

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2020年9月3日 (03.09.2020)



(10) 国际公布号  
**WO 2020/173378 A1**

(51) 国际专利分类号:  
*C07K 16/28* (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/076023

(22) 国际申请日: 2020年2月20日 (20.02.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
201910148914.5 2019年2月28日 (28.02.2019) CN

(71) 申请人: 三生国健药业(上海)股份有限公司(SUNSHINE GUOJIAN PHARMACEUTICAL (SHANGHAI) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 赵杰(ZHAO, Jie); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。 黄浩旻(HUANG, Haomin); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。 朱祯平(ZHU, Zhenping); 中国上海市中国(上海)自由贸易试验区李冰路399号, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 北京律诚同业知识产权代理有限公司(LECOMME INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.); 中国北京市海淀区西土城路1号院1号楼泰富酒店写字楼三层, Beijing 100081 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: ANTIBODY BINDING HUMAN LAG-3, AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 结合人LAG-3的抗体、其制备方法和用途

(57) Abstract: Provided are an antibody capable of specifically binding human LAG-3 or an antigen binding fragment thereof. The antibody or antigen binding fragment thereof has a biological activity for enhancing a mixed lymphocyte reaction, and can be used for preparing a drug for cancer immunotherapy.

(57) 摘要: 提供了能够特异性结合人LAG-3的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段具有增强混合淋巴细胞反应的生物学活性, 可用于制备癌症免疫疗法的药物。



WO 2020/173378 A1

## 结合人 LAG-3 的抗体、其制备方法和用途

### 技术领域

5 本发明涉及抗体领域，更具体地，本发明公开了结合人 LAG-3 的抗体、其制备方法和用途。

### 背景技术

各种类型的恶性肿瘤目前已经成为人类的主要杀手，并且发病率年年攀升。常规的手术、化疗和放疗虽有一定疗效，但是往往带给病人身体带来巨大损害和毒副作用。现阶段的靶向性单克隆抗体类药物（例如，靶向 HER2 的 trastuzumab）以及靶向性小分子激酶抑制剂（例如，靶向某些酪氨酸激酶的 imatinib）虽然在肿瘤治疗中取得了可喜的临床效果，但这类药物只对表达特定靶点的肿瘤有效，能治疗的癌症类型有限，往往客观反应率较低，应用这类抗体之后的肿瘤易产生耐药性从而复发和重新进展。肿瘤免疫治疗是应用免疫学原理和方法，激活免疫系统，打破免疫系统对肿瘤的免疫耐受状态，增强免疫细胞对肿瘤抗原的识别，激发和增强机体抗肿瘤免疫应答，从而使机体免疫系统抑制和杀伤肿瘤细胞，最终达到治疗肿瘤的目的。肿瘤免疫治疗近来备受关注，是肿瘤治疗领域的焦点。近几年，肿瘤免疫治疗的重大好消息不断涌现。目前，在癌症免疫治疗中程序性死亡受体 1(programmed death 1, PD-1) 无疑是最耀眼的明星靶点，以其为靶点的免疫检查点抑制剂如 nivolumab 和 pembrolizumab 等单抗类药物已在一些肿瘤类型如黑色素瘤、非小细胞肺癌等的临床治疗中展示出了强大的抗肿瘤活性，已获得美国 FDA (Food and Drug Administration, FDA) 批准临床应用。肿瘤免疫治疗由于其卓越的疗效和创新性，在 2013 年被《科学》杂志评为年度最重要的科学突破。肿瘤免疫治疗有望成为继手术、化疗、放疗和靶向治疗后肿瘤治疗领域的一场革命。

T 细胞在免疫系统中扮演重要角色，不过 T 细胞的活化需依赖抗原递呈细胞将外来有害的抗原消化并重新呈现为 T 细胞可以识别的抗原型态。T 细胞和抗原递呈细胞上有一群参与调节的蛋白质，具有辅助调节 T 细胞受体信号转导的功能，这些辅助性受体分为 2 大类，有一类是负责传递激活信号的共刺激性受体，另一类是传递抑制信号的共抑制性受体，如今这类抑制性分子被称为免疫检查点的受体和配体。上述提到的明星分子 PD-1 就是典型的免疫检查点的受体，属于 CD28 超家族成员，其重要配体为程序性死亡配体-1 (programmed death ligand 1, PD-L1)。PD-1 与 PD-L1 的结合介导 T 细胞活化的共抑制信号，负向调节 T 细胞活化和增殖。另外，华裔科学家陈列平教授首先发现 PD-L1 在肿瘤组织高表达，而且调节肿瘤浸润 CD8+T 细胞的功能。目前，以 PD-1/PD-L1 为靶点的免疫调节疗法已在临床抗肿瘤治疗中取得了巨大成功。

淋巴细胞活化基因-3 (lymphocyte activation gene-3, LAG-3) 主要表达于活化的 T 淋巴细胞，是一种类似于 PD-1 的免疫负调节分子，LAG-3 的主要配体是 MHC II 分子家族，它能够以更高的亲和力与 CD4 分子竞争结合 MHC II 配体，并向细胞内部转导抑制信号，从而负

向调节细胞的激活、增殖和动态平衡，其分子机制非常类似于 PD-1。LAG-3 能够帮助 T 细胞维持在免疫耐受状态，或使持续激活的 T 细胞处于耗竭的状态，具有维持内环境稳定和参与免疫负向调节的功能，与肿瘤的发生发展密切相关。目前，一些初步的研究表明，阻断 LAG-3 的抗体能够增强免疫反应，与 PD-1 抗体联用能够起到显著的协同激活作用，在癌症免疫治疗领域中潜力巨大。

目前国际上以 LAG-3 为靶点的单抗类药物的研发大部分尚处于初期阶段，主要研发公司都是百时美施贵宝（Bristol-Myers Squibb, BMS）、诺华（Novartis）等国际医药巨头，其中百时美施贵宝的抗 LAG-3 单抗 BMS-986016 正处于临床一期阶段，主要研究目标是与 PD-1 抗体 nivolumab 联合使用的安全性和有效性，研究结果显示，BMS-986016 与 nivolumab 联合应用在黑色素瘤的临床治疗中展现出良好疗效。另外，抗 LAG-3 抗体还可以用来治疗自身免疫病，基本机制是通过抗体依赖细胞介导的细胞毒效应（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC）杀伤激活的 T 细胞，从而起到抑制免疫反应和治疗自身免疫病的目的。然而，仍亟待开发更多新型、特异、高效的以 LAG-3 为靶点的药物用于免疫疗法的临床应用。

## 发明内容

为了解决上述技术问题，本发明的发明人进行了大量试验，从抗原免疫、杂交瘤筛选、抗体表达纯化到生物活性鉴定，筛选获得了两个特异性结合人 LAG-3 的鼠源 134 和 2-34（即 5E7）号抗体，并在此基础上，进一步构建获得其嵌合抗体 134-Chimeric、5E7-Chimeric 以及人源化抗体 134-Hu-IgG4-C91S、5E7-Hu-IgG4。本发明的研究表明鼠源 134 和 2-34（即 5E7）号抗体具有全新的与人 LAG-3 结合的表位。细胞水平实验结果表明人源化抗体 134-Hu-IgG4-C91S、5E7-Hu-IgG4 能够有效地阻断 LAG-3 对 Raji 细胞的结合和增强 SEA 刺激的 PBMC 分泌 IL-2。因此，本发明开发的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段可应用于制备用于癌症免疫疗法的药物。

因此，本发明的第一个目的在于提供一种结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段。

本发明的第二个目的在于提供另一种结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段。

本发明的第三个目的在于提供编码所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

本发明的第四个目的在于提供含有所述的核苷酸序列的表达载体。

本发明的第五个目的在于提供含有所述的表达载体的宿主细胞。

本发明的第六个目的在于提供所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段的制备方法。

本发明的第七个目的在于提供含有所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段的药物组合物。

本发明的第八个目的在于提供所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段或所述的药物组合物的用途。

为了实现上述目的，本发明采用了如下技术方案：

本发明的第一个方面提供了一种结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段，其结合的人 LAG-3 表位包括以下氨基酸序列：AAAPGHPLA (SEQ ID NO: 50)。

根据本发明的优选实施例，其结合的人 LAG-3 表位包括以下氨基酸序列：GPPAAAPGHPLA (SEQ ID NO: 48) 或 AAAPGHPLAPGPHPAAPSS (SEQ ID NO: 49)。

5 本发明的第二个方面提供了一种结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段，包括：

(a) 重链互补决定区 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示，所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示，和轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2、LCDR3，所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示，所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示，所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 43 所示；或

(b) 重链互补决定区 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示，所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示，所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，和轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2、LCDR3，所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示，所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示，所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示。

根据本发明，所述抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。优选的，所述抗体为单克隆抗体。

根据本发明，所述抗体为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体等。优选的，所述抗体为人源化抗体。

根据本发明，所述抗原结合片段包括 Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、Fv 片段等。

20 根据本发明的优选实施例，所述结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，选自：

(a) 所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；

(b) 所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示；

(c) 所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示；和

(d) 所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示。

30 根据本发明的优选实施例，所述结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段包括重链恒定区和轻链恒定区，所述重链恒定区选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 重链恒定区，所述轻链恒定区选自 κ 或 λ 轻链恒定区。优选地，所述重链恒定区为 IgG4 重链恒定区，所述轻链恒定区为 κ 轻链恒定区。更优选的，所述重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示，所述轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示。

35 根据本发明的优选实施例，所述结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段包括重链和轻链，

选自：

(a) 所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 32 所示，所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示；和

5 (b) 所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 38 所示，所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40 所示。

本发明的第三个方面提供了一种核苷酸序列，所述核苷酸序列编码如上任一项所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段。

根据本发明的优选实施例，所述核苷酸序列包括：

10 (a) 如 SEQ ID NO: 1 所示编码重链可变区的核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 3 所示编码轻链可变区的核苷酸序列；

(b) 如 SEQ ID NO: 5 所示编码重链可变区的核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 7 所示编码轻链可变区的核苷酸序列；

(c) 如 SEQ ID NO: 21 所示编码重链可变区的核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 23 所示编码轻链可变区的核苷酸序列；或

15 (d) 如 SEQ ID NO: 25 所示编码重链可变区的核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 27 所示编码轻链可变区的核苷酸序列。

根据本发明的优选实施例，所述核苷酸序列包括如 SEQ ID NO: 29 所示的编码重链恒定区的核苷酸序列，和如 SEQ ID NO: 33 所示的编码轻链恒定区的核苷酸序列。

根据本发明的优选实施例，所述核苷酸序列包括：

20 (a) 如 SEQ ID NO: 31 所示编码重链的核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 35 所示编码轻链的核苷酸序列；或

(b) 如 SEQ ID NO: 37 所示编码重链的核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 39 所示编码轻链的核苷酸序列。

25 本发明的第四个方面提供了一种表达载体，所述表达载体含有如上任一项所述的核苷酸序列。

本发明的第五个方面提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞含有如上所述的表达载体。

本发明的第六个方面提供了如上所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段的制备方法，所述方法包括以下步骤：

30 (a) 在表达条件下，培养如上所述的宿主细胞，从而表达所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段；

(b) 分离并纯化 (a) 所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段。

本发明的第七个方面提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有如上任一项所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

35 根据本发明的优选实施例，所述药物组合物还包括 PD-1 抑制剂。优选的，所述 PD-1 抑制剂为结合 PD-1 的抗体或其抗原结合片段。

本发明的第八个方面提供了如上任一项所述的结合人LAG-3的抗体或其抗原结合片段或如上任一项所述的药物组合物在制备治疗癌症的药物中的用途。

根据本发明，所述癌症选自黑色素瘤、肾细胞癌、非小细胞肺癌、经典霍奇金淋巴瘤、尿路上皮癌、结直肠癌以及肝癌等。

5 有益效果：

本发明公开了能够特异性结合人LAG-3的抗体或其抗原结合片段，其具有全新的与人LAG-3结合的表位以及良好的增强混合淋巴细胞反应的生物学活性，可应用于制备用于癌症免疫疗法的药物，具有良好的临床应用前景。

## 10 附图说明

图1为鼠源抗人LAG-3抗体对混合淋巴细胞反应的影响的结果，其中，图1A为第一轮筛选，图1B为第二轮筛选。

图2为抗人LAG-3抗体的人源化抗体和嵌合抗体之间的相对亲和力比较的结果。

15 图3为人源化抗人LAG-3抗体对PBMC分泌IL-2的增强作用的结果，其中，图3A和3B中的PBMC分别来自不同的捐献者。

图4为人源化抗人LAG-3抗体对细胞表面LAG-3的结合作用的结果。

图5为抗人LAG-3抗体表位的示意图。

图6为人源化抗人LAG-3抗体对LAG-3结合Raji细胞的阻断作用的结果。

图7为流式细胞法检测抗人LAG-3抗体对FGL1结合LAG-3的阻断作用的结果。

20 图8为抗人LAG-3抗体对转基因小鼠MC38移植瘤模型的抑制作用。

## 具体实施方式

本发明中，术语“LAG-3”是指淋巴细胞活化基因3，也称作CD223。

25 本发明中，术语“抗体(Ab)”和“免疫球蛋白G(IgG)”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH)，其后是恒定区，重链恒定区由三个结构域CH1、CH2、以及CH3构成。每条轻链的一端有可变区(VL)，另一端有恒定区，轻链恒定区包括一个结构域CL；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，30 轻链的可变区与重链的可变区相对。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是它们表现出不同的效应功能，例如参与抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)等。重链恒定区包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE；轻链恒定区包括κ(Kappa)或λ(Lambda)。

35 本发明的抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)等。

本发明中，术语“单克隆抗体（单抗）”指从一类基本均一的群体获得的抗体，即该群体中包含的单个抗体是相同的，除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体高特异性地针对单个抗原位点。而且，与常规多克隆抗体制剂（通常是具有针对不同决定簇的不同抗体）不同，各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外，单克隆抗体的好处还在于它们是通过杂交瘤培养来合成的，不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性，是从基本均一的抗体群中获得的，这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

本发明中，术语“抗原结合片段”是指能够与抗原（例如人 LAG-3）特异性结合的抗体的片段。本发明的抗原结合片段的例子包括 Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、Fv 片段等。Fab 片段是用木瓜蛋白酶消化抗体产生的片段。F(ab')<sub>2</sub> 片段是用胃蛋白酶消化抗体产生的片段。Fv 片段是由抗体的重链可变区和轻链可变区紧密非共价关联的二聚物组成。

本发明中，术语“Fc 段”是指木瓜蛋白酶可将抗体裂解为两个完全相同的 Fab 段和一个 Fc 段，Fc 段即可结晶片段（fragment crystallizable, Fc），由抗体的 CH<sub>2</sub> 和 CH<sub>3</sub> 结构域组成。Fc 段无抗原结合活性，是抗体与效应分子或细胞相互作用的部位。

本发明中，术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同，它形成各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于重链可变区和轻链可变区中称为互补决定区（complementarity-determining region, CDR）或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为框架区（frame region, FR）。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个 FR 区，它们大致上呈 β-折叠构型，由形成连接环的三个 CDR 相连，在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的 CDR 通过 FR 区紧密地靠在一起并与另一链的 CDR 一起形成了抗体的抗原结合部位（参见 Kabat 等，NIH Publ.No.91-3242，卷 I，647-669 页（1991））。

本发明的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体等。

本发明中，术语“鼠源抗体”是指来源于大鼠或小鼠的抗体，优选小鼠。本发明的鼠源抗体为使用人 LAG-3 的胞外域为抗原免疫小鼠并进行杂交瘤细胞筛选获得。优选的，本发明的鼠源抗体为 134 号和 2-34（即 5E7）号抗体。

本发明中，术语“嵌合抗体”是指包含来源于一个物种的重链可变区和轻链可变区序列以及来源于另一个物种的恒定区序列的抗体，例如具有与人恒定区连接的鼠重链可变区和轻链可变区的抗体。优选的，本发明的嵌合抗体是由鼠源 134 号和 2-34（即 5E7）号抗体的重链可变区和轻链可变区序列分别与人的恒定区拼接获得。更优选的，本发明的嵌合抗体的重链是由鼠源 134 号和 2-34（即 5E7）号抗体的重链可变区序列分别与人的 IgG4 重链恒定区拼接获得，轻链是由鼠源 134 号和 2-34（即 5E7）号抗体的轻链可变区序列分别与人的 Kappa 轻链恒定区拼接获得。最优选的，本发明的嵌合抗体包括 134-Chimeric 和 5E7-Chimeric。

本发明中，术语“人源化抗体”是指其 CDR 来源于非人物种（优选小鼠）抗体，抗体分子中残余的部分（包括框架区和恒定区）来源于人抗体。此外，框架区残基可被改变以维持

结合亲和性。优选的，本发明的人源化抗体由鼠源 134 号和 2-34（即 5E7）号抗体的 CDR 区和来源自人抗体的非 CDR 区重组，并对包埋残基、与 CDR 区有直接相互作用的残基，以及对 134 号和 2-34（即 5E7）号抗体的 VL 和 VH 的构象有重要影响的残基进行回复突变获得。更优选的，本发明的人源化抗体包括 134-Hu-IgG4-C91S 和 5E7-Hu-IgG4。

5 本发明中，术语“表位”和“人 LAG-3 表位”是指位于人 LAG-3 上并与抗体特异性结合的区域。优选的，本发明的人 LAG-3 表位位于人 LAG-3 的胞外域内，所述的人 LAG-3 的胞外域包括如 SEQ ID NO: 41 所示的氨基酸序列。更优选的，本发明的人 LAG-3 表位包括以下氨基酸序列：AAAPGHPLA（SEQ ID NO: 50）。最优选的，本发明的人 LAG-3 表位包括以下氨基酸序列：GPPAAAPGHPLA（SEQ ID NO: 48）或 AAAPGHPLAPGPHPAAPSS（SEQ  
10 ID NO: 49）。

本发明中，术语“结合人 LAG-3 的抗体”或“抗人 LAG-3 抗体”是指与人 LAG-3 表位特异性结合的抗体。术语“特异性结合”是指抗体以小于  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  或更小、优选为  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  或更小、更优选为  $1 \times 10^{-9} \text{M}$  或更小、 $1 \times 10^{-10} \text{M}$  或更小、 $1 \times 10^{-11} \text{M}$  或更小的平衡解离常数(KD)结合。本发明中，术语“KD”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。例如，使用表面等离子体共振术（Surface Plasmon Resonance，缩写 SPR）在 BIACORE 仪中测定抗体与抗原的结合亲和力或使用 ELISA 测定抗体与抗原结合的相对亲和力。  
15

本发明中，术语“表达载体”可以为 pTT5，pSECTag 系列，pCGS3 系列，pCDNA 系列载体等，以及其它用于哺乳动物表达系统的载体等，表达载体中包括连接有合适的转录和翻译调节序列的融合 DNA 序列。  
20

本发明中，术语“宿主细胞”是指适用于表达上述表达载体的细胞，可以是真核细胞，如哺乳动物或昆虫宿主细胞培养系统均可用于本发明的融合蛋白的表达，CHO（中国仓鼠卵巢，Chinese Hamster Ovary），HEK293，COS，BHK 以及上述细胞的衍生细胞均可适用于本发明。  
25

本发明中，术语“药物组合物”是指本发明的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段可以和药学上可以接受的载体一起组成药物制剂组合物从而更稳定地发挥疗效，这些制剂可以保证本发明公开的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段的氨基酸核心序列的构象完整性，同时还保护蛋白质的多官能团防止其降解（包括但不限于凝聚、脱氨或氧化）。  
30

以下实施例、实验例是对本发明进行进一步的说明，不应理解为对本发明的限制。实施例不包括对传统方法的详细描述，如那些用于构建载体和质粒的方法，将编码蛋白的基因插入到这样的载体和质粒的方法或将质粒引入宿主细胞的方法。这样的方法对于本领域中具有普通技术的人员是众所周知的，并且在许多出版物中都有所描述，包括 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition,  
35

Cold spring Harbor Laboratory Press。

### 实施例1. 人 LAG-3 蛋白以及抗 LAG-3 阳性对照抗体的制备

人 LAG-3 胞外段氨基酸序列来自 <https://www.uniprot.org/uniprot/P18627>，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示，由生工生物工程（上海）股份有限公司进行密码子优化并合成基因，然后将合成的基因片段克隆到 pUC57 载体中。设计引物，用 PCR(Polymerase Chain Reaction) 法扩增 LAG-3 胞外段 (Extracellular Domain, ECD) 编码区 (SEQ ID NO: 41) 和人免疫球蛋白 IgG1 的 Fc 段编码区 (SEQ ID NO: 51)；将上述扩增出的片段回收，通过重组 PCR 将上述片段拼接在一起，同时引入信号肽 (MGVKVLFALICIAVAEA, SEQ ID NO: 42) 编码区，并在两端引入相应的酶切位点；用限制性内切酶切割 pTT5 表达载体 (购自 NRC Biotechnology Research Institute) 和前述重组 PCR 片段；两组酶切产物纯化后，用连接酶连接后转化到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中，涂布于 LB (Amp 抗性) 平板培养基中过夜培养；挑取单克隆菌落，培养扩增之后抽提质粒，用限制性内切酶切割质粒以鉴定是否有目的基因片段插入；挑选合格的阳性克隆测序；选取序列完全正确的克隆扩增之后抽提质粒。利用聚乙烯亚胺 (Polyethyleneimine, PEI) 将上述构建好的 LAG-3 表达载体转入 HEK293E 细胞 (购自 NRC Biotechnology Research Institute) 中进行表达，5 天后收取细胞上清，利用 Protein A 亲和层析纯化，所得蛋白命名为 LAG-3-ECD-hFc，用于免疫小鼠及后续筛选过程。HEK293E 细胞在化学成分限定的无血清培养基 FreeStyle 293 Expression Medium (购自 Thermo Fisher Scientific) 中培养。蛋白定量通过紫外分光光度法进行。

作为阳性对照的抗 LAG-3 单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列来自美国专利申请 US20140093511A1 中的 SEQ ID NO: 12 和 14，由生工生物工程（上海）股份有限公司进行密码子优化并合成基因，重链可变区和轻链可变区基因分别与人 IgG4 重链恒定区 (核苷酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示) 和人 Kappa 轻链恒定区 (核苷酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示) 连接，并引入信号肽序列 (SEQ ID NO: 42)，构建成完整的重链和轻链基因，然后按照上述类似的方法将完整的重链和轻链基因分别克隆到 pTT5 表达载体中。用同样的方法将含有重链和轻链基因的 pTT5 表达载体组合后，转入 HEK293E 细胞中进行表达，5 天后收取细胞上清，利用 Protein A 亲和层析纯化抗体，所得抗体命名为 Anti-LAG3.5。HEK293E 细胞在化学成分限定的无血清培养基 FreeStyle 293 Expression Medium (购自 Thermo Fisher Scientific) 中培养。蛋白定量通过紫外分光光度法测定。

### 实施例2. 用人 LAG-3-ECD-hFc 作为抗原免疫小鼠以及杂交瘤的制备和筛选

将实施例 1 中制备 LAG-3-ECD-hFc 用生理盐水稀释至合适浓度后，与等体积弗氏完全佐剂 (购自 Sigma) 混合，超声乳化后对 4-5 周龄的 Balb/c 小鼠 (购自上海灵畅生物科技有限公司，动物生产许可证号：SCXK (沪) 2013-0018) 进行多点皮下注射；三周后，用生理盐

水稀释 LAG-3-ECD-hFc 并与等体积弗氏不完全佐剂（购自 Sigma）混合，超声乳化完全后对小鼠进行多点皮下注射；两周后再次重复此步骤；所有小鼠在第三次免疫后的第七天取少量血样分离血清，利用常规 ELISA 法检测血清滴度；选取血清抗体效价>10000 的小鼠，七天后每只小鼠通过尾静脉注射 10 $\mu$ g 抗原蛋白。

5 静脉注射抗原蛋白后的第三天，选取一定数量的小鼠，处死并解剖取出脾脏，研磨后收集脾脏细胞并计数，用于制备杂交瘤。在此选取骨髓瘤 Sp2/0 细胞（来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）作为细胞融合配体。Sp2/0 细胞在细胞培养箱（37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub>）中培养，所用培养基为 RPMI-1640 完全培养基（配制方法如下：在 RPMI-1640 基础培养基中添加 10%的胎牛血清和 1%的 Penicillin-Streptomycin，上述材料均购自 Thermo Fisher Scientific），细胞融合前一天更换培养基，使细胞处于较好的生长状态。在此采取电融合法制备杂交瘤细胞。电融合法与杂交瘤筛选过程如下：按照脾脏细胞：Sp2/0 细胞=2：1 的比例混合两种细胞，离心后弃上清液；然后用细胞融合缓冲液（购自 BTX）洗涤细胞三次；细胞沉淀以 1 $\times$ 10<sup>7</sup>/ml 的密度悬浮于细胞融合缓冲液中；加 2ml 细胞悬液于细胞融合池中，置于电融合法仪 ECM2001（购自 BTX）上，按一定条件（AC 60V，30S；DC 1700V，40 $\mu$ S，3X；POST AC 60V，3S）进行处理；然后轻轻地将处理后的细胞转移至 37 $^{\circ}$ C 预热的 RPMI-1640 完全培养基中，室温放置 1 小时；将处理后的细胞按 10<sup>4</sup>/孔的密度接种入 96 孔板，每孔 100 $\mu$ l；次日每孔补加 100 $\mu$ l 含有 2 $\times$ HAT（50 $\times$ HAT 购自 Thermo Fisher Scientific，使用时按照需要用培养基适当稀释）的 RPMI-1640 完全培养基；分别在第四天和第七天用新鲜的含有 1 $\times$ HAT 的 RPMI-1640 完全培养基置换旧培养液；于融合后第九天取样进行 ELISA 检测，鉴定阳性克隆。

20 阳性克隆（能够分泌抗 LAG-3 抗体的克隆）的检测通过 ELISA 方法进行：利用 LAG-3-ECD-hFc 抗原包被酶标板，包被量为 100ng/孔；室温孵育 2 小时后用 PBST（含 0.05% Tween-20 的 PBS）清洗；每孔加入 200 $\mu$ l 含 1%牛血清白蛋白（Bovine Serum Albumin, BSA）的 PBST 溶液进行封闭，室温下孵育 1 小时；用 PBST 洗涤后排干，放置冰箱中保存待用。检测时在酶标板中加入杂交瘤培养上清 100 $\mu$ l/孔，孵育 1 小时左右；用 PBST 洗涤 3 遍；用含有 1% BSA 的 PBST 适当稀释 HRP-Goat-Anti-Mouse IgG 抗体（购自 KPL），室温孵育 1 小时左右；PBST 洗涤 3 遍；每孔加 100 $\mu$ l 显色液（以 TMB 为底物）显色；随后每孔加入 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止液终止反应；立即用酶标仪（Molecular Device）在 450nm 波长处测量各孔 OD 值；分析数据，确定阳性克隆。

30 筛选出的阳性克隆并不一定是单克隆，并且有些克隆可能不稳定，因此需要及时进行亚克隆，并最终获得单克隆。亚克隆采用有限稀释法完成，过程如下：制备阳性克隆的杂交瘤细胞悬液，用 HT 培养基（HT 培养基配制方法如下：用 RPMI-1640 完全培养基将 100 $\times$ HT 溶液稀释至所需浓度，100 $\times$ HT 购自 Thermo Fisher Scientific）将细胞密度调整至 10 或 20 个细胞每毫升的稀释度；每个稀释度接种 96 孔板一块，每孔量为 0.2ml，每孔的杂交瘤细胞数平均为 2 或 4；置于 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 7-10 天，出现肉眼可见的克隆时，在倒置显微镜下观察，标出只有单个克隆生长的孔，取上清作 ELISA 检测（检测方法如上所述）；取 ELISA 检

35

测为阳性的孔在 24 孔板中进行扩大培养，并用有限稀释法继续进行新一轮亚克隆，挑选不少于 24 个克隆孔，进行 ELISA 检测，当检测呈 100%阳性时，即为稳定表达目的抗体的单克隆杂交瘤细胞株；将单克隆杂交瘤细胞株进行扩大培养，并进行冻存保种。

5 将稳定的单克隆细胞株扩大培养，在无血清培养基 HybriGRO SF（购自 Corning）中培养 5-7 天左右，细胞培养上清经过离心和过滤除去沉淀后，用 Protein G（购自 GE Healthcare）纯化鼠源抗体。经过若干次融合和筛选，本发明成功建立了 200 多株稳定的杂交瘤单克隆细胞株，并且纯化得到了相应的鼠源抗体，用于进一步的实验。

### 10 实施例3. 鼠源抗人 LAG-3 抗体对混合淋巴细胞反应的影响

在此采用混合淋巴细胞反应（Mixed Lymphocyte Reaction, MLR）对鼠源抗人 LAG-3 抗体的活性进行评估，并加入 Anti-LAG3.5 作为阳性对照。

MLR 实验方法描述如下：用 Histopaque（购自 Sigma）从人血液中分离出外周血单个核细胞（Peripheral Blood Mononuclear Cell，缩写 PBMC），将 PBMC 中的单核细胞亚群通过贴壁法分离出来，然后用 IL-4 和 GM-CSF 联合诱导单核细胞分化成诱导的树突状细胞（p38  
15 MAPK-inhibited dendritic cells induce superior antitumour immune responses and overcome regulatory T-cell-mediated immunosuppression. Nat Commun. 2014 Jun 24;5:4229. doi: 10.1038/ncomms5229.）；七天之后，消化收集上述诱导的树突状细胞；从另外供体的血液  
20 中用上述方法分离出 PBMC，然后用 MACS 磁铁和 CD4 MicroBeads（购自 MiltenyiBiotec）从中分离 CD4 阳性 T 细胞；将诱导的树突状细胞（ $10^4$  个/孔）和分离出的 CD4 阳性 T 细胞（ $10^5$  个/孔）按 10: 1 的比例混匀后接种到 96 孔板中，每孔 150 $\mu$ l；2 小时后，在上述 96 孔板中加入 50 $\mu$ l 用 AIM-V 培养基稀释好的鼠源抗 LAG-3 抗体；同时设置阳性对照抗体 Anti-LAG3.5，以及不结合 LAG-3 的无关同型对照抗体；将 96 孔板置于细胞培养箱（37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub>）中孵育 3-4 天，取适量培养上清，用双抗夹心 ELISA 检测 IL-2 的分泌量（相关检测试剂购自 BD Biosciences）；用多功能酶标仪（Molecular Device）读取 OD450，用 GraphPad Prism6 进行数  
25 据分析和作图。本实施例中用无血清培养基 AIM-V（购自 Thermo Fisher Scientific）培养细胞。

实验结果如图 1A 和 1B 所示，通过两轮筛选（图 1A 和 1B），获得两个能够明显增强 MLR 分泌 IL-2 的鼠源抗人 LAG-3 抗体，分别是 134 号和 2-34（即 5E7）号单抗。

### 30 实施例4. 优选鼠源抗人 LAG-3 抗体的核苷酸和氨基酸序列的测定

根据实施例 3 的筛选结果，最终挑取了 134 号和 5E7 号单抗作为先导抗体。使用 TRIzol（购自 Thermo Fisher Scientific）从 134 和 5E7 对应的杂交瘤单克隆细胞株中提取总 RNA，用逆转录试剂盒（购自 Takara 公司）将 mRNA 逆转录成 cDNA，通过文献报道的引物组合（《Antibody Engineering》Volume 1, Edited by Roland Kontermann and Stefan Dübel；引物组  
35 合的序列来自第 323 页）用 PCR 扩增鼠源的抗人 LAG-3 抗体的轻链可变区和重链可变区基

因，然后将 PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体，测序并分析可变区基因序列。

134 号克隆的序列信息如下：重链可变区基因序列全长 360bp，编码 120 个氨基酸残基，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示；轻链可变区基因序列全长 321bp，编码 107 个氨基酸残基，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示，氨基酸序列如

5 SEQ ID NO: 4 所示。

134 号克隆的重链可变区的氨基酸序列

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTLTAYYMNWVKQSRGKSLEWIGVINPYNGDSSY  
NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARDDGYRWFYFDVWGTGTTVTVSS  
(SEQ ID NO: 2)

10 134 号克隆的轻链可变区的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSRLNWLQQGPDGSIKRLIYATSSLESVGPKRFS  
GSRSGSDYFLTISSEDFVDYYCLQCGSSPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 4)

5E7 号克隆的序列信息如下：重链可变区基因序列全长 348bp，编码 116 个氨基酸残基，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示；轻链可变区基因序列全长 321bp，编码 107 个氨基酸残基，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示，氨基酸序列如

15 SEQ ID NO: 8 所示。

5E7 号克隆的重链可变区的氨基酸序列

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDDYMAWFRQTPEKRLEWVASISHGGDYIYYA  
DNLKGRFTISRDNANTLYLQMSSLKSEDTAIYFCSRDRRSIDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID  
20 NO: 6)

5E7 号克隆的轻链可变区的氨基酸序列

DIQMTQITSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPDGTIKLLIYYTSRLHSGVPSRFS  
GSGSGTDYSLTISDLQEDIATYFCQQGKTLPLYTFGGGKLERK (SEQ ID NO: 8)

## 25 实施例5. 鼠源抗人 LAG-3 抗体的人源化

对实施例 4 中的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列进行分析，依据 Kabat 编码规则分别确定 134 和 5E7 号抗体重链和轻链的 3 个抗原互补决定区 (CDR) 和 4 个框架区 (FR)。

其中，134 号克隆的重链互补决定区的氨基酸序列为 HCDR1: AYYMN (SEQ ID NO: 9)、HCDR2: VINPYNGDSSYNQKFKG (SEQ ID NO: 10) 和 HCDR3: DDGYRWFYFDV (SEQ ID NO: 11)，轻链互补决定区的氨基酸序列为 LCDR1: RASQDIGSRLN (SEQ ID NO: 12)、LCDR2: ATSSLES (SEQ ID NO: 13) 和 LCDR3: LQCGSSPPT (SEQ ID NO: 14)。

其中，5E7 号克隆的重链互补决定区的氨基酸序列为 HCDR1: DDYMA (SEQ ID NO: 15)、HCDR2: SISHGGDYIYYADNLKG (SEQ ID NO: 16) 和 HCDR3: DRRSIDY (SEQ ID NO: 17)，轻链互补决定区的氨基酸序列为 LCDR1: RASQDISNYLS (SEQ ID NO: 18)、LCDR2: YTSRLHS (SEQ ID NO: 19) 和 LCDR3: QQGKTLPLYT (SEQ ID NO: 20)。

在 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>中, 将 134 号抗体重链可变区氨基酸序列与人免疫球蛋白可变区胚系(Germline)序列进行同源性比较, 选择与 134 号同源性最高的 IGHV1-46\*01 为重链可变区人源化模板, 用鼠源 134 号重链 CDR 替换 IGHV1-46\*01 中对应的 CDR, 构建成重链 CDR 移植可变区。同样地, 经过同源性比较, 选择 IGKV1-39\*01 胚系序列为轻链可变区人源化模板, 将鼠源 134 号轻链 CDR 替换 IGKV1-39\*01 中对应的 CDR, 构建成轻链 CDR 移植可变区。然后在重链和轻链 CDR 移植可变区的基础上, 对一些框架区内的氨基酸位点进行回复突变。回复突变就是将 CDR 移植可变区的框架区内的某些氨基酸(对维持抗体结构和亲和力比较重要的氨基酸)突变成鼠源框架区对应位置上的氨基酸。在进行回复突变时, 依据 Kabat 规则将氨基酸序列编码, 每个氨基酸的位置由 Kabat 编码指示。优选的, 将重链 CDR 移植可变区 44 位的 G 回复突变为 S, 48 位的 M 突变为 I, 67 位的 V 突变为 A, 69 位的 M 突变为 L, 71 位的 R 突变为 V, 73 位的 T 突变为 K, 78 位的 V 突变为 A。优选的, 将轻链 CDR 移植可变区 36 位的 Y 回复突变为 L, 第 43 位的 A 突变为 S, 第 44 位的 P 突变为 I, 第 46 位的 L 突变为 R, 第 66 位的 G 突变为 R, 第 69 位的 T 突变为 S, 第 71 位的 F 突变为 Y。需要注意的是, 134 号抗体轻链 CDR3 (SEQ ID NO: 14) 中含有一个多余的半胱氨酸(Kabat 编码的 91 位, C91), 其可能导致抗体结构异常, 故在此将其突变成丝氨酸(C91S, SEQ ID NO: 43)。在携带上述回复突变的重链和轻链 CDR 移植可变区的末端分别加上氨基酸序列: WGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 44) 和 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 45), 构建成完整的人源化的重链和轻链可变区, 相关基因序列由生工生物工程(上海)股份有限公司进行密码子优化和基因合成。

最终获得的 134 人源化重链可变区(134-Hu-VH)基因序列全长 354bp, 编码 118 个氨基酸残基, 核苷酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示; 134 人源化轻链可变区(134-Hu-VL-C91S)基因序列全长 321bp, 编码 107 个氨基酸残基, 核苷酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示。

134 人源化重链可变区(134-Hu-VH)的氨基酸序列

25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTAYYMNWVRQAPGQSLEWIGVINPYNGDSS  
YNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDDGYRWFYFDVWGQGLTVT  
SS (SEQ ID NO: 22, 其中下划线部分为重链互补决定区)

134 人源化轻链可变区(134-Hu-VL-C91S)的氨基酸序列

30 DIQMTQSPSSLSASVGRVITCRASQDIGSRLNWLQKPGKSIKRLIYATSSLES  
GVPSRFS  
GSRSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCLQSGSSPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 24, 其中下划线部分为轻链互补决定区)

用同样的方法对 5E7 号抗体进行人源化。选择与 5E7 号同源性最高的 IGHV3-21\*01 为重链可变区人源化模板, 用鼠源 5E7 号重链 CDR 替换 IGHV3-21\*01 中对应的 CDR, 构建成重链 CDR 移植可变区。同样地, 经过同源性比较, 选择 IGKV1-33\*01 胚系序列为轻链可变区人源化模板, 将鼠源 5E7 号轻链 CDR 替换 IGKV1-33\*01 中对应的 CDR, 构建成轻链 CDR

移植可变区。然后在重链和轻链 CDR 移植可变区的基础上，对一些框架区内的氨基酸位点进行回复突变。在进行回复突变时，依据 Kabat 规则将氨基酸序列编码，每个氨基酸的位置由 Kabat 编码指示。优选的，将重链 CDR 移植可变区 37 位的 V 回复突变为 F，44 位的 G 突变为 R，49 位的 S 突变为 A，91 位的 Y 突变为 F，93 位的 A 突变为 S。优选的，将轻链 CDR 移植可变区 43 位的 A 突变为 T，第 44 位的 P 突变为 I，第 71 位的 F 突变为 Y，第 87 位的 Y 突变为 F。在携带上述回复突变的重链和轻链 CDR 移植可变区的末端分别加上氨基酸序列：WGQGKVEIK (SEQ ID NO: 44) 和 FGQGKVEIK (SEQ ID NO: 45)，构建成完整的人源化的重链和轻链可变区，相关基因序列由生工生物工程（上海）股份有限公司进行密码子优化和基因合成。

10 最终获得的 5E7 人源化重链可变区 (5E7-Hu-VH) 基因序列全长 354bp，编码 118 个氨基酸残基，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示；5E7 人源化轻链可变区 (5E7-Hu-VL) 基因序列全长 321bp，编码 107 个氨基酸残基，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示。

5E7 人源化重链可变区 (5E7-Hu-VH) 的氨基酸序列

15 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMAWFRQAPGKRLEWVASISHGGDYIYY  
ADNLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCSRDRRSIDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 26, 其中下划线部分为重链互补决定区)

5E7 人源化轻链可变区 (5E7-Hu-VL) 的氨基酸序列

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKTIKLLIYYTSSLRHS  
GVPSRFS  
GSGSGTDYFTISSLQPEDATYFCQQGKTLPLYTFGQGKVEIK (SEQ ID NO: 28, 其中下划线部分为轻链互补决定区)

将上述人工合成的 134 人源化重链可变区与人免疫球蛋白 IgG4 恒定区 (核苷酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示) 相连，构建成完整的 134 人源化重链，命名为 134-Hu-IgG4-HC (核苷酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 32 所示)；134 人源化轻链可变区与人免疫球蛋白 Kappa 链恒定区 (核苷酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示) 相连，构建成完整的 134 人源化轻链，命名为 134-Hu-LC-C91S (核苷酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示)。

人免疫球蛋白 IgG4 恒定区的氨基酸序列

30 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY  
SLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK  
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL  
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM  
35 HEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 30)

134 人源化重链 134-Hu-IgG4-HC 的氨基酸序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTLTAYYMNWVRQAPGQSLEWIGVINPYNGDSS  
YNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDDGYRWFYFDVWGQGLT  
 5 LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 10 VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP  
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS  
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL  
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV  
 MHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 32, 其中下划线部分为重链互补决定区)

10 人免疫球蛋白 Kappa 链恒定区的氨基酸序列

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 34)

134 人源化轻链 134-Hu-LC-C91S 的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQDIGSRLNWLQKPGKSIKRLIYATSSLESGVPSRFS  
 15 GSRSGSDYTLTISSLPEDFATYYCLQSGSSPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS  
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE  
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 36, 其中下划线部分为轻链互补决  
 定区)

20 将上述人工合成的 5E7 人源化重链可变区与人免疫球蛋白 IgG4 恒定区 (核苷酸序列如  
 SEQ ID NO: 29 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示) 相连, 构建成完整的 5E7 人源化  
 重链, 命名为 5E7-Hu-IgG4-HC (核苷酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID  
 NO: 38 所示); 5E7 人源化轻链可变区与人免疫球蛋白 Kappa 链恒定区 (核苷酸序列如 SEQ  
 ID NO: 33 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示) 相连, 构建成完整的 5E7 人源化轻链,  
 命名为 5E7-Hu-LC (核苷酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40 所  
 25 示)。

5E7 人源化重链 5E7-Hu-IgG4-HC 的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSDDYMAWFRQAPGKRLEWVASISHGGDYIYY  
ADNLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCSRDRRSIDYWGQGLTLVTVSSASTKG  
 PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 30 VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDT  
 LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG  
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV  
 MHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 38, 其中下划线部分为重链互补决定区)

35 5E7 人源化轻链 5E7-Hu-LC 的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNYLSWYQQKPGKTIKLLIYYTSRLHSGVPSRFS  
 GSGSGTDYFTFTISLQPEDATYFCQQGKTLPGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS  
 GTASVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYE  
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 40, 其中下划线部分为轻链互补决  
 5 定区)

将上述 134-Hu-IgG4-HC 和 134-Hu-LC-C91S 基因分别构建到 pTT5 表达载体中, 用 PEI 将构建好的表达载体共同转染至 HEK293E 细胞中进行瞬时表达。HEK293E 细胞在 FreeStyle 293 Expression Medium (购自 Thermo Fisher Scientific) 无血清培养基中培养, 5 天后离心并收取细胞上清, 利用 Protein A 亲和层析纯化抗体, 最终制备所得抗体命名为  
 10 134-Hu-IgG4-C91S。用同样的方法构建 5E7 人源化重链和轻链的表达载体, 用同样的方法表达和纯化抗体, 最终制备所得抗体命名为 5E7-Hu-IgG4。

另外, 分别将鼠源 134 号抗体的重链可变区和轻链可变区利用重组 PCR 法分别与人免疫球蛋白 IgG4 重链恒定区 (核苷酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示) 和 Kappa 轻链恒定区 (核苷酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID  
 15 NO: 34 所示) 拼接, 分别构建到 pTT5 表达载体中, 用上述方法表达并纯化抗体, 制备的嵌合抗体命名为 134-Chimeric。用同样方法获得 5E7 抗体的嵌合抗体 5E7-Chimeric。

采用 ELISA 法检测人源化改造对抗体和抗原之间的亲和力产生的影响。用 LAG-3-ECD-His (带有 His 标签的 LAG-3 胞外段, 购自 Sino Biological Inc.) 包被酶标板 (10ng/孔), 室温孵育 2 小时后用 PBST (含 0.05% Tween-20 的 PBS) 清洗; 每孔加入 200 $\mu$ l 封闭液  
 20 (含 1% BSA 的 PBST 溶液) 进行封闭; 用 PBST 洗涤酶标板后拍干; 在酶标板中加入在封闭液中梯度稀释的抗人 LAG-3 抗体, 室温孵育 1 小时左右, 然后洗涤酶标板; 加入用封闭液稀释的 Goat-Anti-Human IgG (Fc specific) 二抗 (购自 Sigma), 室温孵育 1 小时左右, 然后洗涤酶标板; 每孔加 100 $\mu$ l 显色液 (TMB 底物) 显色; 随后每孔加入 50 $\mu$ l 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色反应; 用 SpectraMax 190 (Molecular Device) 在 450nm 波长处测量各孔 OD 值; 用 GraphPad  
 25 Prism6 进行数据分析和作图, 并计算 EC<sub>50</sub>。

实验结果如图 2 所示, Anti-LAG3.5、134-Chimeric、134-Hu-IgG4-C91S、5E7-Chimeric 和 5E7-Hu-IgG4 均能有效结合 LAG-3, EC<sub>50</sub> 分别为 27.63ng/ml、8.685ng/ml、8.782ng/ml、9.741ng/ml 和 9.078 ng/ml, 对应的人源化抗体与嵌合抗体的 EC<sub>50</sub> 基本一致, 表明人源化改造没有降低抗体抗原间的亲和力。其中, 同种型对照为不结合 LAG-3 的 IgG4 抗体。  
 30

## 实施例6. 检验人源化抗人 LAG-3 抗体对 PBMC 分泌 IL-2 的增强作用

葡萄球菌肠毒素 (Staphylococcal Enterotoxin A, SEA) 是一种超抗原, 能够交联抗原递呈细胞 (Antigen Presenting Cell, APC) 的 MHC II 类分子和 T 细胞表面的 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR), 从而激活大量的 T 细胞克隆, 强烈刺激免疫反应。T 细胞激活后表达 LAG-3,  
 35 LAG-3 可与 APC 表面的 MHC II 类分子结合, 从而发挥免疫抑制作用。本实施例中, 用 SEA

刺激 PBMC 之后，加入抗人 LAG-3 抗体，通过检测 IL-2 的分泌，评估人源化抗人 LAG-3 抗体的功能活性。

实验方法描述如下：将带有组氨酸标签的 SEA 基因克隆到 pET28a 载体中，用大肠杆菌系统表达此蛋白，然后用镍亲和层析柱对 SEA 进行纯化；用 Histopaque 从人血液中分离 PBMC，  
5 用 PBS 洗涤后离心；用 RPMI-1640 培养基（含 10%胎牛血清）重悬细胞，加入上述自制的 SEA（SEQ IDNO: 52）至终浓度为 1ng/ml，然后将 PBMC 接种至圆底 96 孔细胞培养板中，每孔  $2 \times 10^5$  个细胞，每孔体积为 150 $\mu$ l；然后在每孔中加入 50 $\mu$ l 梯度稀释的抗人 LAG-3 抗体，将 96 孔板置于细胞培养箱（37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub>）中孵育 2 天；取适量培养上清，用双抗夹心 ELISA 检测 IL-2 的分泌量（相关检测试剂购自 BD Biosciences）；用酶标仪（Molecular Device）读取  
10 OD450，用 GraphPad Prism6 进行数据分析和作图。

图 3A 和 3B 中的 PBMC 分别来自不同的捐献者。实验结果显示，Anti-LAG3.5、134-Hu-IgG4-C91S 和 5E7-Hu-IgG4 均能有效增强 SEA 刺激的 PBMC 分泌 IL-2。图 3A 所示  
15 实验中 Anti-LAG3.5、134-Hu-IgG4-C91S 和 5E7-Hu-IgG4 的 EC50 分别为 98.09 ng/ml、50.71 ng/ml 和 78.12 ng/ml；图 3B 所示实验中上述三个抗体的 EC50 分别为 16.21 ng/ml、10.85 ng/ml 和 3.068 ng/ml。两次实验结果均显示，134-Hu-IgG4-C91S 和 5E7-Hu-IgG4 刺激活化 PBMC 分泌 IL-2 的功能活性均强于 Anti-LAG3.5。其中，同种型对照为不结合 LAG-3 的 IgG4 抗体。

#### 实施例7. 人源化抗人 LAG-3 抗体对细胞表面 LAG-3 的结合作用

超抗原 SEA 能够激活 PBMC 中的 T 细胞克隆，激活的 T 细胞会表达 LAG-3。本实施例  
20 用流式细胞法测定本发明的人源化抗人 LAG-3 抗体对细胞表面 LAG-3 的结合作用。

实验步骤描述如下：用 Histopaque 从人血液中分离 PBMC，用 PBS 洗涤 2 遍，离心收集  
25 细胞；用 RPMI-1640 培养基（含 10%胎牛血清）重悬细胞，加入 SEA 至终浓度为 1ng/ml，然后将 PBMC 接种至圆底 96 孔细胞培养板中，每孔  $2 \times 10^5$  个细胞；将 96 孔板置于细胞培养箱（37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub>）中孵育 2 天；用 PBS 洗涤 96 孔板中的细胞，离心后弃掉上清；用 Biotin N-hydroxysuccinimide ester（货号/规格：H1759-100MG，购自 Sigma）对抗体进行生物素化，具体操作按照生产商提供的说明书进行；加入梯度稀释的用生物素标记的抗人 LAG-3 抗体，孵育 1 小时左右，然后用 PBS 洗涤细胞 2 遍；用含 1%BSA 的 PBS 适当稀释的 PE-Streptavidin（购自 BD Biosciences），加入上述细胞中，孵育 1 小时左右，然后用 PBS 洗涤细胞 2 遍；加入  
30 4%的多聚甲醛固定细胞；在流式细胞仪上（CytoFLEX Cytometer System，购自 Beckman Coulter）检测细胞的 PE 荧光强度；用流式细胞仪分析软件处理实验数据并计算平均荧光强度；用 GraphPad Prism6 进行数据分析和作图，计算 EC50。

实验结果如图 4 所示，Anti-LAG3.5、134-Hu-IgG4-C91S 和 5E7-Hu-IgG4 均能有效结合  
细胞表面的 LAG-3，EC50 分别为 71.68ng/ml、80.45ng/ml 和 53.13ng/ml，三者的结合能力基本一致。其中，同种型对照为不结合 LAG-3 的 IgG4 抗体，纵坐标为平均荧光强度。

### 实施例8. 抗人 LAG-3 抗体的表位分析

LAG-3 胞外段的第一个免疫球蛋白样结构域含有一段暴露的“extra loop”，其氨基酸序列为：GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 46)。据文献报道，该肽段对 LAG-3 与 MHC-II 类分子的结合起重要作用 (Baixeras E, Huard B, Miossec C, et al. Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens.[J]. Journal of Experimental Medicine, 1992, 176(2): 327-337.)。为检验本发明的抗人 LAG-3 抗体与该肽段的结合情况，并确定每个抗体的结合表位，实施了如下肽段扫描实验：通过化学方法合成一系列部分重叠的肽段，这些部分重叠的肽段覆盖整个“extra loop”区，在这些肽段的 N 端连接生物素标签；用 Streptavidin 包被酶标板 (200ng/孔)，洗涤酶标板后用封闭液 (含 1%BSA 的 PBST 溶液) 封闭；用封闭液将生物素化的肽段稀释至 1 $\mu$ g/ml 后加入酶标板中，室温孵育 1 小时，使之被 Streptavidin 捕获，然后洗涤酶标板；在其中加入用封闭液梯度稀释的抗人 LAG-3 抗体，室温孵育 1 小时左右，然后洗涤酶标板；加入在封闭液中适当稀释的 Goat-Anti-Human IgG (Fc specific) 二抗 (购自 Sigma) 检测抗人 LAG-3 抗体对肽段的结合，室温孵育 1 小时左右；每孔加 100 $\mu$ l 显色液 (TMB 底物) 显色，随后每孔加入 50 $\mu$ l 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止液终止反应；用 SpectraMax 190 (Molecular Devices, Inc.) 在 450nm 波长处测量各孔 OD 值；用 GraphPad Prism6 进行数据分析和作图，并计算 EC<sub>50</sub>。肽段扫描实验的结果总结在表 1 中。

表 1. 肽段扫描实验的结果汇总

多肽氨基酸序列	Anti-LAG3.5	134-Hu-IgG4-C91S	5E7-Hu-IgG4
GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRY	+++	+++	+++
GPPAAAPGHPLA	-	+++	-
PAAAPGHPLAPG	-	++	-
AAPGHPLAPGPH	-	+	-
PGHPLAPGPHPA	-	-	-
HPLAPGPHPAAP	-	-	+
LAPGPHPAAPSS	-	-	+
PGPHPAAPSSWG	+++	-	-
PHPAAPSSWGPR	+++	-	-
PAAPSSWGPRPR	-	-	-
APSSWGPRPRRY	-	-	-
AAAPGHPLAPGPHPAAPSS	-	-	+++
AAPGHPLAPGPHPAAPSSW	+++	-	++
APGHPLAPGPHPAAPSSWG	+++	-	+
PGHPLAPGPHPAAPSSWGP	+++	-	+
GHPLAPGPHPAAPSSWGPR	+++	-	+
HPLAPGPHPAAPSSWGPRP	+++	-	+

备注：“-”表示无明显结合，“+”表示有明显结合，“+”越多表示结合越强；EC<sub>50</sub> 越小“+”越多。如果抗体与多条肽段均明显结合，那么重叠的最短的肽段就是该抗体的表位。表 1 实验

结果显示, Anti-LAG3.5 抗体的表位是 PHPAAPSSW (SEQ ID NO: 47), 134 号抗体的表位是 GPPAAAPGHPLA (SEQ ID NO: 48); 而 5E7 号抗体的表位是 AAAPGHPLAPGPHPAAPSS (SEQ ID NO: 49)。相关结果展示在图 5 中。

#### 5 实施例9. 人源化抗人 LAG-3 抗体对 LAG-3 结合 Raji 细胞的阻断作用

Raji 细胞是一种 Burkitt 淋巴瘤细胞, 起源于 B 淋巴细胞, 高表达 MHC-II 类分子。本实施例用流式细胞法测定本发明的人源化抗人 LAG-3 抗体对 LAG-3 结合 Raji 细胞表面 MHC-II 类分子的阻断作用。

实验步骤如下: 用 PBS 将 Raji 细胞(购自 American Type Culture Collection, 缩写为 ATCC; ATCC<sup>®</sup> CCL-86<sup>™</sup>) 洗涤 2 遍, 然后接种至圆底 96 孔细胞培养板中, 每孔  $2 \times 10^5$  个细胞, 离心后弃掉上清; 用含 1%BSA 的 PBS 将生物素化 LAG-3 (购自 ACROBiosystems) 稀释至  $0.5 \mu\text{g/ml}$ , 然后再在此溶液中梯度稀释抗人 LAG-3 抗体, 然后将配好的含有生物素化 LAG-3 和抗人 LAG-3 抗体的混合溶液加入上述细胞中, 室温孵育 1 小时左右, 用 PBS 洗涤细胞 2 遍; 用含 1%BSA 的 PBS 适当稀释 PE-Streptavidin (购自 BD Biosciences), 加入上述细胞中, 孵育 1 小时左右, 用 PBS 洗涤细胞 2 遍; 加入 4%的多聚甲醛固定细胞; 在流式细胞仪上 (CytoFLEX Cytometer System, 购自 Beckman Coulter) 检测细胞的 PE 荧光强度; 用流式细胞仪分析软件处理实验数据并计算平均荧光强度; 用 GraphPad Prism6 进行数据分析和作图, 计算 EC50。

实验结果如图 6 所示, Anti-LAG3.5 和 134-Hu-IgG4-C91S 均能有效阻断 LAG-3 对 Raji 细胞的结合, IC50 分别为  $256.9 \text{ng/ml}$  和  $288.8 \text{ng/ml}$ , 两者的阻断能力基本一致。5E7-Hu-IgG4 对 LAG-3 结合 Raji 细胞的影响不同于 Anti-LAG3.5 和 134-Hu-IgG4-C91S: 在高浓度时, 5E7-Hu-IgG4 只能部分阻断 LAG-3 对 Raji 细胞的结合; 在低浓度时, 5E7-Hu-IgG4 反而能促进 LAG-3 对 Raji 细胞的结合。其中, 同种型对照为不结合人 LAG-3 的 IgG4 抗体, 阴性对照表示没有 LAG-3 存在时 Raji 细胞的背景荧光值。

#### 25 实施例 10. Biacore 检测亲和力

本实施例采用分子相互作用仪 Biacore 8K (GE healthcare) 检测 Anti-LAG3.5、134-Hu-IgG4-C91S 和 5E7-Hu-IgG4 与 LAG-3 之间的亲和力。

用 HBS-EP<sup>+</sup> pH7.4 作为稀释缓冲液, 抗 LAG-3 抗体样品稀释至浓度  $0.5 \mu\text{g/mL}$ , 重组 LAG-3 (购自 SinoBiological, 货号: 16498-H08H) 稀释成  $1.024 \text{nM}$ 、 $2.56 \text{nM}$ 、 $6.4 \text{nM}$ 、 $16 \text{nM}$ 、 $40 \text{nM}$  和  $100 \text{nM}$ , 并增设 0 浓度; 采用 6M 盐酸胍溶液作为再生缓冲液; 在 Biacore 8K 上, 使用 Protein A 芯片捕获抗 LAG-3 抗体, 再将重组 LAG-3 进样, 得到结合-解离曲线, 再生缓冲液洗脱后重复下一个循环; 利用 Biacore 8K Insight Evaluation Software 对数据进行分析。结果如表 2 所示。

表 2. 测定抗 LAG-3 抗体对人 LAG-3 的亲和力

样品名称	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
------	------------	------------	--------

Anti-LAG3.5	6.67E+06	3.79E-03	5.68E-10
134-Hu-IgG4-C91S	9.27E+06	4.43E-03	4.78E-10
5E7-Hu-IgG4	4.41E+06	1.84E-05	4.17E-12

实验结果显示, Anti-LAG3.5、134-Hu-IgG4-C91S 和 5E7-Hu-IgG4 对 LAG-3 的平衡解离常数 (KD) 分别是 5.68E-10M、4.78E-10M 和 4.17E-12M, 这表明 134-Hu-IgG4-C91S 和 5E7-Hu-IgG4 对 LAG-3 的亲合力高于 Anti-LAG3.5。5E7-Hu-IgG4 的解离常数 (Koff) 最小, 其 KD 最小, 因此其亲合力也最高。

#### 5 实施例 11. 流式细胞法检测抗人 LAG-3 抗体对 FGL1 结合 LAG-3 的阻断作用

最近, 陈列平团队发现 FGL1 (Fibrinogen-like protein 1) 是 LAG-3 的主要配体, 并阐明了这一肿瘤抑制通路的基本原理 (参考文献: Wang J, Sanmamed M F, Datar I, et al. Fibrinogen-like protein 1 is a major immune inhibitory ligand of LAG-3[J]. Cell, 2019, 176(1-2): 334-347. e12.)。本实施例用流式细胞术检测 Anti-LAG3.5、134-Hu-IgG4-C91S 和 5E7-Hu-IgG4 10 阻断 FGL1 与 LAG-3 相互作用的能力。

制备重组人 FGL1 蛋白的方法如下: 人 FGL1 序列来自于 <http://www.uniprot.org> (Entry: Q08830), 氨基酸序列如下所示:  
 LEDCAQEQMRLRAQVRLLETRVKQQQVKIKQLLQENEVQFLDKGDENTVIDLGSKRQYAD  
 CSEIFNDGYKLSGFYKIKPLQSPAEFVYCDMSDGGGWTVIQRRSDGSENFNRGWKDYEN  
 15 GFGNFVQKHGEYWLGNKLNHFLTQTQEDYTLKIDLADFEKNSRYAQYKNFKVGVGDEKNFYEL  
 NIGEYSGTAGDSLGNFHPVQWASHQRMKFSTWDRDHDNYEGNCAEEDQSGWVFN  
 CHSANLNGVYYSGPYTAKTDNGIVWYTWHGWWYSLKSVVMKIRPNDIFIPNVI (SEQIDNO:  
 53)。然后通过生工生物工程(上海)股份有限公司合成上述氨基酸序列的编码基因; 通过  
 重组 PCR 的方法将 FGL1 的基因与人 IgG1 的 Fc 段基因融合在一起, 将上述带有 Fc 标签的  
 20 基因构建到哺乳动物表达载体中; 在 HEK293E 细胞中瞬时转染并表达; 五天后通过 Protein A  
 亲和层析法纯化细胞培养上清中的重组蛋白, 通过紫外分光光度法测定蛋白浓度, 所得蛋白  
 命名为 FGL1-hFc。FGL1-hFc 的生物素标记方法如下: 用无水 DMSO 将 Biotin  
 N-hydroxysuccinimide ester(Sigma/货号: H1759-100MG)配制成 100mM 的母液; 根据 FGL1-hFc  
 25 的分子量和浓度计算相应的物质的量浓度; 取适当体积的 Biotin N-hydroxysuccinimide ester  
 溶液, 与 FGL1-hFc 按照 20: 1 的物质的量之比混匀, 室温孵育 1 小时; 透析之后用紫外分  
 光光度法测定蛋白浓度, 所得生物素化蛋白命名为 Biotin-FGL1-hFc。

稳定表达 LAG-3 的 CHO-S 细胞株的构建方法如下: CHO-S 细胞购自 Thermo Fisher Scientific, 将全长人 LAG-3 基因构建到 pCHO1.0 表达载体中, 用 PEI (聚乙烯亚胺) 将该表  
 30 达载体转染至 CHO-S 细胞中, 用甲氨蝶呤 (methotrexate) 和嘌呤霉素 (puromycin) 加压筛选, 然后经过有限稀释法挑取单克隆, 获得一株稳定表达人 LAG-3 的 CHO-S 单克隆细胞株, 将该细胞命名为 CHO-S-LAG-3。

流式细胞术检测抗体阻断 FGL1 与 LAG-3 相互作用的方法描述如下:

将 CHO-S-LAG-3 细胞接种到 96 孔板（圆底带盖）中，每孔 20 万个细胞；300g 离心 5min 后，用排枪将细胞培养上清吸掉，每孔加入 200 $\mu$ l PBS+1%BSA（含 1%牛血清白蛋白的 PBS 溶液）以重悬细胞，然后 300g 离心，吸掉上清；加入梯度稀释的抗 LAG-3 抗体和浓度恒定为 2 $\mu$ g/ml 的 Biotin-FGL1-hFc，室温孵育 1 小时；300g 离心，吸掉上清，用 PBS+1%BSA 洗  
5 涤细胞 2 遍；300g 离心，吸掉上清，在每孔中加入用 PBS+1%BSA 以 1:2000 稀释的 PE Streptavidin，每孔加入 200 $\mu$ l，室温孵育 0.5 小时；300g 离心，吸掉上清，用 PBS+1%BSA 洗  
涤细胞 2 遍；最终用 200 $\mu$ l PBS 重悬细胞；在流式细胞仪上检测各孔细胞在 PE 通道的荧光强度；用 GraphPad Prism6 进行数据分析和作图，并计算 IC50。

实验结果如图 7 所示，Anti-LAG3.5、134-Hu-IgG4-C91S 和 5E7-Hu-IgG4 阻断 FGL1 与  
10 LAG-3 相互作用的 IC50 分别是 785.6ng/ml、97.57ng/ml 和 97.71ng/ml，这表明 134-Hu-IgG4-C91S 和 5E7-Hu-IgG4 的阻断能力强于 Anti-LAG3.5。

### 实施例 12. 抗人 LAG-3 抗体对转基因小鼠 MC38 移植瘤模型的抑制作用

动物实验步骤如下：人 LAG-3 转基因小鼠（种系背景为 C57BL/6）和 MC38 小鼠结肠  
15 细胞株由上海南方模式生物研究中心提供。该转基因小鼠中，小鼠 LAG-3 胞外段部分已被人  
LAG-3 基因的同源部分取代，因此本发明的人源化抗 LAG-3 抗体能够识别该转基因小鼠中的  
LAG-3 分子。

具体实施步骤如下：将 MC38 在体外扩大培养，培养基为含有 10%胎牛血清的 DMEM（胎  
牛血清和 DMEM 培养基购自 Thermo Fisher Scientific）；将扩大培养的 MC38 细胞接种于人  
LAG-3 转基因小鼠中，每只小鼠皮下接种  $1 \times 10^6$  个细胞；待接种的肿瘤细胞生长至体积接近  
20  $100\text{mm}^3$  时，随机将动物分成五组，每组 5 只：同型对照抗体组（仅注射同型对照抗体）；  
Anti-mPD-1（购自 Bio X Cell，货号 BP0146）10 mg/kg；Anti-mPD-1 10mg/kg+Anti-LAG3.5 20  
mg/kg；Anti-mPD-1 10 mg/kg+134-Hu-IgG4-C91S 20 mg/kg；Anti-mPD-1 10  
mg/kg+5E7-Hu-IgG4 20 mg/kg。通过腹腔注射给药，给药频率为每周两次。随后，按照上述  
设计好的方案给药，持续时间三周，每周测量并计算肿瘤体积 2 次。最终，各组肿瘤生长曲  
25 线图 8 所示。抗 LAG-3 单抗作为单药使用时的抗肿瘤作用比较弱（参考文献：Woo S R, Turnis  
M E, Goldberg M V, et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate  
T-cell function to promote tumoral immune escape[J]. Cancer research, 2012, 72(4): 917-927.），考  
虑到动物福利，此处未设置抗 LAG-3 单抗的单药组。

实验结果显示，与对照组相比，Anti-mPD-1 能够明显地抑制小鼠体内 MC38 肿瘤的生长  
30 （ $P=0.0249$ ）；与 Anti-mPD-1 单药相比，Anti-LAG3.5 与 Anti-mPD-1 联合应用能够进一步  
抑制 MC38 肿瘤的生长，但无统计学显著性差异（ $P=0.1174$ ， $P<0.05$  认为有显著性差异）；  
与 Anti-mPD-1 单药相比，134-Hu-IgG4-C91S 与 Anti-mPD-1 联合应用能够进一步抑制 MC38  
肿瘤的生长（ $P=0.0159$ ）；与 Anti-mPD-1 单药相比，5E7-Hu-IgG4 与 Anti-mPD-1 联合应用  
也能进一步抑制 MC38 肿瘤的生长（ $P=0.0003$ ）。

## 权利要求书

1、结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，其结合的人 LAG-3 表位包括以下氨基酸序列：AAAPGHPLA（SEQ ID NO：50）。

2、如权利要求 1 所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，其结合的人 LAG-3 表位包括以下氨基酸序列：GPPAAAPGHPLA（SEQ ID NO：48）或 AAAPGHPLAPGPHPAAPSS（SEQ ID NO：49）。

3、结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，包括：

(a) 重链互补决定区 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：9 所示，所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：10 所示，所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：11 所示，和轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2、LCDR3，所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：12 所示，所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：13 所示，所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：14 或 SEQ ID NO：43 所示；或

(b) 重链互补决定区 HCDR1、HCDR2、HCDR3，所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：15 所示，所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：16 所示，所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：17 所示，和轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2、LCDR3，所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：18 所示，所述 L-CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：19 所示，所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：20 所示。

4、如权利要求 1-3 任一项所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

5、如权利要求 4 所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体为单克隆抗体。

6、如权利要求 1-3 任一项所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

7、如权利要求 6 所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体为人源化抗体。

8、如权利要求 1-3 任一项所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗原结合片段包括 Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、Fv 片段。

9、如权利要求 1-3 中任一项所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，选自：

(a) 所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：2 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：4 所示；

(b) 所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：6 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：8 所示；

(c) 所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：22 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：24 所示；和

(d) 所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示, 所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示。

10、如权利要求 9 所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段包括重链恒定区和轻链恒定区, 所述重链恒定区选自  
5 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 重链恒定区, 所述轻链恒定区选自  $\kappa$  或  $\lambda$  轻链恒定区。

11、如权利要求 10 所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述重链恒定区为 IgG4 重链恒定区, 所述轻链恒定区为  $\kappa$  轻链恒定区。

12、如权利要求 11 所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示, 所述轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:  
10 34 所示。

13、如权利要求 9-12 任一项所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段包括重链和轻链, 选自:

(a) 所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 32 所示, 所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示; 和

15 (b) 所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 38 所示, 所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40 所示。

14、核苷酸序列, 其特征在于, 所述核苷酸序列编码如权利要求 1-13 任一项所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段。

15、如权利要求 14 所述的核苷酸序列, 其特征在于, 所述核苷酸序列包括:

20 (a) 如 SEQ ID NO: 1 所示编码重链可变区的核苷酸序列, 如 SEQ ID NO: 3 所示编码轻链可变区的核苷酸序列;

(b) 如 SEQ ID NO: 5 所示编码重链可变区的核苷酸序列, 如 SEQ ID NO: 7 所示编码轻链可变区的核苷酸序列;

25 (c) 如 SEQ ID NO: 21 所示编码重链可变区的核苷酸序列, 如 SEQ ID NO: 23 所示编码轻链可变区的核苷酸序列; 或

(d) 如 SEQ ID NO: 25 所示编码重链可变区的核苷酸序列, 如 SEQ ID NO: 27 所示编码轻链可变区的核苷酸序列。

16、如权利要求 15 所述的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包括如 SEQ ID NO: 29 所示的编码重链恒定区的核苷酸序列, 和如 SEQ ID NO: 33 所示的编码轻链恒定区的核苷酸序列。

30 17、如权利要求 14-16 任一项所述的核苷酸序列, 所述核苷酸序列包括:

(a) 如 SEQ ID NO: 31 所示编码重链的核苷酸序列, 如 SEQ ID NO: 35 所示编码轻链的核苷酸序列; 或

(b) 如 SEQ ID NO: 37 所示编码重链的核苷酸序列, 如 SEQ ID NO: 39 所示编码轻链的核苷酸序列。

35 18、表达载体, 其特征在于, 所述表达载体含有如权利要求 14-17 任一项所述的核苷酸

序列。

19、宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有如权利要求 18 所述的表达载体。

20、如权利要求 1-13 任一项所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段的制备方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

5 (a) 在表达条件下，培养权利要求 19 所述的宿主细胞，从而表达所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段；

(b) 分离并纯化 (a) 所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段。

21、药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有如权利要求 1-13 任一项所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

10 22、如权利要求 21 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物还包括 PD-1 抑制剂。

23、如权利要求 22 所述的药物组合物，其特征在于，所述 PD-1 抑制剂为结合 PD-1 的抗体或其抗原结合片段。

15 24、如权利要求 1-13 任一项所述的结合人 LAG-3 的抗体或其抗原结合片段或如权利要求 21-23 任一项所述的药物组合物在制备治疗癌症的药物中的用途。

25、如权利要求 24 所述的用途，其特征在于，所述癌症选自黑色素瘤、肾细胞癌、非小细胞肺癌、经典霍奇金淋巴瘤、尿路上皮癌、结直肠癌和肝癌。

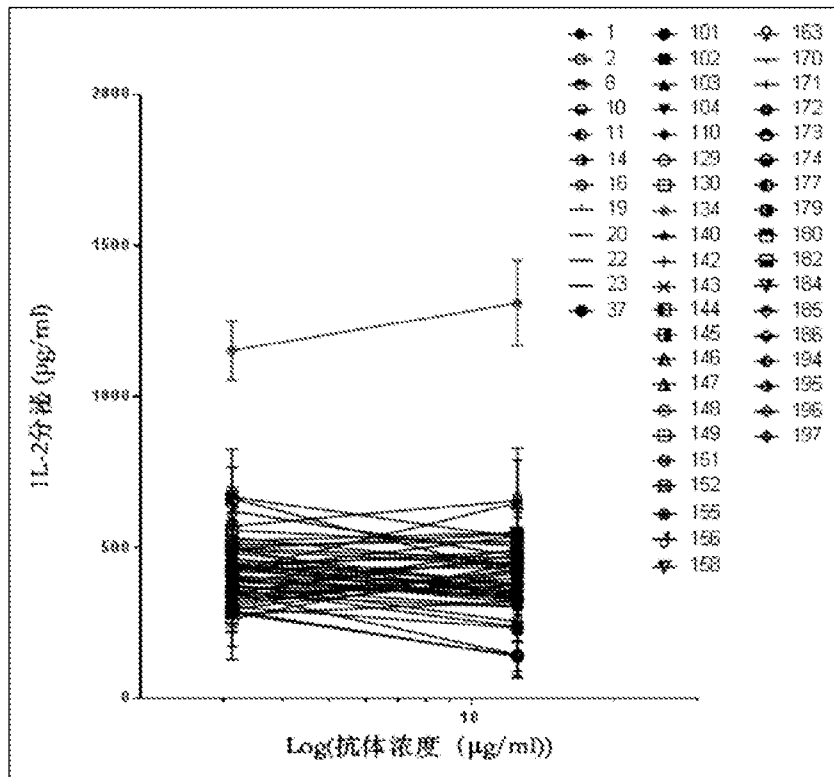


图 1A

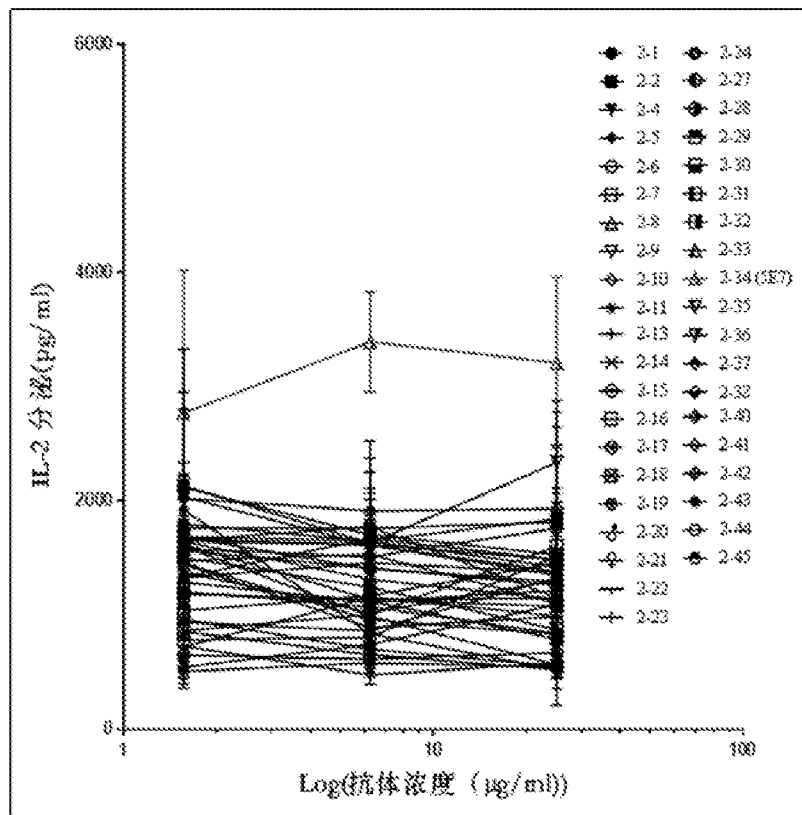


图 1B

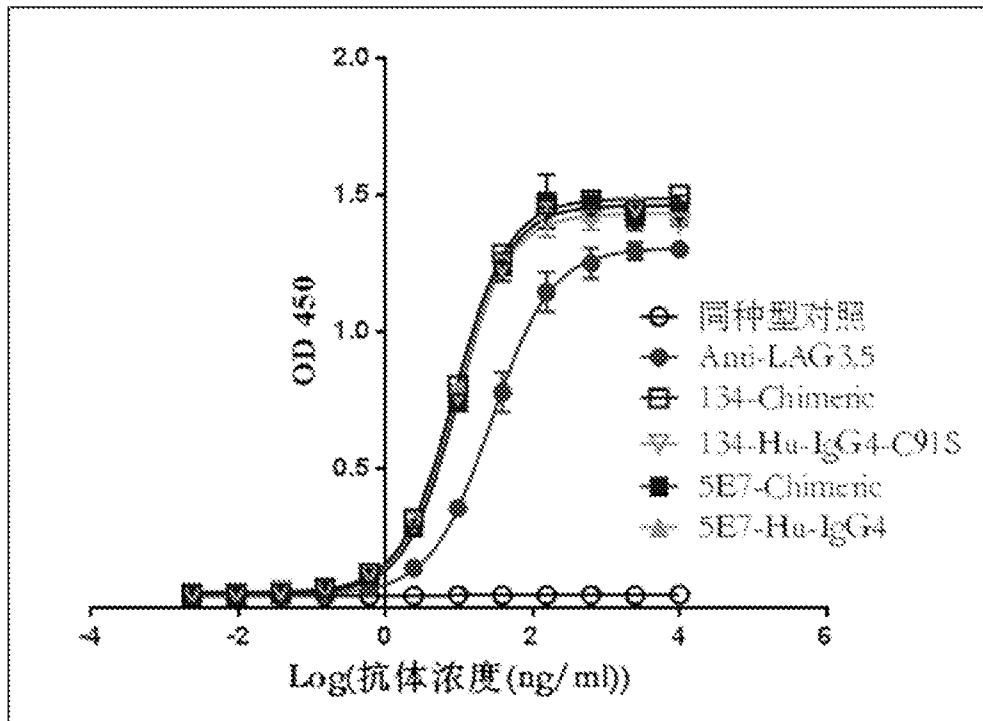


图 2

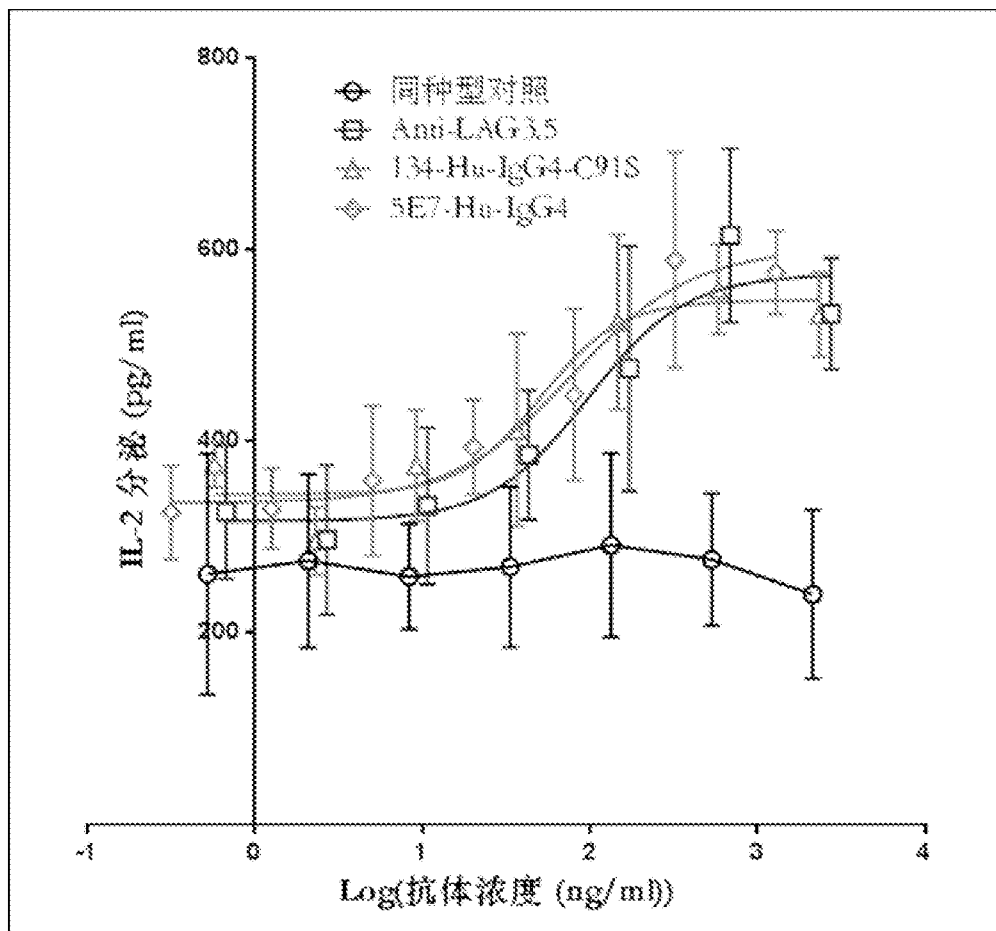


图 3A

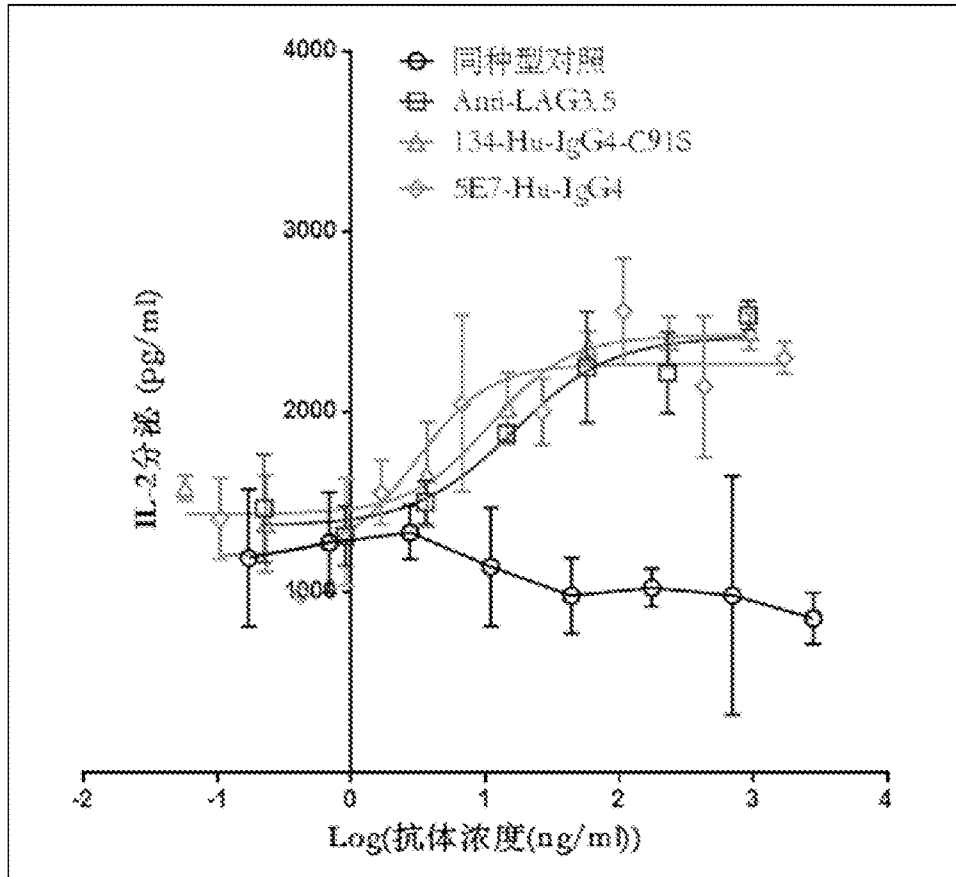


图 3B

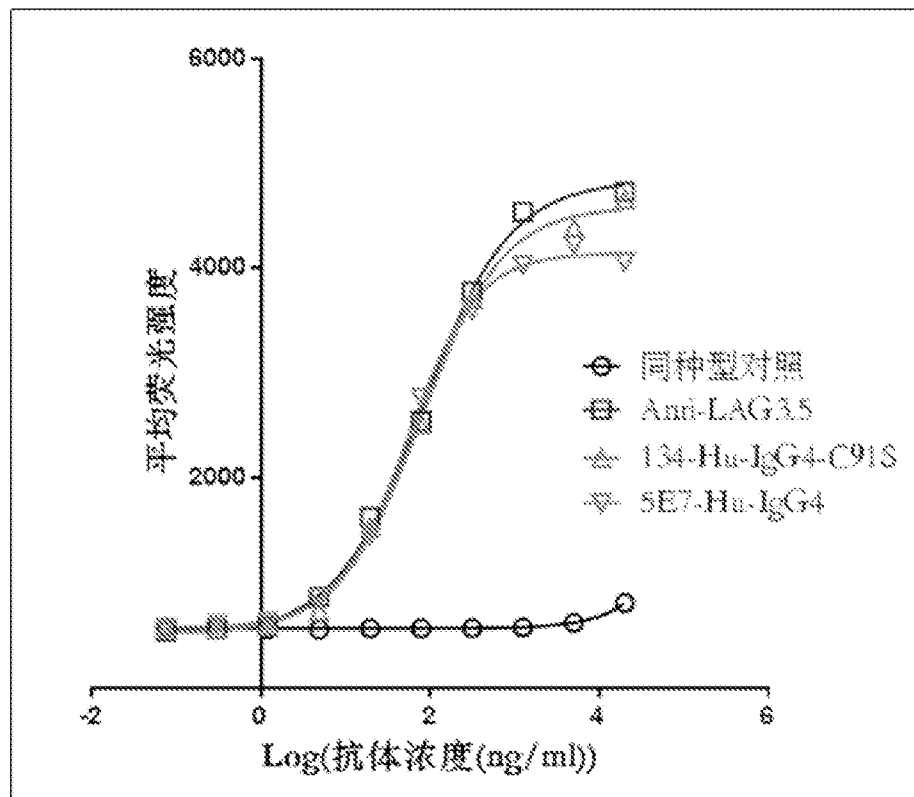


图 4

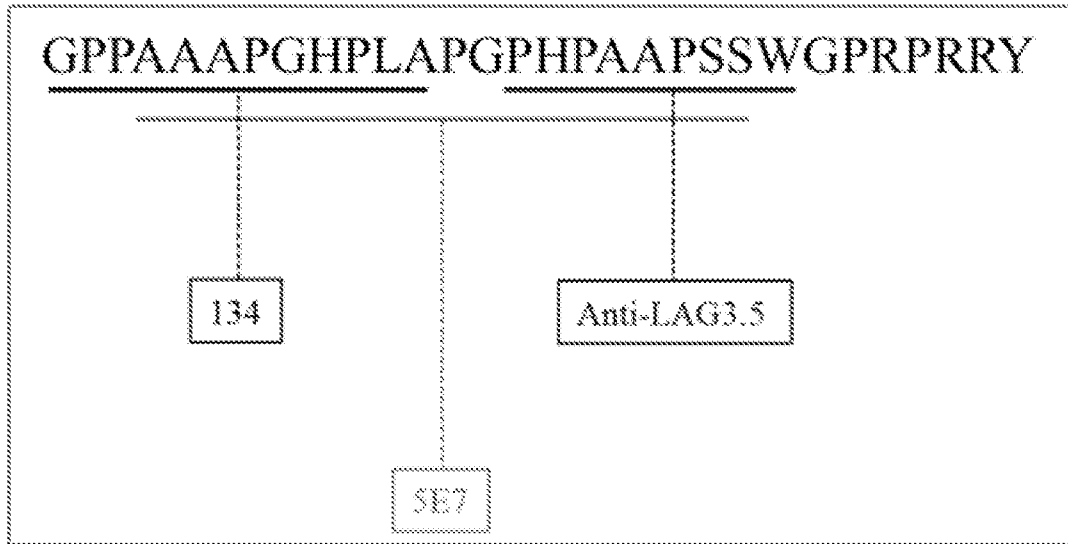


图 5

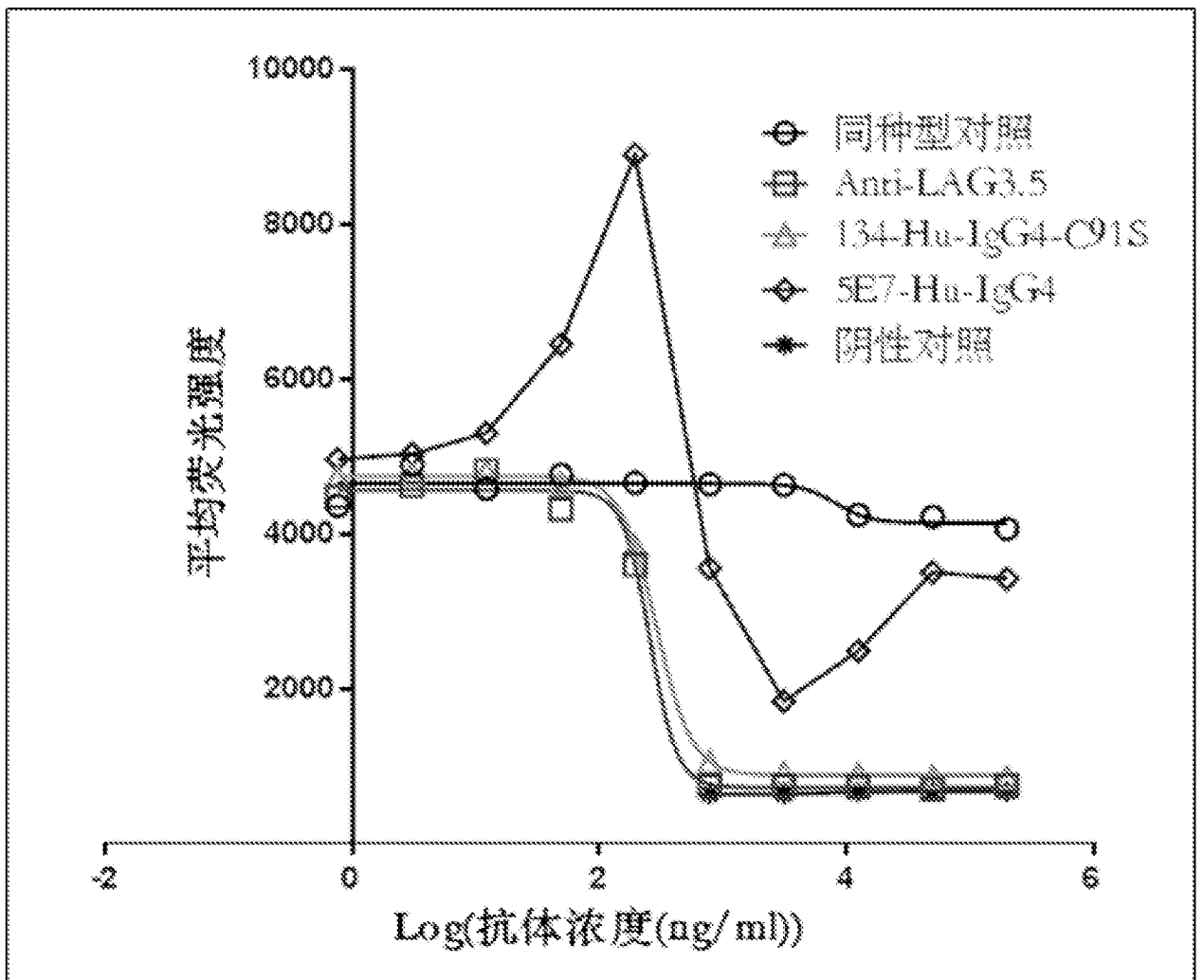


图 6

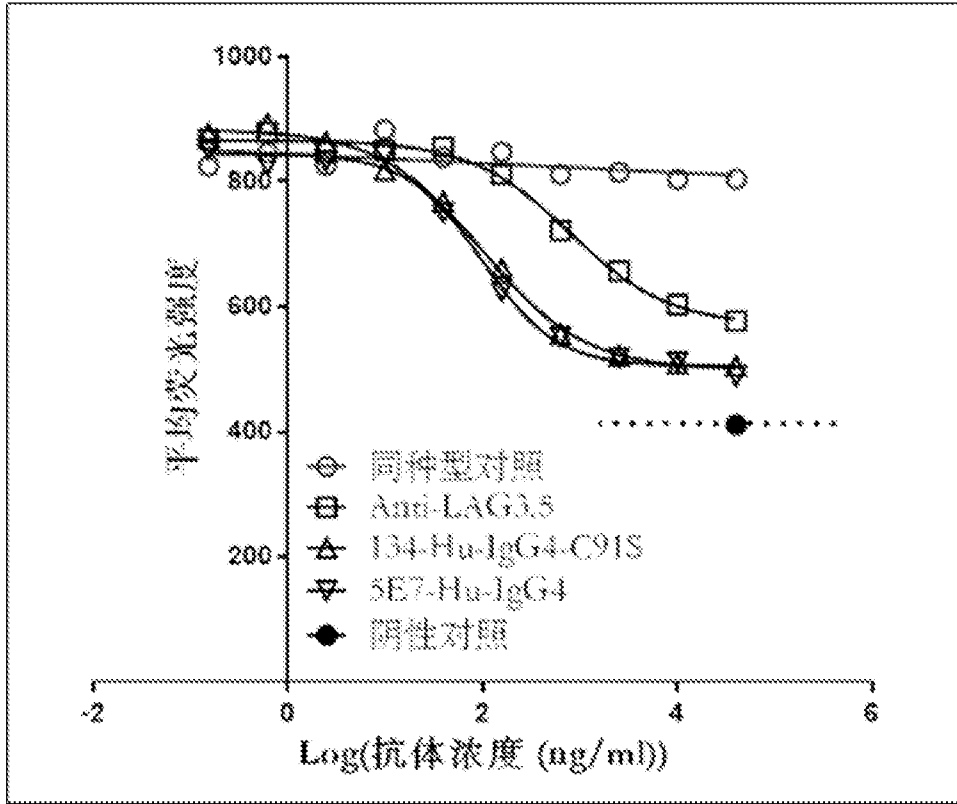


图 7

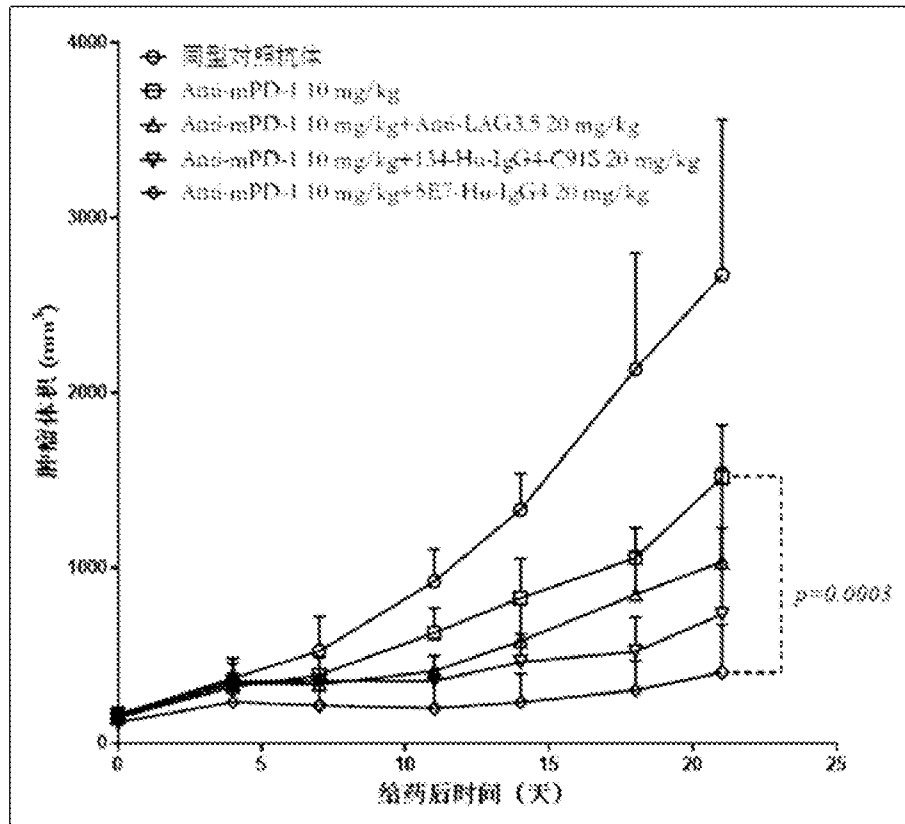


图 8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2020/076023**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; C12P; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Databases: CNMED; CNABS; CPEA; TWMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; CNKI; ISI; ELESEVER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; 万方, WANFANG; 中国专利生物序列检索系统数据库, CHINA PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE SEARCH SYSTEM Search Terms: LAG-3, CD223, 淋巴细胞活化基因-3, 抗体, lymphocyte activation gene-3, antibody, SEQ ID NOS: 1-53		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102176921 A (MEDAREX LLC) 07 September 2011 (2011-09-07) see description, paragraphs 0091-0382, embodiments and the claims	1-2, 4-8 (part), 14 (part), 18-25 (part)
A	CN 102176921 A (MEDAREX LLC) 07 September 2011 (2011-09-07) see description, paragraphs 0091-0382, embodiments and the claims	3, 4-8 (part), 9-13, 14 (part), 15-17, 18-25 (part)
A	WO 2017219995 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.; SHANGHAI HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) 28 December 2017 (2017-12-28) see entire document	1-25
A	WO 2019011306 A1 (NANJING LEADS BIOLABS CO., LTD.) 17 January 2019 (2019-01-17) see entire document	1-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>07 May 2020</b>		Date of mailing of the international search report <b>21 May 2020</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2020/076023**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102176921	A	07 September 2011	TW	I491408	B	11 July 2015
				JP	2019030307	A	28 February 2019
				AU	2014221286	A1	02 October 2014
				HK	1212911	A1	24 June 2016
				SI	2320940	T1	31 July 2015
				AR	072999	A1	06 October 2010
				KR	101700459	B1	26 January 2017
				LT	2905030	T	10 February 2020
				CN	103923213	A	16 July 2014
				JP	2017052765	A	16 March 2017
				SM	T201500125	B	09 July 2015
				JP	2015096503	A	21 May 2015
				EP	2320940	B1	04 March 2015
				DK	2320940	T3	26 May 2015
				TW	201019958	A	01 June 2010
				PT	2320940	E	19 June 2015
				SG	10201706497Q	A	28 September 2017
				KR	20110050507	A	13 May 2011
				JP	5647981	B2	07 January 2015
				MX	2011001250	A	29 March 2011
				SI	2905030	T1	28 February 2020
				PE	03062011	A1	21 May 2011
				ES	2537203	T3	03 June 2015
				HR	P20150453	T1	19 June 2015
				DK	2905030	T3	17 February 2020
				HK	1151985	A1	11 December 2015
				NZ	623319	A	28 August 2015
				PL	2320940	T3	31 August 2015
				PE	20141658	A1	08 November 2014
				US	2019276539	A1	12 September 2019
				EP	2905030	A1	12 August 2015
				CN	102176921	B	07 May 2014
				CA	2734335	C	16 January 2018
				EP	2320940	A4	23 January 2013
				PE	20190373	A1	08 March 2019
				CL	2016002624	A1	09 June 2017
				IL	210731	A	31 August 2017
				PE	16582014	A1	08 November 2014
				SI	EP2320940	T1	31 July 2015
				PT	2905030	T	29 January 2020
				AU	2009282134	A1	18 February 2010
				EA	023032	B1	29 April 2016
				CY	1116582	T1	15 March 2017
				US	10344089	B2	09 July 2019
				CL	2013002062	A1	10 January 2014
				US	2019276538	A1	12 September 2019
				IL	210731	D0	31 March 2011
				WO	2010019570	A2	18 February 2010
				IL	261718	D0	31 October 2018
WO	2017219995	A1	28 December 2017	TW	201800419	A	01 January 2018

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2020/076023**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CA 3024359 A1	28 December 2017
		EP 3476399 A4	29 January 2020
		BR 112018074155 A2	06 March 2019
		EP 3476399 A1	01 May 2019
		MX 2018015393 A	29 April 2019
		JP 2019518459 A	04 July 2019
		KR 20190021248 A	05 March 2019
		CN 108472349 A	31 August 2018
		AU 2017282892 A1	24 January 2019
		US 2019233513 A1	01 August 2019
WO 2019011306 A1	17 January 2019	US 2019016800 A1	17 January 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/076023

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; C12P; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>数据库: CNMED; CNABS; CPEA; TWEMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; CNKI; ISI; ELSEVEER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; 万方; 中国专利生物序列检索系统数据库 检索词: LAG-3, CD223, 淋巴细胞活化基因-3, 抗体, lymphocyte activation gene-3, antibody, SEQ ID NOS:1-53</p>																	
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 102176921 A (梅达雷克斯股份有限公司) 2011年 9月 7日 (2011 - 09 - 07) 参见说明书第0091-0382段, 实施例, 权利要求书</td> <td>1-2, 4-8 (部分), 14 (部分), 18-25 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102176921 A (梅达雷克斯股份有限公司) 2011年 9月 7日 (2011 - 09 - 07) 参见说明书第0091-0382段, 实施例, 权利要求书</td> <td>3, 4-8 (部分), 9-13, 14 (部分), 15-17, 18-25 (部分)</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017219995 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 上海恒瑞医药有限公司) 2017年 12月 28日 (2017 - 12 - 28) 参见全文</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2019011306 A1 (南京维立志博生物科技有限公司) 2019年 1月 17日 (2019 - 01 - 17) 参见全文</td> <td>1-25</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 102176921 A (梅达雷克斯股份有限公司) 2011年 9月 7日 (2011 - 09 - 07) 参见说明书第0091-0382段, 实施例, 权利要求书	1-2, 4-8 (部分), 14 (部分), 18-25 (部分)	A	CN 102176921 A (梅达雷克斯股份有限公司) 2011年 9月 7日 (2011 - 09 - 07) 参见说明书第0091-0382段, 实施例, 权利要求书	3, 4-8 (部分), 9-13, 14 (部分), 15-17, 18-25 (部分)	A	WO 2017219995 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 上海恒瑞医药有限公司) 2017年 12月 28日 (2017 - 12 - 28) 参见全文	1-25	A	WO 2019011306 A1 (南京维立志博生物科技有限公司) 2019年 1月 17日 (2019 - 01 - 17) 参见全文	1-25
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	CN 102176921 A (梅达雷克斯股份有限公司) 2011年 9月 7日 (2011 - 09 - 07) 参见说明书第0091-0382段, 实施例, 权利要求书	1-2, 4-8 (部分), 14 (部分), 18-25 (部分)															
A	CN 102176921 A (梅达雷克斯股份有限公司) 2011年 9月 7日 (2011 - 09 - 07) 参见说明书第0091-0382段, 实施例, 权利要求书	3, 4-8 (部分), 9-13, 14 (部分), 15-17, 18-25 (部分)															
A	WO 2017219995 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 上海恒瑞医药有限公司) 2017年 12月 28日 (2017 - 12 - 28) 参见全文	1-25															
A	WO 2019011306 A1 (南京维立志博生物科技有限公司) 2019年 1月 17日 (2019 - 01 - 17) 参见全文	1-25															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 5月 7日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 5月 21日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>马岚</p> <p>电话号码 86-(10)-62412181</p>															

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/076023

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102176921	A	2011年 9月 7日	TW	1491408	B	2015年 7月 11日
				JP	2019030307	A	2019年 2月 28日
				AU	2014221286	A1	2014年 10月 2日
				HK	1212911	A1	2016年 6月 24日
				SI	2320940	T1	2015年 7月 31日
				AR	072999	A1	2010年 10月 6日
				KR	101700459	B1	2017年 1月 26日
				LT	2905030	T	2020年 2月 10日
				CN	103923213	A	2014年 7月 16日
				JP	2017052765	A	2017年 3月 16日
				SM	T201500125	B	2015年 7月 9日
				JP	2015096503	A	2015年 5月 21日
				EP	2320940	B1	2015年 3月 4日
				DK	2320940	T3	2015年 5月 26日
				TW	201019958	A	2010年 6月 1日
				PT	2320940	E	2015年 6月 19日
				SG	10201706497Q	A	2017年 9月 28日
				KR	20110050507	A	2011年 5月 13日
				JP	5647981	B2	2015年 1月 7日
				MX	2011001250	A	2011年 3月 29日
				SI	2905030	T1	2020年 2月 28日
				PE	03062011	A1	2011年 5月 21日
				ES	2537203	T3	2015年 6月 3日
				HR	P20150453	T1	2015年 6月 19日
				DK	2905030	T3	2020年 2月 17日
				HK	1151985	A1	2015年 12月 11日
				NZ	623319	A	2015年 8月 28日
				PL	2320940	T3	2015年 8月 31日
				PE	20141658	A1	2014年 11月 8日
				US	2019276539	A1	2019年 9月 12日
				EP	2905030	A1	2015年 8月 12日
				CN	102176921	B	2014年 5月 7日
				CA	2734335	C	2018年 1月 16日
				EP	2320940	A4	2013年 1月 23日
				PE	20190373	A1	2019年 3月 8日
				CL	2016002624	A1	2017年 6月 9日
				IL	210731	A	2017年 8月 31日
				PE	16582014	A1	2014年 11月 8日
				SI	EP2320940	T1	2015年 7月 31日
				PT	2905030	T	2020年 1月 29日
				AU	2009282134	A1	2010年 2月 18日
				EA	023032	B1	2016年 4月 29日
				CY	1116582	T1	2017年 3月 15日
				US	10344089	B2	2019年 7月 9日
				CL	2013002062	A1	2014年 1月 10日
				US	2019276538	A1	2019年 9月 12日
				IL	210731	D0	2011年 3月 31日
				WO	2010019570	A2	2010年 2月 18日
				IL	261718	D0	2018年 10月 31日
WO	2017219995	A1	2017年 12月 28日	TW	201800419	A	2018年 1月 1日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/076023

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				CA	3024359	A1	2017年 12月 28日
				EP	3476399	A4	2020年 1月 29日
				BR	112018074155	A2	2019年 3月 6日
				EP	3476399	A1	2019年 5月 1日
				MX	2018015393	A	2019年 4月 29日
				JP	2019518459	A	2019年 7月 4日
				KR	20190021248	A	2019年 3月 5日
				CN	108472349	A	2018年 8月 31日
				AU	2017282892	A1	2019年 1月 24日
				US	2019233513	A1	2019年 8月 1日
WO	2019011306	A1	2019年 1月 17日	US	2019016800	A1	2019年 1月 17日