



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119365487 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 24

(21) 申请号 202380038440.3

(22) 申请日 2023.03.07

(30) 优先权数据

63/268,945 2022.03.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/063821 2023.03.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/172890 EN 2023.09.14

(71) 申请人 艾吉纳斯公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 M·布拉努萨 K·舒尔茨

A·C·舒斯特 E·C·P·布伦德

O·伊纳托维奇 D·A·萨维茨基

K·M·布希尔 B·温斯利

C·加兰德

M·普佩切卡-斯威德尔

(74) 专利代理机构 北京聿华联合知识产权代理

有限公司 11611

专利代理师 刘华联

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

权利要求书3页 说明书64页

序列表(电子公布) 附图12页

(54) 发明名称

抗ILT2抗体及其用途

(57) 摘要

本公开提供了特异性结合Ig样转录物2 (ILT2)的抗体和多肽。本公开还提供了包含这些抗体的药物组合物、编码这些抗体的核酸、用于制备这些抗体的表达载体和宿主细胞,以及使用这些抗体治疗受试者的方法。

1. 一种特异性结合人ILT2的抗体,所述抗体包含:VH,其包含SEQ ID NO:1中所示的VH氨基酸序列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列;和VL,其包含SEQ ID NO:8中所示的VL氨基酸序列的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含分别在SEQ ID NO:9、10和11中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含分别在SEQ ID NO:15、16和19中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含分别在SEQ ID NO:12、16和17;13、16和17;14、16和17;12、16和18;13、16和18;或14、16和18中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含分别在SEQ ID NO:9、10、11、12、16和17;9、10、11、13、16和17;9、10、11、14、16和17;9、10、11、12、16和18;9、10、11、13、16和18;或9、10、11、14、16和18中所示的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含分别在SEQ ID NO:9、10、11、13、16和18中所示的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:1的VH氨基酸序列。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链恒定区,其任选地选自自由人IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、IgA₂和IgM组成的组。

9. 根据权利要求8所述的抗体,其中所述重链恒定区是在根据EU编号系统编号的位置228处包含P的人IgG₄重链恒定区。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含作为野生型重链恒定区的变体的重链恒定区,其中变体重链恒定区以低于所述野生型重链恒定区结合Fc γ R的亲合力结合所述Fc γ R。

11. 根据权利要求10所述的抗体,其中所述重链恒定区的氨基酸序列包含:

(a) 根据EU编号系统的以下氨基酸突变中的一种或多种:L234A、L235A、L235E、N297A、N297Q、N297G、P329A、P329G、G236D、P238D、S239D、S267E、L328F和L328E;或

(b) 选自自由根据EU编号系统的以下各项组成的组的一组氨基酸突变:L234A和L235A;L234A和L235E;L234A、L235A和L329A;或L234A、L235A和P329G;

S267E和L328F;P238D和L328E;P238D和选自自由以下各项组成的组的一个或多个取代:E233D、G237D、H268D、P271G和A330R;P238D、E233D、G237D、H268D、P271G和A330R;G236D和S267E;S239D和S267E;V262E、S267E和L328F;以及V264E、S267E和L328F。

12. 根据权利要求1至9中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含作为野生型重链恒定区的变体的重链恒定区,其中所述变体重链恒定区以高于所述野生型重链恒定区结合Fc γ R的亲合力结合所述Fc γ R。

13. 根据权利要求12所述的抗体,其中所述重链恒定区的氨基酸序列包含:

(a) 根据EU编号系统的以下氨基酸突变中的一种或多种:G236A、S239D、

F243L、T256A、K290A、R292P、S298A、Y300L、V305I、A330L、I332E、E333A、K334A、A339T和

P396L;或

(b) 选自由根据EU编号系统的以下各项组成的组的一组氨基酸突变:S239D;

T256A;K290A;S298A;I332E;E333A;K334A;A339T;S239D和I332E;S239D、A330L和I332E;S298A、E333A和K334A;G236A、S239D和I332E;以及F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述重链恒定区包含SEQ ID NO:33、34、35、36、37、38或39的氨基酸序列。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:20、21、22、23、24、25或26的氨基酸序列。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:8的VL氨基酸序列。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7的VL氨基酸序列。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:27、28、29、30、31或32的氨基酸序列。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中所述VH和所述VL包含分别在SEQ ID NO:1和5、1和2、1和3、1和4、1和6或1和7中所示的氨基酸序列。

20. 根据权利要求18或19所述的抗体,其中所述重链和所述轻链包含分别在SEQ ID NO:26和30、26和27、26和28、26和29、26和31、26和32、25和27、25和28、25和29、25和30、25和31、25和32、24和27、24和28、24和29、24和30、24和31、24和32、23和27、23和28、23和29、23和30、23和31、23和32、22和27、22和28、22和29、22和30、22和31、22和32、21和27、21和28、21和29、21和30、21和31、21和32、20和27、20和28、20和29、20和30、20和31、或20和32中所示的氨基酸序列。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体,其中:

(a) 所述抗体阻断ILT2与HLA-G、HLA-A、HLA-B和HLA-C的结合;并且/或者

(b) 所述抗体阻断ILT2介导的Fc γ R信号传导的抑制。

22. 一种多肽,其包含VH,所述VH包含SEQ ID NO:1中所示的VH氨基酸序列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

23. 根据权利要求22所述的多肽,其中所述VH包含分别在SEQ ID NO:9、10和11中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

24. 根据权利要求22或23所述的多肽,其中所述VH包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

25. 根据权利要求22至24中任一项所述的多肽,其中所述多肽包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:20、21、22、23、24、25或26的氨基酸序列。

26. 一种多肽,其包含VL,所述VL包含SEQ ID NO:8中所示的VL氨基酸序列的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

27. 根据权利要求26所述的多肽,其中所述VL包含分别在SEQ ID NO:15、16和19中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

28. 根据权利要求26或27所述的多肽,其中所述VL包含分别在SEQ ID NO:12、16和17;13、16和17;14、16和17;12、16和18;13、16和18;或14、16和18中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3

氨基酸序列。

29. 根据权利要求26至28中任一项所述的多肽,其中所述VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

30. 根据权利要求26至29中任一项所述的多肽,其中所述VL包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7的氨基酸序列。

31. 根据权利要求26至30中任一项所述的多肽,其中所述多肽包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:27、28、29、30、31或32的氨基酸序列。

32. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体或多肽,其中所述抗体或多肽与细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、毒素、放射性核素或可检测标记缀合。

33. 一种多核苷酸,其编码:根据权利要求1至21中任一项所述的抗体的VH、VL、重链和/或轻链;或根据权利要求22至32中任一项所述的多肽。

34. 一种载体,其包含根据权利要求33所述的多核苷酸。

35. 一种重组宿主细胞,其包含:

(a) 根据权利要求33所述的多核苷酸;

(b) 根据权利要求34所述的载体;

(c) 编码根据权利要求1至21中任一项所述的抗体的重链可变区或重链的第一多核苷酸和编码根据权利要求1至21中任一项所述的抗体的轻链可变区或轻链的第二多核苷酸;

(d) 第一载体,其包含编码根据权利要求1至21中任一项所述的抗体的重链可变区或重链的第一多核苷酸,以及第二载体,其包含编码根据权利要求1至21中任一项所述的抗体的轻链可变区或轻链的第二多核苷酸。

36. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至21或32中任一项所述的抗体、根据权利要求22至32中任一项所述的多肽、根据权利要求33所述的多核苷酸、根据权利要求34所述的载体或根据权利要求35所述的宿主细胞,以及药学上可接受的载剂或赋形剂。

37. 一种产生抗体的方法,所述方法包括在合适的条件下培养根据权利要求35所述的宿主细胞,使得所述多核苷酸得以表达,并且产生所述抗体。

38. 一种治疗受试者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至21或32中任一项所述的抗体、根据权利要求22至32中任一项所述的多肽、根据权利要求33所述的多核苷酸、根据权利要求34所述的载体、根据权利要求35所述的宿主细胞或根据权利要求36所述的药物组合物。

39. 根据权利要求1至21或32中任一项所述的抗体、根据权利要求22至32中任一项所述的多肽、根据权利要求33所述的多核苷酸、根据权利要求34所述的载体、根据权利要求35所述的宿主细胞或根据权利要求36所述的药物组合物用于制造药物中的用途,所述药物用于治疗有需要的受试者的癌症。

40. 根据权利要求1至21或32中任一项所述的抗体、根据权利要求22至32中任一项所述的多肽、根据权利要求33所述的多核苷酸、根据权利要求34所述的载体、根据权利要求35所述的宿主细胞或根据权利要求36所述的药物组合物,其使用于医学。

41. 根据权利要求1至21或32中任一项所述的抗体、根据权利要求22至32中任一项所述的多肽、根据权利要求33所述的多核苷酸、根据权利要求34所述的载体、根据权利要求35所述的宿主细胞或根据权利要求36所述的药物组合物,其使用于治疗有需要的受试者的癌症。

抗ILT2抗体及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2022年3月7日提交的美国临时申请号63/268,945的权益,该临时申请的内容通过引用以其全文并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 以电子方式提交的序列表XML(名称:198451_SL;大小:59,428字节;创建于:2023年3月1日)的内容通过引用以其全文并入本文。

技术领域

[0005] 本公开涉及对人Ig样转录物2(ILT2)具有特异性的抗体及其使用方法。

背景技术

[0006] Ig样转录物2(ILT2)是属于I型跨膜糖蛋白的抑制性受体,其具有四个胞外免疫球蛋白样结构域(D1-D4)、一个跨膜区和一个具有四个基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)的胞内尾部。ILT2在多种免疫细胞上表达,诸如T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、骨髓源性抑制细胞(MDSC)、树突状细胞(DC)和单核细胞/巨噬细胞的亚群。其配体为经典(HLA-A、-B和-C)和非经典MHC I类分子两者,但受体与HLA-G结合的亲和力是与经典MHC I类分子结合的亲和力的三到四倍。ILT2与HLA-G的结合会抑制先天性和适应性抗肿瘤免疫反应的功能和活性,促进癌细胞逃避免疫监视和抗肿瘤免疫。实体瘤中HLA-G的过度表达与不良预后、肿瘤转移和较短的无病存活期相关联,这表明ILT2/HLA-G相互作用的阻断在癌症疗法中可能是有效的。

[0007] 因此,需要针对ILT2的疗法。

发明内容

[0008] 本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体和多肽。本公开还提供了包含这些抗体的药物组合物、编码这些抗体的核酸、用于制备这些抗体的表达载体和宿主细胞,以及使用这些抗体治疗受试者的方法。本文公开的抗体特别有利,因为它们是ILT2/HLA-G相互作用的有效阻断剂,并且与目前临床开发中的其他ILT2抗体相比,表现出免疫细胞功能活性的高离体增强作用。申请人相信这将转化为优异的体内功效。

[0009] 在一个方面,本发明提供了一种特异性结合人ILT2的抗体,该抗体包含:VH,其包含SEQ ID NO:1中所示的VH氨基酸序列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列;和VL,其包含SEQ ID NO:8中所示的VL氨基酸序列的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0010] 在实施例1中,抗体包含分别在SEQ ID NO:9、10和11中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0011] 在实施例2中,抗体包含分别在SEQ ID NO:15、16和19中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0012] 在实施例3中,抗体包含分别在SEQ ID NO:12、16和17;13、16和17;14、16和17;12、

16和18;13、16和18;或14、16和18中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0013] 在实施例中,抗体包含分别在SEQ ID NO:9、10、11、12、16和17;9、10、11、13、16和17;9、10、11、14、16和17;9、10、11、12、16和18;9、10、11、13、16和18;或9、10、11、14、16和18中所示的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0014] 在实施例中,抗体包含分别在SEQ ID NO:9、10、11、13、16和18中所示的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0015] 在实施例中,抗体包含SEQ ID NO:1的VH氨基酸序列。

[0016] 在实施例中,抗体包含重链恒定区,其任选地选自由人IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、IgA₂和IgM组成的组。

[0017] 在实施例中,重链恒定区是在根据EU编号系统编号的位置228处包含P的人IgG4重链恒定区。

[0018] 在实施例中,抗体包含作为野生型重链恒定区的变体的重链恒定区,其中变体重链恒定区以低于野生型重链恒定区结合Fc γ R的亲和力结合Fc γ R。

[0019] 在实施例中,重链恒定区的氨基酸序列包含:

[0020] (a) 根据EU编号系统的以下氨基酸突变中的一种或多种:L234A、L235A、L235E、N297A、N297Q、N297G、P329A、P329G、G236D、P238D、S239D、S267E、L328F和L328E;或

[0021] (b) 选自由根据EU编号系统的以下各项组成的组的一组氨基酸突变:L234A和L235A;L234A和L235E;L234A、L235A和L329A;或L234A、L235A和P329G;S267E和L328F;P238D和L328E;P238D和选自由以下各项组成的组的一个或多个取代:E233D、G237D、H268D、P271G和A330R;P238D、E233D、G237D、H268D、P271G和A330R;G236D和S267E;S239D和S267E;V262E、S267E和L328F;以及V264E、S267E和L328F。

[0022] 在实施例中,抗体包含作为野生型重链恒定区的变体的重链恒定区,其中变体重链恒定区以高于野生型重链恒定区结合Fc γ R的亲和力结合Fc γ R。

[0023] 在实施例中,重链恒定区的氨基酸序列包含:

[0024] (a) 根据EU编号系统的以下氨基酸突变中的一种或多种:G236A、S239D、F243L、T256A、K290A、R292P、S298A、Y300L、V305I、A330L、I332E、E333A、K334A、A339T和P396L;或

[0025] (b) 选自由根据EU编号系统的以下各项组成的组的一组氨基酸突变:S239D;T256A;K290A;S298A;I332E;E333A;K334A;A339T;S239D和I332E;S239D、A330L和I332E;S298A、E333A和K334A;G236A、S239D和I332E;以及F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L。

[0026] 在实施例中,重链恒定区包含SEQ ID NO:33、34、35、36、37、38或39的氨基酸序列。

[0027] 在实施例中,抗体包含重链,该重链包含SEQ ID NO:20、21、22、23、24、25或26的氨基酸序列。

[0028] 在实施例中,抗体包含SEQ ID NO:8的VL氨基酸序列。

[0029] 在实施例中,抗体包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7的VL氨基酸序列。

[0030] 在实施例中,抗体包含轻链,该轻链包含SEQ ID NO:27、28、29、30、31或32的氨基酸序列。

[0031] 在实施例中,VH和VL包含分别在SEQ ID NO:1和5、1和2、1和3、1和4、1和6或1和7中所示的氨基酸序列。

[0032] 在实施例中,重链和轻链包含分别在SEQ ID NO:26和30、26和27、26和28、26和29、

26和31、26和32、25和27、25和28、25和29、25和30、25和31、25和32、24和27、24和28、24和29、24和30、24和31、24和32、23和27、23和28、23和29、23和30、23和31、23和32、22和27、22和28、22和29、22和30、22和31、22和32、21和27、21和28、21和29、21和30、21和31、21和32、20和27、20和28、20和29、20和30、20和31、或20和32中所示的氨基酸序列。

[0033] 在实施例中,抗体阻断ILT2与HLA-G、HLA-A、HLA-B和HLA-C的结合;并且/或者抗体阻断ILT2介导的Fc γ R信号传导的抑制。

[0034] 在一个方面,本公开提供了一种多肽,其包含VH,该VH包含SEQ ID NO:1中所示的VH氨基酸序列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0035] 在实施例中,多肽包含分别在SEQ ID NO:9、10和11中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0036] 在实施例中,VH包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0037] 在实施例中,多肽包含重链,该重链包含SEQ ID NO:20、21、22、23、24、25或26的氨基酸序列。

[0038] 在一个方面,本公开提供了一种多肽,其包含VL,该VL包含SEQ ID NO:8中所示的VL氨基酸序列的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0039] 在实施例中,VL包含分别在SEQ ID NO:15、16和19中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0040] 在实施例中,VL包含分别在SEQ ID NO:12、16和17;13、16和17;14、16和17;12、16和18;13、16和18;或14、16和18中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0041] 在实施例中,VL包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

[0042] 在实施例中,VL包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7的氨基酸序列。

[0043] 在实施例中,多肽包含轻链,该轻链包含SEQ ID NO:27、28、29、30、31或32的氨基酸序列。

[0044] 在实施例中,本文公开的抗体或多肽与细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、毒素、放射性核素或可检测标记缀合。

[0045] 在一个方面,本公开提供了一种多核苷酸,其编码:本文公开的抗体的VH、VL、重链和/或轻链;或本文公开的多肽。

[0046] 在一个方面,本公开提供了一种载体,其包含本文公开的多核苷酸。

[0047] 在一个方面,本公开提供了一种重组宿主细胞,其包含:

[0048] (a) 本文公开的多核苷酸;

[0049] (b) 本文公开的载体;

[0050] (c) 编码本文公开的抗体的重链可变区或重链的第一多核苷酸和编码本文公开的抗体的轻链可变区或轻链的第二多核苷酸;

[0051] (d) 第一载体,其包含编码本文公开的抗体的重链可变区或重链的第一多核苷酸,以及第二载体,其包含编码本文公开的抗体的轻链可变区或轻链的第二多核苷酸。

[0052] 在一个方面,本公开提供了一种药物组合物,其包含本文公开的抗体、本文公开的多肽、本文公开的多核苷酸、本文公开的载体、本文公开的宿主细胞,以及药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0053] 在一个方面,本公开提供了一种产生抗体的方法,该方法包括在合适的条件下培

养本文公开的宿主细胞,使得多核苷酸得以表达,并且产生抗体。

[0054] 在一个方面,本公开提供了一种治疗受试者中的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗体、本文公开的多肽、本文公开的多核苷酸、本文公开的载体、本文公开的宿主细胞,或本文公开的药物组合物。

[0055] 在一个方面,本公开提供了本文公开的抗体、本文公开的多肽、本文公开的多核苷酸、本文公开的载体、本文公开的宿主细胞或本文公开的药物组合物在制造药物中的用途,该药物用于治疗有需要的受试者的癌症。

[0056] 在一个方面,本公开提供了本文公开的抗体、本文公开的多肽、本文公开的多核苷酸、本文公开的载体、本文公开的宿主细胞或本文公开的药物组合物,其使用于医学。

[0057] 在一个方面,本公开提供了本文公开的抗体、本文公开的多肽、本文公开的多核苷酸、本文公开的载体、本文公开的宿主细胞或本文公开的药物组合物,其使用于治疗有需要的受试者的癌症。

附图说明

[0058] 图1是显示抗ILT2抗体BA211和序列优化的变体BA212、BA216、BA213、BA214和BA215与表达相对低水平的人ILT2的CHO细胞的结合的图。结合通过平均荧光强度(MFI)显示为以 $\mu\text{g/mL}$ 为单位的抗体浓度的函数。

[0059] 图2是显示抗ILT2抗体BA211和序列优化的变体BA212、BA216、BA213、BA214和BA215与表达人ILT2的Jurkat细胞的结合的图。结合通过平均荧光强度(MFI)显示为以 $\mu\text{g/mL}$ 为单位的抗体浓度的函数。

[0060] 图3是显示用不同Fc主链格式化的序列优化的变体抗ILT2抗体与表达相对高水平的人ILT2的CHO细胞的结合的图。结合通过平均荧光强度(MFI)显示为以 $\mu\text{g/mL}$ 为单位的抗体浓度的函数。

[0061] 图4A至图4B是显示序列优化的变体抗ILT2抗体BA252和参考抗体15G8与表达相对高(图4A)和低(图4B)水平的人ILT2的CHO细胞的结合的图。结合通过平均荧光强度(MFI)显示为以 $\mu\text{g/mL}$ 为单位的抗体浓度的函数。*** $p < 0.001$ 和**** $p < 0.0001$

[0062] 图5是显示BA211阻断HLA-G与高表达ILT2的CHO细胞之间相互作用的能力的图。阻断通过HLA-G-Fc-PE的最大平均荧光强度(MFI)的百分比显示为抗体浓度($\mu\text{g/mL}$)的函数。

[0063] 图6是显示序列优化的变体抗ILT2抗体BA252阻断HLA-G与高表达ILT2的CHO细胞之间相互作用的能力的图。阻断通过HLA-G-Fc-PE的最大平均荧光强度(MFI)的百分比显示为抗体浓度($\mu\text{g/mL}$)的函数。

[0064] 图7A至图7C是显示序列优化的变体抗ILT2抗体BA252阻断HLA-A(图7A)、HLA-B(图7B)或HLA-C(图7C)与高表达ILT2的CHO细胞之间相互作用的能力的图。阻断分别通过HLA-A*02:01、HLA-B*07:02和HLA-C*07:02五聚体的最大平均荧光强度(MFI)的百分比显示为抗体浓度($\mu\text{g/mL}$)的函数。

[0065] 图8A至图8B是显示在抗CD20抗体利妥昔单抗存在下与表达HLA-G的Ramos细胞共孵育的表达ILT2和CD16的Jurkat报道细胞中NFAT-萤光素酶信号传导增加,以及抗ILT2 IgG1(图8A)和IgG4(图8B)抗体的序列优化的变体的浓度增加的图。信号传导通过萤光素酶活性以相对发光单位(RLU)显示为抗体浓度($\mu\text{g/mL}$)的函数。

[0066] 图9A至图9B是比较在抗CD20抗体利妥昔单抗存在下与表达HLA-G的Ramos细胞共孵育的表达ILT2和CD16的Jurkat报道细胞中NFAT-荧光素酶信号传导增加,以及BA252或参考抗体15G8(图9A)的浓度增加的图。阻断通过荧光素酶活性以相对发光单位(RLU)显示为抗体浓度($\mu\text{g/mL}$)的函数。本实验中BA252的EC50显著低于15G8的EC50(图9B)。*** $p<0.001$

[0067] 图10是显示序列优化的变体抗ILT2抗体BA252和对照抗体与补体组分C1q的结合的图。结合通过450nm处的光密度(OD)显示为抗体浓度($\mu\text{g/mL}$)的函数。

[0068] 图11A至图11B是显示在BA252、参考ILT2抗体15G8或同种型对照存在下引发的健康供体PBMC中初级免疫细胞的活化的图。CD8+T、NKT和NK细胞的活化显示为3个供体的CD25表达%的函数。如果所分析的免疫亚群中的至少一个通过与同种型对照相比CD25表面表达增加 $\geq 20\%$ 而对BA252作出反应,则认为供体是“反应者”(图11A),否则认为它们是“非反应者”(图11B)。

[0069] 图12A至图12B是显示原代人巨噬细胞(M ϕ)上CD163(图12A)或CD86/CD206(图12B)的表面表达差异的图,并表示为占CD33+骨髓细胞总群体的%。在同种型对照、BA252或15G8抗体存在下,从纯化的人单核细胞分化出M ϕ ,并且不进行处理或使用来自表达HLA-G的JEG-3癌细胞(癌细胞CM)的条件培养基或IL-10+TGF β 混合物极化成M2样M ϕ 。*** $p<0.001$, * $p<0.05$, ns=不显著。

[0070] 图13A至图13F是显示在不存在或存在未缀合的BA252的情况下,缀合的抗ILT2抗体BA252-APC(图13A)、VMP55-PE(图13B)、1Q-G2-APC(图13C)、292305-PE(图13D)、GHI/75-PE(图13E)和4F9-FITC(图13F)与表达相对高的人ILT2水平的CHO细胞的结合的一系列图。结合显示为中值荧光强度(MFI),作为未缀合的BA252的浓度的函数。

具体实施方式

[0071] 本公开提供了抗ILT2抗体和多肽。本公开还提供了包含这些抗体的药物组合物、编码这些抗体的核酸、用于制备这些抗体的表达载体和宿主细胞,以及使用这些抗体治疗受试者的方法。本文公开的抗体特别可用于治疗受试者的癌症。

[0072] 定义

[0073] 如本文所用的表述“ILT2”是指免疫球蛋白样转录物2,其也称为白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员1(LILRB1)或白细胞免疫球蛋白样受体1(LIR-1)。全长人Ig样转录物2的氨基酸序列可在登录号Q8NHL6(UniProtKB)中找到。ILT2是I类MHC抗原的抑制性受体,其可识别广谱的HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-G和HLA-F等位基因。除非明确指定来自非人物种,否则本文中对蛋白质、多肽和蛋白质片段的所有提及均旨在指相应蛋白质、多肽或蛋白质片段的人版本。因此,表述“ILT2”意指人ILT2,除非指定为来自非人物种,例如,“小鼠ILT2”、“猴ILT2”等。

[0074] 表1. 示例性的ILT-2氨基酸序列。

[0075]

描述	SEQ ID NO	氨基酸序列
人 ILT2 PE01 全长， 具有胞外结 构域 (ECD)、跨 膜结构域 (TM)和胞 内结构域	43	GHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRLYREKKT ALWITRIPQELVKKGQFPIPSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSE SSDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVILQCDSQVAFD GFSLCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWW YRCYAYDSNSPYEWSLPSDLLELLVLGVSKKPSLSVQPGPIVA PEETLTLCGSDAGYNRFVLYKDGERDFLQLAGAQPQAGLSQ ANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSSEWSAPSDPLDILIAGQF YDRVSLSVQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMQTFLLTKEGAA DDPWRLRSTYQSQKYQAEFPMGPV TSAHAGTYRCYGSQSSK PYLLTHPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGS DPQSGGLGRHLGVVIGILVAVILLLLLLLLLLLFLILRHRRQGKHW STQRKADFQHPAGAVGPEPTDRGLQWRSSPAADAQEENLYAA VKHTQPEDGVEMDTRSPHDEDPQAVTYAEVKHSRPRREMAS PPSPLSGEFLDTKDRQAEEDRQMDTEAAASEAPQDVTYAQLH SLTLRREATEPPPSQEGPSPAVPSIYATLAIH

[0076]

人 ILT2 PE01 ECD	44	GHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRLYREKKT ALWITRIPQELVKKKGQFPIPSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSE SSDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVILQCDSQVAFD GFSLCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWW YRCYAYDSNSPYEWSLPSDLLELLVLGVSKKPSLSVQPGPIVA PEETLTLCGSDAGYNRFVLYKDGERDFLQLAGAQPQAGLSQ ANFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSSEWSAPSDPLDILIAGQF YDRVSLSVQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMQTFLLTKEGAA DDPWRLRSTYQSQKYQAEFPMGPVTSAHAGTYRCYGSQSSK PYLLTHPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGS DPQSGGLGRH
人 ILT2 PE02 ECD	45	GHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRLYREKKT APWITRIPQELVKKKGQFPIPSITWEHTGRYRCYYGSDTAGRSES SDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVTLQCDSQVAFDG FILCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWYR CYAYDSNSPYEWSLPSDLLELLVLGVSKKPSLSVQPGPIVAPEE TLTLQCGSDAGYNRFVLYKDGERDFLQLAGAQPQAGLSQAN FTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSSEWSAPSDPLDILIAGQFYD RVSLSVQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMQTFLLTKEGAADDP WRLRSTYQSQKYQAEFPMGPVTSAHAGTYRCYGSQSSKPYL LTHPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGSDPQ SGLGRH
人 ILT2 PE03 ECD (Sino biological, 16014-H08 H)	46	GHLPKPTLWAEPGSVITQGSPVTLRCQGGQETQEYRLYREKKT APWITRIPQELVKKKGQFPIPSITWEHAGRYRCYYGSDTAGRSE SSDPLELVVTGAYIKPTLSAQSPVVNSGGNVTLQCDSQVAFD GFILCKEGEDEHPQCLNSQPHARGSSRAIFSVGPVSPSRRWWY RCYAYDSNSPYEWSLPSDLLELLVLGVSKKPSLSVQPGPIVAPE ETLTLCGSDAGYNRFVLYKDGERDFLQLAGAQPQAGLSQA NFTLGPVSRSYGGQYRCYGAHNLSSEWSAPSDPLDILIAGQFY DRVSLSVQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMQTFLLTKEGAAD DPWRLRSTYQSQKYQAEFPMGPVTSAHAGTYRCYGSQSSKP YLLTHPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTSGPEDQPLTPTGS DPQSGGLGRH
食蟹猴 ILT2	47	GILPKPTLWAEPPDRVITQGSPVTLRCQGNLEAREYHLYRERKS

[0077]

直系同源蛋白，变体 1 ECD		ASWITLVRPELVKKGQFPIPSTTWEHTGRYRCLYYSHSWWSEP SDPLELVVTGVYSKPTLSALPSPVVASGGNVTLCDSQLAFGG FILCKEGDEHPQCLNSQPSTRGASRAVFSVGPVSPSRRWSYRC YGYDSRSPSVWSLPSDLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVVAPGE KLTLQCGSDAGYDRFVLYKEGERDFPQRSGRQPQAGLSQANF TLGPVRGSHGGQYRCSGAHNLSSEWSAPSDPLDILIAGQIRAR PSLSVQPGPTVASGENVTLLCQSQGWMDFLLTKEGAADAPL RLKSKYQSHMYQAEFPMSPVTSAHAGTYRCYASFSSNPYLLT HPSEPLELVVSGPEDQPLTPTGSAPQSGLGRLHG
食蟹猴 ILT2 直系同源蛋白，变体 2 ECD	48	GILPKPTLWAEPRVITQGSPVTLRCQGNLEALGYHLYRERKS ASWITSIRPELVKKGQFPIPSITWEDAGRYRCLYYSHSWWSEH SDPLELVVTGTYSKPTLSALPSPVVASGGNVTLCDSQLAFGG FILCKEGDEHPQCLNSQPSTRGASRAVFSVGPVSPSRRWSYRC YGYDSHSPYVWSLPSDLLELLVPGVSNKPSLSVQPGPVVAPGE KLTLQCGSDVG YDRFVLYKEGERDLLQSRGRQPQAGLSQANF SLGPVWGS HGGQYRCSGAHNLSSEWSAPSDPLDILISRQTQA RPSLSVQPGPMVASGENVTLLCQSQGWMDFLLIKEGAADAP LRLKSKRRSYIYQAEFPMSPVTSTHAGTYRCYGSFSSNPYLLT HPSEPLELVVSGPSESPSLPLTGPTPTGPEDQSLNPTGSDPQSG LGRHLG
食蟹猴 ILT2 直系同源蛋白，变体 3 ECD	49	GILPKPTLWAEPRVITQGSPVTLRCQGNLEARGYHLYRERKS ASWITLIRPELVKKGQFPIPSITWEHAGRYRCQYSSRNSWSEPS DPLELVVTGAYSKPTLSALPSPVVASGGSVTLQCVSQVAFDGF TLCKEGEDEHPQRLNCQSHARGWSWAVFSVGPVSPSRRWSY RCYSYDSRSPYVWSLPSDLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVVAP GESLTLQCGSDVG YDRFVLYKEGEGEFLQRPGRQPQAGLSQA NFTLGPVRRSHGGQYRCSGAHNLSSEWSAPSDPLDILISEQFY DVVSLSVQPGPTVTSGENVTLCCSRAQFHTFLLTREGAAHPP LHLRSEHQAQQYQAEFPMGPVTSAHAGTYRCYSSLSFNPYLL SHPSDPLELVVSGPSRSPSPPLTGPTPTPGLGRHLG
恒河猴 ILT2 直系同源蛋白，变体 1 ECD	50	GTFPKPTLWAEPGSMISKGSPVTLRCQGSPLVQDYRLQREKKT ASWVRRIQQELVKKGYFAIASIAWEHTGQYRCQYYSHSWWS EPSDPLELVVTGAYSKPTLSALPSPVVASGGNVTLCDSQVAF GGFVLCKEGEDEHPQCHSQPRTRGSSRAVFSVGPVSPSRRWS

[0078]

		YRCYGYELHYRYVWSLPSDLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVV APGDKLTLQCGSDAGYNRFALYKEGERDFLQRPGRQPQAGLS QANFLLGPVRRSHGGQYRCSGAHNLSSEWSAPSDPLDILIAG QIRGRPSLLVQPGPTVVSGENVTLQCSSWQFHVFLTQAGA ADAHLHLRSMYKYPKYQAEFPMSPVTSAHAGTYRCYGSHTS DSYLLSIPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTCGPEDQPLTPTG SDPQSGGLGRHLG
恒河猴 ILT2 直系同源蛋 白, 变体 2 ECD	51	GILPKPTLWAEPGSMISEGSPVTLRCQGSLLQVQDYCLYREKKP ASWVRQIRQELVKKGYFAIGFITWEHTGQYRCQYYNHSWWS EPSDPLELVVIGAYSKPTLSALPSPVVASGRNVTLCDSQVAF DGFILCKEGEDEHPQRLNCQSHARGWSWAVFSVGPVSPSHRW SYRCYGYISSDPYVWSLPSDLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPVV ARGDKLTLQCGSDAGYDRFALYKEGEGDFLQRPQQPQAGL SQANFLLGPVSRSHGGQYRCSGAHNLSSEWSAPSDPLDILIAG QIRGRPFLSVQPGPKVVSGENVTLQCSSWQFHAFLTQAGA ADAHLHLRSMHKYPKYQAEFPISPVTSAHAGTYRCYGSRSSN PYLLSVPSDPLELVVSGPSGGPSSPTTGPTSTCGPEDQPLTPTG SAPQSGGLGRHLG
非洲绿猴 ILT2 ECD	52	GTLPKPTLWAEPGSVISEGSPVTLRCQGSLLQVQEYRLYREKNP ASWVRRIPQELVKKGYFPIASITWEHAGRYRCNYGSYIEGRSE PSDPLDLMVTGAYRKPTLSALPSPVVASGGNVSLQCVSQVAF DSFILCKEGEDEHPQRLNSHFHAHGWSWAVFSVGPVSPSRRW SYRCYGYDSRSPYMWSLPSDLLELLVPGVSKKPSLSVQPGPV VALGEKLTLCQCGSDAGYNRFVLYKEGERDFLQRAGRQPQAG LSQANFPLGLVSRSHGGQYRCYGAHNLSSEWSSPSDPLDILIS GQFYVTVSLSVLPMPVSGENVTLQCSSWELHTFLTKEG AAHPPRLRSKRAPKYQAEFPMGPVTSAHKGTYRCYGSHTS NPYLLSLPSDPLELVVSGPSGSPSLPPTGSTPTPAGPEDQPLTPT GSDPQSGGLGRHLG

[0079] 如本文所用,术语“抗体(antibody/antibodies)”包括全长抗体、全长抗体的抗原结合片段以及包含抗体CDR、VH区和/或VL区的分子。抗体的实例包括但不限于单克隆抗体、重组产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、胞内抗体、异源缀合抗体、抗体-药物缀合物、单结构域抗体、单价抗体、单链抗体或单链Fv(scFv)、骆驼化抗体、亲和体、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗独特型(抗Id)抗体(包括例如抗-抗Id抗体),以及上述任一者的抗原结合片段。在某些实施例中,本文描述的抗体是指多克隆抗体群体。抗体可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、

IgD、IgA或IgY)、任何类别(例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、或IgA₂),或任何亚类(例如,IgG_{2a}或IgG_{2b})。在某些实施例中,本文描述的抗体是IgG抗体或其类别(例如,人IgG₁或IgG₄)或子类别。在具体实施例中,该抗体是人源化单克隆抗体。在另一具体实施例中,该抗体是人单克隆抗体。

[0080] “多特异性抗体”是特异性结合两种或更多种不同抗原或同一抗原的两种或更多种不同区域的抗体(例如,双特异性抗体)。多特异性抗体包括含有两个不同抗原结合位点(不包括Fc区)的双特异性抗体。多特异性抗体可包括例如重组产生的抗体、人抗体、人源化抗体、表面重构抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、异源缀合抗体、连接的单链抗体或连接的单链Fv(scFv)、骆驼化抗体、亲和体、连接的Fab片段、F(ab')₂片段、化学连接的Fv和二硫键连接的Fv(sdFv)。多特异性抗体可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何类别(例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、或IgA₂),或任何亚类(例如,IgG_{2a}或IgG_{2b})。在某些实施例中,本文描述的多特异性抗体是IgG抗体或其类别(例如,人IgG₁、IgG₂或IgG₄)或亚类。

[0081] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”意指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。例如,Kabat等人,J.Biol.Chem.252,6609-6616(1977)和Kabat等人,Sequences of protein of immunological interest.(1991)、Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)和MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)已经描述了这些特定区域,所有这些文献均通过引用以其全文并入本文,其中定义包括彼此比较时氨基酸残基的重叠或子集。在某些实施例中,术语“CDR”是如由MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)和Martin A.“Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains,”在Antibody Engineering,Kontermann和Dübel主编,第31章,第422-439页,Springer-Verlag,Berlin(2001)中定义的CDR。在某些实施例中,术语“CDR”是如由Kabat等人,J.Biol.Chem.252,6609-6616(1977)和Kabat等人,Sequences of protein of immunological interest.(1991)定义的CDR。在某些实施例中,使用不同的惯例来定义抗体的重链CDR和轻链CDR。在某些实施例中,重链CDR和/或轻链CDR通过进行抗体的结构分析并鉴定预测与靶分子(例如,人ILT2)的表位区接触的可变区中的残基来定义。CDRH1、CDRH2和CDRH3表示重链CDR,并且CDRL1、CDRL2和CDRL3表示轻链CDR。

[0082] 如本文所用,术语“可变区”和“可变结构域”可互换使用并且是本领域常见的。可变区通常指抗体的一部分,一般是轻链或重链的一部分,通常是成熟重链中约氨基末端的110至120个氨基酸或110至125个氨基酸,以及成熟轻链中约90至115个氨基酸,它们在抗体之间的序列上有很大不同,并用于特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。序列的可变性集中在那些被称为互补决定区(CDR)的区域,而可变区中更高度保守的区域被称为框架区(FR)。不希望受任何特定机制或理论的束缚,据信轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用和特异性。在某些实施例中,可变区是人可变区。在某些实施例中,可变区包含啮齿动物或鼠CDR和人框架区(FR)。在某些实施例中,可变区是灵长类动物(例如,非人灵长类动物)可变区。在某些实施例中,可变区包含啮齿类动物或鼠CDR和灵长类动物(例如,非人灵长类动物)框架区(FR)。

[0083] 如本文所用,术语“VH”和“VL”分别指抗体重链可变区和轻链可变区,如Kabat等

人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (NIH Publication No. 91-3242, Bethesda) 中所述, 该文献通过引用以其全文并入本文。

[0084] 如本文所用, 术语“恒定区”在本领域中是常见的。恒定区是抗体部分, 例如, 轻链和/或重链的羧基末端部分, 其不直接参与抗体与抗原的结合, 但其可以表现出各种效应子功能, 诸如与Fc受体的相互作用(例如, Fc γ 受体)。

[0085] 如本文所用, 术语“重链”当用于指抗体时可以指基于恒定区的氨基酸序列的任何不同的类型, 例如, α (α)、 δ (δ)、 ϵ (ϵ)、 γ (γ) 和 μ (μ), 其分别产生抗体的IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类别, 包括IgG的亚类, 例如, IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄。

[0086] 如本文所用, 术语“轻链”当用于指抗体时可以指基于恒定区的氨基酸序列的任何不同的类型, 例如, κ (κ) 或 λ (λ)。轻链氨基酸序列是本领域熟知的。在具体实施例中, 轻链是人轻链。

[0087] 如本文所用, 术语“特异性结合”、“特异性识别”、“免疫特异性结合”和“免疫特异性识别”是抗体上下文中的类似术语, 并且是指与抗原(例如, 表位或免疫复合物)结合的分子, 此结合如本领域技术人员所理解的那样。例如, 与抗原特异性结合的分子可以与其他肽或多肽结合, 通常具有较低的亲和力, 如通过例如免疫测定、BIAcore[®]、KinExA 3000仪器(Sapidyne Instruments, Boise, ID)或本领域已知的其他测定所确定的。在具体实施例中, 与抗原特异性结合的分子以至少2个对数(例如, 10的因子)、2.5个对数、3个对数、4个对数的K_A或大于分子与另一种抗原非特异性结合时的K_A与抗原结合。

[0088] 如本文所用, 术语“亲和力”是指分子的单个结合位点(例如, 抗体)与其结合配偶体(例如, 抗原)之间的非共价相互作用的总强度。除非另有说明, 否则如本文所用, “结合亲和力”是指内在结合亲和力, 其反映结合对(例如, 抗体和抗原)的成员之间1:1的相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(K_d)表示。亲和力可以通过本领域已知的常见方法来测量, 包含本文所描述的那些方法。

[0089] 如本文所用, 术语“EU编号系统”是指抗体的恒定区的EU编号惯例, 如Edelman, G.M.等人, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) 和Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health and Human Service^s, 第5版, 1991中所述, 这些文献中的每一者均通过引用以其全文并入本文。

[0090] 如本文所用, 术语“治疗(treat/treating/treatment)”是指本文所述的治疗性或预防性措施。“治疗”的方法采用向患有疾病或疾患或者易患有此疾病或疾患的受试者施用抗体, 以预防、治愈、延迟、减轻疾病或疾患或者复发性疾病或疾患的严重程度, 或改善其一种或多种症状, 或者以延长受试者的存活期, 超过在不存在此类治疗的情况下所预期的存活期。

[0091] 如本文所用, 术语“有效量”在向受试者施用疗法的上下文中是指实现期望的预防或治疗效果的疗法的量。

[0092] 如本文所用, 术语“受试者”包括任何人或非人的动物。在某些实施例中, 受试者是人或非人哺乳动物。在某些实施例中, 受试者是人。

[0093] 如本文所用, 关于抗体或多核苷酸, 术语“经分离的”是指与存在于抗体或多核苷酸的天然来源中的一种或多种污染物(例如, 多肽、多核苷酸、脂质或碳水化合物等)分离的抗体或多核苷酸。本文描述的“经分离的抗体”的所有情况另外预期为可以但不必是经分离

的抗体。本文描述的“经分离的多核苷酸”的所有情况另外预期为可以但不必是经分离的多核苷酸。本文描述的“抗体”的所有情况另外预期为可以但不必是经分离的抗体。本文描述的“多核苷酸”的所有情况另外预期为可以但不必是经分离的多核苷酸。

[0094] 可以使用数学算法来实现对两个序列(例如,氨基酸序列或核酸序列)之间的“同一性百分比”的测定。用于比较两个序列的数学算法的具体、非限制性实例是Karlin S和Altschul SF(1990)PNAS 87:2264-2268的算法,如Karlin S和Altschul SF(1993)PNAS 90:5873-5877中进行修改,这些文献中的每一者均通过引用以其全文并入本文。此类算法被并入Altschul SF等人,(1990)J Mol Biol 215:403的NBLAST和XBLAST程序中,该文献通过引用以其全文并入本文。可以用NBLAST核苷酸程序参数集(例如,对于分数=100,字长=12)执行BLAST核苷酸搜索,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序参数集(例如,以分数50,字长=3)执行BLAST蛋白搜索,以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空隙比对,可以利用如在Altschul SF等人,(1997)Nuc Acids Res 25:3389-3402中所述的空隙BLAST,该文献通过引用以其全文并入本文。替代性地,PSI BLAST可用于执行检测分子之间的距离关系的迭代搜索(同上)。当利用BLAST、空隙BLAST和PSI Blast程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见,例如,万维网上的国家生物技术信息中心(NCBI),ncbi.nlm.nih.gov)。用于序列比较的数学算法的另一具体、非限制性实例是Myers和Miller,1988,CABIOS 4:11-17的算法,该文献通过引用以其全文并入本文。将这种算法并入到ALIGN程序(第2.0版)中,所述程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12以及空位罚分4。

[0095] 在容许或不容许空位的情况下,可使用类似于以上所述的那些技术的技术,确定两个序列之间的同一性百分比。在计算同一性百分比时,通常仅对确切的匹配进行计数。

[0096] 抗ILT2抗体

[0097] 在一个方面,本公开提供了与ILT2(例如,人ILT2)特异性结合的抗体。示例性抗体的氨基酸序列列于表2中。

[0098] 表2. 示例性抗ILT2抗体的氨基酸序列。

抗体	描述	氨基酸序列	SEQ ID NO
[0099]	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNRY YMHWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTNIAQ KFQGRVTMTDRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYY CASKQPSSDYWGQGTLVTVSS	1

[0100]

BA210 BA247 BA211 BA248 BA246	VL	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLHSNGY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASQAP WTFGQGTKVEIK	2
BA212	VL	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLHSNTY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASQAP WTFGQGTKVEIK	3
BA213	VL	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLHSNGY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQASQAP WTFGQGTKVEIK	4
BA214 BA249 BA217 BA251 BA219 BA252 BA221	VL	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLHSNTY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQASQAP WTFGQGTKVEIK	5
BA215 BA222 BA218 BA250 BA220	VL	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLHSNYY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQASQAP WTFGQGTKVEIK	6
BA216	VL	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLHSNYY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASQAP WTFGQGTKVEIK	7
共有	VL	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISICRSSQSLLHSNX ₁ YNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCX ₂ QASQA PWTFGQGTKVEIK X ₁ 为 G、T 或 Y X ₂ 为 L 或 M	8

[0101]

BA210 BA220	CDRH1	RYYMH	9
BA211 BA221			
BA212 BA222			
BA213 BA246			
BA214 BA247			
BA215 BA248			
BA216 BA249			
BA217 BA250			
BA218 BA251			
BA219 BA252			
BA210 BA220	CDRH2	WINPYTGGTNYAQKFQG	10
BA211 BA221			
BA212 BA222			
BA213 BA246			
BA214 BA247			
BA215 BA248			
BA216 BA249			
BA217 BA250			
BA218 BA251			
BA219 BA252			
BA210 BA220	CDRH3	KQPSSDY	11
BA211 BA221			
BA212 BA222			
BA213 BA246			
BA214 BA247			
BA215 BA248			
BA216 BA249			
BA217 BA250			
BA218 BA251			
BA219 BA252			
BA210 BA246	CDRL1	RSSQSLLHSNGYNYLD	12
BA211 BA247			
BA213 BA248			

[0102]

BA212 BA221 BA214 BA249 BA217 BA251 BA219 BA252	CDRL1	RSSQSLLHSNTYNYLD	13
BA215 BA220 BA216 BA222 BA218 BA250	CDRL1	RSSQSLLHSNYNYLD	14
共有	CDRL1	RSSQSLLHSNX ₁ YNYLD X ₁ 为 G、T 或 Y	15
BA210 BA220 BA211 BA221 BA212 BA222 BA213 BA246 BA214 BA247 BA215 BA248 BA216 BA249 BA217 BA250 BA218 BA251 BA219 BA252	CDRL2	LGSNRAS	16
BA210 BA246 BA211 BA247 BA212 BA248 BA216	CDRL3	MQASQAPWT	17
BA213 BA221 BA214 BA222 BA215 BA249 BA217 BA250 BA218 BA251 BA219 BA252 BA220	CDRL3	LQASQAPWT	18
共有	CDRL3	X ₁ QASQAPWT X ₁ 为 L 或 M	19

[0103]

BA210 BA249 BA250	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNRY YMHWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYY CASKQPSSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	20
BA211 BA212 BA213 BA214 BA215 BA216	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNRY YMHWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYY CASKQPSSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	21

[0104]

BA217 BA218 BA246	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNRY YMHWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYY CASKQPSSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQ TYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCPCAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	22
BA219 BA220 BA247	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNRY YMHWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYY CASKQPSSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQ TYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCPCAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVELTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	23

[0105]

BA221 BA222 BA248	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNRY YMHWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYY CASKQPSSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK	24
BA251	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNRY YMHWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYY CASKQPSSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	25

[0106]

BA252	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNRY YMHWVRQAPGQGLEWMGWINPYTGGTNYAQ KFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYY CASKQPSSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAP EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLG	26
BA210 BA211 BA246 BA247 BA248	LC	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSGY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASQAP WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	27
BA212	LC	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHNSNTY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASQAP WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	28

[0107]

BA213	LC	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQASQAP WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	29
BA214 BA249 BA217 BA251 BA219 BA252 BA221	LC	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNTY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQASQAP WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	30
BA215 BA218 BA220 BA222 BA250	LC	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNYY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQASQAP WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
BA216	LC	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNYY NYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASQAP WTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	32

[0108]

人 IgG1 重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	33
人 IgG1 重链恒定区 N297A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	34
人 IgG2 重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	35

[0109]

人 IgG2 重链恒定区 C127S	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTVE RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	36
人 IgG4 重链恒定区 S228P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	37
不含 C 末端赖氨酸的人 IgG1 重链恒定区 N297A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	38

[0110]	人 IgG4 重链恒定区 S228P, 不含 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVSVLTVQLHQLDNLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSSLG	39
	人 κ 轻链恒定区	RTVAAPSVPFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTV KSFNRGEC	40
	15G8 VH (参考抗体)	DVQLQGGSGPGLVKPSETLSLTCSVTGYSITSGYY WNWIRQFPGKKLEWMGYISYDGSNNYNPSLKN RITISRDTSKNQFSLKLNSVTAADTATYYCAHG YSYYYAMDAWGQGTSVTVSS	41
	15G8 VL (参考抗体)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQDISNYLN WYQQKPGKAVKLLISYTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPTFGQG TKLEIK	42

[0111] 在某些实施例中,本公开提供了与ILT2(例如,人ILT2)特异性结合的抗体,该抗体包含VH结构域,该VH结构域包含表2中列出的VH结构域的一个、两个或全部三个CDR。在某些实施例中,抗体包含表2中列出的VH结构域的CDRH1。在某些实施例中,抗体包含表2中列出的VH结构域的CDRH2。在某些实施例中,抗体包含表2中列出的VH结构域的CDRH3。

[0112] 在某些实施例中,本公开提供了与ILT2(例如,人ILT2)特异性结合的抗体,该抗体包含VL结构域,该VL结构域包含表2中公开的VL结构域的一个、两个或全部三个CDR。在某些实施例中,抗体包含表2中列出的VL结构域的CDRL1。在某些实施例中,抗体包含表2中列出的VL结构域的CDRL2。在某些实施例中,抗体包含表2中列出的VL结构域的CDRL3。

[0113] 本文公开的抗体的各个CDR可以根据本领域已知的任何CDR编号方案来确定。

[0114] 在某些实施例中,本文公开的抗体的CDR中的一者或多者可以根据Kabat等人, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) 和Kabat等人, Sequences of protein of immunological interest (1991) 来确定,这些文献中的每一者均通过引用以其全文并入本文。

[0115] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)并包含如通过Kabat编号方案确定的本文表2中公开的抗体的CDR的抗体。

[0116] 在某些实施例中,本文公开的抗体的CDR中的一者或多者可以根据Chothia编号方

案来确定,其指免疫球蛋白结构环的位置(参见,例如,Chothia C和Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196:901-917; Al-Lazikani B等人, (1997) J Mol Biol 273:927-948; Chothia C等人, (1992) J Mol Biol 227:799-817; Tramontano A等人, (1990) J Mol Biol 215(1):175-82; 以及美国专利号7,709,226,所有这些文献通过引用以其全文并入本文)。

[0117] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)并包含如通过Chothia编号系统确定的本文表2中公开的抗体的CDR的抗体。

[0118] 在某些实施例中,本文公开的抗体的CDR中的一者或多者可以根据MacCallum RM等人, (1996) J Mol Biol 262:732-745来确定,该文献通过引用以其全文并入本文。另请参见,例如,Martin A. “Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains,” 在Antibody Engineering, Kontermann和Dübel主编,第31章,第422-439页, Springer-Verlag, Berlin (2001), 其通过引用以其全文并入本文。

[0119] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)并包含如通过MacCallum编号系统确定的本文表2中公开的抗体的CDR的抗体。

[0120] 在某些实施例中,本文公开的抗体的CDR可以根据IMGT编号系统来确定,如描述于:Lefranc M-P, (1999) The Immunologist 7:132-136; Lefranc M-P等人, (1999) Nucleic Acids Res 27:209-212, 这些文献中的每一者均通过引用以其全文并入本文; 以及Lefranc M-P等人, (2009) Nucleic Acids Res 37:D1006-D1012。

[0121] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)并包含如通过IMGT编号系统确定的本文表2中公开的抗体的CDR的抗体。

[0122] 在某些实施例中,本文公开的抗体的CDR可以根据AbM编号方案来确定,AbM编号方案是指AbM高变区,其代表Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,并且由Oxford Molecular的AbM抗体建模软件(Oxford Molecular Group, Inc.)使用,该文献通过引用以其全文并入本文。

[0123] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)并包含如通过AbM编号方案确定的本文表2中公开的抗体的CDR的抗体。

[0124] 在某些实施例中,本文公开的抗体的CDR可以根据AHO编号系统来确定,如Honegger和Plückthun, A., J. Mol. Biol. 309:657-670 (2001) 中所述,该文献通过引用以其全文并入本文。

[0125] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)并包含如通过AHO编号系统确定的本文表2中公开的抗体的CDR的抗体。

[0126] 在某些实施例中,本文公开的抗体的各个CDR各自独立地根据Kabat、Chothia、MacCallum、IMGT、AHO或AbM编号方案中的一者或通过多特异性分子的结构分析来确定,其中结构分析鉴定预测与ILT2的表位区接触的可变区中的残基。

[0127] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其包含VH和VL, VH包含SEQ ID NO:1中所示的VH氨基酸序列的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列, VL包含SEQ ID NO:8中所示的VL氨基酸序列的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列, 其中每个CDR根据Kabat、Chothia、MacCallum、IMGT、AHO或AbM编号方案中的一者或通过多特异性分子的结构分析独立地确定,其中结构分析鉴定预测与ILT2(例如,人ILT2)的表位区接触的可变区中的残基。

[0128] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其中抗体包含分别在SEQ ID NO:1和5、1和2、1和3、1和4、1和6或1和7中所示的VH和VL氨基酸序列的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0129] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其中抗体包含VH,VH包含分别在SEQ ID NO:9、10和11中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0130] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其中抗体包含VL,VL包含分别在SEQ ID NO:15、16和19中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0131] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其中抗体包含VL,VL包含分别在SEQ ID NO:12、16和17;13、16和17;14、16和17;12、16和18;13、16和18;或14、16和18中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0132] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其中抗体包含VH和VL,VH包含CDRH1、CDRH2和CDRH3区,VL包含CDRL1、CDRL2和CDRL3区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区包含分别在SEQ ID NO:9、10、11、12、16和17;9、10、11、13、16和17;9、10、11、14、16和17;9、10、11、12、16和18;9、10、11、13、16和18;或9、10、11、14、16和18中所示的氨基酸序列。

[0133] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其中抗体包含VH和VL,VH包含CDRH1、CDRH2和CDRH3区,VL包含CDRL1、CDRL2和CDRL3区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区包含分别在SEQ ID NO:9、10、11、13、16和18中所示的氨基酸序列。

[0134] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其包含VH,VH包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其包含VH,VH包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,VH的氨基酸序列由SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列组成。

[0135] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其包含VL,VL包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其包含VL,VL包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,VL的氨基酸序列由SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列组成。

[0136] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其包含VL,VL包含与SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7中所示的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其包含VL,VL包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,VL的氨基酸序列由SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7中所示的氨基酸序列组成。

[0137] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其包含VH和VL,VH包含与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%

(例如,至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,VL包含与SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7中所示的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同的氨基酸序列。在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其包含VH和VL,VH包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,VL包含SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7的氨基酸序列。在某些实施例中,VH的氨基酸序列由SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列组成;并且VL的氨基酸序列由SEQ ID NO:2、3、4、5、6或7中所示的氨基酸序列组成。

[0138] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,其包含分别在SEQ ID NO:1和5、1和2、1和3、1和4、1和6或1和7中所示的VH和VL氨基酸序列。在某些实施例中,VH和VL的氨基酸序列由分别在SEQ ID NO:1和5、1和2、1和3、1和4、1和6或1和7中所示的氨基酸序列组成。

[0139] 在某些实施例中,本公开提供了与包含分别在SEQ ID NO:1和5、1和2、1和3、1和4、1和6或1和7中所示的VH和VL的抗体交叉竞争结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体。

[0140] 在某些实施例中,本公开提供了与本文所述的抗体(例如,包含分别在SEQ ID NO:1和5、1和2、1和3、1和4、1和6或1和7中所示的VH和VL氨基酸序列的抗体)结合ILT2的相同或重叠表位(例如,人ILT2的表位)的抗体。

[0141] 在某些实施例中,抗体的表位可以通过例如NMR光谱、表面等离子共振(BIAcore®)、X射线衍射晶体学研究、ELISA测定、氢/氘交换与质谱联用(例如,液相色谱电喷雾质谱法)、基于阵列的寡肽扫描测定和/或诱变作图(例如,定点诱变作图)来确定。对于X射线晶体学,可以使用本领域已知的任何方法来完成结晶(例如,Giegér等人,(1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4):339-350;McPherson A(1990) *Eur J Biochem* 189:1-23;Chayen NE(1997) *Structure* 5:1269-1274;McPherson A(1976) *J Biol Chem* 251:6300-6303,所有这些文献通过引用以其全文并入本文)。抗体:抗原晶体可以使用公知的X射线衍射技术进行研究,并且可以使用计算机软件诸如X-PLOR(耶鲁大学,1992,由Molecular Simulations,Inc.发行;参见,例如,Meth Enzymol(1985)第114和115卷,Wyckoff HW等人主编;美国专利申请号2004/0014194)和BUSTER(Bricogne G(1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1):37-60;Bricogne G(1997) *Meth Enzymol* 276A:361-423,Carter CW主编;Roversi P等人,(2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10):1316-1323,所有这些文献通过引用以其全文并入本文)进行精制。诱变作图研究可以使用本领域技术人员已知的任何方法来完成。参见,例如,Champe M等人,(1995)同上以及Cunningham BC和Wells JA(1989)同上对诱变技术的描述,包括丙氨酸扫描诱变技术。在具体实施例中,使用丙氨酸扫描诱变研究来确定抗体的表位。另外,或者,可以使用常规技术诸如免疫测定,例如通过显示一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原结合的能力,即竞争性结合测定,来鉴定识别并结合ILT2(例如,人ILT2)的相同或重叠表位的抗体。竞争性结合测定还可用于确定两种抗体是否对表位具有相似的结合特异性。竞争性结合可以在测定中确定,其中测试中的免疫球蛋白抑制参考抗体与共同抗原诸如ILT2(例如,人ILT2)的特异性结合。已知许多类型的竞争性结合测定,例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见Stahli C等人,(1983)

Methods Enzymol 9:242-253);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见Kirkland TN等人,(1986)J Immunol 137:3614-9);固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见Harlow E和Lane D,(1988)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel GA等人,(1988)Mol Immunol 25(1):7-15);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见Cheung RC等人,(1990)Virology 176:546-52);和直接标记的RIA(参见Moldenhauer G等人,(1990)Scand J Immunol 32:77-82),所有这些文献通过引用以其全文并入本文。通常,此类测定涉及使用与固体表面或带有未标记的测试免疫球蛋白和标记的参考免疫球蛋白中的任一种的细胞结合的纯化抗原(例如,ILT2,诸如人ILT2)。竞争性抑制可以通过在测试免疫球蛋白存在下测定与固体表面或细胞结合的标记的量来测量。通常,测试免疫球蛋白过量存在。通常,当竞争抗体过量存在时,它将抑制参考或抗体与共同抗原的特异性结合至少50%-55%、55%-60%、60%-65%、65%-70%、70%-75%或更多。可以使用标记的抗原或标记的抗体以大量不同的形式配置竞争结合测定。在此测定的常见版本中,抗原固定在96孔板上。然后使用放射性或酶标记来测量未标记抗体阻断标记抗体与抗原结合的能力。进一步的细节参见,例如,Wagener C等人,(1983)J Immunol 130:2308-2315;Wagener C等人,(1984)J Immunol Methods 68:269-274;Kuroki M等人,(1990)Cancer Res 50:4872-4879;Kuroki M等人,(1992)Immunol Invest 21:523-538;Kuroki M等人,(1992)Hybridoma 11:391-407和Antibodies: A Laboratory Manual,Ed Harlow E和Lane D主编同上,第386-389页,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。

[0142] 在某些实施例中,本公开提供了与ILT2(例如,人ILT2)特异性结合的抗体,该抗体包含重链,该重链包含SEQ ID NO:20、21、22、23、24、25或26中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:20、21、22、23、24、25或26中所示的氨基酸序列组成。

[0143] 在某些实施例中,本公开提供了与ILT2(例如,人ILT2)特异性结合的抗体,该抗体包含轻链,该轻链包含SEQ ID NO:27、28、29、30、31或32中所示的氨基酸序列。在某些实施例中,轻链的氨基酸序列由选自SEQ ID NO:27、28、29、30、31或32组成的组的氨基酸序列组成。

[0144] 在某些实施例中,本公开提供了与ILT2(例如,人ILT2)特异性结合的抗体,其包含重链和轻链,其中重链和轻链分别包含SEQ ID NO:26和30、26和27、26和28、26和29、26和31、26和32、25和27、25和28、25和29、25和30、25和31、25和32、24和27、24和28、24和29、24和30、24和31、24和32、23和27、23和28、23和29、23和30、23和31、23和32、22和27、22和28、22和29、22和30、22和31、22和32、21和27、21和28、21和29、21和30、21和31、21和32、20和27、20和28、20和29、20和30、20和31或20和32的氨基酸序列。

[0145] 在某些实施例中,重链和轻链的氨基酸序列由选自分别由以下项组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:26和30、26和27、26和28、26和29、26和31、26和32、25和27、25和28、25和29、25和30、25和31、25和32、24和27、24和28、24和29、24和30、24和31、24和32、23和27、23和28、23和29、23和30、23和31、23和32、22和27、22和28、22和29、22和30、22和31、22和32、21和27、21和28、21和29、21和30、21和31、21和32、20和27、20和28、20和29、20和30、20和31或20和32。

[0146] 本公开的抗ILT2抗原结合分子可以与另一种功能分子例如另一种肽或蛋白质连接或共表达。例如,抗体或其片段可以功能性连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或其他方式)至一个或多个其他分子实体,诸如另一种抗体或抗体片段,以产生具有第二或额外结合特异性的双特异性或多特异性抗体。

[0147] 在某些实施例中,本文公开的抗体缀合至细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、毒素、放射性核素或可检测标记。在某些实施例中,细胞毒性剂能够诱导与其接触的细胞的死亡或破坏。在某些实施例中,细胞生长抑制剂能够防止或显著减少增殖和/或抑制与其接触的细胞的活性或功能。在某些实施例中,细胞毒性剂或细胞生长抑制剂是化疗剂。在某些实施例中,放射性核素选自同位素³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹¹⁷Lu、¹²¹I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁹⁸Au、²¹¹At、²¹³Bi、²²⁵Ac和¹⁸⁶Re组成的组。在某些实施例中,可检测标记包含荧光部分或点击化学柄。

[0148] 任何免疫球蛋白(Ig)恒定区可用于本文公开的抗体中。在某些实施例中,Ig区是人IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的任何类别(例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂),或任何亚类(例如,IgG_{2a}和IgG_{2b})。

[0149] 在某些实施例中,本公开提供了与ILT2(例如,人ILT2)特异性结合的抗体,该抗体包含重链恒定区,其任选地选自由人IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、IgA₂和IgM组成的组。

[0150] 在某些实施例中,本公开提供了与ILT2(例如,人ILT2)特异性结合的抗体,该抗体包含作为野生型重链恒定区的变体的重链恒定区,其中变体重链恒定区以低于野生型重链恒定区结合Fc γ R的亲和力结合Fc γ R。

[0151] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,该抗体包含重链恒定区,该重链恒定区包含SEQ ID NO:33、34、35、36、37、38或39的氨基酸序列。在某些实施例中,本公开提供了特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体,该抗体包含由SEQ ID NO:33、34、35、36、37、38或39的氨基酸序列组成的重链恒定区。

[0152] 在某些实施例中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸取代)引入本文所述的抗体的Fc区(例如,CH2结构域(人IgG₁的残基231-340))和/或CH3结构域(根据EU编号系统编号的人IgG₁的残基341-447)和/或铰链区(根据EU编号系统编号的残基216-230),以改变抗体的一种或多种功能特性,诸如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。

[0153] 在某些实施例中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸取代)引入本文所述的抗体的铰链区,使得铰链区中的半胱氨酸残基的数量被改变(例如,增加或减少),如例如美国专利号5,677,425中所述,该专利通过引用以其全文并入本文。可以改变铰链区中的半胱氨酸残基的数量,以例如促进轻链和重链的组装,或改变(例如,增加或降低)抗体的稳定性。

[0154] 在具体实施例中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,取代、插入或缺失)引入IgG恒定区或其FcRn结合片段(优选地Fc或铰链-Fc片段)以改变(例如,减少或增加)抗体的体内半衰期。参见,例如,国际公开号W0 02/060919;W0 98/23289;和W0 97/34631;以及美国专利号5,869,046、6,121,022、6,277,375和6,165,745,所有这些文献通过引用以其全文并入本文,作为将改变(例如,减少或增加)抗体的体内半衰期的突变的实例。在某些实施例中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,取代、插入或缺失)引入IgG恒定区或其FcRn

结合片段(优选地Fc或铰链-Fc片段)以减少抗体的体内半衰期。在其他实施例中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,取代、插入或缺失)引入IgG恒定区或其FcRn结合片段(优选地Fc或铰链-Fc片段)以增加抗体的体内半衰期。在具体实施例中,抗体可以在第二恒定(CH2)结构域(人IgG₁的残基231-340)和/或第三恒定(CH3)结构域(人IgG₁的残基341-447)中具有一个或多个氨基酸突变(例如,取代),根据EU编号系统编号。在具体实施例中,本文所述抗体的IgG₁的恒定区包含根据EU编号系统编号的位置252处的蛋氨酸(M)至酪氨酸(Y)取代、位置254处的丝氨酸(S)至苏氨酸(T)取代和位置256处的苏氨酸(T)至谷氨酸(E)取代。参见美国专利号7,658,921,其通过引用以其全文并入本文。与相同抗体的野生型版本相比,这种类型的突变IgG(称为“YTE突变体”)已显示出四倍增加的半衰期(参见Da11' Acqua WF等人,(2006)J Biol Chem 281:23514-24,其通过引用以其全文并入本文)。在某些实施例中,抗体包含IgG恒定区,该IgG恒定区包含根据EU编号系统编号的位置251-257、285-290、308-314、385-389和428-436处的氨基酸残基的一个、两个、三个或更多个氨基酸取代。

[0155] 在某些实施例中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸取代)引入本文所述的抗体的Fc区(例如,CH2结构域(人IgG₁的残基231-340))和/或CH3结构域(根据EU编号系统编号的人IgG₁的残基341-447)和/或铰链区(根据EU编号系统编号的残基216-230),以增加或降低抗体对效应细胞表面上的Fc受体(例如,活化的Fc受体)的亲和力。抗体Fc区中降低或增加抗体对Fc受体的亲和力的突变以及将此类突变引入Fc受体或其片段的技术是本领域技术人员已知的。可以进行抗体Fc受体中的突变以改变抗体对Fc受体的亲和力的实例描述于例如Smith P等人,(2012)PNAS109:6181-6186、美国专利号6,737,056和国际公开号WO 02/060919;WO 98/23289;和WO 97/34631中,所有这些文献通过引用以其全文并入本文)。

[0156] 在某些实施例中,抗体包含作为野生型重链恒定区的变体的重链恒定区,其中变体重链恒定区以高于野生型重链恒定区结合Fc γ RIIB的亲和力结合Fc γ RIIB。在某些实施例中,变体重链恒定区是变体人重链恒定区,例如,变体人IgG₁、变体人IgG₂或变体人IgG₄重链恒定区。在某些实施例中,变体人IgG重链恒定区包含根据EU编号系统的以下氨基酸突变中的一个或多个:G236D、P238D、S239D、S267E、L328F和L328E。在某些实施例中,变体人IgG重链恒定区包含选自根据EU编号系统的以下各项组成的组的一组氨基酸突变:S267E和L328F;P238D和L328E;P238D和选自以下各项组成的组的一个或多个取代:E233D、G237D、H268D、P271G和A330R;P238D、E233D、G237D、H268D、P271G和A330R;G236D和S267E;S239D和S267E;V262E、S267E和L328F;以及V264E、S267E和L328F。在某些实施例中,Fc γ RIIB在选自巨噬细胞、单核细胞、B细胞、树突细胞、内皮细胞和活化的T细胞组成的组的细胞上表达。

[0157] 在进一步的实施例中,将一个、两个或更多个氨基酸取代引入IgG恒定区Fc区以改变抗体的效应子功能。例如,选自根据EU编号系统编号的氨基酸残基234、235、236、237、239、243、267、292、297、300、318、320、322、328、330、332和396的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸残基替换,使得抗体具有针对效应子配体的经过改变的亲和力,但是保留亲代抗体的抗原结合能力。亲和力被改变的效应子配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。这种方法在美国专利号5,624,821和5,648,260中有更详细的描述,这些文献中的每一者均通过引用以其全文并入本文。在某些实施例中,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其他方式)可以减少循环抗体的Fc受体结合,从而增加肿瘤定位。参见,例如,美国专利号5,

585,097和8,591,886,这些文献中的每一者均通过引用以其全文并入本文,用于描述缺失或失活恒定区并由此增加肿瘤定位的突变。在某些实施例中,可以将一个或多个氨基酸取代引入本文所述的抗体的Fc区以去除Fc区上的潜在糖基化位点,这可以减少Fc受体结合(参见,例如,Shields RL等人,(2001)J Biol Chem 276:6591-604,其通过引用以其全文并入本文)。在各种实施例中,可以在本文所述的抗体的恒定区中进行根据EU编号系统编号的以下突变中的一个或多个:N297A取代;N297Q取代;L234A取代;L234F取代;L235A取代;L235F取代;L235V取代;L237A取代;S239D取代;E233P取代;L234V取代;C236缺失;P238A取代;F243L取代;D265A取代;S267E取代;L328F取代;R292P取代;Y300L取代;A327Q取代;P329A取代;A330L取代;I332E取代;或P396L取代。

[0158] 在某些实施例中,选自由根据EU编号系统编号的D265A、P329A及其组合组成的组的突变可以在本文所述的抗体的恒定区中进行。在某些实施例中,选自由根据EU编号系统编号的L235A、L237A及其组合组成的组的突变可以在本文所述的抗体的恒定区中进行。在某些实施例中,选自由根据EU编号系统编号的S267E、L328F及其组合组成的组的突变可以在本文所述的抗体的恒定区中进行。在某些实施例中,选自由根据EU编号系统编号的S239D、I332E、任选地A330L及其组合组成的组的突变可以在本文所述的抗体的恒定区中进行。在某些实施例中,选自由根据EU编号系统编号的L235V、F243L、R292P、Y300L、P396L及其组合组成的组的突变可以在本文所述的抗体的恒定区中进行。在某些实施例中,选自由根据EU编号系统编号的S267E、L328F及其组合组成的组的突变可以在本文所述的抗体的恒定区中进行。

[0159] 在具体实施例中,本文描述的抗体包含具有根据EU编号系统编号的N297Q或N297A氨基酸取代的IgG₁的恒定区。在某些实施例中,本文所述的抗体包含具有选自由根据EU编号系统编号的D265A、P329A及其组合组成的组的突变的IgG₁的恒定区。在另一个实施例中,本文所述的抗体包含具有选自由根据EU编号系统编号的L234A、L235A及其组合组成的组的突变的IgG₁的恒定区。在另一个实施例中,本文所述的抗体包含具有选自由根据EU编号系统编号的L234F、L235F、N297A及其组合组成的组的突变的IgG₁的恒定区。在某些实施例中,本文所述的抗体的恒定区中对应于人IgG₁重链中的位置L234、L235和D265(根据EU编号系统编号)的位置中的氨基酸残基分别不是L、L和D。这种方法在国际公开号W0 14/108483中详细描述,该文献通过引用以其全文并入本文。在某些实施例中,对应于人IgG₁重链中的位置L234、L235和D265(根据EU编号系统编号)的氨基酸分别是F、E和A;或A、A和A。

[0160] 在某些实施例中,选自本文所述的抗体的恒定区中的氨基酸残基329、331和322(根据EU编号系统编号)的一个或多个氨基酸可以用不同的氨基酸残基替换,使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。这种方法在美国专利号6,194,551(Idusogie等人)中有更详细的描述,该专利通过引用以其全文并入本文。在某些实施例中,改变本文所述的抗体的CH2结构域的N末端区中的氨基酸位置231至238(根据EU编号系统编号)内的一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体固定补体的能力。这种方法在国际公开号W0 94/29351中有进一步的描述,该文献通过引用以其全文并入本文。在某些实施例中,修饰本文所述的抗体的Fc区以通过在根据EU编号系统编号的以下位置处突变一个或多个氨基酸(例如,引入氨基酸取代)来增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或增加抗体对Fc γ 受体的亲和力:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、

269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、328、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439。这种方法在国际公开号W0 00/42072中有进一步的描述,该文献通过引用以其全文并入本文。

[0161] 在某些实施例中,本文所述的抗体包含IgG₁的经修饰的恒定区,其中该修饰增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力。在某些实施例中,0.1、1或10μg/mL的抗体能够在1、2或3小时内诱导至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%的ILT2表达细胞的细胞死亡,如通过本文所述和/或本领域技术人员已知的方法评定的。在某些实施例中,IgG₁的经修饰的恒定区包含根据EU编号系统编号的S239D和I332E取代。在某些实施例中,IgG₁的经修饰的恒定区包含根据EU编号系统编号的S239D、A330L和I332E取代。在某些实施例中,IgG₁的经修饰的恒定区包含根据EU编号系统编号的L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L取代。在某些实施例中,抗体能够诱导效应T细胞和Treg中的细胞死亡,其中经历细胞死亡的Treg细胞的百分比比经历细胞死亡的效应T细胞的百分比高至少1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍或5倍。

[0162] 在某些实施例中,本文所述的抗体包含IgG₂抗体的恒定区,并且根据EU编号系统编号的重链的氨基酸残基127处的半胱氨酸取代了丝氨酸。

[0163] 在某些实施例中,本文所述的抗体包含IgG₄抗体的恒定区,并且根据EU编号系统编号的重链的氨基酸残基228处的丝氨酸取代了脯氨酸。

[0164] 在某些实施例中,可以将本文所述的任何恒定区突变或修饰引入本文所述的具有两个重链恒定区的抗体的一个或两个重链恒定区中。

[0165] 药物组合物

[0166] 本文提供了组合物,其包含本文公开的抗ILT2抗体,其在在生理学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂中具有所需纯度(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA)。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲铵氯化物;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如,锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0167] 在具体实施例中,药物组合物包含在药学上可接受的载剂中的本文公开的抗ILT2抗体和任选地一种或多种另外的预防剂或治疗剂。在具体实施例中,药物组合物包含在药学上可接受的载剂中的本文公开的抗ILT2抗体和任选地一种或多种另外的预防剂或治疗剂。在某些实施例中,抗体是药物组合物中包含的唯一活性成分。本文所述的药物组合物可用于降低或阻断ILT2(例如,人ILT2)活性和治疗病症,诸如癌症。在某些实施例中,本公开涉及一种包含本公开的抗ILT2抗体的本公开的药物组合物,其用作药物。在另一个实施例

中,本公开涉及本公开的药物组合物,其使用于治疗癌症的方法中。

[0168] 用于肠胃外制剂中的药学上可接受的载剂包括水性媒剂、非水性媒剂、抗微生物剂、等渗剂、缓冲液、抗氧化剂、局部麻醉剂、悬浮剂和分散剂、乳化剂、多价螯合剂或螯合剂以及其他药学上可接受的物质。水性媒剂的实例包括氯化钠注射液、林格注射液、等渗葡萄糖注射液、无菌水注射液、葡萄糖和乳酸林格注射液。非水性肠胃外媒剂包括植物来源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油和花生油。可以将呈抑菌或抑真菌浓度的抗微生物剂添加到包装在多剂量容器中的肠胃外制剂中,这些肠胃外制剂包括苯酚或甲酚、汞剂、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵以及苄索氯铵。等渗剂包括氯化钠和葡萄糖。缓冲剂包括磷酸盐和柠檬酸盐。抗氧化剂包括硫酸氢钠。局部麻醉剂包括盐酸普鲁卡因。悬浮剂和分散剂包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。乳化剂包括聚山梨醇酯80 (TWEEN® 80)。金属离子的多价螯合剂或螯合剂包括EDTA。药物载剂还包括用于水混溶性媒剂的乙醇、聚乙二醇和丙二醇;以及用于pH调节的氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。

[0169] 药物组合物可经调配用于向受试者施用的任何途径。施用途径的具体实例包括鼻内、口服、肺部、透皮、皮内和肠胃外。本文还考虑了特征在于皮下、肌内或静脉内注射的肠胃外施用。可注射剂可以以常规形式制备,作为液体溶液或悬浮液、适于在注射前在液体中溶解或悬浮的固体形式,或作为乳剂。可注射剂、溶液和乳剂还含有一种或多种赋形剂。合适的赋形剂是例如水、盐水、葡萄糖、甘油或乙醇。另外,如果需要,待施用的药物组合物还可以含有少量的无毒辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解度增强剂和其他此类药剂,诸如例如乙酸钠、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯和环糊精。

[0170] 用于肠胃外施用的抗体的制剂包括准备注射的无菌溶液、准备在使用前与溶剂组合的无菌干燥可溶性产品(诸如冻干粉,包括皮下注射片剂)、准备用于注射的无菌悬浮液、准备在使用前与媒剂组合的无菌干燥不溶性产品和无菌乳剂。溶液可以是水性的或非水性的。

[0171] 如果静脉内施用,则合适的载剂包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS),以及含有增稠剂和增溶剂(诸如葡萄糖、聚乙二醇和聚丙二醇和其混合物)的溶液。

[0172] 如针对局部和全身施用所述制备包含抗体的局部混合物。所得混合物可以是溶液、悬浮液、乳剂等,并且可以经调配为乳膏、凝胶、软膏、乳剂、溶液、酞剂、洗剂、悬浮液、酞剂、糊剂、泡沫、气雾剂、冲洗剂、喷雾剂、栓剂、绷带、皮肤贴剂或任何其他适合局部施用的调配物。

[0173] 本文公开的抗ILT2抗体可以调配为用于局部施用的气雾剂,诸如通过吸入(参见,例如,美国专利号4,044,126、4,414,209和4,364,923,其描述了用于递送可用于治疗炎症性疾病、特别是哮喘的类固醇的气雾剂并通过引用以其全文并入本文)。用于施用至呼吸道的这些调配物可以是用于喷雾器的气雾剂或溶液的形式,或者作为用于吹入的微细粉末的形式,单独或与惰性载剂诸如乳糖组合。在这种情况下,调配物的颗粒在某些实施例中具有小于50微米的直径,在某些实施例中小于10微米。

[0174] 本文公开的抗ILT2抗体可以经调配用于局部或局部应用,诸如以凝胶、乳膏和洗剂的形式局部应用至皮肤和粘膜,诸如眼睛中,以及应用至眼睛或用于脑池内或脊柱内应用。局部施用预期用于透皮递送,并且也可用于施用至眼睛或粘膜,或用于吸入疗法。也可

以施用单独的或与其他药学上可接受的赋形剂组合的抗体的鼻用溶液。

[0175] 透皮贴剂,包括离子电渗疗法和电泳装置,是本领域技术人员所熟知的,并可用于施用抗体。例如,此类贴剂公开于美国专利号6,267,983、6,261,595、6,256,533、6,167,301、6,024,975、6,010715、5,985,317、5,983,134、5,948,433和5,860,957,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。

[0176] 在某些实施例中,包含本文所述的抗体的药物组合物是冻干粉末,其可以重构以作为溶液、乳剂和其他混合物施用。也可以将其重构并调配为固体或凝胶。通过将本文所述的抗体或其药学上可接受的衍生物溶解在合适的溶剂中来制备冻干粉末。在某些实施例中,冻干粉末是无菌的。溶剂可以含有改善粉末或由粉末制备的重构溶液的稳定性或其他药理学组分的赋形剂。可以使用的赋形剂包括但不限于右旋糖、山梨醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其他合适的药剂。溶剂还可以含有缓冲液,诸如柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾或本领域技术人员已知的其他此类缓冲液,在某些实施例中,约为中性pH。随后对溶液进行无菌过滤,然后在本领域技术人员已知的标准条件下冻干,提供所需的调配物。在某些实施例中,所得溶液将被分装到小瓶中用于冻干。每个小瓶将含有单剂量或多剂量的化合物。冻干粉末可以在适当的条件下储存,诸如在约4℃至室温下。用注射用水重构该冻干粉末提供了用于肠胃外施用的调配物。为了重构,将冻干粉末添加到无菌水或其他合适的载剂中。精确的量取决于所选的化合物。此量可以凭经验确定。

[0177] 本文公开的抗ILT2抗体和本文提供的其他组合物还可经调配为靶向待治疗的受试者身体的特定组织、受体或其他区域。许多此类靶向方法是本领域技术人员熟知的。本文考虑将所有此类靶向方法用于本发明的组合物中。关于靶向方法的非限制性实例,参见例如,美国专利号6,316,652、6,274,552、6,271,359、6,253,872、6,139,865、6,131,570、6,120,751、6,071,495、6,060,082、6,048,736、6,039,975、6,004,534、5,985,307、5,972,366、5,900,252、5,840,674、5,759,542和5,709,874,所有这些文献均通过引用以其全文并入本文。在具体实施例中,本文所述的抗体靶向肿瘤。

[0178] 待用于体内施用的组合物可以是无菌的。这可以通过例如无菌过滤膜进行过滤而容易地实现。

[0179] 使用方法和用途

[0180] 另一方面,本公开提供了一种使用本文公开的抗ILT2抗体治疗受试者的方法。可以使用本文公开的抗ILT2抗体治疗受试者中将受益于ILT2(例如,人ILT2)功能的降低的任何疾病或疾患。在某些实施例中,疾病或疾患对检查点靶向剂(例如,拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体或拮抗剂抗PD-1抗体)具有耐受性。在某些实施例中,疾病或疾患在用检查点靶向剂(例如,拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体或拮抗剂抗PD-1抗体)治疗后复发。

[0181] 本文公开的抗ILT2抗体特别可用于抑制免疫系统对肿瘤的耐受性,并因此可用作患有癌症的受试者的免疫疗法。例如,在某些实施例中,本公开提供了一种增加受试者中响应抗原的T细胞(例如,CD8⁺细胞毒性T细胞、CD4⁺辅助T细胞、NKT细胞、效应T细胞或记忆T细胞)活化的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文公开的抗ILT2抗体或其药物组合物。在某些实施例中,本公开提供了一种治疗受试者中的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文公开的抗体或药物组合物。

[0182] 可用本文公开的抗ILT2抗体或药物组合物治疗的癌症包括但不限于实体瘤、血液瘤(例如,白血病、淋巴瘤、骨髓瘤,例如,多发性骨髓瘤)和转移性病变。在某些实施例中,癌症为实体瘤。实体瘤的实例包括恶性肿瘤,例如肉瘤和癌,例如各种器官系统的腺癌,诸如影响肺、乳腺、卵巢、淋巴、胃肠(例如,结肠)、肛门、生殖器和泌尿生殖道(例如,肾、尿路上皮、膀胱细胞、前列腺)、咽、CNS(例如,脑、神经或神经胶质细胞)、头颈、皮肤(例如,黑色素瘤)和胰腺的那些,以及包括结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌或小细胞肺癌)等恶性肿瘤、小肠癌和食管癌的腺癌。癌症可以处于早期、中期、晚期或转移性癌症。在某些实施例中,癌症对检查点靶向剂(例如,拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体或拮抗剂抗PD-1抗体)具有耐受性。在某些实施例中,癌症在用检查点靶向剂(例如,拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体或拮抗剂抗PD-1抗体)治疗后复发。

[0183] 在某些实施例中,癌症选自肺癌(例如,肺腺癌或非小细胞肺癌(NSCLC)(例如,具有鳞状和/或非鳞状细胞癌组织学的NSCLC或NSCLC腺癌))、黑色素瘤(例如,晚期黑色素瘤)、肾癌(例如,肾细胞癌)、肝癌(例如,肝细胞癌)、骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤)、前列腺癌、乳腺癌(例如,不表达雌激素受体、孕酮受体或Her2/neu中的一种、两种或全部的乳腺癌,例如,三阴性乳腺癌)、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、肛门癌、胃食管癌(例如,食管鳞状细胞癌)、间皮瘤、鼻咽癌、甲状腺癌、宫颈癌、上皮癌、腹膜癌或淋巴组织增生性疾病(例如,移植后淋巴组织增生性疾病)。

[0184] 在某些实施例中,癌症是血液瘤,例如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在某些实施例中,癌症是白血病,例如急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、急性髓细胞白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性髓系白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病(CMML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)或毛细胞性白血病。在某些实施例中,癌症是淋巴瘤,例如B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、活化B细胞样(ABC)弥漫性大B细胞淋巴瘤、生发中心B细胞(GCB)弥漫性大B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、复发性非霍奇金淋巴瘤、难治性非霍奇金淋巴瘤、复发性滤泡性非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤或结外边缘区淋巴瘤。在某些实施例中,癌症是骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤。

[0185] 在另一个实施例中,癌症选自癌(例如,晚期或转移性癌)、黑色素瘤或肺癌,例如非小细胞肺癌。

[0186] 在某些实施例中,癌症是肺癌,例如肺腺癌、非小细胞肺癌或小细胞肺癌。

[0187] 在某些实施例中,癌症是黑色素瘤,例如晚期黑色素瘤。在某些实施例中,癌症是对其他疗法没有反应的晚期或不可切除的黑色素瘤。在其他实施例中,癌症是具有BRAF突变(例如,BRAF V600突变)的黑色素瘤。在又其他实施例中,本文公开的抗ILT2抗体或药物组合物在用抗CTLA-4抗体(例如,伊匹单抗(ipilimumab))治疗后施用,有或没有BRAF抑制剂(例如,维莫非尼或达拉菲尼)。

[0188] 在另一个实施例中,癌症是肝癌,例如晚期肝癌,伴有或不伴有病毒感染,例如慢性病毒性肝炎。

[0189] 在另一个实施例中,癌症是前列腺癌,例如晚期前列腺癌。

[0190] 在又一个实施例中,癌症是骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤。

[0191] 在又一个实施例中,癌症是肾癌,例如肾细胞癌(RCC)(例如,转移性RCC、透明细胞肾细胞癌(CCRCC)或肾乳头状细胞癌)。

[0192] 在又一个实施例中,癌症选自肺癌、黑色素瘤、肾癌、乳腺癌、结直肠癌、白血病或癌症的转移性病变。

[0193] 在某些实施例中,这些方法进一步包括向受试者施用另外的治疗剂。在某些实施例中,另外的治疗剂是化疗剂、放疗剂或检查点靶向剂。在某些实施例中,化疗剂是低甲基化剂(例如,阿扎胞苷)。在某些实施例中,化疗剂是DNA损伤诱导剂(例如,吉西他滨)。在某些实施例中,检查点靶向剂选自由以下各项组成的组:拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体、拮抗剂抗PD-1抗体、拮抗剂抗TIM-3抗体、拮抗剂抗LAG-3抗体、拮抗剂抗VISTA抗体、拮抗剂抗CD96抗体、拮抗剂抗CEACAM1抗体、激动剂抗CD137抗体、激动剂抗GITR抗体和激动剂抗OX40抗体。在某些实施例中,检查点靶向剂选自由以下各项组成的组:拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体和拮抗剂抗PD-1抗体,其中本文公开的ILT2(例如,人ILT2)抗体或药物组合物与检查点靶向剂协同作用。

[0194] 在某些实施例中,本公开涉及本公开的抗体和/或药物组合物,其使用于本公开的方法中,其中该方法进一步包括向受试者施用另外的治疗剂。在某些实施例中,本公开涉及(a)本公开的抗体和/或药物组合物和(b)另外的治疗剂,其用作药物。在某些实施例中,本公开涉及(a)本公开的抗体和/或药物组合物和(b)另外的治疗剂,其在用于治疗癌症的方法中使用。在进一步的实施例中,本公开涉及一种药物组合物、试剂盒或多部件试剂盒,其包含(a)本公开的抗体和/或药物组合物和(b)另外的治疗剂。在某些实施例中,另外的治疗剂是化疗剂、放疗剂或检查点靶向剂。

[0195] 在某些实施例中,抗PD-1抗体用于本文公开的方法中。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由Bristol-Myers Squibb开发的纳武单抗(nivolumab),也称为BMS-936558或MDX1106。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由Merck&Co开发的派姆单抗(pembrolizumab),也称为帕博利珠单抗(lambrolizumab)或MK-3475。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由CureTech开发的匹地利珠单抗(pidilizumab),也称为CT-011。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由Medimmune开发的MEDI0680,也称为AMP-514。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由Novartis Pharmaceuticals开发的PDR001。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由Regeneron Pharmaceuticals开发的REGN2810。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由Pfizer开发的PF-06801591。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由BeiGene开发的BGB-A317。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由AnaptysBio和Tesarro开发的TSR-042。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由Hengrui开发的SHR-1210。

[0196] 可用于本文公开的治疗方法的抗PD-1抗体的进一步非限制性实例公开于以下专利和专利申请中,所有这些专利和专利申请出于所有目的通过引用以其全文并入本文:美国专利号6,808,710;美国专利号7,332,582;美国专利号7,488,802;美国专利号8,008,449;美国专利号8,114,845;美国专利号8,168,757;美国专利号8,354,509;美国专利号8,686,119;美国专利号8,735,553;美国专利号8,747,847;美国专利号8,779,105;美国专利号8,927,697;美国专利号8,993,731;美国专利号9,102,727;美国专利号9,205,148;美国公开号US2013/0202623 A1;美国公开号US2013/0291136 A1;美国公开号US 2014/0044738A1;美国公开号US2014/0356363 A1;美国公开号US2016/0075783 A1;和PCT公开号

WO 2013/033091 A1;PCT公开号WO 2015/036394 A1;PCT公开号WO 2014/179664A2;PCT公开号WO 2014/209804 A1;PCT公开号WO 2014/206107 A1;PCT公开号WO 2015/058573 A1;PCT公开号WO 2015/085847 A1;PCT公开号WO 2015/200119A1;PCT公开号WO 2016/015685 A1;和PCT公开号WO 2016/020856 A1。

[0197] 在某些实施例中,抗PD-L1抗体用于本文公开的方法中。在某些实施例中,抗PD-L1抗体是由Genentech开发的阿特殊单抗(atezolizumab)。在某些实施例中,抗PD-L1抗体是由AstraZeneca、Celgene和Medimmune开发的德瓦鲁单抗(durvalumab)。在某些实施例中,抗PD-L1抗体是由Merck Serono和Pfizer开发的阿维鲁单抗(avelumab),也称为MSB0010718C。在某些实施例中,抗PD-L1抗体是由Bristol-Myers Squibb开发的MDX-1105。在某些实施例中,抗PD-L1抗体是由Amplimmune和GSK开发的AMP-224。

[0198] 可用于本文公开的治疗方法的抗PD-L1抗体的非限制性实例公开于以下专利和专利申请中,所有这些专利和专利申请出于所有目的通过引用以其全文并入本文:美国专利号7,943,743;美国专利号8,168,179;美国专利号8,217,149;美国专利号8,552,154;美国专利号8,779,108;美国专利号8,981,063;美国专利号9,175,082;美国公开号US 2010/0203056A1;美国公开号US2003/0232323 A1;美国公开号US2013/0323249 A1;美国公开号US2014/0341917 A1;美国公开号US2014/0044738 A1;美国公开号US 2015/0203580A1;美国公开号US2015/0225483 A1;美国公开号US2015/0346208 A1;美国公开号US2015/0355184 A1;和PCT公开号WO 2014/100079 A1;PCT公开号WO 2014/022758A1;PCT公开号WO 2014/055897 A2;PCT公开号WO 2015/061668 A1;PCT公开号WO 2015/109124 A1;PCT公开号WO 2015/195163 A1;PCT公开号WO 2016/000619A1;和PCT公开号WO 2016/030350 A1。

[0199] 在某些实施例中,抗CTLA-4抗体用于本文公开的方法中。在某些实施例中,抗CTLA-4抗体是由Bristol-Myers Squibb开发的伊匹单抗。

[0200] 在某些实施例中,本文公开的抗ILT2抗体与靶向免疫调节酶诸如IDO(吡啶胺-(2,3)-双加氧酶)和/或TDO(色氨酸2,3-双加氧酶)的化合物组合施用于受试者。因此,在某些实施例中,另外的治疗剂是靶向免疫调节酶的化合物,诸如吡啶胺-(2,3)-双加氧酶(IDO)的抑制剂。在某些实施例中,此类化合物选自由以下各项组成的组:艾卡噪司他(epacadostat)(Incyte Corp;参见,例如,WO 2010/005958,其通过引用以其全文并入本文)、F001287(Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb)、吡啶莫德(indoximod)(NewLink Genetics)和NLG919(NewLink Genetics)。在某些实施例中,化合物为艾卡噪司他。在另一个实施例中,化合物为F001287。在另一个实施例中,化合物为吡啶莫德。在另一个实施例中,化合物为NLG919。在具体实施例中,将本文公开的抗ILT2抗体与IDO抑制剂组合施用于受试者以治疗癌症。如本文所述的用于治疗癌症的IDO抑制剂以药物组合物的固体剂型存在,诸如片剂、丸剂或胶囊,其中药物组合物包含IDO抑制剂和药学上可接受的赋形剂。因此,如本文所述的抗体和如本文所述的IDO抑制剂可以作为单独的剂型单独、依次或同时施用。在某些实施例中,抗体经胃肠外施用,并且IDO抑制剂经口服施用。在某些实施例中,抑制剂选自由艾卡噪司他(Incyte Corporation)、F001287(Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb)、吡啶莫德(NewLink Genetics)和NLG919(NewLink Genetics)组成的组。艾卡噪司他已在PCT公开号WO 2010/005958中进行了描述,该文献出于所有目的通过引用以其全文并入本文。在某些实施例中,抑制剂为艾卡噪司他。在另一个实施例中,抑

制剂为F001287。在另一个实施例中,抑制剂为叫咪莫德。在另一个实施例中,抑制剂为NLG919。

[0201] 在某些实施例中,本文公开的抗ILT2抗体与疫苗组合施用于受试者。疫苗可以是例如肽疫苗、DNA疫苗或RNA疫苗。

[0202] 在某些实施例中,本文公开的抗ILT2抗体与佐剂组合施用于受试者。根据治疗情况可以使用各种佐剂。合适佐剂的非限制性实例包括但不限于弗氏完全佐剂(CFA)、弗氏不完全佐剂(IFA)、montanide ISA(Seppic不完全佐剂)、Ribi佐剂系统(RAS)、Titer Max、胞壁酰肽、Syntex佐剂调配物(SAF)、明矾(氢氧化铝和/或磷酸铝)、铝盐佐剂、Gerbu®佐剂、硝化纤维吸附抗原、封装或包埋抗原、3De-0-酰化单磷酸脂质A(3D-MPL)、免疫刺激寡核苷酸、toll样受体(TLR)配体、甘露聚糖结合凝集素(MBL)配体、STING激动剂、免疫刺激复合物诸如皂苷、Quil A、QS-21、QS-7、ISCOMATRIX等。其他佐剂包括CpG寡核苷酸和双链RNA分子,诸如聚(A)和聚(U)。还可以使用上述佐剂的组合。参见,例如,美国专利号6,645,495;7,029,678;和7,858,589,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。在某些实施例中,本文使用的佐剂是QS-21STIMULON。

[0203] 在某些实施例中,本文公开的抗ILT2抗体与包含TCR的另外的治疗剂组合施用于受试者。在某些实施例中,另外的治疗剂是可溶性TCR。在某些实施例中,另外的治疗剂是表达TCR的细胞。因此,在某些实施例中,本公开涉及本公开的抗体和/或药物组合物与包含TCR的另外的治疗剂组合,其用作药物和/或在用于治疗癌症的方法中使用。

[0204] 在某些实施例中,本文公开的抗ILT2抗体与表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞组合施用于受试者。在某些实施例中,细胞是T细胞。

[0205] 在某些实施例中,本文公开的抗ILT2抗体与TCR模拟抗体组合施用于受试者。在某些实施例中,TCR模拟抗体是特异性结合肽-MHC复合物的抗体。对于TCR模拟抗体的非限制性实例,参见,例如,美国专利号9,074,000以及美国公开号US2009/0304679A1和US2014/0134191 A1,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。

[0206] 在某些实施例中,本文公开的抗ILT2抗体与双特异性T细胞接合剂(BiTE)(例如,如W02005061547A2中所述,该文献通过引用以其全文并入本文)和/或双亲和力重靶向抗体(DART)(例如,如W02012162067A2中所述,该文献通过引用以其全文并入本文)组合施用于受试者。在某些实施例中,BiTE和/或DART特异性结合肿瘤相关抗原(例如,在肿瘤中过表达的多肽、衍生自肿瘤病毒的多肽、包含对肿瘤具有特异性的翻译后修饰的多肽、在肿瘤中特异性突变的多肽)和效应细胞上的分子(例如,CD3或CD16)。在某些实施例中,肿瘤相关抗原是EGFR(例如,人EGFR),任选地其中BiTE和/或DART包含西妥昔单抗(cetuximab)的VH和VL序列。在某些实施例中,肿瘤相关抗原是Her2(例如,人Her2),任选地其中BiTE和/或DART包含曲妥珠单抗(trastuzumab)的VH和VL序列。在某些实施例中,肿瘤相关抗原是CD20(例如,人CD20)。

[0207] 抗ILT2抗体和另外的治疗剂(例如,化疗剂、放疗剂、检查点靶向剂、IDO抑制剂、疫苗、佐剂、可溶性TCR、表达TCR的细胞、表达嵌合抗原受体的细胞和/或TCR模拟抗体)可以作为单独的剂型单独、依次或同时施用。在某些实施例中,抗ILT2抗体经肠胃外施用,并且IDO抑制剂经口服施用。

[0208] 本文所述的抗体或药物组合物可以通过多种途径递送至受试者。这些包括但不限于

于肠胃外、鼻内、气管内、口服、皮内、局部、肌内、腹膜内、透皮、静脉内、瘤内、结膜、动脉内和皮下途径。还可以采用肺部施用,例如通过使用吸入器或喷雾器和具有雾化剂的调配物以用作喷雾剂。在某些实施例中,本文所述的抗体或药物组合物经皮下或静脉内递送。在某些实施例中,本文所述的抗体或药物组合物经动脉内递送。在某些实施例中,本文所述的抗体或药物组合物经瘤内递送。在某些实施例中,本文所述的抗体或药物组合物经递送至肿瘤引流淋巴结中。

[0209] 在病症的治疗和/或预防中有效的抗体或组合物的量将取决于疾病的性质,并且可以通过标准临床技术来确定。

[0210] 在组合物中采用的精确剂量还将取决于施用途径和由其引起的感染或疾病的严重程度,并且应当根据执业者的判断和每个受试者的情况来决定。例如,有效剂量还可以取决于施用方式、目标部位、患者的生理状态(包括年龄、体重和健康状况)、患者是人还是动物、施用的其他药物或治疗是预防性的还是治疗性的而变化。通常,患者是人,但也可以治疗非人哺乳动物,包括转基因哺乳动物。对治疗剂量进行最佳滴定以优化安全性和功效。

[0211] 本文所述的抗ILT2抗体还可用于使用本领域技术人员已知的经典免疫组织学方法测定生物样品中的ILT2(例如,人ILT2)蛋白水平,经典免疫组织学方法包括免疫测定,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀或蛋白质印迹。合适的抗体测定标记是本领域已知的并且包括酶标记,诸如葡萄糖氧化酶;放射性同位素,诸如碘(^{125}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{121}In)和锝(^{99}Tc);发光标记,诸如鲁米诺;和荧光标记,诸如荧光素和罗丹明以及生物素。此类标记可用于标记本文所述的抗体。替代性地,识别本文所述的抗ILT2抗体的第二抗体可被标记并与抗ILT2抗体组合使用以检测ILT2(例如,人ILT2)蛋白水平。因此,在某些实施例中,本公开涉及本公开的抗ILT2抗体用于体外检测生物样品中的ILT2(例如,人ILT2)蛋白的用途。在进一步的实施例中,本公开涉及本公开的抗ILT2抗体用于体外测定和/或检测生物样品中的ILT2(例如,人ILT2)蛋白水平的用途,任选地其中抗ILT2抗体缀合至放射性核素或可检测标记,和/或携带本文所述的标记,和/或其中使用免疫组织学方法。

[0212] 测定ILT2(例如,人ILT2)蛋白的表达水平旨在包括直接(例如,通过确定或估计绝对蛋白质水平)或相对地(例如,通过与第二生物样品中的疾病相关蛋白质水平进行比较)定性或定量测量或估计第一生物样品中的ILT2(例如,人ILT2)蛋白的水平。可以测量或估计第一生物样品中的ILT2(例如,人ILT2)多肽表达水平并与标准ILT2(例如,人ILT2)蛋白水平进行比较,标准是例如,取自从不患有该疾患的个体获得的第二生物样品,或者通过对来自不患有该疾患的个体群体的平均水平来确定。如本领域将理解的,一旦“标准”ILT2(例如,人ILT2)多肽水平已知,其可重复用作比较的标准。因此,在进一步的实施例中,本公开涉及一种用于测定和/或检测生物样品中的ILT2蛋白水平,例如人ILT2蛋白水平的体外方法,其包括通过免疫组织学方法定性或定量测量或估计生物样品中的ILT2蛋白,例如人ILT2蛋白的水平。

[0213] 如本文所用,术语“生物样品”是指从潜在表达ILT2(例如,人ILT2)的受试者、细胞系、组织或其他细胞来源获得的任何生物样品。用于从动物(例如,人或食蟹猴)获得组织活检和体液的方法是本领域众所周知的。生物样品包括外周血单核细胞(PBMC)。

[0214] 本文所述的抗ILT2抗体可用于预后、诊断、监测和筛选应用,包括本领域技术人员

熟知和标准的并且基于本说明书的体外和体内应用。用于体外评定和评估免疫系统状态和/或免疫反应的预后、诊断、监测、和筛选测定和试剂盒可用于预测、诊断和监测以评估患者样品,包括已知患有或疑似患有免疫系统功能障碍的样品,或关于预期或期望的免疫系统反应、抗原反应或疫苗反应的样品。免疫系统状态和/或免疫反应的评定和评估也可用于确定患者对于药物的临床试验或对于特定化疗剂、放疗剂或抗体(包括其组合)相对于不同的药剂或抗体的施用的适合性。这种类型的预后和诊断监测和评定已经在实践中利用针对乳腺癌中HER2蛋白的抗体(HerceptTest™,Dako),其中该测定还用于评估使用Herceptin®进行抗体治疗的患者。体内应用包括定向细胞治疗和免疫系统调节以及免疫反应的放射成像。因此,在某些实施例中,本公开涉及本公开的抗ILT2抗体和/或药物组合物,其用作诊断剂。在某些实施例中,本公开涉及本公开的抗ILT2抗体和/或药物组合物,其使用于预测、诊断和/或监测患有或疑似患有免疫系统功能障碍和/或关于预期或期望的免疫系统反应、抗原反应或疫苗反应的受试者的方法中。在另一个实施例中,本公开涉及本公开的抗ILT2抗体用于通过体外测定和/或检测受试者的生物样品中的人ILT2蛋白水平来预测、诊断和/或监测患有或疑似患有免疫系统功能障碍和/或关于预期或期望的免疫系统反应、抗原反应或疫苗反应的受试者的用途。

[0215] 在某些实施例中,抗ILT2抗体可用于活检样品的免疫组织化学。在某些实施例中,该方法是体外方法。在另一个实施例中,抗ILT2抗体可用于检测ILT2(例如,人ILT2)的水平,或在其膜表面上含有ILT2(例如,人ILT2)的细胞的水平,其水平然后可与某些疾病症状相关联。本文所述的抗ILT2抗体可携带可检测或功能性标记和/或可缀合至放射性核素或可检测标记。当使用荧光标记时,可以利用当前可用的显微镜检查和荧光活化细胞分选分析(FACS)或本领域已知的两种方法程序的组合来鉴定和定量特异性结合成员。本文所述的抗ILT2抗体可携带或可缀合至荧光标记。示例性荧光标记包括例如反应性和缀合探针,例如氨基香豆素、荧光素和德克萨斯红、Alexa Fluor染料、Cy染料和DyLight染料。抗ILT2抗体可携带或可缀合至放射性标记或放射性核素,诸如同位素³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹¹⁷Lu、¹²¹I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁹⁸Au、²¹¹At、²¹³Bi、²²⁵Ac和¹⁸⁶Re。当使用放射性标记时,可以利用本领域已知的当前可用的计数程序来鉴定和定量抗ILT2抗体与ILT2(例如,人ILT2)的特异性结合。在标记是酶的情况下,检测可通过本领域已知的目前使用的比色、分光光度、荧光分光光度、电流分析或气体测量技术中的任一种来完成。这可以通过在允许抗ILT2抗体和ILT2(例如,人ILT2)之间形成复合物的条件下使样品或对照样品与抗ILT2抗体接触来实现。在样品和对照中检测并比较抗ILT2抗体和ILT2(例如,人ILT2)之间形成的任何复合物。鉴于本文所述的抗ILT2抗体对ILT2(例如,人ILT2)的特异性结合,抗ILT2抗体可用于特异性检测ILT2(例如,人ILT2)。本文所述的抗ILT2抗体还可用于经由免疫亲和纯化来纯化ILT2(例如,人ILT2)。本文还包括一种测定系统,其可以以测试试剂盒、试剂盒或多部件试剂盒的形式制备,用于定量分析例如ILT2(例如,人ILT2)/ILT2(例如,人ILT2)配体复合物的存在程度。系统、测试试剂盒、试剂盒或多部件试剂盒可以包含标记的组分,例如标记的抗体和一种或多种另外的免疫化学试剂。

[0216] 多核苷酸、载体和产生抗体的方法

[0217] 另一方面,本文提供了包含编码本文所述的抗体或其部分或其片段(例如,VL和/或VH;以及轻链和/或重链)的核苷酸序列的多核苷酸,其特异性结合ILT2(例如,人ILT2)抗

原,以及载体,例如包含此类多核苷酸的载体,用于在宿主细胞(例如,大肠杆菌和哺乳动物细胞)中重组表达。本文提供了包含编码本文提供的任何抗体的重链和/或轻链的核苷酸序列的多核苷酸,以及包含此类多核苷酸序列的载体,例如它们在宿主细胞(例如,哺乳动物细胞)中有效表达的表达载体。

[0218] 如本文所用,“经分离的”多核苷酸或核酸分子是与存在于核酸分子的天然来源(例如,在小鼠或人中)中的其他核酸分子分离的多核苷酸或核酸分子。此外,“经分离的”核酸分子,诸如cDNA分子,当通过重组技术产生时可以基本上不含其他细胞物质或培养基,或者当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。例如,措辞“基本上不含”包括具有少于约15%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%(特别是少于约10%)的其他物质(例如,细胞物质、培养基、其他核酸分子、化学前体和/或其他化学物质)的多核苷酸或核酸分子的制剂。在具体实施例中,分离或纯化编码本文所述的抗体的核酸分子。

[0219] 在特定方面,本文提供了包含编码抗体的核苷酸序列的多核苷酸,该抗体特异性结合ILT2(例如,人ILT2)多肽并包含如本文所述的氨基酸序列,以及与此类抗体竞争结合ILT2(例如,人ILT2)多肽(例如,以剂量依赖性方式)的抗体,或与此类抗体结合相同表位的抗体。

[0220] 在某些方面,本文提供了包含编码本文所述的抗体的轻链或重链的核苷酸序列的多核苷酸。多核苷酸可包含编码包含本文所述的抗体的VL FR和CDR的轻链的核苷酸序列(参见,例如,表2)或编码包含本文所述的抗体的VH FR和CDR的重链的核苷酸序列(参见,例如,表2)。在某些实施例中,多核苷酸编码本文所述的VH、VL、重链和/或轻链。在另一个实施例中,多核苷酸编码本文所述的第一VH和第一VL。在另一个实施例中,多核苷酸编码本文所述的第二VH和第二VL。在另一个实施例中,多核苷酸编码本文所述的第一重链和第一轻链。在另一个实施例中,多核苷酸编码本文所述的第二重链和第二轻链。在另一个实施例中,多核苷酸编码本文所述的抗体的VH和/或VL,或重链和/或轻链。

[0221] 本文还提供了编码抗ILT2抗体的多核苷酸,其例如通过密码子/RNA优化、用异源信号序列替换和消除mRNA不稳定元件进行优化。生成编码抗ILT2抗体或其片段(例如,轻链、重链、VH结构域或VL结构域)的经优化的核酸用于通过引入密码子变化和/或消除mRNA中的抑制区进行重组表达的方法可以通过相应地调整例如美国专利号5,965,726;6,174,666;6,291,664;6,414,132;和6,794,498中所述的优化方法来进行,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。例如,RNA内的潜在剪接位点和不稳定元件(例如,富含A/T或A/U的元件)可以在不改变核酸序列编码的氨基酸的情况下进行突变,以增加用于重组表达的RNA的稳定性。这些改变利用遗传密码的简并性,例如,使用相同氨基酸的替代密码子。在某些实施例中,可能需要改变一个或多个密码子以编码保守突变,例如,具有与原始氨基酸相似的化学结构和特性和/或功能的相似氨基酸。相对于由未经优化的多核苷酸编码的抗ILT2抗体的表达而言,此类方法可将抗ILT2抗体或其片段的表达增加至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍或更多。

[0222] 在某些实施例中,编码本文所述的抗ILT2抗体或其片段(例如,VL结构域和/或VH结构域)的经优化的多核苷酸序列可以与编码本文所述的抗ILT2抗体或其片段(例如,VL结构域和/或VH结构域)的未经优化的多核苷酸序列的反义(例如,互补)多核苷酸杂交。在具体实施例中,编码本文所述的抗ILT2抗体或片段的经优化的核苷酸序列在高严格条件下与

编码本文所述的抗ILT2抗体或其片段的未经优化的多核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。在具体实施例中,编码本文所述的抗ILT2抗体或其片段的经优化的核苷酸序列在高严格性、中等或较低严格性杂交条件下与编码本文所述的抗ILT2抗体或其片段的未经优化的核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。关于杂交条件的信息已有描述,参见,例如,美国专利申请公开号US2005/0048549(例如,第72-73段),其通过引用以其全文并入本文。

[0223] 可以通过本领域已知的任何方法获得多核苷酸,并确定多核苷酸的核苷酸序列。编码本文所述的抗体(例如,表2中所述的抗体)和这些抗体的修饰形式的核苷酸序列可以使用本领域熟知的方法确定,即已知编码特定氨基酸的核苷酸密码子以生成编码抗体的核酸的方式组装。编码抗体的此类多核苷酸可以由化学合成的寡核苷酸组装而成(例如,如描述于Kutmeier G等人,(1994),*BioTechniques* 17:242-6,其通过引用以其全文并入本文),简而言之,其涉及合成含有编码抗体的序列部分的重叠寡核苷酸,这些寡核苷酸的退火和连接,然后通过PCR扩增连接的寡核苷酸。

[0224] 替代性地,可以使用本领域熟知的方法(例如,PCR和其他分子克隆方法)从来自合适来源(例如,杂交瘤)的核酸生成编码本文所述的抗原结合区或本文所述的抗体的多核苷酸。例如,使用可与已知序列的3'和5'端杂交的合成引物的PCR扩增可以使用从产生感兴趣的抗体的杂交瘤细胞获得的基因组DNA进行。此类PCR扩增方法可用于获得包含编码抗体的轻链和/或重链的序列的核酸。此类PCR扩增方法可用于获得包含编码抗体的可变轻链区和/或可变重链区的序列的核酸。扩增的核酸可以克隆到载体中以在宿主细胞中表达并用于进一步克隆。

[0225] 如果无法获得含有编码特定抗原结合区或抗体的核酸的克隆,但已知抗原结合区或抗体分子的序列,则可以化学合成或从合适的来源(例如,抗体cDNA文库或从表达抗体的任何组织或细胞(诸如选择表达本文所述的抗体的杂交瘤细胞)分离的核酸(优选地聚A+RNA)生成的cDNA文库)通过使用可与序列的3'和5'端杂交的合成引物进行PCR扩增,或通过使用对特定基因序列具有特异性的寡核苷酸探针进行克隆以鉴定例如来自编码抗体的cDNA文库的cDNA克隆,来获得编码免疫球蛋白的核酸。然后可以使用本领域熟知的任何方法将通过PCR生成的扩增核酸克隆到可复制的克隆载体中。

[0226] 编码本文所述的抗ILT2(例如,人ILT2)抗体的DNA可以使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合编码抗ILT2(例如,人ILT2)抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。杂交瘤细胞可以作为此类DNA的来源。一旦分离,可以将DNA置于表达载体中,然后将其转染到宿主细胞,诸如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如,来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞)或骨髓瘤细胞,这些细胞不另外产生免疫球蛋白,以在重组宿主细胞中获得抗ILT2抗体的合成。

[0227] 为了生成完整抗体或抗原结合区,可以使用包括VH或VL核苷酸序列、限制性位点和保护限制性位点的侧翼序列的PCR引物来扩增scFv克隆中的VH或VL序列。利用本领域技术人员已知的克隆技术,可以将PCR扩增的VH结构域克隆到表达重链恒定区(例如,人 γ 1或人 γ 4恒定区)的载体中,并且可以将PCR扩增的VL结构域克隆到表达轻链恒定区(例如,人 κ 或 λ 恒定区)的载体中。在某些实施例中,用于表达VH或VL结构域的载体包含EF-1 α 启动子、分泌信号、可变区的克隆位点、恒定区和选择标记诸如新霉素。还可以将VH和VL结构域克隆到表达必需恒定区的一个载体中。然后使用本领域技术人员已知的技术将重链转化载体和

轻链转化载体共转染到细胞系中以生成表达全长抗体(例如,IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0228] 也可以对DNA进行修饰,例如通过用人重链和轻链恒定区的编码序列替代鼠序列,或通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分共价连接至免疫球蛋白编码序列。

[0229] 还提供了在高严格性、中等或较低严格性杂交条件下与编码本文所述的抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。在具体实施例中,本文所述的多核苷酸在高严格性、中等或较低严格性杂交条件下与编码本文提供的VH结构域和/或VL结构域的多核苷酸杂交。

[0230] 杂交条件已在本领域中描述并且为本领域技术人员已知。例如,在严格条件下的杂交可涉及在约45℃下在6x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中与滤膜结合的DNA杂交,随后在约50-65℃下在0.2xSSC/0.1% SDS中洗涤一次或多次;在高度严格条件下的杂交可涉及在约45℃下在6xSSC中与滤膜结合的核酸杂交,随后在约68℃下在0.1xSSC/0.2% SDS中洗涤一次或多次。在其他严格杂交条件下的杂交是本领域技术人员已知并且已有描述,参见,例如,Ausubel FM等人主编,(1989)Current Protocols in Molecular Biology,第I卷,Green Publishing Associates,Inc.和John Wiley&Sons,Inc.,New York,第6.3.1-6.3.6和2.10.3页,其通过引用以其全文并入本文。

[0231] 在某些方面,本文提供了表达(例如,重组地)本文所述的特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体的细胞(例如,宿主细胞),以及相关多核苷酸和表达载体。本文提供了包含多核苷酸的载体(例如,表达载体),该多核苷酸包含编码抗ILT2抗体或片段的核苷酸序列,用于在宿主细胞、优选地在哺乳动物细胞(例如,CHO细胞)中重组表达。本文还提供了包含用于重组表达本文所述的抗ILT2抗体(例如,人或人源化抗体)的此类载体的宿主细胞。在具体方面,本文提供了用于产生本文所述的抗体的方法,该方法包括从宿主细胞表达抗体。

[0232] 本文所述的特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体(例如,全长抗原结合区或抗体或本文所述的抗体的重链和/或轻链)的重组表达通常涉及构建含有编码抗体的多核苷酸的表达载体。一旦获得了编码本文所述的抗体分子、抗体的重链和/或轻链或其片段(例如,重链和/或轻链可变区)的多核苷酸,则用于抗体分子的产生可以使用本领域熟知的技术通过重组DNA技术来产生。因此,本文描述了通过表达含有含有抗体或抗体片段(例如,轻链或重链)编码核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白质的方法。可以使用本领域技术人员熟知的方法构建含有抗体或抗体片段(例如,轻链或重链)编码序列和适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。还提供了包含核苷酸序列的可复制载体,核苷酸序列编码包含本文所述的抗体分子、抗体的重链或轻链、抗体的重链或轻链可变区或其片段、或重链或轻链CDR,其与启动子可操作地连接。此类载体可例如包括编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见,例如,国际公开号W0 86/05807和W0 89/01036;和美国专利号5,122,464,其通过引用以其全文并入本文),并且可以将抗体的可变区克隆到此载体中,用于表达整个重链、整个轻链或整个重链和轻链两者。

[0233] 在某些实施例中,载体包含编码本文所述的抗体的VH、VL、重链和/或轻链的多核苷酸。在另一个实施例中,载体包含编码本文所述的抗体的VH和VL的多核苷酸。在另一个实施例中,载体包含编码本文所述的抗体的重链和轻链的多核苷酸。

[0234] 可以通过常规技术将表达载体转移至细胞(例如,宿主细胞),然后可通过常规技术培养所得细胞以产生含有本文所述的抗体或其片段。因此,本文提供了含有编码本文所述的抗体或其片段、或其重链或轻链、或其片段、或本文所述的单链抗体的多核苷酸的宿主

细胞,多核苷酸可操作地连接至用于在宿主细胞中表达此类序列的启动子。

[0235] 在某些实施例中,宿主细胞包含编码本文所述的抗体的VH和VL的多核苷酸。在另一个实施例中,宿主细胞包含载体,该载体包含编码本文所述的抗体的VH和VL的多核苷酸。在另一个实施例中,宿主细胞包含编码本文所述的抗体的VH的第一多核苷酸和编码本文所述的抗体的VL的第二多核苷酸。在另一个实施例中,宿主细胞包含第一载体和第二载体,第一载体包含编码本文所述的抗体的VH的第一多核苷酸,第二载体包含编码本文所述的抗体的VL的第二多核苷酸。

[0236] 在具体实施例中,由第一细胞表达的重链/重链可变区与第二细胞的轻链/轻链可变区缔合以形成本文所述的抗ILT2(例如,人ILT2)抗体。在某些实施例中,本文提供了包含此类第一宿主细胞和此类第二宿主细胞的宿主细胞群体。

[0237] 在某些实施例中,本文提供了载体群体,其包含第一载体和第二载体,第一载体包含编码本文所述的抗ILT2(例如,人ILT2)抗体的轻链/轻链可变区的多核苷酸,第二载体包含编码本文所述的抗ILT2(例如,人ILT2)抗体的重链/重链可变区的多核苷酸。

[0238] 多种宿主表达载体系统可用于表达本文所述的抗体分子(参见,例如,美国专利号5,807,715,其通过引用以其全文并入本文)。此类宿主表达系统代表可以产生并随后纯化感兴趣的编码序列的媒介,但也代表当用适当的核苷酸编码序列转化或转染时可以原位表达本文所述的抗体分子的细胞。这些包括但不限于微生物,诸如用例如含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌);用例如含有抗体编码序列的重组酵母表达载体的酵母(例如,酵母菌和毕赤酵母);用例如含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用例如重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒CaMV;烟草花叶病毒TMV)或用例如含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)感染的植物细胞系统(例如,绿藻诸如莱茵衣藻);或哺乳动物细胞系统(例如,COS(例如,COS1或COS)、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa和NIH 3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20和BMT10细胞),包含例如,重组表达构建体,其含有源自哺乳动物细胞的基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)。在具体实施例中,用于表达本文所述的抗体的细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,例如来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞。在某些实施例中,由CHO细胞产生的抗体的重链和/或轻链可以具有被焦谷氨酸取代的N-末端谷氨酰胺或谷氨酸残基。在某些实施例中,用于表达本文所述的抗体的细胞是人细胞,例如人细胞系。在具体实施例中,哺乳动物表达载体是pOptiVEC™或pcDNA3.3。在某些实施例中,细菌细胞诸如大肠杆菌或真核细胞(例如,哺乳动物细胞),特别是用于表达完整重组抗体分子的细胞,用于表达重组抗体分子。例如,哺乳动物细胞诸如CHO细胞,与载体诸如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件结合,是抗体的有效表达系统(Foecking MK和Hofstetter H (1986)Gene 45:101-5;和Cockett MI等人,(1990)Biotechnology 8(7):662-7,这些文献中的每一者均通过引用以其全文并入本文。在某些实施例中,本文所述的抗体由CHO细胞或NS0细胞产生。在具体实施例中,编码本文所述的特异性结合ILT2(例如,人ILT2)的抗体的核苷酸序列的表达受到组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子的调节。

[0239] 在细菌系统中,可以根据待表达的抗体分子的预期用途有利地选择许多表达载

体。例如,当要产生大量此类抗体时,为了产生抗体分子的药物组合物,可能需要指导容易纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体。此类载体包括但不限于大肠杆菌表达载体 pUR278(Ruether U和Mueller-Hill B(1983)EMBO J 2:1791-1794),其中编码序列可以单独连接到具有lac Z编码区的框架中的载体中,从而产生融合蛋白;pIN载体(Inouye S和Inouye M(1985)Nuc Acids Res 13:3101-3109;Van Heeke G和Schuster SM(1989)JBiol Chem 24:5503-5509);等,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。例如,pGEX载体也可用于表达外源多肽作为与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白。一般来说,此类融合蛋白是可溶的,并且可以通过吸附和结合基质谷胱甘肽琼脂糖珠,然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱而容易地从裂解的细胞中纯化。pGEX载体被设计成包括凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点,使得克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0240] 例如,在昆虫系统中,苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)可以用作表达外源基因的载体。该病毒在草地贪夜蛾细胞中生长。可以将编码序列单独克隆到病毒的非必需区(例如多角体蛋白基因)中,并置于AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制下。

[0241] 在哺乳动物宿主细胞中,可以利用许多基于病毒的表达系统。在使用腺病毒作为表达载体的情况下,可以将感兴趣的编码序列连接至腺病毒转录/翻译控制复合体,例如晚期启动子和三联前导序列。然后可以通过体外或体内重组将该嵌合基因插入腺病毒基因组中。在病毒基因组的非必需区(例如,E1区或E3区)的插入将产生一种重组病毒,该病毒是有活力的,并且能够在受感染的宿主中表达该分子(例如,参见Logan J和Shenk T(1984)PNAS 81(12):3655-9,其通过引用以其全文并入本文)。插入编码序列的有效翻译也可能需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同相,以确保整个插入物的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以有多种来源,包括天然的和合成的。可以通过包含适当的转录增强子元件、转录终止子等来增强表达效率(参见,例如,Bitter G等人,(1987)Methods Enzymol.153:516-544,其通过引用以其全文并入本文)。

[0242] 另外,可以选择调节插入序列的表达或以所需的特定方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的此类修饰(例如,糖基化)和加工(例如,切割)对于蛋白质的功能可能很重要。不同的宿主细胞具有用于对蛋白质和基因产物进行翻译后加工和修饰的特征和特异性机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保所表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此,可以使用具有适当加工初级转录物、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERO、BHK、HeLa、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030、COS(例如,COS1或COS)、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10和HsS78Bst细胞。在某些实施例中,本文所述的抗ILT2(例如,人ILT2)抗体在哺乳动物细胞诸如CHO细胞中产生。

[0243] 在具体实施例中,本文所述的抗体具有降低的岩藻糖含量或没有岩藻糖含量。此类抗体可以使用本领域技术人员已知的技术来产生。例如,抗体可以在缺乏或缺少岩藻糖基化能力的细胞中表达。在具体实例中,具有 $\alpha 1,6$ -岩藻糖基转移酶的两个等位基因敲除的细胞系可用于产生具有降低的岩藻糖含量的抗体。Potelligent[®]系统(Lonza)是可用于产生具有降低的岩藻糖含量的抗体的此类系统的实例。

[0244] 对于重组蛋白的长期、高产量生产,可以产生稳定的表达细胞。例如,可以工程化稳定表达本文所述的抗ILT2(例如,人ILT2)抗体的细胞系。在具体实施例中,本文提供的细胞稳定地表达轻链/轻链可变区和重链/重链可变区,它们缔合以形成本文所述的抗原结合区或抗体。

[0245] 在某些方面,不是使用含有病毒复制起点的表达载体,而是可以用受适当表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等等)控制的DNA和可选择标记转化宿主细胞。在引入外源DNA/多核苷酸后,可以允许工程化的细胞在富集培养基中生长1-2天,并且然后切换到选择性培养基。重组质粒中的选择性标记赋予对选择的抗性,并且允许细胞稳定地将质粒整合到它们的染色体中并且生长形成病灶,该病灶进而可以被克隆并扩增到细胞系中。该方法可以有利地用于工程化表达本文所述的抗ILT2(例如,人ILT2)或其片段的细胞系。此类工程化的细胞系可特别用于筛选和评估与抗体分子直接或间接相互作用的组合物。

[0246] 可以使用许多选择系统,包括但不限于分别在tk细胞、hgp⁺rt细胞或ap⁺rt细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler M等人,(1977)Cell 11(1):223-32)、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Szybalska EH和Szybalski W(1962)PNAS 48(12):2026-2034)和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy I等人,(1980)Cell 22(3):817-23)基因,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。此外,抗代谢物抗性可用作选择以下基因的基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler M等人,(1980)PNAS 77(6):3567-70;O'Hare K等人,(1981)PNAS 78:1527-31);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan RC和Berg P(1981)PNAS 78(4):2072-6);neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Wu GY和Wu CH(1991)Biotherapy3:87-95;Tolstoshev P(1993)Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573-596;Mulligan RC(1993)Science 260:926-932;以及Morgan RA和Anderson WF(1993)Ann Rev Biochem 62:191-217;Nabel GJ和Felgner PL(1993)Trends Biotechnol 11(5):211-5);和hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre RF等人,(1984)Gene 30(1-3):147-56),所有这些文献通过引用以其全文并入本文。可以常规地应用重组DNA技术领域中公知的方法来选择所需的重组克隆,并且此类方法描述于例如Ausubel FM等人,(编辑),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons, NY(1993);Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY(1990);并在第12章和第13章中,Dracopoli NC等人,(编辑),Current Protocols in Human Genetics, John Wiley&Sons, NY(1994);Colbère-Garapin F等人,(1981)J Mol Biol 150:1-14,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。

[0247] 可以通过载体扩增来增加抗体分子的表达水平(有关综述,参见Bebbington CR和Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, 第3卷(Academic Press, New York, 1987), 其通过引用以其全文并入本文)。当载体系统中的标记是可扩增的时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的增加将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与感兴趣的基因相关,因此蛋白质的产量也会增加(Crouse GF等人,(1983)Mol Cell Biol 3:257-66,其通过引用以其全文并入本文)。

[0248] 宿主细胞可以用本文所述的两种或更多种表达载体共转染,第一载体编码重链衍生的多肽,并且第二载体编码轻链衍生的多肽。两种载体可含有相同的选择标记,其使得重

链和轻链多肽能够同等表达。宿主细胞可以用不同量的两种或更多种表达载体共转染。例如,宿主细胞可以用以下比例中的任一者的第一表达载体和第二表达载体转染:约1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45或1:50。

[0249] 替代性地,可以使用编码并能够表达重链和轻链多肽两者的单一载体。在这种情况下,轻链应置于重链之前,以避免过量的有毒游离重链(Proudfoot NJ (1986) Nature 322:562-565;和Köhler G (1980) PNAS 77:2197-2199,这些文献中的每一者通过引用以其全文并入本文)。重链和轻链的编码序列可包含cDNA或基因组DNA。表达载体可以是单顺反子或多顺反子。多顺反子核酸构建体可编码2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个基因/核苷酸序列,或在2-5、5-10或10-20个基因/核苷酸序列的范围内。例如,双顺反子核酸构建体可以按以下顺序包含启动子、第一基因(例如,本文所述的抗体的重链)和第二基因(例如,本文所述的抗体的轻链)。在这种表达载体中,两个基因的转录可以由启动子驱动,而来自第一基因的mRNA的翻译可以通过帽依赖性扫描机制进行,并且来自第二基因的mRNA的翻译可以通过帽非依赖性机制,例如,由IRES进行。

[0250] 一旦通过重组表达产生了本文所述的抗体分子,可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法对其进行纯化,例如通过色谱法(例如,离子交换、亲和力,特别是通过在蛋白A后对特定抗原的亲和力,和分级柱色谱法)、离心、差别溶解度,或通过任何其他用于纯化蛋白的标准技术。此外,本文所述的抗体可以与本文所述的或本领域已知的异源多肽序列融合以促进纯化。

[0251] 在具体实施例中,本文所述的抗体是分离的或纯化的。在某些实施例中,经分离的抗体是基本上不含具有与经分离的抗体不同的抗原特异性的其他抗体的抗体。例如,在某些实施例中,本文所述的抗体制剂基本上不含细胞物质和/或化学前体。措辞“基本上不含细胞物质”包括抗体制剂,其中抗体与分离或重组产生抗体的细胞的细胞组分分离。因此,基本上不含细胞物质的抗体包括具有少于约30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1% (以干重计)的异源蛋白质(本文也称为“污染蛋白质”)和/或抗体变体(例如,抗体的不同翻译后修饰形式或抗体的其他不同版本(例如,抗体片段))的抗体制剂。当重组产生抗体时,其通常也基本上不含培养基,即培养基占蛋白质制剂体积的少于约20%、10%、2%、1%、0.5%或0.1%。当通过化学合成产生抗体时,其通常基本上不含化学前体或其他化学物质,即其与参与蛋白质合成的化学前体或其他化学物质分离。因此,此类抗体制剂具有少于约30%、20%、10%或5% (以干重计)的除感兴趣的抗体之外的化学前体或化合物。在具体实施例中,本文所述的抗体是分离的或纯化的。

[0252] 抗ILT2(例如,人ILT2)抗体或其片段可以通过本领域已知的用于合成蛋白质或抗体的任何方法来产生,例如通过化学合成或通过重组表达技术。除非另有说明,否则本文所述的方法采用分子生物学、微生物学、遗传分析、重组DNA、有机化学、生物化学、PCR、寡核苷酸合成和修饰、核酸杂交以及本领域技术范围内的相关领域中的常规技术。例如,在本文引用的参考文献中描述了这些技术,并且在文献中对其进行了充分解释。参见,例如,Maniatis T等人,(1982)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Sambrook J等人,(1989),Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Sambrook J等人,(2001)Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM 等人, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 年和年度更新); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 年和年度更新) Gait (编辑) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (编辑) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren B 等人, (编辑) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 所有这些文献通过引用以其全文并入本文。

[0253] 在具体实施例中, 本文所述的抗体通过涉及产生的任何方式来制备、表达、产生或分离, 例如, 经由 DNA 序列的合成、基因工程。在某些实施例中, 此类抗体包含在动物或哺乳动物 (例如, 人) 体内的抗体种系库中天然不存在的序列 (例如, DNA 序列或氨基酸序列)。

[0254] 在一个方面, 本文提供了一种制备抗 ILT2 (例如, 人 ILT2) 抗体的方法, 该方法包括培养本文所述的细胞或宿主细胞。在某些实施例中, 该方法在体外进行。在某个方面, 本文提供了一种制备抗 ILT2 (例如, 人 ILT2) 抗体的方法, 该方法包括使用本文所述的细胞或宿主细胞 (例如, 包含编码本文所述的抗体的多核苷酸的细胞或宿主细胞) 表达 (例如, 重组表达) 抗体。在某些实施例中, 细胞是经分离的细胞。在某些实施例中, 外源多核苷酸已被引入细胞中。在某些实施例中, 该方法进一步包括纯化从细胞或宿主细胞获得的抗体的步骤。

[0255] 在某些实施例中, 通过在合适的条件下在细胞中表达编码本文所述的抗体的 VH 和 VL 的多核苷酸从而表达多核苷酸并产生抗体来产生抗体。在另一个实施例中, 通过在合适的条件下在细胞中表达编码本文所述的抗体的重链和轻链的多核苷酸从而表达多核苷酸并产生抗体来产生抗体。在某些实施例中, 通过在合适的条件下在细胞中表达编码本文所述的抗体的 VH 的第一多核苷酸和编码本文所述的抗体的 VL 的第二多核苷酸从而表达多核苷酸并产生抗体来产生抗体。在某些实施例中, 通过在合适的条件下在细胞中表达编码本文所述的抗体的重链的第一多核苷酸和编码本文所述的抗体的轻链的第二多核苷酸从而表达多核苷酸并产生抗体来产生抗体。

[0256] 用于产生多克隆抗体的方法是本领域已知的 (参见, 例如, 第 11 章, 载于: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 第 5 版, Ausubel FM 等人, 编辑, John Wiley and Sons, New York, 其通过引用以其全文并入本文)。

[0257] 单克隆抗体可以使用本领域已知的多种技术制备, 包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合。例如, 可以使用杂交瘤技术来产生单克隆抗体, 包括本领域已知的和例如在 Harlow E 和 Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版 1988); Hammerling GJ 等人, 载于: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981) 中教导的那些技术, 这些文献中的每一者均通过引用以其全文并入本文。如本文所使用的, 术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。例如, 单克隆抗体可以从外源表达本文所述的抗体或其片段 (例如此类抗体的轻链和/或重链) 的宿主细胞重组产生。

[0258] 在具体实施例中, 如本文所用的“单克隆抗体”是由单个细胞 (例如, 产生重组抗体的杂交瘤或宿主细胞) 产生的抗体, 其中该抗体特异性结合 ILT2 (例如, 人 ILT2), 例如通过 ELISA 或本领域已知的或本文提供的实例中的其他抗原结合或竞争性结合测定确定。在

某些实施例中,单克隆抗体可以是嵌合抗体或人源化抗体。在某些实施例中,单克隆抗体是单价抗体或多价(例如,二价)抗体。在某些实施例中,单克隆抗体是单特异性或多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。本文所述的单克隆抗体可以例如通过如Kohler G和Milstein C (1975)Nature 256:495中所述的杂交瘤方法制备,该文献通过引用以其全文并入本文,或可以例如使用如本文所述的技术从噬菌体文库中分离。用于制备克隆细胞系和由此表达的单克隆抗体的其他方法是本领域众所周知的(参见,例如,第11章,载于:Short Protocols in Molecular Biology, (2002)第5版,Ausubel FM等人,同上)。

[0259] 如本文所用,当抗体包含至少两个(例如,两个或更多个)单价结合区时,抗体与抗原多价结合(例如,二价),每个单价结合区能够结合抗原上的表位。每个单价结合区可以结合抗原上相同或不同的表位。

[0260] 使用杂交瘤技术产生和筛选特异性抗体的方法是常规的并且是本领域众所周知的。例如,在杂交瘤方法中,免疫小鼠或其他合适的宿主动物,诸如绵羊、山羊、兔、大鼠、仓鼠或猕猴,以引发产生或能够产生抗体的淋巴细胞,该抗体将特异性结合用于免疫的蛋白质(例如,ILT2(例如,人ILT2))。替代性地,可以在体外对淋巴细胞进行免疫。然后使用合适的融合剂(诸如聚乙二醇)将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞(Goding JW (编辑),Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,第59-103页(Academic Press,1986),其通过引用以其全文并入本文)。另外,RIMMS(重复免疫多位点)技术可用于免疫动物(Kilpatrick KE等人,(1997)Hybridoma 16:381-9,其通过引用以其全文并入本文)。

[0261] 在某些实施例中,可以用抗原(例如,ILT2(例如,人ILT2))免疫小鼠(或其他动物,诸如大鼠、猴子、驴、猪、绵羊、仓鼠或狗),并且一旦检测到免疫反应,例如在小鼠血清中检测到抗原特异性抗体,则收获小鼠脾脏并分离脾细胞。然后通过众所周知的技术将脾细胞与任何合适的骨髓瘤细胞(例如,来自美国典型培养物保藏中心(ATCC®) (Manassas,VA)的细胞系SP20的细胞)融合,以形成杂交瘤。通过有限稀释选择并克隆杂交瘤。在某些实施例中,收获免疫小鼠的淋巴结并与NS0骨髓瘤细胞融合。

[0262] 将如此制备的杂交瘤细胞接种并在合适的培养基中生长,该培养基优选地含有一种或多种抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),杂交瘤的培养基通常包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT培养基),这些物质阻止HGPRT缺陷型细胞的生长。

[0263] 具体的实施例采用骨髓瘤细胞,其有效融合、支持所选抗体产生细胞稳定的高-水平抗体产生,并且对诸如HAT培养基的培养基敏感。在这些骨髓瘤细胞系中有鼠骨髓瘤细胞系,诸如NS0细胞系或衍生自MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的细胞系,可从Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA获得,以及SP-2或X63-Ag8.653细胞,可从美国典型培养物保藏中心(Rockville, MD, USA)获得。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已被描述用于产生人单克隆抗体(Kozbor D(1984)J Immunol 133:3001-5; Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第51-63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987), 这些文献中的每一者均通过引用以其全文并入本文)。

[0264] 测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基中针对ILT2(例如,人ILT2)的单克隆抗体的

产生。由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过本领域已知的方法,例如免疫沉淀或通过体外结合测定(诸如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来确定。

[0265] 在鉴定产生所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限稀释程序对克隆进行亚克隆,并通过标准方法生长(Goding JW(编辑), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 同上)。用于此目的合适培养基包括例如D-MEM或RPMI 1640培养基。另外,杂交瘤细胞可以在动物体内作为腹水肿瘤生长。

[0266] 由亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规免疫球蛋白纯化方法,诸如例如蛋白A-琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,从培养基、腹水或血清中适当地分离。

[0267] 本文所述的抗体包括例如识别ILT2(例如,人ILT2)的抗体片段,并且可以通过本领域技术人员已知的任何技术产生。例如,本文所述的Fab和F(ab')₂片段可以通过使用酶诸如木瓜蛋白酶(以产生Fab片段)或胃蛋白酶(以产生F(ab')₂片段)对免疫球蛋白分子进行蛋白水解切割来产生。Fab片段对应于抗体分子的两个相同臂之一,并且含有与重链的VH和CH1结构域配对的完整轻链。F(ab')₂片段含有通过铰链区中的二硫键连接的抗体分子的两个抗原结合臂。

[0268] 此外,本文所述的抗体还可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法产生。在噬菌体展示方法中,将功能性抗体结构域展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。特别地,从动物cDNA文库(例如,受影响组织的人或鼠cDNA文库)扩增编码VH和VL结构域的DNA序列。通过PCR将编码VH和VL结构域的DNA与scFv接头重组在一起,并克隆到噬菌粒载体中。将载体在大肠杆菌中电穿孔,并用辅助噬菌体感染大肠杆菌。在这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,包括fd和M13,并且VH和VL结构域通常与噬菌体基因III或基因VIII重组融合。表达结合特定抗原的抗原结合区的噬菌体可以用抗原进行选择或鉴定,例如,使用标记的抗原或结合或捕获到固体表面或珠的抗原。可用于制备本文所述的抗体的噬菌体展示方法的实例包括Brinkman U等人,(1995) *J Immunol Methods* 182:41-50; Ames RS等人,(1995) *J Immunol Methods* 184:177-186; Kettleborough CA等人,(1994) *Eur J Immunol* 24:952-958; Persic L等人,(1997) *Gene* 187:9-18; Burton DR和Barbas CF(1994) *Advan Immunol* 57:191-280; PCT申请号PCT/GB91/001134; 国际公开号W0 90/02809、W0 91/10737、W0 92/01047、W0 92/18619、W0 93/1 1236、W0 95/15982、W0 95/20401和W0 97/13844; 以及美国专利号5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743和5,969,108中公开的那些,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。

[0269] 如以上参考文献中所述,在噬菌体选择之后,可以分离来自噬菌体的抗体编码区,并将其用于生成完整抗体(包含人抗体或任何其他期望的抗原结合片段),并在任何期望的宿主(包含哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌)中表达,例如,如下所述。重组产生抗体片段诸如Fab、Fab'和F(ab')₂片段的技术也可以是使用本领域已知的方法来使用,诸如PCT公开号W0 92/22324; Mullinax RL等人,(1992) *BioTechniques* 12(6):864-9; Sawai H等人,(1995) *Am J Reprod Immunol* 34:26-34; 和Better M等人,(1988) *Science* 240:1041-1043中公开的那些,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。

[0270] 在某些实施例中,为了产生完整抗体,可以使用包括VH或VL核苷酸序列、限制性位点和保护限制性位点的侧翼序列的PCR引物来从模板(例如,scFv克隆)扩增VH或VL序列。利

用本领域技术人员已知的克隆技术,可以将PCR扩增的VH结构域克隆到表达VH恒定区的载体中,并且可以将PCR扩增的VL结构域克隆到表达VL恒定区(例如,人 κ 或 λ 恒定区)的载体中。还可以将VH和VL结构域克隆到表达必需恒定区的一个载体中。然后使用本领域技术人员已知的技术将重链转化载体和轻链转化载体共转染到细胞系中以生成表达全长抗体(例如,IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0271] 嵌合抗体是其中抗体的不同部分衍生自不同免疫球蛋白分子的分子。例如,嵌合抗体可以含有与人抗体的恒定区融合的小鼠或大鼠单克隆抗体的可变区。用于产生嵌合抗体的方法是本领域已知的。参见,例如,Morrison SL(1985) *Science* 229:1202-7; Oi VT和Morrison SL(1986) *BioTechniques* 4:214-221; Gillies SD等人,(1989) *J Immunol Methods* 125:191-202; 和美国专利号5,807,715、4,816,567、4,816,397和6,331,415,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。

[0272] 人源化抗体能够结合预定抗原,并且其包含基本上具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的框架区和基本上具有非人免疫球蛋白(例如,鼠免疫球蛋白)的氨基酸序列的CDR。在某些实施例中,人源化抗体还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。抗体还可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。人源化抗体可以选自任何类别的免疫球蛋白,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何同种型,包括IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄。人源化抗体可以使用本领域已知的多种技术来产生,包括但不限于CDR移植(欧洲专利号EP 239400;国际公开第W0 91/09967号;和美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089)、饰面或表面重构(欧洲专利号EP 592106和EP 519596;Padlan EA(1991) *Mol Immunol* 28(4/5):489-498;Studnicka GM等人,(1994) *Prot Engineering* 7(6):805-814;和Roguska MA等人,(1994) *PNAS* 91:969-973)、链改组(美国专利号5,565,332),以及例如美国专利号6,407,213、美国专利5,766,886、国际公开号W0 93/17105;Tan P等人,(2002) *J Immunol* 169:1119-25;Caldas C等人,(2000) *Protein Eng.* 13(5):353-60;Morea V等人,(2000) *Methods* 20(3):267-79;Baca M等人,(1997) *J Biol Chem* 272(16):10678-84;Roguska MA等人,(1996) *Protein Eng* 9(10):895-904;Couto JR等人,(1995) *Cancer Res.* 55(23增刊):5973s-5977s;Couto JR等人,(1995) *Cancer Res* 55(8):1717-22;Sandhu JS(1994) *Gene* 150(2):409-10;和Pedersen JT等人,(1994) *J Mol Biol* 235(3):959-73中公开的技术,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。另参见,美国申请公开号US2005/0042664 A1(2005年2月24日),其通过引用以其全文并入本文。

[0273] 已经描述了用于制备多特异性抗体(例如,双特异性抗体)的方法,参见,例如,美国专利号7,951,917;7,183,076;8,227,577;5,837,242;5,989,830;5,869,620;6,132,992;和8,586,713,所有这些文献通过引用以其全文并入本文。

[0274] 双特异性、二价抗体及其制备方法描述于例如美国专利号5,731,168、5,807,706、5,821,333和美国申请公开号2003/020734和2002/0155537;这些文献中的每一者均通过引用以其全文并入本文。双特异性四价抗体及其制备方法描述于例如国际申请公开号W0 02/096948和W0 00/44788,这两篇文献的公开内容通过引用以其全文并入本文。一般参见,国际申请公开号W0 93/17715、W0 92/08802、W0 91/00360和W0 92/05793;Tutt等人,*J. Immunol.* 147:60-69(1991);美国专利号4,474,893;4,714,681;4,925,648;5,573,920;和5,601,819;以及Kostelny等人,*J. Immunol.* 148:1547-1553(1992);这些文献中的每一者

均通过引用以其全文并入本文。

[0275] 如本文所述的双特异性抗体可根据如例如国际公开号WO 2011/131746、WO 2011/147986、WO 2008/119353和WO 2013/060867以及Labrijn AF等人., (2013) PNAS 110(13): 5145-5150中所述的DuoBody技术平台 (Genmab A/S) 产生。DuoBody技术可用于将含有两条重链和两条轻链的第一单特异性抗体或第一抗原结合区的一半与含有两条重链和两条轻链的第二单特异性抗体或第二抗原结合区的一半结合。所得异二聚体含有来自第一抗体或第一抗原结合区的一条重链和一条轻链, 与来自第二抗体或第二抗原结合区的一条重链和一条轻链配对。当两个单特异性抗体或抗原结合区识别不同抗原上的不同表位时, 所得异二聚体是双特异性抗体。

[0276] DuoBody技术要求每个单特异性抗体或抗原结合区包括在CH3结构域中具有单点突变的重链恒定区。点突变允许所得双特异性抗体中的CH3结构域之间的相互作用比单特异性抗体或抗原结合区中的CH3结构域之间的相互作用更强。每个单特异性抗体或抗原结合区中的单点突变位于重链恒定区的CH3结构域中根据EU编号系统编号的残基366、368、370、399、405、407或409处, 如例如国际公开号WO 2011/131746中所述。此外, 与另一个单特异性抗体或抗原结合区相比, 单点突变位于一个单特异性抗体或抗原结合区中的不同残基处。例如, 一个单特异性抗体或抗原结合区可包含突变F405L (即, 在残基405处从苯丙氨酸到亮氨酸的突变), 而另一个单特异性抗体或抗原结合区可包含突变K409R (即, 在残基409处从赖氨酸到精氨酸的突变), 根据EU编号系统编号。单特异性抗体的重链恒定区或抗原结合区可以是IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄同种型 (例如, 人IgG₁同种型), 并且通过DuoBody技术产生的双特异性抗体可以保留Fc介导的效应子功能。

[0277] 另一种用于生成双特异性抗体的方法被称为“杵臼结构”策略 (参见, 例如, 国际公开WO2006/028936)。在该技术中, 通过突变成IgG中CH3结构域的界面的选定氨基酸来减少Ig重链的错配。在CH3结构域内两条重链直接相互作用的位置处, 将具有小侧链 (臼) 的氨基酸引入到一条重链的序列中, 并将具有大侧链 (杵) 的氨基酸引入到另一条重链上的对应的相互作用残基位置中。在一些实施例中, 本公开的组合物具有免疫球蛋白链, 其中CH3结构域已通过突变在两个多肽之间的界面处相互作用的选定氨基酸而被修饰, 以便优先形成双特异性抗体。双特异性抗体可以由相同亚类 (例如, IgG₁或IgG₃) 或不同亚类 (例如, IgG₁和IgG₃, 或IgG₃和IgG₄) 的免疫球蛋白链构成。

[0278] 在一些情况下, 双特异性抗体可以含有IgG₄和IgG₁、IgG₄和IgG₂、IgG₄和IgG₃或IgG₁和IgG₃链异二聚体。此类异二聚体重链抗体可以常规地通过例如修饰形成人IgG₄和IgG₁或IgG₃中的CH3结构域的界面的选定氨基酸来工程化, 以便有利于异二聚体重链形成。

[0279] 在某些实施例中, 本文所述的与本文所述的抗ILT2 (例如, 人ILT2) 抗体结合ILT2 (例如, 人ILT2) 的相同表位的抗体是人抗体。在某些实施例中, 本文所述的竞争性阻断 (例如, 以剂量依赖性方式) 本文所述的任一种抗体与ILT2 (例如, 人ILT2) 结合的抗体是人抗体。人抗体可以使用本领域已知的任何方法产生。例如, 可以使用不能表达功能性内源免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。特别地, 可以将人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物随机或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞中。替代性地, 除了人重链和轻链基因之外, 还可以将人可变区、恒定区和多样性区引入小鼠胚胎干细胞中。小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因可以单独或与通过同源重组引入人免疫球蛋白基因座同时使其失去功

能。特别地, J_H 区的纯合缺失防止内源性抗体产生。将修饰的胚胎干细胞扩增并显微注射到胚泡中以产生嵌合小鼠。然后培育嵌合小鼠以产生表达人抗体的纯合后代。用选定的抗原, 例如全部或部分抗原(例如, ILT2(例如, 人 ILT2))以正常方式免疫转基因小鼠。可以使用常规杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠中获得针对抗原的单克隆抗体。转基因小鼠携带的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化过程中重新排列, 随后经历类别转换和体细胞突变。因此, 使用这种技术, 可以产生治疗上有用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体。关于这种用于产生人抗体的技术的概述, 参见Lonberg N和Huszar D(1995) Int Rev Immunol 13:65-93, 其通过引用以其全文并入。关于这种用于产生人抗体和人单克隆抗体的技术以及用于产生此类抗体的方案的详细讨论, 参见, 例如, 国际公开号W0 98/24893、W0 96/34096和W0 96/33735; 和美国专利号5,413,923、5,625,126、5,633,425、5,569,825、5,661,016、5,545,806、5,814,318和5,939,598, 所有这些文献通过引用以其全文并入本文。能够产生人抗体的小鼠的实例包括XenoMouseTM (Abgenix, Inc.; 美国专利号6,075,181和6,150,184)、HuAb-MouseTM (Medarex, Inc./Gen Pharm; 美国专利号5,545,806和5,569,825)、Trans Chromo MouseTM (Kirin) 和KM MouseTM (Medarex/Kirin), 所有这些文献通过引用以其全文并入本文。

[0280] 特异性结合ILT2(例如, 人 ILT2)的人抗体可以通过本领域已知的多种方法来制备, 包括上述使用衍生自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法。另参见, 美国专利号4,444,887、4,716,111和5,885,793; 和国际公开号W0 98/46645、W0 98/50433、W0 98/24893、W0 98/16654、W0 96/34096、W0 96/33735和W0 91/10741, 所有这些文献通过引用以其全文并入本文。

[0281] 在某些实施例中, 可以使用小鼠-人杂交瘤来产生人抗体。例如, 用爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)转化的人外周血淋巴细胞可以与小鼠骨髓瘤细胞融合, 以产生分泌人单克隆抗体的小鼠-人杂交瘤, 并且可以对这些小鼠-人杂交瘤进行筛选, 以确定分泌特异性结合靶抗原(例如, ILT2(例如, 人 ILT2))的人单克隆抗体的杂交瘤。此类方法是已知的并且在本领域中有描述, 参见, 例如, Shinmoto H等人, (2004) Cytotechnology 46:19-23; Naganawa Y等人, (2005) Human Antibodies 14:27-31, 这些文献中的每一者均通过引用以其全文并入本文。

[0282] 试剂盒

[0283] 还提供了包含本文所述的一种或多种抗体或其药物组合物或缀合物的试剂盒。在具体实施例中, 本文提供了一种药物包装或试剂盒, 其包含一个或多个容器, 该一个或多个容器填充有本文所述的药物组合物的一种或多种成分, 诸如本文提供的一种或多种抗体。在某些实施例中, 试剂盒含有本文所述的药物组合物和任何预防剂或治疗剂, 诸如本文所述的那些。在某些实施例中, 试剂盒可以含有T细胞有丝分裂原, 诸如例如植物血凝素(PHA)和/或佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)或TCR复合物刺激抗体, 诸如抗CD3抗体和抗CD28抗体。任选地, 与此类容器相关联的可以是呈监管药品或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通知, 该通知反映了制造、使用或销售机构获得的用于人类施用的批准。

[0284] 还提供了可用于上述方法的试剂盒。在某些实施例中, 试剂盒包含在一个或多个容器中的本文所述的抗体, 优选地纯化的抗体。在具体实施例中, 本文所述的试剂盒含有基本上分离的ILT2(例如, 人 ILT2)抗原作为对照。在另一个具体实施例中, 本文所述的试剂盒进一步包含不与ILT2(例如, 人 ILT2)抗原反应的对照抗体。在另一个具体实施例中, 本文所

述的试剂盒含有一种或多种用于检测抗体与ILT2(例如,人ILT2)抗原的结合的元件(例如,抗体可以与可检测的底物诸如荧光化合物、酶促底物、放射性化合物或发光化合物缀合,或识别第一抗体的第二抗体可以与可检测的底物缀合)。在具体实施例中,本文提供的试剂盒可以包括重组产生的或化学合成的ILT2(例如,人ILT2)抗原。试剂盒中提供的ILT2(例如,人ILT2)抗原也可以附着于固体支持物。在更具体的实施例中,上述试剂盒的检测工具包括ILT2(例如,人ILT2)抗原附着于其上的固体支持物。此试剂盒还可以包括非附着的报道分子标记的抗人抗体或抗小鼠/大鼠抗体。在该实施例中,抗体与ILT2(例如,人ILT2)抗原的结合可以通过所述报道分子标记的抗体的结合来检测。在某些实施例中,本公开涉及本公开的试剂盒用于体外测定和/或检测生物样品中的ILT2(例如,人ILT2)抗原的用途。

[0285] 实例

[0286] 通过说明而非限制的方式提供以下实例。

[0287] 实例1:抗ILT2抗体的结合动力学和优化

[0288] 该实例描述了特异性结合人ILT2的抗体的特征。这些抗体的氨基酸序列列于本文的表2中。

[0289] 通过哺乳动物逆转录细胞展示产生的抗ILT2抗体通过噬菌体展示进行亲和力成熟。这种抗体的变体被命名为BA210,旨在改善特性并优化分子。BA210可变结构域用人 κ IgG1、IgG2或IgG4恒定区格式化,取代重链无糖基化(N297A)、二硫键形成和稳定化(C127S, S228P),并且根据下表3去除轻链中位置34(G)处的预测脱酰胺位点和位置105(M)处的氧化位点。制备具有C末端赖氨酸缺失的其他变体以改善可制造性。

[0290] 表3. ILT2抗体变体

抗体	描述	抗体	描述
BA210	IgG1	BA220	G34Y/M105L IgG2 C127S
BA211	IgG1 N297A	BA221	G34T/M105L IgG4 S228P
BA212	G34T IgG1 N297A	BA222	G34Y/M105L IgG4 S228P
BA213	M105L IgG1 N297A	BA246	IgG2
BA214	G34T/M105L IgG1 N297A	BA247	IgG2 C127S
BA215	G34Y/M105L IgG1 N297A	BA248	IgG4 S228P
BA216	G34Y IgG1 N297A	BA249	G34T/M105L IgG1
BA217	G34T/M105L IgG2	BA250	G34Y/M105L IgG1
BA218	G34Y/M105L IgG2	BA251	G34T/M105L IgG1 N297A-C-末端K
BA219	G34T/M105L IgG2 C127S	BA252	G34T/M105L IgG4 S228P-C-末端K

[0292] 与纯化的人ILT2蛋白结合

[0293] 通过表面等离子体共振 (SPR) 评定具有IgG1 N297A恒定区的抗ILT2抗体变体对ECD-His标记的人ILT2单倍型PE01、PE02、PE03(参见表1)的结合亲和力。含有已鉴定的翻译后修饰 (PTM) 风险的抗体BA211用作阳性同种型对照,而不相关的抗体VRC01用作阴性同种型对照。

[0294] 简而言之,使用Biacore T200仪器进行SPR实验,并使用1:1结合模型通过Biacore™T200评估软件从每个实验计算缔合速率(K_a)、解离速率(K_d)和解离常数(K_D)。将抗体从人Fab捕获试剂盒(28958325, GE Healthcare)捕获到S系列CM5传感器芯片(29149603,

GE Healthcare) 是使用来自Biacore™控制面板的胺偶联固定化向导并遵循试剂盒随附的制造商建议进行的。

[0295] 在先前制备的抗人Fab CM5芯片的各个流动池中捕获在电泳缓冲液(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA和0.05%表面活性剂P20)中稀释的大约3μg/mL的测试抗ILT2抗体和对照,保留单个流动池作为参考。使用30秒注射以10μL/min的流速捕获抗体,以达到约150个共振单位(RU)。人ILT2 ECD PE01(在电泳缓冲液中以30、10、3.3、1.11、0.37、0.12nM的浓度稀释),以及人ILT2 ECD PE02和PE03(在电泳缓冲液中以33.3、11.1、3.7、1.2、0.41、0.14nM的浓度稀释),以30μL/min的流速流过芯片表面,经历3分钟的缔合阶段和10分钟的解离阶段。传感器芯片在循环之间进行再生,以30μL/min的速度注射两次30秒的10mM甘氨酸pH 2.1,然后进行60秒的稳定期。使用BIAevaluation 3.1软件的全局数据分析选项对传感图进行评估,并将其拟合到简单的Langmuir 1:1相互作用模型。通过目视检查偏差和曲线拟合,并通过评估 R_{max} 、Chi2和Tc的参数来验证数据质量。结合动力学示于表4中。

[0296] 表4. 结合人ILT2单倍型PE01、PE02、PE03的抗ILT2抗体变体的动力学参数。

[0297]

抗体	ILT2单倍型	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (pM)
BA211	PE01	3.4E+05	3.4E-05	99
BA212	PE01	3.7E+04	3.3E-06	89
BA216	PE01	3.6E+05	6.7E-05	185
BA213	PE01	3.2E+05	1.1E-05	33
BA214	PE01	3.3E+05	2.1E-05	64
BA215	PE01	2.8E+05	9.6E-07	3
BA211	PE02	2.6E+05	1.7E-04	671
BA212	PE02	2.7E+05	2.1E-04	783
BA216	PE02	2.3E+05	1.4E-04	617
BA213	PE02	2.3E+05	1.5E-04	630
BA214	PE02	2.6E+05	1.3E-04	513
BA215	PE02	2.3E+05	1.2E-04	541
BA211	PE03	2.7E+05	2.5E-04	929
BA212	PE03	4.6E+05	4.0E-04	875
BA216	PE03	2.7E+05	8.5E-05	317
BA213	PE03	5.0E+05	7.5E-05	149
BA214	PE03	5.4E+05	1.4E-04	257
BA215	PE03	4.9E+05	1.1E-04	216

[0298] 在另一项实验中,通过SPR评定具有轻链取代和/或不同重链恒定区(BA249、BA250、BA214、BA215、BA217、BA218、BA219、BA220、BA221和BA222)的抗ILT2抗体变体对ECD-His标记的人ILT2单倍型PE01的结合亲和力。具有已鉴定的PTM风险的抗体(BA210、BA211、BA246、BA247和BA248)用作阳性同种型对照。不相关抗体VRC01的变体(具有IgG1、IgG1 N297A、IgG4 S228P、IgG2或IgG2 C127S恒定区)用作阴性同种型对照。结合动力学作为两次独立测量的平均值示于表5中。

[0299] 表5. 抗ILT2抗体Fc同种型与人ILT2结合的动力学参数

[0300]

ILT2 (PE01)			
抗体	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
BA210	7.1E+05	8.9E-05	1.5E-10
BA211	3.7E+05	5.6E-05	1.5E-10
BA246	3.3E+05	7.4E-05	2.3E-10
BA247	3.3E+05	9.7E-05	3.1E-10
BA248	4.1E+05	8.3E-05	2.2E-10
BA249	3.8E+05	4.8E-05	1.3E-10
BA214	3.9E+05	6.8E-05	1.9E-10
BA217	3.4E+05	5.4E-05	1.7E-10
BA219	3.5E+05	4.8E-05	1.4E-10
BA221	3.7E+05	7.3E-05	2.0E-10
BA250	4.3E+05	4.8E-05	1.1E-10
BA215	4.3E+05	5.4E-05	1.3E-10
BA218	3.9E+05	7.0E-05	1.9E-10
BA220	4.2E+05	5.7E-05	1.4E-10
BA222	9.7E+05	5.1E-05	6.5E-11

[0301] 在另一项实验中,通过SPR评定抗ILT2抗体变体BA214、BA221、BA251和BA252对ECD-His标记的人ILT2单倍型PE01、PE02和PE03以及ECD-His标记的食蟹猴ILT2直系同源蛋白变体1、ECD-His标记的食蟹猴ILT2直系同源蛋白变体2、ECD-His标记的食蟹猴ILT2直系同源蛋白变体3、ECD-His标记的恒河猴ILT2直系同源蛋白变体1、ECD-His标记的恒河猴ILT2直系同源蛋白变体2、ECD-His标记的非洲绿猴 (AGM) ILT2直系同源蛋白和ECD-His标记的小鼠PirB蛋白 (R&D Systems, 2754PB050) 的结合亲和力。具有IgG4 S228P恒定区的不相关抗体VRC01用作阴性同种型对照。结合动力学 (K_a 、 K_d 和 K_D) 或解离平衡常数 (KD) 示于表6和表7中。

[0302] 表6. 抗ILT2抗体与人ILT2单倍型结合的动力学参数

[0303]

抗体	ILT2 单倍型	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
BA214	PE01	5.2E+05	6.9E-05	1.3E-10
BA221	PE01	5.2E+05	8.7E-05	1.7E-10
BA251	PE01	5.4E+05	5.7E-05	1.1E-10
BA252	PE01	5.2E+05	7.1E-05	1.4E-10

[0304]

对照	PE01	NBD	NBD	NBD
BA214	PE02	4.6E+05	2.2E-04	4.7E-10
BA221	PE02	4.8E+05	2.3E-04	4.8E-10
BA251	PE02	4.8E+05	2.0E-04	4.1E-10
BA252	PE02	4.6E+05	2.0E-04	4.4E-10
对照	PE02	NBD	NBD	NBD
BA214	PE03	4.2E+05	2.6E-04	6.3E-10
BA221	PE03	4.4E+05	2.9E-04	6.6E-10
BA251	PE03	4.3E+05	2.4E-04	5.6E-10
BA252	PE03	4.2E+05	2.5E-04	5.9E-10
对照	PE03	NBD	NBD	NBD

[0305] NBD=高达100nM时未检测到结合

[0306] 表7. 抗ILT2抗体与非人灵长类ILT2直向同源物和小鼠PirB的结合

[0307]

	结合亲和力 KD (M)				
物种	BA214	BA221	BA251	BA252	对照
食蟹猴 ILT2 变体 1	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD
食蟹猴 ILT2 变体 2	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD
食蟹猴 ILT2 变体 3	2.4E-06	2.8E-06	1.7E-06	1.9E-06	NBD
恒河猴 ILT2 变体 1	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD
恒河猴 ILT2 变体 2	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD
AGM ILT2	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD
小鼠 PirB	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD

[0308] NBD=未检测到结合(在5 μ M浓度的受体下高达10RU)

[0309] 特异性结合ILT2

[0310] 如上所述通过SPR评定抗ILT2抗体BA214、BA221、BA251和BA252对重组人LILRA1/LIR-6(Sino Biological 17220-H08H-100)、LILRA2/ILT1(R&D Systems9040-T4-050)、LILRA3/ILT6(Sino Biological 13549-H08H-100)、LILRA4/ILT7(Sino Biological 16058-H08H-50)、LILRA5/ILT11(Sino Biological 16059-H08H-100)、LILRA6/ILT8(Sino Biological 29813-H08H-50)、LILRB1/ILT2 PE01(SEQ ID NO:44)、LILRB2/ILT4(R&D Systems 8429-T4-050)、LILRB3/ILT5(R&D Systems 9159-T5-050)、LILRB4/ILT3(Sino Biological 16742-H08H)和LILRB5/LIR-8(Sino Biological17221-H08H-100)的结合亲和力。不相关抗体VRC01 IgG4 S228P用作阴性同种型对照。

[0311] 结果显示与ILT2的结合动力学参数如表8所示。没有检测到任何其他LILR家族成

员在生理相关水平上的结合,表明与ILT2的特异性结合。

[0312] 表8.抗ILT2抗体与ILT2结合的动力学参数

	ILT2		
	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	KD (M)
BA214	4.8E+05	1.2E-04	2.6E-10
BA221	4.6E+05	2.1E-04	4.5E-10
BA251	5.0E+05	1.2E-04	2.3E-10
BA252	4.8E+05	1.1E-04	2.4E-10

[0314] 然后通过SPR将BA252与LILRA和LILRB家族成员的结合与市售抗ILT2抗体1Q-G2 (Creative, #DCABH-4494)、VMP55 (Novus, #NBP2-50475PE)、4F9 (Biorad, #MCA2515F)、292305 (R&D Systems, #MAB20171)、238145 (Abcam, #EPR22861-6)、HP-F1 (Invitrogen, #16-5129-82) 和15G8 (参见表2) 进行比较。不相关抗体VRC01 IgG1N297A用作阴性同种型对照。

[0315] 结果在表9中示出。所有抗ILT2抗体均以0.15nM至10nM范围内的可测量亲和力结合ILT2。抗ILT2抗体15G8、1Q-G2、VMP55、292305、4F9和238145也显示出与LILRA1和ILT6的可测量的结合。相反,BA252不与LILRA1结合,并且仅显示与ILT6的非常弱的相互作用。

[0316] 测试的抗ILT2克隆中没有一个是与LILRA2、LILRA4、LILRA5、LILRA6、LILRB3、LILRB4或LILRB5结合。

[0317] 表9.抗ILT2抗体与LILRA和LILRB家族成员的结合亲和力。

分析物	抗原									
	ILT2	LILR B3	LILR B4	LILR B5	LILR A1	LILR A2	ILT6	LILR A4	LILR A5	LILR A6
BA252	0.20 nM	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD	>1000 nM	NBD	NBD	NBD
15G8	10 nM	NBD	NBD	NBD	21 nM	NBD	24 nM	NBD	NBD	NBD
1Q-G2	1.7 nM	NBD	NBD	NBD	5 nM	NBD	13 nM	NBD	NBD	NBD
VMP55	0.15 nM	NBD	NBD	NBD	32 nM	NBD	6 nM	NBD	NBD	NBD
292305	2.4 nM	NBD	NBD	NBD	260 nM	NBD	100 nM	NBD	NBD	NBD
4F9	0.89 nM	NBD	NBD	NBD	40 nM	NBD	26 nM	NBD	NBD	NBD
238145	0.24 nM	NBD	NBD	NBD	0.81	NBD	<0.1 nM	NBD	NBD	NBD
nM										
HP-F1	3.6 nM	NBD	NBD	NBD	7.2 nM	NBD	15 nM	NBD	NBD	NBD
对照	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD	NBD

[0320] NBD=未检测到结合

[0321] 与表达人ILT2的细胞结合

[0322] 在多种细胞类型中测试了抗ILT2抗体与表达人ILT2的细胞结合的能力。

[0323] 评定具有IgG1 N297A重链恒定区的抗ILT2抗体变体 (BA211、BA212、BA216、BA213、

BA214和BA215)结合CHO细胞表面表达的人ILT2的能力。简而言之,用编码人ILT2胞外和跨膜结构域的载体转染CHO细胞。在含有4mM L-谷氨酰胺、100U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、1x HT-补充剂的Power CHO-2培养基中培养稳定表达相对较低水平ILT2的克隆。

[0324] 对于抗体结合测定,在25 μ L的补充有0.5% BSA、1mM EDTA和0.05%叠氮化钠(FACS缓冲液)的PBS中,将细胞以每孔 3×10^5 个细胞的密度接种在96孔U型底组织培养板中。将细胞在4℃下与25 μ L系列稀释的抗ILT2抗体或同种型对照在FACS缓冲液中孵育30分钟,最终浓度范围为10 μ g/mL至0.2ng/mL。

[0325] 对于抗体染色,将细胞用冷FACS缓冲液洗涤两次,并以1/800的最终稀释度重悬于100 μ L含有R-藻红蛋白山羊抗人IgG抗体(Jackson Immunoresearch/109-116-098)的FACS缓冲液中。于4℃避光孵育30分钟后,将细胞用冷FACS缓冲液洗涤两次,并通过流式细胞术(BD LSR Fortessa流式细胞仪)分析细胞。使用前向散射面积(FSC-A)与侧向散射面积(SSC-A)的关系图和FSC-A与前向散射高度(FSC-H)的另一关系图来鉴定CHO细胞,以选择单细胞。通过依次门控单细胞群体并绘制代表PE通道中的荧光的直方图来分析样品。对于每个样品,计算平均荧光强度(MFI),并通过GraphPad Prism软件绘制数据。

[0326] 如图1所示,BA211和序列优化的变体BA212、BA216、BA213、BA214和BA215均剂量依赖性地结合表达相对低水平的人ILT2的CHO细胞。计算的几何曲线下面积(AUC)和EC₅₀值列于表10中。

[0327] 表10. 抗ILT2抗体与表达ILT2的CHO细胞结合。

[0328]	抗体	AUC (曲线下面积)	EC ₅₀ (μ g/ml)
	BA211	13342	0.123
	BA212	15132	0.087
	BA216	14407	0.078
[0329]	BA213	13650	0.175
	BA214	15477	0.231
	BA215	14278	0.449

[0330] 测试了相同的抗ILT2抗体变体与Jurkat细胞表面表达的人ILT2结合的能力。简而言之,用编码全长ILT2的载体转染Jurkat细胞,并选择稳定表达ILT2的克隆。该稳定细胞系也在NFAT反应元件和Fc γ RIIIa (Promega/G7102)下表达荧光素酶报道基因,在补充有10%热灭活FBS、1%非必需氨基酸、250 μ g/mL G418二硫酸盐溶液、100 μ g/mL潮霉素和1mM丙酮酸钠的RPMI-1640培养基中培养。

[0331] 对于抗体结合测定,在25 μ L的补充有0.5% BSA、1mM EDTA和0.05%叠氮化钠(FACS缓冲液)的PBS中,将细胞以每孔 3×10^5 个细胞的密度接种在96孔U型底组织培养板中。将细胞在4℃下与25 μ L系列稀释的抗ILT2抗体或同种型对照抗体(VRC01IgG1)在FACS缓冲液中孵育30分钟,浓度范围为10 μ g/mL至2.4ng/mL。如上所述对细胞进行染色和鉴定。

[0332] 如图2所示,抗ILT2抗体BA211和序列优化的变体BA212、BA216、BA213、BA214和BA215剂量依赖性地结合表达人ILT2的Jurkat细胞。结果列于表11中。

[0333] 表11. 抗ILT2抗体与表达ILT2的Jurkat细胞结合。

抗体	AUC(曲线下面积)	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
BA211	225681	0.059
BA212	222439	0.057
BA216	198758	0.070
BA213	189474	0.110
BA214	208116	0.055
BA215	172820	0.096

[0335] 评定了用不同Fc主链格式化的抗ILT2序列优化的变体抗体与CHO细胞表面高度表达的人ILT2结合的能力。简而言之,用编码人ILT2胞外和跨膜结构域的载体转染CHO细胞。选择在膜上表达相对高水平的ILT2的克隆,并在含有4mM L-谷氨酰胺、100U/mL青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、1x HT-补充剂的Power CHO-2培养基中培养。

[0336] 对于抗体结合测定,在25 μL 的补充有0.5% BSA、1mM EDTA和0.05%叠氮化钠(FACS缓冲液)的PBS中,将细胞以每孔 3×10^5 个细胞的密度接种在96孔U型底组织培养板中。将细胞在4℃下与25 μL 系列稀释的抗ILT2抗体或同种型对照在FACS缓冲液中孵育30分钟,浓度为10 $\mu\text{g/ml}$ 至2.4ng/mL。

[0337] 对于抗体染色,将细胞用冷FACS缓冲液洗涤两次,并以1:250稀释度重悬于含有R-藻红蛋白山羊抗人IgG(Fab')₂(Jackson ImmunoResearch/109-116-097)的FACS缓冲液中。于4℃避光孵育30分钟后,将细胞用冷FACS缓冲液洗涤两次,并通过流式细胞术(BD LSR Fortessa流式细胞仪)分析细胞。如上所述鉴定CHO-ILT2细胞并计算MFI。

[0338] 如图3所示,所有序列优化的抗ILT2抗体以剂量依赖性方式与表达高水平人ILT2的CHO细胞结合。计算的AUC和EC₅₀值如表12所示。

[0339] 表12. 抗ILT2抗体与表达ILT2的CHO细胞结合。

抗体	AUC(曲线下面积)	95%CI	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	95%CI ($\mu\text{g/mL}$)
BA214	379740	200212-720249	0.104	0.005-2.105
BA215	392229	227748-675500	0.082	0.014-0.478
BA217	264082	200916-347107	0.248	0.094-0.655
BA218	294751	209658-414382	0.227	0.084-0.613
BA219	307176	251396-375333	0.183	0.077-0.432
BA220	304607	209658-414382	0.282	0.045-1.776
BA221	360571	244693-531325	0.141	0.027-0.722
BA222	372656	245051-566709	0.115	0.018-0.728
BA249	349259	184767-660192	0.117	0.0009-1.457
BA250	383800	245703-599514	0.087	0.016-0.490

[0341] 将抗ILT2抗体变体BA252与参考抗ILT2抗体15G8(参见表2)比较与表达不同水平的人ILT2的细胞的结合。

[0342] 在50 μL 的补充有0.5% BSA、1mM EDTA和0.05%叠氮化钠(FACS缓冲液)的PBS中,将表达相对高和低水平的人ILT2的CHO细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种在96孔U形底组织培养板中。将细胞在4℃下与50 μL 系列稀释的抗ILT2抗体或同种型对照(VRC01 IgG4)

在FACS缓冲液中孵育30分钟,浓度为10 μ g/mL至0.2ng/mL。

[0343] 对于抗体染色,将细胞用冷FACS缓冲液洗涤三次,并以1.25 μ g/mL的最终浓度重悬于含有FITC缀合的小鼠抗人IgG4抗体(Southern Biotech/9190-02)的FACS缓冲液中。于4℃避光孵育30分钟后,将细胞洗涤三次并按上述方法进行分析。通过使用“额外平方和F测试”比较BA252和15G8数据集之间的最佳拟合值来进行统计分析。

[0344] 如图4A和4B所示,BA252和15G8以相对高和低的水平剂量依赖性地结合表达人ILT2的CHO细胞,其中BA252表现出显著更高的最大结合水平(B_{max})。计算的AUC和EC₅₀值列于表13和14中。

[0345] 表13. 抗ILT2抗体与ILT2高表达CHO细胞结合。

	抗体	AUC(曲线下面积)	95% CI	EC ₅₀ (μ g/ml)	95% CI (μ g/ml)
[0346]	BA252	43063	31175-59485	0.165	0.105-0.261
	15G8	38837	26258-57443	0.155	0.116-0.208
	同种型	570	427-762	ND	ND

[0347] 表14. 抗ILT2抗体与ILT2低表达CHO细胞结合。

	抗体	AUC(曲线下面积)	95% CI	EC ₅₀ (μ g/ml)	95% CI (μ g/ml)
[0348]	BA252	1068	746-1527	0.032	0.02-0.05
	15G8	922	605-1403	0.019	0.013-0.03
	同种型	542	391-752	ND	ND

[0349] 实例2: 抗ILT2抗体阻断配体与ILT2的结合

[0350] 抗ILT2抗体BA211和BA252阻断非经典主要组织相容性类别(MHC) I分子HLA-G与CHO细胞上表达的人ILT2的结合

[0351] 测试了抗ILT2抗体阻断ILT2和非经典MHC I配体HLA-G之间结合的能力。

[0352] 对于阻断测定,将25 μ L以相对高水平表达ILT2的CHO细胞以每孔 2×10^5 个细胞的最终浓度分配到96孔U形底微量滴定板中。将25 μ L抗ILT2抗体BA211、商业抗ILT2抗体HP-F1(Thermofisher/16-5129-82)或同种型对照(VRC01 IgG1)在FACS缓冲液中的系列稀释液添加到孔中,以获得最终的测定浓度范围为10 μ g/mL至2.4ng/mL。将混合物在4℃下孵育30分钟。使用LYNX快速R-PE抗体缀合试剂盒(Bio-Rad/LNK022RPE)将ILT2配体HLA-G-Fc与R-藻红蛋白(R-PE)缀合。将HLA-G-Fc-PE以1 μ g/mL重悬于FACS缓冲液中,并将50 μ L溶液添加到96孔U形底组织培养板的孔中。于4℃避光孵育30分钟后,通过添加冷FACS缓冲液洗涤细胞。在通过流式细胞术(BD LSR Fortessa流式细胞仪)分析细胞荧光之前,重复该洗涤两次。

[0353] 使用前向散射面积(FSC-A)与侧向散射面积(SSC-A)的关系图和FSC-A与侧向散射高度(FSC-H)的另一关系图来鉴定CHO细胞,以选择单细胞。通过依次门控单细胞群体并绘制代表PE通道中的荧光的直方图来分析样品。对于每个抗体样品,结合百分比计算如下:

$$(\text{MFI}(\text{样品}) - \text{MFI}(\text{无HLA-G-PE}^{\text{背景}})) / (\text{MFI}(\text{无抗体}^{\text{完全结合}}) - \text{MFI}(\text{无HLA-G-PE}^{\text{背景}})) * 100$$
。使用

GraphPad Prism绘制数据。

[0354] 如图5所示,BA211和HP-F1阻断HLA-G-Fc与表达ILT2的细胞的结合。在此测定中,计算的BA211和HP-F1的 IC_{50} 值分别为 $0.159\mu\text{g/mL}$ (95% CI $0.099-0.260\mu\text{g/mL}$, $N=8$) 和 $0.307\mu\text{g/mL}$ (95% CI $0.176-0.530\mu\text{g/mL}$, $N=8$)。

[0355] 在类似的实验中,抗ILT2抗体BA252阻断HLA-G-Fc与表达ILT2的CHO细胞的结合。图6显示BA252与同种型对照抗体VRC01 IgG4的比较。计算的BA252的 IC_{50} 值为 $0.103\mu\text{g/mL}$ (95% CI $0.077-0.138\mu\text{g/mL}$, $N=3$),证明了配体结合的高效抑制。抗ILT2抗体BA252阻断经典MHC I分子HLA-A、HLA-B和HLA-C与表达人ILT2的CHO细胞结合

[0356] 测试了BA252阻断ILT2和经典MHC I分子配体之间结合的能力。

[0357] 将藻红蛋白(PE)结合的HLA-A*02:01五聚体(ProImmune/F008-2A-G)、HLA-B*07:02五聚体(ProImmune/F045-2A-G)和HLA-C*07:02五聚体(ProImmune/F3269-2A-G)分别以 $0.8\mu\text{g/mL}$ 、 $0.4\mu\text{g/mL}$ 和 $0.4\mu\text{g/mL}$ 悬浮于FACS缓冲液中,并将 $50\mu\text{L}$ 的每种溶液添加到三个96孔U形底组织培养板的单独孔中。将 $25\mu\text{L}$ 的BA252或同种型对照抗体VRC01 IgG4在FACS缓冲液中的系列稀释液添加到孔中,以得到 $30\mu\text{g/mL}$ 至 0.5ng/mL 范围内的最终测定浓度。然后将相对高水平表达ILT2的CHO细胞添加 $25\mu\text{L}$,最终浓度为每孔 2×10^5 个细胞。于 4°C 避光孵育45分钟后,通过添加冷FACS缓冲液洗涤细胞。在通过流式细胞术(BD LSR Fortessa流式细胞仪)分析细胞荧光之前,重复该洗涤两次。如上所述鉴定CHO细胞并分析样品。

[0358] 如图7A至7C所示,BA252分别以 $0.110\mu\text{g/mL}$ (SD $\pm 0.020\mu\text{g/mL}$, $N=2$)、 $0.136\mu\text{g/mL}$ (SD $\pm 0.025\mu\text{g/mL}$, $N=2$) 和 $0.158\mu\text{g/mL}$ (SD $\pm 0.022\mu\text{g/mL}$, $N=2$) 的 IC_{50} 值阻断HLA-A*02:01、HLA-B*07:02和HLA-C*07:02五聚体与表达ILT2的细胞结合。

[0359] 实例3:抗ILT2抗体的功能

[0360] 在人ILT2 T细胞报道基因测定中,序列优化的抗ILT2抗体阻断ILT2并增加Fc γ RIIIa-NFAT信号传导

[0361] 在此实例中,测试了抗ILT2抗体BA214、BA221、BA251和BA252阻断表达ILT2的Jurkat报道细胞与表达HLA-G的Ramos靶细胞之间结合并通过NFAT增强Jurkat细胞中的Fc γ RIIIa信号传导的能力。使用商业抗ILT2抗体HP-F1作为阳性对照,并使用具有IgG1 N297A和IgG4 S228P恒定区的VRC01作为阴性同种型对照。

[0362] 将表达Fc γ RIIIa和NFAT-荧光素酶报道基因的Jurkat细胞(Promega/G7102)在内部工程化以表达ILT2,并用于模拟效应免疫细胞。将这些效应细胞在含有10%胎牛血清、1%MEM非必需氨基酸、 $500\mu\text{g/mL}$ G418、 $200\mu\text{g/mL}$ 潮霉素B和1mM丙酮酸钠的RPMI 1640培养基中扩增。在共培养报道基因测定中,靶细胞由内部工程化以表达HLA-G的Ramos细胞组成。用于扩增靶细胞和用于共培养报道基因测定的培养基由补充有20%胎牛血清、1mM丙酮酸钠、10mM HEPES和 $50\mu\text{M}\beta$ -巯基乙醇的RPMI 1640培养基制成。

[0363] 将Jurkat效应细胞以 1×10^5 接种在96孔微量滴定板的U形孔中。将抗CD20抗体利妥昔单抗(Genentech/NDC代码50242-053-06)用作调理剂,与Ramos靶细胞上的CD20和Jurkat效应细胞上的Fc γ RIIIa结合。将以 $10\mu\text{g/mL}$ 最终测定浓度使用的利妥昔单抗与Jurkat效应细胞在 37°C 和5% CO_2 下预孵育30分钟。然后将最终测定浓度范围为 $10\mu\text{g/mL}$ 至 2.4ng/mL 的系列稀释的抗ILT2抗体以及 5×10^4 个Ramos靶细胞添加到相关孔中。最终测定体积为 $100\mu\text{L}$ 。将板在 37°C 和5% CO_2 下孵育过夜。为了测量荧光素酶报道基因表达,将每个

孔中的培养基混合,并将60 μ L转移到新的96孔平底微量滴定板中。将60 μ L的Bio-Glo荧光素酶底物(Promega/G7941)添加到每个孔中。使用Tecan Infinite M1000-Pro读板仪测量发光信号(RLU)。使用GraphPad Prism软件将RLU值相对于抗ILT2抗体浓度作图,并计算EC₅₀值。

[0364] 如图8A至8B所示,在表达人ILT2的Jurkat效应细胞中,相对于同种型对照,所有抗ILT2抗体均增加Fc γ RIIIa NFAT信号传导。由于发光信号在3个独立实验中有所不同,因此BA214、BA221、BA251和BA252的AUC值被归一化至基准抗ILT2抗体HP-F1的AUC。抗体BA214、BA251、BA221和BA251比市售抗ILT2抗体HP-F1诱导更大的发光增加。计算的归一化AUC和几何平均EC₅₀值列于表15中。

[0365] 表15. 抗ILT2抗体对Fc γ RIIIa-NFAT信号传导的影响。

抗体	平均AUC	SD	EC ₅₀ (mg/mL)	95%CI (mg/mL)
BA214	145.22	17.77	0.0340	0.0005-0.245
BA251	159.24	10.77	0.0212	0.004-0.108
BA221	143.09	20.17	0.0328	0.0076-0.142
BA252	158.58	27.18	0.0153	0.0003-0.763
HP-F1	100	0	0.0328	0.0191-0.057

[0367] 在类似的实验中,将抗ILT2抗体BA252与参考抗体15G8进行比较。如图9A至9B中所示,相对于同种型对照,BA252增加了Fc γ RIIIa-NFAT信号传导,与15G8相比显示出优异的效力。计算的BA252和15G8的EC₅₀值分别为0.07 $\pm$ 0.04 μ g/mL和0.43 $\pm$ 0.20 μ g/mL。

[0368] 抗ILT2抗体BA252不结合C1q

[0369] 评定抗ILT2抗体变体BA252与补体组分1q (C1q) 蛋白的结合,这是诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)的经典补体级联中必需的第一步。

[0370] 使用酶联免疫吸附测定(ELISA)测定C1q结合。简而言之,将96孔NUNC Maxisorp板(Thermoscientific/44-2404-21)在4 $^{\circ}$ C下用50 μ L的BA252或对照抗体纳武单抗(Evidentric GmbH)、抗PD-1IgG4抗体、阿达木单抗(Myonex)、抗TNF α IgG1抗体或IgG4同种型对照(CrownBio/C00045-5)的系列稀释(300-0.14 μ g/mL)包被过夜。然后将板倾析并在室温下用含有2%奶粉的PBS阻断1小时。然后通过除去阻断溶液并添加50 μ L的2 μ g/mL补体组分C1q(Sigma/C1740-1mg)溶液来进行结合测定。将板在含有0.05% Tween 20的PBS中洗涤3次。通过添加50 μ L以0.2 μ g/mL使用的生物素化抗C1q抗体(Invitrogen/MA1-40312)来检测结合的C1q。在室温下孵育1小时后,将板倾析并在PBS/0.05% Tween 20中洗涤3次。将50 μ L的链霉亲和素-辣根过氧化物酶的1.5 μ g/mL溶液(Jackson ImmunoResearch/016-030-084)添加到每个孔中,并将板在室温下孵育1小时。最后,在PBS/0.05% Tween 20中洗涤板3次后,向每个孔中添加50 μ L的色原3,3',5,5'-四甲基联苯胺(Invitrogen/00-4201-56)。使板显色约1分钟,然后通过添加50 μ L的1M HCl溶液终止酶促反应。使用Tecan Infinite M1000-Pro读板仪测量每个孔在450nm处的光密度(OD)。

[0371] 如图10所示,BA252表现出与C1q的最小结合,这也与对照抗体纳武单抗和人IgG4同种型对照相当。作为阳性对照,阿达木单抗(一种IgG1抗体)表现出C1q结合。计算的AUC值列于表16中。

[0372] 表16. 抗ILT2抗体的AUC值。

[0373]	抗体	平均AUC	SD
	BA252	0.55	0.09
	纳武单抗	0.52	0.18
	IgG4同种型对照	0.50	0.21
	阿达木单抗	6.54	0.79

[0374] 抗ILT2抗体BA252增强原代人T、NK和NKT细胞活化

[0375] 使用外周血单核细胞(PBMC)和肿瘤细胞系的共培养物,在离体实验中评定了BA252促进原代免疫细胞功能活性的潜力。

[0376] 通过在BA252、15G8或同种型对照的存在下用IL-2和IL-15引发来自健康供体的PBMC过夜来评定药效学作用。第二天,将表达HLA-G和HLA-A2的JEG-3^{HLA-A2}癌细胞以1:40的肿瘤细胞与PBMC的比率添加到已引发的PBMC中并共培养72小时。通过流式细胞术分析T细胞(CD3+CD4+和CD3+CD8+)、NKT(CD3+CD56+)和NK(CD3-CD56+)细胞上的CD25表达来评定T、NKT和NK细胞的活化。如果满足以下标准,则将PBMC供体分配到“反应者”组:所分析的免疫亚群(NK、NKT、CD8+T细胞)中的至少一种对BA252有反应,与同种型对照抗体相比,CD25表面表达增加 $\geq 20\%$ 。否则,他们将被归入“无反应者”组。

[0377] 显示BA252在促进原代免疫细胞功能活性方面优于15G8的结果如图11A至11B所示。

[0378] BA252介导的ILT2阻断调节原代人巨噬细胞的表型

[0379] 使用原代人巨噬细胞(M ϕ)在体外评定BA252调节骨髓细胞功能活性的效力。

[0380] 在BA252、15G8或IgG4同种型对照存在下,从PBMC的纯化单核细胞部分分化出M ϕ 。M ϕ 在体外被极化成M2样M ϕ 或不受到刺激。为了诱导致瘤性M2表型,用IL-10+TGF β 混合物或来自表达HLA-G的JEG-3癌细胞(癌细胞CM)的条件培养基处理M ϕ 。通过流式细胞术分析CD33+骨髓细胞上CD86、CD163和CD206的表面表达来评定M ϕ 表型。通过配对t检验进行统计分析。

[0381] 证明BA252在抑制M2样和增强抗原呈递表型方面优于15G8的结果如图12A至12B所示。

[0382] 实例4:交叉竞争结合

[0383] BA252不与市售抗ILT2抗体竞争与人ILT2表达细胞的结合

[0384] 通过流式细胞术评估BA252阻断抗ILT2抗体1Q-G2(Creative, #DCABH-4494, APC缀合)、VMP55(Novus, #NBP2-50475PE, PE缀合)、4F9(Biorad, #MCA2515F, FITC缀合)、292305(R&D Systems, #FAB20171P-100, PE缀合)和GHI/75(Biolegend, #333708, PE缀合)与细胞上表达的人ILT2结合的能力。

[0385] 对于表位竞争测定,将表达ILT2的CHO细胞以 8×10^6 个细胞/mL重悬于FACS缓冲液中,并将25 μ L U形底96孔微量滴定板的孔中,得到每孔 2×10^5 个细胞的最终细胞浓度。将25 μ L未缀合的BA252在FACS缓冲液中的系列稀释液添加到孔中,以得到100 μ g/mL至0.01 μ g/mL范围内的最终测定浓度。在冰上预孵育1小时后,将50 μ L与荧光染料缀合的第二抗ILT2抗体添加到孔中。基于预先建立的滴定曲线,抗体1Q-G2、VMP55、4F9、292305和GHI/75的最终测定浓度分别为0.2 μ g/mL、1.7 μ g/mL、2.7 μ g/mL、12.5 μ g/mL和60 μ g/mL。作为证明表位竞争的阳性对照,还包括APC缀合的BA252,并以0.3 μ g/mL的最终浓度使用。避光在冰上再孵育1小

时后,通过在300g下离心5分钟并添加200 μ L冷FACS缓冲液来洗涤细胞。在通过流式细胞术(BD LSR Fortessa流式细胞仪)分析细胞荧光之前,重复该洗涤一次。

[0386] 使用前向散射面积(FSC-A)与侧向散射面积(SSC-A)的关系图和SSC-A与侧向散射高度(SSC-H)的另一关系图来鉴定CHO细胞,以选择单细胞。通过依次门控单细胞群体并绘制代表FITC、PE或APC通道中的荧光的直方图(取决于第二抗体所用的荧光染料)来分析样品。使用GraphPad Prism绘制数据。

[0387] 如图13A所示,未缀合的BA252与APC缀合的BA252竞争结合。BA252不阻断市售抗ILT2克隆1Q-G2、VMP55、4F9、292305和GHI/75的结合,表明其结合人ILT2上的不同表位(图13B至13F)。

[0388] ***

[0389] 本发明不限于本文所述的具体实施例的范围。实际上,除了所描述的那些之外,根据前面的描述和附图,本发明的各种修改对于本领域技术人员将变得显而易见。此类修改旨在落入所附权利要求的范围内。

[0390] 本文引用的所有参考文献(例如,出版物或专利或专利申请)通过引用以其全文并出于所有目的并入本文,其程度如同每个单独的参考文献(例如,出版物或专利或专利申请)被具体地和单独地指出通过引用以其全文并入用于所有目的。

[0391] 其他实施例在以下权利要求范围内。

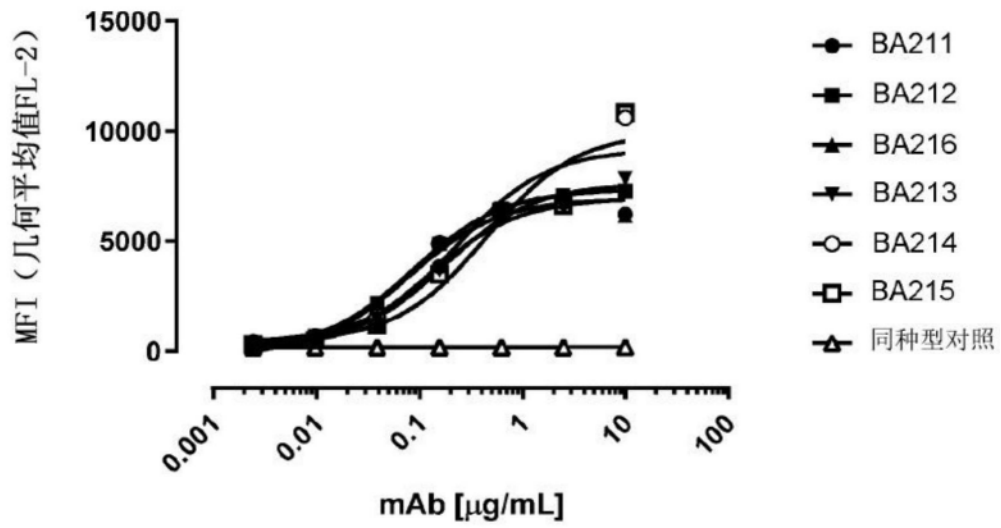


图1

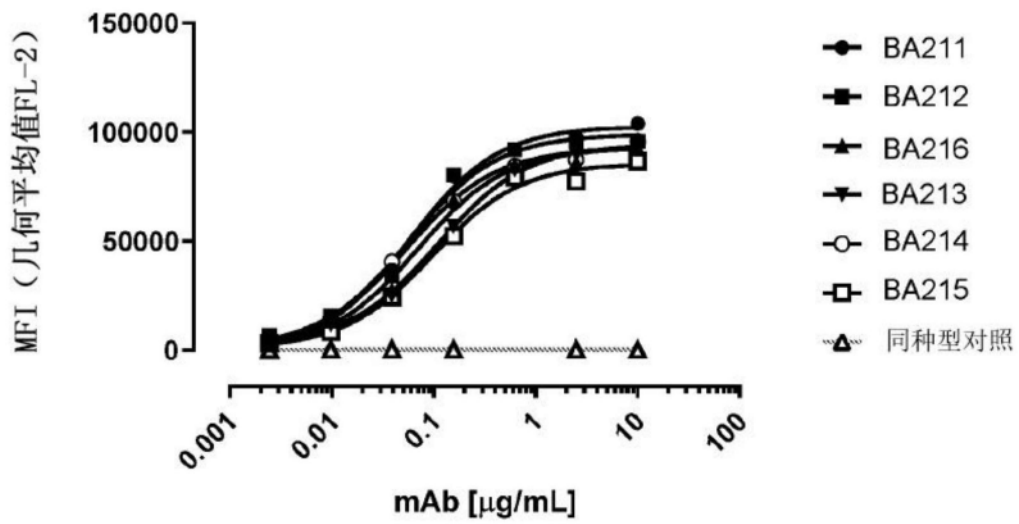


图2

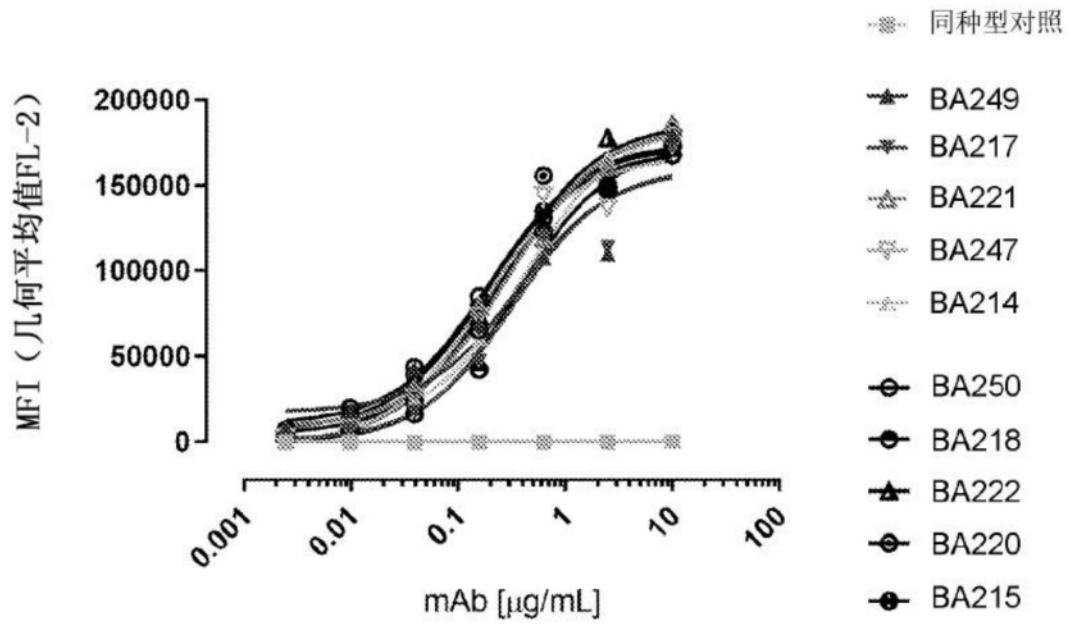


图3

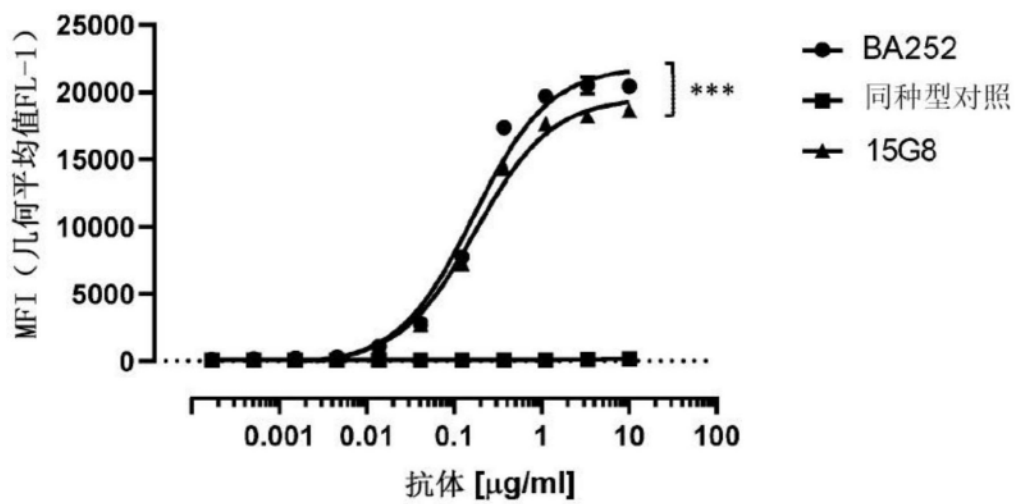


图4A

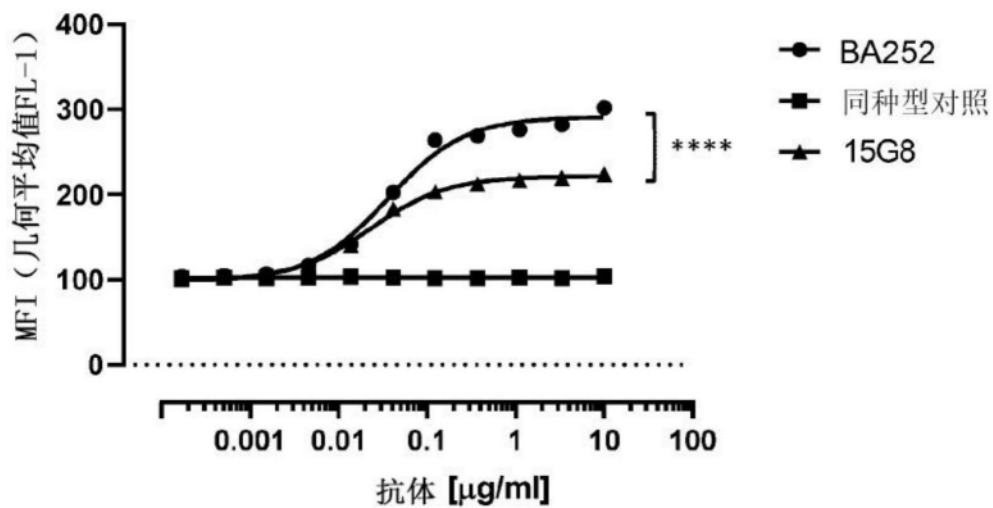


图4B

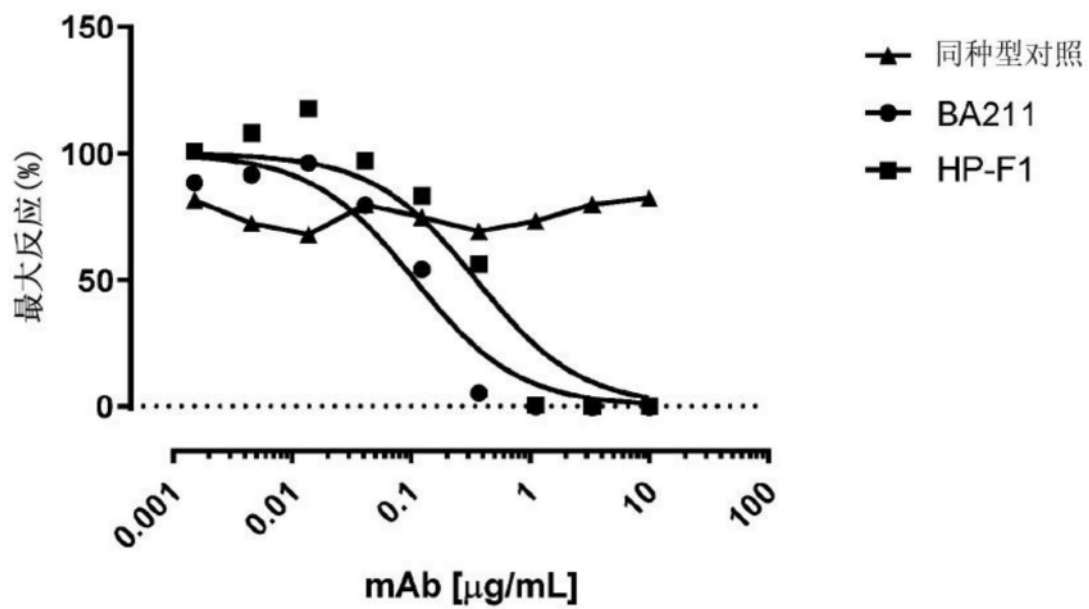


图5

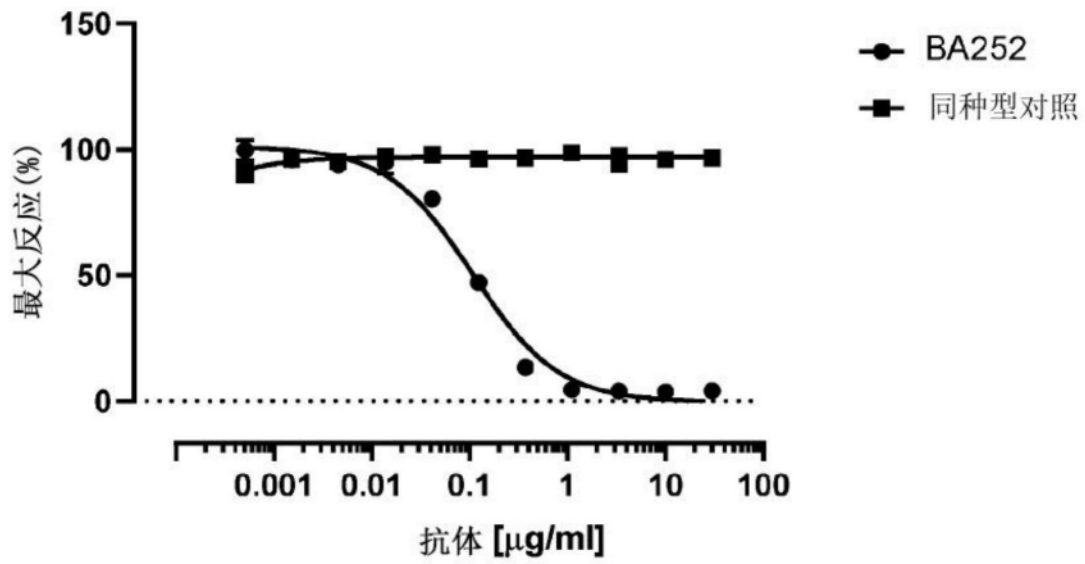


图6

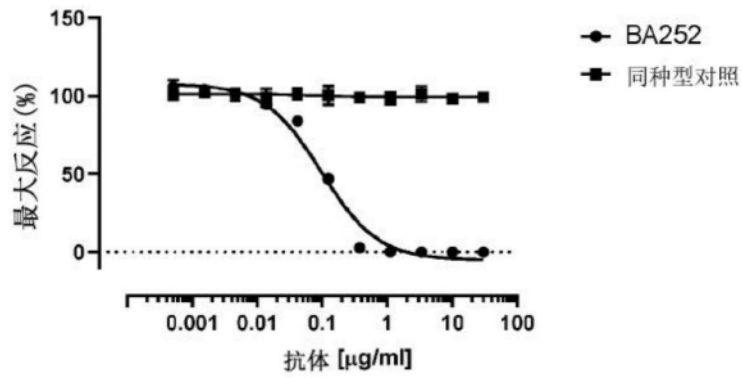


图7A

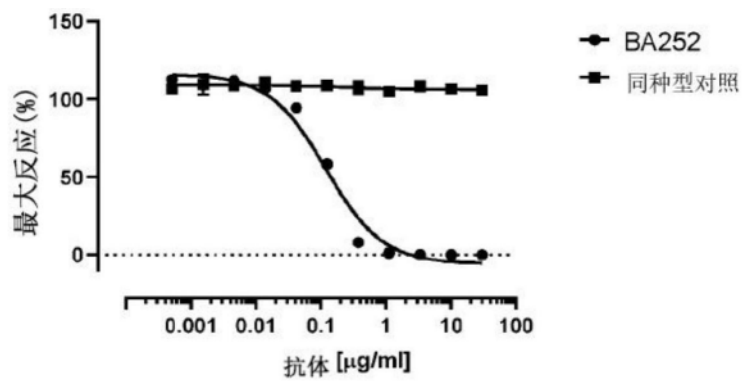


图7B

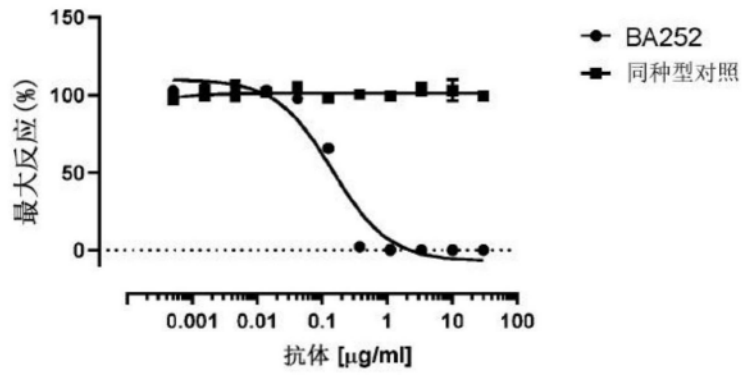


图7C

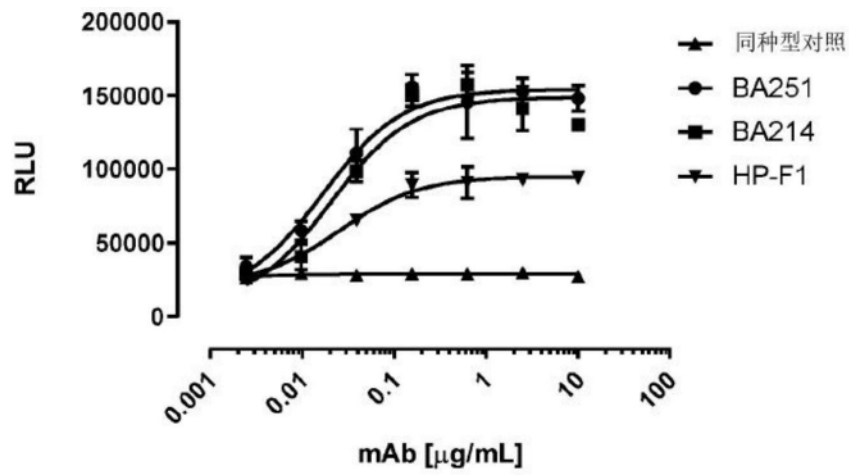


图8A

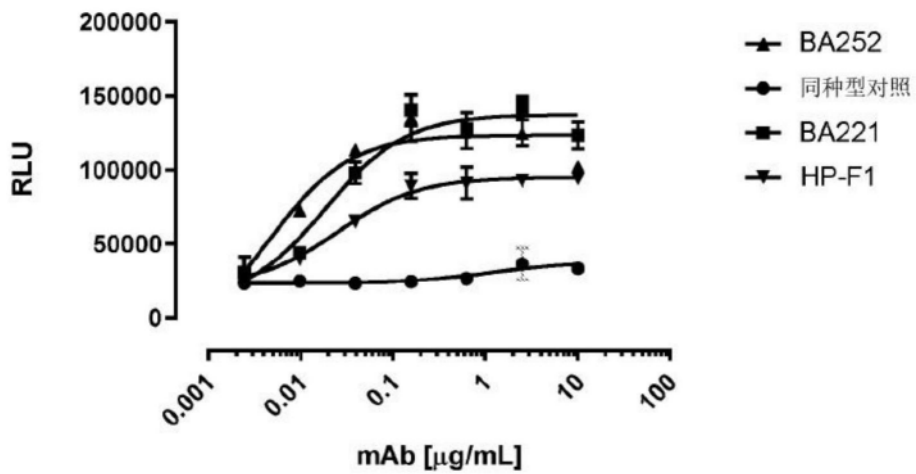


图8B

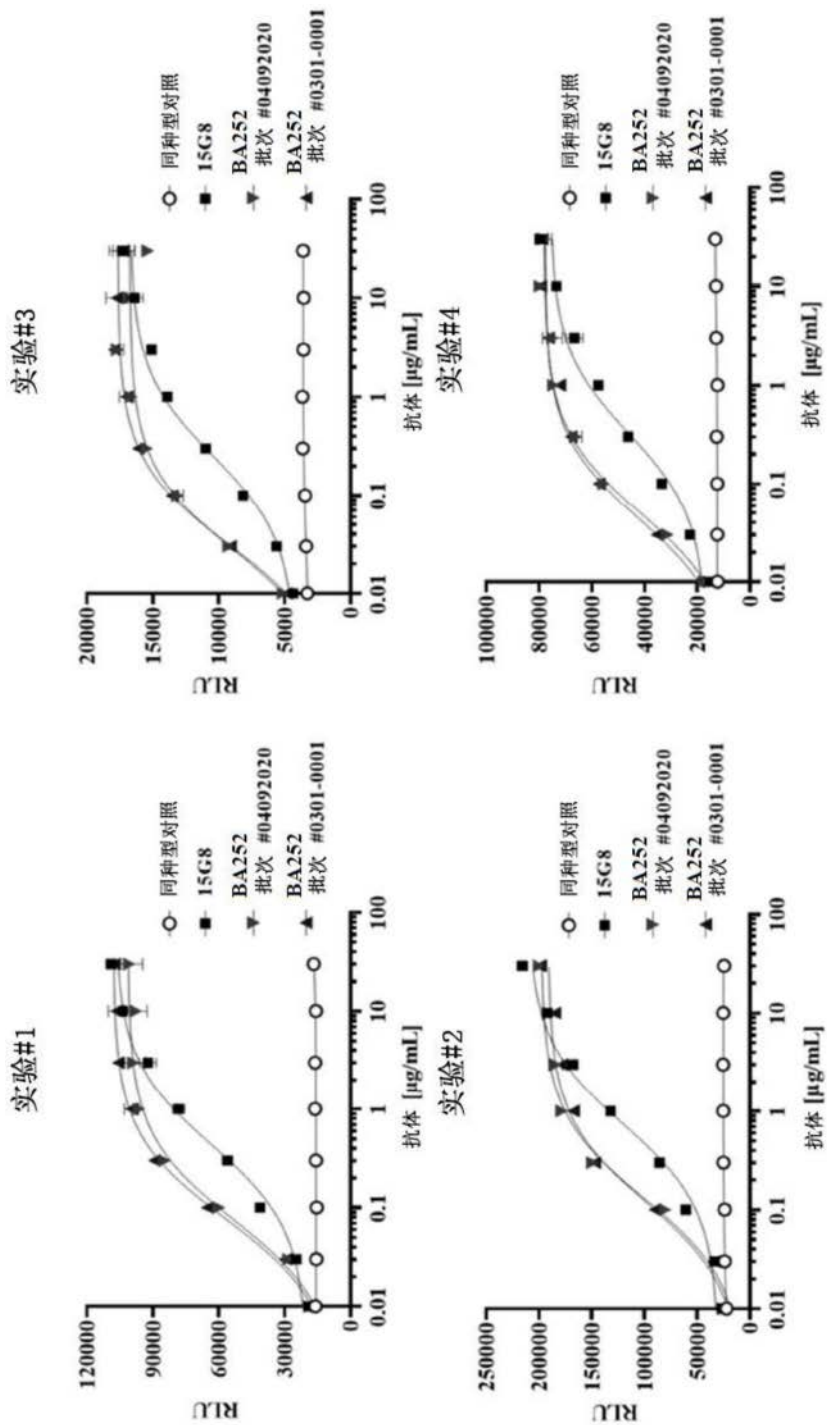


图9A

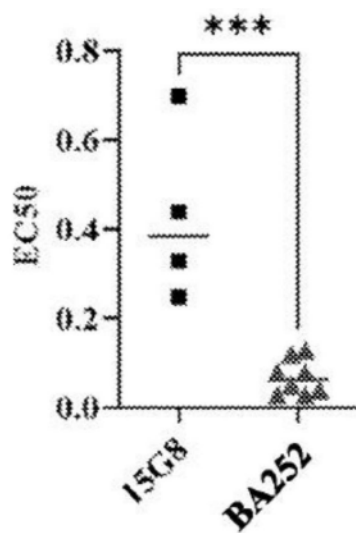


图9B

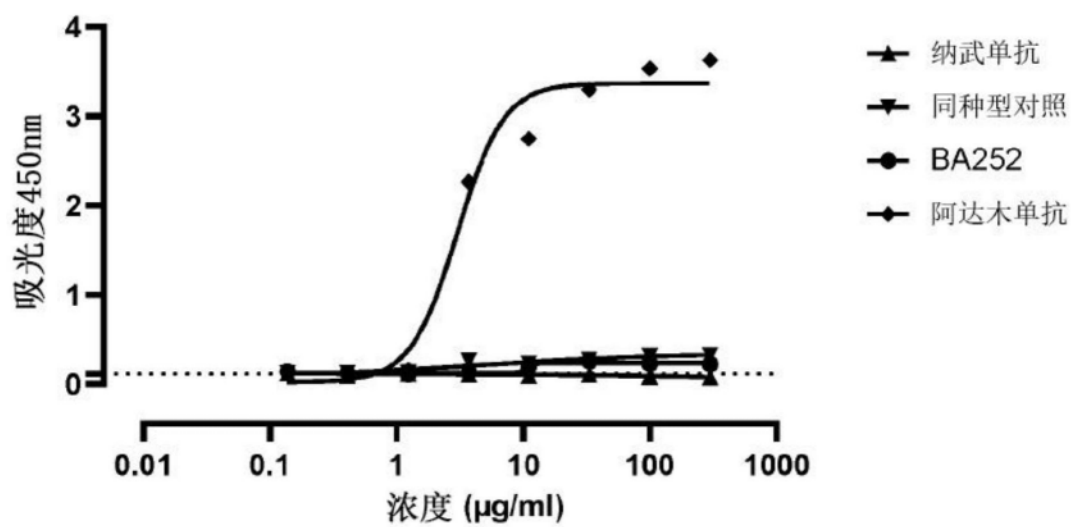


图10

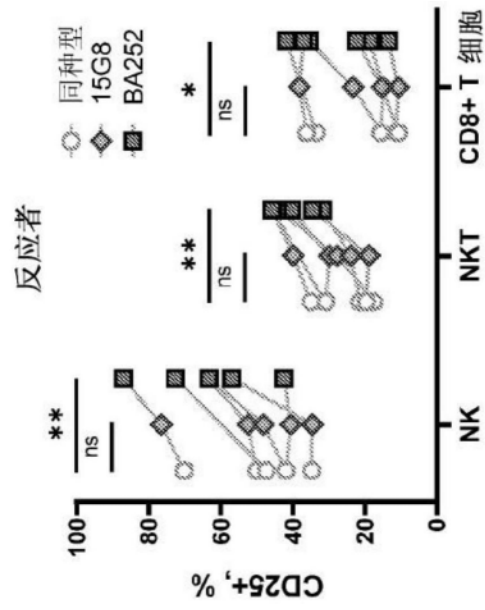


图11A

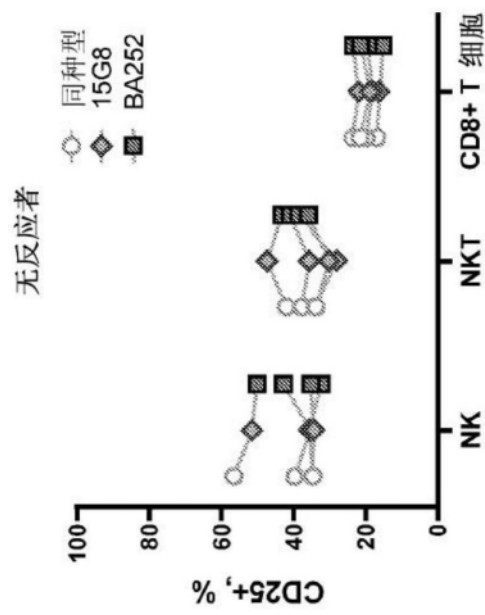


图11B

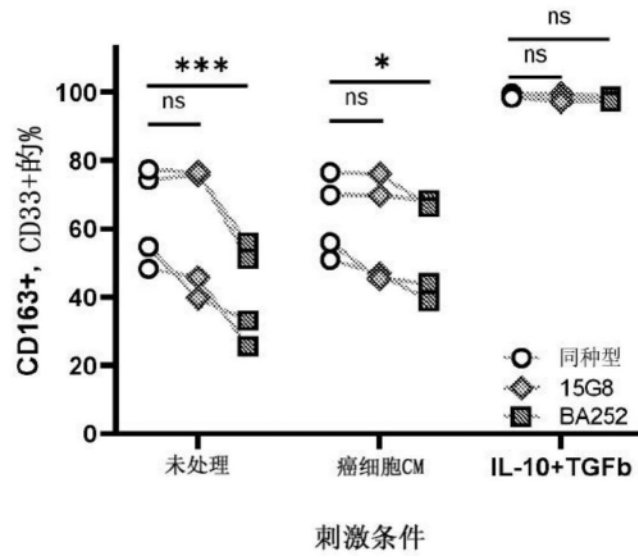


图12A

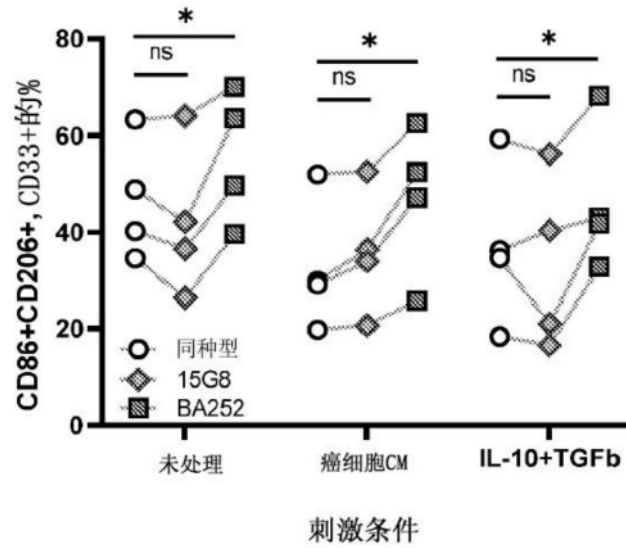


图12B

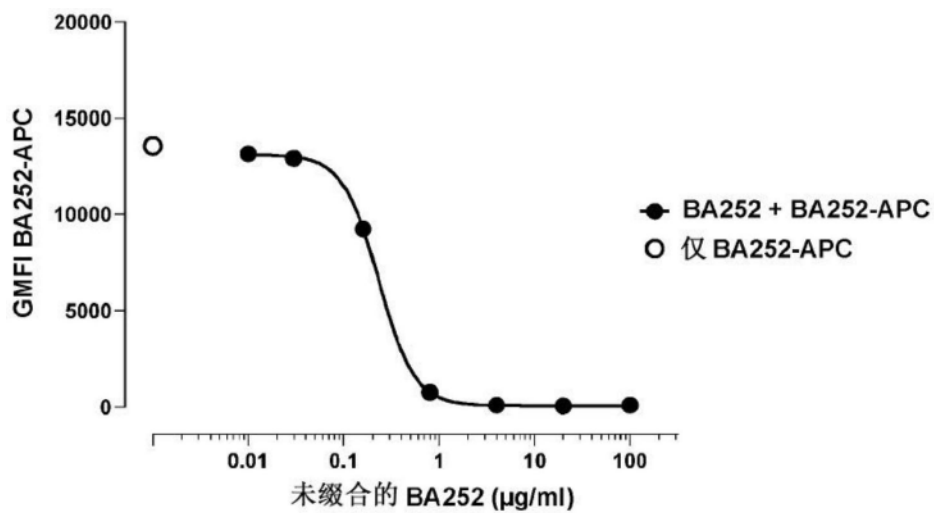


图13A

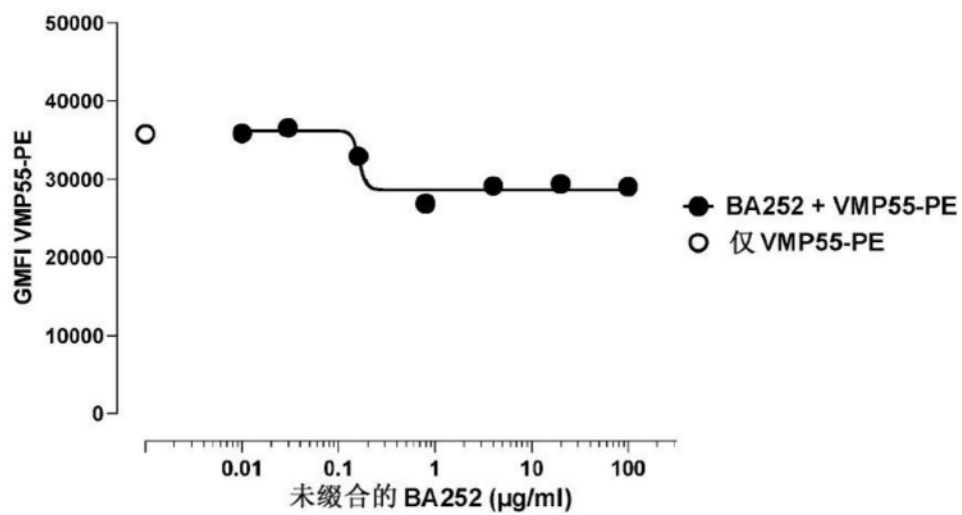


图13B

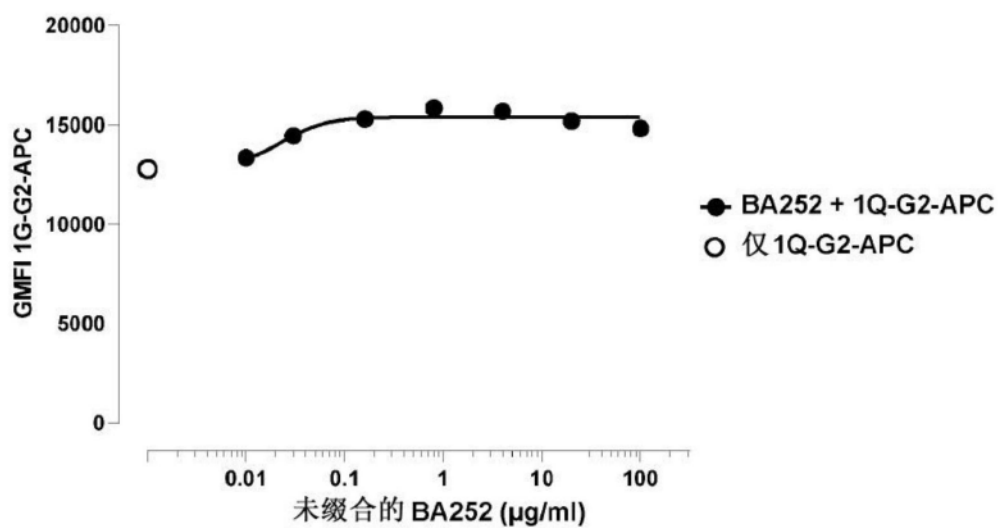


图13C

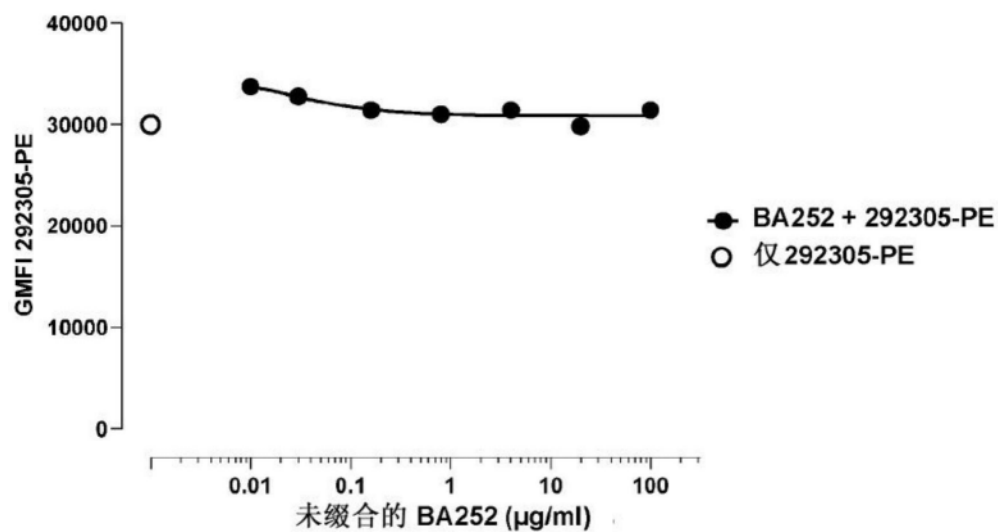


图13D

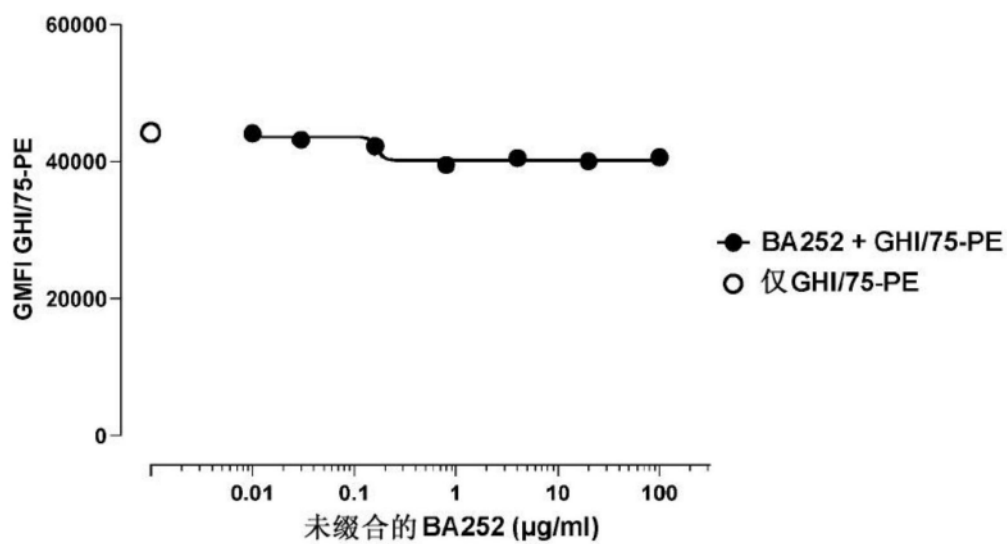


图13E

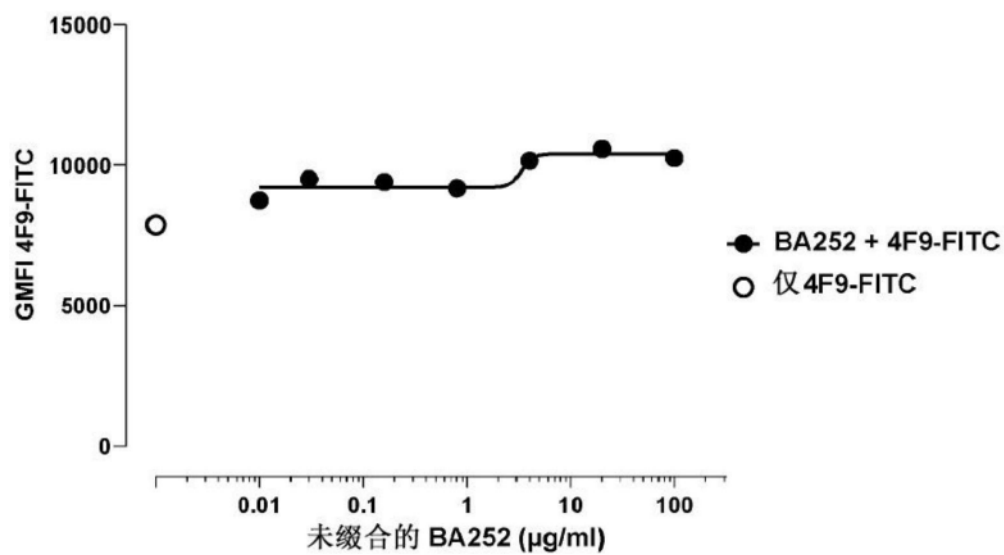


图13F