

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 4 月 6 日 (06.04.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/051621 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/122185
- (22) 国际申请日: 2022 年 9 月 28 日 (28.09.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202111149114.9 2021年9月29日 (29.09.2021) CN
- (71) 申请人: 中山康方生物医药有限公司
(AKESO BIOPHARMA, INC.) [CN/CN]; 中国广东省中山市火炬开发区神农路 6 号, Guangdong 528437 (CN)。
- (72) 发明人: 夏瑜(XIA, Yu); 中国广东省中山市火炬开发区神农路 6 号, Guangdong 528437 (CN)。王忠民(WANG, Zhongmin); 中国广东省中山市火炬开发区神农路 6 号, Guangdong 528437 (CN)。张鹏(ZHANG, Peng); 中国广东省中山市火炬开发区神农路 6 号, Guangdong 528437 (CN)。李百勇(LI, Baiyong); 中国广东省中山市火炬开发区神农路 6 号, Guangdong 528437 (CN)。
- (74) 代理人: 中国贸促会专利商标事务所有限有限公司(CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市复兴门内大街 158 号远洋大厦 F10 层, Beijing 100031 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,

(54) Title: ANTI-LAG3 ANTIBODY, PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USE

(54) 发明名称: 抗LAG3抗体、药物组合物及用途

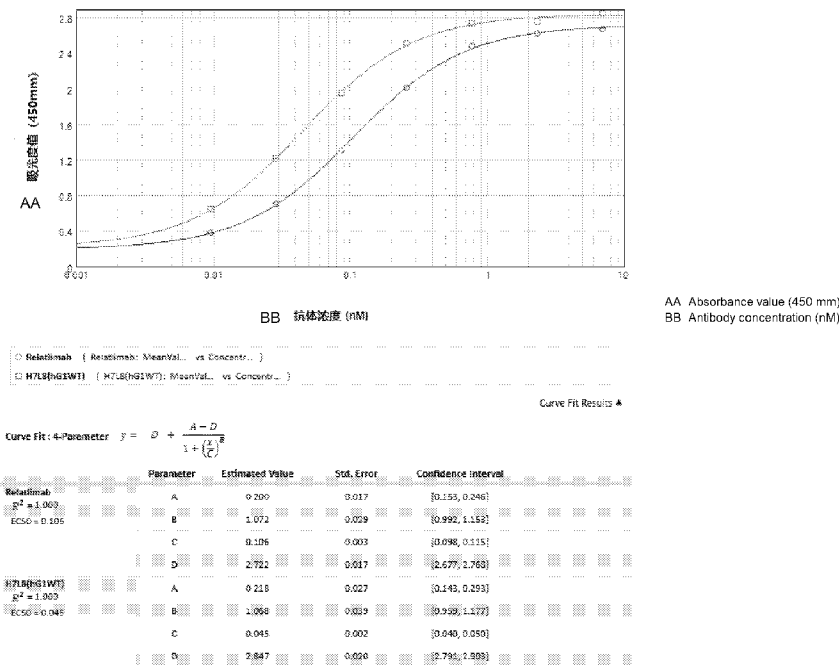


图 1

(57) Abstract: The present invention belongs to the field of biomedicine, and relates to an anti-LAG3 antibody, a pharmaceutical composition containing same, and the use thereof. Specifically, the present invention relates to an anti-LAG3 antibody or an antigen binding fragment thereof, wherein the antibody comprises a heavy chain variable region and a light chain variable region, the heavy chain variable region comprises HCDR1-HCDR3 having amino acid sequences as shown in SEQ ID NOS: 9-11, respectively, and the light chain variable region comprises LCDR1-LCDR3 having amino acid sequences as shown in SEQ ID NOS: 12-14, respectively.

CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

The anti-LAG3 antibody has superior affinity and specificity, and has good application prospects.

(57) 摘要: 属于生物医药领域, 涉及一种抗LAG3抗体、包含该抗LAG3抗体的药物组合物及用途。具体地, 涉及一种抗LAG3抗体或其抗原结合片段, 包含重链可变区和轻链可变区, 其中, 所述重链可变区包含: 氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:9-11所示的HCDR1-HCDR3; 和所述轻链可变区包含: 氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:12-14所示的LCDR1-LCDR3。抗LAG3抗体具有优越的亲合力和特异性, 具有良好的应用前景。

抗 LAG3 抗体、药物组合物及用途

技术领域

本发明属于生物医药领域，涉及一种抗 LAG3 抗体、包含该抗 LAG3 抗体的药物组
5 合物及用途。

背景技术

肿瘤尤其是恶性肿瘤是当今世界严重危害人类健康的疾病，在各种疾病所致死亡
中高居第二位。而且近年来，其发病率呈明显上升趋势。恶性肿瘤治疗效果差，晚期
10 转移率高，预后多不佳。目前临床上所采用的常规治疗方法如放、化疗和手术治疗虽
然在很大程度上缓解了病痛，延长了生存时间，但这些方法均存在很大的局限性，其
疗效难以进一步提高。

淋巴细胞活化基因 3 (lymphocyte-activation gene 3, LAG3)，即 CD223，是
一种由 498 个氨基酸组成的 I 型跨膜蛋白，属于免疫球蛋白超家族 (immunoglobulin
15 superfamily, IgSF) 成员。LAG3 主要表达于活化的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞，另外
自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞、B 细胞、调节性 T 细胞 (regulatory T cell,
Treg) 和浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDC) 等细胞也表
达 LAG3。(Ruffo Elisa, Wu Richard C, Bruno Tullia C et al. Lymphocyte-activation
gene 3 (LAG3): The next immune checkpoint receptor. [J]. Semin Immunol, 2019,
20 42: 101305.)。

LAG3 分子基因定位于人 12 号染色体 (20p13.3) 上，与 CD4 分子基因相邻，二
者具有相同的外显子和内含子。虽然二者的氨基酸序列同源性只有约 20%，但 LAG3 分
子与 CD4 分子在结构上具有较高的相似性。主要组织相容性复合体 II 类分子 (MHC II)、
肝窦内皮细胞凝集素 (LSECtin) 分子和半乳糖凝集素 3 (galectin-3) 分子是 LAG3
25 分子的相关配体。MHC II 类分子是 LAG3 的主要配体，其与 MHC II 类分子的亲和力 (Kd:
60 nmol · L⁻¹) 是 CD4 分子的 100 倍，表明 LAG3 分子能够有效竞争 CD4 与 MHC II 类
分子的结合，抑制 T 细胞活化。

肿瘤微环境中，T 细胞活化 24 小时后便能检测到免疫抑制分子 LAG3 分子的表达，
进而导致 T 细胞失能或者凋亡。LAG3 分子通过其 D1 结构域 (含有 1 个富含脯氨酸的
30 环状结构) 形成二聚体分子与 CD4⁺T 细胞活化第一信号轴 “CD3-TCR-MHC II” 中 MHC II

分子特异性结合，一方面阻断 T 细胞活化的信号转导通路，另一方面 LAG3 分子胞内段（KIEELE 基序）产生免疫抑制信号下调 CD4⁺ T 细胞活性。LAG3 分子能促进 Treg 细胞分化，参与信号转导及转录激活因子 5 下游信号，从而增强 Treg 细胞的抑制作用，这是肿瘤逃逸免疫系统杀伤的机制之一（Andrews Lawrence P, Marciscano Ariel E, Drake Charles G et al. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. [J]. Immunol Rev, 2017, 276: 80-96.）。

多项研究表明，LAG3 在各种恶性肿瘤的肿瘤浸润性 CD8⁺ T 细胞中过表达。例如卵巢癌中，肿瘤浸润的纽约食管鳞状细胞癌 1 抗原（NY-ESO-1）特异性 CD8⁺ T 细胞表达高水平的 PD-1 和 LAG3，产生 IFN- γ 和 TNF- α 的能力降低，进而导致淋巴细胞失活。Galectin-3 和 LSECtin 主要与 LAG3 相互作用来调节 CD8⁺ T 细胞的活化与功能。另外从黑色素瘤转移患者中分离的黑色素瘤抗原特异性 T 细胞在 LAG3 及其他免疫检查点分子 CTLA-4 和 TIM-3 表达上调显著。（刘昊，李新颖，罗龙龙，等. 淋巴细胞活化基因 3 分子生物学功能及其抗体药物临床应用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2019，33(01):70-78.）。

目前已有多种 LAG3 抗体药物进入临床研究阶段，其中，百时美施贵宝的 Relatlimab 进展最快，目前已开展了 10 个临床研究，绝大多数是以 Relatlimab 与纳武单抗进行联合用药，用于治疗血液瘤、黑色素瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞癌和非小细胞肺癌等肿瘤。

目前，尚需要开发新的抗 LAG3 抗体药物。

发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，得到了一种抗 LAG3 抗体。本发明人惊奇地发现，本发明的抗 LAG3 抗体（也简称为抗体或本发明的抗体）具有优越的亲力和/或特异性，甚至在一个或多个方面优于阳性对照抗体（例如 Relatlimab）。

由此提供了下述发明：

本发明的一个方面涉及一种抗 LAG3 抗体或其抗原结合片段，包含重链可变区和轻链可变区，其中，

所述重链可变区包含：氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 9-11 所示的 HCDR1-HCDR3；并且所述轻链可变区包含：氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 12-14 所示的 LCDR1-LCDR3；

所述重链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NOs：9-11所示的HCDR1-HCDR3；并且所述轻链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：15和SEQ ID NO：16所示的LCDR1-LCDR3；

或者

5 所述重链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NOs：9-11所示的HCDR1-HCDR3；并且所述轻链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO：17、SEQ ID NO：15和SEQ ID NO：14所示的LCDR1-LCDR3。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

10 所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO：2所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO：4所示；

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO：2所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO：6所示；

或者

15 所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO：2所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO：8所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

20 在本发明的一些实施方式中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述的抗体以小于0.2nM，例如小于0.15nM、小于0.1nM、小于0.08nM、0.06nM或小于0.05nM或更小的EC₅₀结合人LAG3-mFc；优选地，所述EC₅₀通过间接ELISA方法测得。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

所述的抗体包括非-CDR区，且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种，例如来自人抗体。

25 在本发明的一些实施方式中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

所述的抗体，其恒定区来自人抗体；

优选地，所述抗体的恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区。

在本发明的一些实施方式中，所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

30 所述抗LAG3抗体的重链恒定区为Ig gamma-1 chain C region（例如，如SEQ ID NO：

18所示)或Ig gamma-4 chain C region (例如,如SEQ ID NO: 20所示);轻链恒定区为Ig kappa chain C region (例如,如SEQ ID NO: 19所示)。

在本发明的一些实施方式中,所述的抗LAG3抗体为单克隆抗体。

在本发明的一些实施方式中,所述的抗LAG3抗体为免疫球蛋白形式。

5 在本发明的一些实施方式中,所述的抗LAG3抗体为单链抗体。

本发明的另一方面涉及抗体药物偶联物 (antibody-drug conjugate, ADC), 其包括抗体或其抗原结合片段以及小分子药物, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段为本发明中任一项所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段; 优选地, 所述小分子药物为小分子细胞毒药物;
10 更优选地, 所述小分子药物为肿瘤化疗药物。

所述化疗药物可以是常规的肿瘤化疗药物, 例如烷化剂、抗代谢药、抗肿瘤抗生素、植物类抗癌药、激素、免疫制剂等。

在本发明的一个或多个实施方案中, 所述的抗体药物偶联物, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段通过连接子与小分子药物连接; 所述连接子可以是本领域技术人员知悉的连接子, 例如, 所述连接子为胍键、二硫键或肽键。
15

在本发明的一个或多个实施方案中, 所述的抗体药物偶联物, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段与小分子药物的摩尔比为1: (2-4), 例如1: 2, 1: 3或1: 4。

本发明的再一方面涉及一种分离的核酸分子, 其编码本发明中任一项所述的抗LAG3抗体。
20

本发明的再一方面涉及一种重组载体, 其包含本发明的分离的核酸分子。

本发明的再一方面涉及一种宿主细胞, 其包含本发明的分离的核酸分子, 或者包含本发明的重组载体。

25 本发明的再一方面涉及一种制备本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法, 其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞, 以及从细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段的步骤。

30 本发明的再一方面涉及一种药物组合物, 其包含本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明中任一项所述的抗体药物偶联物; 可选地, 其还包括药学上可接受的辅

料。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明中任一项所述的抗体药物偶联物在制备治疗和/或预防肿瘤或贫血病的药物中的用途；

5 优选地，所述肿瘤为选自卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌和肾癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

优选地，所述血液瘤为白血病；

优选地，所述食管癌为食管鳞癌。

10 根据本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明中任一项所述的抗体药物偶联物，其用于治疗 and/或预防肿瘤或贫血病；

优选地，所述肿瘤为选自卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌和肾癌中的一种或多种；

15 优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

优选地，所述血液瘤为白血病；

优选地，所述食管癌为食管鳞癌。

本发明的再一方面涉及一种治疗和/或预防肿瘤或贫血病的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明中任一项所述的
20 抗体药物偶联物的步骤；

优选地，所述肿瘤为选自卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌和肾癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

25 优选地，所述血液瘤为白血病；

优选地，所述食管癌为食管鳞癌。

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本
30

发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语 EC_{50} 是指半最大效应浓度 (concentration for 50% of maximal effect)，是指能引起 50% 最大效应的浓度。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指通常由两对多肽链（每对具有一条“轻”
5 (L) 链和一条“重” (H) 链）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区 (VH) 和重链恒定区 (CH) 组成。重链恒定区由 3 个结构域 (CH1、CH2 和 CH3) 组成。
10 各轻链由轻链可变区 (VL) 和轻链恒定区 (CL) 组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括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。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域 (称为互补决定区 (CDR))，其间散布有较保守的称为构架区 (FR) 的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 从氨基末端至
15 羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区 (VH 和 VL) 分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Bethesda M. d., Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 1987;196:901-917; Chothia 等人 Nature 1989;342:878-883, 或者 IMGT 编号系统定义, 见 Ehrenmann F, Kaas Q,
20 Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J]. Nucleic acids research, 2009; 38(suppl_1): D301-D307 的定义。

术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG (例如，IgG1,
25 IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的，术语“单抗”和“单克隆抗体”是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段，也即除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常
30 识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获

得 (Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. nature, 1975; 256(5517): 495), 但也可采用重组 DNA 技术获得(如参见 U. S. Patent 4, 816, 567)。

如本文中所使用的, 术语“人源化抗体”是指, 人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体(供体抗体)的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段, 其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源(例如, 小鼠、大鼠或兔)抗体。此外, 受体抗体的构架区(FR)的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换, 或被其他抗体的氨基酸残基替换, 以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容, 可参见例如, Jones et al., Nature 1986; 321:522 525; Reichmann et al., Nature, 1988; 332:323 329; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 1992; 2:593-596;和 Clark, Immunol. Today 2000; 21: 397 402。

如本文中所使用的, 术语“分离的”或“被分离的”指的是, 从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分, 那么可能是其所处的天然环境发生了改变, 或从天然环境下分离出该物质, 或二者情况均有发生。例如, 某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽, 而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质, 也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

如本文中所使用的, 术语“载体(vector)”是指, 可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时, 载体称为表达载体。载体可以通过转化, 转导或者转染导入宿主细胞, 使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的, 包括但不限于: 质粒; 噬菌粒; 柯斯质粒; 人工染色体, 例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或 P1 来源的人工染色体(PAC); 噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于, 逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如 SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件, 包括但不限于, 启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外, 载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草杆菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，GS 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

5 如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异性的抗体）是指，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力 (K_D) 结合该抗原。

10 如本文中所使用的，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的解离平衡常数 (K_D) 结合抗原（例如，PD-1 蛋白）。可以使用本领域技术人员知悉的方法测定 K_D ，例如使用 ForteBio 分子相互作用仪测定。

15 如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

20 如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的（参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995），并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液；表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80；
25 离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如肿瘤）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如肿瘤）的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。
30 例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫

系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

如本文中所使用的，当提及淋巴细胞活化基因 3 (lymphocyte-activation gene 3, LAG3) 的氨基酸序列时，其包括 LAG3 蛋白的全长，或者 LAG3 的胞外片段 LAG3 ECD 或者包含 LAG3 ECD 的片段；还包括 LAG3 蛋白的全长的融合蛋白或 LAG3 ECD 的融合蛋白，例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片段 (mFc 或 hFc) 进行融合的片段。然而，本领域技术人员理解，在 LAG3 蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异 (包括但不限于置换，缺失和/或添加)，而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“添加)，蛋白”应包括所有此类序列，包括其天然或人工的变体。并且，当描述 LAG3 蛋白的序列片段时，其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

发明的有益效果

本发明取得了如下效果中的一项或多项：

- (1) 本发明的抗 LAG3 抗体具有优越的亲力和特异性；
- (2) 本发明的抗 LAG3 抗体能够有效地阻断 LAG3 与 MHC-II 相互作用，特异地解除 LAG3 对机体免疫抑制。

附图说明

图 1：间接 ELISA 方法测定 H7L8 (hG1WT) 与抗原 LAG3-mFc 结合活性检测结果。

图 2：ELISA 方法测定 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT)、H7L10 (hG4WT) 与抗原人 LAG3-mFc 的结合活性。

图 3：FACS 检测 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT)、H7L10 (hG4WT) 与 293T-LAG3 细胞表面抗原 LAG3 的结合活性。

图 4：竞争流式细胞法测定 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT)、H7L10 (hG4WT) 与 LAG3-mFc 竞争结合 293T-LAG3 细胞膜表面抗原 MHC II 检测结果。

图 5：混合淋巴细胞反应 MLR 检测抗 LAG3 抗体促 IFN- γ 分泌的生物活性检测结果。

图 6：混合淋巴细胞反应 MLR 检测抗 LAG3 抗体促 IL-2 分泌的生物活性检测结果。

图 7：抗 LAG 抗体阻断 LAG-3 与 MHC-II 相互作用的生物学活性检测结果。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J. 萨姆布

5 鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，为可以通过市场购买获得的常规产品。

阳性对照抗体 Relatlimab，其序列参考美国专利公开：US20160326248A1。其中重链氨基酸序列参照该专利公开中的 SEQ ID NO: 1，轻链氨基酸序列参照该专利公开

10 中的 SEQ ID NO: 2。Relatlimab 是抗 LAG-3 抗体。

Relatlimab 的重链氨基酸序列：

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHRGSTNSNPSLKSRVTL
SLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDEYNWFDPWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVD
15 KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 23)

Relatlimab 的轻链氨基酸序列：

20 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 24)

对照抗体 14C12H1L1(hG1TM) 为抗 PD-1 抗体，由康方生物制备，批号

25 B105Y2080601。

14C12H1L1(hG1TM) 的重链氨基酸序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFT
ISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
30 VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 21)

14C12H1L1 (hG1TM) 的轻链的氨基酸序列

5 DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQ
DYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 22)

293T-LAG3 细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。293T-LAG3 细胞系由
10 HEK293T 细胞经病毒感染制得，病毒制备使用的是 3rd Generation Lentiviral
Systems，参见，例如 A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional
Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D,
and Naldini L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471. 其中所使用的慢病毒表达
载体为 plenti6.3/V5-huLAG3FL-BSD (其中 LAG3, Genebank ID: NM_002277.4; 载体
15 plenti6.3/V5-BSD, 购自 Invitrogen, 产品编号: K5315-20)。

Raji-PDL1 细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。Raji-PDL1 细胞系由 Raji
细胞经病毒感染制得，病毒制备使用的是 3rd Generation Lentiviral Systems，参
见，例如 A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging
System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini
20 L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471. 其中所使用的慢病毒表达载体为
plenti6.3/V5-PDL1 (其中 PDL1, Genebank ID: NP_054862.1; 载体 plenti6.3/V5,
购自 Invitrogen, 货号: K5315-20)。

Jurkat-NFAT-PD1-LAG3 细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。
Jurkat-NFAT-PD1-LAG3 细胞系由 PD-1 效应细胞 (PD-1 Effector cells (CPM)，厂家：
25 Promega，货号: J112A) 细胞经病毒感染制得，病毒制备使用的是 3rd Generation
Lentiviral Systems，参见，例如 A Third Generation Lentivirus Vector with a
Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen
M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471. 其中所使用的
慢病毒表达载体为 pCDH-huLAG3FL-RFP-NEO (其中 LAG3, Genebank ID: NM_002277.4;
30 载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-RFP+Neo, 购自优宝生物，产品编号: VT9005)。

制备例 1：抗 LAG3 抗体的设计和制备

1. 抗体的设计

5 本发明人根据已有的 LAG3 蛋白序列 (NCBI Reference Sequence: NP_002277.4) 及其蛋白三维晶体结构等, 创造性地人工设计了一系列的抗体序列。通过大量的筛选和检测, 最终得到了与 LAG3 特异性结合的人源化单克隆抗体, 分别命名为 H7L8、H7L9、H7L10。该单克隆抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列及其编码序列如下。

H7L8 的重链可变区 H7v 的核酸序列 (360 bp) :

10 CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGAGCTGGACTGCTGAAACCTAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGTGCT
GTGTACGGCGGATCTATCAGCGATTACTACTGGAAGTGGATCAGGCAGCCCCCTGGAAAGGGACTGGAATGGA
TCGGAGAGATCAACCACAGGGGCACCACCAACTCCAATCCCTCTCTGAAGAGCAGGGTGACACTGAGCCTCGA
CACAAGCAAGAATCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGGTCCGTGACCGCTGCTGATACAGCTGTGTACTACTGTGCC
TTCGGCTACAGCGATTACGAGTACGATTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACACTGGTTACAGTGAGCTCC
15 (SEQ ID NO: 1)

H7L8 的重链可变区 H7v 的氨基酸序列 (120 aa) :

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGISIDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHRGTTNSNPSLKSRVTL
SLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDEYDWFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 2)

H7L8 的轻链可变区 L8v 的核酸序列 (321 bp) :

20 GAGATCGTTCTGACCCAGAGCCCAGCTACACTGAGCCTGTCTCCTGGAGAGAGGGCTACACTGTCCTGC
AGAGCTAGCCAGACCATCAGCAGCTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAAGCTCCAAGGCTGCTGA
TCTACGACGCCTCTAATAGGGCCACCGGCATCCCTGCTAGATTCTCTGGAAGCGGCAGCGGAACCGACTTTAC
ACTGACAATCAGCTCCCTGGAGCCCGAGGATTTGCTGTTTACTACTGTCAGCAGCGCAGCAACTGGCCCATC
ACATTGGACAGGGCACAAATCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 3)

25 H7L8 的轻链可变区 L8v 的氨基酸序列 (107aa) :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTNLEIK (SEQ ID NO: 4)

H7L9 的重链可变区 H7v 的核酸序列与 H7L8 的重链可变区 H7v 的核酸序列相同,
30 即 SEQ ID NO: 1。

H7L9 的重链可变区 H7v 的氨基酸序列与 H7L8 的重链可变区 H7v 的氨基酸序列相同，即 SEQ ID NO: 2。

H7L9 的轻链可变区 L9v 的核酸序列 (321 bp) :

GAGATCGTTCTGACCCAGAGCCCAGCTACACTGAGCCTGTCTCCTGGAGAGAGGGCTACACTGTCCTGC
5 AGAGCTAGCCAGACCATCAGCAGCTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAAGCTCCAAGGCTGCTGA
TCTACGACGGCTCTAATAGGGCCACCGGCATCCCTGCTAGATTCTCTGGAAGCGGCAGCGGAACCGACTTTAC
ACTGACAATCAGCTCCCTGGAGCCCGAGGATTTGCTGTTTACTACTGTCAGCAGCGCAGCAACTGGCCCCCTC
ACATTCCGACAGGGCACAAATCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 5)

H7L9 的轻链可变区 L9v 的氨基酸序列 (107 bp) :

10 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDGSNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIK (SEQ ID NO: 6)

H7L10 的重链可变区 H7v 的核酸序列与 H7L8 的重链可变区 H7v 的核酸序列相同，即 SEQ ID NO: 1。

15 H7L10 的重链可变区 H7v 的氨基酸序列与 H7L8 的重链可变区 H7v 的氨基酸序列相同，即 SEQ ID NO: 2。

H7L10 的轻链可变区 L10v 的核酸序列 (321 bp) :

GAGATCGTTCTGACCCAGAGCCCAGCTACACTGAGCCTGTCTCCTGGAGAGAGGGCTACACTGTCCTGC
AGAGCTAGCCAGTCCATCAGCAGCTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAAGCTCCAAGGCTGCTGA
20 TCTACGACGGCTCTAATAGGGCCACCGGCATCCCTGCTAGATTCTCTGGAAGCGGCAGCGGAACCGACTTTAC
ACTGACAATCAGCTCCCTGGAGCCCGAGGATTTGCTGTTTACTACTGTCAGCAGCGCAGCAACTGGCCCATC
ACATTCCGACAGGGCACAAATCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 7)

H7L10 的轻链可变区 L10v 的氨基酸序列 (107 bp) :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDGSNRATGIPARFSGSGSGT
25 DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTNLEIK (SEQ ID NO: 8)

抗体 H7L8 的 CDR 的氨基酸序列如下 (按照 IMGT 编号系统) :

HCDR1 : GGSISDYY (SEQ ID NO: 9);

HCDR2 : INHRGTT (SEQ ID NO: 10);

30 HCDR3 : AFGYSDEYDWFDP (SEQ ID NO: 11);

LCDR1 : QTISSY (SEQ ID NO: 12);
LCDR2 : DAS (SEQ ID NO: 13) ;
LCDR3 : QQRSNWPIT (SEQ ID NO: 14)。

5 抗体 H7L9 的 CDR 的氨基酸序列如下 (按照 IMGT 编号系统) :

HCDR1 : GGSISDYY (SEQ ID NO: 9);
HCDR2 : INHRGTT (SEQ ID NO: 10);
HCDR3 : AFGYSDEYDWFDP (SEQ ID NO: 11);
LCDR1 : QTISSY (SEQ ID NO: 12);
10 LCDR2 : DGS (SEQ ID NO: 15) ;
LCDR3 : QQRSNWPLT (SEQ ID NO: 16)。

抗体 H7L10 的 CDR 的氨基酸序列如下 (按照 IMGT 编号系统) :

HCDR1 : GGSISDYY (SEQ ID NO: 9);
15 HCDR2 : INHRGTT (SEQ ID NO: 10);
HCDR3 : AFGYSDEYDWFDP (SEQ ID NO: 11);
LCDR1 : QSISSY (SEQ ID NO: 17);
LCDR2 : DGS (SEQ ID NO: 15) ;
LCDR3 : QQRSNWPIT (SEQ ID NO: 14)。

20

2. 人源化抗体 H7L8(hG1WT) 的表达和纯化

将 H7L8(hG1WT) 的重链 cDNA 序列(可变区编码序列如 SEQ ID NO: 1 所示;恒定区是 Ig gamma-1 chain C region) 和轻链的 cDNA 序列(可变区编码序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 恒定区为 human Ig kappa chain C region) 分别克隆到 pUC57simple(金
25 斯瑞公司提供) 载体中, 分别获得 pUC57simple-H7 和 pUC57simple-L8 质粒。分别
将质粒 pUC57simple-H7 和 pUC57simple-L8 进行酶切(HindIII&EcoRI), 电泳回收得
到的重链轻链分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中, 提取重组质粒共转染 293F 细胞。细
胞培养 7 天后, 将培养液通过高速离心、上清浓缩后上样至 HiTrap MabSelect SuRe
柱, 用 Elution Buffer 一步洗脱蛋白并回收目标样品并换液至 PBS。

30 H7L8(hG1WT)重链恒定区氨基酸序列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
 5 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18)

H7L8 (hG1WT) 轻链恒定区氨基酸序列

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLS
 STLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 19)

10 3. 人源化抗体 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT) 以及 H7L10 (hG4WT) 的表达和纯化

将 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT) 以及 H7L10 (hG4WT) 的重链 cDNA 序列(可变区编码
 序列如 SEQ ID NO: 1 所示;恒定区是 Ig gamma-4 chain C region) 和 H7L8 (hG4WT)
 轻链的 cDNA 序列(可变区编码序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 恒定区为 human Ig kappa
 chain C region)、H7L9 (hG4WT)轻链的 cDNA 序列(可变区编码序列如 SEQ ID NO: 5
 15 所示; 恒定区为 human Ig kappa chain C region)、H7L10 (hG4WT)轻链的 cDNA 序
 列(可变区编码序列如 SEQ ID NO: 7 所示; 恒定区为 human Ig kappa chain C region)
 分别克隆到 pUC57simple(金斯瑞公司提供) 载体中, 分别获得 pUC57simple-H7 和
 pUC57simple-L8、pUC57simple-L9、pUC57simple-L10 质粒。 分别将质粒
 pUC57simple-H7 和 pUC57simple-L8、pUC57simple-L9、pUC57simple-L10 进行酶切
 20 (HindIII&EcoRI), 电泳回收得到的重链轻链分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中, 提取重
 组质粒共转染 293F 细胞。细胞培养 7 天后, 将培养液通过高速离心、上清浓缩后上
 样至 HiTrap MabSelect SuRe 柱, 用 Elution Buffer 一步洗脱蛋白并回收目标样品
 并换液至 PBS。

25 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT) 或 H7L10 (hG4WT) 重链恒定区氨基酸序列:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
 30 RLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 20)

H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT) 或 H7L10 (hG4WT) 轻链恒定区氨基酸序列:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 19)

5 制备例 2: 人抗鸡蛋溶酶体抗体的制备

人抗鸡蛋溶酶体抗体 (human anti-Hen Egg Lysozyme IgG, anti-HEL, 即 human IgG, 简称 hIgG), 其序列来自于 Acierno 等人发表的 Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies 研究中 Fab F10.6.6 序列的可变区序列 (Acierno 等人. J Mol Biol. 2007; 374(1):
10 130-46.)。制备方法如下:

human IgG 委托南京金斯瑞生物对抗体的重轻链 (全序列或可变区) 基因进行氨基酸的密码子优化和基因合成, 参照《分子克隆实验指南 (第三版)》介绍的标准技术, 采用 PCR、酶切、DNA 胶回收、连接转化、菌落 PCR 或酶切鉴定等标准的分子克隆技术将重轻链基因分别亚克隆到哺乳动物表达系统的抗体重链表达载体和抗体轻
15 链表达载体, 并进一步对重组表达载体的重轻链基因进行测序分析。测序验证正确后, 中大量制备去内毒素级别的表达质粒并将重轻链表达质粒瞬时共转染 HEK293 细胞进行重组抗体的表达。培养 7 天后收集细胞培养液, 进行 rProtein A 柱 (GE) 亲和纯化, 收获的抗体样品用 SDS-PAGE 和 SEC-HPLC 标准分析技术对其进行质量鉴定。

20 实验例 1: ELISA 方法测定抗 LAG3 抗体与抗原的结合活性

将人 LAG3-mFc (康方生物自制, 批号: 20200417), 0.5 μ g/mL 包被酶标板置于 4℃ 孵育过夜, 然后使用 PBST 洗板包被了抗原的酶标板 1 次, 再使用 1% BSA 的 PBS 溶液作为封闭液在 37℃ 下对酶标板进行封闭 2 小时。酶标板封闭结束后用 PBST 洗板 3 次, 加入 PBST 溶液梯度稀释的抗体 (抗体稀释梯度详见表 1), 加入待测抗体的酶
25 标板置于 37℃ 条件下孵育 30 分钟, 孵育完成后用 PBST 洗板 3 次。洗板后加入 1:5000 比例稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG FC (H+L) (Jackson, 货号: 109-035-098) 二抗工作液, 然后置于 37℃ 条件下孵育 30 分钟。孵育完成后使用 PBST 洗板 4 次, 后加入 TMB (Neogen, 308177) 避光显色 5min, 加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中, 选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件
30 对数据进行分析处理。

检测结果如表 1 和图 1 所示。

表 1：ELISA 检测 Relatlimab、H7L8 (hG1WT) 与 LAG3-mFc 的结合

抗体浓度	抗原抗体结合 OD (450 nm) 值			
(nM)	Relatlimab		H7L8 (hG1WT)	
7.000	2.703	2.660	2.852	2.861
2.333	2.620	2.640	2.746	2.787
0.778	2.478	2.486	2.687	2.788
0.259	2.006	2.025	2.466	2.569
0.086	1.294	1.322	1.895	2.019
0.029	0.703	0.719	1.176	1.269
0.010	0.394	0.376	0.620	0.681
0	0.194	0.187	0.207	0.221
EC ₅₀ (nM)	0.106		0.045	

由图 1 可知，Relatlimab、H7L8 (hG1WT) 与抗原人 LAG3-mFc 能够有效的结合，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的吸光度强度见表 1，通过对结合的抗体进行吸光度定量分析，曲线模拟计算获得抗体 Relatlimab（作为阳性对照）、H7L8 (hG1WT) 的结合效率 EC₅₀ 分别为 0.106nM、0.045nM。

以上实验结果表明，在相同实验条件下，H7L8 (hG1WT) 具有有效结合人 LAG3-mFc 的活性，且 H7L8 (hG1WT) 结合人 LAG3-mFc 的活性强于靶点阳性药 Relatlimab。

10 实施例 2：ELISA 方法测定抗 LAG3 抗体与抗原的结合活性

将人 LAG3-mFc，2 μg/mL 包被酶标板置于 4℃ 孵育过夜，然后使用 PBST 洗板包被了抗原的酶标板 1 次，再使用 1% BSA 的 PBS 溶液作为封闭液在 37℃ 下对酶标板进行封闭 2 小时。酶标板封闭结束后用 PBST 洗板 3 次，加入 PBST 溶液梯度稀释的抗体（抗体稀释梯度详见表 1），加入待测抗体的酶标板置于 37℃ 条件下孵育 30 分钟，孵育完成后用 PBST 洗板 3 次。洗板后加入 1:5000 比例稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG (H+L)（Jackson, 货号：109-035-088）二抗工作液，然后置于 37℃ 条件下孵育 30 分钟。孵育完成后使用 PBST 洗板 4 次，后加入 TMB（Neogen，308177）避光显色 5min，加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中，选择 450nm 光波长读取酶标

板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

检测结果如表 2 和图 2 所示。

表 2: ELISA 检测 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT)、H7L10 (hG4WT) 与抗原人 LAG3-mFc 的结合

	人 LAG3-mFc, 2 μ g/mL, 50 μ L/孔							
抗体稀释 (μ g/mL)	H7L8 (hG4WT)		H7L9 (hG4WT)		H7L10 (hG4WT)		Relatlimab	
1	2.659	2.600	2.735	2.745	2.610	2.626	2.748	2.747
0.3	2.724	2.596	2.668	2.637	2.574	2.548	2.664	2.674
0.1	2.397	2.296	2.326	2.334	2.201	2.211	2.426	2.480
0.03	1.878	1.765	1.853	1.852	1.716	1.735	1.936	2.048
0.01	1.210	1.050	1.106	1.102	0.968	1.005	1.194	1.309
0.003	0.581	0.775	0.534	0.577	0.487	0.523	0.571	0.727
0.001	0.313	0.379	0.304	0.307	0.270	0.275	0.348	0.381
0	0.123	0.130	0.141	0.130	0.123	0.120	0.135	0.138
二抗	Goat Anti Human IgG (H+L), HRP (1:5000)							
EC ₅₀ (nM)	0.131		0.142		0.157		0.112	

- 5 结果显示：抗体 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT)、H7L10 (hG4WT) 均能有效地结合抗原人 LAG3-mFc，结合效率呈剂量依赖关系，且其结合活性与阳性对照抗体 Relatlimab 相当。

实施例 3：流式细胞仪方法检测抗 LAG3 抗体与细胞表面抗原 LAG3 的结合活性

1. 表达 LAG3 抗原的宿主细胞 293T 的构建

具体步骤如下：

表达 LAG3 抗原的宿主细胞 293T 的构建：按照 lipofectamin 转染试剂盒（购自
5 Invitrogen 公司）方法将包含 LAG3 的载体 pLenti6.3/V5- huLAG3FL-BSD（载体
pLenti6.3 购自 Invitrogen 公司）转染 293T 细胞，经筛选获得稳定表达 LAG3 的克隆群
体 293T-LAG3。

2. 抗体对 293T-LAG3 细胞表面抗原的结合

抗体标记和流式细胞仪检测：采用常规胰酶消化方法上述步骤获得的表达 LAG3 抗原
10 的宿主细胞 293T-LAG3，并使每个收集管细胞数为 3×10^5 ，用 1%PBSA（含 1% BSA 的 PBS）
配制终浓度分别为 0.0123 nM，0.123 nM，1.23 nM，3.7 nM，11.1 nM，33.3 nM，100 nM，
300 nM 的 LAG3 抗体稀释液，冰上与表达 LAG3 的 293T 细胞孵育 1 小时。用 1%PBSA 离心
洗涤数次后，每管加入 100 μ L FITC 羊抗人 IgG（购自 Jackson，货号：109-095-098）
（1：500 倍稀释）冰上避光孵育 40min。用 1%PBSA 洗 1 次后加入 200 μ L 1%PBSA 重悬
15 细胞，在流式细胞仪上用 FITC 通道检测荧光信号。

人源化抗 LAG3 抗体与 293T-LAG3 细胞的结合结果如图 3 所示。各抗 LAG3 抗体与
293T-LAG3 表面抗原的结合效率 EC_{50} 如表 3 所示。

表 3：流式细胞仪检测抗 LAG3 抗体结合 293T-LAG3 表面抗原的结合活性

	EC_{50} (nM)
Relatlimab	4.289
H7L8 (hG4WT)	4.929
H7L9 (hG4WT)	4.809
H7L10 (hG4WT)	4.168

由图 3 可见，抗 LAG3 抗体能有效地结合宿主细胞 293T-LAG3 表面的靶标 LAG3 蛋白，
20 且抗 LAG3 抗体 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT)、H7L10 (hG4WT) 与 293T-LAG3 表面抗原的结
合活性和阳性对照抗体 Relatlimab 相当。

实施例 4：竞争流式细胞法测定抗 LAG3 抗体与 LAG3-mFc 竞争结合细胞膜表面抗原 MHC II 的竞争结合活性

将 Raji 细胞（培养基：1640+10%FBS）（中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心，货号：TCHu 44）按 30 万个细胞/样本加入 EP 管中，加入 1000 μ L 1%PBSA（含 1%BSA 的 PBS），600 $\times$ g 离心 5 min 弃上清。按实验设计每管加入终浓度为 300nM 的 hIgG1（康方生物制备，批号：20190410），每管 100 μ L 冰上孵育 1h；向孵育后的 Raji 细胞加入 200 μ L 1%PBSA，600 $\times$ g 离心 5 min，去上清。与此同时，按实验设计另取洁净的 EP 管，加入相应浓度稀释抗体（300nM、100nM、33.3nM、11.1nM、3.7nM、1.23nM、0.123nM、0.0123nM），每管 60 μ L，并设计 Blank(PBSA+细胞)；然后分别将 60 μ L 的 LAG3-mFc（康方生物制备，批号：20190508）（终浓度为 3nM）加入相应的抗体管中，混匀，冰上预孵育 30min。向样本加入预孵育完的 100 μ L 的抗体与蛋白混合液，混匀后冰上避光孵育 1h；加入 200 μ L 1%PBSA，600 $\times$ g 离心 5 min，去上清，洗两次；加入 100 μ L 的 APC anti mouse 抗体（购自 Biolegend，货号：405308）（1:400 倍稀释），混匀后冰上避光孵育 40min；加入 200 μ L 1%PBSA，600 $\times$ g 离心 5 min，去上清；200 μ L Washing Buffer/管，重悬细胞，转移至流式上样管，上机测试。

结果如图 4、表 4 所示。通过荧光定量分析和曲线拟合，计算出抗体 Relatlimab、H7L8(hG4WT)、H7L9(hG4WT)、H7L10(hG4WT)的竞争结合 EC_{50} 分别为 1.153nM、1.342nM、1.317nM、1.267nM。

表 4：FACS 检测 Relatlimab、H7L8(hG4WT)、H7L9(hG4WT)、H7L10(hG4WT)竞争结合 Raji 细胞表面抗原的荧光强度分析

	EC_{50} (nM)
Relatlimab	1.153
H7L8 (hG4WT)	1.342
H7L9 (hG4WT)	1.317
H7L10 (hG4WT)	1.267

结果显示，抗体 H7L8(hG4WT)、H7L9(hG4WT)、H7L10(hG4WT)能有效地阻断 LAG-3 与 Raji 宿主细胞表面的 MHC II 的结合，且呈剂量依赖关系，其活性与阳性对照抗体 Relatlimab 相当。

实验例 5：混合淋巴细胞反应 MLR 检测抗 LAG3 抗体促 IFN- γ 和 IL-2 分泌的生物

活性

1. 抗 LAG3 抗体促 Raji-PDL1 混合淋巴反应体系分泌 IFN- γ 的生物活性检测

Raji-PDL1 细胞常规传代培养；复苏 PBMC，用 10mL 1640 完全培养基培养，0.5 μ g/mL 的 SEB (Staphylococcal enterotoxin B) (德诺泰克，货号：S010201) 刺激两天。Raji-PDL1 细胞用 25 μ g/mL 的 MMC (Stressmarq，货号：SIH-246-10MG) 处理，置于 37℃、5%CO₂ 二氧化碳培养箱中 1 小时；收集经 SEB 刺激 2 天后 PBMC 和经 MMC 处理 1 小时的 Raji-PDL1 细胞，用 PBS 洗涤两次后用完全培养基（即 RPMI 1640+10%FBS）重悬计数。将 PBMC 和 Raji-PDL1 各按 10×10^4 个细胞/孔加入到 U 型 96 孔板 (Corning，型号：3799) 中共培养。并按实验设计加入抗体（单用和联用时各个抗体的终浓度均为 300nM、30nM、3nM），于培养箱中共培养 3 天；3 天后，1200rpm 离心 5min，收集细胞培养上清，ELISA 法进行 IFN- γ 检测。

如图 5 所示，人 PBMC 和 Raji-PDL1 细胞混合培养后对 PBMC 的 IFN- γ 的分泌具有促进作用，而在混合培养体系中同时加入抗体能显著诱导 PBMC 进一步分泌 IFN- γ ，在促 IFN- γ 分泌活性水平方面，抗 LAG3 抗体 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT)、H7L10 (hG4WT) 分别联用 14C12H1L1 (hG1TM)、阳性对照抗体 Relatlimab 联用 14C12H1L1 (hG1TM) 均能促 IFN- γ 分泌，且其活性相当。

2. 抗 LAG 抗体促 Raji-PDL1 混合淋巴反应体系分泌 IL-2 的生物活性检测

Raji-PDL1 细胞常规传代培养；复苏 PBMC，用 10mL 1640 完全培养基培养，添加 0.5 μ g/mL 的 SEB (Staphylococcal enterotoxin B，购自德诺泰克，货号：S010201) 刺激两天。Raji-PDL1 细胞用 25 μ g/mL 的 MMC (Stressmarq，货号：SIH-246-10MG) 处理，置于 37℃、5%CO₂ 二氧化碳培养箱中 1 小时。收集经 SEB 刺激 2 天后的 PBMC 和经 MMC 处理 1 小时的 Raji-PDL1 细胞，用 PBS 洗两次后用完全培养基（即 RPMI 1640+10%FBS）重悬计数。将 PBMC 和 Raji-PDL1 各按 10×10^4 个细胞/孔加入 U 型 96 孔板 (Corning，型号：3799) 中共培养。并按实验设计加入抗体（单用和联用时各个抗体的终浓度均为 300nM、30nM、3nM），共培养 3 天；3 天后，1200rpm 离心 5min，收集细胞培养上清，ELISA 法进行 IL-2 检测。

如图 6 所示，人 PBMC（来自健康捐献者）和 Raji-PDL1 细胞混合培养后对 PBMC 的 IL-2 的分泌有一定的促进作用，而在混合培养体系中同时加入抗体能显著诱导 PBMC 进一步分泌 IL-2，具有显著剂量依赖关系，在促 IL-2 分泌活性水平方面，抗 LAG3

抗体 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT)、H7L10 (hG4WT) 分别联用 14C12H1L1 (hG1TM)、阳性对照 Relatlimab 联用 14C12H1L1 (hG1TM) 均能促 IL-2 分泌, 且其活性相当。

实验例 6: 抗 LAG 抗体阻断 LAG-3 与 MHC-II 相互作用的生物学活性评价 (报告基

因法)

以 Jurkat-NFAT-PD1-LAG3 细胞和 Raji 细胞作为报告基因体系, 加入 SEE 超抗原后, 激活 TCR-NFAT 信号通路, 诱导荧光素酶的表达。而 Jurkat 细胞上的 LAG-3 与 Raji 细胞上的 MHC-II 结合, 抑制 NFAT 信号通路, 下调荧光素酶的表达。抗体通过特异性结合 LAG-3, 解除抑制, 上调荧光素酶的表达。

- 10 收集 Jurkat-NFAT-PD1-LAG3 细胞和 Raji 细胞 (购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 货号: TCHu 44), 110xg 离心 5min 去上清, 1640+10%FBS 培养基重悬细胞, 计数。Jurkat-NFAT-PD1-LAG3 细胞按 10^5 个细胞/孔接种至黑底 96 孔板 (Corning, 型号: 3916), $30 \mu\text{L}$ /孔; 按实验设计加入抗体 (终浓度为 0.3nM、3nM、300nM), $10 \mu\text{L}$ /孔, 置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中预先孵育 30min。与此同时, 向 Raji 细胞加入 SEE
- 15 (Staphylococcal Enterotoxins E, 购自 Toxin Technology, 货号: ET404) (终浓度 0.05ng/mL) 后置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中孵育 30min。30min 后, 将经 SEE 处理的 Raji 细胞按 2×10^4 个细胞/孔 ($40 \mu\text{L}$ /孔) 加至上述含有 Jurkat-NFAT-PD1-LAG3 细胞的 96 孔板中, 体系终体积为 $80 \mu\text{L}$, 混匀后置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中孵育 6h。孵育完毕后取出培养板, 平衡至室温, 加入 Bright-Glo™ Luciferase Assay System (购自 Promega,
- 20 货号: E2650) $80 \mu\text{L}$ /孔, 避光孵育 2min 后读取 RLU 值。其中同型对照 hIgG1DM 为康方生物自制, 批号: 20181107; 同型对照 hG4WT 为康方生物自制, 批号: 20190910。

结果如图 7 所示, 抗 LAG 抗体 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT)、H7L10 (hG4WT)、阳性对照抗体 Relatlimab 均能阻断 LAG-3 与 MHC-II 的相互作用, 上调荧光素酶的表达, 且抗 LAG 抗体 H7L8 (hG4WT)、H7L9 (hG4WT)、H7L10 (hG4WT) 的活性均优于对照抗体 Relatlimab。

25

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述, 本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导, 可以对那些细节进行各种修改和替换, 这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 抗 LAG3 抗体或其抗原结合片段，包含重链可变区和轻链可变区，其中，

所述重链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NOs: 9-11所示的HCDR1-HCDR3；并且所述轻链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NOs: 12-14所示的LCDR1-LCDR3；

所述重链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NOs: 9-11所示的HCDR1-HCDR3；并且所述轻链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 16所示的LCDR1-LCDR3；

或者

所述重链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NOs: 9-11所示的HCDR1-HCDR3；并且所述轻链可变区包含：氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 14所示的LCDR1-LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段，其中，

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示；

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示；

或者

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 8所示。

3. 根据权利要求1至2中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

4. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述的抗体以小于0.2nM，例如小于0.15nM、小于0.1nM、小于0.08nM、0.06nM或小于0.05nM或更小的EC₅₀结合人LAG3-mFc；优选地，所述EC₅₀通过间接ELISA方法测得。

5. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述的抗体包括非-CDR区，且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种，例如来自人抗体。
6. 根据权利要求1至5中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述的抗体，其恒定区来自人抗体；
优选地，所述抗体的恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区。
7. 根据权利要求1至6中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段，其中，
所述抗LAG3抗体的重链恒定区为Ig gamma-1 chain C region（例如，如SEQ ID NO: 18所示）或Ig gamma-4 chain C region（例如，如SEQ ID NO: 20所示）；轻链恒定区为Ig kappa chain C region（例如，如SEQ ID NO: 19所示）。
8. 抗体药物偶联物，其包括抗体或其抗原结合片段以及小分子药物，其中，所述抗体或其抗原结合片段为权利要求1至7中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段；优选地，所述小分子药物为小分子细胞毒药物；更优选地，所述小分子药物为肿瘤化疗药物。
9. 根据权利要求8所述的抗体药物偶联物，其中，所述抗体或其抗原结合片段通过连接子与小分子药物连接；例如，所述连接子为胺键、二硫键或肽键。
10. 根据权利要求8或9所述的抗体药物偶联物，其中，所述抗体或其抗原结合片段与小分子药物的摩尔比为1:（2-4）。
11. 分离的核酸分子，其编码权利要求1至7中任一权利要求所述的抗LAG3抗体。
12. 一种重组载体，其包含权利要求11所述的分离的核酸分子。
13. 一种宿主细胞，其包含权利要求11所述的分离的核酸分子，或者包含权利要求12所述的重组载体。
14. 制备权利要求1至7中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括

在合适的条件下培养权利要求13的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段的步骤。

15. 一种药物组合物，其包含权利要求1至7中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求8至10中任一权利要求所述的抗体药物偶联物；可选地，其还包括药学上可接受的辅料。

16. 权利要求1至7中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求8至10中任一权利要求所述的抗体药物偶联物在制备治疗和/或预防肿瘤或贫血病的药物中的用途；

优选地，所述肿瘤为选自卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌和肾癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

优选地，所述血液瘤为白血病；

优选地，所述食管癌为食管鳞癌。

17. 根据权利要求1至7中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求8至10中任一权利要求所述的抗体药物偶联物，其用于治疗 and/或预防肿瘤或贫血病；

优选地，所述肿瘤为选自卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌和肾癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

优选地，所述血液瘤为白血病；

优选地，所述食管癌为食管鳞癌。

18. 一种治疗和/或预防肿瘤或贫血病的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求1至7中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求8至10中任一权利要求所述的抗体药物偶联物的步骤；

优选地，所述肿瘤为选自卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、神经胶质母细胞瘤、

肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌和肾癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

优选地，所述血液瘤为白血病；

优选地，所述食管癌为食管鳞癌。

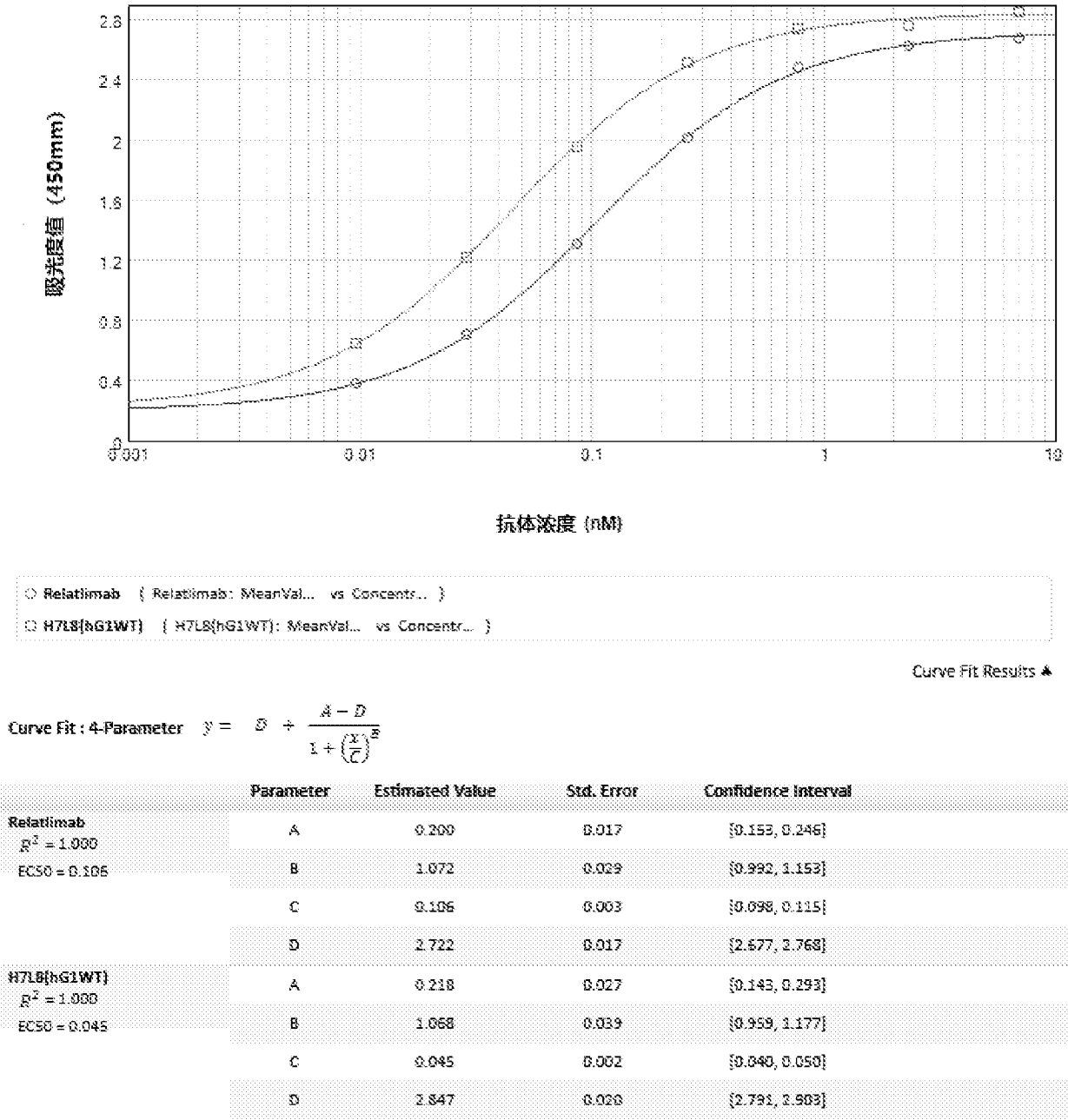
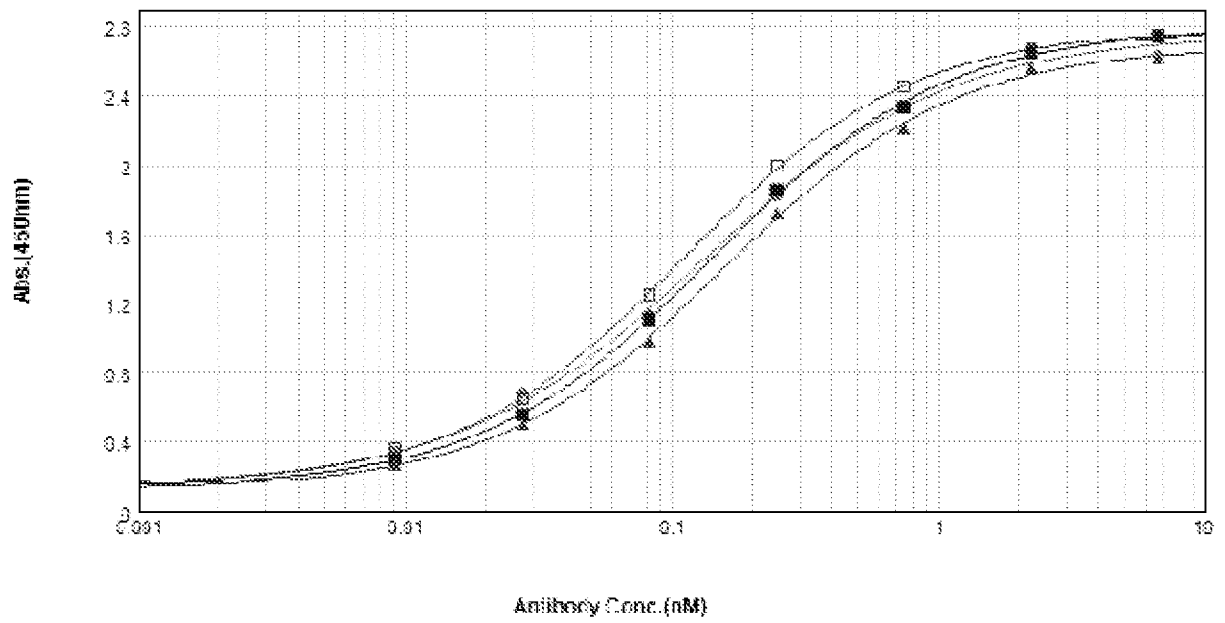


图 1



● H7L8 { H7L8: MeanVal... vs Concentr... }
 ■ H7L9 { H7L9: MeanVal... vs Concentr... }
 ▲ H7L10 { H7L10: MeanVal... vs Concentr... }
 ◆ Relatlimab { Relatlimab: MeanVal... vs Concentr... }

Curve Fit Results ▲

Curve Fit: 4-Parameter $y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$

	Parameter	Estimated Value	Std. Error	Confidence Interval
H7L8 $R^2 = 0.998$ $EC50 = 0.111$	A	0.147	0.053	{-9.63e-4, 0.294}
	B	0.947	0.081	{0.723, 1.171}
	C	0.131	0.013	{0.094, 0.168}
	D	2.757	0.064	{2.580, 2.933}
H7L9 $R^2 = 1.000$ $EC50 = 0.142$	A	0.146	0.023	{0.072, 0.220}
	B	1.091	0.038	{0.896, 1.105}
	C	0.142	0.006	{0.125, 0.159}
	D	2.795	0.028	{2.718, 2.873}
H7L10 $R^2 = 0.999$ $EC50 = 0.157$	A	0.126	0.029	{0.045, 0.206}
	B	1.008	0.051	{0.868, 1.148}
	C	0.157	0.009	{0.133, 0.181}
	D	2.690	0.036	{2.590, 2.790}
Relatlimab $R^2 = 1.000$ $EC50 = 0.112$	A	0.150	0.016	{0.105, 0.195}
	B	1.024	0.026	{0.953, 1.095}
	C	0.112	0.003	{0.103, 0.120}
	D	2.788	0.017	{2.741, 2.835}

图 2

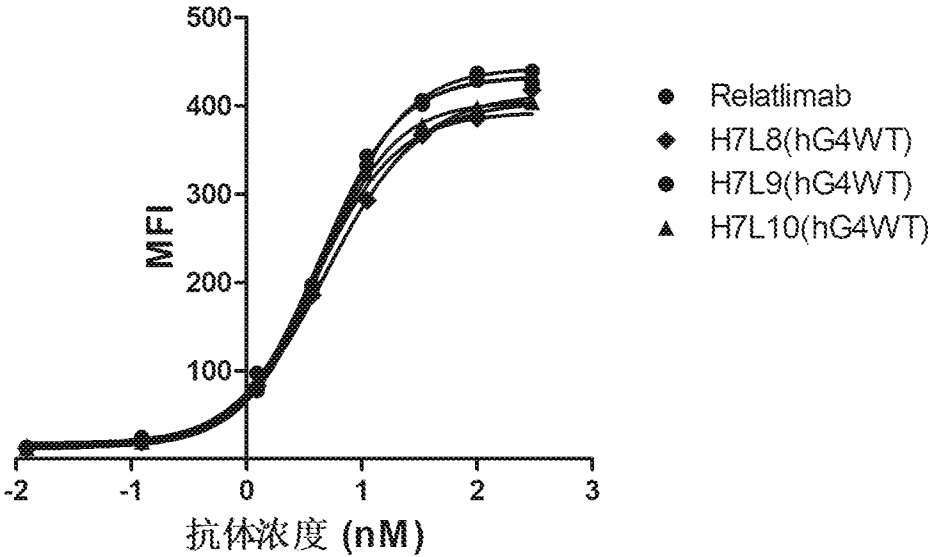


图 3

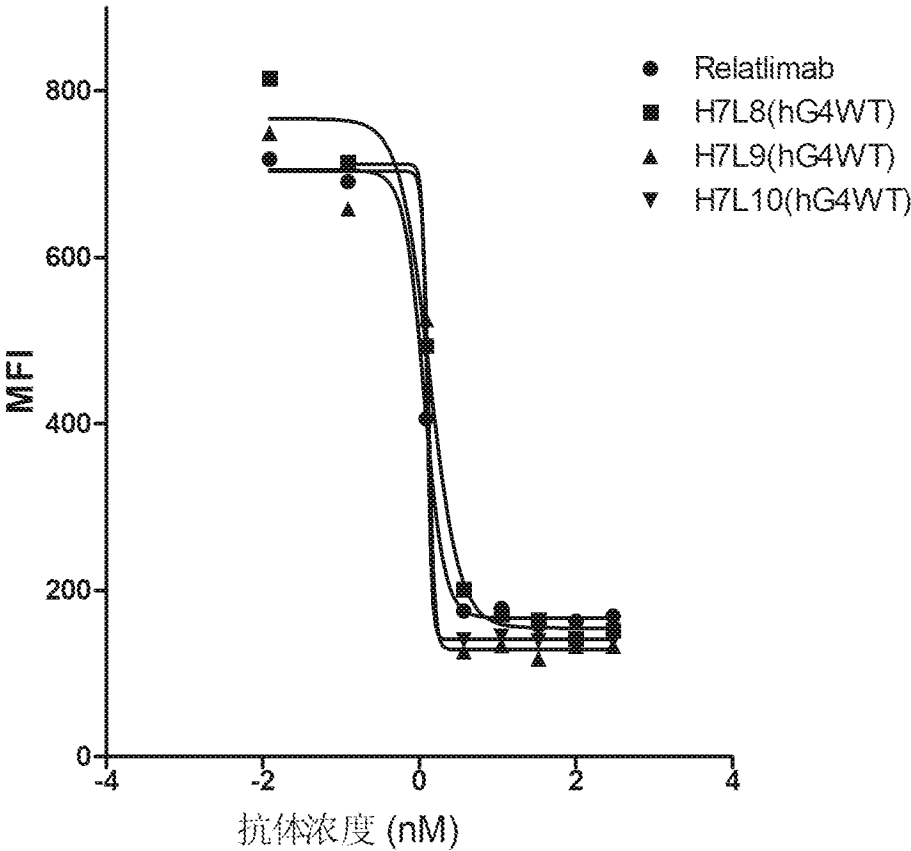


图 4

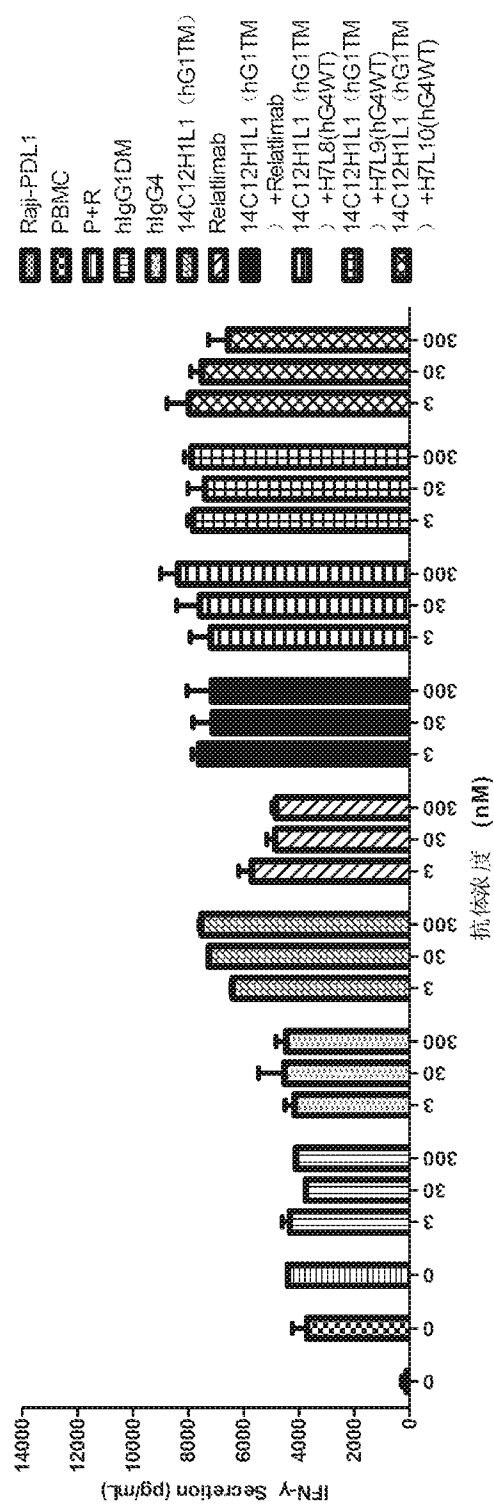


图 5

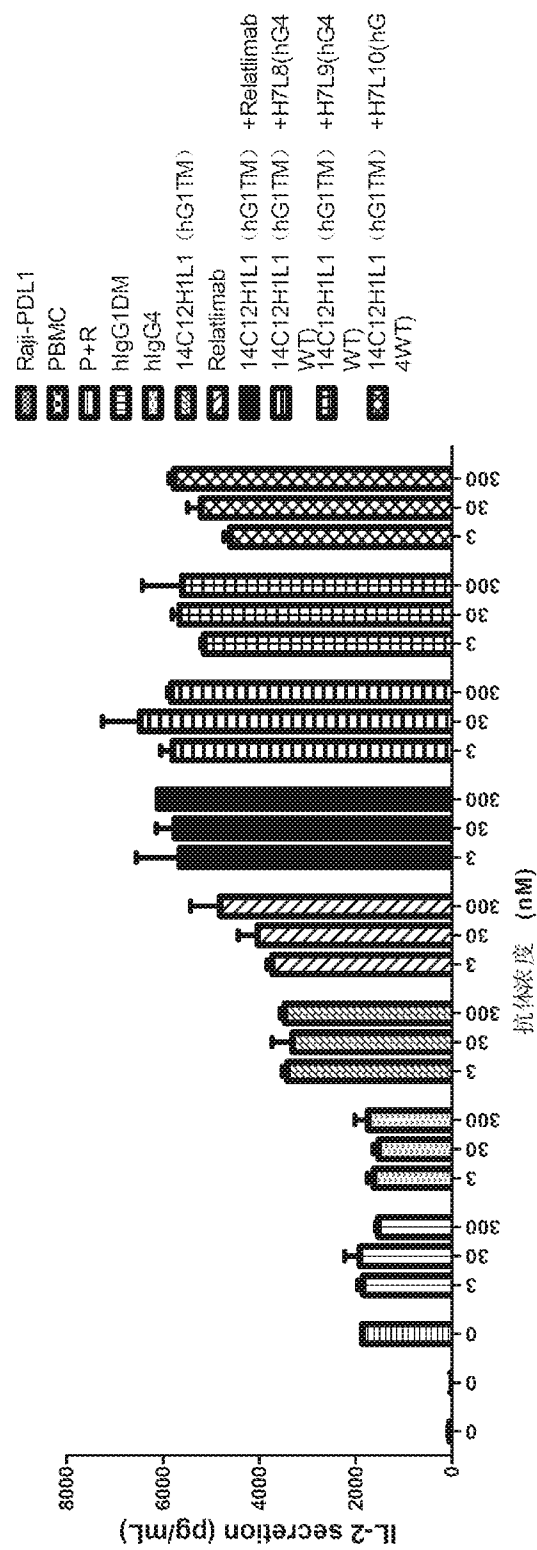


图 9

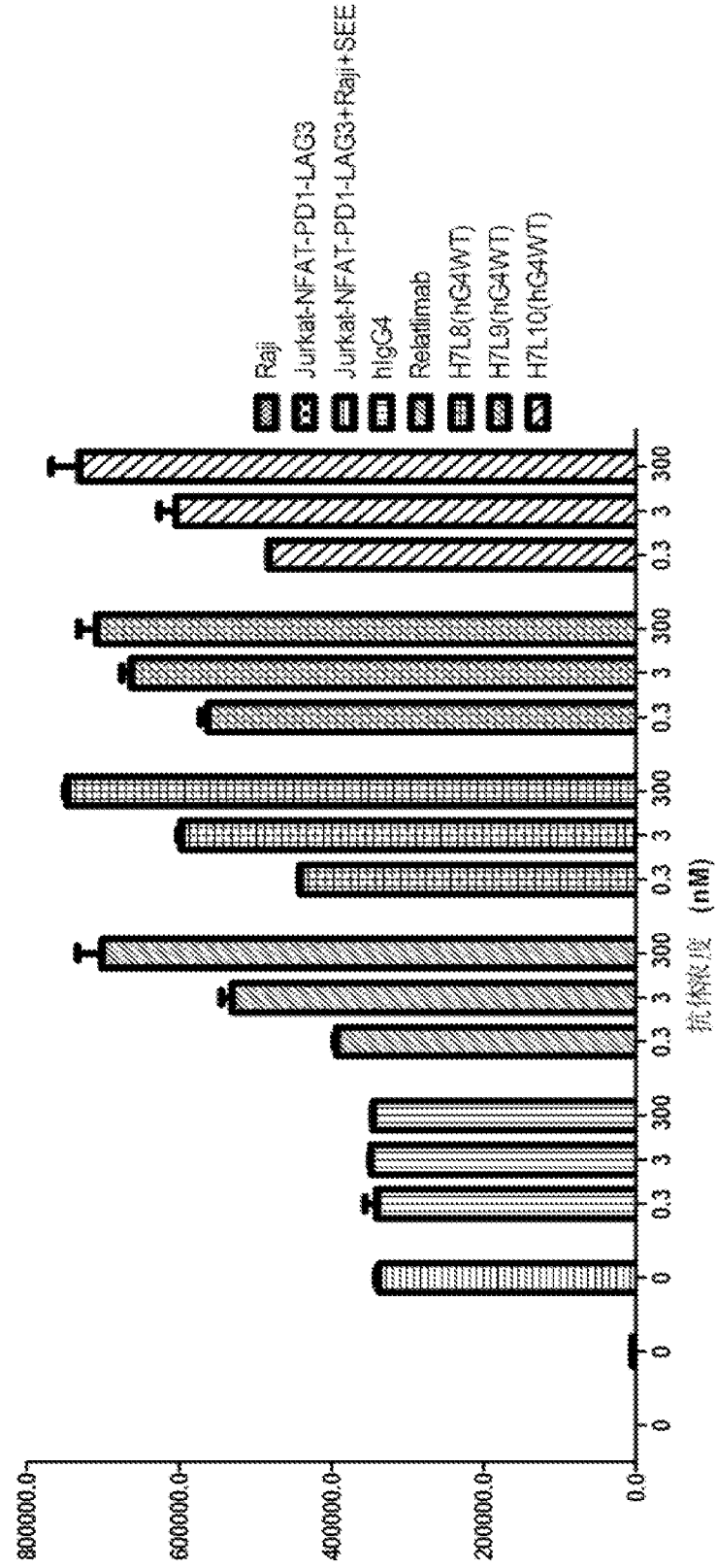


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/122185

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, VEN, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, WANFANG, baidu学术, PUBMED, ELSEVIER, SPRINGER, ISI web of knowledge, sciencedirect, NCBI, Genbank, EMBL, STN, 智能化检索系统序列检索, Sequence Search in Intelligent Retrieval System: LAG3, LAG-3, CD223, 淋巴细胞活化基因3, lymphocyte activation gene 3, H7L8, H7L9, H7L10, 抗体, 抗原结合片段, antibody, antigen binding fragment, 中山康方生物医药有限公司, AKESO biopharma, 发明人, SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 9-17

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105793287 A (BRISTOL MYERS SQUIBB COMPANY) 20 July 2016 (2016-07-20) entire document	1-18
A	CN 112010972 A (REYOUNG (SUZHOU) BIOPHARMACEUTICALS., LTD.) 01 December 2020 (2020-12-01) entire document	1-18
A	CN 110615840 A (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) 27 December 2019 (2019-12-27) entire document	1-18
A	WO 2014/008218 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 09 January 2014 (2014-01-09) entire document	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 December 2022

Date of mailing of the international search report

22 December 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/122185

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	刘昊 等 (LIU, Hao et al.). "淋巴细胞活化基因3分子生物学功能及其抗体药物临床应用研究进展 (Research Advances in Biological Function of Lymphocyte Activation Gene-3(Lag-3) Molecule and Clinical Application of Antibody Drugs Targeting Lag-3)" <i>中国药理学与毒理学杂志 (Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology)</i> , Vol. 33, No. 1, 20 May 2019 (2019-05-20), pp. 70-78	1-18
A	陈秀秀 等 (CHEN, Xiuxiu et al.). "抗淋巴细胞激活基因 3 (LAG-3) 全人源抗体的制备 (Preparation of Anti-Lymphocyte Activation Gene 3 (Lag-3) Fully Human Antibodies)" <i>细胞与分子免疫学杂志 (Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology)</i> , Vol. 36, No. 5, 31 December 2020 (2020-12-31), pp. 451-456	1-18
A	YU, X. J. et al. "Characterization of a novel anti-human lymphocyte activation gene 3 (LAG-3)antibody for cancer immunotherapy" <i>MABS</i> , Vol. 11, No. 6, 26 June 2019 (2019-06-26), pp. 1139-1148	1-18
A	BUROVA, E. et al. "Preclinical Development of the Anti-LAG-3 Antibody REGN3767: Characterization and Activity in Combination with the Anti-PD-1 Antibody Cemiplimab in Human PD-1xLAG-3-Knockin Mice" <i>Molecular Cancer Therapeutics</i> , Vol. 18, No. 11, 08 August 2019 (2019-08-08), pp. 2051-2062	1-18
PX	WO 2022/188867 A1 (AKESO BIOPHARMA, INC.) 15 September 2022 (2022-09-15) claims 12-15, and description, page 17, line 22 to page 18, line 2, SEQ ID NOs: 50-55, 57, and 59	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/122185

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

[1] The actually submitted sequence table is an XML file of the standard ST.26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/122185

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 18 relates to a method for treating and/or preventing a tumor or anemia, i.e., claim 18 relates to the subject matter defined in PCT Rule 39.1 that does not warrant a search conducted by the international searching authority: (iv) methods for treatment of a human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods. An international search was conducted on the basis of a use of the antibody or the antigen-binding fragment or antibody-drug conjugate thereof in the preparation of a drug for treating and/or preventing a tumor or anemia.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/122185

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105793287	A	20 July 2016	EP	3178849	A1	14 June 2017
				EP	3046939	A1	27 July 2016
				ES	2728578	T3	25 October 2019
				KR	20160055269	A	17 May 2016
				JP	2016531849	A	13 October 2016
				RS	58705	B1	28 June 2019
				MX	2016003103	A	26 May 2016
				HU	E044730	T2	28 November 2019
				DK	3178849	T3	01 July 2019
				EP	3508502	A1	10 July 2019
				CA	2924524	A1	26 March 2015
				PL	3178849	T3	30 August 2019
				SG	10201802264 P	A	30 May 2018
				LT	3178849	T	10 June 2019
				PT	3178849	T	11 June 2019
				IL	272149	A	31 March 2020
				IL	244547	D0	21 April 2016
				US	2022185892	A1	16 June 2022
				SI	3178849	T1	28 June 2019
				HR	P20190774	T1	14 June 2019
				IL	290295	A	01 April 2022
				AU	2020203056	A1	28 May 2020
				EA	201690617	A1	29 July 2016
				JP	2020011984	A	23 January 2020
				SG	11201601763 S	A	28 April 2016
				KR	20210141789	A	23 November 2021
				US	2021009692	A1	14 January 2021
				US	2016222116	A1	04 August 2016
				US	2020062845	A1	27 February 2020
				CN	112516302	A	19 March 2021
				AU	2014323523	A1	07 April 2016
				WO	2015042246	A1	26 March 2015
CN	112010972	A	01 December 2020	None			
CN	110615840	A	27 December 2019	TW	202016143	A	01 May 2020
				CN	112166125	A	01 January 2021
				WO	2019242619	A1	26 December 2019
WO	2014/008218	A1	09 January 2014	PH	12014502854	A1	23 February 2015
				KR	20200075891	A	26 June 2020
				KR	20220150417	A	10 November 2022
				EA	202090227	A1	31 May 2020
				NZ	628528	A	29 July 2016
				LT	2867258	T	11 September 2017
				CN	108101991	A	01 June 2018
				PT	2867258	T	31 August 2017
				RS	56398	B1	29 December 2017
				UY	34887	A	31 December 2013
				DK	3275899	T3	30 November 2020
				CY	1119563	T1	07 March 2018
				HK	1249535	A1	02 November 2018
				AU	2013286914	A1	29 January 2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/122185

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		HR P20171315 T1	20 October 2017
		BR 112014032999 A2	01 August 2017
		US 2014093511 A1	03 April 2014
		SG 11201408780 X A	29 January 2015
		TW 201831515 A	01 September 2018
		US 2018371087 A1	27 December 2018
		MX 2015000116 A	14 April 2015
		PT 3275899 T	17 November 2020
		AU 2017221874 A1	21 September 2017
		CA 2877746 A1	09 January 2014
		PL 2867258 T3	30 November 2017
		DK 2867258 T3	02 October 2017
		TW 201938198 A	01 October 2019
		CO 7170127 A2	28 January 2015
		LT 3275899 T	10 December 2020
		US 2015307609 A1	29 October 2015
		TN 2014000536 A1	30 March 2016
		US 2017137514 A1	18 May 2017
		AU 2021225177 A1	30 September 2021
		PE 20150221 A1	19 February 2015
		JP 2015527880 A	24 September 2015
		MY 169383 A	26 March 2019
		KR 20150023909 A	05 March 2015
		SG 10201610960 Y A	27 February 2017
		HU E052406 T2	28 April 2021
		RS 61084 B1	31 December 2020
		IL 236517 D0	26 February 2015
		CL 2014003637 A1	27 March 2015
		KR 20210102485 A	19 August 2021
		JP 2018126149 A	16 August 2018
		JP 2022064901 A	26 April 2022
		TW 202118789 A	16 May 2021
		HK 1207386 A1	29 January 2016
		EA 201590138 A1	30 July 2015
		ES 2831406 T3	08 June 2021
		EP 2867258 A1	06 May 2015
WO 2022/188867 A1	15 September 2022	CN 115073588 A	20 September 2022

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/122185

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K C12N A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, VEN, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, baidu学术, PUBMED, ELSEVIER, SPRINGER, ISI web of knowledge, sciencedirect, NCBI, Genbank, EMBL, STN, 智能化检索系统序列检索: LAG3, LAG-3, CD223, 淋巴细胞活化基因3, lymphocyte activation gene 3, H7L8, H7L9, H7L10, 抗体, 抗原结合片段, antibody, antigen binding fragment, 中山康方生物医药有限公司, AKESO biopharma, 发明人, SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 9-17

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 105793287 A (百时美施贵宝公司) 2016年7月20日 (2016 - 07 - 20) 全文	1-18
A	CN 112010972 A (瑞阳苏州生物科技有限公司) 2020年12月1日 (2020 - 12 - 01) 全文	1-18
A	CN 110615840 A (信达生物制药苏州有限公司) 2019年12月27日 (2019 - 12 - 27) 全文	1-18
A	WO 2014/008218 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2014年1月9日 (2014 - 01 - 09) 全文	1-18
A	刘昊 等. “淋巴细胞活化基因3分子生物学功能及其抗体药物临床应用研究进展” 中国药理学与毒理学杂志, 第33卷, 第1期, 2019年5月20日 (2019 - 05 - 20), 第70-78页	1-18
A	陈秀秀 等. “抗淋巴细胞激活基因 3 (LAG-3) 全人源抗体的制备” 细胞与分子免疫学杂志, 第36卷, 第5期, 2020年12月31日 (2020 - 12 - 31), 第451-456页	1-18

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年12月10日

国际检索报告邮寄日期

2022年12月22日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

郝佳

电话号码 86-(10)-53961967

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	YU, X.J. 等. "Characterization of a novel anti-human lymphocyte activation gene 3 (LAG-3)antibody for cancer immunotherapy" MABS, 第11卷, 第6期, 2019年6月26日 (2019 - 06 - 26), 第1139-1148页	1-18
A	BUROVA, E. 等. "Preclinical Development of the Anti-LAG-3 Antibody RE-GN3767: Characterization and Activity in Combination with the Anti-PD-1 Antibody Cemiplimab in Human PD-1xLAG-3-Knockin Mice" Molecular Cancer Therapeutics, 第18卷, 第11期, 2019年8月8日 (2019 - 08 - 08), 第2051-2062页	1-18
PX	W0 2022/188867 A1 (中山康方生物医药有限公司) 2022年9月15日 (2022 - 09 - 15) 权利要求12-15, 说明书第17页第22行-第18页第2行, SEQ ID NOs:50-55, 57, 59	1-18

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

[1] 实际提交的序列表是ST. 26标准的XML文件。

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 18
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求18涉及一种治疗和/或预防肿瘤或贫血病的方法，也即权利要求18涉及PCT细则39.1定义的
不要求国际检索单位检索的主题：（iv）处置人体或动物体的外科手术方法或治疗方法，
以及诊断方法。国际检索基于所述抗体或其抗原结合片段或者抗体偶联药物在制备用于治疗
和/或预防肿瘤或贫血病的药物中的用途作出。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/122185

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	105793287	A	2016年7月20日	EP	3178849	A1	2017年6月14日
				EP	3046939	A1	2016年7月27日
				ES	2728578	T3	2019年10月25日
				KR	20160055269	A	2016年5月17日
				JP	2016531849	A	2016年10月13日
				RS	58705	B1	2019年6月28日
				MX	2016003103	A	2016年5月26日
				HU	E044730	T2	2019年11月28日
				DK	3178849	T3	2019年7月1日
				EP	3508502	A1	2019年7月10日
				CA	2924524	A1	2015年3月26日
				PL	3178849	T3	2019年8月30日
				SG	10201802264P	A	2018年5月30日
				LT	3178849	T	2019年6月10日
				PT	3178849	T	2019年6月11日
				IL	272149	A	2020年3月31日
				IL	244547	D0	2016年4月21日
				US	2022185892	A1	2022年6月16日
				SI	3178849	T1	2019年6月28日
				HR	P20190774	T1	2019年6月14日
				IL	290295	A	2022年4月1日
				AU	2020203056	A1	2020年5月28日
				EA	201690617	A1	2016年7月29日
				JP	2020011984	A	2020年1月23日
				SG	11201601763S	A	2016年4月28日
				KR	20210141789	A	2021年11月23日
				US	2021009692	A1	2021年1月14日
				US	2016222116	A1	2016年8月4日
				US	2020062845	A1	2020年2月27日
				CN	112516302	A	2021年3月19日
				AU	2014323523	A1	2016年4月7日
				WO	2015042246	A1	2015年3月26日
CN	112010972	A	2020年12月1日	无			
CN	110615840	A	2019年12月27日	TW	202016143	A	2020年5月1日
				CN	112166125	A	2021年1月1日
				WO	2019242619	A1	2019年12月26日
WO	2014/008218	A1	2014年1月9日	PH	12014502854	A1	2015年2月23日
				KR	20200075891	A	2020年6月26日
				KR	20220150417	A	2022年11月10日
				EA	202090227	A1	2020年5月31日
				NZ	628528	A	2016年7月29日
				LT	2867258	T	2017年9月11日
				CN	108101991	A	2018年6月1日
				PT	2867258	T	2017年8月31日
				RS	56398	B1	2017年12月29日
				UY	34887	A	2013年12月31日
				DK	3275899	T3	2020年11月30日
				CY	1119563	T1	2018年3月7日
				HK	1249535	A1	2018年11月2日
				AU	2013286914	A1	2015年1月29日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/122185

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		HR P20171315 T1	2017年10月20日
		BR 112014032999 A2	2017年8月1日
		US 2014093511 A1	2014年4月3日
		SG 11201408780X A	2015年1月29日
		TW 201831515 A	2018年9月1日
		US 2018371087 A1	2018年12月27日
		MX 2015000116 A	2015年4月14日
		PT 3275899 T	2020年11月17日
		AU 2017221874 A1	2017年9月21日
		CA 2877746 A1	2014年1月9日
		PL 2867258 T3	2017年11月30日
		DK 2867258 T3	2017年10月2日
		TW 201938198 A	2019年10月1日
		CO 7170127 A2	2015年1月28日
		LT 3275899 T	2020年12月10日
		US 2015307609 A1	2015年10月29日
		TN 2014000536 A1	2016年3月30日
		US 2017137514 A1	2017年5月18日
		AU 2021225177 A1	2021年9月30日
		PE 20150221 A1	2015年2月19日
		JP 2015527880 A	2015年9月24日
		MY 169383 A	2019年3月26日
		KR 20150023909 A	2015年3月5日
		SG 10201610960Y A	2017年2月27日
		HU E052406 T2	2021年4月28日
		RS 61084 B1	2020年12月31日
		IL 236517 D0	2015年2月26日
		CL 2014003637 A1	2015年3月27日
		KR 20210102485 A	2021年8月19日
		JP 2018126149 A	2018年8月16日
		JP 2022064901 A	2022年4月26日
		TW 202118789 A	2021年5月16日
		HK 1207386 A1	2016年1月29日
		EA 201590138 A1	2015年7月30日
		ES 2831406 T3	2021年6月8日
		EP 2867258 A1	2015年5月6日
WO 2022/188867 A1	2022年9月15日	CN 115073588 A	2022年9月20日