(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119894927 A
(43)申请公布日 2025.04.25

(21)申请号 202380053500.9
(22)申请日 2023.07.14
(30)优先权数据
63/389,607 2022.07.15 US
63/389,610 2022.07.15 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/070259 2023.07.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/015993 EN 2024.01.18
(71)申请人 菲布罗根有限公司
地址 美国加利福尼亚州
申请人 高诚生物医药公司
(72)发明人 D•奥森 章乾 董灵 T•波尔 F•费拉拉 A•布莱伯利 M•C•布伦纳 G•沃金肖
(74)专利代理机构 北京市汉坤律师事务所 11602
专利代理师 张琳琳 李英
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

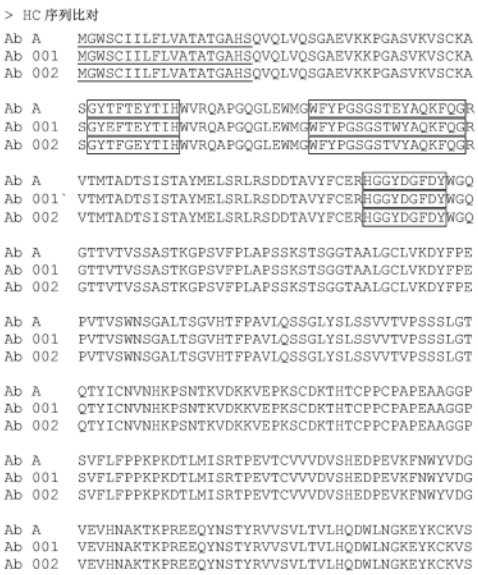
权利要求书6页 说明书59页
序列表（电子公布） 附图10页

(54)发明名称

经修饰的抗半乳凝素-9抗体及其用途

(57)摘要

本文提供了亲和力成熟的抗半乳凝素-9(Gal9)抗体。所述抗体对Gal9具有改善的结合亲和力。本文还提供了使用所述亲和力成熟的抗Gal9抗体的方法,包括治疗癌症的方法、挽救或促进效应T细胞增殖的方法、增强效应T细胞活性的方法和/或鉴定并治疗受试者的癌症的方法,这些方法包括施用本文所述的抗Gal9抗体。还提供了编码本文所述的重链或轻链或其抗原结合部分的多核苷酸,以及包含本文所述的多核苷酸的载体、尤其是表达载体。



CN 119894927 A

1.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

(a)重链可变区(HCVR),所述重链可变区包含

(i)具有氨基酸序列GYX$_1$FX$_2$X$_3$YTIH(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X$_1$选自T、E、P或A;X$_2$选自T、G或S;以及X$_3$选自E、S或D;

(ii)具有氨基酸序列WFYPGSGSTX$_4$YAQKFQG(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X$_4$选自E、W或V;以及

(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及

(b)轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含

(i)具有氨基酸序列KSSX$_5$X$_6$X$_7$LX$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$NX$_{14}$LA(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X$_5$选自Q或R;X$_6$选自S或N;X$_7$选自L、V或I;X$_8$选自Y或W;X$_9$选自S或P;X$_{10}$选自N、S、P或A;X$_{11}$选自N或H;X$_{12}$选自Q、N或Y;X$_{13}$选自K或R;以及X$_{14}$选自Y或H;

(ii)具有氨基酸序列WX$_{15}$SX$_{16}$RX$_{17}$X$_{18}$的LCVR CDR2序列,其中X$_{15}$选自A或G;X$_{16}$选自T、N、M或A;X$_{17}$选自G或E;以及X$_{18}$选自S、E、Y、P或T;以及

(iii)具有氨基酸序列QQYYX$_{19}$X$_{20}$PFT(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X$_{19}$选自S或F;以及X$_{20}$选自Y或F,

其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合半乳凝素-9(Gal9),前提条件是所述抗体不包含HCVR CDR1序列GYTFTEYTIH(SEQ ID NO:2)、HCVR CDR2序列WFYPGSGSTEYAQKFQG(SEQ ID NO:9)、HCVR CDR3序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)、LCVR CDR1序列KSSQSLLYSNNQKNYLA(SEQ ID NO:14)、LCVR CDR2序列WASTRGS(SEQ ID NO:22)以及LCVR CDR3序列QQYYSYPFT(SEQ ID NO:31)。

2.如权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

(a)HCVR,所述HCVR包含

(i)具有氨基酸序列GYX$_1$FX$_2$X$_3$YTIH(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X$_1$选自T或E,以及X$_2$选自T或G,以及X$_3$是E;

(ii)具有氨基酸序列WFYPGSGSTX$_4$YAQKFQG(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X$_4$选自W或V;以及

(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及

(b)LCVR,所述LCVR包含

(i)具有氨基酸序列KSSX$_5$X$_6$X$_7$LX$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$N X$_{14}$LA(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X$_5$是Q,X$_6$是S,X$_7$是L,X$_8$是Y,X$_9$选自S或P,X$_{10}$是N,X$_{11}$是N,X$_{12}$是Q,X$_{13}$是K;以及X$_{14}$是Y;

(ii)具有氨基酸序列WX$_{15}$SX$_{16}$RX$_{17}$X$_{18}$的LCVR CDR2序列,其中X$_{15}$是A,X$_{16}$是T,X$_{17}$是G,以及X$_{18}$选自S或E;以及

(iii)具有氨基酸序列QQYYX$_{19}$X$_{20}$PFT(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X$_{19}$是S,以及X$_{20}$选自Y或F,

其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

3.如权利要求1或2所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

(a)HCVR,所述HCVR包含SEQ ID NO:3的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:10的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,所述LCVR包含SEQ ID NO:15的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:23的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:32的LCVR CDR3序列;或

(b)HCVR,所述HCVR包含SEQ ID NO:4的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:11的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含SEQ ID NO:14的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:24的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:31的LCVR CDR3序列,

其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合Ga19。

4.如权利要求1-3中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:

所述HCVR序列是SEQ ID NO:39;和/或,所述LCVR序列是SEQ ID NO:41,或者

所述HCVR序列是SEQ ID NO:43;和/或,所述LCVR序列是SEQ ID NO:45。

5.如权利要求1-4中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含:

SEQ ID NO:39的HCVR序列以及SEQ ID NO:41的LCVR序列;或

SEQ ID NO:43的HCVR序列以及SEQ ID NO:45的LCVR序列。

6.如权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

(a)HCVR,所述HCVR包含

(i)具有氨基酸序列GYX$_1$FX$_2$X$_3$YTIH(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X$_1$选自T、P或A;X$_2$选自T、S或G;以及X$_3$选自S或D;

(ii)具有氨基酸序列WFYPGSGSTX$_4$YAQKFQG(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X$_4$是E;以及

(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及

(b)LCVR,所述LCVR包含:

(i)具有氨基酸序列KSSX$_5$X$_6$X$_7$LX$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$N X$_{14}$LA(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X$_5$选自Q或R;X$_6$选自S或N;X$_7$选自L、V或I;X$_8$选自Y或W;X$_9$是S,X$_{10}$选自S、P或A;X$_{11}$选自N或H;X$_{12}$是N或Y;X$_{13}$是K或R;以及X$_{14}$是Y或H;

(ii)具有氨基酸序列WX$_{15}$SX$_{16}$RX$_{17}$X$_{18}$的LCVR CDR2序列,其中X$_{15}$选自A或G;X$_{16}$选自T、N、M或A;X$_{17}$选自G或E;以及X$_{18}$选自S、Y、P或T;以及

(iii)具有氨基酸序列QQYYX$_{19}$X$_{20}$PFT(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X$_{19}$是F,以及X$_{20}$是Y,

其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合Ga19。

7.如权利要求1或6所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

(a)HCVR,所述HCVR包含SEQ ID NO:5的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含SEQ ID NO:16的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:25的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;或

(b)HCVR,所述HCVR包含SEQ ID NO:6的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列

以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,所述LCVR包含SEQ ID NO:17的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:26的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;或

(c)HCVR,所述HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,所述LCVR包含SEQ ID NO:18的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:27的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;或

(d)HCVR,所述HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,所述LCVR包含SEQ ID NO:19的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:28的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;或

(e)HCVR,所述HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,所述LCVR包含SEQ ID NO:20的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:29的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,

其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合Ga19。

8.如权利要求1、6或7中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:

所述HCVR序列是SEQ ID NO:47和/或所述LCVR序列是SEQ ID NO:49,

所述HCVR序列是SEQ ID NO:51和/或所述LCVR序列是SEQ ID NO:53,

所述HCVR序列是SEQ ID NO:55和/或所述LCVR序列是SEQ ID NO:57,

所述HCVR序列是SEQ ID NO:59和/或所述LCVR序列是SEQ ID NO:61,或者

所述HCVR序列是SEQ ID NO:63和/或所述LCVR序列是SEQ ID NO:65。

9.如权利要求1、6、7或8中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含:

SEQ ID NO:47的HCVR序列以及SEQ ID NO:49的LCVR序列;

SEQ ID NO:51的HCVR序列以及SEQ ID NO:53的LCVR序列;

SEQ ID NO:55的HCVR序列以及SEQ ID NO:57的LCVR序列;

SEQ ID NO:59的HCVR序列以及SEQ ID NO:61的LCVR序列;或

SEQ ID NO:63的HCVR序列以及SEQ ID NO:65的LCVR序列。

10.如权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

(a)HCVR,所述HCVR包含

(i)具有氨基酸序列GYX$_1$FX$_2$X$_3$YTIH(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X$_1$选自E或P;X$_2$选自T或S;以及X$_3$选自E或S;

(ii)具有氨基酸序列WFYPGSGSTX$_4$YAQKFQG(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X$_4$选自W或E;以及

(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及

(b)LCVR,所述LCVR包含:

(i)具有氨基酸序列KSSX$_5$X$_6$X$_7$LX$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$NX$_{14}$LA(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X$_5$是Q,X$_6$选自S或N,X$_7$选自L或V,X$_8$选自Y或W,X$_9$选自P或S,X$_{10}$选自N或S,X$_{11}$是N,X$_{12}$选自Q或N,X$_{13}$是K;以及X$_{14}$是Y;

(ii)具有氨基酸序列WX$_{15}$SX$_{16}$RX$_{17}$X$_{18}$的LCVR CDR2序列,其中X$_{15}$选自A或G;X$_{16}$选自T或N;X$_{17}$选自G或E,以及X$_{18}$是S;以及

(iii)具有氨基酸序列QQYYX$_{19}$X$_{20}$PFT(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X$_{19}$选自S或F;以及X$_{20}$选自Y或F,

其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

11.如权利要求1或10所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

(a)HCVR,所述HCVR包含SEQ ID NO:3的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:10的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,所述LCVR包含SEQ ID NO:15的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:23的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:32的LCVR CDR3序列;或

(b)HCVR,所述HCVR包含SEQ ID NO:5的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含SEQ ID NO:16的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:25的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,

其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

12.如权利要求1-11中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是人源化抗体。

13.如权利要求1-12中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中其抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')$_2$、F$_d$、单链Fv或scFv、二硫键连接的F$_v$、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、IgGACH$_2$、微型抗体、F(ab')$_3$、四抗体、三抗体、双抗体、结构域抗体(dAb)、DVD-Ig、Fcab、mAb$_2$、(scFv)$_2$、串联scFv、DART®、TandAb、纳米抗体或scFv-Fc。

14.如权利要求1-13中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段以小于约5nM、2nM、1nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM、0.05nM或0.01nM的K$_d$结合人Gal9。

15.如权利要求1-14中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段与Gal9结合,并且抑制Gal9与Gal9受体(例如,TIM3或CD44)结合。

16.如权利要求1-14中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段与Gal9结合,并且不抑制Gal9与Gal9受体(例如,TIM3或CD44)结合。

17.如权利要求1-16中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段逆转T细胞(如CD4$^+$T细胞)的Gal9诱导的Th1凋亡。

18.如权利要求1-17中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合片段抑制Gal9诱导的Treg扩增。

19.一种治疗有此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有效量的如权利要求1-18中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,从而治疗所述受试者的癌症。

20.如权利要求19所述的方法,其中所述癌症是血液癌症或实体瘤。

21.如权利要求20所述的方法,其中所述血液癌症选自由以下构成的组:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病以及毛细胞白血病、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样

霉菌病、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)以及多发性骨髓瘤。

22.如权利要求20所述的方法,其中所述实体瘤是乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结直肠癌、肾癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌、头颈部鳞癌或前列腺癌。

23.如权利要求19-22中任一项所述的方法,所述方法进一步包括向所述患者施用化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。

24.如权利要求23所述的方法,其中所述检查点抑制剂是抗PD-1。

25.如权利要求23所述的方法,其中所述免疫肿瘤剂是抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关蛋白(GITR)抗体。

26.一种多核苷酸,所述多核苷酸编码如权利要求1-13中任一项所述的重链或轻链或其抗原结合部分。

27.一种载体,所述载体包含如权利要求26所述的多核苷酸,其中所述载体是选自由以下构成的组的表达载体:哺乳动物表达载体、酵母表达载体、昆虫表达载体以及细菌表达载体。

28.一种挽救或促进效应T细胞增殖、增强效应T细胞活性和/或鉴定并治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括:

(i)确定来自所述受试者的样品中Gal9的水平,以及

(ii)向受试者施用有效量的如权利要求1-18中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,所述受试者所具有的Gal9水平高于Gal9的参考水平,

从而挽救或促进效应T细胞增殖、增强效应T细胞活性和/或鉴定并治疗受试者的癌症。

29.如权利要求28所述的方法,其中所述受试者被诊断患有癌症,有患上癌症的风险,或者患有癌症复发。

30.如权利要求28或29所述的方法,其中所述Gal9的参考水平是在来自健康或对照个体的样品中测量的Gal9的水平。

31.如权利要求28-30中任一项所述的方法,其中确定包括将所述样品中Gal9的水平与所述参考水平进行比较。

32.如权利要求28-31中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液癌症或实体瘤。

33.如权利要求32所述的方法,其中所述血液癌症选自由以下构成的组:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病以及毛细胞白血病、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样霉菌病、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)以及多发性骨髓瘤。

34.如权利要求32所述的方法,其中所述实体瘤是乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结直肠癌、肾癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌、头颈部鳞癌或前列腺癌。

35.如权利要求28-34中任一项所述的方法,其中所述样品是血液样品、血浆样品、血清样品、肿瘤活检样品或骨髓(BM)源性单个核细胞(MNC)样品。

36.如权利要求28-35中任一项所述的方法,所述方法进一步包括向所述患者施用化学

治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。

37.如权利要求36所述的方法,其中所述检查点抑制剂是抗PD-1。

38.如权利要求36所述的方法,其中所述免疫肿瘤剂是抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关蛋白(GITR)抗体。

经修饰的抗半乳凝素-9抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2022年7月15日提交的美国临时申请号63/389,607和2022年7月15日提交的美国临时申请号63/389,610的优先权权益。在先申请的公开内容被认为是本申请的公开内容的一部分,并且将在先申请的公开内容通过援引以其全文并入本申请的公开内容。

[0003] 序列表的并入

[0004] 将所附序列表中的材料通过援引特此并入本申请。所附的名称为148640-004302_SL.xml的序列表xml文件创建于2023年7月13日,并且为80,112字节。

发明内容

[0005] 本发明总体上涉及抗半乳凝素-9抗体,并且更特别地涉及用于治疗癌症使用的抗半乳凝素-9抗体。

[0006] 半乳凝素-9(或Gal9)是在脊椎动物中具有至少15个成员(在人中包括10个成员)的半乳凝素(或S型凝集素)蛋白质家族的成员。Gal9是不含前导肽的可溶性34-39kDa蛋白,但仍然经由非经典机制分泌。它优先与糖蛋白和糖脂的β-半乳糖苷残基相互作用。在人中,Gal9以三种异形体(长、中和短)存在。

[0007] Gal9(β-半乳糖苷结合蛋白的凝集素家族的成员)含有通过柔性接头连接的2个不同的碳水化合物识别结构域(CRD)(串联重复半乳凝素)。Gal9可以同时结合/连接两种配体,促进两种或更多种单体受体的缔合或组织,导致改变信号传导并且可能导致改变受体胞吞的速率。已经鉴定出几种细胞表面结合配偶体,包括Tim3、PD-1、VISTA、Dectin-1、CD44、CD206、4-1BB(CD137)、TNFRSF25、PDI等。Gal9在调节几种免疫细胞类型的活性从而在肿瘤微环境(TME)中产生免疫抑制性环境方面发挥重要作用。值得注意的是,Gal9(i)诱导CD4+和CD8+T细胞的凋亡,(ii)抑制Th17细胞发育,(iii)诱导抑制性Treg扩增,(iv)促进髓源性抑制细胞的扩增,(v)促进M2极化的肿瘤相关巨噬细胞(TAM)表型,并且(vi)损害自然杀伤(NK)细胞功能。已经用Gal9敲除小鼠研究证实了这些Gal9活性中的几种。

[0008] Gal9是研究最多的含T细胞免疫球蛋白及粘蛋白结构域分子-3(TIM-3)(也称为甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2))的配体之一,并且在多种血液恶性肿瘤(如慢性淋巴细胞白血病(CLL)、骨髓增生异常综合征(MDS)、霍奇金和非霍奇金淋巴瘤、急性髓系白血病(AML))以及实体瘤(如肺癌、乳腺癌和肝细胞癌)上表达。

[0009] 已经发现Gal9与TIM-3/HAVCR2的相互作用可减弱肿瘤微环境和慢性感染中的T细胞扩增和效应子功能。此外,Gal9通过肿瘤细胞转化、细胞周期调节、血管生成和细胞粘附促进肿瘤发生。

[0010] Gal9也直接由调节性T淋巴细胞(或Treg)表达,并且在Treg激活过程中其表达增加。另一方面,Gal9由效应T淋巴细胞(如$CD8^+$细胞毒性T淋巴细胞)非常弱地表达,并且这种表达在效应T淋巴激活过程中消失。已经发现抗Gal9抗体对Gal9的抑制可抑制Treg的抑制活性。

[0011] Wu等人(Immunity[免疫]41(2):270-282,2014)报道到Gal9在调节免疫应答方面是关键的。有两个Treg细胞子集,即“天然”Treg(nTreg)细胞和“诱导”Treg(iTreg)细胞。Gal9由iTreg细胞高度表达,并且对于iTreg细胞而非nTreg细胞的产生和功能是至关重要的。iTreg细胞中的Gal9表达由转录因子Smad3驱动,形成前馈环路,这进一步促进Foxp3表达。Gal9通过与其受体CD44直接结合来增加iTreg细胞稳定性和功能,CD44与转化生长因子-β(TGF-β)受体I(TGF-βRI)和激活的Smad3形成复合物。进一步发现Gal9信号传导可通过主要经由Foxp3基因座的CNS1区起作用来调节iTreg细胞诱导。外源性Gal9除了是Treg细胞的效应分子外,还与TGF-β协同作用以加强iTreg细胞分化和维持。

[0012] 各种类型的T淋巴细胞通常发育成例如“效应”细胞或效应T淋巴细胞,这些细胞将实现专门的免疫功能以保护宿主生物体。因此,$CD4^+$T淋巴细胞或辅助T淋巴细胞分泌主要的细胞因子,这些细胞因子帮助B淋巴细胞的体液功能(产生特异性抗体)和$CD8^+$T淋巴细胞的细胞毒性活性。

[0013] Treg组成型地过表达CD4和CD25分子(因此它们也被称为“$CD4^+CD25^+$”)以及Foxp3转录因子。该小百分比的$CD4^+CD25^+$T淋巴细胞负调节免疫应答的参与者,这些参与者将通过其T细胞受体(TCR)识别各种自身抗原。因此,Treg通过保护生物体免受自身免疫性疾患的出现而在免疫系统的生理学方面发挥主要作用。

[0014] Treg对效应T淋巴细胞发挥免疫抑制活性。这种活性一旦被激活便在病理情况(如肿瘤)下促进肿瘤生长。因此,Treg的抑制活性可以理解为通过抑制效应T淋巴细胞的功能来降低抗肿瘤免疫应答的活性。

[0015] Gal9主要与由与不同免疫受体相互作用引起的肿瘤免疫抑制相关。例如,Gal9抑制Th1应答并且诱导外周耐受,如通过Gal9阻断后Th1凋亡减少、Gal9敲除小鼠对胶原诱导性关节炎(CIA)的易感性增加以及Gal9施用后移植物存活期延长和自身免疫性疾病(AID)抑制所证实。Gal9还调节外周NK细胞功能以促进母-胎耐受,促进髓源性抑制细胞(MDSC)的扩增,并且与TGF-β协同以促进Treg扩增。

[0016] Gal9的高表达在患者的肿瘤和血液中在几种实体瘤和血液恶性肿瘤中都是明显的,并且与侵袭性疾病和不良存活期结局相关。最近,几份已发表的报告提供了对采用抗Gal9抗体与包括免疫检查点抑制剂疗法在内的当前使用的免疫疗法的组合疗法方法的支持。

[0017] Yang等人(Nature Commun.[自然·通讯]12,832,2021)证明了(i)PD-1与Gal9C-CRD结合,并且Gal9和PD-L1与PD-1上的不同位点结合;(ii)派姆单抗不阻断Gal9与PD-1的结合;(iii)Tim-3和PD-1/gal9 C-CRD的复合物通过限制Tim3-Gal9驱动的凋亡而有助于耗竭T细胞的持久性;并且(iv)与单独使用的每种疗法相比,用抗PD-1和抗Gal9抗体的组合治疗可以提供更好的抗肿瘤效果和一般结局(例如,存活期)。此外,Yang等人,同上从48个肿瘤样品中产生了16,291个免疫细胞转录组,这些肿瘤样品是从用抗PD1疗法治疗的32名黑色素瘤患者中收集的,并且评价了它们的Gal9表达及其与治疗结局的关联。与对疗法有应答的患者相比,来自抗PD1无应答者的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)表达水平高得多的gal9。

[0018] Limagne等人(Oncoimmunology[肿瘤免疫学]8:e1564505,2019)评价了转移性非小细胞肺癌(mNSCLC)患者群体,并且发现Tim3+淋巴样细胞和Gal9+单核细胞髓源性抑制细胞(mMDSC)的积累与PD-1阻断抗性相关。

[0019] Li等人(Immunotherapy[免疫疗法]15,135,2023)已经表明,与正常组织相比,胰腺导管腺癌(PDAC)肿瘤中的Gal9和PD-L1水平更高,并且水平与淋巴结的肿瘤侵袭和肿瘤淋巴结转移分期显著相关。在鼠KPC模型(已建立且临床相关的PDAC模型)中,与单独的抗PD-L1或抗Gal9或对照组相比,在抗PD-L1和抗Gal9组合疗法组中观察到显著的肿瘤生长抑制。

[0020] 总之,这些发现表明在某些人癌症中,组合抗Gal9和抗PD1疗法可能是有效的治疗方案。

[0021] 与健康对照相比,某些癌症患者中Gal9的循环水平显著更高。因此,对于用于治疗癌症使用的抗Gal9抗体仍然存在未满足的需求。

[0022] 本文所述的本发明的方面涉及针对Gal9的抗体及其用于治疗与调节性T淋巴细胞(Treg)的抑制活性相关的疾病的用途。

[0023] 在一方面,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)重链可变区(HCVR),该重链可变区包含(i)具有氨基酸序列$GYX_1FX_2X_3YTIH$(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X_1选自T、E、P或A;X_2选自T、G或S;以及X_3选自E、S或D;(ii)具有氨基酸序列$WFYPGSGSTX_4YAQKFQG$(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X_4选自E、W或V;以及(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及(b)轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含(i)具有氨基酸序列$KSSX_5X_6X_7LX_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}NX_{14}LA$(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X_5选自Q或R;X_6选自S或N;X_7选自L、V或I;X_8选自Y或W;X_9选自S或P;X_{10}选自N、S、P或A;X_{11}选自N或H;X_{12}选自Q、N或Y;X_{13}选自K或R;以及X_{14}选自Y或H;(ii)具有氨基酸序列$WX_{15}SX_{16}RX_{17}X_{18}$的LCVR CDR2序列,其中$X_{15}$选自A或G;$X_{16}$选自T、N、M或A;$X_{17}$选自G或E;以及$X_{18}$选自S、E、Y、P或T;以及(iii)具有氨基酸序列$QQYYX_{19}X_{20}PFT$(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X_{19}选自S或F;以及X_{20}选自Y或F,前提条件是抗体不包含HCVR CDR1序列GYTFTEYTIH(SEQ ID NO:2)、HCVR CDR2序列WFYPGSGSTEYAQKFQG(SEQ ID NO:9)、HCVR CDR3序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)、LCVR CDR1序列KSSQSLLYSNNQKNYLA(SEQ ID NO:14)、LCVR CDR2序列WASTRGS(SEQ ID NO:22)以及LCVR CDR3序列QQYYSYPFT(SEQ ID NO:31),其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0024] 在一种实施方式中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)HCVR,该HCVR包含(i)具有氨基酸序列$GYX_1FX_2X_3YTIH$(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X_1选自T或E,以及X_2选自T或G,以及X_3是E;(ii)具有氨基酸序列$WFYPGSGSTX_4YAQKFQG$(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X_4选自W或V;以及(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及(b)LCVR,该LCVR包含(i)具有氨基酸序列$KSSX_5X_6X_7LX_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}N\ X_{14}LA$(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X_5是Q,X_6是S,X_7是L,X_8是Y,X_9选自S或P,X_{10}是N,X_{11}是N,X_{12}是Q,X_{13}是K;以及X_{14}是Y;(ii)具有氨基酸序列$WX_{15}SX_{16}RX_{17}X_{18}$的LCVR CDR2序列,其中$X_{15}$是A,$X_{16}$是T,$X_{17}$是G,以及$X_{18}$选自S或E;以及(iii)具有氨基酸序列$QQYYX_{19}X_{20}PFT$(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X_{19}是S,以及X_{20}选自Y或F,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0025] 在其中的具体实施方式中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(A)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:3的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:10的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,

该LCVR包含SEQ ID NO:15的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:23的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:32的LCVR CDR3序列;或(B)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:4的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:11的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含SEQ ID NO:14的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:24的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:31的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0026] 在一种实施方式中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)HCVR,该HCVR包含(i)具有氨基酸序列GYX$_1$FX$_2$X$_3$YTIH(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X$_1$选自T、P或A;X$_2$选自T、S或G;以及X$_3$选自S或D;(ii)具有氨基酸序列WFYPGSGSTX$_4$YAQKFQG(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X$_4$是E;以及(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及(b)LCVR,该LCVR包含:(i)具有氨基酸序列KSSX$_5$X$_6$X$_7$LX$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$NX$_{14}$LA(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X$_5$选自Q或R;X$_6$选自S或N;X$_7$选自L、V或I;X$_8$选自Y或W;X$_9$是S,X$_{10}$选自S、P或A;X$_{11}$选自N或H;X$_{12}$是N或Y;X$_{13}$是K或R;以及X$_{14}$是Y或H;(ii)具有氨基酸序列WX$_{15}$SX$_{16}$RX$_{17}$X$_{18}$的LCVR CDR2序列,其中X$_{15}$选自A或G;X$_{16}$选自T、N、M或A;X$_{17}$选自G或E;以及X$_{18}$选自S、Y、P或T;以及(iii)具有氨基酸序列QQYYX$_{19}$X$_{20}$PFT(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X$_{19}$是F,以及X$_{20}$是Y;其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0027] 在其中的具体实施方式中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(C)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:5的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含SEQ ID NO:16的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:25的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;(D)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:6的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:17的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:26的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;(E)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:18的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:27的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;(F)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:19的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:28的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;或(G)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:20的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:29的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0028] 在另一种实施方式中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)HCVR,该HCVR包含(i)具有氨基酸序列GYX$_1$FX$_2$X$_3$YTIH(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X$_1$选自E或P;X$_2$选自T或S;以及X$_3$选自E或S;(ii)具有氨基酸序列WFYPGSGSTX$_4$YAQKFQG(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X$_4$选自W或E;以及(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及(b)轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含:(i)具有氨基酸序列KSSX$_5$X$_6$X$_7$LX$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$NX$_{14}$LA(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X$_5$是Q,X$_6$选自S或N,X$_7$选自L或V,X$_8$选自Y或W,X$_9$选

自P或S,X_{10}选自N或S,X_{11}是N,X_{12}选自Q或N,X_{13}是K;以及X_{14}是Y;(ii)具有氨基酸序列$WX_{15}SX_{16}RX_{17}X_{18}$的LCVR CDR2序列,其中$X_{15}$选自A或G;$X_{16}$选自T或N;$X_{17}$选自G或E,以及$X_{18}$是S;以及(iii)具有氨基酸序列$QQYYX_{19}X_{20}PFT$(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X_{19}选自S或F;以及X_{20}选自Y或F,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0029] 在其中的具体实施方式中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(A)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:3的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:10的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:15的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:23的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:32的LCVR CDR3序列;或(C)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:5的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含SEQ ID NO:16的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:25的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0030] 在一方面,(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)或(G)的抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:68的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。在另一方面,(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)或(G)的抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:69的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。在另一方面,(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)或(G)的抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:70的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。在另一方面,(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)或(G)的抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:76的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。在另一方面,(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)或(G)的抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:77的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。在一方面,(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)或(G)的抗体或其抗原结合片段的LCVR序列任选地进一步包含SEQ ID NO:72的LFR1序列、SEQ ID NO:73的LFR2序列、SEQ ID NO:74的LFR3序列和/或SEQ ID NO:75的LFR4序列。

[0031] 在另一方面,HCVR序列是SEQ ID NO:39和/或LCVR序列是SEQ ID NO:41;或者HCVR序列是SEQ ID NO:43和/或LCVR序列是SEQ ID NO:45;或者HCVR序列是SEQ ID NO:47和/或LCVR序列是SEQ ID NO:49;或者HCVR序列是SEQ ID NO:51和/或LCVR序列是SEQ ID NO:53;或者HCVR序列是SEQ ID NO:55和/或LCVR序列是SEQ ID NO:57;或者HCVR序列是SEQ ID NO:59和/或LCVR序列是SEQ ID NO:61;或者HCVR序列是SEQ ID NO:63和/或LCVR序列是SEQ ID NO:65。在一些方面,抗体包含:SEQ ID NO:39的HCVR序列以及SEQ ID NO:41的LCVR序列;或SEQ ID NO:43的HCVR序列以及SEQ ID NO:45的LCVR序列;或SEQ ID NO:47的HCVR序列以及SEQ ID NO:49的LCVR序列;或SEQ ID NO:51的HCVR序列以及SEQ ID NO:53的LCVR序列;或SEQ ID NO:55的HCVR序列以及SEQ ID NO:57的LCVR序列;或SEQ ID NO:59的HCVR序列以及SEQ ID NO:61的LCVR序列;或SEQ ID NO:63的HCVR序列以及SEQ ID NO:65的LCVR序列。

[0032] 在一方面,抗体是人源化抗体。在另一方面,其抗原结合片段是Fab、Fab'、F(ab')$_2$、F_d、单链Fv或scFv、二硫键连接的F_v、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、IgGACH$_2$、微型抗体、F(ab')$_3$、四抗体、三抗体、双抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb$_2$、(scFv)$_2$、串联scFv、DART®、TandAb、纳米抗体或scFv-Fc。在其他方面,单克隆抗体或其抗原结合片段以小于约5nM、2nM、1nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM、0.05nM或0.01nM的K_d结合人Gal9。在一方面,抗体与Gal9结合,并且抑制Gal9与Gal9受体(例如,TIM3或CD44)结合。在另一方面,抗体与Gal9结合,并且不抑制Gal9与Gal9受体(例如,TIM3或CD44)结合。在一方面,抗体逆转Gal9诱导的T细胞(如$CD4^+$T细胞)的Th1凋亡。在另一方面,抗体抑制Gal9诱导的Treg扩增。

[0033] 在另一种实施方式中,本发明提供了治疗有此需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段中的任一种,从而治疗受试者的癌症。

[0034] 在一方面,癌症是血液癌症或实体瘤。在一些方面,血液癌症选自由以下构成的组:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)以及毛细胞白血病;艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样霉菌病、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)以及多发性骨髓瘤。在其他方面,实体瘤选自由以下构成的组:乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结直肠癌、肾癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌、头颈部鳞癌以及前列腺癌。在一方面,方法进一步包括向患者施用化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。在一些方面,检查点抑制剂是抗PD-1。在其他方面,免疫肿瘤剂是抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关蛋白(GITR)抗体。

[0035] 在另外的实施方式中,本发明提供了多核苷酸,该多核苷酸编码本文所述的抗体或其抗原结合片段中的任一种的重链或轻链或其抗原结合部分。

[0036] 在一种实施方式中,本发明提供了载体,该载体包含本文所述的多核苷酸,其中载体是选自由以下构成的组的表达载体:哺乳动物表达载体、酵母表达载体、昆虫表达载体以及细菌表达载体。

[0037] 在另一种实施方式中,本发明提供了挽救或促进效应T细胞增殖、增强效应T细胞活性和/或鉴定并治疗受试者的癌症的方法,该方法包括:(i)确定来自受试者的样品中Gal9的水平,以及(ii)向受试者施用有效量的本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中的任一种,该受试者所具有的Gal9水平高于Gal9的参考水平,从而挽救或促进效应T细胞增殖、增强效应T细胞活性和/或鉴定并治疗受试者。

[0038] 在一方面,受试者被诊断患有癌症,有患上癌症的风险,或者患有癌症复发。在另一方面,Gal9的参考水平是在来自健康或对照个体的样品中测量的Gal9的水平。在一些方面,确定包括将样品中Gal9的水平与参考水平进行比较。在一方面,癌症是血液癌症或实体瘤。在一些方面,血液癌症选自由以下构成的组:ALL、AML、CLL、CML以及毛细胞白血病;艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样霉菌病、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、DLBCL以及多发

性骨髓瘤。在其他方面,实体瘤选自由以下构成的组:乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结直肠癌、肾癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌、头颈部鳞癌以及前列腺癌。在一方面,样品是血液样品、血浆样品、血清样品、肿瘤活检样品或骨髓(BM)源性单个核细胞(MNC)样品。在一方面,方法进一步包括向患者施用化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。在一些方面,检查点抑制剂是抗PD-1抗体。在其他方面,免疫肿瘤剂是抗GITR抗体。

附图说明

[0039] 图1A-图1D示出了序列比对。图1A示出了抗体A(Ab A)、抗体001(Ab 001)和抗体002(Ab 002)抗Gal9抗体的重链的序列的比对。图1B示出了Ab A、Ab 001和Ab 002抗Gal9抗体的轻链的序列的比对。图1C示出了抗体A(Ab A)、抗体003(Ab003)、抗体004(Ab 004)、抗体005(Ab 005)、抗体006(Ab 006)和抗体007(Ab007)抗Gal9抗体的重链的序列的比对。图1D示出了Ab A、Ab 003、Ab 004、Ab 005、Ab 006和Ab 007抗Gal9抗体的轻链的序列的比对。

[0040] 图2A-图2D示出了抗Gal9抗体对Gal9诱导的凋亡的作用。图2A示出了Ab A抗Gal9抗体对T细胞凋亡的作用。图2B示出了亲和力成熟的Ab 001抗Gal9抗体对T细胞凋亡的作用。图2C示出了Ab 001对Gal9诱导的CD4+T细胞凋亡的作用。图2D示出了Ab 001对Gal9诱导的CD8+T细胞凋亡的作用。

[0041] 图3示出了Ab 001和Ab 003对TIM3二聚化的可比较的作用。

具体实施方式

[0042] 本文所述的本发明的方面涉及针对Gal9的抗体及其用于治疗与调节性T淋巴细胞(Treg)的抑制活性相关的疾病的用途。

[0043] 在描述本发明的组合物和方法前,应理解,本发明不限于所描述的具体组合物、方法和实验条件,因为这样的组合物、方法和条件可以变化。还应理解,本文所用的术语仅用于描述具体实施方式的目的,并不旨在是限制性的,因为本发明的范围将仅在所附权利要求中限定。

[0044] 除非上下文另外清楚地规定,否则如本说明书和所附权利要求所用,不使用数量词限定以及单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述/该/这些(the)”包括复数指示物。因此,例如,对“所述/该方法”的提及包括在阅读本公开之后对于本领域技术人员而言将变得清楚的本文所述的类型的一种或多种方法和/或步骤等。

[0045] 将本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都通过援引并入本文,并入程度就像每个单独的出版物、专利或专利申请被明确且单独地指出通过援引并入一样。

[0046] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文所述的那些方法和材料类似或等同的任何方法和材料都可以用于本发明的实践或测试,但将理解,修改和变化涵盖在本公开的精神和范围内。现在描述优选的方法和材料。

[0047] 本文提供了与Gal9特异性结合的亲和力成熟的抗体。亲和力成熟是用于从抗体产生增加的亲和力、亲合力和抗抗原活性的过程(参见例如,Teixeira等人,mAbs 14(1)

e2115200,2022)。

[0048] 对在国际公开号WO WO2021/139682中公开的抗体HFB9-2hz11(Ab A)进行亲和力成熟。鉴定出七种抗体,这些抗体具有显著改善的Gal9结合亲和力。这些抗体展示出CDR区的可变性,与亲本抗体相比,这些抗体在Gal9结合方面保持并改善。因此,在一方面,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)重链可变区(HCVR),该重链可变区包含(i)具有氨基酸序列$GYX_1FX_2X_3YTIH$(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X_1选自T、E、P或A;X_2选自T、G或S;以及X_3选自E、S或D;(ii)具有氨基酸序列$WFYPGSGSTX_4YAQKFQG$(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X_4选自E、W或V;以及(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及(b)轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含(i)具有氨基酸序列$KSSX_5X_6X_7LX_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}NX_{14}LA$(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X_5选自Q或R;X_6选自S或N;X_7选自L、V或I;X_8选自Y或W;X_9选自S或P;X_{10}选自N、S、P或A;X_{11}选自N或H;X_{12}选自Q、N或Y;X_{13}选自K或R;以及X_{14}选自Y或H;(ii)具有氨基酸序列$WX_{15}SX_{16}RX_{17}X_{18}$的LCVR CDR2序列,其中$X_{15}$选自A或G;$X_{16}$选自T、N、M或A;$X_{17}$选自G或E;以及$X_{18}$选自S、E、Y、P或T;以及(iii)具有氨基酸序列$QQYYX_{19}X_{20}PFT$(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X_{19}选自S或F;以及X_{20}选自Y或F,前提条件是抗体不包含HCVR CDR1序列GYTFTEYTIH(SEQ ID NO:2)、HCVR CDR2序列WFYPGSGSTEYAQKFQG(SEQ ID NO:9)、HCVR CDR3序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)、LCVR CDR1序列KSSQSLLYSNNQKNYLA(SEQ ID NO:14)、LCVR CDR2序列WASTRGS(SEQ ID NO:22)以及LCVR CDR3序列QQYYSYPFT(SEQ ID NO:31),其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0049] 在一种实施方式中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)HCVR,该HCVR包含(i)具有氨基酸序列$GYX_1FX_2X_3YTIH$(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X_1选自T或E,以及X_2选自T或G,以及X_3是E;(ii)具有氨基酸序列$WFYPGSGSTX_4YAQKFQG$(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X_4选自W或V;以及(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及(b)LCVR,该LCVR包含(i)具有氨基酸序列$KSSX_5X_6X_7LX_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}N\ X_{14}LA$(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X_5是Q,X_6是S,X_7是L,X_8是Y,X_9选自S或P,X_{10}是N,X_{11}是N,X_{12}是Q,X_{13}是K;以及X_{14}是Y;(ii)具有氨基酸序列$WX_{15}SX_{16}RX_{17}X_{18}$的LCVR CDR2序列,其中$X_{15}$是A,$X_{16}$是T,$X_{17}$是G,以及$X_{18}$选自S或E;以及(iii)具有氨基酸序列$QQYYX_{19}X_{20}PFT$(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X_{19}是S,以及X_{20}选自Y或F,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0050] 其中的具体实施方式包括分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(A)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:3的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:10的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:15的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:23的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:32的LCVR CDR3序列;或(B)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:4的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:11的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含SEQ ID NO:14的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:24的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:31的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0051] 在另一种实施方式中,分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)HCVR,该HCVR包含(i)具有氨基酸序列$GYX_1FX_2X_3YTIH$(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X_1选自T、P或

A;X_2选自T、S或G;以及X_3选自S或D;(ii)具有氨基酸序列WFYPGSGSTX$_4$YAQKFQG(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X_4是E;以及(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及(b)LCVR,该LCVR包含:(i)具有氨基酸序列KSSX$_5$X$_6$X$_7$LX$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$NX$_{14}$LA(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X_5选自Q或R;X_6选自S或N;X_7选自L、V或I;X_8选自Y或W;X_9是S,X_{10}选自S、P或A;X_{11}选自N或H;X_{12}是N或Y;X_{13}是K或R;以及X_{14}是Y或H;(ii)具有氨基酸序列WX$_{15}$SX$_{16}$RX$_{17}$X$_{18}$的LCVR CDR2序列,其中X_{15}选自A或G;X_{16}选自T、N、M或A;X_{17}选自G或E;以及X_{18}选自S、Y、P或T;以及(iii)具有氨基酸序列QQYYX$_{19}$X$_{20}$PFT(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X_{19}是F,以及X_{20}是Y;其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0052] 其中的具体实施方式包括分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(C)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:5的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含SEQ ID NO:16的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:25的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;(D)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:6的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:17的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:26的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;(E)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:18的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:27的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;(F)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:19的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:28的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;或(G)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:20的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:29的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0053] 在另一种实施方式中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)HCVR,该HCVR包含(i)具有氨基酸序列GYX$_1$FX$_2$X$_3$YTIH(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X_1选自E或P;X_2选自T或S;以及X_3选自E或S;(ii)具有氨基酸序列WFYPGSGSTX$_4$YAQKFQG(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X_4选自W或E;以及(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及(b)轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含:(i)具有氨基酸序列KSSX$_5$X$_6$X$_7$LX$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$NX$_{14}$LA(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X_5是Q,X_6选自S或N,X_7选自L或V,X_8选自Y或W,X_9选自P或S,X_{10}选自N或S,X_{11}是N,X_{12}选自Q或N,X_{13}是K;以及X_{14}是Y;(ii)具有氨基酸序列WX$_{15}$SX$_{16}$RX$_{17}$X$_{18}$的LCVR CDR2序列,其中X_{15}选自A或G;X_{16}选自T或N;X_{17}选自G或E,以及X_{18}是S;以及(iii)具有氨基酸序列QQYYX$_{19}$X$_{20}$PFT(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X_{19}选自S或F;以及X_{20}选自Y或F,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0054] 其中的具体实施方式包括分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含(A)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:3的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:10的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:15的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:23的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:32的LCVR CDR3序

列;或(C)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:5的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含SEQ ID NO:16的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:25的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Ga19。

[0055] 术语“抗体”、“ab”、“免疫球蛋白”或“Ig”在最广泛的意义上是指具有相同结构特征的糖蛋白(即,含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子),并且涵盖各种抗体结构,包括天然或人工、单价或多价抗体,包括但不限于单克隆抗体(包括嵌合单克隆抗体、人源化单克隆抗体和人单克隆抗体,特别是人源化单克隆抗体)、多克隆抗体、单链抗体、抗体片段和多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。虽然抗体展现出对特异性抗原的结合特异性,但免疫球蛋白既包括抗体又包括缺乏抗原特异性的其他抗体样分子。“抗体”涵盖包含抗原结合位点的任何多肽,无论来源、起源物种、产生方法和特征如何。术语“抗体”还可以广泛地指代包含重链的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3以及轻链的CDR1、CDR2和CDR3的分子,其中分子能够与抗原结合。

[0056] 在一些实施方式中,抗体包含重链可变区(HCVR)和轻链可变区(LCVR)。在一些实施方式中,抗体包含至少一条重链(HC)(其包含重链可变区和至少一部分重链恒定区)和至少一条轻链(LC)(其包含轻链可变区和至少一部分轻链恒定区)。在一些实施方式中,抗体包含两条重链和两条轻链,其中每条重链包含重链可变区和至少一部分重链恒定区,其中每条轻链包含轻链可变区和至少一部分轻链恒定区。

[0057] “天然抗体”和“完整免疫球蛋白”等通常是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成。来自任何脊椎动物物种的轻链都可以基于其恒定结构域的氨基酸序列被分配给两种明显不同的类型(称为kappa(κ)和lambda(λ))之一。根据其重链的恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以被分配给不同的类别。有以下五个主要的免疫球蛋白类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的几种可以进一步分为亚类(同种型)。例如,IgG抗体包括但不限于IgG1(包含γ1恒定区)、IgG2(包含γ2恒定区)、IgG3(包含γ3恒定区)和IgG4(包含γ4恒定区)抗体;IgA抗体包括但不限于IgA1(包含α1恒定区)和IgA2(包含α2恒定区)抗体;并且IgM抗体包括但不限于IgM1(包含μ1恒定区)和IgM2(包含μ2恒定区)。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定结构域分别被称为α、δ、ε、γ和μ。不同免疫球蛋白类别的亚基结构和三维构型是熟知的。

[0058] 完整抗体可以具有一种或多种“效应子功能”,效应子功能是指归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区或任何其他经修饰的Fc区)的那些生物活性。抗体效应子功能的示例包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬;下调细胞表面受体(例如,B细胞受体(BCR));以及抗原呈递细胞或树突细胞交叉呈递抗原。

[0059] 每条轻链通过一个共价二硫键连接至重链,而二硫键的数量在不同免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条重链在一端具有可变结构域(V_H),随后是多个恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(V_L)并且在其另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。认为特定氨基酸残基在轻链与重链可变结构域之间形成界面。每个可变区包含称为互补决定区(CDR)或高变区的三个区段,并且可变结构域的更高

度保守的部分被称为框架区(FR)。重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区,主要采用β-折叠构型,通过三个CDR连接,这些CDR形成连接β-折叠结构并且在一些情况下形成β-折叠结构的一部分的环。每条链中的CDR通过FR紧密保持在一起,并且与来自另一条链的CDR一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人,NIH出版号91-3242,第I卷,第647-669页[1991])。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但是展现出各种效应子功能,如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0060] 如本文所用的术语"重链可变区(HCVR)"至少是指包含重链CDR1(CDR-H1)、框架2(HFR2)、CDR2(CDR-H2)、FR3(HFR3)和CDR3(CDR-H3)的区域。在一些实施方式中,重链可变区还包含在CDR-H1的N末端的FR1(HFR1)的至少一部分(例如,全部)和/或在CDR-H3的C末端的FR4(HFR4)的至少一部分(例如,全部)。

[0061] 如本文所用的术语"重链恒定区"是指包含至少三个重链恒定结构域CH1、CH2和CH3的区域。非限制性示例性重链恒定区包括γ、δ和α。非限制性示例性重链恒定区还包括ε和μ。每种重链恒定区对应于一种抗体同种型。例如,包含γ恒定区的抗体是IgG抗体,包含δ恒定区的抗体是IgD抗体,包含α恒定区的抗体是IgA抗体,包含ε恒定区的抗体是IgE抗体,并且包含μ恒定区的抗体是IgM抗体。

[0062] 如本文所用的术语"轻链可变区(LCVR)"是指包含轻链CDR1(CDR-L1)、框架(FR)2(LFR2)、CDR2(CDR-L2)、FR3(LFR3)和CDR3(CDR-L3)的区域。在一些实施方式中,轻链可变区还包含在CDR-L1的N末端的FR1(LFR1)的至少一部分(例如,全部)和/或在CDR-L3的C末端的FR4(LFR4)的至少一部分(例如,全部)。

[0063] 如本文所用的术语"轻链恒定区"是指包含轻链恒定结构域CL的区域。非限制性示例性轻链恒定区包括λ和κ。

[0064] 如本文所用的术语"轻链"是指至少包含轻链可变区且具有或不具有前导序列的多肽。在一些实施方式中,轻链包含轻链恒定区的至少一部分。如本文所用的术语"全长轻链"是指包含轻链可变区和轻链恒定区且具有或不具有前导序列的多肽。

[0065] 如本文所用的术语"单克隆抗体"是指获自基本上同质的抗体群体的抗体,即除了可以少量存在的可能天然存在的突变之外,构成群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体具有高度特异性,针对单一抗原位点。此外,与典型地包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了其特异性外,单克隆抗体的优点还在于它们未被其他免疫球蛋白污染。修饰语"单克隆的"指示抗体的特征获自基本上同质的抗体群体,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,要根据本发明使用的单克隆抗体可以通过由Kohler等人,Nature[自然],256:495(1975)首次描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过重组DNA方法(参见例如,美国专利号4,816,567)制备。例如,"单克隆抗体"还可以使用Clackson等人,Nature[自然],352:624-628(1991)和Marks等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],222:581-597(1991)中描述的技术从噬菌体抗体文库分离,从酵母展示分离,以及从转基因动物分离。

[0066] 术语"氨基酸"和"天然存在的氨基酸"在最广泛的意义上是指α-氨基酸,它们是既包含氨基官能团又包含羧酸官能团的有机化合物,从其中产生蛋白质。每种α-氨基酸含有连接至氨基、羧酸、氢和"R"基团的中心碳原子。该"R"基团在每种氨基酸之间变化,并且是区分每种氨基酸的决定性差异。二十种氨基酸由真核遗传密码编码,并且在蛋白质构建过

程中天然掺入多肽链中,并且因此被称为“天然存在的”氨基酸。已知其他非天然存在的氨基酸,它们在蛋白质中未被发现或不通过标准细胞机制(例如,从糖酵解过程中产生的中间体合成)在真核细胞内天然产生。二十种天然存在的氨基酸按它们不同的“R”基团侧链的化学特性来分类。这些特性包括带正电荷或带负电荷的侧链、极性不带电荷的侧链、疏水性侧链以及甘氨酸、半胱氨酸和脯氨酸(其含有不易按以上特性分类的侧链)的特殊情况侧链。

[0067] 20种天然存在的氨基酸包括:丙氨酸(Ala,A)、精氨酸(Arg,R)、天冬酰胺(Asn,N)、天冬氨酸(Asp,D)、半胱氨酸(Cys,C)、谷氨酰胺(Gln,Q)、谷氨酸(Glu,E)、甘氨酸(Gly,G)、组氨酸(His,H)、异亮氨酸(Ile,I)、亮氨酸(Leu,L)、赖氨酸(Lys,K)、甲硫氨酸(Met,M)、苯丙氨酸(Phe,F)、脯氨酸(Pro,P)、丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、色氨酸(Trp,W)、酪氨酸(Tyr,Y)和缬氨酸(Val,V)。

[0068] 在20种天然存在的氨基酸中,五种具有可以带电荷的侧链。在pH＝7时,以下三种带正电荷:赖氨酸(Lys,K)、精氨酸(Arg,R)和组氨酸(His,H)(碱性侧链);并且以下两种带负电荷:天冬氨酸(Asp,D)和谷氨酸(Glu,E)(酸性侧链)。极性不带电荷的氨基酸包括丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、天冬酰胺(Asn,N)和谷氨酰胺(Gln,Q),它们容易与水和其他氨基酸形成氢键。它们在正常条件下不电离,但突出的例外是丝氨酸蛋白酶中的催化丝氨酸。非极性或疏水性氨基酸是丙氨酸(Ala,A)、缬氨酸(Val,V)、异亮氨酸(Ile,I)、亮氨酸(Leu,L)、甲硫氨酸(Met,M)、苯丙氨酸(Phe,F)、色氨酸(Trp,W)和酪氨酸(Tyr,Y),并且它们的相互作用是将蛋白质折叠成其功能性三维结构的过程背后的主要驱动力。这些氨基酸的侧链都不易电离并且因此不具有pKa,除了酪氨酸之外,其中酪氨酸的羟基可以在高pH下去质子化,形成带负电荷的酚盐。由于这一点,可以将酪氨酸放入极性不带电荷的氨基酸类别,但是其在水中的非常低的溶解度与疏水性氨基酸的特征很好地匹配。

[0069] 几种侧链没有被带电荷、极性和疏水性类别很好地描述。甘氨酸(Gly,G)可以被认为是极性氨基酸,因为它的小尺寸意味着它的溶解度主要取决于氨基和羧酸基团。然而,缺乏任何侧链为甘氨酸在氨基酸中提供了独特的柔性,且对蛋白质折叠有很大影响。半胱氨酸(Cys,C)还可以容易地形成氢键,这将将其放入极性氨基酸类别,但在蛋白质结构中经常可以发现它与其他半胱氨酸形成共价键(称为二硫键)。这些键影响蛋白质的折叠和稳定性,并且在抗体形成中是必需的。脯氨酸(Pro,P)具有烷基侧链并且可以被认为是疏水性的,但是因为侧链连接回到α氨基上,所以当掺入蛋白质中时,它变得特别不具有柔性。与甘氨酸一样,它以在氨基酸中独特的方式影响蛋白质结构。G、C和P通常被分类为“特殊情况侧链”氨基酸。

[0070] 本文所述的抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0071] 半乳凝素(动物凝集素家族的成员)是通过共享的共有氨基酸序列来定义的,这些共享的共有氨基酸序列赋予与含有β-半乳糖苷的糖缀合物的特异性结合。从低等生物体(如线虫和海绵)到高等哺乳动物物种(如人)都普遍地表达半乳凝素家族。这样的蛋白质在许多物种中的存在加上对碳水化合物识别结构域(CRD)的配体识别关键的高度保守的氨基酸残基的存在表明,半乳凝集素参与关键的保守的生物过程。半乳凝素CRD(其典型地由紧密折叠成五链和六链β-折叠的夹心结构的大约130个氨基酸残基构成)识别N-乙酰乳糖胺(LacNAc)的基本结构。迄今为止,已经鉴定出哺乳动物半乳凝素家族的十五个成员。Hirabayashi和Kasai提出基于其结构域组织将半乳凝素亚家族指定为原型、嵌合体型或串

联重复型。原型半乳凝素(半乳凝素-1、2、5、7、10、11、13、14和15)含有具有短N末端序列的单个CRD,而串联重复型半乳凝素(半乳凝素-4、6、8、9和12)包含通过短接头肽序列连接的两个不相同的CRD。单一嵌合体型半乳凝素(半乳凝素-3)具有一个CRD,它具有含有富含脯氨酸-酪氨酸-甘氨酸的基序的几个重复的延伸的N末端。Gal9(串联重复型半乳凝素)最初分离自小鼠胚肾细胞,并且后来发现广泛分布在大鼠和小鼠组织中。相比之下,人Gal9的表达限于外周血白细胞和淋巴组织。据报道,最初克隆自人T细胞系的有效力的嗜酸性粒细胞化学引诱物ecalectin与人Gal9相同。存在几种哺乳动物Gal9异形体,每种异形体具有不同长度的接头。

[0072] Gal9展现出多种生物功能,包括细胞聚集、嗜酸性粒细胞化学引诱以及鼠胸腺细胞和T细胞与人黑色素瘤细胞的凋亡。小鼠Gal9以乳糖可抑制的方式诱导胸腺细胞凋亡。Gal9的化学引诱物活性取决于其碳水化合物结合活性,并且需要两个CRD。因此,Gal9的生理功能可能取决于其碳水化合物识别能力。已经报道了小鼠Gal9的两种生理靶标,即Tim-3和葡萄糖转运蛋白(GLUT)-2。Tim-3在1型T辅助(Th1)细胞的表面上特异性表达。Gal9识别共价结合至Tim-3的一种或多种碳水化合物;Gal9-Tim3途径诱导Th1细胞的细胞死亡,表明Gal9在下调Th1应答方面发挥至关重要的作用。

[0073] 然而,Gal9还在细胞外表面上与GLUT-2相互作用,GLUT-2是在胰腺β细胞表面上表达的葡萄糖转运蛋白,它对于葡萄糖刺激的胰岛素分泌是必需的。Gal9通过识别碳水化合物部分来识别GLUT-2为GLUT-2在细胞表面上驻留所需。糖基化的丧失或聚糖的添加减弱了细胞表面上的GLUT-2的半衰期,并且引起了受体胞吞以及再分布到内体和溶酶体中。

[0074] 尽管尚未鉴定出在体内由Gal9识别的确切靶碳水化合物结构,但体外分析已经证明人Gal9对含有β-半乳糖苷的多种寡糖具有高亲和力。体外分析揭示,人Gal9的N末端CRD(NCRD)和C末端CRD(CCRD)具有不同的寡糖结合亲和力。与人Gal9的CCRD相比,NCRD对复合糖缀合物(如福斯曼五糖和聚合的N-乙酰乳糖胺)展现出显著的亲和力。

[0075] 由于人Gal9的生物活性将取决于每个CRD的配体特异性以及随后由两个CRD赋予的多价结合,因此人Gal9 NCRD的特定碳水化合物识别特性的结构分析应当提供对Gal9的生理功能的了解。

[0076] 在一方面,(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)或(G)的抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:68的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。在另一方面,(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)或(G)的抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:69的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。在另一方面,(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)或(G)的抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:70的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。在另一方面,(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)或(G)的抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:76的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。在另一方面,(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)或(G)的抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:77的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。在一

方面,(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)或(G)的抗体或其抗原结合片段的LCVR序列任选地进一步包含SEQ ID NO:72的LFR1序列、SEQ ID NO:73的LFR2序列、SEQ ID NO:74的LFR3序列和/或SEQ ID NO:75的LFR4序列。

[0077] 在另一方面,HCVR序列是SEQ ID NO:39和/或LCVR序列是SEQ ID NO:41;或者HCVR序列是SEQ ID NO:43和/或LCVR序列是SEQ ID NO:45;或者HCVR序列是SEQ ID NO:47和/或LCVR序列是SEQ ID NO:49;或者HCVR序列是SEQ ID NO:51和/或LCVR序列是SEQ ID NO:53;或者HCVR序列是SEQ ID NO:55和/或LCVR序列是SEQ ID NO:57;或者HCVR序列是SEQ ID NO:59和/或LCVR序列是SEQ ID NO:61;或者HCVR序列是SEQ ID NO:63和/或LCVR序列是SEQ ID NO:65。在一些方面,抗体包含:SEQ ID NO:39的HCVR序列以及SEQ ID NO:41的LCVR序列;或SEQ ID NO:43的HCVR序列以及SEQ ID NO:45的LCVR序列;或SEQ ID NO:47的HCVR序列以及SEQ ID NO:49的LCVR序列;或SEQ ID NO:51的HCVR序列以及SEQ ID NO:53的LCVR序列;或SEQ ID NO:55的HCVR序列以及SEQ ID NO:57的LCVR序列;或SEQ ID NO:59的HCVR序列以及SEQ ID NO:61的LCVR序列;或SEQ ID NO:63的HCVR序列以及SEQ ID NO:65的LCVR序列。

[0078] 在一种具体实施方式中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:3的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:10的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:15的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:23的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:32的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Ga19。在一方面,抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:68的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。在一种实施方式中,HCVR序列是SEQ ID NO:39。在其他方面,抗体或其抗原结合片段的LCVR序列任选地进一步包含SEQ ID NO:72的LFR1序列、SEQ ID NO:73的LFR2序列、SEQ ID NO:74的LFR3序列和/或SEQ ID NO:75的LFR4序列。在一种实施方式中,LCVR序列是SEQ ID NO:41。抗体在本文中特别例示为具有SEQ ID NO:38的重链序列以及SEQ ID NO:40的轻链序列(Ab001)。

[0079] 在另一种具体实施方式中,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:5的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含SEQ ID NO:16的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:25的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Ga19。在一方面,抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:69的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。在一种实施方式中,HCVR序列是SEQ ID NO:47。在其他方面,抗体或其抗原结合片段的LCVR序列任选地进一步包含SEQ ID NO:72的LFR1序列、SEQ ID NO:73的LFR2序列、SEQ ID NO:74的LFR3序列和/或SEQ ID NO:75的LFR4序列。在一种实施方式中,LCVR序列是SEQ ID NO:49。抗体在本文中特别例示为具有SEQ ID NO:46的重链序列以及SEQ ID NO:48的轻链序列(Ab 003)。

[0080] 在一方面,抗体是人源化抗体。

[0081] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是含有源自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌

合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')2或抗体的其他抗原结合子序列)。在大多数情况下,人源化抗体是这样的人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体)(如小鼠、大鼠或兔)的具有所需特异性、亲和力和能力的CDR的残基替代。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被对应的非人残基替代。此外,人源化抗体可以包含既不在受体抗体中也不在输入的CDR或框架序列中发现的残基。进行这些修饰以进一步改善并最大化抗体可制造性、稳定性和/或性能。通常,人源化抗体将包含至少一个并且典型地两个可变结构域的基本上全部,其中所有或基本上所有的CDR对应于非人免疫球蛋白的那些CDR,并且所有或基本上所有的FR是人免疫球蛋白序列的那些FR。人源化抗体还将最佳地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。关于进一步的细节,参见Jones等人,Nature[自然],321:522-525(1986);Reichmann等人,Nature[自然],332:323-329(1988);以及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.[结构生物学新见],2:593-596(1992)。人源化抗体包括PRIMATIZED™抗体,其中抗体的抗原结合区源自通过用目的抗原免疫猕猴而产生的抗体(参见Weber,J等人,From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies[从兔抗体库到兔单克隆抗体].Exp Mol Med[实验与分子医学]49,e305(2017))。

[0082] 用于人源化非人抗体的方法是本领域熟知的(参见Yaghoub Safdari等人,(2013)Antibody humanization methods-a review and update[抗体人源化方法-综述与更新],Biotechnology and Genetic Engineering Reviews[生物技术与基因工程评论],29:2,175-186,DOI:10.1080/02648725.2013.801235)。优选地,人源化抗体具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,它们典型地取自“输入”可变结构域。人源化基本上可以按照Winter及其同事的方法(Jones等人,Nature[自然],321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature[自然],332:323-327(1988);Verhoeyen等人,Science[科学],239:1534-1536[1988])通过将啮齿动物CDR或CDR序列取代为人抗体的对应序列来进行。因此,这样的“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号4,816,567),其中远少于完整的人可变结构域已经被来自非人物种的对应序列取代。实际上,人源化抗体典型地是这样的人抗体,其中一些CDR残基和可能地一些FR残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。

[0083] 要用于制备人源化抗体的人可变结构域(轻链和重链二者)的选择对于降低抗原性是非常重要的。根据所谓的“最佳适配”法,针对已知人可变结构域序列的整个文库筛选啮齿动物抗体的可变结构域的序列。然后将最接近啮齿动物序列的人序列接受为人源化抗体的人框架区(FR)(Sims等人,J.Immunol.[免疫学杂志],151:2296(1993);Chothia等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],196:901[1987])。另一种方法使用源自轻链或重链的特定亚组的所有人抗体的共有序列的特定框架区。相同的框架可以用于几种不同的人源化抗体(Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],89:4285(1992);Presta等人,J.Immunol.[免疫学杂志],151:2623[1993])。

[0084] 进一步重要的是在保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物特性的情况下人源化抗体。为了实现这个目标,根据优选的方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念人源化产物的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可

获得的,并且是本领域技术人员熟悉的。图示并展示所选的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序是可获得的。检查这些展示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可以从受体和输入序列中选择并组合FR残基,使得实现所需抗体特征,如对一种或多种靶抗原的增加的亲和力。通常,CDR残基直接且最实质地参与影响抗原结合。

[0085] 可替代地,现在有可能产生在免疫接种后能够在不存在内源性免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的完整库的转基因动物(例如,小鼠)。例如,已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。在这样的种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致抗原激发后产生人抗体。参见例如,Jakobovits等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],90:2551(1993);Jakobovits等人,Nature[自然],362:255-258(1993);Bruggermann等人,Year in Immuno.[免疫学的一年],7:33(1993)。人抗体还可以源自抗体展示文库,例如噬菌体展示文库(Hoogenboom等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],222:581-597[1991]以及Valldorf,Bernhard等人,"Antibody display technologies:selecting the cream of the crop"["抗体展示技术:选择同类中的最佳者"]Biological Chemistry[生物化学],第403卷,第5-6期,2022,第455-477页)。

[0086] 可以通过用来自人Fv可变区的等效序列替代不直接参与抗原结合的Fv可变区的序列来人源化抗体。人源化嵌合抗体的一般性综述由Morrison等人(Science[科学]229:1202-1207(1985))和Oi等人(BioTechniques[生物技术]4:214(1986))提供。这些方法包括分离、操纵和表达编码来自重链或轻链中的至少一个的全部或部分免疫球蛋白Fv可变区的核酸序列。这样的核酸的来源是本领域技术人员熟知的,并且例如可以获自例如产生抗体的杂交瘤。然后可以将编码人源化或嵌合抗体或其片段的重组DNA克隆到适当的表达载体中。

[0087] 可替代地,人源化抗体可以通过CDR取代产生(美国专利号5,225,539;Jones,Nature[自然]321:552-525(1986);Verhoeyan等人,Science[科学]239:1534(1988);以及Beidler,J.Immunol.[免疫学杂志]141:4053-4060(1988))。

[0088] 在另一方面,其抗原结合片段是Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、单链Fv或scFv、二硫键连接的F_v、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、$IgGACH_2$、微型抗体、$F(ab')_3$、四抗体、三抗体、双抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$、串联scFv、DART®、TandAb、纳米抗体(参见mdpi.com/2073-4468/8/2/28/pdf)或scFv-Fc。

[0089] 实验性地,抗体可以用蛋白水解酶木瓜蛋白酶切割,这导致每条重链断裂,产生三个单独的抗体片段。"抗体片段"包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的示例包括Fab、Fab'和$F(ab')_2$、Fc片段或Fc融合产物、单链Fv(scFv)、二硫键连接的Fv(sdfv)和包含VL或VH结构域的片段;双抗体、三抗体等(Zapata等人Protein Eng.[蛋白质工程]8(10):1057-1062[1995])。术语"抗体片段"或(抗体的)"抗原结合部分"包括但不限于能够结合抗原的片段。由轻链和在质量上与轻链大致相等的重链片段构成的两个单元被称为Fab片段(即,"抗原结合"片段)。由重链的两个相等区段构成的第三单元被称为Fc片段。Fc片段典型地不参与抗原-抗体结合,但是在涉及清除体内抗原的后期过程中

是重要的。

[0090] Fab片段含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。“Fab”是指分子量为大约50,000道尔顿的抗体片段,并且具有与抗原结合的活性。它包含通过二硫桥连接的重链的N末端侧的大约一半和整条轻链。Fab可以特别地通过经由蛋白酶(木瓜蛋白酶)处理免疫球蛋白来获得。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在重链CH1结构域的羧基末端添加了几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH在本文中是这样的Fab'的名称,其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基携带游离的巯基。

[0091] $F(ab')_2$抗体片段最初作为Fab'片段对产生,它们之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。术语“$F(ab')_2$”指的是大约100,000道尔顿并且具有与抗原结合的活性的片段。该片段略大于经由铰链区中的二硫桥连接的两个Fab片段。这些片段是通过用蛋白酶(胃蛋白酶)处理免疫球蛋白来获得的。Fab片段可以通过切割铰链区的二硫桥获自$F(ab')_2$片段。

[0092] 抗体的Fc区是抗体的与细胞表面受体和补体系统的一些蛋白质相互作用的尾区。这种特性允许抗体激活免疫系统。在IgG、IgA和IgD抗体同种型中,Fc区由源自抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域的两个相同的蛋白质片段构成;在每条多肽链中IgM和IgE Fc区含有三个重链恒定结构域(CH结构域2-4)。IgG的Fc区携带高度保守的N-糖基化位点。Fc片段的糖基化对于Fc受体介导的活性是必需的。附接至该位点的N-聚糖主要是复杂类型的核心岩藻糖基化的二触角结构。此外,少量的这些N-聚糖还携带平分型GlcNAc和α-2,6连接的唾液酸残基。

[0093] Fc融合蛋白(也称为Fc嵌合融合蛋白、Fc-Ig、基于Ig的嵌合融合蛋白和Fc-标签蛋白)由遗传连接至目的肽或蛋白质的IgG的Fc结构域构成。Fc融合蛋白已经成为用于体内和体外研究的有价值的试剂。Fc融合的结合配偶体的范围可以是单一肽、在与细胞表面受体结合后激活的配体、信号传导分子、在二聚化后激活的受体的胞外结构域或作为用于鉴定蛋白质微阵列中的结合配偶体的诱饵蛋白。Fc结构域在体内最有价值的特征之一是它可以显著延长目的蛋白质的血浆半衰期,对于生物治疗药物,这导致治疗功效改善;该属性使Fc融合蛋白成为有吸引力的生物治疗剂。

[0094] Fc融合蛋白可以是包含Fc融合蛋白和药学上可接受的载体赋形剂或载体的药物组合物的一部分。药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂是本领域熟知的(Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学],第16版,Osol,A.编辑(1980))。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且可以包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽,如XTEN(参见Haeckel A等人,XTEN as Biological Alternative to PEGylation Allows Complete Expression of a Protease-Activatable Killin-Based Cytostatic[XTEN作为PEG化的生物替代物允许基于蛋白酶可激活的Killin的细胞抑制剂的完全表达].PLoS One.[公共科学图书馆·综合]2016年6月13日;11(6):e 0157193.doi:10.1371/journal.pone.0157193.PMID:27295081;PMCID:PMC4905650);蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷

酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反荷离子,如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0095] "Fv"是含有完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。"scFv"的二聚体对应于通过肽键连接在一起的两个scFv分子。该Fv链经常是融合基因表达的结果,该融合基因包含通过编码肽的接头序列连接的编码VH和VL的基因。人scFv片段可以包含优选地通过使用遗传重组技术的手段以适当构象维持的CDR区。该区域由紧密非共价缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体构成。正是在该构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以将抗原结合位点限定在VH-VL二聚体的表面上。共同地,六个CDR为抗体赋予抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特异性的CDR的Fv的一半)也可以具有识别并结合抗原的能力,但亲和力低于整个结合位点。

[0096] "单链Fv"或"scFv"抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。优选地,Fv多肽进一步包含VH与VL结构域之间的多肽接头,它使得sFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于sFv的综述,参见Pluckthun,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies[单克隆抗体的药理学],第113卷,Rosenburg和Moore编辑,Springer-Verlag[施普林格出版社],纽约,第269-315页(1994)。

[0097] "dsFv"片段是通过二硫桥稳定的VH-VL异二聚体;它可以是二价的($dsFv_2$)。二价$sc(Fv)_2$或多价抗体的片段可以通过单价scFvs的缔合自发形成,或者通过经由肽结合序列连接scFv片段而产生。

[0098] Fc片段支持抗体的生物特性,特别是其被免疫效应物识别或激活补体的能力。它由重链的铰链区之外的恒定片段构成。

[0099] 术语"双抗体"意指具有两个抗原固定位点的小抗体片段。这些片段在同一条VH-VL多肽链中包含连接至可变轻链结构域VL的可变重链结构域VH。使用太短而不允许同一条链的两个结构域匹配的结合序列,必然发生与另一条链的两个互补结构域的匹配,并且因此产生两个抗原固定位点。

[0100] 已经开发了用于产生抗体片段的各种技术。传统地,这些片段是经由完整抗体的蛋白水解消化而得到(参见例如,Morimoto等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods[生物化学和生物物理方法杂志]24:107-117(1992)和Brennan等人,Science[科学],229:81[1985])。然而,现在可以通过重组宿主细胞直接产生这些片段。例如,可以从以上讨论的抗体噬菌体文库分离抗体片段。可替代地,可以直接从大肠杆菌回收Fab'-SH片段,并且将其化学偶联以形成$F(ab')_2$片段(Carter等人,Bio/Technology[生物/技术]10:163-167[1992])。根据另一种方法,可以直接从重组宿主细胞培养物分离$F(ab')_2$片段。用于产生抗体片段的其他技术对于熟练从业人员将是清楚的。在其他实施方式中,选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185。

[0101] 在其他方面,单克隆抗体或其抗原结合片段以小于约5nM、2nM、1nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM、0.05nM或0.01nM的K_d结合人Gal9。

[0102] 在一些方面,亲和力成熟的单克隆抗体或其抗原结合片段对Gal9所具有的亲和力是非亲和力成熟的Ab A的约2-10倍。例如,亲和力成熟的单克隆抗体或其抗原结合片段对

Gal9所具有的亲和力是非亲和力成熟的Ab A的约2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍。

[0103] 术语“抗原结合结构域”是指抗体分子的包含与抗原的一部分或全部特异性结合或互补的区域的部分。在抗原较大的情况下,抗体可以仅与抗原的特定部分结合。“表位”或“抗原决定簇”是抗原分子的负责与抗体的抗原结合结构域相互作用的部分。抗原结合结构域可以由一个或多个抗体可变结构域(例如,由VH结构域构成的所谓的Fd抗体片段)提供。抗原结合结构域可以包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

[0104] 根据本发明的“抗原”覆盖将引起免疫应答的任何物质。特别地,“抗原”涉及与抗体或T淋巴细胞(T细胞)特异性反应的任何物质,优选肽或蛋白质。根据本发明,术语“抗原”包括包含至少一个表位的任何分子。优选地,在本发明的上下文中的抗原是任选地在处理后诱导免疫反应的分子。根据本发明,可以使用任何合适的抗原,它是免疫反应的候选物,其中免疫反应优选地是细胞免疫反应。在本发明的实施方式的上下文中,抗原优选地由细胞、优选地由抗原呈递细胞呈递,该抗原呈递细胞包括患病细胞、特别是癌细胞(在MHC分子的情况下),这导致针对抗原的免疫反应。抗原优选地是对应于天然存在的抗原的产物,或者源自天然存在的抗原。这样的天然存在的抗原包括肿瘤抗原。

[0105] 术语“表位”是指分子(如抗原)中的抗原决定簇,即是指由免疫系统识别的分子部分或片段。蛋白质(如肿瘤抗原)的表位优选地包含所述蛋白质的连续或不连续部分。

[0106] 术语“表位”、“抗原肽”、“抗原表位”、“免疫原性肽”和“MHC结合肽”可以在本文中可互换地使用,并且优选地涉及抗原的不完全表示,该抗原优选地能够引起针对抗原或细胞(其表达或包含并且优选地呈递抗原)的免疫应答。

[0107] 术语“结合亲和力”通常是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体之间的非共价相互作用的总和的强度。测量结合亲和力或结合活性的多种方法是本领域已知的,其中的任何方法都可以用于本发明的目的。以下描述了具体的说明性实施方式。

[0108] 如本文所用,“特异性结合”是指抗体与预定抗原结合。典型地,抗体以对应于约10^{-8}M或更小的K_D的亲和力结合,并且抗体以这样的亲和力(如由K_D-解离常数表示)与预定抗原结合,该亲和力是抗体与预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)结合的亲和力的至少1/10,并且优选至少1/100。可替代地,抗体可以以对应于约10^6M^{-1}、或约10^7M^{-1}、或约10^8M^{-1}、或10^9M^{-1}或更高的K_A的亲和力结合,并且抗体以这样的亲和力(如由K_A-缔合常数表示)与预定抗原结合,该亲和力是抗体与预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)结合的亲和力的至少10倍,并且优选至少100倍。

[0109] 如本文所用,术语“k_d”(sec^{-1})旨在指代特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。该值也被称为off值。如本文所用,术语“K_D”(M^{-1})旨在指代特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0110] 在一些实施方式中,本发明的Gal9抗体对Gal9(例如,对人Gal9)所具有的解离常数(K_d)≤5nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如,10^{-8}M或更小,例如从10^{-8}M至10^{-13}M,例如从10^{-9}M至10^{-13}M)。在某些实施方式中,Gal9抗体对Gal9(例如,对人Gal9)所具有的解离常数(K_d)≤5nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如,10^{-8}M或更小,例如从10^{-8}M至10^{-13}M,例如从10^{-9}M至10^{-13}M)。

[0111] 如本文所用,术语“k_a”($M^{-1}sec^{-1}$)旨在指代特定抗体-抗原相互作用的缔合速率常

数。如本文所用,术语“K_A”(M)旨在指代特定抗体-抗原相互作用的平衡缔合常数。

[0112] 本文所述的抗体可以使用表面等离子体共振(SPR)测定或使用溶液平衡测定(SEA)表征。

[0113] 表面等离子体共振(SPR)是在SPR芯片上的薄金表面处发生的物理现象。在SPR测定中,分析物(例如,抗体)的结合靶标通过葡聚糖接头共价附接至表面。当分析物流过表面时,在其与表面之间发生的结合可以直接测量为局部折射率的变化。这产生结合和解离曲线以及结合最大数据。SPR测定典型地比基于板的测定更灵敏,并且检测范围宽得多的抗体。这主要是由于缺乏洗涤步骤,它们将典型地去除大多数低亲和力靶标群体。SPR的无标记性质还消除了交联标记的混淆效应,简化了分析并且显著减少了假阴性。SPR测定还通过在缔合期后添加抗同种型抗体实现了在线同种型分型。

[0114] SPR测定或无标记相互作用测量可以应用于确定抗体特异性、研究相互作用的热力学、研究作用机制或用于表位表征或亲和力筛选。

[0115] 用未纯化样品可靠地估计亲和力的能力是有效筛选的先决条件。使用高通量亲和力筛选过程使得能够通过避免耗时的纯化步骤并且在短时间内实现初始表征数千种抗体候选物来降低总体项目成本和持续时间。这种亲和力筛选工具的基本特征是(1)可靠地鉴定亲和力改善的候选物;(2)合理地估计相应克隆的平衡解离常数(KD);(3)与粗生产基质(如细菌提取物或细胞培养上清液)相容;以及(4)进行高通量处理(例如,通过所有样品处理步骤的自动化)。尽管最先进的技术像表面等离子体共振(SPR;例如,百艾括尔公司(Biacore))和生物层干涉测量法(BLI;例如,奥克泰特公司(Octet))部分地满足这些标准,4,5,但在皮摩尔(pM)范围内以合理的通量区分亲和力仍然是个挑战。

[0116] 溶液平衡滴定(SET)或溶液平衡测定(SEA)使用高度灵敏的电化学发光作为读出系统。因为结合配偶体未被标记,所以所得KD表示真实亲和力的可靠近似值。为了筛选,用四种不同浓度的可溶性靶分子平衡经稀释的细菌裂解物或细胞培养上清液,并且随后在包被有相应抗原的384孔Meso Scale Discovery(MSD)板上定量未结合的抗体。为了根据所得滴定曲线确定KD值,应用从质量作用定律中针对1:1和2:1结合模式推导的拟合模型来同时评估数百种相互作用。

[0117] 在一方面,抗体与Gal9结合,并且抑制Gal9与Gal9受体(例如,TIM3或CD44)结合。在另一方面,抗体与Gal9结合,并且不抑制Gal9与Gal9受体(例如,TIM3或CD44)结合。在一些实施方式中,具有本文所提供的任何特征的Gal9抗体抑制Gal9的信号传导的至少25%、50%、75%、80%、90%或100%。

[0118] 在另一方面,抗体逆转Gal9诱导的T细胞(如$CD4^+$T细胞)的Th1凋亡。

[0119] 在一方面,抗体抑制Gal9诱导的Treg扩增。

[0120] 在另一种实施方式中,本发明提供了治疗有此需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的分离的单克隆抗体或抗原结合片段中的任一种,从而治疗受试者的癌症。

[0121] 如本文所用的术语“受试者”是指对其进行主题方法的任何个体或患者。通常,受试者是人,但如本领域技术人员将理解的,受试者可以是动物。因此,其他动物(包括脊椎动物,如啮齿动物(包括小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠)、猫、狗、兔、农场动物(包括牛、马、山羊、绵羊、猪、鸡等)和灵长类动物(包括猴、黑猩猩、猩猩和大猩猩))包括在受试者的定义内。

[0122] 术语“治疗”与术语“治疗方法”在本文中可互换地使用,并且是指1)治愈、减慢、减轻诊断的病理病症或障碍的症状和/或停止诊断的病理病症或障碍的进展的治疗性治疗或措施,以及2)预防/预防性措施。需要治疗的那些个体可以包括已经患有特定医学障碍的个体以及可能最终患上障碍的那些个体(即,需要预防性措施的那些个体)。“治疗”覆盖在哺乳动物(包括人)中用于疾病(在本文中也称为“障碍”或“病症”)的治疗剂的任何施用或应用,并且包括抑制疾病或疾病进展,抑制或减缓疾病或其进展,阻止其发展,部分或完全缓解疾病,部分或完全缓解疾病的一种或多种症状,或恢复或修复丧失的、缺失的或有缺陷的功能;或刺激低效过程。术语“治疗”还包括降低任何表型特征的严重程度和/或降低该特征的发生率、程度或可能性。

[0123] 术语“治疗有效量”、“有效剂量”、“治疗有效剂量”、“有效量”等是指主题化合物的研究人员、兽医、医生或其他临床医生正在寻求的将引起组织、系统、动物或人的生物或医学应答的量。通常,应答是患者的症状的改善或所需生物结局(例如,癌症的治疗)。本发明的Gal9抗体及其抗原结合片段的治疗有效量可以根据诸如以下的因素而变化:个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体及其抗原结合片段在个体中引起所需应答的能力。治疗有效量涵盖治疗有益作用超过Gal9抗体及其抗原结合片段的任何毒性或有害作用的量。

[0124] 术语“施用(administration of)”和/或“施用(administering)”应当理解为意指向需要治疗的受试者提供治疗有效量的药物组合物。施用途径可以是肠内、局部或肠胃外。因此,施用途径包括但不限于皮内、皮下、静脉内、肌内、玻璃体内、腹膜内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、皮内、经皮、经气管、表皮下、关节点内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内、口服、舌下、经颊、直肠、阴道、鼻部、眼部施用以及输注、吸入和雾化。如本文所用的短语“肠胃外施用(parenteral administration)”和“肠胃外施用(administered parenterally)”意指肠内和局部施用以外的施用方式。在各种实施方式中,可以皮下或静脉内施用Gal9抗体。

[0125] 本文所述的抗体及其抗原结合片段可以制备为包含抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体的药物组合物。“药学上可接受的载体”是指本领域传统的用于与治疗剂一起使用的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料、配制助剂或载体,这些物质和治疗剂共同构成用于向受试者施用的“药物组合物”。药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且与配制品的其他成分相容。药学上可接受的载体适用于所采用的配制品。例如,如果要口服施用治疗剂,则载体可以是凝胶胶囊。如果要皮下施用治疗剂,则载体理想地对皮肤不过敏,并且不引起注射部位反应。

[0126] 可以根据施用方法以多种单位剂型施用药物组合物。合适的单位剂型包括但不限于散剂、片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂、栓剂、贴剂、鼻喷雾剂、注射剂、可植入缓释配制品、脂质复合物等。

[0127] 主题组合物可以被配制成呈固体、半固体、液体或气体形式的制剂;包括但不限于片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、灌肠剂、注射剂、吸入剂和气雾剂。

[0128] 在各种实施方式中,包含Gal9抗体及其抗原结合片段的组合物以具有各种各样的药学上可接受的载体的配制品提供(参见例如,Gennaro,Remington:The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons:Drugfacts Plus[雷明顿:药学科学与实践,事实与比较:药物事实+],第20版(2003);Ansel等人,Pharmaceutical Dosage

Forms and Drug Delivery Systems[药物剂型和药物递送系统],第7版,Lippencott Williams and Wilkins[利平科特·威廉姆斯·威尔金斯出版社](2004);Kibbe等人,Handbook of Pharmaceutical Excipients[药物赋形剂手册],第3版,Pharmaceutical Press[英国医药出版社](2000);Strickley RG,Lambert WJ.A review of Formulations of Commercially Available Antibodies[可商购的抗体的配制品的综述].J Pharm Sci.[药物科学杂志]2021年7月;110(7):2590-2608.e56.doi:10.1016/j.xphs.2021.03.017.Epub 2021年3月28日.PMID:33789155)。各种药学上可接受的载体(其包括媒介物、佐剂和稀释剂)是可获得的。此外,各种药学上可接受的辅助物质(如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、湿润剂等)也是可获得的。非限制性示例性载体包括盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇及其组合。

[0129] 在各种实施方式中,包含Gal9抗体及其抗原结合片段的组合物可以被配制用于注射(包括皮下施用),通过将它们溶解、悬浮或乳化在水性或非水性溶剂(如植物油或其他油、合成脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸酯或丙二醇)中;并且如果需要的话,与传统添加剂(如增溶剂、等渗剂、助悬剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂)一起。

[0130] 在各种实施方式中,组合物可以被配制用于吸入,例如使用加压的可接受的推进剂(如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等)。

[0131] 在各种实施方式中,组合物还可以被配制成缓释微胶囊,如用可生物降解的或不可生物降解的聚合物。非限制性示例性可生物降解的配制品包括聚乳酸-乙醇酸(PLGA)聚合物。非限制性示例性不可生物降解的配制品包括聚甘油脂肪酸酯。制备这样的配制品的某些方法描述于例如EP 1125584 A1中。

[0132] 还提供了包含一个或多个容器的药物剂量包装,每个容器含有一个或多个剂量的Gal9抗体及其抗原结合片段。在一些实施方式中,提供了单位剂量,其中单位剂量含有预定量的包含Gal9抗体及其抗原结合片段的组合物,且具有或不具有一种或多种另外的药剂。在一些实施方式中,这种单位剂量在供注射的一次性预填充注射筒中提供。在各种实施方式中,在单位剂量中所含的组合物可以包含盐水、蔗糖等;缓冲剂,如磷酸盐等;和/或可以被配制在稳定且有效的pH范围内。可替代地,在一些实施方式中,组合物可以作为冻干粉提供,该冻干粉可以在添加适当的液体(例如,无菌水)后重构。在一些实施方式中,组合物包含一种或多种抑制蛋白质聚集的物质,包括但不限于蔗糖和精氨酸。在一些实施方式中,本发明的组合物包含肝素和/或蛋白聚糖。

[0133] 以有效治疗或预防特定适应证的量施用药物组合物。治疗有效量典型地取决于所治疗受试者的体重、他或她的身体或健康状况、要治疗的病症的广泛性或所治疗受试者的年龄。

[0134] 在一些实施方式中,可以以每剂约50μg/kg体重至约50mg/kg体重范围内的量施用Gal9抗体及其抗原结合片段。在一些实施方式中,可以以每剂约100μg/kg体重至约50mg/kg体重范围内的量施用Gal9抗体及其抗原结合片段。在一些实施方式中,可以以每剂约100μg/kg体重至约20mg/kg体重范围内的量施用Gal9抗体及其抗原结合片段。在一些实施方式中,可以以每剂约0.5mg/kg体重至约20mg/kg体重范围内的量施用Gal9抗体及其抗原结合片段。

[0135] 在一些实施方式中,可以以每剂约10mg至约1,000mg范围内的量施用Gal9抗体及

其抗原结合片段。在一些实施方式中,可以以每剂约20mg至约500mg范围内的量施用Gal9抗体及其抗原结合片段。在一些实施方式中,可以以每剂约20mg至约300mg范围内的量施用Gal9抗体及其抗原结合片段。在一些实施方式中,可以以每剂约20mg至约200mg范围内的量施用Gal9抗体及其抗原结合片段。

[0136] 可以根据需要向受试者施用Gal9抗体及其抗原结合片段组合物。在一些实施方式中,向受试者一次或多次施用有效剂量的Gal9抗体及其抗原结合片段。在各种实施方式中,向受试者每月一次、每月少于一次(例如像每两个月、每三个月或每六个月)施用有效剂量的Gal9抗体及其抗原结合片段。在其他实施方式中,每月多于一次(例如像每两周、每周、每周两次、每周三次、每天或每天多次)施用有效剂量的Gal9抗体及其抗原结合片段。向受试者至少一次施用有效剂量的Gal9抗体及其抗原结合片段。在一些实施方式中,可以多次施用有效剂量的Gal9抗体及其抗原结合片段,包括持续至少一个月、至少六个月或至少一年的时间段。在一些实施方式中,根据需要向受试者施用Gal9抗体及其抗原结合片段以缓和病症的一种或多种症状。

[0137] 本文所述的抗体可以用于治疗癌症。

[0138] 癌症是一组涉及异常细胞生长且有可能侵入或扩散到身体的其他部位的疾病。在2015年,约有9050万人患有癌症,每年约有1410万例新病例发生,并且造成了约880万例死亡(占死亡人数的15.7%)。男性中最常见的癌症类型是肺癌、前列腺癌、结直肠癌和胃癌。在女性中,最常见的类型是乳腺癌、结直肠癌、肺癌和宫颈癌。

[0139] 术语“癌症”是指一组这样的疾病,其特征在于从一个部位(原发部位)开始的异常且不受控制的细胞增殖,且有可能侵入并扩散到其他部位(继发部位,转移),这将癌症(恶性肿瘤)与良性肿瘤区分开。实际上,所有器官都可能受到影响,导致可能影响人的100多种类型的癌症。癌症可能由许多原因引起,包括遗传倾向、病毒感染、暴露于电离辐射、暴露于环境污染物、烟草和/或酒精使用、肥胖、不良饮食、缺乏体力活动或其任何组合。

[0140] 如本文所用,“赘生物”或“肿瘤”(包括其语法变化)意指组织的新且异常的生长,它可能是良性的或癌性的。在相关方面,赘生物指示肿瘤疾病或障碍,包括但不限于各种癌症。例如,这样的癌症可以包括前列腺癌、胰腺癌、胆管癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、肾癌、肺癌、睾丸癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、脑癌和头颈癌、黑色素瘤、肉瘤、多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤等。

[0141] 在一方面,癌症是血液癌症或实体瘤。

[0142] 开始于血液形成组织(如骨髓)或免疫系统的细胞的癌症被称为血液癌症或血癌。血液癌症影响血细胞的产生和功能,并且被分类为以下三种主要类型:白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0143] 如本文所用,“白血病”是指由异常白细胞的快速产生引起的血癌。白血病的示例包括急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病和毛细胞白血病。

[0144] 如本文所用,“淋巴瘤”是指影响淋巴系统的类型的血癌。淋巴瘤的示例包括艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样霉菌病、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤和华氏巨球蛋白血症。

[0145] 如本文所用,“骨髓瘤”是浆细胞的癌症。骨髓瘤的示例包括慢性骨髓增殖性赘生

物、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、多发性骨髓瘤、浆细胞赘生物、骨髓增生异常综合征和骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物。

[0146] 在一些实施方式中,本发明的Gal9抗体及其抗原结合片段可以单独使用,或者可替代地与已知能够治疗疾病或适应证的任何其他合适的化合物组合使用。

[0147] 在一些方面,施用可以与一种或多种另外的治疗剂组合。短语“组合疗法”、“与……组合”等是指同时使用多于一种药物或治疗来增加应答。本发明的组合物可以例如与用于治疗癌症的其他药物或治疗组合使用。特别地,向受试者施用本发明的组合物可以与任何抗癌疗法组合。可以在施用本发明的组合物之前、同时或之后施用这样的疗法。

[0148] 在某些实施方式中,向受试者(例如,患有癌症的受试者)同时或连续地施用Gal9抗体与另一种治疗。例如,可以与以下中的一种或多种一起施用Gal9抗体:放射疗法、手术或化学疗法,例如靶向化学疗法或免疫疗法。两种药剂的施用可以在例如相隔30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、3小时、6小时、12小时、24小时、36小时、48小时、3天、5天、7天或一周或几周的时间开始,或者第二药剂的施用可以在已经施用第一药剂后例如30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、3小时、6小时、12小时、24小时、36小时、48小时、3天、5天、7天或一周或几周开始。

[0149] 在一些方面,血液癌症选自由以下构成的组:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病以及毛细胞白血病、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样霉菌病、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)以及多发性骨髓瘤。

[0150] 急性髓系白血病(AML)的法美英(FAB)分类将AML分类为疾病的不同分期。FAB亚型示于表1中。

[0151] 表1:FAB分类

[0152]

FAB亚型	描述
M0	未分化的急性成髓细胞性白血病
M1	最低成熟的急性成髓细胞性白血病
M2	成熟的急性成髓细胞性白血病
M3	急性早幼粒细胞白血病(APL)
M4	急性粒单核细胞白血病
M5	急性单核细胞白血病
M6	急性成红细胞白血病
M7	急性成巨核细胞白血病

[0153] 实体癌的示例包括但不限于癌、肉瘤、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、垂体癌、食管癌、星形细胞瘤、软组织肉瘤、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌(kidney cancer)、肾癌(renal cancer)、肝癌(liver cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、脑癌、子宫内膜癌、睾丸癌、胆管癌、胆囊癌、胃癌、黑色素瘤、胃食管癌、食管癌、宫颈癌和各种类型的头颈癌。

[0154] 在其他方面,实体瘤选自由以下构成的组:乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结直肠癌、肾癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌、头颈部鳞癌以及前列腺癌。

[0155] 在一方面,方法进一步包括向患者施用化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。

[0156] “化学治疗剂”是可用于治疗癌症的化学化合物。化学治疗剂的示例包括但不限于烷化剂,如噻替哌和环磷酰胺(cyclosphosphamide);烷基磺酸盐,如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶,如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙烯亚胺和甲基蜜胺(methylamelamine),包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺(triethylenephosphoramide)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethiylenethiophosphoramide)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(尤其是布拉它辛和布拉它辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成类似物拓扑替康);苔藓虫素;卡利他汀(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);念珠藻素(特别是念珠藻素1和念珠藻素8);尾海兔素;倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥类,如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧化氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝基脲(nitrosurea),如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀(ranimnustine);抗生素,如烯二炔类抗生素(例如,卡奇霉素(calicheamicin),尤其是卡奇霉素γ11和卡奇霉素ω11(参见例如,Agnew,Chem lntl.Ed.Engl[德国应用化学国际英语版],33:183-186(1994);达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;二膦酸盐,如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomysin)、放线菌素、氨茴霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡柔比星(carabicin)、洋红霉素、嗜癌素、色霉素、更生霉素、道诺霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉并-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(如丝裂霉素C)、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星、链黑菌素、链脲佐菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物,如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素,如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素,如氨鲁米特、米托坦、曲络司坦;叶酸补充剂,如亚叶酸(frolinic acid);醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吖啶;贝斯布西(bestrabucil);比生群;依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛;地吖醌;依氟鸟氨酸(elfomithine);依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明(lonidainine);美登木素生物碱,如美登素和安丝菌素;米托胍腙;米托蒽醌;莫哌达醇(mopidanmol);二胺硝吖啶(nitraerine);喷司他丁;蛋氨氮芥;吡柔比星;

洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;多糖复合物(JHS天然产品公司(JHS Natural Products),俄勒冈州尤金);雷佐生;利索新;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2′,2”-三氯三乙胺;单端孢霉烯(尤其是T-2毒素、疣孢菌素(verracurin)A、漆斑菌素A和蛇行菌素(anguidine));乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加西托新(gacytosine);阿拉伯糖苷(“Ara-C”);环磷酰胺;噻替哌;紫杉烷,例如紫杉醇(百时美施贵宝公司肿瘤学部门(Bristol-Myers Squibb Oncology),新泽西州普林斯顿)、不含克列莫佛的紫杉醇的经白蛋白工程化的纳米颗粒配制品(美国药品伙伴公司(American Pharmaceutical Partners,伊利诺伊州绍姆堡)、纳米颗粒白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel)(塞尔基因公司(Celgene))和多西他赛(doxetaxel)(罗纳布朗克罗莱尔公司(Rhone-Poulenc Rorer),法国安东尼);苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,如顺铂、奥沙利铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺消灵(novantrone);替尼泊苷;依达曲沙;柔红霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;伊立替康(依立替康,CPT-11)(包括伊立替康与5-FU和甲酰四氢叶酸的治疗方案);拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(difluorometlhylornithine,DMFO);类视黄醇,如视黄酸;卡培他滨;康普瑞汀;甲酰四氢叶酸(LV);奥沙利铂,包括奥沙利铂治疗方案(FOLFOX);减少细胞增殖的PKC-α、Raf、H-Ras、EGFR(例如,厄洛替尼)和VEGF-A的抑制剂,以及以上任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0157] 其他非限制性示例性化学治疗剂包括起作用以调节或抑制激素对癌症的作用的抗激素剂,如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM),包括例如他莫昔芬(包括他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、考昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬;抑制芳香化酶(其调节肾上腺中的雌激素产生)的芳香化酶抑制剂,例如像4(5)-咪唑、氨鲁米特、醋酸甲地孕酮、依西美坦、福美司坦(formestanie)、法倔唑、伏氯唑、来曲唑和阿那曲唑;以及抗雄激素,如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及曲沙他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特别是抑制涉及异常细胞增殖的信号传导途径中基因(例如像PKC-α、Ralf和H-Ras)的表达的那些反义寡核苷酸;核酶,如VEGF表达抑制剂(例如,核酶)和HER2表达抑制剂;疫苗,如基因疗法疫苗,例如疫苗、疫苗和疫苗;rIL-2;拓扑异构酶1抑制剂;rmRH;以及以上任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0158] “抗血管生成剂”或“血管生成抑制剂”是指直接或间接抑制血管生成、血管发生或不希望的血管通透性的小分子量物质、多核苷酸(包括例如抑制性RNA(RNAi或siRNA)、多肽、分离的蛋白质、重组蛋白质、抗体或其缀合物或融合蛋白。应当理解,抗血管生成剂包括结合血管生成因子或其受体并且阻断血管生成因子或其受体的血管生成活性的那些药剂。例如,抗血管生成剂是针对血管生成剂的抗体或其他拮抗剂,例如针对VEGF-A(例如,贝伐单抗)或VEGF-A受体(例如,KDR受体或Flt-1受体)的抗体、抗PDGFR抑制剂如(甲磺酸伊马替尼)、阻断VEGF受体信号传导的小分子(例如,PTK787/ZK2284、SU6668、/SUI 1248(苹果酸舒尼替尼)、AMG706或描述于例如国际专利申请WO 2004/113304中的那些小分子)。抗血管生成剂还包括天然血管生成抑制剂,例如血管抑素、内皮抑素等。参见例如,Klagsbrun和D′Amore(1991)Annu.Rev.Physiol.[生理学年评]53:217-39;Streit和Detmar(2003)

Oncogene[癌基因]22:3172-3179(例如,表3列出了恶性黑色素瘤的抗血管生成疗法);Ferrara和Alitalo(1999)Nature Medicine[自然·医学]5(12):1359-1364;Tonini等人(2003)Oncogene[癌基因]22:6549-6556(例如,表2列出了已知的抗血管生成因子);以及Sato(2003)Int.J.Clin.Oncol.[国际临床肿瘤学杂志]8:200-206(例如,表1列出了临床试验中使用的抗血管生成剂)。

[0159] 如本文所用的"生长抑制剂"是指在体外或体内抑制细胞(如表达VEGF的细胞)的生长的化合物或组合物。因此,生长抑制剂可以是显著减少S期细胞(如表达VEGF的细胞)百分比的药剂。生长抑制剂的示例包括但不限于阻断细胞周期进程(在S期以外的地方)的药剂,如诱导G1停滞和M期停滞的药剂。经典M期阻断剂包括长春花碱(vinca)(长春新碱和长春碱)、紫杉烷和拓扑异构酶II抑制剂,如多柔比星、表柔比星、道诺霉素、依托泊苷和博来霉素。使G1停滞的那些药剂也引起S期停滞,例如DNA烷化剂,如他莫昔芬、强的松、达卡巴嗪、氮芥、顺铂、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶和ara-C。进一步的信息可见于Mendelsohn和Israel编辑,The Molecular Basis of Cancer[癌症的分子基础],第1章,由Murakami等人撰写的标题为"Cell cycle regulation,oncogenes,and antineoplastic drugs[细胞周期调节,癌基因和抗肿瘤药物]"(W.B.Saunders[W.B.桑德斯出版社],费城,1995),例如第13页。紫杉烷(紫杉醇和多西他赛)是都源自紫杉树的抗癌药物。源自欧洲紫衫的多西他赛(罗纳布朗克罗莱尔公司)是紫杉醇的半合成类似物(百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb))。紫杉醇和多西他赛促进从微管蛋白二聚体组装微管,并且通过防止解聚而稳定微管,从而抑制细胞中的有丝分裂。

[0160] 术语"抗肿瘤组合物"是指可用于治疗癌症的包含至少一种活性治疗剂的组合物。治疗剂的示例包括但不限于例如化学治疗剂、生长抑制剂、细胞毒性剂、在放射疗法中使用的药剂、抗血管生成剂、癌症免疫治疗剂(也称为免疫肿瘤剂)、凋亡剂、抗微管蛋白剂和治疗癌症的其他药剂,如抗HER-2抗体、抗CD20抗体、表皮生长因子受体(EGFR)拮抗剂(例如,酪氨酸激酶抑制剂)、HER1/EGFR抑制剂(例如,厄洛替尼)、血小板源性生长因子抑制剂(例如,甲磺酸伊马替尼)、COX-2抑制剂(例如,塞来昔布)、干扰素、CTLA4抑制剂(例如,抗-CTLA抗体伊匹单抗)、PD-1抑制剂(例如,抗PD-1抗体,BMS-936558)、PD-L1抑制剂(例如,抗PD-L1抗体,MPDL3280A)、PD-L2抑制剂(例如,抗PD-L2抗体)、VISTA抑制剂(例如,抗VISTA抗体)、细胞因子、与以下靶标(ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-β、BlyS、APRIL、BCMA、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、VISTA或VEGF受体)中的一种或多种结合的拮抗剂(例如,中和抗体)、TRAIL/Apo2以及其他生物活性和有机化学药剂等。其组合也包括在本发明中。

[0161] "检查点抑制剂疗法"是当前使用影响免疫系统功能的免疫检查点的癌症治疗形式。免疫检查点可以是刺激性的或抑制性的。肿瘤可以使用这些检查点来保护自己免受免疫系统攻击。检查点疗法可以阻断抑制性检查点,恢复免疫系统功能。检查点蛋白包括程序性细胞死亡1蛋白(PDCD1、PD-1;也称为CD279)及其配体PD-1配体1(PD-L1、CD274)、细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)、A2AR(腺苷A2A受体)、B7-H3(或CD276)、B7-H4(或VTCN1)、BTLA(B和T淋巴细胞弱化因子或CD272)、IDO(吲哚胺2,3-双加氧酶)、KIR(杀伤细胞免疫球蛋白样受体)、LAG3(淋巴细胞激活基因-3)、TIM-3(T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域分子3)和VISTA(T细胞激活的V结构域Ig抑制因子)。

[0162] 程序性细胞死亡蛋白1(也称为PD-1和CD279(分化群279))是在通过抑制T细胞炎

性活性而下调免疫系统并促进自身耐受方面发挥重要作用的细胞表面受体。PD-1是免疫检查点,并且通过促进淋巴结中抗原特异性T细胞的凋亡(细胞程序性死亡)同时减少调节性T细胞(抗炎、抑制性T细胞)的凋亡的双重机制来防止自身免疫。

[0163] PD-1具有两种配体,即PD-L1和PD-L2,它们是B7家族的成员。PD-L1蛋白在巨噬细胞和树突细胞(DC)上响应于LPS和GM-CSF处理而上调,并且在T细胞和B细胞上在TCR和B细胞受体信号传导时上调,而在静息小鼠中,可以在心、肺、胸腺、脾和肾中检测到PD-L1 mRNA。在用IFN-γ处理后,PD-L1在几乎所有鼠肿瘤细胞系(包括PA1骨髓瘤、P815肥大细胞瘤和B16黑色素瘤)上表达。PD-L2表达更受限制,并且主要由DC和一些肿瘤系表达。

[0164] CTLA4或CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4)(也称为CD152(分化群152))是充当免疫检查点下调免疫应答的蛋白质受体。CTLA4在调节性T细胞中组成型地表达,但是在激活后仅在传统T细胞中上调-这种现象在癌症中特别值得注意。CTLA4是免疫球蛋白超家族的成员,它由激活的T细胞表达并且将抑制信号传递给T细胞。CTLA4与T细胞共刺激蛋白CD28同源,并且两种分子都与抗原呈递细胞上的CD80和CD86(也分别称为B7-1和B7-2)结合。CTLA-4结合CD80和CD86的亲和力和亲合力大于结合CD28的亲和力和亲合力,因此与其配体相比,使它能够竞争胜过CD28。CTLA4将抑制信号传递给T细胞,而CD28传递刺激信号。CTLA4也在调节性T细胞中被发现,并且有助于其抑制功能。通过T细胞受体和CD28实现的T细胞激活导致CTLA-4表达增加。

[0165] 有几种当前用于治疗癌症的检查点抑制剂。PD-1抑制剂包括派姆单抗(Keytruda)和纳武单抗(Opdivo)。PD-L1抑制剂包括阿替利珠单抗(Tecentriq)、阿维鲁单抗(Avelumab)(Bavencio)和度伐鲁单抗(Durvalumab)(Imfinzi)。CTLA-4抑制剂包括伊匹单抗(Iplimumab)(Yervoy)。有几种正在开发的其他检查点抑制剂,包括抗B7-H3抗体(MGA271)、抗KIR抗体(利瑞鲁单抗(Lirilumab))和抗LAG3抗体(BMS-986016)。

[0166] 如本文所用,“免疫肿瘤剂”是指通过靶向免疫系统特异性靶向癌症的抗癌剂;这通常是指治疗抗体。在一些方面,免疫肿瘤剂是抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关蛋白(GITR)抗体。

[0167] 肿瘤坏死因子受体超家族成员18(TNFRSF18)(也称为糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)或CD357,也称为激活诱导型TNFR家族受体(AITR))由1号染色体上的TNFRSF18基因编码。

[0168] GITR是TNFR超家族的成员,并且与TNFRSF的其他成员(如CD137、OX40或CD27)在胞质结构域(以半胱氨酸伪重复为特征)中具有高度同源性。GITR在CD25+CD4+调节性T细胞上组成型地表达,并且其表达在激活后在所有T细胞子集上都上调。GITR也在鼠嗜中性粒细胞和NK细胞上表达。GITR与其在抗原呈递细胞(APC)和内皮细胞上表达的配体(GITRL)相互作用。

[0169] GITR是在癌症治疗中具有潜力的免疫检查点分子。GITR信号传导可以促进抗肿瘤和抗感染免疫应答,但是也可以是自身免疫性疾病的驱动因子。对GITR信号传导的不同应答依赖于不同免疫细胞类型上的GITR表达。在不同细胞中如何调节GITR信号传导仍然未知。GITR激动性抗体在减少循环抑制性调节性T细胞的数量的同时作为效应CD8T细胞的激活剂正在临床试验中。与抗PD-1或抗CTLA-4疗法组合增强了对GITR激动性抗体的有限应答。

[0170] 在另外的实施方式中,本发明提供了多核苷酸,该多核苷酸编码本文所述的抗体或其抗原结合片段中的任一种的重链或轻链或其抗原结合部分。

[0171] 本发明还提供了核酸分子,这些核酸分子包含编码本文所述的抗体(如抗Gal9抗体)的一条或多条链的多核苷酸。在一些实施方式中,核酸分子包含编码本文所述的抗体的重链或轻链的多核苷酸。在一些实施方式中,核酸分子既包含编码本文所述的抗体的重链的多核苷酸又包含编码本文所述的抗体的轻链的多核苷酸。在一些实施方式中,第一核酸分子包含编码重链的第一多核苷酸,并且第二核酸分子包含编码轻链的第二多核苷酸。

[0172] 在一些这样的实施方式中,重链和轻链从一个核酸分子表达,或者从两个单独的核酸分子表达为两个单独的多肽。在一些实施方式中,如当抗体是scFv时,单个多核苷酸编码包含连接在一起的重链和轻链二者的单个多肽。

[0173] 在一些实施方式中,编码本文所述的抗体的重链或轻链的多核苷酸包含编码前导序列的核苷酸序列,该前导序列在翻译时位于重链或轻链的N末端。如上所讨论,前导序列可以是天然重链或轻链前导序列,或者可以是另一种异源前导序列。

[0174] 如本文所用,术语“核酸”或“寡核苷酸”是指多核苷酸,如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)。核酸包括但不限于基因组DNA、cDNA、mRNA、iRNA、miRNA、tRNA、ncRNA、rRNA以及重组产生的和化学合成的分子,如适配体、质粒、反义DNA链、shRNA、核酶、缀合的核酸和寡核苷酸。根据本发明,核酸可以作为单链或双链的线性或共价环状封闭的分子存在。核酸可以是分离的。术语“分离的核酸”意指核酸(i)例如经由聚合酶链式反应(PCR)在体外扩增,(ii)通过克隆重组产生,(iii)例如通过切割和凝胶电泳分离纯化,(iv)例如通过化学合成而合成,或(vi)从样品中提取。核酸可以用于引入细胞中,即转染细胞,特别地以RNA的形式,它可以通过体外转录从DNA模板制备。此外,RNA可以在应用前通过稳定序列、加帽和多腺苷酸化来修饰。

[0175] 术语“样品”可以包括全血、血浆、血清、血沉棕黄层、体液、淋巴细胞、组织、羊水、培养的细胞等。术语“样品”还可以指代尿液样品、唾液样品、无血细胞DNA以及要通过拭子的手段检查的皮肤、粘膜或其他身体区域或表面的或来自其的样本。在各种实施方式中,用于收集样品的装置可以含有防腐剂。防腐剂可以包括如盐酸、硼酸、乙酸、甲苯或麝香草酚等防腐剂。

[0176] 可以通过本领域已知的任何方法从样品中提取核酸,包括通过使用有机溶剂(如苯酚和氯仿的混合物),随后用乙醇沉淀。在提取无细胞核酸的其他方法中,一种这样的方法包括例如使用聚赖氨酸包被的二氧化硅颗粒。可替代地,可以使用可商购的试剂盒(例如像QIAamp® DNA迷你试剂盒(凯杰公司(Qiagen),马里兰州日耳曼敦)提取无细胞DNA。

[0177] 通过本领域熟知的用于扩增的替代方法之一来扩增提取的核酸,这些方法包括例如:路明克斯公司(Luminex)的Xmap®技术,它允许通过在微小的聚苯乙烯珠表面上读取生物测试来同时分析多达500个生物测定;多重PCR,它允许同时扩增几个DNA序列;多重连接依赖性探针扩增(MLPA),它用于使用单对引物扩增多种靶标;定量PCR(qPCR),它实时测量并定量扩增;连接链式反应(LCR),它使用覆盖整个序列的引物进行扩增,从而防止具有突变的序列的扩增;滚环扩增(RCA),其中在扩增环状DNA之前,将序列的两个末端通过连接酶连接;解旋酶依赖性扩增(HDA),它依赖于解旋酶来分离双链DNA;环介导的等温扩增(LAMP),它采用具有高链置换活性的DNA聚合酶;基于核酸序列的扩增,它专门针对RNA靶标

设计;链置换扩增(SDA),它依赖于链置换DNA聚合酶,以在引物中所含的位点处由链限制性核酸内切酶或切口酶产生的切口处启动复制;以及多重置换扩增(MDA),它基于使用来自噬菌体Ø29的高度加工性链置换DNA聚合酶。已经使用并测试了如本文所用的扩增方法,并且这些扩增方法是本领域熟知的。

[0178] 如本文所用,"扩增的DNA"或"PCR产物"是指大小确定的DNA的扩增片段。用于检测PCR产物的各种技术是可获得的并且是本领域熟知的。PCR产物检测方法包括但不限于使用琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶的凝胶电泳,并且添加溴化乙锭染色(DNA嵌入剂)、标记探针(放射性或非放射性标记,DNA印迹法)、标记脱氧核糖核苷酸(用于放射性或非放射性标记的直接掺入)或银染色以直接可视化扩增的PCR产物;限制性核酸内切酶消化,它依赖于琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶或高效液相色谱法(HPLC);斑点印迹,使用扩增的DNA在特异性标记探针(放射性或非放射性标记)上的杂交;使用紫外线检测的高压液相色谱法;与电压引发的化学反应/光子检测相结合的电化学发光;以及使用放射性或荧光标记的脱氧核糖核苷酸的直接测序以确定具有目的DNA片段的核苷酸的精确顺序,寡核苷酸连接测定(OLA),PCR,qPCR,DNA测序,荧光,凝胶电泳,磁珠,等位基因特异性引物延伸(ASPE)和/或直接杂交。

[0179] 通常,核酸可以通过多种技术来提取、分离、扩增或分析,如由以下描述的那些方法:Green和Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册](第4版),Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],纽约州伍德伯里2,028页(2012);或如以下中描述的那些方法:美国专利7,957,913;美国专利7,776,616;美国专利5,234,809;美国公开2010/0285578;和美国公开2002/0190663。

[0180] 核酸分析的示例包括但不限于测序和DNA-蛋白质相互作用。测序可以通过本领域已知的任何方法进行。DNA测序技术包括使用标记终止子或引物和板或毛细管中的凝胶分离的经典双脱氧测序反应(桑格法),以及下一代测序方法,如使用可逆终止的标记核苷酸的边合成边测序、焦磷酸测序、454测序、Illumina/Solexa测序、与标记寡核苷酸探针文库的等位基因特异性杂交、使用与标记克隆文库的等位基因特异性杂交随后连接的边合成边测序、在聚合步骤过程中实时监测标记核苷酸的掺入、聚合酶克隆测序(polony sequencing)和SOLiD测序。可以通过使用聚合酶或连接酶的顺序或单次延伸反应以及通过与探针文库的单次或顺序差示杂交对分离的分子进行测序。

[0181] DNA-蛋白质相互作用可以通过ChIP测序(也称为ChIP-seq)来分析。ChIP-seq将染色质免疫沉淀(ChIP)与大规模平行DNA测序相组合,以鉴定DNA相关蛋白的结合位点。它可以用于精确地定位任何目的蛋白质的整体结合位点。先前,基于微阵列的染色质免疫沉淀(ChIP-on-chip)是用于研究这些蛋白质-DNA关系的最常用技术。ChIP方法是本领域熟知的并且进行了描述。

[0182] 在一种实施方式中,本发明提供了载体,该载体包含本文所述的多核苷酸,其中载体是选自由以下构成的组的表达载体:哺乳动物表达载体、酵母表达载体、昆虫表达载体以及细菌表达载体。

[0183] 提供了载体,这些载体包含编码本文所述抗体的重链和/或轻链的多核苷酸。这样的载体包括但不限于DNA载体、噬菌体载体、病毒载体、逆转录病毒载体等。在一些实施方式中,载体包含编码重链的第一多核苷酸序列和编码轻链的第二多核苷酸序列。在一些实施方式中,重链和轻链从载体表达为两个单独的多肽。在一些实施方式中,例如像当抗体是

scFv时,重链和轻链表达为单个多肽的一部分。

[0184] 在一些实施方式中,第一载体包含编码重链的多核苷酸,并且第二载体包含编码轻链的多核苷酸。在一些实施方式中,将第一载体和第二载体以类似的量(如类似的摩尔量或类似的质量量)转染到宿主细胞中。在一些实施方式中,将摩尔比率或质量比率在5:1与1:5之间的第一载体和第二载体转染到宿主细胞中。在一些实施方式中,对于编码重链的载体和编码轻链的载体,使用在1:1与1:5之间的质量比率。在一些实施方式中,对于编码重链的载体和编码轻链的载体,使用1:2的质量比率。

[0185] 在一些实施方式中,选择被优化以用于在CHO或CHO源性细胞或在NSO细胞中表达多肽的载体。示例性载体描述于例如Running Deer等人,Biotechnol.Prog.[生物技术进展]20:880-889(2004)中。在一些实施方式中,选择用于在动物(包括人)中体内表达Gal9抗体及其抗原结合片段的载体。在一些这样的实施方式中,一种或多种多肽的表达在以组织特异性方式起作用的一种或多种启动子的控制下。例如,肝特异性启动子描述于例如PCT公开号WO 2006/076288中。

[0186] 术语“载体”、“表达载体”或“质粒DNA”在本文中用于指代通过人为干预操纵的重组核酸构建体。重组核酸构建体可以含有两个或更多个核苷酸序列,它们以使得产物在自然界的细胞中未发现的方式连接。特别地,两个或更多个核苷酸序列可以可操作地连接,如编码目的蛋白质、一种或多种蛋白质标签、功能结构域等的基因。

[0187] 适合用于在制备蛋白质和/或蛋白质缀合物中使用的载体包括选自以下的那些载体:杆状病毒、噬菌体、质粒、噬菌粒、粘粒、F粘粒、细菌人工染色体、病毒DNA、基于P1的人工染色体、酵母质粒和酵母人工染色体。例如,病毒DNA载体可以选自牛痘、腺病毒、鸡(foul)痘病毒、伪狂犬病病毒和SV40衍生物。一种类型的载体是基因组整合载体或可以整合到宿主细胞的染色体DNA中的“整合载体”。另一种类型的载体是附加型载体,例如能够染色体外复制的核酸。能够指导它们可操作地连接的基因的表达的载体在本文中被称为“表达载体”。病毒载体包括腺病毒、腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒、慢病毒、痘苗病毒、麻疹病毒、疱疹病毒和牛乳头瘤病毒载体(关于病毒和非病毒载体的综述,参见Kay等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]94:12744-12746(1997))。修饰病毒载体,使得病毒的天然嗜性和致病性已经改变或去除。还可以修饰病毒的基因组以增加其感染性并且适应编码目的多肽的核酸的包装。

[0188] 可以将本发明的核酸构建体引入要改变的细胞中,从而允许嵌合蛋白在细胞内表达。多种方法是本领域已知的并且适合于将核酸引入细胞中,包括病毒和非病毒介导的技术。典型的非病毒介导的技术的示例包括但不限于电穿孔、磷酸钙介导的转移、核转染、声致穿孔(sonoporation)、热休克、磁转染、脂质体介导的转移、显微注射、微粒介导的转移(纳米颗粒)、阳离子聚合物介导的转移(DEAE-葡聚糖、聚乙烯亚胺、聚乙二醇(PEG)等)或细胞融合。其他转染方法包括专有转染试剂,如Lipofectamine™、Dojindo Hilymax™、Fugene™、jetPEI™、Effectene™和DreamFect™。

[0189] 可以将本发明的核酸构建体引入要改变的宿主细胞中,从而允许嵌合蛋白在细胞内表达。多种宿主细胞是本领域已知的并且适合于嵌合蛋白表达。用于转染的典型细胞的示例包括但不限于细菌细胞、真核细胞、酵母细胞、昆虫细胞或植物细胞。例如,大肠杆菌、芽孢杆菌属、链霉菌属、巴斯德毕赤酵母、鼠伤寒沙门氏菌、果蝇S2、灰翅夜蛾SJ9、CHO、COS

(例如,COS-7)、3T3-F442A、HeLa、HUVEC、HUAEC、NIH 3T3、Jurkat、293、293H或293F。

[0190] 在各种实施方式中,本文所述抗体的重链和/或轻链可以在原核细胞(如细菌细胞)中表达;或者在真核细胞(如真菌细胞(如酵母)、植物细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞)中表达。这种表达可以例如根据本领域已知的程序进行。可以用于表达多肽的示例性真核细胞包括但不限于COS细胞,包括COS 7细胞;293细胞,包括293-6E细胞;CHO细胞,包括CHO-S和DG44细胞;PER.C6®细胞(库赛尔公司(Crucell));以及NSO细胞。在一些实施方式中,本文所述抗体的重链和/或轻链可以在酵母中表达。参见例如,美国公开号US2006/0270045A1。在一些实施方式中,基于其对Gal9抗体的重链和/或轻链进行所需翻译后修饰的能力来选择特定真核宿主细胞。例如,在一些实施方式中,CHO细胞所产生的多肽的唾液酸化水平高于293细胞中产生的相同多肽的唾液酸化水平。

[0191] 可以通过任何方法将一种或多种核酸引入所需宿主细胞中,包括但不限于磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染等。非限制性示例性方法描述于例如Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社](2001)中。可以根据任何合适的方法在所需宿主细胞中瞬时地或稳定地转染核酸。

[0192] 在一些实施方式中,一种或多种多肽可以根据任何合适的方法在已经用编码多肽的一种或多种核酸分子工程化或转染的动物体内产生。

[0193] 多核苷酸可以在载体(例如,表达载体)中递送到细胞(例如,包含靶细胞或细胞类型和/或非靶细胞类型的多个不同的细胞或细胞类型)中。载体的示例包括但不限于(a)非病毒载体,如核酸载体,包括线性寡核苷酸和环状质粒;人工染色体,如人人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)和细菌人工染色体(BAC或PAC);附加型载体;转座子(例如,PiggyBac);以及(b)病毒载体,如逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和AAV载体。病毒载体具有用于递送核酸的几个优点,包括对于某些靶细胞或组织的高感染性和/或嗜性。在一些情况下,病毒载体可以用于递送本文所述的多核苷酸。

[0194] 在另一种实施方式中,本发明提供了挽救或促进效应T细胞增殖、增强效应T细胞活性和/或鉴定并治疗受试者的方法,该方法包括:(i)确定来自受试者的样品中Gal9的水平,以及(ii)向受试者施用有效量的本文所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段中的任一种,该受试者所具有的Gal9水平高于Gal9的参考水平,从而挽救或促进效应T细胞增殖、增强效应T细胞活性和/或鉴定并治疗受试者。

[0195] “与调节性T淋巴细胞的抑制活性相关的疾患”意指调节性T淋巴细胞的抑制活性特别是通过促进疾患的发展或持续而发挥作用的任何疾患(非自身免疫性的)。特别地,已经证明调节性T淋巴细胞的抑制活性促进肿瘤的发展。因此,本发明更特别地针对T淋巴细胞的抑制活性发挥作用的癌症。

[0196] 在病理情况下,Treg可能引起不适当的免疫抑制,这可能例如促进肿瘤生长。Treg已经与减少抗肿瘤免疫应答相关,特别是通过不适当地抑制效应T淋巴细胞的活性,从而促进许多癌症类型的发展。

[0197] 在激活过程中,Gal9直接由Treg表达,而效应T淋巴细胞仅非常弱地表达,或者根本不表达。因此,通过例如使用Gal9特异性抗体靶向Gal9可以特异性地抑制调节性T淋巴细胞的抑制活性,而没有引起效应T淋巴细胞耗尽的风险。因此,根据本发明的针对Gal9并且

抑制调节性T淋巴细胞的抑制活性的抗体可以用于治疗与调节性T淋巴细胞的抑制活性相关的疾病或病症,特别是治疗癌症。

[0198] 通过本发明的方法/用途可治疗的癌症包括调节性T淋巴细胞发挥其抑制活性的那些癌症,如相对大量的调节性T淋巴细胞存在于肿瘤组织或循环中的那些癌症。调节性T淋巴细胞的扩增(其可以通过Treg的频率来测量)通常与Treg激活的增加相关。调节性T淋巴细胞的频率可以通过本领域已知的任何方法来评估,例如通过肿瘤内淋巴细胞或循环淋巴细胞的流式细胞术(FACS)分析,或通过肿瘤组织的免疫组织学染色。

[0199] 在一方面,受试者被诊断患有癌症,有患上癌症的风险,或者患有癌症复发。

[0200] 在另一方面,Gal9的参考水平是在来自健康或对照个体的样品中测量的Gal9的水平。

[0201] 如本文所用,“参考样品”、“参考细胞”或“参考组织”是指获自已知或据信不患有本发明的方法或组合物正在用于鉴定的疾病或病症的来源的样品、细胞或组织。在一种实施方式中,参考样品、参考细胞或参考组织获自正在使用本发明的组合物或方法鉴定疾病或病症的同一受试者或患者的身体的健康部位。在一种实施方式中,参考样品、参考细胞或参考组织获自至少一个个体的身体的健康部位,该个体不是正在使用本发明的组合物或方法鉴定疾病或病症的受试者或患者。在一些实施方式中,参考样品、参考细胞或参考组织先前获自在患上疾病或病症之前或在疾病或病症的前期的患者。

[0202] 在一些方面,确定包括将样品中Gal9的水平与参考水平进行比较。

[0203] 在一方面,癌症是血液癌症或实体瘤。在一些方面,血液癌症选自由以下构成的组:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病以及毛细胞白血病、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样霉菌病、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)以及多发性骨髓瘤。在其他方面,实体瘤选自由以下构成的组:乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结直肠癌、肾癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌、头颈部鳞癌或前列腺癌。

[0204] 在一方面,样品是血液样品、血浆样品、血清样品、肿瘤活检样品或骨髓(BM)源性单个核细胞(MNC)样品。

[0205] 在一方面,方法进一步包括向患者施用化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。在一些方面,检查点抑制剂是抗PD-1。在其他方面,免疫肿瘤剂是抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关蛋白(GITR)抗体。

[0206] 另外的实施方式

[0207] 实施方式1.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

[0208] (a)HCVR,该HCVR包含(i)具有氨基酸序列$GYX_1FX_2X_3YTIH$(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X_1选自T、E、P或A;X_2选自T、G或S;以及X_3选自E、S或D;(ii)具有氨基酸序列$WFYPGSGSTX_4YAQKFQG$(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X_4选自E、W或V;以及(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及

[0209] (b)LCVR,该LCVR包含(i)具有氨基酸序列$KSSX_5X_6X_7LX_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}NX_{14}LA$(SEQ ID

NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X_5选自Q或R;X_6选自S或N;X_7选自L、V或I;X_8选自Y或W;X_9选自S或P;X_{10}选自N、S、P或A;X_{11}选自N或H;X_{12}选自Q、N或Y;X_{13}选自K或R;以及X_{14}选自Y或H;(ii)具有氨基酸序列$WX_{15}SX_{16}RX_{17}X_{18}$的LCVR CDR2序列,其中$X_{15}$选自A或G;$X_{16}$选自T、N、M或A;$X_{17}$选自G或E;以及$X_{18}$选自S、E、Y、P或T;以及(iii)具有氨基酸序列$QQYYX_{19}X_{20}$PFT(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X_{19}选自S或F;以及X_{20}选自Y或F,

[0210] 其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合半乳凝素-9(Gal9),前提条件是该抗体不包含HCVR CDR1序列GYTFTEYTIH(SEQ ID NO:2)、HCVR CDR2序列WFYPGSGSTEYAQKFQG(SEQ ID NO:9)、HCVR CDR3序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)、LCVR CDR1序列KSSQSLLYSNNQKNYLA(SEQ ID NO:14)、LCVR CDR2序列WASTRGS(SEQ ID NO:22)以及LCVR CDR3序列QQYYSYPFT(SEQ ID NO:31)。

[0211] 实施方式2.如实施方式1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

[0212] (a)HCVR,该HCVR包含(i)具有氨基酸序列$GYX_1FX_2X_3$YTIH(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X_1选自T或E,以及X_2选自T或G,以及X_3是E;(ii)具有氨基酸序列WFYPGSGSTX_4YAQKFQG(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X_4选自W或V;以及(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及

[0213] (b)LCVR,该LCVR包含(i)具有氨基酸序列$KSSX_5X_6X_7LX_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}N$ X_{14}LA(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X_5是Q,X_6是S,X_7是L,X_8是Y,X_9选自S或P,X_{10}是N,X_{11}是N,X_{12}是Q,X_{13}是K;以及X_{14}是Y;(ii)具有氨基酸序列$WX_{15}SX_{16}RX_{17}X_{18}$的LCVR CDR2序列,其中$X_{15}$是A,$X_{16}$是T,$X_{17}$是G,以及$X_{18}$选自S或E;以及(iii)具有氨基酸序列$QQYYX_{19}X_{20}$PFT(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X_{19}是S,以及X_{20}选自Y或F,

[0214] 其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0215] 实施方式3.如实施方式1或2所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

[0216] (A)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:3的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:10的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:15的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:23的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:32的LCVR CDR3序列;或

[0217] (B)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:4的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:11的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含SEQ ID NO:14的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:24的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:31的LCVR CDR3序列,

[0218] 其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0219] 实施方式4.如实施方式1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

[0220] (a)HCVR,该HCVR包含(i)具有氨基酸序列$GYX_1FX_2X_3$YTIH(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X_1选自T、P或A;X_2选自T、S或G;以及X_3选自S或D;(ii)具有氨基酸序列WFYPGSGSTX_4YAQKFQG(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X_4是E;以及(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及

[0221] (b)LCVR,该LCVR包含:(i)具有氨基酸序列$KSSX_5X_6X_7LX_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}N$ X_{14}LA(SEQ

ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X_5选自Q或R;X_6选自S或N;X_7选自L、V或I;X_8选自Y或W;X_9是S,X_{10}选自S、P或A;X_{11}选自N或H;X_{12}是N或Y;X_{13}是K或R;以及X_{14}是Y或H;(ii)具有氨基酸序列$WX_{15}SX_{16}RX_{17}X_{18}$的LCVR CDR2序列,其中$X_{15}$选自A或G;$X_{16}$选自T、N、M或A;$X_{17}$选自G或E;以及$X_{18}$选自S、Y、P或T;以及(iii)具有氨基酸序列$QQYYX_{19}X_{20}$PFT(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X_{19}是F,以及X_{20}是Y,

[0222] 其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0223] 实施方式5.如实施方式1或4所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

[0224] (C)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:5的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含SEQ ID NO:16的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:25的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;或

[0225] (D)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:6的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:17的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:26的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;或

[0226] (E)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:18的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:27的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;或

[0227] (F)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:19的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:28的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列;或

[0228] (G)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:20的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:29的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,

[0229] 其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0230] 实施方式6.如实施方式1所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

[0231] (a)HCVR,该HCVR包含(i)具有氨基酸序列$GYX_1FX_2X_3$YTIH(SEQ ID NO:1)的HCVR CDR1序列,其中X_1选自E或P;X_2选自T或S;以及X_3选自E或S;(ii)具有氨基酸序列WFYPGSGSTX_4YAQKFQG(SEQ ID NO:8)的HCVR CDR2序列,其中X_4选自W或E;以及(iii)具有氨基酸序列HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)的HCVR CDR3序列;以及

[0232] (b)轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含:(i)具有氨基酸序列$KSSX_5X_6X_7LX_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}NX_{14}$LA(SEQ ID NO:13)的LCVR CDR1序列,其中X_5是Q,X_6选自S或N,X_7选自L或V,X_8选自Y或W,X_9选自P或S,X_{10}选自N或S,X_{11}是N,X_{12}选自Q或N,X_{13}是K;以及X_{14}是Y;(ii)具有氨基酸序列$WX_{15}SX_{16}RX_{17}X_{18}$的LCVR CDR2序列,其中$X_{15}$选自A或G;$X_{16}$选自T或N;$X_{17}$选自G或E,以及$X_{18}$是S;以及(iii)具有氨基酸序列$QQYYX_{19}X_{20}$PFT(SEQ ID NO:30)的LCVR CDR3序列,其中X_{19}选自S或F;以及X_{20}选自Y或F,

[0233] 其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0234] 实施方式7.如实施方式1或6所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离

的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

[0235] (A)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:3的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:10的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:15的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:23的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:32的LCVR CDR3序列;或

[0236] (C)HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:5的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含SEQ ID NO:16的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:25的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,

[0237] 其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合Ga19。

[0238] 实施方式8.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:3的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:10的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:15的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:23的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:32的LCVR CDR3序列,其中抗体或其抗原结合片段特异性结合Ga19。

[0239] 实施方式9.如实施方式8所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:68的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0240] 实施方式10.如实施方式8所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:69的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0241] 实施方式11.如实施方式8所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:70的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0242] 实施方式12.如实施方式8所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:76的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0243] 实施方式13.如实施方式8所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:77的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0244] 实施方式14.如实施方式8-13中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的LCVR序列进一步包含SEQ ID NO:72的LFR1序列、SEQ ID NO:73的LFR2序列、SEQ ID NO:74的LFR3序列和/或SEQ ID NO:75的LFR4序列。

[0245] 实施方式15.如实施方式8所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该HCVR序列是SEQ ID NO:39和/或该LCVR序列是SEQ ID NO:41。

[0246] 实施方式16.如实施方式8或5所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:

该HCVR序列是SEQ ID NO:39,以及该LCVR序列是SEQ ID NO:41。

[0247] 实施方式17.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:4的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:11的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含SEQ ID NO:14的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:24的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:31的LCVR CDR3序列,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合半乳凝素-9(Gal9)。

[0248] 实施方式18.如实施方式17所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:68的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0249] 实施方式19.如实施方式17所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:69的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0250] 实施方式20.如实施方式17所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:70的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0251] 实施方式21.如实施方式17所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:76的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0252] 实施方式22.如实施方式17所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:77的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0253] 实施方式23.如实施方式17-22中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的LCVR序列进一步包含SEQ ID NO:72的LFR1序列、SEQ ID NO:73的LFR2序列、SEQ ID NO:74的LFR3序列和/或SEQ ID NO:75的LFR4序列。

[0254] 实施方式24.如实施方式17所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:43和/或该LCVR序列是SEQ ID NO:45。

[0255] 实施方式25.如实施方式17或24所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:43,以及该LCVR序列是SEQ ID NO:45。

[0256] 实施方式26.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:5的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及轻链可变区(LCVR),该轻链可变区包含SEQ ID NO:16的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:25的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合Gal9。

[0257] 实施方式27.如实施方式26所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该

抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:68的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0258] 实施方式28.如实施方式26所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:69的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0259] 实施方式29.如实施方式26所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:70的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0260] 实施方式30.如实施方式26所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:76的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0261] 实施方式31.如实施方式26所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:77的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0262] 实施方式32.如实施方式26-31中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的LCVR序列进一步包含SEQ ID NO:72的LFR1序列、SEQ ID NO:73的LFR2序列、SEQ ID NO:74的LFR3序列和/或SEQ ID NO:75的LFR4序列。

[0263] 实施方式33.如实施方式26所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:47和/或该LCVR序列是SEQ ID NO:49。

[0264] 实施方式34.如实施方式26或33所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:47,以及该LCVR序列是SEQ ID NO:49。

[0265] 实施方式35.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:18的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:27的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合半乳凝素-9(Gal9)。

[0266] 实施方式36.如实施方式35所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:68的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0267] 实施方式37.如实施方式35所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:69的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0268] 实施方式38.如实施方式35所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:70的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0269] 实施方式39.如实施方式35所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:76的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0270] 实施方式40.如实施方式35所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:77的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0271] 实施方式41.如实施方式35-40中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的LCVR序列进一步包含SEQ ID NO:72的LFR1序列、SEQ ID NO:73的LFR2序列、SEQ ID NO:74的LFR3序列和/或SEQ ID NO:75的LFR4序列。

[0272] 实施方式42.如实施方式35所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:51和/或该LCVR序列是SEQ ID NO:53。

[0273] 实施方式43.如实施方式35或42所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:51,以及该LCVR序列是SEQ ID NO:53。

[0274] 实施方式44.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:18的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:27的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合半乳凝素-9(Gal9)。

[0275] 实施方式45.如实施方式44所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:68的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0276] 实施方式46.如实施方式44所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:69的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0277] 实施方式47.如实施方式44所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:70的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0278] 实施方式48.如实施方式44所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:76的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序

列。

[0279] 实施方式49.如实施方式44所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:77的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0280] 实施方式50.如实施方式44-49中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的LCVR序列进一步包含SEQ ID NO:72的LFR1序列、SEQ ID NO:73的LFR2序列、SEQ ID NO:74的LFR3序列和/或SEQ ID NO:75的LFR4序列。

[0281] 实施方式51.如实施方式44所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:55和/或该LCVR序列是SEQ ID NO:57。

[0282] 实施方式52.如实施方式44或51所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:55,以及该LCVR序列是SEQ ID NO:57。

[0283] 实施方式53.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:19的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:28的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合半乳凝素-9(Gal9)。

[0284] 实施方式54.如实施方式53所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:68的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0285] 实施方式55.如实施方式53所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:69的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0286] 实施方式56.如实施方式53所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:70的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0287] 实施方式57.如实施方式53所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:76的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0288] 实施方式58.如实施方式53所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:77的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0289] 实施方式59.如实施方式53-58中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的LCVR序列进一步包含SEQ ID NO:72的LFR1序列、

SEQ ID NO:73的LFR2序列、SEQ ID NO:74的LFR3序列和/或SEQ ID NO:75的LFR4序列。

[0290] 实施方式60.如实施方式53所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:59和/或该LCVR序列是SEQ ID NO:61。

[0291] 实施方式61.如实施方式53或60所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:59,以及该LCVR序列是SEQ ID NO:61。

[0292] 实施方式62.一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段包含:HCVR,该HCVR包含SEQ ID NO:7的HCVR CDR1序列、SEQ ID NO:9的HCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:12的HCVR CDR3序列;以及LCVR,该LCVR包含SEQ ID NO:20的LCVR CDR1序列、SEQ ID NO:29的LCVR CDR2序列以及SEQ ID NO:33的LCVR CDR3序列,其中该抗体或其抗原结合片段特异性结合半乳凝素-9(Gal9)。

[0293] 实施方式63.如实施方式62所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:68的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0294] 实施方式64.如实施方式62所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:69的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0295] 实施方式65.如实施方式62所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:70的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0296] 实施方式66.如实施方式62所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:76的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0297] 实施方式67.如实施方式62所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的HCVR序列进一步包含SEQ ID NO:77的HFR3序列,以及任选地进一步包含SEQ ID NO:66的HFR1序列、SEQ ID NO:67的HFR2序列和/或SEQ ID NO:71的HFR4序列。

[0298] 实施方式68.如实施方式62-67中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中:该抗体或其抗原结合片段的LCVR序列进一步包含SEQ ID NO:72的LFR1序列、SEQ ID NO:73的LFR2序列、SEQ ID NO:74的LFR3序列和/或SEQ ID NO:75的LFR4序列。

[0299] 实施方式69.如实施方式62所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:63和/或该LCVR序列是SEQ ID NO:65。

[0300] 实施方式70.如实施方式62或69所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该HCVR序列是SEQ ID NO:63,以及该LCVR序列是SEQ ID NO:65。

[0301] 实施方式71.如实施方式1-71中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该抗体是人源化抗体。

[0302] 实施方式72.如实施方式1-71中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中其抗原结合片段是Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、单链Fv或scFv、二硫键连接的F_v、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、$IgGACH_2$、微型抗体、$F(ab')_3$、四抗体、三抗体、双抗体、结构域抗体(dAb)、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$、串联scFv、DART®、TandAb、纳米抗体或scFv-Fc。

[0303] 实施方式73.一种分离的单克隆抗体,该分离的单克隆抗体包含SEQ ID NO:38的重链序列以及SEQ ID NO:40的轻链序列。

[0304] 实施方式74.一种分离的单克隆抗体,该分离的单克隆抗体包含SEQ ID NO:42的重链序列以及SEQ ID NO:44的轻链序列。

[0305] 实施方式75.一种分离的单克隆抗体,该分离的单克隆抗体包含SEQ ID NO:46的重链序列以及SEQ ID NO:48的轻链序列。

[0306] 实施方式76.一种分离的单克隆抗体,该分离的单克隆抗体包含SEQ ID NO:50的重链序列以及SEQ ID NO:52的轻链序列。

[0307] 实施方式77.一种分离的单克隆抗体,该分离的单克隆抗体包含SEQ ID NO:54的重链序列以及SEQ ID NO:56的轻链序列。

[0308] 实施方式78.一种分离的单克隆抗体,该分离的单克隆抗体包含SEQ ID NO:58的重链序列以及SEQ ID NO:60的轻链序列。

[0309] 实施方式79.一种分离的单克隆抗体,该分离的单克隆抗体包含SEQ ID NO:62的重链序列以及SEQ ID NO:64的轻链序列。

[0310] 实施方式80.如实施方式1-79中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段以小于约5nM、2nM、1nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0,2nM、0,1nM、0.05nM或0.01nM的K_d结合人Gal9。

[0311] 实施方式81.如实施方式1-80中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段与Gal9结合,并且抑制Gal9与Gal9受体(例如,TIM3或CD44)结合。

[0312] 实施方式82.如实施方式1-80中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段与Gal9结合,并且不抑制Gal9与Gal9受体(例如,TIM3或CD44)结合。

[0313] 实施方式83.如实施方式1-82中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段逆转T细胞(如$CD4^+$T细胞)的Gal9诱导的Th1凋亡。

[0314] 实施方式84.如实施方式1-83中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该分离的单克隆抗体或其抗原结合片段抑制Gal9诱导的Treg扩增。

[0315] 实施方式85.一种治疗有此需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方式1-84中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,从而治疗该受试者的癌症。

[0316] 实施方式86.一种治疗有此需要的受试者的尿路上皮癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌和/或头颈部鳞癌的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方式1-84中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,从而治疗该受试者的癌症。

[0317] 实施方式87.一种治疗有此需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向该受试者

施用有效量的如实施方式1-84中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段以及抗PD-1抗体,从而治疗该受试者的癌症。

[0318] 实施方式88.一种治疗有此需要的受试者的尿路上皮癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌和/或头颈部鳞癌的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方式1-84中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、抗PD-1抗体以及抗GITR抗体,从而治疗该受试者的癌症。

[0319] 实施方式89.一种治疗有此需要的受试者的癌症的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方式1-84中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段以及抗PD-1抗体,从而治疗该受试者的癌症。

[0320] 实施方式90.一种治疗有此需要的受试者的尿路上皮癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌和/或头颈部鳞癌的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施方式1-69中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段、抗PD-1抗体以及抗GITR抗体,从而治疗该受试者的癌症。

[0321] 实施方式91.如实施方式85、87或89所述的方法,其中该癌症是血液癌症或实体瘤。

[0322] 实施方式92.如实施方式91所述的方法,其中该血液癌症选自由以下构成的组:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病以及毛细胞白血病、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样霉菌病、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)以及多发性骨髓瘤。

[0323] 实施方式93.如实施方式91所述的方法,其中该实体瘤是乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结直肠癌、肾癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌、头颈部鳞癌或前列腺癌。

[0324] 实施方式94.如实施方式85、87、89或91-93中任一项所述的方法,该方法进一步包括向该患者施用化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。

[0325] 实施方式95.如实施方式94所述的方法,其中该检查点抑制剂是抗PD-1。

[0326] 实施方式96.如实施方式94所述的方法,其中该免疫肿瘤剂是抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关蛋白(GITR)抗体。

[0327] 实施方式97.一种多核苷酸,该多核苷酸编码如实施方式1-84中任一项所述的重链或轻链或其抗原结合部分。

[0328] 实施方式98.一种载体,该载体包含如实施方式97所述的多核苷酸,其中该载体是选自由以下构成的组的表达载体:哺乳动物表达载体、酵母表达载体、昆虫表达载体以及细菌表达载体。

[0329] 实施方式99.一种挽救或促进效应T细胞增殖、增强效应T细胞活性和/或鉴定并治疗受试者的癌症的方法,该方法包括:

[0330] (i)确定来自该受试者的样品中Gal9的水平,以及

[0331] (ii)向受试者施用有效量的如实施方式1-84中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,该受试者所具有的Gal9水平高于Gal9的参考水平,

[0332] 从而挽救或促进效应T细胞增殖、增强效应T细胞活性和/或鉴定并治疗受试者。

[0333] 实施方式100.一种挽救或促进效应T细胞增殖、增强效应T细胞活性和/或鉴定并治疗受试者的癌症的方法,该方法包括:

[0334] (i)确定来自该受试者的样品中Gal9的水平,以及

[0335] (ii)向受试者施用有效量的如实施方式1-84中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段以及抗PD-1抗体,该受试者所具有的Gal9水平高于Gal9的参考水平,

[0336] 从而挽救或促进效应T细胞增殖、增强效应T细胞活性和/或鉴定并治疗受试者。

[0337] 实施方式101.一种挽救或促进效应T细胞增殖、增强效应T细胞活性和/或鉴定并治疗受试者的癌症的方法,该方法包括:

[0338] (i)确定来自该受试者的样品中Gal9的水平,以及

[0339] (ii)向受试者施用有效量的如实施方式1-84中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段以及抗PD-1抗体以及抗GITR抗体,该受试者所具有的Gal9水平高于Gal9的参考水平,

[0340] 从而挽救或促进效应T细胞增殖、增强效应T细胞活性和/或鉴定并治疗受试者。

[0341] 实施方式102.如实施方式99-101中任一项所述的方法,其中该受试者被诊断患有癌症,有患上癌症的风险,或者患有癌症复发。

[0342] 实施方式103.如实施方式99-102中任一项所述的方法,其中该Gal9的参考水平是在来自健康或对照个体的样品中测量的Gal9的水平。

[0343] 实施方式104.如实施方式99-103中任一项所述的方法,其中确定包括将该样品中Gal9的水平与该参考水平进行比较。

[0344] 实施方式105.如实施方式99-104中任一项所述的方法,其中该癌症是血液癌症或实体瘤。

[0345] 实施方式106.如实施方式105所述的方法,其中该血液癌症选自由以下构成的组:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病以及毛细胞白血病、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样霉菌病、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、皮肤T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)以及多发性骨髓瘤。

[0346] 实施方式107.如实施方式105所述的方法,其中该实体瘤是乳腺癌、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、结直肠癌、肾癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、胃癌、胃食管癌、食管癌、宫颈癌、头颈部鳞癌或前列腺癌。

[0347] 实施方式108.如实施方式99-107中任一项所述的方法,其中该样品是血液样品、血浆样品、血清样品、肿瘤活检样品或骨髓(BM)源性单个核细胞(MNC)样品。

[0348] 实施方式109.如实施方式99或102-106中任一项所述的方法,该方法进一步包括向该患者施用化学治疗剂、抗血管生成剂、生长抑制剂、免疫肿瘤剂、检查点抑制剂和/或抗肿瘤组合物。

[0349] 实施方式110.如实施方式109所述的方法,其中该检查点抑制剂是抗PD-1。

[0350] 实施方式111.如权利要求110所述的方法,其中该免疫肿瘤剂是抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体家族相关蛋白(GITR)抗体。

[0351] 实施例

[0352] 实施例1

[0353] 人源化抗Gal9抗体亲和力成熟

[0354] 为了开发与原始Ab A抗Gal9抗体相比对人Gal9具有改善的结合亲和力的抗Gal9抗体,在以下3个CDR中进行随机突变:H1-H2-L2或L1-L3-H3,并且产生变体文库。

[0355] 以下两种抗体被鉴定为与Ab A抗Gal9抗体相比具有最佳结合亲和力:抗gal9抗体Ab 001和Ab 002。重链和轻链的序列的比对分别图示于图1A和图1B中,其中CDR在序列中是加方格的。

[0356] 使用表面等离子体共振和溶液平衡测定测量抗体的亲和力结合。如表2所示,发现抗Gal9抗体Ab 001和Ab 002比Ab A抗体具有更大的结合亲和力,如由K_D值的减小所定义。

[0357] 表2:亲和力成熟的抗体的结合数据

[0358]

序列 ID	K_D (pM)	k_a	k_d	K_D (pM), SEA	
	SPR 测定			人	小鼠
Ab A	7179	1.4E+06	9.9E-03	3100	49,000
Ab 001	211	2.4E+06	4.7E-03	350	> 60,000
Ab 002	563	8.3E+06	5.2E-04	1500	29,000

[0359] 单独地,为了开发与原始Ab A抗Gal9抗体相比对人Gal9具有改善的结合亲和力的抗Gal9抗体,使用酵母展示方法。

[0360] 以下五种抗体被鉴定为与Ab A抗Gal9抗体相比具有最佳结合亲和力:抗gal9抗体Ab 003、Ab 004、Ab 005、Ab 006和Ab 007。重链和轻链的序列的比对分别图示于图1C和图1D中,其中CDR在序列中是加方格的。

[0361] 使用表面等离子体共振和溶液平衡测定测量抗体的亲和力结合。如表3所示,发现抗Gal9抗体Ab 003-007比抗体Ab A具有更大的结合亲和力,如由K_D值的减小所定义。出人意料地,相对于抗体Ab A,至少抗体Ab 003-005和Ab 007还显示出对小鼠Gal9的显著改善的亲和力。

[0362] 表3:亲和力成熟的抗体的结合数据

[0363]

序列 ID	K_D (pM)	k_a	k_d	K_D (pM), SEA	
	SPR 测定			人	小鼠
Ab A	4900	1.6E+05	7.7E-04	3100	49,000
Ab 003	110	9.3E+04	1.0E-05	650	1240
Ab 004	450	9.6E+04	4.3E-05	740	4470
Ab 005	510	9.3E+04	5.4E-05	800	1490
Ab 006	620	1.0E+05	6.6E-05	无信号	无信号
Ab 007	1400	7.7E+04	1.1E-04	1010	1760

[0364] 实施例2

[0365] 抗Gal9抗体对Gal9诱导的凋亡的作用

[0366] 为了与亲本Ab A抗Gal9抗体相比表征亲和力成熟的Ab 001抗Gal9抗体,进行了抗体对Gal9诱导的凋亡的作用的比较。

[0367] 如图2B所图示,发现与Ab A抗体相比,亲和力成熟的抗Gal9抗体在减少CD4+T细胞凋亡方面更有效力(也示出于图2A中)。计算的IC50值对于Ab A为18.7nM,并且对于Ab 001为1.9nM。

[0368] T细胞凋亡测定将用于评价Ab 002抗体抑制Gal9诱导的凋亡的功效。

[0369] 要进行的抗体的另外的表征将包括评价抗体与其他Gal9家族成员的交叉反应性、生物化学和生物物理特性评估(包括例如聚集数据)、脱氨基、氧化评价、蛋白水解(特别是在热胁迫之前和之后)。

[0370] 通过膜联蛋白V^+和碘化丙啶$^+$(PI)双阳性细胞的流式细胞术分析来评估抗Gal9抗体Ab 001抑制Gal9诱导的$CD4^+$和/或$CD8^+$T细胞凋亡的能力。

[0371] 将$CD4^+$或$CD8^+$T细胞用促分裂刺激物抗CD3和抗CD28以及Gal9激活。将激活的T细胞与抗Gal9抗体Ab 001或同种型对照共培养。如图2C和图2D所图示,与同种型对照相比,包含Ab 001导致$CD4^+$和$CD8^+$T细胞凋亡都显著减少。

[0372] 实施例3

[0373] 离体AML凋亡的评价

[0374] 将评价抗Gal9亲和力成熟的抗体(Ab 001和Ab 002)对白血病干细胞(LSC,CD34+、CD38-)凋亡的作用,并且与非亲和力成熟的抗Gal9抗体(Ab A)诱导的作用进行比较。

[0375] 将收集AML骨髓样品并且冷冻直至用于实验。将基于其CD34和CD38表达从样品中分选LSC细胞。

[0376] 将评估细胞表面的Tim3/Gal9表达水平以及分泌/释放的gal9水平。将在存在或不存在抗体的情况下将细胞悬浮培养96h,并且将通过流式细胞术来评估凋亡。内部对照将包括其他现有的抗Gal9抗体、阳性对照(aGal9)和阴性对照。

[0377] 实施例4

[0378] 亲和力成熟的抗Gal9抗体对AML患者样品的体内作用的评价

[0379] 为了评估亲和力成熟的抗Gal9抗体在体内的功效,将使用AML体内系统模型对NOD scid gamma(NSG)免疫受损的小鼠进行移植。将对FLT3、IDH1/2和TP53基因进行测序以鉴定突变体;将进行细胞遗传学、临床、免疫表型分型评估。

[0380] 将测量系统移植动力学。

[0381] 移植期将持续约6-12周,并且随后通过流式细胞术评估AML移植以检测CD45/CD33细胞。然后将测试AML药剂。实验的终点将是存活期,届时将进行脾细胞、全血、骨髓CD45/CD33的流式细胞术分析,其中用单一抗Gal9抗体或抗Gal9抗体与化学疗法的组合对动物进行治疗。

[0382] 作为人源化AML模型的替代方案,将使用自体AML平台,以便能够在自体共培养系统中测试免疫肿瘤治疗剂(作为单一药剂或组合),同时可利用冠军公司(Champions)的良好表征的AML患者模型库。在存在或不存在目的抗体(单独或与另一种治疗剂组合)的情况下,将患者的原代AML细胞与患者的匹配的T细胞共培养。将使细胞在富集生长培养基中生长,并且将评价多种参数,包括通过流式细胞术评价的表型分型、T细胞激活、通过Luminex评价的细胞因子产生以及AML频率。

[0383] 作为概念验证实验,使用MC38小鼠同基因模型(结直肠癌)的实体瘤模型将用于进一步体内分析。将在MC38动物中进行使用抗Gal9抗体或抗PD-1抗体的单一疗法研究以及剂量反应实验。将进行抗Gal9抗体和抗PD-1的组合研究以理解体内作用机制。

[0384] 实施例5

[0385] Ab 001对Gal9诱导的TIM-3二聚化的抑制作用的评估

[0386] 通过Eurofins DiscoverX测定来评估TIM-3二聚化。测定依赖于酶片段互补,其中酶β-半乳糖苷酶被分成融合至受体TIM-3的胞质尾的两个片段,即酶受体(EA)和酶供体(ED)。当配体Gal9结合其受体TIM-3时,受体同二聚化,将EA和ED聚在一起,它们代谢测定底物并且产生可量化的可见光子。

[0387] 如图3所图示,与同种型对照相比,包含抗Gal9抗体Ab001或Ab003抑制可溶性Gal9形成TIM-3同二聚体的能力,如通过发射光子的淬灭所证明。

[0388] 实施例6

[0389] 抗Gal9抗体作为组合疗法在概念验证小鼠模型中的功效

[0390] 单独测试或与检查点抑制剂抗体组合测试抗Gal9抗体,以评估在MC38小鼠同基因结肠癌模型中抑制肿瘤生长的功效。所测试的抗体包括抗GITR、抗PD-1和抗Gal9。在单独的实验中使用两种抗Gal9抗体,即可商购的抗Gal9抗体(抗Gal9 Ab RG9-1)和本发明的抗体之一(Ab 003)。

[0391] 虽然与同种型对照相比,在该模型中所有单一疗法都显现提供最低的肿瘤生长抑制,但用抗Gal9抗体和抗GITR或抗PD-1的组合疗法导致适度的肿瘤生长抑制(在二联疗法中Ab 003的肿瘤生长抑制为49%-51%)。用抗Gal9、抗GITR和抗PD1的三联疗法提供了甚至更大的肿瘤生长抑制(在三联疗法中Ab 003的肿瘤生长抑制为67%)。

[0392] 实施例7

[0393] 复发性/难治性晚期所选实体瘤的1a/1b期的临床概要

[0394] 1a/1b期临床试验将按照BOIN设计方法评价在患有复发性/难治性晚期实体瘤的患者中本发明的抗Gal9抗体的最大耐受剂量(MTD)。

[0395] 适应证是基于Gal9表达水平选择的,并且如下:结直肠癌、胃癌、胃食管交界处腺癌、食管癌、尿路上皮癌、宫颈癌和头颈部鳞状细胞癌。剂量递增期是标准的3+3贝叶斯最优区间设计。在确定推荐剂量后,剂量扩展期包括施用两个剂量水平的抗Gal9,施用或不施用派姆单抗,直到确认最小安全生物有效剂量。计划在剂量扩展期完成后进行II期试验。

[0396] 尽管已经参考以上实施例描述了本发明,但将理解,修改和变化涵盖在本发明的精神和范围内。因此,本发明仅由以下权利要求限定。

[0397] 序列:

[0398] 加下划线:信号序列

[0399] **加方格**:CDR

[0400] >VH-CDR1

[0401] $GYX_1FX_2X_3YTIH$(SEQ ID NO:1)

[0402] X_1是T、E、P或A

[0403] X_2是T、G或S

[0404] X_3是E、S或D

[0405] >VH-CDR2

[0406] WFYPGSGSTX$_4$YAQKFQG(SEQ ID NO:8)

[0407] X_4是E、W或V

[0408] >VH-CDR3

[0409] HGGYDGFDY(SEQ ID NO:12)

[0410] >VL-CDR1

[0411] KSSX$_5$X$_6$X$_7$LX$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$NX$_{14}$LA(SEQ ID NO:13)

[0412] X_5是Q或R

[0413] X_6是S或N

[0414] X_7是L、V或I

[0415] X_8是Y或W

[0416] X_9是S或P

[0417] X_{10}是N、S、P或A

[0418] X_{11}是N或H

[0419] X_{12}是Q、N或Y

[0420] X_{13}是K或R

[0421] X_{14}是Y或H

[0422] >VL-CDR2

[0423] WX$_{15}$SX$_{16}$RX$_{17}$X$_{18}$

[0424] X_{15}是A或G

[0425] X_{16}是T、N、M或A

[0426] X_{17}是G或E

[0427] X_{18}是S、E、Y、P或T

[0428] >VL-CDR3

[0429] QQYYX$_{19}$X$_{20}$PFT(SEQ ID NO:30)

[0430] X_{19}是S或F

[0431] X_{20}是Y或F

[0432] >Ab A HC(SEQ ID NO:34)

[0433]
MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVR
QAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVY
FCERHGGYDGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

[0434] >Ab A VH(SEQ ID NO:35)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGS

[0435] GSTEYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCERHGGYDGFDYWGQG TTVTVSS

[0436] >Ab A VH-CDR1(SEQ ID NO:2)

[0437] GYTFTEYTIH

[0438] >Ab A VH-CDR2(SEQ ID NO:9)

[0439] WFYPGSGSTEYAQKFQG

[0440] >Ab A VH-CDR3(SEQ ID NO:12)

[0441] HGGYDGFDY

[0442] >Ab A HFR1(SEQ ID NO:66)

[0443] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS

[0444] >Ab A HFR2(SEQ ID NO:67)

[0445] WVRQAPGQGLEWMG

[0446] >Ab A HFR3(SEQ ID NO:68)

[0447] RVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCER>Ab A HFR4(SEQ ID NO:71)

[0448] WGQGTTVTVSS

[0449] >Ab A LC(SEQ ID NO:36)

MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSNNQKNYL

[0450] AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ YYSYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

[0451] >Ab A VL(SEQ ID NO:37)

[0452] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSNNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA STRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPFTFGGGTKVEIK

[0453] >Ab A VL-CDR1(SEQ ID NO:14)

[0454] KSSQSLLYSNNQKNYLA

[0455] >Ab A VL-CDR2(SEQ ID NO:22)

[0456] WASTRGS

[0457] >Ab A VL-CDR3(SEQ ID NO:31)

[0458] QQYYSYPFT

[0459] >Ab A LFR1(SEQ ID NO:72)

[0460] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC

[0461] >Ab A LFR2(SEQ ID NO:73)

[0462] WYQQKPGQPPKLLIY

[0463] >Ab A LFR3(SEQ ID NO:74)

[0464] GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC>Ab A LFR4(SEQ ID NO:75)

[0465] FGGGTKVEIK

[0466] >Ab 001 HC(SEQ ID NO:38)

MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYEFTEYTIHWVR
QAPGQGLEWMGWFYPGSGSTWYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVY
FCERHGGYDGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK

[0467] VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

[0468] >Ab 001 VH(SEQ ID NO:39)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYEFTEYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGS

[0469] GSTWYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCERHGGYDGFDYWGQ
GTTVTVSS

[0470] >Ab 001 VH-CDR1(SEQ ID NO:3)

[0471] GYEFTEYTIH

[0472] >Ab 001 VH-CDR2(SEQ ID NO:10)

[0473] WFYPGSGSTWYAQKFQG

[0474] >Ab 001 VH-CDR3(SEQ ID NO:12)

[0475] HGGYDGFDY

[0476] >Ab 001 HFR1(SEQ ID NO:66)

[0477] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS

[0478] >Ab 001 HFR2(SEQ ID NO:67)

[0479] WVRQAPGQGLEWMG

[0480] >Ab 001 HFR3(SEQ ID NO:68)

[0481] RVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCER>Ab 001 HFR4(SEQ ID NO:71)

[0482] WGQGTTVTVSS

[0483] >Ab 001 LC(SEQ ID NO:40)

MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYPNNQKNYL
AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ

[0484] YYSFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

[0485] >Ab 001 VL(SEQ ID NO:41)

[0486] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYPNNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSFPFTFGGGTKVEIK

[0487] >Ab 001 VL-CDR1(SEQ ID NO:15)

[0488] KSSQSLLYPNNQKNYLA

[0489] >Ab 001 VL-CDR2(SEQ ID NO:23)

[0490] WASTRGS

[0491] >Ab 001 VL-CDR3(SEQ ID NO:32)

[0492] QQYYSFPFT

[0493] >Ab 001 LFR1(SEQ ID NO:72)

[0494] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC

[0495] >Ab 001 LFR2(SEQ ID NO:73)

[0496] WYQQKPGQPPKLLIY

[0497] >Ab 001 LFR3(SEQ ID NO:74)

[0498] GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC>Ab 001 LFR4(SEQ ID NO:75)

[0499] FGGGTKVEIK

[0500] >Ab 002 HC(SEQ ID NO:42)

[0501] MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGEYTIHWVR
QAPGQGLEWMGWFYPGSGSTVYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVY
FCERHGGYDGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

[0502] >Ab 002 VH(SEQ ID NO:43)

[0503] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGEYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGS
GSTVYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCERHGGYDGFDYWGQG
TTVTVSS

[0504] >Ab 002 VH-CDR1(SEQ ID NO:4)

[0505] GYTFGEYTIH

[0506] >Ab 002 VH-CDR2(SEQ ID NO:11)

[0507] WFYPGSGSTVYAQKFQG

[0508] >Ab 002 VH-CDR3(SEQ ID NO:12)

[0509] HGGYDGFDY

[0510] >Ab 002 HFR1(SEQ ID NO:66)

[0511] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS

[0512] >Ab 002 HFR2(SEQ ID NO:67)

[0513] WVRQAPGQGLEWMG

[0514] >Ab 002 HFR3(SEQ ID NO:68)

[0515] RVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCER>Ab 002 HFR4(SEQ ID NO:71)

[0516] WGQGTTVTVSS

[0517] >Ab 002(E07)LC(SEQ ID NO:44)

[0518] MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSNNQKNYL AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRGEGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ YYSYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

[0519] >Ab 002 VL(SEQ ID NO:45)

[0520] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSNNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA STRGEGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPFTFGGGTKVEIK

[0521] >Ab 002 VL-CDR1(SEQ ID NO:14)

[0522] KSSQSLLYSNNQKNYLA

[0523] >Ab 002 VL-CDR2(SEQ ID NO:24)

[0524] WASTRGE

[0525] >Ab 002 VL-CDR3(SEQ ID NO:31)

[0526] QQYYSYPFT

[0527] >Ab 002 LFR1(SEQ ID NO:72)

[0528] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC

[0529] >Ab 002 LFR2(SEQ ID NO:73)

[0530] WYQQKPGQPPKLLIY

[0531] >Ab 002 LFR3(SEQ ID NO:74)

[0532] GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC>Ab 002 LFR4(SEQ ID NO:75)

[0533] FGGGTKVEIK

[0534] >Ab 003 HC(SEQ ID NO:46)

[0535] MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPFSSYTIHWVR QAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVY FCEVHGGYDGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

[0536] >Ab 003 VH(SEQ ID NO:47)

[0537] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPFSSYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCEVHGGYDGFDYWGQGTTVTVSS

[0538] >Ab 003 VH-CDR1(SEQ ID NO:5)

[0539] GYPFSSYTIH

[0540] >Ab 003 VH-CDR2(SEQ ID NO:9)

[0541] WFYPGSGSTEYAQKFQG

[0542] >Ab 003 VH-CDR3(SEQ ID NO:12)

[0543] HGGYDGFDY

[0544] >Ab 003 HFR1(SEQ ID NO:66)

[0545] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS

[0546] >Ab 003 HFR2(SEQ ID NO:67)

[0547] WVRQAPGQGLEWMG

[0548] >Ab 003 HFR3(SEQ ID NO:69)

[0549] RVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCEV>Ab 003 HFR4(SEQ ID NO:71)

[0550] WGQGTTVTVSS

[0551] >Ab 003 LC(SEQ ID NO:48)

[0552] MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNVLWSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWGSNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYFYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0553] >Ab 003 VL(SEQ ID NO:49)

[0554] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNVLWSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWGSNRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYFYPFTFGGGTKVEIK

[0555] >Ab 003 VL-CDR1(SEQ ID NO:16)

[0556] KSSQNVLWSSNNKNYLA

[0557] >Ab 003 VL-CDR2(SEQ ID NO:25)

[0558] WGSNRES

[0559] >Ab 003 VL-CDR3(SEQ ID NO:33)

[0560] QQYYFYPFT

[0561] >Ab 003 LFR1(SEQ ID NO:72)

[0562] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC

[0563] >Ab 003 LFR2(SEQ ID NO:73)

[0564] WYQQKPGQPPKLLIY

[0565] >Ab 003 LFR3(SEQ ID NO:74)

[0566] GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC>Ab 003 LFR4(SEQ ID NO:75)

[0567] FGGGTKVEIK

[0568] >Ab 004 HC(SEQ ID NO:50)

MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTDYTIHWVR

QAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVY

YCEVHGGYDGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF

[0569] PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT

KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK

VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW

[0570] ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ

[0571] KSLSLSPGK

[0572] >Ab 004 VH(SEQ ID NO:51)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTDYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGS

[0573] GSTEYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCEVHGGYDGFDYWGQG

TTVTVSS

[0574] >Ab 004 VH-CDR1(SEQ ID NO:6)

[0575] GYAFTDYTIH

[0576] >Ab 004 VH-CDR2(SEQ ID NO:9)

[0577] WFYPGSGSTEYAQKFQG

[0578] >Ab 004 VH-CDR3(SEQ ID NO:12)

[0579] HGGYDGFDY

[0580] >Ab 004 HFR1(SEQ ID NO:66)

[0581] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS

[0582] >Ab 004 HFR2(SEQ ID NO:67)

[0583] WVRQAPGQGLEWMG

[0584] >Ab 004 HFR3(SEQ ID NO:76)

[0585] RVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCEV

[0586] >Ab 004 HFR4(SEQ ID NO:71)

[0587] WGQGTTVTVSS

[0588] >Ab 004 LC(SEQ ID NO:52)

MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSRNILYSPHNKNYLA

[0589] WYQQKPGQPPKLLIYWASMRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY

YFYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK

[0590] VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK

[0591] SFNRGEC

[0592] >Ab 004 VL(SEQ ID NO:53)

[0593] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSRNILYSPHNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS

MRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYFYPFTFGGGTKVEIK

[0594] >Ab 004 VL-CDR1(SEQ ID NO:17)

[0595] KSSRNILYSPHNKNYLA

[0596] >Ab 004 VL-CDR2(SEQ ID NO:26)

[0597] WASMRGS

[0598] >Ab 004 VL-CDR3(SEQ ID NO:33)

[0599] QQYYFYPFT

[0600] >Ab 004 LFR1(SEQ ID NO:72)

[0601] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC

[0602] >Ab 004 LFR2(SEQ ID NO:73)

[0603] WYQQKPGQPPKLLIY

[0604] >Ab 004 LFR3(SEQ ID NO:74)

[0605] GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC

[0606] >Ab 004 LFR4(SEQ ID NO:75)

[0607] FGGGTKVEIK

[0608] >Ab 005 HC(SEQ ID NO:54)

[0609] MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGDYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCEIHGGYDGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0610]

[0611] >Ab 005 VH(SEQ ID NO:55)

[0612] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGDYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCEIHGGYDGFDYWGQGTTVTVSS

[0613] >Ab 005 VH-CDR1(SEQ ID NO:7)

[0614] GYTFGDYTIH

[0615] >Ab 005 VH-CDR2(SEQ ID NO:9)

[0616] WFYPGSGSTEYAQKFQG

[0617] >Ab 005 VH-CDR3(SEQ ID NO:12)

[0618] HGGYDGFDY

[0619] >Ab 005 HFR1(SEQ ID NO:66)

[0620] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS

[0621] >Ab 005 HFR2(SEQ ID NO:67)

[0622] WVRQAPGQGLEWMG

[0623] >Ab 005 HFR3(SEQ ID NO:70)

[0624] RVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCEI

[0625] >Ab 005 HFR4(SEQ ID NO:71)

[0626] WGQGTTVTVSS

[0627] >Ab 005 LC(SEQ ID NO:56)

[0628] MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSANNRNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWGSAREYGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYFYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0629] >Ab 005 VL(SEQ ID NO:57)

[0630] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSANNRNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWGSAREYGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYFYPFTFGGGTKVEIK

[0631] >Ab 005 VL-CDR1(SEQ ID NO:18)

[0632] KSSQSVLYSANNRNYLA

[0633] >Ab 005 VL-CDR2(SEQ ID NO:27)

[0634] WGSAREY

[0635] >Ab 005 VL-CDR3(SEQ ID NO:33)

[0636] QQYYFYPFT

[0637] >Ab 005 LFR1(SEQ ID NO:72)

[0638] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC

[0639] >Ab 005 LFR2(SEQ ID NO:73)

[0640] WYQQKPGQPPKLLIY

[0641] >Ab 005 LFR3(SEQ ID NO:74)

[0642] GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC>Ab 005 LFR4(SEQ ID NO:75)

[0643] FGGGTKVEIK

[0644] >Ab 006 HC(SEQ ID NO:58)

[0645] MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGDYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCEIHGGYDGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0646] >Ab 006 VH(SEQ ID NO:59)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGDYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGS

[0647] GSTEYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCEIHGGYDGFDYWGQGT

TVTVSS

[0648] >Ab 006 VH-CDR1(SEQ ID NO:7)

[0649] GYTFGDYTIH

[0650] >Ab 006 VH-CDR2(SEQ ID NO:9)

[0651] WFYPGSGSTEYAQKFQG

[0652] >Ab 006 VH-CDR3(SEQ ID NO:12)

[0653] HGGYDGFDY

[0654] >Ab 006 HFR1(SEQ ID NO:66)

[0655] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS

[0656] >Ab 006 HFR2(SEQ ID NO:67)

[0657] WVRQAPGQGLEWMG

[0658] >Ab 006 HFR3(SEQ ID NO:77)

[0659] RVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCEI>Ab 006 HFR4(SEQ ID NO:71)

[0660] WGQGTTVTVSS

[0661] >Ab 006 LC(SEQ ID NO:60)

MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNYKNHLA

WYQQKPGQPPKLLIYWGSTREPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY

[0662] YFYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK

VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK

SFNRGEC

[0663] >Ab 006 VL(SEQ ID NO:61)

[0664] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNYKNHLAWYQQKPGQPPKLLIYWGS

TREPGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYFYPFTFGGGTKVEIK

[0665] >Ab 006 VL-CDR1(SEQ ID NO:19)

[0666] KSSQSLLYSSNYKNHLA

[0667] >Ab 006 VL-CDR2(SEQ ID NO:28)

[0668] WGSTREP

[0669] >Ab 006 VL-CDR3(SEQ ID NO:33)

[0670] QQYYFYPFT

[0671] >Ab 006 LFR1(SEQ ID NO:72)

[0672] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC

[0673] >Ab 006 LFR2(SEQ ID NO:73)

[0674] WYQQKPGQPPKLLIY

[0675] >Ab 006 LFR3(SEQ ID NO:74)

[0676] GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC>Ab 006 LFR4(SEQ ID NO:75)

[0677] FGGGTKVEIK

[0678] >Ab 007 HC(SEQ ID NO:62)

MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGDYTIHWVR
QAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVY
YCEIHGGYDGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK

[0679] VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

[0680] >Ab 007 VH(SEQ ID NO:63)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGDYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGS

[0681] GSTEYAQKFQGRVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCEIHGGYDGFDYWGQG
TTVTVSS

[0682] >Ab 007 VH-CDR1(SEQ ID NO:7)

[0683] GYTFGDYTIH

[0684] >Ab 007 VH-CDR2(SEQ ID NO:9)

[0685] WFYPGSGSTEYAQKFQG

[0686] >Ab 007 VH-CDR3(SEQ ID NO:12)HGGYDGFDY

[0687] >Ab 007 HFR1(SEQ ID NO:66)

[0688] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS

[0689] >Ab 007 HFR2(SEQ ID NO:67)

[0690] WVRQAPGQGLEWMG

[0691] >Ab 007 HFR3(SEQ ID NO:70)

[0692] RVTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCEI

[0693] >Ab 007 HFR4(SEQ ID NO:71)

[0694] WGQGTTVTVSS

[0695] >Ab 007 LC(SEQ ID NO:64)

MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNVLWSSNNRNYL
AWYQQKPGQPPKLLIYWGSTRETGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ

[0696] YYFYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

[0697] >Ab 007 VL(SEQ ID NO:65)

[0698] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNVLWSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWG
STRETGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYFYPFTFGGGTKVEIK

[0699] >Ab 007 VL-CDR1(SEQ ID NO:20)

[0700] KSSQNVLWSSNNRNYLA

[0701] >Ab 007 VL-CDR2(SEQ ID NO:29)

[0702] WGSTRET

[0703] >Ab 007 VL-CDR3(SEQ ID NO:33)

[0704] QQYYFYPFT

[0705] >Ab 007 LFR1(SEQ ID NO:72)

[0706] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC

[0707] >Ab 007 LFR2(SEQ ID NO:73)

[0708] WYQQKPGQPPKLLIY

[0709] >Ab 007 LFR3(SEQ ID NO:74)

[0710] GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC

[0711] >Ab 007 LFR4(SEQ ID NO:75)

[0712] FGGGTKVEIK。

> HC 序列比对

```
Ab A     MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA
Ab 001   MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA
Ab 002   MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA

Ab A     SGYTFTEYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGR
Ab 001   SGYEFTEYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTWYAQKFQGR
Ab 002   SGYTFGEYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTVYAQKFQGR

Ab A     VTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCERHGGYDGFDYWGQ
Ab 001`  VTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCERHGGYDGFDYWGQ
Ab 002   VTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCERHGGYDGFDYWGQ

Ab A     GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
Ab 001   GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
Ab 002   GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE

Ab A     PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
Ab 001   PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
Ab 002   PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT

Ab A     QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
Ab 001   QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
Ab 002   QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP

Ab A     SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
Ab 001   SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
Ab 002   SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

Ab A     VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
Ab 001   VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
Ab 002   VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
```

图1A

> HC 序列比对

```
Ab A    NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
Ab 001  NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
Ab 002  NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT

Ab A    CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
Ab 001  CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
Ab 002  CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS

Ab A    KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ab 001  KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ab 002  KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ab A    (SEQ ID NO:34)
Ab 001  (SEQ ID NO:38)
Ab 002  (SEQ ID NO:42)
```

图1A,续

> HC 序列比对

```
Ab A    MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS
Ab 001  MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS
Ab 002  MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS

Ab A    SQSLLYSNNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRGSGVPDRFS
Ab 001  SQSLLYPNNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRGSGVPDRFS
Ab 002  SQSLLYSNNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRGEGVPDRFS

Ab A    GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPFTFGGGTKVEIK
Ab 001  GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSFPFTFGGGTKVEIK
Ab 002  GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPFTFGGGTKVEIK

Ab A    RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
Ab 001  RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
Ab 002  RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD

Ab A    NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
Ab 001  NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
Ab 002  NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE

Ab A    VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:36)
Ab 001  VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:40)
Ab 002  VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:44)
```

图1B

> HC序列比对

```
Ab A    MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA
Ab 003  MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA
Ab 004  MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA
Ab 005  MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA
Ab 006  MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA
Ab 007  MGWSCIILFLVATATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA

Ab A    SGYTFTEYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGR
Ab 003  SGYPFSSYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGR
Ab 004  SGYAFTDYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGR
Ab 005  SGYTFGDYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGR
Ab 006  SGYTFGDYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGR
Ab 007  SGYTFGDYTIHWVRQAPGQGLEWMGWFYPGSGSTEYAQKFQGR

Ab A    VTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCERHGGYDGFDYWGQ
Ab 003  VTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCEVHGGYDGFDYWGQ
Ab 004  VTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCEVHGGYDGFDYWGQ
Ab 005  VTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCEIHGGYDGFDYWGQ
Ab 006  VTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCEIHGGYDGFDYWGQ
Ab 007  VTMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCEIHGGYDGFDYWGQ

Ab A    GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
Ab 003  GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
Ab 004  GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
Ab 005  GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
Ab 006  GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
Ab 007  GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE

Ab A    PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
Ab 003  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
Ab 004  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
Ab 005  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
Ab 006  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
Ab 007  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
```

图1C

> HC序列比对

```
Ab A    QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
Ab 003  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
Ab 004  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
Ab 005  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
Ab 006  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
Ab 007  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG

Ab A    PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
Ab 003  PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
Ab 004  PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
Ab 005  PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
Ab 006  PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
Ab 007  PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV

Ab A    DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
Ab 003  DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
Ab 004  DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
Ab 005  DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
Ab 006  DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
Ab 007  DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

Ab A    KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
Ab 003  KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
Ab 004  KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
Ab 005  KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
Ab 006  KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
Ab 007  KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
```

图1C,续

> HC 序列比对

```
Ab A     SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
Ab 003   SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
Ab 004   SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
Ab 005   SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
Ab 006   SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
Ab 007   SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF

Ab A     FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
Ab 003   FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
Ab 004   FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
Ab 005   FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
Ab 006   FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
Ab 007   FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

Ab A     G            (SEQ ID NO:34)
Ab 003   GK           (SEQ ID NO:46)
Ab 004   GK           (SEQ ID NO:50)
Ab 005   GK           (SEQ ID NO:54)
Ab 006   GK           (SEQ ID NO:58)
Ab 007   GK           (SEQ ID NO:62)
```

图1C,续

> HC 序列比对

```
Ab A    MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS
Ab 003  MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS
Ab 004  MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS
Ab 005  MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS
Ab 006  MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS
Ab 007  MGWSCIILFLVATATGAHSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS

Ab A    SQSLLYSNNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRGSGVPDRFS
Ab 003  SQNVLWSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWGSNRESGVPDRFS
Ab 004  SRNILYSPHNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASMRGSGVPDRFS
Ab 005  SQSVLYSANNRNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWGSAREYGVPDRFS
Ab 006  SQSLLYSSNYKNHLAWYQQKPGQPPKLLIYWGSTREPGVPDRFS
Ab 007  SQNVLWSSNNRNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWGSTRETGVPDRFS

Ab A    GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPFTFGGGTKVEIK
Ab 003  GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYFYPFTFGGGTKVEIK
Ab 004  GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYFYPFTFGGGTKVEIK
Ab 005  GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYFYPFTFGGGTKVEIK
Ab 006  GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYFYPFTFGGGTKVEIK
Ab 007  GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYFYPFTFGGGTKVEIK

Ab A    RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
Ab 003  RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
Ab 004  RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
Ab 005  RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
Ab 006  RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
Ab 007  RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
```

图1D

> HC 序列比对

```
Ab A    NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
Ab 003  NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
Ab 004  NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
Ab 005  NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
Ab 006  NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
Ab 007  NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA

Ab A    CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC    (SEQ ID NO:36)
Ab 003  CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC    (SEQ ID NO:48)
Ab 004  CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC    (SEQ ID NO:52)
Ab 005  CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC    (SEQ ID NO:56)
Ab 006  CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC    (SEQ ID NO:60)
Ab 007  CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC    (SEQ ID NO:64)
```

图1D,续

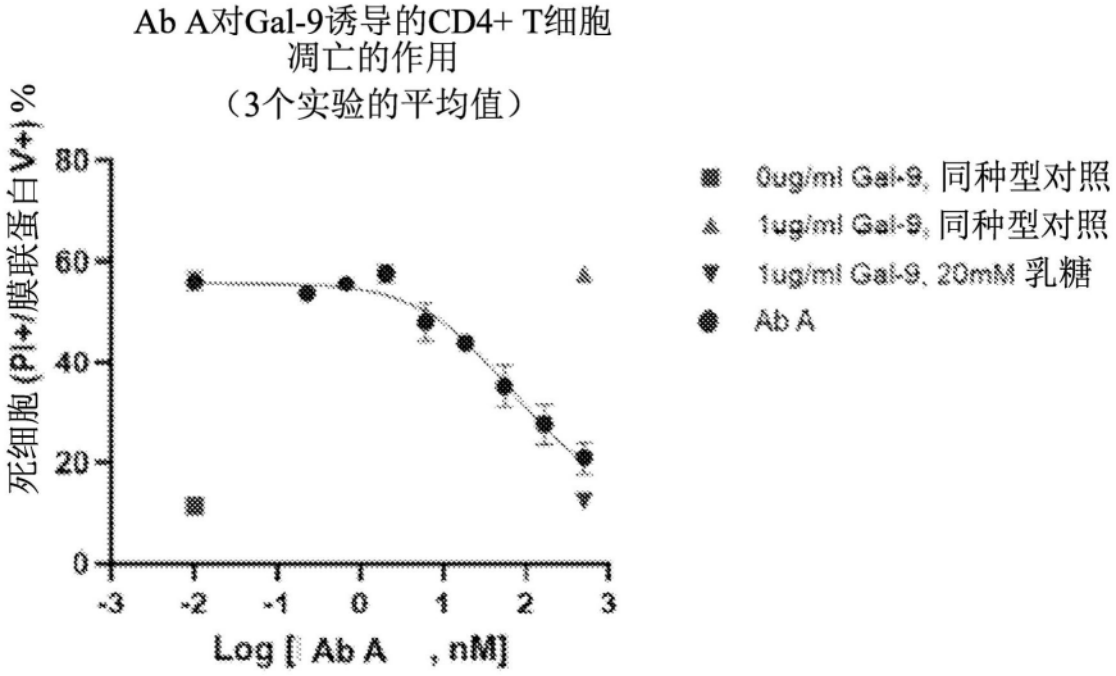


图2A

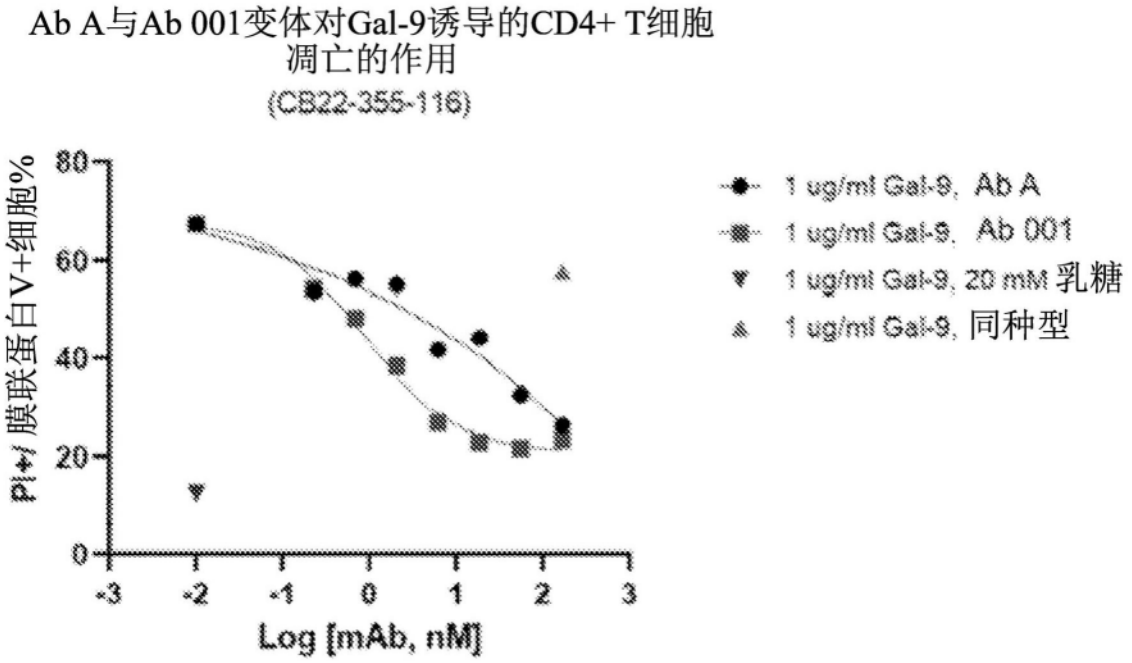

Ab A与Ab 001变体对Gal-9诱导的CD4+ T细胞凋亡的作用
(CB22-355-116)
PI+/ 膜联蛋白V+细胞%
80
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log [mAb, nM]
1 ug/ml Gal-9, Ab A
1 ug/ml Gal-9, Ab 001
1 ug/ml Gal-9, 20 mM 乳糖
1 ug/ml Gal-9, 同种型

图2B

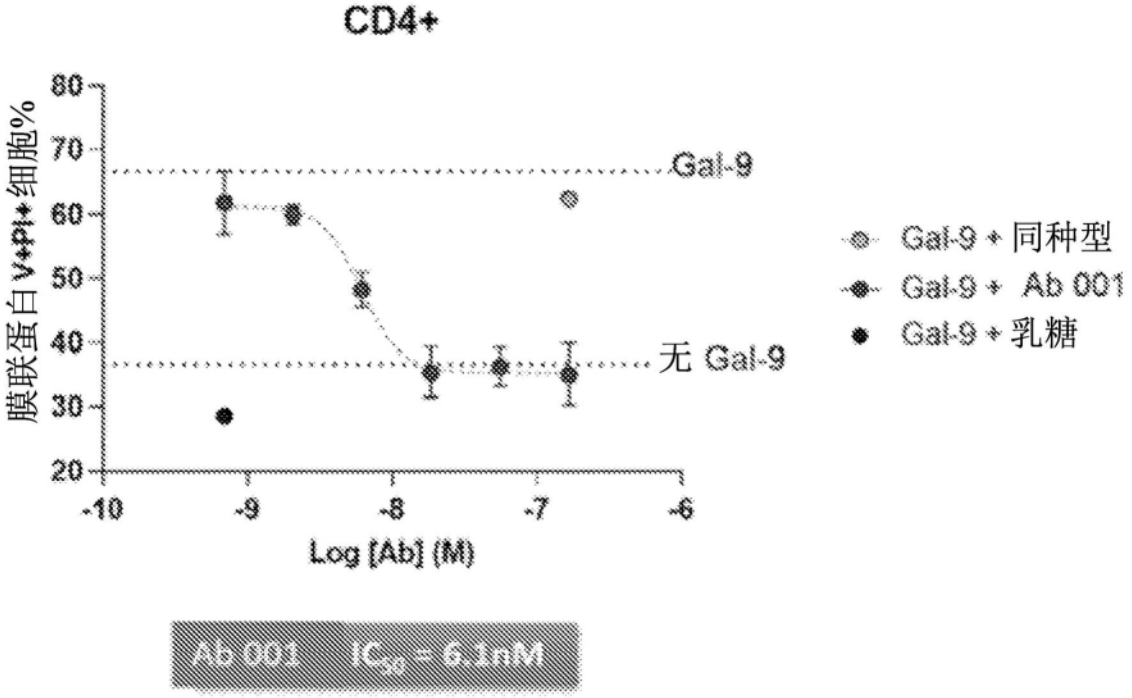

CD4+
膜联蛋白 V+PI+ 细胞%
80
70
60
50
40
30
20
-10
-9
-8
-7
-6
Log [Ab] (M)
Gal-9
无 Gal-9
Gal-9 + 同种型
Gal-9 + Ab 001
Gal-9 + 乳糖
Ab 001 IC50 = 6.1nM

图2C

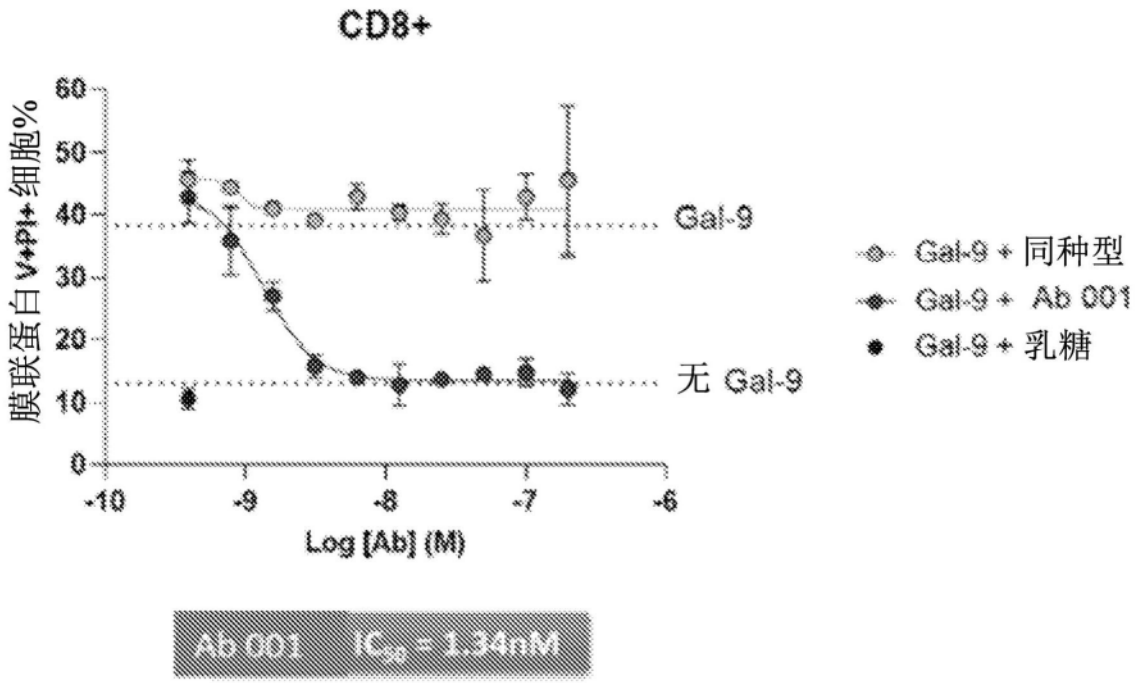

CD8+
膜联蛋白V+PI+细胞%
60
50
40
30
20
10
0
-10
-9
-8
-7
-6
Log [Ab] (M)
Gal-9
无 Gal-9
Gal-9 + 同种型
Gal-9 + Ab 001
Gal-9 + 乳糖
Ab 001 IC50 = 1.34nM

图2D

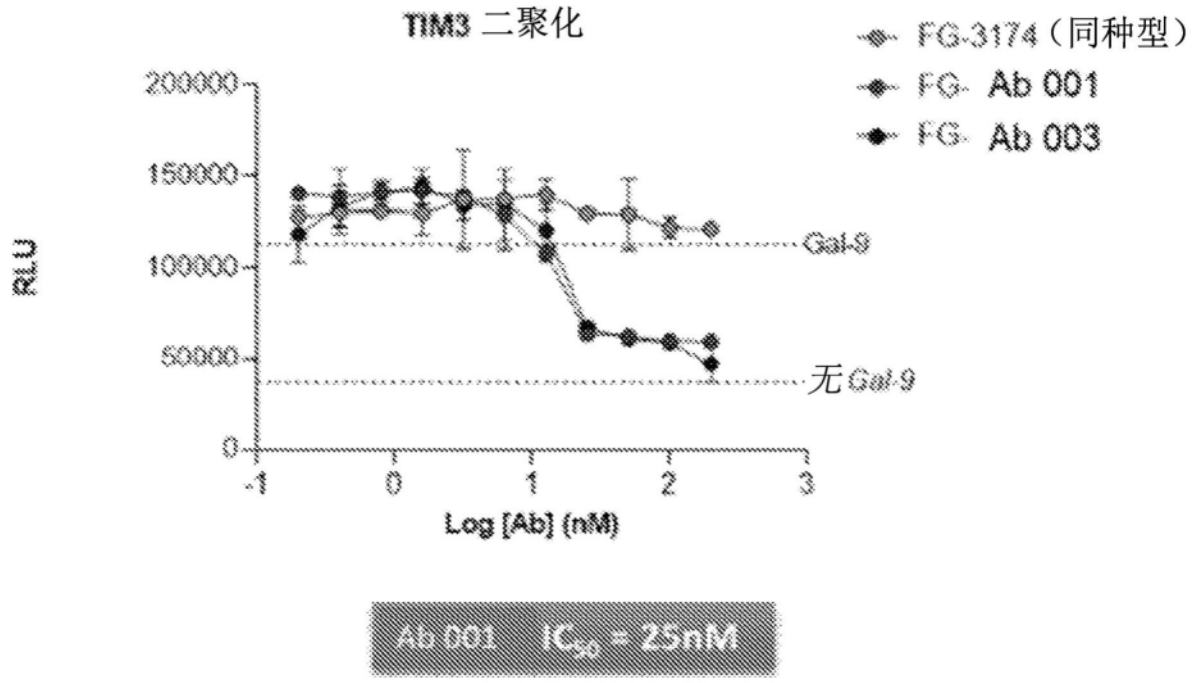

TIM3 二聚化
RLU
200000
150000
100000
50000
0
-1
0
1
2
3
Log [Ab] (nM)
Gal-9
无 Gal-9
FG-3174（同种型）
FG- Ab 001
FG- Ab 003
Ab 001 IC50 = 25nM

图3