人,(2010) Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.17 (2):120-125;Zhou等人,(2013) Cancer Letters.344,13-19)。此类小鼠可与细胞系肿瘤或患者来源的人肿瘤异种移植物结合使用(Siolas等人,(2013) Cancer Res.;73 (17):5315-5319)。

[0844] 此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含人CD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0845] 实施例32:将CD33抗体和/或双特异性抗体与刺激性细胞因子组合的组合疗法的相加抗肿瘤作用的分析

[0846] 用肿瘤细胞皮下攻击15只8周(+/-2周)龄的C57B16/NTac小鼠的组,如在实施例35中所描述的。在植入之前使用异氟烷使动物麻醉。在第2天开始,对小鼠每3天腹膜内注射4个剂量单独的200ug抗CD33抗体或与刺激性细胞因子(例如,IL-12、IFN- α)组合。在第4天开始使用卡尺每两周一次监测肿瘤生长以测量肿瘤生长。实验的终点是2000mm³的肿瘤体积或60天。肿瘤生长和存活%是结果测量值。使用组合疗法肿瘤生长降低和存活%增加指示抗CD33抗体与免疫刺激性细胞因子具有相加或协同治疗性作用。刺激性细胞因子包括IFN- α /b、IL-2、IL-12、IL-18、GM-CSF、以及G-CSF。

[0847] 使表达人IL-3、人GM-CSF、人IL-6、人IL12的免疫缺陷小鼠或免疫缺陷转基因小鼠接种有来自人胎盘、胎儿肝脏、外周血的人免疫细胞,或者还可使用另一种来源用于此类研究(Ito M等人,(2008) Curr Top Microbiol Immunol.;324:53-76;Ito R.等人,(2012) Cellular&Molecular Immunology 9,208-214;Brehm等人,(2010) Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.17 (2):120-125;Zhou等人,(2013) Cancer Letters.344,13-19)。此类小鼠可与细胞系肿瘤或患者来源的人肿瘤异种移植物结合使用(Siolas等人,(2013) Cancer

Res.;73(17):5315-5319)。

[0848] 此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0849] 实施例33:CD33抗体和/或双特异性抗体Fab刺激先天和适应性免疫细胞的成活力的能力的分析

[0850] 在先天免疫细胞(例如,巨噬细胞)或适应性免疫细胞(例如,T细胞)中评价板结合的交联抗CD33抗体Fab片段的激动性功能。

[0851] 在M-CSF和板结合的CD33抗体Fab的存在下培养巨噬细胞并且测量细胞成活力。

[0852] 将衍生自人单核细胞的巨噬细胞和DC以及衍生自人单核细胞的T细胞和人小神经胶质细胞铺板在使用12.5nM或100nM的交联CD33Fab预涂覆的非组织培养物处理的96孔板上。在10ng/ml M-CSF的存在下培养细胞48小时。使用**CellTiter-Glo®**试剂盒(Promega)执行成活力分析。使用GEN5 2.04软件使用BioTek Synergy酶标仪读取板。

[0853] 实施例34:CD33抗体和/或双特异性抗体调节NFAT依赖性基因的能力的分析

[0854] 在NFAT(活化T细胞的核因子)启动子的控制下使用荧光素酶报告基因评价拮抗性抗CD33抗体活化NFAT依赖性基因的能力。

[0855] 使衍生自表达含有ITAM基序的共受体DAP12及其配体结合配偶体TREM2的小鼠T淋巴细胞BW5147.G.1.4**ATCC®**TIB48™)的细胞系感染有人CD33,并且感染有Cignal慢病毒NFAT-荧光素酶病毒(Qiagen)。通过结合板的抗TREM2抗体活化荧光素酶信号传导。将全长和Fab片段抗CD33抗体与TREM2抗体共铺板或施加在溶液中。对于板结合,将抗体在4℃下以10μg/ml下施加在组织培养物处理的清洁底部白色96孔板(100μL/孔)上的DPBS中过夜。使用DPBS淋洗孔三次并且随后以100,000个细胞/孔铺板在具有1%血清的培养基中。作为信号传导的阳性对照,将PMA(0.05μg/ml)和离子霉素(0.25uM)一起添加。将细胞孵育6小时,并且通过将ONE-Glo™试剂(Promega)添加到每个孔并且在RT下在板振动器上孵育3min来测量荧光素酶活性。使用BioTek酶标仪测量荧光素酶信号。

[0856] 实施例35:CD33抗体和/或双特异性抗体的抗中风作用的分析

[0857] 使用瞬时大脑中动脉闭塞(MCAO)(与人中风非常相似的模型)来诱导小鼠中的大脑梗塞。通过右侧颈总动脉的切口将单丝(70SPRe,Docco1 Corp,USA)引入到颈内动脉中。在一系列的再灌注时间(第6小时、第12小时、第24小时、第2天、第7天以及第28天)的情况下使大脑中动脉闭塞30分钟。在第12小时和在第7天使用假手术动物核实手术作用。假手术动物经历相同的手术程序而没有大脑中动脉闭塞。针对梗塞容积、急性炎症应答(第12小时再灌注)、促炎细胞因子TNFa、IL-1a和IL-1β的转录、小神经胶质细胞活性(CD68、Iba1)、趋化因子CCL2(MCP1)、CCL3(MIP1a和趋化因子受体CX3CR1)的转录以及CD3阳性T细胞的侵入测试使用拮抗性抗CD33抗体或对照抗体处理的MCAO动物(Sieber等人(2013)PLoS ONE 8(1):e52982.doi:10.1371/journal.pone.0052982.)。此实验还可在常规小鼠中或可替代地在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0858] 实施例36:抗CD33抗体和/或双特异性抗体的抗阿尔茨海默氏病作用的分析

[0859] 为了评价拮抗性抗CD33抗体延迟、预防、或逆转阿尔茨海默氏病(AD)的发展,使用

5X FAD小鼠。5X FAD小鼠过表达具有瑞典(K670N、M671L)、佛罗里达(I716V)和伦敦(V717I)家族性阿尔茨海默氏病(FAD)突变的突变体人APP(695)以及含有两个FAD突变M146L和L286V的人PS1。两种转基因均通过小鼠Thy1启动子来调节以驱动在大脑上的过表达并且概述AD的主要特征。使用免疫组织化学并且通过组织提取物的ELISA测试使用激动性抗CD33抗体或使用对照抗体处理的小鼠的Aβ斑负载。还使用Morris水迷宫(空间学习和记忆任务)、辐射臂水迷宫(空间学习和记忆任务)、Y迷宫(将自发交替定量为空间认知的量度)、开放领域中的新颖偏好、评估学习和记忆的操作性学习、以及恐惧条件反射测试它们大脑中小神经胶质细胞的数量和认知缺陷的减少(mousebiology.org website;Wang等人,(2015) Cell.pii:S0092-8674(15) 00127-0)。此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0860] 实施例37:CD33抗体和/或双特异性抗体在呼吸道感染中的保护性作用的分析

[0861] 为了评价拮抗剂CD33抗体延迟、预防、或治疗细菌呼吸道感染的能力,使用涉及使用肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)攻击C57B16小鼠的临床前小鼠模型。此模型涉及105CFU肺炎链球菌(*S.pneumoniae*)血清型3(ATCC 6303)的鼻内(i.n.)施用,如所描述的(参见,例如,Sharif O等人,2014PLoS Pathog.2014年6月;10(6):e1004167;以及Schabbauer G等人,2010J Immunol 185:468-476)。在此模型中,约90%WT C57B16小鼠在感染后6天内死于感染。

[0862] 使用肺炎链球菌攻击十至十五只小鼠/组,并且与此同时从第0天开始每隔一天使用拮抗剂抗CD33抗体进行治疗。在使用肺炎链球菌攻击之前3小时施用第一剂量的抗CD33抗体。每天监测小鼠持续15天以检查死亡事件。确定从细菌攻击存活的小鼠的%。

[0863] 在单独的实验中,还确定血液中和肺中细菌负载和细胞因子表达的计数。感染之后24小时或48小时在含有EDTA的管中收集感染血液并且铺板在琼脂板上以计算血浆中的细菌CFU。将血浆储存在-20℃下以用于通过ELISA进行的细胞因子分析。收获肺、均匀化并且铺板在琼脂板上以计算细菌CFU,或在裂解缓冲液中孵育30min并且分析上清液以用于细胞因子测量。

[0864] 在单独的实验中,在细菌感染后40小时收集肺,固定在10%福尔马林中,并且包埋在石蜡中以用于H&E病理学分析。

[0865] 此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0866] 实施例38:CD33抗体和/或双特异性抗体在败血症中的保护性作用的分析

[0867] 为了评价拮抗剂CD33抗体延迟、预防、或治疗败血症的能力,使用涉及用LPS全身性攻击C57B16小鼠的临床前小鼠模型。此模型涉及37mg/ml LPS的腹膜内(i.p.)施用,如上所述的(参见,例如,Gawish R等人,2014FASEB J)。在此模型中,>95%WT C57B16小鼠在LPS注射后40小时内死于感染。

[0868] 使用LPS攻击同龄组小鼠,并且与此同时从第0天开始每天使用拮抗剂抗CD33抗体进行治疗。在使用LPS攻击之前3小时施用第一剂量的抗CD33抗体。在白天期间每约4小时监测小鼠以检查死亡事件。确定从LPS攻击存活的小鼠的百分比。

[0869] 在单独的实验中,收集腹膜灌洗液(PLF)。将上清液储存在-20℃下以用于通过

ELISA进行的细胞因子分析;对沉淀细胞进行计数以定量募集在腹膜腔中的炎性细胞。可实施相似的研究以测试CD33抗体在感染的其他模型中的效力(参见,例如,Sun等人,(2013) Invest Ophthalmol Vis Sci.17;54(5):3451-62)。

[0870] 此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0871] 实施例39:CD33抗体和/或双特异性抗体在急性和慢性结肠炎中的保护性作用的分析

[0872] 为了评价拮抗剂抗CD33抗体延迟、预防、或治疗结肠炎的能力,使用急性或慢性结肠炎的临床前小鼠模型。对于DSS诱导的结肠炎,小鼠随意接受在饮用水中的3%DSS,持续8天。对于TNBS诱导的结肠炎,使小鼠麻痹并且使用在20%乙醇中的3mg TNBS(体积/体积)或作为对照的单独的媒介物的直肠内注射进行处理。对于慢性结肠炎模型,使用3个循环的2%DSS处理所有小鼠,持续5天,接着10天的恢复期。对于所有模型,每天监测体重损失、大便稠度和粪便隐血的存在,并且用于计算疾病活性指数,如所描述的(参见,例如,Correale C,2013,Gastroenterology,2013年2月,第346-356页.e3)。

[0873] 从第0天开始每天使用拮抗剂抗CD33抗体治疗同龄组的小鼠,并且经受DSS或TNBS施用。每天监测小鼠以检查体重损失、大便稠度和粪便隐血的存在,每天监测并且用于计算疾病活性指数,如所描述的(参见,例如,S.Vetrano,Gastroenterology,135(2008),第173-184页)。

[0874] 在单独的实验中,收集粘膜损害的内窥镜和组织学图像以评价炎性细胞浸润和粘膜损害。可实施相似的研究以测试CD33抗体在自身免疫(包括克罗恩氏病、炎症性肠病和溃疡性结肠炎)的其他模型中的益处(参见,例如,Low等人,(2013) Drug Des Devel Ther.;7:1341-1357;以及Sollid等人,(2008) PLoS Med 5(9):e198)。

[0875] 此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0876] 实施例40:CD33抗体和/或双特异性抗体在伤口愈合中的保护性作用的分析

[0877] 为了评价激动性抗CD33抗体增加损伤之后结肠伤口修复的能力,使用在结肠中活组织检查损伤的小鼠模型。在此模型中,将具有外操作鞘的内窥镜插入中降结肠,并且向肛门直肠连接处检查粘膜。然后,使用具有3French直径的柔性活组织检查钳去除整个粘膜和粘膜下层的单一全厚区域。使每只小鼠沿着结肠背侧在3-5个位点处具有活组织检查损伤(参见,例如,Seno H,2008,Proc Natl Acad Sci U S A.2009年1月6日;106(1):256-261)。

[0878] 在活组织检查损伤之后,使用激动剂抗CD33抗体治疗同龄组的小鼠2或3天。每天监测小鼠,持续15天,以通过测量病灶的表面积检查体重损失和伤口愈合。

[0879] 此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0880] 实施例41:CD33抗体和/或双特异性抗体在视网膜变性中的保护性作用的分析

[0881] AMD是外视网膜的变性疾病。认为炎症(具体地是炎性细胞因子和巨噬细胞)促成AMD疾病进展。

[0882] 在脉络膜小疣、布鲁赫氏膜(Bruch's membrane)、脉络膜以及视网膜中记录巨噬细胞在AMD病灶附近的存在。巨噬细胞释放组织因子(TF)和血管内皮生长因子(VEGF),其触

发显示脉络膜新血管形成的患者中新血管形成的扩张。

[0883] 存在于黄斑脉络膜中的巨噬细胞的类型随着年龄变化,从而与较年轻眼睛相比,在较年长眼睛中展示出升高水平的M2巨噬细胞。然而,与相似年龄的正常解剖眼睛相比,晚期AMD黄斑具有较高的M1与M2比例。(参见,例如,Cao X等人,(2011),*Pathol Int* 61(9):第528-35页)。这显示在AMD进展的晚期发作中眼睛中经典M1巨噬细胞活化之间的联系。

[0884] 视网膜小神经胶质细胞是也通常存在于内视网膜中的组织驻留型巨噬细胞。在损害事件中,小神经胶质细胞被可活化并且充当炎症介质。活化的小神经胶质细胞已在AMD组织样品中检测到并且被提出作为导致AMD发病机制的炎性过程的一个潜在贡献者(Gupta等人,(2003)*Exp Eye Res.*,76(4):463-71.)。在一个或多个AMD模型中测试CD33抗体预防、延迟、或逆转AMD的能力(参见,例如,Pennesi等人,(2012)*Mol Aspects Med.*;33(4):487-509)。

[0885] 记录总体炎性巨噬细胞(M1和/或活化的小神经胶质细胞)与AMD疾病进展相关并且因此代表拮抗剂CD33抗体的治疗性靶标。可在青光眼和遗传形式的视网膜变性(诸如色素性视网膜炎)中实现相似的治疗性益处。

[0886] 在青光眼模型中测试CD33抗体预防、延迟、或逆转青光眼中的视网膜神经节细胞变性的能力(参见,例如,El-Danaf等人,(2015).*J Neurosci.*11;35(6):2329-43)。同样,如在Chang等人,(2002)*Vision Res.*;42(4):517-25和在“Retinal Degeneration Rat Model Resource Availability of P23H and S334ter Mutant Rhodopsin Transgenic Rats and RCS Inbred and RCS Congenic Strains of Rats,”MM LaVail,2011年6月30日中所描述的测试REM2在遗传上诱导的视网膜变性和色素性视网膜炎中的治疗性益处。

[0887] 此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0888] 实施例42:CD33抗体和/或双特异性抗体在脂肪生成和饮食诱导的肥胖症中的保护性作用的分析

[0889] 为了测试CD33抗体在脂肪生成和肥胖症中的作用,使用高脂肪饮食(HFD)的小鼠模型(参见,例如,Park等人,(2015)*Diabetes.*64(1):117-27)。

[0890] 此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0891] 实施例43:拮抗剂CD33抗体和/或双特异性抗体在骨质疏松症中的保护性作用的分析

[0892] 骨是不断地被改造以支持钙体内稳态和结构需要的动态器官。破骨细胞是负责去除骨的有机和无机组分两者的细胞。破骨细胞衍生自巨噬细胞谱系中的造血祖细胞,并且响应于NF κ B配体的肿瘤坏死因子家族细胞因子受体活化剂而进行分化。破骨细胞(唯一的骨再吸收细胞)对于骨质疏松症和骨硬化病的发病机制是重要的(Novack等人,(2008)*Annual Rev Pathol.*,3:457-84)。

[0893] 骨质疏松症是特征在于骨质量和密度降低(其可导致增加的骨折风险)的进行性骨病。它在停经之后的最初几年表现最多,此时骨转换加速,破骨细胞和成骨细胞两者的活性均增加。然而,由于再吸收和合成的过程中的失衡,净效应是骨损失,其主要是小梁的骨损失。因此,骨质疏松症中骨折的最普遍位点是腕部、股骨颈和脊椎体,其中小梁结构是总

体骨强度的关键。

[0894] 破骨细胞功能降低导致骨硬化病,其中骨质量增加并且骨髓空间消除,如在缺少DAP12ITAM信号传导接头并且导致破骨细胞样细胞分化的显著缺陷的动物模型中所观察到的(Koga等人,(2004)Nature 428:758-763)。

[0895] 因此,施用本公开的拮抗剂抗CD33抗体可预防、降低风险和/或治疗骨质疏松症。在一些实施方案中,施用激动剂抗CD33抗体可诱导患有骨硬化病的个体中的一种或多种CD33活性(例如,DAP12磷酸化、Syk活化和向破骨细胞的加速分化)(Peng等人(2010).Sci Signal.2010 18;3 122;以及Humphrey等人,(2006)J Bone Miner Res.,21 (2):237-45)。

[0896] 此实验还可在表达来自细菌人工染色体或来自骨髓启动子驱动的cDNA的人CD33基因的小鼠中或在用包含hCD33cDNA的慢病毒或AAV病毒转导的小鼠中实施。

[0897] 实施例44:CD33抗体和/或双特异性抗体调节CD33与SHP1、SHP2和其他信号传导分子的结合的能力的分析

[0898] 使用PBS-EDTA从组织培养皿去除人原代单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、T细胞、小神经胶质细胞或破骨细胞,使用PBS洗涤并且进行计数。在冰上或在其他条件下将细胞与抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体或与同种型匹配的对照抗体以 $1\mu\text{g}/10^6$ 个细胞孵育20min。在冰冷的放射免疫沉淀测定(RIPA)缓冲液中使细胞裂解20min,接着在 4°C 以16,000g离心10min以去除不可溶物质。使所得的上清液经受与所指示的抗体(SHP1、SHP2、c-Cbl、Vav、Syk、LcK、Fyn、GRb2、PLC- γ 、Toll样受体、DAMP受体、模式识别受体)和蛋白A-或蛋白G-琼脂糖(Sigma)的免疫沉淀反应。使用RIPA缓冲液充分洗涤珠粒,并且通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)使蛋白质分离。然后通过蛋白质印迹将蛋白质转移到硝化纤维膜,与适当的CD33抗体一起孵育并且使用增强的化学发光(ECL)系统(Pierce)可视化,如所描述的(例如,Peng等人,(2010)Sci Signal.,3 (122):ra38)。可替代地,在冰上或在其他条件下将细胞与抗CD33抗体和/或CD33双特异性抗体或与同种型匹配的对照抗体以 $1\mu\text{g}/10^6$ 个细胞孵育20min。在冰冷的放射免疫沉淀测定(RIPA)缓冲液中使细胞裂解20min,接着在 4°C 以16,000g离心10min以去除不可溶物质。使所得的上清液经受与第二CD33抗体的免疫沉淀反应。然后通过蛋白质印迹将蛋白质转移到硝化纤维膜并且与所指示的抗体(SHP1、SHP2、c-Cbl、Vav、Syk、LcK、Fyn、GRb2、PLC- γ 、Toll样受体、DAMP受体、模式识别受体)一起孵育。

[0899] 实施例45:CD33抗体结合CD33并且降低体外CD33的细胞表面水平的能力的比较

[0900] CD33抗体结合的比较

[0901] 确定不同的抗CD33抗体结合在人原代单核细胞上表达的CD33的能力。将抗CD33抗体2F5、2E12、6A3、以及6C7的结合能力与商业抗CD33抗体吉妥珠单抗和林妥珠单抗的结合能力进行比较。使用小鼠IgG1(mIgG1)同种型对照和人同种型对照作为对照。收获细胞,在96孔板中以 10^6 个/ml铺板,并且在冰上在含有2%FBS、2mM EDTA和 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、或 $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗CD33抗体和Fc阻断试剂的 $100\mu\text{l}$ PBS中孵育1小时。洗涤细胞两次,并且在冰上在含有2%FBS、2mM EDTA和 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ PE偶联的二抗的 $100\mu\text{l}$ PBS中孵育30分钟。在冷PBS中洗涤细胞两次,并且在BD FACS Canto上通过流式细胞术进行分析。使用FlowJo(TreeStar)软件版本10.0.7执行数据分析和平均荧光强度(MFI)值的计算。

[0902] 如图17A所示,抗CD33抗体2F5、2E12、6A3、以及6C7在 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗体的浓度下以比

商业抗体吉妥珠单抗和林妥珠单抗高的MFI结合到人原代单核细胞。所述结果证明与商业抗体相比,本公开的抗CD33抗体在人原代骨髓细胞中表现出提高的靶标接合。

[0903] CD33的体外表达的比较

[0904] 将抗CD33抗体2F5、2E12、6A3、以及6C7降低人原代单核细胞上CD33的细胞表面水平的能力与商业抗CD33抗体吉妥珠单抗和林妥珠单抗降低人原代单核细胞上CD33的细胞表面水平的能力进行比较。使用小鼠IgG1 (mIgG1) 同种型对照和人同种型对照作为对照。

[0905] 使用RosetteSep™单核细胞分离抗体混合物(StemCell Technologies)分离来自外周人血液样品的单核细胞。在补充有10%HyClone FBS、2mM谷氨酰胺、青霉素/链霉素、以及非必需氨基酸的2ml的RPMI中,将细胞样品以200,000个细胞/ml铺板在24孔板中或以500,000个细胞/ml铺板在6孔皿中。以1.0μg/ml、0.1μg/ml、0.01μg/ml、0.001μg/ml、0.0001μg/ml、以及0.00001μg/ml添加CD33抗体或对照同种型,并且在37℃下使用5%CO₂孵育24小时。

[0906] 为了评估受体动力学,使抗体结合细胞一小时,进行洗涤并且在24小时和48小时后确定CD33的表面水平。

[0907] 通过FACS分析检测细胞表面受体表达。在冰上在黑暗中将细胞与抗CD33-FITC克隆HIM3-4 (图17B) 以及对照表面标记物CD14 (图17C) 一起孵育30分钟。在FACS缓冲液 (PBS+2%FBS, 2mM EDTA) 中洗涤细胞两次,并且在BD FACS Canto上执行流式细胞术。使用TreeStar FlowJo软件分析数据。使用相应荧光团的MFI值将数据计算为在抗体不存在的情况下受体表达的百分比。

[0908] 图17B描绘来自人细胞的CD33细胞表面水平的结果,其中抗CD33抗体针对6点曲线滴定10倍。所述结果证明在小于1.0μg/ml的抗体浓度下CD33的表面水平降低,但是在对照受体CD14的情况下没有降低 (图17B和图17C)。在0.01μg/ml的浓度下的抗体2F5、2E12、6A3、以及6C7使CD33的细胞表面水平降低至约20%,而商业抗体林妥珠单抗降低CD33的细胞表面水平的能力在0.01μg/ml的浓度下完全消失 (图17B)。此外,商业抗体吉妥珠单抗降低CD33的细胞表面水平的能力在0.01μg/ml的浓度下也显著降低下调功能,并且在0.001μg/ml的浓度下完全丧失 (图17B)。相比之下,抗体2F5、2E12、6A3、以及6C7在0.001μg/ml的浓度下能够使CD33的表面水平降低至约50-30% (图17B)。如图17C所示,抗CD33抗体中任一种不调节CD14对照受体的细胞表面水平。

[0909] 所述结果证明抗CD33抗体2F5、2E12、6A3、以及6C7以与商业抗体相比提高的能力稳健地降低CD33的细胞表面水平。具体地,抗体2F5、2E12、6A3、以及6C7在降低CD33的细胞表面水平方面好于商业抗体吉妥珠单抗大约10倍,并且在降低CD33的细胞表面水平方面好于商业抗体林妥珠单抗大约100倍 (图17B)。

[0910] 实施例46: 丧失CD33表达对于细胞因子产生和细胞活化的影响

[0911] 以50,000个细胞/孔在24孔皿中在37℃、5%CO₂下使单核细胞系THP-1经从CRISPR/Cas9单体慢病毒载体 (All-in-One Lentivector) (pLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro, ABM) 表达的杂乱小指导RNA (靶标序列: GCACTCACATCGCTACATCA (SEQ ID NO: 216)) 或CD33小指导RNA (靶标序列: CTAGAGTGCCAGGGATG (SEQ ID NO: 217)) 慢病毒转导过夜。在第二天添加培养基。添加慢病毒后三天,使用0.5μg/ml嘌呤霉素选择转导的细胞,持续两周,每2-3天添加新鲜培养基和抗生素。通过FACS检测CD33受体表达和对照CD14表达 (图18A和

图18B)。

[0912] 为了评估细胞因子产生和细胞活化状态,以100,000个细胞/孔将杂乱sgRNA表达细胞或CD33sgRNA表达THP-1细胞铺板在24孔皿中,并且用没有LPS、1.0 μ g/ml LPS、100ng/ml LPS、或10ng/ml LPS进行处理。在细胞因子刺激的孔中,添加10ng/ml GM-CSF、10ng/ml IL-6和10ng/ml IL-8。刺激后三天,使用人炎性细胞计数珠粒阵列试剂盒(BD Biosciences)分析细胞上清液的细胞因子产生(图18C)。将数据呈现为PE检测物的平均荧光强度(MFI)。刺激后三天,在FACS Canto(BD Biosciences)上针对CD14(Pacific Blue,BD Biosciences)、CD16(v500,BD Biosciences)、HLA-DR(APC-Cy7,BD Biosciences)、以及CCR2(PE,Biolegend)表达对细胞进行FACS分析,并且使用FlowJo 10.1r5(TreeStar)处理数据(图18D)。将数据呈现为与未处理相比的MFI的变化。

[0913] 为了评估CD33表达丧失对于细胞因子产生和细胞活化的影响,生成CRISPR CD33KO THP-1细胞系并且与对照杂乱sgRNA转导细胞进行比较。在基础状态下,CD33CRISPR KO细胞不展示出较大差异细胞因子或活化标记物表达(图18C和图18D)。然而,在使用滴定量的LPS刺激之后,CD33KO细胞产生增加水平的IL-6、IL-8、IL-1 β 、IL-12、TNF- α 、以及IL-10和上调的CD14、CD16、HLA-DR、以及CCR2(图18C和图18D)。这些结果指示缺少CD33的细胞更具有免疫反应性。

[0914] 实施例47:CD33抗体对于免疫检查点的影响

[0915] 通过ficoll离心将人外周血单核细胞(PBMC)与全血分开。在红细胞的ACK裂解之后,在补充10%FBS(Hyclone)、L-谷氨酰胺、青霉素/链霉素、非必需氨基酸、丙酮酸钠、以及抑制性细胞因子混合物的RPMI培养基中培养人PBMC,所述抑制性细胞因子混合物含有10ng/ml重组IL-6(Sigma-Aldrich)、IL-8(R&D Systems)和GM-CSF(R&D Systems)。在一些实施方案中,使用补充有10ng/ml GM-CSF的肿瘤条件培养基培养人PBMC。肿瘤条件培养基是具有以上指出的补充剂(IL-6和IL-8除外)的从肿瘤细胞系培养物(宫颈癌细胞或胶质母细胞瘤细胞)收获并且使用0.2 μ M膜无菌过滤的RPMI培养基。每2-3天向人PBMC添加细胞因子、抗体(CD33抗体2F5或同种型对照)、或rhGM-CSF加标的肿瘤上清液,进行一周。

[0916] 对于FACS分析,收获悬浮细胞和贴壁细胞并且通过标准FACS程序针对所指示的受体的表达进行测试。

[0917] 对于T细胞增殖测定,在培养7天之后,通过使用CD2、CD3、CD8、CD19、以及CD56的抗体的混合物(STEMCELL Technologies)的基于磁的阴性选择来分离骨髓来源的抑制细胞(MDSC)。以50,000个细胞/孔将分离的MDSC铺板在平底96孔非TC板中,并且使用CD33抗体2F5、小鼠同种型对照抗体(mIgG1)、或抗PD-L1抗体进行处理,之后添加T细胞。

[0918] 使用RosetteSep选择技术(STEMCELL Technologies)从全血分离非自体同源供体CD3 T细胞或CD8 T细胞,使用CFSE(Life Technologies)标记并且使用10U/ml IL-2和1:1比率CD3/CD28 T活化剂Dynabeads(Life Technologies)进行活化。MDSC和T细胞以1:2的比率或50,000:100,000个细胞/孔共培养。在共培养后3天在FACS Canto(BD Biosciences)上检测CFSE。使用FlowJo版本10.1(TreeStar)软件分析数据。

[0919] 如图19A所示,抗CD33抗体2F5降低MDSC上的免疫抑制性配体PD-L1的表达,从而导致针对肿瘤的T细胞功能抑制的降低。与抗CD33抗体2F5一起培养的MDSC也展示出表型变化,从而表明免疫抑制性能力减弱。与所述培养基相比,仅对照(未处理MDSC)或同种型对照

抗体处理的细胞 (MDSC+同种型)、与2F5抗体一起培养的MDSC (MDSC+C-2F5) 表达较低水平的PD-1配体 (PD-L1和PD-L2)、降低水平的B7-H3 (强效T细胞检查点抑制剂)、降低水平的CD200R (抑制性信号传导受体)、以及降低水平的M2型标志物CD163和CD206 (图19B)。所述结果指示抗体介导的靶标接合和随后的CD33细胞表面水平的下调以减少抑制性配体和受体的方式导致表型改变。

[0920] 如图19C和图19D所示, 抗CD33抗体2F5在MDSC的存在下增加T细胞增殖, 从而允许生成更多肿瘤对抗T细胞。与活化的T细胞共培养的MDSC抑制T细胞增殖。在这些研究中, 使用抗体2F5处理的MDSC诱导对总CD3⁺ T细胞或细胞毒性CD8⁺ T细胞的T细胞增殖的较少抑制 (图19C和图19D)。同种型对照抗体 (mIgG1) 不改变T细胞增殖的MDSC依赖性抑制 (图19C和图19D)。此外, 与抗PD-L1抗体相比, 2F5抗体在减轻MDSC介导的T细胞抑制方面是更有效的 (图19C和图19D)。所述结果指示能够通过减少抑制性配体和受体的表达来在表型上改变MDSC的抗CD33抗体也能够实现下游功能, 诸如T细胞增殖。

[0921] 实施例48: CD33抗体对于骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) 的影响

[0922] Ficoll分离人外周血细胞, 使用ACK裂解缓冲液使红细胞裂解, 并且洗涤细胞3次, 之后铺板在具有10% FBS、青霉素/链霉素、1mM谷氨酰胺、非必需氨基酸、以及丙酮酸钠的RPMI中。在37°C下在5% CO₂中将人外周血单核细胞 (PBMC) 与以下细胞因子一起培养一周: 10ng/ml rhGM-CSF (R&D)、10ng/ml rhIL-8 (R&D)、以及10ng/ml rhIL-6 (Sigma)。然后向烧瓶添加mIgG1 (BioXcell) 同种型或CD33抗体2F5或6C7。每2-3天补充培养基、细胞因子和抗体 (在适用的情况下)。在培养7天之后, 通过刮擦和研磨收获细胞, 并且重悬浮在具有2% FBS和1mM EDTA的PBS中以用于FACS分析。对于活细胞和死细胞群体的评估, 将Live/Dead Fixable Aqua死细胞染色剂 (Thermo Fisher) 在具有2% FBS和1mM EDTA的PBS中以1:500稀释并且在冰上孵育30分钟。在缓冲液中洗涤细胞3次并且在BD FACS Canto (BD Biosciences) 上针对前向散射和侧向散射和AmCyan荧光进行分析。使用FlowJo (Tree Star 软件) 分析数据。

[0923] 如图20所示, CD33抗体6C7能够在分化骨髓来源的抑制细胞 (MDSC) 中诱导细胞死亡。

[0001]	SEQUENCE LISTING															
[0002]	<110> 艾利妥(ALECTOR INC.)															
[0003]	<120> 抗CD33抗体及其使用方法															
[0004]	<130> 735022000740															
[0005]	<140> 201680047246.1															
[0006]	<141> 2016-06-11															
[0007]	<150> US 62/241,701															
[0008]	<151> 2015-10-14															
[0009]	<150> US 62/175,152															
[0010]	<151> 2015-06-12															
[0011]	<160> 251															
[0012]	<170> FastSEQ for Windows Version 4.0															
[0013]	<210> 1															
[0014]	<211> 364															
[0015]	<212> PRT															
[0016]	<213> 智人															
[0017]	<400> 1															
[0018]	Met	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Trp	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala
[0019]	1				5					10					15	
[0020]	Met	Asp	Pro	Asn	Phe	Trp	Leu	Gln	Val	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Val	Gln
[0021]				20				25						30		
[0022]	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	Leu	Val	Pro	Cys	Thr	Phe	Phe	His	Pro	Ile	Pro
[0023]			35					40					45			
[0024]	Tyr	Tyr	Asp	Lys	Asn	Ser	Pro	Val	His	Gly	Tyr	Trp	Phe	Arg	Glu	Gly
[0025]		50					55					60				
[0026]	Ala	Ile	Ile	Ser	Arg	Asp	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Asn	Lys	Leu	Asp	Gln
[0027]	65				70					75				80		
[0028]	Glu	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Gln	Gly	Arg	Phe	Arg	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro
[0029]				85					90					95		
[0030]	Ser	Arg	Asn	Asn	Cys	Ser	Leu	Ser	Ile	Val	Asp	Ala	Arg	Arg	Arg	Asp
[0031]			100					105					110			
[0032]	Asn	Gly	Ser	Tyr	Phe	Phe	Arg	Met	Glu	Arg	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Ser
[0033]			115				120					125				
[0034]	Tyr	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Ser	Val	His	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	His	Arg
[0035]		130					135				140					
[0036]	Pro	Lys	Ile	Leu	Ile	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Gly	His	Ser	Lys	Asn
[0037]	145				150					155					160	
[0038]	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	Trp	Ala	Cys	Glu	Gln	Gly	Thr	Pro	Pro	Ile

[0039]					165				170				175									
[0040]	Phe	Ser	Trp	Leu	Ser	Ala	Ala	Pro	Thr	Ser	Leu	Gly	Pro	Arg	Thr	Thr						
[0041]					180				185				190									
[0042]	His	Ser	Ser	Val	Leu	Ile	Ile	Thr	Pro	Arg	Pro	Gln	Asp	His	Gly	Thr						
[0043]					195				200				205									
[0044]	Asn	Leu	Thr	Cys	Gln	Val	Lys	Phe	Ala	Gly	Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Glu						
[0045]					210				215				220									
[0046]	Arg	Thr	Ile	Gln	Leu	Asn	Val	Thr	Tyr	Val	Pro	Gln	Asn	Pro	Thr	Thr						
[0047]	225								230								240					
[0048]	Gly	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Gly	Lys	Gln	Glu	Thr	Arg	Ala	Gly						
[0049]					245								250				255					
[0050]	Val	Val	His	Gly	Ala	Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Ala						
[0051]					260								265				270					
[0052]	Leu	Cys	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Phe	Ile	Val	Lys	Thr	His	Arg	Arg	Lys						
[0053]					275								280				285					
[0054]	Ala	Ala	Arg	Thr	Ala	Val	Gly	Arg	Asn	Asp	Thr	His	Pro	Thr	Thr	Gly						
[0055]					290								295				300					
[0056]	Ser	Ala	Ser	Pro	Lys	His	Gln	Lys	Lys	Ser	Lys	Leu	His	Gly	Pro	Thr						
[0057]	305								310								315		320			
[0058]	Glu	Thr	Ser	Ser	Cys	Ser	Gly	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Glu	Met	Asp	Glu						
[0059]					325								330				335					
[0060]	Glu	Leu	His	Tyr	Ala	Ser	Leu	Asn	Phe	His	Gly	Met	Asn	Pro	Ser	Lys						
[0061]					340								345				350					
[0062]	Asp	Thr	Ser	Thr	Glu	Tyr	Ser	Glu	Val	Arg	Thr	Gln										
[0063]					355								360									
[0064]	<210> 2																					
[0065]	<211> 403																					
[0066]	<212> PRT																					
[0067]	<213> 小家鼠																					
[0068]	<400> 2																					
[0069]	Met	Leu	Trp	Pro	Leu	Pro	Leu	Phe	Leu	Leu	Cys	Ala	Gly	Ser	Leu	Ala						
[0070]	1								5								10				15	
[0071]	Gln	Asp	Leu	Glu	Phe	Gln	Leu	Val	Ala	Pro	Glu	Ser	Val	Thr	Val	Glu						
[0072]					20								25								30	
[0073]	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	His	Val	Pro	Cys	Ser	Val	Phe	Tyr	Pro	Ser	Ile						
[0074]					35								40								45	
[0075]	Lys	Leu	Thr	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Gly	Ser	Trp	Leu	Arg	Lys	Gly	Val						
[0076]					50								55								60	
[0077]	Ser	Leu	His	Glu	Asp	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Ser	Asp	Pro	Arg	Gln	Leu						

[0078]	65	70	75	80
[0079]	Val Gln Lys Ala Thr Gln Gly Arg Phe Gln Leu Leu Gly Asp Pro Gln			
[0080]		85	90	95
[0081]	Lys His Asp Cys Ser Leu Phe Ile Arg Asp Ala Gln Lys Asn Asp Thr			
[0082]		100	105	110
[0083]	Gly Met Tyr Phe Phe Arg Val Val Arg Glu Pro Phe Val Arg Tyr Ser			
[0084]		115	120	125
[0085]	Tyr Lys Lys Ser Gln Leu Ser Leu His Val Thr Ser Leu Ser Arg Thr			
[0086]		130	135	140
[0087]	Pro Asp Ile Ile Ile Pro Gly Thr Leu Glu Ala Gly Tyr Pro Ser Asn			
[0088]	145	150	155	160
[0089]	Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Thr			
[0090]		165	170	175
[0091]	Phe Ser Trp Met Ser Thr Ala Leu Thr Ser Leu Ser Ser Arg Thr Thr			
[0092]		180	185	190
[0093]	Asp Ser Ser Val Leu Thr Phe Thr Pro Gln Pro Gln Asp His Gly Thr			
[0094]		195	200	205
[0095]	Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Phe Ser Gly Ala Gly Val Thr Val Glu			
[0096]		210	215	220
[0097]	Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Arg Lys Ser Gly Gln Met Arg Glu			
[0098]	225	230	235	240
[0099]	Leu Val Leu Val Ala Val Gly Glu Ala Thr Val Lys Leu Leu Ile Leu			
[0100]		245	250	255
[0101]	Gly Leu Cys Leu Val Phe Leu Ile Val Met Phe Cys Arg Arg Lys Thr			
[0102]		260	265	270
[0103]	Thr Lys Leu Ser Val His Met Gly Cys Glu Asn Pro Ile Lys Arg Gln			
[0104]		275	280	285
[0105]	Glu Ala Ile Thr Ser Tyr Asn His Cys Leu Ser Pro Thr Ala Ser Asp			
[0106]		290	295	300
[0107]	Ala Val Thr Pro Gly Cys Ser Ile His Arg Leu Ile Ser Arg Thr Pro			
[0108]	305	310	315	320
[0109]	Arg Cys Thr Ala Ile Leu Arg Ile Gln Asp Pro Tyr Arg Arg Thr His			
[0110]		325	330	335
[0111]	Leu Arg Asn Arg Ala Val Ser Thr Leu Arg Phe Pro Trp Ile Ser Trp			
[0112]		340	345	350
[0113]	Glu Gly Ser Leu Arg Ser Thr Gln Arg Ser Lys Cys Thr Lys Leu Cys			
[0114]		355	360	365
[0115]	Ser Pro Val Lys Asn Leu Cys Pro Leu Trp Leu Pro Val Asp Asn Ser			
[0116]		370	375	380

[0117]	Cys Ile Pro Leu Ile Pro Glu Trp Val Met Leu Leu Cys Val Ser Leu
[0118]	385 390 395 400
[0119]	Thr Leu Ser
[0120]	<210> 3
[0121]	<211> 334
[0122]	<212> PRT
[0123]	<213> 褐家鼠
[0124]	<220>
[0125]	<221> 变体
[0126]	<222> 310, 316, 318
[0127]	<223> Xaa = 任何氨基酸
[0128]	<400> 3
[0129]	Met Leu Trp Ile Val Leu Leu Leu Leu Leu Cys Thr Asp Ser Leu Val
[0130]	1 5 10 15
[0131]	Gln Asp Leu Glu Phe Gln Leu Val Ala Pro Lys Ser Val Thr Val Glu
[0132]	20 25 30
[0133]	Glu Ala Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser Val Ser Tyr Pro Ser Ile
[0134]	35 40 45
[0135]	Arg Pro Thr Phe Gly Pro Val Thr Gly Tyr Trp Leu Leu Lys Gly Thr
[0136]	50 55 60
[0137]	Ser Leu His Glu Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Asp Pro Arg Gln Leu
[0138]	65 70 75 80
[0139]	Val Gln Lys Ala Thr Gln Gly Arg Phe Gln Leu Leu Gly Asp Pro Gln
[0140]	85 90 95
[0141]	Lys His Asp Cys Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ala Gln Lys Asn Asp Thr
[0142]	100 105 110
[0143]	Gly Val Tyr Phe Phe Arg Val Val Arg Glu Pro Phe Val Arg Tyr Ser
[0144]	115 120 125
[0145]	Tyr Arg Ala Asn Gln Leu Leu Leu His Val Thr Pro Leu Ser Arg Thr
[0146]	130 135 140
[0147]	Pro Asp Ile Ile Ile Pro Glu Thr Leu Arg Ala Gly His Pro Ser Asn
[0148]	145 150 155 160
[0149]	Leu Ser Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Thr
[0150]	165 170 175
[0151]	Phe Ser Trp Met Ser Asp Ala Leu Thr Ser Leu Ser Ser Arg Thr Thr
[0152]	180 185 190
[0153]	Asn Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr
[0154]	195 200 205
[0155]	Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Phe Ser Gly Ala Gly Val Thr Val Glu

[0156]	210	215	220
[0157]	Arg Thr Ile Arg Leu Asn Val Thr Trp Lys Ser Asp Gln Met Arg Gln		
[0158]	225	230	235
[0159]	Val Val Leu Val Ala Val Gly Glu Ala Ala Val Lys Leu Leu Ile Leu		240
[0160]		245	250
[0161]	Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Ser Val Val Ile Cys Arg Arg Lys Ala		255
[0162]		260	265
[0163]	Thr Lys Leu Ser Val His Met Asn Cys Glu Asn Pro Thr Gln Ala His		270
[0164]		275	280
[0165]	Pro Gln Asp Ser Lys Val His Ser His Ala Glu Asn Ser Arg Pro Leu		285
[0166]	290	295	300
[0167]	Arg Lys Asp Leu Pro Xaa Glu Gln Ser Ser Ile Xaa Thr Xaa Ile Pro		
[0168]	305	310	315
[0169]	Leu Asn Phe Met Gly Ala Lys Ser Gln Glu Tyr Pro Glu Ile		320
[0170]		325	330
[0171]	<210> 4		
[0172]	<211> 364		
[0173]	<212> PRT		
[0174]	<213> 黑猩猩		
[0175]	<400> 4		
[0176]	Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala		
[0177]	1	5	10
[0178]	Met Asp Pro Lys Ile Arg Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln		15
[0179]		20	25
[0180]	Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro		30
[0181]		35	40
[0182]	Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly		45
[0183]		50	55
[0184]	Pro Ile Val Ser Gly Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Pro Asp Gln		60
[0185]	65	70	75
[0186]	Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Leu		80
[0187]		85	90
[0188]	Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp		95
[0189]		100	105
[0190]	Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser		110
[0191]		115	120
[0192]	Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg		125
[0193]		130	135
[0194]	Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Ala Leu Asp Pro Gly His Ser Lys Asn		140

[0195]	145	150	155	160
[0196]	Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile			
[0197]		165	170	175
[0198]	Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr			
[0199]		180	185	190
[0200]	His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr			
[0201]		195	200	205
[0202]	Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu			
[0203]		210	215	220
[0204]	Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr			
[0205]	225	230	235	240
[0206]	Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly			
[0207]		245	250	255
[0208]	Val Val His Gly Ala Val Gly Gly Ala Gly Ile Thr Ala Leu Leu Ala			
[0209]		260	265	270
[0210]	Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys			
[0211]		275	280	285
[0212]	Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly			
[0213]		290	295	300
[0214]	Pro Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr			
[0215]	305	310	315	320
[0216]	Glu Thr Ser Ser Tyr Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu			
[0217]		325	330	335
[0218]	Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys			
[0219]		340	345	350
[0220]	Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln			
[0221]		355	360	
[0222]	<210> 5			
[0223]	<211> 232			
[0224]	<212> PRT			
[0225]	<213> 猕猴			
[0226]	<400> 5			
[0227]	Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Asp Leu Thr His Arg			
[0228]	1	5	10	15
[0229]	Pro Gln Ile Leu Ile Pro Gly Ala Leu Asp Pro Asp His Ser Lys Asn			
[0230]		20	25	30
[0231]	Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile			
[0232]		35	40	45
[0233]	Phe Ser Trp Met Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Leu Arg Thr Thr			

[0234]	50	55	60
[0235]	His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr		
[0236]	65	70	75
[0237]	Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Pro Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu		
[0238]	85	90	95
[0239]	Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Ser Tyr Ala Ser Gln Asn Pro Arg Thr		
[0240]	100	105	110
[0241]	Asp Ile Phe Leu Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Gly Val Val Gln Gly		
[0242]	115	120	125
[0243]	Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Val Leu Leu Ala Leu Cys Leu Cys		
[0244]	130	135	140
[0245]	Leu Ile Phe Phe Thr Val Lys Thr His Arg Arg Lys Ala Ala Arg Thr		
[0246]	145	150	155
[0247]	Ala Val Gly Arg Ile Asp Thr His Pro Ala Thr Gly Pro Thr Ser Ser		
[0248]	165	170	175
[0249]	Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Ala Thr Glu Thr Ser Gly		
[0250]	180	185	190
[0251]	Cys Ser Gly Thr Thr Leu Thr Val Glu Met Asp Glu Glu Leu His Tyr		
[0252]	195	200	205
[0253]	Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Glu Asp Thr Ser Thr		
[0254]	210	215	220
[0255]	Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln		
[0256]	225	230	
[0257]	<210> 6		
[0258]	<211> 378		
[0259]	<212> PRT		
[0260]	<213> 家犬		
[0261]	<400> 6		
[0262]	Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ile Leu Trp Ala Val Glu Trp Ala Gln		
[0263]	1	5	10
[0264]	Gly Lys Val Lys Leu Gly Ala Ser Ala Asp Ala Gly Val Pro Arg Ser		
[0265]	20	25	30
[0266]	Leu Ala Gln Asp Pro Ile Tyr Trp Leu Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr		
[0267]	35	40	45
[0268]	Val Gln Glu Gly Leu Cys Ile Ser Val Pro Cys Tyr Phe Ser Tyr Pro		
[0269]	50	55	60
[0270]	Met Glu Tyr Trp Ile Lys Thr Tyr Ser Ala Leu Gly Tyr Trp Phe Arg		
[0271]	65	70	75
[0272]	Asn Gly Thr Asn Val His Trp Gly Ala Pro Val Ala Thr Asn Asn Pro		

[0273]					85				90				95				
[0274]	Asp	Arg	Lys	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Gln	Gly	Gln	Phe	Phe	Leu	Leu	Gly	
[0275]	100				105				110								
[0276]	Asp	Pro	Gln	Ala	Asn	Asn	Cys	Ser	Leu	Glu	Ile	Arg	Asp	Ala	Gln	Arg	
[0277]	115				120				125								
[0278]	Arg	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Phe	Phe	Arg	Val	Glu	Arg	Gly	Pro	Tyr	Leu	
[0279]	130				135				140								
[0280]	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Gln	Asn	Gln	Leu	Ser	Val	His	Val	Thr	Ala	Leu	
[0281]	145				150				155				160				
[0282]	Thr	His	Thr	Pro	Asp	Ile	Leu	Ile	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Ser	Gly	His	
[0283]	165				170				175								
[0284]	Pro	Arg	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Pro	Trp	Ala	Cys	Glu	Gln	Gly	Ile	
[0285]	180				185				190								
[0286]	Pro	Pro	Ile	Phe	Ser	Trp	Met	Ser	Ala	Ala	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Pro	
[0287]	195				200				205								
[0288]	Arg	Thr	His	Leu	Ser	Ser	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	Pro	Arg	Pro	Gln	Asp	
[0289]	210				215				220								
[0290]	His	Gly	Thr	Asn	Leu	Thr	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Pro	Ala	Val	Gly	Val	
[0291]	225				230				235				240				
[0292]	Met	Val	Glu	Arg	Thr	Ile	Gln	Leu	Asn	Val	Thr	Cys	Thr	Thr	Gln	Asn	
[0293]	245				250				255								
[0294]	Pro	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	Leu	Glu	His	Ser	Thr	Gly	Lys	Pro	Gly	Thr	
[0295]	260				265				270								
[0296]	Arg	Ser	Gly	Val	Thr	Val	Gly	Ala	Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Val	Thr	Met	
[0297]	275				280				285								
[0298]	Leu	Leu	Thr	Leu	Cys	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Phe	Arg	Val	Lys	Thr	Cys	
[0299]	290				295				300								
[0300]	Arg	Lys	Thr	Ala	Ser	Arg	Thr	Ala	Val	Gly	Met	Asp	Asn	Ile	His	Pro	
[0301]	305				310				315				320				
[0302]	Val	Val	Glu	Pro	Ala	Pro	Leu	Asp	Tyr	Gln	Glu	Ser	Asp	Leu	Pro	Asp	
[0303]	325				330				335								
[0304]	Asp	Pro	Thr	Ser	Ser	Ala	Glu	Val	Pro	Ser	Thr	Ser	Glu	Met	Glu	Gln	
[0305]	340				345				350								
[0306]	Glu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Ile	Ser	Phe	His	Arg	Arg	Thr	Glu	Ser	Thr	
[0307]	355				360				365								
[0308]	Cys	Ala	Glu	Tyr	Ser	Glu	Ile	Arg	Thr	Gln							
[0309]	370				375												
[0310]	<210> 7																
[0311]	<211> 366																

[0312]	<212> PRT															
[0313]	<213> 家牛															
[0314]	<400> 7															
[0315]	Met	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Trp	Ala	Ala
[0316]	1			5					10					15		
[0317]	Thr	Leu	Ala	Gln	Asp	Pro	Asn	Tyr	Trp	Leu	Lys	Ala	Pro	Trp	Ser	Val
[0318]				20					25					30		
[0319]	Ser	Val	Gln	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	Arg	Val	Pro	Cys	Ser	Val	Tyr	Tyr
[0320]			35					40					45			
[0321]	Pro	Ser	Asp	Phe	Arg	Ser	Gly	Ser	Thr	Pro	Val	His	Gly	Phe	Trp	Phe
[0322]		50					55					60				
[0323]	Arg	Glu	Gly	Ala	Glu	Val	Leu	Lys	Asp	Ala	Pro	Val	Ala	Thr	Asn	Lys
[0324]	65					70				75					80	
[0325]	Leu	Asp	Arg	Glu	Ala	Gln	Lys	Glu	Thr	Gln	Gly	Arg	Phe	His	Leu	Leu
[0326]				85					90					95		
[0327]	Gly	Asp	Pro	Arg	Asp	Asn	Asn	Cys	Ser	Leu	Glu	Ile	Arg	Asp	Ala	Arg
[0328]				100					105					110		
[0329]	Lys	Ser	Asp	Arg	Gly	Ser	Tyr	Phe	Phe	Arg	Met	Glu	Lys	Gly	Ser	Met
[0330]			115					120					125			
[0331]	Lys	Trp	Ser	Tyr	Leu	Ser	Glu	Leu	Phe	Phe	Leu	Asn	Val	Thr	Ala	Phe
[0332]		130					135					140				
[0333]	Thr	His	Gln	Pro	His	Leu	Leu	Ser	Pro	Gly	Asp	Leu	Glu	Pro	Gly	His
[0334]	145					150					155				160	
[0335]	Pro	Gly	Asn	Met	Thr	Cys	Ser	Val	Pro	Trp	Ala	Cys	Glu	Arg	Ala	Met
[0336]				165					170					175		
[0337]	Pro	Pro	Ile	Phe	Ser	Trp	Thr	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Ser	Leu	Gly	Pro
[0338]				180					185					190		
[0339]	Arg	Thr	Pro	Phe	Ser	Ser	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	Pro	Arg	Pro	Gln	Asp
[0340]			195					200					205			
[0341]	His	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Cys	Gln	Val	Lys	Phe	Pro	Arg	Ser	Gly	Val
[0342]		210					215					220				
[0343]	Met	Val	Glu	Arg	Thr	Ile	Leu	Leu	Asn	Val	Thr	Tyr	Ala	Ser	Arg	Asn
[0344]	225					230					235				240	
[0345]	Pro	Gly	Asn	Ile	Cys	Thr	Gly	Asp	Gly	Thr	Gly	Glu	Ser	Gly	Thr	Gly
[0346]				245					250					255		
[0347]	Ala	Gly	Val	Thr	Glu	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Ala	Gly	Val	Thr	Met	Leu
[0348]				260					265					270		
[0349]	Leu	Val	Leu	Cys	Phe	Gly	Leu	Ile	Phe	Phe	Val	Val	Lys	Ile	Tyr	Arg
[0350]			275					280					285			

[0351]	Lys	Lys	Val	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Asp	Met	Glu	Asp	Ile	Tyr	Ser	Ala
[0352]	290						295					300				
[0353]	Ala	Glu	Pro	Ala	Ser	Leu	Asp	His	Gln	Gln	Glu	Ser	Lys	Ser	Glu	Glu
[0354]	305					310					315					320
[0355]	Ser	Ser	Asp	Pro	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Glu	Leu
[0356]					325					330					335	
[0357]	Glu	Gln	Glu	Leu	His	Tyr	Ser	Ser	Ile	Ile	Phe	Arg	Gly	Glu	Lys	Pro
[0358]				340					345					350		
[0359]	Gln	Glu	Ser	Pro	His	Ser	Glu	Tyr	Ala	Glu	Ile	Arg	Ile	Lys		
[0360]		355						360					365			
[0361]	<210>	8														
[0362]	<211>	384														
[0363]	<212>	PRT														
[0364]	<213>	担尼鱼														
[0365]	<400>	8														
[0366]	Met	Leu	Gln	Thr	Leu	Leu	Phe	Ile	Leu	Ala	Val	Asn	Lys	Met	Thr	Asn
[0367]	1			5					10					15		
[0368]	Cys	Glu	Asp	Ser	Gln	Pro	Gly	Gly	Leu	Asn	Asp	Phe	Phe	Ile	Ser	Val
[0369]			20					25					30			
[0370]	Lys	Glu	Asn	Val	Thr	Gly	Glu	Glu	Gly	Leu	Cys	Ile	Arg	Glu	Gln	Cys
[0371]		35					40					45				
[0372]	Ala	Phe	Arg	Val	Pro	Gln	Asn	Leu	Ser	Glu	Pro	Ile	Lys	Lys	Ser	Trp
[0373]	50						55					60				
[0374]	Phe	Lys	Glu	Asp	Ser	Glu	Asn	Ala	Thr	Ala	Lys	Val	Gln	Phe	Tyr	His
[0375]	65					70					75				80	
[0376]	Ser	Lys	Ala	Glu	Ser	Pro	Ile	Trp	Lys	Glu	Cys	Ser	Phe	Met	Leu	Asn
[0377]					85				90					95		
[0378]	Pro	Leu	Val	Leu	Gly	Glu	Ser	Asp	Gly	Glu	Tyr	Arg	Leu	Lys	Leu	Glu
[0379]			100						105					110		
[0380]	Trp	Gly	Gln	Gly	Asn	Val	His	Ile	Phe	Pro	Gln	Thr	Val	Lys	Ile	Thr
[0381]			115					120					125			
[0382]	Val	Lys	Glu	Leu	Thr	Gln	Lys	Pro	Lys	Ile	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Thr
[0383]		130					135						140			
[0384]	Ile	Gly	Gln	Lys	Ala	Glu	Ile	Ser	Cys	Ile	Phe	Thr	Ile	Lys	Cys	Leu
[0385]	145					150					155					160
[0386]	Val	Pro	Lys	Leu	Arg	Phe	Ala	Trp	Thr	Gly	Ile	Glu	Gly	Lys	Glu	Ser
[0387]					165					170					175	
[0388]	Thr	Leu	Gly	Pro	Arg	Gly	Val	Pro	Gly	Trp	Asn	Glu	Phe	Thr	Ser	Ile
[0389]				180						185					190	

[0390]	Phe Arg Phe His Pro Lys Pro Lys Asp His Asn Thr Lys Leu Thr Cys		
[0391]	195	200	205
[0392]	Lys Ile Ile Val Gln Asp Arg Ile Gln Thr Glu Ala Ala Val Thr Leu		
[0393]	210	215	220
[0394]	Glu Val Arg Tyr Ala Pro Glu Ile Leu Asn Ser Ser Arg Cys Val Met		
[0395]	225	230	235 240
[0396]	Trp Gly Asp Glu Leu Ser Cys Met Cys Ile Ser Ser Gly Val Pro Leu		
[0397]	245	250	255
[0398]	Pro Leu Ile Gln Trp Pro Thr Leu Asp Asp Pro Thr Asn Tyr Cys Ser		
[0399]	260	265	270
[0400]	Thr Tyr Arg Lys Asn Thr Ile Ile Ile Cys Asn Ile Ser Ile Ser Gly		
[0401]	275	280	285
[0402]	Ile Arg Asn Val Lys Asp Thr Ile Glu Cys Ile Ala Glu Asn Val Ile		
[0403]	290	295	300
[0404]	Ala Thr Thr Ser Met Gln Ile Gln Val His Asn Gln Thr Glu Thr Pro		
[0405]	305	310	315 320
[0406]	Lys Ala Asn Leu Gly Leu Ser Met Ser Trp Ile Phe Cys Thr Leu Ser		
[0407]	325	330	335
[0408]	Val Val Leu Asn Ile Ile Phe Gly Ser Cys Thr Val Val Leu Cys Phe		
[0409]	340	345	350
[0410]	Asn Arg Arg Lys Asn Arg Glu Lys Pro Lys Asp Val Asp His Val Tyr		
[0411]	355	360	365
[0412]	Met Thr Ser Leu Lys Arg Glu Glu Ser Val Tyr Glu Thr Ile Lys Val		
[0413]	370	375	380
[0414]	<210> 9		
[0415]	<211> 11		
[0416]	<212> PRT		
[0417]	<213> 人工序列		
[0418]	<220>		
[0419]	<223> 合成构建体		
[0420]	<400> 9		
[0421]	Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Leu Ser		
[0422]	1	5	10
[0423]	<210> 10		
[0424]	<211> 15		
[0425]	<212> PRT		
[0426]	<213> 人工序列		
[0427]	<220>		
[0428]	<223> 合成构建体		

[0429]	<400> 10
[0430]	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Thr Tyr Ser Tyr Met His
[0431]	1 5 10 15
[0432]	<210> 11
[0433]	<211> 15
[0434]	<212> PRT
[0435]	<213> 人工序列
[0436]	<220>
[0437]	<223> 合成构建体
[0438]	<400> 11
[0439]	Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly His Ser Tyr Met His
[0440]	1 5 10 15
[0441]	<210> 12
[0442]	<211> 7
[0443]	<212> PRT
[0444]	<213> 人工序列
[0445]	<220>
[0446]	<223> 合成构建体
[0447]	<400> 12
[0448]	Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
[0449]	1 5
[0450]	<210> 13
[0451]	<211> 7
[0452]	<212> PRT
[0453]	<213> 人工序列
[0454]	<220>
[0455]	<223> 合成构建体
[0456]	<400> 13
[0457]	Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
[0458]	1 5
[0459]	<210> 14
[0460]	<211> 7
[0461]	<212> PRT
[0462]	<213> 人工序列
[0463]	<220>
[0464]	<223> 合成构建体
[0465]	<400> 14
[0466]	Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser
[0467]	1 5

[0468]	<210> 15
[0469]	<211> 9
[0470]	<212> PRT
[0471]	<213> 人工序列
[0472]	<220>
[0473]	<223> 合成构建体
[0474]	<400> 15
[0475]	Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
[0476]	1 5
[0477]	<210> 16
[0478]	<211> 9
[0479]	<212> PRT
[0480]	<213> 人工序列
[0481]	<220>
[0482]	<223> 合成构建体
[0483]	<400> 16
[0484]	Gln Arg Ser Trp Glu Ile Pro Leu Thr
[0485]	1 5
[0486]	<210> 17
[0487]	<211> 9
[0488]	<212> PRT
[0489]	<213> 人工序列
[0490]	<220>
[0491]	<223> 合成构建体
[0492]	<400> 17
[0493]	Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
[0494]	1 5
[0495]	<210> 18
[0496]	<211> 9
[0497]	<212> PRT
[0498]	<213> 人工序列
[0499]	<220>
[0500]	<223> 合成构建体
[0501]	<400> 18
[0502]	Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn
[0503]	1 5
[0504]	<210> 19
[0505]	<211> 9
[0506]	<212> PRT

[0507]	<213>	人工序列
[0508]	<220>	
[0509]	<223>	合成构建体
[0510]	<400>	19
[0511]	Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Leu His	
[0512]	1	5
[0513]	<210>	20
[0514]	<211>	9
[0515]	<212>	PRT
[0516]	<213>	人工序列
[0517]	<220>	
[0518]	<223>	合成构建体
[0519]	<400>	20
[0520]	Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His	
[0521]	1	5
[0522]	<210>	21
[0523]	<211>	9
[0524]	<212>	PRT
[0525]	<213>	人工序列
[0526]	<220>	
[0527]	<223>	合成构建体
[0528]	<400>	21
[0529]	Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Cys Met Asn	
[0530]	1	5
[0531]	<210>	22
[0532]	<211>	14
[0533]	<212>	PRT
[0534]	<213>	人工序列
[0535]	<220>	
[0536]	<223>	合成构建体
[0537]	<400>	22
[0538]	Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn	
[0539]	1	5 10
[0540]	<210>	23
[0541]	<211>	14
[0542]	<212>	PRT
[0543]	<213>	人工序列
[0544]	<220>	
[0545]	<223>	合成构建体

[0546]	<400>	23
[0547]	Ile Gly Phe Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Ile Thr Gly Tyr Asn	
[0548]	1	5 10
[0549]	<210>	24
[0550]	<211>	14
[0551]	<212>	PRT
[0552]	<213>	人工序列
[0553]	<220>	
[0554]	<223>	合成构建体
[0555]	<400>	24
[0556]	Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn	
[0557]	1	5 10
[0558]	<210>	25
[0559]	<211>	13
[0560]	<212>	PRT
[0561]	<213>	人工序列
[0562]	<220>	
[0563]	<223>	合成构建体
[0564]	<400>	25
[0565]	Val Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr	
[0566]	1	5 10
[0567]	<210>	26
[0568]	<211>	10
[0569]	<212>	PRT
[0570]	<213>	人工序列
[0571]	<220>	
[0572]	<223>	合成构建体
[0573]	<400>	26
[0574]	Ala Arg Gly Tyr His Tyr Ala Met Asp Ser	
[0575]	1	5 10
[0576]	<210>	27
[0577]	<211>	10
[0578]	<212>	PRT
[0579]	<213>	人工序列
[0580]	<220>	
[0581]	<223>	合成构建体
[0582]	<400>	27
[0583]	Ala Arg Ser Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr	
[0584]	1	5 10

[0585]	<210>	28	
[0586]	<211>	13	
[0587]	<212>	PRT	
[0588]	<213>	人工序列	
[0589]	<220>		
[0590]	<223>	合成构建体	
[0591]	<400>	28	
[0592]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr		
[0593]	1	5	10
[0594]	<210>	29	
[0595]	<211>	11	
[0596]	<212>	PRT	
[0597]	<213>	人工序列	
[0598]	<220>		
[0599]	<223>	合成构建体	
[0600]	<400>	29	
[0601]	Thr Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Pro Phe Ala Tyr		
[0602]	1	5	10
[0603]	<210>	30	
[0604]	<211>	108	
[0605]	<212>	PRT	
[0606]	<213>	小家鼠	
[0607]	<400>	30	
[0608]	Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Glu Ser Leu		
[0609]	1	5	10 15
[0610]	Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys		
[0611]		20	25 30
[0612]	Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu		
[0613]		35	40 45
[0614]	Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser		
[0615]		50	55 60
[0616]	Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu		
[0617]	65	70	75 80
[0618]	Tyr Glu Asp Met Gly Ile Tyr His Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro		
[0619]		85	90 95
[0620]	Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
[0621]		100	105
[0622]	<210>	31	
[0623]	<211>	107	

[0624]	<212>	PRT
[0625]	<213>	人工序列
[0626]	<220>	
[0627]	<223>	合成构建体
[0628]	<400>	31
[0629]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0630]	1 5 10 15	
[0631]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr	
[0632]	20 25 30	
[0633]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[0634]	35 40 45	
[0635]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0636]	50 55 60	
[0637]	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0638]	65 70 75 80	
[0639]	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu	
[0640]	85 90 95	
[0641]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0642]	100 105	
[0643]	<210>	32
[0644]	<211>	107
[0645]	<212>	PRT
[0646]	<213>	人工序列
[0647]	<220>	
[0648]	<223>	合成构建体
[0649]	<400>	32
[0650]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0651]	1 5 10 15	
[0652]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr	
[0653]	20 25 30	
[0654]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[0655]	35 40 45	
[0656]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0657]	50 55 60	
[0658]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0659]	65 70 75 80	
[0660]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu	
[0661]	85 90 95	
[0662]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	

[0663]	100	105
[0664]	<210> 33	
[0665]	<211> 107	
[0666]	<212> PRT	
[0667]	<213> 人工序列	
[0668]	<220>	
[0669]	<223> 合成构建体	
[0670]	<400> 33	
[0671]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0672]	1 5 10 15	
[0673]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr	
[0674]	20 25 30	
[0675]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[0676]	35 40 45	
[0677]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0678]	50 55 60	
[0679]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[0680]	65 70 75 80	
[0681]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu	
[0682]	85 90 95	
[0683]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0684]	100 105	
[0685]	<210> 34	
[0686]	<211> 107	
[0687]	<212> PRT	
[0688]	<213> 人工序列	
[0689]	<220>	
[0690]	<223> 合成构建体	
[0691]	<400> 34	
[0692]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
[0693]	1 5 10 15	
[0694]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr	
[0695]	20 25 30	
[0696]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
[0697]	35 40 45	
[0698]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
[0699]	50 55 60	
[0700]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro	
[0701]	65 70 75 80	

[0702]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
[0703]	85 90 95
[0704]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0705]	100 105
[0706]	<210> 35
[0707]	<211> 112
[0708]	<212> PRT
[0709]	<213> 小家鼠
[0710]	<400> 35
[0711]	Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val
[0712]	1 5 10 15
[0713]	Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
[0714]	20 25 30
[0715]	Ser Thr Ser Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
[0716]	35 40 45
[0717]	Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro
[0718]	50 55 60
[0719]	Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
[0720]	65 70 75 80
[0721]	His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Ser
[0722]	85 90 95
[0723]	Trp Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0724]	100 105 110
[0725]	<210> 36
[0726]	<211> 111
[0727]	<212> PRT
[0728]	<213> 人工序列
[0729]	<220>
[0730]	<223> 合成构建体
[0731]	<400> 36
[0732]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0733]	1 5 10 15
[0734]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
[0735]	20 25 30
[0736]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[0737]	35 40 45
[0738]	Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
[0739]	50 55 60
[0740]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser

[0741]	65	70	75	80
[0742]	Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Ser Trp			
[0743]	85	90	95	
[0744]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[0745]	100	105	110	
[0746]	<210> 37			
[0747]	<211> 111			
[0748]	<212> PRT			
[0749]	<213> 人工序列			
[0750]	<220>			
[0751]	<223> 合成构建体			
[0752]	<400> 37			
[0753]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0754]	1	5	10	15
[0755]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser			
[0756]	20	25	30	
[0757]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
[0758]	35	40	45	
[0759]	Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser			
[0760]	50	55	60	
[0761]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
[0762]	65	70	75	80
[0763]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Ser Trp			
[0764]	85	90	95	
[0765]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[0766]	100	105	110	
[0767]	<210> 38			
[0768]	<211> 111			
[0769]	<212> PRT			
[0770]	<213> 人工序列			
[0771]	<220>			
[0772]	<223> 合成构建体			
[0773]	<400> 38			
[0774]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0775]	1	5	10	15
[0776]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser			
[0777]	20	25	30	
[0778]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
[0779]	35	40	45	

[0780]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
[0781]	50						55					60				
[0782]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser
[0783]	65					70					75				80	
[0784]	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Arg	Ser	Trp
[0785]					85					90					95	
[0786]	Glu	Ile	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[0787]				100					105						110	
[0788]	<210> 39															
[0789]	<211> 111															
[0790]	<212> PRT															
[0791]	<213> 人工序列															
[0792]	<220>															
[0793]	<223> 合成构建体															
[0794]	<400> 39															
[0795]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[0796]	1			5						10					15	
[0797]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
[0798]				20					25					30		
[0799]	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
[0800]			35				40						45			
[0801]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
[0802]	50						55					60				
[0803]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
[0804]	65					70					75				80	
[0805]	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Arg	Ser	Trp
[0806]					85					90					95	
[0807]	Glu	Ile	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[0808]				100					105						110	
[0809]	<210> 40															
[0810]	<211> 111															
[0811]	<212> PRT															
[0812]	<213> 人工序列															
[0813]	<220>															
[0814]	<223> 合成构建体															
[0815]	<400> 40															
[0816]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
[0817]	1			5						10					15	
[0818]	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Thr	Ser

[0858]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
[0859]	1				5					10					15	
[0860]	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
[0861]					20					25					30	
[0862]	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
[0863]					35					40					45	
[0864]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp
[0865]					50					55					60	
[0866]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
[0867]	65									70					75	
[0868]	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Arg	Ser	Trp
[0869]										85					90	
[0870]	Glu	Ile	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[0871]										100					105	
[0872]	<210> 43															
[0873]	<211> 114															
[0874]	<212> PRT															
[0875]	<213> 小家鼠															
[0876]	<400> 43															
[0877]	Ser	Thr	Gly	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val
[0878]	1					5					10				15	
[0879]	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val
[0880]						20					25				30	
[0881]	Ser	Thr	Ser	Gly	His	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
[0882]						35				40					45	
[0883]	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly
[0884]						50				55					60	
[0885]	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu
[0886]	65									70					75	
[0887]	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln
[0888]										85					90	
[0889]	His	Ser	Arg	Glu	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
[0890]										100					105	
[0891]	Leu	Lys														
[0892]	<210> 44															
[0893]	<211> 111															
[0894]	<212> PRT															
[0895]	<213> 人工序列															
[0896]	<220>															

[0897]	<223> 合成构建体															
[0898]	<400> 44															
[0899]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[0900]	1				5					10					15	
[0901]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
[0902]					20					25					30	
[0903]	Gly	His	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
[0904]					35					40					45	
[0905]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
[0906]					50					55					60	
[0907]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
[0908]	65									70					75	
[0909]	Ser	Leu	Gln	Pro	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg
[0910]										85					90	
[0911]	Glu	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[0912]										100					105	
[0913]	<210> 45															
[0914]	<211> 111															
[0915]	<212> PRT															
[0916]	<213> 人工序列															
[0917]	<220>															
[0918]	<223> 合成构建体															
[0919]	<400> 45															
[0920]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[0921]	1				5					10					15	
[0922]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
[0923]					20					25					30	
[0924]	Gly	His	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
[0925]					35					40					45	
[0926]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
[0927]					50					55					60	
[0928]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
[0929]	65									70					75	
[0930]	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg
[0931]										85					90	
[0932]	Glu	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[0933]										100					105	
[0934]	<210> 46															
[0935]	<211> 111															

[0936]	<212>	PRT
[0937]	<213>	人工序列
[0938]	<220>	
[0939]	<223>	合成构建体
[0940]	<400>	46
[0941]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
[0942]	1 5 10 15	
[0943]	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser	
[0944]	20 25 30	
[0945]	Gly His Ser Tyr Met His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro	
[0946]	35 40 45	
[0947]	Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp	
[0948]	50 55 60	
[0949]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser	
[0950]	65 70 75 80	
[0951]	Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg	
[0952]	85 90 95	
[0953]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0954]	100 105 110	
[0955]	<210>	47
[0956]	<211>	111
[0957]	<212>	PRT
[0958]	<213>	人工序列
[0959]	<220>	
[0960]	<223>	合成构建体
[0961]	<400>	47
[0962]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly	
[0963]	1 5 10 15	
[0964]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser	
[0965]	20 25 30	
[0966]	Gly His Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro	
[0967]	35 40 45	
[0968]	Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp	
[0969]	50 55 60	
[0970]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser	
[0971]	65 70 75 80	
[0972]	Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg	
[0973]	85 90 95	
[0974]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	

[0975]	100	105	110
[0976]	<210> 48		
[0977]	<211> 111		
[0978]	<212> PRT		
[0979]	<213> 人工序列		
[0980]	<220>		
[0981]	<223> 合成构建体		
[0982]	<400> 48		
[0983]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[0984]	1	5	10
[0985]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser		
[0986]	20	25	30
[0987]	Gly His Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
[0988]	35	40	45
[0989]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp		
[0990]	50	55	60
[0991]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[0992]	65	70	75
[0993]	Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		
[0994]	85	90	95
[0995]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0996]	100	105	110
[0997]	<210> 49		
[0998]	<211> 115		
[0999]	<212> PRT		
[1000]	<213> 小家鼠		
[1001]	<400> 49		
[1002]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[1003]	1	5	10
[1004]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
[1005]	20	25	30
[1006]	Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[1007]	35	40	45
[1008]	Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe		
[1009]	50	55	60
[1010]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Asn Thr Thr Tyr		
[1011]	65	70	75
[1012]	Met Gln Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
[1013]	85	90	95

[1014]	Arg Tyr His Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
[1015]	100 105 110
[1016]	Val Ser Ser
[1017]	115
[1018]	<210> 50
[1019]	<211> 117
[1020]	<212> PRT
[1021]	<213> 人工序列
[1022]	<220>
[1023]	<223> 合成构建体
[1024]	<400> 50
[1025]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[1026]	1 5 10 15
[1027]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[1028]	20 25 30
[1029]	Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[1030]	35 40 45
[1031]	Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
[1032]	50 55 60
[1033]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
[1034]	65 70 75 80
[1035]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1036]	85 90 95
[1037]	Ala Arg Gly Tyr His Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
[1038]	100 105 110
[1039]	Val Thr Val Ser Ser
[1040]	115
[1041]	<210> 51
[1042]	<211> 117
[1043]	<212> PRT
[1044]	<213> 人工序列
[1045]	<220>
[1046]	<223> 合成构建体
[1047]	<400> 51
[1048]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[1049]	1 5 10 15
[1050]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[1051]	20 25 30
[1052]	Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[1053]	35	40	45
[1054]	Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe		
[1055]	50	55	60
[1056]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[1057]	65	70	75
[1058]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1059]	85	90	95
[1060]	Ala Arg Gly Tyr His Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
[1061]	100	105	110
[1062]	Val Thr Val Ser Ser		
[1063]	115		
[1064]	<210> 52		
[1065]	<211> 117		
[1066]	<212> PRT		
[1067]	<213> 人工序列		
[1068]	<220>		
[1069]	<223> 合成构建体		
[1070]	<400> 52		
[1071]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1072]	1	5	10
[1073]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
[1074]	20	25	30
[1075]	Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
[1076]	35	40	45
[1077]	Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Asp Ser Val		
[1078]	50	55	60
[1079]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1080]	65	70	75
[1081]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1082]	85	90	95
[1083]	Ala Arg Gly Tyr His Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
[1084]	100	105	110
[1085]	Val Thr Val Ser Ser		
[1086]	115		
[1087]	<210> 53		
[1088]	<211> 117		
[1089]	<212> PRT		
[1090]	<213> 人工序列		
[1091]	<220>		

[1092]	<223> 合成构建体															
[1093]	<400> 53															
[1094]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
[1095]	1				5					10					15	
[1096]	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
[1097]					20					25					30	
[1098]	Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[1099]					35					40					45	
[1100]	Gly	Trp	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Asn	Pro	Ser	Phe
[1101]					50					55					60	
[1102]	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
[1103]	65									70					75	
[1104]	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
[1105]										85					90	
[1106]	Ala	Arg	Gly	Tyr	His	Tyr	Ala	Met	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
[1107]										100					105	
[1108]	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
[1109]																
[1110]	<210> 54															
[1111]	<211> 109															
[1112]	<212> PRT															
[1113]	<213> 小家鼠															
[1114]	<400> 54															
[1115]	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala
[1116]	1					5					10				15	
[1117]	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Asn	Leu	His	Trp	Val	Lys	Leu	Ser
[1118]										20					25	
[1119]	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Phe	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asn	Gly
[1120]										35					40	
[1121]	Ile	Thr	Gly	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val
[1122]										50					55	
[1123]	Asp	Asn	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser
[1124]	65									70					75	
[1125]	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Thr	Val	Asp	Tyr	Phe
[1126]										85					90	
[1127]	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser			
[1128]										100					105	
[1129]	<210> 55															
[1130]	<211> 117															

[1131]	<212>	PRT
[1132]	<213>	人工序列
[1133]	<220>	
[1134]	<223>	合成构建体
[1135]	<400>	55
[1136]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[1137]	1 5 10 15	
[1138]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
[1139]	20 25 30	
[1140]	Asn Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[1141]	35 40 45	
[1142]	Gly Phe Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe	
[1143]	50 55 60	
[1144]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr	
[1145]	65 70 75 80	
[1146]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[1147]	85 90 95	
[1148]	Ala Arg Ser Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu	
[1149]	100 105 110	
[1150]	Val Thr Val Ser Ser	
[1151]	115	
[1152]	<210>	56
[1153]	<211>	117
[1154]	<212>	PRT
[1155]	<213>	人工序列
[1156]	<220>	
[1157]	<223>	合成构建体
[1158]	<400>	56
[1159]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[1160]	1 5 10 15	
[1161]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
[1162]	20 25 30	
[1163]	Asn Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[1164]	35 40 45	
[1165]	Gly Phe Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe	
[1166]	50 55 60	
[1167]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[1168]	65 70 75 80	
[1169]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	

[1170]						85						90						95
[1171]	Ala	Arg	Ser	Thr	Val	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu		
[1172]						100						105						110
[1173]	Val	Thr	Val	Ser	Ser													
[1174]						115												
[1175]	<210> 57																	
[1176]	<211> 117																	
[1177]	<212> PRT																	
[1178]	<213> 人工序列																	
[1179]	<220>																	
[1180]	<223> 合成构建体																	
[1181]	<400> 57																	
[1182]	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
[1183]	1					5					10					15		
[1184]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr		
[1185]					20					25					30			
[1186]	Asn	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile		
[1187]					35					40					45			
[1188]	Gly	Phe	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asn	Gly	Ile	Thr	Gly	Tyr	Asn	Asp	Ser	Val		
[1189]				50					55					60				
[1190]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		
[1191]	65					70					75					80		
[1192]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
[1193]					85					90					95			
[1194]	Ala	Arg	Ser	Thr	Val	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu		
[1195]					100					105					110			
[1196]	Val	Thr	Val	Ser	Ser													
[1197]						115												
[1198]	<210> 58																	
[1199]	<211> 117																	
[1200]	<212> PRT																	
[1201]	<213> 人工序列																	
[1202]	<220>																	
[1203]	<223> 合成构建体																	
[1204]	<400> 58																	
[1205]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu		
[1206]	1					5					10					15		
[1207]	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr		
[1208]					20					25					30			

[1209]	Asn	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[1210]			35					40					45			
[1211]	Gly	Phe	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asn	Gly	Ile	Thr	Gly	Tyr	Asn	Pro	Ser	Phe
[1212]			50					55					60			
[1213]	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
[1214]	65						70					75				80
[1215]	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
[1216]						85					90				95	
[1217]	Ala	Arg	Ser	Thr	Val	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
[1218]					100					105				110		
[1219]	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
[1220]					115											
[1221]	<210>	59														
[1222]	<211>	120														
[1223]	<212>	PRT														
[1224]	<213>	小家鼠														
[1225]	<400>	59														
[1226]	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
[1227]	1				5					10					15	
[1228]	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr
[1229]				20					25					30		
[1230]	Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Ser	Glu	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
[1231]			35					40					45			
[1232]	Gly	Glu	Ile	Asn	Pro	Ser	Thr	Gly	Gly	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
[1233]			50					55					60			
[1234]	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
[1235]	65						70					75				80
[1236]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
[1237]						85					90				95	
[1238]	Thr	Arg	Gly	His	Tyr	Gly	Ser	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	His
[1239]					100					105				110		
[1240]	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser								
[1241]					115					120						
[1242]	<210>	60														
[1243]	<211>	56														
[1244]	<212>	PRT														
[1245]	<213>	小家鼠														
[1246]	<400>	60														
[1247]	Ser	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr

[1248]	1	5	10	15
[1249]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
[1250]	20	25	30	
[1251]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly His			
[1252]	35	40	45	
[1253]	Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
[1254]	50	55		
[1255]	<210> 61			
[1256]	<211> 120			
[1257]	<212> PRT			
[1258]	<213> 人工序列			
[1259]	<220>			
[1260]	<223> 合成构建体			
[1261]	<400> 61			
[1262]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[1263]	1	5	10	15
[1264]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr			
[1265]	20	25	30	
[1266]	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[1267]	35	40	45	
[1268]	Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe			
[1269]	50	55	60	
[1270]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr			
[1271]	65	70	75	80
[1272]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1273]	85	90	95	
[1274]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln			
[1275]	100	105	110	
[1276]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[1277]	115	120		
[1278]	<210> 62			
[1279]	<211> 120			
[1280]	<212> PRT			
[1281]	<213> 人工序列			
[1282]	<220>			
[1283]	<223> 合成构建体			
[1284]	<400> 62			
[1285]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
[1286]	1	5	10	15

[1287]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
[1288]	20 25 30
[1289]	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[1290]	35 40 45
[1291]	Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
[1292]	50 55 60
[1293]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[1294]	65 70 75 80
[1295]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1296]	85 90 95
[1297]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[1298]	100 105 110
[1299]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1300]	115 120
[1301]	<210> 63
[1302]	<211> 120
[1303]	<212> PRT
[1304]	<213> 人工序列
[1305]	<220>
[1306]	<223> 合成构建体
[1307]	<400> 63
[1308]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1309]	1 5 10 15
[1310]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
[1311]	20 25 30
[1312]	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[1313]	35 40 45
[1314]	Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Asp Ser Val
[1315]	50 55 60
[1316]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1317]	65 70 75 80
[1318]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1319]	85 90 95
[1320]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[1321]	100 105 110
[1322]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1323]	115 120
[1324]	<210> 64
[1325]	<211> 120

[1326]	<212>	PRT
[1327]	<213>	人工序列
[1328]	<220>	
[1329]	<223>	合成构建体
[1330]	<400>	64
[1331]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu	
[1332]	1 5 10 15	
[1333]	Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr	
[1334]	20 25 30	
[1335]	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
[1336]	35 40 45	
[1337]	Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Phe	
[1338]	50 55 60	
[1339]	Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	
[1340]	65 70 75 80	
[1341]	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	
[1342]	85 90 95	
[1343]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln	
[1344]	100 105 110	
[1345]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[1346]	115 120	
[1347]	<210>	65
[1348]	<211>	120
[1349]	<212>	PRT
[1350]	<213>	小家鼠
[1351]	<400>	65
[1352]	Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[1353]	1 5 10 15	
[1354]	Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	
[1355]	20 25 30	
[1356]	Cys Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[1357]	35 40 45	
[1358]	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Asn Tyr Val Glu	
[1359]	50 55 60	
[1360]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Arg	
[1361]	65 70 75 80	
[1362]	Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Thr Gly Phe Tyr	
[1363]	85 90 95	
[1364]	Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln	

[1365]	100	105	110
[1366]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala		
[1367]	115	120	
[1368]	<210> 66		
[1369]	<211> 120		
[1370]	<212> PRT		
[1371]	<213> 人工序列		
[1372]	<220>		
[1373]	<223> 合成构建体		
[1374]	<400> 66		
[1375]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly		
[1376]	1 5 10 15		
[1377]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr		
[1378]	20 25 30		
[1379]	Cys Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1380]	35 40 45		
[1381]	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Asn Tyr Val Ala		
[1382]	50 55 60		
[1383]	Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
[1384]	65 70 75 80		
[1385]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
[1386]	85 90 95		
[1387]	Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln		
[1388]	100 105 110		
[1389]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1390]	115 120		
[1391]	<210> 67		
[1392]	<211> 15		
[1393]	<212> PRT		
[1394]	<213> 人工序列		
[1395]	<220>		
[1396]	<223> 合成构建体		
[1397]	<400> 67		
[1398]	Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His		
[1399]	1 5 10 15		
[1400]	<210> 68		
[1401]	<211> 15		
[1402]	<212> PRT		
[1403]	<213> 人工序列		

[1404]	<220>
[1405]	<223> 合成构建体
[1406]	<400> 68
[1407]	Arg Ala Ser Lys Arg Val Ser Thr Ser Val His Ser Tyr Met His
[1408]	1 5 10 15
[1409]	<210> 69
[1410]	<211> 7
[1411]	<212> PRT
[1412]	<213> 人工序列
[1413]	<220>
[1414]	<223> 合成构建体
[1415]	<400> 69
[1416]	Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Cys
[1417]	1 5
[1418]	<210> 70
[1419]	<211> 7
[1420]	<212> PRT
[1421]	<213> 人工序列
[1422]	<220>
[1423]	<223> 合成构建体
[1424]	<400> 70
[1425]	Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser
[1426]	1 5
[1427]	<210> 71
[1428]	<211> 7
[1429]	<212> PRT
[1430]	<213> 人工序列
[1431]	<220>
[1432]	<223> 合成构建体
[1433]	<400> 71
[1434]	Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser
[1435]	1 5
[1436]	<210> 72
[1437]	<211> 9
[1438]	<212> PRT
[1439]	<213> 人工序列
[1440]	<220>
[1441]	<223> 合成构建体
[1442]	<400> 72

[1443]	Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Leu Thr
[1444]	1 5
[1445]	<210> 73
[1446]	<211> 12
[1447]	<212> PRT
[1448]	<213> 人工序列
[1449]	<220>
[1450]	<223> 合成构建体
[1451]	<220>
[1452]	<221> 变体
[1453]	<222> 8
[1454]	<223> Xaa = 任何氨基酸
[1455]	<400> 73
[1456]	Asn Leu Leu Leu Ser Ala His Xaa Gly Ala Tyr Thr
[1457]	1 5 10
[1458]	<210> 74
[1459]	<211> 9
[1460]	<212> PRT
[1461]	<213> 人工序列
[1462]	<220>
[1463]	<223> 合成构建体
[1464]	<400> 74
[1465]	Gln His Ser Arg Glu Val Pro Leu Thr
[1466]	1 5
[1467]	<210> 75
[1468]	<211> 9
[1469]	<212> PRT
[1470]	<213> 人工序列
[1471]	<220>
[1472]	<223> 合成构建体
[1473]	<400> 75
[1474]	Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
[1475]	1 5
[1476]	<210> 76
[1477]	<211> 16
[1478]	<212> PRT
[1479]	<213> 人工序列
[1480]	<220>
[1481]	<223> 合成构建体

[1482]	<400> 76
[1483]	Val Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Asn Tyr Val
[1484]	1 5 10 15
[1485]	<210> 77
[1486]	<211> 14
[1487]	<212> PRT
[1488]	<213> 人工序列
[1489]	<220>
[1490]	<223> 合成构建体
[1491]	<400> 77
[1492]	Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Asp
[1493]	1 5 10
[1494]	<210> 78
[1495]	<211> 20
[1496]	<212> PRT
[1497]	<213> 人工序列
[1498]	<220>
[1499]	<223> 合成构建体
[1500]	<400> 78
[1501]	Glx Thr Gln Ser Leu Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala
[1502]	1 5 10 15
[1503]	Thr Met Ser Cys
[1504]	20
[1505]	<210> 79
[1506]	<211> 23
[1507]	<212> PRT
[1508]	<213> 人工序列
[1509]	<220>
[1510]	<223> 合成构建体
[1511]	<400> 79
[1512]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[1513]	1 5 10 15
[1514]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr
[1515]	20
[1516]	<210> 80
[1517]	<211> 23
[1518]	<212> PRT
[1519]	<213> 人工序列
[1520]	<220>

[1521]	<223>	合成构建体
[1522]	<400>	80
[1523]	Asp Phe Gln Ile Gln Gln Ser Leu Ala Ser Leu Val Val Ser Met Gly	
[1524]	1	5 10 15
[1525]	Gln Arg Ala Ala Ile Ser Phe	
[1526]	20	
[1527]	<210>	81
[1528]	<211>	24
[1529]	<212>	PRT
[1530]	<213>	人工序列
[1531]	<220>	
[1532]	<223>	合成构建体
[1533]	<400>	81
[1534]	Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Glu Ser Leu	
[1535]	1	5 10 15
[1536]	Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys	
[1537]	20	
[1538]	<210>	82
[1539]	<211>	26
[1540]	<212>	PRT
[1541]	<213>	人工序列
[1542]	<220>	
[1543]	<223>	合成构建体
[1544]	<400>	82
[1545]	Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val	
[1546]	1	5 10 15
[1547]	Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Met Ser Cys	
[1548]	20	25
[1549]	<210>	83
[1550]	<211>	15
[1551]	<212>	PRT
[1552]	<213>	人工序列
[1553]	<220>	
[1554]	<223>	合成构建体
[1555]	<400>	83
[1556]	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Lys	
[1557]	1	5 10 15
[1558]	<210>	84
[1559]	<211>	15

237

[1599]	<213>	人工序列
[1600]	<220>	
[1601]	<223>	合成构建体
[1602]	<400>	88
[1603]	Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Glx Trp Asp Arg Leu His	
[1604]	1 5 10 15	
[1605]	Pro Gln His Pro Ser Cys Gly Gly Gly Gly Cys Cys	
[1606]	20 25	
[1607]	<210>	89
[1608]	<211>	32
[1609]	<212>	PRT
[1610]	<213>	人工序列
[1611]	<220>	
[1612]	<223>	合成构建体
[1613]	<400>	89
[1614]	Gly Val Arg Ala Arg Phe Ser Gly Glx Gly Trp Gly Thr Asp Phe Thr	
[1615]	1 5 10 15	
[1616]	Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Gly Ala Thr Tyr Tyr Cys	
[1617]	20 25 30	
[1618]	<210>	90
[1619]	<211>	32
[1620]	<212>	PRT
[1621]	<213>	人工序列
[1622]	<220>	
[1623]	<223>	合成构建体
[1624]	<400>	90
[1625]	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser	
[1626]	1 5 10 15	
[1627]	Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly Ile Tyr His Cys	
[1628]	20 25 30	
[1629]	<210>	91
[1630]	<211>	32
[1631]	<212>	PRT
[1632]	<213>	人工序列
[1633]	<220>	
[1634]	<223>	合成构建体
[1635]	<400>	91
[1636]	Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
[1637]	1 5 10 15	

[1638]	Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
[1639]	20 25 30
[1640]	<210> 92
[1641]	<211> 10
[1642]	<212> PRT
[1643]	<213> 人工序列
[1644]	<220>
[1645]	<223> 合成构建体
[1646]	<400> 92
[1647]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
[1648]	1 5 10
[1649]	<210> 93
[1650]	<211> 10
[1651]	<212> PRT
[1652]	<213> 人工序列
[1653]	<220>
[1654]	<223> 合成构建体
[1655]	<400> 93
[1656]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1657]	1 5 10
[1658]	<210> 94
[1659]	<211> 10
[1660]	<212> PRT
[1661]	<213> 人工序列
[1662]	<220>
[1663]	<223> 合成构建体
[1664]	<400> 94
[1665]	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[1666]	1 5 10
[1667]	<210> 95
[1668]	<211> 26
[1669]	<212> PRT
[1670]	<213> 人工序列
[1671]	<220>
[1672]	<223> 合成构建体
[1673]	<400> 95
[1674]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[1675]	1 5 10 15
[1676]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly

[1677]	20	25
[1678]	<210> 96	
[1679]	<211> 26	
[1680]	<212> PRT	
[1681]	<213> 人工序列	
[1682]	<220>	
[1683]	<223> 合成构建体	
[1684]	<400> 96	
[1685]	Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[1686]	1 5 10 15	
[1687]	Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly	
[1688]	20 25	
[1689]	<210> 97	
[1690]	<211> 26	
[1691]	<212> PRT	
[1692]	<213> 人工序列	
[1693]	<220>	
[1694]	<223> 合成构建体	
[1695]	<400> 97	
[1696]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala	
[1697]	1 5 10 15	
[1698]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly	
[1699]	20 25	
[1700]	<210> 98	
[1701]	<211> 26	
[1702]	<212> PRT	
[1703]	<213> 人工序列	
[1704]	<220>	
[1705]	<223> 合成构建体	
[1706]	<400> 98	
[1707]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
[1708]	1 5 10 15	
[1709]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly	
[1710]	20 25	
[1711]	<210> 99	
[1712]	<211> 18	
[1713]	<212> PRT	
[1714]	<213> 人工序列	
[1715]	<220>	

[1716]	<223>	合成构建体
[1717]	<400>	99
[1718]	Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala	
[1719]	1	5 10 15
[1720]	Ser Gly	
[1721]	<210>	100
[1722]	<211>	12
[1723]	<212>	PRT
[1724]	<213>	人工序列
[1725]	<220>	
[1726]	<223>	合成构建体
[1727]	<400>	100
[1728]	Trp Val Lys Leu Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp	
[1729]	1	5 10
[1730]	<210>	101
[1731]	<211>	12
[1732]	<212>	PRT
[1733]	<213>	人工序列
[1734]	<220>	
[1735]	<223>	合成构建体
[1736]	<400>	101
[1737]	Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp	
[1738]	1	5 10
[1739]	<210>	102
[1740]	<211>	12
[1741]	<212>	PRT
[1742]	<213>	人工序列
[1743]	<220>	
[1744]	<223>	合成构建体
[1745]	<400>	102
[1746]	Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp	
[1747]	1	5 10
[1748]	<210>	103
[1749]	<211>	12
[1750]	<212>	PRT
[1751]	<213>	人工序列
[1752]	<220>	
[1753]	<223>	合成构建体
[1754]	<400>	103

[1755]	Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp
[1756]	1 5 10
[1757]	<210> 104
[1758]	<211> 35
[1759]	<212> PRT
[1760]	<213> 人工序列
[1761]	<220>
[1762]	<223> 合成构建体
[1763]	<400> 104
[1764]	Gln Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ser Ser
[1765]	1 5 10 15
[1766]	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
[1767]	20 25 30
[1768]	Tyr Tyr Cys
[1769]	35
[1770]	<210> 105
[1771]	<211> 35
[1772]	<212> PRT
[1773]	<213> 人工序列
[1774]	<220>
[1775]	<223> 合成构建体
[1776]	<400> 105
[1777]	Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser
[1778]	1 5 10 15
[1779]	Arg Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Thr Gly Phe
[1780]	20 25 30
[1781]	Tyr Tyr Cys
[1782]	35
[1783]	<210> 106
[1784]	<211> 35
[1785]	<212> PRT
[1786]	<213> 人工序列
[1787]	<220>
[1788]	<223> 合成构建体
[1789]	<400> 106
[1790]	Glu Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser
[1791]	1 5 10 15
[1792]	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
[1793]	20 25 30

[1794]	Tyr Phe Cys
[1795]	35
[1796]	<210> 107
[1797]	<211> 35
[1798]	<212> PRT
[1799]	<213> 人工序列
[1800]	<220>
[1801]	<223> 合成构建体
[1802]	<400> 107
[1803]	Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Asn
[1804]	1 5 10 15
[1805]	Thr Thr Tyr Met Gln Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
[1806]	20 25 30
[1807]	Tyr Phe Cys
[1808]	35
[1809]	<210> 108
[1810]	<211> 11
[1811]	<212> PRT
[1812]	<213> 人工序列
[1813]	<220>
[1814]	<223> 合成构建体
[1815]	<400> 108
[1816]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
[1817]	1 5 10
[1818]	<210> 109
[1819]	<211> 11
[1820]	<212> PRT
[1821]	<213> 人工序列
[1822]	<220>
[1823]	<223> 合成构建体
[1824]	<400> 109
[1825]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
[1826]	1 5 10
[1827]	<210> 110
[1828]	<211> 11
[1829]	<212> PRT
[1830]	<213> 人工序列
[1831]	<220>
[1832]	<223> 合成构建体

[1833]	<400> 110
[1834]	Trp Gly His Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
[1835]	1 5 10
[1836]	<210> 111
[1837]	<211> 11
[1838]	<212> PRT
[1839]	<213> 人工序列
[1840]	<220>
[1841]	<223> 合成构建体
[1842]	<400> 111
[1843]	Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[1844]	1 5 10
[1845]	<210> 112
[1846]	<211> 106
[1847]	<212> PRT
[1848]	<213> 小家鼠
[1849]	<400> 112
[1850]	Glx Thr Gln Ser Leu Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala
[1851]	1 5 10 15
[1852]	Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Thr Tyr Ser
[1853]	20 25 30
[1854]	Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
[1855]	35 40 45
[1856]	Ile Lys Tyr Asn Leu Glu Cys Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[1857]	50 55 60
[1858]	Gly Glx Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu
[1859]	65 70 75 80
[1860]	Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Leu Thr
[1861]	85 90 95
[1862]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
[1863]	100 105
[1864]	<210> 113
[1865]	<211> 111
[1866]	<212> PRT
[1867]	<213> 人工序列
[1868]	<220>
[1869]	<223> 合成构建体
[1870]	<400> 113
[1871]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

[1872]	1	5	10	15
[1873]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser			
[1874]	20	25	30	
[1875]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro			
[1876]	35	40	45	
[1877]	Arg Arg Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Cys Gly Val Pro Asp			
[1878]	50	55	60	
[1879]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser			
[1880]	65	70	75	80
[1881]	Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp			
[1882]	85	90	95	
[1883]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[1884]	100	105	110	
[1885]	<210> 114			
[1886]	<211> 111			
[1887]	<212> PRT			
[1888]	<213> 人工序列			
[1889]	<220>			
[1890]	<223> 合成构建体			
[1891]	<400> 114			
[1892]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly			
[1893]	1	5	10	15
[1894]	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser			
[1895]	20	25	30	
[1896]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro			
[1897]	35	40	45	
[1898]	Gln Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Cys Gly Val Pro Asp			
[1899]	50	55	60	
[1900]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser			
[1901]	65	70	75	80
[1902]	Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp			
[1903]	85	90	95	
[1904]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[1905]	100	105	110	
[1906]	<210> 115			
[1907]	<211> 111			
[1908]	<212> PRT			
[1909]	<213> 人工序列			
[1910]	<220>			

[1911]	<223> 合成构建体															
[1912]	<400> 115															
[1913]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
[1914]	1				5					10					15	
[1915]	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
[1916]				20					25					30		
[1917]	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
[1918]			35					40					45			
[1919]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Cys	Gly	Val	Pro	Asp
[1920]		50					55					60				
[1921]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
[1922]	65					70					75				80	
[1923]	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Trp
[1924]					85					90					95	
[1925]	Glu	Ile	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[1926]				100					105					110		
[1927]	<210> 116															
[1928]	<211> 111															
[1929]	<212> PRT															
[1930]	<213> 人工序列															
[1931]	<220>															
[1932]	<223> 合成构建体															
[1933]	<400> 116															
[1934]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[1935]	1				5					10					15	
[1936]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
[1937]				20					25					30		
[1938]	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
[1939]			35					40					45			
[1940]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Cys	Gly	Val	Pro	Ser
[1941]		50					55					60				
[1942]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser
[1943]	65					70					75				80	
[1944]	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Trp
[1945]					85					90					95	
[1946]	Glu	Ile	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[1947]				100					105					110		
[1948]	<210> 117															
[1949]	<211> 111															

[1950]	<212>	PRT
[1951]	<213>	人工序列
[1952]	<220>	
[1953]	<223>	合成构建体
[1954]	<400>	117
[1955]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[1956]	1 5 10 15	
[1957]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser	
[1958]	20 25 30	
[1959]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
[1960]	35 40 45	
[1961]	Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Cys Gly Val Pro Ser	
[1962]	50 55 60	
[1963]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
[1964]	65 70 75 80	
[1965]	Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp	
[1966]	85 90 95	
[1967]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[1968]	100 105 110	
[1969]	<210>	118
[1970]	<211>	111
[1971]	<212>	PRT
[1972]	<213>	人工序列
[1973]	<220>	
[1974]	<223>	合成构建体
[1975]	<400>	118
[1976]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
[1977]	1 5 10 15	
[1978]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser	
[1979]	20 25 30	
[1980]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro	
[1981]	35 40 45	
[1982]	Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Cys Gly Ile Pro Ala	
[1983]	50 55 60	
[1984]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
[1985]	65 70 75 80	
[1986]	Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp	
[1987]	85 90 95	
[1988]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	

[1989]	100	105	110
[1990]	<210> 119		
[1991]	<211> 111		
[1992]	<212> PRT		
[1993]	<213> 人工序列		
[1994]	<220>		
[1995]	<223> 合成构建体		
[1996]	<400> 119		
[1997]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[1998]	1 5 10 15		
[1999]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser		
[2000]	20 25 30		
[2001]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro		
[2002]	35 40 45		
[2003]	Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Cys Gly Val Pro Ser		
[2004]	50 55 60		
[2005]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[2006]	65 70 75 80		
[2007]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp		
[2008]	85 90 95		
[2009]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[2010]	100 105 110		
[2011]	<210> 120		
[2012]	<211> 111		
[2013]	<212> PRT		
[2014]	<213> 人工序列		
[2015]	<220>		
[2016]	<223> 合成构建体		
[2017]	<400> 120		
[2018]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[2019]	1 5 10 15		
[2020]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser		
[2021]	20 25 30		
[2022]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro		
[2023]	35 40 45		
[2024]	Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Cys Gly Val Pro Ser		
[2025]	50 55 60		
[2026]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[2027]	65 70 75 80		

[2028]	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Trp
[2029]					85					90					95	
[2030]	Glu	Ile	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[2031]					100					105					110	
[2032]	<210> 121															
[2033]	<211> 111															
[2034]	<212> PRT															
[2035]	<213> 人工序列															
[2036]	<220>															
[2037]	<223> 合成构建体															
[2038]	<400> 121															
[2039]	Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
[2040]	1				5					10					15	
[2041]	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
[2042]					20					25					30	
[2043]	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
[2044]					35					40					45	
[2045]	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Cys	Gly	Ile	Pro	Ala
[2046]		50							55					60		
[2047]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
[2048]	65					70					75					80
[2049]	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Trp
[2050]					85					90					95	
[2051]	Glu	Ile	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[2052]					100					105					110	
[2053]	<210> 122															
[2054]	<211> 111															
[2055]	<212> PRT															
[2056]	<213> 人工序列															
[2057]	<220>															
[2058]	<223> 合成构建体															
[2059]	<400> 122															
[2060]	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
[2061]	1				5					10					15	
[2062]	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Thr	Ser
[2063]					20					25					30	
[2064]	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
[2065]					35					40					45	
[2066]	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Cys	Gly	Ile	Pro	Asp

[2067]	50	55	60
[2068]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[2069]	65	70	75
[2070]	Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp		
[2071]	85	90	95
[2072]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[2073]	100	105	110
[2074]	<210> 123		
[2075]	<211> 110		
[2076]	<212> PRT		
[2077]	<213> 小家鼠		
[2078]	<220>		
[2079]	<221> 变体		
[2080]	<222> 96		
[2081]	<223> Xaa = 任何氨基酸		
[2082]	<400> 123		
[2083]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[2084]	1	5	10
[2085]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser		
[2086]	20	25	30
[2087]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
[2088]	35	40	45
[2089]	Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala		
[2090]	50	55	60
[2091]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Glx Trp Asp Arg Leu His Pro Gln His Pro		
[2092]	65	70	75
[2093]	Ser Cys Gly Gly Gly Gly Cys Cys Asn Leu Leu Leu Ser Ala His Xaa		
[2094]	85	90	95
[2095]	Gly Ala Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[2096]	100	105	110
[2097]	<210> 124		
[2098]	<211> 114		
[2099]	<212> PRT		
[2100]	<213> 人工序列		
[2101]	<220>		
[2102]	<223> 合成构建体		
[2103]	<220>		
[2104]	<221> 变体		
[2105]	<222> 100		

[2106] <223> Xaa = 任何氨基酸
 [2107] <400> 124
 [2108] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 [2109] 1 5 10 15
 [2110] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 [2111] 20 25 30
 [2112] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 [2113] 35 40 45
 [2114] Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 [2115] 50 55 60
 [2116] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
 [2117] 65 70 75 80
 [2118] Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Asn Leu Leu Leu
 [2119] 85 90 95
 [2120] Ser Ala His Xaa Gly Ala Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 [2121] 100 105 110
 [2122] Ile Lys
 [2123] <210> 125
 [2124] <211> 114
 [2125] <212> PRT
 [2126] <213> 人工序列
 [2127] <220>
 [2128] <223> 合成构建体
 [2129] <220>
 [2130] <221> 变体
 [2131] <222> 100
 [2132] <223> Xaa = 任何氨基酸
 [2133] <400> 125
 [2134] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 [2135] 1 5 10 15
 [2136] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 [2137] 20 25 30
 [2138] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
 [2139] 35 40 45
 [2140] Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 [2141] 50 55 60
 [2142] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
 [2143] 65 70 75 80
 [2144] Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Asn Leu Leu Leu

252

[2184] <223> Xaa = 任何氨基酸
 [2185] <400> 127
 [2186] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [2187] 1 5 10 15
 [2188] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 [2189] 20 25 30
 [2190] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 [2191] 35 40 45
 [2192] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 [2193] 50 55 60
 [2194] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
 [2195] 65 70 75 80
 [2196] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Asn Leu Leu Leu
 [2197] 85 90 95
 [2198] Ser Ala His Xaa Gly Ala Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 [2199] 100 105 110
 [2200] Ile Lys
 [2201] <210> 128
 [2202] <211> 114
 [2203] <212> PRT
 [2204] <213> 人工序列
 [2205] <220>
 [2206] <223> 合成构建体
 [2207] <220>
 [2208] <221> 变体
 [2209] <222> 100
 [2210] <223> Xaa = 任何氨基酸
 [2211] <400> 128
 [2212] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [2213] 1 5 10 15
 [2214] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 [2215] 20 25 30
 [2216] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 [2217] 35 40 45
 [2218] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 [2219] 50 55 60
 [2220] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 [2221] 65 70 75 80
 [2222] Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Asn Leu Leu Leu

254

[2262] <223> Xaa = 任何氨基酸
 [2263] <400> 130
 [2264] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [2265] 1 5 10 15
 [2266] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 [2267] 20 25 30
 [2268] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 [2269] 35 40 45
 [2270] Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 [2271] 50 55 60
 [2272] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 [2273] 65 70 75 80
 [2274] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Asn Leu Leu Leu
 [2275] 85 90 95
 [2276] Ser Ala His Xaa Gly Ala Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 [2277] 100 105 110
 [2278] Ile Lys
 [2279] <210> 131
 [2280] <211> 114
 [2281] <212> PRT
 [2282] <213> 人工序列
 [2283] <220>
 [2284] <223> 合成构建体
 [2285] <220>
 [2286] <221> 变体
 [2287] <222> 100
 [2288] <223> Xaa = 任何氨基酸
 [2289] <400> 131
 [2290] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [2291] 1 5 10 15
 [2292] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 [2293] 20 25 30
 [2294] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 [2295] 35 40 45
 [2296] Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 [2297] 50 55 60
 [2298] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 [2299] 65 70 75 80
 [2300] Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Leu Leu Leu

[2301]		85		90		95
[2302]	Ser Ala His Xaa Gly Ala Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu					
[2303]		100		105		110
[2304]	Ile Lys					
[2305]	<210> 132					
[2306]	<211> 114					
[2307]	<212> PRT					
[2308]	<213> 人工序列					
[2309]	<220>					
[2310]	<223> 合成构建体					
[2311]	<220>					
[2312]	<221> 变体					
[2313]	<222> 100					
[2314]	<223> Xaa = 任何氨基酸					
[2315]	<400> 132					
[2316]	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly					
[2317]	1	5		10		15
[2318]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser					
[2319]		20		25		30
[2320]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro					
[2321]		35		40		45
[2322]	Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala					
[2323]		50		55		60
[2324]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser					
[2325]	65		70		75	80
[2326]	Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Leu Leu Leu					
[2327]		85		90		95
[2328]	Ser Ala His Xaa Gly Ala Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu					
[2329]		100		105		110
[2330]	Ile Lys					
[2331]	<210> 133					
[2332]	<211> 114					
[2333]	<212> PRT					
[2334]	<213> 人工序列					
[2335]	<220>					
[2336]	<223> 合成构建体					
[2337]	<220>					
[2338]	<221> 变体					
[2339]	<222> 100					

[2340] <223> Xaa = 任何氨基酸
 [2341] <400> 133
 [2342] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [2343] 1 5 10 15
 [2344] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 [2345] 20 25 30
 [2346] Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 [2347] 35 40 45
 [2348] Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp
 [2349] 50 55 60
 [2350] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 [2351] 65 70 75 80
 [2352] Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Leu Leu Leu
 [2353] 85 90 95
 [2354] Ser Ala His Xaa Gly Ala Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 [2355] 100 105 110
 [2356] Ile Lys
 [2357] <210> 134
 [2358] <211> 111
 [2359] <212> PRT
 [2360] <213> 小家鼠
 [2361] <400> 134
 [2362] Asp Phe Gln Ile Gln Gln Ser Leu Ala Ser Leu Val Val Ser Met Gly
 [2363] 1 5 10 15
 [2364] Gln Arg Ala Ala Ile Ser Phe Arg Ala Ser Lys Arg Val Ser Thr Ser
 [2365] 20 25 30
 [2366] Val His Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 [2367] 35 40 45
 [2368] Lys Leu Ile Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Arg Ala
 [2369] 50 55 60
 [2370] Arg Phe Ser Gly Glx Gly Trp Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 [2371] 65 70 75 80
 [2372] Pro Val Glu Glu Glu Asp Gly Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 [2373] 85 90 95
 [2374] Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
 [2375] 100 105 110
 [2376] <210> 135
 [2377] <211> 111
 [2378] <212> PRT

[2379]	<213> 人工序列															
[2380]	<220>															
[2381]	<223> 合成构建体															
[2382]	<400> 135															
[2383]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
[2384]	1				5					10					15	
[2385]	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Arg	Val	Ser	Thr	Ser
[2386]					20					25					30	
[2387]	Val	His	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro
[2388]					35					40					45	
[2389]	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp
[2390]					50					55					60	
[2391]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser
[2392]	65					70					75					80
[2393]	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg
[2394]						85					90					95
[2395]	Glu	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[2396]						100					105					110
[2397]	<210> 136															
[2398]	<211> 111															
[2399]	<212> PRT															
[2400]	<213> 人工序列															
[2401]	<220>															
[2402]	<223> 合成构建体															
[2403]	<400> 136															
[2404]	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
[2405]	1				5					10					15	
[2406]	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Arg	Val	Ser	Thr	Ser
[2407]					20					25					30	
[2408]	Val	His	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro
[2409]					35					40					45	
[2410]	Arg	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp
[2411]					50					55					60	
[2412]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser
[2413]	65					70					75					80
[2414]	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg
[2415]						85					90					95
[2416]	Glu	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[2417]						100					105					110

[2418]	<210>	137														
[2419]	<211>	111														
[2420]	<212>	PRT														
[2421]	<213>	人工序列														
[2422]	<220>															
[2423]	<223>	合成构建体														
[2424]	<400>	137														
[2425]	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
[2426]	1				5					10					15	
[2427]	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Arg	Val	Ser	Thr	Ser
[2428]				20					25					30		
[2429]	Val	His	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
[2430]			35					40					45			
[2431]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp
[2432]		50					55					60				
[2433]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
[2434]	65					70					75					80
[2435]	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg
[2436]					85					90					95	
[2437]	Glu	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
[2438]				100					105					110		
[2439]	<210>	138														
[2440]	<211>	111														
[2441]	<212>	PRT														
[2442]	<213>	人工序列														
[2443]	<220>															
[2444]	<223>	合成构建体														
[2445]	<400>	138														
[2446]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[2447]	1				5					10					15	
[2448]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Arg	Val	Ser	Thr	Ser
[2449]				20					25					30		
[2450]	Val	His	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
[2451]			35					40					45			
[2452]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
[2453]		50					55					60				
[2454]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
[2455]	65					70					75					80
[2456]	Ser	Leu	Gln	Pro	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg

[2457]		85		90		95
[2458]	Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
[2459]		100		105		110
[2460]	<210> 139					
[2461]	<211> 111					
[2462]	<212> PRT					
[2463]	<213> 人工序列					
[2464]	<220>					
[2465]	<223> 合成构建体					
[2466]	<400> 139					
[2467]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
[2468]	1	5		10		15
[2469]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Arg Val Ser Thr Ser					
[2470]		20		25		30
[2471]	Val His Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro					
[2472]		35		40		45
[2473]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser					
[2474]		50		55		60
[2475]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser					
[2476]	65	70		75		80
[2477]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg					
[2478]		85		90		95
[2479]	Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
[2480]		100		105		110
[2481]	<210> 140					
[2482]	<211> 111					
[2483]	<212> PRT					
[2484]	<213> 人工序列					
[2485]	<220>					
[2486]	<223> 合成构建体					
[2487]	<400> 140					
[2488]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly					
[2489]	1	5		10		15
[2490]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Arg Val Ser Thr Ser					
[2491]		20		25		30
[2492]	Val His Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro					
[2493]		35		40		45
[2494]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser					
[2495]		50		55		60

[2496]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[2497]	65 70 75 80
[2498]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[2499]	85 90 95
[2500]	Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2501]	100 105 110
[2502]	<210> 141
[2503]	<211> 111
[2504]	<212> PRT
[2505]	<213> 人工序列
[2506]	<220>
[2507]	<223> 合成构建体
[2508]	<400> 141
[2509]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[2510]	1 5 10 15
[2511]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Arg Val Ser Thr Ser
[2512]	20 25 30
[2513]	Val His Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[2514]	35 40 45
[2515]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
[2516]	50 55 60
[2517]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
[2518]	65 70 75 80
[2519]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[2520]	85 90 95
[2521]	Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2522]	100 105 110
[2523]	<210> 142
[2524]	<211> 111
[2525]	<212> PRT
[2526]	<213> 人工序列
[2527]	<220>
[2528]	<223> 合成构建体
[2529]	<400> 142
[2530]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[2531]	1 5 10 15
[2532]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Arg Val Ser Thr Ser
[2533]	20 25 30
[2534]	Val His Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

[2535]	35	40	45
[2536]	Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala		
[2537]	50	55	60
[2538]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[2539]	65	70	75
[2540]	Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		
[2541]	85	90	95
[2542]	Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[2543]	100	105	110
[2544]	<210> 143		
[2545]	<211> 111		
[2546]	<212> PRT		
[2547]	<213> 人工序列		
[2548]	<220>		
[2549]	<223> 合成构建体		
[2550]	<400> 143		
[2551]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[2552]	1	5	10
[2553]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Arg Val Ser Thr Ser		
[2554]	20	25	30
[2555]	Val His Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro		
[2556]	35	40	45
[2557]	Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp		
[2558]	50	55	60
[2559]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[2560]	65	70	75
[2561]	Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		
[2562]	85	90	95
[2563]	Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[2564]	100	105	110
[2565]	<210> 144		
[2566]	<211> 111		
[2567]	<212> PRT		
[2568]	<213> 人工序列		
[2569]	<220>		
[2570]	<223> 合成构建体		
[2571]	<400> 144		
[2572]	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly		
[2573]	1	5	10

[2574]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Arg Val Ser Thr Ser
[2575]	20 25 30
[2576]	Val His Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
[2577]	35 40 45
[2578]	Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
[2579]	50 55 60
[2580]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[2581]	65 70 75 80
[2582]	Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[2583]	85 90 95
[2584]	Glu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2585]	100 105 110
[2586]	<210> 145
[2587]	<211> 107
[2588]	<212> PRT
[2589]	<213> 人工序列
[2590]	<220>
[2591]	<223> 合成构建体
[2592]	<400> 145
[2593]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
[2594]	1 5 10 15
[2595]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
[2596]	20 25 30
[2597]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[2598]	35 40 45
[2599]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[2600]	50 55 60
[2601]	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[2602]	65 70 75 80
[2603]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
[2604]	85 90 95
[2605]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2606]	100 105
[2607]	<210> 146
[2608]	<211> 107
[2609]	<212> PRT
[2610]	<213> 人工序列
[2611]	<220>
[2612]	<223> 合成构建体

[2613]	<400> 146
[2614]	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
[2615]	1 5 10 15
[2616]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
[2617]	20 25 30
[2618]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
[2619]	35 40 45
[2620]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[2621]	50 55 60
[2622]	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
[2623]	65 70 75 80
[2624]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
[2625]	85 90 95
[2626]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2627]	100 105
[2628]	<210> 147
[2629]	<211> 107
[2630]	<212> PRT
[2631]	<213> 人工序列
[2632]	<220>
[2633]	<223> 合成构建体
[2634]	<400> 147
[2635]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[2636]	1 5 10 15
[2637]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
[2638]	20 25 30
[2639]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
[2640]	35 40 45
[2641]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
[2642]	50 55 60
[2643]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
[2644]	65 70 75 80
[2645]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
[2646]	85 90 95
[2647]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2648]	100 105
[2649]	<210> 148
[2650]	<211> 107
[2651]	<212> PRT

[2652]	<213>	人工序列
[2653]	<220>	
[2654]	<223>	合成构建体
[2655]	<400>	148
[2656]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
[2657]	1 5 10 15	
[2658]	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr	
[2659]	20 25 30	
[2660]	Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile	
[2661]	35 40 45	
[2662]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
[2663]	50 55 60	
[2664]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala	
[2665]	65 70 75 80	
[2666]	Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu	
[2667]	85 90 95	
[2668]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[2669]	100 105	
[2670]	<210>	149
[2671]	<211>	107
[2672]	<212>	PRT
[2673]	<213>	人工序列
[2674]	<220>	
[2675]	<223>	合成构建体
[2676]	<400>	149
[2677]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
[2678]	1 5 10 15	
[2679]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr	
[2680]	20 25 30	
[2681]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile	
[2682]	35 40 45	
[2683]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
[2684]	50 55 60	
[2685]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala	
[2686]	65 70 75 80	
[2687]	Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu	
[2688]	85 90 95	
[2689]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[2690]	100 105	

[2691]	<210>	150
[2692]	<211>	107
[2693]	<212>	PRT
[2694]	<213>	人工序列
[2695]	<220>	
[2696]	<223>	合成构建体
[2697]	<400>	150
[2698]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly	
[2699]	1 5 10 15	
[2700]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr	
[2701]	20 25 30	
[2702]	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile	
[2703]	35 40 45	
[2704]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
[2705]	50 55 60	
[2706]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala	
[2707]	65 70 75 80	
[2708]	Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu	
[2709]	85 90 95	
[2710]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[2711]	100 105	
[2712]	<210>	151
[2713]	<211>	111
[2714]	<212>	PRT
[2715]	<213>	人工序列
[2716]	<220>	
[2717]	<223>	合成构建体
[2718]	<400>	151
[2719]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
[2720]	1 5 10 15	
[2721]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser	
[2722]	20 25 30	
[2723]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro	
[2724]	35 40 45	
[2725]	Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala	
[2726]	50 55 60	
[2727]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
[2728]	65 70 75 80	
[2729]	Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Ser Trp	

[2730]		85		90		95
[2731]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
[2732]		100		105		110
[2733]	<210> 152					
[2734]	<211> 111					
[2735]	<212> PRT					
[2736]	<213> 人工序列					
[2737]	<220>					
[2738]	<223> 合成构建体					
[2739]	<400> 152					
[2740]	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly					
[2741]	1	5		10		15
[2742]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser					
[2743]		20		25		30
[2744]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro					
[2745]		35		40		45
[2746]	Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala					
[2747]		50		55		60
[2748]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser					
[2749]	65	70		75		80
[2750]	Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Ser Trp					
[2751]		85		90		95
[2752]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
[2753]		100		105		110
[2754]	<210> 153					
[2755]	<211> 111					
[2756]	<212> PRT					
[2757]	<213> 人工序列					
[2758]	<220>					
[2759]	<223> 合成构建体					
[2760]	<400> 153					
[2761]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
[2762]	1	5		10		15
[2763]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser					
[2764]		20		25		30
[2765]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro					
[2766]		35		40		45
[2767]	Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Asp					
[2768]		50		55		60

[2769]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[2770]	65 70 75 80
[2771]	Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Ser Trp
[2772]	85 90 95
[2773]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[2774]	100 105 110
[2775]	<210> 154
[2776]	<211> 117
[2777]	<212> PRT
[2778]	<213> 小家鼠
[2779]	<400> 154
[2780]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[2781]	1 5 10 15
[2782]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[2783]	20 25 30
[2784]	Asn Leu His Trp Val Lys Leu Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
[2785]	35 40 45
[2786]	Gly Phe Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
[2787]	50 55 60
[2788]	Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[2789]	65 70 75 80
[2790]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[2791]	85 90 95
[2792]	Ala Arg Ser Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
[2793]	100 105 110
[2794]	Leu Thr Val Ser Ser
[2795]	115
[2796]	<210> 155
[2797]	<211> 117
[2798]	<212> PRT
[2799]	<213> 人工序列
[2800]	<220>
[2801]	<223> 合成构建体
[2802]	<400> 155
[2803]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2804]	1 5 10 15
[2805]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[2806]	20 25 30
[2807]	Asn Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

[2808]	35	40	45
[2809]	Gly Phe Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Asp Ser Val		
[2810]	50	55	60
[2811]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
[2812]	65	70	75
[2813]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[2814]	85	90	95
[2815]	Ala Arg Ser Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
[2816]	100	105	110
[2817]	Val Thr Val Ser Ser		
[2818]	115		
[2819]	<210> 156		
[2820]	<211> 117		
[2821]	<212> PRT		
[2822]	<213> 人工序列		
[2823]	<220>		
[2824]	<223> 合成构建体		
[2825]	<400> 156		
[2826]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		
[2827]	1	5	10
[2828]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
[2829]	20	25	30
[2830]	Asn Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
[2831]	35	40	45
[2832]	Gly Phe Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Asp Ser Val		
[2833]	50	55	60
[2834]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[2835]	65	70	75
[2836]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[2837]	85	90	95
[2838]	Ala Arg Ser Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
[2839]	100	105	110
[2840]	Val Thr Val Ser Ser		
[2841]	115		
[2842]	<210> 157		
[2843]	<211> 117		
[2844]	<212> PRT		
[2845]	<213> 人工序列		
[2846]	<220>		

[2847]	<223> 合成构建体															
[2848]	<400> 157															
[2849]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
[2850]	1				5					10					15	
[2851]	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
[2852]					20					25					30	
[2853]	Asn	Leu	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[2854]					35					40					45	
[2855]	Gly	Phe	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asn	Gly	Ile	Thr	Gly	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
[2856]					50					55					60	
[2857]	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
[2858]	65									70						80
[2859]	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[2860]																
[2861]	Ala	Arg	Ser	Thr	Val	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
[2862]																
[2863]	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
[2864]																
[2865]	<210> 158															
[2866]	<211> 117															
[2867]	<212> PRT															
[2868]	<213> 人工序列															
[2869]	<220>															
[2870]	<223> 合成构建体															
[2871]	<400> 158															
[2872]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
[2873]	1				5					10					15	
[2874]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
[2875]																
[2876]	Asn	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[2877]																
[2878]	Gly	Phe	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asn	Gly	Ile	Thr	Gly	Tyr	Asn	Ala	Pro	Val
[2879]																
[2880]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[2881]	65															80
[2882]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[2883]																
[2884]	Ala	Arg	Ser	Thr	Val	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
[2885]																

[2886]	Val Thr Val Ser Ser
[2887]	115
[2888]	<210> 159
[2889]	<211> 117
[2890]	<212> PRT
[2891]	<213> 人工序列
[2892]	<220>
[2893]	<223> 合成构建体
[2894]	<400> 159
[2895]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[2896]	1 5 10 15
[2897]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[2898]	20 25 30
[2899]	Asn Leu His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[2900]	35 40 45
[2901]	Gly Phe Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu
[2902]	50 55 60
[2903]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
[2904]	65 70 75 80
[2905]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2906]	85 90 95
[2907]	Ala Arg Ser Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
[2908]	100 105 110
[2909]	Val Thr Val Ser Ser
[2910]	115
[2911]	<210> 160
[2912]	<211> 120
[2913]	<212> PRT
[2914]	<213> 人工序列
[2915]	<220>
[2916]	<223> 合成构建体
[2917]	<400> 160
[2918]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2919]	1 5 10 15
[2920]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
[2921]	20 25 30
[2922]	Cys Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2923]	35 40 45
[2924]	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Asn Tyr Val Asp

[2925]	50	55	60
[2926]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser		
[2927]	65	70	75
[2928]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
[2929]	85	90	95
[2930]	Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln		
[2931]	100	105	110
[2932]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[2933]	115	120	
[2934]	<210> 161		
[2935]	<211> 120		
[2936]	<212> PRT		
[2937]	<213> 人工序列		
[2938]	<220>		
[2939]	<223> 合成构建体		
[2940]	<400> 161		
[2941]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[2942]	1	5	10
[2943]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr		
[2944]	20	25	30
[2945]	Cys Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[2946]	35	40	45
[2947]	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Asn Tyr Val Asp		
[2948]	50	55	60
[2949]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr		
[2950]	65	70	75
[2951]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
[2952]	85	90	95
[2953]	Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln		
[2954]	100	105	110
[2955]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[2956]	115	120	
[2957]	<210> 162		
[2958]	<211> 120		
[2959]	<212> PRT		
[2960]	<213> 人工序列		
[2961]	<220>		
[2962]	<223> 合成构建体		
[2963]	<400> 162		

[2964]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
[2965]	1 5 10 15
[2966]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
[2967]	20 25 30
[2968]	Cys Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2969]	35 40 45
[2970]	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Asn Tyr Val Asp
[2971]	50 55 60
[2972]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
[2973]	65 70 75 80
[2974]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[2975]	85 90 95
[2976]	Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[2977]	100 105 110
[2978]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[2979]	115 120
[2980]	<210> 163
[2981]	<211> 120
[2982]	<212> PRT
[2983]	<213> 人工序列
[2984]	<220>
[2985]	<223> 合成构建体
[2986]	<400> 163
[2987]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[2988]	1 5 10 15
[2989]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
[2990]	20 25 30
[2991]	Cys Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
[2992]	35 40 45
[2993]	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Asn Tyr Val Gln
[2994]	50 55 60
[2995]	Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr
[2996]	65 70 75 80
[2997]	Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[2998]	85 90 95
[2999]	Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[3000]	100 105 110
[3001]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3002]	115 120

[3003]	<210>	164
[3004]	<211>	120
[3005]	<212>	PRT
[3006]	<213>	人工序列
[3007]	<220>	
[3008]	<223>	合成构建体
[3009]	<400>	164
[3010]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[3011]	1 5 10 15	
[3012]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	
[3013]	20 25 30	
[3014]	Cys Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val	
[3015]	35 40 45	
[3016]	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Asn Tyr Val Gln	
[3017]	50 55 60	
[3018]	Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr	
[3019]	65 70 75 80	
[3020]	Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr	
[3021]	85 90 95	
[3022]	Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln	
[3023]	100 105 110	
[3024]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[3025]	115 120	
[3026]	<210>	165
[3027]	<211>	120
[3028]	<212>	PRT
[3029]	<213>	人工序列
[3030]	<220>	
[3031]	<223>	合成构建体
[3032]	<400>	165
[3033]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu	
[3034]	1 5 10 15	
[3035]	Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	
[3036]	20 25 30	
[3037]	Cys Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[3038]	35 40 45	
[3039]	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Asn Tyr Val Pro	
[3040]	50 55 60	
[3041]	Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr	

[3042]	65	70	75	80
[3043]	Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr			
[3044]	85	90	95	
[3045]	Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln			
[3046]	100	105	110	
[3047]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[3048]	115	120		
[3049]	<210> 166			
[3050]	<211> 120			
[3051]	<212> PRT			
[3052]	<213> 人工序列			
[3053]	<220>			
[3054]	<223> 合成构建体			
[3055]	<400> 166			
[3056]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
[3057]	1	5	10	15
[3058]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr			
[3059]	20	25	30	
[3060]	Cys Met Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[3061]	35	40	45	
[3062]	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Asn Tyr Val Pro			
[3063]	50	55	60	
[3064]	Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln			
[3065]	65	70	75	80
[3066]	Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr			
[3067]	85	90	95	
[3068]	Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln			
[3069]	100	105	110	
[3070]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[3071]	115	120		
[3072]	<210> 167			
[3073]	<211> 120			
[3074]	<212> PRT			
[3075]	<213> 人工序列			
[3076]	<220>			
[3077]	<223> 合成构建体			
[3078]	<400> 167			
[3079]	Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
[3080]	1	5	10	15

[3081]	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
[3082]				20					25					30		
[3083]	Cys	Met	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[3084]			35					40					45			
[3085]	Ala	Glu	Ile	Arg	Leu	Lys	Ser	Asn	Asn	Tyr	Val	Thr	Asn	Tyr	Val	Pro
[3086]		50					55					60				
[3087]	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln
[3088]	65					70					75				80	
[3089]	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
[3090]					85					90					95	
[3091]	Tyr	Cys	Thr	Arg	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Val	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
[3092]				100					105					110		
[3093]	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
[3094]			115					120								
[3095]	<210> 168															
[3096]	<211> 120															
[3097]	<212> PRT															
[3098]	<213> 小家鼠															
[3099]	<400> 168															
[3100]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala
[3101]	1			5					10					15		
[3102]	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
[3103]			20						25					30		
[3104]	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[3105]			35					40					45			
[3106]	Gly	Asn	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Tyr	Asp	Glu	Lys	Phe
[3107]		50					55					60				
[3108]	Lys	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
[3109]	65					70					75				80	
[3110]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
[3111]					85					90					95	
[3112]	Thr	Arg	Gly	His	Tyr	Gly	Ser	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	His
[3113]				100					105					110		
[3114]	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser								
[3115]			115					120								
[3116]	<210> 169															
[3117]	<211> 120															
[3118]	<212> PRT															
[3119]	<213> 人工序列															

[3120]	<220>
[3121]	<223> 合成构建体
[3122]	<400> 169
[3123]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[3124]	1 5 10 15
[3125]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[3126]	20 25 30
[3127]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[3128]	35 40 45
[3129]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
[3130]	50 55 60
[3131]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
[3132]	65 70 75 80
[3133]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3134]	85 90 95
[3135]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[3136]	100 105 110
[3137]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3138]	115 120
[3139]	<210> 170
[3140]	<211> 120
[3141]	<212> PRT
[3142]	<213> 人工序列
[3143]	<220>
[3144]	<223> 合成构建体
[3145]	<400> 170
[3146]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
[3147]	1 5 10 15
[3148]	Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[3149]	20 25 30
[3150]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[3151]	35 40 45
[3152]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Asp Pro Ser Phe
[3153]	50 55 60
[3154]	Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[3155]	65 70 75 80
[3156]	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[3157]	85 90 95
[3158]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

[3159]		100		105		110
[3160]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
[3161]		115		120		
[3162]	<210>	171				
[3163]	<211>	120				
[3164]	<212>	PRT				
[3165]	<213>	人工序列				
[3166]	<220>					
[3167]	<223>	合成构建体				
[3168]	<400>	171				
[3169]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
[3170]	1	5		10		15
[3171]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr					
[3172]		20		25		30
[3173]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile					
[3174]		35		40		45
[3175]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Asp Asp Ser Val					
[3176]	50	55		60		
[3177]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr					
[3178]	65	70		75		80
[3179]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
[3180]		85		90		95
[3181]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln					
[3182]		100		105		110
[3183]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
[3184]		115		120		
[3185]	<210>	172				
[3186]	<211>	120				
[3187]	<212>	PRT				
[3188]	<213>	人工序列				
[3189]	<220>					
[3190]	<223>	合成构建体				
[3191]	<400>	172				
[3192]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser					
[3193]	1	5		10		15
[3194]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr					
[3195]		20		25		30
[3196]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
[3197]		35		40		45

[3198]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Asp Gln Lys Phe
[3199]	50 55 60
[3200]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[3201]	65 70 75 80
[3202]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3203]	85 90 95
[3204]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[3205]	100 105 110
[3206]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3207]	115 120
[3208]	<210> 173
[3209]	<211> 120
[3210]	<212> PRT
[3211]	<213> 人工序列
[3212]	<220>
[3213]	<223> 合成构建体
[3214]	<400> 173
[3215]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[3216]	1 5 10 15
[3217]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[3218]	20 25 30
[3219]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[3220]	35 40 45
[3221]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Asp Asp Ser Val
[3222]	50 55 60
[3223]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[3224]	65 70 75 80
[3225]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3226]	85 90 95
[3227]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[3228]	100 105 110
[3229]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3230]	115 120
[3231]	<210> 174
[3232]	<211> 120
[3233]	<212> PRT
[3234]	<213> 人工序列
[3235]	<220>
[3236]	<223> 合成构建体

[3237]	<400> 174
[3238]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
[3239]	1 5 10 15
[3240]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[3241]	20 25 30
[3242]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[3243]	35 40 45
[3244]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Asp Asp Ser Val
[3245]	50 55 60
[3246]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[3247]	65 70 75 80
[3248]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3249]	85 90 95
[3250]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[3251]	100 105 110
[3252]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3253]	115 120
[3254]	<210> 175
[3255]	<211> 120
[3256]	<212> PRT
[3257]	<213> 人工序列
[3258]	<220>
[3259]	<223> 合成构建体
[3260]	<400> 175
[3261]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
[3262]	1 5 10 15
[3263]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[3264]	20 25 30
[3265]	Trp Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[3266]	35 40 45
[3267]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Asp Pro Ser Leu
[3268]	50 55 60
[3269]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
[3270]	65 70 75 80
[3271]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3272]	85 90 95
[3273]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[3274]	100 105 110
[3275]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[3276]	115	120
[3277]	<210> 176	
[3278]	<211> 120	
[3279]	<212> PRT	
[3280]	<213> 人工序列	
[3281]	<220>	
[3282]	<223> 合成构建体	
[3283]	<400> 176	
[3284]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
[3285]	1 5 10 15	
[3286]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
[3287]	20 25 30	
[3288]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
[3289]	35 40 45	
[3290]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Asp Ala Pro Val	
[3291]	50 55 60	
[3292]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[3293]	65 70 75 80	
[3294]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[3295]	85 90 95	
[3296]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln	
[3297]	100 105 110	
[3298]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[3299]	115 120	
[3300]	<210> 177	
[3301]	<211> 120	
[3302]	<212> PRT	
[3303]	<213> 人工序列	
[3304]	<220>	
[3305]	<223> 合成构建体	
[3306]	<400> 177	
[3307]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	
[3308]	1 5 10 15	
[3309]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
[3310]	20 25 30	
[3311]	Trp Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
[3312]	35 40 45	
[3313]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Asp Pro Ser Leu	
[3314]	50 55 60	

[3315]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
[3316]	65 70 75 80
[3317]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3318]	85 90 95
[3319]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Ser Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[3320]	100 105 110
[3321]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3322]	115 120
[3323]	<210> 178
[3324]	<211> 117
[3325]	<212> PRT
[3326]	<213> 人工序列
[3327]	<220>
[3328]	<223> 合成构建体
[3329]	<400> 178
[3330]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[3331]	1 5 10 15
[3332]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[3333]	20 25 30
[3334]	Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[3335]	35 40 45
[3336]	Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Asp Ser Val
[3337]	50 55 60
[3338]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[3339]	65 70 75 80
[3340]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3341]	85 90 95
[3342]	Ala Arg Gly Tyr His Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
[3343]	100 105 110
[3344]	Val Thr Val Ser Ser
[3345]	115
[3346]	<210> 179
[3347]	<211> 117
[3348]	<212> PRT
[3349]	<213> 人工序列
[3350]	<220>
[3351]	<223> 合成构建体
[3352]	<400> 179
[3353]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

[3354]	1	5	10	15
[3355]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
[3356]	20	25	30	
[3357]	Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
[3358]	35	40	45	
[3359]	Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Asp Ser Val			
[3360]	50	55	60	
[3361]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[3362]	65	70	75	80
[3363]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[3364]	85	90	95	
[3365]	Ala Arg Gly Tyr His Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
[3366]	100	105	110	
[3367]	Val Thr Val Ser Ser			
[3368]	115			
[3369]	<210> 180			
[3370]	<211> 117			
[3371]	<212> PRT			
[3372]	<213> 人工序列			
[3373]	<220>			
[3374]	<223> 合成构建体			
[3375]	<400> 180			
[3376]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
[3377]	1	5	10	15
[3378]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
[3379]	20	25	30	
[3380]	Asp Ile Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
[3381]	35	40	45	
[3382]	Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Pro Ser Leu			
[3383]	50	55	60	
[3384]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser			
[3385]	65	70	75	80
[3386]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[3387]	85	90	95	
[3388]	Ala Arg Gly Tyr His Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
[3389]	100	105	110	
[3390]	Val Thr Val Ser Ser			
[3391]	115			
[3392]	<210> 181			

[3393]	<211> 117																
[3394]	<212> PRT																
[3395]	<213> 人工序列																
[3396]	<220>																
[3397]	<223> 合成构建体																
[3398]	<400> 181																
[3399]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
[3400]	1				5					10					15		
[3401]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
[3402]				20					25					30			
[3403]	Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
[3404]			35					40					45				
[3405]	Gly	Trp	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Asn	Ala	Pro	Val	
[3406]		50					55				60						
[3407]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
[3408]	65					70					75				80		
[3409]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
[3410]				85					90					95			
[3411]	Ala	Arg	Gly	Tyr	His	Tyr	Ala	Met	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
[3412]				100					105					110			
[3413]	Val	Thr	Val	Ser	Ser												
[3414]			115														
[3415]	<210> 182																
[3416]	<211> 117																
[3417]	<212> PRT																
[3418]	<213> 人工序列																
[3419]	<220>																
[3420]	<223> 合成构建体																
[3421]	<400> 182																
[3422]	Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
[3423]	1				5					10					15		
[3424]	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	
[3425]				20					25					30			
[3426]	Asp	Ile	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
[3427]			35					40					45				
[3428]	Gly	Trp	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	
[3429]		50					55				60						
[3430]	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	
[3431]	65					70					75					80	

[3432]	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[3433]					85					90						95
[3434]	Ala	Arg	Gly	Tyr	His	Tyr	Ala	Met	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
[3435]					100					105						110
[3436]	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
[3437]					115											
[3438]	<210>	183														
[3439]	<211>	117														
[3440]	<212>	PRT														
[3441]	<213>	人工序列														
[3442]	<220>															
[3443]	<223>	合成构建体														
[3444]	<400>	183														
[3445]	Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
[3446]	1				5					10					15	
[3447]	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
[3448]					20					25					30	
[3449]	Asn	Leu	His	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[3450]					35					40					45	
[3451]	Gly	Phe	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asn	Gly	Ile	Thr	Gly	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
[3452]					50					55					60	
[3453]	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
[3454]	65					70					75					80
[3455]	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[3456]					85					90						95
[3457]	Ala	Arg	Ser	Thr	Val	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
[3458]					100					105						110
[3459]	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
[3460]					115											
[3461]	<210>	184														
[3462]	<211>	15														
[3463]	<212>	PRT														
[3464]	<213>	人工序列														
[3465]	<220>															
[3466]	<223>	合成构建体														
[3467]	<400>	184														
[3468]	Arg	Pro	Ser	Lys	Arg	Ile	Ser	Ala	Tyr	Val	Phe	Ser	Tyr	Met	His	
[3469]	1				5					10					15	
[3470]	<210>	185														

[3471]	<211> 7
[3472]	<212> PRT
[3473]	<213> 人工序列
[3474]	<220>
[3475]	<223> 合成构建体
[3476]	<220>
[3477]	<221> 变体
[3478]	<222> 7
[3479]	<223> Xaa = 任何氨基酸
[3480]	<400> 185
[3481]	Leu Ser Cys Asn Leu Glu Xaa
[3482]	1 5
[3483]	<210> 186
[3484]	<211> 14
[3485]	<212> PRT
[3486]	<213> 人工序列
[3487]	<220>
[3488]	<223> 合成构建体
[3489]	<400> 186
[3490]	Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp
[3491]	1 5 10
[3492]	<210> 187
[3493]	<211> 13
[3494]	<212> PRT
[3495]	<213> 人工序列
[3496]	<220>
[3497]	<223> 合成构建体
[3498]	<400> 187
[3499]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr
[3500]	1 5 10
[3501]	<210> 188
[3502]	<211> 23
[3503]	<212> PRT
[3504]	<213> 人工序列
[3505]	<220>
[3506]	<223> 合成构建体
[3507]	<400> 188
[3508]	Asp Leu Glx Leu Thr Gln Ser Leu Ala Ser Leu Val Val Cys Met Gly
[3509]	1 5 10 15

[3510]	Gln Arg Ala Ala Ile Ser Phe
[3511]	20
[3512]	<210> 189
[3513]	<211> 32
[3514]	<212> PRT
[3515]	<213> 人工序列
[3516]	<220>
[3517]	<223> 合成构建体
[3518]	<400> 189
[3519]	Gly Val Arg Ala Arg Leu Ser Gly Arg Arg Trp Val Thr Asp Phe Thr
[3520]	1 5 10 15
[3521]	Leu Asn Ile His Pro Ala Glu Glu Glu Asp Gly Ala Thr Tyr Tyr Cys
[3522]	20 25 30
[3523]	<210> 190
[3524]	<211> 26
[3525]	<212> PRT
[3526]	<213> 人工序列
[3527]	<220>
[3528]	<223> 合成构建体
[3529]	<400> 190
[3530]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
[3531]	1 5 10 15
[3532]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly
[3533]	20 25
[3534]	<210> 191
[3535]	<211> 35
[3536]	<212> PRT
[3537]	<213> 人工序列
[3538]	<220>
[3539]	<223> 合成构建体
[3540]	<400> 191
[3541]	Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Gly
[3542]	1 5 10 15
[3543]	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
[3544]	20 25 30
[3545]	Tyr Tyr Cys
[3546]	35
[3547]	<210> 192
[3548]	<211> 111

[3549]	<212>	PRT
[3550]	<213>	小家鼠
[3551]	<220>	
[3552]	<221>	变体
[3553]	<222>	60
[3554]	<223>	Xaa = 任何氨基酸
[3555]	<400>	192
[3556]	Asp Leu Glx Leu Thr Gln Ser Leu Ala Ser Leu Val Val Cys Met Gly	
[3557]	1 5 10 15	
[3558]	Gln Arg Ala Ala Ile Ser Phe Arg Pro Ser Lys Arg Ile Ser Ala Tyr	
[3559]	20 25 30	
[3560]	Val Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
[3561]	35 40 45	
[3562]	Lys Leu Ile Ile Tyr Leu Ser Cys Asn Leu Glu Xaa Gly Val Arg Ala	
[3563]	50 55 60	
[3564]	Arg Leu Ser Gly Arg Arg Trp Val Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His	
[3565]	65 70 75 80	
[3566]	Pro Ala Glu Glu Glu Asp Gly Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg	
[3567]	85 90 95	
[3568]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys	
[3569]	100 105 110	
[3570]	<210>	193
[3571]	<211>	111
[3572]	<212>	PRT
[3573]	<213>	人工序列
[3574]	<220>	
[3575]	<223>	合成构建体
[3576]	<220>	
[3577]	<221>	变体
[3578]	<222>	60
[3579]	<223>	Xaa = 任何氨基酸
[3580]	<400>	193
[3581]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
[3582]	1 5 10 15	
[3583]	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Pro Ser Lys Arg Ile Ser Ala Tyr	
[3584]	20 25 30	
[3585]	Val Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro	
[3586]	35 40 45	
[3587]	Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Cys Asn Leu Glu Xaa Gly Val Pro Asp	

[3588]	50	55	60
[3589]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser		
[3590]	65	70	75
[3591]	Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		80
[3592]		85	90
[3593]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		95
[3594]		100	105
[3595]	<210> 194		110
[3596]	<211> 111		
[3597]	<212> PRT		
[3598]	<213> 人工序列		
[3599]	<220>		
[3600]	<223> 合成构建体		
[3601]	<220>		
[3602]	<221> 变体		
[3603]	<222> 60		
[3604]	<223> Xaa = 任何氨基酸		
[3605]	<400> 194		
[3606]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly		
[3607]	1	5	10
[3608]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Pro Ser Lys Arg Ile Ser Ala Tyr		15
[3609]		20	25
[3610]	Val Phe Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro		30
[3611]		35	40
[3612]	Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Ser Cys Asn Leu Glu Xaa Gly Val Pro Asp		45
[3613]	50	55	60
[3614]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser		
[3615]	65	70	75
[3616]	Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		80
[3617]		85	90
[3618]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		95
[3619]		100	105
[3620]	<210> 195		110
[3621]	<211> 111		
[3622]	<212> PRT		
[3623]	<213> 人工序列		
[3624]	<220>		
[3625]	<223> 合成构建体		
[3626]	<220>		

[3627]	<221>	变体
[3628]	<222>	60
[3629]	<223>	Xaa = 任何氨基酸
[3630]	<400>	195
[3631]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
[3632]	1 5 10 15	
[3633]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Pro Ser Lys Arg Ile Ser Ala Tyr	
[3634]	20 25 30	
[3635]	Val Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
[3636]	35 40 45	
[3637]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Cys Asn Leu Glu Xaa Gly Val Pro Asp	
[3638]	50 55 60	
[3639]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
[3640]	65 70 75 80	
[3641]	Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg	
[3642]	85 90 95	
[3643]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[3644]	100 105 110	
[3645]	<210>	196
[3646]	<211>	111
[3647]	<212>	PRT
[3648]	<213>	人工序列
[3649]	<220>	
[3650]	<223>	合成构建体
[3651]	<220>	
[3652]	<221>	变体
[3653]	<222>	60
[3654]	<223>	Xaa = 任何氨基酸
[3655]	<400>	196
[3656]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[3657]	1 5 10 15	
[3658]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Lys Arg Ile Ser Ala Tyr	
[3659]	20 25 30	
[3660]	Val Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
[3661]	35 40 45	
[3662]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Cys Asn Leu Glu Xaa Gly Val Pro Ser	
[3663]	50 55 60	
[3664]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser	
[3665]	65 70 75 80	

[3666]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[3667]	85 90 95
[3668]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[3669]	100 105 110
[3670]	<210> 197
[3671]	<211> 111
[3672]	<212> PRT
[3673]	<213> 人工序列
[3674]	<220>
[3675]	<223> 合成构建体
[3676]	<220>
[3677]	<221> 变体
[3678]	<222> 60
[3679]	<223> Xaa = 任何氨基酸
[3680]	<400> 197
[3681]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
[3682]	1 5 10 15
[3683]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Lys Arg Ile Ser Ala Tyr
[3684]	20 25 30
[3685]	Val Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[3686]	35 40 45
[3687]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Cys Asn Leu Glu Xaa Gly Val Pro Ser
[3688]	50 55 60
[3689]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[3690]	65 70 75 80
[3691]	Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[3692]	85 90 95
[3693]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[3694]	100 105 110
[3695]	<210> 198
[3696]	<211> 111
[3697]	<212> PRT
[3698]	<213> 人工序列
[3699]	<220>
[3700]	<223> 合成构建体
[3701]	<220>
[3702]	<221> 变体
[3703]	<222> 60
[3704]	<223> Xaa = 任何氨基酸

[3705]	<400> 198
[3706]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[3707]	1 5 10 15
[3708]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Pro Ser Lys Arg Ile Ser Ala Tyr
[3709]	20 25 30
[3710]	Val Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
[3711]	35 40 45
[3712]	Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Cys Asn Leu Glu Xaa Gly Ile Pro Ala
[3713]	50 55 60
[3714]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[3715]	65 70 75 80
[3716]	Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[3717]	85 90 95
[3718]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[3719]	100 105 110
[3720]	<210> 199
[3721]	<211> 111
[3722]	<212> PRT
[3723]	<213> 人工序列
[3724]	<220>
[3725]	<223> 合成构建体
[3726]	<220>
[3727]	<221> 变体
[3728]	<222> 60
[3729]	<223> Xaa = 任何氨基酸
[3730]	<400> 199
[3731]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
[3732]	1 5 10 15
[3733]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Lys Arg Ile Ser Ala Tyr
[3734]	20 25 30
[3735]	Val Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[3736]	35 40 45
[3737]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Cys Asn Leu Glu Xaa Gly Val Pro Ser
[3738]	50 55 60
[3739]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[3740]	65 70 75 80
[3741]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[3742]	85 90 95
[3743]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[3744]	100	105	110
[3745]	<210> 200		
[3746]	<211> 111		
[3747]	<212> PRT		
[3748]	<213> 人工序列		
[3749]	<220>		
[3750]	<223> 合成构建体		
[3751]	<220>		
[3752]	<221> 变体		
[3753]	<222> 60		
[3754]	<223> Xaa = 任何氨基酸		
[3755]	<400> 200		
[3756]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[3757]	1 5 10 15		
[3758]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Lys Arg Ile Ser Ala Tyr		
[3759]	20 25 30		
[3760]	Val Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro		
[3761]	35 40 45		
[3762]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Cys Asn Leu Glu Xaa Gly Val Pro Ser		
[3763]	50 55 60		
[3764]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[3765]	65 70 75 80		
[3766]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		
[3767]	85 90 95		
[3768]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[3769]	100 105 110		
[3770]	<210> 201		
[3771]	<211> 111		
[3772]	<212> PRT		
[3773]	<213> 人工序列		
[3774]	<220>		
[3775]	<223> 合成构建体		
[3776]	<220>		
[3777]	<221> 变体		
[3778]	<222> 60		
[3779]	<223> Xaa = 任何氨基酸		
[3780]	<400> 201		
[3781]	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly		
[3782]	1 5 10 15		

[3783]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Pro Ser Lys Arg Ile Ser Ala Tyr
[3784]	20 25 30
[3785]	Val Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
[3786]	35 40 45
[3787]	Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Cys Asn Leu Glu Xaa Gly Ile Pro Ala
[3788]	50 55 60
[3789]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[3790]	65 70 75 80
[3791]	Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[3792]	85 90 95
[3793]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[3794]	100 105 110
[3795]	<210> 202
[3796]	<211> 111
[3797]	<212> PRT
[3798]	<213> 人工序列
[3799]	<220>
[3800]	<223> 合成构建体
[3801]	<220>
[3802]	<221> 变体
[3803]	<222> 60
[3804]	<223> Xaa = 任何氨基酸
[3805]	<400> 202
[3806]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[3807]	1 5 10 15
[3808]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Pro Ser Lys Arg Ile Ser Ala Tyr
[3809]	20 25 30
[3810]	Val Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
[3811]	35 40 45
[3812]	Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Cys Asn Leu Glu Xaa Gly Ile Pro Asp
[3813]	50 55 60
[3814]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[3815]	65 70 75 80
[3816]	Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[3817]	85 90 95
[3818]	Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[3819]	100 105 110
[3820]	<210> 203
[3821]	<211> 120

[3822]	<212> PRT															
[3823]	<213> 小家鼠															
[3824]	<400> 203															
[3825]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ser	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala
[3826]	1				5					10					15	
[3827]	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
[3828]				20					25					30		
[3829]	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[3830]				35				40					45			
[3831]	Gly	Asn	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Lys	Phe
[3832]		50					55					60				
[3833]	Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Gly	Thr	Ala	Tyr
[3834]	65					70					75				80	
[3835]	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[3836]					85					90				95		
[3837]	Thr	Arg	Gly	His	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
[3838]				100					105					110		
[3839]	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser								
[3840]				115					120							
[3841]	<210> 204															
[3842]	<211> 120															
[3843]	<212> PRT															
[3844]	<213> 人工序列															
[3845]	<220>															
[3846]	<223> 合成构建体															
[3847]	<400> 204															
[3848]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
[3849]	1				5					10					15	
[3850]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
[3851]				20					25					30		
[3852]	Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[3853]				35				40					45			
[3854]	Gly	Asn	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Lys	Phe
[3855]		50					55					60				
[3856]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
[3857]	65					70					75				80	
[3858]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[3859]					85					90				95		
[3860]	Thr	Arg	Gly	His	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln

[3861]	100	105	110
[3862]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[3863]	115	120	
[3864]	<210> 205		
[3865]	<211> 120		
[3866]	<212> PRT		
[3867]	<213> 人工序列		
[3868]	<220>		
[3869]	<223> 合成构建体		
[3870]	<400> 205		
[3871]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu		
[3872]	1 5 10 15		
[3873]	Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
[3874]	20 25 30		
[3875]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
[3876]	35 40 45		
[3877]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp Pro Ser Phe		
[3878]	50 55 60		
[3879]	Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
[3880]	65 70 75 80		
[3881]	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys		
[3882]	85 90 95		
[3883]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
[3884]	100 105 110		
[3885]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[3886]	115 120		
[3887]	<210> 206		
[3888]	<211> 120		
[3889]	<212> PRT		
[3890]	<213> 人工序列		
[3891]	<220>		
[3892]	<223> 合成构建体		
[3893]	<400> 206		
[3894]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[3895]	1 5 10 15		
[3896]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
[3897]	20 25 30		
[3898]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
[3899]	35 40 45		

[3900]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp Asp Ser Val
[3901]	50 55 60
[3902]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[3903]	65 70 75 80
[3904]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3905]	85 90 95
[3906]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[3907]	100 105 110
[3908]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3909]	115 120
[3910]	<210> 207
[3911]	<211> 120
[3912]	<212> PRT
[3913]	<213> 人工序列
[3914]	<220>
[3915]	<223> 合成构建体
[3916]	<400> 207
[3917]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[3918]	1 5 10 15
[3919]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[3920]	20 25 30
[3921]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[3922]	35 40 45
[3923]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp Asp Ser Val
[3924]	50 55 60
[3925]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[3926]	65 70 75 80
[3927]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3928]	85 90 95
[3929]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[3930]	100 105 110
[3931]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3932]	115 120
[3933]	<210> 208
[3934]	<211> 120
[3935]	<212> PRT
[3936]	<213> 人工序列
[3937]	<220>
[3938]	<223> 合成构建体

[3939]	<400> 208
[3940]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
[3941]	1 5 10 15
[3942]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[3943]	20 25 30
[3944]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[3945]	35 40 45
[3946]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp Asp Ser Val
[3947]	50 55 60
[3948]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[3949]	65 70 75 80
[3950]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3951]	85 90 95
[3952]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[3953]	100 105 110
[3954]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3955]	115 120
[3956]	<210> 209
[3957]	<211> 120
[3958]	<212> PRT
[3959]	<213> 人工序列
[3960]	<220>
[3961]	<223> 合成构建体
[3962]	<400> 209
[3963]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[3964]	1 5 10 15
[3965]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[3966]	20 25 30
[3967]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[3968]	35 40 45
[3969]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp Asp Ser Val
[3970]	50 55 60
[3971]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[3972]	65 70 75 80
[3973]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3974]	85 90 95
[3975]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[3976]	100 105 110
[3977]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[3978]	115	120
[3979]	<210> 210	
[3980]	<211> 120	
[3981]	<212> PRT	
[3982]	<213> 人工序列	
[3983]	<220>	
[3984]	<223> 合成构建体	
[3985]	<400> 210	
[3986]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
[3987]	1 5 10 15	
[3988]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
[3989]	20 25 30	
[3990]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[3991]	35 40 45	
[3992]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp Gln Lys Phe	
[3993]	50 55 60	
[3994]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[3995]	65 70 75 80	
[3996]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[3997]	85 90 95	
[3998]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln	
[3999]	100 105 110	
[4000]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[4001]	115 120	
[4002]	<210> 211	
[4003]	<211> 120	
[4004]	<212> PRT	
[4005]	<213> 人工序列	
[4006]	<220>	
[4007]	<223> 合成构建体	
[4008]	<400> 211	
[4009]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
[4010]	1 5 10 15	
[4011]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
[4012]	20 25 30	
[4013]	Trp Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
[4014]	35 40 45	
[4015]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu	
[4016]	50 55 60	

[4017]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
[4018]	65 70 75 80
[4019]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[4020]	85 90 95
[4021]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[4022]	100 105 110
[4023]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[4024]	115 120
[4025]	<210> 212
[4026]	<211> 120
[4027]	<212> PRT
[4028]	<213> 人工序列
[4029]	<220>
[4030]	<223> 合成构建体
[4031]	<400> 212
[4032]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[4033]	1 5 10 15
[4034]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[4035]	20 25 30
[4036]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[4037]	35 40 45
[4038]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp Ala Pro Val
[4039]	50 55 60
[4040]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[4041]	65 70 75 80
[4042]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[4043]	85 90 95
[4044]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[4045]	100 105 110
[4046]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[4047]	115 120
[4048]	<210> 213
[4049]	<211> 120
[4050]	<212> PRT
[4051]	<213> 人工序列
[4052]	<220>
[4053]	<223> 合成构建体
[4054]	<400> 213
[4055]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

[4056]	1	5	10	15
[4057]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
[4058]	20	25	30	
[4059]	Trp Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
[4060]	35	40	45	
[4061]	Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asp Pro Ser Leu			
[4062]	50	55	60	
[4063]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser			
[4064]	65	70	75	80
[4065]	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[4066]	85	90	95	
[4067]	Thr Arg Gly His Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln			
[4068]	100	105	110	
[4069]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[4070]	115	120		
[4071]	<210> 214			
[4072]	<211> 110			
[4073]	<212> PRT			
[4074]	<213> 人工序列			
[4075]	<220>			
[4076]	<223> 合成构建体			
[4077]	<400> 214			
[4078]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg			
[4079]	1	5	10	15
[4080]	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
[4081]	20	25	30	
[4082]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
[4083]	35	40	45	
[4084]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
[4085]	50	55	60	
[4086]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr			
[4087]	65	70	75	80
[4088]	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
[4089]	85	90	95	
[4090]	Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro			
[4091]	100	105	110	
[4092]	<210> 215			
[4093]	<211> 21			
[4094]	<212> PRT			

- [4095] <213> 人工序列
[4096] <220>
[4097] <223> 合成构建体
[4098] <400> 215
[4099] Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu
[4100] 1 5 10 15
[4101] Tyr Arg Asn Gly Lys
[4102] 20
[4103] <210> 216
[4104] <211> 20
[4105] <212> DNA
[4106] <213> 人工序列
[4107] <220>
[4108] <223> 合成构建体
[4109] <400> 216
[4110] gcactcacat cgctacatca 20
[4111] <210> 217
[4112] <211> 17
[4113] <212> DNA
[4114] <213> 人工序列
[4115] <220>
[4116] <223> 合成构建体
[4117] <400> 217
[4118] ctagagtgcc agggatg 17
[4119] <210> 218
[4120] <211> 21
[4121] <212> DNA
[4122] <213> 人工序列
[4123] <220>
[4124] <223> 合成构建体
[4125] <400> 218
[4126] ctccactcac ggcaaattca a 21
[4127] <210> 219
[4128] <211> 22
[4129] <212> DNA
[4130] <213> 人工序列
[4131] <220>
[4132] <223> 合成构建体
[4133] <400> 219

[4134] gatgacaagc ttccattct cg 22
[4135] <210> 220
[4136] <211> 21
[4137] <212> DNA
[4138] <213> 人工序列
[4139] <220>
[4140] <223> 合成构建体
[4141] <400> 220
[4142] ccgtcagccg atttgctatc t 21
[4143] <210> 221
[4144] <211> 22
[4145] <212> DNA
[4146] <213> 人工序列
[4147] <220>
[4148] <223> 合成构建体
[4149] <400> 221
[4150] acggcagaga ggaggttgac tt 22
[4151] <210> 222
[4152] <211> 22
[4153] <212> DNA
[4154] <213> 人工序列
[4155] <220>
[4156] <223> 合成构建体
[4157] <400> 222
[4158] acaacaaaaa agcctcgtgc tg 22
[4159] <210> 223
[4160] <211> 22
[4161] <212> DNA
[4162] <213> 人工序列
[4163] <220>
[4164] <223> 合成构建体
[4165] <400> 223
[4166] ccattgaggt ggagagcttt ca 22
[4167] <210> 224
[4168] <211> 22
[4169] <212> DNA
[4170] <213> 人工序列
[4171] <220>
[4172] <223> 合成构建体

[4173]	<400> 224
[4174]	ggcaaacc ca aggtctacgt tc 22
[4175]	<210> 225
[4176]	<211> 21
[4177]	<212> DNA
[4178]	<213> 人工序列
[4179]	<220>
[4180]	<223> 合成构建体
[4181]	<400> 225
[4182]	tacctcattg gccagctgct t 21
[4183]	<210> 226
[4184]	<211> 20
[4185]	<212> DNA
[4186]	<213> 人工序列
[4187]	<220>
[4188]	<223> 合成构建体
[4189]	<400> 226
[4190]	aggacctggg ttggaagtgg 20
[4191]	<210> 227
[4192]	<211> 20
[4193]	<212> DNA
[4194]	<213> 人工序列
[4195]	<220>
[4196]	<223> 合成构建体
[4197]	<400> 227
[4198]	agttggcatg gtagcccttg 20
[4199]	<210> 228
[4200]	<211> 12
[4201]	<212> PRT
[4202]	<213> 人工序列
[4203]	<220>
[4204]	<223> 合成构建体
[4205]	<400> 228
[4206]	Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu
[4207]	1 5 10
[4208]	<210> 229
[4209]	<211> 13
[4210]	<212> PRT
[4211]	<213> 人工序列

[4212] <220>
[4213] <223> 合成构建体
[4214] <400> 229
[4215] Met Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
[4216] 1 5 10
[4217] <210> 230
[4218] <211> 13
[4219] <212> PRT
[4220] <213> 人工序列
[4221] <220>
[4222] <223> 合成构建体
[4223] <400> 230
[4224] Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
[4225] 1 5 10
[4226] <210> 231
[4227] <211> 13
[4228] <212> PRT
[4229] <213> 人工序列
[4230] <220>
[4231] <223> 合成构建体
[4232] <400> 231
[4233] Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Leu His
[4234] 1 5 10
[4235] <210> 232
[4236] <211> 13
[4237] <212> PRT
[4238] <213> 人工序列
[4239] <220>
[4240] <223> 合成构建体
[4241] <400> 232
[4242] Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Cys Met Asn
[4243] 1 5 10
[4244] <210> 233
[4245] <211> 18
[4246] <212> PRT
[4247] <213> 人工序列
[4248] <220>
[4249] <223> 合成构建体
[4250] <400> 233

[4251]	Val Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Asn Tyr Val
[4252]	1 5 10 15
[4253]	Tyr Cys
[4254]	<210> 234
[4255]	<211> 23
[4256]	<212> PRT
[4257]	<213> 人工序列
[4258]	<220>
[4259]	<223> 合成构建体
[4260]	<400> 234
[4261]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[4262]	1 5 10 15
[4263]	Gln Arg Ala Thr Met Ser Cys
[4264]	20
[4265]	<210> 235
[4266]	<211> 22
[4267]	<212> PRT
[4268]	<213> 人工序列
[4269]	<220>
[4270]	<223> 合成构建体
[4271]	<400> 235
[4272]	Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
[4273]	1 5 10 15
[4274]	Ser Ala Lys Leu Thr Cys
[4275]	20
[4276]	<210> 236
[4277]	<211> 13
[4278]	<212> PRT
[4279]	<213> 人工序列
[4280]	<220>
[4281]	<223> 合成构建体
[4282]	<400> 236
[4283]	Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val
[4284]	1 5 10
[4285]	<210> 237
[4286]	<211> 32
[4287]	<212> PRT
[4288]	<213> 人工序列
[4289]	<220>

[4290]	<223>	合成构建体
[4291]	<400>	237
[4292]	Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr	
[4293]	1	5 10 15
[4294]	Leu Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys	
[4295]		20 25 30
[4296]	<210>	238
[4297]	<211>	10
[4298]	<212>	PRT
[4299]	<213>	人工序列
[4300]	<220>	
[4301]	<223>	合成构建体
[4302]	<400>	238
[4303]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu	
[4304]	1	5 10
[4305]	<210>	239
[4306]	<211>	22
[4307]	<212>	PRT
[4308]	<213>	人工序列
[4309]	<220>	
[4310]	<223>	合成构建体
[4311]	<400>	239
[4312]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
[4313]	1	5 10 15
[4314]	Ser Val Lys Ile Ser Cys	
[4315]		20
[4316]	<210>	240
[4317]	<211>	22
[4318]	<212>	PRT
[4319]	<213>	人工序列
[4320]	<220>	
[4321]	<223>	合成构建体
[4322]	<400>	240
[4323]	Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[4324]	1	5 10 15
[4325]	Ser Met Lys Leu Ser Cys	
[4326]		20
[4327]	<210>	241
[4328]	<211>	109

[4329] <212> PRT
 [4330] <213> 小家鼠
 [4331] <400> 241
 [4332] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 [4333] 1 5 10 15
 [4334] Gln Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 [4335] 20 25 30
 [4336] Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 [4337] 35 40 45
 [4338] Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
 [4339] 50 55 60
 [4340] Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val
 [4341] 65 70 75 80
 [4342] Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp Glu Ile
 [4343] 85 90 95
 [4344] Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 [4345] 100 105
 [4346] <210> 242
 [4347] <211> 115
 [4348] <212> PRT
 [4349] <213> 小家鼠
 [4350] <400> 242
 [4351] Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
 [4352] 1 5 10 15
 [4353] Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 [4354] 20 25 30
 [4355] Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met
 [4356] 35 40 45
 [4357] Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 [4358] 50 55 60
 [4359] Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser
 [4360] 65 70 75 80
 [4361] Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
 [4362] 85 90 95
 [4363] Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 [4364] 100 105 110
 [4365] Thr Val Leu
 [4366] 115
 [4367] <210> 243

[4368]	<211>	109
[4369]	<212>	PRT
[4370]	<213>	小家鼠
[4371]	<400>	243
[4372]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
[4373]	1 5 10 15	
[4374]	Gln Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser	
[4375]	20 25 30	
[4376]	Thr Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
[4377]	35 40 45	
[4378]	Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe	
[4379]	50 55 60	
[4380]	Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val	
[4381]	65 70 75 80	
[4382]	Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp Glu Ile	
[4383]	85 90 95	
[4384]	Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
[4385]	100 105	
[4386]	<210>	244
[4387]	<211>	117
[4388]	<212>	PRT
[4389]	<213>	小家鼠
[4390]	<400>	244
[4391]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
[4392]	1 5 10 15	
[4393]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
[4394]	20 25 30	
[4395]	Asn Leu His Trp Val Lys Leu Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile	
[4396]	35 40 45	
[4397]	Gly Phe Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe	
[4398]	50 55 60	
[4399]	Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[4400]	65 70 75 80	
[4401]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
[4402]	85 90 95	
[4403]	Ala Arg Ser Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr	
[4404]	100 105 110	
[4405]	Leu Thr Val Ser Ser	
[4406]	115	

[4407]	<210>	245
[4408]	<211>	120
[4409]	<212>	PRT
[4410]	<213>	小家鼠
[4411]	<400>	245
[4412]	Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[4413]	1	5 10 15
[4414]	Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	
[4415]	20	25 30
[4416]	Cys Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[4417]	35	40 45
[4418]	Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Val Thr Asn Tyr Val Tyr	
[4419]	50	55 60
[4420]	Cys Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys	
[4421]	65	70 75 80
[4422]	Ser Arg Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Thr Gly	
[4423]	85	90 95
[4424]	Phe Tyr Thr Arg Asp Gly Tyr Tyr Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln	
[4425]	100	105 110
[4426]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
[4427]	115	120
[4428]	<210>	246
[4429]	<211>	117
[4430]	<212>	PRT
[4431]	<213>	小家鼠
[4432]	<400>	246
[4433]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
[4434]	1	5 10 15
[4435]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
[4436]	20	25 30
[4437]	Asn Leu His Trp Val Lys Leu Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile	
[4438]	35	40 45
[4439]	Gly Phe Ile Tyr Pro Ser Asn Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe	
[4440]	50	55 60
[4441]	Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[4442]	65	70 75 80
[4443]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
[4444]	85	90 95
[4445]	Ala Arg Ser Thr Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr	

[4446]	100	105	110
[4447]	Leu Thr Val Ser Ser		
[4448]	115		
[4449]	<210> 247		
[4450]	<211> 19		
[4451]	<212> PRT		
[4452]	<213> 人工序列		
[4453]	<220>		
[4454]	<223> 合成构建体		
[4455]	<220>		
[4456]	<221> 变体		
[4457]	<222> 1		
[4458]	<223> Xaa = Asp或Glu		
[4459]	<220>		
[4460]	<221> 变体		
[4461]	<222> 2, 3		
[4462]	<223> Xaa = 任何氨基酸并且它们中的多至2个可存在或不		
[4463]	<220>		
[4464]	<221> 变体		
[4465]	<222> 5, 6		
[4466]	<223> Xaa = 任何氨基酸		
[4467]	<220>		
[4468]	<221> 变体		
[4469]	<222> 7		
[4470]	<223> Xaa = Leu或Ile		
[4471]	<220>		
[4472]	<221> 变体		
[4473]	<222> 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		
[4474]	<223> Xaa = 任何氨基酸并且它们中的多至2个可存在或不		
[4475]	<220>		
[4476]	<221> 变体		
[4477]	<222> 17, 18		
[4478]	<223> Xaa = 任何氨基酸		
[4479]	<220>		
[4480]	<221> 变体		
[4481]	<222> 19		
[4482]	<223> Xaa = Leu或Ile		
[4483]	<400> 247		
[4484]	Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr		

[4485]	1	5	10	15
[4486]	Xaa Xaa Xaa			
[4487]	<210> 248			
[4488]	<211> 446			
[4489]	<212> PRT			
[4490]	<213> 人工序列			
[4491]	<220>			
[4492]	<223> 合成构建体			
[4493]	<400> 248			
[4494]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
[4495]	1	5	10	15
[4496]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asp Ser			
[4497]	20 25 30			
[4498]	Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile			
[4499]	35 40 45			
[4500]	Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe			
[4501]	50 55 60			
[4502]	Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Pro Thr Asn Thr Ala Tyr			
[4503]	65 70 75 80			
[4504]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys			
[4505]	85 90 95			
[4506]	Val Asn Gly Asn Pro Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
[4507]	100 105 110			
[4508]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala			
[4509]	115 120 125			
[4510]	Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
[4511]	130 135 140			
[4512]	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
[4513]	145 150 155 160			
[4514]	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
[4515]	165 170 175			
[4516]	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
[4517]	180 185 190			
[4518]	Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
[4519]	195 200 205			
[4520]	Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
[4521]	210 215 220			
[4522]	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe			
[4523]	225 230 235 240			

[4524]	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
[4525]		245	250 255
[4526]	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
[4527]		260	265 270
[4528]	Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
[4529]		275	280 285
[4530]	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
[4531]		290	295 300
[4532]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
[4533]	305	310	315 320
[4534]	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
[4535]		325	330 335
[4536]	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
[4537]		340	345 350
[4538]	Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
[4539]		355	360 365
[4540]	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
[4541]		370	375 380
[4542]	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
[4543]	385	390	395 400
[4544]	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
[4545]		405	410 415
[4546]	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
[4547]		420	425 430
[4548]	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[4549]		435	440 445
[4550]	<210>	249	
[4551]	<211>	163	
[4552]	<212>	PRT	
[4553]	<213>	人工序列	
[4554]	<220>		
[4555]	<223>	合成构建体	
[4556]	<400>	249	
[4557]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[4558]	1	5	10 15
[4559]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Leu Asp Asn Tyr		
[4560]		20	25 30
[4561]	Gly Ile Arg Phe Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro		
[4562]		35	40 45

[4563]	Lys	Leu	Leu	Met	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
[4564]	50						55					60				
[4565]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
[4566]	65					70					75				80	
[4567]	Ser	Leu	Gln	Pro	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Lys
[4568]					85					90					95	
[4569]	Glu	Val	Pro	Trp	Ser	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Val	Lys	Arg
[4570]				100					105						110	
[4571]	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
[4572]			115					120					125			
[4573]	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
[4574]	130						135					140				
[4575]	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
[4576]	145					150					155				160	
[4577]	Gly	Asn	Ser													
[4578]	<210>	250														
[4579]	<211>	446														
[4580]	<212>	PRT														
[4581]	<213>	人工序列														
[4582]	<220>															
[4583]	<223>	合成构建体														
[4584]	<400>	250														
[4585]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
[4586]	1			5					10					15		
[4587]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
[4588]			20					25					30			
[4589]	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[4590]		35					40					45				
[4591]	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
[4592]	50						55					60				
[4593]	Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr
[4594]	65					70					75				80	
[4595]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[4596]				85					90					95		
[4597]	Ala	Arg	Gly	Arg	Pro	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
[4598]			100						105					110		
[4599]	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
[4600]			115						120				125			
[4601]	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu

[4602]	130	135	140
[4603]	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
[4604]	145	150	155
[4605]	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
[4606]	165	170	175
[4607]	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
[4608]	180	185	190
[4609]	Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
[4610]	195	200	205
[4611]	Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
[4612]	210	215	220
[4613]	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe		
[4614]	225	230	235
[4615]	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
[4616]	245	250	255
[4617]	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
[4618]	260	265	270
[4619]	Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
[4620]	275	280	285
[4621]	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val		
[4622]	290	295	300
[4623]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
[4624]	305	310	315
[4625]	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
[4626]	325	330	335
[4627]	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
[4628]	340	345	350
[4629]	Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
[4630]	355	360	365
[4631]	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
[4632]	370	375	380
[4633]	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
[4634]	385	390	395
[4635]	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
[4636]	405	410	415
[4637]	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
[4638]	420	425	430
[4639]	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[4640]	435	440	445

[4641]	<210>	251
[4642]	<211>	163
[4643]	<212>	PRT
[4644]	<213>	人工序列
[4645]	<220>	
[4646]	<223>	合成构建体
[4647]	<400>	251
[4648]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[4649]	1 5 10 15	
[4650]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr	
[4651]	20 25 30	
[4652]	Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
[4653]	35 40 45	
[4654]	Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser	
[4655]	50 55 60	
[4656]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
[4657]	65 70 75 80	
[4658]	Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys	
[4659]	85 90 95	
[4660]	Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	
[4661]	100 105 110	
[4662]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln	
[4663]	115 120 125	
[4664]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr	
[4665]	130 135 140	
[4666]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser	
[4667]	145 150 155 160	
[4668]	Gly Asn Ser	

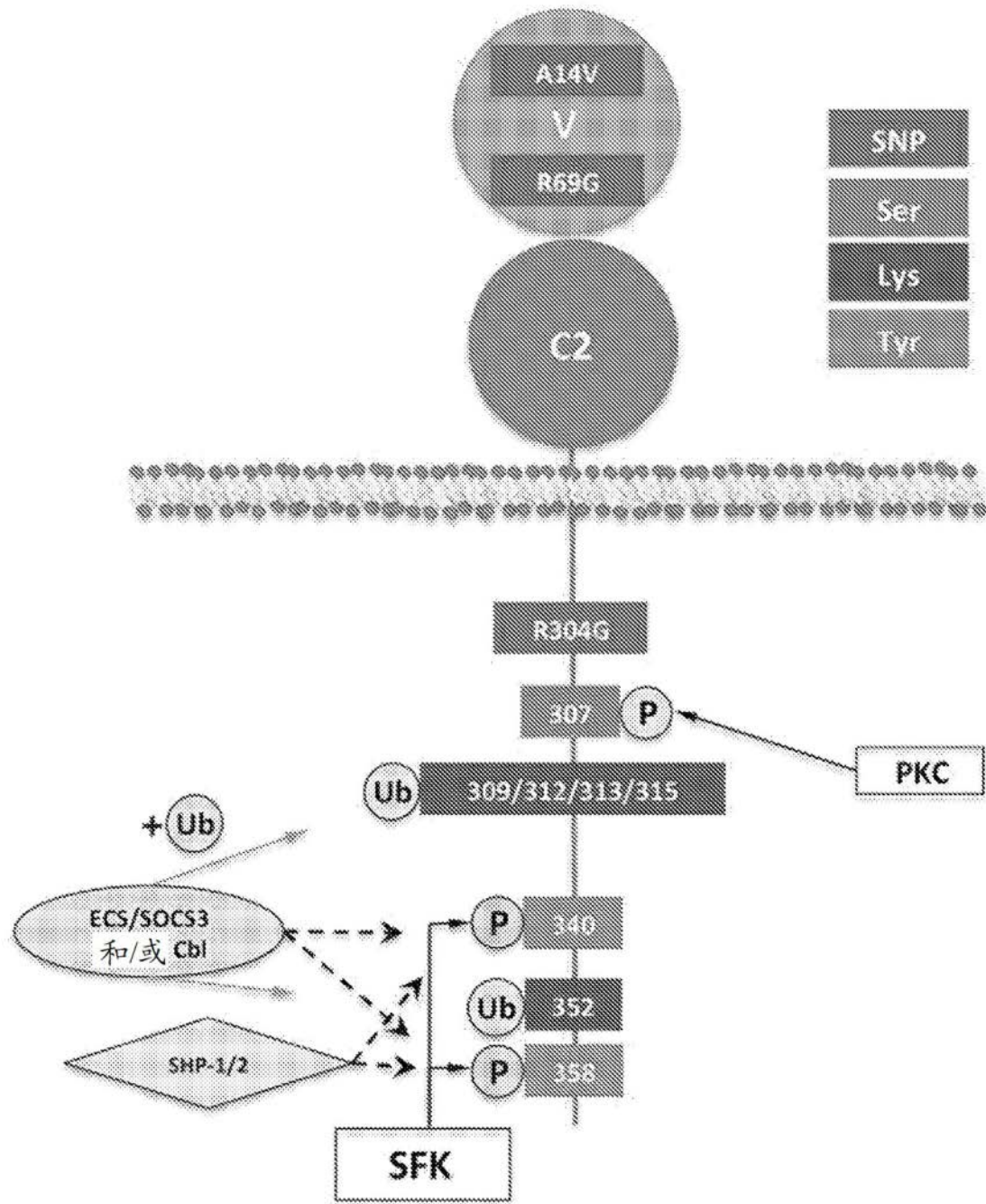


图1

人 CD33	---MPLLLLLLPLWAG-----ALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVL
小鼠 CD33	---MLWPLPLFLLCAG-----SLAQDLEFQLVAPESVTVEEGLCVH
大鼠 CD33	---MLWIVLLLLLLCTD-----SLVQDLEFQLVAPKSVTVEEALCVH
黑猩猩 CD33	---MPLLLLLLPLWAG-----ALAMDPKIRLQVQESVTVQEGLCVL
恒河猴 CD33	-----MLLLLLLPILWAVEWAQGGKVKLGASADAGVPRSLAQDPIYWLQIQESLTVQEGLCIS
狗 CD33	MLPLLLLLPLLLPLWAA-----TLAQDPNYWLKAPWSVSVQEGLCVR
牛 CD33	---MLQTLFLFILAVNKMTN-----CEDS---QPGGLNDDFFISVKENVTGEEGLCIR
斑马鱼 CD33	
人 CD33	VPCTFFHPIPYDKNSPVHGWFREGAII SRDSPVATNKLQEVQEETQGRFRLLGDPQR
小鼠 CD33	VPCSVFYPSI-KLTGLPVTGSLWRKGVSLHEDSPVATSDPRQLVQKATQGRFQLLGDPQK
大鼠 CD33	VPCSVSYPSI-RPTFGPVTGYWLLKGTSLHEDSPVATNDPRQLVQKATQGRFQLLGDPQK
黑猩猩 CD33	VPCTFFHPIPYDKNSPVHGWFREGPIVSGDSPVATNKPQEVQEETQGRFRLLGDLRS
恒河猴 CD33	-----VPCYFSYPMEYWKTYALGYWFRNGTNVHWGAPVATNNDPRKVQEETQGGQFLLGDPQA
狗 CD33	VPCSVYYPSPDFRSGSTPVHGFWRREGAEVLKDAFVATNKLDRQAQKETQGRFHLGDPDRD
牛 CD33	EQCAFRVPQN---LSEPIKKSFWFKEDSENA-----TAKVQF-----YHKAESPIW
斑马鱼 CD33	
人 CD33	NNCSLSIVDAR-RRDNGSYFFRMERGS-TKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLPEG
小鼠 CD33	HDCSLFIRDAQ-KNDTGMYYFRVREPFVRYSYKKSQSLHVTSLSRTPDIIIPGTLLEAG
大鼠 CD33	HDCSLIRDAQ-KNDTGVYFRVREPFVRYSYRANQLLLHVTPLSRTPDIIIPETLRAG
黑猩猩 CD33	NNCSLSIVDAR-RRDNGSYFFRMERGS-TKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGALDPG
恒河猴 CD33	-----MPLLLLLLPLWADLTHRPQILIPGALDPD
狗 CD33	NNCSLEIRDAQ-RRDSGTYYFRVERGPYLYKSYLQNLQSVHVTALHTPDILTPGTLESG
牛 CD33	NNCSLEIRDAR-KSDRGSYFFRMEKGS-MKWSYLSLSEFFLNVTAFTHQPHLLSPGDLEPG
斑马鱼 CD33	KECSFMLNPLVLGESDGEYRLKLEWGQGN-VHIFPQTVKITVKELTQKPKINVR-LTIG
	. : : : * : * *
人 CD33	HSKNLTCSVSWACEQGTTPPIFSWLSA--APTSLGPR-----TTHSSVLIITPRPDHGTN
小鼠 CD33	YPSNLTCVSPWACEQGTTPPTFSWMST--ALTSLSR-----TTDSSVLTFTPQPDHGTK
大鼠 CD33	HPSNLSCVSPWACEQGTTPPTFSWMSD--ALTSLSR-----TTNSSVLTLTTPRQPDHGTK
黑猩猩 CD33	HSKNLTCSVSWACEQGTTPPIFSWLSA--APTSLGPR-----TTHSSVLIITPRPDHGTN
恒河猴 CD33	HSKNLTCSVSPWACEQGTTPPIFSWMSA--APTSLGLR-----TTHSSVLIITPRPDHGTN
狗 CD33	HPRNLTCVSPWACEQGTTPPIFSWMSA--ALTSLGPR-----THLSSVLTLTTPRQPDHGTN
牛 CD33	HPGNMTCSVPWACERAMPPIFSWTS--APSSLGPR-----TPFSSVLTLTTPRQPDHGTN
斑马鱼 CD33	QKAEISCIPTIKCLVP-KLRFATWGIEGKESTLGPRGVPGWNEFTSIFRHPKPKDHNTK
	::* . * ** . :*, * . : : : * : : * *
人 CD33	LTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSBK--QETRAGVVHGAIGGAGV
小鼠 CD33	LTCLVTFSGAGVTVERTIQLNVTTRKSGQMR-----ELVLVAVGEAT-
大鼠 CD33	LTCLVTFSGAGVTVERTIRLNVTWKSDQMR-----QVVLVAVGEAA-
黑猩猩 CD33	LTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSBK--QETRAGVVHGAIGGAGI
恒河猴 CD33	LTCQVKFPGAGVTTERTIQLNVSYASQNPRTDIFLGDGSBK--Q---GVVQGAIGGAGV
狗 CD33	LTCQVQFPVAVGVMVERTIQLNVTCTQNPTNGVCLEHSTGK--PGTRSGVTGGAIGGAGV
牛 CD33	LTCQVKFPRSGVMVERTILLNVTYASRNPG-NICTGDGTGE--SGTGAGVTEGAIAGAGV
斑马鱼 CD33	LTCKIIVQD-RIQTEAAVTLEVRYAPEILNSSRCVMWGDELSCMCISSGVPLPLIQWPTL
	*** : . : . * : : * * :

图2

人CD33	TALLALCLCLIFFIVKTHRRKAART---AVGRNDTHPTGSPKPH-QKK---SKLHGP-
小鼠CD33	VKLLILGLCLVFLIVMFCRRKTTKL---SVHMGCEPIKRQEAITSYNHC---LSPTASD
大鼠CD33	VKLLILGLCLTLLSVVICRRKATKL---SVHMCENPTQAHFQDSKVHSHAENSRPLRKD
黑猩猩CD33	TALLALCLCLIFFIVKTHRRKAART---AVGRNDTHPTGSPKPH-QKK---SKLHGP-
恒河猴CD33	TVLLALCLCLIFFIVKTHRRKAART---AVGRNDTHPTGSPKPH-QKK---SKLHGP-
狗CD33	TMLLTCLCLIFFIVKTHRRKAART---AVGRNDTHPTGSPKPH-QKK---SKLHGP-
牛CD33	TMLLVLCFGLIFFVVKIYRKKVAKT---AVDMEDIYSAAEPASLDH-QQE---SKSEES-
斑马鱼CD33	DDPTNYCSTYRKNTIIICNISISGIRNVKDTIECIAENVIATTSMQIQVHNQTETPKAN-
	: . . :
人CD33	TETSSCSGA-----APTVMDEELH--YASLNFHGMN----P-----SKDT
小鼠CD33	AVTPGCSIHRLISRTPRCTAILRIQDPYR--RTHLRNRAVS---T-----L---
大鼠CD33	LPXEQSSIXTXI-----PLN-----FMGAK---S-----Q---
黑猩猩CD33	TETSSYSGA-----APTVMDEELH--YASLNFHGMN----P-----SKDT
恒河猴CD33	TETSGCSGT-----TLTVEMDEELH--YASLNFHGMN----P-----SED
狗CD33	---TSSAEV-----PSTSEMEQELY--YASISFHRRT-----EST
牛CD33	SDPTNYAGT-----TPSLELEQELH--YSSIIFRGEK---P-----QESP
斑马鱼CD33	---LGLSMS---WIFCTLSVVLNIIFGSCTVVLCFNRNRKNREKPKDQDVHVMYMTSLKRE
	:
人CD33	STEYSEVRTQ-----
小鼠CD33	--RFPWISWEGSLRSTQRSKCTKLCSPVKNLCPLWLVPDNSCIPLIPEWVMLLCVSLTLS
大鼠CD33	--EYPEI-----
黑猩猩CD33	STEYSEVRTQ-----
恒河猴CD33	STEYSEVRTQ-----
狗CD33	CAEYSEIRTQ-----
牛CD33	HSEYAEIRIK-----
斑马鱼CD33	ESVYETIKV-----
	: :

图2(续)

寡糖	R1	R2	R3	人唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素进行的相对识别										
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
N-聚糖 O-聚糖 糖脂	+		+	-	++	++	-	-	-	-	-	+	+	-
	+	+	+	++	-	+	+	++	-	-	+	++	++	+
◆ α 6○ β 4■ β -R1				+	-	+	-	-	-	++	+	+	-	++
◆ α 3○ β 4■ β -R1				++	-	+	+	++	-	-	+	++	++	+
◆ α 8◆ α 3○ β 4■ β -R1				+	-	+	-	-	-	++	+	+	-	++
◆ α 3○ β 3■ β -R1				++	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
◆ α 3○ β 4■ β -R1 α 3▲				+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
◆ α 3○ β 3□ β -R2/ α -R3				+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
◆ α 3○ β 3□ β -R2/ α -R3 α 6◆				?	?	?	++	-	-	+	-	+	?	?
□ β -R2/ α -R3 α 6◆				+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-

图3

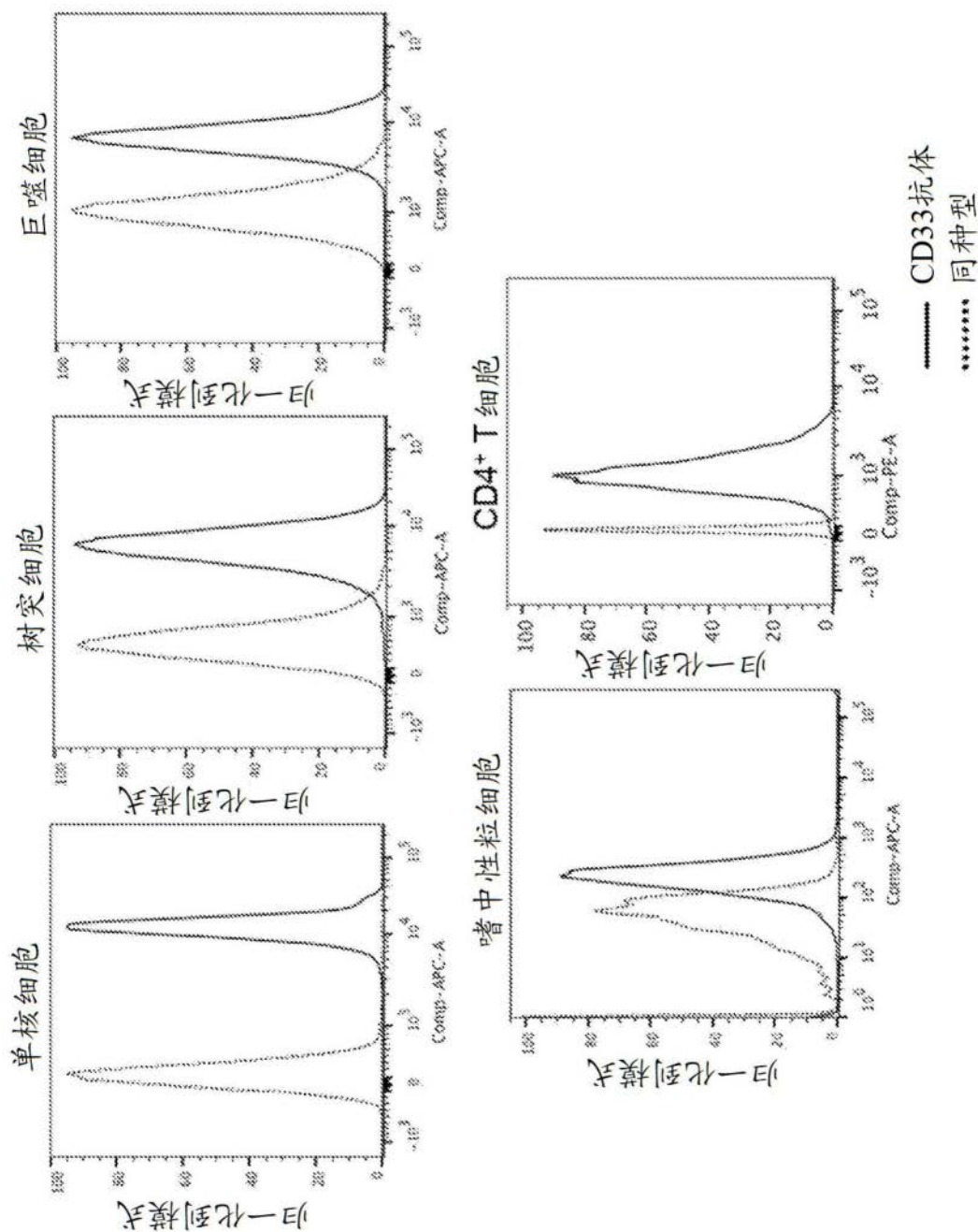


图5A

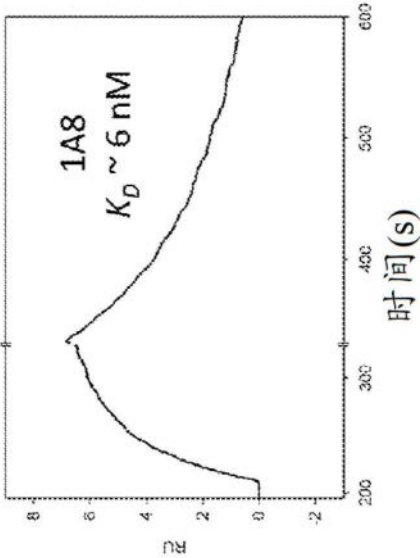


图5B

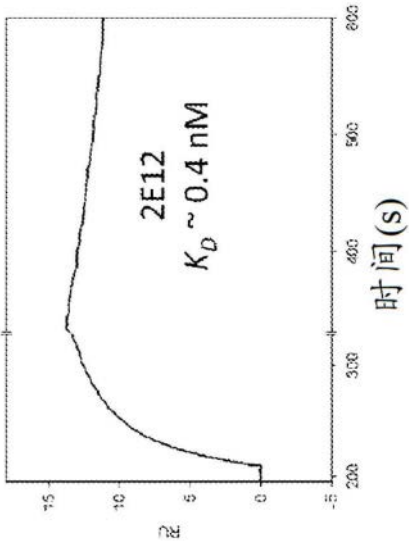


图5C

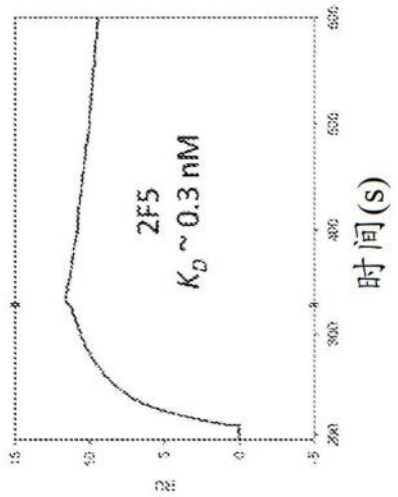


图5D

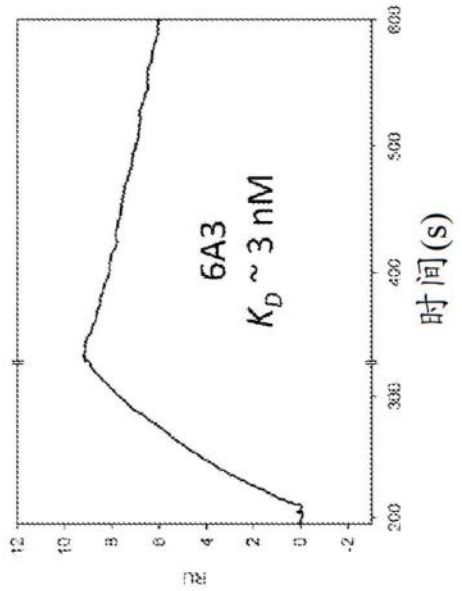


图5E

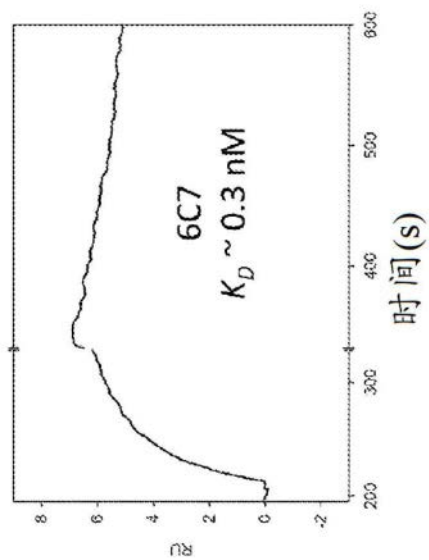


图5F

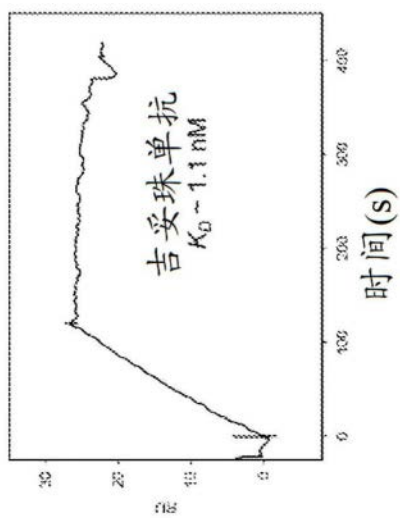


图5G

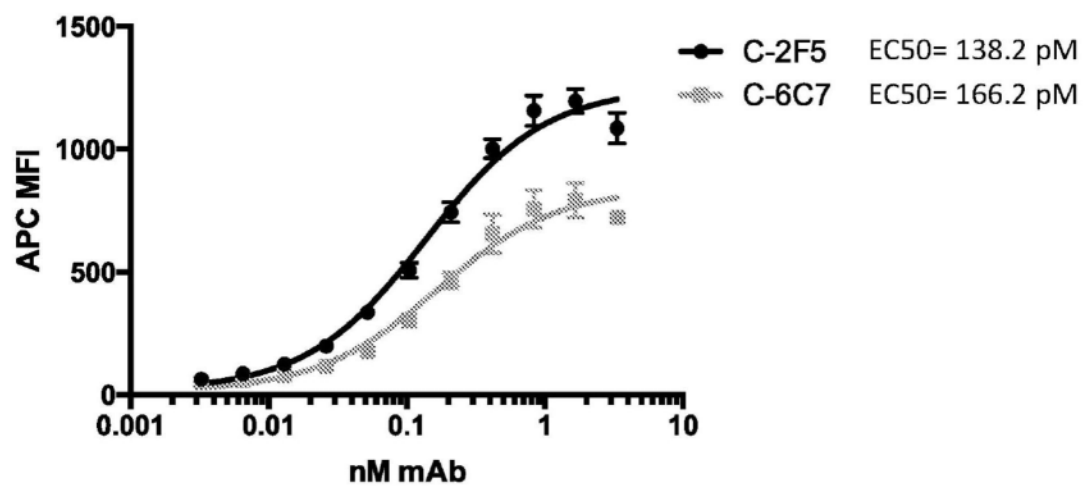


图5H

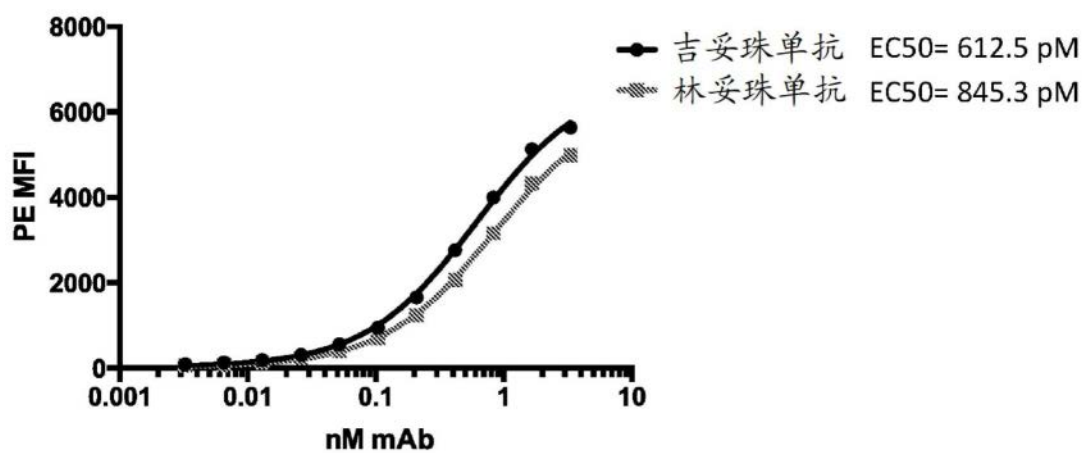


图5I

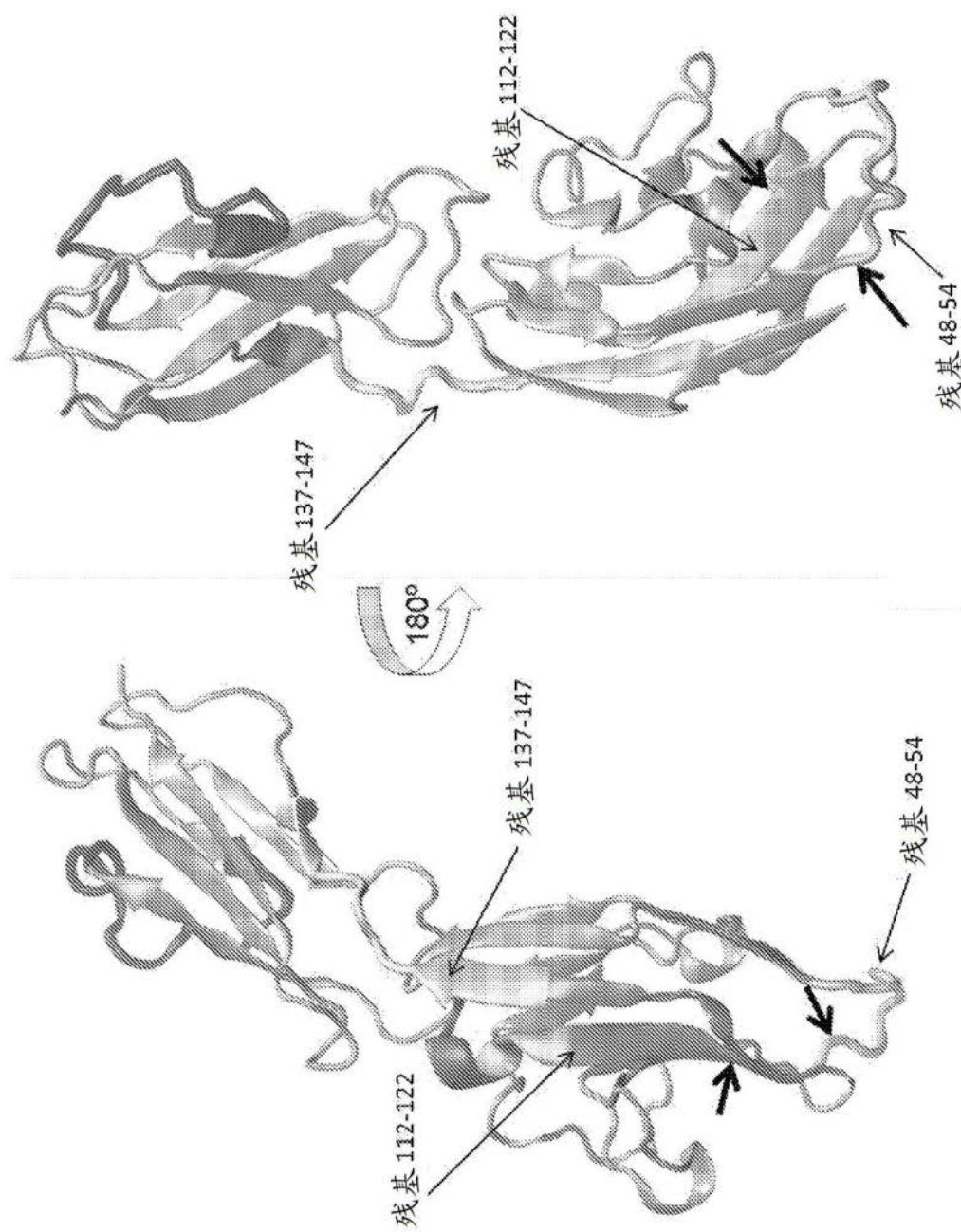


图6A

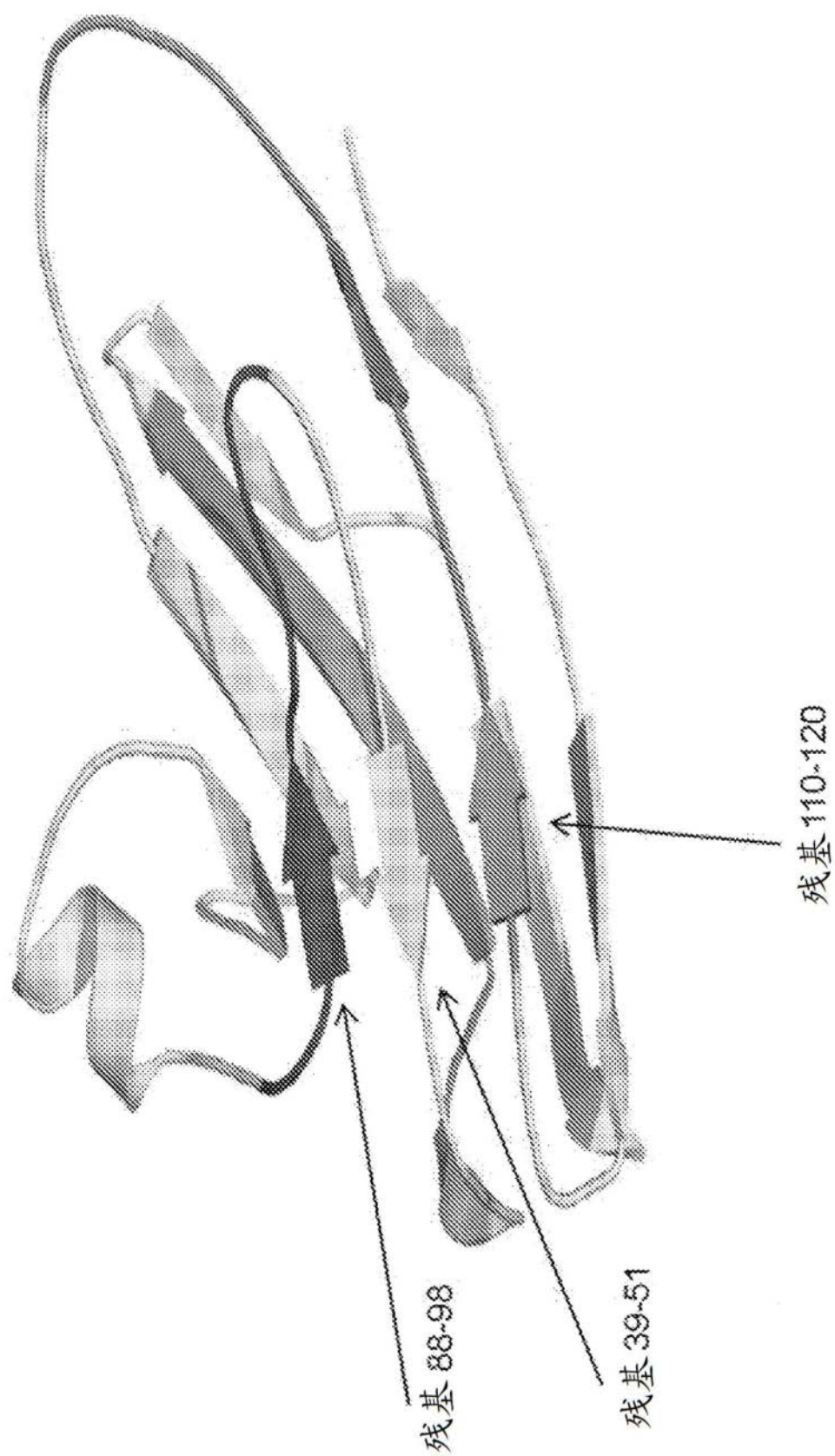


图6B

结合反应性(% WT)					
突变	C-2E12 Fab pH9	C-2F5 Fab	C-6A3 Fab	C-6C7 Fab	WM53 MAb
D18A	103.3 (3)	79.5 (1)	2.6 (5)	96.1 (24)	98.0 (6)
P19A	95.8 (5)	102.4 (52)	46.9 (22)	105.3 (3)	116.1 (7)
N20A	95.1 (14)	111.4 (23)	2.1 (1)	115.0 (17)	166.2 (88)
F21A	70.1 (8)	122.0 (37)	1.5 (0)	97.2 (32)	137.1 (3)
F44A	93.8 (19)	102.1 (11)	51.4 (3)	112.3 (4)	76.5 (12)
P46A	78.2 (2)	104.8 (8)	19.9 (4)	120.5 (17)	152.2 (35)
Y49A	23.6 (5)	20.6 (2)	113.3 (4)	16.5 (24)	1.7 (8)
Y50A	45.4 (11)	32.7 (0)	105.7 (13)	41.6 (29)	75.1 (0)
K52A	11.4 (4)	8.9 (2)	100.4 (24)	33.6 (3)	12.4 (6)
N53A	79.5 (22)	78.2 (44)	136.8 (11)	12.2 (3)	164.5 (9)

图6C

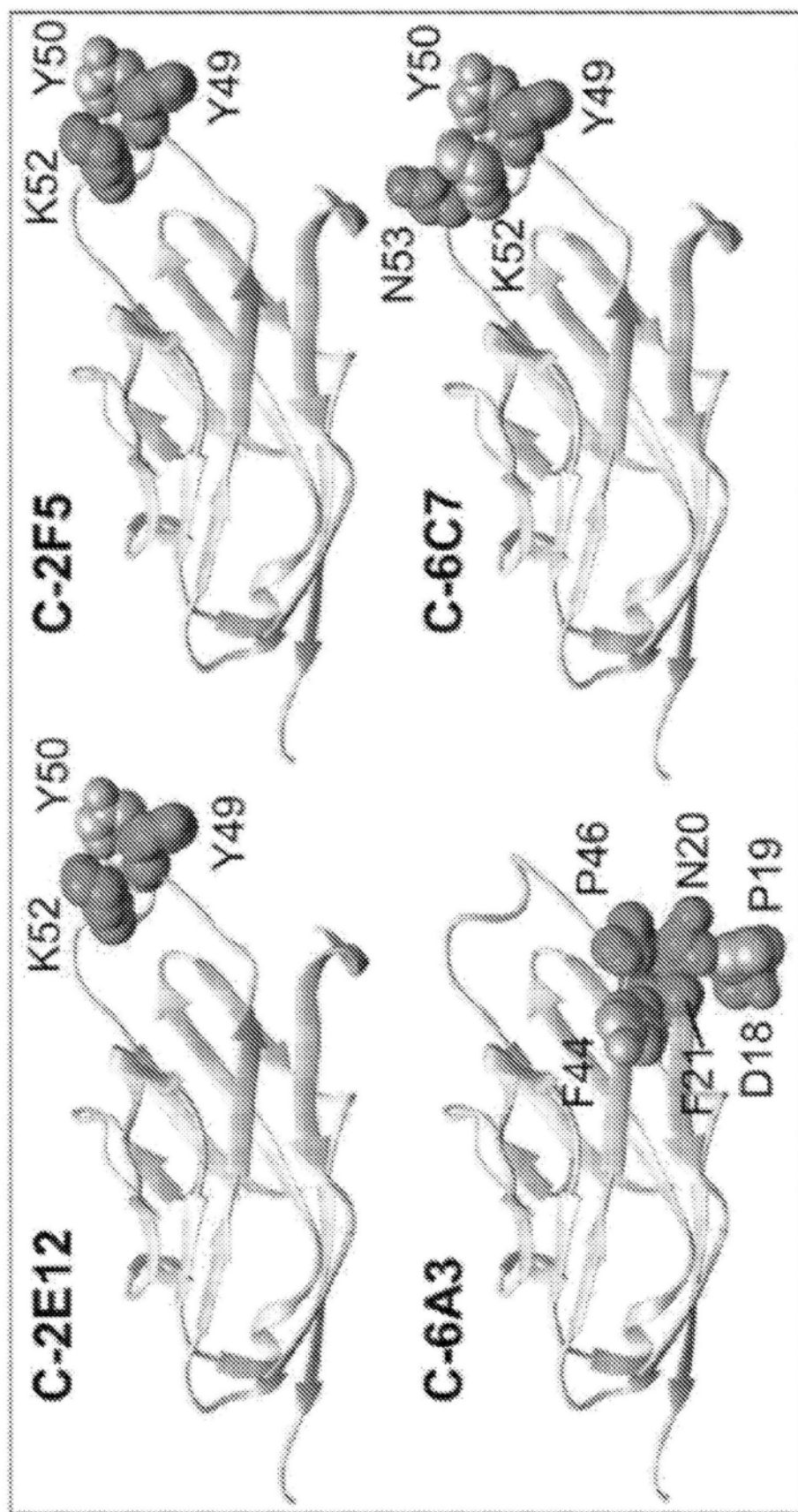


图6D

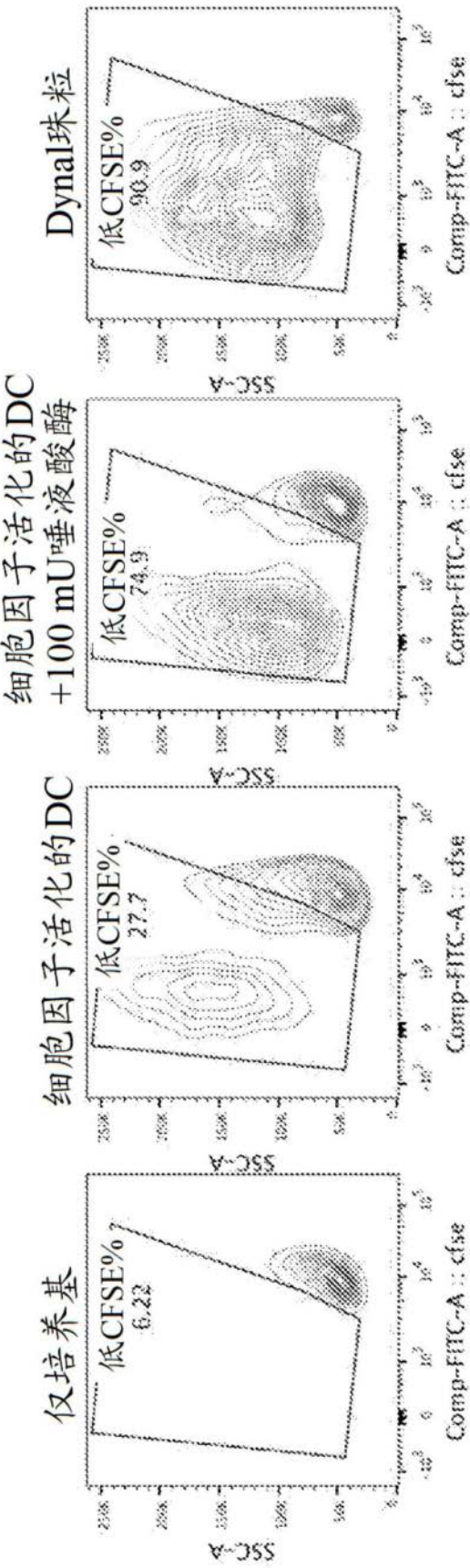


图7

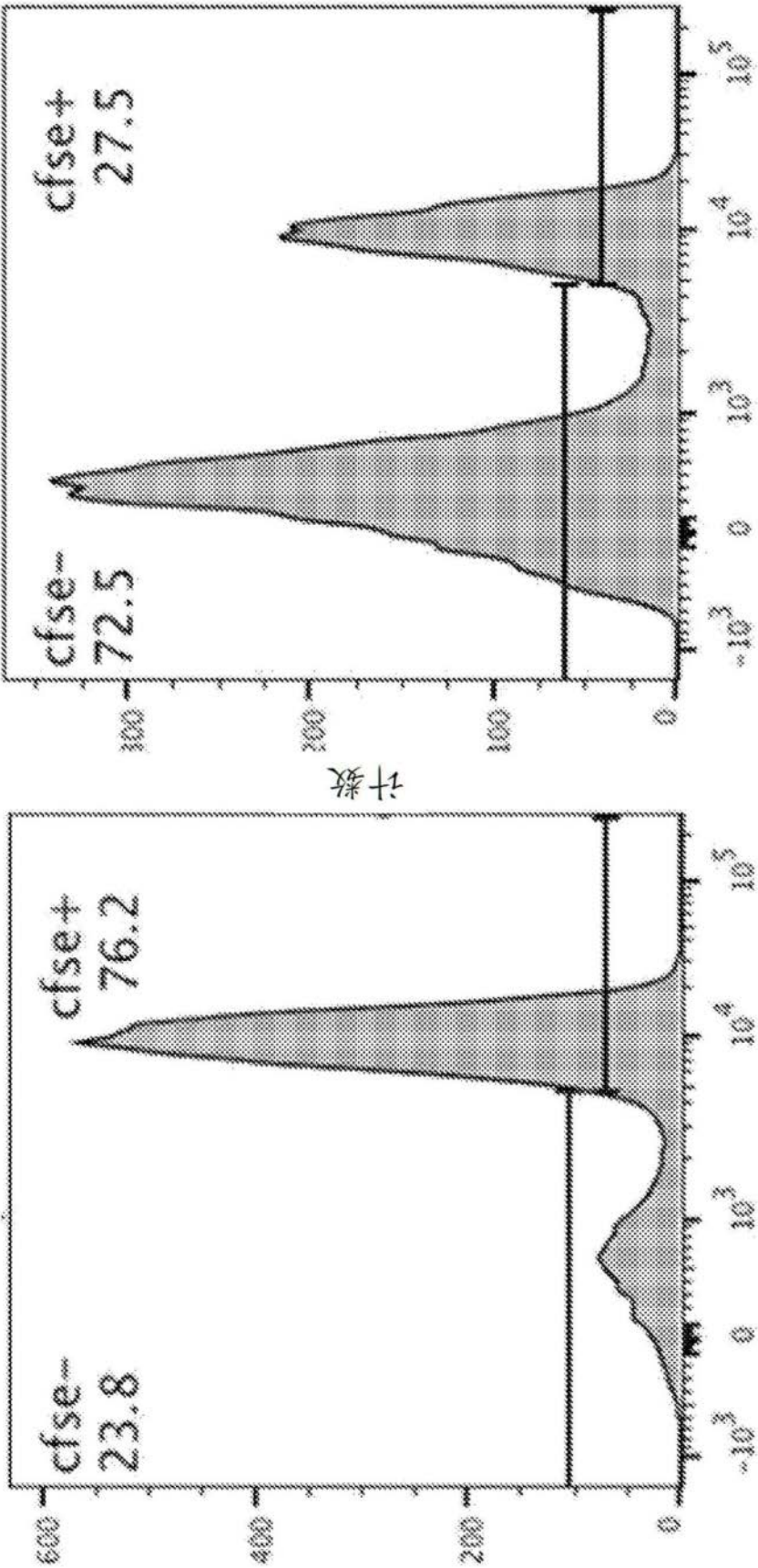


图8

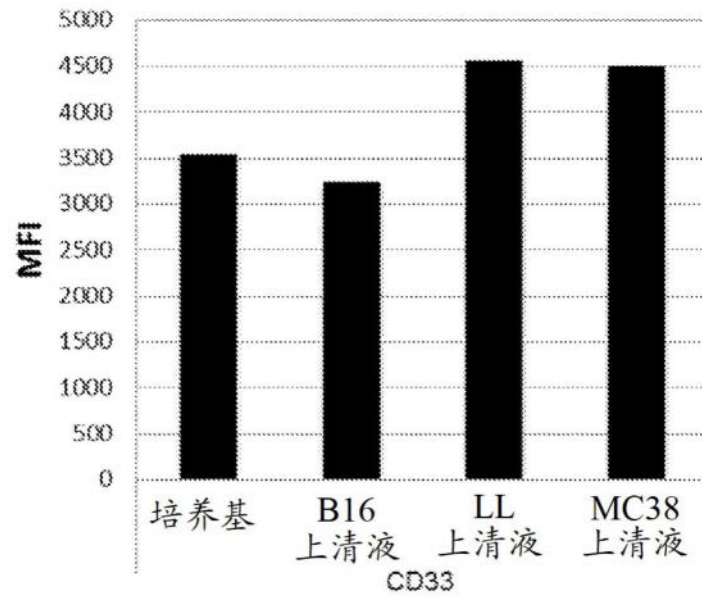


图9A

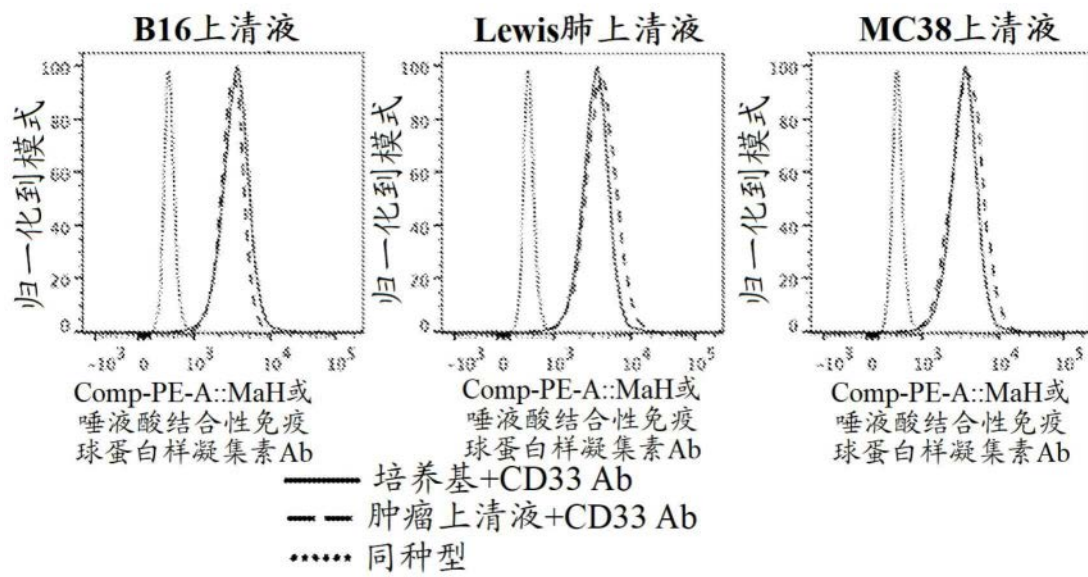


图9B

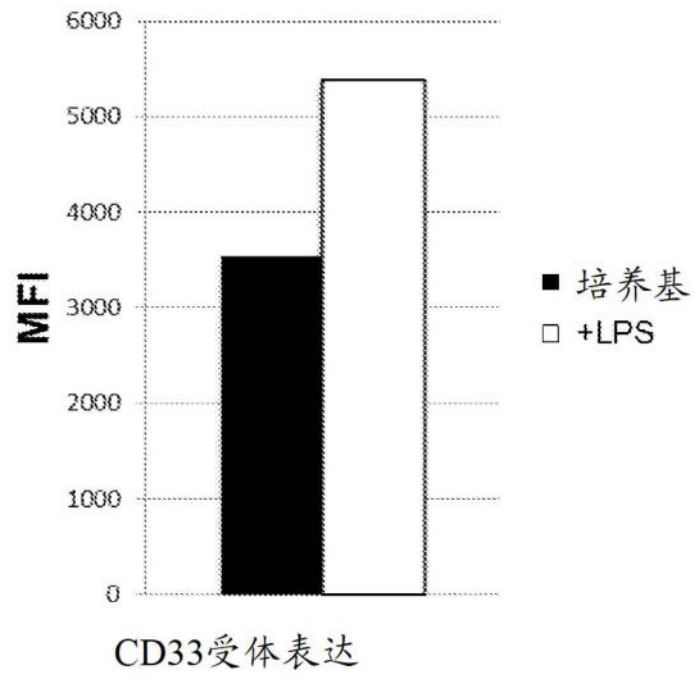


图9C

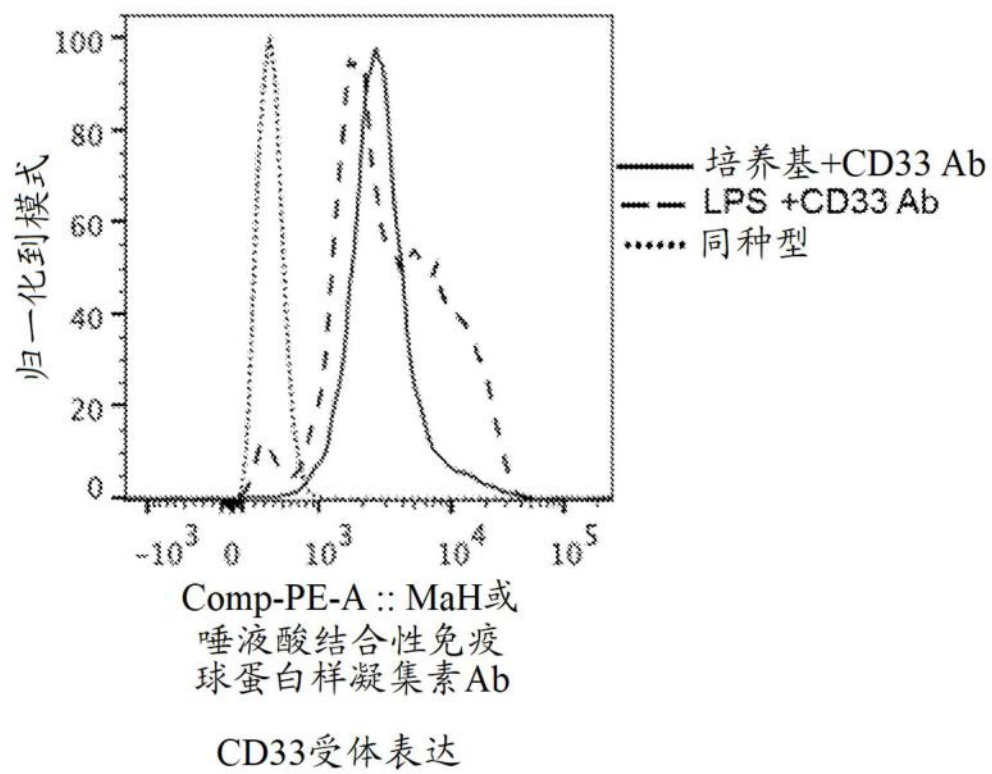


图9D

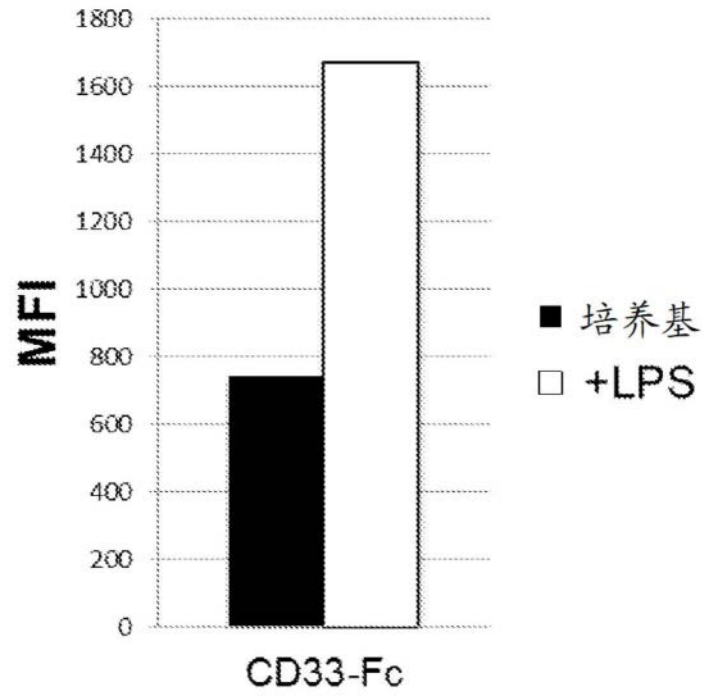


图9E

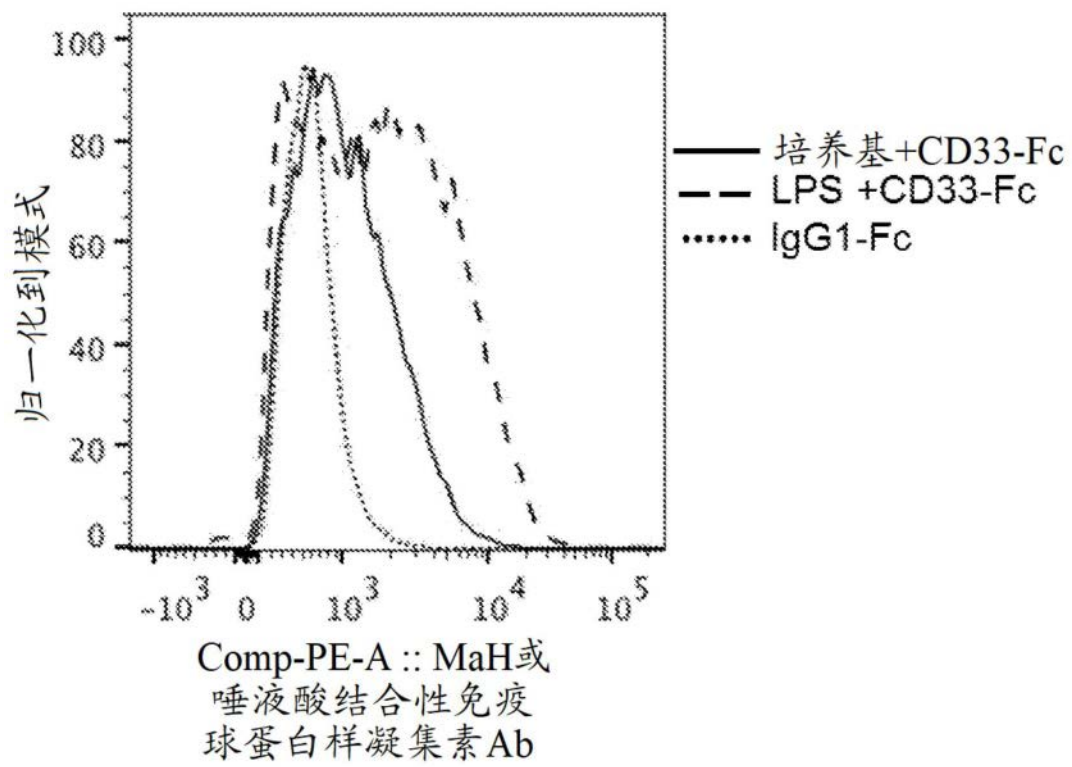


图9F

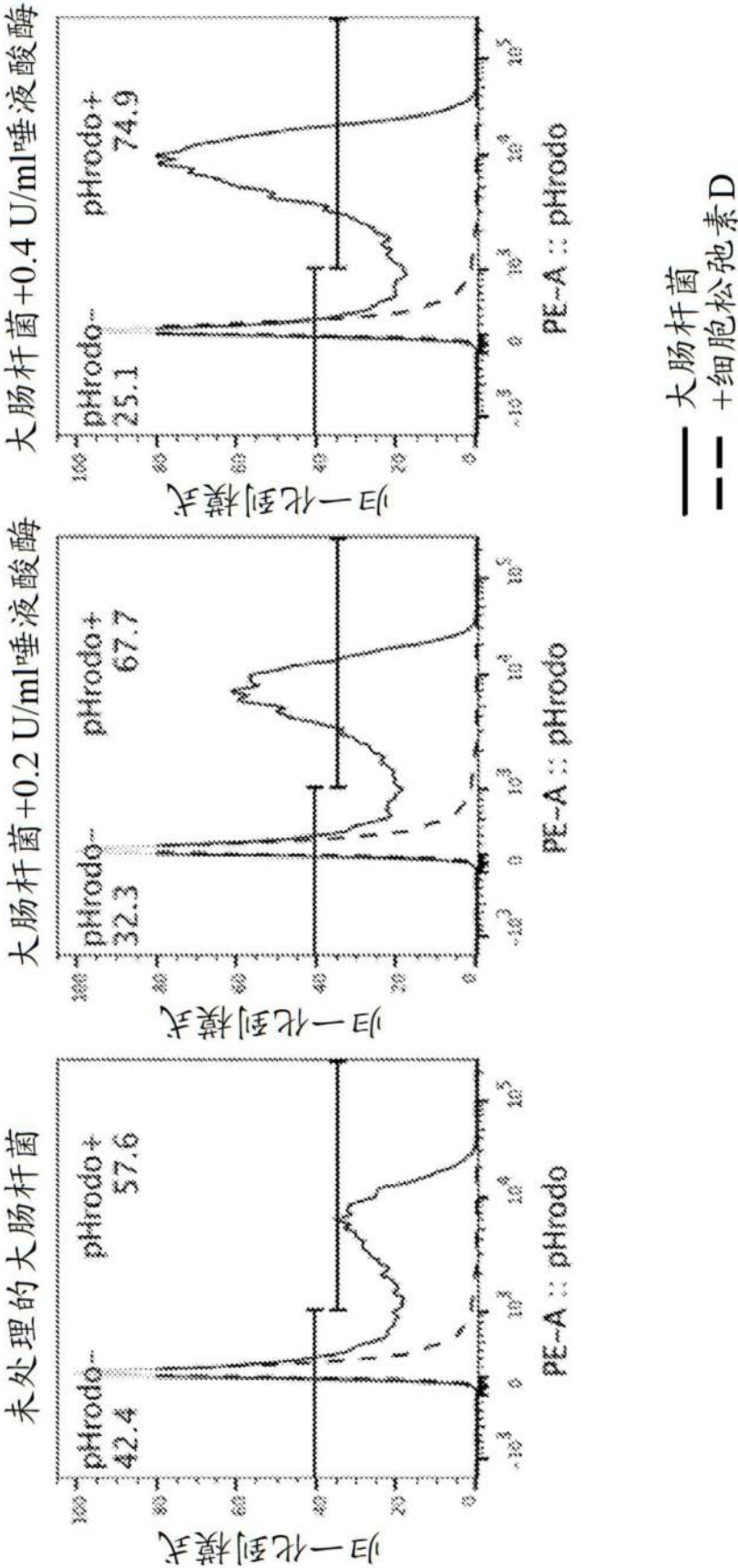


图10

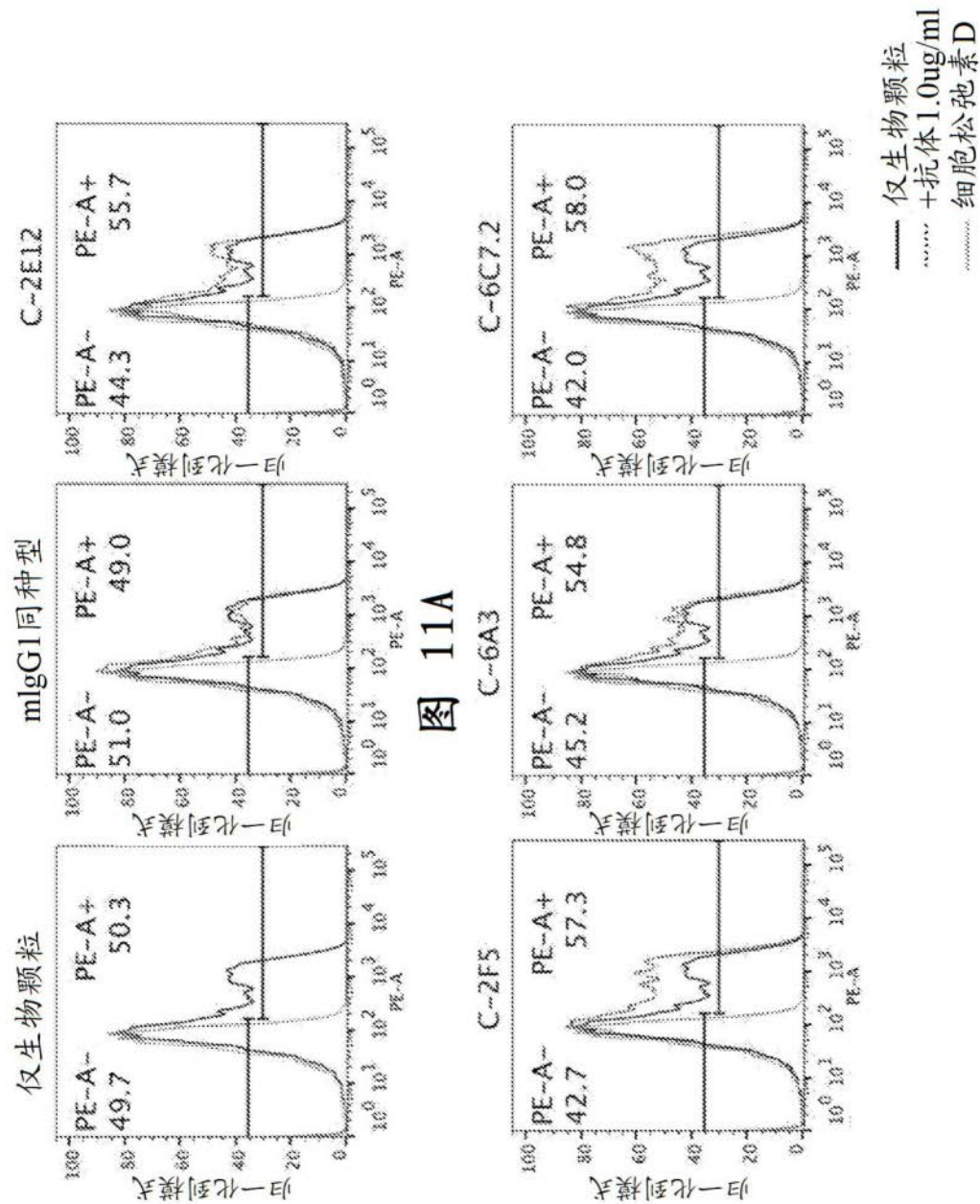


图 11B

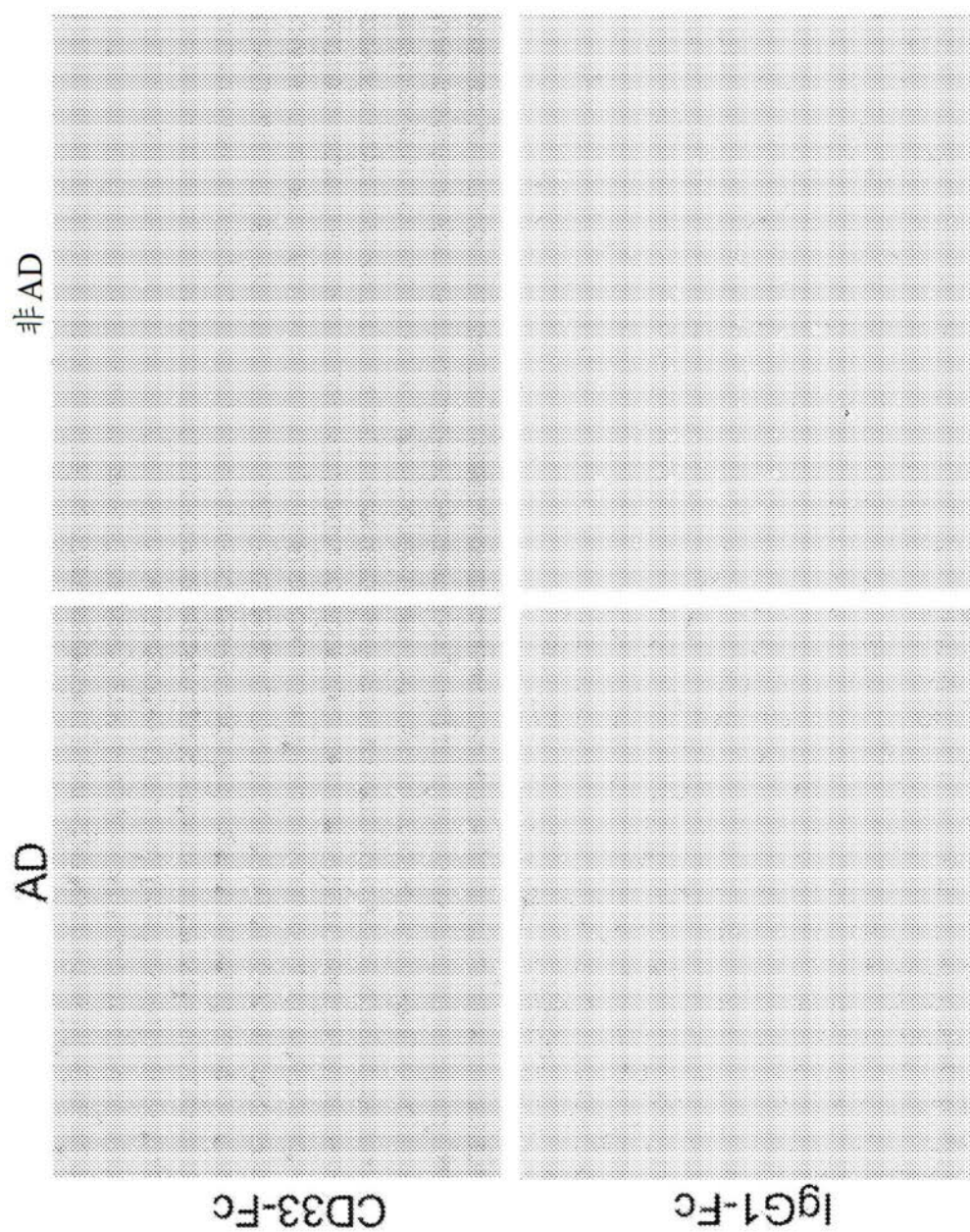


图12A

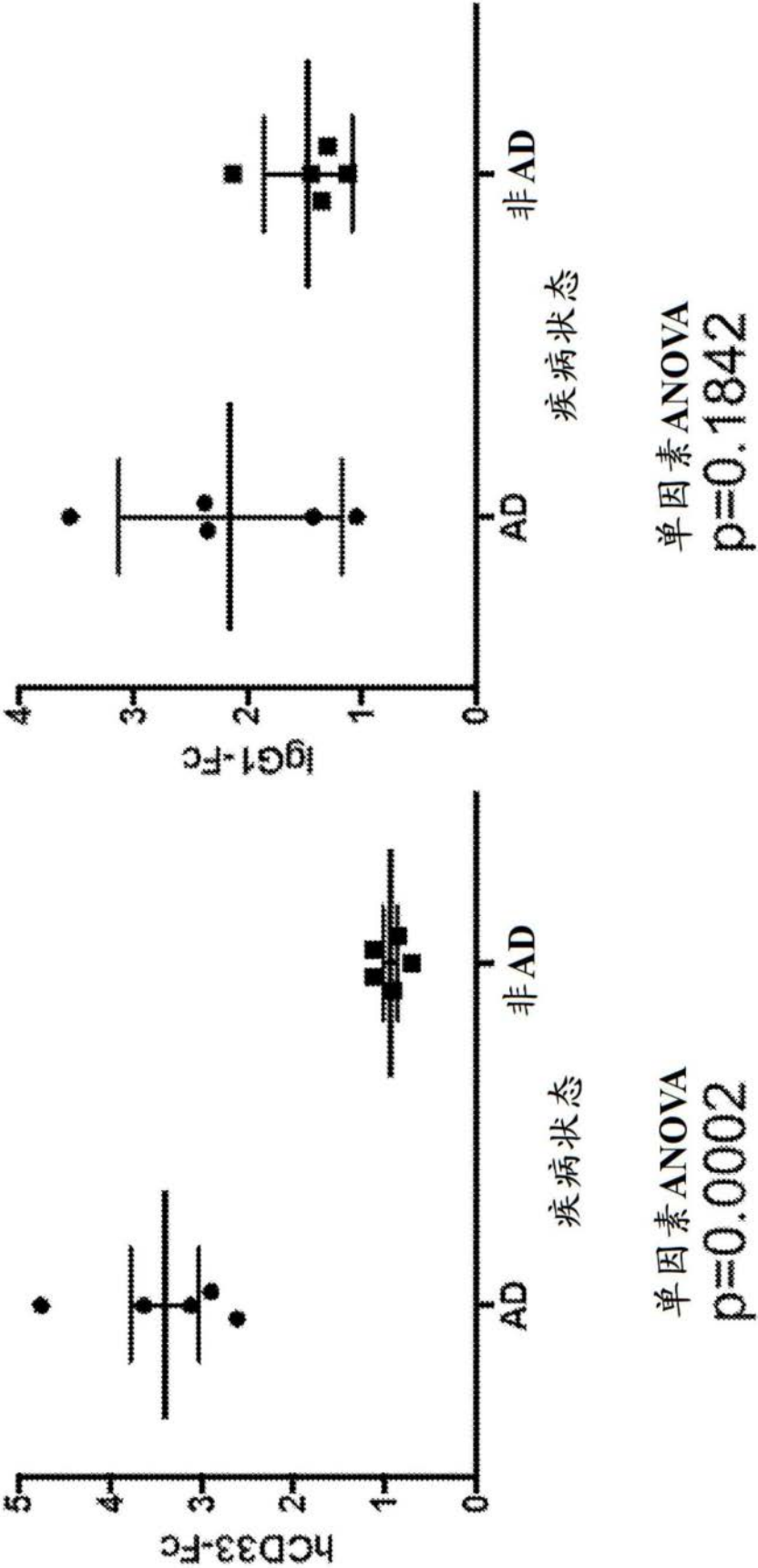


图12B

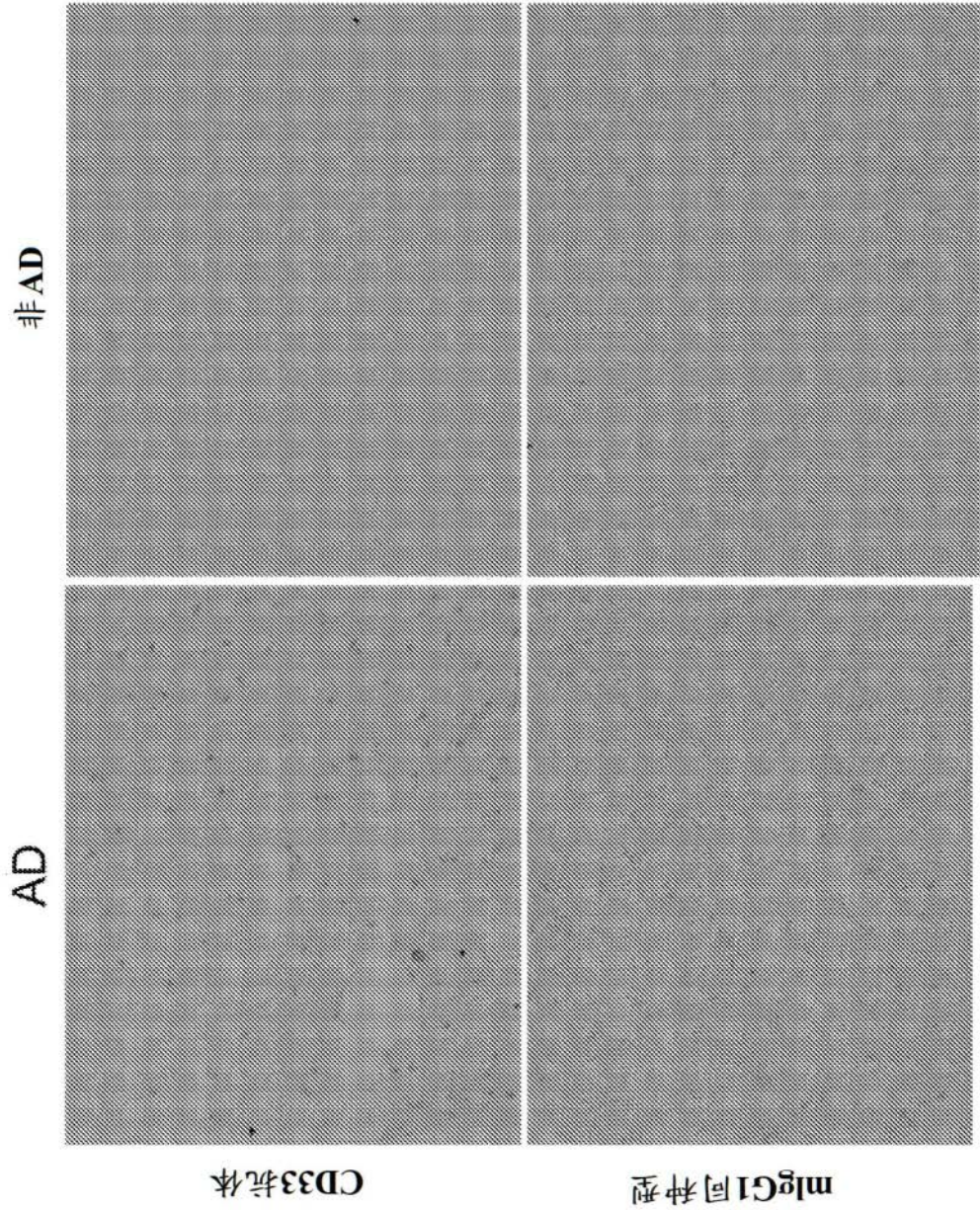


图13A

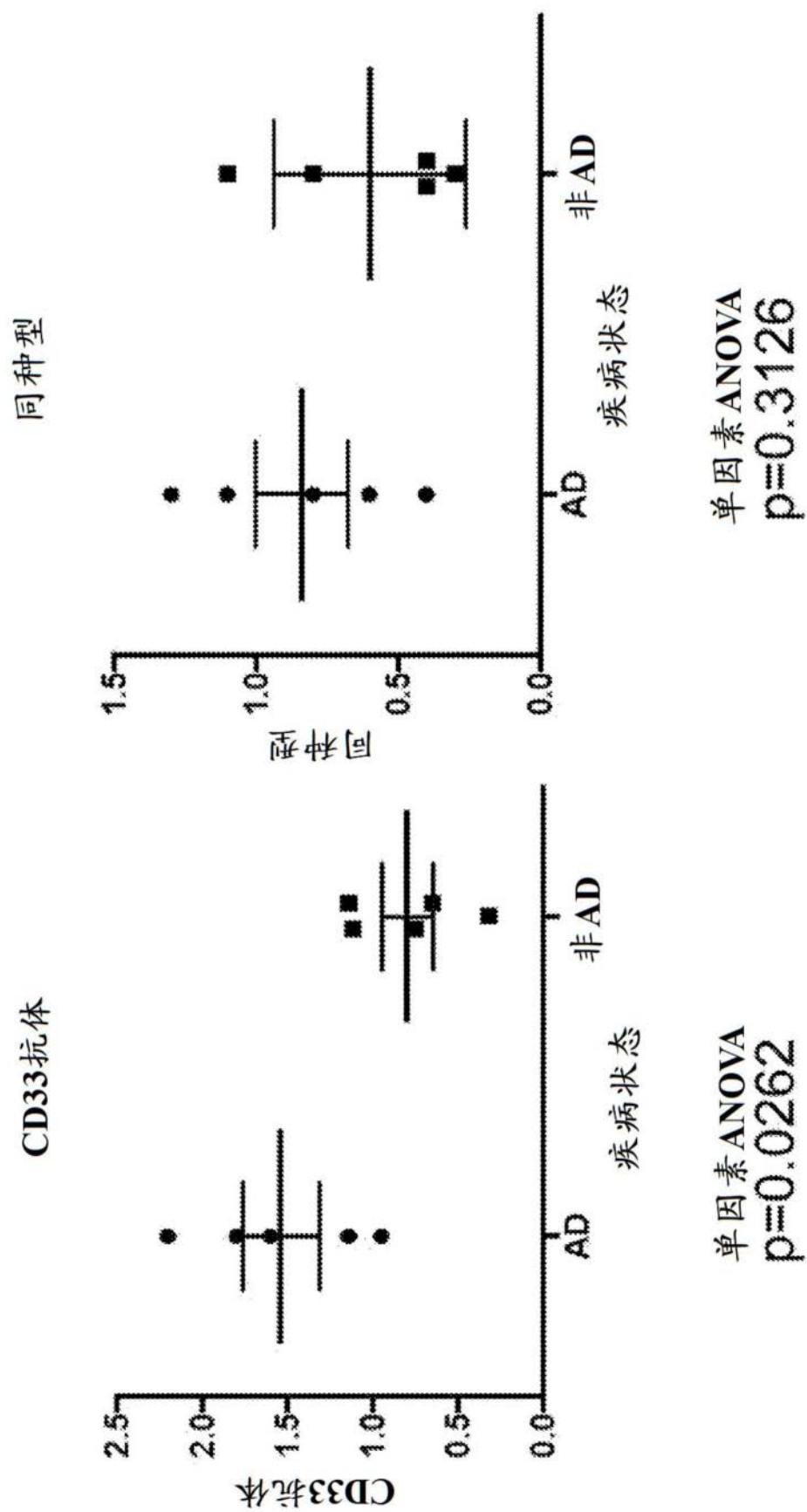


图13B

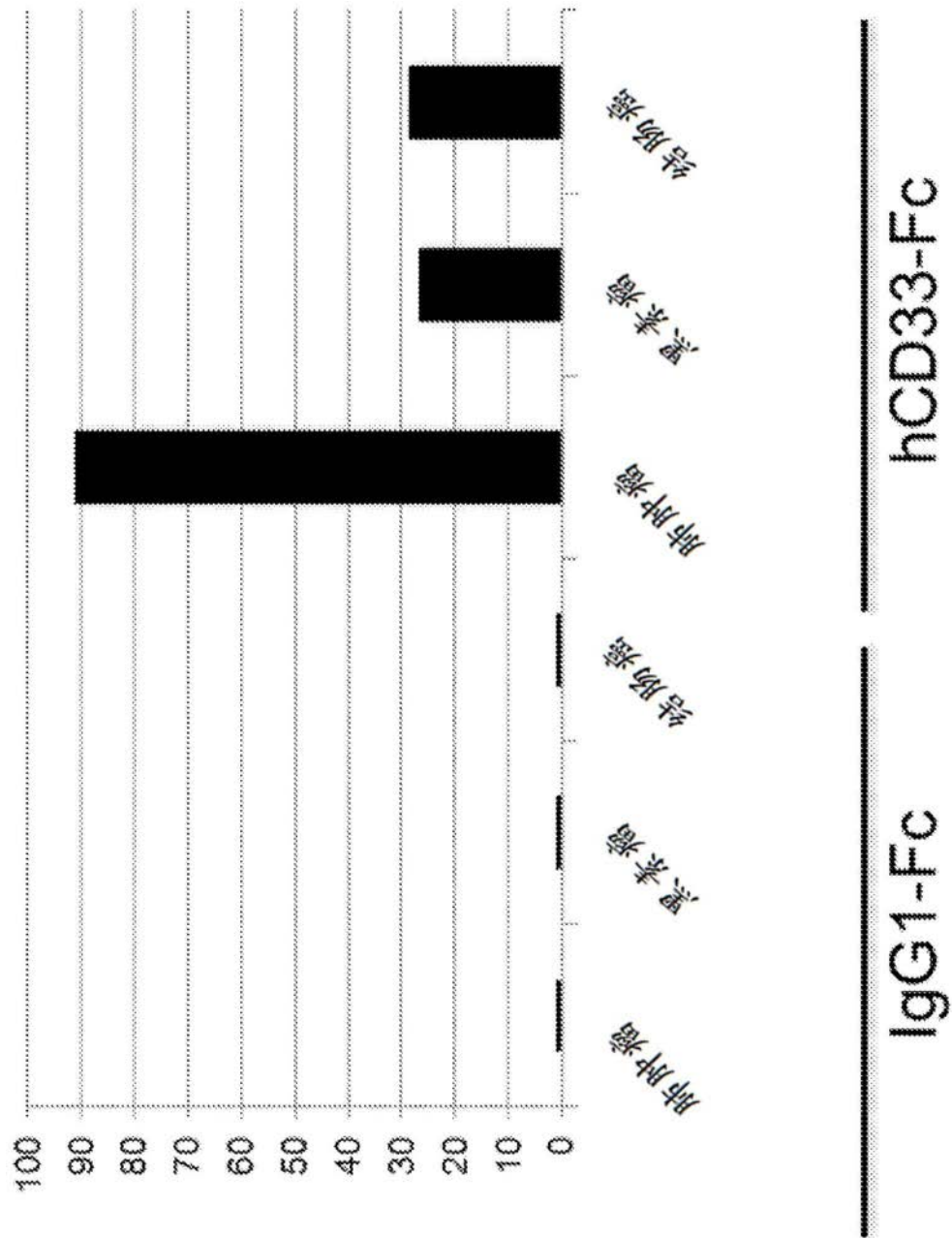


图14A

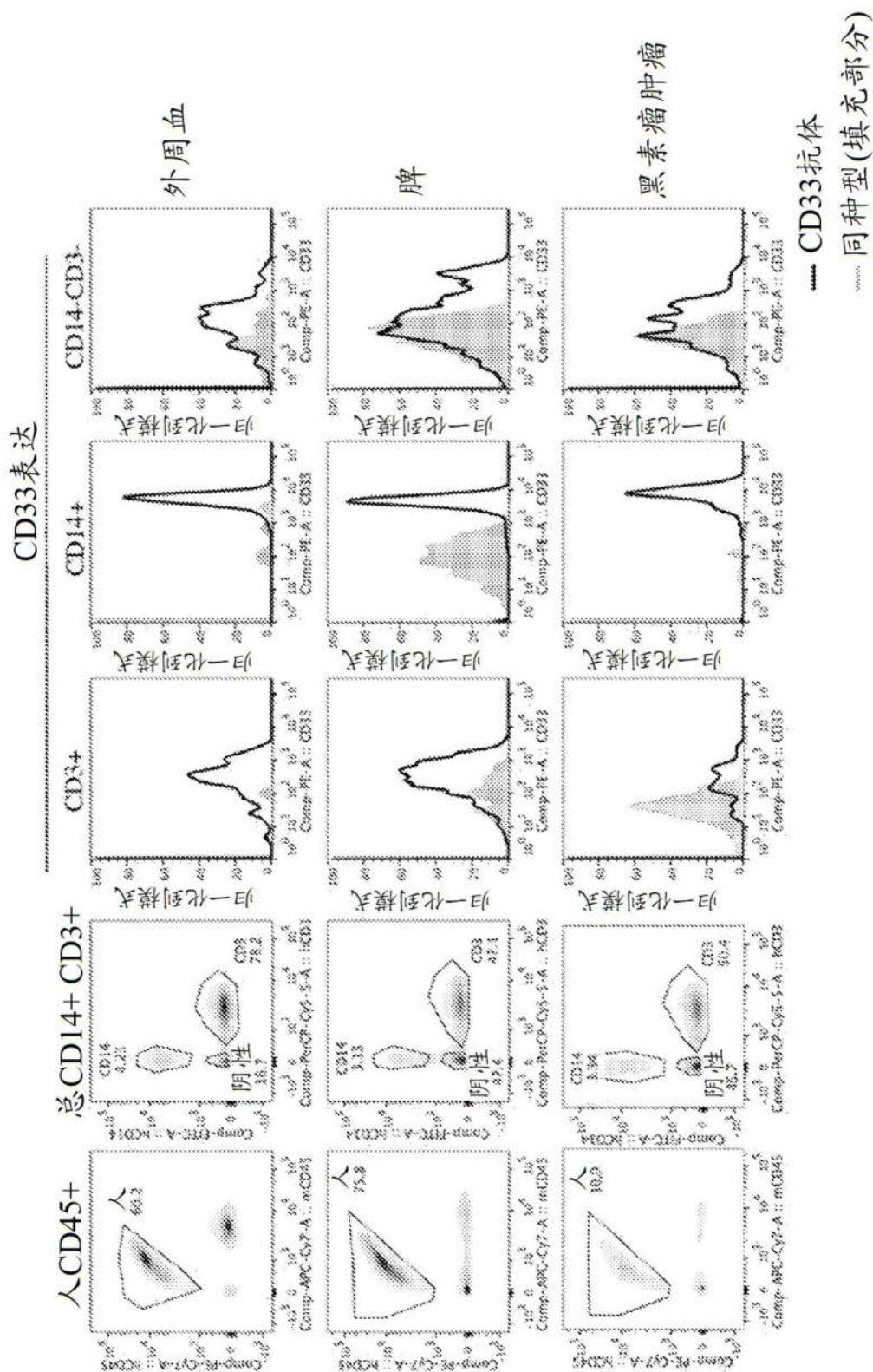


图14B

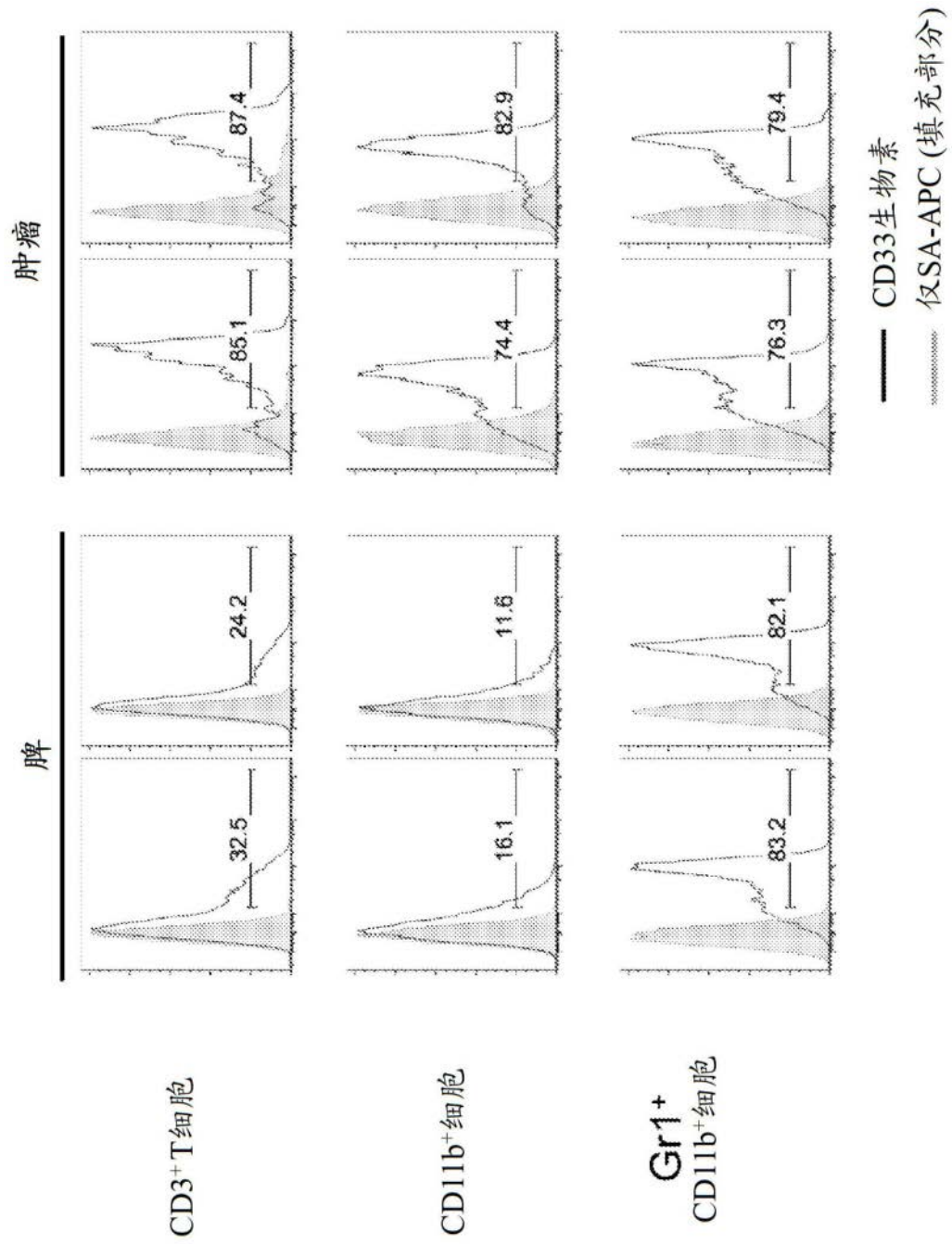


图14C

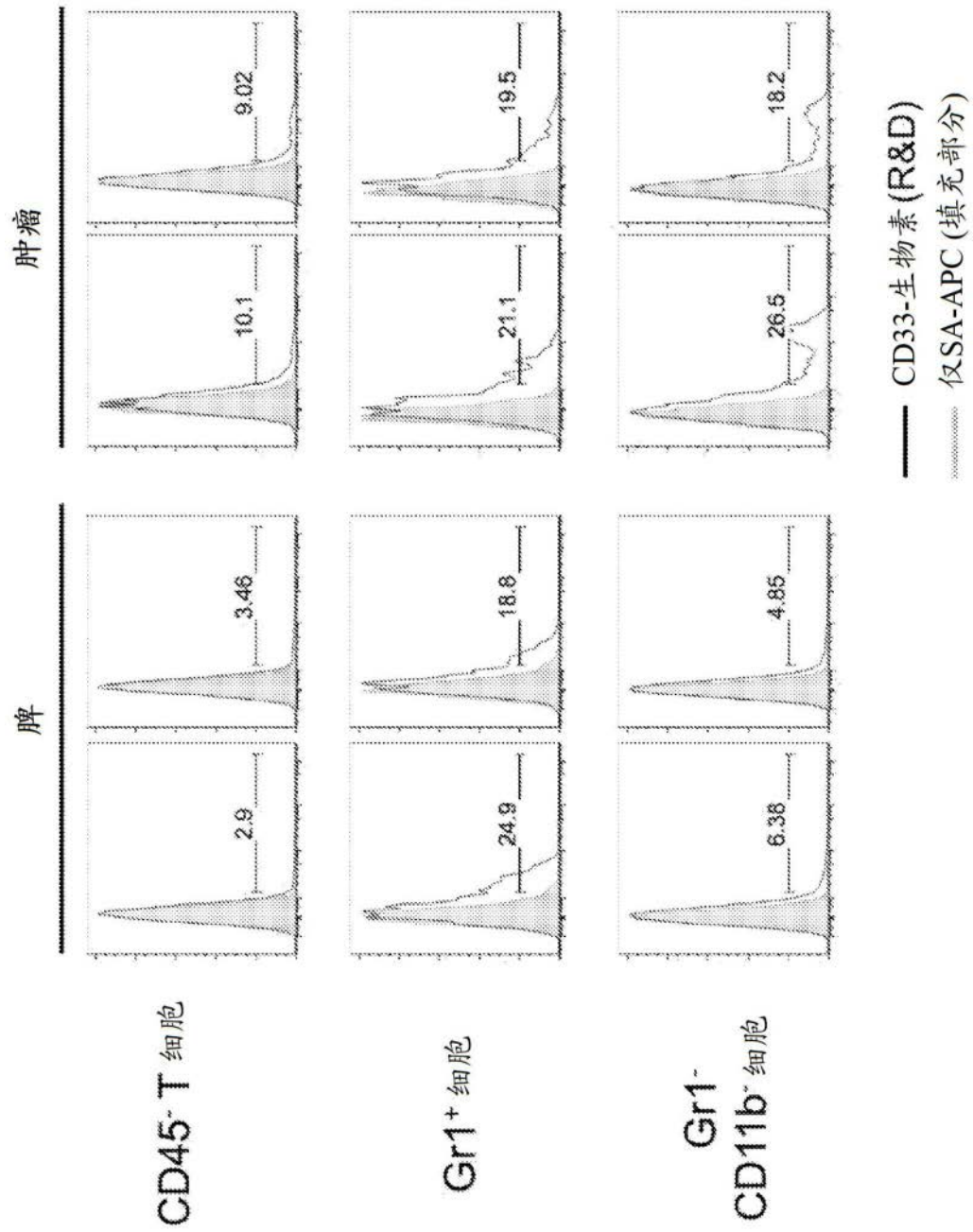


图14D

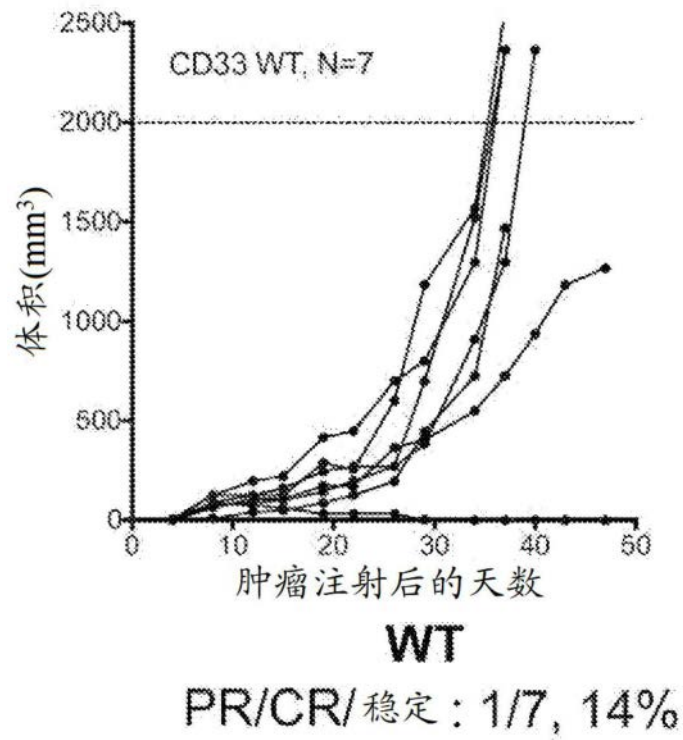


图15A

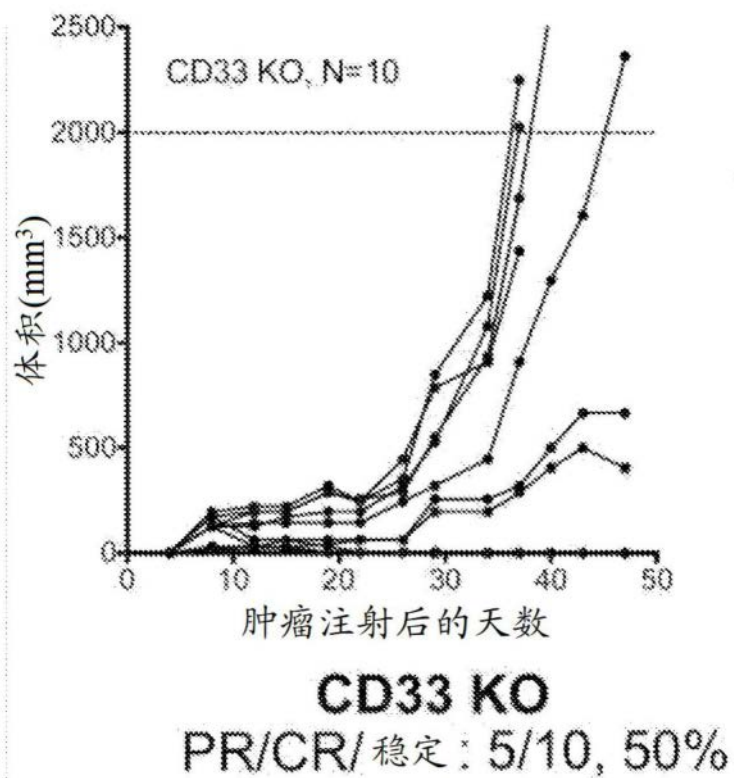


图15B

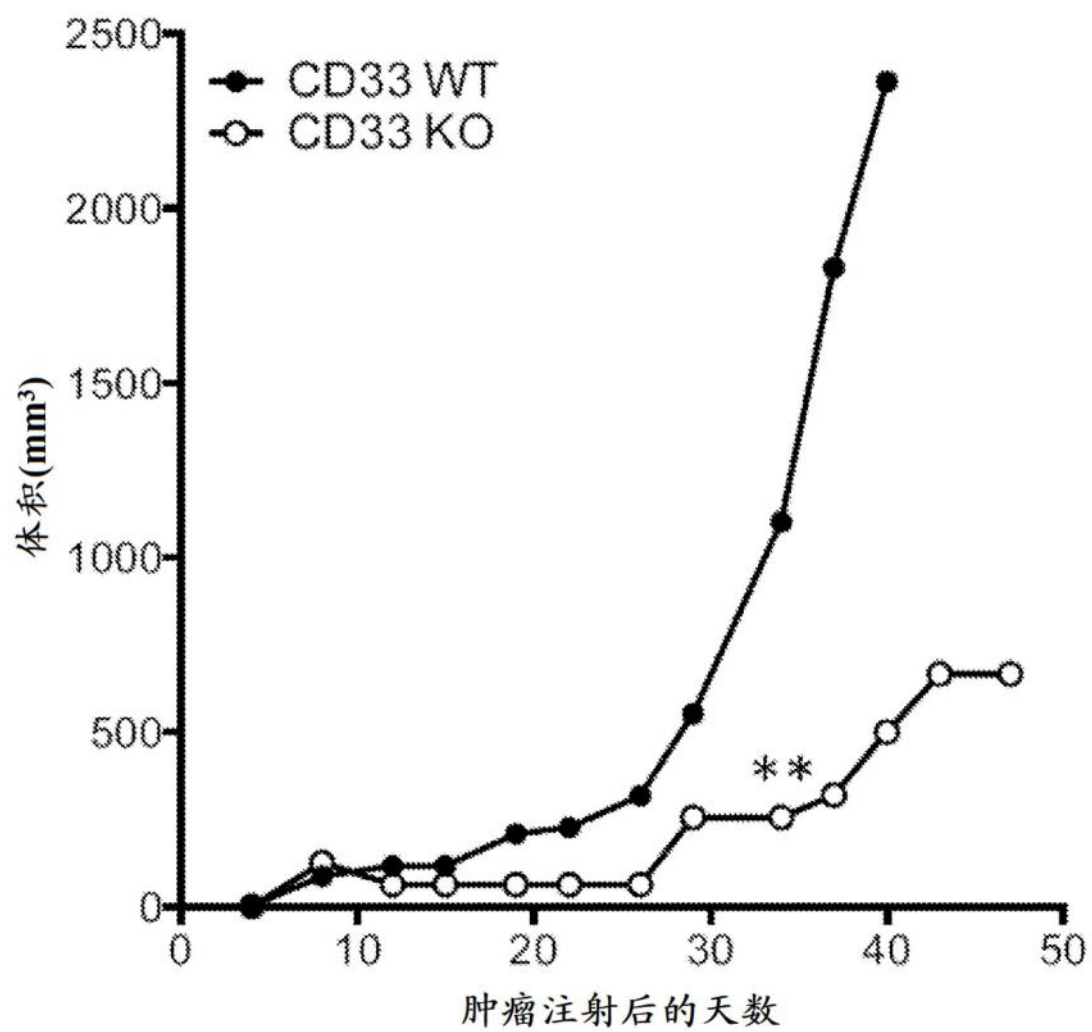


图15C

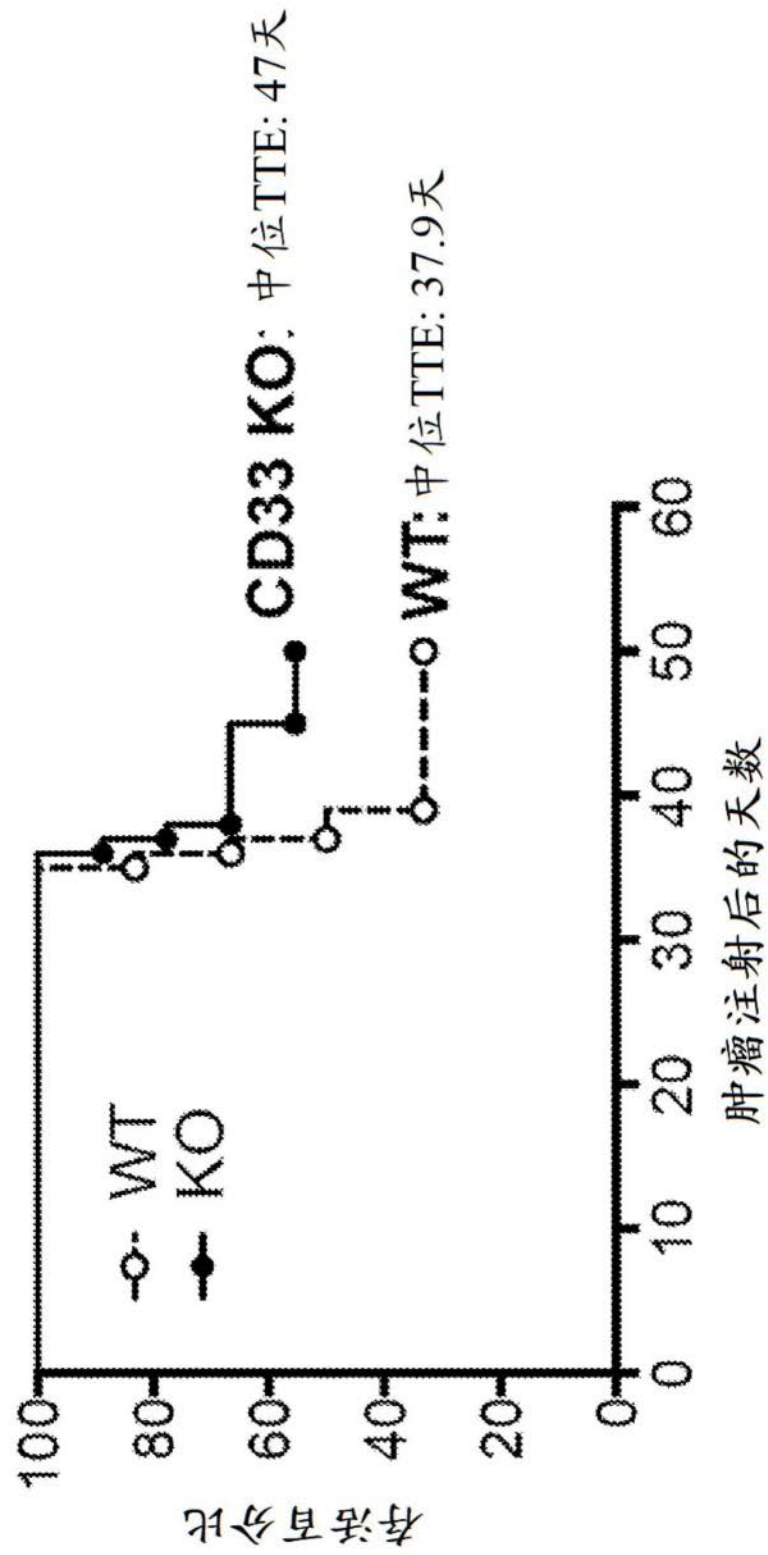


图15D

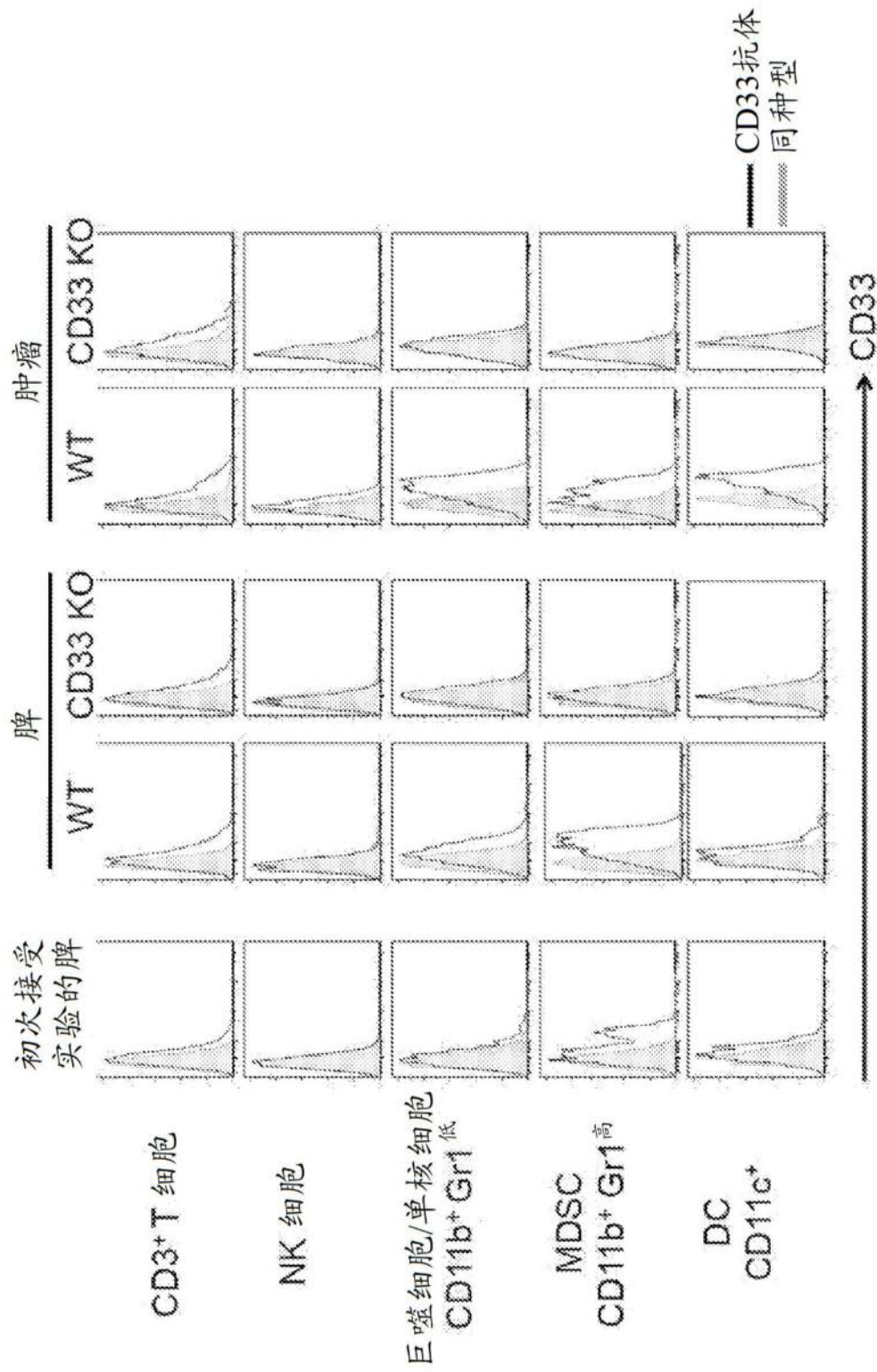


图15E

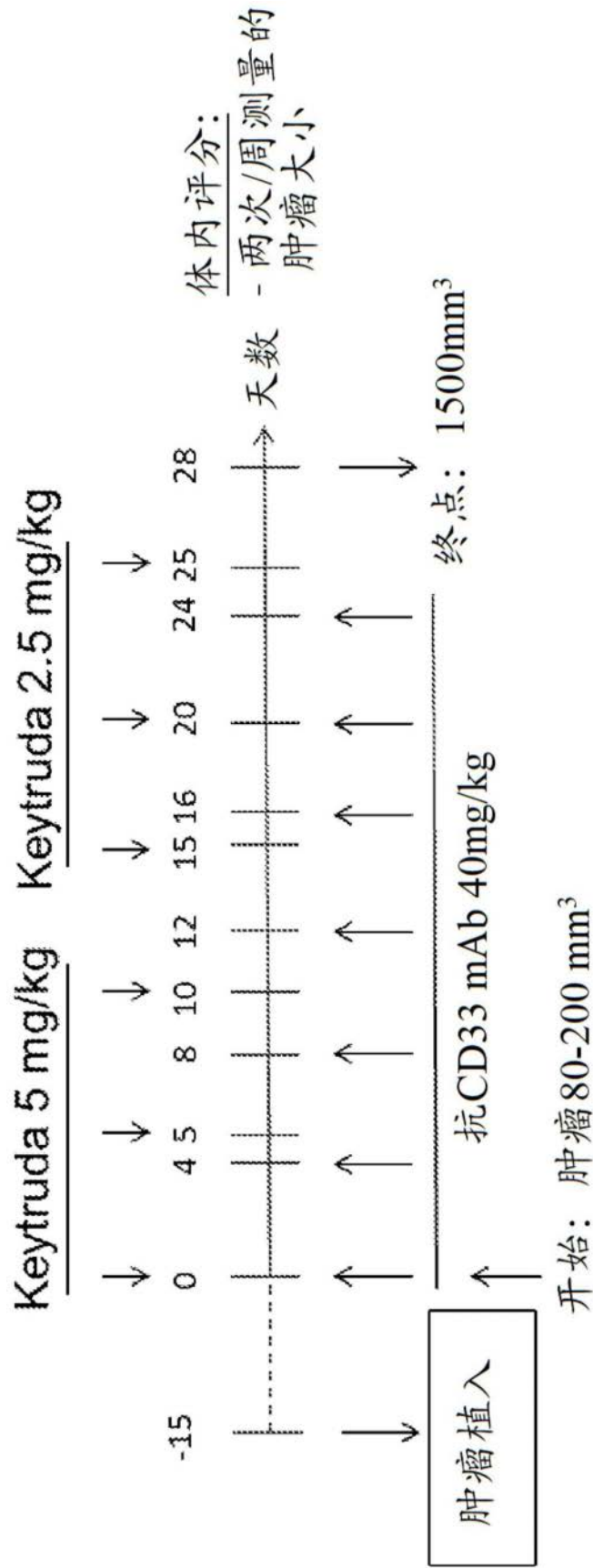


图15F

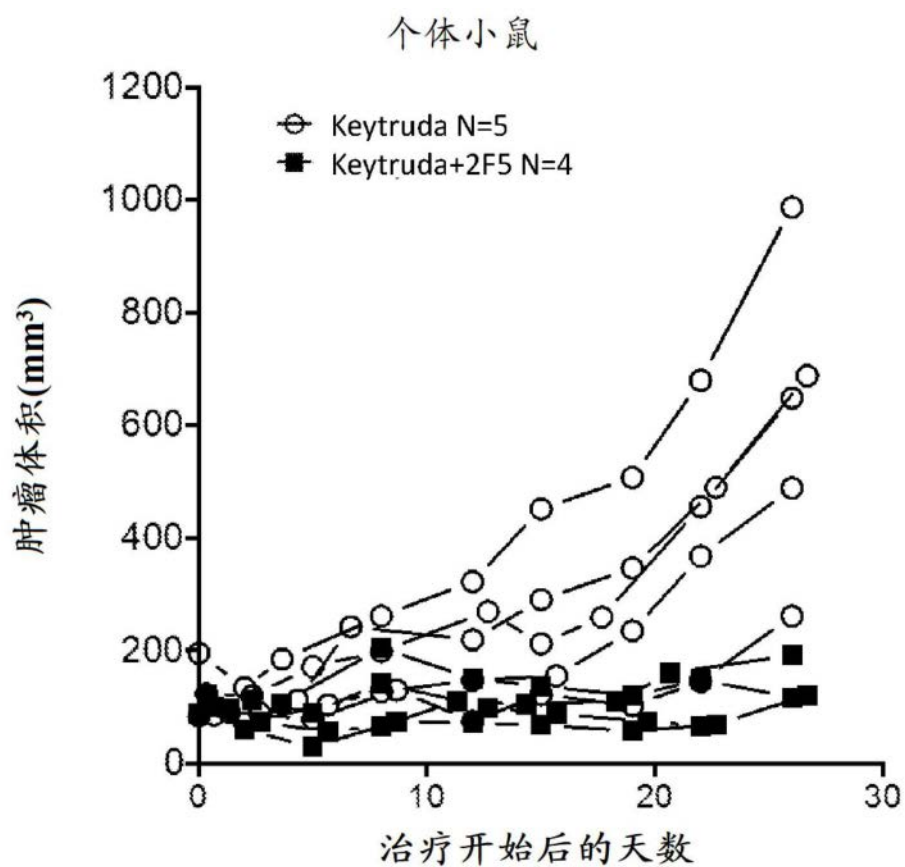


图15G

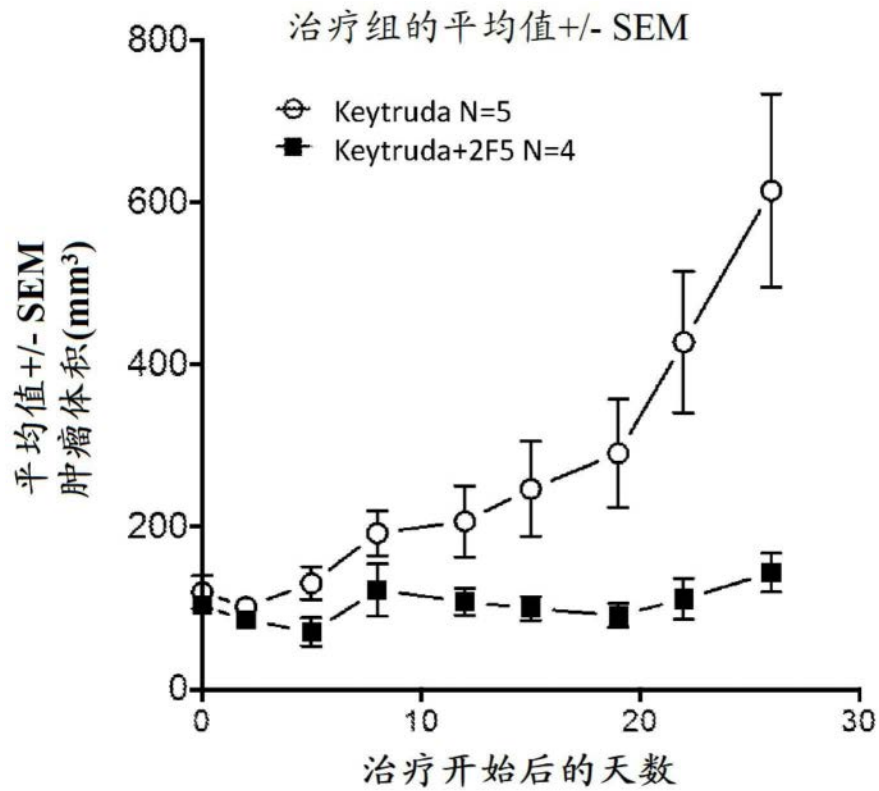


图15H

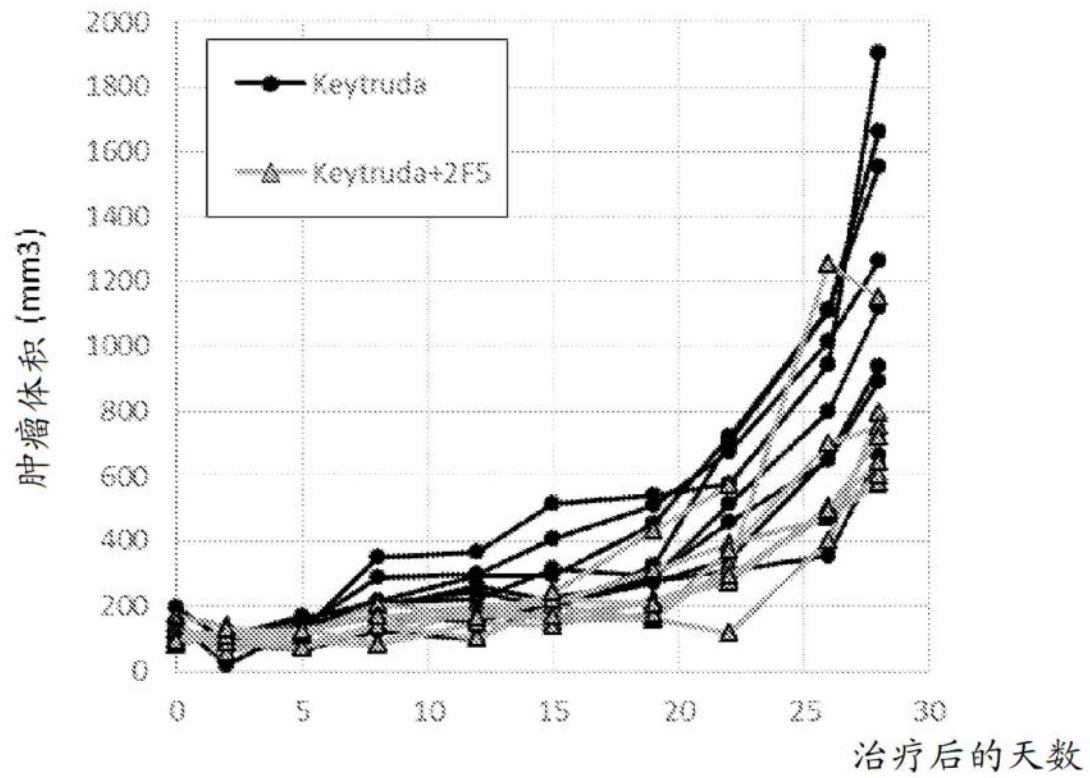


图15I

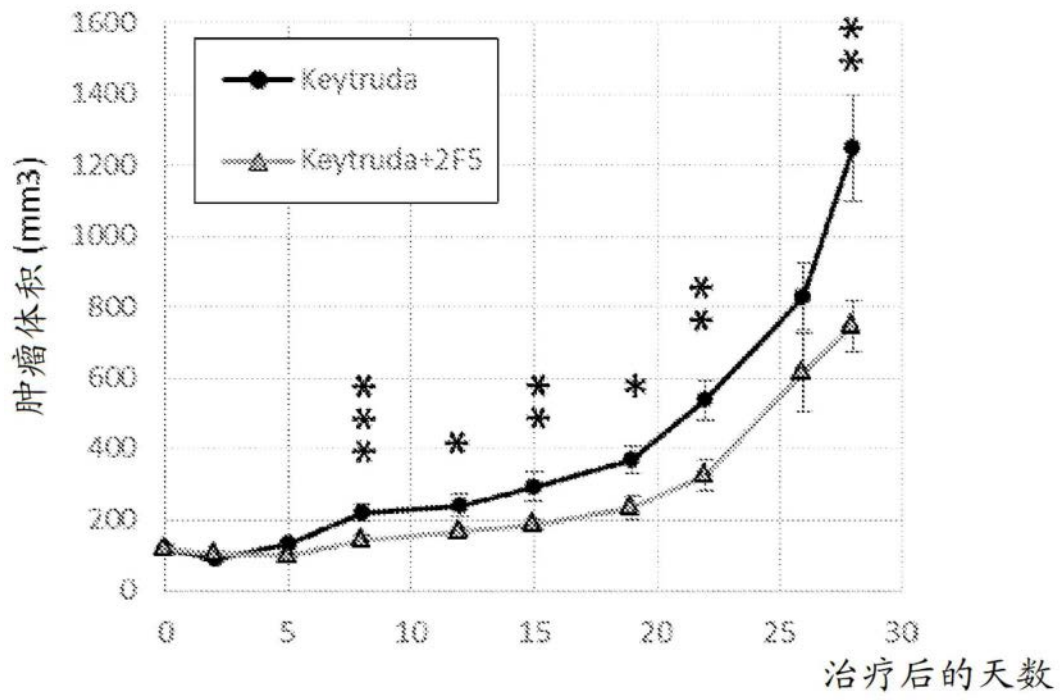


图15J

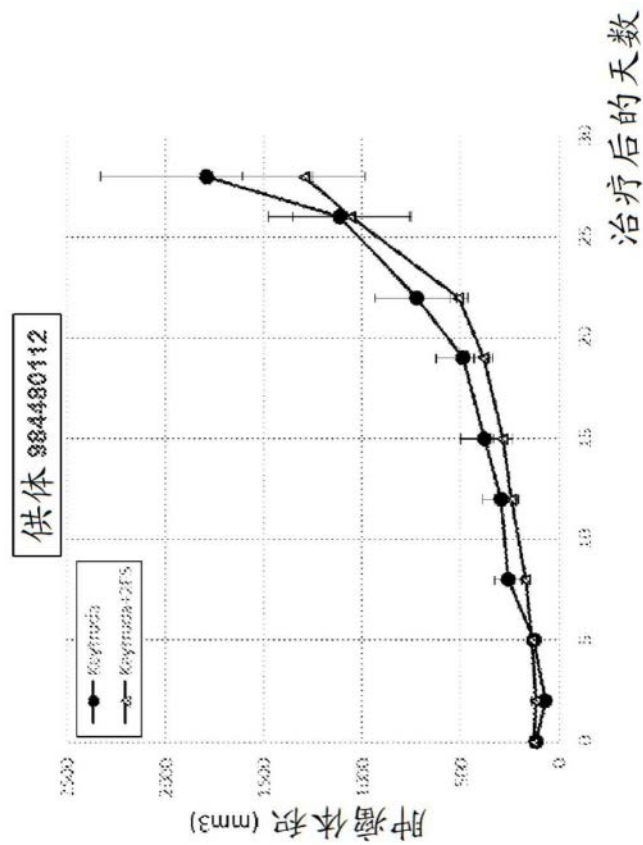


图15K

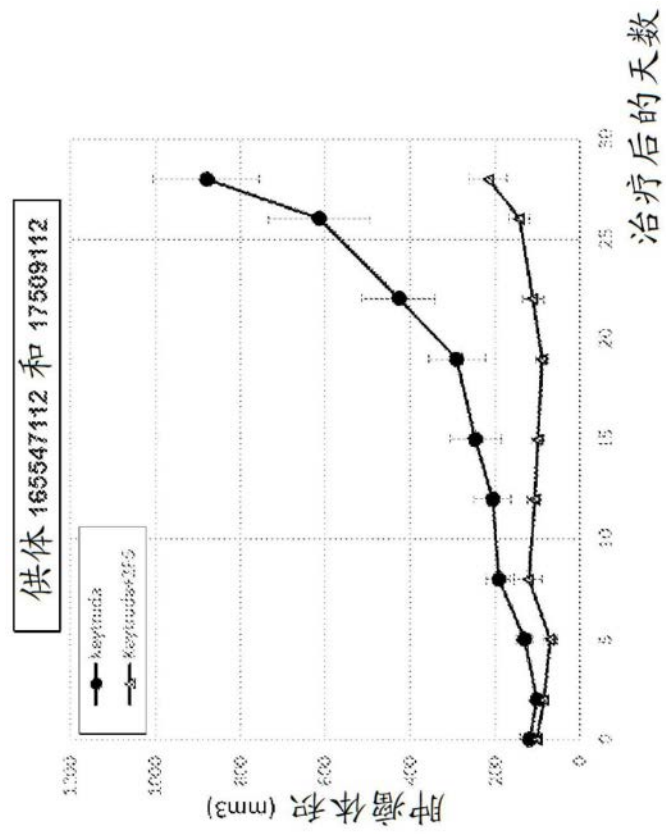


图15L

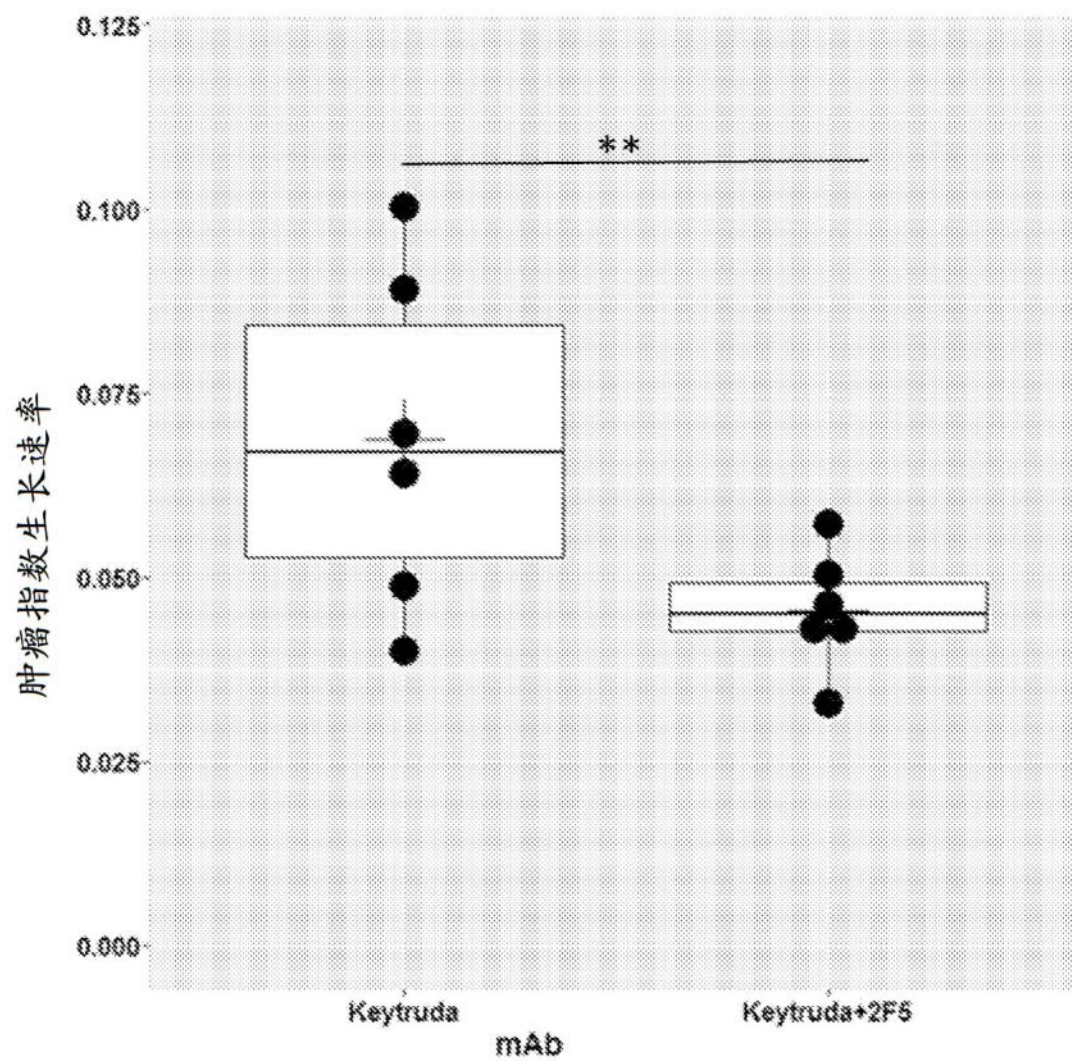


图15M

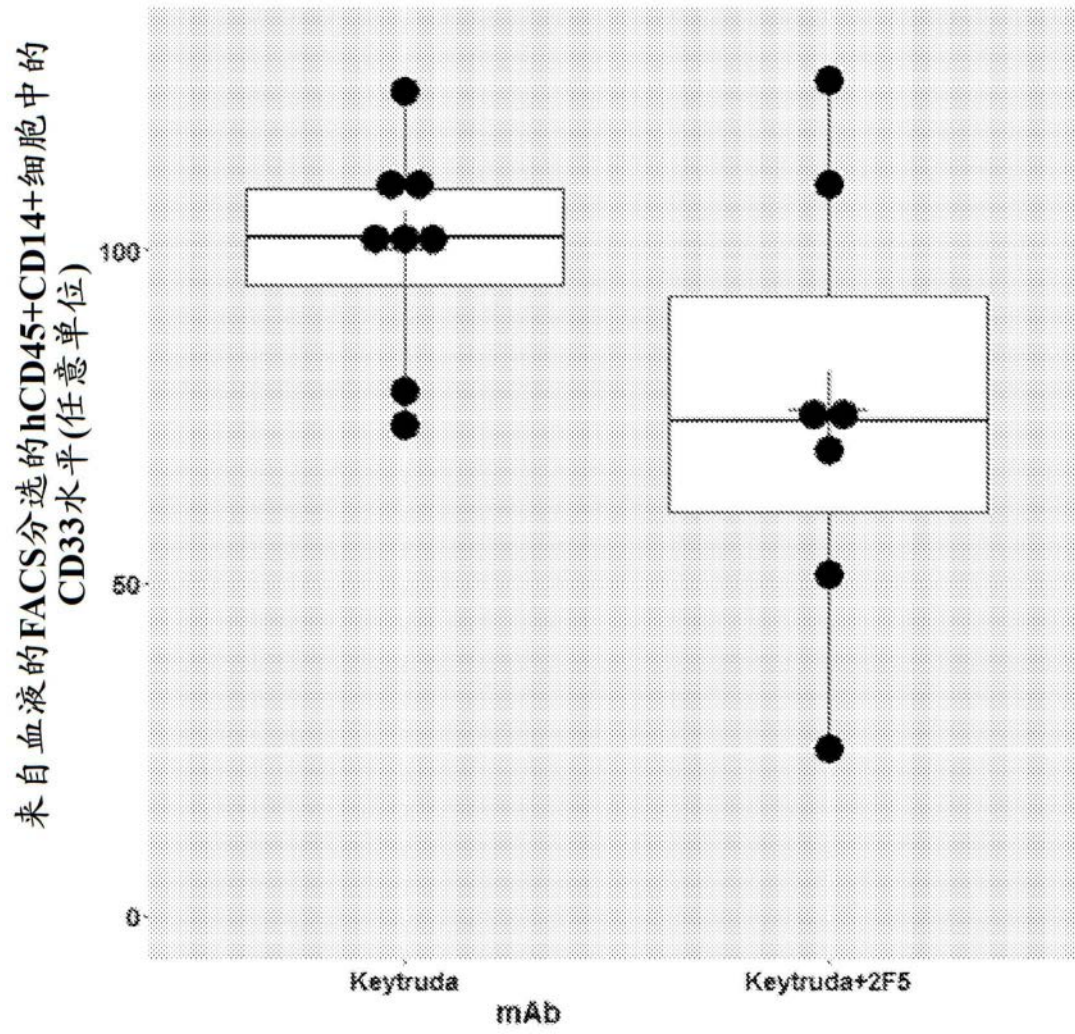


图15N

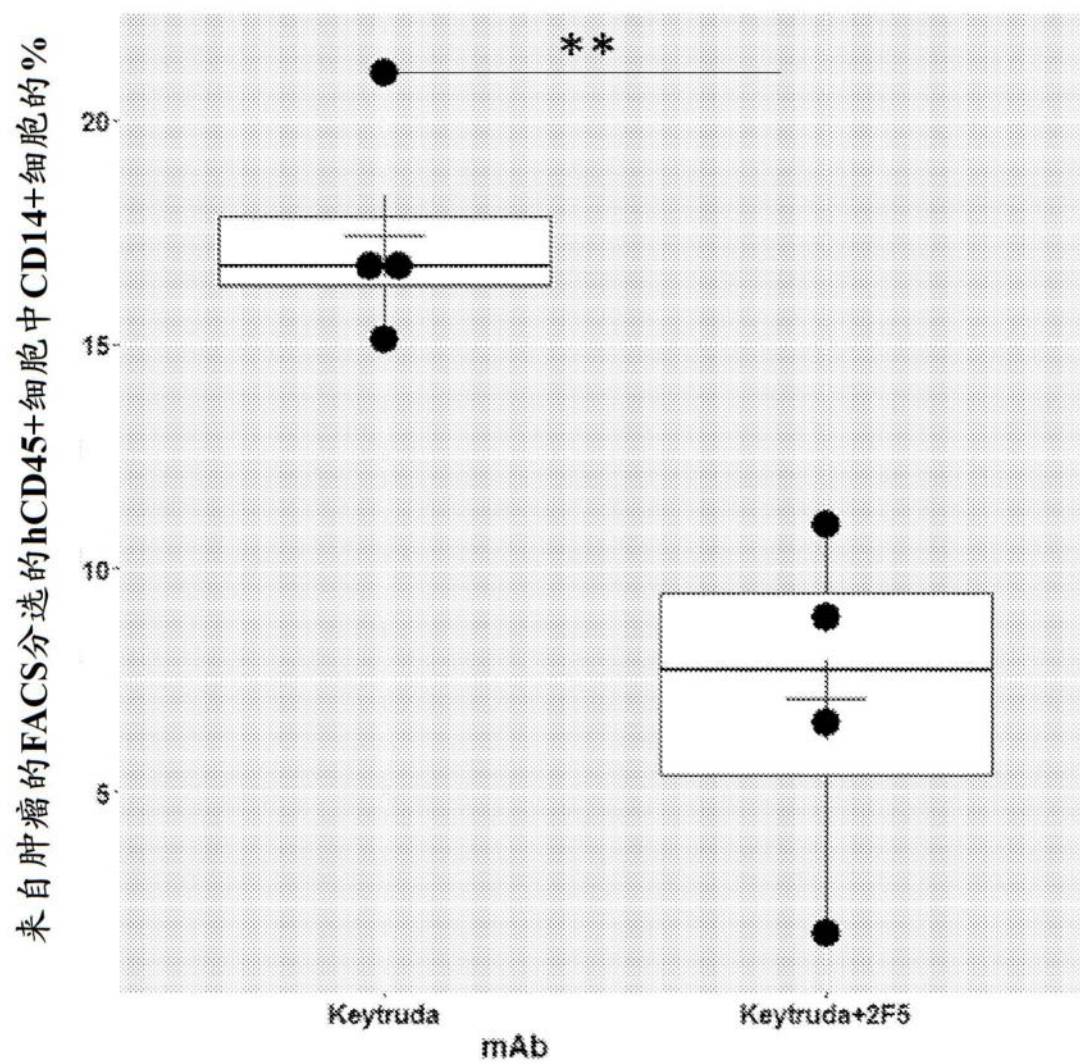


图150

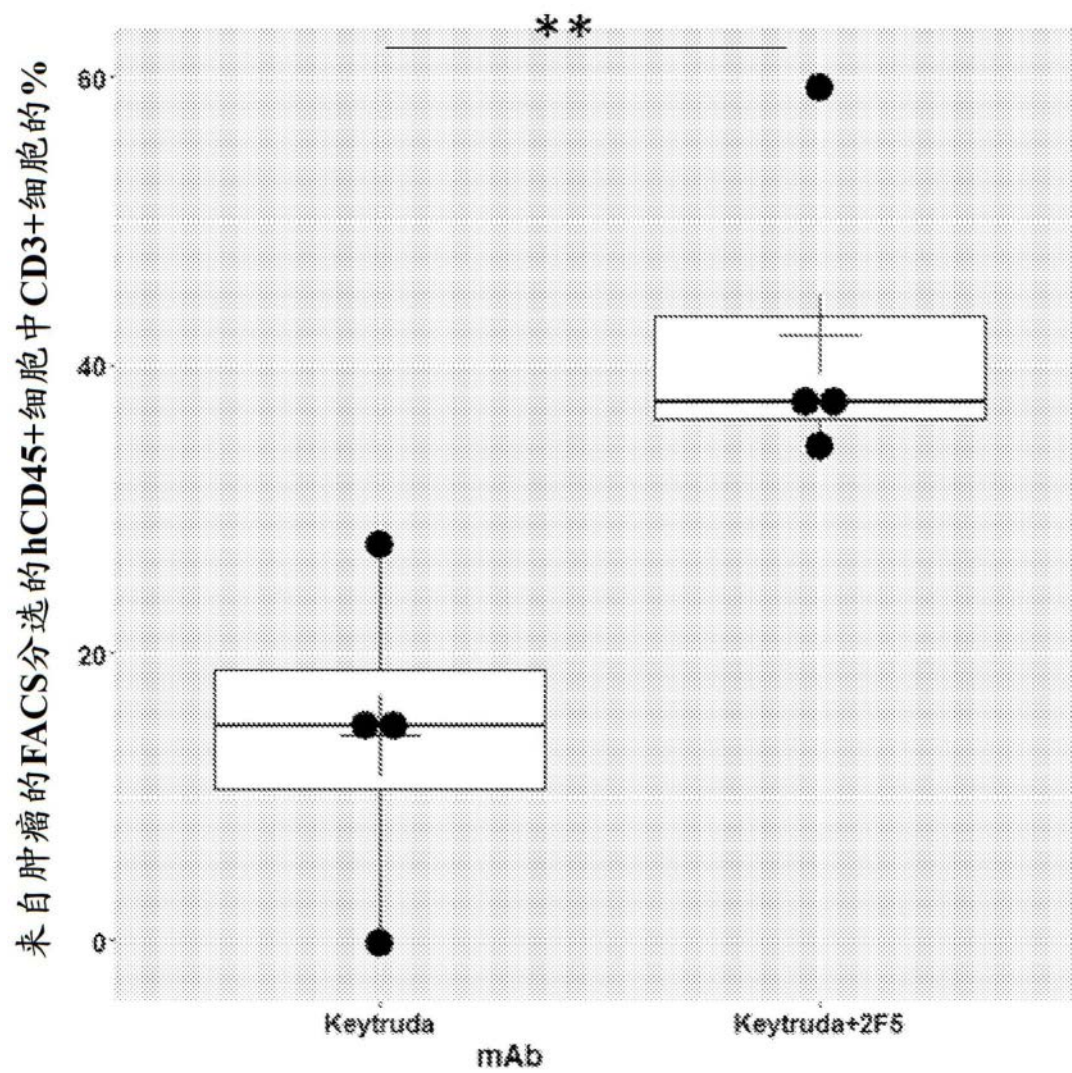


图15P

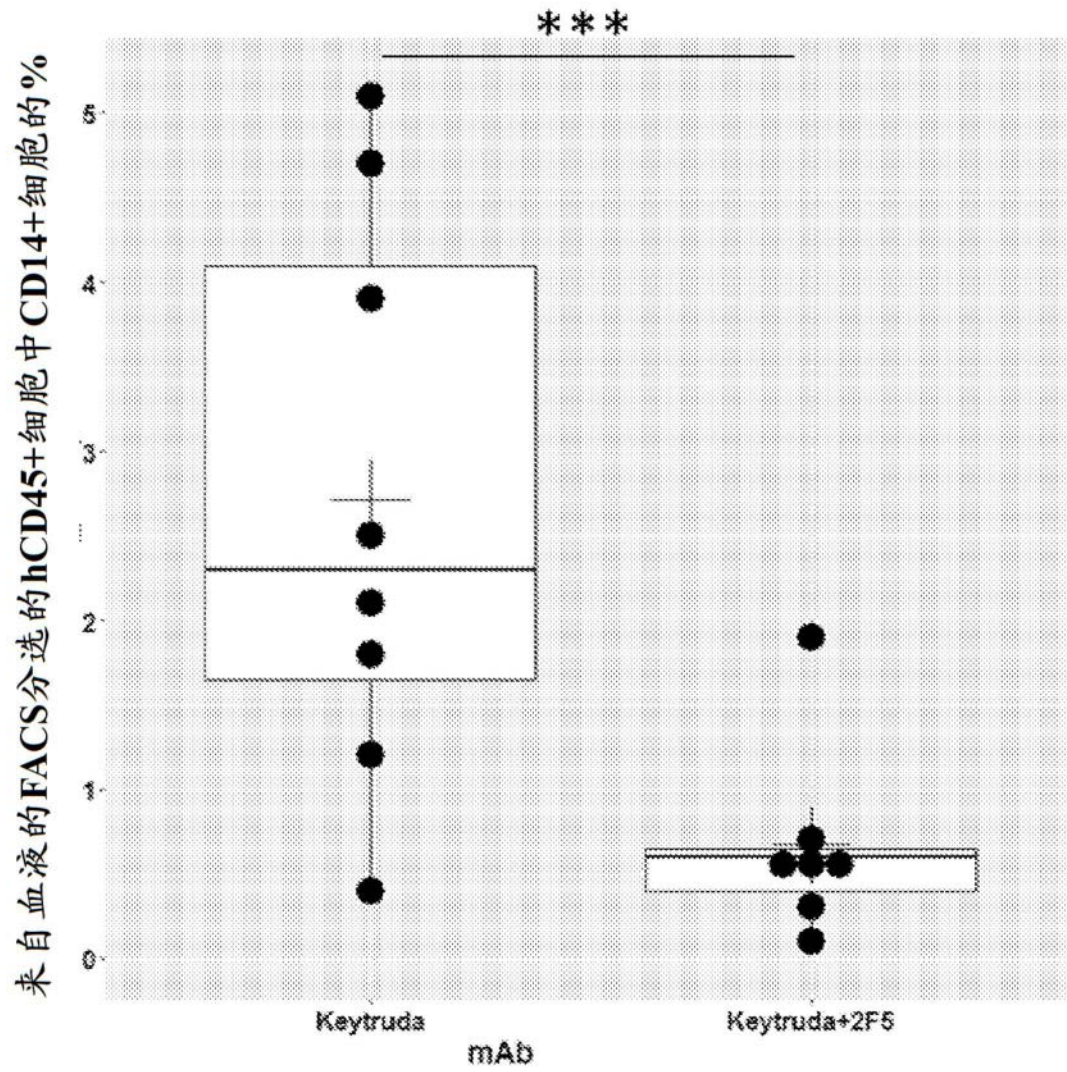


图15Q

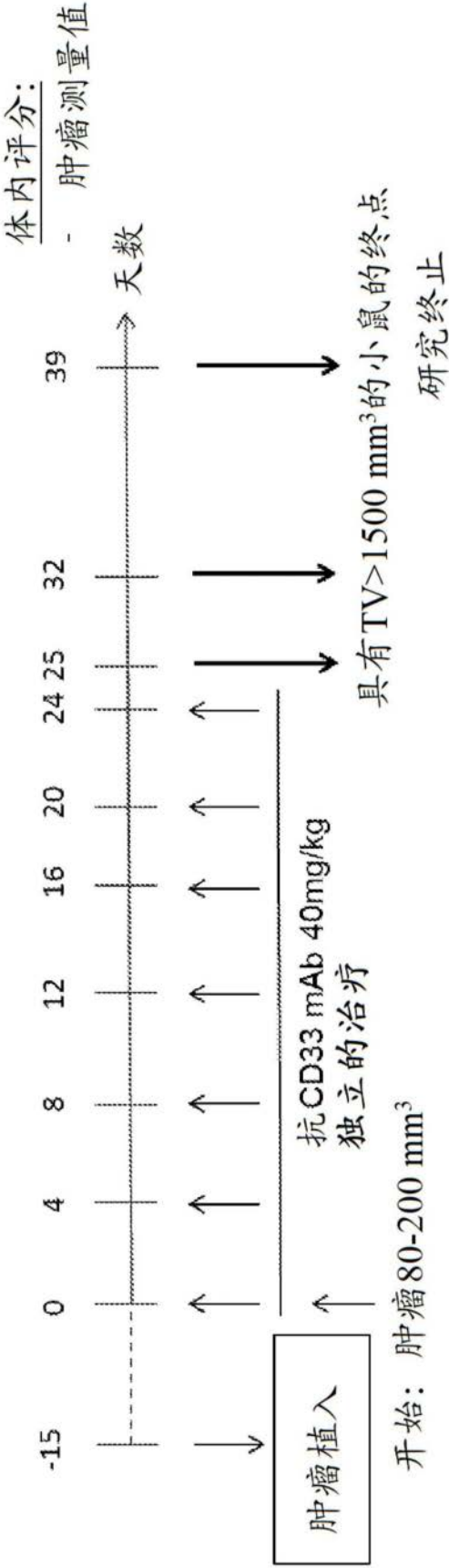


图15R

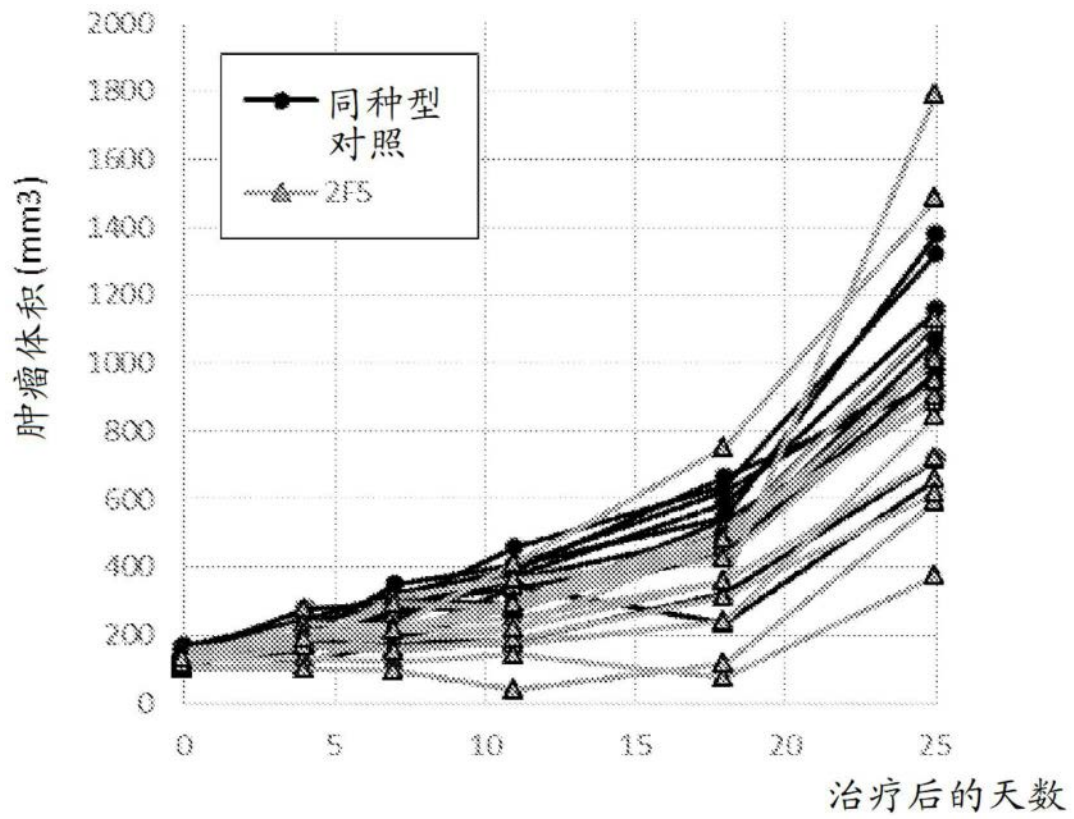


图15S

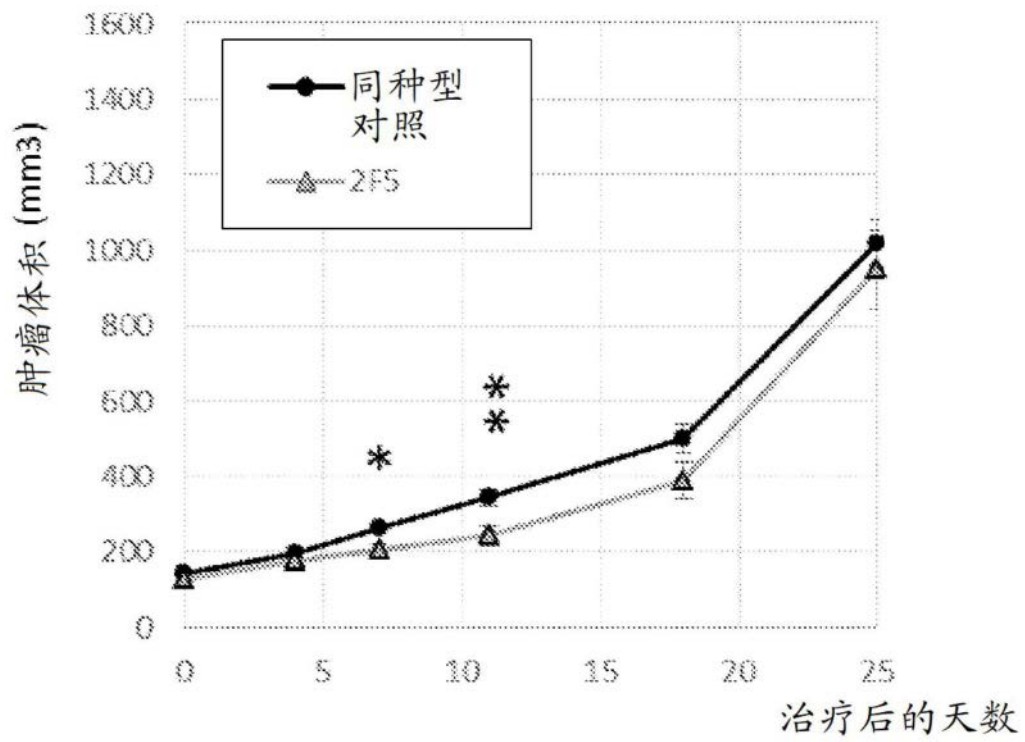


图15T

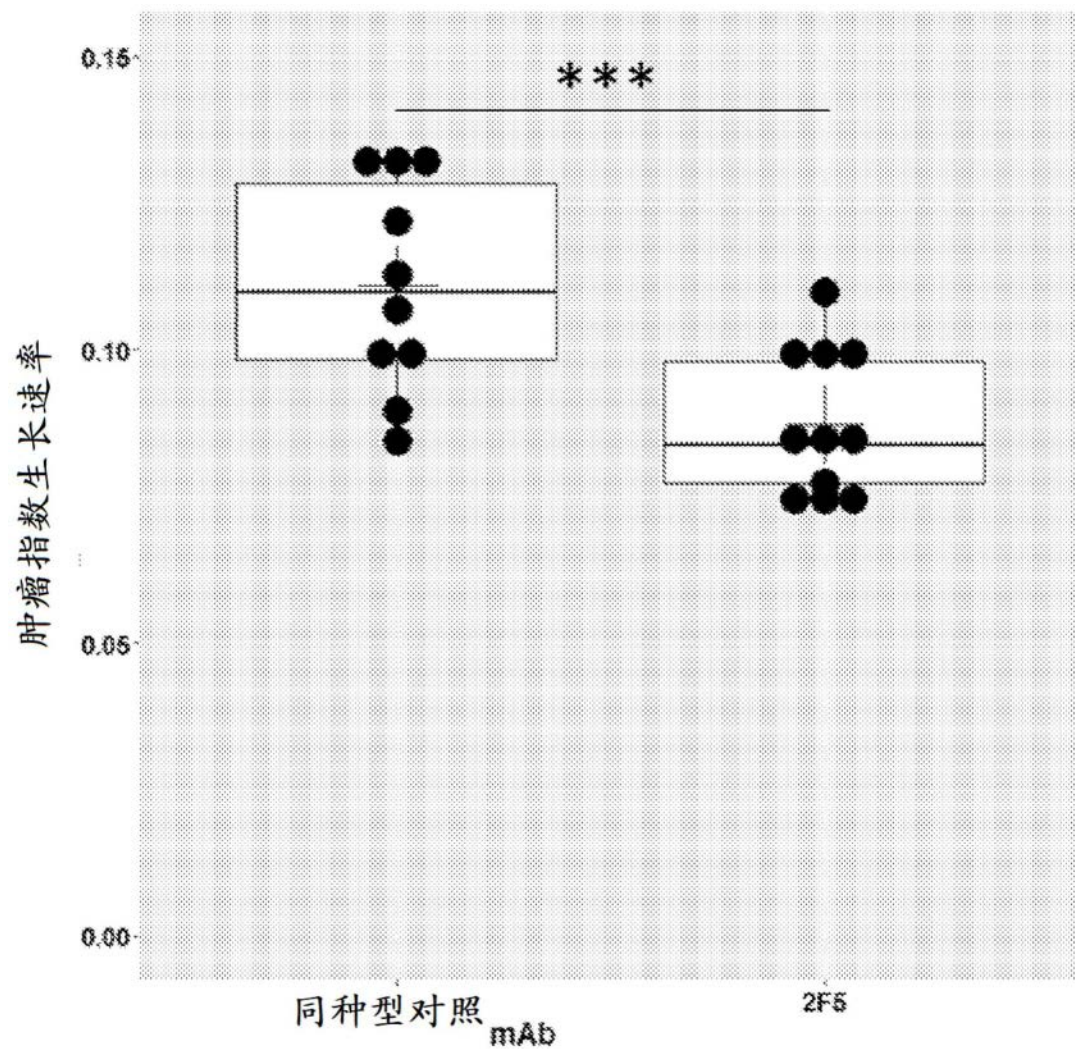


图15U

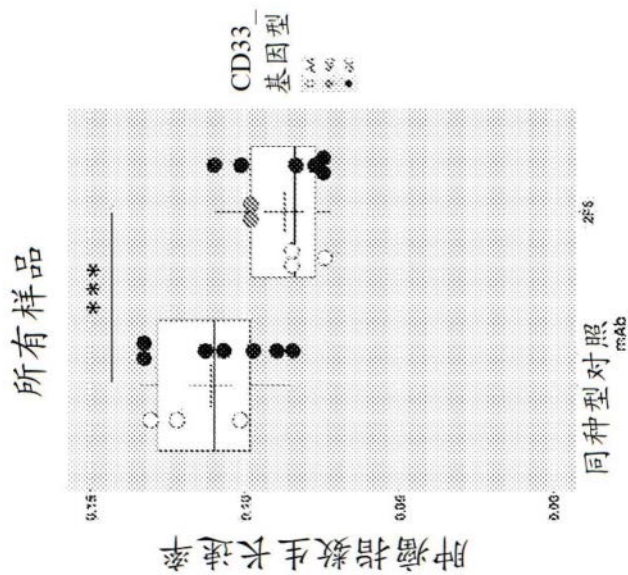


图15V

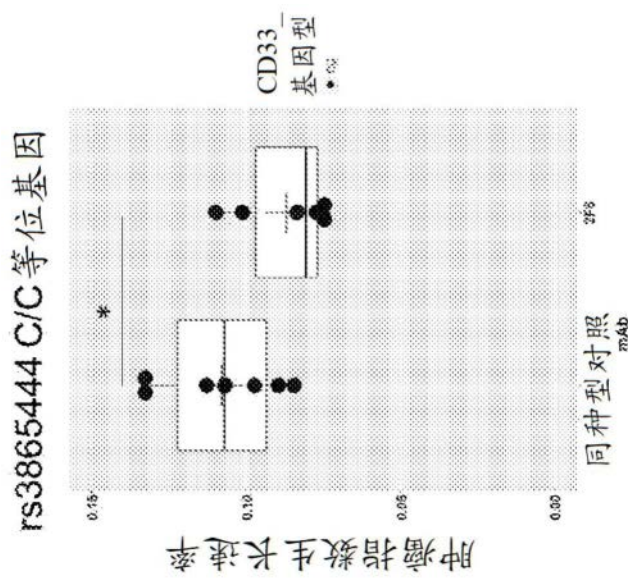


图15W

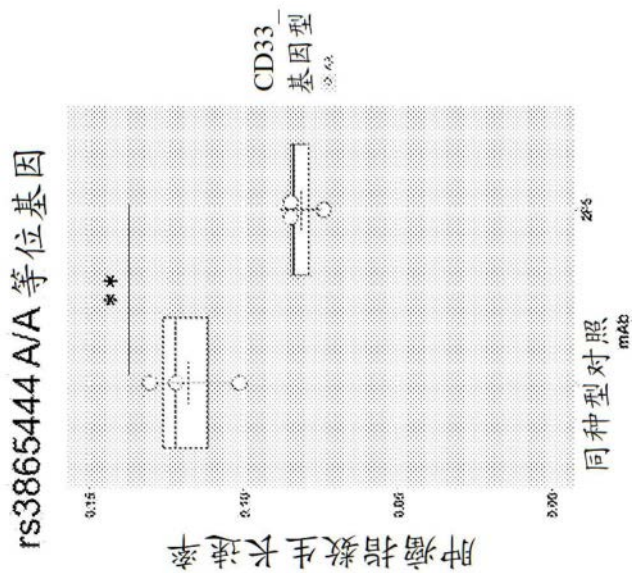


图15X

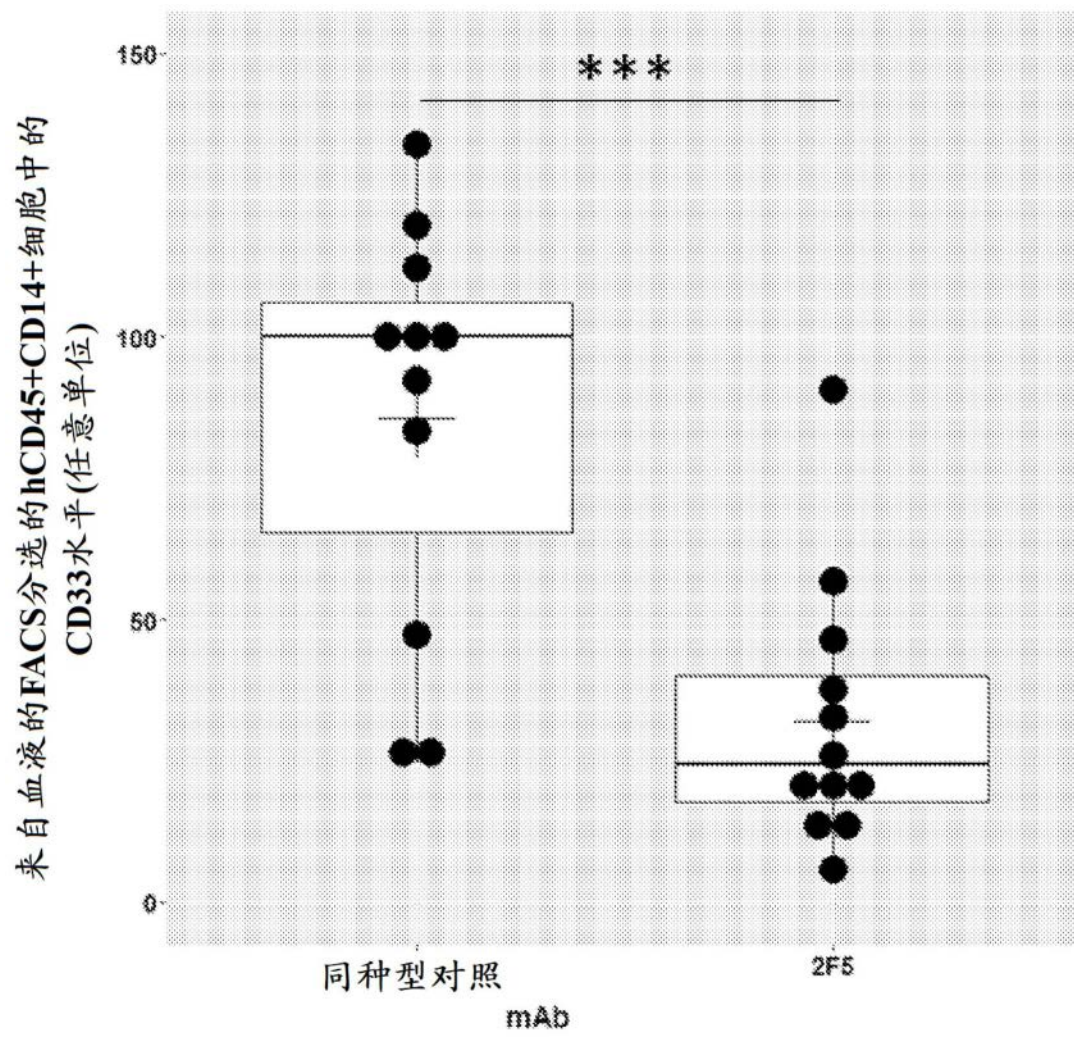


图15Y

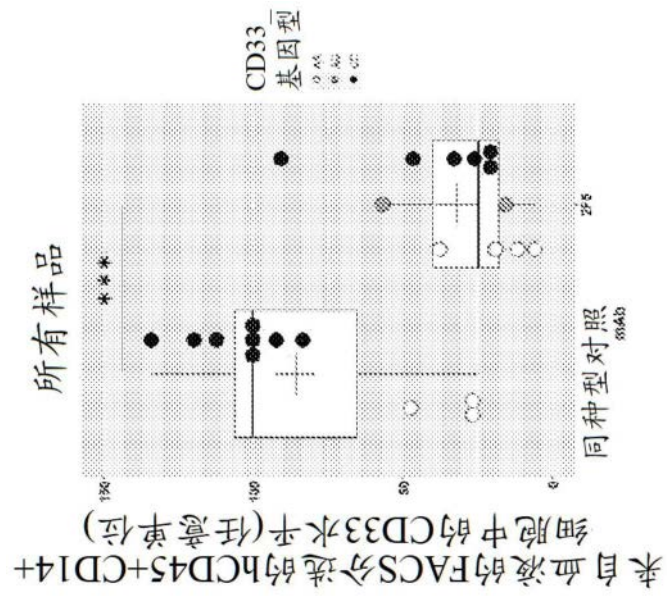


图15Z

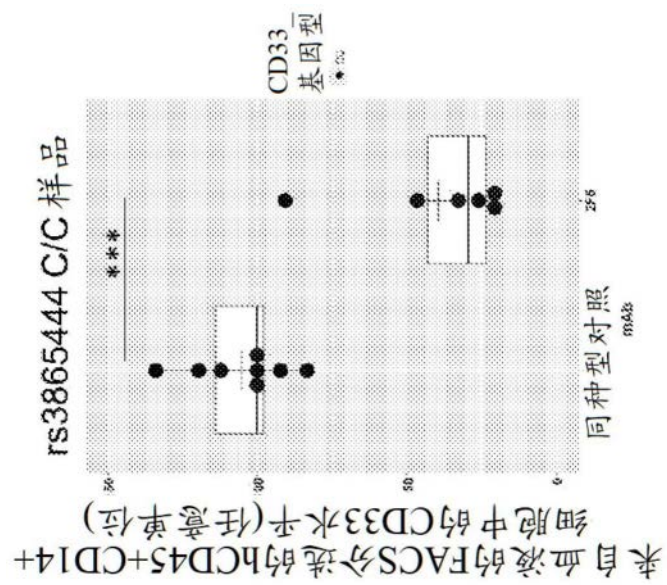


图15AA

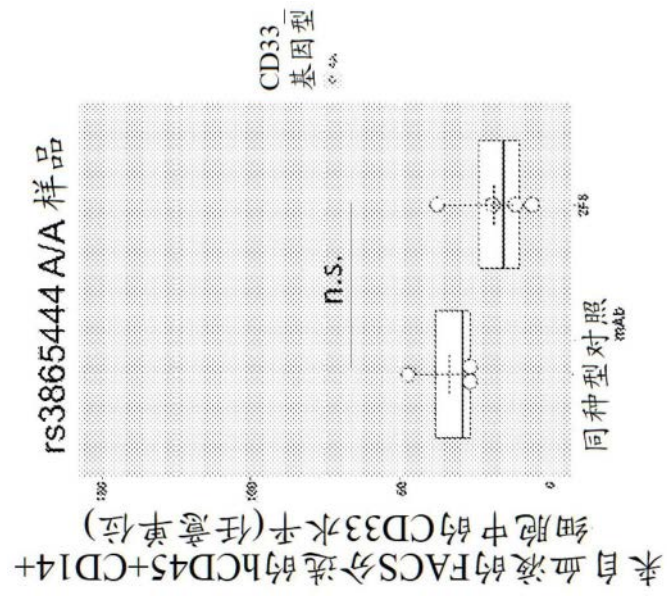


图15BB

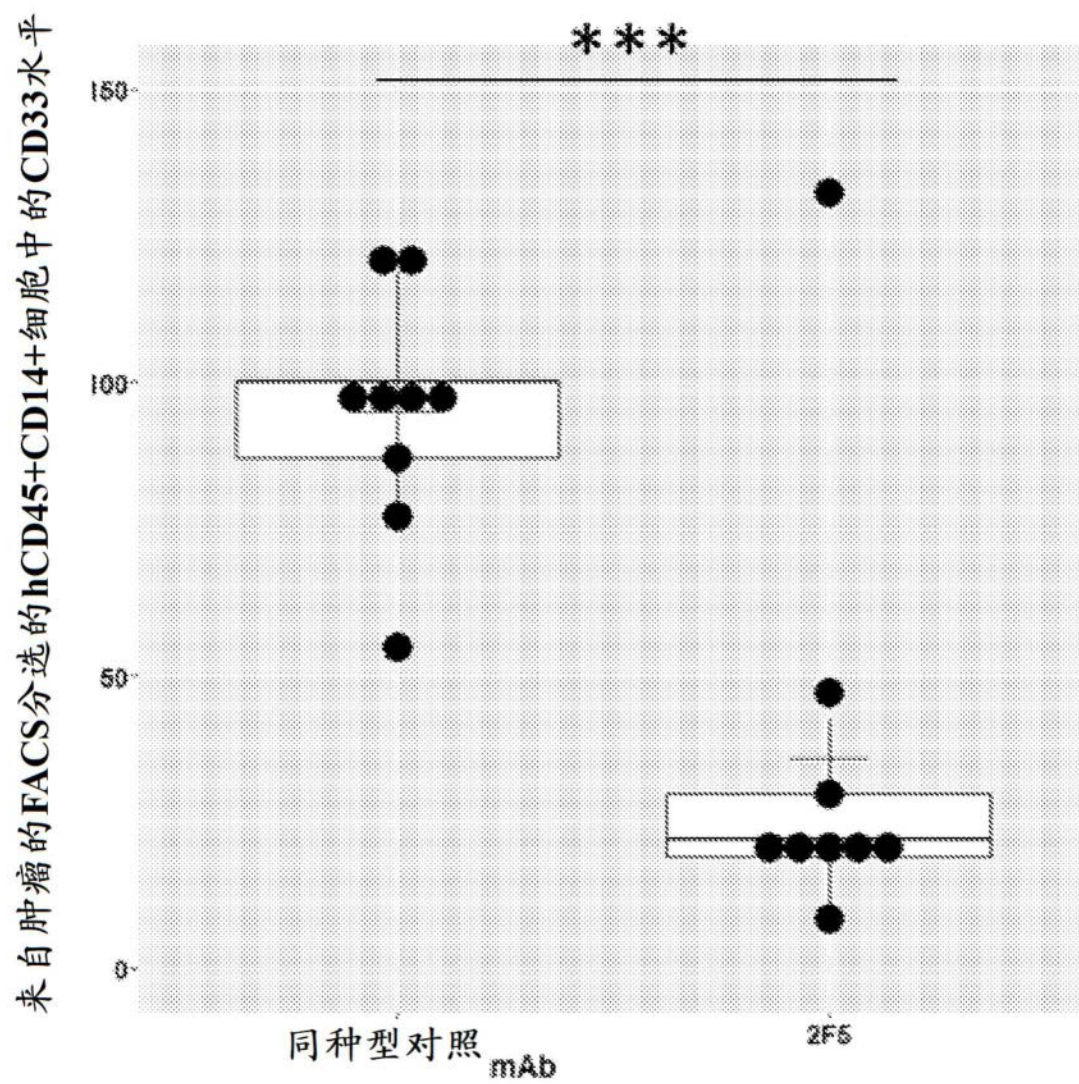


图15CC

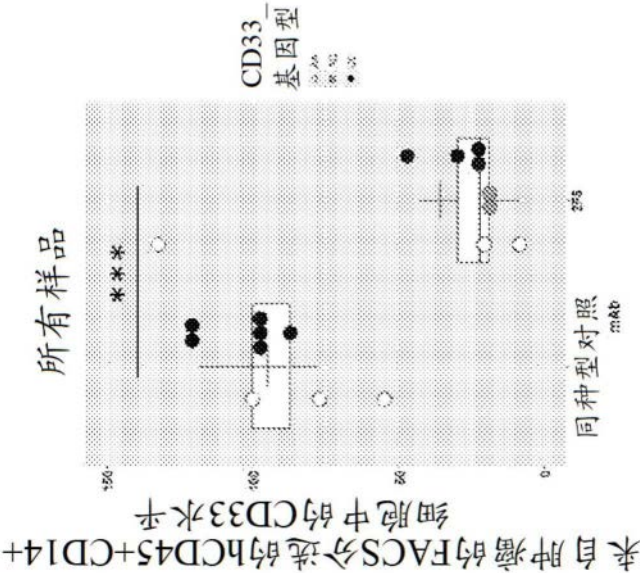


图15DD

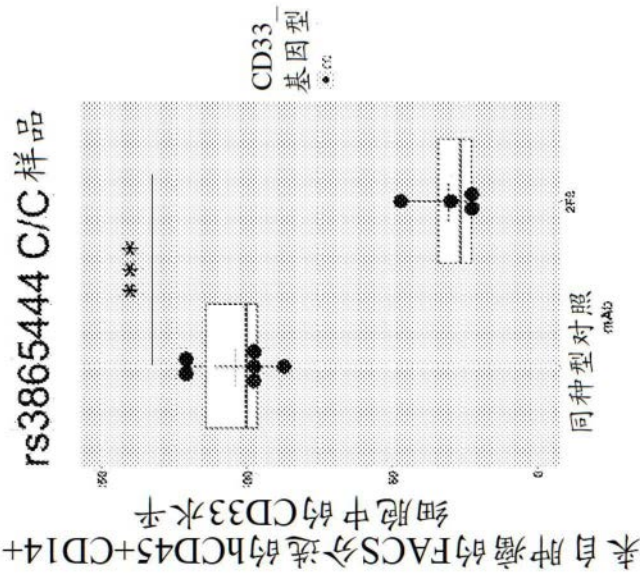


图15EE

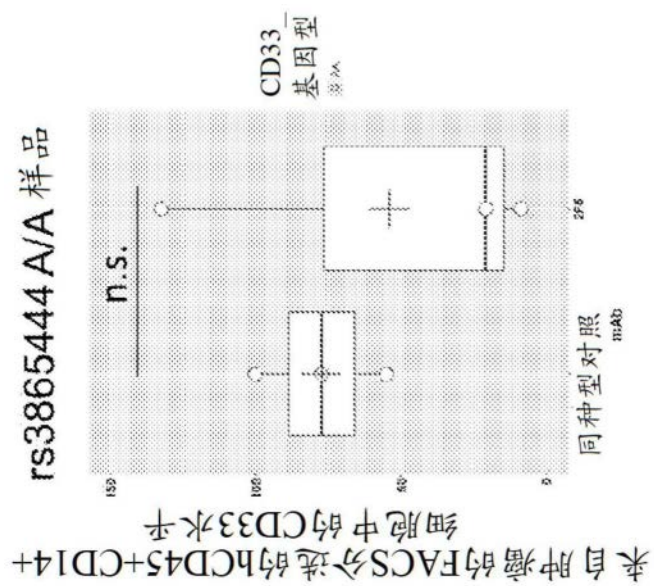


图15FF

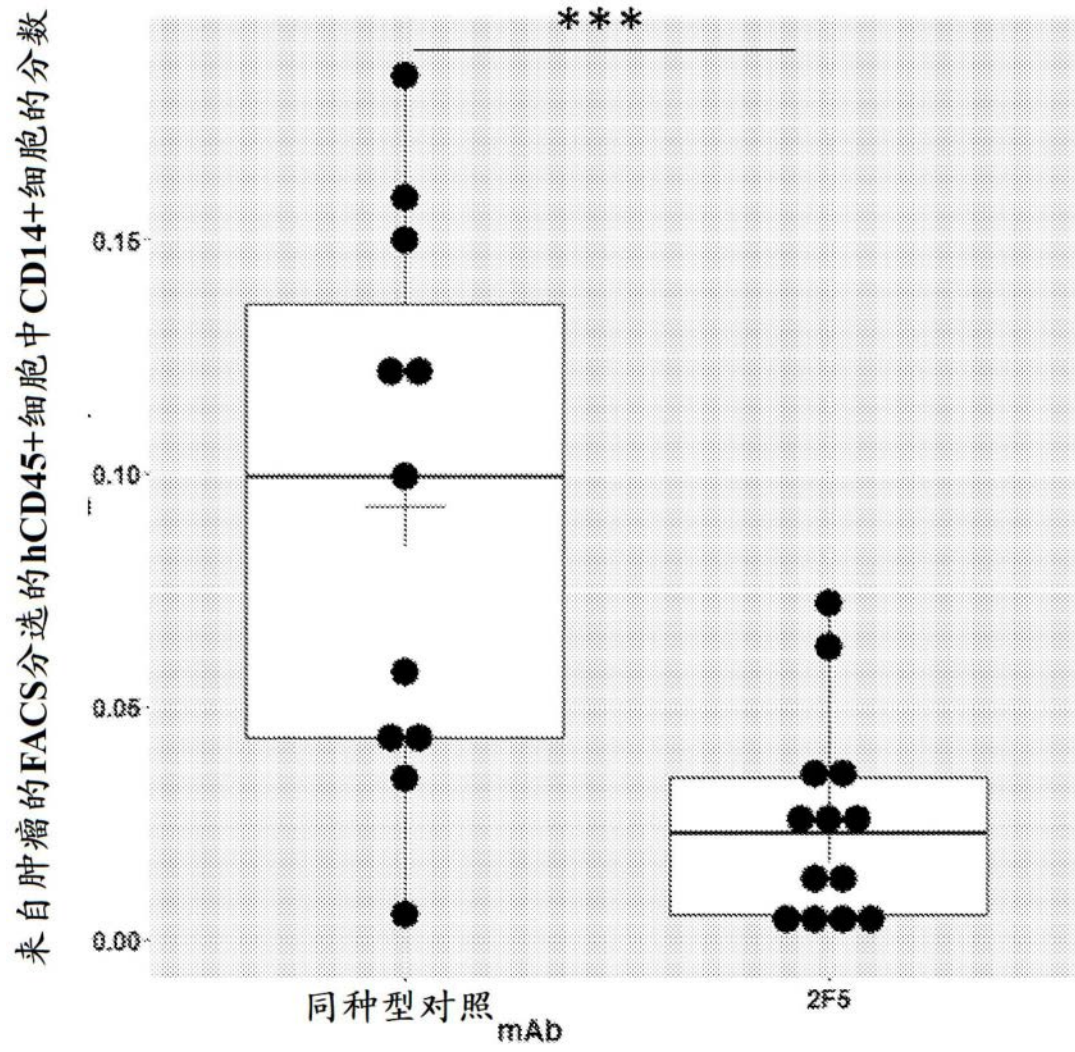


图15GG

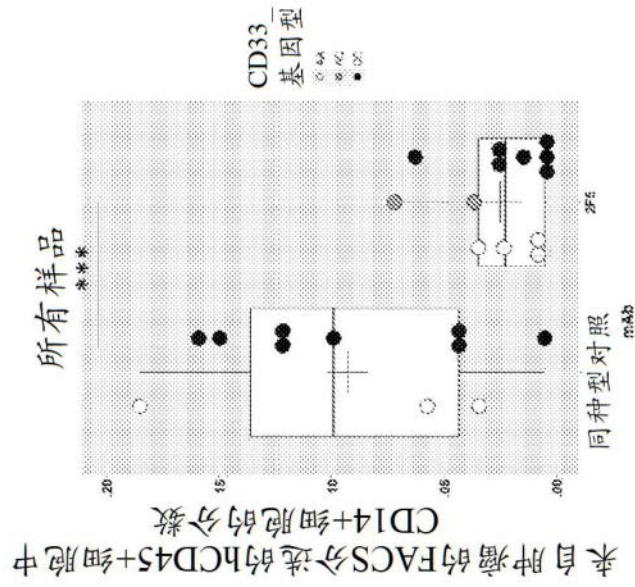


图15HH

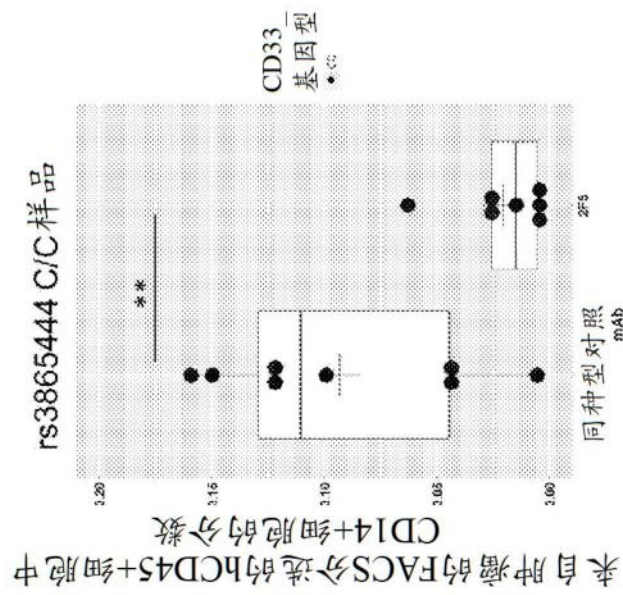


图15II

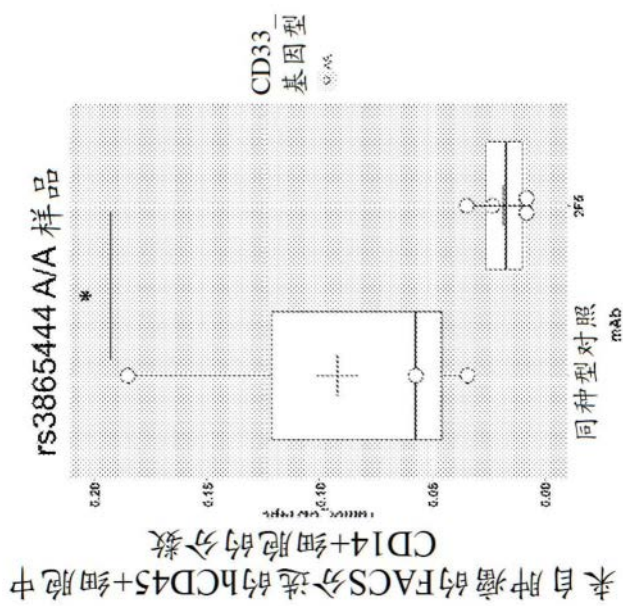


图15JJ

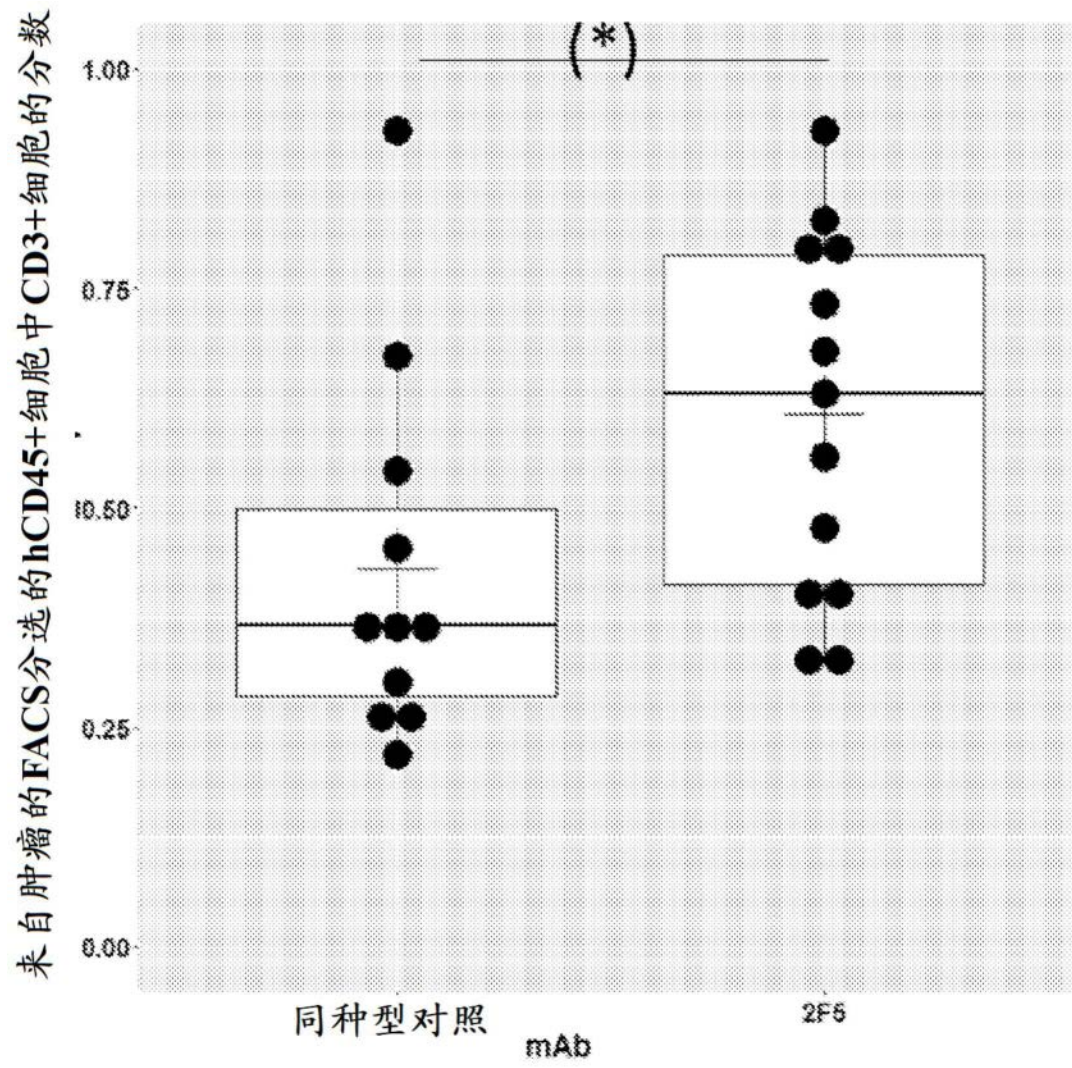


图15KK

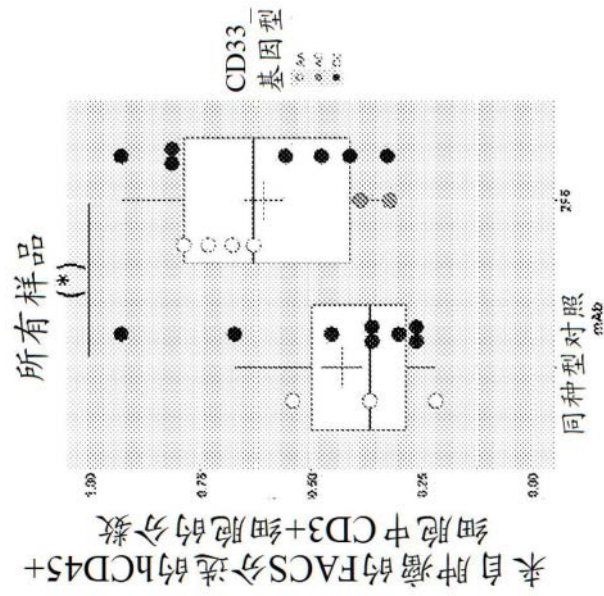


图15LL

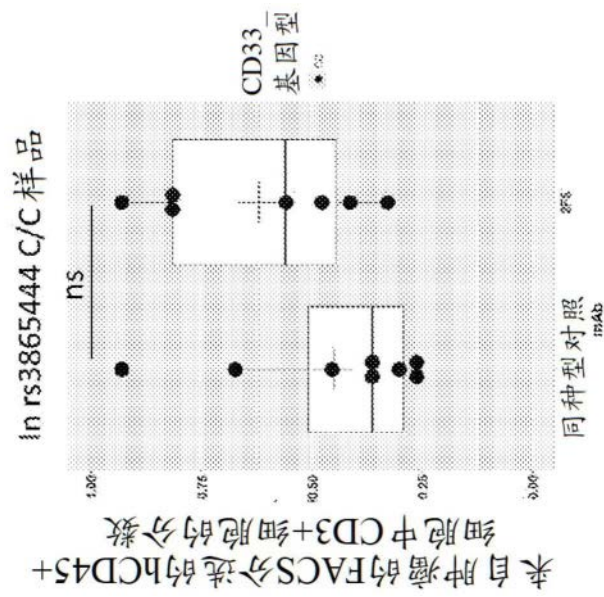


图15MM

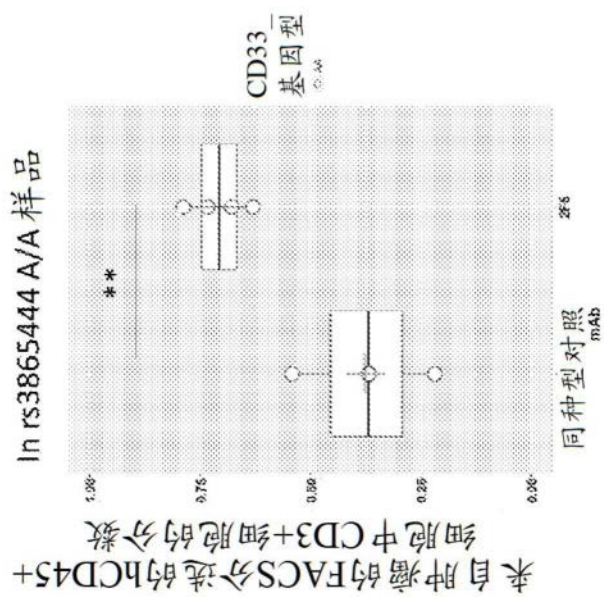


图15NN

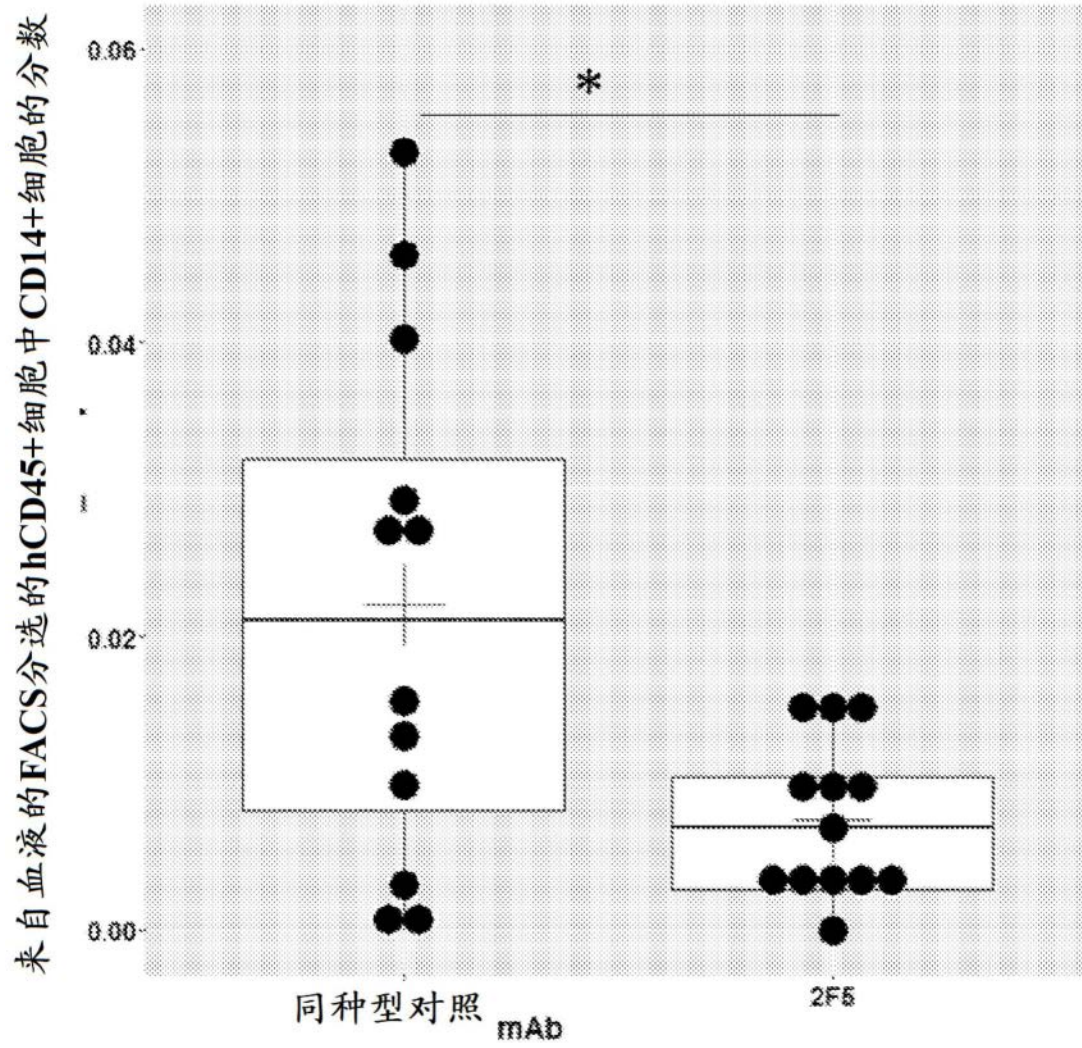


图1500

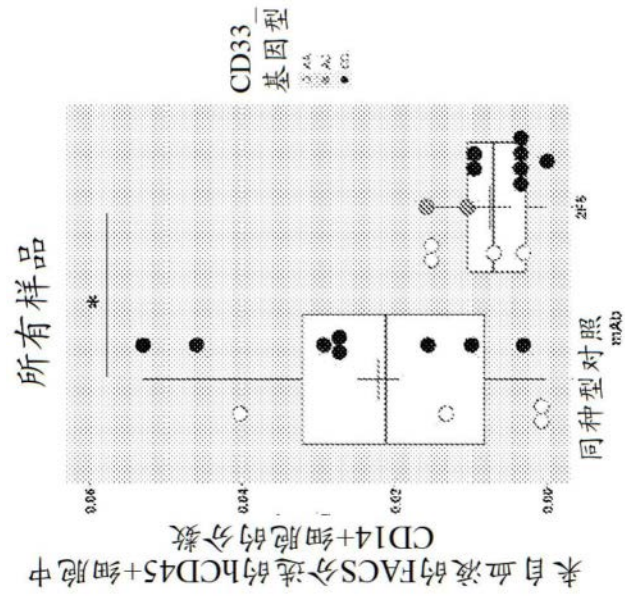


图15PP

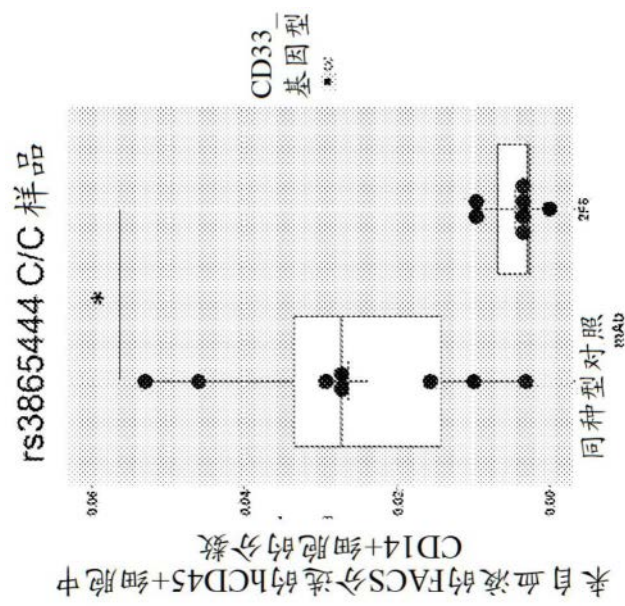


图15QQ

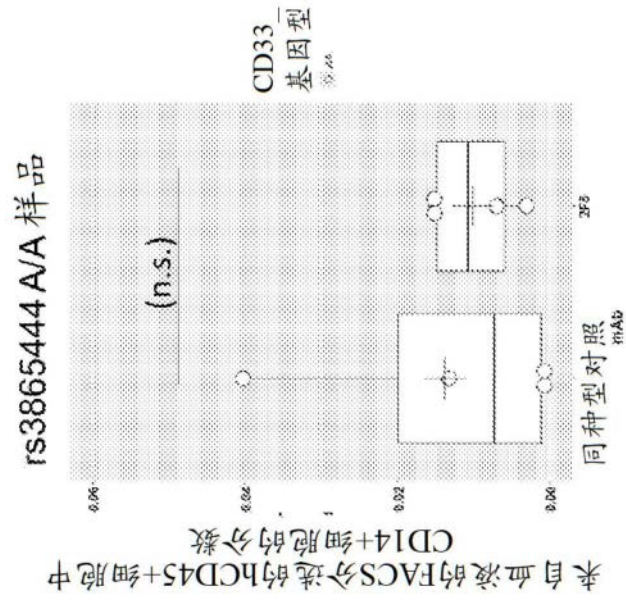


图15RR

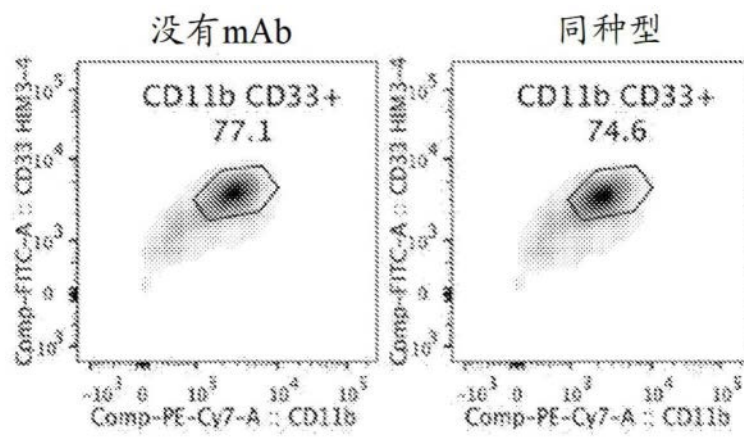


图16A

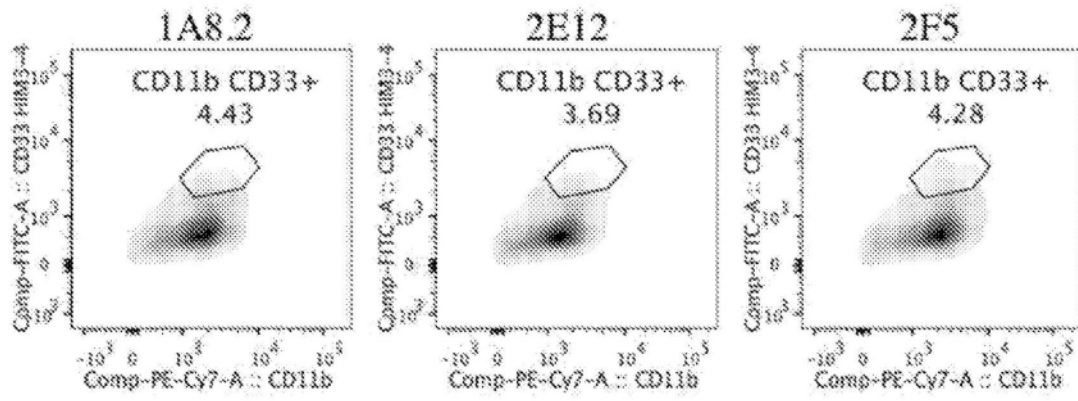


图16B

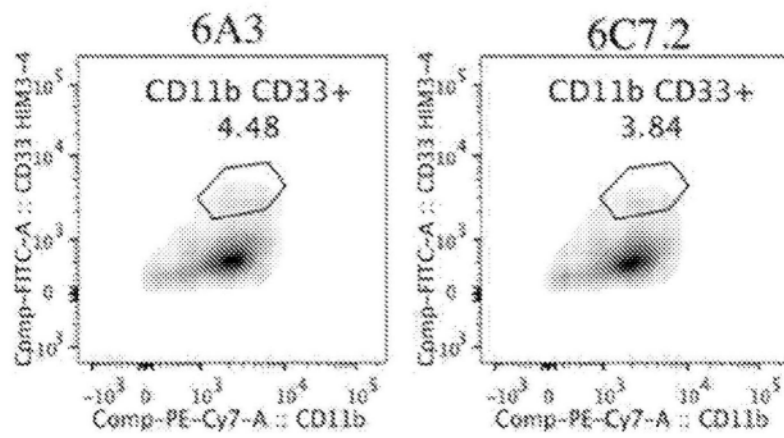


图16C

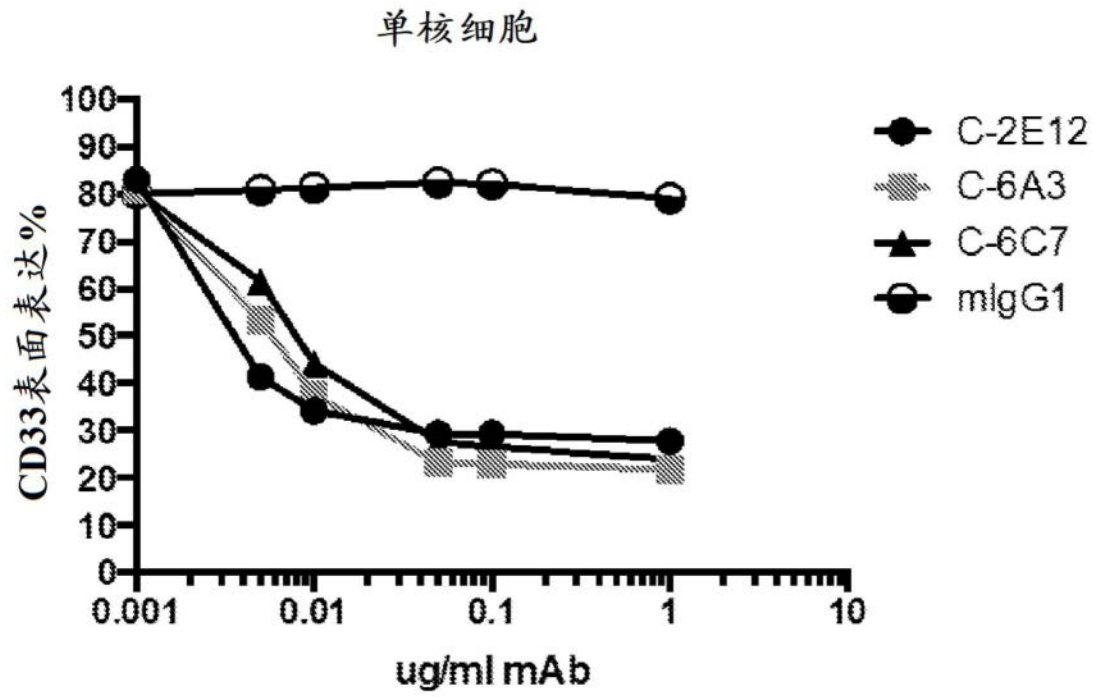


图16D

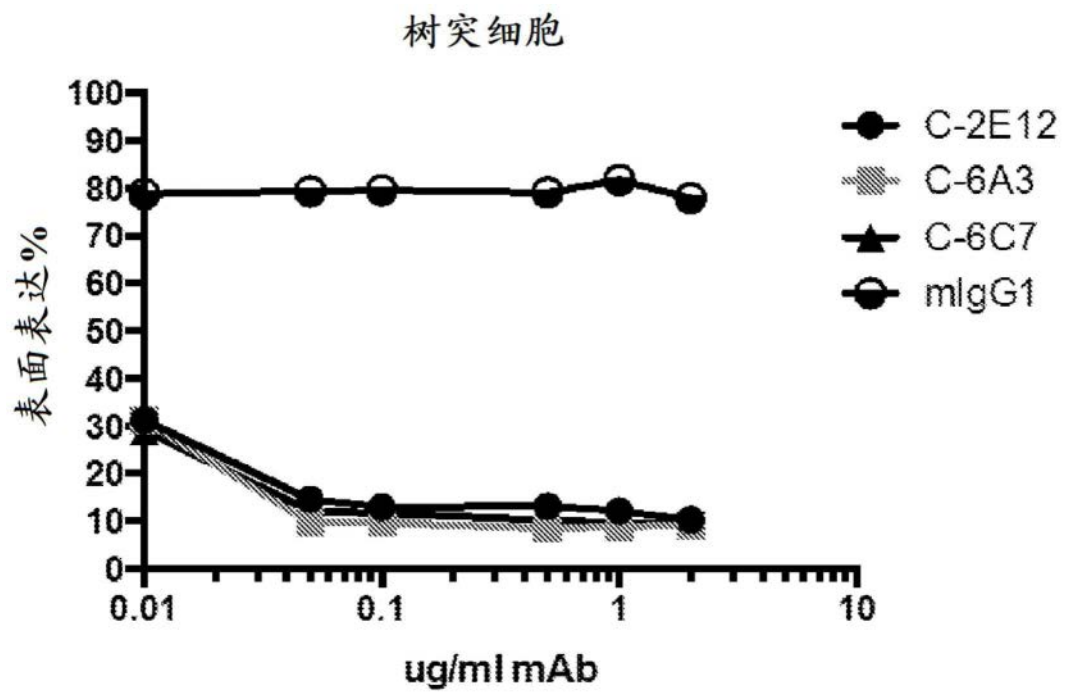


图16E

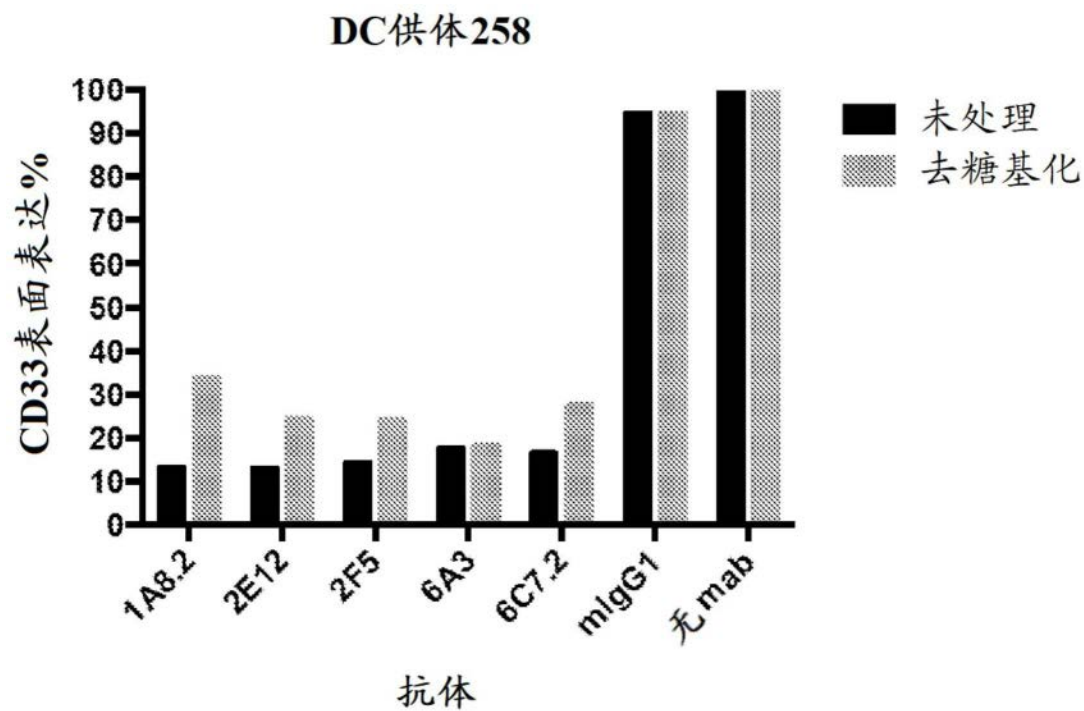


图16F

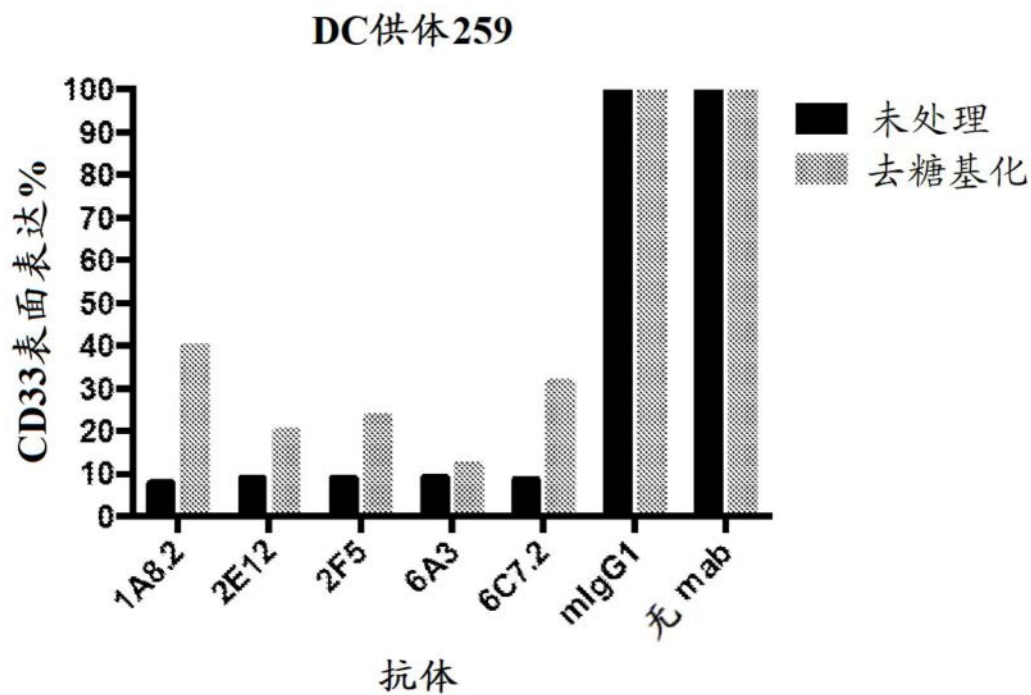


图16G

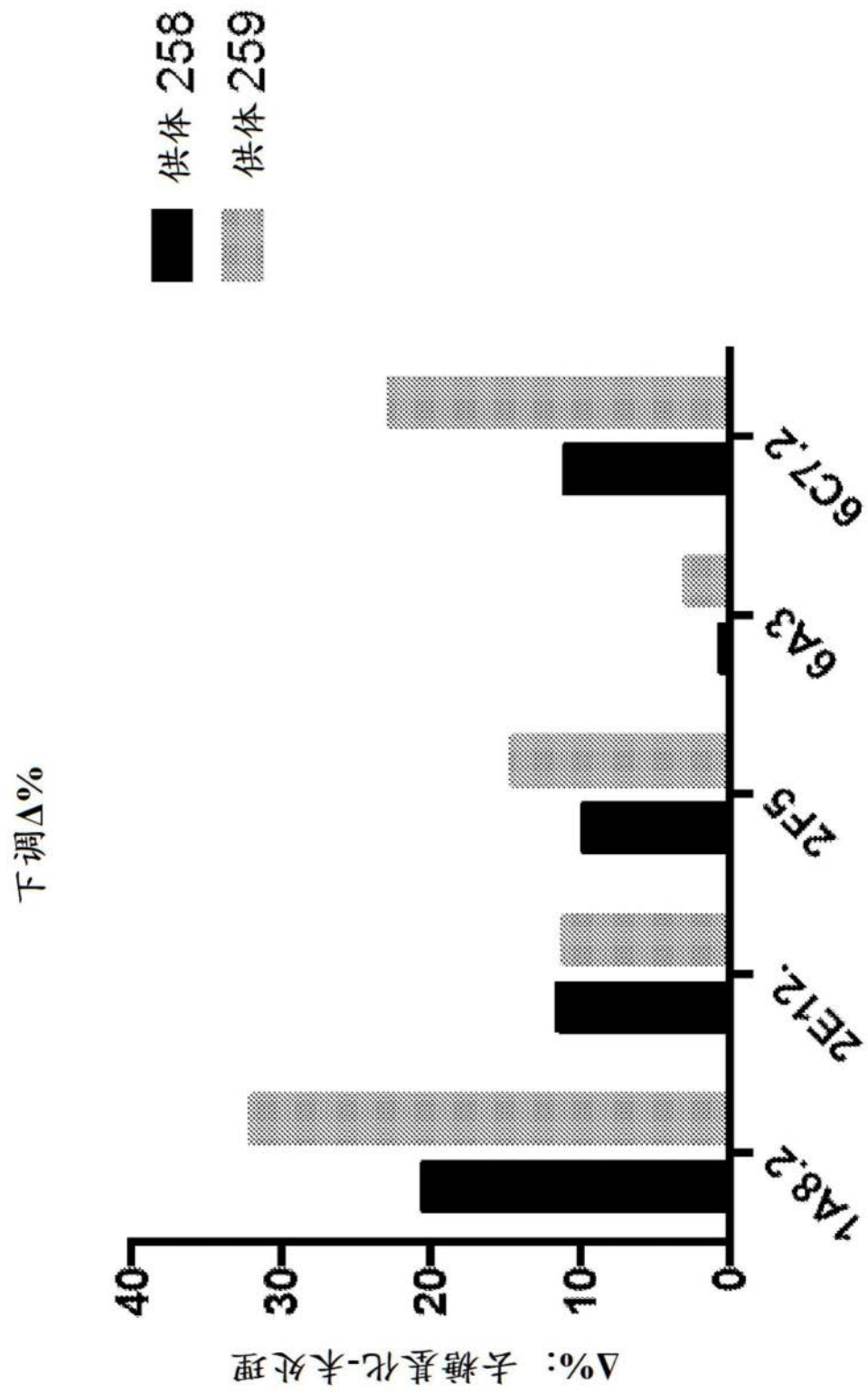


图16H

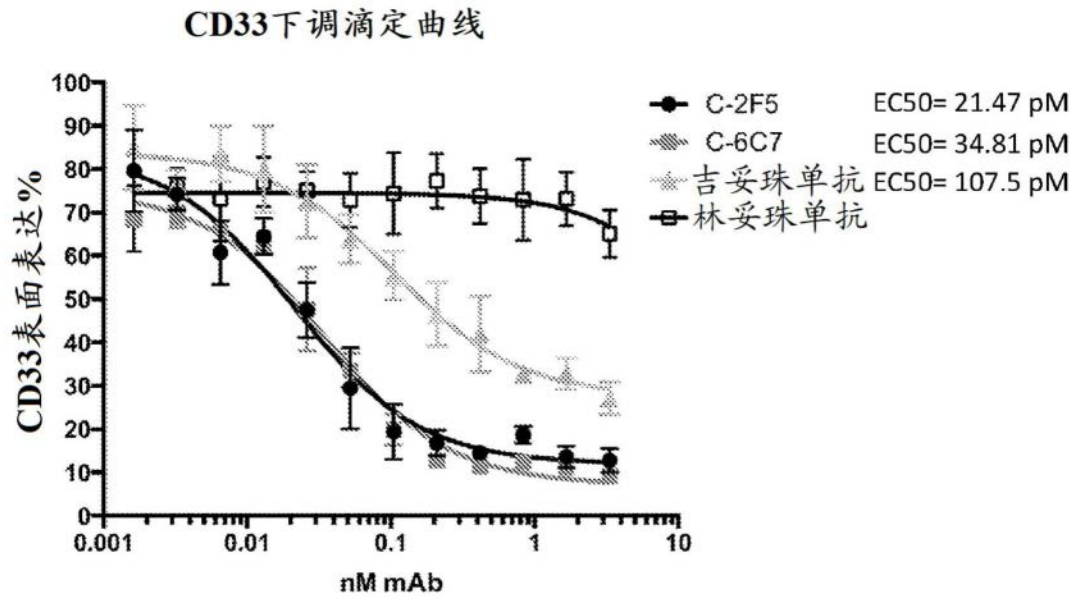


图16I

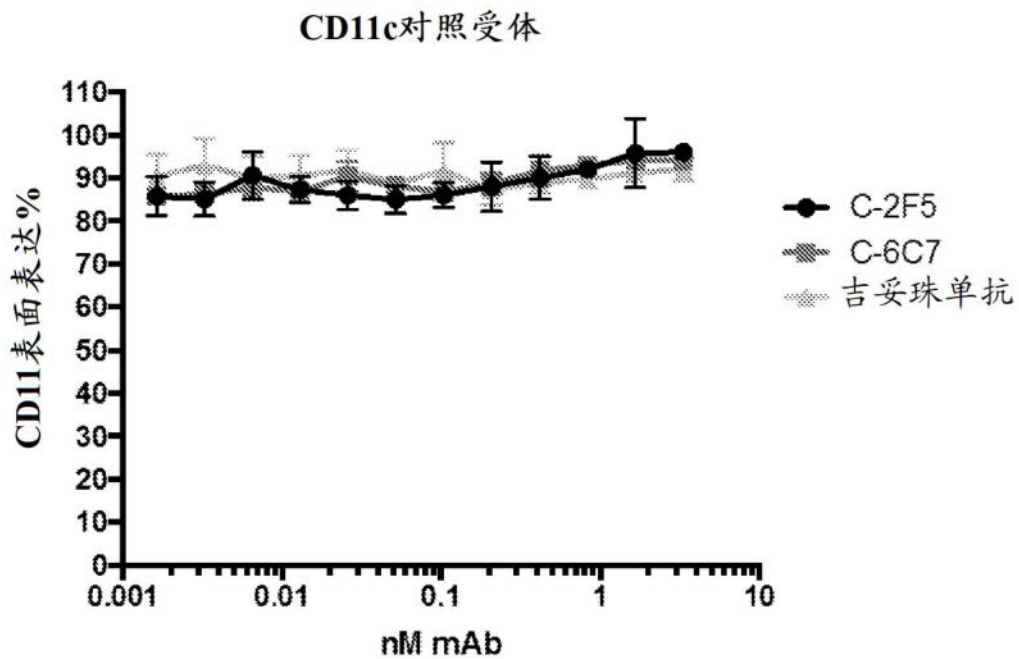


图16J

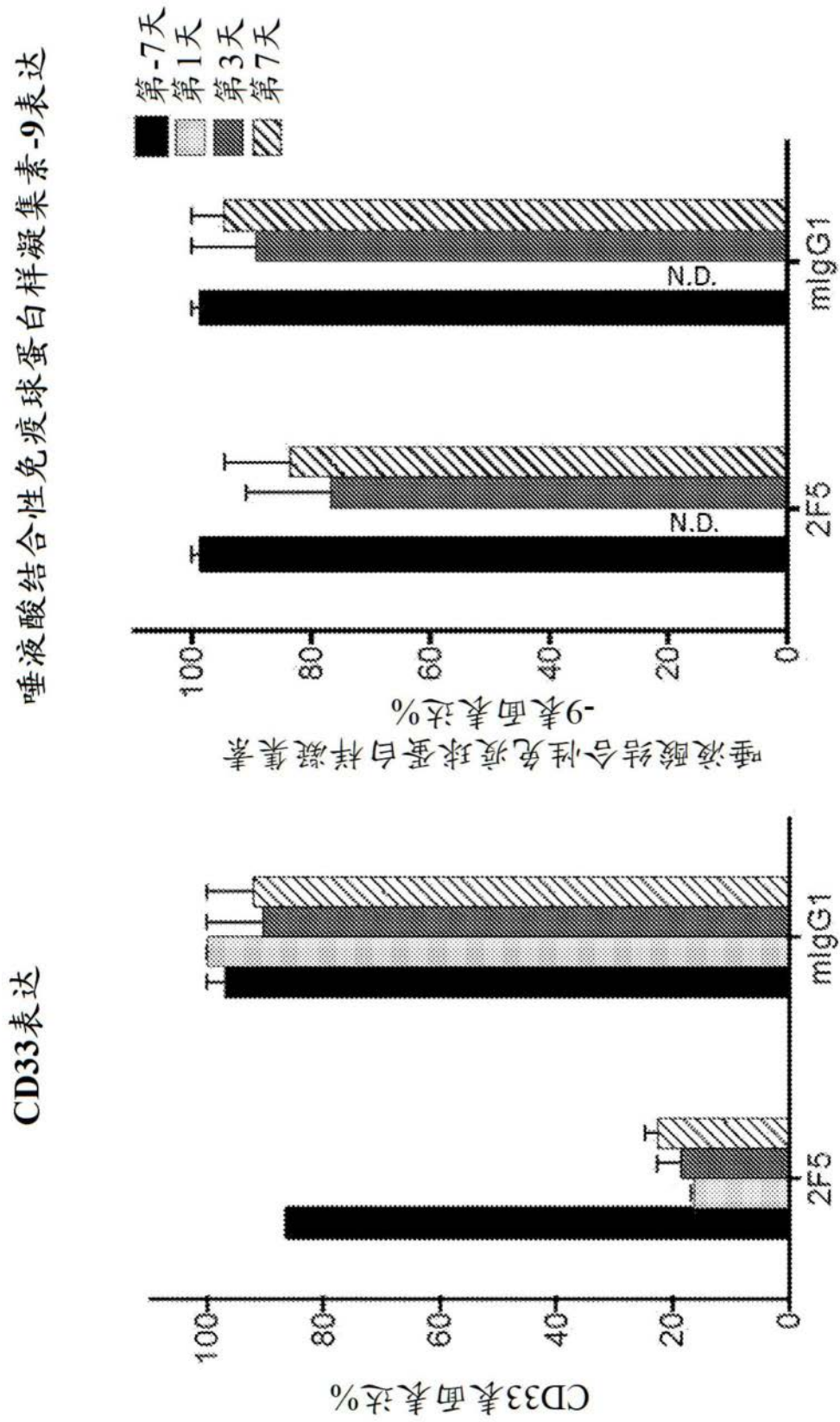


图 16L

图 16K

CD33的细胞表面水平

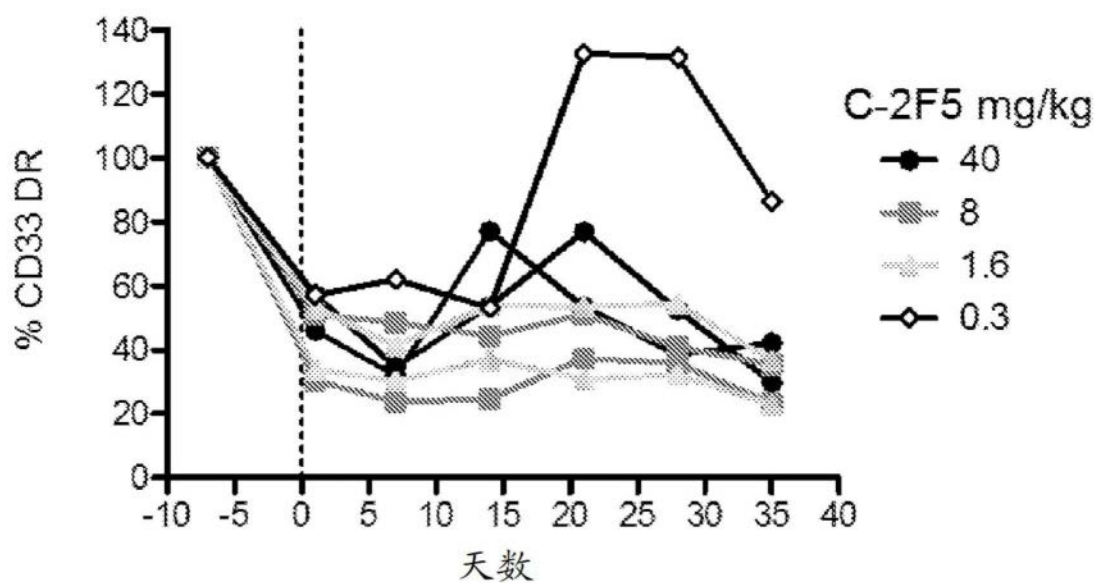


图16M

对照受体的细胞表面水平

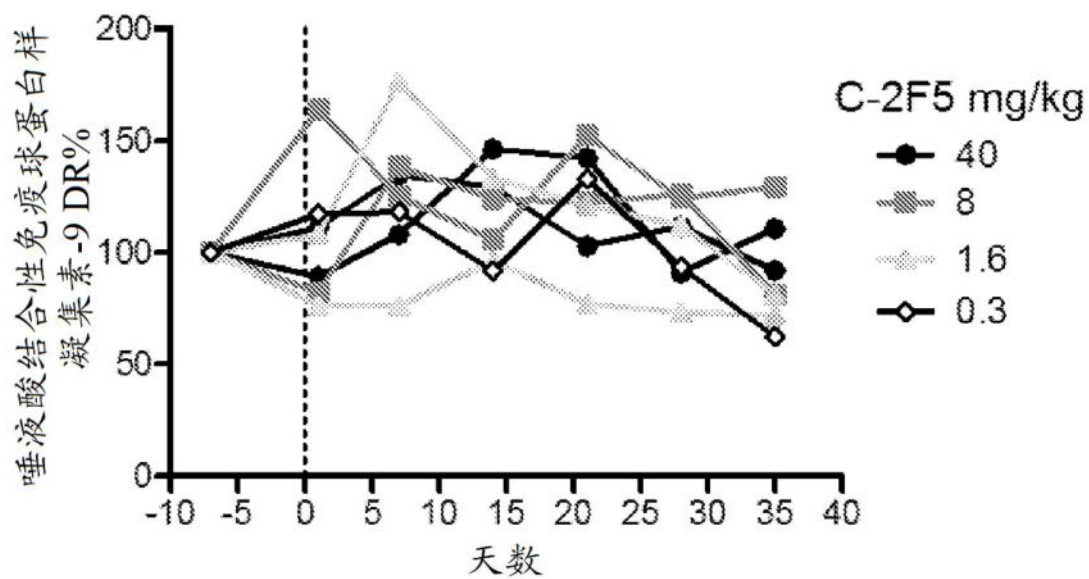


图16N

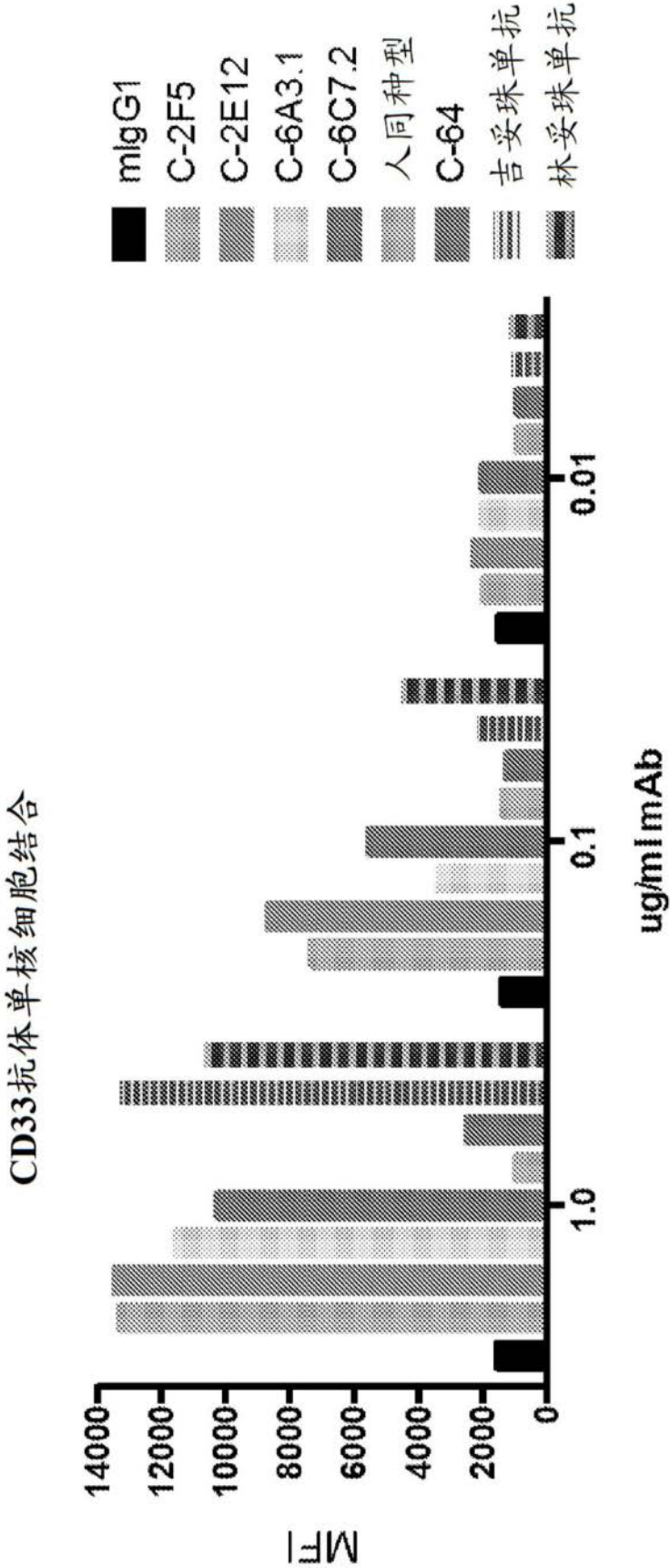


图17A

单核细胞CD33表面表达

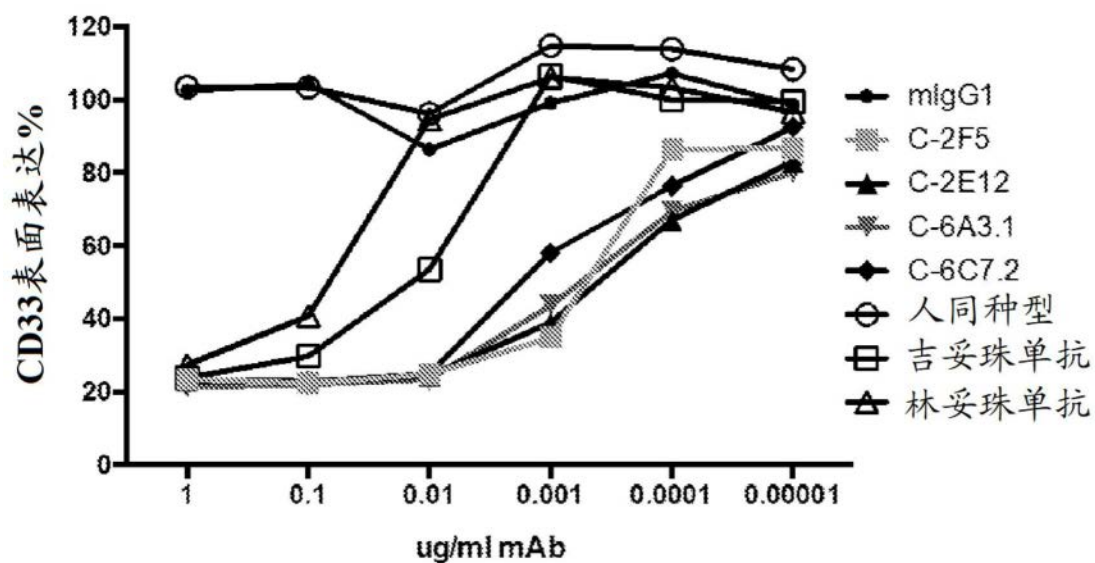


图17B

单核细胞CD14表面表达

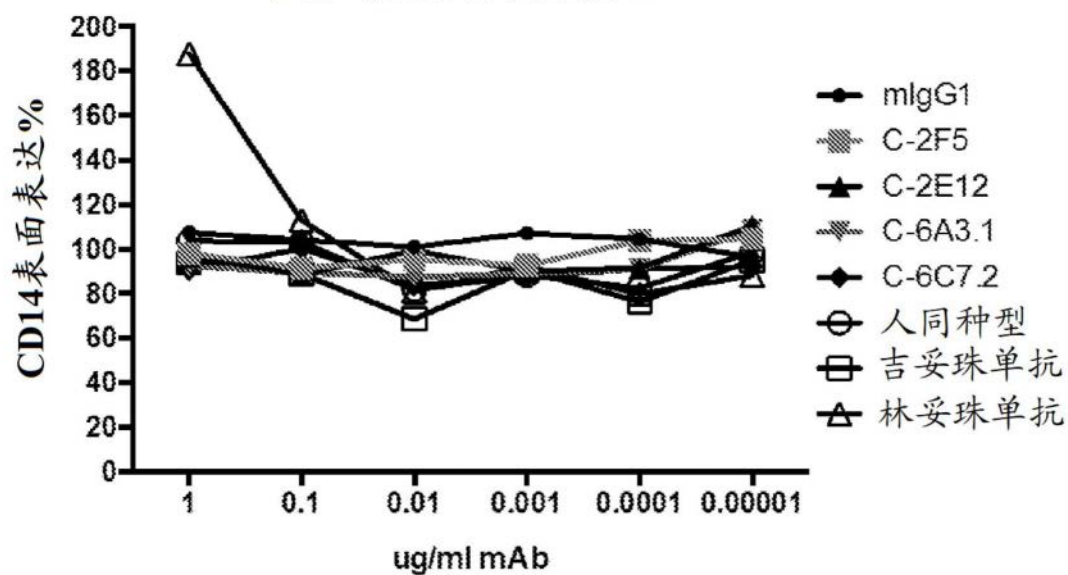


图17C

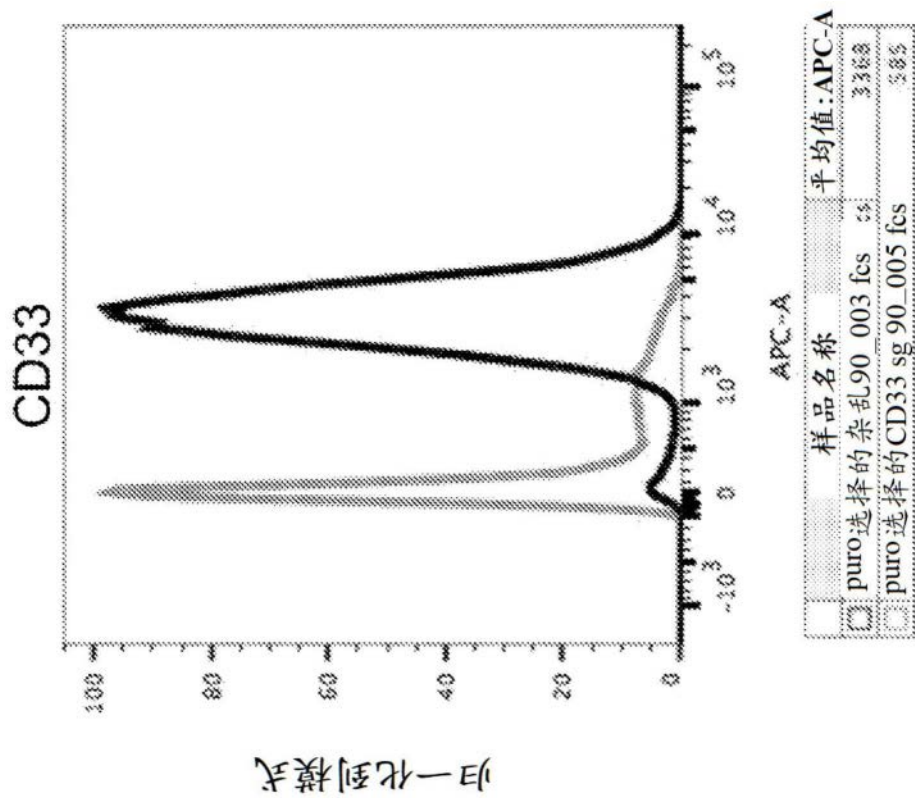


图18A

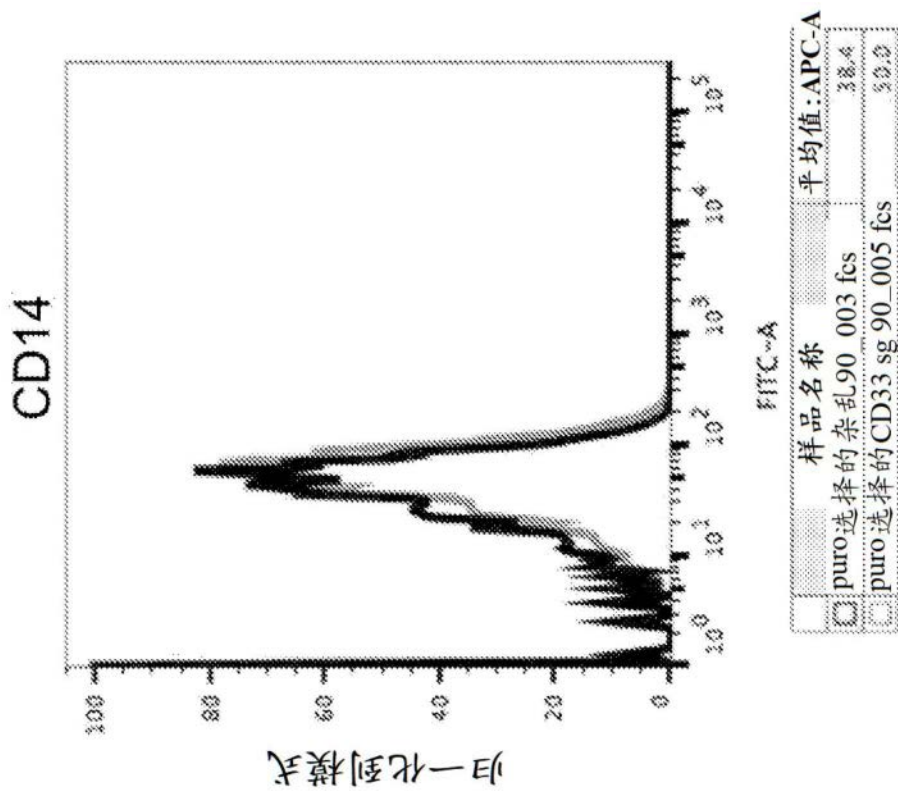


图18B

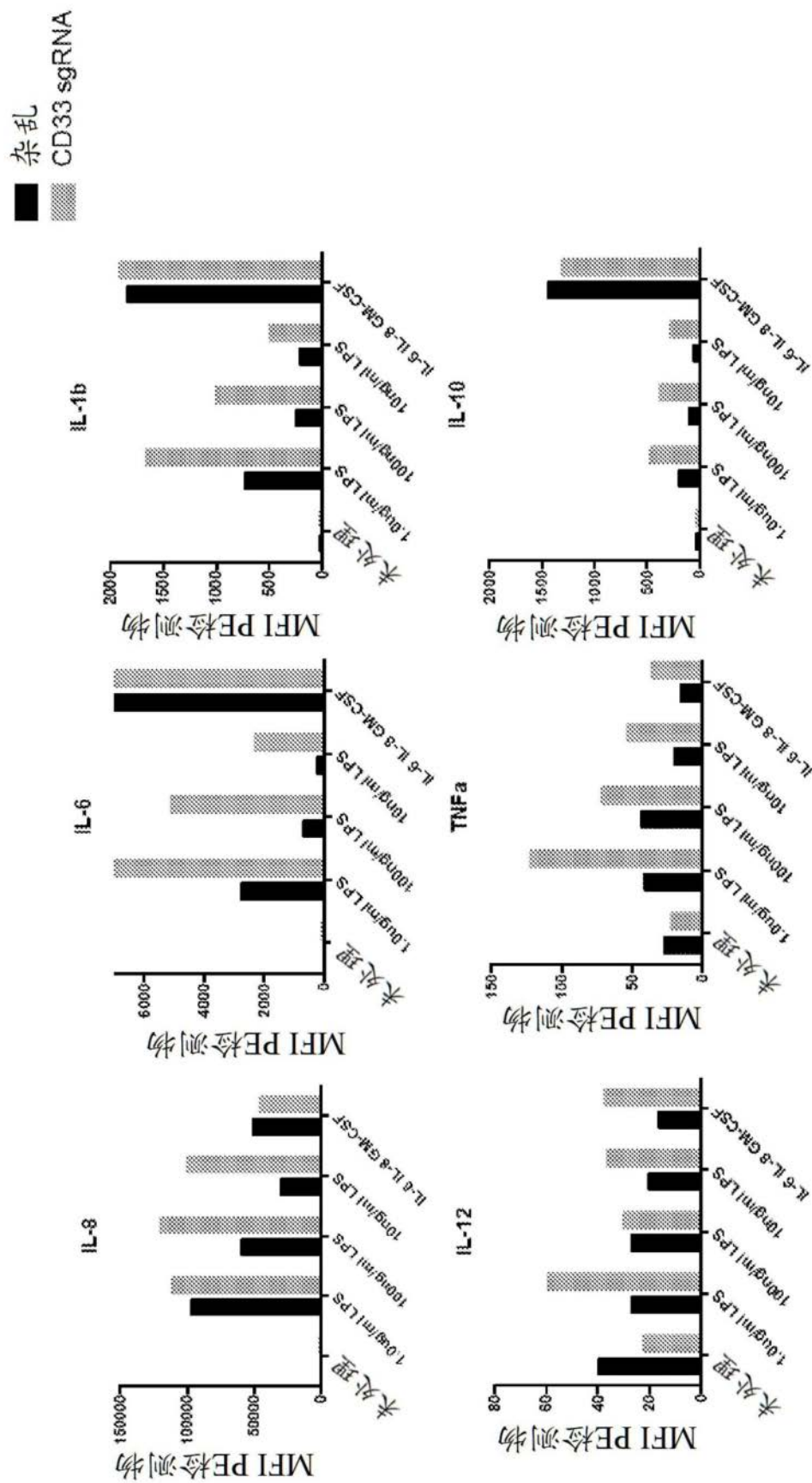


图18C

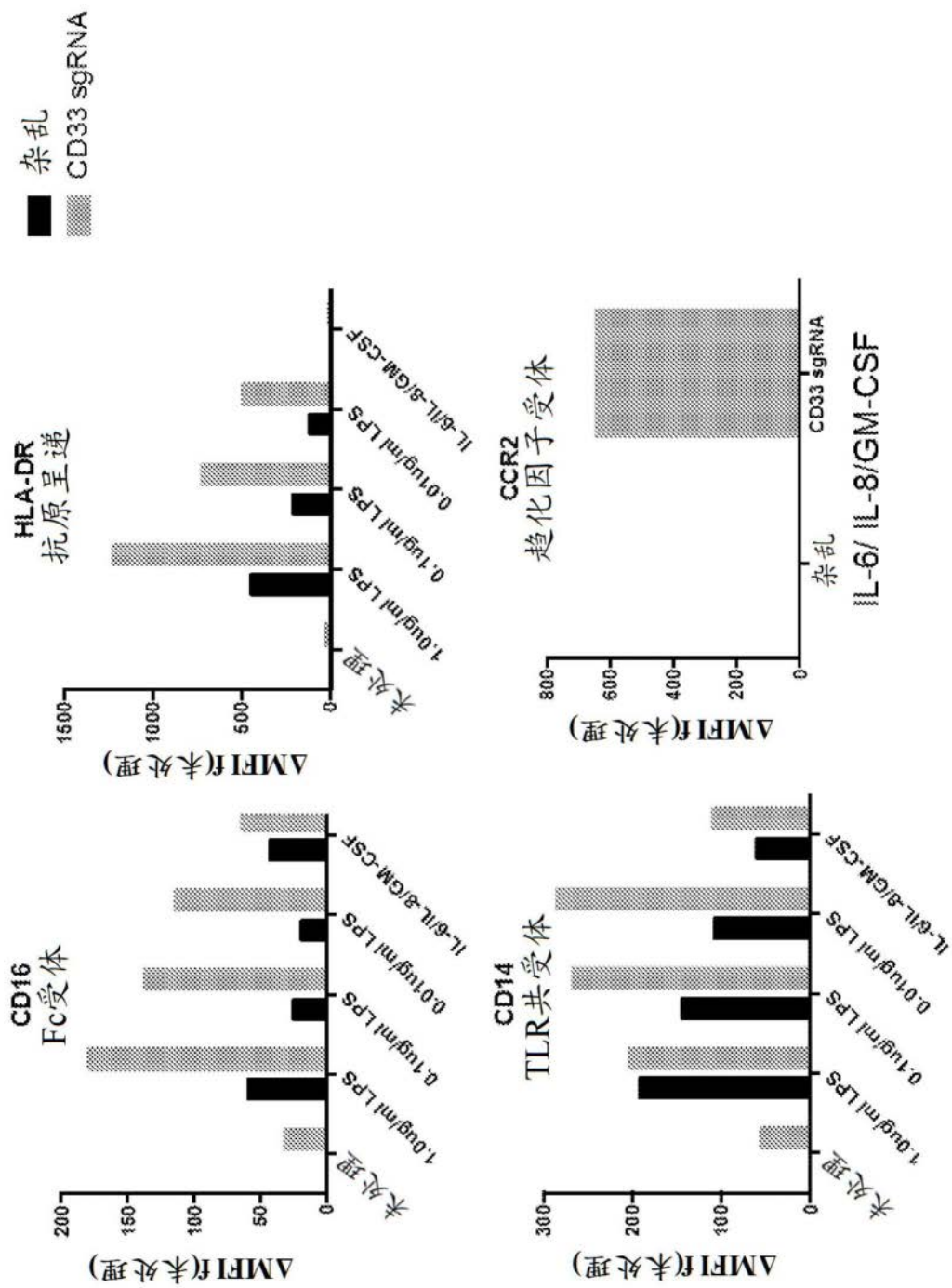


图18D

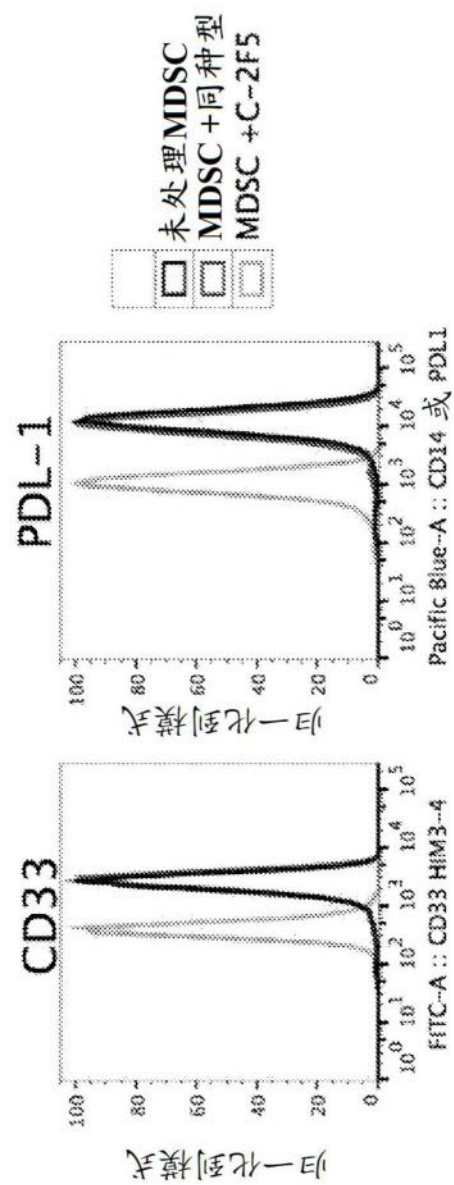


图19A

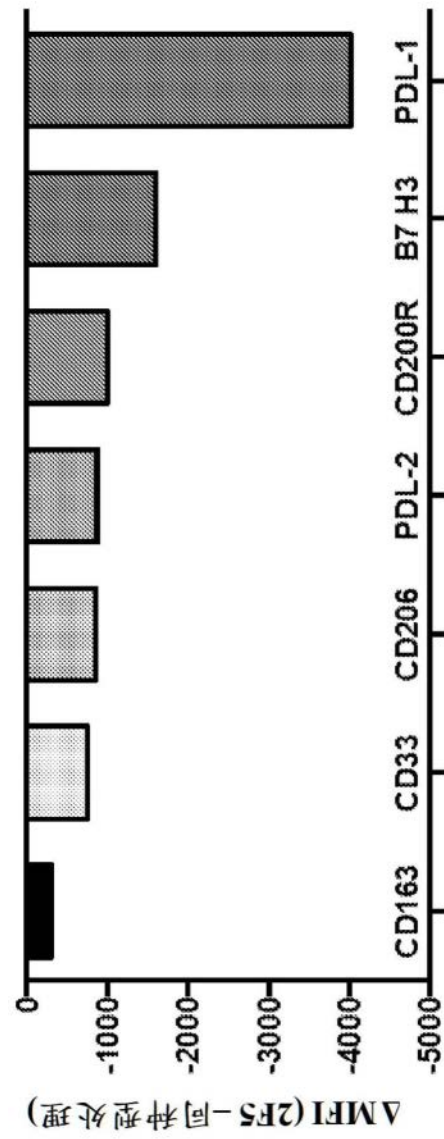


图19B

宫颈癌细胞条件培养基

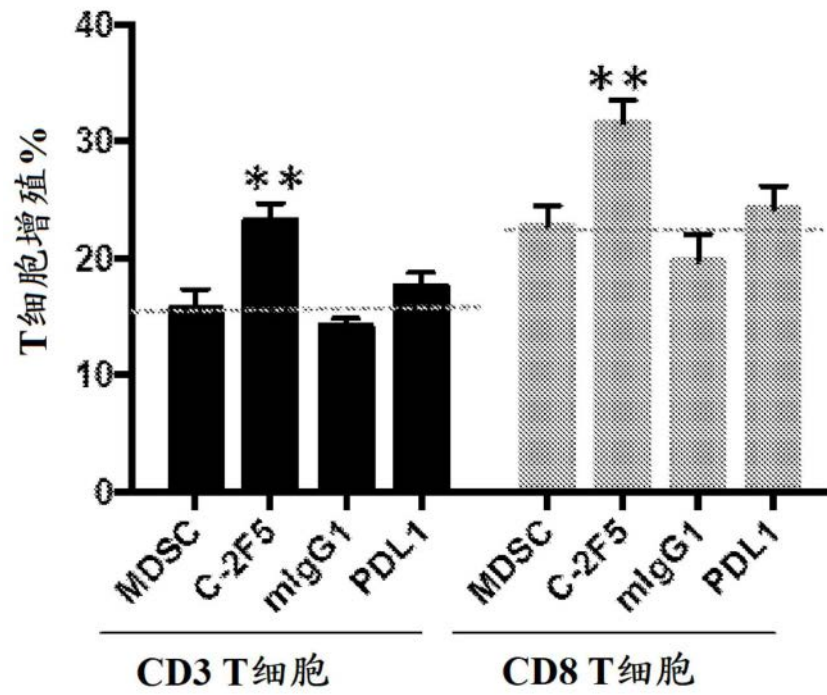


图19C

胶质母细胞瘤细胞条件培养基

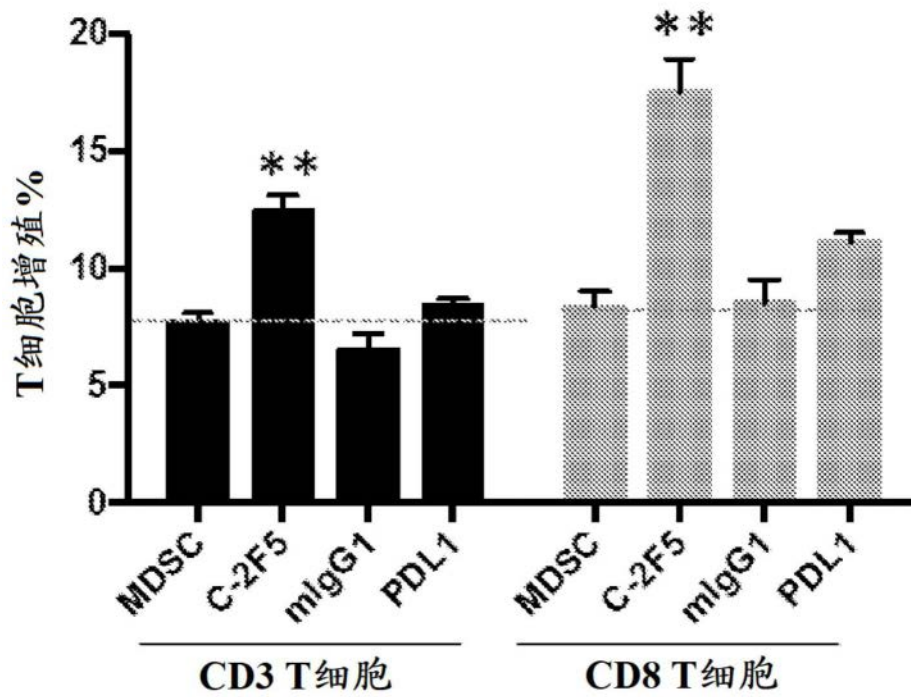


图19D

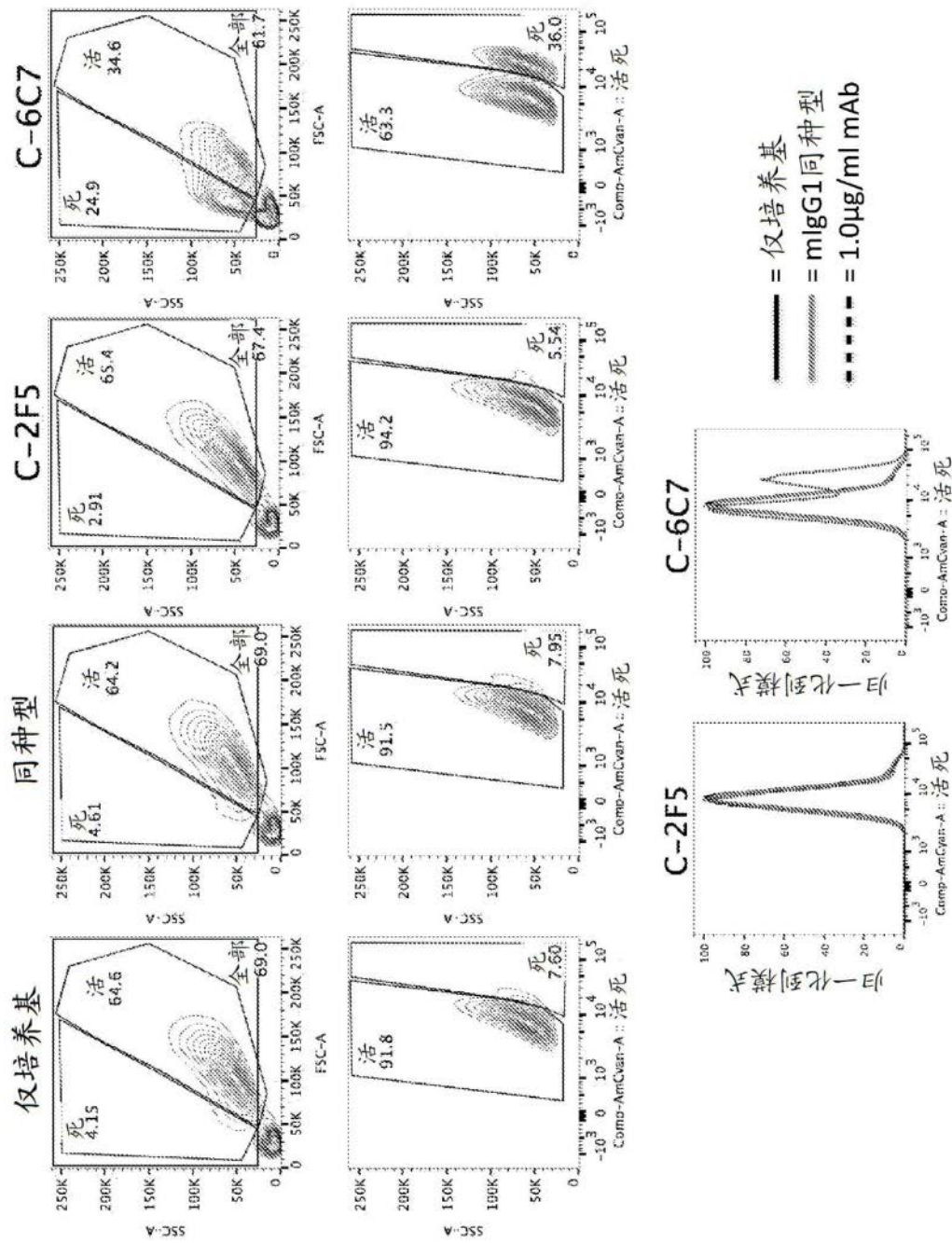


图20