



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111808192 B

(45) 授权公告日 2022.02.15

(21) 申请号 202010509498.X

A61K 38/20 (2006.01)

(22) 申请日 2020.06.05

A61P 35/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 31/00 (2006.01)

申请公布号 CN 111808192 A

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.10.23

A61P 31/04 (2006.01)

(73) 专利权人 北京天广实生物技术股份有限公司

A61P 31/10 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

地址 101100 北京市大兴区北京经济技术开发区科创十四街20号院16号楼5单元一层

专利权人 北京华放天实生物制药有限责任公司

(56) 对比文件

CN 109970856 A, 2019.07.05

CN 110913906 A, 2020.03.24

CN 110691795 A, 2020.01.14

CN 110621337 A, 2019.12.27

CN 110392698 A, 2019.10.29

CN 110062766 A, 2019.07.26

CN 109475617 A, 2019.03.15

CN 109069570 A, 2018.12.21

CN 108368178 A, 2018.08.03

CN 108348601 A, 2018.07.31

CN 107001470 A, 2017.08.01

CN 106103484 A, 2016.11.09

(72) 发明人 胡稳奇 李江美 李锋

(74) 专利代理机构 上海德禾翰通律师事务所
31319

代理人 陈艳娟

审查员 王翔宇

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书2页 说明书34页

序列表18页 附图10页

(54) 发明名称

结合LAG3的抗体及其用途

(57) 摘要

本申请提供一种与人LAG3特异结合的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分。还提供编码该抗体的核酸分子,以及用于表达该抗体的表达载体、宿主细胞和方法。本申请还提供包含该抗体的免疫交联物、双特异性分子、嵌合抗原受体、和药物组合物,以及使用本申请抗体的治疗方法。

1. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其与LAG3结合,包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含VHCDR1区、VHCDR2区和VHCDR3区,该轻链可变区包含VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区,其中VH CDR1区、VH CDR2区、VH CDR3区、VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区的氨基酸序列分别如(1) SEQ ID NOs:1、2、3、5、6和7;或(2) SEQ ID NOs:1、2、4、5、6和8所示。

2. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中,

当VH CDR1区、VH CDR2区、VH CDR3区、VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区的氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:1、2、3、5、6和7所示时,所述重链可变区包含SEQ ID NOs:9、10、11、或12所示的氨基酸序列,

当VH CDR1区、VH CDR2区、VH CDR3区、VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区的氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:1、2、4、5、6和8所示时,所述重链可变区包含SEQ ID NOs:13或14所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中,

当VH CDR1区、VH CDR2区、VH CDR3区、VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区的氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:1、2、3、5、6和7所示时,所述轻链可变区包含SEQ ID NOs:15、16、17、或19所示的氨基酸序列,

当VH CDR1区、VH CDR2区、VH CDR3区、VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区的氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:1、2、4、5、6和8所示时,所述轻链可变区包含SEQ ID NOs:18或20所示的氨基酸序列。

4. 根据权利要求2所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述重链可变区和所述轻链可变区分别包含(1) SEQ ID NOs:9和15;(2) SEQ ID NOs:10和16;(3) SEQ ID NOs:11和17;(4) SEQ ID NOs:11和19;(5) SEQ ID NOs:12和17;(6) SEQ ID NOs:12和19;(7) SEQ ID NOs:13和18;(8) SEQ ID NOs:13和20;或(9) SEQ ID NOs:14和20所示的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,包含重链恒定区和轻链恒定区,其中所述重链恒定区为人IgG1或IgG4恒定区,所述轻链恒定区为人 κ 恒定区。

6. 根据权利要求5所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述重链恒定区包含SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,所述轻链恒定区包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列。

7. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其(a)与人LAG3结合;(b)与猴LAG3结合;(c)不与小鼠LAG3结合;(d)阻断LAG3-MHC II复合体相互作用;(e)促进T细胞激活;和/或(f)具有体内抗肿瘤效果。

8. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其为鼠源、嵌合或人源化抗体。

9. 一种双特异性分子、免疫交联物、嵌合抗原受体、或基因改造T细胞受体,包含权利要求1-8中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分。

10. 一种核酸,编码权利要求1-8中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分。

11. 一种表达载体,包含权利要求10所述的核酸。

12. 一种宿主细胞,包含权利要求11所述的表达载体。
13. 一种药物组合物,包含权利要求1-8中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,以及药学上可接受的载体。
14. 根据权利要求13所述的药物组合物,还包含抗肿瘤剂、抗感染剂或自身免疫疾病治疗剂。
15. 根据权利要求14所述的药物组合物,其中所述抗肿瘤剂为PD-1抗体、PD-L1抗体、TIM-3抗体、STAT3抗体或ROR1抗体。
16. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述抗感染剂为抗病毒剂、抗细菌剂、抗真菌剂、或抗支原体剂。
17. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述自身免疫疾病治疗剂为IL-2抑制剂、IL-17抑制剂、或IL-23抑制剂。
18. 权利要求1-8中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分、或权利要求14或15所述的药物组合物在制备治疗肿瘤的药物中的用途,其中所述肿瘤为实体瘤。
19. 权利要求18所述的用途,其中所述肿瘤选自肠腺癌、乳腺癌、肾细胞癌、黑色素瘤、胰腺癌、非小细胞肺癌、成胶质细胞瘤和胃癌。
20. 权利要求1-8中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分、或权利要求14、16或17所述的组合物在制备治疗感染性疾病或自身免疫疾病的药物中的用途,其中所述感染性疾病为病毒感染疾病、细菌感染疾病、真菌感染疾病或支原体感染疾病,所述自身免疫疾病为斑块型银屑病。

结合LAG3的抗体及其用途

技术领域

[0001] 本申请涉及一种与LAG3特异结合的抗体、及其制备和用途,尤其是其在治疗与LAG3相关的疾病例如癌症、感染性疾病和自身免疫疾病中的用途。

背景技术

[0002] 免疫应答的过程十分复杂,免疫细胞上多种刺激性和/或抑制性分子被活化或去活化,以将免疫应答保持在合适或最优的状态。比如,抑制性受体如PD-1和CTLA-4会上调来平衡刺激性受体的活性,限制免疫细胞的活化,从而防止自身免疫或自身炎症的发生。然而,这种免疫抑制的机制会被肿瘤细胞利用,保护它们自身免受免疫系统的攻击,引起癌症的发生和进展。在外来病原体的感染、尤其是慢性感染的情况下,LAG3也大量表达,引起免疫抑制,导致脓毒症、麻风病、艾滋病等疾病的发生(Bunn PA, Jr. (1998) *Seminars in Oncology*, 25 (2 suppl 6):1-3)。在临床上已经开发了靶向PD-1和/或CTLA-4的抗体来治疗癌症,但是有很大一部分病人对该治疗没有反应(Topalian SL et al., (2012) *The New England journal of medicine* 366:2443-2454)。因而,研发人员又将目标转移到更多的抑制性受体上,例如LAG3(淋巴细胞活化基因3)和TIM3(Anderson AC et al., (2016) *Immunity* 44:989-1004)。

[0003] LAG3, 又称CD233, 是I类跨膜蛋白, 结构与CD4较为相似。LAG3最初在活化的T细胞和NK细胞上发现, 并被认为对T细胞活化/功能以及NK细胞增殖起到负调节作用(Turnis ME et al., (2015) *European journal of immunology* 45:1892-1905)。细胞膜上的LAG3首先形成二聚体, 然后稳定结合MHC II类分子, LAG3-MHC II相互作用通过下调抗原依赖性的CD4+和CD8+ T细胞刺激而减弱免疫应答。例如, 褐色素瘤细胞上的MHC II分子与浸润T细胞表面的LAG3结合, 引发T细胞的耗竭(Hemon P et al., (2011) *Journal of immunology* 186:5173-5183)。过多的LAG3可以在溶酶体中降解, 或通过金属蛋白酶ADAM10和ADAM17而从T细胞表面切除, 从而减轻免疫抑制作用(Clayton KL et al., (2015) *Journal of virology* 89:3723-3736; Bae J et al., (2014) *Journal of immunology* 193:3101-3112; Woo SR et al., (2010) *European journal of immunology* 40:1768-1777)。

[0004] LAG3还能与半乳糖凝集素-3或LSECtin结合, 分别引起肿瘤微环境中CD8+T细胞的抑制、以及抗原特异效应T细胞的IFN γ 分泌抑制(Kouo T et al., (2015) *Cancer Immunol Res.* 3:412-423; Xu F et al., (2014) *Cancer research* 74:3418-3428)。

[0005] 另有研究发现, LAG3在静息的调节T细胞(Treg)上组成性地低量表达, 而在激活的Treg细胞上高水平表达。LAG3表达是Treg分化和抑制活性最大化所必需的, 而MHC II与Treg上LAG3的结合可以抑制树突状细胞的活化和成熟(Huang CT et al., (2004) *Immunity* 21:503-513; Liang B et al., (2008) *Journal of immunology* 180:5916-5926)。

[0006] 从以上可以看出, LAG3的作用是抑制免疫系统, 下调免疫应答。研究发现, LAG3与病原体感染的严重程度强烈相关, 而肿瘤浸润T细胞上的LAG3高表达可能帮助肿瘤细胞进行免疫逃避(Richter K et al., (2010) *International immunology* 22:13-23)。另一方

面,LAG3不足可能引发自身免疫疾病的发生和恶化。

[0007] 已经开发出拮抗型LAG3抗体,例如MK-4280 (Merck,人源化IgG4抗体)和BMS-986016 (Relatlimab,Bristol-Myers Squibb,人源IgG4),用于实体瘤治疗,包括乳腺癌、肾细胞癌、黑色素瘤、胰腺癌、非小细胞肺癌、成胶质细胞瘤和胃癌等。临床上也在研究LAG3抗体与PD-1/PD-L1抗体的联合使用。拮抗型LAG3抗体还被设计用于靶向并消除自身免疫病人病灶内的LAG3+免疫细胞。例如GSK2831781 (GlaxoSmithKline) 目前正处于斑块型银屑病治疗的临床试验阶段 (Andrews LP et al., (2017) Immunological Reviews.276 (1) :80-96)。

[0008] 鉴于LAG3对于免疫系统的重要调节作用,领域内需要更多更好的LAG3抗体。

发明内容

[0009] 本申请提供一种分离的单克隆抗体,例如,与LAG3 (例如,人LAG3和猴LAG3) 结合的鼠源、人源、嵌合或人源化的单克隆抗体,其与现有技术抗体例如BMS-986016相比,具有相当的人/猴LAG3结合活性、相当或更高的LAG3-MHC II阻断活性、更强的T细胞激活能力、以及相当或更好的体内抗肿瘤活性。

[0010] 本申请的抗体可以用于多种应用,包括检测LAG3蛋白、LAG3相关疾病的治疗等。

[0011] 因此,在一个方面,本申请涉及一种分离的单克隆抗体 (例如,人源化抗体)、或其抗原结合部分,其与LAG3结合,可以含有重链可变区,该重链可变区含有VH CDR1区、VH CDR2区和VH CDR3区,其中,VH CDR1区、VH CDR2区和VH CDR3区可以分别包含如(1) SEQ ID NOs:1、2和3;(2) SEQ ID NOs:1、2和4;或(3) SEQ ID NOs:21、22和23所示的氨基酸序列;或与上述序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0012] 在一个方面,本申请的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分的重链可变区可以包含如SEQ ID NOs:9、10、11、12、13、14、27、28、29或30所示的氨基酸序列,或与上述序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0013] 在一个方面,本申请的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分可以含有轻链可变区,该轻链可变区含有VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区,其中,VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区可以分别包含如(1) SEQ ID NOs:5、6和7;(2) SEQ ID NOs:5、6和8;或(3) SEQ ID NOs:24、25和26所示的氨基酸序列;或与上述序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0014] 在一个方面,本申请的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分的轻链可变区可以包含如SEQ ID NOs:15、16、17、18、19、20、31、32、33或34所示的氨基酸序列,或与上述序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0015] 在一个方面,本申请的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分可以包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区包含VH CDR1区、VH CDR2区和VH CDR3区,轻链可变区包含VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR31区,其中VH CDR1区、VH CDR2区、VH CDR3区、VL CDR1区、VL CDR2区和VL CDR3区可以分别包含如(1) SEQ ID NOs:1、2、3、5、6和7;(2) SEQ ID NOs:1、2、4、5、6和8;或(3) SEQ ID NOs:18、19、20、21、22和23所示的氨基酸序列;或与上述序列具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列,其中该抗体或其抗原结合部分与LAG3结合。

[0016] 在一个实施方式中,本申请的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分的重链可变区和轻链可变区可以分别包含如(1)SEQ ID NOs:9和15;(2)SEQ ID NOs:10和16;(3)SEQ ID NOs:11和17;(4)SEQ ID NOs:11和19;(5)SEQ ID NOs:12和17;(6)SEQ ID NOs:12和19;(7)SEQ ID NOs:13和18;(8)SEQ ID NOs:13和20;(9)SEQ ID NOs:14和20;(10)SEQ ID NOs:27和31;(11)SEQ ID NOs:28和32;(12)SEQ ID NOs:29和33;(13)SEQ ID NOs:29和34;(14)SEQ ID NOs:30和33;或(15)SEQ ID NOs:30和34所示的氨基酸序列;或与上述具有至少80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列,其中该抗体或其抗原结合部分与LAG3结合。

[0017] 在一个实施方式中,本申请的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分可以包含重链恒定区和/或轻链恒定区,其中重链恒定区和轻链恒定区可以分别为IgG4恒定区和 κ 恒定区,IgG4恒定区可以为例如人IgG4恒定区,例如含有S228P的氨基酸突变的人IgG4恒定区,其可以包含如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列, κ 恒定区可以为 κ 恒定区,其可以包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列,其中该抗体或其抗原结合部分与LAG3结合。IgG4恒定区中包含S228P的氨基酸突变有助于提高IgG4抗体的结构稳定性。其中,重链恒定区的N端与重链可变区的C端连接,轻链恒定区的N端与轻链可变区的C端连接。

[0018] 在一个实施方式中,本申请的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分可以包含重链恒定区和/或轻链恒定区,其中重链恒定区和轻链恒定区可以分别为IgG1恒定区和 κ 恒定区,IgG1恒定区为例如人IgG1恒定区, κ 恒定区可以为 κ 恒定区,其中该抗体或其抗原结合部分与LAG3结合。

[0019] 本申请的抗体在一些实施方式中包含两条重链和两条轻链,或由两条重链和两条轻链构成,其中各重链包含上述的重链恒定区序列、重链可变区序列或CDR序列,且各轻链包含上述的轻链恒定区序列、轻链可变区序列或CDR序列。本申请的抗体可以是例如IgG4、IgG1、或IgG2的全长抗体。在一些实施方式中,本申请的抗体可以是单链抗体,或由抗体片段构成,例如Fab或F(ab')₂片段。

[0020] 本申请的抗体或其抗原结合部分可以与人/猴LAG3结合,并能够阻断LAG3-MHC II复合体结合,促进T细胞激活,并具有体内抗肿瘤效果。本申请的抗体或其抗原结合部分还具有体内抗炎性疾病例如自身免疫疾病的效果。

[0021] 本申请还提供含有本申请抗体或其抗原结合部分的免疫交联物,该抗体或其抗原结合部分与治疗剂例如细胞毒素或抗癌剂相连接。本申请还提供含有本申请抗体或其抗原结合部分的双特异性分子,该抗体或其抗原结合部分连接有第二功能基团,例如,第二抗体,该第二功能基团具有不同于本申请抗体或其结合部分的结合特异性。在另一方面,本申请的抗体或其抗原结合部分可以是嵌合抗原受体(CAR)或基因改造T细胞受体(TCR)的一部分。本申请还提供具有上述CAR和/或TCR的免疫细胞,包括T细胞、NK细胞等。

[0022] 本申请还提供药物组合物,其包含本申请的抗体或其抗原结合部分、免疫交联物、双特异性分子、或免疫细胞,以及药学上可接受的载体。

[0023] 本申请还包括编码本申请抗体或其抗原结合部分的核酸分子,以及包含该核酸的表达载体以及包含该表达载体的宿主细胞。本申请还提供使用含有上述表达载体的宿主细胞来制备LAG3抗体的方法,包括:(i)在宿主细胞中表达抗体,以及(ii)从宿主细胞或其培养物中分离抗体。

[0024] 在一个方面,本申请提供在受试者中增强免疫应答的方法,包括向有需要的受试者施用有效量的本申请抗体或其抗原结合部分。用于该方法的本申请抗体可以是IgG4抗体。

[0025] 在一个方面,本申请提供在受试者中治疗或减缓癌症疾病的方法,包括向受试者施用治疗有效量的本申请抗体或其抗原结合部分。癌症可以是实体瘤,包括但不限于,肠腺癌、乳腺癌、肾细胞癌、黑色素瘤、胰腺癌、非小细胞肺癌、成胶质细胞瘤和胃癌。用于该方法的本申请抗体可以是IgG4抗体。在一些实施方式中,该方法包括施用本申请的组合物、表达载体、双特异性分子、或免疫交联物。在一些实施方式中,至少一种其他抗癌抗体可以与本申请抗体或其抗原结合部分一起施用,例如PD-1抗体、PD-L1抗体、STAT3抗体和ROR1抗体、TIM-3抗体和/或CTLA-4抗体。在另一个实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分与细胞因子(例如IL-2和/或IL-21)或共刺激抗体(例如CD137抗体和/或GITR抗体)一起施用。在另一个实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分可以与化疗剂一起施用,该化疗剂可以是细胞毒性剂。本申请的抗体可以是例如鼠源、人源、嵌合或人源化抗体。

[0026] 在一个方面,本申请提供在受试者中治疗或减缓感染性疾病的方法,包括向受试者施用治疗有效量的本申请抗体或其抗原结合部分。感染性疾病可以由病毒、细菌、真菌、支原体等引起的。用于该方法的本申请抗体可以是IgG4抗体。在一些实施方式中,该方法包括施用本申请的组合物、表达载体、双特异性分子、或免疫交联物。在一些实施方式中,至少一种其他抗感染剂可以与本申请抗体或其抗原结合部分一起施用,例如抗病毒剂、抗细菌剂、抗真菌剂、抗支原体剂等。

[0027] 在一个方面,本申请提供在受试者中治疗或减缓自身免疫疾病的方法,包括向受试者施用治疗有效量的本申请抗体或其抗原结合部分。自身免疫疾病可以为例如斑块型银屑病。用于该方法的本申请抗体可以是IgG1抗体,且IgG1恒定区可以进一步改造以增强抗体的抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖的细胞毒性(CDC)活性。在一些实施方式中,该方法包括施用本申请的组合物、表达载体、双特异性分子、免疫交联物、或免疫细胞。在一些实施方式中,向受试者炎症病灶区或附件进行施用。在一些实施方式中,至少一种自身免疫疾病治疗剂可以与本申请抗体或其抗原结合部分一起施用,例如治疗斑块型银屑病的IL-2、IL-17、和/或IL-23抑制剂,例如Taltz®和bimekizumab。

[0028] 基于以下具体描述和实施例,当前公开内容的其他特征和优势之处将会更加明晰,具体描述和实施例不应解读为限制性的。在本申请中引用的所有文献、Genbank记录、专利和已公开专利申请的内容通过引用的方式明确地包含在本文中。

附图说明

[0029] 图1示出小鼠源LAG3抗体在Daudi细胞体系中阻断LAG3-MHC II复合体相互作用的活性。

[0030] 图2示出小鼠源LAG3抗体对APC介导的T细胞激活的作用,T细胞激活程度由IFN- γ 分泌量表征。

[0031] 图3示出嵌合抗体101F4(101F4-CM)和嵌合抗体134G10(134G10-CM)对HEK293A/人LAG3(A)、HEK293A/猴LAG3(B)、和HEK293A/小鼠LAG3(C)的结合活性,BMS为阳性对照抗体BMS-986016。

[0032] 图4示出101F4人源化抗体和134G10人源化抗体对HEK293A/人LAG3 (A、D)、HEK293A/猴LAG3 (B、E)、以及HEK293A/小鼠LAG3 (C、F)的结合活性。

[0033] 图5示出101F4人源化抗体 (A) 和134G10人源化抗体 (B) 对Daudi细胞体系中LAG3-MHC II复合体相互作用的阻断活性。

[0034] 图6示出与PD-1抗体联用的101F4人源化抗体 (A) 和134G10人源化抗体 (B) 以剂量依赖的方式促进T细胞的激活, T细胞激活由IFN- γ 分泌表征

[0035] 图7示出亲和力成熟后的101F4H2L2-8抗体与人LAG3 (A)、HEK293A/人LAG3 (B)、HEK293A/猴LAG3 (C)、HEK293A/小鼠LAG3 (D)、以及激活的人PBMC (E)的结合活性。

[0036] 图8示出嵌合抗体101F4-CM (A)、人源化抗体101F4H2L2 (B)、亲和力成熟的人源化抗体101F4H2L2-8 (C)、嵌合抗体134G10-CM (D)、以及人源化抗体134G10H2L3 (E) 与人LAG3的结合亲和力。

[0037] 图9示出人源化抗体101F4H2L2 (A)、亲和力成熟的人源化抗体101F4H2L2-8 (B) 和人源化抗体134G10H2L3 (C) 与猴LAG3的结合亲和力。

[0038] 图10示出与PD-1抗体联用的人源化抗体101F4H2L2和亲和力成熟的人源化抗体101F4H2L2-8 (A)、以及与PD-1抗体联用的亲和力成熟的人源化抗体101F4H2L3-8和101F4H3L3-8 (B) 促进T细胞的激活。

[0039] 图11示出LAG3人源化小鼠模型中经溶剂 (PBS)、101F4H2L2、134G10H2L3、101F4H2L2-8或阳性参照抗体处理的各组小鼠的平均肿瘤体积变化 (A) 和第25天平均小鼠肿瘤重量 (B), 以及溶剂 (C)、101F4H2L2 (D)、101F4H2L2-8 (E)、阳性参照抗体 (F) 和134G10H2L3 (G) 组的个体肿瘤体积变化。

[0040] 图12示出LAG3/PD-1双人源化小鼠模型中经溶剂、101F4H2L2-8、134G10H2L3、或阳性参照抗体处理的各组小鼠的平均肿瘤体积变化 (A), 以及溶剂 (B)、阳性参照抗体 (C)、101F4H2L2-8 (D)、和134G10H2L3 (E) 组的个体肿瘤体积变化。

[0041] 图13示出LAG3人源化小鼠模型中人源化LAG3抗体处理对小鼠血液中CD45+CD3+CD8+ T细胞的增殖有促进作用。

[0042] 图14示出经溶剂 (PBS)、134G10H2L3、PD-1抗体、或134G10H2L3联合PD-1抗体处理的各组小鼠的平均肿瘤体积变化 (A), 以及经溶剂、101F4H2L2-8、PD-1抗体、或101F4H2L2-8联合PD-1抗体处理的各组小鼠的平均肿瘤体积变化 (B)。

具体实施方式

[0043] 为更好理解本申请, 首先定义一些术语。其他定义则贯穿具体实施方式部分而列出。

[0044] 术语“LAG3”是指淋巴细胞激活基因3。该术语包括变体、同源物、直向同源物和平行同源物。例如, 对人LAG3特异的抗体可以在某些情况下与另一物种例如猴的LAG3蛋白交叉反应。在其他实施方式中, 对人LAG3蛋白特异的抗体可以完全地对人LAG3蛋白特异而不与其他物种或其他类型的蛋白交叉反应, 或者可以与一些其他物种而非所有其他物种的LAG3蛋白交叉反应。

[0045] 术语“人LAG3”是指具有人氨基酸序列的LAG3蛋白, 例如具有Genbank登录号为NP_002277.4的氨基酸序列的LAG蛋白, 或由例如SEQ ID NO:37所示核苷酸编码的LAG3蛋白。术

语“猴LAG3”是指具有猴氨基酸序列的LAG3蛋白,例如具有Genbank登录号为XP_001108923.1的氨基酸序列的LAG3蛋白,或由例如SEQ ID NO:38的核苷酸编码的LAG3蛋白。术语“小鼠LAG3”是指具有小鼠氨基酸LAG3蛋白,例如具有Genbank登录号为NP_032505.1的氨基酸序列的LAG3蛋白,或由例如SEQ ID NO:39的核苷酸编码的LAG3蛋白。

[0046] 本文中的术语“抗体”意在包括IgG、IgA、IgD、IgE和IgM全长抗体及其任何抗原结合片段(即,抗原结合部分)。全长抗体是包含至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,重链和轻链由二硫键连接。各重链由重链可变区(简称 V_H)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域构成,即 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。各轻链由轻链可变区(简称 V_L)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 构成。 V_H 和 V_L 区还可以划分为称作互补决定区(CDR)的高变区,其由较为保守的骨架区(FR)区分隔开。各 V_H 和 V_L 由三个CDR以及四个FR构成,从氨基端到羧基端以FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4的顺序排布。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括多种免疫系统细胞(例如,效应细胞)和传统补体系统的第一组分(C1q)。

[0047] 本文中的术语,抗体的“抗原结合部分”(或简称为抗体部分),是指抗体的保持有特异结合抗原(例如,LAG3蛋白)能力的一个或多个片段。已证实,抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来实施。包含在抗体的“抗原结合部分”中的结合片段的例子包括(i) Fab片段,由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 构成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,包含铰链区二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由 V_H 和 C_{H1} 构成的Fd片段;(iv)由抗体单臂 V_L 和 V_H 构成的Fv片段;(v)由 V_H 构成的dAb片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546);(vi)分离的互补决定区(CDR);以及(vii)纳米抗体,一种包含单可变结构域和两个恒定结构域的重链可变区。此外,尽管Fv片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由不同的基因编码,它们可以通过重组法经由使两者成为单蛋白链的合成接头而连接,其中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子(称为单链Fc(scFv);参见例如Bird et al., (1988) Science 242:423-426;and Huston et al., (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。这些单链抗体也意在包括在术语涵义中。这些抗体片段可以通过本领域技术人员已知的常用技术而得到,且片段可以通过与完整抗体相同的方式进行功能筛选。

[0048] 本文所用的术语“分离的抗体”是指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。例如,与LAG3蛋白特异结合的分离抗体基本不含特异结合LAG3蛋白之外抗原的抗体。但是,特异结合人LAG3蛋白的分离抗体可能对其他抗原例如其他物种的LAG3蛋白具有交叉结合性。此外,分离的抗体基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0049] 术语“单克隆抗体”或“单抗”或“单克隆抗体组成”是指单一分子组成的抗体分子制品。单克隆抗体组成呈现出对于特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0050] 术语“鼠源抗体”是指可变区骨架和CDR区得自小鼠种系免疫球蛋白序列的抗体。此外,如果抗体包含恒定区,其也得自小鼠种系免疫球蛋白序列。本申请的鼠源抗体可以包含不由小鼠种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基,例如通过体外随机突变或点突变或通过体内体细胞突变而导入的突变。然而,术语“鼠源抗体”不包括在小鼠骨架序列中插入得自其他哺乳动物物种的CDR序列的抗体。

[0051] 术语“嵌合抗体”是指通过组合非人源遗传物质与人源遗传物质而得来的抗体。或者更笼统地说,嵌合抗体是指组合有一个物种的遗传物质与另一物种遗传物质的抗体。

[0052] 术语“人源化抗体”是指来源于非人物种但其蛋白序列已经被修改以增加其与人天然生成抗体的相似度的抗体。

[0053] 术语“识别抗原的抗体”以及“对抗原特异的抗体”在本文中与术语“特异结合抗原的抗体”交替使用。

[0054] 在本文中，“特异结合人LAG3”的抗体是指与人LAG3(还可能是其他非人物种的LAG3)结合但是基本不与非LAG3蛋白结合的抗体。优选地，抗体以“高亲和力”结合人LAG3蛋白，即 K_D 值为 $1.0 \times 10^{-8}M$ 以下，更优选为 $5.0 \times 10^{-9}M$ 以下。

[0055] 术语“基本不结合”蛋白或细胞是指，不与蛋白或细胞结合，或者不以高亲和力与其结合，即结合蛋白或细胞的 K_D 为 $1.0 \times 10^{-6}M$ 以上，更优选 $1.0 \times 10^{-5}M$ 以上，更优选 $1.0 \times 10^{-4}M$ 以上、 $1.0 \times 10^{-3}M$ 以上，更优选 $1.0 \times 10^{-2}M$ 以上。

[0056] 术语“高亲和性”对于IgG抗体而言，是指对于抗原的 K_D 为 $1.0 \times 10^{-6}M$ 以下，优选 $5.0 \times 10^{-8}M$ 以下，更优选 $1.0 \times 10^{-8}M$ 以下、 $5.0 \times 10^{-9}M$ 以下，更优选 $1.0 \times 10^{-9}M$ 以下。对于其他抗体亚型，“高亲和性”结合可能会变化。例如，IgM亚型的“高亲和性”结合是指 K_D 为 $10^{-6}M$ 以下，优选 $10^{-7}M$ 以下，更优选 $10^{-8}M$ 以下。

[0057] 术语“ EC_{50} ”，又叫半最大效应浓度，是指引起50%最大效应的抗体浓度。

[0058] 术语“抗体依赖的细胞毒性”、“抗体依赖的细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞介导的免疫防御，其中免疫系统效应细胞主动地将细胞膜表面抗原与抗体，例如LAG3抗体，结合的靶细胞例如自身免疫疾病中的免疫细胞裂解。

[0059] 术语“补体依赖的细胞毒性”或“CDC”是指IgG和IgM抗体的效应功能，当与表面抗原结合时引发典型的补体途径，包括形成膜攻击复合体以及靶细胞裂解。本申请的抗体，与LAG3结合时，引发对自身免疫疾病中免疫细胞的CDC。

[0060] 术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳类和非哺乳类，例如非人灵长类、羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖类、和爬行类，尽管优选哺乳动物，例如非人灵长类、羊、狗、猫、牛和马。

[0061] 术语“治疗有效量”是指足以防止或减缓与疾病或病症(例如癌症)相关的症状的本申请抗体量。治疗有效量与被治疗的疾病相关，其中本领域技术人员可以方便地判别出实际的有效量。

[0062] 术语“拮抗型LAG3抗体”是指在能够阻断或抑制由LAG3与其配体如MHC II相互作用引发的LAG3信号通路的LAG3抗体。拮抗型LAG3抗体可以促进T细胞激活，细胞因子释放，增强免疫效应。

[0063] 本申请的多个方面在以下更加具体地加以描述。

[0064] LAG3抗体具有对人LAG3的结合特异性以及其他有益的功能特征

[0065] 本申请的抗体可以与人或猴LAG3特异性结合，且结合活性与现有技术抗体例如BMS-986016等相当。本申请的抗体还可以阻断LAG3-MHC II复合体结合或相互作用，且阻断活性与现有技术抗体例如BMS-986016相当或更高。

[0066] 更重要的是，本申请的抗体具有比现有技术抗体例如BMS-986016更强的T细胞激活能力，且体内抗肿瘤活性与现有技术如BMS-986016和MK-4280相当，甚至更高。

[0067] 优选的本申请抗体是单克隆抗体。此外，抗体可以是例如鼠源的、嵌合的或人源化的单克隆抗体。

[0068] LAG3单克隆抗体

[0069] 本申请的示例性抗体是结构和化学特性在以下描述的单克隆抗体。

[0070] 本申请抗体或其抗原结合部分的重链可变区CDR和轻链可变区CDR通过Kabat编号系统确定,且CDR区氨基酸序列的SEQ ID NO列于表1中。领域内熟知,重链可变区和轻链可变区CDR可以通过例如Chothia、IMGT、AbM或Contact编号系统/方法确定。

[0071] 本申请中示例性抗体或其抗原结合部分的重链/轻链可变区序列的SEQ ID NO也列于以下表1中,一些抗体具有相同的 V_H 或 V_L 。

[0072] 本申请抗体可以具有重链恒定区,例如可以是IgG4或IgG1恒定区,根据抗体的具体用途而定。IgG4恒定区可以是人IgG4恒定区,例如含有S228P的氨基酸突变的人IgG4恒定区,其可以包含如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列。IgG4恒定区中包含S228P的氨基酸突变有助于提高IgG4抗体的结构稳定性。轻链恒定区可以为 κ 恒定区,例如人 κ 恒定区,其可以包含SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列

[0073] 与人LAG3结合的其他LAG3抗体的 V_H 和/或 V_L 序列(或CDR序列)可以与本申请抗体的 V_H 和/或 V_L 序列(或CDR序列)“混合并配对”。优选地,当 V_H 和 V_L (或其中的CDR)混合并配对时,特定 V_H/V_L 配对中的 V_H 序列可以由结构近似的 V_H 序列取代。相似地,优选特定 V_H/V_L 配对中的 V_L 序列由结构近似的 V_L 序列取代。

[0074] 因此,在一个实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分包括:

[0075] (a) 包含列于表1中氨基酸序列的重链可变区;以及

[0076] (b) 包含列于表1中氨基酸序列的轻链可变区,或者另一LAG3抗体的 V_L ,其中该抗体特异结合人LAG3。

[0077] 在另一实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分包括:

[0078] (a) 列于表1中的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3;以及

[0079] (b) 列于表1中的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3,或者另一LAG3抗体的CDR,其中该抗体特异结合人LAG3。

[0080] 在另一实施方式中,本申请的抗体或其抗原结合部分包括LAG3抗体的重链可变区CDR2以及其他结合人LAG3的抗体的CDR,例如重链可变区CDR1和/或CDR3,和/或另一LAG3抗体的轻链可变区CDR1、CDR2和/或CDR3。

[0081] 表1. 重链/轻链可变区CDR和重链/轻链可变区的氨基酸序列SEQ ID NOs.

[0082]

SEQ ID NO. 抗体编号	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3	HV	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	LV
小鼠和嵌合101F4	1	2	3	9	5	6	7	15
101F4H0L0	1	2	3	10	5	6	7	16
101F4H2L2	1	2	3	11	5	6	7	17
101F4H2L3	1	2	3	11	5	6	7	19
101F4H3L2	1	2	3	12	5	6	7	17
101F4H3L3	1	2	3	12	5	6	7	19
101F4H2L2-8	1	2	4	13	5	6	8	18
101F4H2L3-8	1	2	4	13	5	6	8	20
101F4H3L3-8	1	2	4	14	5	6	8	20
小鼠和嵌合134G10	21	22	23	27	24	25	26	31
134G10H0L0	21	22	23	28	24	25	26	32
134G10H2L2	21	22	23	29	24	25	26	33
134G10H2L3	21	22	23	29	24	25	26	34
134G10H3L2	21	22	23	30	24	25	26	33
134G10H3L3	21	22	23	30	24	25	26	34

[0083] 此外,领域内公知的是,CDR3结构域,独立于CDR1和/或CDR2,可单独确定抗体对同种抗原的结合特异性,且可以预测到基于该CDR3序列可生成具有相同结合特异性的多种抗体。参见,例如Klimka et al.,*British J.of Cancer* 83(2):252-260(2000);Beiboer et al.,*J.Mol.Biol.*296:833-849(2000);Rader et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*95:8910-8915(1998);Barbas et al.,*J.Am.Chem.Soc.*116:2161-2162(1994);Barbas et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*92:2529-2533(1995);Ditzel et al.,*J.Immunol.*157:739-749(1996);Berezov et al.,*BIAjournal*8:Scientific Review 8(2001);Igarashi et al.,*J.Biochem(Tokyo)*117:452-7(1995);Bourgeois et al.,*J.Virol* 72:807-10(1998);Levi et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*90:4374-8(1993);Polymenis and Stoller,*J.Immunol.*152:5218-5329(1994) and Xu and Davis,*Immunity* 13:37-45(2000);U.S.Pat.Nos.6,951,646;6,914,128;6,090,382;6,818,216;6,156,313;6,827,925;5,833,943;5,762,905和5,760,185。这些参考文献通过引用的方式全部并入本文。

[0084] 在另一实施方式中,本申请的抗体包含LAG3抗体的重链可变区的CDR2以及至少LAG3抗体的重链和/或轻链可变区的CDR3,或另一LAG3抗体的重链和/或轻链可变区的CDR3,其中该抗体能够特异结合人LAG3。优选这些抗体(a)竞争结合LAG3;(b)保留功能特性;(c)结合相同表位;和/或(d)具有与本申请LAG3抗体相似的结合亲和力。在另一实施方式中,抗体还可以包含LAG3抗体的轻链可变区CDR2,或者另一LAG3抗体的轻链可变区CDR2,其中该抗体特异结合人LAG3。在另一实施方式中,本申请的抗体可以包括LAG3抗体的重链/轻链可变区CDR1,或另一LAG3抗体的重链和/或轻链可变区CDR1,其中该抗体特异结合人LAG3。

[0085] 保守修饰

[0086] 在另一实施方式中,本申请的抗体包含与本申请LAG3抗体存在一个或多个保守修饰的重链和/或轻链可变区序列或CDR1、CDR2和CDR3序列。本领域知道,一些保守序列修改不会使抗原结合性消失。参见,例如,Brummell et al.,(1993)*Biochem* 32:1180-8;de Wildt et al.,(1997)*Prot.Eng.*10:835-41;Komissarov et al.,(1997)*J.Biol.Chem.*272:26864-26870;Hall et al.,(1992)*J.Immunol.*149:1605-12;Kelley and O'Connell(1993)*Biochem.*32:6862-35;Adib-Conquy et al.,(1998)

Int.Immunol.10:341-6and Beers et al.,(2000) Clin.Can.Res.6:2835-43。

[0087] 因此,在一个实施方式中,抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,重链可变区和轻链可变区分别包含CDR1、CDR2和CDR3,其中:

[0088] (a) 重链可变区CDR1包含表1列出的序列,和/或其保守修改;和/或

[0089] (b) 重链可变区CDR1包含表1列出的序列,和/或其保守修改;和/或

[0090] (c) 重链可变区CDR3包含表1列出的序列,和/或其保守修改;和/或

[0091] (d) 轻链可变区CDR1、和/或CDR2、和/或CDR3包含表1列出的序列,和/或其保守修改;且

[0092] (e) 该抗体特异结合人LAG3。

[0093] 本申请的抗体具有一个或多个以下功能特征,例如对人LAG3的高亲和力,以及引发对LAG3表达细胞的ADCC或CDC的能力。

[0094] 在多个实施方式中,抗体可以是例如鼠源、人源、嵌合或人源化抗体。

[0095] 本文所用的术语“保守序列修饰”是指不会显著影响或改变抗体结合特性的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸替换、添加和删除。可以通过领域内已知的标准技术,例如点突变和PCR介导的突变,将修饰引入本申请抗体中。保守氨基酸替换是氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基进行替换。具有相似侧链的氨基酸残基组在领域内已知。这些氨基酸残基组包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,本申请抗体的CDR区中的一个或多个氨基酸残基可以用同侧链组的其他氨基酸残基替换,且得到的抗体可以使用本文所述的功能检测对其进行保留功能(即,上述的功能)的测试。

[0096] 基因修饰的抗体

[0097] 本申请的抗体可以以具备本申请LAG3抗体的一个或多个 V_H/V_L 序列的抗体作为起始材料,制备成基因修饰的抗体。抗体可以通过修饰一个或两个可变区(即, V_H 和/或 V_L)内(例如,在一个或多个CDR区和/或一个或多个骨架区)的一个或多个残基来进行基因修饰,以改善结合亲和力和/或增加与某些物种天然产生的抗体的相似性。例如,骨架区经修饰成提供人源化的抗体。此外,或者抗体可以通过修饰恒定区中的残基进行基因修饰,例如改变抗体的效应功能。

[0098] 在某些实施方式中,CDR区植入可以用来基因修饰抗体的可变区。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶标抗原进行相互作用。出于这个原因,CDR内的氨基酸残基比起CDR外的序列在个体抗体之间更加地多样。因为CDR序列负责主要的抗体-抗原相互作用,可以通过构建含有特定天然抗体的CDR序列植入到不同特性的不同抗体的骨架序列的表达载体,来表达模拟特定天然抗体的特性的重组抗体(Riechmann et al.,(1998) Nature 332:323-327; Jones et al.,(1986) Nature 321:522-525; Queen et al.,(1989) Proc.Natl.Acad;U.S.A.86:10029-10033;U.S.Pat.Nos.5,225,539;5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0099] 因此,本申请的另一实施方式涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含

重链可变区和/或轻链可变区,重链可变区包含具有本申请上述序列的CDR1、CDR2和CDR3,轻链可变区包含具有本申请上述序列的CDR1、CDR2和CDR3。尽管这些抗体包含本申请单克隆抗体的 V_H 和 V_L CDR序列,它们可以含有不同的骨架序列。

[0100] 这样的骨架序列可以从包括种系抗体基因序列的公开DNA数据库或公开参考文献中获得。例如,用于人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在Vbase人种系序列数据库(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)以及Kabat et al., (1991),同上;Tomlinson et al., (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798;和Cox et al., (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:827-836中获得。作为另一实施方式,用于人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在Genbank数据库中得。例如,下列HC07 HuMAb小鼠中的重链种系序列的Genbank登录号为1-69 (NG--0010109,NT--024637&BC070333)、3-33 (NG--0010109&NT--024637)和3-7 (NG--0010109&NT--024637)。作为另一例子,以下来自Hco12 HuMAb小鼠的重链种系序列的Genbank登录号为1-69 (NG--0010109,NT--024637&BC070333)、5-51 (NG--0010109&NT--024637)、4-34 (NG--0010109&NT--024637)、3-30.3 (CAJ556644)和3-23 (AJ406678)。

[0101] 通过使用本领域公知的称为空格 (gap) BLAST的序列相似性搜索方法之一 (Altschul et al., (1997)),将抗体蛋白序列与蛋白序列数据库进行比较。

[0102] 用于本申请抗体的优选骨架序列是结构上与本申请抗体所用的骨架序列相似的那些。 V_H CDR1、CDR2、和CDR3序列可以植入到与得到该骨架序列的种系免疫球蛋白基因具有相同序列的骨架区中,或者CDR序列可以植入到包含有与种系序列相比具有一个或多个突变的骨架区中。例如,在一些情况下,将骨架区中的残基进行突变是有益的,以保持或增强抗体的抗原结合性(参见例如U.S. Pat. Nos. 5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0103] 另一类的可变区修饰是将 V_H 和/或 V_L CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基进行突变,从而改进目标抗体的一种或多种结合特性(例如,亲和力)。可以进行点突变或PCR介导的突变来引入突变,且其对于抗体结合或其他功能特性的影响可以在本领域所知的体外或体内检测中进行评价。优选地,引入本领域所知的保守修饰。突变可以是氨基酸替换、添加或缺失,但优选为替换。此外,通常改变CDR区内的不多于一个、两个、三个、四个或五个的残基。

[0104] 此外,在另一实施方式中,本申请提供分离的LAG3单克隆抗体或其抗原结合部分,包含重链可变区和轻链可变区,其包含:(a) V_H CDR1区,包含本申请的序列,或一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;(b) V_H CDR2区,包含本申请的序列,或一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;(c) V_H CDR3区,包含本申请的序列,或一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;(d) V_L CDR1区,包含本申请的序列,或一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;(e) V_L CDR2区,包含本申请的序列,或一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列;和(f) V_L CDR3区,包含本申请的序列,或一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列。

[0105] 本申请的基因改造抗体包括在 V_H 和/或 V_L 的骨架残基中做出基因修饰以例如改变抗体特性的那些。通常而言,这些骨架修饰用来降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个骨架残基“回复突变”成相应的种系序列。更加具体而言,经历体细胞突变的抗

体可能包含不同于得到抗体的种系序列的骨架残基。这些残基可以通过将抗体骨架序列与得到抗体的种系序列相比较而识别出来。

[0106] 另一类的骨架修饰包括对骨架区的、或者甚至一个或多个CDR区的一个或多个残基进行突变,以去除T细胞表位,从而减少抗体的可能导致的免疫原性。该方法也称为“去免疫化”,在美国专利公开20030153043中有更加详细的描述。

[0107] 此外,作为骨架或CDR区内修饰之外的另一种选择,本申请的抗体可以基因改造成在Fc区包括基因修饰,通常来改变抗体的一个或多个功能特性,例如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合、和/或抗体依赖的细胞毒性。此外,本申请的抗体可以进行化学修饰(例如,可以向抗体附加一个或多个化学功能基团),或者修饰成改变其糖基化,来改变抗体的一个或多个功能特性。

[0108] 在一个实施方式中, C_{H1} 的铰链区进行修饰,改变,例如增加或减少铰链区的半胱氨酸残基的数量。该方法在美国专利5,677,425中进一步描述。改变 C_{H1} 铰链区的半胱氨酸残基,来例如促进重链轻链的组装或增加/降低抗体的稳定性。

[0109] 在另一个实施方式中,对抗体的Fc铰链区进行突变,以降低抗体的生物半衰期。更加具体地,将一个或多个氨基酸突变引入Fc铰链片段的 C_{H2} - C_{H3} 连接区,从而抗体相对于天然Fc-铰链结构域SpA结合而言,具有减弱的SpA结合力。该方法在美国专利6,165,745中有更详细的描述。

[0110] 在另一实施方式中,修饰抗体的糖基化。例如,可以制备去糖基化的抗体(即,抗体缺少糖基化)。可以改变糖基化,来例如增加抗体对抗原的亲合性。这样的糖化修饰可以通过例如改变抗体序列中的一个或多个糖基化位点来达成。例如,可以做出一个或多个氨基酸替换,以消除一个或多个可变区骨架糖基化位点,从而消除该位置的糖基化。这样的去糖基化可以增加抗体对抗原的亲合性。参见,例如美国专利5,714,350和6,350,861。

[0111] 此外,可以制备具有改变的糖基化类型的抗体,例如岩藻糖残基量减少的低岩藻糖基抗体,或者具有增加的平分型GlcNac结构的抗体。改变的糖基化形式被证明能增加抗体的ADCC活性。这样的糖化修饰可以通过例如在糖基化系统改变的宿主细胞中表达抗体而进行。具有改变的糖基化系统的细胞在领域中已知,且可以用作表达本申请重组抗体的宿主细胞,以制备具有改变的糖基化的抗体。例如,细胞系Ms704、Ms705和Ms709缺少岩藻糖基转移酶基因FUT8($\alpha(1,6)$ -岩藻糖基转移酶),从而在Ms704、Ms705和Ms709细胞系中表达的抗体在其糖中缺失岩藻糖。Ms704、Ms705和Ms709 FUT8^{-/-}细胞系通过在CHO/DG44细胞中使用两种替换载体定向破坏FUT8基因而制备(参见美国专利公开20040110704和Yamane-Ohnuki et al., (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22)。作为另一个例子,EP 1,176,195记载了FUT8基因功能破坏的细胞系,其编码岩藻糖基转移酶,从而在该细胞系中表达的抗体通过降低或消除 α -1,6键相关酶而表现出低岩藻糖基化。EP 1,176,195也描述了一种细胞系,其具有较低的用于向结合抗体Fc区的N-乙酰葡萄糖胺添加岩藻糖的酶活性,或者不具有这种酶的活性,例如大鼠骨髓瘤细胞系YB2/0(ATCC CRL 1662)。WO 03/035835描述了CHO变体细胞系,Lec13细胞,其具有降低的向Asn(297)-相关糖添加岩藻糖的能力,从而使得宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(参见Shields et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740)。具有改变的糖基化图谱的抗体也可以在鸡蛋中制备,如WO 06/089231中所述的。或者,具有改变的糖基化图谱的抗体可以在植物细胞如浮萍中制备。WO 99/54342公

开了一种细胞系,其基因改造成表达修饰糖蛋白的糖基转移酶(例如, $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺转移酶III(GnTIII)),从而在基因改造细胞系中表达的抗体表现出增加的平分型GlcNac结构,其引起抗体增强的ADCC活性(Umana et al.,(1999)Nat.Biotech.17:176-180)。或者,抗体的岩藻糖残基可以使用岩藻糖苷酶来切除抗体的岩藻糖残基,例如 α -L-岩藻糖苷酶从抗体移除岩藻糖残基(Tarentino et al.,(1975)Biochem.14:5516-23)。

[0112] 本文抗体的另一修饰是聚乙二醇化(PEG化)。抗体可以PEG化,例如来增加抗体的生物(例如,血清)半衰期。为使抗体PEG化,抗体或其片段通常与聚乙二醇(PEG),例如PEG的反应性酯或醛类衍生物,在使一个或多个PEG基团附于抗体或抗体片段的条件下反应。优选地,PEG化通过与反应性PEG分子(或类似的有反应性的水溶性聚合物)的酰化反应或烷化反应进行。本文中所用的术语“聚乙二醇”包括任何形式的用于衍生其他蛋白的PEG,例如单(C_1 - C_{10})烷氧基-或芳氧基聚乙二醇或聚乙二醇马来酰亚胺。在某些实施方式中,需要PEG化的抗体是去糖基化的抗体。PEG化蛋白的方法在领域内已知,且可以应用到本申请的抗体。参见,例如EPO 154 316和EP 0 401 384。

[0113] 抗体的物理特性

[0114] 本申请的抗体可以用它们的多种物理特性进行表征,以检测和/或区别其分类。

[0115] 例如,抗体可以在轻链或重链可变区包含一个或多个糖基化位点。这些糖基化位点可能引起增加的抗体免疫原性,或由于改变的抗原结合而引起改变的抗体pK值(Marshall et al(1972)Annu Rev Biochem 41:673-702;Gala and Morrison(2004)J Immunol 172:5489-94;Wallick et al(1988)J Exp Med 168:1099-109;Spiro(2002)Glycobiology 12:43R-56R;Parekh et al(1985)Nature 316:452-7;Mimura et al.,(2000)Mol Immunol 37:697-706)。糖基化已知发生在含有N-X-S/T序列的基序中。在一些情况下,优选LAG3抗体不包含可变区糖基化。这可以通过选择不在可变区包含糖基化基序的抗体或通过突变糖基化区域的残基来实现。

[0116] 在优选实施方式中,抗体不包含天冬酰胺异构位点。天冬酰胺的脱酰胺可能出现在N-G或D-G序列,创建出异天冬氨酸残基,其向多肽链中引入扭结并降低其稳定性(异天冬氨酸效果)。

[0117] 各抗体将具有独特的等电点(pI),基本落在6-9.5的pH范围内。IgG1抗体的pI通常落在7-9.5的pH范围内,而IgG4抗体的pI基本落在6-8的pH范围内。推测pI在正常范围外的抗体可能在体内条件下具有一些展开结构且不稳定。因此,优选LAG3抗体的pI值落在正常范围内。这可以通过选择pI在正常范围内的抗体或通过突变不带电的表面残基来实现。

[0118] 编码本申请抗体的核酸分子

[0119] 在另一方面,本申请提供编码本申请抗体或其抗原结合部分的重链/轻链可变区或CDR的核酸分子。核酸可以存在整细胞中,在细胞裂解液中,或处于部分纯化或基本纯的形式。当通过标准技术从其他细胞组分或其他污染物例如其他细胞核酸或蛋白中纯化出来后,核酸是“分离的”或“基本纯的”。本申请的核酸可以为例如DNA或RNA,且可能包含或可能不包含内含子序列。在优选实施方式中,核酸是cDNA分子。

[0120] 本申请的核酸可以使用标准的分子生物学技术获得。对于由杂交瘤(例如,由携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤)表达的抗体,编码杂交瘤制备的抗体的轻链和重链的cDNA可以通过标准PCR扩增或cDNA克隆技术获得。对于(例如使用噬菌体展示技

术)从免疫球蛋白基因库获得的抗体,编码这类抗体的核酸可以从基因库中收集。

[0121] 优选的本申请核酸分子包括编码LAG3单克隆抗体的 V_H 和 V_L 序列或CDR的那些。一旦获得了编码 V_H 和 V_L 的DNA片段,这些DNA片段可以进一步通过标准的重组DNA技术进行操作,例如将可变区基因转变为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,编码 V_H 或 V_L 的DNA片段与编码另一蛋白的另一DNA片段,例如抗体恒定区或柔性接头,可操作地连接。术语“可操作地连接”是指两个DNA片段连接在一起,从而两个DNA片段编码的氨基酸序列都在阅读框内。

[0122] 编码 V_H 区的分离DNA可以通过可操作地连接 V_H 编码DNA与编码重链恒定区(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})的另一DNA分子而转变成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列在领域内已知,且包括这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增而获得。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,但是优选为IgG1或IgG4恒定区。对于Fab片段重链基因,编码 V_H 区的DNA可以可操作地与仅编码重链 C_{H1} 恒定区的另一DNA分子连接。

[0123] 编码 V_L 区的分离DNA可以通过可操作地连接 V_L 编码DNA与编码轻链恒定区 C_L 的另一DNA分子而转变成全长轻链基因。人轻链恒定区基因的序列在领域内已知,且包括这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增而获得。在优选实施方式中,轻链恒定区可以是 κ 和 λ 恒定区。

[0124] 为创建scFv基因,编码 V_H 和 V_L 的DNA片段可以可操作地与编码柔性接头例如编码氨基酸序列(Gly4-Ser)₃的另一片段连接,从而 V_H 和 V_L 序列可以作为连续的单链蛋白进行表达,其中 V_H 和 V_L 区域通过该柔性接头连接(参见,例如Bird et al., (1988) Science 242: 423-426;Huston et al., (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554)。

[0125] 本申请单克隆抗体的制备

[0126] 本申请的单克隆抗体可以使用Kohler and Milstein(1975) Nature 256:495的体细胞杂交(杂交瘤)技术进行制备。制备单克隆抗体的其他实施方式包括B淋巴细胞的病毒或致癌性转化以及噬菌体展示技术。嵌合或人源化抗体也在领域内熟知。参见,例如美国专利4,816,567;5,225,539;5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370。

[0127] 制备本申请单克隆抗体的转染瘤的生成

[0128] 本申请的抗体还可以使用例如重组DNA技术结合基因转染方法,在宿主细胞转染瘤中生成(例如Morrison,S. (1985) Science 229:1202)。在一个实施方式中,将由标准分子生物技术得到的编码部分或全长轻链和重链的DNA插入一个或多个表达载体中,从而基因与转录和翻译调控序列可操作地连接。在该情况下,术语“可操作地连接”是指抗体基因连接到载体中,从而载体内的转录和翻译控制序列行使它们既定的调控抗体基因转录和翻译的功能。

[0129] 术语“调控序列”包括控制抗体基因转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。这样的调控序列在例如Goeddel (Gene Expression Technology.Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,Calif. (1990))中有过描述。优选的用于哺乳动物宿主细胞表达的调控序列包括引导在哺乳动物细胞中的高水平蛋白表达的病毒元件,例如得自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒的启动子和/或增强子,如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP)和多瘤病毒。或者,可以使用非病毒调控

序列,例如泛素启动子或 β -珠蛋白启动子。另外,调控元件由不同来源的序列构成,例如SRa启动子系统,其包含来自SV40早期启动子的序列和人T细胞白血病I型病毒的长末端重复(Takebe et al., (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。表达载体和表达控制序列选为与所使用的表达宿主细胞相容。

[0130] 抗体轻链基因和抗体重链基因可以插入到同一或不同的表达载体中。在优选实施方式中,可变区通过插入到已经编码所需亚型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中而构建全长抗体基因,从而 V_H 与载体中的 C_H 可操作地连接, V_L 与载体中的 C_L 可操作地连接。或者,重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。抗体链基因可以克隆到载体中,从而信号肽在阅读框内连接到抗体链基因的氨基端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0131] 除抗体链基因和调控序列外,本申请的重组表达载体可以携带其他序列,例如调控载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制起始点)和可选择标记物基因。可选择标记物基因可用于选择已导入载体的宿主细胞(参见,例如,美国专利4,399,216;4,634,665和5,179,017)。例如,通常可选择标记物基因赋予已导入载体的宿主细胞以药物抗性,例如G418、潮霉素、或氨甲喋呤抗性。优选的可选择标记物基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于dhfr宿主细胞的氨甲喋呤选择/扩增)和neo基因(用于G418选择)。

[0132] 对于轻链和重链的表达,编码重链和轻链的表达载体通过标准技术转染到宿主细胞中。多个形式的术语“转染”包括多种常用于将外源DNA导入原核或真核宿主细胞的技术,例如,电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-右旋糖转染等。尽管在原核或真核宿主细胞中表达本申请抗体在理论上是可行的,优选抗体在真核细胞中表达,最优选在哺乳动物宿主细胞中表达,因为真核细胞,特别是哺乳动物细胞,比原核细胞更可能组装并分泌适当折叠且有免疫活性的抗体。

[0133] 优选的用于表达本申请重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括与DHFR可选择标记物一起施用的dhfr-CHO细胞,在Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中有过描述, DHFR可选择标记物在例如R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621中描述)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。特别在使用NS0骨髓瘤细胞时,另一优选的表达系统是GS基因表达系统,记载于WO 87/04462、WO 89/01036和EP 338,841。当编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞时,通过将宿主细胞培养足以使得宿主细胞中抗体表达、或优选地足以使得使抗体分泌到宿主细胞生长的培养基中的一段时间,从而制备抗体。抗体可以使用蛋白纯化方法从培养基中回收。

[0134] 免疫交联物

[0135] 本申请的抗体或其抗原结合部分可以与治疗剂交联,形成免疫交联物,例如抗体-药物交联物(ADC)。合适的治疗剂包括细胞毒素、烷化剂、DNA小沟结合分子、DNA嵌入剂、DNA交联剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶I或II的抑制剂、热激蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素和抗有丝分裂剂。在ADC中,抗体和治疗剂优选地通过接头交联,该接头可切割,例如肽类接头、二硫类接头或脲类接头。更优选地,接头是肽类接头,例如Val-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Cit-Cit、Val-Lys、Lys、Cit、Ser或Glu。ADC可以如美国专利7,087,600;

6,989,452;和7,129,261;PCT公开WO 02/096910;WO 07/038,658;WO 07/051,081;WO 07/059,404;WO 08/083,312;和WO 08/103,693;美国专利公开20060024317;20060004081;和20060247295中描述般进行制备。

[0136] 双特异性分子

[0137] 另一方面,本申请涉及包含与至少一个其他功能分子如另一种肽或蛋白(例如,另一抗体或受体配体)相连接的一种或多种本申请抗体或其抗原结合部分的双特异性分子,以生成与至少两个不同结合位点或靶向分子结合的双特异性分子。术语“双特异性分子”包括具有三种或更多种特异性的分子。

[0138] 在实施方式中,除Fc结合特异性和LAG3结合特异性外,双特异性分子还具有第三特异性。第三特异性可以针对PD-1或CTLA-4,以增强免疫系统应答。或者,第三特异性可以是针对增强因子(EF),例如与参与细胞毒性活性的表面蛋白结合并从而增加针对靶细胞的免疫应答的分子。例如,增强因子抗体可以与细胞毒性T细胞(例如,通过CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40或ICAM-1)或其他免疫细胞结合,引起增强的针对靶细胞的免疫应答。

[0139] 双特异性分子可以以多种形式和尺寸出现。在尺寸谱的一端,双特异性分子保持传统抗体形式,除其具有两个结合臂且各臂具有不同特异性外,替代具有两个特异性相同的结合臂的情况。在另一极端的是双特异性分子,由两个经肽链连接的单链抗体片段(scFv)构成,称为Bs(scFv)₂构建体。中间尺寸的双特异性分子包括由肽类接头连接的两个不同的F(ab)片段。这些和其他形式的双特异性分子可以通过基因改造、体细胞杂交或化学法进行制备。参见,例如Kuffer et al.,cited supra;Cao and Suresh,Bioconjugate Chemistry,9(6),635-644(1998);和van Spriël et al.,Immunology Today,21(8),391-397(2000)。

[0140] 嵌合抗原受体

[0141] 本申请还提供包含LAG3单链抗体scFv的嵌合抗原受体,该scFv包含本申请中所述的重链和轻链CDR、或重链和轻链可变区。

[0142] LAG3嵌合抗原受体可以包含(a)含有LAG3 scFv的胞外抗原结合域;(b)跨膜结构域;和(c)胞内信号转导结构域。

[0143] 药物组合物

[0144] 在另一方面,本申请提供一种药物组合物,其包含本申请的一种或多种抗体或其抗原结合部分、抗体或抗原结合部分编码载体、免疫交联物、免疫细胞、和/或双特异抗体,与药学上可接受的载体配制在一起。组合物可以任选地包含一种或多种其他药学上的有效成分,例如另一抗肿瘤抗体、抗感染抗体、免疫增强抗体、或自身免疫疾病治疗抗体,或者非抗体类抗肿瘤剂、抗感染剂、免疫增强剂、或自身免疫疾病治疗剂。本申请的药学组合物可以与例如另一抗癌剂、另一抗感染剂、另一免疫增强剂、或另一自身免疫疾病治疗剂联合使用。

[0145] 药学组合物可以包含任何数量的赋形剂。可以使用的赋形剂包括载体、表面活性剂、增稠或乳化剂、固体粘合剂、分散或混悬剂、增溶剂、染色剂、矫味剂、涂层、崩解剂、润滑剂、甜味剂、防腐剂、等渗剂及其组合。合适赋形剂的选择和使用在Gennaro,ed., Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20th Ed.(Lippincott Williams&Wilkins 2003)中有教导。

[0146] 优选地,药物组合物适合于静脉内、肌内、皮下、肠道外、脊柱或表皮施用(例如通过注射或推注)。基于施用途径的不同,有效成分可以包在材料中,以保护其不受酸和可能使其失活的其他自然条件的影响。“肠道外施用”是指不同于肠道和局部外用的方式,通常通过注射进行,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、膜内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬脑膜上和胸骨内注射和推注。或者,本申请的抗体可以通过非肠道外路径施用,例如外用、表皮施用或粘膜施用,例如鼻内、经口、阴道、直肠、舌下、或局部外用。

[0147] 药物组合物可以为无菌水溶液或分散液的形式。它们也可以配制在微乳剂、脂质体或其他适于高浓度药物的有序结构中。

[0148] 与载体材料一起制备成单剂型的有效成分的量将随着治疗主体和特定施用模式而变,且基本上而言是产生疗效的组合物的量。以百分比计,该量为约0.01-约99%的与药学上可接受载体结合的有效成分,优选为约0.1%-约70%,最优选为约1%-约30%的有效成分。

[0149] 给药方案经调整提供最佳的所需反应(例如,治疗反应)。例如,可以施用快速灌注剂,可以随时间推移施用多个分剂量,或者剂量可以随治疗情况的危急程度成比例降低或提高。特别有利的是,以方便施用和剂量均匀的剂量单位型配置肠道外组合物。剂量单位型是指物理上分开的单位,适于治疗主体的单次给药;各单位包含计算出来与药学载体一起产生所需疗效的预定量的有效成分。或者,抗体可以以缓释剂施用,这种情况下所需的施用频率降低。

[0150] 对于抗体的施用,剂量可以为约0.001-100mg/kg宿主体重,更常见的为0.01-5mg/kg。例如,剂量可以为0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重,或在1-10mg/kg范围内。示例性的治疗方案涉及每周施用一次、两周一次、三周一次、四周一次、一个月一次、3个月一次、或3-6个月一次。本申请LAG3的优选给药方案包括静脉内施用,1mg/kg体重或3mg/kg体重,抗体以以下给药时间表中的一个进行给药:(i)每四周给药六次,然后每三个月一次;(ii)每三周一次;(iii)3mg/kg体重一次,之后1mg/kg体重每三周一次。在一些方法中,剂量调整成实现约1-1000 μ g/ml的血药浓度,在一些方法中为约25-300 μ g/ml。

[0151] “治疗有效量”的本申请LAG3抗体引起疾病症状严重程度的降低、无症状期频率和持续时间的增加。例如,对于带瘤受试者的治疗,“治疗有效量”优选地,与未治疗受试者相比,将肿瘤生长抑制至少约20%、更优选抑制至少约40%,甚至更优选地抑制至少约60%,且更优选地抑制至少约80%。治疗有效量的治疗抗体可以减小肿瘤尺寸,或者减轻受试者的症状,受试者可以是人或另一哺乳动物。又例如,对于自身免疫疾病受试者的治疗,“治疗有效量”优选地,与未治疗受试者相比,缓解炎症,例如减少至少约20%的炎症、更优选至少约40%、甚至更优选至少约60%或80%的炎症,甚至引起自身免疫疾病的彻底消失。

[0152] 药物组合物可以是缓释试剂,包括植入体、和微胶囊递送系统。可以使用生物可降解、生物相容的聚合物,例如乙烯-醋酸乙烯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯、和聚乳酸。参见,例如,Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R.Robinson,ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。

[0153] 药学组合物可以经医学设备来给药,例如(1)无针皮下注射设备(例如,美国专利

5,399,163;5,383,851;5,312,335;5,064,413;4,941,880;4,790,824;和4,596,556);(2)微量输液泵(美国专利4,487,603);(3)经皮给药设备(美国专利4,486,194);(4)推注设备(美国专利4,447,233和4,447,224);和(5)渗透设备(美国专利4,439,196和4,475,196)。

[0154] 在某些实施方式中,本申请的单抗可以经配制,以确保合适的体内分布。例如,为确保本申请的治疗抗体穿越血脑屏障,抗体可以配制在脂质体中,其还可以额外地包含靶向功能基团,以增强对特定细胞或器官的选择性输送。参见,例如美国专利4,522,811;5,374,548;5,416,016;和5,399,331;V.V.Ranade (1989) J.Clin.Pharmacol.29:685;Umezawa et al., (1988) Biochem.Biophys.Res.Commun.153:1038;Bloeman et al., (1995) FEBS Lett.357:140;M.Owais et al., (1995) Antimicrob.Agents Chemother.39:180;Briscoe et al., (1995) Am.J.Physiol.1233:134;Schreier et al., (1994) J.Biol.Chem.269:9090;Keinanen and Laukkanen (1994) FEBS Lett.346:123;和Killion and Fidler (1994) Immunomethods 4:273。

[0155] 本申请的用途和方法

[0156] 本申请的药物组合物具有多种体外和外内应用,涉及例如癌症、感染性疾病和自身免疫疾病的治疗,或者更笼统地讲,用于癌症和感染性疾病患者的免疫增强、以及用于炎性疾病如自身免疫疾病患者的病灶区免疫细胞的减少。抗体可以施用至人受试者,以例如体内抑制肿瘤生长、减少或消除病原体、减少或消除自身免疫疾病。

[0157] 考虑到本申请药物组合物的抑制肿瘤细胞增殖和存活的能力,本申请提供抑制受试者中肿瘤细胞生长的方法,包括向该受试者施用本申请的药物组合物,从而在该受试者中肿瘤生长被抑制。可以由本申请抗体治疗的肿瘤的非限制性例子包括但不限于肠腺癌、乳腺癌、肾细胞癌、黑色素瘤、胰腺癌、非小细胞肺癌、成胶质细胞瘤和胃癌,原发或转移的。此外,难治的或复发的恶性肿瘤可能可以用本申请的抗体抑制。

[0158] 本申请的药物组合物可以用于减少或消除病原体,本申请提供治疗感染性疾病的方法,包括向该受试者施用本申请的药物组合物。感染性疾病可以是由病毒、细菌、真菌、支原体等引起的。

[0159] 本申请的药物组合物可以用于减少或消除自身免疫疾病,本申请提供治疗自身免疫疾病的方法,包括向该受试者,特别是炎症病灶区,施用本申请的抗体。自身免疫疾病可以包括斑块型银屑病。

[0160] 本申请的这些和其他方法在以下进一步讨论。

[0161] 联合疗法

[0162] 本申请提供本申请药物组合物与一种或多种其他抗体或非抗体类治疗剂一起施用的联合疗法,其能有效抑制受试者中的肿瘤生长。在一个实施方式中,本申请提供在受试者中抑制肿瘤生长的方法,包括向受试者施用LAG3药物组合物以及一种或多种其他抗体,例如TIM-3抗体、PD-1抗体和/或CTLA-4抗体。在某些实施方式中,受试者是人。在另一个方面,本申请提供癌症治疗方法,其中本申请的LAG3药物组合物与化疗剂一起施用,化疗剂可以是细胞毒性剂。其他可以与LAG3药物组合物联合的疗法包括但不限于免疫原性剂施用、白介素2 (IL-2) 施用、放疗、手术或激素去除。

[0163] 本申请还提供本申请药物组合物与一种或多种其他抗体或非抗体类治疗剂一起施用的联合疗法,其能有效减少或消除受试者中的病原体,例如病毒、细菌、真菌、支原体。

例如,本申请的药物组合物可以与抗感染剂联用,包括但不限于,抗病毒剂、抗细菌剂、抗真菌剂和抗支原体剂等。

[0164] 本申请还提供本申请药物组合物与一种或多种其他抗体或非抗体类治疗剂一起施用的联合疗法,其能有效减少或消除受试者中的自身免疫疾病,例如斑块型银屑病。例如,本申请的药物组合物可以与自身免疫治疗剂联用,例如治疗斑块型银屑病的IL-2、IL-17、和/或IL-23抑制剂,例如Taltz®和bimekizumab等。

[0165] 本文讨论的治疗剂的组合可以作为在药学可接受载体中的单一组合物同时施用,或者作为分开的组合物同时施用,其中各药剂处于药学可接受载体中。在另一个实施方式中,治疗剂的组合可以按序施用。

[0166] 此外,如果进行多次联合疗法施用,且药剂按序施用,则在各时间点的按序施用的次序可以反转或保持相同,按序施用可以与同时施用或其任何组合相结合。

[0167] 本申请还通过以下实施例进行进一步描述,实施例不应当解读为限制性的。所有附图和在本申请中通篇引用的所有参考文献、Genbank序列、专利和公开专利申请都通过引用的方式全部并入本文。

[0168] 实施例

[0169] 实施例1稳定表达人、猴或小鼠LAG3的HEK293A细胞株的构建

[0170] 使用HEK293A细胞来构建稳定过表达人、猴或小鼠LAG3的细胞系。简单而言,合成人、猴或小鼠LAG3的cDNA序列(SEQ ID NOs:37、38和39),并经酶切克隆到pLV-EGFP(2A)-Puro载体(北京英茂盛业生物科技有限公司,中国)的EcoRI和XhoI酶切位点之间。将得到的pLV-EGFP(2A)-Puro-VISTA与psPAX和pMD2.G质粒通过脂质体转染的方式转染到HEK293T细胞(南京科佰公司,中国)中,产生慢病毒,具体转染方法与Lipofectamine 3000试剂盒(Thermo Fisher Scientific,美国)说明书步骤完全一致。转染三天后,从HEK293T细胞的细胞培养基(DMEM培养基(Cat#:SH30022.01,Gibco),补充有10%FBS(Cat#:FND500,Excell))中收获慢病毒。然后用慢病毒转染HEK293A细胞(南京科佰公司,中国),得到稳定表达人、猴、或小鼠LAG3的HEK293A细胞(分别为HEK293A/人LAG3、HEK293A/猴LAG3、HEK293A/小鼠LAG3)。转染的HEK293A细胞培养在含有0.2μg/ml嘌呤霉素(Cat#:A11138-03,Gibco)的DMEM+10%FBS培养基中7天。人和猴LAG3的表达通过流式分析仪经FACS分析,使用市售可得的LAG3抗体(PE-人LAG3抗体,Cat#:369205,Biolegend,美国)。相似地,小鼠LAG3的表达通过市售可得的小鼠LAG3抗体(PE-小鼠LAG3抗体,Cat#:125207,Biolegend,美国)经FACS确证。

[0171] 实施例2制备产生小鼠抗人LAG3单克隆抗体的杂交瘤细胞系

[0172] 小鼠抗人LAG3单克隆抗体通过常规杂交瘤融合技术获得,方案略做改动,具体如下。

[0173] 免疫

[0174] 表2.免疫方案

接种	首次	第一次加强	第二次加强	第三次加强	最后一次加强
时间进程	第 0 天	第 14 天	第 28 天	第 42 天	第 56 天
[0175] 接种蛋白和剂量	人 LAG3 (ECD) - hFc (50 μg/小鼠)	人 LAG3 (ECD) - hFc (50 μg/小鼠)	猴 LAG3 (ECD) - hFc (50 μg/小鼠)	人 LAG3 (ECD) - hFc (50 μg/小鼠)	猴 LAG3 (ECD) - hFc (25 μg/小鼠) + 人 LAG3 (ECD) - hFc (25 μg/小鼠)
佐剂	完全 Freund 佐剂	不完全 Freund 佐剂	不完全 Freund 佐剂	不完全 Freund 佐剂	PBS
接种方式	腹腔注射 (i.p.)	腹腔注射 (i.p.)	腹腔注射 (i.p.)	腹腔注射 (i.p.)	静脉注射 (i.v.)

[0176] 13只BALB/c小鼠(维通利华,中国)通过交叉注射重组人LAG3(ECD)-hFc蛋白(Cat#:16498-H02H,义翘神州,中国)和猴LAG3(ECD)-hFc蛋白(Cat#:LA3-C5252,ACRO,中国)进行免疫,具体免疫流程如表2所示。人LAG3(ECD)-hFc蛋白和猴LAG3(ECD)-hFc蛋白用等体积的完全Freund佐剂(Cat#:F5881-10*10ML,Sigma,美国)或不完全Freund佐剂(Cat#:F5506-6*10ML,Sigma,美国)或PBS超声乳化。

[0177] 每次加强免疫后1周,从每只小鼠鼠尾取50μl血清,经ELISA检测滴度,具体使用重组人LAG3(ECD)-his(Cat#:16498-H08H,义翘神州,中国)、猴LAG3(ECD)-hFc(Cat#:LA3-C5252,ACRO,中国)和鼠LAG3(ECD)-his(Cat#:53069-M08H,义翘神州,中国)进行结合测试。还通过使用实施例1中制备的过表达人、猴、小鼠LAG3的HEK293A细胞经FACS进行滴度测试。

[0178] 基于最后一次加强之后的ELISA检测和FACS检测结果,血清滴度较高的10只小鼠被选出用于下一步的杂交瘤细胞系制备。

[0179] 杂交瘤细胞系的制备

[0180] 通过常规的杂交瘤融合技术制备杂交瘤细胞系,方案略做修改。

[0181] 在最后一次免疫加强4天后,处死小鼠,取脾脏,在PBS中制备成单细胞混悬液。脾细胞用DMEM培养基(Cat#:SH30243.01B,Hyclone,美国)清洗3次。处于对数生长期的骨髓瘤细胞SP2/0(CRL-1581,ATCC,美国)与上述分离的小鼠脾细胞按1:4的比例混匀后用DMEM清洗2次。细胞融合通过PEG(Cat#:P7181,Sigma,美国)融合的方式进行。融合后的细胞用DEME清洗3次,并重悬在细胞生长培养基中(RPMI 1640(Cat#:C22400500CP,Gibco)+10%FBS+1X HAT(H0262,Sigma))。将细胞混悬液在96孔培养板上铺板,每孔200μl,5×10⁴细胞每孔,将细胞置于37℃、5%CO₂的潮湿细胞培养箱培养7天。之后,将培养基换成新鲜培养基(DMEM+i0%FBS+1X HAT)。2-3天以后,吸取细胞培养液上清,经ELISA和FACS筛选杂交瘤细胞。

[0182] 通过ELISA筛选杂交瘤细胞系

[0183] 首先通过高通量的ELISA结合检测来筛选与人LAG3结合的杂交瘤克隆,在ELISA中使用人LAG3(ECD)-his(Cat#:16498-H08H,义翘神州,中国)。对与人LAG3结合的杂交瘤克隆进一步测试其与猴或小鼠LAG3结合的能力,在ELISA中使用猴LAG3(ECD)-hFc(Cat#:LA3-C5252,ACRO,中国)和小鼠LAG3(ECD)-his(Cat#:53069-M08H,义翘神州,中国)作为检测抗原。

[0184] 经上述ELISA,筛选出211个与人以及猴LAG3有特异结合力的杂交瘤细胞系。

[0185] 通过FACS检测筛选杂交瘤细胞系

[0186] 对筛选出的211个杂交瘤细胞系进一步测试其与HEK293A细胞上表达的人、猴或小鼠LAG3的结合能力,使用实施例1中制备的HEK293A/人LAG3细胞、HEK293A/猴LAG3细胞、和HEK293A/小鼠LAG3细胞。

[0187] 基于上述FACS筛选,得到78个对HEK293A/人LAG3细胞以及HEK293A/猴LAG3细胞有高结合力的杂交瘤抗体克隆,该78个抗体克隆与HEK-293A/小鼠LAG3细胞均不结合。

[0188] 产生LAG3抗体的杂交瘤细胞的亚克隆

[0189] 对上述78个杂交瘤克隆进行2轮亚克隆。在亚克隆过程中,选出各克隆的多个亚克隆($n > 3$),并经上述的ELISA和FACS检测进行特征确证。将经该步骤得到的亚克隆确定为单克隆杂交瘤细胞系。最终得到47个对人和猴LAG3呈现出高结合力的亚克隆,每个亚克隆来自不同的原始母克隆。

[0190] 实施例3小鼠源LAG3抗体阻断LAG3与Daudi细胞上MHC II复合体的结合

[0191] 一种检测LAG3-hFc融合蛋白(Cat#:16498-H02H,义翘神州,中国)与Daudi细胞上的MHC II复合体结合能力的体外检测体系被开发用来检测LAG3抗体的阻断效果。

[0192] 收集上述筛选出来的47个不同克隆的杂交瘤细胞上清各100 μ l,分别加入LAG3-hFc融合蛋白,使得融合蛋白终浓度为10 μ g/ml,缓冲液体系为PBS溶液(137 mMNaCl,2.7mM KCl,10mM Na₂HPO₄,2mM KH₂PO₄,PH7.4),常温孵育20分钟。然后在100 μ l体积的混合物中加入 2×10^5 Daudi细胞。细胞、抗体、融合蛋白的混合物继续在4度混合孵育30分钟。细胞用PBS缓冲液清洗2次后,与200倍稀释的抗人Fc的二抗PE-labeled F(ab')₂anti-hIgG Fc(Cat#:H10104,Life Technologies,美国)混合,4度继续孵育30分钟后,PBS缓冲液清洗1遍。结合到细胞上的LAG3-hFc的水平通过流式细胞仪(BD Bioscience)进行检测。其中空白对照是在体系中没有加入LAG3-hFc蛋白的实验组,阴性对照为加入LAG3-hFc蛋白和对照抗体He1(Cat#:LT12031,LifeTein,美国)的实验组,阳性对照为加入LAG3-hFc蛋白和阳性对照抗体BMS-986016(简称为BMS,按照EP 2 320 940 B1中的氨基酸序列合成,恒定区为IgG4(S228P)/ κ)的实验组。

[0193] 结果如图1所示,BMS可以完全阻断LAG3融合蛋白与Daudi细胞上的MHC II复合体的结合。所检测的杂交瘤抗体中,总共有12个抗体可以阻断LAG3与MHC II复合体的结合。

[0194] 实施例4小鼠LAG3单克隆抗体的纯化和分型

[0195] 对实施例3得到的12个克隆进行进一步的研究。首先将12个所选克隆的小鼠抗体进行纯化。简单而言,各个亚克隆的杂交瘤细胞在T175细胞培养瓶中生长,各个培养瓶含100ml新鲜无血清杂交瘤培养基(Gibco,美国,Cat#:12045-076)和1%HT补充液(Gibco,Cat#:11067-030)。细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养10天。收集培养物,3500rpm离心5分钟,并通过0.22 μ m滤膜过滤除去细胞碎片。单克隆抗体通过预平衡的蛋白-A亲和柱(Cat#:17040501,GE,美国)来富集纯化。后用洗脱缓冲液(20mM柠檬酸,pH3.0-pH3.5)进行洗脱。之后,抗体保存在PBS缓冲液(pH 7.0)中,并通过NanoDrop检测抗体浓度。

[0196] 通过使用 κ 和 λ -小鼠快速分型试剂盒(Thermal,美国,Cat#:26179)和小鼠单克隆抗体分型试剂(Sigma,美国,Cat#:IS02-1KT)来确定纯化抗体的亚型,检测步骤与试剂盒说明书中的一致。

[0197] 大部分克隆,包括101F4,产生小鼠IgG1/ κ 抗体,而134G10产生小鼠IgG2a/ κ 抗体。克隆101F4和134G10的表达滴度分别为8.6mg/L和3.4mg/L。

[0198] 实施例5纯化的小鼠LAG3抗体与人和猴LAG3结合

[0199] 纯化的小鼠LAG3单克隆抗体首先通过ELISA检测来确定其与重组人、猴或小鼠LAG3蛋白的结合亲和力。

[0200] ELISA板用50 μ l的500ng/ml人LAG3 (ECD) -his (Cat#:16498-H08H,义翘神州,中国) 4 $^{\circ}$ C包被过夜。各孔用200 μ l封闭液 (PBS缓冲液+1%BSA+i%山羊血清+0.05%吐温20) 室温封闭2个小时,然后加入100 μ l梯度稀释的LAG3抗体 (最高浓度40 μ g/ml),室温孵育1小时。ELISA板用PBST (PBS缓冲液+0.05%吐温20) 洗3遍后加入5000倍稀释的山羊抗小鼠IgG-HRP (Cat#:A9309-1ml, Sigma,美国),室温孵育1小时。ELISA板用新鲜配制的Ultra-TMB (BD,美国, Cat#no.:555214) 室温显色5分钟。之后用SpectraMax^Ri3X (Molecular Devies,美国) 在450nm读值。

[0201] 12个LAG3单克隆抗体对猴或小鼠LAG3的物种交叉反应性进一步通过直接ELISA进行测试。具体地,将50 μ l的500ng/ml猴LAG3 (ECD) -hFc (Cat#:LA3-C5252,ACRO,中国) 或者小鼠LAG3-his (Cat#:53069-M08H,义翘神州,中国) 包被在96孔ELISA板中,随后与100 μ l梯度稀释的LAG3抗体 (最高浓度40 μ g/ml) 共同孵育。之后使用HRP-山羊抗小鼠IgG (Sigma,美国, Cat#:A9309-1ml)。BMS-986016作为阳性对照。

[0202] 两种代表性抗体的结合力的EC₅₀总结在表3中。数据显示,所有12个克隆的抗体与人以及猴LAG3结合,而不与小鼠LAG3交叉反应。不同于本申请的抗体,参照抗体BMS不与猴LAG3结合。

[0203] 表3.代表性小鼠LAG3单抗对人、猴、或小鼠LAG3的结合力

抗体	ELISA (EC ₅₀ :M/L)		
	人LAG3 (ECD) -his	猴LAG3 (ECD) -hFc	小鼠LAG3 -his
[0204] BMS	1.23E-9	不结合	不结合
101F4	4.0 E-9	2.30E-9	不结合
134G10	1.92 E-9	2.30E-10	不结合

[0205] 实施例6小鼠LAG3单克隆抗体与HEK293A细胞表面的人和猴LAG3结合

[0206] 为进一步确定本申请的LAG3抗体是否与HEK293A细胞表面的人、猴或小鼠LAG3结合,分别使用实施例1构建的稳定过表达人、猴或小鼠LAG3的HEK293A细胞进行FACS细胞结合检测。简单而言,将50 μ l PBS缓冲液中悬浮的10⁵个HEK293A细胞加入96孔U底细胞培养板,随后加入50 μ l的梯度稀释的LAG3抗体 (初始最高浓度为40 μ g/ml,5倍梯度稀释12个浓度)。4 $^{\circ}$ C孵育1个小时后,96孔板用PBST清洗3遍。之后,加入500倍稀释的APC-山羊抗小鼠IgG (Cat#:405308,BioLegend,美国)。4 $^{\circ}$ C孵育1小时后,96孔板用PBS清洗3遍,然后使用FACS检测仪 (BD) 检测细胞荧光。

[0207] 两种代表性抗体的结合力的EC₅₀总结在表4中。数据表明,所有小鼠LAG3单克隆抗体均对人以及猴LAG3表现出高结合力,但不与小鼠LAG3结合。

[0208] 表4.小鼠LAG3抗体与人、猴以及小鼠LAG3的结合亲和力

	抗体	FACS (EC ₅₀ : M/L)		
		HEK-293A/人 LAG3	HEK-293A/猴 LAG3	HEK-293A/小鼠LAG3
[0209]	BMS	5.2E-11	不结合	不结合
	101F4	3.6E-10	3.9E-10	不结合
	134G10	8.6E-9	6.5E-9	不结合

[0210] 实施例7抗原表位竞争

[0211] 通过竞争ELISA的方法检测抗体之间的抗原结合表位竞争。简单而言,96孔ELISA检测板用50 μ l的5 μ g/ml的BMS抗体包被4度包被过夜。这些孔用200 μ l封闭液(PBS+1%BSA+1%山羊血清+0.05%吐温20)室温封闭2小时。50 μ l的0.5 μ g/ml人LAG3(ECD)-his(Cat#:16498-H08H,义翘神州,中国)加入检测板中,室温继续孵育1小时。板用PBST清洗3遍,加入100 μ l的1 μ g/ml纯化的抗体,室温孵育1小时。ELISA板用PBST洗3遍后加入20000倍稀释的抗小鼠Fc-HRP(Cat#:A9309-1MC,Simga,美国),室温孵育1小时。继续用PBST洗液洗3遍后,用新鲜配制的Ultra-TMB(Huzhou Yingchuang,中国,Cat#:TMB-S-003)室温显色5分钟,并用酶标仪(Thermo Multiscan FC)在450nm进行读值。

[0212] 5种小鼠抗体,包括克隆101F4抗体,与BMS存在抗原表位竞争,表明这些抗体与BMS结合相同或相似的抗原表位。其余抗体,包括克隆134G10的抗体,与参照抗体BMS不存在竞争,表明它们结合不同的抗原表位。

[0213] 实施例8纯化的小鼠LAG3抗体抑制人LAG3-MHC II复合体的相互作用

[0214] 按照实施例3的方法检测抗体对LAG3-MHC II复合体的阻断效果,经FACS检测方法测量。简单而言,50 μ l经PBS梯度稀释的LAG3抗体(初始最高浓度为40 μ g/ml,5倍梯度稀释12个浓度)与50 μ l终浓度为10 μ g/ml的LAG3-hFc融合蛋白常温孵育20分钟,然后在混合物中加入100 μ l PBS缓冲液悬浮的2 \times 10⁵Daudi细胞。细胞、抗体和融合蛋白的混合物继续在4度混合孵育30分钟。细胞用PBS缓冲液清洗2次后,与200倍稀释的抗人Fc的二抗PE-labeled F(ab')₂anti-hIgG Fc(Cat#:H10104,Life Technologies,美国)混合后4度继续孵育30分钟,PBS清洗1遍。结合到细胞上的LAG3-hFc的水平通过流式细胞仪(BD Bioscience)进行检测。其中BMS作为阳性对照。

[0215] 数据示出,本申请的所有抗体都能阻断LAG3-MHC II复合体之间的相互作用。两种代表性抗体的EC₅₀值总结在表5中,其中134G10的EC₅₀低于BMS。

[0216] 表5. 小鼠LAG3抗体对LAG3-MHCII复合体相互作用的阻断力

抗体	阻断效果EC ₅₀ (M/L)
BMS	1.3E-8
101F4	1.3E-8
134G10	9.3E-9

[0218] 实施例9小鼠LAG3抗体促进T细胞激活

[0219] 小鼠LAG3抗体对APC介导的T细胞激活的作用通过混合淋巴细胞反应(MLR)进行检测。

[0220] 简单而言,通过梯度密度离心收集健康人供体血样中的PBMC,重悬于RPMI1640培养基中。PBMC在37 $^{\circ}$ C孵育箱中培养2小时,收集贴壁细胞,即为单核细胞。单核细胞在含有

100ng/ml重组人GM-CSF (Cat#:7954-GM,R&D,美国)、100ng/ml重组人IL-4 (Cat#:6507-IL,R&D,美国)和10%FBS的RPMI1640培养基中培养。三天后,将一半的培养基替换为新鲜培养基。在培养的第6天,将培养基替换为含有100ng/ml重组人GM-CSF、100ng/ml重组人IL-4、10ng/ml的rhTNF- α (Cat#:210-TA-100,R&D,US)、1000U/ml rhIL-6 (Cat#:7270-IL-025,R&D,US)、1 μ g/ml PGE2 (Cat#363-24-6,TOCRIS,US)、和10ng/ml IL-1 β (Cat#:210-LB-025,R&D,US)的新鲜培养基。细胞再孵育2天,诱导出树突状细胞(DC)。

[0221] 之后,通过梯度密度离心收集另一健康人供体血样中的PBMC,重悬于RPMI1640培养基中。使用不接触人CD4+T细胞分离试剂盒 (Cat#:11346D,Thermal Fisher Scientific,美国)从PBMC中分离出CD4+ T细胞。

[0222] 在96孔U形底检测板中,将来自第一供体的树突状细胞和来自第二供体的CD4+T细胞以 2.5×10^4 细胞/孔和 5×10^4 细胞/孔的密度进行铺板,培养基为100 μ l的完全培养基(90%DMEM+10%FBS)。向孔中加入50 μ l LAG3抗体(终浓度为100 μ g/ml)、或对照抗体He1 (Cat#:LT12031,LifeTein,美国),板再孵育72小时。吸取细胞混合物的培养基上清加入IFN- γ 检测试剂盒的ELISA板 (Cat#:SIF50,R&D,美国),根据制造商的方法步骤,确定IFN- γ 浓度。每个实验组设三个重复。实验中的空白对照为只有分离的CD4+T细胞,阴性对照为DC细胞混合CD4+T细胞并加入终浓度为100 μ g/ml的He1抗体,阳性对照为DC细胞混合CD4+T细胞并加入终浓度为100 μ g/ml的BMS抗体。

[0223] 如图2所示,相对于He1对照,其中包括101F4和134G10在内的6个抗体增加T细胞的IFN- γ 分泌,且在用101F4和134G10的小鼠LAG3抗体处理的孔中,检测到最高量的IFN- γ 。

[0224] 实施例10嵌合LAG3抗体的表达和纯化

[0225] 选取抗体101F4和134G10进行进一步的研究。首先通过PCR方法对这个抗体的杂交瘤细胞进行重链/轻链可变区序列的克隆,使用文献中提及的引物(Juste et al.,(2006), Anal Biochem.,1;349(1):159-61),并测序。序列总结在表1和表6中。通过将编码重链可变区和人IgG4恒定区、以及编码轻链可变区和人 κ 的的序列分别插入到pCDNA3.1 (Invitrogen,美国)的限制性酶切位点XhoI/BamHI之间来构建表达载体,其中IgG4重链恒定区包含一个S228P的突变,重链恒定区和轻链恒定区的氨基酸序列分别列于SEQ ID NOs:35和36,重链可变区的C端接重链恒定区的N端,轻链可变区的C端接轻链恒定区的N端。

[0226] 将上述获得的表达载体PEI转染HEK-293F细胞(Cobioer,中国)。具体而言,HEK-293F细胞在Free Style™ 293表达培养基(Cat#:12338-018,Gibco)中培养,并用聚乙烯亚胺(PEI)转染的方式将各表达载体转染至细胞,DNA与PEI的比例是1:3,每毫升细胞培养液中加入DNA的量是1.5 μ g。转染后的HEK-293F细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中以120RPM转速培养。10-12天后,收集细胞培养上清,按照实施例4的方法步骤纯化单克隆抗体。嵌合抗体以后缀CM表示。

[0227] 实施例11嵌合LAG3单克隆抗体与人或猴LAG3结合

[0228] 根据实施例6的方法步骤,进一步通过FACS方法检测嵌合LAG3抗体对HEK293A/人LAG3细胞、HEK293A/猴LAG3细胞以及HEK293A/小鼠LAG3细胞的结合力。

[0229] 如图3所示,嵌合抗体对人LAG3(图3,A)和猴LAG3(图3,B)均有高结合力,不结合小鼠LAG3(图3,C)。

[0230] 实施例12 LAG3抗体的人源化改造

[0231] 基于上述相关的功能试验,对101F4和134G10进行人源化改造和进一步研究。小鼠抗体的人源化改造通过互补决定区(CDR)移植法(美国专利5,225,539)进行,具体方法详见下文。

[0232] 为选出鼠源抗体101F4和134G10的人源化受体框架,将101F4和134G10的轻链和重链可变区序列与NCBI网站的人免疫球蛋白基因数据库

[0233] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)进行比对。选择与101F4和134G10同源度最高的人种系IGVH和IGVK作为人源化改造的框架。对于101F4,所选择的重链种系受体序列是人IGHV1-24*01,所选择的轻链种系受体序列是人IGKV1-33*01。对于134G10,所选择的重链种系受体序列是人IGHV3-21*01,所选择的轻链种系受体序列是人IGKV4-1*01

[0234] 对101F4和134G10的可变结构域进行三维结构模拟,以确定可能对于维持CDR环状结构起重要作用的关键框架氨基酸残基,从而设计人源化抗体的回复突变。

[0235] 基于上述的结构建模,101F4重链鉴定出5个潜在的回复突变(M70L、E72A、V24A、V68A和T98G),轻链鉴定出4个潜在的回复突变(T69Q、F71Y、M4I和Y36F)。134G10重链鉴定出2个潜在的回复突变(G44R和S49G),轻链鉴定出3个潜在的回复突变(D9S、G106A和S69T)。

[0236] 如表1所示,对于101F4和134G10,各设计出3个人源化重链可变区和3个人源化轻链可变区,每个母本抗体各得到5个人源化抗体。

[0237] 合成编码人源化重链可变区加人IgG4恒定区(含有S228突变)的序列、以及编码轻链可变区加人κ恒定区的序列,重链恒定区和轻链恒定区的氨基酸序列分别列于SEQ ID NOs:35和36,并分别利用EcoR I/Xho I和Cla I/Hind III限制性酶切位点克隆到GS表达载体(Invitrogen,美国)中。所有表达构建体均经测序证实。用表达构建体质粒转染EXPiCHO表达系统(Invitrogen,美国),瞬时表达5个人源化101F4抗体和5个人源化134G10抗体,方法步骤如实施例10所述。人源化抗体按照实施例4所述进行纯化。

[0238] 实施例13嵌合和人源化LAG3抗体的特征鉴定

[0239] 根据实施例6的方法步骤,检测嵌合和人源化抗体与实施例1制备的HEK293A/人LAG3细胞、HEK293A/猴LAG3细胞以及HEK293A/小鼠LAG3细胞的结合力。结果显示在图4。

[0240] 根据实施例8的方法检测嵌合和人源化抗体对LAG3-MHC II复合体的阻断作用。结果显示在图5。

[0241] 嵌合和人源化抗体激活T细胞功能的检测依据实施例9中MLR的试验方案进行,稍做调整。简单而言,通过梯度密度离心收集健康人供体血样中的PBMC,重悬于RPMI1640培养基中。PBMC在37℃孵育箱中培养2小时,收集贴壁细胞,即为单核细胞。单核细胞在含有100ng/ml重组人GM-CSF(Cat#:7954-GM,R&D,美国)、100ng/ml重组人IL-4(Cat#:6507-IL,R&D,美国)和10%FBS的RPMI1640培养基中培养。三天后,将一半的培养基替换为新鲜培养基。在培养的第6天,将培养基替换为含有100ng/ml重组人GM-CSF、100ng/ml重组人IL-4、10ng/ml的rhTNF-α(Cat#:210-TA-100,R&D,US)、1000U/ml rhIL-6(Cat#:7270-IL-025,R&D,US)、1μg/ml PGE2(Cat#363-24-6,TOCRIS,US)、和10ng/ml IL-1β(Cat#:210-LB-025,R&D,US)的新鲜培养液。细胞再孵育2天,诱导出树突状细胞。之后,通过梯度密度离心收集另一健康人供体血样中的PBMC,重悬于RPMI1640培养基中。使用Invitrogen Dynabeads不接触人CD4⁺ T细胞分离试剂盒(Cat#:11346D,Thermal Fisher Scientific,美国)从PBMC中分离出CD4⁺ T细胞。在96孔U形底检测板中,将来自第一供体的树突状细胞和来自第二供体

的CD4⁺T细胞以 2.5×10^4 细胞/孔和 5×10^4 细胞/孔的密度进行铺板,培养基为100 μ l的完全培养基(90%DMEM+10%FBS)。向孔中加入100 μ l终浓度为100 μ g/ml的PD-1抗体Nivolumab(又称为 α -PD 1,按照US 8,008,449进行抗体制备,恒定区为IgG4/ κ),细胞混合物继续培养5天。然后细胞用PBS缓冲液清洗3遍后,向96孔板中加入100 μ l含 α -PD 1(终浓度为1 μ g/ml)的完全培养基以及100 μ l的含不同浓度的抗LAG3抗体(终浓度为100 μ g/ml、20 μ g/ml或者4 μ g/ml)完全培养基的混合物、或 α -PD 1与对照抗体Hel(Cat#:LT12031,LifeTein,美国)的混合物,板再孵育72小时。使用IFN- γ 检测试剂盒(Cat#:SIF50,R&D,美国),根据制造商的方法步骤,确定IFN- γ 浓度。每个处理组设三个重复实验。其中BMS作为阳性对照。

[0242] 如图4所示,人源化134G10抗体的结合力与其相应的嵌合抗体相似,人源化101F4抗体的结合力存在些许差别。

[0243] 如图5所示,人源化LAG3抗体对LAG3游离蛋白与MHC II复合体的阻断效果与其各自的嵌合抗体相似,且比BMS略好或者相当。

[0244] 如图6所示,所有的人源化抗体都能促进经PD-1抗体预处理的T细胞的活性,其促进T细胞分泌IFN- γ 的水平高于或类似于BMS抗体。其中101F4H2L2和134G10H2L3抗体激活T细胞的能力最强。

[0245] 实施例14 101F4人源化抗体通过噬菌体展示技术进行亲和力成熟

[0246] 为进一步改善结合亲和力,通过噬菌体展示技术对101F4H2L2进行亲和力成熟改造。简单而言,进行3D结构建模模拟来识别101F4H2L2重链和轻链CDR中可能对结合亲和力重要的氨基酸残基。识别出的CDR残基通过PCR进行突变,使用针对点突变特别设计的引物和标准方法步骤。构建出噬菌体展示库,通过珠子偶联的人hLAG3-hFc蛋白进行生物筛选。在3轮生物筛选后,选出高结合力克隆,收集并侵染细菌细胞。挑取细菌菌落并在96孔板上生长,然后使用ELISA来识别高结合力克隆,并进行测序。识别出重链和轻链CDR中的有益突变,并结合到新的噬菌体展示库中,再进行3轮生物筛选和测序证明。识别出1种与母克隆101F4H2L2相比重链CDR3包含三个氨基酸突变轻链CDR3包含一个氨基酸突变且呈现高结合力的克隆,称为101F4H2L2-8,将其在HEK293F细胞中以全长IgG4(S228P)/ κ 抗体形式表达。

[0247] 101F4H2L2和101F4H2L2-8抗体与人LAG3的亲和力按照实施例5通过ELISA进行检测。抗体对HEK293细胞表面的人LAG3、猴LAG3或者小鼠LAG3的亲和力按照实施例6的方法进行检测。此外,抗体与激活的人PBMC细胞的亲和力也通过FACS进行检测。简而言之,人的PBMC细胞通过梯度密度离心进行分离,然后在完全培养基(RPMI培养基+10%胎牛血清+人IL-2(20IU/ml,R&D,Cat#:202-IL)+DynabeadsTM Human T-Activator CD3/CD28(Gibco,Cat:11132D))中培养2天获得激活的T细胞。然后收集细胞按照实施例6的方法进行FACS检测。

[0248] 如图7所示,相比较于其母本101H2L2,通过ELISA和FACS各种手段检测到的101F4H2L2-8与游离的以及表达于细胞表面的人和猴LAG3的亲和力都得到显著的提高。

[0249] 实施例15通过SPR检测LAG3抗体的结合亲和力

[0250] 通过BIAcoreTM 8K(GE Life Sciences,美国)来定量测定人源化LAG3抗体对人和猴LAG3的结合亲和力。具体地,将100-200RU(反应单位)的人LAG3(ECD)-his蛋白(Cat#:16498-H02H,义翘神州,中国)或者猴LAG3(ECD)-mFc蛋白(Cat#:LA3-C52A0,ACRO,中国)耦联到CM5生物芯片(Cat#:BR-1005-30,GELife Sciences,美国)上,随后用1M氨基乙醇封闭

芯片未反应基团。梯度稀释(浓度从0.3 μ M到10 μ M)的人源化抗体注入到SPR反应液(HBS-EP缓冲液,pH7.4,Cat#:BR-1006-69,GE Life Sciences,美国)中,速度控制在30 μ L/分钟。抗体的结合力计算时,扣减空白对照孔的RU。结合速率(k_a)和解离速率(k_d)使用BIA评估软件中的1:1配对模型的公式进行计算。平衡解离常数 K_D 通过 k_d/k_a 计算得到。

[0251] 通过BIAcore™测量的人源化抗体的结合人LAG3的亲和力显示在图8中,101F4-CM、101F4H2L2、101F4H2L2-8、134G10-CM和134G10H2L3的结合 K_a 值分别为4.03E+05、9.60E+05、1.04E+05、9.39E+04和1.66E+05, K_d 值分别为3.35E-04、3.98E-01、2.14E-04、6.92E-05和4.35E-05, K_D 值分别为8.33E-10、4.14E-07、2.05E-09、7.37E-10和2.62E-10。亲和力成熟之后的抗体101F4H2L2-8与人LAG3的亲和力显著强于其亲本101F4H2L2。

[0252] 101F4H2L2、101F4H2L2-8和134G10H2L3抗体对猴LAG3蛋白的亲和力检测结果如图9所示,101F4H2L2、101F4H2L2-8和134G10H2L3抗体的 K_a 值分别为3.94E+06、1.62E+05和1.23E+07, K_d 值分别为1.92E-03、1.59E-04和2.46E-06, K_D 值分别为4.88E-10、9.80E-10和2.01E-13。数据表明101F4H2L2-8对猴LAG3的亲和力与人LAG3相当,而134G10H2L3对猴LAG3蛋白的亲和力强于与人LAG3蛋白的亲和力。

[0253] 实施例16亲和力成熟抗体促进T细胞激活

[0254] 人源化抗体101F4H2L2和亲和力成熟抗体101F4H2L2-8激活T细胞功能的检测依据实施例13中MLR的试验方案实行。其中BMS作为阳性对照。

[0255] 根据实施例14噬菌体成熟筛选的CDR突变的结果,构建并合成101F4H2L3-8(即在101F4H2L3基础上包含如上所述三个重链CDR3区氨基酸突变和一个轻链CDR3区氨基酸突变)和101F4H3L3-8(即在101F4H3L3基础上包含如上所述三个重链CDR3区氨基酸突变和一个轻链CDR3区氨基酸突变)。将101F4H2L3-8和101F4H3L3-8的可变序列加入IgG4恒定区(含有S228突变)/ κ 恒定区的序列,并分别利用EcoR I/Xho I和Cla I/Hind III限制性酶切位点克隆到GS表达载体(Invitrogen,美国)中。抗体表达方法步骤如实施例10所述。抗体纯化按照实施例4所述进行。101F4H2L3-8和101F4H3L3-8激活T细胞功能的检测依据实施例13中MLR的试验方案实行。其中BMS作为阳性对照

[0256] 结果如图10所示,所有的LAG3抗体均能促进PD-1抗体预处理过的T细胞的活性,且101F4H2L2、101F4H2L2-8、101F4H2L3-8和101F4H3L3-8抗体的激活能力都高于或相当于阳性对照活性。其中101F4H2L2-8的激活能力最强,比101F4H2L2更能促进IFN- γ 分泌,尤其在高浓度时。

[0257] 实施例17人源化抗体有体内抗肿瘤效果

[0258] 对抗体101F4H2L2、101F4H2L2-8和134G10H2L3的体内抗肿瘤效果进行研究,这些抗体具有人IgG4(S228P)/ κ 恒定区。LAG3抗体MK-4280(抗体可变区按照WO 2016/028672 A1进行序列合成,恒定区为IgG4(S228P)/ κ)作为阳性对照。

[0259] 所使用的动物模型通过对LAG3靶点人源化的转基因小鼠(GemPharmatech Co.Ltd,中国)植入MC38小鼠肠腺癌而建立。小鼠在第0天在侧腹部皮下注射 1×10^6 MC38细胞,随机分成五组,每组10只。各组小鼠在第0、4、7、11、14和18天腹腔注射101F4H2L2(10mg/kg)、101F4H2L2-8(10mg/kg)、134G10H2L3(10mg/kg)、MK-4280(10mg/kg)或PBS。

[0260] 101F4H2L2-8和134G10H2L3的体内抗肿瘤效果进一步通过PD-1/LAG3双人源化小鼠进行确证(GemPharmatech Co.Ltd,中国)。其中BMS-986016(恒定区为IgG4(S228P)/ κ)作

为阳性对照。小鼠在第0天在侧腹部皮下注射 1×10^6 MC38细胞,随机分成四组,每组10只。各组小鼠在第0、4、7、11、14和18天腹腔注射101F4H2L2-8 (10mg/kg)、134G10H2L3 (10mg/kg)、BMS (10mg/kg) 或PBS。

[0261] 随时间追踪肿瘤大小和小鼠体重。用游标卡尺测量肿瘤的长边(D)和短边(d),并通过公式 $TV = 0.5 \times D \times d^2$ 计算肿瘤体积。肿瘤体积变化显示在图11和图12中,并用单因素方差分析来确定肿瘤体积差异。

[0262] 在第25天,小鼠处死。小鼠处死后立即取肿瘤称重,之后放置在有胶原酶的Hanks缓冲液中。用剪刀将肿瘤组织剪成小块,并将剪碎的肿瘤组织继续孵育在含胶原酶的Hanks缓冲液中,37℃轻缓震荡30分钟。之后,向各样品加入10ml RPMI 1640+10%FBS,终止胶原酶活性,保持免疫细胞活力。将样品通过70 μ m细胞滤膜(Coming, Cat#:352350)过滤,并放置在新离心管中。样品离心后重悬到PBSF缓冲液中(PBS+2%FBS),细胞密度为 1×10^7 细胞/ml。取全部的样品,用PBSF清洗2遍,然后加入终浓度1 μ g/ml的荧光标记的CD45抗体(Brilliant Violet 785™小鼠CD45抗体, Biolegend, US, Cat#:103149),终浓度1 μ g/ml的CD8抗体(APC小鼠CD8a抗体, Biolegend, US, Cat#:100712)和终浓度1 μ g/ml的CD3抗体(FITC小鼠CD3抗体, Biolegend, US, Cat#:100203)混合物。所得的混合物4℃孵育半个小时。细胞用PBSF清洗2遍,然后经FACS仪器(BD)进行分析。

[0263] 如图11和图12所示,101F4H2L2-8和134G10H2L3能显著抑制人源化LAG3小鼠中肿瘤的生长,且在所有检测抗体中其抗肿瘤效果最好。

[0264] 图13显示出在LAG3人源化小鼠模型中101F4H2L2-8和134G10H2L3能够显著增加肿瘤里浸润的CD8阳性的T细胞的数量。

[0265] 实施例18人源化LAG3抗体增强PD-1抗体的体内抗肿瘤效果

[0266] 对抗体101F4H2L2-8和134G10H2L3与PD-1抗体的体内抗肿瘤协同效果进行研究。所使用的动物模型通过对LAG3靶点人源化的转基因小鼠(GemPharmatech Co.Ltd,中国)植入MC38小鼠肠腺癌而建立。小鼠在第0天在侧腹部皮下注射 1×10^6 MC38细胞,随机分组,每组10只。其中4组小鼠在第0、4、7、11、14和18天分别腹腔注射101F4H2L2-8 (10mg/kg)、PD-1抗体(InVivoMAb抗小鼠PD-1 (CD279), Cat#BE0146, USA, 1mg/kg)、101F4H2L2-8+PD-1抗体(10mg/kg+1mg/kg)或PBS。其他4组小鼠在第0、4、7、11、14和18天分别腹腔注射134G10H2L3 (10mg/kg)、PD-1抗体(2.5mg/kg)、134G10H2L3+PD-1抗体(10mg/kg+2.5mg/kg)或PBS。

[0267] 随时间追踪肿瘤大小和小鼠体重。用游标卡尺测量肿瘤的长边(D)和短边(d),并通过公式 $TV = 0.5 \times D \times d^2$ 计算肿瘤体积。在抗体组肿瘤达到3.5cm³前停止实验。用单因素方差分析来确定肿瘤体积差异。

[0268] 结果如图14所示,虽然抗肿瘤效果在各个小鼠中存在较大个体差异,但是101F4H2L2-8和134G10H2L3与对照溶剂相比能显著抑制人源化LAG3小鼠中肿瘤的生长。当PD-1抗体与LAG3抗体联用时,两个抗体的抗肿瘤效果比任何一个抗体单用的抗肿瘤效果更好。

[0269] 本申请中提及的序列总结在表6中。

[0270] 表6序列

	描述/ 序列/SEQ ID NO.
	小鼠、嵌合和人源化（包括亲和力成熟）101F4抗体的VH-CDR1 DYEMH（SEQ ID NO: 1）
	小鼠、嵌合和人源化（包括亲和力成熟）101F4抗体的VH-CDR2 AIDPETGGIVYNQRFKG（SEQ ID NO: 2）
	小鼠、嵌合和人源化101F4抗体的VH-CDR3 AGWGY（SEQ ID NO: 3）
	亲和力成熟化的人源化101F4抗体的VH-CDR3 TGWND（SEQ ID NO: 4）
	小鼠、嵌合和人源化（包括亲和力成熟）101F4抗体的VL-CDR1 KASQDINSYLS（SEQ ID NO: 5）
	小鼠、嵌合和人源化（包括亲和力成熟）101F4抗体的VL-CDR2 RANRLLD（SEQ ID NO: 6）
	小鼠、嵌合和人源化101F4抗体的VL-CDR3 LQYDEFPFT（SEQ ID NO: 7）
[0271]	亲和力成熟化的人源化101F4抗体的VL-CDR3 QQYDEFPFT（SEQ ID NO: 8）
	小鼠和嵌合101F4抗体的VH EVQLEQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEMHWVKQTPVYGLEWMGAIDPETGGI VYNQRFK GKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTGAGWGYWGQGTTLTVSS （SEQ ID NO: 9）
	人源化抗体101F4H0L0的VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKVSGYTFTDYEMHWVRQAPGKGLEWMGAIDPETG GIVYNQRFKGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATAGWGYWGQGTTLTVSS （SEQ ID NO:10）
	人源化抗体101F4H2L2和101F4H2L3的VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKVSGYTFTDYEMHWVRQAPGKGLEWMGAIDPETG GIVYNQRFKGRVTLTADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATAGWGYWGQGTTLTVSS S（SEQ ID NO:11）
	人源化抗体101F4H3L2和101F4H3L3的VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGKGLEWMGAIDPETG GIVYNQRFKGRATLTADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCAGAGWGYWGQGTTLTVSS S（SEQ ID NO: 12）

[0272]

亲和力成熟化的人源化抗体101F4H2L2-8和101F4H2L3-8的VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTFTDYEMHWVRQAPGKGLEWMGAIDPETG- GIVYNQRFKGRVTLTADTSTDTAYMELSSLRSED A VYYCATTGWNDWGQGT V TVSS (SEQ ID NO: 13)
亲和力成熟化的人源化抗体101F4H3L3-8的VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYEMHWVRQAPGKGLEWMGAIDPETG GIVYNQRFKGRATLTADTSTDTAYMELSSLRSED A VYYCAGTGWNDWGQGT V TVSS S (SEQ ID NO: 14)
小鼠和嵌合101F4抗体的VL DIVITQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQKPGKSPKTLIYRANRLLDGVPSR FSGSGSGQDYSLTISSLEFEDMGLYYCLQYDEFPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 15)
人源化抗体101F4H0L0的VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLLDGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 16)
人源化抗体101F4H2L2和101F4H3L2的VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLLDGVPS RFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 17)
亲和力成熟抗体101F4H2L2-8的VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLLDGVPS RFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCQYDEFPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)
人源化抗体101F4H2L3和101F4H3L3的VL DIQITQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWFQKPGKAPKLLIYRANRLLDGVPSR FSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 19)
亲和力成熟抗体101F4H2L3-8和101F4H3L3-8的VL DIQITQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWFQKPGKAPKLLIYRANRLLDGVPSR FSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCQYDEFPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 20)
小鼠、嵌合和人源化134G10抗体的VH-CDR1 SFGMS (SEQ ID NO: 21)
小鼠、嵌合和人源化134G10抗体的VH-CDR2 IISGGTYTFYPDILKG (SEQ ID NO:22)
小鼠、嵌合和人源化134G10抗体的VH-CDR3 VYSDYDGRFDY (SEQ ID NO: 23)
小鼠、嵌合和人源化134G10抗体的VL-CDR1 KSSQSLN S GNQKNYLA (SEQ ID NO: 24)
小鼠、嵌合和人源化134G10抗体的VL-CDR2 GASTRES (SEQ ID NO:25)

[0273]

小鼠、嵌合和人源化134G10抗体的VL-CDR3 QNDHSYPLT (SEQ ID NO: 26)
小鼠和嵌合134G10抗体的VH EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSFGMSWVRQTPDKRLEWVGISSGGTYTF YPDILKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARVYSDYDGRFDYWGQGTTLT VSS (SEQ ID NO: 27)
人源化抗体134G10H0L0的VH EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSISSGGTYTFY PDILKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYSDYDGRFDYWGQGTTLTVS S (SEQ ID NO: 28)
人源化抗体134G10H2L2和134G10H2L3的VH EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKRLEWVSISSGGTYTF YPDILKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYSDYDGRFDYWGQGTTLTV VSS (SEQ ID NO:29)
人源化抗体134G10H3VL2和134G10H3L3的VH EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKRLEWVGISSGGTYTF YPDILKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYSDYDGRFDYWGQGTTLTV VSS (SEQ ID NO: 30)
小鼠和嵌合134G10抗体的VL DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMNC <u>KSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQP</u> PKLLIYGAST RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC <u>QNDHSYPLTFGAGTKLEL</u> K (SEQ ID NO: 31)
人源化抗体134G10H0L0的VL DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGAST RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QNDHSYPLTFGQGTKLEI</u> K (SEQ ID NO: 32)
人源化抗体134G10H2L2和134G10H3L2的VL DIVMTQSPSSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGAST RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QNDHSYPLTFGAGTKLEI</u> K (SEQ ID NO: 33)
人源化抗体134G10H2L3和134G10H3L3的VL DIVMTQSPSSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGAST RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QNDHSYPLTFGAGTKLEI</u> K (SEQ ID NO: 34)
具有S228P的人IgG4恒定区 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVT <u>PSSSLG</u> TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV

<p>FLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 35)</p>
<p>人κ恒定区 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 36)</p>
<p>人LAG3 ATGTGGGAGGCCAGTTCCTGGGCCTGCTGTTCTGCAGCCCCTGTGGGTGGCCCC GTGAAGCCCCTGCAGCCCGGCGCCGAGGTGCCCGTGGTGTGGGCCAGGAGGGCGC CCCCGCCAGCTGCCCTGCAGCCCCACCATCCCCCTGCAGGACCTGAGCCTGCTGCG CCGCGCCGGCGTGACCTGGCAGCACCAGCCGACAGCGGCCCCCCCGCCGCCGCC CCGCCACCCCCTGGCCCCGGCCCCACCCCGCCGCCCCAGCAGCTGGGGCCCC GCCCCCGCCGCTACACCGTGCTGAGCGTGGGCCCGGCGGCCTGCGCAGCGGCCGC CTGCCCTGCAGCCCCGCGTGCAGCTGGACGAGCGCGGCCGCCAGCGCGGGGACTT CAGCCTGTGGCTGCGCCCCGCCGCGCGCCGACGCCGGCGAGTACCGCGCCGCCG TGCACCTGCGCGACCGCGCCCTGAGCTGCCGCCTGCGCCTGCGCCTGGGCCAGGCCA GCATGACCGCCAGCCCCCGGCAGCCTGCGCGCCAGCGACTGGGTGATCCTGAAC TGCAGCTTCAGCCGCCCCGACCGCCCCGCCAGCGTGCCTGTTCCGCAACCGCGGC CAGGGCCGCGTGCCCGTGCAGGAGAGCCCCACCACCACCTGGCCGAGAGCTTCT GTTCTGCCCCAGGTGAGCCCCATGGACAGCGGCCCTGGGGCTGCATCCTGACCTA CCGCGACGGCTTCAACGTGAGCATCATGTACAACCTGACCGTGCTGGGCCTGGAGC CCCCACCCCCTGACCGTGTACGCCGGCGCCGGCAGCCGCGTGGGCCTGCCCTGCC GCCTGCCCCGCCGCGTGGGCACCCGAGCTTCTGACCGCCAAGTGGACCCCCCCCC GCGGCGGCCCGACCTGCTGGTGACCGGCGACAACGGCGACTTACCCTGCGCCTG GAGGACGTGAGCCAGGCCAGGCCGACCTACACCTGCCACATCCACCTGCAGGA GCAGCAGCTGAACGCCACCGTGACCCTGGCCATCATCACCGTGACCCCCAAGAGCT TCGGCAGCCCCGGCAGCCTGGGCAAGCTGCTGTGCGAGGTGACCCCCGTGAGCGGC CAGGAGCGCTTCGTGTGGAGCAGCCTGGACACCCCCAGCCAGCGCAGCTTCAGCGG CCCCTGGCTGGAGGCCAGGAGGCCAGCTGCTGAGCCAGCCCTGGCAGTGCCAGC TGTACCAGGGCGAGCGCCTGCTGGGCGCCGCCGTGTACTTACCAGCTGAGCAGC CCCGGCGCCAGCGCAGCGGCCGCGCCCCGGCGCCCTGCCCGCCGCCACCTGCT GCTGTTCTGATCCTGGGCGTGCTGAGCCTGCTGCTGCTGGTGACCGGCGCCTTCGG CTTCCACCTGTGGCGCCGCCAGTGGCGCCCCCGCCGCTTACGCGCCCTGGAGCAGGG CATCCACCCCCCAGGCCAGAGCAAGATCGAGGAGCTGGAGCAGGAGCCCCGAGC CCGAGCCCAGCCCCGAGCCCAGCCCCGAGCCCAGCCCCGAGCCCAGCCGAGCAGCTGTAA (SEQ ID NO:37)</p>
<p>猴LAG3</p>

[0274]

[0275]

ATGTGGGAGGCCAGTTCCTGGGCCTGCTGTTCTGCAGCCCCTGTGGGTGGCCCC
 GTGAAGCCCCCAGCCCGGCGCCGAGATCAGCGTGGTGTGGGCCAGGAGGGCGC
 CCCCAGCTGCCCTGCAGCCCCACCATCCCCCTGCAGGACCTGAGCCTGCTGCG
 CCGCGCCGGCGTGACCTGGCAGCACCAGCCGACAGCGGCCCCCCCGCCCCGCC
 CCGGCCACCCCCCGCCCCGGCCACCGCCCCGCCGCCCTACAGCTGGGGCCCC
 GCCCCCGCCGCTACACCGTGCTGAGCGTGGGCCCGGCGGCCTGCGCAGCGGCCG
 CTGCCCCTGCAGCCCCGCGTGCAGCTGGACGAGCGCGGCCGCCAGCGCGGCGACTT
 CAGCCTGTGGCTGCGCCCCGCCGCCGCGCCGACGCCGGCGAGTACCGCGCCACCG
 TGCACCTGCGCGACCGCGCCCTGAGCTGCCGCCTGCGCCTGCGCGTGGGCCAGGCC
 AGCATGACCGCCAGCCCCCGGCAGCCTGCGCACCAGCGACTGGGTGATCCTGAA
 CTGCAGCTTCAGCCGCCCGACCGCCCCGCCAGCGTGCCTGGTTCCGCAGCCGCG
 CCAGGGCCGCGTGCCTGTGCAGGGCAGCCCCACCACCACCTGGCCGAGAGCTTCC
 TGTTCCTGCCCCACGTGGGCCCATGGACAGCGGCCTGTGGGGCTGCATCCTGACCT
 ACCGCGACGGCTTCAACGTGAGCATCATGTACAACCTGACCGTGCTGGGCCTGGAG
 CCGGCCACCCCCCTGACCGTGTACGCCGGCGCCGGCAGCCGCGTGGAGCTGCCCTGC
 CGCCTGCCCCCGCCGTGGGCACCCAGAGCTTCTGACCGCCAAGTGGGGCCCCCCCC
 GGCGGCGGCCCGACCTGCTGGTGGCCGGCGACAACGGCGACTTCACCCTGCGCCT
 GGAGGACGTGAGCCAGGCCAGGCCGGCACCTACATCTGCCACATCCGCCTGCAGG
 GCCAGCAGCTGAACGCCACCGTGACCCTGGCCATCATCACCGTGACCCCCAAGAGC
 TTCGGCAGCCCCGGCAGCCTGGGCAAGCTGCTGTGCGAGGTGACCCCCGCCAGCGG
 CCAGGAGACTTCGTGTGGAGCCCCCTGAACACCCCCAGCCAGCGCAGCTTCAGCG
 GCCCCTGGCTGGAGGCCAGGAGGCCAGCTGCTGAGCCAGCCCTGGCAGTGCCAG
 CTGCACCAGGGCGAGACCCTGCTGGGCGCCGCCGTGTACTTCACCGAGCTGAGCAG
 CCCCCGCGCCAGCGCAGCGGCCGCGCCCCGGCGCCCTGCGCGCCGGCCACCTGC
 CCCTGTTCTGATCCTGGGCGTGCTGTTCTGCTGCTGCTGGTGACCGGCGCCTTCGG
 CTTCCACCTGTGGCGCCGCCAGTGGCGCCCCCGCCGCTTCAGCGCCCTGGAGCAGGG
 CATCCACCCCCCAGGCCAGAGCAAGATCGAGGAGCTGGAGCAGGAGCCCCGAGC
 TGGAGCCCAGCCCCAGCTGGAGCGCAGCTGGGCCCGAGCCGAGCCCCGGCCCC
 GAGCCCGAGCCCGAGCAGCTGTAA (SEQ ID NO: 38)

小鼠LAG3
 ATGCGGAGGACCTGCTGCTGGGCTTCCTGCTGCTGGGCCTGCTGTGGGAGGCCCCC
 GTGGTGAGCAGCGGCCCGGCAAGGAGCTGCCCGTGGTGTGGGCCAGGAGGGCGC
 CCCCCTGCACCTGCCCTGCAGCCTGAAGAGCCCCAACCTGGACCCCAACTCCTGCG
 CCGCGGCGGCGTGATCTGGCAGCACCAGCCGACAGCGGCCAGCCACCCCCATCC
 CCGCCCTGGACCTGCACCAGGGCATGCCAGCCCCCGCCAGCCCGCCCCGGCCGCT
 ACACCGTGCTGAGCGTGGCCCCGGCGGCCTGCGCAGCGGCCGCCAGCCCTGCAC
 CCCCACGTGCAGCTGGAGGAGCGCGCCCTGCAGCGCGGCGACTTCAGCCTGTGGCT
 GCGCCCCGCCCTGCGCACCGACGCCGGCGAGTACCACGCCACCGTGCGCCTGCCCA
 ACCGCGCCCTGAGCTGCAGCCTGCGCCTGCGCGTGGGCCAGGCCAGCATGATCGCC
 AGCCCCAGCGGCGTGCTGAAGCTGAGCGACTGGGTGCTGCTGAACTGCAGCTTCAG

[0276]

```

CCGCCCCGACCGCCCCGTGAGCGTGCCTGGTTCCAGGGCCAGAACCGCGTGCCCG
TGTACAACAGCCCCCGCCACTTCTGGCCGAGACCTTCCTGCTGCTGCCCCAGGTGA
GCCCCCTGGACAGCGGCACCTGGGGCTGCGTGCTGACCTACCGCGACGGCTTCAAC
GTGAGCATCACCTACAACCTGAAGGTGCTGGGCCTGGAGCCCGTGGCCCCCCTGAC
CGTGTACGCCGCCGAGGGCAGCCGCGTGGAGCTGCCCTGCCACCTGCCCCCGGCG
TGGGCACCCCCAGCCTGCTGATCGCCAAGTGGACCCCCCGGCGGCGGCCCGGAG
CTGCCCCGTGGCCGCAAGAGCGGCAACTTCACCCTGCACCTGGAGGCCGTGGGCCT
GGCCCAGGCCGGCACCTACACCTGCAGCATCCACCTGCAGGGCCAGCAGCTGAACG
CCACCGTGACCCTGGCCGTGATCACCGTGACCCCCAAGAGCTTCGGCCTGCCCGGCA
GCCGCGGCAAGCTGCTGTGCGAGGTGACCCCCGCCAGCGGCAAGGAGCGCTTCGTG
TGGCGCCCCCTGAACAACCTGAGCCGCAGCTGCCCCGGCCCCGTGCTGGAGATCCA
GGAGGCCCGCCTGCTGGCCGAGCGCTGGCAGTGCCAGCTGTACGAGGGCCAGCGCC
TGCTGGGCGCCACCGTGTACGCCGCCGAGAGCAGCAGCGGCGCCACAGCGCCCCG
CGCATCAGCGGCACCTGAAGGGCGGCCACCTGGTGCTGGTGCTGATCCTGGGCGC
CCTGAGCCTGTTCTGCTGGTGGCCGGCGCCTTCGGCTTCCACTGGTGGCGCAAGCA
GCTGCTGCTGCGCCGCTTACGCGCCCTGGAGCACGGCATCCAGCCCTTCCCCGCCCA
GCGCAAGATCGAGGAGCTGGAGCGGAGCTGGAGACCGAGATGGGCCAGGAGCCC
GAGCCCGAGCCCGAGCCCCAGCTGGAGCCCGAGCCCCGCCAGCTGTAA (SEQ ID
NO: 39)

```

SEQ ID NOs:1-36: 氨基酸序列, SEQ ID NOs:37-39: 核苷酸序列

[0277] 尽管本申请已结合一个或多个实施方式进行了描述,应当理解的是,本申请不限于这些实施方式,且上述描述意在涵盖包括在所附权利要求的精神和范围内的所有其他可选择形式、修饰和等同物。本文引用的所有文献均通过引用的方式全部并入本文。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 北京天广实生物技术股份有限公司
- [0003] 北京华放天实生物制药有限责任公司
- [0004] <120> 结合LAG3的抗体及其用途
- [0005] <130> 55556 00033
- [0006] <160> 39
- [0007] <170> PatentIn版本3.5
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 5
- [0010] <212> PRT
- [0011] <213> 人工序列
- [0012] <220>
- [0013] <223> 小鼠、嵌合和人源化(包括亲和力成熟)101F4抗体的VH-CDR1
- [0014] <400> 1
- [0015] Asp Tyr Glu Met His
- [0016] 1 5
- [0017] <210> 2
- [0018] <211> 17
- [0019] <212> PRT
- [0020] <213> 人工序列
- [0021] <220>
- [0022] <223> 小鼠、嵌合和人源化(包括亲和力成熟)101F4抗体的VH-CDR2
- [0023] <400> 2
- [0024] Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
- [0025] 1 5 10 15
- [0026] Gly
- [0027] <210> 3
- [0028] <211> 5
- [0029] <212> PRT
- [0030] <213> 人工序列
- [0031] <220>
- [0032] <223> 小鼠、嵌合和人源化101F4抗体的VH-CDR3
- [0033] <400> 3
- [0034] Ala Gly Trp Gly Tyr
- [0035] 1 5
- [0036] <210> 4
- [0037] <211> 5
- [0038] <212> PRT
- [0039] <213> 人工序列
- [0040] <220>
- [0041] <223> 亲和力成熟化的人源化101F4抗体的VH-CDR3

[0042]	<400>	4	
[0043]	Thr Gly Trp Asn Asp		
[0044]	1	5	
[0045]	<210>	5	
[0046]	<211>	11	
[0047]	<212>	PRT	
[0048]	<213>	人工序列	
[0049]	<220>		
[0050]	<223>	小鼠、嵌合和人源化(包括亲和力成熟)101F4抗体的VL-CDR1	
[0051]	<400>	5	
[0052]	Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser		
[0053]	1	5	10
[0054]	<210>	6	
[0055]	<211>	7	
[0056]	<212>	PRT	
[0057]	<213>	人工序列	
[0058]	<220>		
[0059]	<223>	小鼠、嵌合和人源化(包括亲和力成熟)101F4抗体的VL-CDR2	
[0060]	<400>	6	
[0061]	Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp		
[0062]	1	5	
[0063]	<210>	7	
[0064]	<211>	9	
[0065]	<212>	PRT	
[0066]	<213>	人工序列	
[0067]	<220>		
[0068]	<223>	小鼠、嵌合和人源化101F4抗体的VL-CDR3	
[0069]	<400>	7	
[0070]	Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr		
[0071]	1	5	
[0072]	<210>	8	
[0073]	<211>	9	
[0074]	<212>	PRT	
[0075]	<213>	人工序列	
[0076]	<220>		
[0077]	<223>	亲和力成熟化的人源化101F4抗体的VL-CDR3	
[0078]	<400>	8	
[0079]	Gln Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe Thr		
[0080]	1	5	
[0081]	<210>	9	
[0082]	<211>	114	
[0083]	<212>	PRT	

[0084] <213> 人工序列
 [0085] <220>
 [0086] <223> 小鼠和嵌合101F4抗体的VH
 [0087] <400> 9
 [0088] Glu Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 [0089] 1 5 10 15
 [0090] Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [0091] 20 25 30
 [0092] Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val Tyr Gly Leu Glu Trp Met
 [0093] 35 40 45
 [0094] Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Arg Phe
 [0095] 50 55 60
 [0096] Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0097] 65 70 75 80
 [0098] Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0099] 85 90 95
 [0100] Thr Gly Ala Gly Trp Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 [0101] 100 105 110
 [0102] Ser Ser
 [0103] <210> 10
 [0104] <211> 114
 [0105] <212> PRT
 [0106] <213> 人工序列
 [0107] <220>
 [0108] <223> 人源化抗体101F4H0L0的VH
 [0109] <400> 10
 [0110] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0111] 1 5 10 15
 [0112] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [0113] 20 25 30
 [0114] Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 [0115] 35 40 45
 [0116] Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Arg Phe
 [0117] 50 55 60
 [0118] Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 [0119] 65 70 75 80
 [0120] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0121] 85 90 95
 [0122] Ala Thr Ala Gly Trp Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 [0123] 100 105 110
 [0124] Ser Ser
 [0125] <210> 11

[0126] <211> 114
 [0127] <212> PRT
 [0128] <213> 人工序列
 [0129] <220>
 [0130] <223> 人源化抗体101F4H2L2和101F4H2L3的VH
 [0131] <400> 11
 [0132] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0133] 1 5 10 15
 [0134] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [0135] 20 25 30
 [0136] Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 [0137] 35 40 45
 [0138] Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Arg Phe
 [0139] 50 55 60
 [0140] Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 [0141] 65 70 75 80
 [0142] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0143] 85 90 95
 [0144] Ala Thr Ala Gly Trp Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 [0145] 100 105 110
 [0146] Ser Ser
 [0147] <210> 12
 [0148] <211> 114
 [0149] <212> PRT
 [0150] <213> 人工序列
 [0151] <220>
 [0152] <223> 人源化抗体101F4H3L2和101F4H3L3的VH
 [0153] <400> 12
 [0154] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0155] 1 5 10 15
 [0156] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [0157] 20 25 30
 [0158] Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 [0159] 35 40 45
 [0160] Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Arg Phe
 [0161] 50 55 60
 [0162] Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 [0163] 65 70 75 80
 [0164] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0165] 85 90 95
 [0166] Ala Gly Ala Gly Trp Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 [0167] 100 105 110

[0168] Ser Ser
 [0169] <210> 13
 [0170] <211> 114
 [0171] <212> PRT
 [0172] <213> 人工序列
 [0173] <220>
 [0174] <223> 亲和力成熟化的人源化抗体101F4H2L2-8和101F4H2L3-8的VH
 [0175] <400> 13
 [0176] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0177] 1 5 10 15
 [0178] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [0179] 20 25 30
 [0180] Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 [0181] 35 40 45
 [0182] Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Arg Phe
 [0183] 50 55 60
 [0184] Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 [0185] 65 70 75 80
 [0186] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0187] 85 90 95
 [0188] Ala Thr Thr Gly Trp Asn Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 [0189] 100 105 110
 [0190] Ser Ser
 [0191] <210> 14
 [0192] <211> 114
 [0193] <212> PRT
 [0194] <213> 人工序列
 [0195] <220>
 [0196] <223> 亲和力成熟化的人源化抗体101F4H3L3-8的VH
 [0197] <400> 14
 [0198] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0199] 1 5 10 15
 [0200] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [0201] 20 25 30
 [0202] Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 [0203] 35 40 45
 [0204] Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ile Val Tyr Asn Gln Arg Phe
 [0205] 50 55 60
 [0206] Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 [0207] 65 70 75 80
 [0208] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0209] 85 90 95

[0210]	Ala Gly Thr Gly Trp Asn Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
[0211]	100 105 110
[0212]	Ser Ser
[0213]	<210> 15
[0214]	<211> 107
[0215]	<212> PRT
[0216]	<213> 人工序列
[0217]	<220>
[0218]	<223> 小鼠和嵌合101F4抗体的VL
[0219]	<400> 15
[0220]	Asp Ile Val Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
[0221]	1 5 10 15
[0222]	Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
[0223]	20 25 30
[0224]	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
[0225]	35 40 45
[0226]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0227]	50 55 60
[0228]	Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Phe
[0229]	65 70 75 80
[0230]	Glu Asp Met Gly Leu Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe
[0231]	85 90 95
[0232]	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0233]	100 105
[0234]	<210> 16
[0235]	<211> 107
[0236]	<212> PRT
[0237]	<213> 人工序列
[0238]	<220>
[0239]	<223> 人源化抗体101F4H0L0的VL
[0240]	<400> 16
[0241]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0242]	1 5 10 15
[0243]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
[0244]	20 25 30
[0245]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0246]	35 40 45
[0247]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0248]	50 55 60
[0249]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0250]	65 70 75 80
[0251]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe

[0252]		85	90	95
[0253]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0254]		100	105	
[0255]	<210>	17		
[0256]	<211>	107		
[0257]	<212>	PRT		
[0258]	<213>	人工序列		
[0259]	<220>			
[0260]	<223>	人源化抗体101F4H2L2和101F4H3L2的VL		
[0261]	<400>	17		
[0262]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0263]	1	5	10	15
[0264]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr			
[0265]		20	25	30
[0266]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[0267]		35	40	45
[0268]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0269]		50	55	60
[0270]	Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0271]	65	70	75	80
[0272]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe			
[0273]		85	90	95
[0274]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0275]		100	105	
[0276]	<210>	18		
[0277]	<211>	107		
[0278]	<212>	PRT		
[0279]	<213>	人工序列		
[0280]	<220>			
[0281]	<223>	亲和力成熟抗体101F4H2L2-8的VL		
[0282]	<400>	18		
[0283]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0284]	1	5	10	15
[0285]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr			
[0286]		20	25	30
[0287]	Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[0288]		35	40	45
[0289]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0290]		50	55	60
[0291]	Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0292]	65	70	75	80
[0293]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe			

[0294]		85	90	95
[0295]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0296]		100	105	
[0297]	<210> 19			
[0298]	<211> 107			
[0299]	<212> PRT			
[0300]	<213> 人工序列			
[0301]	<220>			
[0302]	<223> 人源化抗体101F4H2L3和101F4H3L3的VL			
[0303]	<400> 19			
[0304]	Asp Ile Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0305]	1	5	10	15
[0306]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr			
[0307]		20	25	30
[0308]	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[0309]		35	40	45
[0310]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0311]	50	55	60	
[0312]	Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0313]	65	70	75	80
[0314]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe			
[0315]		85	90	95
[0316]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0317]		100	105	
[0318]	<210> 20			
[0319]	<211> 107			
[0320]	<212> PRT			
[0321]	<213> 人工序列			
[0322]	<220>			
[0323]	<223> 亲和力成熟抗体101F4H2L3-8和101F4H3L3-8的VL			
[0324]	<400> 20			
[0325]	Asp Ile Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0326]	1	5	10	15
[0327]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr			
[0328]		20	25	30
[0329]	Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[0330]		35	40	45
[0331]	Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0332]	50	55	60	
[0333]	Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0334]	65	70	75	80
[0335]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Phe			

[0336]		85	90	95
[0337]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0338]		100	105	
[0339]	<210>	21		
[0340]	<211>	5		
[0341]	<212>	PRT		
[0342]	<213>	人工序列		
[0343]	<220>			
[0344]	<223>	小鼠、嵌合和人源化134G10抗体的VH-CDR1		
[0345]	<400>	21		
[0346]	Ser Phe Gly Met Ser			
[0347]	1	5		
[0348]	<210>	22		
[0349]	<211>	17		
[0350]	<212>	PRT		
[0351]	<213>	人工序列		
[0352]	<220>			
[0353]	<223>	小鼠、嵌合和人源化134G10抗体的VH-CDR2		
[0354]	<400>	22		
[0355]	Ile Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ile Leu Lys			
[0356]	1	5	10	15
[0357]	Gly			
[0358]	<210>	23		
[0359]	<211>	11		
[0360]	<212>	PRT		
[0361]	<213>	人工序列		
[0362]	<220>			
[0363]	<223>	小鼠、嵌合和人源化134G10抗体的VH-CDR3		
[0364]	<400>	23		
[0365]	Val Tyr Ser Asp Tyr Asp Gly Arg Phe Asp Tyr			
[0366]	1	5	10	
[0367]	<210>	24		
[0368]	<211>	17		
[0369]	<212>	PRT		
[0370]	<213>	人工序列		
[0371]	<220>			
[0372]	<223>	小鼠、嵌合和人源化134G10抗体的VL-CDR1		
[0373]	<400>	24		
[0374]	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu			
[0375]	1	5	10	15
[0376]	Ala			
[0377]	<210>	25		

[0378]	<211>	7
[0379]	<212>	PRT
[0380]	<213>	人工序列
[0381]	<220>	
[0382]	<223>	小鼠、嵌合和人源化134G10抗体的VL-CDR2
[0383]	<400>	25
[0384]	Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser	
[0385]	1	5
[0386]	<210>	26
[0387]	<211>	9
[0388]	<212>	PRT
[0389]	<213>	人工序列
[0390]	<220>	
[0391]	<223>	小鼠、嵌合和人源化134G10抗体的VL-CDR3
[0392]	<400>	26
[0393]	Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr	
[0394]	1	5
[0395]	<210>	27
[0396]	<211>	120
[0397]	<212>	PRT
[0398]	<213>	人工序列
[0399]	<220>	
[0400]	<223>	小鼠和嵌合134G10抗体的VH
[0401]	<400>	27
[0402]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly	
[0403]	1	5 10 15
[0404]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe	
[0405]		20 25 30
[0406]	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val	
[0407]		35 40 45
[0408]	Gly Ile Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ile Leu	
[0409]		50 55 60
[0410]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr	
[0411]		65 70 75 80
[0412]	Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	
[0413]		85 90 95
[0414]	Ala Arg Val Tyr Ser Asp Tyr Asp Gly Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln	
[0415]		100 105 110
[0416]	Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	
[0417]		115 120
[0418]	<210>	28
[0419]	<211>	120

[0420] <212> PRT
 [0421] <213> 人工序列
 [0422] <220>
 [0423] <223> 人源化抗体134G10H0L0的VH
 [0424] <400> 28
 [0425] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 [0426] 1 5 10 15
 [0427] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 [0428] 20 25 30
 [0429] Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0430] 35 40 45
 [0431] Ser Ile Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ile Leu
 [0432] 50 55 60
 [0433] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 [0434] 65 70 75 80
 [0435] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0436] 85 90 95
 [0437] Ala Arg Val Tyr Ser Asp Tyr Asp Gly Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 [0438] 100 105 110
 [0439] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0440] 115 120
 [0441] <210> 29
 [0442] <211> 120
 [0443] <212> PRT
 [0444] <213> 人工序列
 [0445] <220>
 [0446] <223> 人源化抗体134G10H2L2和134G10H2L3的VH
 [0447] <400> 29
 [0448] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 [0449] 1 5 10 15
 [0450] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 [0451] 20 25 30
 [0452] Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 [0453] 35 40 45
 [0454] Ser Ile Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ile Leu
 [0455] 50 55 60
 [0456] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 [0457] 65 70 75 80
 [0458] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0459] 85 90 95
 [0460] Ala Arg Val Tyr Ser Asp Tyr Asp Gly Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 [0461] 100 105 110

[0462]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0463]	115 120
[0464]	<210> 30
[0465]	<211> 120
[0466]	<212> PRT
[0467]	<213> 人工序列
[0468]	<220>
[0469]	<223> 人源化抗体134G10H3L2和134G10H3L3的VH
[0470]	<400> 30
[0471]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0472]	1 5 10 15
[0473]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
[0474]	20 25 30
[0475]	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
[0476]	35 40 45
[0477]	Gly Ile Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ile Leu
[0478]	50 55 60
[0479]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0480]	65 70 75 80
[0481]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0482]	85 90 95
[0483]	Ala Arg Val Tyr Ser Asp Tyr Asp Gly Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[0484]	100 105 110
[0485]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0486]	115 120
[0487]	<210> 31
[0488]	<211> 113
[0489]	<212> PRT
[0490]	<213> 人工序列
[0491]	<220>
[0492]	<223> 小鼠和嵌合134G10抗体的VL
[0493]	<400> 31
[0494]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly
[0495]	1 5 10 15
[0496]	Glu Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[0497]	20 25 30
[0498]	Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0499]	35 40 45
[0500]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0501]	50 55 60
[0502]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0503]	65 70 75 80

[0504]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
[0505]	85 90 95
[0506]	Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
[0507]	100 105 110
[0508]	Lys
[0509]	<210> 32
[0510]	<211> 113
[0511]	<212> PRT
[0512]	<213> 人工序列
[0513]	<220>
[0514]	<223> 人源化抗体134G10H0L0的VL
[0515]	<400> 32
[0516]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0517]	1 5 10 15
[0518]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[0519]	20 25 30
[0520]	Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0521]	35 40 45
[0522]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0523]	50 55 60
[0524]	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0525]	65 70 75 80
[0526]	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
[0527]	85 90 95
[0528]	Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0529]	100 105 110
[0530]	Lys
[0531]	<210> 33
[0532]	<211> 113
[0533]	<212> PRT
[0534]	<213> 人工序列
[0535]	<220>
[0536]	<223> 人源化抗体134G10H2L2和134G10H3L2的VL
[0537]	<400> 33
[0538]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0539]	1 5 10 15
[0540]	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[0541]	20 25 30
[0542]	Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0543]	35 40 45
[0544]	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[0545]	50 55 60

[0588]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[0589]	50 55 60
[0590]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
[0591]	65 70 75 80
[0592]	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[0593]	85 90 95
[0594]	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[0595]	100 105 110
[0596]	Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[0597]	115 120 125
[0598]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[0599]	130 135 140
[0600]	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[0601]	145 150 155 160
[0602]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
[0603]	165 170 175
[0604]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[0605]	180 185 190
[0606]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
[0607]	195 200 205
[0608]	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[0609]	210 215 220
[0610]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
[0611]	225 230 235 240
[0612]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[0613]	245 250 255
[0614]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[0615]	260 265 270
[0616]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0617]	275 280 285
[0618]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
[0619]	290 295 300
[0620]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0621]	305 310 315 320
[0622]	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0623]	325
[0624]	<210> 36
[0625]	<211> 107
[0626]	<212> PRT
[0627]	<213> 人工序列
[0628]	<220>
[0629]	<223> 人κ恒定区

[0630]	<400>	36	
[0631]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
[0632]	1	5	10 15
[0633]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
[0634]		20	25 30
[0635]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[0636]		35	40 45
[0637]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[0638]		50	55 60
[0639]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
[0640]		65	70 75 80
[0641]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
[0642]		85	90 95
[0643]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0644]		100	105
[0645]	<210>	37	
[0646]	<211>	1578	
[0647]	<212>	DNA	
[0648]	<213>	智人(Homo sapiens)	
[0649]	<400>	37	
[0650]	atgtgggagg cccagttcct gggcctgctg ttctgcagc ccctgtgggt ggccccctg	60	
[0651]	aagcccctgc agcccggcgc cgaggtgcc gtggtgtggg cccaggagg cgccccgcc	120	
[0652]	cagctgccct gcagcccac catccccctg caggacctga gcctgctgcg ccgcgccggc	180	
[0653]	gtgacctggc agcaccagcc cgacagcggc cccccgccc ccgccccgg ccacccccctg	240	
[0654]	gccccggcc cccaccccgc cccccagc agctggggcc cccgccccg ccgctacacc	300	
[0655]	gtgctgagcg tgggccccgg cggcctgcgc agcggccgcc tgcccctgca gccccgctg	360	
[0656]	cagctggacg agcgcggccg ccagcgcggc gacttcagcc tgtggctgcg ccccgccgc	420	
[0657]	cgcgccgacg ccggcgagta ccgcccggc gtgcacctgc gcgaccgcgc cctgagctgc	480	
[0658]	cgctgcgcc tgcgctggg ccaggccagc atgaccgcca gccccccgg cagcctgcgc	540	
[0659]	gccagcgact gggatgacct gaactgcagc ttcagccgcc ccgaccgcc cgcagcgtg	600	
[0660]	cactggttcc gcaaccgagg ccaggggcgc gtgcccgtgc gcgagagccc ccaccaccac	660	
[0661]	ctggccgaga gcttctgtt cctgccccag gtgagccca tggacagcgg cccctggggc	720	
[0662]	tgatcctga cctaccgca cggcttcaac gtgagcatca tgtacaacct gaccgtgctg	780	
[0663]	ggcctggagc cccccaccc cctgaccgtg tacgcccggc ccggcagccg cgtgggctg	840	
[0664]	ccctgccgcc tgcccggcg cgtgggcacc cgcagcttcc tgaccgcaa gtggaccccc	900	
[0665]	ccggcggcg gccccacct gctggtgacc ggcgacaacg gcgacttac cctgcgctg	960	
[0666]	gaggacgtga gccaggccca ggccggcacc tacacctgcc acatccacct gcaggagcag	1020	
[0667]	cagctgaacg ccaccgtgac cctggccatc atcaccgtga cccccaagag cttcggcagc	1080	
[0668]	ccggcagcc tgggcaagct gctgtgagc gtgaccccc tgagcggcca ggagcgttc	1140	
[0669]	gtgtggagca gcctggacac cccagccag cgcagcttca gcggcccctg gctggaggcc	1200	
[0670]	caggaggccc agctgtgag ccagccctgg cagtgccagc tgtaccaggc cgagcgcctg	1260	
[0671]	ctgggcggcg ccgtgtactt caccgagctg agcagcccc gcgcccagcg cagcggccgc	1320	

[0672]	gccccggcg ccctgcccgc cggccacctg ctgctgttcc tgatcctggg cgtgctgagc	1380
[0673]	ctgtctctgc tggtagaccg cgccttcggc ttccacctgt ggcgccgcca gtggcgcccc	1440
[0674]	cgccgcttca gcgccctgga gcagggcatc ccccccccc aggcccagag caagatcgag	1500
[0675]	gagctggagc aggagcccga gcccagagccc gagcccagc ccgagcccga gcccagagccc	1560
[0676]	gagcccagc agctgtaa	1578
[0677]	<210> 38	
[0678]	<211> 1602	
[0679]	<212> DNA	
[0680]	<213> 恒河猴(<i>Macaca mulatta</i>)	
[0681]	<400> 38	
[0682]	atgtgggagg cccagttcct gggcctgctg ttctgcagc ccctgtgggt ggccccctg	60
[0683]	aagccccccc agcccggcgc cgagatcagc gtggtgtggg cccaggagg cgccccgcc	120
[0684]	cagctgcct gcagccccac catccccctg caggacctga gcctgctgcg ccgcgccgcg	180
[0685]	gtgacctggc agcaccagcc cgacagcggc cccccgccc ccgccccgg ccaccccc	240
[0686]	gccccggcc accgccccgc cgccccctac agctggggcc cccgccccg ccgctacacc	300
[0687]	gtgtgagcg tgggccccgg cggcctgcgc agcggccgcc tgcccctgca gccccgctg	360
[0688]	cagctggacg agcgcggccg ccagcgcggc gacttcagcc tgttgctgcg ccccgccccg	420
[0689]	cgcgccgacg ccggcgagta ccgcgccacc gtgcacctgc gcgaccgcgc cctgagctgc	480
[0690]	cgctgcgcc tgcgctggg ccaggccagc atgaccgcca gccccccgg cagcctgcgc	540
[0691]	accagcgact gggtagcct gaactgcagc ttcagccgcc ccgaccgcc cgccagcgtg	600
[0692]	cactggttcc gcagccggg ccagggccgc gtgcccgtgc agggcagccc ccaccaccac	660
[0693]	ctggccgaga gcttctgtt cctgccccac gtgggcccc tggacagcgg cctgtggggc	720
[0694]	tgatcctga cctaccgca cggcttaac gtgagcatca tgtacaacct gaccgtgctg	780
[0695]	ggcctggagc ccgccacccc cctgaccgtg tacgccggcg ccggcagccc cgtggagctg	840
[0696]	ccctgccgcc tgccccgc cgtgggcacc cagagcttcc tgaccgcaa gtgggcccc	900
[0697]	cccggcggcg gccccacct gctggtggc ggcgacaac gcgacttac cctgcgctg	960
[0698]	gaggacgtga gccaggccca ggccggcacc tacatctgcc acatccgct gcagggccag	1020
[0699]	cagctgaacg ccacctgac cctggccatc atcaccgtga ccccaagag cttcggcagc	1080
[0700]	cccggcagcc tgggcaagct gctgtgcgag gtgaccccc ccagcggcca ggagcacttc	1140
[0701]	gtgtggagcc ccctgaacac ccccagccag cgcagcttca gcggccccctg gctggagcc	1200
[0702]	caggagccc agctgtgag ccagccctgg cagtgccagc tgcaccagg cgagaccctg	1260
[0703]	ctgggcgcc ccgtgtactt caccgagctg agcagcccc gcgcccagcg cagcggccgc	1320
[0704]	gccccggcg ccctgcgcgc cggccacctg ccctgttcc tgatcctggg cgtgctgttc	1380
[0705]	ctgtctctgc tggtagaccg cgccttcggc ttccacctgt ggcgccgcca gtggcgcccc	1440
[0706]	cgccgcttca gcgccctgga gcagggcatc ccccccccc aggcccagag caagatcgag	1500
[0707]	gagctggagc aggagcccga gctggagccc gagcccagc tggagcgcga gctgggcccc	1560
[0708]	gagcccagc ccggccccga gcccagagccc gagcagctgt aa	1602
[0709]	<210> 39	
[0710]	<211> 1566	
[0711]	<212> DNA	
[0712]	<213> 小鼠(<i>Mus musculus</i>)	
[0713]	<400> 39	

[0714]	atgCGcGagg acctgctgct gggcttcctg ctgctgggcc tgctgtggga ggccccctg	60
[0715]	gtgagcagcg gccccgcaa ggagctgccc gtggtgtggg cccaggagg cgccccctg	120
[0716]	cacctgcct gcagcctgaa gagccccaac ctggacccca acttctctgc cgcggcggc	180
[0717]	gtgatctggc agcaccagcc cgacagcggc cagcccacc ccatccccgc cctggacctg	240
[0718]	caccagggca tgcccagccc ccgcccagccc gccccggcc gctacaccgt gctgagcgtg	300
[0719]	gccccggcg gcctgcgag cggccgccc cccctgcacc cccacgtgca gctggaggag	360
[0720]	cgcggcctgc agcgcggcga cttagcctg tggctgcgcc ccgcccctgc caccgagcc	420
[0721]	ggcgagtacc acgccacgt gcgctgccc aaccgcgcc tgagctgcag cctgcgctg	480
[0722]	cgcgtgggcc aggccagcat gatcgccagc cccagcggcg tgctgaagct gagcgactgg	540
[0723]	gtgctgctga actgcagctt cagccgccc gaccgcccg tgagcgtgca ctggttcag	600
[0724]	ggccagaacc gcgtgcccgt gtacaacagc ccccgccact tctggccga gaccttctg	660
[0725]	ctgctgccc aggtgagccc cctggacagc ggcacctggg gctgcgtgct gacctaccg	720
[0726]	gacgcttca acgtgagcat cacctaac ctgaaggtgc tggcctgga gcccgaggc	780
[0727]	cccctgaccg tgtacccgc cgaggcagc cgcgtggagc tgccctgcca cctgcccc	840
[0728]	ggcgtggca cccccagcct gctgatgcc aagtggacc cccccggcg cggccccgag	900
[0729]	ctgcccgtgg ccgcaagag cggcaactc acctgcacc tggaggccgt gggcctggc	960
[0730]	cagccggca cctacacct cagcatcac ctgcaggcc agcagctgaa cgccacctg	1020
[0731]	accctggccg tgatcacct gacccccag agcttcggc tgcccgag ccgcggcaag	1080
[0732]	ctgctgtgag aggtgacccc cgccagcggc aaggagcgt tcgtgtggcg ccccctgaa	1140
[0733]	aacctgagc gcagctgccc cggcccctg ctggagatcc aggaggccc cctgctggc	1200
[0734]	gagcgtggc agtgccagct gtacgagggc cagcgcctgc tggcgccac cgtgtacgc	1260
[0735]	gccgagagca gcagcggcg ccacagcgc cccgcatca gcggcgacct gaaggcggc	1320
[0736]	cacctggtgc tggctgat cctggcgccc ctgagcctgt tctgctggt ggccggcgcc	1380
[0737]	ttcgcttcc actggtggcg caagcagctg ctgctgcgcc gcttcagcg cctggagc	1440
[0738]	ggcatccagc cttccccgc ccagcgaag atcgaggagc tggagcgcga gctggagacc	1500
[0739]	gagatggccc aggagcccga gcccagccc gagccccagc tggagcccga gccccccag	1560
[0740]	ctgtaa	1566

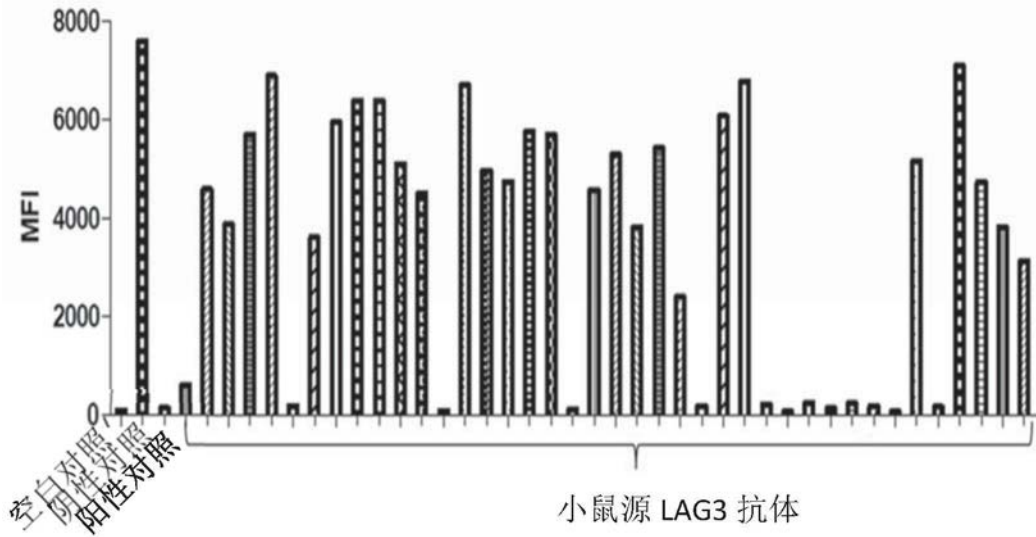


图1

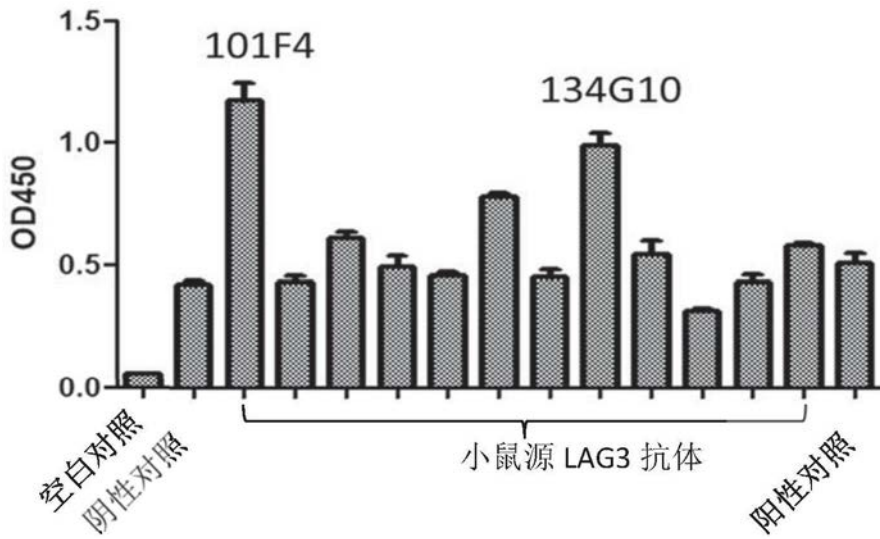


图2

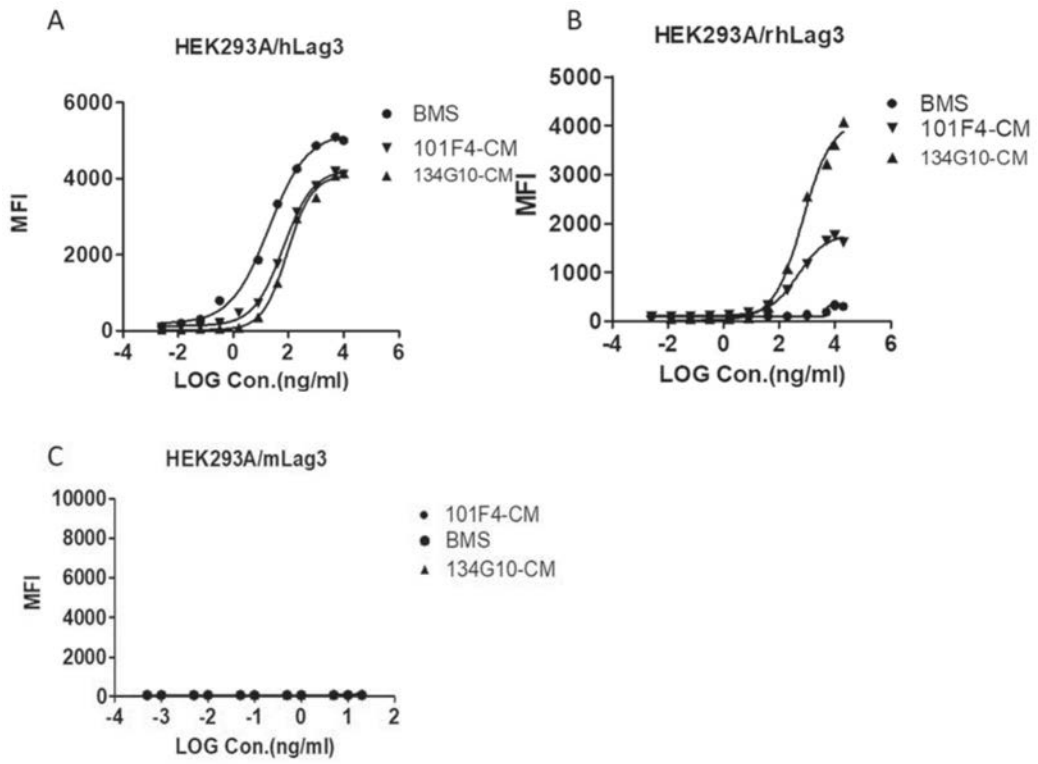


图3

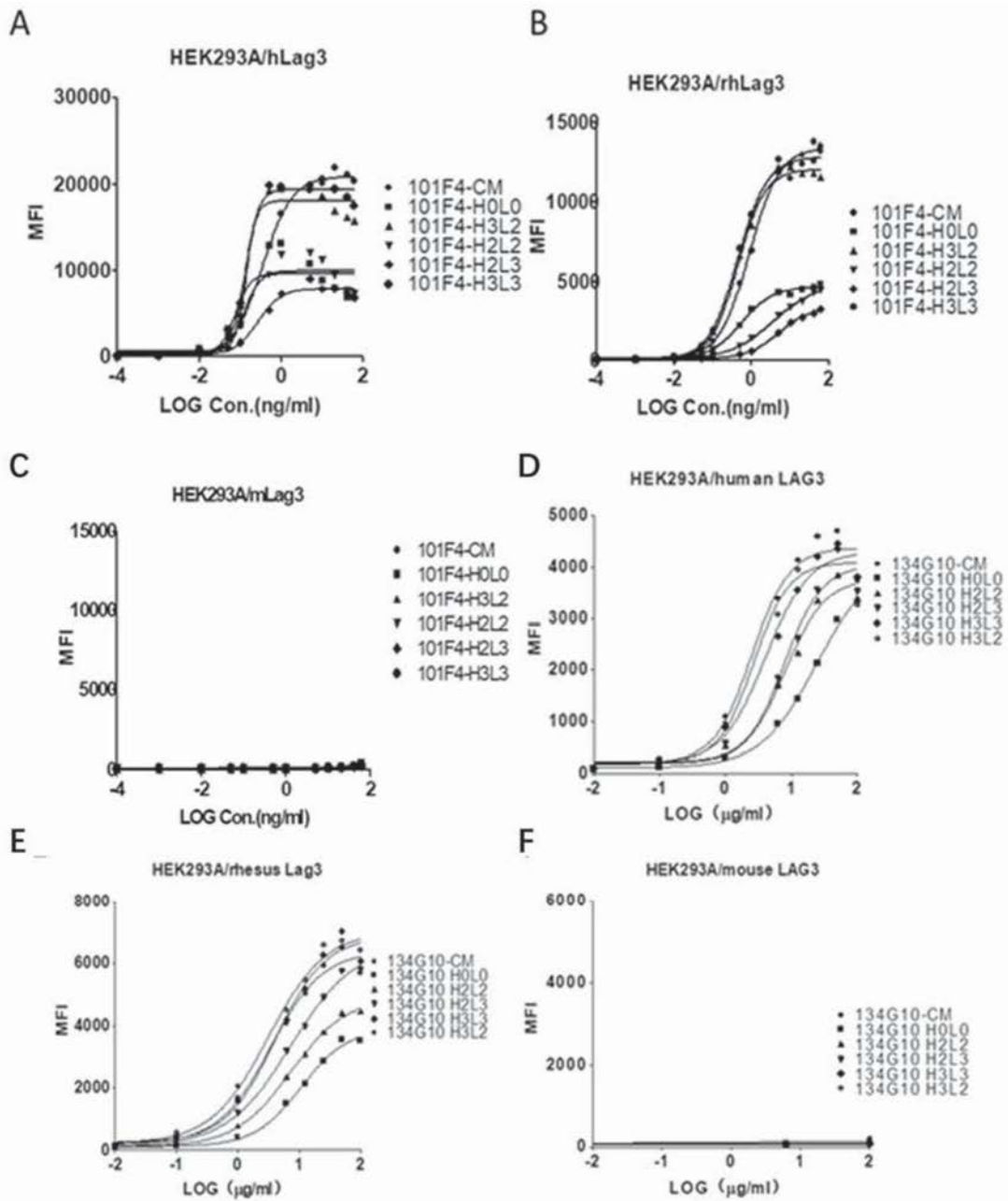


图4

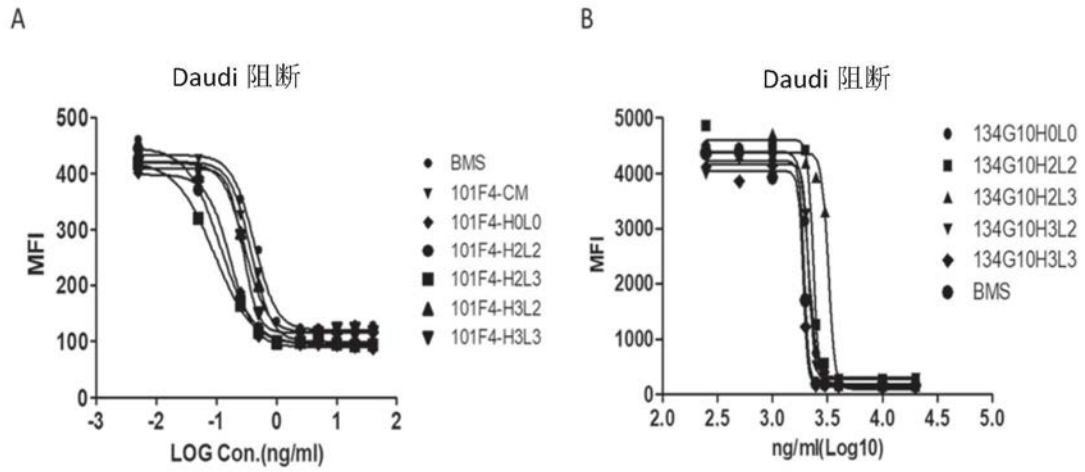


图5

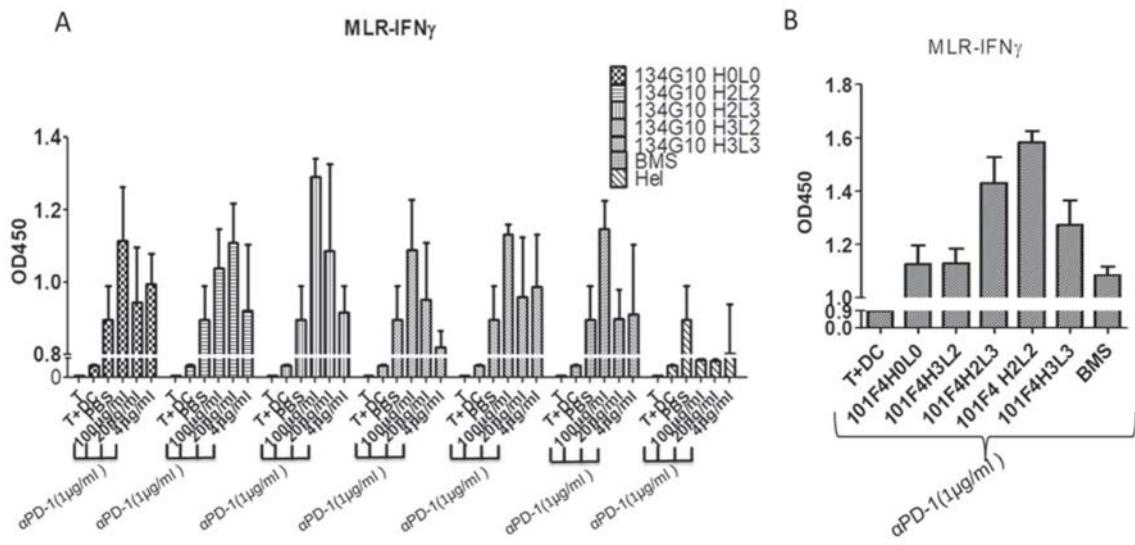


图6

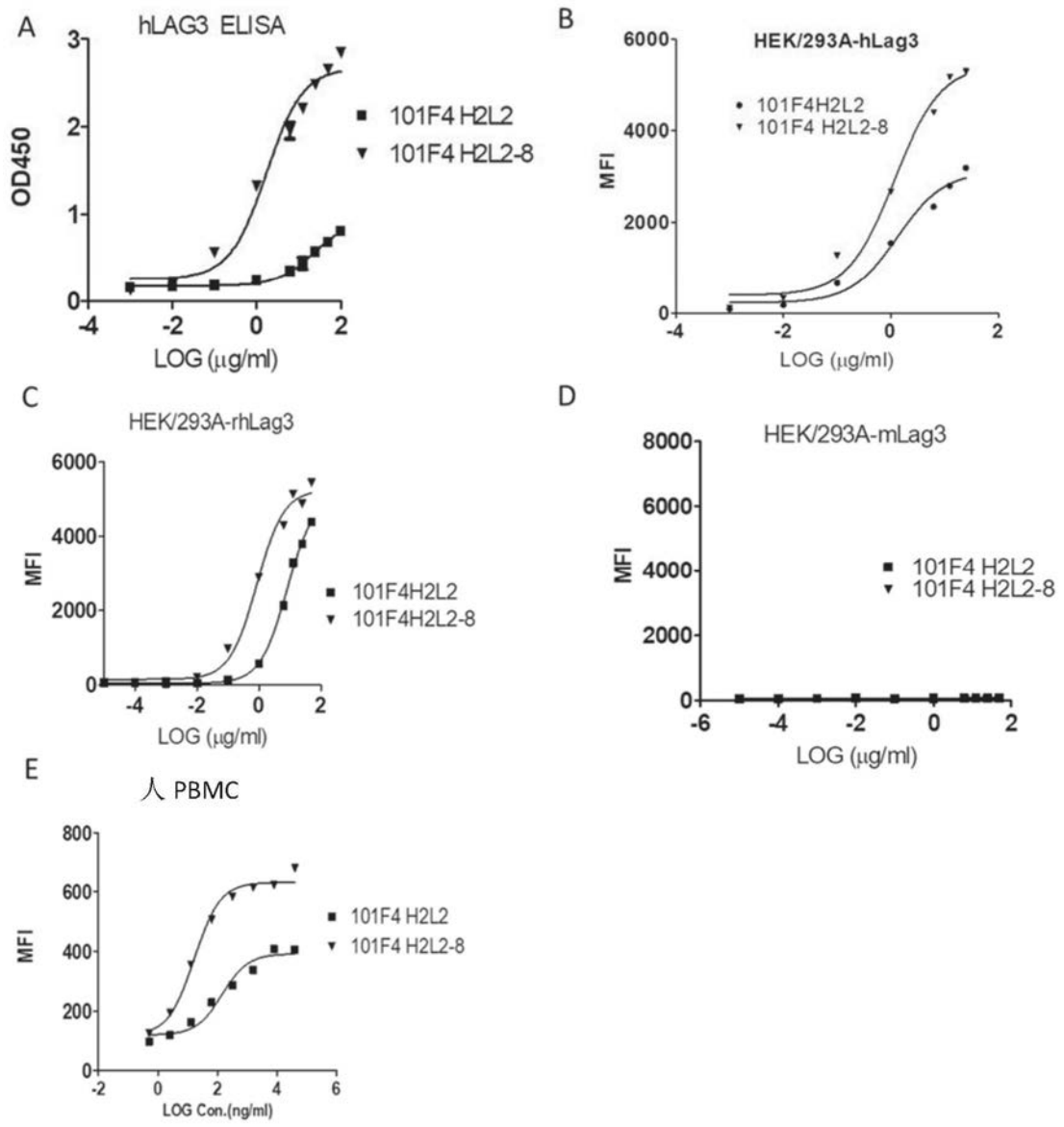


图7

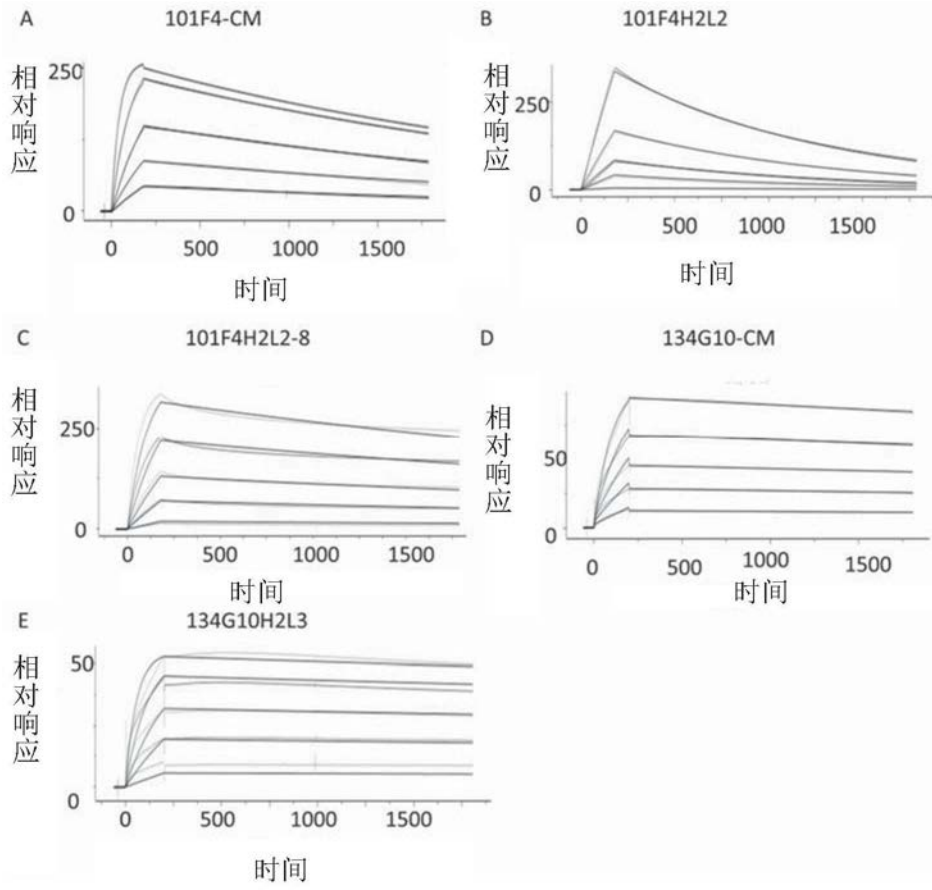


图8

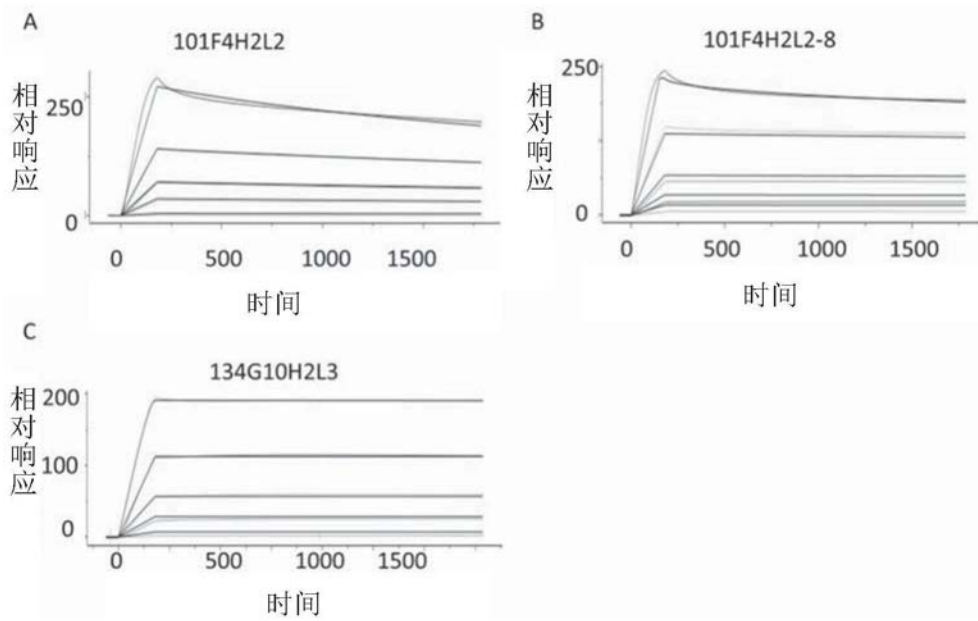


图9

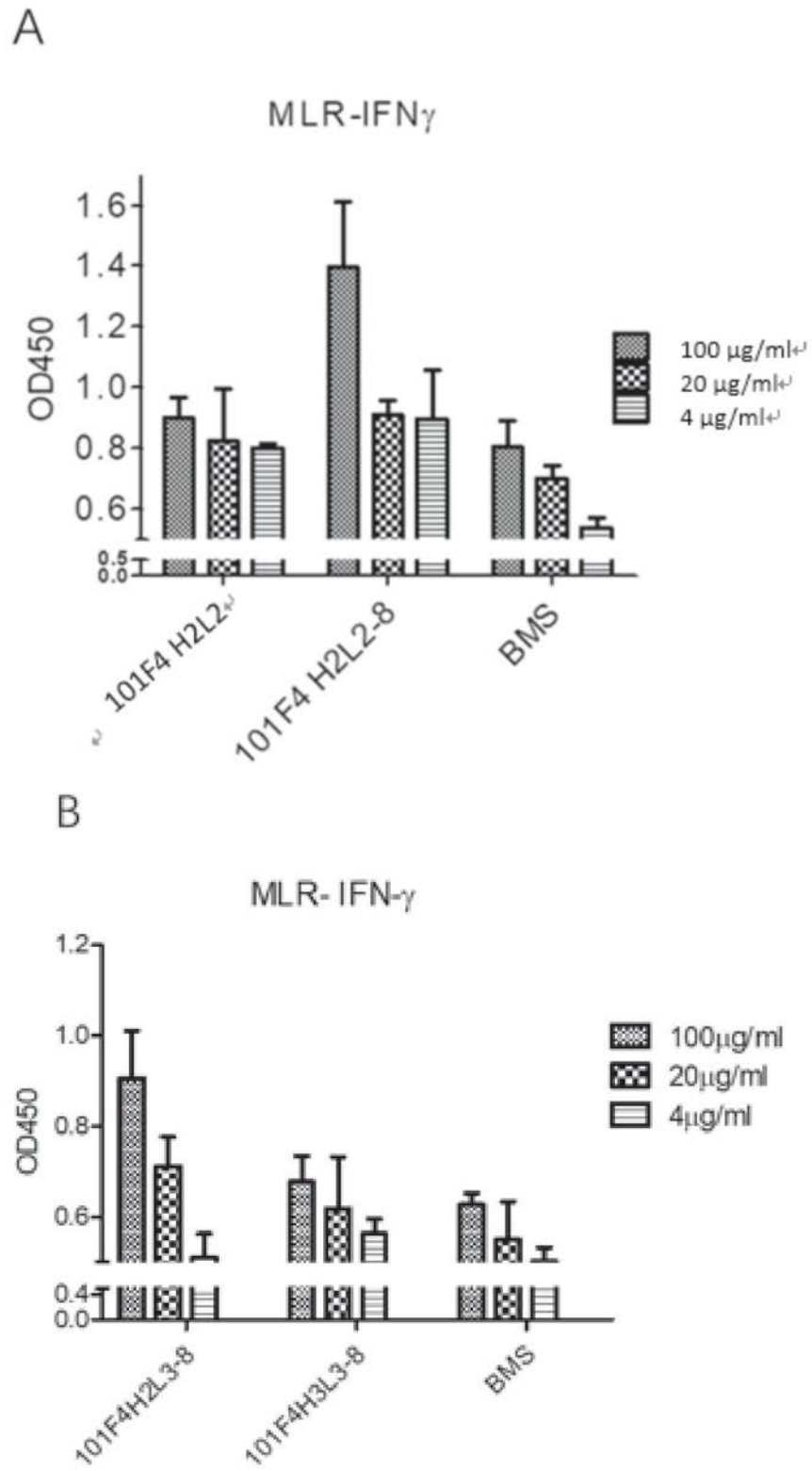


图10

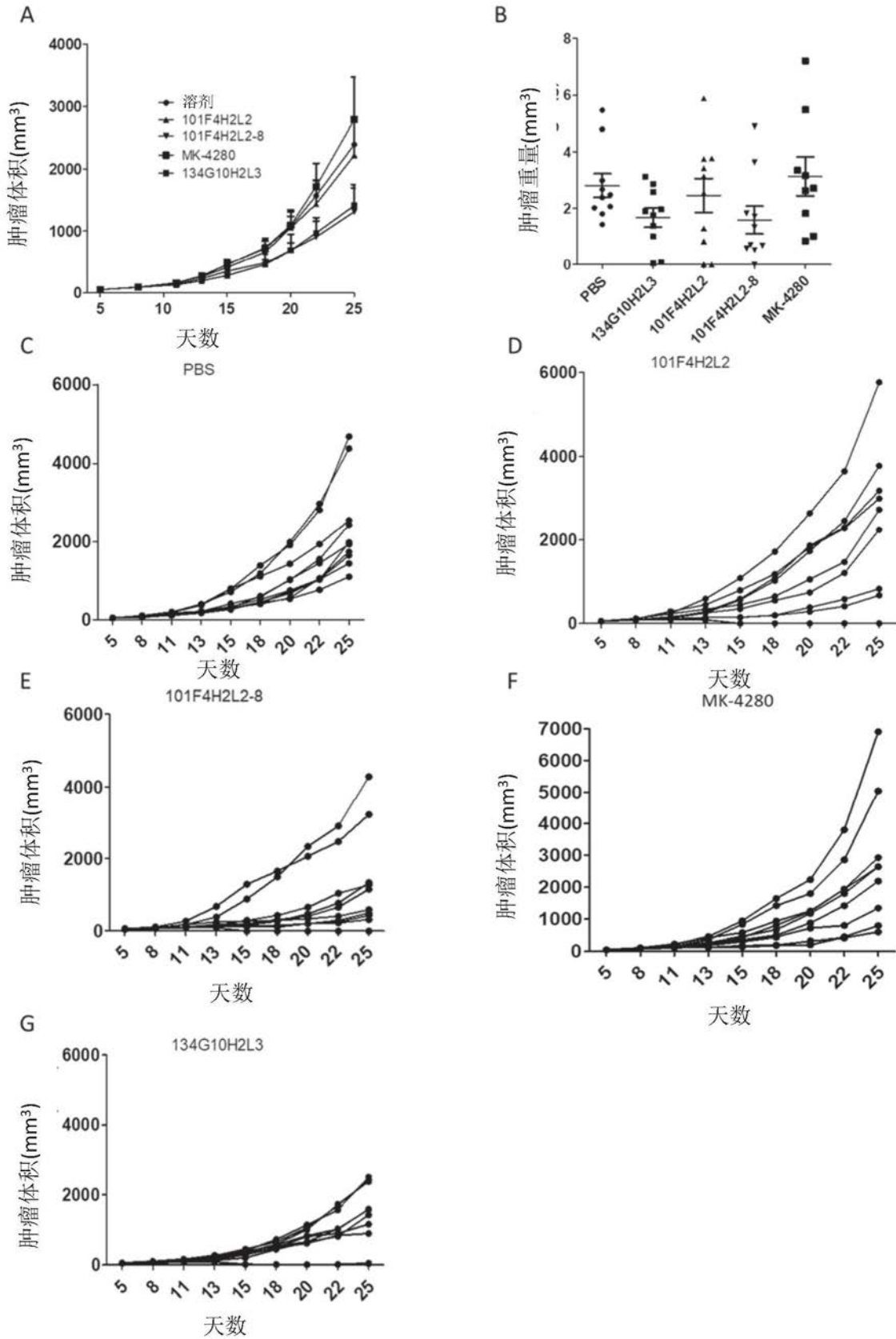


图11

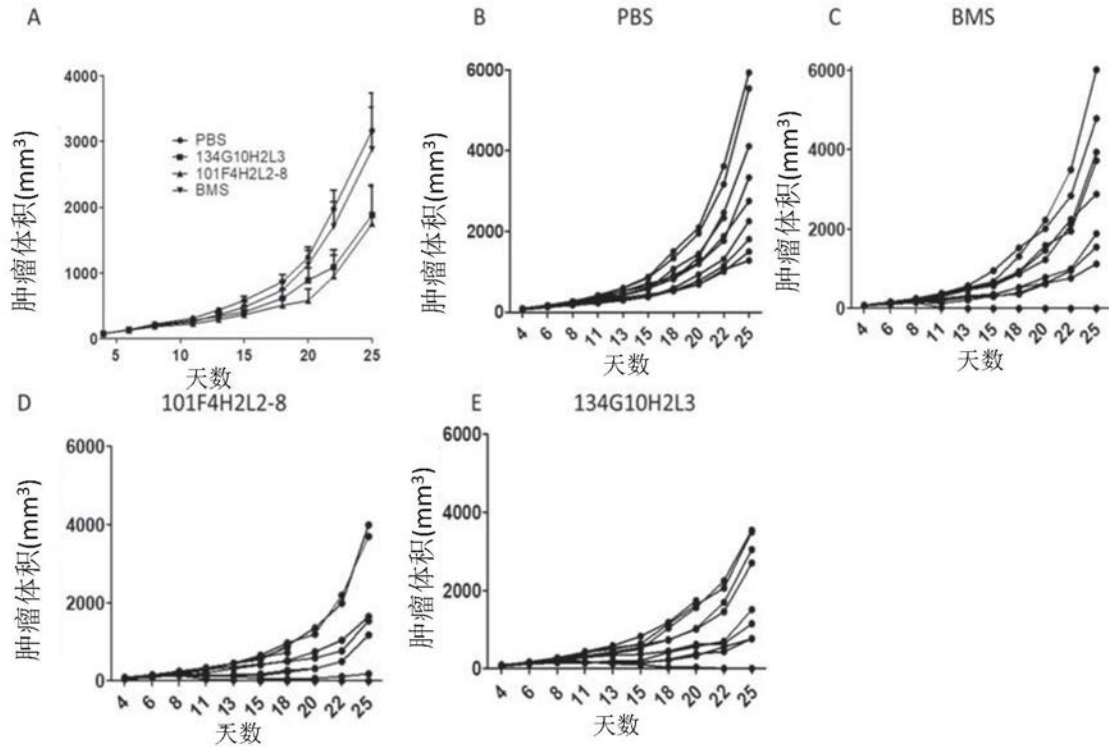


图12

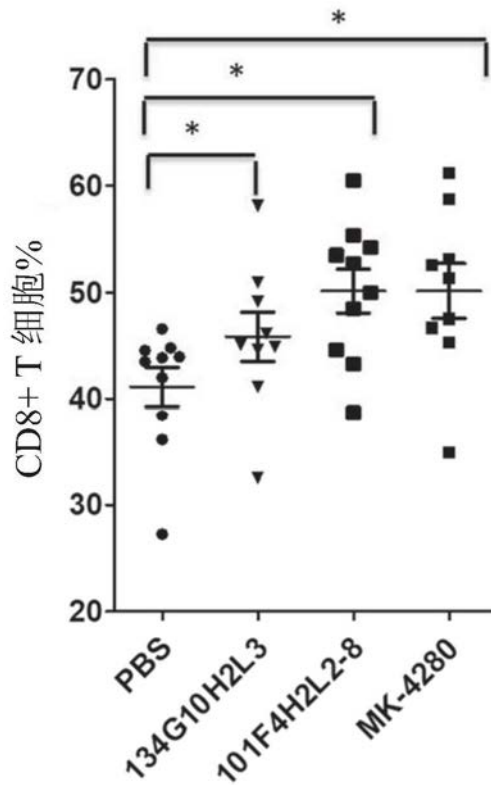


图13

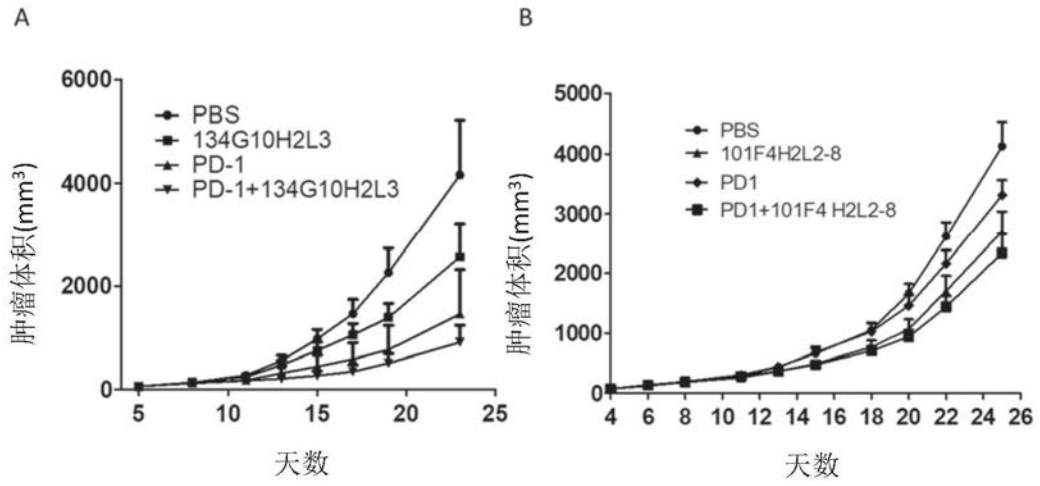


图14