



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108699145 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201680064139.X

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224

(22)申请日 2016.09.01

代理人 刘培培 黄爱娇

(30)优先权数据

1515572.4 2015.09.02 GB

1612437.2 2016.07.18 GB

(51)Int.Cl.

G07K 16/28(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/070664 2016.09.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/037203 EN 2017.03.09

(71)申请人 伊缪泰普有限公司

地址 法国奥尔赛

(72)发明人 弗雷德里克·特里贝尔

克里斯泰勒·布里尼奥内

权利要求书16页 说明书80页

序列表30页 附图31页

(54)发明名称

抗LAG-3抗体

(57)摘要

描述了与淋巴细胞活化基因3(LAG-3)结合的抗体或其抗原结合片段,特别是作为LAG-3的激动剂的抗体或其抗原结合片段。该抗体与LAG-3结合并抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖或抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化。所述抗体可以用作药物,特别是用于治疗与CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的增殖和/或活化相关的病症,例如炎症和自身免疫失调。

1. 分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段与淋巴细胞活化基因3 (LAG-3) 结合,并抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖,或抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化。

2. 根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段抑制抗原诱导的CD4⁺和抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖。

3. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段对抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖的抑制作用大于对抗原诱导的CD4⁺T细胞增殖的抑制作用。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,对抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖的所述抑制是LAG-3依赖性的,且是IL-2非依赖性的。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖,并抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化。

6. 一种分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段与淋巴细胞活化基因3 (LAG-3) 结合并抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段与LAG-3结合的亲和力高于单克隆抗体17B4。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段抑制LAG-3或IMP321与MHC II类阳性细胞的结合。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段抑制LAG-3诱导的抗原呈递细胞 (APC) 的活化或IMP321诱导的单核细胞的活化。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段与LAG-3的表位结合,所述LAG-3的表位与LAG-3的MHC II类结合位点重叠。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体重链可变 (VH) 区的一个、两个或三个互补决定区 (CDR) 和/或抗体轻链可变 (VL) 区的一个、两个或三个CDR,所述抗体重链可变区含有氨基酸序列SEQ ID NO:7,所述抗体轻链可变区含有氨基酸序列SEQ ID NO:8。

12. 根据权利要求11所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体VH区的CDR选自氨基酸序列SEQ ID NO:1、2、3、21、22和23的CDR,且所述抗体VL区的CDR选自氨基酸序列SEQ ID NO:4、5、6、24、25和26的CDR。

13. 根据权利要求11或12所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,其中所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列,和/或所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列,和/或所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列。

14. 根据权利要求13所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其特征在于
所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列,并且所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列;

所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列,并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;

所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列,并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;或

所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列,所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列,并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列。

15. 根据权利要求11-14任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其中,所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列,和/或所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列,和/或所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列。

16. 根据权利要求15所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其特征在于:

所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列,并且所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列;

所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列,并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列;

所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列,并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列;或

所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列,所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列,并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列。

17. 根据权利要求13至16中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列,所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列,并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;和/或所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列,所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列,并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列。

18. 根据权利要求11至17中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体VH区的CDR为氨基酸序列SEQ ID NO:1、2和3的CDR,且所述抗体VL区的CDR为氨基酸序列SEQ ID NO:4、5和6的CDR。

19. 根据权利要求11至17中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体VH区的CDR为氨基酸序列SEQ ID NO:21、22和23的CDR,且所述抗体VL区的CDR为氨基酸序列SEQ ID NO:24、25和26的CDR。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区和/或抗体VL区,所述抗体VH区具有含有SEQ ID NO:1、2和3的氨基酸序列的CDR,所述VL区具有含有SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列的CDR。

21. 根据权利要求1至19中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区和/或抗体VL区,所述抗体VH区具有含有SEQ ID NO:21、22和23的氨基酸序列的CDR,所述VL区具有含有SEQ ID NO:24、25和26的氨基酸序列的CDR。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区含有:(a) VH CDR1区,其含有SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VH CDR2区,其含有SEQ ID NO:2或与SEQ ID NO:2相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) VH CDR3区,其含有SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;所述轻链可变区含有:(a) VL CDR1区,其含有SEQ ID NO:4或与SEQ ID NO:4相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加

的氨基酸序列；(b) VL CDR2区，其含有SEQ ID NO:5或与SEQ ID NO:5相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列；以及(c) VL CDR3区，其含有SEQ ID NO:6或与SEQ ID NO:6相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或片段包含重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区含有：(a) VH CDR1区，其含有SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列；(b) VH CDR2区，其含有SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列；以及(c) VH CDR3区，其含有SEQ ID NO:23或与SEQ ID NO:23相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列；所述轻链可变区含有：(a) VL CDR1区，其含有SEQ ID NO:24或与SEQ ID NO:24相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列；(b) VL CDR2区，其含有SEQ ID NO:25或与SEQ ID NO:25相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列；以及(c) VL CDR3区，其含有SEQ ID NO:26或与SEQ ID NO:26相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列。

24. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或片段包含抗体VH区和/或抗体VL区，所述抗体VH区包含氨基酸序列SEQ ID NO:7或与氨基酸序列SEQ ID NO:7至少60%相同的氨基酸序列，所述抗体VL区包含氨基酸序列SEQ ID NO:8或与氨基酸序列SEQ ID NO:8至少60%相同的氨基酸序列。

25. 根据前述权利要求24所述的分离的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或片段包含抗体VH区和抗体VL区，所述抗体VH区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7至少60%相同的氨基酸序列，所述抗体VL区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8至少60%相同的氨基酸序列。

26. 根据前述权利要求24所述的分离的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或片段包含抗体VH区和抗体VL区，所述抗体VH区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:7至少60%相同的氨基酸序列，所述抗体VL区包含氨基酸序列SEQ ID NO:8。

27. 根据前述权利要求24所述的分离的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或片段包含抗体VH区和抗体VL区，所述抗体VH区包含氨基酸序列SEQ ID NO:7，所述抗体VL区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:8至少60%相同的氨基酸序列。

28. 根据权利要求24所述的分离的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或片段包含抗体VH区和抗体VL区，所述抗体VH区含有氨基酸序列SEQ ID NO:7，所述VL区含有氨基酸序列SEQ ID NO:8。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或片段包含抗体VH区的一个、两个或三个CDR和/或抗体VL区的一个、两个或三个CDR，所述抗体VH区含有氨基酸序列SEQ ID NO:17，所述抗体VL区含有氨基酸序列SEQ ID NO:18。

30. 根据权利要求29所述的分离的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体VH区的CDR选自氨基酸序列SEQ ID NO:11、12、13、31、32和33的CDR，且所述抗体VL区的CDR选自氨基酸序列SEQ ID NO:14、15、16、34、35和36的CDR。

31. 根据权利要求29或30所述的分离的抗体或其抗原结合片段，所述抗体或片段包含抗体VH区，所述抗体VH区含有VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3，其中，所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列，和/或所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列，和/或所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列。

32. 根据权利要求31所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于:

所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列, 并且所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列;

所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列, 并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列;

所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列, 并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列; 或

所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列, 所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列, 并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列。

33. 根据权利要求29-32中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或片段包含抗体VL区, 所述抗体VL区含有VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3, 其中, 所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列, 和/或所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列, 和/或VL CDR3具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列。

34. 根据权利要求33所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于:

所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列, 并且所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列;

所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列, 并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列;

所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列, 并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列; 或

所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列, 所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列, 并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列。

35. 根据权利要求31至34中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列, 所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列, 并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列; 和/或所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列, 所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列, 并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列。

36. 根据权利要求29至35中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体VH区的CDR为氨基酸序列SEQ ID NO:11、12和13的CDR, 且所述抗体VL区的CDR为氨基酸序列SEQ ID NO:14、15和16的CDR。

37. 根据权利要求29至35中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体VH区的CDR为氨基酸序列SEQ ID NO:31、32和33的CDR, 且所述抗体VL区的CDR为氨基酸序列SEQ ID NO:34、35和36的CDR。

38. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或片段包含抗体VH区和/或抗体VL区, 所述抗体VH区具有含有SEQ ID NO:11、12和13的氨基酸序列的CDR, 所述抗体VL区具有含有SEQ ID NO:14、15和16的氨基酸序列的CDR。

39. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或片段包含抗体VH区和/或抗体VL区, 所述抗体VH区具有含有SEQ ID NO:31、32和33的氨基酸序列的CDR, 所述VL区具有含有SEQ ID NO:34、35和36的氨基酸序列的CDR。

40. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区含有:(a) VH CDR1区,其含有SEQ ID NO:11或与SEQ ID NO:11相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VH CDR2区,其含有SEQ ID NO:12或与SEQ ID NO:12相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) CDR3区,其含有SEQ ID NO:13或与SEQ ID NO:13相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;所述轻链可变区含有:(a) VL CDR1区,其含有SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VL CDR2区,其含有SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) VL CDR3区,其含有SEQ ID NO:16或与SEQ ID NO:16相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列。

41. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区含有:(a) VH CDR1区,其含有SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VH CDR2区,其含有SEQ ID NO:32或与SEQ ID NO:32相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) CDR3区,其含有SEQ ID NO:33或与SEQ ID NO:33相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;所述轻链可变区含有:(a) VL CDR1区,其含有SEQ ID NO:34或与SEQ ID NO:34相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VL CDR2区,其含有SEQ ID NO:35或与SEQ ID NO:35相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) VL CDR3区,其含有SEQ ID NO:36或与SEQ ID NO:36相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列。

42. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区和/或抗体VL区,所述抗体VH区包含氨基酸序列SEQ ID NO:17或与氨基酸序列SEQ ID NO:17至少60%相同的氨基酸序列,所述抗体VL区包含氨基酸序列SEQ ID NO:18或与氨基酸序列SEQ ID NO:18至少60%相同的氨基酸序列。

43. 根据权利要求42所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区和抗体VL区,所述抗体VH区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:17至少60%相同的氨基酸序列,所述抗体VL区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:18至少60%相同的氨基酸序列。

44. 根据权利要求42所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区和抗体VL区,所述抗体VH区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:17至少60%相同的氨基酸序列,所述抗体VL区包含氨基酸序列SEQ ID NO:18。

45. 根据权利要求42所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区和抗体VL区,所述抗体VH区包含氨基酸序列SEQ ID NO:17,所述抗体VL区包含与氨基酸序列SEQ ID NO:18至少60%相同的氨基酸序列。

46. 根据权利要求42所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区和抗体VL区,所述抗体VH区含有氨基酸序列SEQ ID NO:17,所述VL区含有氨基酸序列SEQ ID NO:18。

47. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段是人源化单克隆抗体或其抗原结合片段。

48. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片

段包含人源化轻链框架区。

49. 根据权利要求48所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述人源化轻链构架区包含具有表27中VL₁、VL₂、VL₃或VL₄所示的任何氨基酸取代的氨基酸序列。

50. 根据权利要求48或49所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述人源化轻链框架区包含SEQ ID NO:68至83中任一个的氨基酸序列。

51. 根据权利要求50所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含:

SEQ ID NO:68的VL框架区1 (VL FR1); SEQ ID NO:69的VL FR2; SEQ ID NO:70的VL FR3; 和SEQ ID NO:71的VL FR4;

SEQ ID NO:72的VL框架区1 (VL FR1); SEQ ID NO:73的VL FR2; SEQ ID NO:74的VL FR3; 和SEQ ID NO:75的VL FR4;

SEQ ID NO:76的VL框架区1 (VL FR1); SEQ ID NO:77的VL FR2; SEQ ID NO:78的VL FR3; 和SEQ ID NO:79的VL FR4; 或

SEQ ID NO:80的VL框架区1 (VL FR1); SEQ ID NO:81的VL FR2; SEQ ID NO:82的VL FR3; 和SEQ ID NO:83的VH FR4。

52. 根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:68; VL CDR1,其具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列;

VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:69; VL CDR2,其具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列;

VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:70; VL CDR3,其具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列;

和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:71。

53. 根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:68; VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:4; VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:69; VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:5; VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:70; VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:6; 和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:71。

54. 根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:68; VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:24; VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:69; VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:25; VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:70; VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:26; 和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:71。

55. 根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:72; VL CDR1,其具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列;

VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:73;VL CDR2,其具有选自SEQ ID NO:5和25氨基酸序列;

VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:74;VL CDR3,其具有选自SEQ ID No:6和26的氨基酸序列;

和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:75。

56.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:72;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:4;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:73;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:5;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:74;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:6;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:75。

57.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:72;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:24;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:73;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:25;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:74;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:26;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:75。

58.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76;VL CDR1,其具有选自SEQ ID No:4和24的氨基酸序列;

VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77;VL CDR2,其具有选自SEQ ID No:5和25的氨基酸序列;

VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78;VL CDR3,其具有选自SEQ ID No:6和26的氨基酸序列;

和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79。

59.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:4;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:5;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:6;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79。

60.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:24;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:25;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:26;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79。

61.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗

体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:80;VL CDR1,其具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列;

VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:81;VL CDR2,其具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列;

VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:82;VL CDR3,其具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列;

和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:83。

62.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:80;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:4;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:81;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:5;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:82;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:6;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:83。

63.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:80;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:24;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:81;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:25;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:82;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:26;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:83。

64.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:68;VL CDR1,其具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:69;VL CDR2,其具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:70;VL CDR3,其具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:71。

65.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:68;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:14;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:69;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:15;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:70;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:16;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:71。

66.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:68;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:34;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:69;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:35;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:70;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:36;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:71。

67.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗

体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:72;VL CDR1,其具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:73;VL CDR2,其具有选自SEQ ID NO:15和35氨基酸序列;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:74;VL CDR3,其具有选自SEQ ID No:16和36的氨基酸序列;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:75。

68.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:72;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:14;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:73;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:15;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:74;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:16;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:75。

69.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:72;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:34;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:73;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:35;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:74;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:36;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:75。

70.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76;VL CDR1,其具有选自SEQ ID No:14和34的氨基酸序列;

VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77;VL CDR2,其具有选自SEQ ID No:15和35的氨基酸序列;

VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78;VL CDR3,其具有选自SEQ ID No:16和36的氨基酸序列;

和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79。

71.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:14;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:15;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:16;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79。

72.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:34;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:35;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:36;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79。

73.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗

体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:80;VL CDR1,其具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:81;VL CDR2,其具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:82;VL CDR3,其具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:83。

74.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:80;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:14;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:81;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:15;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:82;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:16;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:83。

75.根据前述权利要求48至51中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:80;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:34;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:81;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:35;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:82;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:36;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:83。

76.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含人源化重链框架区。

77.根据权利要求76所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述人源化重链框架区包含具有表26中VH₁、VH₂、VH₃或VH₄所示的任一氨基酸取代的氨基酸序列。

78.根据权利要求76或77所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述人源化重链框架区包含SEQ ID NO:52至67中任一个的氨基酸序列。

79.根据权利要求78所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含:

SEQ ID NO:52的VH框架区1(VH FR1);SEQ ID NO:53的VH FR2;SEQ ID NO:54的VH FR3;和SEQ ID NO:55的VH FR4;

SEQ ID NO:56的VH框架区1(VH FR1);SEQ ID NO:57的VH FR2;SEQ ID NO:58的VH FR3;和SEQ ID NO:59的VH FR4;

SEQ ID NO:60的VH框架区1(VH FR1);SEQ ID NO:61的VH FR2;SEQ ID NO:62的VH FR3;SEQ ID NO:63的VH FR4;或

SEQ ID NO:64的VH框架区1(VH FR1);SEQ ID NO:65的VH FR2;SEQ ID NO:66的VH FR3;和SEQ ID NO:67的VH FR4。

80.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:52;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列;

VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列;

VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:54;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:3和23的氨

基酸序列；

和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:55。

81.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:52;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:54;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:55。

82.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:52;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:21;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:22;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:54;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:23;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:55。

83.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:56;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列;

VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列;

VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:58;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;

和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:59。

84.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:56;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:58;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:59。

85.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:56;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:21;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:22;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:58;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:23;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:59。

86.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列;

VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:61;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列;

VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:62;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;

和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:63。

87.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:61;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:62;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:63。

88.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:21;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:61;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:22;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:62;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:23;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:63。

89.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列;

VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列;

VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;

和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67。

90.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67。

91.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:21;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:22;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:23;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67。

92.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗

体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:52;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:54;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:3和33的氨基酸序列;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:55。

93.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:52;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:11;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:12;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:54;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:55。

94.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:52;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:31;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:32;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:54;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:33;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:55。

95.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:56;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:58;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:59。

96.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:56;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:11;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:12;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:58;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:13;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:59。

97.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:56;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:31;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:32;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:58;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:33;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:59。

98.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:61;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:12

和32的氨基酸序列;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:62;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:63。

99.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:11;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:61;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:12;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:62;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:13;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:63。

100.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:31;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:61;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:32;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:62;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:33;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:63。

101.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列;VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67。

102.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:11;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:12;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:13;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67。

103.根据前述权利要求76至79中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:31;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:32;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:33;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67。

104.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含:

抗体VH区和抗体VL区,所述抗体VH区含有:VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67;所述抗体VL区含有:VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76;VL

CDR1,其具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77;VL CDR2,其具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78;VL CDR3,其具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79。

105.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含:

抗体VH区和抗体VL区,所述抗体VH区含有:VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67;所述抗体VL区含有:VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:4;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:5;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:6;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79。

106.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含:

抗体VH区和抗体VL区,所述抗体VH区含有:VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:21;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:22;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:23;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67;所述抗体VL区含有:VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:24;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:25;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:26;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79。

107.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段是嵌合抗体分子或其抗原结合片段。

108.根据权利要求107所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段包含根据前述权利要求中任一项所述的抗体的可变区氨基酸序列,还包含人恒定区氨基酸序列。

109.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段不具有补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

110.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段,例如通过Biacore分析确定,以不大于100pM、不大于90pM、不大于80pM、不大于70pM、不大于60pM、不大于50pM、不大于40pM、不大于30pM、或不大于25pM的解离常数(K_D)与人LAG-3蛋白(或人LAG-3Ig蛋白)结合。

111.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段是激动性抗LAG-3抗体或其抗原结合片段。

112.根据前述权利要求中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或片段不与人LAG-3蛋白的第一个N末端D1结构域的30个氨基酸的外环序列(SEQ ID NO:40)结合。

113. 核酸,其包含编码根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

114. 核酸,其包含SEQ ID NO:9、10、19或20中任一个的核苷酸序列,或与SEQ ID NO:9、10、19或20中任一个的核苷酸序列至少80%相同的核苷酸序列。

115. 重组载体,其包含权利要求113或114所述的核酸。

116. 重组细胞,其包含权利要求113或114所述的核酸或权利要求115所述的重组载体。

117. 药物组合物,其包含根据权利要求1至112中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,以及药学上可接受的载体、辅料或稀释剂。

118. 根据权利要求1至112中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求117所述的药物组合物,其中所述抗体或片段或药物组合物用作药物。

119. 根据权利要求1至112中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求117所述的药物组合物,其中所述抗体或片段或药物组合物用于治疗T细胞介导的免疫失调。

120. 根据权利要求1至112中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求117所述的药物组合物在制备用于治疗T细胞介导的免疫失调的药物中的用途。

121. 一种治疗T细胞介导的免疫失调的方法,该方法包括将有效量的根据权利要求1至112中任一项所述所述的分离的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求117所述的药物组合物施用至需要这种治疗的对象。

122. 根据权利要求119所述的分离的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求120所述的用途或根据权利要求121所述的方法,其特征在于,所述T-细胞介导的免疫失调是炎性疾病或自身免疫失调。

123. 根据权利要求119所述的分离的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求120所述的用途或根据权利要求121所述的方法,其特征在于,所述T-细胞介导的免疫失调选自:感染(病毒、细菌、真菌和寄生虫),与感染相关的内毒素休克,败血症,关节炎,类风湿性关节炎,哮喘,COPD,盆腔炎症,阿尔茨海默氏病,炎症性肠病,克罗恩氏病,溃疡性结肠炎,佩罗尼氏病,乳糜泻,胆病,藏毛病,腹膜炎,牛皮癣,血管炎,手术粘连,中风,I型糖尿病,莱姆病,关节炎,脑膜脑炎,自身免疫性葡萄膜炎,免疫介导的中枢和外周神经系统的炎性疾病例如多发性硬化症、狼疮(如系统性红斑狼疮)和格林-巴利综合征,过敏性皮炎,自身免疫性肝炎,纤维化肺泡炎,格雷夫斯病,IgA肾病,特发性血小板减少性紫癜,美尼尔氏病,天疱疮,原发性胆汁性肝硬化,类肉状瘤病,硬皮病,韦格纳肉芽肿病,其他自体免疫失调,胰腺炎,外伤(手术),移植物抗宿主病,移植排斥,心脏病,包括缺血性疾病例如心肌梗塞以及动脉粥样硬化,血管内凝血,骨吸收,骨质疏松症,骨关节炎,牙周炎和胃酸过少,或与胎儿母体耐受性不足有关的不孕症。

抗LAG-3抗体

[0001] 本发明涉及结合至淋巴细胞活化基因3 (LAG-3) 的抗体或其抗原结合片段,特别是作为LAG-3激动剂的抗体或其抗原结合片段,以及涉及所述抗体或片段作为药物的用途,该药物特别是用于治疗与CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的增殖和/或活化有关的病症、尤其是炎症和自身免疫失调的药物。

[0002] 淋巴细胞活化基因3 (LAG-3) 是具有四个细胞外Ig超家族结构域的CD4同系物I类膜蛋白。类似于CD4,LAG-3在T细胞表面寡聚体化并且与抗原呈递细胞 (APC) 上的MHC II类分子结合,但LAG-3具有比CD4高得多的亲和力。LAG-3在活化的CD4阳性和CD8阳性T淋巴细胞上表达,其与细胞表面的CD3-TCR复合物相关并对信号转导进行负调节。因此,其负调节T细胞增殖、功能和内稳态。当通过特异性TCR识别MHC II类肽复合物时,细胞内信号通过TCR在T细胞中转导并通过MHC II类分子在APC中转导。通向T细胞的LAG-3信号传导的负调节作用在初级CD4和CD8人T细胞应答中起作用 [Maçon-Lemaître, et al., Immunology. 2005 Jun; 115 (2):170-178]。

[0003] LAG-3还编码被转化为可溶形式的LAG-3 (sLAG-3) 的剪接异构体。作为可溶性分子,LAG-3通过MHC II类信号传导来激活抗原呈递细胞 (APC),导致体内抗原特异性T细胞应答增加 (Triebel, Trends Immunol., 2003, 24:619-622)。

[0004] 图1 (Huard等人) 提供了人和小鼠LAG-3蛋白的氨基酸序列 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 11:5744-5749, 1997)。图1下面重复了人LAG-3蛋白的序列 (SEQ ID NO:27)。人LAG-3的四个细胞外Ig超家族结构域 (D1、D2、D3和D4) 的氨基酸序列在以下氨基酸残基处:1-149 (D1) (SEQ ID NO:28); 150-239 (D2) (SEQ ID NO:29); 240-330 (D3) (SEQ ID NO:39); 和331-412 (D4) (SEQ ID NO:51)。

[0005] Baixeras等人 (J. Exp. Med., 1992, Vol. 176:327-337) 描述了人LAG-3蛋白的小鼠单克隆抗体 (同种型IgG1) 17B4的产生。所述抗体识别人LAG-3的第一个N-末端D1结构域的30个氨基酸的外环。17B4作为LAG-3信号传导拮抗剂抑制LAG-3/MHC类相互作用并增加T细胞增殖 (Huard et al., Eur J Immunol. 1996; 26:1180-6)。17B4mAb不具有激动剂活性,这一点已通过以下事实确定:在不存在二级交联剂的情况下,17B4mAb不能诱导细胞内游离钙升高到T细胞中 (Hannier et al., J Immunol. 1998; 161:4058-65.)。

[0006] 非常需要能够调节CD8阳性和CD4阳性T细胞的活化和/或效应功能的药剂。特别地,已知许多自身免疫性失调涉及自体反应性T细胞和自身抗体。因此,需要能够抑制或消除自体反应性淋巴细胞而不损害免疫系统抵抗病原体的能力的药剂。

[0007] Poirier等人 (Clinical and Experimental Immunology, 2011, 164:265-274) 描述了细胞毒性LAG-3嵌合抗体 (嵌合A9H12) 的评估。在体内,在狒狒的结核菌素诱导的迟发型超敏反应 (DTH) 模型中,所述抗体消除淋巴结中的LAG-3⁺激活的T细胞,并且显示出减少皮肤炎症的功效。特异性消除活化的T细胞的抗体提供了预防和/或治疗自身免疫失调的有希望的治疗策略。

[0008] 作为一种替代策略,申请人已经认识到LAG-3激动剂将对T细胞增殖和/或功能进行负调节而不消除T细胞,并且这种激动剂也可以用于治疗炎症或自身免疫失调。

[0009] 申请人已能够生产单克隆抗LAG-3激动剂抗体。这些抗体抑制抗原诱导的CD4阳性和CD8阳性T细胞的增殖。所述抗体及其抗原结合片段可用于治疗免疫失调,特别是T细胞介导的免疫失调,包括炎症和自身免疫失调。

[0010] 根据本发明,提供了激动性抗LAG-3抗体或其抗原结合片段。特别地,所述抗体是单克隆激动性抗LAG-3抗体或其抗原结合片段。

[0011] 本申请使用的术语“LAG-3”是指淋巴细胞活化基因-3。术语“LAG-3”包括变体、同种型、同系物、直系同源物和旁系同源物。例如,对人LAG-3蛋白具有特异性的抗体在某些情况下可与来自除人以外的物种的LAG-3蛋白交叉反应。在其他实施例中,对人LAG-3蛋白具有特异性的抗体可以对人LAG-3蛋白有完全特异性,并且可以不显示物种或其他类型的交叉反应性,或可以与来自某些其他物种但不是所有其他物种的LAG-3交叉反应(例如,与猴LAG-3交叉反应,但不与小鼠LAG-3交叉反应)。术语“人LAG-3”是指人序列LAG-3,例如具有Genbank登记号NP_002277的人LAG-3的完整氨基酸序列(SEQ ID NO:38),或图1中给出的人LAG-3蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:27)。术语“小鼠LAG-3”是指小鼠序列LAG-3,例如具有Genbank登记号NP_032505的小鼠LAG-3的完整氨基酸序列。LAG-3在本领域中也称为例如CD223。人LAG-3序列可以与Genbank登记号NP_002277的人LAG-3不同,例如人LAG-3序列在非保守区中具有保守的突变或突变,并且LAG-3具有与Genbank登记号NP_002277的人LAG-3基本相同的生物学功能。例如,人LAG-3的生物学功能为:在本申请所述抗体特异性结合的LAG-3的胞外结构域中具有表位,或人LAG-3的生物学功能为可以与MHC II类分子结合。

[0012] 术语“猴LAG-3”旨在包括旧世界和新世界猴表达的LAG-3蛋白,包括但不限于食蟹猴LAG-3和恒河猴LAG-3。猴LAG-3的代表性氨基酸序列是也以Genbank登记号XM_001108923保藏的恒河猴LAG-3氨基酸序列。猴LAG-3的另一代表性氨基酸序列是如US 2011/0150892A1中所述的克隆pa23-5的替代性恒河猴序列。与Genbank保藏序列相比,所述替代性恒河猴序列在419位显示出单个氨基酸差异。

[0013] 特定的人LAG-3序列通常与Genbank登记号NP_002277的人LAG-3的氨基酸序列具有至少90%的同一性,并且含有当与其他物种(例如小鼠)的LAG-3氨基酸序列比较时将其氨基酸序列鉴定为人的氨基酸残基。在某些情况下,人LAG-3与Genbank登记号NP_002277的LAG-3的氨基酸序列可以具有至少95%的同一性,或甚至至少96%、97%、98%或99%的同一性。在某些实施例中,人LAG-3序列将显示与Genbank登记号NP_002277的LAG-3序列不大于10个氨基酸的差异。在某些实施例中,人LAG-3可显示与Genbank登记号NP_002277的LAG-3序列不大于5个,或甚至不大于4、3、2或1个氨基酸的差异。同一性百分比可以如本文所述的那样进行确定。

[0014] 根据一些实施例,本发明的激动性抗LAG-3抗体,或其抗原结合片段,抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖或抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化。

[0015] 本发明的激动性抗LAG-3抗体或其抗原结合片段可以是分离的激动性抗LAG-3抗体或其抗原结合片段。

[0016] 术语“激动性”在本申请中与术语“激动剂”可互换使用。

[0017] 根据本发明,还提供了结合LAG-3并抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖或抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0018] 在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段抑制抗原诱导的CD4⁺T细胞增殖和/

或抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段抑制抗原诱导的CD4⁺T细胞增殖和抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖。在特定的实施例中,相比抑制抗原诱导的CD4⁺T细胞增殖,所述抗体或其抗原结合片段更多地抑制抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖。

[0019] 图21说明了消除性抗LAG-3抗体、拮抗性抗LAG-3抗体和本发明的抗体(即激动性抗LAG-3抗体,以及与LAG-3结合并抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖、或抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化的抗体)之间的差异。

[0020] 消耗性抗LAG-3抗体通过与细胞表面上表达的LAG-3结合而引起活化T细胞的消耗。消耗可通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或通过补体依赖性细胞毒性(CDC)而发生。在ADCC中,消耗性抗体的Fc区与免疫效应细胞(例如天然杀伤细胞和巨噬细胞)表面上的Fc受体(Fc γ R)结合,导致靶细胞裂解。在CDC中,消耗性抗体的Fc区与补体的C1q成分结合,并且通过触发细胞表面的补体级联来杀死靶细胞。因此,消耗性抗LAG-3抗体抑制T细胞介导的免疫应答。可以理解的是,因为消耗性抗LAG-3抗体引起活化T细胞的破坏,所以其效果是持久的,并且是不可逆的。这些抗体对于例如治疗炎症和自身免疫失调以及预防移植排斥是有用的。

[0021] 拮抗性抗LAG-3抗体与活化T细胞表面上的LAG-3结合,并防止LAG-3与抗原呈递细胞(APC)表面上的MHC II类分子相互作用。这阻断了当APC与活化的T细胞上的LAG-3结合时发生的信号转导的负调节。因此,拮抗性抗LAG-3抗体阻止通常由LAG-3介导的T细胞增殖、功能和内稳态的负调节。这些抗体对于例如治疗癌症和传染病是有用的。

[0022] 本发明的抗体与活化的T细胞的表面上的LAG-3结合,并通过LAG-3的激动负调节信号转导,引起T细胞增殖和/或活化的负调节。因此,本发明的抗体抑制T细胞介导的免疫应答,特别是通过抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖和/或抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化来抑制T细胞介导的免疫应答。这些抗体的作用是可逆的,并且可能不及消耗性抗LAG-3抗体的作用持久,因为它们不会引起活化T细胞的破坏。应该理解,本发明的抗体有效的时间长度取决于抗体的血浆半衰期。

[0023] 可以通过熟练技术人员已知的任何合适的方法来确定对抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖的抑制。合适方法的一个例子是在存在抗体或片段时,测量由抗原肽诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的增殖,将其与存在相同同种型的阴性对照抗体时的相应增殖进行比较。例如,CD4⁺和CD8⁺T细胞可以存在于例如从健康供体获得的外周血单核细胞(PBMC)的样品中。细胞的增殖可以通过任何合适的抗原肽诱导,所述抗原肽例如涵盖CMV pp35序列的肽库。细胞的增殖可通过标记所述细胞来测量,例如用荧光细胞染色染料(如羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE))来进行标记。在下面的实施例10中更详细地描述了用于确定抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖抑制的方法的实例。

[0024] 可以将抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖的抑制百分比确定为增殖指数(PI)的抑制百分比,将其计算为以下各项之和:CD4⁺和/或CD8⁺T细胞在每个分裂峰下的百分比(通过FACS评估),乘以分裂数,这在以下实施例10中将有更详细的描述。

[0025] 在一些实施例中,与不存在所述抗体或片段时抗原诱导的CD4⁺T细胞增殖相比,本发明的抗体或其抗原结合片段以至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%的抑制百分比抑制抗原诱导的CD4⁺T细胞增殖。

[0026] 在一些实施例中,与不存在所述抗体或片段时抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖相比,本

发明的抗体或其抗原结合片段以至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%的抑制百分比抑制抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖。

[0027] 在一些实施例中,分别与不存在所述抗体或片段时抗原诱导的CD4⁺T细胞增殖和抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖相比,本发明的抗体或其抗原结合片段各以至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%的抑制百分比抑制抗原诱导的CD4⁺T细胞增殖和抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖。

[0028] 在一个实施例中,与所述抗体或片段不存在时抗原诱导的CD4⁺T细胞增殖相比,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制至少20%的抗原诱导的CD4⁺T细胞增殖,并且与抗体或片段不存在时抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖相比,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制至少30%的抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖。

[0029] 可以将本发明的抗体或其片段对抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖的抑制,与存在相同同种型的阴性对照抗体或其片段的情况下的抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖进行比较。

[0030] 在一些实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖比该抗体或片段抑制抗原诱导的CD4⁺T细胞增殖要多至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%。

[0031] 根据一些实施例,抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖的抑制是LAG-3依赖性和IL-2独立性的。根据一些实施例,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化。在某些实施例中,本发明抗体或其抗原结合片段抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖和抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化。

[0032] 特别地,本发明的抗体或其抗原结合片段可以与LAG-3结合,并抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化。在某些实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段与LAG-3结合,并抑制抗原诱导的CD4⁺T细胞活化和抗原诱导的CD8⁺T细胞活化。

[0033] 可以通过熟练技术人员已知的任何合适的方法来确定对CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化的抑制。合适方法的一个实例是测量抗体或片段对CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化标记物表达或T细胞活化标记物分泌的影响。例如,CD8⁺T细胞活化可以通过如下方式来测量:测量存在所述抗体或片段时,作为活化标记物的CD25在由抗原肽诱导的CD8⁺T细胞上的表达,将其与存在相同同种型的阴性对照抗体时相应的CD25表达进行比较。或者,可以通过如下方式来测量T细胞活化:在存在所述抗体或片段的情况下测量由抗原肽诱导的T细胞的细胞上清液中的IFN- γ 的分泌,将其与存在相同同种型的阴性对照抗体时的相应分泌进行比较。例如,T细胞可以存在于例如从健康供体获得的PBMC样品中。细胞的活化可以由任何合适的抗原肽来诱导,所述抗原肽例如涵盖CMV pp35序列的肽库。在下面的实施例15中更详细地描述了通过测量T细胞活化标记物分泌来对抗原诱导的T细胞活化的抑制进行确定的方法的例子。在下面的实施例16中更详细地描述了通过测量CD8⁺T细胞活化标记物表达来对抗原诱导的CD8⁺T细胞活化的抑制进行确定的方法的例子。

[0034] 在一些实施例中,与不存在本发明的抗体或其抗原结合片段时抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化相比,所述抗体或其抗原结合片段抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%。

[0035] 可以将本发明的抗体或其片段对抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化的抑制,与

存在相同同种型的阴性对照抗体或其片段时的抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞活化进行比较。根据一些实施例,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制IMP321与MHC II类阳性细胞的结合。

[0036] IMP321 (以下也称为“LAG-3Ig”)是重组可溶性人LAG-3Ig融合蛋白。所述融合蛋白是作为200-kDa二聚体而获得,该200-kDa二聚体在用质粒转染的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中产生,其中所述质粒编码与人IgG1Fc融合的人LAG-3的细胞外结构域。美国专利申请号2011/0008331的SEQ ID NO:17中提供了IMP321的序列。

[0037] IMP321与MHC II类阳性细胞的结合可以通过以下方式确定:测量IMP321-标记缀合物(例如IMP321-Alex 488缀合物)与Raji细胞(这些是MHC II类阳性B细胞)的结合,例如,如下面的实施例8中所述。

[0038] 在一些实施例中,与不存在本发明的抗体或其抗原结合片段时IMP321与MHC II类阳性细胞的结合相比,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制IMP321与MHC II类阳性细胞的结合的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0039] 在一些实施例中,与不存在本发明的抗体或其抗原结合片段时IMP321与MHC II类阳性细胞的结合相比,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制IMP321与MHC II类阳性细胞的结合的至少30%,其中所述抗体或片段与IMP321的浓度比为0.1:1。

[0040] 在一些实施例中,与不存在本发明的抗体或其抗原结合片段时IMP321与MHC II类阳性细胞的结合相比,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制IMP321与MHC II类阳性细胞的结合的至少80%,其中所述抗体或片段与IMP321的浓度比为0.3:1或1:1。

[0041] 在一些实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制IMP321诱导的单核细胞活化。

[0042] IMP321能够活化人单核细胞系THP-1的细胞。THP-1细胞的活化可以通过THP-1细胞的趋化因子配体4(CCL4,也称为巨噬细胞炎症蛋白1 β ,即MIP-1 β)的分泌水平来确定。在混合物与THP-1细胞温育之前,预先对本发明的抗体或片段与IMP321进行温育,可用于确定所述抗体或片段是否抑制IMP321诱导的单核细胞活化。下面的实施例9更详细地描述了用于对IMP321诱导的单核细胞活化的抑制进行确定的方法。

[0043] 在一些实施例中,与存在本发明的抗体或片段时IMP321诱导的单核细胞活化的量相比,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制IMP321诱导的单核细胞活化的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0044] 在一些实施例中,与不存在本发明的抗体或片段时IMP321诱导的单核细胞活化的量相比,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制IMP321诱导的单核细胞活化的至少70%,其中所述抗体或片段与IMP321的浓度比为1:1。

[0045] Huard等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,11:5744-5749,1997)描述了LAG-3蛋白上的MHC II类结合位点的特征。许多结合MHC II类蛋白所必需的残基聚集在LAG-3D1结构域中大的30个氨基酸的环外结构的碱基处。人LAG-3蛋白的D1结构域的外环结构的氨基酸序列是GPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPRRY(SEQ ID NO:40),其为图1中加下划线的序列。

[0046] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以与人LAG-3的表位相结合,该表位与LAG-3上的MHC II类结合位点重叠。

[0047] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以与一表位结合,该表位与人LAG-3的第一个N末端D1结构域的30个氨基酸的外环重叠。

[0048] 在其他实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段不与人LAG-3蛋白的第一个N末端D1结构域的30个氨基酸的外环序列(SEQ ID NO:40)结合。

[0049] 本发明的抗体可以在体内抑制LAG-3与MHC II类分子的结合。特别地,本发明的抗体可以将MHC II类激活信号拮抗成抗原呈递细胞(APC)。因此,本发明的抗体可以抑制LAG-3诱导的APC活化,例如树突细胞活化,例如LAG-3诱导的单核细胞或巨噬细胞活化。

[0050] 在一些实施例中,与不存在本发明的抗体或片段时LAG-3与MHC II类阳性细胞的结合相比,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制LAG-3与MHC II类阳性细胞的结合的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0051] 在一些实施例中,与不存在本发明的抗体或片段时LAG-3诱导的APC活化量相比,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制LAG-3诱导的APC活化的至少10%、至少20%、至少

[0052] 30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0053] 本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段可以包含抗体重链可变(VH)区的一个、两个或三个互补决定区(CDR)和/或抗体轻链可变(VL)区的一个、两个或三个CDR,所述抗体重链可变区含有氨基酸序列SEQ ID NO:7,所述抗体轻链可变区含有氨基酸序列SEQ ID NO:8。

[0054] 根据本发明还提供了抗LAG-3抗体或其抗原结合片段,该抗体或片段包含抗体重链可变(VH)区的一个、两个或三个互补决定区(CDR)和/或抗体轻链可变(VL)区的一个、两个或三个CDR,所述抗体重链可变区含有氨基酸序列SEQ ID NO:7,所述抗体轻链可变区含有氨基酸序列SEQ ID NO:8。

[0055] 所述抗体VH区的CDR可以是氨基酸序列SEQ ID NO:1、2和3的CDR,并且所述抗体VL区的CDR可以是氨基酸序列SEQ ID NO:4、5和6的CDR。

[0056] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含抗体VH区和/或抗体VL区,所述抗体VH区具有含有SEQ ID NO:1、2和3的氨基酸序列的CDR,所述VL区具有含有SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列的CDR。

[0057] 氨基酸序列SEQ ID NO:1、2和3的CDR可以以任何顺序存在于VH区中,并且氨基酸序列SEQ ID NO:4、5和6的CDR可以以任何顺序存在于VL区中。然而,在优选的实施例中,所述抗体或其片段包含:具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的CDR-H1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:2的CDR-H2、以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:3的CDR-H3,和/或具有氨基酸序列SEQ ID NO:4的CDR-L1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的CDR-L2、以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:6的CDR-L3。

[0058] 所述抗体VH区的CDR可以是氨基酸序列SEQ ID NO:21、22和23的CDR,并且所述抗体VL区的CDR可以是氨基酸序列SEQ ID NO:24、25和26的CDR。

[0059] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含抗体VH区和/或抗体VL区,所述抗体VH区具有含有SEQ ID NO:21、22和23的氨基酸序列的CDR,所述VL区具有含有SEQ ID NO:24、25和26的氨基酸序列的CDR。

[0060] 氨基酸序列SEQ ID NO:21、22和23的CDR可以以任何顺序存在于VH区中,并且氨基

酸序列SEQ ID NO:24、25和26的CDR可以以任何顺序存在于VL区中。然而,在优选的实施例中,所述抗体或其片段包含:具有氨基酸序列SEQ ID NO:21的CDR-H1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:22的CDR-H2、以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:23的CDR-H3,和/或具有氨基酸序列SEQ ID NO:24的CDR-L1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:25的CDR-L2、以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:26的CDR-L3。

[0061] 在一些实施例中,所述抗体VH区的CDR选自氨基酸序列SEQ ID NO:1、2、3、21、22和23的CDR,并且所述抗体VL区的CDR选自氨基酸序列SEQ ID NO:4、5、6、24、25和26的CDR。

[0062] 在一些实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,其中,所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列,和/或VH CDR2具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列,和/或VH CDR3具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列。

[0063] 在一些实施例中:

[0064] 所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列,并且所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列;

[0065] 所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列,并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;

[0066] 所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列,并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;或

[0067] 所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列,所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列,并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列。

[0068] 在一些实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其中,所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列,和/或所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列,和/或所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列。

[0069] 在一些实施例中:

[0070] 所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列,并且所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列;

[0071] 所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列,并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列;

[0072] 所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列,并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列;或

[0073] 所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列,所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列,并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列。

[0074] 在特定的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含抗体VH区和抗体VL区,所述抗体VH区含有:具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列的VH CDR1;具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列的VH CDR2;和具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列的VH CDR3;所述抗体VL区包含:具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列的VL CDR1;具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列的VL CDR2;和具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列的VL CDR3。

[0075] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含抗体VH区和/或抗体VL区,所述抗体VH

区含有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,所述抗体VL区含有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0076] 在一个优选的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:7的抗体VH区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:8的抗体VL区。

[0077] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含抗体VH区和/或抗体VL区,该抗体VH区和/或抗体VL区含有与小鼠单克隆抗LAG-3抗体13E2的VH和/或VL区的氨基酸序列(描述于本申请中的实例1、2和3中(13E2VH氨基酸序列:SEQ ID NO:7;13E2VL氨基酸序列:SEQ ID NO:8))至少60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同或完全相同的氨基酸序列。

[0078] 根据本发明还提供了一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或片段与包含抗体VH区和抗体VL区的抗体竞争结合至LAG-3,所述抗体VH区含有氨基酸序列SEQ ID NO:7,所述抗体VL区含有氨基酸序列SEQ ID NO:8。

[0079] 根据本发明进一步提供了一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或片段与小鼠单克隆抗LAG-3抗体13E2竞争结合至LAG-3。

[0080] 本发明的单克隆抗体或其抗原结合片段可以包含抗体重链可变(VH)区的一个、两个或三个互补决定区(CDR)和/或抗体轻链可变(VL)区的一个、两个或三个CDR,所述抗体重链可变区含有氨基酸序列SEQ ID NO:17,所述抗体轻链可变区含有氨基酸序列SEQ ID NO:18。

[0081] 根据本发明还提供了一种抗LAG-3抗体或其抗原结合片段,该抗体或片段包含抗体重链可变(VH)区的一个、两个或三个互补决定区(CDR)和/或抗体轻链可变(VL)区的一个、两个或三个CDR,所述抗体重链可变区含有氨基酸序列SEQ ID NO:17,所述抗体轻链可变区含有氨基酸序列SEQ ID NO:18。

[0082] 所述抗体VH区的CDR可以是氨基酸序列SEQ ID NO:11、12和13的CDR,并且所述抗体VL区的CDR可以是氨基酸序列SEQ ID NO:14、15和16的CDR。

[0083] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含抗体VH区和/或抗体VL区,所述抗体VH区具有含有SEQ ID NO:11、12和13的氨基酸序列的CDR,所述抗体VL区具有含有SEQ ID NO:14、15和16的氨基酸序列的CDR。

[0084] 氨基酸序列SEQ ID NO:11、12和13的CDR可以以任何顺序存在于VH区中,并且氨基酸序列SEQ ID NO:14、15和16的CDR可以以任何顺序存在于VL区中。然而,在优选的实施例中,所述抗体或其片段包含:具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的CDR-H1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:12的CDR-H2以及具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的CDR-H3,和/或具有氨基酸序列SEQ ID NO:14的CDR-L1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:15的CDR-L2和具有氨基酸序列SEQ ID NO:16的CDR-L3。

[0085] 所述抗体VH区的CDR可以是氨基酸序列SEQ ID NO:31、22和33的CDR,并且所述抗体VL区的CDR可以是氨基酸序列SEQ ID NO:34、35和36的CDR。

[0086] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含抗体VH区和/或抗体VL区,所述抗体VH

区具有含有SEQ ID NO:31、32和33的氨基酸序列的CDR,所述抗体VL区具有含有SEQ ID NO:34、35和36的氨基酸序列的CDR。

[0087] 氨基酸序列SEQ ID NO:31、32和33的CDR可以以任何顺序存在于VH区中,并且氨基酸序列SEQ ID NO:34、35和36的CDR可以以任何顺序存在于VL区中。然而,在优选的实施例中,所述抗体或其片段包含:具有氨基酸序列SEQ ID NO:31的CDR-H1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:32的CDR-H2和具有氨基酸序列SEQ ID NO:33的CDR-H3,和/或具有氨基酸序列SEQ ID NO:34的CDR-L1、具有氨基酸序列SEQ ID NO:35的CDR-L2和具有氨基酸序列SEQ ID NO:36的CDR-L3。

[0088] 在一些实施例中,所述抗体VH区的CDR选自氨基酸序列SEQ ID NO:11、12、13、31、32和33的CDR,并且所述抗体VL区的CDR选自氨基酸序列SEQ ID NO:14、15、16、34、35和36的CDR。

[0089] 在一些实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,其中,所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列,和/或所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列,和/或所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列。

[0090] 在一些实施例中:

[0091] 所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列,并且所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列;

[0092] 所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列,并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列;

[0093] 所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列,并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列;或

[0094] 所述VH CDR1具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列,所述VH CDR2具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列,并且所述VH CDR3具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列。

[0095] 在一些实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其中,所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列,和/或所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列,和/或所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列。

[0096] 在一些实施例中:

[0097] 所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列,并且所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列;

[0098] 所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列,并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列;

[0099] 所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列,并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列;或

[0100] 所述VL CDR1具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列,所述VL CDR2具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列,并且所述VL CDR3具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列。

[0101] 在特定的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含抗体VH区和抗体VL区,所述抗体VH区含有:具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列的VH CDR1;具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列的VH CDR2;以及具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列的VH CDR3;所述抗体VL区包含:具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列的VL CDR1;具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列的VL CDR2;和具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列的VL CDR3。

[0102] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含抗体VH区和/或抗体VL区,所述抗体VH区含有与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,所述抗体VL区含有与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0103] 在一个优选的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:17的抗体VH区和/或含有氨基酸序列SEQ ID NO:18的抗体VL区。

[0104] 本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含抗体VH区和抗体VL区,该抗体VH区和抗体VL区含有与小鼠单克隆抗LAG-3抗体34F4的VH和VL区的氨基酸序列(描述于的实施例4、5和6中(34F4VH氨基酸序列:SEQ ID NO:17;34F4VL氨基酸序列:SEQ ID NO:18))至少60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同或完全相同的氨基酸序列。

[0105] 根据本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,该抗体或片段与包含抗体VH区和抗体VL区的抗体竞争结合至LAG-3,所述抗体VH区含有氨基酸序列SEQ ID NO:17,所述抗体VL区含有氨基酸序列SEQ ID NO:18。

[0106] 根据本发明进一步提供了与小鼠单克隆抗LAG-3抗体34F4竞争结合至LAG-3的抗体或其抗原结合片段。

[0107] 在某些实施例中,本发明的抗体包含含有CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和含有CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,该重链和轻链可变区与抗体13E2或34F4的可变区的差异在于前者具有一个或多个保守性修饰,例如具有最多达五个保守性修饰。本领域应该理解,可以进行某些不去除抗原结合的保守性序列修饰。参见,例如:Brummell et al. (1993) *Biochem* 32:1180-8;de Wildt et al. (1997) *Prot.Eng.* 10:835-41;Komissarov et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870;Hall et al. (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12;Kelley and O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35;Adib-Conquy et al. (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 and Beers et al. (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43。

[0108] 如本文所用,术语“保守性序列修饰”是指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。所述保守性修饰包括氨基酸取代、添加和删除。可以通过本领域已知的标准技术将修饰引入本发明的抗体中,例如定点诱变和PCR介导的诱变。保守性氨基酸取代是指其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基置换。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有以下侧链的氨基酸:碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙

氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,本发明抗体的CDR区内的一个或多个氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基替换,并且可以使用本文所述的功能测定法来测试已被改变的抗体的保留功能(即,上文所述的功能)。

[0109] 本发明的抗体可以使用具有13E2或34F4的一个或多个VH和/或VL序列的抗体作为起始材料来制备,以改造经修饰的抗体。可通过修饰一个或两个可变区(即VH和/或VL)内(例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个框架区内)的一个或多个残基来改造抗体。另外地或可选地,可以通过修饰恒定区内的残基来改造抗体,例如以改变所述抗体的效应子功能。

[0110] 在某些实施例中,CDR移植可以用于改造抗体的可变区。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。由于这个原因,CDR内的氨基酸序列在各个抗体之间比在CDR之外的序列更加多样化。因为CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,所以可以通过构建表达载体来表达模拟天然存在的特定抗体的性质的重组抗体,所述表达载体包括来自天然存在的特定抗体的CDR序列,其中所述天然存在的特定抗体被移植到了来自具有不同性质的不同抗体的框架序列上[参见,例如Riechmann et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; U.S. Pat. Nos. 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370]。

[0111] 根据本发明还提供了本发明的抗体或其抗原结合片段,例如单克隆抗体或其抗原结合片段,该抗体或片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:7的抗体重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3和/或包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:8的抗体轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3(即13E2的CDR)。尽管所述抗体含有单克隆抗体13E2的VH和VL CDR序列,但它们可以含有不同的框架序列。

[0112] 类似地,根据本发明还提供了本发明的抗体或其抗原结合片段,例如单克隆抗体或其抗原结合片段,该抗体或片段包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:17的抗体重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3和/或包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:18的抗体轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3(即34F4的CDR)。尽管所述抗体含有单克隆抗体34F4的VH和VL CDR序列,但它们可以含有不同的框架序列。

[0113] 这些框架序列可以从公开的DNA数据库或包括种系抗体基因序列的公开的参考文献获得。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在如下资源中找到:“VBase”人种系序列数据库(可在互联网www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase上获得),以及上文引用过的Kabat et al. (1991) 文献; Tomlinson et al. (1992) “The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops” *J. Mol. Biol.* 227:776-798; 和Cox et al. (1994) “A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage” *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; 以上每一个的内容通过引用明确地并入本文。作为另一个例子,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在Genbank数据库中找到。例如, HCo7HuMAb小鼠中发现的以下重链种系序列可以在所附的Genbank登记号中获得:1-69 (NG_

0010109,NT_024637&BC070333),3-33(NG_0010109&NT_024637)和3-7(NG_0010109&NT_024637)。作为另一个例子,在HCo12HuMAb小鼠中发现的以下重链种系序列可以在所附的Genbank登记号中获得:1-69(NG_0010109,NT_024637&BC070333),5-51(NG_0010109&NT_024637),4-34(NG_0010109&NT_024637),3-30.3(CAJ556644)&3-23(AJ406678)。

[0114] 使用本领域技术人员熟知的称为Gapped BLAST(参见上文引用的文献Altschul et al.(1997))的序列相似性搜索方法之一,将抗体蛋白序列与编译的蛋白序列数据库进行比较。用于本发明抗体的优选框架序列与13E2或34F4抗体的框架序列在结构上相似。

[0115] 与编码单克隆抗体13E2的VH结构域的核酸序列显示出显著对齐的序列包括以下种系基因:IGHV8-8*01、IGHV8-11*01、IGHV8-12*01、IGHD2-12*01、IGHD1-1*01、IGHJ1*01、IGHJ1*02、IGHJ1*03。

[0116] 与编码单克隆抗体13E2的VL结构域的核酸序列显示出显著对齐的序列包括以下种系基因:IGKV6-17*01、IGKV6-25*01、IGKV6-23*01、IGKJ2*01、IGKJ2*03、IGKJ2*02。

[0117] 与编码单克隆抗体34F4的VH结构域的核酸序列显示出显著对齐的序列包括以下种系基因:IGHV8-8*01、IGHV8-12*01、IGHV8-11*01、IGHD1-1*01、IGHD1-2*01、IGHD2-3*01、IGHJ2*01、IGHJ2*02、IGHJ2*03。

[0118] 与编码单克隆抗体34F4的VL结构域的核酸序列显示出显著对齐的序列包括以下种系基因:IGKV6-17*01、IGKV6-25*01、IGKV6-23*01、IGKJ1*01、IGKJ1*02、IGKJ2*01。

[0119] 用于本发明的抗体的优选重链框架序列是那些与由种系V基因IGHV8-8*01、IGHV8-11*01或IGHV8-12*01(特别是IGHV8-8*01)编码的框架序列结构相似的序列。用于本发明抗体的优选轻链框架序列是那些与由种系V基因IGKV6-17*01、IGKV6-25*01或IGKV6-23*01(特别是IGKV6-17*01)编码的框架序列结构相似的序列。

[0120] 可以将VH CDR1、CDR2和CDR3序列以及VL CDR1、CDR2和CDR3序列移植到这样的框架区上:该框架区具有与种系免疫球蛋白基因(框架序列源自该基因)中发现的序列相同的序列,或者可以将所述CDR序列移植到含有一个或多个突变(与种系序列相比)的框架区上。例如,已经发现在某些情况下,框架区内的突变残基是有利的,以维持或增强抗体的抗原结合能力(参见,例如美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0121] 另一种可变区修饰的类型是使得VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基突变,从而改善目标抗体的一种或多种结合特性(例如亲和力)。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入突变,并且可以在如本文所述且在实施例中提供的体外或体内测定中,评估对抗体结合或其他想要评估的功能特性的影响。优选引入保守性修饰(如上所述)。所述突变可以是氨基酸取代、添加或删除,但优选是取代。而且,CDR区内通常不大于1、2、3、4或5个残基被改变。在一些实施例中,对于全部六个CDR区,总共改变不大于1、2、3、4或5个残基。

[0122] 在特定的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含:

[0123] 抗体VH区和抗体VL区,所述抗体VH区含有:具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列的VH CDR1;具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列的VH CDR2;以及具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列的VH CDR3;所述抗体VL区含有:具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列的VL CDR1;具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列的VL CDR2;和具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列的VL CDR3;或

[0124] 其变体,在该变体中,在CDR序列内通过氨基酸取代、添加或删除改变了不大于1、2、3、4或5个氨基酸残基。

[0125] 在特定的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段包含:

[0126] 抗体VH区和抗体VL区,所述抗体VH区含有:具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列的VH CDR1,具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列的VH CDR2,以及具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列的VH CDR3;所述抗体VL区含有:具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列的VL CDR1;具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列的VL CDR2;以及具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列的VL CDR3;或其变体,在该变体中,在CDR序列内通过氨基酸取代、添加或删除改变了不大于1、2、3、4或5个氨基酸残基。

[0127] 在另一个实施例中,本发明提供了抗LAG-3单克隆抗体或其抗原结合片段,该抗体或片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区含有:(a) VH CDR1区,其含有SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VH CDR2区,其含有SEQ ID NO:2或与SEQ ID NO:2相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) VH CDR3区,其含有SEQ ID NO:3或与SEQ ID NO:3相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;所述轻链可变区含有:(a) VL CDR1区,其含有SEQ ID NO:4或与SEQ ID NO:4相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VL CDR2区,其含有SEQ ID NO:5或与SEQ ID NO:5相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) VL CDR3区,其含有SEQ ID NO:6或与SEQ ID NO:6相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列。

[0128] 在一个进一步的实施例中,本发明提供了抗LAG-3单克隆抗体或其抗原结合片段,该抗体或片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区含有:(a) VH CDR1区,其含有SEQ ID NO:11或与SEQ ID NO:11相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VH CDR2区,其含有SEQ ID NO:12或与SEQ ID NO:12相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) VH CDR3区,其含有SEQ ID NO:13或与SEQ ID NO:13相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;所述轻链可变区含有:(a) VL CDR1区,其含有SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VL CDR2区,其含有SEQ ID NO:15或与SEQ ID NO:15相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) VL CDR3区,其含有SEQ ID NO:16或与SEQ ID NO:16相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列。

[0129] 在另一个实施例中,本发明提供了抗LAG-3单克隆抗体或其抗原结合片段,该抗体或片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区含有:(a) VH CDR1区,其含有SEQ ID NO:21或与SEQ ID NO:21相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VH CDR2区,其含有SEQ ID NO:22或与SEQ ID NO:22相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) VH CDR3区,其含有SEQ ID NO:23或与SEQ ID NO:23相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;所述轻链可变区含有:(a) VL CDR1区,其含有SEQ ID NO:24或与SEQ ID NO:24相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VL CDR2区,其含有SEQ ID NO:25或与SEQ ID NO:25相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) VL CDR3区,其含有SEQ

ID NO:26或与SEQ ID NO:26相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列。

[0130] 在一个进一步的实施例中,本发明提供了抗LAG-3单克隆抗体或其抗原结合片段,该抗体或片段包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区含有:(a) VH CDR1区,其含有SEQ ID NO:31或与SEQ ID NO:31相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VH CDR2区,其含有SEQ ID NO:32或与SEQ ID NO:32相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) VH CDR3区,其含有SEQ ID NO:33或与SEQ ID NO:33相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;所述轻链可变区含有:(a) VL CDR1区,其含有SEQ ID NO:34或与SEQ ID NO:34相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;(b) VL CDR2区,其含有SEQ ID NO:35或与SEQ ID NO:35相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列;以及(c) VL CDR3区,其含有SEQ ID NO:36或与SEQ ID NO:36相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、删除或添加的氨基酸序列。

[0131] 本发明的经改造的抗体包括已经对VH和/或VL内的框架残基进行了修饰的抗体,该修饰例如用以改善抗体的性质。通常进行这种框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个框架残基“回复突变”(“backmutate”)成相应的种系序列。更具体地,经历了体细胞突变的抗体可以包含与衍生出该抗体的种系序列不同的框架残基。这些残基可以通过将抗体框架序列与衍生该抗体的种系序列进行比较来识别。

[0132] 另一种类型的框架修饰涉及使框架区内或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基发生突变,以去除T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。这种方法也被称为“去免疫化”,其在公开号为US20030153043的美国专利申请中得到了进一步的详细描述。

[0133] 除框架区或CDR区内进行的修饰之外或作为其替代,本发明的抗体可以被改造以包括Fc区内的修饰,通常改变抗体的一种或多种功能特性,例如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,本发明的抗体可以被化学修饰(例如,可将一个或多个化学基团附接到抗体上)或被修饰以改变其糖基化,从而再次改变抗体的一种或多种功能特性。下面将更详细地描述这些实施例中的每一个。Fc区中残基的编号是Kabat的EU索引的编号。

[0134] 在一个实施例中,CF11的铰链区被修饰,使得铰链区中半胱氨酸残基的数目发生改变,例如增加或减少。美国专利US5,677,425进一步描述了这种方法。例如,改变CF11的铰链区中半胱氨酸残基的数目,以便于轻链和重链的组装,或提高或降低抗体的稳定性。

[0135] 在另一个实施例中,使抗体的Fc铰链区发生突变以降低抗体的生物半衰期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变引入Fc-铰链片段的CF12-CF13结构域接口区,使得该抗体相对于天然Fc铰链结构域SpA结合具有削弱的葡萄球菌蛋白A (SpA) 结合。美国专利US6,165,745进一步描述了这种方法。

[0136] 在另一个实施例中,对抗体进行修饰以增加其生物半衰期。IgG类最稳定,其血清半衰期为20天,而IgM和IgA仅持续5-8天(Brekke&Sandlie,2003,Nature Reviews Drug Discovery 2,52-62)。各种方法都是可行的。例如,可以引入一个或多个以下突变:T252L、T254S、T256F,如美国专利US6,277,375所述。或者,为了增加生物半衰期,可使抗体在CF11或CL区内发生改变以包含取自IgG的Fc区的CF12结构域的两个环的补救受体结合表位,如

美国专利US5,869,046和US6,121,022所述。

[0137] 本发明的抗体或其抗原结合片段应当缺乏抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒性 (CDC), 使得所述抗体或片段可用于负调节T细胞增殖和/或功能而不消耗T细胞 (ADCC或CDC会导致T细胞消耗)。

[0138] 在ADCC中, 抗体的Fc区与免疫效应细胞 (例如天然杀伤细胞和巨噬细胞) 表面上的Fc受体 (Fc γ R) 结合, 导致靶细胞裂解。在CDC中, Fc区与补体的C1q成分结合, 并且通过触发细胞表面的补体级联来杀死靶细胞。抗体的ADCC和CDC活性取决于其同种型。IgM和IgG都可以介导补体固定, 而只有IgG可以促进抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。IgG同种型表现出不同水平的CDC和ADCC:

[0139] IgG: CDC (hIgG3>hIgG1>hIgG2>hIgG4; mIgG2a>mIgG1);

[0140] ADCC (hIgG1 $\geq$ hIgG3>hIgG2 $\geq$ IgG4; mIgG2a>mIgG1)

[0141] 因此, 在一些实施例中, 本发明的抗体或其抗原结合片段包含小鼠IgG1或人IgG4Fc部分以确保所述抗体或片段缺乏ADCC和CDC活性。

[0142] 本发明的抗体或其抗原结合片段的ADCC和CDC活性可以通过本领域技术人员已知的任何合适的方法确定。专利文献W02008/132601和下文均描述了CDC和ADCC活性的合适测定法的例子。

[0143] 与其同种型对照相比, 表现出CDC活性的抗LAG-3抗体将在存在补体的情况下持续杀死LAG-3⁺细胞。

[0144] 对于CDC测试, 用于评估抗LAG-3抗体的靶细胞可以是LAG-3转染的细胞系, 或被激活以诱导LAG-3表达的原代T细胞。例如, 在一种用于CDC测试的可能测定法中, 与wt CHO细胞相比, 靶细胞是LAG-3⁺CHO细胞。将两种类型的细胞 (即, 表达LAG-3的细胞和不表达LAG-3的同等细胞) 与抗LAG-3测试抗体或其同种型匹配的阴性对照抗体以及含有活性补体的兔血清在37°C下温育1小时。然后使用7-氨基放线菌素D (7-AAD) 评估细胞活性, 所述7-AAD是一种用来标记已经失去其膜完整性 (细胞死亡后迅速出现的一种现象) 的细胞的荧光染料。通过流式细胞术分析来确定7-AAD阳性CHO细胞 (即死亡靶细胞) 的百分比。表现出CDC活性的抗体仅在存在补体的情况下杀死LAG-3⁺细胞 (例如LAG-3⁺CHO细胞)。可以滴定抗LAG-3Ab以确定抗体在抗体低浓度下活化CDC的功效。

[0145] 也可以对用超抗原SEB刺激的PBMC进行CDC测定。在活化的 (即CD25⁺/LAG-3⁺细胞) 和未活化的 (即CD25⁻/LAG-3⁻细胞) CD4⁺辅助T细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞上分析测试抗体的细胞毒性。只有活化的CD4⁺和CD8⁺T细胞被表现CDC的抗体特异性杀死。

[0146] 对于ADCC测试, 用IL-2将PBMC刺激1天以作为效应细胞, 用活性染料CFSE标记LAG-3表达细胞 (例如LAG-3⁺CHO细胞) 以充当靶细胞。在存在测试抗LAG-3抗体的情况下, 与同种型匹配的阴性对照抗体相比, 如果效应细胞 (PBMC) 能够杀死显著百分比的LAG-3表达细胞 (例如LAG-3⁺CHO细胞), 则测试抗体表现出ADCC。这种效应应该随着效应细胞数量的增加而增加。可以滴定测试抗体以确定抗体在抗体低浓度下诱导ADCC的功效。

[0147] 当测试抗LAG-3抗体在上述任何测定法中杀死的LAG-3⁺细胞少于同种型匹配的阴性对照抗体所杀死的LAG-3⁺细胞的两倍时, 则认为该测试抗LAG-3抗体没有表现出CDC或ADCC。

[0148] 在经典ADCC生物测定法中采用杀死靶细胞的方式, 该测定法使用供体外周血单核

细胞(PBMC)或天然杀伤(NK)细胞亚群作为效应细胞。但是,这些细胞的应答可能会发生变化,并可能导致高背景读数。来自Promega的ADCC报告生物测定法(ADCC Reporter Bioassay)使用ADCC通路活化早期的替代性读数:通过效应细胞中的NFAT(活化的T细胞的核因子)通路激活基因转录。此外,ADCC报告生物测定法使用稳定表达Fc γ RIIIa受体的经改造的Jurkat细胞、V158(高亲和力)变体和驱动萤火虫荧光素酶的表达的NFAT应答元件作为效应细胞。通过作为NFAT通路活化结果而产生的荧光素酶来量化ADCC中的抗体生物学活性;用荧光读数来量化效应细胞中的荧光素酶活性。使用该测定法,信号高,测定背景低。只有在存在具有正确的表面抗原的靶细胞、正确的特异性抗体和表达Fc γ RIIIa的效应细胞时,才能获得良好的测定响应。如果其中任何一个缺失,则没有响应。

[0149] 当使用ADCC报告生物测定法评估抗体的ADCC活性时,当测量的生物发光增加小于其同种型匹配的阴性对照抗体的两倍时,可以认为测试抗体不表现ADCC。

[0150] 在其它实施例中,Fc区包含具有S228P突变的突变型人IgG4Fc序列以消除Fab臂交换(如图20(A)中包含重链序列13E2IgG4mut的嵌合抗体Chim13E2IgG4所示)。

[0151] 在其他实施例中,Fc区包含野生型人Ig κ (IgK)链C部分(13E2IgK)(如图20(B)中包含轻链序列13E2IgK的嵌合抗体Chim13E2IgG4所示)。

[0152] 上述用于人IgG4Fc突变体的Fc区中残基的编号是Kabat中Eu指数的标准编号[Kabat,E.A.et al.,Sequences of proteins of immunological interest,5th Edition-US Department of Health and Human Services,NIH publication n°91-3242,pp 662,680,689(1991)]。

[0153] 在另一个实施例中,抗体的糖基化被修饰。例如,可以制备去糖基化抗体(即,该抗体缺乏糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对抗原的亲和力。这种碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来完成。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除所述位点的糖基化。这种去糖基化可能增加抗体对抗原的亲和力。参见,例如美国专利US5,714,350和US6,350,861。

[0154] 本发明所考虑的本发明抗体的另一种修饰是聚乙二醇化。可将抗体聚乙二醇化以例如增加抗体的生物(例如血清)半衰期。为了使抗体聚乙二醇化,通常使所述抗体或其片段,在一个或多个聚乙二醇(PEG)基团附接到所述抗体或抗体片段的情况下,与聚乙二醇(PEG)(例如PEG的反应性酯或醛衍生物)反应。优选地,聚乙二醇化通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应来实现。如本文所用,术语“聚乙二醇”旨在涵盖已经用于衍生其它蛋白的任何形式的PEG,例如单(C1-C10)烷氧基或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施例中,要被聚乙二醇化的抗体是去糖基化抗体。使蛋白聚乙二醇化的方法是本领域已知的并且可以应用于本发明的抗体。参见,例如专利文献EP 0 154 316和EP 0 401 384。

[0155] 本发明的抗体可以是单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0156] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”包括任何同种型的抗体或免疫球蛋白、保留与抗原特异性结合的抗体片段,包括但不限于Fab、Fv、scFv和Fd片段、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体(scAb)、单结构域抗体(dAb)、单结构域重链抗体、单结构域轻链抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、以及包含抗体的抗原-结合(本文也称为“抗原结合”)部分和非抗体蛋白的融

合蛋白。所述术语还涵盖Fab'、Fv、F(ab')₂和或其它保留与抗原特异性结合的抗体片段,以及单克隆抗体。抗体可以是单价的或二价的。抗体可以是Ig单体,其是由四条多肽链组成的“Y形”分子,所述四条多肽链为:通过二硫键连接的两条重链和两条轻链。抗体可以被可检测地标记,例如用放射性同位素、能产生可检测产物的酶、荧光蛋白等进行标记。所述抗体可以进一步缀合至其他部分,例如特异性结合对的成员,如生物素(生物素-抗生物素蛋白特异性结合对的成员)等。所述抗体也可以结合到固体支持物上,该固体支持物包括但不限于聚苯乙烯板或珠子等。

[0157] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,例如完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体[Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)];结构域抗体[dAb; Holt et al. (2003) Trends Biotechnol. 21:484];单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段)和一残余的“Fc”片段,其中,每个抗原结合片段具有单个抗原结合位点,所述“Fc”片段是反映容易结晶的能力的指标。进行胃蛋白酶处理会形成具有两个抗原结合位点且仍能与所述抗原交联的F(ab')₂片段。

[0158] Fv为包括完整的抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该区由紧密且非共价结合的一个重链可变结构域与一个轻链可变结构域的二聚体组成。正是在这种结构中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以在V_H-V_L二聚体的表面上限定抗原结合位点。该六个CDR共同地赋予该抗体以抗原结合特异性。然而,甚至单个可变结构域(或Fv的一半,其仅包含三个对抗原有特异性的CDR)也具有识别和结合抗原的能力,尽管其亲和力低于整个结合位点。

[0159] “Fab”片段还含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH₁)。Fab片段与Fab'片段的不同之处在于前者在重链CH₁结构域的羧基末端处添加了几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文对其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离巯基的Fab'的命名。F(ab')₂抗体片段最初是作为Fab'片段对产生的,在所述Fab'片段对之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0160] 基于其恒定结构域的氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的抗体的“轻链”可以归入两种明显不同的类型中的一种,所述两种明显不同的类型称为κ(kappa)和λ(lambda)。根据其重链的恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同类。存在五大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且其中的几类可以进一步细分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。亚类可以进一步分为多种类型,例如IgG2a和IgG2b。

[0161] “单链Fv”或“sFv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。在一些实施例中,Fv多肽还包含V_H和V_L结构域之间的多肽接头,所述多肽接头使得sFv能够形成抗原结合所需的结构。有关sFv的综述,请参阅Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994)。

[0162] 术语“双链抗体”(Diabodies)是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包含与同一多肽链(V_H-V_L)中的轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H)。通过使用因太短而不能在同一链上的两个结构域之间配对的接头,迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。例如,专利文献EP 404,097; WO 93/11161; 和非专利文献[Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448]中更完整地

描述了双链抗体。

[0163] 如本文所用,“单克隆抗体”是由一组相同细胞产生的抗体,所述相同细胞全部由单个细胞通过重复的细胞复制产生。也就是说,细胞的克隆仅产生单个抗体物种。虽然可以使用杂交瘤生产技术来产生单克隆抗体,但也可以使用本领域技术人员已知的其他生产方法(例如,源自抗体噬菌体展示文库的抗体)来产生单克隆抗体。

[0164] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”旨在表示在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。非专利文献[Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977)]; [Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of proteins of immunological interest” (1991) (also referred to herein as Kabat 1991)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) (本文也称为Chothia 1987)]; 和[MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)]中描述了CDR。另一个系统是国际ImMunoGeneTics (IMGT) 编号系统[Lefranc et al., Nucleic Acids Research 27:209-212 (1999)]。当相互比较时,其定义包括氨基酸残基的重叠或亚组。尽管如此,本文意图将用任一定义来指代抗体或移植抗体或其变体的CDR的应用都包含在本文所定义和所使用的术语的范围内。下表1中列出了包含如上面引用的每篇参考文献所定义的CDR的氨基酸残基作为比较。根据Lefranc 1999和Kabat1991定义了实施例2中的表4和实施例5中的表9所列出的CDR。

[0165] 表1.CDR定义

[0166]

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³	Lefranc ⁴
V _H CDR-1	31-35	26-32	30-35	27-38
V _H CDR-2	50-65	53-55	47-58	56-65
V _H CDR-3	95-102	96-101	93-101	105-117
V _L CDR-1	24-34	26-32	30-36	27-38
V _L CDR-2	50-56	50-52	46-55	56-65
V _L CDR-3	89-97	91-96	89-96	105-117

[0167] ¹残基编号遵循上述Kabat等人的命名法

[0168] ²残基编号遵循上述Chothia等人的命名法

[0169] ³残基编号遵循上述MacCallum等人的命名法

[0170] ⁴残基编号遵循上述Lefranc等人的命名法

[0171] 如本文所用,术语“CDR-L1”、“CDR-L2”和“CDR-L3”分别指轻链可变区中的第一、第二和第三CDR。如本文所用,术语“CDR-H1”、“CDR-H2”和“CDR-H3”分别指重链可变区中的第一、第二和第三CDR。如本文所用,术语“CDR-1”、“CDR-2”和“CDR-3”分别指任一链的可变区中的第一、第二和第三CDR。

[0172] 如本文所用,术语“亲和力”是指两种试剂(例如抗体和抗原)的可逆结合的平衡常数,并且表示为解离常数(K_d)。亲和力可以比抗体对无关氨基酸序列的亲和力大至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍或至少1,000倍或更多。抗体对靶蛋白的亲和力可以是例如从约100纳摩尔(nM)至约0.1nM、

从约100nM至约1皮摩尔 (pM)、或从约100nM至约1飞摩尔 (fM) 或更多。如本文所用,术语“亲和力和”是指在稀释后两种或更多种试剂的复合物对解离的抗性。术语“免疫反应性”和“优先结合”在本文中相对于抗体和/或抗原结合片段可互换使用。

[0173] 术语“结合”是指由于例如共价、静电、疏水和离子和/或氢键相互作用(包括诸如盐桥和水桥的相互作用)而引起的两个分子之间的直接联合。本发明的抗体与LAG-3蛋白(特别是人LAG-3蛋白)内的表位特异性结合。“特异性结合”是指以至少约 5×10^{-7} M或更大,例如 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M或更大,的亲和力进行结合。“非特异性结合”是指以小于约 10^{-7} M的亲和力进行结合,例如以 10^{-6} M、 10^{-5} M、 10^{-4} M等的亲和力进行结合。如本文所用,“特异性结合至人LAG-3”的抗体旨在表示结合至人LAG-3蛋白(和可能来自一种或多种非人物种的LAG-3蛋白)但基本上不结合至非LAG-3蛋白的抗体。优选地,所述抗体以“高亲和力”结合至人LAG-3蛋白,即 K_D 为 1×10^{-7} M或更小,更优选为 1×10^{-8} M或更小,更优选为 5×10^{-9} M或更小,更优选为 1×10^{-9} M或更小。

[0174] 如本文所用,术语与蛋白或细胞“基本上不结合”意指不结合或不以高亲和力结合至蛋白或细胞,即以 1×10^{-6} M或更大,更优选以 1×10^{-5} M或更大,或更更优选以 1×10^{-4} M或更大,或更更优选以 1×10^{-3} M或更大,甚至更优选以 1×10^{-2} M或更大的 K_D 结合至蛋白或细胞。

[0175] 如本文所用,术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”旨在表示特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而本文所用的术语“ K_{dis} ”或“ K_d ”旨在表示特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所用,术语“ K_D ”旨在表示解离常数,其由 K_d 与 K_a 之比(即 K_d/K_a)获得,表示为摩尔浓度(M)。

[0176] 用于IgG抗体的术语“高亲和力”是指抗体对靶抗原的 K_D 为 1×10^{-7} M或更小,更优选为 5×10^{-8} M或更小,甚至更优选为 1×10^{-8} M或更小,甚至更优选为 5×10^{-9} M或更小以及甚至更优选为 1×10^{-9} M或更小。然而,对于其他抗体同种型而言,“高亲和力”结合可以不同。例如,IgM同种型的“高亲和力”结合是指抗体的 K_D 为 10^{-6} M或更小,更优选为 10^{-7} M或更小,甚至更优选为 10^{-8} M或更小。

[0177] 在一些实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段以比拮抗性抗LAG-3单克隆抗体17B4更高的亲和力(即,具有更低的解离常数)结合至人LAG-3蛋白(Baixeras, et al., J. Exp. Med., 1992, Vol. 176: 327-337)。下面的实施例7描述了17B4抗体与人LAG-3Ig蛋白结合的Biacore分析结果。结果显示17B4对人LAG-3Ig的解离常数为3.69nM。因此,在一些实施例中,例如通过Biacore分析确定,本发明的抗体以小于3.69nM的解离常数(K_D)结合人至LAG-3蛋白(或人LAG-3Ig蛋白)。

[0178] 在一些实施例中,本发明的抗体以不大于3.5nM、不大于2.5nM、不大于2nM、不大于1nM、不大于0.9nM、不大于0.8nM、不大于0.7nM、不大于0.6nM、不大于0.5nM、不大于0.4nM、不大于0.3nM、不大于0.2nM、不大于0.1nM的解离常数(K_D)结合至人LAG-3蛋白(或其衍生物,诸如人LAG-3Ig蛋白)。在一些实施例中,本发明的抗LAG-3抗体以不大于90pM、不大于80pM、不大于70pM、不大于60pM、不大于50pM、不大于40pM、不大于30pM、不大于20pM、不大于10pM、不大于9pM、不大于8pM、不大于7pM、不大于6pM、不大于5pM、不大于4pM、不大于3pM、不大于2pM、或不大于1pM的 K_D 结合至人LAG-3蛋白。

[0179] 下面的实施例20描述了嵌合13E2IgG4抗体(如下文所述)与人LAG-3Ig蛋白的结合、以及人源化13E2IgG4(如下文所述)与人LAG-3Ig蛋白的结合的Biacore分析结果。结果显示嵌合13E2IgG4抗体对人LAG-3Ig的解离常数为21.9pM,人源化13E2IgG4对人LAG-3Ig的

解离常数为22.8pM。

[0180] 在特定的实施例中,例如通过Biacore分析确定,本发明的抗体以不大于100pM、不大于90pM、不大于80pM、不大于70pM、不大于60pM、不大于50pM、不大于40pM、不大于30pM或不大于25pM的解离常数(K_D)结合至人LAG-3蛋白(或人LAG-3Ig蛋白)。

[0181] 在一些实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段的亲和力可以比17B4对人LAG-3蛋白的亲和力至少高10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一些实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段的亲和力可以是17B4对人LAG-3蛋白的亲和力的至少1.5、2、2.5、3或3.5倍。

[0182] 本领域技术人员可以适当地通过表面等离子体共振(例如使用生物传感器系统,如Biacore系统)来确定抗体对人LAG-3蛋白的亲和力(Murphy et al, Using Biacore to measure the binding kinetics of an antibody-antigen interaction; Curr Protoc Protein Sci. 2006 Sep; Chapter 19: Unit 19.14)。例如, Biacore分析可用于确定本发明抗体与人LAG-3蛋白之间的解离常数。

[0183] 可以使用本领域中已经成熟的一种或多种其他技术来评估与人LAG-3的结合。例如,可以通过流式细胞术测定法来测试抗体,在该测定法中,所述抗体与表达人LAG-3的细胞系(例如已经转染以在其细胞表面表达人LAG-3的CHO细胞)反应。其他用于流式细胞术测定的合适细胞包括SEB刺激的PBMC,或表达天然LAG-3的、抗CD3刺激的CD4⁺活化T细胞。其他合适的结合测定法包括ELISA测定,例如使用重组LAG-3蛋白进行的ELISA测定。

[0184] 本发明的抗体是分离的抗体。“分离的”抗体是已被识别且已与其天然环境的组分分离和/或从其中回收的抗体。其天然环境的污染成分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,这些污染成分可能包括酶、激素和其他蛋白或非蛋白溶质。在一些实施例中,抗体将被纯化(1)至按Lowry法测定的抗体重量的大于90%、大于95%或大于98%,例如大于99%重量,(2)至足以通过使用旋杯式序列分析仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)达到在使用考马斯蓝或银染的还原或非还原条件下通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)获得的均一性。由于抗体天然环境的至少一种组分将不存在,因此分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。在一些情况下,分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0185] 在优选的实施例中,本发明的抗体是人源化抗体或其抗原结合片段,特别是人源化单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0186] 本发明的人源化抗体或其抗原结合片段可以包含人源化轻链框架区和/或人源化重链框架区。如本文所用,术语“人源化抗体”是指包含不同来源的免疫球蛋白部分的免疫球蛋白,其中至少一部分包含人源氨基酸序列。例如,人源化抗体可以包含源自具有必需特异性的非人源(如小鼠)免疫球蛋白的部分,以及源自人源免疫球蛋白序列(例如免疫球蛋白)的部分,这些部分通过常规技术(例如合成)化学地连接起来或使用基因工程技术制备成连续多肽(例如编码嵌合抗体的蛋白部分的DNA可被表达以产生连续多肽链)。人源化免疫球蛋白的另一个例子是含有一个或多个免疫球蛋白链的免疫球蛋白,所述免疫球蛋白链包含源自非人源抗体的CDR和源自人源轻链和/或重链的框架区(例如具有或不具有框架变化的CDR移植抗体)。术语人源化免疫球蛋白也涵盖嵌合或CDR移植的单链抗体。参见,例如: Cabilly等人的美国专利US4,816,567; Cabilly等人的欧洲专利EP0,125,023 B1; Boss等人

的美国专利US4,816,397;Boss等人的欧洲专利EP0,120,694 B1;Neuberger,M.S.等人的PCT专利申请W0 86/01533;Neuberger,M.S.等人的欧洲专利EP0,194,276 B1;Winter的美国专利US5,225,539;Winter的欧洲专利EP0,239,400B1;Padlan,E.A.等人的欧洲专利EP0,519,596 A1。关于单链抗体,还参见Ladner等人的美国专利US4,946,778;Huston的美国专利US5,476,786;和[Bird,R.E.et al.,Science,242:423-426(1988)]。

[0187] 术语“嵌合抗体”旨在指其中可变区序列来源于一个物种而恒定区序列来源于另一物种的抗体,例如其中可变区序列来源于小鼠抗体而恒定区序列来源于人抗体的抗体。可变区氨基酸序列可以与它所来源的物种的可变区氨基酸序列(例如小鼠序列)相同,或者可以与该可变区序列至少60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同。例如,与其来源物种的可变区氨基酸序列相比,本发明的嵌合抗体的可变区氨基酸序列可以包含一个或多个氨基酸删除、取代或添加(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸删除、取代或添加)。

[0188] 相似地,恒定区氨基酸序列可以与它所来源的物种的恒定区氨基酸序列(例如人序列)相同,或者可以与该恒定区氨基酸序列至少60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同。例如,与其来源物种的恒定区氨基酸序列相比,本发明的嵌合抗体的恒定区氨基酸序列可以包含一个或多个氨基酸删除、取代或添加(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸删除、取代或添加)。

[0189] 例如,如上所述,嵌合抗体的Fc铰链区的氨基酸序列可以是突变型以降低抗体的生物半衰期,或者Fc区的氨基酸序列可以是突变型以增加嵌合抗体的生物半衰期。

[0190] 例如,在本发明的嵌合抗体的一些实施例中,重链可变区序列包含或源自小鼠抗体,并且重链恒定区序列包含或源自IgG4Fc序列。在其他实施例中,轻链可变区序列包含或源自小鼠抗体,并且轻链恒定区序列包含或源自人Igκ(IgK)链C序列。

[0191] 在其他实施例中,Fc区包含具有S228P突变的突变型人IgG4Fc序列以消除Fab臂交换(如图20(A)中的包含重链序列13E2IgG4mut的嵌合抗体Chim 13E2IgG4所示)。

[0192] 在其他实施例中,Fc区包含野生型人Igκ(IgK)链C部分(13E2IgK)(如图20(B)中的包含轻链序列13E2IgK的嵌合抗体Chim13E2IgG4所示)。

[0193] 上述用于人IgG4Fc突变体的Fc区中残基的编号是Kabat中Eu指数的标准编号[Kabat,E.A.et al.,Sequences of proteins of immunological interest.5th Edition-US Department of Health and Human Services,NIH publication n°91-3242,pp 662,680,689(1991)]。

[0194] 可以使用合成和/或重组核酸来制备人源化抗体以制备编码所需人源化链的基因(例如,cDNA)。例如,可以使用PCR诱变方法构建编码人源化可变区的核酸(例如DNA)序列,以改变编码人或人源化链的DNA序列,例如来自预先人源化可变区的DNA模板[参见,例如Kamman,M.,et al.,Nucl.Acids Res.,17:5404(1989);Sato,K.,et al.,Cancer Research,53:851-856(1993);Daugherty,B.L.et al.,Nucleic Acids Res.,19(9):2471-2476(1991);and Lewis,A.P.and J.S.Crowe,Gene,101:297-302(1991)]。使用这些或其他合适的方法,也可以容易地产生变体。例如,克隆的可变区可以被诱变,并且可以选择编码具有目标特异性的变体的序列(例如,来自噬菌体文库;参见,例如Krebber等人的美国专利

US5,514,548;Hoogenboom等人的PCT申请W0 93/06213,公布于1993年4月1日)。

[0195] 如本文所用,当术语“框架”用于指抗体可变区时,其旨在表示抗体可变区内CDR区外的所有氨基酸残基。可变区框架通常是长度在约100-120个氨基酸之间的不连续氨基酸序列,但旨在仅指CDR外的那些氨基酸。如本文所用,术语“框架区”旨在表示由CDR分隔的框架的每个结构域。

[0196] 框架区的人源化降低了抗体在人体内引发人抗小鼠抗体(HAMA)应答的风险。可以进行确定免疫应答的本领域公认的方法以监测特定患者或临床试验期间的HAMA应答。可以在治疗给药的开始和整个期间对患者施用的人源化抗体进行免疫原性评估。例如,通过使用本领域技术人员已知的方法(包括表面等离子体共振技术(BIACORE)和/或固相酶联免疫吸附测定法分析)检测来自患者的血清样品中的人源化治疗剂的抗体来测量HAMA应答。在许多情况下,本发明的人源化抗体基本上不引起人对象中的HAMA应答。

[0197] 基于它们对CDR构象和/或结合抗原的可能影响,选择来自人可变区构架残基的某些氨基酸用于取代。小鼠CDR区与人可变框架区的非自然并置可导致非天然构象限制,除非通过取代某些氨基酸残基进行校正,否则会导致丧失结合亲和力。

[0198] 用于取代的氨基酸残基的选择可以部分通过计算机建模来确定。用于产生免疫球蛋白分子的三维图像的计算机硬件和软件是本领域已知的。通常,分子模型从免疫球蛋白链或其结构域的解析结构开始产生。将要建模的链与解析三维结构的链或结构域就氨基酸序列相似性进行比较,并且选择显示出最大序列相似性的链或结构域作为构建分子模型的起始点。选择共享至少50%序列同一性的链或结构域用于建模,例如选择共享至少60%、至少70%、至少80%、至少90%序列同一性或更多的序列同一性的链或结构域以用于建模。修饰解析起始结构以允许被建模的免疫球蛋白链或结构域中的实际氨基酸与起始结构中的氨基酸之间的差异。然后将修饰的结构组装成复合免疫球蛋白。最后,通过能量最小化和通过验证所有原子在彼此适当的距离内并且键长和角度在化学上可接受的限度内来精制该模型。

[0199] CDR和框架区可以如[Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1987and 1991)]中所定义。[Chothia et al.,J.Mol.Biol.196:901(1987);Nature 342:878(1989);and J.Mol.Biol.186:651(1989)](统称为“Chothia”)提出了另一种替代结构的定义。当由如上文Kabat所定义的骨架残基构成如上文Chothia所定义的结构环残基时,可以选择小鼠抗体中存在的氨基酸来取代进入人源化抗体中。“与CDR区相邻”的残基包括在与人源化免疫球蛋白链的一级序列中的一个或多个CDR紧邻的位置上的氨基酸残基,所述位置例如与如上文Kabat所定义的CDR紧邻的位置,或与如上文Chothia所定义的CDR紧邻的位置[例如,参见Chothia and Lesk JMB 196:901(1987)]。这些氨基酸特别可能与CDR中的氨基酸相互作用,并且如果选自受体,则会扭曲供体CDR并降低亲和力。此外,相邻氨基酸可以与抗原直接相互作用[Amit et al.,Science,233:747(1986)],并且从供体中选择这些氨基酸可能是期望的,以保留所有在原始抗体中提供亲和力的抗原接触。或者,CDR和框架区可以如MacCallum等人或Lefranc等人(同上-见表1)所定义。

[0200] 在一些情况下,人源化V_H框架或V_L框架是共有人源化框架。共有人源化框架可以代表选择的人免疫球蛋白V_L或V_H框架序列中最常出现的氨基酸残基。

[0201] 在一些实施例中,本发明的抗体或其片段包含一个或多个人源化框架区(FR)。在一些实施例中,主题抗LAG-3抗体包含含有已经人源化的1、2、3或4个轻链FR的轻链可变区。在一些实施例中,主题抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化轻链FR1;如本文所述的CDR-L1;人源化轻链FR2;如本文所述的CDR-L2;人源化轻链FR3;如本文所述的CDR-L3;以及人源化轻链FR4。在一些实施例中,CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3各自的氨基酸序列为:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3。

[0202] 例如,主题抗体可以包含轻链可变区,所述轻链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化轻链FR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的CDR-L1;人源化轻链FR2;包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的CDR-L2;人源化轻链FR3;包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的CDR-L3;以及人源化轻链FR4。

[0203] 在其他实施例中,CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3各自的氨基酸序列是:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0204] 例如,主题抗体可以包含轻链可变区,所述轻链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化轻链FR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的CDR-L1;人源化轻链FR2;包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的CDR-L2;人源化轻链FR3;包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的CDR-L3;以及人源化轻链FR4。

[0205] 在其他实施例中,CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3各自的氨基酸序列是:SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26。

[0206] 例如,主题抗体可以包含轻链可变区,所述轻链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化轻链FR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:24的CDR-L1;人源化轻链FR2;包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的CDR-L2;人源化轻链FR3;包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的CDR-L3;以及人源化轻链FR4。

[0207] 在其他实施例中,CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3各自的氨基酸序列选自:SEQ ID NO:4和24(CDR-L1);SEQ ID NO:5和25(CDR-L2);以及SEQ ID NO:6和26(CDR-L3)。

[0208] 例如,主题抗体可以包含轻链可变区,所述轻链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化轻链FR1;包含选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列的CDR-L1;人源化轻链FR2;包含选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列的CDR-L2;人源化轻链FR3;包含选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列的CDR-L3;以及人源化轻链FR4。

[0209] 在其他实施例中,CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3各自的氨基酸序列是:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0210] 例如,主题抗体可以包含轻链可变区,所述轻链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化轻链FR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的CDR-L1;人源化轻链FR2;包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的CDR-L2;人源化轻链FR3;包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的CDR-L3;以及人源化轻链FR4。

[0211] 在其他实施例中,CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3各自的氨基酸序列是:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。

[0212] 例如,主题抗体可以包含轻链可变区,所述轻链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化轻链FR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的CDR-L1;人源化轻链FR2;包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的CDR-L2;人源化轻链FR3;包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的CDR-L3;以及人

源化轻链FR4。

[0213] 在其他实施例中,CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3各自的氨基酸序列是:SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36。

[0214] 例如,主题抗体可以包含轻链可变区,所述轻链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化轻链FR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:34的CDR-L1;人源化轻链FR2;包含氨基酸序列SEQ ID NO:35的CDR-L2;人源化轻链FR3;包含氨基酸序列SEQ ID NO:36的CDR-L3;以及人源化轻链FR4。

[0215] 在其他实施例中,CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3各自的氨基酸序列选自:SEQ ID NO:14和34 (CDR-L1);SEQ ID NO:15和35 (CDR-L2);以及SEQ ID NO:16和36 (CDR-L3)。

[0216] 例如,主题抗体可以包含轻链可变区,所述轻链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化轻链FR1;包含选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列的CDR-L1;人源化轻链FR2;包含选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列的CDR-L2;人源化轻链FR3;包含选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列的CDR-L3;以及人源化轻链FR4。

[0217] 在一些实施例中,主题抗LAG-3抗体包含含有已经人源化的1、2、3或4个重链FR的重链可变区。在一些实施例中,主题抗体包含重链可变区,所述重链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化重链FR1;如本文所述的CDR-H1;人源化重链FR2;如本文所述的CDR-H2;人源化重链FR3;如本文所述的CDR-H3;以及人源化重链FR4。

[0218] 在一些实施例中,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3各自的氨基酸序列是:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。

[0219] 例如,主题抗体可以包含重链可变区,所述重链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化重链FR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的CDR-H1;人源化重链FR2;包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的CDR-H2;人源化重链FR3;包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的CDR-H3;以及人源化重链FR4。

[0220] 在其他实施例中,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3各自的氨基酸序列是:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3。

[0221] 例如,主题抗体可以包含重链可变区,所述重链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化重链FR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的CDR-H1;人源化重链FR2;包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的CDR-H2;人源化重链FR3;包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的CDR-H3;以及人源化重链FR4。

[0222] 在其他实施例中,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3各自的氨基酸序列是:SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23。

[0223] 例如,主题抗体可以包含重链可变区,所述重链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化重链FR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的CDR-H1;人源化重链FR2;包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的CDR-H2;人源化重链FR3;包含氨基酸序列SEQ ID NO:23的CDR-H3;以及人源化重链FR4。

[0224] 在其他实施例中,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3各自的氨基酸序列选自:SEQ ID NO:1和21 (CDR-H1);SEQ ID NO:2和22 (CDR-H2);以及SEQ ID NO:3和23 (CDR-H3)。

[0225] 例如,主题抗体可以包含重链可变区,所述重链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化重链FR1;包含选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列的CDR-H1;人源化重链FR2;包含

选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列的CDR-H2;人源化重链FR3;包含选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列的CDR-H3;和人源化重链FR4。

[0226] 在其他实施例中,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3各自的氨基酸序列是:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16。

[0227] 例如,主题抗体可以包含重链可变区,所述重链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化重链FR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的CDR-H1;人源化重链FR2;包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的CDR-H2;人源化重链FR3;包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的CDR-H3;以及人源化重链FR4。

[0228] 在其他实施例中,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3各自的氨基酸序列是:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0229] 例如,主题抗体可以包含重链可变区,所述重链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化重链FR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的CDR-H1;人源化重链FR2;包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的CDR-H2;人源化重链FR3;包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的CDR-H3;以及人源化重链FR4。

[0230] 在其他实施例中,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3各自的氨基酸序列是:SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0231] 例如,主题抗体可以包含重链可变区,所述重链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化重链FR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:31的CDR-H1;人源化重链FR2;包含氨基酸序列SEQ ID NO:32的CDR-H2;人源化重链FR3;包含氨基酸序列SEQ ID NO:33的CDR-H3;以及人源化重链FR4。

[0232] 在其他实施例中,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3各自的氨基酸序列选自:SEQ ID NO:11和31 (CDR-H1);SEQ ID NO:12和32 (CDR-H2);以及SEQ ID NO:13和33 (CDR-H3)。

[0233] 例如,主题抗体可以包含重链可变区,所述重链可变区按从N端至C端的顺序含有:人源化重链FR1;包含选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列的CDR-H1;人源化重链FR2;包含选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列的CDR-H2;人源化重链FR3;包含选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列的CDR-H3;以及人源化重链FR4。

[0234] 合适的人源化框架序列的例子包括:

[0235] VH变体1 (VH₁)

[0236] VH₁FR1:QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFS (SEQ ID NO:52);

[0237] VH₁FR2:WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO:53);

[0238] VH₁FR3:RLTISKDTSKSQVILNMTNMDPVDATYYC (SEQ ID NO:54);以及

[0239] VH₁FR4:WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:55);

[0240] VH变体2 (VH₂)

[0241] VH₂FR1:QITLKESGPALVKPTQTLTLTCSFS (SEQ ID NO:56);

[0242] VH₂FR2:WIRQPPGKALEWLA (SEQ ID NO:57);

[0243] VH₂FR3:RLTISKDTSKNQVVLTMANMDPVDATYYC (SEQ ID NO:58);

[0244] VH₂FR4:WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:59);

[0245] VH变体3 (VH₃)

[0246] VH₃FR1:QITLKETGPTLVKPTQTLTLTCTFS (SEQ ID NO:60);

- [0247] VH₃FR2:WIRQPPGKALEWVT (SEQ ID NO:61) ;
- [0248] VH₃FR3:RVTIRKDTSKNQVALTMTNMDPLDTGTYYC (SEQ ID NO:62) ;
- [0249] VH₃FR4:WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:63) ;
- [0250] VH变体4 (VH₄)
- [0251] VH₄FR1:QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS (SEQ ID NO:64) ;
- [0252] VH₄FR2:WIRQPPGKTLEWLT (SEQ ID NO:65) ;
- [0253] VH₄FR3:RLSITKDTSKNQVVLMTNMDPLDTGTYYC (SEQ ID NO:66) ;
- [0254] VH₄FR4:WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:67) ;
- [0255] VL变体1 (VL₁)
- [0256] VL₁FR1:DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:68) ;
- [0257] VL₁FR2:WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:69) ;
- [0258] VL₁FR3:GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO:70) ;以及
- [0259] VL₁FR4:FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:71)
- [0260] VL变体2 (VL₂)
- [0261] VL₂FR1:DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:72) ;
- [0262] VL₂FR2:WYQQKPGQAPKLLIF (SEQ ID NO:73) ;
- [0263] VL₂FR3:GVPDRFSGSGSGTDFTLTLSSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:74) ;以及
- [0264] VL₂FR4:FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:75)
- [0265] VL变体3 (VL₃)
- [0266] VL₃FR1:DIVMTQTPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:76) ;
- [0267] VL₃FR2:WYQQRPGQAPKLLIY (SEQ ID NO:77) ;
- [0268] VL₃FR3:GVPDRFSGSGSGTDFTLTLSSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:78) ;以及
- [0269] VL₃FR4:FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:79)
- [0270] VL变体4 (VL₄)
- [0271] VL₄FR1:EIVLTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:80) ;
- [0272] VL₄FR2:WYQQKAGQSPKLLIY (SEQ ID NO:81) ;
- [0273] VL₄FR3:GVPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO:82) ;以及
- [0274] VL₄FR4:FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:83)

[0275] 在图22中,显示了人源化VH变体1-4和VL变体1-4的可变区的序列与原始小鼠抗体13E2的相应序列的比对。CDR序列以灰色突出显示。与原始小鼠序列相比,变体的人源化框架序列的变化以加下划线和粗体显示。每个变体的人源化序列中改变的残基也列于实施例18中的表26(重链序列)和表27(轻链序列)中。

[0276] 在一些实施例中,本发明的人源化抗体(或其抗原结合片段)包含人源化重链和/或人源化轻链,所述人源化重链含有表26中针对VH₁、VH₂、VH₃或VH₄所描述的任何氨基酸取代,所述人源化轻链含有表27中针对VL₁、VL₂、VL₃或VL₄所描述的任何氨基酸取代。

[0277] 本发明的抗体或其抗原结合片段(特别是本发明的人源化抗体或其抗原结合片段)可以包含任何上述人源化框架序列(SEQ ID NO:52-83),或上述人源化框架序列(SEQ ID NO:52-83)的任何组合。

[0278] 在一些实施例中,人源化重链框架区可以包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:52、

53、54或55中的任一个;SEQ ID NO:56、57、58或59中的任一个;SEQ ID NO:60、61、62或63中的任一个;或者SEQ ID NO:64、65、66或67中的任一个。

[0279] 在特定的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段(特别是本发明的人源化抗体或其抗原结合片段)可以包含:

[0280] SEQ ID NO:52的VH框架区1(VH FR1);SEQ ID NO:53的VH FR2;SEQ ID NO:54的VH FR3;以及SEQ ID NO:55的VH FR4;

[0281] SEQ ID NO:56的VH框架区1(VH FR1);SEQ ID NO:57的VH FR2;SEQ ID NO:58的VH FR3;以及SEQ ID NO:59的VH FR4;

[0282] SEQ ID NO:60的VH框架区1(VH FR1);SEQ ID NO:61的VH FR2;SEQ ID NO:62的VH FR3;SEQ ID NO:63的VH FR4;或

[0283] SEQ ID NO:64的VH框架区1(VH FR1);SEQ ID NO:65的VH FR2;SEQ ID NO:66的VH FR3;以及SEQ ID NO:67的VH FR4。

[0284] 可选地或另外地,在一些实施例中,人源化轻链框架区可以包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:68、69、70或71中的任一个;SEQ ID NO:72、73、74或75中的任一个;SEQ ID NO:76、77、78或79中的任一个;或者SEQ ID NO:80、81、82或83中的任一个。

[0285] 在特定的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段(特别是本发明的人源化抗体或其抗原结合片段)可以包含:

[0286] SEQ ID NO:68的VL框架区1(VL FR1);SEQ ID NO:69的VL FR2;SEQ ID NO:70的VL FR3;以及SEQ ID NO:71的VL FR4;

[0287] SEQ ID NO:72的VL框架区1(VL FR1);SEQ ID NO:73的VL FR2;SEQ ID NO:74的VL FR3;以及SEQ ID NO:75的VL FR4;

[0288] SEQ ID NO:76的VL框架区1(VL FR1);SEQ ID NO:77的VL FR2;SEQ ID NO:78的VL FR3;以及SEQ ID NO:79的VL FR4;或

[0289] SEQ ID NO:80的VL框架区1(VL FR1);SEQ ID NO:81的VL FR2;SEQ ID NO:82的VL FR3;以及SEQ ID NO:83的VL FR4。

[0290] 在特定的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段(特别是本发明的人源化抗体或其抗原结合片段)可以包含人源化框架序列的任何以下组合:

[0291] VH₁FR1-FR4;和VL₁FR1-FR4;

[0292] VH₁FR1-FR4;和VL₂FR1-FR4;

[0293] VH₁FR1-FR4;和VL₃FR1-FR4;

[0294] VH₁FR1-FR4;和VL₄FR1-FR4;

[0295] VH₂FR1-FR4;和VL₁FR1-FR4;

[0296] VH₂FR1-FR4;和VL₂FR1-FR4;

[0297] VH₂FR1-FR4;和VL₃FR1-FR4;

[0298] VH₂FR1-FR4;和VL₄FR1-FR4;

[0299] VH₃FR1-FR4;和VL₁FR1-FR4;

[0300] VH₃FR1-FR4;和VL₂FR1-FR4;

[0301] VH₃FR1-FR4;和VL₃FR1-FR4;

[0302] VH₃FR1-FR4;和VL₄FR1-FR4;

[0303] VH₄FR1-FR₄;和VL₁FR1-FR₄;

[0304] VH₄FR1-FR₄;和VL₂FR1-FR₄;

[0305] VH₄FR1-FR₄;和VL₃FR1-FR₄;

[0306] VH₄FR1-FR₄;和VL₄FR1-FR₄。

[0307] 在一个特定的实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段(特别是本发明的人源化抗体或其抗原结合片段)包含以下人源化框架序列:

[0308] VH₄FR1:QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS (SEQ ID NO:64);

[0309] VH₄FR2:WIRQPPGKTLEWLT (SEQ ID NO:65);

[0310] VH₄FR3:RLSITKDTSKNQVVLMTNMDPLDTGTYYC (SEQ ID NO:66);和

[0311] VH₄FR4:WGQGTLVTVSS (SEQ ID No:67);和

[0312] VL₃FR1:DIVMTQTPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:76);

[0313] VL₃FR2:WYQQRPGQAPKLLIY (SEQ ID NO:77);

[0314] VL₃FR3:GVPSRFSGSGSGTDFTLTLSSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:78);和

[0315] VL₃FR4:FGQGTRLDIK (SEQ ID NO:79)

[0316] 在特定的实施例中,本发明的分离的抗体或其抗原结合片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

[0317] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:52;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:54;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:55;

[0318] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:52;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:54;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:55;

[0319] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:52;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:21;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:22;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:54;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:23;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:55;

[0320] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:56;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:58;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:59;

[0321] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:56;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:58;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:59;

[0322] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:56;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:21;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:22;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:58;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:23;

和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:59;

[0323] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:61;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:62;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:63;

[0324] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:61;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:62;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:63;

[0325] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:21;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:61;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:22;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:62;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:23;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:63;

[0326] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:1和21的氨基酸序列;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:2和22的氨基酸序列;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:3和23的氨基酸序列;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67;

[0327] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67;或

[0328] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:21;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:22;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:23;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67。

[0329] 在一个特定的实施例中,本发明的分离的抗体或其抗原结合片段包含抗体重链,所述抗体重链含有氨基酸序列SEQ ID NO:84。

[0330] 可选地或另外地,在特定的实施例中,本发明的分离的抗体或其抗原结合片段包含抗体VL区,所述抗体VL区含有:

[0331] VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:68;VL CDR1,其具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:69;VL CDR2,其具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:70;VL CDR3,其具有选自SEQ ID NO:6和26的氨基酸序列;以及VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:71;

[0332] VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:68;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:4;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:69;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:5;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:70;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:6;以及VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:71;

[0333] VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:68;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:24;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:69;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:

25; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:70; VL CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:26; 以及VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:71;

[0334] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:72; VL CDR1, 其具有选自SEQ ID NO:4和24的氨基酸序列; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:73; VL CDR2, 其具有选自SEQ ID NO:5和25的氨基酸序列; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:74; VL CDR3, 其具有选自SEQ ID No:6和26的氨基酸序列; 以及VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:75;

[0335] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:72; VL CDR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:4; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:73; VL CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:5; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:74; VL CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:6; 以及VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:75;

[0336] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:72; VL CDR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:24; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:73; VL CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:25; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:74; VL CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:26; 以及VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:75;

[0337] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76; VL CDR1, 其具有选自SEQ ID No:4和24的氨基酸序列; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77; VL CDR2, 其具有选自SEQ ID No:5和25的氨基酸序列; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78; VL CDR3, 其具有选自SEQ ID No:6和26的氨基酸序列; 以及VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79;

[0338] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76; VL CDR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:4; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77; VL CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:5; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78; VL CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:6; 以及VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79;

[0339] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76; VL CDR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:24; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77; VL CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:25; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78; VL CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:26; 以及VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79;

[0340] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:80; VL CDR1, 其具有选自SEQ ID No:4和24的氨基酸序列; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:81; VL CDR2, 其具有选自SEQ ID No:5和25的氨基酸序列; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:82; VL CDR3, 其具有选自SEQ ID No:6和26的氨基酸序列; 以及VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:83;

[0341] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:80; VL CDR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:4; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:81; VL CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:5; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:82; VL CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:6; 以及VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:83; 或

[0342] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:80; VL CDR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:24; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:81; VL CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:25; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:82; VL CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:26; 以及VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:83。

[0343] 在一个特定的实施例中, 本发明的分离的抗体或其抗原结合片段包含抗体轻链,

所述抗体轻链含有氨基酸序列SEQ ID NO:85。

[0344] 在一个进一步的特定实施例中,本发明的分离的抗体或其抗原结合片段包含抗体重链和抗体轻链,所述抗体重链含有氨基酸序列SEQ ID NO:84,所述抗体轻链含有氨基酸序列SEQ ID NO:85。

[0345] 在其他实施例中,本发明的分离的抗体或其抗原结合片段包含抗体VH区,所述抗体VH区含有:

[0346] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:52;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:54;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:55;

[0347] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:52;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:11;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:12;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:54;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:13;以及VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:55;

[0348] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:52;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:31;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:53;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:32;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:54;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:33;以及VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:55;

[0349] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:56;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:58;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列;和VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:59;

[0350] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:56;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:11;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:12;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:58;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:13;以及VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:59;

[0351] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:56;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:31;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:57;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:32;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:58;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:33;以及VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:59;

[0352] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;VH CDR1,其具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:61;VH CDR2,其具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:62;VH CDR3,其具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列;以及VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID以及NO:63;

[0353] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:11;VH FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:61;VH CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:12;VH FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:62;VH CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:13;以及VH FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:63;

[0354] VH FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:60;VH CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID

NO:31; VH FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:61; VH CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:32; VH FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:62; VH CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:33; 以及VH FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:63;

[0355] VH FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64; VH CDR1, 其具有选自SEQ ID NO:11和31的氨基酸序列; VH FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65; VH CDR2, 其具有选自SEQ ID NO:12和32的氨基酸序列; VH FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66; VH CDR3, 其具有选自SEQ ID NO:13和33的氨基酸序列; 以及VH FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67;

[0356] VH FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64; VH CDR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:11; VH FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65; VH CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:12; VH FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66; VH CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:13; 以及VH FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67; 或

[0357] VH FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:64; VH CDR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:31; VH FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:65; VH CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:32; VH FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:66; VH CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:33; 以及VH FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:67。

[0358] 可选地或另外地, 在特定的实施例中, 本发明的分离的抗体或其抗原结合片段包含抗体VL区, 所述抗体VL区含有:

[0359] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:68; VL CDR1, 其具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:69; VL CDR2, 其具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:70; VL CDR3, 其具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列; 和VH FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:71;

[0360] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:68; VL CDR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:14; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:69; VL CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:15; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:70; VL CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:16; 和VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:71;

[0361] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:68; VL CDR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:34; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:69; VL CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:35; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:70; VL CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:36; VH FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:71;

[0362] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:72; VL CDR1, 其具有选自SEQ ID NO:14和34的氨基酸序列; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:73; VL CDR2, 其具有选自SEQ ID NO:15和35的氨基酸序列; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:74; VL CDR3, 其具有选自SEQ ID NO:16和36的氨基酸序列; 和VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:75;

[0363] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:72; VL CDR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:14; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:73; VL CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:15; VL FR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:74; VL CDR3, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:16; 和VL FR4, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:75;

[0364] VL FR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:72; VL CDR1, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:34; VL FR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:73; VL CDR2, 其具有氨基酸序列SEQ ID NO:

35;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:74;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:36;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:75;

[0365] VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76;VL CDR1,其具有选自SEQ ID No:14和34的氨基酸序列;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77;VL CDR2,其具有选自SEQ ID No:15和35的氨基酸序列;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78;VL CDR3,其具有选自SEQ ID No:16和36的氨基酸序列;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79;

[0366] VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:14;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:15;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:16;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79;

[0367] VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:76;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:34;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:77;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:35;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:78;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:36;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:79;

[0368] VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:80;VL CDR1,其具有选自SEQ ID No:14和34的氨基酸序列;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:81;VL CDR2,其具有选自SEQ ID No:15和35的氨基酸序列;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:82;VL CDR3,其具有选自SEQ ID No:16和36的氨基酸序列;和VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:83;

[0369] VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:80;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:14;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:81;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:15;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:82;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:16;以及VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:83;或

[0370] VL FR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:80;VL CDR1,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:34;VL FR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:81;VL CDR2,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:35;VL FR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:82;VL CDR3,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:36;以及VL FR4,其具有氨基酸序列SEQ ID NO:83。在一些情况下,主题抗体包含免疫球蛋白的恒定区(例如,Fc区)。在一些实施例中,Fc区(如果存在的话)是人Fc区。如果存在恒定区,所述抗体可以同时含有轻链和重链恒定区。合适的重链恒定区包括CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。

[0371] 合适的重链Fc区的一个例子是人同种型IgG4Fc。轻链恒定区可以是 λ 或 κ 。主题抗体(例如,主题人源化抗体)可以包含来自多于一种类别或同种型的序列。抗体可以表示为:含有两条轻链和两条重链的四聚体;单独的重链、轻链;Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv;或其中重链和轻链可变结构域通过间隔区连接的单链抗体。

[0372] 在一些情况下,所述重链区域是同种型IgG4的重链区域。在这些实施例的一些中,铰链区包含S241P取代。参见,例如Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105。在这些实施例的一些中,铰链区包含L236E[或L235E,使用EU编号, Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. U.S. Dept. Health and Human Services, Bethesda, MD, NIH Publication No. 91-3242]取代。参见,例如Reddy et al. (2000) J. Immunol. 164:1925; and Klechevsky et al. (2010) Blood 116:1685。在这些实施例的一

些中,所述铰链区包含S241P取代和L236E取代。

[0373] 恒定区氨基酸序列可以与它来源的物种的恒定区氨基酸序列(例如人序列)相同,或者可以与该恒定区氨基酸序列至少60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%相同。例如,与其来源物种的恒定区氨基酸序列进行比较,本发明的抗体的恒定区氨基酸序列可以包含一个或多个氨基酸删除、取代或添加(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸删除、取代或添加)。

[0374] 例如,如上所述,本发明的抗体的Fc铰链区的氨基酸序列可以被突变以降低抗体的生物半衰期,或者Fc区的氨基酸序列可以被突变以增加所述抗体的生物半衰期。

[0375] 应该确保本发明的抗体或其抗原结合片段缺乏抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC),从而使得所述抗体或片段可用于负调节T细胞增殖和/或功能而不消耗T细胞(ADCC或CDC会导致T细胞消耗)。

[0376] 例如,在一些实施例中,所述Fc区包含野生型人IgG4Fc序列。

[0377] 在其他实施例中,Fc区包含具有S228P突变的突变型人IgG4Fc序列以消除Fab臂交换(如图20(A)中的包含重链序列13E2IgG4mut的嵌合抗体Chim 13E2IgG4所示)。

[0378] 在其他实施例中,Fc区包含野生型人Ig κ (IgK)链C部分(13E2IgK)(如图20(B)中的包含轻链序列13E2IgK的嵌合抗体Chim13E2IgG4所示)。

[0379] 上述用于人IgG4Fc突变体的Fc区中残基的编号是Kabat中EU指数的标准编号[Kabat,E.A.et al.,Sequences of proteins of immunological interest,5th Edition-US Department of Health and Human Services,NIH publication n°91-3242,pp 662,680,689(1991)]。

[0380] 主题抗体可在羧基末端包含游离巯基(-SH)基团,其中该游离巯基基团可用于将所述抗体附接到第二多肽(例如,另一抗体,包括主题抗体)、支架、载体等。

[0381] 在一些实施例中,主题抗体包含一种或多种非天然存在的氨基酸。在一些实施例中,非天然编码的氨基酸包含羰基、乙酰基、氨氧基、胍基、酰胍基、氨基脒基、叠氮基或炔基。关于合适的非天然存在的氨基酸,参见例如美国专利US7,632,924。包含非天然存在的氨基酸可提供与聚合物、第二多肽、支架等的连接。例如,可以通过使包含羰基的水溶性聚合物(例如PEG)与抗体反应来制备与水溶性聚合物连接的主题抗体,其中所述抗体包含非天然编码的氨基酸,所述非天然编码的氨基酸包含氨氧基、胍基、酰胍基或氨基脒基团。作为另一例子,可通过使包含炔基的主题抗体与包含叠氮部分的水溶性聚合物(例如PEG)反应来制备与水溶性聚合物连接的主题抗体;在一些实施例中,叠氮基或炔基通过酰胺键与PEG分子连接。“非天然编码的氨基酸”是指不是20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸或硒代半胱氨酸的其中之一氨基酸。可以与术语“非天然编码的氨基酸”同义使用的其他术语是“非-天然氨基酸”、“非天然氨基酸”、“非天然存在的氨基酸”以及其不同连字符和无连字符版本。术语“非天然编码的氨基酸”还包括但不限于通过修饰(例如翻译后修饰)天然编码的氨基酸(包括但不限于20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸)而产生的氨基酸,但它们本身不会通过翻译复合物天然地结合到生长中的多肽链中。所述非天然存在的氨基酸的例子包括但不限于N-乙酰葡萄糖胺基-L-丝氨酸、N-乙酰葡萄糖胺基-L-苏氨酸和O-磷酸酪氨酸。在一些实施例中,主题抗体与聚合物(例如,不同于多肽的聚合物)连接(例如,共价连

接)。合适的聚合物包括例如生物相容性聚合物和水溶性的生物相容性聚合物。合适的聚合物包括合成聚合物和天然存在的聚合物。合适的聚合物包括例如取代或未取代的直链或支链聚亚烷基、聚亚烯基或聚氧化亚烷基聚合物或支化或非支化多糖,例如,同多糖或异多糖。合适的聚合物包括:例如,乙烯乙二醇共聚物(通常通过通用名EVOH或商品名EVAL为人所知);聚甲基丙烯酸丁酯;聚(羟基戊酸酯);聚(L-乳酸);聚己内酯;聚(丙交酯-共-乙交酯);聚(羟基丁酸酯);聚(羟基丁酸酯-共-戊酸酯);聚二恶烷酮;聚原酸酯;聚酸酐;聚(乙醇酸);聚(D,L-乳酸);聚(乙醇酸-共-三亚甲基碳酸酯);聚磷酸酯;聚磷酸酯氨基甲酸乙酯;聚氨基酸;氰基丙烯酸酯;聚(三亚甲基碳酸酯);聚亚氨基碳酸;共聚(醚-酯)(例如聚(环氧乙烷)-聚乳酸(PEO/PLA)共聚物);聚亚烷基草酸酯;聚磷腈;生物分子,如纤维蛋白,纤维蛋白原,纤维素,淀粉,胶原和透明质酸;聚氨酯;硅酮;聚酯;聚烯烃;聚异丁烯和乙烯- α 烯烃共聚物;丙烯酸聚合物和共聚物;卤乙烯聚合物和共聚物,如聚氯乙烯;聚乙烯醚,如聚乙烯甲基醚;聚偏二卤乙烯,如聚偏二氟乙烯和聚偏二氯乙烯;聚丙烯腈;聚乙烯酮;聚乙烯芳族化合物,如聚苯乙烯;聚乙烯酯,如聚乙酸乙烯酯;乙烯基类单体相互之间和烯烃的共聚物,如乙烯-甲基丙烯酸甲酯共聚物,丙烯腈-苯乙烯共聚物,ABS树脂,和乙烯-乙酸乙烯酯共聚物;聚酰胺,如尼龙66和聚己内酰胺;醇酸树脂;聚碳酸酯;聚甲醛;聚酰亚胺;聚醚;环氧树脂;聚氨酯;人造纤维;人造纤维-三醋酸酯;纤维素;醋酸纤维素;丁酸纤维素;醋酸丁酸纤维素;玻璃纸;硝酸纤维素;丙酸纤维素;纤维素醚;无定形铁氟龙(Teflon);聚乙二醇;以及羧甲基纤维素。

[0382] 合适的合成聚合物包括未取代的和取代的直链或支链聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇及其衍生物,例如取代的聚乙二醇,如甲氧基聚乙二醇及其衍生物。合适的天然存在的聚合物包括,例如白蛋白、直链淀粉、葡聚糖、糖原及其衍生物。

[0383] 合适的聚合物的平均分子量范围可以为500Da至50,000Da,例如5,000Da至40,000Da、或25,000至40,000Da。例如,在一些实施例中,主题抗体包含聚乙二醇(PEG)或甲氧基聚乙二醇聚合物,所述PEG或甲氧基聚乙二醇聚合物的分子量范围可以为约0.5千道尔顿(kDa)至约1kDa、约1kDa至5kDa、5kDa至10kDa、10kDa至25kDa、25kDa至40kDa、或40kDa至60kDa。

[0384] 如上所述,在一些实施例中,主题抗体与非肽的合成聚合物共价连接。在一些实施例中,主题抗体与PEG聚合物共价连接。在一些实施例中,主题scFv多聚体与PEG聚合物共价连接。参见,例如Albrecht et al. (2006) J. Immunol. Methods 310:100。适用于蛋白的聚乙二醇化的方法和试剂在本领域中是众所周知的,并且可以在例如美国专利US5,849,860中找到。适合与蛋白缀合的PEG通常在室温下可溶于水,并具有通式 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$,其中R为氢或保护基团如烷基或烷醇基,并且其中n是1至1,000的整数。当R是保护基团时,其通常具有1至8个碳。

[0385] 在一些实施例中,与主题抗体缀合的PEG是线性的。在一些实施例中,与主题抗体缀合的PEG是支化的。支化的PEG衍生物,如美国专利US5,643,575中所述的那些,“星状PEG”和“多臂PEG”,如Shearwater Polymers, Inc. catalog “Polyethylene Glycol Derivatives 1997-1998.”中所述。包括美国专利US6,046,305在内的本领域现有技术中描述了星状PEG。

[0386] 主题抗体可以是糖基化的,例如,主题抗体可以包含共价连接的碳水化合物或多糖部分。抗体的糖基化一般是N联或O联的。N联指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链附

接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸)是碳水化合物部分与天冬酰胺侧链进行酶促附接的识别序列。因此,这些三肽序列中的任一个在多肽中的存在都将产生潜在糖基化位点。O联糖基化指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之中的一个与羟基氨基酸的附接,所述羟基氨基酸最常见地为丝氨酸或苏氨酸,尽管也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。

[0387] 给抗体添加糖基化位点可以通过改变氨基酸序列,使得它包含上述三肽序列中的一个或多个而方便地完成(用于N联糖基化位点)。所述改变还可以通过给原始抗体的序列添加或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来完成(用于O联糖基化位点)。类似地,去除糖基化位点可以通过抗体的天然糖基化位点内的氨基酸改变来完成。

[0388] 在一些实施例中,主题抗体将包含“不透射线”标签,例如使用如X射线可以容易地可视化的标签。不透射线材料对于本领域技术人员来说是熟知的。最常见的不透射线材料包括碘化物、溴化物或钡盐。也有已知的其他不透射线材料,包括但不限于有机铋衍生物(参见,例如美国专利US5,939,045)、不透射线的多氨基甲酸酯(参见美国专利US5,346,981),有机铋复合材料(参见,例如美国专利US5,256,334)、不透射线的钡多聚体配合物(参见,例如美国专利US4,866,132)等。

[0389] 可以使用例如戊二醛、同双官能交联剂、或异双官能交联剂将主题抗体共价连接至第二部分(例如,脂质、除主题抗体外的多肽、合成聚合物、碳水化合物等)。戊二醛通过多肽的氨基部分与该多肽交联。同双官能交联剂(例如同双官能亚胺酯,同双官能N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)酯或同双官能巯基反应性交联剂)含有两个或更多个相同的反应性部分,并且可用于一步式反应过程,其中将交联剂加入含有待连接的多肽的混合物的溶液中。同双官能NHS酯和亚氨基酯与含多肽的胺交联。在温和的碱性pH中,亚氨基酯只与伯胺反应形成亚氨基酰胺,并且交联多肽的总电荷不受影响。同双官能巯基反应性交联剂包括双马来酰亚胺己烷(BMH)、1,5-二氟-2,4-二硝基苯(DFDNB)和1,4-二-(3',2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基丁烷(DPDPB)。

[0390] 异双官能交联剂具有两个或更多个不同的反应性部分(例如胺反应性部分和巯基反应性部分)并且通过胺或巯基反应性部分与多肽中的一个交联,然后通过未反应部分与另一多肽反应。可以获得多种异双官能卤代乙酰基交联剂,以及吡啶基二硫化物交联剂。碳二亚胺是用于将羧基偶联到胺上的异双官能交联剂的典型实例,其结果产生酰胺键。

[0391] 主题抗体可以固定在固体支持物上。合适的支持物在本领域中是公知的,尤其包括市售柱材料、聚苯乙烯珠粒、胶乳珠粒、磁珠、胶体金属颗粒、玻璃和/或硅片和表面、硝化纤维素条、尼龙膜、片材、duracytes、反应塔板(例如多孔板)的孔、塑料管等。固体支持物可以包含多种物质中的任何一种,包括例如玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、聚糖、尼龙、直链淀粉、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。用于将主题抗体固定在固体支持物上的合适方法是众所周知的,包括但不限于离子型、疏水性、共价相互作用等。固体支持物可以例如在水溶液中是可溶的或不溶的。在一些实施例中,合适的固体支持物通常不溶于水溶液。

[0392] 在一些实施例中,主题抗体包含可检测标记物。合适的可检测标记物包括可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学手段检测的任何组合物。合适的标记物包括但不限于磁珠(例如Dynabeads™)、荧光染料(例如异硫氰酸荧光素、德克萨斯红

(texas red)、若丹明(rhodamine)、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白等)、放射性标记(例如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、酶(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶、以及其他常用于酶联免疫吸附测定(ELISA)的酶)和比色标记,该比色标记如胶体金或有色玻璃或塑料(例如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等)珠粒。

[0393] 在一些实施例中,主题抗体包含造影剂或放射性同位素,其中所述造影剂或放射性同位素是适于在成像过程中使用的物质,所述成像例如对人进行的成像程序。标记物的非限制性例子包括:放射性同位素如 ^{123}I (碘)、 ^{18}F (氟)、 ^{99}Tc (锝)、 ^{111}In (铟)和 ^{67}Ga (镓),以及造影剂如钆(Gd)、镓和铁。也可用放射性Gd同位素(^{153}Gd),其适用于非人哺乳动物的成像程序。

[0394] 可以使用标准技术对主题抗体进行标记。例如,可以使用氯胺T或1,3,4,6-四氯-3 α ,6 α -二苯基甘脒来使主题抗体碘化。对于氟化,可以在合成期间通过氟离子置换反应将氟加入到主题抗体中。参见[Muller-Gartner, H., TIB Tech., 16:122-130 (1998) 和 Saji, H., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 16 (2): 209-244 (1999)] 中用这些放射性同位素合成蛋白的综述。也可以通过标准技术用造影剂标记主题抗体。例如,可以通过将低分子Gd螯合物(如Gd二亚乙基三胺五乙酸(GdDTPA)或Gd四氮杂环十二烷四乙酸(GdDOTA))缀合至抗体而用Gd标记主题抗体。参见[Caravan et al., Chem. Rev. 99: 2293-2352 (1999) and Lauffer et al., J. Magn. Reson. Imaging, 3: 11-16 (1985)]。通过例如将聚赖氨酸-Gd螯合物缀合至抗体,从而可以用Gd标记主题抗体。参见,例如[Curtet et al., Invest. Radiol., 33 (10): 752-761 (1998)]。或者,可以通过将包含Gd螯合脂质的顺磁性聚合脂质体与抗生物素蛋白和生物素化抗体一起温育,来实现用Gd标记主题抗体。参见,例如[Sipkins et al., Nature Med., 4: 623-626 (1998)]。

[0395] 可以与主题抗体连接的合适的荧光蛋白包括但不限于:来自维多利亚水母(Aequoria victoria)或其突变体或衍生物的绿色荧光蛋白,例如,如美国专利US6,066,476;6,020,192;5,985,577;5,976,796;5,968,750;5,968,738;5,958,713;5,919,445;5,874,304所述;例如增强GFP,许多此类GFP是商售的,例如来自Clontech, Inc.;红色荧光蛋白;黄色荧光蛋白;许多来自Anthozoan物种的荧光和有色蛋白中的任一种,例如,如[Matz et al. (1999) Nature Biotechnol. 17: 969-973]所述;等等。

[0396] 在一些实施例中,主题抗体与治疗剂缀合。本文公开的任何主题抗体均可用于形成抗体-药剂缀合物。所述药剂可以附接到轻链的N末端、轻链的C末端、重链的N末端或重链的C末端。在一些实施例中,所述药剂附接到抗体的铰链或连接到抗体上的一个或多个其他位点。对于单链抗体,所述药剂可以附接到单链抗体的N或C末端。可以使用本领域技术人员已知的技术将药剂直接或通过接头缀合至抗体。所述接头可以是可切割的或不可切割的。这种治疗药剂的例子(例如,用于疗法)是本领域技术人员已知的。

[0397] 在一些实施例中,主题抗体将连接至(例如,共价或非共价连接至)融合配偶体,该融合配偶体例如:配体;表位标签;肽;除抗体以外的蛋白;等等。合适的融合配偶体包括肽和多肽,所述肽和多肽:赋予体内增强稳定性(例如增强血清半衰期);提供易于纯化性,例如(His) $_n$,例如6His,等等;提供从细胞中分泌融合蛋白;提供表位标签,例如GST、血球凝集素(HA;例如YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 41)、FLAG(例如DYKDDDDK; SEQ ID NO: 42)、c-myc(例如EQKLISEEDL; SEQ ID NO: 43),等等;提供可检测信号,例如产生可检测产物(例如 β -半乳糖

苷酶,荧光素酶)的酶、或其本身可检测的蛋白,例如绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白等;提供多聚化,例如多聚化结构域,如免疫球蛋白的Fc部分;等等。

[0398] 融合物还可以包括亲和结构域,包括可以与结合配偶体相互作用的肽序列,该结合配偶体例如可用于鉴定或纯化的固定在固体支持物上的结合配偶体。当与蛋白融合时,连续的单氨基酸(如组氨酸)可用于通过与树脂柱(如镍琼脂糖凝胶)的高亲和力结合而一步步式纯化融合蛋白。示例性亲和结构域包括His5(HHHHH)(SEQ ID NO:44),HisX6(HHHHHH)(SEQ ID NO:45),c-myc(EQKLISEEDL)(SEQ ID NO:46),Flag(DYKDDDDK)(SEQ ID No:42),StrepTag(WSHPQFEK)(SEQ ID NO:47),血球凝集素例如HA标签(YPYDVPDYA;SEQ ID NO:41),谷胱甘肽-S-转移酶(GST),硫氧还蛋白,纤维素结合结构域,RYIRS(SEQ ID NO:48),Phe-His-His-Thr(SEQ ID NO:49),几丁质结合结构域,S-肽,T7肽,SH2结构域,C-末端RNA标签,WEAAAREACCRECCARA(SEQ ID NO:50),金属结合结构域,例如锌结合结构域或钙结合结构域,例如从钙结合蛋白而来的,例如钙调蛋白、肌钙蛋白C、钙调磷酸酶B、肌球蛋白轻链、恢复蛋白、S-调节蛋白、视维蛋白、VILIP、神经钙蛋白、海马钙结合蛋白、聚集蛋白、钙牵蛋白、钙蛋白酶大亚基、S100蛋白、小清蛋白、钙结合蛋白D9K、钙结合蛋白D28K和钙网膜蛋白,内含肽类,生物素,链霉抗生物素,MyoD,亮氨酸拉链序列,和麦芽糖结合蛋白。

[0399] 对于核苷酸和氨基酸序列,术语“相同”或“同一性”表示两个核酸或两个氨基酸序列在进行最佳比对并与合适的插入或删除进行比较时的同一性程度。

[0400] 两个序列之间的百分比同一性是由所述序列共享的相同位置的数量的函数(即, $\% \text{同一性} = \text{相同位置的数量} / \text{位置的总数} \times 100$),同时考虑间隔的数量以及每个间隔的长度,这需要引入以用于所述两个序列的最佳比对。如下所述,可以使用数学算法完成两个序列之间的序列比较和百分比同一性测定。

[0401] 查询核酸序列(Query nucleic acid sequence)和主题核酸序列之间的百分比同一性是“同一性”值,以百分比表示,其计算方式为:在执行配对BLASTN比对之后,当主题核酸序列与查询核酸序列具有100%查询覆盖率时,通过BLASTN算法计算“同一性”值。查询核酸序列和主题核酸序列之间的这种配对BLASTN比对通过使用国家生物技术研究院(National Center for Biotechnology Institute)网站上可用的BLASTN算法的默认设置来执行,其中低复杂度区域的过滤器被关闭。重要的是,查询核酸序列可以由本申请的一个或多个权利要求中确定的核酸序列来描述。

[0402] 查询氨基酸序列(Query amino acid sequence)和主题氨基酸序列之间的百分比同一性是“同一性”值,以百分比表示,其计算方式为:在执行配对BLASTP比对之后,当主题氨基酸序列与查询氨基酸序列具有100%查询覆盖率时,通过BLASTP算法计算“同一性”值。查询氨基酸序列和主题氨基酸序列之间的这种配对BLASTP比对通过使用国家生物技术研究院网站上可用的BLASTP算法的默认设置来执行,其中低复杂度区域的过滤器被关闭。重要的是,查询氨基酸序列可以由本申请的一个或多个权利要求中确定的氨基酸序列来描述。

[0403] 生产主题抗体的方法

[0404] 主题抗体可以通过任何已知的方法生产,例如用于蛋白合成的常规合成方法;重组DNA方法;等等。在一些实施例中,主题抗体的生产方法选自重组生产和化学合成。

[0405] 在主题抗体是单链多肽的情况下,其可以使用标准化学肽合成技术来合成。在化

学合成多肽的情况下,合成可以通过液相或固相进行。固相多肽合成(SPPS),其中序列的C端氨基酸连接至不溶性支持物,然后序列中的剩余氨基酸依次加入,这是一个化学合成主题抗体的合适方法的例子。各种形式的SPPS,如Fmoc和Boc,可用于合成主题抗体。固相合成技术在以下非专利文献中有描述:Barany and Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; pp.3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol.2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2156 (1963); Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984); 和 Ganesan A. 2006 *Mini Rev. Med Chem.* 6:3-10 以及 Camarero JA et al. 2005 *Protein Pept Lett.* 12:723-8。简而言之,用其上构建肽链的功能单位处理小的不溶性多孔珠粒。在偶合/去保护的重复循环之后,被附接的固相的游离N-末端胺与单个N-保护的氨基酸单元偶联。然后将所述单元脱保护,展现了可以附接另一个氨基酸的新的N-末端胺。所述肽保持固定在固相上并且在被切割之前经历过滤过程。

[0406] 标准重组方法可用于生产主题抗体。例如,将编码轻链和重链可变区且任选连接于恒定区的核酸插入表达载体中。所述轻链和重链可以克隆在相同或不同的表达载体中。编码免疫球蛋白链的DNA区与确保免疫球蛋白多肽表达的表达载体中的控制序列可操作地连接。表达控制序列包括但不限于启动子(例如天然相关或异源启动子)、信号序列、增强子元件、阻遏子元件和转录终止序列。表达控制序列可以是能够转化或转染真核宿主细胞(例如,COS或CHO细胞)的载体中的真核启动子系统。一旦载体已被整合到合适的宿主中,所述宿主就维持在适合高水平表达核苷酸序列且收集和纯化所述抗体的条件下。

[0407] 由于密码子的简并性,多种核酸序列可以编码每一种免疫球蛋白氨基酸序列。所需的核酸序列可以通过重新固相DNA合成或通过聚合酶链式反应(PCR)诱变较早制备的所需多核苷酸的变体来产生。寡核苷酸介导的诱变是用于制备靶多肽DNA的取代、删除和插入变体的合适方法的例子。参见Adelman et al., *DNA* 2:183 (1983)。简而言之,通过将编码所需突变的寡核苷酸与单链DNA模板杂交来改变靶多肽DNA。杂交后,使用DNA聚合酶来合成掺入了寡核苷酸引物的模板的完整的第二条互补链,且DNA聚合酶编码靶多肽DNA中所选的改变。

[0408] 合适的表达载体通常可以作为附加体或作为宿主染色体DNA的组成部分在宿主生物体中复制。通常,表达载体含有选择标记物(例如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性 or 新霉素抗性)以允许检测那些用所需DNA序列转化的细胞。

[0409] 大肠杆菌(*Escherichia coli*)是可用于克隆编码主题抗体的多核苷酸的原核宿主细胞的例子。其他适用的微生物宿主包括:杆菌(bacilli)如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),和其他肠杆菌科(enterobacteriaceae)如沙门氏菌(*Salmonella*)、沙雷氏菌(*Serratia*),和各种假单胞菌(*Pseudomonas*)属。在这些原核宿主中,也可以制备表达载体,所述表达载体通常含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如复制起点)。另外,将存在许多种众所周知的启动子,例如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自 λ 噬菌体的启动子系统。启动子通常控制表达,任选地与操纵子序列一起,并具有用于启动和完成转录和翻译的核糖体结合位点序列等。

[0410] 其他微生物,如酵母,也可用于表达。酿酒酵母(即*Saccharomyces*,例如,*S. cerevisiae*)和毕赤酵母属(*Pichia*)是合适的酵母宿主细胞的例子,同时根据需要具有

合适的载体,该合适的载体具有表达控制序列(例如启动子),复制起点,终止序列等。典型的启动子包括3-磷酸甘油酸激酶和其他糖酵解酶。诱导型酵母启动子包括来自醇脱氢酶、异细胞色素C和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子等。

[0411] 除了微生物之外,还可以使用哺乳动物细胞(例如体外细胞培养基中生长的哺乳动物细胞)来表达和产生本发明的抗LAG-3抗体(例如,编码主题抗LAG-3抗体的多核苷酸)。参见Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)。合适的哺乳动物宿主细胞包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系和转化的B细胞或杂交瘤。这些细胞的表达载体可以包括表达控制序列,如复制起点、启动子和增强子[Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)],以及必需的处理信息位点,如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点,和转录终止子序列。合适的表达控制序列的例子是来源于免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等的启动子。参见Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992)。在其他方法中,本发明的抗体可以在小鼠中产生(参见,例如Laffleur et al. “Production of human or humanized antibodies in mice”, *Methods Mol Biol.* 2012;901:149-59)。

[0412] 一旦(化学地或重组地)合成,可根据本领域的标准程序纯化全部抗体、其二聚体、单独的轻链和重链、或主题抗体的其他形式(例如scFv等),所述标准程序包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、高效液相色谱(HPLC)纯化、凝胶电泳等(一般地,参见Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., (1982)))。主题抗体可以是基本纯的,例如纯度至少约80%至85%、纯度至少约85%至90%、纯度至少约90%至95%、或纯度98%至99%或更纯,纯到例如不含污染物如细胞碎片、除主题抗体以外的大分子等。

[0413] 核酸分子、表达载体和宿主细胞

[0414] 本发明还提供了包含编码本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列的核酸分子。

[0415] 在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含重链可变区的主题抗LAG-3抗体,所述重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:7或SEQ ID No:17所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含重链可变区的主题抗LAG-3抗体,所述重链可变区含有如SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。

[0416] 在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含轻链可变区的主题抗LAG-3抗体,所述轻链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:8或SEQ ID No:18所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含轻链可变区的主题抗LAG-3抗体,所述轻链可变区含有SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。

[0417] 在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含重链可变区的主题抗LAG-3抗体,所述重链可变区分别含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

[0418] 在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含轻链可变区的主题抗LAG-3抗体,所述轻链可变区分别含有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0419] 在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含重链可变区的主题抗LAG-3抗体,所述重链可变区分别含有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

[0420] 在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含轻链可变区的主题抗LAG-3抗体,所述轻链可变区分别含有SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0421] 在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含重链可变区的主题抗LAG-3抗体,所述重链可变区分别含有SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

[0422] 在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含轻链可变区的主题抗LAG-3抗体,所述轻链可变区分别含有SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0423] 在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含重链可变区的主题抗LAG-3抗体,所述重链可变区分别含有SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。

[0424] 在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含轻链可变区的主题抗LAG-3抗体,所述轻链可变区分别含有SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0425] 在一些实施例中,本发明的核酸分子编码包含轻链可变区和重链可变区的主题抗LAG-3抗体。

[0426] 编码主题抗体的核酸分子可以可操作地连接至允许核苷酸序列在预期靶细胞(例如,经基因修饰以合成被编码的抗体的细胞)中表达的一个或多个调控元件(例如,启动子和增强子)。

[0427] 合适的启动子和增强子元件是本领域已知的。用于原核宿主细胞的合适的启动子包括但不限于:噬菌体T7RNA聚合酶启动子;T3启动子;T5启动子; λ P启动子;trp启动子;lac操纵子启动子;杂合启动子,例如lac/tac杂合启动子、tac/trc杂合启动子、trp/lac启动子、T7/lac启动子;trc启动子;tac启动子等;gpt启动子;araBAD启动子;体内调节启动子,例如ssaG启动子或相关启动子(参见,例如美国专利公开号20040131637)、pagC启动子

[0428] [Pulkkinen and Miller, J. Bacteriol., 1991:173(1):86-93; Alpuche-Aranda et al., PNAS, 1992; 89(21):10079-83]、nirB启动子[Harborne et al. (1992) Mol. Micro. 6:2805-2813]、等等[参见,例如Dunstan et al. (1999) Infect. Immun. 67:5133-5141; McKelvie et al. (2004) Vaccine 22:3243-3255; and Chatfield et al. (1992) Biotechnol. 10:888-892]; sigma70启动子,例如共有sigma70启动子(参见,例如GenBank登记号.AX798980、AX798961和AX798183);固定相启动子,例如dps启动子、spv启动子等;致病性岛SPI-2衍生的启动子(参见,例如W096/17951); actA启动子[参见,例如Shetron-Rama et al. (2002) Infect. Immun. 70:1087-1096]; rpsM启动子[参见,例如Valdivia and Falkow (1996) Mol. Microbiol. 22:367]; tet启动子[参见,例如Hillen, W. and Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. and Heinemann, U. (eds), Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction. Macmillan, London, UK,

Vol.10, pp.143-162]; SP6启动子[参见,例如Melton et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12: 7035]; 等等。用于原核生物如大肠杆菌的合适的强启动子包括但不限于Trc、Tac、T5、T7和P_λ。用于细菌宿主细胞的操纵子的非限制性例子包括乳糖启动子操纵子(当与乳糖接触时, LacI阻遏蛋白改变构象,从而防止LacI阻遏蛋白与操纵子结合)、色氨酸启动子操纵子(当与色氨酸复合时, TrpR阻遏蛋白具有结合操纵子的构象;在不存在色氨酸的情况下, TrpR阻遏蛋白具有不结合操纵子的构象)和tac启动子操纵子[参见,例如deBoer et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25]。

[0429] 在一些实施例中,例如,为了在酵母细胞中表达,合适的启动子是组成型启动子:如ADH1启动子、PGK1启动子、ENO启动子、PYK1启动子等;或可调节启动子,如GAL1启动子、GAL10启动子、ADH2启动子、PHO5启动子、CUP1启动子、GAL7启动子、MET25启动子、MET3启动子、CYC1启动子、HIS3启动子和ADH1启动子、PGK启动子、GAPDH启动子、ADC1启动子、TRP1启动子、URA3启动子、LEU2启动子、ENO启动子、TP1启动子和AOX1(例如,用于毕赤酵母属)。

[0430] 为了在真核细胞中表达,合适的启动子包括但不限于轻链和/或重链免疫球蛋白基因启动子和增强子元件;巨细胞病毒立即早期启动子;单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子;早期和晚期SV40启动子;存在于来自逆转录病毒的长末端重复序列中的启动子;小鼠金属硫蛋白-I启动子;

[0431] 以及各种本领域已知的组织特异性启动子。

[0432] 合适的载体和启动子的选择完全在本领域普通技术人员的水平内。

[0433] 编码主题抗体的核酸分子可以存在于表达载体和/或克隆载体中。本发明提供了一种重组载体,其包含在克隆载体中编码主题抗体的核酸分子。本发明还提供了重组分子,其包含编码主题抗体的核酸分子,所述核酸分子可操作地连接至表达载体中的合适调节序列以确保被编码的抗体的表达。当主题抗体包含两条单独的多肽时,编码该两条多肽的核酸分子可以克隆在相同或不同的载体中以形成一个或多个重组分子。重组分子可以包含可选择的标记物、复制起点以及提供重组分子复制和/或维持的其他特征。

[0434] 大量合适的载体和启动子是本领域技术人员已知的;许多可商购获得用于产生主题重组分子。提供以下载体作为例子。细菌的:pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540和pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)。真核生物的:pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL (Pharmacia)。

[0435] 表达载体通常具有位于启动子序列附近的方便的限制性位点以提供编码异源蛋白的核酸序列的插入。可以存在在表达宿主中起作用的可选择的标记物。合适的表达载体包括但不限于病毒载体。病毒载体的例子包括但不限于基于以下的病毒载体:牛痘病毒;脊髓灰质炎病毒;腺病毒(参见,例如see, e.g., Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35: 2543-2549, 1994; Borrás et al., Gene Ther 6:515-524, 1999; Li and Davidson, PNAS 92:7700-7704, 1995; Sakamoto et al., Hum Gene Ther 5:1088-1097, 1999; WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984和WO 95/00655);腺伴随病毒[参见,例如(Ali et al., Hum Gene Ther 9:81-86, 1998, Flannery et al., PNAS 94:6916-6921, 1997; Bennett et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 38:2857-2863, 1997; Jomary et al., Gene Ther 4:683-690, 1997, Rolling et al., Hum Gene Ther 10:641-648, 1999; Ali et

al., Hum Mol Genet 5:591594, 1996; Srivastava in WO 93/09239, Samulski et al., J. Vir. (1989) 63:3822-3828; Mendelson et al., Virol. (1988) 166:154-165; 和 Flotte et al., PNAS (1993) 90:10613-10617]; SV40; 单纯疱疹病毒; 逆转录病毒载体 [例如, 小鼠白血病病毒, 脾脏坏死病毒, 和来源于逆转录病毒的载体, 如劳斯肉瘤病毒 (Rous Sarcoma Virus)、哈维肉瘤病毒 (Harvey Sarcoma Virus)、禽白血病病毒、人类免疫缺陷病毒 (参见, 例如 Miyoshi et al., PNAS 94:10319-23, 1997; Takahashi et al., J. Virol 73:7812-7816, 1999)、骨髓增生性肉瘤病毒和乳腺肿瘤病毒)]; 等等。

[0436] 如上所述, 主题核酸分子包含编码本发明的抗LAG-3抗体的核苷酸序列。在一些实施例中, 主题核酸分子包含编码主题13E2或34F4抗体的重链和轻链CDR的核苷酸序列。在一些实施例中, 主题核酸分子包含编码主题抗体的重链和轻链CDR的核苷酸序列, 其中编码CDR的序列散布有编码FR的核苷酸序列。在一些实施例中, 编码FR的核苷酸序列是人编码FR的核苷酸序列。

[0437] 宿主细胞

[0438] 本发明提供了用主题核酸分子进行基因修饰的分离的基因修饰的宿主细胞 (例如, 体外细胞)。在一些实施例中, 主题分离的经基因修饰的宿主细胞可产生主题抗体。这样的细胞称为重组细胞。重组细胞包含编码主题抗体的重组分子。

[0439] 合适的宿主细胞包括: 真核宿主细胞, 如哺乳动物细胞、昆虫宿主细胞、酵母细胞; 以及原核细胞, 如细菌细胞。可以通过例如磷酸钙沉淀、DEAE葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染、电穿孔或其他已知方法将主题核酸导入宿主细胞。

[0440] 合适的哺乳动物细胞包括原代细胞和永生化细胞系。合适的哺乳动物细胞系包括人细胞系、非人灵长类细胞系、啮齿动物 (例如小鼠、大鼠) 细胞系等。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于: HeLa细胞 [例如, 美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 号CCL-2]、CHO细胞 [例如, ATCC号CRL9618、CCL61、CRL9096]、293细胞 (例如, ATCC号CRL-1573)、Vero细胞、NIH 3T3细胞 (例如, ATCC号CRL-1658)、Huh-7细胞、BHK细胞 (例如, ATCC号CCL10)、PC12细胞 (ATCC号CRL1721)、COS细胞、COS-7细胞 (ATCC号CRL1651)、RAT1细胞、小鼠L细胞 (ATCC号CCLI.3)、人胚胎肾 (HEK) 细胞 (ATCC号CRL1573)、HLHepG2细胞等。在一些情况下, 所述细胞为HEK细胞。在一些情况下, 所述细胞为CHO细胞, 例如, CHO-K1细胞 (ATCC号CCL-61)、CHO-M细胞、CHO-DG44细胞 (ATCC号PTA-3356) 等。在一些实施例中, 所述宿主细胞为COS细胞。在一些实施例中, 所述宿主细胞为293细胞。在一些实施例中, 所述宿主细胞为CHO细胞。

[0441] 合适的酵母细胞包括但不限于巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、芬兰毕赤酵母 (*Pichia finlandica*)、*Pichia trehalophila*、*Pichia koclamae*、膜状毕赤酵母 (*Pichia membranaefaciens*)、*Pichia opuntiae*、耐热毕赤酵母 (*Pichia thermotolerans*)、*Pichia salictaria*、*Pichia guercuum*、*Pichia pijperi*、*Pichia stiptis*、甲醇毕赤酵母 (*Pichia methanolica*)、毕赤酵母属 (*Pichia* sp.)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、酵母属 (*Saccharomyces* sp.)、多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces* sp.)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、*Chrysosporium lucknowense*、镰孢菌 (*Fusarium* sp.)、禾谷镰孢霉 (*Fusarium gramineum*)、镰片镰孢

(*Fusarium venenatum*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)等。在一些实施例中,所述宿主细胞为酵母属。在一些实施例中,所述宿主细胞为毕赤酵母属。

[0442] 合适的原核细胞包括但不限于大肠杆菌、芽孢杆菌属(例如枯草芽孢杆菌)、乳酸菌属等的各种实验室菌株中的任一种。参见,例如Carrier et al. (1992) J. Immunol. 148: 1176-1181;美国专利US6,447,784;和Sizemore et al. (1995) Science 270:299-302。通常,实验室菌株是非致病性菌株。在一些实施例中,所述宿主细胞为大肠杆菌。在一些实施例中,所述宿主细胞为枯草芽孢杆菌。

[0443] 组合物

[0444] 本发明提供了包含主题抗体的组合物。主题抗体组合物除了包含主题抗体之外,还可包含以下一种或多种:盐,例如NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄等;缓冲剂,例如磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、Tris缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)等;增溶剂;洗涤剂,例如非离子型洗涤剂如吐温-20等;蛋白酶抑制剂;甘油;等等。

[0445] 药物组合物

[0446] 本发明提供了包括药物组合物的组合物,所述药物组合物包含主体抗体。通常,药物组合物(在本文中也称为制剂)包含有效量的主题抗体。“有效量”是指足以产生所需结果的剂量,例如减少与免疫失调症有关的不利症状、改善免疫失调症状、减缓免疫失调的发展等。通常,与对照相比,期望的结果至少是免疫失调症状的减轻。

[0447] 制剂

[0448] 在主题方法中,主题抗体可以使用能够产生期望的治疗效果或诊断效果的任何方便的手段向宿主给药。因此,所述药剂可以掺入用于治疗给药的多种制剂中。更特别地,主题抗体通过与合适的药学上可接受的载体、药学上可接受的稀释剂或其他药学上可接受的辅料组合而配制成药物组合物,并且可以配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂,例如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂和气雾剂。在一些实施例中,药物组合物包含主题抗体和药学上可接受的辅料。

[0449] 在药物剂型中,主题抗体可以以其药学上可接受的盐的形式给药,或者它们也可以单独或以适当的缔合形式使用,以及与其他药学活性化合物组合使用。以下方法和辅料仅仅是示例性而非限制性的。

[0450] 对于口服制剂,主题抗体可以单独使用或与合适的添加剂组合制成片剂、粉剂、颗粒剂或胶囊剂,所述合适的添加剂例如用常规添加剂如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉;用粘合剂如结晶纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;用崩解剂如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠;用润滑剂,如滑石或硬脂酸镁;并且如果需要的话,用稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂和调味剂。

[0451] 通过将抗体溶解、悬浮或乳化于水性或非水性溶剂(例如植物油或其他类似的油、丙二醇、合成的脂肪酸甘油酯、可注射的有机酯(例如油酸乙酯)、高级脂族酸的酯或丙二醇)中,可将主题抗体配置成注射用制剂;并且如果需要的话,同时使用常规添加剂如增溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。肠胃外赋形剂包括氯化钠溶液、林格氏葡萄

糖(Ringer's dextrose)、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液或固定油。静脉内赋形剂包括流体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏葡萄糖的电解质补充剂)等。此外,根据药物组合物的预期用途,本发明的药物组合物可以包含其他药剂,例如多巴胺或精神药理学药物。

[0452] 通过将具有所需纯度的主题抗体与任选的生理上可接受的载体、其它辅料、稳定剂、表面活性剂、缓冲剂和/或张力剂混合来制备包含主题抗体的药物组合物。可接受的载体、其他辅料和/或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、蛋氨酸和柠檬酸;防腐剂(例如乙醇、苯甲醇、苯酚,间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、苯扎氯铵或其组合);氨基酸,如精氨酸、甘氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、脯氨酸及其组合;单糖、二糖和其他碳水化合物;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白,如明胶或血清白蛋白;螯合剂,如EDTA;糖,如海藻糖、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、半乳糖、果糖、山梨糖、棉子糖、葡糖胺、N-甲基葡糖胺、半乳糖胺和神经氨酸;和/或非离子表面活性剂,如吐温、Brij Pluronics、Triton-X或聚乙二醇(PEG)。

[0453] 药物组合物可以是液体形式、冻干形式或从冻干形式复原的液体形式,其中冻干制剂在给药前用无菌溶液重构。重构冻干组合物的标准程序是加回一定体积的纯水(通常相当于冻干过程中去除的体积);然而包含抗菌剂的溶液可以用于生产用于肠胃外给药的药物组合物;还参见Chen(1992) Drug Dev Ind Pharm 18,1311-54。

[0454] 主题药物组合物中的示例性抗体浓度范围可以在约1mg/mL至约200mg/mL、或约50mg/mL至约200mg/mL、或约150mg/mL至约200mg/mL。

[0455] 抗体的水性制剂可以在pH缓冲溶液中制备,例如在pH约4.0至约7.0,或约5.0至约6.0,或者约5.5的条件下制备。适用于该pH范围内的缓冲液的包括磷酸盐、组氨酸、柠檬酸盐、琥珀酸盐、乙酸盐缓冲液和其他有机酸缓冲液。缓冲液浓度可以为约1mM至约100mM,或约5mM至约50mM,这取决于例如缓冲剂和制剂所需的张力。

[0456] 张力剂可包含在抗体制剂中以调节制剂的张力。示例性张力剂包括氯化钠、氯化钾、甘油和来自氨基酸、糖及其组合的任何组分。在一些实施例中,含水制剂是等渗的,但高渗或低渗溶液也可能是合适的。术语“等渗”表示与其比较的某种其他溶液(例如生理盐溶液或血清)具有相同张力的溶液。张力剂可以以约5mM至约350mM的量使用,例如以100mM至350mM的量使用。

[0457] 表面活性剂也可加入到抗体制剂中以减少配制的抗体的聚集和/或最小化制剂中颗粒的形成和/或减少吸附。示例性的表面活性剂包括聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯(吐温)、聚氧乙烯烷基醚(Brij)、烷基苯基聚氧乙烯醚(Triton-X)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(泊洛沙姆(Poloxamer)、普朗尼克(Pluronic))和十二烷基硫酸钠(SDS)。合适的聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯的例子是聚山梨酯20(以商标Tween 20TM出售)和聚山梨酯80(以商标Tween 80TM出售)。合适的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的例子以名称Pluronic®F68或Poloxamer 188TM出售。合适的聚氧乙烯烷基醚的例子以商标BrijTM出售。表面活性剂的示例性浓度范围可以在约0.001%至约1%w/v。

[0458] 也可加入冻干保护剂以保护冻干过程中不稳定活性成分(例如蛋白)免受不稳定

条件影响。例如,已知的冻干保护剂包括糖(包括葡萄糖和蔗糖);多元醇(包括甘露醇、山梨醇和甘油);和氨基酸(包括丙氨酸、甘氨酸和谷氨酸)。冻干保护剂的用量可以在约10mM至500mM。

[0459] 在一些实施例中,主题制剂包括主题抗体和一种或多种上述药剂(例如表面活性剂、缓冲剂、稳定剂、张力剂)并且基本上不含一种或多种防腐剂,例如乙醇、苯甲醇、苯酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯或丙酯、苯扎氯铵、及其组合。在其他实施例中,在所述制剂中含有防腐剂,防腐剂的浓度例如为约0.001%至约2% (w/v)。

[0460] 例如,主题制剂可以是适用于肠胃外给药的液体或冻干制剂,并且可以包含:约1mg/mL至约200mg/mL的主题抗体;约0.001%至约1%的至少一种表面活性剂;约1mM至约100mM的缓冲剂;任选地约10mM至约500mM的稳定剂;和约5mM至约305mM的张力剂;并且pH为约4.0至约7.0。

[0461] 作为另一个例子,主题肠胃外制剂是液体或冻干制剂,其包含:约1mg/mL至约200mg/mL的主题抗体;0.04w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和250mM的蔗糖;并且pH为5.5。作为另一个例子,主题肠胃外制剂包含冻干制剂,该冻干制剂包含:1) 15mg/mL的主题抗体;0.04w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和250mM的蔗糖;并且pH为5.5;或2) 75mg/mL的主题抗体;0.04w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和250mM的蔗糖;并且pH为5.5;或3) 75mg/mL的主题抗体;0.02w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和250mM的蔗糖;并且pH为5.5;或4) 75mg/mL的主题抗体;0.04w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和250mM的海藻糖;并且pH为5.5;或5) 75mg/mL的主题抗体;0.02w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和250mM的海藻糖;并且pH为5.5。

[0462] 作为另一个例子,主题肠胃外制剂是液体制剂,其包含:1) 7.5mg/mL的主题抗体;0.02w/v%的吐温20;120mM的L-组氨酸;和250 125mM的蔗糖;并且pH为5.5;或2) 37.5mg/mL的主题抗体;0.02w/v%的吐温20;10mM的L-组氨酸;和125mM的蔗糖;并且pH为5.5;或3) 37.5mg/mL的主题抗体;0.01w/v%的吐温20;10mM的L-组氨酸;和125mM的蔗糖;并且pH为5.5;或4) 37.5mg/mL的主题抗体;0.02w/v%的吐温20;10mM的L-组氨酸;125mM的海藻糖;并且pH为5.5;或5) 37.5mg/mL的主题抗体;0.01w/v%的吐温20;10mM的L-组氨酸;和125mM的海藻糖;并具有5.5的pH;或6) 5mg/mL的主题抗体;0.02w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和250mM的海藻糖;并且pH为5.5;或7) 75mg/mL的主题抗体;0.02w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和250mM的甘露醇;并且pH为5.5;或8) 75mg/mL的主题抗体;0.02w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和140mM的氯化钠;并且pH为5.5;或9) 150mg/mL的主题抗体;0.02w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和250mM的海藻糖;并且pH为5.5;或10) 150mg/mL的主题抗体;0.02w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和250mM的甘露醇;并且pH为5.5;或11) 150mg/mL的主题抗体;0.02w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和140mM的氯化钠;并且pH为5.5;或12) 10mg/mL的主题抗体;0.01w/v%的吐温20;20mM的L-组氨酸;和40mM的氯化钠;并且pH为5.5。

[0463] 主题抗体可用于气雾剂制剂中以通过吸入给药。可将主题抗体配制成加压可接受的推进剂,例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。气溶胶制剂如鼻喷雾制剂包括活性剂与防腐剂和等渗剂的纯化水溶液或其他溶液。将所述制剂调整至与鼻粘膜相容的pH和等渗状态。

[0464] 此外,通过与各种基质如乳化基质或水溶性基质混合,可将主题抗体制成栓剂。主题抗体可以通过栓剂经直肠给药。栓剂可以包括诸如可可脂、碳蜡和聚乙二醇的赋形剂,该

赋形剂在体温下熔化,但在室温下固化。

[0465] 可以提供用于口服或直肠给药的单位剂型,例如糖浆剂、酏剂和混悬剂,其中每个剂量单位,例如一茶匙、一汤匙、片剂或栓剂,含有预定量的组合物。类似地,用于注射或静脉内给药的单位剂型可以包含位于组合物中的抗体,该组合物为以无菌水、生理盐水或其它药学上可接受的载体为溶剂的溶液。

[0466] 如本文所用,术语“单位剂型”是指适合作为人和动物对象的单位剂量的物理离散单位,每个单位含有预定量的本发明的抗LAG-3抗体,其量计算为足以与药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂结合产生所需效果。主题抗体的规格可以取决于使用的特定抗体和待实现的效果,以及与宿主中每种抗体相关的药效学。

[0467] 其他给药模式也可以用于本发明的方法。例如,可以将主题抗体配制成栓剂,并且在一些情况下可以配制成气雾剂和鼻内组合物。对于栓剂,赋形剂组合物将包含传统的粘合剂和载体,例如聚亚烷基二醇或甘油三酯。所述栓剂可以由含有约0.5%至约10% (w/w),例如约1%至约2%范围内的活性成分的混合物形成。

[0468] 鼻内制剂通常包括既不会刺激鼻粘膜也不会显著干扰纤毛功能的赋形剂。可以使用稀释剂如水、盐水或其他已知物质。鼻内制剂还可以含有防腐剂,例如但不限于氯丁醇和苯扎氯铵。可以存在表面活性剂以增强鼻粘膜对主题抗体的吸收。

[0469] 主题抗体可以作为可注射制剂给药。典型地,将可注射组合物制备成液体溶液或混悬液;也可以制备适合于在注射之前溶解或悬浮于液体赋形剂中的固体形式。制剂也可以被乳化或在脂质体赋形剂中包封抗体。

[0470] 合适的辅料赋形剂是例如水、盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等,以及其组合。此外,如果需要,所述赋形剂可以含有少量的辅助物质,如润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。制备所述剂型的实际方法对于本领域技术人员来说是已知的或是显而易见的。参见,例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 17th edition, 1985。无论如何,待给药的组合物或制剂将含有足以在所治疗的对象中达到所需状态的量的主题抗体。

[0471] 药学上可接受的辅料如赋形剂、佐剂、载体或稀释剂,公众容易获得。而且,药学上可接受的辅助物质,例如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、润湿剂等等,公众容易获得。

[0472] 在一些实施例中,将主题抗体配制成控释制剂。可以使用本领域公知的方法制备缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,其中所述基质为成形制品的形式,例如,薄膜或微胶囊。缓释基质的例子包括聚酯、L-谷氨酸和L-谷氨酸乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、水凝胶、聚交酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。通过使用适当的添加剂,通过控制水分含量和开发特定的聚合物基质组合物,可以防止缓释制剂中包含的抗体的生物学活性的可能损失和免疫原性的可能变化。

[0473] 在本发明的范围内,控释可以被认为是多种延长释放剂型中的任何一种。为了本发明的目的,以下术语可以被认为基本上等同于控释:连续释放、控制释放、延迟释放、储库、延长释放、渐进释放、速释、长期释放、程序释放、延长缓释、成比例释放、长时间释放、贮藏、延迟、缓慢释放、间隔释放、缓释、定时包衣、定时释放、延迟作用、延长作用、分层时间作

用、长效作用、持续作用、重复作用、减缓作用、缓释作用和缓释作用药物。所述术语的进一步说明可在Lesczek Krowczynski, Extended-Release Dosage Forms, 1987 (CRC Press, Inc.) 中找到。

[0474] 各种控释技术涵盖了非常广泛的药物剂型。控释技术包括但不限于物理系统和化学系统。

[0475] 物理系统包括但不限于具有速率控制膜的储藏系统, 如微胶囊化、巨囊化和膜系统; 没有速率控制膜的储藏系统, 例如中空纤维、超微孔三乙酸纤维素及多孔聚合物基材和泡沫; 整体系统, 包括物理溶解在无孔、聚合物或弹性体基质 (例如, 不可溶蚀、易腐蚀、环境试剂侵入和可降解的) 中的整体系统和物理分散在无孔、聚合物或弹性体基质 (例如, 不可溶蚀、易腐蚀、环境试剂侵入和可降解的) 中的材料; 层压结构, 包括与外部控制层化学相似或不相似的储层; 和其他物理方法, 如渗透泵、或吸附在离子交换树脂上。

[0476] 化学系统包括但不限于聚合物基质的化学侵蚀 (例如, 不均匀或均匀侵蚀) 或聚合物基质的生物侵蚀 (例如, 不均匀或均匀侵蚀)。关于控释系统类别的更多讨论可在Agis F. Kydonieus, Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications, 1980 (CRC Press, Inc.) 中找到。

[0477] 开发了许多用于口服给药的控释药物制剂。这些包括但不限于渗透压控制胃肠递送系统; 流体动力学压力控制胃肠递送系统; 膜渗透控制胃肠递送系统, 其包括微孔膜渗透控制胃肠递送装置; 抗胃液的肠靶向控释胃肠递送装置; 凝胶扩散控制胃肠递送系统; 和离子交换控制胃肠递送系统, 其包括阳离子和阴离子药物。关于控释药物递送系统的其他信息可以在Yie W. Chien, Novel Drug Delivery Systems, 1992 (Marcel Dekker, Inc.) 中找到。

[0478] 剂量

[0479] 基于各种临床因素, 主治医师或其他有资质的医务人员可以确定合适的剂量。如在医学领域中众所周知的, 任何一个患者的剂量取决于许多因素, 包括患者的体型、体表面积、年龄、待给药的特定化合物、患者性别、给药时间和途径, 一般健康状况和同时施用的其他药物。主题抗体可以以1ng/kg体重至20mg/kg体重的量给药, 例如0.001至10、0.01至10、0.1至10、1至10、0.001至1、0.01至1、0.1至1、0.05至5、0.05至0.5、或0.5至5mg/kg体重。然而, 特别考虑到上述因素, 可以设想低于或高于所述示例性范围的剂量。如果该方案是连续输注, 则其可以在每分钟1μg至10mg/kg体重的范围内。

[0480] 在一些实施例中, 主题抗LAG-3抗体的剂量在0.001μg至100mg的范围内, 例如0.001μg至10mg、0.001μg至1mg、0.001μg至0.1mg、0.01μg至10mg、0.1μg至10mg、0.1μg至1mg、或0.1μg至0.1mg、或0.01至100mg、0.01至10mg、0.01至1mg、0.01至0.1mg、0.1至100mg、0.1至10mg、0.1至1mg。

[0481] 在一些实施例中, 所述剂量可以在例如约0.0001至100mg/kg、或约0.01至5mg/kg (例如0.02至5mg/kg、0.25至5mg/kg、0.5至5mg/kg、0.75至5mg/kg、1至5mg/kg、2至5mg/kg等) 体重的范围内。例如, 剂量可以是0.1、1或10mg/kg体重, 或在0.01-10mg/kg的范围内, 或至少0.1mg/kg。

[0482] 在特定的实施例中, 本发明的抗LAG-3抗体或其片段的剂量最高达0.5mg/kg体重, 例如在0.0001至0.5mg/kg、0.001至0.5mg/kg、0.01-0.5mg/kg、0.1-0.5mg/kg、0.0001-

0.1mg/kg、0.001-0.1mg/kg、0.01-0.1mg/kg体重的范围内。

[0483] 在一些实施例中,主题抗LAG-3抗体以提供约0.001 μ g/ml至约1mg/ml的峰值血清浓度的量给药,所述峰值血清浓度例如为:0.0001 μ g/ml至1 μ g/ml,0.001 μ g/ml至1 μ g/ml,0.001 μ g/ml至0.1 μ g/ml,0.01至1、或0.01至0.1 μ g/ml,或约0.005 μ g/ml至约1 μ g/ml,或约0.1 μ g/ μ g/ml至约1 μ g/ml,或约1 μ g/ml至约2.5 μ g/ml,约2.5 μ g/ml至约5 μ g/ml,约5 μ g/ml至约7.5 μ g/ml,约7.5 μ g/ml至约10 μ g/ml,约10 μ g/ml至约25 μ g/ml,约25 μ g/ml至约50 μ g/ml,约50 μ g/ml至约100 μ g/ml,约100 μ g/ml至约250 μ g/ml,约250 μ g/ml至约500 μ g/ml,约500 μ g/ml至约750 μ g/ml,或约750 μ g/ml至约1000 μ g/ml。在一些实施例中,主题抗LAG-3抗体以提供高于1mg/ml的峰值血清浓度的量给药,所述峰值血清浓度例如为约1mg/ml至约2mg/ml、约2mg/ml至约5mg/ml、或约5mg/ml至约10mg/ml。在其他实施例中,本发明的抗LAG-3抗体或其片段以提供最高达1 μ g/ml的峰值血清浓度的量给药,所述峰值血清浓度例如在0.0001 μ g/ml至1 μ g/ml、0.001 μ g/ml至1 μ g/ml、0.01 μ g/ml至1 μ g/ml、0.1至1 μ g/ml、0.0001 μ g/ml至0.1 μ g/ml、0.001 μ g/ml至0.1 μ g/ml、或0.01 μ g/ml至0.1 μ g/ml的范围内。这种给药适宜通过皮下注射进行。

[0484] 个体可以每天、隔天、每周或根据通过实证分析确定的任何其他时间表来以所述剂量给药。示例性治疗需要以多个剂量在延长的时间(例如至少六个月)内给药。额外的示例性治疗方案需要每两周一次或每月一次或每3至6个月一次给药。

[0485] 示例性的剂量方案包括连续每天给药0.01至1mg/kg、0.01至0.1mg/kg、0.1至1mg/kg、1至10mg/kg或15mg/kg,隔天给药0.02至20mg/kg,例如0.2mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg或20mg/kg,或每周给药0.1至100mg/kg,例如1mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg或60mg/kg。在一些方法中,同时以具有不同结合特异性的两种或更多种单克隆抗体给药,在该情况下,每种抗体的给药剂量落入所指明的范围内。可以通过定期评估来监测进展情况。

[0486] 在对象中表达LAG-3的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的数量相对较低。预期本发明的抗体(特别是具有至少两周的血清半衰期并且缺乏显著的CDC和ADCC活性的本发明的抗体,例如人IgG同种型抗体(其缺少CDC和ADCC活性),或包含一个或多个突变以降低或消除CDC和ADCC活性的抗体)可有效抑制抗原诱导的CD4⁺和/或CD8⁺T细胞增殖至少数周。鉴于此,合适的治疗方案可以包括每四、六、八或十周一次,或每两或三个月一次,以本发明的抗体给药(例如0.01-1mg/kg抗体)。这种治疗可以在至少六个月,或至少一年、两年、三年、四年或五年或更长时间的时期内提供,例如在整个疾病治疗的给药过程,或在受试者的整个生命周期内提供。

[0487] 技术人员很容易理解,剂量水平和给药时间表可以根据特定抗体的功能、症状的严重程度和对象对副作用的敏感性而变化。给定化合物的优选剂量和给药时间表容易由本领域技术人员通过各种手段确定。

[0488] 给药途径

[0489] 使用适用于药物递送的任何可用的方法和途径,包括体内和体外方法,以及全身和局部给药途径,以主题抗体对个体给药。

[0490] 常规和药学上可接受的给药途径包括鼻内、肌内、气管内、鞘内、颅内、皮下、真皮内、局部、静脉内、腹膜内、动脉内(例如通过颈动脉)、脊柱或脑递送、直肠、鼻、口以及其他

肠内和肠胃外给药途径。如果需要,可以组合给药途径,或根据抗体和/或所需效果进行调整。主题抗体组合物可以以单剂量或多剂量给药。在一些实施例中,主题抗体组合物通过口服给药。在一些实施例中,主题抗体组合物通过吸入途径给药。在一些实施例中,主题抗体组合物通过鼻内给药。在一些实施例中,主题抗体组合物通过局部给药。在一些实施例中,主题抗体组合物通过颅内给药。在一些实施例中,主题抗体组合物通过静脉内给药。在一些实施例中,主题抗体组合物通过鞘内给药。

[0491] 本发明的抗体可以使用任何适用于常规药物递送的常规方法和途径(包括全身或局部途径)对宿主给药。通常,本发明考虑的给药途径包括但不限于肠内、肠胃外或吸入途径。

[0492] 非吸入给药的肠胃外给药途径包括但不限于局部、透皮、皮下、肌内、眶内、囊内、脊柱内、胸骨内、鞘内和静脉内途径,即除了通过消化道以外的任何给药途径。可以进行肠胃外给药以实现主题抗体的全身或局部递送。当期望全身递送时,给药通常涉及药物制剂的侵入性或全身性吸收的局部或粘膜给药。

[0493] 主题抗体也可以通过肠内给药递送给对象。肠内给药途径包括但不限于口服和直肠(例如使用栓剂)递送。

[0494] “治疗”是指至少改善与困扰宿主的病理状况相关的症状,其中改善广义上指的是至少减少参数的量级,例如,与正在治疗的病理状况有关的症状,如免疫失调。如此,治疗还包括病理状况或至少与其相关的症状完全被抑制的情况,所述完全抑制例如防止发生或停止、例如终止,这使得宿主不再患有病理状况,或至少不再具有表征病理状况的症状。

[0495] 在一些实施例中,主题抗体通过注射和/或递送给药,例如到达脑动脉中的位点给药或直接向脑组织给药。主题抗体还可以直接向靶位点给药,例如通过生物射弹传递至靶位点。

[0496] 根据主题方法,多种宿主(其中术语“宿主”在本文中与术语“对象”、“个体”和“患者”可互换使用)是可治疗的。通常,这些宿主是“哺乳动物”或“哺乳类动物”,其中所述术语广义地用于描述哺乳动物纲内的生物,包括食肉目(例如猫)、食草目(例如牛、马和绵羊)、杂食目(例如狗、山羊和猪)、啮齿目(例如小鼠,豚鼠和大鼠)以及灵长目(例如人类,黑猩猩和猴子)。在一些实施例中,宿主是具有补体系统的个体,例如哺乳动物、鱼类或无脊椎动物。在一些实施例中,所述宿主是含补体系统的哺乳动物、鱼类或无脊椎伴侣动物、农业动物、工作动物、动物园动物或实验室动物。在一些实施例中,所述宿主为人。

[0497] 实施例包括包含容器的组合物,所述容器适于容纳包含用于对个体给药的主题抗LAG-3抗体的组合物。例如,可以将主题抗体置于适于容纳药物组合物的容器内。容器可以是例如瓶子(例如,具有封闭装置,诸如帽子)、泡罩包装(例如,其可以提供每个泡罩一次或多次剂量的封闭)、小瓶、软包装(例如密封的胶带或塑料袋)、安瓿(单剂量溶液)、滴管、注射器、薄膜、管等。在一些实施例中,容器如无菌容器包含主题药物组合物。在一些实施例中,所述容器是瓶子或注射器。在一些实施例中,所述容器是瓶子。在一些实施例中,所述容器是注射器。

[0498] 提供了具有单位剂量的主题抗体(例如,口服或注射剂量)的试剂盒。在这种试剂盒中,除含有单位剂量的容器外,还将提供一份信息性说明书,其说明抗体在治疗目标病理状况中的应用和伴随的益处。优选的化合物和单位剂量如上文所述。

[0499] 治疗方法

[0500] 根据本发明,还提供了用作药物的本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的药物组合物。本发明的抗体、片段或组合物可用于需要增加对象中LAG-3作用的任何疗法。

[0501] 术语“对象”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖动物和爬行动物,但优选哺乳动物,例如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、牛和马。

[0502] 所述抗体、片段或组合物可用于需要负调节T细胞增殖和/或功能的任何治疗。

[0503] 根据本发明还提供了本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的药物组合物,其用于治疗对象中与CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的增殖或活性相关的失调或与对象中LAG-3的表达和/或活性降低相关的失调。

[0504] 根据本发明还提供了本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗对象中与CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的增殖或活性相关的失调或与对象中LAG-3的表达和/或活性降低相关的失调。

[0505] 根据本发明进一步提供了治疗对象中与CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的增殖或活性相关的失调或与对象中LAG-3的表达和/或活性降低相关的失调的方法,其中该方法包括以有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的药物组合物对需要这种治疗的对象进行给药。

[0506] 与CD4⁺和/或CD⁺T细胞的增殖或活性相关的失调可以是免疫失调,特别是T细胞介导的免疫失调,例如炎症性疾病或自身免疫失调。

[0507] 所述抗体、片段或组合物可用于减少炎症过程或防止炎症过程。在一个实施例中,提供了T细胞增殖或活化的体内减少,特别是涉及不适当的炎症免疫应答的那些T细胞增殖或活化,例如募集到这种应答的附近/位置。

[0508] 如本文所用,T细胞增殖或活化的减少与治疗前或未治疗相比可以减少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。

[0509] 有利的是,用根据本发明的抗体、片段或组合物进行治疗可以使T细胞增殖或活化减少,而不降低患者T细胞(未活化的T细胞)的总体水平。这可能会导致更少的副作用,并防止患者T细胞耗竭。

[0510] 免疫失调可以例如选自:感染(病毒、细菌、真菌和寄生虫感染)、与感染相关的内毒素休克、败血症、关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、COPD、盆腔炎症、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease)、炎症性肠病、克罗恩氏病(Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、佩罗尼氏病(Peyronie's Disease)、乳糜泻、胆病、藏毛病、腹膜炎、牛皮癣、血管炎、手术粘连、中风、I型糖尿病、莱姆病(lyme disease)、关节炎、脑膜脑炎、自身免疫性葡萄膜炎、免疫介导的中枢和外周神经系统的炎症性疾病(例如,多发性硬化症、狼疮(如系统性红斑狼疮)和格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome))、过敏性皮炎、自身免疫性肝炎、纤维化肺泡炎、格雷夫斯病(Grave's disease)、IgA肾病、特发性血小板减少性紫癜、美尼尔氏病(Meniere's disease)、天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、类肉状瘤病、硬皮病、韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、其他自体免疫失调、胰腺炎、外伤(手术)、移植物抗宿主病、移植排斥、心脏病(包括缺血性疾病(例如心肌梗塞以及动脉粥样硬化))、血管内凝血、骨吸收、骨质疏松症、骨关节炎、牙周炎和胃酸过少、与胎儿母体耐受性不足有关的不孕

症。

[0511] 本发明的抗体、片段或组合物可用于需要抑制LAG-3与MHC II类分子的结合、将MHC II类激活信号拮抗成抗原呈递细胞(APC)、或抑制LAG-3诱导的APC活化的任何疗法。

[0512] 根据本发明还提供了本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的药物组合物,其用于治疗对象中与APC活化相关的失调。

[0513] 根据本发明还提供了本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的药物组合物在药物制备中的用途,所述药物用于治疗对象中与APC活化相关的失调。

[0514] 根据本发明进一步提供了对象中与APC活化相关的失调的治疗方法,该方法包括以有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段或本发明的药物组合物向需要这种治疗的对象给药。

[0515] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”,“治疗(treat)”等是指获得所需的药理学和/或生理学效果。就完全或部分预防疾病或其症状而言,该效果可以是预防性的,和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于该疾病的不利影响而言,该效果可以是治疗性的。如本文所用的“治疗”涵盖对哺乳动物,特别是人的疾病的任何治疗,并且包括:(a)在可能易患该疾病但尚未被诊断患有该疾病的对象中预防该疾病发生;(b)抑制疾病,即阻止其发展;和(c)缓解疾病,即导致疾病的消退。

[0516] 本文可互换使用的术语“个体”、“对象”、“宿主”和“患者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖动物和爬行动物,但优选哺乳动物,例如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、牛和马。

[0517] “治疗有效量”或“有效量”是指当向哺乳动物或其它对象给药以治疗疾病时,足以达成对该疾病的这种治疗的抗LAG-3抗体的量。“治疗有效量”将根据抗LAG-3抗体、疾病及其严重性,以及待治疗对象的年龄、体重等而变化。

[0518] 本文提及的所有出版物均通过援引方式并入本申请,以公开和描述与所引用出版物相关的方法和/或材料。

[0519] 现结合附图,仅通过示例的方式描述本发明的实施例,其中:

[0520] 图1展示了成熟人LAG-3蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:27)。四个细胞外Ig超家族结构域位于氨基酸残基处:1-149(D1);150-239(D2);240-330(D3);和331-412(D4)。人LAG-3蛋白的D1结构域的外环结构的氨基酸序列以加下划线和粗体(SEQ ID NO:40)显示;

[0521] 图2展示了单克隆抗体13E2的V_H CDR环[Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)];

[0522] 图3展示了与编码核酸序列比对的单克隆抗体13E2的V_H结构域的氨基酸序列;

[0523] 图4展示了单克隆抗体13E2的V_L CDR环[Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)];

[0524] 图5展示了与编码核酸序列比对的单克隆抗体13E2的V_L结构域的氨基酸序列;

[0525] 图6展示了单克隆抗体34F4的V_H CDR环[Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)];

[0526] 图7展示了与编码核酸序列比对的单克隆抗体34F4的V_H结构域的氨基酸序列;

[0527] 图8展示了单克隆抗体34F4的V_L CDR环[Lefranc, M.-P. et al.,

Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)];

[0528] 图9展示了与编码核酸序列比对的单克隆抗体34F4的VL结构域的氨基酸序列;

[0529] 图10展示了编码单克隆抗体13E2的VH区的核苷酸序列的顶部V-D-J种系BLAST比对;

[0530] 图11展示了编码单克隆抗体13E2的VL区的核苷酸序列的顶部V-J种系BLAST比对;

[0531] 图12展示了编码单克隆抗体34F4的VH区的核苷酸序列的顶部V-D-J种系BLAST比对;

[0532] 图13展示了编码单克隆抗体34F4的VL区的核苷酸序列的顶部V-J种系BLAST比对;

[0533] 图14展示了与同种型对照抗体 (mIgG1) 相比,不同浓度的激动性抗LAG-3单克隆抗体13E2和34F4以及拮抗性抗LAG-3单克隆抗体17B4与LAG-3转染的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞结合的结果;

[0534] 图15展示了与来自健康供体 (供体1) 的同种型对照抗体 (mIgG1) 相比,不同浓度的激动性抗LAG-3单克隆抗体13E2和34F4以及拮抗性抗LAG-3单克隆抗体17B4与CD4⁺和CD8⁺原代细胞 (SEB刺激的PBMC) 结合的结果;

[0535] 图16A展示了与同种型对照抗体 (mIgG1) 相比,在不同浓度的激动性抗LAG-3单克隆抗体13E2和34F4以及拮抗性抗LAG-3单克隆抗体17B4下,IMP321 (LAG-3Ig, 1μg/ml) 与MHC II类阳性B细胞结合的抑制结果。图16B展示了与同种型对照抗体 (mIgG1) 相比,在存在不同浓度的激动性抗LAG-3单克隆抗体13E2和34F4以及拮抗性抗LAG-3单克隆抗体17B4的情况下,IMP321 (20ng/ml) 活化THP-1细胞的抑制结果。

[0536] 图17 (A) 展示了在存在mIgG1、17B4、13E2或34F4时,一种供体的CD8⁺T细胞的CMV诱导的增殖曲线,其通过流式细胞术和用实施例10中描述的用于该测定的设门策略进行分析。图17 (B) 展示了与相同供体的同种型对照抗体 (mIgG1) 相比,抗体13E2、34F4和17B4抑制CD8⁺T细胞增殖的测定结果。图中还展示了基线增殖 (无刺激);

[0537] 图18展示了与几种不同供体中的同种型对照抗体 (mIgG1) 相比,抗体13E2或34F4抑制CD4⁺或CD8⁺T细胞增殖的测定结果;

[0538] 图19展示了不同浓度的激动性抗LAG-3单克隆抗体13E2和34F4对CD8⁺T细胞增殖的影响;

[0539] 图20展示了嵌合13E2-人IgG4Fc抗体的重链氨基酸序列 (嵌合13E2-人IgG4Fc重链氨基酸序列在图中被称为13E2IgG4mut), 和嵌合13E2-人IgK抗体的轻链氨基酸序列 (嵌合13E2-人IgK轻链氨基酸序列在图中被称为13E2IgK);

[0540] 图21展示了消耗、拮抗性和激动性抗LAG-3抗体对T细胞的不同作用;

[0541] 图22展示了人源化VH变体1-4 (VH₁、VH₂、VH₃和VH₄) 的可变区, 和人源化VL变体1-4 (VL₁、VL₂、VL₃和VL₄) 的可变区, 与原始小鼠单克隆抗体13E2的相应序列 (分别为13E2VH和13E2VL), 的比对。CDR序列以灰色突出显示。与原始小鼠序列相比, 变体的人源化框架序列的变化以加下划线和粗体显示。

[0542] 图23展示了与抗体Chim13E2IgG4的嵌合13E2-人IgG4Fc重链氨基酸序列 (13E2IgG4mut) 比对的人源化13E2-人IgG4Fc抗体 (IMP761) 的重链氨基酸序列。VH区以粗体显示, 并且Fc区为突出显示。不同于嵌合13E2IgG4mut序列的相应残基的人源化IMP761序列的氨基酸残基以加单下划线标出。CDR序列 (基于组合的IMGT/Kabat CDR序列识别) 以加双

下划线标出；

[0543] 图24展示了与抗体Chim13E2IgG4的嵌合13E2-人IgK轻链氨基酸序列(13E2IgK)比对的人源化13E2-人IgK抗体(IMP761)的轻链氨基酸序列。 V_L 区以粗体显示,并且IgK区为突出显示。不同于嵌合13E2IgK序列的相应残基的人源化IMP761序列的氨基酸残基以加单下划线标出。CDR序列(基于组合的IMGT/Kabat CDR序列识别)以加双下划线标出；

[0544] 图25显示测试嵌合13E2-人IgG4Fc抗体(Chim13E2IgG4)和IMP761结合至CHO-LAG-3⁺细胞的结合的测定结果；

[0545] 图26显示了测试IMP761和Chim13E2IgG4对以下各项的作用的测定结果:(a) 抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖；和(b) CD8⁺T细胞内的CD25表达；

[0546] 图27显示了IMP761和Chim13E2IgG4对抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖和CD25表达的作用,绘制为以下的图:(a) CD8⁺T细胞增殖的抑制百分比；和(b) 与同种型匹配的对照相比,CD8⁺T细胞内CD25表达的抑制百分比；

[0547] 图28展示了不同浓度的IMP761和Chim13E2IgG4对抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖的影响；

[0548] 图29展示了(a) 使用来自Promega的ADCC Reporter Bioassay来确定IMP761对表达LAG-3的细胞是否具有细胞毒活性的ADCC测定结果；和(b) 使用IL-2刺激的PBMC作为效应细胞的ADCC测定结果-该结果绘制为PBMC种群中CD4⁺和CD8⁺T细胞的百分比；或(c) PBMC种群中LAG-3⁺CD4⁺和LAG-3⁺CD8⁺T细胞的百分比；

[0549] 图30展示了使用兔补体来确定IMP761对抗表达LAG-3的细胞是否具有细胞毒活性的CDC测定结果-该结果绘制为在PBMC种群中以下各项的百分比:(a) CD4⁺和CD8⁺T细胞；或(b) LAG-3⁺CD4⁺和LAG-3⁺CD8⁺T细胞；以及

[0550] 图31展示了用抗体培养抗原刺激的PBMC 3天后,用于确定IMP761对表达LAG-3的细胞是否具有细胞毒活性的测定结果。所得结果绘制为以下图:(a) PBMC种群中CD4⁺和CD8⁺T细胞的百分比；和(b) CD4⁺和CD8⁺T细胞亚种群中LAG-3⁺细胞的百分比。

实施例1

[0551] 13E2抗LAG-3单克隆抗体的产生

[0552] 为了产生抗LAG-3抗体,根据下述免疫方案对15只Balb/c小鼠(下面称为编号为1-15的小鼠)进行免疫。

[0553] 在第0天、第15天、第30天、第50天、第67天和第108天,对13只小鼠中的每只分别皮下(s.c.)注射100 μ g IMP321 (LAG-3Ig) (临床级批次S017/LC1/041011 (以下称为“LC1”)) 进行免疫:3次(第12号小鼠);4次(第9号小鼠);5次(第5和14号小鼠);或6次(第3和11号小鼠)。将第1、2、4、8、10、13和15号小鼠再免疫最多达4次。平行地,用10 μ g完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant, CFA)中的LC1对用作对照的两只小鼠(第6号和第7号小鼠)在第0天免疫一次,并用相同剂量的不完全弗氏佐剂(IFA)中的抗原在第15天、第30天、第50天、第67天和第108天对所述小鼠进行免疫。

[0554] 第6次免疫后12天时,取第1、2、3、4、8、10、11、13和15号小鼠(第5、9、12和14号小鼠已经被处死)的血清并进行酶联免疫吸附测定(ELISA)分析,使用LAG-3D1-D4作为包被抗原,纯化的抗LAG-3 17B4小鼠单克隆抗体作为参考,以及山羊抗小鼠Ig-HRP作为标记的第

二抗体,以确定存在于血清中的抗LAG-3抗体的浓度。其结果展示于下表2中:

[0555] 表2

小鼠编号	[抗 LAG-3 Ab]
	$\mu\text{g/ml}$
1	1049
2	281
3	423
4	193
6	131
7	394
8	242
10	275
11	506
13	188
15	848

[0557] 六次免疫后,即使在不存在作为佐剂的CFA或IFA的情况下用IMP321免疫这些小鼠,来自几只小鼠(包括第3号小鼠)的血清出人意料地给出比两个阳性对照小鼠(第6和7号)的血清更好的结果。与在IFA中使用表达LAG-3的CHO细胞的其他实验(数据未显示)相比,这种非常规技术(即用PBS中的IMP321免疫,不使用CFA或IFA作为佐剂)也产生了良好的结果。不受理论束缚,据信这可能是因为IMP321本身是佐剂,即它直接触发树突细胞的活化和成熟。

[0558] 评估相同的血清样品抑制IMP321与在Raji B细胞上表达的其配体(MHC II类)结合的能力。将10微升的10 $\mu\text{g/ml}$ Alexa-Fluor488缀合的IMP321的溶液在4 $^{\circ}\text{C}$ 下与或不与5 μl 从每只小鼠收集的血清或初始血清预温育30分钟。然后加入Raji细胞至终体积为50 μl ,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30分钟。通过流式细胞术分析细胞结合的荧光。

[0559] 第3号小鼠被选中是因为来自该小鼠的血清在D1-D4血清ELISA测定中显示出高滴度(423 $\mu\text{g/ml}$)(表1),并且其具有强大的抑制IMP321与MHC II $^{+}$ 类Raji B细胞结合的能力。

[0560] 第六次免疫后12天时,第3号小鼠接受静脉内(i.v.)加强10 μg D1-D4LAG-3(无Fc尾)重组蛋白(在CHO细胞中产生并经纯化)。i.v.加强注射三天后,处死第3号小鼠并除去脾脏。通过在含有完全无血清DMEM的培养皿中用5ml注射器橡胶柱塞挤压脾脏片提取脾细胞。在无血清培养基中洗涤脾细胞和Sp2/0骨髓瘤细胞(在RPMI 1640+10%FCS+2mM谷氨酰胺+0.5%P/S中培养)。两种细胞类型以脾细胞:骨髓瘤为5:1的比例混合在一起,然后通过离心沉淀。将融合剂(PEG-1500,溶于PBS中的50%w/v聚乙二醇溶液,Roche 10783641001,1ml/10 8 细胞)在37 $^{\circ}\text{C}$ 下预温并逐滴加入细胞团中。将细胞轻轻地重新悬浮,并在90秒后通过加倍体积来稀释。在约5分钟内,将细胞以规律的间隔进一步稀释至1至15的最终稀释度。然后将细胞离心并重悬于含有10%FBS的培养基中并在37 $^{\circ}\text{C}$ 温育约1小时。然后将细胞(10,000个细胞/孔)置于46个96孔板中,在含有10%Ultralow Ig FBS(Gibco 16250)、2%HAT

(Gibco 21060) 并补充有10%BM Condimed H1 (培养基中的补充剂, 以支持融合后和克隆期间的B细胞杂交瘤的生长, Roche 11088947001) 的完全RPMI中培养直至筛选。

[0561] 使用CHO细胞和膜表达的LAG-3通过细胞计数进行筛选, 以分析存在生长中的杂交瘤上清液中的抗体的结合能力, 其由FITC缀合的山羊抗小鼠Ig揭示。在CHO LAG-3⁺细胞和野生型CHO细胞上扩增并重新筛选阳性杂交瘤。从该融合中, 通过对表达LAG-3的CHO细胞进行FACS分析, 筛选总共632个孔 (产率为14%)。发现4个杂交瘤克隆稳定表达抗LAG-3抗体, 包括13E2。然后通过有限稀释将杂交瘤亚克隆。

[0562] 表3

[0563]

融合	N° 5
脾细胞 (百万)	33
融合特征	BM 规定 H1, 10,000 个细胞/孔
起始孔数	4416
筛选的分离细胞孔数	632
收率	14%
稳定的抗 LAG-3 杂交瘤数	4

[0564] 实施例2

[0565] 抗体13E2的可变区的氨基酸序列

[0566] V_H氨基酸序列

[0567]

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGLGWIRQPSGKGLEWLTHIWWDDIKR
YNPDLRSRLTISKDTSSSQIFLKIASVDTADTATYYCARIVEGSYSSSYFDVWGAGTTVTVS
S (SEQ ID NO: 7)。

[0568] SEQ ID NO:7是抗体13E2的重链可变 (V_H) 结构域的氨基酸序列。由IMGT编号系统 [Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212 (1999)] 确定的互补决定区 (CDR) 以加下划线标出。由Kabat编号系统确定的CDR以粗体显示。

[0569] 图2显示了单克隆抗体13E2的V_H CDR环 [Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]。阴影圆圈 (残基编号4、12、13、19、21、23、25、41、50、52、53、71、76、78、87、89、91、94、100) 是框架1-3中的疏水 (非极性的) 残基, 其位于大部分抗体中的疏水位点。正方形是每个CDR开始和结束时的关键残基。框架中的编号为23、41、89、104、118的氨基酸残基是结构上保守的氨基酸;

[0570] V_L氨基酸序列

[0571]

DIVMTQPHKFMSTSVEDRVITICKASQDVIFDVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRVSGVPD
RFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPYTFGGGTLEIK (SEQ ID NO:
8)。

[0572] SEQ ID NO:8是抗体13E2的轻链可变(VL)结构域的氨基酸序列。由IMGT编号系统[Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Research,27,209-212(1999)]确定的互补决定区(CDR)以加下划线示出。由Kabat编号系统确定的CDR以粗体显示。

[0573] 表4.13E2VH和VL CDR序列

[0574]

抗体	CDR-1	CDR-2	CDR-3
13E2 VH (IMGT 编号)	GFSLSTSGMG (SEQ ID NO: 1)	IWWDDIK (SEQ ID NO: 2)	ARIVEGSYSSSYFDV (SEQ ID NO: 3)
13E2 VL (IMGT 编号)	QDVIFD (SEQ ID NO: 4)	SAS (SEQ ID NO: 5)	QQHYSTPYT (SEQ ID NO: 6)
13E2 VH (Kabat 编号)	TSGMGLG (SEQ ID NO: 21)	HIWWDDIKRYNPDLRS (SEQ ID NO: 22)	IVEGSYSSSYFDV (SEQ ID NO: 23)
13E2 VL (Kabat 编号)	KASQDVIFDVA (SEQ ID NO: 24)	SASSRVS (SEQ ID NO: 25)	QQHYSTPYT (SEQ ID NO: 26)

[0575] 图4显示了单克隆抗体13E2的VL CDR环[Lefranc,M.-P.et al., Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003)]。阴影圆圈(残基编号4、11、19、21、23、25、40、41、52、53、54、71、76、87、89、91、94、96、100、101)是框架1-3中的疏水(非极性的)残基,其在大部分抗体中的疏水位点。正方形是每个CDR开始和结束时的关键残基。框架中编号为23、41、89、104、118的氨基酸残基是结构上保守的氨基酸。

[0576] 实施例3

[0577] 编码抗体13E2的可变结构域的核酸序列

[0578] 编码单克隆抗体13E2的VH结构域的核酸序列如图3和下文所示:

[0579]

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGG
GTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTCTAGGCTGGATTTCGTCAGCCATCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGACAC
ACATTTGGTGGGATGATATCAAGCGCTATAACCCAGACCTGAGGAGCCGACTGACTATCTCCAAGGATACCTCCAGC
AGCCAGATTTTCTCAAGATCGCCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATATTACTGTGCTCGAATAGTGGAGGG
TTCATACAGTAGTAGTTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCAG (SEQ ID NO:9)。

[0580] 核酸BLAST比对显示编码单克隆抗体13E2的VH结构域的核酸序列与下列种系基因的序列具有显著同一性:IGHV8-8*01、IGHV8-11*01、IGHV8-12*01、IGHD2-12*01、IGHD1-

[0581] 1*01、IGHJ1*01、IGHJ1*02、IGHJ1*03。

[0582] 图10显示编码13E2抗体的VH结构域的核酸序列与其最高种系基因匹配的比对。图10显示包含13E2VH区的核苷酸1-301的部分(其包含重链框架区FR1、FR2和FR3)与V基因IGHV8-8*01的核酸序列具有92.7%的核酸序列同一性。

[0583] 表5.13E2VH和IGHV8-8*01之间的比对总结

[0584]

	长度	匹配	错配	间隔	同一性(%)
FR1-IMGT	75	75	0	0	100
CDR1-IMGT	30	29	1	0	96.7
FR2-IMGT	51	48	3	0	94.1
CDR2-IMGT	21	18	3	0	85.7
FR3-IMGT	114	99	15	0	86.8
CDR3-IMGT (种系)	10	10	0	0	100
总数	301	279	22	0	92.7

[0585] 编码单克隆抗体13E2的VL结构域的核酸序列如图5和下文所示:

[0586]

GACATTGTGATGACCCAGCCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTGGAAGACAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAG
TCAGGATGTGATTTTTGATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAATTACTGATTTACTCGGCAT
CCTCCCGGGTCAGTGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACCTTACCATCAGTAGT
GTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACACTATAGTACTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAC
GCTGGAAATAAAAC (SEQ ID NO:10)。

[0587] 核酸BLAST比对显示编码单克隆抗体13E2的VL结构域的核酸序列与下列种系基因的序列具有显著同一性:IGKV6-17*01、IGKV6-25*01、IGKV6-23*01、IGKJ2*01、IGKJ2*03、IGKJ2*02。

[0588] 图11显示编码13E2抗体的VL结构域的核酸序列与其最高种系基因匹配的比对。图11显示包含13E2VL区的核苷酸1-284的部分(其包含轻链框架区FR1、FR2和FR3)与V基因IGKV6-17*01的核酸序列具有94.7%的核酸序列同一性。

[0589] 表6.13E2VL和IGKV6-17*01之间的比对总结

[0590]

	长度	匹配	错配	间隔	同一性(%)
FR1-IMGT	78	74	4	0	94.9
CDR1-IMGT	18	14	4	0	77.8
FR2-IMGT	51	50	1	0	98
CDR2-IMGT	9	9	0	0	100
FR3-IMGT	108	103	5	0	95.4
CDR3-IMGT (种系)	20	19	1	0	95
总数	284	269	15	0	94.7

[0591] 实施例4

[0592] 34F4抗LAG-3单克隆抗体的产生

[0593] 在第0天、第14天、第28天、第43天和第70天分别免疫4只Ba1b/c小鼠(以下称为第1-4号小鼠)中的每只:s.c.注射四次(第2和4号小鼠)或五次(第1和3号小鼠)100μg IMP321 (LAG-3Ig) [临床级批次S017/LC1/041011(以下称为“LC1”)]。对另外一只Ba1b/c小鼠(以下称为第5号小鼠)免疫:三次s.c.注射D1-D4LAG-3。

[0594] 在第三次注射后两周时,用ELISA测定法测试来自每只小鼠的血清的抗LAG-3抗体含量(如实施例1中所述)。其结果展示于下表7中:

[0595] 表7

[0596]

小鼠编号	[抗LAG-3Ab] $\mu\text{g/ml}$
1	31
2	10
3	13
4	28
5	10

[0597] 通过FACS分析(如实施例1中所述)确定来自每只小鼠的血清抑制IMP321与Raji B细胞结合的能力。

[0598] 从表7可以看出,所有小鼠的抗体滴度都很低。三次免疫后所有血清均未抑制IMP321与MHC II⁺类Raji B细胞的结合。没有进行其他出血以测试血清滴度和抑制能力。继续进行免疫接种过程,接受5次s.c.注射LC1的第3号小鼠在第92天用i.v.10 μg D1-D4LAG-3加强。

[0599] i.v.加强注射三天后,来自第3号小鼠的7,300万脾细胞与1,500万个Sp2/0骨髓瘤细胞融合,其过程与实施例1中描述的过程相同。40个96孔板的孔中,每孔接种大约25,500个细胞,然后用补充有10%BM Condimed H1的培养基培养。通过对表达LAG-3的CHO细胞进行FACS分析筛选2256个孔(产率为59%)。选择两种稳定的抗LAG-3杂交瘤,包括34F4(参见下表8)。

[0600] 表8

融合	N° 17
脾细胞(百万)	73
融合特征	BM condimed H1, 25,000 个细胞/孔
起始孔数	3840
筛选的分离细胞孔数	2256
收率	59%
稳定的抗 LAG-3 杂交瘤数	2

[0601] 实施例5

[0602] 抗体34F4的可变区的氨基酸序列

[0603] V_H氨基酸序列

[0604]

QVTLKESGPGILQPSQTLTCSFSGFSLNTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLTHIWWDDVK
RYNPALKSRLTISKDTSSSQVFLKIASVDTADTATYYCARIEGDTYYDYFDYWGQGVTLT
VSS (SEQ ID NO: 17)。

[0606] SEQ ID NO:17是抗体34F4的重链可变(V_H)结构域的氨基酸序列。由IMGT编号系统[Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Research,27,209-212(1999)]确定的互补决定区(CDR)以加下划线示出。由Kabat编号系统确定的CDR以粗体显示。

[0607] 图6显示了单克隆抗体34F4的V_H CDR环[Lefranc,M.-P.et al.,Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003)]。阴影圆圈(残基编号4、12、13、19、21、23、25、41、50、52、53、71、76、78、87、89、91、94、100)是框架1-3中的疏水(非极性的)残基,其在大部分抗体中的疏水位点。正方形是每个CDR开始和结束时的关键残基。框架中的氨基酸残基编号23、41、89、104、118是结构上保守的氨基酸。

[0608] V_L氨基酸序列:

[0609]

DIVMTQSHKLMSTSVGDGLSITCKAS**QDV**SI**AVV**WYQQKPGQSPKLLIY**SAS**FRYTGVDPD
RFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC**QQHYSIPWT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:
18)。

[0610] SEQ ID NO:18是抗体34F4的轻链可变(V_L)结构域的氨基酸序列。由IMGT编号系统[Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Research,27,209-212(1999)]确定的互补决定区(CDR)以加下划线示出。由Kabat编号系统确定的CDR以粗体显示。

[0611] 表9.34F4VH和VL CDR序列

[0612]

抗体	CDR-1	CDR-2	CDR-3
34F4 VH (IMGT 编号)	GFSLNTSGMG (SEQ ID NO: 11)	IWWDDVK (SEQ ID NO: 12)	ARIEGDTYYDYFDY (SEQ ID NO: 13)
34F4 VL (IMGT 编号)	QDV SI A (SEQ ID NO: 14)	SAS (SEQ ID NO: 15)	QQHYSIPWT (SEQ ID NO: 16)
34F4 VH (Kabat 编号)	TSGMGVG (SEQ ID NO: 31)	HIWWDDVKRYNPALKS (SEQ ID NO: 32)	IEGDTYYDYFDY (SEQ ID NO: 33)
34F4 VL (Kabat 编号)	KASQDV SI AVV (SEQ ID NO: 34)	SAS FRYT (SEQ ID NO: 35)	QQHYSIPWT (SEQ ID NO: 36)

[0613] 图8显示了单克隆抗体34F4的V_L CDR环[Lefranc,M.-P.et al.,Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003)]。阴影圆圈(残基编号4、11、19、21、23、25、40、41、52、53、54、71、76、87、89、91、94、96、100、101)是框架1-3中的疏水(非极性的)残基,其在大部分抗体中的疏水位点。正方形是每个CDR开始和结束时的关键残基。框架中的氨基酸残基编号23、41、89、104、118是结构上保守的氨基酸。

[0614] 实施例6

[0615] 编码抗体34F4的可变结构域的核酸序列

[0616] 编码单克隆抗体34F4的VH结构域的核酸序列如图7和下文所示:

[0617]

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGG
GTTTTCACTGAACACTTCTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTTCGTCAGCCATCAGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGACAC

ACATTTGGTGGGATGATGTCAAGCGCTATAATCCAGCCCTGAAGAGCCGACTGACTATCTCCAAGGATACCTCCAGCAGCCAGGTATTCTCAAGATCGCCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAATAGAGGGGA TACTTACTACGACTATTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCGTCACTCTCACAGTCTCCTCAG (SEQ ID NO:19)。

[0618] 核酸BLAST比对显示编码单克隆抗体34F4的VH结构域的核酸序列与下列种系基因的序列具有显著同一性:IGHV8-8*01、IGHV8-12*01、IGHV8-11*01、IGHD1-1*01、IGHD1-2*01、IGHD2-3*01、IGHJ2*01、IGHJ2*02、IGHJ2*03。

[0619] 图12显示编码34F4抗体的VH结构域的核酸序列与其最高种系基因匹配的比对。图12显示包含34F4VH区的核苷酸1-301的部分(其包含重链框架区FR1、FR2和FR3)与V基因IGHV8-8*01的核酸序列具有94.4%的核酸序列同一性。

[0620] 表10.34F4VH和IGHV8-8*01之间的比对总结

[0621]

	长度	匹配	错配	间隔	同一性(%)
FR1-IMGT	75	75	0	0	100
CDR1-IMGT	30	28	2	0	93.3
FR2-IMGT	51	49	2	0	96.1
CDR2-IMGT	21	19	2	0	90.5
FR3-IMGT	114	103	11	0	90.4
CDR3-IMGT (种系)	10	10	0	0	100
总数	301	284	17	0	94.4

[0622] 编码单克隆抗体34F4的VL结构域的核酸序列如图9和下文所示:

[0623]

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAACCTCATGTCCACATCAGTTGGAGACGGGCTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGCATTGCTGTAGTCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTGCTGATTTACTCGGCATCCTTCCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATAGTATTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC (SEQ ID NO:20)。

[0624] 核酸BLAST比对显示编码单克隆抗体34F4的VL结构域的核酸序列与下列种系基因的序列具有显著同一性:IGKV6-17*01、IGKV6-25*01、IGKV6-23*01、IGKJ1*01、IGKJ1*02、IGKJ2*01。

[0625] 图13显示编码34F4抗体的VL结构域的核酸序列与其最高种系基因匹配的比对。图13显示包含34F4VL区的核苷酸1-284的部分(其包含轻链框架区FR1、FR2和FR3)与V基因IGKV6-17*01的核酸序列具有94.7%的核酸序列同一性。

[0626] 表11.34F4VL和IGKV6-17*01之间的比对总结

[0627]

	长度	匹配	错配	间隔	同一性(%)
FR1-IMGT	78	74	4	0	94.9
CDR1-IMGT	18	16	2	0	88.9
FR2-IMGT	51	49	2	0	96.1
CDR2-IMGT	9	9	0	0	100

FR3-IMGT	108	107	1	0	99.1
CDR3-IMGT (种系)	20	19	1	0	95
总数	284	274	10	0	96.5

[0628] 实施例7

[0629] 与17B4拮抗性单克隆抗体相比,激动性13E2和34F4单克隆抗体与LAG-3⁺转染的原代细胞的结合

[0630] 将来自健康供体的LAG-3⁺转染的CHO细胞或SEB刺激的PBMC与抗LAG-3单克隆抗体或同种型对照(mIgG1)在4℃下在PBS、0.5%BSA、0.1%叠氮化物中孵育30分钟。洗涤细胞,通过FITC缀合的山羊F(ab')₂-抗小鼠Ig(H+L)(Coulter)显示细胞结合的抗体。将二抗洗掉,并通过流式细胞术直接分析CHO细胞。使用CD4-PE-Cy7和CD8-APC-Cy7对PBMC进行表型分型。

[0631] 与CHO LAG-3⁺细胞结合

[0632] 结果表示为作为抗体浓度的函数的、用人LAG-3编码质粒转染的CHO细胞的荧光强度(MFI)的平均值。其结果展示于下表12和图14中。

[0633] 表12.与CHO LAG3⁺的结合

[0634]

(ug/mL)	mIgG1	17B4	13E2	34F4
10000	440	6087	6578	6618
2000	251	5477	6904	6411
500	168	4759	6069	4988
100	nd	3170	4583	3653
20	nd	1378	2475	1763
6	nd	549	925	693
1	nd	247	379	329
0.4	nd	179	222	222
0	156	156	156	156

[0635] nd=未测定。

[0636] 基于表12中的结果,每种抗体与表达LAG-3的CHO细胞结合的EC₅₀值为:17B4:0.7nM;13E2:0.3nM;34F4:0.5nM。

[0637] 来自四个独立实验(数据未显示)的每种抗体与表达LAG-3的CHO细胞结合的平均EC₅₀值为:17B4:0.7nM;13E2:0.4nM;34F4:0.5nM。

[0638] 来自四次独立实验的13E2EC₅₀值的平均值是17B4EC₅₀值的平均值的2.7倍。

[0639] 来自四次独立实验的34F4EC₅₀值的平均值是17B4EC₅₀值的平均值的1.6倍。

[0640] 与SEB刺激的PBMC的结合

[0641] 结果表示为作为抗体浓度的函数的、用0.5μg/ml SEB刺激3天的供体(供体1)的PBMC的CD4⁺或CD8⁺细胞上的荧光强度的平均值。结合供体1的CD4⁺和CD8⁺细胞的结果显示在下面的表13和图15中。

[0642] 表13.在CD4和CD8(供体1)上的结合

[0643]

CD4					CD8				
抗体 ng/ml	mIgG1	17B4	13E2	34F4	ng/ml	mIgG1	17B4	13E2	34F4
10000	116	1598	1947	1787	10000	140	5142	5107	4719
2326	113	1944	1869	1662	2326	137	4826	4850	4455
541	116	1746	1601	1590	541	120	4092	4359	3867
126	109	1239	1491	1384	126	115	2837	3677	3302
29	108	675	1160	1139	29	110	1397	2432	2332
7	110	324	600	621	7	114	606	1131	1183
1.6	127	192	272	282	1.6	116	309	458	446
0.4	106	143	165	169	0.4	112	195	232	288
0	106	106	106	106	0	112	112	112	112

[0644] 基于表13中给出的结果,每种抗体与CD4⁺细胞结合的EC₅₀值为:17B4:0.5nM;13E2:0.1nM;34F4:0.1nM。

[0645] 来自三个供体(数据未显示)的与CD4⁺细胞结合的每种抗体的平均EC₅₀值为:17B4:0.8nM;13E2:0.2nM;34F4:0.2nM。

[0646] 来自三个供体的13E2和34F4CD4⁺EC₅₀值的平均值是17B4EC₅₀值的平均值的3.8倍。基于表13中给出的结果,每种抗体与CD8⁺细胞结合的EC₅₀值为:17B4:0.7nM;13E2:0.3nM;34F4:0.2nM。

[0647] 来自三个供体(数据未显示)的与CD8⁺细胞结合的每种抗体的平均EC₅₀值为:17B4:1nM;13E2:0.4nM;34F4:0.5nM。

[0648] 来自三个供体的13E2和34F4CD8⁺EC₅₀值的平均值是17B4EC₅₀值的平均值的2.5倍。结果显示13E2和34F4单克隆抗体以与17B4相比更高的亲和力各自与表达LAG-3⁺的CHO细胞结合以及与CD4⁺-T细胞和CD8⁺-T细胞结合。

[0649] 芯片上的LAG-3Ig和运行缓冲液中的17B4抗体的Biacore分析得到以下结果:

[0650] k_a (1/Ms) 1.09×10^6

[0651] k_d (1/s) 1.32×10^{-4}

[0652] KD (M) 1.21×10^{-10}

[0653] 芯片上的17B4抗体和运行缓冲液中的LAG-3Ig的Biacore分析得到以下结果:

k_a (1/Ms) 2.22×10^5

k_d (1/s) 8.18×10^{-4}

[0654] KA (1/M) 2.71×10^8

KD (M) 3.69×10^{-9}

[0655] 实施例8

[0656] 通过13E2和34F4抑制IMP321 (LAG-3Ig) 与MHC II类阳性细胞的结合

[0657] 在将缀合物(4℃下1μg/ml)与抗LAG-3单克隆抗体(13E2、34F4或17B4)或同种型对照(mIgG1)预孵育之后,测定IMP321缀合物(LAG-3Ig-Alexa 488)与MHC II类阳性B细胞(Raji细胞)的结合。使用荧光激活细胞分选(FACS)进行细胞结合荧光的分析。作为抗体浓度的函数的、对应于细胞结合的LAG-3Ig的平均荧光强度(MFI)显示于下表14和图16A中。

[0658] 表14.sLAG-3Ig-Alexa 488的MEI

[0659]

抗体 (ng/ml)	mIgG1	17B4	13E2	34F4	比例 Ab: IMP321- Alexa (1 μ g/ml)
11000	328	-11	-2	-7	10: 1
3300	359	13	20	18	3: 1
990	361	35	37	35	1: 1
297	373	73	51	46	0.3: 1
89	324	214	179	185	0.1: 1
27	254	260	207	258	0.03: 1
0	284	284	284	284	

[0660] 结果显示,通过与每种LAG-3特异性单克隆抗体预温育,抑制了IMP321与Raji细胞的结合。

[0661] 实施例9

[0662] 通过13E2和34F4抑制IMP321 (LAG-3Ig) 诱导的单核细胞活化

[0663] 将混合物与THP-1细胞在37℃下孵育4小时之前,将IMP321 (20ng/ml) 与抗LAG-3单克隆抗体13E2、34F4或17B4或同种型对照 (mIgG1) 在37℃下预孵育5分钟。THP-1细胞分泌的CCL4的量用于确定单核细胞活化水平。

[0664] 作为Ab浓度的函数的CCL4浓度 (以pg/ml表示) 显示于下表15和图16B中。

[0665] 表15. 在THP-1单核细胞上清液中读出 [CCL4] (pg/ml)

[0666]

抗体 (ng/ml)	mIgG1	17B4	13E2	34F4	比例 Ab: IMP321- Alexa (20ng/ml)
20000	2901	860	97	130	1000: 1
2000	2261	947	77	111	100: 1
200	2222	860	94	135	10: 1
20	2145	1548	224	338	1: 1
2	2052	1963	1661	1798	0.10: 1
0	2112	2112	2112	2112	

[0667] 结果显示,IMP321诱导的单核细胞活化受到IMP321与拮抗性抗LAG-3单克隆抗体17B4的预孵育以及与激动性单克隆抗体13E2和34F4的预孵育的抑制。

[0668] 从这些结果和从实施例8的结果可以推断,激动性单克隆抗体13E2和34F4,像拮抗性17B4单克隆抗体一样,与LAG-3的MHC II类结合位点相互作用或接近,如它们阻断LAG-3Ig (IMP321) 的结合和活性的能力所示。

[0669] 实施例10

[0670] 与17B4相比,13E2和34F4对T细胞增殖的抑制

[0671] 用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 标记来自3个健康供体的PBMC (0.2×10^6 个细胞/孔, 1×10^6 /ml, 在完全RPMI+10%FBS中), 并在存在单克隆抗体抗LAG-3抗体13E2、34F4、17B4或同种型对照 (mIgG1) (超最佳剂量, 对供体#1和#2为300ng/ml, 对供体#3为100ng/ml) 的情况下,用覆盖CMV pp35序列的肽库孵育所述PBMC。

[0672] 通过在第5天测量CD4⁺或CD8⁺T细胞的基于CFSE的增殖来研究T细胞应答。图17 (A) 中显示了在每种不同抗体存在下供体#1的CD8⁺T细胞的FACS图谱以及设门策略。图17 (B) 显示了对于同一供体,作为细胞分裂的函数的、在每个分裂峰下的CD8⁺T细胞的百分比。在下面表16中展示三个供体的结果。还测量了没有抗原肽的基线增殖 (无刺激) (参见图17 (A) 最下图和表16)。供体#1的CD4⁺T细胞不显示任何CMV特异性增殖,因此不包括该种群的结果。

[0673] 表16. 在每个分裂峰下CD4⁺和CD8⁺T细胞的百分比

分裂编号	1	2	3	4	5	6	7
供体#1 CD8⁺							
mIgG1	0.68	0.54	1.28	2.20	1.50	1.22	0.78
17B4	0.84	1.02	1.81	2.82	2.22	2.10	1.51
13E2	1.02	0.41	0.61	0.67	0.39	0.36	0.31
34F4	1.16	0.68	1.32	1.22	0.66	0.52	0.27
无刺激	1.77	0.36	0.33	0.52	0.38	0.13	0.04
供体#2 CD4⁺							
mIgG1	1.90	2.26	2.67	1.84	0.78	0.20	0.18
17B4	1.87	2.44	2.47	1.72	0.69	0.17	0.14
13E2	1.72	1.89	2.04	1.35	0.64	0.21	0.16
34F4	1.61	1.88	2.01	1.34	0.60	0.16	0.15
无刺激	1.34	1.14	1.48	0.81	0.41	0.17	0.12
供体#2 CD8⁺							
mIgG1	1.24	1.72	2.54	3.37	1.28	0.37	0.24
17B4	1.24	1.79	2.57	3.30	1.13	0.37	0.17
13E2	1.27	1.35	1.83	2.14	0.75	0.22	0.14
34F4	1.25	1.47	1.95	2.17	0.86	0.25	0.23
无刺激	0.77	0.92	1.03	1.22	0.33	0.22	0.10

[0674]

供体#3 CD4⁺							
mIgG1	2.93	2.85	4.32	8.18	5.03	2.1	
17B4	2.95	2.8	4.51	9.9	6.71	2.81	
13E2	3.42	2.62	3.01	4.66	2.53	1.07	
无刺激	2.77	2.07	2.79	3.71	1.71	0.5	
供体#3 CD8⁺							
mIgG1	4.62	1.3	1.41	4.26	4.64	2.6	
17B4	4.74	1.63	1.56	4.24	4.56	2.67	
13E2	5.1	1.56	1.24	2.81	1.9	0.97	
无刺激	4.04	0.44	0.37	0.38	0.11	0.07	

[0675]

[0676] 表17提供了增殖指数 (PI) (计算为以下的总和: 每个分裂峰下的CD4⁺或CD8⁺T细胞的百分比乘以分裂编号)。该指数强调经历了多次分裂的细胞的百分比。表17还记录了与同种型对照 (mIgG1) 相比, 每种抗体基于PI值的抑制百分比。

[0677] 表17. 与17B4相比, 抗体13E2和34F4对CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖的影响

[0678]

供体 编号	抗体	PI (CD4)	%抑制 (CD4)	PI (CD8)	%抑制 (CD8)
1	mIgG1			34.64	
	17B4			53.80	-55
	13E2			12.60	64
	34F4			19.65	43
	无刺激			8.54	
2	mIgG1	28.16		36.09	
	17B4	26.52	6	34.77	4
	13E2	22.59	20	24.09	33
	34F4	21.76	23	26.13	28
	无刺激	15.20		14.25	
3	mIgG1	92.06		67.29	
	17B4	112.09	-22	68.46	-2
	13E2	55.40	40	38.50	43
	无刺激	41.67		8.52	

[0679] 结果显示,单克隆抗体13E2和34F4一直抑制由抗原肽诱导的CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖,而单克隆抗体17B4在测试浓度下往往具有较小的正面作用。

[0680] 实施例11

[0681] 13E2和34F4对T细胞增殖的抑制

[0682] 用CFSE标记来自12个健康供体的PBMC (0.2×10^6 个细胞/孔, 1×10^6 /ml, 在完全RPMI+10%FBS中), 并在存在单克隆抗体抗LAG-3抗体13E2、34F4或同种型对照 (mIgG1) 的情况下, 用覆盖CMV pp35序列的肽库孵育所述PBMC。

[0683] 通过在第5天测量CD4⁺或CD8⁺T细胞的基于CFSE的增殖来研究T细胞应答。使用图17(A)所示的设门策略, 计算作为细胞分裂的函数的、每个分裂峰下的CD4⁺或CD8⁺T细胞的百分比。还测量了没有抗原肽的基线增殖(无刺激)。供体#1、供体#5和供体#12的CD4⁺T细胞不显示任何CMV特异性增殖, 因此不包括该样品的结果。

[0684] 表18提供了每个供体的增殖指数(PI)(计算为以下的总和: 每个分裂峰下的CD4⁺或CD8⁺T细胞的百分比乘以分裂编号), 该结果示于图18中。表18还记录了每种抗体与同种型对照(mIgG1)相比的、基于PI值的抑制百分比。

[0685] 表18. 抗体13E2和34F4对CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖的影响

[0686]

供体编号	抗体	PI (CD4)	%抑制 (CD4)	PI (CD8)	%抑制 (CD8)
1	mlgG1			34.64	
	13E2			12.60	64
	34F4			19.65	43
	无刺激			8.54	
2	mlgG1	28.16		36.09	
	13E2	22.59	20	24.09	33
	34F4	21.76	23	26.13	28
	无刺激	15.20		14.25	
3	mlgG1	92.06		67.29	
	13E2	55.40	40	38.50	43
	无刺激	41.67		8.52	
4	mlgG1	10.10		43.05	
	13E2	8.83	13	19.27	55
	34F4	9.39	7	19.32	55
	无刺激	6.14		3.26	
5	mlgG1			11.01	
	13E2			7.00	36
	34F4			6.71	39
	无刺激			3.08	
6	mlgG1	14.56		78.19	
	13E2	6.30	57	15.56	80
	34F4	6.14	58	17.01	78
7	mlgG1	36.25		31.62	
	13E2	18.90	48	12.95	59

[0687]

	34F4	32.00	12	21.99	30
	无刺激	29.59		15.53	
8	mlgG1	6.20		10.96	
	13E2	4.32	30	6.77	38
	无刺激	2.60		4.48	
9	mlgG1	7.60		10.44	
	13E2	4.63	39	6.57	37
	无刺激	1.28		1.57	
10	mlgG1	15.80		75.10	
	34F4	11.70	26	25.50	66
	无刺激	17.00		6.60	
11	mlgG1	15.19		19.14	
	13E2	5.51	64	12.77	33
	34F4	4.96	67	1.73	91
12	mlgG1			20.69	
	13E2			10.71	48
	无刺激			10.71	

[0688] 供体#1、2、4、5、6、7、8、9:300ng/ml;供体#3:100ng/ml;供体#10、11、12:1000ng/ml

[0689] 这些结果的平均值列于表19中。

[0690] 表19. 抗体13E2和34F4对CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖的影响 (供体平均值)

抑制百分比 的平均值	用 13E2 测试的 11 个供体的平 均值	用 34F4 测试 的 8 个供体的 平均值	用两种抗体测试的 7 个供体的平均值	
			13E2	34F4
CD4	39%	36%	40%	33%
CD8	48%	55%	52%	52%

[0692] 结果显示,单克隆抗LAG-3抗体13E2和34F4抑制由抗原肽诱导的CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖。结果表明,每种抗体对CD8⁺T细胞的抑制作用可能比对CD4⁺T细胞更明显。在大多数测试供体中,13E2和34F4抗体的效果非常相似,因此所述抗体似乎具有彼此相当的活性。

[0693] 实施例12

[0694] 激动性抗体对CD8⁺T细胞增殖的剂量反应

[0695] 如上所述,在各种浓度的激动性抗LAG-3单克隆抗体13E2、34F4或同种型对照(mIgG1)存在下,通过CMV肽刺激CFSE标记的PBMC。

[0696] 通过在第5天测量CD8⁺T细胞的基于CFSE的增殖来研究T细胞应答。表20提供了增殖指数(计算为以下的总和:每个分裂峰下的CD8⁺T细胞的百分比乘以分裂编号)。

[0697] 表20. 13E2和34F4抗体对CD8⁺T细胞增殖的影响

抗体 (30 ng/ml)	增殖指数
mIgG1	69.9
13E2	26.2
34F4	16.4
无	95.3

[0699] 下表21记录了作为抗体浓度的函数的、CD8⁺T细胞增殖指数。表21的结果绘制于图19中。

[0700] 表21. 不同浓度的抗体对CD8⁺T细胞增殖的影响

抗体浓度 (ng/ml)	CD8 ⁺ T 细胞增殖指数		
	mIgG1	13E2	34F4
3000	82.9	17.6	14.9
952	72.9	13.7	10.5
302	69.9	16.4	26.2
96	65.3	19.6	13.7
30	87.4	14.4	22.8
10	78.2	50.4	46.2
3	77.8	59.2	66.6
0	95.3	95.3	95.3

[0702] 结果显示,剂量低至30ng/ml的单克隆抗LAG-3抗体13E2或34F4对CD8⁺T细胞增殖起到了最大的抑制作用。结果还显示所述抗体的效果非常相似。

[0703] 实施例13

[0704] 通过与IMP321一起预孵育来逆转34F4对CD8⁺T细胞增殖的抑制

[0705] 如上所述,在存在不同浓度的34F4抗体的情况下,通过CMV肽刺激来自2个供体的CFSE标记的PBMC。用10倍过量的IMP321中和后,还评估了1 μ g/ml剂量的34F4。

[0706] 通过在第5天测量CD8⁺T细胞的基于CFSE的增殖来研究T细胞应答。与具有或不具有IMP321的对照相比,基于34F4抗体、或34F4抗体和IMP321 (LAG-3Ig) 存在下观察到的分裂细胞百分比,计算CD8⁺T细胞增殖的抑制百分比。

[0707] 其结果展示于下表22中。

[0708] 表22. IMP321对34F4抗体抑制CD8⁺T细胞增殖的影响

[0709]

	供体#1			供体#2		
孵育条件	抗体浓度			抗体浓度		
	1000 ng/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	1000 ng/ml	100 ng/ml	10 ng/ml
34F4	64%	68%	44%	65%	35%	41%
34F4 + IMP321	0%	nd	nd	41%	nd	nd

[0710] 结果显示,34F4抗体与IMP321的预孵育逆转了34F4抗体对CD8⁺T细胞增殖的抑制作用。这表明,由34F4介导的对CD8⁺T细胞增殖的抑制依赖于34F4抗体与LAG-3的结合。

[0711] 实施例14

[0712] IL-2不能逆转13E2和34F4对CD8⁺T细胞增殖的抑制作用

[0713] 如上所述,在13E2或34F4抗体存在下,有或无IL-2,通过CMV肽刺激CFSE标记的PBMC。

[0714] 通过在第5天测量CD8⁺T细胞的基于CFSE的增殖来研究T细胞应答。与具有或不具有IL-2的同种型对照相比,在具有或不具有IL-2时基于13E2或34F4抗体存在下观察到的分裂细胞百分比,计算CD8⁺T细胞增殖的抑制百分比。

[0715] 其结果展示于下表23中。

[0716] 表23. IL-2对13E2和34F4抗体抑制CD8⁺T细胞增殖的影响

抗体	CD8 ⁺ T 细胞增殖的抑制百分比	
	无 IL-2	有 IL-2
13E2	38%	44%
34F4	59%	64%

[0719] 结果显示,加入外源IL-2不能克服13E2或34F4抗体对CD8⁺T细胞增殖的抑制作用。

从这些结果得出结论,抗体13E2和34F4各自直接抑制CD8⁺T细胞中的信号1(对CMV抗原的应答,T细胞受体依赖性途径)而不是信号2(对IL-2的应答,该IL-2是来自CD4细胞的辅助)。

[0720] 实施例15

[0721] 13E2对T细胞活化标记物分泌的影响

[0722] 外周血单核细胞(PBMC)包括淋巴细胞(T细胞、B细胞和NK细胞)、单核细胞和树突细胞。IFN- γ 主要由活化的CD4⁺和CD8⁺记忆和效应T细胞分泌,并在激活后由NK细胞分泌。用体外特异性抗原重新刺激后,IFN- γ 的分泌被诱导。

[0723] 用CFSE标记来自4个健康供体的PBMC(0.2×10^6 个细胞/孔, 1×10^6 /ml,在完全RPMI+10%FBS中),并在存在单克隆抗LAG-3抗体13E2或同种型对照(mIgG1)的情况下,用覆盖CMV pp35序列的肽库孵育。通过在第2天测量细胞上清液中IFN- γ 的释放来研究T细胞应答。下表24列出了IFN- γ 的浓度和13E2对IFN-分泌的抑制百分比。

[0724] 表24

供体	激动剂/ 对照	[IFN] (pg/ml)
供体 1	mIgG1	297
	13E2	226
	%抑制	24%
供体 2	mIgG1	1043
	13E2	255
	%抑制	76%
供体 3	mIgG1	499
	13E2	91
	%抑制	82%
供体 4	mIgG1	1151
	13E2	75
	%抑制	93%

[0726] 结果显示,单克隆抗体13E2在每个测试供体中抑制IFN- γ 的分泌。这提供了单克隆抗体13E2抑制T细胞活化的证据。

[0727] 实施例16

[0728] 13E2和34F4对T细胞活化标记物表达的影响

[0729] 用CFSE标记来自4个健康供体的PBMC(0.2×10^6 个细胞/孔, 1×10^6 /ml,在完全RPMI+10%FBS中),并在存在单克隆抗LAG-3抗体13E2或34F4或同种型对照(mIgG1)的情况下,用覆盖CMV pp35序列的肽库孵育。

[0730] 通过在第5天测量CD8⁺T细胞上作为活化标记物的CD25的表达来研究T细胞应答。下表25显示了表达CD25的CD8⁺T细胞的百分比以及13E2或34F4对CD25表达的抑制百分比。

[0731] 表25

[0732]

供体	激动剂/ 对照	CD8 ⁺ T 细胞中的 CD25 ⁺ %
供体 1	mIgG1	3,5
	13E2	1,2
	%抑制	66%
供体 2	mIgG1	6,6
	13E2	5
	%抑制	24%
供体 3	mIgG1	27,5
	34F4	8,8
	%抑制	68%
供体 4	mIgG1	9,2
	34F4	7,0
	%抑制	24%

[0733] 结果显示,每种单克隆抗体13E2和34F4均显著抑制CD8⁺T细胞上CD25的表达。这为每种抗体抑制CD8⁺T细胞活化提供了证据。

[0734] 实施例17

[0735] 嵌合13E2-人抗体序列

[0736] 编码13E2重链和轻链的小鼠可变区的核苷酸序列分别与编码人IgG4重链和κ轻链的恒定区的序列融合。将这些合成的嵌合序列亚克隆到表达载体中,并在悬浮液中生长的CHO细胞中表达。

[0737] 嵌合13E2-人IgG4Fc抗体的重链氨基酸序列显示如下,并在图20 (A) 中显示。所述抗体包含小鼠单克隆抗体13E2的V_H结构域和具有S228P突变(以消除Fab臂交换)的人IgG4Fc部分(13E2IgG4mut)。在图中,V_H区以粗体显示,并且Fc区为突出显示。

[0738] 13E2IgG4mut

[0739]

MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGLGWIRQPSGKGLEWLTHIWWDDI
KRYNPDLRSRLTISKDTSSSQIFLKIASVDTADTATYYCARIVEGSYSSSYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLA
PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKP
SNTKVDKRVESKYGPPCPPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVSVLTIVLHQLDNLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSLGK (SEQ ID NO:30)

[0740] 嵌合13E2-人IgK抗体的轻链氨基酸序列如下所示,并且在图20 (B) 中显示。所述抗体包含单克隆抗体13E2的V_L结构域和野生型人Igκ (IgK) 链C部分(13E2IgK)。图中,V_L区以粗体显示,而IgK区为突出显示。

[0741] 13E2IgK

[0742]

MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQPHKFMSTSVEDRVTITCKASQDVIFDVAWYQQKPGQSPKLLIYSASSRVSG
VPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPYTFGGGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID NO:37)

[0743] 嵌合13E2-人抗体(称为Chim13E2IgG4)包含嵌合重链和轻链:13E2IgG4mut;和13E2IgK。

[0744] 实施例18

[0745] 人源化13E2单克隆抗体(IMP761)序列

[0746] 为了最佳地保留CDR-环构象,使用组合的IMGT/Kabat CDR序列识别来将来自小鼠13E2的CDR移植到人框架上以获得人源化形式的13E2。将这些合成的嵌合序列亚克隆到表达载体中,并在生长于悬浮液中的CHO细胞中表达。

[0747] 下面显示了人源化13E2单克隆抗体(称为IMP761)的重链和轻链氨基酸序列。可变结构域以粗体显示,CDR序列以加下划线示出。

[0748] IMP761重链的氨基酸序列

[0749]

MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGLGWIRQ
PPGKTLEWLTHIWWDDIKRYNPDLRSRLSITKDTSKNQVLTMTNMDPLDTGTYYCARI
EGSYSSSYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID

NO: 84)

[0750] 该序列(IMP761重链)与实施例17的嵌合重链序列13E2IgG4mut的比对示于图23中。图中,V_H区以粗体显示,且Fc区为突出显示。不同于嵌合13E2IgG4mut序列的相应残基的人源化IMP761序列的氨基酸残基以加单下划线示出。CDR序列(基于组合的IMGT/Kabat CDR序列识别)以加双下划线示出。人源化序列中改变的残基也在下表26中列出(作为VH变体4,VH₄,以及原始13E2重链序列的三个其他人源化变体中改变的残基:VH变体1、2和3,VH₁、VH₂和VH₃)。

[0751] 表26

[0752]

重链残基编号	13E2 小鼠重链残基	人源化残基			
		VH ₁	VH ₂	VH ₃	VH ₄ (IMP761)
21	V		I	I	I
26	S			T	
29	G	A	A	T	T
30	I	L	L	L	L
31	L	V	V	V	V
32	Q	K	K	K	K
34	S	T	T	T	T
38	S	T	T	T	T
42	S	T		T	T
62	S	P	P	P	P
65	G	A	A	A	T
69	L			V	
70	T	A	A		
88	L			V	
89	T				S
91	S			R	T
96	S	K	K	K	K
97	S		N	N	N
99	I	V	V	V	V
100	F	I	V	A	V
102	K	N	T	T	T
103	I	M	M	M	M
104	A	T		T	T
105	S	N	N	N	N
106	V	M	M	M	M
108	T	P	P	P	P
109	A	V	V	L	L
112	A			G	G
134	A	Q	Q	Q	Q
137	T			L	L

[0753] 人源化抗体(抗体IMP761)的重链框架序列是:

[0754] VH FR1:QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS (SEQ ID NO:64);

[0755] VH FR2:WIRQPPGKTLEWLT (SEQ ID NO:65);

[0756] VH FR3:RLSITKDTSKNQVVLMTNMDPLDTGTYYC (SEQ ID NO:66);和

[0757] VH FR4:WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:67)。

[0758] IMP761轻链的氨基酸序列

MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQTPSSLSASVGDRVTITCKASQDVIFDVAWYQQRPGQAPKLLIYSASSRVSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPYTFGG

GTRLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ

ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)

[0760] 该序列 (IMP761轻链) 与实施例17的嵌合轻链序列13E2IgK的比对示于图24中。图

中,VL区以粗体显示,且IgK区为突出显示。不同于嵌合13E2IgK序列的相应残基的人源化IMP761序列的氨基酸残基以加单下划线示出。CDR序列(基于组合的IMGT/Kabat CDR序列识别)以加双下划线示出。人源化序列中改变的残基在下表27中列出(作为VL变体3,VH₃,以及原始13E2重链序列的三个其他人源化变体中改变的残基:VL变体1、2和4,VL₁、VL₂和VL₄)。

[0761] 表27

轻链残基编号	13E2 小鼠轻链残基	人源化残基			
		VL ₁	VL ₂	VL ₃ (IMP761)	VL ₄
21	D				E
23	V		Q		
24	M				L
27	P	S	S	T	S
28	H	P	P	P	P
29	K	D	S	S	D
30	F	S	S	S	S
31	M	L	L	L	L
32	S	A			A
33	T	V	A	A	V
35	V	L			L
36	E	G	G	G	G
37	D	E			E
39	V	A			A
59	K			R	
60	P				A
63	S	P	A	A	
69	Y		F		
80	D		S	S	
83	T	S	S	S	S
93	F	L	L	L	L
96	S				D
98	V	L	L	L	L
100	A		P	P	
103	L	V	F	F	V
105	V		T	T	
120	G	Q	Q	Q	
123	T	K	K	R	K
124	L		V		V
125	E			D	

[0764] 人源化抗体(抗体IMP761)的轻链框架序列是:

[0765] VL FR1:DIVMTQTPSSLSASVGDRVITTC(SEQ ID NO:64);

[0766] VL FR2:WYQQRPGQAPKLLIY(SEQ ID NO:65);

[0767] VL FR3:GVPSRFSGSGGTDFTLTSSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:66);和

[0768] VL FR4:FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:67)

[0769] 实施例19

[0770] 嵌合13E2-人抗体 (Chim13E2IgG4) 和人源化13E2抗体 (IMP761) 与CHO-LAG-3⁺细胞的结合

[0771] 在其表面上表达LAG-3的CHO细胞 (0.05×10^6 个细胞/孔, 在PBS、0.5% BSA、0.1% 叠氮化物中) 与不同浓度的嵌合13E2-人抗体 (称为Chim13E2IgG4) 一起孵育, 所述嵌合13E2-人抗体包含实施例17中所述的嵌合重链和轻链 (重链: 13E2IgG4mut; 轻链: 13E2IgK)、IMP761或人IgG4 (作为同种型匹配的阴性对照)。使用二抗山羊抗人IgG-FITC来检测CHO-LAG-3⁺细胞表面上抗体的存在。通过流式细胞术分析后, 确定FITC平均荧光强度 (MFI)。

[0772] 其结果展示于下表28和图25中。

[0773] 表28

	MFI FITC CHO 细胞			
	ng/ml	Chim13E2IgG4	IMP761	hulgG4
[0774]	6000	2039	2086	71
	1905	2024	1989	77
	605	1874	1821	46
	192	1580	1429	59
	61	1058	898	69
	20	593	460	49
	6	279	234	37
	0	35	35	35

[0775] 结果显示, 人源化单克隆抗体IMP761以与嵌合抗体非常相似的方式结合至表达LAG-3的CHO细胞。

[0776] 实施例20

[0777] 嵌合13E2-人抗体 (Chim13E2IgG4) 和人源化13E2抗体 (IMP761) 与人LAG-3Ig蛋白的结合亲和力

[0778] 使用嵌合抗体Chim13E2IgG4 (包含实施例17中描述的嵌合重链13E2IgG4mut和嵌合轻链13E2IgK) 或实施例18中描述的人源化13E2抗体 (IMP761) 进行BiacoreTM表面等离子体共振分析, (将所述抗体) 共价固定至C1传感器芯片。在10mM乙酸钠、pH 5.0中进行涂层, 以达到 13 ± 1 RU。然后将在0.078-2.5nM的范围内的6个不同的浓度的重组人LAG-3Ig蛋白 (IMP321) 在25℃的分析缓冲液 (10mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% 吐温20) 中通过捕获的抗体, 并在每个循环中再生。该分析在BiacoreTM T200上进行, 数据用动态全局拟合 (Langmuir 1:1) 模型进行拟合。动力学参数记录在表29中, 并表示三次运行的平均值。

[0779] 表29

[0780]

抗体	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (pM)
Chim13E2IgG4	$2.9 \pm 0.2 \times 10^7$	$6.4 \pm 0.6 \times 10^{-4}$	21.9 ± 0.1
IMP761	$2.9 \pm 0.2 \times 10^7$	$6.6 \pm 0.6 \times 10^{-4}$	22.8 ± 0.9

[0781] 结果显示人源化单克隆抗体IMP761与嵌合抗体对人LAG-3Ig蛋白具有相同的亲和

力。两种抗体均显示非常快速的结合速率,这解释了13E2衍生的抗体对LAG-3的高亲和力。

[0782] 实施例21

[0783] 人源化13E2抗体 (IMP761) 对由抗原刺激诱导的CD8⁺T细胞增殖和CD25表达的影响
将来自健康供体的CFSE标记的PBMC (0.2×10^6 个细胞/孔, 在完全RPMI+10%FBS中) 用覆盖CMV pp35序列的肽库孵育一式三份, 用300ng/ml 人IgG4 (同种型对照) Chim13E2IgG4或IMP761一起孵育。通过测量增殖来评估T细胞应答, 使用增殖指数 (通过每个分裂峰下的CD8⁺T细胞的百分比乘以分割数的和计算) 评估增值, 以及在第5天通过流式细胞术评估CD25的表达。基于增殖指数值或CD8⁺T细胞群内CD25⁺T细胞的百分比, 计算每种抗体与同种型匹配的阴性对照 (huIgG4) 相比的抑制百分比。

[0784] 在下面表30和31以及图26和27中展示其结果。

[0785] 表30

[0786]

增殖指数			
		PI (CD8)	%抑制
供体 1	hulG4	8.3	
	Chim13E2IgG4	3.6	56.6
	IMP761	3.9	53.0
供体 2	hulG4	29.4	
	Chim13E2IgG4	17.7	39.8
	IMP761	10.9	62.9
供体 3	hulG4	3.7	
	Chim13E2IgG4	0.8	78.4
	IMP761	1.4	62.2
供体 4	hulG4	9.7	
	Chim13E2IgG4	4.5	53.6
	IMP761	3.6	62.9
平均值	hulG4	12.8	
	Chim13E2IgG4	6.7	57.1
	IMP761	5.0	60.2

[0787] 表31

[0788]

CD8 ⁺ T 细胞中的 CD25 表达			
		%CD25	%抑制
供体 1	hulG4	3.3	
	Chim13E2IgG4	1.7	48.5
	IMP761	2.1	36.4
供体 2	hulG4	15.1	
	Chim13E2IgG4	9.6	36.4
	IMP761	6.9	54.3
供体 3	hulG4	3.3	
	Chim13E2IgG4	1.3	60.6
	IMP761	2.2	33.3
供体 4	hulG4	5.1	
	Chim13E2IgG4	2.8	45.1
	IMP761	2.3	54.9
平均值	hulG4	6.7	
	Chim13E2IgG4	3.9	47.7
	IMP761	3.4	44.7

[0789] 结果显示,人源化单克隆抗体IMP761与嵌合抗体Chim13E2IgG4具有相似的对抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖和CD25⁺表达的抑制作用。两种抗体均导致抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖平均约60%的抑制,以及CD8⁺T细胞群内的CD25⁺T细胞约45%的抑制。

[0790] 实施例22

[0791] 不同剂量的嵌合13E2-人抗体 (Chim13E2IgG4) 和人源化13E2抗体 (IMP761) 对CD8⁺T细胞应答的影响

[0792] 将来自健康供体的CFSE标记的PBMC (0.2×10^6 个细胞/孔,在完全RPMI+10%FBS中)用覆盖CMV pp35序列的肽库孵育一式三份,用不同剂量的Chim13E2IgG4、IMP761或人IgG4(同种型匹配的阴性对照)一起孵育。在第5天通过流式细胞术测量增殖(CFSE稀释)来评估T细胞应答。计算所使用的不同抗体剂量的每个分裂数的CD8⁺T细胞百分比。

[0793] 结果展示在下面表32和图28中。

[0794] 表32

抗体浓度 (ng/ml)	抗体	细胞分裂						
		1	2	3	4	5	6	7 及更多
10	hulG4	2.3	5.1	5.9	3.7	1.6	0.5	0.3
	Chim13E2IgG4	1.9	4	4.4	2.6	1.1	0.4	0.1
	IMP761	2.2	2.6	3.5	2.1	0.9	0.3	0
30	hulG4	2.1	4.9	5.4	2.4	1.2	0.3	0.2
	Chim13E2IgG4	2.1	3.4	3.4	2	0.9	0.2	0.1
	IMP761	1.5	2.3	2.5	1.5	0.7	0.1	0
100	hulG4	1.9	4.3	4.4	2	0.6	0.3	0
	Chim13E2IgG4	1.2	1.4	1.9	0.9	0.6	0.2	0
	IMP761	1.4	1.6	1.7	0.9	0.3	0.1	0
300	hulG4	2.9	5.5	5.8	2.4	1.1	0.2	0.1
	Chim13E2IgG4	1.5	2.1	2.4	1.5	0.7	0.1	0.1
	IMP761	1.4	1.9	2.1	1.2	0.6	0.2	0.1
	无刺激	1.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0

[0796] 结果显示,IMP761和Chim13E2IgG4对抗原诱导的CD8⁺T细胞增殖的抑制作用呈剂量依赖性。特别地,随着剂量从10ng/ml增加到100ng/ml抗体,每种抗体的抑制作用增加。在300ng/ml抗体下,抑制效果与100ng/ml抗体相似。在所有测试剂量下,IMP761的抑制作用均与Chim13E2IgG4相似。

[0797] 实施例23

[0798] 人源化13E2抗体(IMP761)对表达LAG-3的细胞不具有细胞毒性

[0799] 使用几种类型的测定法来确认人源化13E2抗体(IMP761)对表达LAG-3的细胞不具有细胞毒性。

[0800] 1) ADCC报告生物测定(Promega,G7015)

[0801] 在该测定中,将原代供体PBMC或NK细胞替换为稳定表达人Fc γ RIIIa(高亲和力V158受体)的Jurkat细胞和驱动萤光素酶报告基因表达的NFAT应答元件。如果测试抗体具有ADCC活性,则它将会把靶细胞和Jurkat细胞的Fc γ RIIIa受体结合在一起。Fc γ RIIIa受体下游信号传导通路的活化导致NFAT通路活化,从而诱导萤光素酶报告基因的表达。萤光素酶活性通过发光读数来量化。

[0802] 将LAG-3转染的CHO和Jurkat细胞以及由SEB刺激2天以引起LAG-3表达的PBMC(55%的PBMC为LAG-3⁺)用作靶细胞,以测定IMP761的ADCC活性,将其与同种型匹配的阴性对照抗体hIgG4(来自BioRad的重组mAb)进行比较。使用测定试剂盒提供的抗CD20抗体和Raji细胞作为阳性对照。还在SEB刺激的PBMC上测试抗CD20抗体。按照制造商的说明进行测定,使用75,000个效应细胞和12,500个靶细胞。在37℃下孵育6小时后,根据制造商的说明书,使用Bio-Glo萤光素酶测定系统,利用PerkinElmer EnVision 2103光度计(积分时间为0.5秒/孔)测量发光。

[0803] 结果展示在下面表33和图29(a)中。结果表示为相对发光单位(RLU)的倍数变化,其通过将存在测试抗体(以制造商推荐的最大浓度,3 μ g/ml)情况下获得的RLU除以没有抗体获得的RLU来计算。

[0804] 表33

[0805]		RLU 倍数变化		
	靶细胞	抗 CD20	hIgG4	IMP761
	Raji	36,8		
	CHO-LAG3 ⁺		1,4	1,1
	野生型 Jurkat		2,3	0,9
	Jurkat-LAG3 ⁺		2,5	1,2
	LAG3 ⁺ PBMCs	5,0	1,9	1,3

[0806] 结果显示,不管靶细胞是否表达LAG-3,对于每种不同的测试靶细胞,IMP761抗体的RLU倍数变化约为1倍。获得的同种型匹配的阴性对照抗体hIgG4的RLU倍数变化略高,是不同的靶细胞的1.4-2.5倍。阳性对照抗CD20抗体对Raji细胞(B细胞系)和对含有少量百分比的B细胞的SEB刺激的PBMC显示出显著的ADCC活性。

[0807] 从这些结果得出结论,IMP761抗体对表达LAG-3的细胞的不具有任何ADCC活性。

[0808] 2) 常规ADCC测定

[0809] 所述测定使用在X-Vivo 10培养基(Lonza)中用100IU/ml的IL-2(Roche)刺激1天的PBMC,用CFSE标记PBMC,用SEB刺激2天以允许T细胞上的LAG-3表达。所述测定在X-Vivo 10培养基中以50:1的效应细胞:靶细胞比例进行,其具有高剂量(3μg/ml)的IMP761或同种型匹配的阴性对照抗体hIgG4。4小时后,收集细胞混合物并使用荧光染料缀合的抗体对CD4、CD8、CD25和LAG-3进行染色。然后通过流式细胞术评估每个血细胞群的细胞存活率,排除了对7-氨基-放线菌素D(7-AAD)染色呈阳性的细胞后,通过荧光染料来评估所述细胞存活率,该荧光染料标记失去膜完整性的细胞,该现象在细胞死亡后迅速出现。

[0810] 结果展示在表34以及图29(b)和(c)中。结果表示为PBMC种群中活CD4⁺或CD8⁺细胞的百分比(b),以及PBMC种群中活LAG-3⁺CD4⁺或LAG-3⁺CD8⁺细胞的百分比(c)。

[0811] 表34

[0812]

	在 PBMC 种群中活 CD8 ⁺ 或 CD4 ⁺ 细胞%			在 PBMC 种群中活 LAG-3 ⁺ CD8 ⁺ 或 LAG-3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞%		
	无抗体	hIgG4	IMP761	无抗体	hIgG4	IMP761
CD8 ⁺ 细胞	24.9	23.9	22.9	10.5	8.4	13.9
CD4 ⁺ 细胞	43.3	41.0	44.1	14.0	9.0	17.1

[0813] 结果显示,IMP761抗体不降低PBMC种群中CD8⁺或CD4⁺T细胞的百分比,或PBMC种群中LAG-3⁺CD8⁺细胞毒性T细胞或LAG-3⁺CD4⁺辅助T细胞的百分比。同种型匹配的阴性对照抗体hIgG4导致PBMC群体中T细胞存活率的轻微降低,尤其是表达LAG-3的活化T细胞。

[0814] 从这些结果得出结论,IMP761抗体对表达LAG-3的细胞不具有任何的ADCC活性。

[0815] 3) CDC测定

[0816] 对于CDC测试,将用作靶细胞的SEB刺激的细胞与3μg/ml的IMP761、同种型匹配的阴性对照抗体hIgG4、CDC阳性抗CD3对照抗体(克隆MEM-57,Cerdalane)或同种型匹配的阴性对照小鼠抗体mIgG2a一起在PBS、0.5%BSA中孵育45分钟。然后洗去未结合的抗体,并将细胞在RPMI培养基中、在用兔补体稀释3倍体积的情况下、在37℃下孵育1小时。使用荧光染料缀合的抗体对CD4、CD8、CD25和LAG-3进行染色。在排除由7-AAD标记的细胞后,通过流式

细胞术评估每个血细胞群中的细胞存活率。

[0817] 结果展示在表35和图30中。结果表示为PBMC种群中活CD4⁺或CD8⁺细胞的百分比(a),以及PBMC种群中活LAG-3⁺CD4⁺或LAG-3⁺CD8⁺细胞的百分比(b)。

[0818] 表35

[0819]

	在 PBMC 种群中活 CD8 ⁺ 或 CD4 ⁺ 细胞%				在 PBMC 种群中 LAG-3 ⁺ CD8 ⁺ 或 LAG-3 ⁺ CD4 ⁺ 细胞%			
	hlgG4	IMP761	mlgG2a	CD3	hlgG4	IMP761	mlgG2a	CD3
CD8 ⁺ 细胞	13.0	13.4	13.7	9.3	10.0	10.5	8.6	5.9
CD4 ⁺ 细胞	35.8	36.6	32.9	26.9	13.3	13.9	12.1	8.9

[0820] 结果显示,IMP761抗体不降低PBMC种群中CD8⁺或CD4⁺T细胞的百分比,或PBMC种群中LAG-3⁺CD8⁺细胞毒性T细胞或LAG-3⁺CD4⁺辅助T细胞的百分比。正如预期的那样,抗CD3阳性对照抗体确实引起了PBMC种群中T细胞的百分比和表达LAG-3的活化T细胞的百分比的降低。

[0821] 从这些结果得出结论,IMP761抗体对表达LAG-3的T细胞不具有任何的CDC活性。

[0822] 4) T细胞增殖测定中的细胞毒性评估

[0823] 在上述(1)-(3)中描述的任何短期细胞毒性测定中,IMP761抗体显示无细胞毒性。还在培养抗原刺激的PBMC数天后评估IMP761对表达LAG-3的T细胞的细胞毒性。以与前述实施例中描述的增殖测定相似的方式,将来自健康供体的PBMC (0.2×10^6 个细胞/孔,在完全 RPMI+10%FBS中)用覆盖CMV pp35序列的肽库孵育一式三份,在存在300ng/ml IMP761或人 IgG4 (作为同种型匹配的阴性对照) 的情况下孵育。三天后,通过流式细胞术测量活淋巴细胞中门内的CD8⁺和CD4⁺T细胞百分比以及这些T细胞亚群中LAG-3⁺细胞的百分比。

[0824] 结果展示在表36和图31中。

[0825] 表36

[0826]

	淋巴细胞中活 CD8 ⁺ 或 CD4 ⁺ 细胞%				淋巴细胞 CD8 ⁺ 或 CD4 ⁺ 中活 LAG3 ⁺ %			
	供体 1		供体 2		供体 1		供体 2	
	hlgG4	IMP761	hlgG4	IMP761	hlgG4	IMP761	hlgG4	IMP761
CD8 ⁺ 细胞	13.9	13.9	36.3	36.2	3.2	3.8	0.9	1.2
CD4 ⁺ 细胞	35.8	36.6	35.3	35.3	2.6	3.4	2.5	2.8

[0827] 结果显示,IMP761抗体不降低淋巴细胞种群中CD8⁺或CD4⁺T细胞的百分比,或淋巴细胞种群中LAG-3⁺CD8⁺细胞毒性T细胞或LAG-3⁺CD4⁺辅助T细胞的百分比。

[0828] 从这些结果得出结论,在该增殖测定中,IMP761抗体对表达LAG-3的细胞没有显示出任何CDC活性。

[0829] 从本实施例中的结果可以得出结论,IMP761抗体不具有细胞毒活性,因此该抗体对抗原诱导的T细胞增殖和活化的抑制不是由于对活化的T细胞的任何细胞毒活性而导致的。

序列表

<110> 伊缪泰普有限公司

<120> 抗LAG-3抗体

<130> P/73968.W001

<150> GB 1515572.4

<151> 2015-09-02

<150> GB 1612437.2

<151> 2016-07-18

<160> 85

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 2

Ile Trp Trp Asp Asp Ile Lys

1 5

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 3

Ala Arg Ile Val Glu Gly Ser Tyr Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 4

Gln Asp Val Ile Phe Asp

1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 5

Ser Ala Ser

1

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 6

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 7

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20

25

30

Gly Met Gly Leu Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

35

40

45

Trp Leu Thr His Ile Trp Trp Asp Asp Ile Lys Arg Tyr Asn Pro Asp

50

55

60

Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Ser Gln Ile

65

70

75

80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg Ile Val Glu Gly Ser Tyr Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Val

100

105

110

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Pro His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Glu
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Phe Asp
 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 Ser Arg Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9

<211> 370

<212> DNA

<213> Balb/c mouse

<400> 9

caggttactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtcctg 60
 acttggttctt tctctggggtt ttcactgagc acttctggta tgggtctagg ctggattcgt 120
 cagccatcag ggaagggtct ggagtggctg acacacattt ggtgggatga tatcaagcgc 180
 tataaccag acctgaggag ccgactgact atctccaagg atacctccag cagccagatt 240
 ttctctcaaga tcgccagtgt ggacactgca gatactgcca catattactg tgctcgaata 300
 gtggagggtt catacagtag tagttacttc gatgtctggg gcgcaggac cacggtcacc 360
 gtctcctcag 370

<210> 10

<211> 322

<212> DNA

<213> Balb/c mouse

<400> 10

gacattgtga tgaccagacc tcacaaattc atgtccacat cagtggaaga cagggtcacc 60
 atcacctgca aggccagtca ggatgtgatt tttgatgtag cctggtatca acagaaacca 120
 ggacaatctc ctaaattact gatttactcg gcatcctccc gggtcagtgg agtcctgat 180
 cgcttcaactg gcagtggatc tgggacggat ttcacttca ccatcagtag tgtgcaggct 240
 gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cactatagta ctccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccacgc tggaaataaa ac 322

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 11

Gly Phe Ser Leu Asn Thr Ser Gly Met Gly

1 5 10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 12

Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys

1 5

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 13

Ala Arg Ile Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 14

Gln Asp Val Ser Ile Ala

1 5

<210> 15

<211> 3

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 15

Ser Ala Ser

1

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 16

Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Trp Thr

1 5

<210> 17

<211> 123

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 17

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Thr His Ile Trp Trp Asp Asp Val Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Ser Gln Val

65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ile Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Val Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Balb/c mouse

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Leu Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Gly Leu Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala

20 25 30

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Trp

85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 19		
<211> 370		
<212> DNA		
<213> Balb/c mouse		
<400> 19		
caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60		
acttggttctt tctctgggtt ttcaactgaac acttctggta tgggtgtagg ctggattcgt 120		
cagccatcag ggaagggtct ggagtggctg acacacattt ggtgggatga tgtcaagcgc 180		
tataatccag ccctgaagag ccgaactgact atctccaagg atacctccag cagccaggta 240		
ttcctcaaga tcgccagtgt ggacaactgca gatactgcca catactactg tgctcgaata 300		
gagggggata ctactacga ctattacttt gactactggg gccaaaggcgt cactctcaca 360		
gtctcctcag 370		
<210> 20		
<211> 322		
<212> DNA		
<213> Balb/c mouse		
<400> 20		
gacattgtga tgaccagtc tcacaaactc atgtccacat cagttggaga cgggctcagc 60		
atcacctgca aggccagtca ggatgtgagc attgctgtag tctggtatca acagaaacca 120		
ggacaatctc ctaaactgct gatttactcg gcacctctcc ggtacactgg agtccctgat 180		
cgtttcactg gcagtggatc tgggacggat ttcaacttca ccatcagcag tgtgcaggct 240		
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ttccgtggac gttcggtgga 300		
ggcaccaagc tggaaatcaa ac 322		
<210> 21		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> Balb/c mouse		
<400> 21		
Thr Ser Gly Met Gly Leu Gly		
1 5		
<210> 22		
<211> 16		
<212> PRT		
<213> Balb/c mouse		
<400> 22		
His Ile Trp Trp Asp Asp Ile Lys Arg Tyr Asn Pro Asp Leu Arg Ser		

1	5	10	15
<210> 23			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> Balb/c mouse			
<400> 23			
Ile Val Glu Gly Ser Tyr Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Val			
1	5	10	
<210> 24			
<211> 11			
<212> PRT			
<213> Balb/c mouse			
<400> 24			
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Phe Asp Val Ala			
1	5	10	
<210> 25			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> Balb/c mouse			
<400> 25			
Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser			
1	5		
<210> 26			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> Balb/c mouse			
<400> 26			
Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr			
1	5		
<210> 27			
<211> 502			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 27			
Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala			
1	5	10	15
Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser			
	20	25	30
Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly			

35	40	45
Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro		
50	55	60
Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu		
65	70	75
Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro		
85	90	95
Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu		
100	105	110
Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala		
115	120	125
Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu		
130	135	140
Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser		
145	150	155
Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala		
165	170	175
Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg		
180	185	190
Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln		
195	200	205
Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg		
210	215	220
Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu		
225	230	235
Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val		
245	250	255
Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu		
260	265	270
Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr		
275	280	285
Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln Ala		
290	295	300
Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln Leu		
305	310	315
Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe		
325	330	335
Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val		
340	345	350

Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr Pro Ser Gln
 355 360 365
 Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu
 370 375 380
 Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly
 385 390 395 400
 Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser Pro Gly Ala Gln Arg Ser
 405 410 415
 Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly His Leu Leu Leu Phe Leu
 420 425 430
 Thr Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu Val Thr Gly Ala Phe Gly
 435 440 445
 Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro Arg Arg Phe Ser Ala Leu
 450 455 460
 Glu Gln Gly Ile His Pro Gln Ala Gln Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu
 465 470 475 480
 Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu
 485 490 495
 Pro Glu Pro Glu Gln Leu
 500

<210> 28

<211> 149

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala
 1 5 10 15
 Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser
 20 25 30
 Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly
 35 40 45
 Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro
 50 55 60
 Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu
 65 70 75 80
 Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro
 85 90 95
 Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 100 105 110

Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala
115 120 125

Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu
130 135 140

Gly Gln Ala Ser Met
145

<210> 29

<211> 90

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu
1 5 10 15

Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe
20 25 30

Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His
35 40 45

His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp
50 55 60

Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val
65 70 75 80

Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly
85 90

<210> 30

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> VH domain of mouse monoclonal antibody 13E2, and a human IgG4 Fc
portion with an S228P mutation

<400> 30

Met Gly Trp Thr Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Met Gly Leu Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
50 55 60

Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Thr	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Ile	Lys	Arg	Tyr
65					70					75					80
Asn	Pro	Asp	Leu	Arg	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser
				85					90					95	
Ser	Gln	Ile	Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala
				100					105					110	
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	Ser	Tyr	Ser	Ser	Ser	Tyr
				115					120					125	
Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
				130					135					140	
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr
145					150					155					160
Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
				165					170					175	
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
				180					185					190	
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
				195					200					205	
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr
				210					215					220	
Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val
225					230					235					240
Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe
				245					250					255	
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				260					265					270	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
				275					280					285	
Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
				290					295					300	
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser
305					310					315					320
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
				325					330					335	
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser
				340					345					350	
Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
				355					360					365	
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln

370	375	380
Val Ser Leu Thr Cys Leu	Val Lys Gly Phe Tyr Pro	Ser Asp Ile Ala
385	390	395
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	Lys Thr Thr
405	410	415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	Ser Arg Leu
420	425	430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	Gln Glu Gly Asn Val Phe	Ser Cys Ser
435	440	445
Val Met His Glu Ala Leu His	Asn His Tyr Thr Gln Lys	Ser Leu Ser
450	455	460
Leu Ser Leu Gly Lys		
465		
<210> 31		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> Balb/c mouse		
<400> 31		
Thr Ser Gly Met Gly Val Gly		
1	5	
<210> 32		
<211> 16		
<212> PRT		
<213> Balb/c mouse		
<400> 32		
His Ile Trp Trp Asp Asp Val	Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu	Lys Ser
1	5	10
<210> 33		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> Balb/c mouse		
<400> 33		
Ile Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr	Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
1	5	10
<210> 34		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> Balb/c mouse		
<400> 34		

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Val
 1 5 10
 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Balb/c mouse
 <400> 35
 Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Balb/c mouse
 <400> 36
 Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 37
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> VL domain of monoclonal antibody 13E2, and a wild-type human Ig
 kappa (IgK) chain C portion
 <400> 37
 Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Pro His Lys Phe Met Ser
 20 25 30
 Thr Ser Val Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45
 Val Ile Phe Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
 100 105 110
 Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Lys Arg

115	120	125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
130	135	140
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
145	150	155
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
165	170	175
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
180	185	190
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
195	200	205
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
210	215	220
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	
<210> 38		
<211> 525		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 38		
Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp		
1	5	10
Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val		
20	25	30
Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile		
35	40	45
Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln		
50	55	60
His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu		
65	70	75
Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro		
85	90	95
Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly		
100	105	110
Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln		
115	120	125
Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala		
130	135	140
Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys		

145	150	155	160
Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro			
	165	170	175
Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser			
	180	185	190
Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln			
	195	200	205
Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser			
	210	215	220
Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly			
225	230	235	240
Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn			
	245	250	255
Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala			
	260	265	270
Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val			
	275	280	285
Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly			
	290	295	300
Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu			
305	310	315	320
Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His			
	325	330	335
Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr			
	340	345	350
Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu			
	355	360	365
Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser			
	370	375	380
Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala			
385	390	395	400
Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln			
	405	410	415
Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser			
	420	425	430
Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly			
	435	440	445
His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu			
450	455	460	

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
 465 470 475 480
 Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
 485 490 495
 Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
 500 505 510
 Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
 515 520 525

<210> 39

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg
 1 5 10 15
 Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe
 20 25 30
 Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val
 35 40 45
 Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln
 50 55 60
 Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln
 65 70 75 80
 Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr
 85 90

<210> 40

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His
 1 5 10 15
 Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr
 20 25 30

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Hemagglutinin epitope tag
<400> 41
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5
<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> FLAG epitope tag
<400> 42
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5
<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> c-myc epitope tag
<400> 43
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10
<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> His5 affinity domain
<400> 44
His His His His His
1 5
<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> HisX6 affinity domain
<400> 45
His His His His His His

1	5
---	---

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> c-myc affinity domain
<400> 46
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1	5	10
---	---	----

<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> StrepTag affinity domain
<400> 47
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1	5
---	---

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Affinity domain
<400> 48
Arg Tyr Ile Arg Ser

1	5
---	---

<210> 49
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Affinity domain
<400> 49
Phe His His Thr

1

<210> 50
<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Affinity domain

<400> 50

Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg
1 5 10 15
Ala

<210> 51

<211> 82

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu
1 5 10 15
Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
20 25 30
Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
35 40 45
Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
50 55 60
Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
65 70 75 80
Pro Gly

<210> 52

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 52

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser
20 25

<210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 53

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 54

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 54

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Ile Leu Asn

1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 55

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 56

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 56

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser

20 25

<210> 57

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 57

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 58

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 58

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Ala Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 59

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 60

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 60

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Thr Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser

20 25

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 61

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val Thr

1 5 10

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 62

Arg Val Thr Ile Arg Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ala Leu Thr

1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Leu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 63

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 64

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 64

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser

20 25

<210> 65

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 65

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Thr Leu Glu Trp Leu Thr

1 5 10

<210> 66

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 66

Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Leu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 67

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 68

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 68

Asp 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

20

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 69

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 70

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 70

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 71

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 72

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 72

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

20

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 73

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

1 5 10 15

<210> 74

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 74

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Leu Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 75

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 76

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 76

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 77

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

1 5 10 15

<210> 78

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 78

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 79

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys

1 5 10

<210> 80

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Humanized framework sequence

<400> 80

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

1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys			
20			
<210> 81			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Humanized framework sequence			
<400> 81			
Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr			
1	5	10	15
<210> 82			
<211> 32			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Humanized framework sequence			
<400> 82			
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr			
1	5	10	15
Leu Thr Ile Asp Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys			
20	25	30	
<210> 83			
<211> 10			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Humanized framework sequence			
<400> 83			
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
1	5	10	
<210> 84			
<211> 469			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Heavy chain amino acid sequences of humanized 13E2 monoclonal antibody			

<400> 84

Met	Gly	Trp	Thr	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Ala	Gly
1				5					10					15	
Val	His	Ser	Gln	Ile	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Leu	Val	Lys
			20					25					30		
Pro	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu
		35					40					45			
Ser	Thr	Ser	Gly	Met	Gly	Leu	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys
	50				55				60						
Thr	Leu	Glu	Trp	Leu	Thr	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Ile	Lys	Arg	Tyr
65				70				75						80	
Asn	Pro	Asp	Leu	Arg	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys
			85				90						95		
Asn	Gln	Val	Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Leu	Asp	Thr	Gly
		100					105					110			
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	Ser	Tyr	Ser	Ser	Ser	Tyr
	115						120					125			
Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
	130					135					140				
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr
145				150				155						160	
Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
			165				170					175			
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
		180					185					190			
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
	195					200						205			
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr
	210				215					220					
Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val
225				230				235						240	
Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe
			245				250					255			
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
	260						265					270			
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
	275					280						285			
Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
	290					295					300				

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser			
305	310	315	320
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu			
	325	330	335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser			
	340	345	350
Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			
	355	360	365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln			
	370	375	380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala			
385	390	395	400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr			
	405	410	415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu			
	420	425	430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser			
	435	440	445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
	450	455	460
Leu Ser Leu Gly Lys			
465			
<210> 85			
<211> 234			
<212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
<223> Light chain amino acid sequence of humanized 13E2 monoclonal antibody			
<400> 85			
Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln			
1	5	10	15
Gly Thr Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser			
	20	25	30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp			
	35	40	45
Val Ile Phe Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro			
	50	55	60
Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Gly Val Pro Ser			

65					70					75					80
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
					85					90					95
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr
					100					105					110
Ser	Thr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Ile	Lys	Arg
					115					120					125
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
					130					135					140
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
145					150					155					160
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
					165					170					175
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
					180					185					190
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
					195					200					205
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
					210					215					220
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
225					230										

10	20	30	40	50	60
LQFGAEVPV	WAQEGAPAQL	FCSETIPLQD	LSLLRPAGVT	WQHQPDS	<u>GFP</u> <u>AAAPGHPLAP</u>
70	80	90	100	110	120
<u>GPHPAAPSSW</u>	<u>GPRPRRYTVL</u>	SVGPGCLRSG	RLPLQPRVQL	DERGRQRGDF	SLNLRPARRA
130	140	150	160	170	180
DAGEYRAAVH	LRDRALSCRL	RLRLQASMT	ASPPGSLRAS	DWVILNCSPS	RFDRPASVHW
190	200	210	220	230	240
FRNRQQGBVP	VRESPHHBLA	ESFLFLPQVS	PMDSGPWGCI	LTYRQGFNVS	IMYNLTVLGL
250	260	270	280	290	300
EPPTPLTVYA	GAGSRVGLPC	RLPAGVGTSS	FLTAKWTFFG	GGPDLLVTGD	NGDETLEKLE
310	320	330	340	350	360
VSQAQAGTYT	CHIHLOEQQL	NATVTLAIIT	VTPKSFSSPG	SLGKLLCEVT	PVSGQERFVW
370	380	390	400	410	420
ESLDTPSQRS	FSGFWLEAGE	AQLLSQFWQC	QLYQGERLLG	AAVYFTELSS	PGAGRSGRAP
430	440	450	460	470	480
GALPAGHLLL	FLTLGVLSLL	LLVTGAFGFH	LWRRQWRPRR	FSALEQGIHF	QAQSKISELE
490	500				
QEPEPEPEPE	PEPEPEPEPE	QL			

图1

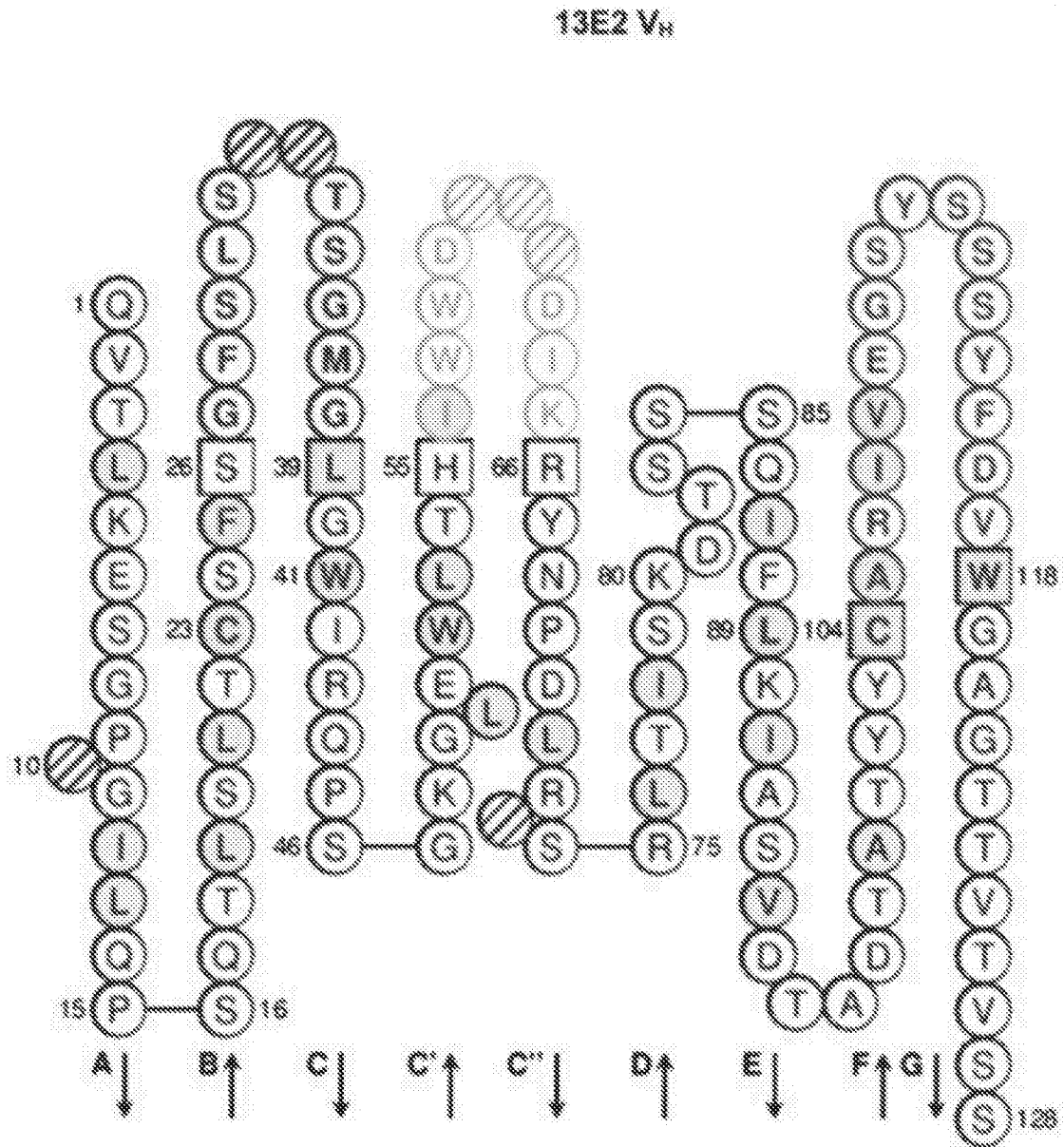


图2

432 V²

```

<-----FR1-IMGT-----><-----CDR1----->
Q V T L K E S G P G I L Q P S Q T L S L T C S F S G F S L S
CAGGTTACTCTCAACAGACTGTGGCCCGGATATTGCAGGCCCTCCACAGCCTCAGTCGACTGTTCTTCTCTGGGTTTCACTGAGC
98

-----FR2-IMGT-----><-----CDR2-IMGT-----><-----
T S G M G L G W I R Q P S G K G L E W L F W I W W D D I K R
ACTTCTGGTAATGGCTCTAGGCTCGCATTCAGCCATCAGGAGAGGCTCTGAGTGGCTGACACACATTTGGTGGGATGATATCAAGGC
180

-----FR3-IMGT-----><-----
Y N P D L R S R L T I S K D T S S S Q I F L K I A S V D T A
TATAACCCAGACTTGAGAGCCGACTGACTATCTCCAGGATACCTCCAGCAGCCAGATTTCTTCAGATCGCCAGCTGTGGACACTGCA
270

-----CDR3-IMGT-----><----->
D T A T Y Y C A R I V E G S Y S S Y F D V W C A G T T V F
GATACTCGCACATATTACTGTGCTGTAATAGCTGGAGGGTTCAATACAGTAGTAGTACTTCGATGCTGTGGGCGCCAGGACACAGGTCACC
360

V S S
CTCTCTCTAG 370

```

图3

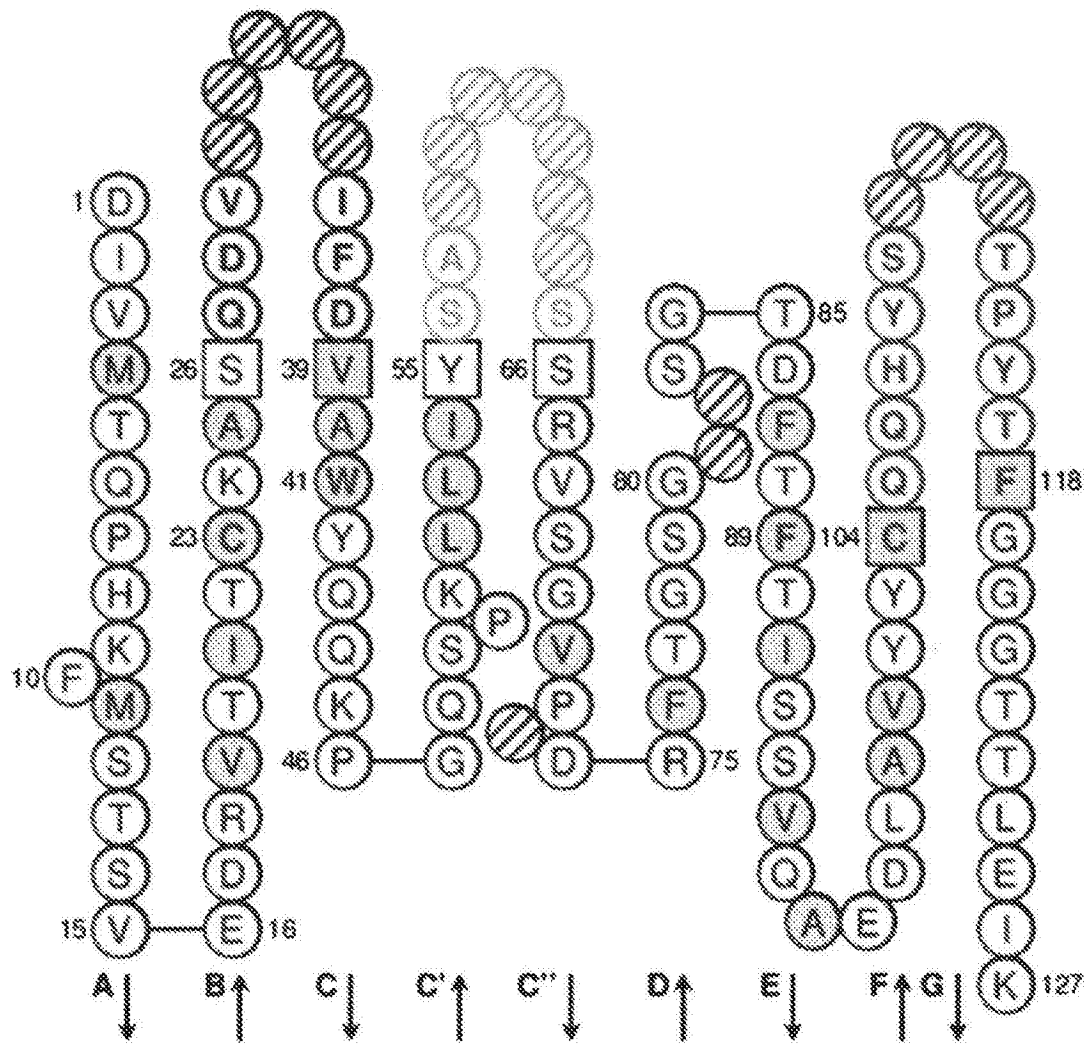
13E2 V_L

图4

13E2 V_L

```

<-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IM
D I V M T Q P H K F M S T S V E D R V T I T C K A S Q D V I
GACATTCGTGATGACCCGCTCACAATTCATGCTCAGTCGGACACACAGGCTCACCACATCCAGAGGCCAGTCAGGATGAT 90

<-----FR2-IMGT-----><-----CDR2-IM><-----
P D V A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y S A S S R V S G V P D
TTGTATCTAGCCCTGGTATCAGACAGAACAGGACATCTCCTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 180

<-----FR3-IMGT-----><-----CDR3-IM><-----
R F T G S G S G P D F T F T I S S V Q A E D L A V Y Y C Q Q
CCCTTCACCTGGCAGTGGATCTGGGAGGATTTTCACTTCACCATCAGTACGTTCTCCAGCCAGACACCTGCCAGTTTATCTCTCAGCAA 270

<-----CDR3-IMGT----->
W Y S T P Y T P G G T F L E I K
CACTATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 323

```

图5

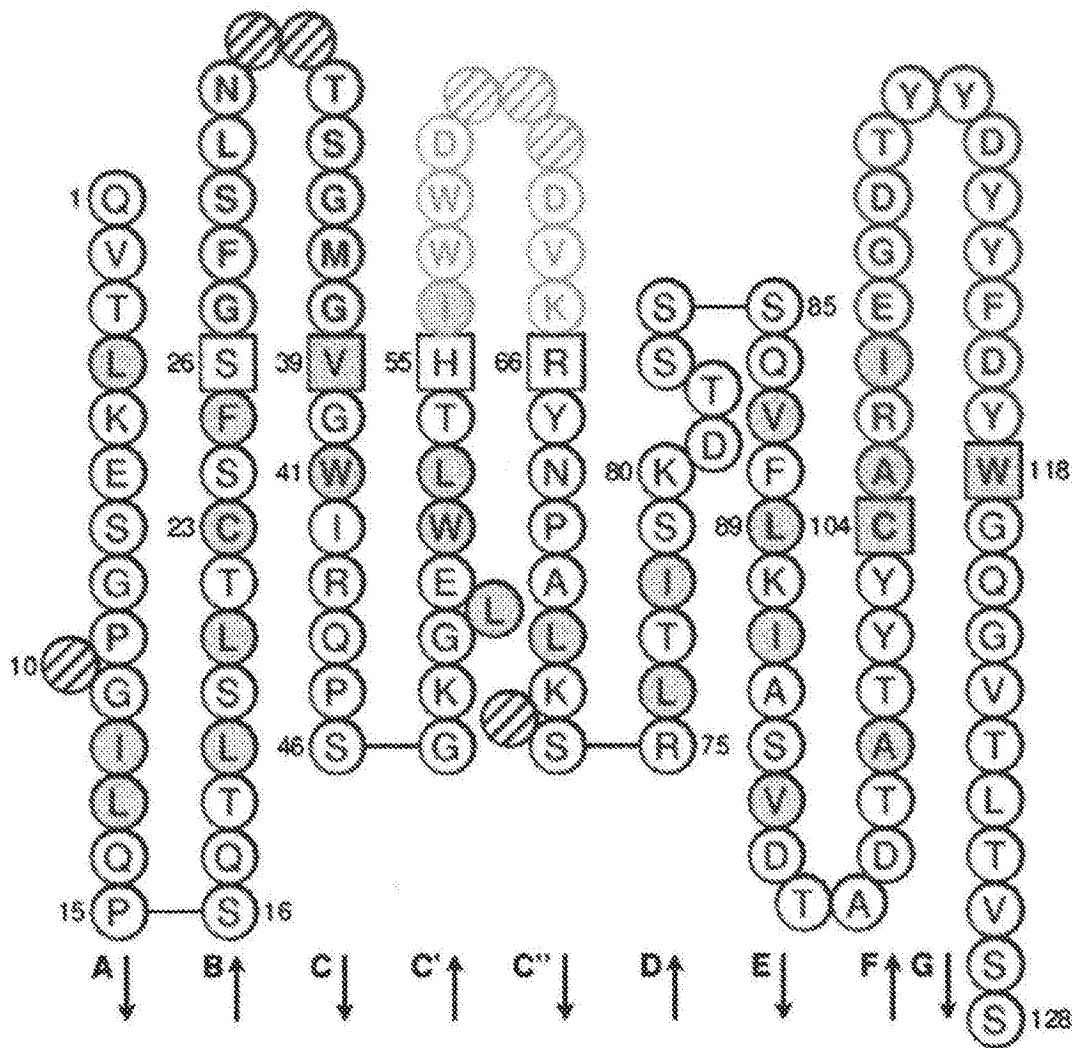
34F4 V_H

图6

林 林 林

```

<-----FR1-IMGT-----><-----CDR1----->
Q V T L K E S G P G I L Q P S Q T L S L T C S F S G F S L N
CAGGTTACTGGAACAGCTGGCCCTGGGATATTGACAGCTCCACAGCCCTCAGTCTGACTGTCTTCTCTCGGTTTCACTGGAC
90

-----FR2-IMGT-----><-----CDR2-IMGT-----><-----
T S G M G V G W I R Q P S G K G L E W L T H I W W D D V K R
ACTTCTGGTAGGCTTAGGCTGCAITTCCTCAGCCATCAGGAGAGGCTCTGGAGTGGCTGACACAAATTCGTGGGATGATGTCAGAGGC
160

-----FR3-IMGT-----><-----
Y N P A L K S R L T I S K D T S S S Q V F L K I A S V D T A
TATAATCAGGCTCAGACAGCCGACTGACTATCTCCAGGATACCTCCAGCCAGGATATCCACAGATCCCCAGCTGTGGACACTGCA
270

-----CDR3-IMGT-----><-----
D T A T Y Y C A R I E G D T Y Y D Y Y F D Y W G Q G V T L T
CATACTGACATACACTGTGCTGCAATAGAGGGGGAATCTACTACGACTATTACTTTGACTACTGCGCCCAAGGGCTCACTCTCACA
360

V S S
CTCTCTCTCAG 370

```

图7

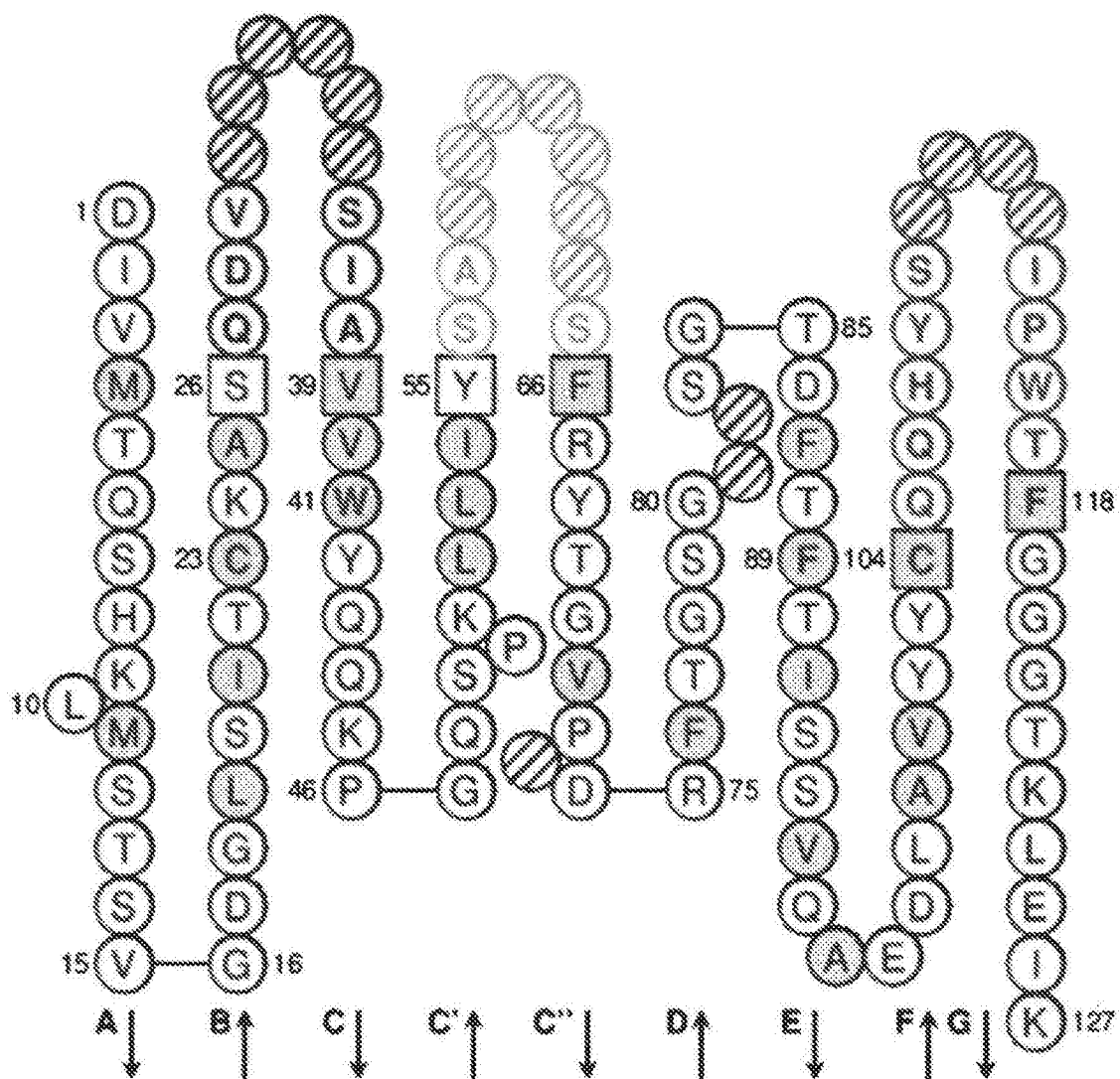
34F4 V_L

图8

34F4 V_L

```

<-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IM
D I V M T Q S H K L M S T S V G D G L S L T C K A S Q D V S
GACATTCGATGACCCAGCTCTACAACTCATGTCACATCAGTTGGAGAGGGCTCAGCATCACCCTGCAGGCCAGTCAGGATGTGAGC 90
GT-----><-----FR2-IMGT-----><CDR2-IM><-----
I A V V W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y S A S F R Y T G V P D
ATTGCTGTAGTCTGTGATATCAACAGAAACCCAGGACAACTCTCTAAGCTGCTGATTACTCCGATCCTTCGGTACACTGGAGTCCCTGAT 180
-----FR3-IMGT-----><-----
R F T G S G S G T D F T F T I S S V Q A E D L A V Y Y C Q Q
CGCTTCACCTGGCAATGATCTGGGACGGATTCACCATCAGTCAGTGTGACAGCTGAGACCTGGGCACTTATTACTGTTCAGCAA 270
-----CDR3-IMGT----->
W Y S I P W T F G G G T K L E I K
CATTATAGTATTCGGTGGACCTTCGGTGGAGGAGGACAGCTGGAAATCAAC 332

```

图9

图 11

4					
V	94.4%	(284/301)	3424 VB	IGHV0-8*01	
V	94.4%	(284/301)	3424 VB	IGHV0-8*01	
V	94.4%	(284/301)	3424 VB	IGHV0-8*01	
V	94.4%	(284/301)	3424 VB	IGHV0-8*01	
D	100.0%	(8/8)	IGHV1-2*01		
D	100.0%	(8/8)	IGHV1-1*01		
D	95.7%	(44/46)	IGHV2*01		
D	95.7%	(44/46)	3424 VB	IGHV2*01	

图12

图13

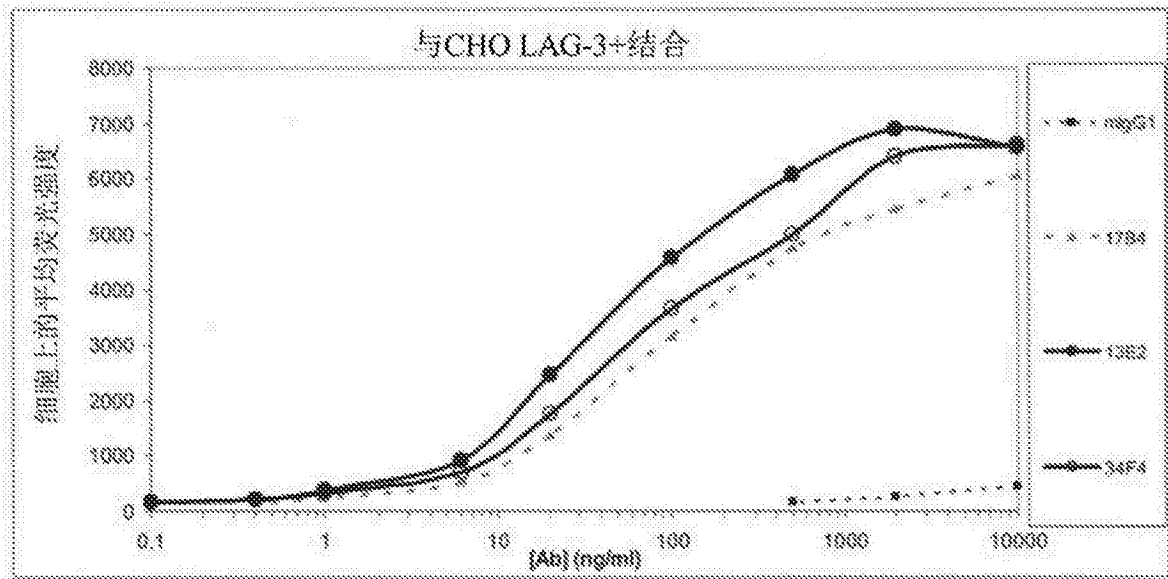
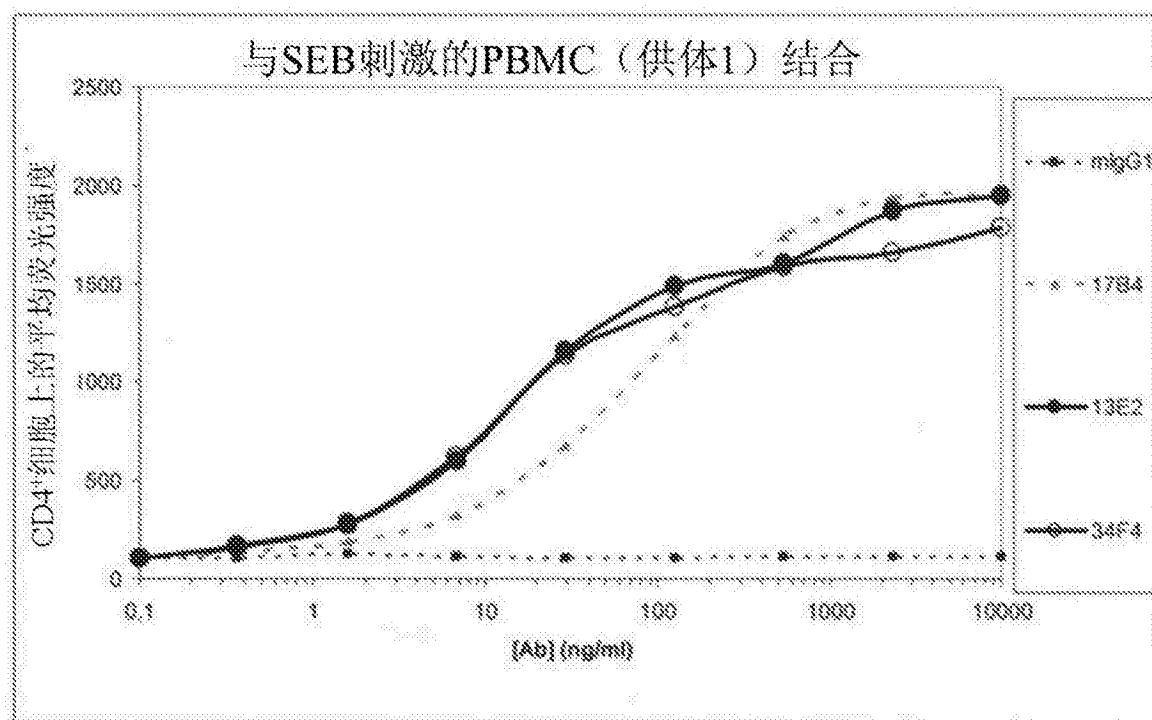


图14

A)



B)

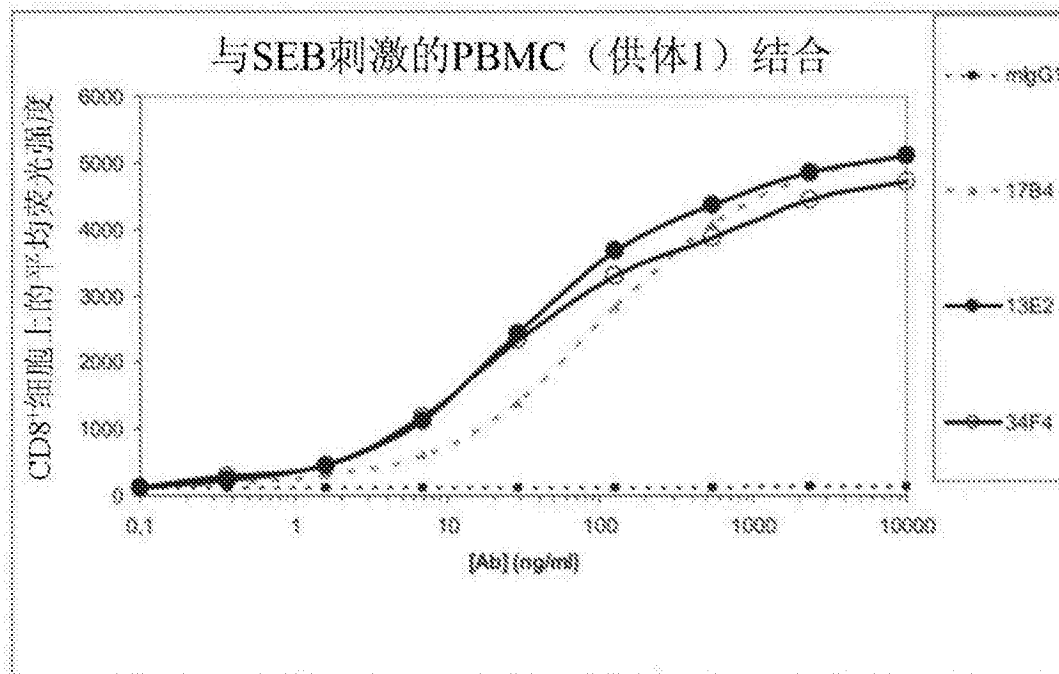


图15

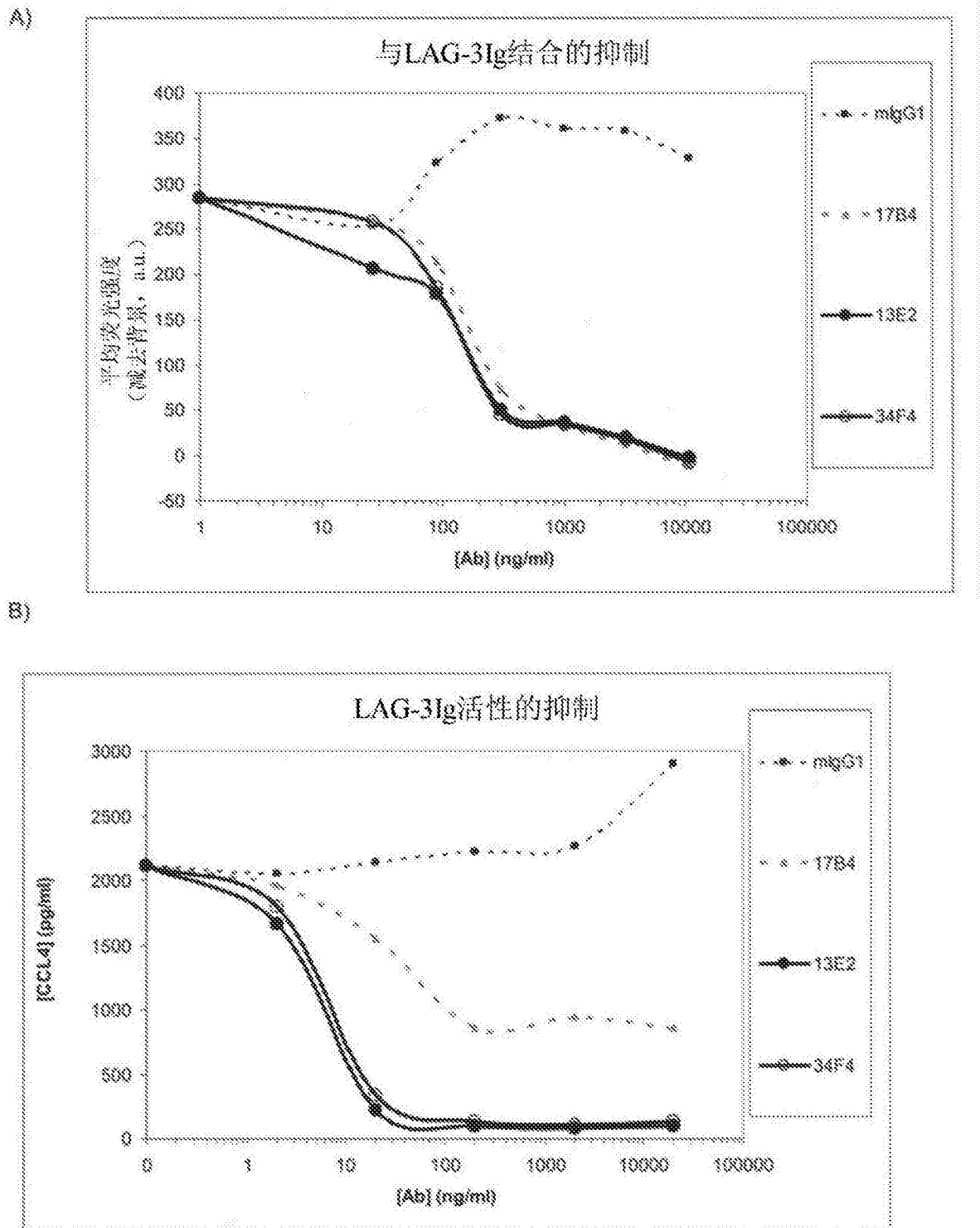


图16

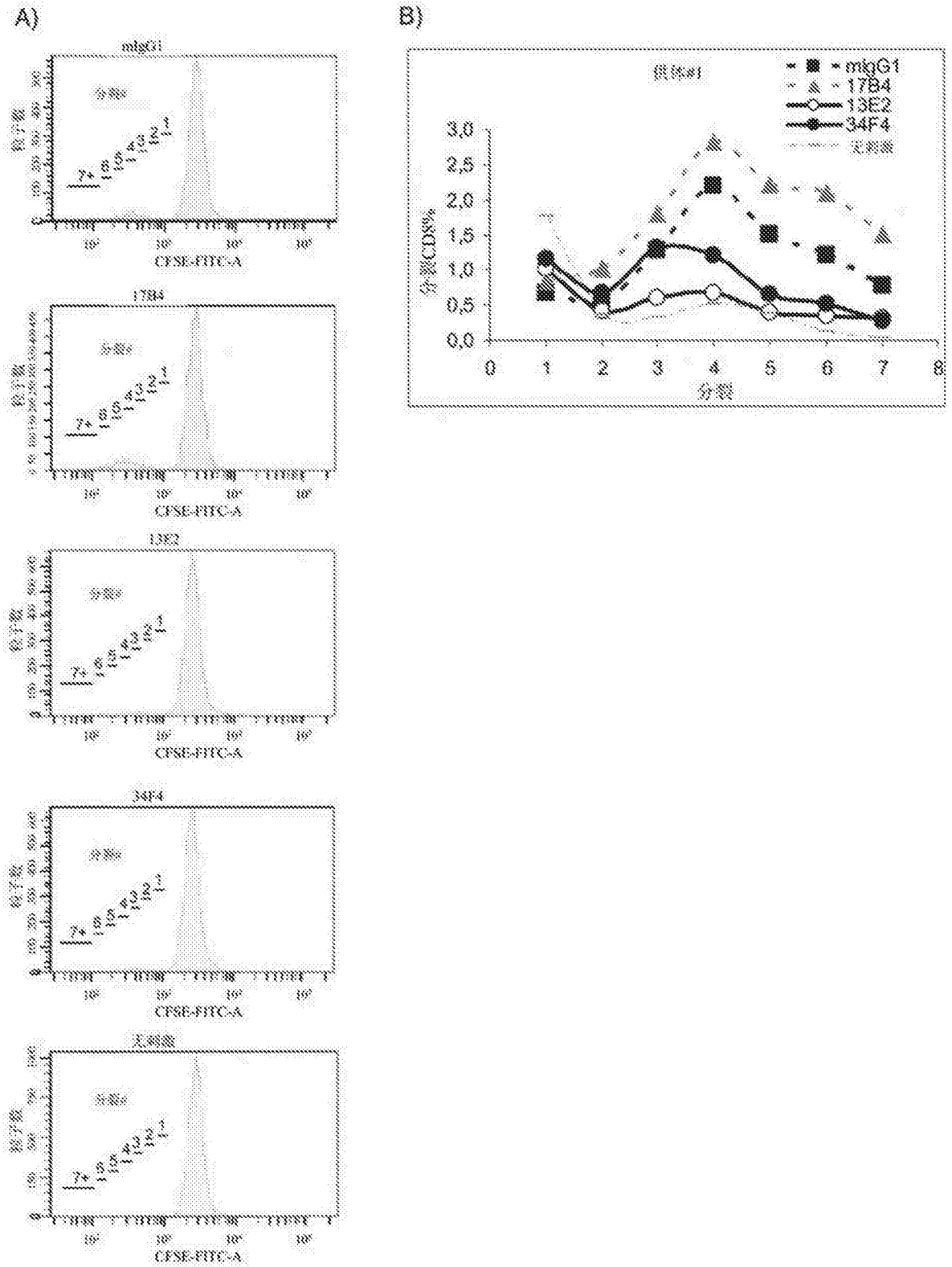


图17

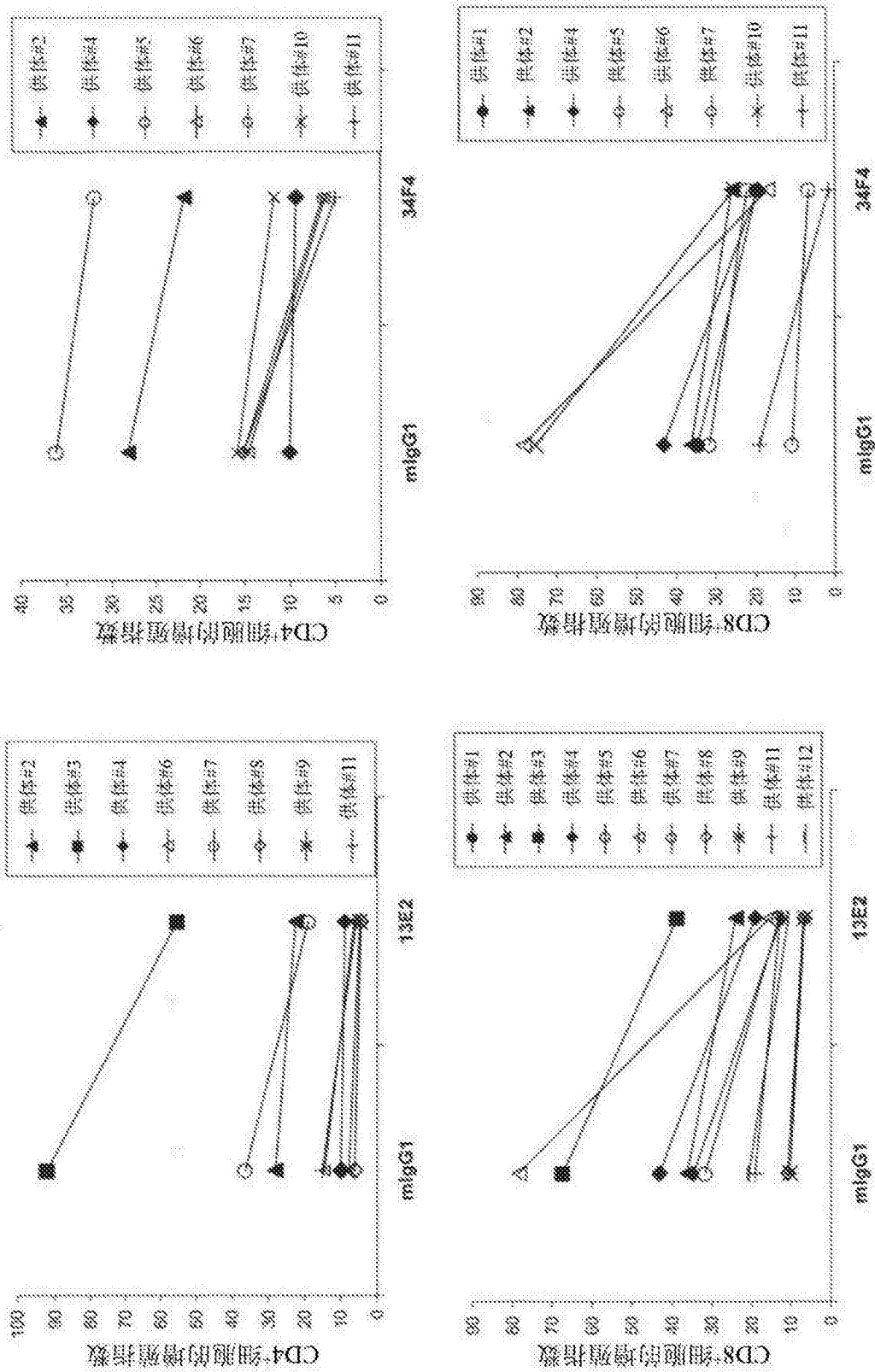


图18

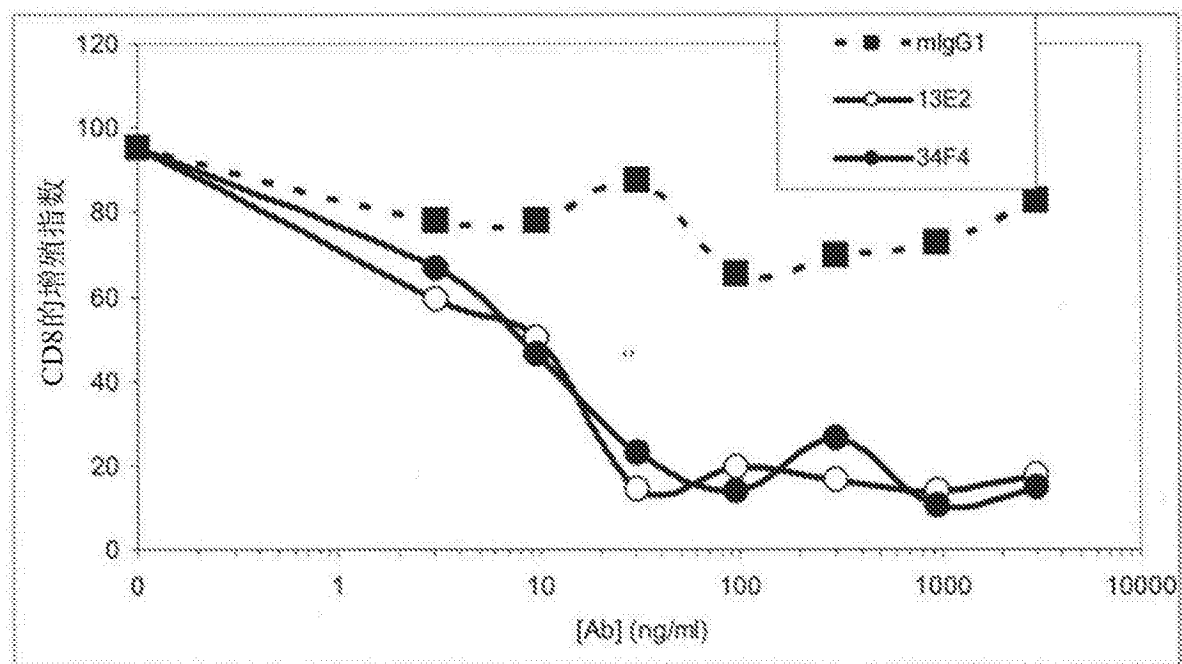


图19

A) 13E2IgG4mut (heavy chain of chimeric antibody Chim13E2IgG4)

```

MEWTLVFLFLLSVTAGVHSQVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGLGWIRQ 60
PSGKGLEWLTHIWDDIKRYNPDLRSLTISKDTSSSQIFLKIASVDTADTATYYCARIV 120
EGSYSSSYFDVWGACTTVTVSSASTKGFSVFPLAPCSSTSESTAALGCLVKDYFPEPV 180
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTFTPTCNVDHKEFNTKVDKRV 240
ESKYGPPCPPECPAPEFLGQPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWY 300
VDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVQLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISK 360
AKGQPPREFQVYTLFPSSQSENIKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPFVL 420
DEDGSFFLYSRLTVDKGRWQEGNVPSCSMNEALHNHYTQKSLSLGLK 469

```

B) 13E2IgK (light chain of chimeric antibody Chim13E2IgG4)

```

MVSSAQFLGLLLLCFQGTCDIVMTQPHKEMSTSVEDRVTITCKASQDVIEDVAWYQQKP 60
GQSPKLLIYSASSRVSGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPYTFGG 120
GTTLEIKRTVAAPSVPFIFFPEDEQLKSCITASVVCLLNNEVEREAKVQWKVDNALQSGNSQ 180
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAALEYEKSRVYACEVTHQCLSPVTKSFNRGEC 234

```

图20

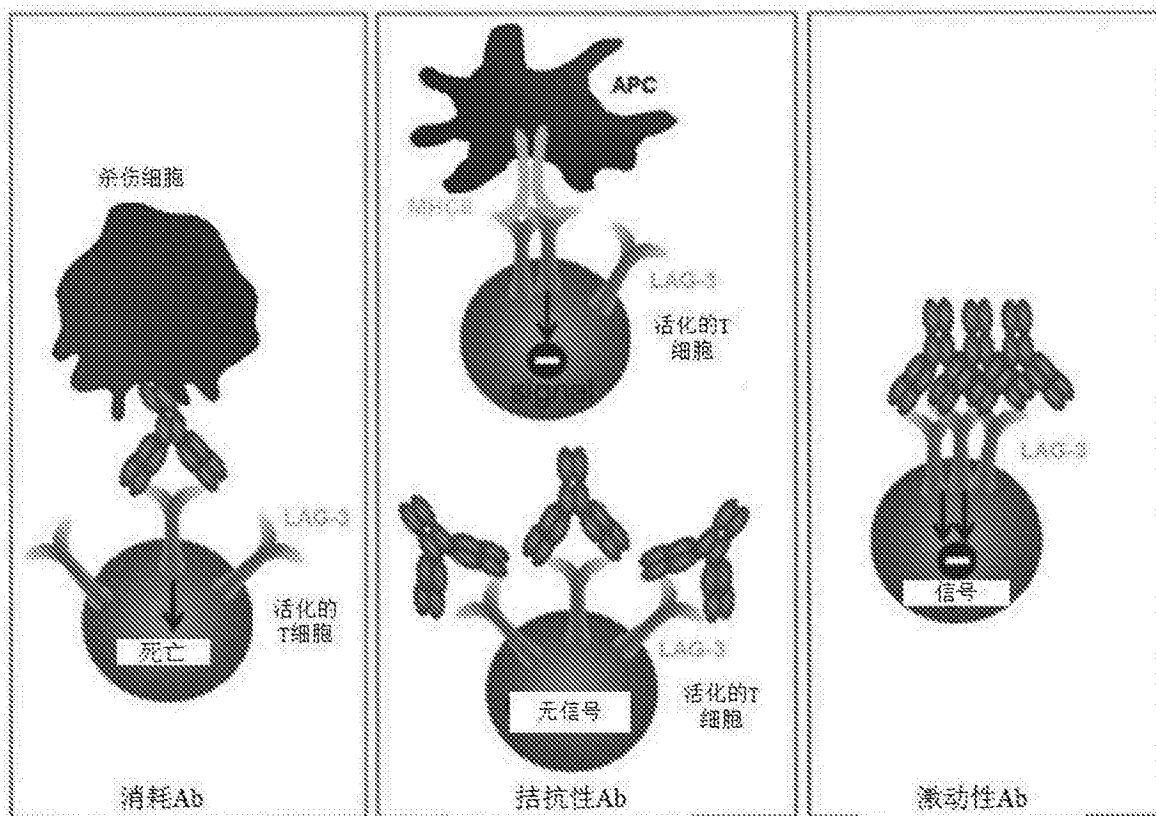


图21

13E2 VH	20	QVTLKESGPG ILQPSQTLSL TCSFSGFSLS TSGMGLGWIR QPSGKGLEWL THINWDDIKR	QVTLKESGPA LVRPTQTLL TL TCTFSGFSLS TSGMGLGWIR QPCKALEWL <u>AMINWDDIKR</u>	QVTLKESGPA LVRPTQTLL TL TCSFSGFSLS TSGMGLGWIR QPCKALEWL <u>AMINWDDIKR</u>	QVTLKESGPA LVRPTQTLL TL TCSFSGFSLS TSGMGLGWIR QPCKALEWL <u>AMINWDDIKR</u>	QVTLKESGPA LVRPTQTLL TL TCSFSGFSLS TSGMGLGWIR QPCKALEWL <u>AMINWDDIKR</u>
VH ₁						
VH ₂						
VH ₃						
VH ₄ (IMP761-H)						
13E2 VH	80	YNPDLRSRLT ISKDTSSSQI FLKIASVDTA DTATYYCARI VEGSYSSSYF DVGAGTIVT	YNPDLRSRLT ISKDTSSSQI FLKIASVDTA DTATYYCARI VEGSYSSSYF DVGAGTIVT	YNPDLRSRLT ISKDTSSSQI FLKIASVDTA DTATYYCARI VEGSYSSSYF DVGAGTIVT	YNPDLRSRLT ISKDTSSSQI FLKIASVDTA DTATYYCARI VEGSYSSSYF DVGAGTIVT	YNPDLRSRLT ISKDTSSSQI FLKIASVDTA DTATYYCARI VEGSYSSSYF DVGAGTIVT
VH ₁						
VH ₂						
VH ₃						
VH ₄ (IMP761-H)						
13E2 VH	140	VSS	VSS	VSS	VSS	VSS
VH ₁						
VH ₂						
VH ₃						
VH ₄ (IMP761-H)						
13E2 VL	21	DIVMTQPHKE MSTSVEDRVT ITCKASQDVI ITCKASQDVI ASSRVSGVPD	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQDVI ITCKASQDVI ASSRVSGVPD	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQDVI ITCKASQDVI ASSRVSGVPD	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQDVI ITCKASQDVI ASSRVSGVPD	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQDVI ITCKASQDVI ASSRVSGVPD
VL ₁						
VL ₂						
VL ₃ (IMP761-L)						
VL ₄						
13E2 VL	81	RFTSGSGGTD FTFTISSVOA EDLAVYYCQQ EDLAVYYCQQ	RFTSGSGGTD FTFTISSVOA EDLAVYYCQQ EDLAVYYCQQ	RFTSGSGGTD FTFTISSVOA EDLAVYYCQQ EDLAVYYCQQ	RFTSGSGGTD FTFTISSVOA EDLAVYYCQQ EDLAVYYCQQ	RFTSGSGGTD FTFTISSVOA EDLAVYYCQQ EDLAVYYCQQ
VL ₁						
VL ₂						
VL ₃ (IMP761-L)						
VL ₄						

图22

13E21gG4mut	1	MCWTLVFLFL	LSVTAGVHSQ	VTIKESGPGI	LOPSQTLST	CSFSQFSLS	SEMGLGNIRQ
IMP761-H	1	MCWTLVFLFL	LSVTAGVHSQ	ITIKESGPTL	VKPTQTLST	CTFSQFSLS	SEMGLGNIRQ
13E21gG4mut	61	PSGKGLWLT	HIMDDIKRY	NPDLSRLTI	SKDTSSQIF	LXIASVTRD	TATYICARIY
IMP761-H	61	PPGXTLEWLT	HIMDDIKRY	NPDLSRLSI	TKDTSKNQVV	LTNTMDPLD	TGYTCARIY
13E21gG4mut	121	EGSYSSSYFD	VWAGTTVTV	SSASTGQPSV	FPLAPCSRST	SESTAALCOL	VKDYFPEPVT
IMP761-H	121	EGSYSSSYFD	VWQGTILTV	SSASTGQPSV	FPLAPCSRST	SESTAALCOL	VKDYFPEPVT
13E21gG4mut	181	VSWNSGALTSG	VHTFPAYLQ	SSGLYSLSV	VTVPSSSLOT	KTYTCNVNKK	PENTKVOKRV
IMP761-H	181	VSWNSGALTSG	VHTFPAYLQ	SSGLYSLSV	VTVPSSSLOT	KTYTCNVNKK	PENTKVOKRV
13E21gG4mut	241	ESKYGPPCPFC	PAPEFLGCP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTQVTVDSQ	EDPEVQFNWY
IMP761-H	241	ESKYGPPCPFC	PAPEFLGCP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTQVTVDSQ	EDPEVQFNWY
13E21gG4mut	301	VQGVVHNNAKT	KPREEQFMS	TYRVVSULTV	LHQDWLNCKE	YCKKVSNNKGL	PSSIEXTISK
IMP761-H	301	VQGVVHNNAKT	KPREEQFMS	TYRVVSULTV	LHQDWLNCKE	YCKKVSNNKGL	PSSIEXTISK
13E21gG4mut	361	AKGQFRFPQVY	TLPPSQSEM	TKNQVSLTCL	VGGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTTPVL
IMP761-H	361	AKGQFRFPQVY	TLPPSQSEM	TKNQVSLTCL	VGGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTTPVL
13E21gG4mut	421	DSDGSEFLYSR	LTVDKSRWQ	EGNVFSCSV	HEATHNHYTQ	KSLSLSLCK	
IMP761-H	421	DSDGSEFLYSR	LTVDKSRWQ	EGNVFSCSV	HEATHNHYTQ	KSLSLSLCK	

图23

13E21gK	1	MYSSAQELGL	LLICFOGTRC	DIWMTQPHF	MSTSVEDRVT	ITCKASQDVI	FDVANIQQKP
IMP761-L	1	MYSSAQELGL	LLICFOGTRC	DIWMTQPHF	LSASVEDRVT	ITCKASQDVI	FDVANIQQRP
13E21gK	61	GOAPKLLIYS	ASSRVSGVPS	RFTCSGSGTD	FTFTISSVQA	EDLAVIYCQ	HYSTPYTFGG
IMP761-L	61	GOAPKLLIYS	ASSRVSGVPS	RFTCSGSGTD	FTFTISSVQA	EDLAVIYCQ	HYSTPYTFGG
13E21gK	121	CTTLEIKRTV	APPSVFIIPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNEY	PREAKVQWKV	DNALQSONSQ
IMP761-L	121	CTTLEIKRTV	APPSVFIIPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNEY	PREAKVQWKV	DNALQSONSQ
13E21gK	181	ESVTEQDSND	STYSLSTLT	LSKADIEKKK	VIACEVTHQG	LSSPYTKSEN	ROEC
IMP761-L	181	ESVTEQDSND	STYSLSTLT	LSKADIEKKK	VIACEVTHQG	LSSPYTKSEN	ROEC

图24

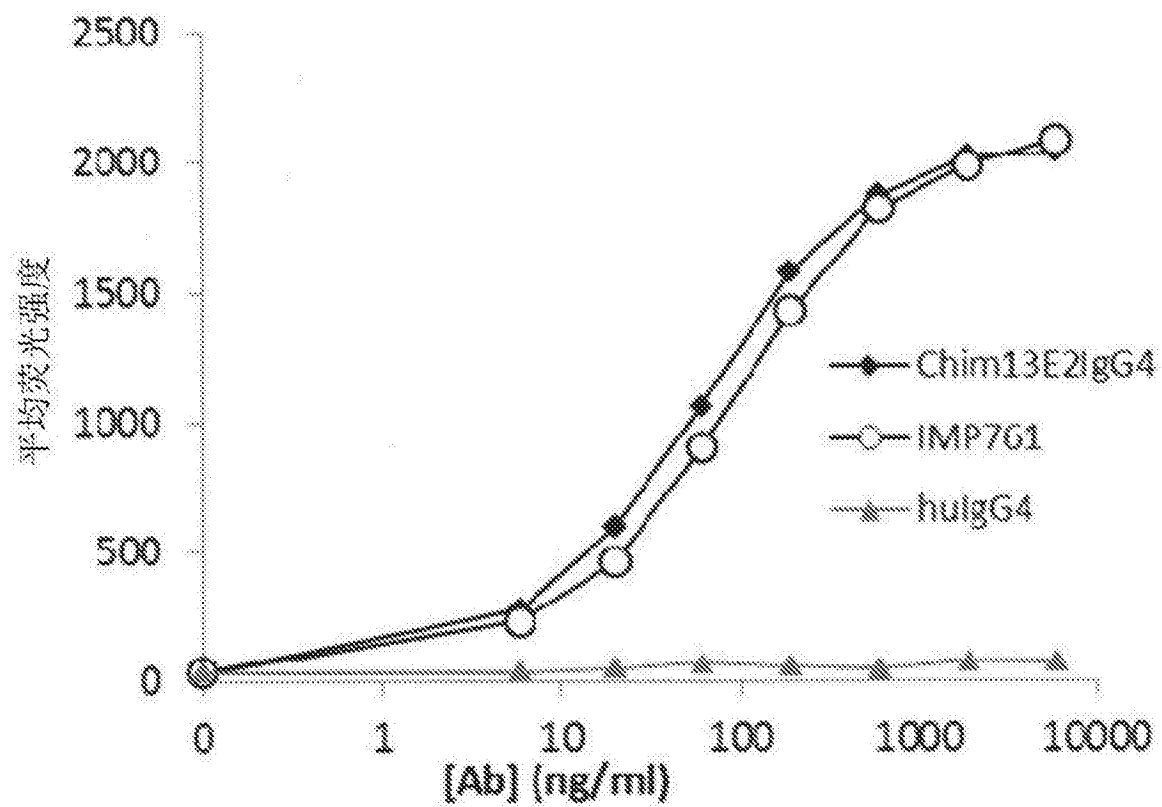


图25

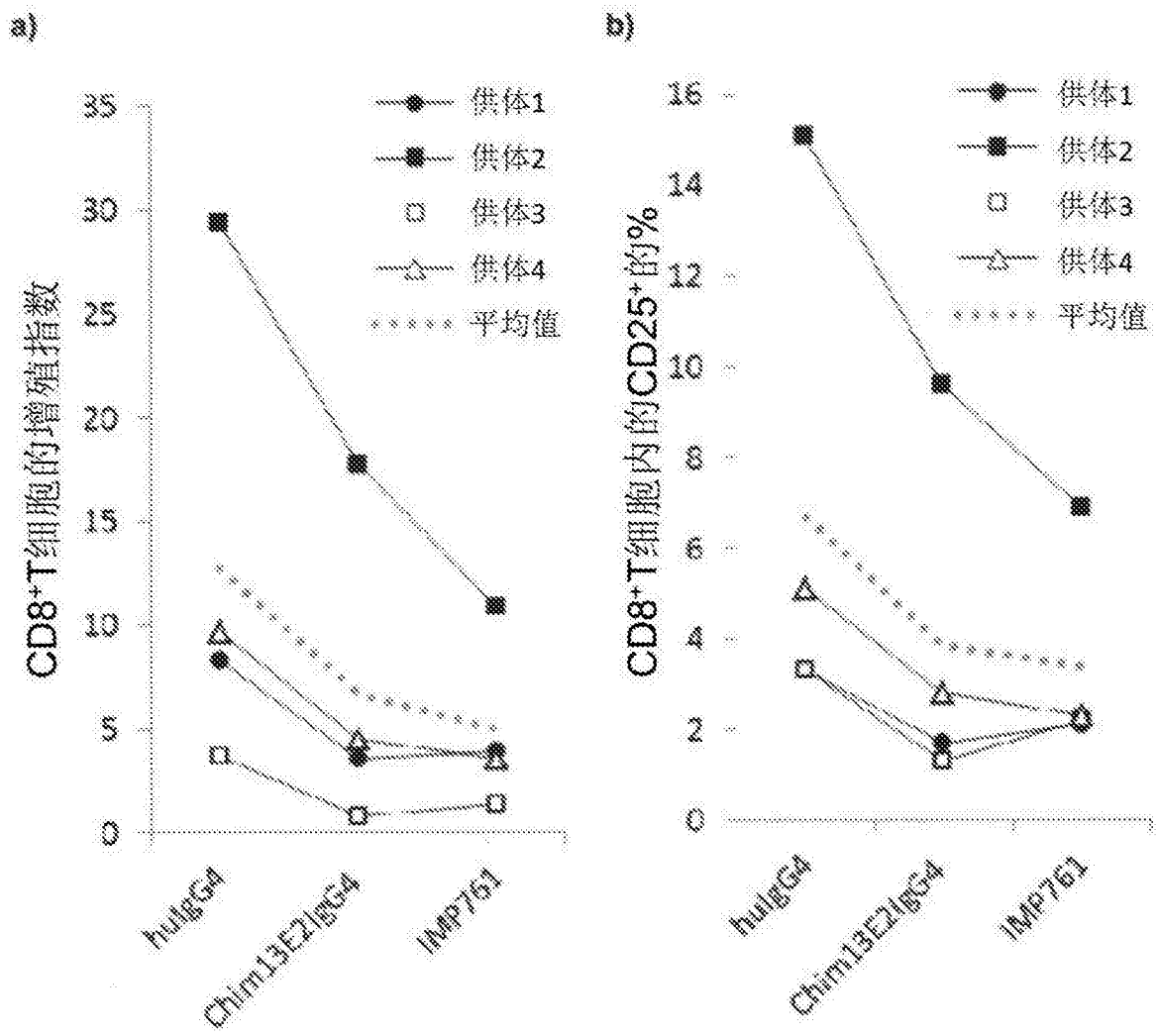


图26

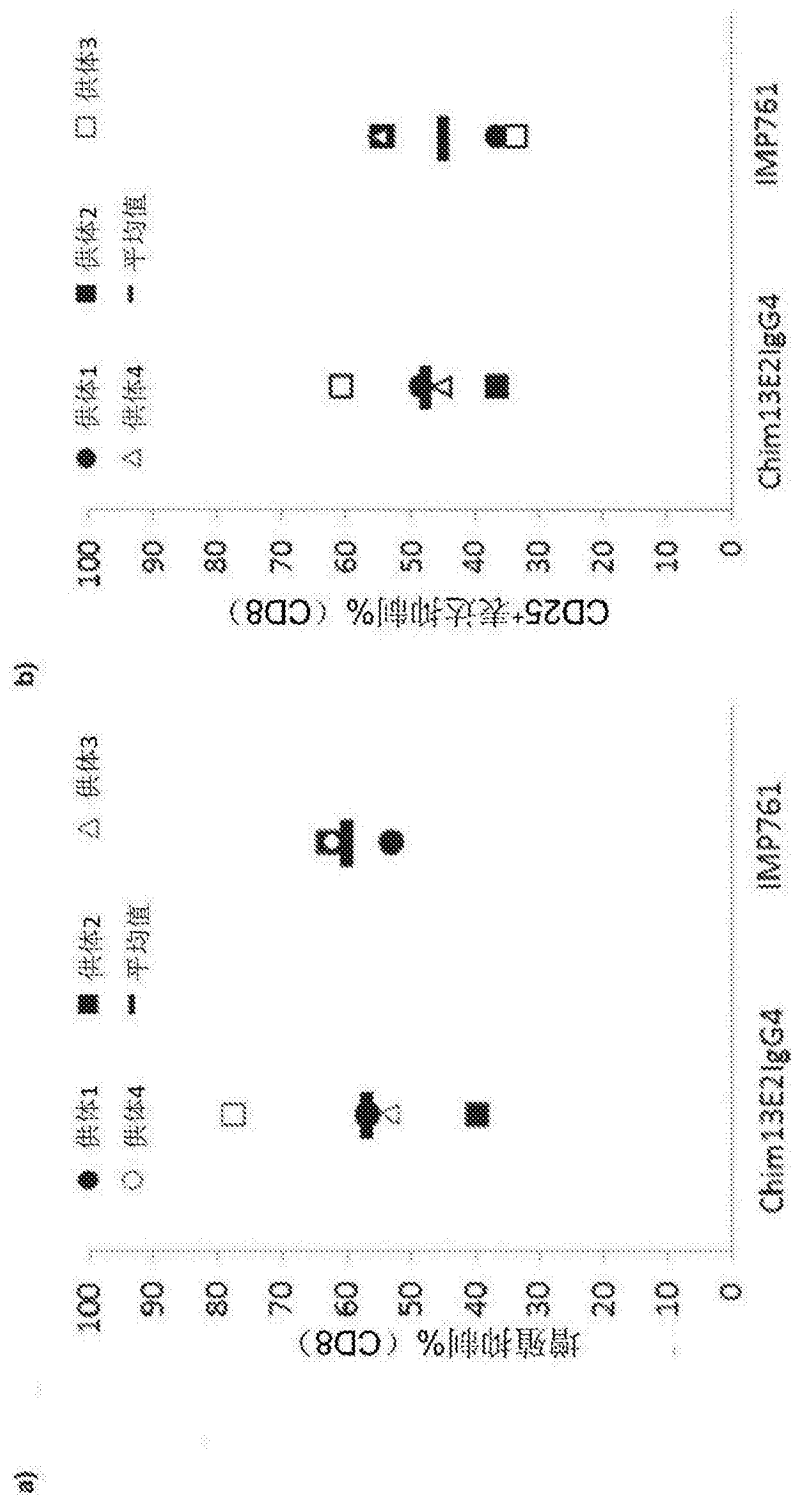


图27

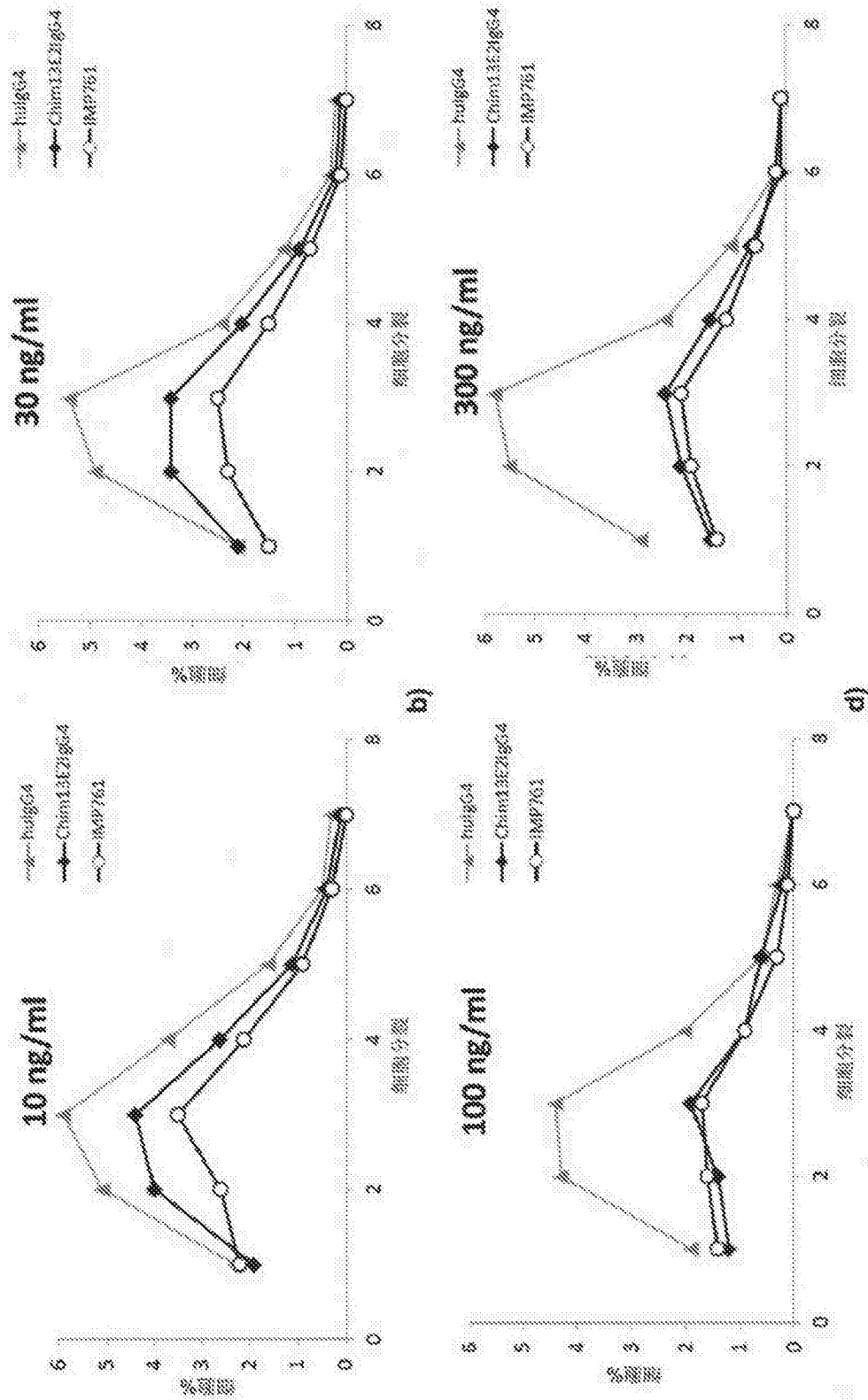


图28

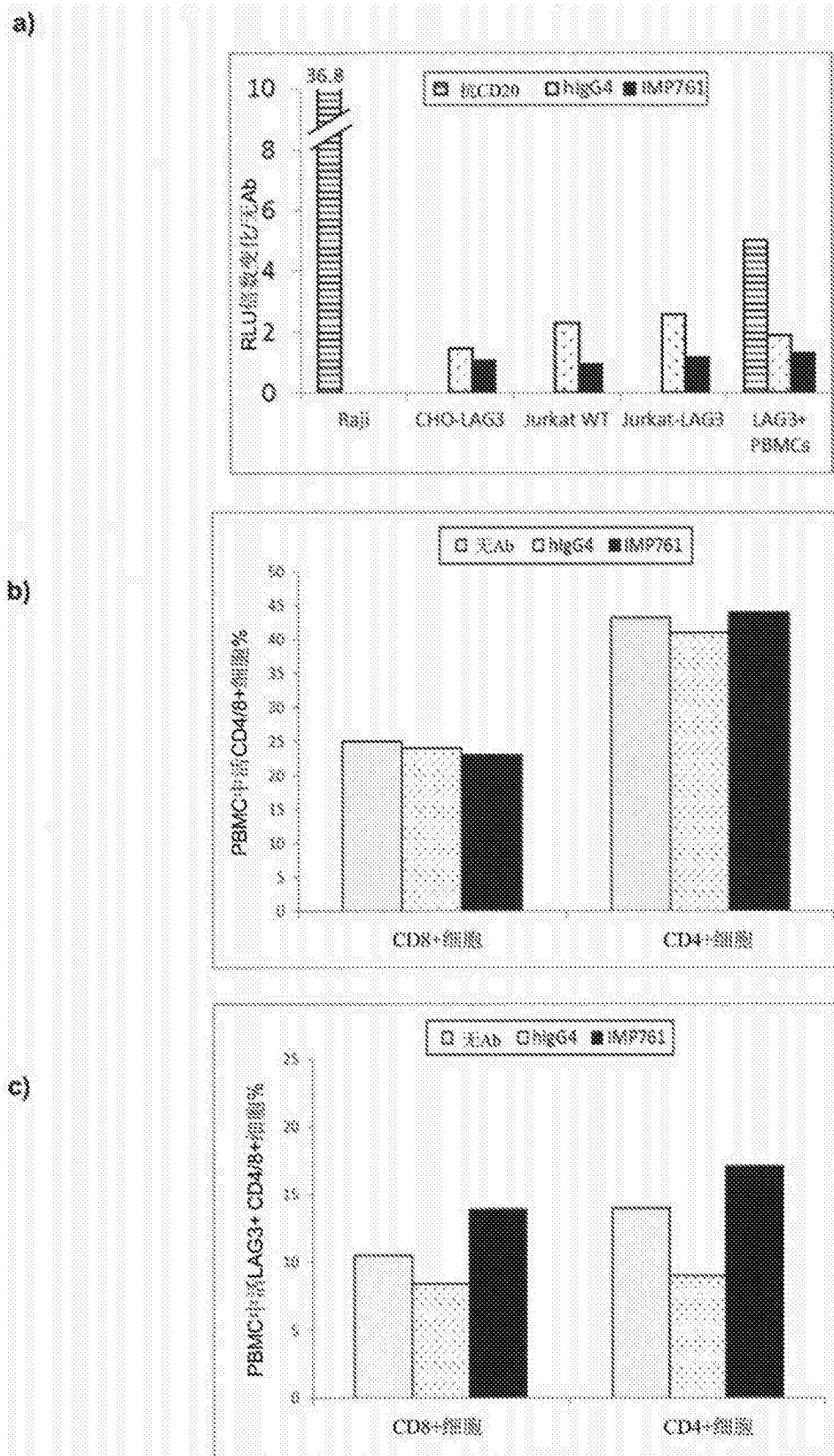
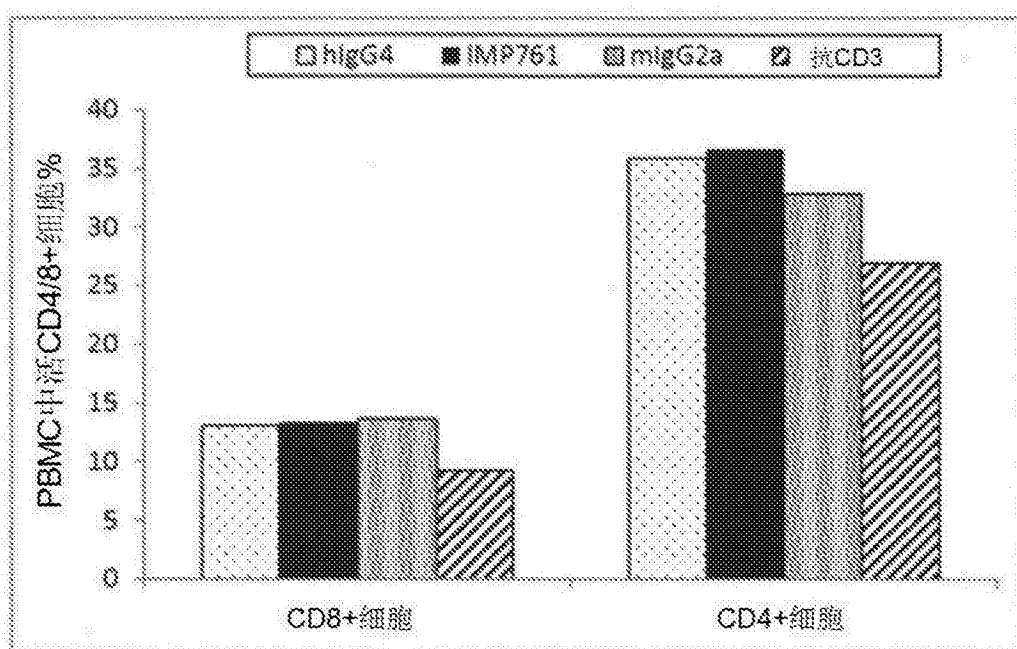


图29

a)



b)

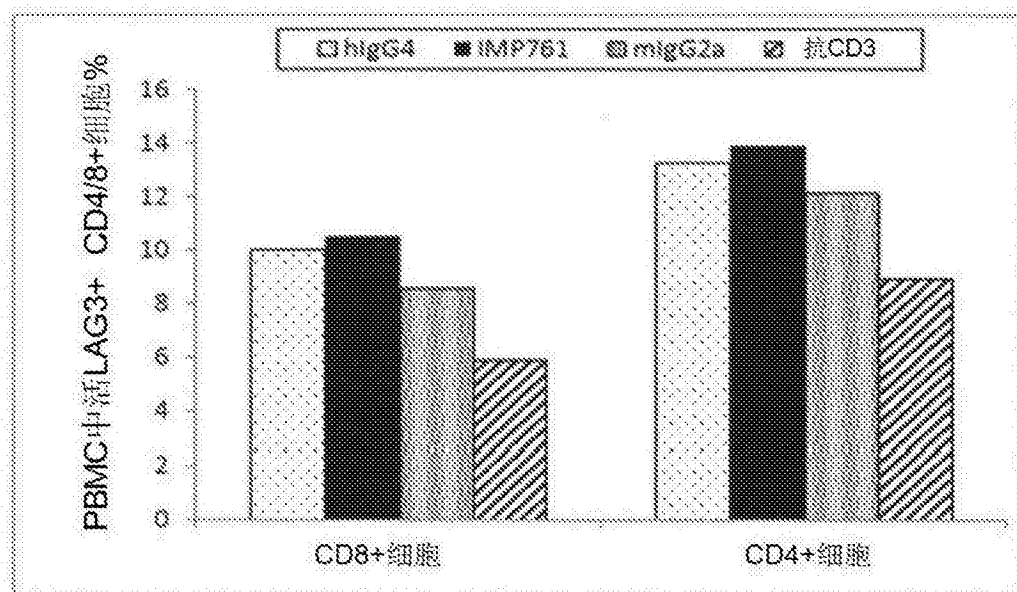


图30

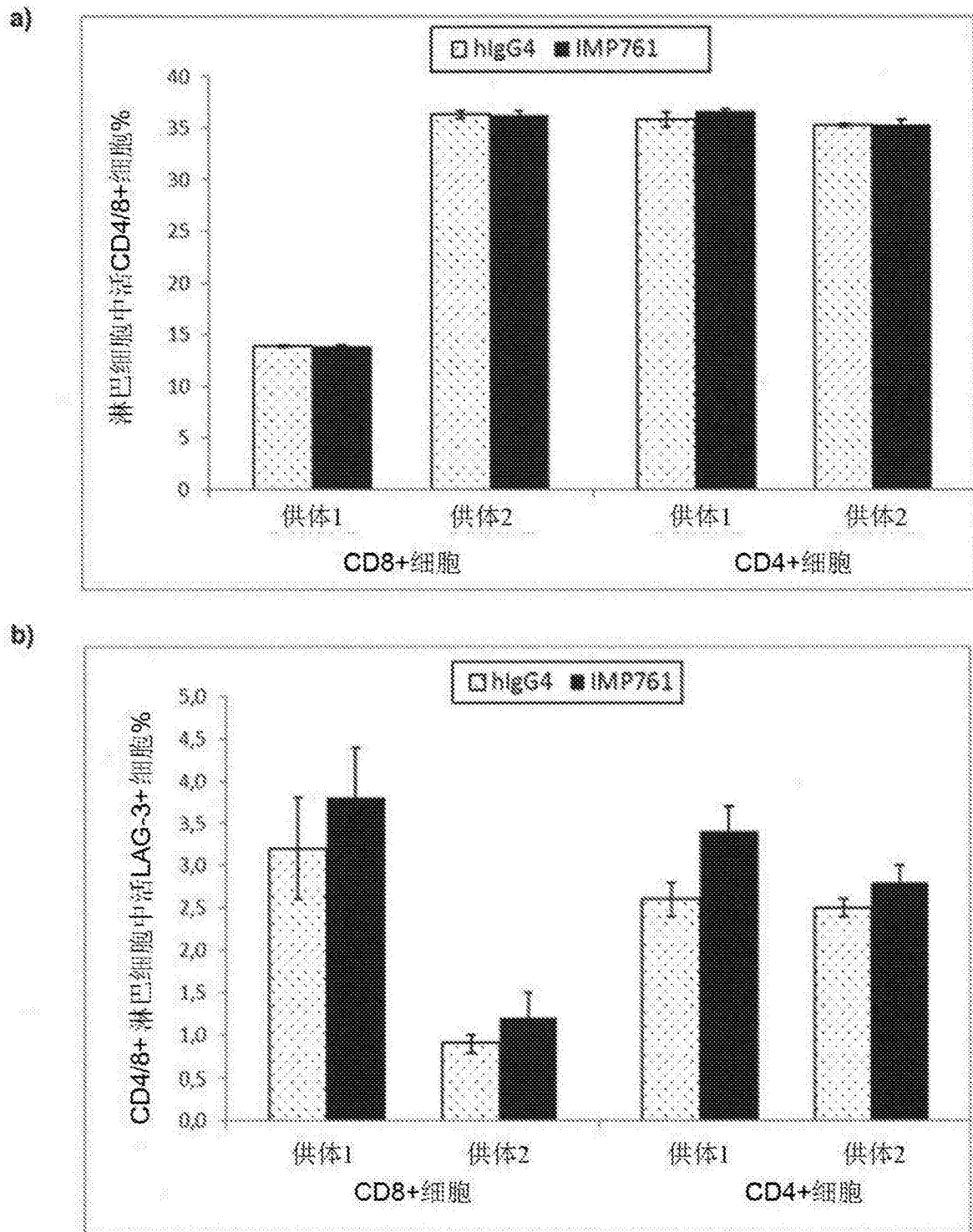


图31