



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118894938 A

(43) 申请公布日 2024.11.05

(21) 申请号 202411323242.4

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2020.01.21

C07K 16/28 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/13 (2006.01)

62/795,378 2019.01.22 US

A61K 39/395 (2006.01)

62/868,791 2019.06.28 US

A61P 29/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 1/04 (2006.01)

202080013162.2 2020.01.21

A61P 1/00 (2006.01)

(71) 申请人 百时美施贵宝公司

A61P 19/02 (2006.01)

地址 美国新泽西州

A61P 17/06 (2006.01)

(72) 发明人 A·P·亚姆尼克 S·R·布罗德尔

A61P 3/10 (2006.01)

E·迪亚诺瓦 R·Y-C·黄 王芸

A61P 37/02 (2006.01)

A·R·朗吉什 陈国栋

A61P 9/00 (2006.01)

S·M·凯尔乐 沈虹 A·M·帕申

A61P 13/12 (2006.01)

苏琳惠

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

权利要求书6页 说明书88页

11256

序列表(电子公布) 附图40页

专利代理人 陈文平 张蕊蕊

(54) 发明名称

抗IL-7R  $\alpha$  亚基的抗体及其用途

(57) 摘要

本文提供抗体,其与IL-7受体的  $\alpha$  亚基(IL-7R  $\alpha$ )结合。还提供这些抗体在治疗性应用,诸如治疗炎性疾病中的用途。进一步提供产生所述抗体的细胞、编码所述抗体的重链区和/或轻链区的多核苷酸和包含所述多核苷酸的载体。

1. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中所述抗体

(a)能够以约5nM或更小(例如,小于约3nM)的EC<sub>50</sub>,与全血中的T细胞(CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD45RA-、CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup>CD45RA-)结合;

(b)不能与全血中的非T细胞结合;

(c)不能有效地阻断胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)介导的单核细胞活化;

(d)在与所述IL-7受体结合后,不会激动IL-7受体信号传导,例如最低的pSTAT5活化;

或

(e)其任何组合。

2. 如权利要求1所述的抗体,其中所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列(DEYSRGYYVLDV)。

3. 如权利要求1或2所述的抗体,其中所述抗体具有选自由以下组成的组的一个或多个特性:

(a)能够与人类和食蟹猴IL-7受体(IL-7R)的 $\alpha$ 链选择性地结合;

(b)能够与可溶性且膜结合的IL-7R的 $\alpha$ 链结合;

(c)当向有需要的受试者施用时,能够阻断病原性T细胞的扩增和/或存活;

(d)当向有需要的受试者施用时,能够恢复T调节性细胞(Treg)功能和/或促进Treg存活;

(e)能够比**CTLA4-Ig (ORENCIA®)**维持更长的无药物缓解;

(f)能够在有需要的受试者的肠组织内阻断例如由病原性T细胞诱导的炎症和粘膜损伤;

(g)能够在有需要的受试者中降低肠系膜淋巴结(MLN)和/或固有层(LP)中的T效应细胞的频率;

(h)能够降低或抑制T细胞(例如,CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>)中的IL-7介导的pSTAT活化;

(i)能够阻断产生IL-17和/或IFN- $\gamma$ 的细胞的扩增;

(j)能够治疗患有炎性疾病(例如,炎性肠病)的受试者;和

(k)其任何组合。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的抗体,其中所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列(DHAMH)。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的抗体,其中所述重链CDR 2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列(GISWNSRGIGYADSVKG)。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的抗体,其中所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列(RASQGISSALA)。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的抗体,其中所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列(DASSLES)。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的抗体,其中所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列(QQFNSYPLWIT)。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的抗体,其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含与SEQ ID NO:19中所阐述的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至

少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

10. 如权利要求1至8中任一项所述的抗体,其中所述VL包含与SEQ ID NO:20中所阐述的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的抗体,其在选自由以下组成的组的表位处,与所述人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合:<sup>24</sup>SQLLEVNGSQHSLTCAF<sup>39</sup> (SEQ ID NO:8);<sup>73</sup>FIETKKFLLIGKSNIC<sup>88</sup> (SEQ ID NO:9);<sup>89</sup>VKVGEKSLTCKKIDLTT<sup>105</sup> (SEQ ID NO:10);<sup>136</sup>QKKYVKVLMHDVAY<sup>149</sup> (SEQ ID NO:11);<sup>181</sup>YEIKVRSIPDHYFKGF<sup>196</sup> (SEQ ID NO:12);及其组合。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的抗体,其在包含选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸残基的表位处,与所述人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合:H33、E75、F79、182、K84、M144、R186、H191、Y192及其组合。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的抗体,其中所述抗体选自由以下组成的组:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4及其变体。

14. 如权利要求13所述的抗体,其中所述抗体为IgG1抗体。

15. 如权利要求14所述的抗体,其包含无效应IgG1 Fc。

16. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链和轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:21中所阐述的氨基酸序列并且其中所述轻链包含SEQ ID NO:22中所阐述的氨基酸序列。

17. 如权利要求1至16中任一项所述的抗体,其以小于10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM(例如,1.3nM)的K<sub>D</sub>与所述人类IL-7受体的 $\alpha$ 链结合,如通过表面等离子体共振所测量。

18. 如权利要求1至17中任一项所述的抗体,其以小于10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM(例如,1.7nM)的K<sub>D</sub>与所述食蟹猴IL-7受体的 $\alpha$ 链结合,如通过表面等离子体共振所测量。

19. 如权利要求17或18所述的抗体,其中与所述人类IL-7受体的 $\alpha$ 链或所述食蟹猴IL-7受体的 $\alpha$ 链的结合为pH依赖性。

20. 如权利要求19所述的抗体,其在pH 7.4下以约1.3nM的K<sub>D</sub>并在pH 6下以约5.3nM的K<sub>D</sub>与所述人类IL-7受体的 $\alpha$ 链结合。

21. 如权利要求19或20所述的抗体,其在pH 7.4下以约1.7nM的K<sub>D</sub>并在pH 6下以约7.0nM的K<sub>D</sub>与所述食蟹猴IL-7受体的 $\alpha$ 链结合。

22. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3,其中所述HC CDR1包含氨基酸序列G<sub>1</sub>X<sub>2</sub>FDDHAX<sub>3</sub>H (SEQ ID NO:260),其中X<sub>1</sub>为F或Y;X<sub>2</sub>为T、P、A、S、V、L、I、M、H、F、Y、N、D、E或Q;并且X<sub>3</sub>为L或M。

23. 如权利要求22所述的抗体,其中X<sub>2</sub>为D或E。

24. 如权利要求22或23所述的抗体,其中所述HC CDR2包含氨基酸序列G<sub>1</sub>X<sub>2</sub>SRGX<sub>3</sub>GYX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub> (SEQ ID NO:261),其中X<sub>1</sub>为S或T;X<sub>2</sub>为H或N;X<sub>3</sub>为I或V;X<sub>4</sub>为G、A、S、T、V、L、I、R、H或N;X<sub>5</sub>为P、T、N、D、E、Q、S、H或Y;X<sub>6</sub>为P、G、A、S、T、V、R、H、F、Y、N、D或E;X<sub>7</sub>为V或

I;X<sub>8</sub>为A、S、T、V、L、I、M、K、R、H、F、Y、N、D、E或Q;并且X<sub>9</sub>为G、H、D或Q。

25. 如权利要求24所述的抗体,其中X<sub>1</sub>为T。

26. 如权利要求22至25中任一项所述的抗体,其中所述HC CDR3包含氨基酸序列DEYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GYYX<sub>3</sub>LDX<sub>4</sub> (SEQ ID NO:262),其中X<sub>1</sub>为S、T、N、D或E;X<sub>2</sub>为L、M、R或S;X<sub>3</sub>为G、A、S、T、V、M、N、E或Q;并且X<sub>4</sub>为A、S、T、V、R、H、Y、W、N、E、Q或M。

27. 如权利要求26所述的抗体,其中X3为A、S或T。

28. 如权利要求26或27所述的抗体,其中X4为E。

29. 如权利要求22至28中任一项所述的抗体,其中所述LC CDR1包含氨基酸序列X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>SX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>A (SEQ ID NO:263),其中X<sub>1</sub>为S、T、V、K、R、H、Y或I;X<sub>2</sub>为A、S、T或V;X<sub>3</sub>为P、G、A、S、T、V、L、I、M、K、R、H、N、E或Q;X<sub>4</sub>为P、G、A、S、T、V、L、I、M、H、F、Y、N、D、E或Q;X<sub>5</sub>为P、G、A、S、T、H、E、Q、M、N或D;X<sub>6</sub>为P、G、A、S、T、V、L、I或N;X<sub>7</sub>为S、T、V、L、I、M、H、F、Y、N、D、E或Q;X<sub>8</sub>为P或A;并且X<sub>9</sub>为A、L或V。

30. 如权利要求29所述的抗体,其中X<sub>6</sub>为P。

31. 如权利要求29或30所述的抗体,其中X<sub>8</sub>为P。

32. 如权利要求29至31中任一项所述的抗体,其中X7为D或E。

33. 如权利要求22至32中任一项所述的抗体,其中所述LC CDR2包含氨基酸序列DX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub> (SEQ ID NO:264),其中X<sub>1</sub>为G、A、S、M、H、N、D、E或Q;X<sub>2</sub>为G、A、S、T、V、M、H、F、Y、N、D、E或Q;X<sub>3</sub>为A、S、F、Y、W、N、D、E或L;X<sub>4</sub>为P、S、T、L、K、H或N;X<sub>5</sub>为D、E或Q;并且X<sub>6</sub>为G、S、T、N、D、Q、P或E。

34. 如权利要求22至33中任一项所述的抗体,其中所述LC CDR3包含氨基酸序列X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>FX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>YPLX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub> (SEQ ID NO:265),其中X<sub>1</sub>为M或Q;X<sub>2</sub>为G、A、D、E或Q;X<sub>3</sub>为N或E;X<sub>4</sub>为P、A或S;X<sub>5</sub>为T、I、M、K、W、N、E或Q;X<sub>6</sub>为L或I;并且X<sub>7</sub>为T、M、K、H、Y、E或Q。

35. 如权利要求34所述的抗体,其中X<sub>2</sub>为A。

36. 如权利要求34或35所述的抗体,其中X<sub>4</sub>为P或A。

37. 如权利要求22至36中任一项所述的抗体,其中所述重链CDR1包含SEQ ID NO:31至46中所阐述的氨基酸序列。

38. 如权利要求37所述的抗体,其中所述重链CDR1包含SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:44中所阐述的氨基酸序列。

39. 如权利要求22至38中任一项所述的抗体,其中所述重链CDR2包含SEQ ID NO:47至96中所阐述的氨基酸序列。

40. 如权利要求39所述的抗体,其中所述重链CDR2包含SEQ ID NO:47中所阐述的氨基酸序列。

41. 如权利要求22至40中任一项所述的抗体,其中所述重链CDR3包含SEQ ID NO:97至122中所阐述的氨基酸序列。

42. 如权利要求41所述的抗体,其中所述重链CDR3包含SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:120中所阐述的氨基酸序列。

43. 如权利要求22至42中任一项所述的抗体,其中所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:123至194中所阐述的氨基酸序列。

44. 如权利要求43所述的抗体,其中所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:

189. SEQ ID NO:190或SEQ ID NO:192中所阐述的氨基酸序列。

45. 如权利要求22至44中任一项所述的抗体,其中所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:195至237中所阐述的氨基酸序列。

46. 如权利要求22至45中任一项所述的抗体,其中所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:238至259中所阐述的氨基酸序列。

47. 如权利要求46所述的抗体,其中所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:244或SEQ ID NO:245中所阐述的氨基酸序列。

48. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3,其中:

- (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:31至46中所阐述的氨基酸序列;
- (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;
- (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;
- (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;
- (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且
- (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

49. 如权利要求48所述的抗体,其中所述重链CDR1包含SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:44中所阐述的氨基酸序列。

50. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3,其中:

- (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;
- (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:47至96中所阐述的氨基酸序列;
- (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;
- (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;
- (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且
- (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

51. 如权利要求50所述的抗体,其中所述重链CDR2包含SEQ ID NO:47中所阐述的氨基酸序列。

52. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3,其中:

- (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;
- (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;
- (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:97至122中所阐述的氨基酸序列;
- (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;
- (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且
- (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

53. 如权利要求52所述的抗体,其中所述重链CDR3包含SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:120中所阐述的氨基酸序列。

54. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3,其中:

- (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列；
- (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列；
- (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列；
- (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:123至194中所阐述的氨基酸序列；
- (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列；并且
- (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

55. 如权利要求54所述的抗体,其中所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:189、SEQ ID NO:190或SEQ ID NO:192中所阐述的氨基酸序列。

56. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3,其中:

- (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列；
- (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列；
- (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列；
- (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列；
- (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:195至237中所阐述的氨基酸序列；并且
- (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

57. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3,其中:

- (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列；
- (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列；
- (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列；
- (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列；
- (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列；并且
- (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:238至259中所阐述的氨基酸序列。

58. 如权利要求57所述的抗体,其中所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:244或SEQ ID NO:245中所阐述的氨基酸序列。

59. 一种核酸,其编码如权利要求1至58中任一项所述的抗体。

60. 一种载体,其包含如权利要求59所述的核酸。

61. 一种细胞,其包含如权利要求60所述的载体。

62. 如权利要求61所述的细胞,其中所述细胞为CHO细胞、HEK293细胞、HBK细胞、COS细胞、NS0细胞或HT1080细胞。

63. 一种免疫缀合物,其包含与剂连接的如权利要求1至58中任一项所述的抗体。

64. 一种组合物,其包含如权利要求1至58中任一项所述的抗体、如权利要求59所述的核酸、如权利要求60所述的载体、如权利要求61或62所述的细胞或如权利要求63所述的免疫缀合物,和载剂。

65. 一种试剂盒,其包含如权利要求1至58中任一项所述的抗体、如权利要求59所述的核酸、如权利要求60所述的载体、如权利要求61或62所述的细胞或如权利要求63所述的免疫缀合物,和使用说明书。

66. 一种抑制有需要的受试者中的IL-7活性的方法,其包括向所述受试者施用如权利

要求1至58中任一项所述的抗体、如权利要求59所述的核酸、如权利要求60所述的载体、如权利要求61或62所述的细胞或如权利要求63所述的免疫缀合物。

67. 一种抑制有需要的受试者中的效应T细胞的增殖和/或诱导调节性T细胞的产生和/或存活的方法,其包括向所述受试者施用如权利要求1至58中任一项所述的抗体、如权利要求59所述的核酸、如权利要求60所述的载体、如权利要求61或62所述的细胞或如权利要求63所述的免疫缀合物。

68. 一种治疗有需要的受试者的炎性疾病或自身免疫疾病的方法,其包括向所述受试者施用如权利要求1至58中任一项所述的抗体、如权利要求59所述的核酸、如权利要求60所述的载体、如权利要求61或62所述的细胞或如权利要求63所述的免疫缀合物。

69. 如权利要求68所述的方法,其中所述炎性疾病或所述自身免疫疾病选自由以下组成的组:炎性肠病(IBD)、肠易激综合症、类风湿性关节炎(RA)、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、全身性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、脉管炎、败血症、全身性炎症反应综合症(SIRS)、I型糖尿病、格雷氏病、多发性硬化(MS)、自身免疫心肌炎、川崎病、冠状动脉疾病、慢性阻塞性肺病、间质性肺病、自身免疫甲状腺炎、硬皮病、全身性硬化症、骨关节炎、异位性皮炎、白斑病、移植植物抗宿主疾病、舍格伦综合症、自身免疫肾炎、古德帕斯丘综合症、慢性炎性脱髓鞘多发性神经病、过敏、哮喘、由急性或慢性炎症引起的其他自身免疫疾病及其任何组合。

70. 如权利要求69所述的方法,其中所述炎性疾病或所述自身免疫疾病为炎性肠病。

71. 如权利要求69或70所述的方法,其中所述炎性肠病为溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。

72. 如权利要求66至71中任一项所述的方法,其中所述受试者对先前的TNF- $\alpha$ 抑制剂疗法没有充分反应(抗TNF- $\alpha$ 不充分反应者)。

73. 如权利要求66至72中任一项所述的方法,其还包括施用一种或多种额外治疗剂。

74. 如权利要求73所述的方法,其中所述额外治疗剂包括抗TNF- $\alpha$ 抗体。

75. 如权利要求66至74中任一项所述的方法,其中以均一剂量或基于体重的剂量,向所述受试者施用所述抗体。

76. 如权利要求66至75中任一项所述的方法,其中所述抗体是静脉内、皮下、肌肉内、皮内或腹膜内施用。

77. 如权利要求76所述的方法,其中所述抗体是静脉内或皮下施用。

78. 一种制造与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合的抗体(“抗IL-7R抗体”的方法,其包括在适合条件下培养如权利要求61或62所述的细胞以及分离所述抗体。

## 抗IL-7R $\alpha$ 亚基的抗体及其用途

[0001] 本申请是申请日为2020年1月21日、申请号为202080013162.2、发明名称为“抗IL-7R $\alpha$ 亚基的抗体及其用途”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 经由EFS-WEB以电子方式提交的序列表的参考

[0003] 随着本申请一起提交的呈ASCII文本文件的以电子方式提交的序列表(名称:4521.001PC02\_Seqlisting\_ST25.txt;大小:100,565字节;和创建日期:2020年1月17日)的内容以引用的方式整体并入本文中。

### 背景技术

[0004] 白介素-7(IL-7)为细胞因子的共有 $\gamma$ 链( $\gamma$  c)家族的成员,所述细胞因子还包括IL-2、IL-4、IL-9、IL-15和IL-21。Nguyen V.等人, *J Immunol Res* 2017;4807853 (2017)。类似于其他成员,IL-7经由其独特 $\alpha$ -受体、IL-7R $\alpha$ (CD127)和共有 $\gamma$ 受体形成的三元复合物发送信号。Carrette,F.等人, *Semin Immunol* 24(3):209-17 (2012)。此相互作用刺激Janus激酶(JAK)和信号转导与转录活化因子(STAT)蛋白,以及随后磷酸肌醇3-激酶(PI3K)/Akt或Src路径的活化,以促进靶基因转录。IL-7R $\alpha$ 也由胸腺基质源性淋巴细胞生成素(TSLP)用作含有第二受体链TSLPR的复合物的一部分。Durum,S.K., *Blood* 124(1):4-5 (2014)。

[0005] IL-7在正常免疫系统的发育中起关键作用,这是因为其为胸腺发育外周维持和淋巴细胞的存活所必需的。Maraskovsky,E.等人, *J Immunol* 157(12):5315-5323 (1996)。胸腺T细胞前体需要IL-7以用于增殖、分化和存活。在外周中,IL-7通过增强原生和记忆T细胞的存活和增殖来调节T细胞止血。

[0006] IL-7为一种组织源性细胞因子,并且主要由各种组织中的基质和上皮细胞产生。例如,在小肠和大肠中,IL-7由肠杯状上皮细胞产生,并且在动物模型中已描述为是持久性慢性结肠炎所必需的。Tomita,T.等人, *J Immunol* 180(1):383-390 (2008)。还已显示IL-7干扰调节性T细胞(Treg)的免疫抑制能力。Heninger,A.K.等人, *J Immunol* 189(12):5649-5658 (2012)。因此,可调节体内IL-7的活性并因此降低病原性T细胞的存活/功能和/或增加调节性T细胞的诱导的剂,为治疗炎性疾病(诸如炎性肠病)特别需要的。

### 发明内容

[0007] 本文提供一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中所述抗体

[0008] (a)能够以约5nM或更小(例如,小于约3nM)的EC<sub>50</sub>,与全血中的T细胞(CD4 $^+$ CD45RA $^+$ 、CD4 $^+$ CD45RA $-$ 、CD8 $^+$ CD45RA $^+$ 和/或CD8 $^+$ CD45RA $-$ )结合;

[0009] (b)不能与全血中的非T细胞结合;

[0010] (c)不能有效地阻断胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)介导的单核细胞活化;

- [0011] (d) 在与所述IL-7受体结合后,不激动IL-7受体信号传导,例如最低的pSTAT5活化;或
- [0012] (e) 其任何组合。
- [0013] 在一些实施方案中,抗IL-7R抗体(例如,本文所公开)的重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列(DEYSRGYYVLDV)。
- [0014] 在一些实施方案中,本发明的抗IL-7R抗体具有选自由以下组成的组的一个或多个特性:
- [0015] (a) 能够与人类和食蟹猴IL-7受体(IL-7R)的 $\alpha$ 链选择性地结合;
- [0016] (b) 能够与可溶且膜结合的IL-7R的 $\alpha$ 链结合;
- [0017] (c) 当向有需要的受试者施用时,能够阻断病原性T细胞的扩增和/或存活;
- [0018] (d) 当向有需要的受试者施用时,能够恢复T调节性细胞(Treg)功能和/或促进Treg存活;
- [0019] (e) 能够比CTLA4-Ig(**ORENCIA<sup>®</sup>**)维持更长的无药物缓解;
- [0020] (f) 能够在有需要的受试者的肠组织内阻断例如由病原性T细胞诱导的炎症和粘膜损伤;
- [0021] (g) 能够在有需要的受试者中降低肠系膜淋巴结(MLN)和/或固有层(LP)中的T效应细胞的频率;
- [0022] (h) 能够降低或抑制T细胞(例如,CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>)中的IL-7介导的pSTAT活化;
- [0023] (i) 能够阻断产生IL-17和/或IFN- $\gamma$ 的细胞的扩增;
- [0024] (j) 能够治疗患有炎性疾病(例如,炎性肠病)的受试者;和
- [0025] (k) 其任何组合。
- [0026] 在一些实施方案中,抗IL-7R抗体包含重链CDR1,其中所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列(DHAMH)。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体包含重链CDR2,其中所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列(GISWNSRGIGYADSVKG)。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体包含轻链CDR1,其中所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列(RASQGISSALA)。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体包含轻链CDR2,其中所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列(DASSLES)。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体包含轻链CDR3,其中所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列(QQFNSYPLWIT)。
- [0027] 在一些实施方案中,抗IL-7R抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含与SEQ ID NO:19中所阐述的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,VL包含与SEQ ID NO:20中所阐述的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列。
- [0028] 在一些实施方案中,本文所公开的抗IL-7R抗体在选自由以下组成的组的表位处,与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合:<sup>24</sup>SQLLEVNGSQHSLTCAF<sup>39</sup>(SEQ ID NO:8);<sup>73</sup>FIETKKFLLIGKSNIC<sup>88</sup>(SEQ ID NO:9);<sup>89</sup>VKVGEKSLTCKKIDLTT<sup>105</sup>(SEQ ID NO:10);<sup>136</sup>QKKYVKVLMHDVAY<sup>149</sup>(SEQ ID NO:11);<sup>181</sup>YEIKVRSIPDHYFKGF<sup>196</sup>(SEQ ID NO:12);及其组合。

在某些实施方案中,抗IL-7R抗体在包含选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸残基的表位处,与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合:H33、E75、F79、I82、K84、M144、R186、H191、Y192及其组合。

[0029] 在一些实施方案中,本发明的抗IL-7R抗体选自由以下组成的组:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4及其变体。在某些实施方案中,IL-7R抗体为IgG1抗体。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体包含无效应IgG1Fc。

[0030] 本文还公开一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链和轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:21中所阐述的氨基酸序列,并且其中所述轻链包含SEQ ID NO:22中所阐述的氨基酸序列。

[0031] 在一些实施方案中,抗IL-7R抗体以小于10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM(例如,1.3nM)的 $K_D$ ,与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链结合如通过表面等离子体共振所测量。在某些实施方案中,抗IL-7R抗体以小于10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM(例如,1.7nM)的 $K_D$ ,与食蟹猴IL-7受体的 $\alpha$ 链结合,如通过表面等离子体共振所测量。在一些实施方案中,与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链或食蟹猴IL-7受体的 $\alpha$ 链的结合为pH依赖性的。在某些实施方案中,抗IL-7R抗体在pH 7.4下以约1.3nM的 $K_D$ 且在pH 6下以约5.3nM的 $K_D$ ,与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链结合。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体在pH 7.4下以约1.7nM的 $K_D$ 且在pH 6下以约7.0nM的 $K_D$ ,与食蟹猴IL-7受体的 $\alpha$ 链结合。

[0032] 本文提供一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”)其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3,其中所述HC CDR1包含氨基酸序列GX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>FDDHAX<sub>3</sub>H(SEQ ID NO:260),其中X<sub>1</sub>为F或Y;X<sub>2</sub>为T、P、A、S、V、L、I、M、H、F、Y、N、D、E或Q;并且X<sub>3</sub>为L或M。在某些方面,X<sub>2</sub>为D或E。

[0033] 在一些方面,HC CDR2包含氨基酸序列GIX<sub>1</sub>WX<sub>2</sub>SRGX<sub>3</sub>GYX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>(SEQ ID NO:261),其中X1为S或T;X2为H或N;X3为I或V;X4为G、A、S、T、V、L、I、R、H或N;X5为P、T、N、D、E、Q、S、H或Y;X6为P、G、A、S、T、V、R、H、F、Y、N、D或E;X7为V或I;X8为A、S、T、V、L、I、M、K、R、H、F、Y、N、D、E或Q;并且X9为G、H、D或Q。在某些方面,X<sub>1</sub>为T。

[0034] 在一些方面,HC CDR3包含氨基酸序列DEYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GYYX<sub>3</sub>LDX<sub>4</sub>(SEQ ID NO:262),其中X<sub>1</sub>为S、T、N、D或E;X<sub>2</sub>为L、M、R或S;X<sub>3</sub>为G、A、S、T、V、M、N、E或Q;并且X<sub>4</sub>为A、S、T、V、R、H、Y、W、N、E、Q或M。在某些方面,X<sub>3</sub>为A、S或T。在一些方面,X4为E。

[0035] 在一些方面,LC CDR1包含氨基酸序列X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>SX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>A(SEQ ID NO:263),其中X<sub>1</sub>为S、T、V、K、R、H、Y或I;X<sub>2</sub>为A、S、T或V;X<sub>3</sub>为P、G、A、S、T、V、L、I、M、K、R、H、N、E或Q;X<sub>4</sub>为P、G、A、S、T、V、L、I、M、H、F、Y、N、D、E或Q;X<sub>5</sub>为P、G、A、S、T、H、E、Q、M、N或D;X<sub>6</sub>为P、G、A、S、T、V、L、I或N;X<sub>7</sub>为S、T、V、L、I、M、H、F、Y、N、D、E或Q;X<sub>8</sub>为P或A;并且X<sub>9</sub>为A、L或V。在某些方面,X6为P。在其他方面,X<sub>8</sub>为P。在一些方面,X<sub>7</sub>为D或E。

[0036] 在一些方面,LC CDR2包含氨基酸序列DX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>(SEQ ID NO:264),其中X<sub>1</sub>为G、A、S、M、H、N、D、E或Q;X<sub>2</sub>为G、A、S、T、V、M、H、F、Y、N、D、E或Q;X<sub>3</sub>为A、S、F、Y、W、N、D、E或L;X<sub>4</sub>为P、S、T、L、K、H或N;X<sub>5</sub>为D、E或Q;并且X<sub>6</sub>为G、S、T、N、D、Q、P或E。

[0037] 在一些方面,LC CDR3包含氨基酸序列X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>FX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>YPLX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>(SEQ ID NO:265),其中X<sub>1</sub>为M或Q;X<sub>2</sub>为G、A、D、E或Q;X<sub>3</sub>为N或E;X<sub>4</sub>为P、A或S;X<sub>5</sub>为T、I、M、K、W、N、E或Q;X<sub>6</sub>为L或I;并且X<sub>7</sub>为T、M、K、H、Y、E或Q。在某些方面,X<sub>2</sub>为A。在其他方面,X<sub>4</sub>为P或A。

[0038] 在一些方面,重链CDR1包含SEQ ID NO:31至46中所阐述的氨基酸序列。在某些方面,重链CDR1包含SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:44中所阐述的氨基酸序列。在一些方面,重链CDR2包含SEQ ID NO:47至96中所阐述的氨基酸序列。在某些方面,重链CDR2包含SEQ ID NO:47中所阐述的氨基酸序列。在其他方面,重链CDR3包含SEQ ID NO:97至122中所阐述的氨基酸序列。在某些方面,重链CDR3包含SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:120中所阐述的氨基酸序列。在一些方面,轻链CDR1包含SEQ ID NO:123至194中所阐述的氨基酸序列。在某些方面,轻链CDR1包含SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:189、SEQ ID NO:190或SEQ ID NO:192中所阐述的氨基酸序列。在一些方面,轻链CDR2包含SEQ ID NO:195至237中所阐述的氨基酸序列。在一些方面,轻链CDR3包含SEQ ID NO:238至259中所阐述的氨基酸序列。在某些方面,轻链CDR3包含SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:244或SEQ ID NO:245中所阐述的氨基酸序列。

[0039] 本文提供一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3,其中:(i)所述重链CDR1包含SEQ ID NO:31至46中所阐述的氨基酸序列;(ii)所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;(iii)所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;(iv)所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;(v)所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且(vi)所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。在某些方面,重链CDR1包含SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:44中所阐述的氨基酸序列。

[0040] 本文还提供一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3,其中:(i)所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;(ii)所述重链CDR2包含SEQ ID NO:47至96中所阐述的氨基酸序列;(iii)所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;(iv)所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;(v)所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且(vi)所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。在某些方面,重链CDR2包含SEQ ID NO:47中所阐述的氨基酸序列。

[0041] 本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3,其中:(i)所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;(ii)所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;(iii)所述重链CDR3包含SEQ ID NO:97至122中所阐述的氨基酸序列;(iv)所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;(v)所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且(vi)所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。在一些方面,重链CDR3包含SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:120中所阐述的氨基酸序列。

[0042] 本文提供一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”),其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3,其中:(i)所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;(ii)所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;(iii)所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的

氨基酸序列; (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:123至194中所阐述的氨基酸序列; (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列; 并且 (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。在某些方面, 轻链CDR1包含SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:189、SEQ ID NO:190或SEQ ID NO:192中所阐述的氨基酸序列。

[0043] 本文还提供一种分离的抗体或其抗原结合部分, 其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”), 其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3, 其中: (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列; (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列; (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列; (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列; (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:195至237中所阐述的氨基酸序列; 并且 (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

[0044] 本文提供一种分离的抗体或其抗原结合部分, 其与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合(“抗IL-7R抗体”), 其包含重链(HC)CDR1、CDR2和CDR3以及轻链(LC)CDR1、CDR2和CDR3, 其中: (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列; (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列; (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列; (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列; (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列; 并且 (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:238至259中所阐述的氨基酸序列。在某些方面, 轻链CDR3包含SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:244或SEQ ID NO:245中所阐述的氨基酸序列。

[0045] 本发明还提供编码本发明的抗IL-7R抗体的核酸、包含所述核酸的载体和包含所述载体的细胞。在一些实施方案中, 所述细胞为CHO细胞、HEK293细胞、HBK细胞、COS细胞、NS0细胞或HT1080细胞。

[0046] 本文还提供免疫缀合物, 其包含与剂连接的如本文所公开的抗IL-7R抗体。

[0047] 本发明进一步提供组合物, 其包含如本文所公开的抗IL-7R抗体、核酸、载体、细胞或免疫缀合物, 和载剂。

[0048] 在本发明中还提供试剂盒, 其包含如本文所公开的抗IL-7R抗体、核酸、载体、细胞或免疫缀合物, 和使用说明书。

[0049] 本文提供一种抑制有需要的受试者中的IL-7活性的方法, 其包括向所述受试者施用如本文所公开的抗IL-7R抗体、核酸、载体、细胞或免疫缀合物。

[0050] 本文提供一种抑制有需要的受试者中的效应T细胞的增殖和/或诱导调节性T细胞的产生和/或存活的方法, 其包括向所述受试者施用如本文所公开的抗IL-7R抗体、核酸、载体、细胞或免疫缀合物。

[0051] 本文还提供一种治疗有需要的受试者的炎性疾病或自身免疫疾病的方法, 其包括向所述受试者施用如本文所公开的抗IL-7R抗体、核酸、载体、细胞或免疫缀合物。在某些实施方案中, 炎性疾病或自身免疫疾病选自由以下组成的组: 炎性肠病(IBD)、肠易激综合症、类风湿性关节炎(RA)、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、全身性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、脉管炎、败血症、全身性炎症反应综合症(SIRS)、I型糖尿病、格雷氏病(Grave's disease)、多发性硬化(MS)、自身免疫心肌炎、川崎病(Kawasaki disease)、冠状动脉疾病、慢性阻塞性肺病、间质性肺病、自身免疫甲状腺炎、硬皮病、全身性硬化症、骨关节炎、异位性皮炎、白斑

病、移植植物抗宿主疾病、舍格伦综合症 (Sjogren's syndrome)、自身免疫肾炎、古德帕斯丘综合症 (Goodpasture syndrome)、慢性炎性脱髓鞘多发性神经病、过敏、哮喘、由急性或慢性炎症引起的其他自身免疫疾病及其任何组合。在一些实施方案中,炎性疾病或自身免疫疾病为炎性肠病。在其他实施方案中,炎性肠病为溃疡性结肠炎或克罗恩氏病 (Crohn's disease)。

[0052] 在一些实施方案中,受试者(例如,本文所描述)对先前的TNF- $\alpha$ 抑制剂疗法没有充分反应(抗TNF- $\alpha$ 不充分反应者)。

[0053] 在一些实施方案中,本文所公开的方法可还包括施用一种或多种额外治疗剂。在某些实施方案中,额外治疗剂包括抗TNF- $\alpha$ 抗体。

[0054] 在一些实施方案中,以均一剂量或基于体重的剂量,向受试者施用本文所公开的抗IL-7R抗体。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体是经静脉内、皮下、肌肉内、皮内或腹膜内施用。在某些实施方案中,抗IL-7R抗体是经静脉内或皮下施用。

[0055] 本文还提供一种制造与人类IL-7受体的 $\alpha$ 链特异性结合的抗体(“抗IL-7R抗体”)的方法,其包括在适合条件下培养本文所描述的细胞和分离所述抗体。

## 附图说明

[0056] 图1示出抗IL-7R抗体与CD3-细胞(即非T细胞)的结合曲线,如通过流式细胞术所测量。x轴示出抗IL-7R抗体的浓度( $\mu$ g/mL),并且y轴示出结合的平均荧光强度(MFI)。

[0057] 图2A和图2B示出在食蟹猴中单一静脉内施用抗体后,抗IL-7R抗体对于食蟹猴IL-7Ra的交叉反应性。图2A示出CD4 $^+$ CD45RA $^+$ T细胞上表达的总IL-7Ra的百分比,其随抗IL-7R抗体血清浓度(ng/mL)而变化。图2B示出随血清中的抗IL-7R抗体浓度(nM)变化的CD4 $^+$ CD45RA $^+$ T细胞中的pSTAT5活化。pSTAT5活化示出为磷酸化的总STAT5的百分比。在图2A和图2B两者中,血清中的抗体浓度意图表示CD4 $^+$ CD45RA $^+$ T细胞暴露于抗IL-7R抗体的所测量暴露。

[0058] 图3示出在NOD SCID  $\gamma$  (NSG) - 人类PBMC转移小鼠中单一静脉内施用后,抗IL-7R抗体的药代动力学(血清浓度)。小鼠接受两个抗IL-7R抗体剂量中的一者:0.5mg/kg(具有实线的实心正方形)或5mg/kg(具有虚线的空心正方形)。对照小鼠接受A3312F抗体:0.5mg/kg(具有实线的实心圆圈)或5mg/kg(具有虚线的空心圆圈)。数据显示为平均值 $\pm$ 标准差。

[0059] 图4示出在食蟹猴中单一静脉内施用抗IL-7R抗体后,药代动力学(血清浓度)和抗药物抗体(ADA)两者。动物接受三个抗体剂量中的一者:0.1mg/kg(正方形)、0.5mg/kg(圆圈)或3mg/kg(三角形)。以不同剂量下的抗体的血清浓度(左侧y轴)显示为实线。抗药物抗体(即针对所施用抗IL-7R抗体的抗体)形成(右侧y轴)显示为虚线。数据显示为平均值 $\pm$ 标准差。

[0060] 图5示出在食蟹猴中单一静脉内施用后,抗IL-7R抗体和A33 12F抗体的药代动力学(血清浓度)的比较。动物接受三个抗IL-7R抗体剂量中的一者:0.1mg/kg(具有实线的实心正方形)、0.5mg/kg(具有实线的实心圆圈)或3mg/kg(具有实线的实心三角形)。对照动物接受在以下剂量下中的一者的A3312F抗体:0.1mg/kg(具有虚线的空心正方形)、0.5mg/kg(具有虚线的空心圆圈)或3mg/kg(具有虚线的空心三角形)。数据显示为平均值 $\pm$ 标准差。

[0061] 图6示出在食蟹猴中单一静脉内施用抗IL-7R抗体(正方形)或A3312F抗体(三角形)后,CD4 $^+$ CD45RA $^+$ T细胞中的pSTAT5活化。pSTAT5活化示出为磷酸化的总STAT5的百分比。

血清中的抗体浓度意图表示CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>T细胞暴露于抗体的所测量暴露。

[0062] 图7A、7B和7C示出在不同食蟹猴中单一静脉内施用抗IL-7R抗体(3mg/kg)后,在外周血液中观测到的不同T细胞群体的频率。图7A示出呈总淋巴细胞的百分比的CD3<sup>+</sup>T细胞的频率。图7B和图7C分别示出呈总CD3<sup>+</sup>T细胞群体的百分比的CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的频率。在图7A、7B和7C中,在施用前(自个别猴的各条柱组左侧的第一条柱)和在施用抗体后第4天(从个别猴的每个条柱组左侧的第二条柱)、在第8天(从个别猴的每个条柱组左侧的第三条柱)和第15天(从个别猴的每个条柱组左侧的第四条柱),观测不同T细胞群体的频率。x轴提供各猴的标识号。

[0063] 图8示出抗IL-7R抗体的不同生产批次的免疫原性的潜在风险,如体外使用树突状细胞:T细胞增殖分析所测量。所测试的不同抗IL-7R抗体包括:(i) P1-061895-2、(ii) P1-066930-3、(iii) P1-066930-9和(iv) 抗体A RACIR。安维汀(Avastin)和抗IL-21R抗体(IL-21R mAb)分别示出为阴性和阳性对照。

[0064] 图9示出使用HDX-MS表位定位分析得到的人类IL-7R $\alpha$ 的序列覆盖。每个条柱指示消化性肽。

[0065] 图10示出使用HDX-MS表位定位分析鉴别出的抗IL-7R抗体的五个表位的氘吸收差异。所示出的五个表位包括:(i) <sup>24</sup>SQLEVNGS QHSLTCAF<sup>39</sup>; (ii) <sup>73</sup>FIETKKFLLIGKSNIC<sup>88</sup>; (iii) <sup>89</sup>VKGEGKSLTC KKIDLTT<sup>105</sup>; (iv) <sup>136</sup>QKKYVKVLMHDVAY<sup>149</sup>; 和(v) <sup>181</sup>YEIKVRSI PDHYFKGF<sup>196</sup>。黑色竖直条柱指示每个肽的氘化上的总差异。线条表示在不同时间点处每个肽的氘化上的差异,所述不同时间点即1分钟(“(2)”)、10分钟(“(3)”)和240分钟(“(1)”)。

[0066] 图11A和11B示出抗IL-7R抗体的表位定位分析的概述。在图11A中,将表位定位于线性人类IL-7R $\alpha$ 序列上。使用HDX-MS分析所鉴别的表位由实线指示。使用FPOP/GEE分析所鉴别的表位由虚线指示。使用FPOP分析所鉴别的表位的最受保护的残基由圆圈指示。使用GEE分析所鉴别的表位的最受保护的残基由三角形指示。所示出的编号对应于人类IL-7R $\alpha$ 的成熟序列。在图11B中,将表位定位于人类IL-7R $\alpha$ 的晶体结构上。左侧晶体结构示出使用HDX-MS分析所鉴别的表位。右侧晶体结构示出使用FPOP/GEE分析所鉴别的表位。表位的序列提供于晶体结构下。

[0067] 图12A和12B示出用于表征猴和人类中的PK和PD数据的抗IL-7R抗体的PK模型(图12A)和PK/OD机制模型(图12B)的示意图。

[0068] 图13示出在预计抗IL-7R抗体的人类剂量(对于70kg成年人,每隔一周皮下110mg)下,所预测的人类药代动力学(基于抗IL-7R抗体的血清浓度)(左侧y轴)和受体占有率(右侧y轴)曲线。上方线条(“R0”)示出受体占有率数据。下方线条(“PK”)示出药代动力学数据。

[0069] 图14A和图14B示出在重新格式化为scFv后,18B1(抗体A)抗体与人类IL-7R的结合。图14A提供在不同浓度下,18B1scFv的结合的比较。图14B提供ka、kd和KD值。

[0070] 图15示出重链和轻链CDR中的特定氨基酸残基,对于实施例11中所描述的突变扫描分析,所述特定氨基酸残基分别进行突变。

[0071] 图16示出对于18B1scFv进行单轮选择的结果。示出如与生物素-IL-7R相比,18B1重链和轻链与人类IL-7R的百分比结合。测试在两个不同浓度(0.2nM和1nM)下的18B1重链和轻链。

[0072] 图17A和17B提供涉及构建实施例11中所描述的突变扫描文库和使用下一代测序

(NGS) 来鉴别以下的整体方法的示意图:1) 对于结合关键的CDR位置、2) 容许突变的CDR位置处和3) 可改进抗体与hIL-7R的结合的突变。图17A示出方法本身的不同方面。图17B提供解释来自热图的结果的简要说明。

[0073] 图18A、18B、18C、18D、18E和18F分别提供在以下中具有突变的18B1抗体变体的热图结果:LC CDR3、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2、HC CDR1和HC CDR2。对于每个图,测试在两个不同浓度(0.2nM和1nM)下的抗体变体。在每个图中,最左列提供在特定氨基酸残基处制得的特定突变。不同突变的富集评分提供于相关框中。如在图17B中所阐述,富集评分>1表明有利突变(即改进结合),其中富集评分愈高表明更有利的突变。富集评分1表明中性突变(即不显著地影响结合)。富集评分<1表明不利突变(即削弱结合)。

[0074] 图19提供(i) KD值(示出为亲本18B1抗体:变体抗体的比率),和(ii)经由对不同18B1抗体变体的NGS热图分析获得的富集比率。

[0075] 图20A和20B提供用于评定实施例11中所描述的18B1(抗体A)和18B1丙氨酸变体的结合的Biacore动力学型式的概述。所使用的特定条件提供于图20A的左图。18B1抗体的Biacore传感器图谱提供于图20A的右图。图20B示出所使用的Biacore分析的示意图。

[0076] 图21提供不同18B1抗体变体与人类IL-7R的结合数据,如通过Biacore分析所测量。

[0077] 图22提供示例性18B1抗体变体的表面等离子体共振(SPR)概况。对于抗体变体中的每一者,ka、kd和KD值提供于SPR概况下。

[0078] 图23提供不同18B1抗体变体的KD值的分布的图形概述。基于哪些CDR进行突变,将抗体变体中的每一者进行划分。每个圆圈表示个别抗体。

[0079] 图24示出不同丙氨酸变体的KD值(正方形)与使用NGS所产生的热图结果(空心圆圈)之间的相关性。沿X轴提供特定突变(在轻链CDR或HC CDR中)。

[0080] 图25A和25B提供18B1抗体的Fab片段的晶体结构。在图25A中,标示18B1抗体的重链(深灰色)和轻链(浅灰色)。在图25B中,对于与IL-7R $\alpha$ 结合重要的残基以深灰色示出。可被修饰以改进结合的残基以黑色示出。

[0081] 图26提供从接受以下剂量中的一者皮下施用18B1抗体的猴分离出的CD3<sup>+</sup>白血球上的IL-7R $\alpha$ 表达的比较:(i) 2mg/kg(“正方形”),(ii) 10mg/kg(“三角形”)和(iii) 50mg/kg(“菱形”)。并未接受18B1抗体的动物用作对照(“圆圈”)。IL-7R $\alpha$ 表达示出为如使用流式细胞术所测量的平均荧光强度(MFI)。在给药抗体后以下天测量IL-7R $\alpha$ 表达:1天4小时;5天;8天;22天;36天;36天4小时;40天;43天;64天;和99天。

[0082] 图27A和27B提供在接受以下剂量中的一者皮下施用18B1抗体的猴中,钥孔戚血蓝蛋白(KIH)诱导的IgM(图27A)和IgG(图27B)抗体反应的比较:(i) 2mg/kg(“正方形”),(ii) 10mg/kg(“三角形”)和(iii) 50mg/kg(“菱形”)。并未接受18B1抗体的动物用作对照(“圆圈”)。通过使用ELISA提供端点效价在动物血清中所测量的KLH特异性IgM和IgG抗体,示出KLH诱导的IgM和IgG反应。如图27A中所示,在施用18B1抗体后第15天、第22天和第29天(即分别在KIH免疫接种后0天、7天和14天),测量KLH特异性IgM。如图27B中所示,在施用18B1抗体后第15天、第29天、第36天和第43天(即分别在KLH免疫接种后0天、14天、21天和28天),测量KLH特异性IgG。

[0083] 图28A、28B和28C示出使用HDX-MS表位定位分析所鉴别的三种参考抗IL-7R抗体

(分别为4A8、13A10和PFE A3312F)的不同表位的氘吸收差异。示出于图28A中的4A8抗体的表位包括: (i) <sup>57</sup>LVEVKCLNF<sup>65</sup>、(ii) <sup>73</sup>FIETKKFLIGKSNIC<sup>88</sup>、(iii) <sup>136</sup>QKKYVKVLMHDVAY<sup>149</sup>和(iv) <sup>181</sup>YEIKVRSIPDHYFKGF<sup>196</sup>。图28B中示出的13A10抗体的表位包括: (i) <sup>73</sup>FIETKKFLIGKSNIC<sup>88</sup>、(ii) <sup>89</sup>VKGEEKSLTCKKIDLTT<sup>105</sup>、(iii) <sup>136</sup>QKKYVKVLMHDVAY<sup>149</sup>和(iv) <sup>181</sup>YEIKVRSIPDHYFKGF<sup>196</sup>。图28C中示出的PFE A3312F的表位包括: (i) <sup>24</sup>SQLEVNGSQHSLTCA<sup>38</sup>、(ii) <sup>52</sup>EICGALVEVKCLNF<sup>65</sup>、(iii) <sup>73</sup>FIETKKFLIGKSNIC<sup>88</sup>、(iv) <sup>89</sup>VKGEEKSLTCKKIDLTT<sup>105</sup>、(v) <sup>104</sup>TTIVKPEAPFDLSV<sup>117</sup>、(vi) <sup>109</sup>PEAPFDLSVIYRE<sup>121</sup>、(vii) <sup>136</sup>QKKYVKVLMHDVAY<sup>149</sup>、(viii) <sup>169</sup>TLLQRKLQPAAM<sup>180</sup>和(ix) <sup>181</sup>YEIKVRSIPDHYFKGF<sup>196</sup>。黑色竖直条柱指示每个肽的氘化上的总差异。线条表示在不同时间点处每个肽的氘化上的差异,所述不同时间点即1分钟(“(2)”)、10分钟(“(3)”)和240分钟(“(1)”)。

[0084] 图29A、29B和29C示出定位至人类IL-7R $\alpha$ 蛋白的晶体结构上的三种参考抗IL-7R抗体(分别为4A813A10和PFE A3312F)的表位

### 具体实施方式

[0085] 为了使本说明书可更易于理解,首先定义某些术语。额外定义在整个具体实施方式中阐述。

[0086] 应注意,术语“一个/种(a或an)”实体是指一个或多个该实体;例如,“一个核苷酸序列”应理解为表示一个或多个核苷酸序列。因此,术语“一个/种(a/an)”、“一个/种或多个/种”和“至少一个/种”在本文中可互换使用。

[0087] 此外,在本文中所用的术语“和/或”应视为两种指定特征或组分中的每一者具有或不具有另一者的特定公开内容。因此,诸如本文中“A和/或B”的短语中所用的术语“和/或”意图包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样,如在诸如“A、B和/或C”的短语中所用的术语“和/或”意图涵盖以下方面的每一者:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0088] 应理解,每当本文中用语言“包含”描述方面时,则还提供用术语“由……组成”和/或“基本上由……组成”所描述的类似方面。

[0089] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的技术人员通常所理解相同的含义。例如, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第3版, 1999, Academic Press; 和 the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 修订, 2000, Oxford University Press向技术人员提供本发明中所使用的多个术语的通用词典。

[0090] 单位、前缀和符号以其国际单位制(Système International deUnités, SI)接受形式表示。数值范围包括限定所述范围的数值。除非另外指示,否则核苷酸序列以5'至3'取向从左向右书写。氨基酸序列以氨基至羧基取向从左向右书写。本文提供的标题并非本发明的各种方面的限制,其可作为整体由说明书提及。因此,下文紧接着定义的术语通过参考整个说明书更充分定义。

[0091] 术语“约”在本文中用于指大致、大约、约或在……区域中。当术语“约”与数值范围结合使用时,其通过向上和向下扩展所阐述数值的边界来调整其范围。一般而言,术语“约”

可调整高于和低于所陈述值例如上下10% (高或低) 变化的数值。

[0092] 如本文所用,术语“IL-7R”和“IL-7受体”是指保留IL-7R的活性的至少部分的IL-7R的任何形式,包括其变体。IL-7R为由 $\alpha$ 亚基(IL-7R $\alpha$ 或CD127)和细胞因子受体共有 $\gamma$ 链( $\gamma$  c)组成的杂二聚体。IL-7R $\alpha$ 亚基在各种细胞类型上表达,包括原初和记忆T细胞以及发育中的B细胞。如本文所用,在一些方面,术语IL-7R是指 $\alpha$ 亚基并且可与IL-7R $\alpha$ 互换使用。

[0093] 已鉴别出人类IL-7R $\alpha$ 的四种同种型。同种型1(登录号NP\_002176.2;SEQ ID NO:1)由459个氨基酸组成并且表示典型序列。同种型2(登录号P16871-4;SEQ ID NO:2)由252个氨基酸组成并且为可溶性。其缺乏氨基酸残基253-459,所述氨基酸残基编码跨膜结构域的一部分和整个细胞质结构域。氨基酸237-252也不同于典型序列(即同种型1)。同种型3(登录号P16871-2,SEQ ID NO:3)由298个氨基酸组成并且具有截短的细胞质结构域。其与典型序列的不同之处在于氨基酸残基293-459。同种型4(登录号P16871-3;SEQ ID NO:4)由261个氨基酸组成并且为可溶性。其与典型序列的不同之处在于氨基酸残基237-459。

[0094] 以下为四种已知人类IL-7R $\alpha$ 同种型的氨基酸序列。

[0095] (A) 人类IL-7R $\alpha$ 同种型1(登录号NP\_002176.2;SEQ ID NO:1,由具有登录号NM\_002185.4的核苷酸序列编码;SEQ ID NO:5) :

MTILGTTFGMVFSLLQVVSGESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNNTN

LEFEICGALVEVKCLNFRKLQEIYFIETKKFLLIGKSNCVKGEKSLTCKKIDLTTTIVKPEAPFDLS

[0096] VIYREGANDFVVTFNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDENKWTHVNLSSTKLTLLQRKLQPAAMYEIK

VRSIPDHYFKGFWSEWSPSYYFRTPEINNSGEMDPILLTISILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIV

WPSLPDPHKKTLEHLCKKPRKVSVFGA

[0097] (B) 人类IL-7R $\alpha$ 同种型2(登录号P16871-4;SEQ ID NO:2) :

MTILGTTFGMVFSLLQVVSGESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNNTN

LEFEICGALVEVKCLNFRKLQEIYFIETKKFLLIGKSNCVKGEKSLTCKKIDLTTTIVKPEAPFDLS

[0098] VIYREGANDFVVTFNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDENKWTHVNLSSTKLTLLQRKLQPAAMYEIK

VRSIPDHYFKGFWSEWSPSYYFRTPEINNSGLSLSYGPVSPIIRQEL

[0099] (C) 人类IL-7R $\alpha$ 同种型3(登录号P16871-2;SEQ ID NO:3) :

MTILGTTFGMVFSLLQVVSGESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNNTN

LEFEICGALVEVKCLNFRKLQEIYFIETKKFLLIGKSNCVKGEKSLTCKKIDLTTTIVKPEAPFDLS

[0100] VIYREGANDFVVTFNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDENKWTHVNLSSTKLTLLQRKLQPAAMYEIK

VRSIPDHYFKGFWSEWSPSYYFRTPEINNSGEMDPILLTISILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIV

WPSLPDPHKKTLEHLCKKPRKVSVFGA

[0101] (D) 人类IL-7R $\alpha$ 同种型4(登录号P16871-3;SEQ ID NO:4) :

MTILGTTFGMVFSLLQVVSGESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNNTN

LEFEICGALVEVKCLNFRKLQEIYFIETKKFLLIGKSNCVKGEKSLTCKKIDLTTTIVKPEAPFDLS

[0102] VIYREGANDFVVTFNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDENKWTHVNLSSTKLTLLQRKLQPAAMYEIK

VRSIPDHYFKGFWSEWSPSYYFRTPEINNSGLSLSYGPVSPIIRRLWNIFVRNQEK。

[0103] 同种型1-4的信号序列对应于氨基酸残基1-20(加下划线)。因此,例如典型序列(同种型1)的成熟形式由氨基酸21-459组成。成熟人类IL-7R $\alpha$ (例如,同种型1)的胞外结构域由氨基酸残基21-239组成并且具有以下氨基酸序列:

[0104]

ESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNTTNLEFEICGALVEVKCLNFRKL  
 QEIYFIETKKFLLIGKSNICVKGKSLTCKKIDLTIVKPEAPPFDLSVIYREGANDFVVTFNTSHLQ  
 KYVKVLMHDVAYRQEKENWTHVNLSSTKLTLQRKLQPAAMYEIKVRSIPDHYFKGFSEWSPSY  
 YFRTPEinNNSGEMD (SEQ ID NO: 6)。

[0105]

食蟹猴IL-7R $\alpha$ 蛋白由以下氨基酸序列(包括信号序列,其为加下划线)组成:

MTILGTTFGMVFSLLQVVGESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNTTN  
LEFEICGALVEVKCLSFRKLQEIYFIETKKFLLIGKSNICVKGKSLTCKKIDLTIVKPEAPPFDLS  
VIYREGANDFVVTFNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKENWVMHVNLSSTKLTLQRNLQPEAMYEIK  
VRSIPDHYFKGFSEWSPSYFRTPEinNNSPGEMDPILLTISLLSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIV  
WPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQQLEESKKQRL  
GGDVQSPSCPSEDVVITPESFERDSSLRCLAGNVSACDAPILSSRSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLSL  
GTTNSTLPPPFSLQSGILTLPVAQGQPILTSLSNQEEAYVTMSSFYQNZ (SEQ ID NO: 7)。

[0106]

[0107] 如本文所用,“TSLP”是指极其类似于IL-7并且在骨髓细胞(例如,单核细胞和树突状细胞)的成熟和活化中起作用的生长因子。TSLP由各种细胞类型产生,诸如纤维母细胞、上皮细胞和基质细胞。TSLP的水平升高已与疾病(诸如哮喘、异位性皮炎和炎性关节炎)相关,也已知所述疾病与IL-7的异常调节相关。Nguyen V.等人, J Immunol Res 2017: 4807853 (2017)。

[0108] 如本文所用,术语“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的蛋白质。每条重链包含重链可变区(本文中缩写为VH)和重链恒定区(本文中缩写为CH)。在某些抗体(例如天然存在的IgG抗体)中,重链恒定区包含铰链和三个结构域CH1、CH2和CH3。在某些抗体(例如天然存在的IgG抗体)中,每条轻链包含轻链可变区(本文中缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(本文中缩写为CL)。VH和VL区可进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),穿插有称为框架区(FR)的更保守区。每个VH和VL包含从氨基端至羧基端按以下次序排列的三个CDR和四个FR:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括与免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。重链可具有或不具有C端赖氨酸。除非本文中另外规定,否则可变区中的氨基酸使用Kabat编号系统来加以编号,而恒定区中的那些氨基酸使用EU系统来加以编号。例如,“抗体”包括天然存在和非天然存在的抗体两者;单克隆抗体和多克隆抗体;嵌合抗体和人源化抗体;人类抗体和非人类抗体和完全合成抗体。

[0109] 如本文所用,在某些实施方案中,“IgG抗体”,例如人类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4抗体,具有天然存在的IgG抗体的结构,即其与相同子类的天然存在的IgG抗体具有相同数目的重链和轻链以及二硫键。例如,抗IL-7R IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体由两条重链(HC)和两条轻链(LC)组成,其中所述两条重链和轻链由数目和位置分别与天然存在的IgG1、IgG2、IgG3和IgG4抗体中所出现相同的二硫桥连接(除非所述抗体已突变以修饰所述二硫桥)。

[0110] 抗体通常以高亲和力与其同源抗原特异性结合,所述高亲和力由解离常数( $K_D$ )为 $10^{-5}$ 至 $10^{-11}$ M或更小反映。任何大于约 $10^{-4}$ M的 $K_D$ 一般被认为指示非特异性结合。如本文所用,与抗原“特异性结合”的抗体是指以高亲和力与所述抗原和实质上一致的抗原结合但不以高亲和力与无关抗原结合的抗体,所述高亲和力意指具有 $10^{-7}$ M或更小、 $10^{-8}$ M或更小、 $5 \times 10$

$^{-9}$ M或更小或在 $10^{-8}$ M与 $10^{-10}$ M之间或更小的 $K_D$ 。如果抗原与给定抗原呈现较高程度的序列同一性,例如,如果抗原与给定抗原的序列呈现至少80%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%序列同一性,则所述抗原与给定抗原“实质上一致”。例如,在某些实施方案中,与人类IL-7R $\alpha$ 特异性结合的抗体也可与来自某些灵长类物种的IL-7R $\alpha$ 抗原(例如食蟹猴IL-7R $\alpha$ )具有交叉反应性,但不能与来自其他物种的IL-7R $\alpha$ 抗原或IL-7R $\alpha$ 以外的抗原交叉反应。

[0111] 如本文所用,“同型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE抗体)。IgG同型在某些物种中划分成子类:人类中IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,以及小鼠中IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3。在一些实施方案中,本文所描述的抗IL-7R抗体具有IgG1同型。免疫球蛋白(例如IgG1)以若干同种异型存在,所述同种异型彼此相差至多几个氨基酸。

[0112] 如本文所用,术语“同种异型”是指在特定同型组内的天然存在的变体,其中所述变体相差几个氨基酸(参见例如Jefferis等人(2009)mAbs1:1)。本文所描述的抗IL-7R抗体可具有任何同种异型。如本文所用,称为“IgG1f”、“IgG1.1f”或“IgG1.3f”同型的抗体分别为同种异型“f”的IgG1、无效应IgG1.1和无效应IgG1.3抗体,即,根据如Kabat中的EU索引,具有214R、356E和358M,如例如在SEQ ID NO:21中所示。

[0113] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”是指抗体中保留与抗原(例如,人类IL-7R $\alpha$ )特异性结合的能力的一个或多个片段。已显示,抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段执行。涵盖在术语抗体(例如本文所描述的抗IL-7R抗体)的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括:(i)Fab片段(来自番木瓜蛋白酶裂解的片段)或类似一价片段,其由V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、LC和CH1结构域组成;(ii)F(ab')2片段(来自胃蛋白酶裂解的片段)或类似二价片段,其包含通过铰链区处的二硫桥连接的两个Fab片段;(iii)Fd片段,其由V<sub>H</sub>和CH1结构域组成;(iv)Fv片段,其由抗体的单一臂的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域组成;(v)dAb片段(Ward等人,(1989)Nature 341:544-546),其由V<sub>H</sub>结构域组成;(vi)分离的互补决定区(CDR);和(vii)两个或更多个分离的CDR的组合,所述CDR可任选地通过合成接头连接。此外,尽管Fv片段的两个结构域V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>由独立基因编码,其可使用重组方法,通过使其能够制成其中V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>区配对形成一价分子的单一蛋白质链的合成接头来连接(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等人(1988)Science 242:423-426;和Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。此类单链抗体也意图涵盖于术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且以与完整抗体相同的方式来筛选供使用的片段。抗原结合部分可通过重组型DNA技术,或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学裂解来产生。

[0114] “双特异性”或“双功能抗体”为具有两对不同重链/轻链和两个不同结合位点的人工杂交抗体。双特异性抗体可通过多种方法产生,包括杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。参见例如Songsivilai和Lachmann,Clin.Exp.Immunol.79:315-321(1990);Kostelny等人,J.Immunol.148,1547-1553(1992)。

[0115] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指来自实质上均质抗体的群体的抗体,即包含在所述群体中的个别抗体实质上类似并且结合相同表位(例如,抗体显示单一结合特异性和亲和力),除可能在单克隆抗体产生期间产生的可能变体以外,此类变体一般以少量存在。修饰语“单克隆”指示抗体的特征为从实质上均质的抗体群体获得,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生所述抗体。术语“人类单克隆抗体”是指来自显示单一结合特异性

并且具有来源于人类生殖系免疫球蛋白序列的可变区和任选地存在的恒定区的实质上均质抗体的群体的抗体。在一个实施方案中,人类单克隆抗体由杂交瘤产生,所述杂交瘤包括与永生化细胞融合的从转基因非人类动物(例如转基因小鼠)获得的B细胞,其具有包含人类重链转基因和人类轻链转基因的基因组。

[0116] 如本文所用,术语“重组人类抗体”包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人类抗体,诸如(a)从人类免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤分离的抗体;(b)从被转化以表达抗体的宿主细胞(例如从转染瘤)分离的抗体;(c)从重组、组合人类抗体文库分离的抗体;和(d)通过涉及将人类免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。所述重组人类抗体包含利用由生殖系基因编码的特定人类生殖系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区,但包括例如发生在抗体成熟期间的后续重排和突变。如本领域中已知(参见例如Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23 (9) :1117-1125),可变区含有由重排以形成对外来抗原具有特异性的抗体的各种基因编码的抗原结合结构域。除重排以外,可变区可通过多个单氨基酸变化(称为体细胞突变或超突变)进一步修饰以增加抗体对于外来抗原的亲和力。恒定区将在对于抗原的进一步反应中发生变化(即同型转换)。因此,响应于抗原而编码轻链和重链免疫球蛋白多肽的重排且体细胞突变的核酸分子无法与原始核酸分子具有序列同一性,但可替代地将实质上相同或类似(即,具有至少80%同一性)。

[0117] “人类”抗体(HuMAb)是指具有其中框架区和CDR区均来源于人类生殖系免疫球蛋白序列的可变区的抗体。此外,如果抗体含有恒定区,则恒定区也来源于人类生殖系免疫球蛋白序列。本文所描述的抗IL-7R抗体可包括不由人类生殖系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所用,术语“人类抗体”并不意图包括来源于另一种哺乳动物物种(诸如小鼠)的生殖系的CDR序列已移植于人类框架序列上的抗体。术语“人类”抗体与“完全人类”抗体同义使用。

[0118] “人源化”抗体是指其中非人类抗体的CDR结构域外的一些、大部分或所有氨基酸被来源于人类免疫球蛋白的对应氨基酸置换的抗体。在抗体的人源化形式的一个实施方案中,CDR结构域外的一些、大部分或所有氨基酸被来自人类免疫球蛋白的氨基酸置换,而一个或多个CDR区内的一些、大部分或所有氨基酸不变。氨基酸的小添加、缺失、插入、取代或修饰为容许的,只要其不消除抗体与特定抗原结合的能力即可。“人源化”抗体保留类似于初始抗体的抗原特异性。

[0119] “嵌合抗体”是指其中可变区来源于一个物种而恒定区来源于另一物种的抗体,诸如其中可变区来源于小鼠抗体而恒定区来源于人类抗体的抗体。

[0120] 短语“识别抗原的抗体”和“对抗原具有特异性的抗体”在本文中可与术语“与抗原特异性结合的抗体”互换使用。

[0121] 如本文所用,“分离的抗体”意图是指实质上不含其他蛋白质和细胞材料的抗体。

[0122] 如本文所用,“抑制IL-7与IL-7R $\alpha$ 的结合”的抗体意图是指例如在使用来自表达IL-7R $\alpha$ 的全血的T细胞的结合测定中,在本领域中公认的方法(例如本文所描述的基于FACS的结合测定)中以约1 $\mu$ g/mL或更小的EC<sub>50</sub>,诸如约0.9 $\mu$ g/mL或更小、约0.85 $\mu$ g/mL或更小、约0.8 $\mu$ g/mL或更小、约0.75 $\mu$ g/mL或更小、约0.7 $\mu$ g/mL或更小、约0.65 $\mu$ g/mL或更小、约0.6 $\mu$ g/

mL或更小、约0.55μg/mL或更小、约0.5μg/mL或更小、约0.45μg/mL或更小、约0.4μg/mL或更小、约0.35μg/mL或更小、约0.3μg/mL或更小、约0.25μg/mL或更小、约0.2μg/mL或更小、约0.15μg/mL或更小、约0.1μg/mL或更小、或约0.05μg/mL或更小,抑制IL-7R $\alpha$ 与其配体(例如白介素-7(IL-7))的结合的抗体。

[0123] “效应功能”是指抗体Fc区与Fc受体或配体的相互作用,或由其引起的生物化学事件。示例性“效应功能”包括C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合、Fc $\gamma$ R介导的效应功能(诸如ADCC)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)以及细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调。此类效应功能一般需要Fc区与结合结构域(例如抗体可变结构域)组合。

[0124] “Fc受体”或“FcR”为与免疫球蛋白的Fc区结合的受体。与IgG抗体结合的FcR包括Fc $\gamma$ R家族的受体,包括这些受体的等位基因变体和交替剪接形式。Fc $\gamma$ R家族由三种活化性受体(小鼠中的Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIII和Fc $\gamma$ RIV;人类中的Fc $\gamma$ RIA、Fc $\gamma$ RIIA和Fc $\gamma$ RIIIA)和一种抑制性受体(Fc $\gamma$ RIIB)组成。人类Fc $\gamma$ R的各种特性为本领域中已知的。大部分先天性效应细胞类型共表达一种或多种活化性Fc $\gamma$ R和抑制性Fc $\gamma$ RIIB,而自然杀伤(NK)细胞选择性地表达一种活化性Fc受体(小鼠中的Fc $\gamma$ RIII和人类中的Fc $\gamma$ RIIIA)但不在小鼠和人类中表达抑制性Fc $\gamma$ RIIB。人类IgG1与大多数人类Fc受体结合,并且对于与其结合的活化Fc受体的类型而言,认为其等效于鼠类IgG2a。

[0125] “Fc区”(片段可结晶区)或“Fc结构域”或“Fc”是指抗体的重链中介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合(包括与位于免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)上的Fc受体的结合,或与经典补体系统的第一组分(C1q)的结合)的C端区。因此,Fc区包含除第一恒定区免疫球蛋白结构域(例如CH1或CL)外的抗体的恒定区。在IgG、IgA和IgD抗体同型中,Fc区包含来源于抗体的两条重链的第二(CH2)和第三(CH3)恒定结构域的两个一致蛋白质片段;IgM和IgE Fc区在每一条多肽链中包含三个重链恒定结构域(CH结构域2-4)。对于IgG,Fc区包含免疫球蛋白结构域CH2和CH3以及在CH1与CH2结构域之间的铰链。尽管对免疫球蛋白重链的Fc区的边界的定义可不同,但如本文所定义,人类IgG重链Fc区定义为对于IgG1从氨基酸残基D221,对于IgG2从V222,对于IgG3从L221并且对于IgG4从P224延伸至重链的羧基端,其中所述编号是根据Kabat中的EU索引。人类IgG Fc区的CH2结构域从氨基酸237延伸至氨基酸340,并且CH3结构域定位于Fc区中的CH2结构域的C端侧上,即其从IgG的氨基酸341延伸至氨基酸447或446(如果C端赖氨酸残基不存在)或445(如果C端甘氨酸和赖氨酸残基不存在)。如本文所用,Fc区可为原生序列Fc,包括任何同种异型变体或变体Fc(例如非天然存在的Fc)。Fc也可以是指分离的此区或在包含Fc的蛋白质多肽(诸如“包含Fc区的结合蛋白”,也称为“Fc融合蛋白”(例如抗体或免疫黏附))的情况下此区。

[0126] “原生序列Fc区”或“原生序列Fc”包含与在自然界中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。原生序列人类Fc区包括原生序列人类IgG1 Fc区;原生序列人类IgG2 Fc区;原生序列人类IgG3 Fc区;和原生序列人类IgG4 Fc区以及其天然存在的变体。原生序列Fc包括Fc的各种同种异型(参见例如Jefferis等人(2009)mAbs1:1)。

[0127] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指与免疫球蛋白或抗体特异性结合的抗原(例如IL-7R $\alpha$ )上的位点,例如,如由用于鉴别它的特定方法所定义。表位可由连续氨基酸(通常为线性表位)或通过蛋白质三级折叠并接的非连续氨基酸(通常为构象表位)两者形成。由连

续氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂中后通常但未必总是保留,而通过三级折叠形成的表位在用变性溶剂处理后通常消失。表位典型地以独特的空间构象包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。用于确定给定抗体结合哪种表位(即表位定位)的方法为本领域中熟知的,并且包括例如免疫印迹法和免疫沉淀分析,其中测试来自(例如来自IL-7Ra)的重叠或连续肽与给定抗体(例如抗IL-7R抗体)的反应性。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本文所描述的技术,例如X射线结晶学、抗原突变分析、2维核磁共振和HDX-MS(参见例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris编(1996))。

[0128] 术语“表位定位”是指鉴别用于抗体-抗原识别的分子决定簇的方法。

[0129] 提及两种或更多种抗体的术语“与相同表位结合”意指,如通过给定方法所测定,抗体与氨基酸残基的相同区段结合。用于确定抗体是否与本文所描述的抗体结合“IL-7Ra上的相同表位”的技术包括例如表位定位方法,诸如提供表位的原子解析的对抗原:抗体复合物的晶体的x射线分析和氢/氘交换质谱(HDX-MS)。其他方法监测抗体对抗原片段或抗原的突变变体的结合,其中归因于抗原序列内的氨基酸残基修饰的结合损失通常视为表位组分的指示。此外,还可使用表位定位的计算组合方法。这些方法依赖于感兴趣抗体从组合噬菌体展示肽文库中亲和分离特定短肽的能力。预期具有相同VH和VL或相同CDR1、2和3序列的抗体与相同表位结合。

[0130] “与另一种抗体竞争与靶标结合”的抗体是指(部分或完全)抑制另一种抗体与靶标结合的抗体。两种抗体是否彼此竞争与靶标结合,即一种抗体是否抑制另一种抗体与靶标结合及其抑制程度可使用例如BIACORE<sup>TM</sup>表面等离子体共振(SPR)分析的已知竞争实验来测定。在某些实施方案中,抗体与另一种抗体竞争与靶标结合并抑制其结合至少50%、60%、70%、80%、90%或100%。抑制或竞争的水平可根据哪一种抗体为“阻断抗体”(即首先与靶标一起孵育的冷抗体)而不同。竞争测定可如例如Ed Harlow和David Lane,Cold Spring Harb Protoc;2006;doi:10.1101/pdb.prot4277中或Ed Harlow和David Lane的第11章“Using Antibodies”,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, NY, USA 1999中所描述来进行。如果抗体彼此双向阻断至少50%,则两种抗体“交叉竞争”,即与在竞争实验中一种抗体或另一种抗体首先与抗原接触无关。

[0131] 用于确定两种抗体是否竞争结合或交叉竞争结合的竞争性结合测定包括:与表达IL-7Ra的T细胞结合的竞争,例如通过诸如实施例中描述的流式细胞术。其他方法包括:SPR(例如BIACORE<sup>TM</sup>)、固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见Stahli等人,Methods in Enzymology9:242(1983));固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见Kirkland等人,J. Immunol.137:3614(1986));固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press(1988))使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel等人,Mol. Immunol.25(1):7(1988));固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(Cheung等人,Virology 176:546(1990));和直接标记RIA.(Moldenhauer等人,Scand.J. Immunol.32:77(1990))。

[0132] 如本文所用,术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异地结合”是指抗体与预定抗原上的表位结合。通常,抗体(i)在通过例如表面等离子体共振(SPR)技术,在BIACORE<sup>TM</sup> 2000仪器中使用例如重组人类IL-7Ra的预定抗原作为分析物并使用抗

体作为配体或抗体与抗原阳性细胞结合的Scatchard分析测定时,以大约小于 $10^{-7}$ M(诸如大约小于 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M或甚至更低)的平衡解离常数( $K_D$ )结合,并(ii)以大于其与除预定抗原或紧密相关抗原以外的非特异性抗原(例如BSA,酪蛋白)结合的亲和力至少两倍的亲和力与预定抗原结合。因此,“与人类IL-7R $\alpha$ 特异性结合”的抗体是指以 $10^{-7}$ M或更小(诸如大约小于 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M或甚至更低)的 $K_D$ ,与可溶性或细胞结合的人类IL-7R $\alpha$ 结合。“与食蟹猴IL-7R $\alpha$ 交叉反应”的抗体是指以 $10^{-7}$ M或更小(诸如大约小于 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M或甚至更低)的 $K_D$ ,与食蟹猴IL-7R $\alpha$ 结合的抗体。在某些实施方案中,不与来自非人类物种的IL-7R $\alpha$ 交叉反应的此类抗体在标准结合测定中呈现基本上不可检测的针对这些蛋白质的结合。

[0133] 如本文所用的术语“ $k_{assoc}$ ”或“ $k_a$ ”意图是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而如本文所用的术语“ $k_{dis}$ ”或“ $k_d$ ”意图是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所用,术语“ $K_D$ ”意图是指解离常数,其为由 $K_d$ 与 $K_a$ 的比率(即 $K_d/K_a$ )获得并表述为摩尔浓度(M)。抗体的 $K_D$ 值可使用本领域中充分确立的方法测定。可用于测定抗体的 $K_D$ 的方法包括表面等离子体共振、生物传感器系统(诸如**BIACORE**<sup>®</sup>系统)或流式细胞术和Scatchard分析。

[0134] 如本文所用,术语IgG抗体的“高亲和力”是指抗体针对靶标抗原具有 $10^{-8}$ M或更小、 $10^{-9}$ M或更小或 $10^{-10}$ M或更小的 $K_D$ 。然而,对于其他抗体同型,“高亲和力”结合可变化。例如,IgM同型的“高亲和力”结合是指抗体具有 $10^{-10}$ M或更小、或 $10^{-8}$ M或更小的 $K_D$ 。

[0135] 在使用抗体或其抗原结合片段进行体外或体内测定的情形下,术语“ $EC_{50}$ ”是指诱导最大反应的50%(即最大反应与基线之间一半)的反应的抗体或其抗原结合部分的浓度。

[0136] 如本文所用,术语“天然存在的”在应用于对象时是指对象可在自然界中发现的事实。例如,存在于可从自然界中的来源分离的生物体(包括病毒)中并且未在实验室中被人类有意修饰的多肽或多核苷酸序列为天然存在的。

[0137] “多肽”是指包含至少两个连续连接的氨基酸残基的链,其中链长无上限。蛋白质中的一个或多个氨基酸残基可含有修饰,诸如但不限于糖基化、磷酸化或二硫键形成。“蛋白质”可包含一或多个多肽。

[0138] 如本文所用,术语“核酸分子”意图包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可为单链或双链,并且可为cDNA。

[0139] “保守性氨基酸取代”是指氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基取代。本领域中已限定具有类似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 $\beta$ 分支链侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。在某些实施方案中,在抗IL-7R抗体中所预测的非必需氨基酸残基被来自相同侧链家族的另一氨基酸残基置换。鉴别不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守性取代的方法为本领域中熟知的(参见例如Brumme11等人,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi等人Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997))。

[0140] 对于核酸,术语“实质性同源性”指示两种核酸或其指定序列在进行最佳比对和比较时为相同的,其中在至少约80%核苷酸、至少约90%至95%或至少约98%至99.5%核苷

酸中,具有适当的核苷酸插入或缺失。可替代地,当区段将在选择性杂交条件下与所述链的互补链杂交时,存在实质性同源性。

[0141] 对于多肽,术语“实质性同源性”指示,两条多肽或其指测序列在进行最佳比对和比较时为相同的,其中在至少约80%氨基酸、至少约90%至95%或至少约98%至99.5%氨基酸中,具有适当的氨基酸插入或缺失。

[0142] 在考虑到需要引入以进行两个序列的最佳比对的间隙的数目和各间隙的长度的情况下,两个序列之间的百分比同一性为由所述序列共有的相同位置的数目的函数(即,同源性% = 相同位置数/位置总数 × 100)。序列的比较和两个序列之间的百分比同一性的测定可使用数学算法实现,例如如下文非限制性实例中所描述。

[0143] 两个核苷酸序列之间的百分比同一性可使用GCG软件包(可在worldwideweb.gcg.com获得)中的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵以及间隙权重40、50、60、70或80和长度权重1、2、3、4、5或6来确定。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性也可使用已并入ALIGN程序(2.0版)中的E.Meyers和W.Miller(CABIOS, 4:11-17 (1989))的算法,使用PAM120权重残基表、间隙长度罚分12和间隙罚分4来测定。另外,两个氨基酸序列之间的百分比同一性可使用已并入GCG软件包(可在http://www.gcg.com获得)中的GAP程序中的Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol. (48):444-453 (1970))算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及间隙权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6来确定。

[0144] 本文所描述的核酸和蛋白质序列可进一步用作“查询序列”以针对公共数据库进行检索,以例如鉴别相关序列。此类检索可使用Altschul等人(1990)的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)(J.Mol.Biol.215:403-10)进行。BLAST核苷酸检索可使用NBLAST程序(评分=100、字长=12)进行,以获得与本文所描述的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质检索可使用XBLAST程序(评分=50,字长=3)进行,以获得与本文所描述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了使间隙比对实现比较目的,可如Altschul等人,(1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402中所描述使用间隙BLAST。在使用BLAST和间隙BLAST程序时,可使用各别程序(例如XBLAST和NBLAST)的预设参数。参见worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov。

[0145] 核酸可存在于全细胞、细胞裂解物中或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当核酸与其他细胞组分或其他杂质,例如其他细胞核酸(例如,染色体的其他部分)或蛋白质纯化分开时,所述核酸为“分离的”或“呈现实质上纯的”,所述纯化通过标准技术来进行,包括碱性/SDS处理、CsCl显带、柱色谱、琼脂糖凝胶电泳和本领域中熟知的其他技术。参见F.Ausubel等人编Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

[0146] 核酸(例如cDNA)可根据标准技术进行突变以提供基因序列。对于编码序列,这些突变可根据需要影响氨基酸序列。特别地,涵盖实质上与原生V、D、J、恒定、转换和本文所描述的其他此类序列同源或来源于所述序列的DNA序列(其中“来源于”表示序列与另一个序列相同或由另一序列修饰所得)。

[0147] 如本文所用,术语“载体”意图是指能够转运已与其连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体为“质粒”,其是指可将额外DNA区段连接至其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体为病毒载体,其中额外DNA区段可连接至病毒基因组中。某些载体能够在其所引入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其

他载体(例如非游离型哺乳动物载体)在引入宿主细胞中时可整合至宿主细胞的基因组中,并且因此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够引导与其可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简言之,“表达载体”)。一般而言,在重组DNA技术中使用的表达载体通常呈质粒形式。在本说明书中,由于质粒为载体的最常用形式,因此“质粒”和“载体”可互换地使用。然而,还包括提供等效功能的其他表达载体形式,诸如病毒载体(例如复制缺陷逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0148] 如本文所用,术语“重组宿主细胞”(或简言之“宿主细胞”)意图是指包含不天然存在于细胞中的核酸的细胞,并且可为其中已引入重组表达载体的细胞。应理解,此类术语意图不仅是指特定受试者细胞,而且是指此种细胞的后代。因为某些修饰可能由于突变或环境影响而出现在后续世代中,所以此类后代实际上无法与亲本细胞相同,但仍包括在如本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0149] 如本文所用,术语“免疫反应”如在本领域中所理解,并且通常是指脊椎动物内针对外来剂或异常(例如癌)细胞的生物反应,所述反应保护生物体免受这些剂和由其造成的影响。免疫反应由以下的作用介导:免疫系统的一种或多种细胞(例如,T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突状细胞或嗜中性粒细胞);和由这些细胞中的任一者或其产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体.),其导致选择性靶向脊椎动物体内的侵袭病原体、被病原体感染的细胞或组织、癌性或其他异常细胞(或在自身免疫或病理性炎症的情况下,正常人类细胞或组织),与其结合,将其损伤,将其破坏,和/或消除。免疫反应包括例如对T细胞(例如效应T细胞、Th细胞、CD4<sup>+</sup>细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞或Treg细胞)的活化或抑制,或对免疫系统的任何其他细胞(例如NK细胞)的活化或抑制。

[0150] 如本文所用,术语“异常免疫反应”是指受试者的免疫系统不能将自身与非自身区别开来或未能对外来抗原起反应。如在过敏性病症的情况下,所述术语还包括对外来抗原的超免疫反应。因此,所述反应在自身免疫性病症和过敏性病症两者中存在。异常免疫反应包括但不限于由产生对于生物体自身组织的抗体引起的组织损伤和炎症,由细胞毒性或非细胞毒性作用机制引起的细胞因子产生减弱和组织损伤。在一些实施方案中,异常免疫反应为引起患者症状的不适当调节的免疫反应。通常,自身免疫反应在受试者的免疫系统将自身抗原识别为外来物时发生,从而导致产生自身反应性效应免疫细胞。自身反应性效应免疫细胞包括来自各种谱系的细胞,包括但不限于细胞毒性T细胞、辅助T细胞和B细胞。虽然精确机制不同,但罹患自身免疫性病症的患者中自身反应性效应免疫细胞的存在可导致破坏患者的组织和细胞,从而产生病理性症状。类似地,经历对正常受试者以更限制方式起反应的外来抗原起超敏性反应的细胞的存在指示超敏性(过敏)。实例包括但不限于食物过敏、花粉热和过敏性哮喘。用于确定患者中此类细胞的存在并因此确定在患者中自身免疫性病症(诸如抗原特异性自身免疫性病症)或过敏病症的存在的多种分析,为本领域技术人员已知的并且可容易地在本发明方法中使用。

[0151] 如本文所用,术语“自身免疫疾病”是指其中免疫系统产生针对为正常宿主的一部分的抗原(即自身抗原)的免疫反应(例如,B细胞或T细胞反应)并伴随组织损伤的疾病或病症。自身抗原可来源于宿主细胞,或可来源于诸如通常定殖于粘膜表面的微生物(称为共生生物体)的共生生物体。

[0152] 影响哺乳动物的示例性自身免疫疾病包括类风湿性关节炎、幼年型少关节炎、胶原蛋白诱导的关节炎、佐剂诱导的关节炎、舍格伦综合症、多发性硬化、实验性自身免疫性脑脊髓炎、炎性肠病(例如,克罗恩氏病、溃疡性结肠炎)、自身免疫性胃萎缩、寻常天疱疮、牛皮癣、白斑病、1型糖尿病、非肥胖性糖尿病、重症肌无力、格雷氏病、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、硬化性胆管炎、硬化性涎腺炎、全身性红斑狼疮、自身免疫性血小板减少性紫癜、吉德帕斯丘综合症、艾迪森氏病(Addison's disease)、全身性硬化症、多发性肌炎、皮肌炎、自身免疫溶血性贫血、恶性贫血等。

[0153] 如本文所用,术语“炎性肠病”(IBD)是指一组非同质的慢性胃肠道炎性病症。在一些实施方案中,IBD包括克罗恩氏病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)。

[0154] 如本文所用,术语“免疫抑制剂”是指可降低免疫反应(诸如炎症反应)的分子,诸如化合物、小分子、类固醇、核酸分子或其他生物剂。免疫抑制剂包括但不限于用于治疗关节炎的剂(抗关节炎剂)。免疫抑制剂的特定非限制性实例为非类固醇抗炎剂、环孢素A、FK506和抗CD4。在额外实例中,所述剂为生物反应调节剂,诸如**KINERET®**(阿那白滞素(anakinra))、**ENBREL®**(依那西普(etanercept))或**REMICADE®**(英利昔单抗(infliximab))；改善疾病的抗风湿药物(DMARD),诸如**ARAVA®**(来氟米特(lefotunomide))；非类固醇抗炎药(NSAID)；特异性环加氧酶-2(COX-2)抑制剂,诸如**CELEBREX®**(塞来昔布(celecoxib))和**VIOXX®**(罗非昔布(rofecoxib))；或另一产品,诸如**HYALGAN®**(透明质酸(hyaluronan))和**SYNVISC®**(hyylan G-F20)。雷帕霉素(Rapamycin)为免疫抑制剂的额外实例。

[0155] 如本文所用,术语“炎症”或“炎性过程”是指一系列复杂事件,包括小动脉、毛细管和小静脉扩张(伴随渗透性和血流增加)、液体(包括血浆蛋白质)渗出和白血球迁移至炎性病灶中。炎症可通过本领域中熟知的多种方法来测量,诸如白血球的数目、多形核嗜中性粒细胞(PMN)的数目、测量PMN活化程度(诸如内腔增强的化学发光)或测量所存在促炎性细胞因子(例如,IL-6或TNF- $\alpha$ )的量。

[0156] “免疫调节剂”或“免疫调控剂”是指可涉及调节、调控或改变免疫反应的剂,例如靶向信号传导路径的组分的剂。“调节”、“调控”或“改变”免疫反应是指在免疫系统的细胞中或在此类细胞(例如效应T细胞,诸如Th1细胞)的活性上的任何改变。此类调节包括刺激或抑制免疫系统,其可体现为各种细胞类型的数目的增加或减少、这些细胞的活性的增加或降低或可在免疫系统内发生的任何其他变化。已鉴别出抑制性与刺激性免疫调节剂两者,其中一些可在肿瘤微环境中具有增强的功能。在一些实施方案中,免疫调节剂靶向T细胞表面上的分子。“免疫调节靶标”或“免疫调控靶标”为受到物质、剂、部分、化合物或分子结合所靶向且其活性通过物质、剂、部分、化合物或分子的结合而进行改变的分子,例如细胞表面分子。免疫调节靶标包括例如细胞表面上的受体(“免疫调节受体”)和受体配体(“免疫调节配体”)。

[0157] “免疫疗法”是指通过包括诱导、增强、抑制或以其他方式改变免疫系统或免疫反应的方法,治疗罹患疾病或处于感染或遭受疾病复发的风险下的受试者。

[0158] 如本文所用,术语“病原性T细胞”是指引起与疾病或病症(例如炎性疾病(例如炎性肠病))相关的潜在症状和/或损伤的T细胞(例如,CD4 $^+$ 或CD8 $^+$ T细胞)。在一些实施方案中,

所述术语可与“效应T细胞”( $T_{eff}$ )互换,其是指具有细胞溶解活性的T细胞(例如,CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞)以及T辅助(Th)细胞(例如Th1细胞),其可分泌炎性细胞因子(例如,TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 或IL-17)并且还活化并引导其他免疫细胞(例如,单核细胞)产生促炎性介质,并且因此引起与疾病或病症相关的潜在症状和/或损伤。在一些实施方案中,效应T细胞为Th17细胞,其是指产生促炎性细胞因子IL-17的CD4<sup>+</sup>T细胞。在一些实施方案中,效应T细胞为细胞毒性T淋巴细胞(CTL),其是指具有杀死其他细胞(例如,经由释放穿孔蛋白或颗粒酶B)的能力的CD8<sup>+</sup>T细胞。

[0159] 如本文所用,术语“调节性T细胞”(Treg)是指能够降低或抑制效应T细胞的诱导和增殖并因此调节免疫反应的T细胞群体。在一些实施方案中,Treg可通过分泌抗炎细胞因子(诸如IL-10、TGF- $\beta$ 和IL-35)抑制免疫反应,所述抗炎细胞因子可干扰原生T细胞的活化和分化为效应T细胞。在一些实施方案中,Treg也可产生细胞溶解分子,诸如颗粒酶B,所述细胞溶解分子可诱导效应T细胞的细胞凋亡。在一些实施方案中,调节性T细胞为自然调节性T细胞(nTreg)(即在胸腺内发育)。在一些实施方案中,调节性T细胞为诱导性调节性T细胞(iTreg)(即在暴露于某些刺激后,在外周组织中分化为Treg的原生T细胞)。用于鉴别Treg的方法为本领域中已知的。例如,Treg表达了可使用流式细胞术测量的某些表型标记物(例如,CD25、Foxp3或CD39)。参见例如国际公布号WO 2017/062035A1;Gu J.等人,Cell Mol Immunol 14(6):521-528(2017)。在一些实施方案中,Treg为CD45RA<sup>-</sup>CD39<sup>+</sup>T细胞。

[0160] 如本文所用,术语“连接”是指两个或更多个分子的缔合。连接可为共价或非共价的。连接也可为遗传的(即以重组方式融合)。此类连接可使用广泛多种的本领域中公认的技术(诸如化学结合和重组蛋白质产生)来实现。

[0161] 如本文所用,“施用”是指使用本领域技术人员已知的多种方法和递送系统中的任一者,向受试者物理引入包含治疗剂的组合物。用于本文所描述的抗IL-7R抗体的不同施用途径包括静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、脊椎或例如通过注射或输注的其他胃肠外施用途径。如本文所用,短语“胃肠外施用”意指除经肠和局部施用以外的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、腹膜内、肌肉内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛膜下、脊椎内、硬膜外和胸骨内注射和输注,以及体内电穿孔。可替代地,本文所描述的抗体可经由非胃肠外途径施用,诸如局部、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、经口、经阴道、经直肠、舌下或局部。施用也可例如执行一次、多次和/或经一个或多个延长的时段。

[0162] 如本文所用,术语“抑制”或“阻断”(例如,提及抑制/阻断IL-7与细胞上的IL-7R $\alpha$ 的结合)可互换地使用,并且涵盖部分和完全抑制/阻断两者。在一些实施方案中,例如如本文进一步描述地确定,抗IL-7R抗体抑制IL-7与IL-7R $\alpha$ 的结合至少约50%,例如约60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。在一些实施方案中,例如如本文进一步所描述地确定,抗IL-7R抗体抑制IL-7与IL-7R $\alpha$ 的结合不大于50%,例如约40%、30%、20%、10%、5%或1%。

[0163] 如本文所使用,术语“治疗(treat/treating/treatment)”是指以逆转、缓解、改善、抑制或减缓或预防疾病相关症状、并发症、病状或生物化学标志的进展、发展、严重性或复发或增强总存活期为目标,来对受试者执行的任何类型的干预或方法或向受试者施用活性剂。治疗可为治疗患有疾病的受试者或未患有疾病的受试者(例如用于预防)。

[0164] 术语“有效剂量 (effective dose/effective dosage)”被定义为足以实现或至少部分实现所需效果的量。药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”为药物在单独或与另一治疗剂组合使用时促进疾病消退的任何量,疾病消退的证据在于疾病症状的严重性降低、疾病无症状期的频率和持续时间增加或预防因疾病病痛所致的损伤或残疾。药物的治疗有效量或剂量包括“预防有效量”或“预防有效剂量”,其为当单独或与另一治疗剂组合向具有发展疾病或遭遇疾病复发的风险的受试者施用时,抑制所述疾病的发展或复发的药物的任何量。治疗剂促进疾病消退或抑制疾病发展或复发的能力可使用本领域技术人员已知的各种方法(诸如在临床试验期间在人类受试者中、在预测于人类中的功效的动物模型系统中或通过在体外测定法中分析所述剂的活性)来评价。

[0165] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性治疗的人类和其他哺乳动物受试者。

[0166] 如本文所用,术语“受试者”包括任何人类或非人类动物。例如,本文所描述的方法和组合物可用于治疗患有癌症的受试者。术语“非人类动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0167] 如本文中所提及,术语“基于体重”的剂量或给药意指,向患者施用的剂量系基于患者的体重计算的。例如,当60kg体重的患者需要3mg/kg抗IL-7R抗体时,可计算并使用适当量的抗IL-7R抗体(即,180mg)来施用。

[0168] 关于本公开的方法使用术语“固定剂量”意指,单一组合物中的两种或更多种不同抗体(例如,抗IL-7R抗体和第二抗体,例如抗TNFR抗体)彼此以特定(固定)比率存在于组合物中。在一些实施方案中,固定剂量是基于抗体的重量(例如mg)。在某些实施方案中,固定剂量是基于抗体浓度(例如mg/mL)。在一些实施方案中,两种抗体(例如抗IL-7R和抗TNFR)的比率为至少约1:1、约1:2、约1:3、约1:4、约1:5、约1:6、约1:7、约1:8、约1:9、约1:10、约1:15、约1:20、约1:30、约1:40、约1:50、约1:60、约1:70、约1:80、约1:90、约1:100、约1:120、约1:140、约1:160、约1:180、约1:200、约200:1、约180:1、约160:1、约140:1、约120:1、约100:1、约90:1、约80:1、约70:1、约60:1、约50:1、约40:1、约30:1、约20:1、约15:1、约10:1、约9:1、约8:1、约7:1、约6:1、约5:1、约4:1、约3:1或约2:1mg第一抗体(例如抗IL-7R抗体):mg第二抗体。例如,2:1比率的抗IL-7R抗体与抗TNF受体抗体(诸如阿托萨布(atrosab))可意指,小瓶或注射可含有约480mg抗IL-7R抗体和240mg抗TNFR抗体,或约2mg/mL抗IL-7R抗体和1mg/mL抗TNFR抗体。

[0169] 关于本文所描述的方法和剂量使用术语“均一剂量”意指在不考虑患者的体重或体表面积(BSA)的情况下向所述患者施用的剂量。因此,均一剂量不以mg/kg剂量形式提供,而实际上以所述剂(例如抗IL-7R抗体)的绝对量形式提供。例如,60kg人和100kg人应接受相同剂量的抗体(例如,480mg抗IL-7R抗体)。

[0170] 如本文所用,术语“ug”和“uM”可分别与“μg”和“μM”互换使用。

[0171] 在以下子部分中进一步详细描述本文所描述的各种方面。

[0172] I. 抗人类IL-7R抗体

[0173] 本文描述抗体,例如完全人类抗体,其特征在于特定功能特征或特性。例如,抗体特异性结合人类IL-7R $\alpha$ ,并且更具体地说,人类IL-7R $\alpha$ 的胞外结构域内的特定结构域(例如,功能结构域)。在一些实施方案中,抗体与同IL-7结合的IL-7R $\alpha$ 上的位点特异性结合。在某些实施方案中,抗体为拮抗剂抗体,即其抑制或抑止病原性T细胞(例如效应CD8+T细胞)

的IL-7介导的扩增和/或存活。在某些实施方案中,本文所公开的抗IL-7R抗体与来自一种或多种非人灵长类动物的IL-7R $\alpha$  (诸如食蟹猴IL-7R $\alpha$ ) 交叉反应。在一些实施方案中,抗体与人类IL-7R $\alpha$ 的胞外区和食蟹猴IL-7R $\alpha$ 的胞外区特异性结合。在某些实施方案中,抗体以高亲和力与人类IL-7R $\alpha$ 结合。

- [0174] 本文所描述的抗IL-7R抗体呈现以下功能特性中的一者或多者:
- [0175] (a) 能够与可溶性和/或膜结合的人类IL-7R $\alpha$ 结合;
- [0176] (b) 能够与可溶性和/或膜结合的食蟹猴IL-7R $\alpha$ 结合;
- [0177] (c) 能够与全血(例如人类全血)中的T细胞(CD4 $^+$ CD45RA $^+$ 、CD4 $^+$ CD45RA $^-$ 、CD8 $^+$ CD45RA $^+$ 和/或CD8 $^+$ CD45RA $^-$ )上表达的IL-7R $\alpha$ 结合;
- [0178] (d) 不能与全血(例如人类全血)中的非T细胞(例如单核细胞)上表达的IL-7R $\alpha$ 结合;
- [0179] (e) 不能有效地阻断胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)介导的单核细胞活化;
- [0180] (f) 不能在与IL-7R $\alpha$ 结合后激动IL-7受体信号传导,例如最低的pSTAT5活化;
- [0181] (g) 能够恢复T调节性细胞(Treg)功能和/或促进Treg存活;
- [0182] (h) 能够阻断产生IL-17和/或IFN- $\gamma$ 的细胞的扩增;
- [0183] (i) 能够比CTLA4-Ig(**ORENCIA<sup>®</sup>**)维持更长的无药物缓解;
- [0184] (j) 能够阻断肠组织中的炎症和粘膜损伤(例如由病原性T细胞诱导);
- [0185] (k) 能够降低例如肠系膜淋巴结(MLN)和/或固有层(LP)中的T效应细胞的频率;
- [0186] (l) 能够治疗患有炎性疾病(例如炎性肠病)的受试者;
- [0187] (m) 能够在选自由以下组成的组的表位处与人类IL-7R $\alpha$ 结合:  
<sup>24</sup>SQLLEVNGSQHSLTCAF<sup>39</sup> (SEQ ID NO:8)、<sup>73</sup>FIETKKFLLIGKSNI C<sup>88</sup> (SEQ ID NO:9)、<sup>89</sup>VKVGEKSLTCKKIDLT<sup>105</sup> (SEQ ID NO:10)、<sup>136</sup>QKKYVKVLMHDVAY<sup>149</sup> (SEQ ID NO:11)、<sup>181</sup>YEIKVRSIP DHYFKGF<sup>196</sup> (SEQ ID NO:12)及其组合,例如如通过氢/氘交换质谱(HDX-MS)所确定;和/或
- [0188] (n) 能够在选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸残基处与人类IL-7R $\alpha$ 结合:H33、E75、F79、I82、K84、M144、R186、H191、Y192及其组合,例如如通过基于质谱法的蛋白质足迹法(诸如蛋白质的光化学氧化(FPOP)和甘氨酸乙酯(GEE)标记)所测定。
- [0189] 在一些实施方案中,本文所描述的抗IL-7R抗体以高亲和力与人类IL-7R $\alpha$ 结合,例如以10 $^{-7}$ M或更小、10 $^{-8}$ M或更小、10 $^{-9}$ M或更小、10 $^{-10}$ M或更小、10 $^{-11}$ M或更小、10 $^{-12}$ M或更小、10 $^{-13}$ M至10 $^{-7}$ M、10 $^{-11}$ M至10 $^{-7}$ M、10 $^{-10}$ M至10 $^{-7}$ M或10 $^{-9}$ M至10 $^{-7}$ M的K<sub>D</sub>结合。在某些实施方案中,例如如通过BIACORE<sup>TM</sup>所确定,抗IL-7R抗体以以下K<sub>D</sub>与可溶性人类IL-7R $\alpha$ 结合:10 $^{-7}$ M或更小、10 $^{-8}$ M或更小、10 $^{-9}$ M(1nM)或更小、10 $^{-10}$ M或更小、10 $^{-12}$ M至10 $^{-7}$ M、10 $^{-11}$ M至10 $^{-7}$ M、10 $^{-10}$ M至10 $^{-7}$ M、10 $^{-9}$ M至10 $^{-7}$ M或10 $^{-8}$ M至10 $^{-7}$ M。在某些实施方案中,例如如通过流式细胞术和Scatchard曲线所确定,抗IL-7R抗体以以下K<sub>D</sub>与诸如人类T细胞上而非人类非T细胞上的结合的(例如细胞膜结合的)人类IL-7R $\alpha$ 结合:10 $^{-7}$ M或更小、10 $^{-8}$ M或更小、10 $^{-9}$ M(1nM)或更小、5×10 $^{-10}$ M或更小、10 $^{-10}$ M或更小、10 $^{-12}$ M至10 $^{-7}$ M、10 $^{-11}$ M至10 $^{-8}$ M、10 $^{-10}$ M至10 $^{-8}$ M、10 $^{-9}$ M至10 $^{-8}$ M、10 $^{-11}$ M至10 $^{-9}$ M或10 $^{-10}$ M至10 $^{-9}$ M。在一些实施方案中,例如如通过流式细胞术所确定,本文所公开的抗IL-7R抗体以以下EC<sub>50</sub>与诸如人类T细胞上而非人类非T细胞上的结合的(例如细胞膜结合的)人类IL-7R $\alpha$ 结合:10 $\mu$ g/mL或更小、5 $\mu$ g/mL或更小、1 $\mu$ g/mL或更小、0.9 $\mu$ g/mL或更小、0.8 $\mu$ g/mL或更

小、 $0.7\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、 $0.6\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、 $0.4\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、 $0.3\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、 $0.2\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、 $0.05\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小或 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小。在一些实施方案中,本文所描述的抗IL-7R抗体例如以以下 $K_D$ 与食蟹猴IL-7R $\alpha$ 结合: $10^{-7}\text{M}$ 或更小、 $10^{-8}\text{M}$ 或更小、 $10^{-9}\text{M}$ 或更小、 $10^{-10}\text{M}$ 或更小、 $10^{-11}\text{M}$ 或更小、 $10^{-12}\text{M}$ 或更小、 $10^{-12}\text{M}$ 至 $10^{-7}\text{M}$ 、 $10^{-11}\text{M}$ 至 $10^{-7}\text{M}$ 、 $10^{-10}\text{M}$ 至 $10^{-7}\text{M}$ 或 $10^{-9}\text{M}$ 至 $10^{-7}\text{M}$ 。在某些实施方案中,例如如通过BIACORE<sup>TM</sup>所确定,抗IL-7R抗体以以下 $K_D$ 与可溶性食蟹猴IL-7R $\alpha$ 结合: $10^{-7}\text{M}$ 或更小、 $10^{-8}\text{M}$ 或更小、 $10^{-9}\text{M}$ ( $1\text{nM}$ )或更小、 $10^{-10}\text{M}$ 或更小、 $10^{-12}\text{M}$ 至 $10^{-7}\text{M}$ 、 $10^{-11}\text{M}$ 至 $10^{-7}\text{M}$ 、 $10^{-9}\text{M}$ 至 $10^{-7}\text{M}$ 或 $10^{-8}\text{M}$ 至 $10^{-7}\text{M}$ 。例如如通过流式细胞术所测量,本发明的抗IL-7R抗体可以例如以下 $\text{EC}_{50}$ 与诸如食蟹猴T细胞上而非食蟹猴非T细胞上的结合的(例如膜结合的)食蟹猴IL-7R $\alpha$ 结合: $100\text{nM}$ 或更小、 $10\text{nM}$ 或更小、 $100\text{nM}$ 至 $0.01\text{nM}$ 、 $100\text{nM}$ 至 $0.1\text{nM}$ 、 $100\text{nM}$ 至 $1\text{nM}$ 或 $10\text{nM}$ 至 $1\text{nM}$ 。在某些实施方案中,例如如通过流式细胞术和Scatchard曲线所确定,抗IL-7R抗体以以下 $K_D$ 与诸如食蟹猴T细胞上而非食蟹猴非T细胞上的结合的(例如细胞膜结合的)食蟹猴IL-7R $\alpha$ 结合: $10^{-7}\text{M}$ 或更小、 $10^{-8}\text{M}$ 或更小、 $10^{-9}\text{M}$ ( $1\text{nM}$ )或更小、 $5 \times 10^{-10}\text{M}$ 或更小、 $10^{-10}\text{M}$ 或更小、 $10^{-12}\text{M}$ 至 $10^{-7}\text{M}$ 、 $10^{-11}\text{M}$ 至 $10^{-8}\text{M}$ 、 $10^{-10}\text{M}$ 至 $10^{-8}\text{M}$ 、 $10^{-9}\text{M}$ 至 $10^{-8}\text{M}$ 、 $10^{-11}\text{M}$ 至 $10^{-9}\text{M}$ 或 $10^{-10}\text{M}$ 至 $10^{-9}\text{M}$ 。

[0190] 用于评价抗体对各种物种的IL-7R $\alpha$ 的结合能力的标准测定为本领域中已知的,包括例如ELISA、蛋白质印迹和RIA。在实施例中也描述了适合的测定。抗体的结合动力学(例如结合亲和力)也可通过本领域中已知的标准测定(诸如通过Biacore分析)来评定。在下文和实施例中,进一步详细描述用于评价抗体对于免疫细胞的功能特性(例如配体结合、STAT5磷酸化/活化、细胞因子产生)的影响的测定。

[0191] 在一些实施方案中,本文所公开的抗IL-7R抗体对于T细胞(例如 $\text{CD4}^+\text{CD45RA}^+$ 、 $\text{CD4}^+\text{CD45RA}^-$ 、 $\text{CD8}^+\text{CD45RA}^+$ 、 $\text{CD8}^+\text{CD45RA}^-$ )上而非非T细胞(例如单核细胞)上表达的IL-7R $\alpha$ 具有选择性。因此,在一些实施方案中,抗IL-7R抗体可有效地阻断IL-7与T细胞上的IL-7R $\alpha$ 的结合,但不能阻断TSLP与非T细胞(例如单核细胞)上表达的IL-7R $\alpha$ 的结合。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体可抑制或降低T细胞中的IL-7介导的STAT5磷酸化(“pSTAT5活化”)。在一些实施方案中,与参考(例如未用本文所公开的抗IL-7R抗体处理的对应T细胞)相比,使pSTAT5活化抑制或降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些实施方案中,本文所公开的抗IL-7R抗体不降低或预防TSLP介导的单核细胞活化。

[0192] 在一些实施方案中,本文所描述的抗IL-7R抗体能够调节(例如增加)有需要的受试者中的调节性T细胞与效应T细胞的比率。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体通过恢复受试者中的Treg(例如 $\text{CD45RA}^-\text{CD39}^+$  T细胞)的功能和/或促进其存活来调节所述比率。在某些实施方案中,与参考(例如并未接受抗IL-7R抗体的受试者中的对应Treg)相比,本发明的抗IL-7R抗体使Treg功能(例如抑止T细胞增殖和/或IL-10产生的能力)增加至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%。在一些实施方案中,与参考(例如并未接受抗IL-7R抗体的受试者中的对应Treg)相比,受试者中的Treg的频率增加至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%。

[0193] 在一些实施方案中,本文所公开的抗IL-7R抗体通过阻断受试者中的效应T细胞(例如产生IL-17和/或IFN- $\gamma$ 的T细胞)的扩增来调节调节性T细胞与效应T细胞的比率。在

某些实施方案中,与参考(例如并未接受抗IL-7R抗体的受试者中的对应Treg)相比,受试者中的效应T细胞的频率降低至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%。在某些实施方案中,本发明的抗IL-7R抗体通过恢复受试者中的Treg的功能和/或促进Treg的存活和阻断效应T细胞的扩增两者来调节所述比率。

[0194] 在一些实施方案中,与参考(例如并未接受抗IL-7R抗体的受试者中的对应比率)相比,调节性T细胞与效应T细胞的比率增加至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%。

[0195] 在一些实施方案中,本文所描述的抗IL-7R抗体与表位结合,所述表位例如人类IL-7R $\alpha$ 的胞外部分(例如胞外区的Ig样结构域)中的构象表位,即SEQ ID NO:1的氨基酸21至239。在某些实施方案中,抗IL-7R抗体与由SEQ ID NO:1的氨基酸残基44至59(即SEQ ID NO:6的残基24至39(SQLEVNGSQHSLTCAF,“表位1”;SEQ ID NO:8)组成的区结合或与所述区内的表位结合。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体与由SEQ ID NO:1的氨基酸残基93至108(即SEQ ID NO:6的残基73至88)(FIETKKFLLIGKSNIC,“表位2”;SEQ ID NO:9)组成的区结合或与所述区内的表位结合。在其他实施方案中,抗IL-7R抗体与由SEQ ID NO:1的氨基酸残基109至125(即SEQ ID NO:6的残基89至105)(VKVGEKSLTCKKIDLTT,“表位3”;SEQ ID NO:10)组成的区结合或与所述区内的表位结合。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体与由SEQ ID NO:1的氨基酸残基156至169(即SEQ ID NO:6的残基136至149)(QKKYVKVLMHDVAY,“表位4”;SEQ ID NO:11)组成的区结合或与所述区内的表位结合。在其他实施方案中,抗IL-7R抗体与由SEQ ID NO:1的氨基酸残基201至216(即SEQ ID NO:6的残基181至196)(YEIKVRSIPDHYFKGF,“表位5”;SEQ ID NO:12)组成的区结合或与所述区内的表位结合。

[0196] 在一些实施方案中,本发明的抗IL-7R抗体与包含以下氨基酸残基中的一者或更多的表位(或人类IL-7R $\alpha$ 的区)结合:SEQ ID NO:1的H53、E95、F99、I102、K104、M164、R206、H211和Y212(即SEQ ID NO:6的H33、E75、F79、I82、K84、M144、R186、H191和Y192)。在一些实施方案中,本文所公开的抗IL-7R抗体不与其中以下氨基酸残基中的一者或更多者改变为另一氨基酸(例如在非保守性氨基酸取代中)的人类IL-7R $\alpha$ 显著地结合,或仅以显著降低的结合亲和力与其结合:SEQ ID NO:1的H53、E95、F99、I102、K104、M164、R206、H211和Y212。

[0197] 在一些实施方案中,本文所公开的抗IL-7R抗体不为原生抗体或不为天然存在的抗体。例如,在某些实施方案中,抗IL-7R抗体具有与天然存在的抗体的那些翻译后修饰不同的翻译后修饰,诸如不同之处在于具有更多、更少或不同类型的翻译后修饰。

[0198] 在一些实施方案中,抗IL-7R抗体不具有激动活性,如例如通过在使T细胞与抗IL-7R抗体一起培养后测量pSTAT活化所确定,其中除单独抗IL-7R抗体以外,此类抗体不增强活性。在某些实施方案中,抗IL-7R抗体阻断IL-7R $\alpha$ 与IL-7的相互作用而不促进激动活性。

[0199] 在一些实施方案中,本发明的抗IL-7R抗体不能阻断胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)介导的单核细胞活化。

[0200] 在一些实施方案中,抗IL-7R抗体能够维持比例如CTLA4-Ig(**ORENCIA<sup>®</sup>**)维持更长的无药物缓解。

[0201] 在一些实施方案中,抗IL-7R抗体能够阻断肠组织中的炎症和粘膜损伤(例如由病原性T细胞诱导)。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体能够降低例如肠系膜淋巴结(MLN)和/或

固有层(LP)中的T效应细胞的频率。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体能够治疗患有炎性疾病(例如炎性肠病)的受试者。

[0202] 在一些实施方案中,本发明的抗IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列。在某些实施方案中,轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列。在其他实施方案中,轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

[0203] 在一些实施方案中,抗IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中重链CDR1、CDR2和CDR3分别包含如SEQ ID NO:13、14和15所阐述的CDR1、CDR2和CDR3序列,其中轻链CDR1、CDR2和CDR3分别包含如SEQ ID NO:16、17和18所阐述的CDR1、CDR2和CDR3序列,并且其中抗IL-7R抗体具有本文所公开的特性中的一者或者者。

[0204] 在一些方面,本发明的抗IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中重链CDR3包含相对于SEQ ID NO:15的一个或多个氨基酸修饰(例如一、二、三或四个取代,例如如图18B中示出为富集比率 $\geq 1.00$ 的那些修饰)。在一些方面,重链CDR1包含相对于SEQ ID NO:13的一个或多个氨基酸修饰(例如一个、两个或三个取代,例如如图18E中示出为富集比率 $\geq 1.00$ 的那些修饰)。在某些方面,重链CDR2包含相对于SEQ ID NO:14的一个或多个氨基酸修饰(例如一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个或九个取代,例如如图18F中示出为富集比率 $\geq 1.00$ 的那些修饰)。在其他方面,轻链CDR1包含相对于SEQ ID NO:16的一个或多个氨基酸修饰(例如一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个或九个取代,例如如图18C中示出为富集比率 $\geq 1.00$ 的那些修饰)。在一些方面,轻链CDR2包含相对于SEQ ID NO:17的一个或多个氨基酸修饰(例如一个、两个、三个、四个、五个或六个取代,例如如图18D中示出为富集比率 $\geq 1.00$ 的那些修饰)。在某些方面,轻链CDR3包含相对于SEQ ID NO:18的一个或多个氨基酸修饰(例如一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个取代,例如如图18A中示出为富集比率 $\geq 1.00$ 的那些修饰)。

[0205] 在一些方面,本文所公开的抗IL-7R抗体的重链CDR1包含氨基酸序列GX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>FDDHAX<sub>3</sub>H(SEQ ID NO:260),其中X<sub>1</sub>为F或Y;X<sub>2</sub>为T、P、A、S、V、L、I、M、H、F、Y、N、D、E或Q;并且X<sub>3</sub>为L或M。在某些方面,X<sub>2</sub>为D或E。在其他方面,X<sub>2</sub>为D。在其他方面,X<sub>2</sub>为E。本文所公开的IL-7R抗体的重链CDR1序列的非限制性实例提供于表13中。

[0206] 在一些方面,本文所公开的抗IL-7R抗体的重链CDR2包含氨基酸序列GIX<sub>1</sub>WX<sub>2</sub>SRGX<sub>3</sub>GYX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>(SEQ ID NO:261),其中X<sub>1</sub>为S或T;X<sub>2</sub>为H或N;X<sub>3</sub>为I或V;X<sub>4</sub>为G、A、S、T、V、L、I、R、H或N;X<sub>5</sub>为P、T、N、D、E、Q、S、H或Y;X<sub>6</sub>为P、G、A、S、T、V、R、H、F、Y、N、D或E;X<sub>7</sub>为V或I;X<sub>8</sub>为A、S、T、V、L、I、M、K、R、H、F、Y、N、D、E或Q;并且X<sub>9</sub>为G、H、D或Q。在某些方面,X<sub>1</sub>为T。本文所公开的IL-7R抗体的重链CDR2序列的非限制性实例提供于表14中。

[0207] 在一些方面,本文所公开的抗IL-7R抗体的重链CDR3包含氨基酸序列DEYX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GYYX<sub>3</sub>LDX<sub>4</sub>(SEQ ID NO:262),其中X<sub>1</sub>为S、T、N、D或E;X<sub>2</sub>为L、M、R或S;X<sub>3</sub>为G、A、S、T、V、M、N、E或Q;并且X<sub>4</sub>为A、S、T、V、R、H、Y、W、N、E、Q或M。在某些方面,X<sub>3</sub>为A、S或T。在一些方面,X<sub>3</sub>为A。在其他方面,X<sub>3</sub>为S。在其他方面,X<sub>3</sub>为T。在一些方面,X<sub>4</sub>为E。本文所公开的IL-7R抗体的重链CDR3序列的非限制性实例提供于表15中。

[0208] 在一些方面,本发明的抗IL-7R抗体的轻链CDR1包含氨基酸序列X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>SX<sub>8</sub>X<sub>9</sub>A(SEQ ID NO:263),其中X<sub>1</sub>为S、T、V、K、R、H、Y或I;X<sub>2</sub>为A、S、T或V;X<sub>3</sub>为P、G、A、S、T、V、L、I、M、K、R、H、N、E或Q;X<sub>4</sub>为P、G、A、S、T、V、L、I、M、H、F、Y、N、D、E或Q;X<sub>5</sub>为P、G、A、S、T、H、E、Q、M、N或D;X<sub>6</sub>为P、G、A、S、T、V、L、I或N;X<sub>7</sub>为S、T、V、L、I、M、H、F、Y、N、D、E或Q;X<sub>8</sub>为P或A;并且X<sub>9</sub>为A、L或V。在某些方面,X<sub>6</sub>为P。在一些方面,X<sub>8</sub>为P。在其他方面,X<sub>7</sub>为D或E。在某些方面,X<sub>7</sub>为D。在一些方面,X<sub>7</sub>为E。本文所公开的IL-7R抗体的轻链CDR1序列的非限制性实例提供于表16中。

[0209] 在一些方面,本文所公开的抗IL-7R抗体的轻链CDR2包含氨基酸序列DX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>(SEQ ID NO:264),其中X<sub>1</sub>为G、A、S、M、H、N、D、E或Q;X<sub>2</sub>为G、A、S、T、V、M、H、F、Y、N、D、E或Q;X<sub>3</sub>为A、S、F、Y、W、N、D、E或L;X<sub>4</sub>为P、S、T、L、K、H或N;X<sub>5</sub>为D、E或Q;并且X<sub>6</sub>为G、S、T、N、D、Q、P或E。本文所公开的IL-7R抗体的轻链CDR2序列的非限制性实例提供于表17中。

[0210] 在一些方面,本文所公开的抗IL-7R抗体的轻链CDR3包含氨基酸序列X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>FX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>YPLX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>(SEQ ID NO:265)其中X<sub>1</sub>为M或Q;X<sub>2</sub>为G、A、D、E或Q;X<sub>3</sub>为N或E;X<sub>4</sub>为P、A或S;X<sub>5</sub>为T、I、M、K、W、N、E或Q;X<sub>6</sub>为L或I;并且X<sub>7</sub>为T、M、K、H、Y、E或Q。在某些方面,X<sub>2</sub>为A。在一些方面,X<sub>4</sub>为P或A。在某些方面,X<sub>4</sub>为P。在其他方面,X<sub>4</sub>为A。本文所公开的IL-7R抗体的轻链CDR3序列的非限制性实例提供于表18中。

[0211] 在一些方面,本文所公开的抗IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中:

- [0212] (i)所述重链CDR1包含SEQ ID NO:31至46中所阐述的氨基酸序列;
- [0213] (ii)所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;
- [0214] (iii)所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;
- [0215] (iv)所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;
- [0216] (v)所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且
- [0217] (vi)所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

[0218] 在一些方面,本文所公开的抗IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中:

- [0219] (i)所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;
- [0220] (ii)所述重链CDR2包含SEQ ID NO:47至96中所阐述的氨基酸序列;
- [0221] (iii)所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;
- [0222] (iv)所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;
- [0223] (v)所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且
- [0224] (vi)所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

[0225] 在一些方面,本文所公开的抗IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中:

- [0226] (i)所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;
- [0227] (ii)所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;
- [0228] (iii)所述重链CDR3包含SEQ ID NO:97至122中所阐述的氨基酸序列;
- [0229] (iv)所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;
- [0230] (v)所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且

- [0231] (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。
- [0232] 在一些方面,本文所公开的抗IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中:
- [0233] (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;
- [0234] (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;
- [0235] (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;
- [0236] (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:123至194中所阐述的氨基酸序列;
- [0237] (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且
- [0238] (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。
- [0239] 在一些方面,本文所公开的抗IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中:
- [0240] (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;
- [0241] (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;
- [0242] (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;
- [0243] (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;
- [0244] (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:195至237中所阐述的氨基酸序列;并且
- [0245] (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。
- [0246] 在一些方面,本文所公开的抗IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中:
- [0247] (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;
- [0248] (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;
- [0249] (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;
- [0250] (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;
- [0251] (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且
- [0252] (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:238至259中所阐述的氨基酸序列。
- [0253] 在一些方面,本文所公开的抗IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中:
- [0254] (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13和31至46中所阐述的氨基酸序列中的任一者;
- [0255] (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14和47至96中所阐述的氨基酸序列中的任一者;
- [0256] (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15和97至122中所阐述的氨基酸序列中的任一者;
- [0257] (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16和123至194中所阐述的氨基酸序列中的任一者;
- [0258] (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17和195至237中所阐述的氨基酸序列中的任一者;且/或
- [0259] (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18和238至259中所阐述的氨基酸序列中的任一者。

[0260] 在一些方面,重链CDR1包含SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:44中所阐述的氨基酸序列。在一些方面,重链CDR2包含SEQ ID NO:47中所阐述的氨基酸序列。在一些方面,重链CDR3包含SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:120中所阐述的氨基酸序列。在一些方面,轻链CDR1包含SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:189、SEQ ID NO:190或SEQ ID NO:192中所阐述的氨基酸序列。在一些方面,轻链CDR3包含SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:244或SEQ ID NO:245中所阐述的氨基酸序列。

[0261] 在一些方面,本文所公开的IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中:

[0262] (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:44中所阐述的氨基酸序列。

[0263] (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;

[0264] (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;

[0265] (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;

[0266] (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且

[0267] (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

[0268] 在一些方面,本文所公开的IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中:

[0269] (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;

[0270] (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:47中所阐述的氨基酸序列;

[0271] (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;

[0272] (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;

[0273] (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且

[0274] (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

[0275] 在一些方面,本文所公开的IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中:

[0276] (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;

[0277] (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;

[0278] (iii) 重链CDR3包含SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:106、SEQ ID NO:107或SEQ ID NO:120中所阐述的氨基酸序列;

[0279] (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;

[0280] (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且

[0281] (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

[0282] 在一些方面,本文所公开的IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中:

[0283] (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;

[0284] (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;

[0285] (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;

[0286] (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:172SEQ ID NO:189SEQ ID NO:190或SEQ ID NO:192中所阐述的氨基酸序列;

[0287] (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且

[0288] (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列。

[0289] 在一些方面,本文所公开的IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中:

[0290] (i) 所述重链CDR1包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列;

[0291] (ii) 所述重链CDR2包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列;

[0292] (iii) 所述重链CDR3包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列;

[0293] (iv) 所述轻链CDR1包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列;

[0294] (v) 所述轻链CDR2包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列;并且

[0295] (vi) 所述轻链CDR3包含SEQ ID NO:240、SEQ ID NO:244或SEQ ID NO:245中所阐述的氨基酸序列。

[0296] 在一些方面,本文所公开的IL-7R抗体包含重链CDR1、CDR2和CDR3以及轻链CDR1、CDR2和CDR3,其中重链或轻链CDR中的一者包含本文所公开的氨基酸修饰,并且其他重链或轻链CDR未相对于本文所公开的18B1抗体(在本文中也称为“抗体A”)的对应CDR进行修饰。在一些方面,重链或轻链CDR中的两者包含本文所公开的氨基酸修饰,并且其他重链或轻链CDR未相对于18B1抗体的对应CDR进行修饰。在其他方面,重链或轻链CDR中的三者包含本文所公开的氨基酸修饰,并且其他重链或轻链CDR未相对于18B1抗体的对应CDR进行修饰。在某些方面,重链或轻链CDR中的四者包含本文所公开的氨基酸修饰,并且其他重链或轻链CDR未相对于18B1抗体的对应CDR进行修饰。在其他方面,重链或轻链CDR中的五者包含本文所公开的氨基酸修饰,并且其他重链或轻链CDR未相对于18B1抗体的对应CDR进行修饰。在一些方面,重链和轻链CDR中的所有六者均包含相对于18B1抗体的对应CDR的本文所公开的氨基酸修饰。如本文中所描述,18B1抗体包含SEQ ID NO:13中所阐述的重链CDR1、SEQ ID NO:14中所阐述的重链CDR2、SEQ ID NO:15中所阐述的重链CDR3、SEQ ID NO:16中所阐述的轻链CDR1、SEQ ID NO:17中所阐述的轻链CDR2和SEQ ID NO:18中所阐述的轻链CDR3。

[0297] 在一些实施方案中,本文所公开的抗IL-7R抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含与SEQ ID NO:19中所阐述的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列,其中VL包含与SEQ ID NO:20中所阐述的氨基酸序列具有至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或约100%同一性的氨基酸序列,并且其中抗IL-7R抗体具有本文所公开的特性中的一者或多者。

[0298] 在一些实施方案中,抗IL-7R抗体包含VH和VL,其中VH包含SEQ ID NO:19的重链CDR1、CDR2和CDR3,其中VL包含SEQ ID NO:20的轻链CDR1、CDR2和CDR3,并且其中抗IL-7R抗体具有本文所公开的特性中的一者或多者。

[0299] 在一些实施方案中,本发明的抗IL-7R抗体与参考抗IL-7R抗体交叉竞争与人类IL-7R $\alpha$ 结合,本发明的抗IL-7R抗体包含VH和VL其中VH包含SEQ ID NO:19中所阐述的氨基酸序列,并且其中VL包含SEQ ID NO:20中所阐述的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所公开的抗IL-7R抗体与同参考抗IL-7R抗体相同的人类IL-7R $\alpha$ 上的表位结合,本文所公开的抗IL-7R抗体包含VH和VL其中VH包含SEQ ID NO:19中所阐述的氨基酸序列,并且其中VL包含SEQ ID NO:20中所阐述的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体和参考抗体两者

均与选自由以下组成的组的表位结合:SQLEVNGSQHSLTCAF (SEQ ID NO:8)、FIETKKFLLIGKSNIC (SEQ ID NO:9)、VKVGEKSLTCKKIDLT (SEQ ID NO:10)、QKKYVKVLMHDVAY (SEQ ID NO:11)、YEIKVRSIPDHYFKGF (SEQ ID NO:12)。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体和参考抗体两者均与包含以下氨基酸残基中的一者或者者的表位结合:SEQ ID NO:1的H53、E95、F99、I102、K104、M164、R206、H211和Y212(即SEQ ID NO:6的H33、E75、F79、I82、K84、M144、R186、H191和Y192)。

[0300] 在一些实施方案中,本文所公开的抗IL-7R抗体使参考抗IL-7R抗体与人类IL-7R $\alpha$ 的结合抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。竞争抗体与相同表位、重叠表位或相邻表位结合(例如由位阻所证明)。两种抗体是否彼此竞争与靶标结合,可使用本领域中已知的竞争实验(诸如RIA和EIA)来测定。

[0301] 本文所描述的VH结构域或其一个或多个CDR可与恒定结构域连接以用于形成重链,例如全长重链。类似地,本文所描述的VL结构域或其一个或多个CDR可与恒定结构域连接以用于形成轻链,例如全长轻链。全长重链(除C端赖氨酸(K)以外或除C端甘氨酸和赖氨酸(GK)以外,其可能不存在)和全长轻链组合以形成全长抗体。

[0302] 在一些实施方案中,本文所描述的VH结构域可与人类IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4,其为天然存在的或修饰的)的恒定结构域融合,例如如本文进一步描述。例如,VH结构域可包含与人类IgG(例如IgG1)恒定区融合的本文所描述的任何VH结构域的氨基酸序列,所述恒定区诸如以下野生型人类IgG1恒定结构域氨基酸序列:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKD  
[0303] T  
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
C  
VSNKALPAPIEKTISAKGQP  
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQ  
PEN  
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
23)

[0304] 或SEQ ID NO:23的同种异型变体的那些并且具有以下氨基酸序列:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSW  
NSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK  
PSNTKVDK  
RVEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKD  
[0305] T  
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
C  
VSNKALPAPIEKTISAK  
KGQP  
REPQVYTLPPS  
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESN  
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
SCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24; 同种异型特定氨基酸  
残基呈粗体形式并加下划线)。

[0306] 在一些实施方案中,抗IL-7R抗体的VH结构域可包含与无效应恒定区融合的本文所描述的任何VH结构域的氨基酸序列,所述无效应恒定区例如以下无效应人类IgG1恒定结

构域氨基酸序列：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
 SGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK  
 PSNTKVDKRVEPKSCDKTHCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL  
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKA  
 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
 GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25; “IgG1.1f”，其包含取代 L234A、L235E、G237A、A330S 和 P331S，所述取代为加下划线的)。

[0307] 或

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
 SGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK  
 PSNTKVDKRVEPKSCDKTHCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL  
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIKTISKA  
 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
 GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26; “IgG1.3f”，其包含取代 L234A、L235E 和 G237A，所述取代为加下划线的)。

[0311] 例如，IgG1的同种异型变体包含K97R、D239E和/或L241M(在上文加下划线并加粗)并且根据SEQ ID NO:24-26中的编号进行编号。在全长重区内并根据EU编号，这些氨基酸取代编号为K214R、D356E和L358M。在一些实施方案中，抗IL-7R抗体的恒定区还包含在如SEQ ID NO:24-26中所编号的氨基酸L117、A118、G120、A213和P214(在上文加下划线)或根据EU编号的氨基酸L234、A235、G237、A330和P331处的一个或多个突变或取代。在其他实施方案中，抗IL-7R抗体的恒定区包含在SEQ ID NO:23的氨基酸L1 17A、A1 18E、G120A、A213S和P214S或根据EU编号的氨基酸L234A、L235E、G237A、A330S和P331S处的一个或多个突变或取代。抗IL-7R抗体的恒定区还可包含以下一个或多个突变或取代：SEQ ID NO:23L1 17A、A1 18E和G120A，或根据EU编号的L234A、L235E和G237A。

[0312] 可将本文所描述的VL结构域与人类κ或λ轻链的恒定结构域融合。例如，抗IL-7R抗体的VL结构域可包含与以下人类IgG1κ轻链氨基酸序列融合的本文所描述的任何VL结构域的氨基酸序列：

[0313] **RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL  
SSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20)**

[0314] 在某些实施方案中,重链恒定区包含在C端处的赖氨酸或另一个氨基酸,例如其包含以下于重链中的最后氨基酸:LSPGK (SEQ ID NO:28)。在某些实施方案中,重链恒定区缺乏在C端处的一个或多个氨基酸,并且具有例如C端序列LSPG (SEQ ID NO:29)或LSP。

[0315] 在一些实施方案中,本发明的抗IL-7R抗体包含重链(HC)和轻链(LC),其中HC包含SEQ ID NO:21中所阐述的氨基酸序列,并且其中LC包含SEQ ID NO:22中所阐述的氨基酸序列。

## [0316] II. 工程化和修饰的抗体

[0317] 还提供工程化并修饰的抗体,其可使用具有本文所公开的VH和/或VL序列中的一者或多者的抗体作为起始材料以使修饰的抗体工程化来制备,所述修饰的抗体可具有与起始抗体相比改变的特性。抗体可通过修饰一个或两个可变区(即VH和/或VL)内,例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个框架区内的一个或多个残基来进行工程化。另外地或可替代地,抗体可通过修饰恒定区内的残基而进行工程化,以例如改变抗体的效应功能。

[0318] 可进行的一种类型的可变区工程化为CDR移植。抗体主要经由位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶标抗原相互作用。出于此原因,与CDR外部的序列相比,CDR内部的氨基酸序列在个别抗体之间更多样化。因为CDR序列负责大部分抗体-抗原相互作用,所以有可能通过构建包含来自天然产生的特定抗体的CDR序列移植至来自具有不同特性的不同抗体的框架序列上的表达载体来表达模拟天然产生的特定抗体的特性的重组抗体(参见例如Riechmann,L等人(1998)Nature 332:323-327;Jones,P.等人(1986)Nature 321:522-525;Queen,C.等人(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:10029-10033;Winter的美国专利第5,225,539号;和Queen等人的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370)。

[0319] 因此,本文所描述的一个实施方案涉及一种分离的单克隆抗体,其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)其中VH包含分别如SEQ ID NO:13、14和15中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3序列,其中VL包含分别如SEQ ID NO:16、17和18中所阐述的CDR1、CDR2和CDR3序列,并且其中抗体具有本文所公开的一个或多个特性。因此,本文所公开的抗IL-7R抗体可含有上文所叙述的VH和VL CDR序列,但可含有不同框架序列。

[0320] 此类框架序列可从包括生殖系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开的参考文献获得。例如,人类重链和轻链可变区基因的生殖系DNA序列可见于“VBase”人类生殖系序列数据库(可在互联网上在www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase处获得)中,以及Kabat,E.A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公布号91-3242;Tomlinson,I.M.等人(1992)“The Repertoire of Human Germline V<sub>H</sub> Sequences Reveals about Fifty Groups of V<sub>H</sub> Segments with Different Hypervariable Loops”/.Mol.Biol.227:776-798;和Cox,J.P.L等人(1994)“A Directory of Human Germ-line V<sub>H</sub> Segments Reveals a Strong Bias in their Usage”Eur.J.Immunol.24:827-836中;其中每一者的内容均明确地以引用的方式并入本文中。

[0321] 在一些实施方案中,用于本文所描述的抗IL-7R抗体中的框架序列为与由本文所

描述的抗IL-7R抗体使用的框架序列结构上类似的框架序列。可将VH CDR1、2和3序列和VL CDR1、2和3序列移植于框架区上,所述框架区具有与获得框架序列的生殖系免疫球蛋白基因中所发现的序列相同的序列,或可将CDR序列移植于与生殖系序列相比含有一个或多个突变的框架区上。例如,已发现,在某些情况下有益的是,使框架区内的残基突变以维持或增强抗体的抗原结合能力(参见例如Queen等人的美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,762;和6,180,370)。

[0322] 本文所描述的工程化的抗IL-7R抗体包括其中已对VH和/或VL内的框架残基进行修饰以例如改进抗体的特性的那些抗体。通常,进行此类框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法为使一个或多个框架残基“回复突变”成对应生殖系序列。更确切地说,已进行体细胞突变的抗体可含有不同于获得抗体的生殖系序列的框架残基。此类残基可通过比较抗体框架序列与获得抗体的生殖系序列来鉴别。为了使框架区序列恢复成其生殖系构型,体细胞突变可通过例如定点诱变或PCR介导性诱变而“回复突变”成生殖系序列。还意图涵盖此类“回复突变”抗体。另一种类型的框架修饰涉及使框架区内或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基突变,以移除T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。此方法也称为“去免疫”,并且进一步详细描述于Carr等人的美国专利公布号20030153043中。

[0323] 另一种类型的可变区修饰为使VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基突变,从而改进感兴趣抗体的一种或多种结合特性(例如亲和力)。可进行定点诱变或PCR介导性诱变以引入突变,并且对抗体结合或感兴趣的其他功能特性的影响可在如本文所描述和实施例中所提供的体外或体内测定中进行评价。在一些实施方案中,引入保守性修饰(如上文所讨论)。突变可为氨基酸取代、添加或缺失。此外,通常,在CDR区内不大于一个、两个、三个、四个或五个残基被改变。

[0324] 因此,本文还提供分离的抗IL-7R抗体,其包含VH和VL,其中VH包含:(i) CDR1区,其包含SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列(DHAMH),或与SEQ ID NO:13相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(ii) CDR2区,其包含SEQ ID NO:14中所阐述的氨基酸序列(GISWNSRGIGYADSVKG),或与SEQ ID NO:14相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;和(iii) CDR3区,其包含SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列(DEYSRGYYVLDV),或与SEQ ID NO:15相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;其中VL包含:(iv) CDR1区,其包含SEQ ID NO:16中所阐述的氨基酸序列(RASQGIISSALA),或与SEQ ID NO:16相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(v) CDR2区,其包含SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列(DASSLES),或与SEQ ID NO:17相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;和(vi) CDR3区,其包含SEQ ID NO:18中所阐述的氨基酸序列(QQFNSYPLWIT),或与SEQ ID NO:18相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;并且其中抗体具有本文所公开的一个或多个特性。此类VH和VL CDR序列的非限制性实例提供于表13(VH CDR1)、表14(VH CDR 2)、表15(VH CDR3)、表16(VL CDR1)、表17(VL CDR2)和表18(VL CDR3)中。

[0325] 可对抗体的CDR中的甲硫氨酸残基进行氧化,引起潜在化学降解并因此降低抗体的效能。因此,还提供重链和/或轻链CDR中的一个或多个甲硫氨酸残基被不进行氧化降解的氨基酸残基置换的抗IL-7R抗体。

[0326] 类似地,脱酰胺作用位点可从本文所公开的抗IL-7R抗体,尤其在CDR中移除。

[0327] 可将本文所描述的抗IL-7R可变区与Fc (例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc) 连接(例如共价连接或融合),所述Fc可具有任何同种异型或异同种异型,例如对于IgG1:G1m、G1m1 (a)、G1m2 (x)、G1m3 (f)、G1m17 (z) 对于IgG2:G2m、G2m23 (n);对于IgG3:G3m、G3m21 (g1)、G3m28 (g5)、G3m11 (b0)、G3m5 (b1)、G3m13 (b3)、G3m14 (b4)、G3m10 (b5)、G3m15 (s)、G3m16 (t)、G3m6 (c3)、G3m24 (c5)、G3m26 (u)、G3m27 (v);并且对于K:Km、Km1、Km2、Km3 (参见例如Jefferies等人(2009)mAbs1:1)。

[0328] 在某些实施方案中,将本文所描述的抗IL-7R可变区与无效应或大部分无效应Fc (例如IgG1.1f或IgG1.3f) 连接。

[0329] 通常,可将本文中所描述的可变区与包含一个或多个修饰的Fc连接,典型地改变抗体的一种或多种功能特性,诸如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞的细胞毒性。此外,本文所描述的抗体可进行化学修饰(例如可将一个或多个化学部分与抗体连接)或进行修饰以改变其糖基化,以改变抗体的一种或多种功能特性。这些实施方案中的每一者进一步详细描述于下文中。Fc区中的残基的编号为Kabat的EU索引的编号。

[0330] Fc区涵盖来源于免疫球蛋白的恒定区的结构域,包括所述恒定区的片段、类似物、变体、突变体或衍生物。适合的免疫球蛋白包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4和其他类别,诸如IgA、IgD、IgE和IgM,免疫球蛋白的恒定区被定义为天然存在的免疫球蛋白C端区或以合成方式产生的与免疫球蛋白C端区同源的多肽,并且单独或组合地可包括CH1结构域、铰链、CH2结构域、CH3结构域或CH4结构域。

[0331] Ig分子与多种类别的细胞受体相互作用。例如,IgG分子与对IgG类别抗体具有特异性的三种类别的Fc  $\gamma$  受体(Fc  $\gamma$  R) (即Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RII和Fc  $\gamma$  RIII) 相互作用。据报导对IgG与Fc  $\gamma$  R受体结合而言重要的序列位于CH2和CH3结构域中。抗体的血清半衰期受所述抗体与Fc受体(FcR)结合的能力影响。

[0332] 在某些实施方案中,Fc区为变体Fc区,例如已相对于亲本Fc序列(例如未修饰的Fc多肽,其随后进行修饰以产生变体)进行修饰(例如氨基酸取代、缺失和/或插入)以提供所需结构特征和/或生物活性的Fc序列。

[0333] 一般而言,恒定区或其部分(例如CH1、CL、铰链、CH2或CH3结构域)的变体可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个突变和/或至多10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个突变或1-10或1-5个突变,或包含与对应野生型区或结构域(分别为CH1、CL、铰链、CH2或CH3结构域)具有至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,其限制条件为包含重链恒定区的特定变体保留必要生物活性。

[0334] 例如,可在Fc区中进行修饰以便产生如下的Fc变体:相对于亲本Fc, (a) 具有增加或降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC), (b) 增加或降低的补体介导的细胞毒性(CDC), (c) 具有增加或降低的针对C1q的亲和力;和/或 (d) 具有增加或降低的针对Fc受体的亲和力。此类Fc区变体将一般在Fc区中包含至少一个氨基酸修饰。认为组合氨基酸修饰为尤其需要的。例如,变体Fc区可在其中例如本文中所鉴别的特定Fc区位置包含两个、三个、四个、五个等取代。

[0335] 变体Fc区也可包含其中参与二硫键形成的氨基酸被移除或被其他氨基酸置换的序列改变。此类移除可避免与存在于用于产生本文所描述的抗IL-7R抗体的宿主细胞中的

其他含半胱氨酸的蛋白质反应。即使当移除半胱氨酸残基时,单链Fc结构域仍可形成非共价地结合在一起的二聚Fc结构域。在其他实施方案中,Fc区可被修饰以使其与所选宿主细胞更兼容。例如,可移除典型原生Fc区的N端附近的PA序列,所述序列可由大肠杆菌中的消化酶(诸如脯氨酸亚氨基肽酶)识别。在其他实施方案中,可移除Fc结构域内的一个或多个糖基化位点。通常糖基化的残基(例如天冬酰胺)可赋予细胞溶解反应。此类残基可缺失或被未糖基化的残基(例如丙氨酸)取代。在其他实施方案中,可从Fc区中移除涉及与补体相互作用的位点(诸如C1q结合位点)。例如,可缺失或取代人类IgG1的EKK序列。在某些实施方案中,可移除影响与Fc受体结合的位点,优选地除挽救受体结合位点以外的位点。在其他实施方案中,Fc区可进行修饰以移除ADCC位点。ADCC位点为本领域中已知的;关于IgG1中的ADCC位点,参见例如Molec. Immuno 1.29 (5) :633-9 (1992)。变体Fc结构域的具体实例公开于例如WO 97/34631和WO 96/32478中。

[0336] 在一个实施方案中,Fc的铰链区被修饰使得铰链区中的半胱氨酸残基的数目发生改变,例如增加或减少。此方法进一步描述于Bodmer等人的美国专利号5,677,425中。改变Fc的铰链区中的半胱氨酸残基的数目,以例如促进轻链和重链的组装或提高或降低抗体的稳定性。在一个实施方案中,抗体的Fc铰链区被突变以缩短抗体的生物半衰期。更具体地说,将一个或多个氨基酸突变引入至Fc铰链片段的CH2-CH3结构域界面区域中,使得抗体对葡萄球菌蛋白A(SpA)的结合相对于原生Fc铰链结构域SpA结合有所减弱。此方法进一步详细描述于Ward等人的美国专利号6,165,745中。

[0337] 在又其他实施方案中,Fc区通过用不同氨基酸残基置换至少一个氨基酸残基来改变,以改变抗体的效应功能。例如,选自氨基酸残基234、235、236、237、297、318、320、322、330和/或331的一个或多个氨基酸可被不同氨基酸残基置换,使得抗体针对效应配体的亲和力改变但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应配体可为例如Fc受体或补体的C1组分。此方法进一步详细描述于例如Winter等人的美国专利号5,624,821和5,648,260中。

[0338] 在另一个实例中,选自氨基酸残基329、331和322的一个或多个氨基酸可被不同氨基酸残基置换,使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。此方法进一步详细描述于Idusogie等人的美国专利案号6,194,551中。

[0339] 在另一个实例中,氨基酸位置231和239内的一个或多个氨基酸残基发生改变,从而改变抗体固定补体的能力。此方法进一步描述于例如Bodmer等人的PCT公布WO 94/29351中。

[0340] 在又另一个实例中,Fc区可被修饰以通过修饰在以下位置处的一个或多个氨基酸来降低抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或降低针对Fc  $\gamma$ 受体的亲和力:234、235、236、238、239、240、241、243、244、245、247、248、249、252、254、255、256、258、262、263、264、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、299、301、303、305、307、309、312、313、315、320、322、324、325、326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、433、434、435、436、437、438或439。示例性取代包括236A、239D、239E、268D、267E、268E、268F、324T、332D和332E。示例性变体包括239D/332E、236A/332E、236A/239D/332E、268F/324T、267E/268F、267E/324T和267E/268F/324T。用于增强Fc  $\gamma$  R与补体相互作用的其他修饰包括但不

限于取代298A、333A、334A、326A、2471、339D、339Q、280H、290S、298D、298V、243L、292P、300L、396L、3051和396L。这些和其他修饰综述于Strohl, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20:685-691中。

[0341] 增加与Fc  $\gamma$  受体的结合的Fc修饰包括在以下任何一个或多个氨基酸位置处的氨基酸修饰:Fc区的238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、279、280、283、285、298、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、312、315、324、327、329、330、335、337、338、340、360、373、376、379、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439,其中所述Fc区中的残基的编号为如Kabat中的EU索引的编号(W000/42072)。

[0342] 可对Fc进行的其他Fc修饰为降低或去除与Fc  $\gamma$  R和/或补体蛋白的结合的那些修饰,从而降低或去除Fc介导的效应功能,诸如ADCC、ADCP和CDC。示例性修饰包括但不限于在位置234、235、236、237、267、269、325、328、330和/或331(例如330和331)的取代、插入和缺失,其中编号是根据EU索引进行。示例性取代包括但不限于234A、235E、236R、237A、267R、269R、325L、328R、330S和331S(例如330S和331S),其中编号是根据EU索引进行。Fc变体可包含236R/328R。用于减少Fc  $\gamma$  R与补体相互作用的其他修饰包括取代297A、234A、235A、237A、318A、228P、236E、268Q、309L、330S、331S、220S、226S、229S、238S、233P和234V,以及通过突变或酶方式移除或通过在不使蛋白质糖基化的生物体(诸如细菌)中产生来移除在位置297处的糖基化。这些和其他修饰综述于Strohl, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20:685-691中。

[0343] 任选地,Fc区可包含在本领域技术人员已知的额外和/或替代位置处的非天然存在的氨基酸残基(参见例如美国专利号5,624,821、6,277,375、6,737,056、6,194,551、7,317,091、8,101,720;PCX专利公布W0 00/42072、W0 01/58957、W0 02/06919、W0 04/016750、W0 04/029207、W0 04/035752、W0 04/074455、W0 04/099249、W0 04/063351、W0 05/070963、W0 05/040217、W0 05/092925和W0 06/020114)。

[0344] 也可使用增强针对抑制性受体Fc  $\gamma$  RIIb的亲和力的Fc变体。此类变体可提供具有与Fc  $\gamma$  RIIb细胞(包括例如B细胞和单核细胞)相关的免疫调节活性的Fc融合蛋白。在一个实施方案中,相对于一种或多种活化受体,Fc变体提供选择性增强的对Fc  $\gamma$  RIIb的亲和力。用于改变与Fc  $\gamma$  RIIb的结合的修饰包括在选自由以下组成的组的位置处的一个或多个修饰:根据EU索引的234、235、236、237、239、266、267、268、325、326、327、328、330、331和332。用于增强Fc  $\gamma$  RIIb亲和力的示例性取代包括但不限于234A、234D、234E、234F、234W、235D、235E、235F、235R、235Y、236D、236N、237A、237D、237N、239D、239E、266M、267D、267E、268D、268E、327D、327E、328F、328W、328Y、330S、331S和332E。示例性取代包括235Y、236D、239D、266M、267E、268D、268E、328F、328W和328Y。用于增强与Fc  $\gamma$  RIIb的结合的其他Fc变体包括235Y/267E、236D/267E、239D/268D、239D/267E、267E/268D、267E/268E和267E/328F。

[0345] Fc区针对其配体的亲和力和结合特性可通过本领域中已知的多种体外测定方法(基于生物化学或免疫的测定)来测定,所述方法包括但不限于平衡方法(例如酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA))或动力学(例如BIACORE<sup>TM</sup>分析)和其他方法,诸如间接结合测定、竞争性抑制测定、荧光共振能量转移(FRET)、凝胶电泳和色谱(例如凝胶过滤)。这些和其他方法可利用所检查的组分中的一者或者上的标记和/或采用多种检测方

法,包括但不限于显色、荧光、发光或同位素标记。结合亲和力和动力学的详细描述可见于 Paul, W.E. 编, *Fundamental Immunology*, 第4版, Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), 其聚焦于抗体-免疫原相互作用。

[0346] 在某些实施方案中,修饰抗体以增加其生物半衰期。多种方法为可能的。例如,这可通过增加Fc区针对FcRn的结合亲和力来完成,例如,以下残基中的一者或两者可发生突变:252、254、256、433、435、436,如美国专利号6,277,375中所描述。特定示例性取代包括以下中的一者或两者:T252L、T254S和/或T256F。可替代地,为了增加生物半衰期,抗体可在CH1或CL区内进行改变以含有从IgG的Fc区的CH2结构域的两个环获得的挽救受体结合表位,如Presta等人的美国专利号5,869,046和6,121,022中所描述。增加与FcRn的结合和/或改进药代动力学特性的其他示例性变体包含在位置259、308、428和434处的取代,包括例如259I、308F、428L、428M、434S、434I1.434F、434Y和434X1。增加Fc与FcRn的结合的其他变体包含:250E、250Q、428L、428F、250Q/428L (Hinton等人 2004, *J. Biol. Chem.* 279 (8) : 6213-6216, Hinton等人 2006 *Journal of Immunology* 176:346-356)、256A、272A、286A、305A、307A、307Q、311A、312A、376A、378Q、380A、382A、434A (Shields等人, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (9) : 6591-6604)、252F、252T、252Y、252W、254T、256S、256R、256Q、256E、256D、256T、309P、311S、433R、433S、433I、433P、433Q、434H、434F、434Y、252Y/254T/256E、433K/434F/436H、308T/309P/311S (Dall'Acqua等人, 2002, *Journal of Immunology*, 169:5171-5180, Dall'Acqua等人, 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281:23514-23524)。用于调节FcRn结合的其他修饰描述于Yeung等人, 2010, *J Immunol*, 182:7663-7671中。

[0347] 在某些实施方案中,可使用具有特定生物学特征的杂交IgG同型。例如, IgG1/IgG3杂交变体可通过用来自IgG3的氨基酸在两种同型不同的位置处取代CH2和/或CH3区中的IgG1位置来构建。因此,可构建杂交变体IgG抗体,其包含一个或多个取代,例如274Q、276K、300F、339T、356E、358M、384S、392N、397M、422I、435R和436F。在本文所描述的其他实施方案中, IgG1/IgG2杂交变体可通过用IgG1中两种同型不同的位置处的氨基酸取代IgG2的CH2和/或CH3区中的位置来构建。因此,可构建包含一个或多个取代,例如以下氨基酸取代中的一者或者的杂交变体IgG抗体:233E、234L、235L、-236G(是指在位置236处插入甘氨酸)和327A。

[0348] 此外,人类IgG1上的针对Fc $\gamma$  RI、Fc $\gamma$  RII、Fc $\gamma$  RIII和FcRn的结合位点已定位,并且已描述具有改进结合的变体(参见Shields, R.L. 等人 (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604)。已显示在位置256、290、298、333、334和339处的特异性突变改进了与Fc $\gamma$  RIII的结合。另外,已显示以下组合突变体改进了Fc $\gamma$  RIII结合:T256A/S298A/S298A/E333A/S298A/K224A和S298A/E333A/K334A,已显示会呈现增强的Fc $\gamma$  RIIIa结合和ADCC活性(Shields等人, 2001)。已鉴别强烈增强与Fc $\gamma$  RIIIa的结合的其他IgG1变体,包括具有S239D/I332E和S239D/I332E/A330L突变的变体,其显示针对Fc $\gamma$  RIIIa的亲和力的最大增加、Fc $\gamma$  RIIb结合的降低和在食蟹猴中的强烈细胞毒性活性(Lazar等人, 2006)。将三重突变引入至诸如阿仑单抗(alemtuzumab) (CD52特异性)、曲妥珠单抗(trastuzumab) (HER2/neu特异性)、利妥昔单抗(rituximab) (CD20特异性)和西妥昔单抗(cetuximab) (EGFR特异性)的抗体中,从而转化成体外ADCC活性极大地增强,并且S239D/I332E变体显示在猴中耗乏B细胞的能力增强。

(Lazar等人,2006)。另外,已鉴别在B细胞恶性肿瘤和乳腺癌的模型中在表达人类Fc  $\gamma$  RIIIa的转基因小鼠中的含有L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L突变的IgG1突变体,其呈现增强的与Fc  $\gamma$  RIIIa的结合和伴随的增强的ADCC活性(Stavenhagen等人,2007; Nordstrom等人,2011)。可使用的其他Fc突变体包括:S298A/E333A/L334A、S239D/I332E、S239D/I332E/A330L、L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L和M428L/N434S。

[0349] 在某些实施方案中,选择具有降低的与Fc  $\gamma$  R的结合的Fc。Fc  $\gamma$  R结合降低的示例性Fc(例如IgG1 Fc)包含以下三个氨基酸取代:L234A、L235E和G237A。

[0350] 在某些实施方案中,选择补体结合降低的Fc。补体结合降低的示例性Fc(例如IgG1 Fc)具有以下两个氨基酸取代:A330S和P331S。

[0351] 在某些实施方案中,选择基本上不具有效应功能的Fc,即其降低的与Fc  $\gamma$  R的结合和降低的补体结合。无效应的示例性Fc(例如IgG1 Fc)包含以下五个突变:L234A、L235E、G237A、A330S和P331S。

[0352] 当使用IgG4恒定结构域时,其可包含取代S228P,其模拟IgG1中的铰链序列并因此使IgG4分子稳定。

[0353] 在又其他实施方案中,修饰抗体的糖基化。例如,可制备脱糖基化(aglycoslated)抗体(即,缺乏糖基化的抗体)。糖基化可被改变以例如提高抗体针对抗原的亲和力。此类碳水化合物修饰可通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可进行一个或多个氨基酸取代,从而消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除所述位点处的糖基化。此类脱糖基化可增加抗体针对抗原的亲和力。此方法进一步详细描述于Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中。

[0354] N297上恒定区的糖基化可通过使N297残基突变为例如N297A的另一残基,和/或通过使例如298的相邻氨基酸突变来预防,从而降低N297上的糖基化。

[0355] 另外地或可替代地,可制备糖基化类型改变的抗体,诸如岩藻糖基残基量减少的低岩藻糖基化抗体或二等分GlcNac结构增加的抗体。已证明此类改变的糖基化模式会提高抗体的ADCC能力。此类碳水化合物修饰可通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来实现。具有改变的糖基化机制的细胞已描述于本领域中,并且可用作表达本文所描述的重组抗IL-7R抗体,从而产生糖基化改变的抗体的宿主细胞。例如,Hanai等人的EP 1,176,195描述一种具有功能受到破坏的FUT8基因的细胞系,所述基因编码岩藻糖基转移酶,使得此种细胞系中所表达的抗体呈现低岩藻糖基化。Presta的PCT公布WO 03/035835描述一种变体CHO细胞系Led 3细胞,其使岩藻糖与连接Asn(297)的碳水化合物连接的能力降低,还导致所述宿主细胞中所表达的抗体发生低岩藻糖基化(还参见Shields, R.L等人的(2002)J.Biol.Chem. 277:26733-26740)。Umana等人的PCT公布WO 99/54342描述细胞系,其被工程化以表达糖蛋白修饰的糖基转移酶(例如 $\beta$ (1,4)-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III(GnTIII)),使得在工程化的细胞系中表达的抗体呈现增加的二等分GlcNac结构,引起抗体的ADCC活性增加(还参见Umana等人的(1999)Nat.Biotech. 17:176-180)。

[0356] 本文中所描述的抗IL-7R抗体的另一种修饰为聚乙二醇化。抗体可被聚乙二醇化以例如增加抗体的生物(例如血清)半衰期。为了使抗体发生聚乙二醇化,通常使抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)(诸如PEG的反应性酯或醛衍生物)在使一个或多个PEG基团连接至抗体或抗体片段的条件下反应。在一些实施方案中,聚乙二醇化经由与反应性PEG分子(或类

似反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应来进行。如本文所用,术语“聚乙二醇”意图涵盖已用于衍生得到其他蛋白质的任一种PEG形式,诸如单(Cl-ClO)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-顺丁烯二酰亚胺。在某些实施方案中,待聚乙二醇化的抗体为脱糖基化抗体。用于使蛋白质聚乙二醇化的方法为本领域中已知的并且可应用于本文所描述的抗IL-7R抗体。参见例如Nishimura等人的EP 0 154 316和Ishikawa等人的EP 0 401 384。

[0357] III. 抗体物理特性

[0358] 抗IL-7R抗体(例如本文所描述的那些)具有本文所描述的物理特征中的一些或全部,诸如实施例中所描述的特征。

[0359] 本文所描述的抗IL-7R抗体可在轻链或重链可变区中含有一个或多个糖基化位点。此类糖基化位点可归因于抗原结合改变而引起抗体的免疫原性增加或抗体的pK改变(Marshall等人, (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala和Morrison (2004) *J. Immunol* 172:5489-94; Wallick等人, (1988) *J. Exp. Med.* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh等人, (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura等人, (2000) *Mol. Immunol* 37:697-706)。已知糖基化在含有N-X-S/T序列的基序处发生。在一些实施方案中,抗IL-7R抗体不含可变区糖基化。这可通过选择在可变区中不含糖基化基序的抗体或通过使糖基化区内的残基突变来实现。

[0360] 在一些实施方案中,本文所描述的抗IL-7R抗体不含天冬酰胺异构位点。天冬酰胺的脱酰胺作用可在N-G或D-G序列上发生并引起异天冬氨酸残基产生,所述异天冬氨酸残基将扭结引入多肽链中并降低其稳定性(异天冬氨酸作用)。

[0361] 每种抗体将具有独特等电点(pi),其通常在6与9.5之间的pH范围内。IgG1抗体的pi通常在7-9.5的pH范围内,并且IgG4抗体的pi通常在6-8的pH范围内。推测pi超出正常范围的抗体在体内条件下可能具有某种去折叠和不稳定性。因此,抗IL-7R抗体可含有处于正常范围内的pi值。这可通过选择pi在正常范围内的抗体或通过使带电表面残基突变来实现。

[0362] 每种抗体将具有特征性解链温度,其中较高解链温度指示较大体内总体稳定性(Krishnamurthy R和Manning M C (2002) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3:361-71)。一般而言,  $T_m$  (初始去折叠的温度) 可大于60°C、大于65°C或大于70°C。抗体的熔点可使用差示扫描量热法(Chen等人, (2003) *Pharm. Res.* 20:1952-60; Ghirlando等人, (1999) *Immunol. Lett.* 68:47-52)或圆二色性(Murray等人, (2002) *J. Chromatogr. Sci.* 40:343-9)测量。

[0363] 在一个实施方案中,选择不迅速降解的抗体。抗体降解可使用毛细管电泳法(CE)和MALDI-MS(Alexander A J和Hughes D E (1995) *Anal. Chem.* 67:3626-32)来测量。

[0364] 在一些实施方案中,选择具有最低聚集作用的抗体,所述聚集作用可触发不想要的免疫反应和/或改变或不利的药代动力学特性。一般而言,可接受的抗体的聚集为25%或更小、20%或更小、15%或更小、10%或更小或5%或更小。聚集可通过若干技术来测量,所述技术包括尺寸排阻柱色谱(SEC)、高效液相色谱(HPLC)和光散射。

[0365] IV. 工程化抗体的方法

[0366] 如上文所讨论,通过对VH和/或VL序列或与其连接的恒定区进行修饰,本文所公开的具有VH和VL序列的抗IL-7R抗体可用于产生新的抗IL-7R抗体。因此,在本文所描述的另一方面,本文所描述的抗IL-7R抗体的结构特征用于产生结构上相关的抗IL-7R抗体,其保

留本文所描述的抗IL-7R抗体的至少一种功能特性,诸如与人类IL-7R $\alpha$ 和食蟹猴IL-7R $\alpha$ 结合。例如,可将本文所公开的抗IL-7R抗体的一个或多个CDR区以重组方式与已知框架区和/或其他CDR组合,以产生如上文所讨论的额外的以重组方式工程化的抗IL-7R抗体。其他修饰类型包括先前部分中所描述的那些修饰。工程化方法的起始材料为本文所提供的VH和/或VL序列中的一者或者,或其一个或多个CDR区。为了产生工程化的抗体,不需实际上制备(即表达为蛋白质)具有本文所提供的VH和/或VL序列中的一者或者,或其一个或多个CDR区的抗体。相反,序列中所含有的信息用作起始材料来产生来源于初始序列的“第二代”序列,并且随后制备“第二代”序列并表达为蛋白质。

[0367] 因此,本文提供用于制备抗IL-7R抗体的方法,其包括:

[0368] (a) 提供: (i) 重链可变区抗体序列,其包含如SEQ ID NO:13中所阐述的CDR1序列或提供于表13中的序列中的任一者、如SEQ ID NO:14中所阐述的CDR2序列或提供于表14中的序列中的任一者和/或如SEQ ID NO:15中所阐述的CDR3序列或提供于表15中的序列中的任一者;和(ii) 轻链可变区抗体序列,其包含如SEQ ID NO:16中所阐述的CDR1序列或提供于表16中的序列中的任一者、如SEQ ID NO:17中所阐述的CDR2序列或提供于表17中的序列中的任一者和/或如SEQ ID NO:18中所阐述的CDR3序列或提供于表18中的序列中的任一者;

[0369] (b) 改变重链可变区抗体序列和/或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基,以产生至少一个改变的抗体序列;和

[0370] (c) 将改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0371] 可使用标准分子生物学技术来制备并表达改变的抗体序列。在一些实施方案中,由改变的抗体序列编码的抗体为保留本文所描述的抗IL-7R抗体的功能特性中的一些或全部的抗体。改变的抗体的功能特性可使用本领域中可获得和/或本文所描述的标准测定,诸如实施例中所阐述的那些测定(例如,ELISA、FACS)来评定。

[0372] 在一些实施方案中,可随机或选择性地沿抗IL-7R抗体编码序列的全部或部分引入突变,并且可针对结合活性和/或如本文所描述的其他功能特性筛选所得修饰的抗IL-7R抗体。突变方法已描述于本领域中。例如,Short的PCT公布WO 02/092780描述使用饱和诱变、合成连接组装或其组合来产生并筛选抗体突变的方法。可替代地,Lazar等人的PCT公布WO 03/074679描述了使用计算筛选方法使抗体的生理化学特性优化的方法。

[0373] V. 核酸、载体和细胞

[0374] 本文还描述编码本文所描述的抗IL-7R抗体的核酸分子。核酸可以存在于全细胞、细胞裂解物中或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当核酸与其他细胞组分或例如其他细胞核酸(例如其他染色体DNA,例如从自然界中分离的DNA连接的染色体DNA)或蛋白质的其他杂质纯化分开时,所述核酸为“分离的”或“呈现实质上纯的”,所述纯化通过包括碱性/SDS处理、CsCl显带、柱色谱、限制酶、琼脂糖凝胶电泳和本领域中熟知的其他技术的标准技术来进行。参见F.Ausubel等人编(1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本文所描述的核酸可为例如DNA或RNA,并且可含有或不含有内含子序列。在某些实施方案中,核酸为cDNA分子。

[0375] 本文所描述的核酸可使用标准分子生物学技术来获得。对于由杂交瘤(例如由携带人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤,如下文进一步描述)表达的抗体,编码

由杂交瘤制备的抗体的轻链和重链的cDNA可通过标准PCR扩增或cDNA克隆技术来获得。对于自免疫球蛋白基因文库(例如使用噬菌体展示技术)获得的抗体,可自文库回收编码抗体的核酸。

[0376] 在一些实施方案中,本文所描述的核酸为编码本发明的抗IL-7R抗体的VH和VL序列的核酸。在一些实施方案中,本文所描述的核酸编码与本文所公开的抗IL-7R抗体同源的VH和VL序列。在一些实施方案中,核酸编码与编码本文所公开的抗IL-7R抗体的VH和VL序列的核酸分子具有至少70%一致,例如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的VH和VL序列。

[0377] 在一些实施方案中,本文所描述的核酸分子可被修饰以缺失特定序列,例如限制酶识别序列。在一些实施方案中,核酸分子包含保守性取代(即在核酸分子翻译后不改变所得氨基酸序列的取代)例如以用于进行密码子优化。

[0378] 用于制备如本文所公开的抗IL-7R抗体的方法可包括在细胞系中表达重链和轻链,所述细胞系包含编码具有信号肽的重链和轻链的核苷酸序列,分别例如SEQ ID NO:21和22。本文中涵盖包含这些核苷酸序列的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是来源于CHOZN细胞系。

[0379] 一旦获得编码VH和VL区段的DNA片段,这些DNA片段可通过标准重组DNA技术进一步操纵,例如以将可变区基因转化成全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操纵中,编码VL或VH的DNA片段与编码另一种蛋白质(诸如抗体恒定区或柔性接头)的另一个DNA片段可操作地连接。如此上下文中所使用的术语“可操作地连接”意图意指两个DNA片段连接,使得由两个DNA片段编码的氨基酸序列保持在框内。

[0380] 编码VH区的分离的DNA可通过将编码VH的DNA与编码重链恒定区(铰链、CH1、CH2和/或CH3)的另一个DNA分子可操作地连接而转化成全长重链基因。人类重链恒定区基因的序列为本领域中已知的(参见例如Kabat, E. A. 等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 公布号91-3242),并且涵盖这些区的DNA片段可通过标准PCR扩增来获得。重链恒定区可为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,例如IgG1区。对于Fab片段重链基因,可将编码VH的DNA与仅编码重链CH1恒定区的另一个DNA分子可操作地连接。

[0381] 编码VL区的分离的DNA可通过将编码VL的DNA与编码轻链恒定区CL的另一个DNA分子可操作地连接来转化成全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人类轻链恒定区基因的序列为本领域中已知的(参见例如Kabat, E. A. 等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 公布第91-3242号),并且涵盖这些区的DNA片段可通过标准PCR扩增来获得。轻链恒定区可为K或λ恒定区。

[0382] 本发明进一步提供表达(例如以重组方式)本文所描述的抗IL-7R抗体的细胞(例如宿主细胞)和相关多核苷酸以及表达载体。本文还提供包含含有编码抗IL-7R抗体或其片段的核苷酸序列的多核苷酸的载体。在一些实施方案中,载体可用于在宿主细胞中,例如在哺乳动物细胞(例如CHOZN细胞)中,以重组方式表达本文所描述的抗IL-7R抗体。在一些实施方案中,载体可用于基因疗法。适用于本发明的载体包括表达载体、病毒载体和质粒载体。

[0383] 如本文所用,表达载体是指任何核酸构建体,其含有用于当引入至适当宿主细胞中时所插入编码序列的转录和翻译的必需元件,或在RNA病毒载体的情况下用于复制和翻译的必需元件。表达载体可包括质粒、噬菌粒、病毒及其衍生物。

[0384] 本发明的表达载体可包括编码本文所描述的抗体或其抗原结合部分的多核苷酸。在一些实施方案中,将抗体或其抗原结合部分的编码序列与表达控制序列可操作地连接。如本文所用,当两个核酸序列以允许每个组分核酸序列保留其功能性的方式共价连接时,所述两个核酸序列可操作地连接。当编码序列和基因表达控制序列以将编码序列的表达或转录和/或翻译置于基因表达控制序列的影响或控制下的方式共价连接时,认为所述编码序列和所述基因表达控制序列可操作地连接。如果5'基因表达序列中启动子的诱导引起编码序列转录,并且如果两个DNA序列之间的连接的性质不(1)引起引入框移突变,(2)干扰启动子区引导编码序列转录的能力,或(3)干扰对应RNA转录物翻译成蛋白质的能力,则认为所述两个DNA序列可操作地连接。因此,如果基因表达序列能够影响编码核酸序列的转录,使得所得转录物翻译成所需抗体或其抗原结合部分,则所述基因表达序列将与所述编码核酸序列可操作地连接。

[0385] 病毒载体包括但不限于来自以下病毒的核酸序列:逆转录病毒,诸如莫洛尼(Moloney)鼠类白血病病毒、哈维(Harvey)鼠类肉瘤病毒、鼠类乳房肿瘤病毒和劳斯(Rous)肉瘤病毒;慢病毒;腺病毒;腺相关病毒;SV40类型病毒;多瘤病毒;艾巴二氏(Epstein-Barr)病毒;乳头状瘤病毒;疱疹病毒;牛痘病毒;脊髓灰质炎病毒;和RNA病毒,诸如逆转录病毒。可容易地采用本领域中熟知的其他载体。某些病毒载体是基于非细胞病变真核病毒,其中非必需基因已被感兴趣基因置换。非细胞病变病毒包括逆转录病毒,其生命周期涉及将基因组病毒RNA逆转录成DNA,随后将前病毒整合至宿主细胞DNA中。已批准逆转录病毒用于人类基因疗法试验。最适用的为复制缺陷型逆转录病毒(即,能够引导所需蛋白质的合成,但不能制造感染性颗粒)。此类基因改变的逆转录病毒表达载体具有用于体内高效转导基因的一般效用。用于制造复制缺陷型逆转录病毒的标准方案(包括将外源性遗传物质并入质粒中、用质粒转染封装细胞系、由封装细胞系产生重组逆转录病毒、从组织培养物中收集病毒颗粒以及用病毒颗粒感染靶标细胞的步骤)提供于Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman Co., New York (1990) 和Murry, E.J., Methods in Molecular Biology, 第7卷, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991) 中。

#### [0386] VI. 抗体产生

[0387] 本文所描述的抗IL-7R抗体可使用多种已知技术来产生,诸如由Kohler和Milstein, Nature 256:495 (1975) 所描述的标准体细胞杂交技术。虽然体细胞杂交程序为优选的,但原则上也可采用用于产生单克隆抗体的其他技术,例如B淋巴细胞的病毒或致癌转化、使用人类抗体基因的文库的噬菌体展示技术。

[0388] 用于制备杂交瘤的优选动物系统为鼠类系统。在小鼠中产生杂交瘤为极好建立的程序。分离免疫接种的脾细胞以用于融合的免疫接种方案和技术为本领域中已知的。融合配偶体(例如鼠类骨髓瘤细胞)和融合程序也为已知的。

[0389] 本文所描述的嵌合或人源化抗IL-7R抗体可基于如上文所描述制备的鼠类单克隆抗体的序列来制备。编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA可使用标准分子生物学技术从感兴

趣的鼠类杂交瘤获得并被工程化以含有非鼠类(例如人类)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可使用本领域中已知的方法将鼠类可变区与人类恒定区连接(参见例如Cabilly等人的美国专利号4,816,567)。为了产生人源化抗体,可使用本领域中已知的方法将鼠类CDR区插入至人类框架中(参见例如Winter的美国专利号5,225,539;和Queen等人的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,762和6,180,370)。

[0390] 在一个实施方案中,本文所描述的抗IL-7R抗体为人类单克隆抗体。此类针对IL-7Ra的人类单克隆抗体可使用携带部分人类免疫系统而非小鼠系统的转基因或转染色体小鼠来产生。这些转基因和转染色体小鼠包括在本文中分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并且在本文中统称为“人类Ig小鼠”。

[0391] HUMAB-**MOUSE**<sup>®</sup> (Medarex, Inc.)含有编码未重排的人类重链( $\mu$ 和 $\gamma$ )和K轻链免疫球蛋白序列的人类免疫球蛋白基因微型基因座;以及使内源性 $\mu$ 和K链基因座失活的靶向突变(参见例如Lonberg等人,(1994)Nature 368(6474):856-859)。因此,小鼠呈现降低的小鼠IgM或K表达,并且响应于免疫接种,所引入的人类重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变,产生高亲和力人类IgGK单克隆(Lonberg,N.等人(1994),同上;综述于Lonberg,N.(1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Lonberg,N.和Huszar,D.(1995)Intern. Rev. Immunol. 13:65-93,和Harding,F.和Lonberg,N.(1995)Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546中)。HuMab小鼠的制备和用途以及由此类小鼠携带的基因组修饰进一步描述于Taylor,L等人(1992)Nucleic Acids Research 20:6287-6295;Chen,J.等人,(1993)International Immunology 5:647-656;Tuailion等人(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724;Choi等人(1993)Nature Genetics 4:117-123;Chen,J.等人(1993)EMBO J. 12:821-830;Tuailion等人(1994)Immunol. 152:2912-2920;Taylor,L等人(1994)International Immunology 6:579-591;和Fishwild,D.等人(1996)Nature Biotechnology 14:845-851中。此外,参见全部均为Lonberg和Kay的美国专利号5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,789,650、5,877,397、5,661,016、5,814,318、5,874,299和5,770,429;Surani等人的美国专利号5,545,807;全部均为Lonberg和Kay的PCT公布号W0 92/03918、W0 93/12227、W0 94/25585、W0 97/13852、W098/24884和W0 99/45962;和Korman等人的PCT公布号W0 0 1/14424。

[0392] 在某些实施方案中,使用在转基因和转染色体上携带人类免疫球蛋白序列的小鼠,诸如携带人类重链转基因和人类轻链转染色体的小鼠,来产生本文所描述的抗IL-7R抗体。此类小鼠(在本文中称为“KM小鼠”)详细描述于Ishida等人的PCT公布W0 02/43478中。

[0393] 再者,表达人类免疫球蛋白基因的替代性转基因动物系统在本领域中为可获得的,并且可用于产生本文所描述的抗IL-7R抗体。例如,可使用称为**XENOMOUSE**<sup>®</sup> (Abgenix, Inc.)的替代性转基因系统;此类小鼠描述于例如Kucherlapati等人的美国专利号5,939,598、6,075,181、6,114,598、6,150,584号和6,162,963中。

[0394] 此外,表达人类免疫球蛋白基因的替代转染色体动物系统在本领域中为可获得的,并且可用于产生本文所描述的抗IL-7R抗体。例如,可使用称为“TC小鼠”的携带人类重链转染色体和人类轻链转染色体两者的小鼠;此类小鼠描述于Tomizuka等人(2000)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727中。此外,携带人类重链和轻链转染色体的牛已描述于本领域中(Kuroiwa等人(2002)Nature Biotechnology 20:889-894),并且可用于产生本

文所描述的抗IL-7R抗体。

[0395] 本领域中描述的用于产生人类抗体(例如人类抗IL-7R抗体)的额外小鼠系统包括: (i) **VELOCLMMUNE®** 小鼠 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.) , 其中内源性小鼠重链和轻链可变区已经由同源重组被人类重链和轻链可变区置换, 与内源性小鼠恒定区可操作地连接, 使得在小鼠中产生嵌合抗体(人类V/小鼠C), 并且接着随后使用标准重组DNA技术转化成完全人类抗体; 和 (ii) **MEMO®** 小鼠 (Merus Biopharmaceuticals, Inc.) , 其中小鼠含有未重排的人类重链可变区, 但单一重排的人类常见轻链可变区。此类小鼠及其产生抗体的用途描述于例如WO 2009/15777、US2010/0069614、WO 2011/072204、WO 2011/097603、WO 2011/163311、WO 2011/163314、WO 2012/148873、US2012/0070861和US2012/0073004中。

[0396] 本文所描述的人类单克隆抗IL-7R抗体也可使用筛选人类免疫球蛋白基因库的噬菌体展示方法来制备。在本领域中已确立此类用于分离人类抗体的噬菌体展示方法。参见例如:Ladner等人的美国专利号5,223,409、5,403,484号和5,571,698; Dower等人的美国专利号5,427,908号和5,580,717; McCafferty等人的美国专利号5,969,108和6,172,197; 和 Griffiths等人的美国专利号5,885,793、6,521,404、6,544,731、6,555,313、6,582,915和6,593,081。

[0397] 本文所描述的人类单克隆抗IL-7R抗体也可使用已向其中重构人类免疫细胞以使得可在免疫接种后产生人类抗体反应的SCID小鼠来制备。此类小鼠描述于例如Wilson等人的美国专利号5,476,996和5,698,767中。

[0398] VI..A. 免疫接种

[0399] 为了产生针对IL-7Ra的完全人类抗体, 含有人类免疫球蛋白基因的转基因或转染色体小鼠(例如HCo12、HCo7或KM小鼠)可用IL-7Ra抗原的纯化或富集制备物和/或表达IL-7Ra或其片段的细胞进行免疫接种, 如例如Lonberg等人, (1994) *Nature* 368 (6474) : 856-859; Fishwild等人, (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851和WO 98/24884针对其他抗原所描述。可替代地, 小鼠可用编码人类IL-7Ra或其片段的DNA进行免疫接种。在一些实施方案中, 在第一次输注时, 小鼠可为6-16周龄。例如, 重组IL-7Ra抗原的纯化或富集制备物(5-50 $\mu$ g)可用于腹膜内免疫接种HuMAb小鼠。在使用不产生抗体的IL-7Ra抗原的纯化或富集制备物免疫接种的情况下, 小鼠也可用表达IL-7Ra的细胞(例如细胞系)免疫接种, 以促进免疫反应。示例性细胞系包括过度表达IL-7Ra的稳定的CHO细胞系(CHOZN)。

[0400] 各种抗原的累积经历已显示, 当最初用含有抗原的Ribi佐剂腹膜内(IP)或皮下(SC)免疫接种, 随后每隔一周用含有抗原的Ribi佐剂进行IP/SC免疫接种(至多总共10次)时, HuMAb转基因小鼠反应最佳。可在免疫接种方案的过程内监测免疫反应, 其中血浆样品通过眶后出血获得。血浆可通过ELISA和FACS(如下文所描述)筛选, 并且具有足够效价的抗IL-7R人类免疫球蛋白的小鼠可用于融合。在处死并移除脾与淋巴结前, 小鼠可用抗原静脉内增强3天。预期对于各免疫接种, 可能需要执行2-3次融合。针对每种抗原, 通常对6至24只小鼠进行免疫接种。通常, 使用HCo7、HC012和KM品系。另外, HCo7和HC012转基因均可一起培育至具有两个不同人类重链转基因(HCo7/HC012)的单一小鼠中。

[0401] VI.B. 产生对于IL-7Ra的单克隆抗体的杂交瘤的生成

[0402] 为了产生本文所描述的产生人类单克隆抗IL-7R抗体的杂交瘤, 可分离来自免疫

接种小鼠的脾细胞和/或淋巴结细胞,并且将所述细胞与适当永生化细胞系(诸如小鼠骨髓瘤细胞系)融合。可筛选产生抗原特异性抗体的所得杂交瘤。例如,可在PEG存在下,将来自免疫接种小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬浮液与Sp2/0非分泌性小鼠骨髓瘤细胞(ATCC,CRL 1581)融合。可将细胞铺板在平底微量滴定板中,随后在选择培养基中孵育。在几周后,可在培养基中培养细胞。随后可针对人类单克隆IgM和IgG抗体,通过ELISA筛选个别孔。一旦发生大量杂交瘤生长,则通常可在10-14天后观测培养基。可置换抗体分泌性杂交瘤,再次进行筛选,并且如果对人类IgG仍为阳性,则可通过限制稀释法将单克隆抗体亚克隆至少两次。随后可体外培养稳定的亚克隆以在组织培养基中产生少量抗体以用于表征。

[0403] 为了纯化人类单克隆抗体,可使所选择杂交瘤在两升旋转烧瓶中生长以用于单克隆抗体纯化。在用蛋白A-琼脂糖(Pharmacia,Piscataway,N.J.)进行亲和色谱前,可过滤上清液并进行浓缩。洗脱的IgG可通过凝胶电泳和高效液相色谱检查以确保纯度。可将缓冲溶液更换为PBS,并且浓度可通过OD280使用1.43消光系数确定。可将单克隆抗体等分并储存。

[0404] VI.C.产生对于IL-7Ra的单克隆抗体的转染瘤的生成

[0405] 抗体可使用例如如本领域中熟知的重组DNA技术与基因转染方法的组合(Morrison,S.(1985)Science 229:1202)而在宿主细胞转染瘤中产生。

[0406] 例如,为了表达抗体或其抗体片段,编码部分或全长轻链和重链的DNA可通过标准分子生物学技术(例如使用表达感兴趣抗体的杂交瘤进行的PCR扩增或cDNA克隆)获得,并且可将所述DNA插入表达载体中,使得基因与转录和翻译控制序列可操作地连接。在此情形下,术语“可操作地连接”意图意指,抗体基因连接至载体中,使得载体内的转录和翻译控制序列发挥其调控抗体基因的转录和翻译的预期功能。选择与所用表达宿主细胞兼容的表达载体和表达控制序列。可将抗体轻链基因和抗体重链基因插入至单独载体中,或将两个基因插入至同一表达载体中。通过标准方法(例如使抗体基因片段和载体上的互补限制位点连接,或在无限制位点存在时进行钝端连接),将抗体基因插入至表达载体中。通过将本文所描述的抗IL-7R抗体的轻链和重链可变区插入至已编码所需同型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,使得V<sub>H</sub>区段与载体内的C<sub>H</sub>区段可操作地连接并V<sub>L</sub>区段与载体内的C<sub>L</sub>区段可操作地连接,所述轻链和重链可变区可用于产生任何抗体同型的全长抗体基因。

[0407] 另外地或可替代地,重组表达载体可编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可将抗体链基因克隆至载体中,使得信号肽与抗体链基因的氨基端框内连接。信号肽可为免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽)。可使用的示例性信号肽序列为本领域中已知的。参见例如国际公布号WO 2018/013818A2。

[0408] 除抗体链基因以外,重组表达载体也可携带控制抗体链基因在宿主细胞中的表达的调控序列。术语“调控序列”意图包括控制抗体链基因的转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如聚腺苷酸化信号)。此类调控序列描述于例如Goeddel(Gene Expression Technology.Methods in Enzymology 185,Academic Press, San Diego,CA (1990))中。本领域技术人员应了解,表达载体的设计(包括调控序列的选择)可取决于诸如待转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达量等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调控序列包括在哺乳动物细胞中引导高蛋白质表达水平的病毒元件,诸如来源于细胞巨大病毒(CMV)、猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒的启动子和/或增强子。可替代地,可使用非病毒调控序列,诸如泛素启动子或β-球蛋白启

动子。再者,调控元件包含来自不同来源的序列,诸如SRa启动子系统,其含有来自SV40早期启动子的序列和人类T细胞1型白血病病毒的长末端重复序列(Takebe, Y. 等人(1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

[0409] 除抗体链基因和调控序列以外,重组表达载体可携带额外序列,诸如调控载体在宿主细胞中的复制的序列(例如复制起点)和选择标记基因。选择标记基因促进对已引入载体的宿主细胞的选择(参见例如均为Axe1等人的美国专利号4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,在已引入载体的宿主细胞上,选择标记基因通常赋予对药物(诸如G418)、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于dhfr<sup>-</sup>宿主细胞,用甲氨蝶呤进行选择/扩增)和neo基因(用于G418选择)。

[0410] 对于轻链和重链的表达,通过标准技术,将编码重链和轻链的表达载体转染至宿主细胞中。术语“转染”的各种形式意图涵盖常用于将外源性DNA引入原核或真核宿主细胞中的各种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染及其类似技术。

[0411] 尽管理论上有可能在原核或真核宿主细胞中表达本文所描述的抗IL-7R抗体,但在真核细胞并且最优选地为哺乳动物宿主细胞中表达抗体为最佳的,因为此类真核细胞(并且尤其哺乳动物细胞)与原核细胞相比更可能组装并分泌恰当折叠且具免疫活性的抗体。据报导抗体基因的原核表达对于活性抗体的高产率产生为低效的(Boss, M. A. 和Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13)。

[0412] 用于表达本文所描述的重组抗IL-7R抗体的某些哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)(包括Urlaub和Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中所描述的dhfr-CHO细胞,与DHFR选择标记一起使用,例如如R. J. Kaufman和P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 759:601-621中所描述)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。特别地,对于与NS0骨髓瘤细胞一起使用,另一种表达系统为在WO 87/04462、WO 89/01036和EP 338,841中所公开的GS基因表达系统。当将编码抗体基因的重组表达载体引入至哺乳动物宿主细胞中时,抗体通过将所述宿主细胞培养足以允许在所述宿主细胞中表达抗体或更优选地将所述抗体分泌至生长所述宿主细胞的培养基中的时间段来产生。可使用标准蛋白质纯化方法,从培养基回收抗体。

[0413] VII. 免疫缀合物、抗体衍生物和诊断

[0414] 本文所描述的抗IL-7R抗体可用于诊断目的,包括样品测试和体内成像,并且出于此目的,所述抗体(或其结合片段)可与适当可检测剂结合以形成免疫缀合物。出于诊断目的,对于全身成像,适合的剂为包括放射性同位素的可检测标记,并且对于样品测试,适合的剂为放射性同位素、酶、荧光标记和其他适合的抗体标签。

[0415] 可与本文所描述的任何IL-7R抗体连接的可检测标记可为目前在体外诊断领域中所使用的各种类型中的任一者,包括微粒标记,包括金属溶胶,诸如胶体金;同位素,例如像与N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>S或N4类型的肽螯合剂一起存在的I<sup>125</sup>或Tc<sup>99</sup>;发色团,包括荧光标记、发光标记、磷光标记等以及将给定底物转化成可检测标记的酶标记;和多核苷酸标签,其在扩增(诸如通过聚合酶链反应)后揭示。适合的酶标记包括辣根过氧化酶、碱性磷酸酶等。例如,标记可为酶碱性磷酸酶,通过测量在1,2--二-氧杂环丁烷底物(诸如金刚烷基甲氧基磷酰基氨基二氧杂环丁烷(AMPPD)、3-(4-(甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'--(5'-氯)三环{3.3.1.13,7}癸}-4-基)苯基磷酸二钠(CSPD),以及CDP和CDP-STAR<sup>®</sup>或本领域技术人员

员熟知的其他发光底物,例如适合的镧系元素(诸如铽(III)和铕(III))的螯合物)的转化后,化学发光的存在或形成来检测。检测手段由所选择的标记决定。标记或其反应产物的外观可在标记为微粒并以适当水平积聚的情况下使用肉眼来实现,或使用全部根据标准实践的诸如分光光度计、光度计、荧光计等仪器来实现。

[0416] 在一些实施方案中,缀合方法产生实质上(或几乎)非免疫原性的键,例如,肽键(即酰胺键)、硫键(空间位阻)、二硫键、腙键和醚键。这些键几乎为非免疫原性的,并且在血清内显示合理稳定性(参见例如Senter, P.D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886)。

[0417] 根据所述部分和抗体的生物化学性质,可采用不同缀合策略。在所述部分为具有50至500个氨基酸之间的天然存在或重组型部分的情况下,在描述用于合成蛋白质缀合物的化学方法的课本中存在标准程序,其可由本领域技术人员容易地遵循(参见例如Hackenberger, C.P.R. 和 Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 10030-10074)。在一个实施方案中,使用顺丁烯二酰亚氨基部分与抗体或部分内的半胱氨酸残基的反应。这在例如使用抗体的Fab或Fab'片段的情况下为尤其适合的偶合化学物质。可替代地,在一个实施方案中,进行与抗体或部分的C端的偶合。蛋白质(例如Fab片段)的C端修饰可如(Sunbul, M. 和 Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371)所描述进行。

[0418] 一般而言,位点特异性反应和共价偶合是基于将天然氨基酸转化成具有与所存在其他官能基的反应性正交的反应性的氨基酸。例如,罕见序列情形内的特定半胱氨酸可酶促转化成醛(参见Frese, M.A. 和 Dierks, T., *ChemBioChem.* 10 (2009) 425-427)。还有可能通过利用某些酶在给定序列情形下与天然氨基酸的特异性酶促反应性来获得所需氨基酸修饰(参见例如Taki, M. 等人, *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. 等人 *Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136; 并且C-N键的蛋白酶催化形成由Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403使用)。位点特异性反应和共价偶合也可通过末端氨基酸与适当修饰试剂的选择性反应来实现。

[0419] N端半胱氨酸与苯甲腈的反应性(参见Ren, H. 等人, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662)可用于实现位点特异性共价偶合。

[0420] 原生化学连接也可依赖于C端半胱氨酸残基(Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96)。

[0421] US6437095 B1描述一种基于带负电氨基酸链段内的半胱氨酸与位于带正电氨基酸链段中的半胱氨酸的反应更快的缀合方法。

[0422] 所述部分也可为合成肽或肽模拟物。在化学合成多肽的情况下,可在此类合成期间并入具有正交化学反应性的氨基酸(参见例如de Graaf, A.J. 等人, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295)。由于多种正交官能基至关重要并且可引入至合成肽中,因此此类肽与接头的缀合为标准化学。

[0423] 为了获得单标记多肽,可通过色谱,将具有1:1化学计量的缀合物与其他缀合副产物分离。可通过使用染料标记的结合对成员和带电接头促进此程序。通过使用此类标记并高度带负电的结合对成员,容易地将单缀合的多肽与未标记的多肽和携带多于一个接头的多肽分离开,这是因为电荷和分子量的差异可用于分离。荧光染料可适用于从未结合组分(如标记的一价缀合物)中纯化出复合物。

[0424] 在一个实施方案中,与抗IL-7R抗体连接的部分选自由以下组成的组:结合部分、标记部分和生物学活性部分。

[0425] 本文所描述的抗IL-7R抗体也可与治疗剂缀合以形成免疫缀合物,诸如抗体-药物缀合物(ADC)。适合的治疗剂包括抗代谢物、烷基化剂、DNA小沟结合剂、DNA嵌入剂、DNA交联剂、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓朴异构酶I或II抑制剂、热休克蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素和抗有丝分裂剂。在ADC中,抗体和治疗剂优选经由可裂解接头,诸如肽基、二硫键或腙接头缀合。在其他实施方案中,接头为肽基接头,诸如Val-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Pro-Val-Gly-Val-Val(SEQ ID NO:30)、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Cit-Cit、Val-Lys、Lys、Cit、Ser或Glu。ADC可如以下中所描述来制备:美国专利号7,087,600、6,989,452和7,129,261;PCT公布WO 02/096910、WO 07/038658、WO07/051081、WO07/059404、WO08/083312和WO 08/103693;美国专利公布20060024317、20060004081和20060247295。

[0426] 抗IL-7R抗体(例如本文所描述的那些)也可用于检测IL-7R $\alpha$ ,诸如人类IL-7R $\alpha$ (例如组织或组织样品中的人类IL-7R $\alpha$ )。抗体可用于例如ELISA测定或流式细胞术中。在某些实施方案中,使抗IL-7R抗体与细胞(例如组织中的细胞)接触适于发生特异性结合的一段时间,并且随后添加检测抗IL-7R抗体的试剂,例如抗体。示例性测定提供于实施例中。抗IL-7R抗体可为完全人类抗体,或其可为嵌合抗体,诸如具有人类可变区和鼠类恒定区或其一部分的抗体。可在与抗体和/或检测试剂一起孵育后,包括洗涤步骤。因为可使用单独检测试剂,所以用于这些方法中的抗IL-7R抗体不必与标记或检测试剂连接。

[0427] 抗IL-7R抗体的其他用途(例如作为单一疗法或组合疗法的用途)提供于本文中的其他地方,例如在关于治疗用途的部分中。

#### [0428] VIII. 双特异性分子

[0429] 本文所描述的抗体可用于形成双特异性分子。可将本文所公开的抗IL-7R抗体衍生为另一种功能分子(例如另一种肽或蛋白质(例如针对受体的另一种抗体或配体))或与其连接,以产生与至少两种不同结合位点或靶标分子结合的双特异性分子。已描述各种细胞因子在许多炎性疾病的发生中,诸如在炎性肠病中起重要作用。此类细胞因子的非限制性实例包括TNF- $\alpha$ 、TL1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、IL-12、IL-23、IL-17和IL-27。Sanchez-Munoz F.等人,World J Gastroenterol 14(27):4280-4288(2008)。如上文所描述,也认为调节性T细胞在治疗炎性疾病中为重要的。已知在诱导调节性T细胞中为重要的细胞因子中的一些包括TGF- $\beta$ 、IL-10和IL-2。Hoeppli R.E.,等人,Front Immunol 6:61(2015)。因此,可将本文所公开的抗IL-7R抗体与同以上细胞因子中的任一者特异性结合并因此调控炎性疾病的发作和/或调节性T细胞的诱导的抗体连接。在一些实施方案中,可将抗IL-7R抗体与治疗疾病或病症(例如炎性疾病)的抗体连接。此类抗体的非限制性实例包括那他珠单抗(Natalizumab) (**TYSABRI<sup>®</sup>**)、英利昔单抗(Infliximab)、阿达木单抗(Adalimumab)、优特克单抗(Ustekinumab)、戈利木单抗(Golimumab)、托西利单抗(Tocilizumab)、维多珠单抗(Vedolizumab)、丝克鲁单抗(Secukinumab)。

[0430] 本文所描述的抗体可实际上衍生成多于一种其他功能分子或与其连接,以产生与多于两种不同结合位点和/或靶标分子结合的多特异性分子;此类多特异性分子也意图由如本文所用的术语“双特异性分子”涵盖。为了产生本文所描述的双特异性分子,可将本文

所描述的抗体与一种或多种其他结合分子,诸如另一种抗体、其抗体结合部分、肽或结合模拟物功能性连接(例如通过化学偶合、基因融合、非共价结合或以其他方式),使得产生双特异性分子。

[0431] 因此,本文提供双特异性分子,其包含针对IL-7Ra的至少一种第一结合特异物和针对第二靶标表位的第二结合特异物。在一些实施方案中,双特异性分子可还包含第三结合特异物。

[0432] 在一些实施方案中,本文所描述的双特异性分子包含作为结合特异物的至少一种抗体,包括例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或单链Fv(scFv)。抗体也可为轻链或重链二聚体,或其任何极小片段,诸如Fv或单链构建体,如Ladner等人的美国专利号4,946,778中所描述,其内容以引用的方式明确地并入。

[0433] 当人类单克隆抗体为优选的时,在本文所描述的双特异性分子中可采用的其他抗体为鼠类、嵌合和人源化单克隆抗体。

[0434] 本文所描述的双特异性分子可通过使用本领域中已知的方法使组成性结合特异物结合来制备。例如,双特异性分子的每种结合特异物可分别单独产生,并且随后彼此缀合。当结合特异物为蛋白质或肽时,各种偶合剂或交联剂可用于共价缀合。交联剂的实例包括蛋白A、碳化二亚胺、N-丁二酰亚氨基-S-乙酰基-硫乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫基双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻亚苯基二顺丁烯二酰亚胺(oPDM)、N-丁二酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)和4-(N-顺丁烯二酰亚氨基甲基)环己烷-1-甲酸碘基丁二酰亚胺酯(碘基-SMCC)(参见例如Karpovsky等人(1984)J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA等人(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括在Paulus(1985)Behring Ins. Mitt.第78期,118-132; Brennan等人(1985)Science 229:81-83)和Glennie等人(1987)J. Immunol. 139:2367-2375)中所描述的方法。一些缀合剂为SATA和碘基-SMCC,两者均可购自Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)。

[0435] 当结合特异物为抗体时,其可经由两条重链的C端铰链区的羟基键合来结合。在特定实施方案中,在结合前,修饰铰链区以含有奇数个羟基残基,优选地一个。

[0436] 可替代地,两种结合特异物可在同一载体中编码,并且在同一宿主细胞中表达和组装。此方法尤其适用于双特异性分子为mAb×mAb、mAb×Fab、mAb×(scFv)<sub>2</sub>、Fab×F(ab')<sub>2</sub>或配体×Fab融合蛋白的情况。双特异性抗体可包括在每条重链的C端处包含scFv的抗体。本文所描述的双特异性分子可为包含一个单链抗体和一个结合决定簇的单链分子,或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可包含至少两种单链分子。用于制备双特异性分子的方法描述于例如美国专利号5,260,203、美国专利号5,455,030、美国专利号4,881,175、美国专利号5,132,405、美国专利号5,091,513、美国专利号5,476,786、美国专利号5,013,653、美国专利号5,258,498和美国专利号5,482,858中。

[0437] 双特异性分子与其特异性靶标的结合可使用本领域中公认的方法,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、FACS测定、生物测定(例如生长抑制)或蛋白质印迹测定来确认。这些测定中的每一者通常通过采用对感兴趣复合物具有特异性的标记试剂(例如抗体)来检测特别感兴趣的蛋白质-抗体复合物的存在。

[0438] IX. 试剂盒

[0439] 本文提供试剂盒,其包含一种或多种本文所描述的抗IL-7R抗体或其抗原结合部

分、双特异性分子或其免疫缀合物。在一些实施方案中，本文提供一种药物封装或试剂盒，其包含填充有本文所描述的药物组合物的成分（诸如一种或多种本文所提供的抗体或其抗原结合部分）中的一种或多种的一个或多个容器、任选的使用说明书。在一些实施方案中，试剂盒含有本文所描述的药物组合物和任何预防剂或治疗剂，诸如本文所描述的预防剂或治疗剂。

[0440] X药物、组合物

[0441] 本文提供组合物，其包含在生理学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂中具有所需纯度的本文所描述的抗体或其抗原结合部分（Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA）。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者为无毒性的，并且包括：缓冲液，诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂（诸如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵；氯化六羟季铵；苯扎氯铵、苄索氯铵；苯酚、丁醇或苯甲醇；对羟基苯甲酸烷基酯，诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚；低分子量（小于约10个残基）多肽；蛋白质，诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、双糖和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，诸如EDTA；糖，诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐抗衡离子，诸如钠；金属络合物（例如，Zn-蛋白质络合物）；和/或非离子表面活性剂，诸如**TWEEN®**、**PLURONICS®**或聚乙二醇（PEG）。

[0442] 在一个特定实施方案中，药物组合物包含含有本文所描述的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子或免疫缀合物和任选地一种或多种额外预防剂或治疗剂的药学上可接受的载剂。在一个特定实施方案中，药物组合物包含含有效量的本文所描述的抗体或其抗原结合部分和任选地一种或多种额外预防剂或治疗剂的药学上可接受的载剂。在一些实施方案中，抗体为药物组合物中所含有的唯一活性成分。本文所描述的药物组合物可适用于调节（例如降低或抑制）T细胞（例如病原性T细胞）中的IL-7活性，并可用于治疗疾病或病症，诸如炎性疾病，例如炎性肠病。

[0443] 如本文所用，“药学上可接受的载剂”包括生理学上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。在一些实施方案中，载剂适用于静脉内、肌肉内、皮下、胃肠外、脊椎或表皮施用（例如通过注射或输注）。根据施用途径，可将活性化合物（即抗体、免疫缀合物或双特异性分子）包衣于材料中，以保护化合物免受酸和可使化合物失活的其他天然条件的作用。

[0444] 因此，本发明的一个目的为提供一种改进抗IL-7R抗体的稳定性并因此允许其长期储存的药物制剂。在一些实施方案中，本文所公开的药物制剂包含：(a) 抗IL-7R抗体；(b) 缓冲剂；(c) 稳定剂；(d) 盐；(e) 填充剂；和/或(f) 表面活性剂。在一些实施方案中，药物制剂稳定至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少1年、至少2年、至少3年、至少5年或更长时间。在一些实施方案中，制剂在储存于4°C、25°C或40°C下时为稳定的。

[0445] 缓冲剂

[0446] 适用于本发明的缓冲剂可为用于在添加另一酸或碱之后维持溶液酸性（pH）接近所选值的弱酸或弱碱。适合的缓冲剂可通过维持制剂的pH控制而使药物制剂的稳定性最大。适合的缓冲剂也可确保生理学兼容性或使溶解性优化。流变性、粘度和其他特性也可依

赖于制剂的pH。常见缓冲剂包括但不限于组氨酸、柠檬酸盐、丁二酸盐、乙酸盐和磷酸盐。在一些实施方案中,缓冲剂包含组氨酸(例如L-组氨酸)和等渗剂以及潜在地利用本领域中已知的酸或碱进行的pH调整。在某些实施方案中,缓冲剂为L-组氨酸。在某些实施方案中,制剂的pH维持在约2与约10之间或约4与约8之间。

[0447] 稳定剂

[0448] 将稳定剂添加至药物产品中以便使该产品稳定。此类剂可以多种不同方式使蛋白质稳定。常见稳定剂包括但不限于:氨基酸,诸如甘氨酸、丙氨酸、赖氨酸、精氨酸或苏氨酸;碳水化合物,诸如葡萄糖、蔗糖、海藻糖、棉籽糖或麦芽糖;多元醇,诸如甘油、甘露醇、山梨糖醇、环糊精或具有任哪种类和分子量的葡聚糖或PEG。在本发明的一个方面,选择稳定剂以使冻干剂中的FIX多肽的稳定性达到最大。在某些实施方案中,稳定剂为蔗糖和/或精氨酸。

[0449] 填充剂

[0450] 可将填充剂添加至药物产品中以便增加产品的体积和质量,从而有助于对其进行精确计量和处置。常见填充剂包括但不限于乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨糖醇、碳酸钙或硬脂酸镁。

[0451] 表面活性剂

[0452] 表面活性剂为具有亲水基团和疏水基团的两亲性物质。表面活性剂可为阴离子型、阳离子型、两性离子型或非离子型。非离子型表面活性剂的实例包括但不限于烷基乙氧基化物、壬基苯酚乙氧基化物、胺乙氧基化物、聚氧化乙烯、聚氧化丙烯、脂肪醇(诸如鲸蜡醇或油醇)、椰油酰胺MEA、椰油酰胺DEA、聚山梨醇酯或十二烷基二甲胺氧化物。在一些实施方案中,表面活性剂为聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。

[0453] 在一些实施方案中,本发明的药物制剂包含:

[0454] (a) 约0.25mg/mL至250mg/mL(例如10至200mg/mL)抗IL-7R抗体;

[0455] (b) 约20mM组氨酸;

[0456] (c) 约260mM蔗糖;

[0457] (d) 约0.5mM DTPA;和

[0458] (e) 约0.05%Tween-80。

[0459] 制剂可还包含缓冲剂系统、防腐剂、张力剂、螯合剂、稳定剂和/或表面活性剂以及其各种组合中的一种或多种。防腐剂、等渗剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂在药物组合物中的用途为技术人员所熟知的。可参考Remington: The Science and of Pharmacy,第19版,1995。

[0460] 在一些实施方案中,药物制剂为水性制剂。此类制剂通常为溶液或悬浮液,但也可包括胶体、分散液、乳液和多相材料。术语“水性制剂”被定义为包含至少50%w/w水的制剂。同样,术语“水溶液”被定义为包含至少50%w/w水的溶液,并且术语“水性悬浮液”被定义为包含至少50%w/w水的悬浮液。

[0461] 在一些实施方案中,药物制剂为冷冻干燥制剂,医师或患者在使用前向其中添加溶剂和/或稀释剂。

[0462] 本文所描述的药物组合物也可在组合疗法中进行施用,即与其他剂组合。例如,组合疗法可包括本文所描述的IL-7R抗体与至少一种其他治疗剂的组合。可用于组合疗法中

的治疗剂的实例可包括用于治疗疾病或病症(例如炎性病症)的其他化合物、药物和/或剂。此类化合物、药物和/或剂可包括例如阻断或降低炎性细胞因子的产生的抗炎药或抗体。在一些实施方案中,治疗剂可包括抗IP-10抗体、抗TNF- $\alpha$ 抗体(例如阿达木单抗(adalimumab)(**HUMIRA<sup>®</sup>**)、戈利木单抗(**SIMPONI<sup>®</sup>**)、英夫利昔单抗(infliximab)(**REMICADE<sup>®</sup>**)、聚乙二醇化赛妥珠单抗(certolizumab pegol)(**CIMZIA<sup>®</sup>**)、干扰素 $\beta$ -1a(例如**AVONEX<sup>®</sup>**、**REBIF<sup>®</sup>**)、干扰素 $\beta$ -1b(例如**BETASERON<sup>®</sup>**、**EXTAVIA<sup>®</sup>**)、乙酸格拉替雷(glatiramer acetate)(例如**COPAXONE<sup>®</sup>**、**GLATOPA<sup>®</sup>**)、米托蒽醌(mitoxantrone)(例如**NOVANTRONE<sup>®</sup>**)、非类固醇抗炎药(NSAID)、镇痛剂、皮质类固醇及其组合。在一些实施方案中,治疗剂可包括可诱导产生调节性T细胞(例如诱导性调节性T细胞)的化合物、药物和/或剂。此类治疗剂的非限制性实例包括TGF- $\beta$ 、IL-10、IL-2及其组合。

[0463] 本文所描述的药物化合物可包括一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保留亲本化合物的所需生物活性并且不赋予任何非所需毒理作用的盐(参见例如Berge, S. M. 等人(1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19)。此类盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生于无毒无机酸的那些盐,所述无毒无机酸诸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等;以及衍生于无毒有机酸的那些盐,所述无毒有机酸诸如脂族单羧酸和脂族二羧酸、苯基取代的烷酸、羟基烷酸、芳族酸、脂族和芳族磺酸等。碱加成盐包括衍生于碱土金属的那些盐,所述碱土金属诸如钠、钾、镁、钙等;以及衍生于无毒有机胺的那些盐,所述无毒有机胺诸如N,N'-二苯甲基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因(chloroprocaine)、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因(procaine)等。

[0464] 本文所描述的药物组合物也可包含药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,诸如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,诸如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等;和(3)金属螯合剂,诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0465] 本文所描述的药物组合物可采用的合适水性和非水性载剂的实例包括水、乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其适合的混合物、植物油(诸如橄榄油)和可注射的有机酯(诸如油酸乙酯)。可例如通过使用包衣材料(诸如卵磷脂)、通过维持所需粒度(在分散液的情况下)和通过使用表面活性剂来维持适当流动性。

[0466] 这些组合物也可含有诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂的佐剂。可通过前述灭菌程序和通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等)两者来确保预防微生物体存在。也可能需要在组合物中包括等渗剂,诸如糖、氯化钠等。另外,可通过包含延迟吸收的剂(诸如单硬脂酸铝和明胶)来延长可注射的药物形式的吸收。

[0467] 药学上可接受的载剂包括无菌水溶液或分散液和用于现场制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉剂。此类介质和剂于药物活性物质上的用途为本领域中已知。除非任何常规介质或剂与活性化合物不相容,否则考虑将其用于本文所描述的药物组合物中。药物组合物可包含防腐剂或可不含防腐剂。可将补充活性化合物并入至组合物中。

[0468] 治疗性组合物通常必须在制造和储存条件下为无菌且稳定的。组合物可配制为溶液、微乳液、脂质体或适合于较高药物浓度的其他有序结构。载剂可为含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其适合混合物的溶剂或分散介质。可例如通过使用诸如卵磷脂的包衣、通过维持所需粒度(在分散液的情况下)和通过使用表面活性剂来维持适当流动性。在许多情况下,组合物可包含等渗剂(例如糖)、多元醇(诸如甘露醇、山梨糖醇)或氯化钠于组合物中。可通过在组合物中包含延迟吸收的剂(例如单硬脂酸盐和明胶)来延长可注射组合物的吸收。

[0469] 无菌可注射溶液通过将所需量活性化合物在需要时与上文所列举的一种成分或成分组合并入适当溶剂中,随后经过灭菌微过滤来制备。一般而言,分散液通过将活性化合物并入含有基本分散介质和来自本文所列举成分的所需其他成分的无菌媒介物中来制备。在以无菌粉剂制备无菌可注射溶液的情况下,有些制备方法为从其先前经过无菌过滤的溶液进行真空干燥和冷冻干燥(冻干),产生活性成分加任何额外所需成分的粉末。

[0470] 可与载剂材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据所治疗的受试者和特定施用模式而变化。可与载剂材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常将为产生治疗效果的组合物的量。一般而言,在100%中,此量的范围将为约0.01%至约90%的活性成分、约0.1%至约70%或约1%至约30%的活性成分,与药学上可接受的载剂组合。

[0471] 调整给药方案以得到最佳所需反应(例如治疗反应)。例如,可施用单一药团,可随时间推移施用若干分次剂量,或剂量可如由治疗情形的紧急状态所指示而按比例减少或增加。就施用容易性和剂量均一性而言,以单位剂型配制胃肠外组合物为尤其有利的。如本文所用,单位剂型是指适合作为单位剂量用于待治疗的受试者的物理离散单位;每个单位含有被计算与所需药物载剂结合产生所需治疗效果的预定量的活性化合物。本文所描述的单位剂型的规格由以下因素规定并直接依赖于以下因素:(a)活性化合物的独特特征和待实现的特定治疗效果,和(b)此种活性化合物用于治疗受试者过敏性的混配技术中固有的限制。

[0472] 对于例如本文所描述的抗IL-7R抗体的施用,剂量范围为约0.0001至100mg/kg宿主体重且更通常为0.01至5或10mg/kg宿主体重。例如,剂量可为0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg范围内。示例性治疗方案需要每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每3个月一次或每三至6个月一次施用。

[0473] 在一些实施方案中,抗IL-7R抗体以均一剂量(均一剂量方案)施用。在其他实施方案中,抗IL-7R抗体以固定剂量与另一种抗体一起施用。在某些实施方案中,抗IL-7R抗体以基于体重的剂量施用。

[0474] 在一些方法中,具有不同结合特异性的两种或更多种单克隆抗体同时施用,在此情况下,所施用的每种抗体的剂量在所指示的范围内。抗体通常多次施用。单次剂量之间的时间间隔可为例如每周、每月、每三个月或每年。时间间隔也可为不规律的,如通过测量患者中针对靶标抗原的抗体的血液水平所指示。在一些方法中,调整剂量以达到约1-1000 $\mu$ g/ml的血浆抗体浓度,并且在一些方法中达到约25-300 $\mu$ g/ml。

[0475] 抗体可以持续释放制剂的形式施用,在此情况下,降低必要施用的频率。剂量和频率根据患者中的抗体的半衰期而变化。一般而言,人类抗体显示出最长半衰期,继而为人源

化抗体、嵌合抗体和非人类抗体。施用剂量和频率可根据治疗是预防性或是治疗性而变化。在预防性应用中,在长时间段内,以相对不频繁的时间间隔施用相对低的剂量。一些患者在其余生中继续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要在相对短的时间间隔下的相对高的剂量,直至疾病进展减少或终止为止,并且直至患者显示疾病症状部分或完全改善为止。其后,可向患者施用预防性方案。

[0476] 本文所描述的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可改变,以便获得有效实现特定患者、组合物和施用模式的所需治疗反应而对患者无毒性的活性成分的量。所选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括所使用的本文所描述的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性;施用途径;施用时间;所使用的特定化合物的排泄速率;治疗持续时间;与所使用的特定化合物组合使用的其他药物、化合物和/或物质;所治疗的患者的年龄、性别、体重、病状、一般健康状况和先前病史;以及医学技术中熟知的类似因素。

[0477] 本文所描述的组合物可经由一种或多种施用途径,使用本领域中已知的多种方法中的一者或者者来施用。如本领域技术人员应了解,施用途径和/或模式将根据所需结果而变化。本文所描述的抗IL-7R抗体的施用途径可包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊椎或其他胃肠外施用途径,例如通过注射或输注。如本文所用,短语“胃肠外施用”意指除经肠和局部施用以外的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛膜下、脊椎内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0478] 可替代地,本文所描述的抗体有可能经由非胃肠外途径施用,诸如局部、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、经口、经阴道、经直肠、舌下或局部。

[0479] 活性化合物可用将保护化合物免于快速释放的载体制备,所述载体诸如控制释放制剂,包括植入物、经皮贴片和微胶囊化递送系统。可使用生物可降解、生物相容性聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酰胺、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的许多方法已获得专利或通常为本领域技术人员已知的。参见例如*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson编, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0480] 也可用本领域中已知的医学装置施用治疗性组合物。例如,在一个特定实施方案中,本文所描述的治疗性组合物可用无针皮下注射装置来施用,所述装置诸如为美国专利号5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824或4,596,556中所公开的装置。与本文所描述的抗IL-7R抗体一起使用的熟知植入物和模块的实例包括:美国专利号4,487,603,其公开一种用于以受控速率分配药物的植入式微量输注泵;美国专利号4,486,194,其公开一种用于经由皮肤施用药物的治疗装置;美国专利号4,447,233,其公开一种用于以精确输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利号4,447,224,其公开一种用于连续药物递送的变流植入式输注设备;美国专利号4,439,196,其公开一种具有多腔室隔室的渗透性药物递送系统;以及美国专利号4,475,196,其公开一种渗透性药物递送系统。这些专利以引用的方式并入本文中。许多其他此类植入物、递送系统和模块为本领域技术人员已知的。

[0481] XI. 用途和方法

[0482] 本发明的抗IL-7R抗体和包含此类抗体的组合物(例如药物组合物、制剂、多核昔

酸、载体和细胞)可用于治疗炎性疾病(例如通过调节受试者中的调节性T细胞与效应T细胞的比率)。

[0483] 因此,在一个方面中,本发明提供用于治疗有需要的受试者的炎性疾病的方法,其包括向受试者施用治疗有效剂量的抗IL-7R抗体。可用本发明抗IL-7R抗体治疗的炎性疾病的实例包括但不限于炎性肠病(IBD)、克罗恩氏病(CD)、溃疡性结肠炎(UC)、肠易激综合症、类风湿性关节炎(RA)、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、全身性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、I型糖尿病、格雷氏病、多发性硬化症(MS)、自身免疫心肌炎、川崎病、冠状动脉疾病、慢性阻塞性肺病、间质性肺病、自身免疫甲状腺炎、硬皮病、全身性硬化症、骨关节炎、异位性皮炎、白斑病、移植植物抗宿主病、舍格伦综合症、自身免疫肾炎、吉德帕斯丘综合症、慢性炎性脱髓鞘多发性神经病、过敏、哮喘和由急性或慢性炎症引起的其他自身免疫疾病。

[0484] 在一些实施方案中,抗IL-7R抗体适用于治疗患有炎性肠病的受试者。炎性肠病(IBD)为一种可影响从口部至肛门的胃肠道的任何部分,从而引起广泛多种症状的疾病。IBD主要导致腹痛、腹泻(其可能有血)、呕吐或体重减轻,但也可能导致胃肠道外部的并发症,诸如皮肤皮疹、关节炎、眼部炎症、疲劳和注意力不集中。患有IBD的患者可主要分成两个类别:患有溃疡性结肠炎(UC)的患者和患有克罗恩氏病(CD)的患者。CD通常涉及回肠和结肠,但其可能影响肠的任何区域并且常常为非连续的(疾病集中区域扩散在整个肠中)。UC始终涉及直肠(结肠)并且为更连续的。在CD中,炎症可透壁,引起脓肿、瘘和狭窄,而在UC中,炎症通常局限于粘膜。不存在克罗恩氏病的已知药物或手术治愈法,而一些患有UC的患者可通过手术移除结肠而治愈。治疗选择限于控制症状、维持缓解和预防复发。对于CD,在临床中炎性肠病的功效可以基于实验室测试和生活质量问卷进行评分分级的克罗恩氏病活动指数(CDAI)评分降低的形式测量。在动物模型中,主要通过体重以及疾病活动性指数(DAI)增加来测量功效,所述疾病活动性指数为大便坚实度、重量和便血的组合。

[0485] 在一些实施方案中,本发明的抗IL-7R抗体适用于治疗患有类风湿性关节炎的受试者。类风湿性关节炎(RA)为影响几乎全部身体(即使不为全部)的全身性疾病且为关节炎的最常见形式之一。其特征在于关节炎症,其导致疼痛、僵硬、发热、发红和肿胀。此炎症为炎性细胞侵袭关节的结果,并且这些炎性细胞释放可分解骨和软骨的酶。因此,此炎症可能导致严重骨和软骨损坏并导致关节退化和严重疼痛以及其他生理影响。所涉及的关节可能丧失其形状和对准,从而导致疼痛和运动性丧失。本领域中已知类风湿性关节炎的数种动物模型。例如,在胶原蛋白诱发的关节炎(CIA)模型中,小鼠罹患类似于人类类风湿性关节炎的炎性关节炎。因为CIA与RA共享类似免疫和病理特征,因此使得其为筛选潜在人类抗炎化合物的适合模型。在此模型中的功效通过关节肿胀减少来测量。在临床中RA的功效通过减少患者症状的能力来测量,所述功效以关节肿胀、红血球沉降率、C反应蛋白水平和血清因子(诸如抗瓜氨酸蛋白抗体)的水平的组合形式来测量。

[0486] 在一些实施方案中,如本文所公开的抗IL-7R抗体适用于治疗患有牛皮癣的受试者。牛皮癣为T细胞介导的可造成相当大的不适的皮肤炎性病症。其为一种当前无治愈方法并且影响所有年龄的人群的疾病。尽管患有轻度牛皮癣的受试者可常常用局部剂控制其疾病,但全世界超过一百万患者需要紫外光治疗或全身性免疫抑制疗法。令人遗憾的是,紫外辐射的不便和风险以及许多疗法的毒性限制其长期使用。此外,患者的牛皮癣通常会复发,并且在一些情况下,在停止免疫抑制疗法后不久即反弹。基于CD4<sup>+</sup>T细胞转移的牛皮癣的新

近开发的模型模拟人类牛皮癣的许多方面,并且因此可用于鉴别适用于治疗牛皮癣的化合物(Davenport等人,Internat.Immunopharmacol 2:653-672,2002)。在此模型中的功效通过皮肤病理减少使用评分系统来测量。类似地,在患者中的功效通过皮肤病理减少来测量。

[0487] 在一些实施方案中,抗IL-7R适用于治疗患有牛皮癣性关节炎的受试者。牛皮癣性关节炎(PA)为在患有牛皮癣的患者的子集中发生的一类炎性关节炎。在这些患者中,皮肤病理/症状伴有与类风湿性关节炎中所见的关节肿胀类似的关节肿胀。其特征在于伴有脱皮的皮肤炎症的片状突起红色区域。牛皮癣通常影响肘部和膝部的端部、头皮、脐和生殖器区域或肛门周围。大约10%患有牛皮癣的患者中的关节也产生相关炎症。

[0488] 就本发明而言,预防性、姑息性、症状性和/或治愈性治疗可表示本发明的独立方面。本发明抗体可胃肠外(诸如静脉内,诸如肌肉内,诸如皮下)施用。可替代地,本发明抗体可经由诸如经口或局部的非胃肠外途径施用。本发明抗体可预防性地施用。本发明抗体可治疗性地施用(按需求)。

[0489] 上文所引用的所有参考文献以及本文中所引用的所有参考文献均以全文引用的方式并入本文中。

[0490] 以下实施例以说明且非限制的方式提供。

[0491] 实施例

[0492] 实施例1:人类抗IL-7R抗体的特征

[0493] 分析本文所公开的抗IL-7R抗体(包含如SEQ ID NO:19中所阐述的VH和如SEQ ID NO:20中所阐述的VL,参见表12) (“抗体A”)与IL-7R $\alpha$ 表达细胞的结合。IL-7R $\alpha$ 主要表达于人类T细胞上并且以较小程度表达于单核细胞上。

[0494] 如表1(下文)中所示,抗体A能够结合来自全血的各种子集的T细胞(CD4 $^+$ CD45RA $^+$ 、CD4 $^+$ CD45RA $-$ 、CD8 $^+$ CD45RA $^+$ 和CD8 $^+$ CD45RA $-$ )上表达的IL-7R $\alpha$ (EC $_{50}$ 值范围为约1.4至3.3nM)。此外,抗体A并不激动IL-7R $\alpha\alpha$ 信号传导(参见表2),并且能够有效地阻断IL-7与CD4 $^+$ CD45RA $^+$  T细胞上表达的IL-7R $\alpha\alpha$ 结合(如通过pSTAT5活化所测量)。与参考抗IL-7R抗体(“PFE A3312F”)相比,抗体A在阻断IL-7与IL-7R $\alpha\alpha$ 结合方面更高效。当在抗体A存在下,用IL-7(例如2.0ng/mL)刺激来自全血的CD4 $^+$ CD45RA $^+$  T细胞时,存在最低的pSTAT5活化(IC50=2.1±1.4nM)。相比之下,在PFE A3312F的情况下,pSTAT5活化显著更高(IC50=15.8±4.0)。

[0495] 表1.与参考抗IL-7R单克隆抗体(PFE A3312F)相比,抗体A的体外特性

细胞类型	子集	测定	刺激	抗 IL-7R 抗体	PFE A3312F
T 细胞(全血)	CD4 $^+$ CD45RA $^+$	结合 EC50 nM	--	1.4 ± 0.7	1.5 ± 0.5
	CD4 $^+$ CD45RA $-$			3.3 ± 1.6	3.1 ± 0.9
	CD8 $^+$ CD45RA $^+$			2.0 ± 0.9	1.7 ± 0.4
	CD8 $^+$ CD45RA $-$			1.9 ± 1.4	2.7 ± 0.8
T 细胞(全血)	CD4 $^+$ CD45RA $^+$	pSTAT5	IL-7 (0.25)	0.6 ± 0.7	1.0 ± 0.9

血)	IC50 (nM)	ng/mL)		
		IL-7 (2.0 ng/mL)	2.1 ± 1.4	15.8 ± 4.0
单核细胞	纯化的	MCP1 产生 IC50 (nM)	TSLP	24 ± 4.5

[0498] 抗体A在其阻断TSLP介导的单核细胞活化的能力方面也与参考抗体不同。如表1(最后一行)中所示,在PFE A3312F存在下,用TSLP刺激的单核细胞未能产生单核细胞化学引诱剂蛋白质-1(MCP-1) ( $IC_{50}=0.08\pm0.3\text{nM}$ ),表明PFE A3312F能够与单核细胞上表达的IL-7R $\alpha$ 结合并有效地阻断TSLP与IL-7R $\alpha$ 的结合。相比之下,在抗体A的情况下,TSLP刺激的单核细胞产生显著更高量的MCP1 ( $IC_{50}=24\pm4.5$ )。

[0499] 接下来,为了评定不能阻断TSLP刺激的单核细胞活化是否归因于结合问题,将来自人类供体的全血与变化浓度的抗体A一起孵育。随后,使用流式细胞术来测量抗体A与非T细胞(CD3-)上表达的IL-7R $\alpha$ 的结合的平均荧光强度(MFI)。如图1中所示,即使在高达70nM的浓度下,存在极少的抗体A与非T细胞的结合。

[0500] 总之,以上数据指示,与其他已知抗体(PFE A3312F)相比,本文所公开的抗IL-7R抗体(抗体A)在阻断IL-7结合方面更强效,并且对于T细胞上而非非T细胞(例如单核细胞和全血中的其他CD3-细胞)上表达的IL-7R $\alpha$ 具有选择性。

[0501] 实施例2:抗IL-7R抗体的激动活性的测定

[0502] 接下来,为了评定抗IL-7R抗体的结合是否可诱导IL-7R $\alpha$ 信号传导,将外周血液单核细胞(PBMC)和全血与不同浓度抗体A(100、50、25、13、6、3、2、1和0nM)一起孵育。同型对照抗体和IL-7(2nM)分别用作阴性和阳性对照。

[0503] 如表2中所示,在所有所测试浓度下,与阴性对照相比,抗体A并不诱导pSTAT5活化。此结果表明,在与IL-7R $\alpha$ 结合后,抗体A不激动信号传导。

[0504] 表2. 如使用pSTAT5活化所评定,对于人类PBMC和人类全血的体外激动活性

抗 IL-7R 抗体(抗体 A) (nM)	<u>PBMC</u>						
	d355 +单独 BMS DR		d173 +单独 BMS DR		d341 +单独 BMS DR		
单独抗 IL-7R 抗 体 (pSTAT5 活化)	相对于 对照的 百分比	单独抗 IL-7R 抗体 (pSTAT5 活化)	相对于 对照的 百分比	单独抗 IL-7R 抗 体 (pSTAT5 活化)	相对 于对 照的 百分 比		
100	786	2	1836	6	1083	2	
50	868	2	915	0	1386	3	
25	894	3	1072	1	1333	3	
13	1038	4	1060	1	1373	3	
6	941	3	1031	1	1476	4	
3	938	3	1467	4	1711	5	
2	896	3	1075	1	1582	4	
1	1174	5	1467	4	1787	5	
0	597	0	841	0	797	0	
同型对照	934	3	1174	2	1325	3	
2 nM IL-7 刺激	11520	100	16575	100	19406	100	
抗 IL-7R 抗体(抗体 A) (nM)	<u>全血</u>						
	d232 +单独 BMS DR		d331 +单独 BMS DR		d344 +单独 BMS DR		
	单独抗 IL-7R 抗 体 (pSTAT5 活化)	相对于 对照的 百分比	单独抗 IL-7R 抗体 (pSTAT5 活化)	相对于 对照的 百分比	单独抗 IL-7R 抗 体 (pSTAT5 活化)	相对 于对 照的 百分 比	
	100	14704	-4	1055	-10	8328	-20
	50	17982	0	1001	-15	9524	-9
	25	16463	-2	1140	-3	11526	10
	13	15041	-4	1031	-12	11212	7
	6	19004	1	976	-17	10891	4
	3	15281	-4	958	-19	9132	-13
	2	21046	3	1016	-14	14779	41
[0506]	1	17489	-1	1045	-11	10224	-2
	0	18350	0	1178	0	10459	0
同型对照		18648	0	952	-19	14024	34
2 nM IL-7 刺激		85984	100	7371	526	33102	216

[0507] 实施例3:食蟹猴中的抗IL-7R抗体的交叉反应性

[0508] 为了评定抗体A的交叉反应性,使用表面等离子体共振(SPR)来评定对于人类和食蟹猴IL-7Ra的结合亲和力。简言之,在BIACORE™T200仪器(GE Healthcare, Chicago, IL,

USA) 上,在pH 7.4或pH 6.0下由10mM NaPO4、130mM NaCl、0.05% p20 (PBS-T) 组成的运行缓冲液中进行实验。通过将蛋白A固定在CM5传感器芯片的流动槽1、2、3和4上,使用密度为4000RU的乙基(二甲氨基丙基) 碳化二亚胺/NHS,来制备芯片表面。使用在10 $\mu$ l/min下,30秒的接触时间,来捕获抗体A。使用从500nM至7.8nM的2倍连续稀释液,其中在30 $\mu$ l/min下,在180s结合时间和360s解离时间下,测试his标记的人类IL7R或食蟹猴IL7R的已纯化胞外结构域构建体(内部生成)的结合。使用2×30秒10mM甘氨酸-HCl pH 1.5注射,实现循环之间的再生。使用Biacore T200评价软件(GE Healthcare) 来分析数据,并且将其拟合于1:1朗缪尔模型(Langmuir model)。

[0509] 如表3中所示,抗体A可以类似亲和力与人类和食蟹猴IL-7R $\alpha$ 两者结合。例如,在pH 7.4下,抗体A分别以1.3nM和1.7nM的KD值,与人类和食蟹猴IL-7R $\alpha$ 结合。在pH 6.0下,结合大约弱4倍,表明抗IL-7R与人类和食蟹猴IL-7R $\alpha$ 两者的结合均为pH依赖性的。相比之下,PFE A33 12F并不表明pH依赖性结合,其中在pH 7.4下KD值为4.4nM且在pH 6.0下KD值为3.9nM。SPR分析也表明,在神经pH下与所有人类和食蟹猴Fc  $\gamma$  R结合极弱,并且在pH 6.0下结合更强,如hIgG1.3f同型所预期。

[0510] 表3. 抗IL-7R抗体(抗体A) 对与人类和食蟹猴IL-7R $\alpha$ 的结合亲和力

靶标	温度	pH	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
人类	37°C	7.4	3.1E+05	4.0E-04	1.3
		6.0	2.4E+05	1.3E-03	5.3

IL-7R $\alpha$					
食蟹猴	37°C	7.4	2.9E+05	5.0E-04	1.7
		6.0	2.3E+05	1.6E-03	7.0

[0513] 为了确认以上交叉反应性数据,也评定细胞结合和功能性阻断。简言之,向食蟹猴施用单一剂量(0.1、0.5或3.0mg/kg)的抗体A。随后,在施用后第8天,从动物分离PBMC。为了测量阻断IL-7与食蟹猴IL-7R $\alpha$ 结合的能力,PBMC用重组食蟹猴IL-7(5pM)刺激15分钟,并且使用流式细胞术评定pSTAT5活性和CD4 $^+$ T细胞上的受体占有率。

[0514] 如图2A中所示,在约310-350ng/mL (~ 2.1-2.3nM)的血清抗IL-7R抗体浓度下,食蟹猴CD4 $^+$ T细胞上表达的IL-7R $\alpha$ 占据大于95%。类似地,如图2B中所示,血清抗IL-7R抗体浓度与pSTAT5活性呈直接负相关性。在670-2200ng/mL (4.5-15nM)之间的血清浓度下,存在大于90% STAT5抑制。基于这些结果,体内完全阻断IL-7R $\alpha$ ,将需要大约2-15nM的低谷浓度。

[0515] 总之,以上数据表明,本文所公开的抗IL-7R抗体(抗体A) 在食蟹猴中具有完全交叉反应性,并且可有效地与食蟹猴IL-7R $\alpha$ 结合并阻断IL-7诱导的食蟹猴IL-7R $\alpha$ 的信号传导。

[0516] 实施例4:抗IL-7R抗体的额外特征

[0517] 抗体A的分析性和生理特征提供于表4中。

[0518] 抗体A的分析性和生理特性对于继续研发为有利的。通过质谱分析(完整质量分析和肽图谱),来确认抗体的同一性。如通过分析性尺寸排阻色谱所测试,抗体为>99%单体抗体。确认单一N糖基化位点在重链上的N297处,其中聚糖概况符合CHO表达的单克隆抗体(G0F、G1F和G2F)的聚糖概况。如通过成像毛细管等电聚焦所测定的电荷变体概况显示在8.5 (60%) 的主峰pI,其中34%为酸性变体并且6%为碱性变体。热稳定性( $T_m$ =70.0°C,

$T_m2 = 75.4^\circ\text{C}$ ,  $T_m3 = 84.2^\circ\text{C}$ ) 在典型的人类 IgG1.3f 单克隆抗体的范围内。

[0519] 表4. 抗IL-7R抗体的分析性和生理特征

特性	方法	结果
同一性	LC-MS	确认完整质量
	LC-MS/MS 肽图谱	序列由胰蛋白酶肽图谱确认, 其中重链和轻链 100% 覆盖。糖基化占有率为 99.8%
纯度/ 均质性	SEC	99.6% 单体, 0.4% HMW
	SEC-MALS	预期单体质谱
	LC-MS	在重链上观测到 56% G0F、40% G1F 和 4% G2F。
	cIEF	主峰 $pI = 8.53$ (59.8%); 酸性变体 = 34.4%; 碱性变体 = 5.8%
	SDS-PAGE	还原性: ~50 kDa 和 ~25 kDa 的 2 条主带 非还原性: ~150 kDa 的主带, 以及 ~100 kDa、~25 kDa 的微小片段 (SDS 电泳条件的伪影)
热稳定性	DSC	$T_m1 = 70.0^\circ\text{C}$ , $T_m2 = 75.4^\circ\text{C}$ , $T_m3 = 84.2^\circ\text{C}$

[0521] 抗体A的稳定性特征提供于表5中。

[0522] 表5. 抗IL-7R抗体 (抗体A) 的稳定性

特性	方法	结果
冻/融 (在 $-80^\circ\text{C}$ 下 2 h, 在 RT 下 4 h $\times$ 3)	UV、SEC、 DLS、iCIEF	显示无冻/融稳定性风险
溶解性/浓度分布	UV、SEC	平台制剂缓冲液 (20 mM 组氨酸, 260 mM 蔗糖, 0.05 mM DTPA, 0.05% Tween-80, pH 6.0) 中的至少 150 mg/mL
针对构象和胶体稳定性的 pH 筛选	Optim2 (Tm 和 Tagg 起始)	最佳构象稳定性 = pH 6-8 最佳胶体稳定性 = pH 5-6
缓冲剂和赋形剂筛选	Optim2 (Tm 和 Tagg 起始)	稳定剂: 蔗糖、山梨糖醇、甘油
150 mg/mL, 在 $4^\circ\text{C}$ 、 $25^\circ\text{C}$ 和 $40^\circ\text{C}$ 下, 于截短平台制剂 (20 mM 组氨酸、260 mM 蔗糖、0.05 mM DTPA、0.05% Tween-80, pH 6.0) 中 12 w 的加速的稳定性	SEC、cIEF、 HIC、 LC-MS/MS (肽图谱和完整质谱)、 Biacore、生物测定、UV-Vis、 DLS	在 $40^\circ\text{C}$ 下 12 w = 未观测到 HMW 或 LMW 的变化  在 $25^\circ\text{C}$ 下 12 w = HMW 增加 <0.1%/月 LMW 增加 0.3%/月  在 $40^\circ\text{C}$ 下 12 w = HMW 增加 ~1%/月 LMW 增加 ~1.3%/月 未注意到 Rh 或 Pd 增加

		在 40°C 下 12 w = HC CDR2 中的 N54 脱酰胺作用 5.5%/月, HC CDR1 中的 D30/31 脱酰胺作用 3.4%/月, VSNK 脱酰胺作用 10%/月
[0524]	搅动稳定性研究 (在 150 mg/mL 下 进行)	在 RT 下, 350 rpm, 在制剂缓 冲液 $\pm$ 0.05% PS80 中, 7 天
	粘度评定	测定浓度-粘 度曲线

[0525] 使用HEK衍生材料,对本文所公开的抗IL-7R抗体进行初步制剂评价,包括搜寻最佳pH、缓冲液组成和赋形剂和加速稳定性研究。在冻融胁迫(5个循环)期间,在截短平台制剂(20mM组氨酸、260mM蔗糖、0.05mM DTPA, pH 6.0)中,或归因于搅动胁迫,具有或不具有表面活性剂,在150mg/mL下,未观测到物理稳定性问题。在这些研究期间不评定表面活性剂的添加。在150mg/mL下的强制降解研究设定在4、25和40°C下。在最高胁迫条件(40°C下,3个月)下,观测到CDR区中的化学修饰,这与SPR活性测定中的KD和Rmax两者的变化有关。在25°C储存下,在相同CDR位点观测到微小化学变化。未观测到储存在4或25°C下的样品的活性的变化。也观测到预期VSNK脱酰胺作用变化。

[0526] 使用HEK衍生材料进行的可行性评价也表明HMW和LMW变体两者的时间和温度相关性变化(在40°C下分别以~1%/月和~1.3%/月增加)。在4°C储存下, HMW保持不变;而25°C储存下,增加0.3%/月。在40°C储存下观测到的LMW形成通过准确质量来表征为假定在上铰链区中的保守序列处的化学限幅结果,1Fab以及Fab臂累积物质损失。来自这些HEK衍生材料的HMW和LMW的变化研究是在IgG1.3mAb的预期内并且支持分子进展。

[0527] 抗体A的粘度限制被视为早期前导物优化的不利因素。在制剂评定过程期间所测量的粘度-浓度分布表明,在100mg/mL下为8cP粘度,并且在140mg/mL下为~19cP粘度。基于抗体A的粘度曲线,估计~125mg/mL浓度将为使用常规装置呈可注射的浓度上限。

[0528] 实施例5:NOD Scid  $\gamma$  (NSG) - 人类PBMC转移小鼠中的抗IL-7R抗体的药代动力学(PK)

[0529] 由于抗体A不与小鼠IL-7Ra交叉反应,因此NSG-人类PBMC转移小鼠能够对靶标介导的清除对于PK的影响进行评价。另外,例如相对于PFE A3312F,显示抗体A对于IL-7Ra呈现不同的pH依赖性结合亲和力(参见实施例3)。对于归因于靶标介导的清除而呈现短半衰期的mAb,证实pH依赖性抗原结合引起PK曲线改进。参见Igawa T.等人,Nat Biotechnol 28 (11):1203-7(2010)。因此,此模型也用于评价pH依赖性靶标结合是否将转变为药代动力学改进。

[0530] 简言之,NSG-人类PBMC转移小鼠接受单次施用抗体A或参考PFE A3312F抗体。小鼠静脉内接受以下两个剂量中的一者:0.5mg/kg或5mg/kg。随后,在施用后的不同时间点对小鼠进行抽血,并且测定血清抗体浓度。如图3中所示,PFE A33 12F的PK为非线性的,如在0.5

与5mg/kg剂量之间,血液清除(CL)降低5.7倍(参见表6),大概是归因于靶标介导的药物处置(TMDD)。尽管在5mg/kg下的抗体A的PK类似于PFE A3312F,但在较低剂量(0.5mg/kg)下观测到暴露显著提高。不受任何理论束缚,由于靶标介导的药物清除一般在较低剂量范围下更显而易见,因此假定在较低剂量下所观测到的PK改进是归因于抗IL-7R抗体对于IL-7Ra的差异性pH依赖性结合亲和力。

[0531] 表6.在NSG-人类PBMC转移小鼠中单次IV剂量后的药代动力学参数

[0532]	抗 IL-7R 抗体(抗体 A)		PFE A3312F		
	IV 剂量(mg/kg)	0.5	5.0	0.5	
	N (小鼠数目)	6	6	5	
[0533]	AUClast (μM*h)	4.1	51.2	0.7	49.6
	T <sub>1/2</sub> (h)	38	54	56	39
	CL (mL/h/kg)	0.8	0.6	4.0	0.7

[0534] 实施例6:食蟹猴中的抗IL-7R抗体的药代动力学(PK)

[0535] 为了进一步评定抗体A的PK,食蟹猴静脉内接受在以下剂量中的一者下的单一剂量的抗体A或参考PFE A3312F抗体:0.1mg/kg、0.5mg/kg或3mg/kg。随后,在施用后的不同时间点对动物抽血,并且比较抗体的体内效能(PK、R0和离体pSTAT5活化)。

[0536] 如图4中所示,在接受≥0.5mg/kg的任一抗体的动物中,检测在第10天和之后的抗药物抗体(ADA)(虚线),从而得到动物中的较低抗体血清浓度(实线)。如图5中所示,抗体A和PFE A33 12F的药代动力学在所测试剂量下为非线性的,表明TMDD。然而,如表7中所示,相对于PFE A3312F,抗体A的平均暴露(AUC)更高(1.6至2.1倍)。类似地,抗体A的清除值在以下剂量下也更高:0.1、0.5和3mg/kg,所述清除值分别为1.15±0.20、0.64±0.10和0.44±0.02mL/h/kg,而A3312F的清除值分别为1.76±0.22、1.16±0.39和0.94±0.12mL/h/kg(表7)。

[0537] 表7.在NSG-人类PBMC转移小鼠中单次IV剂量后的药代动力学参数

[0538]	抗 IL-7R 抗体(抗体 A)			PFE A3312F		
	IV 剂量(mg/kg)	0.1	0.5	3	0.1	0.5
	N (小鼠数目)	3	3	3	3	3
	AUClast (μM*h)	0.6 ± 1	5.3 ± 0.8	46.4 ± 2.4	0.4 ± 0.1	3.1 ± 1.1
	CL (mL/h/kg)	1.15 ± 0.20	0.64 ± 0.10	0.44 ± 0.02	1.76 ± 0.22	1.16 ± 0.39
	V <sub>ss</sub> (mL/kg)	39 ± 1	42 ± 0	41 ± 1	41 ± 0	48 ± 1

[0539] 在食蟹猴中的pSTAT5抑制与抗体A的血清浓度之间,存在良好相关性。参见图6。随着对抗体A的暴露增加(如通过血清抗体浓度增加所证明),IL-7介导的pSTAT5活化对应降低。这在接受本发明抗IL-7R抗体或PFE A3312(IC50=~2nm)的两种猴中也成立。

[0540] 在3周评价时段期间,不存在抗IL-7R抗体相关的关于以下的临床观测或副作用:体重、血液学(用WBC分类)、血清临床化学或T/B/NK细胞表型分型(图7A-图7C中显示的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>)。

[0541] 以上结果表明,与参考抗体相比,本文所公开的抗IL-7R抗体(抗体A)在食蟹猴中

具有类似的体内效能,但呈现改进的药代动力学而具有极少毒性问题。

[0542] 实施例7:抗IL-7R抗体的免疫原性的分析

[0543] 通过计算机方法以及通过体外DC:T细胞增殖测定,来评价抗体A的潜在免疫原性风险。计算机iDAB分析显示针对VL CDR3的一些结合潜能和在VH的位置71处从丝氨酸突变为苯丙氨酸的框架突变(F71S)。体外DC:T细胞增殖分析,其由与用抗体A脉冲的树突状细胞一起孵育的40个PBMC供体组成,显示针对抗体A的非RACIR批料显著的免疫原性反应(~30-50%供体) (参见图8中P1-066930-3和P1-066930-9)。有趣的是,这些结果与先前所描述的猴研究中所观测到的ADA的严重性(参见实施例6)有关。抗体A的RACIR批料在供体中具有极少免疫原性(~12.5%),与对照蛋白(安维汀)相当。鉴于在分析中针对RACIR材料的低反应,预测抗体A在用于临床中例如治疗本文所公开的炎性疾病应为安全的。

[0544] 实施例8:抗IL-7R抗体阻断人类T细胞中的IL-7信号传导的能力的分析

[0545] 为了进一步评定抗体A抑制IL-7与IL-7R $\alpha$ 结合的能力,从健康志愿者(NHV)、溃疡性结肠炎(UC)患者和克罗恩氏病(CD)患者获取外周血液。随后,离体孵育PBMC,并且在抗体A存在下用IL-7刺激大约15分钟。随后,使用流式细胞术分析T细胞中的pSTAT5活性。

[0546] 如表8中所示,在来自所有所测试受试者的T细胞中存在最低的pSTAT5活性,表明抗体A可有效地阻断IL-7与来自健康和疾病患者两者的人类IL-7R $\alpha$ 结合。在NHV与UC或CD供体反应之间,未观测到统计学差异。此结果显示,本文所公开的抗IL-7R抗体(抗体A)可通过有效地阻断病原性T细胞中的IL-7信号传导而有效地体内治疗炎性疾病。

[0547] 表8.在NSG-人类PBMC转移小鼠中单次IV剂量后的药代动力学参数

	IC <sub>50</sub> (nM)	CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+a</sup>	CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-b</sup>
[0548]	NHV (n=19)	0.60±0.3	0.52±0.3	0.43±0.29	0.38±0.30
	UC (n=21)	0.34±0.2	0.28±0.2	0.29±0.40	0.22±0.18
	CD (n=10)	0.36±0.3	0.36±0.4	0.29±0.22	0.23±0.30

[0549] <sup>a,b</sup>仅计算在CD8 T细胞对于IL-7起反应时的IC50

[0550] 实施例9:表位定位分析

[0551] 使用氢/氘交换质谱(HDX-MS)与正交共价标记足迹技术(诸如蛋白质的快速光化学氧化(FPOP)和甘氨酸乙酯标记(GEE))的组合来探测在与抗体A相互作用后的hIL7R $\alpha$ 的结合表位。

[0552] HDX-MX

[0553] 在表位定位实验前,进行未氘化实验以生成内部生成的重组人类hIL7R $\alpha$ (10 $\mu$ M)的共有肽和hIL7R $\alpha$ 与抗体A的Fab的蛋白质复合物(1:1摩尔比)的列表。将样品注射至Waters Enzymate BEH胃蛋白酶柱(2.1×30mm)中,并且在15°C下消化3min。将UPLC系统的冷却腔室(其容纳所有色谱元件)保持在0.0±0.1°C下持续整个测量时间。截获所注射肽并在40 $\mu$ L/min下去盐3min,并且随后以65 $\mu$ L/min,用5-40%乙腈-水梯度,分离6min。分离柱为含有1.7 $\mu$ m颗粒的1.0mm×100.0mm ACQUITY UPLC BEH C18柱(Waters),并且平均背压为8500psi,0.1°C。使用Xevo G2质谱仪来进行数据获取。仪器构型如下:毛细管电压3.2kV,截获碰撞能量6V,取样锥电压35V,源温度80°C和去溶剂化温度175°C。获得在100至1900的m/z范围内的

质谱。通过用500nM[Glu1]-纤维蛋白肽B校准来确保质量准确性，并且在所有实验中，其小于10ppm。消化肽的鉴别利用精确质量分析和MSE的组合，使用ProteinLynx Global SERVER 2.5(Waters)来实现。

**[0554]** 在HDX-MS实验中，将5 $\mu$ L各样品(分别为hIL7R $\alpha$ 或hIL7R $\alpha$ /抗体A的Fab)稀释至55 $\mu$ L D<sub>2</sub>O缓冲液(10mM磷酸盐缓冲液，D<sub>2</sub>O，pH 7.0)中，以起始标记反应。反应进行不同时间段：1min、10min和240min。在每个标记反应时段结束时，通过添加淬灭缓冲液(具有4M GdnCl和0.4M TCEP的100mM磷酸盐缓冲液，pH 2.5, 1:1, v/v)来淬灭反应。使用与未氘化实验严格相同的条件，在线消化50 $\mu$ L已淬灭样品。所有比较实验均在相同实验条件下进行，使得不针对反交换来校正氘水平并因此将氘水平报导为相对值。所有实验均重复两次。在此实验配置中，测量每种肽的质量的误差为 $\pm 0.20$ Da，与先前获得的值一致。通过从来自氘标记样品的肽离子的同位素分布的质心减去来自非氘化蛋白质的肽离子的同位素分布的质心，来计算氘吸收。用软件程序DYNAMX 3.0<sup>TM</sup>(Waters)，对所得相对氘水平相对于交换时间作图。

**[0555]** FFOP

**[0556]** 对于hIL7R $\alpha$ 和hIL7R $\alpha$ /Fab(抗体A)复合物(1:1摩尔比，10 $\mu$ M最终浓度)进行FPOP实验。使用KrF准分子激光，通过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>光解来产生羟基自由基，并且激发波长设定为248nm。在即将标记前，将各自5 $\mu$ L的组氨酸和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加至蛋白质等分试样中。蛋白溶液的最终容积为50 $\mu$ L，并且组氨酸和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的最终浓度分别为500 $\mu$ M和15mM。将激光能量调整至28mJ/脉冲(7.4Hz)。FPOP和无激光对照实验均重复三次。在含有11 $\mu$ L淬灭溶液(800nM过氧化氢酶四聚体和200mM甲硫氨酸)的微量离心管中收集每种重复。使样品变性，还原，烷基化，并且用胰凝乳蛋白酶消化。在具有Waters Acuity UPLC系统的Thermo Q Exactive Plus质谱仪上进行数据获取。使用Byonic搜索引擎来提供测序覆盖并鉴别氧化位点。使用Byologic软件(Protein Metrics, San Carlos, CA)来计算胰蛋白酶肽的相对氧化水平。仅考虑在游离态和结合态之间的相对氧化上具有统计学上显著差异(基于student T测试p值<0.01)的肽用于进一步分析。残基水平分析用Byologic软件来完成并且对每种重复进行人工验证。仅考虑在游离hIL7R $\alpha$ 与hIL7R $\alpha$ /Fab-抗体A之间的氧化上具有统计学上显著差异的残基(基于student T测试p值<0.01)为受保护残基。

**[0557]** GEE标记

**[0558]** 通过在室温下，将10 $\mu$ L各样品(hPAI1或hPAI1/mAb, 1mg/mL)与1 $\mu$ L 2M GEE和1 $\mu$ L 50mM 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)混合1min，来起始GEE标记。通过向样品中添加10 $\mu$ L 1M乙酸铵来淬灭反应。使17.5 $\mu$ L每种GEE标记样品经受酶促消化。使样品在0.5%Rapigest表面活性剂存在下变性，在56°C下用DTT还原30min，在室温下于暗处用IAM烷基化30min，并在37°C下于Tris pH7.4中用胰凝乳蛋白酶消化过夜，随后酸性淬灭。在Thermo Q ExactivePlus质谱法上分析已消化样品，并且监测在不存在/存在抗体A下hIL7R $\alpha$ 上的GEE修饰水平。

**[0559]** 结果

**[0560]** 如图9中所示，使用HDX-MS分析，获得97.3%的hIL7R的序列覆盖。分析显示以下非连续表位(其涵盖hIL7R内的四个不同区)：(i) 区1, <sup>24</sup>SQLLEVNGSQHSLTCAF<sup>39</sup>；(ii) 区2, <sup>73</sup>FIETKKFLLIGKSNIC<sup>88</sup>、<sup>89</sup>VKGEGKSLTCKKIDLT<sup>105</sup>；(iii) 区3, <sup>136</sup>QKKYVKVLMHDVAY<sup>149</sup>；和(iv) 区4, <sup>181</sup>YEIKVRSIPDHYFKGF<sup>196</sup>。基于相对氘吸收差异，可将肽区排名为区1>2、3、4，其中区1具有

最显著的氘吸收变化(图10)。

[0561] 利用FPOP分析,鉴别出hIL7R的以下五种表位: (i) 区1, <sup>24</sup>SQLEVNGSQHS<sup>35</sup>; (ii) 区2, <sup>73</sup>FIETKKF<sup>79</sup>和<sup>80</sup>LLIGKSNICVKVGEKSL<sup>95</sup>; (iii) 区3, <sup>144</sup>MHDVAY<sup>149</sup>; 和 (iv) 区4, <sup>182</sup>EIKVRSIPDH<sup>193</sup>。这些表位与上述使用HDX-MS分析所鉴别出的非连续区重叠。此外,如表9中所示,与对照相比,所鉴别出的表位也呈现氧化水平降低。鉴别出如下最受保护的残基: (i) 区1, H33; (ii) 区2, F79、I82和K84; (iii) 区3, M144; 和 (iv) 区4, R186、H191和Y192。

[0562] 表9. 在对hIL7R $\alpha$ 的胰凝乳蛋白酶肽进行FPOP后的残基氧化水平扩充

肽	<sup>24</sup> <b>SQLEV</b> <b>GSQHSL</b> <sup>35</sup>	<sup>73</sup> <b>FIETKK</b> <b>F</b> <sup>79</sup>		<sup>80</sup> <b>LLIGKSNI</b> <b>CVKVGEKS</b> <b>L</b> <sup>96</sup>		<sup>144</sup> <b>MHDVAY</b> <sup>149</sup>			<sup>182</sup> <b>EIKVRSIPDH</b> <b>YF</b> <sup>193</sup>		
氨基酸残基编号	H33	F73	F79	I82	K84	M144	H14 5	Y14 9	R186	H191	Y192
氧化% IL7R	0.13	1.40	0.83	3.35	1.25	29.22	0.05	0.36	1.15	0.09	2.61
氧化% IL7R-抗体 A	0.07	1.35	0.38	1.18	0.37	16.42	0.05	0.33	0.19	0.03	0.28
P 值	0.001	0.287 3	0.000 1	0.0000	0.0001	0.000 1	0.10 7	0.29 6	0.00 01	0.0000 02	0.000 001
STDEV(IL7R)	0.01	0.09	0.07	0.09	0.12	0.93	0.00	0.04	0.12	0.00	0.09
STDEV(IL7R-抗体 A)	0.01	0.09	0.05	0.13	0.02	1.64	0.00	0.07	0.02	0.00	0.04

[0564] 与hIL7R $\alpha$ 对照相比,在与抗体A结合后显示氧化水平上具有显著差异(p值<0.01)的残基被视为最受保护的残基。计算值表示n=3个重复/条件。

[0565] 最后,GEE标记(其用于提供关于具有有限氧化倾向的残基的补充数据,所述残基可能对于FPOP无反应,特别为天冬氨酸和谷氨酸),鉴别E75为在与抗体A相互作用后hIL7R $\alpha$ 上最受保护的残基(表10)。

[0566] 表10. hIL7R $\alpha$ 的胰凝乳蛋白酶肽的GEE标记的扩充

肽	<sup>24</sup> SQLLEV DGS QHSL <sup>35</sup>	<sup>73</sup> FIETK KF <sup>79</sup>	<sup>80</sup> LLIGKS NICVK VGEKSL <sup>96</sup>	<sup>144</sup> MHDV AY <sup>149</sup>	<sup>182</sup> EIKVRSI PDHYF <sup>193</sup>
残基编号	E27	E75	E93	D146	E182/D190
GEE 标记% IL7R	0.16	4.07	0.76	ND	1.75
GEE 标记% IL7R-抗体 A	0.16	2.65	0.65	ND	1.43
P 值	0.460	0.004	0.020	NA	0.017
STDEV(IL7R )	0.01	0.27	0.06	NA	0.13
STDEV(IL7R mAb)	0.02	0.42	0.02	NA	0.12

[0568] 与hIL7R $\alpha$ 对照相比,在与抗体A结合后显示GEE标记水平上具有显著差异(p值<0.01)的残基被视为最受保护的残基。计算表示n=2个重复/条件。

[0569] 基于以上分析,在与抗体A相互作用后,将hIL7R $\alpha$ 的表位定位于hIL7R $\alpha$ 的线性序列上(图11A)并且进一步定位于晶体结构上(图11B)。

[0570] 总之,氢/氘交换质谱(HDX-MS)实验指示,人类IL7R $\alpha$ 上的抗体A结合位点定位于以下肽序列中的残基:<sup>24</sup>SQLLEV NGSQHSLTCAF<sup>39</sup>、<sup>73</sup>FIETKFKLLIGKS NIC<sup>88</sup>、<sup>89</sup>VKVGEKSLTCKKIDLTT<sup>105</sup>、<sup>136</sup>QKKYVKVLMHDVAY<sup>149</sup>和<sup>181</sup>YEIKVRSIPDHYFKGF<sup>196</sup>。额外基于质谱法的蛋白质足迹法(包括FPOP和GEE标记)提供在以下氨基酸中人类IL7R $\alpha$ 上的抗体A结合位点的氨基酸解析:H33、E75、F79、I82、K84、M144、R186、H191和Y192。

[0571] 实施例10:预测的人类剂量

[0572] 使用近年来针对PFE A3312F所报导的靶标介导的药物处置机制模型nbc.aapsmeeting.org/event/member/373852),预测本文所公开的抗IL-7R抗体的人类PK/RO/PD(图12A和12B)。在人类临床研究中,此机制模型能够捕获在施用PFE A3312F mAb后PK/RO/PD的时程。

[0573] 启用抗IL-7R抗体的人类PK和PD的模拟,尽管大部分模型参数类似于所报导模型,但人类中的清除呈现低2倍(相对于PFE A3312F)。这由在药理学相关剂量(3mg/kg;图4)下,CL比在猴中观测到的A3312F低2倍所支持。另外,在猴与人类之间,特别地在pH7.4下,抗IL-7R抗体的结合亲和力类似(参见实施例3)。因此,PK预测设想,CL中的此差异将转换至人类上。鉴于本发明抗IL-7R抗体和A3312F在猴中的体内效能类似(图5),设想这些两种抗体将在人类中类似。

[0574] 通过在每两周一次给药后在低谷下靶向95%RO来预测人类有效剂量。猴PK/PD研究表明,大于95%RO引起pSTAT5的90%抑制。参见实施例3。因此,使用RO而非pSTAT5覆盖来用于剂量预测,这是因为pSTAT5抑制在猴和人类中更为不同。

[0575] 整合以上信息,估计对于70kg成年人,每隔一周(Q2W)110mg的维持SC剂量将在用本发明抗IL-7R抗体治疗期间实现95%IL-7R RO。使得能够在第一剂量后实现此RO的SC负载剂量计算为140mg(图13)。

[0576] 预测在此剂量下的人类稳态暴露和PK参数列于表11中。如所预期,归因于非线性

药代动力学,保护所预测的人类中的抗IL-7R抗体的半衰期随着剂量增加而增加。在110mg的有效剂量下,预测半衰期为53小时,但估计其在更高剂量下将为更长(例如在125mg下为85小时)。

[0577] 表11.在NSG-人-类PBMC转移小鼠中单次IV剂量后的药代动力学参数

[0578]	PK 参数	抗 IL-7R 抗体的预测人类剂量和 PK 参数估计值
		每 2 周 110 mg SC
	$C_{max,ss}$ (nM)	40.6
	$AUC(\tau)_{ss}$ (nM*h)	7893
	CL (mL/h/kg)	0.56
	C 波谷 $ss$ (nM)	6.0
	终末 $T_{1/2}$ (h)	53

[0579] 实施例11:抗体18B1的突变扫描分析

[0580] 为了进行突变扫描,首先将抗体18B1(抗体A,表12)重新格式化为scFv,并且经由mRNA显示确认针对全长hIL-7R结合的结合(XuL等人(2002)Chemistry&Biology 9:933; Roberts RW和JW Szostak(1997)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:12297;Kurz等人(2000)Nucleic Acids Res.28(18):E83)。重新格式化的抗体的结合数据提供于图14A和图14B中。

[0581] 一旦确认结合,接下来构建突变扫描文库,其中所含的每种文库变体仅为CDR内的单一突变。抗体的所有六个CDR均为突变型,其中CDR中的各位置在彼位置处突变成所有可能氨基酸。进行突变的特定位置示出于图15中。使用mRNA显示进行针对hIL-7R的单轮选择,获取此18B1scFv变体文库。所述单轮选择的结果提供于图16中。通过下一代测序(NGS)来分析选择输出(Selection output),并且产生热图以观察NGS数据且容易地鉴别1)对于结合而言关键的CDR位置,2)其中突变为抗性的CDR位置和3)可改进抗体与hIL-7R的结合的突变。图17A和图17B提供整体方法的示意图。热图结果提供于图18A-图18F中。

[0582] 制备18B1抗体的丙氨酸取代变体以确认以上NGS数据。简言之,设计其中将单一丙氨酸突变引入至CDR中的位置中的一系列单一突变变体。对于六个CDR的所有位置进行此操作,已编码丙氨酸的CDR位置除外。这些丙氨酸取代变体均为基因合成的,在Expi293中暂时表达为IgG1.3,并且使用蛋白A树脂纯化。

[0583] 经由biacore,测试18B1和丙氨酸取代变体的其与hIL-7R的结合。简言之,使用CM5芯片(在芯片表面上具有Fc)来捕获12.5nM抗体,引入含30、10和3.3nM hIL-7R的HBS-P(pH 7.4,37°C)作为配体。参见图20A和20B。使用此方法获得每种变体与hIL-7R结合的亲和力( $K_d$ ),并且与经由同一变体的NGS热图分析获得的富集比率(ER)进行比较。图19提供各抗体变体的所述值。

[0584] 如图21中所示,若干18B1变体能够以与18B1抗体(即,抗体A)类似的亲和力与hIL-7R结合。并且如图22和图23中所示,重链CDR3和轻链CDR3的丙氨酸突变似乎对于结合具有最大影响。最后,如图24中所示,热图中显示的结果与丙氨酸变体的所测量 $K_d$ 值具有良好相关性。图25提供18B1抗体的Fab片段的晶体结构,其中显示对于结合而言关键的残基(红色)和可改进结合的残基(蓝色)。

[0585] 实施例12:在与IL-7受体 $\alpha$ 链(IL-7R $\alpha$ )结合后的18B1抗体的内化分析

[0586] 为了进一步表征本文所公开的抗IL-7R抗体,测试18B1抗体(即,抗体A)在与猴白

血球上表达的IL-7R $\alpha$ 结合后的内化。简言之,食蟹猴接受皮下施用以下剂量中的一者的18B1抗体: (i) 2mg/kg、(ii) 10mg/kg和(iii) 50mg/kg。并未接受18B1抗体的动物用作对照。随后,在施用后的不同时间点,从动物收集外周血液,并且使用流式细胞术评定CD3+白血球上的IL-7R $\alpha$ 表达的平均荧光强度(MFI)。

[0587] 如图26中所示,CD3+白血球上的IL-7R $\alpha$ 表达在实验持续时间在用18B1抗体处理的所有动物中很大程度上保持一致。与对照动物相比,施用18B1抗体并不引起CD3+白血球上的IL-7R $\alpha$ 的表达降低。

[0588] 此结果表明,本文所公开的18B1抗体在结合后并不诱导IL-7R $\alpha$ 的内化,这确认所述抗体不具有任何激动作用。

[0589] 实施例13:18B1抗体的效能的分析

[0590] 本文所公开的抗IL-7R抗体的效能评定,测量18B1抗体抑制钥孔戚血蓝蛋白(KLH)诱导的抗体反应的能力。简言之,食蟹猴(雄性和雌性两者)接受皮下施用以下剂量中的一者的18B1抗体: (i) 2mg/kg、(ii) 10mg/kg和(iii) 50mg/kg。并未接受18B1抗体的动物用作对照。随后,在施用抗体后第15天,所有动物均用KLH(10mg;在后四头肌中肌肉内)进行免疫接种。随后,在不同时间点,从动物(从股静脉、头部静脉或隐静脉)收集外周血液,并且使用ELISA来测量血清中的KLH特异性IgM和IgG抗体的端点效价(endpoint titer, EPT)。

[0591] 如图27A和图27B中所示,在用KLH免疫接种后,在所有处理组中均观测到KLH特异性IgM和IgG抗体增加。对于KLH特异性IgM反应,处理组间不存在显著差异(参见图27A)。然而,在用18B1抗体处理的动物中,与对照动物(即,用KLH进行免疫接种但并未接受18B1抗体的动物)相比,在KLH免疫接种2(“第29天”)、3(“第36天”)和4(“第43天”)周后,KLH特异性IgG反应统计学上显著降低(至多80%抑制)(参见图27B)。所观测到的KLH特异性IgG反应的抑制为剂量非依赖性的,因为不论剂量用18B1抗体处理的所有动物中的反应呈现为相当的。

[0592] 以上数据表明,所公开抗IL-7R抗体的效能,并且即使在低至2mg/kg的剂量下,18B1抗体可有效地抑制KLH特异性IgG反应。不受任何理论束缚,KLH特异性IgG而非IgM反应的抑制表明,18B1抗体可抑制进行同型转换的B细胞中的抗体类别转换重组。

[0593] 实施例14:额外表位定位分析

[0594] 为了进一步表征本发明的抗IL-7R抗体,测定三种参考抗体(即,4A8、13A10和PFE A3312F)的结合表位,并且与抗体18B1(抗体A,表12)的结合表位进行比较。如先前在实施例9中所描述测定结合表位。

[0595] 如图28A至图28C中所示,基于HDX-MS实验,4A8抗体的结合位点定位于以下肽序列中的残基: (i)  $^{57}\text{LVEVKCLNF}^{65}$ 、(ii)  $^{73}\text{FIETKKFLIGKSNIC}^{88}$ 、(iii)  $^{136}\text{QKKYVKVLHMHDVAY}^{149}$ 和(iv)  $^{181}\text{YEIKVRSIPDHYFKGF}^{196}$ 。13A10抗体的结合位点定位于以下肽序列: (i)  $^{73}\text{FIETKKFLIGKSNIC}^{88}$ 、(ii)  $^{89}\text{VKVGEKSLTCKKIDLTT}^{105}$ 、(iii)  $^{136}\text{QKKYVKVLHMHDVAY}^{149}$ 和(iv)  $^{181}\text{YEIKVRSIPDHYFKGF}^{196}$ 。并且PFE A3312F的结合位点定位于以下肽序列: (i)  $^{24}\text{SQLEVNGSQHSLTCA}^{38}$ 、(ii)  $^{52}\text{EICGALVEVKCLNF}^{65}$ 、(iii)  $^{73}\text{FIETKKFLIGKSNIC}^{88}$ 、(iv)  $^{89}\text{VKVGEKSLTCKKIDLTT}^{105}$ 、(v)  $^{104}\text{TTIVKPEAPFDLSV}^{117}$ 、(vi)  $^{109}\text{PEAPFDLSVIYRE}^{121}$ 、(vii)  $^{136}\text{QKKYVKVLHMHDVAY}^{149}$ 、(viii)  $^{169}\text{TLLQRKLQPAAM}^{180}$ 和(ix)  $^{181}\text{YEIKVRSIPDHYFKGF}^{196}$ 。图29A至图29C示出定位于人类IL-7R $\alpha$ 蛋白的晶体结构上的4A8、13A10和PFE A3312F的结合位点。

[0596] 与实施例9中提供的数据相比(还参见图10和图11B),以上结果表明,本申请中所公开的抗体18B1与人类IL-7R $\alpha$ 蛋白上的与此实施例中所描述的参考抗体不同的区结合。

[0597] 表12.

SE Q ID	描述	序列
19	抗 IL-7R 抗体(抗体 A)重链可变区 (VH)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDHAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWNSRGIGYADSVKGR FTIFRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDEY SRGYYVLDVGQGTTVTVSS
20	抗 IL-7R 抗体(抗体 A)轻链可变区 (VL)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAW YQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLWITFGQGTR LEIK
21	抗 IL-7R 抗体(抗体 A)重链	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDHAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWNSRGIGYADSVKGR FTIFRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDEY SRGYYVLDVGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPEA EGAPSVFLFPPKPKDTLmisRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV

SE Q ID	描述	序列
		VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
22	抗 IL-7R 抗体(抗体 A)轻链	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAW YQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLWITFGQGTR LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

[0600] 表13.示例性重链CDR1序列

	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
[0601]	“18B1” (SEQ ID NO: 31)	G	F	T	F	D	D	H	A	M
	F27Y (SEQ ID NO: 32)	G	Y	T	F	D	D	H	A	M
	T28P (SEQ ID NO: 33)	G	F	P	F	D	D	H	A	M
	T28A (SEQ ID NO: 34)	G	F	A	F	D	D	H	A	M
	T28V (SEQ ID NO: 35)	G	F	V	F	D	D	H	A	M
	T28L (SEQ ID NO: 36)	G	F	L	F	D	D	H	A	M
	T28I (SEQ ID NO: 37)	G	F	I	F	D	D	H	A	M
	T28M (SEQ	G	F	M	F	D	D	H	A	M

[0602]	ID NO: 38)												
	T28H (SEQ ID NO: 39)	G	F	H	F	D	D	H	A	M	M	H	
	T28F (SEQ ID NO: 40)	G	F	F	F	D	D	H	A	M	M	H	
	T28Y (SEQ ID NO: 41)	G	F	Y	F	D	D	H	A	M	M	H	
	T28N (SEQ ID NO: 42)	G	F	N	F	D	D	H	A	M	M	H	
	T28D (SEQ ID NO: 43)	G	F	D	F	D	D	H	A	M	M	H	
	T28E (SEQ ID NO: 44)	G	F	E	F	D	D	H	A	M	M	H	
	T28Q (SEQ ID NO: 45)	G	F	Q	F	D	D	H	A	M	M	H	
[0603]	M34L (SEQ ID NO: 46)	G	F	T	F	D	D	H	A	L	L	H	

表14.示例性重链CDR2序列

	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
“18B1” (SEQ ID NO: 14)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	K	G
S52T (SEQ ID NO: 47)	G	I	T	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	K	G
N53H (SEQ ID NO: 48)	G	I	S	W	H	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	K	G
I57V	G	I	S	W	N	S	R	G	V	G	Y	A	D	S	V	K	G

[0605]

	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
(SEQ ID NO: 49)																	
A60G (SEQ ID NO: 50)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	G	D	S	V	K	G
A60S (SEQ ID NO: 51)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	S	D	S	V	K	G
A60T (SEQ ID NO: 52)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	T	D	S	V	K	G
A60V (SEQ ID NO: 53)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	V	D	S	V	K	G
A60L (SEQ ID NO: 54)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	L	D	S	V	K	G
A60I (SEQ ID NO: 55)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	I	D	S	V	K	G
A60R (SEQ ID NO: 56)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	R	D	S	V	K	G
A60H (SEQ ID NO: 57)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	H	D	S	V	K	G
A60N (SEQ ID NO: 58)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	N	D	S	V	K	G
D61P (SEQ ID NO: 59)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	P	S	V	K	G
D61T (SEQ ID NO: 60)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	T	S	V	K	G
D61N (SEQ ID NO: 61)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	N	S	V	K	G
D61E (SEQ ID NO: 62)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	E	S	V	K	G
D61Q	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	Q	S	V	K	G

[0606]

	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
(SEQ ID NO: 63)																	
D61S (SEQ ID NO: 64)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	S	S	V	K	G
D61H (SEQ ID NO: 65)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	H	S	V	K	G
S62P (SEQ ID NO: 66)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	P	V	K	G
S62G (SEQ ID NO: 67)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	G	V	K	G
S62A (SEQ ID NO: 68)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	A	V	K	G
S62T (SEQ ID NO: 69)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	T	V	K	G
S62V (SEQ ID NO: 70)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	V	V	K	G
S62R (SEQ ID NO: 71)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	R	V	K	G
S62H (SEQ ID NO: 72)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	H	V	K	G
S62F (SEQ ID NO: 73)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	F	V	K	G
S62Y (SEQ ID NO: 74)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	Y	V	K	G
S62N (SEQ ID NO: 75)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	N	V	K	G
S62D (SEQ ID NO: 76)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	D	V	K	G
S62E	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	E	V	K	G

[0607]

	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
(SEQ ID NO: 77)																	
V63I (SEQ ID NO: 78)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	I	K	G
K64A (SEQ ID NO: 79)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	A	G
K64S (SEQ ID NO: 80)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	S	G
K64T (SEQ ID NO: 81)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	T	G
K64V (SEQ ID NO: 82)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	V	G
K64L (SEQ ID NO: 83)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	L	G
K64I (SEQ ID NO: 84)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	I	G
K64M (SEQ ID NO: 85)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	M	G
K64R (SEQ ID NO: 86)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	R	G
K64H (SEQ ID NO: 87)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	H	G
K64F (SEQ ID NO: 88)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	F	G
K64Y (SEQ ID NO: 89)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	Y	G
K64N (SEQ ID NO: 90)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	N	G
K64D	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	D	G

[0608]

	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
(SEQ ID NO: 91)																	
K64E (SEQ ID NO: 92)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	E	G
K64Q (SEQ ID NO: 93)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	Q	G
G65H (SEQ ID NO: 94)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	K	H
G65D (SEQ ID NO: 95)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	K	D
G65Q (SEQ ID NO: 96)	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	K	Q

[0609] 表15.示例性重链CDR3序列

[0610]

	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	101	102
“18B1” (SEQ ID NO: 15)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	V	L	D	V
S98T (SEQ ID NO: 97)	D	E	Y	T	R	G	Y	Y	V	L	D	V
S98N (SEQ ID NO: 98)	D	E	Y	N	R	G	Y	Y	V	L	D	V
S98D (SEQ ID NO: 99)	D	E	Y	D	R	G	Y	Y	V	L	D	V
S98E (SEQ ID NO: 100)	D	E	Y	E	R	G	Y	Y	V	L	D	V
R99L (SEQ ID NO: 101)	D	E	Y	S	L	G	Y	Y	V	L	D	V
R99M (SEQ ID NO:	D	E	Y	S	M	G	Y	Y	V	L	D	V

	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	101	102	
102)													
R99S (SEQ ID NO: 103)	D	E	Y	S	S	G	Y	Y	V	L	D	V	
[0611]	V100cG (SEQ ID NO: 104)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	G	L	D	V
	V100cA (SEQ ID NO: 105)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	A	L	D	V
	V100cS (SEQ ID NO: 106)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	S	L	D	V
	V100cT (SEQ ID NO: 107)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	T	L	D	V
	V100cM (SEQ ID NO: 108)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	M	L	D	V
	V100cN (SEQ ID NO: 109)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	N	L	D	V
	V100cE (SEQ ID NO: 110)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	E	L	D	V
	V100cQ (SEQ ID NO: 111)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	Q	L	D	V
	V102A (SEQ ID NO: 112)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	V	L	D	A
	V102S (SEQ ID NO: 113)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	V	L	D	S
	V102T (SEQ ID NO:	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	V	L	D	T

	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	101	102
114)												
V102R (SEQ ID NO: 115)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	V	L	D	R
V102H (SEQ ID NO: 116)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	V	L	D	H
V102Y (SEQ ID NO: 117)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	V	L	D	Y
V102W (SEQ ID NO: 118)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	V	L	D	W
V102N (SEQ ID NO: 119)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	V	L	D	N
V102E (SEQ ID NO: 120)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	V	L	D	E
V102Q (SEQ ID NO: 121)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	V	L	D	Q
V102M (SEQ ID NO: 122)	D	E	Y	S	R	G	Y	Y	V	L	D	M

[0612] 表16.示例性轻链CDR1序列

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
“18B1” (SEQ ID NO: 16)	R	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A
R24S (SEQ ID NO: 123)	S	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A
R24T (SEQ	T	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
ID NO: (SEQ ID NO: 124)												
R24V (SEQ ID NO: 125)	V	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A	
R24K (SEQ ID NO: 126)	K	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A	
R24H (SEQ ID NO: 127)	H	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A	
R24Y (SEQ ID NO: 128)	Y	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A	
R24I (SEQ ID NO: 129)	I	A	S	Q	G	I	S	S	A	L	A	
[0615]	A25S (SEQ ID NO: 130)	R	S	S	Q	G	I	S	S	A	L	A
	A25T (SEQ ID NO: 131)	R	T	S	Q	G	I	S	S	A	L	A
	A25V (SEQ ID NO: 132)	R	V	S	Q	G	I	S	S	A	L	A
	S26P (SEQ ID NO: 133)	R	A	P	Q	G	I	S	S	A	L	A
	S26G (SEQ ID NO: 134)	R	A	G	Q	G	I	S	S	A	L	A
	S26A (SEQ ID NO: 135)	R	A	A	Q	G	I	S	S	A	L	A
	S26T (SEQ	R	A	T	Q	G	I	S	S	A	L	A

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
ID NO: (SEQ ID NO: 136)											
S26V (SEQ ID NO: 137)	R	A	V	Q	G	I	S	S	A	L	A
S26L (SEQ ID NO: 138)	R	A	L	Q	G	I	S	S	A	L	A
S26I (SEQ ID NO: 139)	R	A	I	Q	G	I	S	S	A	L	A
S26M (SEQ ID NO: 140)	R	A	M	Q	G	I	S	S	A	L	A
S26K (SEQ ID NO: 141)	R	A	K	Q	G	I	S	S	A	L	A
S26R (SEQ ID NO: 142)	R	A	R	Q	G	I	S	S	A	L	A
S26H (SEQ ID NO: 143)	R	A	H	Q	G	I	S	S	A	L	A
S26N (SEQ ID NO: 144)	R	A	N	Q	G	I	S	S	A	L	A
S26E (SEQ ID NO: 145)	R	A	E	Q	G	I	S	S	A	L	A
S26Q (SEQ ID NO: 146)	R	A	Q	Q	G	I	S	S	A	L	A
Q27P (SEQ ID NO: 147)	R	A	S	P	G	I	S	S	A	L	A
Q27G (SEQ	R	A	S	G	G	I	S	S	A	L	A

[0617]

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
ID NO: (148)											
Q27A (SEQ ID NO: 149)	R	A	S	A	G	I	S	S	A	L	A
Q27S (SEQ ID NO: 150)	R	A	S	S	G	I	S	S	A	L	A
Q27T (SEQ ID NO: 151)	R	A	S	T	G	I	S	S	A	L	A
Q27V (SEQ ID NO: 152)	R	A	S	V	G	I	S	S	A	L	A
Q27L (SEQ ID NO: 153)	R	A	S	L	G	I	S	S	A	L	A
Q27I (SEQ ID NO: 154)	R	A	S	I	G	I	S	S	A	L	A
Q27M (SEQ ID NO: 155)	R	A	S	M	G	I	S	S	A	L	A
Q27H (SEQ ID NO: 156)	R	A	S	H	G	I	S	S	A	L	A
Q27F (SEQ ID NO: 157)	R	A	S	F	G	I	S	S	A	L	A
Q27Y (SEQ ID NO: 158)	R	A	S	Y	G	I	S	S	A	L	A
Q27N (SEQ ID NO: 159)	R	A	S	N	G	I	S	S	A	L	A
Q27D (SEQ	R	A	S	D	G	I	S	S	A	L	A

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
ID NO: (160)											
Q27E (SEQ ID NO: 161)	R	A	S	E	G	I	S	S	A	L	A
G28P (SEQ ID NO: 162)	R	A	S	Q	P	I	S	S	A	L	A
G28A (SEQ ID NO: 163)	R	A	S	Q	A	I	S	S	A	L	A
G28S (SEQ ID NO: 164)	R	A	S	Q	S	I	S	S	A	L	A
G28T (SEQ ID NO: 165)	R	A	S	Q	T	I	S	S	A	L	A
[0618] G28H (SEQ ID NO: 166)	R	A	S	Q	H	I	S	S	A	L	A
G28E (SEQ ID NO: 167)	R	A	S	Q	E	I	S	S	A	L	A
G28Q (SEQ ID NO: 168)	R	A	S	Q	Q	I	S	S	A	L	A
G28M (SEQ ID NO: 169)	R	A	S	Q	M	I	S	S	A	L	A
G28N (SEQ ID NO: 170)	R	A	S	Q	N	I	S	S	A	L	A
G28D (SEQ ID NO: 171)	R	A	S	Q	D	I	S	S	A	L	A
I29P	R	A	S	Q	G	P	S	S	A	L	A

[0619]

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
(SEQ ID NO: 172)											
I29G (SEQ ID NO: 173)	R	A	S	Q	G	G	S	S	A	L	A
I29A (SEQ ID NO: 174)	R	A	S	Q	G	A	S	S	A	L	A
I29S (SEQ ID NO: 175)	R	A	S	Q	G	S	S	S	A	L	A
I29T (SEQ ID NO: 176)	R	A	S	Q	G	T	S	S	A	L	A
I29V (SEQ ID NO: 177)	R	A	S	Q	G	V	S	S	A	L	A
I29L (SEQ ID NO: 178)	R	A	S	Q	G	L	S	S	A	L	A
I29N (SEQ ID NO: 179)	R	A	S	Q	G	N	S	S	A	L	A
S30T (SEQ ID NO: 180)	R	A	S	Q	G	I	T	S	A	L	A
S30V (SEQ ID NO: 181)	R	A	S	Q	G	I	V	S	A	L	A
S30L (SEQ ID NO: 182)	R	A	S	Q	G	I	L	S	A	L	A
S30I (SEQ ID NO: 183)	R	A	S	Q	G	I	I	S	A	L	A
S30M	R	A	S	Q	G	I	M	S	A	L	A

	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
(SEQ ID NO: 184)												
S30H (SEQ ID NO: 185)	R	A	S	Q	G	I	H	S	A	L	A	
S30F (SEQ ID NO: 186)	R	A	S	Q	G	I	F	S	A	L	A	
S30Y (SEQ ID NO: 187)	R	A	S	Q	G	I	Y	S	A	L	A	
S30N (SEQ ID NO: 188)	R	A	S	Q	G	I	N	S	A	L	A	
[0620]	S30D (SEQ ID NO: 189)	R	A	S	Q	G	I	D	S	A	L	A
	S30E (SEQ ID NO: 190)	R	A	S	Q	G	I	E	S	A	L	A
	S30Q (SEQ ID NO: 191)	R	A	S	Q	G	I	Q	S	A	L	A
	A32P (SEQ ID NO: 192)	R	A	S	Q	G	I	S	S	P	L	A
	L33A (SEQ ID NO: 193)	R	A	S	Q	G	I	S	S	A	A	A
	L33V (SEQ ID NO: 194)	R	A	S	Q	G	I	S	S	A	V	A

[0621] 表17.示例性轻链CDR2序列

	50	51	52	53	54	55	56
--	----	----	----	----	----	----	----

[0623]

	50	51	52	53	54	55	56
“18B1” (SEQ ID NO: 17)	D	A	S	S	L	E	S
A51G (SEQ ID NO: 195)	D	G	S	S	L	E	S
A51S (SEQ ID NO: 196)	D	S	S	S	L	E	S
A51M (SEQ ID NO: 197)	D	M	S	S	L	E	S
A51H (SEQ ID NO: 198)	D	H	S	S	L	E	S
A51N (SEQ ID NO: 199)	D	N	S	S	L	E	S
A51D (SEQ ID NO: 200)	D	D	S	S	L	E	S
A51E (SEQ ID NO: 201)	D	E	S	S	L	E	S
A51Q (SEQ ID NO: 202)	D	Q	S	S	L	E	S
S52G (SEQ ID NO: 203)	D	A	G	S	L	E	S
S52A (SEQ ID NO: 204)	D	A	A	S	L	E	S
S52T (SEQ ID NO: 205)	D	A	T	S	L	E	S
S52V (SEQ ID NO: 206)	D	A	V	S	L	E	S
S52M (SEQ ID NO: 207)	D	A	M	S	L	E	S
S52H (SEQ ID NO: 208)	D	A	H	S	L	E	S
S52F (SEQ ID NO: 209)	D	A	F	S	L	E	S

[0624]

	50	51	52	53	54	55	56
S52Y (SEQ ID NO: 210)	D	A	Y	S	L	E	S
S52N (SEQ ID NO: 211)	D	A	N	S	L	E	S
S52D (SEQ ID NO: 212)	D	A	D	S	L	E	S
S52E (SEQ ID NO: 213)	D	A	E	S	L	E	S
S52Q (SEQ ID NO: 214)	D	A	Q	S	L	E	S
S53A (SEQ ID NO: 215)	D	A	S	A	L	E	S
S53F (SEQ ID NO: 216)	D	A	S	F	L	E	S
S53Y (SEQ ID NO: 217)	D	A	S	Y	L	E	S
S53W (SEQ ID NO: 218)	D	A	S	W	L	E	S
S53N (SEQ ID NO: 219)	D	A	S	N	L	E	S
S53D (SEQ ID NO: 220)	D	A	S	D	L	E	S
S53E (SEQ ID NO: 221)	D	A	S	E	L	E	S
S53L (SEQ ID NO: 222)	D	A	S	L	L	E	S
L54P (SEQ ID NO: 223)	D	A	S	S	P	E	S
L54S (SEQ ID NO: 224)	D	A	S	S	S	E	S
L54T (SEQ ID NO: 225)	D	A	S	S	T	E	S

	50	51	52	53	54	55	56
L54K (SEQ ID NO: 226)	D	A	S	S	K	E	S
L54H (SEQ ID NO: 227)	D	A	S	S	H	E	S
L54N (SEQ ID NO: 228)	D	A	S	S	N	E	S
E55D (SEQ ID NO: 229)	D	A	S	S	L	D	S
E55Q (SEQ ID NO: 230)	D	A	S	S	L	Q	S
S56G (SEQ ID NO: 231)	D	A	S	S	L	E	G
S56T (SEQ ID NO: 232)	D	A	S	S	L	E	T
S56N (SEQ ID NO: 233)	D	A	S	S	L	E	N
S56D (SEQ ID NO: 234)	D	A	S	S	L	E	D
S56Q (SEQ ID NO: 235)	D	A	S	S	L	E	Q
S56P (SEQ ID NO: 236)	D	A	S	S	L	E	P
S56E (SEQ ID NO: 237)	D	A	S	S	L	E	E

[0625]

表18.示例性轻链CDR3序列

	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97
“18B1” (SEQ ID NO: 18)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	W	I	T
Q89M (SEQ ID NO: 238)	M	Q	F	N	S	Y	P	L	W	I	T
Q90G (SEQ ID	Q	G	F	N	S	Y	P	L	W	I	T

[0627]

	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97
NO: 239)											
Q90A (SEQ ID NO: 240)	Q	A	F	N	S	Y	P	L	W	I	T
Q90D (SEQ ID NO: 241)	Q	D	F	N	S	Y	P	L	W	I	T
Q90E (SEQ ID NO: 242)	Q	E	F	N	S	Y	P	L	W	I	T
N92E (SEQ ID NO: 243)	Q	Q	F	E	S	Y	P	L	W	I	T
S93P (SEQ ID NO: 244)	Q	Q	F	N	P	Y	P	L	W	I	T
S93A (SEQ ID NO: 245)	Q	Q	F	N	A	Y	P	L	W	I	T
W95bT (SEQ ID NO: 246)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	T	I	T
W95bI (SEQ ID NO: 247)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	I	I	T
W95bM (SEQ ID NO: 248)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	M	I	T
W95bK (SEQ ID NO: 249)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	K	I	T
W95bN (SEQ ID NO: 250)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	N	I	T
W95bE (SEQ ID NO: 251)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	E	I	T
W95bQ (SEQ ID NO: 252)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	Q	I	T
I96L (SEQ ID NO: 253)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	W	L	T
T97M (SEQ ID NO: 254)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	W	I	M
T97K (SEQ ID NO: 255)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	W	I	K
T97H (SEQ ID NO: 256)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	W	I	H
T97Y (SEQ ID NO: 257)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	W	I	Y

	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97	
[0629]	T97E (SEQ ID NO: 258)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	W	I	E
	T97Q (SEQ ID NO: 259)	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	W	I	Q

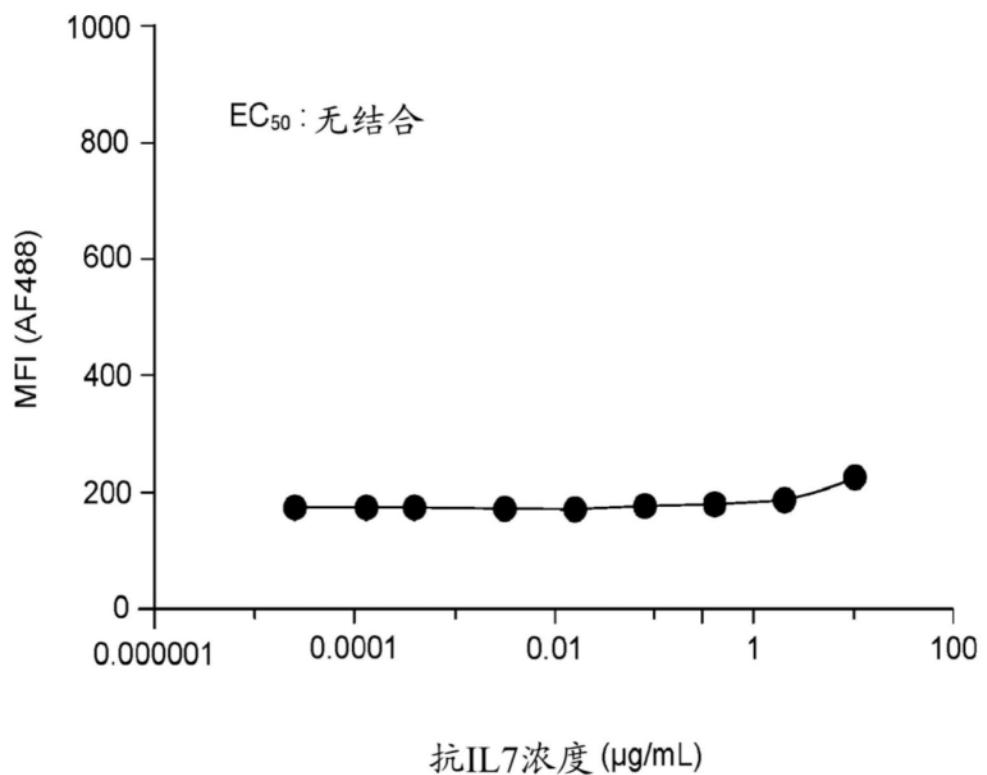


图1

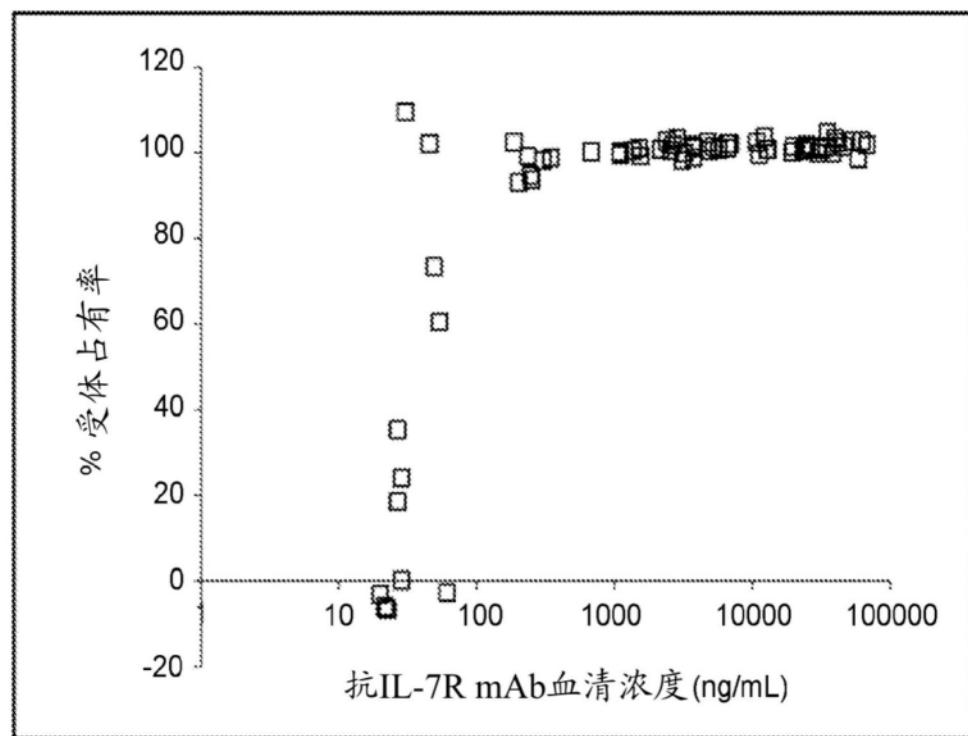


图2A

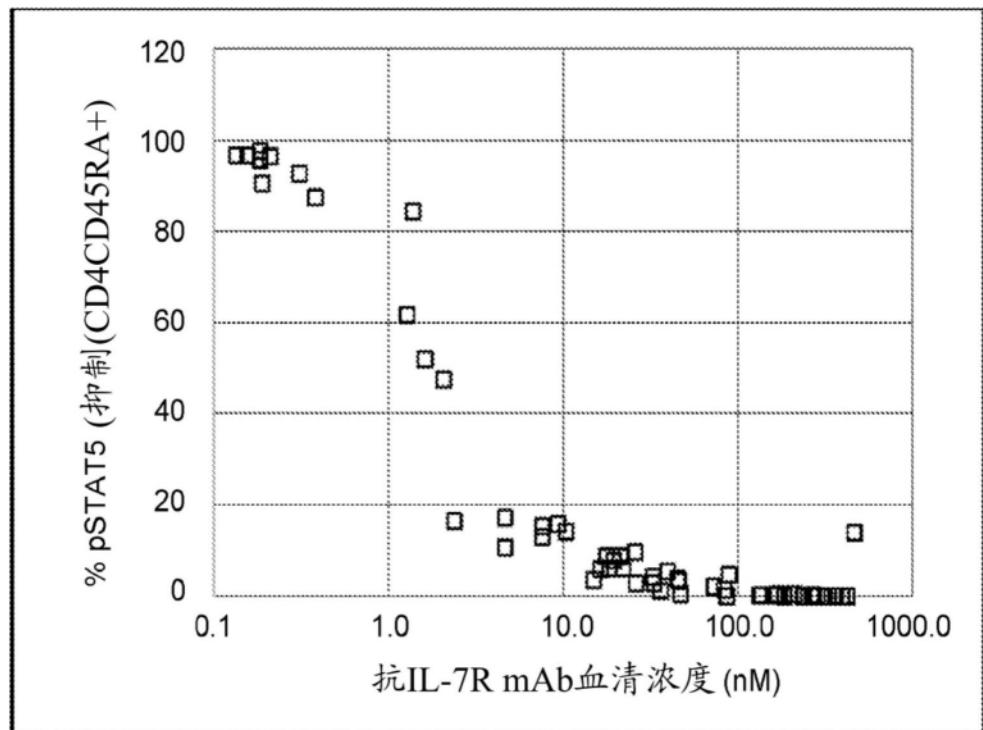


图2B

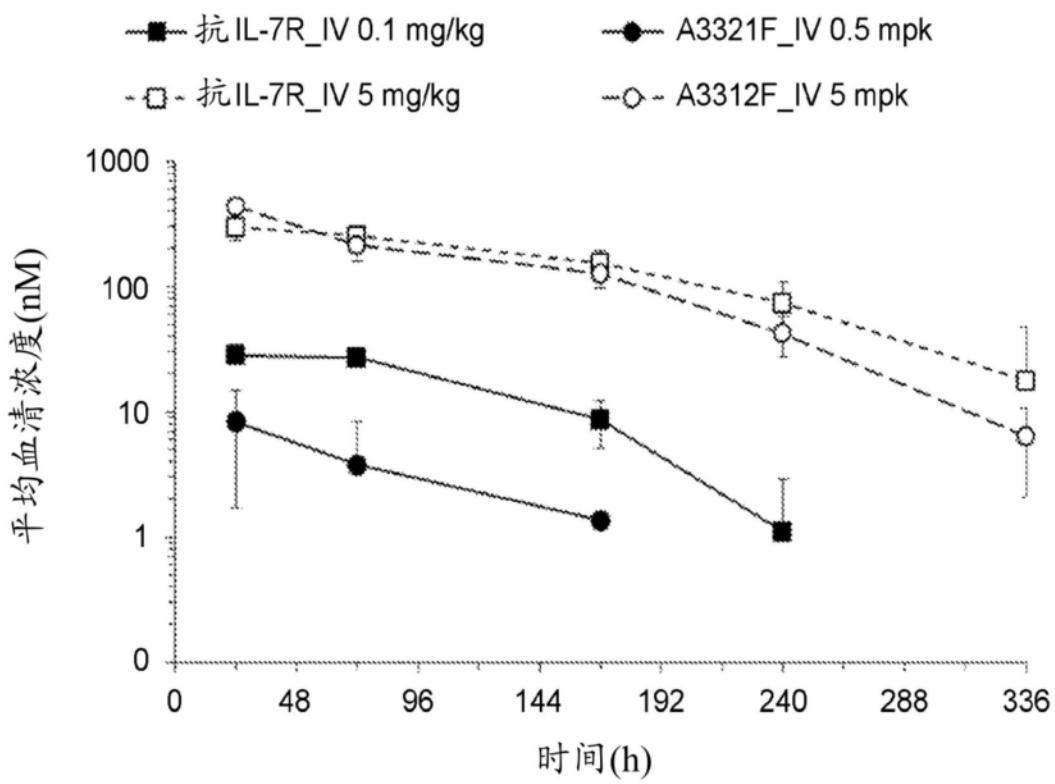


图3

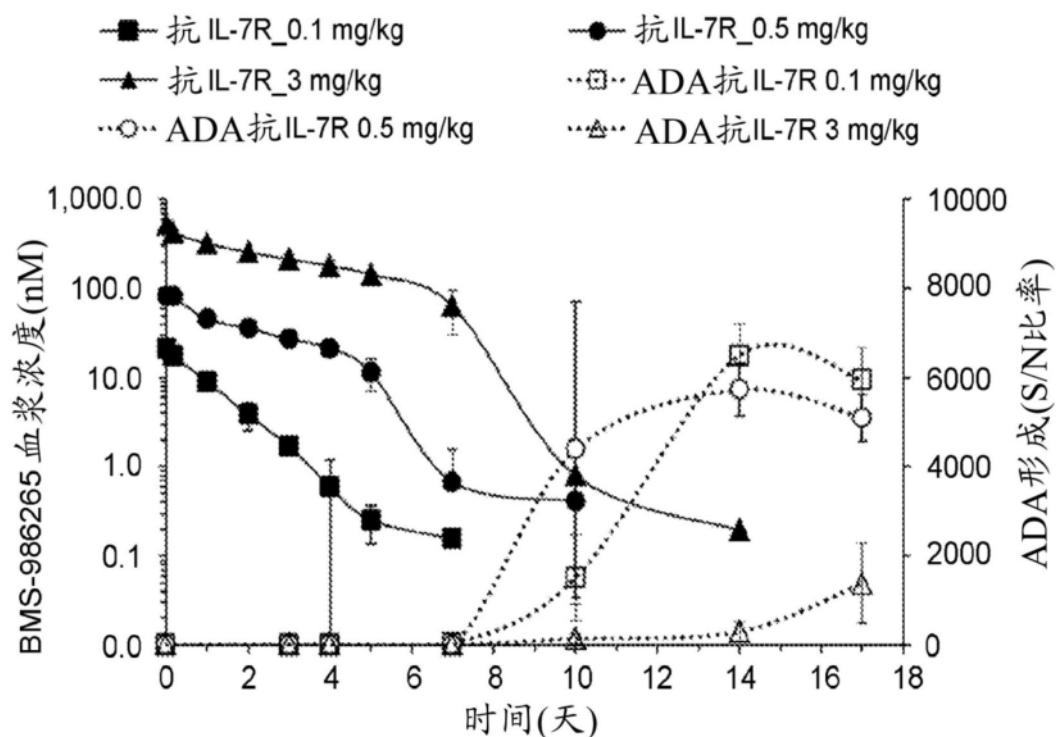


图4

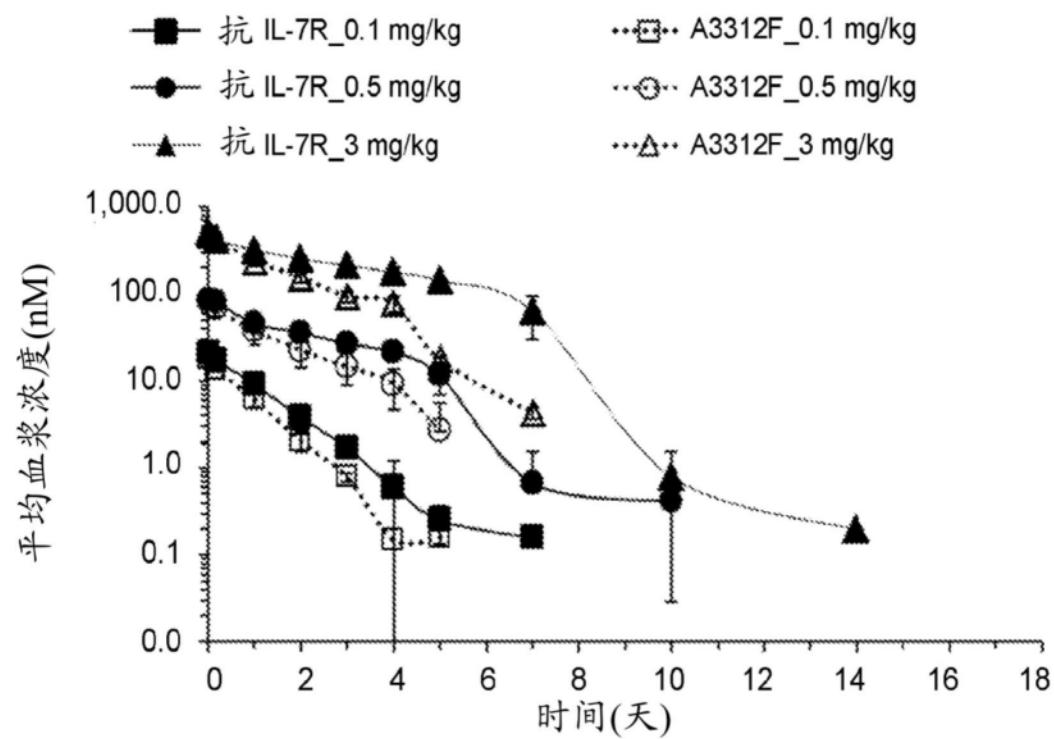


图5

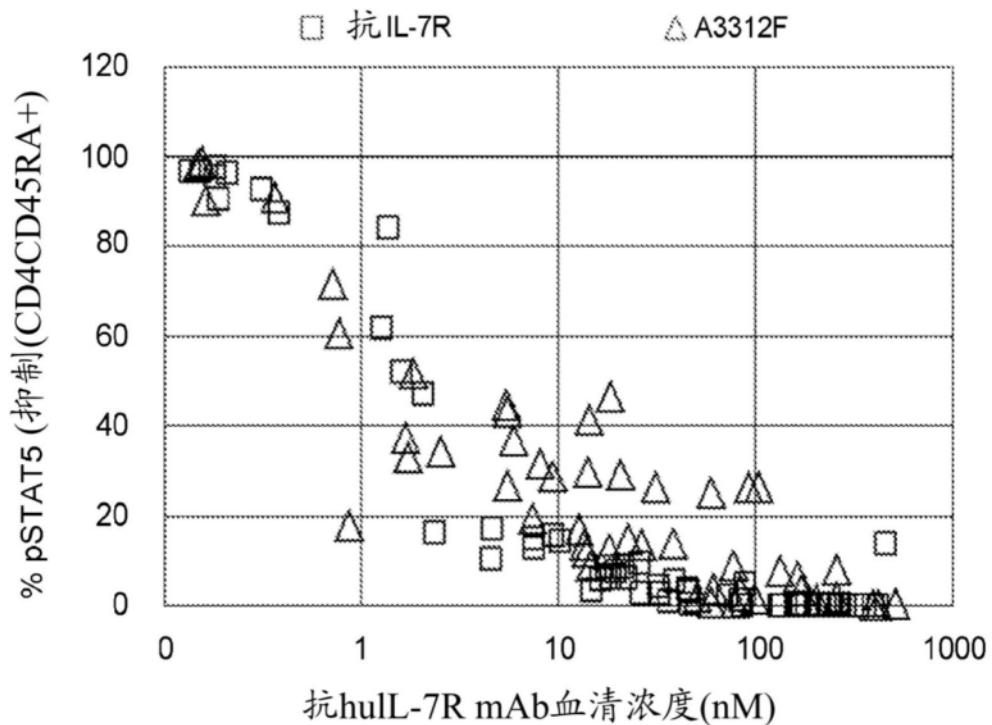


图6

作为总淋巴细胞的% CD3 T细胞

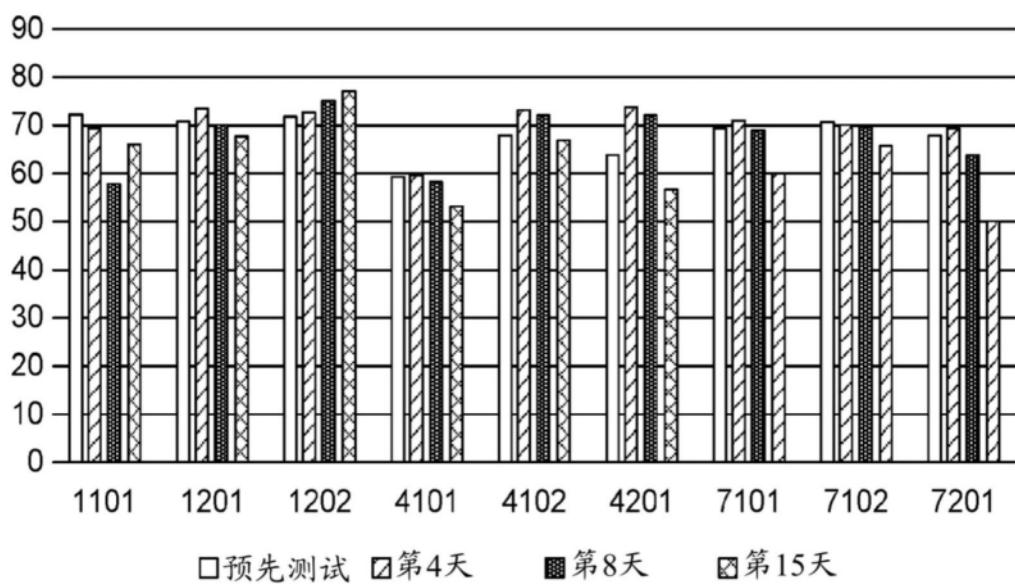


图7A

作为总CD3+淋巴细胞的% CD3/CD4  
+ T细胞

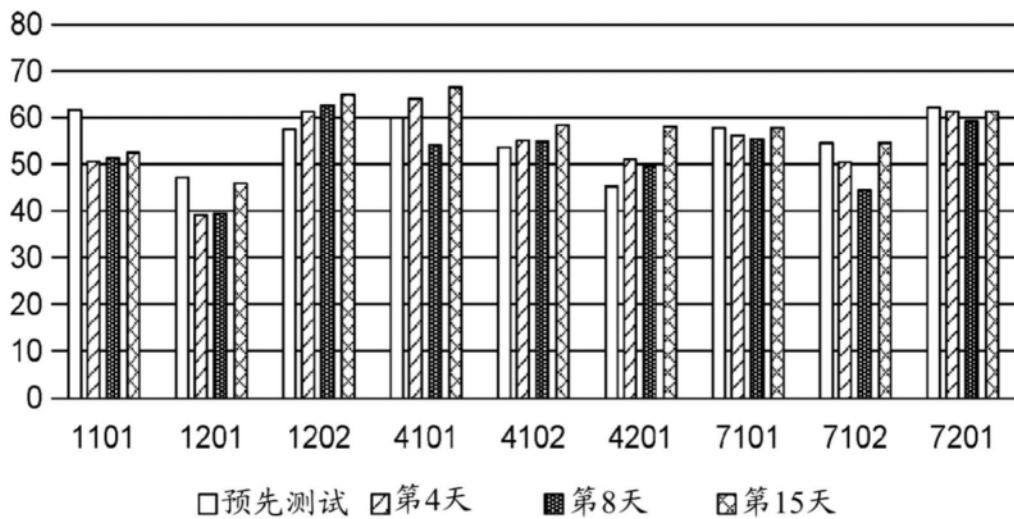


图7B

作为总CD3+淋白血病的% CD3/CD8+  
T细胞

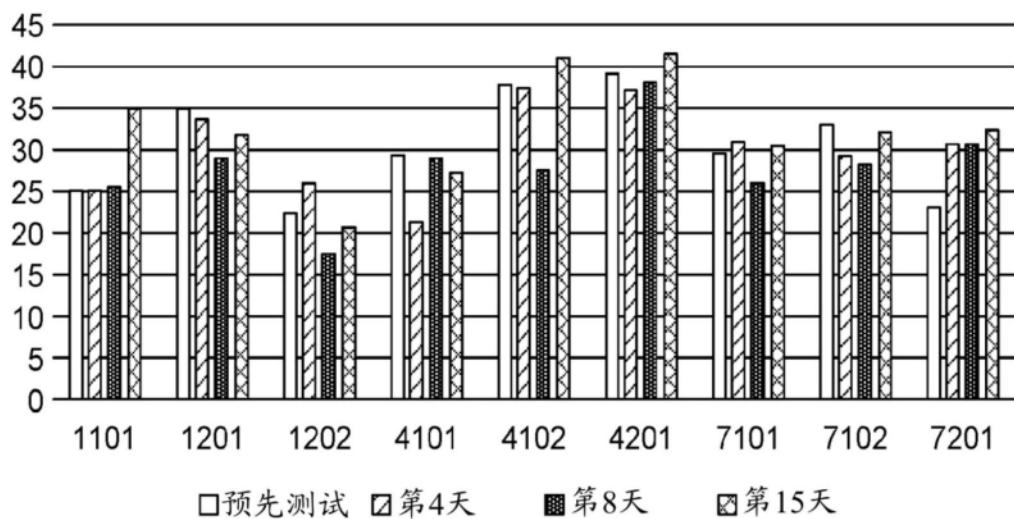


图7C

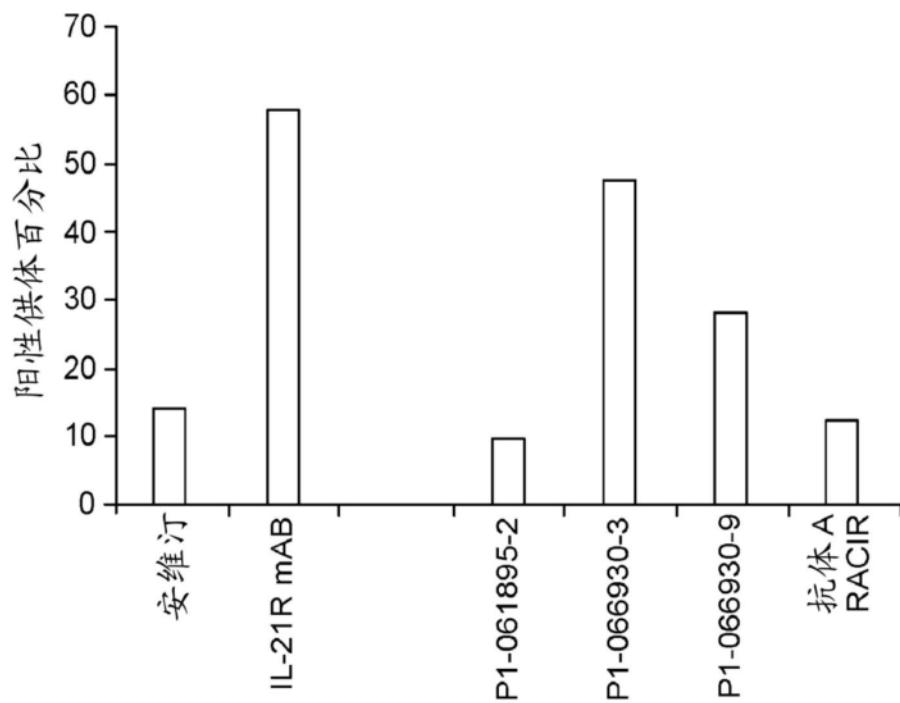
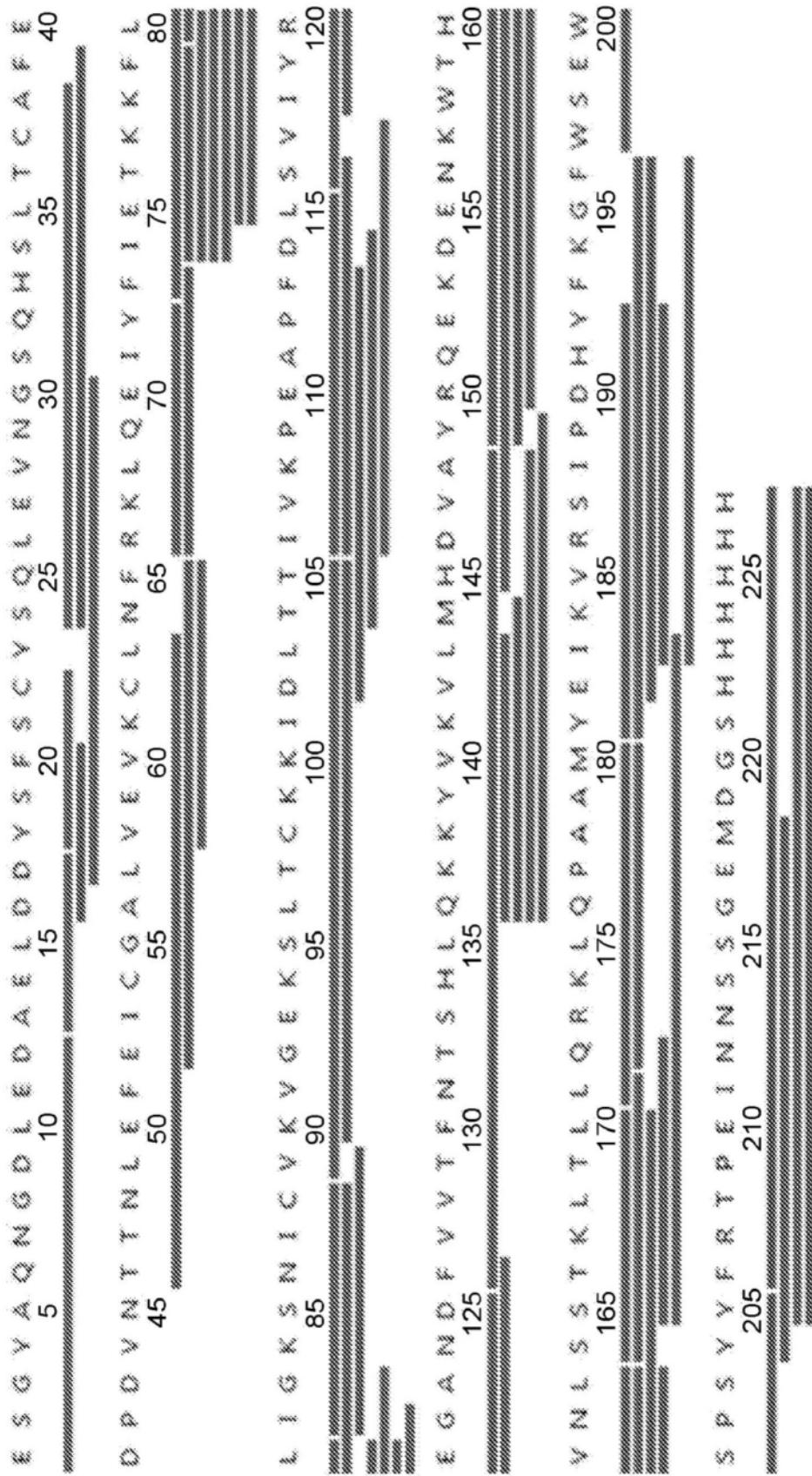


图8



总计：56种肽，97.4%覆盖率，3.04冗余

图9

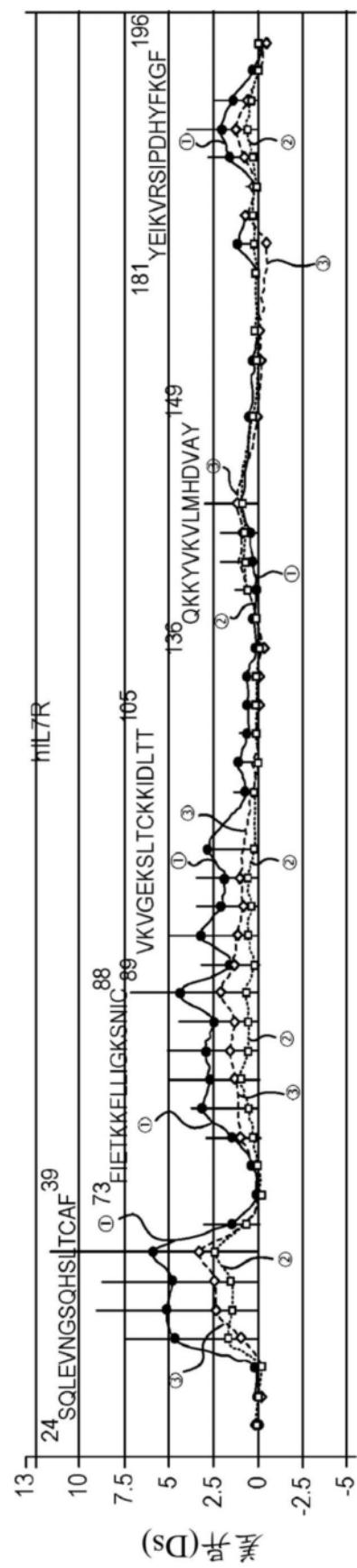


图10

Sequence logo showing the conservation of amino acids at each position of the protein sequence. The x-axis represents the sequence position (1 to 200). The y-axis represents the amino acid probability scale (0 to 1). The legend indicates: HDX (diagonal line), FPOP/GEE (filled circle), and GEE (open triangle).

Position	HDX	FPOP/GEE	GEE
1	ESGYAQNGDLED	●	
51	FEICGALVEVKCLNFRKLQETIYFIEL	●	▲
101	IDL <sub>111</sub> IVKPEAAPEDILSVIYREGANDEVVITENTSHLQKKYVVKVILMHDVAYR	●	
151	QEKDENKWTHVNLSSTKLTLQQRKLOQPAAMYEIKVRSI	●	●
201	SPSYYFRTPETNNSSGEMDGSHHHHH	200	

图11A

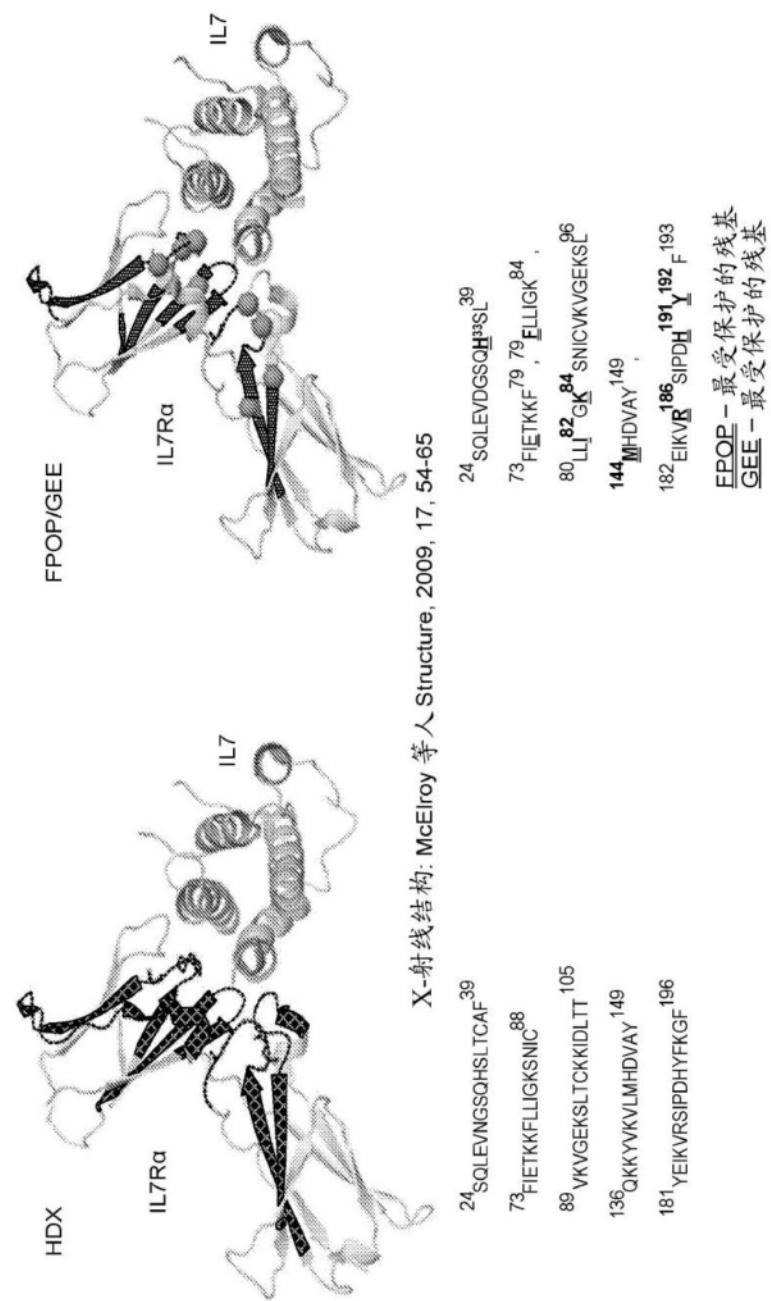


图11B

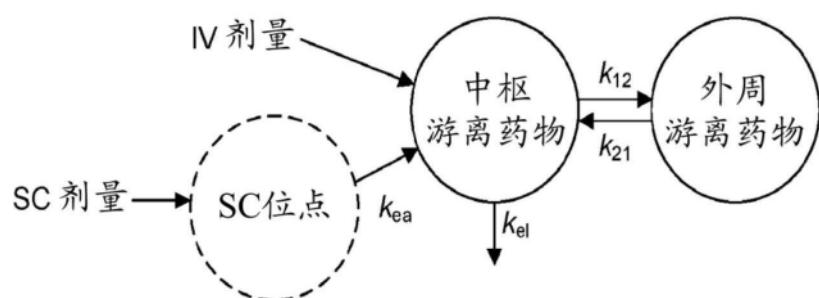


图12A

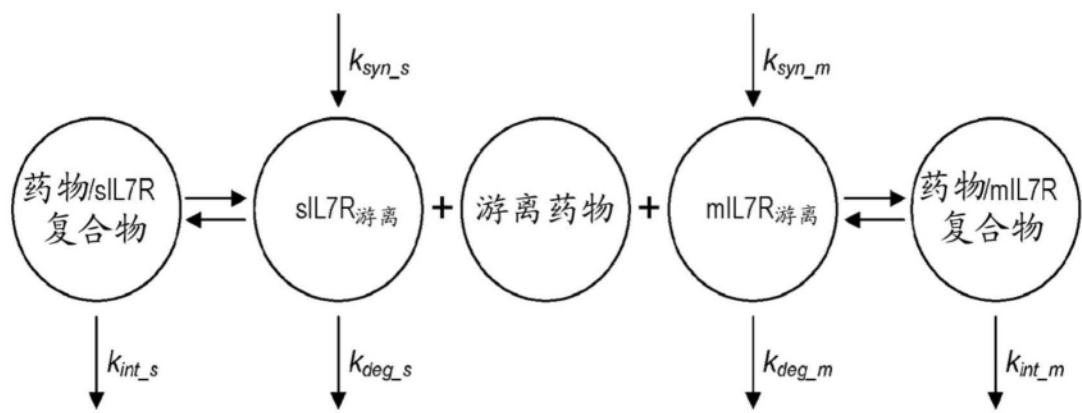


图12B

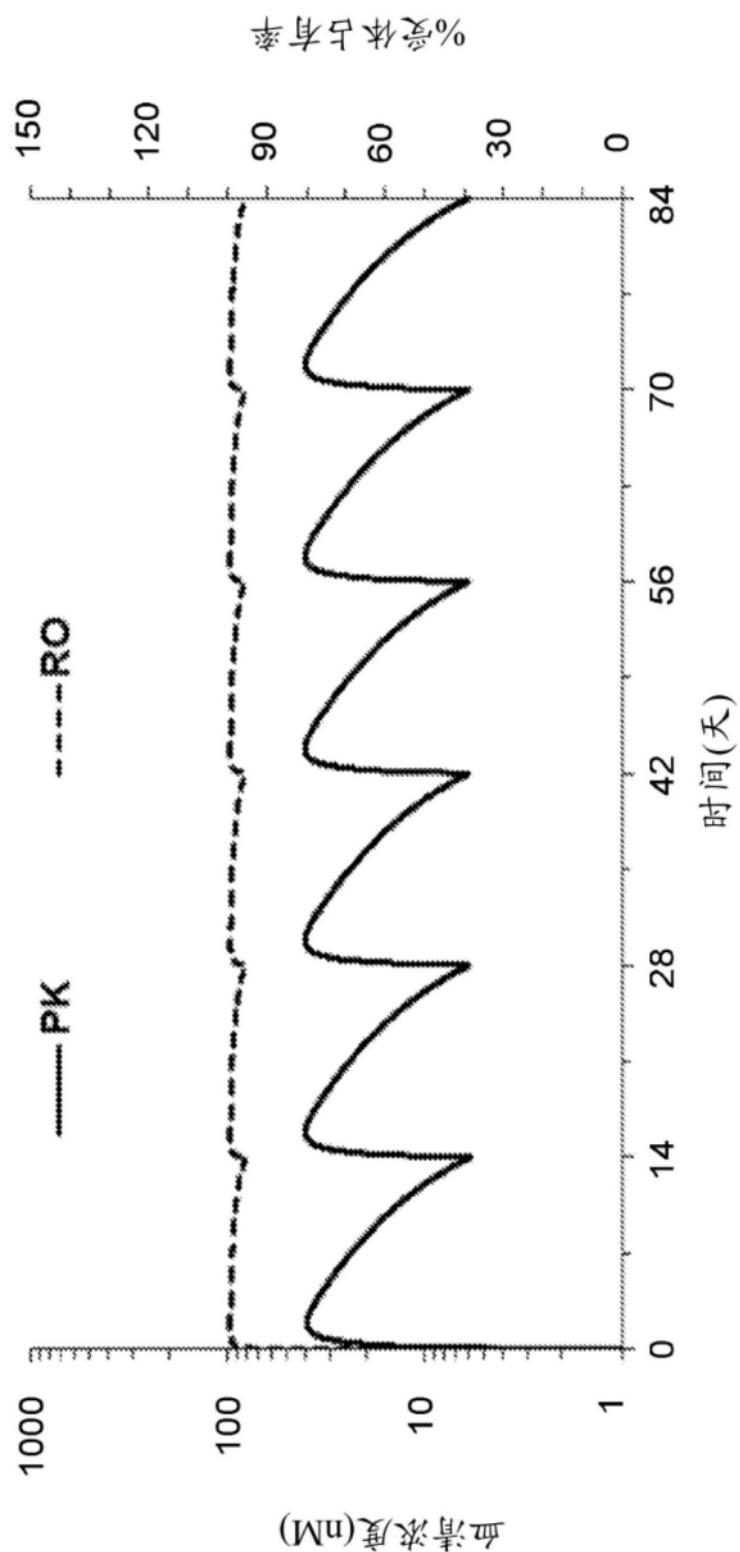


图13

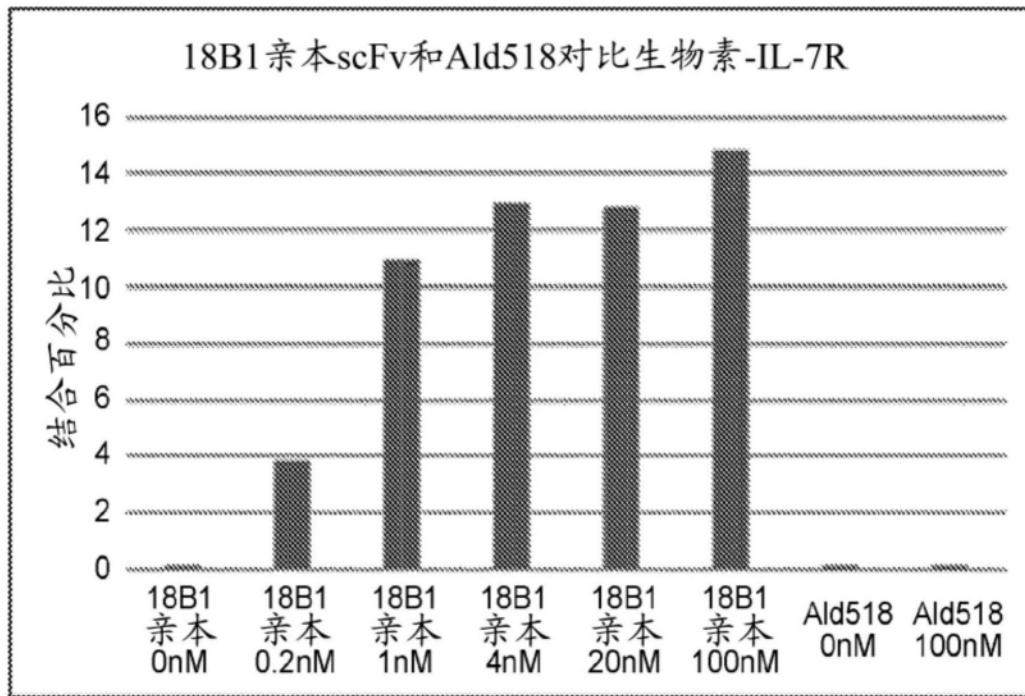


图14A

在37C下的SPR数据：

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
18B1	3.11e5	4.03e-04	1.3

图14B

图15

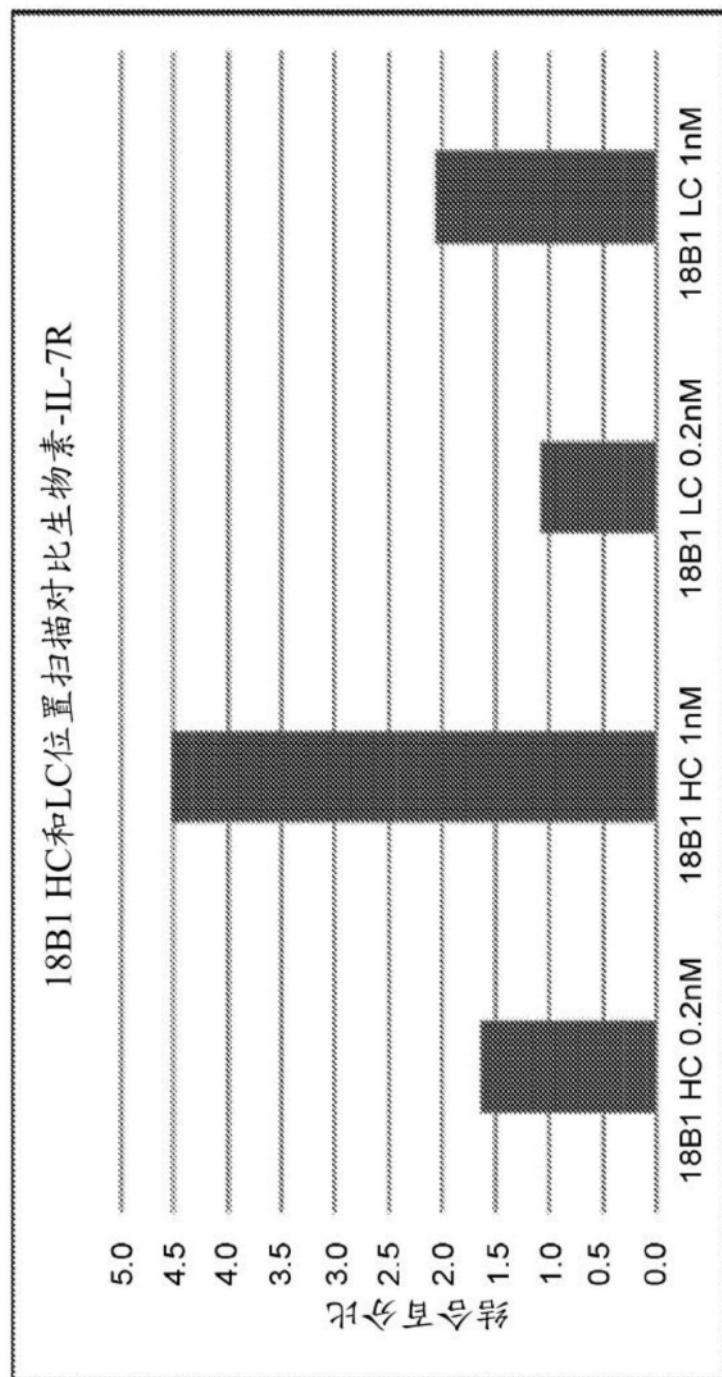


图16

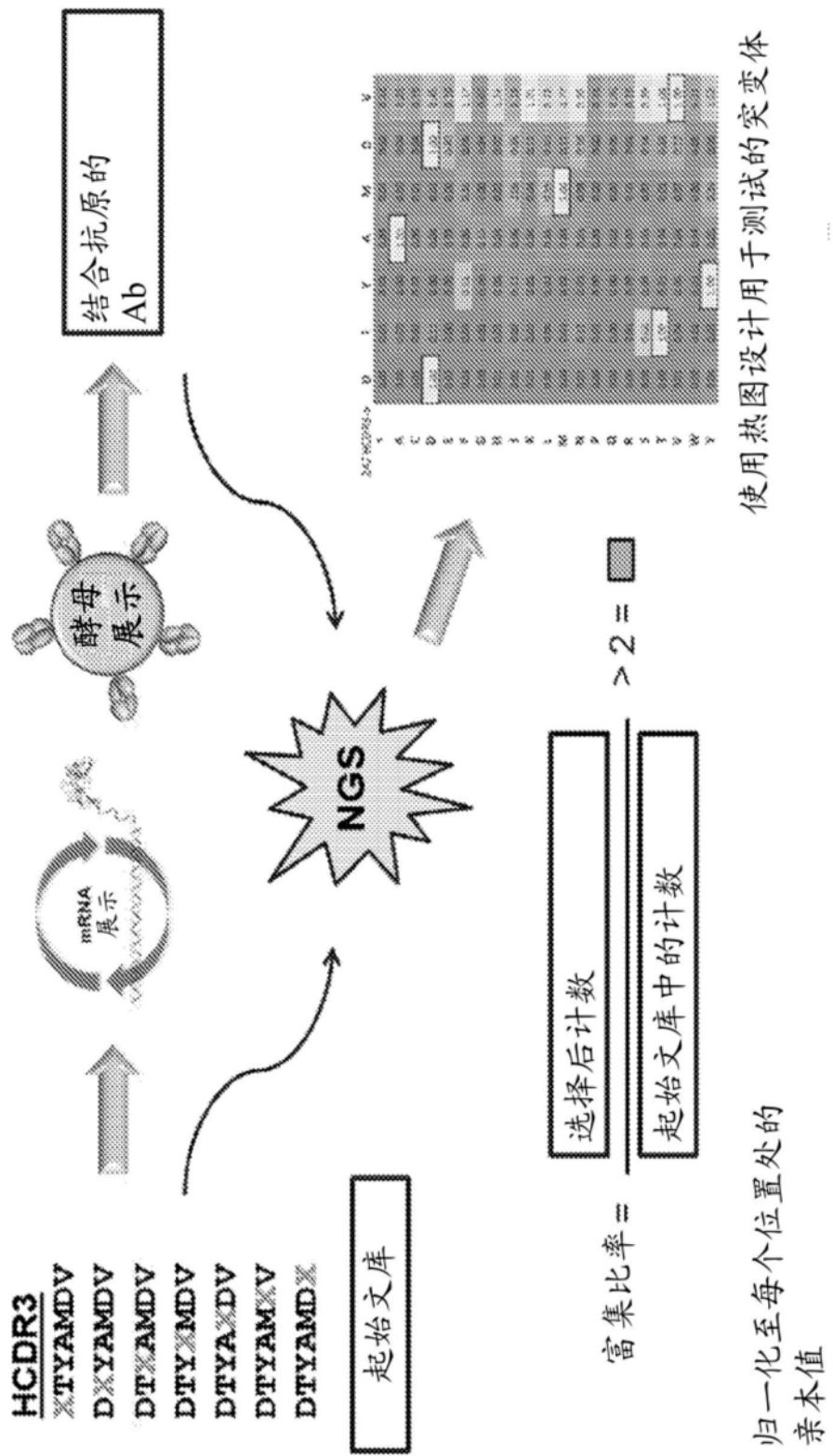


图17A

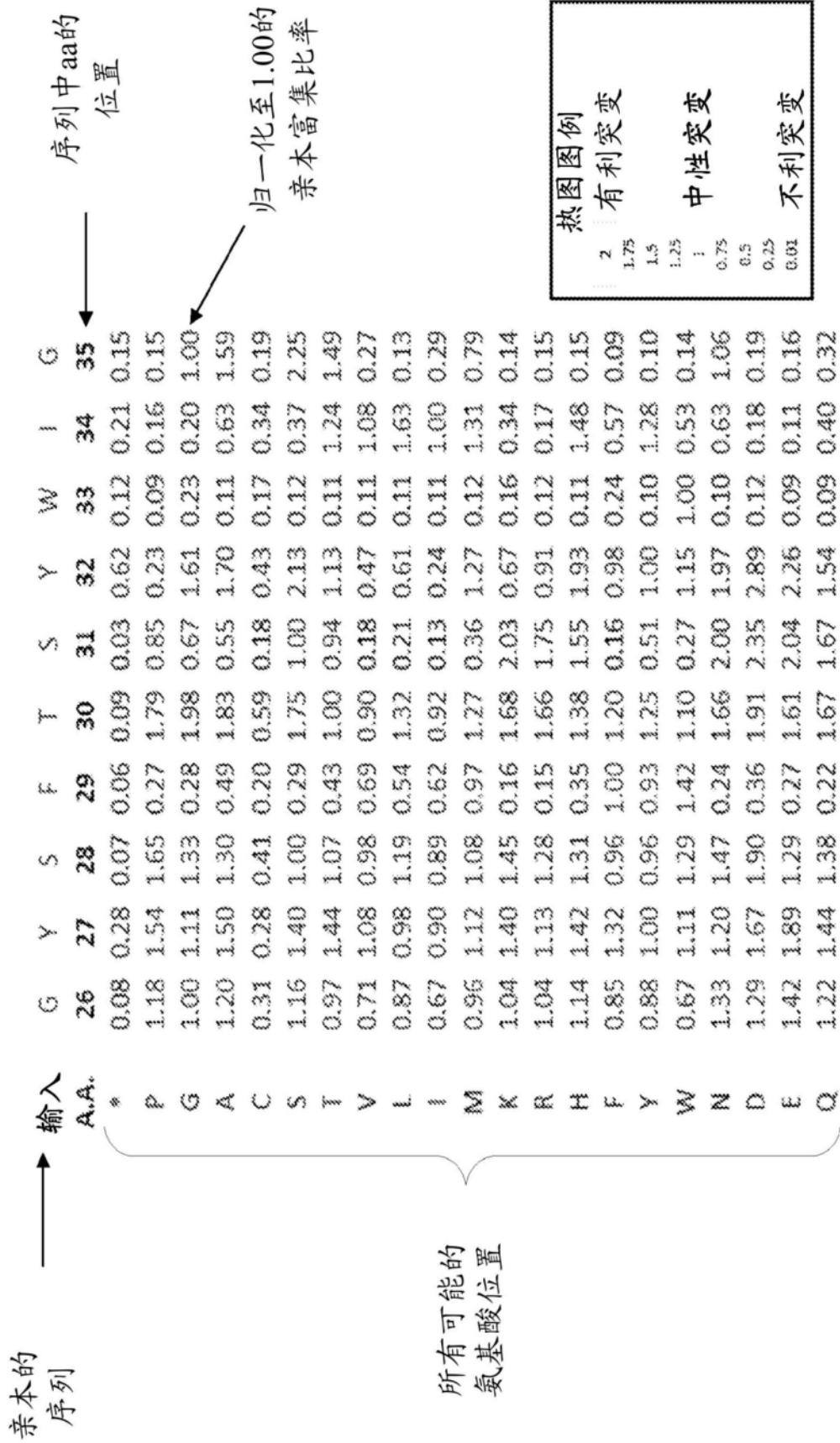


图17B

0.2 nM		1 nM		生殖系 亲本 归一化ER(AA)的计数		生殖系 亲本 归一化ER(AA)的计数		生殖系 亲本 归一化ER(AA)的计数	
*	0.06	0.30	0.00	0.07	0.01	0.06	0.00	0.30	0.01
P	0.03	0.20	0.01	0.02	2.06	0.01	1.00	0.12	0.02
G	0.04	1.28	0.01	0.27	0.29	0.01	0.02	0.01	0.46
A	0.07	1.63	0.05	0.34	1.84	0.00	0.03	0.01	0.88
C	0.08	0.35	0.05	0.41	0.13	0.02	0.03	0.02	0.92
S	0.07	0.40	0.04	0.74	1.00	0.01	0.05	0.02	0.94
T	0.10	0.08	0.04	0.44	0.16	0.01	0.08	0.01	1.03
V	0.02	0.28	0.05	0.24	0.94	0.01	0.02	0.08	0.99
L	0.21	0.17	0.06	0.23	0.02	0.01	0.05	1.00	1.29
I	0.02	0.21	0.05	0.28	0.12	0.02	0.02	1.05	1.00
M	1.15	0.57	0.06	0.53	0.02	0.02	0.44	1.08	3.35
K	0.70	0.12	0.01	0.38	0.01	0.00	0.02	1.03	1.05
R	0.03	0.13	0.01	0.46	0.04	0.01	0.03	0.12	0.91
H	0.64	0.24	0.02	0.77	0.02	0.02	0.16	0.00	0.67
F	0.25	0.04	1.00	0.51	0.03	0.08	0.02	0.46	0.86
Y	0.03	0.04	0.04	0.34	0.02	1.00	0.03	0.02	0.75
W	0.43	0.40	0.15	0.34	0.02	0.03	0.05	0.02	1.00
N	0.03	0.59	0.01	1.00	0.36	0.00	0.01	0.02	0.81
D	0.04	1.03	0.01	0.73	0.02	0.01	0.02	0.01	0.85
E	0.14	3.25	0.02	1.04	0.02	0.02	0.03	0.00	1.21
Q	1.00	1.00	0.01	0.75	0.01	0.01	0.16	0.03	1.14

图18A

1 nM  
0.2 nM

生殖系		亲本		归一化ER(AA)的计数										生殖系		亲本		归一化ER(AA)的计数										
S	R	S	R	S					T					S					T					S				
E	V	E	V	S	R	G	V	S	R	G	V	S	R	G	V	S	R	G	V	S	R	G	V	S	R	G	V	
*	*	0.00	0.00	0.22	0.02	0.01	0.00	0.43	0.05	0.00	0.00	0.03	0.08	*	0.00	0.01	0.20	0.02	0.01	0.01	0.44	0.11	0.00	0.01	0.00	0.08		
P	P	0.01	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.08	0.02	0.15	P	0.00	0.00	0.01	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.07	0.04	0.30		
G	G	0.05	0.03	0.01	0.66	0.64	3.00	0.09	0.01	1.46	0.01	0.02	0.90	G	0.05	0.06	0.01	0.84	0.78	1.00	0.18	0.00	1.39	0.01	0.02	0.99		
A	A	0.03	0.01	0.02	0.59	0.53	0.01	0.34	0.00	1.70	0.03	0.02	1.19	A	0.02	0.01	0.02	0.74	0.70	0.01	0.51	0.00	1.39	0.05	0.03	1.16		
C	C	0.01	0.09	0.07	0.70	0.19	0.15	0.21	0.01	0.25	0.03	0.02	0.71	C	0.00	0.09	0.08	0.34	0.24	0.16	0.30	0.04	0.19	0.02	0.01	0.71		
S	S	0.01	0.04	0.03	1.00	0.93	0.03	0.12	0.01	1.64	0.01	0.01	1.04	S	0.00	0.01	0.04	1.03	1.02	0.02	0.21	0.00	1.47	0.00	0.01	1.04		
T	T	0.00	0.01	0.61	1.01	0.85	0.01	0.14	0.01	1.62	0.02	0.01	1.07	T	0.00	0.01	0.90	1.06	0.97	0.01	0.20	0.00	1.40	0.02	0.00	1.08		
V	V	0.05	0.01	0.75	0.02	0.24	0.04	0.26	0.07	1.80	0.11	0.02	1.00	V	0.05	0.00	0.89	0.04	0.38	0.03	0.44	0.14	1.00	0.49	0.01	1.03		
L	L	0.01	0.01	0.02	0.28	1.08	0.02	0.76	0.14	0.64	1.00	0.01	0.76	L	0.00	0.00	0.03	0.46	1.09	0.01	0.87	0.23	0.78	1.00	0.01	0.92		
I	I	0.02	0.02	0.13	0.02	0.69	0.02	0.32	0.01	0.98	0.23	0.01	0.87	I	0.01	0.01	0.24	0.04	0.79	0.00	0.48	0.01	0.53	0.35	0.01	0.91		
M	M	0.01	0.01	0.01	0.82	1.15	0.01	0.08	0.01	1.13	0.45	0.01	0.94	M	0.00	0.01	0.00	0.94	1.02	0.00	0.18	0.00	1.16	0.64	0.01	1.15		
E	E	0.02	0.02	0.02	0.04	0.65	0.01	0.14	0.01	0.05	0.02	0.01	0.93	E	0.00	0.01	0.02	0.07	0.83	0.01	0.23	0.00	0.08	0.01	0.01	0.93		
R	R	0.01	0.01	0.01	0.10	1.00	0.02	0.11	0.01	0.31	0.06	0.01	1.03	R	0.00	0.00	0.00	0.11	1.00	0.01	0.24	0.00	0.47	0.05	0.00	1.11		
H	H	0.04	0.01	0.05	0.31	0.81	0.01	0.16	0.00	0.11	0.01	0.05	1.18	H	0.04	0.02	0.05	0.46	0.92	0.00	0.26	0.00	0.16	0.00	0.13	1.05		
F	F	0.01	0.02	0.04	0.42	0.72	0.02	0.38	0.01	0.24	0.26	0.01	0.82	F	0.01	0.01	0.05	0.59	0.62	0.01	0.61	0.01	0.33	0.43	0.01	0.94		
Y	Y	0.11	0.01	1.00	0.22	0.58	0.02	1.00	0.18	0.02	0.01	1.13	Y	0.09	0.01	1.00	0.37	0.74	0.01	1.00	0.00	0.35	0.03	0.01	1.16			
W	W	0.01	0.01	0.01	0.19	0.86	0.02	0.55	0.01	0.37	0.02	0.02	1.00	W	0.01	0.00	0.01	0.30	0.86	0.01	0.79	0.00	0.43	0.01	0.01	0.97		
N	N	0.05	0.09	0.09	1.44	0.69	0.01	0.14	0.01	1.01	0.01	0.15	1.18	N	0.06	0.16	0.12	1.35	0.83	0.00	0.33	0.00	1.07	0.01	0.26	1.15		
D	D	1.00	0.18	0.37	1.19	0.25	0.04	0.05	0.01	0.48	0.01	1.00	0.77	D	1.00	0.28	0.38	1.13	0.38	0.04	0.08	0.01	0.59	0.01	1.00	0.72		
E	E	0.40	1.00	0.05	1.07	0.31	0.01	0.05	0.01	1.41	0.01	0.44	1.56	E	0.37	1.00	0.03	0.97	0.53	0.00	0.09	0.00	1.26	0.01	0.53	1.39		
Q	Q	0.00	0.02	0.01	0.44	0.93	0.01	0.12	0.01	1.32	0.06	0.05	1.18	Q	0.00	0.02	0.00	0.61	0.98	0.01	1.23	0.07	0.44	0.01	1.22			

图18B

0.2 nM

生殖系 亲本	归一化ER(AA)的计数											
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
*	0.08	0.05	0.03	0.53	0.03	0.04	0.03	0.00	0.01	0.07	0.03	
P	0.28	0.74	1.27	1.28	1.41	1.60	0.40	0.52	1.95	0.94	0.18	
G	0.68	0.71	1.22	1.06	1.00	1.41	0.26	0.46	0.25	0.63	0.67	
A	0.91	1.03	1.32	1.27	1.05	1.44	0.70	0.61	1.03	1.05	1.03	
C	0.64	0.94	0.54	0.90	0.89	0.50	0.42	0.23	0.17	0.43	0.15	
S	3.17	1.12	3.00	3.17	3.02	3.29	1.00	1.00	0.61	0.57	0.27	
T	3.00	1.33	3.25	3.22	3.20	3.43	1.13	0.52	0.45	0.72	0.71	
V	3.00	1.00	3.15	3.11	0.92	3.43	1.09	0.87	0.40	0.96	0.93	
L	0.73	0.58	4.31	4.08	0.96	1.06	1.04	0.52	0.47	1.00	0.15	
I	0.96	0.54	3.06	2.08	0.97	2.06	1.01	0.85	0.35	0.82	0.57	
M	0.84	0.45	1.18	1.05	0.95	0.97	1.12	0.56	0.55	0.80	0.47	
K	1.02	0.17	1.35	0.85	0.74	0.25	0.34	0.11	0.38	0.20	0.14	
R	1.00	0.18	1.24	0.64	0.76	0.37	0.40	0.13	0.70	0.21	0.14	
H	1.10	0.47	1.09	1.27	1.07	1.50	1.20	0.50	0.36	0.32	0.04	
F	0.94	0.58	0.90	1.02	0.85	0.86	1.15	0.68	0.31	0.67	0.03	
Y	3.03	0.44	0.92	1.06	0.87	0.86	1.03	0.70	0.53	0.47	0.11	
W	0.70	0.60	0.91	0.77	0.63	0.64	0.73	0.43	0.53	0.48	0.04	
N	0.92	0.90	3.05	1.09	0.94	1.03	1.07	0.55	0.25	0.37	0.04	
D	0.41	0.31	0.91	1.36	0.98	0.69	1.53	0.26	0.66	0.21	0.03	
E	0.69	0.27	1.28	1.41	1.31	0.75	1.59	0.19	0.22	0.22	0.19	
Q	0.96	0.35	1.30	1.00	1.19	0.71	1.14	0.40	0.55	0.38	0.16	

1 nM

生殖系 亲本	归一化ER(AA)的计数											
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
*	0.07	0.06	0.02	0.50	0.04	0.03	0.04	0.00	0.03	0.06	0.02	
P	0.30	0.66	1.09	1.26	1.43	1.26	0.52	0.61	1.54	0.98	0.20	
G	0.71	0.77	1.07	1.11	1.00	1.21	0.39	0.57	0.38	0.65	0.75	
A	0.95	1.03	1.14	1.33	1.12	1.17	0.78	0.69	1.00	0.97	1.03	
C	0.62	0.77	0.47	0.87	0.89	0.49	0.41	0.77	0.70	0.49	0.21	
S	1.22	1.09	1.00	1.20	1.12	1.11	1.00	1.00	0.75	0.57	0.42	
T	1.08	1.04	1.10	1.21	1.24	1.25	1.14	0.68	0.56	0.75	0.78	
V	1.09	0.97	0.97	1.16	0.95	1.22	1.02	0.82	0.49	1.09	0.91	
L	0.79	0.62	0.81	1.07	0.96	1.03	0.56	0.57	0.53	1.00	0.22	
I	1.03	0.52	0.87	1.07	0.93	1.00	0.98	0.80	0.45	0.94	0.61	
M	0.84	0.57	1.02	1.14	1.05	0.97	1.06	0.55	0.66	0.89	0.60	
K	1.06	0.20	1.24	0.95	0.88	0.30	0.52	0.17	0.54	0.25	0.19	
R	1.00	0.23	1.09	0.78	0.85	0.45	0.53	0.19	0.84	0.29	0.21	
H	1.14	0.56	0.94	1.28	1.16	0.65	1.22	0.65	0.51	0.38	0.06	
F	0.87	0.60	0.72	1.01	0.91	0.87	1.04	0.63	0.37	0.69	0.03	
Y	1.03	0.47	0.81	1.09	0.98	0.82	0.95	0.68	0.65	0.50	0.20	
W	0.74	0.55	0.74	0.76	0.72	0.62	0.69	0.39	0.55	0.55	0.03	
N	0.99	0.73	0.98	1.15	1.09	0.99	1.18	0.64	0.34	0.42	0.05	
D	0.44	0.38	0.83	1.31	1.06	0.77	1.46	0.33	0.78	0.24	0.03	
E	0.67	0.30	1.12	1.35	1.18	0.77	1.45	0.28	0.36	0.26	0.27	
Q	0.95	0.44	1.17	1.00	1.18	0.74	1.18	0.57	0.72	0.47	0.24	

图18C

0.2 nM

生殖系		归一化ER(AA)的计数						
亲本	子代	D	A	S	L	E	S	
		50	51	52	53	54	55	56
*		0.10	0.08	0.09	0.07	0.12	0.08	0.08
P		0.31	0.83	0.87	0.92	1.08	0.98	0.98
G		0.54	1.04	1.12	0.96	0.92	0.87	1.06
A		0.39	1.01	1.09	1.07	0.99	0.23	0.96
C		0.21	0.44	0.76	0.62	0.72	0.43	0.73
S		0.84	1.14	1.01	1.01	1.03	0.87	1.01
T		0.76	0.90	1.06	0.90	1.06	0.93	1.00
V		0.46	0.84	1.10	0.70	0.96	0.41	0.82
L		0.42	0.82	0.95	0.99	1.01	0.85	0.96
I		0.32	0.83	0.99	0.61	0.99	0.80	0.81
M		0.60	1.01	1.06	0.90	0.97	0.59	0.95
K		0.68	0.92	0.92	0.31	1.04	0.74	0.85
R		0.73	0.97	0.89	0.37	0.88	0.50	0.85
H		0.67	1.06	1.04	0.88	1.02	0.70	0.99
F		0.49	0.88	1.06	1.18	0.88	0.59	0.93
Y		0.68	0.88	1.06	1.18	0.86	0.49	0.99
W		0.70	0.90	0.99	1.41	0.82	0.07	0.93
N		0.36	1.12	1.07	1.04	1.04	0.90	1.05
D		1.01	1.11	1.23	1.08	0.85	1.00	1.07
E		0.97	1.10	1.33	1.10	0.85	1.01	0.97
Q		0.85	1.14	1.01	0.78	0.97	0.98	1.02

1 nM

生殖系		归一化ER(AA)的计数						
亲本	子代	D	A	S	L	E	S	
		50	51	52	53	54	55	56
*		0.10	0.07	0.10	0.07	0.13	0.07	0.06
P		0.36	0.79	0.82	0.88	1.05	0.98	1.04
G		0.62	1.07	1.06	0.91	0.87	0.90	1.01
A		0.34	1.01	1.05	1.04	0.95	0.30	0.98
C		0.21	0.43	0.71	0.67	0.66	0.47	0.71
S		0.84	1.12	1.01	1.01	0.97	0.93	1.01
T		0.71	0.97	1.07	0.96	1.01	0.95	1.02
V		0.42	0.89	1.12	0.77	0.94	0.51	0.83
L		0.42	0.75	0.90	1.00	1.01	0.87	0.95
I		0.28	0.89	0.99	0.71	0.95	0.85	0.84
M		0.63	0.99	1.04	0.93	0.89	0.64	0.92
K		0.70	0.91	0.95	0.38	0.98	0.83	0.88
R		0.74	0.93	0.88	0.44	0.91	0.60	0.90
H		0.69	1.00	1.01	0.90	0.96	0.76	0.97
F		0.45	0.83	0.96	1.13	0.83	0.66	0.93
Y		0.66	0.83	1.00	1.13	0.80	0.57	0.98
W		0.66	0.81	0.92	1.15	0.74	0.08	0.91
N		0.43	1.13	1.03	1.00	0.98	0.95	1.04
D		1.01	1.06	1.12	1.02	0.81	1.00	1.04
E		0.97	1.04	1.23	1.08	0.83	1.01	1.00
Q		0.86	1.06	0.97	0.86	0.91	1.02	1.05

图18D

# 0.2 nM

生殖系 亲本	归一化ER(AA)的计数						
	26	27	28	29	30	31	32
*	0.02	0.01	0.00	0.01	0.05	0.02	0.00
P	0.03	0.02	1.44	0.01	0.14	0.01	0.03
G	1.00	0.03	0.72	0.01	0.32	0.02	0.01
A	0.47	0.05	1.25	0.01	0.30	0.02	0.01
C	0.21	0.03	0.74	0.03	0.31	0.02	0.02
S	0.41	0.03	0.90	0.03	0.31	0.02	0.02
T	0.19	0.04	1.00	0.03	0.14	0.01	0.15
V	0.20	0.13	1.19	0.06	0.24	0.04	0.01
L	0.35	0.09	1.35	0.13	0.18	0.02	0.04
I	0.18	0.12	1.43	0.08	0.14	0.01	0.02
M	0.43	0.26	1.09	0.25	0.17	0.01	0.01
K	0.52	0.02	0.41	0.01	0.05	0.01	0.01
R	0.41	0.01	0.68	0.01	0.06	0.01	0.02
H	0.63	0.03	1.11	0.01	0.19	0.08	1.00
F	0.40	1.00	1.02	1.00	0.21	0.03	0.17
Y	0.44	0.89	1.05	0.80	0.21	0.14	0.22
W	0.27	0.01	0.95	0.06	0.17	0.08	0.02
N	0.73	0.03	1.01	0.01	0.42	0.14	0.16
D	0.44	0.03	1.54	0.01	1.00	1.00	0.03
E	0.37	0.02	1.51	0.01	0.71	0.21	0.01
O	0.48	0.02	1.44	0.01	0.28	0.02	0.05

# 1 nM

生殖系 亲本	归一化ER(AA)的计数						
	26	27	28	29	30	31	32
*	0.00	0.00	0.00	0.01	0.05	0.02	0.00
P	0.03	0.02	1.35	0.01	0.26	0.01	0.02
G	1.00	0.06	0.90	0.00	0.39	0.02	0.00
A	0.67	0.11	1.26	0.02	0.48	0.02	0.01
C	0.25	0.02	0.69	0.04	0.47	0.02	0.01
S	0.61	0.05	1.04	0.03	0.50	0.03	0.00
T	0.31	0.08	1.30	0.05	0.28	0.00	0.00
V	0.32	0.27	1.15	0.11	0.38	0.03	0.01
L	0.50	0.18	1.34	0.21	0.31	0.02	0.03
I	0.28	0.26	1.32	0.14	0.25	0.01	0.00
M	0.57	0.42	1.05	0.43	0.31	0.03	0.00
K	0.69	0.02	0.58	0.01	0.10	0.01	0.00
R	0.59	0.02	0.85	0.00	0.12	0.00	0.02
H	0.82	0.05	1.16	0.04	0.35	0.08	1.00
F	0.53	1.03	1.06	1.00	0.35	0.04	0.30
Y	0.61	1.00	1.07	0.84	0.32	0.17	0.28
W	0.35	0.01	0.98	0.12	0.28	0.10	0.01
N	0.88	0.06	1.10	0.01	0.57	0.19	0.16
D	0.61	0.07	1.35	0.00	1.00	1.00	0.02
E	0.62	0.04	1.30	0.00	0.84	0.32	0.00
O	0.68	0.02	1.33	0.01	0.40	0.01	0.05

图18E

0.2 nM		生殖系																				
亲本	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	K	G					
		50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65				
归一化ER(AA)的计数																						
*	0.03	0.00	0.01	0.31	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.03	0.43	0.05	0.09	0.21	0.03	0.51	0.03					
P	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.05	0.01	0.01	0.02	0.01	0.54	1.09	1.13	0.25	0.36	0.68					
G	1.00	0.02	0.07	0.06	0.01	0.36	0.04	1.00	0.03	1.00	0.25	1.10	0.81	1.16	0.58	0.98	1.00					
A	0.87	0.20	0.07	0.00	0.01	0.61	0.07	0.01	0.35	0.04	0.42	1.00	0.85	1.24	0.89	1.22	0.87					
C	0.07	0.02	0.12	0.08	0.02	0.20	0.35	0.02	0.41	0.02	0.37	0.39	0.36	0.61	0.29	0.61	0.19					
S	0.04	0.15	1.00	0.02	0.12	1.00	0.09	0.01	0.52	0.03	0.40	1.19	0.98	1.00	0.57	1.20	0.85					
T	0.03	0.18	1.64	0.06	0.05	0.33	0.00	0.01	0.71	0.01	0.48	1.01	1.00	1.18	0.86	1.10	0.81					
Y	0.08	0.90	0.04	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.99	0.01	0.69	1.09	0.73	1.00	1.00	1.14	0.33					
L	0.13	0.55	0.01	0.07	0.01	0.14	0.11	0.07	0.80	0.01	0.70	1.00	0.77	0.91	0.74	1.34	0.42					
+	0.10	1.00	0.08	0.01	0.06	0.08	0.01	0.01	1.00	0.01	0.72	1.03	0.68	0.91	0.95	1.16	0.34					
M	0.14	0.39	0.01	0.01	0.02	0.31	0.02	0.01	0.76	0.01	0.67	0.83	0.83	0.81	0.62	1.17	0.62					
K	0.01	0.06	0.01	0.00	0.04	0.17	0.00	0.01	0.40	0.01	0.22	0.78	0.75	0.97	0.13	1.00	0.51					
R	0.03	0.01	0.15	0.11	0.01	0.18	1.00	0.01	0.34	0.01	0.22	1.04	0.69	1.04	0.08	1.13	0.52					
H	0.01	0.01	0.01	0.01	1.07	0.35	0.37	0.00	0.41	0.01	0.66	1.10	0.92	1.00	0.48	1.17	1.24					
F	0.03	0.14	0.03	0.01	0.02	0.08	0.04	0.03	0.51	0.02	0.73	0.42	0.71	1.14	0.78	1.21	0.50					
Y	0.03	0.01	0.01	0.01	0.07	0.07	0.03	0.01	0.58	0.01	1.00	0.40	0.88	1.04	0.52	1.27	0.50					
W	0.02	0.02	0.03	1.00	0.01	0.06	0.01	0.02	0.33	0.02	0.42	0.26	0.62	0.77	0.15	0.93	0.40					
N	0.02	0.12	0.56	0.00	1.00	0.19	0.03	0.03	0.26	0.34	0.33	1.18	1.01	1.22	0.53	1.17	0.88					
S	0.06	0.01	0.01	0.01	0.11	0.10	0.00	0.00	0.32	0.08	0.23	0.85	1.00	1.28	0.18	1.42	1.09					
E	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.32	0.02	0.01	0.60	0.02	0.38	0.84	1.14	1.11	0.25	1.23	0.72					
Q	0.01	0.16	0.00	0.00	0.01	0.23	0.03	0.01	0.56	0.01	0.43	0.73	1.03	0.90	0.28	1.20	1.03					
1 nM		生殖系																				
亲本	G	I	S	W	N	S	R	G	I	G	Y	A	D	S	V	K	G					
	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65					
归一化ER(AA)的计数																						
*	0.00	0.00	0.02	0.31	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.46	0.07	0.09	0.18	0.03	0.43	0.00					
P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.01	0.00	0.00	0.60	1.19	1.13	0.32	0.31	0.59						
G	1.00	0.01	0.08	0.06	0.00	0.52	0.04	1.00	0.05	1.00	0.33	1.10	0.88	1.15	0.62	0.96	1.00					
A	0.93	0.38	0.12	0.00	0.01	0.76	0.12	0.01	0.50	0.09	0.52	1.00	0.94	1.25	0.94	1.18	0.84					
C	0.05	0.03	0.10	0.07	0.01	0.21	0.25	0.01	0.58	0.01	0.36	0.39	0.35	0.30	0.52	0.21						
S	0.06	0.20	1.00	0.01	0.22	1.00	0.10	0.00	0.66	0.06	0.51	1.25	1.05	1.00	0.63	1.13	0.87					
T	0.05	0.24	1.40	0.00	0.05	0.31	0.00	0.00	0.82	0.01	0.58	1.07	1.12	1.19	0.90	1.01	0.80					
V	0.12	0.96	0.08	0.00	0.01	0.06	0.00	0.01	1.03	0.01	0.77	1.06	0.78	1.02	1.00	1.09	0.35					
L	0.22	0.68	0.01	0.06	0.01	0.26	0.12	0.13	0.89	0.01	0.75	1.00	0.84	0.94	0.73	1.25	0.42					
+	0.16	1.00	0.06	0.00	0.07	0.10	0.00	0.00	1.00	0.00	0.82	1.04	0.71	0.97	1.00	1.08	0.29					
M	0.29	0.57	0.01	0.01	0.02	0.46	0.01	0.01	0.84	0.01	0.81	0.92	0.90	0.87	0.63	1.06	0.61					
K	0.00	0.82	0.00	0.00	0.05	0.36	0.00	0.00	0.61	0.01	0.33	0.87	0.84	0.95	0.16	1.00	0.71					
R	0.02	0.01	0.16	0.10	0.00	0.29	1.00	0.01	0.54	0.01	0.34	1.13	0.84	1.05	0.12	1.13	0.58					
H	0.00	0.01	0.00	1.00	0.55	0.34	0.01	0.59	0.01	0.70	1.13	1.08	1.08	0.56	1.17	1.14						
F	0.01	0.14	0.01	0.00	0.01	0.05	0.06	0.03	0.66	0.01	0.79	0.45	0.76	1.15	0.85	1.16	0.56					
Y	0.00	0.01	0.00	0.01	0.07	0.15	0.09	0.00	0.73	0.00	1.00	0.42	1.00	1.01	0.61	1.22	0.54					
W	0.02	0.01	0.02	1.00	0.01	0.08	0.02	0.01	0.50	0.05	0.48	0.32	0.72	0.81	0.18	0.89	0.42					
N	0.01	0.14	0.70	0.00	1.00	0.34	0.06	0.04	0.37	0.48	0.36	1.27	1.05	1.16	0.61	1.11	0.86					
D	0.05	0.01	0.00	0.00	0.15	0.20	0.00	0.00	0.43	0.13	0.28	0.91	1.00	1.31	0.21	1.34	1.04					
E	0.01	0.02	0.00	0.00	0.01	0.50	0.04	0.00	0.66	0.03	0.38	0.85	1.12	1.12	0.29	1.14	0.72					
Q	0.00	0.35	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.00	0.86	0.01	0.50	0.77	1.07	0.87	0.32	1.06	0.79					

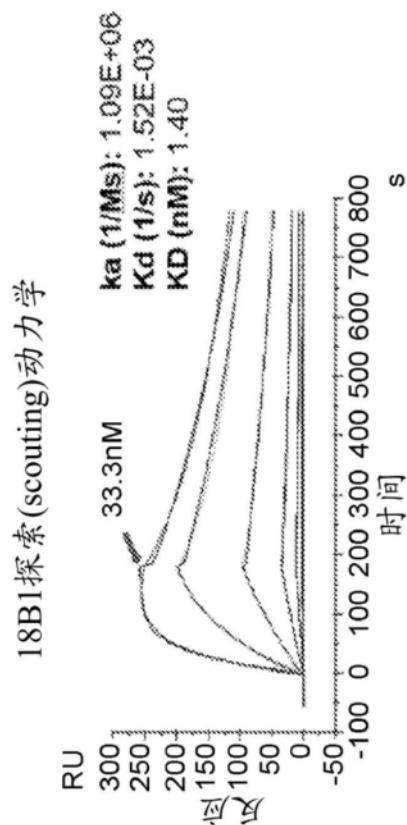
图18F

抗体变体	相对于18B1的KD	0.2 nM NGS
18B1_LC_R24A	1.15	0.91
18B1_LC_S26A	1.28	1.32
18B1_LC_Q27A	1.06	1.27
18B1_LC_G28A	0.85	1.05
18B1_LC_I29A	1.46	1.44
18B1_LC_S30A	0.88	0.70
18B1_LC_S31A	0.74	0.60
18B1_LC_L33A	1.08	1.05
18B1_LC_Q89A	0.23	0.07
18B1_LC_Q90A	1.46	1.63
18B1_LC_F91A	0.19	0.05
18B1_LC_N92A	0.63	0.34
18B1_LC_S93A	1.86	1.84
18B1_LC_Y94A	0.01	0.01
18B1_LC_P95A	0.08	0.03
18B1_LC_L95aA	0.01	0.01
18B1_LC_I96A	0.16	0.02
18B1_LC_T97A	1.16	0.92
18B1_HC_F89LG26A	0.71	0.47
18B1_HC_F89LF27A	0.18	0.05
18B1_HC_F89LT28A	0.98	1.25
18B1_HC_F89LF29A	0.05	0.01
18B1_HC_F89LD30A	0.46	0.30
18B1_HC_F89LD31A	0.03	0.02
18B1_HC_F89LH32A	0.01	0.01
18B1_HC_F89LM34A	0.25	0.08
18B1_HC_F89LH35A	0.02	0.01
18B1_HC_F89LG50A	1.02	0.87
18B1_HC_F89LI51A	0.28	0.20
18B1_HC_F89LS52A	0.22	0.07
18B1_HC_F89LW52aA	1.28	0.00
18B1_HC_F89LN53A	0.02	0.00
18B1_HC_F89LS54A	0.57	0.61
18B1_HC_F89LR55A	0.42	0.07
18B1_HC_F89LG56A	0.08	0.01
18B1_HC_F89LI57A	0.54	0.36
18B1_HC_F89LG58A	0.16	0.04
18B1_HC_F89LY59A	0.78	0.42
18B1_HC_F89LD61A	0.78	0.85
18B1_HC_F89LS62A	0.93	1.24
18B1_HC_F89LV63A	0.88	0.89
18B1_HC_F89LK64A	1.23	1.22
18B1_HC_F89LG65A	1.03	0.87
18B1_HC_F89LE96A	0.04	0.01
18B1_HC_F89LY97A	0.07	0.02
18B1_HC_F89LS98A	0.55	0.59

图19

18B1 HC F89LR99A	0.63	0.53
18B1 HC F89LG100A	0.01	0.01
18B1 HC F89LY100aA	0.31	0.34
18B1 HC F89LV100cA	1.17	1.46
18B1 HC F89LL100dA	0.27	0.01
18B1 HC F89LD101A	0.14	0.02
18B1 HC F89LV102A	1.14	0.90
18B1亲本	1.00	1.00
18B1 LC D50A	0.77	0.30
18B1 LC S52A	0.93	1.09
18B1 LC S53A	0.79	1.07
18B1 LC L54A	0.93	0.99
18B1 LC E55A	0.57	0.23
18B1 LC S56A	0.98	0.96
18B1 LC R24A	1.15	0.91

图19 (续)



- **hu IL-7R (30nM, 10nM, 3.3nM)**
- 运行缓冲液: HBS-P+ pH 7.4
- 温度: 37°C
- 捕获: HMEP\_0216-01 mAb
  - 12.5nM, 在10μL/min 下 20s
- 再生: 使用MgCl<sub>2</sub> 2X 30s

图20A

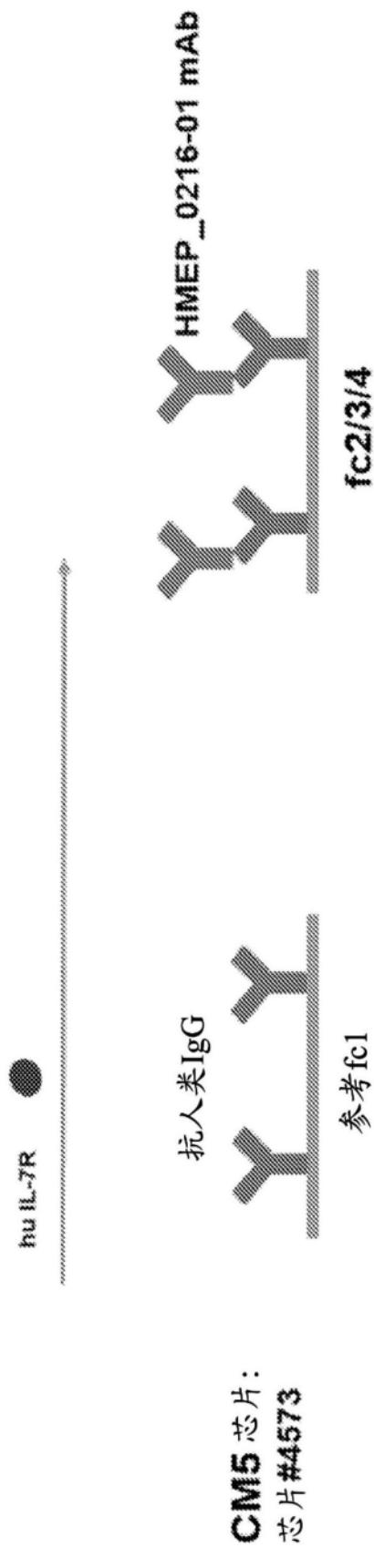


图20B

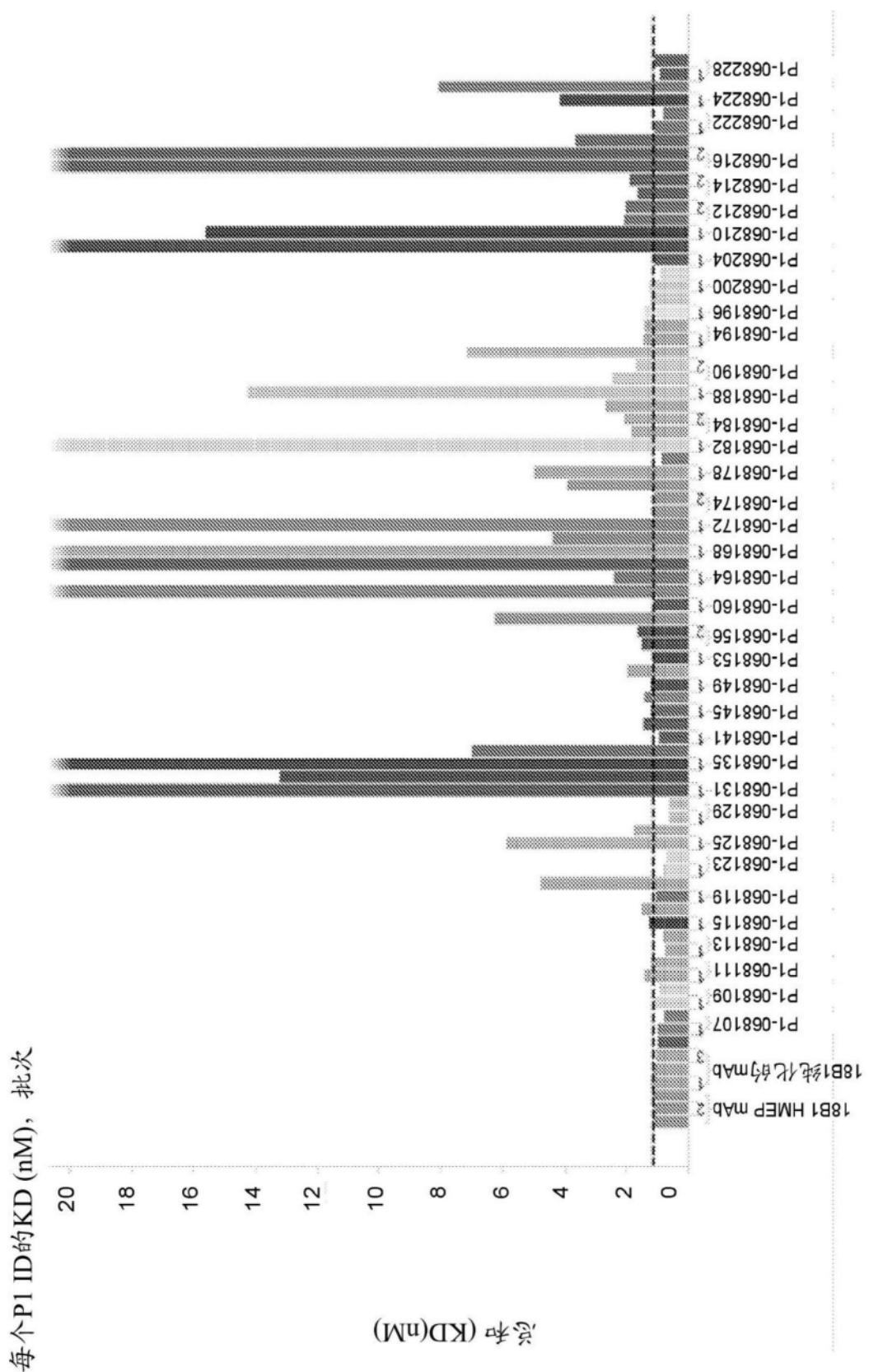


图21

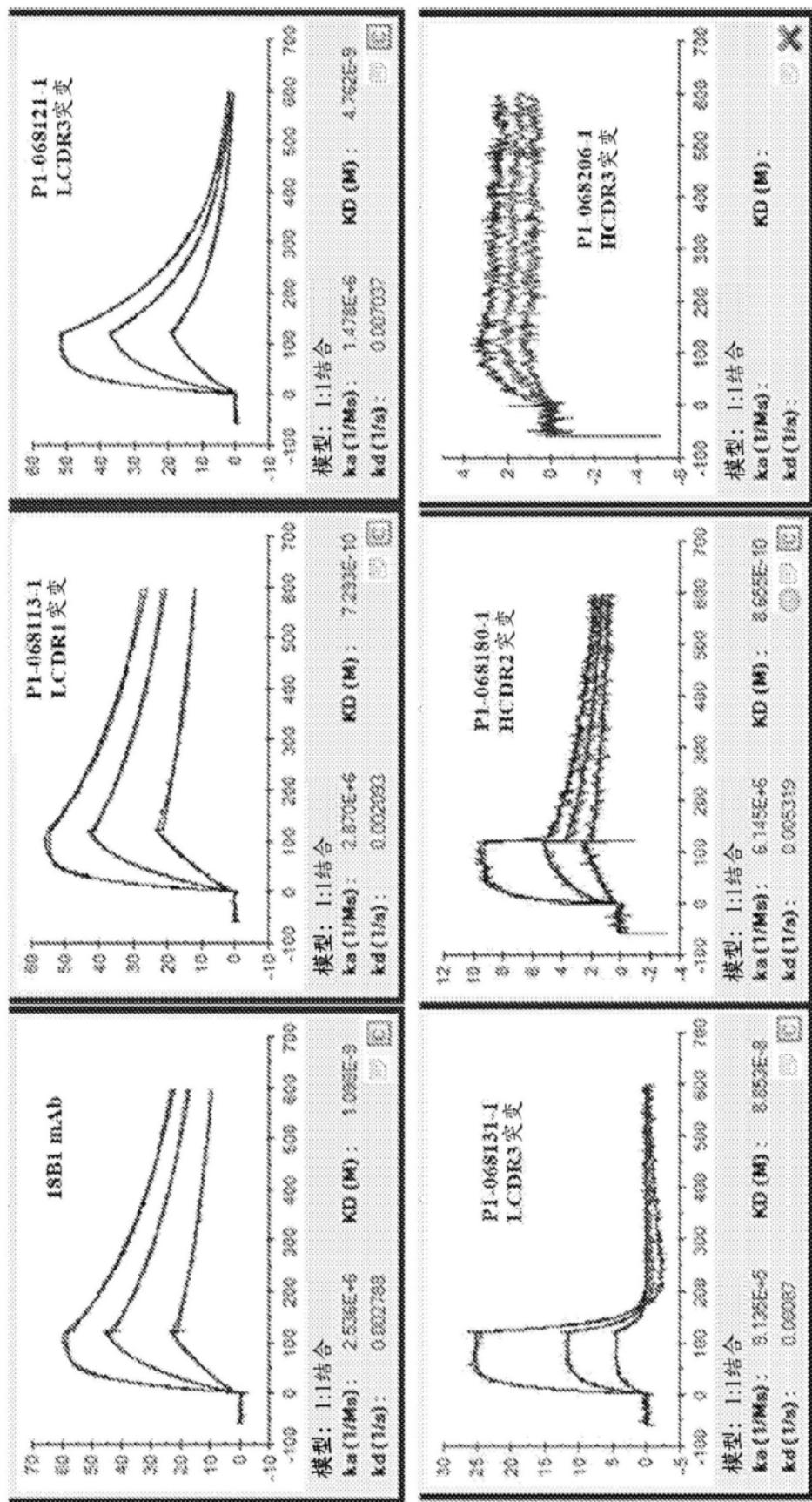


图22

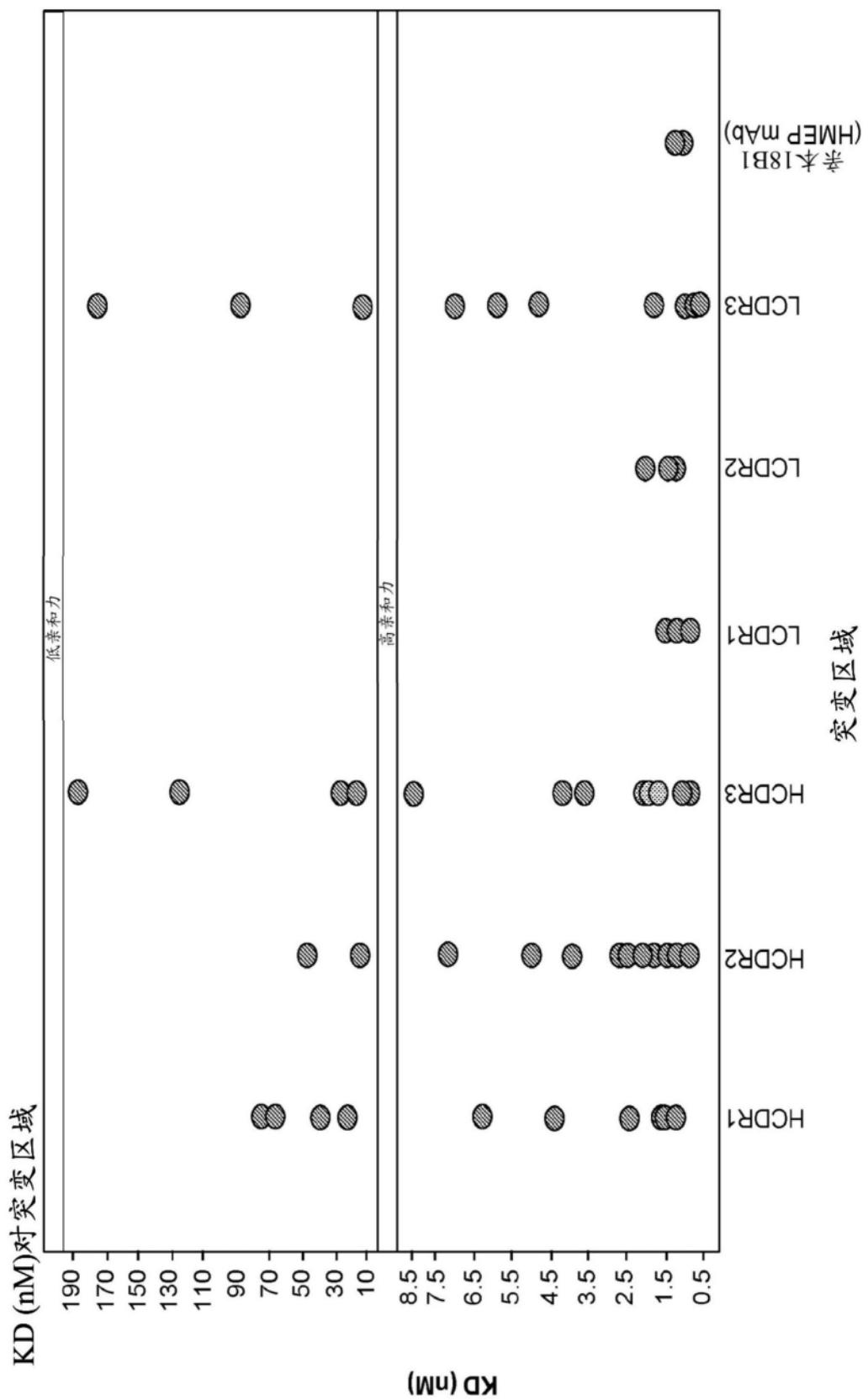


图23

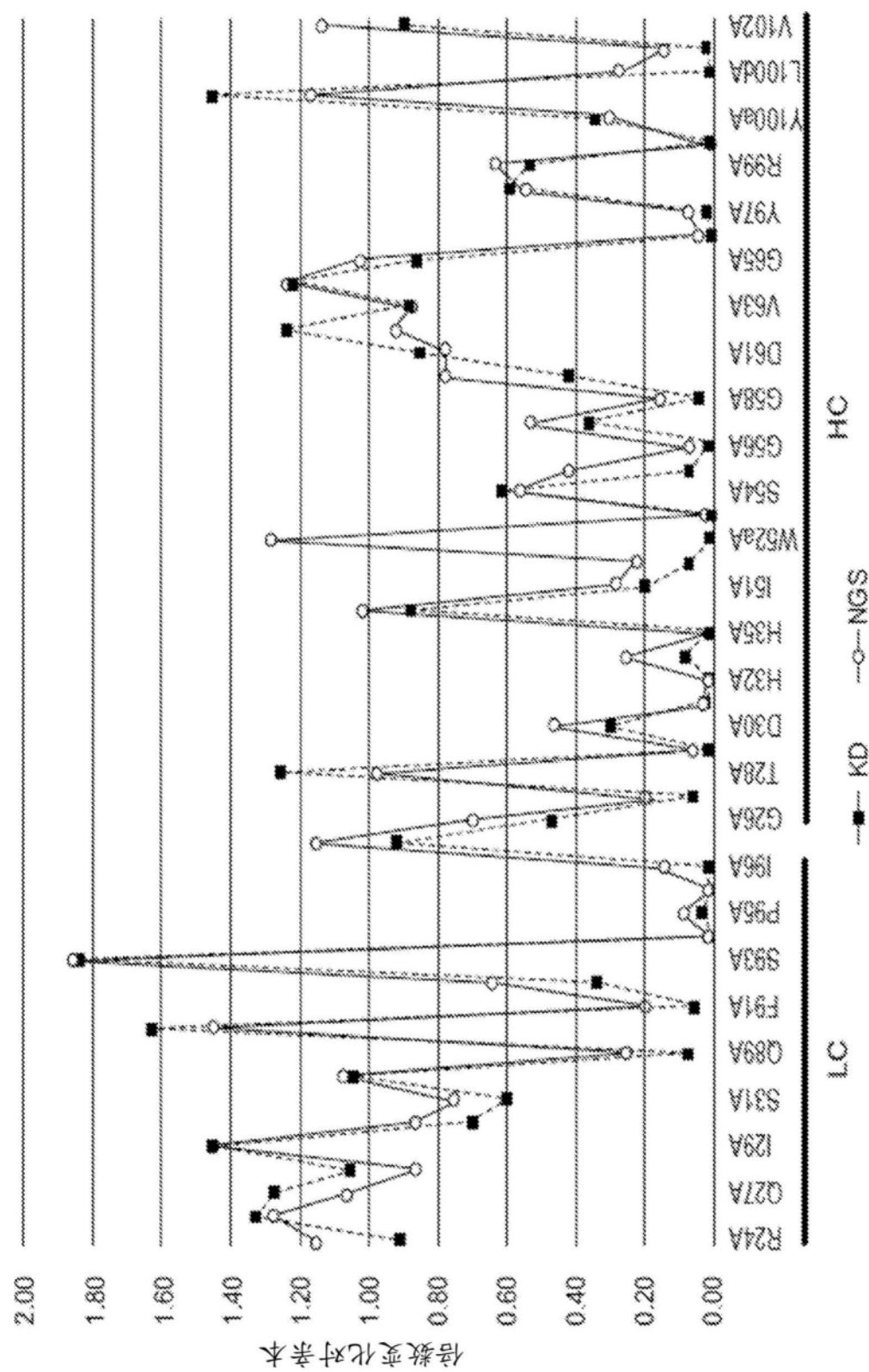


图24

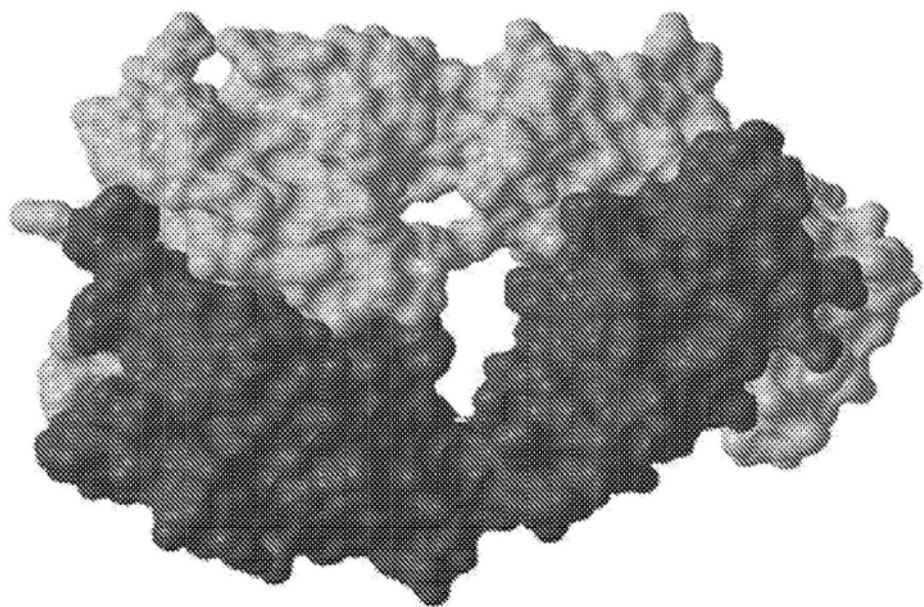


图25A

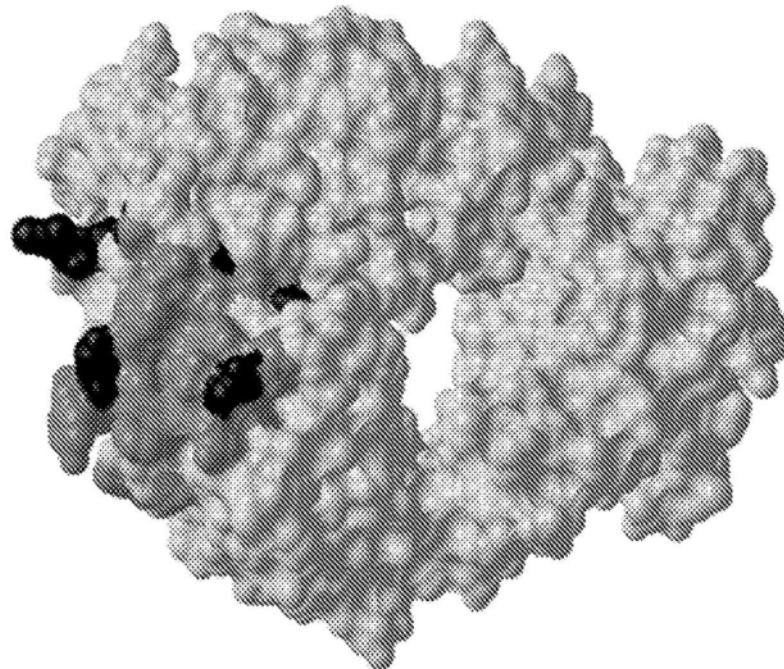


图25B

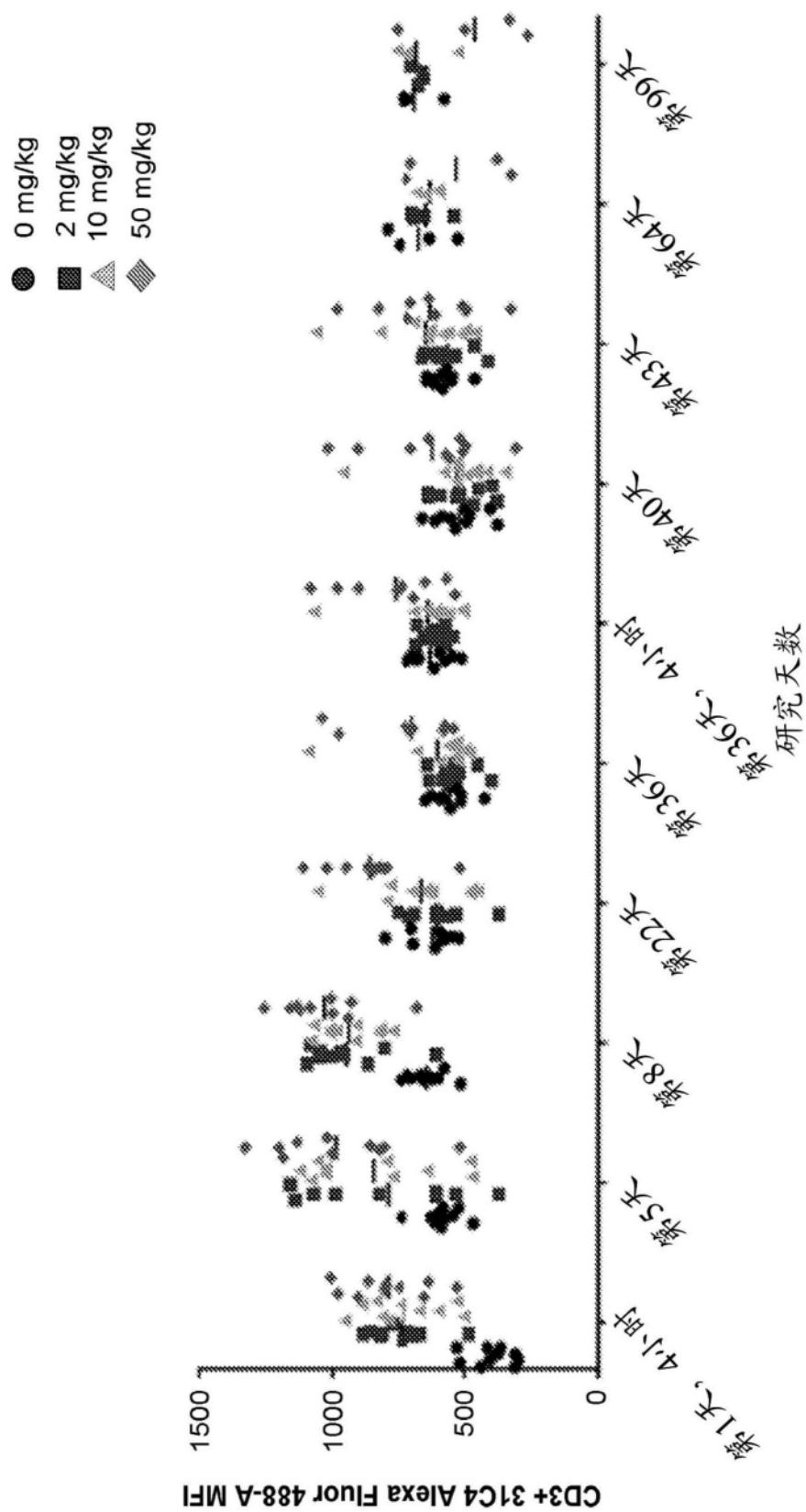


图26

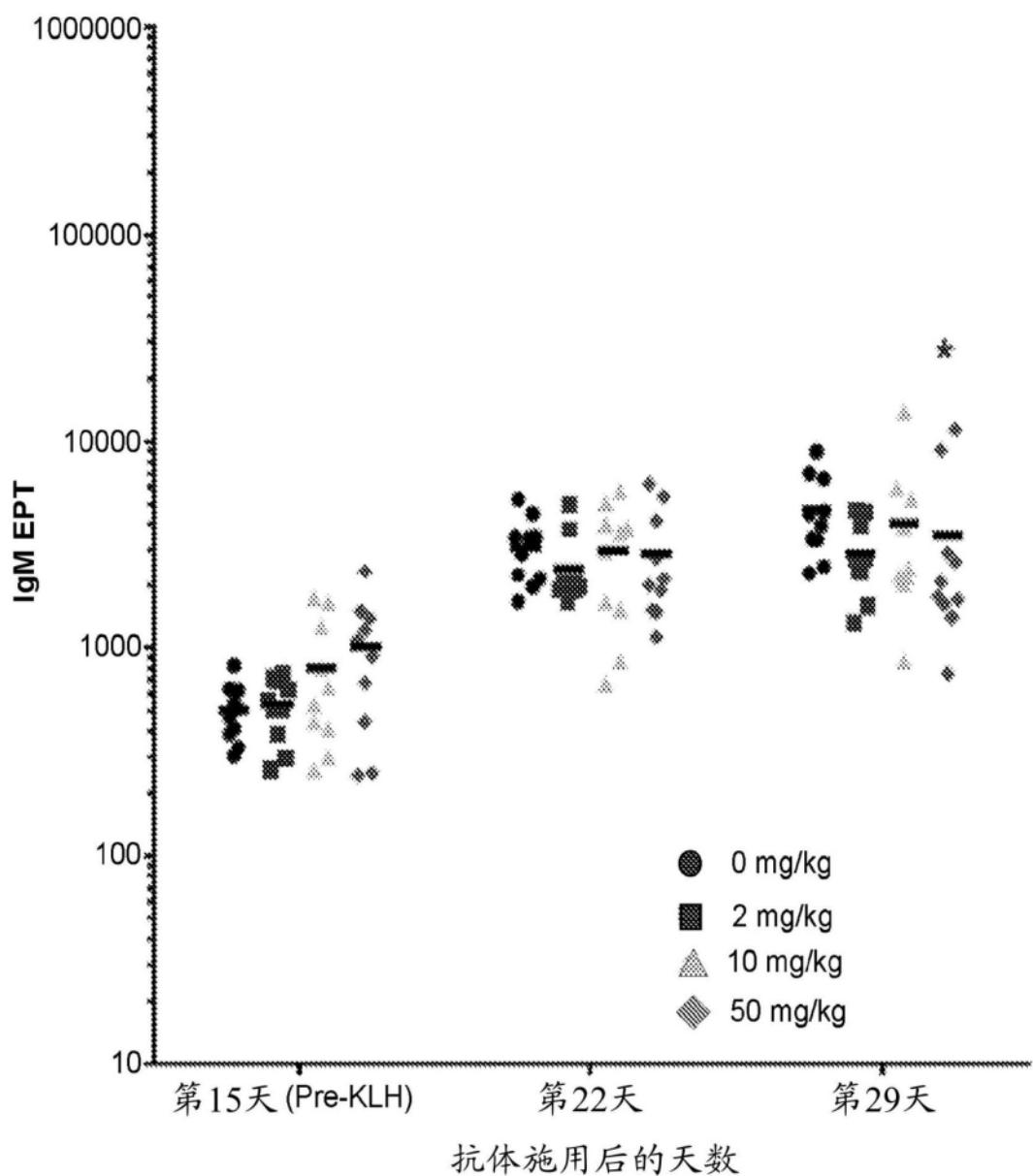


图27A

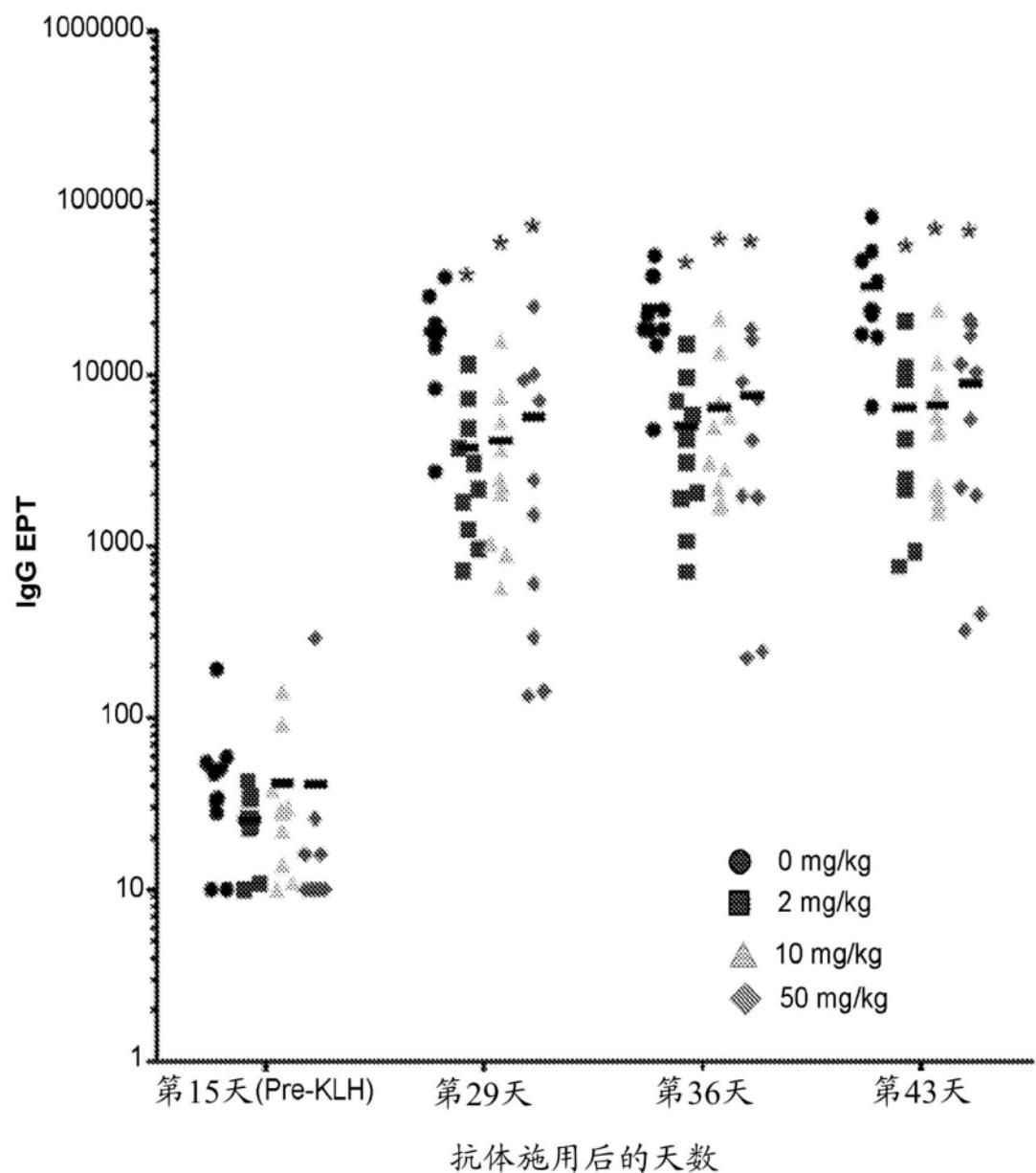


图27B

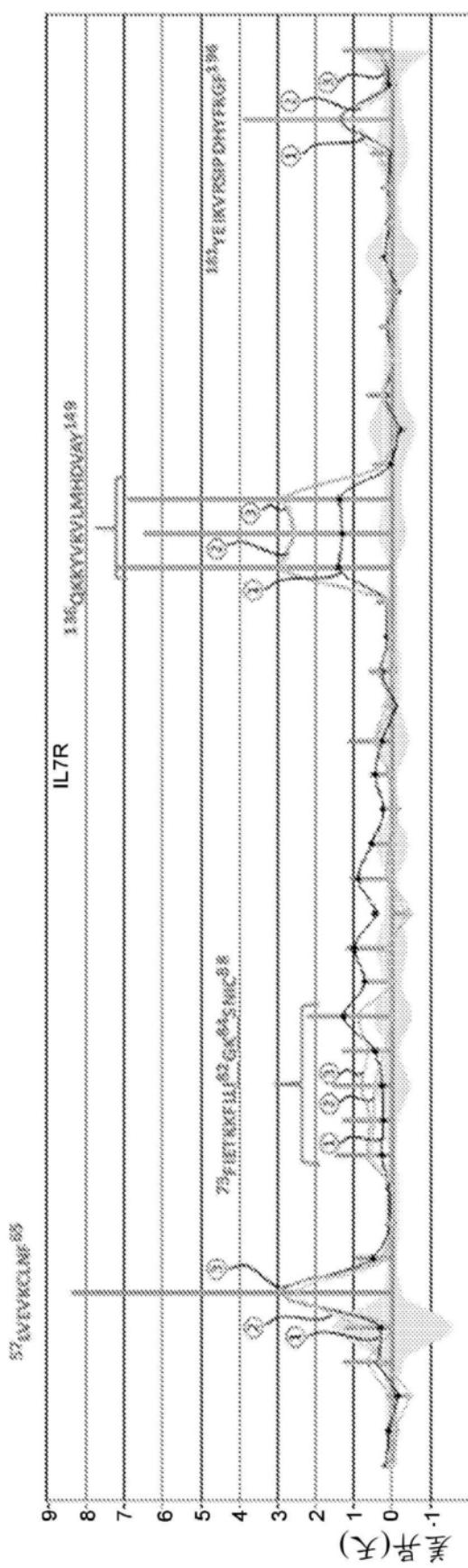


图28A

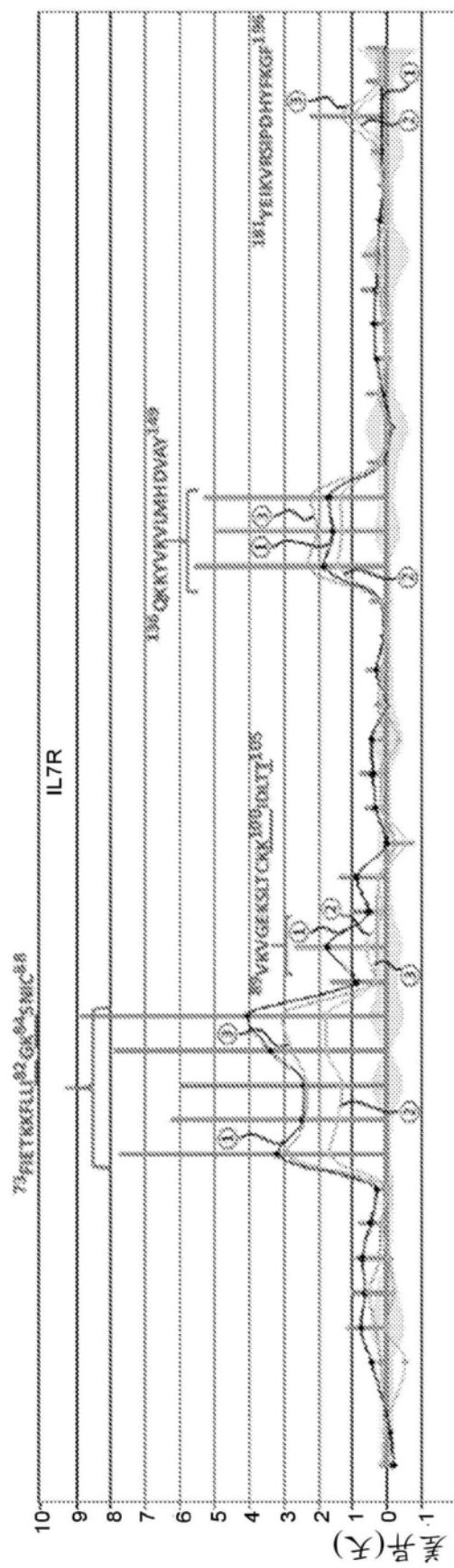


图28B

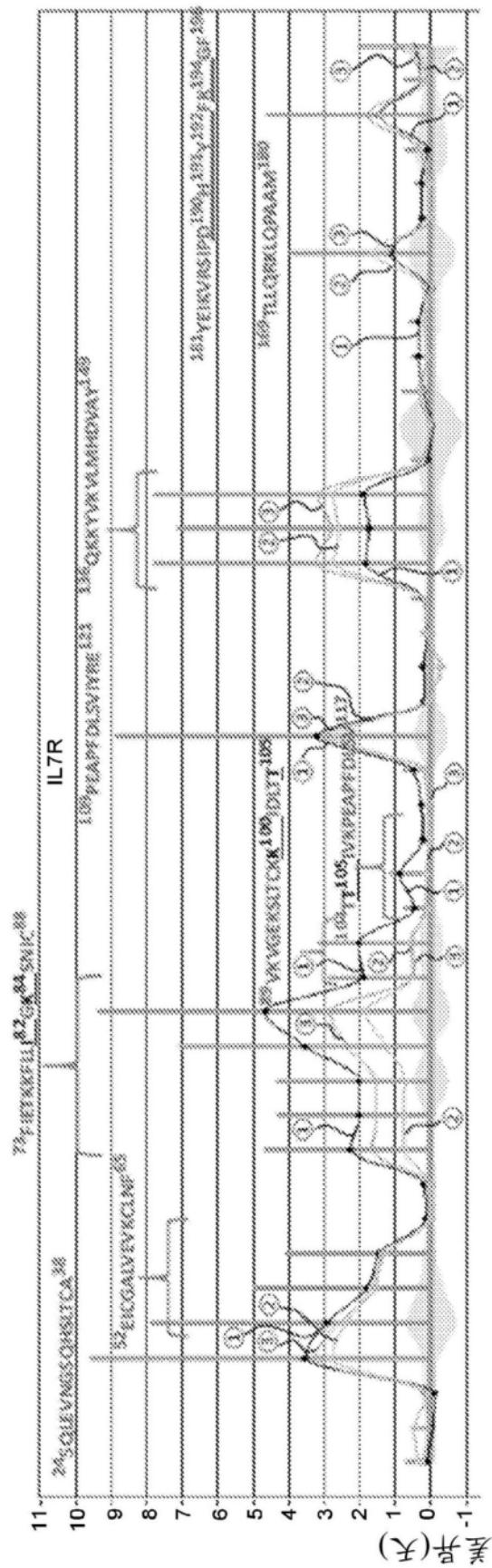


图28C

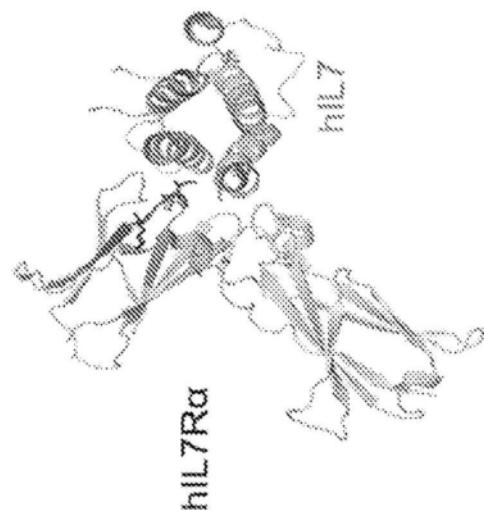


图29A

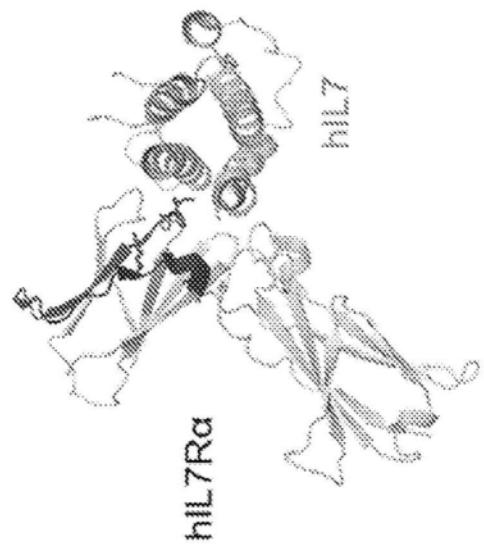


图29B

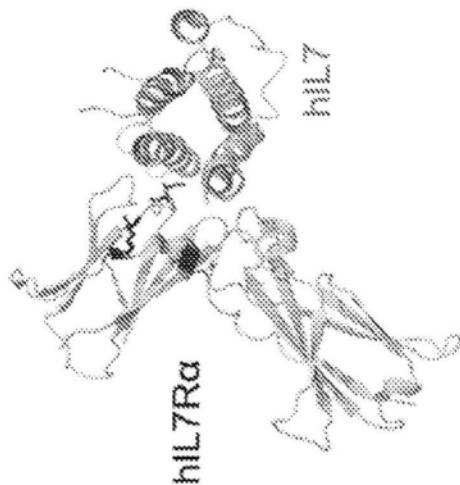


图29C