



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118667019 A

(43) 申请公布日 2024.09.20

(21) 申请号 202410802940.6

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2019.08.21

A61P 35/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/720,234 2018.08.21 US

(62) 分案原申请数据

201980037800.1 2019.08.21

(71) 申请人 阿尔伯特爱因斯坦医学院

地址 美国纽约州

(72) 发明人 臧兴兴

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理人 郭煜 王北南

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书3页 说明书19页

C12N 15/13 (2006.01)

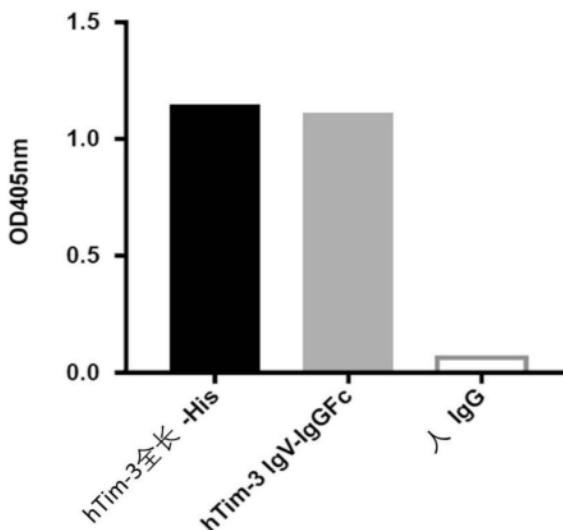
序列表 (电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

针对人TIM-3的单克隆抗体

(57) 摘要

本发明提供了抗人Tim-3IgV结构域特异性抗体及其片段,以及使用此类抗体和/或片段的方法。



1. 一种结合人Tim-3 (T细胞免疫球蛋白及黏蛋白-3) 的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

a) 包含一个或多个选自下述的重链CDR的重链:

GYSFTGYTIN (SEQ ID NO:1) (CDR1) ;

LFNPYNGGTT (SEQ ID NO:2) (CDR2) ;

ARRYGYDAMDY (SEQ ID NO:3) (CDR3) ;

或

GFNIKDYMH (SEQ ID NO:7) (CDR1) ;

WIDPENDNTIY (SEQ ID NO:8) (CDR2) ;

ARDFGYVAWLVY (SEQ ID NO:9) (CDR3) ; 和

b) 包含一个或多个选自下述的轻链CDR的轻链:

KSSQSVLYSSNQKNHLA (SEQ ID NO:4) (CDR1) ;

WASTRES (SEQ ID NO:5) (CDR2) ;

HQYLSSYT (SEQ ID NO:6) (CDR3) ;

或

KASQNVDTAVA (SEQ ID NO:10) (CDR1) ;

SASNRYT (SEQ ID NO:11) (CDR2) ;

QQYSSYPT (SEQ ID NO:12) (CDR3) 。

2. 一种结合人Tim-3的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

包含下述重链CDR的重链:

GYSFTGYTIN (SEQ ID NO:1) (CDR1) ;

LFNPYNGGTT (SEQ ID NO:2) (CDR2) ;

ARRYGYDAMDY (SEQ ID NO:3) (CDR3) ; 和

包含下述轻链CDR的轻链:

KSSQSVLYSSNQKNHLA (SEQ ID NO:4) (CDR1) ;

WASTRES (SEQ ID NO:5) (CDR2) ;

HQYLSSYT (SEQ ID NO:6) (CDR3) 。

3. 一种结合人Tim-3的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域的抗体或其抗原结合片段, 其包含:

包含下述重链CDR的重链:

GFNIKDYMH (SEQ ID NO:7) (CDR1) ;

WIDPENDNTIY (SEQ ID NO:8) (CDR2) ;

ARDFGYVAWLVY (SEQ ID NO:9) (CDR3) ; 和

包含下述轻链CDR的轻链:

KASQNVDTAVA (SEQ ID NO:10) (CDR1) ;

SASNRYT (SEQ ID NO:11) (CDR2) ;

QQYSSYPT (SEQ ID NO:12) (CDR3) 。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的抗体或其片段, 其中所述轻链和重链的框架区是人

框架区,或与人框架区具有至少85%同一性。

5. 如权利要求4所述的抗体或其片段,其中所述轻链和重链的框架区是人框架区。

6. 一种分离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以10.0nM KD或更强的亲和力结合人Tim-3的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域。

7. 如权利要求6所述的分离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以0.5nM KD或更强的亲和力结合人Tim-3的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的分离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具有人Fc区序列。

9. 如权利要求6、7或8中任一项所述的分离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抑制人Tim-3与地塞米松处理过的Jurkat T细胞上表达的磷脂酰丝氨酸结合。

10. 如权利要求6-9中任一项所述的分离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包含重链,所述重链包含一个或多个选自下述的重链CDR:

GYSFTGYTIN (SEQ ID NO:1) (CDR1)

LFNPYNGGTT (SEQ ID NO:2) (CDR2)

ARRYGYDAMDY (SEQ ID NO:3) (CDR3)。

11. 如权利要求6-10中任一项所述的分离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包含轻链,所述轻链包含一个或多个选自下述的轻链CDR:

KSSQSVLYSSNQKNHLA (SEQ ID NO:4) (CDR1)

WASTRES (SEQ ID NO:5) (CDR2)

HQYLSSYT (SEQ ID NO:6) (CDR3)。

12. 如权利要求6-9中任一项所述的分离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包含重链,所述重链包含一个或多个选自下述的重链CDR:

GFNIKDYMH (SEQ ID NO:7) (CDR1)

WIDPENDNTIY (SEQ ID NO:8) (CDR2)

ARDFGYVAWLVY (SEQ ID NO:9) (CDR3)。

13. 如权利要求6-9或12中任一项所述的分离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包含轻链,所述轻链包含一个或多个选自下述的轻链CDR:

KASQNVDTAVA (SEQ ID NO:10) (CDR1)

SASNRYT (SEQ ID NO:11) (CDR2)

QQYSSYPT (SEQ ID NO:12) (CDR3)。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段是嵌合或人源化的。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的分离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由单克隆抗体、scFv、Fab片段、Fab'片段和F(ab)'片段组成的组。

16. 一种核酸,其编码的抗体重链包含一个或多个选自下述的重链CDR:

GYSFTGYTIN (SEQ ID NO:1) (CDR1) ;

LFNPYNGGTT (SEQ ID NO:2) (CDR2) ;

ARRYYGYDAMDY (SEQ ID NO:3) (CDR3)。

17. 一种核酸,其编码的抗体重链包含一个或多个选自下述的重链CDR:

GFNIKDYMH (SEQ ID NO:7) (CDR1) ;

WIDPENDNTIY (SEQ ID NO:8) (CDR2) ;

ARDFGYVAWLVY (SEQ ID NO:9) (CDR3)。

18. 一种核酸,其编码的抗体轻链包含一个或多个选自下述的轻链CDR:

KSSQSVLYSSNQKNHLA (SEQ ID NO:4) (CDR1) ;

WASTRES (SEQ ID NO:5) (CDR2) ;

HQYLSSYT (SEQ ID NO:6) (CDR3)。

19. 一种核酸,其编码的抗体轻链包含一个或多个选自下述的轻链CDR:

KASQNVDTAVA (SEQ ID NO:10) (CDR1) ;

SASNRYT (SEQ ID NO:11) (CDR2)

QQYSSYPT (SEQ ID NO:12) (CDR3)。

20. 一种宿主细胞,其包含一种或多种如权利要求14-17中任一项所述的核酸。

21. 如权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段与治疗剂连接或缀合。

22. 如权利要求21所述的抗体或其片段,其中所述治疗剂是细胞毒性剂、放射性同位素、免疫调节剂或第二抗体。

23. 一种在受试者中抑制人Tim-3的方法,其中所述方法包括以有效抑制人Tim-3的量施用如权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段,或其人Tim3结合片段。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述受试者患有癌症。

25. 一种在受试者中抑制Tim-3介导的T细胞抑制的方法,其中所述方法包括以有效抑制Tim-3介导的T细胞抑制的量施用如权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段,或其人Tim3结合片段。

26. 一种在受试者中治疗癌症的方法,其中所述方法包括以有效治疗受试者癌症的量施用如权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述癌症是人Tim-3-阳性的癌症。

28. 一种在受试者中检测人Tim-3阳性细胞的方法,其中所述方法包括以有效标记人Tim-3阳性细胞的量施用与可检测的标记物缀合的如权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段,然后通过检测受试者中所述标记物的存在来检测受试者中的人Tim-3阳性细胞。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述标记物通过成像检测。

30. 如权利要求28或29所述的方法,其中所述细胞是癌细胞。

31. 如权利要求24、26、27或30中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液系统恶性肿瘤。

32. 如权利要求24、26、27或30中任一项所述的方法,其中所述癌症包括实体瘤。

33. 如权利要求24、26、27或30-32中任一项所述的方法,其中所述受试者正在接受抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA4治疗。

## 针对人TIM-3的单克隆抗体

[0001] 本申请是申请日为2019年8月21日,申请号为“201980037800.1”,发明名称为“针对人TIM-3的单克隆抗体”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

本申请要求2018年8月21日提交的美国临时申请号No.62/720,234的优先权,其内容各以全文引用的方式并入本申请中。

[0003] 序列表

本申请包含以ASCII格式通过EFS-Web提交的序列表,并通过引用的方式整体并入本申请中。于2019年8月21日创建的ASCII副本被命名为SequenceListing.txt,大小为15.6KB。

[0004] 发明背景

本文引用的所有出版物、专利、专利申请出版物和书籍的公开内容均通过引用的方式整体并入本申请中,以更全面地描述本发明所涉及的领域。

[0005] T细胞免疫球蛋白及黏蛋白-3(Tim-3)又称甲型肝炎病毒细胞受体2(HAVCR2),为I型跨膜蛋白,是由产生IFN- $\gamma$ 的T细胞,Foxp3 $^{+}$ 调节性T细胞和固有免疫细胞,例如巨噬细胞和树突状细胞表达的抑制性受体。Tim-3通过与其配体相互作用抑制免疫反应。Tim-3包含一个N-末端免疫球蛋白(IgV)结构域、一个具有O-连接糖基化位点的粘蛋白结构域、一个位于粘蛋白结构域和跨膜结构域之间且具有N-连接糖基化位点的茎结构域、一个跨膜结构域和一个胞质尾区(Monney 2002)。该研究者的实验室曾报道过,Tim-3的IgV结构域是具有功能性的结构域,能够结合碳水化合物(Cao 2007)。Tim-3的IgV结构域包含两个非经典二硫键和一个独特的CC'-FG夹缝,这个结构特征在所有Tim家族蛋白中都被鉴定出来,但未在其他免疫球蛋白超家族成员中发现。还有报告表明,对PD-1阻断治疗的适应性耐药与包括Tim-3在内的其他免疫检查点的上调有关(Koyama 2016)。据报道,Tim-3的配体除了碳水化合物外(Cao 2007;Wilker 2007),还包括Galectin-9(Zhu2005)、磷脂酰丝氨酸(DeKruyff 2010)、HMGB1(高迁移率族蛋白B1(Chiba 2012)和LILRB2(白细胞免疫球蛋白样受体B2)(PCT公开号W016/111947)。

[0006] 发明概述

本发明提供一种结合人Tim-3(T细胞免疫球蛋白及黏蛋白-3)的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0007] a)包含一个或多个选自下述的重链CDR的重链:

[0008] GYSFTGYTIN(SEQ ID NO:1)互补决定区(CDR)1(CDR1);

[0009] LFNPYNNGTT(SEQ ID NO:2)(CDR2);

[0010] ARRYGYDAMDY(SEQ ID NO:3)(CDR3);

[0011] 或

[0012] GFNIKDYYMH(SEQ ID NO:7)(CDR1);

[0013] WIDPENDNTIY(SEQ ID NO:8)(CDR2);

[0014] ARDFGYVAWLVY(SEQ ID NO:9)(CDR3);和

[0015] b) 包含一个或多个选自下述的轻链CDR的轻链：

[0016] KSSQSVLYSSNQKNHLA (SEQ ID NO:4) (CDR1)；

[0017] WASTRES (SEQ ID NO:5) (CDR2)；

[0018] HQYLSSYT (SEQ ID NO:6) (CDR3)；

[0019] 或

[0020] KASQNVDTAVA (SEQ ID NO:10) (CDR1)；

[0021] SASNRYT (SEQ ID NO:11) (CDR2)；

[0022] QQYSSYPT (SEQ ID NO:12) (CDR3)。

[0023] 本发明提供一种结合人Tim-3的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域的抗体或其抗原结合片段,其包含：

[0024] 包含下述重链CDR的重链：

[0025] GYSFTGYTIN (SEQ ID NO:1) (CDR1)；

[0026] LFNPyNNGTT (SEQ ID NO:2) (CDR2)；

[0027] ARRYYGYDAMDY (SEQ ID NO:3) (CDR3)；和

[0028] 包含下述轻链CDR的轻链：

[0029] KSSQSVLYSSNQKNHLA (SEQ ID NO:4) (CDR1)；

[0030] WASTRES (SEQ ID NO:5) (CDR2)；

[0031] HQYLSSYT (SEQ ID NO:6) (CDR3)。

[0032] 本发明提供一种结合人Tim-3的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域的抗体或其抗原结合片段,其包含：

[0033] 包含下述重链CDR的重链：

[0034] GFNIKDYYMH (SEQ ID NO:7) (CDR1)；

[0035] WIDPENDNTIY (SEQ ID NO:8) (CDR2)；

[0036] ARDFGYVAWLVY (SEQ ID NO:9) (CDR3)；和

[0037] 包含下述轻链CDR的轻链：

[0038] KASQNVDTAVA (SEQ ID NO:10) (CDR1)；

[0039] SASNRYT (SEQ ID NO:11) (CDR2)；

[0040] QQYSSYPT (SEQ ID NO:12) (CDR3)。

[0041] 本发明提供一种分离的抗体,所述分离的抗体以10.0nM KD或更强的亲和力结合人Tim-3的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域。

[0042] 本发明提供一种核酸,其编码的抗体重链包含一个或多个选自下述的重链CDR：

GYSFTGYTIN (SEQ ID NO:1) (CDR1)；

[0043] LFNPyNNGTT (SEQ ID NO:2) (CDR2)；

[0044] ARRYYGYDAMDY (SEQ ID NO:3) (CDR3)。

[0045] 本发明提供一种核酸,其编码的抗体重链包含一个或多个选自下述的重链CDR：

GFNIKDYYMH (SEQ ID NO:7) (CDR1)；

[0046] WIDPENDNTIY (SEQ ID NO:8) (CDR2)；

[0047] ARDFGYVAWLVY (SEQ ID NO:9) (CDR3)。

[0048] 本发明提供一种核酸,其编码的抗体轻链包含一个或多个选自下述的轻链CDR：

KSSQSVLYSSNQKNHLA (SEQ ID NO:4) (CDR1) ;

[0049] WASTRES (SEQ ID NO:5) (CDR2) ;

[0050] HQYLSSYT (SEQ ID NO:6) (CDR3) .

[0051] 本发明提供一种核酸,其编码的抗体轻链包含一个或多个选自下述的轻链CDR: KASQNVDTAVA (SEQ ID NO:10) (CDR1) ;

[0052] SASNRYT (SEQ ID NO:11) (CDR2)

[0053] QQYSSYPT (SEQ ID NO:12) (CDR3) .

[0054] 本发明提供一种宿主细胞,其包含一种或多种本发明的核酸。

[0055] 本发明提供与治疗剂连接或缀合的本发明的抗体或其片段。

[0056] 本发明提供一种在受试者中抑制人Tim-3的方法,所述方法包括以有效抑制人Tim-3的量施用本发明的抗体或其片段。

[0057] 本发明提供一种在受试者中抑制Tim-3介导的T细胞抑制的方法,所述方法包括以有效抑制Tim-3介导的T细胞抑制的量施用本发明的抗体或其片段。

[0058] 本发明提供一种在受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括以有效治疗受试者癌症的量施用本发明的抗体或其片段。

[0059] 本发明提供一种在受试者中检测人Tim-3阳性细胞的方法,所述方法包括以有效标记人Tim-3阳性细胞的量施用与可检测的标记物缀合的本发明的抗体或其片段,然后通过检测受试者中标记物的存在来检测受试者中的人Tim-3阳性细胞。

[0060] 本发明提供一种分离的核酸分子,其编码本发明的抗体或其片段。在一个实施方案中,核酸是DNA。在一个实施方案中,核酸是cDNA。在一个实施方案中,核酸是RNA。在一些实施方案中,抗体的抗原结合片段是其Tim-3 IgV结构域结合片段。在一些实施方案中,抗体的抗原结合片段是其人Tim-3 IgV结构域结合片段。

[0061] 本发明提供一种载体,其编码本发明的核酸分子。本发明提供一种宿主细胞,其包含本发明的核酸分子,或包含本发明的载体。

[0062] 本发明提供一种制备抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段的方法,所述方法包括在能够使宿主细胞产生抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段的条件下,培养所述宿主细胞。

[0063] 本发明提供一种药物组合物,其包含本发明的抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段,以及药学上可接受的赋形剂。

[0064] 本发明提供一种在有需要的受试者中降低Tim-3活性的方法,所述方法包括给予所述受试者治疗有效量的本发明的抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段。

[0065] 附图简要说明

[0066] 图1:ELISA分析表明50B5能够与Tim-3-IgV蛋白和Tim-3全长的胞外区蛋白(IgV-粘蛋白-茎结构域)结合,但不与人IgG对照蛋白结合。

[0067] 图2:FACS分析表明50B5与表达人Tim-3的细胞系结合,但不与表达鼠Tim-3的细胞系结合。50B5(空心直方图)或鼠1gG1同型对照(阴影直方图)

[0068] 图3:表面等离子体共振检测50B5的动力学参数。

[0069] 图4A-4B:4A:在混合淋巴细胞反应测定中,第4天发现分裂的CD4 T细胞和分裂的

CD8 T细胞表达Tim-3,但未分裂的CD4 T细胞和未分裂的CD8 T细胞不表达Tim-3。4B:在混合淋巴细胞反应测定中,第4天发现mAb 50B5显著增强了CD4 T细胞和CD8T细胞的IFN- $\gamma$ 的产生;N=8;\*\*P<0.01。

[0070] 图5:FACS分析表明15B4与表达人Tim-3的细胞系结合。15B4(空心直方图)或鼠1gG1同型对照(阴影直方图)

[0071] 图6:表面等离子体共振检测的动力学参数。

[0072] 发明详述

本发明提供一种结合人Tim-3(T细胞免疫球蛋白及黏蛋白-3)的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0073] a) 包含一个或多个选自下述的重链CDR的重链:

[0074] GYSFTGYTIN (SEQ ID NO:1) (CDR1) ;

[0075] LFNPYNGGTT (SEQ ID NO:2) (CDR2) ;

[0076] ARRYYGYDAMDY (SEQ ID NO:3) (CDR3) ;

[0077] 或

[0078] GFNIKDYYMH (SEQ ID NO:7) (CDR1) ;

[0079] WIDPENDNTIY (SEQ ID NO:8) (CDR2) ;

[0080] ARDFGYVAWLVY (SEQ ID NO:9) (CDR3) ;和

[0081] b) 包含一个或多个选自下述的轻链CDR的轻链:

[0082] KSSQSVLYSSNQKNHLA (SEQ ID NO:4) (CDR1) ;

[0083] WASTRES (SEQ ID NO:5) (CDR2) ;

[0084] HQYLSSYT (SEQ ID NO:6) (CDR3) ;

[0085] 或

[0086] KASQNVDTAVA (SEQ ID NO:10) (CDR1) ;

[0087] SASNRYT (SEQ ID NO:11) (CDR2) ;

[0088] QQYSSYPT (SEQ ID NO:12) (CDR3) .

[0089] 本发明提供一种结合人Tim-3的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0090] 包含下述重链CDR的重链:

[0091] GYSFTGYTIN (SEQ ID NO:1) (CDR1) ;

[0092] LFNPYNGGTT (SEQ ID NO:2) (CDR2) ;

[0093] ARRYYGYDAMDY (SEQ ID NO:3) (CDR3) ;和

[0094] 包含下述轻链CDR的轻链:

[0095] KSSQSVLYSSNQKNHLA (SEQ ID NO:4) (CDR1) ;

[0096] WASTRES (SEQ ID NO:5) (CDR2) ;

[0097] HQYLSSYT (SEQ ID NO:6) (CDR3) .

[0098] 本发明提供一种结合人Tim-3的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域的抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0099] 包含下述重链CDR的重链:

[0100] GFNIKDYYMH (SEQ ID NO:7) (CDR1) ;

- [0101] WIDPENDNTIY (SEQ ID NO:8) (CDR2) ;  
[0102] ARDFGYVAWLVY (SEQ ID NO:9) (CDR3) ; 和  
[0103] 包含下述轻链CDR的轻链：  
[0104] KASQNVDTAVA (SEQ ID NO:10) (CDR1) ;  
[0105] SASNRYT (SEQ ID NO:11) (CDR2) ;  
[0106] QQYSSYPT (SEQ ID NO:12) (CDR3) .  
[0107] 在一些实施方案中,所述轻链和重链的框架区是人框架区,或与人框架区具有至少85%同一性。  
[0108] 在一些实施方案中,所述轻链和重链的框架区是人框架区。本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段以10.0nM KD或更强的亲和力结合人Tim-3的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域。  
[0109] 在一些实施方案中,所述分离的抗体以1.0nM KD或更强的亲和力结合人Tim-3的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域。在一些实施方案中,所述分离的抗体以0.5nM KD或更强的亲和力结合人Tim-3的IgV结构域或人Tim-3的IgV-粘蛋白-茎结构域。  
[0110] 在一些实施方案中,所述分离的抗体不结合鼠Tim-3。  
[0111] 在一些实施方案中,所述分离的抗体抑制人Tim-3与地塞米松处理过的Jurkat T细胞上表达的磷脂酰丝氨酸结合。  
[0112] 在一些实施方案中,所述分离的抗体或其抗原结合片段具有人Fc区序列。  
[0113] 在一些实施方案中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含一个或多个选自下述的重链CDR：  
[0114] GYSFTGYTIN (SEQ ID NO:1) (CDR1)  
[0115] LFNPyNNGTT (SEQ ID NO:2) (CDR2)  
[0116] ARYYGYDAMDY (SEQ ID NO:3) (CDR3) .  
[0117] 在一些实施方案中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链包含一个或多个选自下述的轻链CDR：  
[0118] KSSQSVLYSSNQKNHLA (SEQ ID NO:4) (CDR1)  
[0119] WASTRES (SEQ ID NO:5) (CDR2)  
[0120] HQYLSSYT (SEQ ID NO:6) (CDR3) .  
[0121] 在一些实施方案中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含一个或多个选自下述的重链CDR：  
[0122] GFNIKDYYMH (SEQ ID NO:7) (CDR1)  
[0123] WIDPENDNTIY (SEQ ID NO:8) (CDR2)  
[0124] ARDFGYVAWLVY (SEQ ID NO:9) (CDR3) .  
[0125] 在一些实施方案中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链包含一个或多个选自下述的轻链CDR：  
[0126] KASQNVDTAVA (SEQ ID NO:10) (CDR1)  
[0127] SASNRYT (SEQ ID NO:11) (CDR2)  
[0128] QQYSSYPT (SEQ ID NO:12) (CDR3) .  
[0129] 在一些实施方案中,本发明提供的分离的抗体或其抗原结合片段或抗体或其片段

是嵌合或人源化的。

[0130] 在一些实施方案中,本发明提供的分离的抗体或其抗原结合片段或抗体或其片段选自由单克隆抗体、scFv、Fab片段、Fab'片段和F(ab)'片段组成的组。应当指出,尽管scFv并非严格意义上的抗体片段,而是一种融合蛋白,但是本发明的抗体片段包括scFv,除非另有说明。

[0131] 本发明提供一种核酸,其编码的抗体重链包含一个或多个选自下述的重链CDR: GYSFTGYTIN (SEQ ID NO:1) (CDR1) ;

[0132] LFNPYNGGTT (SEQ ID NO:2) (CDR2) ;

[0133] ARRYYGYDAMDY (SEQ ID NO:3) (CDR3) .

[0134] 本发明提供一种核酸,其编码的抗体重链包含一个或多个选自下述的重链CDR: GFNIKDYYMH (SEQ ID NO:7) (CDR1) ;

[0135] WIDPENDNTIY (SEQ ID NO:8) (CDR2) ;

[0136] ARDFGYVAWLVY (SEQ ID NO:9) (CDR3) .

[0137] 本发明提供一种核酸,其编码的抗体轻链包含一个或多个选自下述的轻链CDR: KSSQSVLYSSNQKNHLA (SEQ ID NO:4) (CDR1) ;

[0138] WASTRES (SEQ ID NO:5) (CDR2) ;

[0139] HQYLSSYT (SEQ ID NO:6) (CDR3) .

[0140] 本发明提供一种核酸,其编码的抗体轻链包含一个或多个选自下述的轻链CDR: KASQNVDTAVA (SEQ ID NO:10) (CDR1) ;

[0141] SASNRYT (SEQ ID NO:11) (CDR2)

[0142] QQYSSYPT (SEQ ID NO:12) (CDR3) .

[0143] 本发明提供一种宿主细胞,其包含一种或多种本发明的核酸。

[0144] 本发明提供与治疗剂连接或缀合的本发明的抗体或其片段。

[0145] 在一些实施方案中,所述治疗剂是细胞毒性剂、放射性同位素、免疫调节剂或第二抗体。

[0146] 本发明提供一种在受试者中抑制人Tim-3的方法,所述方法包括以有效抑制人Tim-3的量施用本发明的抗体或其片段或其人Tim-3结合片段。

[0147] 在一些实施方案中,所述受试者患有癌症。

[0148] 本发明提供一种在受试者中抑制Tim-3介导的T细胞抑制的方法,所述方法包括以有效抑制Tim-3介导的T细胞抑制的量施用本发明的抗体或其片段或其人Tim-3结合片段。本发明提供一种在受试者中治疗癌症的方法,所述方法包括以有效治疗受试者癌症的量施用本发明的抗体或其片段。

[0149] 在一些实施方案中,所述癌症是人Tim-3-阳性的癌症。

[0150] 本发明提供一种在受试者中检测人Tim-3阳性细胞的方法,所述方法包括以有效标记人Tim-3阳性细胞的量施用与可检测的标记物缀合的本发明的抗体或其片段,然后通过检测受试者中标记物的存在来检测受试者中的人Tim-3阳性细胞。

[0151] 在一些实施方案中,所述标记物通过成像检测。

[0152] 在一些实施方案中,所述细胞是癌细胞。

[0153] 在一些实施方案中,所述癌症是血液系统恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述癌症

是肺癌、胃癌、头颈癌、神经鞘瘤、黑素瘤或滤泡性B细胞非霍奇金淋巴瘤。

[0154] 在一些实施方案中,所述癌症包括实体瘤。

[0155] 在一些实施方案中,所述受试者正在接受抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA4治疗。

[0156] 在一些实施方案中,本发明提供的抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段,包含(i) VH的框架区,其包含人种系框架区序列IGHV1-2\*02,IGHV1-2\*04,IGHV1-2\*05,IGHV1-18\*04,IGHV1-69-2\*01,IGHV1-46\*01,IGHD5-12\*01,IGHD5-24\*01,IGHD6-25\*01,IGHJ3\*01,IGHJ4\*01,IGHJ4\*03,IGHJ6\*01,IGHJ6\*02和/或(ii) VL的框架区,其包含人种系框架区序列IGKV1-13\*02,IGKV1-27\*01,IGKV3-7\*02,IGKV4-1\*01,IGKV1D-13\*02,IGKV3D-7\*01,IGKJ1\*01,IGKJ2\*01,IGKJ4\*01,IGKJ4\*02。

[0157] 在一些实施方案中,本发明提供的抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段以约 $1\times 10^{-9}$  M至约 $1\times 10^{-12}$  M的结合亲和力(KD)结合Tim-3 IgV结构域。

[0158] 在一些实施方案中,本发明提供的抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段是单克隆抗体。

[0159] 在一些实施方案中,本发明提供的抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段是重组抗体。

[0160] 在一些实施方案中,本发明提供的抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段包含人框架区。

[0161] 在一些实施方案中,本发明提供的抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段包含人恒定区。

[0162] 在一些实施方案中,本发明提供了抗Tim-3 IgV结构域抗体。

[0163] 在一些实施方案中,本发明提供了抗体的Tim-3 IgV结构域结合片段。

[0164] 在一些实施方案中,所述Tim-3 IgV结构域结合片段是Fab、F(ab)2或scFv。

[0165] 本发明提供一种分离的核酸分子,其编码本发明的抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段。在一个实施方案中,核酸是DNA。在一个实施方案中,核酸是cDNA。在一个实施方案中,核酸是RNA。

[0166] 本发明提供一种载体,其包含本发明的核酸分子。本发明还提供一种宿主细胞,其包含本发明的核酸分子,或包含本发明的载体。

[0167] 本发明提供一种制备抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段的方法,所述方法包括在能够使宿主细胞产生抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段的条件下,培养所述宿主细胞。

[0168] 本发明提供了一种组合物,其包含本发明的抗Tim-3 IgV结构域抗体或其Tim-3 IgV结构域结合片段,和载体。在一个实施方案中,所述组合物是药物组合物,所述载体是药物载体。本发明还提供一种药物组合物,其包含本发明的抗体或其结合片段以及药学上可接受的赋形剂。

[0169] 本文所用的术语“抗体”是指完整抗体,例如具有完整的Fc区和Fv区的抗体。“片段”是指抗体的任何部分或者连接在一起的抗体部分,在非限制性示例中,如Fab、F(ab)2,单链Fv(scFv),其小于完整抗体,但它是抗原结合片段,并且与具有特异性结合片段的完整抗体竞争。在本发明中,抗原是人的Tim-3 IgV结构域。

[0170] 例如,可以通过切割完整抗体或重组技术来制备抗体片段,通常参见基础免疫学

(Fundamental Immunology第7章Paul, W.编辑,第2版,Raven Press, N.Y. (1989),通过引用的方式整体并入本文)。抗原结合片段可以通过DNA重组技术,或通过酶促或化学裂解完整抗体,或通过分子生物学技术来制备。在一些实施方案中,抗体片段是Fab, Fab', F(ab')2, Fd, Fv, 互补决定区(CDR)片段或单链抗体(scFv,通过连接肽连接的轻链可变结构域(VL)和重链可变结构域(VH))。在一个实施方案中,scFv包含与人可变结构域FR1, FR2, FR3或FR4序列相同的可变结构域框架区序列。在一个实施方案中,scFv包含长度为5至30个氨基酸残基的连接肽。在一个实施方案中,scFv包含连接肽,所述连接肽包含甘氨酸,丝氨酸和苏氨酸残基中的一个或多个。

[0171] 在一个实施方案中,scFv的连接肽的长度为10-25个氨基酸。在一个实施方案中,连接肽包含甘氨酸,丝氨酸和/或苏氨酸残基(参见Bird 1988和Huston 1988,两者通过引用的方式整体并入本文),或包含至少含有抗体的一部分的多肽,所述抗体的一部分足够使Tim-3 IgV结构域特异性抗原与所述多肽结合,包括双特异性抗体。从N-端到C-端,成熟的轻重链可变结构域包含FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR、CDR3和FR4结构域。每个结构域的氨基酸分配均按照Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987和1991)), Chothia&Lesk 1987或Chothia 1989中的定义进行,参考文献的内容各以全文引用的方式并入本文。本文所用的术语“多肽”涵盖天然或人工蛋白质、蛋白质片段和蛋白质序列的多肽类似物。多肽可以是单体或多聚体的形式。如本文所用,Fd片段是由VH和CH1结构域组成的抗体片段;Fv片段由抗体的单臂VL和VH结构域组成;dAb片段(Ward 1989,通过引用的方式整体并入本文)由VH结构域组成。在一些实施方案中,片段的长度为至少5个、6个、8个或10个氨基酸。在其他实施方案中,片段长度为至少14个,至少20个,至少50个或至少70个、80个、90个、100个、150个或200个氨基酸。

[0172] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指基本上均质的抗体群中的抗体,即,除少量可能存在的天然突变外,该抗体群中的抗体个体均相同。因此,修饰词“单克隆”表示抗体的性质不是离散抗体的混合物。在某些实施方案中,所述单克隆抗体包括具有结合人Tim-3 IgV结构域多肽序列的抗体。多克隆抗体通常包含针对多个决定簇(表位)的多种抗体,而单克隆抗体与其不同,每种单克隆抗体只针对单一抗原决定簇。除其特异性外,单克隆抗体的优势还在于它们通常不受其他免疫球蛋白的污染。因此,已知序列的单克隆抗体可以通过非杂交瘤方法例如合适的重组技术获得。

[0173] 在一个实施方案中,抗体是分离的。本文所用的术语“分离的抗体”是指其源于或衍生自具有以下一种,两种,三种或四种的抗体:(1)不与其在天然状态中伴随它的天然缔合成分缔合,(2)不含来自同一物种的其他蛋白,(3)由来自不同物种的细胞表达,并且(4)非天然发生。

[0174] 在一个实施方案中,抗体是人源化的。非人(如鼠)抗体的“人源化”形式是包含最少源于非人免疫球蛋白序列的嵌合抗体。在一个实施方案中,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体)中高变区(HVR或CDR)的残基被非人物种(供体抗体)如小鼠,大鼠,兔子或非人灵长类动物中具有所需特异性,亲和力和/或能力的HVR(或CDR)的残基取代。在一个实施方案中,抗体具有本发明所述的鼠抗体(mAb 15B4和mAb 50B5)的重链和轻链CDR1-3中的1、2、3、4、5或6个。在一个优选的实施方案中,鼠单克隆抗体的框架区(FR)的残基被相应的人免

免疫球蛋白可变结构域的框架区 (FR) 的残基取代。可以在实施方案进行这些修饰,以进一步改善抗体性能。此外,在特定的实施方案中,人源化抗体可包含未在受体抗体或供体抗体中发现的残基。在一个实施方案中,人源化抗体不包含未在受体抗体或供体抗体中发现的残基。一般情况下,人源化抗体包含了基本上所有具有以下的至少一种,通常两种的可变结构域,其中所有或基本上所有高变区卷曲区域对应于非人免疫球蛋白的高变区卷曲区域(例如本发明所述的mAb 15B4和mAb 50B5),以及所有或基本上所有的FR是人的免疫球蛋白序列中的FR。人源化抗体任选地还包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分、通常是人免疫球蛋白的至少一部分,参见例如, Jones 1986; Riechmann 1988; Presta 1992; Vaswani & Hamilton 1998; Harris 1995; Hurle & Gross 1994 和美国专利6,982,321和7,087,409,其内容各以引用的方式整体并入本文。在一个实施方案中,人源化抗体中包含未在受体抗体或供体抗体中发现的残基,如W099/58572中所述的修饰的抗体Fc区,其内容以引用的方式整体并入本文。单克隆抗体的人源化技术是众所周知的,如在美国专利4,816,567;5,807,715;5,866,692;6,331,415;5,530,101;5,693,761;5,693,762;5,585,089;和6,180,370中进行了描述,其内容各以引用的方式整体并入本文。许多包含源自非人免疫球蛋白抗原结合位点的“人源化”抗体分子已被描述,包括具有融合至人恒定结构域的啮齿动物或经修饰的啮齿动物V区及其相关CDRs的抗体,参见例如, Winter 1991, Lobuglio 1989, Shaw 1987, 和Brown 1987, 其内容各以全文引用的方式并入本文。其他参考文献描述在与合适的人抗体恒定结构域融合之前,将啮齿动物高变区或CDRs移植到人支持框架区 (FR) 中,参见例如, Riechmann 1988, Verhoeyen 1988 和 Jones 1986, 其内容各以全文引用的方式并入本文。另一参考文献描述了由经重组改造的啮齿动物框架区所支持的啮齿动物CDRs,参见欧洲专利公开号0519596,通过引用的方式整体并入本文。这些“人源化”分子经设计以最小化啮齿动物抗人抗体分子中的不希望的免疫反应,所述不希望的免疫反应限制了这些抗体在人类治疗应用中的持续时间和有效性。对抗体的恒定区进行基因工程改造,使其呈免疫学惰性(例如,不会诱发补体溶解),参见例如, PCT公开号W099/58572;英国专利申请号9809951.8。其他可能被利用的人源化抗体方法由Daugherty 1991;美国专利号6,180,377;6,054,297;5,997,867;5,866,692;6,210,671;6,350,861及PCT公开号W001/27160公开,其内容各以全文引用的方式并入本文。

[0175] 其他形式的人源化抗体,其中一个或多个或所有CDRs (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2或CDR H3) 相对于原始抗体发生改变,也被称为从原始抗体的一个或多个CDRs “衍生”的一个或多个CDRs。在一个实施方案中,本发明提供的抗体是人源化的mAb 15B4和mAb 50B5,其中一个或多个或所有CDRs (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2或CDR H3) 相对于原始抗体发生改变。在一个实施方案中,本发明提供的抗体是人源化的mAb 15B4和mAb 50B5,其CDRs (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2或CDR H3) 相对于原始抗体均没有改变。

[0176] 在一些实施方案中,抗体或片段可以通过重组技术产生,例如,利用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达抗体,从重组的人源抗体组合文库中分离抗体,从转入人免疫球蛋白基因的动物(例如,小鼠)中分离抗体。

[0177] 在一个实施方案中,本发明的抗Tim-3 IgV结构域抗体能够特异性结合或特异地结合人Tim-3 IgV结构域。如本文所用,术语“能够特异性结合”或“特异地结合”是指抗体部

分或片段与(特定的)抗原结合的解离常数 $<1\mu\text{M}$ ,优选 $<1\text{nM}$ ,且最优选 $<10\text{pM}$ 。在一个实施方案中,本发明的抗体(或片段)对Tim-3 IgV结构域的Kd小于10.0nM。在一个实施方案中,本发明的抗体(或片段)对Tim-3 IgV结构域的Kd小于1.0nM。在一个实施方案中,本发明的抗体(或片段)对Tim-3 IgV结构域的Kd小于0.5nM。在一个实施方案中,本发明的抗体(或片段)对Tim-3 IgV结构域的Kd小于或等于0.1nM。

**[0178]** 本文所用的术语“Kd”是指抗体-抗原相互作用的解离常数。测定抗体对Tim-3 IgV结构域的Kd或结合亲和力的一个方法是检测抗体单功能性Fab片段的结合亲和力。(结合常数是反解离常数)。用木瓜蛋白酶切割抗体(例如,IgG)或重组表达,可以得到单功能性Fab片段。抗人Tim-3 IgV结构域抗体片段的亲和力可以例如通过表面等离子体共振(BIAcore3000<sup>TM</sup>表面等离子体共振(SPR)系统,BlaAcore Inc.,Piscataway N.J.)进行测定。CM5芯片可用N-乙基-N’-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)根据厂商说明书进行活化。抗原以pH 4.0的10mM乙酸钠稀释,并以0.005mg/mL的浓度注射到活化的芯片上。使用不同的流动时间通过各芯片通道,获得两组抗原密度:用于详细的动力学研究的100-200响应单位(RU)和用于筛选的500-600RU。将纯化的Fab样品梯度稀释(0.1-10×估计的Kd),并以100μL/min注射1分钟,解离时间长达2小时。采用已知浓度的Fab(由氨基酸分析确定)作为标准,通过ELISA和/或SDS-PAGE电泳测定Fab蛋白的浓度。使用BIA evaluation软件以1:1Langmuir结合模型拟合数据,同时获得动力学缔合速率(kon)和解离速率(koff)(参见Karlsson等,Kinetic and concentration analysis using BIA technology,Methods:A Companion to Methods Enzymol 6:99-110(1994),其内容以引用的方式整体并入本文),通过koff/kon计算平衡解离常数(Kd)值。该方案适用于确定针对任何抗原的抗体或片段的结合亲和力,也可以使用本领域已知的其他方案测定,例如ELISA。

**[0179]** “特异性结合”抗体或多肽的表位是本领域熟知的术语,并且测定这种特异性或优先结合的方法也是本领域熟知的。如果分子与特定细胞或物质的反应或结合,比其与其他细胞或物质的反应和结合更频繁,更迅速,更持久和/或具有更强的亲和力,则该分子被认为表现出“特异性结合”或“优先结合”。如果抗体与靶标的结合,比其与其他物质的结合具有更强的亲和力、亲留力,更容易和/或更持久,则该抗体“特异性结合”或“优先结合”至靶标。例如,特异性结合或优先结合人Tim-3 IgV结构域的抗体,是指相比与Tim-3的其他表位或非Tim-3表位的结合,该抗体与人Tim-3 IgV结构域的结合具有更强的亲和力、亲留力,更快速和/或更持久。通过阅读该定义还应理解,例如,特异地或优先地结合至第一靶标的抗体(或部分或表位)可以或不可以特异地或优先地结合第二靶标。因此,“特异性结合”或“优先结合”并不一定(尽管可以包括)排他结合。

**[0180]** 本文针对抗体所使用的术语“竞争”是指第一种抗体或其抗原结合部分与第二种抗体或其抗原结合部分以足够相似的方式结合一个表位,与不存在第二种抗体相比,当存在第二种抗体时第一种抗体与其相关表位的结合可检测地降低。或者,情况可以是(但不必是)第二种抗体与其表位的结合在存在第一种抗体时也可检测地降低。即,第一种抗体能够抑制第二种抗体与其表位的结合,而第二种抗体不能抑制第一种抗体与其表位的结合。然而,当每个抗体可检测地抑制另一抗体与其相关表位或配体的结合时,无论程度相同、更高或更低,认为抗体彼此“交叉竞争”结合它们各自的表位。竞争和交叉竞争的抗体均包括

在本发明中。无论这类竞争或交叉竞争发生的机制(例如空间位阻、构象变化、或与共同表位或其部分结合等),熟练的技术人员应当知道,根据本文提供的教导,这类竞争和/或交叉竞争的抗体被包括在内并适用于本发明公开的方法。

[0181] 根据抗体重链恒定结构域的氨基酸序列,可以将抗体(免疫球蛋白)划分为不同的类别。例如,抗体或片段可以分别是IgG, IgD, IgE, IgA或IgM抗体或其片段中的任何一种。在一个实施方案中,抗体是免疫球蛋白G。在一个实施方案中,抗体片段是免疫球蛋白G的片段。在一个实施方案中,抗体是IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3或IgG4。在一个实施方案中,抗体包含来自人IgG1, 人IgG2, 人IgG2a, 人IgG2b, 人IgG3或人IgG4的序列。也可以使用上述任意抗体亚型的组合。选择需要的抗体类型时要考虑抗体血清半衰期。例如, IgG的血清半衰期通常为23天,IgA的血清半衰期为6天,IgM的血清半衰期为5天,IgD的血清半衰期为3天,IgE的血清半衰期为2天( Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*, 第4版, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 2000, 通过引用的方式整体并入本文)。

[0182] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的氨基末端结构域。重链的可变结构域可称作“VH”,轻链的可变结构域可称作“VL”。这些结构域包含抗原结合位点,通常是抗体最多变的部分。术语“可变的”是指以下事实:可变结构域某些部分的序列在抗体之间差异很大,并用于每一种特定抗体与其特定抗原的结合及其特异性。然而,这种可变性并不是均匀分布在抗体的可变结构域内,主要集中在轻链和重链可变结构域内三个被称为高变区(HVRs或CDRs)的片段中。可变结构域中保守性更高的部分称为框架区(FR)。每个天然的重链和轻链可变结构域各包含主要采用 $\beta$ -折叠构型的四个FR区,所述FR区通过三个CDRs连接在一起,形成卷曲连接,并在某些情况下形成 $\beta$ -折叠构型的一部分。每条链的CDRs通过FR以紧密相邻的方式保持在一起,并与另一条链的CDRs结合在一起,有利于形成抗体的抗原结合部位(参见Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*(免疫学重要的蛋白序列),第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。恒定结构域并不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出多种效应功能,例如参与抗体在抗体-依赖性细胞毒效应中的作用。

[0183] 来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可以根据其恒定结构域的氨基酸序列被分为两种明显不同类型(即kappa( $\kappa$ )和lambda( $\lambda$ ))中的一种。

[0184] “框架区”或“FR”残基是指可变结构域中除了本文定义的HVR残基之外的那些残基。本文使用的术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域中序列高度变化和/或形成结构上定义的卷曲的区域。通常,抗体包含6个高变区:三个在VH中(H1、H2、H3),三个在VL中(L1、L2、L3)。在天然的抗体中,H3和L3是六个HVR中最具多样性的区域,特别是H3被认为在赋予抗体精密的特异性中起到独特的作用,参见例如,Xu等., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson和Wu, *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003)。实际上,天然存在的仅由重链组成的骆驼(camelid)抗体在缺乏轻链的情况下是有功能且稳定的(参见例如,Hamers-Casterman 1993; Sheriff&Constantine 1996)。多个HVR描述处于使用中并且被本文所涵盖。Kabat互补决定区(CDRs)是以序列变异性为基础的且是最常用的(Kabat等., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), 通

过引用整体并入本文)。重链和轻链各有CDRs 1、2和3。而Chothia是指结构卷曲的位置(Chothia&Lesk 1987)。AbM HVRs代表Kabat HVR与Chothia结构卷曲区域之间的折衷,并且通过Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。”接触”HVR是基于可获得的复合晶体结构的分析。HVR可包含如下所示的”延伸的HVRs”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)以及89-97或89-96(L3),和VH中的26-35(H1)、50-65或49-65(H2)以及93-102、94-102或95-102(H3)。就这些定义中的每一个而言,可变结构域残基根据上文中Kabat等编号。

[0185] 本文的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区,其包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链Fc区的边界可能有所不同,但人IgG重链Fc区通常被定义为从Cys226或Pro230的氨基酸残基的位置延伸至其羧基末端。Fc区的C-末端赖氨酸可以例如在抗体的制备或纯化过程中移除,或通过重组改造编码抗体重链的核酸来移除。因此,本文所用的完整抗体可以是具有或不具有C末端赖氨酸的抗体。

[0186] 包含本发明的抗体,scFv或抗体片段的组合物或药物组合物,优选地包含稳定剂,以防止蛋白质在使用前的储存和运输过程中,由于变性,氧化或聚集而导致活性或结构完整性的丧失。所述组合物或药物组合物可以包含盐,表面活性剂,pH调节剂和张力调节剂(例如糖)中的一种或多种的任意组合,用于克服聚集的问题。所述组合物或药物组合物作为注射剂时,期望的pH值约在中性pH值范围内,还要最小化表面活性剂含量以避免制剂中不利于注射到受试者体内的气泡。在一个实施方案中,所述组合物或药物组合物为液体形式,能够维持溶液中高浓度生物活性抗体的稳定,且适于吸入或肠胃外给药。在一个实施方案中,所述组合物或药物组合物适于静脉内,肌内,腹膜内,皮内和/或皮下注射。在一个实施方案中,所述组合物或药物组合物为液体形式,其产生气泡和类过敏反应副作用的风险已最小化。在一个实施方案中,所述组合物或药物组合物是等渗的。在一个实施方案中,所述组合物或药物组合物的pH值为6.8至7.4。

[0187] 在一个实施方案中,将本发明公开的ScFvs或抗体片段冻干和/或冷冻干燥,并重构以使用。

[0188] 药学上可接受的载体的实例,包括但不限于磷酸盐缓冲盐溶液,无菌水(包括注射用水USP),乳剂(例如油/水乳剂),和各种类型的润湿剂。用于气雾剂或肠胃外给药的稀释剂优选为磷酸盐缓冲盐溶液或生理盐水(0.9%),例如0.9%的氯化钠溶液,USP。通过熟知的常规方法配制包含此类载体的组合物(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,A.Gennaro,ed.,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1990和Remington,The Science and Practice of Pharmacy第20版.Mack Publishing,2000,其内容各以引用的方式整体并入本文)。在非限制性示例中,可以包含磷酸氢二钠、氯化钾、磷酸二氢钾、聚山梨酯80(如2-[2-[3,5-bis(2-hydroxyethoxy)oxolan-2-yl]-2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethyl(E)-octadec-9-enoate)、乙二胺四乙酸二钠盐、蔗糖、一水合磷酸二氢钠和二水合磷酸氢二钠中的一种或多种。

[0189] 本发明所述的抗体或抗体片段,或组合物或药物组合物可以冻干的或任何合适的形式提供,包括但不限于可注射溶液或可吸入溶液,凝胶和片剂。

[0190] 本文的术语“Fc结构域”用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区,其包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链Fc区的边界可能有所不同,但人IgG重链Fc区通常被定义为从Cys226或Pro230的氨基酸残基的位置延伸至其羧基末端。Fc区的C-末端的赖氨酸可

被移除,例如通过重组改造编码它的核酸。在一些实施方案中,抗体包含Fc结构域。在一个实施方案中,Fc结构域的序列与人IgG1 Fc结构域的序列相同或具有99%及以上的序列相似性。在一个实施方案中,Fc结构域的序列与人IgG2 Fc结构域的序列相同或具有99%及以上的序列相似性。在一个实施方案中,Fc结构域的序列与人IgG3Fc结构域的序列相同或具有99%及以上的序列相似性。在一个实施方案中,Fc结构域的序列与人IgG4 Fc结构域的序列相同或具有99%及以上的序列相似性。在一个实施方案中,Fc结构域没有突变。在一个实施方案中,Fc结构域的CH2-CH3结构域界面处发生突变,以增加酸性而非中性pH条件下IgG对FcRn的亲和力(Dall'Acqua 2006; Yeung 2009)。在一个实施方案中,Fc结构域与人IgG1 Fc结构域具有相同的序列。

**[0191]** 在一些实施方案中,本发明涵盖针对可变区的修饰形式。例如,本发明包括不显著影响其性能的具有功能上等效的可变区和CDRs的抗体,以及具有增强或降低的活性和/或亲和力的变体。例如,可以突变抗体的氨基酸序列以获得对人Tim-3 IgV具有所需结合亲和力的抗体。多肽的修饰是本领域的常规操作,无需在此详细描述。修饰的多肽的实例包括具有保守氨基酸残基取代,一个或多个氨基酸缺失或添加(其不显著有害地改变功能活性,或使多肽与其配体的亲和力成熟(增强)),或应用化学类似物的多肽。

**[0192]** 氨基酸序列插入包括在氨基和/或羧基端融合长度为1个残基至含有100个或更多个残基的多肽,以及序列内单个或多个氨基酸残基的插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酸残基的抗体或与表位标签融合的抗体。抗体分子其它插入变体包括在抗体N或C端与酶或多肽的融合,以增加抗体的血清半衰期。

**[0193]** 取代变体是抗体分子中至少一个氨基酸残基被去除并在该位置插入了不同的残基。对于取代诱变而言最有意义的位点包括高变区,但是框架区的改变也在考虑之列。保守取代显示在表头为“保守取代”的表1中。如果此类取代导致生物学活性改变,则可以引入表1中命名为“示例性取代”的或者以下参考氨基酸类别进一步描述的更实质性改变,并筛选产物。

**[0194]** 表1:氨基酸取代

	初始残基	保守取代	示例性取代
<b>[0195]</b>	Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
	Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn

Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine 正亮氨酸
Leu (L)	Ile	Norleucine 正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine 正亮氨酸

[0196]

[0197] 抗体生物学特性的实质性修饰可以通过选择性取代来实现,即选择对维持以下方面的作用存在显著差异的残基: (a) 取代区域中多肽骨架的结构,例如 $\beta$ -折叠或螺旋构象; (b) 该分子靶位点处的电荷或疏水性;或 (c) 侧链体积 (bulk)。根据常见的侧链性质,天然残基可以划分为以下几类:

[0198] (1) 非极性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0199] (2) 极性不带电荷:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0200] (3) 酸性(带负电荷):Asp、Glu;

[0201] (4) 碱性(带正电荷):Lys、Arg;

[0202] (5) 影响侧链定向的残基:Gly、Pro;和

[0203] (6) 芳香族:Trp、Tyr、Phe、His。

[0204] 非保守性取代可通过将这些类型中的某一类的成员变换为另一类来进行。

[0205] 一种取代类型,例如,将抗体中的一个或多个可能具有化学反应性的半胱氨酸改变为另一种残基,例如但不限于丙氨酸或丝氨酸。例如,可以对非经典的半胱氨酸进行取代。可以在可变结构域的CDR区或框架区或抗体的恒定区中进行取代。在一些实施方案中,所述半胱氨酸是经典的半胱氨酸。也可以用丝氨酸取代不参与维持抗体正确构型的任何半胱氨酸残基,以改善该分子的氧化稳定性并防止异常的交联。相反,可以向抗体中加入半胱

氨酸连接以改善其稳定性,尤其当该抗体是抗体片段如Fv片段时。

[0206] 抗体也可以在例如重链和/或轻链的可变结构域中进行修饰,以改变抗体的结合特性。可变结构域的变化可以改变结合亲和力和/或特异性。在一些实施方案中,在CDR结构域内进行的保守氨基酸取代不超过1-5个。在其他实施方案中,在CDR结构域内进行的保守氨基酸取代不超过1-3个。例如,可以在一个或多个CDR区内进行突变,以增加或减少抗体对人Tim-3 IgV结构域的KD,或 $k_{off}$ ,或改变抗体的结合特异性。定点诱变技术是本领域众所熟知的。

[0207] 还可以在框架区或恒定区中进行修饰或突变以增加抗人Tim-3 IgV结构域抗体的半衰期,参见例如PCT公开号W0 00/09560。也可以在框架区或恒定区进行突变以改变抗体的免疫原性,提供与另一分子共价或非共价结合的位点,或改变补体固定,FcR结合和抗体-依赖性细胞介导的细胞毒效应等特性。根据本发明,一个抗体可以在可变结构域的CDRs或框架区或恒定区的一个或多个中具有突变。

[0208] 在一个实施方案中,本发明所述的抗体是重组产生的。在一个实施方案中,融合蛋白是在真核表达系统中产生的。

[0209] 在一个实施方案中,真核表达系统产生的融合蛋白在Fc部分对应于Asn297的残基处包含糖基化修饰。

[0210] 在一个实施方案中,包含本发明的抗体或其抗原结合片段的组合物或药物组合物就其抗体或其抗原结合片段而言是基本上纯的。当包含本发明的抗体或其抗原结合片段的组合物或药物组合物中至少60%至75%的样品是单独种类的抗体或其抗原结合片段时,所述组合物或药物组合物就其抗体或其片段而言是“基本上纯的”。一种基本上纯的组合物或药物组合物(包含本发明的抗体或其抗原结合片段),即作为抗体或抗原结合片段的那部分包含60%,70%,80%或90%,优选约95%,更优选99%以上单独种类的抗体或其抗原结合片段。纯度或均质性可通过本领域熟知的多种手段来测定,如聚丙烯酰胺凝胶电泳或HPLC。

[0211] 在一个实施方案中,人Tim3具有如下序列:

[0212] MFSHLPFDCVLLLLLRLTRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWKGKA

[0213] CPVFECGNVVLRTDERDVNYWTSRYWLNGDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQI

[0214] PGIMNDEKFNLKLVIKPAKVTAPTRQRDFTAAFPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDIN

[0215] LTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWKWYSHSKEK

[0216] IQNLSLISLANLPPSGLANAVAEGIRSEENIYTIEENVYEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP  
(SEQ ID NO:13)

[0217] 在一个实施方案中,抗体的IgV结构域的序列包括:SEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPG  
NLVPVCWKGKACPVFECGNVVLRTDERDVN YWTSRYWLNGDFRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDE  
KFNKLKLVIKPA (SEQ ID NO:22)

[0218] 本文所用的术语“和/或”,例如选项A和/或选项B,包含(i)单独的选项A,(ii)单独的选项B,和(iii)选项A加上选项B。

[0219] 除非另有说明或上下文明显矛盾,否则本文描述的各种要素的所有组合均在本发明的范围内。

[0220] 在下面的描述中阐述了很多实验细节以便于更好地理解本发明。

## 实施例

[0221] 特异性结合人Tim-3 IgV结构域的抗体的产生:将人Tim-3 IgV基因的编码区(S22-A132)融合到pMT/BiP质粒中人IgG1 Fc标签上,得到Tim-3 IgV-Ig融合蛋白(Zhao 2013)。融合蛋白在S2系统中表达,然后对其进行纯化。用Tim-3 IgV-Ig融合蛋白免疫小鼠,并采用标准技术将脾细胞和骨髓瘤细胞NS0融合,产生杂交瘤。

[0222] mAb 50B5的鉴定:获得mAb 50B5,其具有IgG1重链和k轻链。ELISA分析表明,mAb 50B5能够与Tim-3-IgV蛋白和Tim-3全长的胞外区蛋白(IgV-粘蛋白-茎结构域)结合,但不与人IgG蛋白结合(图1)。FACS分析表明,mAb 50B5能够与细胞系上表达的人Tim-3结合,但不与细胞系上表达的鼠Tim-3结合(图2)。

[0223] 通过表面等离子体共振方法,测量到mAb 50B5与人Tim-3蛋白的结合亲和力为0.13nM KD(图3)。为了确定mAb 50B5的阻断功能,进行了结合试验,发现mAb 50B5能够阻断人Tim-3与地塞米松处理过的Jurkat T细胞上表达的磷脂酰丝氨酸结合。Tim-3是由产生IFN- $\gamma$ 的T细胞表达的抑制性受体,因此采用混合淋巴细胞反应来检测mAb 50B5的拮抗能力。将供体PBMC中单核细胞分化而来的成熟树突状细胞,和来自另一供体PBMC中纯化的T细胞一起孵育四天。发现分裂的CD4 T细胞和分裂的CD8 T细胞表面表达Tim-3,但未分裂的CD4 T细胞和未分裂的CD8 T细胞表面不表达Tim-3(图4A)。在上述混合淋巴细胞反应中,分别加入mAb 50B5和小鼠IgG1对照,结果表明,mAb50B5增加的IFN- $\gamma$ 产量是IgG1对照的三倍以上(图4B)。

[0224] 综上所述,这些结果表明mAb 50B5是针对人Tim-3的拮抗剂抗体。最后,对mAb50B5杂交瘤进行测序,发现其具有单一的VH和VL序列:

[0225] 50B5重链:DNA序列(414bp)

[0226] 前导肽序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0227] (前导肽序列以粗体显示,CDRs1-3以下划线显示)

**ATGGGATGGAGCTGGATCTTCTCTCCTCTGTCAAGGAAC**TCAGGTGTCCAC  
**TCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCA**  
**ATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATAAACT**  
**GGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTTTAATCCTTA**  
**CAATGGTGGTACTACCTCAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTAACTGTT**  
**GACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCTCAGTCTGACATCTGAGGAC**  
**TCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGATACTACGGCTACGATGCTATGGACTACT**  
**GGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA**

(SEQ ID NO:14)

[0229] 50B5重链:氨基酸序列(138aa)

[0230] 前导肽序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0231] (前导肽序列以粗体显示,CDRs1-3以下划线显示)

**MGWSWIFLFLLSGTAGVHS**EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTINWV  
 KQSHGKNLEWIGLFNPYNGTTFNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVY  
 [0232] **YCARRYGYDAMDYWGQGTSVTVSS**

(SEQ ID NO:15)

[0233] 50B5轻链:DNA序列 (396bp)

[0234] 前导肽序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0235] (前导肽序列以粗体显示,CDRs 1-3以下划线显示)

**ATGGAATCACAGACTCAGGTCTCCTCTCCCTGCTCTGGGTATCTGGTACC**  
**TGTGGGAACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTGGCTGTCTGCAGGA**  
 GAAAAGGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTTTTTACAGTTCAAATCA  
GAAGAAACCACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCT  
 [0236] **AATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTACAGGCAG**  
 TGGATCTGGGACAGATTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCTG  
GCAGTTTATTACTGT**CATCAATACCTCTCCTCGTACACGTT**CGGAGGGGGACCA  
 AGCTGGAAATTAAG

(SEQ ID NO:16)

[0237] 50B5轻链:氨基酸序列 (132aa)

[0238] 前导肽序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0239] (前导肽序列以粗体显示,CDRs 1-3以下划线显示)

**MESQTQVFLSLLLWVSGTCGNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQ**  
KNHLAWYQQKPGQSPKLLIY**WASTRESGV**PDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAV  
 [0240] **YYCHQYLSSYTFGGGT**KLEIK

(SEQ ID NO:17)

[0241] mAb 15B4的鉴定:mAb 15B4是通过如上所述的技术产生的另一抗体。mAb 15B4具有IgG1重链和k轻链,FACS分析表明其能够与细胞系上表达的人Tim-3结合(图5)。通过表面等离子体共振方法,测量到mAb 15B4与人Tim-3蛋白的结合亲和力为0.32nM KD(图6)。为了确定mAb 50B5的阻断功能,进行了结合试验,发现mAb 15B4能够阻断人Tim-3与地塞米松处理过的Jurkat T细胞上表达的磷脂酰丝氨酸结合。最后,对15B4杂交瘤进行测序,发现其具有单一的VH和VL序列:

[0242] 15B4重链:DNA序列 (414bp)

[0243] 前导肽序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0244] (前导肽序列以粗体显示,CDRs 1-3以下划线显示)

**ATGGAATGGAGCTGGTCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGGGTCAAT**  
**TCAAGAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGGTTGTGAGGCCAGGGGCCTT**  
**AGTCAAGTTGTCCTGCAAAGCTTCTGGCTCAACATTAAAGACTACTATATGCACT**  
**GGGTGAGGCAGAGGCCTAACACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCT**  
**GAGAATGACAATACTATATGACCCGAAGTCCAGGACAGGGCCAGTATAACAG**  
**CAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGG**  
**ACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGACTTCGGCTACGTAGCCTGGCTTGTTTA**  
**CTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTTGCA**

(SEQ ID NO:18).

[0245] 15B4重链:氨基酸序列 (138aa)

[0247] 前导肽序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0248] (前导肽序列以粗体显示,CDRs 1-3以下划线显示)

**MEWSWVFLFLMAVVTGVN**SEVQLQQSGAEVVRPGALVKLSCKASGFNIKDYYMHW  
**VRQRPEQGLEWIGWIDP**ENDNTIYDPKFQDRASITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVY  
**YCARDFGYVAWL**VLYWGQGTLTVSA

(SEQ ID NO:19).

[0250] 15B4轻链:DNA序列 (378bp)

[0251] 前导肽序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0252] (前导肽序列以粗体显示,CDRs 1-3以下划线显示)

**ATGTCACAGTCTCAGGTCTTGTATT**CGCTTCTCTGGTTGTCTGGTGTGATG  
**GAGACATTGTGATGACCCAGTCTCAAGAATT**CATGTCCACATCAGTAGGAGACAG  
**GGTCAGCATCACCTG**CAAGGCAGTCAGAATGTGGATACTGCTGTAGCCTGGTA  
**TCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATT**TACTCGGCATCCAATCGG  
**TACACTGGAGTCCCTGATCGCTCACAGGCACTGGATCTGGACAGATTTC**ACT  
**CTCACCATCAACAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCAGATTATTC**CTGCCAGCAAT  
**ATAGCAGCTATCCCACGTT**CGGAGGGAGGACCAAGCTGGAAATAAACGG

(SEQ ID NO:20).

[0255] 15B4轻链:氨基酸序列 (126aa)

[0256] 前导肽序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0257] (前导肽序列以粗体显示,CDRs 1-3以下划线显示)

[0258] MSQSQVFVFAFLWLSGVGDIVMTQSQEFMSTSVGDRVSITCKASQNVDATAWY

[0259] QQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDFGTGSGTDFTLTINNMQSEDLADYFCQQYS

[0260] SYPTFGGRTKLEIKR

[0261] (SEQ ID NO:21).

参考文献

[0263] Bird et al. Science 242 (4877) :423-426 (1988)

[0264] Brown et al. Cancer Res 47 (13) :3577-3583 (1987)

- [0265] Cao et al. *Immunity* 26(3):311-321 (2007)
- [0266] Chiba et al. *Nat Immunol* 13(9):832-842 (2012)
- [0267] Chothia&Lesk *J Mol Biol* 196(4):901-917 (1987)
- [0268] Chothia et al. *Nature* 342(6252):877-883 (1989)
- [0269] Dall' Acqua et al. *J Biol Chem* 281(33):23514-23524 (2006)
- [0270] Daugherty et al. *Nucleic Acids Res* 19(9):2471-2476 (1991)
- [0271] DeKruyff et al. *J Immunol* 184(4):1918-1930 (2010)
- [0272] Hamers-Casterman et al. *Nature* 363(6428):446-448 (1993)
- [0273] Harris *Biochem Soc Trans* 23(4):1035-1038 (1995)
- [0274] Hurle&Gross *Curr Opin Biotechnol* 5(4):428-433 (1994)
- [0275] Huston et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(16):5879-5883 (1988)
- [0276] Jones et al. *Nature* 321(6069):522-525 (1986)
- [0277] Koyama et al. *Nat Commun* 7:10501 (2016)
- [0278] Lobuglio et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(11):4220-4224 (1989)
- [0279] Monney et al. *Nature* 415(6871):536-541 (2002)
- [0280] Presta *Curr Opin Biotechnol* 3(4):394-398 (1992)
- [0281] Riechmann et al. *Nature* 332(6162):323-327 (1988)
- [0282] Shaw et al. *J Immunol* 138(12):4534-4538 (1987)
- [0283] Sheriff&Constantine *Nat Struct Biol* 3(9):733-736 (1996)
- [0284] Vaswani&Hamilton *Ann Allergy Asthma Immunol* 81(2):105-115 (1998)
- [0285] Verhoeven et al. *Science* 239(4847):1534-1536 (1988)
- [0286] Ward et al. *Nature* 341(6242):544-546 (1989)
- [0287] Wilker et al. *Int Immunol* 19(6):763-773 (2007)
- [0288] Winter et al. *Nature* 349(6307):293-299 (1991)
- [0289] Yeung et al. *J Immunol* 182:7663-7671 (2009)
- [0290] Zhao et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(24):9879-9884 (2013)
- [0291] Zhu et al. *Nat Immunol* 6(12):1245-1252 (2005)

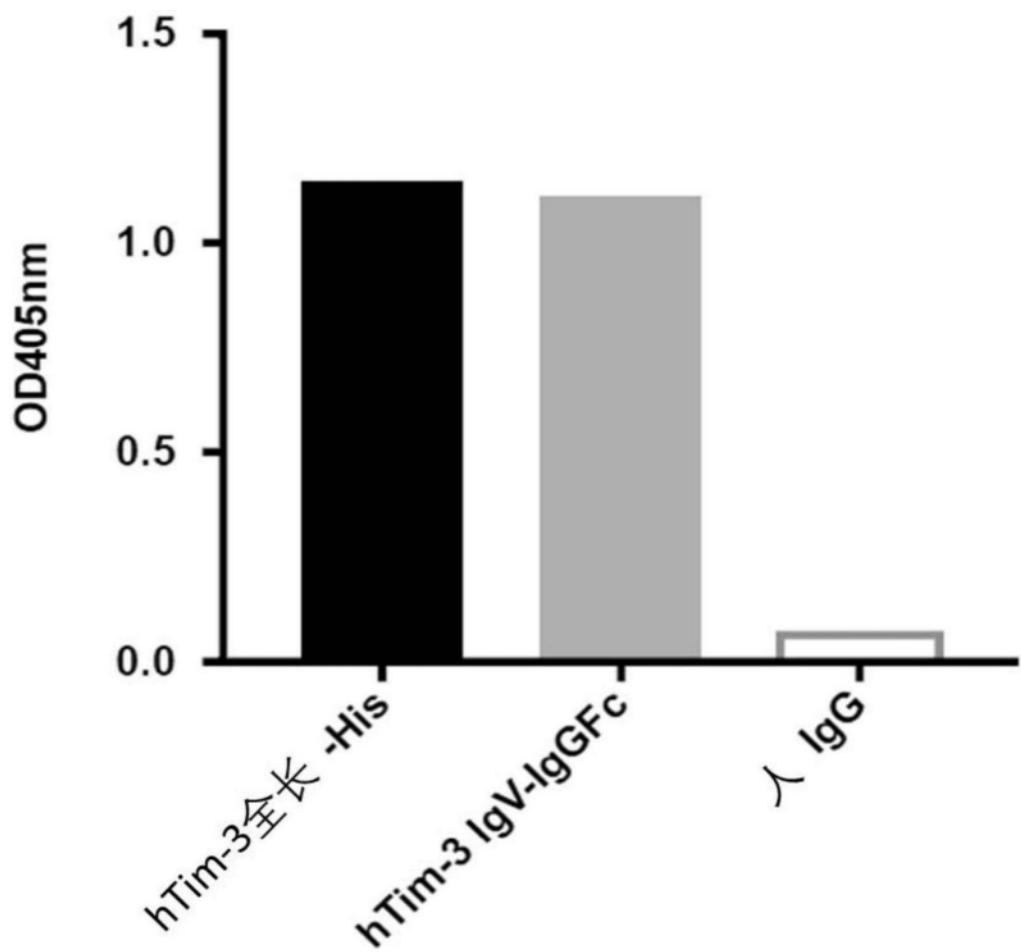


图1

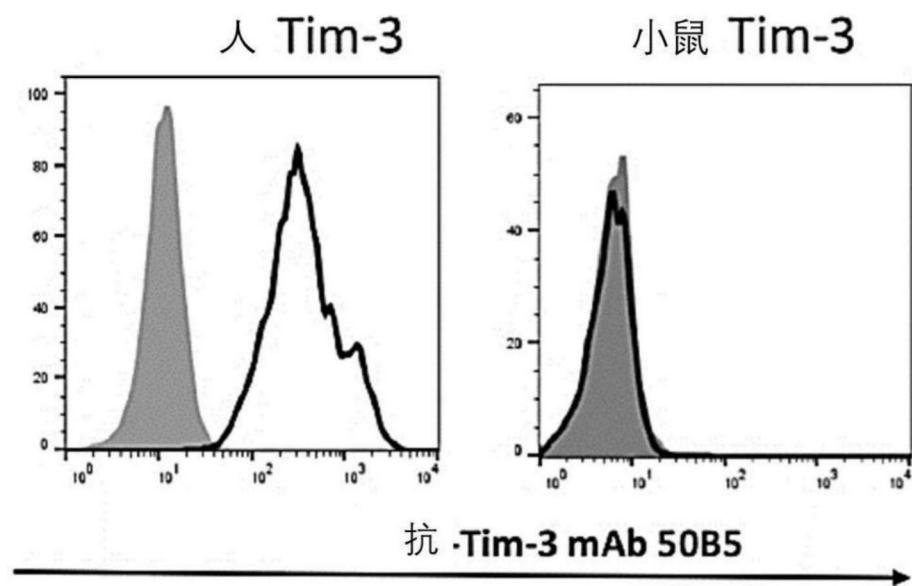


图2

克隆	同型	$K_{\text{结合}} (\text{Ms})^{-1}$	$K_{\text{解离}} (\text{s}^{-1})$	$K_D (\text{nM})$
50B5	IgG1, K	$1.87 \times 10^5$	$2.35 \times 10^{-5}$	0.13

图3

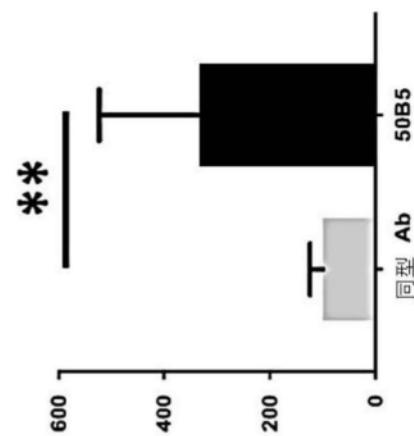
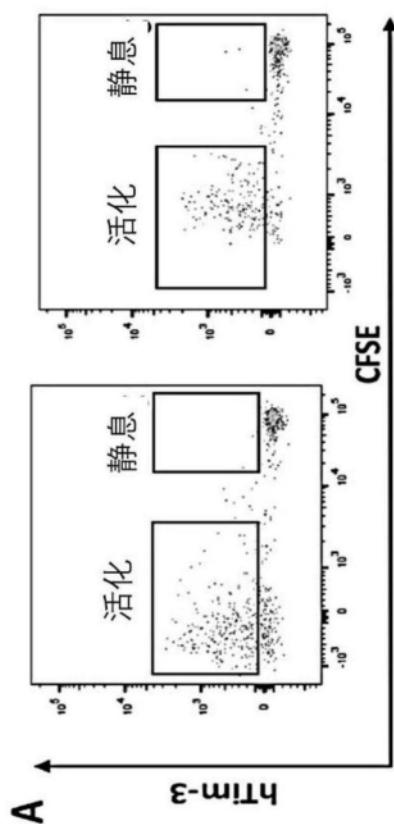
同型Ab IFN- $\gamma$ 浓度的平均百分数**B**

图4A-4B

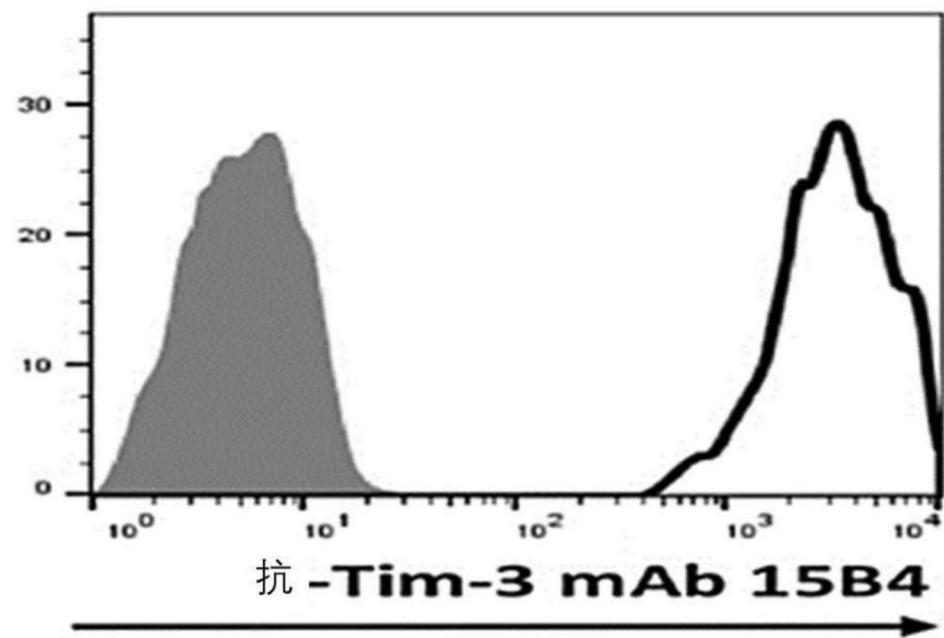


图5

克隆	同型 $\lg G1, K$	$K_{\text{结合}}$ $(M\text{s})^{-1}$	$K_{\text{解离}}$ $(\text{s}^{-1})$	$KD$ ( $nM$ )
15B4		$9.1 \times 10^5$	$2.9 \times 10^{-4}$	0.32

图6