



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114025797 A

(43) 申请公布日 2022. 02. 08

(21) 申请号 202080041552.0

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22) 申请日 2020.05.29

代理人 黄革生 隋晓平

(30) 优先权数据

62/855,590 2019.05.31 US

62/900,105 2019.09.13 US

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2020/050546 2020.05.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/237320 EN 2020.12.03

(71) 申请人 昆士兰医学研究所理事会

地址 澳大利亚昆士兰州

(72) 发明人 M·威克斯 D·K·普鲁库纳特

权利要求书6页 说明书114页 附图21页

(54) 发明名称

抗Ga19免疫抑制性结合分子

(57) 摘要

展示了抑制性抗GAL9结合分子、抗体构建体、包含结合分子和抗体构建体的药物组合物及其使用方法。

1. 一种Galectin-9 (GAL9) 抗原结合分子, 包含: 对第一GAL9抗原的第一表位特异的第一抗原结合位点 (ABS), 其中第一抗原结合位点包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR。

2. 一种Galectin-9 (GAL9) 抗原结合分子, 包含对第一GAL9抗原的第一表位特异的第一抗原结合位点 (ABS), 其中第一抗原结合位点包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的全部三个VL CDR。

3. 一种Galectin-9 (GAL9) 抗原结合分子, 包含对第一GAL9抗原的第一表位特异的第一抗原结合位点 (ABS), 其中第一抗原结合位点包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

4. 一种Galectin-9 (GAL9) 抗原结合分子, 包含对第一GAL9抗原的第一表位特异的第一抗原结合位点 (ABS), 其包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的VL序列和VH序列。

5. 权利要求4的GAL9抗原结合分子, 其中第一抗原结合位点 (ABS) 进一步包含第一IgG重链多肽和第一轻链多肽。

6. 权利要求1-5中任一项的GAL9抗原结合分子, 其中GAL9抗原是人GAL9抗原。

7. 权利要求1-6中任一项的GAL9抗原结合分子, 其中所述GAL9抗原结合分子进一步包含第二抗原结合位点 (ABS)。

8. 权利要求7的GAL9抗原结合分子, 其中第二ABS对GAL9抗原是特异的。

9. 权利要求7的GAL9抗原结合分子, 其中第二ABS对第一GAL9抗原的第二表位是特异的。

10. 权利要求7的GAL9抗原结合分子, 其中第二ABS对第一GAL9抗原的第一表位是特异的, 并且与第一ABS相同。

11. 权利要求7-10中任一项的GAL9抗原结合分子, 其中第二ABS包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的另一个ABS克隆的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR或者全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

12. 权利要求11的GAL9抗原结合分子, 其中第二抗原结合位点包含来自另一个ABS克隆的VL序列和VH序列。

13. 权利要求12的GAL9抗原结合分子, 其中第二抗原结合位点包含来自另一个ABS克隆的包含VL序列的完整免疫球蛋白轻链序列和包含VH序列的完整免疫球蛋白重链序列。

14. 权利要求7的GAL9抗原结合分子,其中第二抗原结合位点对不同于第一GAL9抗原的抗原具有特异性。

15. 前述权利要求中任一项的GAL9抗原结合分子,其中第一抗原结合位点包括选自ABS克隆中的任何一个的所有三个VH CDRs、所有三个VL CDRs,或所有三个VH CDRs和所有三个VL CDRs:P9-11、P9-24、P9-34、和P9-37。

16. 权利要求1-14中任一项的GAL9抗原结合分子,其中第一抗原结合位点包含来自选自P9-11、P9-24、P9-34、和P9-37的任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR、或全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

17. 权利要求1-14中任一项的GAL9抗原结合分子,其中第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-11的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR、或全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

18. 权利要求1-14中任一项的GAL9抗原结合分子,其中第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-24的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR、或全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

19. 权利要求1-14中任一项的GAL9抗原结合分子,其中第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-34的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR、或全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

20. 权利要求1-14中任一项的GAL9抗原结合分子,其中第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-37的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR、或全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

21. 权利要求1-20中任一项的GAL9抗原结合分子,其中GAL9抗原结合分子包括选自以下组的抗体格式:全长抗体、Fab片段、可变区片段(Fv)、单链可变区片段(scFv)、串联scFv、双体抗体(Diabody)、scDiabody、DART、tandAb、迷你抗体(minibody)和B-body。

22. 权利要求1-21中任一项的GAL9抗原结合分子,其中所述GAL9抗原结合分子在接触后减少活化的免疫细胞的TNF- α 分泌,其中相对于用对照剂处理的活化的免疫细胞而言,该减少约为至少30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%。

23. 根据权利要求1-22中任一项的GAL9抗原结合分子,其中所述GAL9抗原结合分子在接触后减少活化的免疫细胞的IFN- γ 分泌,其中相对于用对照剂处理的活化的免疫细胞而言,该减少约为至少20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。

24. 权利要求1-23中任一项的GAL9抗原结合分子,其中所述GAL9抗原结合分子在接触后增加活化免疫细胞的IL-10分泌,其中,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,该增加约为至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%。

25. 根据权利要求1-24中任一项的GAL9抗原结合分子,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,所述GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的PD-1表面表达。

26. 权利要求1-25中任一项的GAL9抗原结合分子,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,所述GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的PD-L1表面表达。

27. 权利要求1-26中任一项的GAL9抗原结合分子,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,所述GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的CTLA-4表面表达。

28. 权利要求1-27中任一项的GAL9抗原结合分子,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,所述GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的TIM-3表面表达。

29. 权利要求1-28中任一项的GAL9抗原结合分子,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,所述GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的LAG-3表面表达。

30. 权利要求1-29中任一项的GAL9抗原结合分子,其中相对于用对照剂处理的活化CD8⁺

T细胞, GAL9抗原结合分子降低了活化CD8⁺T细胞上的4-1BB表面表达。

31. 权利要求1-30中任一项的GAL9抗原结合分子, 其中相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞, GAL9抗原结合分子降低了活化CD8⁺T细胞上的CD40L表面表达。

32. 权利要求1-31中任一项的GAL9抗原结合分子, 其中相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞, GAL9抗原结合分子降低了活化CD8⁺T细胞上的OX40表面表达。

33. 权利要求22-32中任一项的GAL9抗原结合分子, 其中对照剂是阴性对照剂或阳性对照剂。

34. 权利要求33的GAL9抗原结合分子, 其中对照剂是一种对照抗体。

35. 权利要求34的GAL9抗原结合分子, 其中对照抗体选自ECA42克隆抗GAL9抗体、RG9.1克隆抗GAL9抗体、RG9.35克隆抗GAL9抗体、抗PD1抗体、108A2克隆抗GAL9抗体和无GAL9结合的同种型对照抗体组成的组。

36. 权利要求22-35中任一项的GAL9抗原结合分子, 其中激活的免疫细胞是由多肽刺激、抗CD3或树突状细胞激活的。

37. 一种GAL9抗原结合分子, 其中GAL9抗原结合分子在接触后减少活化的免疫细胞的TNF- α 分泌, 其中相对于用对照剂处理的活化的免疫细胞而言, 该减少约为至少30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%。

38. 一种GAL9抗原结合分子, 其中GAL9抗原结合分子在接触后减少活化的免疫细胞的IFN- γ 分泌, 其中相对于用对照剂处理的活化的免疫细胞而言, 该减少约为至少20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。

39. 一种GAL9抗原结合分子, 其中GAL9抗原结合分子在接触后增加活化免疫细胞的IL-10分泌, 其中, 相对于用对照剂处理的活化免疫细胞, 该增加约为至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%。

40. 一种GAL9抗原结合分子, 其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞, GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的PD-1表面表达。

41. 一种GAL9抗原结合分子, 其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞, GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的PD-L1表面表达。

42. 一种GAL9抗原结合分子, 其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞, GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的CTLA-4表面表达。

43. 一种GAL9抗原结合分子, 其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞, GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的TIM3表面表达。

44. 一种GAL9抗原结合分子, 其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞, GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的LAG3表面表达。

45. 一种GAL9抗原结合分子, 相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞, 降低了活化CD8⁺T细胞上的4-1BB表面表达。

46. 一种GAL9抗原结合分子, 相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞, 降低了CD40L在活化CD8⁺T细胞上的表面表达。

47. 一种GAL9抗原结合分子, 相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞, 降低了在CD8⁺T细胞上活化的OX40表面表达。

48. 一种GAL9抗原结合分子, 其中该GAL9抗原结合分子表现出以下一种或多种特性:

A) 减少活化免疫细胞的TNF- α 分泌,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,该减少约为至少30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%;

B) 减少活化免疫细胞的IFN- γ 分泌,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,该减少约为至少20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%;

C) 增加活化免疫细胞的IL-10分泌,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,增加约为至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%;

D) 相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,不调节活化免疫细胞的PD-1表面表达;

E) 相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,不调节活化免疫细胞的PD-L1表面表达;

F) 相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,不调节活化免疫细胞上CTLA-4的表面表达;

G) 相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,不调节活化免疫细胞上TIM3的表面表达;

H) 相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,不调节活化免疫细胞上LAG3的表面表达;

I) 相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞而言,减少活化CD8⁺T细胞上的4-1BB表面表达;

J) 相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞而言,减少活化CD8⁺T细胞上的CD40L表面表达;或

K) 相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞而言,减少活化CD8⁺T细胞上的OX40表面表达。

49. 权利要求37-48中任一项的GAL9抗原结合分子,其中对照剂是阴性对照剂或阳性对照剂。

50. 权利要求49的GAL9抗原结合分子,其中对照剂是一种对照抗体。

51. 权利要求50的GAL9抗原结合分子,其中对照抗体选自由ECA42克隆抗GAL9抗体、RG9.1克隆抗GAL9抗体、RG9.35克隆抗GAL9抗体、抗PD1抗体、108A2克隆抗GAL9抗体和无GAL9结合的同种型对照抗体组成的组。

52. 权利要求37-51中任一项的GAL9抗原结合分子,其中,被激活的免疫细胞,是由被肽刺激、抗CD3或树突状细胞激活的。

53. 权利要求37-49中任一项的GAL9抗原结合分子,其包含对第一种GAL9抗原的第一表位特异的第一抗原结合位点,其中第一抗原结合位点包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

54. 权利要求53的GAL9抗原结合分子,包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的任何一个ABS克隆的VL序列和VH序列。

55. 权利要求54的GAL9抗原结合分子,包含包含VH序列的完整免疫球蛋白重链序列,和包含VL序列的完整免疫球蛋白轻链序列,其中VH序列和VL序列来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中的任何一个ABS克隆。

56. 权利要求37-55中任一项的GAL9抗原结合分子,其中GAL9抗原是人GAL9抗原。

57. 权利要求37-56中任一项的GAL9抗原结合分子,其中该GAL9抗原结合分子进一步包括第二抗原结合位点。

58. 权利要求57的GAL9抗原结合分子,其中第二抗原结合位点对GAL9抗原是特异的。

59. 权利要求58的GAL9抗原结合分子,其中第二抗原结合位点与第一抗原结合位点相同。

60. 权利要求57的GAL9抗原结合分子,其中第二抗原结合位点对第一GAL9抗原的第二表位是特异的。

61. 权利要求60的GAL9抗原结合分子,其中第二抗原结合位点包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的另一个ABS克隆的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

62. 权利要求61的GAL9抗原结合分子,其中第二抗原结合位点包含来自其他的ABS克隆的VL序列和VH序列。

63. 权利要求62的GAL9抗原结合分子,其中第二抗原结合位点包含来自其他ABS克隆的包含VL序列的完整免疫球蛋白轻链序列和包含VH序列的完整免疫球蛋白重链序列。

64. 权利要求57的GAL9抗原结合分子,其中第二抗原结合位点对不同于第一GAL9抗原的抗原是特异的。

65. 权利要求53-64中任一项的GAL9抗原结合分子,其中第一抗原结合位点包含来自选自P9-11、P9-24、P9-34、和P9-37的任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

66. 权利要求53-64中任一项的GAL9抗原结合分子,其中第一抗原结合位点包含来自选自P9-11、P9-24和P9-34的任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

67. 权利要求53-64中任一项的GAL9抗原结合分子,其中第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-11的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

68. 权利要求53-64中任一项的GAL9抗原结合分子,其中第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-24的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

69. 权利要求53-64中任一项的GAL9抗原结合分子,其中第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-34的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

70. 权利要求53-64中任一项的GAL9抗原结合分子,其中第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-37的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

71. 权利要求37-70中任一项的GAL9抗原结合分子,其中GAL9抗原结合分子包括选自以下组的抗体格式:全长抗体、Fab片段、可变区片段(Fv)、单链可变区片段(scFv)、串联scFv、双体抗体(Diabody)、scDiabody、DART、tandAb、迷你抗体(minibody)和B-body。

72. 一种GAL9抗原结合分子,其与任何一项前述权利要求中的GAL9抗原结合分子结合相同的表位。

73. 一种GAL9抗原结合分子,其与前述权利要求中任一项的GAL9抗原结合分子竞争结合。

74. 前述权利要求中任一项的GAL9抗原结合分子,其是经纯化的。

75. 一种药物组合物,其包含前述权利要求中任一项的GAL9抗原结合分子和药学上可接受的稀释剂。

76. 一种治疗患有自身免疫性疾病的受试者的方法,包括:向受试者施用治疗有效量的权利要求75的药物组合物。

77. 权利要求76的方法,其中与来自健康对照的树突状细胞相比,患有自身免疫性疾病的受试者在树突状细胞上具有增加的PD-L2表达量。

78. 权利要求76的方法,其中自身免疫性疾病选自炎症性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、结肠炎、乳糜泻、类风湿性关节炎、白塞氏病、淀粉样变性、银屑病、银屑病关节炎、系统性红斑狼疮肾炎、移植物抗宿主病 (GVHD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH),以及强直性脊柱炎组成的组。

79. 权利要求76的方法,其中治疗的结果是减少炎症、减少自身免疫反应、延长缓解、诱导缓解、重建免疫耐受、改善器官功能、减少疾病的进展、减少第二种疾病的进展或发生的风险、或增加总生存。

抗Gal9免疫抑制性结合分子

1. 相关申请的交叉参考

[0001] 本申请根据35U.S.C.119(e) 要求获得先前共同未决的2019年9月13日提交的美国临时专利申请第62/900,105号和2019年5月31日提交的美国临时专利申请第62/855,590号的权益。

2. 序列表

[0002] 本申请包含序列表,其已经由EFS-Web提交,并在此以参考方式将其全部并入。所述ASCII副本创建于2020年XX月,命名为XXXXUS_sequencelisting.txt,大小为X,XXX,XXX字节。

3. 背景技术

[0003] 自身免疫性疾病由免疫系统内部不平衡导致的对人体自身细胞和组织的免疫介导的攻击所引起。目前治疗自身免疫性疾病的“金标准”是通过免疫抑制剂进行全身免疫抑制,包括糖皮质激素、抗细胞因子抗体诸如抗TNF- α 、抗IL-1、抗IL-5、抗IL-6、抗IL-17抗体和抗IL-23抗体,以及减少炎性细胞因子信号转导的小分子药物,如JAK/STAT抑制剂。然而,非特异的全身性免疫抑制使病人容易患感染性疾病,并可能有其他严重的副作用。

[0004] 免疫疗法在治疗自身免疫性疾病方面有很大的潜力。Galectin-9 (GAL9) 是一种S型凝集素 β -半乳糖苷结合蛋白,其N端和C端碳水化合物结合域由一个连接肽相连。GAL9与调节细胞-细胞和细胞-基质相互作用有关联。GAL9已被证明可以结合可溶性PD-L2,并且至少有一些PD-L2的免疫学效应被提出是通过多聚体PD-L2与GAL9的结合而不是通过PD-1介导的(WO 2016/008005,以其整体通过引用并入本文)。然而,GAL9和PD-L2影响免疫效应器功能的机制还没有完全确定。

[0005] 仍然需要更有针对性的治疗方法,通过调节免疫效应细胞来建立一个更有利于临床的细胞因子谱,从而重建免疫系统的平衡。这样的治疗剂可能对改进自身免疫性和炎症性疾病的治疗是有用的。

4. 发明概述

[0006] 本发明的产生部分是由于预料之外的发现,即PD-L2在自身免疫性疾病中过量表达,和抑制Galectin-9/PD-L2途径可调节免疫效应细胞以产生更多临床上有利的细胞因子谱。

[0007] 因此,本文公开了各种GAL9结合分子、其抗原结合部分以及特异性地结合并拮抗人GAL9 (Galectin-9) 的抗体。使用本文公开的抗人GAL9结合分子抑制GAL9可减少促炎症细胞因子的分泌和产生,增加抗炎细胞因子的分泌和产生,并减少刺激性分子的表面表达。

[0008] 还公开了包含GAL9结合分子的药物组合物。本文公开的抗GAL9结合分子、其抗原结合部分和抗体可以本身作为药物组合物使用,或与其他治疗剂或程序组合使用,以治疗、预防和/或诊断自身免疫性疾病、炎症性疾病或唤起炎症反应的疾病,如感染。抗GAL9结合分子对于那些在其中GAL9/PD-L2的相互作用对发病起显著促进作用的疾病或状况特别有用。抗GAL9结合分子有益于治疗、减少炎症,减少自身免疫反应,延长缓解期,诱导缓解,重

新建立免疫耐受,改善器官功能,减少疾病进展,降低发生第二种疾病的风险,或增加受试者的总生存率。

[0009] 在第一方面,本发明公开了一种Galectin-9 (GAL9) 抗原结合分子,其包含对第一GAL9抗原的第一表位特异的第一抗原结合位点 (ABS),其中第一抗原结合位点包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的ABS克隆中任一个的全部三个VH CDR。

[0010] 在第二方面,本发明提供了一种Galectin-9 (GAL9) 抗原结合分子,包括对第一GAL9抗原的第一表位特异的第一抗原结合位点,其中第一抗原结合位点包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的全部三个VL CDR。

[0011] 在第三方面,本发明公开了一种Galectin-9 (GAL9) 抗原结合分子,其包含对第一GAL9抗原的第一表位特异的第一抗原结合位点,其中第一抗原结合位点包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的ABS克隆中任何一个的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0012] 在第四方面,本发明公开了一种Galectin-9 (GAL9) 抗原结合分子,包括对第一GAL9抗原的第一表位特异的第一抗原结合位点,其包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的VL序列和VH序列。

[0013] 在一些实施例中,GAL9抗原结合分子包含包含VH序列的全免疫球蛋白重链"IgG1"序列和包含VL序列的全免疫球蛋白轻链序列,其中VH序列和VL序列来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的ABS克隆中的任何一个。

[0014] 在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子包含包含VH序列的完整免疫球蛋白重链"IgG4"序列和包含VL序列的完整免疫球蛋白轻链序列,其中VH序列和VL序列来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的ABS克隆中的任何一个。

[0015] 在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子可以包含一个GAL9抗原,该抗原是人GAL9抗原。

[0016] 在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子可以进一步包含第二抗原结合位点。

[0017] 在某些实施方案中,第二抗原结合位点对GAL9抗原是特异性的。在其他实施方案中,第二抗原结合位点与第一抗原结合位点相同。

[0018] 在其他实施方案中,第二抗原结合位点对第一GAL9抗原的第二表位是特异的。

[0019] 在一些实施例中,第二抗原结合位点包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、

P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的另一个ABS克隆的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR或者全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0020] 在一些实施方案中,第二抗原结合位点包含来自另一个ABS克隆的VL序列和VH序列。

[0021] 在一些实施例中,第二抗原结合位点包含包含VH序列的完整的免疫球蛋白重链序列和一个包含VL序列的完整的免疫球蛋白轻链序列。

[0022] 在一些实施方案中,第二抗原结合位点对不同于第一GAL9抗原的抗原具有特异性。

[0023] 在一些实施例中,第一抗原结合位点包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR或者全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0024] 在一些实施方案中,第一抗原结合位点包含来自选自P9-11、P9-24、P9-34、和P9-37的任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR、或全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0025] 在一些实施方案中,第一抗原结合位点包含来自选自P9-11、P9-24和P9-34的任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR、或全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0026] 在一些实施方案中,第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-11的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR,或全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0027] 在一些实施方案中,第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-24的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR,或全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0028] 在一些实施方案中,第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-34的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR,或全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0029] 在一些实施方案中,第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-37的全部三个VH CDR、全部三个VL CDR,或全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0030] 在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子包括选自以下组的抗体格式:全长抗体、Fab片段、F(ab)'₂片段、Fvs、scFvs、串联scFv、双体抗体(diabody)、scDiabodies、DARTs、单链VHH骆驼抗体、tandAbs、迷你抗体(minibody)和B-body。B-body在号码为US 2018/0118811的美国授权前公开中描述,其全部内容通过参考纳入本文。

[0031] 在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子在接触后减少活化的免疫细胞的TNF- α 分泌,其中相对于用对照剂处理的活化的免疫细胞而言,该减少约为至少30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%。

[0032] 在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子在接触后减少活化的免疫细胞的IFN- γ 分泌,其中相对于用对照剂处理的活化的免疫细胞而言,该减少约为至少20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。

[0033] 在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子在接触后增加活化免疫细胞的IL-10分泌,

其中,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,该增加约为至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%。

[0034] 在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的PD-1表面表达。

[0035] 在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,GAL9抗原结合分子不会调节活化免疫细胞上的PD-L1表面表达。

[0036] 在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的CTLA-4表面表达。

[0037] 在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的TIM3表面表达。

[0038] 在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,GAL9抗原结合分子不会调节活化免疫细胞上的LAG3表面表达。

[0039] 在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞,GAL9抗原结合分子降低了活化CD8⁺T细胞上的4-1BB表面表达。

[0040] 在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞,GAL9抗原结合分子降低了CD40L在活化CD8⁺T细胞上的表面表达。

[0041] 在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞,GAL9抗原结合分子降低了在CD8⁺T细胞上活化的OX40表面表达。

[0042] 在一些实施方案中,对照剂是阴性对照剂或阳性对照剂。

[0043] 在一些实施方案中,对照剂是一种对照抗体。

[0044] 在一些实施方案中,对照抗体选自由ECA42克隆抗GAL9抗体、RG9.1克隆抗GAL9抗体、RG9.35克隆抗GAL9抗体、抗PD1抗体、108A2克隆抗GAL9抗体和无GAL9结合的同种型对照抗体组成的组。

[0045] 在一些实施方案中,被激活的免疫细胞、被激活的CD8⁺T细胞或被激活的DC是由被多肽刺激、抗CD3或树突状细胞所激活。

[0046] 在第五方面,本公开提供了一种GAL9抗原结合分子,其降低了活化免疫细胞的TNF- α 分泌,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,该降低约为至少30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%。

[0047] 在第六方面,本公开提供了一种GAL9抗原结合分子,其减少了活化免疫细胞的IFN- γ 分泌,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,该减少约为至少20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。

[0048] 在第七方面,本发明提供了一种GAL9抗原结合分子,其增加了活化免疫细胞的IL-10分泌,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,该增加约为至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%。

[0049] 在第八方面,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,本发明提供的GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的PD-1表面表达。

[0050] 在第九方面,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,本发明提供的GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的PD-L1表面表达。

[0051] 在第十方面,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,本发明提供的GAL9抗原结合

分子不调节活化免疫细胞上的CTLA-4的表面表达。

[0052] 在第十一方面,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,本发明提供的GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的TIM3的表面表达。

[0053] 在第十二方面,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,本发明提供的GAL9抗原结合分子不调节活化免疫细胞上的LAG3的表面表达。

[0054] 在第十三方面,本发明提供了一种GAL9抗原结合分子,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞而言,降低了活化CD8⁺T细胞上的4-1BB表面表达。

[0055] 在第十四方面,本发明提供了一种GAL9抗原结合分子,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞而言,降低了CD40L在活化CD8⁺T细胞上的表面表达。

[0056] 在第十五方面,本发明提供了一种GAL9抗原结合分子,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞而言,降低了在CD8⁺T细胞上活化的OX40表面表达。

[0057] 在第十六方面,本发明公开提供的GAL9抗原结合分子展示了以下一个或多个特性:A)减少活化免疫细胞的TNF- α 分泌,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,该减少约为至少30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%;B)减少活化免疫细胞的IFN- γ 分泌,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,该减少约为至少20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。C)增加活化免疫细胞的IL-10分泌,其中相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,增加约为至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%;D)相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,不调节活化免疫细胞的PD-1表面表达;E)相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,不调节活化免疫细胞的PD-L1表面表达。F)相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,不调节活化免疫细胞上CTLA-4的表面表达;G)相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,不调节活化免疫细胞上TIM3的表面表达;H)相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,不调节活化免疫细胞上LAG3的表面表达。I)相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞而言,减少活化CD8⁺T细胞上的4-1BB表面表达;J)相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞而言,减少活化CD8⁺T细胞上的CD40L表面表达;或K)相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞而言,减少活化CD8⁺T细胞上的OX40表面表达。

[0058] 在一些实施方案中,对照剂是阴性对照剂或阳性对照剂。

[0059] 在一些实施方案中,对照剂是一种对照抗体。

[0060] 在一些实施方案中,对照抗体选自包括:ECA42克隆抗GAL9抗体、RG9.1克隆抗GAL9抗体、RG9.35克隆抗GAL9抗体、抗PD1抗体、108A2克隆抗GAL9抗体和无GAL9结合的同种型对照抗体。

[0061] 在一些实施方案中,激活的免疫细胞是被多肽刺激、抗CD3或树突状细胞激活。

[0062] 在一些实施方案中,本文提供的第五-第十五方面的GAL9抗原结合分子包含对第一GAL9抗原的第一表位特异的第一抗原结合位点,其中第一抗原结合位点包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0063] 在一些实施方案中,来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的任何一个ABS克隆的

VL序列和VH序列。

[0064] 在某些特定的实施方案中，GAL9抗原结合分子包含包含VH序列的完整免疫球蛋白重链序列，和包含VL序列的完整免疫球蛋白轻链序列，其中VH序列和VL序列来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中的任何一个ABS克隆。

[0065] 在一些实施方案中，GAL9抗原是人类GAL9抗原。

[0066] 在一些实施方案中，GAL9抗原结合分子进一步包含第二抗原结合位点。

[0067] 在一些实施方案中，第二抗原结合位点对GAL9抗原是特异性的。

[0068] 在一些实施例中，第二抗原结合位点与第一抗原结合位点相同。

[0069] 在一些实施方案中，第二抗原结合位点对第一GAL9抗原的第二表位具有特异性。

[0070] 在一些实施例中，第二抗原结合位点包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57的另一个ABS克隆的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0071] 在一些实施方案中，第二抗原结合位点包含来自其他ABS克隆的VL序列和VH序列。

[0072] 在一些实施方案中，第二抗原结合位点包含来自另一个ABS克隆的包含VL序列的完整免疫球蛋白轻链序列和包含VH序列的完整免疫球蛋白重链序列。

[0073] 在一些实施方案中，第二抗原结合位点对不同于第一GAL9抗原的抗原具有特异性。

[0074] 在一些实施方案中，第一抗原结合位点包含来自选自P9-11、P9-24、P9-34、和P9-37的任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0075] 在一些实施方案中，第一抗原结合位点包含来自选自P9-11、P9-24和P9-34的任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0076] 在一些实施方案中，第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-11的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0077] 在一些实施方案中，第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-24的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0078] 在一些实施方案中，第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-34的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0079] 在一些实施方案中，第一抗原结合位点包含来自ABS克隆P9-37的全部三个VH CDR和全部三个VL CDR。

[0080] 在一些实施方案中，GAL9抗原结合分子包括选自以下组的抗体格式：全长抗体、Fab片段、可变区片段(Fv)、单链可变区片段(scFv)、串联scFv、双体抗体(Diabody)、scDiabody、DART、tandAb、迷你抗体(minibody)和B-body。

[0081] 在第十七方面，本公开提供了一种GAL9抗原结合分子，其与任何一项前述权利要求中的GAL9抗原结合分子结合相同的表位。

[0082] 在第十八方面，本公开提供了一种GAL9抗原结合分子，其与前述权利要求中任何一项的GAL9抗原结合分子竞争结合。

[0083] 在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子是纯化的。

[0084] 在第十九方面,本公开提供了一种药物组合物,其包含前述权利要求中任一项的GAL9抗原结合分子和药学上可接受的稀释剂。

[0085] 在第二十方面,本公开提供了一种治疗患有自身免疫性疾病的受试者的方法,包括向受试者施用治疗有效量的本文提供的药物组合物。

[0086] 在一些实施方案中,与来自健康对照的树突状细胞相比,患有自身免疫性疾病的受试者在树突状细胞上的PD-L2表达量增加。

[0087] 在一些实施方案中,自身免疫性疾病选自炎症性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、结肠炎、乳糜泻、类风湿性关节炎、白塞氏病、淀粉样变性、银屑病、银屑病关节炎、系统性红斑狼疮肾炎、移植物抗宿主病 (GVHD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH),以及强直性脊柱炎组成的组。

[0088] 在一些实施方案中,施用治疗有效量的GAL结合分子本身或药物组合物的结果是减少炎症、减少自身免疫反应、延长缓解、诱导缓解、重建免疫耐受、改善器官功能、减少疾病的进展、减少第二种疾病的进展或发生的风险、或增加总生存期。

5.附图简述

[0089] 图1A和1B显示了如应用于本文提供的P9-01抗人Gal9候选抗体的各种CDR和框架编号系统--Chothia、Martin (ABA) 和Kabat的说明性实例。

[0090] 图2显示了来自克罗恩病患者的CD11c⁺血液树突状细胞被检测为PD-L1或PD-L2表达阳性的百分比的密度等值线图,与标记的同种型IgG对照相比。

[0091] 图3A和3B显示了健康对照组或克罗恩病患者中表达PD-L1或PD-L2的血液树突状细胞的百分比散点图。图3C和3D显示了健康对照组或克罗恩病患者中血液树突状细胞上PD-L1或PD-L2表面表达的几何平均荧光 (GMI) 的散点图。

[0092] 图4A和4B显示了来自两个健康对照者 (4A) 和三个克罗恩病患者 (4B) 的树突状细胞上的DNA (DAPI; 蓝色)、PD-L1 (绿色) 和PD-L2 (红色) 的表达情况的代表性共聚焦图像;在附图中以灰度呈现。

[0093] 图5A-5C显示了克罗恩病 (CD) 患者的PMBCs在用抗CD3模拟TCR激活并且抗PD-L2 (α PD-L2) 或IgG对照处理后所分泌的细胞因子的平均浓度。5A-5B显示了用抗PD-L2或IgG对照处理CD患者的PMBC后,TNF- α 和IFN- γ 的平均浓度。图5C显示了用抗PD-L2和IgG对照处理CD患者的PMBC后,IL-10:TNF- α 分泌的平均比值。

[0094] 图6显示了用sPD-L2处理或用sPD-L2和抑制性抗小鼠抗GAL9 (108A2) 共同处理后的抗CD3激活的小鼠CD4⁺T细胞分泌的TNF- α 。

[0095] 图7显示了用小鼠抑制性抗小鼠GAL9 (108A2) 和激活性抗小鼠GAL9 (RG9.1) 抗体处理后,来自疟疾感染小鼠的CD4⁺T细胞中DNA (DAPI; 蓝色)、PD-L1 (绿色)、PD-1 (红色) 和OX40 (黄色) 表达情况的代表性共聚焦图像;在附图中以灰色标度呈现。

[0096] 图8A和8B显示了用sPD-L2处理或sPD-L2和小鼠抑制性抗GAL9 (108A2) 抗体处理之后存活的小鼠CD4⁺和CD8⁺T细胞的百分比柱状图。

[0097] 图9A和9B显示了与树突状细胞共同培养 (刺激的) 并用阻断性抗PD-L2 (克隆Ty25) 或抑制性抗GAL9 (108A2) 小鼠抗体处理后的小鼠CD4⁺T细胞分泌的INF- γ (9A) 和TNF- α (9B) 的柱状图,与对照组未刺激的CD4⁺T细胞相比较。

[0098] 图10A和10B显示了来自经处理后的HCMV肽体外刺激的PBMC的INF- γ (10A) 和TNF- α (10B) 的分泌,所述处理使用各种抗人GAL9候选物、已知的活化工具抗体(Tool mAb)、抗PD-1抗体、IgG对照抗体(IgG Ctrl)和媒介物(vehicle)对照(PBS对照)。黑色菱形显示了由工具mAb和抗PD-1抗体刺激的活化PBMCs的分泌。

[0099] 图11A-11C显示了与IgG对照抗体(IgG)相比较,用抗人GAL9 P9-11、P9-37或P9-57处理后,从HCMV肽,体外刺激的PBMCs分泌的INF- γ 和TNF- α 。

[0100] 图12A-12C显示了与IgG对照抗体(IgG)相比较,用抗人GAL9候选物P9-11、P9-24或P9-34处理后,从HCMV肽,体外刺激的PBMCs分泌的TNF- α (12A)、INF- γ (12B) 和IL-10 (12C)。

[0101] 图13A和13B显示了用抑制性抗小鼠GAL9 (108A2) 和抗人GAL9 P9-11、P9-24或P9-34处理后,抗CD3活化小鼠CD3⁺T细胞的TNF- α :IL-10分泌的比值(13A) 和INF- γ :IL-10分泌的比值(13B)的柱状图。

6. 发明详述

6.1. 定义

[0102] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域的技术人员通常理解的含义。如本文所使用的,以下术语具有下文赋予它们的含义。

[0103] “抗原结合位点”或“ABS”是指GAL9结合分子中特异性识别或结合到给定抗原或表位的区域。

[0104] 如本文所用,术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”是在其最广泛被接受的临床意义上使用。这些术语包括但不限于减轻疾病的征兆或症状;改善疾病的征兆或症状;减轻症状;减少疾病的范围;稳定(即不恶化)疾病的状态;延迟或减缓疾病的进展;改善或缓和疾病状态;缓解(无论是部分或全部),无论是可检测或不可检测的;治愈;与不接受治疗时的预期生存相比,延长生存期。除非另有明确说明,“治疗”或“治疗”并不意味着预防或防止疾病。

[0105] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”是指希望对其进行诊断、预后或治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人类、家畜、农场动物和动物园、运动或宠物动物,诸如狗、猫、豚鼠、兔子、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛等等。除非另有说明,“患者”指的是人类“受试者”。

[0106] 术语“足量”是指足以产生所需效果的量,例如足以调节蛋白质在细胞中聚集的量。

[0107] 术语“治疗有效量”是指能有效改善疾病症状的量。

[0108] 术语“预防有效量”是指能有效防止疾病症状的量。

6.2. 其他解释惯例

[0109] 除非另有规定,本文提到的序列都是指氨基酸序列。

[0110] 除非另有规定,抗体恒定区的残基编号是根据Eu索引,如在www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html#refs (2017年8月22日访问)所描述的,在此通过引用以其全文并入,残基编号根据其在内源性恒定区序列中的位置确定残基,而不考虑该残基在本文所述GAL9结合分子链中的物理位置。

[0111] 除非另外指定为“Kabat CDR”、“Chothia CDR”、“Contact CDR”或“IMGT CDR”,所有提到的“CDR”是指使用Martin(ABA)定义所定义的CDR。

[0112] “内源性序列”或“原生序列”是指任何序列,包括核酸和氨基酸序列,其来源于没有经过人工修饰或突变的生物体、组织或细胞。

[0113] 多肽链编号(例如,“第一”多肽链,“第二”多肽链等,或多肽“链1”、“链2”等)在本文作为形成结合分子的特定多肽链的独特标识符,并且不意在暗示结合分子内部不同多肽链的顺序或数量。

[0114] 在本公开内容中,“包括(comprise)”、“包含(comprising)”、“含有(containing)”、“具有(having)”、“包含(include)”、“包括(including)”和其语言学变体具有美国专利法中赋予它们的含义,允许存在明确叙述的那些之外的额外成分。

[0115] 如本文所使用的,除非上下文明确指出,单数形式的“一个(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数指称。术语“包括(include)”、“诸如(such as)”等意在表达不受限制的包含,除非另有具体说明。

[0116] 本文提供的范围被理解为是范围内所有数值的简略表示方式,包括所述端点。例如,1至50的范围被理解为包括来自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50组成的组的任何数字、数字组合或者子区间。

[0117] 除非特别说明或从上下文中明显看出,本文使用的术语“大约”被理解为在本领域的正常公差范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。大约可以理解为在所列值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%以内。

6.3. 总览

[0118] 本公开提供了Galectin-9 (GAL9) 抗原结合分子,例如抗GAL9抗体及其抗原结合片段;包含GAL9结合分子的组合物;包含GAL9结合分子的药物组合物;以及使用GAL9结合分子治疗患有疾病或病况的受试者的方法。本发明具体提供了多种GAL9抗原结合分子,其是抑制性的,作为免疫系统的抑制剂,减少各种免疫细胞中促炎症细胞因子的分泌和产生,增加抗炎症细胞因子的分泌和产生,减少刺激性分子的表面表达。

[0119] GAL9抗原结合分子对于治疗受试者的自身免疫性疾病或炎症性疾病特别有用。在一些实施方案中,该组合物和方法用于治疗引起受试者炎症反应的感染。抗GAL9结合分子特别适用于治疗GAL9/PD-L2相互作用对发病机制起显著促进作用的疾病或状况。在一些实施方案中,抗GAL9结合分子作为药物组合物,或与其他治疗剂或程序组合,被施用于受试者本身。

6.4. GAL9抗原结合分子

[0120] 在第一方面,提供了抗原结合分子。在每个实施方案中,抗原结合分子至少含有对GAL9抗原特异的第一抗原结合位点;因此,该结合分子被称为GAL9抗原结合分子或GAL9结合分子。

[0121] 本文所描述的GAL9抗原结合分子与GAL9抗原特异性结合。

[0122] 如本文所用,“GAL9抗原”是指Galectin-9家族成员和同源物。GAL9也被称为LGALS9、HUAT、LGALS9A、肿瘤抗原HOM-HD-21、和ecalectin。在特定的实施方案中,GAL9结合分子具有抗原结合位点,其可特异性地与一个以上的GAL9结构域的至少一部分结合,诸如第一和第二GAL9结构域之间的交界处。

[0123] 在具体的实施方案中,GAL9抗原是人的。GenBank登录号#NP_033665.1描述了一个

典型的人类GAL9蛋白,包括其序列和结构域特征,并在此将其全部内容通过引用并入。SEQ ID NO:6提供了全长的GAL9蛋白序列。

MAFSGSQAPYLSPAVPFSGTIQGGLQDGLQITVNGTVLSSSGTRFAVNFQTGFSGNDIAHFHNPFRFED
GGYVVCNTRQNGSWGPEERKTHMPFQKGMFPDLCFLVQSSDFKVMVNGILFVQYFHRVPFHRVDTISVNGSVQLSY
ISFQNPRTVPVQPAFSTVPFSQPVCFPFRPRGRQRKPPGVWPANPAPITQTVIHTVQSAPGQMFSTPAIPPMYPH
PAYPMPFITITLGGLYPSKSILLSGTVLPSAQRFHINLCSGNHIAFHLNPRFDENAVVRNTQIDNSWGSEERSLPR
KMPFVRGQSFSVWILCEAHCLKVAVDGQHLFEYYHRLRNLPNTINRLEVGGDIQLTHVQT[SEQ ID NO:6]

[0124] 在各种实施方案中,GAL9结合分子另外与GAL9抗原之外的至少一种抗原特异性结合。

6.4.1.GAL9抗原结合分子的功能特征

[0125] 在典型的实施方案中,在与之接触后,GAL9抗原结合分子调节免疫细胞或活化免疫细胞的细胞因子分泌(例如,增加或减少细胞因子的分泌)。在一些实施例中,免疫细胞是外周血单个核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞是效应T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD8⁺T细胞。在具体实施中,T细胞是CD4⁺T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD3⁺T细胞。

[0126] GAL9抗原结合分子对免疫细胞细胞因子分泌的影响可以通过任何合适的方式确定。例如,GAL9抗原结合分子对免疫细胞细胞因子分泌的影响可以在体内、离体或体外确定。在一些实施方案中,细胞因子分泌在与GAL9抗原结合分子接触的活化免疫细胞中确定,相比较于与对照剂例如对照抗原结合分子或媒介物对照的活化免疫细胞进行比较。免疫细胞可以通过肽的刺激而被激活。例如,免疫细胞可由已知可诱发免疫反应的多肽或多个多肽激活。已知可诱发免疫反应的多个肽可以来自病原体的感染,诸如病毒感染或细菌感染。

[0127] 对照剂可以是阴性对照或阳性对照。在一些实施方案中,相对于阴性对照剂或阴性对照抗原结合分子,GAL9抗原结合分子增加了免疫细胞中的细胞因子分泌。在一些实施方案中,阴性对照抗原结合分子是一种不与GAL9结合的同种型对照结合分子。在一些实施方案中,阳性对照抗体是一种抗PD1抗体,诸如nivolumab。在一些实施例中,阳性对照抗体是GAL9对照抗体。GAL9对照抗体可以是Gal9抗体克隆RG9.1 (Cat.No.BE0218, InVivoMab Antibodies) 或RG9.35。RG9.1和RG9.35都在Fukushima A, Sumi T, Fukuda K, Kumagai N, Nishida T等(2008) Roles of galectin-9 in the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. Int Arch Allergy Immunol 146:36-43中描述,其全文通过引用并入本文。GAL9对照抗体可以是GAL9抗体克隆ECA42 (Cat.No.LS-C179449, LifeSpan BioScience)。GAL9对照抗体可以是GAL9抗体克隆108A2 (**BioLegend®** San Diego, CA)。在一些实施方案中,相对于对照抗体,GAL9抗原结合分子降低了免疫细胞中促炎细胞因子的分泌。在一些实施方案中,相对于对照抗体,GAL9抗原结合分子增加免疫细胞中抑制性细胞因子的细胞因子分泌。

[0128] 免疫细胞的细胞因子分泌可以通过任何合适的手段进行评估。仅作为例子,体外或离体免疫细胞培养模型的细胞因子分泌可以通过分析培养的细胞上清液的细胞因子含量,例如,通过细胞因子珠阵列来进行评估。

[0129] 在一些实施方案中,所述细胞因子是TNF- α 。在一些实施方案中,与本文所述的对照剂相比,GAL9抗原结合分子使活化的免疫细胞中TNF- α 的分泌减少了至少1%、5%、10%、

15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%。在一些实施方案中,与本文所述的对照剂相比,GAL9抗原结合分子使活化的免疫细胞中的TNF- α 分泌减少至少1%-5%,5-10%,10-15%,15-20%,20-25%,25-30%,30-35%,35%-40%,40-45%,45%-50%,50-55%,55%-60%,60-65%,70%-75%,75%-80%,80-85%,或85-90%。在一些实施方案中,与本文所述的对照剂相比,GAL9抗原结合分子使活化的免疫细胞中TNF- α 的分泌减少了大约30%-50%。

[0130] 在一些实施方案中,该细胞因子是IFN- γ 。在一些实施方案中,与本文所述的对照剂相比,GAL9抗原结合分子使活化的免疫细胞中IFN- γ 的分泌至少减少1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%。在一些实施方案中,与本文所述的对照剂相比,GAL9抗原结合分子使活化的免疫细胞中的IFN- γ 分泌减少至少10-15%、15-20%、20-25%、25-30%、30-35%、35-40%、40%-45%、45%-50%、50%-55%、55%-60%、60%-65%、或70%-75%。在一些实施方案中,与本文所述的对照剂相比,GAL9抗原结合分子使活化的免疫细胞中IFN- γ 的分泌减少了大约20%-40%。

[0131] 在一些实施方案中,该细胞因子是IL-10。在一些实施方案中,与本文所述的对照剂相比,GAL9抗原结合分子使活化的免疫细胞中的IL-10分泌增加至少1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、或50%。在一些实施方案中,与本文所述的对照剂相比,GAL9抗原结合分子使活化的免疫细胞中的IL-10分泌增加至少1%-5%,5%-10%,10-15%,15-20%,20-25%,25-30%,30-35%,35-40%,40-45%,或45%-50%。在一些实施方案中,与本文所述的对照剂相比,GAL9抗原结合分子使活化的免疫细胞中IL-10的分泌增加约5%-30%。

[0132] 在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,GAL9抗原结合分子在与其接触后不调节免疫检查点分子(例如,刺激性或抑制性检查点分子)的表面表达。术语“不调节”是指用本文提供的GAL9结合分子处理后,与对照剂相比,免疫检查点分子的表达没有实质性增加或减少。在一些实施方案中,表面表达没有实质性增加(例如,不调节表达)是指相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,细胞表面表达的增加不超过1.01X、1.02X、1.03X、1.04X、1.05X、1.06X、1.07X、1.08X、1.09X、1.1X、1.2X或1.3X倍变化。在一些实施方案中,表面表达无实质性减少(例如,不调节表达)是指相对于用对照剂处理的活化免疫细胞而言,细胞表面表达的减少不超过0.01X、0.02X、0.03X、0.04X、0.05X、0.06X、0.07X、0.08X、0.09X、0.1X或0.2X倍变化。

[0133] 在一些实施方案中,表面表达无实质性增加(例如,不调节表达)是指相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,表面表达的约1%增加、2%增加、3%增加、4%增加、5%增加、6%增加、7%增加、8%增加、9%增加、10%增加、11%增加、12%增加、13%增加、14%增加、或15%增加的增加。在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化免疫细胞,表面表达没有实质性的减少(例如,不调节表达)是指表面表达的约1%减少、2%减少、3%减少、4%减少、5%减少、6%减少、7%减少、8%减少、9%减少、10%减少、11%减少、12%减少、13%减少、14%减少或15%减少的减少。

[0134] 在一些实施方案中,表面表达没有实质性的增加或减少是通过将表面表达水平与检测中的噪音水平(例如,体内、离体或体外)相比较而确定的。在一些实施方案中,通过比较表面表达水平与检测中的标准偏差(如体内、离体或体外)来确定表面表达没有实质性增

加或减少。

[0135] GAL9抗原结合分子对一种或多种免疫检查点分子的表面表达的影响可以通过任何合适的手段确定。例如, GAL9抗原结合分子对一种或多种共刺激分子的表面表达的影响可以在体内、离体或体外确定。

[0136] 在一些实施方案中, 一种或多种免疫检查点分子选自PD-1、PD-L1、CTLA-4、TIM3、LAG3、TIGIT和PVRIG。在一些实施方案中, 一个或多个检查点分子选自PD-1、PD-L1、TIM3和LAG3。在一些实施方案中, 免疫检查点分子是PD-1或PD-L1。在多种实施方案中, 激活的(例如, 刺激的)免疫细胞是T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、CD3⁺T细胞, 或PBMC。

[0137] 在一些实施方案中, 所述免疫检查点分子是PD-1。在一些实施方案中, 相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞, 用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺或CD4⁺T细胞在PD-1表面表达中呈现出 $\leq 1.01X$ 、 $\leq 1.02X$ 、 $\leq 1.03X$ 、 $\leq 1.04X$ 、 $\leq 1.05X$ 、 $\leq 1.06X$ 、 $\leq 1.07X$ 、 $\leq 1.08X$ 、 $\leq 1.09X$ 、 $\leq 1.1X$ 、 $\leq 1.2X$ 或 $\leq 1.3X$ 倍的变化增加。在一些实施方案中, 相对于用对照剂处理的活化CD4⁺或CD8⁺T细胞, 用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺或CD4⁺T细胞在PD-1表面表达中呈现出 $\leq 0.01X$ 、 $\leq 0.02X$ 、 $\leq 0.03X$ 、 $\leq 0.04X$ 、 $\leq 0.05X$ 、 $\leq 0.06X$ 、 $\leq 0.07X$ 、 $\leq 0.08X$ 、 $\leq 0.09X$ 、 $\leq 0.1X$ 、或 $\leq 0.2X$ 倍的变化减少。

[0138] 在一些实施方案中, 用GAL9抗原结合分子处理的活化的CD8⁺或CD4⁺T细胞表现出相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞的PD-1表面表达的 $\leq 1\%$ 的增加、 $\leq 2\%$ 的增加、 $\leq 3\%$ 的增加、 $\leq 4\%$ 的增加、 $\leq 5\%$ 的增加、 $\leq 6\%$ 的增加、 $\leq 7\%$ 的增加、 $\leq 8\%$ 的增加、 $\leq 9\%$ 的增加、 $\leq 10\%$ 的增加、 $\leq 11\%$ 的增加、 $\leq 12\%$ 的增加、 $\leq 13\%$ 的增加、 $\leq 14\%$ 的增加或 $\leq 15\%$ 的增加。在一些实施方案中, 用GAL9抗原结合分子处理的活化的CD8⁺或CD4⁺T细胞表现出相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞在PD-1表面表达中 $\leq 1\%$ 减少, $\leq 2\%$ 减少, $\leq 3\%$ 减少, $\leq 4\%$ 减少, $\leq 5\%$ 减少, $\leq 6\%$ 减少, $\leq 7\%$ 减少, $\leq 8\%$ 减少, $\leq 9\%$ 减少, $\leq 10\%$ 减少, $\leq 11\%$ 减少, $\leq 12\%$ 减少, $\leq 13\%$ 减少, $\leq 14\%$ 减少, 或 $\leq 15\%$ 减少。

[0139] 在一些实施方案中, 免疫检查点分子是PD-L1。在一些实施方案中, 相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞, 用GAL9抗原结合分子处理的活化的CD8⁺或CD4⁺T细胞在PD-L1表面表达中呈现出 $\leq$ 倍数变化。在一些实施方案中, 相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞, 用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺或CD4⁺T细胞在PD-L1表面表达中呈现出 $\leq 1.01X$ 、 $\leq 1.02X$ 、 $\leq 1.03X$ 、 $\leq 1.04X$ 、 $\leq 1.05X$ 、 $\leq 1.06X$ 、 $\leq 1.07X$ 、 $\leq 1.08X$ 、 $\leq 1.09X$ 、 $\leq 1.1X$ 、 $\leq 1.2X$ 或 $\leq 1.3X$ 倍的变化增加。在一些实施方案中, 相对于用对照剂处理的活化CD4⁺或CD8⁺T细胞, 用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺或CD4⁺T细胞在PD-L1表面表达中呈现出 $\leq 0.01X$ 、 $\leq 0.02X$ 、 $\leq 0.03X$ 、 $\leq 0.04X$ 、 $\leq 0.05X$ 、 $\leq 0.06X$ 、 $\leq 0.07X$ 、 $\leq 0.08X$ 、 $\leq 0.09X$ 、 $\leq 0.1X$ 、或 $\leq 0.2X$ 倍的变化减少。

[0140] 在一些实施方案中, 用GAL9抗原结合分子处理的活化的CD8⁺或CD4⁺T细胞表现出相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞的PD-L1表面表达的 $\leq 1\%$ 的增加、 $\leq 2\%$ 的增加、 $\leq 3\%$ 的增加、 $\leq 4\%$ 的增加、 $\leq 5\%$ 的增加、 $\leq 6\%$ 的增加、 $\leq 7\%$ 的增加、 $\leq 8\%$ 的增加、 $\leq 9\%$ 的增加、 $\leq 10\%$ 的增加、 $\leq 11\%$ 的增加、 $\leq 12\%$ 的增加、 $\leq 13\%$ 的增加、 $\leq 14\%$ 的增加或 $\leq 15\%$ 的增加。在一些实施方案中, 用GAL9抗原结合分子处理的活化的CD8⁺或CD4⁺T细胞表现出相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞在PD-L1表面表达中 $\leq 1\%$ 减少, $\leq 2\%$ 减少, $\leq 3\%$ 减少, $\leq 4\%$ 减少, $\leq 5\%$ 减少, $\leq 6\%$ 减少, $\leq 7\%$ 减少, $\leq 8\%$ 减少, $\leq 9\%$ 减少, $\leq 10\%$ 减少, $\leq 11\%$ 减少, $\leq 12\%$ 减少, $\leq 13\%$ 减少, $\leq 14\%$ 减少, 或 $\leq 15\%$ 减少。

[0141] 在一些实施方案中,所述免疫检查点分子是CTLA-4。在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞,用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺或CD4⁺T细胞在CTLA-4表面表达中呈现出 $\leq 1.01X$ 、 $\leq 1.02X$ 、 $\leq 1.03X$ 、 $\leq 1.04X$ 、 $\leq 1.05X$ 、 $\leq 1.06X$ 、 $\leq 1.07X$ 、 $\leq 1.08X$ 、 $\leq 1.09X$ 、 $\leq 1.1X$ 、 $\leq 1.2X$ 或 $\leq 1.3X$ 倍的变化的增加。在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化CD4⁺或CD8⁺T细胞,用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺或CD4⁺T细胞在CTLA-4表面表达中呈现出 $\leq 0.01X$ 、 $\leq 0.02X$ 、 $\leq 0.03X$ 、 $\leq 0.04X$ 、 $\leq 0.05X$ 、 $\leq 0.06X$ 、 $\leq 0.07X$ 、 $\leq 0.08X$ 、 $\leq 0.09X$ 、 $\leq 0.1X$ 、或 $\leq 0.2X$ 倍的变化的减少。

[0142] 在一些实施方案中,用GAL9抗原结合分子处理的活化的CD8⁺或CD4⁺T细胞表现出相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞的CTLA-4表面表达的 $\leq 1\%$ 的增加、 $\leq 2\%$ 的增加、 $\leq 3\%$ 的增加、 $\leq 4\%$ 的增加、 $\leq 5\%$ 的增加、 $\leq 6\%$ 的增加、 $\leq 7\%$ 的增加、 $\leq 8\%$ 的增加、 $\leq 9\%$ 的增加、 $\leq 10\%$ 的增加、 $\leq 11\%$ 的增加、 $\leq 12\%$ 的增加、 $\leq 13\%$ 的增加、 $\leq 14\%$ 的增加或 $\leq 15\%$ 的增加的增加。在一些实施方案中,用GAL9抗原结合分子处理的活化的CD8⁺或CD4⁺T细胞表现出相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞在CTLA-4表面表达中 $\leq 1\%$ 减少、 $\leq 2\%$ 减少、 $\leq 3\%$ 减少、 $\leq 4\%$ 减少、 $\leq 5\%$ 减少、 $\leq 6\%$ 减少、 $\leq 7\%$ 减少、 $\leq 8\%$ 减少、 $\leq 9\%$ 减少、 $\leq 10\%$ 减少、 $\leq 11\%$ 减少、 $\leq 12\%$ 减少、 $\leq 13\%$ 减少、 $\leq 14\%$ 减少,或 $\leq 15\%$ 减少的减少。

[0143] 在一些实施方案中,所述免疫检查点分子是TIM3。在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞,用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺或CD4⁺T细胞在TIM3表面表达中呈现出 $\leq 1.01X$ 、 $\leq 1.02X$ 、 $\leq 1.03X$ 、 $\leq 1.04X$ 、 $\leq 1.05X$ 、 $\leq 1.06X$ 、 $\leq 1.07X$ 、 $\leq 1.08X$ 、 $\leq 1.09X$ 、 $\leq 1.1X$ 、 $\leq 1.2X$ 或 $\leq 1.3X$ 倍的变化的增加。在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化CD4⁺或CD8⁺T细胞,用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺或CD4⁺T细胞在TIM3表面表达中呈现出 $\leq 0.01X$ 、 $\leq 0.02X$ 、 $\leq 0.03X$ 、 $\leq 0.04X$ 、 $\leq 0.05X$ 、 $\leq 0.06X$ 、 $\leq 0.07X$ 、 $\leq 0.08X$ 、 $\leq 0.09X$ 、 $\leq 0.1X$ 、或 $\leq 0.2X$ 倍的变化减少。

[0144] 在一些实施方案中,用GAL9抗原结合分子处理的活化的CD8⁺或CD4⁺T细胞表现出相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞的TIM3表面表达的 $\leq 1\%$ 的增加、 $\leq 2\%$ 的增加、 $\leq 3\%$ 的增加、 $\leq 4\%$ 的增加、 $\leq 5\%$ 的增加、 $\leq 6\%$ 的增加、 $\leq 7\%$ 的增加、 $\leq 8\%$ 的增加、 $\leq 9\%$ 的增加、 $\leq 10\%$ 的增加、 $\leq 11\%$ 的增加、 $\leq 12\%$ 的增加、 $\leq 13\%$ 的增加、 $\leq 14\%$ 的增加或 $\leq 15\%$ 的增加的增加。在一些实施方案中,用GAL9抗原结合分子处理的活化的CD8⁺或CD4⁺T细胞表现出相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞在TIM3表面表达中 $\leq 1\%$ 减少、 $\leq 2\%$ 减少、 $\leq 3\%$ 减少、 $\leq 4\%$ 减少、 $\leq 5\%$ 减少、 $\leq 6\%$ 减少、 $\leq 7\%$ 减少、 $\leq 8\%$ 减少、 $\leq 9\%$ 减少、 $\leq 10\%$ 减少、 $\leq 11\%$ 减少、 $\leq 12\%$ 减少、 $\leq 13\%$ 减少、 $\leq 14\%$ 减少,或 $\leq 15\%$ 减少的减少。

[0145] 在一些实施方案中,所述免疫检查点分子是LAG3。在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞,用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺或CD4⁺T细胞在LAG3表面表达中呈现出 $\leq 1.01X$ 、 $\leq 1.02X$ 、 $\leq 1.03X$ 、 $\leq 1.04X$ 、 $\leq 1.05X$ 、 $\leq 1.06X$ 、 $\leq 1.07X$ 、 $\leq 1.08X$ 、 $\leq 1.09X$ 、 $\leq 1.1X$ 、 $\leq 1.2X$ 或 $\leq 1.3X$ 倍的变化的增加。在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化CD4⁺或CD8⁺T细胞,用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺或CD4⁺T细胞在LAG3表面表达中呈现出 $\leq 0.01X$ 、 $\leq 0.02X$ 、 $\leq 0.03X$ 、 $\leq 0.04X$ 、 $\leq 0.05X$ 、 $\leq 0.06X$ 、 $\leq 0.07X$ 、 $\leq 0.08X$ 、 $\leq 0.09X$ 、 $\leq 0.1X$ 、或 $\leq 0.2X$ 倍的变化减少。在一些实施方案中,用GAL9抗原结合分子处理的活化的CD8⁺或CD4⁺T细胞表现出相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞的LAG3表面表达的 $\leq 1\%$ 的增加、 $\leq 2\%$ 的增加、 $\leq 3\%$ 的增加、 $\leq 4\%$ 的增加、 $\leq 5\%$ 的增加、 $\leq 6\%$ 的增加、 $\leq 7\%$ 的增加、 $\leq 8\%$ 的增加、 $\leq 9\%$

的增加、10%的增加、11%的增加、12%的增加、13%的增加、14%的增加或15%的增加的增加。在一些实施方案中,用GAL9抗原结合分子处理的活化的CD8⁺或CD4⁺T细胞表现出相对于用对照剂处理的活化的CD4⁺或CD8⁺T细胞在LAG3表面表达中不超过1%减少,2%减少,3%减少,4%减少,5%减少,6%减少,7%减少,8%减少,9%减少,10%减少,11%减少,12%减少,13%减少,14%减少,或15%减少的减少。

[0146] 在某些实施方案中,GAL9抗原结合分子降低免疫细胞(例如人类免疫细胞)上一种或多种共刺激分子的表面表达。在某些实施方案中,GAL9抗原结合分子降低了激活的免疫细胞中的一种或多种共刺激分子的表面表达。在特定的实施方案中,激活的免疫细胞是T细胞。在具体的实施方案中,激活的免疫细胞是CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,一个或多个共刺激分子选自4-1BB、CD40L和OX40。在一些实施方案中,一个或多个共刺激分子选自4-1BB和CD40L。在一些实施方案中,共刺激分子是OX40。

[0147] GAL9抗原结合分子对一种或多种共刺激分子的表面表达的影响可通过任何合适的手段确定。例如,可以在体内、离体或体外确定GAL9抗原结合分子对一种或多种共刺激分子的表面表达的影响。

[0148] 在一些实施方案中,与用对照剂处理的活化免疫细胞相比,GAL9抗原结合分子降低了活化免疫细胞上一种或多种共刺激分子的表面表达。本文描述了示例性的对照剂。在特定的实施方案中,对照剂是一种不与GAL9结合的同种型对照结合分子。

[0149] 在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞,GAL9抗原结合分子降低了4-1BB在活化CD8⁺T细胞上的表面表达。在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞,用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺T细胞的4-1BB表面表达至少减少约0.1X减少,0.2X减少,0.3X减少,0.4X减少,0.5X减少,或0.6X减少。在一些实施方案中,用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺T细胞,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞,其4-1BB表面表达下降了约0.1X-.2X减少,0.2X-.3X减少,0.3X-0.4X减少,0.4X-0.5X减少,或0.5X-0.6X减少。

[0150] 在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞,GAL9抗原结合分子降低了活化CD8⁺T细胞的CD40L表面表达。在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞,用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺T细胞的CD40L表面表达至少减少约0.1X减少,0.2X减少,0.3X减少,0.4X减少,0.5X减少,或0.6X减少。在一些实施方案中,用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺T细胞,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞,CD40L表面表达约减少0.1X-.2X减少,0.2X-.3X减少,0.3X-0.4X减少,0.4X-0.5X减少,或0.5X-0.6X减少。⁺

[0151] 在一些实施方案中,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞,GAL9抗原结合分子降低了活化CD8⁺T细胞的OX40表面表达⁺。在一些实施方案中,用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺T细胞,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞,OX40表面表达至少减少0.1X减少,0.2X减少,0.3X减少,0.4X减少,0.5X减少,或0.6X减少。在一些实施方案中,用GAL9抗原结合分子处理的活化CD8⁺T细胞,相对于用对照剂处理的活化CD8⁺T细胞,OX40表面表达约减少0.1X-.2X减少,0.2X-.3X减少,0.3X-0.4X减少,0.4X-0.5X减少,或0.5X-0.6X减少。

[0152] 本公开还提供了具有各种临床益处的GAL9抗原结合分子,其改善了患有自身免疫性或炎症性疾病的受试者的健康。该受试者可以是哺乳动物。该哺乳动物可以是小鼠。在一些实施方案中,该哺乳动物是人类。

[0153] 在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子减少受试者中的自身免疫反应。在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子减少受试者中的炎症。炎症可以是全身性的,也可以是在器官或组织中的局部的。在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子延长了受试者的疾病或病况的缓解期。在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子能诱导受试者的缓解。在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子在受试者中重新建立免疫耐受(例如,改善细胞因子谱或环境)。重建免疫耐受可以是促炎性细胞因子的减少,抑制性细胞因子的增加,或其组合。在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子改善了受试者的器官功能。在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子降低了疾病进展或发生第二种疾病如癌症或感染的风险/可能性。在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子提高了受试者的总体生存。

6.4.2.可变区

[0154] 在典型的实施方案中,GAL9结合分子具有抗体的可变区域氨基酸序列,包括VH和VL抗体结构域序列。VH和VL序列在下文第6.4.2.1和6.4.2.2节中分别进行了更详细的描述。

6.4.2.1.VH区域

[0155] 在典型的实施方案中,本文所述的GAL9结合分子包括抗体重链可变结构域序列。在自然界和本文所述的GAL9结合分子中的典型抗体排列中,特定的VH氨基酸序列与特定的VL氨基酸序列结合,形成抗原结合位点。在各种实施方案中,VH氨基酸序列是哺乳动物序列,包括人类序列、合成序列或非人类哺乳动物、哺乳动物和/或合成序列的组合,如上文第6.4.2.3和6.4.2.4节中进一步详细描述。在各种实施方案中,VH氨基酸序列是自然存在序列的突变序列。

6.4.2.2.VL区域

[0156] 本文所述的GAL9结合分子中有用的VL氨基酸序列是抗体轻链可变域序列。在天然抗体和本文所述的抗体构建体的典型排列中,特定的VL氨基酸序列与特定的VH氨基酸序列结合,形成抗原结合位点。在不同的实施方案中,VL氨基酸序列是哺乳动物序列,包括人类序列、合成序列或人类、非人类哺乳动物、哺乳动物和/或合成的序列的组合,如下文6.4.2.3和6.4.2.4节中进一步详细描述的。

[0157] 在各种实施方案中,VL氨基酸序列是自然存在序列的变异序列。在某些实施方案中,VL氨基酸序列是 λ (lambda) 轻链可变域序列。在某些实施方案中,VL氨基酸序列是 κ (kappa) 轻链可变域序列。在一个优选的实施方案中,VL氨基酸序列是 κ (kappa) 轻链可变结构域序列。

6.4.2.3.互补决定区

[0158] VH和VL氨基酸序列包含被称为“互补决定区”(CDR)的高度可变序列,其通常是三个CDR(CDR1、CDR2和CDR3)。在各种实施方案中,CDR是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔子、骆驼、驴、山羊和人序列。在一个优选的实施方案中,CDR是人类序列。在各种实施方案中,CDR是天然存在的序列。在不同的实施方案中,CDR是已经过突变以改变抗原结合位点对特定抗原或表位的结合亲和力的天然存在序列。在某些实施方案中,天然存在的CDR在宿主体内通过亲和力成熟和体细胞高频突变进行了突变。在某些实施方案中,CDR通过包括但不限于PCR诱变和化学诱变的方法在体外进行了突变。在多种实施方案中,CDR是合成的序列,包括但不限于从随机序列CDR库和合理设计的CDR库获得的CDR。Martin编号方

案被用来确定CDR的边界。见图1A-1B,适用于本文提供的P9-01抗人GAL9候选物。

[0159] 在多种实施方案中,对确定为与目的抗原结合的CDR进一步突变(即,“亲和力成熟”),以实现所需的结合特性,诸如相对于原始CDR的对目的抗原的亲和力增加。例如,可以使用简并寡核苷酸有针对性地将多样性引入CDR,包括那些被确定为与目的抗原结合的CDR。各种随机化方案可以被采用。例如,可以使用“软随机化(soft-randomization)”,在一个给定的氨基酸位置提供一个高度偏向野生型序列的特性,例如允许CDR中的一个给定位置在所有20个氨基酸中变化,同时通过在每个密码子位置的四个碱基的非等效水平的掺入而偏向野生型序列。作为软随机化的一个说明性例子,如果希望达到大约50%的野生型序列,每个密码子的每个碱基保持70%的野生型和10%的每个其他核苷酸,并使用简并寡核苷酸,以围绕选定的CDR制作一个聚焦噬菌体库(focused phage library),所得的噬菌体颗粒根据需要在各种严格的选择条件下用于噬菌体淘选。

6.4.2.4. 框架区和CDR嫁接(grafting)

[0160] VH和VL的氨基酸序列包含“框架区”(FR)序列。FRs通常是保守的序列区域,作为穿插CDR的支架(见第6.4.2.3节),通常以FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4排列(从N端到C端)。在各种实施方案中,FR是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔子、骆驼、驴、山羊和人类序列。在一个优选的实施方案中,FR是人类序列。在各种实施方案中,FRs是自然存在序列。在不同的实施方案中,FR是合成的序列,包括但不限于合理设计的序列。

[0161] 在各种实施方案中,FRs和CDR都来自相同的自然存在可变结构域序列。在各种实施方案中,FR和CDR来自不同的可变结构域序列,其中CDR被嫁接到FR支架上,CDR提供对特定抗原的特异性。在某些实施方案中,嫁接的CDR都来自同一天然存在的可变结构域序列。在某些实施方案中,嫁接的CDR来自不同的可变结构域序列。在某些实施方案中,嫁接的CDR是合成的序列,包括但不限于从随机序列CDR库和合理设计的CDR库获得的CDR。在某些实施方案中,嫁接的CDR和FR来自同一物种。在某些实施方案中,嫁接的CDR和FR来自不同的物种。在一个优选的嫁接CDR实施方案中,抗体是“人源化的”,其中嫁接的CDR是非人类哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔子、骆驼、驴和山羊序列,而FR是人类序列。人源化抗体在美国专利6,407,213号中有更详细的讨论。该专利的全部内容在此通过引用并入。在多种实施方案中,一个物种的FR的部分或特定序列被用来替换另一个物种的FR的部分或特定序列。

6.4.3. GAL9结合分子的示例性氨基酸序列

[0162] 在各种实施方案中,GAL9结合分子包含特定的VH CDR3 (CDR-H3) 序列和特定的VL CDR3 (CDR-L3) 序列。

[0163] 在一些实施方案中,GAL9结合分子包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的CDR-H3和CDR-L3。所述ABS克隆的VH CDR氨基酸序列在表3中公开。所述ABS克隆的VL CDR氨基酸序列在表4中公开。为清楚起见,每个GAL9 ABS克隆都被分配一个独特的ABS克隆编号,其在本公开中自始至终使用。

[0164] 在一个目前优选的实施方案中,GAL9结合分子包含ABS克隆P9-11的CDR-H3和CDR-L3。

[0165] 在一些实施方案中,GAL9结合分子包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的全部三个VH CDR。在一个目前优选的实施方案中,GAL9结合分子包含ABS克隆P9-11的全部三个VH CDR。

[0166] 在一些实施方案中,GAL9结合分子包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的全部三个VL CDR。在一个目前优选的实施方案中,GAL9结合分子包含ABS克隆P9-11的全部三个VL CDR。

[0167] 在一些实施方案中,GAL9结合分子包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的全部六个CDR。在一个目前优选的实施方案中,GAL9结合分子包含ABS克隆P9-11的全部六个CDR。

[0168] 在一些实施方案中,GAL9结合分子包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的VH氨基酸序列、VL氨基酸序列,或VH和VL氨基酸序列。表6中提供了完整的免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链序列,以及VH和VL氨基酸序列。在一个目前优选的实施方案中,GAL9结合分子包含来自ABS克隆P9-11的VH氨基酸序列,VL氨基酸序列,或VH和VL氨基酸序列。

[0169] 在一些实施方案中,GAL9结合分子包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的完整IgG重链序列和完整IgG轻链序列。在一个目前优选的实施方案中,GAL9结合分子包含来自ABS克隆P9-11的完整IgG重链序列和完整IgG轻链序列。

6.4.4. 恒定区

[0170] 在一些实施方案中,GAL9结合分子包含抗体恒定区结构域序列。如本文所述,恒定区结构域氨基酸序列是抗体的恒定区结构域的序列。恒定区域可以指CH1、CH2、CH3、CH4或CL恒定结构域。

[0171] 在各种实施方案中,恒定区序列是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔子、骆驼、驴、山羊和人类序列。在一个优选的实施方案中,恒定区域序列是人类序列。在某些实施方案中,恒定区序列来自抗体轻链。在特定的实施方案中,恒定区序列来自 λ 或 κ 轻链。在某些实施方案中,恒定区序列来自抗体重链。在特定的实施方案中,恒定区序列是一种抗体重链序列,其是IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM同种型。在一个具体的实施方案中,恒定区序列来自IgG同种型。在一个优选的实施方案中,恒定区序列来自IgG1同种型。

[0172] 示例性的恒定区域及其修饰描述于W02018075692,其全部内容在此通过引用并

入。

6.4.4.1.CH1和CL区域

[0173] CH1氨基酸序列,如本文所述,参照从N端到C端的原生抗体重链架构,是抗体重链第二结构域的序列。在某些实施方案中,CH1序列是内源性序列。在多种实施方案中,CH1序列是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔子、骆驼、驴、山羊和人类序列。在一个优选的实施方案中,CH1序列是人类序列。在某些实施方案中,CH1序列来自IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM同种型。在一个优选的实施方案中,CH1序列来自IgG1同种型。在优选的实施方案中,CH1序列是UniProt登录号P01857氨基酸1-98。

[0174] 在本文所述的GAL9结合分子中有用的CL氨基酸序列是抗体轻链恒定结构域序列,参考原生抗体轻链结构。在某些实施方案中,CL序列是内源性序列。在各种实施方案中,CL序列是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔子、骆驼、驴、山羊和人类序列。在一个优选的实施方案中,CL序列是人类序列。

[0175] 在某些实施方案中,CL氨基酸序列是lambda (λ) 轻链恒定域序列。在特定的实施方案中,CL氨基酸序列是人类 λ 轻链恒定域序列。在优选的实施方案中,lambda (λ) 轻链序列是UniProt登录号P0CG04。

[0176] 在某些实施方案中,CL氨基酸序列是kappa (κ) 轻链恒定域序列。在一个优选的实施方案中,CL氨基酸序列是人kappa (κ) 轻链恒定域序列。在一个优选的实施方案中, κ 轻链序列是UniProt登录号P01834。

[0177] 在某些实施方案中,CH1序列和CL序列均为内源性序列。在某些实施方案中,CH1序列和CL序列分别包括内源性CH1和CL序列中的正交修饰,如下文第6.4.4.1节更详细地讨论的。CH1和CL序列也可以是其部分,无论是内源性序列还是修饰过的序列,从而具有CH1序列的结构域或其部分可以与具有CL序列的结构域或其部分相联系。

6.4.4.2.CH1和CL的正交修饰

[0178] 在某些实施方案中,CH1序列和CL序列分别包含内源性CH1和CL序列的正交修饰。一般来说,正交变异在下文第6.4.6.1-6.4.6.3节中有更详细的描述。

[0179] 在特定的实施方案中,内源性CH1和CL序列中的正交修饰是选自CH1序列的138位和CL序列的116位、CH1序列的128位和CL序列的119位、或CH1序列的129位和CL序列的210位的工程化的半胱氨酸的工程化的二硫桥,如在美国专利号8,053,562和美国专利号9,527,927(每篇均以其整体通过引用并入本文)中所编号和更详细地讨论的。在一个优选的实施方案中,工程化的半胱氨酸位于按Eu指数所编号的CH1序列的第128位和CL Kappa序列的第118位。

[0180] 在一系列优选的实施方案中,提供非内源性半胱氨酸氨基酸的突变是如Eu指数所编号的CL序列中的F118C突变与相应的CH1序列中的A141C,或CL序列中的F118C突变与相应的CH1序列中的L128C,或CL序列中的S162C突变与相应的CH1序列中的P171C突变。

[0181] 在各种实施方案中,CL序列和CH1序列的正交突变是电荷对突变。在具体的实施方案中,电荷对突变是CL序列中的F118S、F118A或F118V突变与CH1序列中相应的A141L,或CL序列中的T129R突变与CH1序列中相应的K147D,其如由Eu索引编号并在Bonisch等人(Protein Engineering, Design&Selection, 2017, pp.1-12)中更详细地描述,本文通过引用并入其所有教导。在一系列优选的实施方案中,电荷对突变是CL序列中的N138K突变与

CH1序列中相应的G166D,或CL序列中的N138D突变与CH1序列中相应的G166K,如按Eu指数编号。

6.4.4.3.CH2区域

[0182] 在本文所述的GAL9结合分子中,GAL9结合分子可以具有CH2氨基酸序列。CH2氨基酸序列,如本文所述,是抗体重链第三结构域的CH2氨基酸序列,参照从N端到C端的原生抗体重链架构。在各种实施方案中,CH2序列是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔子、骆驼、驴、山羊和人类序列。在一个优选的实施方案中,CH2序列是人类序列。在某些实施方案中,CH2序列来自IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgM同种型。在一个优选的实施方案中,CH2序列来自IgG1的同种型。

[0183] 在某些实施方案中,CH2序列是内源性序列。在特定的实施方案中,该序列是UniProt登录号P01857氨基酸111-223。

[0184] 在一系列实施方案中,GAL9结合分子具有一个以上成对的组的具有CH2序列的CH2结构域,其中第一组具有来自第一同种型的CH2氨基酸序列和来自另一同种型的一个或多个直系同源的组的CH2氨基酸序列。如本文所述,直系同源的CH2氨基酸序列能够与来自共同同种型的CH2氨基酸序列相互作用,但不能与GAL9结合分子中存在的来自另一同种型的CH2氨基酸序列发生明显的相互作用。在特定的实施方案中,所有组CH2氨基酸序列都来自同一物种。在优选的实施方案中,所有组的CH2氨基酸序列都是人类的CH2氨基酸序列。在其他实施方案中,各组CH2氨基酸序列来自不同物种。在具体的实施方案中,第一组CH2氨基酸序列与GAL9结合分子中的其他非CH2结构域来自同一同种型。在一个具体的实施方案中,第一组的CH2氨基酸序列来自IgG同种型,而一个或多个直系同源组具有来自IgM或IgE同种型的CH2氨基酸序列。在某些实施方案中,一组或多组CH2氨基酸序列是内源性的CH2序列。在其他实施方案中,一组或多组CH2氨基酸序列是具有一个或多个突变的内源性CH2序列。在特定的实施方案中,一个或多个突变是正交的knob-hole突变,正交的电荷对突变,或正交的疏水突变。对GAL9结合分子有用的正交CH2氨基酸序列在国际PCT申请W02017/011342和W02017/106462中有更详细的描述,本文通过引用将其全部内容并入。

6.4.4.4.CH3区域

[0185] 本文所述的CH3氨基酸序列是抗体重链的C端结构域的序列,参照从N端到C端的原生抗体重链结构。

[0186] 在各种实施方案中,CH3序列是哺乳动物序列,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、骆驼、驴、山羊和人类序列。在一个优选的实施方案中,CH3序列是人类序列。在某些实施方案中,CH3序列来自IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4同种型或来自IgE或IgM同型的CH4序列。在一个具体的实施方案中,CH3序列来自IgG同种型。在一个优选的实施方案中,CH3序列来自IgG1同种型。

[0187] 在某些实施方案中,CH3序列是内源性序列。在特定的实施方案中,CH3序列是UniProt登录号P01857氨基酸224-330。在多种实施方案中,CH3序列是内源性CH3序列的区段。在特定的实施方案中,CH3序列具有缺乏N端氨基酸G224和Q225的内源性CH3序列。在特定的实施方案中,CH3序列具有缺乏C-末端的氨基酸P328、G329和K330的内源性CH3序列。在特别的实施方案中,CH3序列具有既缺乏N端氨基酸G224和Q225,又缺乏C端氨基酸P328、G329和K330的内源性CH3序列。在优选的实施方案中,一个GAL9结合分子有多个具有CH3序

列的结构域,其中CH3序列既可以指完整的内源性CH3序列,也可以指缺乏N端氨基酸、C端氨基酸或两者的CH3序列。

[0188] 在某些实施方案中,CH3序列是具有一个或多个突变的内源性序列。在特定的实施方案中,突变是一个或多个正交突变,这些突变被引入到内源性CH3序列中以指导特定CH3序列的特定配对,如下文6.4.6.1-6.4.6.3节中更详细地描述。

[0189] 在某些实施方案中,CH3序列被工程化为通过一个同种异型 (allotype) 的特定氨基酸被另一同种异型的氨基酸替换来降低抗体的免疫原性,在此称为isoallotype突变,如Stickler等人 (Genes Immun. 2011Apr;12 (3) :213-221) 中更详细地描述,该文献通过引用而并入其所有教导。在特定的实施方案中,G1m1同种异型的特定氨基酸被替换。在一个优选的实施方案中,在CH3序列中作出isoallotype突变D356E和L358M。

[0190] 在一些实施方案中,IgG1 CH3氨基酸序列包括以下突变变化:P343V;Y349C;和一个三肽插入,445P,446G,447K。在其他优选的实施方案中,结构域B具有人IgG1 CH3序列,具有以下突变的变化:T366K;和一个三肽插入,445K,446S,447C。在其他优选的实施方案中,结构域B具有人IgG1 CH3序列,具有以下突变的变化:Y349C和一个三肽插入,445P,446G,447K。

[0191] 在一些实施方案中,IgG1 CH3氨基酸序列包括纳入其他内源性CH3序列中的447C突变。

6.4.5. 抗原结合位点

[0192] 在一些实施方案中,一个VL或VH氨基酸序列和一个同源的VL或VH氨基酸序列相关联并形成第一抗原结合位点 (ABS)。抗原结合位点 (ABS) 能够特异性地结合抗原的表位。下面第6.4.5.1节更详细地描述了抗原结合位点的抗原结合。

[0193] 在另一个实施方案中,例如,其中GAL9结合分子是单域抗体,VH或VL氨基酸序列形成第一ABS。

[0194] 在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子包含第二ABS。在一些实施方案中,第二ABS对与第一ABS相同的GAL9抗原具有特异性。在一些实施方案中,第二种ABS与第一种ABS特异性地结合同一GAL9抗原的同一表位。在一些实施方案中,第二ABS与第一ABS相同。

[0195] 在一些实施方案中,第二ABS对第一GAL9抗原的不同表位具有特异性。例如,如果第一ABS包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中任何一个ABS克隆的CDR或可变结构域。第二ABS可以包含来自选自P9-01、P9-02A、P9-03、P9-06、P9-07、P9-11、P9-12、P9-14、P9-23、P9-24、P9-25、P9-29、P9-30、P9-34、P9-37、P9-38、P9-40、P9-41、P9-42、P9-43、P9-44、P9-45、P9-46、P9-50、P9-51、P9-52、P9-53、P9-56和P9-57中另一个ABS克隆的CDR或可变结构域。

[0196] 在一些实施方案中,GAL9抗原结合分子是多特异性的,例如,GAL9抗原结合分子的第二ABS特异性地结合了与第一ABS特异性结合的GAL9抗原不同的抗原。

6.4.5.1. 抗原与ABS的结合

[0197] ABS,以及包括该ABS的GAL9结合分子,被称为“识别”ABS与其特异性结合的该表位(或更通常地,该抗原),并且该表位(或更通常地,该抗原)被称为该ABS的“识别特异性”或“

结合特异性”。

[0198] 据说ABS以特定的亲和力与它的特定抗原或表位结合。如本文所述,“亲和力”是指一个分子和另一个分子之间的非共价分子间力的相互作用的强度。亲和力,即相互作用的强度,可以表示为解离平衡常数(K_D),其中较低的 K_D 值指的是分子之间更强的相互作用。抗体构建体的 K_D 值的测量是通过本领域众所周知的方法,包括但不限于生物层干涉仪(如**Octet/FORTEBIO**[®]),表面等离子体共振 (SPR) 技术(例如**Biacore**[®])和细胞结合试验。为了本文的目的,亲和力是指通过使用**Octet/FORTEBIO**[®]的生物层干涉测量法的解离平衡常数。

[0199] 本文所用的“特异性结合”是指ABS与其同源抗原或表位之间的亲和力,其中 K_D 值低于 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M。

[0200] 本文所述的GAL9结合分子中ABS的数量定义了GAL9结合分子的“价”。一个具有单个ABS的GAL9结合分子是“单价”。具有多个ABS的GAL9结合分子被称为“多价”。有两个ABS的多价GAL9结合分子是“二价”。有三个ABS的多价GAL9结合分子是“三价”。有四个ABS的多价GAL9结合分子是“四价”。

[0201] 在各种多价的实施方案中,所有的多个ABS具有相同的识别特异性。这样的GAL9结合分子是“单特异性”“多价性”结合构建体。在其他多价的实施方案中,多个ABS中至少有两个具有不同的识别特异性。这样的GAL9结合分子是多价的和“多特异性”的。在ABS集体具有两种识别特异性的多价实施方案中,GAL9结合分子是“双特异性”。在ABS集体具有三个识别特异性的多价实施方案中,GAL9结合分子是“三特异性”。

[0202] 在ABS对存在于同一抗原上的不同表位集体地具有多种识别特异性的多价实施方案中,GAL9结合分子是“多互补位 (multiparatopic)”的。在ABS共同识别同一抗原上的两个表位的多价实施方案中,是“双互补位 (biparatopic)”。

[0203] 在各种多价实施方案中,GAL9结合分子的多价性提高了GAL9结合分子对特定目标的亲合力 (avidity)。如本文所述,“亲合力”是指两个或多个分子之间相互作用的总体强度,例如,多价GAL9结合分子对特定目标的作用,其中亲合力是由多个ABS的亲和力提供的累积作用强度。亲合力可以通过与上述用于确定亲和力的相同方法来测量。在某些实施方案中,GAL9结合分子对特定目标的亲合力是这样的,即相互作用是一种特定的结合相互作用,其中两个分子之间的亲合力的 K_D 值低于 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M。在某些实施方案中,GAL9结合分子对特定目标的亲合力具有一个 K_D 值,使该相互作用为特异性结合相互作用,其中单个ABS的一个或多个亲和力不具有符合单独结合其各自抗原或表位的 K_D 值。在某些实施方案中,亲合力是由多个ABS对共享的特定目标或复合物(诸如在单个细胞上发现的单独抗原)上的单独抗原的亲和力所提供的相互作用的累积强度。在某些实施方案中,亲合力是由多个ABS对共同个别抗原上的单独表位的亲和力提供的累积的相互作用强度。

6.4.6. 正交修饰

[0204] 在本文所述的GAL9结合分子中,GAL9结合分子可以具有包含正交修饰的恒定区域结构域。恒定区域域的氨基酸序列在上文第6.4.4节中有更详细的描述。

[0205] 本文所述的“正交修饰”或同义的“正交突变”是抗体结构域的氨基酸序列中的一个或多个工程化突变,这些突变增加了具有正交修饰的第一结构域与具有互补的正交修饰

的第二结构域的结合亲和力。在某些实施方案中,正交修饰会降低具有正交修饰的结构域对缺乏互补正交修饰的结构域的亲和力。在某些实施方案中,正交修饰是内源性抗体结构域序列的突变。在各种实施方案中,正交修饰是内源性抗体结构域序列的N端或C端的修饰,包括但不限于氨基酸的增加或删除。在特定的实施方案中,正交修饰包括但不限于工程化的二硫桥、knob-in-hole突变和电荷对突变,如下文6.4.6.1-6.4.6.3节中更详细地描述的。在特定的实施方案中,正交修饰包括选自但不限于工程二硫桥、knob-in-hole突变和电荷对突变的正交修饰的组合。在特定的实施方案中,正交修饰可以与降低免疫原性的氨基酸替换相结合,例如isoallotype突变,如上文第6.4.4.4节中更详细地描述的。

6.4.6.1. 正交工程化二硫桥

[0206] 在各种实施方案中,正交修饰包括在第一和第二结构域之间产生工程化二硫桥的突变。如本文所述,“工程化二硫桥”是在两个或更多个结构域中提供非内源性半胱氨酸氨基酸的突变,以便在两个或多个结构域结合时形成非天然二硫键。Merchant等人(Nature Biotech (1998) 16:677-681)更详细地描述了工程化二硫桥,其全部内容在此通过引用并入其所教导的内容。在某些实施方案中,设计的二硫桥改善了特定结构域之间的正交联系。在一个特定的实施方案中,产生工程化二硫桥的突变是第一或第二CH3结构域之一的K392C突变和其他CH3结构域的D399C。在一个优选的实施方案中,产生工程二硫桥的突变是第一或第二CH3结构域之一的S354C突变和另一个CH3结构域的Y349C。在另一个优选的实施方案中,产生工程二硫桥的突变是第一和第二CH3结构域两者中的447C突变,其是通过整合KSC三肽序列的CH3结构域的C端的延伸来提供的。

6.4.6.2. 正交knob-hole突变

[0207] 在各种实施例中,正交修饰包括knob-hole(同义, knob-in-hole)突变。如本文所述, knob-hole突变是改变第一结构域表面的立体特征的突变,从而相对于与没有互补立体突变的结构域结合,第一结构域将优先与具有互补立体突变的第二结构域结合。美国专利第5,821,333号和美国专利第8,216,805号更详细地描述了knob-hole突变的情况,其每一篇都以其整体并入本文。在各种实施方案中,将knob-hole突变与工程化的二硫桥相结合,如以其整体通过引用并入本文的Merchant等人(Nature Biotech (1998) 16:677-681)中更详细地描述的。在不同的实施方案中,将knob-hole突变、isoallotype突变和工程化的二硫化物突变结合起来。

[0208] 在某些实施方案中, knob-in-hole突变是第一结构域中的T366Y突变,以及第二结构域中的Y407T突变。在某些实施方案中, knob-in-hole突变是第一结构域中的F405A,和第二结构域中的T394W。在某些实施方案中, knob-in-hole突变是第一结构域中的T366Y突变和F405A,以及第二结构域中的T394W和Y407T。在某些实施方案中, knob-in-hole突变是第一结构域中的T366W突变,以及第二结构域中的Y407A。在某些实施方案中,联合的knob-in-hole突变和工程化二硫化物突变是第一结构域的S354C和T366W突变,以及第二结构域的Y349C、T366S、L368A和Y407V突变。在一个优选的实施方案中,组合的knob-in-hole突变、isoallotype突变和工程化二硫化物突变是第一结构域中的S354C和T366W突变,以及第二结构域中的Y349C、D356E、L358M、T366S、L368A、和Y407V突变。

6.4.6.3. 正交电荷对突变

[0209] 在多种实施方案中,正交修饰是电荷对突变。如本文所用,电荷对突变是影响结构

域表面的氨基酸电荷的突变,这样相对于与没有互补电荷对突变的结构域结合,结构域将优先与具有互补电荷对突变的第二个结构域结合。在某些实施方案中,电荷对突变改善了特定结构域之间的正交联系。电荷对突变在美国专利第8,592,562号,美国专利第9,248,182号,和美国专利第9,358,286号,其中每项专利的所有教导都通过引用并入本文中。在某些实施方案中,电荷对突变改进了特定结构域之间的稳定性。在一个优选的实施方案中,电荷对突变是第一个结构域中的T366K突变和另一个结构域中的L351D突变。

[0210] 在具体实施方式中,正交突变是VH/VL界面的电荷对突变。在优选的实施方案中,在VH/VL界面的电荷对突变是VH中的Q39E与VL中相应的Q38K,或VH中的Q39K与VL中相应的Q38E,如Igawa等人(Protein Eng.Des.Sel,2010,vol.23,667-677)中更详细地描述,其所有教导通过引用并入。

6.4.7. 三价和四价的GAL9结合分子

[0211] 在另一系列的实施方案中,GAL9结合分子具有三个抗原结合位点,因此被称为“三价”。在多种实施方案中,GAL9结合分子具有4个抗原结合位点,因此被称为“四价”。

6.5. GAL9结合分子结构

[0212] 本文描述的抗原结合位点,包括特定的CDR子集,可以被格式化为任何结合分子架构,包括但不限于全长抗体、Fab片段、Fvs、scFvs、串联scFvs、双体抗体(Diabody)、scDiabodies、DARTs、tandAbs、迷你抗体(minibodies)、骆驼VHH,以及本领域技术人员已知的其他抗体片段或格式。示例性抗体和抗体片段格式在Brinkmann等人(MABS,2017,Vol.9, No.2,182-212)中详细描述,其所有教导通过引用并入。本文描述的抗原结合位点,包括特定的CDR子集,也可以被格式化为“B-body”格式,更详细的描述见美国授权前公开No.US 2018/0118811和国际申请公开号W02018/075692,其每一篇在此都以其整体通过引用并入。

6.6. 进一步的修饰

[0213] 在进一步的一系列实施方案中,GAL9结合分子具有额外的修饰。

6.6.1. 抗体-药物共轭物

[0214] 在各种实施方案中,GAL9结合分子与治疗剂(即药物)缀合,形成GAL9结合分子-药物缀合物。治疗剂包括但不限于化学治疗剂、成像剂(如放射性同位素)、免疫调节剂(如细胞因子、趋化因子或检查点抑制剂)和毒素(如细胞毒剂)。在某些实施方案中,治疗剂通过连接肽连接到GAL9结合分子上,如下文第6.6.3节更详细地讨论的。

[0215] 可适用于将药物与本文公开的GAL9结合分子缀合的抗体-药物缀合物(ADC)的制备方法,在例如以下中详细描述:美国专利号8,624,003(罐装方法)、美国专利号8,163,888(一步法)、美国专利号5,208,020(两步法),美国专利号8,337,856,美国专利号5,773,001,美国专利号7,829,531,美国专利号5,208,020,美国专利号7,745,394,W0 2017/136623,W0 2017/015502,W0 2017/015496,W0 2017/015495,W0 2004/010957,W0 2005/077090,W0 2005/082023,W0 2006/065533,W0 2007/030642,W0 2007/103288,W02013/173337,W0 2015/057699,W0 2015/095755,W0 2015/123679,W0 2015/157286,W0 2017/165851,W0 2009/073445,W0 2010/068759,W0 2010/138719,W02012/171020,W0 2014/008375,W0 2014/093394,W0 2014/093640,W0 2014/160360,W0 2015/054659,W0 2015/195925,W0 2017/160754,Storz(MAbs.2015Nov-Dec;7(6):989-1009),Lambert et al.(Adv Ther, 2017 34:1015),Diamantis et al.(British Journal of Cancer,2016,114,362-367),

Carrico et al. (Nat Chem Biol, 2007.3:321-2), We et al. (Proc Natl Acad Sci USA, 2009.106:3000-5), Rabuka et al. (Curr Opin Chem Biol., 2011 14:790-6), Hudak et al. (Angew Chem Int Ed Engl., 2012:4161-5), Rabuka et al. (Nat Protoc., 2012 7:1052-67), Agarwal et al. (Proc Natl Acad Sci USA., 2013, 110:46-51), Agarwal et al. (Bioconjugate Chem., 2013, 24:846-851), Barfield et al. (Drug Dev. and D., 2014, 14:34-41), Drake et al. (Bioconjugate Chem., 2014, 25:1331-41), Liang et al. (J Am Chem Soc., 2014, 136:10850-3), Drake et al. (Curr Opin Chem Biol., 2015, 28:174-80), 以及 York et al. (BMC Biotechnology, 2016, 16(1):23), (BMC Biotechnology, 2016, 16(1):23), 其中每一篇都通过引用并入全部其教导的内容。

6.6.2. 额外的结合部分 (moiety)

[0216] 在各种实施方案中, GAL9结合分子具有包含一个或多个额外结合部分的修饰。在某些实施方案中, 结合部分是抗体片段或抗体格式, 包括但不限于全长抗体、Fab片段、Fvs、scFvs、串联scFvs、双体抗体 (Diabody)、scDiabodies、DARTs、tandAbs、迷你抗体 (minibodies)、骆驼VHH, 以及本领域技术人员已知的其他抗体片段或格式。示例性抗体和抗体片段格式在Brinkmann等人 (MABS, 2017, Vol. 9, No. 2, 182-212) 中详细描述, 其所有教导通过引用并入。

[0217] 在特定的实施方案中, 所述一个或多个额外的结合部分连接到第一或第三多肽链的C端。在特定的实施方案中, 一个或多个额外的结合基团连接到第一和第三多肽链两者的C-末端。在特定的实施方案中, 一个或多个额外的结合部分被连接到第一和第三多肽链群的C-末端。在某些实施方案中, 一个或多个额外的结合部分的个别部分分别连接到第一和第三多肽链的C端, 从而使这些部分形成功能性结合部分。

[0218] 在特定的实施方案中, 一个或多个额外的结合部分连接到任何多肽链 (例如第一、第二、第三、第四、第五或第六多肽链) 的N端。在某些实施方案中, 额外的结合部分的各个部分分别连接到不同多肽链的N端, 从而使这些部分形成功能性结合部分。

[0219] 在某些实施方案中, 一个或多个额外的结合部分对GAL9结合分子内的ABSs的不同抗原或表位具有特异性。在某些实施方案中, 一个或多个额外的结合部分对GAL9结合分子内的ABS的相同抗原或表位具有特异性。在某些其中修饰是两个或更多的额外的结合部分的实施方案中, 额外结合部分对同一抗原或表位具有特异性。在某些其中修饰是两个或更多的额外的结合部分的实施方案中, 额外结合部分对不同的抗原或表位具有特异性。

[0220] 在某些实施方案中, 将一个或多个额外的结合部分连接到GAL9结合分子上是使用体外方法, 包括但不限于反应性化学和亲和标记系统, 如下文第6.6.3节中更详细地讨论。在某些实施方案中, 一个或多个额外的结合部分通过Fc介导的结合 (例如蛋白质A/G) 连接到GAL9结合分子。在某些实施方案中, 使用重组DNA技术将一个或多个额外的结合部分连接到GAL9结合分子上, 例如在同一表达载体 (例如质粒) 上编码GAL9结合分子和额外结合部分之间融合产物的核苷酸序列。

6.6.3. 功能性/反应性群体

[0221] 在各种实施方案中, GAL9结合分子具有包含可用于下游工艺的官能团或化学活性基团的修饰, 例如与额外的部分 (例如药物缀合物和额外的结合部分, 如上文第6.6.1. 和 6.6.2. 节中更详细地讨论的) 和下游纯化工艺的连接。

[0222] 在某些实施方案中,修饰是化学反应性基团,包括但不限于反应性硫醇(例如基于马来酰亚胺的反应性基团)、反应性胺(例如基于N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide)的反应性基团)、“点击化学”基团(例如反应性炔基)和带有甲酰甘氨酸(FGly)的醛。在某些实施方案中,修饰是功能性基团,包括但不限于亲和肽序列(如HA、HIS、FLAG、GST、MBP和Strep系统等)。在某些实施方案中,功能基团或化学反应基团具有可裂解的肽序列。在特定的实施方案中,可裂解肽通过包括但不限于光裂解、化学裂解、蛋白酶裂解、还原条件和pH条件等方式进行裂解。在特定的实施方案中,蛋白酶裂解是由细胞内蛋白酶进行的。在特定的实施方案中,蛋白酶的裂解是由细胞外或膜相关的蛋白酶进行的。采用蛋白酶裂解的ADC疗法在Choi等人(Theranostics, 2012; 2(2):156-178.)中有更详细的描述,在此通过引用纳入其全部教导。

6.6.4. 效应子功能减弱

[0223] 在某些实施方案中,GAL9结合分子在抗体结构域的氨基酸序列中具有一个或多个工程化突变,该突变减弱了与抗体结合自然相关的效应子功能。效应子功能包括但不限于由Fc受体与抗体的Fc部分结合而产生的细胞功能,如抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC,也称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)、补体固定(如C1q结合)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP),以及调理作用。减少效应子功能的示例性工程化突变在美国公开号2017/0137530, Armour, et al. (Eur. J. Immunol. 29(8) (1999) 2613-2624), Shields, et al. (J. Biol. Chem. 276(9) (2001) 6591-6604) 和 Oganessian, et al. (Acta Crystallographica D64(2008) 700-704), 其中每一篇都通过引用以其整体并入本文。

6.7. 纯化的方法

[0224] 本文提供了纯化GAL9结合分子的方法。纯化步骤包括但不限于基于蛋白质的特性,如尺寸(如尺寸排除色谱法)、电荷(如离子交换色谱法),或疏水性(例如疏水性相互作用色谱法)纯化GAL9结合分子。在一个实施方案中,进行阳离子交换色谱法。可以进行本领域技术人员已知的其他纯化方法,包括但不限于使用蛋白A、蛋白G或蛋白A/G试剂。可以进行单一纯化方法的多次迭代。可以进行各种纯化方法的组合。

6.7.1. 复合物的组装和纯度

[0225] 在本发明的实施方案中,至少有四个不同的多肽链结合在一起,形成一个完整的复合物,即GAL9结合分子。然而,不完整的复合物也可以形成,不包含至少四个不同的多肽链。例如,不完整的复合物可以形成只有一个、两个或三个多肽链的复合物。在其他例子中,不完全复合物可能包含三个以上的多肽链,但不包含至少四个不同的多肽链,例如,不完全复合物不适当地与一个以上的不同多肽链的拷贝结合。本发明的方法将复合物,即完全组装的GAL9结合分子,从不完整复合物中纯化出来。

[0226] 评估纯化步骤的功效和效率的方法是本领域技术人员所熟知的,包括但不限于SDS-PAGE分析、离子交换色谱法、尺寸排阻色谱法和质谱法。纯度也可以根据各种标准来评估。标准的例子包括,但不限于。1) 评估完全组装的GAL9结合分子提供的洗脱液中总蛋白质的百分比,2) 评估纯化所需产品的方法的倍数富集或百分比增加,例如,比较洗脱液中完全组装的GAL9结合分子提供的总蛋白质与起始样品中的蛋白质,3) 评估总蛋白质的百分比或不需要的产品的百分比减少,例如。3) 评估总蛋白质的百分比或不希望的产物,如上述不完整的复合物,包括确定特定的不希望的产物(如未缔合的单个多肽链,多肽链的任何组合的二

聚体,或多肽链的任何组合的三聚体)的百分比或减少的百分比。纯度可以在本文所述的任何方法组合后评估。

6.8. 制造方法

[0227] 本文所述的GAL9结合分子可以通过使用目前用于抗体制造的标准无细胞翻译、瞬时转染和稳定转染方法进行表达而容易制造。在具体的实施方案中,可以使用Expi293细胞(ThermoFisher)来生产GAL9结合分子,使用ThermoFisher的方案和试剂,例如ExpiFectamine,或本领域技术人员已知的其他试剂,例如Fang等人(Biological Procedures Online,2017,19:11)中详细描述聚乙烯亚胺,通过引用将其全部教导并入本文。

[0228] 使用各种纯化策略,包括但不限于使用蛋白A、蛋白G或蛋白A/G试剂,可以很容易地将表达的蛋白与不希望的蛋白和蛋白复合物分离。进一步的纯化可以使用本领域内常规使用的离子交换色谱法来影响。

6.9. 医药组合物

[0229] 在另一个方面,提供了药物组合物,其包括本文所述的GAL9结合分子和药学上可接受的载体或稀释剂。在典型的实施方案中,该药物组合物是无菌的。

[0230] 在各种实施方案中,药物组合物包括浓度为0.1mg/ml-100mg/ml的GAL9结合分子。在具体实施方案中,药物组合物包括浓度为0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、2.5mg/ml、5mg/ml、7.5mg/ml或10mg/ml的GAL9结合分子。在某些实施方案中,药物组合物包括浓度超过10mg/ml的GAL9结合分子。在某些实施方案中,GAL9结合分子的浓度为20mg/ml、25mg/ml、30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/ml、甚至50mg/ml或更高。在特定的实施方案中,GAL9结合分子的存在浓度超过50mg/ml。

[0231] 在各种实施方案中,药物组合物在美国专利号8,961,964、美国专利号8,945,865、美国专利号8,420,081、美国专利号6,685,940、美国专利号6,171,586、美国专利号8,821,865、美国专利号9,216,219、美国申请10/813,483、WO 2014/066468、WO 2011/104381,和WO 2016/180941,其中每一项都以其整体并入本文中。

6.10. 治疗的方法

[0232] 在另一个方面,提供了治疗的方法,该方法包括以可治疗患者的有效量(例如治疗有效量)向患有疾病或病况的患者(例如受试者)施用本文所述的GAL9结合分子。

6.10.1. 受试者

[0233] 在一些实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,该哺乳动物是小鼠。在一个优选的实施方案中,该哺乳动物是人类。在一些实施方案中,相对于来自健康个体(例如健康对照)的免疫细胞,例如血液树突状细胞,受试者的免疫细胞具有增加的PD-L2表达。

6.10.2. 联合治疗

[0234] GAL9结合分子可单独使用或与其他治疗剂或程序联合使用,以治疗或预防疾病或病况。GAL9结合分子可以同时或按顺序给药,这取决于要治疗的疾病或病症。

[0235] 抗GAL9结合分子可与临床上使用的或属于当前治疗标准的药剂或程序结合使用,以治疗或预防某种疾病或病症。

在一些实施方案中,GAL9结合分子与第二免疫抑制剂联合施用。在某些实施方案

中,第二种免疫抑制剂是一种糖皮质激素(如泼尼松、地塞米松或氢化可的松)、一种细胞抑制剂、抗细胞因子抗体,包括抗TNF α 、抗IL1、抗IL5、抗IL6、抗IL-17抗体和抗IL-23抗体,以及减少炎症细胞因子信号转导的小分子药物,如JAK/STAT抑制剂、甲氨蝶呤、羟氯喹、氯喹、抗CD25或抗CD52抗体,或作用于免疫亲和素的药物(例如,环孢菌素或西罗莫司,或任何其他已知可抑制或阻止免疫系统活动的药物。

[0236] 在一些实施方案中,GAL9结合分子与一种或多种抗炎药物联合施用。

6.10.3. 自身免疫性或炎症性疾病

[0237] 在一些实施方案中,治疗包括向患有自身免疫性疾病或炎症性疾病的受试者施用本文所述的GAL9结合分子,其用量对治疗该受试者有效。

[0238] 在一些实施方案中,自身免疫性疾病是肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、失弛缓症、阿狄森氏病、成人斯蒂尔氏病、丙种球蛋白缺乏血症、斑秃、淀粉样变、强直性脊柱炎、抗GBM/抗TBM肾炎、抗磷脂综合征、自身免疫性血管水肿、自身免疫性自主神经障碍、自身免疫性脑脊髓炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病、自身免疫性心肌炎、自身免疫性卵巢炎、自身免疫性睾丸炎、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性视网膜病变、自身免疫性荨麻疹、轴索及神经病(AMAN)、Balo病、白塞氏病、良性粘膜疱疹、牛痘、卡斯特曼病、乳糜泻、南美锥虫病、慢性炎症性脱髓鞘多发性神经病、慢性复发性多灶性骨髓炎、Churg-Strauss综合征、嗜伊红细胞性肉芽肿病、瘢痕性类天疱疮、科根氏(Cogan's)综合征、冷凝集素病、先天性心脏传导阻滞、柯萨奇心肌炎、CREST综合征、克罗恩病、带状疱疹、皮炎、Devic病(视神经炎)、盘状狼疮、Dressier's综合征、子宫内膜异位症、嗜酸细胞性食管炎(EoE)、嗜酸细胞性筋膜炎、结节性红斑、原发性混合性冷球蛋白血症、埃文斯综合征、纤维肌痛、纤维化肺炎、巨细胞动脉炎(颞部动脉炎)、巨细胞心肌炎、肾小球肾炎、Goodpasture's综合征、肉芽肿性多血管炎、Graves病、Guillain-Barre综合征、桥本甲状腺炎、溶血性贫血、Henoch-Schonlein purpura (HSP)、妊娠期疱疹或妊娠期疱疹(PG)、化脓性皮炎(HS)(Acne Inversa)、低丙种球蛋白血症、IgA肾病、IgG4相关硬化性疾病、免疫性血小板减少性紫癜(ITP)、包涵体肌炎、间质性膀胱炎、青少年关节炎、青少年糖尿病(1型糖尿病)、青少年肌炎、川崎病、兰伯特-伊顿综合征、白细胞减少性脉管炎、扁平苔藓、扁平苔藓、木质结膜炎、线性IgA病(LAD)、红斑狼疮、慢性莱姆病、美尼尔氏病、显微镜下多血管炎、混合性结缔组织病(MCTD)、Mooren's溃疡、Mucha-Habermann病、多灶性运动神经病(MMN)或MMNCB、多发性硬化症、重症肌无力、肌炎、嗜睡症、新生儿狼疮、视神经炎、中性粒细胞减少症、眼部卡他性丘疹、视神经炎、掌状风湿病(PR)、PANDAS、副肿瘤性小脑变性(PCD)、阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、Parry Romberg综合征、Pars planitis(周边葡萄膜炎)、Parsonage-Turner综合征、pemphigus、周围神经病、周围脑脊髓炎、恶性贫血(pa)、POEMS综合征、结节性多动脉炎、I型、II型或III型多腺体综合征、多发性风湿病、多肌炎、心肌梗死后综合征、心包切除术后综合征、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、孕激素皮炎、银屑病、银屑病关节炎、纯红细胞增生症、脓皮病、雷诺现象、反应性关节炎、反射性交感神经萎缩症、复发性多软骨炎、不宁腿综合征、腹膜后纤维化、风湿热、类风湿性关节炎、肉瘤病、施密特综合征、硬膜炎、硬皮病、Sjogren's综合征、精子和睾丸自身免疫、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎、Susac's综合征、交感神经性眼炎、Takayasu's动脉炎、睾丸自身免疫、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎、苏萨克综合征、交感神经性眼炎、高加索动脉炎、颞动脉炎、巨细胞动脉炎、血小板减

少性紫癜、Tolosa-Hunt综合征、横纹肌炎、1型糖尿病、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病、葡萄膜炎、脉管炎、白癜风或Vogt-小柳原田综合症。

[0239] 在一些实施方案中,自身免疫性疾病选自包括:炎症性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、结肠炎、乳糜泻、类风湿性关节炎、白塞氏病、淀粉样变性、银屑病、银屑病关节炎、系统性红斑狼疮肾炎、移植物抗宿主疾病 (GVHD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH),以及强直性脊柱炎。在一个优选的实施方案中,该疾病是克罗恩病。

[0240] 在一些实施方案中,治疗包括向有移植排斥风险的受试者施用如本文所述的GAL9结合分子,其量可有效减少移植排斥反应。在一些实施方案中,治疗包括向患有移植物抗宿主病的受试者施用本文所述的GAL9结合分子,其量可有效减少GvHD。在一些实施方案中,治疗包括向患有创伤后免疫反应的受试者施用本文所述的GAL9结合分子,其用量可有效减少炎症。在一些实施方案中,治疗包括向患有缺血的受试者施用如本文所述的GAL9结合分子,其量对治疗受试者有效。在一些实施方案中,治疗包括向经历过卒中的受试者施用本文所述的GAL9结合分子,其量对治疗受试者有效。

[0241] 在一些实施方案中,治疗包括以有效减少急性呼吸窘迫综合征和/或急性细胞因子释放综合征(细胞因子风暴)的量向具有病毒感染的受试者给予GAL9结合分子。在特定的实施方案中,该病毒感染是感染SARS-CoV-2病毒,该疾病是COVID-19。

6.10.4. 给药

[0242] GAL9结合分子可以通过本领域已知的任何途径向受试者给药。例如,GAL9结合分子可以通过例如动脉内、肌肉内、皮内、静脉内、腹膜内、鼻内、肠外、肺内、皮下给药、局部、口服、舌下、瘤内、病灶内、滑膜内、鞘内、脑脊液内或静脉周围给药给予人类受试者。该GAL9结合分子可作为药物组合物给受试者本身或给药。示例性药物组合物在此描述。

[0243] 本文公开的抗GAL9结合分子可以单独或与其他治疗剂或程序联合施用,以治疗或预防疾病或病况。

[0244] 根据要治疗的病况或疾病,用GAL9结合分子治疗可以改善受试者的一个或多个临床终点。改善患有疾病或病症的受试者的临床终点的例子包括但不限于:减少炎症、减少自身免疫反应、延长缓解期、诱导缓解、重新建立免疫耐受、改善器官功能、减少疾病或病症的进展或发展的风险、减少第二种疾病的进展或发展的风险、增加受试者的总生存期或其组合。

6.11. 实施例

[0245] 下面的例子是以说明的方式提供的,而不是限制。特别是,表达和纯化各种抗原结合蛋白的方法以及它们在下面描述的各种检测中的使用都是非限制性的和说明性的。

6.11.1. 方法

6.11.1.1. Expi293表达式

[0246] 根据制造商的说明,使用Expi293瞬时转染系统表达测试的各种抗原结合蛋白。简而言之,除非另有说明,否则将编码各个链的质粒以1:1的质量比混合,并用ExpiFectamine 293转染试剂盒转染到Expi 293细胞。细胞在37℃,8%的二氧化碳,100%的湿度和125rpm的摇动下培养。转染16-18小时后,对转染的细胞进行一次补料(fed)。在第5天,以2000g离心10分钟,收获细胞。收集上清液进行亲和层析纯化。

6.11.1.2.ExpiCHO表达

[0247] 根据制造商的说明,使用ExpiCHO瞬时转染系统表达各种GAL9抗原结合蛋白。简而言之,编码各个链的质粒以例如1:1的质量比混合,并用ExpiFectamine CHO转染试剂盒转入ExpiCHO。

[0248] 细胞在37℃,8%的CO₂,100%的湿度和125rpm的摇动下培养。转染的细胞一般在转染16-18小时后被补料一次。在第5天,以2000g离心10分钟,收获细胞。然后收集上清液进行亲和层析纯化。

6.11.1.3.蛋白质A纯化

[0249] 含有各种抗原结合蛋白的清澈上清液使用蛋白质A(ProtA)树脂或抗CH1树脂在重力流纯化器上进行分离。在进行头对头比较的实例中,含有各种抗原结合蛋白的上清液被分成两个相等的样品。对于ProtA纯化,用PBS(5mM磷酸钾钠pH7.4,150mM氯化钠)平衡1mL Protein A柱(GE Healthcare)。样品以5毫升/分钟的速度被加载到柱子上。用0.1M醋酸钠pH3.5洗脱样品。通过280nm的吸光度监测洗脱过程,合并洗脱峰进行分析。通过280nm的吸光度监测洗脱过程,合并洗脱峰进行分析。

6.11.1.4.SDS-Page分析

[0250] 含有各种分离的抗原结合蛋白的样品通过还原和非还原SDS-PAGE分析是否存在完全产物、不完全产物和总体纯度。将每个样品的2μg加入15μL SDS上样缓冲液中。还原性样品在有10mM还原剂的情况下于75℃孵育10分钟。非还原性样品在70℃下孵育5分钟,无还原剂。将还原性和非还原性样品加载入4-15%梯度TGX凝胶(BioRad),加入运行缓冲液,在220伏下运行30分钟。运行结束后,用去离子水清洗凝胶,并用GelCode Blue Safe Protein Stain(ThermoFisher)进行染色。在分析之前,凝胶用去离子水脱色。使用标准的图像分析软件对脱色后的凝胶的扫描图像进行密度分析,以计算每个样品中条带的相对丰度。

6.11.1.5.IEX色谱法

[0251] 含有各种分离的抗原结合蛋白的样品通过阳离子交换色谱法分析完整产品与不完整产品和杂质的比例。用AKTA Purifier FPLC上的5-ml MonoS(GE Lifesciences)分析澄清的上清液。MonoS柱用10mM MES pH 6.0的缓冲液A进行平衡。样品以2毫升/分钟的速度加载到柱子上。用0-30%的梯度的缓冲液B(10mM MES pH 6.0,1M氯化钠)在6个柱体积(CV)对样品进行洗脱。通过280纳米的吸光度监测洗脱过程,并通过峰值积分计算样品的纯度,以确定单体峰和污染物峰的丰度。单体峰和污染物峰分别汇集在一起进行如上描述的SDS-PAGE分析。

[0252] 分析性SEC色谱法将1mg/mL的每个样品以1ml/min的速度加载到柱子上。使用1.5CV PBS的等度流洗脱样品。用280nm的吸光度监测洗脱过程,用峰值积分分析洗脱峰。

6.11.1.6.质谱分析法

[0253] 含有各种分离的抗原结合蛋白的样品通过质谱分析以确认分子量的正确种类。所有分析都是由第三方研究机构进行的。简而言之,样品用酶cocktail处理以去除糖基化。样品都以还原格式进行测试,以按分子量具体识别每条链。样品都在非还原条件下测试,以确定样品中所有复合物的分子量。质谱分析被用来确定基于分子量的独特产品的数量。

6.11.1.7.通过噬菌体展示发现抗体

[0254] 人类Fab文库的噬菌体展示是使用标准方案进行的。人GAL9蛋白购自Aero

Biosystems (Human Gal9 His-tag Cat#LG9-H5244), 并使用EZ-Link NHS-PEG₁₂-Biotin (ThermoScientific Cat#21312) 按标准方案进行生物素化。使用标准方案, 通过噬菌体 ELISA 筛选噬菌体克隆与 GAL9 蛋白结合的能力。

[0255] 简而言之, 使用能够在噬菌体中复制和表达的表达载体 (也称为噬菌粒) 构建 Fab 格式的噬菌体库。重链和轻链都在同一个表达载体中编码, 其中重链与噬菌体衣壳蛋白 pIII 的截短变体融合。轻链和重链-pIII 融合物被表达为单独的多肽, 并在细菌周质中组装, 其中的氧化还原电位使二硫键形成, 从而形成含有候选 ABS 的噬菌体展示抗体。

[0256] 该文库使用来自特定的人类重链可变域 (VH3-23) 和特定的人类轻链可变域 (V_K-1) 的序列创建。对于筛选出的文库, VH 结构域的全部三个 CDR 都被多样化, 以匹配人类抗体库中发现的按 CDR 长度计算的氨基酸位置频率。筛选库中的轻链可变结构只在 VL CDR3 (L3) 中引入了多样性; 轻链 VL CDR1 (L1) 和 CDR2 (L2) 保留了人类种系序列。

[0257] 噬菌体展示库中使用的重链支架 (SEQ ID NO:2)、轻链支架 (SEQ ID NO:4)、完整重链 Fab 多肽 (SEQ ID NO:1) 和完整轻链 Fab 多肽 (SEQ ID NO:3) 如下所示, 其中小写“x”代表创建库时变化的 CDR 氨基酸。

噬菌体展示 VH 支架 [SEQ ID NO:2]:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFxxxxIHWVRQAPGKGLEWVAXXXXXXXXXXXYADSVKGR
FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXDYWGQGTLLTVSSAS

噬菌体展示 VL 支架 [SEQ ID NO:4]:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQXXXXXTFGQGTKVEIKRT

噬菌体展示重链 Fab 多肽 [SEQ ID NO:1]:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFxxxxIHWVRQAPGKGLEWVAXXXXXXXXXXXYADSVKGR
FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTC

噬菌体展示轻链 Fab 多肽 [SEQ ID NO:3]:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQXXXXXTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDSQLKSGTASVCLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0258] 多样性是通过 Kunkel 诱变产生的, 使用引物将多样性引入 VH CDR1 (H1)、CDR2 (H2) 和 CDR3 (H3) 以及 VL CDR3, 以模仿在天然抗体库中发现的多样性, 如 Kunkel, TA (PNAS 1月1日, 1985.82 (2) 488-492) 中详细描述, 通过引用以其整体并入本文。简而言之, 使用标准程序从分离的噬菌体制备单链 DNA, 并进行 Kunkel 诱变。然后将化学合成的 DNA 电穿孔到 MC1061F-细胞。用限制性酶 (Bam HI 和 Xba I) 消化从过夜培养中获得的噬菌粒体, 以去除野生型序列。将消化后的样品电穿孔到 TGI 细胞中, 然后进行回收。回收的细胞经传代培养后用 M13K07 辅助噬菌体感染以产生噬菌体库。

[0259] 噬菌体淘选是使用标准程序进行的。简而言之, 第一轮噬菌体淘选是用固定在链霉菌亲和素磁珠上的靶标进行的, 磁珠在 1mL 的 PBST-2% BSA 中与准备好的库中的 $\sim 5 \times 10^{12}$ 个噬菌体接触。孵育一小时后, 用磁力架将磁珠结合的噬菌体从上清液中分离出来。将珠子洗

三次以去除非特异性结合的噬菌体,然后加入到OD₆₀₀在0.6的ER2738细胞(5毫升)中。20分钟后,将被感染的细胞在25毫升2xYT⁺氨苄青霉素和M13K07辅助噬菌体(最终浓度,~10¹⁰ pfu/ml)中进行传代培养,并允许在37℃下剧烈摇晃过夜。第二天,使用标准程序通过PEG沉淀法制备噬菌体。在平移之前,对特异于SAV包被磁珠的噬菌体进行了预清除。第二轮淘选是使用KingFisher磁珠处理机和用100nM磁珠固定的抗原,使用标准程序进行的。总共进行了3-4轮的噬菌体淘选,以在噬菌体展示的Fab中富集对目标抗原特异的。使用多克隆和单克隆噬菌体ELISA确认目标特异性富集。用DNA测序来确定含有候选ABS的分离的Fab克隆。

[0260] 上述噬菌体筛选中鉴定的VL和VH结构域被重新格式化为二价单特异性的人全长IgG1架构。

天然人全长IgG1重链结构[SEQ ID NO:5]:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFxxxxIHWVRQAPGKGLEWVAxxxxxxxxxxxxYADSVKGR
FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARxxxxxxxxxxxxDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK[SEQ ID NO:5]

天然人全长IgG1轻链结构:

相当于噬菌体显示轻链Fab,参见SEQ ID NO:3

6.11.1.8.结合动力学的Octet测定

[0261] 为了在GAL9结合探索活动(discovery campaign)中测量定性的结合亲和力,将IgG1重新格式化的结合物固定在Octet (Pall ForteBio)生物层干涉仪的生物传感器上。

[0262] 然后将可溶性GAL9抗原添加到系统中并测量结合。定性的结合亲和力是通过观察octet感应图的解离阶段从最弱(°)到最强(++)的斜率来评估的。缓慢的脱离速度代表着感应图解离阶段的下降可以忽略不计,并表示紧密结合的抗体(++).为了获得准确的单价亲和力的动力学常数,在结合步骤中测量了涉及至少五个浓度的GAL9分析物的稀释系列(范围从大约10到20X K_d到0.1X K_d值,2倍稀释)。在解离步骤中,将传感器浸入不含GAL9分析物的缓冲溶液中,传感器表面的结合复合物在其中解离。使用Octet动力学分析软件,基于结合和解离的速率曲线计算动力学和平衡结合常数。分析是全局进行的(全局拟合),其中动力学常数是由实验中包括的所有分析物浓度同时得出的。

6.11.1.9.表位分箱

[0263] 如上所述,将抗GAL9候选者格式化为二价单特异性的人类全长IgG1,使用基于octet的'串联'试验,以成对的方式测试GAL9的结合。简而言之,生物素化的GAL9被固定在链霉亲和素传感器上,两个抗GAL9的候选者被串联起来。生成一个竞争性阻断曲线,确定一个给定的抗GAL9候选物是否阻断了一组其他抗GAL9候选物与GAL9的结合。对相同或不重叠的结合区域进行竞争的抗GAL9候选物被分组,并被称为属于同一箱(bin)。

6.11.1.10.PBMC的激活和Galectin 9抗体处理

PepMix HCMVA (pp65) (>90%) Protein ID:P06725 (Cat.No.PM-PP65-2, JPT

Peptide Technologies)的单个试样按照制造商的说明制备。PepMixTMHCMVA (pp65)是通过人巨细胞病毒 (HHV-5)的65kDa磷蛋白 (pp65) (Swiss-Prot ID:P06725)得到的15聚肽重叠的完整蛋白质跨度混合物,用于免疫刺激免疫细胞反应。

[0265] 按照标准条件解冻冷冻的人外周血单个核细胞 (PBMC),然后重新悬浮在生长培养基 (10%FBS in RPMI) 中。

[0266] 将重悬的PBMC以 5×10^5 个细胞播种于96孔板。将细胞与2 μ g/mL PepMixTMHCMVA (pp65)加40 μ g/mL候选GAL9抗体或对照抗体在生长培养基中培养24小时,以温度37 $^{\circ}$ C,5% CO₂。

6.11.1.11.LEGENDplex人类Th细胞因子检测法

[0267] 在PBMC激活和本文所述的Galectin 9抗体处理后,在处理24小时和72小时通过细胞因子珠阵列评估PBMC和免疫细胞亚群的细胞因子分泌,如下所示。

[0268] 收集200 μ l的细胞培养上清液,并离心以去除细胞碎屑。使用LEGENDplexTMHuman Th1 Panel (5plex) (Cat.No.740009,Biolegend)对所得上清液进行分析。LEGENDplexTM人类Th1检测试剂盒是一种基于珠子的检测方法,可以用流式细胞仪同时定量检测人类细胞因子IL-2、IL-6、IL-10、IFN- γ 和TNF- α 。

[0269] 简而言之,根据制造商的说明制备细胞因子标准品和捕获珠混合物。按1:1:1的捕获珠混合物:生物素化的检测抗体;检测缓冲液准备了检测母液。

[0270] 将12.5 μ L上清液样品或细胞因子标准品与37.5 μ L测定母液进行孵育。将平板密封,用铝箔覆盖,并在室温下以600转/分钟的速度摇动2小时。然后用链霉亲和素-藻红素 (SA-PE)在室温下孵育30分钟,并在600rpm下摇晃。然后将珠子洗两次并重新悬浮,然后根据制造商的说明进行流式细胞仪分析。

6.11.1.12.用标志物抗体对PBMC进行染色

[0271] 在本文所述的PBMC激活和Galectin 9抗体处理后,根据以下程序用标记抗体对PBMCs免疫细胞进行染色。

[0272] 将细胞以 5×10^6 个细胞/毫升重悬于生长培养基 (10%FBS in RPMI)。将200 μ L重新悬浮的细胞等分布到96孔板中,然后用Fixable Viability Dye **eFluor[®]780**在2-8 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,以不可逆地标记死细胞。然后清洗细胞,再与人Fc阻断液 (Cat.No.14-9161-73,eBiosciences)在室温下孵育10分钟。

[0273] 根据下表制备抗体cocktail工作溶液。

表 1 抗体染色工作液		
	抗体	稀释
T 细胞表面标志物	BV510 抗人 CD3 (Cat. No. 563109, BD Biosciences)	1 in 20
	PerCP/Cy5.5 抗人 CD56 (Cat. No. 362505, BD Biosciences)	1 in 20
单核细胞表面标志物	FITC 抗人 CD14 (Cat. No. 367115, BD Biosciences)	1 in 20
	Alexa Fluor® 700 抗人 CD16 (Cat. No. 302025, Biolegend)	1 in 20
树突细胞表面标志物	Brilliant Violet 421™ 抗人 CD11c (Cat. No. 301627, Biolegend)	1 in 20
	Alexa Fluor 647 抗人 CD123 (Cat. No. 306023, Biolegend)	1 in 40
	BV510 抗人 Lineage Cocktail (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) (Cat. No. 348807, Biolegend)	1 in 10
	FITC 抗人 HLA-DR (Cat. No. 307603, Biolegend)	1 in 20
B 细胞表面标志物	PerCP/Cy5.5 抗人 CD19 (Cat. No. 363015, Biolegend)	1 in 20
Galectin-9	PE 抗人 galectin 9 (Cat. No. 348905, Biolegend)	1 in 10

[0274] 用10 μ L稀释的抗体cocktail在2-8℃下孵育孔30分钟。然后洗净并重新悬浮细胞，并通过流式细胞仪分析。

[0275] 为了分析免疫刺激性标记物CD27、CD40L、ICOS、4-1BB和OX40，遵循上述提供的相同方案，但将细胞与替代性抗体cocktail孵育，详见下表2。

表 2
抗体染色工作液

抗体	稀释
FITC 抗人 CD134 (OX40) (Cat. No. 350006, BioLegend)	1 in 50
PerCP/Cy5.5 抗人 CD3 (Cat. No. 560835, BD Biosciences)	1 in 100
AF700 抗人 CD4 (Cat. No. 344622, BioLegend)	1 in 100
eFluor™ Fixable Viability Dye (Cat. No. 65-0865-14, eBioscience™)	1 in 2000
BV421 抗人 CD8 (Cat. No. 344748, BioLegend)	1 in 100
BV650 抗人 CD137 (4-1BB) (Cat. No. 309828, BioLegend)	1 in 50
BV711 抗人 ICOS (Cat. No. 563833, BD Biosciences)	1 in 100
PE 抗人 CD154 (CD40L) (Cat. No. 310806, BioLegend)	1 in 50
PE/Cy7 抗小鼠/大鼠/人 CD27 (Cat. No. 124216, BioLegend)	1 in 100

6.11.2. 实施例1: 来自克罗恩病患者的血液树突状细胞的PD-L2表达量增加

[0276] 程序性死亡1 (PD-1) 缺陷的小鼠会发生各种类似自身免疫的疾病, 这表明PD-1受体在免疫和自身免疫中发挥重要作用。PD-1有两个内源性配体, PD-L1和PD-L2。PD-1/PD-L1的相互作用已被牵涉到自身免疫中; 然而, PD-L2在自身免疫中的作用还不太清楚。

[0277] 克罗恩病 (CD) 是一种胃肠道的慢性炎症性疾病。虽然该病的具体原因还不太清楚, 但很明显, CD患者的免疫系统过度活跃, 导致胃肠道的炎症和损害。这项研究是为了确定克罗恩病患者的血液树突状细胞上PD-L2和PD-L1的表达。

研究参与者

[0278] 从29名经结肠镜检查证实患有克罗恩病的成年人身上抽取外周血。选择了处于不同治疗阶段的患者, 但如果他们接受过抗TNF- α 治疗, 则被排除在外。作为对照, 从13名接受结肠直肠癌家族史筛查的健康成年人身上抽取外周血。

免疫染色

[0279] 将从10毫升全血中获得的单细胞悬浮液与Fc受体结合抗体进行孵育, 以阻断特异

性抗体的非特异性Fc结合。Fixable Viability Dye eFluor780 (ebioscience, San Diego, CA) 被用来排除分析中的死细胞。以下的抗人类单克隆抗体被用来评估细胞: HLA-DR PerCP-Cy5.5 (clone G46-6; BD Bioscience, San Jose, CA); lineage cocktail BV510 [CD3 (克隆OKT3) / CD14 (克隆M5E2) / CD16 (克隆3G8) / CD19 (克隆HIB19) / CD20 (克隆2H7) 和CD56 (克隆HCD56)]; CD11c BV605 (克隆3.9; BioLegend, San Diego, CA)。

[0280] 抗人PD-L2单克隆抗体 (克隆MIH18; BioLegend, San Diego, CA) 和抗人PD-L1单克隆抗体 (克隆29E.2A3; BioLegend, San Diego, CA) 或对照IgG分别使用Lightning-Link Rapid DyLight 647和Lightning-Link Rapid DyLight 488 (BioNovus Life Sciences, Cherrybrook, NSW, Australia) 内部标记。细胞用抗HLA-DR、抗PD-L2、或抗PD-L1或IgG对照物在室温下染色30分钟, 然后用PBS洗两次, 每次5分钟, 然后用1%多聚甲醛-PBS, pH7.25固定细胞。

流式细胞术

[0281] 用Fixable Viability Dyes (FVD) 对细胞进行染色, 并在侧向散射与正向散射图的单个核细胞区域进行门控, 以只捕获有活力的细胞。树突状细胞被定义为HLA-DR⁺和Lin⁺, 然后在总的外周血人群中进行CD11c⁺的门控。对每个捐赠者至少收集 1×10^4 个事件。

[0282] 使用BD LSR Fortessa流式细胞仪分析细胞, 并使用BD FACSDiva软件 (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、FCS express (De Novo软件, Glendale, CA) 或FlowJo软件 (Tree Star; Becton的子公司, Dickinson and Company, Ashland, OR) 分析数据。

统计分析

[0283] 使用GraphPad Prism (GraphPad Software) 进行基于双尾非参数Mann-Whitney U检验。

显微镜

[0284] 显微镜样品是通过将染色、分选的细胞安装在玻璃载玻片上制成的。使用共聚焦显微镜收集图像。

结果/结论

[0285] 图2显示了克罗恩病患者的CD11c⁺树突状细胞 (DCs) 细胞用IgG对照、抗PD-L1或抗PD-L2染色的等值线图。我们观察到IgG对照有2.23%与DC细胞的非特异性结合, 而抗PD-L1抗体将28.6%的DC细胞染色为PD-L1⁺。同样, 在第二个实验中, IgG对照组仅与3.22%的CD11c⁺DC结合, 而抗PD-L2抗体检测到62.7%的DC细胞为PD-L2⁺。

[0286] 图3A-3B显示了来自健康对照捐赠者和CD患者的在CD11c⁺血液树突状细胞中的PD-L2⁺细胞的百分比散点图 (图3B) 和在CD11c⁺血液树突状细胞中的PD-L1⁺细胞的百分比散点图 (图3B)。散点图上的横条显示的是平均值。图3C-3D显示了健康对照捐赠者和克罗恩病患者CD11c⁺血液树突状细胞上PD-L1表达量 (GMI) (图3C) 和PD-L2表达量 (GMI) 的散点图 (图3D)。散点图上的横条表示平均值。单星号“*”表示P值=0.0292。双星号“**”表示P值=0.0032。

[0287] 图4A-4B显示了两个健康对照者和三个克罗恩病患者血液中树突状细胞 (DC) 的代表性免疫染色。来自健康对照组的DC在整个细胞中显示出高的PD-L1 (绿色) 和PD-L2 (红色) 染色; 在附图中以灰色度呈现。相比之下, 来自克罗恩病患者的树突状细胞显示出低的PD-L1表达和高水平的看起来是聚集的PD-L2。在一些细胞中, 我们观察到聚集的PD-L1的高染

色。

[0288] 结果表明,与健康对照的捐赠者相比,PD-L2蛋白在克罗恩病患者的血液树突状细胞中表达得更高。(P-值=0.0032),产生的统计学差异高于PD-L1 (P-值=0.0292)。这些结果表明,PD-L2途径可能在克罗恩病和其他自身免疫性疾病中发挥重要作用。

6.11.3. 实施例2:抑制克罗恩病患者PBMC中的PD-L2带来临床上有利的细胞因子谱

[0289] 本研究旨在确定与IgG对照组相比,抑制PD-L2蛋白对克罗恩病(CD)患者PBMCs中细胞因子谱的影响。

研究参与者

[0290] 血液样本来自14个不同的克罗恩病患者。使用肝素化的血液在Ficoll-Paque (Pharmacia, Freiburg, 德国) 上进行密度离心分离外周血单核细胞(PBMC)。来自对照组和CD患者的分离的PBMC加入预包被抗CD3的孔中(2×10^5 个细胞/孔)。R10培养基,补充有青霉素(100IU/ml)、链霉素(0.1mg/ml)和L-谷氨酰胺(0.29gm/l)。将对照IgG或阻断性抗PD-L2 (MIH18) 抗体以20 μ g/ml的剂量加入到培养物中。

处理

[0291] 用IgG对照或抗人PD-L2抗体克隆MIH18 (BioLegend) 处理匹配的PBMC样本36小时,然后进行测定。

细胞因子测定

[0292] 按照制造商的说明使用BDTM Cytometric Bead Array (CBA) 测量TNF- α 、IFN- γ 和IL-10的浓度。

统计分析

[0293] 使用GraphPad Prism (GraphPad Software) 进行Wilcoxon配对有符号秩检验。

结果/结论

[0294] 匹配样本的TNF- α 和IFN- γ 的平均浓度分别显示在图5A-5B中。图5C显示了IL-10: TNF- α 的平均比值。这些结果表明,抑制PD-L2会通过降低促炎症细胞因子TNF- α 和IFN- γ 的水平,并增加抑制性细胞因子IL-10的水平而使得CD患者的PMBC中出现临床上有利的细胞因子谱。

6.11.4. 实施例3:刺激或阻断GAL9/PD-L2通路调节小鼠CD4⁺T细胞中TNF- α 的分泌

[0295] 此前,我们表明GAL9可以结合可溶性PD-L2,并且PD-L2的一些免疫学效应是通过多聚体PD-L2与GAL9的结合而介导的,而不是通过PD-1/PD-L1 (WO 2016/008005,其全文通过引用并入本文)。目前的研究是为了确定刺激或阻断GAL9/PD-L2通路是否可以调节小鼠CD4⁺T细胞中TNF- α 的分泌。

动物

[0296] 研究中使用了C57BL6/J小鼠。研究中使用的所有动物都按照国家健康医学研究委员会(NHMRC)的动物使用指南进行饲养和护理。

sPD-L2

[0297] 带有人IgG1 Fc的可溶性小鼠PD-L2 (sPD-L2) 由Geneart (德国) 定制生产。

抗体

[0298] 处理时,使用抑制性抗小鼠GAL9抗体克隆108A2 (**BioLegend®** San Diego, CA) 或

大鼠IgG2a对照抗体。抗小鼠GAL9克隆(108A2)结合小鼠Galectin-9的连接肽(Oomizu,S.etal.,PLoS One 7(11):e48574(2012);Doi:10.1371/journal.pone.0048574,在此通过引用并入本文)。抗CD3(克隆145.2C11)(Aviva Systems Biology Corp.San Diego,CA)用于进行刺激。

细胞分离和CD4⁺T细胞的刺激

[0299] 从五只小鼠中制成小鼠脾脏细胞悬液。使用Miltenyi Biotec Inc.(Auburn,CA)的试剂盒分离出未受影响的CD4⁺T细胞。用抗CD3克隆145.2C11(Aviva Systems Biology Corp.San Diego,CA)以5μg/ml刺激小鼠CD4⁺T细胞。接下来,用IgG对照或sPD-L2(20μg/ml),或用sPD-L2和抗GAL9 mAb克隆108A2(均为20μg/ml)处理受刺激的CD4⁺T细胞,然后培养36小时。

细胞因子测定

[0300] 处理36小时后,按照制造商的说明,使用BD™Cytometric Bead Array测量TNF-α的浓度。

统计分析

[0301] 使用GraphPad Prism(GraphPad Software)进行非参数Mann-Whitney U检验。

结果/结论

[0302] 图6显示了每个处理组的TNF-α浓度水平的柱状图。单独用sPD-L2处理活化的CD4⁺T细胞,与IgG对照相比,CD4⁺T细胞分泌的TNF-α明显增加,*P值<0.0001。加入抑制性抗小鼠GAL9抗体(108A2)后,与用108A2处理的活化CD4⁺T细胞相比,以及与IgG对照相比,活化CD4⁺T细胞的TNF-α分泌都明显减少,*P值<0.0001。

[0303] sPD-L2与T细胞上的GAL9结合,诱导TNF-α的分泌,而抑制GAL9会阻断sPD-L2介导的CD4⁺T细胞中TNF-α的分泌。这些结果表明,GAL9/PD-L2途径调节受刺激的CD4⁺T细胞中的TNF-α水平。

6.11.5. 实施例4:在疟疾感染小鼠的CD4⁺T细胞中,抑制性抗小鼠GAL9(108A2)抗体独立于PD-1/PD-L1起作用而激活抗GAL9抗体则不然

[0304] 本研究是为了研究抑制性和激活性GAL9抗体对PD-1/PD-L1途径的依赖性。

[0305] 感染疟疾的小鼠模型可用于研究免疫机制和对药物的敏感度.Wykes,MN等人,Eur J Immunol.(2009)39:2004-7,其全部内容通过引用并入本文。此外,已经证明导致疟疾的疟原虫可以利用PD-1途径来“停用”T细胞功能。当PD-1缺失的小鼠被证明能迅速和完全清除夏氏疟原虫(P.chabaudi)感染时,PD-1在疟疾发病机制中的明确作用被证明。因此,疟疾感染模型可用于了解PD-1及其配体PD-L1和PD-L2在免疫中的相对作用。

抗体

[0306] 本研究使用了抑制性抗小鼠GAL9抗体(108A2)和激活性抗小鼠GAL9抗体(RG9.1)(Cat.No.BE0218,InVivoMab Antibodies)。

感染疟疾的小鼠模型

[0307] C57BL/6小鼠的队列被感染了非致命性疟疾(P.yoelii 17XNL)。静脉注射10⁵个P.yoelii感染的红细胞后,将小鼠培养7天,使感染发生。

CD4⁺T细胞的分离和处理

[0308] 使用Miltenyi Biotec未影响的CD4⁺T细胞分离试剂盒从疟疾感染的小鼠中分离

出CD4⁺T细胞。接下来,用对照IgG抗体、抑制性抗小鼠GAL9抗体(108A2)或激活性抗小鼠GAL9抗体(RG9.1)培养分离的T细胞并处理过夜。

免疫染色和显微镜检查

[0309] 处理后,用DAPI(检测DNA)和使用Lightning-Link Rapid DyLight 647、594或488试剂盒标记的抗OX40(CD134)、抗PD-1和抗PD-L1(BioXCell, Lebanon, NH)抗体对细胞进行染色。免疫染色通过共聚焦成像观察。

结果/结论

[0310] 图7显示了用IgG对照、抑制性抗小鼠GAL9抗体(108A2)或激活性抗小鼠GAL9抗体(RG9.1)处理的CD4⁺T细胞的代表性共聚焦图像。红色染色显示PD-1受体,绿色染色显示PD-L1配体,黄色染色显示OX40受体,蓝色染色显示DNA(DAPI),在附图中以灰阶呈现。

[0311] 我们观察到,用活化的抗小鼠GAL9(RG9.1)抗体处理可降低PD-1受体(染色水平低)和PD-L1配体(染色水平大幅减弱)的表达。相反,我们观察到,用抑制性抗GAL9(108A2)处理对表达PD-1受体(染色水平与IgG对照水平相似)或PD-L1配体(染色水平与IgG对照水平相似)没有影响。此外,我们观察到用抑制性抗GAL9(108A2)处理导致OX40的表达减少。这些结果表明,抑制性GAL9抗体在CD4⁺T细胞中独立于PD-1/PD-L1途径发挥作用。

6.11.6. 实施例5:用抑制性抗小鼠GAL9(108A2)处理降低了PD-L2介导的感染疟疾的小鼠CD4⁺和CD8⁺T细胞的存活率

[0312] 本研究是为了确定抑制性抗小鼠GAL9(108A2)抗体对PD-L2介导的来自疟疾感染小鼠的CD4⁺和CD8⁺T细胞的生存的影响。

[0313] PD-L2已被证明可通过增加寄生虫特异性CD4⁺和CD8⁺T细胞的数量来保护小鼠免受致命的疟疾感染,从而介导CD4⁺和CD8⁺T细胞在疟疾感染小鼠中的生存。参见Karunaratne et al. Immunity (2016). Aug 16:45 (2):333-45,其全部内容通过引用并入本文。

感染疟疾的小鼠模型

[0314] 用非致死性疟疾(*P. yoelii* 17XNL)感染5只C57BL/6小鼠的群组。静脉注射10⁵个*P. yoelii*感染的红细胞后,将小鼠培养7天,使感染发生。研究中使用的所有动物都是按照国家健康医学研究委员会(NHMRC)的动物使用指南进行饲养和护理的。

sPD-L2

[0315] 作为阳性对照,用Genart(德国)公司定制的可溶性PD-L2"sPD-L2"处理CD4⁺和CD8⁺T细胞。

细胞分离、处理和存活率测定

[0316] 通过使用用于未受影响的CD4⁺和CD8⁺T细胞的Miltenyi Biotec Inc. (Auburn, CA)的试剂盒的FACS,从受感染的小鼠中分离出CD4⁺和CD8⁺T细胞。分离,然后在37°C下培养36小时。接下来,用20mg/ml的sPD-L2或20mg/ml的抗小鼠GAL9(108A2)处理CD4⁺和CD8⁺T细胞。处理后,用活力染料和流式细胞术对细胞进行活力测定。

结果/结论

[0317] CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的存活测定实验结果分别显示在图8A和图8B中。用sPD-L2处理增加了CD4⁺和CD8⁺T细胞中PD-L2介导的存活。相反,用sPD-L2和抗GAL9(108A2)处理后,CD4⁺和CD8⁺T细胞中的PD-L2介导的存活率都下降。这些结果表明,PD-L2与GAL9共同起作用,介导CD4⁺和CD8⁺T细胞的生存。

6.11.7. 实施例6:阻断GAL9/PD-L2途径可减少疟疾感染小鼠活化CD4⁺T细胞中的促炎症细胞因子

[0318] 本研究旨在确定通过阻断性抗PD-L2抗体或抑制性抗小鼠GAL9 (108A2) 抗体阻断GAL9/PD-L2途径是否能减少疟疾感染小鼠的活化CD4⁺T细胞中促炎症细胞因子的分泌。

感染疟疾的小鼠模型

[0319] 将5只C57BL/6小鼠组成的队列感染疟疾菌株P.yoelii 17XNL并培养7天,以使感染发生。研究中使用的所有动物都按照NHMRC的动物使用指南进行饲养和照料。

抗体

[0320] 使用阻断性抗小鼠PD-L2 mAb克隆TY25 (BioXCell, Lebanon, NH) 或抑制性抗小鼠GAL9克隆108A2 (**BioLegend®** San Diego, CA)。

细胞分离和共培养的刺激

[0321] 通过使用用于CD4⁺T细胞分离Miltenyi Biotec试剂盒 (Auburn, CA) 和用于DC分离的CD11c⁺珠球,从感染疟疾的小鼠分离CD4⁺T细胞和DC细胞。接下来,将大约1x10⁶个T细胞与2x10⁵个DC在至少一式三份的孔中进行培养,然后与20ug/ml的抗PD-L2 mAb或20ug/ml的抗Gal9 mAb培养36小时。

细胞因子测定

[0322] 处理后,按照制造商的说明,用BDTMCytometric Bead Array (CBA) 测量IFN- γ 或TNF- α 的浓度。

统计分析

[0323] 使用GraphPad Prism (GraphPad Software) 进行带Welch's校正的非配对t检验。

结果/结论

[0324] 图9A显示了每个处理组检测的IFN- γ 浓度的柱状图。与未处理的共培养对照组相比,用抗PD-L2或抗GAL9 (108A2) 处理都导致IFN- γ 水平显著降低。

[0325] 图9B显示了每个处理组检测到的TNF- α 浓度的柱状图。用抗PD-L2或抑制性抗小鼠GAL9抗体 (108A2) 处理,与未处理的共培养对照组相比,TNF- α 水平明显降低。星号"*"表示与对照组相比,P值<0.05的统计学显著性。值得注意的是,用抗PD-L2和抗GAL9 (108A2) 处理将IFN- γ 和TNF- α 的降至大致相同的浓度水平。

6.11.8. 例7:人GAL9 (抗人GAL9) 的结合臂探索活动

[0326] 如上所述,使用单克隆噬菌体ELISA格式,针对GAL9抗原筛选了其中引入了Fab CDR的多样性的化学合成的Fab噬菌体文库。对表达识别GAL9的Fabs的噬菌体克隆进行测序。

[0327] 该活动最初确定了52个GAL9结合候选者(抗原结合位点克隆)。在这些克隆的可变区域被重新格式化为二价单特异性人IgG1格式后进行功能测定,确定了30种具有免疫抑制特性的抗体。

[0328] 表3列出了来自30个抑制性ABS克隆的VH CDR1/2/3序列,只显示了在构建库时被改变的CDR的残基。表4列出了已鉴定的ABS克隆中的VL CDR1/2/3序列;轻链CDR1和CDR2序列是不变的,只有CDR3的残基在构建库时有变化。

表 3
候选的抗人 GAL9 VH 抗原结合位点

ABS 克隆	CDR1 (变体残基)	SEQ ID #	CDR2 (变体残基)	SEQ ID #	CDR3 (变体残基)	SEQ ID #
P9-01	SSYW	7	WIDPDYGTTS	59	AGISYVF	111

表 3
候选的抗人 GAL9 VH 抗原结合位点

ABS 克隆	CDR1 (变体残基)	SEQ ID #	CDR2 (变体残基)	SEQ ID #	CDR3 (变体残基)	SEQ ID #
P9-02A	SSYW	8	WIDPDYGTTS	60	AQYVPGL	112
P9-03	SGYY	10	VISPYSGYTS	62	ATYMPYPYGF	114
P9-06	AYYG	13	YIYPHGYITD	65	DSGVPYYWAVL	117
P9-07	SSYY	14	YISPYGGDTS	66	DSYMSYIDGF	118
P9-11	SSYY	18	YISPSGGYTY	70	GAVLYSSAM	122
P9-12	SSYW	19	SIASYFGQTY	71	GFGYAAM	123
P9-14	GSYY	20	DIYPYFSSTY	72	GSHFGF	124
P9-23	SQYY	28	TIYPRGGYTF	80	KSYWGM	132
P9-24	SSYF	29	SIYPTSHSTS	81	LGYPGVM	133
P9-25	SSYY	30	SIYPYGSYTY	82	LGYSSTM	134
P9-26	SSYY	31	WIESSSHTD	83	LPYKYYLGVF	135
P9-29	SSYA	34	YIAPGGSYTY	86	LSYPGVM	138
P9-30	STYT	35	WIYPKGGSTD	87	PSGYGF	139
P9-34	STYF	38	YIYPQGGYTY	90	QSYPGVF	142
P9-37	WKYG	40	YIYPAGGITS	92	SDYYSGMGM	144
P9-38	SSYW	41	WIDPDYGTTS	93	SETGAAM	145
P9-40	RWYY	43	TIYPDWDYTT	95	SPVTGPYGF	147
P9-41	RYYW	44	AIYPSSDSTY	96	SSPYPYQGQVF	148
P9-42	SSYY	45	AIYSAWGTTY	97	SYGYVFGYSSGM	149
P9-43	HSYW	46	RIDSSKFGTY	98	SYIDYPVSPAVF	150
P9-44	SYYW	47	AISPSGSYTS	99	SYRFRTPYTVM	151
P9-45	FSYV	48	AIYPYSGYTT	100	TKYYDYHVF	152
P9-46	SRYY	49	FISSDSGYTQ	101	TMSYSAL	153
P9-50	SSYV	51	LIYSSGGYTQ	103	VGTTYPSRYLEAL	155

表 3
候选的抗人 GAL9 VH 抗原结合位点

ABS 克隆	CDR1 (变体残基)	SEQ ID #	CDR2 (变体残基)	SEQ ID #	CDR3 (变体残基)	SEQ ID #
P9-51	SSYY	52	GIYPEGSYTY	104	VGYPGVM	156
P9-52	STYL	53	AITPYSGYTS	105	VGYPMVM	157
P9-53	SRYQ	54	YIASASGTTS	106	VPYVAM	158
P9-56	SSYY	56	YIDSSGKYTD	108	YAYPGVM	160
P9-57	SSYY	57	TIYPSGGYTY	109	YSYPGVL	161

表 4
候选的抗人 GAL9 VL 抗原结合位点

ABS 克隆	CDR1 (非变体)	SEQ ID #	CDR2 (非变体)	SEQ ID #	CDR3 (变体残基)	SEQ ID #
P9-01	RASQSVSSA	163	SASSLYS	215	QVSDLL	267
P9-02A	RASQSVSSA	164	SASSLYS	216	SYPTLG	268
P9-03	RASQSVSSA	166	SASSLYS	218	GGSFY	270
P9-06	RASQSVSSA	169	SASSLYS	221	HFSSPG	273
P9-07	RASQSVSSA	170	SASSLYS	222	WTSTLW	274
P9-11	RASQSVSSA	174	SASSLYS	226	YYPSPS	278
P9-12	RASQSVSSA	175	SASSLYS	227	EYGRPY	279
P9-14	RASQSVSSA	176	SASSLYS	228	HASGPL	280
P9-23	RASQSVSSA	184	SASSLYS	236	WSVYLE	288
P9-24	RASQSVSSA	185	SASSLYS	237	VDSRLA	289
P9-25	RASQSVSSA	186	SASSLYS	238	WAPDLT	290
P9-26	RASQSVSSA	187	SASSLYS	239	YSSSLY	291
P9-29	RASQSVSSA	190	SASSLYS	242	GYSSLL	294
P9-30	RASQSVSSA	191	SASSLYS	243	YLSSPY	295
P9-34	RASQSVSSA	194	SASSLYS	246	WTIALT	298

表 4 候选的抗人 GAL9 VL 抗原结合位点						
ABS 克隆	CDR1 (非变体)	SEQ ID #	CDR2 (非变体)	SEQ ID #	CDR3 (变体残基)	SEQ ID #
P9-37	RASQSVSSA	196	SASSLYS	248	YYSPSPS	300
P9-38	RASQSVSSA	197	SASSLYS	249	GSYFLQ	301
P9-40	RASQSVSSA	199	SASSLYS	251	PTYSLW	303
P9-41	RASQSVSSA	200	SASSLYS	252	WYSSLW	304
P9-42	RASQSVSSA	201	SASSLYS	253	WSSDLV	305
P9-43	RASQSVSSA	202	SASSLYS	254	VYFSPY	306
P9-44	RASQSVSSA	203	SASSLYS	255	GIDSPE	307
P9-45	RASQSVSSA	204	SASSLYS	256	GWDSLW	308
P9-46	RASQSVSSA	205	SASSLYS	257	YWWSPE	309
P9-50	RASQSVSSA	207	SASSLYS	259	FGSSLP	311
P9-51	RASQSVSSA	208	SASSLYS	260	WGSSLA	312
P9-52	RASQSVSSA	209	SASSLYS	261	LDYSLA	313
P9-53	RASQSVSSA	210	SASSLYS	262	GYPHPG	314
P9-56	RASQSVSSA	212	SASSLYS	264	YDYSLW	316
P9-57	RASQSVSSA	213	SASSLYS	265	SSSFLW	317

[0329] 表5根据多个本领域公认的定义,列出了人候选抑制性抗GAL9抗体的完整CDR序列。

表 5 CDR 定义					
区域	定义	序列	残基	长度	SEQ ID NO:
P9-01					
CDR-H1	Chothia	GFTFSSY---	26 - 32	7	318
	AbM	GFTFSSYWIH	26 - 35	10	319
	Kabat	-----SYWIH	31 - 35	5	320
	Contact	-----SSYWIH	30 - 35	6	321
	IMGT	GFTFSSYW--	26 - 33	8	322
CDR-H2	Chothia	-----DPDYGT-----	52 - 57	6	323
	AbM	---WIDPDYGTTS-----	50 - 59	10	324
	Kabat	---WIDPDYGTTSYADSVKG	50 - 66	17	325
	Contact	WVAWIDPDYGTTS-----	47 - 59	13	326
	IMGT	-----IDPDYGT-----	51 - 58	8	327
CDR-H3	Chothia	--AGISYVFDY	99 - 107	9	328
	AbM	--AGISYVFDY	99 - 107	9	329
	Kabat	--AGISYVFDY	99 - 107	9	330
	Contact	ARAGISYVFD-	97 - 106	10	331
	IMGT	ARAGISYVFDY	97 - 107	11	332
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	333
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	334
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	335
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	336

	IMGT	---QVSVA---	27 - 32	6	337
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	338
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	339
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	340
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	341
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	342
CDR-L3	Chothia	QQQVSDLLT	89 - 97	9	343
	AbM	QQQVSDLLT	89 - 97	9	344
	Kabat	QQQVSDLLT	89 - 97	9	345
	Contact	QQQVSDLL-	89 - 96	8	346
	IMGT	QQQVSDLLT	89 - 97	9	347
P9-02A					
CDR-H1	Chothia	GFTFSSY---	26 - 32	7	348
	AbM	GFTFSSYWIH	26 - 35	10	349
	Kabat	-----SYWIH	31 - 35	5	350
	Contact	-----SSYWIH	30 - 35	6	351
	IMGT	GFTFSSYW--	26 - 33	8	352
CDR-H2	Chothia	-----DPDYGTT-----	52 - 57	6	353
	AbM	----WIDPDYGTTS-----	50 - 59	10	354
	Kabat	----WIDPDYGTTSYADSVKG	50 - 66	17	355
	Contact	WVAWIDPDYGTTS-----	47 - 59	13	356
	IMGT	-----IDPDYGT-----	51 - 58	8	357
CDR-H3	Chothia	--AQYVPGLDY	99 - 107	9	358
	AbM	--AQYVPGLDY	99 - 107	9	359
	Kabat	--AQYVPGLDY	99 - 107	9	360
	Contact	ARAYVPGLD-	97 - 106	10	361
	IMGT	ARAYVPGLDY	97 - 107	11	362

CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	363
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	364
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	365
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	366
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	367
CDR-L2	Chothia	-----SASSLYS	50 - 56	7	368
	AbM	-----SASSLYS	50 - 56	7	369
	Kabat	-----SASSLYS	50 - 56	7	370
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	371
	IMGT	-----SA-----	50 - 51	2	372
CDR-L3	Chothia	QQSYPTLGT	89 - 97	9	373
	AbM	QQSYPTLGT	89 - 97	9	374
	Kabat	QQSYPTLGT	89 - 97	9	375
	Contact	QQSYPTLG-	89 - 96	8	376
	IMGT	QQSYPTLGT	89 - 97	9	377
P9-03					
CDR-H1	Chothia	GFTFSGY---	26 - 32	7	378
	AbM	GFTFSGYIH	26 - 35	10	379
	Kabat	-----GYIH	31 - 35	5	380
	Contact	-----SGYIH	30 - 35	6	381
	IMGT	GFTFSGY--	26 - 33	8	382
CDR-H2	Chothia	-----SPYSGY-----	52 - 57	6	383
	AbM	---VISPYSGYTS-----	50 - 59	10	384
	Kabat	---VISPYSGYTSYADSVKG	50 - 66	17	385
	Contact	WVAVISPYSGYTS-----	47 - 59	13	386
	IMGT	-----ISPYSGYT-----	51 - 58	8	387
CDR-H3	Chothia	--ATYMPYGFYD	99 - 109	11	388

	AbM	--ATYMPYGFY	99 - 109	11	389
	Kabat	--ATYMPYGFY	99 - 109	11	390
	Contact	ARATYMPYGF-	97 - 108	12	391
	IMGT	ARATYMPYGFY	97 - 109	13	392
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	393
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	394
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	395
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	396
	IMGT	----QSVSSA----	27 - 32	6	397
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	398
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	399
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	400
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	401
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	402
CDR-L3	Chothia	QQGGSFPYT	89 - 97	9	403
	AbM	QQGGSFPYT	89 - 97	9	404
	Kabat	QQGGSFPYT	89 - 97	9	405
	Contact	QQGGSFPY-	89 - 96	8	406
	IMGT	QQGGSFPYT	89 - 97	9	407
P9-06					
CDR-H1	Chothia	GTFAYY---	26 - 32	7	408
	AbM	GTFAYYGIH	26 - 35	10	409
	Kabat	-----YIGH	31 - 35	5	410
	Contact	----AYIGH	30 - 35	6	411
	IMGT	GTFAYYG--	26 - 33	8	412
CDR-H2	Chothia	-----YPHGYI-----	52 - 57	6	413
	AbM	---YIYPHGYITD-----	50 - 59	10	414

	Kabat	---YIYPHGYITDYADSVKG	50 - 66	17	415
	Contact	WVAYIYPHGYITD-----	47 - 59	13	416
	IMGT	-----IYPHGYIT-----	51 - 58	8	417
CDR-H3	Chothia	--DSGVPYYWAVLDY	99 - 111	13	418
	AbM	--DSGVPYYWAVLDY	99 - 111	13	419
	Kabat	--DSGVPYYWAVLDY	99 - 111	13	420
	Contact	ARDSGVPYYWAVLD-	97 - 110	14	421
	IMGT	ARDSGVPYYWAVLDY	97 - 111	15	422
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	423
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	424
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	425
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	426
	IMGT	----QSVSSA-----	27 - 32	6	427
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	428
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	429
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	430
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	431
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	432
CDR-L3	Chothia	QQHFSSPGT	89 - 97	9	433
	AbM	QQHFSSPGT	89 - 97	9	434
	Kabat	QQHFSSPGT	89 - 97	9	435
	Contact	QQHFSSPG-	89 - 96	8	436
	IMGT	QQHFSSPGT	89 - 97	9	437
p9-07					
CDR-H1	Chothia	GFTFSS---	26 - 32	7	438
	AbM	GFTFSSYYIH	26 - 35	10	439
	Kabat	-----SYIYH	31 - 35	5	440

	Contact	----SSYYIH	30 - 35	6	441
	IMGT	GFTSSYY--	26 - 33	8	442
CDR-H2	Chothia	-----SPYGGD-----	52 - 57	6	443
	AbM	---YISPYGGDTS-----	50 - 59	10	444
	Kabat	---YISPYGGDTSYADSVKG	50 - 66	17	445
	Contact	WVAYISPYGGDTS-----	47 - 59	13	446
	IMGT	----ISPYGGDT-----	51 - 58	8	447
CDR-H3	Chothia	--DSYMSYIDGFDY	99 - 110	12	448
	AbM	--DSYMSYIDGFDY	99 - 110	12	449
	Kabat	--DSYMSYIDGFDY	99 - 110	12	450
	Contact	ARDSYMSYIDGFD-	97 - 109	13	451
	IMGT	ARDSYMSYIDGFDY	97 - 110	14	452
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	453
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	454
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	455
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	456
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	457
CDR-L2	Chothia	-----SASSLYS	50 - 56	7	458
	AbM	-----SASSLYS	50 - 56	7	459
	Kabat	-----SASSLYS	50 - 56	7	460
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	461
	IMGT	-----SA-----	50 - 51	2	462
CDR-L3	Chothia	QQWTSTLWT	89 - 97	9	463
	AbM	QQWTSTLWT	89 - 97	9	464
	Kabat	QQWTSTLWT	89 - 97	9	465
	Contact	QQWTSTLW-	89 - 96	8	466
	IMGT	QQWTSTLWT	89 - 97	9	467

P9-11					
CDR-H1	Chothia	GFTFSY---	26 - 32	7	468
	AbM	GFTFSYYIH	26 - 35	10	469
	Kabat	-----SYIH	31 - 35	5	470
	Contact	----SSYYIH	30 - 35	6	471
	IMGT	GFTFSYY--	26 - 33	8	472
CDR-H2	Chothia	-----SPGGY-----	52 - 57	6	473
	AbM	---YISPSGGYTY-----	50 - 59	10	474
	Kabat	---YISPSGGYTYADSVKG	50 - 66	17	475
	Contact	WVAYISPSGGYTY-----	47 - 59	13	476
	IMGT	----ISPSGGYT-----	51 - 58	8	477
CDR-H3	Chothia	--GAVLYSSAMDY	99 - 109	11	478
	AbM	--GAVLYSSAMDY	99 - 109	11	479
	Kabat	--GAVLYSSAMDY	99 - 109	11	480
	Contact	ARGAVLYSSAMD-	97 - 108	12	481
	IMGT	ARGAVLYSSAMDY	97 - 109	13	482
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	483
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	484
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	485
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	486
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	487
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	488
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	489
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	490
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	491
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	492
CDR-L3	Chothia	QQYFPSPST	89 - 97	9	493

	AbM	QQYYPSPST	89 - 97	9	494
	Kabat	QQYYPSPST	89 - 97	9	495
	Contact	QQYYPSPS-	89 - 96	8	496
	IMGT	QQYYPSPST	89 - 97	9	497
P9-12					
CDR-H1	Chothia	GFTFSS---	26 - 32	7	498
	AbM	GFTFSSYWIH	26 - 35	10	499
	Kabat	-----SYWIH	31 - 35	5	500
	Contact	-----SSYWIH	30 - 35	6	501
	IMGT	GFTFSSYW--	26 - 33	8	502
CDR-H2	Chothia	-----ASYFGQ-----	52 - 57	6	503
	AbM	----SIASYFGQTY-----	50 - 59	10	504
	Kabat	----SIASYFGQTYADSVKG	50 - 66	17	505
	Contact	WVASIASYFGQTY-----	47 - 59	13	506
	IMGT	-----IASYFGQT-----	51 - 58	8	507
CDR-H3	Chothia	--GFGYAAMDY	99 - 107	9	508
	AbM	--GFGYAAMDY	99 - 107	9	509
	Kabat	--GFGYAAMDY	99 - 107	9	510
	Contact	ARGFGYAAMD-	97 - 106	10	511
	IMGT	ARGFGYAAMDY	97 - 107	11	512
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	513
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	514
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	515
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	516
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	517
CDR-L2	Chothia	-----SASSLYS	50 - 56	7	518

	AbM	-----SASSLYS	50 - 56	7	519
	Kabat	-----SASSLYS	50 - 56	7	520
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	521
	IMGT	-----SA-----	50 - 51	2	522
CDR-L3	Chothia	QQEYGRPYT	89 - 97	9	523
	AbM	QQEYGRPYT	89 - 97	9	524
	Kabat	QQEYGRPYT	89 - 97	9	525
	Contact	QQEYGRPY-	89 - 96	8	526
	IMGT	QQEYGRPYT	89 - 97	9	527
CDR-H1	Chothia	GFTFGSY---	26 - 32	7	528
	AbM	GFTFGSYIH	26 - 35	10	529
	Kabat	-----SYIH	31 - 35	5	530
	Contact	-----GSYIH	30 - 35	6	531
	IMGT	GFTFGSY--	26 - 33	8	532
CDR-H2	Chothia	-----YPYFS-----	52 - 57	6	533
	AbM	---DIYPYFSSTY-----	50 - 59	10	534
	Kabat	---DIYPYFSSTYADSVKG	50 - 66	17	535
	Contact	WVADIYPYFSSTY-----	47 - 59	13	536
	IMGT	-----IYPYFSST-----	51 - 58	8	537
CDR-H3	Chothia	--GSHFGFDY	99 - 106	8	538
	AbM	--GSHFGFDY	99 - 106	8	539
	Kabat	--GSHFGFDY	99 - 106	8	540

p9-14

	Contact	ARGSHFGFD-	97 - 105	9	541
	IMGT	ARGSHFGFDY	97 - 106	10	542
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	543
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	544
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	545
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	546
	IMGT	----QSVSSA----	27 - 32	6	547
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	548
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	549
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	550
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	551
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	552
CDR-L3	Chothia	QQHASGPLT	89 - 97	9	553
	AbM	QQHASGPLT	89 - 97	9	554
	Kabat	QQHASGPLT	89 - 97	9	555
	Contact	QQHASGPL-	89 - 96	8	556
	IMGT	QQHASGPLT	89 - 97	9	557
P9-23					
CDR-H1	Chothia	GTFSQY---	26 - 32	7	558
	AbM	GTFSQYIYH	26 - 35	10	559
	Kabat	-----QYIYH	31 - 35	5	560
	Contact	----SQYIYH	30 - 35	6	561
	IMGT	GTFSQYIY--	26 - 33	8	562
CDR-H2	Chothia	-----YPRGGY-----	52 - 57	6	563
	AbM	---TIYPRGGYTF-----	50 - 59	10	564
	Kabat	---TIYPRGGYTFYADSVKG	50 - 66	17	565
	Contact	WVATIYPRGGYTF-----	47 - 59	13	566

	IMGT	-----IYPRGGYT-----	51 - 58	8	567
CDR-H3	Chothia	--KSYWGMDY	99 - 106	8	568
	AbM	--KSYWGMDY	99 - 106	8	569
	Kabat	--KSYWGMDY	99 - 106	8	570
	Contact	ARKSYWGMD-	97 - 105	9	571
	IMGT	ARKSYWGMDY	97 - 106	10	572
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	573
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	574
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	575
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	576
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	577
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	578
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	579
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	580
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	581
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	582
CDR-L3	Chothia	QQWSVYLET	89 - 97	9	583
	AbM	QQWSVYLET	89 - 97	9	584
	Kabat	QQWSVYLET	89 - 97	9	585
	Contact	QQWSVYLE-	89 - 96	8	586
	IMGT	QQWSVYLET	89 - 97	9	587
P9-24					
CDR-H1	Chothia	GFTFSS---	26 - 32	7	588
	AbM	GFTFSSYFIH	26 - 35	10	589
	Kabat	-----SYFIH	31 - 35	5	590
	Contact	-----SSYFIH	30 - 35	6	591

	IMGT	GFTFSYF--	26 - 33	8	592
CDR-H2	Chothia	-----YPTSHS-----	52 - 57	6	593
	AbM	---SIYPTSHSTS-----	50 - 59	10	594
	Kabat	---SIYPTSHSTSYADSVKG	50 - 66	17	595
	Contact	WVASIYPTSHSTS-----	47 - 59	13	596
	IMGT	-----IYPTSHST-----	51 - 58	8	597
CDR-H3	Chothia	--LGYPGVMDY	99 - 107	9	598
	AbM	--LGYPGVMDY	99 - 107	9	599
	Kabat	--LGYPGVMDY	99 - 107	9	600
	Contact	ARLGYPGVMD-	97 - 106	10	601
	IMGT	ARLGYPGVMDY	97 - 107	11	602
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	603
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	604
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	605
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	606
	IMGT	----QSVSSA----	27 - 32	6	607
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	608
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	609
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	610
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	611
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	612
CDR-L3	Chothia	QQVDSRLAT	89 - 97	9	613
	AbM	QQVDSRLAT	89 - 97	9	614
	Kabat	QQVDSRLAT	89 - 97	9	615
	Contact	QQVDSRLA-	89 - 96	8	616
	IMGT	QQVDSRLAT	89 - 97	9	617
P9-25					

CDR-H1	Chothia	GFTFSSY---	26 - 32	7	618
	AbM	GFTFSSYIH	26 - 35	10	619
	Kabat	-----SYIH	31 - 35	5	620
	Contact	----SSYIH	30 - 35	6	621
	IMGT	GFTFSSY--	26 - 33	8	622
CDR-H2	Chothia	-----YPGSY-----	52 - 57	6	623
	AbM	---SIYPYGSYTY-----	50 - 59	10	624
	Kabat	---SIYPYGSYTYADSVKG	50 - 66	17	625
	Contact	WVASIYPYGSYTY-----	47 - 59	13	626
	IMGT	-----IYPYGSYT-----	51 - 58	8	627
CDR-H3	Chothia	--LGYSSGMDY	99 - 107	9	628
	AbM	--LGYSSGMDY	99 - 107	9	629
	Kabat	--LGYSSGMDY	99 - 107	9	630
	Contact	ARLGYSSGMD-	97 - 106	10	631
	IMGT	ARLGYSSGMDY	97 - 107	11	632
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	633
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	634
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	635
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	636
	IMGT	---QSVSSA-----	27 - 32	6	637
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	638
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	639
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	640
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	641
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	642
CDR-L3	Chothia	QQWAPDLTT	89 - 97	9	643
	AbM	QQWAPDLTT	89 - 97	9	644
	Kabat	QQWAPDLTT	89 - 97	9	645
	Contact	QQWAPDLT-	89 - 96	8	646

	IMGT	QQWAPDLTT	89 - 97	9	647
p9-26					
CDR-H1	Chothia	GFTFSY---	26 - 32	7	648
	AbM	GFTFSYYIH	26 - 35	10	649
	Kabat	-----SYIH	31 - 35	5	650
	Contact	----SSYYIH	30 - 35	6	651
	IMGT	GFTFSYY--	26 - 33	8	652
CDR-H2	Chothia	-----ESSSH-----	52 - 57	6	653
	AbM	---WIESSSHTD-----	50 - 59	10	654
	Kabat	---WIESSSHTDYADSVKG	50 - 66	17	655
	Contact	WVWIESSSHTD-----	47 - 59	13	656
	IMGT	----IESSSHT-----	51 - 58	8	657
CDR-H3	Chothia	--LPKYYYLGVFDY	99 - 111	13	658
	AbM	--LPKYYYLGVFDY	99 - 111	13	659
	Kabat	--LPKYYYLGVFDY	99 - 111	13	660
	Contact	ARLPKYYYLGVFD-	97 - 110	14	661
	IMGT	ARLPKYYYLGVFDY	97 - 111	15	662
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	663
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	664
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	665
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	666
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	667
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	668
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	669
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	670
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	671
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	672

CDR-L3	Chothia	QQYSSSLYT	89 - 97	9	673
	AbM	QQYSSSLYT	89 - 97	9	674
	Kabat	QQYSSSLYT	89 - 97	9	675
	Contact	QQYSSSLY-	89 - 96	8	676
	IMGT	QQYSSSLYT	89 - 97	9	677
P9-29					
CDR-H1	Chothia	GTFSSY---	26 - 32	7	678
	AbM	GTFSSYAIH	26 - 35	10	679
	Kabat	-----SYAIH	31 - 35	5	680
	Contact	-----SSYAIH	30 - 35	6	681
	IMGT	GTFSSYA--	26 - 33	8	682
CDR-H2	Chothia	-----APGSY-----	52 - 57	6	683
	AbM	---YIAPGGSYTY-----	50 - 59	10	684
	Kabat	---YIAPGGSYTYIYADSVKG	50 - 66	17	685
	Contact	WVAYIAPGGSYTY-----	47 - 59	13	686
	IMGT	-----IAPGGSYT-----	51 - 58	8	687
CDR-H3	Chothia	--LSYPGVMDY	99 - 107	9	688
	AbM	--LSYPGVMDY	99 - 107	9	689
	Kabat	--LSYPGVMDY	99 - 107	9	690
	Contact	ARLSYPGVMD-	97 - 106	10	691
	IMGT	ARLSYPGVMDY	97 - 107	11	692
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	693
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	694
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	695
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	696
	IMGT	----QSVSSA-----	27 - 32	6	697
CDR-L2	Chothia	-----SASSLYS	50 - 56	7	698

	AbM	-----SASSLYS	50 - 56	7	699
	Kabat	-----SASSLYS	50 - 56	7	700
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	701
	IMGT	-----SA-----	50 - 51	2	702
CDR-L3	Chothia	QQGYSSLLT	89 - 97	9	703
	AbM	QQGYSSLLT	89 - 97	9	704
	Kabat	QQGYSSLLT	89 - 97	9	705
	Contact	QQGYSSLL-	89 - 96	8	706
	IMGT	QQGYSSLLT	89 - 97	9	707
P9-30					
CDR-H1	Chothia	GFTFSTY---	26 - 32	7	708
	AbM	GFTFSTYTIH	26 - 35	10	709
	Kabat	-----TYTIH	31 - 35	5	710
	Contact	-----STYTIH	30 - 35	6	711
	IMGT	GFTFSTYT--	26 - 33	8	712
CDR-H2	Chothia	-----YPKGGS-----	52 - 57	6	713
	AbM	---WIYPKGGSTD-----	50 - 59	10	714
	Kabat	---WIYPKGGSTDYADSVKG	50 - 66	17	715
	Contact	WVAWIYPKGGSTD-----	47 - 59	13	716
	IMGT	-----IYPKGGST-----	51 - 58	8	717
CDR-H3	Chothia	--PSGYGFDY	99 - 106	8	718
	AbM	--PSGYGFDY	99 - 106	8	719
	Kabat	--PSGYGFDY	99 - 106	8	720
	Contact	ARPSGYGFD-	97 - 105	9	721
	IMGT	ARPSGYGFDY	97 - 106	10	722
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	723
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	724

	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	725
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	726
	IMGT	----QSVSSA----	27 - 32	6	727
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	728
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	729
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	730
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	731
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	732
CDR-L3	Chothia	QQYLSSPYT	89 - 97	9	733
	AbM	QQYLSSPYT	89 - 97	9	734
	Kabat	QQYLSSPYT	89 - 97	9	735
	Contact	QQYLSSPY-	89 - 96	8	736
	IMGT	QQYLSSPYT	89 - 97	9	737
P9-34					
CDR-H1	Chothia	GFTFTSTY---	26 - 32	7	738
	AbM	GFTFTSTYFIH	26 - 35	10	739
	Kabat	-----TYFIH	31 - 35	5	740
	Contact	-----STYFIH	30 - 35	6	741
	IMGT	GFTFTSTYF--	26 - 33	8	742
CDR-H2	Chothia	-----YPQGGY-----	52 - 57	6	743
	AbM	---YIYPQGGYTY-----	50 - 59	10	744
	Kabat	---YIYPQGGYTYADSVKG	50 - 66	17	745
	Contact	WVAYIYPQGGYTY-----	47 - 59	13	746
	IMGT	-----IYPQGGYT-----	51 - 58	8	747
CDR-H3	Chothia	--QSYPGVFDY	99 - 107	9	748
	AbM	--QSYPGVFDY	99 - 107	9	749
	Kabat	--QSYPGVFDY	99 - 107	9	750

	Contact	ARQSYPGVFD-	97 - 106	10	751
	IMGT	ARQSYPGVFDY	97 - 107	11	752
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	753
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	754
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	755
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	756
	IMGT	----QSVSSA----	27 - 32	6	757
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	758
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	759
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	760
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	761
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	762
CDR-L3	Chothia	QQWTIALTT	89 - 97	9	763
	AbM	QQWTIALTT	89 - 97	9	764
	Kabat	QQWTIALTT	89 - 97	9	765
	Contact	QQWTIALT-	89 - 96	8	766
	IMGT	QQWTIALTT	89 - 97	9	767
P9-37					
CDR-H1	Chothia	GTFSSY---	26 - 32	7	768
	AbM	GTFSSYWIH	26 - 35	10	769
	Kabat	-----SYWIH	31 - 35	5	770
	Contact	----SSYWIH	30 - 35	6	771
	IMGT	GTFSSYW--	26 - 33	8	772
CDR-H2	Chothia	-----DPDYGTT-----	52 - 57	6	773
	AbM	---WIDPDYGTT-----	50 - 59	10	774
	Kabat	---WIDPDYGTTSYADSVKG	50 - 66	17	775
	Contact	WVAWIDPDYGTT-----	47 - 59	13	776

	IMGT	-----IDPDYGT-----	51 - 58	8	777
CDR-H3	Chothia	--SETGAAMDY	99 - 107	9	778
	AbM	--SETGAAMDY	99 - 107	9	779
	Kabat	--SETGAAMDY	99 - 107	9	780
	Contact	ARSETGAAMD-	97 - 106	10	781
	IMGT	ARSETGAAMDY	97 - 107	11	782
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	783
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	784
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	785
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	786
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	787
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	788
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	789
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	790
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	791
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	792
CDR-L3	Chothia	QQGSYFLQT	89 - 97	9	793
	AbM	QQGSYFLQT	89 - 97	9	794
	Kabat	QQGSYFLQT	89 - 97	9	795
	Contact	QQGSYFLQ-	89 - 96	8	796
	IMGT	QQGSYFLQT	89 - 97	9	797
P9-40					
CDR-H1	Chothia	GFTRWY---	26 - 32	7	798
	AbM	GFTRWYIYH	26 - 35	10	799
	Kabat	-----WYIYH	31 - 35	5	800
	Contact	----RWYIYH	30 - 35	6	801
	IMGT	GFTRWY--	26 - 33	8	802

CDR-H2	Chothia	-----YPDWDY-----	52 - 57	6	803
	AbM	---TIYPDWDYTT-----	50 - 59	10	804
	Kabat	---TIYPDWDYTTYADSVKG	50 - 66	17	805
	Contact	WVATIYPDWDYTT-----	47 - 59	13	806
	IMGT	-----IYPDWDYT-----	51 - 58	8	807
CDR-H3	Chothia	--SPVTGPYGFDY	99 - 109	11	808
	AbM	--SPVTGPYGFDY	99 - 109	11	809
	Kabat	--SPVTGPYGFDY	99 - 109	11	810
	Contact	ARSPVTGPYGFD-	97 - 108	12	811
	IMGT	ARSPVTGPYGFDY	97 - 109	13	812
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	813
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	814
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	815
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	816
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	817
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	818
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	819
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	820
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	821
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	822
CDR-L3	Chothia	QQPTYSLWT	89 - 97	9	823
	AbM	QQPTYSLWT	89 - 97	9	824
	Kabat	QQPTYSLWT	89 - 97	9	825
	Contact	QQPTYSLW-	89 - 96	8	826
	IMGT	QQPTYSLWT	89 - 97	9	827
P9-41					
CDR-H1	Chothia	GFTRFY---	26 - 32	7	828

	AbM	GTFRYYWTH	26 - 35	10	829
	Kabat	-----YYWTH	31 - 35	5	830
	Contact	-----YYWTH	30 - 35	6	831
	IMGT	GTFRYYW--	26 - 33	8	832
CDR-H2	Chothia	-----YPSSDS-----	52 - 57	6	833
	AbM	---AIYPSSDSTY-----	50 - 59	10	834
	Kabat	---AIYPSSDSTYYADSVKG	50 - 66	17	835
	Contact	WVAAIYPSSDSTY-----	47 - 59	13	836
	IMGT	-----IYPSSDST-----	51 - 58	8	837
CDR-H3	Chothia	--SSPYPGQGVFDY	99 - 111	13	838
	AbM	--SSPYPGQGVFDY	99 - 111	13	839
	Kabat	--SSPYPGQGVFDY	99 - 111	13	840
	Contact	ARSSPYPGQGVFD-	97 - 110	14	841
	IMGT	ARSSPYPGQGVFDY	97 - 111	15	842
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	843
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	844
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	845
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	846
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	847
CDR-L2	Chothia	-----SASSLYS	50 - 56	7	848
	AbM	-----SASSLYS	50 - 56	7	849
	Kabat	-----SASSLYS	50 - 56	7	850
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	851
	IMGT	-----SA-----	50 - 51	2	852
CDR-L3	Chothia	QQWYSSLWT	89 - 97	9	853
	AbM	QQWYSSLWT	89 - 97	9	854
	Kabat	QQWYSSLWT	89 - 97	9	855
	Contact	QQWYSSLW-	89 - 96	8	856
	IMGT	QQWYSSLWT	89 - 97	9	857

P9-42

CDR-H1	Chothia	GFTFSY---	26 - 32	7	858
	AbM	GFTFSYYIH	26 - 35	10	859
	Kabat	-----SYIH	31 - 35	5	860
	Contact	-----SSYYIH	30 - 35	6	861
	IMGT	GFTFSYY--	26 - 33	8	862
CDR-H2	Chothia	-----YSAWG----	52 - 57	6	863
	AbM	---AIYSAWGTT-----	50 - 59	10	864
	Kabat	---AIYSAWGTTYYADSVKG	50 - 66	17	865
	Contact	WVAAIYSAWGTT-----	47 - 59	13	866
	IMGT	-----IYSAWGTT-----	51 - 58	8	867
CDR-H3	Chothia	--SYGVFGYSGMDY	99 - 112	14	868
	AbM	--SYGVFGYSGMDY	99 - 112	14	869
	Kabat	--SYGVFGYSGMDY	99 - 112	14	870
	Contact	ARSYGVFGYSGMD-	97 - 111	15	871
	IMGT	ARSYGVFGYSGMDY	97 - 112	16	872
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	873
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	874
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	875
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	876
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	877
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	878
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	879
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	880
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	881
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	882
CDR-L3	Chothia	QQWSSDLVT	89 - 97	9	883

	AbM	QQWSSDLVT	89 - 97	9	884
	Kabat	QQWSSDLVT	89 - 97	9	885
	Contact	QQWSSDLV-	89 - 96	8	886
	IMGT	QQWSSDLVT	89 - 97	9	887
P9-43					
CDR-H1	Chothia	GFTHSY---	26 - 32	7	888
	AbM	GFTHSYWIH	26 - 35	10	889
	Kabat	-----SYWIH	31 - 35	5	890
	Contact	----HSYWIH	30 - 35	6	891
	IMGT	GFTHSYW--	26 - 33	8	892
CDR-H2	Chothia	-----DSSKFG-----	52 - 57	6	893
	AbM	---RIDSKFGTY-----	50 - 59	10	894
	Kabat	---RIDSKFGTYADSVKG	50 - 66	17	895
	Contact	WVARIDSKFGTY-----	47 - 59	13	896
	IMGT	----IDSKFGT-----	51 - 58	8	897
CDR-H3	Chothia	--SYIDYPVSPAVFDY	99 - 112	14	898
	AbM	--SYIDYPVSPAVFDY	99 - 112	14	899
	Kabat	--SYIDYPVSPAVFDY	99 - 112	14	900
	Contact	ARSYIDYPVSPAVFD-	97 - 111	15	901
	IMGT	ARSYIDYPVSPAVFDY	97 - 112	16	902
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	903
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	904
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	905
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	906
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	907
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	908
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	909

	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	910
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	911
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	912
CDR-L3	Chothia	QQVYFSPYT	89 - 97	9	913
	AbM	QQVYFSPYT	89 - 97	9	914
	Kabat	QQVYFSPYT	89 - 97	9	915
	Contact	QQVYFSPY-	89 - 96	8	916
	IMGT	QQVYFSPYT	89 - 97	9	917
P9-44					
CDR-H1	Chothia	GTFSYY---	26 - 32	7	918
	AbM	GTFSYYWIH	26 - 35	10	919
	Kabat	-----YYWIH	31 - 35	5	920
	Contact	-----SYWIH	30 - 35	6	921
	IMGT	GTFSYYW--	26 - 33	8	922
CDR-H2	Chothia	-----SPGSY-----	52 - 57	6	923
	AbM	---AISPGSYTS-----	50 - 59	10	924
	Kabat	---AISPGSYTSYADSVKG	50 - 66	17	925
	Contact	WVA AISPGSYTS-----	47 - 59	13	926
	IMGT	-----ISPGSYT-----	51 - 58	8	927
CDR-H3	Chothia	--SYRFRTPYTVMDY	99 - 112	14	928
	AbM	--SYRFRTPYTVMDY	99 - 112	14	929
	Kabat	--SYRFRTPYTVMDY	99 - 112	14	930
	Contact	ARSYRFRTPYTVMD-	97 - 111	15	931
	IMGT	ARSYRFRTPYTVMDY	97 - 112	16	932
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	933
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	934
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	935

	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	936
	IMGT	----QSVSSA----	27 - 32	6	937
CDR-L2	Chothia	-----SASSLYS	50 - 56	7	938
	AbM	-----SASSLYS	50 - 56	7	939
	Kabat	-----SASSLYS	50 - 56	7	940
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	941
	IMGT	-----SA-----	50 - 51	2	942
CDR-L3	Chothia	QQGIDSPET	89 - 97	9	943
	AbM	QQGIDSPET	89 - 97	9	944
	Kabat	QQGIDSPET	89 - 97	9	945
	Contact	QQGIDSPET	89 - 96	8	946
	IMGT	QQGIDSPET	89 - 97	9	947
P9-45					
CDR-H1	Chothia	GTFFFSY---	26 - 32	7	948
	AbM	GTFFFSYVIH	26 - 35	10	949
	Kabat	-----SYVIH	31 - 35	5	950
	Contact	----FSYVIH	30 - 35	6	951
	IMGT	GTFFFSYV--	26 - 33	8	952
CDR-H2	Chothia	-----YPYSGY-----	52 - 57	6	953
	AbM	---AIYPYSGYTT-----	50 - 59	10	954
	Kabat	---AIYPYSGYTTYADSVKG	50 - 66	17	955
	Contact	WVAALYPYSGYTT-----	47 - 59	13	956
	IMGT	-----IYPYSGYT-----	51 - 58	8	957
CDR-H3	Chothia	--TKYYDYHVFDY	99 - 109	11	958
	AbM	--TKYYDYHVFDY	99 - 109	11	959
	Kabat	--TKYYDYHVFDY	99 - 109	11	960
	Contact	ARTKYYDYHVFD-	97 - 108	12	961

	IMGT	ARTKYDYHVFY	97 - 109	13	962
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	963
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	964
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	965
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	966
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	967
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	968
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	969
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	970
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	971
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	972
CDR-L3	Chothia	QQGWDSLVT	89 - 97	9	973
	AbM	QQGWDSLVT	89 - 97	9	974
	Kabat	QQGWDSLVT	89 - 97	9	975
	Contact	QQGWDSLVT	89 - 96	8	976
	IMGT	QQGWDSLVT	89 - 97	9	977
P9-46					
CDR-H1	Chothia	GFTFSRY---	26 - 32	7	978
	AbM	GFTFSRYIH	26 - 35	10	979
	Kabat	-----RYIH	31 - 35	5	980
	Contact	----SRYYIH	30 - 35	6	981
	IMGT	GFTFSRY--	26 - 33	8	982
CDR-H2	Chothia	-----SSDSGY-----	52 - 57	6	983
	AbM	----FISSDSGYTQ-----	50 - 59	10	984
	Kabat	----FISSDSGYTQADSVKG	50 - 66	17	985
	Contact	WVAFISSDSGYTQ-----	47 - 59	13	986

	IMGT	-----ISSDSGYT-----	51 - 58	8	987
CDR-H3	Chothia	--TMSYSALDY	99 - 107	9	988
	AbM	--TMSYSALDY	99 - 107	9	989
	Kabat	--TMSYSALDY	99 - 107	9	990
	Contact	ARTMSYSALD-	97 - 106	10	991
	IMGT	ARTMSYSALDY	97 - 107	11	992
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	993
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	994
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	995
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	996
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	997
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	998
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	999
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	1000
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	1001
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	1002
CDR-L3	Chothia	QQYWWSPET	89 - 97	9	1003
	AbM	QQYWWSPET	89 - 97	9	1004
	Kabat	QQYWWSPET	89 - 97	9	1005
	Contact	QQYWWSPE-	89 - 96	8	1006
	IMGT	QQYWWSPET	89 - 97	9	1007
P9-50					
CDR-H1	Chothia	GTFSSY---	26 - 32	7	1008
	AbM	GTFSSYVIH	26 - 35	10	1009
	Kabat	-----SYVIH	31 - 35	5	1010
	Contact	-----SSYVIH	30 - 35	6	1011
	IMGT	GTFSSYV--	26 - 33	8	1012

CDR-H2	Chothia	-----YSSGGY-----	52 - 57	6	1013
	AbM	---LIYSSGGYTQ-----	50 - 59	10	1014
	Kabat	---LIYSSGGYTQYADSVKG	50 - 66	17	1015
	Contact	WVALIYSSGGYTQ-----	47 - 59	13	1016
	IMGT	-----IYSSGGYT-----	51 - 58	8	1017
CDR-H3	Chothia	--VGTTPSPRYLEALDY	99 - 113	15	1018
	AbM	--VGTTPSPRYLEALDY	99 - 113	15	1019
	Kabat	--VGTTPSPRYLEALDY	99 - 113	15	1020
	Contact	ARVGTTPSPRYLEALD-	97 - 112	16	1021
	IMGT	ARVGTTPSPRYLEALDY	97 - 113	17	1022
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1023
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1024
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1025
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	1026
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	1027
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	1028
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	1029
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	1030
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	1031
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	1032
CDR-L3	Chothia	QQFGSSLPT	89 - 97	9	1033
	AbM	QQFGSSLPT	89 - 97	9	1034
	Kabat	QQFGSSLPT	89 - 97	9	1035
	Contact	QQFGSSLP-	89 - 96	8	1036
	IMGT	QQFGSSLPT	89 - 97	9	1037
p9-51					

CDR-H1	Chothia	GFTFSSY---	26 - 32	7	1038
	AbM	GFTFSSYIH	26 - 35	10	1039
	Kabat	-----SYIH	31 - 35	5	1040
	Contact	----SSYIH	30 - 35	6	1041
	IMGT	GFTFSSY--	26 - 33	8	1042
CDR-H2	Chothia	-----YPEGSY-----	52 - 57	6	1043
	AbM	---GIYPEGSYTY-----	50 - 59	10	1044
	Kabat	---GIYPEGSYTYADSVKG	50 - 66	17	1045
	Contact	WVAGIYPEGSYTY-----	47 - 59	13	1046
	IMGT	----IYPEGSYT-----	51 - 58	8	1047
CDR-H3	Chothia	--VGYPGVMDY	99 - 107	9	1048
	AbM	--VGYPGVMDY	99 - 107	9	1049
	Kabat	--VGYPGVMDY	99 - 107	9	1050
	Contact	ARVGYPGVMD-	97 - 106	10	1051
	IMGT	ARVGYPGVMDY	97 - 107	11	1052
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1053
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1054
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1055
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	1056
	IMGT	---QSVSSA-----	27 - 32	6	1057
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	1058
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	1059
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	1060
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	1061
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	1062
CDR-L3	Chothia	QWQGSSLAT	89 - 97	9	1063
	AbM	QWQGSSLAT	89 - 97	9	1064
	Kabat	QWQGSSLAT	89 - 97	9	1065
	Contact	QWQGSSLA-	89 - 96	8	1066

	IMGT	QQWSSSLAT	89 - 97	9	1067
p9-52					
CDR-H1	Chothia	GFTFSTY---	26 - 32	7	1068
	AbM	GFTFSTYLIH	26 - 35	10	1069
	Kabat	-----TYLIH	31 - 35	5	1070
	Contact	----STYLIH	30 - 35	6	1071
	IMGT	GFTFSTYL--	26 - 33	8	1072
CDR-H2	Chothia	-----TPYSGY-----	52 - 57	6	1073
	AbM	---AITPYSGYTS-----	50 - 59	10	1074
	Kabat	---AITPYSGYTSYADSVKG	50 - 66	17	1075
	Contact	WVAAITPYSGYTS-----	47 - 59	13	1076
	IMGT	-----ITPYSGYT-----	51 - 58	8	1077
CDR-H3	Chothia	--VGYPVMMDY	99 - 107	9	1078
	AbM	--VGYPVMMDY	99 - 107	9	1079
	Kabat	--VGYPVMMDY	99 - 107	9	1080
	Contact	ARVGYPVMMD-	97 - 106	10	1081
	IMGT	ARVGYPVMMDY	97 - 107	11	1082
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1083
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1084
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1085
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	1086
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	1087
CDR-L2	Chothia	-----SASSLYS	50 - 56	7	1088
	AbM	-----SASSLYS	50 - 56	7	1089
	Kabat	-----SASSLYS	50 - 56	7	1090
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	1091
	IMGT	-----SA-----	50 - 51	2	1092

CDR-L3	Chothia	QQLDYSLAT	89 - 97	9	1093
	AbM	QQLDYSLAT	89 - 97	9	1094
	Kabat	QQLDYSLAT	89 - 97	9	1095
	Contact	QQLDYSLA-	89 - 96	8	1096
	IMGT	QQLDYSLAT	89 - 97	9	1097
P9-53					
CDR-H1	Chothia	GFTSRY---	26 - 32	7	1098
	AbM	GFTSRYQIH	26 - 35	10	1099
	Kabat	-----RYQIH	31 - 35	5	1100
	Contact	-----SRYQIH	30 - 35	6	1101
	IMGT	GFTSRYQ--	26 - 33	8	1102
CDR-H2	Chothia	-----ASASGT-----	52 - 57	6	1103
	AbM	---YIASAGTTS-----	50 - 59	10	1104
	Kabat	---YIASAGTTSYADSVKG	50 - 66	17	1105
	Contact	WVAYIASAGTTS-----	47 - 59	13	1106
	IMGT	-----IASAGTT-----	51 - 58	8	1107
CDR-H3	Chothia	--VPYVAMDY	99 - 106	8	1108
	AbM	--VPYVAMDY	99 - 106	8	1109
	Kabat	--VPYVAMDY	99 - 106	8	1110
	Contact	ARVPYVAMD-	97 - 105	9	1111
	IMGT	ARVPYVAMDY	97 - 106	10	1112
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1113
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1114
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1115
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	1116

	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	1117
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	1118
	AbM	-----SASSLYS	50 - 56	7	1119
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	1120
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	1121
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	1122
CDR-L3	Chothia	QQGYPHPGT	89 - 97	9	1123
	AbM	QQGYPHPGT	89 - 97	9	1124
	Kabat	QQGYPHPGT	89 - 97	9	1125
	Contact	QQGYPHPG-	89 - 96	8	1126
	IMGT	QQGYPHPGT	89 - 97	9	1127
P9-56					
CDR-H1	Chothia	GFTFSSY---	26 - 32	7	1128
	AbM	GFTFSSYIH	26 - 35	10	1129
	Kabat	-----SYIH	31 - 35	5	1130
	Contact	----SSYIH	30 - 35	6	1131
	IMGT	GFTFSSY--	26 - 33	8	1132
CDR-H2	Chothia	-----DSSGY-----	52 - 57	6	1133
	AbM	---YIDSSGKYTD-----	50 - 59	10	1134
	Kabat	---YIDSSGKYTDYADSVKG	50 - 66	17	1135
	Contact	WVAYIDSSGKYTD-----	47 - 59	13	1136
	IMGT	----IDSSGKYT-----	51 - 58	8	1137
CDR-H3	Chothia	--YAYPGVMDY	99 - 107	9	1138
	AbM	--YAYPGVMDY	99 - 107	9	1139
	Kabat	--YAYPGVMDY	99 - 107	9	1140
	Contact	ARYAYPGVMD-	97 - 106	10	1141

	IMGT	ARYAYPGVMDY	97 - 107	11	1142
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1143
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1144
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1145
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	1146
	IMGT	---QSVSSA----	27 - 32	6	1147
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	1148
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	1149
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	1150
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	1151
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	1152
CDR-L3	Chothia	QQYDYSLWT	89 - 97	9	1153
	AbM	QQYDYSLWT	89 - 97	9	1154
	Kabat	QQYDYSLWT	89 - 97	9	1155
	Contact	QQYDYSLW-	89 - 96	8	1156
	IMGT	QQYDYSLWT	89 - 97	9	1157
P9-57					
CDR-H1	Chothia	GFTFSSY---	26 - 32	7	1158
	AbM	GFTFSSYIH	26 - 35	10	1159
	Kabat	-----SYIH	31 - 35	5	1160
	Contact	----SSYIH	30 - 35	6	1161
	IMGT	GFTFSSY--	26 - 33	8	1162
CDR-H2	Chothia	-----YPSGGY-----	52 - 57	6	1163
	AbM	---TIYPSGGYTY-----	50 - 59	10	1164
	Kabat	---TIYPSGGYTYADSVKG	50 - 66	17	1165
	Contact	WVATIYPSGGYTY-----	47 - 59	13	1166

	IMGT	-----IYPSGGYT-----	51 - 58	8	1167
CDR-H3	Chothia	--YSYPGVLDY	99 - 107	9	1168
	AbM	--YSYPGVLDY	99 - 107	9	1169
	Kabat	--YSYPGVLDY	99 - 107	9	1170
	Contact	ARYSYPGVLD-	97 - 106	10	1171
	IMGT	ARYSYPGVLDY	97 - 107	11	1172
CDR-L1	Chothia	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1173
	AbM	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1174
	Kabat	RASQSVSSAVA--	24 - 34	11	1175
	Contact	-----SSAVAWY	30 - 36	7	1176
	IMGT	----QSVSSA----	27 - 32	6	1177
CDR-L2	Chothia	----SASSLYS	50 - 56	7	1178
	AbM	----SASSLYS	50 - 56	7	1179
	Kabat	----SASSLYS	50 - 56	7	1180
	Contact	LLIYSASSLY-	46 - 55	10	1181
	IMGT	----SA-----	50 - 51	2	1182
CDR-L3	Chothia	QQSSSFLWT	89 - 97	9	1183
	AbM	QQSSSFLWT	89 - 97	9	1184
	Kabat	QQSSSFLWT	89 - 97	9	1185
	Contact	QQSSSFLW-	89 - 96	8	1186
	IMGT	QQSSSFLWT	89 - 97	9	1187

[0329] 表6列出了被格式化为二价单特异性人全长IgG1架构的各种ABS候选者的完整免疫球蛋白重链和完整免疫球蛋白轻链序列,以及VH和VL序列。

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-01	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYW IHWVRQAPGKGLEWV AWIDPDYGTTSYADSV KGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCA RAGISYVFDYWGGTL VTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKG QPREPVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQQ VSDLLTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKSTYSLSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY WIHWVRQAPG KGLEWVAWID PDYGTTSYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARAGISYVF DYWGQGTLLV VSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQQVS DLLTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-02A	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYW IHWVRQAPGKGLEWV AWIDPDYGTTSYADSV KGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCA RAQYVPGLDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSEF LYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHY TQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQS YPTLGTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY WIHWVRQAPG KGLEWVAWID PDYGTTSYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARAQYVPG LDYWGQGTLV TVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQSY TLGTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-03	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSGYY IHWVRQAPGKGLEWV AVISPYSGYTSYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR ATYMPYGFQDYWGQG TLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGGS FFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQG GSFPYTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSGY YIHWVRQAPG KGLEWVAVIS PYSGYTSYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARATYMVP YGFQDYWGQGT LVTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQGGS FPYTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-06	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFAYYG IHWVRQAPGKGLEWV AYIYPHGYITDYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR DSGVPYYWAVLDYWG QGTLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQH FSSPGTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	'EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFAYY GIHWVRQAPG KGLEWVAYIY PHGYITDYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARDGVPY YWAVLDYWG QGTLTVTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQHFS SPGTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-07	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYYI HWVRQAPGKGLEWVA YISPYGGDTSYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR DSYMSYIDGFDYWGQG TLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTALGC LVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGGS FFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQW TSTLWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY YIHWVRQAPG KGLEWVAYIS PYGGDTSYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARDYSYI DGFDYWGQGT LVTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQWT STLWTFGQG TKVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-11	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYYI HWVRQAPGKGLEWVA YISPSGGYTTYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR GAVLYSSAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQY YPSPSTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY YIHWVRQAPG KGLEWVAYIS PSGGYTTYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARGAVLYS SAMDYWGQG TLVTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQYYYP SPSTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-12	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYW IHWVRQAPGKGLEWV ASIASYFGQTYYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR GFGYAAMDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQE YGRPYTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY WIHWVRQAPG KGLEWVASIAS YFGQTYYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARGFGYAA MDYWGQGT LTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQEY GRPYTFGQG TKVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-14	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFGSY IHWVRQAPGKGLEWV ADIYPYFSSTYYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR GSHFGFDYWGGQTLV TVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSL	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQH ASGPLTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFGSY YIHWVRQAPG KGLEWVADIY PYFSSTYYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARGSHFGF DYWGQGT VSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQHAS GPLTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-23	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSQYY IHWVRQAPGKGLEWV ATYIPRGYTFYADSV KGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCA RKSYWGMDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSEF LYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHY TQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGDFTL TISSLQPEDFATYYCQW SVYLETFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSQY YIHWVRQAPG KGLEWVATYI PRGGYTFYAD SVKGRFTISAD TSKNTAYLQM NSLRAEDTAV YYCARFSYWG MDYWGQGT VTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQWS VYLETFGQG TKVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-24	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYFI HWVRQAPGKGLEWVA SIYPTSHSTSYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR LGYPGVMDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQV DSRLATFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY FIHWVRQAPG KGLEWVASIY PTSHSTSYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARLGYPGV MDYWGQGT LTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQVDS RLATFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-25	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYYI HWVRQAPGKGLEWVA SIYPYGSYTYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR LGYSYGMDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQW APDLTTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY YIHWRQAPG KGLEWVASIY PYGSYTYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARLGYSYG MDYWGQGT LTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQWA PDLTTFGQG TKVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-26	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYYI HWVRQAPGKGLEWVA WIESSSHTDYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR LPYKYYLGVFDYWG QGTLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQY SSSLYTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY YIHWRQAPG KGLEWVAWIE SSSHTDYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARLPYKYY YLGVDYWGQ GTLTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQYSS SLYTFGQGT KVEIKRTVA
NEG. CON				

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-29	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYAI HWVRQAPGKGLEWVA YIAPGGSYTYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR LSYPGVMDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQG YSSLLTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY AIHWVRQAPG KGLEWVAYIA PGGSYTYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARLSYPGV MDYWGQGT LTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQGYS SLLTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-30	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSTYT IHWVRQAPGKGLEWV AWIYPKGGSTDYADSV KGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCA RPSGYGFQDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSQSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQY LSSPYTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKSTYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSTY TIHWVRQAPG KGLEWVAVIY PKGGSTDYAD SVKGRFTISAD TSKNTAYLQM NSLRAEDTAV YYCARPSGYG FDYWGQGT TVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQYLS SPYTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-34	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSTYFI HWVRQAPGKGLEWVA YIYPQGGYTTYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR QSYPGVFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQGW TIALTTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSTY FIHWVRQAPG KGLEWVAYIY PQGGYTTYAD SVKGRFTISAD TSKNTAYLQM NSLRAEDTAV YYCARQSYPG VFDYWGQGT LTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQWTI ALTTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-37	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFWKY GIHWVRQAPGKGLEW VAYIYPAGGITSYADSV KGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCA RSDYYSGMGMDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQY YPSPSTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFWK YGIHWVRQAP GKGLEWVAYI YPAGGITSYAD SVKGRFTISAD TSKNTAYLQM NSLRAEDTAV YYCARSDYYS GMGMDYWGQ GTLVTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQYYP SPSTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-38	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYW IHWVRQAPGKGLEWV AWIDPDYGTTSYADSV KGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCA RSETGAAMDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSEF LYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMetHEALHNH YTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQG SYFLQTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY WIHWVRQAPG KGLEWVAWID PDYGTTSYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARSETGAA MDYWGQGT VTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQGSY FLQTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-40	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFRWY YIHWVRQAPGKGLEW VATIYPDWDTTYADS VKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYC ARSPVTGPYGFYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGGS FFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGDFTL TISSLQPEDFATYYCQQP TYSLWTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDSQLKS GTASVVCLLNFPYPREAK VQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFRW YIHWVRQAP GKGLEWVATI YPDWDTTYA DSVKGRFTISA DTSKNTAYLQ MNSLRAEDTA VYYCARSPVT GPYGFYWGQ GTLVTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQPTY SLWTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-41	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFRYY WIHWVRQAPGKGLEW VAAIYPSSDSTYYADSV KGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCA RSSPYPYQGQVFDYWG QGTLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQW YSSLWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	'EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFRYY WIHWVRQAPG KGLEWVAAIY PSSDSTYYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARSSPYPYG QGVFDYWGQ GTLTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQQWY SSLWTFGQG TKVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-42	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYYI HWVRQAPGKGLEWVA AIYSAWGTTYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR SYGYVFGYYSGMDYW GQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQGW SSDLVTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY YIHWVRQAPG KGLEWVAAIY SAWGTTYAD SVKGRFTISAD TSKNTAYLQM NSLRAEDTAV YYCARSYGYV FGYYSGMDYW GQGTLVTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQWSS DLVTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-43	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFHSY WIHWVRQAPGKGLEW VARIDSSKFGTTYADSV KGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCA RSYIDYPVSPAVFDYW GQGTLTVTSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQV YFSPYTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFHSY WIHWVRQAPG KGLEWVARID SSKFGTTYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARSYIDYPV SPAVFDYWGQ GTLTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQVYF SPYTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-44	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSYY WIHWVRQAPGKGLEW VAAISPSGSYTSYADSV KGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCA RSYYRFRTPYTVMDY WGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVT PSSSLGTQTYICNVNKH PSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPV LDSGGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSP GK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQGI DSPETFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDSQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSITLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSYY WIHWVRQAPG KGLEWVAAIS PSGSYTSYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARSYRFR TPYTVMDYWG QGTLLTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQGID SPETFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-45	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFFSYV IHWVRQAPGKGLEWV AAIYPYSGYTTYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR TKYYDYHVFQYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGDFTL TISSLQPEDFATYYCQQG WDSLVTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDSQLKS GTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLT SKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNREGC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFFSY VIHWVRQAPG KGLEWVAAY PYSGYTTYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARTKYYDY HVFQYWGQGT LVTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQGW DSLVTFGQG TKVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-46	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSRY IHWVRQAPGKGLEWV AFISDSGYTQYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR TMSYSALDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGDFTL TISSLPEDFATYYCQQY WWSPETFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDSQLKS GTASVVCLLNFPYPREAK VQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSTLSSTLTL SKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSRY YIHWVRQAPG KGLEWVAFISS DSGYTQYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARTMSYSA LDYWGQGT TVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQYW WSPETFGQG TKVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-50	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYVI HWVRQAPGKGLEWVA LIYSSGGYTQYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR VGTTPSRYLEALDYW GQGTLLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQF GSSLPTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY VIHWVRQAPG KGLEWVALIY SSGGYTQYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARVGTTP SRYLEALDYW GQGTLLTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQFGS SLPTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-51	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYYI HWVRQAPGKGLEWVA GIYPEGSYTYYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR VGYPGVMDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQGW GSSLATFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY YIHWRQAPG KGLEWVAGIY PEGSYTYYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARVGYPGV MDYWGQGT LTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQWG SSLATFGQG TKVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-52	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSTYL IHWVRQAPGKGLEWV AAITPYSGYTSYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR VGYPVMVMDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSEFF LYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHY TQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQL DYSLATFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSTY LIHWVRQAPG KGLEWVAAIT PYSGYTSYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARVGYPMV MDYWGQGT VTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQLDY SLATFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-53	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSRYQ IHWVRQAPGKGLEWV AYIASASGTTSYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR VPYVAMDYWGQGT TVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQG YPHPGTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSRY QIHWVRQAPG KGLEWVAYIA SASGTTSYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARVPYVAM DYWGQGT VSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQGY HPGTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-55	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFATYY IHWVRQAPGKGLEWV AYIDSESGYTTYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR VSRGSSGTHVMDYWG QGTLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSVVTVPPSSS LGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQR YSSLLTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDSQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFATY YIHWVRQAPG KGLEWVAYID SESGYTTYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARVSRGSSG THVMDYWGQ GTLTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQRYS SLLTFGQGT KVEIKRTV

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-56	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYYI HWVRQAPGKGLEWVA YIDSSGKYTDYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR YAYPGVMDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLD RDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGSRSGDFTL TISSLPEDFATYYCQQY DYSWTFEGQGTKVEIKR TVAAPSVEFIPPSDSQLKS GTASVVCLLNFPYREAK VQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSITLTL SKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNREGC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY YIHWRQAPG KGLEWVAYID SSGKYTDYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARYAYPGV MDYWGQGT LTVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQS VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQQYD YSLWTFGQ GTKVEIKRT V

表 6
候选 GAL9 ABS 克隆和包含 GAL9 ABS 的 IgG 格式化的抗体的完整链序列和 VH/VL 序列

ABS 克隆	完整 IgG 重链	完整 IgG 轻链	VH 序列	VL 序列
P9-57	EVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYYI HWVRQAPGKGLEWVA TIYPSGGYTYADSVK GRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR YSYPGVL DYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKG QPREPVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSVSSAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASSL YSGVPSRFSGRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQSS SFLWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDSQLSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTL ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFTFSSY YIHWVRQAPG KGLEWVATYI PSGGYTYADS VKGRFTISADT SKNTAYLQMN SLRAEDTAVY YCARYSYPGV LDYWGQGT TVSS	DIQMTQSPS SLSASVGDR VTITCRASQ VSSAVAWYQ QKPGKAPKL LIYSASSLYS GVPSRFSGS RSGTDFTLTI SSLQPEDFA TYYCQSSS FLWTFGQG TKVEIKRTV

[0331] 对选定的GAL9结合候选者进行了结合特性分析：与小鼠GAL9的交叉反应性结合；定性结合；表位分箱（箱2-与LS Bio公司的商业抗体克隆ECA8[LS-C179448]的候选箱；箱3-与LS Bio公司的商业抗体克隆ECA42[LS-C179449]（图10中提到的“工具抗体”）的候选箱），以及单价亲和性结合。分析结果列于表7。

表 7: 候选抗人 GAL9 结合特性

ABS	小鼠交叉反应性	结合 解离速率 (++ = 普通; +++ = 慢)	分箱	计算 K_D (M)
P9-01	Y	+++	1	
P9-02A	Y	+++	1	
P9-03		+++	1	

表 7: 候选抗人 GAL9 结合特性				
ABS	小鼠交叉反应性	结合 解离速率 (⁺⁺ = 普通; ⁺⁺⁺ = 慢)	分箱	计算 K _D (M)
P9-06		⁺⁺	1	
P9-07	Y	⁺⁺	3	
P9-11	Y	⁺⁺⁺	1	6.554x10 ⁻⁹
P9-12		⁺⁺	3	
P9-14		⁺⁺⁺	2	
P9-24		⁺⁺⁺	1	5.409 x 10 ⁻⁹
P9-25		⁺⁺⁺	1	3.48 x 10 ⁻⁹
P9-26		阴性对照 (NC)		
P9-29		⁺⁺⁺	1	
P9-30		⁺⁺⁺	1	
P9-34		⁺⁺⁺	1	
P9-37	Y	⁺⁺⁺	1	4.543 x 10 ⁻⁹
P9-38		⁺⁺	1	
P9-40	Y	⁺⁺⁺	1	
P9-41		⁺⁺	1	
P9-42	Y	⁺⁺	1	
P9-43	Y	⁺⁺⁺	1	
P9-45		⁺⁺	3	
P9-46		⁺⁺⁺	2	
P9-50	Y	⁺⁺⁺	3	1.206 x 10 ⁻⁹
P9-51		⁺⁺⁺	1	
P9-52		⁺⁺⁺	1	
P9-53		⁺⁺⁺	1	

表 7: 候选抗人 GAL9 结合特性				
ABS	小鼠交叉反应性	结合 解离速率 (⁺⁺ = 普通; ⁺⁺⁺ = 慢)	分箱	计算 K _D (M)
P9-55		阴性对照(NC)		
P9-56	Y	⁺⁺⁺	1	
P9-57	Y	⁺⁺⁺	1	2.557 x 10 ⁻⁹

[0332] 进一步分析了选定的GAL9结合候选物的序列基序,这些基序可能不利地影响与临床开发相关的抗体特性,诸如稳定性、可变异性和免疫原性。计算分析是根据Kumar和Singh (Developability of biotherapeutics:computational approaches.Boca Raton:CRC

Press,Taylor&Francis Group,2016) 进行的。分析结果见表8,并证明在所列克隆中存在数量有限的不利的序列基序,表明有进一步临床开发的潜力。

表 8: 候选抗人 GAL9 抗体属性											
ABS	CDR3 环长度	产量 (ug/mL)	分子量 (kDa)	等电点	脱氨基位点 数 ¹	异构化位点 数 ²	片段化位点 数 ³	N-连 糖基化位点数 ⁴	CDR 中的 Cys	其他位 点数 ⁵	T 细胞表 位数 ⁶
P9-07	15	45	1.453x10 ⁵	8.08	0	3	1	0	No	0	1
P9-11	14	68.85	1.446x10 ⁵	8.42	0	1	1	0	No	0	2
P9-24	12	72.15	1.438x10 ⁵	8.43	0	2	2	0	No	0	0
P9-25	12	163.5	1.444x10 ⁵	8.32	0	1	1	0	No	0	0
P9-37	14	108.45	1.447x10 ⁵	8.42	0	1	2	0	No	0	1
P9-50	18	78.6	1.453x10 ⁵	8.22	0	1	1	0	No	0	0
P9-55	-	-	1.452x10 ⁵	8.42	0	2	1	0	No	0	0
P9-57	12	30	1.442x10 ⁵	8.42	0	1	1	0	No	0	0

¹ (NG, NS, NA, NH, ND)

² (DG, DP, DS)

³ (DP, DY, HS, KT, HXS, SXH)

⁴ (NXS/T)

⁵ (LLQG, HPQ, FHENSP, LPRWG, HHH)

⁶ 3% in at least 2 of DRB1_0101,DRB1_0301,DRB1_0401,DRB1_0701,DRB1_1101,DRB1_1301,DRB1_1501,DRB1_0801

6.11.9. 实施例8: 抗人GAL9候选物对外周血单个核细胞 (PBMC) 产生细胞因子的影响

[0333] 候选的抗人GAL9抗原结合位点 (ABS) 被格式化为二价单特异性的天然全长IgG1重链和轻链架构(分别为SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:3), 并测试其对肽刺激后人PBMC产生细胞因子的影响。基本上按照上文第6.11.1节所描述的对PBMC进行了刺激。简而言之, 从已知对人CMV病毒 (HCMV) 有反应的人类供体中采集PBMC, 置于培养液中, 用HCMV PepMix刺激以引发抗原特异性反应, 并用以下之一处理: 对照IgG、对比性抗人GAL9工具激活性mAb (克隆ECA42, 小鼠IgG2a)、 α -PD1 (Nivolumab) 或格式化为二价单特异性全长人IgG1抗体的候选抗GAL9抗体。通过珠细胞因子阵列在处理24和72小时测量细胞因子的分泌。INF- γ 和 TNF- α 的结果在图10A和10B中描述。图10中显示的数据在下面提供的表9和表10中有更详细的描述。

表 9 INF- γ 72hr					
		平均/ 供者			
		供者 19	供者 25	供者 27	
IgG	pg/ml	5922	43775	1657	
P9-11	pg/ml	5891	22998	891	
	倍数变化	0.99	0.52	0.53	0.68
P9-24	pg/ml	NT	35748	1258	
	倍数变化		0.82	0.78	0.80
P9-34	pg/ml	NT	44378	1048	
	倍数变化		1.01	0.74	0.88
P9-37	pg/ml	3231	NT	NT	
	倍数变化	0.55			0.55
P9-57	pg/ml	4939	NT	NT	
	倍数变化	0.83			0.83

Table 10 TNF- α 72hr					
		平均/ 供者			
		供者 19	供者 25	供者 27	
IgG	pg/ml	777	1284	929	
P9-11	pg/ml	607	982	374	
	倍数变化	0.78	0.76	0.40	0.64
P9-24	pg/ml	NT	962	299	
	倍数变化		0.75	0.32	0.54
P9-34	pg/ml	NT	874	596	
	倍数变化		0.68	0.79	0.74
P9-37	pg/ml	429	NT	NT	
	倍数变化	0.55			0.55
P9-57	pg/ml	417	NT	NT	
	倍数变化	0.54			0.54

6.11.10. 实施例9: 用抗人GAL9 IgG1抗体P9-11、P9-37或P9-57处理减少了活化的PBMC中TNF- α 和INF- γ 的产生

[0334] 从实施例7中选择的抑制性抗人GAL9候选物, 格式化为二价单特异性人IgG1抗体, 在另外三个人类供体的PBMCs上进一步测试其抑制PBMC中细胞因子产生的能力。

刺激PBMC

[0335] 从供体19、供体RCB和供体RG收集人原代PBMC, 已知其对人类CMV病毒 (HCMV) 有强烈反应。基本上按照上文第6.11.1节中描述的方式刺激PBMC。简而言之, 从已知对人CMV病

毒 (HCMV) 有反应的供体中采集PBMC, 置于培养液中, 用HCMV PepMix刺激以引发抗原特异性反应, 并用格式为二价单特异性全长人类IgG1抗体的P9-41、P9-42、P9-53、P9-11、P9-37或P9-57, 或人IgG对照, 进行处理。

细胞因子测定

[0336] 按照制造商的说明, 在处理24小时和72小时使用BD™Cytometric Bead Array (CBA) 测量TNF- α 和IFN- γ 的分泌。测定以一式四份进行。

结果/结论

[0337] 图11A-11C中显示了处理72小时的代表性数据。平均值在散点图上以横条表示。误差条表示标准偏差。

[0338] 图11A-11B显示了用人IgG对照 (hIgG) 和抑制性抗人GAL9候选物处理后TNF- α 水平的散点图。11A-11B显示了用人IgG对照 (hIgG) 和抑制性抗人GAL9候选物处理后的TNF- α 水平散点图。与IgG对照相比, 用格式化为人IgG1抗体的P9-11、P9-37或P9-57处理, 降低了所有三个人供体的PBMC中的TNF- α 水平。图11C显示了用人类对照IgG (hIgG) 或抗人类GAL9候选物处理后IFN- γ 水平的散点图。与对照组相比, 用P9-11、P9-37或P9-57处理降低了PBMC中的IFN- γ 水平。

[0339] 用P9-41、P9-42或P9-53处理后, TNF- α 和IFN- γ 的分泌呈中性或微弱 (数据未显示)。

6.11.11. 实施例10: 用抗人GAL9 P9-11、P9-24或P9-34处理, 可减少活化的PBMC中TNF- α 和INF- γ 的产生并增加IL-10的产生

[0340] 本研究是为了确定实施例7中选择的抑制性抗人GAL9候选物对活化的人PBMCs中TNF- α 、IFN- γ 和IL-10的分泌的影响。

刺激PBMC

[0341] 基本上按照上文第6.11.1节所述的方式刺激PBMCs。简而言之, 从已知对人类CMV病毒 (HCMV) 有高度反应的人类供体中采集PBMCs, 置于培养物中, 用HCMV PepMix刺激以引发抗原特异性反应, 并用格式化为二价单特异性人IgG1抗体的P9-11、P9-24和P9-34中的一种, 或人IgG对照, 进行处理。

细胞因子测定

[0342] 按照制造商的说明, 使用BD™细胞计数珠阵列 (CBA), 在治疗后72小时测量TNF- α 、IFN- γ 和IL-10的细胞因子分泌。

结果/结论

[0343] 图12A显示了用对照IgG (hIgG) 或抑制性抗人GAL9候选物处理后的TNF- α 水平柱状图。与IgG对照组相比, 用抗人IgG1 P9-11、P9-24或P9-34处理导致PBMC分泌的TNF- α 减少。图12B显示了用对照IgG (hIgG) 或抑制性抗GAL9候选物处理后的IFN- γ 水平柱状图。与IgG对照相比, 用抗人GAL9抗体P9-11、P9-24或P9-34处理后, PBMC分泌的IFN- γ 减少。图12C显示了用抑制性抗人GAL9候选物或IgG对照处理后的IL-10水平的柱状图。与对照组相比, 用P9-11、P9-24或P9-34抗体处理增加了PBMC中IL-10的分泌。

6.11.12. 实施例11: 用抗人GAL9抗体P9-11、P9-24或P9-34处理活化的CD3⁺T细胞可以改善细胞因子谱, 而抗小鼠GAL9 (108A2) 则导致细胞因子分泌的完全阻断

[0344] 我们测量了IFN- γ 、TNF- α 或IL-10细胞因子的分泌, 以确定抗小鼠GAL9 (克隆

108A2) 和抗人GAL9抗体P9-11、P9-24或P9-34 (格式化为人IgG1抗体) 对小鼠活化CD3⁺T细胞中细胞因子谱的影响。

动物和CD3⁺T细胞的分离

[0345] 每个治疗组使用五只小鼠。研究中使用的所有动物都按照NHMRC的动物使用指南进行饲养和照料。

抗体

[0346] 使用了格式化为二价单特异性人IgG1抗体的P9-11、P9-24和P9-34抗体, 以及人IgG对照。此外, 还使用了抑制性抗小鼠GAL9克隆108A2“mGAL9” (**BioLegend®** San Diego, CA)。

CD3⁺T细胞的刺激

[0347] CD3⁺T细胞 (CD90.2⁺CD3⁺) 从幼稚小鼠的脾脏中分离出来。用抗CD3克隆145.2C11 (Aviva Systems Biology Corp. San Diego, CA) 以5μg/ml刺激小鼠CD3⁺T细胞, 浓度为。接下来, 受刺激的CD3⁺T细胞用IgG对照组或抑制性抗体的一种以20μg/ml处理并培养72小时。

细胞因子测定

[0348] 处理72小时后, 按照制造商的说明, 使用BD[™]Cytometric Bead Array (CBA) 测量IFN-γ、TNF-α或IL-10的浓度。

统计分析

[0349] 使用GraphPad Prism (GraphPad Software) 进行非参数无配对t检验。

结果/结论

[0350] 结果显示在图13A和13B中。TNF-α:IL-10或INF-γ:IL:10的比值降低表明促炎症细胞因子的减少并有抑制性细胞因子IL-10的增加。用抗小鼠GAL9 (108A2) 抗体处理可明显减少TNF-α、IFN-γ和IL-10的分泌。见图13A。相反, 用抗人GAL9抗体P9-11、P9-24或P9-34 (人IgG1 Fc) 处理并没有减少TNF-α或IFN-γ的分泌, 而IL-10的分泌则显著增加。见图13B。星号“*”表示与对照组相比, P值

<0.05的统计学显著性。

[0351] 用抗人P9-11和P9-24抗体 (格式为人IgG1抗体) 处理, 导致炎症环境改善, 减少TNF-α、IFN-γ的分泌, 增加IL-10的分泌。值得注意的是, 用抗小鼠GAL9 (108A2) 处理导致细胞因子反应的完全阻断, 包括IL-10的分泌。抗人GAL9和抗鼠GAL9 (108A2) 产生的细胞因子谱的差异表明, 抗人GAL9和抗鼠GAL9 (108A2) 抗体有不同的作用机制。

6.11.13. 实施例12: 用抗人GAL9处理并没有实质性地改变刺激的CD4⁺和CD8⁺T细胞中的免疫检查点分子的表达, 并且减少CD8⁺T细胞中的4-1BB、CD40L和OX40共刺激分子

[0352] 本研究是为了确定抗人GAL9候选者P9-11、P9-24和P9-34对受刺激的CD8⁺和CD4⁺T细胞中所选定的检查点分子表达的影响, 以及抗人GAL9 P9-11对受刺激的CD8⁺T细胞中所选定的共刺激分子的影响。

刺激和处理

[0353] 如上所述刺激包括了CD8⁺或CD4⁺T细胞群的PBMC, 并用格式化为二价单特异性人IgG1抗体的抗人GAL9 P9-11、P9-24、P9-34或人IgG对照物进行处理。

免疫标记

[0354] 将PBMCs以5x10⁶个细胞/mL重悬于含10%FBS的RPMI中。将200μL重悬的细胞等分

布到96孔板中,然后用Fixable Viability Dye **eFluor®**780在2-8℃下染色30分钟,以不可逆地标记死细胞。然后清洗细胞,并在室温下用人Fc封闭溶液 (Cat.No.14-9161-73, eBiosciences) 孵育10分钟。通过流式细胞术评估PD-L1、PD-1、CTLA-4、TIM3、LAG3、4-1BB、CD27、CD40L、ICOS或OX40的表面表达。

流式细胞术

[0355] 使用BD LSR Fortessa流式细胞仪和BD FACSDiva软件 (Becton,Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 进行流式细胞术分析。对于每个样品,至少收集 5×10^5 个事件。

[0356] 对免疫检查点分子染色为阳性的CD4⁺或CD8⁺T细胞的百分比的代表性数据在下文表11和表12中列出。对于共刺激分子染色阳性的CD8⁺T细胞百分比数据见下表13。

[0357] “%值”表示具有可检测水平的指定标记物的细胞的%。“(x)”表示与人IgG对照相比,用选定的α-GAL9候选抗体处理后的倍数变化。

表 11:所选定的免疫检查点分子呈阳性的 CD4⁺ 细胞百分比

标志物	PD-L1	PD-1	GAL9	CTLA-4	TIM3	LAG3
hIgG 对照	43.6%	14.2%	3.02%	0.67 %	0.99 %	1.00 %
P9-11	37.3% (0.9x)	14.2% (1.0x)	2.21% (0.7x)	0.71% (1.0x)	1.14 % (1.1x)	0.93 % (0.9x)
P9-24	40.2% (0.9x)	15.0 % (1.0x)	2.05% (0.6x)	0.67% (1.0x)	0.93 % (0.9x)	1.03 % (1.0x)
P9-34	42.3% (0.9x)	16.0 % (1.1x)	2.63% (0.8x)	0.71% (1.0x)	1.03 % (1.0x)	1.12 % (1.1x)

表 12: 所选定的免疫检查点分子呈阳性的 CD8⁺ 细胞百分比

标志物	PD-L1	PD-1	GAL9	CTLA-4	TIM3	LAG3
hIgG 对照	29.1 %	16.1 %	4.35 %	18.7 %	0.81 %	2.25 %
P9-11	26.7% (0.9x)	16.5% (1.0x)	1.63% (0.3x)	15.2% (0.8x)	0.95 % (1.1x)	2.00 % (0.9x)
P9-24	24.5% (0.8x)	16.7% (1.0x)	1.82% (0.4x)	15.1% (0.8x)	0.88 % (1.0x)	1.88 % (0.8x)
P9-34	26.3% (0.9x)	17.0% (1.0x)	2.79% (0.6x)	15.0% (0.8x)	0.82 % (1.0x)	2.40 % (1.0x)

表 13: 所选定的共刺激分子呈阳性的 CD8⁺ 细胞百分比

标志物	4-1BB	CD27	CD40L	ICOS	OX40
hIgG 对照	5.64%	53.5%	2.57%	6.39%	9.95%
P9-11	3.03% (0.53x)	52.6% (0.98x)	1.85% (0.72x)	5.56% (0.87x)	5.2% (0.5x)

结果/结论

[0358] 在受刺激的CD8⁺或CD4⁺T细胞中,任何免疫检查点分子的表达没有实质性变化。然而,我们观察到在受刺激的CD8⁺T细胞中,共刺激分子4-1BB、CD40L和OX40减少。这些结果表

明, 抗人GAL9候选物对细胞因子反应的影响是由抑制GAL9驱动的, 并且不是通过PD-1/PD-L1免疫检查点途径或其他检查点分子, 如CTLA-4、TIM3或LAG3。

7. 等同形式

[0359] 虽然已经说明和描述了各种具体的实施方案, 但上述说明书并不是限制性的。可以理解的是, 在不背离本发明的精神和范围的情况下, 可以做出各种改变。本领域的技术人员在阅读本说明书后会发现许多变化。

Query protein sequence		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	
Chothia numbering		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	
Martin numbering		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	
Kabat numbering		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	
REGIONS: CHOTHIA		HFR1																				
ABM1		HFR1																				
KABAT		HFR1																				
CONTACT		HFR1																				
↓																						
S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	T	Y	F	I	H	W	V	R	Q	A	P	G	K
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
CDR-H1											HFR2											
CDR-H1											HFR2											
CDR-H1											HFR2											
CDR-H1											HFR2											
G	L	E	W	V	A	Y	I	Y	P	Q	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
CDR-H2											HFR3											
CDR-H2											HFR3											
CDR-H2											HFR3											
CDR-H2											HFR3											
↓																						
v	↑										↓											

图1A

R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83	H84	H85
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H72A	H72B	H72C	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H83	H84	H85
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83	H84	H85
HFR3																						
H																						
D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	Q	S	Y	P	G	V	F	D	Y	W	G	Q	G	T
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100A	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H107
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100A	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H107
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100A	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H107
CDR-H3															HFR4							
															HFR4							
CDR-H3															HFR4							
															HFR4							
CDR-H3															HFR4							

图1A (续)

Query protein sequence		D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	
Chothia numbering		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	
Martin numbering		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	
Kabat numbering		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	
REGIONS: CHOTHIA																						
		LFR1																				
		LFR1																				
		LFR1																				
		LFR1																				
		CONTACT																				
★																						
I	T	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43
CDR-L1										LFR2												
										LFR2												
CDR-L1										LFR2												
										LFR2												
										CDR-L1								LFR2				
⚡																						
P	K	L	L	I	Y	S	A	S	S	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	R
L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66
L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66
L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66
										CDR-L2								LFR3				
										CDR-L2								LFR3				
										CDR-L2								LFR3				
										CDR-L2								LFR3				

图1B

S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	E	A	T	Y	Y	C	Q
L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89
L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89
L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89
																						CDR-L3
																						CDR-L3
																						CDR-L3
																						CDR-L3

✱

Q	W	T	I	A	L	T	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V
L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107	L108	L109	L110
L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107	L108	L109	L110
L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107	L108	L109	L110

		LFR4
		LFR4
		LFR4
		LFR4

图1B (续)

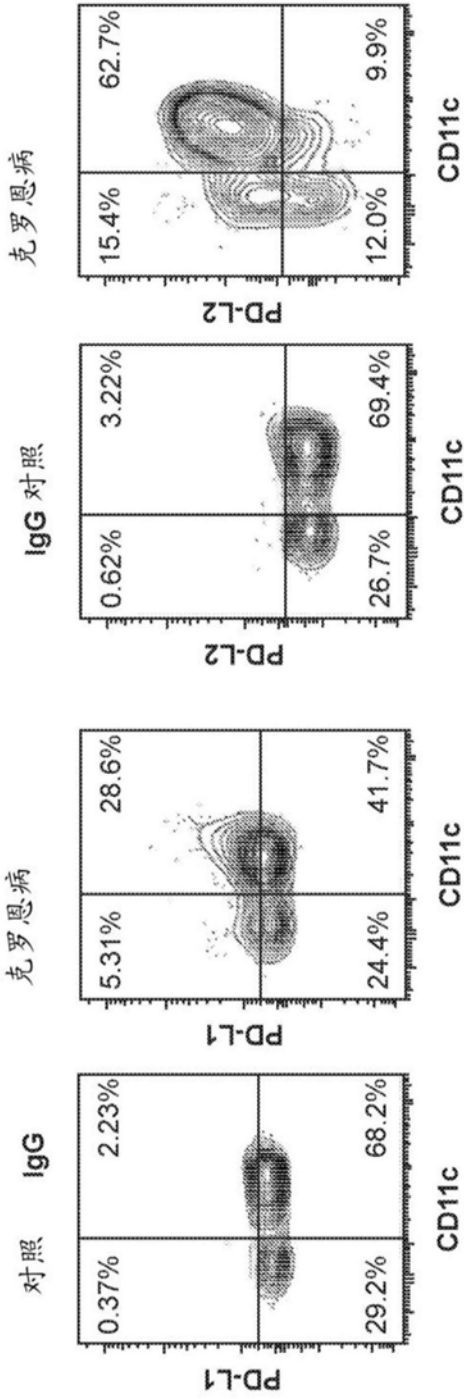


图2

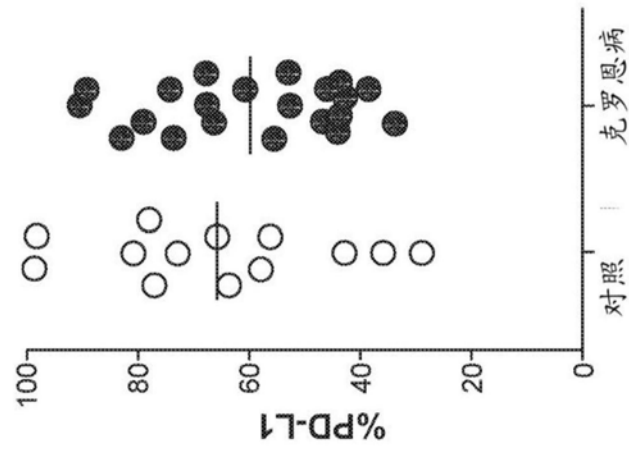


图3A

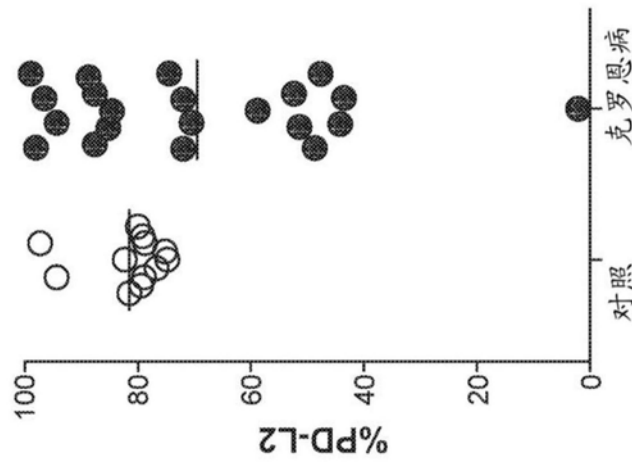


图3B

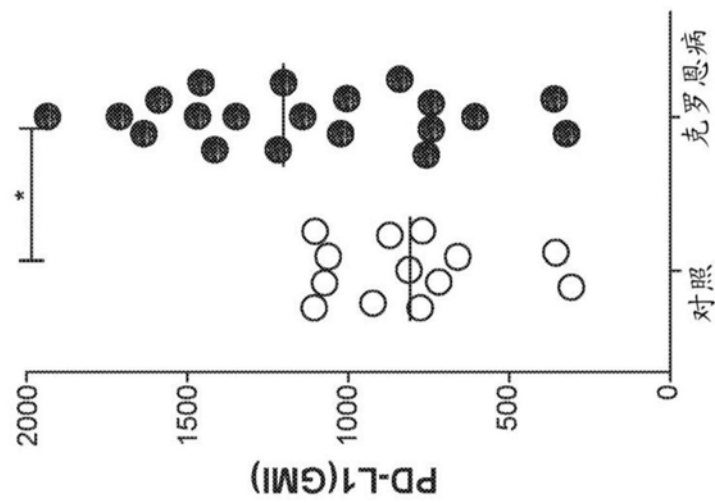


图3C

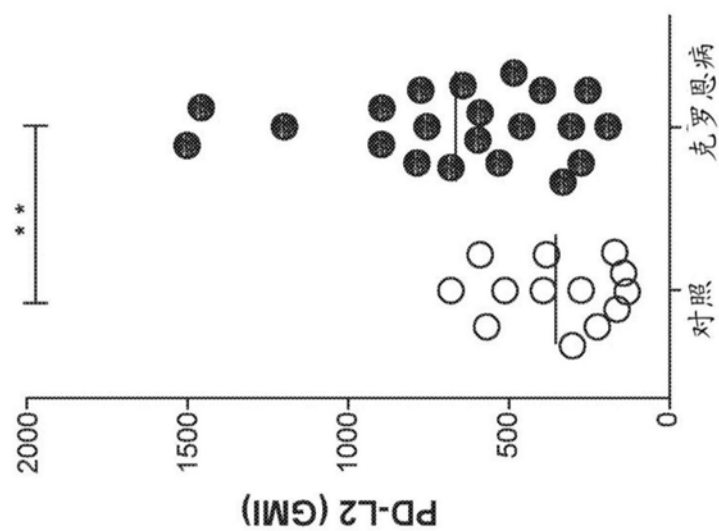


图3D

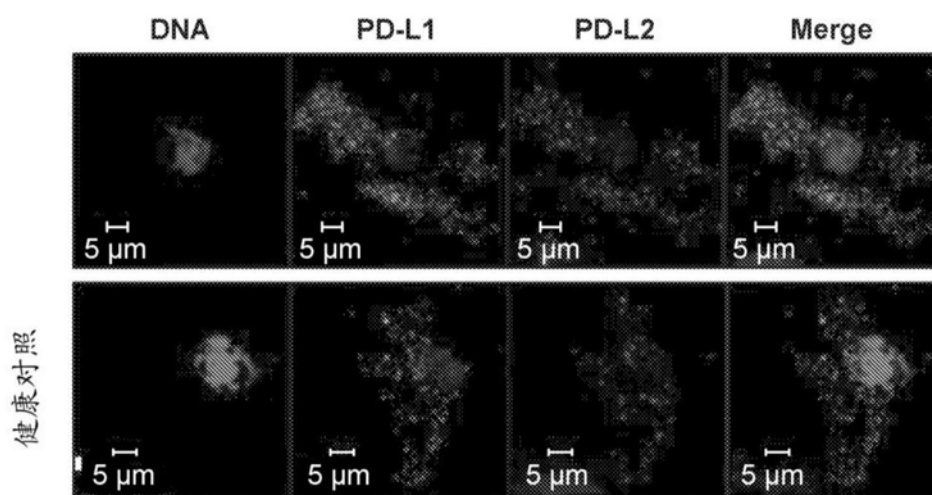


图4A

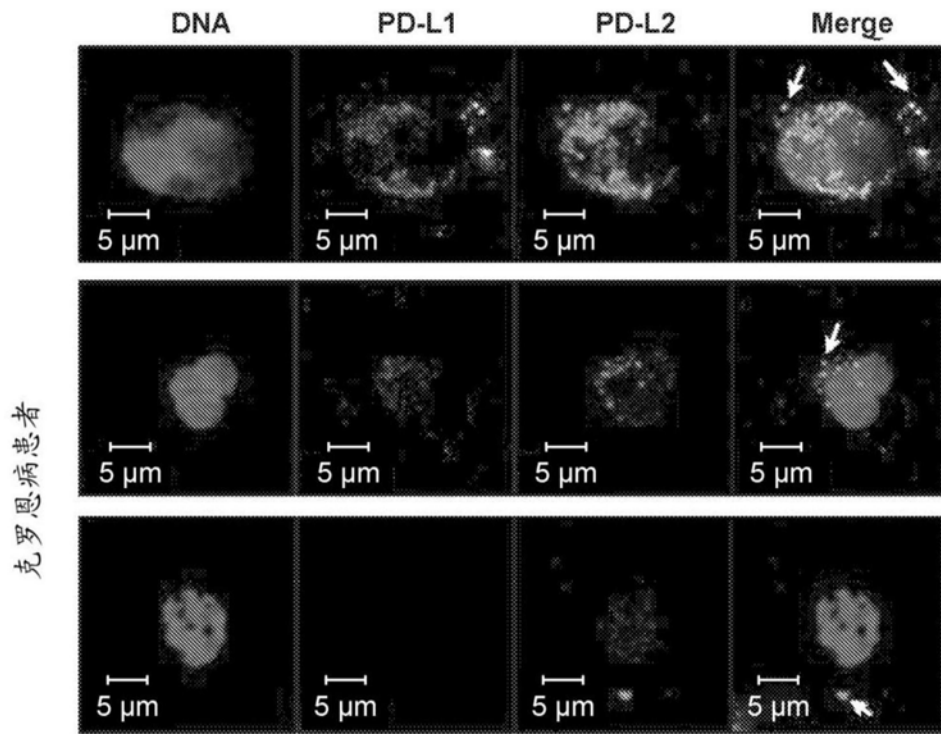


图4B

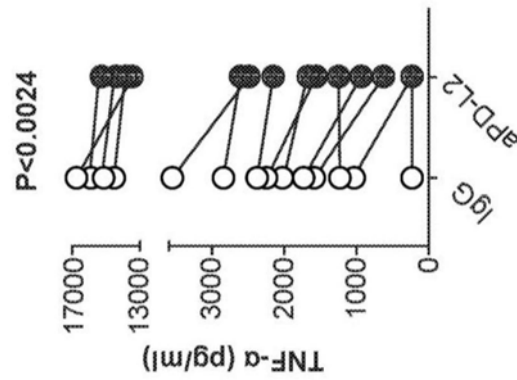


图5A

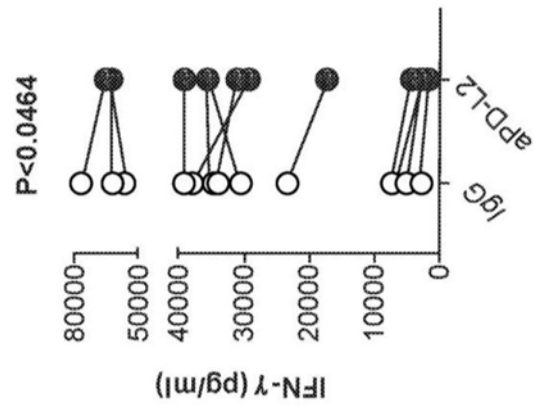


图5B

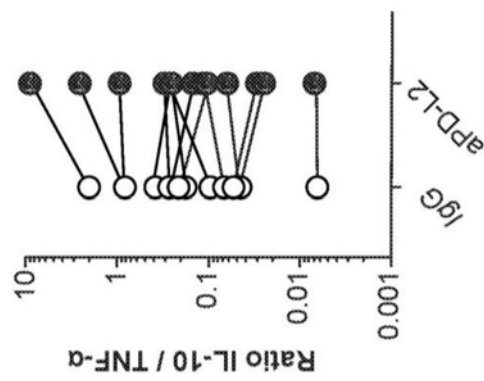


图5C

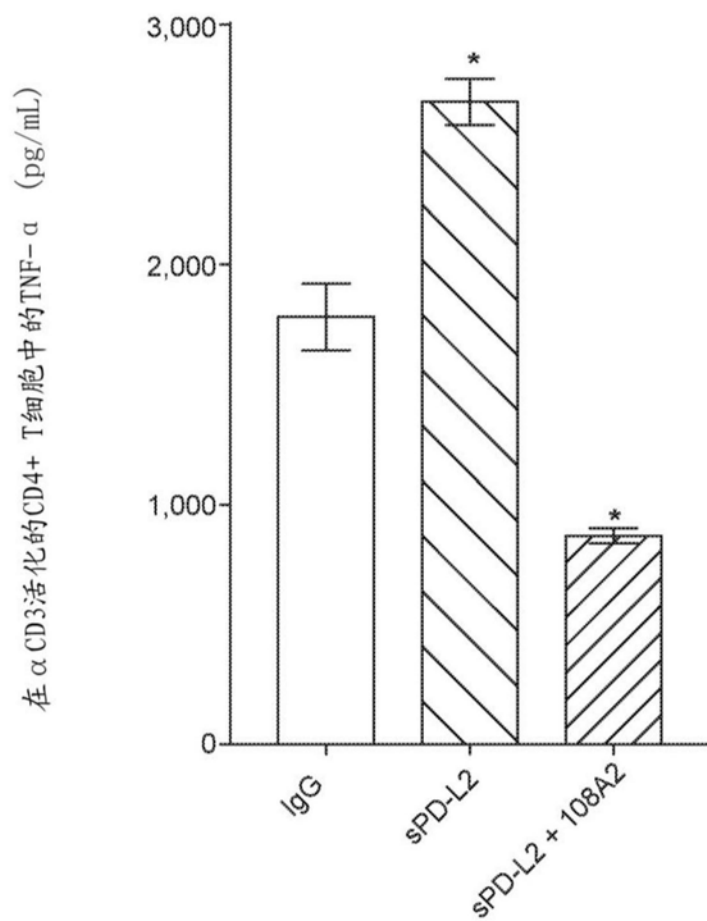


图6

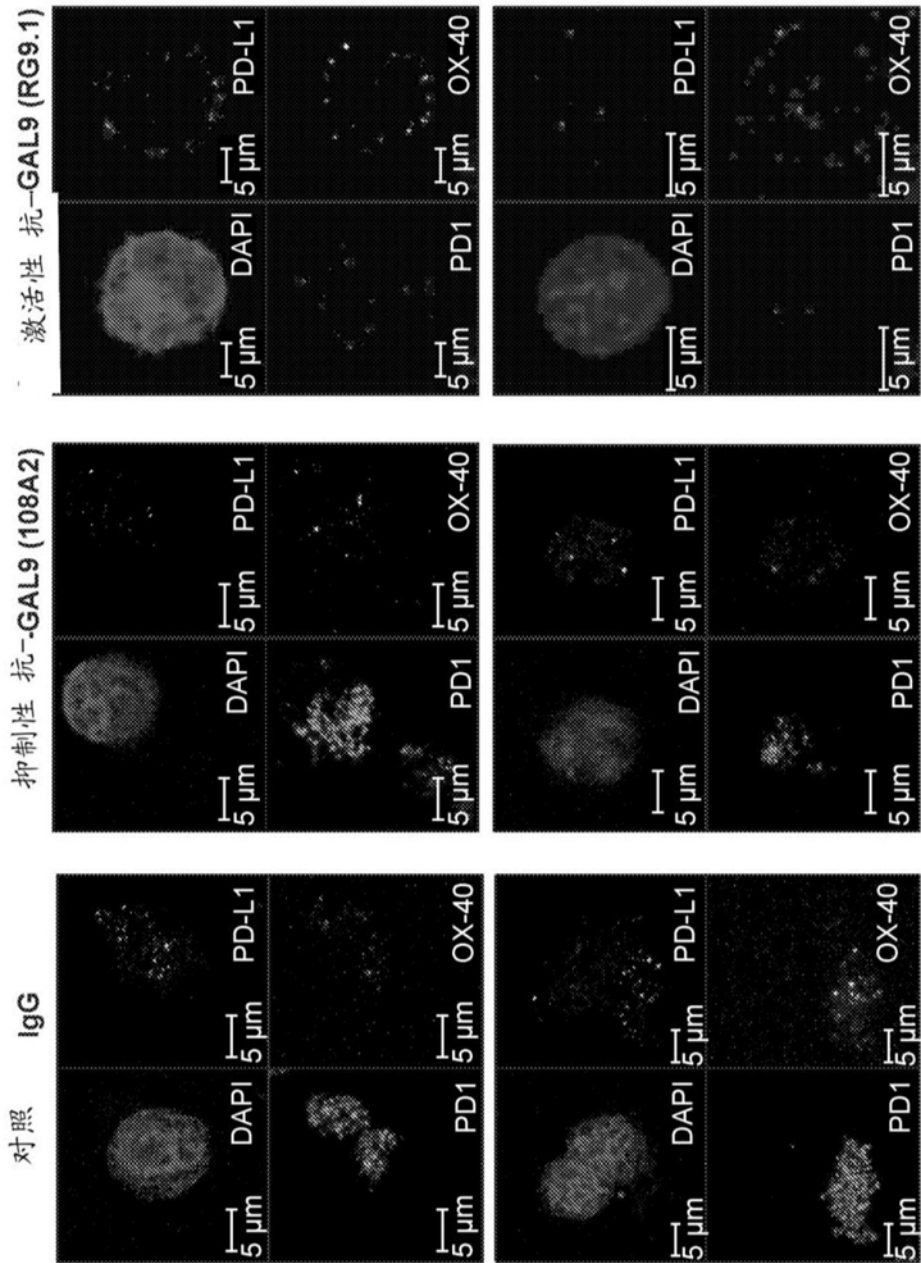


图7

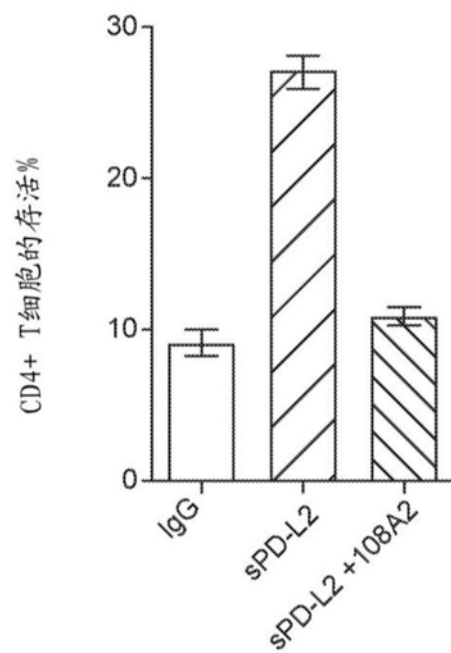


图8A

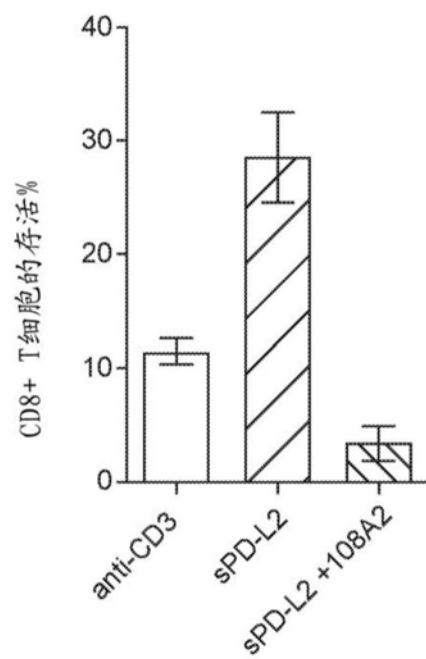


图8B

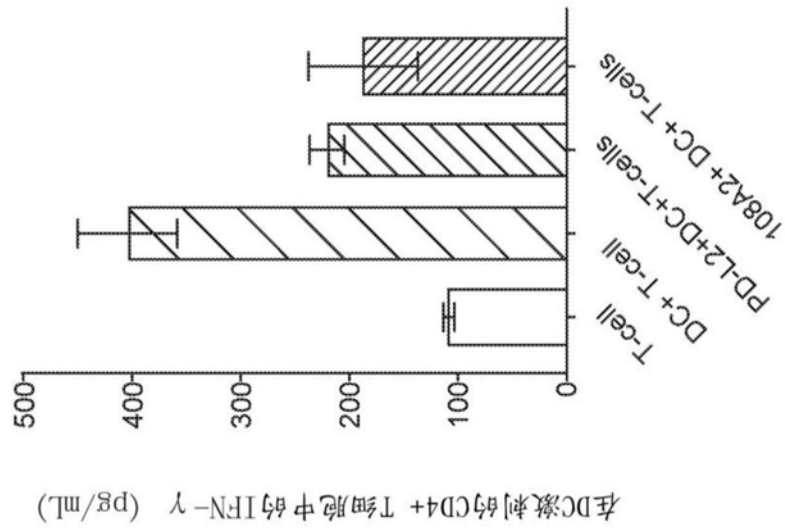


图9A

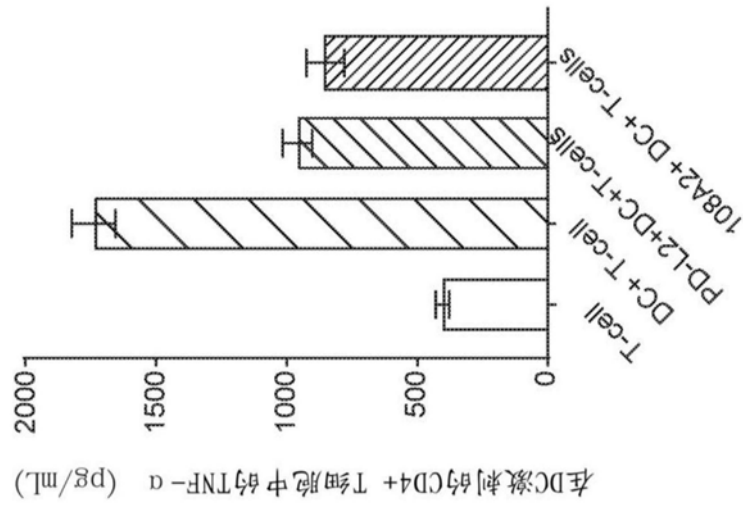


图9B

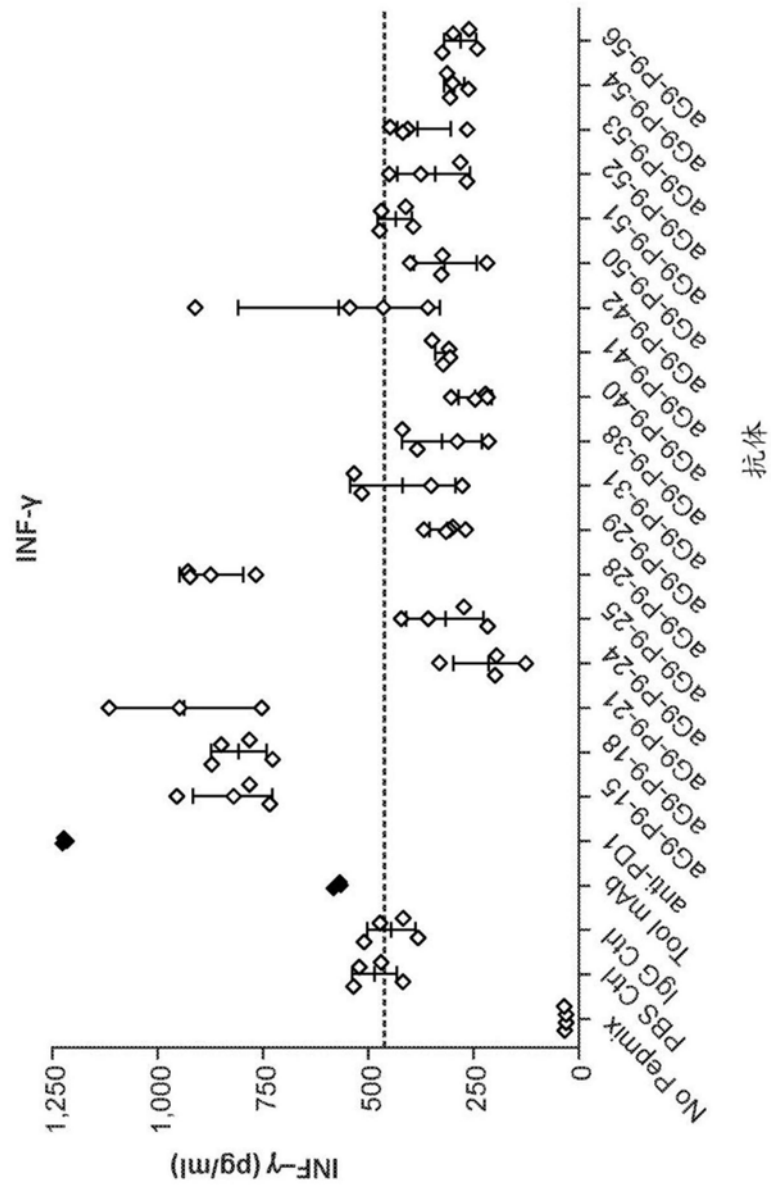


图10A

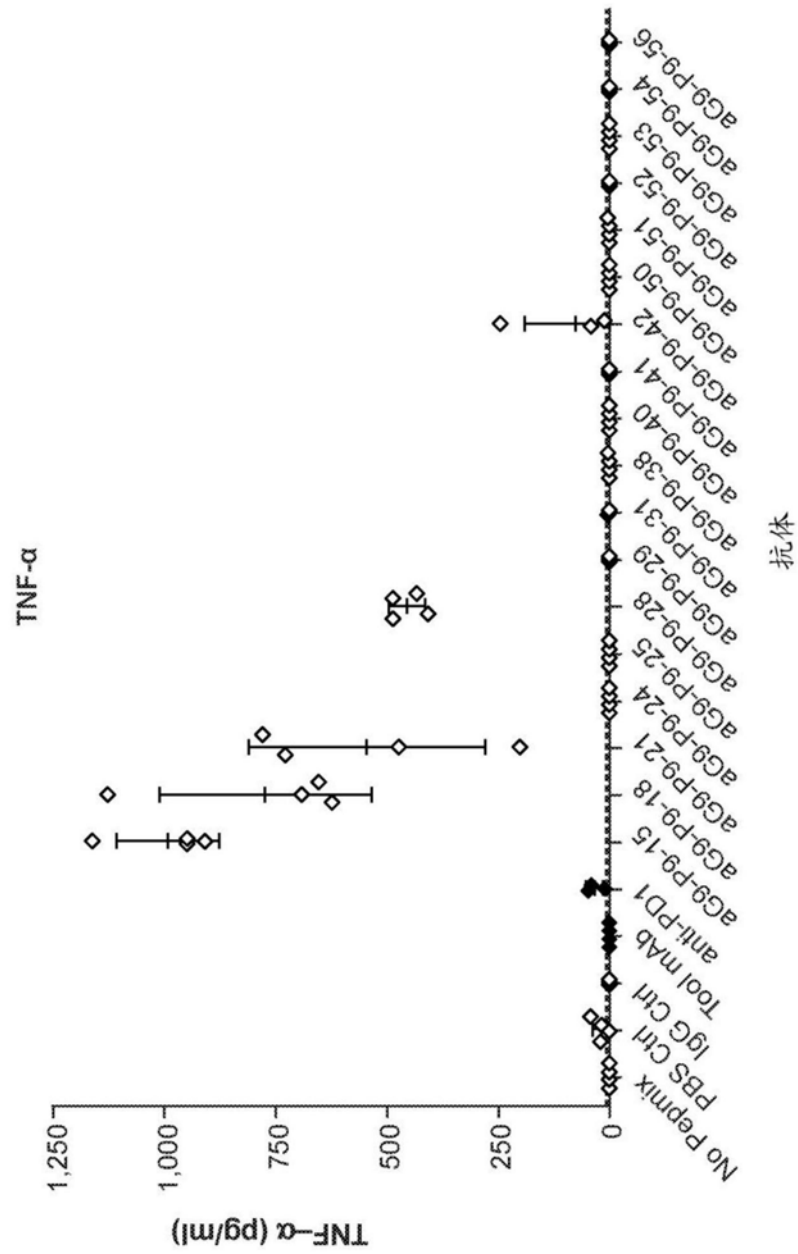


图10B

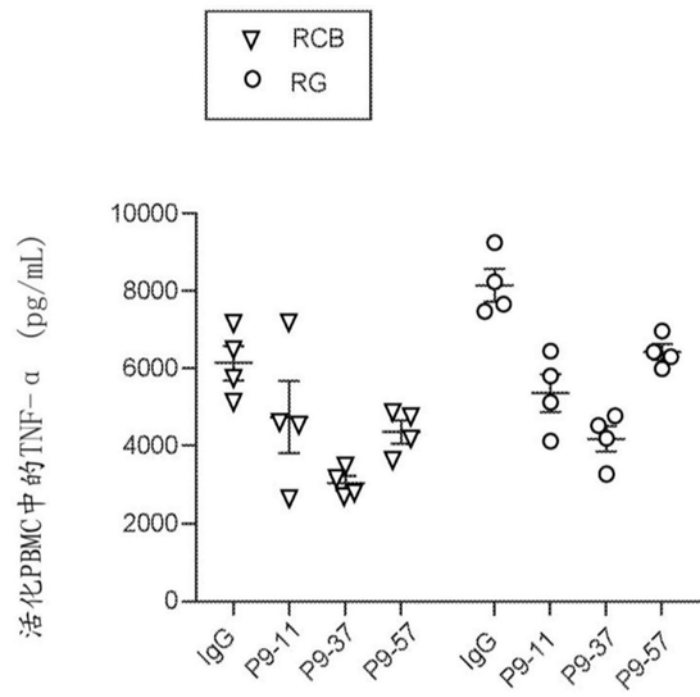


图11A

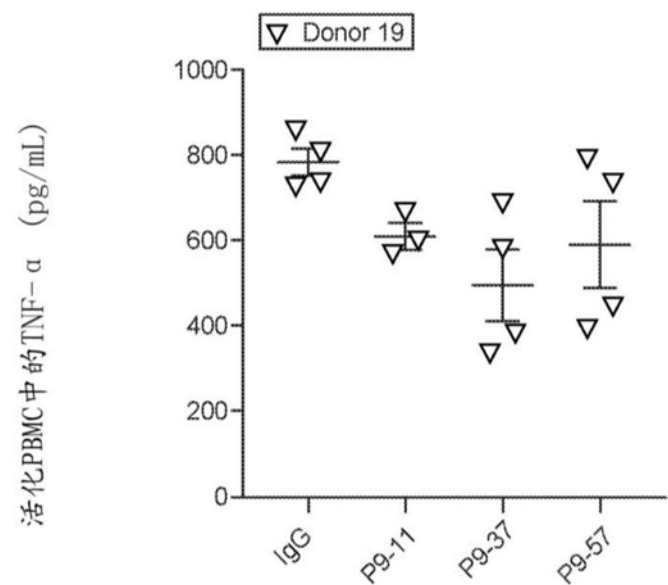


图11B

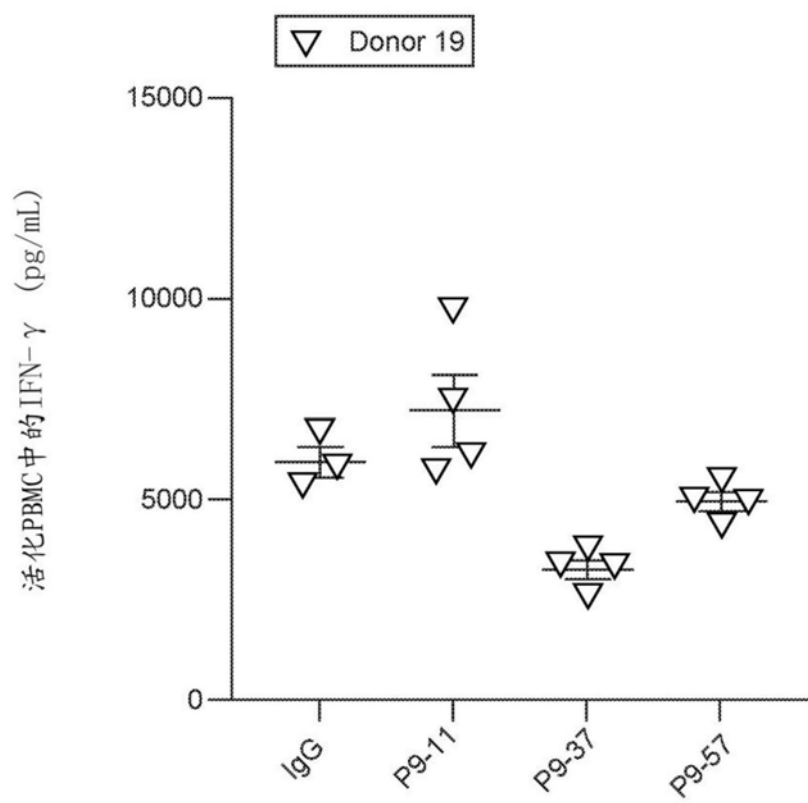


图11C

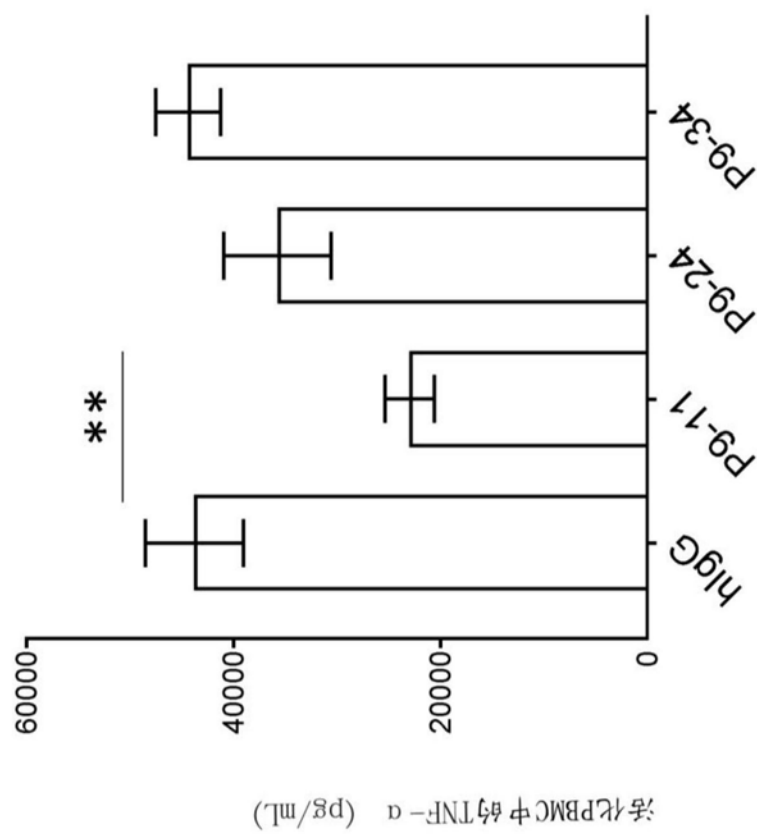


图12A

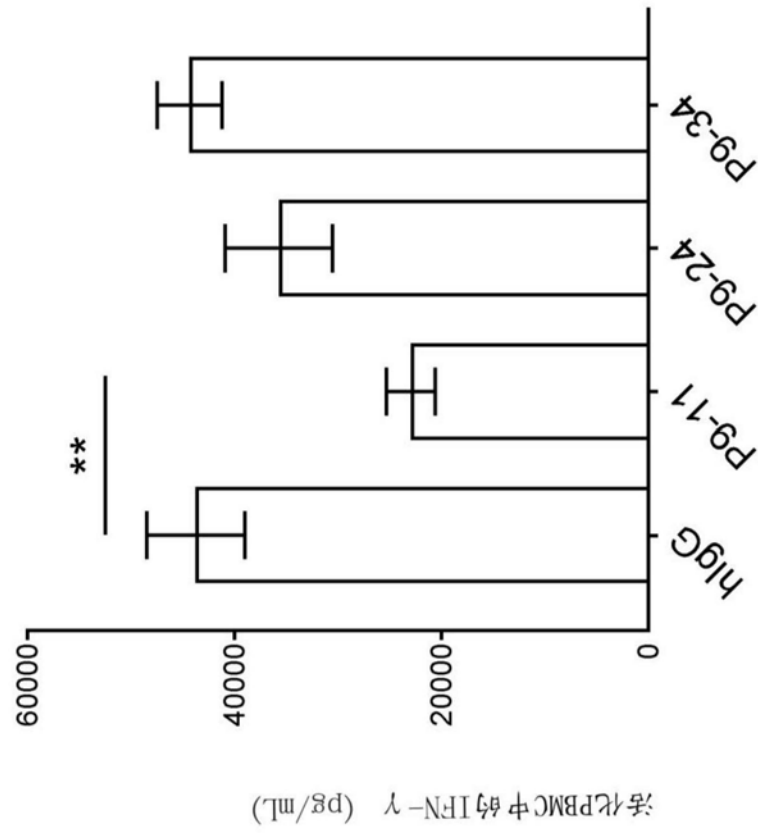


图12B

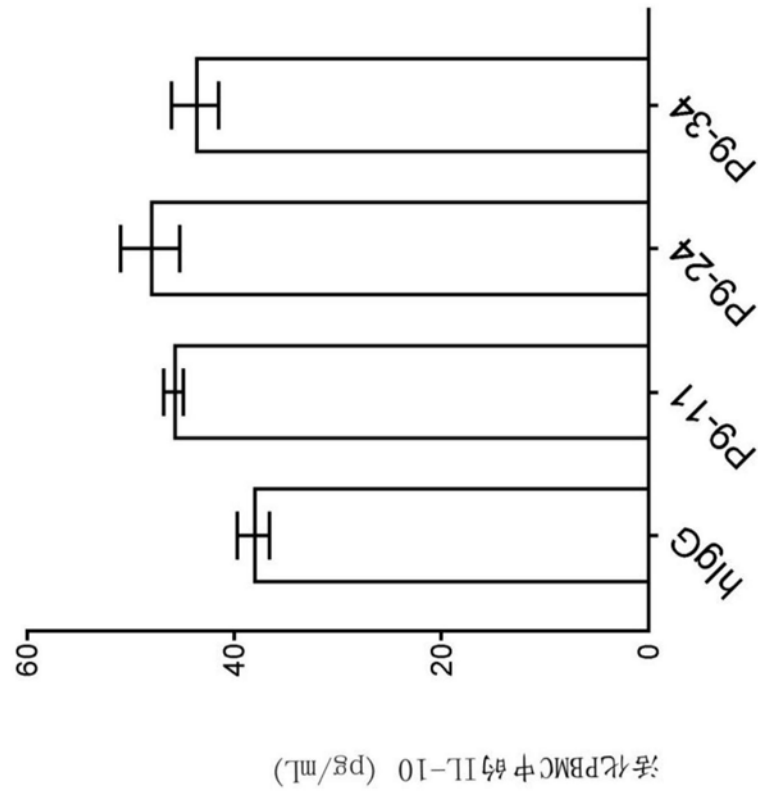


图12C

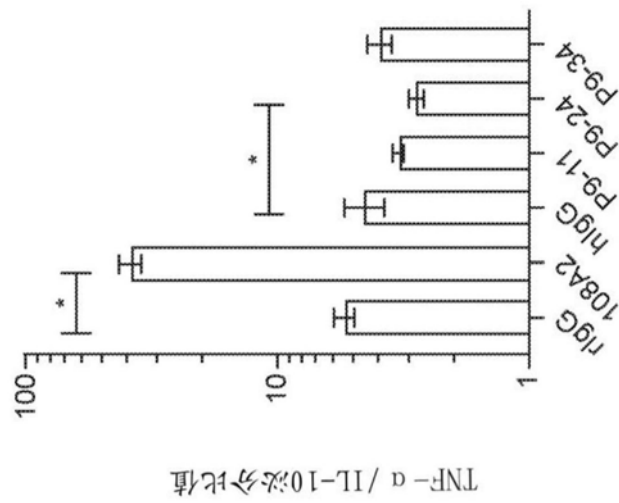


图13A

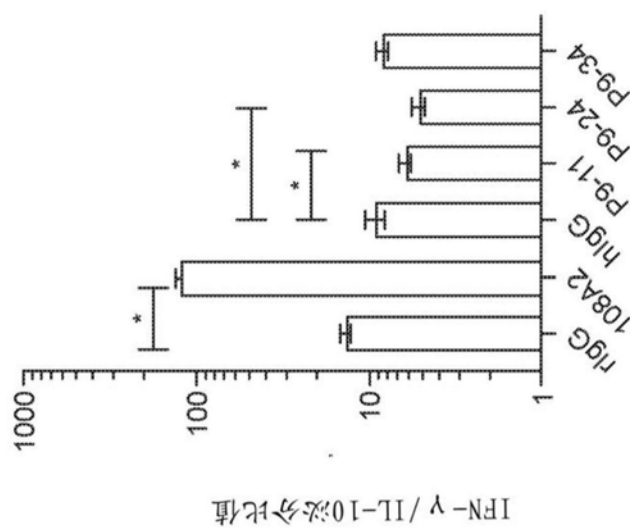


图13B