



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104093740 B

(45)授权公告日 2018.01.09

(21)申请号 201380008292.7

(22)申请日 2013.02.06

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104093740 A

(43)申请公布日 2014.10.08

(30)优先权数据

61/595,658 2012.02.06 US

61/680,674 2012.08.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.08.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/024998 2013.02.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/119716 EN 2013.08.15

(73)专利权人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 X·马 Y·陈 S·斯塔维基

Y·吴 F·马丁 W·Y·林

M·A·斯塔洛瓦斯尼克

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈迎春 黄革生

(51)Int.Cl.

C07K 16/24(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

(56)对比文件

W0 2009112245 A1,2009.09.17,

W0 2011140249 A2,2011.11.10,

T Chihara等.IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation.《Cell Death and Differentiation》.2010,第17卷1917-1927.

Haishan Lin等.Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome.《Science》.2008,第320卷807-811.

审查员 尹军团

权利要求书3页 说明书70页

序列表44页 附图30页

(54)发明名称

使用CSF1R抑制剂的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供了CSF1-R途径的抑制剂,包括抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体和抗CSF-1R抗体,以及使用上述抑制剂治疗髓样致病性免疫病的方法。

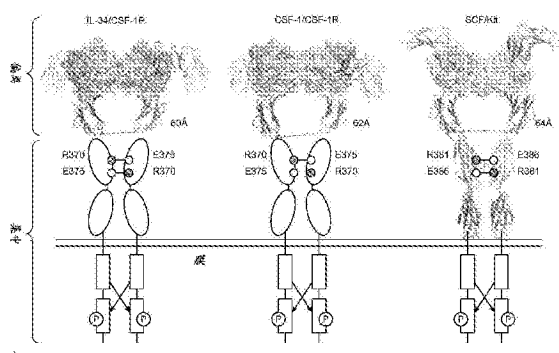


图 6

1. 一种与人IL-34结合的分离的单克隆抗体,所述抗体与包含以下至少一个氨基酸残基的人IL-34表位结合:Asp107,Glu111,Ser104,Gln120,Glu103,Leu109,Trp116和Asn61,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置,并且其中所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合,并且其中所述抗体包含(a)-(f):

(a) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59) 的HVR-H1;

(b) 包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG (SEQ ID NO:52) 或RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51) 的HVR-H2;

(c) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33) 或GINQGSKRGAMDY (SEQ ID NO:32) 的HVR-H3;

以及(d) 包含氨基酸序列的RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50) 的HVR-L1;

(e) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53) 的HVR-L2和

(f) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39) 或QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43) 或QQYTALPYT (SEQ ID NO:49) 或QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45) 或QQYSDVPYT (SEQ ID NO:47) 或QQSRTARPT (SEQ ID NO:41) 或QQSFYFPN (SEQ ID NO:38) 或QQSYTTPP (SEQ ID NO:42) 或QQYTALPY (SEQ ID NO:48) 或QQYSDLPY (SEQ ID NO:44) 或QQYSDVPY (SEQ ID NO:46) 或QQSRTARP (SEQ ID NO:40) 的HVR-L3。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中表位还包含以下的至少一个氨基酸残基:人IL-34的Pro152,Val108,Leu110,Gln106,Glu123,Leu127,Lys117,Ile60和Lys55,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中抗体包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区序列。

4. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中抗体包含了(a) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33) 的HVR-H3; (b) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39) 的HVR-L3; 和(c) 包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG (SEQ ID NO:52) 的HVR-H2。

5. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中抗体包含了(a) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59) 的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG (SEQ ID NO:52) 的HVR-H2; (c) 包含GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33) 的HVR-H3, 并且(d) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50) 的HVR-L1; (e) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53) 的HVR-L2; 和(f) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39) 的HVR-L3。

6. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中抗体与IL-34的二聚体结合。

7. 根据权利要求6所述的抗体,其中抗体与覆盖人IL-34二聚体的两个原体的表位结合。

8. 根据权利要求1所述的抗体,其中抗体包含了(a) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33) 或GINQGSKRGAMDY (SEQ ID NO:32) 的HVR-H3; (b) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39) 或QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43) 或QQYTALPYT (SEQ ID NO:49) 或QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45) 或QQYSDVPYT (SEQ ID NO:47) 或QQSRTARPT (SEQ ID NO:41) 的HVR-L3; 和(c) 包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG (SEQ ID NO:52) 或RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51) 的HVR-H2。

9. 根据权利要求1所述的抗体,其中抗体包含了(a) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY

(SEQ ID NO:33)的HVR-H3; (b) 包含氨基酸序列QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45)的HVR-L3;和(c) 包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51)的HVR-H2。

10. 根据权利要求1所述的抗体,其中抗体包含了(a) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59)的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51)的HVR-H2;和(c) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3;并且(d) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1; (e) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(f) 包含氨基酸序列QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45)的HVR-L3。

11. 根据权利要求1所述的抗体,其中抗体包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区序列。

12. 根据权利要求1所述的抗体,其中抗体包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区序列。

13. 根据权利要求1所述的抗体,其中抗体包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区序列。

14. 根据权利要求1所述的抗体,其中抗体包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变区序列。

15. 根据权利要求1所述的抗体,其中抗体包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链可变区序列。

16. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中抗体中和IL-34活性。

17. 根据权利要求16所述的抗体,其中抗体包含了(a) 包含氨基酸序列SRGAYRFAY (SEQ ID NO:56)的HVR-H3; (b) 包含氨基酸序列QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43)的HVR-L3;和(c) 包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG (SEQ ID NO:54)的HVR-H2。

18. 根据权利要求16所述的抗体,其中抗体包含了(a) 包含氨基酸序列SNYIIH (SEQ ID NO:55)的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG (SEQ ID NO:54)的HVR-H2; (c) 包含氨基酸序列SRGAYRFAY (SEQ ID NO:56)的HVR-H3; (d) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1; (e) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(f) 包含氨基酸序列QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43)的HVR-L3。

19. 根据权利要求1或18所述的抗体,其中抗体包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区序列。

20. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中抗体不抑制人CSF-1和人CSF-1R之间的结合。

21. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

22. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中抗体是双特异性抗体。

23. 根据权利要求22所述的抗体,其中双特异性抗体包含针对人CSF-1的第二结合特异性。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的抗体,所述抗体是结合人IL-34的抗体片段。

25. 根据权利要求24所述的片段,其中片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv或scFv片段。

26. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中抗体是单臂抗体。

27. 根据权利要求1或2所述的抗体,其中抗体是线性抗体。

28. 根据权利要求1或2所述的抗体,所述抗体是全长IgG1或IgG4抗体。

29. 分离的核酸, 编码根据权利要求1-28中任一项所述的抗体。
30. 载体, 包含根据权利要求29所述的核酸。
31. 宿主细胞, 包含根据权利要求29所述的核酸。
32. 产生抗体的方法, 包括培养根据权利要求31所述的宿主细胞, 从而产生抗体。
33. 根据权利要求32所述的方法, 还包括回收宿主细胞产生的抗体。
34. 药物组合物, 包含根据权利要求1-28中任一项所述的抗体和可药用载体。
35. 根据权利要求1-28中任一项所述的抗体在制造药物中的用途。
36. 根据权利要求35所述的用途, 其中药物用于治疗髓样致病性免疫病。
37. 根据权利要求35所述的用途, 其中药物同时抑制人IL-34和人CSF-1R之间以及人CSF1和人CSF1R之间的结合。
38. 权利要求36的用途, 其中髓样致病性免疫病是类风湿性关节炎、炎性肠病、多发性硬化、巨噬细胞活化综合征(MAS)、圆盘状狼疮、结节病、血管炎和移植物抗宿主病。
39. 权利要求1-28中任一项所述的抗体在制备用于治疗个体的药物中的用途, 其中待治疗的个体对用于髓样致病性疾病的TNF疗法和/或利妥昔单抗疗法具有不充分的反应。
40. 试剂盒, 包含根据权利要求1-28中任一项所述的抗体。
41. 试剂盒, 包含根据权利要求1-28中任一项所述的抗体, 并且还包含与人CSF-1结合的抗体。
42. 根据权利要求40所述的试剂盒, 还包括向个体施用有效量的抗体用于治疗所述个体中髓样致病性免疫病的说明书。

使用CSF 1R抑制剂的组合物和方法

发明领域

[0001] 本发明涉及使用CSF1-R途径抑制剂的组合物和方法,所述CSF1-R途径抑制剂包括抗IL-34抗体、双特异性IL-34/CSF1抗体和CSF1R抗体。

[0002] 背景

[0003] 白介素-34,也称作C16orf77或UNQ20374 (Clark等人,Genome Res 13:2265-2270 (2003)),最近在人单核细胞增殖筛选中被鉴定为CSF-1R的第二种和高亲和力配体 (Lin等人,Science 320:807-811 (2008))。这个发现已经长久以来由在CSF-1R无效小鼠中比在CSF-1缺陷CSF-1^{op}/CSF-1^{op}小鼠中更严重的表型所预示 (Dai等人,Blood 99:111-120 (2002))。如同CSF-1 (也称作M-CSF) (更充分表征的CSF-1R配体),IL-34刺激人单核细胞中ERK1/2的磷酸化并促进人骨髓培养物中粒细胞-巨噬细胞祖细胞 (CFU-GM) 和巨核细胞祖细胞 (CFU-M) 的形成 (Lin等人,Science 320:807-811 (2008))。由共同受体CSF-1R介导,原癌基因c-fms、IL-34和CSF-1的转录物充当单核吞噬细胞谱系细胞如单核细胞、巨噬细胞和破骨细胞分化、增殖和存活的关键调节物 (Droin等人,Journal of leukocyte biology 87:745-747 (2010))。

[0004] IL-34的功能与CSF-1具有强烈相似性,但是附带几个明显差异。两种细胞因子均在细胞培养研究中同等地支持细胞生长和存活 (Chihara等人,Cell death and differentiation 17:1917-1927 (2010);Wei等人,Journal of leukocyte biology 88:495-505 (2010))。在CSF-1启动子控制下表达时,IL-34基因可能拯救CSF-1失效合子的CSF-1^{op}/CSF-1^{op}小鼠的表型 (Wei等人,Journal of leukocyte biology 88:495-505 (2010))。IL-34也可以替代CSF-1来支持RANKL诱导的破骨细胞生成 (Baud'huin等人,The Journal of pathology 221:77-86 (2010))。然而,这两种因子在它们诱导原代巨噬细胞中趋化因子如MCP-1和嗜酸性粒细胞趋化因子-2的产生、TF-1-fms细胞中的形态变化和J774A.1细胞移行的能力方面似乎不同 (Chihara等人,Cell death and differentiation 17:1917-1927 (2010))。已经显示IL-34诱导CSF-1R和下游效应子的更强烈但短暂的酪氨酸磷酸化并快速下调CSF-1R表达 (Chihara等人,Cell death and differentiation 17:1917-1927 (2010))。另外,IL-34和CSF-1在胚组织和成体组织中均显示出差异性时空表达模式,这导致CSF-1R的互补激活 (Wei等人,Journal of leukocyte biology 88:495-505 (2010))。最令人震惊地,在胚胎中与CSF-1R一起检测到IL-34信使RNA,但未检测到CSF-1信使RNA,这可能解释为何小胶质细胞在CSF-1缺陷小鼠中形成,但是不在CSF-1R缺陷小鼠中形成 (Ginhoux等人,Science 330:841-845 (2010);Mizuno等人,The American journal of pathology 179:2016-2027 (2011))。因而,尽管IL-34和CSF-1彼此相似,但是它们在其发育角色、生物活性和信号激活动力学或强度方面并不必然相同。

[0005] 尽管缺少与其他蛋白质的可察觉序列相似性,通过折叠识别方法提出IL-34是一种短链螺旋状细胞因子,属于与CSF-1、SCF和Flt3L的相同家族 (Garceau等人,Journal of leukocyte biology 87:753-764 (2010))。后三种二聚体造血细胞因子在螺旋状细胞因子当中是独特,在于它们具有膜结合形式 (Bazan,Cell 65:9-10 (1991a);Hannum等人,Nature

368:643-648 (1994)) ; IL-34明显不同, 在于它缺少疏水性跨膜区段。此外, CSF-1、SCF和Flt3L细胞因子二聚体与受体酪氨酸激酶 (RTK) 家族的PDGFR亚家族结合 (III/V型) (Rosnet等人, *Critical reviews in oncogenesis* 4:595-613 (1993)), 而不与造血细胞因子受体结合 (Bazan, *Immunology today* 11:350-354 (1990))。CSF-1、SCF和Flt3L细胞因子二聚体在功能上模拟作为RTK家族激活型配体的PDGF和VEGF脱氨酸结生长因子二聚体 (Savvides等人, *Nature structural biology* 7:486-491 (2000); Wiesmann等人, *Nature structural biology* 7:440-442 (2000))。这个RTK家族的全部成员共享相似的总体构造, 所述总体构造由其胞外区中的多个Ig样结构域、单一跨膜区段和具有巨大插入的胞质酪氨酸激酶结构域组成。一旦刺激, CSF-1R二聚化并使其胞内结构域中的某些酪氨酸残基自身磷酸化, 所述酪氨酸残基充当有助于巨噬细胞分化的含有SH2的效应子蛋白的对接位点 (Pixley等人, *Trends in cell biology* 14:628-638 (2004))。

[0006] 与CSF-1R复合的二聚体CSF-1的结构揭示一种非对称的2:1复合物, 其中一个CSF-1原体在D2和D3之间的裂隙处靠近其受体, 而第二个CSF-1原体保持未被占据 (Chen等人, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:18267-18272 (2008))。然而, 直至本文描述时仍不清楚CSF-1R还能够藉此识别IL-34 (一种具有有限序列同一性的远缘相关配体) 的分子基础。IL-34可以独立地发挥功能, 但是不与CSF-1协同 (Lin等人, *Science* 320:807-811 (2008))。实际上, CSF-1与IL-34竞争结合至CSF-1R (Wei等人, *Journal of leukocyte biology* 88:495-505 (2010)), 显示CSF-1R上的相同配体结合位点。然而与之相反, 一项在CSF-1R和其两种配体之间的最近对比序列研究提出, IL-34的CD环和CSF-1R的D3与D4之间的交界在进化期间共有强的序列保守相关系数, 并且因此可以代表与CSF-1/CSF-1R复合物所使用的结合模型不同的独特结合模型 (Garceau等人, *Journal of leukocyte biology* 87:753-764 (2010))。有趣地, 抗CSF-1R抗体MAb12-2D6据报道阻断IL-34和CSF-1与CSF-1R的结合, 而另一种抗体MAb2-4A5仅阻断CSF-1/CSF-1R结合 (Chihara等人, *Cell death and differentiation* 17:1917-1927 (2010))。这些结果有力地提示IL-34和CSF-1在CSF-1R的表面上具有重叠但不相同的结合位点。

[0007] 本文中提到的全部参考文献, 包括专利申请和出版物, 因而通过引用的方式完整并入。

[0008] 概述

[0009] 本发明提供抗IL-34抗体、与IL-34和CSF-1结合的双特异性抗体和抗CSF-1R抗体, 及使用所述抗体的方法。在一个实施方案中, 本发明的抗体具有减少的抗体依赖的细胞介导细胞毒 (ADCC) 和/或补体依赖的细胞毒 (CDC) 活性。在一个具体的实施方案中, 通过在以下一个或多个残基238、265、269、270、297、327和329 (EU编号) 处至少包含Fc区置换, 本发明的抗体具有减少的ADCC活性。在一个具体的实施方案中, 减少ADCC活性的Fc区置换在残基297处。在另一个实施方案中, 减少ADCC活性的Fc区置换是N297G或N297A。在另一个实施方案中, 减少ADCC的Fc区置换是D265A。在又一个实施方案中, 减少ADCC活性的Fc置换是将残基265和297置换成丙氨酸。在一个实施方案中, 双特异性抗IL-34/抗CSF-1抗体是杵臼 (knob-into-hole) 双特异性抗体。

[0010] 本文中提供与人IL-34结合的分离抗体, 所述抗体与包含以下至少一个氨基酸残

基的表位结合：人IL-34的Glu103、Leu109、Gln106、Asn150、Leu127、Asn128、Ser184、Leu186、Asn187、Lys44、Glu121、Asp107、Glu111、Ser104、Gln120、Trp116和Asn61，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置，并且所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。

[0011] 本文中提供与人IL-34结合的分离抗体，所述抗体与包含从人IL-34的Glu103至Asn150的至少一个氨基酸残基的表位结合，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置，并且所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。

[0012] 在一些实施方案中，抗体与包含以下至少一个氨基酸残基的表位结合：人IL-34的Glu103、Leu109、Gln106和Asn150，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，表位还包含以下的至少一个氨基酸残基：人IL-34的Ser100、Glu123、Trp116、Thr124、Leu127、Asn128、Gln131和Thr134，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，抗体与人IL-34的位置100-108、116-134、109和150内部的氨基酸结合，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

[0013] 在一些实施方案中，抗体与包含以下至少一个氨基酸残基的表位结合：人IL-34的Asn128、Ser184、Leu186、Asn187、Lys44和Glu121，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，表位还包含以下的至少一个氨基酸残基：人IL-34的Phe40、Asp43、Leu125、Gln189、Thr36和Val185，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，抗体与人IL-34的位置36-44、121-128和184-187内部的氨基酸结合，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，抗体与包含从人IL-34的Glu103-Leu127的至少一个氨基酸残基的表位结合，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，抗体与包含以下至少一个氨基酸残基的表位结合：人IL-34的Asp107、Glu111、Ser104、Gln120、Glu103、Leu109、Trp116和Asn61，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，表位还包含以下的至少一个氨基酸残基：人IL-34的Pro152、Val108、Leu110、Gln106、Glu123、Leu127、Lys117、Ile60和Lys55，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，抗体与人IL-34的位置55-61、100-108、109、111-127和152内部的氨基酸结合，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

[0014] 在一些实施方案中，抗体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中，抗体包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区序列和/或具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区序列。在一些实施方案中，抗体包含了(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3；(b)包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39)的HVR-L3；和(c)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG (SEQ ID NO:52)的HVR-H2。在一些实施方案中，抗体包含了(a)包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG (SEQ ID NO:52)的HVR-H2；和(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3。在一些实施方案中，抗体包含了(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(b)包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(c)包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39)的HVR-L3。

[0015] 在一些实施方案中，抗体包含了(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:

33) 或GINQGSKRGAMDY (SEQ ID NO:32) 的HVR-H3; (b) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39) 或QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43) 或QQYTALPYT (SEQ ID NO:49) 或QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45) 或QQYSDVPYT (SEQ ID NO:47) 或QQSRTARPT (SEQ ID NO:41) 的HVR-L3; 和(c) 包含氨基酸序列RISPYYYYSYADSVKG (SEQ ID NO:52) 或RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51) 的HVR-H2。在一些实施方案中, 抗体包含了(a) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59) 的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列RISPYYYYSYADSVKG (SEQ ID NO:52) 或RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51) 的HVR-H2; 和(c) 包含GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33) 或GINQGSKRGAMDY (SEQ ID NO:32) 的HVR-H3。在一些实施方案中, 抗体包含了(a) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50) 的HVR-L1; (b) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53) 的HVR-L2; 和(c) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39) 或QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43) 或QQYTALPYT (SEQ ID NO:49) 或QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45) 或QQYSDVPYT (SEQ ID NO:47) 或QQSRTARPT (SEQ ID NO:41) 或QQSFYFPN (SEQ ID NO:38) 或QQSYTTPP (SEQ ID NO:42) 或QQYTALPY (SEQ ID NO:48) 或QQYSDLPY (SEQ ID NO:44) 或QQYSDVPY (SEQ ID NO:46) 或QQSRTARP (SEQ ID NO:40) 的HVR-L3。

[0016] 在一些实施方案中, 抗体包含了(a) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33) 的HVR-H3; (b) 包含氨基酸序列QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45) 的HVR-L3; 和(c) 包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51) 的HVR-H2。在一些实施方案中, 抗体包含了(a) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59) 的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51) 的HVR-H2; 和(c) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33) 的HVR-H3。在一些实施方案中, 抗体包含了(a) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50) 的HVR-L1; (b) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53) 的HVR-L2; 和(c) 包含氨基酸序列QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45) 的HVR-L3。

[0017] 在一些实施方案中, 抗体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中, 抗体包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区序列。在一些实施方案中, 抗体包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中, 抗体包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区序列。在一些实施方案中, 抗体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中, 抗体包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区序列。在一些实施方案中, 抗体包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中, 抗体包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变区序列。在一些实施方案中, 抗体包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中, 抗体包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的重链可变区序列

和/或SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链可变区序列。

[0018] 在一些实施方案中,抗体包含了(a)包含氨基酸序列SRGAYRFAY (SEQ ID NO:56)的HVR-H3;(b)包含氨基酸序列QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43)的HVR-L3;和(c)包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG (SEQ ID NO:54)的HVR-H2。在一些实施方案中,抗体包含了(a)包含氨基酸序列SNYIH (SEQ ID NO:55)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG (SEQ ID NO:54)的HVR-H2;和(c)包含氨基酸序列SRGAYRFAY (SEQ ID NO:56)的HVR-H3。在一些实施方案中,抗体包含了(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43)的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区序列。在一些实施方案中,抗体不抑制人CSF-1和人CSF-1R之间的结合。

[0019] 在一些实施方案中,本文所述的抗IL-34抗体与IL-34的二聚体结合。在一些实施方案中,本文所述的抗IL-34抗体与覆盖IL-34二聚体的两个原体的表位结合。在一些实施方案中,本文所述的抗IL-34抗体中和IL-34活性。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与人IL-34结合,抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合,和/或中和IL-34活性。

[0020] 在一些实施方案中,本文所述的抗IL-34抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,本文所述的抗IL-34抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体包含针对人CSF-1的第二结合特异性。

[0021] 本文中提供包含针对人IL-34的第一结合特异性和针对人CSF-1的第二结合特异性的双特异性抗体和它们在治疗髓样致病性免疫病和癌症中的用途。在一些实施方案中,抗体抑制人IL-34与人CSF-1R的结合并抑制人CSF-1与人CSF-1R的结合。在另一个实施方案中,本文中提供包含分别针对人IL-34的结合特异性和针对人CSF-1的结合特异性的两种多肽,每种多肽具有能够彼此异二聚化的异源多聚化结构域。

[0022] 在一些实施方案中,上文描述的抗体是结合人IL-34的抗体片段。在一些实施方案中,片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv或scFv片段。

[0023] 在一些实施方案中,本文描述的抗体是单臂抗体。在一些实施方案中,本文描述的抗体是线性抗体。在一些实施方案中,本文描述的抗体是全长IgG1或IgG4抗体。

[0024] 另外本文中提供了结合人CSF-1R的分离抗体,所述抗体与包含以下至少一个氨基酸残基的表位结合:人CSF-1R的Arg144、Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn254,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置,并且所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。

[0025] 在一些实施方案中,抗体与包含CSF-1R的Arg144的氨基酸残基的表位结合,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中,抗体与包含以下的至少一个氨基酸残基的表位结合:人CSF-1R的Arg144、Arg142、Arg146和Arg150,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中,表位还包含以下的至少一个氨基酸残基:人CSF-1R的Ser172和Arg192,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中,表位还包含以下的至少一个氨基酸残基:人CSF-1R的Arg146、Met149、

Arg150、Phe169、Ile170和Gln173,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中,抗体与位置142-150和169-173内部的氨基酸结合,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

[0026] 在一些实施方案中,抗体与包含以下至少一个氨基酸残基的表位结合:人CSF-1R的Arg144、Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn254,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中,抗体与包含以下至少一个氨基酸残基的表位结合:人CSF-1R的Tyr257、Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn254,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中,表位还包含以下的至少一个氨基酸残基:Pro247、Gln258和Lys259,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中,表位还包含以下的至少一个氨基酸残基:人CSF-1R的Val231、Asp251和Tyr257,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中,抗体与位置231、248-252和254内部的氨基酸残基结合,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

[0027] 另外本文中提供分离的核酸,其编码本文所述的任何抗体。本文中还提供载体,其包含本文所提供的任何核酸。本文中还提供宿主细胞,其包含本文提供的核酸。

[0028] 另外本文中提供产生抗体的方法,包括培养本文提供的任何宿主细胞,从而产生抗体。在一些实施方案中,所述方法还包括回收宿主细胞产生的抗体。

[0029] 本文中还提供药物组合物,其包含本文提供的任何抗体和可药用载体。

[0030] 本文中提供本文所述的用作药物的抗体。本文中提供本文所述的用于治疗髓样致病性免疫病的抗体。本文中提供本文所述的用于抑制人IL-34和人CSF-1R之间结合的抗体。

[0031] 本文还提供本文所述的任何抗体在制造药物中的用途。在一些实施方案中,该药物用于治疗髓样致病性免疫病。在一些实施方案中,该药物用于抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。

[0032] 本文中提供了治疗患有炎症性疾病和/或具有髓样致病组分的自身免疫性疾病(“髓样致病性免疫病”)的个体的方法,所述方法包括向个体施用有效量本文提供的任一种抗体。本文中还提供了治疗患有炎症性疾病和/或自身免疫性疾病的个体的方法,所述方法包括向个体施用有效量本文提供的任一种抗体或联合疗法。在一些实施方案中,抗体是抑制人IL-34和人CSF-1的活性的双特异性抗体。在一些实施方案中,该方法包括施用有效量的本文提供的任一种抗IL-34抗体连同与人CSF-1结合的抗体。在一些实施方案中,人IL-34和人CSF-1的活性由双特异性抗IL-34和抗CSF1抗体抑制。在一些实施方案中,通过抑制人IL-34与人CSF-1R结合并且抑制人CSF-1和人CSF-1R结合而抑制活性。

[0033] 在上文的任何方法的一些实施方案中,髓样致病性免疫病是类风湿性关节炎(RA)、炎症肠病(例如,局限性回肠炎、溃疡性结肠炎)、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、哮喘、骨质疏松症、Paget病、动脉粥样硬化、代谢综合征、II型糖尿病、巨噬细胞活化综合征(MAS)、血管炎(巨细胞动脉炎、ANCA相关性血管炎)、圆盘状狼疮、结节病、移植物抗宿主病、LSD(溶酶体贮积病,如但不限于胱氨酸贮积症、唾液酸贮积病、戈谢病)、组织细胞增多症(Histiocytosis),包括但不限于Rosai-Dorfman病、Faisalabad组织细胞增多症、H综合征、色素沉着性多毛症伴胰岛素依赖性糖尿病(PHID)、血管炎、心肌梗死和移植物抗宿主病。在一个实施方案中,血管炎是显微镜下多动脉炎、CNS血管炎、坏死性、皮肤或超敏反应血管炎、全身性坏死性血管炎或ANCA相关性血管炎,如Churg-Strauss血管炎或综合征

(CSS)。在另一个实施方案中,血管炎是大血管炎或中等血管炎。在一个实施方案中,大血管炎是风湿性多肌痛或巨细胞动脉炎或高安动脉炎。在一个实施方案中,中等血管炎是结节性多发性动脉炎的川崎病。在一个具体的实施方案中,本发明的抗体(例如,IL-34抗体、双特异性IL-34/CSF1抗体或CSF1R抗体)用来治疗未充分响应于病情改善型抗风湿药(DMARD)疗法(DMARD-IR)的RA患者。在又一个实施方案中,DMARD-IR患者先前尚未用抗TNF剂治疗过(“未用过TNF”)。在一个实施方案中,DMARD是甲氨蝶呤。在一个具体的实施方案中,本发明的抗体(例如,IL-34抗体、双特异性IL-34/CSF1抗体或CSF1R抗体)用来治疗未充分响应于病情改善型抗风湿药(DMARD)疗法(DMARD-IR)的RA患者。在又一个实施方案中,DMARD-IR患者先前尚未用抗TNF剂治疗过(“未用过TNF”)。在一个具体的实施方案中,本发明的抗体(例如,IL-34抗体、双特异性IL-34/CSF1抗体或CSF1R抗体)用来治疗未充分响应于抗TNF疗法(例如TNFR-Fc或抗TNF抗体)的RA患者。在一个具体的实施方案中,本发明的抗体(例如,IL-34抗体、双特异性IL-34/CSF1抗体或CSF1R抗体)用来治疗患有髓样致病性免疫病的患者,所述患者未充分响应于抗TNF疗法(例如,包括但不限于,TNFR-Fc、抗TNF抗体和TNF或TNF受体的小分子抑制剂)。

[0034] 在本发明的另一个实施方案中,用本发明的CSF1-R途径抑制剂待治疗的RA患者患有RA髓样亚型和/或纤维样亚型。在一个实施方案中,本发明提供一种在患有类风湿性关节炎的个体中治疗类风湿性关节炎的方法,所述方法包括向已经患有RA髓样亚型和/或纤维样亚型的患者施用CSF1-R途径抑制剂。在一个实施方案中,通过以下方式确定髓样亚型或纤维样亚型:测量髓样亚型或纤维样亚型基因的基因表达水平或蛋白质表达水平并且确定RA个体是否患有髓样亚型或纤维样亚型的RA,其中确定RA个体患有髓样亚型或纤维样亚型的RA表示该RA个体更可能响应于CSF1-R途径抑制剂。

[0035] 在本发明的一个实施方案中,本发明抗体的药动力学效果可以在用抗体治疗后,通过监测患者血液中非经典单核细胞(CD14+CD16++)和/或中间单核细胞(CD14++CD16+)的水平降低来测量。

[0036] 另外本文中提供在个体中抑制人IL-34和人CSF-1R之间结合的方法,所述方法包括向个体施用有效量的本文提供的任何抗体。

[0037] 另外本文中提供了包含本文提供的任何抗体的制造品。在一些实施方案中,制造品还包括向个体施用有效量的抗体用于治疗所述个体中髓样致病性免疫病的说明书。本文中还提供了包含本文提供的任何抗IL-34抗体并且还包括与人CSF-1结合的抗体的制造品。在一些实施方案中,制造品还包括向个体施用有效量的抗IL-34抗体和与人CSF-1结合的抗体用于治疗该个体中髓样致病性免疫病的说明书。在一些实施方案中,髓样致病性免疫病是类风湿性关节炎、炎性肠病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、哮喘、骨质疏松症、Paget病、动脉粥样硬化、代谢综合征、II型糖尿病、LSDs(溶酶体贮积病,如但不限于胱氨酸贮积症、唾液酸贮积病、戈谢病)、组织细胞增多症,包括但不限于Rosai-Dorfman病、Faisalabad组织细胞增多症、H综合征、色素沉着性多毛症伴胰岛素依赖性糖尿病(PHID)。

[0038] 本发明提供一种用于诊断待用CSF1-R途径抑制剂治疗的RA患者的方法,所述方法包括步骤:测量髓样亚型或纤维样亚型基因的基因表达水平或蛋白质表达水平并且确定RA个体是否患有髓样亚型或纤维样亚型的RA,其中确定RA个体患有髓样亚型或纤维样亚型RA表示该RA个体更可能响应于CSF1-R途径抑制剂。在一个实施方案中,该方法还包括测量患

者中IL-34和/或CSF-1的基因表达水平或蛋白质表达水平的步骤。在一个实施方案中,测量来自RA患者的血清或滑液生物样品中的CSF-1水平。在另一个实施方案中,测量RA患者的血清、滑液或组织活检样品中的IL-34水平。

[0039] 本文中还提供包含CSF-1R的前三个IgG结构域(即,从N末端的第一、第二和第三IgG结构域)的多肽,其中所述多肽不包含来自CSF-1R的其他IgG结构域。在一些实施方案中,多肽还包含IgG结构域之间的接头。在一些实施方案中,多肽还包一个或多个融合配偶物(例如,Fc序列)。本文中还提供编码多肽的核酸、包含该核酸的载体和包含核酸的宿主细胞。本文中还提供产生多肽的方法,所述方法包括培养产生多肽的宿主细胞。本文中还提供用于治疗本文所述的髓样致病性免疫病的方法,所述方法包括向个体施用有效量的多肽。本文中还提供包含本文所述多肽的制造品。应该理解,本文所述的各个实施方式的一个、一些或全部特征可以组合以形成本发明的其它实施方式。本发明的这些方面和其他方面将相对于本领域技术人员变得显而易见。

[0040] 附图简述

[0041] 图1显示人IL-34的功能核心的结构。(A)人IL-34的示意图。预测的N-联糖基化位点以星号指示。IL-34序列中物种之间保守的二硫键显示为短划线。(B)hIL-34在促进人单核细胞生存力方面有活性。(C)二聚体人IL-34s结构的带状图(Ribbon representation)。标出末端结构和二级结构(当可见时)。(D)鼠CSF-1结构的带状图。标出末端结构和二级结构。

[0042] 图2显示hIL-34s和hCSF-1与含有结构域D1-D3和D1-D5的两种不同hCSF-1R相互作用的生物物理表征。(A)IL-34s、CSF-1R D1-D3和D1-D5及其相应复合物的分析性大小排阻色谱分析结果。显示从如方法中所述的独立试验中叠加并参考分子量标准物的色谱图。插图:在右侧显示源自峰级分的样品的SDS-PAGE。(B)CSF-1RD1-D5与hIL-34s(左)结合、CSF-1R D1-D3与hIL-34s(中)结合的等温滴定量热测量和来自hIL-34s的CSF-1R D1-D3由CSF-1R D1-D5替换(右)。(C)CSF-1R D1-D3与hCSF-1(左)结合和CSF-1R D1-D5与hCSF-1(右)结合的量热测量。(D)注射器中的蛋白质及其浓度、细胞中的蛋白质及其浓度、焓变化(ΔH)、熵变化(ΔS)、Gibbs自由能变化(ΔG)、结合亲和力(KD)和化学计量(n)的总结,所述总结源自小图B和C中所示的三个ITC滴定实验的分析。N.D.表示因曲线陡度而不可确定。

[0043] 图3显示与IL-34和CSF-1复合的CSF-1R的位点1界面和位点2界面的比较。(A-D)IL-34/CSF-1R(A,C)界面或CSF-1/CSF-1R(B,D)界面的位点1和位点2的特写图。将关键的细胞因子受体相互作用残基显示为棍,将氢键绘制为短划线,并且将二级结构元件用条带和链标记。

[0044] 图4A显示在单核细胞生存力测定法中YW404.33.56 Fab抑制IL-34生物活性。图4B显示YW404.33.56 Fab的CDR环(H1-H3,L3)与hIL-34s相互作用的特写图(示意图)。参与界面相互作用的关键残基以棍模型突出显示。

[0045] 图5显示定位到IL-34(A)和CSF-1(B)的二级结构上的受体接触残基。位点1和位点2界面残基由虚线椭圆突出显示。

[0046] 图6显示人IL-34/CSF-1R(左)、鼠CSF-1/CSF-1R(中,PDB 3EJJ)和SCF/Kit(右,PDB 2E9W)信号传导复合体结构的比较。将二聚体4螺旋束细胞因子显示为草图和半透明表面。将受体胞外结构域作为带状图提出并针对CSF-1R D4和D5显示为椭圆。将已经涉及CSF-1R

和Kit的受体同型接触的离子对显示为圆圈并注释。

[0047] 图7.选择的IL-34哺乳动物同源物(智人(*Homo sapiens*) (SEQ ID NO:68);猕猴(*Macaca mulatta*) (SEQ ID NO:69);家犬(*Canis lupus familiaris*) (SEQ ID NO:70);大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*) (SEQ ID NO:71);野马(*Equus caballus*) (SEQ ID NO:72);普通牛(*Bos taurus*) (SEQ ID NO:73);小家鼠(*Mus musculus*) (SEQ ID NO:74);褐家鼠(*Rattus norvegicus*) (SEQ ID NO:75);共有序列(SEQ ID NO:76))的序列比对。编号和二级结构依据人IL-34 (SEQ ID NO:68)。将严格保守的残基以深灰色加阴影,并且将大部分序列中如通过相似性评分计算的保守残基加框表示。在位点1、位点2和IL-34二聚化界面处的IL-34残基分别由底部的实心圆圈、圆圈和星号表示。三角形表示二硫键配对和糖基化位点。使用程序ESPRIT(互联网网址:esprit.ibcp.fr/ESPrIPT/ESPrIPT),产生比对图。

[0048] 图8显示抗IL-34 Ab YW404.33在单核细胞增殖测定法中的中和活性。

[0049] 图9显示抗IL-34 Ab YW404.1、YW404.6、YW404.33、YW405.1、YW405.3、YW406.1、YW406.93(A)和Ab YW404.33、YW404.33.12和YW404.33.56在mIL-34浓度100ng/mL(B)时在单核细胞增殖测定法中的中和活性。

[0050] 图10:抗IL-34 Ab YW404.1、YW404.3、YW404.33、YW404.33.10、YW404.33.12、YW404.33.11、YW404.33.56和YW404.33.93的可变重链(A)序列和可变轻链(B)序列。为这些抗体的亲和力成熟所靶向的氨基酸残基由框包围。图10A显示404.1(SEQ ID NO:15)、404.6(SEQ ID NO:77)、405.3(SEQ ID NO:25)、404.33(SEQ ID NO:5)、404.33.10(SEQ ID NO:7)、404.33.12(SEQ ID NO:11)、404.33.11(SEQ ID NO:9)、404.33.56(SEQ ID NO:3)和404.33.93(SEQ ID NO:13)的VH氨基酸序列。图10B显示404.1(SEQ ID NO:16)、404.6(SEQ ID NO:78)、405.3(SEQ ID NO:26)、404.33(SEQ ID NO:6)、404.33.10(SEQ ID NO:8)、404.33.12(SEQ ID NO:12)、404.33.11(SEQ ID NO:10)、404.33.56(SEQ ID NO:4)和404.33.93(SEQ ID NO:14)的VL氨基酸序列。Kabat HVR之间的重链框架区序列是10A图中显示的FR1序列(SEQ ID NO:17)、FR2序列(SEQ ID NO:18)、FR3(SEQ ID NO:19)和FR4(SEQ ID NO:20)。Kabat HVR之间的轻链框架区序列是10B图中显示的FR1序列(SEQ ID NO:21)、FR2序列(SEQ ID NO:22)、FR3序列(SEQ ID NO:23)和FR4序列(SEQ ID NO:24)。

[0051] 图11显示具有硫酸葡聚糖钠(DSS)诱导型炎症肠病(IBD)的Balb/c小鼠的组织学评分,其中所述小鼠用对照抗体(抗豚草,a-RW)、环孢菌素(CSA)、抗CSF-1抗体(a-CSF-1)、抗IL-34抗体(a-IL-34)或抗CSF-1抗体和抗IL-34抗体的组合处理。

[0052] 图12显示与对照小鼠相比,IL-34和CSF-1的血清水平在用对照抗体(a-RW)处理的具有DSS诱导型IBD的Balb/c小鼠中升高。

[0053] 图13显示CSF-1和IL-34在来自类风湿性关节炎患者的血清、滑液和组织中表达。

[0054] 图14显示CSF1/IL34途径存在于原发性和继发性TNF-NR RA患者中。

[0055] 图15显示aCSF1+aIL34的组合治疗匹配TNFR1I-Fc炎症抑制和并且在小鼠CIA中保护骨侵蚀方面优越(髓样驱动者(myeloid drivers))。

[0056] 图16显示对CSF1和IL-34的双重阻断在模型中抑制DSS结肠炎。

[0057] 图17显示IL-34在IBD结肠中表达,但是在血清中表达低/不可检出。

[0058] 图18显示来自类风湿性关节炎和骨关节炎患者的滑液中不存在IL-34/CSF-1和TNFa表达的相关性。

[0059] 图19显示在抗CSF1/IL-34联合治疗仅7日后浸润关节液的小鼠髓样细胞(Mf和单核细胞)减少。

[0060] 本发明的具体实施方案

[0061] 不受理论约束,直接抑制IL-34和CSF-1以治疗髓样致病性免疫病的组合方案据信优于直接靶向它们的受体或单独的IL-34和CSF-1。预测这种方案的优点包括但不限于以下任一个或其组合:更好的药物代谢动力学特性、更好的安全谱(safety profile)、更好的功效、更好的效力和基于以上安全性和功效考虑事项而更好的治疗窗口。

[0062] 定义

[0063] 术语“抗IL-34抗体”和“与IL-34结合的抗体”指一种抗体,所述抗体能够以足够亲和力和结合IL-34,从而该抗体可用作靶向IL-34的诊断药和/或治疗药。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与不相关的非IL-34蛋白质结合的程度小于该抗体与IL-34结合的约10%,如例如通过Biacore测定法或BLI测定法所测量。在一些实施方案中,与IL-34结合的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 500\text{nM}$ 、 $\leq 250\text{nM}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如从 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如从 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_d)。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与来自不同物种的IL-34之间保守的IL-34表位结合。

[0064] 如本文所用,术语“IL-34”指来自任何脊椎动物来源的任何天然IL-34,其中除非另外说明,否则所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如,人类)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。本术语涵盖“全长”、未加工的IL-34以及因细胞中加工而产生的任何形式的IL-34。本术语还涵盖IL-34的天然存在变体,例如,剪接变体或等位变体。SEQ ID NO:1中显示示例性人IL-34的氨基酸序列。在一些实施方案中,人IL-34包含SEQ ID NO:1中所显示的氨基酸序列,其中第81位置处的氨基酸Q缺失。

[0065] 1 MPRGFTWLRY LGIFLGVALG NEPLEMWPLT QNEECTVTGF LRDKLQYRSRLQYMKHYFPI

[0066] 61 NYKISVPYEG VFRIANVTRL QRAQVSEREL RYLWVLVSL S ATESVQDVLLEGHP SWKYLQ

[0067] 121 EVETLLLVNQ QGLTDVEVSP KVESVLSLLN APGPNLKLVR PKALLDNCFRVMELLYCSCC

[0068] 181 KQSSVLNWQD CEVPSPQSCS PEPSLQYAAT QLYPPPPWSP SSPPHSTG SVRPVRAQGEGL

[0069] 241 LP (SEQ ID NO:1)。

[0070] 术语“抗CSF-1抗体”和“与CSF-1结合的抗体”指一种抗体,所述抗体能够以足够亲和力和结合CSF-1,从而该抗体可用作靶向CSF-1的诊断药和/或治疗药。在一些实施方案中,抗CSF-1抗体与不相关的非CSF-1蛋白质结合的程度小于该抗体与CSF-1结合的约10%,如例如通过Biacore测定法或BLI测定法所测量。在一些实施方案中,与CSF-1结合的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 500\text{nM}$ 、 $\leq 250\text{nM}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如从 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如从 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_d)。在一些实施方案中,抗CSF-1抗体与来自不同物种的CSF-1之间保守的CSF-1表位结合。

[0071] 如本文所用,术语“CSF-1”指来自任何脊椎动物来源的任何天然CSF-1,其中除非另外说明,否则所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如,人类)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。本术语涵盖“全长”、未加工的CSF-1以及因细胞中加工而产生的任何形式的CSF-1。本术语还涵盖CSF-1的天然存在变体,例如,剪接变体或等位变体。一种示例性人CSF-1在Takahashi等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.161(2),892-901(1989)中描述。

[0072] 术语“抗CSF-1R抗体”和“与CSF-1R结合的抗体”指一种抗体,所述抗体能够以足够

亲和力结合CSF-1R,从而该抗体可用作靶向CSF-1R的诊断药和/或治疗药。在一些实施方案中,抗CSF-1R抗体与不相关的非CSF-1R蛋白质结合的程度小于该抗体与CSF-1R结合的约10%,如通过Biacore测定法或BLI测定法所测量。在一些实施方案中,与CSF-1R结合的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 500\text{nM}$ 、 $\leq 250\text{nM}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如从 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如从 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_d)。在一些实施方案中,抗CSF-1R抗体与来自不同物种的CSF-1R之间保守的CSF-1R表位结合。

[0073] 如本文所用,术语“CSF-1R”或“CSF1R”指来自任何脊椎动物来源的任何天然CSF-1R,其中除非另外说明,否则所述脊椎动物来源包括哺乳动物如灵长类(例如,人类)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。本术语涵盖“全长”、未加工的CSF-1R以及因细胞中加工而产生的任何形式的CSF-1R。本术语还涵盖CSF-1R的天然存在变体,例如,剪接变体或等位变体。SEQ ID NO:2中显示示例性人CSF-1R的氨基酸序列。

[0074] MGPVLLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNGSVEWDGPPSPHWTL

[0075] YSDGSSSILS TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY VKDPARPWNVLAQEVVVFED

[0076] QDALLPCLLT DPVLEAGVSL VRVRGRPLMR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFIQSQDYQCSAL

[0077] MGGRKVMSSIS IRLKVQKVIP GPPALTLVPA ELVRIRGEAA QIVCSASSVDVNFDFVLQHN

[0078] NTKLAIPQQS DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA SNVQGHSTSMFFRVVESAY

[0079] LNLSSSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSDHQPEPKLANATTKDITY

[0080] RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIWFINGSGTLLCA

[0081] ASGYQPQNVTL WLCQSGHTDR CDEAQVLQVW DDPYPEVLSQ EPFHKVTVQSLLTVETLEHN

[0082] QTYECRAHNS VGSGSWAFIP ISAGAHTHP DEFLEFTPVVV ACMSIMALLLLLLLLLLLYKY

[0083] KQKPKYQVRW KIIESYEGNS YTFIDPTQLP YNEKWEFPRN NLQFGKTLGAGAFGKVEAT

[0084] AFGLGKEDAV LKVAVKMLKS TAHADKEAL MSELKIMSHL GQHENIVNLLGACTHGGPV

[0085] VITEYCCYGD LLNFLRRKAE AMLGPSLSPG QDPEGGVYDK NIHLEKKYVRRDSGFSQGV

[0086] DTYVEMRPVS TSSNDSFSEQ DLDKEDGRPL ELRDLLHFSS QVAQGMFLASKNCIHRDVA

[0087] ARNVLLTNGH VAKIGDFGLA RDIMNDSNYI VKGNARLPVK WMAPESIFDCVYTVQSDVWS

[0088] YGILLWEIFS LGLNPYPGIL VNSKFYKLVK DGYQMAQPAF APKNIYSIMQACWALEPTHR

[0089] PTFQQICSFL QEQAQEDRRE RDTNLPSSS RSGSGSSSS ELEEESSSEHLTCCEQGDIA

[0090] QPLLQPNNYQ FC (SEQ ID NO:2)

[0091] 本发明的治疗药包括可以与上文中鉴定的靶结合的物质,如可以与蛋白质或核酸分子结合的多肽(例如,抗体、免疫黏附素或肽体(peptibody))、适配体或小分子,其中所述蛋白质或核酸分子可以与编码本文中鉴定的靶的核酸分子(即,sRNA)结合。

[0092] 术语“CSF1-R途径抑制剂”指抑制CSF1-R信号传导的治疗药。在一个实施方案中,CSF1-R途径抑制剂与CSF-1、IL-34、CSF1-R或CSF-1和IL-34结合。在一个实施方案中,结合CSF-1、IL-34或CSF-1和IL-34的药物抑制这类蛋白质与CSF1-R的结合。在另一个实施方案中,结合CSF1-R的药物抑制CSF1-R与IL-34和CSF-1的结合。在一个实施方案中,CSF1-R的激酶活性降低表示CSF-1R信号传导减少。在一个实施方案中,CSF1-R途径抑制剂是本发明的抗体。在另一个实施方案中,CSF-1R途径抑制剂是CSF1-R的小分子抑制剂。在另一个实施方案中,CSF1-R途径抑制剂是与Fc融合的CSF1-R胞外结构域。

[0093] 术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且涵盖各种抗体结构物,包括但不限于单

克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示出所需的抗原结合活性。

[0094] 术语“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链的参与抗体结合至抗原的结构域。天然抗体重链和轻链的可变域(分别是VH和VL)通常具有相似的结构,每种结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个高变区(HVR)。(见,例如,Kindt等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单个VH结构域或VL结构域可能足以赋予抗原结合特异性。另外,结合特定抗原的抗体可以利用来自结合该抗原的抗体的VH或VL结构域分别筛选互补性VL结构域或VH结构域文库进行分离。见,例如,Portolano等人,J. Immunol. 150: 880-887 (1993); Clarkson等人, Nature 352:624-628 (1991)。

[0095] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”指抗体可变域的如下每个区域,所述区域在序列上高变和/或形成结构上确定的环(“高变环”)。通常,天然的4链抗体包含六个HVR;VH中三个(H1、H2、H3)和VL中三个(L1、L2、L3)。HVR通常包含来自高变环和/或来自“互补决定区”(CDR)的氨基酸残基,所述互补决定区具有最高序列变异性和/或参与抗原识别。如本文所用的HVR可以包含位于位置(L1的)24-36、(L2的)46-56、(L3的)89-97、(H1的)26-35B、(H2的)47-65、和(H3的)93-102内部的残基。例如,HVR可以包含在先前描述的位置中的残基:

[0096] A) 第24-34位残基(L1)、第50-56位残基(L2)、第89-97位残基(L3)、第26-32位残基(H1)、第52-56位残基(H2)和第95-102位残基(H3)(Chothia和Lesk,J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987);

[0097] B) L1的第24-34位残基、L2的第50-56位残基、L3的第89-97位残基、H1的第31-35B位残基、H2的第50-65位残基和H3的第95-102位残基(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD (1991);和

[0098] C) 第30-36位残基(L1)、第46-55位残基(L2)、第89-96位残基(L3)、第30-35位残基(H1)、第47-58位残基(H2)、第93-101位残基(H3)(MacCallum等人,J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996))。

[0099] 除非另外说明,否则HVR残基和可变域中的其他残基(例如,FR残基)在本文中根据上文Kabat等人编号。

[0100] 除非另外说明,否则HVR残基和可变域中的其他残基(例如,FR残基)在本文中根据上文Kabat等人编号。

[0101] 除了VH中的CDR1以外,CDR通常包含形成高变环的氨基酸残基。CDR还包含“特异性决定残基”或“SDR”,这些残基是接触抗原的残基。SDR含于CDR区域内部,称作缩写-CDR或a-CDR。示例性a-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2和a-CDR-H3)存在于L1的第31-34位残基、L2的第50-55位残基、L3的第89-96位残基、H1的第31-35B位残基、H2的第50-58位残基和H3的第95-102位残基处。(见Almagro和Fransson,Front. Biosci. 13: 1619-1633 (2008))。除非另外说明,否则HVR残基和可变域中的其他残基(例如,FR残基)在本文中根据上文Kabat等人编号。

[0102] “框架”或“FR”指除高变区(HVR)残基之外的可变域残基。可变域的FR通常由以下4个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR序列和FR序列通常按以下序列出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0103] “人类共有框架”是这样的框架,它代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选项中最常出现的氨基酸残基。通常,人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选项来自可变域序列的亚组。通常,序列亚组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest (目的免疫蛋白质的序列),第5版,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD (1991),第1-3卷中那样的亚组。在一些实施方案中,对于VL,该亚组是如上文Kabat等人中那样的亚组 κ I。在一些实施方案中,对于VH,该亚组是如上文Kabat等人中那样的亚组III。

[0104] 出于本文目的,“接纳体人类框架”是这样的框架,它包含源自人免疫球蛋白框架或如下文定义的人共有序列框架的轻链可变域(VL)框架或重链可变域(VH)框架的氨基酸序列。“源自”人免疫球蛋白框架或人类共有框架的接纳体人类框架可以包含其相同的氨基酸序列,或它可以含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,氨基酸变化的数目是10或更小、9或更小、8或更小、7或更小、6或更小、5或更小、4或更小、3或更小、或2或更小。在一些实施方案中,VL接纳体人类框架在序列上与VL人免疫球蛋白框架序列或人类共有框架序列相同。

[0105] 抗体的“类别”指由其重链拥有的恒定域或恒定区的类型。存在抗体的5个主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM、并且这些类型中的几种可以进一步划分成亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应不同类别免疫球蛋白的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0106] 术语“Fc区”在本文中用来限定免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的C端区域。该定义包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一些实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。除非本文中另外说明,否则Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号根据如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述的EU编号体系,也称作EU index。

[0107] “天然抗体”指具有不定结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是由二硫键结合的两条相同轻链和两条相同重链组成的约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。从N端至C端,每条重链具有一个可变区(VH),也称作可变重链结构域或重链可变域,随后是三个恒定域(CH1, CH2和CH3)。类似地,从N端至C端,每条轻链具有一个可变区(VL),也称作可变轻链结构域或轻链可变域,随后一个恒定轻链(CL)结构域。抗体的轻链可以基于其恒定域的氨基酸序列而划分成两种类型之一,称作 κ 和 λ 。

[0108] 如本文所用,术语“单克隆抗体”指从基本上同质的抗体群体中获得的抗体,即,构成该群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位,例外在于例如含有天然存在突变或在产生单克隆抗体制备物期间出现的可能变体抗体,这类变体通常以微量存在。另外,与一般包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相反,单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示如从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征,并且不解释为需要通过任何特殊方法产生该抗体。例如,根据本发明待使用的单克隆抗体可以通过多种技术产生,所述多种技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,用于制造单克隆抗体的这类方法和其他示例性方法在本文中描述。

[0109] 术语“嵌合”抗体指一种抗体，其中重链和/或轻链的一部分源自特定的来源或物种，而重链和/或轻链的剩余部分源自不同的来源或物种。

[0110] “人源化”抗体指包含来自非人类HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在一些实施方案中，人源化抗体将基本包含至少1个、并且一般2个可变域的全部，其中全部或基本上全部的HVR（例如CDR）与非人抗体的那些HVR对应并且全部或基本上全部的FR对应于人抗体的那些FR。人源化抗体任选地可以包含从人抗体衍生的抗体恒定区的至少一部分。抗体（例如，非人抗体）的“人源化形式”指已经历过人源化的抗体。

[0111] “人抗体”是这样一种抗体，其拥有对应于人或人细胞产生的或从利用人抗体库或其他编码人抗体的序列的非人来源衍生的抗体的氨基酸序列。这种人抗体定义特别地排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0112] “抗体片段”指除完整抗体之外包含完整抗体的一部分的分子，所述部分结合与完整抗体结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；双体抗体；线性抗体；单链抗体分子（例如scFv）；和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0113] 术语“全长抗体”、“完好抗体”和“完整抗体”在本文中可互换地用来指一种抗体，所述抗体具有基本上与天然抗体结构相似的结构或具有含有如本文定义的Fc区的重链。

[0114] “分离的”抗体是已经与其自然环境的组分分离的一种抗体。在一些实施方案中，将抗体纯化至大于95%或99%纯度，如通过例如电泳（例如，SDS-PAGE、等电聚焦（IEF）、毛细管电泳法）或色谱（例如，离子交换或反相HPLC）所确定。关于评估抗体纯度的方法的综述，见，例如，Flatman等人，J.Chromatogr.B 848:79-87（2007）。

[0115] “亲和力成熟的”抗体指在一个或多个高变区（HVR）中具有一个或多个改变的抗体，相比之下亲本抗体不拥有这类改变，这类改变导致抗体对抗原的亲和力改善。

[0116] “亲和力”指分子（例如，抗体）的单一结合位点及其结合配偶物（例如，抗原）之间总计非共价相互作用的强度。除非另外指出，否则如本文所用，“结合亲和力”指反映结合对的成员（例如，抗体和抗原）之间1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶物Y的亲和力可以通常由解离常数（K_d）代表。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量，包括本文所述的那些方法。在下文中描述用于测量结合亲和力的具体示意性和示例性实施方案。

[0117] “与参考抗体结合相同表位的抗体”指在竞争测定法中阻断参考抗体与其抗原结合达50%或更多的抗体，并且反过来，参考抗体在竞争测定法中阻断该抗体与其抗原结合达50%或更多。本文提供示例性竞争测定法。

[0118] “效应子功能”指随抗体同种型变动的归因于抗体Fc区的那些生物学活性。抗体效应子功能的例子包括：C1q结合和补体依赖的细胞毒性（CDC）；Fc受体结合作用；抗体依赖的细胞介导细胞毒性（ADCC）；吞噬；下调细胞表面受体（例如，B细胞受体）；和B细胞活化。

[0119] “裸抗体”指不与异源部分（例如，细胞毒部分）或放射标记物缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0120] “分离的”核酸指已经与其自然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括含于细胞内的核酸分子，所述细胞通常含有该核酸分子，但是该核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0121] “编码抗IL-34抗体的分离核酸”指编码抗体重链和轻链（或其片段）的一个或多个核酸分子，包括在单一载体或独立载体中的这类核酸分子和在宿主细胞中一个或多个位置

处存在的这类核酸分子。

[0122] 相对于参考多肽序列,将“氨基酸序列同一性百分数(%)”定义为比对序列并根据需要引入空位以实现最大序列同源性百分数并且不考虑任何保守性置换作为序列同一性的部分之后,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分数。为了确定氨基酸序列同一性百分数的比对可以按本领域能力范围内的多种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数,包括为实现正在比较的全长序列范围内最大比对所需要的任何算法。然而,出于本文目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生氨基酸序列同一性%值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech, Inc. 创作,并且源代码已经随用户文档提交至华盛顿特区美国版权办公室,在那里它以美国版权登记号TXU510087登记。ALIGN-2程序从Genentech, Inc., South San Francisco, 加利福尼亚州可公开获得或可以从源代码汇编。应当将ALIGN-2程序汇编在UNIX操作系统(包括数字式UNIX V4.0D)上使用。全部序列比较参数由ALIGN-2程序设定并且不变动。

[0123] 在使用ALIGN-2比较氨基酸序列的情况下,如下计算给定氨基酸序列A与、同或针对给定氨基酸序列B(这可以备选地描述为给定氨基酸序列A具有或包含某一与、同或针对给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%)的氨基酸序列同一性%:

[0124] $100 \times \text{分数} X/Y$,

[0125] 其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序的A和B比对结果中评定为相同匹配的氨基酸残基的数目,并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。将可以理解在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A相对于B的氨基酸序列同一性%将不等于B相对于A的氨基酸序列同一性%。除非另外特别声明,否则本文所用的全部氨基酸序列同一性值%如紧接前段中所述那样使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0126] 如本文所用,术语“载体”指能够增殖与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制型核酸结构的载体以及并入宿主细胞的基因组中的载体,其中已经向所述细胞中引入所述载体。某些载体能够指导与它们有效连接的核酸表达。此类载体在本文中称作“表达载体”。

[0127] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”互换使用并且指已经向其中引入外源核酸的细胞,包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,这包括原代转化的细胞和从中衍生的子代,而无论传代次数是多少。子代可以在核酸内容物方面不完全与亲本细胞相同,反而可以含有突变。本文中包括突变子代,所述突变子代具有与针对最初转化的细胞所筛选或选择的功能或生物活性相同的功能或生物活性。

[0128] 如本文所用,“治疗”(和其语法变型)指意欲改变正在治疗的个体的天然过程的临床介入,并且可以为了预防或在临床病理学过程期间进行。想要的治疗效果包括,但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态,以及缓解或预后改善。在一些实施方案中,本发明的抗体用来延缓疾病发展或用来减慢疾病的进展。

[0129] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如,牛、羊、猫、犬和马)、灵长类(例如,人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。在一些实施方案中,个体或受试者是人。

[0130] 术语“药物制剂”指一种制备物,所述制备物处于这类形式从而允许其中所含的有效成分的生物活性有效,并且不含有对于将会施用该制剂的受试者不可接受地有毒的额外组分。

[0131] “可药用载体”指药物制剂中除有效成分之外的对受试者无毒的成分。可药用载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0132] 药剂(例如,药物制剂)的“有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段,有效实现所需治疗性或预防性结果的量。

[0133] 如临床环境下理解,治疗药(例如,本文提供的抗体)、药物、化合物或药物组合物的有效量可以结合或可以不结合另一种药物、化合物、或药物组合物一起实现。因而,“有效量”可以在施用一种或多种治疗药的背景下考虑,并且如果与一种或多种其他药物联合,可以实现或实现合乎需要的结果,则单一药剂可以视为以有效量给予。

[0134] 如本文所用,“与联合”指施用除另一个治疗模式之外的一个治疗模式。就这一点而论,“与联合”指对个体施用其他治疗模式之前、其期间或之后施用一个治疗模式。

[0135] 术语“包装内容物”用来指治疗产品的商业包装中习惯性包含的说明书,所述说明书含有关于涉及此类治疗产品用途之适应症、用法、剂量、施用、联合疗法、禁忌症和/或警告的信息。

[0136] “炎性肠病”或“IBD”指一组病症,它们造成肠发炎,通常表现出多种症状,包括腹部痉挛和疼痛、腹泻、体重减轻和肠出血。IBD的主要形式是溃疡性结肠炎(UC)和局限性回肠炎。

[0137] 如本文所用,“髓样致病性免疫病”指具有髓样致病组分的炎性疾病和/或自身免疫性疾病。

[0138] 如本文所用,“DMARD”指病情改善型抗风湿药。DMARD的例子包括阿达木单抗(adalimumab)、氯喹、羟氯喹、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)、甲氨蝶呤、来福米特(leflunomide)、硫唑嘌呤、D-青霉胺、金盐(金硫代苹果酸钠(sodium aurothiomalate)、auraofin)、Gold(口服)、Gold(肌内)、米诺环素、环孢菌素、依那西普、戈利木单抗(golimumab)、英夫单抗(infliximab)、米诺环素和利妥昔单抗(rituximab)。

[0139] 如本文所用,“F1”指成纤维细胞丰富型1亚型,“F2”指成纤维细胞丰富型2亚型,“L”指淋巴样丰富亚型或淋巴样亚型,和“M”指髓样丰富亚型或髓样亚型。总体上,基于基因表达分析,这些亚型鉴定了类风湿性关节炎患者的4种分子亚型。总体上,将F1和F2亚型称作纤维样或“F”亚型。L亚型的RA患者通常具有涉及B细胞、浆细胞、T细胞和巨噬细胞的特征的基因表达模式和作为B及T细胞活化、同种型转换、Ig分泌和细胞因子产生的证据。髓样亚型的RA患者通常具有涉及单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞的特征的基因表达模式和作为巨噬细胞活化、吞噬、突发性呼吸、T细胞活化和细胞因子产生的证据。纤维样亚型的RA患者通常具有涉及成纤维细胞和成骨细胞的特征的基因表达模式和作为骨形成、生长和分化和血管新生的证据。

[0140] 如本文中所用,除非上下文另外清楚地指出,否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数称谓。例如,对“抗体”的提及是指从一个至许多个抗体,如分子量,并且包括本领域技术人员已知的其等同物等。

[0141] 本文中对“约”某个值或参数的谈及包括(并且描述)涉及该值或参数本身的实施

方案。例如,提到“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0142] 可以理解,本文所述发明的多个方面和变体包括“由.....组成”和/或“基本上由.....组成”方面和变体。

[0143] 组合物和方法

[0144] 本发明提供与IL-34结合的抗体、具有针对IL-34的第一结合特异性和针对CSF-1的第二结合特异性的双特异性抗体(下文称作双特异性抗IL-34/CSF-1抗体),和与CSF-1R结合的抗体。本发明的抗体例如可用于诊断或治疗髓样致病性免疫病,包括但不限于炎症肠病、类风湿性关节炎和多发性硬化。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与哺乳动物(例如,人)IL-34结合。在一些实施方案中,双特异性抗IL-34/CSF-1抗体包含针对哺乳动物(例如,人)IL-34的第一结合特异性和针对哺乳动物(例如,人)CSF-1的第二结合特异性。在一些实施方案中,抗CSF-1R抗体与哺乳动物(例如,人)CSF-1R结合。

[0145] 示例性抗IL-34抗体和抗CSF-1R抗体

[0146] 抗IL-34抗体

[0147] 在一个方面,本发明提供与IL-34(例如,人IL-34)结合的分离抗体。本文中所述的抗IL-34抗体可以具有以下一个或多个特征:(i)抑制IL-34(例如,人IL-34)与CSF-1R(例如,人CSF-1R)的结合;(ii)中和IL-34活性(例如,人IL-34活性);(iii)抑制IL-34诱导的外周血单核细胞增殖;(iv)与IL-34(例如,人IL-34)的二聚体结合;(v)与覆盖IL-34IL-34(例如,人IL-34)的两个原体的表位结合;(vi)不抑制CSF-1(例如,人CSF-1)与CSF-1R(例如,人CSF-1R)的结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与不相关的非IL-34蛋白质结合的程度小于该抗体与IL-34结合的约10%,如例如通过Biacore测定法或生物膜干涉技术(BLI)测定法所测量。在一些实施方案中,与IL-34结合的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 500\text{nM}$ 、 $\leq 250\text{nM}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如从 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如从 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_d)。在一些实施方案中,抗IL-34抗体具有小于约500nM的 K_d 值。在一些实施方案中,抗IL-34抗体具有小于约100nM或10nM的 K_d 值。在一些实施方案中,抗IL-34抗体具有小于约1nM的 K_d 值。在一些实施方案中,IL-34抗体具有小于约100pM的 K_d 值。在一些实施方案中,抗IL-34抗体具有约100-200pM、约100-500pM、约100pM-1nM或约1nM-50nM的 K_d 。在一些实施方案中,抗IL-34抗体具有约17nM的 K_d 。在一些实施方案中,抗IL-34抗体具有约120nM的 K_d 。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与来自不同物种的IL-34之间保守的IL-34表位结合。

[0148] 在一个方面,本文提供一种抗IL-34抗体,所述抗体与包含人IL-34氨基酸残基Glu103、Leu109、Gln106、Asn150、Leu127、Asn128、Ser184、Leu186、Asn187、Lys44、Glu121、Asp107、Glu111、Ser104、Gln120、Trp116和Asn61的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三、十四、十五或十六或十七个氨基酸残基中至少任一个氨基酸残基的表位结合。在一个方面,本文提供一种抗IL-34抗体,所述抗体与包含从人IL-34的Glu103至Asn150的至少一个氨基酸残基的表位结合。在一个方面,本文提供一种抗IL-34抗体,所述抗体与包含人IL-34的氨基酸残基Glu103、Leu109、Gln106和Asn150的一个、两个或三个或四个氨基酸残基中至少任一个氨基酸残基的表位结合。在上述任一个方面,抗IL-34抗体可以与还包含人IL-34的氨基酸残基Ser100、Glu123、Trp116、Thr124、Leu127、Asn128、Gln131和Thr134的一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个或八

个氨基酸残基中至少任一个的表位结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与人IL-34的位置100-108、116-134、109和150内部的氨基酸结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体中和人IL-34活性。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与人IL-34的二聚体结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与覆盖人IL-34的两个原体的表位结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是与IL-34结合的抗体片段。如本文所用,本文中的残基位置对应于SEQ ID NO:1中的残基位置。在一个方面,本文提供一种抗IL-34抗体,所述抗体与人IL-34氨基酸残基Glu103、Leu109、Gln106、Asn150、Leu127、Asn128、Ser184、Leu186、Asn187、Lys44、Glu121、Asp107、Glu111、Ser104、Gln120、Trp116和Asn61的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三、十四、十五或十六或十七个氨基酸残基中至少任一个的表位结合。在一个方面,本文提供一种抗IL-34抗体,所述抗体与包含人IL-34的氨基酸残基Asn128、Ser184、Leu186、Asn187、Lys44和Glu121的一个、两个、三个、四个或五个或六个氨基酸残基中至少任一个氨基酸残基的表位结合。在上述任一个方面,抗IL-34抗体可以与还包含人IL-34的氨基酸残基Phe40、Asp43、Leu125、Gln189、Thr36和Val185的一个、两个、三个、四个或五个或六个氨基酸残基中至少任一个的表位结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与人IL-34的位置36-44、121-128和184-187内部的氨基酸结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体中和人IL-34活性。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与人IL-34的二聚体结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与覆盖人IL-34的两个原体的表位结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是与IL-34结合的抗体片段。如本文所用,本文中的残基位置对应于SEQ ID NO:1中的残基位置。在一个方面,本文提供一种抗IL-34抗体,所述抗体与包含从人IL-34的Glu103-Leu127的至少一个的表位结合。在一个方面,本文提供一种抗IL-34抗体,所述抗体与包含人IL-34的氨基酸残基Asp107、Glu111、Ser104、Gln120、Glu103、Leu109、Trp116和Asn61的一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个或八个氨基酸残基中至少任一个氨基酸残基的表位结合。在上文提供的任何方面,该抗体可以与还包含人IL-34的氨基酸残基Pro152、Val108、Leu110、Gln106、Glu123、Leu127、Lys117、Ile60和Lys55的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个或九个氨基酸残基中至少任一个氨基酸残基的表位结合。在一些实施方案中,该抗体与人IL-34的位置55-61、100-108、109、111-127和152内部的氨基酸结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体中和人IL-34活性。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与人IL-34的二聚体结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与覆盖人IL-34的两个原体的表位结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是与IL-34结合的抗体片段。如本文所用,本文中的残基位置对应于SEQ ID NO:1中的残基位置。

[0149] 在一个方面,本发明提供抗IL-34抗体,所述抗IL-34抗体包含如图10A和10B中所显示的一个、两个、三、四个或五个或六个HVR的任何组合的至少任一个。在一些实施方案

中,抗IL-34抗体包含一个、两个、三、四个或五个或六个HVR中的至少任一个,其中所述HVR选自(a)包含氨基酸序列STWIIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列RISPYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3。在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含一个、两个、三、四个或五个或六个HVR中的至少任一个,其中所述HVR选自(a)包含氨基酸序列STWIIH(SEQ ID NO:59)或GFTFSST(SEQ ID NO:30)或SSTWIIH(SEQ ID NO:57)的HVR-H1,(b)包含氨基酸序列RISPYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)或PYYYY(SEQ ID NO:37)或WVARISPYYYSD(SEQ ID NO:62)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或ARGLGKGSKRGAMD(SEQ ID NO:28)的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)或STAVAWY(SEQ ID NO:58)的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)或LLIYSASFLY(SEQ ID NO:34)的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)或QQSFYFPN(SEQ ID NO:38)的HVR-L3。

[0150] 在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含一个、两个、三、四个或五个或六个HVR中的至少任一个,其中所述HVR选自(a)含氨基酸序列STWIIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3。在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含一个、两个、三、四个或五个或六个HVR中的至少任一个,其中所述HVR选自(a)包含氨基酸序列STWIIH(SEQ ID NO:59)或GFTFSST(SEQ ID NO:30)或SSTWIIH(SEQ ID NO:57)的HVR-H1,(b)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)或PYSGY(SEQ ID NO:36)或WVARISPYSGYTNY(SEQ ID NO:61)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或ARGLGKGSKRGAMD(SEQ ID NO:28)的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)或STAVAWY(SEQ ID NO:58)的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)或LLIYSASFLY(SEQ ID NO:34)的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)或QQYSDLPY(SEQ ID NO:44)的HVR-L3。

[0151] 在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含一个、两个、三、四个或五个或六个HVR中的至少任一个,其中所述HVR选自(a)包含氨基酸序列STWIIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列RISPYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)或RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或GINQGSKRGAMDY(SEQ ID NO:32)的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)或QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)或QQYTALPYT(SEQ ID NO:49)或QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)或QQYSDVPYT(SEQ ID NO:47)或QQSRTARPT(SEQ ID NO:41)的HVR-L3。在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含了(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或GINQGSKRGAMDY(SEQ ID NO:32)的HVR-H3;(b)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)或QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)或QQYTALPYT(SEQ ID NO:49)或QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)或

QQYSDVPYT (SEQ ID NO:47) 或QQSRTARPT (SEQ ID NO:41) 的HVR-L3; 和(c) 包含氨基酸序列RISPYYYSDYADSVKG (SEQ ID NO:52) 或RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51) 的HVR-H2。在一些实施方案中, 抗IL-34抗体包含一个、两个、三、四个或五个或六个HVR中的至少任一个, 其中所述HVR选自(a) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59) 或GFTFSST (SEQ ID NO:30) 或SSTWIIH (SEQ ID NO:57) 的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列RISPYYYSDYADSVKG (SEQ ID NO:52) 或RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51) 或PYYYY (SEQ ID NO:37) 或PYSKY (SEQ ID NO:36) 或WVARISPYYYSD (SEQ ID NO:62) 或WVARISPYSGYTN (SEQ ID NO:61) 的HVR-H2; 和(c) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33) 或GINQGSKRGAMDY (SEQ ID NO:32) 或ARGLGKGSKRGAMD (SEQ ID NO:28) 或ARGINQGSKRGAMD (SEQ ID NO:27) 的HVR-H3; (d) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50) 或STAVAWY (SEQ ID NO:58) 的HVR-L1; (e) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53) 或LLIYSASFLY (SEQ ID NO:34) 的HVR-L2; 和(f) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39) 或QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43) 或QQYTALPYT (SEQ ID NO:49) 或QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45) 或QQYSDVPYT (SEQ ID NO:47) 或QQSRTARPT (SEQ ID NO:41) 或QQSFYFPN (SEQ ID NO:38) 或QQSYTTPP (SEQ ID NO:42) 或QQYTALPY (SEQ ID NO:48) 或QQYSDLPY (SEQ ID NO:44) 或QQYSDVPY (SEQ ID NO:46) 或QQSRTARP (SEQ ID NO:40) 的HVR-L3。

[0152] 在一些实施方案中, 抗IL-34抗体包含一个、两个、三、四个或五个或六个HVR中的至少任一个, 其中所述HVR选自(a) 包含氨基酸序列SNYIHH (SEQ ID NO:55) 的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG (SEQ ID NO:54) 的HVR-H2; (c) 包含氨基酸序列SRGAYRFAY (SEQ ID NO:56) 的HVR-H3; (d) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50) 的HVR-L1; (e) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53) 的HVR-L2; 和(f) 包含氨基酸序列QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43) 的HVR-L3。在一些实施方案中, 抗IL-34抗体包含了(a) 包含氨基酸序列SRGAYRFAY (SEQ ID NO:56) 的HVR-H3; (b) 包含氨基酸序列QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43) 的HVR-L3; 和(c) 包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG (SEQ ID NO:54) 的HVR-H2。在一些实施方案中, 抗IL-34抗体包含一个、两个、三、四个或五个或六个HVR中的至少任一个, 其中所述HVR选自(a) 包含氨基酸序列SNYIHH (SEQ ID NO:55) 或GFTFTSN (SEQ ID NO:31) 或TSNYIHH (SEQ ID NO:60) 的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG (SEQ ID NO:54) 或PASGD (SEQ ID NO:35) 或WVASITPASGDTD (SEQ ID NO:63) 的HVR-H2; (c) 包含氨基酸序列SRGAYRFAY (SEQ ID NO:56) 或ARSRGAYRFA (SEQ ID NO:29) 的HVR-H3; (d) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50) 或STAVAWY (SEQ ID NO:58) 的HVR-L1; (e) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53) 或LLIYSASFLY (SEQ ID NO:34) 的HVR-L2; 和(f) 包含氨基酸序列QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43) 或QQSYTTPP (SEQ ID NO:42) HVR-L3。

[0153] 在一个方面, 本发明提供一种抗IL-34抗体, 所述抗体包含了选自以下的至少一个、至少两个或全部三个VH HVR序列: (a) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59) 的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列RISPYYYSDYADSVKG (SEQ ID NO:52) 的HVR-H2; (c) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33) 的HVR-H3。在一些实施方案中, 抗IL-34抗体包含了包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33) 的HVR-H3。在一些实施方案中, 抗IL-34抗体包含了(a) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33) 的HVR-H3, 和(b) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39) 的HVR-L3。在一些实施方案中, 抗IL-34抗体包含了(a) 包含氨基

酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3; (b) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39)的HVR-L3; 和 (c) 包含氨基酸序列RISPYYYYSYADSVKG (SEQ ID NO:52)的HVR-H2。在一些实施方案中, 抗体包含 (a) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59)的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列RISPYYYYSYADSVKG (SEQ ID NO:52)的HVR-H2; 和 (c) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3。

[0154] 在另一个方面, 本发明提供一种抗IL-34抗体, 所述抗体包含了选自以下的至少一个、至少两个或全部三个VL HVR序列: (a) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1; (b) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2; 和 (c) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39)的HVR-L3。在一些实施方案中, 抗体包含了 (a) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1; (b) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2; 和 (c) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39)的HVR-L3。

[0155] 在另一个方面, 本发明的抗IL-34抗体包含 (a) VH结构域, 所述VH结构域包含选自以下的至少一个、至少两个或全部三个VH HVR序列: (i) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59)的HVR-H1、(ii) 包含氨基酸序列RISPYYYYSYADSVKG (SEQ ID NO:52)的HVR-H2和 (iii) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3; 和 (b) VL结构域, 所述VL结构域包含选自以下的至少一个、至少两个或全部三个VL HVR序列: (i) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1、(ii) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2和 (iii) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39)的HVR-L3。

[0156] 在另一个方面, 本发明提供一种抗IL-34抗体, 所述抗体包含了 (a) 含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59)的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列RISPYYYYSYADSVKG (SEQ ID NO:52)的HVR-H2; (c) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3; (d) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1; (e) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2; 和 (f) 包含氨基酸序列QQSFYFPNT (SEQ ID NO:39)的HVR-L3。

[0157] 在一个方面, 本发明提供一种抗IL-34抗体, 所述抗体包含了选自以下的至少一个、至少两个或全部三个VH HVR序列: (a) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59)的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51)的HVR-H2; (c) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3。在一些实施方案中, 抗IL-34抗体包含了包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3。在一些实施方案中, 抗IL-34抗体包含了 (a) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3, 和 (b) 包含氨基酸序列QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45)的HVR-L3。在一些实施方案中, 抗IL-34抗体包含了 (a) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3; (b) 包含氨基酸序列QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45)的HVR-L3; 和 (c) 包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51)的HVR-H2。在一些实施方案中, 该抗体包含了 (a) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59)的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51)的HVR-H2; 和 (c) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3。

[0158] 在另一个方面, 本发明提供一种抗IL-34抗体, 所述抗体包含了选自以下的至少一个、至少两个或全部三个VL HVR序列: (a) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1; (b) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2; 和 (c) 包含氨基酸序列QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45)的HVR-L3。在一些实施方案中, 该抗体包含了 (a) 包含氨基酸序

列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1; (b) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2; 和(c) 包含氨基酸序列QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45)的HVR-L3。

[0159] 在另一个方面, 本发明的抗IL-34抗体包含(a) VH结构域, 所述VH结构域包含选自以下的至少一个、至少两个或全部三个VH HVR序列: (i) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59)的HVR-H1, (ii) 包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51)的HVR-H2, (iii) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3; 和(b) VL结构域, 所述VL结构域包含选自以下的至少一个、至少两个或全部三个VL HVR序列: (i) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1; (ii) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2; 和(iii) 包含氨基酸序列QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45)的HVR-L3。

[0160] 在另一个方面, 本发明提供一种抗IL-34抗体, 所述抗体包含了(a) 包含氨基酸序列STWIIH (SEQ ID NO:59)的HVR-H1; (b) 包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:51)的HVR-H2; (c) 包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY (SEQ ID NO:33)的HVR-H3; (d) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1; (e) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2; 和(f) 包含氨基酸序列QQYSDLPYT (SEQ ID NO:45)的HVR-L3。

[0161] 在另一个方面, 本发明提供一种抗IL-34抗体, 所述抗体包含了(a) 包含氨基酸序列SNWIIH (SEQ ID NO:79)的HVR-H1, (b) 包含氨基酸序列RISPNSGYTDYADSVKG (SEQ ID NO:80)的HVR-H2; (c) 包含氨基酸序列SMRARRGFDY (SEQ ID NO:81)的HVR-H3; (d) 包含氨基酸序列RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50)的HVR-L1; (e) 包含氨基酸序列SASFLYS (SEQ ID NO:53)的HVR-L2; 和(f) 包含氨基酸序列QQSYTTPPT (SEQ ID NO:43)的HVR-L3。

[0162] 在另一个方面, 本发明提供从本文中例举的抗IL-34抗体衍生的抗IL-34抗体。

[0163] 在一些实施方案中, 抗IL-34抗体包含两、三、四、五或六种以下HVR中的任一个或其任何组合:

[0164] HVR-H1: SX₁X₂IH, 其中X₁是N或T, 并且X₂是Y或W (SEQ ID NO:64);

[0165] HVR-H2: X₁IX₂PX₃X₄X₅X₆X₇X₈YADSVKG, 其中X₁是S或R; 并且X₂是T或S; X₃是A或Y; X₄是S或Y; X₅是G或Y; X₆是D或Y; X₇是T或S; 和X₈是D或N (SEQ ID NO:65);

[0166] HVR-H3: SRGAYRFAY (SEQ ID NO:56), 或GX₁X₂X₃GSKRGAMDY, 其中X₁是L或I; X₂是G或N; X₃是K或Q (SEQ ID NO:66);

[0167] HVR-L1: RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:50);

[0168] HVR-L2: SASFLYS (SEQ ID NO:53);

[0169] HVR-L3: QQ X₁IX₂PX₃X₄X₅X₆T, 其中X₁是S或Y; 并且X₂是Y、T、S、F或R; X₃是T、A、D或Y; X₄是T、L、V、F或A; X₅是P或R; X₆是P、Y或N (SEQ ID NO:67)。

[0170] 在一些实施方案中, 可以置换HVR中的一个或多个氨基酸残基。在一些实施方案中, 置换是如本文中提供的保守性置换。

[0171] 在以上实施方案的任一项中, 抗IL-34抗体是人源化的。在一些实施方案中, 抗IL-34抗体包含如以上实施方案的任一项中的HVR, 并且还包含接纳体人类框架, 例如, 人免疫球蛋白框架或人类共有框架。在另一个实施方案中, 抗IL-34抗体包含如以上实施方案的任一项中的HVR, 并且还包含一个VH和/或一个VL, 所述VH包含SEQ ID NO:17的FR1序列、SEQ ID NO:18的FR2序列、SEQ ID NO:19的FR3序列、SEQ ID NO:20的FR4序列, 所述VL包含SEQ ID NO:21的FR1序列、SEQ ID NO:22的FR2序列、SEQ ID NO:23的FR3序列、SEQ ID NO:24的

FR4序列。

[0172] 在另一个方面,抗IL-34抗体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列(抗体404.33.56的VH氨基酸序列在图10A中显示)具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或100%序列同一性中至少任一个序列同一性的重链可变域(VH)序列。在一些实施方案中,相对于参考序列,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%或99%同一性中至少任一个同一性的VH序列含有置换(例如,保守性置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗IL-34抗体保留与IL-34结合的能力。在一些实施方案中,已经在SEQ ID NO:3中置换、插入和/或缺失总计1至10个氨基酸。在一些实施方案中,置换、插入或缺失出现在HVR外部的区域内(即,在FR中)。任选地,抗IL-34抗体包含SEQ ID NO:3中的VH序列,包含该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,VH包含一个、两个或三个HVR,所述HVR选自:(a)包含氨基酸序列STWIIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列RISPYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。

[0173] 在另一个方面,提供一种抗IL-34抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列(抗体404.33.56的VL氨基酸序列在图10B中显示)具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或100%序列同一性中至少任一个序列同一性的轻链可变域(VL)。在一些实施方案中,相对于参考序列,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%或99%同一性中至少任一个同一性的VL序列含有置换(例如,保守性置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗IL-34抗体保留与IL-34结合的能力。在一些实施方案中,已经在SEQ ID NO:4中置换、插入和/或缺失总计1至10个氨基酸。在一些实施方案中,置换、插入或缺失出现在HVR外部的区域内(即,在FR中)。任选地,抗IL-34抗体包含SEQ ID NO:4中的VL序列,包含该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,VL包含一个、两个或三个HVR,所述HVR选自:(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3。

[0174] 在另一个方面,抗IL-34抗体包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列(抗体404.33.12的VH氨基酸序列在图10A中显示)具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或100%序列同一性中至少任一个序列同一性的重链可变域(VH)序列。在一些实施方案中,相对于参考序列,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%或99%同一性中至少任一个同一性的VH序列含有置换(例如,保守性置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗IL-34抗体保留与IL-34结合的能力。在一些实施方案中,已经在SEQ ID NO:11中置换、插入和/或缺失总计1至10个氨基酸。在一些实施方案中,置换、插入或缺失出现在HVR外部的区域内(即,在FR中)。任选地,抗IL-34抗体包含SEQ ID NO:11中的VH序列,包含该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,VH包含一个、两个或三个HVR,所述HVR选自:(a)含氨基酸序列STWIIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。

[0175] 在另一个方面,提供一种抗IL-34抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列(抗体404.33.12的VL氨基酸序列在图10B中显示)具有90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%或99%或100%序列同一性中至少任一个序列同一性的轻链可变域(VL)。在一些实施方案中,相对于参考序列,具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%或99%同一性中至少任一个同一性的VL序列含有置换(例如,保守性置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗IL-34抗体保留与IL-34结合的能力。在一些实施方案中,已经在SEQ ID NO:12中置换、插入和/或缺失总计1至10个氨基酸。在一些实施方案中,置换、插入或缺失出现在HVR外部的区域内(即,在FR中)。任选地,抗IL-34抗体包含SEQ ID NO:12中的VL序列,包含该序列的翻译后修饰。在一个特定实施方案中,VL包含一个、两个或三个HVR,所述HVR选自:(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3。在另一个方面,提供一种抗IL-34抗体,其中所述抗体包含如上文提供的任一个实施方案中的VH和如上文提供的任一个实施方案中的VL。在一些实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中,该抗体包含分别在SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78中的VH和VL序列,包括这些序列的翻译后修饰。

[0176] 在又一个方面,本发明提供一种抗体,所述抗体与本文提供的抗IL-34抗体结合相同表位。例如,在一些实施方案中,提供一种抗体,所述抗体与选自以下的抗IL-34抗体结合相同的表位:包含SEQ ID NO:3的VH序列和SEQ ID NO:4的VL序列的抗IL-34抗体、包含SEQ ID NO:11的VH序列和SEQ ID NO:12的VL序列的抗IL-34抗体、包含SEQ ID NO:5的VH序列和SEQ ID NO:6的VL序列的抗IL-34抗体、包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列的抗IL-34抗体、包含SEQ ID NO:9的VH序列和SEQ ID NO:10的VL序列的抗IL-34抗体、包含SEQ ID NO:13的VH序列和SEQ ID NO:14的VL序列的抗IL-34抗体、或包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列的抗IL-34抗体。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与包含SEQ ID NO:3的VH序列和SEQ ID NO:4的VL序列的抗IL-34抗体结合相同的表位。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与包含SEQ ID NO:11的VH序列和SEQ ID NO:12的VL序列的抗IL-34抗体结合相同的表位。在一些实施方案中,该表位是构象表位。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与包含SEQ ID NO:77的VH序列和SEQ ID NO:78的VL序列的抗IL-34抗体结合相同的表位。在一些实施方案中,该表位是构象表位。在一些实施方案中,该表位是线性表位。

[0177] 在本发明的又一个方面,根据任一个以上实施方案的抗IL-34抗体是单克隆抗体,包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是抗体片段,例如,Fv、Fab、Fab'、scFv、双体抗体(diabody)或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,该抗体是全长抗体,例如,完整IgG1或IgG4抗体或如本文定义的其他抗体类别或同种型。

[0178] 在又一个方面,根据任一个以上实施方案的抗IL-34抗体可以单独或以组合方式

合并如下文1-7部分中所述的任一特征：

[0179] 抗CSF-1R抗体

[0180] 在另一个方面，本发明提供与CSF-1R（例如，人CSF-1R）结合的分离抗体。在一个方面，本文提供一种抗CSF-1R抗体，所述抗体与包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg144、Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn254的一个、两个、三个、四个或五个或六个氨基酸残基中至少任一个的表位结合。在一个方面，本文提供一种抗CSF-1R抗体，所述抗体与包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg144的表位结合。在一个方面，本文提供一种抗CSF-1R抗体，所述抗体与包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg144、Arg142、Arg146和Arg250的一个、两个或三个或四个氨基酸残基中至少任一个的表位结合。以上任意方面的抗CSF-1R抗体可以与还包含人CSF-1R氨基酸残基Ser172和Arg192中至少一个或两个的表位结合。以上任意方面的抗CSF-1R抗体可以与还包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg146、Met149、Arg150、Phe169、Ile170和Gln173的一个、两个、三个、四个或五个或六个氨基酸残基中至少任一个的表位结合。在一些实施方案中，抗CSF-1R抗体与CSF-1R的位置142-150和169-172内部的氨基酸结合。如本文所用，本文中的残基位置对应于SEQ ID NO:2中的残基位置。在一些实施方案中，抗CSF-1R抗体抑制人IL-34和/或人CSF-1与人CSF-1R之间的结合。

[0181] 在另一个方面，本文提供一种抗CSF-1R抗体，所述抗体与包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg144、Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn254的一个、两个、三个、四个或五个或六个氨基酸残基中至少任一个的表位结合。在一个方面，本文提供一种抗CSF-1R抗体，所述抗体与包含人CSF-1R的氨基酸残基Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn254的一个、两个、三个、或四个或五个氨基酸残基中至少任一个的表位结合。在一个方面，本文提供一种抗CSF-1R抗体，所述抗体与包含人CSF-1R的氨基酸残基Gln248、Gln249、Ser250、Phe252、Asn254和Tyr257的一个、两个、三个、四个或五个或六个氨基酸残基中至少任一个的表位结合。以上任意方面的抗CSF-1R抗体可以与还包含人CSF-1R氨基酸残基Pro247、Gln258和Lys259中至少一个、至少两个或三个氨基酸残基的表位结合。以上任意方面的抗CSF-1R抗体可以与还包含人CSF-1R氨基酸残基Val231、Asp251和Tyr257中至少一个、至少两个或三个氨基酸残基的表位结合。在一些实施方案中，抗CSF-1R抗体与CSF-1R的位置231、248-252和254内部的氨基酸结合。如本文所用，本文中的残基位置对应于SEQ ID NO:2中的残基位置。在一些实施方案中，抗CSF-1R抗体抑制人IL-34和/或人CSF-1与人CSF-1R之间的结合。

[0182] 在本发明的又一个方面，根据任一个以上实施方案的抗CSF-1R抗体是单克隆抗体，包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一些实施方案中，抗CSF-1R抗体是抗体片段，例如，Fv、Fab、Fab'、scFv、双体抗体或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中，该抗体是全长抗体，例如，完整IgG1或IgG4抗体或如本文定义的其他抗体类别或同种型。

[0183] 在又一个方面，根据任一个以上实施方案的抗CSF-1R抗体可以单独或以组合方式合并如下文1-7部分中所述的任一特征：

[0184] 抗体亲和力

[0185] 在一些实施方案中，本文中提供的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ （例如 10^{-8}M 或更小，例如从 10^{-8}M 至 10^{-13}M ，例如从 10^{-9}M 至 10^{-13}M ）的解离常数（K_d）。在一些实施方案中，通过放射标记抗原结合测定法（RIA）测量K_d，如以下测定法所述，所述测定法用目的抗体的Fab形式和其抗原进行。通过以下方式测量Fab对

抗原的溶液结合亲和力:在未标记抗原的滴定系列存在下用最低浓度的(^{125}I)标记的抗原平衡Fab,随后用抗Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原(见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了建立用于测定法的条件,将**MICROTITER**[®]多孔板(Thermo Scientific)用50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗Fab捕获抗体(Cappel Labs)包被过夜并随后用PBS中的2% (w/v)牛血清白蛋白在室温(大约23 $^{\circ}\text{C}$)封闭2至5小时。在不吸附性平板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM[^{125}I]-抗原与目的Fab的连续稀释物(例如,与Presta等人,Cancer Res.57:4593-4599(1997)中评估抗VEGF抗体Fab-12一致)混合。随后将目的Fab孵育过夜;然而,孵育可以持续较长时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获平板以便在室温孵育(例如,1小时)。随后移除溶液并将平板用PBS中的0.1%聚山梨醇酯20(**TWEEN-20**[®])洗涤8次。当平板已经干燥时,添加150 μL /孔闪烁体(MICROSCINT-20TM;Packard),并且将平板在TOPCOUNTTM γ 计数器(Packard)上计数10分钟。选择产生小于或等于20%最大结合作用的每种Fab的浓度用于竞争性结合测定法中。

[0186] 根据另一个实施方案,使用表面等离子体共振测定法,例如使用**BIACORE**[®]-2000或**BIACORE**[®]-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在25 $^{\circ}\text{C}$ 采用固定抗原CM5芯片以约10个响应单位(RU),测量 K_d 。简而言之,根据供应商说明书,以盐酸N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)。将抗原用10mM乙酸钠, pH4.8稀释至5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (约0.2 μM),随后以5 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ 的流速上样以实现偶联蛋白的大约10个响应单位(RU)。在抗原上样后,注入1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量,将Fab在具有0.05%聚山梨醇酯20(Tween-20TM)表面活性剂的PBS(PBST)中的两倍连续稀释物(例如,0.78nM至500nM)在25 $^{\circ}\text{C}$ 以大约25 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ 的流速注射。使用简单的一对一Langmuir结合模型(**BIACORE**[®]评价软件3.2版)通过同时拟合缔合和解离传感图(sensorgram),计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(K_d)计算为比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过以上表面等离子体共振测定法显示缔合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,则可以使用荧光猝灭技术测定缔合速率,其中所述的荧光猝灭技术在如光谱仪中所测量的增加浓度的抗原存在下,在25 $^{\circ}\text{C}$ 测量在PBS, pH7.2中的20nM抗抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)增加或减少,所述光谱仪如配备止流法(stop-flow)的分光光度计(Aviv Instruments)或具有搅拌型比色皿的8000-系列SLM-AMINCOTM分光光度计(ThermoSpectronic)。

[0187] 根据另一个实施方案,使用BLI测定法测量 K_d ,例如,如本文所述。

[0188] 抗体片段

[0189] 在一些实施方案中,本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、和scFv片段和下文描述的其他片段。关于某些抗体片段的综述,见Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,见例如Pluckthün,引自The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编著,(Springer-Verlag, New York,第269-315页(1994);还见WO 93/16185;和美国专利号5,

571,894和5,587,458。关于包含救援受体 (salvage receptor) 结合表位残基和具有增加的体内半寿期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,见美国专利号5,869,046。

[0190] 双体抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,所述两个抗原结合位点可以是双价或双特异性的。见,例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134 (2003);和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448 (1993)。三体抗体和四体抗体还在Hudson等人,Nat.Med.9:129-134 (2003) 中描述。

[0191] 单一结构域抗体是包含抗体的全部或一部分重链可变域或全部或一部分轻链可变域的抗体片段。在一些实施方案中,单一结构域抗体是人单一结构域抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 见,例如,美国专利号6,248,516B1)。

[0192] 在一些实施方案中,抗体片段是具有基本上与完整抗体相似的体内半寿期的单价抗体。例如,这种抗体片段可以包含与能够对该片段赋予体内稳定性的Fc序列连接的一条抗原结合臂。在一个实施方案中,本发明的抗体是如WO 2005/063816中所述的单臂抗体。在一个实施方案中,该单臂抗体包含构成“杵”和“臼”的Fc突变,如WO 2005/063816中所述。该抗体片段也可以是“线性抗体”,例如,如美国专利号5,641,870中所述。此类线型抗体片段可以是单特异性或双特异性的。抗体片段可以通过多种技术产生,所述多种技术包括但不限于蛋白酶解消化完整抗体以及由重组宿主细胞产生(例如,大肠杆菌或噬菌体),如本文所述。

[0193] 嵌合和人源化抗体

[0194] 在一些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体例如在美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855 (1984) 中描述。在一个例子中,嵌合抗体包含非人类可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类如猴的可变区)和人类恒定区。在又一个例子中,嵌合抗体是其中类别或亚类已经从亲本抗体的类别或亚类被改变的“类别转换”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0195] 在一些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。一般,将非人抗体人源化以减少针对人类的免疫原性,同时保留亲本非人类抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含其中HVR(例如,CDR)(或其部分)源自非人类抗体并且FR(或其部分)源自人抗体序列的一个或多个可变域。人源化抗体任选地也将包含人类恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基用来自非人抗体(例如,从中衍生HVR残基的抗体)的相应残基置换,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0196] 人源化抗体和制造它们的方法综述于例如Almagro和Fransson, Front.Biosci.13:1619-1633 (2008) 中,并且例如还在Riechmann等人,Nature 332:323-329 (1988);Queen等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA86:10029-10033 (1989);美国专利号5,821,337,7,527,791,6,982,321,和7,087,409;Kashmiri等人,Methods 36:25-34 (2005) (描述SDR(a-CDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498 (1991) (描述“表面重塑”);Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60 (2005) (描述“FR改组”);和Osborn等人,Methods 36:61-68 (2005) 和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260 (2000) (描述针对FR改组的“导向选择”方案)中描述。

[0197] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳配合”方法选择的框架区(见,例如,Sims等人,J.Immunol.151:2296 (1993));从特定亚组的人抗体的轻链可变区或

重链可变区的共有序列衍生的框架区(见,例如,Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89:4285 (1992);和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(见,例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633 (2008));和从筛选FR文库衍生的框架区(见,例如,Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684 (1997)和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618 (1996))。

[0198] 人抗体

[0199] 在一些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的多种技术产生人抗体。人抗体总体上在van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74 (2001)和Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459 (2008)中描述。

[0200] 人抗体可以通过施用免疫原至转基因动物制备,其中所述转基因动物已经被修饰以应答于抗原攻击产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这类动物一般含有替换内源免疫球蛋白基因座或在染色体外存在或随机整合入动物染色体的全部或部分人免疫球蛋白基因座。在这类转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座通常已经失活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125 (2005)。还见,例如,描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述**HuMab®**技术的美国专利号5,770,429;描述**K-MOUSE®**技术的美国专利号7,041,870,和描述**VELOCI MOUSE®**技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900)。可以进一步修饰来自这类动物产生的完整抗体的人可变区,例如,通过与不同的人类恒定区组合。

[0201] 也可以通过基于杂交瘤的方法产生人抗体。已经描述了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。(见,例如,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);和Boerner等人,J.Immunol.,147:86 (1991))。借助人B-细胞杂交瘤技术产生的人抗体还在Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 103:3557-3562 (2006)中描述。额外的方法包括例如在美国专利号7,189,826(描述从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268 (2006)(描述人-人杂交瘤)中描述的那些。人杂交瘤技术(三体瘤技术)还在Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937 (2005)以及Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91 (2005)中描述。

[0202] 也可以通过分离从人衍生的噬菌体展示文库选出的Fv克隆可变域序列产生人抗体。这类可变域序列随后可以与所需的人恒定域组合。下文描述用于从抗体文库选出人抗体的技术。

[0203] 文库衍生的抗体

[0204] 可以通过对组合文库筛选具有所需活性或多种活性的抗体,分离本发明的抗体。例如,本领域已知用于产生噬菌体展示文库并对这类文库筛选拥有所需结合特征的抗体的多种方法。这类方法例如综述于Hoogenboom等人,引自Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等人编著,Human Press,Totowa,NJ,2001)中并且例如还在McCafferty等人,Nature 348:552-554;Clackson等人,Nature 352:624-628 (1991);Marks等人,

J.Mol.Biol.222:581-597 (1992); Marks和Bradbury, 引自Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo编著, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu等人, J.Mol.Biol.338(2): 299-310 (2004); Lee等人, J.Mol.Biol.340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472 (2004); 和Lee等人, J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132 (2004) 中描述。

[0205] 在某些噬菌体展示法中, VH基因和VL基因库分别由聚合酶链反应(PCR)克隆并且在噬菌体文库中随机重组, 其中随后可以对所述噬菌体文库筛选结合抗原的噬菌体, 如Winter等人, Ann.Rev.Immunol., 12:433-455 (1994) 中所述。噬菌体一般将抗体片段展示为单链Fv(scFv)片段或展示为Fab片段。来自自己免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体, 无需构建杂交瘤。可选地, 可以克隆天然库(例如, 从人)以在不做任何免疫的情况下, 提供针对广泛类型非自身抗原的抗体和还针对自身抗原的抗体的单一来源, 如Griffiths等人, EMBO J, 12:725-734 (1993) 所述。最后, 也可以通过从干细胞克隆未重排的V-基因区段并使用含有随机序列的PCR引物以编码高度可变性CDR3区并实现体外重排, 合成地产生天然文库, 如Hoogenboom和Winter, J.Mol.Biol., 227:381-388 (1992) 所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公布例如包括: 美国专利号5,750,373和美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0206] 将从人抗体文库分离的抗体或抗体片段视为本文中的人抗体或人抗体片段。

[0207] 6. 多特异性抗体

[0208] 双特异性抗体

[0209] 双特异性抗体是对两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体。在一些实施方案中, 双特异性抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施方案中, 一种结合特异性针对IL-34(例如, 人IL-34)并且另一种结合特异性针对任何其他抗原。在一些实施方案中, 双特异性抗体可以与IL-34(例如, 人IL-34)的两个不同表位结合。在一些实施方案中, 双特异性抗体包含针对IL-34(例如, 人IL-34)的第一结合特异性和针对CSF-1(例如, 人CSF-1)的第二结合特异性。在一些实施方案中, 双特异性抗体结合至IL-34上与本文所述的任何抗IL-34抗体结合的同表位结合。在一些实施方案中, 双特异性抗体包含本文所述的任一种抗IL-34抗体的一个、两个、三、四个或五个或六个HVR中的至少任一个HVR。可以将双特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段(例如, F(ab')₂双特异性抗体)。

[0210] 用于产生双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统上, 双特异性抗体的重组产生基于共表达两条免疫球蛋白重链-轻链对, 其中两条重链具有不同的特异性(Milstein和Cuellar, Nature 305:537 (1983))。因为免疫球蛋白重链和轻链的随机分配, 这些杂交瘤(四合瘤(quadroma)产生10种不同抗体分子的可能混合物, 其中仅一种分子具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化是相当繁琐的, 通常借助亲和层析步骤进行, 并且产物产率低。类似的方法在1993年5月13日公布的WO 93/08829中并在Traunecker等人, EMBOJ., 10:3655 (1991) 中公开。

[0211] 根据一种不同方案, 具有所需结合特异性的抗体可变域(抗体-抗原结合位点)与免疫球蛋白恒定域序列融合。例如, 这种融合物具有免疫球蛋白重链恒定域, 包括铰链部、CH2区和CH3区的至少部分。在一些实施方案中, 含有轻链结合必需的位点的第一重链恒定

区(CH1)在至少一种融合物中存在。将编码免疫球蛋白重链融合物和(如果所需)免疫球蛋白轻链的DNA插入独立的表达载体中并且共转染至合适的宿主生物中。在构建中所用的比率不等的3多肽链提供最佳产率时的实施方案中,这在调节3种多肽片段的相互比例方面提供灵活性。然而,当至少两条多肽链以等比率的表达导致高产率时或当该比率没有特定意义时,可能将2条或全部3条多肽链的编码序列在一个表达载体中插入。

[0212] 在这种方案的一些实施方案中,双特异性抗体由一条臂中具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一条臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。发现这种非对称结构促进所需的双特异性化合物与不想要的免疫球蛋白链组合分离,因为免疫球蛋白轻链在所述双特异性分子的仅一半中的存在提供了便利的分离方式。这种方法在WO 94/04690中公开。关于产生双特异性抗体的进一步细节,见,例如Suresh等人,Methods in Enzymology,121:210(1986)。

[0213] 根据另一个方案,可以将一对抗体分子之间的界面工程化以最大化从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分数。该界面包含抗体恒定域的CH3结构域的至少一部分。在这种方法中,来自第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链由较大侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换。通过将大氨基酸侧链替换为较小侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸),在第二抗体分子的界面上产生针对大体积侧链的相同或相似尺寸的补偿“腔”。这提供了相对于其他不想要的产物(如同型二聚体)而言增加异二聚体产率的机制。

[0214] 双特异性抗体包括交联抗体或“异质缀合”抗体。例如,异质缀合下的抗体之一可以偶联于抗生物素蛋白,另一种抗体偶联于生物素。已经例如提出这类抗体将免疫系统细胞导引至不想要的细胞(美国专利号4,676,980)并用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/00373和EP03089)。可以使用任何便利的交联方法产生异质缀合抗体。合适的交联剂是本领域熟知的并且连同许多交联技术一起在美国专利号4,676,980中公开。也已经在文献中描述从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如,可以利用化学键制备双特异性抗体。Brennan等人,Science229:81(1985)描述了其中完整抗体经蛋白酶解方式切割以产生F(ab')₂片段的方法。这些片段在二硫酚(dithiol)络合剂亚砷酸钠存在下还原以稳定邻位二硫酚并防止分子间二硫化物形成。产生的Fab'片段随后转化成硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。随后将Fab'-TNB衍生物之一通过用巯基乙胺还原再转化成Fab'-巯基并且与等摩尔量的其他Fab'-TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可以用作用于选择性固定酶的物质。最近的进展已经促进从大肠杆菌直接回收Fab'-SH片段,所述片段可以化学地偶联以形成双特异性抗体。Shalaby等人,J.Exp.Med.,175:217-225(1992)描述了全长人源化双特异性抗体F(ab')₂分子的产生。每种Fab片段分别从大肠杆菌分泌并经历体外定向化学偶联以形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够与过量表达HER2受体的细胞和正常人T细胞结合,同时触发人细胞毒淋巴细胞针对人乳腺肿瘤靶的溶解活性。

[0215] 也已经描述了从重组细胞培养物直接产生并分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已经使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体。Kostelny等人,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992)。来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两个不同抗体的Fab'部分连接。抗体同型二聚体在铰链区经还原以形成单体和随后再氧化以形成抗体异二聚体。也可以将这种方法用于抗体同型二聚体的产生。Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)描述的“双体抗体”技术已经为产生双特异性抗体片段提供替代性机

制。这些片段包含通过接头与轻链可变域(VL)连接的重链可变域(VH),其中所述接头太短,以至于不允许相同链上的这两个结构域之间配对。因而,迫使一个片段的VH和VL结构域与另一个片段的互补性VL和VH结构域配对,因而形成两个抗原结合位点。还已经报道了通过利用单链Fv(sFv)二聚体产生双特异性抗体片段的另一种策略。见Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994)。

[0216] 根据一个实施方案,包含本发明抗原结合结构域的一种多肽包含异二聚化结构域。如本文所用,“异源多聚化结构域”指对生物分子的如此改变或添加,从而促进异源多聚体形成并阻碍同型多聚体形成。具有形成异二聚体超越形成同型二聚体的强烈倾向的任何异二聚化结构域处于本发明范围。说明性的例子包括但不限于,例如,美国专利申请20030078385(Arathoon等人;描述杵臼法(knob-into-hole));W02007147901(Kjærgaard等人;描述离子相互作用);W02009089004(Kannan等人;描述静电转向效应);W02011/034605(Christensen等人;描述卷曲螺旋)。还见,例如,描述亮氨酸拉链的Pack,P.和Plueckthun,A.,Biochemistry 31,1579-1584(1992)或描述螺旋-转角-螺旋基序的Pack等人,Bio/Technology 11,1271-1277(1993)。短语“异源多聚化结构域”和“异二聚化结构域”在本文中互换地使用。

[0217] 如本文中提到的术语“杵臼法”或“KnH”技术指通过在两条多肽相互作用的界面处将隆起(杵)引入一个多肽中并将腔体(臼)至引入另一个多肽在体外或在体内指导这两种多肽配对的技术。例如,已经在抗体的Fc:Fc结合界面、CL:CH1界面或VH/VL界面中引入KnH(例如,US2007/0178552、W0 96/027011、W0 98/050431和Zhu等人,(1997)Protein Science 6:781-788)。

[0218] 用于产生多特异性(例如,双特异性)抗体的其他技术包括但不限于“杵-臼”工程化(见,例如,美国专利号5,731,168),使用静电转向效应工程化以产生抗体Fc-异二聚体分子(W0 2009/089004A1)。

[0219] 构思了大于二价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tutt等人,J.Immunol.147:60(1991)。

[0220] 本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化抗体,包括“八抗体(Octopus antibody)”(见,例如,US 2006/0025576A1)。

[0221] 本文的抗体或片段还包括“双重功能FAB”或“DAF”,其包含与IL-34以及另一种不同抗原(例如,CSF-1)结合的抗原结合位点(例如见,US2008/0069820)。

[0222] 7.抗体变体

[0223] 在一些实施方案中,构思了本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能想要改善该抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。可以通过向编码抗体的核苷酸序列引入适宜修饰或通过肽合成制备该抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如,从抗体的氨基酸序列内部缺失残基和/或将残基插入所述氨基酸序列中和/或置换所述氨基酸序列中的残基。可以产生缺失、插入和置换的任意组合以实现最终构建体,只要所述最终构建体拥有想要的特征,例如抗原结合作用。

[0224] 置换变体、插入变体和缺失变体

[0225] 在一些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换诱变的目的位点包括HVR和FR。表1中在“保守性置换”标题下显示保守性置换。表1中在“示例性

置换”标题下显示并且参考氨基酸侧链类别如下文进一步描述更明显的变化。可以将氨基酸置换引入目的抗体中并且对产物筛选所需的活性,例如,保留/改善的抗原结合作用、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC。

[0226] 表1

[0227]

原始残基	示例性置换	优选的置换
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu;Asn	Clu
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
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)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val;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

[0228] 氨基酸可以根据常见的侧链特性分组:

[0229] (1) 疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0230] (2) 中性亲水:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0231] (3) 酸性:Asp、Glu;

[0232] (4) 碱性:His、Lys、Arg;

[0233] (5) 影响链方向的残基:Gly、Pro;

[0234] (6) 芳族:Trp、Tyr、Phe。

[0235] 非保守性置换将使这些分类之一的成员交换为另一个分类的成员。

[0236] 一个置换变体类型涉及置换亲本抗体(例如,人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,为进一步研究所选择的产生的变体将相对于亲本抗体在某些生物学特性方面(例如,增加的亲和力,降低的免疫原性)具有修饰(例如,改善)和/或将具有亲本抗体的基本上保留的某些生物学特性。示例性置换变体是亲和力成熟抗体,所述抗体可以例如,使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术如本文所述的那些技术便利地产生。简而言之,将一

个或多个HVR残基突变并且将变体抗体在噬菌体上展示并筛选特定生物活性(例如,结合亲和力)。

[0237] 可以在HVR中做出改变(例如,置换),例如以改善抗体亲和力。这类改变可以在HVR“热点”(即,在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子所编码的残基(见,例如,Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)))和/或SDR(a-CDR)中做出,同时对所产生的变体VH或VL测试结合亲和力。已经例如在Hoogenboom等人,引自 *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人编著, Human Press, Totowa, NJ, (2001))中描述了通过构建次级文库并从中重新选择实现亲和力成熟。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)的任一种,将多样性引入所选择用于成熟的可变基因中。随后产生次级文库。随后筛选该文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及HVR指导的方案,其中将几种HVR残基(例如,一次4-6个残基)随机分组。可以特别地鉴定参与抗原结合的HVR残基,例如,使用丙氨酸扫描法诱变或建模。尤其经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0238] 在一些实施方案中,置换、插入或缺失可以在一个或多个HVR内部出现,只要这类改变不实质降低抗体结合抗原的能力。例如,可以在HVR中做出不实质降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文中提供的保守性置换)。这类种改变可以在HVR“热点”或SDR外部。在上文提供的变体VH和VL序列的一些实施方案中,每个HVR或者不予改变或含有不多于一个、两个或三个氨基酸置换。

[0239] 一种用于鉴定可以被靶向以便诱变的抗体残基或区域的有用方法称作“丙氨酸扫描法诱变法”,如Cunningham和Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所述。在这种方法中,将残基或靶残基组(例如,带电荷残基如arg、asp、his、lys和glu)鉴定并且用中性或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸)替换以确定该抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对于初始置换显示功能敏感的氨基酸位置处引入其他置换。备选或额外地,测定抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和抗原之间的接触点。可以将这类接触残基和邻近残基作为置换候选物靶向或消除。可以筛选变体以确定它们是否含有所需的特性。

[0240] 氨基酸序列插入包括长度从1个残基至含有成百个或更多个残基的多肽间变动的氨基端和/或羧基端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入性变体包括抗体的N末端或C末端与酶(例如,针对ADEPT的酶)或增加该抗体血清半寿期的多肽融合。

[0241] 糖基化变体

[0242] 在一些实施方案中,改变本文提供的抗体以增加或减少抗体发生糖基化的程度。可以通过改变氨基酸序列从而创造或移除一个或多个糖基化位点,便利地实现向抗体添加或对其删除糖基化位点。

[0243] 在抗体包含Fc区的情况下,可以改变与之连接的糖。哺乳动物细胞产生的天然抗体一般包含分枝的双天线状低聚糖,所述低聚糖通常借助N联连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。例如见,Wright等人, *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。低聚糖可以包括各种糖,例如,甘露糖、N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及与双天线状低聚糖结构的“茎部”中GlcNAc连接的岩藻糖。在一些实施方案中,可以修饰本发明抗体中的低聚糖以产生具有某些改善特性的抗体变体。

[0244] 在一些实施方案中,提供具有糖结构的抗体变体,所述糖结构缺少与Fc区(直接或间接)连接的岩藻糖。例如,这类抗体中岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。通过以下方式确定岩藻糖的量:相对于如通过MALDI-TOF质谱法所测量的与Asn297连接的全部糖结构(例如,复杂结构、杂合结构和高甘露糖结构)的总和,计算在糖链内部Asn297处岩藻糖的平均量,例如,如WO 2008/077546中所述。Asn297指位于Fc区内约第297位置处的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);然而,Asn297也可以位于第297位置上游或下游约±3氨基酸,即,在第294和300位置之间,原因在于抗体中的微小序列变异。这类岩藻糖化变体可以具有改善的ADCC功能。见,例如,美国专利公开号US2003/0157108 (Presta,L.);美国2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。与“去岩藻糖化”或“岩藻糖缺陷型”抗体变体相关的出版物的例子包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人,J.Mol.Biol.336:1239-1249 (2004);Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614 (2004)。能够产生去岩藻糖化抗体的细胞系的例子包括在蛋白质岩藻糖化方面缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等人,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545 (1986));美国专利申请号US2003/0157108A1,Presta,L;和WO 2004/056312 A1,Adams等人,Acta crystallographica Section D,Biological crystallography 66:213-221 (2010),特别地在实施例11)中,和敲除细胞系,如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除CHO细胞(见,例如,Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614 (2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94 (4):680-688 (2006);和WO 2003/085107)。

[0245] 还可以提供具有双分低聚糖的抗体变体,例如,其中与抗体Fc区连接的双天线状低聚糖由GlcNAc对分。这类抗体变体可以具有减少的岩藻糖化和/或改善的ADCC功能。这类抗体变体的例子例如在WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684 (Umana等人);和US2005/0123546 (Umana等人)中描述。也提供低聚糖中的至少一个半乳糖残基与Fc区连接的抗体变体。这类抗体变体可以具有改善的CDC功能。这类抗体变体例如在WO 1997/30087 (Patel等人);WO1998/58964 (Raju,S.);和WO 1999/22764 (Raju,S)中描述。

[0246] Fc区变体

[0247] 在一些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的抗体Fc区中,因而产生Fc区变体。该Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如,置换)的人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0248] 在一些实施方案中,本发明构思了拥有一些但不是全部效应子功能的抗体变体,这使所述抗体变体成为其中抗体体内半寿期重要而某些效应子功能(如补体和ADCC)不必要或有害的应用的有利候选物。可以实施体外和/或体内细胞毒性测定法以证实CDC和/或ADCC活性降低/耗尽。例如,可以实施Fc受体(FcR)结合测定法以确保抗体缺少Fc γ R结合作用(因此可能缺少ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞-NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达汇总于Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492 (1991)的第464页上的表3中。评估目的分子的ADCC活性的体外测定法的非限制性例子在美国专利号5,500,362(见,例如,

Hellstrom, I. 等人, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) 和 Hellstrom, I 等人, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5, 821, 337 (见 Bruggemann, M. 等人, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)) 中描述。可选地, 可以使用非放射性分析方法 (见, 例如, 用于流式细胞术的 ACTI™ 非放射性细胞毒性测定法 (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; 和 CytoTox 96® 非放射性细胞毒性测定法 (Promega, Madison, WI))。用于此类测定法的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。备选或额外地, 可以在体内, 例如, 在动物模型中, 如在 Clynes 等人, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) 公开中的那种动物模型中评估目的分子的 ADCC 活性。也可以实施 C1q 结合测定法以证实抗体不能结合 C1q 并因此缺少 CDC 活性。见, 例如, WO 2006/029879 和 WO 2005/100402 中的 C1q 和 C3c 结合 ELISA。为了评估补体激活, 可以进行 CDC 测定法 (见, 例如, Gazzano-Santoro 等人, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. 等人, Blood 101:1045-1052 (2003); 和 Cragg, M. S. 和 M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004))。也可以使用本领域已知的方法确定 FcRn 结合作用和体内清除率/半寿期 (见, 例如, Petkova, S. B. 等人, Int' l. Immunol. 18 (12):1759-1769 (2006))。

[0249] 效应子功能减少的抗体包括置换了一个或多个 Fc 区残基 238、265、269、270、297、327 和 329 (美国专利号 6,737,056) 的那些。这类 Fc 突变体包括在两个或更多个氨基酸位置 265、269、270、297 和 327 处具有置换的 Fc 突变体, 包括残基 265 和 297 置换成丙氨酸的所谓 “DANA” Fc 突变体 (美国专利号 7,332,581)。

[0250] 描述了具有改善或削弱的 FcR 结合作用的某些抗体变体。(见, 例如, 美国专利号 6,737,056; WO2004/056312, 和 Shields 等人, J. Biol. Chem. 9 (2):6591-6604 (2001))。

[0251] 在一些实施方案中, 在 Fc 区内做出改变, 所述改变导致变更 (即改善或削弱) 的 C1q 结合作用和/或补体依赖细胞毒性 (CDC), 例如, 如美国专利号 6,194,551、WO99/51642 和 Idusogie 等人, J. Immunol. 164:4178-4184 (2000) 中所述。

[0252] 在 US2005/0014934A1 (Hinton 等人) 中描述了具有增加的半寿期和改善的新生 Fc 受体 (FcRn) 结合作用的抗体, 所述新生 Fc 受体负责转移母源 IgG 至胎儿 (Guyer 等人, J. Immunol. 117:587 (1976) 和 Kim 等人, J. Immunol. 24:249 (1994))。这些抗体包含其中具有一个或多个置换的 Fc 区, 其中所述置换改善 Fc 区与 FcRn 的结合。这类 Fc 变体包括在一个或多个 Fc 区残基: 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434 处具有置换 (例如, Fc 区残基 434 置换) 的那些 (美国专利号 7,371,826)。

[0253] 还见涉及 Fc 区变体其他例子的 Duncan 等人, Nature 322:738-40 (1988)); 美国专利号 5,648,260; 美国专利号 5,624,821; 和 WO94/29351。

[0254] 半胱氨酸工程化抗体变体

[0255] 在一些实施方案中, 可以想要产生半胱氨酸工程化的抗体, 例如, “硫代 MAb”, 其中所述抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基置换。在具体的实施方案中, 置换的残基出现在抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸置换这些残基, 因而将反应性巯基安置在抗体的可及位点处并且可以用来使抗体缀合至其他部分, 如药物部分或接头-药物部分以产生免疫缀合物, 如本文中进一步所述。在一些实施方案中, 可以用半胱氨酸取代以下残基的任何一个或多个: 轻链的 V205 (Kabat 编号); 重链的 A118 (EU 编号); 和重链 Fc 区的 S400 (EU 编号)。半

胱氨酸工程化的抗体可以例如美国专利号7,521,541中所述那样产生。

[0256] 抗体衍生物

[0257] 在一些实施方案中,可以进一步修饰本文提供的抗体以含有本领域已知并轻易可获得的额外的非蛋白质部分。适于衍生抗体的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、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、亚乙基/马来酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、和葡聚糖或聚(N-乙基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如,丙三醇)、聚乙烯醇和它们的混合物。聚乙二醇丙醛可以具有制造方面的优点,原因在于其在水中的稳定性。这种聚合物可以具有任何分子量,并可以是分枝或不分枝的。与抗体连接的聚合物的数目可以变动,并且如果连接多于一种聚合物,它们可以是相同或不同的分子。通常,用于衍生的聚合物的数目和/或类型可以基于以下考虑事项确定,包括但不限于待改善的抗体特定特性或功能、抗体衍生物是否将用于限定情况下的疗法中等等。

[0258] 在另一个实施方案中,提供了抗体和非蛋白质部分的缀合物,其中所述非蛋白质部分可以通过暴露于辐射而选择性加热。在一些实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人,Proc Natl Acad Sci USA 102:11600-11605(2005))。辐射可以具有任何波长,并包括,但不限于这样的波长,所述波长不伤害普通细胞,但是使非蛋白质部分加热至杀伤临近于抗体-非蛋白质部分的细胞的温度。

[0259] 重组方法和组合物

[0260] 可以使用重组方法和组合物产生抗体,例如,如美国专利号4,816,567中所述。在一些实施方案中,提供了分离的核酸,所述核酸编码本文描述的抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1R抗体。这种核酸可以编码构成抗体VL的氨基酸序列和/或构成抗体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,提供了包含这种核酸的一种或多种载体(例如,表达载体)。在一些实施方案中,提供了包含这种核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞包含(例如,已经用以下载体转化):(1)包含核酸的载体,所述核酸编码构成抗体VL的氨基酸序列和构成抗体VH的氨基酸序列,或(2)包含核酸的第一载体,所述核酸编码构成抗体VL的氨基酸序列,和包含核酸的第二载体,所述核酸编码构成抗体VH的氨基酸序列。在一些实施方案中,宿主细胞是真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。在一些实施方案中,提供一种产生抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1R抗体的方法,其中所述方法包括在适于表达抗体的条件下培养如上文提供的包含编码抗体的核酸的宿主细胞,并且任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收该抗体。

[0261] 为了重组产生抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1R抗体,将编码抗体的核酸(例如,如上文所述)分离并插入一种或多种载体中用于宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规方法(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针),轻易地分离这种核酸并将其测序。

[0262] 克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中产生抗体,尤其当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于在细菌中表达抗体片段和多肽,见,例如,美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(还见Charlton,

Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编著,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,其描述在大肠杆菌中表达抗体片段)。在表达后,抗体可以从细菌细胞糊状物中以可溶性级分分离并且可以进一步纯化。

[0263] 除原核生物之外,真核微生物如丝状真菌或酵母是编码抗体的载体的合适克隆宿主或表达宿主,包括其糖基化途径已经“人源化”的真菌和酵母菌株,导致产生具有部分或完全人类糖基化模式的抗体。见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004),和Li等人,Nat.Biotech.24:210-215(2006)。

[0264] 表达糖基化抗体的合适宿主细胞还源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定了可以与昆虫细胞一起使用、尤其用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的众多杆状病毒毒株。

[0265] 也可以利用植物细胞培养物作为宿主。见,例如,美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0266] 也可以使用脊椎动物细胞作为宿主。例如,适应于悬浮培育的哺乳动物细胞系可以是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他例子是由SV40(COS-7)转化的猴肾CV1系;人胚肾系(如Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)中所述的293或293T细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(如在例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK;布法罗大鼠肝脏细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝脏细胞(Hep G2);小鼠乳腺癌细胞(MMT060562);TRI细胞,如在例如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述;MRC5细胞和FS4细胞。其他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));和骨髓瘤细胞系如Y0、NS0和Sp2/0。关于适于产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,见,例如,Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编著,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0267] 测定法

[0268] 可以通过本领域已知的多种测定法,鉴定、筛选本文提供的抗IL-34抗体,双特异性抗IL-34/CSF-1抗体和抗CSF-1R抗体或表征其物理/化学特性和/或生物活性。

[0269] 结合测定法和其他测定法

[0270] 在一个方面,例如,通过已知的方法如ELISA、蛋白质印迹法等,对本发明的抗体测试其抗原结合活性。

[0271] 在另一个方面,竞争测定法可以用来鉴定与例如本文所述的抗IL-34抗体竞争的抗IL-34抗体或双特异性抗IL-34/CSF-1抗体。例如,抗体与包含SEQ ID NO:5的VH序列和SEQ ID NO:6的VL序列的抗IL-34抗体竞争与IL-34结合。在一些实施方案中,这种竞争性抗体例如与包含SEQ ID NO:5的VH序列和SEQ ID NO:6的VL序列的抗IL-34抗体结合相同的表位(例如,线性或构象表位)。用于定位与抗体结合的表位的详细示例性方法在Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols(表位定位法)”,引自Methods in Molecular Biology第66卷(Humana Press,Totowa,NJ)中提供。

[0272] 在示例性竞争测定法中,将固定的IL-34在溶液中孵育,所述溶液包含与IL-34结

合的第一标记抗体(例如,包含SEQ ID NO:5的VH序列和SEQ ID NO:6的VL序列的抗IL-34抗体)和正在对其与第一抗体竞争结合至IL-34的能力测试的第二未标记抗体。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定的IL-34在包含第一标记抗体但是不包含第二未标记抗体的溶液中孵育。在允许第一抗体与IL-34结合的条件下孵育后,移除过多的未结合的抗体,并且测量与固定的IL-34结合的标记物的量。如果与固定的IL-34结合的标记物的量在测试样品中相对于对照样品实质降低,则表示第二抗体正在与第一抗体竞争结合至IL-34。见Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual第14章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0273] 在一个方面,提供了用于鉴定具有生物学活性的抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF1R抗体的测定法。生物活性可以例如包括抑制人外周血单核细胞(PBMC)增殖、抑制IL-34与CSF-1R结合或抑制CSF-1与CSF-1R结合。还提供在体内和/或在体外具有这类生物活性的抗体。

[0274] 在一些实施方案中,对本发明的抗体测试这种生物活性。例如,可以使用CellTiter-Glo的细胞增殖测定法测量抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1R抗体的中和活性。在添加到细胞如外周血单核细胞(PBMC)之前,将hIL-34或mIL-34与抗IL-34 mAb、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF1抗体的连续稀释物组合。在37℃处孵育平板72小时后,通过测量RLU获得抗体抑制活性。可以用Kaleida Graph计算半数最大抑制浓度(IC₅₀),其定义为当IL-34以激发70-80%增殖反应的浓度存在时,为了在细胞上产生IL-34活性的半数最大抑制所需要的抗体浓度。

[0275] 可以在ELISA测定法中在抗体(例如,抗IL-34抗体、双特异性IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1抗体)的连续稀释物存在下,使用固定的IL-34或CSF-1和可溶解性CSF-1测试本文提供的抗体对IL-34或CSF-1与CSF-1R结合的抑制作用。

[0276] 用于诊断和检测的方法和组合物

[0277] 在一些实施方案中,本文提供的任一种抗IL-34抗体和抗CSF-1R可用于检测生物样品中IL-34或CSF-1R的存在。如本文所用,术语“检测”涵盖定量性或定性检测。在一些实施方案中,生物样品包含细胞或组织。

[0278] 在一些实施方案中,提供了在诊断或检测方法中使用的抗IL-34抗体。在又一个方面,提供一种检测IL-34在生物样品中存在的方法。在一些实施方案中,该方法包括:使生物样品与如本文所述的抗IL-34抗体在允许抗IL-34抗体与IL-34结合的条件下接触,并且检测抗IL-34抗体和IL-34之间是否形成复合物。这种方法可以是体外或体内方法。在一些实施方案中,抗IL-34抗体用来选择适于采用抗IL-34抗体治疗的受试者,例如,其中IL-34是选择患者的生物标记。

[0279] 在一些实施方案中,提供了在诊断或检测方法中使用的抗CSF-1R抗体。在又一个方面,提供一种检测CSF-1R在生物样品中存在的方法。在一些实施方案中,该方法包括:使生物样品与如本文所述的抗CSF-1R抗体在允许抗CSF-1R抗体与CSF-1R结合的条件下接触,并且检测抗CSF-1R抗体和CSF-1R之间是否形成复合物。这种方法可以是体外或体内方法。在一些实施方案中,抗CSF-1R抗体用来选择适于采用抗CSF-1R抗体治疗的受试者,例如,其中CSF-1R是选择患者的生物标记。

[0280] 可以使用本发明抗体诊断的示例性病症包括髓样致病性免疫病如类风湿性关节炎

炎、炎性肠病或多发性硬化。

[0281] 在一些实施方案中,提供标记的抗IL-34抗体和抗CSF-1R抗体。标记物包括但不限于,标记物或直接检测到(如荧光、有色、电子致密、化学发光和放射性标记物)的部分,以及间接检测到(例如借助酶促反应或分子相互作用)的部分,如酶或配体。示例性标记物包括但不限于放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I、荧光团如稀土元素螯合物或荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹磺酰、伞形酮、荧光素酶,例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利号4,737,456)、荧光素、2,3-二氢二氮杂萘二酮(2,3-dihydrophthalazinediones)、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶,例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,其与利用过氧化氢来氧化染料前体的酶如HRP、乳过氧化物酶或微过氧化物酶偶联、生物素/抗生物素蛋白、自旋标记物、噬菌体标记物、稳定自由基等。

[0282] 髓样和纤维样亚型的生物标记

[0283] 在一个实施方案中,用CSF1-R途径抑制剂待治疗的RA患者是与RA的髓样或纤维样亚型(F1和/或F2)对应的那些患者。在某些实施方案中,M亚型治疗靶选自W02011/028945的表6中列出的基因之一或其组合。在某些实施方案中,M亚型治疗靶选自W02011/028945的表2中列出的基因之一或其组合。在某些实施方案中,M亚型治疗靶选自W02011/028945的表11中列出的基因之一或其组合。在某些实施方案中,M亚型治疗靶选自W02011/028945的表6中列出的基因之一或其组合所编码的蛋白质之一或其组合。在某些实施方案中,M亚型治疗靶选自W02011/028945的表2中列出的基因之一或其组合所编码的蛋白质之一或其组合。在某些实施方案中,M亚型治疗靶选自W02011/028945的表11中列出的基因之一或其组合所编码的蛋白质之一或其组合。在某些实施方案中,RA的M亚型的治疗靶选自以下一个或多个:CLEC5A、CLEC7A、ALCAM、IL1RAP、IRAK1、NRP2、TREM1和VEGF。

[0284] 在另一个方面,诊断RA的某种亚型(本文作为M亚型)的方法包括测量W02011/028945的表6中列出的基因之一或其组合的基因表达,或测量由W02011/028945的表6中列出的基因之一或其组合表达的蛋白质的量。在某些实施方案中,在W02011/028945的表6中鉴定的一个或多个基因或由所述基因编码的蛋白质是M亚型的生物标记。在某些实施方案中,诊断M亚型RA的方法包括测量W02011/028945的表2中列出的基因之一或其组合的基因表达,或测量由W02011/028945的表2中列出的基因之一或其组合表达的蛋白质。在某些实施方案中,在W02011/028945的表2中鉴定的一个或多个基因或由所述基因编码的蛋白质是M亚型的生物标记。在某些实施方案中,诊断M亚型RA的方法包括测量W02011/028945的表11中列出的基因之一或其组合的基因表达,或测量由W02011/028945的表11中列出的基因之一或其组合表达的蛋白质。在某些实施方案中,在W02011/028945的表11中鉴定的一个或多个基因或由所述基因编码的蛋白质是M亚型的生物标记。在某些实施方案中,诊断M亚型RA的方法包括测量以下一者或多者的基因表达或蛋白质表达:ADAM8、CTSB、CXCL3、ICAM1、IL18BP、IL1B、IL8、MMP12、CCL2、VEGFA和S100A11。

[0285] 在某些实施方案中,F2亚型治疗靶选自W02011/028945的表7中列出的基因之一或其组合。在某些实施方案中,F2亚型治疗靶选自W02011/028945的表3中列出的基因之一或其组合。在某些实施方案中,F2亚型治疗靶选自W02011/028945的表12中列出的基因之一或

其组合。在某些实施方案中，F2亚型治疗靶选自W02011/028945的表7中列出的基因之一或其组合所编码的蛋白质之一或其组合。在某些实施方案中，F2亚型治疗靶选自W02011/028945的表3中列出的基因之一或其组合所编码的蛋白质之一或其组合。在某些实施方案中，F2亚型治疗靶选自W02011/028945的表12中列出的基因之一或其组合所编码的蛋白质之一或其组合。在某些实施方案中，RA的F2亚型的治疗靶选自以下一个或多个：IL17D、IL17RC、TIMP3和TNFRSF11B。

[0286] 在另一个方面，诊断RA的某种亚型（本文作为F2亚型）的方法包括测量W02011/028945的表7中列出的基因之一或其组合的基因表达，或测量由W02011/028945的表7中列出的基因之一或其组合表达的蛋白质。在某些实施方案中，在W02011/028945的表7中鉴定的一个或多个基因或由所述基因编码的蛋白质是F2亚型的生物标记。在某些实施方案中，诊断F2亚型RA的方法包括测量W02011/028945的表3中列出的基因之一或其组合的基因表达，或测量由表3中列出的基因之一或其组合表达的蛋白质。在某些实施方案中，在W02011/028945的表3中鉴定的一个或多个基因或由所述基因编码的蛋白质是F2亚型的生物标记。在某些实施方案中，诊断F2亚型RA的方法包括测量W02011/028945的表12中列出的基因之一或其组合的基因表达，或测量由W02011/028945的表12中列出的基因之一或其组合表达的蛋白质。在某些实施方案中，在W02011/028945的表12中鉴定的一个或多个基因或由所述基因编码的蛋白质是F2亚型的生物标记。在某些实施方案中，诊断F2亚型RA的方法包括测量以下一者或多者的基因表达或蛋白质表达：FGF10、FGF18、FGF2、LRP6、TGFbeta2、WNT11、BMP6、BTC、CLU、CRLF1、TIMP3、FZD10、FZD7、FZD8和IL17D。

[0287] 在某些实施方案中，F1亚型治疗靶选自W02011/028945的表8中列出的基因之一或其组合。在某些实施方案中，F1亚型治疗靶选自W02011/028945的表4中列出的基因之一或其组合。在某些实施方案中，F1亚型治疗靶选自W02011/028945的表13中列出的基因之一或其组合。在某些实施方案中，F1亚型治疗靶选自W02011/028945的表8中列出的基因之一或其组合所编码的蛋白质之一或其组合。在某些实施方案中，F1亚型治疗靶选自W02011/028945的表4中列出的基因之一或其组合所编码的蛋白质之一或其组合。在某些实施方案中，F1亚型治疗靶选自W02011/028945的表13中列出的基因之一或其组合所编码的蛋白质之一或其组合。在某些实施方案中，RA的F1亚型的治疗靶选自以下一个或多个：CDH11、ITGA11和CLEC11A。

[0288] 在另一个方面，诊断RA的某种亚型（本文作为F1亚型）的方法包括测量W02011/028945的表8中列出的基因之一或其组合的基因表达，或测量由W02011/028945的表8中列出的基因之一或其组合表达的蛋白质。在某些实施方案中，在W02011/028945的表8中鉴定的一个或多个基因或由所述基因编码的蛋白质是F1亚型的生物标记。在某些实施方案中，诊断F1亚型RA的方法包括测量W02011/028945的表4中列出的基因之一或其组合的基因表达，或测量由W02011/028945的表4中列出的基因之一或其组合表达的蛋白质。在某些实施方案中，在W02011/028945的表4中鉴定的一个或多个基因或由所述基因编码的蛋白质是F1亚型的生物标记。在某些实施方案中，诊断F1亚型RA的方法包括测量W02011/028945的表13中列出的基因之一或其组合的基因表达，或测量由W02011/028945的表13中列出的基因之一或其组合表达的蛋白质。在某些实施方案中，在表13中鉴定的一个或多个基因或由所述基因编码的蛋白质是F1亚型的生物标记。在某些实施方案中，诊断F1亚型RA的方法包括测

量以下一者或多者的基因表达或蛋白质表达:ITGA11、MMP11、MMP13、MMP16、MMP28、ADAM12、ADAM22、CTSK、CTHRC1、ENPEP、POSTN、ANGPT2、SFRP2、TIE1和VWF。

[0289] 药物制剂

[0290] 通过以下方式制备冻干制剂或水溶液剂形式的如本文所述的抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1R抗体的药物制剂:将具有所需纯度的这种双特异性抗体与一种或多种任选的可药用载体混合(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编著(1980))。可药用载体总体上在所用的剂量和浓度对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂(包括抗坏血酸和甲硫氨酸);防腐剂(如十八烷基苄基二甲基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基尼泊金酯如尼泊金甲酯或丙酯;儿茶酚;雷琐辛;环己醇;3-戊醇和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水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、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露糖、海藻糖或山梨糖;形成盐的反离子如钠;金属复合物(例如,Zn-蛋白质复合物)和/或非离子表面活性剂如聚乙二醇(PEG)。本文中的示例性可药用载体还包括间质(interstitial)药物分散剂如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如,人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,如rHuPH20(**HYLENEX®**, Baxter International, Inc.)。在美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中描述了某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20。在一个方面,sHASEGP与一种或多种额外的糖胺聚糖如软骨素酶组合。示例性冻干抗体制剂在美国专利号6,267,958中描述。水质抗体制剂包括在美国专利号6,171,586和W02006/044908中描述的那些制剂,后一类制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

[0291] 本文中的制剂也可以根据正在治疗的特定适应症需要而含有多于一种有效成分,优选地是具有互补活性且并未相互不利影响的那些有效成分。例如,可能想要进一步提供抗CSF-1抗体。这种有效成分以有效用于预期目的的量适当地存在于组合中。

[0292] 有效成分可以包埋于例如分别通过凝聚技术或界面聚合制备的微胶囊(例如,羟甲基纤维素微胶囊或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶态药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)或乳浊液中。此类技术在Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编著(1980)中公开。

[0293] 可以制备持续释放制品。持续释放制品的合适例子包括含有抗体的固态疏水性聚合物半通透性基质,所述基质处于成型制品(例如,薄膜或微胶囊)形式。待用于体内施用的制剂通常是无菌的。可以例如通过借助无菌滤膜过滤轻易地实现无菌性。

[0294] 治疗方法和组合物

[0295] 本文提供的任何抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1R抗体可以用于治疗性方法中。

[0296] 在一个方面,提供用作药物的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体。在其他方面,提供用于治疗髓样致病性免疫病的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体。在一些实施方案中,髓样致病性免疫病是类风湿性关节炎、炎性肠病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、哮喘、骨质疏松症、Paget病、动脉粥样硬化、代谢综合征、II型糖尿病、LSDs(溶酶体贮积病,如但不限于胱氨酸贮积症、唾液酸贮积病、戈谢病)、组织细胞增多症,包括但不限于Rosai-Dorfman

病、Faisalabad组织细胞增多症、H综合征、色素沉着性多毛症伴胰岛素依赖性糖尿病 (PHID)。在一些实施方案中,提供用于治疗方法中的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体。在一些实施方案中,本发明提供在治疗患有髓样致病性免疫病(例如,类风湿性关节炎,炎性肠病或多发性硬化)的个体方法中使用的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体,所述方法包括向个体施用有效量的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体。在一些实施方案中,该方法还包括向该个体施用有效量的例如下文描述的至少一种额外治疗药。在一些实施方案中,本发明提供用于抑制IL-34与CSF-1R结合的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体。在一些实施方案中,本发明提供了在抑制个体中IL-34与CSF-1R结合的方法中使用的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体,所述方法包括向个体施用有效量的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体以抑制IL-34与CSF-1R的结合。在一些实施方案中,本发明提供用于中和IL-34活性的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体。在一些实施方案中,本发明提供了在中和个体内IL-34活性的方法中使用的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体,所述方法包括向个体施用有效量的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体以中和IL-34活性。根据以上任一个实施方案的“个体”优选地是人。

[0297] 在又一个方面,本发明提供抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体在制造或制备药物中的用途。在一些实施方案中,该药物用于治疗髓样致病性免疫病。在一些实施方案中,髓样致病性免疫病是类风湿性关节炎、炎性肠病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、哮喘、骨质疏松症、Paget病、动脉粥样硬化、代谢综合征、II型糖尿病、LSDs(溶酶体贮积病,如但不限于胱氨酸贮积症、唾液酸贮积病、戈谢病)、组织细胞增多症,包括但不限于Rosai-Dorfman病、Faisalabad组织细胞增多症、H综合征、色素沉着性多毛症伴胰岛素依赖性糖尿病 (PHID)。在一些实施方案中,该药物用于治疗髓样致病性免疫病(例如,类风湿性关节炎、炎性肠病或多发性硬化)的方法中,所述方法包括向患有髓样致病性免疫病(例如,类风湿性关节炎、炎性肠病或多发性硬化)的个体施用有效量的该药物。在一些实施方案中,该方法还包括向该个体施用有效量的例如下文描述的至少一种额外治疗药。在一些实施方案中,该药物用于抑制个体中IL-34与CSF-1R的结合。在一些实施方案中,该药物用于抑制个体中IL-34与CSF-1R结合的方法中,所述方法包括向个体施用有效量的该药物以抑制个体中IL-34与CSF-1R的结合。在一些实施方案中,该药物用于中和个体内IL-34的活性。在一些实施方案中,该药物用于中和个体内IL-34活性的方法中,所述方法包括向个体施用有效量的该药物以中和个体中IL-34的活性。根据以上实施方案中任一个的“个体”可以是人。

[0298] 在又一个方面,本发明提供一种用于治疗髓样致病性免疫病的方法。在一些实施方案中,髓样致病性免疫病是类风湿性关节炎、炎性肠病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、哮喘、骨质疏松症、Paget病、动脉粥样硬化、代谢综合征、II型糖尿病、LSDs(溶酶体贮积病,如但不限于胱氨酸贮积症、唾液酸贮积病、戈谢病)、组织细胞增多症,包括但不限于Rosai-Dorfman病、Faisalabad组织细胞增多症、H综合征、色素沉着性多毛症伴胰岛素依赖性糖尿病 (PHID)。在一些实施方案中,该方法包括向患有髓样致病性免疫病(例如,类风湿性关节炎、炎性肠病或多发性硬化)的个体施用有效量的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体。在一些实施方案中,该方法还包括向该个体施用有效量的至少一种额外的治疗药,如下文描述。根据以上实施方案中任一个的“个体”可以是人。

[0299] 在又一个方面,本发明提供一种用于抑制个体中IL-34与CSF-1R结合的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用有效量的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体以抑制个体

中IL-34与CSF-1R结合。在又一个方面,本发明提供一种用于中和个体内IL-34活性的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用有效量的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体以中和个体内IL-34的活性。在一些实施方案中,“个体”是人。

[0300] 在一个方面,提供了作为药物使用的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体。在其他方面,提供用于治疗髓样致病性免疫病的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体。在一些实施方案中,髓样致病性免疫病是类风湿性关节炎、炎性肠病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、哮喘、骨质疏松症、Paget病、动脉粥样硬化、代谢综合征、II型糖尿病、LSDs(溶酶体贮积病,如但不限于胱氨酸贮积症、唾液酸贮积病、戈谢病)、组织细胞增多症,包括但不限于Rosai-Dorfman病、Faisalabad组织细胞增多症、H综合征、色素沉着性多毛症伴胰岛素依赖性糖尿病(PHID)。在一些实施方案中,提供了用于治疗方法中的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体。在一些实施方案中,本发明提供在治疗患有髓样致病性免疫病(例如,类风湿性关节炎,炎性肠病或多发性硬化)的个体的方法中使用双特异性抗IL-34/CSF-1抗体,所述方法包括向个体施用有效量的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体。在一些实施方案中,本发明提供用于抑制IL-34与CSF-1R结合和CSF-1与CSF-1R结合的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体。在一些实施方案中,本发明提供了在抑制个体中IL-34与CSF-1R结合和CSF-1与CSF-1R结合的方法中使用的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体,所述方法包括向个体施用有效量的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体以抑制IL-34与CSF-1R的结合和CSF-1与CSF-1R的结合。在一些实施方案中,本发明提供用于中和IL-34和/或CSF-1的活性的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体。在一些实施方案中,本发明提供了在中和个体内IL-34和/或CSF-1的活性的方法中使用的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体,所述方法包括向个体施用有效量的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体以中和IL-34和/或CSF-1的活性。根据以上任一实施方案的“个体”优选地是人。

[0301] 在又一个方面,本发明提供双特异性抗IL-34/CSF-1抗体在制造或制备药物中的用途。在一些实施方案中,该药物用于治疗髓样致病性免疫病。在一些实施方案中,髓样致病性免疫病是类风湿性关节炎、炎性肠病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、哮喘、骨质疏松症、Paget病、动脉粥样硬化、代谢综合征、II型糖尿病、LSDs(溶酶体贮积病,如但不限于胱氨酸贮积症、唾液酸贮积病、戈谢病)、组织细胞增多症,包括但不限于Rosai-Dorfman病、Faisalabad组织细胞增多症、H综合征、色素沉着性多毛症伴胰岛素依赖性糖尿病(PHID)。在一些实施方案中,该药物用于治疗髓样致病性免疫病(例如,类风湿性关节炎、炎性肠病或多发性硬化)的方法中,所述方法包括向患有髓样致病性免疫病(例如,类风湿性关节炎、炎性肠病或多发性硬化)的个体施用有效量的该药物。在一些实施方案中,该药物用于抑制个体中IL-34与CSF-1R结合和CSF-1与CSF-1R结合。在一些实施方案中,该药物用于抑制个体中IL-34与CSF-1R结合和CSF-1与CSF-1R结合的方法中,所述方法包括向个体施用有效量的该药物以抑制个体中IL-34与CSF-1R的结合和CSF-1与CSF-1R的结合。在一些实施方案中,该药物用于中和个体内IL-34和/或CSF-1的活性。在一些实施方案中,该药物用于中和个体内IL-34和/或CSF-1活性的方法中,所述方法包括向个体施用有效量的该药物以抑制个体中IL-34和/或CSF-1的活性。根据以上实施方案中任一个的“个体”可以是人。

[0302] 在又一个方面,本发明提供一种用于治疗髓样致病性免疫病的方法。在一些实施方案中,髓样致病性免疫病是类风湿性关节炎、炎性肠病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、哮喘、骨质疏松症、Paget病、动脉粥样硬化、代谢综合征、II型糖尿病、LSDs(溶酶体

贮积病,如但不限于胱氨酸贮积症、唾液酸贮积病、戈谢病)、组织细胞增多症,包括但不限于Rosai-Dorfman病、Faisalabad组织细胞增多症、H综合征、色素沉着性多毛症伴胰岛素依赖性糖尿病(PHID)。在一些实施方案中,该方法包括向患有髓样致病性免疫病(例如,类风湿性关节炎、炎性肠病或多发性硬化)的个体施用有效量的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体。根据以上实施方案中任一个的“个体”可以是人。

[0303] 在又一个方面,本发明提供一种用于抑制个体中IL-34与CSF-1结合和CSF-1与CSF-1R结合的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用有效量的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体以抑制个体中IL-34与CSF-1R结合和CSF-1与CSF-1R结合。在又一个方面,本发明提供一种用于中和个体内IL-34和/或CSF-1的活性的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用有效量的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体以中和个体内IL-34和/或CSF-1的活性。在一些实施方案中,“个体”是人。

[0304] 在又一个方面,本发明提供了包含本文提供的任何抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1R抗体的药物制剂,例如,用于前述任一个治疗方法中。在一些实施方案中,药物制剂包含本文提供的任何抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1R抗体和可药用载体。在另一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任何抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1R抗体和例如下文描述的至少一种额外治疗药。

[0305] 本发明的抗体可以在疗法中单独或与其他药物组合使用。例如,本发明的抗体可以与至少一种额外治疗药共施用。在一些实施方案中,额外的治疗药是抗CSF-1抗体。

[0306] 上文所示的这类联合疗法涵盖联合施用(其中在相同或独立的制剂中包含两种或更多种治疗药),和独立施用,在这种情况下,本发明抗体的施用可以在施用额外的治疗药和/或辅助剂之前、同时和/或之后进行。

[0307] 在其他方面,提供用于治疗髓样致病性免疫病的抗IL-34抗体和抗CSF-1抗体。在一些实施方案中,髓样致病性免疫病是类风湿性关节炎、炎性肠病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、哮喘、骨质疏松症、Paget病、动脉粥样硬化、代谢综合征、II型糖尿病、LSDs(溶酶体贮积病,如但不限于胱氨酸贮积症、唾液酸贮积病、戈谢病)、组织细胞增多症,包括但不限于Rosai-Dorfman病、Faisalabad组织细胞增多症、H综合征、色素沉着性多毛症伴胰岛素依赖性糖尿病(PHID)。在一些实施方案中,提供用于治疗方法中的抗IL-34抗体和抗CSF-1抗体。在一些实施方案中,本发明提供在治疗患有髓样致病性免疫病(例如,类风湿性关节炎、炎性肠病或多发性硬化)的个体方法中使用的抗IL-34抗体和抗CSF-1R抗体,所述方法包括向个体施用有效量的与抗CSF-1抗体联合的抗IL-34抗体。在一些实施方案中,本发明提供用于抑制IL-34与CSF-1R结合和CSF-1与CSF-1R结合的抗IL-34抗体和抗CSF-1抗体。在一些实施方案中,本发明提供了在抑制个体中IL-34与CSF-1R结合和CSF-1与CSF-1R结合的方法中使用的抗IL-34抗体和抗CSF-1抗体,所述方法包括向个体施用有效量的与抗CSF-1抗体联合的抗IL-34抗体以抑制IL-34与CSF-1R的结合和CSF-1与CSF-1R的结合。在一些实施方案中,本发明提供用于中和IL-34和/或CSF-1活性的抗IL-34抗体和抗CSF-1抗体。在一些实施方案中,本发明提供了在中和个体内IL-34和/或CSF-1活性的方法中使用的抗IL-34抗体和抗CSF-1抗体,所述方法包括向个体施用有效量的与CSF-1抗体联合的抗IL-34抗体以中和IL-34和/或CSF-1的活性。根据以上任一个实施方案的“个体”优选地是人。

[0308] 在又一个方面,本发明提供一种用于治疗髓样致病性免疫病的方法。在一些实施

方案中,髓样致病性免疫病是类风湿性关节炎、炎性肠病、多发性硬化、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、哮喘、骨质疏松症、Paget病、动脉粥样硬化、代谢综合征、II型糖尿病、LSDs(溶酶体贮积病,如但不限于胱氨酸贮积症、唾液酸贮积病、戈谢病)、组织细胞增多症,包括但不限于Rosai-Dorfman病、Faisalabad组织细胞增多症、H综合征、色素沉着性多毛症伴胰岛素依赖性糖尿病(PHID)。在一些实施方案中,该方法包括向患有髓样致病性免疫病(例如,类风湿性关节炎、炎性肠病或多发性硬化)的个体施用有效量的与抗CSF-1抗体联合的抗IL-34抗体。根据以上实施方案中任一个的“个体”可以是人。

[0309] 在又一个方面,本发明提供一种用于抑制个体中IL-34与CSF-1R结合和CSF-1与CSF-1R结合的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用有效量的与抗CSF-1抗体联合的抗IL-34抗体以抑制个体中IL-34与CSF-1R的结合和CSF-1与CSF-1R的结合。在一些实施方案中,“个体”是人。

[0310] 在又一个方面,本发明提供一种用于中和个体内IL-34和/或CSF-1的活性的方法。在一些实施方案中,该方法包括向个体施用有效量的与抗CSF-1抗体联合的抗IL-34抗体以中和个体内IL-34和/或CSF-1的活性。在一些实施方案中,“个体”是人。

[0311] 本文所述的抗IL-34抗体、抗CSF-1R抗体和双特异性抗IL-34/CSF-1抗体可以用于靶向肿瘤的髓样间质。在一些实施方案中,该抗体用于治疗癌症(如结肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌和子宫癌等)。在一些实施方案中,将该抗体与另一个抗癌疗法联合施用至个体以治疗个体中的癌症。在一些实施方案中,抗癌疗法用**赫赛汀®、Avastin®**或特罗凯**(Tarceva)®**治疗。

[0312] 本文所述的抗IL-34抗体、抗CSF-1R抗体和双特异性抗IL-34/CSF-1抗体还可以用于治疗溶酶体贮积病(LSD)和自身免疫性疾病,包括但不限于类风湿性关节炎、炎性肠病(IBD,例如,局限性回肠炎、溃疡性结肠炎)、多发性硬化、血管疾病,包括但不限于动脉粥样硬化、心肌梗死和咽喉炎、骨质疏松症、阿尔茨海默病、糖尿病(1型和/或2型)、传染病和癌症。

[0313] 溶酶体贮积病(LSD)是因溶酶体功能缺陷产生的一种代谢紊乱。当身体内细胞的特定细胞器-溶酶体-功能异常时,导致溶酶体贮积病。LSD的例子包括但不限于,由欠缺或缺陷的蛋白质(如欠缺/缺陷性溶酶体水解酶)引起的疾病(例如,神经鞘脂贮积症如神经节苷脂积累病、戈谢病和各种Niemann-Pick病)、翻译后修饰的硫酸酯酶(例如,多发性硫酸酯酶缺乏症)、欠缺/缺陷性膜转运蛋白如核苷酸/核苷转运蛋白或N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶(例如,粘脂质积累病II型和IIIa型)、欠缺/缺陷性酶保护蛋白质如组织蛋白酶A(例如,GM2-AP缺乏症、变体AB、Niemann-Pick病C2型、SAP缺乏症)、欠缺/缺陷性跨膜蛋白如M-CSFR、ENT3、NPC1和唾液酸转运蛋白(sialin)(例如,Niemann-Pick病C1型、Salla病)。LSD的分类包括脂质贮积病(例如,神经鞘脂贮积症),神经节苷脂积累病(例如,Tay-Sachs病),脑白质营养不良症、粘多糖病(包括Hunter综合征和Hurler病)、糖蛋白贮积病(例如,Pompe病)和粘脂贮积症。

[0314] 更常见的LSD以如下著称:激活物缺乏症/GM2神经节苷脂积累病、 α -甘露糖苷贮积症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、胆固醇酯贮积病、慢性氨基己糖苷酶A缺乏症、胱氨酸病、Danon病、法布里病、法伯病、岩藻糖沉积症、半乳糖唾液酸苷贮积症、戈谢病(I型、II型、III型)、

GM1神经节苷脂积累病(婴儿、婴儿/幼年晚期、成人/慢性)、I-细胞病/粘脂质积累病II、婴儿游离唾液酸贮积病/ISSD、幼年氨基己糖苷酶A缺乏症、Krabbe病(婴儿发作、晚期发作)、异染性脑白质营养不良、粘多糖病病症(例如,假性胡尔勒多种营养不良/粘脂质积累病IIa、MPSI胡尔勒综合征、MPSI Scheie综合征、MPS I胡尔勒-Scheie综合征、MPS II Hunter综合征、Sanfilippo综合征A型/MPS III A型、Sanfilippo综合征B型/MPS III B型、Sanfilippo综合征C型/MPS III C型、Sanfilippo综合征D型/MPS III D型、Morquio A型/MPS IVA型、Morquio B型/MPS IVB型、MPS IX透明质酸酶缺乏症、MPS VI Maroteaux-Lamy、MPS VII Sly综合征、粘脂质积累病I/唾液酸沉积症、粘脂质积累病IIIC、粘脂质积累病IV型)、多个硫酸酯酶缺乏症、Niemann-Pick病(A型、B型、C型)、神经元蜡样质脂褐质沉积病(例如,CLN6病-非典型晚期婴儿、晚期发作变体、幼年早期、Batten-Spielmeyer-Vogt/幼年NCL/CLN3病、Finnish变异晚期婴儿CLN5、Jansky-Bielschowsky病/晚期婴儿CLN2/TPP1病、Kufs/成人发作型NCL/CLN4病、北方癫痫/变异晚期婴儿CLN8、Santavuori-Haltia/婴儿CLN1/PPT病、 β -甘露糖苷贮积症)、Pompe病/糖原贮积病II型、致密成骨不全症、Sandhoff病/成人发作型/GM2神经节苷脂积累病。婴儿Sandhoff病/GM2神经节苷脂积累病、幼年Sandhoff病/GM2神经节苷脂积累病、Schindler病、Salla病/唾液酸贮积病、Tay-Sachs/GM2神经节苷脂积累病和Wolman病。

[0315] 本文中所述的“自身免疫病”是源自并且针对个体自身组织的疾病或病症或者共分离的疾病或病症或其表现或从其中所致的病状。自身免疫疾病或病症的例子包括但不限于关节炎(类风湿性关节炎如急性关节炎、慢性类风湿性关节炎、痛风性关节炎、急性痛风性关节炎、慢性炎性关节炎、退行性关节炎、感染性关节炎、莱姆病关节炎、增生性关节炎、银屑病关节炎、椎骨关节炎和幼年发作型类风湿性关节炎、骨关节炎、慢性进行性关节炎、变形性关节炎、慢性原发多发性关节炎、反应性关节炎和强直性脊柱炎)、炎性过度增生性皮肤病、银屑病如斑块状银屑病、滴状银屑病(guttate psoriasis)、脓疱性银屑病和趾甲银屑病、皮炎,包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、过敏性皮炎、变应性接触性皮炎、疱疹样皮炎和异位性皮炎、X连锁的IgM过多综合征、荨麻疹如慢性变应性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹,包括慢性自身免疫疾病荨麻疹、多发性肌炎/皮肌炎、幼年型皮肌炎、中毒性表皮坏死松解症、硬皮病(包括全身性硬皮病)、硬化如全身性硬化症、多发性硬化(MS)如脊髓-视神经MS、原发性进行性MS(PPMS)和复发缓解性MS(RRMS)、进行性全身性硬化症、动脉粥样硬化、动脉硬化、散播性硬化和共济失调性硬化、炎性肠病(IBD)(例如,局限性回肠炎、自身免疫介导的胃肠病、结肠炎如溃疡性结肠炎、溃疡性结肠炎(colitis ulcerosa)、显微镜下结肠炎、胶原性结肠炎、息肉状结肠炎、坏死性小肠结肠炎和透壁性结肠炎以及自身免疫炎性肠病)、坏疽性脓皮病、结节性红斑、原发性硬化胆管炎、巩膜外层炎)、呼吸窘迫综合症,包括成人或急性呼吸窘迫综合症(ARDS)、脑膜炎、全部或部分葡萄膜炎、虹膜炎、脉络膜炎、自身免疫血液学疾病、类风湿性脊椎炎、突发性听力损失、IgE介导的疾病如过敏反应和过敏性鼻炎和特应性鼻炎、脑炎如Rasmussen脑炎和边缘叶和/或脑干脑炎、葡萄膜炎如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎、后葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎、伴发和不伴发肾病综合症的肾小球肾炎(GN),如慢性或急性肾小球肾炎如原发性GN、免疫介导的GN、膜性GN(膜性肾病)、特发性膜性GN或特发性膜性肾病、膜性(membrano)或膜性增生性GN(MPGN)(包括I型和II型)和快速进展性GN、过

敏性疾病、变态反应、湿疹,包括变应性或特发性湿疹、哮喘,如支气管哮喘、支气管哮喘和自身免疫性哮喘、涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的病状、慢性肺部炎症性疾病、自身免疫性心肌炎、白细胞黏附作用缺损、系统性红斑狼疮(SLE)或系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematoses)如皮肤SLE、亚急性皮肤型红斑狼疮、新生儿狼疮综合征(NLE)、播散性红斑狼疮、狼疮(包括肾炎、脑炎、儿科、非肾、肾外、盘状、秃顶性狼疮)、幼年发作型(I型)糖尿病,包括儿科胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)、成人发作型糖尿病(II型糖尿病)、自身免疫性糖尿病、特发性尿崩症、与细胞因子及T-淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫反应、结核病、结节病、肉芽肿,包括淋巴瘤样肉芽肿、韦格纳肉芽肿、粒细胞缺乏症、血管炎类,包括血管炎(包括大血管炎(包括风湿性多肌痛和巨细胞动脉炎或高安动脉炎)、中等血管炎(包括川崎病和结节性多动脉炎)、显微镜下多动脉炎、CNS血管炎、坏死性、皮肤型或超敏性血管炎、全身性坏死性血管炎和ANCA相关性血管炎,如Churg-Strauss血管炎或综合征(CSS)、颞动脉炎、再生障碍性贫血、自身免疫再生障碍性贫血、Coombs阳性贫血、Diamond-Blackfan贫血、溶血性贫血或免疫溶血性贫血,包括自身免疫溶血性贫血(AIHA)、恶性贫血(anemia perniciousa)、Addison病、纯红细胞贫血或纯红细胞再生障碍性贫血(PRCA)、因子VIII缺乏症、血友病A、自身免疫中性粒细胞减少症、全血细胞减少症、白细胞减少症、涉及白细胞渗出的疾病、CNS炎症性疾病、多器官损伤综合征,如继发于败血症、创伤或出血的那些多器官损伤综合征、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜病、抗磷脂抗体综合征、变应性神经炎、Behcet病或Behcet病、Castleman综合征、Goodpasture综合征、Reynaud综合征、Sjogren综合征、Stevens-Johnson综合征、类天疱疮,如大疱性类天疱疮和皮肤类天疱疮、天疱疮(包括寻常性天疱疮、落叶型天疱疮、天疱疮粘膜类天疱疮(pemphigus mucos-membrane pemphigoid)和红斑性天疱疮)、自身免疫多内分泌病、莱特尔病或综合征、免疫复合物肾炎、抗体介导的肾炎、视神经脊髓炎、多发性神经病、慢性神经病如IgM多发性神经病或IgM介导的神经病、血小板减少症(如由心肌梗死患者形成),包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP)和自身免疫性或免疫介导的血小板减少症,如特发性血小板减少性紫癜(ITP)(包括慢性或急性ITP)、睾丸和卵巢的自身免疫病,包括自身免疫睾丸炎和卵巢炎、原发性甲状腺功能减退症、甲状旁腺功能减退症、自身免疫性内分泌疾病(包括甲状腺炎如自身免疫性甲状腺炎、桥本病、慢性甲状腺炎(桥本甲状腺炎)或亚急性甲状腺炎、自身免疫甲状腺病、特发性甲状腺功能减退症、Grave病、多内分泌腺综合征,如自身免疫多内分泌腺综合征(或多内分泌腺内分泌病综合征)、副肿瘤综合征,包括神经系统副肿瘤综合征如Lambert-Eaton肌无力综合征或Eaton-Lambert综合征、僵人或僵者综合征、脑脊髓炎如变应性脑脊髓炎或过敏性脑脊髓炎和实验性变应性脑脊髓炎(EAE)、重症肌无力如胸腺肿瘤相关性重症肌无力、小脑变性、神经性肌强直、视性眼阵挛或视性眼阵挛肌阵挛综合征(OMS)和感觉神经病、多灶性运动神经病、Sheehan综合征、自身免疫性肝炎、慢性肝炎、类狼疮性肝炎、巨细胞肝炎、慢性活动性肝炎或自身免疫慢性活动性肝炎、淋巴细胞间质性肺炎、闭塞性细支气管炎(非移植物)与NSIP、Guillain-Barré综合征、Berger病(IgA肾病)、特发性IgA肾病、线状IgA皮肤病(linear IgA dermatosis)、原发性胆汁性肝硬化、肺硬变、自身免疫性肠病综合征、小肠吸收不良(Celiac disease)、脂泻病(Coeliac disease)、乳糜泻(麸质性肠病)、难治性口炎性腹泻、特发性口炎性腹泻、冷球蛋白血症、肌萎缩侧索硬化(ALS;Lou Gehrig病)、冠状动脉病、自身免疫性耳病如自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫听力损失、

视性眼阵挛肌阵挛综合征 (OMS)、多软骨炎如难治性或复发性多软骨炎、肺泡蛋白沉积症、淀粉样变性、巩膜炎、非癌性淋巴细胞增多、原发性淋巴细胞增多,其包括单克隆B细胞淋巴细胞增多(例如,良性单克隆免疫球蛋白病和意义不确定性单克隆免疫球蛋白病, MGUS)、外周神经病、副肿瘤性综合征、离子通道病,如癫痫、偏头痛、心律失常、肌肉病 (muscular disorder)、耳聋、失明、周期性麻痹和CNS离子通道病、孤独症、炎性肌病、局灶节段性肾小球硬化 (FSGS)、内分泌眼病、葡萄膜视网膜炎、脉络膜视网膜炎、自身免疫性肝病、纤维肌痛、多发性内分泌衰竭、Schmidt综合征、肾上腺炎、胃萎缩、早老性痴呆、脱髓鞘病,如自身免疫性脱髓鞘病、糖尿病性神经病、Dressler综合征、斑秃、CREST综合征 (钙质沉着症、雷诺现象、食管运动功能失常、指端硬化和毛细血管扩张症)、男性和女性自身免疫性不育、混合型结缔组织病、Chaga病、风湿热、反复流产、霉菌肺 (farmer's lung)、多形红斑、心脏切开后综合征、库欣综合征、养鸟人肺 (bird-fancier's lung)、变应性肉芽肿性血管炎、良性淋巴细胞血管炎、Alport综合征、肺泡炎如过敏性肺泡炎和纤维化肺泡炎、间质性肺病、输血反应、麻风病、疟疾、利什曼病、kypanosomiasis、血吸虫病、蛔虫病、曲霉病、Sampter综合征、Caplan综合征、登革热、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、弥漫性间质性肺纤维化、间质性肺纤维化、特发性肺纤维化、囊性纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑 (erythema elevatum et diutinum)、胎儿幼红细胞增多症、嗜酸性筋膜炎、Shulman综合征、Felty综合征、丝虫病 (filariasis)、睫状体炎如慢性睫状体炎、异色性睫状体炎 (heterochronic cyclitis)、虹膜睫状体炎或Fuch睫状体炎、Henoch-Schonlein紫癜、人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染、艾可病毒感染、心肌病、阿尔茨海默病、细小病毒感染、风疹病毒感染、接种后综合征、先天性风疹感染、Epstein-Barr病毒感染、腮腺炎、Evan综合征、自身免疫性性腺衰竭、Sydenham舞蹈病、链球菌感染后肾炎、闭塞性血栓性血管炎 (thromboangitis obliterans)、甲状腺毒症、脊髓痨 (tabes dorsalis)、脉络膜炎、巨细胞多肌痛、内分泌眼病 (endocrine ophthalmopathy)、过敏性肺炎、干燥性角膜结膜炎、流行性角膜结膜炎、特发性肾病综合征、微小病变性肾病、良性家族性和缺血-再灌注损伤、视网膜自体免疫 (retinal autoimmunity)、关节发炎、支气管炎、慢性阻塞性气道病、矽肺病、口疮、口疮性口炎、动脉硬化病、无精子发生症 (aspermogenesis)、自身免疫性溶血、Boeck病、冷球蛋白血症、Dupuytren挛缩、晶状体蛋白过敏性眼内炎 (endophthalmitis phacoanaphylactica)、过敏性肠炎、麻风结节性红斑、特发性面瘫、慢性疲劳综合征、风湿热 (febris rheumatica)、Hamman-Rich病、感觉神经性听力损失 (sensorineural hearing loss)、阵发性血红蛋白尿 (haemoglobinuria paroxysmatica)、性腺功能减退症、局限性回肠炎、白细胞减少症、传染性单核细胞增多症、横贯性脊髓炎、原发特发性粘液性水肿、肾病、交感性眼炎 (ophthalmia sympathica)、肉芽肿性睾丸炎、胰腺炎、急性多神经根炎、坏疽性脓皮病、奎汶氏甲状腺炎、获得性脾萎缩、因抗精子抗体所致的不育、非恶性胸腺肿瘤、白癜风、SCID和Epstein-Barr病毒相关性疾病、获得性免疫缺陷综合征 (AIDS)、寄生虫病如利什曼原虫病、中毒性休克综合征、食物中毒、涉及T细胞浸润的病状、白细胞黏附缺陷、与细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫应答、涉及白细胞渗出的疾病、多器官损伤综合征、抗原-抗体复合物-介导的疾病、抗肾小球基底膜病、变应性神经炎、自身免疫性多内分泌腺病、卵巢炎、原发粘液性水肿、自身免疫性萎缩性胃炎、交感性眼炎、风湿性疾病、混合型结缔组织病、肾病综合征、胰岛炎、多内分泌腺衰竭、外周神经病、自身免疫性多内分泌腺综合

征I型、成年发作型特发性甲状旁腺功能减退症(AOIH)、全秃、扩张型心肌病、获得性大疱性表皮松解症(epidermolysis bullosa acquisita,EBA)、血色素沉着症、心肌炎、肾病综合征、原发性硬化胆管炎、化脓性或非化脓性鼻窦炎、急性或慢性鼻窦炎、筛窦炎、额窦炎、上颌窦炎或蝶窦炎、嗜酸细胞相关性病症如嗜酸粒细胞增多症、肺嗜酸细胞增多性浸润、嗜酸粒细胞增多-肌痛综合征、Loffler综合征、慢性嗜酸细胞性肺炎、热带肺嗜酸粒细胞增多症、支气管肺曲霉病、曲霉肿或含有嗜酸性细胞的肉芽肿、过敏反应、血清阴性脊柱关节炎、多内分泌腺自身免疫病、硬化胆管炎、巩膜念珠菌病、巩膜外层念珠菌病、慢性粘膜皮肤念珠菌病、Bruton综合征、婴儿期暂时性低丙球蛋白血症、Wiskott-Aldrich综合征、共济失调毛细血管扩张症、与胶原病相关的自身免疫病、风湿病、神经疾病、缺血性再灌注病、血压反应下降、血管功能障碍、脉管扩张(angiectasis)、组织损伤、心血管缺血、痛觉过敏、脑缺血,和伴血管化疾病、变应性超敏病(allergic hypersensitivity disorder)、肾小球肾炎、再灌注损伤、心肌或其他组织再灌注损伤、具有急性炎症组分的皮肤病、急性紫癜性脑膜炎或其他中枢神经系统炎性病症、眼和眼眶炎性病症、粒细胞输血相关综合征、细胞因子引起的中毒、急性严重炎症、慢性顽固性炎症、肾盂炎、肺硬变、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性大动脉病、动脉内增生、消化性溃疡、心瓣炎和子宫内膜异位。

[0316] 本发明的抗体(和任何额外的治疗药)可以通过任何合适的手段施用,所述的合适手段包括肠胃外、肺内和鼻内以及(如果局部治疗需要)病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何合适的途径进行,例如通过注射,如静脉内或皮下注射,这部分地取决于施用是否为短暂或长时间的。本文中构思了各种给药方案,包括但不限于单次或在各种时间点多次施用、快速浓注施用和冲击输注(pulse infusion)。

[0317] 本发明的抗体将以符合医学规范的方式配制、投予和施用。在这种情况下考虑的因素包括正在治疗的具体病症、正在治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、病症原因、递送药物的部位、施用方法、施用计划和医疗执业者已知的其他因素。该抗体不需要与目前用来预防或治疗所讨论病症的一种或多种药物一起配制,但是任选地与它们一起配制。这类其他药物的有效量取决于该制剂中存在的抗体的量、疾病类型或疗法和上文讨论的其他因素。这些药物通常以与本文所述相同的剂量并且采用与本文所述相同的施用途径使用,或以约1%至99%的本文所述剂量使用,或以经验地/临床上确定适宜的任何剂量和任何途径使用。

[0318] 为了预防或治疗疾病,本发明抗体的适宜剂量(当单独或与一种或多种其他额外治疗药组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和过程,抗体是否出于预防或治疗目的施用、先前疗法、患者的临床史和对抗体的反应以及主治医师的决定。将抗体适当地按一次或经过一系列治疗施用至患者。取决于疾病的类型和严重性,约1 μ g/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg-10mg/kg抗体)可以是向患者施用的初始候选剂量,无论是否例如通过一个或多个单独施用或通过连续输注来施用。取决于上文提到的因素,一个常见的每日剂量可能是从约1 μ g/kg至100mg/kg或更多。对于在几日或更长时间范围内重复施用,取决于病状,治疗通常将持续直至所需的疾病症状抑制作用出现。抗体的一个示例性剂量将处于约0.05mg/kg至约10mg/kg范围内。因此,可以向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或其任意组合)的一种或多种剂量。这类剂量可以断续地施用,例

如,每周或每3周(例如,从而,患者接受从约2个至约20个或例如约六个剂量的抗体)。可以施用较高的初始负荷剂量,随后是一个或多个较低剂量。示例性给药方案包括施用。然而,可以使用其他剂量方案。通过常规技术和测定法容易地监测这种疗法的进程。

[0319] 制造品或试剂盒

[0320] 在本发明的另一个方面,提供制造品或试剂盒,所述制造品或试剂盒含有上文描述的可用于治疗、预防和/或诊断病症的物质。该制造品包括容器和/或在容器上或与之结合的标签或包装内容物。合适的容器例如包括瓶、小药瓶、注射器、静脉内输液袋等。容器可以从多种材料如玻璃或塑料中形成。该容器容纳了本身或与另一种组合物组合时有效治疗、预防和/或诊断病症的组合物并且可以具有无菌接入口(例如该容器可以是静脉内输液袋或是具有皮下注射针头可穿透的瓶塞的小药瓶)。组合物中的至少一个活性物质是本发明的抗体。标签或包装插页说明该组合物用于治疗选择的病状。另外,制造品可以包含(a)其中含有组合物的第一容器,其中所述组合物包含本发明的抗体;和(b)其中含有组合物的第二容器,其中所述组合物包含其他细胞毒药物或治疗药。在本发明的这个实施方案中制造品还可以包含指示组合物可以用来治疗特定病状的包装内容物。在一些实施方案中,制造品包含如本文所述的抗IL-34抗体。在一些实施方案中,制造品包含如本文所述的双特异性IL-34/CSF-1抗体。在一些实施方案中,制造品包含如本文所述的抗CSF-1R抗体。在一些实施方案中,制造品包含如本文所述的抗IL-34和抗CSF-1抗体。备选或额外地,该制造品可以还包含第二(或第三)容器,其包含可药用缓冲液,如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、Ringer溶液和葡萄糖溶液。它可以还包括从商业和用户观点看受欢迎的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、滤器、针头和注射器。

实施例

[0321] 以下是本发明方法和组合物的例子。应当理解,鉴于上文提供的一般表述,可以实施多种其他实施方案。

[0322] 实施例1:IL-34、IL-34/CSF-1R复合物和IL-34/抗体复合物的结构

[0323] 方法

[0324] 蛋白质表达和纯化

[0325] 将与C末端FLAG-标签或His6-标签融合的人IL-34活性核心(hIL-34s的残基N21-V193和hIL-34f1的残基N21-P242)的编码序列,和与C末端His6-标签连接的人CSF-1R胞外结构域(结构域D1-D3的残基20-299和结构域D1-D5的残基20-512)的编码序列克隆至pAcGP67载体(BD Biosciences)中。根据制造商的说明书(Pharmlngen),使用BaculoGold™表达系统,通过在ESF921培养基(Expression Systems LLC,Woodland,CA)中用pAcGP67A构建体和线性化杆状病毒DNA共转染sf9细胞,产生重组杆状病毒。通过3轮扩增产生病毒并且将4ml第3轮原液用来感染1升密度为 2×10^6 个细胞/ml的Tni.PRO细胞。将细胞在27℃培育48小时并通过离心从培养基取出。将上清液从细胞取出并补充以50mM Tris-HCl pH 7.5中的1mM NiCl₂,5mM CaCl₂。使用重力流(gravity flow),使在上清液中的蛋白质由Ni-NTA柱(Qiagen)捕获,用30ml洗涤缓冲液(50mM Tris-HCl pH 7.5,300mM NaCl,10mM咪唑)洗涤,并用洗脱缓冲液(50mM Tris-HCl pH 7.5,300mM NaCl,300mM咪唑)从柱洗脱下来。将蛋白质浓缩并用5mM Tris-HCl pH 7.5和100mM NaCl平衡的大小排阻柱(HiLoad16/60Superde

x200, GE Biosciences) 进一步纯化。含有目的蛋白的部分由 SDS-PAGE 分析, 汇集并且通过 280nm 处的吸光度确定浓度。

[0326] 分析性凝胶过滤

[0327] 将浓度 1mg/mL 的 500 μ l 蛋白质样品连续地注射至用 PBS 平衡的 Superdex 20010/300GL 柱 (GE Biosciences) 中。通过蛋白质分子量标准的混合物 (Bio-Rad) 校准同一个柱, 并且将目的蛋白的洗脱体积用来估计它们的相应分子量。

[0328] 等温滴定量热法

[0329] 使用 Superdex200 10/300GL 柱, 将全部蛋白质样品在 ITC 实验之前交换缓冲液成 PBS 缓冲液以最小化缓冲液稀释效应。在 VP-ITC200 量热器 (MicroCal, Northampton, MA) 上实施量热滴定, 并且用 MicroCal Origin 7.0 软件处理数据。将注射物 IL-34 或 CSF-1 蛋白经过多个注射过程添加至 CSF-1R D1-D3 或 CSF-1R D1-D5 直至受体被完全饱和。将 CSF-1R D1-D3 或 D-D5、注射物经过多个注射过程添加至含有 IL-34、CSF-1 或 IL-34/CSF-1R D1-D3 复合物的小室直至受体被完全饱和。

[0330] 使用生物膜干涉技术 (BLI) 的亲和力测量

[0331] IL-34 或 CSF-1 与 CSF-1R D1-D3 结合

[0332] 使用 Octet RED384™ BLI 仪 (fortéBio) 实施结合测定法。将生物素酰化的 IL-34 或 CSF-1 固定在链霉亲和素包被的生物传感器上, 洗涤, 并转移至反应缓冲液 (1x 动力学分析缓冲液, forteBio#18-5032) 中, 所述缓冲液含有 CSF-1R D1-D3 的 4 倍连续稀释物 (关于 IL-34, 1600nM 至 25nM, 并且关于 CSF-1, 3200nM 至 50nM)。监测缔合反应直至结合作用达到稳态。随后, 将结合的物质转移至反应缓冲液中并且监测解离反应以确保细胞因子和 CSF-1R D1-D3 之间的可逆结合。使用简单的单位点结合方程计算缔合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。将平衡解离常数 (K_d) 计算为 k_{off}/k_{on} 比。在 30°C 测量结合动力学并将样品以 1000 转/分钟搅拌。

[0333] 使用 BIACORE3000, 还评价了抗体亲和力。亲和力总体上与 BLI 量值相符。抗 IL-34 人 IgG 由 CM5 传感芯片上包被的小鼠抗人 IgG 捕获以实现大约 250 响应单位 (RU)。对于动力学测量, 将 PBT 缓冲液 (含 0.05% Tween 20 的 PBS) 中的人 IL-34 和小鼠 IL-34 (3.9nM 至 500nM) 的两倍连续稀释物在 25°C 以流速 30ml/min 注射。使用简单一对朗格缪尔结合模型 (BIAcore 评估软件 3.2 版) 计算缔合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。将平衡解离常数 (K_d) 计算为 k_{off}/k_{on} 比。

[0334] 结晶和结构测定

[0335] hIL-34s_CFlag/YW405.3 Fab

[0336] 将等摩尔比的 hIL-34s_CFlag 和 YW405.3Fab 混合并使用 HiLoad16/60Superdex200 柱进行最终凝胶过滤步骤, 并在结晶试验之前浓缩至 30mg/ml。hIL-34s_CFlag/YW405.3Fab 复合物的斜方晶体在 19°C 从含有 0.2M 四水合酒石酸钾钠, 20% w/v 聚乙二醇 3,350 的 Hampton Research Index HT H02 (86) 长出。

[0337] hIL-34s_CFlag

[0338] 通过混合等体积的 10mg/ml 的蛋白质和含有 0.1M Hepes pH 7.5、10% w/v 聚乙二醇 6,000、5% v/v (+/-) -2-甲基-2,4-戊二醇的储液 (Hampton Research Crystal Screen HT G06 (78)), 在 19°C 获得 hIL-34s_CFlag 的两个二维片状物。

[0339] hIL-34s_CHis/hCSF-1R D1-D3 CHis

[0340] hIL-34s_CHis和hCSF-1R D1-D3_CHis在昆虫细胞中共表达并通过镍-亲和力和使用HiLoad 16/60 Superdex 200柱,大小排阻层析来纯化。将复合物浓缩至20mg/ml并用座滴气相扩散技术筛选。hIL-34s_CHis/hCSF-1R D1-D3 CHis复合物的纺锤形晶体在19℃从含有0.1M CaAcet,0.1M Mes pH 6,15%PEG400的Qiagen Protein Complex Screen A02 (2) 长出。

[0341] hIL-34s_CFlag/YW404.33.56 Fab

[0342] 将YW404.33.56的Fab片段与hIL-34s_CFlag按1:1摩尔比混合并通过HiLoad 16/60 Superdex 200柱进一步纯化并浓缩至20mg/ml。在一个月后,hIL-34s_CFlag/YW404.33.56 Fab复合物单一晶体在19℃在0.2M磷酸二氢铵、0.1M Tris pH 8.5,50%v/v (+/-) -2-甲基-2,4-戊二醇的储液上方长出。

[0343] 数据采集

[0344] 在数据采集之前,在液氮中速冷全部结晶的晶体。使用ADSC Q315CCD探测器在ALS BL5.0.2采集全部数据集。使用HKL2000,将衍射图像加注索引、集成和放大 (Otwinowski等人,Methods in Enzymology276:307-326 (1997))。表2中给出数据采集、定相和晶体学修正的全部统计结果汇总。

[0345] 表2.X射线数据集、定相和修正统计结果(refinement statistics)

[0346]

数据集	hIL-34s	hIL-34s/hCSF-1R	hIL-34s/YW405.3 Fab	hIL-34s/YW404.33.56 Fab
波长 (Å) 空间群 晶胞尺度	P2 ₁ a=57.694Å b=77.866Å c=58.083Å α=γ=90° β=103.245°	P3 ₁ 21 a=b=101.361Å c=175.252Å α=β=90° γ=120.000°	C2 a=117.917Å b=181.822Å c=79.254Å α=γ=90° β=118.268°	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ a=105.549Å b=122.465Å c=149.155Å α=β=γ=90°
分辨率 (Å) 总观察 结果 唯一观察结果 I/SigI 冗余性 完整度 (%) R _{sym} ^a (%)	50.0-1.85 (1.92-1.85) 154925 42509 11.3 (2.0) 3.6 (3.2) 99.8 (99.0) 9.3 (51.9)	50.0-3.0 (3.11-3.00) 164357 21502 23.5 (2.8) 7.6 (7.0) 99.8 (99.8) 6.1 (62.7)	50.0-2.6 (2.69-2.60) 243871 44009 11.0 (2.3) 5.5 (5.4) 99.3 (96.9) 11.1 (60.9)	50.0-3.0 (3.11-3.00) 208888 38972 16.7 (2.2) 5.4 (5.0) 99.6 (99.9) 8.6 (62.3)
修正				
分辨率 (Å) 蛋白质原子 数目 糖原子数目 水数目 R _{work} R _{free} ^b rmsd 键长 rmsd 键角	50.0-1.85 2614 78 486 17.4% 20.3% 0.015 1.402	50.0-3.0 4724 134 16 28.4% 31.3% 0.004 0.881	50.0-2.6 8729 122 126 22.8% 25.9% 0.006 0.979	50.0-3.0 8948 111 50 23.5% 27.3% 0.006 0.927
拉氏图				
最有利 (%) 额外允许 (%) 一般 允许 (%) 不允许 (%)	93.9 6.1 0.0 0.0	88.2 10.6 0.4 0.8	89.6 9.9 0.1 0.4	90.5 8.8 0.7 0.0

[0347] 括号中的值代表最高壳层 (highest resolution shell)

[0348] $aR_{\text{sym}}(I) = \sum hkl \sum i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum hkl \sum i I_i(hkl)$, 其中汇总覆盖每种反射的*i*个观察结果并且全部*hkl*. $\langle I(hkl) \rangle$ 是*i*个观察结果的平均强度。[0349] $R_{\text{work}} = |F(\text{obs}) - F(\text{calc})| / F(\text{obs})$ [0350] bR^{free} 是对修正中不使用的5%随机选择的反射计算的

[0351] 结构测定和修正

[0352] 达到**1.85 Å**、**3.0 Å**、**2.6 Å**和**3.0 Å**的完整数据集分别从h-IL-34s、hIL-34s/CSF-1R D1-D3复合物、hIL-34s/YW405.3 Fab复合物和hIL-34s/YW404.33.56 Fab复合物的单晶采集(表2)。

[0353] hIL-34s_CFlag/YW405.3 Fab和hIL-34s_CFlag

[0354] 使用程序PHASER (Storoni等人, Acta crystallographica Section D, Biological crystallography 60:432-438 (2004)), 采用通过依次检索Fab的Fv区和Fc区

从单一Fab (蛋白质数据库 (PDB) 登录号2QQN) 产生的检索模型,通过分子置换法解析hIL-34s_CFlag/YW405.3 Fab复合物结构。发现包括2种Fab的唯一正确解揭示出Fab的CDR区外部IL-34的非常受限的电子密度。通过溶剂平滑、使用PHENIX AutoBuild中常规的引发-转换定位图2倍NCS平均化,大幅度改善来自这个初步解析的相位(Adams等人,Acta crystallographica Section D,Biological crystallography 66:213-221 (2010))。所产生的图具有足够高的品质以允许在Coot中手工绘制IL-34的完整主链。将这种局部IL-34模型通过分子置换法输入hIL-34s_CFlag的 **1.85 Å** 分辨率数据集中并且使用Coot (Emsley等人,Acta crystallographica Section D,Biological crystallography 66:486-501 (2010)) 进行模型重建,并且使用Refmac (Murshudov等人,Acta crystallographica Section D,Biological crystallography 53:240-255 (1997)) 迭代地修正。在最终轮次修正中,将4个N-乙酰基-氨基葡萄糖基团和4个甘露糖部分添加至IL-34的残基Asn75,并且最终模型中包含486个水分子。完成的IL-34模型随后用于重建并修正hIL-34s_CFlag/YW405.3 Fab复合物结构以按 **2.6 Å** 分辨率收敛(convergence)。

[0355] hIL-34s_CHis/hCSF-1R D1-D3 CHis

[0356] 使用分子置换程序PHASER,将hIL-34s_CHis/hCSF-1R D1-D3CHis复合物的各个组件依次定位,以hIL-34s、鼠CSF-1R D1-D2和鼠CSF-1R D3 (PDB ID 3EJJ) 作为检索模型。根据人氨基酸序列重建并修正CSF-1R D1-D3,并且通在Refmac中交互修正和在Coot中建模,完成最终的hIL-34s_CHis/hCSF-1R D1-D3 CHis模型。

[0357] hIL-34s_CFlag/YW404.33.56 Fab

[0358] 通过分子置换方法测定与阻断性Fab YW405.33.56复合的hIL-34s_CFlag,所述分子置换方法在程序PHASER中采用hIL-34s和具有相似框架的Fab的Fv区和Fc区的结构执行,随后手工组装YW404.33.56 Fab的CDR区。使用 **3.0 Å** 数据集实施几轮模型重建和结构修正直至达到收敛。

[0359] 表2中给出了全部4种结构的修正统计结果和立体化学分析汇总。将程序MolProbity (Chen等人,Acta crystallographica Section D,Biological crystallography 66:12-21 (2010)) 用来审查最终模型的质量。坐标已经提交至蛋白质数据库(www.rcsb.org),hIL-34s、hIL-34s/hCSF-1R D1-D3、hIL-34s/YW404.33.56 Fab和hIL-34s/YW405.3的登录代码分别是xxx、yyy、zzz、www。使用程序PyMol (互联网网址:pymol.sourceforge.net) 准备图。

[0360] 人单核细胞和细胞生存力/增殖测定法

[0361] 通过在Ficoll上梯度离心分离人外周血单核细胞(PBMC)。在细胞生存力/增殖测定法中,将96孔板中每孔 1×10^4 个新鲜分离的PBMC用连续稀释状态下的IL-34(全长形式和缩短形式)或CSF-1刺激。在37°C孵育72小时后,通过CellTiter-Glo发光细胞生存力分析试剂盒(Promega,目录号#G7571) 测量细胞中的ATP水平以确定细胞生存力/增殖。将增殖显示为相对发光单位(RLU)。

[0362] 人IL-34生物活性的中和

[0363] 中和hIL-34活性所需要的最佳抗体浓度依赖于细胞因子数量、细胞类型和测定法类型。为测量抗体中和hIL-34或mIL-34对PBMC的生物活性的能力,我们使用CellTiter-Glo

的细胞增殖测定法。基于针对IL-34连续稀释物的细胞反应,选择100ng/mL的IL-34量用于确定抗体中和活性。半数最大抑制浓度(IC50)定义为当IL-34以激发70-80%增殖反应的浓度存在时,为了在细胞上产生IL-34活性的半数最大抑制所需要的抗体浓度。将100ng/mL hIL-34或mIL-34与抗IL-34mAb或抗CSF1抗体的连续稀释物组合,之后,以总体积100ul添加到细胞上。在37℃处孵育平板72小时后,通过测量RLU获得抗体抑制活性。用Kaleida Graph计算IC50值。

[0364] 通过噬菌体展示产生抗体

[0365] 鉴定抗IL-34抗体的文库分选和筛选

[0366] 使用鼠IL-34 (PR0307278) 作为文库分选的抗原。将Nunc96孔最大吸附免疫平板在4℃用靶抗原(10μg/ml)包被过夜并在室温用噬菌体封闭缓冲液PBST(磷酸盐缓冲盐水(PBS)和1%(w/v)牛血清白蛋白(BSA)和0.05%(v/v)Tween-20)封闭1小时。将所选择的CDR中具有合成多样性的人合成性抗体噬菌体文库VH(见,例如, Lee等人, J. Immunol. Meth. 284:119-132, 2004)和VH/VL(见Liang等人, Journal of molecular biology 366:815-829 (2007))分别地添加至抗原平板并在室温孵育过夜。次日将抗原包被的平板用PBT(含0.05% Tween-20的PBS)洗涤10次,并且结合的噬菌体用50mM HCl和500mM NaCl洗脱30分钟并用等体积的1M Tris碱(pH7.5)中和。在大肠杆菌XL-1 Blue细胞中扩增回收的噬菌体。在后续选择轮次期间,抗体噬菌体与抗原包被平板的孵育缩减至2-3小时,并逐渐地增加平板洗涤的严格性。

[0367] 在4个淘洗轮次后,观察到显著富集。从VH文库和VH/VL文库分选各自挑出96个克隆,以确定它们是否为人/鼠IL-34交叉结合物或鼠IL-34特异性结合物。将这些克隆的可变区进行PCR测序以鉴定独特序列克隆。随后通过将各个克隆的VL区和VH区分别克隆至LPG3载体和LPG4载体中,将这些独特噬菌体克隆再格式化成为IgG(Carter等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289 (1992)),在哺乳动物CHO细胞中瞬时表达并用蛋白A柱纯化。

[0368] 用于YW404.33亲和力改善的构建体文库

[0369] 噬菌粒pW0703(源自噬菌粒pV0350-2b (Lee, 2004), 其在M13噬菌体表面上展示单价Fab)充当用于移植YW404.33的轻链(VL)和重链(VH)链可变域以便亲和力成熟的文库模板。随后将终止密码子掺入文库模板的CDR-L3中。柔性随机化策略用于亲和力成熟,所述策略通过使用有毒(poisoned)寡核苷酸策略,借助有利于野生型核苷酸的70-10-10-10碱基混合物,在选择的位置处引入大约50%的突变速率(Gallop等人, Journal of medicinal chemistry 37:1233-1251 (1994))。具体而言,靶向CDR-L1的第28-32位置处、CDR-L2的第50和53-55位置处、CDR-L3的第91-94和96位置处、CDR-H1的第28-35位置处、CDR-H2的第50-58位置处、CDR-H3的第95-100位置处的残基。并且构建具有柔性随机化CDR环、L1/L2/L3、L3/H1/H2和L3/H3的组合的三个不同文库。

[0370] 产生亲和力改善的噬菌体分选策略

[0371] 为了进行亲和力改善选择,使噬菌体文库第一轮经历平板分选,随后4轮溶液分选。在第一轮平板分选时,将三个文库在室温针对鼠IL-34包被的平板(NUNC Maxisorp平板)分选2小时。接下来,再实施4个轮次的溶液分选,连同增加选择严格性的两种方法。通过将生物素酰化靶蛋白浓度从50nM减少至0.5nM,第一种方法是缔合速率(on-rate)选择,并

且通过添加过量的非生物素酰化靶蛋白(100~500倍过量)以在室温竞争除去更弱的结合物,第二种方法是解离速率(off-rate)选择。每个噬菌体文库还与非生物素酰化的mIL-34孵育以充当背景噬菌体结合,用于估计每轮淘洗的富集作用。

[0372] 高通量亲和力筛选ELISA(单点竞争)

[0373] 在5个淘洗轮次后,高通量单点竞争性噬菌体ELISA用来如所述那样快速地筛选高亲和力克隆(Sidu,2004)。选择相对于mIL-34不存在时在5nM mIL-34存在下对固定的mIL-34具有低结合率的克隆进一步表征。

[0374] 亲和力测量

[0375] 将配有链霉亲和素(SA)生物传感器探头(fortéBio,Menlo park,CA,美国)的Octet QK用于亲和力测量。在分析之前,将SA生物传感器探头在分析缓冲液(1x动力学分析缓冲液,fortéBio)中平衡10分钟。在300C测量结合动力学并将样品按1000转/分钟搅拌。SA探头用5ug/ml生物素酰化的人IL-34(R&D,目录号#5265-IL-010/CF)饱和200秒,这在六探头的柱内部产生 0.22 ± 0.02 nm捕获水平。制备抗IL-34抗体的三倍连续稀释物(100nM、33.3nM、11.1nM、3.7nM、1.2nM)以及缓冲剂空白。监测缔合和解离300秒。全部反应和测量均在室温进行。使用Octet数据分析软件6.4(fortéBio)分析数据。

[0376] 结果

[0377] 本文中首次展示单独的人IL-34和与CSF-1R复合的人IL-34的晶体结构,并表征它们在溶液中的结合特性。显示IL-34实际上属于短链螺旋状细胞因子家族,在家族成员当中二聚化界面最小。就涉及的结构域而言,IL-34/CSF-1R复合物的结构显示相似的总体配体/受体装配,如对CSF-1复合物所见。然而,涉及的受体结构域经历出乎意料的重排,导致不同的界面组成。这些两个细胞因子信号传导复合体之间的仔细比较提供了分子决定簇的理解,所述分子决定簇允许CSF-1R混杂地结合两个结构上相关、然而进化上远缘的配体IL-34和CSF-1。另外,与噬菌体衍生的两种抗IL-34单克隆抗体的Fab片段复合的IL-34的共晶体结构为它们相应地无阻断活性和中和活性提供结构原理,并且对治疗性开发提供新的深入了解。

[0378] 人IL-34活性核心的结构

[0379] 成熟全长的人IL-34由222个氨基酸组成,但是预测其最后约50个残基大多无序,伴有Jpred 3(Cole等人,Nucleic acids research 36:W197-201(2008))和PsiPRED(McGuffin等人,Bioinformatics 16:404-405(2000))可识别的极少数二级结构。另外,含有前202个或182个残基的IL-34构建体在活化TF-1-fms细胞生长方面与全长蛋白质不可区分,而仅包含前162残基的构建体显示显著削弱的活性(Chihara等人,Cell death and differentiation 17:1917-1927(2010))。此外,7个半胱氨酸残基(35、168、177、179、180、191、和199)存在于人IL-34中并且其中(除C199之外)6个跨物种充分保守(图1A,图7)。因此,选择由成熟多肽的残基N21-V193组成的截短型IL-34构建体(本文中称作hIL-34s)用于后续研究。hIL-34s与C末端FLAG-标签融合,在昆虫细胞中重组表达,如方法中所述那样纯化,并且除非另外指出,否则用于全部后续研究中。hIL-34s与CSF-1一样有活性并且在促进人单核细胞生存力的能力方面比重组全长IL-34略微更有活性(图1B)。人IL-34基因不含可识别的膜结合区,而由于可变RNA剪接和蛋白酶解加工,小鼠直向同源物作为GPI锚定的和可溶解的同工型天然存在(图1A)。

[0380] 人IL-34的活性核心结构域的结构通过用非阻断性抗体YW405.3Fab片段从其复合物中分子置换以**2.6 Å**分辨率测定(表6),并且使用从单独hIL-34s晶体采集的**1.85 Å**分辨率数据集修正(表2)。不令人惊讶,结构分析表明IL-34具有由 α A、 α B、 α C和 α D组成的明显反向平行4螺旋束细胞因子折叠(Sprang等人,Curr Opin Struc Biol 3:815-827(1993)),但是该结构含有在这个核心部分外部的许多突出特征(图1C)。与CSF-1相比,交叉的 β -链1和2大大缩短并且部分地由三个短螺旋(α 1、 α 2和 α 3)取代(Chen等人,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:18267-18272(2008);Pandit等人,Science 258:1358-1362(1992))(图1D)。另外,位于每个原体的极处并远离二聚体界面的两个分子内二硫键对与存在于相关的二聚体“短链”螺旋状细胞因子CSF-1、SCF和Flt3L的结构中的二硫键无结构相似性(Jiang等人,The EMBO journal 19:3192-3203(2000);Savvides等人,Nature structural biology 7:486-491(2000);Zhang等人,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:7732-7737(2000))。第一个二硫键(在C35和C180之间)连接螺旋 α A和 α D,而另一个二硫键(在C177和C191之间)使 α D连接至C末端螺旋 α 4。因此,包含 α 4的C末端尾部与CSF-1的相比倒转并且压到 α A和 α D的表面上。其他两个半胱氨酸C168和C179保持非配对并且因此对IL-34的正确折叠而言并不必要。总体,如通过PDBeFOLD结构叠加判定(Krissinel等人,Acta crystallographica Section D,Biological crystallography 60:2256-2268(2004)),显示IL-34在结构上最类似于SCF(均方根偏差(rmsd):**2.6 Å**),然而与功能上相关的CSF-1更趋异(rmsd:**3.2 Å**)。

[0381] 这种结构分析的结果还显示非对称单位中IL-34的两个原体以类似于针对CSF-1、SCF和Flt3L所见的方式进一步装配成非共价二聚体。在形成IL-34二聚体时,每个亚基覆盖**656 Å²**,来自一个单体的 α A- β 1环和 α B- α C环与另一个单体的对应区段互锁。通过一个原体的H56、Y57、F58、P59和Y62的侧链对来自相邻单体的残基P114'、H113'、L110'、L109'、V108'、Y62'、P59'和F58'堆积,形成一个以P58/P58'为中心的紧凑和相对扁平的疏水性小块。这些相互作用可以导致固性的IL-34二聚体形成,尽管与分别由**1690 Å²**和**1640 Å²**组成的相关非共价SCF和Flt3L二聚体相比,覆盖表面积更小(**1310 Å²**)。在IL-34二聚体界面处的残基在来自其他物种的直向同源物之间高度保守(图7)。在hIL-34s晶体中观察到的IL-34二聚体构造可能是溶液中蛋白质构造的代表,因为相同的“头对头”二聚体排列方式还存在于本文讨论的三种IL-34复合物结构中。在结晶的构建体中包含成熟IL-34位于N76处的一个预测的N-联糖基化位点,并且观察了与侧链连接的(GlcNAc)₂Man的电子密度。结果表明糖的方向由Y68的芳环和第二GlcNAc残基的疏水面之间的堆叠相互作用、连同IL-34中的三个保守残基E69、R79和K157介导的极性相互作用固定,从而显示这个糖部分是IL-34结构的不可或缺部分。类似的糖基化位点在啮齿类IL-34中保守,所述啮齿类IL-34还在与hIL-34s结构中溶剂可及的人S100等同的位置含有预测的额外N-联糖基化位点。

[0382] IL-34/CSF-1R复合物的生物物理表征

[0383] 为探测hIL-34s在溶液中的寡聚状态,使用分析性大小排阻层析(图2A)。hIL-34s单体的理论分子质量是22kDa,然而该蛋白质比44kDa参比物更早洗脱,表明hIL-34s在溶液

中形成二聚体,与hIL-34s晶体中观察到二重非晶体学对称二聚体结构一致。为了评估IL-34配体/受体复合物的分子大小,将几乎含有完整胞外结构域(ECD)的构建体与IL-34以1:1原体摩尔比混合并由相同技术分析,其中所述完整胞外结构域包括受体的免疫球蛋白结构域D1至D5(hCSF-1R D1-D5)。这种复合物的表现大小与针对2:2复合物计算的大小一致(图2A)。类似地,为了缩减形成复合物所必需的最小受体构建体,将hIL-34s与仅含有前三个免疫球蛋白结构域的受体构建体(hCSF-1R D1-D3)的混合物进行大小排阻分析,揭示大于158kDa的表现大小,与2:2复合物一致(图2A)。

[0384] 为了精确测定IL-34与CSF-1R结合的化学计量和能量学并将它们与CSF-1结合作用比较,通过等温滴定量热法(ITC)评估结合作用的热力学参数(图2B,D)。滴定CSF-1R受体至IL-34细胞因子中证实全长和截短形式的受体CSF-1R D1-D5和D1-D3被等摩尔量的IL-34单体饱和。这种结果,连同通过分析性大小排阻层析确定的表现大小,有力地支持溶液中该复合物的2:2细胞因子/受体化学计量(图2D)。由于IL-34/CSF-1R D1-D5相互作用的高亲和力产生了妨碍以高准确度确定解离常数的陡峭滴定转变(图2B,左小图),通过将CSF-1R D1-D5滴定入IL-34与CSF-1R D1-D3的混合物实施置换ITC(图2B,右小图)。本文确定的结合等温线表明IL-34与其受体结合主要受焓驱动。IL-34与CSF-1R D1-D3和D1-D5二者结合的放热性质表明IL-34/CSF-1R复合物形成可能涉及关键的极性相互作用。纳入近膜端结构域CSF-1R D4-D5导致亲和力大大增加(D1-D5和D1-D3的亲和力分别为1.6和94nM K_d),这在焓方面显著更有利,不过在熵方面略微不利。这些结果表明虽然hCSF-1R D1-D3足以导致高亲和力配体结合,但是一旦形成完整的细胞因子/受体信号传导复合体,CSF-1R D4-D5可能含有额外的同型受体相互作用位点,如与KIT受体二聚体的完整胞外结构域结合的SCF的复合物结构中所见(Yuzawa等人,Cell 130:323-334(2007))。令人惊讶地,与分别结合至hCSF-1R D1-D3和D1-D5的IL-34相比,表征更好的配体CSF-1显示出9.5和13倍较低的亲和力(图2C,D)。与IL-34相比,这些结果表明CSF-1复合物同时受有利的焓和熵驱动。与IL-34相似,人CSF-1滴定还对两种形式的受体提出2:2配体/受体化学计量。虽然与较早报道(Guilbert等人,The Journal of biological chemistry 261:4024-4032(1986)))一致,但是这显示人CSF-1和鼠CSF-1之间的关键差异。在不存在D4和D5的情况下,鼠CSF-1据报道在溶液中与鼠CSF-1R形成2:1部分复合物,任由鼠CSF-1上的一半受体结合表面未占据(Chen等人,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:18267-18272(2008))。

[0385] 为了进一步理解这个系统中细胞因子/受体结合的动力学,将生物素酰化的IL-34或CSF-1固定在链霉亲和素包被的生物传感器探头上,以便使用生物膜干涉技术(BLI),用受体连续稀释物测量缔合和解离速率。从这种项正交方法的结果还证实IL-34结合CSF-1R ($k_{on}=2.9 \times 10^5 s^{-1} M^{-1}$, $k_{off}=3.5 \times 10^{-2} s^{-1}$, $K_d=120 nM$) 比CSF-1结合CSF-1R ($k_{on}=7.7 \times 10^4 s^{-1} M^{-1}$, $k_{off}=5.4 \times 10^{-2} s^{-1}$, $K_d=720 nM$) 更紧密,主要归因于与略慢 k_{off} 偶联的3.8倍更快的 k_{on} 。

[0386] IL-34/CSF-1R D1-D3复合物的结构

[0387] 使用hIL-34s和鼠CSF-1R的结构(Chen等人,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:18267-18272(2008))作为检索探针,通过分子置换法解析与hCSF-1R D1-D3结合的hIL-34s的**3.0 Å**分辨率结构(表2)。虽然这项研究中测试的全部生物物理方法均表明hCSF-1R D1-D3与hIL-34s在溶液

中形成2:2复合物,但是晶体结构毫不含混地揭示一个CSF-1R D1-D3在非对称单元中与一个hIL-34s同型二聚体结合。结构分析表明,相邻原体上的类似受体结合位点参与晶胞堆积,抑制这个晶体结构形式中预期的2:2复合物形成。然而,这种结构良好地揭示IL-34/受体界面。显示IL-34与CSF-1R的D2和D3形成的处于下述构型的凹面结合,其中所述构型类似于CSF-1与CSF-1R受体结合时所采用的构型。IL-34/CSF-1R界面中还保留了在CSF-1细胞因子/受体复合体中见到的相似双位点结合模型。这些结果表明位点1涉及IL-34和受体的Ig结构域D2之间的相互作用,并且位点2涉及IL-34和受体结构域D3之间的相互作用。每个位点分别提供**1280 Å²**和**1160 Å²**总覆盖表面积。D2和D3之间的接头,虽然在结构上充分有序,但是远离与IL-34相互作用,这有效地将IL-34/CSF-1R界面分析成两个空间上分离的位点。

[0388] IL-34配体/受体结合位点1

[0389] 结构分析揭示位点1主要由构成CD环和EF环的受体D2结构域残基(分别是残基142-150和169-173)形成,所述CD环和EF环接驳到IL-34螺旋αB(残基100-108)、αC(116-134)、间插环(残基109)和α3(残基150)提供的凸凹不平表面上(图3A)。这个区域内IL-34的带负电荷表面和CSF-1R上带正电荷表面之间的互补性静电相互作用似乎在这个位点处在介导IL-34结合方面重要。具体而言,位于中央的盐桥在CSF-1R的碱性氨基酸R142、R146与IL-34上的酸性E103之间形成。在CD环的周界处的CSF-1R的R144和R150参与分别与N150的侧链氧和Q106和L109的主链羰基氧的氢键合相互作用。由IL-34中脂族侧链L127形成的小疏水片紧密契合在CSF-1R的F169和I170之间。尽管这个位点似乎优势为极性相互作用,但是许多分子间范德瓦尔斯接触也存在于该界面,如表3中详述。

[0390] IL-34配体/受体结合位点2

[0391] 结果进一步表明,略微较小的位点2主要来自BC环和DE环的受体D3残基(分别为残基231和254)和链D(残基248-252)形成,依住IL-34螺旋αA、αC和α4的部分(分别是残基36-44、121-128、184-187)所产生的表面堆积(图3C)。这个界面可以进一步分成两个极性相互作用区域,由IL-34残基F40和L125及CSF-1R残基V231、Y257和F252形成的疏水区分隔。第一区域由CSF-1R D3 D-链起点和IL-34α4之间的主链和侧链氢键相互作用的组合形成。IL-34的N187的侧链酰胺氢和氧参与和受体的至多三个氢键,而受体涉及CSF-1R的Q249的侧链酰胺和S248的主链氮和羰基氧。另外,两个主链-主链氢键在CSF-1R Q248和IL-34S184和L186之间形成。缺失IL-34中构成α4区的残基导致蛋白质表达水平大幅度降低和就刺激TF-1-fms细胞生长的能力而言显著更弱的活性(Chihara等人,Cell death and differentiation 17:1917-1927 (2010))。本文中报道的结果证实涵盖α4的残基是IL-34的活性核心结构域的不可或缺部分,并且因此对其活性重要。位点2中的第二极性区域涵盖在IL-34 N128、K44及E121的末端侧链原子和CSF-1R的Y257的羟基、F252的羰基氧和N254的主链酰胺之间侧链介导的三个氢键。表3中列出由范德瓦尔斯接触介导的额外相互作用。

[0392] 表3. IL-34/CSF-1R和CSF-1/CSF-1R相互作用。

[0393]

CSF-1R D2		IL-34		距离 (Å)	CSF-1		距离 (Å)
氢键和盐桥 (共享)							
Arg142	Nη1				Gln58	Oε1	3.4
	Nη2	Glu103	OE1	3.1			
	Nη2	Glu103	OE2	3.2			
Arg146	Nη1				Gln58	Oε1	2.4
	Nη2	Glu103	OE1	2.6	Asp59	Oδ1	3.4
Arg150	Nη1	Leu109	O	3.2			
	Nη2	Gln106	O	3.5	Asp62	O	3.0
	N				Asp62	Oδ1	3.4
	N				Asp62	Oδ2	3.2
氢键和盐桥 (独特)							
Arg144	Nη1	Asn150	Oδ1	2.5			
Lys151	Nζ				Glu78	Oε1	3.9
Lys168	Nζ				Glu78	Oε1	3.6
Lys168	Nζ				Glu78	Oε2	3.7
Leu170	O				Asn85	Nδ2	3.1
范德瓦尔斯接触 (共享)							
Arg146		Ser100, Asn150			Phe55		
Met149 (Leu149)		Glu123			Asp62, Gln81		
Arg150		Trp116			Arg66		
Phe169 (Val169)		Thr124, Leu127, Asn128, Gln131			Glu82		
Ile170 (Leu170)		Glu123, Thr124, Leu127			Glu78		
Gln173 (Asn173)		Leu127			Glu78		
范德瓦尔斯接触 (独有)							
Lys151					Asp62		
Ser172		Leu127					
Arg192		Thr134					
CSF-1R D3		IL-34		距离 (Å)	CSF-1		距离 (Å)
氢键和盐桥 (共享)							
Tyr257	OH	Asn128	Nδ2	2.7	Met10	O	2.6
氢键和盐桥 (独特)							
Gln248	N	Ser184	O	2.7			
	O	Leu186	N	2.8			
Gln249	Nε2	Asn187	Oδ1	3.1			
Ser250	N	Asn187	Oδ1	3.0			
	O	Asn187	Nδ2	3.5			
Asp251	Oδ1				Asn13	N	3.0
	Oδ2				Gly14	N	2.9
Phe252	O	Lys44	Nζ	2.6			
Asn254	N	Glu121	Oε2	3.8			
范德瓦尔斯接触 (共享)							
Val231		Phe40			His6, Met10		
Ser250		Phe40, Asp43			His9		
Asp251		Phe40, Asp43			Gly12		
Phe252		Leu125			Gly14, His15, Arg79		
Tyr257		Phe40, Leu125			His9, His15		
范德瓦尔斯接触 (独有)							

[0394]

Gly232		His6
Phe233		His6
Pro247	Ser184, Gln189	
Gln248	Thr36, Val185, Asn187	
Gln249	Leu186	
Asn255		Arg79
Gln258	Phe40	
Lys259	Thr36	

[0395] mAb YW404.33.56对IL-34拮抗作用的结构基础

[0396] 为了剖析IL-34和CSF-1的独立功能并探索来自阻断IL-34信号传导的治疗益处,使用噬菌体展示技术产生特异性拮抗人IL-34和鼠IL-34的抗体,从而使得审查IL-34在人类患者和啮齿类模型中的功能成为可能。YW404.33通过筛选V_H和V_H/V_L噬菌体展示文库来鉴定并且基于其高结合亲和力(K_d=17nM,表4)和其对IL-34的阻断活性从一组96个克隆中选出。随后使用如方法所述的柔性随机化策略,使YW404.33发生亲和力成熟。与亲本克隆相比时,YW404.33.56显示140倍结合亲和力改善(K_d=120pM),如通过BLI实验所测量。在人单核细胞生存力(图4A)和增殖(图8)测定法中,IL-34的生物活性被类似于受体Fc融合物的这种抗体彻底阻断,但是不被抗CSF-1抗体阻断。

[0397] 表4. 非中和性抗体YW405.3/hIL-34和中和抗体YW404.33/hIL-34、YW404.33.56/hIL-34的结合动力学的Octet测量

[0398]

抗-IL-34Mabs	k _{on} (s ⁻¹ M ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _d (M)
YW405.3	1.45E+06	4.52E-03	3.12E-09
YW404.33	3.58E+05	6.11E-03	1.71E-08
YW404.33.56	3.38E+06	4.19E-04	1.24E-10

[0399] 为了更好理解YW404.33.56 mAb阻断IL-34生物活性的机制,以3.0 Å分辨率解析与YW404.33.56的Fab片段复合的hIL-34s的结构(表2)。晶体含有在非对称单元中与两个YW404.33.56 Fab结合的一个hIL-34s二聚体。有趣地,结构分析显示每个YW404.33.56 Fab识别在两个IL-34原体的交界处一大片连续的区域。在IL-34二聚体侧面上,该界面的大部分(786 Å²或79%)由来自一个原体的螺旋αB、αC及其间插环贡献,而较小部分(215 Å²或21%)由另一个IL-34原体的αB-β1环贡献(图4B)。在YW404.33.56 Fab侧面上,大部分相互作用由重链CDR-H1(55 Å²)、CDR-H2(267 Å²)和CDR-H3(316 Å²)介导,来自轻链CDR的贡献较小(303 Å²)。4个盐桥(R50^{YW404.33.56}-E111^{IL-34}、R100b^{YW404.33.56}-E111^{IL-34}、R100b^{YW404.33.56}-D107^{IL-34}和K100a^{YW404.33.56}-E103^{IL-34})沿IL-34的αB和αC之间的凹槽形成“静电拉链”。IL-34和YW404.33.56 Fab之间的这种强静电互补性让人联想到上文描述的IL-34/CSF-1R复合物中的位点1电荷-电荷相互作用。另外,W33^{YW404.33.56}、Y54^{YW404.33.56}、K98^{YW404.33.56}和S100^{YW404.33.56}分别与D107^{IL-34}、D107^{IL-34}、S104^{IL-34}和Q120^{IL-34}形成侧链特定氢键。此外,其他YW404.33.56主链羰基介导氢键和如表5中详述的几种其他范德瓦尔斯相互作用。IL-34的糖基化N76的糖链从相互作用界面延伸离开,并且不直接接触YW404.33.56 Fab。出乎意料地,经常介导高亲和力蛋白质-蛋白质相互作用的跨界面疏水堆积不存在于这种抗体/抗原

系统中。Fab互补位和IL-34表位之间的形状互补性是0.61,这略小于其他抗体/抗原复合物的平均值(0.64-0.68)(Lawrence等人,Journal of molecular biology 234:946-950 (1993)),表明YW404.33.56 mAb的互补位可以理论上进一步优化以实现用于紧密结合于IL-34的更高形状互补性和化学互补性。

[0400] IL-34/YW404.33.56中的IL-34分子和IL-34/CSF-1R复合物的叠加显示该Fab重链和轻链均与CSF-1R抵触。这些结果表明YW404.33.56结合至主要与负责位点1、CSF-1R D2结合的结合表位重叠的表位,并且包括来自一个IL-34原体的螺旋 α B和 α C的残基。IL-34/CSF-1R结合位点1处来自IL-34的11个残基中6个残基或 $600\text{\AA}^2$ 覆盖的溶剂可及表面积中 $220\text{\AA}^2$ 被IL-34/Fab复合物中与YW404.33.56的相互作用占据。因此,YW404.33.56与IL-34的结合将直接竞争与受体CSF-1R的结合,这解释了IL-34信号传导受YW404.33.56抑制的分子机制。

[0401] 表5. IL-34/YW404.33.56 Fab相互作用。

YW404.33.56 H 链		IL-34 mol A		距离(Å)
氢键和盐桥				
Trp33	Ne1	Asp107	Oδ1	3.5
	Ne1	Asp107	Oδ2	3.4
Arg50	Nη1	Glu111	Oε2	3.0
Arg50	Nη2	Glu111	Oε1	3.0
Tyr54	OH	Asp107	Oδ2	3.0
Lys98	Nζ	Ser104	Oγ	3.5
Gly99	N	Asp107	Oδ1	2.4
Ser100	Oγ	Gln120	Oε1	3.0
Lys100A	Nζ	Glu103	Oε1	2.8
Arg100B	Ne	Glu111	Oε2	3.7
Arg100B	Nη1	Asp107	Oδ1	3.4
Arg100B	Nη1	Asp107	O	2.9
Arg100B	Nη2	Leu109	O	2.8
Arg100B	Nη2	Glu111	Oε1	3.9
Arg100B	Nη2	Glu111	Oε2	3.2
范德瓦尔斯接触				
Thr28		Pro152		
Tyr54		Val108		
Tyr56		Leu110		
Lys98		Glu103, Asp107		
Gly99		Gln106, Trp116		
Ser100		Gln106, Trp116		
Lys100A		Glu123		
Arg100B		Leu109, Leu110, Trp116		
YW404.33.56 L 链		IL-34 mol A		距离(Å)
氢键和盐桥				
Phe92	O	Trp116	Ne1	3.3
范德瓦尔斯接触				
Phe53		Leu127		
Ser91		Trp116		
Phe92		Glu111, Lys117, Gln120		
Phe94		Glu111		
YW404.33.56 H 链		IL-34 mol B		距离(Å)
氢键和盐桥				
Tyr54	O	Asn61	Nδ2	2.7
Tyr55	O	Asn61	Nδ2	3.4
范德瓦尔斯接触				
Trp33		Ile60		
Tyr54		Ile60		
Try56		Lys55, Ile60		

[0403] 表6. IL-34/YW405.3相互作用

[0404]

YW405.3 H 链		IL-34 mol A		距离 (Å)
氢键和盐桥				
Trp52A	O	Arg170	Nη2	3.2
Tyr53	O	Arg170	Ne	2.7
	OH	Asn167	Oδ1	2.3
Gly54	O	Lys162	Nζ	2.8
Gly55	O	Tyr47	OH	2.7
Asp56	Oδ1	Lys162	Nζ	3.8
	Oδ1	Tyr47	OH	3.7
	Oδ2	Lys55	Nζ	3.6
Asp98	Oδ1	Lys63	Nζ	2.7
	Oδ1	Arg160	Nη1	2.6
	Oδ2	Lys63	Nζ	3.7
	Oδ2	Arg160	Nη1	3.2
范德瓦尔斯接触				
Tyr53		Arg73, Ile74		
Gly54		Tyr47, Asp166		
Tyr99		Arg73		
YW405.3 L 链		IL-34 mol A		距离 (Å)
氢键和盐桥				
Tyr32	OH	Leu158	O	3.5
Trp92	O	Arg160	Nη1	3.8
Glu94	N	Asn61	Oδ1	3.5
范德瓦尔斯接触				
Tyr32		Lys63		
Trp92		Asn61, Lys63, Leu158		
Ser93		Asn61		
YW405.3 L 链		IL-34 mol B		距离 (Å)
氢键和盐桥				
Ser26	O	Asn155	N	2.9
范德瓦尔斯接触				
Ala25		Pro154		
Ser26		Pro154		

[0405] 讨论

[0406] 与受体结合时IL-34中的构象变化

[0407] 这里首次报告了IL-34的基于自身和与其受体CSF-1R复合而解析的三维结构。比较其未结合形式和CSF-1R-结合形式的IL-34原体结构揭示与其受体结合时,该细胞因子的结构几乎不改变。甚至受体界面残基采用的侧链旋转异构体构象显示游离状态和结合状态之间出乎意料小的差异,表明未结合的IL-34原体高度地兼容于并引发受体结合。基于比较本文中提出的4种结构,IL-34原体结构的表观刚度与最近测定的Flt3L结构一致(Verstraete等人,Blood 118:60-68 (2011)),但是与更为塑性的CSF-1结构(Chen等人,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:18267-18272 (2008))或SCF结构(Liu等人,The EMBO journal 26:891-901

(2007);Yuzawa等人,Cell 130:323-334 (2007)) 非常不同,所述CSF-1结构或SCF结构必须经历明显的局部结构变化以容纳受体结合。然而,一旦复合物形成,则观察到二聚体界面周围一个IL-34原体相对于另一个原体的方向变化明显。通过倾角 α C描述时,受体结合或YW404.33.56结合分别引起IL-34原体之间角度的 6.6° 或 4.6° 增加。在CSF-1/CSF-1R、SCF/Kit和Flt3L/Flt3系统中先前报道过相似的较合部样刚体移动。出乎意料地,另一种抗体YW405.3触发相似的转动,但是沿反方向转动,导致倾角减少 6.4° 。这种高程度的塑性是其他二聚体4螺旋束细胞因子中前所未有的,并且可能可以归因于更小和非常疏水的IL-34二聚化界面。

[0408] IL-34和CSF-1由CSF-1R双重识别

[0409] 尽管IL-34和CSF-1在一级序列水平相似性不高,但是发现它们实际上采取相似的4螺旋束核心折叠和相关的二聚化及受体结合界面,差异分属于核心外环和结构性修饰——一项在比较螺旋状细胞因子结构时的重现性发现(Bazan,Neuron 7:197-208 (1991b);Hill等人,Journal of molecular biology 322:205-233 (2002);Rozwarski等人,Structure 2:159-173 (1994))。实际上,螺旋状细胞因子祖先的明显残余(除了三维折叠关系外)是它们相应基因的外显子/内含子结构的相似性(Bazan,Cell 65:9-10 (1991a);Betts等人,The EMBO journal 20:5354-5360 (2001));在这个方面,IL-34基因的结构与CSF-1、SCF和Flt3L基因同源。

[0410] IL-34和CSF-1均以高亲和力结合CSF-1R受体并诱导相似(如果不相同的话)生物活性(Chihara等人,Cell death and differentiation 17:1917-1927 (2010);Lin等人,Science 320:807-811 (2008))。这个惊人现象导致将人IL-34/CSF-1R复合物的结构与鼠CSF-1/CSF-1R复合物的结构直接比较以确定决定这些结构上相似但是进化上趋异的配体共享受体的分子机制。这项分析表明,CSF-1R利用共同“双界面模型”以便其与两种细胞因子相互作用。在IL-34和CSF-1R之间界面处所覆盖的溶剂可及总表面积是大约 $2400\text{\AA}^2$,显著大于CSF-1/CSF-1R界面中所覆盖的 $1700\text{\AA}^2$ 。值得注意地,与IL-34和CSF-1相互作用的CSF-1R区域大多重叠,但不相同。与这个结果一致,阻断两种细胞因子的信号传导的抗CSF-1R mAb克隆12-2D6(Chihara等人,Cell death and differentiation 17:1917-1927 (2010)),识别在CSF-1R受体的前三个结构域内部的残基1-308之间的表位。12-2D6很可能通过与受体上重叠IL-34/CSF-1结合位点的位点结合发挥作用,并且因此取消受体信号传导,无论配体是什么。与之相反,通过识别位于残基349-512之间的表位,mAb克隆2-4A5阻断CSF-1与TF-1-fms细胞结合,但是不阻断IL-34与TF-1-fms细胞结合(Chihara等人,Cell death and differentiation 17:1917-1927 (2010))。考虑到这个表位远离两种细胞因子的配体结合位点,2-4A5区分CSF-1与IL-34的能力仍是个谜。然而,空间位阻可以由这种抗体/CSF-1R复合物的仅影响CSF-1结合的特定几何形状产生。

[0411] 进一步的分析揭示两种CSF-1R信号传导复合体之间相互作用的数目和类型的巨大差异。在D1-D3内部无空位的情况下,人CSF-1R和小鼠CSF-1R的序列相同多于70%;因此允许直接比较人IL-34复合物中CSF-1R的结构与鼠CSF-1复合物中CSF-1R的结构(Chen等人,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:18267-18272 (2008))。位点1界面共有许多共同特征。两种细胞因子的CSF-1R

CD环和螺旋 α B之间的大部分极性相互作用由该受体上的相同一组碱性残基(R142、R146和R150)介导,这决定这个区域内共享的电荷互补性(图3A,B)。有趣地,CSF-1R上的这三个残基保持不变,而其他真核物种中的CSF-1R直向同源物之间,其他共享界面接触更趋异。在螺旋 α B的第二转角处位于中央的酸性残基(IL-34中的E103和CSF-1中的D59)参与两种结构中的盐桥。在CSF-1R的EF环和CSF-1中的N85之间的氢键相互作用由IL-34/CSF-1R复合物中的附近疏水区替代。最明显差异位于CSF-1R的CD环和EF环的边缘处。IL-34/CSF-1R中不存在位于K151^{CSF-1R}、K168^{CSF-1R}和E78^{CSF-1}之间两个连接环的下部边缘处的盐桥。取而代之,桥接N150^{IL-34}和R144^{CSF-1R}的独特氢键使IL-34与CD环的上班边缘密切接触。位点2界面之间的差异甚至更惊人。在那里,在CSF-1R的CD环、D链和DE环和IL-34中的螺旋 α A、 α C和 α 4之间的广泛氢键网络形成位点2处界面的核心。然而,这类相互作用在CSF-1/CSF-1R复合物中完全不存在,产生小得多的位点2界面。然而,在两种复合物中观察到涉及受体上V231的疏水相互作用。

[0412] IL-34与CSF-1细胞因子/受体复合体中CSF-1R受体D2-D3结构域方向的巨大重排

[0413] 受体结构域D1和D2的方向在两种细胞因子/受体复合体中是保守的;然而当比较两种复合物时,受体结构域D3的方向相对于D1-D2显示明显的27°变化。被IL-34接合在CSF-1R的D2和D3之间触发转动,产生一个延长、近乎线性的造型,所述造型明显不同于CSF-1结合形式的扭结构型。CSF-1R的这种总体再定向可以至少部分地归因于不寻常的IL-34分子表面,所述分子表面将在空间上与CSF-1R抵触,同时不诱导本文所报道的结构中观察到的新方向。当定位到两种细胞因子的二级结构上时,受体接触残基清晰地显示,两个相互作用位点在IL-34上均比CSF-1上更为铺展(图5A,B)。这主要归因于4-螺旋束核心外部的不寻常结构特征,即 α 3和 α 4。因此,在IL-34上产生更扁平的界面,这需要更伸展的受体构象,而CSF-1更多突入CSF-1R D2和D3之间因它们更弯曲的方向而产生的裂隙中。相邻结构域D2和D3之间的界面在CSF-1/受体复合物中最小,然而,仅这种复合物中D3 E230和D2 K194之间的盐桥在IL-34/受体复合体中破裂,从而允许D2和D3在IL-34结合时采取一种更伸展、几乎线性的布局。受体D2-D3铰合部序列¹⁹⁶NKVIPGP²⁰²完全自我重新配置,使用K197和G201作为两个枢轴点,同时使得D1-D2止于N196并使得D3始于P202,结构扰动最小。因而,D2和D3结构域之间的巨大肘状灵活性允许CSF-1R分子适合IL-34和CSF-1提供的不寻常结合表面(图5A,B)。与之相反,当SCF结合时,KIT的受体D1-D2-D3区域似乎作为刚体发挥作用,而D4和D5重新排列并介导两个结合SCF的KIT分子之间的受体-受体相互作用(Yuzawa等人,Cell 130:323-334(2007))。在Kit中,在结构域D2-D3之间存在一个明显疏水界面,它不存在于CSF-1R中。已经使用结构域间灵活性作为多种病毒蛋白利用相同宿主细胞受体以便进入的适应性机制。结构上不相关的两种蛋白质-麻疹病毒血凝素和腺病毒11/21型头节蛋白共有CD46的前两个SCR结构域,这两个结构域的接头在结构上具有相当的塑性(Cupelli等人,Journal of virology 84:3189-3200(2010);Persson 等人,Nature structural & molecular biology 14:164-166(2007);Santiago等人,Nature structural & molecular biology 17:124-129(2010))。另外,扰动受体结构域方向可以导致深刻的功能后果,如与合成性激动剂肽和拮抗剂肽复合的促红细胞生成素受体(EPOR)转动14°所展示(Livnah等人,Nature structural biology 5:993-1004(1998))。据报道与CSF-1相比,IL-34诱导更强但是更短暂的CSF-1R激活并且更快速地下调CSF-1R水平(Chihara等人,Cell death and

differentiation 17:1917-1927 (2010))。可能CSF-1R受体结构域的这种再定向可以与针对这两种细胞因子的不同亲和力联合调节其信号传导效力。

[0414] 细胞因子/CSF-1R信号传导复合体中相等间隔的CSF-1R D3-D4交界使D4、D5为简并信号传导(degenerative signaling)

[0415] 已经提出受体介导的同型相互作用在激活III型RTK中发挥不可替代的作用。这类相互作用已经在KITD4 (Yuzawa等人, Cell 130:323-334 (2007)) 和VEGFR2 D7 (Yang等人, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:1906-1911 (2010)) 的例子中在结构上捕获,或在PDGFR β 的例子中经生物化学表征 (Shim等人, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107:11307-11312 (2010))。这些相互作用的本质是两个受体KIT D4结构域 (VEGFR中的D7或PDGFR中的D4) 之间EF环中的一对相互盐桥。归因于CSF-1R和KIT之间相对高的序列同一性,由CSF-1R D4中这个保守离子对所强调的,相似的受体同型相互作用还可能在跨膜中继配体结合信号时驱动CSF-1R二聚化。鉴于本文所述的生物物理分析指示溶液中IL-34/CSF-1R复合物的2:2化学计量,晶体结构中观察到的2:1 IL-34/CSF-1R复合物很可能受晶胞堆积力影响。因此,通过在针对CSF-1R的两个IL-34原体之间应用2重对称性,对预期的完整2:2配体/受体信号传导复合体建模。将缺失的CSF-1R拷贝添加至IL-34二聚体上未占据的位点时,在这个2:2 IL-34/CSF-1R模型中CSF-1R D3的两个C末端之间的距离(**60 Å**)与2:2 CSF-1/CSF-1R模型(**62 Å**)中和2:2 SCF/Kit结构(**64 Å**)中的对应距离十分相似(图6)。总之,虽然CSF-1R D2-D3之间的铰合部可以采取非常不同构象以适应两种细胞因子的迥异表面形状,然而D2-D3的再定向导致D3-D4交界在两个细胞因子/受体信号传导复合体中均等地间隔,从而将CSF-1D4展示为同型相互作用的汇集点以激发下游简并反应。

[0416] CSF-1R中的配体结合混杂性利用来自共享型造血细胞因子受体的不寻常机制

[0417] 已经对许多共享型细胞因子受体如共同 γ 链 (γ c)、gp130和干扰素 α 受体 (IFNAR1/2) 解释了细胞因子结合混杂性的分子机制,原因是这些细胞因子受体均已经在结构上以至少两种不同配体结合状态捕获 (Thomas等人, Cell 146:621-632 (2011); Wang等人, Annual review of immunology 27:29-60 (2009))。 γ c和gp130的胞外结构域均含有一个由两个Ig样纤连蛋白III型 (FNIII) 结构域组成的细胞因子结合同源区 (CHR) (Wang等人, Annual review of immunology 27:29-60 (2009))。虽然细胞因子结合位点位于两种共享型I类细胞因子受体中结构域间交界处,但是通过比较IL-2/ γ c四元复合物与IL-4/ γ c三元复合物 (LaPorte等人, Cell 132:259-272 (2008); Wang等人, Science 310:1159-1163 (2005)) 或比较无配体的gp130与三种gp130家族细胞因子复合物 (Boulanger等人, Molecular cell 12:577-589 (2003a); Boulanger等人, Science 300:2101-2104 (2003b); Bravo等人, The EMBO journal 17:1665-1674 (1998); Chow等人, Science 291:2150-2155 (2001)), 未观察到明显的肘状移动。甚至与不同细胞因子结合时, γ c和gp130中界面残基的旋转异构态 (rotameric states) 基本上保持不变 (Wang等人, Annual review of immunology 27:29-60 (2009))。 γ c和gp130使用“化学惰性互补表面”, 连同被外周极性区域包围的共享疏水核心区域, 以分别识别短链细胞因子和长链细胞因子 (Boulanger等人, Molecular cell 12:577-589 (2003a); Wang等人, Annual review of immunology 27:29-

60 (2009))。最近测定的I型IFN受体复合体揭示,旁系同源物IFN α 2和IFN ω 夹在IFNAR1的前三个FNIII结构域(SD1-SD3)和更紧凑的IFNAR2的两个FNIII样结构域(D1,D2)之间(Thomas等人,Ce11 146:621-632 (2011))。有趣地,虽然当IFN结合时N端SD1结构域相对于IFNAR1的SD2-SD3区段转动,不过一旦与IFN结合,则IFNAR1显示近乎相同的构象,无论结合的细胞因子的身份是什么。IFNAR1和IFNAR2均依赖于I型IFN表面上的一些保守“锚定点”残基用于交叉反应性(Thomas等人,Ce11 146:621-632 (2011))。然而,许多较不保守的氨基酸间插在保守的IFN结合表面的格局之间,用于精细调节它们各自针对受体的结合亲和力。

[0418] 通过比较,CSF-1R混杂性的结构基础与前述共享型细胞因子受体非常不同。CSF-1R上的核心和外周结合界面构造或多或少地类似于I类细胞因子/受体识别范式,虽然CSF-1R主要使用位点1中的极性相互作用作为其核心,替代如 γ c和gp130中观察到的疏水相互作用。CSF-1R更大程度地明显依赖于使得交叉反应性成为可能的其构象塑性(一种在其他共享型细胞因子受体中未见的结构性适应)。考虑到IL-34仅与CSF-1共享11%序列同一性并且已经逃避预示性生物信息学程序识别(Conklin等人,Bioinformatics 21:1776-1781 (2005)),这可能不令人惊讶,尽管更灵敏的折叠识别方法更好(JFB,未发表)。通过结构域间结构塑性和界面残基的组成变化的组合,CSF-1R设法在进化期间保持针对IL-34和CSF-1的可观亲和力。这提供一种非常有效尽管并非唯一的简并识别远缘相关性螺旋状细胞因子的机制,如其他细胞因子系统中见证。

[0419] 实施例2:人抗IL-34抗体的表征

[0420] 方法

[0421] 借助竞争ELISA的表位定位

[0422] 将ELISA平板用PBS中的1H μ IL-34flag (1 μ g/mL) 在4 $^{\circ}$ C包被过夜或在室温包被2小时并使用含1%BSA和0.15%Tween 20的PBS封闭。将浓度30纳摩尔的生物素酰化YW404.33抗体添加至待测的初始浓度为300纳摩尔的抗IL-34抗体的7倍连续稀释物中。在室温短暂预孵育抗体混合物。随后将混合物添加至包被的ELISA平板并在室温孵育约30分钟至约1小时。将平板洗涤并且用SA-HRP检测结合的生物素酰化抗体。使用抗 μ IL-34和赫赛汀作为这个测定法中的对照。

[0423] 结果

[0424] 使用噬菌体展示技术生成抗IL-34抗体并如实施例1中所述,在基于细胞的测定法中测试其中和IL-34活性的能力。例如,在图9A中显示抗IL-34抗体YW404.1、YW404.6和YW404.33的中和活性。比较这些抗体对人IL-34与鼠IL-34的特异性以及它们的阻断活性和结合亲和力(表7)。另外,在竞争ELISA中测试这些抗体以确定它们是否与IL-34上的重叠表位结合(表7)。

[0425] 表7:YW404.1、YW404.6、YW404.33的比较

[0426]

	h/m特异性	阻断活性	结合亲和力	表位
YW404.1	交叉	++	+++	不同
YW404.6	鼠	++	+	与YW404.33重叠
YW404.33	交叉	+++	+++	与YW404.6重叠

[0427] 随后使用柔性随机化策略,使几种人抗IL-34抗体发生亲和力成熟,并且如实施例

1中所述测量它们的亲和力。在基于细胞的中和测定法中如实施例1中所述进一步测试亲和力成熟的抗体。如图9B中所示,亲和力改善与抗IL-34抗体YW404.33、YW404.33.12和YW404.33.56的更好细胞阻断活性相关。

[0428] 另外,基于抗体中和IL-34对单核细胞MNFS60的生物活性的能力,测定IC₅₀值。为测量抗体中和加FLAG标签的mIL-34对MNFS50的生物活性的能力,使用**CellTiter-Glo®**的细胞增殖测定法。基于针对IL-34连续稀释物的细胞反应,选择50ng/mL的IL-34量用于确定抗体中和活性。半数最大抑制浓度(IC₅₀)定义为当IL-34以激发70-80%增殖反应的浓度存在时,为了在细胞上产生IL-34活性的半数最大抑制所需要的抗体浓度。

[0429] 将50ng/mL hIL-34与抗IL-34mAb的连续稀释物组合,之后,添加到细胞上,总体积100ul。在37℃处孵育平板72小时后,通过测量RLU获得抗体抑制活性。用Kaleida Graph计算IC₅₀。例如,抗IL-34AbsYW404.33.56、404.33和YW404.33.93分别具有20.21ng/mL、77.42ng/mL和31.62ng/mL的IC₅₀值。

[0430] 图10A和10B中显示这些抗体以及YW404.1、YW404.6、YW405.3、YW404.33.10、YW404.33.12和YW404.33.11的可变重链和可变轻链和CDR区的序列。

[0431] 实施例3:使用抗CSF-1抗体和抗IL-34抗体的组合抑制小鼠中DSS诱导型炎症肠病。

[0432] 方法

[0433] 将Balb/c小鼠预称重并在处理之前随机分组并如下处理。组1(每组n=8)在整个实验期间接受不含硫酸葡聚糖钠(DSS)的正常饮用水。从实验第0日至第6日,组2-6用含3% DSS的饮用水(硫酸葡聚糖钠3g/100ml(3%))持续饲养。在第6日后,组2-6接受不含DSS的正常饮用水直至处死。将组2用400ug抗豚草抗体(a-RW-mIgG2 a)每隔1日处理,始于第0日之前一日直至第8日,作为阴性对照。将组3用0.9%氯化钠中的25mg/kg环孢菌素A(CSA)腹膜内每日处理,始于第0日之前一日直至第8日。将组4用200ug抗CSF-1抗体(大鼠抗体ATCC#CRL-2702,克隆5A1)和200ug a-RW抗体每隔1日处理,始于第0日之前一日直至第8日。将组5用200ug抗IL-34抗体(YW404.33.12)和200ug a-RW抗体每隔1日处理,始于第0日之前一日直至第8日。将组6用200ug抗CSF-1抗体(大鼠抗体ATCC#CRL-2702,克隆5A1)和200ug抗IL-34抗体(YW404.33.12)每隔1日处理,始于第0日之前一日直至第8日。全部小鼠均在第8日处死并且基于参数如隐窝丧失和炎症细胞(包括T细胞、B细胞和巨噬细胞)浸润确定其结肠炎严重性评分。

[0434] 结果

[0435] 与用对照a-RW抗体处理的小鼠相比,用抗IL-34抗体或抗CSF-1抗体处理的具有DSS诱导型IBD的小鼠显示降低的结肠炎严重性评分。在这个IBD模型中,使用抗CSF-1抗体和抗IL-34抗体的组合抑制CSF-1和IL-34甚至更多有效(图11)。

[0436] 通过测量对照(无DSS)小鼠和用对照抗体(a-RW)处理的具有DSS诱导型IBD的小鼠中IL-34和CSF-1的血清水平,进一步支持IL-34和CSF-1参与IBD。使用ELISA确定CSF-1和IL-34的水平。与对照小鼠相比,用对照抗体处理的具有DSS诱导型IBD的小鼠显示升高的IL-34和CSF-1水平(图12)。

[0437] 实施例4-人RA患者中的IL-34和CSF-1

[0438] 图13中显示来自类风湿性关节炎患者的血清、滑液和组织中CSF-1、IL-34和TNFα

蛋白的表达。在这些流体中, IL-34以低于CSF-1和TNF α 的水平表达。采用抗IL-34抗体的RA患者的滑膜组织的IHC染色显示IL-34可能富集在组织/胞外基质 (ECM) 中。

[0439] 图14中显示测量RA患者的关节中髓样亚型基因的基因表达的微阵列结果, 其中所述RA患者 (A) 应答于TNF阻断 (TNF-R) 或不应答于TNF阻断 (TNF-NR) 或 (B) 在用TNF阻断治疗无应答后用利妥昔单抗治疗。利妥昔单抗非应答者是“利妥昔单抗NR”并且利妥昔单抗应答者是“利妥昔单抗R”。对于抗TNF应答者 (TNF-R), 髓样亚型富集。结果还表明CSF1/IL34途径参与原发性和继发性TNF-NR RA患者。由于IL-34和CSF1的转录物在TNF-NR和利妥昔单抗NR中以高水平存在, 因而IL-34/CSF1途径可能显著地在不应答于抗TNF α 或利妥昔单抗治疗的这些患者中促进致病性。出于临床益处, 可能需要在这些患者中阻断两种细胞因子。

[0440] 实施例5-CIA模型中抑制IL-34和CSF-1

[0441] 在小鼠CIA模型中针对TNFR1I-Fc比较抗CSF1抗体与抗IL34抗体的处理组合 (图15)。将DBA-1J小鼠用在CFA中的牛胶原蛋白II型在第0日和第21日通过皮内注射。随后每日监测关节炎评分。在第24日或第31日 (关节炎建立, 临床评分=4) 启动抗体治疗在终止之前持续7周。抗体治疗是: α -豚草 (抗体mIgG2a同种型对照)、TNFR1I-Ig (mIgG2a)、抗 μ CSF1 (自制、mIgG2a)、抗IL-34 (YW404.33.12、mIgG2a)、抗mCSF1+抗IL-34 (3和4的组合)、抗mCSF1 (DANA)+抗IL-34 (YW404.33.12 DANA)。将全部动物 (n=10/组) 用以上试剂200ug/动物、3次/周腹膜内治疗, 在终止之前持续7周。终点PD包括纵向临床评分、组织病理学 (爪和相关组织), FACS (组织单核细胞亚群和Mf) 和骨体积 (uCT) 分析。

[0442] 本研究显示采用抗CSF1抗体和抗IL-34抗体的组合时, 可比地或趋势更好地抑制临床评分和组织学评分 (炎症、纤维增生症、软骨), 优于TNFR1I-Fc, 特别采用具有降低的ADCC活性的抗体 (即, DANA突变是Fc区内的D265A、N297A) 时。另外, 与TNFR1I-Fc相比, 用 α CSF1+ α IL-34的组合治疗明显在保护免遭骨侵蚀方面优越, 并且另外, 用抗CSF1和抗IL-34抗体的组合治疗优于采用单独任一种抗体治疗。

[0443] 实施例6-额外的IBD模型中抑制IL-34和CSF-1

[0444] 在另一个IBD模型中, 在C57BL/6J雌性6-8周龄小鼠中诱导DSS结肠炎 (图16)。对C57BL/6J小鼠口服施用3%DSS持续5日以诱导特征为上皮损伤、可逆体重减轻和大肠中嗜中性细胞浸润的急性结肠炎。在-1日启动抗体治疗, 总计4个剂量。在第8日终止研究以便分析。治疗组 (n=10/组): 3%DSS+ α -豚草 (mIgG2a对照, 400ug/小鼠, 腹膜内)、3%DSS+ α -mCSF1Ab (自制, 200ug/小鼠, 腹膜内)、3%DSS+ α -IL-34Ab (YW404.33.12, 200ug/小鼠, 腹膜内)、3%DSS+ α -mCSF1/ α -IL-34 (200ug/小鼠 α -CSF1和200ug/小鼠 α -IL-34, 腹膜内)。地塞米松以0.5mg/kg, QD, 腹膜内施用。未用过药的小鼠不用DSS处理。使用抗豚草抗体作为阴性对照。在终止后, 读取这个模型的结肠组织学评分。

[0445] 分析TNF Δ ARE结肠炎小鼠显示当存在较高的髓样细胞增殖和激活时, 存在较高的CSF-1/IL-34和CSF-1R蛋白和mRNA表达 (数据未显示)。在TNF Δ ARE小鼠脾中, Mf和单核细胞显著增殖和活化。与野生型 (wt) 小鼠相比, TNF Δ ARE小鼠在肠组织中产生更高的CSF-1和IL-34。与野生型小鼠相比, 在TNF Δ ARE小鼠回肠中观察到更高的CSF-1R、CSF1和IL-34mRNA表达水平。

[0446] 实施例7-人局限性回肠炎患者和UC患者中的IL-34和CSF-1

[0447] 分析来自患有局限性回肠炎或溃疡性结肠炎的人类患者的血清和组织的CSF-1和

IL-34蛋白,显示IL-34以非常低的水平在血清中表达,但是以较高水平在组织中表达。在另一方面,CSF-1在血清中并在组织中良好表达(图17)。这种组织数据进一步支持以下观点;在炎性肠病(包括溃疡性结肠炎和局限性回肠炎)中抑制IL-34和CSF1二者将优于用单独任何一种抑制剂治疗IBD患者。

[0448] 在RA患者中,IL-34蛋白表达低于CSF1,但是在血清和滑液中可容易地检出。在这些相同的患者中,CSF-1蛋白在血清和滑液中均高度表达(图13)。

[0449] 对RA患者和骨关节炎患者的滑液中IL-34、CSF-1和TNF α 蛋白的分析显示,在类风湿性关节炎患者和骨关节炎患者中的那些流体中,在IL-34/CSF-1和TNF α 的表达水平之间不存在相关性(图18)。因此,数据表明,患有RA和骨关节炎的患者具有不同分子概况(即TNF α 表达与CSF-1/IL-34表达),尽管他们的表型相似。

[0450] 实施例8-对IL-34和CSF-1的抑制减少髓样细胞浸润

[0451] 如前文提到建立小鼠CIA。从用a-CSF1+a-IL-34组合抗体或抗豚草治疗2次的小鼠采集动物关节滑膜细胞/组织,所述治疗始于第39日(建立CIA,临床评分=4)=在7日时间(n=3/样品)。在7日治疗后使动物安乐死。收集关节滑膜组织/细胞并经胶原蛋白酶消化制备单细胞悬液。将细胞用标记的抗-CD11b、Ly6C、Ly6G和F4/80抗体(购自BD Biosystem)染色。通过流式细胞仪分析标记的细胞以限定髓样亚群(Mf:CD11b+/F480+,炎性单核细胞:CD11b+/Ly6C+/Ly6Glow和居民(residential)单核细胞:CD11b+/Ly6G+/Ly6Clow)。

[0452] 该数据显示在可以观察到任何临床益处之前,仅7日抗CSF1/IL-34组合治疗已经患有关节炎的动物后浸润关节滑膜的小鼠髓样细胞(Mf和单核细胞)减少。这显示,因联合疗法抑制作用所致的髓样抑制的主要机制是滑膜中髓样细胞移行、浸润或扩充减少。

[0453] 虽然已经出于清晰理解目的,以说明和举例方式某种程度地详细描述前述发明,但是这些说明和例子不应当解释为限制本发明的范围。本文中援引的全部专利和科学文献的公开内容通过引用方式明确地完整并入。这些公开包括作为Ma等人,(2012) Structure 20:676-687引用的出版物和2012年2月6日提交的美国临时申请号61,595,658和2012年8月7日提交的美国临时申请号61/680,674,其中本申请要求来自所述文献的权益,所述文献均通过引用的方式完整引用。

序 列 表

<110> 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

<120> 使用 CSF1R 抑制剂的组合物和方法

<130> P4836R1-W0

<140>

<141> 2013-02-06

<150> US 61/680,674

<151> 2012-08-07

<150> US 61/595,658

<151> 2012-02-06

<160> 87

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

[0001]

<210> 1

<211> 242

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```
Met Pro Arg Gly Phe Thr Trp Leu Arg Tyr Leu Gly Ile Phe Leu Gly
 1           5           10           15
Val Ala Leu Gly Asn Glu Pro Leu Glu Met Trp Pro Leu Thr Gln Asn
      20           25           30
Glu Glu Cys Thr Val Thr Gly Phe Leu Arg Asp Lys Leu Gln Tyr Arg
      35           40           45
Ser Arg Leu Gln Tyr Met Lys His Tyr Phe Pro Ile Asn Tyr Lys Ile
      50           55           60
Ser Val Pro Tyr Glu Gly Val Phe Arg Ile Ala Asn Val Thr Arg Leu
65           70           75           80
Gln Arg Ala Gln Val Ser Glu Arg Glu Leu Arg Tyr Leu Trp Val Leu
      85           90           95
Val Ser Leu Ser Ala Thr Glu Ser Val Gln Asp Val Leu Leu Glu Gly
      100          105          110
His Pro Ser Trp Lys Tyr Leu Gln Glu Val Glu Thr Leu Leu Leu Asn
```

115	120	125
Val Gln Gln Gly Leu Thr Asp Val Glu Val Ser Pro Lys Val Glu Ser		
130	135	140
Val Leu Ser Leu Leu Asn Ala Pro Gly Pro Asn Leu Lys Leu Val Arg		
145	150	155
Pro Lys Ala Leu Leu Asp Asn Cys Phe Arg Val Met Glu Leu Leu Tyr		
165	170	175
Cys Ser Cys Cys Lys Gln Ser Ser Val Leu Asn Trp Gln Asp Cys Glu		
180	185	190
Val Pro Ser Pro Gln Ser Cys Ser Pro Glu Pro Ser Leu Gln Tyr Ala		
195	200	205
Ala Thr Gln Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Trp Ser Pro Ser Ser Pro Pro		
210	215	220
His Ser Thr Gly Ser Val Arg Pro Val Arg Ala Gln Gly Glu Gly Leu		
225	230	235
Leu Pro		240

[0002]

<210> 2

<211> 972

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His		
1	5	10
Gly Gln Gly Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val		
20	25	30
Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val		
35	40	45
Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly		
50	55	60
Ser Ser Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly		
65	70	75
Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala		
85	90	95
Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala		
100	105	110
Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu		
115	120	125
Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg		
130	135	140
Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His		

	145	150	155	160
	Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln			
		165	170	175
	Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg			
		180	185	190
	Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val			
		195	200	205
	Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys			
		210	215	220
	Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn			
	225	230	235	240
	Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg			
		245	250	255
	Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His			
		260	265	270
	Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser			
		275	280	285
	Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser			
		290	295	300
	Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn			
	305	310	315	320
[0003]	Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp			
		325	330	335
	Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala			
		340	345	350
	Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu			
		355	360	365
	Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg			
		370	375	380
	Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr			
	385	390	395	400
	Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr			
		405	410	415
	Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu			
		420	425	430
	Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln			
		435	440	445
	Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His			
		450	455	460
	Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn			
	465	470	475	480
	Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp			
		485	490	495
	Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu			

	500	505	510
	Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu		
	515	520	525
	Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro		
	530	535	540
	Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser		
	545	550	555
	Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu		
	565	570	575
	Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala		
	580	585	590
	Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp		
	595	600	605
	Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala		
	610	615	620
	Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu		
	625	630	635
	Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly		
	645	650	655
	Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu		
	660	665	670
[0004]	Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser		
	675	680	685
	Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu		
	690	695	700
	Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val		
	705	710	715
	Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser		
	725	730	735
	Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu		
	740	745	750
	Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe		
	755	760	765
	Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val		
	770	775	780
	Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala		
	785	790	795
	Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg		
	805	810	815
	Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr		
	820	825	830
	Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile		
	835	840	845
	Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys		

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Thr
			20					25					30		
Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ala	Arg	Ile	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Gly	Leu	Gly	Lys	Gly	Ser	Lys	Arg	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp
		100						105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115						120							

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 4

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

[0006]

<210> 5
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 5

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Leu Gly Lys Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 6

[0007] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Leu Gly Lys Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

[0008]

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 8

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

<210> 9

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 9

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1             5             10             15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr
          20             25             30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35             40             45
Ala Arg Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
          50             55             60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65             70             75             80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85             90             95
Ala Arg Gly Leu Gly Lys Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp
          100            105            110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115            120

```

[0009]

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 10

```

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

```

				85					90				95
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg		
				100					105				

<210> 11

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 11

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Thr
				20					25					30	
Trp	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				35					40					45	
Ala	Arg	Ile	Ser	Pro	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
				50					55					60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
				65					70					75	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Leu	Gly	Lys	Gly	Ser	Lys	Arg	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp
				100					105					110	
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
				115					120						

[0010]

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 12

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

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

<210> 13

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

[0011]

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr			
20	25	30	
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Arg Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Gly Ile Asn Gln Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp			
100	105	110	
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 14

```

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

```

[0012]

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 15

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Asn
           20           25           30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ala Ser Ile Thr Pro Ala Ser Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
           50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Ser Arg Gly Ala Tyr Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
           100           105           110

```

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 16

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

[0013]

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 18

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
1				5					10			

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

[0014]

<400> 19

Arg	Phe	Thr	Tle	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 20

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 21

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 22

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1

5

10

15

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 23

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1

5

10

15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

[0015]

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 24

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

1

5

10

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

[0016]

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser His Ile Asp Trp Tyr Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Gly Gly Pro Asp Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 26

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

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

[0017]

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 27

Ala Arg Gly Ile Asn Gln Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp
1 5 10

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 28

Ala Arg Gly Leu Gly Lys Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp
1 5 10

<210> 29

	<211> 10
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成的构建体
	<400> 29
	Ala Arg Ser Arg Gly Ala Tyr Arg Phe Ala
	1 5 10
	<210> 30
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成的构建体
	<400> 30
	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr
	1 5
	<210> 31
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成的构建体
	<400> 31
	Gly Phe Thr Phe Thr Ser Asn
	1 5
	<210> 32
	<211> 13
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>

[0018]

<223> 合成的构建体

<400> 32

Gly Ile Asn Gln Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 33

Gly Leu Gly Lys Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

[0019]

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 34

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr
1 5 10

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 35

Pro Ala Ser Gly Asp
1 5

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 36

Pro Tyr Ser Gly Tyr

1

5

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

[0020]

<400> 37

Pro Tyr Tyr Tyr Tyr

1

5

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 38

Gln Gln Ser Phe Tyr Phe Pro Asn

1

5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 39

Gln Gln Ser Phe Tyr Phe Pro Asn Thr
1 5

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 40

Gln Gln Ser Arg Thr Ala Arg Pro
1 5

[0021]

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 41

Gln Gln Ser Arg Thr Ala Arg Pro Thr
1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

[0022]

<400> 42

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro

1

5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 43

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1

5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 44

Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Pro Tyr

1

5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 45

Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Pro Tyr Thr

1

5

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 46

Gln Gln Tyr Ser Asp Val Pro Tyr

1

5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

[0023]

<400> 47

Gln Gln Tyr Ser Asp Val Pro Tyr Thr

1

5

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 48

Gln Gln Tyr Thr Ala Leu Pro Tyr

1

5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 49

Gln Gln Tyr Thr Ala Leu Pro Tyr Thr

1

5

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 50

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1

5

10

[0024]

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 51

Arg Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 52

Arg Ile Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 53

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

[0025]

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 54

Ser Ile Thr Pro Ala Ser Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 55

Ser Asn Tyr Ile His

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 56

Ser Arg Gly Ala Tyr Arg Phe Ala Tyr

1 5

<210> 57

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

[0026]

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 57

Ser Ser Thr Trp Ile His

1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 58

Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr

1 5

<210> 59

	<211> 5
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成的构建体
	<400> 59
	Ser Thr Trp Ile His
	1 5
	<210> 60
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成的构建体
	<400> 60
[0027]	Thr Ser Asn Tyr Ile His
	1 5
	<210> 61
	<211> 13
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成的构建体
	<400> 61
	Trp Val Ala Arg Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn
	1 5 10
	<210> 62
	<211> 13
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>

<223> 合成的构建体

<400> 62

Trp	Val	Ala	Arg	Ile	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Asp
1				5						10		

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 63

Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Thr	Pro	Ala	Ser	Gly	Asp	Thr	Asp
1				5					10			

[0028]

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<221> 变体

<222> 2

<223> Xaa = Asn 或 Thr

<221> 变体

<222> 3

<223> Xaa = Tyr 或 Trp

<400> 64

Ser	Xaa	Xaa	Ile	His
1			5	

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<221> 变体

<222> 1

<223> Xaa = Ser 或 Arg

<221> 变体

<222> 3

<223> Xaa = Thr 或 Ser

<221> 变体

<222> 5

<223> Xaa = Ala 或 Tyr

<221> 变体

<222> 6

<223> Xaa = Ser 或 Tyr

[0029]

<221> 变体

<222> 7

<223> Xaa = Gly 或 Tyr

<221> 变体

<222> 8

<223> Xaa = Asp 或 Tyr

<221> 变体

<222> 9

<223> Xaa = Thr 或 Ser

<221> 变体

<222> 10

<223> Xaa = Asp 或 Asn

<400> 65

Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

	<210> 66
	<211> 13
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成的构建体
	<221> 变体
	<222> 2
	<223> Xaa = Leu 或 Ile
	<221> 变体
	<222> 3
	<223> Xaa = Gly 或 Asn
	<221> 变体
	<222> 4
	<223> Xaa = Lys 或 Gln
	<400> 66
[0030]	Gly Xaa Xaa Xaa Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr
	1 5 10
	<210> 67
	<211> 11
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> 合成的构建体
	<221> 变体
	<222> 3
	<223> Xaa = Ser 或 Tyr
	<221> 变体
	<222> 5
	<223> Xaa = Tyr, Thr, Ser, Phe, 或 Arg
	<221> 变体
	<222> 7
	<223> Xaa = Thr, Ala, Asp, 或 Tyr

<221> 变体
 <222> 8
 <223> Xaa = Thr, Leu, Val, Phe, 或 Ala

<221> 变体
 <222> 9
 <223> Xaa = Pro 或 Arg

<221> 变体
 <222> 10
 <223> Xaa = Pro, Tyr, 或 Asn

<400> 67
 Gln Gln Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
 1 5 10

<210> 68
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> 智人

[0031]

<400> 68
 Asn Glu Pro Leu Glu Met Trp Pro Leu Thr Gln Asn Glu Glu Cys Thr
 1 5 10 15
 Val Thr Gly Phe Leu Arg Asp Lys Leu Gln Tyr Arg Ser Arg Leu Gln
 20 25 30
 Tyr Met Lys His Tyr Phe Pro Ile Asn Tyr Lys Ile Ser Val Pro Tyr
 35 40 45
 Glu Gly Val Phe Arg Ile Ala Asn Val Thr Arg Leu Gln Arg Ala Gln
 50 55 60
 Val Ser Glu Arg Glu Leu Arg Tyr Leu Trp Val Leu Val Ser Leu Ser
 65 70 75 80
 Ala Thr Glu Ser Val Gln Asp Val Leu Leu Glu Gly His Pro Ser Trp
 85 90 95
 Lys Tyr Leu Gln Glu Val Glu Thr Leu Leu Leu Asn Val Gln Gln Gly
 100 105 110
 Leu Thr Asp Val Glu Val Ser Pro Lys Val Glu Ser Val Leu Ser Leu
 115 120 125
 Leu Asn Ala Pro Gly Pro Asn Leu Lys Leu Val Arg Pro Lys Ala Leu
 130 135 140
 Leu Asp Asn Cys Phe Arg Val Met Glu Leu Leu Tyr Cys Ser Cys Cys
 145 150 155 160

Lys Gln Ser Ser Val Leu Asn Trp Gln Asp Cys Glu Val
165 170

<210> 69

<211> 173

<212> PRT

<213> 猕猴 (Macaca mulatta)

<400> 69

Asn Glu His Leu Glu Ile Trp Pro Leu Thr Gln Ser Glu Glu Cys Thr
1 5 10 15
Val Thr Gly Phe Leu Arg Asp Lys Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Leu Gln
20 25 30
Tyr Met Lys His Tyr Phe Pro Ile Asn Tyr Lys Ile Ser Val Pro Tyr
35 40 45
Glu Gly Val Phe Arg Ile Ala Asn Val Thr Arg Leu Gln Arg Ala Arg
50 55 60
Val Ser Glu Arg Glu Leu Arg Tyr Leu Trp Val Leu Val Ser Leu Ser
65 70 75 80
Ala Thr Glu Ser Val Gln Asp Val Leu Leu Asp Gly His Pro Ser Trp
85 90 95
[0032] Lys Tyr Leu Gln Glu Val Gln Thr Leu Leu Leu Asn Val Gln Lys Gly
100 105 110
Leu Met Asp Val Glu Val Ser Pro Lys Val Glu Ser Val Leu Ser Leu
115 120 125
Leu Asn Ala Pro Gly Pro Asn Leu Lys Pro Val Arg Pro Lys Ala Leu
130 135 140
Leu Asp Asn Cys Phe Arg Val Met Glu Leu Leu Tyr Cys Ser Cys Cys
145 150 155 160
Lys Gln Ser Ser Val Leu Asn Trp Gln Asp Cys Glu Val
165 170

<210> 70

<211> 173

<212> PRT

<213> 家犬 (Canis lupus familiaris)

<400> 70

Asn Gln Gly Leu Glu Met Trp Pro Leu Thr Gln Asn Glu Glu Cys Ala
1 5 10 15
Val Thr Gly Phe Leu Arg Asp Lys Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Leu Gln
20 25 30

```

Tyr Met Lys His Tyr Phe Pro Ile Asn Tyr Arg Val Ser Val Pro Tyr
    35              40              45
Glu Gly Val Leu Arg Met Ala Asn Ile Thr Arg Leu Gln Arg Ala Arg
    50              55              60
Val Ser Gln Gln Glu Leu Arg Tyr Leu Trp Val Trp Val Ser Leu Ser
    65              70              75              80
Ala Thr Glu Ser Val Gln Glu Val Leu Leu Glu Gly His Pro Ser Trp
              85              90              95
Lys Tyr Leu Glu Asp Val His Thr Leu Leu Leu Asp Val Gln Gln Ser
    100              105              110
Leu Thr Asp Val Glu Val Gly Pro Lys Val Glu Ala Val Val Ser Leu
    115              120              125
Leu Ser Ala Pro Arg Leu Ser Leu Lys Leu Val Arg Pro Lys Ala Leu
    130              135              140
Leu Asp Asn Cys Phe Arg Val Met Glu Leu Leu Tyr Cys Ser Cys Cys
    145              150              155              160
Lys Gln Ser Ser Val Leu Asn Trp Gln Asp Cys Glu Val
              165              170

```

[0033]

<210> 71

<211> 173

<212> PRT

<213> 大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*)

<400> 71

```

Asn Glu Gly Leu Glu Met Trp Pro Leu Thr Gln Thr Glu Glu Cys Ala
    1              5              10              15
Ile Thr Gly Phe Leu Arg Asp Lys Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Leu Gln
              20              25              30
Tyr Met Lys His Tyr Phe Pro Ile Asn Tyr Arg Val Gly Val Pro Tyr
    35              40              45
Glu Gly Val Leu Arg Met Ala Asn Ile Thr Arg Leu Gln Arg Ala Arg
    50              55              60
Val Ser Gln Gln Glu Leu Arg Tyr Leu Trp Val Trp Val Ser Leu Ser
    65              70              75              80
Ala Thr Glu Ser Val Gln Glu Val Leu Leu Glu Gly His Pro Ser Trp
              85              90              95
Lys Tyr Leu Lys Glu Val His Thr Leu Leu Leu Asp Val Gln Gln Ser
    100              105              110
Leu Arg Asp Val Glu Val Ser Pro Lys Val Asp Ala Thr Val Ser Leu
    115              120              125
Leu Ser Ala Pro Arg Leu Ser Leu Lys Leu Val Arg Pro Lys Ala Leu
    130              135              140

```

Leu Asp Asn Cys Phe Arg Val Met Glu Leu Leu Tyr Cys Ser Cys Cys
145 150 155 160
Lys Gln Ser Ser Val Leu Asn Trp Gln Asp Cys Glu Leu
165 170

<210> 72

<211> 173

<212> PRT

<213>野马(Equus caballus)

<400> 72

Asn	Lys	Gly	Leu	Glu	Val	Trp	Pro	Leu	Thr	Gln	Ser	Glu	Glu	Cys	Ala
1				5					10					15	
Val	Thr	Gly	Phe	Leu	Arg	Asp	Lys	Leu	Gln	Tyr	Arg	Asn	Arg	Leu	Gln
			20					25					30		
Tyr	Met	Lys	His	Tyr	Phe	Pro	Ile	Asn	Tyr	Arg	Val	Ser	Val	Pro	Tyr
		35					40					45			
Glu	Gly	Val	Leu	Arg	Met	Ala	Asn	Val	Thr	Arg	Leu	Gln	Arg	Ala	Arg
		50				55					60				
Val	Ser	Gln	Gln	Glu	Leu	Arg	Tyr	Leu	Trp	Val	Trp	Val	Ser	Leu	Ser
65					70					75					80
Ala	Thr	Glu	Trp	Val	Gln	Glu	Val	Leu	Leu	Glu	Asp	His	Pro	Ser	Trp
			85						90					95	
Lys	Tyr	Leu	Glu	Glu	Val	His	Thr	Leu	Leu	Leu	Asp	Val	Gln	Gln	Ser
		100						105					110		
Leu	Arg	Asp	Val	Glu	Val	Ser	Pro	Gln	Val	Glu	Ala	Val	Leu	Ser	Leu
		115					120				125				
Leu	Ser	Ala	Pro	Gly	Leu	Ser	Leu	Lys	Leu	Val	Arg	Pro	Lys	Ala	Leu
	130				135					140					
Leu	Asp	Asn	Cys	Phe	Arg	Val	Met	Glu	Leu	Leu	Tyr	Cys	Pro	Cys	Cys
145				150						155					160
Lys	His	Ser	Ser	Val	Leu	Asn	Trp	Gln	Asp	Cys	Glu	Leu			
			165					170							

<210> 73

<211> 172

<212> PRT

〈213〉普通牛(Bos taurus)

<400> 73

Asn Glu Gly Leu Glu Pro Trp Pro Leu Thr Arg Ser Asp Glu Cys Ala
1 5 10 15


```

Ile Thr Gly Phe Leu Arg Asp Lys Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Leu Gln
    20                      25                      30
Tyr Met Lys His Tyr Phe Pro Ile Asn Tyr Arg Val Ser Val Pro Tyr
    35                      40                      45
Glu Gly Val Leu Arg Thr Ala Asn Val Thr Arg Leu Gln Arg Ala Gln
    50                      55                      60
Val Ser Gln Gln Glu Leu Arg Tyr Leu Trp Val Leu Val Ser Leu Ser
    65                      70                      75                      80
Ala Thr Glu Trp Val Gln Glu Val Leu Leu Glu Gly His Pro Ser Trp
    85                      90                      95
Lys Tyr Leu Glu Glu Val His Thr Leu Leu Leu Asp Val Lys Gln Gly
    100                     105                     110
Leu Gly Gly Val Glu Val Ser Pro Gln Val Glu Ala Val Leu Asn Leu
    115                     120                     125
Leu Ser Ala Pro Gly Ser Leu Lys Leu Val Arg Pro Lys Ala Leu Leu
    130                     135                     140
Asp Asn Cys Phe Arg Val Met Gln Leu Leu Tyr Cys Pro Cys Cys Lys
    145                     150                     155                     160
Glu Ser Ser Val Leu Asn Trp Gln Asp Cys Glu Ala
    165                     170

```

[0035]

<210> 74
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 74
 Asn Glu Asn Leu Glu Ile Trp Thr Leu Thr Gln Asp Lys Glu Cys Asp
 1 5 10 15
 Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Lys Asn Arg Leu Gln
 20 25 30
 Tyr Met Lys His Tyr Phe Pro Ile Asn Tyr Arg Ile Ala Val Pro Tyr
 35 40 45
 Glu Gly Val Leu Arg Val Ala Asn Ile Thr Arg Leu Gln Lys Ala His
 50 55 60
 Val Ser Glu Arg Glu Leu Arg Tyr Leu Trp Val Leu Val Ser Leu Asn
 65 70 75 80
 Ala Thr Glu Ser Val Met Asp Val Leu Leu Glu Gly His Pro Ser Trp
 85 90 95
 Lys Tyr Leu Gln Glu Val Gln Thr Leu Leu Glu Asn Val Gln Arg Ser
 100 105 110
 Leu Met Asp Val Glu Ile Gly Pro His Val Glu Ala Val Leu Ser Leu
 115 120 125

Leu Ser Thr Pro Gly Leu Ser Leu Lys Leu Val Arg Pro Lys Ala Leu
 130 135 140
 Leu Asp Asn Cys Phe Arg Val Met Glu Leu Leu Tyr Cys Ser Cys Cys
 145 150 155 160
 Lys Gln Ser Pro Ile Leu Lys Trp Gln Asp Cys Glu Leu
 165 170

<210> 75

<211> 172

<212> PRT

<213> 褐家鼠(Rattus norvegicus)

<400> 75

Asn Glu Asn Leu Glu Ile Trp Thr Leu Ala Gln Asp Lys Glu Cys Asp
 1 5 10 15
 Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Lys Asn Arg Leu Gln
 20 25 30
 Tyr Met Lys His Tyr Phe Pro Ile Asn Tyr Arg Ile Ala Val Pro Tyr
 35 40 45
 Glu Gly Val Leu Arg Val Ala Asn Ile Thr Arg Leu Lys Ala His Val
 50 55 60
 Ser Glu Arg Glu Leu Arg Tyr Leu Trp Val Leu Val Ser Leu Asn Ala
 65 70 75 80
 Thr Glu Ser Val Leu Asp Val Leu Leu Glu Gly His Pro Ser Trp Lys
 85 90 95
 Tyr Leu Gln Glu Val Gln Thr Leu Leu Glu Asn Val Gln Arg Ser Leu
 100 105 110
 Met Asp Val Glu Ile Gly Pro His Val Glu Ala Val Leu Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Thr Pro Gly Leu Ser Leu Lys Leu Val Arg Pro Lys Ala Leu Leu
 130 135 140
 Asp Asn Cys Phe Arg Val Met Glu Leu Leu Tyr Cys Ser Cys Cys Lys
 145 150 155 160
 Gln Ser Pro Ile Leu Lys Trp Gln Asp Cys Glu Leu
 165 170

[0036]

<210> 76

<211> 173

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

- <221> 变体
<222> 3
<223> Xaa = Pro, His, Gly 或 Asn
- <221> 变体
<222> 6
<223> Xaa = Met, Ile, Val 或 Pro
- <221> 变体
<222> 12
<223> Xaa = Asn, Ser, Thr 或 Asp
- <221> 变体
<222> 16
<223> Xaa = Thr, Ala 或 Asp
- <221> 变体
<222> 20
<223> Xaa = Phe 或 Tyr
- [0037] <221> 变体
<222> 44
<223> Xaa = Ile 或 Val
- <221> 变体
<222> 45
<223> Xaa = Ser, Gly 或 Ala
- <221> 变体
<222> 54
<223> Xaa = Ile, Met, Thr 或 Val
- <221> 变体
<222> 57
<223> Xaa = Val 或 Ile
- <221> 变体
<222> 64
<223> Xaa = Gln, Arg 或 His
- <221> 变体
<222> 67
<223> Xaa = Glu 或 Gln

- <221> 变体
<222> 68
<223> Xaa = Arg 或 Gln
- <221> 变体
<222> 76
<223> Xaa = Leu 或 Trp
- <221> 变体
<222> 87
<223> Xaa = Asp 或 Glu
- <221> 变体
<222> 91
<223> Xaa = Asp 或 Glu
- <221> 变体
<222> 101
<223> Xaa = Asp 或 Glu
- [0038] <221> 变体
<222> 103
<223> Xaa = Glu, Gln 或 His
- <221> 变体
<222> 108
<223> Xaa = Asn 或 Asp
- <221> 变体
<222> 111
<223> Xaa = Gln, Lys 或 Arg
- <221> 变体
<222> 112
<223> Xaa = Gly 或 Ser
- <221> 变体
<222> 114
<223> Xaa = Thr, Met, Arg 或 Gly
- <221> 变体
<222> 118
<223> Xaa = Val 或 Ile

	<221> 变体
	<222> 119
	<223> Xaa = Ser 或 Gly
	<221> 变体
	<222> 121
	<223> Xaa = Lys, Gln 或 His
	<221> 变体
	<222> 123
	<223> Xaa = Glu 或 Asp
	<221> 变体
	<222> 134
	<223> Xaa = Pro 或 Leu
	<221> 变体
	<222> 153
	<223> Xaa = Glu 或 Gln
[0039]	<221> 变体
	<222> 165
	<223> Xaa = Val 或 Ile
	<221> 变体
	<222> 173
	<223> Xaa = Val, Leu 或 Ala
	<400> 76
	Asn Glu Xaa Leu Glu Xaa Trp Pro Leu Thr Gln Xaa Glu Glu Cys Xaa
	1 5 10 15
	Val Thr Gly Xaa Leu Arg Asp Lys Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Leu Gln
	20 25 30
	Tyr Met Lys His Tyr Phe Pro Ile Asn Tyr Arg Xaa Xaa Val Pro Tyr
	35 40 45
	Glu Gly Val Leu Arg Xaa Ala Asn Xaa Thr Arg Leu Gln Arg Ala Xaa
	50 55 60
	Val Ser Xaa Xaa Glu Leu Arg Tyr Leu Trp Val Xaa Val Ser Leu Ser
	65 70 75 80
	Ala Thr Glu Ser Val Gln Xaa Val Leu Leu Xaa Gly His Pro Ser Trp
	85 90 95
	Lys Tyr Leu Gln Xaa Val Xaa Thr Leu Leu Leu Xaa Val Gln Xaa Xaa
	100 105 110

Leu Xaa Asp Val Glu Xaa Xaa Pro Xaa Val Xaa Ala Val Leu Ser Leu
 115 120 125
 Leu Ser Ala Pro Gly Xaa Ser Leu Lys Leu Val Arg Pro Lys Ala Leu
 130 135 140
 Leu Asp Asn Cys Phe Arg Val Met Xaa Leu Leu Tyr Cys Ser Cys Cys
 145 150 155 160
 Lys Gln Ser Ser Xaa Leu Asn Trp Gln Asp Cys Glu Xaa
 165 170

<210> 77
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 77

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

<210> 78
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的构建体

<400> 78

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

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

[0041]

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 79

Ser Asn Trp Ile His

1 5

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 80

Arg Ile Ser Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的构建体

<400> 81
Ser Met Arg Ala Arg Arg Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 82
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的构建体

[0042] <400> 82
Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的构建体

<400> 83
His Ile Asp Trp Tyr Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 84
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 84

Gly Gly Pro Asp Tyr Ala Met Asp Val
1 5

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 85

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

[0043]

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 86

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser
1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 87
[0044] Gln Gln Tyr Trp Ser Glu Pro Val Thr
1 5

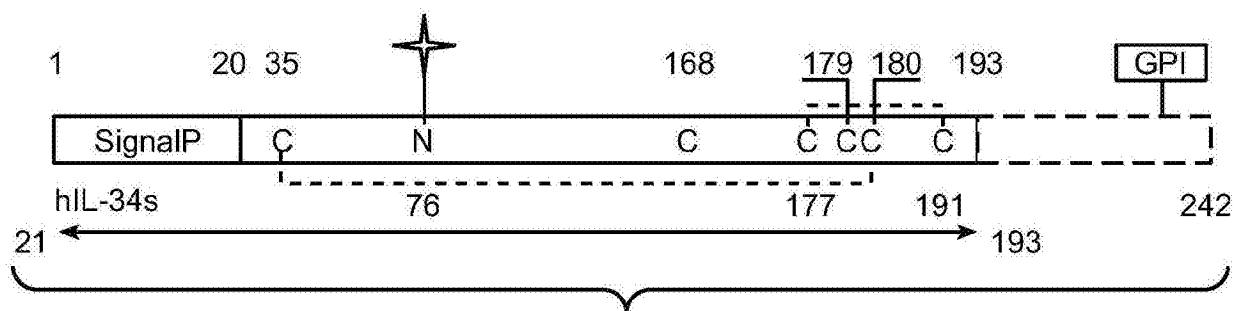


图1A

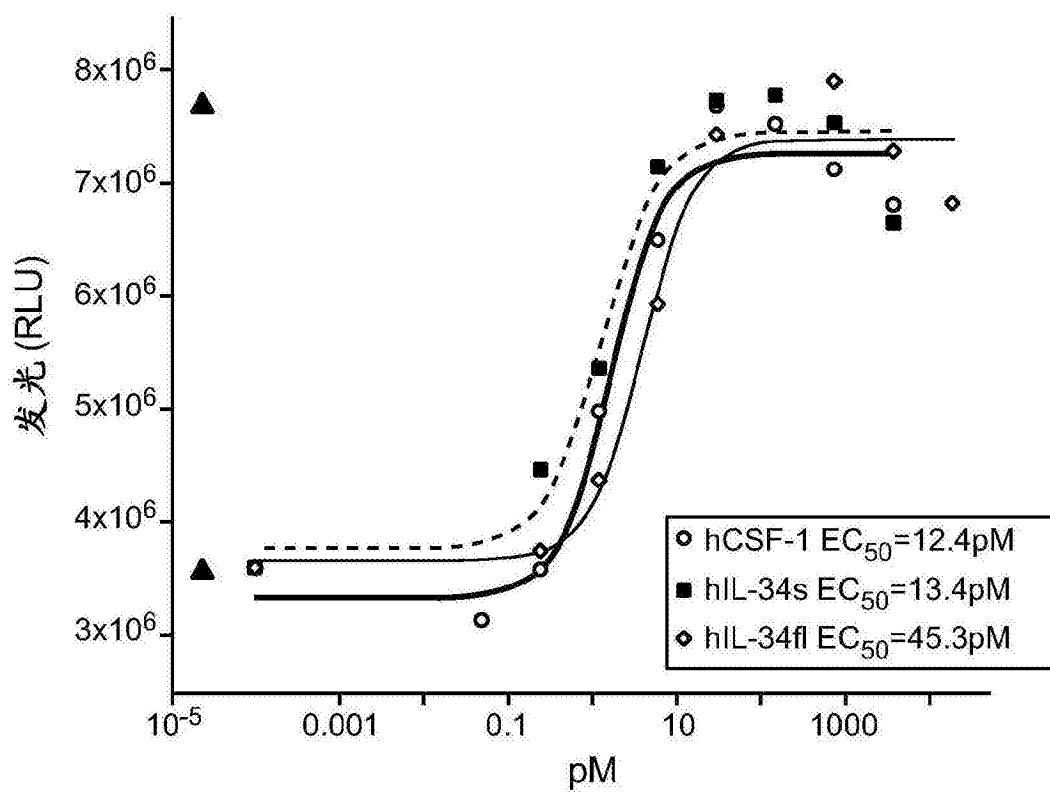


图1B

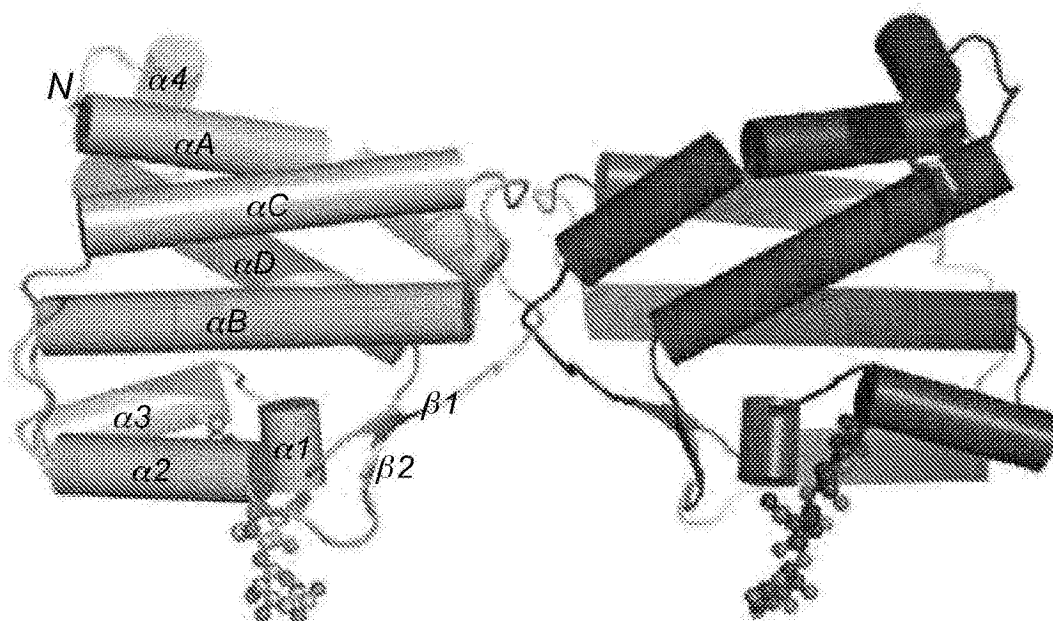


图1C

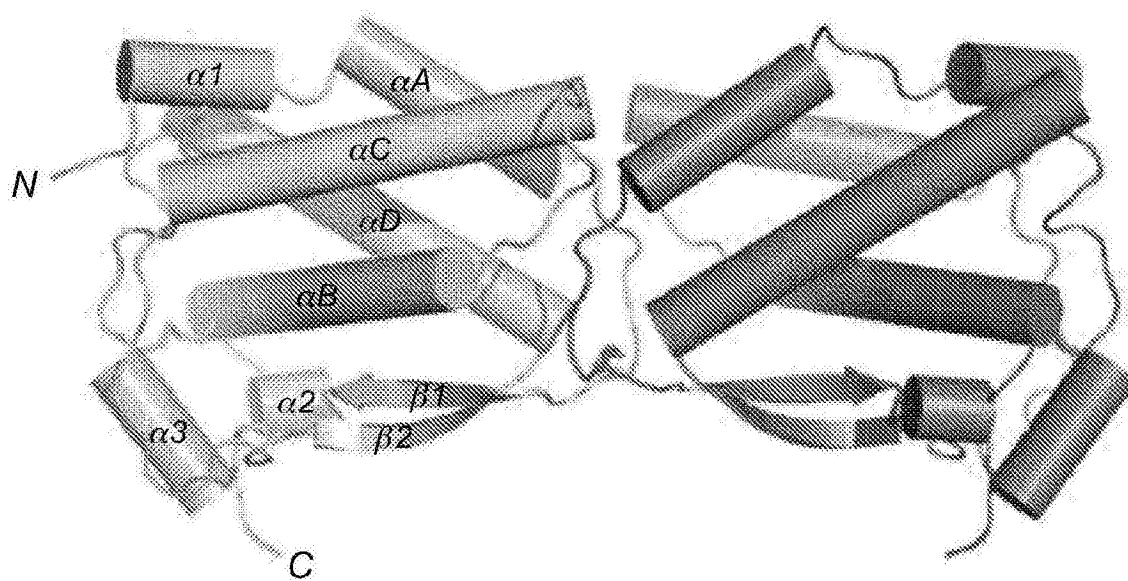


图1D

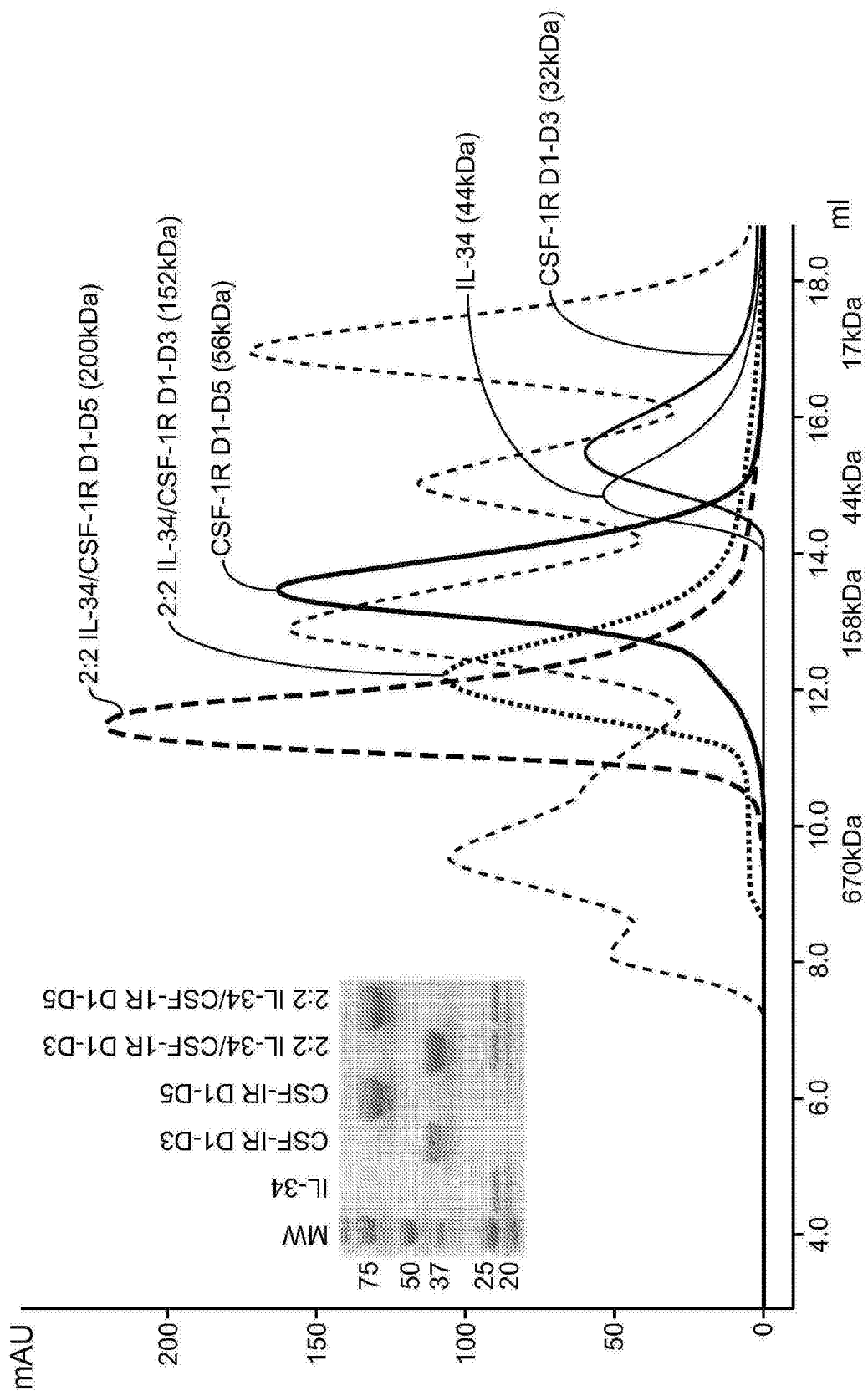


图2A

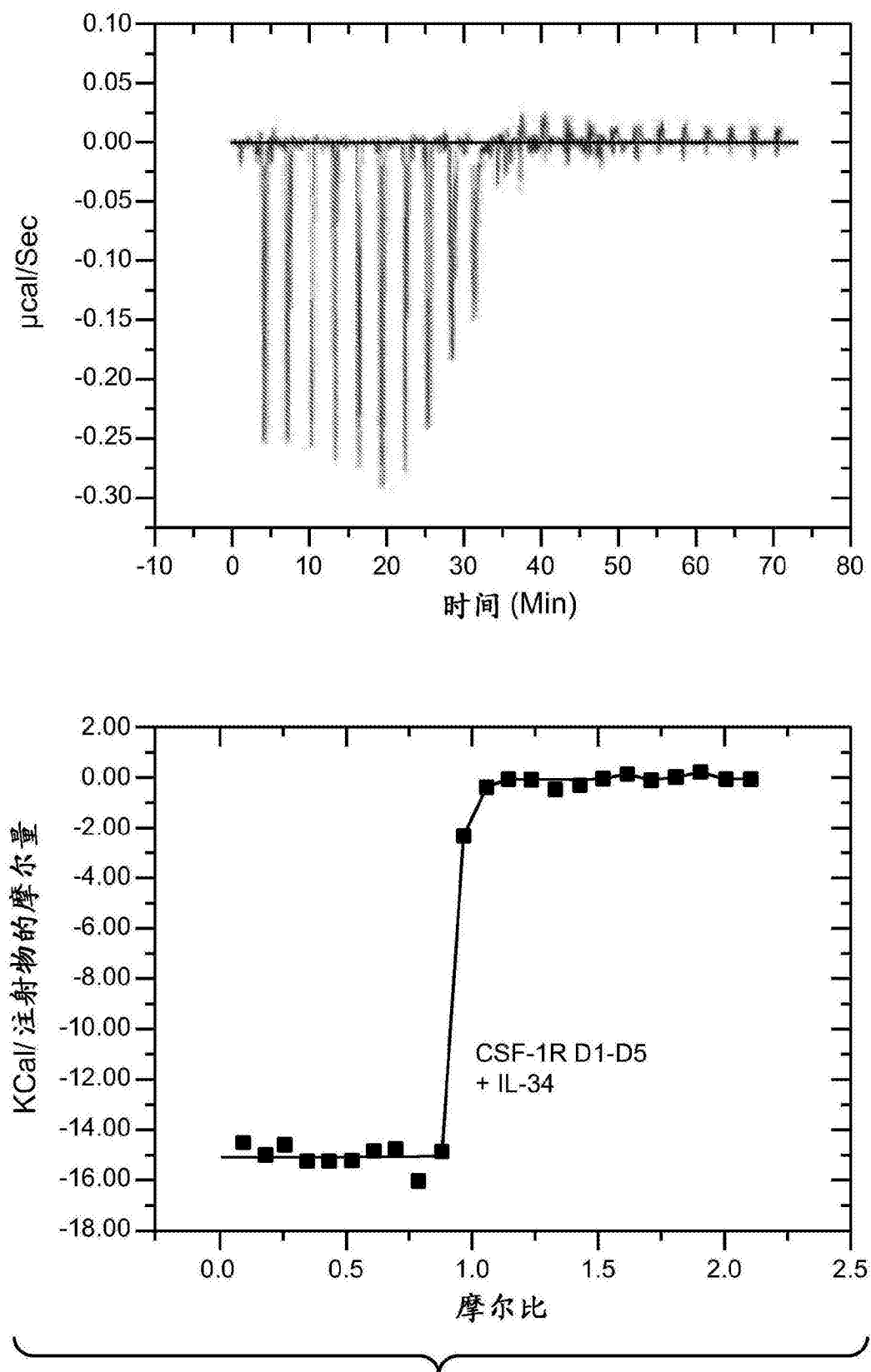


图2B-1

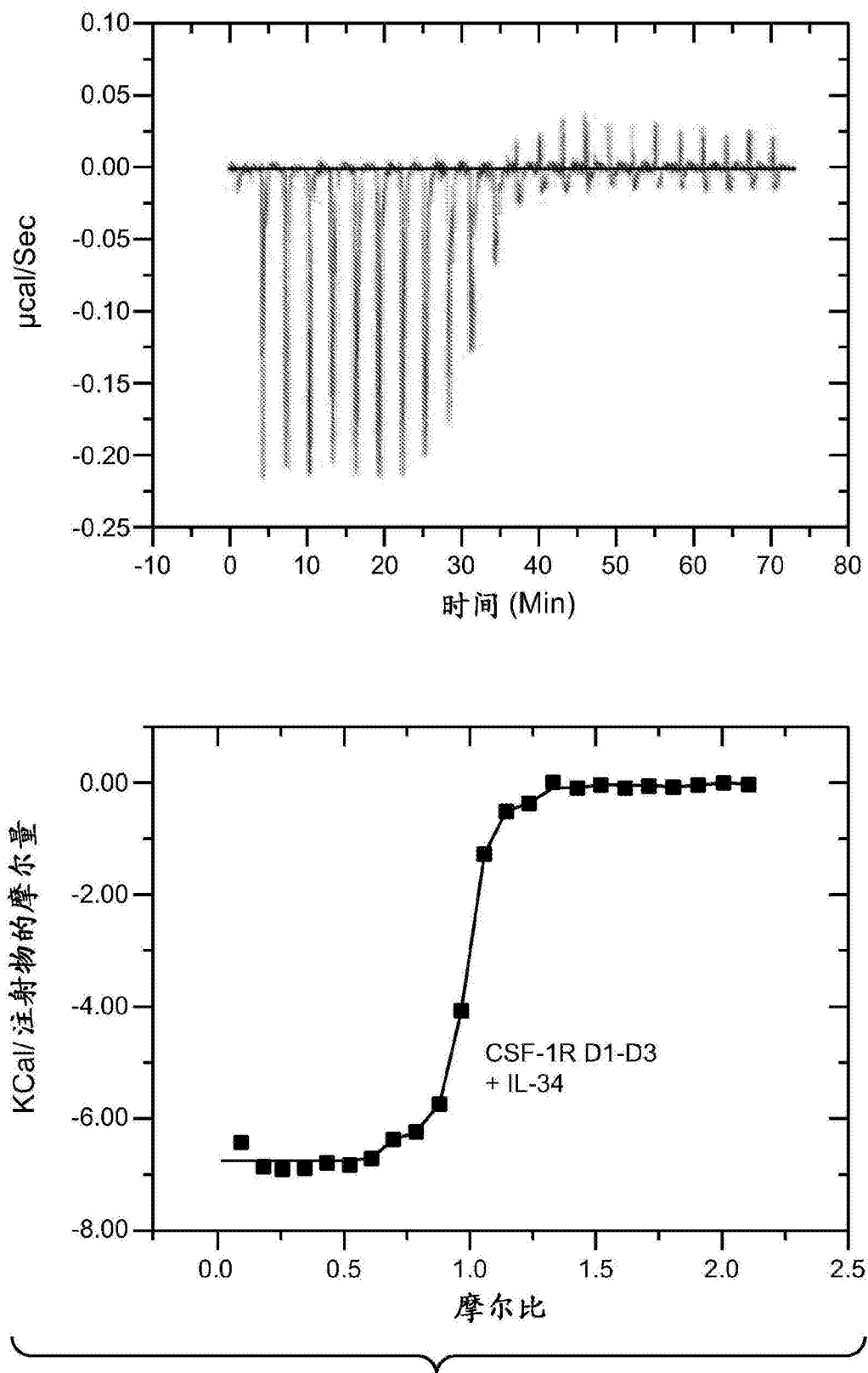


图2B-2

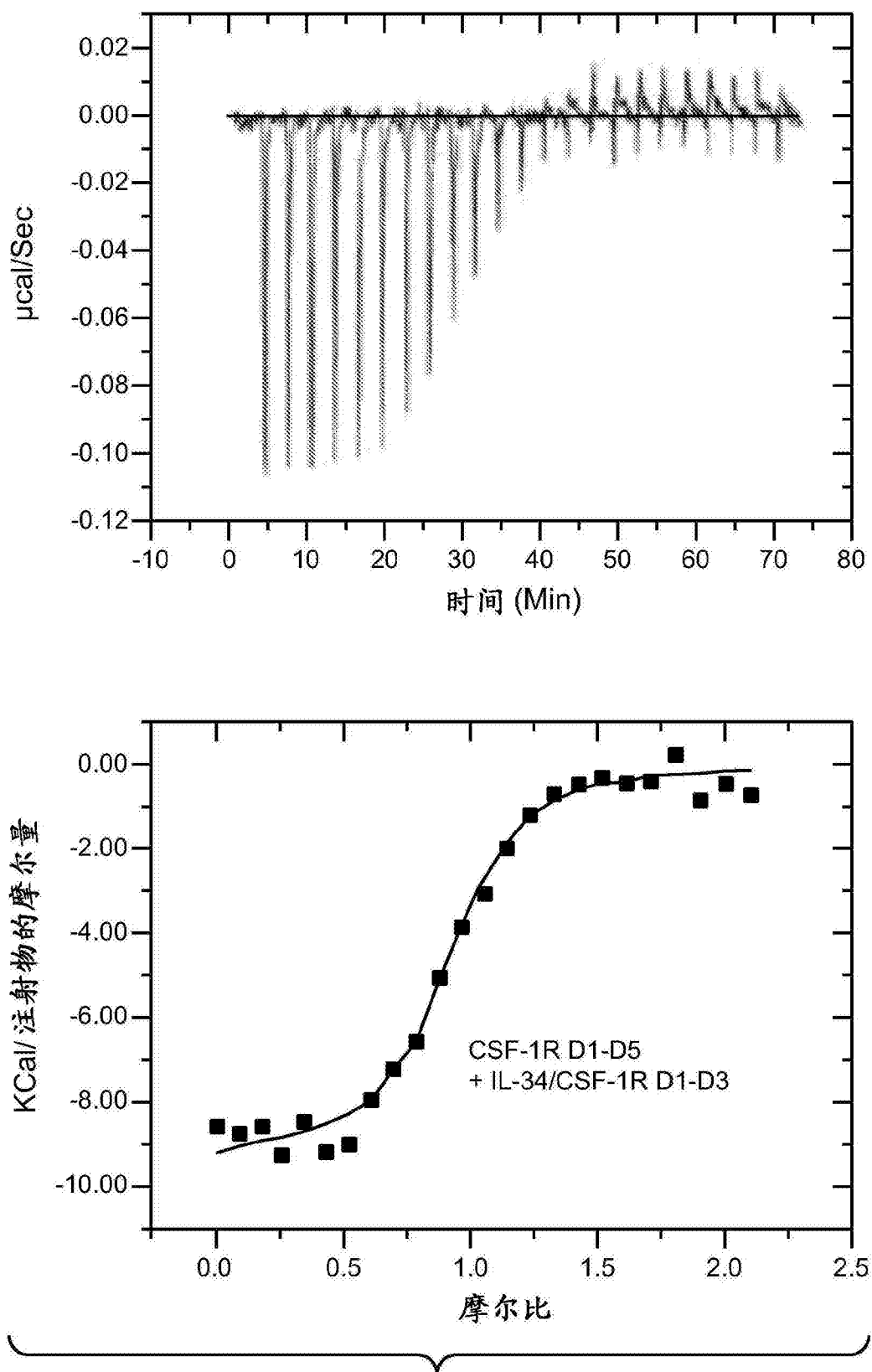


图2B-3

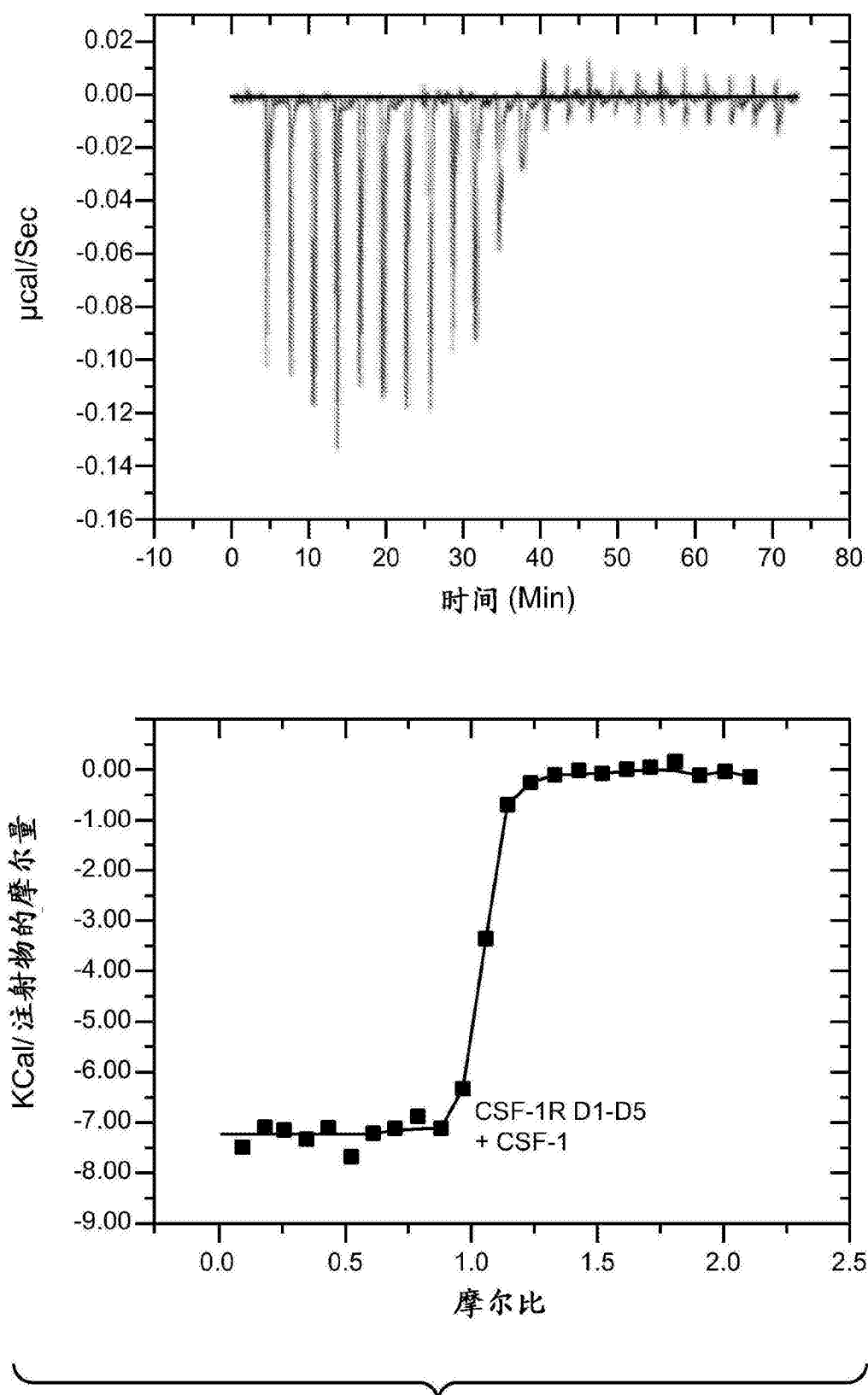


图2C-1

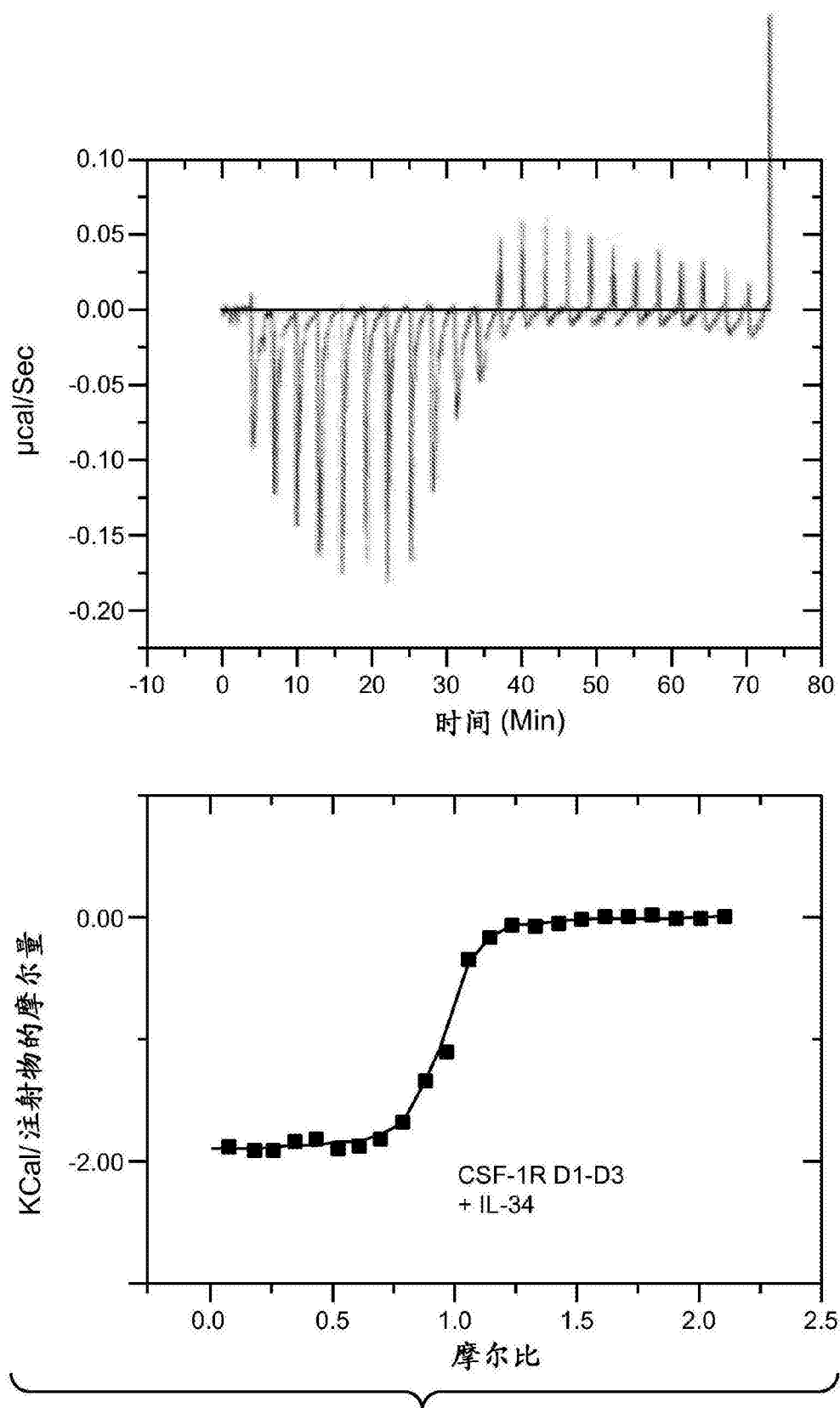


图2C-2

注射物	细胞	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/K)	ΔG (Kcal/mol)	K_d (nM)	N
CSF-1R D1-D5 (200 μ M)	hIL-34s (20 μ M)	-15.1	N.D.	N.D.	N.D.	0.89
CSF-1R D1-D3 (400 μ M)	hIL-34s (40 μ M)	-6.8	9.5	-9.6	94.3	0.94
CSF-1R D1-D5 (150 μ M)	hIL-34s (15 μ M) + CSF-1R D1-D3 (20 μ M)	-15.7	-12.5	-12.0	1.6	0.94
CSF-1R D1-D5 (200 μ M)	hCSF-1 (20 μ M)	-7.3	10.7	-10.5	20.2	1.00
CSF-1R D1-D3 (2000 μ M)	hCSF-1 (200 μ M)	-1.9	21.2	-8.2	892.9	0.93

图2D

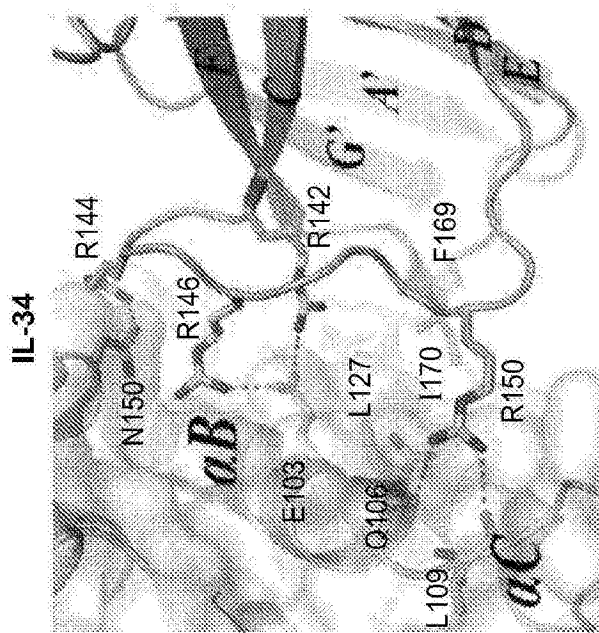


图3A

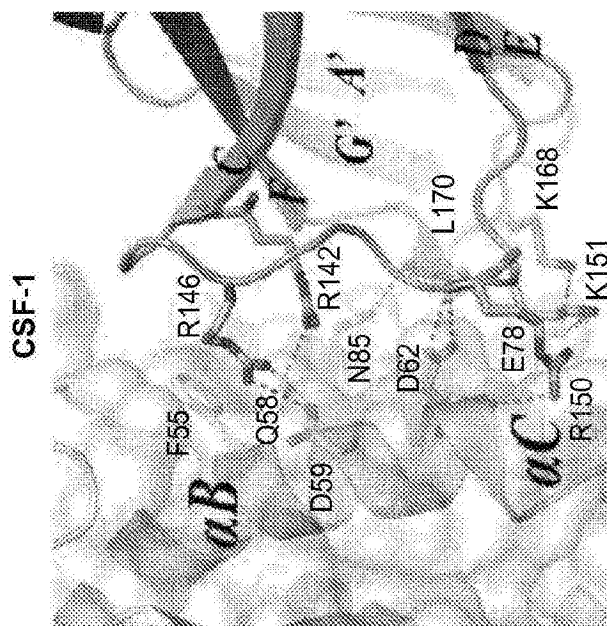
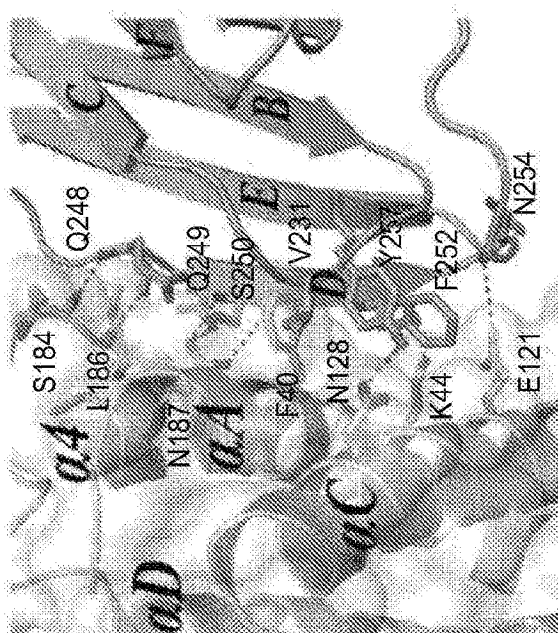


图3B



位点 2

图3C

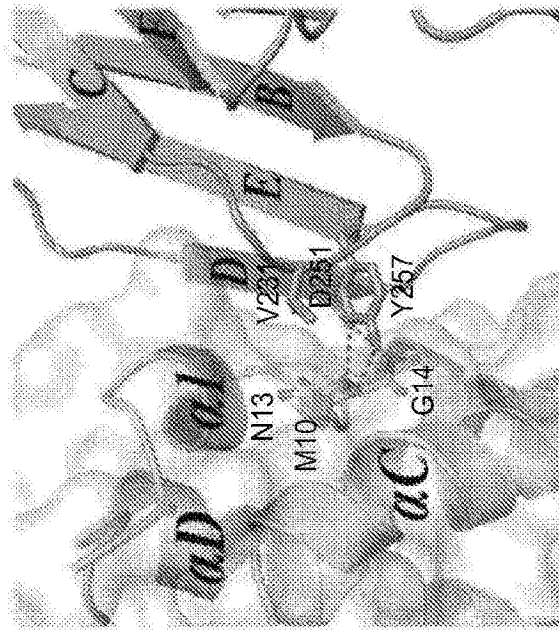


图3D

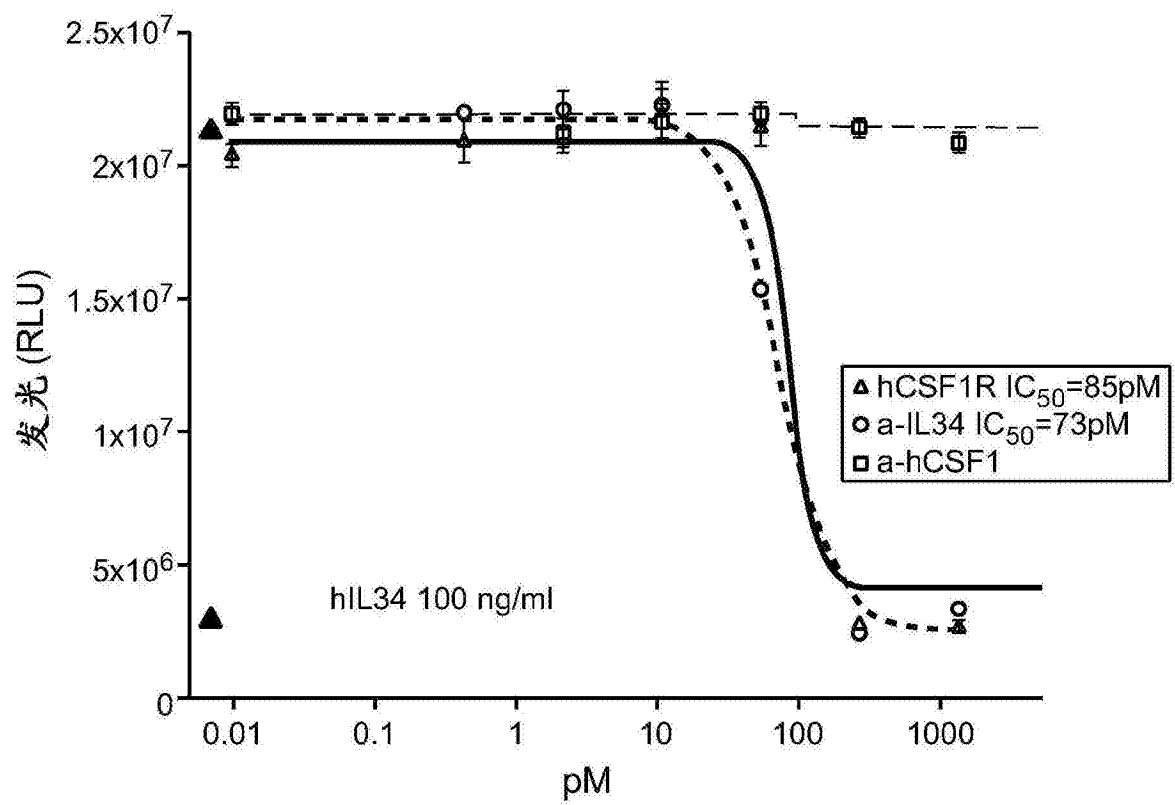


图4A

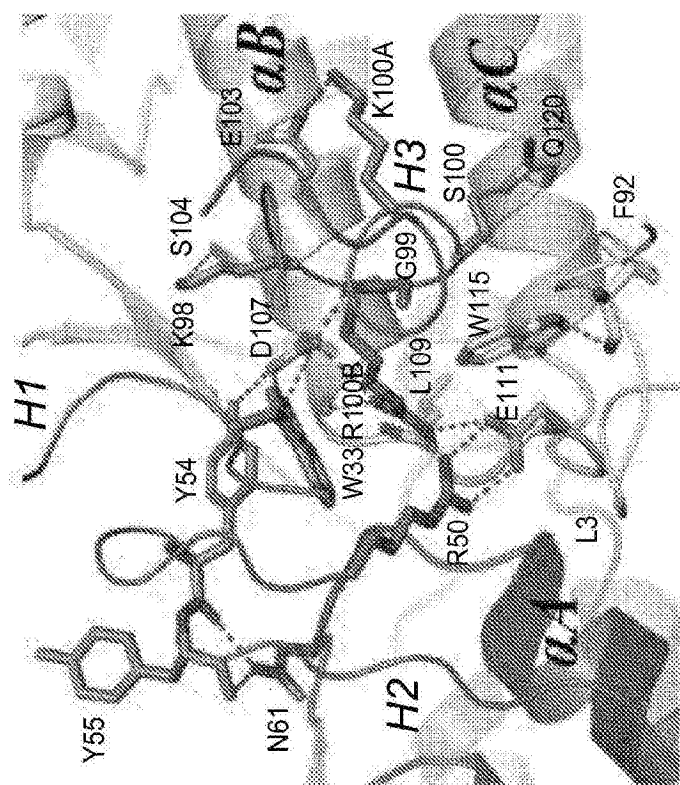


图4B

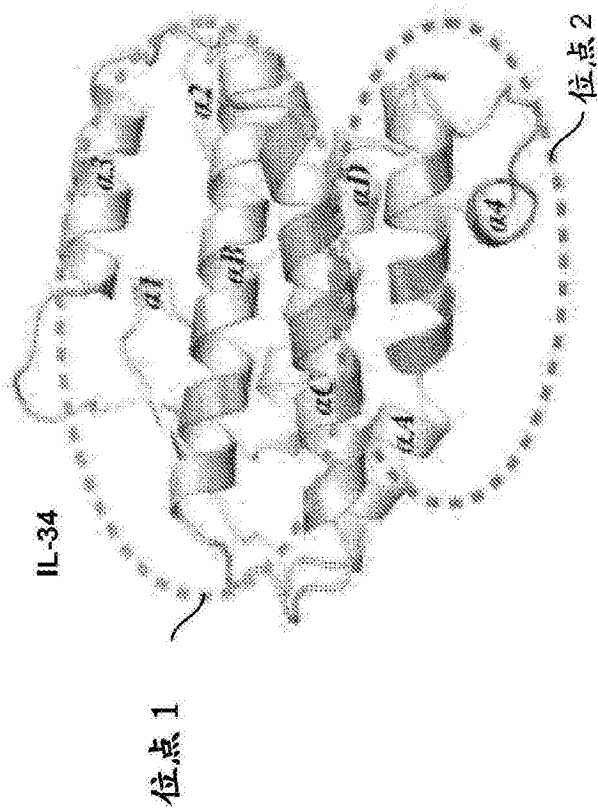


图5A

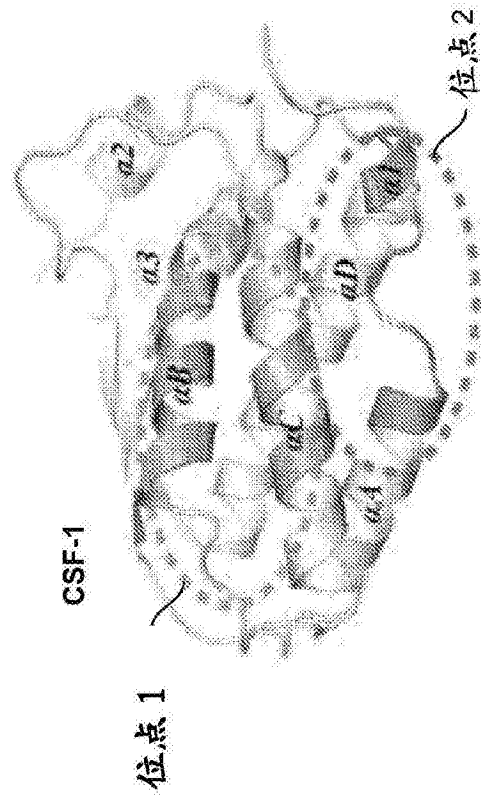


图5B

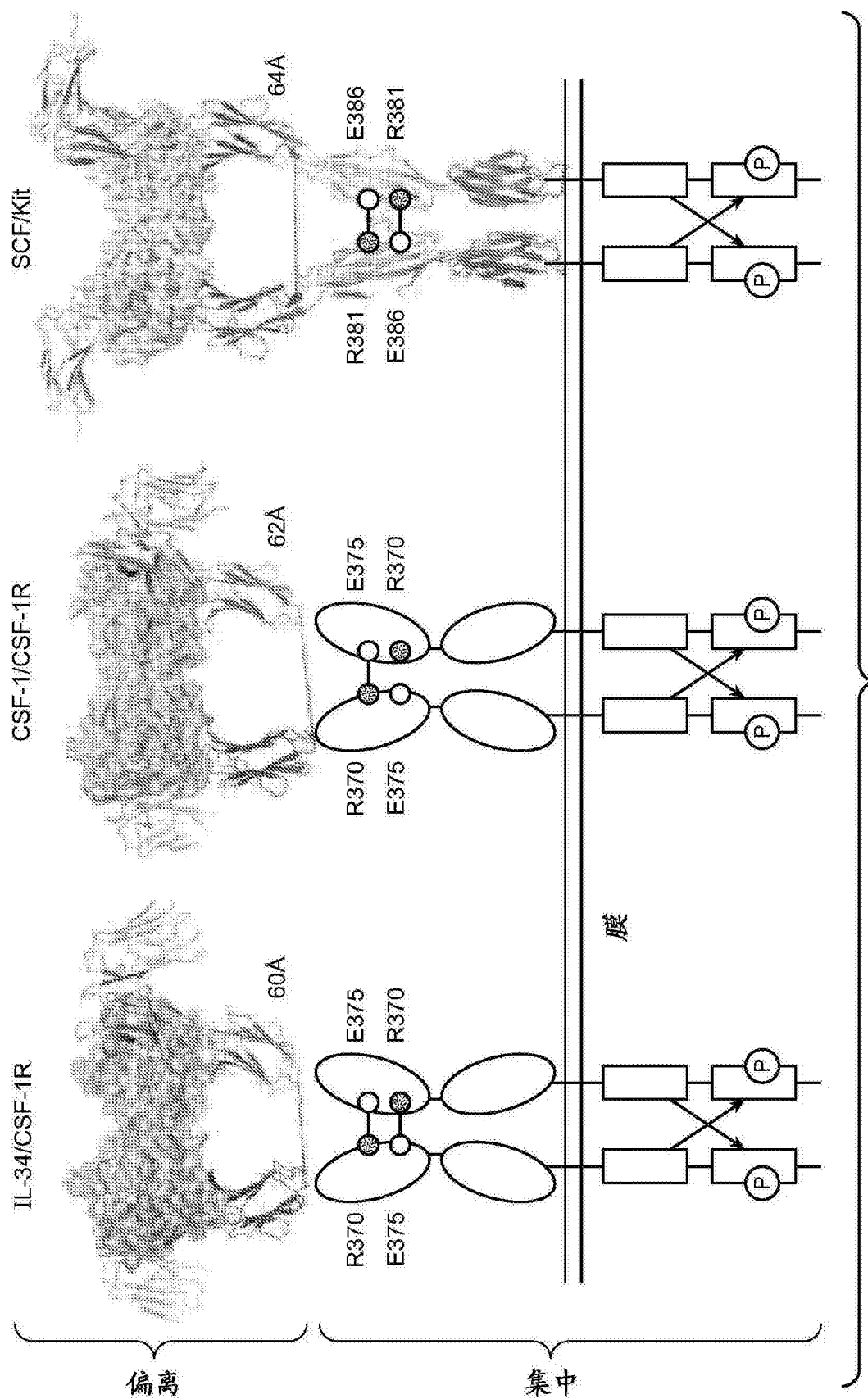


图6

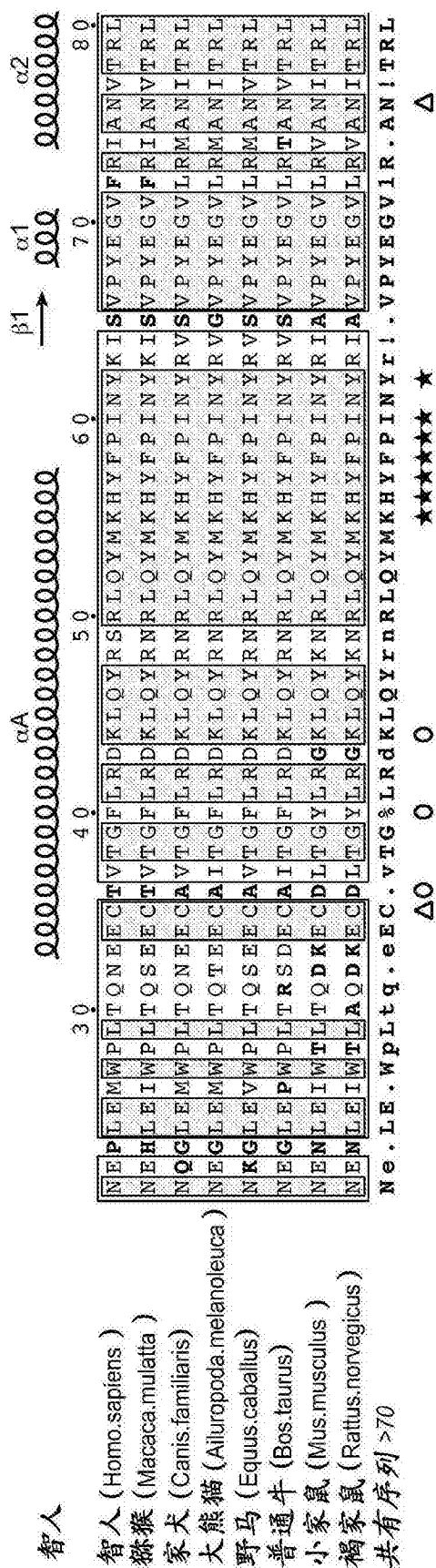


图7A

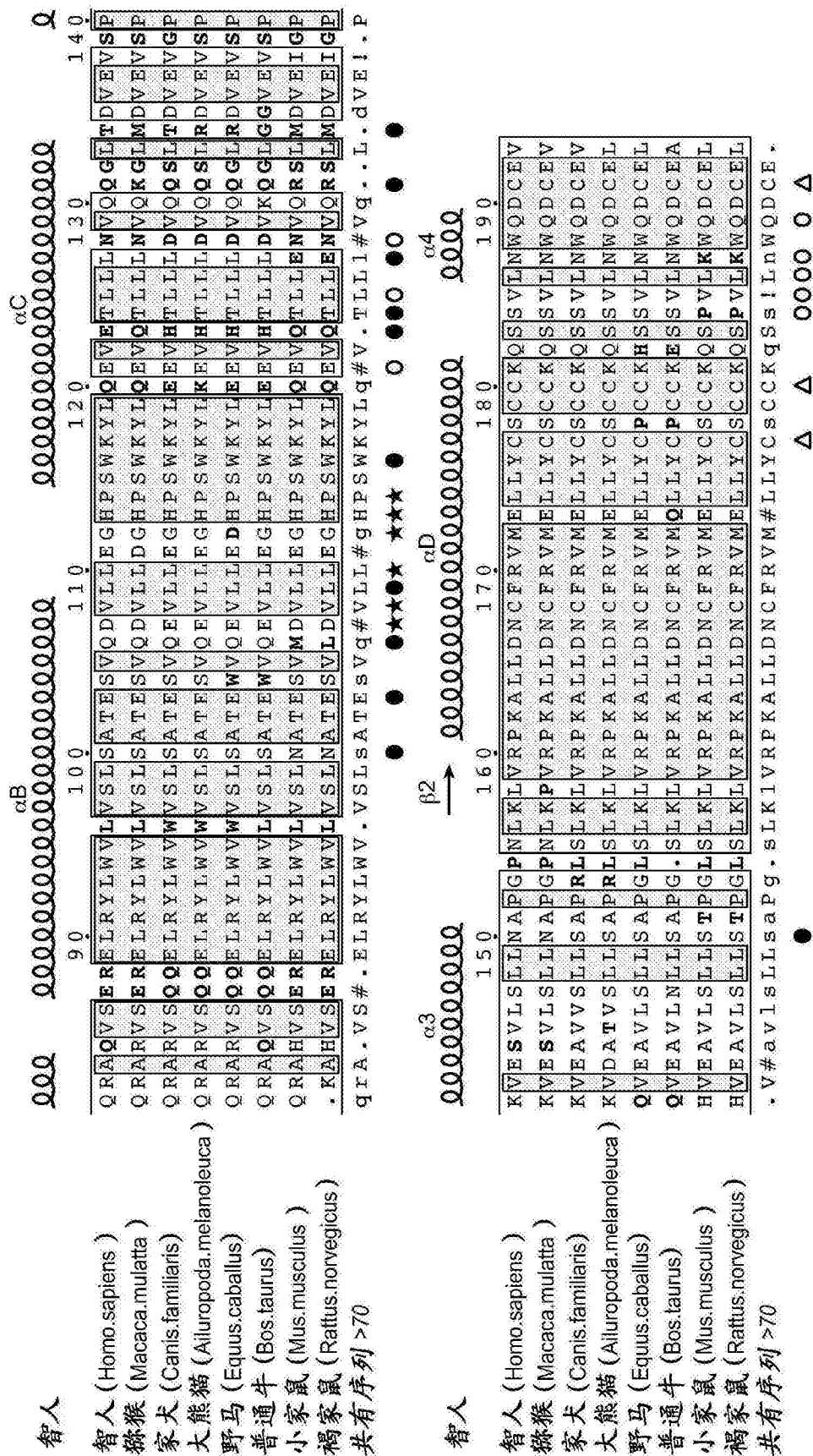


图7B

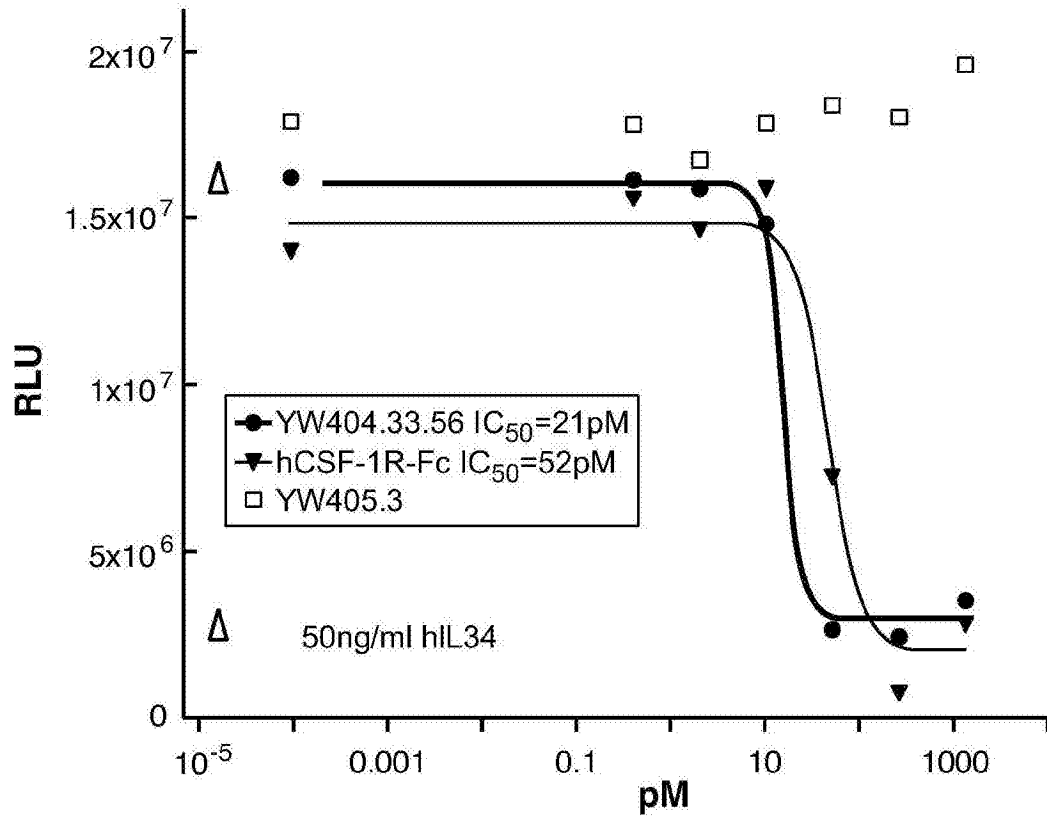


图8

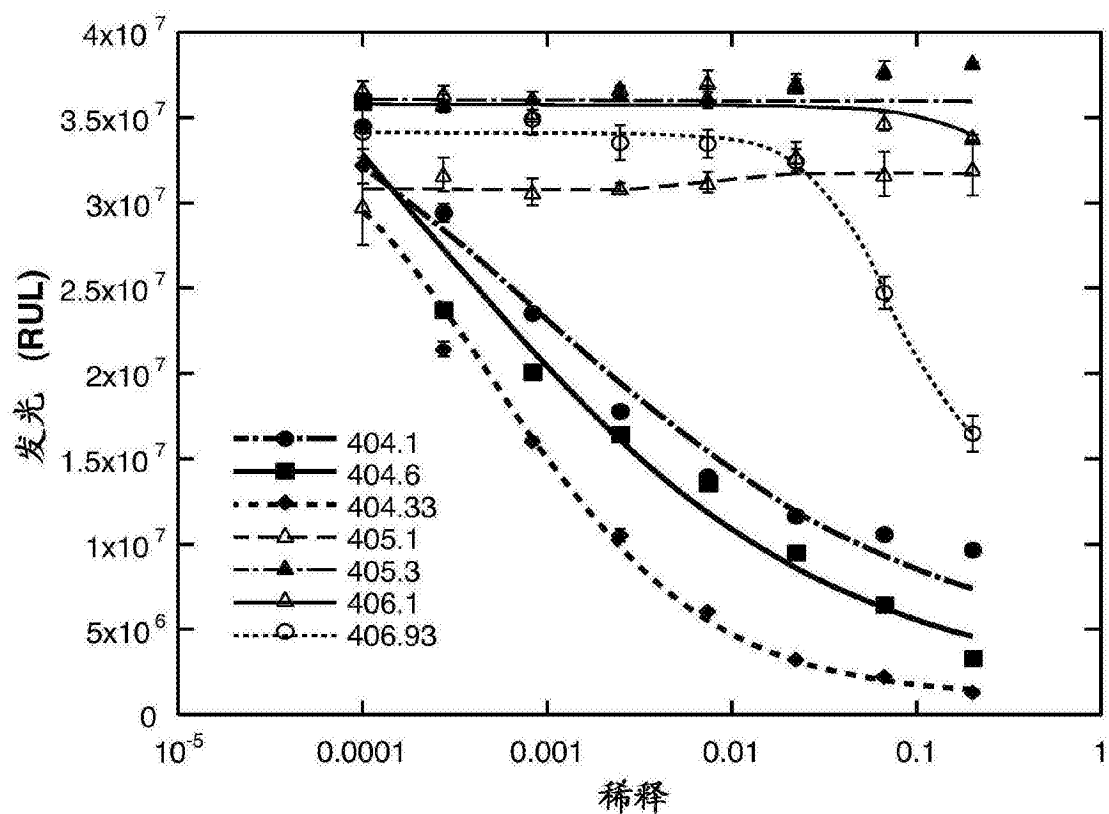


图9A

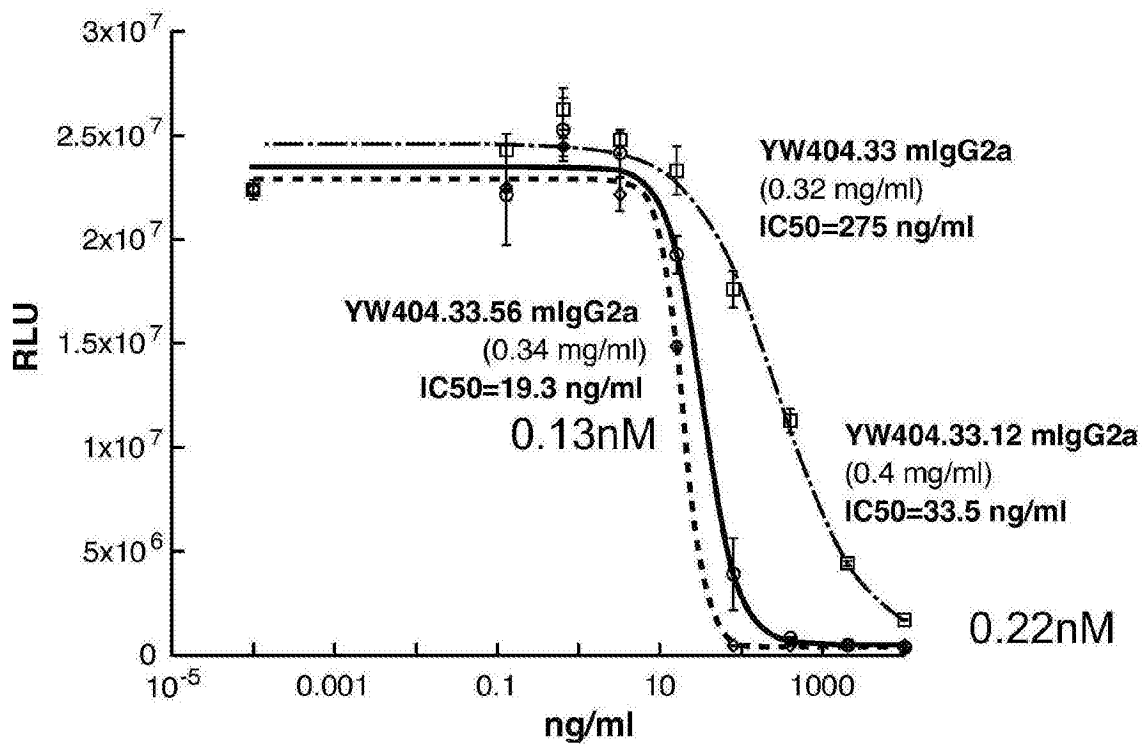


图9B

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
	Kabat - CDR H1																																								
	Chothia - CDR H1																																								
404.1	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E			
404.6	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V			
405.3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L			
404.33.10	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		
404.33.11	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		
404.33.56	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E			
404.33.93	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E			
Kabat#	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	B	C	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
	Kabat - CDR H2																																								
	Chothia - CDR H2																																								
404.1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P			
404.6	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G			
405.3	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K			
404.33.10	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L			
404.33.12	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G			
404.33.11	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E			
404.33.56	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V			
404.33.93	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V			
Kabat#	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
	Kabat - CDR H3																																								
	Chothia - CDR H3																																								
404.1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		
404.6	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L			
405.3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		
404.33.10	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		
404.33.12	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T			
404.33.11	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D			
404.33.56	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E			
404.33.93	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			

图10A

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
	D	I	I	Q	Q	M	T	Q	Q	S	P	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C	R	R	A	S	S	Q				D	V	S	T	A	V	A	V	W	Y	Q
404.1	D	I	I	Q	Q	M	T	Q	Q	S	P	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C	R	R	A	S	S	Q				D	V	S	T	A	V	A	V	W	Y	Q
404.6	D	I	I	Q	Q	M	T	Q	Q	S	P	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C	R	R	A	S	S	Q				D	V	S	T	A	V	A	V	W	Y	Q
405.3	D	I	I	Q	Q	M	T	Q	Q	S	P	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C	R	R	A	S	S	Q				D	V	S	T	A	V	A	V	W	Y	Q
404.33	D	I	I	Q	Q	M	T	Q	Q	S	P	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C	R	R	A	S	S	Q				D	V	S	T	A	V	A	V	W	Y	Q
404.33.10	D	I	I	Q	Q	M	T	Q	Q	S	P	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C	R	R	A	S	S	Q				D	V	S	T	A	V	A	V	W	Y	Q
404.33.12	D	I	I	Q	Q	M	T	Q	Q	S	P	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C	R	R	A	S	S	Q				D	V	S	T	A	V	A	V	W	Y	Q
404.33.11	D	I	I	Q	Q	M	T	Q	Q	S	P	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C	R	R	A	S	S	Q				D	V	S	T	A	V	A	V	W	Y	Q
404.33.56	D	I	I	Q	Q	M	T	Q	Q	S	P	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C	R	R	A	S	S	Q				D	V	S	T	A	V	A	V	W	Y	Q
404.33.93	D	I	I	Q	Q	M	T	Q	Q	S	P	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C	R	R	A	S	S	Q				D	V	S	T	A	V	A	V	W	Y	Q
Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
	Q	Q	Q	Q	K	G	P	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	G	S	R	R	F	G	S	G	S	G	F	D	T	L	F	I	I	S	S	S	P	P
404.1	Q	Q	Q	Q	K	G	P	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	G	S	R	R	F	G	S	G	S	G	F	D	T	L	F	I	I	S	S	S	P	P
404.6	Q	Q	Q	Q	K	G	P	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	G	S	R	R	F	G	S	G	S	G	F	D	T	L	F	I	I	S	S	S	P	P
405.3	Q	Q	Q	Q	K	G	P	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	G	S	R	R	F	G	S	G	S	G	F	D	T	L	F	I	I	S	S	S	P	P
404.33	Q	Q	Q	Q	K	G	P	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	G	S	R	R	F	G	S	G	S	G	F	D	T	L	F	I	I	S	S	S	P	P
404.33.10	Q	Q	Q	Q	K	G	P	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	G	S	R	R	F	G	S	G	S	G	F	D	T	L	F	I	I	S	S	S	P	P
404.33.12	Q	Q	Q	Q	K	G	P	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	G	S	R	R	F	G	S	G	S	G	F	D	T	L	F	I	I	S	S	S	P	P
404.33.11	Q	Q	Q	Q	K	G	P	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	G	S	R	R	F	G	S	G	S	G	F	D	T	L	F	I	I	S	S	S	P	P
404.33.56	Q	Q	Q	Q	K	G	P	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	G	S	R	R	F	G	S	G	S	G	F	D	T	L	F	I	I	S	S	S	P	P
404.33.93	Q	Q	Q	Q	K	G	P	K	L	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	G	S	R	R	F	G	S	G	S	G	F	D	T	L	F	I	I	S	S	S	P	P
Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108															
	E	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Q	Q	S	Y	W	T	S	D	V	F	A	T	T	T	T	I	K	K	R															
404.1	E	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Q	Q	S	Y	W	T	S	D	V	F	A	T	T	T	T	T	I	K	K	R														
404.6	E	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Q	Q	S	Y	W	T	S	D	V	F	A	T	T	T	T	T	I	K	K	R														
405.3	E	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Q	Q	S	Y	W	T	S	D	V	F	A	T	T	T	T	T	I	K	K	R														
404.33	E	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Q	Q	S	Y	W	T	S	D	V	F	A	T	T	T	T	T	I	K	K	R														
404.33.10	E	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Q	Q	S	Y	W	T	S	D	V	F	A	T	T	T	T	T	I	K	K	R														
404.33.12	E	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Q	Q	S	Y	W	T	S	D	V	F	A	T	T	T	T	T	I	K	K	R														
404.33.11	E	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Q	Q	S	Y	W	T	S	D	V	F	A	T	T	T	T	T	I	K	K	R														
404.33.56	E	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Q	Q	S	Y	W	T	S	D	V	F	A	T	T	T	T	T	I	K	K	R														
404.33.93	E	E	D	F	A	T	Y	C	Q	Q	Q	S	Y	W	T	S	D	V	F	A	T	T	T	T	T	I	K	K	R														

图10B

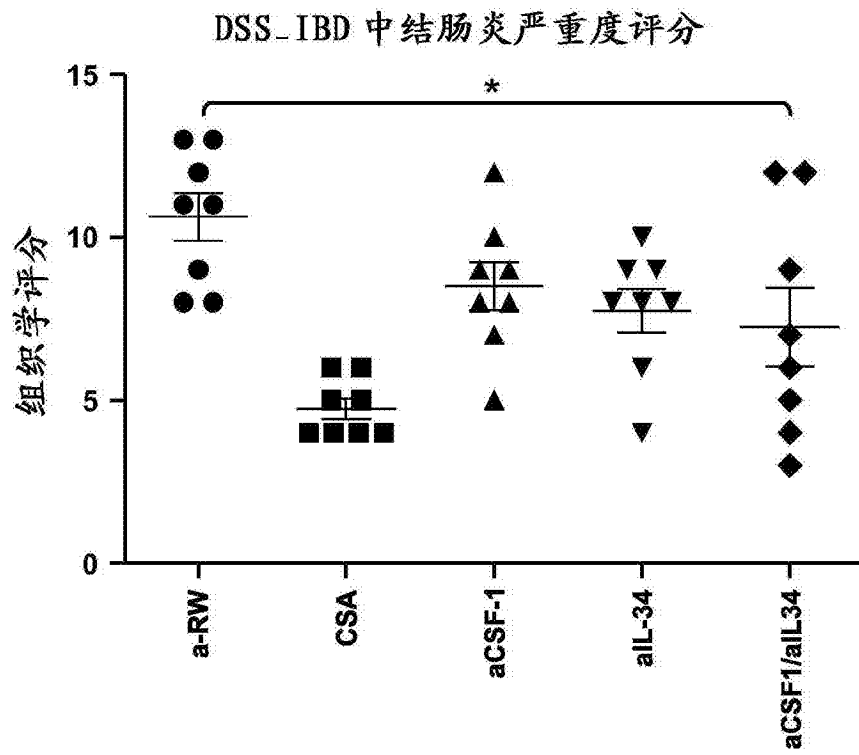


图11

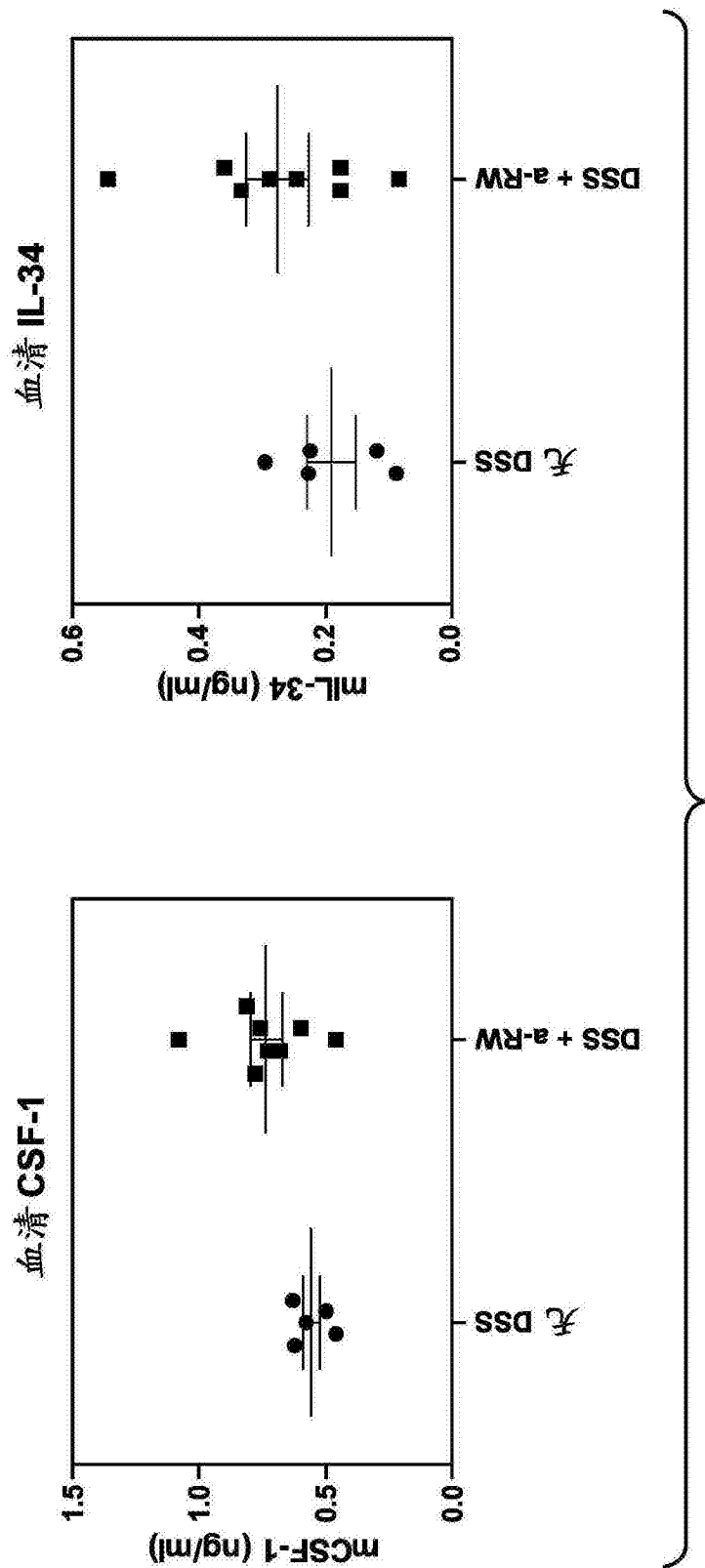


图12

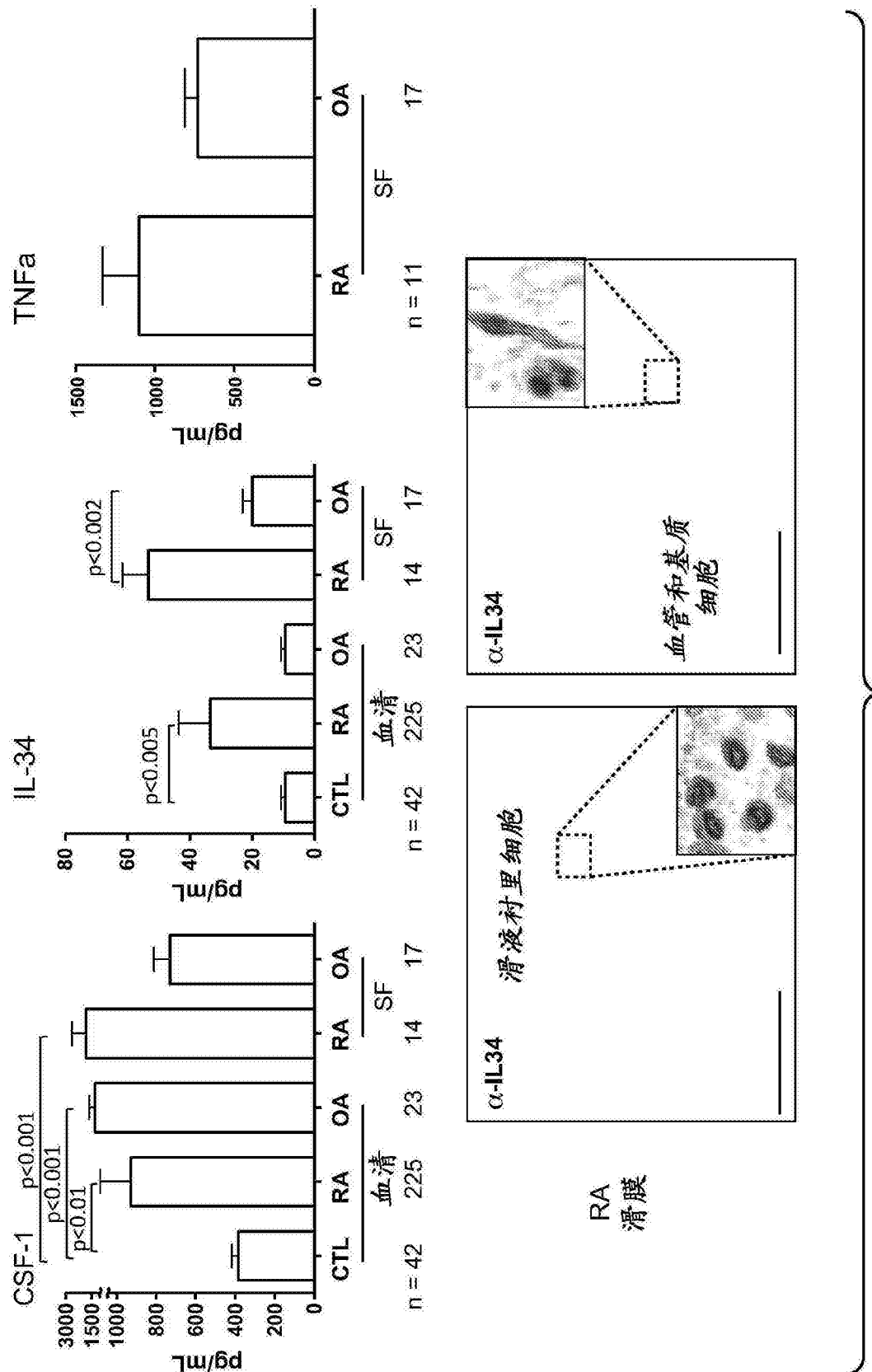


图13

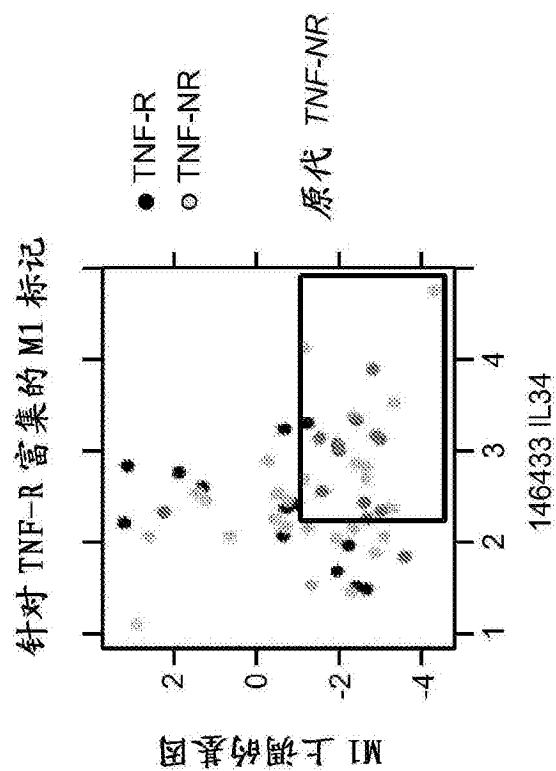


图14A

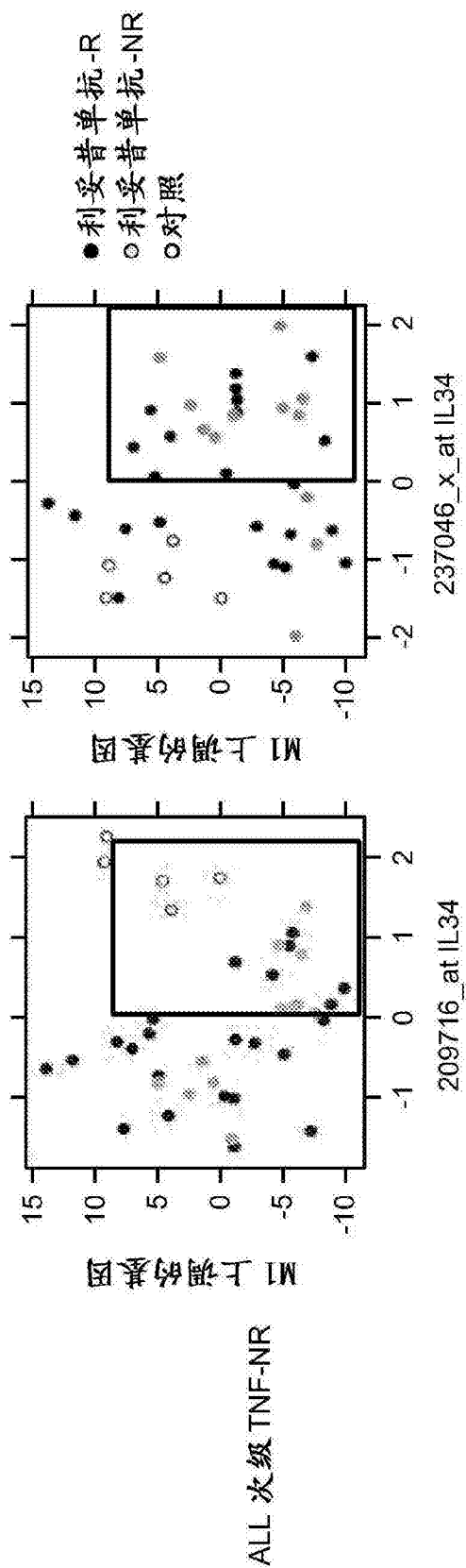


图14B

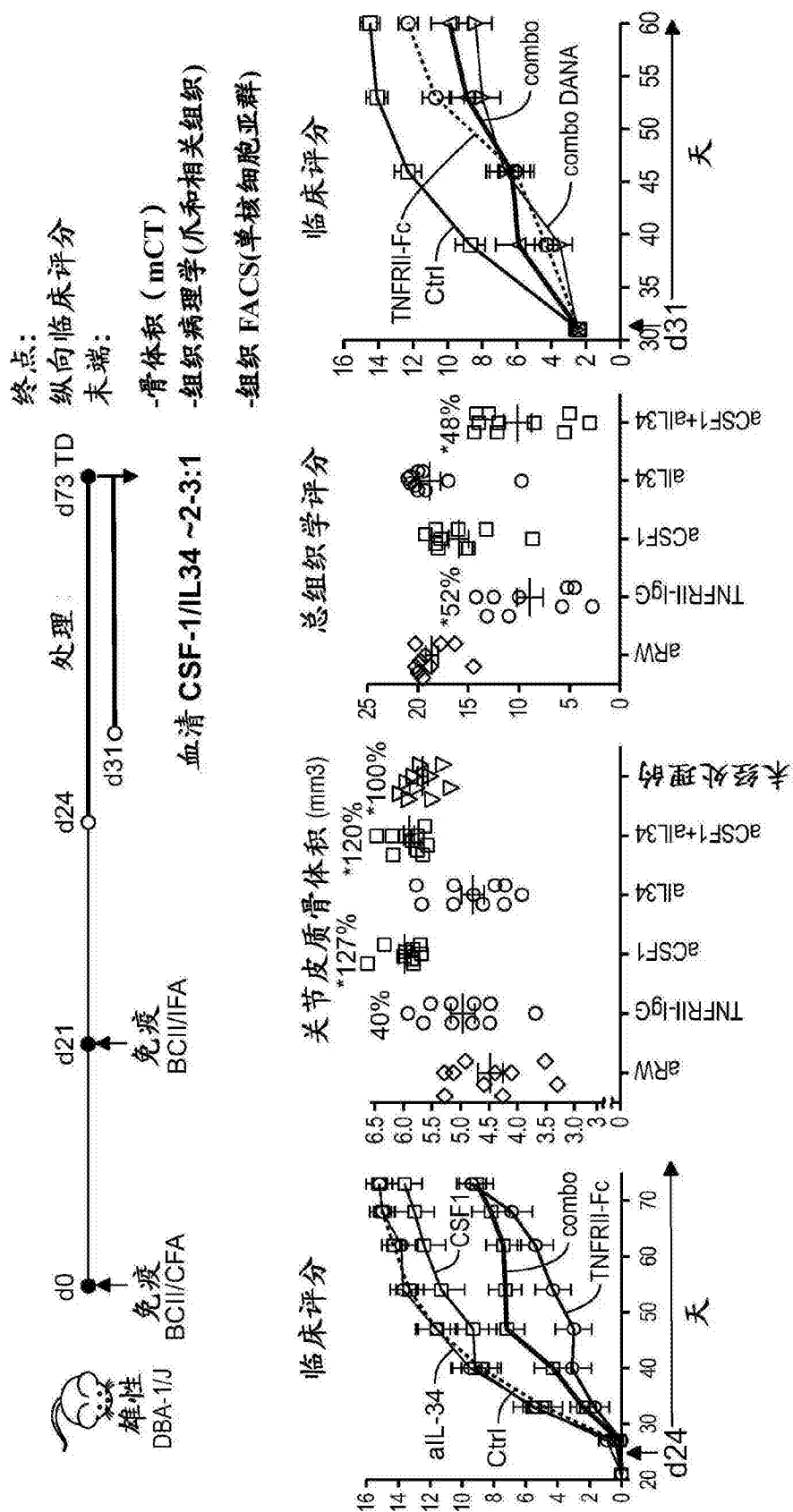
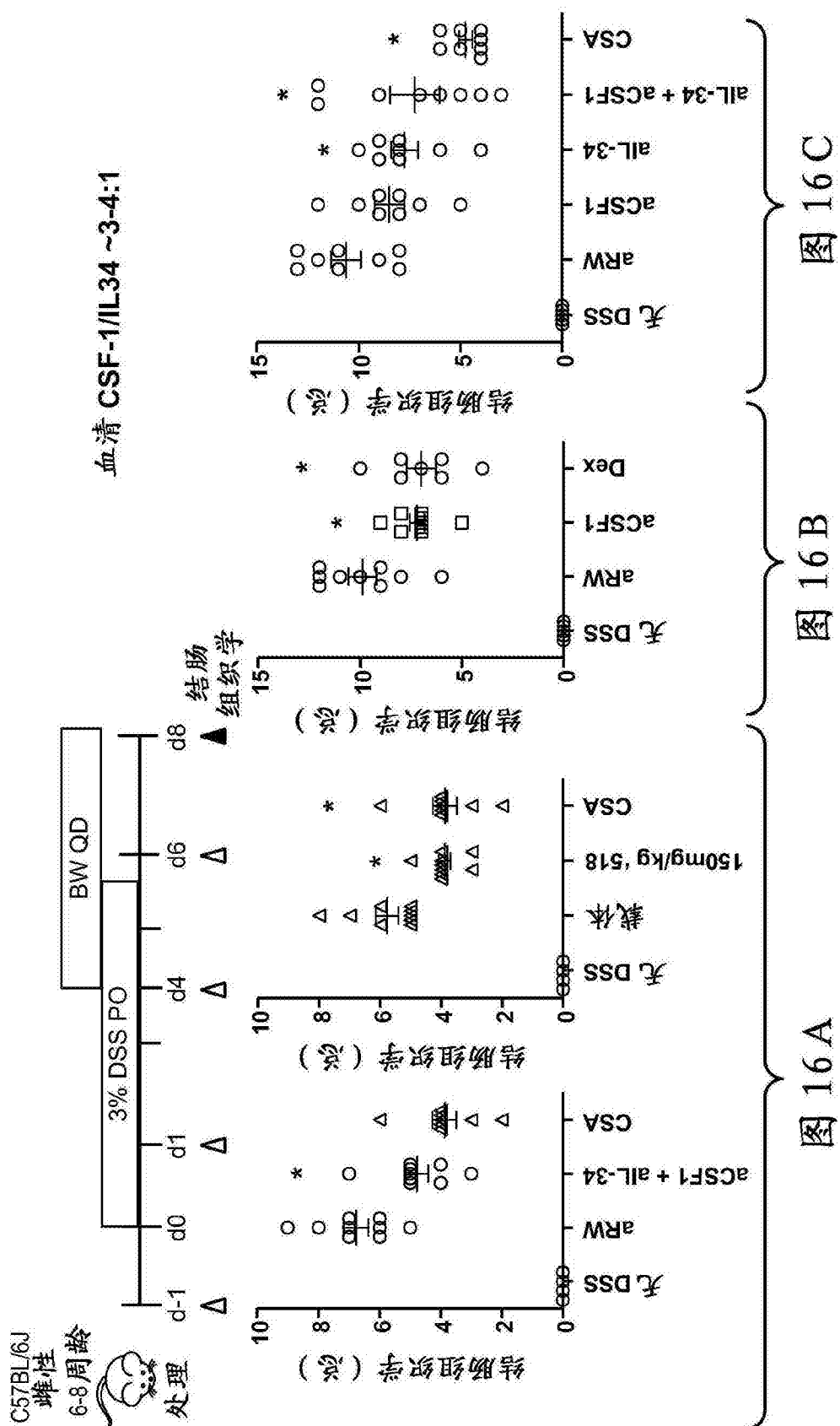


图15



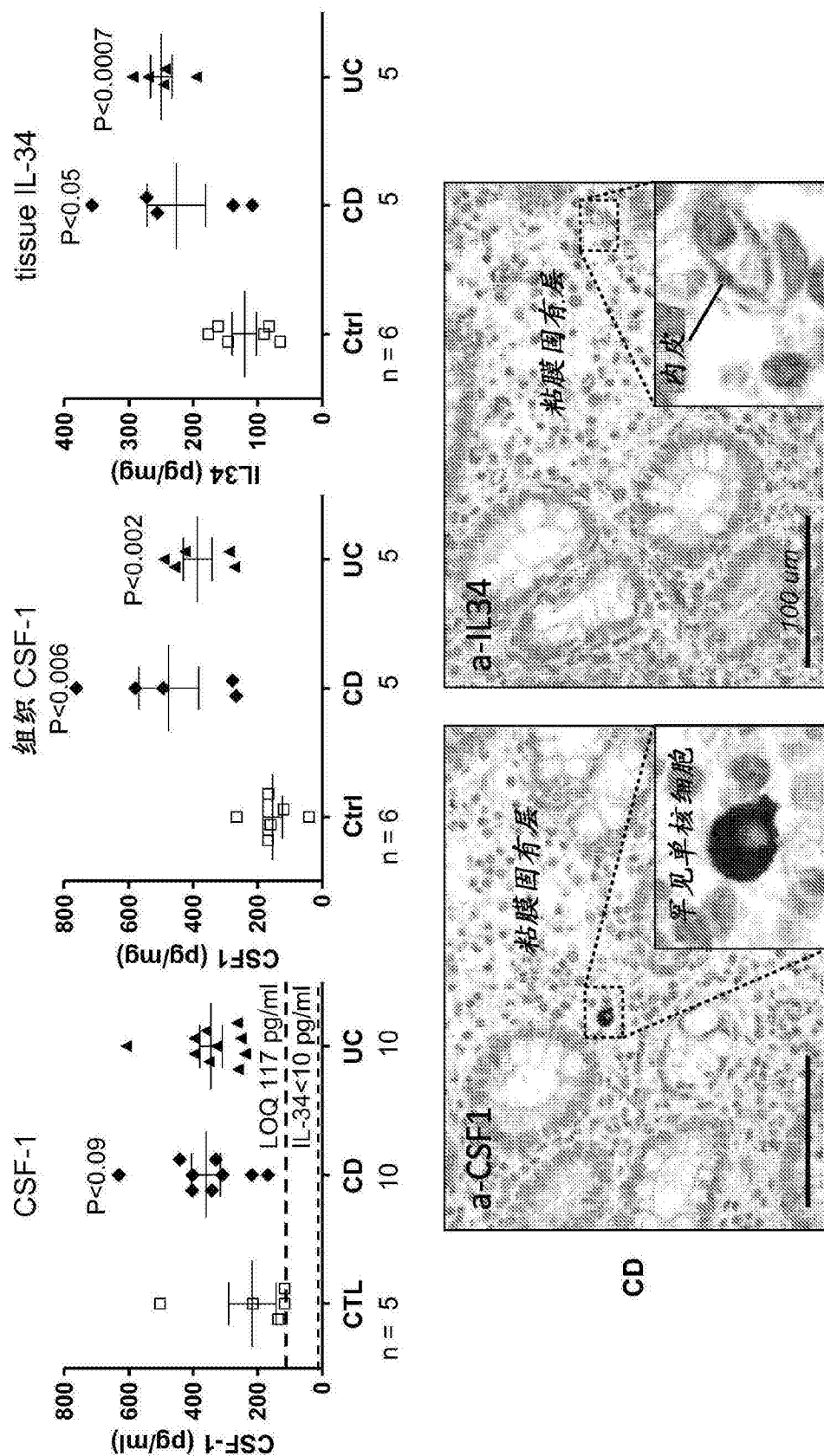


图17

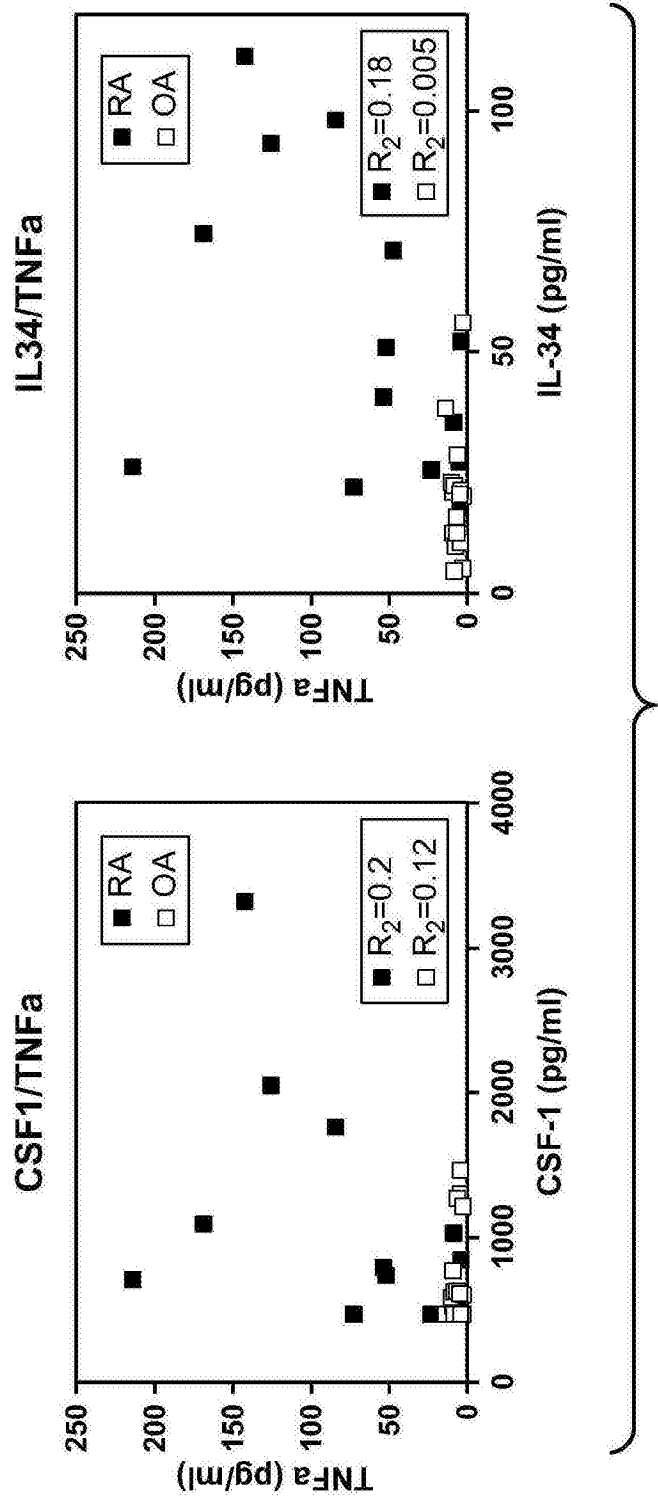


图18

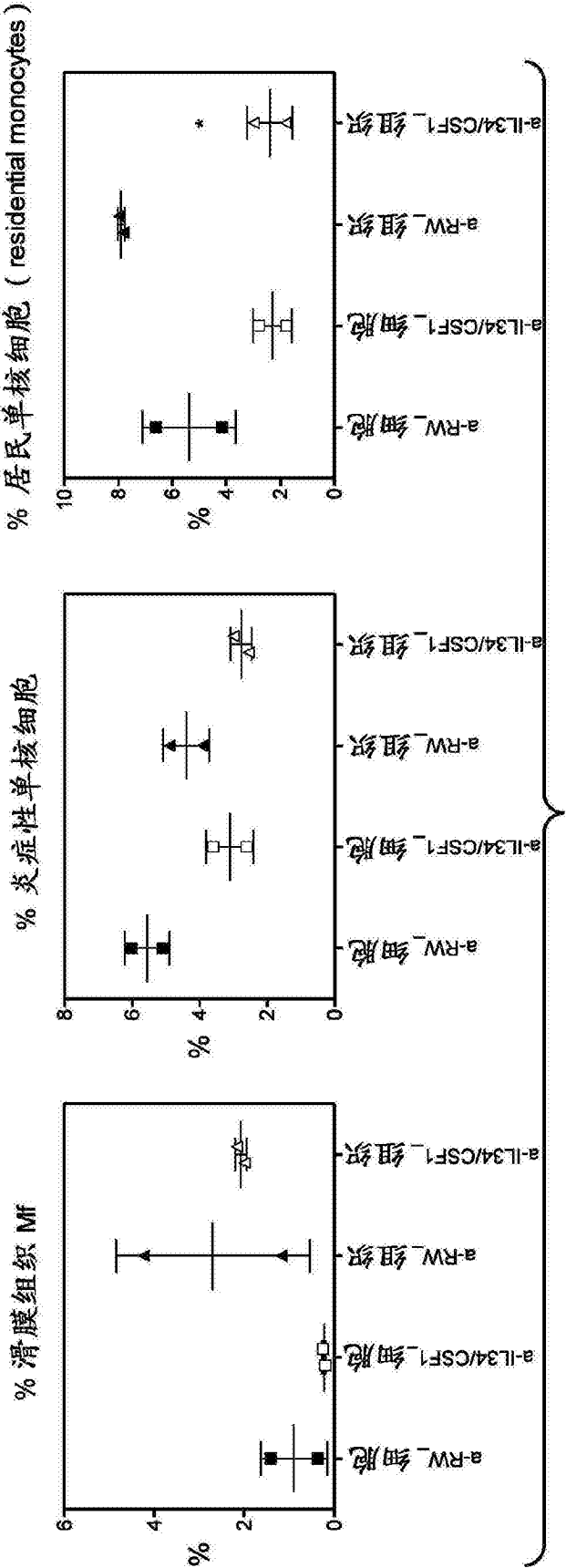


图19