



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118510539 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 16

(21) 申请号 202280087171.5

(22) 申请日 2022.12.30

(30) 优先权数据

63/295,681 2021.12.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/082628 2022.12.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/130073 EN 2023.07.06

(71) 申请人 纽约市哥伦比亚大学理事会

地址 美国

(72) 发明人 A·拉撒 A·M·阿里

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 张小勇

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/02 (2006.01)

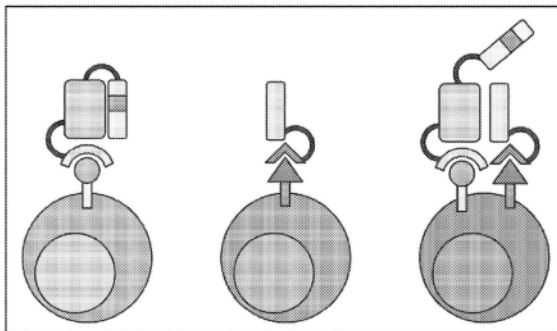
权利要求书6页 说明书59页 附图24页

(54) 发明名称

用于靶向第一细胞的双特异性分子

(57) 摘要

本文所述的主题涉及一种使用识别第一细胞表面上不同组织谱系的两种抗原标志物的双特异性分子来治疗有需要的受试者的癌症的方法。



1. 一种双特异性分子,其包含至少两个抗原结合区,其中每个抗原结合区结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。

2. 如权利要求1所述的双特异性分子,其中第一抗原是上皮细胞谱系标志物。

3. 如权利要求2所述的双特异性分子,其中所述上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。

4. 如权利要求2所述的双特异性分子,其中所述上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。

5. 如权利要求4所述的双特异性分子,其中EpCAM包含SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:12。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的双特异性分子,其中第二抗原是巨噬细胞谱系标志物。

7. 如权利要求6所述的双特异性分子,其中所述巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。

8. 如权利要求6所述的双特异性分子,其中所述巨噬细胞谱系标志物是CD163。

9. 如权利要求8所述的双特异性分子,其中CD163包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的双特异性分子,其中所述癌症包括实体瘤。

11. 如权利要求1所述的双特异性分子,其中所述癌症是乳腺癌、脑癌、胃肠癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、肺癌、胸腺癌、卵巢癌、前列腺癌或子宫内膜癌。

12. 如权利要求11所述的双特异性分子,其中所述胃肠癌是胃癌或结肠直肠癌。

13. 如权利要求1-9中任一项所述的双特异性分子,其中所述癌症包括液体癌症。

14. 如权利要求13所述的双特异性分子,其中所述液体癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。

15. 如权利要求13所述的双特异性分子,其中所述液体癌症是急性髓系白血病(AML)。

16. 如权利要求13所述的双特异性分子,其中所述液体癌症是B细胞恶性肿瘤。

17. 如权利要求13所述的双特异性分子,其中所述液体癌症是髓系肿瘤、骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、MDS/MPN重叠综合征、急性髓系白血病或慢性髓系白血病。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的双特异性分子,其中所述第一抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:36的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:37的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:38的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:33的重链CDR1、SEQ ID NO:34的重链CDR2和SEQ ID NO:35的重链CDR3。

19. 如权利要求18所述的双特异性分子,其中所述第二抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:42的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:43的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:44的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:39的重链CDR1、SEQ ID NO:40的重链CDR2和SEQ ID NO:41的重链CDR3。

20. 如权利要求18所述的双特异性分子,其中所述第二抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:48的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:49的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:50的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:45的重链CDR1、SEQ ID NO:46的重链CDR2和SEQ ID NO:47的重链CDR3。

21. 如权利要求1-17中任一项所述的双特异性分子,其中所述第一抗原结合区包含SEQ ID NO:28的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:27的重链可变(VH)区。

22. 如权利要求21所述的双特异性分子,其中所述第二抗原结合区包含SEQ ID NO:30的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:29的重链可变(VH)区。

23. 如权利要求21所述的双特异性分子,其中所述第二抗原结合区包含SEQ ID NO:32的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:31的重链可变(VH)区。

24. 如权利要求13-17所述的双特异性分子,其中所述第一抗原和所述第二抗原是巨噬细胞谱系标志物。

25. 如权利要求24所述的双特异性分子,其中所述第一抗原是CD117、CD34或CD123,并且所述第二抗原是CD163。

26. 如权利要求1所述的双特异性分子,其中TFC是转移性TFC。

27. 如权利要求1-26中任一项所述的双特异性分子,其中所述双特异性分子是双特异性抗体或其抗原结合片段。

28. 如权利要求27所述的双特异性分子,其中所述双特异性抗体与药物缀合。

29. 如权利要求28所述的双特异性分子,其中所述药物是毒素。

30. 如权利要求28所述的双特异性分子,其中所述药物是化疗剂。

31. 如权利要求1-26中任一项所述的双特异性分子,其中所述双特异性分子包括双纳米抗体、BiTE、tandAb、DART、DART-Fc、DARPin、scFv、scFv-HAS-scFV和DNL-Fab3。

32. 如权利要求1-26中任一项所述的双特异性分子,其中所述双特异性分子是双特异性嵌合抗原受体(CAR)。

33. 如权利要求1-26中任一项所述的双特异性分子,其中所述双特异性分子是包含第一多肽和第二多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原。

34. 如权利要求33所述的双特异性分子,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19。

35. 如权利要求33所述的双特异性分子,其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21。

36. 如权利要求32所述的双特异性分子,其中所述双特异性CAR是synNotch CAR。

37. 如权利要求1-26所述的双特异性分子,其中所述双特异性分子是包含第一多肽、第二多肽和第三多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原,其中所述第三多肽与CAR结合,并且其中所述第三多肽与所述第一多肽或所述第二多肽可操作地连接。

38. 如权利要求1-26所述的双特异性分子,其中所述双特异性分子包括分裂型CAR-T系统,所述分裂型CAR-T系统包含嵌合抗原受体(CAR)模块和嵌合共刺激受体(CCR)模块,其中所述CAR模块包含第一抗原结合区和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域的多肽,其中所述CCR模块包含第二抗原结合区和两个或更多个共刺激结构域的多肽,并且其中所述CAR模块和所述CCR模块各自结合癌症的TFC上的不同抗原。

39. 如权利要求28所述的双特异性分子,其中所述分裂型CAR-T系统包含表4的多肽序列中的一个或多个多肽序列。

40. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-39中任一项所述的双特异性分子。
41. 一种多核苷酸,其编码如权利要求1-39中任一项所述的双特异性分子。
42. 一种载体,其包含如权利要求41所述的多核苷酸。
43. 一种病毒,其包含如权利要求41所述的多核苷酸。
44. 一种基因工程改造的细胞,其包含如权利要求1-39中任一项所述的双特异性分子。
45. 一种基因工程改造的细胞,其包含如权利要求41所述的多核苷酸。
46. 一种治疗或预防有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含至少两个抗原结合区的双特异性分子,其中每个抗原结合区结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。
47. 如权利要求46所述的方法,其中第一抗原是上皮细胞谱系标志物。
48. 如权利要求47所述的方法,其中所述上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。
49. 如权利要求48所述的方法,其中所述上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。
50. 如权利要求49所述的方法,其中EpCAM包含SEQ ID NO:7或SEQ ID:12。
51. 如权利要求46-50中任一项所述的方法,其中第二抗原是巨噬细胞谱系标志物。
52. 如权利要求51所述的方法,其中所述巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。
53. 如权利要求51所述的方法,其中所述巨噬细胞谱系标志物是CD163。
54. 如权利要求53所述的方法,其中CD163包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13。
55. 如权利要求46-54中任一项所述的方法,其中所述癌症包括实体瘤。
56. 如权利要求55所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌、脑肿瘤、胃肠癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、肺癌、胸腺癌、卵巢癌、前列腺癌或子宫内膜癌。
57. 如权利要求56所述的方法,其中所述胃肠癌是胃癌或结肠直肠癌。
58. 如权利要求46-54所述的方法,其中所述癌症是液体癌症。
59. 如权利要求58所述的方法,其中所述液体癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。
60. 如权利要求58所述的方法,其中所述液体癌症是急性髓系白血病(AML)。
61. 如权利要求58所述的方法,其中所述液体癌症是B细胞恶性肿瘤。
62. 如权利要求58所述的方法,其中所述液体癌症是髓系肿瘤、骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、MDS/MPN重叠综合征、急性髓系白血病或慢性髓系白血病。
63. 如权利要求46-62中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:36的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:37的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:38的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:33的重链CDR1、SEQ ID NO:34的重链CDR2和SEQ ID NO:35的重链CDR3。
64. 如权利要求63所述的方法,其中所述第二抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:42的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:43的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:44的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:39的重链CDR1、SEQ ID NO:40的重链CDR2和SEQ ID NO:41的重链CDR3。

65. 如权利要求63所述的方法,其中所述第二抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:48的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:49的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:50的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:45的重链CDR1、SEQ ID NO:46的重链CDR2和SEQ ID NO:47的重链CDR3。

66. 如权利要求46-62中任一项所述的方法,其中所述第一抗原结合区包含SEQ ID NO:28的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:27的重链可变(VH)区。

67. 如权利要求66所述的方法,其中所述第二抗原结合区包含SEQ ID NO:30的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:29的重链可变(VH)区。

68. 如权利要求66所述的方法,其中所述第二抗原结合区包含SEQ ID NO:32的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:31的重链可变(VH)区。

69. 如权利要求58-62所述的方法,其中所述第一抗原和所述第二抗原是巨噬细胞谱系标志物。

70. 如权利要求69所述的方法,其中所述第一抗原是CD117、CD34或CD123,并且所述第二抗原是CD163。

71. 如权利要求46所述的方法,其中TFC是转移性TFC。

72. 如权利要求46-71中任一项所述的方法,其中所述双特异性分子是双特异性抗体或其抗原结合片段。

73. 如权利要求72所述的方法,其中所述双特异性抗体与药物缀合。

74. 如权利要求73所述的方法,其中所述药物是毒素。

75. 如权利要求73所述的方法,其中所述药物是化疗剂。

76. 如权利要求46-71中任一项所述的方法,其中所述双特异性分子包括双纳米抗体、BiTE、tandAb、DART、DART-Fc、DARPin、scFv、scFv-HAS-scFv和DNL-Fab3。

77. 如权利要求46-71中任一项所述的方法,其中所述双特异性分子是双特异性嵌合抗原受体(CAR)。

78. 如权利要求46-71中任一项所述的方法,其中所述双特异性分子是包含第一多肽和第二多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原。

79. 如权利要求66所述的方法,其中所述第一多肽包含SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19。

80. 如权利要求66所述的方法,其中所述第二多肽包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21。

81. 如权利要求80所述的方法,其中所述双特异性CAR是synNotch CAR。

82. 如权利要求80中任一项所述的方法,其中所述双特异性分子是包含第一多肽、第二多肽和第三多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原,其中所述第三多肽与双特异性CAR结合,并且其中所述第三多肽与所述第一多肽或所述第二多肽可操作地连接。

83. 如权利要求46-71所述的方法,其中所述双特异性分子包括分裂型CAR-T系统,所述分裂型CAR-T系统包含嵌合抗原受体(CAR)模块和嵌合共刺激受体(CCR)模块,

其中所述CAR模块包含含有第一抗原结合区和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域的多肽,

其中所述CCR模块包含含有第二抗原结合区和两个或更多个共刺激结构域的多肽,并且

其中所述CAR模块和所述CCR模块各自结合癌症的TFC上的不同抗原。

84.如权利要求63所述的方法,其中所述分裂型CAR-T系统包含表4的多肽序列中的一个或多个多肽序列。

85.一种工程改造的细胞,其表达至少一种上皮细胞谱系标志物和至少一种巨噬细胞谱系标志物。

86.如权利要求85所述的细胞,其中所述至少一种上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。

87.如权利要求85所述的细胞,其中所述至少一种上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。

88.如权利要求87所述的细胞,其中EpCAM包含SEQ ID NO:7或SEQ ID:12。

89.如权利要求85-88中任一项所述的细胞,其中所述至少一种巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。

90.如权利要求85所述的细胞,其中所述至少一种巨噬细胞谱系标志物是CD163。

91.如权利要求90所述的细胞,其中CD163包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13。

92.一种诊断癌症的方法,其中所述方法包括检测表达至少一种上皮细胞谱系标志物和至少一种巨噬细胞谱系标志物的细胞。

93.如权利要求92所述的方法,其中所述至少一种上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。

94.如权利要求92所述的方法,其中所述至少一种上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。

95.如权利要求94所述的方法,其中EpCAM包含SEQ ID NO:7。

96.如权利要求92-95中任一项所述的方法,其中所述至少一种巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。

97.如权利要求96所述的方法,其中所述至少一种巨噬细胞谱系标志物是CD163。

98.如权利要求97所述的方法,其中CD163包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11。

99.如权利要求92所述的方法,其中所述检测包括其中双特异性分子与所述至少一种上皮细胞谱系标志物和所述至少一种巨噬细胞谱系标志物结合的测定。

100.如权利要求92-99中任一项所述的方法,其中所述癌症包括实体瘤。

101.如权利要求100所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌、脑癌、胃肠癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、肺癌、胸腺癌、卵巢癌、前列腺癌或子宫内膜癌。

102.如权利要求101所述的方法,其中所述胃肠癌是胃癌或结肠直肠癌。

103.如权利要求92-99中任一项所述的方法,其中所述癌症是液体癌症。

104.如权利要求103所述的方法,其中所述液体癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。

105.如权利要求103所述的方法,其中所述液体癌症是急性髓系白血病(AML)。

106.如权利要求103所述的方法,其中所述液体癌症是B细胞恶性肿瘤。

107. 如权利要求103所述的方法,其中所述液体癌症是髓系肿瘤、骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、MDS/MPN重叠综合征、急性髓系白血病或慢性髓系白血病。

## 用于靶向第一细胞的双特异性分子

[0001] 本申请要求2021年12月31日提交的美国临时专利申请63/295,681的权益和优先权,该临时专利申请的全部内容据此以引用的方式并入。

[0002] 本专利公开包含受版权保护的材料。版权所有者的反对由任何人以专利文件或专利公开出现在美国专利与商标局专利文档或记录中的形式复制所述专利文件或专利公开,但是另外保留任何所有版权权利。

[0003] 本文引用的所有专利、专利申请和出版物通过引用整体并入本文。这些出版物的全部公开以引用的方式并入本申请,以更全面地描述截至本文所述的发明之日本领域技术人员已知的现有技术。

### 背景技术

[0004] 癌症代表一类以异常细胞生长为特征的病症。癌细胞可能扩散并侵入身体的其他器官。最常见的癌症症状包括肿块、异常出血、长期咳嗽和不明原因的体重减轻。还存在不形成细胞团的血液癌症。人体内可发生超过100种类型的癌症,其中大多数是无法治愈的。

### 发明内容

[0005] 在某些方面,本文所述的发明提供一种包含至少两个抗原结合区的双特异性分子,其中每个抗原结合区结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。

[0006] 在一些实施方案中,第一抗原是上皮细胞谱系标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。在一些实施方案中,EpCAM包含SEQ ID NO:7或SEQ ID:12。在一些实施方案中,第二抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,CD163包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13。

[0007] 在一些实施方案中,癌症包括实体瘤。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、脑癌、胃肠癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、肺癌、胸腺癌、卵巢癌、前列腺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,胃肠癌是胃癌或结肠直肠癌。

[0008] 在一些实施方案中,癌症包括液体癌症。在一些实施方案中,液体癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,液体癌症是急性髓系白血病(AML)。在一些实施方案中,液体癌症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,液体癌症是髓系肿瘤、骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、MDS/MPN重叠综合征、急性髓系白血病或慢性髓系白血病。

[0009] 在一些实施方案中,第一抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:36的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:37的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:38的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:33的重链CDR1、SEQ ID NO:34的重链CDR2和SEQ ID NO:35的重链CDR3。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含轻链可

变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:42的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:43的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:44的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:39的重链CDR1、SEQ ID NO:40的重链CDR2和SEQ ID NO:41的重链CDR3。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:48的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:49的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:50的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:45的重链CDR1、SEQ ID NO:46的重链CDR2和SEQ ID NO:47的重链CDR3。

[0010] 在一些实施方案中,第一抗原结合区包含SEQ ID NO:28的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:27的重链可变(VH)区。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含SEQ ID NO:30的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:29的重链可变(VH)区。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含SEQ ID NO:32的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:31的重链可变(VH)区。

[0011] 在一些实施方案中,第一抗原和所述第二抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,第一抗原是CD117、CD34或CD123,所述第二抗原是CD163。在一些实施方案中,TFC是转移性TFC。

[0012] 在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,双特异性抗体与药物缀合。在一些实施方案中,药物是毒素。在一些实施方案中,药物是化疗剂。在一些实施方案中,双特异性分子包括双纳米抗体、BiTE、tandAb、DART、DART-Fc、DARPin、scFv、scFv-HAS-scFV和DNL-Fab3。在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,双特异性分子是包含第一多肽和第二多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原。

[0013] 在一些实施方案中,第一多肽包含SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19。在一些实施方案中,第二多肽包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21。

[0014] 在一些实施方案中,双特异性CAR是synNotch CAR。在一些实施方案中,双特异性分子是包含第一多肽、第二多肽和第三多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原,其中所述第三多肽与CAR结合,并且其中所述第三多肽与所述第一多肽或所述第二多肽可操作地连接。

[0015] 在一些实施方案中,双特异性分子包括分裂型CAR-T系统,所述分裂型CAR-T系统包含嵌合抗原受体(CAR)模块和嵌合共刺激受体(CCR)模块,其中所述CAR模块包含含有第一抗原结合区和CD3z信号传导结构域的多肽,其中所述CCR模块包含含有第二抗原结合区和两个或更多个共刺激结构域的多肽,并且其中所述CAR模块和所述CCR模块各自结合癌症的TFC上的不同抗原。在一些实施方案中,分裂型CAR-T系统包含表4的多肽序列中的一个或多个多肽序列。

[0016] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种药物组合物,其包含根据本文所述的任何实施方案所述的双特异性分子。

[0017] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种多核苷酸,其编码根据本文所述的任何实施方案所述的双特异性分子。

[0018] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种载体,其包含根据本文所述的任何实施方案所述的多核苷酸。

[0019] 在某些方面,本文所述的主题提供了一种病毒,其包含根据本文所述的任何实施方案所述的多核苷酸。

[0020] 在某些方面,本文所述的主题提供了一种基因工程改造的细胞,其包含根据本文所述的任何实施方案所述的双特异性分子。

[0021] 在某些方面,本文所述的主题提供了一种基因工程改造的细胞,其包含根据本文所述的任何实施方案所述的多核苷酸。

[0022] 在某些方面,本文所述的主题提供了一种治疗或预防有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含至少两个抗原结合区的双特异性分子,其中每个抗原结合区结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。

[0023] 在一些实施方案中,第一抗原是上皮细胞谱系标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。在一些实施方案中,EpCAM包含SEQ ID NO:7或SEQ ID:12。

[0024] 在一些实施方案中,第二抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,CD163包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13。

[0025] 在一些实施方案中,癌症包括实体瘤。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、脑肿瘤、胃肠癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、肺癌、胸腺癌、卵巢癌、前列腺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,胃肠癌是胃癌或结肠直肠癌。

[0026] 在一些实施方案中,癌症是液体癌症。在一些实施方案中,液体癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,液体癌症是急性髓系白血病(AML)。在一些实施方案中,液体癌症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,液体癌症是髓系肿瘤、骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、MDS/MPN重叠综合征、急性髓系白血病或慢性髓系白血病。

[0027] 在一些实施方案中,第一抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:36的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:37的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:38的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:33的重链CDR1、SEQ ID NO:34的重链CDR2和SEQ ID NO:35的重链CDR3。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:42的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:43的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:44的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:39的重链CDR1、SEQ ID NO:40的重链CDR2和SEQ ID NO:41的重链CDR3。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:48的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:49的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:50的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:45的重链CDR1、SEQ ID NO:46的重链CDR2和SEQ ID NO:47的重链CDR3。

[0028] 在一些实施方案中,第一抗原结合区包含SEQ ID NO:28的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:27的重链可变(VH)区。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含SEQ ID NO:30的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:29的重链可变(VH)区。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含SEQ ID NO:32的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:31的重链可变(VH)区。

[0029] 在一些实施方案中,第一抗原和所述第二抗原为巨噬细胞谱系标志物。在一些实

施方案中,第一抗原是CD117、CD34或CD123,所述第二抗原是CD163。

[0030] 在一些实施方案中,TFC是转移性TFC。在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0031] 在一些实施方案中,双特异性抗体与药物缀合。在一些实施方案中,药物是毒素。在一些实施方案中,药物是化疗剂。

[0032] 在一些实施方案中,双特异性分子包括双纳米抗体、BiTE、tandAb、DART、DART-Fc、DARPin、scFv、scFv-HAS-scFV和IDNL-Fab3。在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,双特异性分子是包含第一多肽和第二多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原。在一些实施方案中,第一多肽包含SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19。在一些实施方案中,第二多肽包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21。

[0033] 在一些实施方案中,双特异性CAR是synNotch CAR。在一些实施方案中,双特异性分子是包含第一多肽、第二多肽和第三多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原,其中所述第三多肽与双特异性CAR结合,并且其中所述第三多肽与所述第一多肽或所述第二多肽可操作地连接。

[0034] 在一些实施方案中,双特异性分子包括分裂型CAR-T系统,所述分裂型CAR-T系统包含嵌合抗原受体(CAR)模块和嵌合共刺激受体(CCR)模块,其中所述CAR模块包含含有第一抗原结合区和CD3z信号传导结构域的多肽,其中所述CCR模块包含含有第二抗原结合区和两个或更多个共刺激结构域的多肽,并且其中所述CAR模块和所述CCR模块各自结合癌症的TFC上的不同抗原。在一些实施方案中,分裂型CAR-T系统包含表4的多肽序列中的一个或多个多肽序列。

[0035] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种工程改造的细胞,其表达至少一种上皮细胞谱系标志物和至少一种巨噬细胞谱系标志物。

[0036] 在一些实施方案中,至少一种上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,至少一种上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。在一些实施方案中,EpCAM包含SEQ ID NO:7或SEQ ID:12。

[0037] 在一些实施方案中,至少一种巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,至少一种巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,CD163包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13。

[0038] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种诊断癌症的方法,其中所述方法包括检测表达至少一种上皮细胞谱系标志物和至少一种巨噬细胞谱系标志物的细胞。

[0039] 在一些实施方案中,至少一种上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,至少一种上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。在一些实施方案中,EpCAM包含SEQ ID NO:7。

[0040] 在一些实施方案中,至少一种巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,至少一种巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,CD163包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11。

[0041] 在一些实施方案中,检测包括其中双特异性分子与所述至少一种上皮细胞谱系标

志物和所述至少一种巨噬细胞谱系标志物结合的测定。

[0042] 在一些实施方案中,癌症包括实体瘤。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、脑癌、胃肠癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、肺癌、胸腺癌、卵巢癌、前列腺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,胃肠癌是胃癌或结肠直肠癌。在一些实施方案中,癌症是液体癌症。在一些实施方案中,液体癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,液体癌症是急性髓系白血病(AML)。在一些实施方案中,液体癌症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,液体癌症是髓系肿瘤、骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、MDS/MPN重叠综合征、急性髓系白血病或慢性髓系白血病。

## 附图说明

[0043] 一个或多个附图以彩色提供。为了符合PCT专利申请的要求,本文中提供的许多附图都是最初以彩色创建的图像的黑白表示。

[0044] 图1示出了表现出主要或独有巨噬细胞表达的抗原。在最后两列,“+”表示存在表达,“-”表示不存在表达,空白表示表达未知。

[0045] 图2示出了表现出主要或独有上皮细胞表达的抗原。在最后两列,“+”表示存在表达,“-”表示不存在表达,空白表示表达未知。

[0046] 图3A至图3B示出了Co-LOCKR的一个实施方案。图3A示出了Co-LOCKR的构象变化。图3B示出了Co-LOCKR募集CAR-T细胞。

[0047] 图4示出了按尺寸分离细胞,其中选择大细胞。

[0048] 图5A至图5D示出了不表达谱系特异性抗原(LSA)(A)、单独表达每种LSA(B和C)或同时表达两种抗原(D)的细胞的示意图。使用不表达或表达单独LSA表达的细胞作为对照以显示在靶标上测试的各种模式的特异性。

[0049] 图6A至图6C示出了CD163(A)或EpCAM(B)或CD163和EpCAM二者(C)的表达的流式细胞术分析。左图示出了同种型对照,右图示出了用识别EpCAM(克隆9C4,PerCP/Cyanine5.5小鼠单克隆IgG2;目录号324213Biolegend)或CD163(克隆RM3/1,PE缀合的小鼠单克隆IgG2;目录号326506Biolegend)的抗体染色。

[0050] 图7A至图7C示出了笼(Cage)和钥(Key)分别与表达抗原A(图A)或抗原B(图B)的细胞结合的示意图。当钥不与笼共定位时,笼处于闭合构象并固定(sequester)门锁(latch)(图A),但是当钥和笼与同一细胞上的抗原A和B结合并共定位时,门锁从笼上释放(图C)。

[0051] 图8A至图8B示出了Co-LOCKR组分笼和钥蛋白(图A)或笼和钥蛋白变体(图B)的各种组分的示意图。A或B蛋白的抗原结合结构域以笼和钥的组合形式制备以鉴定最优组合。

[0052] 图9A至图9B示出了Co-LOCKR蛋白的表达和纯化。A)考马斯G250染色凝胶。B)使用抗His6抗体的免疫印迹。1)PageRuler™ Plus预染色蛋白梯。2)His6-TEV-EpCAM-ScFV\_笼(约64kDa)。3)His6-TEV\_钥-EpCAM-ScFV(约38kDa)。4)His6-TEV\_钥\_N3-EpCAM-ScFV(约37kDa)。5)PageRuler™ Plus预染色蛋白梯。6)His6-TEV-CD163-ScFV\_笼(约62kDa)。7)His6-TEV\_钥-CD163-ScFV(约35.8kDa)。8)His6-TEV-CD163-ScFV-笼\_I287A(约62kDa)。9)His6-TEV\_钥\_N3-CD163-ScFV(约35.5kDa)。

[0053] 图10示出了表达CAR模块和CCR模块的分裂型CAR-T细胞的接合的示意图。当分裂型CAR-T接合表达抗原A和B二者的靶细胞时,那么它被活化并受到共刺激,导致根除表达A

和B的细胞。分裂型CAR-T与表达A或B的细胞接合导致次优活化。

[0054] 图11示出了分裂型CAR-T系统的CAR和CCR模块的各种组分的示意图。A或B蛋白的抗原结合结构域以CAR和CCR的组合形式制备以鉴定最优组合。

### 具体实施方式

[0055] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种包含至少两个抗原结合区的双特异性分子,其中每个抗原结合区结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。

[0056] 在一些实施方案中,第一抗原是上皮细胞谱系标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。在一些实施方案中,EpCAM包含SEQ ID NO:7或SEQ ID:12。在一些实施方案中,第二抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,CD163包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13。

[0057] 在一些实施方案中,癌症包括实体瘤。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、脑癌、胃肠癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、肺癌、胸腺癌、卵巢癌、前列腺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,胃肠癌是胃癌或结肠直肠癌。

[0058] 在一些实施方案中,癌症包括液体癌症。在一些实施方案中,液体癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,液体癌症是急性髓系白血病(AML)。在一些实施方案中,液体癌症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,液体癌症是髓系肿瘤、骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、MDS/MPN重叠综合征、急性髓系白血病或慢性髓系白血病。

[0059] 在一些实施方案中,第一抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:36的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:37的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:38的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:33的重链CDR1、SEQ ID NO:34的重链CDR2和SEQ ID NO:35的重链CDR3。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:42的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:43的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:44的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:39的重链CDR1、SEQ ID NO:40的重链CDR2和SEQ ID NO:41的重链CDR3。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:48的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:49的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:50的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:45的重链CDR1、SEQ ID NO:46的重链CDR2和SEQ ID NO:47的重链CDR3。

[0060] 在一些实施方案中,第一抗原结合区包含SEQ ID NO:28的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:27的重链可变(VH)区。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含SEQ ID NO:30的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:29的重链可变(VH)区。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含SEQ ID NO:32的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:31的重链可变(VH)区。

[0061] 在一些实施方案中,第一抗原和所述第二抗原为巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,第一抗原是CD117、CD34或CD123,所述第二抗原是CD163。在一些实施方案中,TFC

是转移性TFC。

[0062] 在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,双特异性抗体与药物缀合。在一些实施方案中,药物是毒素。在一些实施方案中,药物是化疗剂。在一些实施方案中,双特异性分子包括双纳米抗体、BiTE、tandAb、DART、DART-Fc、DARPin、scFv、scFv-HAS-scFv和DNL-Fab3。在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,双特异性分子是包含第一多肽和第二多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原。

[0063] 在一些实施方案中,第一多肽包含SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19。在一些实施方案中,第二多肽包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21。

[0064] 在一些实施方案中,双特异性CAR是synNotch CAR。在一些实施方案中,双特异性分子是包含第一多肽、第二多肽和第三多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原,其中所述第三多肽与CAR结合,并且其中所述第三多肽与所述第一多肽或所述第二多肽可操作地连接。

[0065] 在一些实施方案中,双特异性分子包括分裂型CAR-T系统,所述分裂型CAR-T系统包含嵌合抗原受体(CAR)模块和嵌合共刺激受体(CCR)模块,其中所述CAR模块包含含有第一抗原结合区和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域的多肽,其中所述CCR模块包含含有第二抗原结合区和两个或更多个共刺激结构域的多肽,并且其中所述CAR模块和所述CCR模块各自结合癌症的TFC上的不同抗原。在一些实施方案中,分裂型CAR-T系统包含表4的多肽序列中的一个或多个多肽序列。

[0066] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种药物组合物,其包含根据本文所述的任何实施方案所述的双特异性分子。

[0067] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种多核苷酸,其编码根据本文所述的任何实施方案所述的双特异性分子。

[0068] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种载体,其包含根据本文所述的任何实施方案所述的多核苷酸。

[0069] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种病毒,其包含根据本文所述的任何实施方案所述的多核苷酸。

[0070] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种基因工程改造的细胞,其包含根据本文所述的任何实施方案所述的双特异性分子。

[0071] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种基因工程改造的细胞,其包含根据本文所述的任何实施方案所述的多核苷酸。

[0072] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种治疗或预防有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用包含至少两个抗原结合区的双特异性分子,其中每个抗原结合区结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。

[0073] 在一些实施方案中,第一抗原是上皮细胞谱系标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。在一些实施方案中,EpCAM包含SEQ ID NO:7或SEQ ID:12。在一些实施方案中,第二抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志

物是图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,CD163包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13。

[0074] 在一些实施方案中,癌症包括实体瘤。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、脑肿瘤、胃肠癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、肺癌、胸腺癌、卵巢癌、前列腺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,胃肠癌是胃癌或结肠直肠癌。

[0075] 在一些实施方案中,癌症是液体癌症。在一些实施方案中,液体癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,液体癌症是急性髓系白血病(AML)。在一些实施方案中,液体癌症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,液体癌症是髓系肿瘤、骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、MDS/MPN重叠综合征、急性髓系白血病或慢性髓系白血病。

[0076] 在一些实施方案中,第一抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:36的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:37的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:38的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:33的重链CDR1、SEQ ID NO:34的重链CDR2和SEQ ID NO:35的重链CDR3。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:42的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:43的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:44的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:39的重链CDR1、SEQ ID NO:40的重链CDR2和SEQ ID NO:41的重链CDR3。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中所述VL区包含SEQ ID NO:48的轻链CDR1(CDRL1)、SEQ ID NO:49的轻链CDR2(CDRL2)、SEQ ID NO:50的轻链CDR3(CDRL3),并且所述VH区包含SEQ ID NO:45的重链CDR1、SEQ ID NO:46的重链CDR2和SEQ ID NO:47的重链CDR3。

[0077] 在一些实施方案中,第一抗原结合区包含SEQ ID NO:28的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:27的重链可变(VH)区。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含SEQ ID NO:30的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:29的重链可变(VH)区。在一些实施方案中,第二抗原结合区包含SEQ ID NO:32的轻链可变(VL)区和SEQ ID NO:31的重链可变(VH)区。

[0078] 在一些实施方案中,第一抗原和所述第二抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,第一抗原是CD117、CD34或CD123,所述第二抗原是CD163。

[0079] 在一些实施方案中,TFC是转移性TFC。在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0080] 在一些实施方案中,双特异性抗体与药物缀合。在一些实施方案中,药物是毒素。在一些实施方案中,药物是化疗剂。

[0081] 在一些实施方案中,双特异性分子包括双纳米抗体、BiTE、tandAb、DART、DART-Fc、DARPin、scFv、scFv-HAS-scFV和DNL-Fab3。在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,双特异性分子是包含第一多肽和第二多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原。在一些实施方案中,第一多肽包含SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:19。在一些实施方案中,第二多肽包含SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:21。

[0082] 在一些实施方案中,双特异性CAR是synNotch CAR。在一些实施方案中,双特异性

分子是包含第一多肽、第二多肽和第三多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原,其中所述第三多肽与双特异性CAR结合,并且其中所述第三多肽与所述第一多肽或所述第二多肽可操作地连接。

[0083] 在一些实施方案中,双特异性分子包括分裂型CAR-T系统,所述分裂型CAR-T系统包含嵌合抗原受体(CAR)模块和嵌合共刺激受体(CCR)模块,其中所述CAR模块包含含有第一抗原结合区和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域的多肽,其中所述CCR模块包含含有第二抗原结合区和两个或更多个共刺激结构域的多肽,并且其中所述CAR模块和所述CCR模块各自结合癌症的TFC上的不同抗原。在一些实施方案中,分裂型CAR-T系统包含表4的多肽序列中的一个或多个多肽序列。

[0084] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种工程改造的细胞,其表达至少一种上皮细胞谱系标志物和至少一种巨噬细胞谱系标志物。

[0085] 在一些实施方案中,至少一种上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,至少一种上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。在一些实施方案中,EpCAM包含SEQ ID NO:7或SEQ ID:12。

[0086] 在一些实施方案中,至少一种巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,至少一种巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,CD163包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13。

[0087] 在某些方面,本文所述的主体提供了一种诊断癌症的方法,其中所述方法包括检测表达至少一种上皮细胞谱系标志物和至少一种巨噬细胞谱系标志物的细胞。

[0088] 在一些实施方案中,至少一种上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,至少一种上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。在一些实施方案中,EpCAM包含SEQ ID NO:7。

[0089] 在一些实施方案中,至少一种巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,至少一种巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,CD163包含SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11。

[0090] 在一些实施方案中,检测包括其中双特异性分子与所述至少一种上皮细胞谱系标志物和所述至少一种巨噬细胞谱系标志物结合的测定。

[0091] 在一些实施方案中,癌症包括实体瘤。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、脑癌、胃肠癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、肺癌、胸腺癌、卵巢癌、前列腺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,胃肠癌是胃癌或结肠直肠癌。在一些实施方案中,癌症是液体癌症。在一些实施方案中,液体癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,液体癌症是急性髓系白血病(AML)。在一些实施方案中,液体癌症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,液体癌症是髓系肿瘤、骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、MDS/MPN重叠综合征、急性髓系白血病或慢性髓系白血病。

[0092] 癌细胞的特异性靶向已经是癌症领域的主要挑战。<sup>1</sup>最常见的癌症治疗方法(诸如化疗和放射疗法)是不加选择的并且靶向癌细胞和正常(非癌症或健康)细胞二者,导致患者经历许多痛苦的副作用。杀死癌细胞的靶向方法,诸如免疫治疗方法(包括抗体和嵌合抗原疗法(CAR-T)),具有精确地消除表达一种或多种预定抗原的细胞的能力。然而,主要挑战是鉴定对可以靶向的癌细胞具有特异性的抗原。<sup>1,2</sup>这一挑战是由于缺乏仅存在于癌细胞

而不存在于正常细胞上的单一独有抗原。区分癌细胞的策略包括靶向两种或更多种抗原。<sup>1</sup>

[0093] 在一些实施方案中,本文公开的主题涉及大多数癌症不是自发产生的发现。对器官或组织的压力可以导致受压力的细胞产生英勇的生存策略。在一些实施方案中,这些细胞生存策略之一包括与血源性巨噬细胞融合。<sup>3-6</sup>这种杂交的组织细胞和巨噬细胞被称为第一细胞(TFC)并且它引起癌性生长。因此,癌症不一定始于一种细胞,但是它可以始于两种细胞。

[0094] 在一些实施方案中,这种TFC经历基因组重组和重新工程改造,具有多种结果,包括:

[0095] 在一些实施方案中,TFC具有逃避免疫系统的能力——因为TFC表达巨噬细胞标志物,所以它可以逃避免疫系统。<sup>4,5,7-13</sup>

[0096] 在一些实施方案中,TFC是杂交细胞(hybrid),保留两种起源组织的特性。作为一部分巨噬细胞,TFC可以不受惩罚地遍及全身,并且可以与转移显著相关。<sup>4,5,7-13</sup>

[0097] 在一些实施方案中,TFC可以在视觉上鉴定。在一些实施方案中,TFC表现为巨型多倍体细胞。在一些实施方案中,在100%的实体瘤中可以观察到TFC呈巨型多倍体细胞。在一些实施方案中,在骨髓增生异常综合征(MDS)病例中可以观察到TFC呈巨型多倍体细胞。在一些实施方案中,在急性髓系白血病(AML)病例中可以观察到TFC呈巨型多倍体细胞。<sup>7</sup>

[0098] 在实体瘤中,TFC可以表达其来源的上皮组织的至少一种标志物和巨噬细胞的至少一种标志物<sup>5,14</sup>。在一些实施方案中,上皮组织标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。EpCAM被发现在身体表面和腔内膜(lining)的上皮细胞中。EpCAM可以跨越上皮细胞的膜,并且它对于细胞粘附很重要。在一些实施方案中,巨噬细胞标志物是CD163,一种结合珠蛋白-血红蛋白复合物的清道夫受体。

[0099] 在一些实施方案中,TFC不同于其他肿瘤细胞。在一些实施方案中,TFC不同于循环肿瘤细胞(CTC)。<sup>7</sup>

[0100] 在一些实施方案中,TFC还被称为CAML(癌症相关巨噬细胞样细胞)或PACC(多非整倍体癌细胞)或PGCC(多倍体巨型癌细胞)及其他名称。<sup>7</sup>在一些实施方案中,TFC可被称为融合细胞或巨型细胞。

[0101] 在一些实施方案中,TFC的独特之处在于它表达EpCAM和CD163标志物。<sup>7</sup>EpCAM表达仅限于上皮谱系的细胞,并且CD163表达仅限于巨噬细胞谱系。在一些实施方案中,不存在表达这两种抗原的正常细胞。

[0102] 在一些实施方案中,本文所述的主题涉及靶向两种抗原以消除TFC作为患者癌症疗法的一部分。在一些实施方案中,抗原是上皮细胞谱系标志物和巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,抗原是EpCAM和CD163。在一些实施方案中,本文所述的任何识别两种抗原的双特异性分子(包括但不限于识别两种抗原的双特异性抗体)靶向两种抗原。

[0103] 在一些实施方案中,为了避免靶向单独表达这些抗原中的任一种的细胞,可以使用布尔逻辑运算符AND系统。在一些实施方案中,由于两种抗原(EpCAM和CD163)的存在,故该系统仅靶向TFC。在一些实施方案中,该策略放过单独表达CD163(巨噬细胞谱系)或EpCAM(上皮谱系)的细胞。

[0104] 布尔运算符可以形成数学集合和数据库逻辑的基础,允许将检索词连接在一起以缩小或扩大检索结果。有三种基本布尔运算符-AND、OR和NOT。使用AND运算符将缩小检索结

果,因为所有检索词必须都出现在结果记录中。仅具有两种状态的基于逻辑的模型被称为布尔模型。在一些实施方案中,主要用于集成电路的设计和功能的布尔逻辑门的原理在本文中执行以感测一个或多个输入并将这些输入整合以产生期望生物学输出。在一些实施方案中,逻辑AND门在所有其指定的输入存在的情况下产生输出。在本文公开的主题的一些实施方案中,逻辑AND门已经在设计分子电路中执行。在一些实施方案中,仅当抗原(输入)EpCAM和CD163二者均存在于同一细胞上时才可以使细胞毒性反应(输出)成为可能。

[0105] 在一些实施方案中,当靶向TFC上的两种抗原时,可以利用下述的一种或多种方法。在一些实施方案中,方法是基于大生物分子(例如,蛋白质)。在一些实施方案中,方法是基于过继性细胞疗法(例如,CAR-T)。

[0106] 在一些实施方案中,本文公开的主题涉及一种选择性靶向癌细胞的方法,所述方法包括靶向至少两个抗原结合区,其中每个抗原结合区结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。在一些实施方案中,第一抗原是上皮细胞谱系标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。在一些实施方案中,第二抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,TFC表达图2的标志物中的一种或多种和图1的标志物中的一种或多种。在一些实施方案中,例如在骨髓系白血病或骨髓起源的癌症中,第一抗原和第二抗原是巨噬细胞谱系的两种标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系的两种标志物选自图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,第一抗原是CD117、CD34、CD123或其任何组合,第二抗原是CD163。在一些实施方案中,癌症包括实体瘤。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、脑肿瘤、胃肠癌(包括胃癌和结肠直肠癌)、胰腺癌、肾癌、肝癌、肺癌、胸腺癌、卵巢癌、前列腺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,癌症是液体癌症。在一些实施方案中,液体癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,液体癌症是B细胞恶性肿瘤,包括但不限于多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或慢性淋巴细胞白血病(CLL)。在一些实施方案中,液体癌症是急性髓系白血病(AML)。在一些实施方案中,液体癌症是髓系肿瘤。在一些实施方案中,液体癌症是骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、MDS/MPN重叠综合征、急性髓系白血病或慢性髓系白血病。在一些实施方案中,TFC是转移性TFC。在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,双特异性抗体或其抗原结合片段与毒素缀合。在一些实施方案中,双特异性分子包括双纳米抗体、DARpins、BiTE、tandAb、DART、DART-Fc、scFv、scFv-HAS-scFV和DNL-Fab3。在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,双特异性分子是包含第一多肽和第二多肽的共门控正交笼-钥蛋白(co-latching orthogonal cage-key protein, Co-LOCKR),其中第一多肽和第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原。

[0107] 在一些实施方案中,双特异性分子是包含第一多肽、第二多肽和第三多肽的Co-LOCKR,其中第一多肽和第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原,其中第三多肽结合CAR,并且其中第三多肽与第一多肽或第二多肽可操作地连接。在一些实施方案中,在与其各自的抗原结合后第一多肽和第二多肽存在构象变化。在一些实施方案中,构象变化导致第三多肽暴露于周围蛋白质。在一些实施方案中,CAR在T细胞的表面上表达。在一些实施方

案中,双特异性CAR是synNotch CAR。在一些实施方案中,双特异性分子包含设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)。在一些实施方案中,Co-LOCKR的第一多肽和第二多肽使用DARPin结构域结合癌症的TFC上其各自的抗原(例如,EpCAM和CD163)。

[0108] 本发明的双特异性分子

[0109] 在某些方面,本发明提供了一种包含至少两个抗原结合区的双特异性分子,其中每个抗原结合区结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。

[0110] 在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性抗体、其功能等同物、其抗原结合片段、其衍生物、或抗体样双特异性分子。此类分子是本领域已知的,并且包括但不限于具有全长重链和轻链、全长重链、全长轻链、Fab片段、单链Fv(scFv)片段的分子的二价单链抗体或双抗体(其各自对靶抗原具有特异性),单结构域抗体,或对靶抗原具有特异性的一种或多种肽。各种双特异性分子形式是本领域已知的,例如如Konterman R.E.等人,Bispecific Antibodies,Drug Discov.Today 20(7月(7))(2015年)838-847的图2和Suurs F.V.等人,A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges,Pharmacol.Ther.2019年9月;201:103-119的图1中所述的,这些文献中每一篇的全部内容以引用的方式并入本文。本发明的双特异性分子包括但不限于免疫球蛋白(Ig)样双特异性抗体以及较小的双特异性分子,其中大多数不具有Fc区,包括但不限于双纳米抗体、DARPin、BiTE、tandAb、DART、DART-Fc、scFv、scFv-HAS-scFV和DNL-Fab3。还有许多替代物,诸如亲和体(affibody)、肽和Co-LOCKR。事实上,如本领域技术人员将理解的,几乎任何以高亲和力结合癌症的TFC上给定抗原的分子都可用作抗原结合区。确定双特异性分子是否以高亲和力与给定抗原结合的方法是本领域技术人员已知的,包括但不限于直接和间接固相测定,诸如ELISA和Biacore。

[0111] IgG抗体的结构性质是这样的使得有两个抗原结合位点,这两个位点都对相同表位具有特异性。因此它们是单特异性的。双特异性抗体是对至少两个不同表位具有结合特异性的抗体。双特异性抗体在肿瘤免疫疗法中具有广泛应用,因为它们的临床治疗效果可以优于单克隆抗体的那些效果。在一些实施方案中,本文所述的主题涉及一种双特异性抗体、其功能等同物、其抗原结合片段、其衍生物、或抗体样双特异性分子,其与癌细胞上的两种不同抗原结合。在一些实施方案中,双特异性抗体、其功能等同物、其抗原结合片段、其衍生物、或抗体样双特异性分子与TFC表面上的两种不同抗原结合。在一些实施方案中,一种抗原是上皮细胞谱系标志物,另一种抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是EpCAM。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,双特异性抗体、其功能等同物、其抗原结合片段、其衍生物、或抗体样双特异性分子与两种不同抗原结合,一种选自图1,另一种选自图2。在一些实施方案中,两种抗原都是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,第一抗原是CD117、CD34、CD123或其任何组合,第二抗原CD163。在一些实施方案中,双特异性抗体、其功能等同物、其抗原结合片段、其衍生物、或抗体样双特异性分子与选自图1的两种不同抗原结合。

[0112] 在一些实施方案中,本发明提供了一种包含两个抗原结合区的双特异性分子,其中第一抗原结合区结合EpCAM,第二抗原结合区与CD163结合。对EpCAM具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对EpCAM具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。对CD163具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为

“对CD163具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。本发明的双特异性分子包含与任何对CD163具有特异性的抗原结合区组合的任何对EpCAM具有特异性的抗原结合区。

[0113] 存在用于产生不同类型的双特异性抗体的各种平台。一些产生双特异性抗体的技术是基于重链和轻链的异源重组。产生衍生自两种不同抗体的抗原结合位点的双特异性抗体的不同策略是本领域已知的,例如如Konterman R.E.等人,Bispecific Antibodies, Drug Discov.Today 20(7月(7)) (2015年) 838-847中所述的,这些文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0114] 在某些方面,还提供了包含上述双特异性分子的药物组合物,编码双特异性分子的多核苷酸,包含编码双特异性分子的多核苷酸的载体,包含编码双特异性分子的多核苷酸的病毒,包含双特异性分子和/或编码双特异性分子的多核苷酸的基因工程改造的细胞、转化或转导的宿主细胞。

[0115] CAR-T疗法

[0116] 嵌合抗原受体技术(CAR-T)疗法是一种类型的癌症治疗,其中患者自身的T细胞被编程以攻击身体中的癌细胞。在这种疗法中,可以从患者的血液中采集T细胞。使来自患者手臂静脉的血液通过单采机(apheresis machine),该单采机除去白细胞,包括T细胞,并将剩余的血液送回患者中。然后在实验室条件下,可以将与患者癌细胞上的某种蛋白质结合的特异性受体的基因引入所采集的T细胞中。该受体被称为嵌合抗原受体(CAR)。可以在实验室条件下培养大量的这些工程改造的CAR-T细胞,并且可以输注到患者的血流中。CAR-T细胞疗法的持久缓解成功率为30%至40%,无需额外治疗。在一些实施方案中,本文所述的方法可以与CAR-T疗法联合施用。

[0117] 在某些方面,本发明的双特异性分子是包含至少两个抗原结合区的双特异性CAR,其中每个抗原结合区结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。在一些实施方案中,双特异性CAR与TFC表面上的两种不同抗原结合。在一些实施方案中,一种抗原是上皮细胞谱系标志物,另一种抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是EpCAM。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,双特异性CAR与两种不同抗原结合,一种选自图1,另一种选自图2。在一些实施方案中,两种抗原都是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,第一抗原是CD117、CD34、CD123或其任何组合,第二抗原为CD163。在一些实施方案中,两种抗原都是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,双特异性CAR与选自图1的两种不同抗原结合。

[0118] 在一些实施方案中,本发明提供了一种包含两个抗原结合区的双特异性CAR,其中第一抗原结合区与EpCAM结合,第二抗原结合区与CD163结合。对EpCAM具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对EpCAM具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。对CD163具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对CD163具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。本发明的双特异性CAR包含与任何对CD163具有特异性的抗原结合区组合的任何对EpCAM具有特异性的抗原结合区。

[0119] 在某些方面,还提供了包含上述双特异性CAR的药物组合物、编码双特异性CAR的多核苷酸、包含编码双特异性CAR的多核苷酸的载体,包含编码双特异性CAR的多核苷酸的病毒、以及包含双特异性CAR和/或编码双特异性CAR的多核苷酸的基因工程改造的细胞。

[0120] 在一些实施方案中,可以使用避免靶向仅表达一种抗原的细胞的方法。此类方法

是本领域已知的,并且包括但不限于Co-LOCKR、SynNotch CAR细胞和组合抗原识别系统。

[0121] Co-LOCKR细胞靶向

[0122] Co-LOCKR是共定位依赖性蛋白质开关,其执行AND、OR和NOT逻辑运算。<sup>15</sup>该系统包括由合成蛋白质制成的设计纳米级装置,其仅将治疗剂或抗体靶向具有特异性的预定的细胞表面标志物组合的细胞。在一些实施方案中,这些蛋白质开关在细胞表面上执行AND逻辑。在一些实施方案中,Co-LOCKR蛋白在混合细胞群中执行2输入和3输入逻辑运算。在一些实施方案中,闩锁正交笼-钥蛋白(LOCKR)开关由结构“笼”蛋白组成,该蛋白质使用“闩锁”结构域以非活性构象固定功能肽,直到分开的“钥”蛋白的结合诱导允许与“效应”蛋白结合的构象变化。在一些实施方案中,笼、钥和效应子以三相平衡结合,并且可以通过调节相对的笼-闩锁和笼-钥亲和力来调节开关的灵敏度。Co-LOCKR系统的另外实施方案在Lajoie, M.J.,等人,Designed protein logic to target cells with precise combinations of surface antigens,Science.2020年9月25日;369(6511):1637-1643中描述,该文献全文并入本文。在一些实施方案中,合成蛋白质是分子开关,其在分开时没有作用。但是当它们在靶向细胞表面组合时,它们改变构象,活化分子信标。细胞表面上的这些信标可以将预定的生物活性(例如细胞消除)引导到特异性靶向细胞。在一些实施方案中,这些分子信标募集CAR-T细胞,其特异性结合分子信标,如图3A至图3B所示。在一些实施方案中,分子信标包括Bim-Bcl2系统。在一些实施方案中,Bim作为固定的肽被编码到LOCKR系统的闩锁中。在一些实施方案中,Bcl2用作LOCKR系统的效应子。

[0123] 在一些实施方案中,Co-LOCKR系统包含与Bcl2结合的CAR-T细胞,其用作系统的效应分子。在一个实施方案中,本文所述的CAR-T系统包含Bcl2 CAR序列,该序列包含氨基酸序列:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDYKDEYPYDVPDYAGSAHAG  
RTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAAGDDAEENRTEAPEGTES  
EVVHRALRDAGDDFERRYRRDFAEMSSQLHLTPDTARQRFETVV  
EELFRDGVNWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIAEWMT  
EYLNRLHTWIQDNGGWDADFVELYGPSMRGGGGSGGGGSESKY  
GPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQE  
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQD  
WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE  
[0124] MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD  
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
GKMFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYM  
NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQG  
QNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY  
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD  
ALHMQALPPRLEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPRMLLLVTSLLLC  
ELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGLH  
ILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDL  
HAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISG  
NKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHAL  
[0125] CSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSE  
CIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGV  
MGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPK  
IPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM (SEQ ID NO: 1)。

[0126] 在一些实施方案中, LOCKR系统的Bc12效应子是与SEQ ID NO:1具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性的Bc1 CAR。在一些实施方案中, LOCKR系统的Bc12效应子是包含SEQ ID NO:1的序列的Bc1 CAR。在一些实施方案中, LOCKR系统的Bc12效应子是由SEQ ID NO:1的序列组成的Bc1 CAR。在一些实施方案中, Bc1 CAR是CAR-T系统的一部分。

[0127] 在一些实施方案中, 本发明的双特异性分子是包含第一多肽和第二多肽的Co-LOCKR, 其中第一多肽和第二多肽结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。在一些实施方案中, 双特异性分子是包含第一多肽、第二多肽和第三多肽的Co-LOCKR, 其中第一多肽和第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原, 其中第三多肽结合CAR, 并且其中第三多肽与第

一多肽或第二多肽可操作地连接。在一些实施方案中,一种抗原是上皮细胞谱系标志物,另一种抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,本文所述的主题涉及产生识别EpCAM和CD163的双特异性Co-LOCKR系统。在一些实施方案中,第一多肽结合的上皮细胞谱系标志物是EpCAM。在一些实施方案中,第二多肽结合的巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,第一多肽与选自图1的任何抗原结合,第二多肽与选自图2的任何抗原结合。在一些实施方案中,两种抗原都是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,第一抗原是CD117、CD34、CD123或其任何组合,第二抗原是CD163。在一些实施方案中,第一多肽与选自图1的任何抗原结合,第二多肽与选自图1的任何其他抗原结合。在一些实施方案中,当第一多肽和第二多肽与癌症的TFC结合时,分子信标被活化,例如以引导杀伤T细胞杀死癌症的TFC。

[0128] 在一些实施方案中,本发明提供了一种包含第一多肽和第二多肽的双特异性Co-LOCKR,其中第一多肽包含结合EpCAM的抗原结合区,第二多肽包含与CD163结合的抗原结合区。对EpCAM具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对EpCAM具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。对CD163具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对CD163具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。本发明的双特异性Co-LOCKR包括使用与任何对CD163具有特异性的抗原结合区组合的任何对EpCAM具有特异性的抗原结合区。

[0129] 在一些实施方案中,本发明提供了一种包含第一多肽和第二多肽的双特异性Co-LOCKR,其中第一多肽包含钥或笼结构域和结合EpCAM的抗原结合区,第二多肽包含钥或笼结构域和与CD163结合的抗原结合区,其中如果第一多肽包含钥结构域,则第二多肽包含笼结构域,或其中如果第一多肽包含笼结构域,则第二多肽包含钥结构域。编码双特异性Co-LOCKR的序列可以进一步包含信号肽、纯化标签和/或蛋白酶位点。本领域技术人员理解,在向有需要的受试者施用双特异性Co-LOCKR之前从任何多肽中切割或除去信号肽和/或纯化标签。示例性的钥和笼结构域以及信号肽、纯化标签和蛋白酶位点在实施例2中描述。

[0130] 在某些方面,还提供了包含本文所述的Co-LOCKR的药物组合物、编码本文所述的Co-LOCKR的多核苷酸、包含编码本文所述的Co-LOCKR的多核苷酸的病毒、以及包含本文所述的Co-LOCKR和/或编码本文所述的Co-LOCKR的多核苷酸的基因工程改造的细胞。

[0131] 分裂型CAR-T

[0132] 分裂型嵌合抗原受体T细胞(分裂型CAR-T)系统包含两个模块—一个具有CAR,另一个具有嵌合共刺激受体(CCR)。CAR和CCR二者的结合是T细胞完全活化所需的。CAR和CCR可以在同一T细胞中表达,以在表达两种不同靶向抗原的靶细胞(诸如第一细胞)上实现平衡的信号传导和最大的T细胞细胞毒性活性。在一些实施方案中,CAR模块包含含有特异性识别第一抗原的抗原结合结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域的多肽。在一些实施方案中,CAR模块包含:1)用于膜靶向的信号肽(衍生自GM-CSF或CD8 $\alpha$ )、2) ScFv序列(衍生自抗EpCAM抗体或抗CD163抗体)、3) 铰链区(衍生自CD8)、4) 跨膜结构域(衍生自CD8)、以及5) CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。

[0133] 在一些实施方案中,CCR模块包含含有特异性识别第二抗原的抗原结合结构域和两个或更多个共刺激结构域的多肽。在一些实施方案中,CCR模块包含:1)用于膜靶向的信号肽(衍生自GM-CSF)、2) ScFv序列(衍生自抗EpCAM抗体或抗CD163抗体)、3) 铰链区(衍生自CD28)、4) 跨膜结构域(衍生自CD28)、和5) CD28共刺激结构域、以及6) 4-1BB共刺激结构域。

[0134] 在一些实施方案中,本发明提供了一种包含第一多肽和第二多肽的双特异性分裂型CAR-T,其中第一多肽包含结合EpCAM的抗原结合区,第二多肽包含与CD163结合的抗原结合区。对EpCAM具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对EpCAM具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。对CD163具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对CD163具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。本发明的双特异性分裂型CAR-T包括使用与任何对CD163具有特异性的抗原结合区组合的任何对EpCAM具有特异性的抗原结合区。

[0135] 在一些实施方案中,本发明提供了一种包含第一多肽和第二多肽的双特异性分裂型CAR-T,其中第一多肽包含结合EpCAM的抗原结合区和间隔结构域、跨膜结构域和CD3z信号传导结构域,第二多肽包含与CD163结合的抗原结合区、间隔结构域、跨膜结构域、第一共刺激结构域和第二共刺激结构域。在一些实施方案中,本发明提供了一种包含第一多肽和第二多肽的双特异性分裂型CAR-T,其中第一多肽包含结合CD163的抗原结合区和间隔结构域、跨膜结构域和CD3z信号传导结构域,第二多肽包含与EpCAM结合的抗原结合区、间隔结构域、跨膜结构域、第一共刺激结构域和第二共刺激结构域。多肽序列可以进一步包含信号肽。在一些实施方案中,间隔结构域是CD8铰链结构域。在一些实施方案中,间隔结构域是CD28铰链结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域是CD8跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域是CD28跨膜结构域。在一些实施方案中,第一共刺激结构域是CD28共刺激结构域。在一些实施方案中,第二共刺激结构域是4-1BB共刺激结构域。本领域技术人员理解,在翻译后加工期间从任何多肽中切割或除去信号肽。示例性的间隔结构域、跨膜结构域和共刺激结构域以及信号肽在实施例3中描述。

[0136] 在一些实施方案中,本发明提供了一种包含第一多肽和第二多肽的双特异性分裂型CAR-T,其中第一多肽包含与EpCAM结合的抗原结合区和CD8铰链结构域、CD8跨膜结构域和CD3z信号传导结构域,第二多肽包含与CA163结合的抗原结合区、CD28铰链结构域、CD28跨膜结构域、CD28共刺激结构域和4-1BB共刺激结构域。在一些实施方案中,本发明提供了一种包含第一多肽和第二多肽的双特异性分裂型CAR-T,其中第一多肽包含与CD163结合的抗原结合区和CD8铰链结构域、CD8跨膜结构域和CD3z信号传导结构域,第二多肽包含与EpCAM结合的抗原结合区、CD28铰链结构域、CD28跨膜结构域、CD28共刺激结构域和4-1BB共刺激结构域。

[0137] 在某些方面,还提供了包含本文所述的分裂型CAR-T的药物组合物、编码本文所述的分裂型CAR-T的多核苷酸、包含编码本文所述的分裂型CAR-T的多核苷酸的病毒、以及包含本文所述的分裂型CAR-T和/或编码本文所述的分裂型CAR-T的多核苷酸的基因工程改造的细胞。

[0138] SynNotch CAR细胞<sup>16,17</sup>

[0139] 合成Notch (synNotch) 通路可以驱动哺乳动物细胞中预定的功能反应。单独synNotch通路不共享共同的信号传导中间体,这使这些通路在功能上正交。因此,可以在同一细胞中使用多个synNotch受体来实现多个外部线索的整合,包括布尔反应程序。SynNotch-CAR T细胞是引发和杀死分子电路。仅当靶细胞上存在所有相关抗原时,synNotch受体才引发并活化CAR T细胞。这允许CAR T细胞仅靶向癌细胞并放过正常细胞。另外,基于CAR的方法包括SUPRA CAR<sup>19,20</sup>、RevCAR<sup>21,22</sup>和AvidCAR。<sup>23</sup>在一些实施方案中,双特

异性CAR是SynNotch CAR。在一些实施方案中,通过双特异性分子使用蛋白质开关的Co-LOCKR系统靶向TFC。在一些实施方案中,通过双特异性分子使用synCAR系统、SUPRA CAR系统、RevCAR系统或AvidCAR系统靶向TFC。在一些实施方案中,通过双特异性抗体使用组合抗原识别系统靶向TFC。在一些实施方案中,通过与毒素缀合的双特异性抗体靶向TFC。

[0140] 组合抗原识别系统<sup>18</sup>

[0141] 组合抗原识别系统可以促进通过工程改造的T细胞的选择性肿瘤根除。它允许工程改造的T细胞在不存在真正的肿瘤特异性靶抗原的情况下对肿瘤具有特异性。

[0142] DARPin

[0143] 设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)是基因工程改造的抗体模拟蛋白。DARPin以高特异性和高亲和力结合其靶蛋白。它们可以衍生自锚蛋白重复蛋白,一类负责多种细胞功能的结合蛋白。在一些实施方案中,DARPin由两个或更多个重复多肽基序组成并且具有被N末端帽和C末端帽保护的疏水性核心。

[0144] 在一些实施方案中,本发明的双特异性分子是包含第一多肽和第二多肽的DARPin分子,其中第一多肽和第二多肽结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。在一些实施方案中,一种抗原是上皮细胞谱系标志物,另一种抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,本文所述的发明涉及产生识别EpCAM和CD163的双特异性DARPin分子。在一些实施方案中,第一多肽结合的上皮细胞谱系标志物是EpCAM。在一些实施方案中,第二多肽结合的巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,第一多肽与选自图1的任何抗原结合,第二多肽与选自图2的任何抗原结合。在一些实施方案中,两种抗原都是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,第一抗原是CD117、CD34、CD123或其任何组合,第二抗原是CD163。在一些实施方案中,第一多肽与选自图1的任何抗原结合,第二多肽与选自图1的任何其他抗原结合。在一些实施方案中,双特异性DARPin分子引导杀伤T细胞杀死癌症的TFC。在一些实施方案中,CAR抗原识别结构域包含双特异性DARPin分子。在一些实施方案中,Co-LOCKR系统的抗原结合结构域包含DARPin。在一些实施方案中,通过筛选一个或多个DARPin文库来鉴定特异性结合靶细胞上的EpCAM和CD163的一种或多种DARPin。在一些实施方案中,一个或多个DARPin文库是可商购的。

[0145] 单链可变片段

[0146] 单链可变片段(scFv)是一种或多种免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)可变区的融合蛋白。这两条链可以用10至约25个氨基酸的短接头肽连接。接头可以富含甘氨酸用于柔性,以及丝氨酸或苏氨酸用于溶解度。接头可以将VH的N末端与VL的C末端连接,或反之亦然。该蛋白质保留了原始的一种或多种免疫球蛋白的特异性。scFv可以表达为本文所述的任何双特异性分子的抗原结合结构域。scFv可以表达为CAR的抗原结合结构域。在一些实施方案中,可以通过将两个或更多个scFv片段连接在一起来工程改造多价scFv。在一些实施方案中,多价scFv可以被工程改造为双特异性串联scFv,被称为双特异性T细胞接合物(BiTE抗体构建体)。

[0147] 在一些实施方案中,本发明的双特异性分子包含至少两个scFv,其中每个scFv的抗原结合位点各自结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。在一些实施方案中,一种抗原是上皮细胞谱系标志物,另一种抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,本文所述的发明涉及产生包含识别EpCAM和CD163的至少两个scFv的双特异性分子。在一些实施方案

中,第一scFV结合的上皮细胞谱系标志物是EpCAM。在一些实施方案中,第二scFV结合的巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,第一scFV与选自图1的任何抗原结合,第二scFV与选自图2的任何抗原结合。在一些实施方案中,两种抗原都是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,第一抗原是CD117、CD34、CD123或其任何组合,第二抗原是CD163。在一些实施方案中,第一scFV与选自图1的任何抗原结合,第二scFV与选自图1的任何其他抗原结合。在一些实施方案中,双特异性scFv片段引导杀伤T细胞杀死癌症的TFC。在一些实施方案中,CAR抗原识别结构域包含双特异性scFv片段。特异性结合EpCAM的抗体分子的实施方案和序列在美国专利号US 7,632,925 B2中公开,该专利的全部内容以引用的方式并入本文。特异性结合CD163的抗体分子的实施方案和序列在美国专利申请公开号US 2017/0119790 A1、US9,724,426和US11,034,770中公开,这些专利中每一篇的全部内容以引用的方式并入本文。

**[0148] 药物缀合的双特异性抗体**

**[0149]** 在一些实施方案中,本文所述的主题涉及产生药物缀合的双特异性抗体。在一些实施方案中,药物是毒素。在一些实施方案中,毒素是化疗剂。在一些实施方案中,化疗剂是关坦新(emtansine)。在一些实施方案中,药物是甲氨喋呤、硫鸟嘌呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷(ara-C)、顺铂、放线菌素D、蒽环类药物或长春花生物碱。在一些实施方案中,药物是微管干扰剂。在一些实施方案中,微管干扰剂是澳瑞他汀(auristatin)。在一些实施方案中,微管干扰剂包括美登素类化合物(maytansinoids)。在一些实施方案中,药物是DNA损伤剂。在一些实施方案中,DNA损伤剂是卡奇霉素(calicheamicin)。在一些实施方案中,DNA损伤剂是倍癌霉素(duocarmycin)。在一些实施方案中,DNA损伤剂是阿霉素(doxorubicin)。在一些实施方案中,毒素杀死靶癌细胞。在一些实施方案中,药物通过生物素-链亲和素相互作用与双特异性抗体缀合。在一些实施方案中,药物与双特异性抗体共价缀合。在一些实施方案中,药物通过接头与抗体缀合。抗体-药物缀合物的另外实施方案在Khongorzul, P., *Antibody-Drug Conjugates: A Comprehensive Review*, *Mol Cancer Res.*, 2020年, 18(1): 3-19中公开,该文献全文并入本文。

**[0150]** 在一些实施方案中,药物缀合的抗体疗法的目标是使用特异性载体将高毒性药物递送到其靶细胞。在一些实施方案中,这种疗法的施用静脉内进行到血流中以避免胃酸和蛋白水解酶降解抗体。在一些实施方案中,在识别其靶细胞后,药物缀合的抗体及其抗原通过受体介导的内吞作用内化到细胞中。在一些实施方案中,内化导致游离细胞毒性药物释放到细胞质中,其中药物干扰细胞机制、诱导细胞凋亡和/或最终细胞死亡。

**[0151]** 在某些方面,本发明的双特异性分子是包含至少两个抗原结合区的药物缀合的双特异性抗体,其中每个抗原结合区结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。在一些实施方案中,双特异性抗体与TFC表面上的两种不同抗原结合。在一些实施方案中,一种抗原是上皮细胞谱系标志物,另一种抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是EpCAM。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,双特异性抗体与两种不同抗原结合,一种选自图1,另一种选自图2。在一些实施方案中,两种抗原都是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,第一抗原是CD117、CD34、CD123或其任何组合,第二抗原是CD163。在一些实施方案中,双特异性抗体与两种不同抗原结合,一种选自图1。

[0152] 在一些实施方案中,本发明提供了一种包含两个抗原结合区的药物缀合的双特异性抗体,其中第一抗原结合区与EpCAM结合,第二抗原结合区与CD163结合。对EpCAM具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对EpCAM具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。对CD163具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对CD163具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。本发明的药物缀合的双特异性抗体包含与任何对CD163具有特异性的抗原结合区组合的任何对EpCAM具有特异性的抗原结合区。

[0153] 在某些方面,还提供了包含上述药物缀合的双特异性抗体的药物组合物、编码药物缀合的双特异性抗体的多核苷酸、包含编码药物缀合的双特异性抗体的多核苷酸的载体、包含编码药物缀合的双特异性抗体的多核苷酸的病毒、以及包含双特异性抗体和/或编码药物缀合的双特异性抗体的多核苷酸的基因工程改造的细胞。

[0154] 工程改造的杂交细胞

[0155] 在一些实施方案中,本文所述的主题涉及工程改造表达至少一种上皮细胞谱系标志物和至少一种巨噬细胞谱系标志物的细胞或细胞群。在一些实施方案中,至少一种上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,至少一种上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。在一些实施方案中,至少一种巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,至少一种巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,细胞表达单独的EpCAM或CD163、或EpCAM和CD163标志物二者。在一些实施方案中,本文所述的主题涉及工程改造至少两种巨噬细胞谱系标志物的细胞或细胞群。在一些实施方案中,至少两种标志物是CD117、CD34、CD123或其任何组合中的任一种和CD163。在一些实施方案中,本文所述的主题涉及证明特异性靶向表达两种抗原的工程改造的细胞,放过单独表达任一抗原的细胞。在一些实施方案中,本文所述的主题涉及进行体外和体内测定研究以证明双特异性分子的特异性和毒性。在一些实施方案中,测定中使用的靶细胞被工程改造以表达至少一种上皮细胞谱系标志物和至少一种巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,测定中使用的靶细胞被工程改造以表达巨噬细胞谱系的至少两种标志物。在一些实施方案中,测定中使用的靶细胞包含表达两种不同抗原的工程改造的细胞群,一种选自图1,另一种选自图2。在一些实施方案中,测定中使用的靶细胞包含表达选自图1的两种不同抗原的工程改造的细胞群。在一些实施方案中,测定中使用的靶细胞包含表达EpCAM和CD163标志物二者的工程改造的细胞群。在一些实施方案中,本文所述的主题涉及数种其他抗原的鉴定,这些抗原显示出受限的谱系特异性表达并且当使用来自图1和图2的抗原的组合时可以潜在地被靶向。在一些实施方案中,本文所述的癌症治疗方法将普遍地靶向并消除所有癌症中的TFC。

[0156] 抗原结合区或结构域

[0157] 抗体是包含至少两条重链和两条轻链的异多聚体糖蛋白。除了IgM之外,完整抗体通常是由两条相同轻(L)链和两条相同重(H)链组成的异四聚体糖蛋白。典型地,每条轻链通过二硫键与重链连接。每条重链和轻链还具有链内二硫桥。每条重链在一端都有可变结构域(VH),后跟许多恒定区。每条轻链具有可变结构域(VL)和在另一端的恒定区。根据恒定区的氨基酸序列,大多数脊椎动物物种的抗体轻链可以被分配两种类型之一,被称为 $\kappa$ 和 $\lambda$ 。抗体的可变结构域赋予抗体结合特异性,某些区域表现出独特的变异性,被称为互补决定

区 (CDR)。可变区更保守的部分称为框架区 (FR)。抗体的完整重链和轻链可变结构域各自包含由三个CDR连接的四个FR。每条链中的CDR通过FR区与另一条链中的CDR紧密结合在一起,并有助于形成抗体的抗原结合位点。当针对特定抗原制备非人抗体时,可以通过将衍生自非人抗体的CDR嫁接到待修饰的人抗体中存在的FR上来人源化可变区。在一些实施方案中,人源化抗体保留所有CDR序列(例如,含有小鼠抗体的所有六个CDR的人源化小鼠抗体)。在其他实施方案中,人源化抗体具有相对于原始抗体改变的一个或多个CDR(一个、二个、三个、四个、五个或六个),这些CDR也被称为衍生自原始抗体的一个或多个CDR的一个或多个CDR。

[0158] 针对与期望靶标结合的抗原结合区或结构域,该靶标衍生自与期望靶标结合的抗体,诸如但不限于EpCAM和CD163,这些抗体的可变轻 (VL) 链和可变重 (VH) 链的示例性氨基酸序列如下所示。因此,本领域技术人员将能够构建具有所述VH和VL链的CDR的双特异性分子,以及能够与被这些抗体识别的表位结合的抗体及其衍生物,包括其人源化衍生物。

[0159] 亲和力是指两种试剂可逆结合的平衡常数并且表示为KD。在一些实施方案中,双特异性分子和/或其抗原结合区或结构域表现出在纳摩尔范围 ( $10^{-7}$ 至 $10^{-9}$ M) 内或更小的对CD163或EpCAM的结合亲和力,如通过KD(平衡解离常数)测量的。在某些实施方案中,本文所述的抗体以小于或等于10nM的KD与人CD163多肽特异性结合。在某些实施方案中,本文所述的抗体以小于或等于10nM的KD与人EpCAM多肽特异性结合。

[0160] 对EpCAM具有特异性的抗原结合区或结构域

[0161] 下面提供了对应于EpCAM(Uniprot ID:P16422)的氨基酸序列:

[0162] **MAPPQVLAFGLLLAATATFAAAQEECVENYKLAVNCFVN  
NNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAAKCLVMKAEMNGSKLGRRAKP  
EGALQNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVVRT  
DKDTEITCSERVRTYWIIIELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRY  
QLDPKFITSILYENNVITIDL VQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDV  
KGESLFHSSKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGL  
KAGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVISRKKRMAKYEKAEIKEMGEM  
HRELNA (SEQ ID NO: 2)。**

[0163] 在一些实施方案中,双特异性分子的抗原结合区之一与EpCAM结合。在一些实施方案中,双特异性分子的抗原结合区之一与SEQ ID NO:2的表位结合。在一些实施方案中,本发明涉及基于IgG的结构,例如编码EpCAM特异性抗体的重链和轻链序列的多核苷酸和多肽序列。特异性结合EpCAM的抗体分子的实施方案和序列是本领域已知的,包括美国专利号7,632,925B2中公开的那些,该专利的全部内容以引用的方式并入本文。

[0164] 在一些实施方案中,对EpCAM具有特异性的抗原结合区包含SEQ ID NO:3,其是EpCAM特异性DARPin:

**DLGKKLLEAARAGQDDEVRLVANGADVNAAYFGTTPLHLAA  
[0165] AHGRLEIVEVLLKNGADVNAQDVWGITPLHLAAYNHLEIVEVL  
LKYGADVNAHDTRGWTPHLAAINGHLEIVEVLLKNVADVNAQ  
DRSGKTPFDLAIDNGNEDIAEVLQKAAKLN (SEQ ID NO: 3)。**

[0166] 在一些实施方案中,对EpCAM具有特异性的抗原结合区包含与SEQ ID NO:3具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。关于针对EpCAM的DARPin的其他细节可以在Stefan,N.等人, DARPins recognizing the tumor-associated antigen EpCAM selected by phage and ribosome display and engineered for multivalency. J Mol Biol, 2011年, 413(4): 826-843中找到,该文献全文并入本文。

[0167] 在一些实施方案中,对EpCAM具有特异性的抗原结合区包含SEQ ID NO:4,其是通过DARPin靶向EpCAM的co-LOCKR笼:

**MGSHHHHHGGSGSENLYFQSGGSDLGKKLLEAARAGQDD  
EVRILVANGADVNAAYFGTTPLHLAAAHGRLEIVEVLLKNGADV  
[0168] AQDVWGITPLHLAAYNHLEIVEVLLKYGADVNAHDTRGWTP  
HLAAINGHLEIVEVLLKNVADVNAQDRSGKTPFDLAIDNGNEDIA  
EVLQKAAKLNSGSGSGKPGQASGSELARKLLEASTKLQRLNIRLA  
EALLEAIARLQELNLELVYLAVELTDPKRIRDEIKEVKDKSKEIIRR  
AEKEIDDAAKESEKILEEAREAISGSGSELAKLLLKAIAETQDLNL  
RAAKAFLEAAAKLQELNIRAVELLVKLTDPATIREALEHAKRRSK  
[0169] EIIDEAERAIRAAKRESERIIEEARRLIEKSGSGSELARELLRAHAQ  
LQRLNLELLRELLRALAQLQELNLDLLRLASELTDEIWIAQELRRI  
GDEFNAYYADAERLIREAAAASEKISREAERLIR (SEQ ID NO: 4)。**

[0170] 在一些实施方案中,对EpCAM具有特异性的抗原结合区包含与SEQ ID NO:4具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0171] 在一些实施方案中,对EpCAM具有特异性的抗原结合区包含SEQ ID NO:5,其是通过DARPin靶向EpCAM的co-LOCKR笼:

[0172] MGSHHHHHHGSGSENLYFQGSGGSDEARKAIARVKRESKRI  
VEDAERLIREAAAASEKISREAERLIRGGSGSGSGSGKPGQASGS  
DLGKKLLEAARAGQDDEVRLVANGADVNAAYFGTTPLHLAAAH  
GRLEIVEVLLKNGADVNAQDVWGITPLHLAAYNGHLEIVEVLLK  
YGADVNAHDTRGWTPHLAAINGHLEIVEVLLKNVADVNAQDR  
SGKTPFDLAIDNGNEDIAEVLQKAAKLN (SEQ ID NO: 5)。

[0173] 在一些实施方案中,对EpCAM具有特异性的抗原结合区包含与SEQ ID NO:5具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0174] 在一些实施方案中,对EpCAM具有特异性的抗原结合区包含SEQ ID NO:27的VH链:

**EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAP**  
[0175] **GKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN**  
**SLRAEDTAVYYCAKDMGWGSGWRPYYYYGMDVWGQGTTVT**  
**VSSAPTKAPDVFPL (SEQ ID NO:27)。**

[0176] CDR以粗体并加下划线显示,并且包含氨基酸31至35(CDRH1)、50至66(CDRH2)和98至117(CDRH3)。编码SEQ ID NO:27的核酸是US7,632,925的SEQ ID NO:143,以引用的方式并入本文。CDRH1包含nt 91至nt 105,CDRH2包含nt 148至nt 198,CDRH3包含nt 292至nt 351。

[0177] 在一些实施方案中,对EpCAM具有特异性的抗原结合区包含与SEQ ID NO:27具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0178] 在一些实施方案中,对EpCAM具有特异性的抗原结合区包含含有选自以下的一个或多个CDR序列的VH区:

[0179] SYGMH (SEQ ID NO:33)

[0180] VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:34)

[0181] KDMGWGSGWRPYYYYGMDVW (SEQ ID NO:35)。

[0182] 在一些实施方案中,对EpCAM具有特异性的抗原结合区包含SEQ ID NO:28的VL链:

**ELQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGQ**  
[0183] **PPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSES GTNYTLTISSLQPEDFATYFC**  
**QQSDSLPITFGQGR LDIQ (SEQ ID NO:28)。**

[0184] CDR以粗体并加下划线显示,并且包含氨基酸24-34(CDR1)、50至56(CDR2)和89至98(CDR3)。编码SEQ ID NO:28的核酸是US7,632,925的SEQ ID NO:147,以引用的方式并入本文。CDRL1包含nt 70至nt 102,CDRL2包含nt 148至nt 168,CDRL3包含nt 265至nt 294。

[0185] 在一些实施方案中,对EpCAM具有特异性的抗原结合区包含与SEQ ID NO:28具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0186] 在一些实施方案中,对EpCAM具有特异性的抗原结合区包含含有选自以下的一个或多个CDR序列的VL区:

[0187] RASQSISSYLN (SEQ ID NO:36)

[0188] WASTRES (SEQ ID NO:37)

[0189] QQSDSLPITF (SEQ ID NO:38)。

[0190] 在一些实施方案中,本文所述的多肽是包含与期望靶标(诸如但不限于EpCAM)结合的抗体的一个或多个VL链和/或VH区的多肽。在一些实施方案中,多肽包含与期望靶标(诸如但不限于EpCAM)结合的抗体的一个或多个VL链和/或VH链CDR。在一些实施方案中,多肽包含抗体的VL链和/或VH链的三个CDR。在一些实施方案中,多肽包含具有以下任一项的抗体的氨基酸序列:结合EpCAM的抗体的序列的至少5个连续氨基酸、结合EpCAM的抗体的至少8个连续氨基酸、结合EpCAM的抗体的至少约10个连续氨基酸、结合EpCAM的抗体的至少约15个连续氨基酸、结合EpCAM的抗体的至少约20个连续氨基酸、结合EpCAM的抗体的至少约25个连续氨基酸、结合EpCAM的抗体的至少约30个连续氨基酸。在另一个实施方案中,5(或更多)个连续氨基酸来自抗体的CDR。

[0191] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少80%同一性的重链可变区(VH)。

[0192] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少90%同一性的重链可变区(VH)。

[0193] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少95%同一性的重链可变区(VH)。

[0194] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少99%同一性的重链可变区(VH)。

[0195] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有100%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少80%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少90%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少95%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少99%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有100%同一性的轻链可变区(VL)。

[0196] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少80%同一性的轻链可变区(VL)。

[0197] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少90%同一性的轻链可变区(VL)。

[0198] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少95%同一性的轻链可变区(VL)。

[0199] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结

合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少99%同一性的轻链可变区 (VL)。

[0200] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有100%同一性的轻链可变区 (VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少80%同一性的重链可变区 (VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少90%同一性的重链可变区 (VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少95%同一性的重链可变区 (VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少99%同一性的重链可变区 (VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有100%同一性的重链可变区 (VH)。

[0201] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少80%同一性的重链可变区 (VH) 和与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少80%同一性的轻链可变区 (VL) 的双特异性分子。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少85%同一性的轻链可变区 (VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少90%同一性的轻链可变区 (VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少95%同一性的轻链可变区 (VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有至少99%同一性的轻链可变区 (VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:28具有100%同一性的轻链可变区 (VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少85%同一性的重链可变区 (VH)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少90%同一性的重链可变区 (VH)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少95%同一性的重链可变区 (VH)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少99%同一性的重链可变区 (VH)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:27具有至少100%同一性的重链可变区 (VH)。

[0202] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含重链序列和轻链序列的双特异性分子,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:33具有至少80%同一性的互补决定区 (CDR) H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:34具有至少80%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:35具有至少80%同一性的CDR H3,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少80%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少80%同一性的CDRL2和与氨基酸序列SEQ ID NO:38具有至少80%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少85%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少85%同一性的CDR L2和与氨基酸序列SEQ ID NO:38具有至少85%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少90%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少90%同一性的CDR L2和与氨基酸序列SEQ ID NO:38具有至少90%同一性的CDRL3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少95%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少95%同一性的CDRL2和与氨基酸序列SEQ ID NO:38具有至少95%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,

双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有至少99%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有至少99%同一性的CDR L2和与氨基酸序列SEQ ID NO:38具有至少99%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:36具有100%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:37具有100%同一性的CDR L2和与氨基酸序列SEQ ID NO:38具有至少100%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:33具有至少85%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:34具有至少85%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:35具有至少85%同一性的CDRH3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:33具有至少90%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:34具有至少90%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:35具有至少90%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:33具有至少95%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:34具有至少95%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:35具有至少95%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:33具有至少99%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:34具有至少99%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:35具有至少99%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:33具有至少100%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:34具有至少100%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:35具有至少100%同一性的CDRH3。

[0203] 在一些实施方案中,本文描述了一种与EpCAM结合的双特异性分子,该双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR1、具有与如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR3。在一些实施方案中,与EpCAM结合的双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1、具有与如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0204] 在一些实施方案中,本文描述了一种与EpCAM结合的双特异性分子,该双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR1、具有与如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸

序列的重链CDR3。在一些实施方案中,与EpCAM结合的双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR1、具有与如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR3。

[0205] 在一些实施方案中,本文描述了一种与EpCAM结合的双特异性分子,该双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR1、具有与如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR2、具有与如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR3、具有与如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR1、具有与如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,与EpCAM结合的双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1、具有与如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2、具有与如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3、具有与如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR1、具有与如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR3。

[0206] 在一些实施方案中,本文描述了包含赋予对EpCAM的结合特异性的VL和VH链的双特异性分子,其中框架中的氨基酸可以改变。在一些实施方案中,氨基酸变异涉及保守氨基酸置换的引入。在一些实施方案中,与EpCAM结合的双特异性分子包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中VL区包含具有与如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1(CDRL1)、具有与如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2(CDRL2)、具有与如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3(CDRL3),其中VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:28的至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,并且其中VH区包含具有与如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1(CDRH1)、具有与如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2(CDRH2)、具有与如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3(CDRH3),其中VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:27的至

少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:28的至少90%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:27的至少90%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:28的至少95%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:27的至少95%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:28的至少99%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:27的至少99%同一性。

[0207] 在一些实施方案中,与EpCAM结合的双特异性分子包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中VL区包含具有与如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1(CDRL1)、具有与如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2(CDRL2)、具有与如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3(CDRL3),其中VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:28的至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,其中VL区的V基因使用(Vgene usage)是 $\kappa$ 轻链,并且其中VH区包含具有与如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1(CDRH1)、具有与如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2(CDRH2)、具有与如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3(CDRH3),其中VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:27的至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,其中VH区的V基因使用是IGHV基因。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:28的至少90%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:27的至少90%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:28的至少95%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:27的至少95%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:28的至少99%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:27的至少99%同一性。在一些实施方案中,VL区的V基因使用是 $\kappa$ 5.1轻链。

[0208] 对CD163具有特异性的抗原结合区或结构域

[0209] 下面提供了对应于CD163(Uniport ID:Q86VB7)序列的氨基酸序列:

MSKLRMVLLLED SG SADFRRHFVNLS PFTITV VLLLSACFVTSS  
LGGTDKELRLVDGENKCSGRVEVKVQEEWGTVCNNGWSMEAV  
SVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVSCRGNESALWD  
CKHDGWGKHSNCTHQQDAGVTCSDGSNLEMRLTRGGNMCSGRI  
EIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSGSSNFGEGS  
GPIWFDDLICNGNESALWNCKHQGWGKHNC DHAEDAGVICSKG  
ADLSRLVDGVTECSGRLEVRFQGEWGTICDDGWDSYDAAVAC  
KQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLD SVSCQGHEPAIWQCKHH  
[0210] EWGKHHCNHNE DAVTCS DGS DLELRLRGGG SRCAGTVEVEIQR  
LLGKVCDRGWGLKEADV VCRQLGCGSALKTSYQVYSKIQATNT  
WFLSSCNGNETSLWDCKNWQWGGLTCDHYEEAKITCSAHREP  
RLVGGDIPCSGRVEVKHGD TWGSICDSDFSLEAASVLCRELQCGT  
VVSILGGAHFGE GNGQIWAE EFQCEGHESHLSLCPVAPRPEGTCS  
HSRDVG VVCSRYTEIRLVNGKTPCEGRVELKTLGAWGSLCNSHW  
DIEDAHVLCQQLKCGVALSTPGGARFGKGNGQIWRHMFHCTGTE  
QHMGDCPV TALGASLCPSEQVASVICSGNQSQTLSSCNSSSLGPTR  
PTIPEESA VACIESGQLRLVNGGGRCAGRVEIYHEGSWGTICDDS  
WDLSDAHV VCRQLGCGEAINATGSAHFGE GTGPIWLDEM KCNG  
KESRIWQCHSHGWGQQNCRHKEDAGVICSEFMSLRLTSEASREA  
CAGRLEV FYNGAWGTVGKSSMSETTVGV VCRQLGCADKGKINP  
ASLDKAMSIPMWVDNVQCPKGPDTLWQCPSSPWEKRLASPSEET  
WITCDNKIRLQEGPTSCSGRVEIWHGGSWGTVCDDSWDLDDAQV  
[0211] VCQQLGCGPALKAFKEAEFGQGTGPIWLNEVKCKGNESSLWDCP  
ARRWGHSECGHKEDAAVNCTDISVQKTPQKATTGRSSRQSSFI AV  
GILGVVLLAIFVALFFLTKKRRQRQLAVSSRGENLVHQIQYREM  
NSCLNADDLDLMNSSENSHESADFSAAELISVSKFLPISGMEKEAI  
LSHTEKENG NL (SEQ ID NO: 6)。

[0212] 在一些实施方案中,双特异性分子的抗原结合区之一与CD163结合。在一些实施方案中,双特异性分子的抗原结合区之一与SEQ ID NO:6的表位结合。在一些实施方案中,本发明涉及基于IgG的结构,例如编码CD163特异性抗体的重链和轻链序列的多核苷酸和多肽序列。特异性结合CD163的抗体分子的实施方案和序列是本领域已知的,包括美国专利申请

公开号US 2017/0119790 A1中公开的那些,该专利的全部内容以引用的方式并入本文。

[0213] 在一些实施方案中,本文所述的多肽是包含与期望靶标(诸如但不限于CD163)结合的抗体的一个或多个VL链和/或VH区的多肽。在一些实施方案中,多肽包含与期望靶标(诸如但不限于CD163)结合的抗体的一个或多个VL链和/或VH链CDR。在一些实施方案中,多肽包含抗体的VL链和/或VH链的三个CDR。在一些实施方案中,多肽包含具有以下任一项的抗体的氨基酸序列:结合CD163的抗体的序列的至少5个连续氨基酸、结合CD163的抗体的至少8个连续氨基酸、结合CD163的抗体的至少约10个连续氨基酸、结合CD163的抗体的至少约15个连续氨基酸、结合CD163的抗体的至少约20个连续氨基酸、结合CD163的抗体的至少约25个连续氨基酸、结合CD163的抗体的至少约30个连续氨基酸。在另一个实施方案中,5(或更多)个连续氨基酸来自抗体的CDR。

[0214] 在一些实施方案中,对CD163具有特异性的抗原结合区包含SEQ ID NO:29的VH链:

**QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITS~~SDY~~AWN~~WIR~~QFP**

[0215] **GNKLEWMGYITYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT  
AADTATYYCVSGTYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 29)。**

[0216] CDR以粗体并加下划线显示,并且包含氨基酸26至33(CDR1)、54至56(CDR2)和96至107(CDR3)。

[0217] 在一些实施方案中,对CD163具有特异性的抗原结合区包含与SEQ ID NO:29具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0218] 在一些实施方案中,对CD163具有特异性的抗原结合区包含含有选自以下的一个或多个CDR序列的VH区:

[0219] GYSITS~~SDY~~ (SEQ ID NO:39)

[0220] YSG (SEQ ID NO:40)

[0221] CVSGTYYFDYWG (SEQ ID NO:41)。

[0222] 在一些实施方案中,对CD163具有特异性的抗原结合区包含SEQ ID NO:30的VL链:

**DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSD~~V~~AWFQQKPGK**

[0223] **SPKPLIYYASNRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDFAVYFCG  
QDYTS~~PRT~~FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:30)。**

[0224] CDR以粗体并加下划线显示,并且包含氨基酸25至33(CDR1)、50至52(CDR2)和90至97(CDR3)。

[0225] 在一些实施方案中,对CD163具有特异性的抗原结合区包含与SEQ ID NO:30具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0226] 在一些实施方案中,对CD163具有特异性的抗原结合区包含含有选自以下的一个或多个CDR序列的VL区:

[0227] ASQSVSSD~~V~~ (SEQ ID NO:42)

[0228] YAS (SEQ ID NO:43)

[0229] QDYTSPT (SEQ ID NO:44)。

[0230] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少80%同一性的重链可变区(VH)。

[0231] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少90%同一性的重链可变区(VH)。

[0232] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少95%同一性的重链可变区(VH)。

[0233] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少99%同一性的重链可变区(VH)。

[0234] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有100%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少80%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少90%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少95%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少99%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有100%同一性的轻链可变区(VL)。

[0235] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少80%同一性的轻链可变区(VL)。

[0236] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少90%同一性的轻链可变区(VL)。

[0237] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少95%同一性的轻链可变区(VL)。

[0238] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少99%同一性的轻链可变区(VL)。

[0239] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有100%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少80%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少90%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少95%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少99%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有100%同一性的重链可变区(VH)。

[0240] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少80%同一性的重链可变区(VH)和与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少80%同一性的轻链可变区(VL)的双特异性分子。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少85%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨

氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少90%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少95%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有至少99%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:30具有100%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少85%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少90%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少95%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少99%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:29具有至少100%同一性的重链可变区(VH)。

[0241] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含重链序列和轻链序列的双特异性分子,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:39具有至少80%同一性的互补决定区(CDR)H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:40具有至少80%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:41具有至少80%同一性的CDR H3,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:42具有至少80%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:43具有至少80%同一性的CDRL2和与氨基酸序列SEQ ID NO:44具有至少80%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:42具有至少85%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:43具有至少85%同一性的CDR L2和与氨基酸序列SEQ ID NO:44具有至少85%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:42具有至少90%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:43具有至少90%同一性的CDR L2和与氨基酸序列SEQ ID NO:44具有至少90%同一性的CDRL3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:42具有至少95%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:43具有至少95%同一性的CDRL2和与氨基酸序列SEQ ID NO:44具有至少95%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:42具有至少99%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:43具有至少99%同一性的CDR L2和与氨基酸序列SEQ ID NO:44具有至少99%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:42具有100%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:43具有100%同一性的CDR L2和与氨基酸序列SEQ ID NO:44具有至少100%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:39具有至少85%同一性的CDRH1、与氨基酸序列SEQ ID NO:40具有至少85%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:41具有至少85%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:39具有至少90%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:40具有至少90%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:41具有至少90%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:39具有至少95%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:40具有至少95%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:41具有至少95%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该

重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:39具有至少99%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:40具有至少99%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:41具有至少99%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:39具有至少100%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:40具有至少100%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:41具有至少100%同一性的CDRH3。

[0242] 在一些实施方案中,本文描述了一种与CD163结合的双特异性分子,该双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR1、具有与如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR3。在一些实施方案中,与CD163结合的双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1、具有与如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0243] 在一些实施方案中,本文描述了一种与CD163结合的双特异性分子,该双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR1、具有与如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,与CD163结合的双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR1、具有与如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR3。

[0244] 在一些实施方案中,本文描述了一种与CD163结合的双特异性分子,该双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR1、具有与如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR2、具有与如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR1、具有与如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,与CD163结合的双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1、具有与如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2、具有与如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3、具有与如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR1、具有与如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR3。

[0245] 在一些实施方案中,本文描述了包含赋予对CD1163的结合特异性的VL和VH链的双特异性分子,其中框架中的氨基酸可以改变。在一些实施方案中,氨基酸变异涉及保守氨基酸置换的引入。在一些实施方案中,与CD163结合的双特异性分子包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中VL区包含具有与如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1(CDRL1)、具有与如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2(CDRL2)、具有与如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3(CDRL3),其中VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:30的至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,并且其中VH区包含具有与如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1(CDRH1)、具有与如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2(CDRH2)、具有与如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3(CDRH3),其中VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:29的至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:30的至少90%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:29的至少90%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:30的至少95%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:29的至少95%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:30的至少99%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:29的至少99%同一性。

[0246] 在一些实施方案中,与CD163结合的双特异性分子包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中VL区包含具有与如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1(CDRL1)、具有与如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2(CDRL2)、具有与如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的

轻链CDR3 (CDRL3), 其中VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:30的至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性, 其中VL区的V基因使用是κ轻链, 并且其中VH区包含具有与如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1 (CDRH1)、具有与如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2 (CDRH2)、具有与如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3 (CDRH3), 其中VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:29的至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性, 其中VH区的V基因使用是IGHV基因。在一些实施方案中, VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:30的至少90%同一性, 并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:29的至少90%同一性。在一些实施方案中, VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:30的至少95%同一性, 并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:29的至少95%同一性。在一些实施方案中, VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:30的至少99%同一性, 并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:29的至少99%同一性。在一些实施方案中, VL区的V基因使用是κ8轻链。在一些实施方案中, VL区的V基因使用是IGKV1D-39\*01。在一些实施方案中, VH区的V基因使用是IGHV4基因。在一些实施方案中, VH区的V基因使用是IGHV4-b\*01。

[0247] 在一些实施方案中, 对CD163具有特异性的抗原结合区包含SEQ ID NO:31的VH链:

**EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAP**

[0248] **GKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS**

**LRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDVWGQG**

**TTVTVSSA (SEQ ID NO: 31)。**

[0249] CDR以粗体并加下划线显示, 并且包含氨基酸31至35 (CDR1)、50至65 (CDR2) 和99至122 (CDR3)。

[0250] 在一些实施方案中, 对CD163具有特异性的抗原结合区包含与SEQ ID NO:31具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0251] 在一些实施方案中, 对CD163具有特异性的抗原结合区包含含有选自以下的一个或多个CDR序列的VH区:

[0252] SYAMH (SEQ ID NO:45)

[0253] VISYDGSNKYYADSVK (SEQ ID NO:46)

[0254] ENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDV (SEQ ID NO:47)。

[0255] 在一些实施方案中, 对CD163具有特异性的抗原结合区包含SEQ ID NO:32的VL链:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGK  
APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ  
[0256] QSYSTPRGTFGQGTKVEI**

**(SEQ ID NO:32)。**

[0257] CDR以粗体并加下划线显示,并且包含氨基酸24至34(CDR1)、50至55(CDR2)和89至98(CDR3)。

[0258] 在一些实施方案中,对CD163具有特异性的抗原结合区包含与SEQ ID NO:32具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0259] 在一些实施方案中,对CD163具有特异性的抗原结合区包含含有选自以下的一个或多个CDR序列的VL区:

[0260] RASQSISSYLN(SEQ ID NO:48)

[0261] AASSLQS(SEQ ID NO:49)

[0262] QQSYSTPRGT(SEQ ID NO:50)。

[0263] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少80%同一性的重链可变区(VH)。

[0264] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少90%同一性的重链可变区(VH)。

[0265] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少95%同一性的重链可变区(VH)。

[0266] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少99%同一性的重链可变区(VH)。

[0267] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有100%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少80%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少90%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少95%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少99%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有100%同一性的轻链可变区(VL)。

[0268] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少80%同一性的轻链可变区(VL)。

[0269] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少90%同一性的轻链可变区(VL)。

[0270] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少95%同一性的轻链可变区(VL)。

[0271] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少99%同一性的轻链可变区(VL)。

[0272] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含抗原结合区的双特异性分子,该抗原结合区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有100%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少80%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少90%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少95%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少99%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子进一步包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有100%同一性的重链可变区(VH)。

[0273] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少80%同一性的重链可变区(VH)和与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少80%同一性的轻链可变区(VL)的双特异性分子。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少85%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少90%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少95%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少99%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有100%同一性的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少85%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少90%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少95%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少99%同一性的重链可变区(VH)。在一些实施方案中,双特异性分子包含与氨基酸序列SEQ ID NO:31具有至少100%同一性的重链可变区(VH)。

[0274] 在一些实施方案中,本文描述了一种包含重链序列和轻链序列的双特异性分子,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:45具有至少80%同一性的互补决定区(CDR)H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:46具有至少80%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:47具有至少80%同一性的CDR H3,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48具有至少80%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:49具有至少80%同一性的CDRL2和与氨基酸序列SEQ ID NO:50具有至少80%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48具有至少85%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:49具有至少85%同一性的CDR L2和与氨基酸序列SEQ ID NO:50具有至少85%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48具有至少90%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:49具有至少90%同一性的CDR L2和与氨基酸序列SEQ ID NO:50具有至少90%同一性的CDRL3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48具有至少95%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:49具有至少95%同一性

的CDRL2和与氨基酸序列SEQ ID NO:50具有至少95%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48具有至少99%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:49具有至少99%同一性的CDR L2和与氨基酸序列SEQ ID NO:50具有至少99%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含轻链序列,该轻链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:48具有100%同一性的CDR L1、与氨基酸序列SEQ ID NO:49具有100%同一性的CDR L2和与氨基酸序列SEQ ID NO:50具有至少100%同一性的CDR L3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:45具有至少85%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:46具有至少85%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:47具有至少85%同一性的CDRH3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:45具有至少90%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:46具有至少90%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:47具有至少90%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:45具有至少95%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:46具有至少95%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:47具有至少95%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:45具有至少99%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:46具有至少99%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:47具有至少99%同一性的CDR H3。在一些实施方案中,双特异性分子包含重链序列,该重链序列包含与氨基酸序列SEQ ID NO:45具有至少100%同一性的CDR H1、与氨基酸序列SEQ ID NO:46具有至少100%同一性的CDR H2和与氨基酸序列SEQ ID NO:47具有至少100%同一性的CDRH3。

[0275] 在一些实施方案中,本文描述了一种与CD163结合的双特异性分子,该双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR1、具有与如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR3。在一些实施方案中,与CD163结合的双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1、具有与如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0276] 在一些实施方案中,本文描述了一种与CD163结合的双特异性分子,该双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR1、具有与如SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、

87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,与CD163结合的双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR1、具有与如SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR3。

[0277] 在一些实施方案中,本文描述了一种与CD163结合的双特异性分子,该双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR1、具有与如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR2、具有与如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的轻链CDR3、具有与如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR1、具有与如SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列至少约75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的重链CDR3。在一些实施方案中,与CD163结合的双特异性分子包含以下项中的至少一个:具有与如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1、具有与如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2、具有与如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3、具有与如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR1、具有与如SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR2、和具有与如SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的重链CDR3。

[0278] 在一些实施方案中,本文描述了包含赋予对CD163的结合特异性的VL和VH链的双特异性分子,其中框架中的氨基酸可以改变。在一些实施方案中,氨基酸变异涉及保守氨基酸置换的引入。在一些实施方案中,与CD163结合的双特异性分子包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中VL区包含具有与如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1(CDRL1)、具有与如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2(CDRL2)、具有与如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3(CDRL3),其中VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:32的至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,并且其中VH区包含具有与如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1(CDRH1)、具有与如SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2(CDRH2)、具有与如SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3(CDRH3),其中

VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:31的至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:32的至少90%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:31的至少90%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:32的至少95%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:31的至少95%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:32的至少99%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:31的至少99%同一性。

[0279] 在一些实施方案中,与CD163结合的双特异性分子包含轻链可变(VL)区和重链可变(VH)区,其中VL区包含具有与如SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1(CDRL1)、具有与如SEQ ID NO:49所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2(CDRL2)、具有与如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3(CDRL3),其中VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:32的至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,其中VL区的V基因使用是 $\kappa$ 轻链,并且其中VH区包含具有与如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR1(CDRH1)、具有与如SEQ ID NO:46所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR2(CDRH2)、具有与如SEQ ID NO:47所示的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列的轻链CDR3(CDRH3),其中VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:31的至少75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,其中VH区的V基因使用是IGHV基因。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:32的至少90%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:31的至少90%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:32的至少95%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:31的至少95%同一性。在一些实施方案中,VL区在CDRL1、CDRL2和CDRL3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:32的至少99%同一性,并且VH区在CDRH1、CDRH2和CDRH3外面的氨基酸序列的总体序列同一性为与SEQ ID NO:31的至少99%同一性。在一些实施方案中,VL区的V基因使用是VK1.012。在一些实施方案中,VH区的V基因使用是IGHV3基因。在一些实施方案中,VH区的V基因使用是IGHV3.30-3。

#### [0280] 治疗方法

[0281] 在某些方面,本文所述的主体涉及一种治疗或预防患有癌症的受试者的癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向受试者施用包含至少两个抗原结合区的双特异性分子,其中每个抗原结合区结合癌症的第一细胞(TFC)上的不同抗原。在一些实施方案中,所述方法包括向受试者施用药物组合物,该药物组合物包含本文所述的双特异性分子中的

任一种。

[0282] 在一些实施方案中,第一抗原是上皮细胞谱系标志物,其中第一抗原是上皮细胞谱系标志物。在一些实施方案中,上皮标志物是图2的标志物中的任一种标志物,上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。在一些实施方案中,第二抗原是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞标志物是图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,两种抗原都是巨噬细胞谱系标志物。在一些实施方案中,第一抗原是CD117、CD34、CD123或其任何组合,第二抗原是CD163。在一些实施方案中,双特异性抗体、其功能等同物、其抗原结合片段、其衍生物、或抗体样双特异性分子与选自图1的两种不同抗原结合。

[0283] 在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体与药物缀合。在一些实施方案中,药物是毒素。在一些实施方案中,药物是化疗剂。在一些实施方案中,双特异性分子包括双纳米抗体、BiTE、tandAb、DART、DART-Fc、DARPin、scFv、scFv-HAS-scFv和DNL-Fab3。在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,双特异性分子是分裂型CAR-T。在一些实施方案中,双特异性分子是包含第一多肽和第二多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原。在一些实施方案中,双特异性CAR是synNotch CAR。在一些实施方案中,双特异性CAR与包含第一多肽、第二多肽和第三多肽的Co-LOCKR结合,其中第一多肽和第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原,其中第三多肽与双特异性CAR结合,并且其中第三多肽与第一多肽或第二多肽可操作地连接。

[0284] 在一些实施方案中,本发明的方法包括向受试者施用药物组合物,该药物组合物包含本文所述的双特异性分子中的任一种,其中第一抗原结合区与EpCAM结合,第二抗原结合区与CD163结合。对EpCAM具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对EpCAM具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。对CD163具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对CD163具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。本发明的治疗方法包括使用与任何对CD163具有特异性的抗原结合区组合的对EpCAM具有特异性的抗原结合区的本文所述的任何双特异性分子。

[0285] 在一些实施方案中,癌症包括实体瘤。在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、脑肿瘤、胃肠癌(包括胃癌和结肠直肠癌)、胰腺癌、肾癌、肝癌、肺癌、胸腺癌、卵巢癌、前列腺癌或子宫内膜癌。在一些实施方案中,癌症是液体癌症。在一些实施方案中,液体癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,液体癌症是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在一些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是非霍奇金淋巴瘤(NHL)。在一些实施方案中,B细胞恶性肿瘤是慢性淋巴细胞白血病(CLL)。在一些实施方案中,液体癌症是急性髓系白血病(AML)。在一些实施方案中,液体癌症是髓系肿瘤。在一些实施方案中,液体癌症是骨髓增生异常综合征(MDS)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、MDS/MPN重叠综合征、急性髓系白血病或慢性髓系白血病。在一些实施方案中,TFC是转移性TFC。

[0286] 骨髓系白血病

[0287] 在一些实施方案中,癌症是骨髓系白血病。在一些实施方案中,骨髓系白血病TFC表达第一抗原和第二抗原。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原是巨噬细胞谱系的两种标志物。在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原是图1的标志物中的任一种标志物的一对。在一些实施方案中,第一抗原是CD117、CD34、CD123或其任何组合。在一些实施方案中,第二抗原是CD163。在一些实施方案中,本文公开的双特异性分子结合两种抗原,这两种抗原都是巨噬细胞谱系标志物。

#### [0288] 髓系肿瘤

[0289] 在一些实施方案中,癌症是髓系肿瘤。在一些实施方案中,髓系肿瘤是骨髓增生异常综合征(MDS)。在一些实施方案中,髓系肿瘤是骨髓增殖性肿瘤(MPN)。在一些实施方案中,髓系肿瘤是MDS/MPN重叠综合征。在一些实施方案中,髓系肿瘤是急性髓系白血病或慢性髓系白血病。

#### [0290] 癌症治疗

[0291] 现在有许多可用的癌症治疗选择。进行手术以除去癌症或肿瘤块。化疗包括向患者施用毒性药物以杀死癌细胞。放射疗法利用高能能量束(诸如X射线或质子)来杀死癌细胞。可以将健康个体的骨髓移植到癌症患者中,替代患者自身患病的骨髓。骨髓从血液干细胞产生血细胞,进行骨髓移植是为了治疗或治愈液体癌症。骨髓移植还允许使用更高剂量的化疗来治疗癌症患者。免疫疗法使用身体自身的免疫系统来对抗癌症。免疫疗法可以帮助患者的免疫系统识别癌细胞并攻击它们。激素疗法可以用于治疗乳腺癌或前列腺癌,这可以得到身体激素的支持。阻断它们对身体的作用可能会阻止癌症生长。冷冻消融通过使用细针(冷冻探针)插入患者皮肤并直接到癌性肿瘤中来降低温度来杀死癌细胞。射频消融使用电能来加热癌细胞,从而杀死它们。高频能量通过针引导,这导致周围组织升温。这些治疗中的每一种都可以与本文所述的方法联合施用。

#### [0292] 诊断方法

[0293] 在某些方面,本文所述的主体涉及一种诊断癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法包括检测表达至少一种上皮细胞谱系标志物和至少一种巨噬细胞谱系标志物的细胞。在一些实施方案中,至少一种上皮细胞谱系标志物是图2的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,至少一种上皮细胞谱系标志物是上皮细胞黏附分子(EpCAM)。在一些实施方案中,至少一种巨噬细胞谱系标志物是图1的标志物中的任一种标志物。在一些实施方案中,至少一种巨噬细胞谱系标志物是CD163。在一些实施方案中,所述方法包括检测表达至少两种巨噬细胞谱系标志物的细胞。在一些实施方案中,第一标志物是CD117、CD34、CD123或其任何组合,第二标志物是CD163。在一些实施方案中,巨噬细胞谱系的至少两种标志物是图1的标志物中的任两种。在一些实施方案中,检测包括其中双特异性分子与至少一种上皮细胞谱系标志物和至少一种巨噬细胞谱系标志物结合的测定。在一些实施方案中,检测包括其中双特异性分子与巨噬细胞谱系的至少两种标志物结合的测定。在一些实施方案中,检测包括流式细胞术测定。在一些实施方案中,检测包括免疫染色测定。在一些实施方案中,结合每种抗原的抗体各自与不同的荧光染料缀合,并使用流式细胞术或免疫染色来检测荧光染料。在一些实施方案中,免疫染色是免疫荧光染色。在一些实施方案中,检测包括在测定之前按尺寸分离细胞的步骤,如图4所示。在一些实施方案中,在尺寸分离期间选择大细胞并进行测定。

[0294] 在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体与药物缀合。在一些实施方案中,药物是毒素。在一些实施方案中,药物是化疗剂。在一些实施方案中,双特异性分子包括双纳米抗体、BiTE、tandAb、DART、DART-Fc、DARPin、scFv、scFv-HAS-scFv和DNL-Fab3。在一些实施方案中,双特异性分子是双特异性嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,双特异性分子是包含第一多肽和第二多肽的Co-LOCKR,其中所述第一多肽和所述第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原。在一些实施方案中,双特异性CAR是synNotch CAR。在一些实施方案中,双特异性CAR与包含第一多肽、第二多肽和第三多肽的Co-LOCKR结合,其中第一多肽和第二多肽各自结合癌症的TFC上的不同抗原,其中第三多肽与双特异性CAR结合,并且其中第三多肽与第一多肽或第二多肽可操作地连接。

[0295] 在一些实施方案中,本发明提供了一种方法,所述方法包括使用本文所述的双特异性分子中的任一种来检测表达至少一种上皮细胞谱系标志物和至少一种巨噬细胞谱系标志物的细胞,其中第一抗原结合区与EpCAM结合,第二抗原结合区与CD163结合。对EpCAM具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对EpCAM具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。对CD163具有特异性的抗原结合区在本文中进行了描述,包括但不限于标题为“对CD163具有特异性的抗原结合区或结构域”的部分。本发明的诊断方法包括使用与任何对CD163具有特异性的抗原结合区组合的对EpCAM具有特异性的抗原结合区的本文所述的任何双特异性分子。

[0296] 药物组合物

[0297] 在某些方面,还提供了药物组合物,其包含上述双特异性分子。在一些实施方案中,本文所述的主题涉及一种药物组合物,其包含有效量的本文所述的双特异性分子及药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。

[0298] 如本文所用,“药物组合物”意指根据本发明的治疗有效的制剂。如本文所用,“治疗有效量”或“有效量”或“治疗有效”是指为给定病症和施用方案提供治疗效果量。治疗有效量可以由技术人员根据患者特征(诸如年龄、体重、性别、病症、并发症、其他疾病等)来确定,如本领域众所周知的。

[0299] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以作为固体组合物施用。在一些实施方案中,固体组合物包含赋形剂,包括但不限于乳糖、淀粉、纤维素、牛奶糖或高分子量聚乙二醇。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以作为水性混悬剂和/或酞剂施用。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可与各种甜味剂或调味剂、着色剂或染料,与乳化剂和/或悬浮剂,以及与稀释剂(诸如水、乙醇、丙二醇和甘油及其组合)组合。

[0300] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以肠胃外施用,例如静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、心室内、胸骨内、颅内、肌内或皮下施用,或它们可通过输注技术施用。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以以无菌水溶液的形式施用,该溶液可含有其他物质,例如足够使溶液与血液等渗的盐或葡萄糖。通过本领域技术人员众所周知的标准制药技术容易地完成在无菌条件下制备合适的肠胃外制剂。

[0301] 在一些实施方案中,适合于肠胃外施用的药物组合物包括水性和非水性无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质;以及水性和非水性无菌混悬剂,其可包含悬浮剂和增稠剂。药物组合物可以存在于单位剂量或多剂量容器中。药物组合物可以是密封的安瓿或小瓶。药物组合物可以在冷冻干燥(冻干)

条件下储存,仅需要在使用前立即添加无菌液体载剂,诸如注射用水。

[0302] 多核苷酸

[0303] 在某些方面,还提供了多核苷酸,其编码本文所述的双特异性分子或其部分。在一些实施方案中,根据本领域可用的方法,包括通过聚合酶链式反应进行扩增,从表达本文所述的双特异性分子或其部分的细胞中分离编码本文所述的双特异性分子或其部分的多核苷酸。编码本文所述的一种或多种双特异性分子或其部分的一种或多种多核苷酸可以亚克隆到一种或多种表达载体中。在一些实施方案中,使用本领域已知的程序,可以使用包含编码双特异性分子或其部分的多核苷酸的表达载体来重组产生本文所述的双特异性分子或其部分。

[0304] 载体

[0305] 在某些方面,还提供了载体,其包含编码本文所述的一种或多种双特异性分子或其部分的一种或多种多核苷酸。在一些实施方案中,使用本领域已知的任何合适的载体和方法重组产生本文所述的双特异性分子或其部分。合适的表达载体包括但不限于 pcDNA3.4、pcDNA3.3Topo、pOptiVec、pSG5L、pDEST27、pCI、pIRES、pBApo、pSF-CMV和pEF4/V5 His A。

[0306] 病毒

[0307] 在某些方面,还提供了病毒,其包含编码双特异性分子的多核苷酸。合适的基于病毒的蛋白质表达系统是本领域已知的并且包括但不限于慢病毒表达系统和腺病毒表达系统。合适的慢病毒载体包括但不限于 pHIV-dTomato、pAWp11、LRG2.1、LT3、LentiV、pCCL、pCS 和 pHIV-eGFP。合适的腺病毒载体包括但不限于 pAd/CMV/V5-DEST pAdenoX、pICPIS、pAAV 和 pAd/PL-DEST。使用基于病毒的表达系统的蛋白质表达方法是本领域众所周知的。

[0308] 细胞

[0309] 在某些方面,还提供了基因工程改造的细胞、转化或转导的宿主细胞,其包含双特异性分子和/或编码双特异性分子的多核苷酸。本领域已知的合适细胞包括但不限于 T 细胞、HL-60 细胞、CHO 细胞、HEK 293 细胞、293T 细胞、大肠杆菌 (*E. coli*)、DH5a。这些细胞可以通过本领域已知的任何方法用双特异性分子和/或编码双特异性分子的多核苷酸进行基因工程改造、转化或转导。

[0310] 参考文献:

[0311] 1 Borot, F., Mukherjee, S. & Ali, A. M. Challenges and Solutions to Bringing Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy to Myeloid Malignancies. *Cancer J* 27, 143-150, doi:10.1097/PP0.0000000000000512 (2021).

[0312] 2 Borot, F. et al. Gene-edited stem cells enable CD33-directed immune therapy for myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 11978-11987, doi:10.1073/pnas.1819992116 (2019).

[0313] 3 Wang, H. F. et al. Cell fusion in cancer hallmarks: Current research status and future indications. *Oncol Lett* 22, 530, doi:10.3892/ol.2021.12791 (2021).

[0314] 4 Vignery, A. Macrophage fusion: are somatic and cancer cells possible partners? *Trends Cell Biol* 15, 188-193, doi:10.1016/j.tcb.2005.02.008 (2005).

- [0315] 5 Sutton,T.L.,Walker,B.S.&Wong,M.H.Circulating Hybrid Cells Join the Fray of Circulating Cellular Biomarkers.Cell Mol Gastroenterol Hepatol 8,595-607,doi:10.1016/j.jcmgh.2019.07.002(2019) .
- [0316] 6 Shabo,I.et al.Macrophage traits in cancer cells are induced by macrophage-cancer cell fusion and cannot be explained by cellular interaction.BMC Cancer 15,922,doi:10.1186/s12885-015-1935-0(2015) .
- [0317] 7 Adams,D.L.et al.Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors.Proc Natl Acad Sci U S A 111,3514-3519,doi:10.1073/pnas.1320198111(2014) .
- [0318] 8 Shabo,I.,Olsson,H.,Sun,X.F.&Svanvik,J.Expression of the macrophage antigen CD163 in rectal cancer cells is associated with early local recurrence and reduced survival time.Int J Cancer 125,1826-1831,doi:10.1002/ijc.24506(2009) .
- [0319] 9 Aljabery,F.,Olsson,H.,Gimm,O.,Jahnson,S.&Shabo,I.M2-macrophage infiltration and macrophage traits of tumor cells in urinary.bladder cancer.Urol Oncol 36,159 e119-159 e126,doi:10.1016/j.urolonc.2017.11.020(2018) .
- [0320] 10 Sodi,S.A.et al.Melanoma x macrophage fusion hybrids acquire increased melanogenesis and metastatic potential:altered N-glycosylation as an underlying mechanism.Pigment.Cell.Res 11,299-309,doi:10.1111/j.1600-0749.1998.tb00739.x(1998) .
- [0321] 11 Rachkovsky,M.et al.Melanoma x macrophage hybrids with enhanced metastatic potential.Clin Exp Metastasis 16,299-312,doi:10.1023/a:1006557228604(1998) .
- [0322] 12 Dittmar,T.et al.Recurrence cancer stem cells--made by cell fusion? Med Hypotheses 73,542-547,doi:10.1016/j.mehy.2009.05.044(2009) .
- [0323] 13 Clawson,G.A.et al."Stealth dissemination"of macrophage-tumor cell fusions cultured from blood of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma.PLoS One 12,e0184451,doi:10.1371/journal.pone.0184451(2017) .
- [0324] 14 Aguirre,L.A.et al.Tumor stem cells fuse with monocytes to form highly invasive tumor-hybrid cells.Oncoimmunology 9,1773204,doi:10.1080/2162402X.2020.1773204(2020) .
- [0325] 15 Lajoie,M.J.et al.Designed protein logic to target cells with precise combinations of surface antigens.Science 369,1637-1643,doi:10.1126/science.aba6527(2020) .
- [0326] 16 Roybal,K.T.et al.Engineering T Cells with Customized Therapeutic Response Programs Using Synthetic Notch Receptors.Cell 167,419-432 e416,doi:10.1016/j.cell.2016.09.011(2016) .
- [0327] 17 Morsut,L.et al.Engineering Customized Cell Sensing and Response

Behaviors Using Synthetic NOLCH Receptors. *Cell* 164,780-791,doi:10.1016/j.cell.2016.01.012(2016) .

[0328] 18 Kloss,C.C.,Condomines,M.,Cartellieri,M.,Bachmann,M.&Sadelain,M.Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells.*Nat Biotechnol* 31,71-75,doi:10.1038/nbt.2459(2013) .

[0329] 19 Lee,S.&Wong,W.W.The Most Logical Approach to Improve CAR T Cell Therapy.*Cell Syst* 11,421-423,doi:10.1016/j.cels.2020.10.008(2020) .

[0330] 20 Cho,J.H.,Collins,J.J.&Wong,W.W.Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses.*Cell* 173,1426-1438 e1411,doi:10.1016/j.cell.2018.03.038(2018) .

[0331] 21 Kittel-Boselli,E.et al.Targeting Acute Myeloid Leukemia Using the RevCAR Platform:A Programmable,Switchable and Combinatorial Strategy.*Cancers (Basel)* 13,doi:103390/cancers13194785(2021) .

[0332] 22 Feldmann,A.et al.Versatile chimeric antigen receptor platform for controllable and combinatorial T cell therapy.*Oncoimmunology* 9,1785608,doi:10.1080/2162402X.2020.1785608(2020) .

[0333] 23 Salzer,B.et al.Engineering AvidCARs for combinatorial antigen recognition and reversible control of CAR function.*Nat Commun* 11,4166,doi:10.1038/s41467-020-17970-3(2020) .

[0334] 实施例1-用于表达谱系特异性抗原的细胞系模型的产生。

[0335] 产生了细胞系模型,该模型概括了第一细胞(在本文中也被称为肿瘤巨噬细胞杂交体(TMh)靶细胞)上两种谱系特异性抗原(LSA)的表达(图5A至图5D)。

[0336] LSA选择:TMh细胞是通过来自两个不同谱系的细胞融合形成的。融合导致生物分子(包括染色质、转录组和蛋白质组)重组,产生保留两个谱系的某些抗原表达的杂交细胞(1-3)。理论上,任一谱系的LSA都应该存在于杂交细胞上。图1和图2示出了具有上皮或巨噬细胞谱系的CD抗原的列表。报道了数种LSA在TMh上的表达(4,5)。根据这些抗原在TMh上的表达,选择的LSA是EpCAM和CD163(1,2,4,6-19)。EpCAM或CD163及其亚型的蛋白质序列可以在下表1中找到。

[0337] 细胞系:使用HL-60(CCL-240;ATCC)细胞系来表达LSA。将HL-60细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)和1X青霉素和链霉素的IMDM培养基中在加湿室中于37℃和5%CO<sub>2</sub>下培养。

[0338] 质粒DNA:在大肠杆菌(DH5a)细胞中扩增具有慢病毒骨架(pLenti6.3(V5-DEST)和C末端的V5标签的EpCAM(HsCD00954335;DNASU存储库)和CD163(HsCD00861066;DNASU存储库)编码质粒,并使用Qiagen Maxi试剂盒纯化质粒DNA。在HL-60细胞中表达的EpCAM或CD163的序列在表2中列出。

[0339] 慢病毒:通过与辅助质粒(编码VSVG外壳蛋白)共转染293细胞获得EpCAM和CD163表达质粒的慢病毒颗粒。将293细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)和1X青霉素和链霉素的DMEM培养基中在加湿室中于37℃和5%CO<sub>2</sub>下培养。使用PEG纯化细胞上清液中的慢病毒颗粒,并重悬浮于IMDM培养基中。

[0340] 病毒转导和选择:使用慢病毒颗粒来转导HL-60细胞。将浓缩的慢病毒颗粒与纤连蛋白处理的细胞培养物以及HL-60细胞共孵育。在共孵育48h后,使用抗生素杀稻瘟菌素选择表达EpCAM或CD163或二者的细胞。

[0341] 表型分析:使用流式细胞术测量EpCAM和CD163的表达(图6A至图6C)。使用识别人EpCAM(与PerCP/Cyanine5.5缀合的克隆9C4;Biolegend 324213)或CD163(与PE缀合的克隆RM3/1;Biolegend 326506)的1:100稀释的荧光染料缀合物单克隆抗体对细胞进行染色,并在BD LSRII流式细胞仪和Diva软件上获取数据。使用FlowJo (FlowJo LLC) 或FCS Express (De Novo Software) 分析流式细胞术数据。

[0342] 表1:具有uniprot ID的EpCAM和CD163的序列。

**EpCAM 蛋白质序列(Uniprot ID P16422):**

MAPPQVLAFGLLLAATATFAAAQEECVCENYKLAVNCFVNN  
NRQCQCTSVGAQNTVICKLAACKCLVMKAEMNGSKLGRRRAK  
PEGALQNNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAGV  
RRTDKDTEITCSERVRTYWIHIELKHKAREKPYDSKSLRTALQK  
EITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDL VQNSSQKTQNDVDIADVA  
YYFEKDVKGESLFHKKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEK  
APEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVISRKKRMAKYE  
KAEIKEMGEMHRELNA (SEQ ID NO.7)

**CD163 蛋白质序列(Uniprot ID Q86VB7-1):**

MSKLRLMVLLLEDSGSADFRRHFVNLSPTITVVLSSACFVTSSL  
GGTDKELRLVDGENKCSGRVEVKVQEEWGTVCNNGWSMEA  
VSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVSCRGNESAL  
WDCKHDGWGKHSNCTHQQDAGVTCSDGSNLEMRLTRGGNM  
CSGRIEIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSGS  
SNFGEGSGPIWFDDLICNGNESALWNCKHQGWGKHNCDAE  
DAGVICKSGADLSLRLVDGVTECSGRLEVRFGGEWGTICDDG  
WDSYDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDVSCQ  
GHEPAIWQCKHHEWGKHHCNHNEDAGVTCSDGSDLELRLRG  
GGSRCAGTVEVEIQRLLGKVCDRGWGLKEADVVCRLGCGS  
ALKTSYQVYSKIQATNTWLFLSSCNGNETSLWDCKNWQWGG  
LTCDHYEAKITCSAHREPRLVGGDIPCSGRVEVKHGDWGS  
CDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSILGGAHFGEGNGQIWAEEF  
QCEGHESHLSCPVAPRPEGTCSHSRDVGVCVCSRYTEIRLVNG  
KTPCEGRVELKTLGAWGSLCNSHWDIEDAHVLCQQLKCGVAL  
STPGGARFGKGNQIWRHMFHCTGTEQHMGDGPVTALGASLC  
PSEQVASVICSGNQSQTLSSCNSSSLGPTRPTIPEESAVACIESGQ  
LRLVNGGGRCAGRVEIYHEGSWGTICDDSWDLSDAHVVCRL  
GCGEAINATGSAHFGEGTGPIWLDEMCKNGKESRIWQCHSHG  
WGQQNCRHKEDAGVICSEFMSLRLTSEASREACAGRLEVFN  
GAWGTVGKSSMSETTVGVVCRLGCADKKGKINPASLDKAMSI  
PMWVDNVQCPCPKGPDTLWQCPSSPWEKRLASPSEETWITCDNK

[0343]

IRLQEGPTSCSGRVEIWHGGSWGTVCDSDWDLDDAQVVCQQL  
GCGPALKAFKEAEFGQGTGPIWLNEVKCKGNESSLWDCPARR  
WGHSECGHKEDAAVNCTDISVQKTPQKATTGRSSRQSSFIAVG  
ILGVVLLAIFVALFFLTKKRRQRQLAVSSRGENLVHQIQYRE  
MNSCLNADDLDMNSSSENSHESADFSAAELISVSKFLPISGMEK  
EAILSHTEKENGNL (SEQ ID NO.8)

CD163 长尾变体(Uniprot ID Q86VB7-2):

MSKLRMVLLLEDSGSADFRRHFNLSPTITVVLLLSACFVTSSL  
GGTDKELRLVDGENKCSGRVEVKVQEEWGTVCNNGWSMEA  
VSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVSCRGNESAL  
WDCKHDGWGKHSNCTHQQDAGVTCSDGNSNLEMRLTRGGNM  
CSGRIEIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSGS  
SNFGEGSGPIWFDDLICNGNESALWNCKHQGWGKHNCDAE  
DAGVICSKGADLSLRLVDGVTECSGRLEVRFQGEWGTICDDG  
WDSYDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDVSCQ  
GHEPAIWQCKHHEWGKHHCNHNEDAGVTCSDGSDLELRLRG  
GGSRCAGTVEVEIQRLLGKVCDRGWGLKEADVVCRLGCGS  
ALKTSYQVYSKIQTNTWLFLSSCNGNETSLWDCKNWQWGG  
LTCDHYEEAKITCSAHREPRLVGGDIPCSGRVEVKHGDWTSI  
CDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSILGGAHFGEGNGQIWAEF  
QCEGHESHLSCPAPRPEGTCSHSRDVGVVCSRYTEIRLVNG  
KTPCEGRVELKTLGAWGSLCNHWDIEDAHVLCQQLKCGVAL  
STPGGARFGKGNGQIWRHMFHCTGTEQHMGDGPVTALGASLC  
PSEQVASVICSGNQSQTLSSCNSSSLGPTRPTIPEESAVACIESGQ  
LRLVNGGGRCAGRVEIYHEGSWGTICDDSDWLDSDAHVVCRL  
GCGEAINATGSAHFGEGTGPIWLDEMCKNGKESRIWQCHSHG  
WGQQNCRHKEDAGVICSEFMSLRLTSEASREACAGRLEVFYN  
GAWGTVGKSSMSETTVGVVVCRLGCADKGKINPASLDKAMSI  
PMWVDNVQCPKGPDTLWQCPSPWEKRLASPSEETWITCDNK  
IRLQEGPTSCSGRVEIWHGGSWGTVCDSDWDLDDAQVVCQQL  
GCGPALKAFKEAEFGQGTGPIWLNEVKCKGNESSLWDCPARR  
WGHSECGHKEDAAVNCTDISVQKTPQKATTGRSSRQSSFIAVG  
ILGVVLLAIFVALFFLTKKRRQRQLAVSSRGENLVHQIQYRE  
MNSCLNADDLDMNSSGLWVLGGSIAQGFRSVAAVEAQTFYF  
DKQLKKSKNVIGSLDAYNGQE (SEQ ID NO.9)

CD163 短尾变体(Uniprot ID Q86VB7-3):

MSKLRMVLLLEDSGSADFRRHFNLSPTITVVLLLSACFVTSSL  
GGTDKELRLVDGENKCSGRVEVKVQEEWGTVCNNGWSMEA  
VSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVSCRGNESAL  
WDCKHDGWGKHSNCTHQQDAGVTCSDGNSNLEMRLTRGGNM  
CSGRIEIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSGS  
SNFGEGSGPIWFDDLICNGNESALWNCKHQGWGKHNCDAE

[0344]

DAGVICKSGADLSRLVDGVTECSGRLEVRFQGEWGTICDDG  
WDSYDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDVSCQ  
GHEPAIWQCKHHEWGKHHCNHNEAGVTCSDGSDLELRLRG  
GGSRCAGTVEVEIQRLLGKVCDRGWGLKEADVVCRLGCGS  
ALKTSYQVYSKIQTNTWFLSSCNGNETSLWDCKNWQWGG  
LTCDHYEEAKITCSAHREPRLVGGDIPCSGRVEVKHGDWGS  
CDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSILGGAHFGEGNGQIWAEFF  
QCEGHESHLSCPVAPRPEGTCSSSRDVGVCSSRYTEIRLVNG  
KTPCEGRVELKTLGAWGSLCNSHWDIEDAHVLCQQLKCGVAL  
STPGGARFGKGNGQIWRHMFHCTGTQHMGDPCVTALGASLC  
PSEQVASVICSNGSQTLSSCNSSSLGPTRPTIPEESAVACIESGQ  
LRLVNGGGRCAGRVEIYHEGSWGTICDDSWDLSDAHVVCRL  
GCGEAINATGSAHFGEGTGPIWLDEMCKNGKESRIWQCHSHG  
WGQQNCRHKEDAGVICSEFMSLRLTSEASREACAGRLEVFN  
GAWGTVGKSSMSETTVGVVCRLGCGADKKGKINPASLDKAMSI  
PMWVDNVQCPKGPDTLWQCPSSPWEKRLASPSEETWITCDNK  
IRLQEGPTSCSGRVEIWHGGSWGTVCDDSWDLDDAQVVCQQL  
GCGPALKAFKEAEFGQGTGPIWLNEVKCKGNESSLWDPCARR  
WGHSECGHKEDAAVNCTDISVQKTPQKATTGRSSRQSSFIAGV  
ILGVVLLAIFVALFFLTKKRRQRQLAVSSRGENLVHQIQYRE  
MNSCLNADDLDLMNSSGGHSEPH (SEQ ID NO.10)

[0345]

CD163 变体(Uniprot ID Q86VB7-4):

MSKLRMVLLDSGSADFRRHFVNLSPTTITVVLLLSACFVTSSL  
GGTDKELRLVDGENKCSGRVEVKVQEEWGTVCNNGWSMEA  
VSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVSCRGNESAL  
WDCKHDGWGKHSNCTHQDAGVTCSDGSNLEMRLTRGGNM  
CSGRIEIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSGS  
SNFGEESGPIWFDDLICNGNESALWNCKHQGWGKHNCDAE  
DAGVICKSGADLSRLVDGVTECSGRLEVRFQGEWGTICDDG  
WDSYDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDVSCQ  
GHEPAIWQCKHHEWGKHHCNHNEAGVTCSDGSDLELRLRG  
GGSRCAGTVEVEIQRLLGKVCDRGWGLKEADVVCRLGCGS  
ALKTSYQVYSKIQTNTWFLSSCNGNETSLWDCKNWQWGG  
LTCDHYEEAKITCSAHREPRLVGGDIPCSGRVEVKHGDWGS  
CDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSILGGAHFGEGNGQIWAEFF  
QCEGHESHLSCPVAPRPEGTCSSSRDVGVCSSKTQKTSLIGS  
YTVKGTGLGSHSCLFLKPCLLPGYTEIRLVNGKTPCEGRVELKT  
LGAWGSLCNSHWDIEDAHVLCQQLKCGVALSTPGGARFGKG  
NGQIWRHMFHCTGTQHMGDPCVTALGASLCPSEQVASVICS  
GNQSQTLSNCSNSSLGPTRPTIPEESAVACIESGQLRLVNGGGRC  
AGRVEIYHEGSWGTICDDSWDLSDAHVVCRLGCGEAINATG  
SAHFGEGTGPIWLDEMCKNGKESRIWQCHSHGWGQQNCRHK  
EDAGVICSEFMSLRLTSEASREACAGRLEVFNAGAWGTVGKSS

[0346]

MSETTVGVVCRQLGCADKKGKINPASLDKAMSIPMWVDNVQC  
 PKGPDTLWQCPSSPWEKRLASPSEETWITCDNKIRLQEGPTSCS  
 GRVEIWHGGSWGTVCDDSWDLDDAQVVCQQLGCGPALKAFK  
 EAEFGQGTGPIWLNEVKCKGNESSLWDCPARRWGHSECGRHE  
 DAAVNCTDISVQKTPQKATTGRSSRQSSFIAVGILGVVLLAIFV  
 ALFFLTKKRRQRQLAVSSRGENLVHQIQYREMNSCLNADDL  
 DLMNSSGGHSEPH (SEQ ID NO.11)

[0347] 表2:在HL-60细胞中表达的蛋白质序列。

在 C 末端具有 V5 标签(加下划线)的 EpCAM 蛋白质序列(Uniprot ID P16422):

MAPPQVLAFLGLLLAAATATFAAAQEECVENYKLAVNCFVN  
 NNRQCQCTSVGAQNTVICKSLAAKCLVMKAEMNGSKLGRR  
 AKPEGALQNNDGLYDPDCDESLFKAKQCNGTSMCWCVNT  
 AGVRRTDKDTEITCSERVRTYWIIEELKHKAREKPYDSKSLRT  
 ALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVITIDL VQNSSQKTQNDVD  
 IADVAYYFEKDVKGESLFHSSKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIY  
 YVDEKAPEFSMQGLKAGVIAVIVVVVIAVVAGIVVLVISRKK  
 RMAKYEKAIEKEMGEMHRELNADPAFLYKVVDIQHSGGRSS  
 LEGPRFEGKPIPNPLLGLDSTRTG (SEQ ID NO.12)

[0348]

在 C 末端具有 V5 标签(加下划线)的 CD163 蛋白质序列(Uniprot ID Q86VB7-1):

MSKLRMVLLLEDSSGSADEFRRHFVNLSPTITVVLSSACFVTSS  
 LGGTDKELRLVDGENKCSGRVEVKVQEEWGTVCNNGWSME  
 AVSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVSCRGNES  
 ALWDCKHDGWGKHSNCTHQQDAGVTCSDGSNLEMRLTRGG  
 NMCSGRIEIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSF  
 SGSSNFGEGSGPIWFDDLICNGNESALWNCKHQGWGKHNC  
 HAEDAGVICKGADLSLRLVDGVTECSGRLEVRFGGEWGTIC  
 DDGWDSYDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDS  
 VSCQGHEPAIWQCKHHEWGKHHCNHNEDAGVTCSDGSDLE  
 LRLRGGGSRCAAGTVEVEIQRLLGKVCDRGWGLKEADVVC  
 RQLGCGSALKTSYQVYSKIQAATNTWFLSSCNGNETSLWDCKN  
 WQWGGLTCDHYEEAKITCSAHREPRLVGGDIPCSGRVEVKH  
 GDTWGSICDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSILGGAHFGEGN  
 GQIWAEFQCEGHESHLSCPAPRPEGTCSHSRDVGVCSSR  
 YTEIRLVNGKTPCEGRVELKTLGAWGSLCNSHWDIEDAHVLC  
 QQLKCGVALSTPGGARFGKGNQIWRHMFHCTGTEQHMGD  
 CPVTALGASLCPSEQVASVICSGNQSQTLSSCNSSSLGPTRPTIP  
 EESAIVACIESGQLRLVNGGGRCAGRVEIYHEGSWGTICDDSW  
 DLSDAHVVCRQLGCGEAINATGSAHFGEGTGPIWLDEMCKN

[0349]

GKESRIWQCHSHGWGQQNCRHKEDAGVICSEFMSLRILTSEAS  
 REACAGRLEVFYNGAWGTVGKSSMSETTVGVVCRQLGCAD  
 KGKINPASLDKAMSIPMWVDNVQCPKGPDTLWQCPSSPWEK  
 RLASPSEETWITCDNKIRLQEGPTSCSGRVEIWHGGSWGTVCD  
 DSWDLDDAQVVCQQLGCGPALKAFKEAEFGQGTGPIWLNEV  
 KCKGNESSLWDCPARRWGHSECGHKEDAAVNCTDISVQKTP  
 QKATTGRSSRQSSFIAVGILGVVLLAIFVALFFLTKKRRQRQRL  
 AVSSRGENLVHQIQYREMNSCLNADDLDLMNSSSENSHESADF  
 SAAELISVSKFLPISGMEKEAILSHTEKENGNNLLNPAFLYKVVD  
 IQHSGGRSSLEGPRFEGKPIPNNLLGLDSTRTG (SEQ ID NO.13)

[0350] 实施例2-Co-LOCKR蛋白的产生

[0351] 为了实现精确靶向以表达来自两个不同谱系的LSA为特征的TMH并放过来自亲本谱系的细胞(表达单独的LSA),使用共定位依赖性基于蛋白质的逻辑门控设计执行AND布尔逻辑运算来靶向具有表面抗原(EpCAM或CD163)的精确组合的TMH(20)。已经描述了在共定位以计算AND逻辑时活化的从头蛋白质开关,其包括门锁正交笼-钥蛋白(Co-LOCKR)。Co-LOCKR由笼和钥蛋白组成,当笼和钥共定位时通过构象变化活化(图7A-7C)(20)。笼模块由“门锁”组成,该“门锁”以非活性构象固定功能肽(Bim),但是可以在构象变化时结合效应子(Bc12)。效应子可以是蛋白质药物缀合物(与细胞毒性化合物缀合的Bc12)或表达Bc12 CAR的嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)(20)。笼和钥二者都是模块化的,可以与抗原结合结构域附接以将笼和钥募集到表达靶抗原(EpCAM或CD163)的细胞中。抗原结合结构域可以是单链可变片段(ScFv)或Darpin或对靶标具有亲和力的任何分子。

[0352] 设计:靶向EpCAM和CD163的笼和钥的示意性设计在图8A至图8B中描述。典型的笼和钥靶向蛋白含有来自小鼠免疫球蛋白κ(mIgk)的信号肽、用于蛋白质纯化的6x组氨酸标签(His6)、用于除去标签、钥或笼结构域和抗原结合结构域的烟草蚀纹病毒(TEV)蛋白酶位点。使用钥和笼的“野生型”序列或变体设计EpCAM和CD163的笼和钥蛋白,产生总共8种蛋白质(表3)。对于与EpCAM结合的抗原结合结构域,我们选择了抗EpCAM ScFv:抗EpCAM ScFv的可变轻链(VL)和可变重链(VH)序列已经在专利US 7,632,925 B2中描述,该专利的全部内容以引用的方式并入本文。对于与CD163结合的抗原结合结构域,我们选择了抗CD163 ScFv:抗CD163 ScFv的可变轻链(VL)和可变重链(VH)序列已经在专利US 9,724,426 B2中描述,该专利的全部内容以引用的方式并入本文。对于与CD163结合的抗原结合结构域,还可以使用抗CD163 ScFv的可变轻链(VL)和可变重链(VH)序列,在专利US11,034,770 B2中描述,该专利的全部内容以引用的方式并入本文。笼和钥序列在Lajoie,M.J.当然,Science.2020年;369(6511):1637-43中描述,该文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0353] 笼和钥蛋白的合成和克隆:合成了编码表2的蛋白质序列的密码子优化的DNA序列作为片段并克隆到哺乳动物表达载体pcDNA3.4中。将所得质粒在大肠杆菌(DH5a)细胞中扩增,并使用Qiagen Maxi试剂盒纯化质粒DNA。

[0354] Co-LOCKR蛋白的表达和纯化

[0355] 根据MIRUS BIO™ TRANSIT™-293转染试剂(,MIR 2700 Mirus Bio)的制造商方案转染293细胞。在转染前24小时将293细胞铺板于10-cm组织培养物处理的培养皿中,以在转

染当天达到80%汇合率。将每种Co-LOCKR质粒的Maxi DNA与TRANSIT™-293试剂和无血清培养基混合,并在室温下孵育25分钟。孵育后,将混合物逐滴添加到293细胞中。将细胞放回孵育箱中72-96小时。最后,收集细胞培养物上清液,离心以与任何脱离细胞分离,并补充苯甲基磺酰氟(PMSF)至最终浓度1mM,以在纯化期间抑制丝氨酸蛋白酶活性。为了纯化Co-LOCKR蛋白,将每1ml上清液的10μL的**TALON®**金属亲和树脂(Takara Bio USA, San Jose, California)用PBST洗涤。将含有Co-LOCKR蛋白的培养物上清液在4℃下旋转过夜。第二天,将样品在4℃下以500g离心5分钟,并吸出上清液。将树脂重悬浮于PBST中,在4℃下旋转10分钟,并如前所述的离心。重复这种洗涤过程,总共3次洗涤。将每100μL树脂的300μL在PBS中的洗脱缓冲液、150mM咪唑添加到树脂床,并将样品在4℃下旋转至少1小时。将样品在4℃下以500g离心5分钟,并通过移液轻轻重悬浮,然后转移到MICRO BIO-Spin™色谱柱(Bio-Rad实验室, Hercules, California)。将柱置于微量离心管中,并在4℃下以10,000g离心1分钟。将**TALON®**树脂的洗脱液在PBS中稀释至最终体积6mL,并添加到30kDa MWC0蛋白质浓缩器(ThermoFisher)中。将样品以3,000g离心15分钟。弃去浓缩器下室的流出物,并将浓缩样品在5mL PBS中稀释,然后在上述条件下离心。收集含有His纯化的实验构建体的浓缩样品,并立即用于后续实验或在-20℃下冷冻直到使用。

[0356] 染色和免疫印迹分析:将Co-LOCKR蛋白洗脱液与含有β-巯基乙醇的2X-Laemmli样品缓冲液(Bio-Rad)混合。将混合物在95℃下加热10分钟,并将25μL样品在Novex 4%-20%三甘氨酸微型凝胶(Invitrogen, Waltham, Massachusetts)上解析。为了检查表达和纯度,用考马斯G-250染色剂对凝胶进行染色(图9A)。将凝胶用去离子水洗涤5min,并用考马斯G-250染色20min,然后脱色10min。使用LiCOR成像系统对凝胶进行拍照。对于免疫印迹分析,将凝胶中的蛋白质转移到尼龙膜上,使用在PBST中制备的5%牛奶封闭,并与在PBST中制备的0.5%牛奶中的抗His6一抗孵育过夜。过夜孵育后,将膜在PBST中洗涤,总共4次洗涤。使用从LI-COR Biosciences(Lincoln, Nebraska)获得的抗小鼠800CW二抗在室温下探测膜30分钟。弃去二抗,并如上所述,将膜洗涤4次。使用ImageStudio软件(LI-COR)用Odyssey XF成像系统(LI-COR)分析膜(图9B)。

[0357] 表3: 钥和笼蛋白

[0358]

>mIgk\_His6\_TEV\_钥\_EpCAM-ScFV (VL 加粗; VH 加下划线)  
 METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSHHHHHHGGSGSENLYFQGS  
 GSDEARKAIARVKRESKRIVEDAERLIREAAAASEKISREAERLI  
 RGGGSGSGSGSGKPGQASGSELQMTQSPSSLSASVGDRVIT  
**CRASQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS**  
**GSESGTNYTLTISSLQPEDFATYFCQQSDSLPITFGQGTRLDI**

[0359]

QGSTSGSGKPGSGEGSGEVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASG  
FTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGR  
FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDMGWGSGWRP  
YYYYGMDVWGQGTTVTVSSAPTKAPDVFPL (SEQ ID NO. 14)

>mIgk\_His6\_TEV\_EpCAM-ScFV (VL 加粗; VH 加下划线)  
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSHHHHHHSGSGSENLYFQGSG  
GSDEAIARVKRESKRIVEDAERLIREAAAASEKISREAERLIRGG  
GSGSGSGSGKPGQASGSELQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRA  
**SQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSES**  
**GTNYTLTISSLQPEDFATYFCQQSDSLPITFGQGTRLDIQGST**  
SGSGKPGSGEGSGEVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS  
YGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR  
DN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDMGWGSGWRPYYYY  
GMDVWGQGTTVTVSSAPTKAPDVFPL (SEQ ID NO. 15)

>mIgk\_His6\_TEV\_EpCAM-ScFV\_笼(VL 加粗; VH 加下划线)  
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSHHHHHHSGSGSENLYFQGSG  
GSELQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQK**P**  
**GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSES**GTNYTLTISSLQPED  
**FATYFCQQSDSLPITFGQGTRLDIQGSTSGSGKPGSGEGSGEV**  
QLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG  
LEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL  
RAEDTAVYYCAKDMGWGSGWRPYYYYGMDVWGQGTTVTV  
SSAPTKAPDVFPLSGSGSGKPGQASGSELARKLLEASTKLQRLN  
IRLAEALLEAIARLQELNLELVYLAVELTDPKRIRDEIKEVKDK  
SKEIIRRAEKEIDDAAKESEKILEEAREAISGSGSELAKLLLKAIA  
ETQDLNLRAAKAFLEAAKLQELNIRAVELLVKLTDPATIREA  
LEHAKRRSKEIIDEAERAIRAAKRESERIIEEARRLIEKGSGSGSE  
LARELLRAHAQLQRLNLELLRELLRALAQLQELNLDLLRLASE  
LTDEIWIAQELRRIGDEFNAYYADAERLIREAAAASEKISREAE  
RLIR (SEQ ID NO. 16)

>mIgk\_His6\_TEV\_EpCAM-ScFV\_笼-I287A (VL 加粗; VH 加下划线)  
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSHHHHHHSGSGSENLYFQGSG  
GSELQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQK**P**  
**GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSES**GTNYTLTISSLQPED  
**FATYFCQQSDSLPITFGQGTRLDIQGSTSGSGKPGSGEGSGEV**  
QLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG  
LEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL  
RAEDTAVYYCAKDMGWGSGWRPYYYYGMDVWGQGTTVTV  
SSAPTKAPDVFPLSGSGSGKPGQASGSELARKLLEASTKLQRLN  
IRLAEALLEAIARLQELNLELVYLAVELTDPKRIRDEIKEVKDK  
SKEIIRRAEKEIDDAAKESEKILEEAREAISGSGSELAKLLLKAIA

[0360]

ETQDLNLRAAKAFLEAAAKLQELNIRAVELLVKLTDPATIREA  
LEHAKRRSKEIIDEAERAIRAAKRESERIIEEARRLIEKSGSGSGSE  
LARELLRAHAQLQRLNLELLRELLRALAQLQELNLDLLRLASE  
LTDEIWIAQELRRIGDEFNAYYADAERLIREAAAASEKISREAE  
RLAR (SEQ ID NO.17)

>mIgk\_His6\_TEV\_钥\_CD163-ScFV (VL 加粗; VH 加下划线)  
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSHHHHHHGGSGSENLYFQGS  
GSDEARKAIARVKRESKRIVEDAERLIREAAAASEKISREAE  
RLIRGGSGSGSGSGKPGQASGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCT  
VSGYSITSDYAWNWIROFPGNKLEWMGYITYSGSTYYNPSLKS  
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYYCVSGTYYFDYWGQ  
GTTTLTVSSGSTSGSGKPGSGEGSGDIVMTQSPSSLSASVGDRV  
TITCRASQSVSSDVAWFQQKPGKSPKPLIYYASNRYSGVPSR  
FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDFAVYFCGQDYTSPRTFGGGTK  
LEIKR (SEQ ID NO. 18)

>mIgk\_His6\_TEV\_钥-N3\_CD163-ScFV (VL 加粗; VH 加下划线)  
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSHHHHHHGGSGSENLYFQGS  
GSDEAIARVKRESKRIVEDAERLIREAAAASEKISREAE  
RLIRGGSGSGSGSGKPGQASGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG  
YSITSDYAWNWIROFPGNKLEWMGYITYSGSTYYNPSLKS  
SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYYCVSGTYYFDYWGQ  
GTTTLTVSSGSTSGSGKPGSGEGSGDIVMTQSPSSLSASVGDRV  
TITCRASQSVSSDVAWFQQKPGKSPKPLIYYASNRYSGVPSR  
FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDFAVYFCGQDYTSPRTFGGGTK  
LEIKR (SEQ ID NO. 19)

>mIgk\_His6\_TEV\_CD163-ScFV\_笼(VL 加粗; VH 加下划线)  
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSHHHHHHGGSGSENLYFQGS  
GSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIROF  
PGNKLEWMGYITYSGSTYYNPSLKS  
SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYYCVSGTYYFDYWGQ  
GTTTLTVSSGSTSGSGKPGSGEGSGDIVMTQSPSSLSASVGDRV  
TITCRASQSVSSDVAWFQQKPGKSPKPLIYYASNRYSGVPSR  
FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDFAVYFCGQDYTSPRTFGGGTK  
LEIKRSGSGSGKPGQASGS  
ELARKLLEASTKLQRLNIRLAEALLEAIARLQELNLELVYLAVE  
LTDPKRIRDEIKEVKDKSKEIRRAEKEIDDAAKESEKILEEARE  
AISGSGSELAKLLLKAIAETQDLNLRAAKAFLEAAAKLQELNIR  
AVELLVKLTDPATIREALEHAKRRSKEIIDEAERAIRAAKRESE  
RIIEEARRLIEKSGSGSGSELARELLRAHAQLQRLNLELLRELLRA  
LAQLQELNLDLLRLASELTDEIWIAQELRRIGDEFNAYYADAE  
RLIREAAAASEKISREAE  
RLIR (SEQ ID NO. 20)

>mIgk\_His6\_TEV\_CD163-ScFV\_笼-I287A (VL 加粗; VH 加下划线)  
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSHHHHHHGGSGSENLYFQGS

[0361]

GSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIQFP  
 GNKLEWMGYITYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSS  
 VTAADTATYYCVSGTYYFDYWGQGTTLTVSSGSTSGSGKPGS  
 GEGSGDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSDVAWFQ  
 QKPGKSPKPLIYYASNRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQA  
 EDFAVYFCGQDYTSPTFTGGGKLEIKRSGSGSGKPGQASGS  
 ELARKLLEASTKLQRLNIRLAELAEALAEIARLQELNLELVYLAVE  
 LTDPKRIRDEIKEVKDKSKEIIRRAEKEIDDAAKESEKILEEARE  
 AISGSGSELAKLLLKAIAETQDLNLRAAKAFLEAAAKLQELNIR  
 AVELLVKLTDPATIREALEHAKRRSKEIIDEAERAIRAAKRESE  
 RIIEEARRLIEKSGSGSGSELARELLRAHAQLQRLNLELLRELLRA  
 LAQLQELNLDLLRLASELTDEIWIAQELRRIGDEFNAYYADAE  
 RLIREAAAASEKISREAERLAR (SEQ ID NO.21)

[0362] 实施例3-分裂型CAR-T的产生

[0363] 在分裂型嵌合抗原受体T细胞(分裂型CAR-T)系统中,两个模块在同一T细胞中表达,一个具有CAR,另一个具有嵌合共刺激受体(CCR),以在表达两种不同靶向抗原的靶细胞上实现平衡的信号传导和最大的T细胞细胞毒性活性(图10)(21)。CAR模块包含靶向一种抗原的抗原结合结构域和CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。CCR模块包含靶向另一种抗原的抗原结合结构域和两个或更多个共刺激结构域。

[0364] 设计:靶向EpCAM和CD163的CAR和CCR模块的示意性设计在图11中显示。在一些实施方案中,CAR模块被设计以包含:1)用于膜靶向的信号肽(衍生自GM-CSF或CD8 $\alpha$ )、2) ScFv序列(衍生自抗EpCAM抗体或抗CD163抗体)、3) 铰链区(衍生自CD8)、4) 跨膜结构域(衍生自CD8)、以及5) CD3 $\zeta$ 信号传导结构域。在一些实施方案中,CCR模块被设计以包含:1)用于膜靶向的信号肽(衍生自GM-CSF)、2) ScFv序列(衍生自抗EpCAM抗体或抗CD163抗体)、3) 铰链区(衍生自CD28)、4) 跨膜结构域(衍生自CD28)、和5) CD28共刺激结构域、以及6) 4-1BB共刺激结构域。对于与EpCAM结合的抗原结合结构域,我们选择了抗EpCAM ScFv:抗EpCAM ScFv的可变轻链(VL)和可变重链(VH)序列已经在专利US 7,632,925 B2中描述,这些专利中每一篇的全部内容以引用的方式并入本文。对于与CD163结合的抗原结合结构域,我们选择了抗CD163 ScFv:抗CD163ScFv的可变轻链(VL)和可变重链(VH)序列已经在专利US9,724,426B2和US11,034,770 B2中描述,这些专利中每一篇的全部内容以引用的方式并入本文。各种分裂型CAR模块的序列在表4中描述。

[0365] 分裂型CAR模块的合成和克隆:合成了编码表4的蛋白质序列的密码子优化的DNA序列作为片段并克隆到pHIV-dTomato或pHIV-eGFP慢病毒载体骨架中。将所得质粒在大肠杆菌(DH5a)细胞中扩增,并使用Qiagen Maxi试剂盒纯化质粒DNA。

[0366] 表4:分裂型CAR模块

[0367]

>抗 EpCAM\_CD28\_41BB (来自噬菌体文库的人抗体; HD70) (VL 加粗; VH 加下划线)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPELQMTQSPSSLSASVGDRVITIT  
CRASQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS  
GSESGTNYTLTISSLQPEDFATYFCQQSDSLPITFGQGTRLDI  
QGSTSGSGKPGSGEGSGEVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASG  
FTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGR  
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDMGWGSGWRP  
YYYYGMDVWGQGTTVTVSSAPTKAPDVFPLLDNEKSNGTIH  
VKGKHLCPSPLPFGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF  
WVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR  
SKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL  
(SEQ ID NO. 22)

>抗 CD163\_CD8\_CD3z (来自小鼠克隆 Mac-158 的人源化抗体)  
(VL 加粗; VH 加下划线)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCT  
VSGYSITSDYAWNWIWIRQFPGNKLEWMGYITYSGSTYYNPSLKS  
RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYYCVSGTYFDYWGQ  
GTTLTVSSGSTSGSGKPGSGEGSGDIVMTQSPSSLSASVGDRV  
TITCRASQSVSSDVAVWFQQKPGKSPKPLIYYASNRYSGVPSR  
FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDFAVYFCGQDYTSPTFTGGGK  
LEIKRALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPL  
SLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL  
VITRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRR  
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER  
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO.  
23)

>抗 CD163\_CD8\_CD3z (来自小鼠克隆 Mac2-158 的人源化抗体)  
(VL 加粗; VH 加下划线)  
MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTC  
TVSGYSITSSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGSTYYNPSLK  
SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYYCVSGTYYFDYWGO  
GTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRV  
**TITCRASQSVSSDVAWFQQKPGKSPKPLIYYASNRYS**GVPSR  
**FSGSGSGTDFTLT**ISSLQAEDFAVYFCGQDYTS**PRTFGGG**TK  
**LEIKRALS**NSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT**IASQPL**  
SLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL  
VITRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR  
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER  
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO.  
24)

>抗 CD163\_CD8\_CD3z (专利 US11034770B2 的小鼠抗体) (VL 加粗; VH 加下划线)  
MALPVTALLLPLALLLHAARP**DIQMTQSPSSLSASVGDRV**TIT  
**CRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG**  
**SGSGTDFTLT**ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPRGTF**GQG**TKVE  
IKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS  
GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG  
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFW  
SGYYSEYYYYGMDVWGQGTTVTVSSAALSNSIMYFSHFVPVFL  
LPAKPTTTPAPRPPTPAPT**IASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGL**  
DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITRVKFSRSADAPAYQQGQ  
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL  
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD  
TYDALHMQALPPR (SEQ ID NO. 25)

>抗 CD163\_CD8\_CD3z (来自小鼠克隆 Mac2-158 的人源化抗体)  
(VL 加粗; VH 加下划线)  
MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTC  
TVSGYSITSSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGSTYYNPSLK  
SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYYCVSGTYYFDYWGO  
GTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRV  
**TITCRASQSVSSDVAWFQQKPGKSPKPLIYYASNRYS**GVPSR  
**FSGSGSGTDFTLT**ISSLQAEDFAVYFCGQDYTS**PRTFGGG**TK  
**LEIKRDYKDDDDKALS**NSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPT  
PAPT**IASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAG**  
TCGVLLLSLVITRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE  
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS  
EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR  
(SEQ ID NO.26)

[0368] 实施例1-3的参考文献:

[0369] 1.Gast CE,Silk AD,Zarour L,Riegler L,Burkhart JG,Gustafson KT,et

al.Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival.Sci Adv.2018;4(9):eaat7828.

[0370] 2.Powell AE,Anderson EC,Davies PS,Silk AD,Pelz C,Impey S,et al.Fusion between Intestinal epithelial cells and macrophages in a cancer context results in nuclear reprogramming.Cancer Res.2011;71(4):1497-505.

[0371] 3.Sutton TL,Walker BS,Wong MH Circulating Hybrid Cells Join the Fray of Circulating Cellular Biomarkers.Cell Mol Gastroenterol Hepatol.2019;8(4):595-607.

[0372] 4.Adams DL,Martin SS,Alpaugh RK,Charpentier M,Tsai S,Bergan RC,et al.Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors.Proc Natl Acad Sci U S A.2014;111(9):3514-9.

[0373] 5.Tang CM,Zhu P,Li S,Makarova OV,Amstutz PT,Adams DL.Blood-based biopsies-clinical utility beyond circulating tumor cells.Cytometry A.2018;93(12):1246-50.

[0374] 6.Adams DL,Adams DK,Alpaugh RK,Cristofanilli M,Martin SS,Chumsri S,et al.Circulating Cancer-Associated Macrophage-Like Cells Differentiate Malignant Breast Cancer and Benign Breast Conditions.Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.2016;25(7):1037-42.

[0375] 7.Aguirre LA,Montalban-Hernandez K,Avendano-Ortiz J,Marin E,Lozano R,Toledano V,et al.Tumor stem cells fuse with monocytes to form highly invasive tumor-hybrid cells.Oncoimmunology.2020;9(1):1773204.

[0376] 8.Aljabery F,Olsson H,Gimm O,Jahnsen S,Shabo I.M2-macrophage infiltration and macrophage traits of tumor cells in urinary bladder cancer.Urol Oncol.2018;36(4):159e19-e26.

[0377] 9.Augustyn A,Adams DL,He J,Qiao Y,Verma V,Liao z,et al.Giant Circulating Cancer-Associated Macrophage-Like Cells Are Associated With Disease Recurrence and Survival in Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Chemoradiation and Atezolizumab.Clin Lung Cancer.2021;22(3):e451-e65.

[0378] 10.Clawson GA,Matters GL,Xin P,Imamura-Kawasawa Y,Du Z,Thiboutot DM,et al.Macrophage-tumor cell fusions from peripheral blood of melanoma patients.PLoS One.2015;10(8):e0134320.

[0379] 11.Clawson GA,Matters GL,Xin P,McGovern C,Wafula E,dePamphilis C,et al."Stealth dissemination"of macrophage-tumor cell fusions cultured from blood of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma.PLoS One.2017;12(9):e0184451.

[0380] 12.Pawelek JM.Tumour-cell fusion as a source of myeloid traits in cancer.Lancet Oncol.2005;6(12):988-93.

[0381] 13.Pawelek JM.Fusion of bone marrow-derived cells with cancer cells: metastasis as a secondary disease in cancer.Chin J Cancer.2014;33(3):133-9.

- [0382] 14.Shabo I,Olsson H,Sun XF,Svanvik J.Expression of the macrophage antigen CD163 in rectal cancer cells is associated with early local recurrence and reduced survival time.Int J Cancer.2009;125(8):1826-31.
- [0383] 15.Shabo I,Stal O,Olsson H,Dore S,Svanvik J.Breast cancer expression of CD163,a macrophage scavenger receptor,is related to early distant recurrence and reduced patient survival.Int J Cancer.2008;123(4):780-6.
- [0384] 16.Shabo I,Svanvik J.Expression of macrophage antigens by tumor cells.Adv Exp Med Biol.2011;714:141-50.
- [0385] 17.Shabo I,Svanvik J,Lindstrom A,Lechertier T,Trabulo S,Hulit J,et al.Roles of cell fusion,hybridization and polyploid cell formation in cancer metastasis.World J Clin Oncol.2020;11(3):121-35.
- [0386] 18.Sieler M,Weiler J,Dittmar T.Cell-Cell Fusion and the Roads to Novel Properties of Tumor Hybrid Cells.Cells.2021;10(6).
- [0387] 19.Walker BS,Sutton TL,Zarour L,Hunter JG,Wood SG,Tsikitis VL,et al.Circulating Hybrid Cells:A Novel Liquid Biomarker of Treatment Response in Gastrointestinal Cancers.Ann Surg Oncol.2021;28(13):8567-78.
- [0388] 20.Lajoie MJ,Boyken SE,Salter AI,Bruffey J,Rajan A,Langan RA,et al.Designed protein logic to target cells with precise combinations of surface antigens.Science.2020;369(6511):1637-43.
- [0389] 21.Kloss CC,Condomines M,Cartellieri M,Bachmann M,Sadelain M.Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells.Nat Biotechnol.2013;31(1):71-5.

| CD_名称 | NCBI_名称 | 基因_名称 | NCBI_其他名称                           | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|-------|---------|-------|-------------------------------------|---------------|----------|
| CD1a  | CD1A    | CD1A  | CD1                                 | +             |          |
| CD1b  | CD1B    | CD1B  | CD1                                 | +             |          |
| CD1c  | CD1C    | CD1C  | CD1                                 | +             |          |
| CD4   | CD4     | CD4   | 无                                   | +             | -        |
| CD11a | ITGAL   | CD11A | CD11A; LFA-1; LFA1A                 | +             |          |
| CD11b | ITGAMI  | CD11B | CD11B; CR3A; MAC-1; MAC1A; MO1A     | +             |          |
| CD11c | ITGAX   | CD11C | CD11C                               | +             |          |
| CD11d | ITGAD   | CD11D | ADB2; CD11D                         | +             |          |
| CD14  | CD14    | CD14  | 无                                   | +             |          |
| CD15  | FUT4    | CD15  | CD15; ELFT; FCT3A; FUC-TIV          | +             |          |
| CD16a | FCGR3A  | CD16  | CD16; FCG3; FCGR3; IGFR3            | +             |          |
| CD18  | ITGB2   | CD18  | CD18; LAD; LCAMB; LFA-1; MF17; MF17 | +             |          |
| CD25  | IL2RA   | CD25  | CD25; IL2R; TCGFR                   | +             | -        |
| CD30  | TNFRSF8 | CD30  | CD30; D1S166E; KI-1                 | +             | -        |
| CD31  | PECAM1  | CD31  | CD31                                | +             |          |
| CD33  | CD33    | CD33  | SIGLEC-3; p67                       | +             | -        |
| CD35  | CR1     | CD35  | C3BR; CD35                          | +             |          |

图1

| CD_名称  | NCBI_名称 | 基因_名称  | NCBI_其他名称                                          | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|--------|---------|--------|----------------------------------------------------|---------------|----------|
| CD36   | CD36    | CD36   | FAT; GP3B; GP4; GPIV; PASIV; SCARB3                | +             | +        |
| CD37   | CD37    | CD37   | GP52-40                                            | +             | +        |
| CD38   | CD38    | CD38   | ADP-核糖基环化酶 I; NAD(+)核苷酶                            | +             | +        |
| CD43   | SPN     | CD43   | CD43; GPL115; LSN                                  | +             | +        |
| CD45   | PTPRC   | CD45   | B220; CD45; GP180; LCA; LY5; T200                  | +             | +        |
| CD45RA | PTPRC   | CD45RA | CD45亚型                                             | +             | +        |
| CD45RB | PTPRC   | CD45RB | CD45亚型                                             | +             | +        |
| CD45RC | PTPRC   | CD45RC | CD45亚型                                             | +             | +        |
| CD45RO | PTPRC   | CD45RO | CD45亚型                                             | +             | +        |
| CD48   | CD48    | CD48   | BCM1; BLAST; BLAST1; MEM-102; SLAMF2; hCD48; mCD48 | +             | +        |
| CD49a  | ITGA1   | CD49A  | CD49a; VLA1                                        | +             | +        |
| CD49d  | ITGA4   | CD49D  | CD49D                                              | +             | +        |
| CD50   | ICAM3   | CD50   | CD50; CDW50; ICAM-R                                | +             | +        |
| CD51   | ITGAV   | CD51   | CD51; MSK8; VNRA                                   | +             | +        |
| CD53   | CD53    | CD53   | MOX44                                              | +             | +        |
| CD54   | ICAM1   | CD54   | BB2; CD54                                          | +             | +        |
| CD59   | CD59    | CD59   | MGC2354; MIC11; MIN1; MIN2; MIN3; MSK21; PROTECTIN | +             | +        |

图1续

| CD_名称 | NCBI_名称 | 基因_名称 | NCBI_其他名称                                                                       | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|-------|---------|-------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------|
| CD60a | 碳水化合物   | CD60  | 碳水化合物                                                                           | +             |          |
| CD61  | ITGB3   | CD61  | CD61; GP3A; GPIIa                                                               | +             |          |
| CD62L | SELL    | CD62L | CD62L; LAM-1; LAM1; LECAM1; LNHR; LSEL; LYAM1; Leu-8; Lyam-1; PLNHR; TQ1; hLHRC | +             |          |
| CD63  | CD63    | CD63  | LAMP-3; ME491; MLA1; OMA81H                                                     | +             |          |
| CD64a | FCGR1A  | CD64  | CD64; FCRI; IGFRI                                                               | +             | -        |
| CD65  | 碳水化合物   | CD65  | 碳水化合物                                                                           | +             |          |
| CD65s | 碳水化合物   | CD65S | 碳水化合物                                                                           | +             |          |
| CD68  | CD68    | CD68  | SCARD1                                                                          | +             |          |
| CD69  | CD69    | CD69  | 无                                                                               | +             |          |
| CD72  | CD72    | CD72  | LYB2                                                                            | +             |          |
| CD75  | 碳水化合物   | CD75  | 碳水化合物                                                                           | +             | -        |
| CD80  | CD80    | CD80  | B淋巴细胞活化抗原B7; B7-1; B7.1                                                         | +             | -        |
| CD84  | CD84    | CD84  | LY9B; SLAMF5; hCD84; mCD84                                                      | +             | -        |
| CD85A | LILRB3  | CD85A | CD85A; HL9; ILT5; LIR-3; LIR3                                                   | +             | -        |
| CD85C | LILRB5  | CD85C | CD85C; LIR-8; LIR8                                                              | +             |          |
| CD85D | LILRB2  | CD85D | CD85D; ILT4; LIR-2; LIR2; MIR-10; MIR10                                         | +             | -        |
| CD85F | LILRB7  | CD85F | CD85F; ILT11; LILRB7                                                            | +             |          |

图1续

| CD_名称 | NCBI_名称 | 基因_名称 | NCBI_其他名称                                       | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|-------|---------|-------|-------------------------------------------------|---------------|----------|
| CD85G | LILRA4  | CD85G | ILT7; CD85g; MGC129597                          | +             |          |
| CD85I | LILRA1  | CD85I | CD85I; LIR-6; LIR6                              | +             |          |
| CD85J | LILRB1  | CD85J | CD85; CD85J; ILT2; LIR-1; LIR1; MIR-7; MIR7     | +             | .        |
| CD85K | LILRB4  | CD85K | CD85K; HM18; ILT3; LIR-5; LIR5                  | +             | .        |
| CD86  | CD86    | CD86  | B7-2; B70; CD28LG2; LAB72; MGC34413             | +             | .        |
| CD87  | PLAUR   | CD87  | CD87; UPAR; URKR                                | +             | .        |
| CD89  | FCAR    | CD89  | CD89                                            | +             | .        |
| CD93  | CD93    | CD93  | C1QR1; C1qRP; CDw93; MXRA4; C1qR(P); dJ737E23.1 | +             | .        |
| CD95  | FAS     | CD95  | APT1; CD95; FAS1; APO-1; FASTM; ALPS1A; TNFRSF6 | +             |          |
| CD97  | CD97    | CD97  | TM7LN1                                          | +             |          |
| CD100 | SEMA4D  | CD100 | CD100; M-信号素G; M-信号素-G; SEMAJ; coll-4           | +             |          |
| CD101 | IGSF2   | CD101 | CD101; V7                                       | +             |          |
| CD102 | ICAM2   | CD102 | CD102                                           | +             |          |
| CD105 | ENG     | CD105 | CD105; END; HHT1; ORW; ORW1                     | +             |          |
| CD114 | CSF3R   | CD114 | CD114; GCSFR                                    | +             |          |
| CD115 | CSF1R   | CD115 | C-FMS; CD115; CSFR; FIM2; FMS                   | +             |          |

图1续

| CD_名称  | NCBI_名称 | 基因_名称  | NCBI_其他名称                                                                                                     | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|--------|---------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------|
| CD116  | CSF2RA  | CD116  | CD116; CDw116; CSF2R; CSF2RAX; CSF2RAY; CSF2RX; CSF2RY; GM-CSF-R- $\alpha$ ;<br>GMCSFR; GMR; MGC3848; MGC4838 | +             |          |
| CD119  | IFNGR1  | CD119  | CD119; IFNGR                                                                                                  | +             |          |
| CD121b | IL1R2   | CD121B | IL1RB; MGC47725                                                                                               | +             | -        |
| CD122  | IL2RB   | CD122  | P70-75                                                                                                        | +             |          |
| CD127  | IL7R    | CD127  | CD127; CDW127; IL-7R- $\alpha$                                                                                | +             |          |
| CD130  | IL6ST   | CD130  | CD130; CDw130; GP130; GP130-RAPS; IL6R- $\beta$                                                               | +             |          |
| CD131  | CSF2RB  | CD131  | CD131; CDw131; IL3RB; IL5RB                                                                                   | +             |          |
| CD132  | IL2RG   | CD132  | CD132; IMD4; SCIDX; SCIDX1                                                                                    | +             |          |
| CD139  | CD139   | CD139  | 记录从NCBI撤回                                                                                                     | +             |          |
| CD147  | BSG     | CD147  | 5F7; CD147; EMMPRIN; M6; OK; TCSF                                                                             | +             |          |
| CD148  | PTPRJ   | CD148  | CD148; DEP1; HP1P $\eta$ ; R-PTP-ETA; SCC1                                                                    | +             |          |
| CD153  | TNFSF8  | CD153  | CD153; CD30L; CD30LG                                                                                          | +             |          |
| CD155  | PVR     | CD155  | CD155; HVED; NECL5; PVS; TAGE4                                                                                | +             |          |
| CD156a | ADAM8   | CD156A | CD156; MS2                                                                                                    | +             |          |
| CD156b | ADAM17  | CD156B | CD156b; TACE; cSVP                                                                                            | +             | -        |
| CD156C | ADAM10  | CD156C | KUZ; MADW; CD156c; HsT18717                                                                                   | +             |          |

图1续

| CD_名称  | NCBI_名称 | 基因_名称  | NCBI_其他名称                                                                                | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|--------|---------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------|
| CD157  | BST1    | CD157  | CD157                                                                                    | +             |          |
| CD162  | SEPLG   | CD162  | CD162; PSGL-1; PSGL1                                                                     | +             |          |
| CD163  | CD163   | CD163  | M130; MM130                                                                              | +             | -        |
| CD168  | HMMR    | CD168  | RHAMM                                                                                    | +             |          |
| CD169  | SN      | CD169  | CD169; FLJ00051; FLJ00055; FLJ00073; FLJ32150; SIGLEC-1; dJ1009E24.1                     | +             |          |
| CD170  | SIGLEC5 | CD170  | CD33L2; OB-BP2; OBBP2; SIGLEC-5                                                          | +             |          |
| CD172a | PTPNS1  | CD172A | BIT; MFR; MYD-1; P84; SHPS-1; SHPS1; SIRP; SIRP-ALPHA-1; SIRP $\alpha$ ; SIRP $\alpha$ 2 | +             |          |
| CD172b | SIRPB1  | CD172B | SIRP-BETA-1                                                                              | +             |          |
| CD180  | CD180   | CD180  | LY64; LY78; RP105; MGC126233; MGC126234                                                  | +             |          |
| CD181  | IL8RA   | CD181  | C-C-CKR-1; C-C-CKR-1; CD128; CDw128a; CMKAR1; CXCR1; IL8R1; IL8RBA                       | +             |          |
| CD182  | IL8RB   | CD182  | CDw128b; CMKAR2; CXCR2; IL8R2; IL8RA                                                     | +             |          |
| CD184  | CXCR4   | CD184  | D2S201E; HM89; HSY3RR; LAP3; LESTR; NPY3R; NPYR; NPY3R; WHIM                             | +             |          |
| CD185  | BLR1    | CD185  | BLR1; CXCR5; MDR15                                                                       | +             |          |
| CD191  | CCR1    | CD191  | CCR-1; CMKBR1; HM145; MIP1aR; SCYAR1                                                     | +             |          |
| CD192  | CCR2    | CD192  | CC-CCR-2; CCR2A; CCR2B; CCR2; CCR2A; CCR2B; CMKBR2; MCP-1-R                              | +             |          |
| CD194  | CCR4    | CD194  | CC-CCR-4; CCR4; CMKBR4; ChemR13; HGCN                                                    | +             |          |
| CD195  | CCR5    | CD195  | CC-CCR-5; CCCR5; CD195; CCR-5; CCR5; CMKBR5                                              | +             |          |

图1续

| CD_名称   | NCBI_名称   | 基因_名称   | NCBI_其他名称                                                       | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|---------|-----------|---------|-----------------------------------------------------------------|---------------|----------|
| CD204   | MSR1      | CD204   | SCARA1; SR-A; phSR1; phSR2                                      | +             |          |
| CD205   | LY75      | CD205   | CLEC13B; DEC-205; GP200-MR6                                     | +             |          |
| CD209   | CD209     | CD209   | CDSIGN; DC-SIGN; DC-SIGN1                                       | +             |          |
| CD210a  | IL10RA    | CD210A  | CDW210A; HL-10R; IL-10R1; IL10R                                 | +             |          |
| CD213a1 | IL13RA1   | CD213A1 | IL-13Ra; NR4                                                    | +             |          |
| CD226   | CD226     | CD226   | DNAM-1; DNAM1; PTA1; TLISA1                                     | +             |          |
| CD232   | PLXNC1    | CD232   | PLXN-C1; VESPR                                                  | +             |          |
| CD244   | CD244     | CD244   | 2B4; NAIL; NKR2B4; Nmrk; SLAMF4                                 | +             |          |
| CD253   | TNFSF10   | CD253   | Apo-2L; CD253; TL2; TRAIL                                       | +             |          |
| CD256   | TNFSF13   | CD256   | APRIL; TALL2; TRDL-1; UNQ383/PRO715                             | +             |          |
| CD257   | TNFSF13B  | CD257   | BAFF; BLYS; TALL-1; TALL1; THANK; TNFSF20; ZTNF4; $\delta$ BAFF | +             |          |
| CD258   | TNFSF14   | CD258   | TNFSF14; LTg; TR2; HVEM-L; LIGHT                                | +             |          |
| CD261   | TNFRSF10A | CD261   | Apo2; CD261; DR4; TRAILR-1                                      | +             |          |
| CD262   | TNFRSF10B | CD262   | CD262; DR5; KILLER; TRAIL-R2; TRICK2A; TRICKB                   | +             |          |
| CD263   | TNFRSF10C | CD263   | CD263; DR1; LIT; TRAILR3; TRID                                  | +             |          |
| CD264   | TNFRSF10D | CD264   | CD264; DR2; TRAILR4; TRUNDO                                     | +             |          |
| CD265   | TNFRSF11A | CD265   | EOF; FEO; ODFR; OFE; PDB2; RANK; TRANCER                        | +             |          |

图1续

| CD_名称 | NCBI_名称   | 基因_名称 | NCBI_其他名称                                                         | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|-------|-----------|-------|-------------------------------------------------------------------|---------------|----------|
| CD267 | TNFRSF13B | CD267 | CVID; TACI; CD267; FLJ39942; MGC39952; MGC133214; TNFRSF14B       | +             |          |
| CD268 | TNFRSF13C | CD268 | BAFFR; CD268; BAFF-R; MGC138235                                   | +             |          |
| CD270 | TNFRSF14  | CD270 | ATAR; CD270; “疱疹病毒入侵介质”; HVEA; HVEM; LIGHTR; TR2                  | +             |          |
| CD272 | BTLA      | CD272 | BTLA1; FLJ16065                                                   | +             |          |
| CD273 | PDCD1LG2  | CD273 | PDCD1LG2; B7DC; BIdc; PDL2; PD-L2; PDCD1L2; bA574F11.2            | +             |          |
| CD274 | CD274     | CD274 | B7-H; B7H1; PD-L1; PDCD1L1; PDL1                                  | +             |          |
| CD275 | ICOSLG    | CD275 | B7-H2; B7H2; B7RP-1; B7RP1; GL50; ICOS-L; ICOSLG; KIAA0653; LICOS | +             |          |
| CD276 | CD276     | CD276 | B7H3                                                              | +             |          |
| CD277 | BTN3A1    | CD277 | BTF5; BT3.1                                                       | +             |          |
| CD280 | MRC2      | CD280 | MRC2; UPARAP; ENDO180; KIAA0709                                   | +             |          |
| CD281 | TLR1      | CD281 | TLR1; TIL; tsc786; KIAA0012; DKFZp5470610; DKFZp5640682           | +             |          |
| CD282 | TLR2      | CD282 | TIL4                                                              | +             |          |
| CD284 | TLR4      | CD284 | TOLL; hToll                                                       | +             |          |
| CD288 | TLR8      | CD288 | TLR8                                                              | +             |          |
| CD289 | TLR9      | CD289 | 无                                                                 | +             |          |
| CD297 | ART4      | CD297 | DO; DOK1; CD297; ART4                                             | +             |          |
| CD298 | ATP1B3    | CD298 | ATP1B3; ATPB-3; FLJ29027                                          | +             |          |

图1续

| CD 名称  | NCBI 名称 | 基因 名称  | NCBI 其他名称                                                                    | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|--------|---------|--------|------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------|
| CD300a | CD300A  | CD300A | CMRF-35-H9; CMRF35H; CMRF35H9; IRC1; IRC2; IRp60                             | +             |          |
| CD300c | CD300c  | CD300c | CMRF-35A; CMRF35A; CMRF35A1; LIR                                             | +             |          |
| CD301  | CLEC10A | CD301  | HML; HML2; CLECSF13; CLECSF14                                                | +             |          |
| CD302  | CD302   | CD302  | DCL-1; BIMLEC; KIAA0022                                                      | +             |          |
| CD305  | LAIR1   | CD305  | LAIR-1                                                                       | +             |          |
| CD306  | LAIR2   | CD306  | LAIR2                                                                        | +             |          |
| CD312  | EMR2    | CD312  | 无                                                                            | +             |          |
| CD314  | KLRK1   | CD314  | KLRK1; KLR; NKG2D; NKG2-D; D12S2489E                                         | +             |          |
| CD315  | PTGFRN  | CD315  | PTGFRN; FPRP; EWI-F; CD9P-1; SMAP-6; FLJ11001; KIAA1436                      | +             |          |
| CD317  | BST2    | CD317  | 无                                                                            | +             |          |
| CD319  | SLAMF7  | CD319  | 19A; CRACC; CS1                                                              | +             |          |
| CD328  | SIGLEC7 | CD328  | p75; QA79; AIRM1; CDw328; SIGLEC-7; p75/AIRM1                                | +             |          |
| CD329  | SIGLEC9 | CD329  | CD329                                                                        | +             |          |
| CD338  | ABCG2   | CD338  | MRX; MXR; ABCP; BCRP; BMDP; MXR1; ABC15; BCRP1; CDw338; EST157481; MGC102821 | +             |          |
| CD351  | FCAMR   | CD351  | CD351; FCAMR; FKG87                                                          | +             |          |
| CD352  | SLAMF6  | CD352  | CD352; KALI; KALIb; Ly108; NTB-A; NTBA; SF2000                               | +             |          |
| CD353  | SLAMF8  | CD353  | BLAME; CD353; SBB42                                                          | +             |          |

图1续

| CD_名称 | NCBI_名称  | 基因_名称 | NCBI_其他名称                            | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|-------|----------|-------|--------------------------------------|---------------|----------|
| CD354 | TREM1    | CD354 | CD354; TREM-1                        | +             |          |
| CD357 | TNFRSF18 | CD357 | AITR; CD357; GITR                    | +             |          |
| CD358 | TNFRSF21 | CD358 | CD358; “死亡受体6”; DR6                  | +             |          |
| CD360 | IL21R    | CD360 | CD360                                | +             |          |
| CD361 | EVI2B    | CD361 | CD361; D17S376; EVDB                 | +             |          |
| CD362 | SDC2     | CD362 | CD362; 纤维蛋白聚糖; SYND2; “多配体蛋白聚糖蛋白聚糖2” | +             |          |
| CD366 | HAVCR2   | CD366 | T细胞免疫球蛋白粘蛋白家族成员3, TIM-3, TIMD3       | +             |          |
| CD367 | CLEC4A   | CD367 | DCIR, DDB27, CLECSF6                 | +             |          |
| CD368 | CLEC4D   | CD368 | MCL, CLECSF8, CLEC-6, MPCL           | +             |          |
| CD369 | CLEC7A   | CD369 | DECTIN-1, CLECSF12,                  | +             |          |
| CD371 | CLEC12A  | CD371 | OLL-1, MICL, DCAL-2                  | +             |          |

图1续

| CD_名称  | NCBI_名称 | 基因_名称  | NCBI_其他名称                                     | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|--------|---------|--------|-----------------------------------------------|---------------|----------|
| CD1d   | CD1D    | CD1D   | 无                                             |               | +        |
| CD21   | CR2     | CD21   | C3DR; CD21                                    | .             | +        |
| CD24   | CD24    | CD24   | CD24A                                         | .             | +        |
| CD66a  | CEACAM1 | CD66A  | BGP; BGP1; BGP1; CD66; CD66A                  |               | +        |
| CD66c  | CEACAM6 | CD66c  | CD66c; CEAL; NCA                              |               | +        |
| CD66e  | CEACAM5 | CD66E  | CD66e; CEA                                    |               | +        |
| CD66f  | PSG1    | CD66F  | B1G1; CD66f; PBG1; PSBG1; PSGGA; SP1          |               | +        |
| CD73   | NT5E    | CD73   | CD73; ESNT; NT5; NTE; eN; eNT                 | .             | +        |
| CD77   | 碳水化合物   | CD77   | 碳水化合物                                         | .             | +        |
| CD104  | ITGB4   | CD104  | 无                                             | .             | +        |
| CD110  | MPL     | CD110  | C-MPL; CD110; MPLV; TPOR                      | .             | +        |
| CD113  | PVRL3   | CD113  | PVTL3; PPR3; PRR3; PVRR3; 结合素3; DKFZP566B0846 |               | +        |
| CD118  | LIFR    | CD118  | LIFR; SWS; SJS2; STWS                         |               | +        |
| CD129  | IL9R    | CD129  | 无                                             |               | +        |
| CD133  | PROM1   | CD133  | AC133; CD133; PROM1                           | .             | +        |
| CD138  | SDC1    | CD138  | CD138; SDC; SYND1                             | .             | +        |
| CDw145 | CDw145  | CDW145 | NCBI中没有记录                                     | .             | +        |

图2

| CD_名称  | NCBI_名称 | 基因_名称  | NCBI_其他名称                                                                   | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|--------|---------|--------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------|----------|
| CD151  | CD151   | CD151  | GP27; PETA-3; SFA1                                                          | +             | +        |
| CD174  | FUT3    | CD174  | LE; Les                                                                     |               | +        |
| CD175  | 碳水化合物   | CD175  | 碳水化合物                                                                       |               | +        |
| CD175s | 碳水化合物   | CD175S | 碳水化合物                                                                       |               | +        |
| CD176  | 碳水化合物   | CD176  | 碳水化合物                                                                       |               | +        |
| CD178  | FASLG   | CD178  | FASL; CD178; CD95L; TNFSF6; APT1LG1                                         | +             | +        |
| CD193  | CCR3    | CD193  | CC-CCR3; CCR3; CMKBR3                                                       |               | +        |
| CD234  | DARC    | CD234  | CCBP1; DARC; GPD                                                            |               | +        |
| CD239  | LU      | CD239  | AU; BCAM; MSK19                                                             |               | +        |
| CD249  | ENPEP   | CD249  | APA; gp160; EAP                                                             |               | +        |
| CD296  | ART1    | CD296  | ART2; RT6                                                                   |               | +        |
| CD324  | CDH1    | CD324  | Arc-1; CDHE; ECAD; LCAM; UVO                                                |               | +        |
| CD326  | TACSTD1 | CD326  | CO17-1A; EGP; EGP40; Ep-CAM; GA733-2; KSA; M4S1; MIC18; MK-1; TROP1; IEGP-2 |               | +        |
| CD331  | FGFR1   | CD331  | FGFR1; H2; H3; H4; H5; CEK; FLG; FLT2; KAL2; BFGFR; C-FGR; N-SAM            |               | +        |
| CD332  | FGFR2   | CD332  | FGFR2; BEK; JWS; CEK3; CFD1; ECT1; KGFR; TK14; TK25; BFR-1; K-SAM           |               | +        |
| CD333  | FGFR3   | CD333  | FGFR3; ACH; CEK2; JTK4; HSFGR3EX                                            |               | +        |
| CD334  | FGFR4   | CD334  | FGFR4; TKF; JTK2; MGC20292                                                  |               | +        |

图2续

| CD_名称 | NCBI_名称 | 基因_名称 | NCBI_其他名称                                        | 巨噬细胞/<br>单核细胞 | 上皮<br>细胞 |
|-------|---------|-------|--------------------------------------------------|---------------|----------|
| CD339 | JAG1    | CD339 | JAG1; AGS; AHD; AWS; HJ1; JAGL1                  |               | +        |
| CD340 | ERBB2   | CD340 | NEU; NGL; HER2; TKR1; HER-2; c-erb B2; HER-2/neu |               | +        |
| CD344 | FZD4    | CD344 | EVR1; FEVR; Fz-4; FZE4; GPCR; FZD4S; MGC34390    |               | +        |
| CD350 | FZD10   | CD350 | FZE7; FZ-10; hFz10                               |               | +        |

图2续

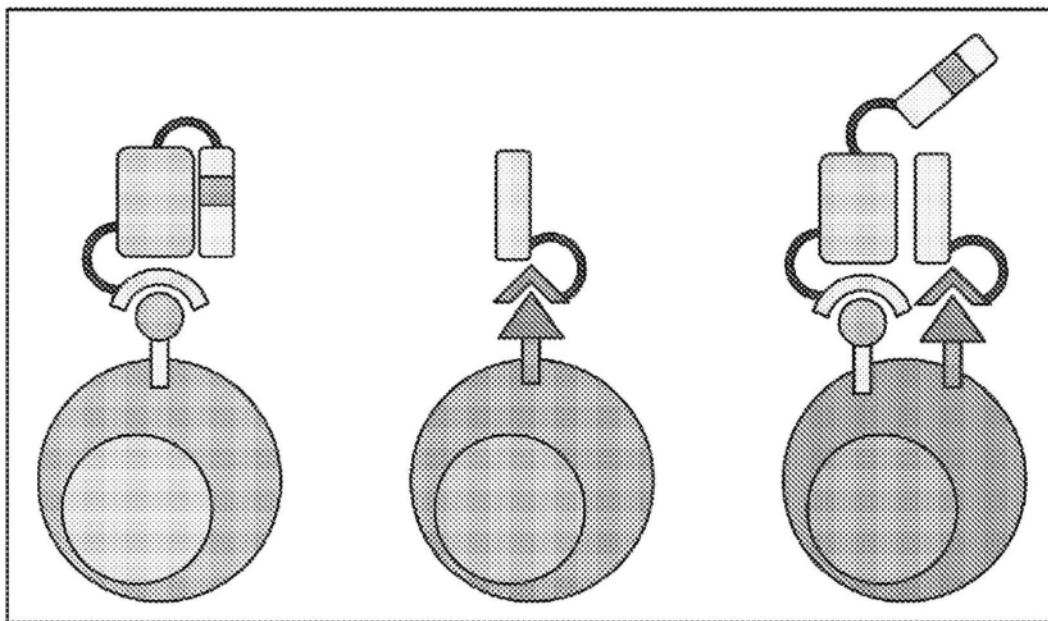


图3A

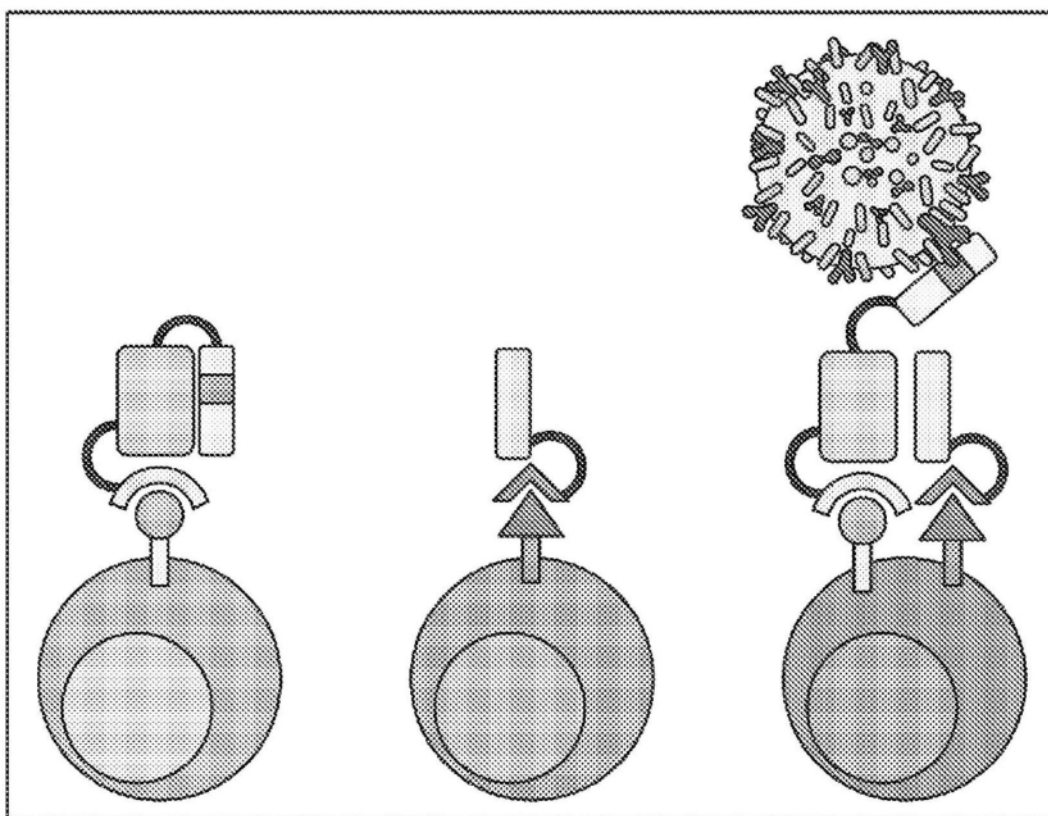


图3B

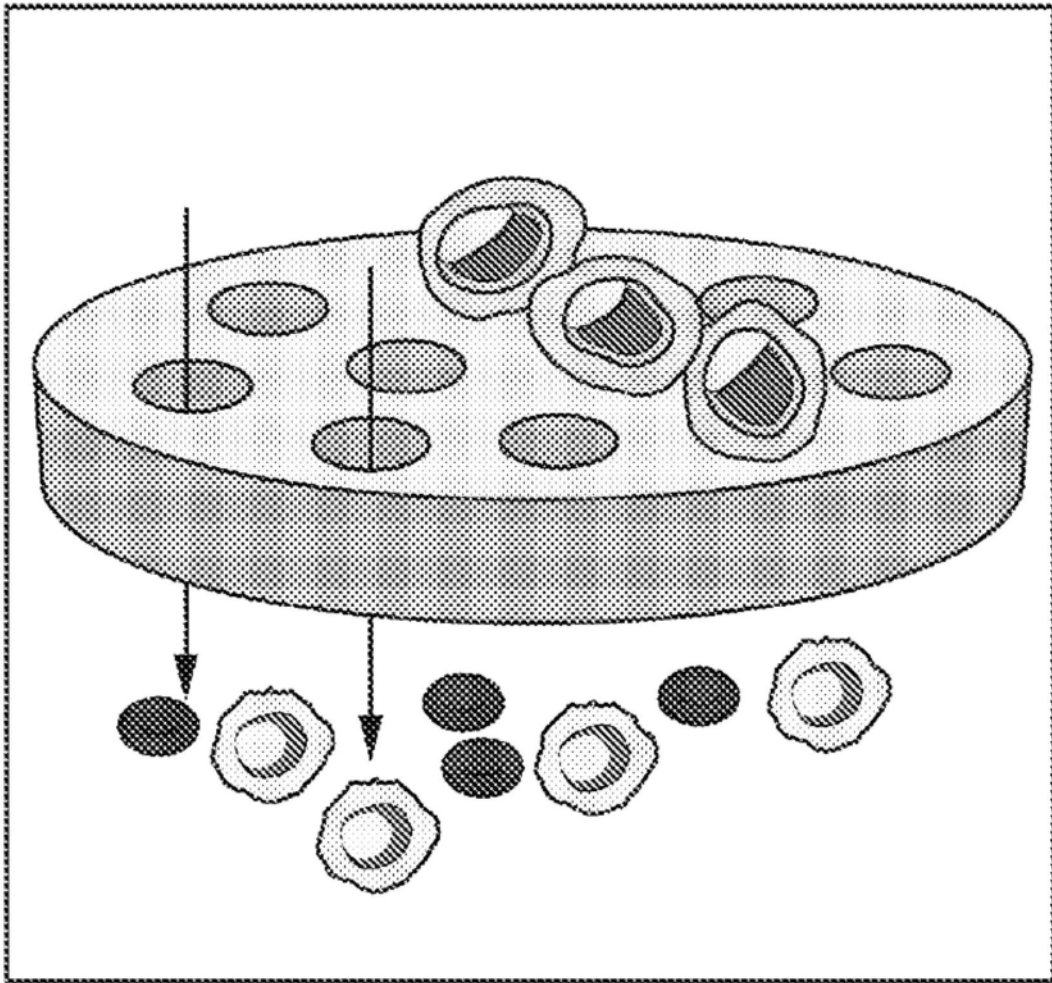
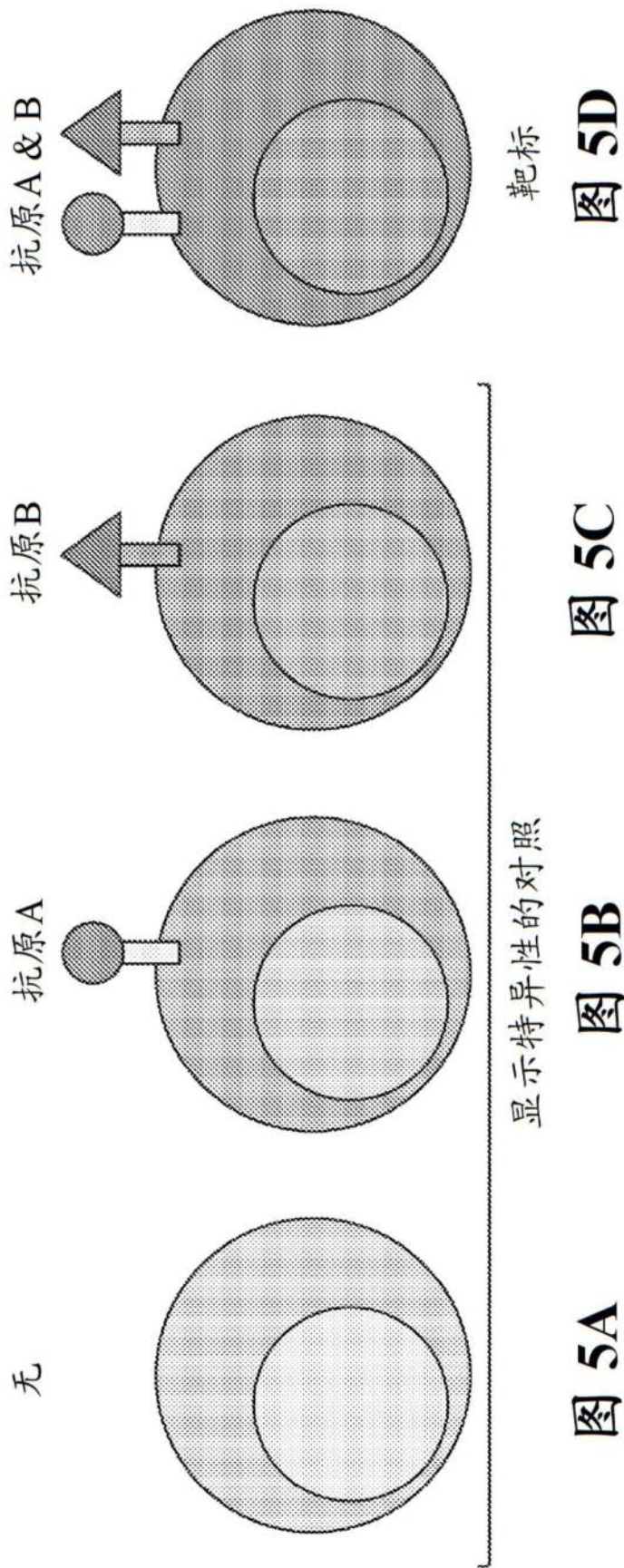


图4



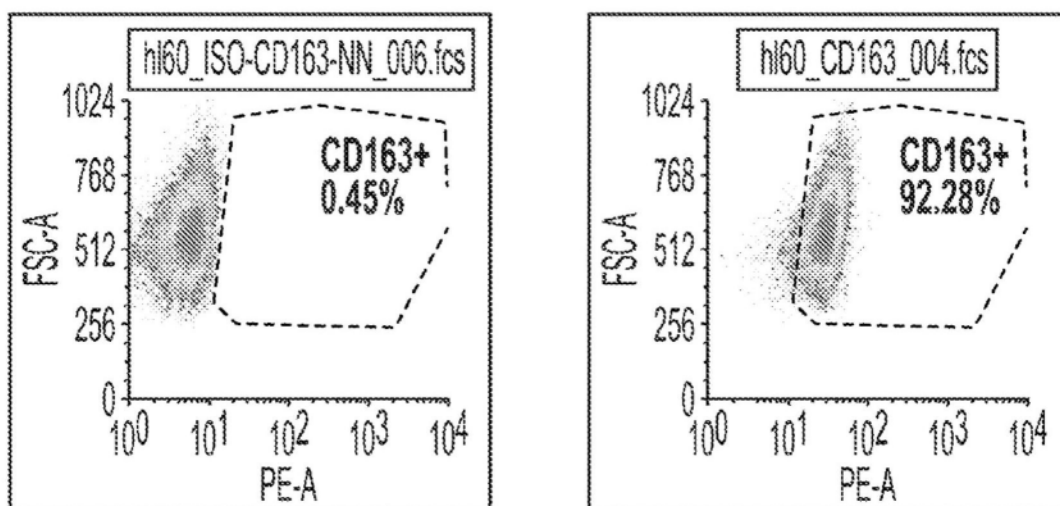


图6A

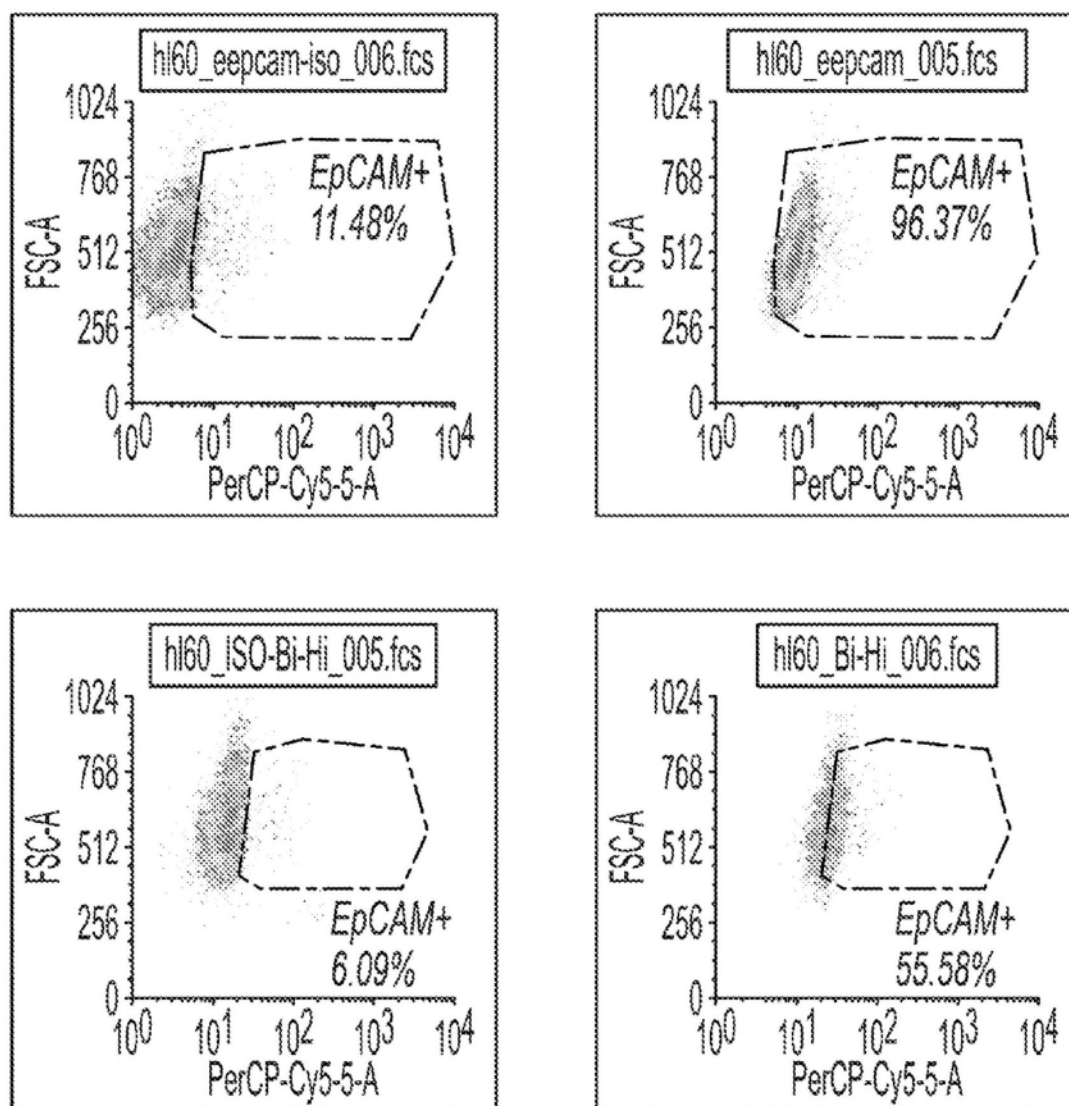


图6B

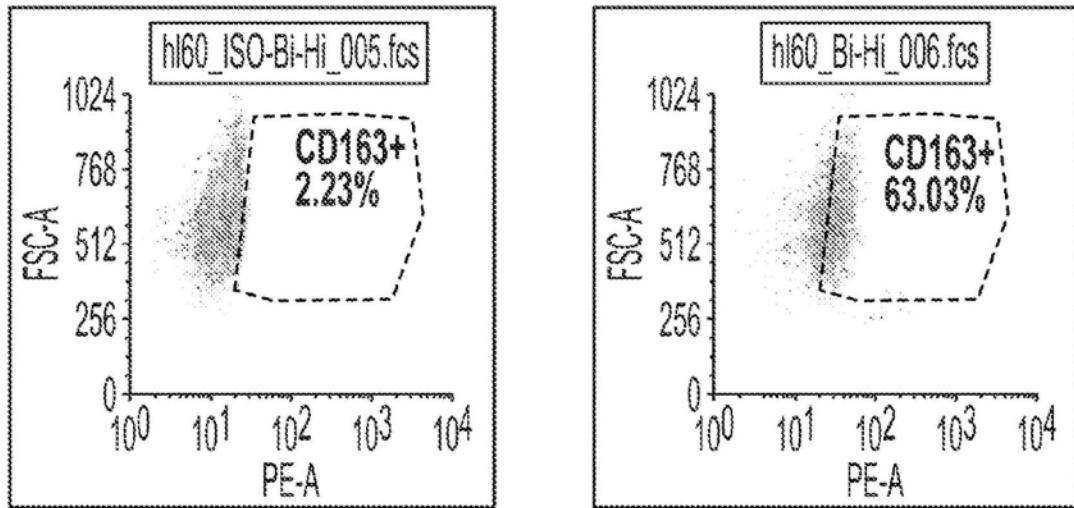


图6C

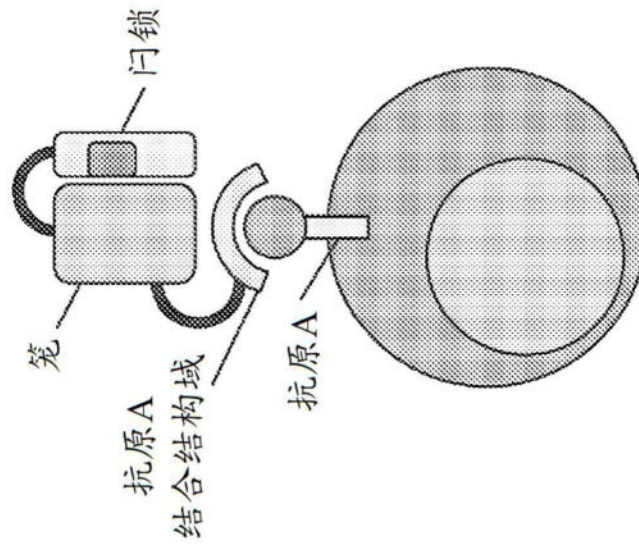


图7A

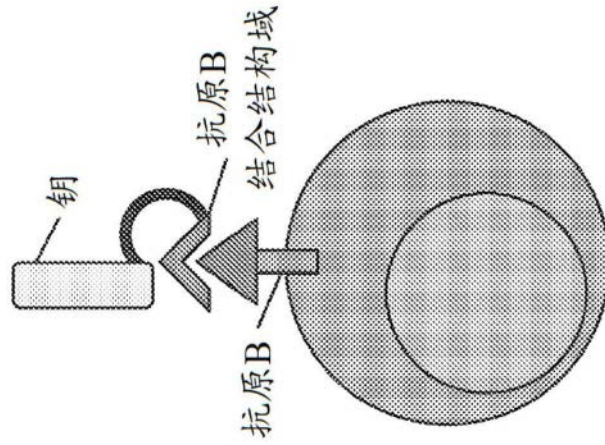


图7B

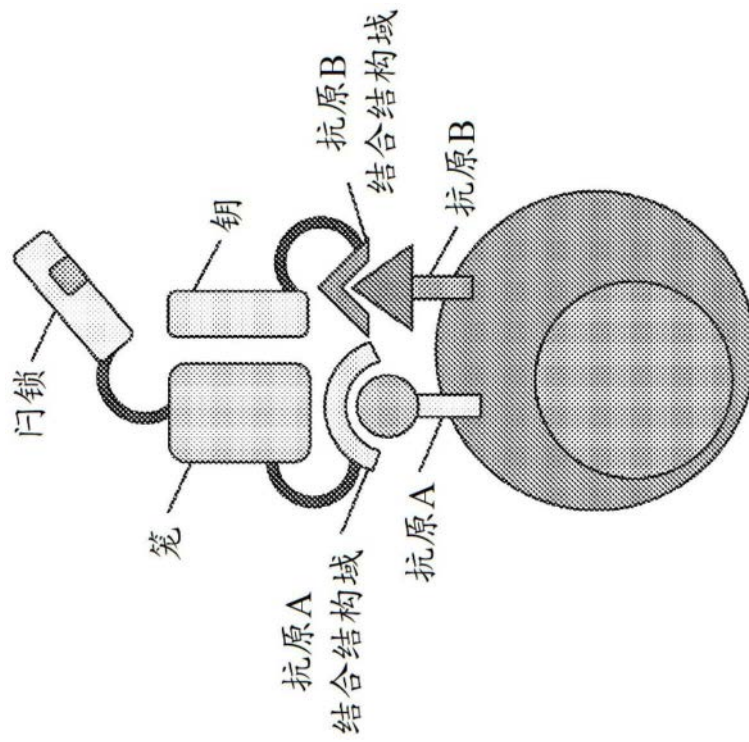


图7C

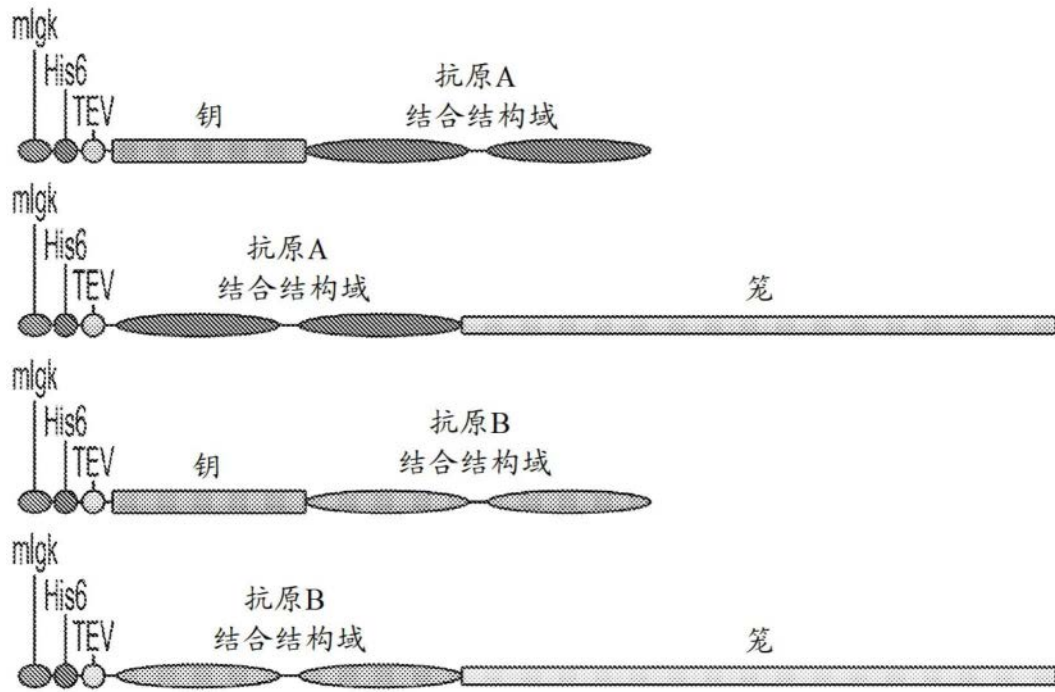


图8A

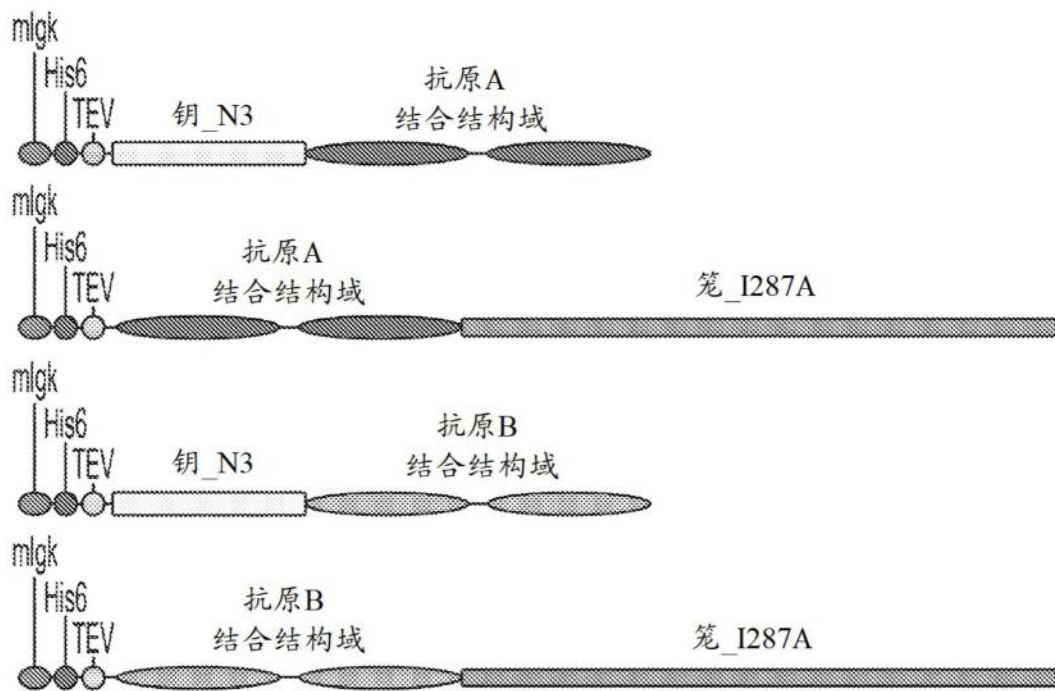


图8B

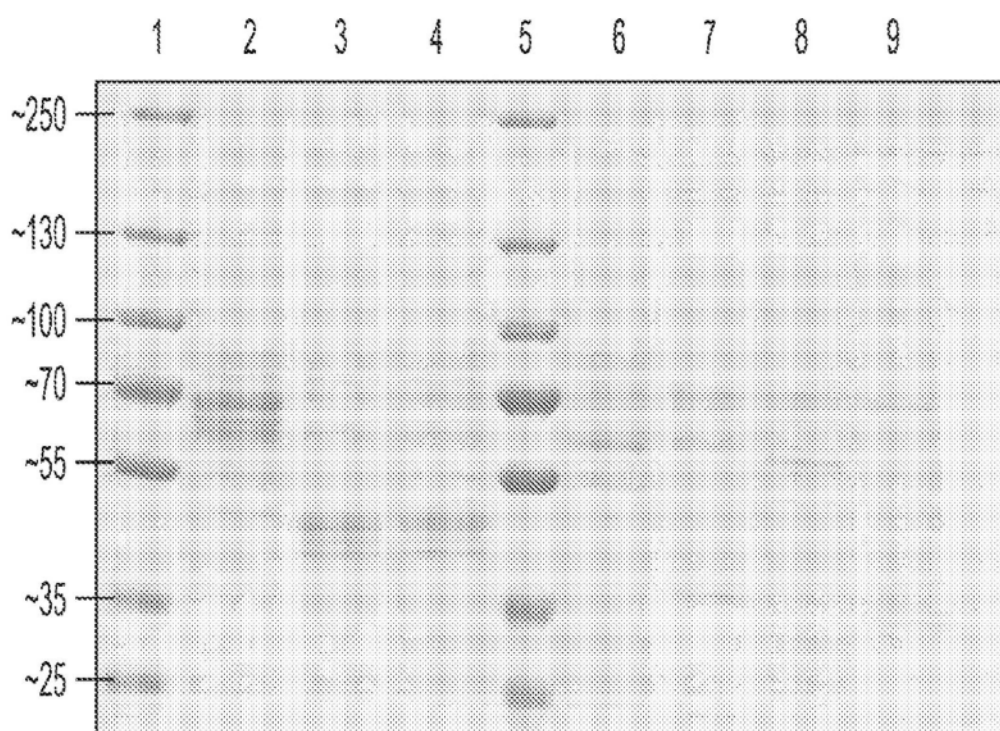


图9A

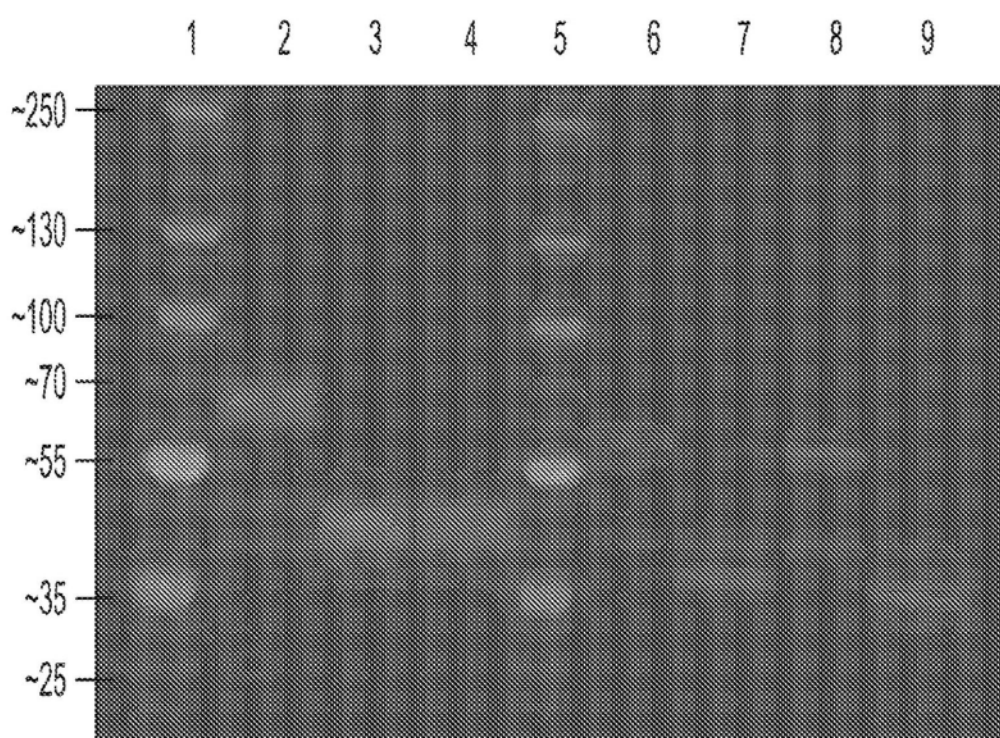


图9B

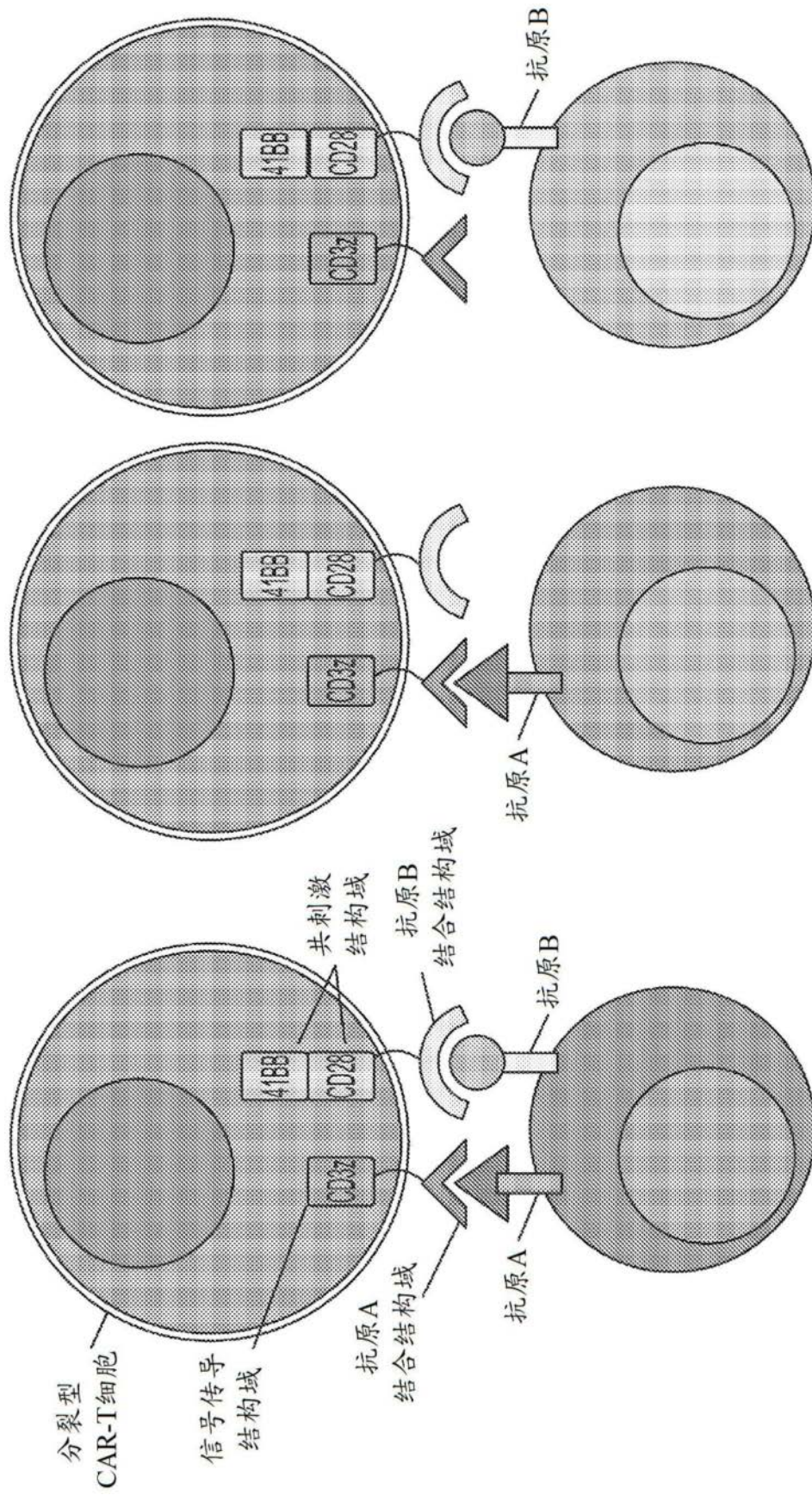


图10

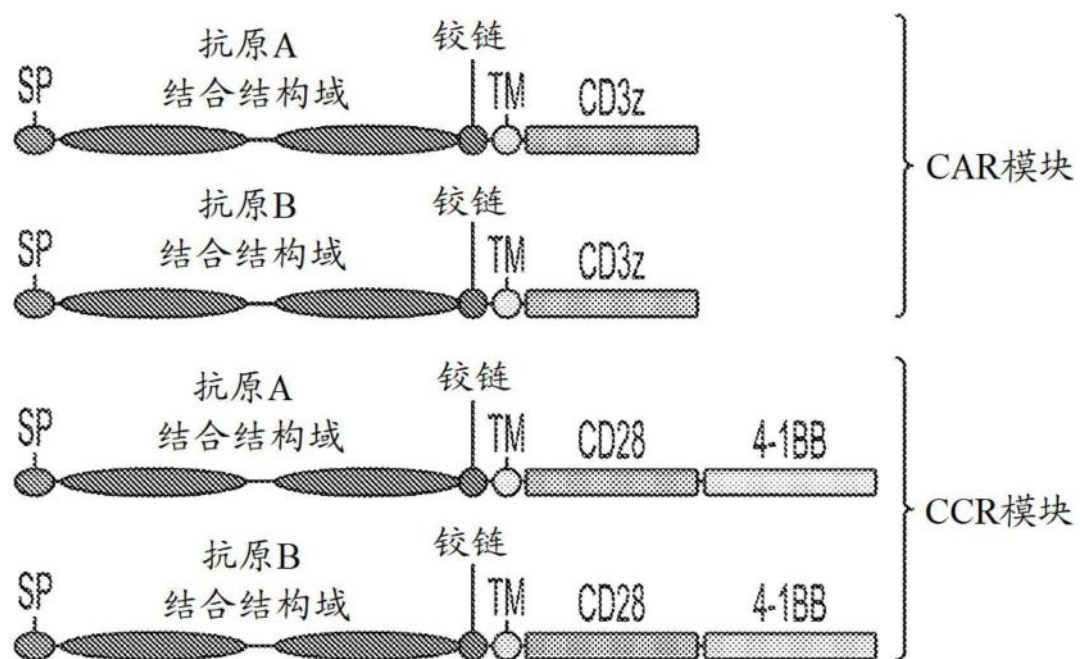


图11