



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I751397 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：107147436

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 12 月 27 日

(51)Int. Cl.：

**C07K16/24 (2006.01)****C07K16/28 (2006.01)****C12N15/13 (2006.01)****C12N15/63 (2006.01)****C12P21/08 (2006.01)****A61K47/68 (2017.01)****A61K39/395 (2006.01)****G01N33/53 (2006.01)**

(30)優先權：2017/12/27 中國大陸

201711449486.7

2018/12/19 中國大陸

201811561512.X

(71)申請人：大陸商信達生物製藥（蘇州）有限公司（中國大陸）INNOVENT BIOLOGICS  
(SUZHOU) CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：繆小牛 MIAO, XIAONI (CN)；胡化靜 HU, HUAJING (CN)；曾竣瑋 TSUN, ANDY  
(CN)；劉軍建 LIU, JUNJIAN (CN)；劉曉林 LIU, XIAOLIN (CN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

TW 201406784A

TW 201726730A

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：45 項 圖式數：9 共 191 頁

(54)名稱

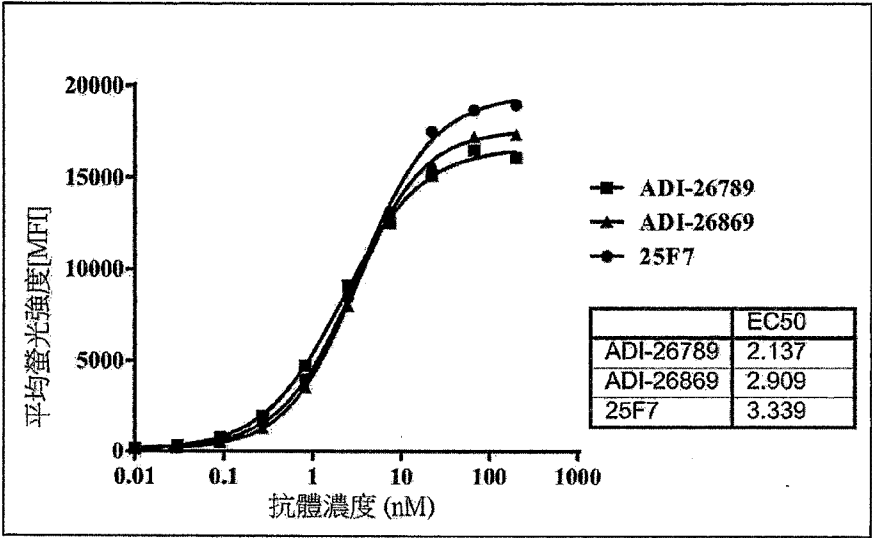
抗 LAG-3 抗體及其用途

(57)摘要

本發明涉及特異性結合 LAG-3 的新型抗體和抗體片段以及含有該抗體或抗體片段的組合物。此外，本發明涉及編碼該抗體或其抗體片段的核酸及包含其的宿主細胞，以及相關用途。此外，本發明涉及這些抗體和抗體片段的治療和診斷用途。特別地，本發明涉及這些抗體和抗體片段與其它治療劑，例如抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體的聯合治療。

The present invention relates to novel antibodies and antibody fragments that specifically bind to LAG-3 and compositions containing the antibodies or antibody fragments. Furthermore, the invention relates to nucleic acids encoding the antibodies or antibody fragments thereof, and host cells comprising the same, and related uses. Furthermore, the invention relates to the therapeutic and diagnostic use of these antibodies and antibody fragments. In particular, the invention relates to the combination therapy of these antibodies and antibody fragments with other therapeutic agents, such as anti-PD-1 or anti-PD-L1 antibodies.

指定代表圖：



【第1圖】

## 發明摘要

### 【發明名稱】(中文/英文)

抗 LAG-3 抗體及其用途

ANTI-LAG-3 ANTIBODIES AND USES THEREOF

### 【中文】

本發明涉及特異性結合 LAG-3 的新型抗體和抗體片段以及含有該抗體或抗體片段的組合物。此外，本發明涉及編碼該抗體或其抗體片段的核酸及包含其的宿主細胞，以及相關用途。此外，本發明涉及這些抗體和抗體片段的治療和診斷用途。特別地，本發明涉及這些抗體和抗體片段與其它治療劑，例如抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體的聯合治療。

### 【英文】

The present invention relates to novel antibodies and antibody fragments that specifically bind to LAG-3 and compositions containing the antibodies or antibody fragments. Furthermore, the invention relates to nucleic acids encoding the antibodies or antibody fragments thereof, and host cells comprising the same, and related uses. Furthermore, the invention relates to the therapeutic and diagnostic use of these antibodies and antibody fragments. In particular, the invention relates to the combination therapy of these antibodies and antibody fragments with other therapeutic agents, such as anti-PD-1 or anti-PD-L1 antibodies.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**第（ 1 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**無。

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**

本案無代表化學式。

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

抗 LAG-3 抗體及其用途

ANTI-LAG-3 ANTIBODIES AND USES THEREOF

## 【技術領域】

本發明涉及特異性結合 LAG-3 的新型抗體和抗體片段以及含有該抗體或抗體片段的組合物。此外，本發明涉及編碼所述抗體或其抗體片段的核酸及包含其的宿主細胞，以及相關用途。此外，本發明涉及這些抗體和抗體片段的治療和診斷用途。特別地，本發明涉及這些抗體和抗體片段與其它療法，例如治療方式或治療劑，例如抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體的聯合治療。

## 【先前技術】

淋巴細胞激活基因 3(LAG-3)，也稱為 CD223，是由 LAG3 基因在人體中編碼的 I 型跨膜蛋白。LAG-3 的分子性質和生物學功能已經有充分的表徵和描述，參見例如 Sierro 等人，Expert Opin Ther Targets(2011)15(1):91-101。LAG-3 是一種 CD4 樣蛋白，在 T 細胞(特別是活化的 T 細胞)、自然殺傷細胞、B 細胞和漿細胞樣樹突狀細胞表面表達。已顯示 LAG-3 是負共刺激受體，即抑制性受體。

LAG-3 與 MHC II 類分子結合(Baixeras 等(1992) J. Exp. Med.176:327-337; Huard 等(1996) Eur.J.Immunol, 26:1180-1186)，在抗原呈遞細胞(APC)如樹突狀細胞、巨噬細胞

胞和 B 細胞的表面處組成型表達高水平的分子家族。LAG-3 功能依賴於與 II 類 MHC 的結合和藉由其胞質結構域的信號傳導。已經提出，LAG-3 與 MHC II 類分子的直接結合在下調 CD4+T 淋巴細胞的抗原依賴性刺激中起作用(Huard 等，(1994)Eur.J.Immunol.24：3216-3221)。還認為 LAG3 和 II 類 MHC 之間的相互作用在調節樹突細胞功能中起作用(Andreae 等人. J Immunol 168:3874-3880, 2002)。近期的臨床前研究也已經記錄了 LAG-3 在 CD8 T-細胞耗竭中的作用(Blackburn 等人. Nat Immunol 10:29-37, 2009)。

研究表明，慢性病毒感染後耗盡的 CD8+T 細胞表達多種抑制性受體(如 PD-1，CD160 和 2B4)。LAG-3 在 LCMV 感染後以高水平表達，並且顯示阻斷 PD-1/PD-L1 途徑與阻斷 LAG-3 顯著降低慢性感染小鼠中的病毒載量(Blackburn 等人，Nat Immunol (2009)10：29-37)。還顯示 PD-1/PD-L1 途徑和 LAG-3 阻斷劑的聯合抑制提供了抗腫瘤功效(Jing 等人，Journal for ImmunoTherapy of Cancer(2015)3：2)。

鑒於 LAG-3 的上述重要作用，需要開發調節其活性的新的抗 LAG-3 抗體，特別是人源化或人抗體。這類抗體能夠更好地用於治療腫瘤以及其它疾病如感染。還希望獲得能夠與其他療法(例如治療劑，例如抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體)聯合用於治療腫瘤，特別是轉移性或難治性腫瘤，或者治療感染，例如慢性感染的新的抗 LAG-3 抗體。此外，還

需要能夠用於小鼠模型的抗鼠 LAG-3 抗體，以便於研究抗體的體內生物學活性。

### 【發明內容】

本文公開了與 LAG-3 結合的抗體分子，例如全人抗體分子或人源化抗體分子。還提供了編碼該抗體或其抗體片段的核酸、用於產生抗體分子的表達載體、宿主細胞和方法。還提供包含抗 LAG-3 的抗體分子的免疫綴合物、多特异性或雙特异性抗體分子，以及醫藥組成物。本文公開的抗 LAG-3 抗體分子可以單獨或聯合其他療法，例如治療劑（例如抗 PD-1 抗體或抗 PD-L1 抗體）或治療方式，用來治療、預防和/或診斷腫瘤疾病以及感染性疾病。此外，本文還公開了用於檢測 LAG-3 的組合物和方法以及使用抗 LAG-3 抗體分子治療多種疾病（包括腫瘤和/或感染性疾病）的方法。

因此，在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段（特异性）結合 LAG-3。在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段（特异性）結合人 LAG-3 或小鼠 LAG-3。

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體或其片段以高親和力結合 LAG-3（例如人 LAG-3），例如，以以下平衡解離常數 ( $K_D$ ) 與 LAG-3 結合，該  $K_D$  小於大約 100nM，較佳地，小於或等於大約 50nM，更佳地小於或等於大約 20nM，更佳地小於或等於大約 10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM 或 2nM，最較佳地，該  $K_D$  小於或等於大約 1nM、0.9nM、0.8nM 或 0.7nM。在一些實施方案

中，本發明的抗 LAG-3 抗體以 0.1 至 20nM，較佳地 0.5-20nM，更佳地 0.5 至 10nM、0.5 至 8nM、0.5 至 5nM，最佳地 0.5 至 1nM、0.5 至 0.8nM、0.5 至 0.7nM、0.6 至 0.7nM 的  $K_D$  結合 LAG-3。在一些實施方案中，LAG-3 為人 LAG-3。在一些實施方案中，LAG-3 為小鼠 LAG-3。在一些實施方案中，抗體結合親和力是使用生物光干涉測定法(例如 Fortebio 親和測量)測定法測定的。

在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段結合表達人 LAG-3 的細胞，例如，以小於或等於大約 3.3nM、3nM、2nM、1.5nM、1.4nM、1.3nM、1.2nM、1.1nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM 或 0.5nM 的  $EC_{50}$ 。在一些實施方案中，該結合用流式細胞術(例如 FACS)測定。在一些實施方案中，表達人 LAG-3 的細胞為表達人 LAG-3 的 293 細胞(例如 HEK293 細胞)。

在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段結合表達小鼠 LAG-3 的細胞，例如，以小於或等於大約 15000nM、14000nM 或 13000nM 的  $EC_{50}$ 。在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段結合表達小鼠 LAG-3 的細胞，例如，以小於或等於大約 50nM 的  $EC_{50}$ ，例如以大約 40-50nM 的  $EC_{50}$ 、大約 40 至 45nM 的  $EC_{50}$  或大約 42nM 的  $EC_{50}$ 。在一些實施方案中，用流式細胞術(例如 FACS)測定所述結合。在一些實施方案中，表達小鼠 LAG-3 的細胞為表達小鼠 LAG-3 的中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。

在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段抑制

LAG-3 的相關活性，例如以小於或等於大約 20nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM 或 5nM 的  $IC_{50}$ ，較佳以大約 1 至 6nM、1 至 5nM、4nM、4.5nM、5nM、5.1nM、5.2nM、5.3nM、5.4nM、5.5nM、5.6nM、5.7nM、5.8nM、5.9nM 或 6nM 的  $IC_{50}$ 。在一些實施方案中，LAG-3 的相關活性是 MHC II 類分子與 LAG-3 的結合。在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段以小於或等於大約 20nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM 或 5nM 的  $IC_{50}$ ，較佳以大約 1 至 6nM、1 至 5nM、4nM、4.5nM、5nM、5.1nM、5.2nM、5.3nM、5.4nM、5.5nM、5.6nM、5.7nM、5.8nM、5.9nM 或 6nM 的  $IC_{50}$  抑制 LAG-3 與表達 MHC II 類分子的細胞上的 MHC II 類分子的結合。在一些實施方案中，MHC II 類分子是 HLA-DR。在一些實施方案中，細胞為 CHO 細胞。在一些實施方案中，用流式細胞術（例如 FACS）測量所述本發明的抗體或其片段對 LAG-3 的相關活性的抑制。

在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段結合激活的 CD4<sup>+</sup>和/或 CD8<sup>+</sup> T 細胞的表面上的內源 LAG-3，例如以小於或等於大約 35pM、30pM、25pM、20pM、15pM、14pM 或 13pM 的  $EC_{50}$ ，較佳大約 1 至 20pM、5 至 20pM、5 至 15pM、10 至 15pM、11 至 13pM、10pM、11pM、12pM 或 13pM 的  $EC_{50}$ 。在一些實施方案中，激活的 CD4<sup>+</sup>T 細胞為激活的人 CD4<sup>+</sup>T 細胞。在一些實施方案中，用流式細胞術（例如 FACS）測定上述結合。在一些實施方案中，在 Accuri C6 系統中進行流式細胞術。

在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段抑制LAG-3的一種或多種活性，例如，導致以下一種或多種：CD4<sup>+</sup> T淋巴細胞的抗原依賴性刺激增加；T細胞增殖增加；活化抗原(例如，CD25)的表達增加；細胞因子(例如，干擾素- $\gamma$ 增加；細胞因、白介素-2(IL-2)或白介素-4(IL-4))的表達增加；趨化因子(例如，CCL3、CCL4或CCL5)的表達增加；Treg細胞的阻抑活性減少；T細胞穩態增加；腫瘤浸潤型淋巴細胞增加；或癌細胞的免疫逃避減少。

在一些實施方案中，本發明的抗LAG-3抗體或其片段能夠誘發抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)。

在一些實施方案中，本發明的抗LAG-3抗體單獨或與其他的療法(例如治療方式和/或治療劑)組合能夠有效治療腫瘤(例如癌症)或感染性疾病(例如慢性感染)。較佳地，本發明的抗LAG-3抗體能夠與抗PD-1或抗PD-L1抗體聯合治療腫瘤，特別是轉移性或難治性腫瘤。在一些實施方案中，腫瘤是癌症。在一些實施方案中，腫瘤是胃腸道腫瘤。在一些實施方案中，癌症是結腸癌。

在一些實施方案中，本發明抗LAG-3抗體或其片段的重鏈和/或輕鏈還包含信號肽序列，例如METDTLLLVVLLLVVPGSTG(SEQ ID NO:48)。

在一些實施方案中，本發明的抗體還涵蓋抗LAG-3抗體的胺基酸序列的變體，以及與上文所述的任何抗LAG-3抗體或其片段結合相同表位的抗體。

在某些實施方案中，提供結合LAG-3或其片段的抗體

或抗體片段(較佳的抗原結合片段)，其中所述抗體或抗體片段結合 LAG-3 內的表位。

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 或 IgE 形式的抗體。在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體包含選自例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE 的重鏈恆定區的重鏈恆定區；特別地，選自例如 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的重鏈恆定區的重鏈恆定區，更具體地 IgG1、IgG2 或 IgG4 的重鏈恆定區，例如人 IgG1、IgG2 或 IgG4 的重鏈恆定區。在一個實施方案中，重鏈恆定區是人 IgG1 或人 IgG4 重鏈恆定區。在一個實施方案中，重鏈恆定區是人 IgG4 重鏈恆定區。在另一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子具有例如選自  $\kappa$  或  $\lambda$  輕鏈恆定區的輕鏈恆定區、較佳地  $\kappa$ (例如，人  $\kappa$ )的輕鏈恆定區。

在又一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子包含 IgG4(例如，人 IgG4)的重鏈恆定區。在一個實施方案中，人 IgG4 包含在根據 EU 編號的位置 228 處的置換(例如，Ser 至 Pro 置換)。在又一個實施方案中，人 IgG4 在第 114-115 位(EU 編號)被突變為 AA(Armour KL1, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM, Eur J Immunol. 1999 Aug;29(8):2613-24, Recombinant human IgG molecules lacking Fc $\gamma$  receptor I binding and monocyte triggering activities)。在一個實施方案中，重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:46 所示的胺基酸序列，或與之具有至少 80%、

85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的序列，或由該序列組成。

在又一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子包含  $\kappa$  輕鏈恆定區，例如，人  $\kappa$  輕鏈恆定區。在一個實施方案中，輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:47 的胺基酸序列，或與之具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的序列，或由該序列組成。

在另一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子包含 IgG4 的重鏈恆定區(例如，人 IgG4 重鏈恆定區)和  $\kappa$  輕鏈恆定區(例如，人  $\kappa$  輕鏈恆定區)。在一個實施方案中，恆定區是突變的 IgG4，例如，突變的人 IgG4(例如，具有在根據 EU 編號的位置 228 處的突變(例如，S228P 突變))。在一些實施方案中，人 IgG4 重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:46 所示的胺基酸序列，或與之具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的序列，或由該序列組成。在一個實施方案中，人  $\kappa$  輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:47 的胺基酸序列，或與之具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的序列，或由該序列組成。

在一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子是分離的或重組的。

在一些實施方案中，抗 LAG-3 抗體是單株抗體或具有單特異性的抗體。抗 LAG-3 抗體分子也可以是人源化的、嵌合的、駱駝科(camelid)、鯊魚或體外生成的抗體分子。

在一些實施方案中，抗 LAG-3 抗體是人源化的。在一些實施方案中，抗 LAG-3 抗體是人抗體。在一些實施方案中，至少部分的抗 LAG-3 抗體的構架序列是人共有構架序列。在一個實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體還涵蓋其抗體片段，較佳地選自以下的抗體片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、單鏈抗體(例如 scFv)或(Fab')<sub>2</sub>、單結構域抗體、雙抗體(dAb)或線性抗體。

在某些實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子處於雙特異性或多特異性抗體分子形式。在一個實施方案中，雙特異性抗體分子具有針對 LAG-3 的第一結合特異性和針對 PD-1、TIM-3、CEACAM(例如，CEACAM-1 和/或 CEACAM-5)、PD-L1 或 PD-L2 的第二結合特異性。在一個實施方案中，雙特異性抗體分子與 LAG-3 和 PD-1 結合。在另一個實施方案中，雙特異性抗體分子與 LAG-3 和 PD-L1 結合。在又一個實施方案中，雙特異性抗體分子與 LAG-3 和 PD-L2 結合。可以在多特異性抗體分子中產生前述分子的任何組合。多特異性抗體分子例如三特異性抗體分子，其包含針對 LAG-3 的第一結合特異性和針對以下一種或多種的分子的第二及第三結合特異性：PD-1、TIM-3、CEACAM(例如、CEACAM-1 或 CEACAM-5)、PD-L1 或 PD-L2。

在其他實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子與包含以下一種或多種的雙特異性分子組合使用：PD-1、TIM-3、CEACAM(例如、CEACAM-1 或 CEACAM-5)、PD-L1 或 PD-L2。

在一方面，本發明提供了編碼以上任何抗 LAG-3 抗體或其片段的核酸。在一個實施方案中，提供包含該核酸的載體。在一個實施方案中，載體是表達載體。在一個實施方案中，提供包含該核酸或該載體的宿主細胞。在一個實施方案中，宿主細胞是真核的。在另一個實施方案中，宿主細胞選自酵母細胞、哺乳動物細胞(例如 CHO 細胞或 293 細胞)或適用於製備抗體或其抗原結合片段的其它細胞。在另一個實施方案中，宿主細胞是原核的，例如大腸桿菌細胞。

在一個實施方案中，本發明提供製備抗 LAG-3 抗體或其片段(較佳的抗原結合片段)的方法，其中該方法包含在適於表達編碼所述抗體或其片段(較佳的抗原結合片段)的核酸的條件下培養該宿主細胞，以及視需要地分離所述抗體或其片段(較佳地抗原結合片段)。在某個實施方案中，該方法還包括從宿主細胞回收抗 LAG-3 抗體或其片段(較佳地抗原結合片段)。

在一些實施方案中，本發明提供了免疫綴合物，其包含本文中提供的任何抗 LAG-3 抗體和其它物質，例如細胞毒性劑或標記。在一些實施方案中，該免疫綴合物用於預防或治療腫瘤(例如癌症)或感染性疾病。較佳地，腫瘤是胃腸道腫瘤(例如癌症)，例如結腸癌。較佳地，感染性疾病是慢性感染。

在一些實施方案中，本發明提供包含本文所述的任何抗 LAG-3 抗體或其片段(較佳地其抗原結合片段)或其免疫

綴合物的組成物，較佳地組合物為醫藥組成物。在一個實施方案中，該組成物還包含藥用輔料。在一個實施方案中，組合物，例如，醫藥組成物，包含本發明的抗 LAG-3 抗體或其片段或其免疫綴合物，以及一種或多種其它治療劑(例如化療劑、細胞毒性劑、疫苗、其它抗體、抗感染活性劑或免疫調節劑(例如共刺激分子的激活劑或免疫檢查點分子的抑制劑)，較佳地抗 PD-1 抗體、抗 PD-L1 抗體或抗 PD-L2 抗體)的組合。

在一些實施方案中，該醫藥組成物用於預防或治療腫瘤(例如癌症)或感染。較佳地，腫瘤是胃腸道腫瘤(例如癌症)，例如結腸癌。較佳地，感染性疾病是慢性感染。

在另一方面中，本發明涉及預防或治療受試者或個體腫瘤(例如癌症)或感染性疾病的方法，該方法包括向該受試者施用有效量的本文所述的任何抗 LAG-3 抗體或其片段、醫藥組成物或免疫綴合物。在一個實施方案中，腫瘤是胃腸道腫瘤(例如癌症)，例如結腸癌。在一個實施方案中，感染性疾病是慢性感染。在另一方面，本發明還涉及本文所述的任何抗 LAG-3 抗體或其片段製備用於在受試者中治療腫瘤(例如癌症)或感染的藥物的用途。在一個實施方案中，腫瘤是胃腸道腫瘤(例如癌症)，例如結腸癌。在一個實施方案中，感染性疾病是慢性感染。

在另一方面中，本發明涉及預防或治療受試者或個體腫瘤(例如癌症)或感染性疾病的方法，該方法包括向該受試者聯合施用有效量的本文所述的任何抗 LAG-3 抗體或

其片段、醫藥組成物或免疫綴合物，以及 PD-1 軸結合拮抗劑或包含所述 PD-1 軸結合拮抗劑的藥物或活性劑。在一個實施方案中，腫瘤是胃腸道腫瘤(例如癌症)，例如結腸癌。在一個實施方案中，感染性疾病是慢性感染。在另一方面，本發明還涉及本文所述的任何抗 LAG-3 抗體或其片段與 PD-1 軸結合拮抗劑組合在製備用於在受試者中治療腫瘤(例如癌症)或感染性疾病的藥物中的用途。在一個實施方案中，腫瘤是胃腸道腫瘤(例如癌症)，例如結腸癌。在一個實施方案中，感染性疾病是慢性感染。

在一些實施方案中，PD-1 軸結合拮抗劑包括例如抗 PD-1 抗體或抗 PD-L1 抗體或抗 PD-L2 抗體。

在進一步的一些實施方案中，在本文所述的預防或治療方法中，還包括向該受試者或個體施用一種或多種療法(例如治療方式和/或其它治療劑)。在一些實施方案中，治療方式包括手術治療和/或放射療法。在一些實施方案中，其它治療劑選自化療劑、細胞毒性劑、疫苗、其它抗體、抗感染活性劑或免疫調節劑(例如共刺激分子的激活劑或免疫檢查點分子的抑制劑)。

在一些實施方案中，受試者或個體是非人動物。在一些實施方案中，受試者或個體是哺乳動物，較佳地人。

在一方面中，本發明涉及檢測樣品中 LAG-3 的方法，該方法包括(a)將樣品與本文所述的任何抗 LAG-3 抗體或其片段接觸；和(b)檢測抗 LAG-3 抗體或其片段和 LAG-3 間的複合物的形成。在一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體是

被可檢測地標記的。

在一些實施方案中，本發明涉及試劑盒或製品，其包含本文所述的任何抗 LAG-3 抗體或其片段。在一些實施方案中，該試劑盒或製品包含本文所述的抗 LAG-3 抗體或其片段與視需要的藥用輔料。在一些實施方案中，該試劑盒或製品進一步包含關於施用藥物來治療腫瘤或感染的說明書。

本發明還涵蓋本文所述的任何實施方案的任意組合。本文所述的任何實施方案或其任何組合適用於本文所述的發明的任何和所有抗 LAG-3 抗體或其片段、方法和用途。

### 【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示了用流式細胞術檢測的親本抗體和細胞表面 hLAG-3 的結合能力。

第 2 圖顯示了用流式細胞術檢測的親和力成熟後的抗體和細胞表面 hLAG-3 的結合能力。

第 3 圖顯示了用流式細胞術檢測的抗 LAG-3 抗體阻斷人 MHC II(HLA-DR)和 LAG-3 的相互作用。

第 4 圖顯示了用流式細胞術檢測的抗 LAG-3 抗體和激活的人 CD4+ T 細胞的結合能力。

第 5 圖顯示了用流式細胞術檢測的抗 LAG-3 抗體和細胞表面小鼠 LAG-3 的結合能力。

第 6 圖顯示了用抗 LAG-3 抗體和抗 PD-1 抗體聯合使用在 CT26 移植瘤模型中對腫瘤的抑制作用。

第 7 圖顯示了用抗 LAG-3 抗體和抗 PD-1 抗體或 PD-L1

聯合使用在 NOG 模型中對腫瘤的抑制作用。

第 8 圖顯示了 IL-2 標準曲線。

第 9 圖顯示了抗體或抗體組合對活化人 CD4+ T 細胞分泌 IL-2 的影響。

## 【實施方式】

### 發明詳述

#### 縮寫

除非另外說明，否則本說明書中的縮寫具有以下含義：

使用以下縮寫：

ADCC 抗體依賴性細胞介導的毒性

CDC 補體依賴性細胞毒性

CDR 在免疫球蛋白可變區中的互補決定區

CHO 中國倉鼠卵巢

EC50 導致 50%效力或結合的濃度

K<sub>D</sub> 平衡解離常數

ELISA 酶聯免疫吸附測定

FR 抗體框架區

IC50 產生 50%抑制的濃度

Ig 免疫球蛋白

Kabat 藉由 Elvin A . Kabat ((1991) Sequences of Proteins of Immun ological Interest , 第 5 版 Public Health Service , National Institutes of Health , Bethesda , Md .)設立的免疫球蛋白比對和編號系統

|                 |         |
|-----------------|---------|
| mAb 或 Mab 或 MAb | 單株抗體    |
| PCR             | 聚合酶鏈式反應 |
| IFN             | 干擾素     |
| VL              | 輕鏈可變區   |
| VH              | 重鏈可變區   |
| LC              | 輕鏈      |
| HC              | 重鏈      |
| HCDR            | 重鏈互補決定區 |
| LCDR            | 輕鏈互補決定區 |

### 定義

在下文詳細描述本發明前，應理解本發明不限於本文中描述的特定方法學、方案和試劑，因為這些可以變化。還應理解本文中使用的術語僅為了描述具體實施方案，而並不意圖限制本發明的範圍，其僅會由所附申請專利範圍限制。除非另外定義，本文中使用的所有技術和科學術語與本發明所屬領域中普通技術人員通常的理解具有相同的含義。

為了解釋本說明書，將使用以下定義，並且只要適當，以單數形式使用的術語也可以包括複數，並且反之亦然。要理解，本文所用的術語僅是為了描述具體的實施方案，並且不意欲是限制性的。

術語“約”在與數字數值聯合使用時意為涵蓋具有比指定數字數值小 5% 的下限和比指定數字數值大 5% 的上限的範圍內的數字數值。

“親和力”是指分子(例如抗體)的單一結合位點與其結合配偶體(例如抗原)之間全部非共價相互作用總和的強度。除非另有說明，在用於本文時，“結合親和力”指反映結合對的成員(例如抗體與抗原)之間 1:1 相互作用的內在結合親和力。分子 X 對其配偶體 Y 的親和力通常可用平衡解離常數( $K_D$ )來表述。親和力可藉由本領域知道的常用方法來測量，包括現有技術已知以及本文中所描述的那些。

術語“淋巴細胞活化基因-3”或“LAG-3”包括全部同種型，哺乳動物(例如，人)LAG-3、人 LAG-3 的物種同源物和包含 LAG-3 的至少一個共同表位的類似物。LAG-3(例如，人 LAG-3)的胺基酸序列和核苷酸序列是本領域已知的，例如，參見 Triebel 等人, (1990) J. Exp. Med. 171:1393-1405。在一些實施方案中，術語“人 LAG-3”指的是人序列 LAG-3，如 Genbank 登錄號為 NP\_002277 的人 LAG-3 的完整胺基酸序列。在一些實施方案中，術語“小鼠 LAG-3”指的是小鼠序列 LAG-3，如 Genbank 登錄號為 NP\_032505 的小鼠 LAG-3 的完整胺基酸序列。LAG-3 在現有技術中也稱為，例如，CD223。人 LAG-3 序列可以具有例如保守突變或在非保守區中的突變而不同於 Genbank 登錄號 NP\_002277 的人 LAG-3，並且該 LAG-3 與 Genbank 登錄號 NP\_002277 的人 LAG-3 具有基本上相同的生物功能。例如，人 LAG-3 的生物功能為具有在 LAG-3 的胞外結構域中的表位，其被本公開的抗體特異性結合，或者人 LAG-3 的生物功能為與 MHC II 類分子結合。

本文所用的術語“抗 LAG-3 抗體”、“抗 LAG-3”、“LAG-3 抗體”或“結合 LAG-3 的抗體”是指這樣的抗體，該抗體能夠以足夠的親和力結合 LAG-3 蛋白或其片段。在一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體與非 LAG-3 蛋白結合的程度低於該抗體與 LAG-3 結合的約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%或約 90%或以上，如例如藉由放射性免疫測定(RIA)或生物光干涉測定法或 MSD 測定法測量的。

如本文所用，“單株抗體”或“mAb”或”Mab”指來源於例如真核生物的、原核生物的或噬菌體選殖的單一套數或純株的抗體，而不指其產生的方法。單株抗體或其抗原結合片段可以例如藉由融合瘤技術、重組技術、噬菌體展示技術、合成技術例如 CDR 接枝、或此類或其它本領域已知的技術的組合來產生。

“天然抗體”指具有不同結構的天然存在的免疫球蛋白分子。例如，天然 IgG 抗體是約 150,000 道爾頓的異四聚糖蛋白，由以二硫化物鍵合的兩條相同輕鏈和兩條相同重鏈構成。從 N 至 C 端，每條重鏈具有一個可變區(VH)，又稱作可變重域或重鏈可變域，接著是三個恆定域(CH1, CH2, 和 CH3)。類似地，從 N 至 C 端，每條輕鏈具有一個可變區(VL)，又稱作可變輕域或輕鏈可變域，接著是一個恆定輕(CL)域。根據其恆定域胺基酸序列，抗體輕鏈可歸入兩種類型中的一種，稱作卡帕( $\kappa$ )和拉姆達( $\lambda$ )。“天然序列 Fc 區”包含與在自然界中找到的 Fc 區的胺基酸序列相同的胺

基酸序列。天然序列人 Fc 區包括天然序列人 IgG1 Fc 區(非 A 和 A 同種異型);天然序列人 IgG2 Fc 區;天然序列人 IgG3 Fc 區;和天然序列人 IgG4 Fc 區;及其天然存在變體。

“抗體片段”指與完整抗體不同的分子，其包含完整抗體的一部分且結合完整抗體所結合的抗原。抗體片段的例子包括但不限於 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; 雙抗體; 線性抗體; 單鏈抗體(例如 scFv); 單結構域抗體; 雙價或雙特異性抗體或其片段; 駱駝科抗體; 和由抗體片段形成的雙特異性抗體或多特異性抗體。

如本文所用，術語“表位”指抗原(例如，人 LAG-3)中與抗體分子特異性相互作用的部分。這部分(本文中稱作表位決定簇)一般包含元件如胺基酸側鏈或糖側鏈或是其組成部分。表位決定簇可以按照本領域已知的或本文公開的方法(例如，藉由結晶學或藉由氫-氘交換法)限定。抗體分子上與表位決定簇特異性相互作用的至少一個或某些部分一般位於 CDR 內。通常，表位具有特定的三維結構特徵。通常，表位具有特定電荷特徵。一些表位是線性表位，而另一些是構象表位。

與參照抗體“結合相同或重疊表位的抗體”是指這樣的抗體，其在競爭測定中阻斷 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 以上的所述參照抗體與其抗原的結合，反言之，參照抗體在競爭測定中阻斷 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 以上的該抗體與其抗原的結合。

與參照抗體競爭結合其抗原的抗體是指這樣的抗體，

其在競爭測定中阻斷 50%、60%、70%、80%、90%或 95% 以上的所述參照抗體與其抗原的結合。反言之，參照抗體在競爭測定中阻斷 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的該抗體與其抗原的結合。眾多類型的競爭性結合測定可用於確定一種抗體是否與另一種競爭，這些測定例如：固相直接或間接放射免疫測定(RIA)、固相直接或間接酶免疫測定(EIA)、夾心競爭測定(參見例如 Stahli 等，1983，*Methods in Enzymology* 9：242-253)。

抑制（例如競爭性抑制）參照抗體與其抗原的結合的抗體是指這樣的抗體，其抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述參照抗體與其抗原的結合。反言之，參照抗體抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的該抗體與其抗原的結合。抗體與其抗原的結合可以親和力（例如平衡解離常數）衡量。測定親和力的方法是本領域已知的。

與參照抗體顯示相同或相似的結合親和力和/或特異性的抗體是指這樣的抗體，其能夠具有參照抗體的至少 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的結合親和力和/或特異性。這可以藉由本領域已知的任何測定結合親和力和/或特異性的方法進行測定。

“互補決定區”或“CDR 區”或“CDR”是抗體可變結構域中在序列上高變並且形成在結構上確定的環（“超變環”）和/或含有抗原接觸殘基（“抗原接觸點”）的區域。CDR 主要負責與抗原表位結合。重鏈和輕鏈的 CDR 通常被稱作

CDR1、CDR2 和 CDR3，從 N-端開始順序編號。位於抗體重鏈可變結構域內的 CDR 被稱作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位於抗體輕鏈可變結構域內的 CDR 被稱作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一個給定的輕鏈可變區或重鏈可變區胺基酸序列中，各 CDR 的精確胺基酸序列邊界可以使用許多公知的抗體 CDR 指派系統的任一種或其組合確定，該指派系統包括例如：基於抗體的三維結構和 CDR 環的拓撲學的 Chothia (Chothia 等人. (1989) *Nature* 342: 877-883，Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, *Journal of Molecular Biology*, 273, 927-948 (1997))，基於抗體序列可變性的 Kabat (Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London)，國際 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在萬維網上 [imgt.cines.fr/](http://imgt.cines.fr/)上)，以及基於利用大量晶體結構的近鄰傳播聚類 (affinity propagation clustering) 的 North CDR 定義。

例如，根據不同的 CDR 確定方案，每一個 CDR 的殘基如下所述。

| CDR            | Kabat 方案 | AbM 方案   | Chothia 方案 | Contact 方案 |
|----------------|----------|----------|------------|------------|
| LCDR1          | L24-L34  | L24-L34  | L26-L32    | L30-L36    |
| LCDR2          | L50-L56  | L50-L56  | L50-L52    | L46-L55    |
| LCDR3          | L89-L97  | L89-L97  | L91-L96    | L89-L96    |
| HCDR1          | H31-H35B | H26-H35B | H26-H32    | H30-H35B   |
| (Kabat 編號系統)   |          |          |            |            |
| HCDR1          | H31-H35  | H26-H35  | H26-H32    | H30-H35    |
| (Chothia 編號系統) |          |          |            |            |
| HCDR2          | H50-H65  | H50-H58  | H53-H55    | H47-H58    |
| HCDR3          | H95-H102 | H95-H102 | H96-H101   | H93-H101   |
| (Kabat 編號系統)   |          |          |            |            |

CDR 也可以基於與參考 CDR 序列(例如本發明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 編號位置而確定。

除非另有說明，否則在本發明中，術語“CDR”或“CDR 序列”涵蓋以上述任一種方式確定的 CDR 序列。

除非另有說明，否則在本發明中，當提及抗體可變區中的殘基位置（包括重鏈可變區殘基和輕鏈可變區殘基）時，是指根據 Kabat 編號系統（Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）的編號位置。

在一個實施方案中，本發明抗體的 CDR 藉由 Kabat 規則確定邊界，藉由 IMGT 確定規則，或藉由 AbM 確定規

則，或藉由其組合確定規則，例如其序列如表 1 所示。

應該注意，基於不同的指派系統獲得的同一抗體的可變區的 CDR 的邊界可能有所差異。即不同指派系統下定義的同一抗體可變區的 CDR 序列有所不同。因此，在涉及用本發明定義的具體 CDR 序列限定抗體時，該抗體的範圍還涵蓋了這樣的抗體，其可變區序列包含所述的具體 CDR 序列，但是由於應用了不同的方案（例如不同的指派系統規則或組合）而導致其所聲稱的 CDR 邊界與本發明所定義的具體 CDR 邊界不同。

具有不同特異性（即，針對不同抗原的不同結合位點）的抗體具有不同的 CDR（在同一指派系統下）。然而，儘管 CDR 在抗體與抗體之間是不同的，但是 CDR 內只有有限數量的胺基酸位置直接參與抗原結合。使用 Kabat, Chothia, AbM、Contact 和 North 方法中的至少兩種，可以確定最小重疊區域，從而提供用於抗原結合的“最小結合單位”。最小結合單位可以是 CDR 的一個子部分。正如本領域技術人員明瞭，藉由抗體的結構和蛋白折疊，可以確定 CDR 序列其餘部分的殘基。因此，本發明也考慮本文所提供的任何 CDR 的變體。例如，在一個 CDR 的變體中，最小結合單位的胺基酸殘基可以保持不變，而根據 Kabat 或 Chothia 定義的其餘 CDR 殘基可以被保守胺基酸殘基替代。

本領域已知五個主要類別的抗體：IgA，IgD，IgE，IgG 和 IgM，並且這些抗體中的數個可以進一步被劃分為亞類（同種型），例如，IgG<sub>1</sub>，IgG<sub>2</sub>，IgG<sub>3</sub>，IgG<sub>4</sub>，IgA<sub>1</sub> 和 IgA<sub>2</sub>。

對應於不同類別的免疫球蛋白的重鏈恆定結構域分別被稱為  $\alpha$ ， $\delta$ ， $\epsilon$ ， $\gamma$  和  $\mu$ 。

“IgG 形式的抗體”是指抗體的重鏈恆定區所屬於的 IgG 形式。所有同一型的抗體的重鏈恆定區都是相同的，不同型的抗體之間的重鏈恆定區不同。例如，IgG4 形式的抗體是指其重鏈恆定區 Ig 結構域為 IgG4 的 Ig 結構域。

術語“PD-1 軸結合拮抗劑”是指如下的分子，其抑制 PD-1 軸結合配偶與一種或多種它的結合配偶相互作用，從而去除源自 PD-1 信號傳導軸上的信號傳導的 T 細胞功能障礙——一項結果是恢復或增強 T 細胞功能(例如增殖，細胞因子生成，靶細胞殺傷)。如本文中使用的，PD-1 軸結合拮抗劑包括 PD-1 結合拮抗劑(例如抗 PD-1 抗體)，PD-L1 結合拮抗劑(例如抗 PD-L1 抗體)和 PD-L2 結合拮抗劑(例如抗 PD-L2 抗體)。

術語“PD-1 結合拮抗劑”指如下的分子，其降低、阻斷、抑制、消除或干擾源自 PD-1 與一種或多種它的結合配偶(諸如 PD-L1，PD-L2)相互作用的信號轉導。在一些實施方案中，PD-1 結合拮抗劑是抑制 PD-1 結合一種或多種它的結合配偶的分子。在一個特定方面，PD-1 結合拮抗劑抑制 PD-1 結合 PD-L1 和/或 PD-L2。例如，PD-1 結合拮抗劑包括降低、阻斷、抑制、消除或干擾源自 PD-1 與 PD-L1 和/或 PD-L2 相互作用的信號轉導的抗 PD-1 抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽和其它分子。在一個實施方案中，PD-1 結合拮抗劑降低由或經由 T 淋巴細胞

上表達的細胞表面蛋白質介導的負面共刺激信號(經由 PD-1 介導信號傳導)，從而使得功能障礙性 T 細胞不太功能障礙性(例如增強對抗原識別的效應器應答)。在一些實施方案中，PD-1 結合拮抗劑是抗 PD-1 抗體。在一個具體實施方案中，PD-1 結合拮抗劑是 WO2015/095423 中公開的 MDX-1106(nivolumab)、MK-3475(pembrolizumab)、CT-011(pidilizumab)或 AMP-224。在一個具體的實施方案中，抗 PD-1 抗體是 WO2017/133540 中公開的“Antibody C”。在另一個具體的實施方案中，抗 PD-1 抗體是 WO2017/025016 中公開的“Antibody D”。

術語“PD-L1 結合拮抗劑”指如下的分子，其降低、阻斷、抑制、消除或干擾源自 PD-L1 與一種或多種它的結合配偶(諸如 PD-1，B7-1)相互作用的信號轉導。在一些實施方案中，PD-L1 結合拮抗劑是抑制 PD-L1 結合它的結合配偶的分子。在一個特定方面，PD-L1 結合拮抗劑抑制 PD-L1 結合 PD-1 和/或 B7-1。在一些實施方案中，PD-L1 結合拮抗劑包括降低、阻斷、抑制、消除或干擾源自 PD-L1 與一種或多種它的結合配偶(諸如 PD-1，B7-1)相互作用的信號轉導的抗 PD-L1 抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽和其它分子。在一個實施方案中，PD-L1 結合拮抗劑降低由或經由 T 淋巴細胞上表達的細胞表面蛋白質介導的負面共刺激信號(經由 PD-L1 介導信號傳導)，從而使得功能障礙性 T 細胞不太功能障礙性(例如增強對抗原識別的效應器應答)。在一些實施方案中，PD-L1 結合拮

抗劑是抗 PD-L1 抗體。在一個具體方面，抗 PD-L1 抗體是 WO2015/095423 中公開的 YW243.55.S70、MDX-1105、MPDL3280A 或 MEDI4736。

術語“PD-L2 結合拮抗劑”指如下的分子，其降低、阻斷、抑制、消除或干擾源自 PD-L2 與一種或多種它的結合配偶(諸如 PD-1)相互作用的信號轉導。在一些實施方案中，PD-L2 結合拮抗劑是抑制 PD-L2 結合一種或多種它的結合配偶的分子。在一個特定方面，PD-L2 結合拮抗劑抑制 PD-L2 結合 PD-1。在一些實施方案中，PD-L2 拮抗劑包括降低、阻斷、抑制、消除或干擾源自 PD-L2 與一種或多種它的結合配偶(諸如 PD-1)相互作用的信號轉導的抗 PD-L2 抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽和其它分子。在一個實施方案中，PD-L2 結合拮抗劑降低由或經由 T 淋巴細胞上表達的細胞表面蛋白質介導的負面共刺激信號(經由 PD-L2 介導信號傳導)，從而使得功能障礙性 T 細胞不太功能障礙性(例如增強對抗原識別的效應器應答)。在一些實施方案中，PD-L2 結合拮抗劑是免疫黏附素。

“抗體依賴性細胞介導的細胞毒性”或“ADCC”指其中結合到某些細胞毒性細胞(例如 NK 細胞，嗜中性粒細胞和巨噬細胞)上存在的 Fc 受體(FcR)上的分泌型免疫球蛋白，使得這些細胞毒性效應細胞能夠特異性結合攜帶抗原的靶細胞，隨後用細胞毒素殺死靶細胞的細胞毒性形式。介導 ADCC 的主要細胞，NK 細胞，只表達 Fc $\gamma$ RIII，而單核細

胞表達  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 、 $\text{Fc}\gamma\text{RII}$  和  $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ 。Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991)第 464 頁表 3 總結了造血細胞上的  $\text{FcR}$  表達。為了評估目的分子的 ADCC 活性，可進行體外 ADCC 測定法，諸如美國專利 No.5,500,362 或 5,821,337 或美國專利 No.6,737,056(Presta)中所記載的。可用於此類測定法的效應細胞包括 PBMC 和 NK 細胞。可選地/另外地，可在體內評估目的分子的 ADCC 活性，例如在動物模型中，諸如 Clynes 等人, *PNAS(USA)* 95:652-656 (1998)中所披露的。

術語“細胞毒性劑”或“細胞毒性因子”用在本發明中指抑制或防止細胞功能和/或引起細胞死亡或破壞的物質。細胞毒性劑例子參見 WO2015/153513、WO2016/028672 或 WO2015/138920 中所公開的那些。

本文所述的術語“治療劑”涵蓋在預防或治療腫瘤(例如癌症)和感染(例如慢性感染)中有效的任何物質，包括化療劑、細胞毒性劑、疫苗、其它抗體、抗感染活性劑或免疫調節劑，例如 WO2016/028672 或 WO2015/138920 中所公開的可以與抗 LAG-3 抗體聯合使用的任何物質。

“化療劑”包括在治療癌症中有用的化學化合物。化療劑的例子參見 WO2015/153513 或 WO2016/028672 或 WO2015/138920 中所公開的那些。

術語“細胞因子”是由一種細胞群釋放，作為細胞間介質作用於另一細胞的蛋白質的通稱。此類細胞因子的例子有淋巴因子，單核因子；白介素(IL)，諸如 IL-1、IL-1 胞、

IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-15；腫瘤壞死因子，諸如 TNF- $\alpha$  或 TNF- $\beta$ ；及其它多肽因子，包括 LIF 和 kit 配體(KL)和  $\gamma$ -干擾素。如本文中使用的，術語細胞因子包括來自天然來源或來自重組細胞培養物的蛋白質及天然序列細胞因子的生物學活性等效物，包括藉由人工合成產生的小分子實體，及其藥劑學可接受的衍生物和鹽。

術語“共刺激分子”指 T 細胞上與共刺激配體特異性結合，因而由 T 細胞介導共刺激反應(如但不限於增殖)的相關結合配偶體。共刺激分子是高效免疫應答要求的除抗原受體或其配體之外的細胞表面分子。共刺激分子包括但不限於：MHC I 類分子、TNF 受體蛋白、免疫球蛋白樣蛋白質、細胞因子受體、整聯蛋白、信號傳導淋巴細胞的活化分子(SLAM 蛋白)、NK 細胞活化受體、BTLA、Toll 配體受體、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、4-1BB (CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8 $\alpha$ 、CD8 $\beta$ 、IL2R $\beta$ 、IL2R $\gamma$ 、IL7R $\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、

DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a 和與 CD83 特異性結合的配體。

術語“激活劑”或“激動劑”包括使所提供的分子(例如，共刺激分子)的某些參數(例如，活性)增加的物質。例如，這個術語包括使得所提供的分子增加至少 5%、10%、25%、50%、75%或更多的活性(例如，共刺激活性)的物質。

術語“免疫檢查點分子”意指在 CD4 T 細胞和 CD8 T 細胞的細胞表面上的一組分子。這些分子可以有效地充當下調或抑制抗腫瘤免疫應答的“剎車”。免疫檢查點分子包括但不限於程序性死亡 1 (PD-1)、細胞毒 T 淋巴細胞抗原 4 (CTLA-4)、B7H1、B7H4、OX-40、CD137、CD40 和 LAG-3，它們直接抑制免疫細胞。

術語“抑制劑”或“拮抗劑”包括使所提供的分子(例如，免疫檢查點抑制蛋白)的某些參數(例如，活性)降低的物質。例如，這個術語包括使得所提供的分子被抑制至少 5%、10%、20%、30%、40%或更多的活性(例如，PD-1 活性或 PD-L1 活性)的物質。因此，抑制作用不必是 100%。

術語“雙抗體”指具有兩個抗原結合位點的抗體片段，該片段在相同的多肽鏈(VH-VL)中包含與輕鏈可變結構域(VL)連接的重鏈可變結構域(VH)。藉由使用因為太短而不

能在相同鏈上的兩個結構域之間配對的接頭，迫使該結構域與另一條鏈的互補結構域配對從而產生兩個抗原結合位點。雙抗體可以是二價的或雙特異性的。雙抗體更充分地描述於例如 EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson 等，Nat.Med.9：129-134 (2003)；和 Hollinger 等，美國國家科學院學報(Proc.Natl.Acad.Sci.USA) 90：6444-6448(1993)中。三抗體和四抗體同樣描述於 Hudson 等，Nat.Med. 9：129-134(2003)中。

“功能性 Fc 區”擁有天然序列 Fc 區的“效應器功能”。例示性的“效應器功能”包括 C1q 結合；CDC；Fc 受體結合；ADCC；吞噬作用；細胞表面受體(例如 B 細胞受體；BCR)下調等。此類效應器功能一般要求 Fc 區與結合結構域(例如抗體可變域)聯合，而且可以使用多種測定法來評估，例如本文所公開的那些。

“效應子功能”指那些可歸於抗體 Fc 區且隨抗體同種型而變化的生物學活性。抗體效應子功能的實例包括：C1q 結合和補體依賴性細胞毒性(CDC)；Fc 受體結合；抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如 B 細胞受體)下調；和 B 細胞活化。

“人效應細胞”指表達一種或多種 FcR 並行使效應器功能的白細胞。在某些實施方案中，該細胞至少表達 Fc 使效應器功並行使 ADCC 效應器功能。介導 ADCC 的人白細胞的例子包括外周血單個核細胞(PBMC)、天然殺傷(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性 T 細胞和嗜中性粒細胞。效應細胞可

以從其天然來源分離，例如血液。

術語“有效量”指本發明的抗體或片段或綴合物或組合物的這樣的量或劑量，其以單一或多次劑量施用患者後，在需要治療或預防的患者中產生預期效果。有效量可以由作為本領域技術人員的主治醫師藉由考慮以下多種因素來容易地確定：諸如哺乳動物的物種；它的大小、年齡和一般健康；涉及的具體疾病；疾病的程度或嚴重性；個體患者的應答；施用的具體抗體；施用模式；施用製劑的生物利用率特徵；選擇的給藥方案；和任何伴隨療法的使用。

“治療有效量”指以需要的劑量並持續需要的時間段，有效實現所需治療結果的量。抗體或抗體片段或其綴合物或組合物的治療有效量可以根據多種因素如疾病狀態、個體的年齡、性別和重量和抗體或抗體部分在個體中激發所需反應的能力而變動。治療有效量也是這樣的一個量，其中抗體或抗體片段或其綴合物或組合物的任何有毒或有害作用不及治療有益作用。相對於未治療的對象，“治療有效量”較佳地抑制可度量參數(例如腫瘤生長率)至少約 20%、更佳地至少約 40%、甚至更佳地至少約 50%、60%或 70%和仍更佳地至少約 80%。可以在預示人腫瘤中的功效的動物模型系統中評價化合物抑制可度量參數(例如，癌症)的能力。可選地，可以藉由檢驗化合物抑制的能力評價組合物的這種特性，該抑制在體外藉由熟練技術人員已知的測定法。

“預防有效量”指以需要的劑量並持續需要的時間段，

有效實現所需預防結果的量。通常，由於預防性劑量在對象中在疾病較早階段之前或在疾病較早階段使用，故預防有效量將小於治療有效量。

適用於本發明的“抗體及其抗原結合片段”包括但不限於多株、單株、單價、雙特異性、異綴合物、多特異性、重組、異源、異源雜合、嵌合、人源化(特別是接枝有 CDR 的)、去免疫的、或人的抗體，Fab 片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、由 Fab 表達庫產生的片段、Fd、Fv、二硫化物連接的 Fv(dsFv)、單鏈抗體(例如 scFv)、雙抗體或四抗體(Holliger P. (1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90(14),6444-6448)、納米抗體(nanobody)(也稱為單結構域抗體)、抗獨特型(抗 Id)抗體(包括例如針對本發明抗體的抗 Id 抗體)和上述任一種的表位結合片段。

“Fab”片段包括重鏈可變結構域和輕鏈可變結構域，並且還包括輕鏈的恆定結構域以及重鏈的第一恆定結構域(CH1)。Fab'片段因在重鏈 CH1 結構域的羧基末端增加了一些殘基(包括來自抗體鉸鏈區的一個或多個半胱胺酸)而與 Fab 片段不同。Fab'-SH 是對其中恆定結構域的半胱胺酸殘基攜帶一個游離硫醇基的 Fab'的稱謂。F(ab')<sub>2</sub> 抗體片段最初是作為成對 Fab'片段生成的，在 Fab'片段之間具有鉸鏈半胱胺酸。抗體片段的其它化學偶聯也是已知的。

術語“Fc 區”在本文中用於定義免疫球蛋白重鏈的 C 端區域，該區域包含至少一部分的恆定區。該術語包括天然

序列 Fc 區和變體 Fc 區。在某些實施方案中，人 IgG 重鏈 Fc 區從 Cys226 或 Pro230 延伸至重鏈的羰基端。然而，Fc 區的 C 端賴胺酸(Lys447)可以存在或者可以不存在。除非另外說明，Fc 區或恆定區中的胺基酸殘基的編號是根據 EU 編號系統，其也被稱為 EU 索引，如在 Kabat 等，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，5th Ed. Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD，1991 中所述。

術語“可變區”或“可變結構域”是指參與抗體與抗原結合的抗體重或輕鏈的結構域。天然抗體的重鏈和輕鏈的可變結構域通常具有相似的結構，其中每個結構域包含四個保守的構架區(FR)和三個互補決定區(CDR)。(參見，例如，Kindt 等 Kuby Immunology, 6<sup>th</sup> ed., W.H.Freeman and Co.91 頁(2007))。單個 VH 或 VL 結構域可以足以給予抗原結合特異性。此外，可以使用來自與特定抗原結合的抗體的重鏈 VH 或 VL 結構域來分離結合該抗原的抗體，以分別篩選互補 VL 或 VH 結構域的文庫。參見，例如，Portolano 等，*J.Immunol.*150:880-887(1993); Clarkson 等，*Nature* 352:624-628(1991)。

“框架”或“F R”是指除互補決定區(CDR)殘基之外的可變結構域殘基。可變結構域的 FR 通常由四個 FR 結構域組成：FR1，FR2，FR3 和 FR4。因此，CDR 和 FR 序列通常出現在重鏈可變結構域(VH)(或輕鏈可變結構域(VL))的以下序列中：

FR1-HCDR1(LCDR1)-FR2-HCDR2(LCDR2)-FR3-HCDR3(LCDR3)-FR4。

除非另有說明，抗體各個結構域中的殘基的編號根據 EU 編號系統，其也被稱為 EU 索引，如在 Kabat 等，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，5th Ed. Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD，1991 中所述。

術語“全長抗體”、“完整的抗體”和“完整抗體”在本文被可交換地用於指結構與天然抗體結構基本相似或具有包含如本文所定義的 Fc 區的重鏈的抗體。

“Fv”是包含完整抗原結合位點的最小抗體片段。在一個實施方案中，雙鏈 Fv 種類由一個重鏈可變結構域和一個輕鏈可變結構域以緊密的，非共價締合的二聚體組成。在單鏈 Fv(scFv)種類中，一個重鏈可變結構域和一個輕鏈可變結構域可以藉由柔性肽接頭共價連接從而使輕鏈和重鏈可以以類似於雙鏈 Fv 種類的“二聚體”結構締合。在這種構型中，正是每個可變結構域的三個 CDR 作用來限定了 VH-VL 二聚體的表面上的抗原結合位點。總而言之，六個 CDR 將抗原結合特異性賦予抗體。然而，即使是單個可變結構域(或只包含對抗原特異的三個 CDR 的一半 Fv)也具有識別和結合抗原的能力，儘管親和性低於完整結合位點。關於 scFv 的綜述參見例如 Pluckthun 於 *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，卷 113，Rosenburg 和 Moore 編輯，(Springer-Verlag，New York，

1994)，第 269-315 頁中。

術語“宿主細胞”、“宿主細胞系”和“宿主細胞培養物”可交換地使用且是指其中引入外源核酸的細胞，包括這種細胞的後代。宿主細胞包括“轉化體”和“轉化的細胞”，其包括初級轉化的細胞和來源於其的後代，而不考慮傳代的數目。後代在核酸內容上可能與親本細胞不完全相同，而是可以包含突變。本文中包括在最初轉化的細胞中篩選或選擇的具有相同功能或生物學活性的突變體後代。

“人抗體”指具有這樣的胺基酸序列的抗體，該胺基酸序列對應於下述抗體的胺基酸序列，該抗體由人或人細胞生成或來源於非人來源，其利用人抗體庫或其它人抗體編碼序列。人抗體的這種定義明確排除包含非人抗原結合殘基的人源化抗體。

“人共有框架”是指這樣的框架，即在選擇人免疫球蛋白VL或VH 構架序列中，其代表最常出現的胺基酸殘基。一般而言，對人免疫球蛋白VL或VH序列的選擇是從可變結構域序列的亞型中選擇。一般而言，該序列的亞型是如Kabat等(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD(1991), 1-3卷)中公開的亞型。在一個實施方案中，對於VL，該亞型是如Kabat等(見上文)中的亞型κI。在一個實施方案中，對於VH，該亞型是如Kabat等(見上文)中的亞型III。

“人源化”抗體是指包含來自非人 CDR 的胺基酸殘基和來自人 FR 的胺基酸殘基的嵌合抗體。在一些實施方案

中，人源化抗體將包含基本上所有的至少一個、通常兩個可變結構域，其中所有或基本上所有的 CDR(例如，CDR)對應於非人抗體的那些，並且所有或基本上所有的 FR 對應於人抗體的那些。人源化抗體視需要可以包含至少一部分的來源於人抗體的抗體恆定區。抗體(例如非人抗體)的“人源化形式”是指已經進行了人源化的抗體。

術語“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳動物中特徵通常為細胞生長不受調節的生理疾患。癌症的例子包括但不限於癌，淋巴瘤，母細胞瘤，肉瘤和白血病或淋巴樣惡性腫瘤。此類癌症的更具體例子包括但不限於鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)，肺癌(包括小細胞肺癌，非小細胞肺癌，肺的腺癌，和肺的鱗癌)，腹膜癌，肝細胞癌，胃癌(包括胃腸癌和胃腸基質癌)，胰腺癌，成膠質細胞瘤，宮頸癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，尿道癌，肝瘤，乳腺癌，結腸癌，直腸癌，結腸直腸癌，子宮內膜癌或子宮癌，唾液腺癌，腎癌，前列腺癌，外陰癌，甲狀腺癌，肝癌，肛門癌，陰莖癌，黑素瘤，淺表擴散性黑素瘤，惡性雀斑樣痣黑素瘤，肢端黑素瘤，結節性黑素瘤，多發性骨髓瘤和 B 細胞淋巴瘤，慢性淋巴細胞性白血病(CLL)，急性成淋巴細胞性白血病(ALL)，毛細胞性白血病，慢性成髓細胞性白血病，和移植後淋巴增殖性病症(PTLD)，以及與癥瘕病(phakomatoses)，水腫(諸如與腦瘤有關的)和梅格斯氏(Meigs)綜合症有關的異常血管增殖，腦瘤和腦癌，以及頭頸癌，及相關轉移。

術語“細胞增殖性病變”和“增殖性病變”指與一定程度的異常細胞增殖有關的病變。在一個實施方案中，細胞增殖性病變指癌症。

術語“腫瘤”指所有贅生性(neoplastic)細胞生長和增殖，無論是惡性的還是良性的，及所有癌前(pre-cancerous)和癌性細胞和組織。術語“癌症”，“癌性”，“細胞增殖性病變”，“增殖性病變”和“腫瘤”在本文中提到時並不互相排斥。

術語“感染性疾病”是指病原體引發的疾病，包括例如病毒感染、細菌感染、真菌感染或者原生動物例如寄生蟲感染。

術語“慢性感染”是指這樣的感染，其中傳染原(例如，病原體如病毒、細菌、原生動物例如寄生蟲、真菌或諸如此類)已經在感染的宿主中誘導了免疫應答，但尚未如在急性感染過程中一樣被從宿主中清除或消除。慢性感染可以是持續性的、潛伏性的或緩慢的。儘管急性感染通常被免疫系統在數天或數周(如流感)內解決，持續性的感染可以相對低的水平持續數月、數年、數十年或一生(例如，乙型肝炎)。相比之下，潛伏性的感染的特徵是長期的無症狀活動，被一段時間的迅速增加的高度感染和升高的病原體水平不時打斷(例如單純皰疹)。最後，緩慢感染的特徵是疾病症狀的逐漸和連續增加，諸如長期的潛伏期，隨後在臨床症狀出現後是延長的和進展的臨床過程開始。不像潛伏性的和持續性的感染，慢性感染可以不以病毒增殖的急性期開始(例如，小 RNA 病毒感染(picornaviruses

infection)、綿羊髓鞘脫落病毒(visna virus)、瘙癢病(scrapie)、克雅氏病(Creutzfeldt-Jakobdisease))。能夠誘導慢性感染的示例性傳染原包括病毒(例如,巨細胞病毒、EB 病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、單純皰疹病毒 I 型和 II 型、人免疫缺陷病毒 1 型和 2 型,人乳頭狀瘤病毒、人 T 淋巴細胞病毒 1 型和 2 型,水痘-帶狀皰疹病毒等等),細菌(例如,結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*),李斯特菌屬物種(*Listeria* spp.),肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*),肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*),金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),疏螺旋體屬物種(*Borrelia* spp.),幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)等等),原生動物例如寄生蟲(例如,利什曼原蟲屬物種(*Leishmaniaspp.*),惡性瘧原蟲(*Plasmodium falciparum*),血吸蟲屬物種(*Schistosoma* spp.),弓形蟲屬物種(*Toxoplasma* spp.),錐蟲屬物種(*Trypanosoma* spp.),*Taenia carssiceps* 等等),和真菌(例如,麴黴屬物種(*Aspergillus* spp.),白色念珠菌(*Candida albicans*),粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*),夾膜組織胞漿菌(*Histoplasma capsulatum*),卡氏肺囊蟲(*Pneumocystis carinii*)等等)。另外的傳染原包括朊病毒或錯誤折疊的蛋白質,其藉由在這些組織中進一步傳播蛋白錯誤折疊影響腦或神經元結構,導致形成澱粉樣蛋白斑(其導致細胞死亡、組織損傷和最終死亡)。由朊病毒感染導致的疾病的實例包括:克雅氏病及其變種(*Creutzfeldt-Jakob disease and its varieties*),

Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome(GSS)，致命性家族性失眠症(sFI)(fatal familial insomnia(sFI))，庫魯病(kuru)，瘙癢病(scrapie)，牛的牛海綿狀腦病(BSE)(又名“狂牛”病)(Bovine spongiform encephalopathy(BSE) in cattle(aka“mad cow”disease))，以及其他各種動物形式的腦病[例如，傳染性水貂腦病(TME)(transmissible mink encephalopathy(TME))，白尾鹿(white-tailed deer)、麋鹿(elk)和驢鹿(mule deer)中慢性消耗性疾病(chronic wasting disease(CWD))，貓海綿狀腦病(feline spongiform encephalopathy)，尼牙藪羚(nyala)、羚羊(oryx)和更大角羚(greater kudu)中的外來有蹄類腦病(EUE)(exotic ungulate encephalopathy(EUE)，鴛鳥的海綿狀腦病(spongiform encephalopathy of the ostrich)]。

“免疫綴合物”是與一個或多個其它物質(包括但不限於細胞毒性劑或標記)綴合的抗體。

本文所使用的術語“標記”是指被直接或間接綴合或融合至試劑(諸如多核苷酸探針或抗體)並且促進其所綴合或融合的試劑的檢測的化合物或組合物。標記本身可以是可檢測的(例如，放射性同位素標記或螢光標記)或在酶促標記的情況下可以催化可檢測的受質化合物或組合物的化學改變。術語旨在涵蓋藉由將可檢測物質偶聯(即，物理連接)至探針或抗體來直接標記探針或抗體，以及藉由與直接被標記的另一種試劑反應來間接標記探針或抗體。間接標記的實例包括使用螢光標記的二級抗體進行的一級抗體的

檢測和具有生物素的 DNA 探針的末端標記，使得其可以用螢光標記的鏈黴抗生素蛋白來檢測。

“個體”或“受試者”包括哺乳動物。哺乳動物包括但不限於，家養動物(例如，牛，羊，貓，狗和馬)，靈長類動物(例如，人和非人靈長類動物如猴)，兔，以及齧齒類動物(例如，小鼠和大鼠)。在一些實施方案中，個體或受試者是人。

“分離的”抗體是這樣的抗體，其已經與其天然環境的組分分離。在一些實施方案中，將抗體純化至超過 95% 或 99% 純度，如藉由例如電泳(例如，SDS-PAGE，等電聚焦(IEF)，毛細管電泳)或層析(例如，離子交換或反相 HPLC)確定的。對於用於評估抗體純度的方法的綜述，參見，例如，Flatman 等，J.Chromatogr.B848：79-87(2007)。

“分離的”核酸是指這樣的核酸分子，其已經與其天然環境的組分分離。分離的核酸包括包含在通常包含該核酸分子的細胞中的核酸分子，但是該核酸分子存在於染色體外或在不同於其天然染色體位置的染色體位置處。

“分離的編碼抗 LAG-3 抗體或其片段的核酸”是指一個或多個核酸分子，其編碼抗體重鏈或輕鏈(或其片段)，包括在單一載體或分開的載體中的這樣的核酸分子，以及存在於宿主細胞中的一個或多個位置處的這樣的核酸分子。

術語“核酸”、“核酸序列”、“核苷酸序列”或“多核苷酸序列”和“多核苷酸”互換使用。它們指聚合物形式的任何長度的核苷酸(脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)或其類似物。

多核苷酸可以是單鏈或雙鏈，並且如果為單鏈，可以是編碼鏈或非編碼(反義)鏈。多核苷酸可以包含修飾的核苷酸，如甲基化核苷酸及核苷酸類似物。核苷酸的序列可以被非核苷酸組分打斷。可以在聚合後進一步修飾多核苷酸，如藉由與標記組分綴合。核酸可以是重組多核苷酸或在自然界中不存在或與另一個多核苷酸以非自然佈局連接的基因組來源、cDNA 來源、半合成來源或合成來源的多核苷酸。

術語“多肽”、“肽”和“蛋白質”(如果為單鏈)在本文中互換地使用並且為任意長度的胺基酸聚合物。該聚合物可以是線形或分支的，它可以包含修飾的胺基酸，並且它可以由非胺基酸隔斷。該術語也包括已經被修飾(例如，二硫鍵形成、糖基化、脂質化、乙醯化、磷酸化或任何其他操作，如以標記組分綴合)的胺基酸聚合物。多肽可以從天然來源分離，可以藉由重組技術從真核或原核宿主產生並且可以是合成方法的產物。

如下進行序列之間序列同一性的計算。

為確定兩個胺基酸序列或兩個核酸序列的同一性百分數，將該序列出於最佳比較目的比對(例如，可以為了最佳比對而在第一和第二胺基酸序列或核酸序列之一或二者中引入間隙或可以為比較目的而拋棄非同源序列)。在一個較佳實施方案中，為比較目的，所比對的參考序列的長度是至少 30%、較佳地至少 40%、更佳地至少 50%、60%和甚至更佳地至少 70%、80%、90%、100%的參考序列長度。隨後比較在對應胺基酸位置或核苷酸位置處的胺基酸殘基

或核苷酸。當第一序列中的位置由第二序列中對應位置處的相同胺基酸殘基或核苷酸佔據時，則該分子在這個位置處是相同的。

可以利用數學算法實現兩個序列間的序列比較和同一性百分數的計算。在一個較佳實施方案中，使用已經集成至 GCG 軟件包的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) 算法 (在 <http://www.gcg.com> 可獲得)，使用 Blossum 62 矩陣或 PAM250 矩陣和間隙權重 16、14、12、10、8、6 或 4 和長度權重 1、2、3、4、5 或 6，確定兩個胺基酸序列之間的同一性百分數。在另一個較佳的實施方案中，使用 GCG 軟件包中的 GAP 程序(在 <http://www.gcg.com> 可獲得)，使用 NWSgapdna.CMP 矩陣和間隙權重 40、50、60、70 或 80 和長度權重 1、2、3、4、5 或 6，確定兩個核苷酸序列之間的同一性百分數。特別較佳的參數集合(和除非另外說明否則應當使用的一個參數集合)是採用間隙罰分 12、間隙延伸罰分 4 和移碼間隙罰分 5 的 Blossum 62 評分矩陣。

還可以使用 PAM120 加權餘數表、間隙長度罰分 12，間隙罰分 4)，利用已經併入 ALIGN 程序(2.0 版)的 E. Meyers 和 W. Miller 算法, ((1989) CABIOS, 4:11-17)確定兩個胺基酸序列或核苷酸序列之間的同一性百分數。

額外地或備選地，可以進一步使用本文所述的核酸序列和蛋白質序列作為“查詢序列”以針對公共數據庫執行檢索，以例如鑒定其他家族成員序列或相關序列。例如，可

以使用 Altschul 等人, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10 的 NBLAST 及 XBLAST 程序執行此類檢索。BLAST 核苷酸檢索可以用 NBLAST 程序, 評分=100、字長度=12 執行, 以獲得與本發明核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白質檢索可以用 XBLAST 程序、評分 =50、字長度=3 執行, 以獲得與本發明蛋白質分子同源的胺基酸序列。為了出於比較目的獲得帶間隙的比對結果, 可以如 Altschul 等人, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 中所述那樣使用間隙 BLAST。當使用 BLAST 和間隙 BLAST 程序時, 可以使用相應程序(例如 XBLAST 和 NBLAST)的默認參數。參見 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

如本文所用, 術語“在低嚴格性、中等嚴格性、高嚴格性或極高嚴格性條件下雜交”描述了雜交和洗滌條件。進行雜交反應的指導可以在藉由引用方式併入的 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 中找到。參考文獻中描述了含水方法和非含水方法並且可以使用任一方法。本文中提及的特異性雜交條件如下: 1)低嚴格性雜交條件是在約 45°C 於 6X 氯化鈉/檸檬酸鈉(SSC)中, 隨後至少在 50°C (對於低嚴格性條件, 可以增加洗滌的溫度至 55°C)於 0.2X SSC, 0.1% SDS 中洗滌兩次; 2)中等嚴格性雜交條件是在約 45°C 於 6 X SSC 中、隨後在 60°C 在 0.2 X SSC、0.1% SDS 中洗滌一次或多次; 3)高嚴格性雜交條件是在約 45°C 在 6 X SSC 中、隨後在 65°C 於 0.2X SSC、0.1% SDS 中洗滌一次或多次;

並且較佳地 4)極高嚴格性雜交條件是在 65°C 於 0.5 M 磷酸鈉、7%SDS 中、隨後在 65°C 於 0.2X SSC、0.1% SDS 中洗滌一次或多次。極高嚴格性條件(4)是較佳的條件和除非另外說明，否則應當使用的一個條件。

術語“醫藥組成物”指這樣的組合物，其以允許包含在其中的活性成分的生物學活性有效的形式存在，並且不包含對施用該組合物的受試者具有不可接受的毒性的另外的成分。

術語“藥用輔料”指與活性物質一起施用的稀釋劑、佐劑(例如弗氏佐劑(完全和不完全的))、載體、賦形劑或穩定劑等。

用於本文時，“治療”指減緩、中斷、阻滯、緩解、停止、降低、或逆轉已存在的症狀、病症、病況或疾病的進展或嚴重性。

用於本文時，“預防”包括對疾病或病症或特定疾病或病症的症狀的發生或發展的抑制。在一些實施方式中，具有癌症家族病史的受試者是預防性方案的候選。通常，在癌症的背景中，術語“預防”是指在癌症的病徵或症狀發生前，特別是在具有癌症風險的受試者中發生前的藥物施用。

術語“抗感染活性劑”包括在施用濃度和給藥間隔下特異性抑制或消除微生物生長但對宿主不致命的任何分子，該微生物諸如病毒、細菌、真菌或原生動物，例如寄生蟲。用於本文時，術語抗感染活性劑包括抗生素、抗菌劑、抗

病毒劑、抗真菌劑和抗原生動物劑。在一個具體方面中，抗感染活性劑在施用濃度和給藥間隔對宿主是無毒的。

抗細菌的抗感染活性劑或抗菌劑可廣泛的分類為殺菌的(即，直接殺死)或抑菌的(即，阻止分裂)。抗菌的抗感染活性劑可進一步再分類為窄譜抗菌劑(即，僅影響小類細菌亞型，例如，革蘭氏陰性等)或廣譜抗菌劑(即，影響廣泛種類)。實例包括阿米卡星、慶大黴素、格爾德黴素、除莠黴素、莫匹羅星、呋喃妥因、吡嗪醯胺、奎奴普汀/達福普汀、利福平/異福醯胺 或替硝唑等。

術語“抗病毒劑”包括抑制或消除病毒生長、致病和/或存活 的任何物質。這包括例如阿昔洛韋、西多福韋、齊多夫定、去羥肌苷(ddI, VIDEX)、紮西他濱(ddC, HIVID)、司他夫定(d4T, ZERIT)、拉米夫定(3TC, EPIVIR)、阿巴卡韋(ZIAGEN)、恩曲他濱(EMTRIVA)等。

術語“抗真菌劑”包括抑制或消除真菌生長、致病和/或存活的任何物質。這包括例如那他黴素、龜裂殺菌素、非律平、制黴菌素、兩性黴素 B、坎底辛、綠葉刺蕊草(patchouli)、印度棟樹種子油(neem seed oil)、椰子油(Coconut Oil)等。

術語“抗原生動物劑”包括抑制或消除原生動物生物體(例如寄生蟲)生長、發病和/或存活的任何物質。抗原生動物劑的實例包括抗瘧疾試劑例如，奎寧、奎尼丁等

示例性的抗菌劑、抗病毒劑、抗真菌劑、抗原生動物劑參見例如 WO2010/077634 等。抗感染活性劑還參見例如

WO2014/008218、WO2016/028672 或 WO2015/138920。

術語“載體”當在本文中使用时是指能夠增殖與其相連的另一個核酸的核酸分子。該術語包括作為自我複製核酸結構的載體以及結合到已經引入其的宿主細胞的基因組中的載體。一些載體能夠指導與其可操作相連的核酸的表達。這樣的載體在本文中被稱為“表達載體”。

“受試者/患者樣品”指從患者或受試者得到的細胞或流體的集合。組織或細胞樣品的來源可以是實體組織，像來自新鮮的、冷凍的和/或保存的器官或組織樣品或活檢樣品或穿刺樣品；血液或任何血液組分；體液，諸如腦脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或間隙液；來自受試者的妊娠或發育任何時間的細胞。組織樣品可能包含在自然界中天然不與組織混雜的化合物，諸如防腐劑、抗凝劑、緩衝劑、固定劑、營養物、抗生素、等等。腫瘤樣品的例子在本文中包括但不限於腫瘤活檢、細針吸出物、支氣管灌洗液、胸膜液(胸水)、痰液、尿液、手術標本、循環中的腫瘤細胞、血清、血漿、循環中的血漿蛋白質、腹水、衍生自腫瘤或展現出腫瘤樣特性的原代細胞培養物或細胞系，以及保存的腫瘤樣品，諸如福爾馬林固定的、石蠟包埋的腫瘤樣品或冷凍的腫瘤樣品。

術語“包裝插頁”用於指治療產品的商業包裝中通常包含的用法說明書，其含有關於涉及此類治療產品應用的適應症，用法，劑量，施用，聯合療法，禁忌症和/或警告的信息。

## 本發明的抗體

因此，在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段結合 LAG-3。在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段結合哺乳動物 LAG3，例如人 LAG-3 或小鼠 LAG-3。例如，抗體分子與 LAG-3 上的表位(例如，線性或構象表位)特異性結合。在一些實施方案中，抗體分子與 LAG-3 的一個或多個胞外 Ig 樣結構域(例如，LAG-3 的第一、第二、第三或第四胞外 Ig 樣結構域)結合。

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體或其片段具有以下一種或多種性質：

(1) 本發明的抗 LAG-3 抗體或其片段以高親和力結合 LAG-3(例如人 LAG-3)，例如，以以下平衡解離常數( $K_D$ )與 LAG-3 結合，該  $K_D$  小於大約 100nM，較佳地，小於或等於大約 50nM，更佳地小於或等於大約 20nM，更佳地小於或等於大約 10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM 或 2nM，最佳地，該  $K_D$  小於或等於大約 1nM、0.9nM、0.8nM 或 0.7nM。在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體以 0.1 至 20nM，較佳地 0.5-20nM，更佳地 0.5 至 10nM、0.5 至 8nM、0.5 至 5nM，最佳地 0.5 至 1nM、0.5 至 0.8nM、0.5 至 0.7nM、0.6 至 0.7nM 的  $K_D$  結合 LAG-3。在一些實施方案中，LAG-3 為人 LAG-3。在一些實施方案中，LAG-3 為小鼠 LAG-3。在一些實施方案中，抗體結合親和力是使用生物光干涉測定法(例如 Fortebio 親和測量)測定法測定

的。

(2) 本發明的抗體或其片段結合表達人 LAG-3 的細胞，例如，以小於或等於大約 3.3nM、3nM、2nM、1.5nM、1.4nM、1.3nM、1.2nM、1.1nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM 或 0.5nM 的 EC<sub>50</sub>。在一些實施方案中，該結合用流式細胞術(例如 FACS)測定。在一些實施方案中，表達人 LAG-3 的細胞為表達人 LAG-3 的 293 細胞(例如 HEK293 細胞)。

(3) 本發明的抗體或其片段結合表達小鼠 LAG-3 的細胞，例如，以小於或等於大約 15000nM、14000nM 或 13000nM 的 EC<sub>50</sub>。在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段結合表達小鼠 LAG-3 的細胞，例如，以小於或等於大約 50nM 的 EC<sub>50</sub>，例如以大約 40-50nM 的 EC<sub>50</sub>、大約 40-45nM 的 EC<sub>50</sub> 或大約 42nM 的 EC<sub>50</sub>。在一些實施方案中，用流式細胞術(例如 FACS)測定該結合。在一些實施方案中，表達小鼠 LAG-3 的細胞為表達小鼠 LAG-3 的中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。

(4) 本發明的抗體或其片段抑制 LAG-3 的相關活性，例如以小於或等於大約 20nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM 或 5nM 的 IC<sub>50</sub>，較佳以大約 1 至 6nM、1 至 5nM、4nM、4.5nM、5nM、5.1nM、5.2nM、5.3nM、5.4nM、5.5nM、5.6nM、5.7nM、5.8nM、5.9nM 或 6nM 的 IC<sub>50</sub>。在一些實施方案中，LAG-3 的相關活性是 MHC II 類分子與 LAG-3 的結合。在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段以小於或等於大約 20nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM 或 5nM 的 IC<sub>50</sub>，

較佳以大約 1 至 6nM、1 至 5nM、4nM、4.5nM、5nM、5.1nM、5.2nM、5.3nM、5.4nM、5.5nM、5.6nM、5.7nM、5.8nM、5.9nM 或 6nM 的  $IC_{50}$  抑制 LAG-3 與表達 MHCII 類分子的細胞上的 MHCII 類分子的結合。在一些實施方案中，MHCII 類分子是 HLA-DR。在一些實施方案中，細胞為 CHO 細胞。在一些實施方案中，用流式細胞術（例如 FACS）測量該本發明的抗體或其片段對 LAG-3 的相關活性的抑制。

(5) 本發明的抗體或其片段結合激活的  $CD4^{+}$  和 / 或  $CD8^{+}$  T 細胞的表面上的內源 LAG-3，例如以小於或等於大約 35pM、30pM、25pM、20pM、15pM、14pM 或 13pM 的  $EC_{50}$ ，較佳大約 1 至 20pM、5 至 20pM、5 至 15pM、10 至 15pM、11 至 13pM、10pM、11pM、12pM 或 13pM 的  $EC_{50}$ 。在一些實施方案中，激活的  $CD4^{+}$ T 細胞為激活的人  $CD4^{+}$ T 細胞。在一些實施方案中，用流式細胞術（例如 FACS）測定上述結合。在一些實施方案中，在 Accuri C6 系統中進行流式細胞術。

(6) 本發明的抗體或其片段抑制 LAG-3 的一種或多種活性，例如，導致以下一種或多種： $CD4^{+}$  T 淋巴細胞的抗原依賴性刺激增加；T 細胞增殖增加；活化抗原（例如，CD25）的表達增加；細胞因子（例如，干擾素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、白介素-2 (IL-2) 或白介素-4 (IL-4)) 的表達增加；趨化因子（例如，CCL3、CCL4 或 CCL5）的表達增加；Treg 細胞的阻抑活性減少；T 細胞穩態增加；腫瘤浸潤型淋巴細胞增加；或癌細胞的免疫逃避減少。

(7)本發明的抗 LAG-3 抗體或其片段能夠誘發抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)。

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段具有以下一個或多個特性：

(i)顯示與本發明抗體（例如表 3 所列的任一抗體）對 LAG-3 相同或相似的結合親和力和/或特異性；

(ii)抑制（例如，競爭性抑制）本發明抗體（例如表 3 所列的任一抗體）與 LAG-3 的結合；

(iii)與本發明抗體（例如表 3 所列的任一抗體）結合相同或重疊的表位；

(iv)與本發明抗體（例如表 3 所列的任一抗體）競爭結合 LAG-3；

(v)具有本發明抗體（例如表 3 所列的任一抗體）的一個或多個生物學特性。

## 示例性的抗體

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區（VH），其中該 VH 包含

(i) 表 B 所列任一抗體的 VH 中所含的三個互補決定區域（CDR），或

(ii)相對於(i)的序列，在該三個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 5、4、3、2 或 1 個胺基酸改變(較佳胺基酸置換，較佳保守置換)的序列。

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體或其抗原

結合片段包含輕鏈可變區(VL)，其中該 VL 包含：

(i) 表 B 所列任一抗體的 VL 中所含的三個互補決定區域 (CDR)；或

(ii) 相對於(i)的序列，在該三個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 5、4、3、2 或 1 個胺基酸改變(較佳胺基酸置換，較佳保守置換)的序列。

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區 VH 和/或輕鏈可變區 VL，其中

(a) 該 VH 包含

(i) 表 B 所列任一抗體的 VH 中所含的三個互補決定區域 (CDR)，或

(ii)相對於(i)的序列，在該三個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 5、4、3、2 或 1 個胺基酸改變(較佳胺基酸置換，較佳保守置換)的序列；和/或

(b)該 VL 包含：

(i) 表 B 所列任一抗體的 VL 中所含的三個互補決定區域 (CDR)；或

(ii) 相對於(i)的序列，在該三個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 5、4、3、2 或 1 個胺基酸改變(較佳胺基酸置換，較佳保守置換)的序列。

在較佳的實施方案中，VH 包含選自 SEQ ID NO:22、23、24 或 25 所示的胺基酸序列，或由該胺基酸序列組成。

在較佳的實施方案中，VL 包含選自 SEQ ID NO:26、27、28 或 29 所示的胺基酸序列，或由該胺基酸序列組成。

在較佳的實施方案中，本發明抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段包含

如 SEQ ID NO: 22、23、24 或 25 所示的重鏈可變區的 3 個互補決定區 HCDR，以及如 SEQ ID NO:26、27、28 或 29 所示的輕鏈可變區的 3 個互補決定區 LCDR。

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區 (VH) 和/或輕鏈可變區 (VL)，其中

(i) 該 VH 包含互補決定區域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含選自 SEQ ID NO:1、2、3、4 或 17 的胺基酸序列，或由該胺基酸序列組成，或者 HCDR1 包含與選自 SEQ ID NO:1、2、3、4 或 17 的胺基酸序列相比具有一個、兩個或三個改變(較佳胺基酸置換，較佳保守置換)的胺基酸序列；HCDR2 包含選自 SEQ ID NO:5、6、7 或 18 的胺基酸序列，或由該胺基酸序列組成，或者 HCDR2 包含與選自 SEQ ID NO: 5、6、7 或 18 的胺基酸序列相比具有一個、兩個或三個改變(較佳胺基酸置換，較佳保守置換)的胺基酸序列；HCDR3 包含選自 SEQ ID NO:8、9、10 或 19 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成，或者 HCDR3 包含與選自 SEQ ID NO: 8、9、10 或 19 的胺基酸序列相比具有一個、兩個或三個改變(較佳胺基酸置換，較佳保守置換)的胺基酸序列；

和/或

(ii) 其中該 VL 包含互補決定區域 (CDR) LCDR1、

LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含選自 SEQ ID NO:11、12 或 20 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成，或者 LCDR1 包含與選自 SEQ ID NO: 11、12 或 20 的胺基酸序列相比具有一個、兩個或三個改變(較佳胺基酸置換，較佳保守置換)的胺基酸序列；LCDR2 包含選自 SEQ ID NO:13 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成，或者 LCDR2 包含與選自 SEQ ID NO: 13 的胺基酸序列相比具有一個、兩個或三個改變(較佳胺基酸置換，較佳保守置換)的胺基酸序列；LCDR3 包含選自 SEQ ID NO:14、15、16 或 21 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成，或者 LCDR3 包含與選自 SEQ ID NO: 14、15、16 或 21 的胺基酸序列相比具有一個、兩個或三個改變(較佳胺基酸置換，較佳保守置換)的胺基酸序列。

在較佳的實施方案中，本發明提供抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區 (VH) 和/或輕鏈可變區 (VL)，其中

(a) 該 VH 包含

(i)表 A 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的組合;或

(ii) (i)的 HCDR 組合的變體，該變體在該三個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 5、4、3、2 或 1 個胺基酸改變(較佳胺基酸置換，較佳保守置換)；

和/或

(ii) 該 VL 包含

(i)表 A 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的組合;或者

(ii) (i)的 LCDR 組合的變體，該變體在該三個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 5、4、3、2 或 1 個胺基酸改變（較佳胺基酸置換，較佳保守置換）。

在較佳的實施方案中，本發明提供抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中該 VH 包含互補決定區域（CDR）HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 並且該 VL 包含（CDR）LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中該抗體或其抗原結合片段所包含的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的組合如下表（表 A）所示：

表 A：本發明抗體或其抗原結合片段中 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的示例性組合

| 組合  | HCDR1，其包含下述 SEQ ID NO 所示的胺基酸序列或由其組成 | HCDR2，其包含下述 SEQ ID NO 所示的胺基酸序列或由其組成 | HCDR3，其包含下述 SEQ ID NO 所示的胺基酸序列或由其組成 | LCDR1，其包含下述 SEQ ID NO 所示的胺基酸序列或由其組成 | LCDR2，其包含下述 SEQ ID NO 所示的胺基酸序列或由其組成 | LCDR3，其包含下述 SEQ ID NO 所示的胺基酸序列或由其組成 |
|-----|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| (1) | SEQ ID NO:1                         | SEQ ID NO:5                         | SEQ ID NO:8                         | SEQ ID NO:11                        | SEQ ID NO:13                        | SEQ ID NO:14                        |
| (2) | SEQ ID NO:2                         | SEQ ID NO:6                         | SEQ ID NO:9                         | SEQ ID NO:11                        | SEQ ID NO:13                        | SEQ ID NO:15                        |
| (3) | SEQ ID NO:3                         | SEQ ID NO:7                         | SEQ ID NO:10                        | SEQ ID NO:12                        | SEQ ID NO:13                        | SEQ ID NO:16                        |
| (4) | SEQ ID NO:4                         | SEQ ID NO:7                         | SEQ ID NO:9                         | SEQ ID NO:11                        | SEQ ID NO:13                        | SEQ ID NO:16                        |
| (5) | SEQ ID NO:17                        | SEQ ID NO:18                        | SEQ ID NO:19                        | SEQ ID NO:20                        | SEQ ID NO:13                        | SEQ ID NO:21                        |

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區 VH 和/或輕鏈可變區 VL，其中，

(a) 重鏈可變區 VH

(i) 包含與選自 SEQ ID NO: 22、23、24 或 25 的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的胺基酸序列或由其組成；或者

(ii) 包含選自 SEQ ID NO: 22、23、24 或 25 的胺基酸序列或由其組成；或者

(iii) 包含與選自 SEQ ID NO: 22、23、24 或 25 的胺基酸序列相比具有 1 個或多個（較佳不超過 10 個，更較佳不超過 5、4、3、2、1 個）的胺基酸改變（較佳胺基酸置換，更較佳胺基酸保守置換）的胺基酸序列，較佳地，該胺基酸改變不發生在 CDR 區中；

和/或

(b) 輕鏈可變區 VL

(i) 包含與選自 SEQ ID NO: 26、27、28 或 29 的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的胺基酸序列或由其組成；

(ii) 包含選自 SEQ ID NO: 26、27、28 或 29 的胺基酸序列或由其組成；或者

(iii) 包含與選自 SEQ ID NO: 26、27、28 或 29 的胺基酸序列相比具有 1 個或多個（較佳不超過 10 個，更較佳不超過 5、4、3、2、1 個）的胺基酸改變（較佳胺基酸置換，更較佳胺基酸保守置換）的胺基酸序列，較佳地，該

胺基酸改變不發生在 CDR 區中。

在較佳的實施方案中，本發明提供抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中該抗體或其抗原結合片段所包含的重鏈可變區 VH 和輕鏈可變區 VL 的組合如下表（表 B）所示：

表 B：本發明抗體或其抗原結合片段中重鏈可變區 VH 和輕鏈可變區 VL 的示例性組合

| 組合  | VH，其包含下述 SEQ ID NO 所示的胺基酸序列或由其組成 | VL，其包含下述 SEQ ID NO 所示的胺基酸序列或由其組成 |
|-----|----------------------------------|----------------------------------|
| (1) | SEQ ID NO:22                     | SEQ ID NO:26                     |
| (2) | SEQ ID NO:23                     | SEQ ID NO:27                     |
| (3) | SEQ ID NO:24                     | SEQ ID NO:28                     |
| (4) | SEQ ID NO:25                     | SEQ ID NO:29                     |

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段包含重鏈和/或輕鏈，其中

(a)重鏈

(i)包含與選自 SEQ ID NO:30、31、32 或 33 的胺基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列或由其組成；

(ii) 包含選自 SEQ ID NO: 30、31、32 或 33 的胺基酸序列或由其組成；或者

(iii) 包含與選自 SEQ ID NO: 30、31、32 或 33 的胺基酸序列相比具有 1 個或多個(較佳不超過 20 個或 10 個，

更佳不超過 5、4、3、2、1 個) 的胺基酸改變(較佳胺基酸置換, 更佳胺基酸保守置換) 的胺基酸序列, 較佳地, 該胺基酸改變不發生在重鏈的 CDR 區中, 更佳地, 該胺基酸改變不發生在重鏈可變區中;

和/或

(b) 輕鏈

(i) 包含與選自 SEQ ID NO:34、35、36 或 37 的胺基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列或由其組成;

(ii) 包含選自 SEQ ID NO: 34、35、36 或 37 的胺基酸序列或由其組成; 或者

(iii) 包含與選自 SEQ ID NO: 34、35、36 或 37 的胺基酸序列相比具有 1 個或多個(較佳不超過 20 個或 10 個, 更佳不超過 5、4、3、2、1 個) 的胺基酸改變(較佳胺基酸置換, 更佳胺基酸保守置換) 的胺基酸序列, 較佳地, 該胺基酸改變不發生在輕鏈的 CDR 區中, 更佳地, 該胺基酸改變不發生在輕鏈可變區中。

在較佳的實施方案中, 本發明提供抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段, 其包含重鏈和輕鏈, 其中該抗體或其抗原結合片段所包含的重鏈和輕鏈的組合如下表(表 C)所示:

表 C：本發明抗體或其抗原結合片段中重鏈和輕鏈的  
示例性組合

| 組合  | 重鏈，其包含下述 SEQ ID NO<br>所示的胺基酸序列或由其組成 | 輕鏈，其包含下述 SEQ ID NO<br>所示的胺基酸序列或由其組成 |
|-----|-------------------------------------|-------------------------------------|
| (1) | SEQ ID NO:30                        | SEQ ID NO:34                        |
| (2) | SEQ ID NO:31                        | SEQ ID NO:35                        |
| (3) | SEQ ID NO:32                        | SEQ ID NO:36                        |
| (4) | SEQ ID NO:33                        | SEQ ID NO:37                        |

在一些實施方案中，本發明抗 LAG-3 抗體或其片段的  
重 鏈 和 / 或 輕 鏈 還 包 含 信 號 肽 序 列 ， 例 如  
METDTLLLWVLLLWVPGSTG ( SEQ ID NO:48 )。

在本發明的一個實施方案中，本文所述的胺基酸改變  
包括胺基酸的置換、插入或缺失。較佳的，本文所述的胺  
基酸改變為胺基酸置換，較佳地保守置換。

在較佳的實施方案中，本發明所述的胺基酸改變發生  
在 CDR 外的區域（例如在 FR 中）。更較佳地，本發明所  
述的胺基酸改變發生在重鏈可變區外和/或輕鏈可變區外  
的區域。

視需要地，本發明的抗 LAG-3 抗體包括對輕鏈可變區、  
重鏈可變區、輕鏈或重鏈的翻譯後修飾。示例性的翻譯後  
修飾包括二硫鍵形成、糖基化、脂質化、乙醯化、磷酸化  
或任何其他操作，如以標記組分綴合。

在一些實施方案中，置換為保守性置換。保守置換是

指一個胺基酸經相同類別內的另一胺基酸置換，例如一個酸性胺基酸經另一酸性胺基酸置換，一個鹼性胺基酸經另一鹼性胺基酸置換，或一個中性胺基酸經另一中性胺基酸置換。示例性的置換如下表 D 所示：

表 D

| 原始殘基    | 示例性置換                             | 較佳的置換 |
|---------|-----------------------------------|-------|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile                     | Val   |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn                     | Lys   |
| Asn (N) | Gln; His; Asp; Lys; Arg           | Gln   |
| Asp (D) | Glu; Asn                          | Glu   |
| Cys (C) | Ser; Ala                          | Ser   |
| Gln (Q) | Asn; Glu                          | Asn   |
| Glu (E) | Asp; Gln                          | Asp   |
| Gly (G) | Ala                               | Ala   |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg                | Arg   |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮<br>胺酸 | Leu   |
| Leu (L) | 正亮胺酸; Ile; Val; Met; Ala;<br>Phe  | Ile   |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn                     | Arg   |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile                     | Leu   |
| Phe (F) | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr      | Tyr   |
| Pro (P) | Ala                               | Ala   |
| Ser (S) | Thr                               | Thr   |
| Thr (T) | Val; Ser                          | Ser   |
| Trp (W) | Tyr; Phe                          | Tyr   |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser                | Phe   |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮<br>胺酸 | Leu   |

在某些實施方案中，本文中所提供的抗體經改變以增加或降低抗體糖基化的程度。對抗體的糖基化位點的添加

或缺失可藉由改變胺基酸序列以便產生或移除一或多個糖基化位點而方便地實現。

舉例而言，可實施一或多種胺基酸置換以消除一或多個可變區構架糖基化位點，由此消除該位點處的糖基化。這類無糖基化可增加抗體對抗原的親和力。例如參見美國專利第 5,714,350 號及第 6,350,861 號。可製備具有改變類型的糖基化的抗體，例如具有減小量的岩藻糖基殘基的低岩藻糖化抗體或具有增加的等分 GlcNac 結構的抗體。這類改變的糖基化模式已顯示可增加抗體的 ADCC 能力。可藉由例如在具有改變的糖基化體系的宿主細胞中表達抗體來實現這類糖類修飾。具有改變的糖基化體系的細胞已在本領域中闡述，且可用作為在其中表達本發明的抗體以由此產生具有改變的糖基化的抗體的宿主細胞。舉例而言，細胞系 Ms704、Ms705 及 Ms709 缺乏岩藻糖基轉移酶基因 FUT8( $\alpha(1,6)$ -岩藻糖基轉移酶)，從而在 Ms704、Ms705 及 Ms709 細胞系中表達的抗體在其糖類上缺乏岩藻糖。可以藉由使用兩種代替載體靶向破壞 CHO/DG44 細胞中的 FUT8 基因來創建 Ms704、Ms705 及 Ms709FUT8<sup>-/-</sup> 細胞系(參見美國專利公開 20040110704 號及 Yamane-Ohnuki 等人(2004)Biotechnol Bioeng 87:614-22)。EP 1,176,195 描述了具有功能受破壞的編碼岩藻糖基轉移酶的 FUT8 基因的細胞系，從而在這類細胞系中表達的抗體藉由減少或消除  $\alpha$ -1,6 鍵相關酶來展現低岩藻糖化。EP 1,176,195 還描述了具有向結合抗體 Fc 區的 N-乙醯葡萄糖胺添加岩藻糖的

低酶活性或不具有該酶活性的細胞系，例如大鼠骨髓瘤細胞系 YB2/0(ATCC CRL 1662)。PCT 公開文本 WO 03/035835 描述了一種變體 CHO 細胞系 Lec13 細胞，其中使岩藻糖附接至 Asn(297)-連接的糖類的能力降低，從而亦導致在該宿主細胞中表達的抗體的低岩藻糖化(亦參見 Shields 等人(2002)J.Biol.Chem.277:26733-26740)。具有經修飾的糖基化概況的抗體亦可產生於雞蛋中，如 PCT 公開文本 WO06/089231 中所闡述。備選地，具有經修飾的糖基化概況的抗體可產生於植物細胞(例如青萍(Lemna))中。在植物系統中產生抗體的方法公開在對應於 Alston 及 Bird LLP 代理檔案號：040989/314911 的 2006 年 8 月 11 日提出申請的美國專利申請案中。PCT 公開文本 WO 99/54342 描述了經工程化以表達糖蛋白修飾糖基轉移酶(例如  $\beta(1,4)$ -N- 乙醯葡萄糖胺基轉移酶 III(GnTIII))的細胞系，從而在該工程化細胞系中表達的抗體展現增加的等分 GlcNac 結構，其導致增加的抗體的 ADCC 活性(亦參見 Umana 等人(1999)Nat.Biotech.17:176-180)。備選地，可使用岩藻糖苷酶切除抗體的岩藻糖殘基；舉例而言，岩藻糖苷酶  $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶自抗體去除岩藻糖基殘基(Tarentino 等人(1975)Biochem.14:5516-23)。

在本發明的一個實施方案中，本發明所述抗體或片段用經工程改造的酵母 N-連接的聚糖或 CHO N-連接的聚糖糖基化。

本發明所涵蓋的另一種對本文所述抗體或其片段的

修飾是聚乙二醇化(pegylation)。可對抗體實施聚乙二醇化以例如增加抗體的生物(例如血清)半衰期。為將抗體聚乙二醇化，通常使抗體或其片段與聚乙二醇(PEG)(例如 PEG 的反應性酯或醛衍生物)在其中一或多個 PEG 基團變得附接至抗體或抗體片段的條件下發生反應。較佳地，經由使用反應性 PEG 分子(或類似反應性水溶性聚合物)進行醯化反應或烷基化反應來實施聚乙二醇化。如本文中所使用，術語“聚乙二醇”意圖涵蓋已用於衍生化其他蛋白質的 PEG 的任一形式，例如單(C1-C10) 烷氧基-或芳氧基聚乙二醇或聚乙二醇-馬來醯亞胺。在某些實施方案中，要聚乙二醇化的抗體是無糖基化抗體。本領域中已知使蛋白質聚乙二醇化的方法且可將其應用於本發明的抗體，例如參見 EP 0154316 及 EP 0401384。

在某些實施方案中，可在本文中所提供抗體的 Fc 區中引入一個或多個胺基酸修飾，以此產生 Fc 區變體，以便增強例如抗體治療癌症或細胞增殖性疾病的有效性。本文中公開的抗-LAG3 抗體和其抗原結合片段也包括具有修飾的(或封閉的) Fc 區以提供改變的效應子功能的抗體和片段。參見，例如，美國專利號 5,624,821、WO2003/086310、WO2005/120571、WO2006/0057702。可以使用這樣的修飾增強或抑制免疫系統的各種反應，這可能具有在診斷和治療中的有益效果。Fc 區的修飾包括胺基酸變化(置換、缺失和插入)、糖基化或去糖基化、和添加多個 Fc。對 Fc 的修飾還可以改變治療性抗體中的抗體的半衰期，從而實現

更低頻率的給藥和因而增加的方便和減少的材料使用。參見 Presta (2005) J . Allergy Clin . Immunol . 116:731 , 734-735 頁。

在一個實施方案中，可以改變抗體的半胱胺酸殘基數目以修飾抗體特性。例如對 CH1 的鉸鏈區實施修飾，從而改變(例如增加或降低)鉸鏈區中的半胱胺酸殘基的數目。此辦法進一步闡述於美國專利第 5,677,425 號中。可以改變 CH1 的鉸鏈區中半胱胺酸殘基的數目以例如促進輕鏈及重鏈的裝配或增加或降低抗體的穩定性。

在某些實施方案中，本文中所提供的抗體可進一步經修飾為含有本領域中已知且輕易獲得的其他非蛋白質部分。適合抗體衍生作用的部分包括，但不限於，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性實例包括，但不限於，聚乙二醇 (PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙醇醇、聚乙醇吡咯烷酮、聚-1,3-二烷、聚-1,3,6-三烷、乙烯/馬來酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚環氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙醇醇、及其混合物。聚合物可具有任何分子量，並且可為分支或未分支的。連接到抗體的聚合物的數目可變化，並且如果連接多於一個聚合物，那麼其可為相同或不同分子。一般說來，用於衍生化的聚合物的數目和/或類型可基於包括但不限於有待改善的抗體的特定特性或功能、抗體衍生物是否將在確定條件下用於療法中等考慮

因素加以確定。

在一些實施方案中，本發明涵蓋抗 LAG-3 抗體的片段。抗體片段的實例包括但不限於 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH，F(ab')<sub>2</sub>、雙抗體、線性抗體、單鏈抗體(例如 scFv)；和由抗體片段形成的多特異性抗體。

例如，抗體分子可以包括重鏈(HC)可變結構域序列和輕鏈(LC)可變結構域序列。在一個實施方案中，抗體分子包含一條重鏈和一條輕鏈(在本文中稱作半抗體)或由其組成。在另一個例子中，抗體分子包含兩個重鏈可變結構域序列和兩個輕鏈可變結構域序列，因而形成兩個抗原結合位點，如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fc、Fd、Fd'、Fv、單鏈抗體(例如 scFv)、單結構域抗體、雙抗體(Dab)(雙價和雙特異性)和嵌合(例如，人源化)抗體，它們可以藉由修飾完整抗體產生，或使用重組 DNA 技術從頭合成那些抗體分子。這些功能性抗體片段保留選擇性地與其相應抗原或受體結合的能力。抗體和抗體片段可以來自任何抗體類別，包括但不限於 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE 並且來自任何抗體亞類(例如，IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4)。抗體分子的製備可以是單株或多株的。抗體也可以是人抗體、人源化抗體、嵌合抗體、CDR 移植抗體或體外生成的抗體。抗體可以具有例如選自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重鏈恆定區。抗體還可以具有例如選自  $\kappa$  或  $\lambda$  的輕鏈。

本發明的抗體也可以是單結構域抗體。單結構域抗體可以包括其互補決定區是單結構域多肽組成部分的抗體。

例子包括但不限於重鏈抗體、天然缺少輕鏈的抗體、衍生自常規 4-鏈抗體的單結構域抗體或工程化抗體。單結構域抗體可以是現有技術的任何抗體，或將來的任何單結構域抗體。單結構域抗體可以衍生自任何物種，包括但不限於小鼠、人、駱駝、羊駝、魚類、鯊魚、山羊、兔和牛。根據本發明的另一個方面，單結構域抗體是天然存在的單結構域抗體，稱作缺少輕鏈的重鏈抗體。這類單結構域抗體例如在 WO 94/04678 中公開。單結構域抗體或納米抗體可以是自駱駝科(Camelidae)物種(例如駱駝、羊駝、單峰駝、駝羊和原駝)中產生的抗體。除駱駝之外的其他物種可以產生天然缺少輕鏈的重鏈抗體；這類單結構域抗體處於本發明的範圍內。

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體是人源化抗體。用於使抗體人源化的不同方法是技術人員已知的，如由 Almagro&Fransson 綜述的，其內容藉由提述完整併入本文(Almagro JC 和 Fransson J, (2008) *Frontiers in Bioscience* 13:1619-1633)。Almagro&Fransson 區分理性辦法和經驗辦法。理性辦法的特徵在於生成少數工程化抗體變體並評估其結合或任何其它感興趣的特性。如果設計的變體不產生預期的結果，那麼啟動新一輪的設計和結合評估。理性辦法包括 CDR 接枝、表面重建(Resurfacing)、超人源化(Superhumanization) 和人字符串內容優化(Human StringContent Optimization)。相比之下，經驗辦法基於生成大的人源化變體庫並使用富集技術或高通量篩選選出最

佳克隆。因而，經驗辦法依賴於能夠對大量抗體變體進行搜索的可靠的選擇和/或篩選系統。體外展示技術，如噬菌體展示和核糖體展示滿足這些要求並且是技術人員公知的。經驗辦法包括 FR 庫、導向選擇(Guided selection)、構架改組(Framework-shuffling) 和 Humaneering。

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體是人抗體。可使用本領域中已知的各種技術來製備人抗體。人抗體一般描述於 van Dijk 和 van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol 5 :368-74(2001) 以及 Lonberg, Curr. Opin. Immunol 20 :450-459(2008)。例如，可以使用攜帶人免疫球蛋白基因而非小鼠系統的轉基因小鼠，產生人單株抗體(參見，例如，Wood 等人，國際申請 WO 91/00906；Kucherlapati 等人，PCT 公開 WO 91/10741；Lonberg 等人，國際申請 WO 92/03918；Kay 等人，國際申請 92/03917；Lonberg, N.等人，1994 Nature 368:856-859；Green, L.L.等人，1994 Nature Genet. 7:13-21；Morrison, S.L.等人，1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855；Bruggeman 等人，1993 Year Immunol 7:33-40；Tuailon 等人，1993 PNAS 90:3720-3724；Bruggeman 等人，1991 Eur J Immunol 21:1323-1326)。

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體是非人抗體，例如齧齒類(小鼠或大鼠)抗體、山羊抗體、靈長類(例如，猴)抗體、駱駝抗體。較佳地，非人抗體是齧齒類(小鼠或大鼠)抗體。產生齧齒類抗體的方法是本領域已知的。

可藉由在組合文庫中篩選具有所需活性的抗體來分

離本發明抗體。舉例來說，本領域中已知多種用於產生噬菌體展示文庫並且在這些文庫中篩選具有所需結合特徵的抗體的方法。這些方法於例如 Hoogenboom 等人，*Methods in Molecular Biology* 178 : 1-37 (O' Brien 等人編，Human Press，Totowa，NJ，2001) 中評述，並且進一步於例如 McCafferty 等人，*Nature* 348: 552-554；Clackson 等人，*Nature* 352: 624-628(1991)；Marks 等人，*J. Mol. Biol.* 222 : 581-597(1992)；Marks 及 Bradbury，*Methods in Molecular Biology* 248: 161-175 (Lo 編，Human Press，Totowa，NJ，2003)；Sidhu 等人，*J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310(2004)；Lee 等人，*J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093(2004)；Fellouse，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472(2004)；以及 Lee 等人，*J. Immunol. Methods* 284(1-2) : 119-132(2004) 中描述。

在一個實施方案中，抗體分子是單特異性抗體分子並且結合單一表位。例如，單特異性抗體分子具有各自結合相同表位的多個免疫球蛋白可變結構域序列。

在一個實施方案中，抗體分子是多特異性抗體分子，例如，它包含多個免疫球蛋白可變結構域序列，其中多個免疫球蛋白可變結構域序列的第一免疫球蛋白可變結構域序列具有針對第一表位的結合特異性並且多個免疫球蛋白可變結構域序列的第二免疫球蛋白可變結構域序列具有針對第二表位的結合特異性。在一個實施方案中，第一和第二表位在相同抗原(例如，相同蛋白質(或多聚體蛋白的亞

基))上。在一個實施方案中，第一和第二表位重疊。在一個實施方案中，第一和第二表位不重疊。在一個實施方案中，第一和第二表位在不同抗原(例如，不同蛋白質(或多聚體蛋白的不同亞基))上。在一個實施方案中，多特異性抗體分子包含第三、第四或第五免疫球蛋白可變結構域。在一個實施方案中，多特異性抗體分子是雙特異性抗體分子、三特異性抗體分子或四特異性抗體分子。

在一個實施方案中，多特異性抗體分子是雙特異性抗體分子。雙特異性抗體對不多於兩種抗原具有特異性。雙特異性抗體分子以針對第一表位具有結合特異性的第一免疫球蛋白可變結構域序列和針對第二表位具有結合特異性的第二免疫球蛋白可變結構域序列為特徵。在一個實施方案中，第一和第二表位在相同抗原(例如，相同蛋白質(或多聚體蛋白的亞基))上。在一個實施方案中，第一和第二表位重疊。在一個實施方案中，第一和第二表位不重疊。在一個實施方案中，第一和第二表位在不同抗原(例如，不同蛋白質(或多聚體蛋白的不同亞基))上。在一個實施方案中，雙特異性抗體分子包含針對第一表位具有結合特異性的重鏈可變結構域序列和輕鏈可變結構域序列以及針對第二表位具有結合特異性的重鏈可變結構域序列和輕鏈可變結構域序列。在一個實施方案中，雙特異性抗體分子包含針對第一表位具有結合特異性的半抗體和針對第二表位具有結合特異性的半抗體。在一個實施方案中，雙特異性抗體分子包含針對第一表位具有結合特異性的半抗體或其片

段和針對第二表位具有結合特異性的半抗體或其片段。在一個實施方案中，雙特異性抗體分子包含針對第一表位具有結合特異性的 scFv 或其片段和針對第二表位具有結合特異性的 scFv 或其片段。在一個實施方案中，第一表位位於 LAG-3 上並且第二表位位於 PD-1、TIM-3、CEACAM (例如，CEACAM-1 和/或 CEACAM-5)、PD-L1 或 PD-L2 上。在較佳的實施方案中，第二表位位於 PD-1 上。

在一些實施方案中，本發明的抗體可以是嵌合抗體(例如，人恆定結構域/小鼠可變結構域)。本文中使用的“嵌合抗體”是具有來自第一抗體的可變結構域和來自第二抗體的恆定結構域的抗體，其中該第一抗體和第二抗體來自不同的物種(美國專利號 4,816,567; 和 Morrison 等人, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855)。通常，該可變結構域得自來自實驗動物(諸如齧齒動物)的抗體(“親本抗體”)，且該恆定結構域序列得自人抗體，使得得到的嵌合抗體在人受試者中引起不利免疫應答的可能性低於親本(例如，小鼠)抗體。

在一些實施方案中，本發明還涵蓋與其它物質，例如治療性模塊或標記物，如細胞毒性劑或免疫調節劑，綴合的抗 LAG-3 單株抗體(“免疫綴合物”)。細胞毒性劑包括任何對細胞有害的藥劑。適合於形成免疫綴合物的細胞毒性劑(例如化療劑)的例子是本領域中已知的，參見例如 WO05/103081 或 WO2015/138920 或 CN 107001470 A。例如，細胞毒性劑包括但不限於：放射性同位素(例如，碘

(<sup>131</sup>I 或 <sup>125</sup>I)、釔(<sup>90</sup>Y)、鐳(<sup>177</sup>Lu)、銦(<sup>225</sup>Ac)、鐳、砒(<sup>211</sup>At)、銑(<sup>186</sup>Re)、鉍(<sup>212</sup>Bi 或 <sup>213</sup>Bi)、銦(<sup>111</sup>In)、錳(<sup>99m</sup>Tc)、磷(<sup>32</sup>P)、銦(<sup>188</sup>Rh)、硫(<sup>35</sup>S)、碳(<sup>14</sup>C)、氦(<sup>3</sup>H)、鉻(<sup>51</sup>Cr)、氯(<sup>36</sup>Cl)、鈷(<sup>57</sup>Co 或 <sup>58</sup>Co)、鐵(<sup>59</sup>Fe)、硒(<sup>75</sup>Se)或鎵(<sup>67</sup>Ga)。細胞毒性劑的實例還包括化療劑或其它治療藥物，例如，紫杉酚、松胞菌素 B、短桿菌肽 D、溴化乙錠、依米丁、絲裂黴素、依託泊苷、替尼泊苷、長春新鹼、長春鹼、秋水仙鹼、多柔比星、道諾黴素、二羥基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神黴素、放線菌素 D、1-脫氫辜酮、糖皮質激素、普魯卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛爾、嘌呤黴素、類美登素(maytansinoid)，例如，美登醇(參見美國專利號 5,208,020)、CC-1065(參見美國專利號 5,475,092、5,585,499、5,846,545)及其類似物或同源物。細胞毒性劑還包括例如抗代謝物(例如，甲胺蝶呤、6-巰基嘌呤、6-硫鳥嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶達卡巴嗪)、烷基化劑(例如，氮芥、硫代苯丁酸氮芥、CC-1065、美法侖、卡莫司汀(BSNU)和羅莫司汀(CCNU)、環磷醯胺、白消安、二溴甘露醇、鏈脲黴素、絲裂黴素 C 和順-二氯二胺鉑(II)(DDP)順鉑)、蒽環類(例如，道諾黴素(以前柔紅黴素)和多柔比星)、抗生素(例如，更生黴素(dactinomycin)(前稱放線菌素 D)、博來黴素、光神黴素和安黴黴素(AMC)) and 抗有絲分裂劑(例如，長春新鹼、長春鹼、紫杉酚和類美登素))；生長抑制劑；酶及其片段如核酸水解酶；抗生素；毒素如小分子毒素或細菌、真菌、植物或動物起源的酶促

活性毒素，包括其片段和/或變體；和已知的各種抗腫瘤或抗癌劑。

### **本發明的核酸以及包含其的宿主細胞**

在一方面，本發明提供了編碼以上任何抗 LAG-3 抗體或其片段的核酸。該核酸可以編碼包含抗體的輕鏈可變區和/或重鏈可變區的胺基酸序列，或包含抗體的輕鏈和/或重鏈的胺基酸序列。

例如，本發明的示例性的核酸包含與選自 SEQ ID NO:38、39、40、41、42、43、44 或 45 的核酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的核酸序列，或包含選自 SEQ ID NO:38、39、40、41、42、43、44、45 的核酸序列。例如，本發明的核酸包含編碼選自 SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36 或 37 中任一項所示胺基酸序列的核酸，或編碼與選自 SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36 或 37 中任一項所示的胺基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的胺基酸序列的核酸。

本發明還涵蓋與下述核酸在嚴格性條件下雜交的核酸或與下述核酸具有一個或多個置換(例如保守性置換)、缺失或插入的核酸：包含與選自 SEQ ID NO:38、39、40、41、42、43、44、45 的核酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性

的核酸序列的核酸；或包含選自 SEQ ID NO:38、39、40、41、42、43、44、45 的核酸序列的核酸；包含編碼選自 SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36 或 37 中任一項所示胺基酸序列的核酸序列的核酸；或包含編碼與選自 SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36 或 37 中任一項所示的胺基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的胺基酸序列的核酸序列的核酸。

在一個實施方案中，提供包含該核酸的一個或多個載體。在一個實施方案中，載體是表達載體，例如真核表達載體。載體包括但不限於病毒、質粒、黏粒、 $\lambda$  噬菌體或酵母人工染色體(YAC)。可以使用眾多載體系統。例如，一個類別的載體利用衍生自動物病毒例如牛乳頭瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、痘苗病毒、杆狀病毒、逆轉錄病毒(勞斯肉瘤病毒、MMTV 或 MOMLV)或 SV40 病毒的 DNA 元件。另一類載體利用衍生自 RNA 病毒如 Semliki 森林病毒、東方馬腦炎病毒和黃病毒的 RNA 元件。在較佳的實施方案中，本發明的表達載體是 pTT5 表達載體。

另外，可以藉由引入允許選擇已轉染的宿主細胞的一個或多個標記物，選出已經穩定將 DNA 摻入至其染色體中的細胞。標記物可以例如向營養缺陷型宿主提供原養型、殺生物抗性(例如，抗生素)或重金屬(如銅)抗性等。可選擇標記基因可以與待表達的 DNA 序列直接連接或藉由共轉

化引入相同的細胞中。也可能需要額外元件以便最佳合成 mRNA。這些元件可以包括剪接信號，以及轉錄啟動子、增強子和終止信號。

一旦已經製備了用於表達的表達載體或 DNA 序列，則可以將表達載體轉染或引入適宜的宿主細胞中。多種技術可以用來實現這個目的，例如，原生質體融合、磷酸鈣沉澱、電穿孔、逆轉錄病毒的轉導、病毒轉染、基因槍、基於脂質的轉染或其他常規技術。在原生質體融合的情況下，將細胞在培養基中培育並且篩選適宜的活性。用於培養所產生的轉染細胞和用於回收產生的抗體分子的方法和條件是本領域技術人員已知的並且可以基於本說明書和現有技術已知的方法，根據使用的特定表達載體和哺乳動物宿主細胞變動或優化。

在一個實施方案中，提供包含編碼本文該的抗體分子的核酸或本文該載體的宿主細胞。用於克隆或表達編碼抗體的核酸或載體的適當宿主細胞包括本文描述的原核或真核細胞。例如，抗體可在細菌中產生，特別當不需要糖基化和 Fc 效應子功能時。對於抗體片段和多肽在細菌中的表達，見，例如，美國專利號 5,648,237，5,789,199 和 5,840,523，還見 Charlton, *Methods in Molecular Biology*，卷 248(B.K.C.Lo, 編輯, Humana Press, Totowa, NJ, 2003)，第 245-254 頁，其描述抗體片段在大腸桿菌中的表達)。在表達後，抗體可以從可溶級分中的細菌細胞糊狀物分離，並且可以進一步純化。在一個實施方案中，宿主細胞是大

腸桿菌細胞。

在一個實施方案中，宿主細胞是真核的。在另一個實施方案中，宿主細胞選自酵母細胞、哺乳動物細胞(例如人細胞)、昆蟲細胞、植物細胞或適用於製備抗體或其抗原結合片段的其它細胞。例如，真核微生物諸如絲狀真菌或酵母是編碼抗體的載體的合適選殖或表達宿主，包括糖基化途徑已經進行“人源化”從而導致產生具有部分或完全人糖基化模式的抗體的真菌和酵母菌株。參見 Gerngross, Nat.Biotech.22:1409-1414(2004), 和 Li 等, Nat.Biotech.24:210-215(2006)。適於表達糖基化抗體的宿主細胞也衍生自多細胞生物體(無脊椎動物和脊椎動物)。也可以將脊椎動物細胞用作宿主。例如，可以使用被改造以適合於懸浮生長的哺乳動物細胞系。有用的哺乳動物宿主細胞系的其它實例是用 SV40 轉化的猴腎 CV1 系(COS-7)；人胚腎系(293HEK 或 293 細胞，如例如 Graham 等, J.Gen Virol. 36 : 59(1977) 中所描述的) 等。其它有用的哺乳動物宿主細胞系包括中國倉鼠卵巢(CHO) 細胞，包括 DHFR-CHO 細胞 (Urlaub 等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77 : 216(1980)) ；以及骨髓瘤細胞系如 Y0, NS0 和 Sp2/0。關於適合產生抗體的某些哺乳動物宿主細胞系的綜述見例如 Yazaki 和 Wu, Methods in Molecular Biology, 卷 248 (B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), 第 255-268 頁(2003)。其它有用的宿主細胞還包括但不限於 Vero 細胞、Hela 細胞、COS 細胞、CHO 細胞、HEK293 細胞、BHK 細胞、MDCKII

細胞、PerC6 細胞系(例如，來自 Crucell 的 PERC6 細胞)、卵母細胞和來自轉基因動物的細胞，例如乳腺上皮細胞。合適的昆蟲細胞包括但不限於 Sf9 細胞。

### **製備本發明抗體及其抗原結合片段的方法**

可以重組生產本文公開的抗-LAG3 抗體。存在幾種本領域已知的用於生產重組抗體的方法。用於重組生產抗體的方法的一個例子公開在美國專利號 4,816,567 中。

在一個實施方案中，提供了製備抗 LAG-3 抗體的方法，其中該方法包括，在適合抗體表達的條件下，培養包含編碼該抗體的核酸的宿主細胞，如上文所提供的，和視需要地從該宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收該抗體。為了重組產生抗 LAG-3 抗體，分離編碼抗體(例如上文所描述的抗體)的核酸，並將其插入一個或多個載體，用於在宿主細胞中進一步選殖和/或表達。此類核酸易於使用常規規程分離和測序(例如藉由使用能夠與編碼抗體重鏈和輕鏈的基因特異性結合的寡核苷酸探針進行)。

在一個實施方案中，宿主細胞包含含有編碼抗體的 VL 的胺基酸序列的核酸以及編碼抗體的 VH 的胺基酸序列的核酸的載體。在一個實施方案中，宿主細胞包含含有編碼抗體的 VL 的胺基酸序列的核酸的第一載體和含有編碼抗體的 VH 的胺基酸序列的核酸的第二載體。

### **測定法**

可以藉由本領域中已知的多種測定法對本文中提供的抗 LAG-3 抗體進行鑒定、篩選，或表徵其物理/化學特

性和/或生物學活性。一方面，對本發明的抗體測試其抗原結合活性，例如藉由已知的方法諸如 ELISA、Western 印跡，流式細胞術、抗體分子複合的磁珠等來進行。可使用本領域已知方法來測定 LAG-3 結合，本文中公開了例示性方法。在一些實施方案中，使用生物光干涉測定法(例如 Fortebio 親和測量)或 MSD 測定法或流式細胞術。

另一方面，可使用競爭測定法來鑒定與本文中公開的任何抗 LAG-3 抗體競爭對 LAG-3 的結合的抗體。在某些實施方案中，此類競爭性抗體結合與本文中公開的任何抗 LAG-3 抗體所結合表位相同的表位(例如線性或構象表位)。用於定位抗體所結合表位的詳細例示性方法見 Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols”, Methods in Molecular Biology vol.66(Humana Press,Totowa,NJ)。

本發明還提供了用於鑒定具有上文所述的一種或多種性質的抗 LAG-3 抗體的測定法。還提供在體內和/或在體外具有此類生物學活性的抗體。

在某些實施方案中，對本發明的抗體測試上文所述的一種或多種性質。

供任何上述體外測定法使用的細胞包括天然表達 LAG-3 或經改造而表達 LAG-3 的細胞或細胞系。幾種細胞類型表達 LAG-3。例如，LAG-3 在活化的 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 細胞、Treg 細胞、天然殺傷(NK)細胞和漿細胞樣樹狀細胞(DC)上表達。LAG-3 在腫瘤浸潤性淋巴細胞(例如，頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)中的浸潤性淋巴細胞)中表達。LAG-3 在

高度阻抑性誘導型和天然 Treg 上表達。例如，在黑素瘤和結直腸癌中高度阻抑性 FoxP3<sup>+</sup> nTreg 和 FoxP3-iTreg 為 LAG-3 陽性 (Camisaschi 等人 (2010) *J. Immunol.* 184(11):6545-6551; Scurr 等人 (2014) *Mucosal. Immunol.* 7(2):428-439)。此類細胞還包括表達 LAG-3 的細胞系和並非正常情況下表達 LAG-3 但已經用編碼 LAG-3 的核酸轉染的細胞系。

可以理解的是，能夠使用本發明的免疫綴合物替換或補充抗 LAG-3 抗體來進行任何上述測定法。

可以理解的是，能夠使用抗 LAG-3 抗體和其它的治療劑來進行任何上述測定法。

### **醫藥組成物和藥物製劑**

本發明還包括包含抗 LAG-3 抗體或其片段或其免疫綴合物的組成物(包括醫藥組成物或藥物製劑)和包含編碼抗 LAG-3 抗體或其片段的核酸的組合物。在某些實施方案中，組成物包含一種或多種結合 LAG-3 的抗體或其片段或其免疫綴合物或一種或多種編碼一種或多種結合 LAG-3 的抗體或其片段的核酸。這些組成物還可以包含合適的藥用輔料，如本領域中已知的藥用載體、賦形劑等，包括緩衝劑。

適用於本發明的藥用載體可以是無菌液體，如水和油，包括那些石油、動物、植物或合成來源的，如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油等。當靜脈內施用醫藥組成物時，水是較佳的載體。還可以將鹽水溶液和水性右旋糖以及甘

油溶液用作液體載體，特別是用於可注射溶液。

合適的賦形劑包括澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、甘油單硬脂酸酯、滑石、氯化鈉、乾燥的脫脂乳、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。對於賦形劑的使用及其用途，亦參見“Handbook of Pharmaceutical Excipients”，第五版，R.C.Rowe, P.J.Seskey 和 S.C.Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。

若期望的話，該組成物還可以含有少量的潤濕劑或乳化劑，或 pH 緩衝劑。這些組成物可以採用溶液、懸浮液、乳劑、片劑、丸劑、膠囊劑、粉末、持續釋放配製劑等的形式。口服配製劑可以包含標準載體和/或賦形劑，如藥用級甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精。

可以藉由將具有所需純度的本發明的抗 LAG-3 抗體與一種或多種視需要的藥用輔料 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 編(1980)) 混合來製備包含本文該的抗 LAG-3 抗體的藥物製劑，較佳地以凍乾製劑或水溶液的形式。

示例性的凍乾抗體製劑描述於美國專利號 6,267,958。水性抗體製劑包括美國專利號 6,171,586 和 WO2006/044908 中該的那些，後一種製劑包括組胺酸-乙酸鹽緩衝劑。

本發明的醫藥組成物或製劑還可以包含超過一種活性成分，該活性成分是被治療的特定適應證所需的，較佳

具有不會不利地彼此影響的互補活性的那些活性成分。例如，理想的是還提供其它抗癌活性成分，例如化療劑和/或 PD-1 軸結合拮抗劑(例如抗 PD-1 抗體或抗 PD-L1 抗體或抗 PD-L2 抗體)。該活性成分以對於目的用途有效的量合適地組合存在。活性成分可以是本領域已知的能夠與抗 LAG-3 抗體組合的任何物質，包括化療劑、抗體以及其他的治療劑。這些活性成分的例子參見例如 WO2016/028672、WO2015/042246、WO2015/138920 等等。

在一些實施方案中，抗 PD-1 抗體或抗 PD-L1 抗體或抗 PD-L2 抗體是抗人 PD-1 抗體或抗人 PD-L1 抗體或抗人 PD-L2 抗體，例如人源化的抗人 PD-1 抗體或抗人 PD-L1 抗體或抗人 PD-L2 抗體。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑的合適實例包括含有抗體的固體疏水聚合物的半滲透基質，該基質呈成形物品，例如薄膜或微囊形式。

### 抗體的用途

在一方面中，本發明涉及調節對象中免疫反應的方法。該方法包括向對象施用有效量的本文公開的抗體分子(例如，抗 LAG-3 抗體)或醫藥組成物或免疫綴合物，從而調節對象中的免疫反應。在一個實施方案中，本文公開的抗體分子(例如，治療有效量的抗 LAG-3 抗體分子)或醫藥組成物或免疫綴合物恢復、增強、刺激或增加對象中的免疫反應。

在另一方面中，本發明涉及預防或治療受試者的腫瘤

(例如癌症)的方法，該方法包括向該受試者施用有效量的本文公開的抗體分子(例如，抗LAG-3抗體)或醫藥組成物或免疫綴合物。在一個實施方案中，腫瘤是胃腸道腫瘤(例如癌症)，例如結腸癌等。

在另一方面中，本發明涉及預防或治療受試者的感染性疾病的方法，該方法包括向該受試者施用有效量的本文公開的抗體分子(例如，抗LAG-3抗體)或醫藥組成物或免疫綴合物。在一個實施方案中，感染性疾病是慢性感染。

在另一方面，本發明涉及在受試者中引起抗體依賴性細胞介導的細胞毒性的方法，該方法包括向該受試者施用有效量的本文公開的抗體分子(例如，抗LAG-3抗體)或醫藥組成物或免疫綴合物。

受試者可以是哺乳動物，例如，靈長類，較佳地，高級靈長類，例如，人類(例如，患有本文所述疾病或具有患有本文所述疾病的風險的患者)。在一個實施方案中，受試者需要增強免疫反應。在一些實施方案中，本文所述的抗LAG-3抗體分子恢復、增強或刺激受試者中的抗原特異性T細胞反應，例如，抗原特異性T細胞反應中的白介素-2(IL-2)或干擾素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )產生。在一些實施方案中，免疫反應是抗腫瘤反應。在一個實施方案中，受試者患有本文所述疾病(例如，如本文所述的腫瘤或感染性疾病)或具有患有本文所述疾病的風險。在某些實施方案中，受試者免疫受損或具有免疫受損風險。例如，受試者接受或已經接受過化療治療和/或放射療法。備選地或組合下，受試者因

感染而免疫受損或具有因感染而免疫受損的風險。

在一些實施方案中，本文所述的腫瘤，例如癌症，包括但不限於實體瘤、血液學癌(例如，白血病、淋巴瘤、骨髓瘤)及其轉移性病灶。在一個實施方案中，癌症是實體瘤。實體瘤的例子包括惡性腫瘤，例如，多個器官系統的肉瘤和癌(例如，腺癌)，如侵襲肺、乳腺、淋巴、胃腸道或結直腸、生殖器和生殖泌尿道(例如，腎細胞、膀胱細胞、膀胱細胞)、咽、CNS(例如，腦細胞、神經細胞或神經膠質細胞)、皮膚(例如，黑素瘤)、頭部和頸部(例如，頭頸鱗狀細胞癌(HNCC))和胰的那些。例如，黑素瘤、結腸癌、胃癌、直腸癌、腎細胞癌、乳腺癌(例如，不表達一種、兩種或全部雌激素受體、孕酮受體或 Her2/neu 的乳腺癌，例如，三陰性乳腺癌)、肝癌、肺癌(例如，非小細胞肺癌(NSCLC))(例如，具有鱗狀和/或非鱗狀結構的 NSCLC)或小細胞肝癌)、前列腺癌、頭部或頸部癌(例如，HPV+鱗狀細胞癌)、小腸癌和食道癌。血液學癌的例子包括但不限於白血病(例如，髓樣白血病、淋巴樣白血病或慢性淋巴細胞白血病(CLL))、淋巴瘤(例如，霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)、T 細胞淋巴瘤或套細胞淋巴瘤(MCL))和骨髓瘤，例如，多發性骨髓瘤。癌症可以處於早期、中期或晚期或是轉移性癌。

在一些實施方案中，癌症選自結直腸癌(例如，CRC)、黑素瘤，例如，晚期黑素瘤(例如，II-IV 期黑素瘤)或 HLA-A2 陽性-黑素瘤；胰腺癌，例如，晚期胰腺癌；乳腺

癌，例如，轉移性乳腺癌或三陰性乳腺癌；頭頸癌(例如，HNSCC)；食管癌；腎細胞癌(RCC)，例如，腎透明細胞癌(ccRCC)或轉移性腎細胞癌(MRCC)；肺癌(例如，NSCLC)；宮頸癌；膀胱癌；或血液學惡性病，例如，白血病(例如，淋巴細胞白血病)或淋巴瘤(例如，霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)、套細胞淋巴瘤(MCL)或 CLL，例如，復發性或頑固性慢性淋巴細胞白血病)。

本文公開的方法和組成物可用於治療與前述癌症相關的轉移性病灶。

在一些實施方案中，該癌症是表達 LAG-3 的癌症，特別是轉移性癌症。在一些實施方案中，該癌症是表達 PD-L1 的癌症。在一些實施方案中，該癌症是表達 LAG-3 以及 PD-L1 的癌症。

在一些實施方案中，本文所述的癌症是結腸癌及其轉移性癌症。

在一些實施方案中，該感染是急性的或慢性的。在一些實施方案中，該慢性感染是持續性的、潛伏的感染或緩慢感染。在一些實施方案中，該慢性感染是因為選自細菌、病毒、真菌和原生動物的病原體導致的。

在一些實施方案中，該感染性疾病是由於病毒感染引起的。致病性病毒的一些例子包括(甲型、乙型和丙型)肝炎病毒、(甲型、乙型和丙型)流感病毒、HIV、疱疹病毒(例如，VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II、CMV、Epstein Barr

病毒+)、腺病毒、黃病毒、艾柯病毒、鼻病毒、柯薩奇病毒、冠狀病毒、呼吸道合胞體病毒、腮腺炎病毒、輪狀病毒、麻疹病毒、風疹病毒、細小病毒、痘苗病毒、HTLV病毒、登革病毒、乳頭狀瘤、軟疣病毒、脊髓灰質炎病毒、狂犬病病毒、JC病毒和蟲媒腦炎病毒。

在一些實施方案中，該感染是細菌感染。引起感染的病原菌的一些例子包括梅毒菌、衣原體、立克次體菌、分枝桿菌、葡萄球菌、鏈球菌、肺炎球菌、腦膜炎球菌和淋球菌(*gonococci*)、克雷伯菌、變形菌、沙雷菌、假單胞菌、軍團菌、白喉桿菌、沙門氏菌、芽孢桿菌、霍亂菌、破傷風菌、肉毒桿菌、炭疽菌、鼠疫菌、鉤端螺旋體病菌和萊姆病菌。

在一些實施方案中，該感染是真菌感染，致病真菌的一些例子包括假絲酵母(白假絲酵母(*Candida albicans*)、克柔假絲酵母(*Candida krusei*)、光滑假絲酵母(*Candida glabrata*)、熱帶假絲酵母(*Candida tropicalis*)等)、新型隱球酵母(*Cryptococcus neoformans*)、麴黴(*Aspergillus*)(煙麴黴(*Aspergillus fumigatus*)、黑麴黴(*Aspergillus niger*)等)、毛黴目(*Mucorales*)(毛黴(*mucor*)、犁頭黴(*bsidia*)、根黴(*rhizophus*))、申克孢子絲菌(*Sporothrix schenkii*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)和荚膜組織胞漿菌(*Histoplasma capsulatum*)。

在一些實施方案中，該感染是原生動物例如寄生蟲感

染，寄生蟲的一些例子包括包括痢疾阿米巴 (*Entamoeba histolytica*)、結腸小袋纖毛蟲 (*Balantidium coli*)、福氏耐格裡變形蟲 (*Naegleria fowleri*)、棘阿米巴屬物種 (*Acanthamoeba* sp.)、藍氏賈第鞭毛蟲 (*Giardia lamblia*)、隱孢子蟲屬物種 (*Cryptosporidium* sp.)、卡氏肺囊蟲 (*Pneumocystis carinii*)、間日瘧原蟲 (*Plasmodium vivax*)、田鼠巴貝蟲 (*Babesia microti*)、布氏錐蟲 (*Trypanosoma brucei*)、枯氏錐蟲 (*Trypanosoma cruzi*)、杜氏利什曼原蟲 (*Leishmania donovani*)、剛地弓形蟲 (*Toxoplasma gondi*) 和巴西日圓線蟲 (*Nippostrongylus brasiliensis*)。

在一個實施方案中，感染性疾病是肝炎(例如，乙型肝炎感染)。抗 LAG-3 抗體分子(單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑，例如抗 PD-1 或抗 PD-L1，組合)可以出於治療優勢與乙型肝炎感染的常規治療組合。在某些實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子與乙型肝炎抗原((例如，Engerix B))或疫苗組合施用，和視需要地聯合含鋁佐劑組合施用。

在另一個實施方案中，感染性疾病是流感。在某些實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子與流感抗原或疫苗組合施用。

適於用本發明的抗 LAG-3 的抗體或其片段預防或治療的疾病可進一步參見 WO2015/138920、WO2016/028672、WO2015/042246 等。

在其他方面，本發明提供抗 LAG-3 抗體或其片段或其免疫綴合物在生產或製備藥物中的用途，該藥物用於治療

上文提及的相關疾病或病症。

在一些實施方案中，本發明的抗體或抗體片段或免疫綴合物會延遲病症和/或與病症相關的症狀的發作。

## 聯合療法

在一些實施方案中，本文所述的預防或治療方法還包括向該受試者或個體聯合施用本文公開的抗體分子(例如，抗 LAG-3 抗體)或醫藥組成物或免疫綴合物，以及 PD-1 軸結合拮抗劑或包含該 PD-1 軸結合拮抗劑的藥物或免疫綴合物。在一些實施方案中，PD-1 軸結合拮抗劑包括例如抗 PD-1 抗體或抗 PD-L1 抗體或抗 PD-L2 抗體。

在一些實施方案中，PD-1 軸結合拮抗劑包括但不限於 PD-1 結合拮抗劑，PD-L1 結合拮抗劑和 PD-L2 結合拮抗劑。"PD-1"的備選名稱包括 CD279 和 SLEB2。"PD-L1"的備選名稱包括 B7-H1、B7-4、CD274 和 B7-H。"PD-L2"的備選名稱包括 B7-DC、B7-1 和 CD273。在一些實施方案中，PD-1、PD-L1 和 PD-L2 是人 PD-1、PD-L1 和 PD-L2。在一些實施方案中，PD-1 結合拮抗劑是抑制 PD-1 結合其配體結合配偶的分子。在一個具體方面，PD-1 配體結合配偶是 PD-L1 和/或 PD-L2。在另一個實施方案中，PD-L1 結合拮抗劑是抑制 PD-L1 結合其結合配偶的分子。在一個具體方面，PD-L1 結合配偶是 PD-1 和/或 B7.1。在另一個實施方案中，PD-L2 結合拮抗劑是抑制 PD-L2 結合其結合配偶的分子。在一個具體方面，PD-L2 結合配偶是 PD-1。拮抗劑可以是

抗體，其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。在一些實施方案中，PD-1 結合拮抗劑是抗 PD-1 抗體(例如人抗體，人源化抗體，或嵌合抗體)。在一些實施方案中，抗 PD-1 抗體選自下組：MDX-1106(納武單抗(nivolumab)，OPDIVO)，Merck 3475(MK-3475，匹博利珠單抗(pembrolizumab)，KEYTRUDA)和 CT-011(匹地利珠單抗(Pidilizumab))。在一些實施方案中，PD-1 結合拮抗劑是免疫黏附素(例如包含融合至恆定區(例如免疫球蛋白序列的 Fc 區)的，PD-L1 或 PD-L2 的胞外或 PD-1 結合部分的免疫黏附素)。在一些實施方案中，PD-1 結合拮抗劑是 AMP-224。在一些實施方案中，PD-L1 結合拮抗劑是抗 PD-L1 抗體。在一些實施方案中，抗 PD-L1 結合拮抗劑選自下組：YW243.55.S70，MPDL3280A，MEDI4736 和 MDX-1105。MDX-1105，也稱作 BMS-936559，是 WO2007/005874 中記載的抗 PD-L1 抗體。抗體 YW243.55.S70(重和輕鏈可變區序列分別顯示於 SEQ ID No.20 和 21)是 WO 2010/077634 A1 中記載的抗 PD-L1。MDX-1106，也稱作 MDX-1106-04，ONO-4538，BMS-936558 或 nivolumab，是 WO2006/121168 中記載的抗 PD-1 抗體。Merck 3475，也稱作 MK-3475，SCH-900475 或 pembrolizumab，是 WO2009/114335 中記載的抗 PD-1 抗體。CT-011，也稱作 hBAT，hBAT-1 或 pidilizumab，是 WO2009/101611 中記載的抗 PD-1 抗體。AMP-224，也稱作 B7-DCIg，是 WO2010/027827 和 WO2011/066342 中記載的 PD-L2-Fc 融合可溶性受體。在

一些實施方案中，抗 PD-1 抗體是 MDX-1106。"MDX-1106" 的備選名稱包括 MDX-1106-04，ONO-4538，BMS-936558 或 nivolumab。在一些實施方案中，抗 PD-1 抗體是 nivolumab(CAS 註冊號：946414-94-4)。在較佳的實施方案中，抗 PD-1 抗體是本文所述的 "Antibody C" 或 Antibody D。

在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體也可以與抗 PD-L1 抗體聯合用於治療。

在一些實施方案中，本發明的抗 PD-L1 抗體是抗人 PD-L1 抗體。在一些實施方案中，本發明的抗 PD-L1 抗體是 IgG1 形式的抗體或 IgG2 形式的抗體或 IgG4 形式的抗體。在一些實施方案中，抗 PD-L1 抗體是單株抗體。在一些實施方案中，抗 PD-L1 抗體是人源化的。在一些實施方案中，抗 PD-L1 抗體是嵌合抗體。在一些實施方案中，至少部分的抗 PD-L1 抗體的框架序列是人共有框架序列。在一個實施方案中，本發明的抗 PD-L1 抗體還涵蓋其抗體片段，較佳地選自以下的抗體片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、單鏈抗體(例如 scFv)或(Fab')<sub>2</sub>、單結構域抗體、雙抗體(dAb)或線性抗體。

在一些具體的實施方案中，本發明的抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段包含

(i)如 SEQ ID NO:57 所示的重鏈可變區的 3 個互補決定區 HCDR，和/或

(ii)如 SEQ ID NO:58 所示的輕鏈可變區的 3 個互補決

定區 LCDR。

在一些實施方案中，本發明的抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區 (VH) 和/或輕鏈可變區 (VL)，其中

(i) 該 VH 包含互補決定區域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:51 的胺基酸序列，或由該胺基酸序列組成；HCDR2 包含選自 SEQ ID NO:52 的胺基酸序列，或由該胺基酸序列組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:53 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成；

和/或

(ii) 其中該 VL 包含互補決定區域 (CDR) LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO:54 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:55 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成；LCDR3 包含選自 SEQ ID NO:56 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成。

在一些實施方案中，本發明的抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區 VH 和/或輕鏈可變區 VL，其中，

(a) 重鏈可變區 VH

(i) 包含與選自 SEQ ID NO:57 的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的胺基酸序列或由其組成；或者

(ii) 包含選自 SEQ ID NO:57 的胺基酸序列或由其組成；或者

(iii)包含與選自 SEQ ID NO: 57 的胺基酸序列相比具有 1 個或多個（較佳不超過 10 個，更佳不超過 5、4、3、2、1 個）的胺基酸改變（較佳胺基酸置換，更較佳胺基酸保守置換）的胺基酸序列，較佳地，該胺基酸改變不發生在 CDR 區中；

和/或

(b)輕鏈可變區 VL

(i)包含與選自 SEQ ID NO:58 的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列或由其組成；

(ii) 包含選自 SEQ ID NO: 58 的胺基酸序列或由其組成；或者

(iii) 包含與選自 SEQ ID NO:58 的胺基酸序列相比具有 1 個或多個（較佳不超過 10 個，更較佳不超過 5、4、3、2、1 個）的胺基酸改變（較佳胺基酸置換，更較佳胺基酸保守置換）的胺基酸序列，較佳地，該胺基酸改變不發生在 CDR 區中。

在一些實施方案中，本發明的抗 PD-L1 抗體或其抗原結合片段包含重鏈和/或輕鏈，其中

(a)重鏈

(i)包含與選自 SEQ ID NO:59 的胺基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列或由其組成；

(ii) 包含選自 SEQ ID NO:59 的胺基酸序列或由其組

成；或者

(iii) 包含與選自 SEQ ID NO:59 的胺基酸序列相比具有 1 個或多個(較佳不超過 20 個或 10 個，更佳不超過 5、4、3、2、1 個)的胺基酸改變(較佳胺基酸置換，更佳胺基酸保守置換)的胺基酸序列，較佳地，該胺基酸改變不發生在重鏈的 CDR 區中，更佳地，該胺基酸改變不發生在重鏈可變區中；

和/或

(b) 輕鏈

(i) 包含與選自 SEQ ID NO:60 的胺基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列或由其組成；

(ii) 包含選自 SEQ ID NO:60 的胺基酸序列或由其組成；或者

(iii) 包含與選自 SEQ ID NO:60 的胺基酸序列相比具有 1 個或多個(較佳不超過 20 個或 10 個，更佳不超過 5、4、3、2、1 個)的胺基酸改變(較佳胺基酸置換，更佳胺基酸保守置換)的胺基酸序列，較佳地，該胺基酸改變不發生在輕鏈的 CDR 區中，更佳地，該胺基酸改變不發生在輕鏈可變區中。

在一些實施方案中，本發明針對抗 LAG-3 抗體的修飾同樣適用於抗 PD-L1 抗體。

在進一步的一些實施方案中，單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組合的抗 LAG-3 抗體或其片段還能與一種或多種

其它療法例如治療方式和/或其它治療劑組合施用。

在一些實施方案中，治療方式包括外科手術(例如腫瘤切除術)；放射療法(例如，外粒子束療法，它涉及其中設計照射區域的三維適形放射療法)、局部照射(例如，指向預選靶或器官的照射)或聚焦照射)等。聚焦照射可以選自立體定位放射手術、分割立體定位放射手術和強度調節型放射療法。聚焦照射可以具有選自粒子束(質子)、鈷-60(光子)和直線加速器(X射線)的輻射源，例如，如 WO 2012/177624 中描述。

放射療法可以藉由幾種方法之一或方法組合施用，該方法包括而不限於外粒子束療法、內部放射療法，植入物照射、立體定位放射手術、全身放射療法、放療法和永久或短暫間質近距放射療法。術語“近距放射療法”指藉由空間限制的放射性物質遞送的放射療法，該放射性物質在腫瘤或其他增殖性組織疾病部位處或其附近插入體內。該術語意在而不限於包括暴露於放射性同位素(例如 At-211、I-131、I-125、Y-90、Re-186、Re-188、Sm-153、Bi-212、P-32 和 Lu 的放射性同位素)。合適輻射源包括固體和液體。藉由非限制性舉例方式，輻射源可以是放射性核素，如 I-125、I-131、Yb-169、Ir-192 作為固態源、I-125 作為固態源或發射光子、 $\beta$  粒子、 $\gamma$  輻射或其他治療性射線的其他放射性核素。放射性物質也可以是從任何放射性核素溶液，例如，I-125 或 I-131 溶液製成的流體，或可以使用含有固體放射性核素(如 Au-198、Y-90)小顆粒的合適流體的漿液

產生放射性流體。另外，放射性核素可以包含在凝膠或放射性微球狀體中。

在一些實施方案中，治療劑選自化療劑、細胞毒性劑、疫苗、其它抗體、抗感染活性劑或免疫調節劑(例如共刺激分子的激活劑或免疫檢查點分子的抑制劑)。

示例性的細胞毒性劑包括抗微管藥物、拓撲異構酶抑制劑、抗代謝藥、有絲分裂抑制劑、烷基化劑、蔥環類、長春鹼類生物鹼、嵌入劑、能夠干擾信號轉導途徑的活性劑、促凋亡活性劑、蛋白酶體抑制劑和照射(例如，局部或全身照射(例如、 $\gamma$  輻射))。

示例性的其它抗體包括但不限於免疫檢查點抑制劑(例如，抗 CTLA-4、抗 TIM-3、抗 CEACAM)；刺激免疫細胞的抗體(例如，激動性 GITR 抗體或 CD137 抗體)；抗癌抗體(例如，利妥昔單抗(Rituxan®或 MabThera®)、曲妥珠單抗(Herceptin®)、托西莫單抗(Bexxar®)、替伊莫單抗(Zevalin®)、阿來組單抗(Campath®)、依帕珠單抗(Lymphocide®)、貝伐珠單抗(Avastin®)、厄洛替尼(Tarceva®)西妥昔單抗(Erbitux®)，等等。

示例性的化療劑包括但不限於阿那曲唑(Arimidex®)、比卡魯胺(Casodex®)、硫酸博來黴素(Blenoxane®)、白消安(Myleran®)、白消安注射劑(Busulfex®)、卡培他濱(Xeloda®)、N4-戊氧羰基-5-脫氧-5-氟胞苷、卡鉑(Paraplatin®)、卡莫司汀(BicNU®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、順鉑(Platinol®)、克拉立濱(Leustatin®)、環

磷醯胺(Cytosan®或 Neosar®)、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂質體注射劑(DepoCyt®)、達卡巴嗪(DTIC-Dome®)、更生黴素(dactinomycin)(放線菌素 D、Cosmegen)、鹽酸道諾黴素(Cerubidine®)、檸檬酸道諾黴素脂質體注射劑(DaunoXome®)、地塞米松、多西紫杉醇(Taxotere®)、鹽酸多柔比星(Adriamycin®、Rubex®)、依託泊苷(Vepesid®)、磷酸氟達拉濱(Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®、Efudex®)、氟他胺(Eulexin®)、tezacitibine、吉西他濱(雙氟脫氧胞苷)、羥基脲(Hydrea®)、伊達比星(Idamycin®)、異環磷醯胺(IFEX®)、伊立替康(Camptosar®)、L-天冬醯胺酶(ELSPAR®)、亞葉酸鈣、美法侖(Alkeran®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、甲胺蝶呤(Folex®)、米托蒽醌(米托蒽醌)、米羅他(mylotarg)、紫杉醇(Taxol®)、phoenix(鈹 90/MX-DTPA)、噴司他丁、聚苯丙生 20 聯用卡莫司汀植入物(Gliadel®)、檸檬酸他莫昔芬(Nolvadex®)、替尼泊苷(Vumon®)、6-硫鳥嘌呤、塞替派、替拉紫明(Tirazone®)、注射用鹽酸拓撲替康(Hycamptin®)、長春鹼(Velban®)、長春新鹼(Oncovin®)、長春瑞濱(長春瑞濱)、依魯替尼、吉利德(idelalisib)和貝倫妥單抗-維多汀(brentuximab vedotin)。

示例性的疫苗包括但不限於癌症疫苗。疫苗可以是基於 DNA 的疫苗、基於 RNA 的疫苗或基於病毒轉導的疫苗。癌症疫苗可以是預防性的或治療性的。在一些實施方案中，該癌症疫苗是肽癌症疫苗，其在一些實施方案中是個性化

肽疫苗。在一些實施方案中，該肽癌症疫苗是多價長肽、多重肽、肽混合物、雜合肽，或經肽脈衝的樹突細胞疫苗(參見例如 Yamada 等人，*Cancer Sci*,104:14-21,2013)。

示例性的抗感染活性劑包括但不限於，抗病毒劑、抗真菌劑、抗原生動物劑、抗菌劑，例如核苷類似物齊多夫定(AST)、更昔洛韋、膦甲酸或 cidovir，如上文該。

免疫調節劑包括免疫檢查點分子抑制劑和共刺激性分子激活劑。

在一些實施方案中，免疫檢查點分子的抑制劑是 CTLA-4、TIM-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CEACAM(例如，CEACAM-1 和/或 CEACAM-5)和/或 TIGFR 的抑制劑。對分子的抑制可以在 DNA、RNA 或蛋白質水平進行。在一些實施方案中，抑制性核酸(例如，dsRNA、siRNA 或 shRNA)可以用來抑制免疫檢查點分子的表達。在其他實施方案中，免疫檢查點分子的抑制劑是與免疫檢查點分子結合的多肽，例如，可溶性配體或抗體或抗體片段。示例性 TIM-3 抗體分子包括但不限於 MBG220、MBG227 和 MBG219。

在其他實施方案中，免疫調節劑是 CTLA4 的可溶性配體(例如，CTLA-4-Ig 或 TIM-3-Ig)或抗體或抗體片段。例如，抗 LAG-3 抗體分子(單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑)可以與 CTLA-4 抗體(例如，伊匹木單抗)組合施用。示例性抗 CTLA4 抗體包括曲美木單抗(tremelimumab)(從 Pfizer 可獲得的 IgG2 單克隆抗體，以前稱作 ticilimumab、

CP-675,206)；和伊匹木單抗 (CTLA-4 抗體，也稱作 MDX-010、CAS No.477202-00-9)。

在一些實施方案中，免疫調節劑是共刺激分子的激活劑或激動劑。在一個實施方案中，共刺激分子的激動劑選自以下分子的激動劑(例如，激動性抗體或其抗原結合片段、或可溶性融合物)：OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3 或 CD83 配體。在另一個實施方案中，單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組合的抗 LAG-3 抗體或其片段與包括 CD28、CD27、ICOS 和 GITR 的共刺激結構域的共刺激分子(例如，與正向信號相關的激動劑)組合使用。示例性 GITR 激動劑例如包括 GITR 融合蛋白和抗 GITR 抗體(例如，雙價的抗 GITR 抗體)，例如，以下文獻中描述的 GITR 融合蛋白：美國專利號 6,111,090、歐洲專利號 090505B1、美國專利號 8,586,023、PCT 公開號 WO 2010/003118 和 2011/090754。一個示例性抗 GITR 抗體是 TRX518。

在進一步的一些實施方案中，單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組合的抗 LAG-3 抗體或其片段還能與酪胺酸激酶抑制劑(例如，受體酪胺酸激酶(RTK)抑制劑)組合使用。示例性酪胺酸激酶抑制劑包括但不限於表皮生長因子(EGF)途徑抑制劑(例如，表皮生長因子受體(EGFR)抑制劑)、血管內皮生長因子(VEGF)途徑抑制劑(例如，血管內皮生長

因子受體 (VEGFR) 抑制劑 (例如, VEGFR-1 抑制劑、VEGFR-2 抑制劑、VEGFR-3 抑制劑)、血小板衍生生長因子 (PDGF) 途徑抑制劑 (例如, 血小板衍生生長因子受體 (PDGFR) 抑制劑 (例如, PDGFR- $\beta$  抑制劑))、RAF-1 抑制劑、KIT 抑制劑和 RET 抑制劑。

在一些實施方案中, 單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組合的抗 LAG-3 抗體或其片段還能與 PI3K 抑制劑、mTOR 抑制劑、BRAF 抑制劑、MEK 抑制劑和/或 JAK2 抑制劑等組合使用。

在本發明的任何方法的一些實施方案中, 單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組合的本發明的抗 LAG-3 抗體或其片段的施用與腫瘤抗原的施用組合。抗原可以例如是腫瘤抗原、病毒抗原、細菌性抗原或來自病原體的抗原。在一些實施方案中, 腫瘤抗原包含蛋白質。在一些實施方案中, 腫瘤抗原包含核酸。在一些實施方案中, 腫瘤抗原是腫瘤細胞。

在一些實施方案中, 單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組合的本發明的抗 LAG-3 抗體或其片段可以與包含過繼轉移表達嵌合抗原受體 (CAR) 的 T 細胞 (例如細胞毒性 T 細胞或 CTL) 的治療聯合施用。

在一些實施方案中, 單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組合的本發明的抗 LAG-3 抗體或其片段可以與抗腫瘤劑聯合施用。

在一些實施方案中, 單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組

合的本發明的抗 LAG-3 抗體或其片段可以與溶瘤病毒聯合施用。

在一些實施方案中，單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組合的本發明的抗 LAG-3 抗體或其片段可以與細胞因子聯合施用。細胞因子可以作為與抗 LAG-3 抗體分子的融合分子施用，或作為單獨的組合物施用。在一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體與一種、兩種、三種或更多種細胞因子(例如，作為融合分子或作為單獨組合物)組合施用。在一個實施方案中，細胞因子是選自 IL-1、IL-2、IL-12、IL-12、IL-15 或 IL-21 中一者、兩者、三者或更多者的白介素(IL)。

在一些實施方案中，單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組合的本發明的抗體或其片段可以與本領域常規的癌症療法組合，常規的癌症療法包括但不限於：(i) 放射療法(例如，放射療法、X 射線療法、照射)或用電離輻射殺死癌細胞並縮小腫瘤。放射療法可經體外放射治療(EBRT)或經內部近距離放射療法施用；(ii) 化學療法，或應用細胞毒藥物，其一般影響快速分裂的細胞；(iii) 靶向療法，或特異性影響癌細胞蛋白去調節的藥劑(例如，酪胺酸激酶抑制劑伊馬替尼(imatinib)、吉非替尼(gefitinib)；單株抗體，光動力學療法)；(iv) 免疫療法，或增強宿主免疫應答(例如，疫苗)；(v) 激素療法，或阻斷激素(例如，當腫瘤是激素敏感的時候)，(vi) 血管發生抑制劑，或阻斷血管形成和生長，和(vii) 姑息護理，或這樣的治療，其涉及改善護理質量以降低疼痛、噁心、嘔吐、腹瀉和出血，其中疼痛

藥物如嗎啡(morphine) 和羥考酮(oxycodone)，抗-催吐藥如昂丹司瓊(ondansetron) 和阿瑞匹坦(aprepitant)，從而可容許更具攻擊性的治療方案。

在一些實施方案中，單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組合的本發明的抗體或其片段可以與增強宿主免疫功能的常規方法組合，該常規方法包括但不限於：(i)APC 增強，諸如(a)向腫瘤注射編碼異源 MHC 同種異體抗原的 DNA，或(b)用增加免疫抗原識別可能性的基因(例如免疫刺激細胞因子、GM-CSF、共刺激分子 B7.1、B7.2) 轉染活檢的腫瘤細胞，(iii) 過繼性細胞免疫療法，或用活化的腫瘤特異性 T 細胞治療。過繼性細胞免疫療法包括分離腫瘤浸潤的宿主 T 淋巴細胞，諸如藉由 IL-2 或腫瘤或兩者刺激體外擴增該群體；此外，功能障礙的分離的 T 細胞也可藉由體外應用本發明的抗體來活化，如此活化的 T 細胞可然後重新施用給宿主。

上文該的各種組合療法可以進一步組合以用於治療。

更多的抗 LAG-3 抗體與其他治療方式或治療劑的組合的例子可以參見 WO2015/138920、WO2016/028672、WO2015/042246 等。

此類組合療法涵蓋組合施用(其中兩種或更多種治療劑包含在同一配製劑或分開的配製劑中)，和分開施用，在該情況中，可以在施用別的療法，例如治療方式和/或治療劑之前，同時，和/或之後發生本發明的抗體的施用。抗體

分子和/或其他療法，例如治療劑或治療方式可以在活動性疾病期間或在緩解或活動度更小的疾病期間施用。抗體分子可以在其他治療前、與其他治療同時、治療後或在疾病緩解期間施用。

在一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體的施用和別的療法（例如治療方式或治療劑）的施用彼此在約一個月內，或約一，兩或三週內，或約 1，2，3，4，5，或 6 天內發生。

在一些實施方案中，本文中描述的抗體組合可以分別施用，例如，作為單獨的抗體分別施用，或連接時（例如作為雙特異性或三特異性抗體分子）施用。

可以理解的是，能夠使用本發明的免疫綴合物替換或補充抗 LAG-3 抗體來進行任何治療。

### **施用途徑和劑量**

本發明的抗體（以及包含其的醫藥組成物或免疫綴合物，以及任何另外的治療劑）可以藉由任何合適的方法給藥，包括腸胃外給藥，肺內給藥和鼻內給藥，並且，如果局部治療需要，病灶內給藥。腸胃外輸注包括肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下給藥。在一定程度上根據用藥是短期或長期性而定，可藉由任何適合途徑，例如藉由注射，例如靜脈內或皮下注射用藥。本文中涵蓋各種用藥時程，包括，但不限於，單次給藥或在多個時間點多次給藥、推注給藥及脈衝輸注。

為了預防或治療疾病，本發明的抗體的合適劑量（當單獨或與一種或多種其他的治療劑組合使用時）將取決於待

治療疾病的類型、抗體的類型、疾病的嚴重性和進程、該抗體是以預防目的施用還是以治療目的施用、以前的治療、患者的臨床病史和對該抗體的應答，和主治醫師的判斷力。該抗體以一次治療或經過一系列治療合適地施用於患者。

在一些實施方案中，調整劑量方案以提供最佳的所需反應(例如，治療反應)。例如，可以施用單次團注，可以隨時間推移施用幾個分開的劑量或可以如治療情況的危急性所示，按比例減少或增加該劑量。特別有利的是以劑量單位形式配製腸胃外組合物以易於劑量的施用和均勻性。如本文所用的劑量單位形式指適合作為用於待治療對象的單一劑量的物理分立的單元；每個單元含有預定量的活性化合物，該預定量經計算與所要求的藥用載體結合時產生所需的治療效果。用於本發明劑量單位形式的規格直接取決於(a)活性化合物的獨特特徵和待實現的特定治療效果，以及(b)混合這種活性化合物用於個體中敏感性治療的領域內所特有的限制。

在一些實施方案中，抗體分子治療有效量或預防有效量的示例的非限制性範圍是 0.1 至 30 mg/kg、更佳地 1 至 25 mg/kg、更佳地 5 至 15mg/kg。抗 LAG-3 抗體分子的劑量和治療方案可以由技術人員確定。在某些實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子藉由注射(例如，皮下或靜脈內)以約 1 至 40 mg/kg，例如，1 至 30 mg/kg，例如，約 5 至 25 mg/kg、約 10 至 20 mg/kg、約 1 至 5 mg/kg、1 至 10 mg/kg、5 至 15 mg/kg、10 至 20 mg/kg、15 至 25 mg/kg 或約 3 mg/kg

的劑量施用。給藥方案可以從例如一週一次變動至每 2、3 或 4 週一次。在一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子以約 10 至 20 mg/kg 的劑量每隔一週施用。抗體分子可以藉由靜脈內輸注以超過 20 mg/分鐘，例如，20 至 40 mg/分鐘和較佳地大於或等於 40 mg/分鐘的速率施用，以達到約 35 至 440 mg/m<sup>2</sup>、較佳地約 70 至 310 mg/m<sup>2</sup> 和更佳地約 110 至 130 mg/m<sup>2</sup> 的劑量。在實施方案中，約 110 至 130 mg/m<sup>2</sup> 的輸注速率實現約 3 mg/kg 的水平。在一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子以約 3 至 800 mg(例如，約 3、20、80、240 或 800 mg)的劑量施用(例如，靜脈內施用)。在某些實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子以約 20 至 800 mg(例如，約 3、20、80、240 或 800 mg)的劑量單獨施用。在其他實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子以約 3 至 240 mg(例如，約 3、20、80 或 240 mg)的劑量與第二活性劑或治療方式(例如，本文該的第二活性劑或治療方式)組合施用。在一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子在每個 8 週循環期間每 2 週施用(例如，在第 1、3、5、7 週期間)，例如，最多 96 週。

在一些實施方案中，抗體分子可以藉由靜脈內輸注以超過 20 mg/分鐘，例如，20 至 40 mg/分鐘和較佳地大於或等於 40 mg/分鐘的速率施用，以達到約 35 至 440 mg/m<sup>2</sup>、較佳地約 70 至 310 mg/m<sup>2</sup> 和更佳地約 110 至 130 mg/m<sup>2</sup> 的劑量。在實施方案中，約 110 至 130 mg/m<sup>2</sup> 的輸注速率實現約 3 mg/kg 的水平。在其他實施方案中，抗體分子藉由靜脈內輸注以小於 10 mg/分鐘，例如，小於或等於 5 mg/

分鐘的速率施用，以達到約 1 至 100 mg/m<sup>2</sup>，例如，約 5 至 50 mg/m<sup>2</sup>、約 7 至 25 mg/m<sup>2</sup> 和更佳地，約 10 mg/m<sup>2</sup> 的劑量。在一些實施方案中，抗體是經約 30 分鐘時間輸注。

在另一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子與抗 PD-1 抗體分子組合施用。可以是使用的示例性劑量包括約 1 至 10 mg/kg(例如，3 mg/kg)的抗 PD-1 抗體分子劑量。抗 LAG-3 抗體分子可以約 20 至 800 mg，例如，約 20、80、240 或 800 mg 的劑量聯合施用。在一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子在每 8 週循環期間(例如，最多 96 週)每 2 週施用(例如，在第 1、3、5、7 週期間)。

### 用於診斷和檢測的方法和組合物

在某些實施方案中，本文中提供的任何抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段可以用於檢測 LAG-3 在生物樣品中的存在。術語“檢測”用於本文中時，包括定量或定性檢測，示例性的檢測方法可以涉及免疫組織化學、免疫細胞化學、流式細胞術(例如，FACS)、抗體分子複合的磁珠、ELISA 測定法、PCR-技術(例如，RT-PCR)。在某些實施方案中，生物樣品是血、血清或生物來源的其他液體樣品。在某些實施方案中，生物樣品包含細胞或組織。在一些實施方案中，生物樣品來自過度增生性或癌性病灶。

在一個實施方案中，提供用於診斷或檢測方法的抗 LAG-3 抗體。在另一個方面中，提供檢測 LAG-3 在生物樣品中的存在的方法。在某些實施方案中，方法包含檢測

LAG-3 蛋白在生物樣品中的存在。在某些實施方案中，LAG-3 是人 LAG-3。在某些實施方案中，該方法包括將生物樣品與如本文所述的抗 LAG-3 抗體在允許抗 LAG-3 抗體與 LAG-3 結合的條件下接觸，並檢測在抗 LAG-3 抗體和 LAG-3 之間是否形成複合物。複合物的形成表示存在 LAG-3。該方法可以是體外或體內方法。在一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體被用於選擇適合利用抗 LAG-3 抗體的治療的受試者，例如其中 LAG-3 是用於選擇該受試者的生物標記物。

在一個實施方案中，可以使用本發明抗體診斷癌症或腫瘤，例如評價(例如，監測)對象中本文所述疾病(例如，過度增生性或癌性疾病)的治療或進展、其診斷和/或分期。

在某些實施方案中，提供標記的抗 LAG-3 抗體。標記包括但不限於，被直接檢測的標記或部分(如螢光標記、發色團標記、電子緻密標記、化學發光標記和放射性標記)，以及被間接檢測的部分，如酶或配體，例如，藉由酶促反應或分子相互作用。示例性標記包括但不限於，放射性同位素  $^{32}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$  和  $^{131}\text{I}$ ，螢光團如稀土螯合物或螢光素及其衍生物，羅丹明及其衍生物，丹醯(dansyl)，傘形酮(umbelliferone)，螢光素酶(luciferase)，例如，螢火蟲螢光素酶和細菌螢光素酶(美國專利號 4,737,456)，螢光素，2,3-二氫酞嗪二酮，辣根過氧化物酶(HR)，鹼性磷酸酶， $\beta$ -半乳糖苷酶，葡糖澱粉酶，溶解酶，糖類氧化酶，

例如，葡萄糖氧化酶，半乳糖氧化酶，和葡萄糖-6-磷酸脫氫酶，雜環氧化酶如尿酸酶和黃嘌呤氧化酶，以及利用過氧化氫氧化染料前體的酶如 HR，乳過氧化物酶，或微過氧化物酶(microperoxidase)，生物素/親和素，自旋標記，噬菌體標記，穩定的自由基等等。

在本文中提供的任何發明的一些實施方案中，樣品是在用抗 LAG-3 抗體治療之前獲得的。在一些實施方案中，樣品是在用癌症藥物治療之前獲得的。在一些實施方案中，樣品是在癌症已經轉移之後獲得的。在一些實施方案中，樣品是福爾馬林固定、石蠟包膜(FFPE)的。在一些實施方案中，樣品是活檢(例如芯活檢)，手術標本(例如來自手術切除的標本)，或細針吸出物。

在一些實施方案中，在治療之前，例如，在起始治療之前或在治療間隔後的某次治療之前檢測 LAG-3。

在一些實施方案中，提供了一種治療腫瘤或感染的方法，該方法包括：對受試者(例如，樣品)(例如，包含癌細胞的受試者樣品)檢驗 LAG-3 的存在，因而確定 LAG-3 值，將 LAG-3 值與對照值比較，並且如果 LAG-3 值大於對照值，則向受試者施用治療有效量的視需要與一種或多種其他療法組合的單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組合的抗 LAG-3 抗體(例如，本文該的抗 LAG-3 抗體)，因而治療腫瘤或感染。

本發明示例性抗 LAG-3 抗體的序列

表 1、本發明示例性抗體的重鏈可變區和輕鏈可變區 CDR 序列(括號內為確定規則)

| 抗體名稱               | HCDR1                                                                                                                                                              | HCDR2(Kabat)                                                                                                                         | HCDR3 (IMGT)                                                                                                                     | LCDR1(Kabat)                                      | LCDR2(Kabat)          | LCDR3(Kabat)                                                                                                                  |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADI-26789          | FTFDDYAMH(SEQ ID NO:1)                                                                                                                                             | GISWNSGDIGYADSVKG(SEQ ID NO:5)                                                                                                       | AKGGYDGSYYGMDV(SEQ ID NO:8)                                                                                                      | QASQDISNYLN(SEQ ID NO:11)                         | DASNLET(SEQ ID NO:13) | QQVLDLPLT(SEQ ID NO:14)                                                                                                       |
| ADI-26869          | GSISSDYYWG(SEQ ID NO:2)                                                                                                                                            | SIYSGSTYYNP SLKS(SEQ ID NO:6)                                                                                                        | ARVRTWDAADF(SEQ ID NO:9)                                                                                                         | QASQDISNYLN(SEQ ID NO:11)                         | DASNLET(SEQ ID NO:13) | QQVHALPPWT(SEQ ID NO:15)                                                                                                      |
| ADI-31851          | GSISPDYYWG(SEQ ID NO:3)                                                                                                                                            | SIVYSGYTYNP SLKS(SEQ ID NO:7)                                                                                                        | ARVRTWDQSFH(SEQ ID NO:10)                                                                                                        | QAGQDISNYLN(SEQ ID NO:12)                         | DASNLET(SEQ ID NO:13) | QQVLELPPWT(SEQ ID NO:16)                                                                                                      |
| ADI-31853          | GSISSEYYWG(SEQ ID NO:4)                                                                                                                                            | SIVYSGYTYNP SLKS(SEQ ID NO:7)                                                                                                        | ARVRTWDAADF(SEQ ID NO:9)                                                                                                         | QASQDISNYLN(SEQ ID NO:11)                         | DASNLET(SEQ ID NO:13) | QQVLELPPWT(SEQ ID NO:16)                                                                                                      |
| 共有序列               | GSIXSX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> YYWG(其中 X <sub>1</sub> 選自任意氨基酸，較佳地 S 或 Y，X <sub>2</sub> 選自任意氨基酸，較佳地 S、P 或 E，和/或 X <sub>3</sub> 選自任意氨基酸，較佳地 D 或 S)(SEQ ID NO:17) | SIX <sub>1</sub> YSGX <sub>2</sub> TYNP SLKS(其中 X <sub>1</sub> 選自任意氨基酸，較佳地 Y 或 V，和/或 X <sub>2</sub> 選自任意氨基酸，較佳地 S 或 Y)(SEQ ID NO:18) | ARVRTWDX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> FDI(其中 X <sub>1</sub> 選自任意氨基酸，較佳地 A 或 Q，和/或 X <sub>2</sub> 選自任意氨基酸，較佳地 A 或 S)(SEQ ID NO:19) | QAXQDISNYLN(其中 X 選自任意氨基酸，較佳地 S 或 G)(SEQ ID NO:20) |                       | QQVX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> LPWT(其中 X <sub>1</sub> 選自任意氨基酸，較佳地 H 或 L，和/或 X <sub>2</sub> 選自任意氨基酸，較佳地 A 或 E)(SEQ ID NO:21) |
| HZ3266-IgG1N297A * | GFNIETD(SEQ ID NO:51)                                                                                                                                              | DPANDD(SEQ ID NO:52)                                                                                                                 | GLGRWFAY(SEQ ID NO:53)                                                                                                           | KASQDVINA V A(SEQ ID NO:54)                       | SASNRYT(SEQ ID NO:55) | QQHYSPPLT(SEQ ID NO:56)                                                                                                       |

\*HCDR 定義規則為 Chothia，LCDR 定義規則為 Kabat。

表 2、本發明示例性抗體的重鏈可變區和輕鏈可變區序列

| 抗體名稱                     | 重鏈可變區(VH)                                                                                                                                       | 輕鏈可變區(VL)                                                                                                                          |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADI-26<br>789            | EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFTEDDYAMHWVRQAPGKGLEW<br>VSGISWNSGDIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYY<br>CAKGGYDGSYYGMDVWGQGTITVTVSS(SEQ ID NO:22)   | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCASQDISNYLNWYQQKPG<br>KAPKLLIYDASNLETVPSRFGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAT<br>YYCQQVLDLPLTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:26)     |
| ADI-26<br>869            | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYVWGWIRQPPGKGLEW<br>IGSIYSGSTYYNPSSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCAR<br>VRTWDAAFDIWGQGTMTVTVSS(SEQ ID NO:23)  | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCASQDISNYLNWYQQKPG<br>KAPKLLIYDASNLETVPSRFGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAT<br>YYCQQVHALPPWTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:27)    |
| ADI-31<br>851            | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSPDYVWGWIRQPPGKGLEW<br>IGSIYSGYTYYNPSSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCAR<br>VRTWDQSFDIWGQGTMTVTVSS(SEQ ID NO:24) | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCAGQDISNYLNWYQQKPG<br>KAPKLLIYDASNLETVPSRFGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAT<br>YYCQQVLELPPWTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:28)    |
| ADI-31<br>853            | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIYSESYYWGWIRQPPGKGLEW<br>IGSIYSGYTYYNPSSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYYCAR<br>VRTWDAAFDIWGQGTMTVTVSS(SEQ ID NO:25) | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCASQDISNYLNWYQQKPG<br>KAPKLLIYDASNLETVPSRFGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAT<br>YYCQQVLELPPWTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:29)    |
| HZ326<br>6-IgG1<br>N297A | EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIETVYHWVQAPGQGLEWI<br>GRIDPANDDTKYAPKFGQRAITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYC<br>GRGLGRWFAYWGQGTITVTVSS(SEQ ID NO:57)       | GIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVINA VAWYQQKPG<br>QSPKLLIYSASNRYTGVPDFRFGSGSGTDFTLTISSLQAECLA<br>VYYCQQHYSPPLTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:58) |

表 3：本發明示例性抗體的重鏈和輕鏈序列

| 抗體名稱        | 重鏈(HC)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 輕鏈(LC)                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AD 1-26 789 | EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTEDDYAMHWVRQAPGKGL<br>EWVSGISWNSGDIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRADDT<br>ALYYCAKGGYDGSYYGMDVWGQGTITVVSASTKGPSVFPLAPCS<br>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL<br>YSLSSVTVPSSSLGTKYITCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC<br>PAPEAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK<br>CKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFELYSRLTVDKS<br>RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK(SEQ ID NO:30)  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLL<br>IYDASNLETGVPSRFGSGSGTDFTFTISLQPEDIAITYYCQQVLDLPL<br>TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA<br>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHK<br>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:34)  |
| AD 1-26 869 | QLQLQESGPGLVKPSSETLSLICTVSGGSISSDYWGWIRQPPGKGL<br>EWIGSIYYSGSTYYNPSSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTVAADTA VY<br>YCARVRTWDAAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES<br>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV<br>VTVPSSSLGTKYITCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAA<br>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG<br>VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNK<br>GLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFELYSRLTVDKSRWQEG<br>NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK(SEQ ID NO:31) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLL<br>IYDASNLETGVPSRFGSGSGTDFTFTISLQPEDIAITYYCQQVHALPP<br>WTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR<br>EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEK<br>HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:35) |
| AD 1-31 851 | QLQLQESGPGLVKPSSETLSLICTVSGGSISSPDYYWGWIRQPPGKGL<br>EWIGSIYYSGYTYNPSSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTVAADTA V<br>YYCARVRTWDQSFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQAGQDISNYLNWYQQKPGKAPKLL<br>IYDASNLETGVPSRFGSGSGTDFTFTISLQPEDIAITYYCQQVLELPP<br>WTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR                                                                                             |

|                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                  | STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEA<br>AGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br>KGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ<br>EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG(SEQ ID NO:32)                                                                                                                                                        | EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEK<br>HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:36)                                                                                                                                                           |
| AD<br>I-31<br>853                | QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIYSESYYWGWIRQPPGKGL<br>EWIGSIVYSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSTVAADTAV<br>YYCARVRTWDAAFDIWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRTSE<br>STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEA<br>AGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br>KGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ<br>EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG(SEQ ID NO:33) | DIQMTQSPSSLSASVGRDRTITTCQASQDSINYLNWYQQKPGKAPKLL<br>IYDASNLETGVPSRPSGSGGTDFITFISSLPEDIAITYYCCQVLELPP<br>WTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPR<br>EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEK<br>HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:37) |
| HZ3<br>266-<br>IgG<br>1N2<br>97A | EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTASGFNIEDTYIHVVQAPGQGLEWIGRIDP<br>ANDDTKYAPKFKQGRATITADTSTDTAYMELSSLRSEDTA VYCGRGLGRWFA<br>YWGQGTLVTVSSASTKGPSVHFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNWNHKSNTKVD<br>KKVEPKSCDKTHITCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br>EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG<br>FPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVPS<br>CSVMMEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:59)    | GIVMTQSPDLSAVSLGERATNCKASQDVINAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASN<br>RYTGVDPDRFSGSGGTDFLTITSSLSQAEDLAVYYCQHHYSPPLTFGGGTKEIK<br>RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ<br>ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<br>(SEQ ID NO:60)  |

表 4:編碼本發明示例性抗體的重鏈可變區和輕鏈可變區的核苷酸序列

| 抗體名稱 | VH DNA                                         | VL DNA                                         |
|------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| A    | GAGGTGCAGCTGGTGAGAGCGGAGGCGGACTGTGTGACGCCTGG   | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGG |
| D    | CAGAAAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCGA  | GGCGATAGGGTGACCATCACCTGCCAGGCCAGCCAGGACATCAG   |
| I-26 | CGACTACGCCATGCACTGGGTGAGACAGGCCCTTGGCAAAGGCTT  | CAACTACCTGAACCTGGTACCAGCAGAGAACCCGGCAAGGCCCCCA |
| 78   | GGAGTGGGTGAGCGGCATCAGCTGGAATAGCGGCGACATCGGCT   | AGCTGCTGATCTACGACGCCAGCAACCTGGAGACCGGGGTGCCTA  |
| 9    | AGCCGACAGCGGTGAAGGCCAGGTTCAACCATCAGCAGGGACAAC  | GCAGATTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACAGACITTCACCTTCACCA |
|      | GCCAAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGAGGCCGAG | TCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGC  |
|      | GACACGCCCTGTACTACTGCGCCAAAGGCGGCTACGACGGCAGC   | AGGTGCTGGACCTGCCCTTACCTTTGGCGGGCACCAAGGTGG     |
|      | TACTACGGCATGGACGTGTGGGCCAGGGCAOCCACCGTGACAGTG  | AGATCAAG(SEQ ID NO:42)                         |
|      | AGCAGC(SEQ ID NO:38)                           |                                                |
| A    | CAGCTGCAGCTGCAGGAGAGCGGACCTGGCCTGGTGAAGCCCAG   | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGG |
| D    | CGAGACCTTGAGCCTGACCTGCACAGTGTCCGGCGGCAGCATCAG  | GGCGATAGGGTGACCATCACCTGCCAGGCCAGCCAGGACATCAG   |
| I-26 | CAGCAGGACTACTACTGGGGCTGGATCAGACAGCCCCCGGAA     | CAACTACCTGAACCTGGTACCAGCAGAGAACCCGGCAAGGCCCCCA |
| 86   | AGGCCCTGGAGTGGATCGGCAGCATCTACTACAGCGGCAGCACCT  | AGCTGCTGATCTACGACCGCAGCAACCTGGAGACCGGGGTGCCTA  |
| 9    | ACTACAACCCAGCCTGAAGAGCAGGCTGACCATCAGCGTGGAC    | GCAGATTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACAGACTTCACCTTCACCA  |
|      | ACCAGCAAGAACCAAGTTAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGC   | TCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGC  |
|      | CGCGACACAGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGTGAGGACCTGGGA   | AGGTGCAAGCCCTGCCTCCCTGGACCTTTGGCGGGCACCAAGG    |
|      | CGCCGCCTTCGACATCTGGGACAGGGCACCATGTGTGACAGTGAG  | TGGAGATCAAG(SEQ ID NO:43)                      |
|      | CAGC(SEQ ID NO:39)                             |                                                |

|    |                                                 |                                               |
|----|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| A  | CAGCTGCAGCTGCAGGAAAGCGGACCAGGACTGGTGAAACCTAG    | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTG |
| D  | CGAGACCCCTGAGCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGAGGCAGCATCAG | GGAGATAGAGTGACCATCACTTGCCAGGCCGGCCAGGACATCAG  |
| I- | CTCCCCGACTACTATTGGGGTTGGATCCGGCAGCCACAGGAAA     | CAACTACTGTAAATTGTACAGACAAGCCCCGGCAAGGCCCTAA   |
| 31 | GGGCTGGAGTGGATTGGCAGCATCGTGTACAGCGGCTACACCTA    | GCTGCTGATCTACGACGCTCTAATCTGAGACCCGGGTGCCTAG   |
| 85 | CTACAAACCCAGCCTGAAGAGCCCGGTGACAATCAGCGTGGACAC   | CAGATTACGCGGAAGCGGACGCGGCACAGATTTACCTTCACCAT  |
| I  | CAGCAAGAACCCAGTTCAGCCTGAAGCTGTCTTCAGTGACAGCCGC  | CAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTATTGCCAGCA |
|    | CGACACCGCAGTGTACTATTGGGCCAGGGTGGGACTTTGGGACCA   | GGTGTGGAGCTGCTCCTTGGACATTCGGAGGAGGAACAAGGT    |
|    | GAGCTTCGACATTTGGGGCAGGGCACCAATGGTGACAGTGAGCA    | GGAGATCAAG(SEQ ID NO:44)                      |
|    | GC(SEQ ID NO:40)                                |                                               |
| A  | CAGCTGCAGCTGCAGGAATCAGGACCAAGGACTGGTGAAGCCTAG   | GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTG |
| D  | CGAGACACTGAGCCCTGACCTGTACCGTCCGGAGGCAGCATCTA    | GGAGATAGAGTGACCATCACTTGCCAGGCCAGCCAGGACATCAG  |
| I- | CAGCGAGAGCTACTATTGGGGTTGGATCCGGCAGCCACCCAGGA    | CAACTACCTGAATTGTGTACAGACAAGCCCCGGCAAGGCCCTAA  |
| 31 | AGGGCCTGGAGTGGATTGGCAGCATCGTGTACAGCGGCTACACCT   | GCTGCTGATCTACGACGCTCTAATCTGAGACCCGGGTGCCTAG   |
| 85 | ACTACAACCCAGCCTGAAGAGCCCGGTGACAATCAGCGTGGAC     | CAGATTACGCGGAAGCGGACGCGGCACAGATTTACCTTCACCAT  |
| 3  | ACCAAGCAAGAACCCAGTTCAGCCTGAAGCTGTCTTCAGTGACAGCC | CAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTATTGCCAGCA |
|    | GCCGACACCCGAGTGTACTATTGGGCCAGGGTGGGACTTTGGGAC   | GGTGTGGAGCTGCCCTCCTTGGACATTCGGAGGAGGAACAAGGT  |
|    | GCCGCCCTTGACATTTGGGGCCAGGGCACCAATGGTGACAGTGAGC  | GGAGATCAAG(SEQ ID NO:45)                      |
|    | AGC(SEQ ID NO:41)                               |                                               |

表 5：示例性的重鏈恆定區和輕鏈恆定區

| 重鏈恆定區(IgG4)                                                         | 輕鏈恆定區( $\kappa$ 輕鏈)                |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| ASTTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP |
| SSVVTVPSSSLGTTKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLPPPKPKDT | REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY   |
| LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVGVHNAAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD      | SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT  |
| WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI   | KSFNRGEC(SEQ ID NO:47)             |
| AWEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKS      |                                    |
| LSLSLGK(SEQ ID NO:46)                                               |                                    |

本發明的這些以及其它方面和實施方案在圖式(圖式簡單說明緊隨其後)和以下的發明詳述中得到描述並且示例於以下實施例中。上文以及整個本申請中所論述的任何或所有特徵可以在本發明的各種實施方案中組合。以下實施例進一步說明本發明，然而，應理解實施例以說明而非限定的方式來描述，並且本領域技術人員可以進行多種修改。

## 實施例

### 實施例 1. 酵母展示技術篩選抗 LAG-3 全人源抗體

基於酵母的抗體展示 (yeast-based antibody presentation) 文庫，按照現有的方法 (WO2009036379；WO2010105256；WO2012009568) 進行擴增，其中每個庫的多樣性達到  $1 \times 10^9$ 。簡言之，前兩輪的篩選使用 Miltenyi 公司的 MACS 系統進行磁性激活細胞分選。首先，將文庫的酵母細胞 ( $\sim 1 \times 10^{10}$  細胞/文庫) 分別在 FACS 洗滌緩衝液中 (磷酸鹽緩衝液，含有 0.1% 牛血清蛋白) 室溫孵化 15 分鐘，緩衝液中含有 100 nM 生物素標記的人 LAG-3 抗原 (ArcoBiosystems)。使用 50 ml 預冷的 FACS 洗滌緩衝液洗一次，再用 40 ml 相同洗滌緩衝液重懸細胞，並加入 500  $\mu$ l 鏈黴素微珠 (Miltenyi LS) 於 4 °C 孵化 15 分鐘。1000 rpm 離心 5 min 棄去上清後用 5 ml FACS 洗滌緩衝液重懸細胞，將細胞溶液加到 Miltenyi LS 柱中。加樣完成後，用 FACS 洗滌緩衝液洗柱 3 次，每次 3 ml。從磁性區域取下 Miltenyi LS 柱，用 5 ml 生長培養基洗脫，收集洗脫的酵母細胞並

在 37°C 過夜生長。

使用流式細胞儀進行下一輪的分選：將經過 MACS 系統篩選獲得的大約  $1 \times 10^8$  的酵母細胞用 FACS 緩衝液洗三次，於含有低濃度生物素(100-1 nM)標記的人 LAG-3 抗原中室溫下培養。棄去培養液，細胞用 FACS 洗滌緩衝液洗兩次之後，將細胞與 LC-FITC (FITC 標記山羊抗人免疫球蛋白 F(ab')kappa 鏈抗體, Southern Biotech)(1:100 稀釋)混合，並與 SA-633(鏈黴親和素 -633, Molecular Probes)(1:500 稀釋)或 SA-PE(鏈黴親和素 -藻紅蛋白, Sigma)(1:50 稀釋)試劑混合，4°C 下培養 15 分鐘。用預冷的 FACS 洗滌緩衝液洗脫兩次，並重懸於 0.4 ml 緩衝液中，將細胞轉移到帶濾器的分離管中。使用 FACS ARIA(BD Biosciences)分選細胞。

將藉由篩選獲得的表達抗人 LAG-3 抗體的酵母細胞在 30°C 下震盪誘導 48 小時以表達抗人 LAG-3 的抗體。誘導結束之後，1300 rpm 離心 10 min 去除酵母細胞，收穫上清液。使用 Protein A 對上清液中的抗人 LAG-3 抗體進行純化，pH2.0 醋酸溶液洗脫，收穫抗人 LAG-3 抗體，抗體純度 > 95%。

本次篩選獲得抗體 ADI-26789 及抗體 ADI-26869。

## 實施例 2 抗人 LAG-3 抗體的親和力優化

為了獲得更高親和力的抗人 LAG-3 抗體，我們藉由以下方法對抗體 ADI-26789 及 ADI-26869 進行了優化。

### *VHmut* 篩選

該方法是藉由常規的錯配 PCR 的方法向抗體重鏈區域引入突變。PCR 過程中，藉由使用 1 $\mu$ M 高突變的鹼基類似物 dPTP 和 8-oxo-dGTP，從而將鹼基錯配概率提高至約 0.01 bp。

獲得的錯配 PCR 的產物藉由同源重組的方法構建入含有重鏈恆定區的載體中。藉由這種方法，在包括 LAG-3 抗原滴度、未標記抗原競爭以及使用母抗體競爭的篩選壓力下，我們獲得了庫容量為  $1 \times 10^7$  的次級庫。藉由 FACS 方法進行了 3 輪成功篩選。

### *CDRH1/CDRH2* 篩選

把 VHmut 方法獲得的子代抗體的 CDRH3 基因構建入  $1 \times 10^8$  多樣性的 CDRH1/CDRH2 基因庫中，並對其進行了 3 輪篩選。第一輪使用 MACS 方法，而第二、三輪使用 FACS 方法，對抗體抗原結合物進行親和力加壓，篩選出最高親和力的抗體。

經過以上親和力成熟過程，我們獲得了親和力提高的抗人 LAG-3 單株抗體 ADI-31851 和 ADI-31853。

### 實施例 3. HEK293 細胞中的表達和純化

本發明示例的 4 個抗體 (ADI-26789，ADI-26869，ADI-31851，ADI-31853) 的 CDR 區、輕鏈可變區和重鏈可變區、輕鏈和重鏈的胺基酸序列，以及對應的核酸序列以及編號在本申請的“表 1-4”部分列出。

根據本領域常規方法，將編碼各條抗 LAG-3 抗體的輕鏈胺基酸序列和重鏈胺基酸序列的 cDNA 分別選殖到表達載體 pTT5 中。

將含有目標抗體基因的上述表達載體與轉染試劑 PEI(Polysciences)按照生產產商提供的方案瞬時轉染培養的人腎胚細胞 293 細胞(Invitrogen)，轉染後，棄去培養基並用新鮮的 EXPI293 培養基(Gibco)把細胞稀釋到  $4 \times 10^6/\text{ml}$ 。在  $37^{\circ}\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  的條件下培養細胞 7 天，每 48 小時流加新鮮培養基。7 天後，1300rpm 離心 20min。取上清液，用 Protein A 純化上清液，使抗體的純度  $> 95\%$ 。

在 HEK293 細胞中還表達並且純化實施例中使用的下述對照抗體：

|        |
|--------|
| 對照抗體   |
| 25F7   |
| BAP050 |

其中 25F7 是在 HEK293 細胞中瞬時表達的人 LAG-3 抗體，其序列與美國專利 US20170137514A1 中的抗體“25F7”的序列相同。BAP050 是在 HEK293 細胞中瞬時表達的抗人 LAG-3 抗體，其序列與美國專利 WO2015/138920A1 中的抗體“BAP050”的序列相同。

**實施例 4：本發明抗 LAG-3 抗體的親和力測定**

採用生物光干涉測量(ForteBio)測定法測定本發明上述 4 個示例抗體結合人 LAG-3(hLAG-3)的平衡解離常數(KD)。

ForteBio 親和力測定按照現有的方法(Estep, P 等人 , High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): p. 270-8)進行。簡言之，傳感器在分析緩衝液中線下平衡 30 分鐘，然後線上檢測 60 秒建立基線，在線加載如上該獲得的經純化的抗體至 AHQ 傳感器(ForteBio)上進行 ForteBio 親和測量。再將具有加載的抗體的傳感器暴露於 100 nM 的人 LAG-3 抗原(ArcoBiosystems)中作用 5 分鐘，之後將傳感器轉移至分析緩衝液解離 5 分鐘用於解離速率測量。使用 1:1 結合模型進行動力學的分析。

在如以上測定法該進行的實驗中，ADI-26789、ADI-26869、ADI-31851、ADI-31853 以及對照抗體 25F7 和 BAP050 親和力如表 6 所示。

表 6：藉由生物光干涉測量本發明抗體的結合動力學

| 抗體        | 抗體在 AHQ 尖端上，人 LAG-3-His 在溶液中(100 nM) [單價的親和力，平衡解離常數 $K_D(M)$ ] | 結合常數 ( $M^{-1}S^{-1}$ ) | 解離常數 ( $S^{-1}$ ) |
|-----------|----------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------|
| ADI-26789 | 1.83E-08                                                       | 2.12E+05                | 3.89E-03          |
| ADI-26869 | 7.88E-09                                                       | 4.88E+05                | 3.85E-03          |
| ADI-31851 | 6.06E-10                                                       | 3.30E+05                | 2.00E-04          |
| ADI-31853 | 6.22E-10                                                       | 3.22E+05                | 2.00E-04          |
| 25F7      | 9.02E-09                                                       | 1.12E+05                | 1.01E-03          |
| BAP050    | 8.44E-10                                                       | 2.37E+05                | 2.00E-04          |

可見，本發明上述 4 個示例抗體均顯示極高的親和力，其中 ADI-31851 和 ADI-31853 具有比 25F7 更高、和 BAP050 相似的親和力。

### **實施例 5：本發明抗 LAG-3 抗體與人 LAG-3 的結合**

在基於流式細胞術的測定法中測量本發明的上述 4 個示例抗體與人 LAG-3 的結合。

藉由將攜帶純株至多選殖位點 MCS 的人 LAG-3 cDNA(Sino Biological)的 pCHO1.0 載體(Invitrogen)轉染至人腎胚細胞 293 細胞(Invitrogen)，產生過度表達人 LAG-3 的 293 細胞(293-hLAG-3 細胞)。

將 293-hLAG-3 細胞( $0.2 \times 10^6$  個細胞)與不同濃度的如上該製備的實驗抗體(ADI-26789、ADI-26869 及對照抗體 25F7)混合(抗體稀釋方法為：最高抗體濃度為 500 nM，三倍稀釋在含 0.1%牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 中，總共測試了 8 個濃度)。冰上孵育 30 分鐘。然後將細胞洗滌至少兩次，加入 1:100 稀釋的二抗(PE 標記的羊抗人 IgG 抗體，SouthernBiotech，終濃度為 5 $\mu$ g/ml)，冰上(避光)孵育 30 分鐘。將細胞洗滌至少兩次並藉由流式細胞術進行分析。在 Accuri C6 系統(BD Biosciences)上進行流式細胞術檢測，並根據其 MFI 用 GraphPad 擬合濃度依賴的曲線。

在如以上測試法所述進行的實驗中，ADI-26789 和 ADI-26869 結合 HEK293 細胞上過度表達的 hLAG-3，EC50 值分別為 2.137 nM 和 2.909 nM，優於對照抗體 25F9

與 HEK293 細胞上過度表達的 hLAG-3 的結合能力(對照抗體 25F9 的 EC50 值為 3.339 nM)(參見第 1 圖)。

親和力優化的抗 hLAG-3 抗體 ADI-31851 和 ADI-31853 結合 HEK293 細胞上過度表達的 hLAG-3，EC50 值分別為 0.501 nM 和 0.4332nM，優於對照抗體 25F7 和 BAP050 與 HEK293 細胞上過表達的 hLAG-3 的結合能力(EC50 值分別為 2.593 nM 和 1.409 nM)。(參見第 2 圖)

#### **實施例 6. 本發明抗 LAG-3 抗體對人 LAG-3 配體 MHC II 與 LAG-3 相互作用的阻斷**

藉由流式細胞術測量 ADI-31851、ADI-31853 阻斷人 LAG-3 與細胞表面的 MHC II(HLA)結合的能力。

將具有如下該序列的 HLA-DR- $\alpha$  和 HLA-DR $\beta$ 1 兩段 DNA 同時構建到 pCHO1.0 載體(Invitrogen)中，轉染到 CHO-S 細胞(Invitrogen, ExpiCHO™ Expression System Kit, 貨號: A29133)中產生表面過度表達人 HLA-DR 的 CHO 細胞(CHO-DR 細胞)。

##### **HLA-DR $\beta$ 1**

```
atggtgtgtctgaagctccctggaggctcctgcatgacagcgctgacagtgacact
gatggtgctgagctccccactggctttgtctggggacacccgaccacgtttcctgtg
gcagcctaagagggagtgatcatttcttcaatgggacggagcgggtgcggttcctgg
acagatacttctataaccaggaggagtgccgtgcgcttcgacagcgacgtggggga
gttcggggcggtgacggagctggggcggcctgacgctgagtactggaacagcca
gaaggacatcctggagcaggcgcgggccgcggtggacacctactgcagacacaa
ctacgggggttggtggagagcttcacagtgcagcggcgagtgccaacctaaggtgact
```

gtatatccttcaaagaccagccctgcagcaccacaacctcctgggtctgctctgtg  
 agtggttttctatccaggcagcattgaagtcagggtgggttcctgaacggccaggaaga  
 gaaggctgggatgggtgtccacaggcctgatccagaatggagactggaccttcag  
 acctgggtgatgctggaaacagttcctcgaagtggagagggttacacctgccaagt  
 ggagcaccceaagcgtgacaagccctctcacagtggaatggagagcacgggtctgaa  
 tctgcacagagcaagatgctgagtgagtcgggggctttgtgctgggcctgctctt  
 ccttgggggccgggctgttcattctacttcaggaatcagaaaggacactctggacttca  
 gccaacaggattcctgagctga(SEQ ID NO:49)

# HLA-DR-N

atggccataagtggagtcctgtgctaggatcttcatcatagctgtgctgatgagcg  
 ctgaggaatcatgggctatcaaagaagaacatgtgatcatccaggccgagttctatc  
 tgaatcctgaccaatcaggcgagtttatgtttgactttgatgggtgatgagattttccat  
 gtggatatggcaaagaaggagacgggtctggcggcttgaagaatttggaacgatttgc  
 cagctttgaggctcaagggtgcattggccaacatagctgtggacaaagccaacctgg  
 aaatcatgacaaagcgtccaactatactccgatcaccaatgtacctccagaggtaa  
 ctgtgctcaciaaacagccctgtggaactgagagagcccaacgtcctcatctgtttca  
 tagacaagttcaccccaccagtgggtcaatgtcacgtggcttcgaaatggaaaacct  
 gtcaccacaggagtggtcagagacagttcttctgcccagggaagaccaccttttcg  
 caagttccactatctcccccttctgcccactgaggacgtttacgactgcagggt  
 ggagcactgggggcttggatgagcctcttctcaagcactgggagtttgatgctcaa  
 gccctctcccagagactacagagaacgtgggtgtgtgccctgggcctgactgtgggt  
 ctgggtgggcatcattattgggaccattctcatcatcaagggttgcgcaaaagcaat  
 gcagcagaacgcagggggcctctgtaa (SEQ ID NO:50)

將抗原 rhLAG3 蛋白(huFc)(Sino Biological)稀釋至 40 nM，50  $\mu$ l/孔。將如上所述製備的抗體(ADI-31851、ADI-31853 和對照抗體 25F9)從最高濃度 80 nM 開始進行 3 倍梯度稀釋，共 8 個稀釋梯度，50  $\mu$ l/孔，於 PBS 冰上孵育 30 min，抗原終濃度 20 nM，抗體最高終濃度 40 nM。將 CHO-DR 細胞調節至  $3 \times 10^5$  細胞/孔，100  $\mu$ l/孔。細胞於 300 g 離心 5 min，棄上清，重懸於抗原抗體混合液。冰上孵育 30 min，加 PBS 100  $\mu$ l/孔，300 g 離心 5 min，PBS 清洗 1 次，加 1:100 稀釋的 100  $\mu$ l 山羊抗人 IgG-PE (SouthernBiotech)/孔，冰浴 20 min，加 PBS 100  $\mu$ l/孔，300 g 離心 5 min，PBS 清洗 1 次。用 100  $\mu$ l PBS 重懸，細胞流式儀(BD Biosciences)檢測細胞螢光信號值。

實驗結果表明，ADI-31851 和 ADI-31853 均可以有效阻斷 LAG-3 和其配體 MHC II(HLA-DR)的結合，其阻斷能力和對照抗體 25F9 一致。具體而言，ADI-31851 和 ADI-31853 阻斷人 LAG-3 與 MHC II(HLA-DR)的結合的 IC50 分別為 5.85 nM 和 4.533 nM。對照抗體 25F9 阻斷人 LAG-3 與 MHCII(HLA-DR)的結合的 IC50 為 5.14 nM。(參見第 3 圖)。

#### 實施例 7. 抗體與激活的 T 細胞結合實驗

人 CD4<sup>+</sup> T 細胞被激活後其表面會表達 LAG-3 蛋白，本研究藉由流式細胞術測量 ADI-31851、ADI-31853 和激活的人 CD4<sup>+</sup> T 細胞的結合能力。

PBMC 分離：取捐贈者新鮮血液 50 ml，添加 2.5 倍 PBS，輕輕加入到 Ficoll(Thermo)，分 4 管，每管 12.5 ml，400 g，30 min 離心，0 減速度停止。吸取中間白色條帶至 PBS 中，PBS 洗 2 次。

CD4<sup>+</sup>T 細胞分離：按照 ‘Untouched CD4<sup>+</sup> T cell isolation’ 試劑盒 (11346D, Invitrogen) 說明書，利用該試劑盒進行操作。PBMC 靜置培養 2 h，吸取懸浮的細胞液至 15 ml 離心管中，200 g 離心 10 min，沉澱加入 500  $\mu$ l 分離液、100  $\mu$ l AB 型血清、100  $\mu$ l 純化抗體重懸，4 $^{\circ}$ C 孵育 20 min，用分離液清洗一次，再加入 500  $\mu$ l Bead Buffer (Invitrogen) 孵育 15 min，磁場去除 Bead，T 細胞培養基洗一次，使用 8 ml 培養基重懸，37 $^{\circ}$ C、6% CO<sub>2</sub> 培養。

按照磁珠：CD4<sup>+</sup>T 細胞=1:1 的比例向 CD4<sup>+</sup>T 細胞中加入抗 CD3/CD28 磁珠(Gibco)刺激 3 天，調節細胞密度至  $1 \times 10^6$  個/ml，分裝第一孔 150  $\mu$ l/孔，其他孔 100  $\mu$ l/孔，第一列孔中分別加如上所述製備的抗體 ADI-31851 和 ADI-31853 和對照抗體 25F7，終濃度 10 nM，混勻，吸取 50  $\mu$ l 入下一列孔，以此類推。每個樣品做 3 個複孔。冰浴 30 min，400 g 離心 5 min，PBS 清洗 2 次，添加 1:100 稀釋的 PE-抗人 Fc 抗體(SouthernBiotech)50  $\mu$ l，冰浴 30 min，400 g 離心 5 min，PBS 清洗 2 次，用 60  $\mu$ l PBS 重懸，藉由流式細胞術進行分析。在 Accuri C6 系統(BD Biosciences)上進行流式細胞術，並根據其 MFI 用 GraphPad 擬合濃度依賴的曲線。

實驗結果表明，ADI-31851 和 ADI-31853 能和激活的人 CD4<sup>+</sup>T 細胞結合，EC50 值分別為 0.013 nM 和 0.011 nM，結合能力優於對照抗體 25F7(對照抗體的 EC50 值為 0.036 nM)(參見第 4 圖 4=)。

### 實施例 8：本發明抗 LAG-3 抗體與小鼠 LAG-3 的結合

在基於流式細胞術的測定法中測量本發明的 2 個示例抗體 ADI-31851 及 ADI-31853 與小鼠 LAG-3 的結合。

藉由轉染攜帶純株至多選殖位點的小鼠 LAG-3 cDNA(Sino Biological)的 pCHO1.0 載體(Invitrogen)至 CHO-S 細胞(Invitrogen, ExpiCHO™ Expression System Kit, 貨號：A29133)，產生過度表達小鼠 LAG-3 的 CHO 細胞(CHO-mLAG-3 細胞)。

將 CHO-mLAG-3 細胞( $0.2 \times 10^6$  個細胞)與不同濃度的如上所述製備的實驗抗體(ADI-31851、ADI-31853 及對照抗體 25F7 和 BAP050)混合(抗體稀釋方法為：最高抗體濃度為 500 nM，三倍稀釋在含 0.1% 牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 中，總共測試了 8 個濃度)。冰上孵育 30 分鐘。然後將細胞洗滌至少兩次，加入 1:100 稀釋的二抗(PE 標記的羊抗人 IgG 抗體，SouthernBiotech，終濃度為 5 µg/ml)，冰上(避光)孵育 30 分鐘。將細胞洗滌至少兩次並藉由流式細胞術進行分析。在 Accuri C6 系統(BD Biosciences)上進行流式細胞術檢測，並根據其 MFI 用 GraphPad 擬合濃度依

賴的曲線。

在如以上測試法所述進行的實驗中，親和力優化的抗 hLAG-3 抗體 ADI-31851 和 ADI-31853 能結合 CHO 細胞上過度表達的小鼠 LAG-3，其中 ADI31853 結合能力較好 ( $EC_{50}=42.33$  nM)，ADI-31851 結合能力較弱。而對照抗體 25F7 和 BAP050 均不能和 CHO 細胞上過度表達的小鼠 LAG-3 結合。(參見第 5 圖)

### 實施例 9. 本發明抗 LAG-3 抗體的抗腫瘤活性

本研究利用 CT26 移植瘤小鼠模型研究了抗人 LAG-3 抗體 ADI-31853 單獨使用或和抗鼠 PD-1 抗體“Antibody C”(WO2017/133540)聯合使用的抗腫瘤活性。

小鼠：

雌性 BALB/c 小鼠(約 8 週大)購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。小鼠在到達後馴化 7 天，隨後開始研究。

細胞

小鼠結腸癌細胞 CT26(ATCC# CRL-2638)購自 ATCC，並嚴格按照 ATCC 要求進行常規傳代培養用於後續體內實驗。離心收集細胞，在無菌 PBS 中重懸細胞並調整細胞密度為  $5 \times 10^6$  個/ml。在第 0 天取 0.2 ml 細胞懸液皮下接種至 BALB/c 小鼠(北京維通利華實驗動物技術有限公司)右側腹部區域中來建立荷瘤小鼠模型。

給藥

將小鼠分為四組(每組 8 隻小鼠)，每組分別皮下注射如下劑量的抗體：

- (1) 小鼠 IgG(equitech-Bio)，10mg/kg；
- (2) PD-1(Antibody C)，1mg/kg；
- (3) LAG-3(ADI-31853)，10mg/kg；
- (4) LAG-3(ADI-31853)，10mg/kg PBS+PD-1(Antibody C)，1mg/kg。

#### 試劑注射

接種後第 7 天，將符合實驗要求的小鼠隨機分組，每組 8 隻。分別用如上四組試劑在第 7 天、第 10 天、第 14 天和第 17 天為每組小鼠按如上劑量給藥。

#### 分析

在整個研究期間每週測量兩次腫瘤和體重，當腫瘤達到端點時(腫瘤體積 $>2500\text{ mm}^3$ )或當小鼠具有 $>20\%$ 體重減輕時，使小鼠安樂死。採用遊標卡尺測定腫瘤的最大長軸(L)和最大寬軸(W)，腫瘤體積按如下公式計算： $V=L\times W^2/2$ 。將來自每組的小鼠的腫瘤尺寸與時間作圖。使用方差分析(ANOVA)來確定統計顯著性。 $<0.05$ 的P值被視為在所有分析中具有統計顯著性，該分析是用 Prism 5 統計軟件(GraphPad 軟件)執行。

實驗結果見第 6 圖，可見本申請的抗 LAG-3 單株抗體 ADI-31853 和抗 PD-1 單株抗體“Antibody C”聯合使用時與 IgG 對照(equitech-Bio)及這兩個抗體分別使用相比，能顯著抑制腫瘤的生長。

## 實施例 10. 本發明抗 LAG-3 抗體與其他抗體聯用的抗腫瘤活性

本研究利用人源化小鼠模型研究了抗人 LAG-3 抗體 ADI-31853 和抗 PD-1 抗體 “Antibody D”(IBI308 , WO2017/025016)或抗 PD-L1 抗體 (HZ3266-IgG1N297A) 聯合使用的抗腫瘤活性。

本研究採用 A375 (ATCC) 人的皮膚癌細胞在 NOG 小鼠上測定抗 LAG-3 抗體的抗腫瘤作用。預先靜脈注射人的 PBMC ( $2 \times 10^6$  個細胞/小鼠) (AllCells), 然後採用皮下接種的方式建立 A375 荷瘤小鼠模型(NOG 模型), 成瘤後分組, 給予不同抗體的治療, 監測給藥期間各組小鼠腫瘤體積和體重變化, 給藥頻率為 2 次/週, 給藥 2 周, 共給藥 5 次。監測頻率均為 2 次/週, 連續監測 4 週, 給藥劑量和方式如表 2。給藥結束後計算相對腫瘤抑制率 (TGI%)。

抗 PD-L1 抗體 (HZ3266-IgG1N297A)

根據本領域常規方法, 將編碼抗 PD-L1 抗體 HZ3266-IgG1N297A 的輕鏈氨基酸序列和重鏈氨基酸序列 (表 3) 的 cDNA 分別克隆到表達載體 pMD20-T 載體 (Clontech), 獲取質粒用於轉染。

根據所需轉染體積傳代 293F 細胞 (Invitrogen), 轉染前一天將細胞密度調整至  $1.5 \times 10^6$  個細胞/ml。轉染當天細胞密度約為  $3 \times 10^6$  個細胞/ml。取終體積 1/10 的 F17 培養基 (Gibco, A13835-01) 作為轉染緩衝液, 加入適當的質

粒，混勻。加合適的聚乙炔亞胺(PEI)( Polysciences, 23966)到質粒中(質粒與 PEI 的比例在 293F 細胞中為 1:3)，混勻後室溫孵育 10 min，獲得 DNA/PEI 混合物。用 DNA/PEI 混合物重懸細胞後，36.5℃，8%的 CO<sub>2</sub>。24 h 後補加轉染體積 2%的 FEED (Sigma)，於 36.5℃，120 rpm，8%的 CO<sub>2</sub> 條件下培養。連續培養至第 6 天或者細胞活力≤60%時，收集細胞上清進行純化。

將純化使用的重力柱使用 0.5 M NaOH 過夜處理，玻璃瓶等用蒸餾水洗淨後在 180℃ 4 h 乾烤，獲得純化柱。純化前將收集的培養基 4500 rpm 離心 30 min，棄掉細胞。再將上清使用 0.22 μl 的濾器過濾。每管裝填 1 ml Protein A，並使用 10 ml 結合緩衝液（磷酸鈉 20mM, NaCl 150mM, PH7.0）平衡。將過濾後的上清加入純化柱後使用 15 ml 結合緩衝液再平衡。加 5 ml 洗脫緩衝液(檸檬酸+檸檬酸鈉 0.1M, PH3.5)，收集洗脫液，每 1 ml 的洗脫液加入 80 μl Tris-HCl。將收集的抗體超濾濃縮交換到 PBS (Gibco, 70011-044) 中，並檢測濃度。

採用生物光干涉測定法(ForteBio)測定抗 PD-L1 抗體 (HZ3266-IgG1N297A) 結合人 PD-L1 的平衡解離常數 (KD)。ForteBio 親和力測定按照現有的方法 (Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): 第 270-8 頁) 進行。

實驗開始前半個小時，根據樣品數量，取合適數量的

AMQ (Pall, 1506091) (用於樣品檢測) 或 AHQ (Pall, 1502051) (用於陽性對照檢測) 傳感器浸泡於 SD buffer (PBS 1×, BSA 0.1%, Tween-20 0.05%) 中。

取 100  $\mu$ l 的 SD 緩衝液、抗體、抗原 (包括人 PD-L1 均自 Acrobiosystems 購買) 分別加入到 96 孔黑色聚苯乙烯半量微孔板 (Greiner, 675076) 中。根據樣品位置布板, 選擇傳感器位置。儀器設置參數如下: 運行步驟: Baseline、Loading ~1 nm、Baseline、Association 和 Dissociation; 各個步驟運行時間取決於樣品結合和解離速度, 轉速為 400 rpm, 溫度為 30°C。使用 ForteBio 分析軟件分析 KD 值。測得的  $K_D$  值為 0.724nM。

小鼠: NOG 小鼠, 雌性, 7 至 8 週 (腫瘤細胞接種時的小鼠週齡), 體重 17.6 週 24.2g, 購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。小鼠在到達後馴化 7 天, 隨後開始研究。

細胞: 人的皮膚癌細胞 A375(ATCC# CRL-1619)購自 ATCC, 並嚴格按照 ATCC 要求進行常規傳代培養用於後續體內實驗。離心收集細胞, 在無菌 PBS 中重懸細胞並調整細胞密度為  $30 \times 10^6$  個/ml。NOG 小鼠已經靜脈注射了人的 PBMC 後, 右側背部剃毛, 皮下注射 A375 細胞 0.2 ml/只。腫瘤細胞接種 7 天後檢測各隻小鼠瘤體積, 挑選出瘤平均體積在 70 至 71  $\text{mm}^3$  範圍內的小鼠按瘤體積隨機分組。

給藥: 每組分別皮下注射如下劑量的抗體:

(1)人 IgG(equitech-Bio), 20mg/kg;

- (2) PD-1(Antibody D, IBI308), 10mg/kg;
- (3) LAG-3(ADI-31853), 10mg/kg;
- (4) LAG-3(ADI-31853), 10mg/kg+PD-1(Antibody D, IBI308), 10 mg/kg;
- (5) PD-L1 ( HZ3266-IgG1N297A ) , 10mg/kg;
- (6) LAG-3(ADI-31853), 10mg/kg+PD-L1 ( HZ3266-IgG1N297A ) , 10 mg/kg。

接種後第 7 天，將符合瘤平均體積要求的小鼠隨機分組，每組 8 隻。分別用如上六組試劑在第 7 天、第 10 天、第 14 天和第 17 天為每組小鼠按如上劑量給藥。

分析：在整個研究期間每週測量兩次腫瘤和體重，當腫瘤達到端點時或當小鼠具有 > 20% 體重減輕時，使小鼠安樂死。採用遊標卡尺測定腫瘤的最大長軸(L)和最大寬軸(W)，腫瘤體積按如下公式計算： $V=L \times W^2/2$ 。將來自每組的小鼠的腫瘤尺寸與時間作圖。使用方差分析 (ANOVA) 來確定統計顯著性。 < 0.05 的 P 值被視為在所有分析中具有統計顯著性。

實驗結果見第 7A 圖或第 7B 圖，可見本申請的抗 LAG-3 單株抗體 ADI-31853 (31853) 和抗 PD-1 單株抗體 “Antibody D” ( IBI308 ) 或抗 PD-L1 單株抗體 HZ3266-IgG1N297A(HZ3266) 聯合使用時與 IgG 對照 (equitech-Bio)(hIgG)及這兩個抗體分別使用相比，能顯著抑制腫瘤的生長。

## 實施例 11. 抗 LAG-3 抗體與抗 PD-L1 抗體組合對人 CD4<sup>+</sup> T 細胞活化作用研究

本實驗採用人 CD4<sup>+</sup> T 細胞激活法檢測 ADI-31853 對人 T 細胞的激活作用。將 Beads 刺激活化（如實施例 7 所述）的人 CD4<sup>+</sup> T 細胞、成熟 DC 和不同濃度的 ADI-31853、25F7 單獨溶液、PD-L1 抗體（HZ3266-IgG1N297A，如上所述製備）單獨溶液、以及其組合在 96 孔 U 底板中共孵育 3 天。最後檢測上清中的 IL-2 濃度，比較 ADI-31853、25F7 單獨，以及與 PD-L1 抗體（HZ3266-IgG1N297A，如上所述製備）對 T 細胞的激活作用。

### 實驗步驟

#### 準備 DC

從液氮罐中取出人 PBMC 細胞（如實施例 7 所述製備），在 37°C 水浴鍋中迅速解凍，轉移至 20 ml 人 T 細胞培養基（含 1% DNA 酶（Sigma））中，400 g 離心 10 min。用 20 ml 人 T 細胞培養基（1% DNA 酶）重懸至 T75 培養瓶中，37°C、5% CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中培養 24 h。

DC 細胞分離：棄懸浮細胞液，剩下細胞添加 9 ml DC 培養基，培養 2 天後添加 3 ml DC 培養基，再培養第 5 天，然後添加 rTNF $\alpha$  (1000 U/ml)，IL-1 $\beta$  (5 ng/ml)，IL-6 (10 ng/ml) 和 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub>（Tocris）培養 2 天，作為淋巴細胞混合反應（MLR）的 DC 細胞。

其中，T 細胞培養基及 DC 細胞培養基均為 CTS AIM V

SFM，DC 培養基中還額外加入了 1000U/ml IL-4 和 1000U/ml GM-CSF。貨號及批號如下：

| 試劑            | 公司          | 貨號         |
|---------------|-------------|------------|
| CTS AIM V SFM | Gibco       | A3021002   |
| 重組人 GM-CSF    | R&D Systems | 215-GM-010 |
| 重組人 IL-4      | R&D Systems | 204-IL-010 |

### 人 CD4<sup>+</sup> T 細胞純化

從液氮罐中取出人 PBMC 細胞(如實施例 7 所述製備)，在 37℃ 水浴鍋中迅速解凍，然後轉移至如上所述人 T 細胞培養基（1% DNA 酶）中，400 g 離心 10 min。採用如實施例 7 所述的 Untouched CD4<sup>+</sup> T cell isolation 試劑盒分離純化人 CD4<sup>+</sup> T 細胞，並用 Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation 激活人 CD4<sup>+</sup> T 細胞，37℃、5%CO<sub>2</sub> 細胞培養箱中培養三天。

### 上樣

將成熟的 DC 細胞與 CD4<sup>+</sup>細胞混合，每孔體積 200 μl，DC 細胞 10000 個，CD4<sup>+</sup>細胞 100000 個，加入抗體(200 nM，4 倍系列稀釋，SEE (Toxin technology) 1 ng/ml)，DC、CD4<sup>+</sup>細胞、混合細胞作為陰性對照，混合培養 3 天。

所利用的抗體濃度如下：

抗 LAG-3 ADI-31853：200nM 起始，4 倍稀釋，共計 10 個濃度

抗 PD-L1：200nM 起始，4 倍稀釋，共計 10 個濃度

25F7: 200nM 起始，4 倍稀釋，共計 10 個濃度

抗 LAG-3 (200nM 起始，4 倍稀釋，共計 10 個濃度)

+抗 PD-L1 (12.5nM)

25F7 (200nM 起始，4 倍稀釋，共計 10 個濃度) + 抗 PD-L1 (12.5nM)

IL-2 檢測

採用 Cisbio Human IL-2 kit 檢測培養基中 IL-2 的濃度。

檢測液配製 (試劑均來自 Human IL2 1000 tests 試劑盒, Cisbio)

取 30  $\mu$ l Human IL-2 d2 antibody (來源) 至 570  $\mu$ l 檢測緩衝液(來源)中，取 30  $\mu$ l Human IL-2 cryptate antibody (來源) 至 570  $\mu$ l 檢測緩衝液中，二者 1:1 混合。

標準品溶液梯度稀釋

表 7. IL-2 標準品溶液的梯度稀釋

| 梯度 | 濃度 (pg/ml) | 稀釋方法                                                                      |
|----|------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1  | 5000       | 取 15 $\mu$ g/ml 標準品，取 80 $\mu$ l 標準品溶液加入至 160 $\mu$ l 的稀釋液(1 $\times$ )中。 |
| 2  | 2500       | 取 80 $\mu$ l 的梯度 1 溶液加入 80 $\mu$ l 的稀釋液(1 $\times$ )中混勻。                  |
| 3  | 1250       | 取 80 $\mu$ l 的梯度 2 溶液加入 80 $\mu$ l 的稀釋液(1 $\times$ )中混勻。                  |
| 4  | 625        | 取 80 $\mu$ l 的梯度 3 溶液加入 80 $\mu$ l 的稀釋液(1 $\times$ )中混勻。                  |
| 5  | 312.5      | 取 80 $\mu$ l 的梯度 4 溶液加入 80 $\mu$ l 的稀釋液(1 $\times$ )中混勻。                  |
| 6  | 156.25     | 取 80 $\mu$ l 的梯度 5 溶液加入 80 $\mu$ l 的稀釋液(1 $\times$ )中混勻。                  |
| 7  | 78.125     | 取 80 $\mu$ l 的梯度 6 溶液加入 80 $\mu$ l 的稀釋液(1 $\times$ )中混勻。                  |
| 8  | 0          | 直接取 160 $\mu$ l 稀釋液(1 $\times$ )。                                         |

### (3) 檢測

取培養基上清和標準品梯度溶液 (10 $\mu$ l) 加入 96 孔微孔板，每孔加入 10  $\mu$ l 檢測液，400 g 離心 1 min，避光，室溫孵育 2 h。

採用多功能酶標儀，在 616 nm 和 665 nm 讀取 OD 值，分析數據。

算法公式為： $\text{Ratio} = \text{OD}_{665\text{nm}} / \text{OD}_{616\text{nm}} \times 10^4$

$\Delta F\% = (\text{Ratio}_{\text{標準/樣品}} - \text{Ratio}_{\text{標準0}}) / \text{Ratio}_{\text{標準0}}$

### 實驗結果

以標準品梯度濃度的  $\Delta \text{Ratio}$  為橫坐標，IL-2 水平為縱坐標，得 IL-2 標準曲線，如第 8 圖所示，以標準曲線，計算各組中人 CD4<sup>+</sup> T 細胞的 IL-2 水平。如第 9 圖所示，與對照（25F7）或抗 LAG-3 抗體 ADI31853 單獨相比，本發明的抗 LAG-3 抗體 (ADI-31853) 與抗 PD-L1 抗體 (HZ3266) 組合更加顯著激活人 CD4<sup>+</sup> T 細胞。

### 【符號說明】

無。

【序列表】

<110> 信達生物製藥(蘇州)有限公司(INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.)

<120> 抗 LAG-3 抗體及其用途

<130> PF 180591PCT

<160> 60

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成的

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Thr | Phe | Asp | Asp | Tyr | Ala | Met | His |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成的

<400> 2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Ile | Ser | Ser | Ser | Asp | Tyr | Tyr | Trp | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成的

<400> 3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Ile | Ser | Ser | Pro | Asp | Tyr | Tyr | Trp | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 4

Gly Ser Ile Tyr Ser Glu Ser Tyr Tyr Trp Gly  
1 5 10

<210> 5  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 5

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 6  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 6

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 7  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 7

Ser Ile Val Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 8

<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 8

Ala Lys Gly Gly Tyr Asp Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
1 5 10

<210> 9  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 9

Ala Arg Val Arg Thr Trp Asp Ala Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 10  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 10

Ala Arg Val Arg Thr Trp Asp Gln Ser Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 11  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 11

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
1 5 10

<210> 12  
<211> 11

<212> PRT  
<213> 人工  
  
<220>  
<223> 合成的  
  
<400> 12  
  
Gln Ala Gly Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
1 5 10

<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工  
  
<220>  
<223> 合成的  
  
<400> 13  
  
Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
1 5

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工  
  
<220>  
<223> 合成的  
  
<400> 14  
  
Gln Gln Val Leu Asp Leu Pro Leu Thr  
1 5

<210> 15  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工  
  
<220>  
<223> 合成的  
  
<400> 15  
  
Gln Gln Val His Ala Leu Pro Pro Trp Thr  
1 5 10

<210> 16  
<211> 10  
<212> PRT

<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 16

Gln Gln Val Leu Glu Leu Pro Pro Trp Thr  
1 5 10

<210> 17  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa 可為任何天然發生的胺基酸

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(7)  
<223> Xaa 可為任何天然發生的胺基酸

<400> 17

Gly Ser Ile Xaa Ser Xaa Xaa Tyr Tyr Trp Gly  
1 5 10

<210> 18  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa 可為任何天然發生的胺基酸

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa 可為任何天然發生的胺基酸

<400> 18

Ser Ile Xaa Tyr Ser Gly Xaa Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

- <210> 19
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> 人工
- <220>
- <223> 合成的
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (8)..(9)
- <223> Xaa 可為任何天然發生的胺基酸
- <400> 19

Ala Arg Val Arg Thr Trp Asp Xaa Xaa Phe Asp Ile  
1 5 10

- <210> 20
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> 人工
- <220>
- <223> 合成的
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (3)..(3)
- <223> Xaa 可為任何天然發生的胺基酸
- <400> 20

Gln Ala Xaa Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
1 5 10

- <210> 21
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> 人工
- <220>
- <223> 合成的
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (4)..(5)
- <223> Xaa 可為任何天然發生的胺基酸

<400> 21

Gln Gln Val Xaa Xaa Leu Pro Pro Trp Thr  
1 5 10

<210> 22  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 22

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Gly Gly Tyr Asp Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 23  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 23

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Val Arg Thr Trp Asp Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

- <210> 24
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 24

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Pro  
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Val Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 50    |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Leu   | Lys | Ser | Arg | Val | Thr | Ile | Ser | Val | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Gln | Phe |
| 65    |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser   | Leu | Lys | Leu | Ser | Ser | Val | Thr | Ala | Ala | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr |
|       |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Cys   | Ala | Arg | Val | Arg | Thr | Trp | Asp | Gln | Ser | Phe | Asp | Ile | Trp | Gly | Gln |
|       |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly   | Thr | Met | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <210> | 25  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> | 120 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> | PRT |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213> | 人工  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <220> |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <223> | 合成的 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400> | 25  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln   | Leu | Gln | Leu | Gln | Glu | Ser | Gly | Pro | Gly | Leu | Val | Lys | Pro | Ser | Glu |
| 1     |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr   | Leu | Ser | Leu | Thr | Cys | Thr | Val | Ser | Gly | Gly | Ser | Ile | Tyr | Ser | Glu |
|       |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser   | Tyr | Tyr | Trp | Gly | Trp | Ile | Arg | Gln | Pro | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu |
|       |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp   | Ile | Gly | Ser | Ile | Val | Tyr | Ser | Gly | Tyr | Thr | Tyr | Tyr | Asn | Pro | Ser |
|       | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu   | Lys | Ser | Arg | Val | Thr | Ile | Ser | Val | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Gln | Phe |
| 65    |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser   | Leu | Lys | Leu | Ser | Ser | Val | Thr | Ala | Ala | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr |
|       |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Cys   | Ala | Arg | Val | Arg | Thr | Trp | Asp | Ala | Ala | Phe | Asp | Ile | Trp | Gly | Gln |
|       |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115120

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成的

<400> 26

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

151015

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

202530

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

354045

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

505560

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65707580

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Leu Asp Leu Pro Leu

859095

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100105

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成的

<400> 27

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

151015

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Leu Glu Leu Pro Pro  
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 29  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 29

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Leu Glu Leu Pro Pro  
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 30  
<211> 448  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 30

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

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

|                                                                 |     |     |     |     |    |  |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|----|--|
|                                                                 | 20  |     | 25  |     | 30 |  |
| Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val | 35  | 40  | 45  |     |    |  |
| Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val | 50  | 55  | 60  |     |    |  |
| Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr | 65  | 70  | 75  | 80  |    |  |
| Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys | 85  | 90  | 95  |     |    |  |
| Ala Lys Gly Gly Tyr Asp Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly | 100 | 105 | 110 |     |    |  |
| Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser | 115 | 120 | 125 |     |    |  |
| Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala | 130 | 135 | 140 |     |    |  |
| Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val | 145 | 150 | 155 | 160 |    |  |
| Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala | 165 | 170 | 175 |     |    |  |
| Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val | 180 | 185 | 190 |     |    |  |
| Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His | 195 | 200 | 205 |     |    |  |
| Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly | 210 | 215 | 220 |     |    |  |
| Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser | 225 | 230 | 235 | 240 |    |  |
| Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg | 245 | 250 | 255 |     |    |  |

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro  
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr  
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser  
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
435 440 445

<210> 31  
<211> 447  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 31

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Val Arg Thr Trp Asp Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala  
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys  
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
435 440 445

<210> 32  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 32

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Pro  
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Val Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Val Arg Thr Trp Asp Gln Ser Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala  
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys  
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
435 440 445

<210> 33  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 33

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Ser Glu  
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Val Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg Val Arg Thr Trp Asp Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala  
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys  
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val  
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
435 440 445

<210> 34  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 34

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Leu Asp Leu Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 35  
<211> 215  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 35

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val His Ala Leu Pro Pro

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Leu Glu Leu Pro Pro  
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 37  
<211> 215  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 37

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Leu Glu Leu Pro Pro  
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 38  
<211> 363  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>

<223> 合成的

<400> 38

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggtgcagc tggtagagag cggaggcggg ctggtgcagc ctggcagaag cctgagactg  | 60  |
| agctgtgccg ccagcggcctt caccttcgac gactacgcca tgcactgggt gagacaggcc | 120 |
| cctggcaaag gcctggagtg ggtgagcggc atcagctgga atagcggcga catcggtac   | 180 |
| gccgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acgccaagaa cagcctgtac  | 240 |
| ctgcagatga actccctgag ggccgaggac accgccctgt actactgcgc caagggcggc  | 300 |
| tacgacggca gctactacgg catggacgtg tggggccagg gcaccaccgt gacagtgagc  | 360 |
| agc                                                                | 363 |

<210> 39

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成的

<400> 39

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| cagctgcagc tgcaggagag cggacctggc ctggtgaagc ccagcgagac cctgagcctg  | 60  |
| acctgcacag tgtccggcgg cagcatcagc agcagcgact actactgggg ctggatcaga  | 120 |
| cagcccccg gaaagggcct ggagtggatc ggcagcatct actacagcgg cagcacctac   | 180 |
| tacaacccca gccatgaagag cagggtgacc atcagcgtgg acaccagcaa gaaccagttc | 240 |
| agcctgaagc tgagcagcgt gacagccgcc gacacagcgg tgtactactg cgccagagtg  | 300 |
| aggacctggg acgccgcctt cgacatctgg ggacagggca ccatggtgac agtgagcagc  | 360 |

<210> 40

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成的

<400> 40

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| cagctgcagc tgcaggaaag cggaccagga ctggtgaaac ctagcgagac cctgagcctg | 60  |
| acctgtacag tgtccggagg cagcatcagc tccccgact actattgggg ttggatccgg  | 120 |
| cagccaccag gaaagggcct ggagtggatt ggcagcatcg tgtacagcgg ctacacctac | 180 |

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| tacaacccca gcctgaagag ccgcgtgaca atcagcgtgg acaccagcaa gaaccagttc | 240 |
| agcctgaagc tgtcttcagt gacagccgcc gacaccgcag tgtactattg cgccagggtg | 300 |
| cggacttggg accagagctt cgacatttgg gggcagggca ccatggtgac agtgagcagc | 360 |

<210> 41  
 <211> 360  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 合成的

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 41                                                          |     |
| cagctgcagc tgcaggaatc aggaccagga ctggtgaagc ctagcgagac actgagcctg | 60  |
| acctgtaccg tgtccggagg cagcatctac agcgagagct actattgggg ttgatccgg  | 120 |
| cagccaccag gaaagggcct ggagtggatt ggcagcatcg tgtacagcgg ctacacctac | 180 |
| tacaacccca gcctgaagag ccgcgtgaca atcagcgtgg acaccagcaa gaaccagttc | 240 |
| agcctgaagc tgtcttcagt gacagccgcc gacaccgcag tgtactattg cgccagggtg | 300 |
| cggacttggg acgccgcctt tgacatttgg ggccagggca caatggtgac agtgagcagc | 360 |

<210> 42  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 合成的

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 42                                                          |     |
| gacatccaga tgaccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga tagggtgacc  | 60  |
| atcacctgcc aggccagcca ggacatcagc aactacctga actggtacca gcagaagccc | 120 |
| ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagcaacc tggagaccgg cgtgcctagc | 180 |
| agatttagcg gcagcggcag cggcacagac ttcaccttca ccatcagcag cctgcagccc | 240 |
| gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag gtgctggacc tgcccctgac ctttggcggc | 300 |
| ggcaccaagg tggagatcaa g                                           | 321 |

<210> 43  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

<223> 合成的

<400> 43

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca tagggtgacc | 60  |
| atcacctgcc aggccagcca ggacatcagc aactacctga actggtacca gcagaagccc | 120 |
| ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagcaacc tggagaccgg cgtgcctagc | 180 |
| agatttagcg gcagcggcag cggcacagac ttcaccttca ccatcagcag cctgcagccc | 240 |
| gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag gtgcacgccc tgcctccctg gacctttggc | 300 |
| ggcggcacca aggtggagat caag                                        | 324 |

<210> 44

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成的

<400> 44

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcta gcgtgggaga tagagtgacc  | 60  |
| atcacttgcc aggccggcca ggacatcagc aactacctga attggtacca gcagaagccc  | 120 |
| ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gcctctaatac tggagaccgg cgtgcctagc | 180 |
| agattcagcg gaagcggcag cggcacagat ttcaccttca ccatcagcag cctgcagccc  | 240 |
| gaggacatcg ccacctacta ttgccagcag gtgctggagc tgcctccttg gacattcgga  | 300 |
| ggaggaacaa aggtggagat caag                                         | 324 |

<210> 45

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成的

<400> 45

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcta gcgtgggaga tagagtgacc  | 60  |
| atcacttgcc aggccagcca ggacatcagc aactacctga attggtacca gcagaagccc  | 120 |
| ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gcctctaatac tggagaccgg cgtgcctagc | 180 |
| agattcagcg gaagcggcag cggcacagat ttcaccttca ccatcagcag cctgcagccc  | 240 |
| gaggacatcg ccacctacta ttgccagcag gtgctggagc tgcctccttg gacattcgga  | 300 |

ggaggaacaa aggtggagat caag

324

<210> 46

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成的

<400> 46

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 47  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 47

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 48  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 48

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly  
20

<210> 49  
<211> 801  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 49

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggtgtgtc tgaagctccc tggaggctcc tgcatgacag cgctgacagt gacactgatg  | 60  |
| gtgctgagct cccactggc tttgtctggg gacaccogac cacgtttcct gtggcagcct   | 120 |
| aagagggagt gtcatttctt caatgggacg gagcgggtgc ggttcctgga cagatacttc  | 180 |
| tataaccagg aggagtccgt gcgcttcgac agcgacgtgg gggagttccg ggcgggtgacg | 240 |
| gagctggggc ggcctgacgc tgagtactgg aacagccaga aggacatcct ggagcaggcg  | 300 |

cgggccgcgg tggacaccta ctgcagacac aactacgggg ttgtggagag cttcacagtg 360  
cagcggcgag tccaacctaa ggtgactgta tacccttcaa agaccagcc cctgcagcac 420  
cacaacctcc tggctctgctc tgtgagtggg ttctatccag gcagcattga agtcagggtg 480  
ttcctgaacg gccaggaaga gaaggctggg atgggtgtcca caggcctgat ccagaatgga 540  
gactggacct tccagaccct ggtgatgctg gaaacagttc ctgaagtgg agaggtttac 600  
acctgccaa gggagcacc aagcgtgaca agccctctca cagtggaatg gagagcacgg 660  
tctgaatctg cacagagcaa gatgctgagt ggagtcgggg gctttgtgct gggcctgctc 720  
ttccttgggg ccgggctggt catctacttc aggaatcaga aaggacaetc tggacttcag 780  
ccaacaggat tcctgagctg a 801

<210> 50  
<211> 765  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 50  
atggccataa gtggagtccc tgtgctagga tttttcatca tagctgtgct gatgagcgct 60  
caggaatcat gggctatcaa agaagaacat gtgatcatcc aggccgagtt ctatctgaat 120  
cctgaccaat caggcgagtt tatgtttgac tttgatggg atgagatttt ccatgtggat 180  
atggcaaaga aggagacggg ctggcggctt gaagaatttg gacgatttgc cagctttgag 240  
gctcaagggt cattggccaa catagctgtg gacaaagcca acctggaaat catgacaaag 300  
cgctccaact atactccgat caccaatgta cctccagagg taactgtgct cacaacagc 360  
cctgtggaac tgagagagcc caacgtctc atctgtttca tagacaagtt caccacacca 420  
gtgggtcaatg tcacgtggct tcgaaatgga aaacctgtca ccacaggagt gtcagagaca 480  
gtcttctgct ccagggaaga ccaccttttc cgcaagttcc actatctccc ctctctgccc 540  
tcaactgagg acgtttacga ctgcagggtg gagcactggg gcttgatga gcctctctc 600  
aagcactggg agtttgatgc tccaagccct ctcccagaga ctacagagaa cgtggtgtgt 660  
gccctgggcc tgactgtggg tctggtgggc atcattattg ggacctctt catcatcaag 720  
ggattgcgca aaagcaatgc agcagaacgc agggggcctc tgtaa 765

<210> 51

<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工  
  
<220>  
<223> 合成的  
  
<400> 51  
  
Gly Phe Asn Ile Glu Asp Thr  
1 5

<210> 52  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工  
  
<220>  
<223> 合成的  
  
<400> 52  
  
Asp Pro Ala Asn Asp Asp  
1 5

<210> 53  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工  
  
<220>  
<223> 合成的  
  
<400> 53  
  
Gly Leu Gly Arg Trp Phe Ala Tyr  
1 5

<210> 54  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工  
  
<220>  
<223> 合成的  
  
<400> 54  
  
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Asn Ala Val Ala  
1 5 10

<210> 55  
<211> 7

<212> PRT  
<213> 人工  
  
<220>  
<223> 合成的  
  
<400> 55  
  
Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
1 5  
  
<210> 56  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工  
  
<220>  
<223> 合成的  
  
<400> 56  
  
Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Leu Thr  
1 5  
  
<210> 57  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> 人工  
  
<220>  
<223> 合成的  
  
<400> 57  
  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
  
Thr Val Lys Ile Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Thr  
20 25 30  
  
Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
  
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe  
50 55 60  
  
Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

$\langle 220 \rangle$   
 $\langle 223 \rangle$  合成的

<400> 59

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Thr  
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Gly Arg Gly Leu Gly Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 60  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> 合成的

<400> 60

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Asn Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

## 申請專利範圍

1. 一種結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，該抗體包含重鏈可變區的 3 個互補決定區 HCDR，以及輕鏈可變區的 3 個互補決定區 LCDR，其中

(i) HCDR1 包含 SEQ ID NO:3 所示的胺基酸序列或由其組成，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 7 所示的胺基酸序列或由其組成，HCDR3 包含 SEQ ID NO:10 所示的胺基酸序列或由其組成，LCDR1 包含 SEQ ID NO: 12 所示的胺基酸序列或由其組成，LCDR2 包含 SEQ ID NO: 13 所示的胺基酸序列或由其組成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 16 所示的胺基酸序列或由其組成；

(ii) HCDR1 包含 SEQ ID NO:4 所示的胺基酸序列或由其組成，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 7 所示的胺基酸序列或由其組成，HCDR3 包含 SEQ ID NO: 9 所示的胺基酸序列或由其組成，LCDR1 包含 SEQ ID NO: 11 所示的胺基酸序列或由其組成，LCDR2 包含 SEQ ID NO: 13 所示的胺基酸序列或由其組成，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 16 所示的胺基酸序列或由其組成。

2. 如申請專利範圍第 1 中所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體包含

(i)含有 SEQ ID NO: 24 所示的胺基酸序列或由其組成的重鏈可變區，和含有 SEQ ID NO: 28 所示的胺基酸序列或由其組成的輕鏈可變區；

(ii) 含有 SEQ ID NO: 25 所示的胺基酸序列或由

其組成的重鏈可變區，和含有 SEQ ID NO: 29 所示的胺基酸序列或由其組成的輕鏈可變區。

3. 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體包含重鏈和輕鏈，其中

(i)重鏈包含選自 SEQ ID NO: 32 的胺基酸序列或由其組成；和輕鏈包含選自 SEQ ID NO: 36 的胺基酸序列或由其組成；

(ii)重鏈包含選自 SEQ ID NO: 33 的胺基酸序列或由其組成；和輕鏈包含選自 SEQ ID NO: 37 的胺基酸序列或由其組成。

4. 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其具有以下一個或多個特性：

(1)以高親和力結合人 LAG-3，以以下平衡解離常數( $K_D$ )與 LAG-3 結合，該  $K_D$  小於 8nM；

(2)結合表達人 LAG-3 的細胞，以小於或等於 1nM 的  $EC_{50}$ ；

(3)結合表達小鼠 LAG-3 的細胞，以小於或等於 50nM 的  $EC_{50}$ ；

(4)抑制 LAG-3 的相關活性，以小於或等於 5nM 的  $IC_{50}$  抑制 LAG-3 與表達 MHC II 類分子的細胞上的 MHC II 類分子的結合；

(5)結合激活的  $CD4^+$ 和/或  $CD8^+$  T 細胞的表面上

的內源 LAG-3，以小於或等於 35pM；

(6)抑制 LAG-3 的一種或多種活性，導致以下一種或多種：CD4+ T 淋巴細胞的抗原依賴性刺激增加；T 細胞增殖增加；活化抗原的表達增加；細胞因子的表達增加；趨化因子的表達增加；Treg 細胞的阻抑活性減少；T 細胞穩態增加；腫瘤浸潤型淋巴細胞增加；或癌細胞的免疫逃避減少；

(7)能夠誘發抗體依賴性細胞介導的細胞毒性；

(8)顯示與申請專利範圍第 3 項所述的任一抗體對 LAG-3 相同或相似的結合親和力和/或特異性；

(9)抑制申請專利範圍第 3 項所述的任一抗體與 LAG-3 的結合；

(10)與申請專利範圍第 3 項所述的任一抗體結合相同或重疊的表位；

(11)與申請專利範圍第 3 項所述的任一抗體競爭結合 LAG-3；

(12)具有申請專利範圍第 3 項所述的任一抗體分子的一個或多個生物學特性。

5. 如申請專利範圍第 4 項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其中，該活化抗原為 CD25，該細胞因子為干擾素- $\gamma$ 、白介素-2 或白介素-4，或者該趨化因子為 CCL3、CCL4 或 CCL5。

6. 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體是 IgG4 形

- 式的抗體或其抗原結合片段。
7. 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體是單株抗體。
  8. 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體是人源化的抗體或人抗體。
  9. 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗原結合片段是選自以下的抗體片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、單鏈抗體、單結構域抗體、雙抗體(dAb)或線性抗體。
  10. 如申請專利範圍第 1 至 2 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體是雙特異性抗體或多特異性抗體。
  11. 如申請專利範圍第 10 項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其中，該雙特異性抗體結合 LAG-3 和 PD-1，結合 LAG-3 和 PD-L1，或結合 LAG-3 和 PD-L2。
  12. 如申請專利範圍第 10 項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其中，該多特異性抗體包含針對 LAG-3 的第一結合特異性和針對以下一種或多種的分子的第二及第三結合特異性：人 PD-1、人 TIM-3、人 CEACAM、人 PD-L1 或人 PD-L2。
  13. 一種分離的核酸，其編碼如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段。
  14. 一種包含如申請專利範圍第 13 項所述的核酸的載體。

15. 如申請專利範圍第 14 項所述的載體，其中，該載體是表達載體。
16. 如申請專利範圍第 15 項所述的載體，其中，該表達載體是 pTT5 載體。
17. 一種包含如申請專利範圍第 13 項所述的核酸或如申請專利範圍第 14 至 16 項中任一項所述的載體的宿主細胞。
18. 如申請專利範圍第 17 項所述的宿主細胞，其中，該宿主細胞是原核的或真核的。
19. 如申請專利範圍第 17 項所述的宿主細胞，其中該宿主細胞選自大腸桿菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞或適用於製備抗體或其抗原結合片段的其它細胞。
20. 如申請專利範圍第 17 項所述的宿主細胞，其中，該宿主細胞是 293 細胞或 CHO 細胞。
21. 一種製備結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段的方法，該方法包括在適於表達編碼如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段的核酸的條件下培養如申請專利範圍第 17 至 20 項中任一項所述的宿主細胞。
22. 如申請專利範圍第 21 項所述的方法，還包括分離該抗體或其抗原結合片段。
23. 如申請專利範圍第 22 項所述的方法，其中，該方法還包括從該宿主細胞回收該結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段。

24. 一種免疫綴合物，其包含如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段和其它物質。
25. 如申請專利範圍第 24 項所述的免疫綴合物，其中，該其他物質為細胞毒性劑。
26. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項所述的抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段或者如申請專利範圍第 24 或 25 項所述的免疫綴合物。
27. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段或者如申請專利範圍第 24 或 25 項所述的免疫綴合物，以及其它治療劑。
28. 如申請專利範圍第 27 項所述的醫藥組成物，其中，該其它治療劑選自化療劑、其它抗體、細胞毒性劑、疫苗、抗感染活性劑或免疫調節劑。
29. 如申請專利範圍第 28 項所述的醫藥組成物，其中，該免疫調節劑為共刺激分子的激活劑或免疫檢查點分子的抑制劑。
30. 如申請專利範圍第 27 項所述的醫藥組成物，其中，該其它治療劑選自抗人 PD-1 抗體、抗人 PD-L1 抗體或抗人 PD-L2 抗體。
31. 如申請專利範圍第 30 項所述的醫藥組成物，其中，該抗人 PD-L1 抗體包含

(i)如 SEQ ID NO:57 所示的重鏈可變區的 3 個互補

決定區 HCDR，和/或

(ii)如 SEQ ID NO:58 所示的輕鏈可變區的 3 個互補決定區 LCDR。

32. 如申請專利範圍第 30 項所述的醫藥組成物，其中，該抗人 PD-L1 抗體重鏈可變區(VH)和/或輕鏈可變區(VL)，其中

(i) 該 VH 包含互補決定區域(CDR)HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:51 的胺基酸序列，或由該胺基酸序列組成；HCDR2 包含選自 SEQ ID NO:52 的胺基酸序列，或由該胺基酸序列組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:53 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成；

和/或

(ii) 其中該 VL 包含互補決定區域(CDR)LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO:54 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:55 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成；LCDR3 包含選自 SEQ ID NO:56 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成。

33. 一種有效量的如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段、或如申請專利範圍第 24 或 25 項所述的免疫綴合物、或如申請專利範圍第 27 至 32 項中任一項所述的醫藥組成物的用途，其用在製備藥物，該藥物用於在受試者中治療受

試者或個體腫瘤或感染性疾病。

34. 一種有效量的如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段、或如申請專利範圍第 24 或 25 項所述的免疫綴合物、或如申請專利範圍第 27 至 32 項中任一項所述的醫藥組成物、以及 PD-1 軸結合拮抗劑或包含該 PD-1 軸結合拮抗劑的藥物或活性劑的用途，其用在製備藥物，該藥物用於在受試者中治療受試者或個體腫瘤或感染性疾病。
35. 如申請專利範圍第 34 項所述的用途，其中，該 PD-1 軸結合拮抗劑是抗人 PD-1 抗體或抗人 PD-L1 抗體。
36. 如申請專利範圍第 33 至 35 項中任一項所述的用途，其中，該腫瘤是胃腸道腫瘤或者該感染性疾病是慢性感染。
37. 如申請專利範圍第 33 或 34 項所述的用途，其還包括向該受試者聯合施用一種或多種其它療法。
38. 如申請專利範圍第 37 項所述的用途，其中，該療法包括治療方式和/或其它治療劑。
39. 如申請專利範圍第 38 項所述的用途，其中，該治療方式包括手術治療和/或放射療法，或者該治療劑選自化療劑、細胞毒性劑、疫苗、其它抗體、抗感染活性劑或免疫調節劑。
40. 如申請專利範圍第 39 項所述的用途，其中，該免疫調節劑為共刺激分子的激活劑或免疫檢查點分子的抑制劑。

41. 如申請專利範圍第 38 項所述的用途，其中，該其它治療劑為抗人 PD-1 抗體、抗人 PD-L1 抗體或抗人 PD-L2 抗體。
42. 如申請專利範圍第 41 項所述的用途，其中，該抗人 PD-L1 抗體包含
- (i) 如 SEQ ID NO:57 所示的重鏈可變區的 3 個互補決定區 HCDR，和/或
  - (ii) 如 SEQ ID NO:58 所示的輕鏈可變區的 3 個互補決定區 LCDR。
43. 如申請專利範圍第 41 項所述的用途，其中，該抗人 PD-L1 抗體重鏈可變區(VH)和/或輕鏈可變區(VL)，其中
- (i) 該 VH 包含互補決定區域(CDR)HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:51 的胺基酸序列，或由該胺基酸序列組成；HCDR2 包含選自 SEQ ID NO:52 的胺基酸序列，或由該胺基酸序列組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:53 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成；
  - 和/或
  - (ii) 其中該 VL 包含互補決定區域(CDR)LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO:54 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:55 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成；LCDR3 包含選自 SEQ ID NO:56 的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成。

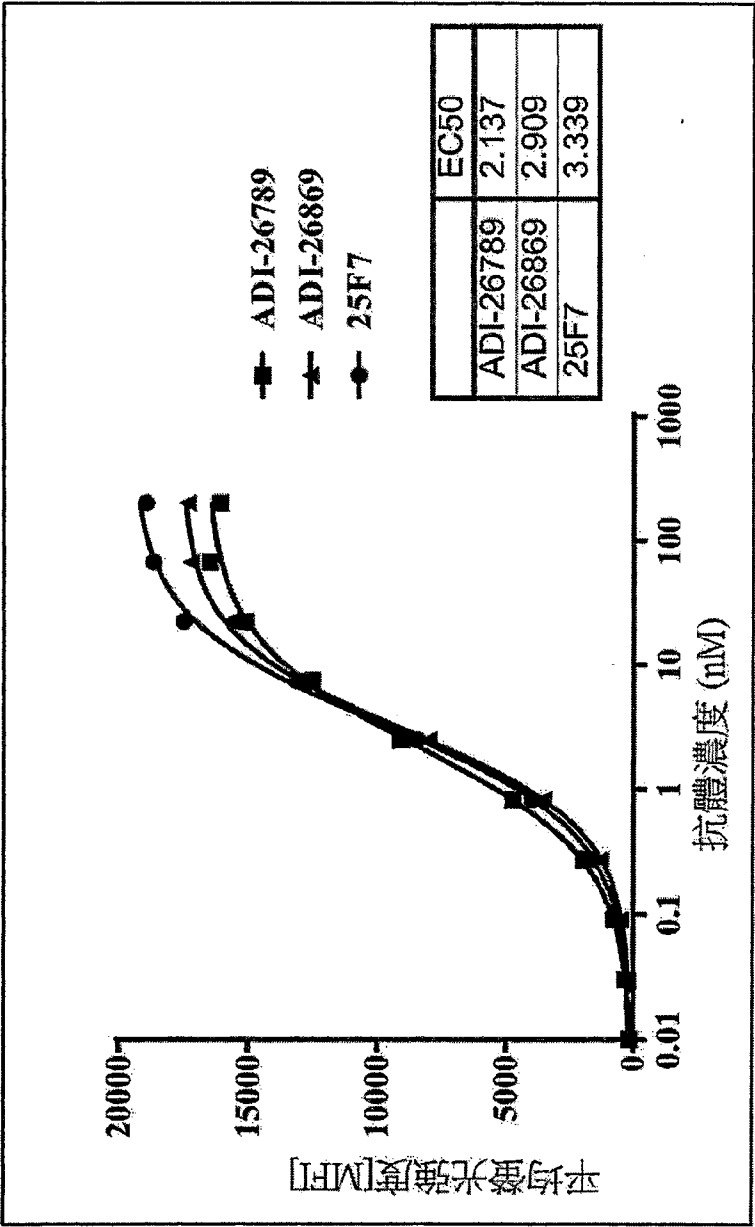
44. 一種檢測樣品中 LAG-3 的方法，該方法包括

(a)將樣品與如申請專利範圍第 1 至 12 項中任一項所述的結合 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段接觸；和

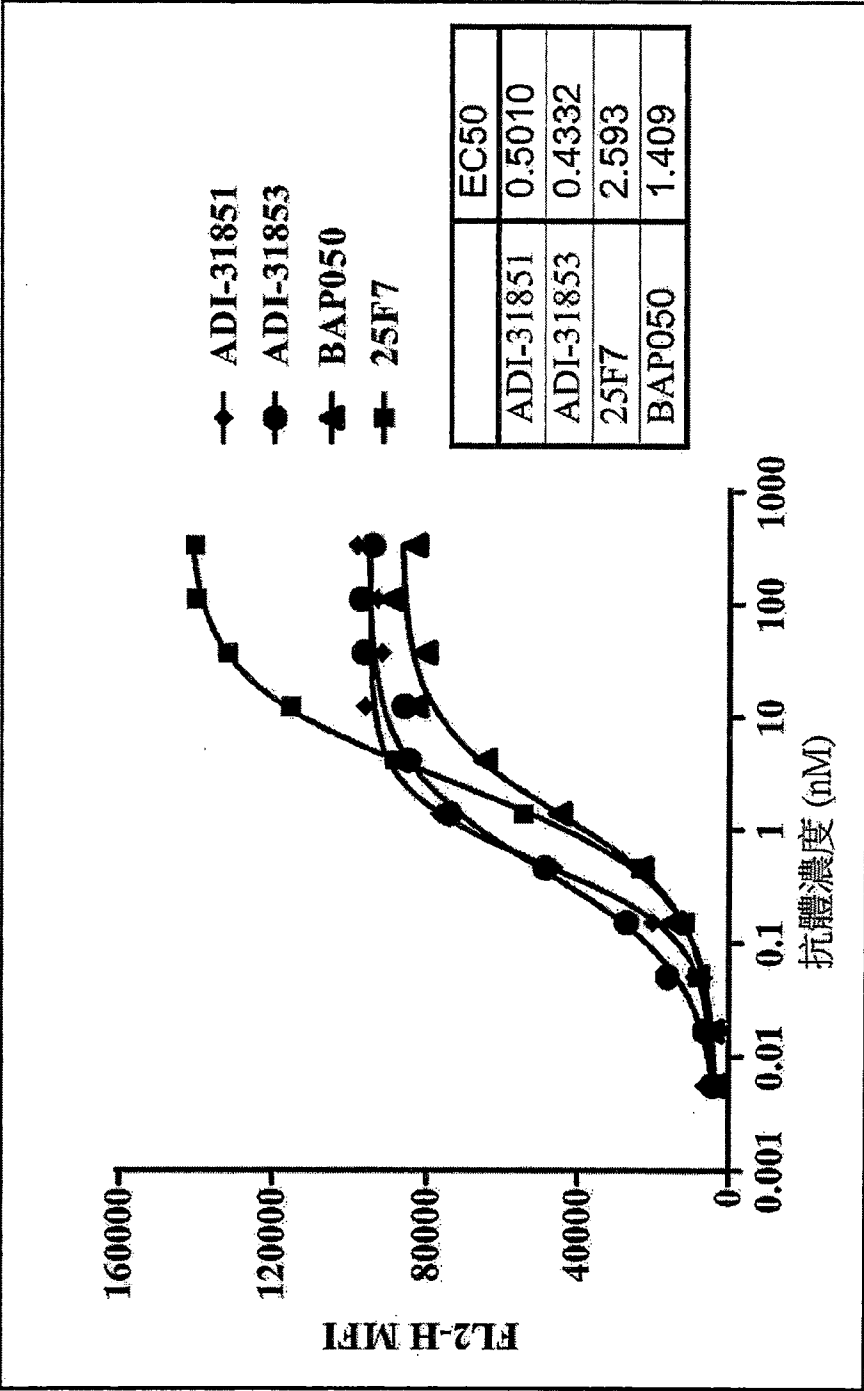
(b)檢測抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段和 LAG-3 間的複合物的形成。

45. 如申請專利範圍第 44 項所述的方法，其中，該抗 LAG-3 抗體是被可檢測地標記的。

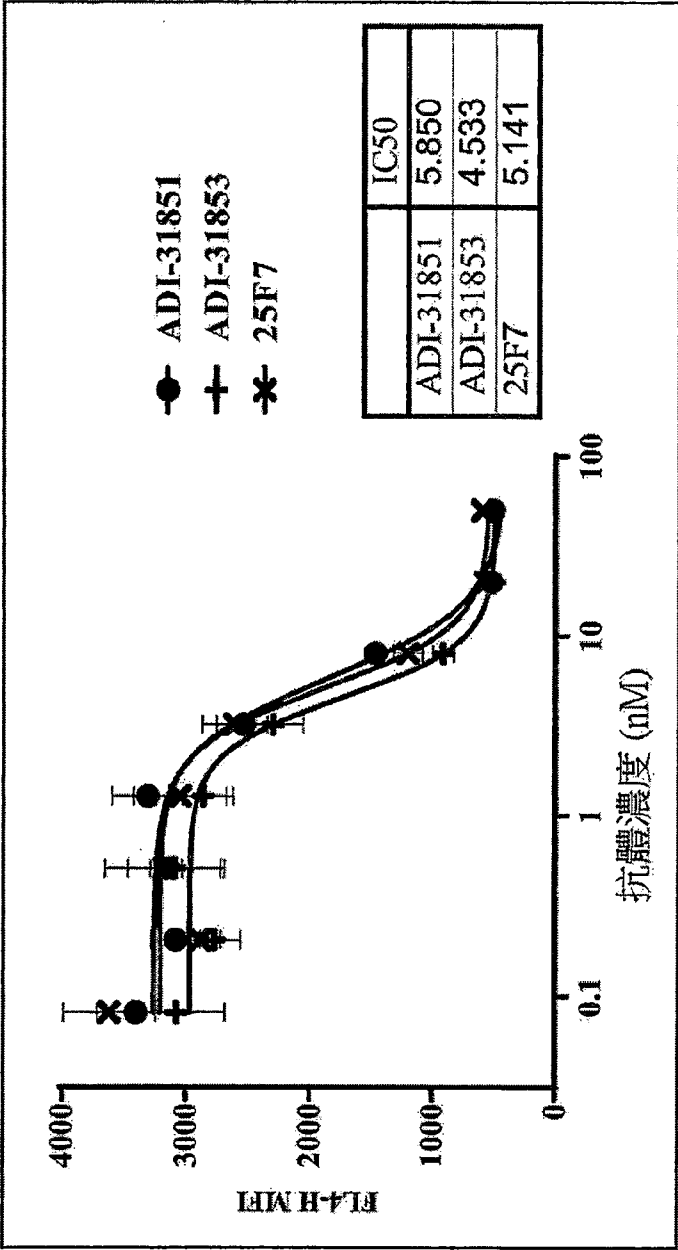
【發明圖式】



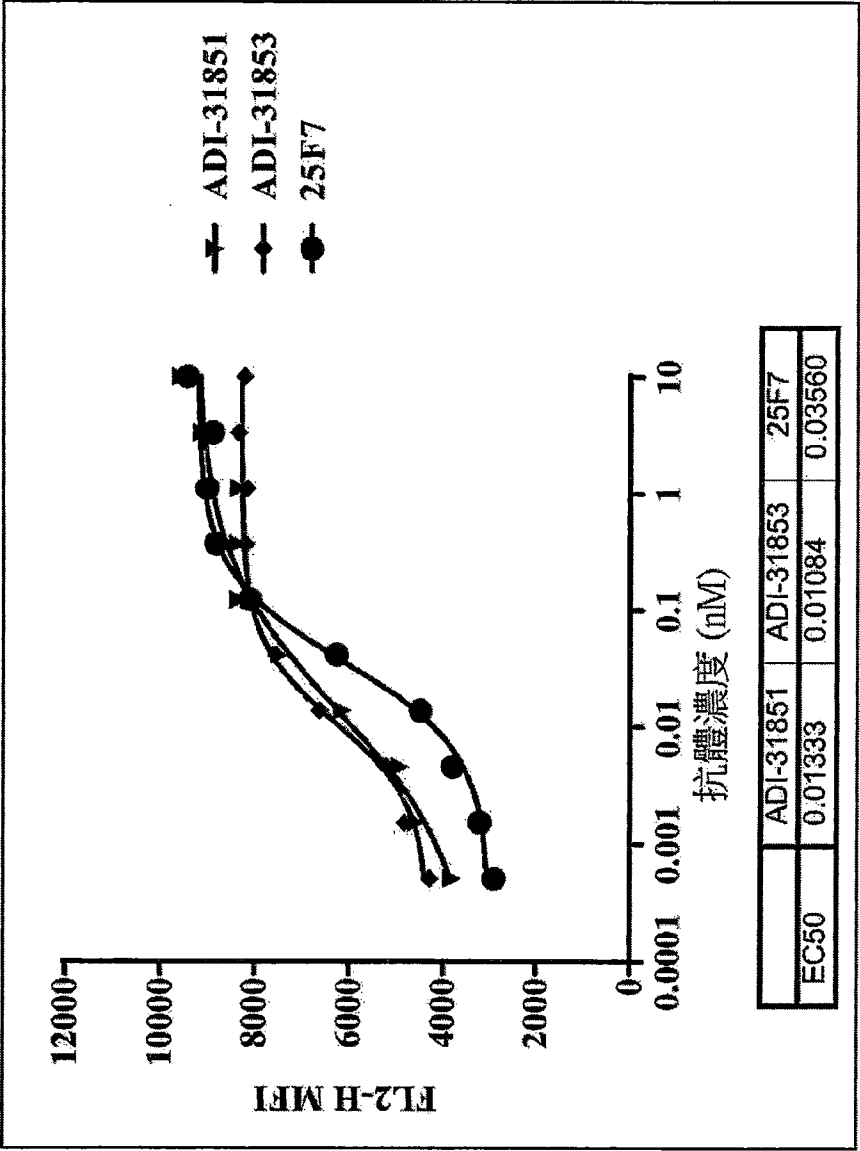
【第1圖】



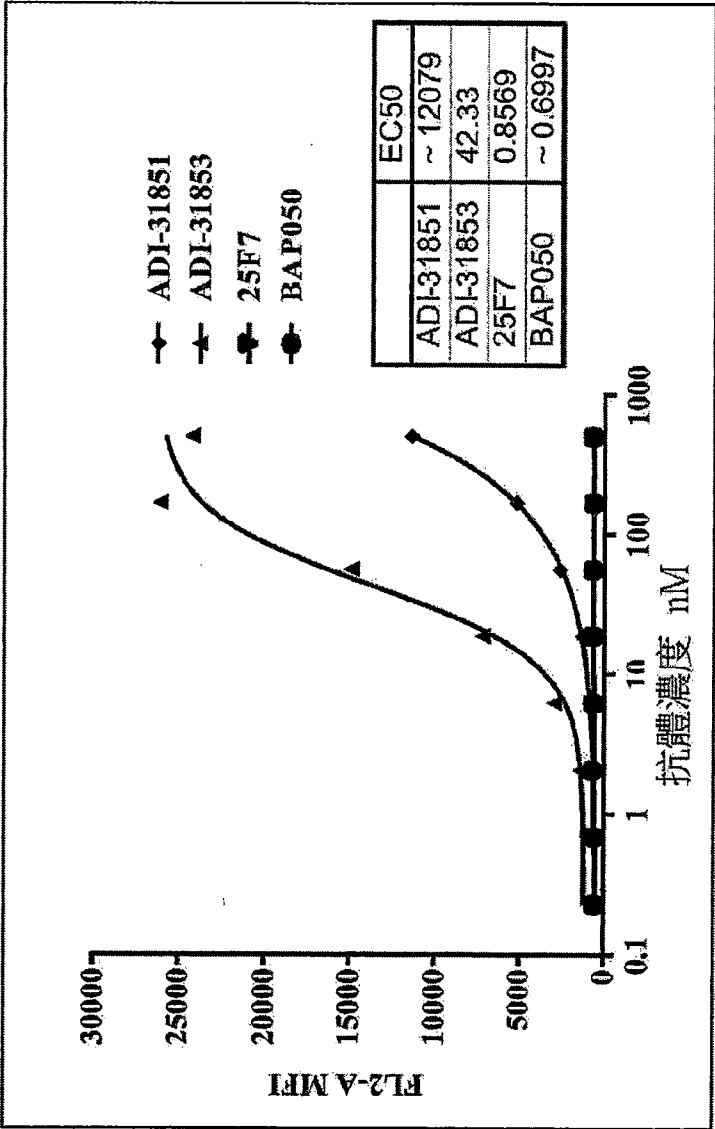
【第2圖】



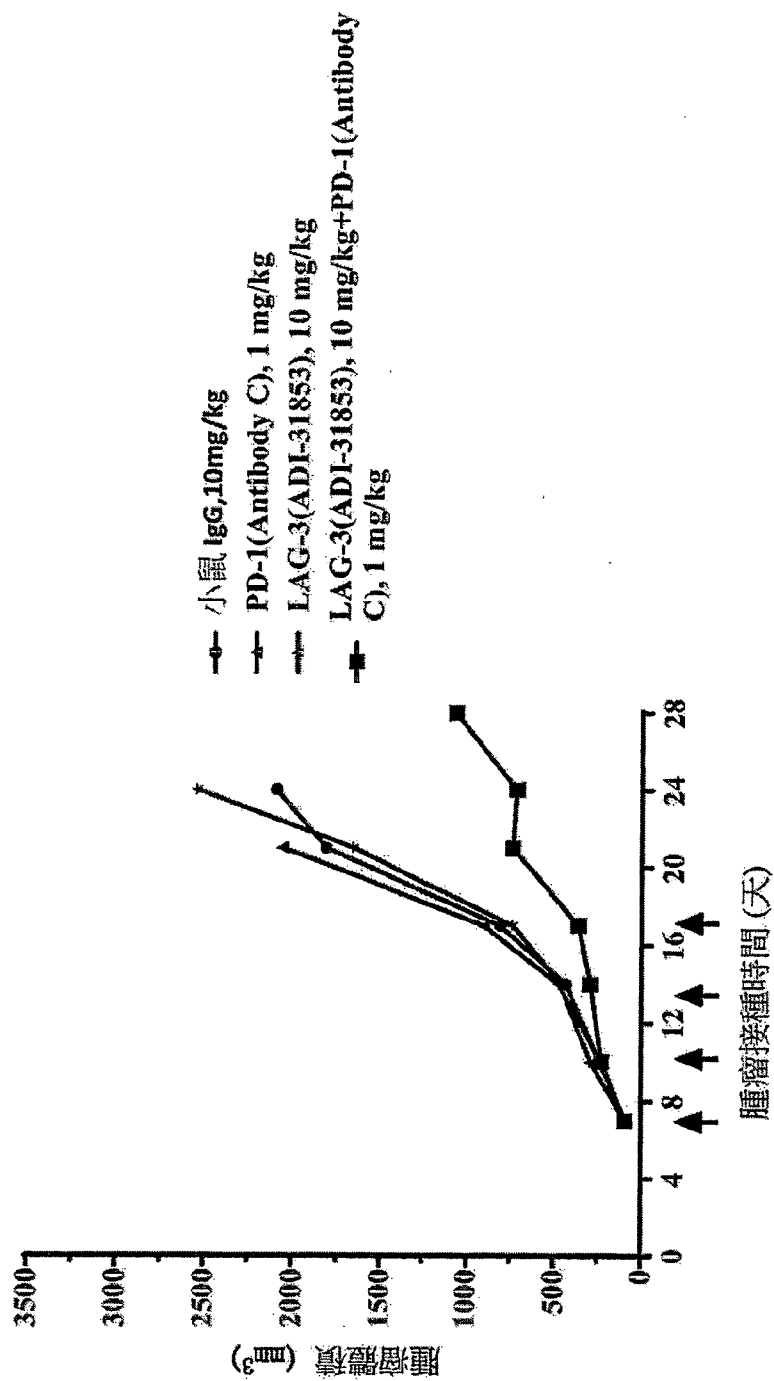
【第3圖】



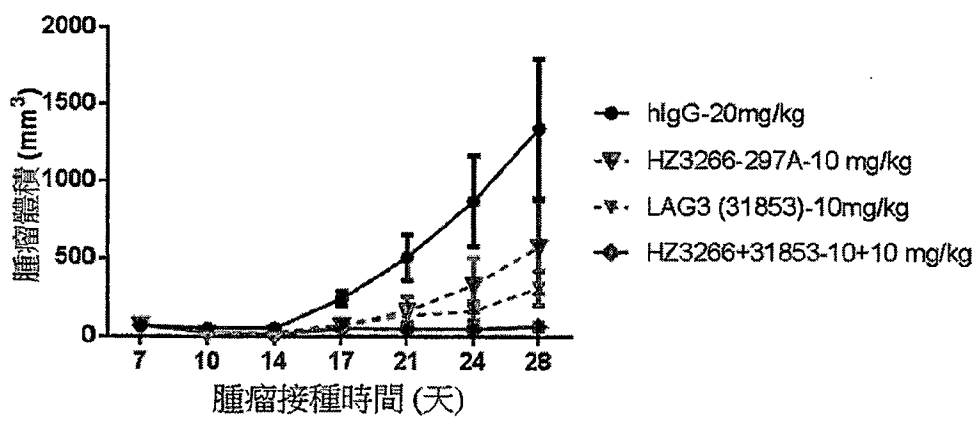
【第4圖】



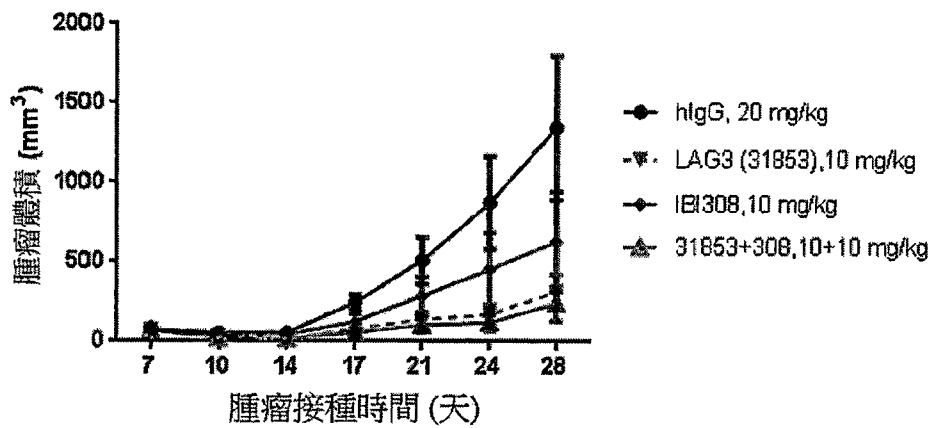
【第5圖】



【第6圖】

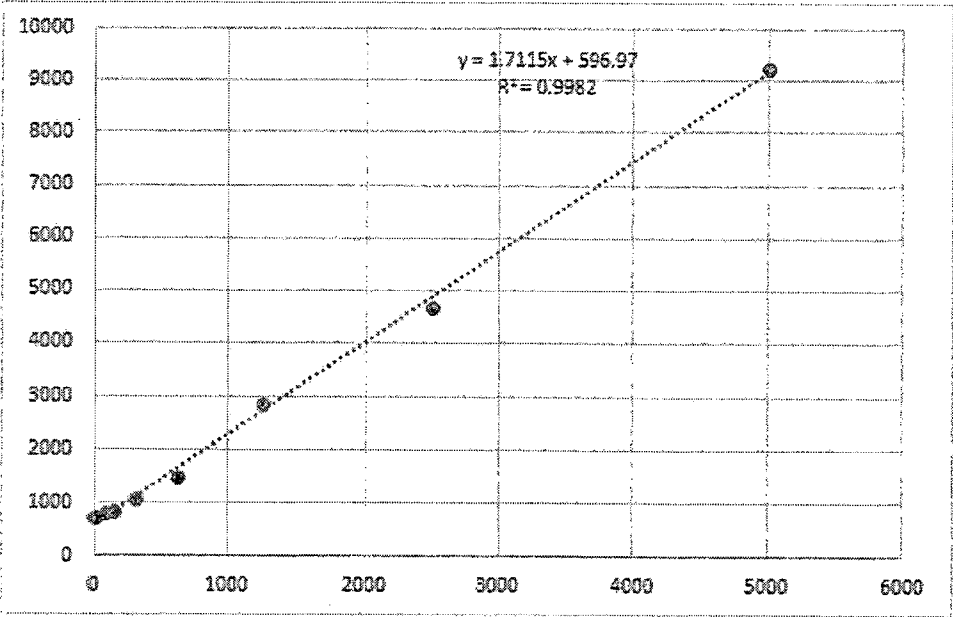


(A)

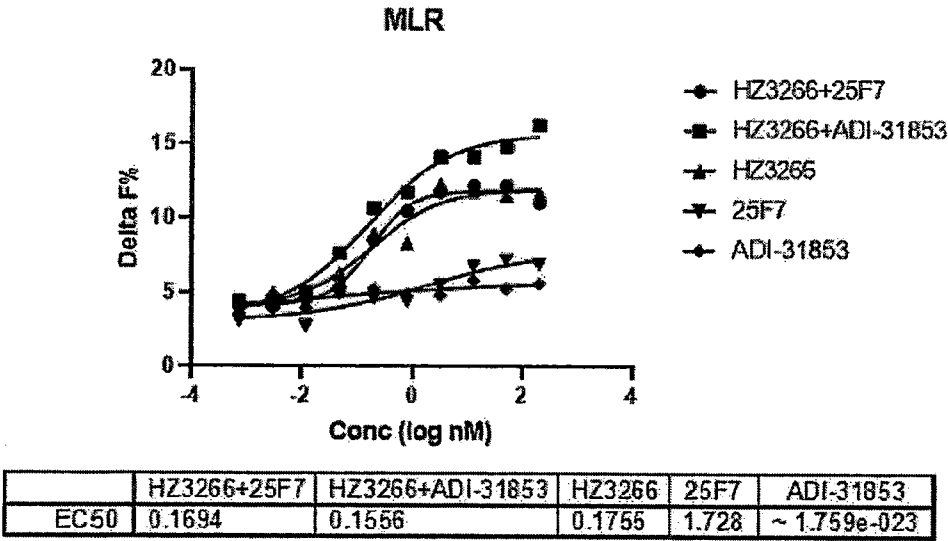


(B)

【第7圖】



【第8圖】



【第9圖】