



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110062766 B

(45) 授权公告日 2023. 12. 15

(21) 申请号 201780074499.2

(22) 申请日 2017.10.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110062766 A

(43) 申请公布日 2019.07.26

(30) 优先权数据
62/407,678 2016.10.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.05.31

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/076188 2017.10.13

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/069500 EN 2018.04.19

(73) 专利权人 正大天晴药业集团股份有限公司
地址 222062 江苏省连云港市郁州南路369号

(72) 发明人 麦可.蒙拉德.葛兰达尔
维克拉姆.克乔乐.巴蒂亚
托本.葛杰廷 卡米拉.佛利克
古特.罗兰.科理儿 麦可.葛雷
艾芬.大卫.胡拉克
汤姆士.布昆恩
米克.汪达尔.彼得森

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2014008218 A1, 2014.01.09
CN 103923213 A, 2014.07.16
EP 1987839 A1, 2008.11.05
WO 2015138920 A1, 2015.09.17
WO 2016028672 A1, 2016.02.25

审查员 杨卓一

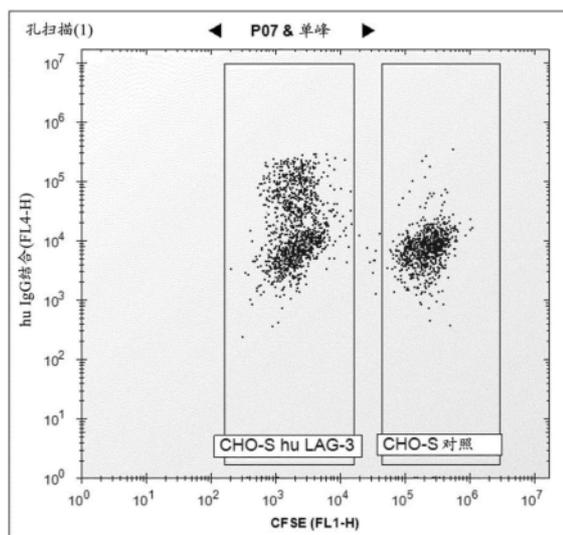
权利要求书2页 说明书60页
序列表38页 附图11页

(54) 发明名称

抗LAG-3抗体及组合物

(57) 摘要

此发明涉及抗LAG-3抗体和使用它们以治疗受益于调控LAG-3活性的疾病和病状(如癌症)的方法。



1. 一种抗LAG-3抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的H-CDR1-3和L-CDR1-3氨基酸序列分别为SEQ ID NO:41、42、43、44、45和40。

2. 如权利要求1的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的重链可变域与SEQ ID NO:7的氨基酸序列有至少90%序列一致和所述抗体的轻链可变域与SEQ ID NO:8的氨基酸序列有至少90%序列一致。

3. 一种抗LAG-3抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的重链可变域和轻链可变域的氨基酸序列分别为SEQ ID NO:7和8。

4. 如权利要求1-3中任一项的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分,其中该抗体为IgG同种型。

5. 如权利要求4的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分,其中该抗体为IgG同种型的亚类IgG₁。

6. 如权利要求4的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分,其中

a) 该抗体为同种型IgG的亚类IgG₁和在位置234和235的氨基酸残基的一者或两者从Leu突变为Ala,或

b) 该抗体为同种型IgG的亚类IgG₄和其中在位置228的氨基酸残基从Ser突变为Pro。

7. 如权利要求1-3中任一项的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分,其中该抗体或抗原结合部分有至少一种选自以下的特性:

a) 以流式细胞术竞争分析来测定,在20μg/mL的浓度,相较于阴性对照抗体,减少人类LAG-3对A375细胞上的人类II类MHC的结合大于85%;

b) 以流式细胞术竞争分析来测定,在20μg/mL的浓度,相较于阴性对照抗体,减少人类LAG-3对A375细胞上的人类II类MHC的结合35%和85%之间;

c) 阻断在Jurkat细胞上表达的人类LAG-3与在Raji细胞上表达的人类II类MHC之间的结合;

d) 以流式细胞术来测量,以EC₅₀为0.1nM或更少结合人类LAG-3;

e) 以流式细胞术来测量,以EC₅₀为0.3nM或更少结合食蟹猴LAG-3;

f) 以表面等离子体共振来测量,以K_D为3.0x 10⁻⁸M或更少结合人类LAG-3;

g) 以表面等离子体共振来测量,以K_D为1.5x 10⁻⁷M或更少结合食蟹猴LAG-3;

h) 以表面等离子体共振来测量,以K_D为3.5x 10⁻⁸M或更少结合小鼠LAG-3;

i) 刺激经葡萄球菌(Staphylococcal)肠毒素B(SEB)处理的人类外周血单个核细胞(PBMC)中的IL-2产生;

j) 减少人类T细胞中的LAG-3的细胞水平;

k) 减少人类T细胞的培养物中的LAG-3的可溶性水平;和

l) 不与抗体25F7-Lag3.5结合相同的人类LAG-3的表位。

8. 如权利要求1-3中任一项的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分,其中该抗体或抗原结合部分结合人类LAG-3的表位,该人类LAG-3的表位由SEQ ID NO:68的氨基酸残基H85、P86、A87、P89、S91、W92和G93确定。

9. 如权利要求1-3中任一项的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合人LAG-3表位,该表位由SEQ ID NO:68的氨基酸残基78-105和123-131确定。

10. 一种抗LAG-3抗体,其中所述抗体重链的可变域和恒定区的氨基酸序列分别由SEQ

ID NO:7和30组成,和所述抗体轻链的可变域和恒定区的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:8和34组成。

11.一种医药组合物,其包含权利要求1-10中任一项的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分以及医药上可接受的赋形剂。

12.经分离的核酸分子,其包含编码如权利要求1-10中任一项的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的重链序列的核苷酸序列、和编码如权利要求1-10中任一项的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的轻链序列的核苷酸序列。

13.载体,其包含如权利要求12的经分离的核酸分子,其中所述载体进一步包含表达控制序列。

14.一种宿主细胞,其包含编码如权利要求1-10中任一项的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的重链序列的核苷酸序列以及编码如权利要求1-10中任一项的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的轻链序列的核苷酸序列。

15.一种制造抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的方法,其包含提供根据权利要求14的宿主细胞,在适合表达该抗体或其抗原结合部分的条件下培养所述宿主细胞,以及分离所产生的抗体或部分。

16.一种双特异性结合分子,其包含根据权利要求1-10中任一项的抗LAG-3抗体的抗原结合部分和另一个不同抗体的抗原结合部分。

17.一种如权利要求1-10中任一项的抗LAG-3抗体或抗原结合部分、权利要求11的医药组合物或权利要求16的双特异性结合分子用于制造药物的用途,所述药物用于治疗患者的黑色素瘤、纤维肉瘤、或非小细胞肺癌。

18.权利要求17的用途,其中所述药物与下述一起施用:免疫刺激剂、化学治疗剂、抗肿瘤剂、抗血管生成剂或辐射疗法。

19.权利要求17的用途,其中所述药物与下述一起施用:疫苗、酪氨酸激酶抑制剂或LAG-3途径抑制剂。

20.权利要求17的用途,其中所述药物与选自由以下组成的组的化合物一起施用:视黄酸、苯基丁酸盐(phenylbutyrate)和活化型维生素D。

21.权利要求17的用途,其中所述药物与全反式视黄酸一起施用。

抗LAG-3抗体及组合物

[0001] 序列表

[0002] 本案含有以ASCII格式电子呈送并以其整体为参照的方式并入本文中的序列表。该序列表(创于2017年10月5日)的电子拷贝被命名为

[0003] 022675_W0057_SL.txt且有64,693字节的大小。

[0004] 发明背景

[0005] LAG-3(淋巴细胞-活化基因3)(也称为CD223)是免疫球蛋白超家族蛋白质,其功能为免疫检查点受体。成熟蛋白质为具有四个胞外类Ig域(Ig-like domain)的503个氨基酸的第I型跨膜蛋白。其在各种类型的细胞上表达,包括活化的T细胞、T调控(Treg)细胞、自然杀伤细胞、B细胞和浆细胞样(plasmacytoid)树突细胞。关于序列资料、外显子/内含子框架和LAG-3的染色体定位的信息指出,其与CD4密切相关。与CD4相似,LAG-3结合II类MHC分子,尽管相较于CD4有更高的亲和力且在不同的位点上。

[0006] LAG-3为共抑制受体,其被认为以类似于CTLA-4和PD-1的方式调节T细胞增殖、活化和稳态。当配体结合细胞外域时,LAG-3透过随后的经细胞质域的信号传导来发挥其作用。LAG-3的最佳的表征配体为II类MHC(MHCII),而其他LAG-3配体已被描述,包括LSECtin。

[0007] LAG-3没有典型的ITIM或ITSM基序,但有被认为对于完成T细胞活性的抑制功效是必要的之保守性KIEELE基序(SEQ ID NO:73)。对于LAG-3影响T细胞活性的确切机制的了解甚少。LAG-3通过阻断活化的T细胞进入细胞周期的生长期来抑制T细胞扩增,造成S期(S-phase)中的细胞聚积。LAG-3亦被认为有加强调控性T细胞的抑制活性以及调控树突细胞功能的作用。癌细胞能够上调会与效应T细胞上的LAG-3结合的MHCII的表达,因此抑制其活性并诱导肿瘤免疫逃逸(immune escape)。

[0008] 鉴于LAG-3作为免疫调节者的关键角色,需要靶向LAG-3以治疗癌症和某些免疫系统的病症的新的且改良的免疫疗法。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明关于靶向LAG-3的新颖的重组抗体,以及包含这些抗体的一或多种的医药组合物,以及该抗体和医药组合物用于增加患者免疫力和用于癌症治疗的用途,该癌症源自于诸如以下的组织:皮肤、肺、肠、结肠、卵巢、脑、前列腺、肾、软组织、造血系统、头和颈、肝、膀胱、乳房、胃、子宫和胰脏。相较于目前对于此类癌症的可用的治疗(包括抗体治疗),预期本发明的抗体单独或与另一种癌症治疗剂(诸如靶向另一免疫检查点蛋白质的抗体)组合可提供优异的临床反应。

[0011] 在一个实施方案中,本发明提供抗LAG-3抗体或其抗原结合部分,其中该抗LAG-3抗体为在此称为抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的抗体之任一或其变体,其中该变体可为(例如)不同的同种型或同种型亚类(subclass)及/或含有某些相对于抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的最小氨基酸改变而没有丧失亲本抗体(parent antibody)的抗原结合特异性。

[0012] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体与具有以下重链(H)CDR1-3和轻链(L)CDR1-3的抗体竞争结合人类LAG-3:与抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的H-

CDR1-3和L-CDR1-3相同或源自于抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的H-CDR1-3和L-CDR1-3。

[0013] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体与具有以下重链(H) CDR1-3和轻链(L) CDR1-3的抗体结合相同的人类LAG-3的表位:与抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的H-CDR1-3和L-CDR1-3相同或源自于抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的H-CDR1-3和L-CDR1-3。

[0014] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含H-CDR3,该H-CDR3包含抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的H-CDR3氨基酸序列。

[0015] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含H-CDR1-3,该H-CDR1-3分别包含抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的H-CDR1-3序列。

[0016] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含L-CDR3,该L-CDR3包含抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的L-CDR3氨基酸序列。

[0017] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含L-CDR1-3,该L-CDR1-3分别包含抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的L-CDR1-3序列。

[0018] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的H-CDR3和L-CDR3氨基酸序列。

[0019] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的H-CDR1-3和L-CDR1-3氨基酸序列。

[0020] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体与抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011竞争结合人类LAG-3。

[0021] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体与抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011结合相同的人类LAG-3的表位。

[0022] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含包含SEQ ID NO:37、43、46、50、55、58或64的氨基酸序列的重链互补决定区(H-CDR)3。

[0023] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含H-CDR1-3,该H-CDR1-3分别包含SEQ ID NO:35-37;41-43;35、42和46;48-50;53-55;56-58;或62-64的氨基酸序列。

[0024] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有重链可变域(VH),该重链可变域与SEQ ID NO:3、7、11、15、19、23或27的VH氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致。

[0025] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有包含SEQ ID NO:3、7、11、15、19、23或27的VH。

[0026] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有重链(HC),该重链包含SEQ ID NO:3、7、11、15、19、23或27的VH氨基酸序列和SEQ ID NO:30的重链恒定区氨基酸序列。

[0027] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含包含SEQ ID NO:40、52、61或67的氨基酸序列的轻链互补决定区(L-CDR)3。

[0028] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含L-CDR1-3,该L-CDR1-3分别包含SEQ ID NO:38-40;44、45和40;44、47和40;51、47和52;59-61;或65-67的氨基酸序列。

[0029] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有轻链可变域(VL),该轻链可变域与SEQ ID NO:4、8、12、16、20、24或28的VL氨基酸序列有至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少

98%或至少99%)序列一致。

[0030] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有包含SEQ ID NO:4、8、12、16、20、24或28的VL。

[0031] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有轻链(LC),该轻链包含SEQ ID NO:4、8、12、16、20、24或28的VL氨基酸序列和SEQ ID NO:32或34的轻链恒定区氨基酸序列。

[0032] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含H-CDR3和L-CDR3,该H-CDR3和L-CDR3分别为SEQ ID NO:37和40;43和40;46和40;50和52;55和40;58和61;或64和67的氨基酸序列。

[0033] 在某些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分包含以下H-CDR1-3和L-CDR1-3氨基酸序列:

[0034] a) 分别为SEQ ID NO:35、36、37、38、39和40;

[0035] b) 分别为SEQ ID NO:41、42、43、44、45和40;

[0036] c) 分别为SEQ ID NO:35、42、46、44、47和40;

[0037] d) 分别为SEQ ID NO:48、49、50、51、47和52;

[0038] e) 分别为SEQ ID NO:53、54、55、44、45和40;

[0039] f) 分别为SEQ ID NO:56、57、58、59、60和61;或

[0040] g) 分别为SEQ ID NO:62、63、64、65、66和67。

[0041] 在某些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分:

[0042] a) 具有与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VH,以及与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VL;

[0043] b) 具有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VH,以及与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VL;

[0044] c) 具有与SEQ ID NO:11的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VH,以及与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VL;

[0045] d) 具有与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VH,以及与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VL;

[0046] e) 具有与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VH,以及与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VL;

[0047] f) 具有与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VH,以及与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VL;或

[0048] g) 具有与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VH,以及与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少90%(例如,至少92%、至少95%、至少98%或至少99%)序列一致的VL。

[0049] 在某些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分:

[0050] a) 具有包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的VH, 以及包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的VL;

[0051] b) 具有包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的VH, 以及包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的VL;

[0052] c) 具有包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的VH, 以及包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的VL;

[0053] d) 具有包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的VH, 以及包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的VL;

[0054] e) 具有包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成的VH, 以及包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列或由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的VL;

[0055] f) 具有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列或由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的VH, 以及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列或由SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成的VL; 或

[0056] g) 具有包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或由SEQ ID NO:27的氨基酸序列组成的VH, 以及包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列或由SEQ ID NO:28的氨基酸序列组成的VL。

[0057] 在某些实施方案中, 该抗LAG-3抗体:

[0058] a) 具有包含SEQ ID NO:4和34的氨基酸序列或由SEQ ID NO:4和34的氨基酸序列组成的LC, 以及包含SEQ ID NO:3和30的氨基酸序列或由SEQ ID NO:3和30的氨基酸序列组成的HC;

[0059] b) 具有包含SEQ ID NO:8和34的氨基酸序列或由SEQ ID NO:8和34的氨基酸序列组成的LC, 以及包含SEQ ID NO:7和30的氨基酸序列或由SEQ ID NO:7和30的氨基酸序列组成的HC;

[0060] c) 具有包含SEQ ID NO:12和34的氨基酸序列或由SEQ ID NO:12和34的氨基酸序列组成的LC, 以及包含SEQ ID NO:11和30的氨基酸序列或由SEQ ID NO:11和30的氨基酸序列组成的HC;

[0061] d) 具有包含SEQ ID NO:16和34的氨基酸序列或由SEQ ID NO:16和34的氨基酸序列组成的LC, 以及包含SEQ ID NO:15和30的氨基酸序列或由SEQ ID NO:15和30的氨基酸序列组成的HC;

[0062] e) 具有包含SEQ ID NO:20和34的氨基酸序列或由SEQ ID NO:20和34的氨基酸序列组成的LC, 以及包含SEQ ID NO:19和30的氨基酸序列或由SEQ ID NO:19和30的氨基酸序列组成的HC;

[0063] f) 具有包含SEQ ID NO:24和34的氨基酸序列或由SEQ ID NO:24和34的氨基酸序列组成的LC, 以及包含SEQ ID NO:23和30的氨基酸序列或由SEQ ID NO:23和30的氨基酸序列组成的HC; 或

[0064] g) 具有包含SEQ ID NO:28和32的氨基酸序列或由SEQ ID NO:28和32的氨基酸序列组成的LC, 以及包含SEQ ID NO:27和30的氨基酸序列或由SEQ ID NO:27和30的氨基酸序列组成的HC。

[0065] 在一些实施方案中, 本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分具有至少一种以下特性:

[0066] a) 以流式细胞术竞争分析来测定, 在20 μ g/mL的浓度, 相较于阴性对照抗体, 减少

大于85%的人类LAG-3对A375细胞上的人类II类MHC的结合;

[0067] b) 以流式细胞术竞争分析来测定,在20 μ g/mL的浓度,相较于阴性对照抗体,减少人类LAG-3对A375细胞上的人类II类MHC的结合35%和85%之间;

[0068] c) 阻断在Jurkat细胞上表达的人类LAG-3与在Raji细胞上表达的人类II类MHC之间的结合;

[0069] d) 以流式细胞术来测量,以EC₅₀为0.1nM或更少结合人类LAG-3;

[0070] e) 以流式细胞术来测量,以EC₅₀为0.3nM或更少结合食蟹猴LAG-3;

[0071] f) 以表面等离子体共振来测量,以K_D为3.0x 10⁻⁸或更少结合人类LAG-3;

[0072] g) 以表面等离子体共振来测量,以K_D为1.5x 10⁻⁷或更少结合食蟹猴LAG-3;

[0073] h) 以表面等离子体共振来测量,以K_D为3.5x 10⁻⁸或更少结合小鼠LAG-3;

[0074] i) 刺激经葡萄球菌 (Staphylococcal) 肠毒素B (SEB) 处理的人类外周血单个核细胞 (PBMC) 中的IL-2产生;

[0075] j) 减少人类T细胞中的LAG-3的细胞水平;

[0076] k) 减少人类T细胞培养物中的LAG-3的可溶性水平;

[0077] l) 诱导体内肿瘤生长退化;

[0078] m) 延缓体内肿瘤生长;以及

[0079] n) 不与抗体25F7-Lag3.5结合相同的人类LAG-3的表位。

[0080] 该抗体的实例包括(不限于)抗体15646(至少具有特性b、c、d、e、i和n)、抗体15532(至少具有特性a、c、d、e、f、g、i、j、k、m和n)、抗体15723(至少具有特性b、c、d、e、i和n)、抗体15595(至少具有特性a、c、d、e、i和n)、抗体15431(至少具有特性a、c、d、e、f、g、i和n)、抗体15572(至少具有特性b、c、d、e、f、g、i和n)和抗体15011(至少具有特性a、c、d、e、f、g、h、i、j、k、l、m和n)。在一些实施方案中,本发明的抗TIM-3抗体或抗原结合部分具有至少13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1种所述特性。在一些实施方案中,本发明的抗TIM-3抗体或抗原结合部分具有:至少特性b、c、d、e、i和n;至少特性a、c、d、e、f、g、i、j、k、m和n;至少特性a、c、d、e、i和n;至少特性a、c、d、e、f、g、i和n;至少特性b、c、d、e、f、g、i和n;或至少特性a、c、d、e、f、g、h、i、j、k、l、m和n。

[0081] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分与抗体15011、15572及/或15431竞争结合人类LAG-3。

[0082] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分结合人类LAG-3的表位,该人类LAG-3的表位具有:

[0083] a) SEQ ID NO:68的氨基酸残基H85、P86、A87、P89、S91、W92和G93;

[0084] b) SEQ ID NO:68的氨基酸残基A40、Q41、P43、P46、P49、D52、T62、Q64、H65、Q66、P67、D68、G93、P94、P96、R98、Y99、T100、V101、P106、G107、R119、E124、R129、G130、D131、S133、R137、P138、D143、R148和R163;

[0085] c) SEQ ID NO:68的氨基酸残基A40、Q41、P43、P46、P49、D52、T62、Q64、H65、Q66、P67、D68、P96、Y99、T100、V101、P106、G107、R119、E124、R129、G130、D131、S133、R137、P138、D143、R148和R163;或

[0086] d) SEQ ID NO:68的氨基酸残基G107、L109、R110和S111。

[0087] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分结合具有SEQ ID NO:

68的氨基酸残基98-105的表位。该抗体的实例包括(不限于)抗体15532、15431、15572和15011。

[0088] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分结合表位,该表位具有:

[0089] a) SEQ ID NO:68的氨基酸残基78-105和123-131;

[0090] b) SEQ ID NO:68的氨基酸残基23-30、40-66、88-105、123-137和148-152;或

[0091] c) SEQ ID NO:68的氨基酸残基23-30、40-66、98-105、118-137和148-161。

[0092] 在一些实施方案中,本发明的抗体为IgG同种型,例如IgG同种型的亚类IgG₁或IgG₂。在某些实施方案中,该抗体包含至少一种Fc区域中的突变。在特定实施方案中,该抗体包含重链氨基酸位置228、234和235之一或多者中的突变,此类位置根据IMGT®编号方法(IMGT® numbering scheme)来编号。例如,在位置234和235的氨基酸残基之一者或两者可以从Leu突变为Ala及/或在位置228的氨基酸残基可以从Ser突变为Pro。

[0093] 在另一方面中,本发明提供包含至少一种(例如,一种)本文所述的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分以及医药上可接受的赋形剂之医药组合物,任选地有其他治疗剂,诸如抗癌抗体治疗剂。

[0094] 本发明进一步提供经分离的核酸分子,其包含编码本文所述的抗LAG-3抗体的重链或其抗原结合部分的核苷酸序列、编码本文所述的抗LAG-3抗体的轻链或其抗原结合部分的核苷酸序列或两者。本发明亦提供包含该经分离的核酸分子的载体,其中所述载体可进一步包含表达控制序列。

[0095] 本发明亦提供宿主细胞,其包含编码本文所述的抗LAG-3抗体的重链或其抗原结合部分的核苷酸序列、或编码本文所述的抗LAG-3抗体的轻链或其抗原结合部分的核苷酸序列或两者。

[0096] 本发明亦提供制造本文所述的抗体或其抗原结合部分的方法,该方法包含提供包含编码本文所述的抗LAG-3抗体的重链或其抗原结合部分的核苷酸序列以及编码本文所述的抗LAG-3抗体的轻链或其抗原结合部分的核苷酸序列的宿主细胞,在适合表达该抗体或部分的条件下培养所述宿主细胞,以及分离所产生的抗体或部分。

[0097] 本发明亦提供多特异性(如双特异性)结合分子,其包含本文所述的抗LAG-3抗体的抗原结合部分以及另一不同的抗体(诸如另一抗LAG-3抗体(如本文所述的)或靶向不同蛋白质(如另一免疫检查点蛋白质、癌症抗原或其活性可介导诸如癌症的疾病状况的另一细胞表面分子)的抗体)的抗原结合部分。

[0098] 本发明亦提供治疗LAG-3相关病症的患者的方法,包含将本文所述的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分、医药组合物或双特异性结合分子施用至所述患者。除非另有指明,本文中的患者系指人类患者。

[0099] 本发明亦提供增加患者免疫力的方法,包含将本文所述的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分、医药组合物或双特异性结合分子施用至所述患者。

[0100] 本发明进一步提供治疗患者的癌症的方法,包含将本文所述的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分、医药组合物或双特异性结合分子施用至所述患者。在一些实施方案中,该癌症源自选自以下的组织中:皮肤、肺、肠、结肠、卵巢、脑、前列腺、肾、软组织、造血系统、头和颈、肝、膀胱、乳房、胃、子宫和胰脏。在某些实施方案中,该癌症为纤维肉瘤、非小细胞肺癌、

黑色素瘤、神经胶质母细胞瘤、神经胶质肉瘤或结肠直肠癌。

[0101] 上述方法之任一者可进一步包含施用(例如)化学治疗剂、抗肿瘤剂、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、LAG-3途径抑制剂或辐射疗法。在一些实施方案中,该方法进一步包含施用视黄酸、苯基丁酸盐、全反式视黄酸及/或活化型维生素D。

[0102] 本发明进一步提供包含本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的抗体组合物用于制造药物的用途,所述药物用于治疗LAG-3相关病症的患者、治疗患者的癌症及/或增强有需要的患者的免疫力。

[0103] 本发明进一步提供用于治疗LAG-3相关病症的患者、治疗患者的癌症及/或增强有需要的患者的免疫力的本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分。

[0104] 本发明进一步提供包含本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的制品,其中所述制品适合用于治疗LAG-3相关病症的患者、治疗患者的癌症及/或增强有需要的患者的免疫力。

[0105] 附图简述

[0106] 图1A-1C显示如实施例2所述产生的抗体的代表性的流式细胞术点图。图1A:与人类LAG-3转染的细胞特异性结合的抗体克隆。图1B:与CHO-S细胞非特异性结合的抗体克隆。图1C:不与用于筛选中的任何细胞群结合的抗体克隆。

[0107] 图2显示在以抗LAG-3单克隆抗体处理之后,从经SEB刺激的PBMC的IL-2产生的水平。

[0108] 图3显示在以抗LAG-3单克隆抗体处理之后,从经SEB刺激的PBMC的IL-2产生的水平。每个点代表来自单一PBMC供体的IL-2分泌水平。

[0109] 图4显示在以抗LAG-3单克隆抗体处理之后,第II类LAG-3-MHC阻断分析中的发光水平。数据以平均值 \pm SEM表示。

[0110] 图5显示以抗LAG-3单克隆抗体处理之后,来自LAG-3转染的T细胞系的溶胞产物和上清液中的LAG-3的水平。数据以平均值 \pm SEM表示。星号表示15532和参考抗体类似物之间的统计学上显著的差异(*: $p<0.05$,***: $p<0.001$,****: $p<0.0001$)。

[0111] 图6证实抗体15011在两个同系鼠类肿瘤模型中的体内功效。

[0112] 图7证实抗体15532在半人源化异种移植肿瘤模型中的体内功效,其中以人类PBMC重建NOG小鼠的免疫系统,且以将人类黑色素瘤A375细胞移植至该小鼠。

[0113] 图8显示一组13种抗LAG-3抗体的结合竞争分析所鉴定出的表位组(表位仓(epitope bin))的概述。由黑线连接的抗体表示在两种方向(配体和分析物)上的交叉阻断活性。由虚线连接的抗体表示单一方向的阻断,其中该抗体在仅以分析物进行测试时被阻断。根据与其他抗LAG-3抗体的竞争模式将抗体分组。

[0114] 图9显示配体抗体的表位多样性的群聚分析。在x轴值高于0处具有分支点的抗体具有表位,此类表位可基于对该群组中其他抗体的LAG-3结合的竞争来区分。

[0115] 发明详述

[0116] 本发明提供新的抗人类LAG-3抗体,其用于增强诸如癌症患者的人类患者的免疫系统。除非另外指明,在此所用的“LAG-3”指人类LAG-3。人类LAG-3多肽序列可从UniProt Accession No.P18627(LAG3_HUMAN)(SEQ ID NO:68)获得。

[0117] 在此所用的术语“抗体”(Ab)或“免疫球蛋白”(Ig)指包含以双硫键互相连接的两

个重(H)链(约50-70kDa)和两个轻(L)链(约25kDa)的四聚体。每个重链由重链可变域(VH)和重链恒定区(CH)组成。每个轻链由轻链可变域(VL)和轻链恒定区(CL)组成。VH和VL结构域可进一步细分为称作“互补决定区(CDR)”的高度变异区,散布有更保守的区域,称为“框架区”(FR)。每个VH和VL由三个CDR(在此的H-CDR指重链中的CDR;在此的L-CDR指轻链中的CDR)和四个FR组成,依以下从氨基端至羧基端的顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链或轻链中的氨基酸编号分配可根据IMGT[®]定义(Lefranc等人,Dev Comp Immunol 27(1):55-77(2003));或以下文件的定义:Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,MD(1987和1991));Chothia&Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);或Chothia等人,Nature342:878-883(1989)。

[0118] 术语“重组抗体”指自包含编码抗体的核苷酸序列的细胞或细胞系所表达的抗体,其中所述核苷酸序列不与该细胞自然结合。

[0119] 术语“经分离的蛋白质”、“经分离的多肽”或“经分离的抗体”指由于其来源或衍生源而有以下特征的蛋白质、多肽或抗体:(1)在其自然态不与其所伴随的天然结合的组分结合,(2)不含来自相同物种的其他蛋白质,(3)由来自不同物种的细胞所表达及/或(4)在自然下不会出现。因此,化学合成或在不同于其自然来源的细胞的细胞系统中合成的多肽会是从其天然结合的组分中“分离的”。也可通过分离(使用本领域中熟知的蛋白质纯化技术)使蛋白质实质上不含天然结合组分。

[0120] 如在此所用的,术语“种系(germline)”指抗体基因和基因片段的核苷酸和氨基酸序列,因为其透过生殖细胞从亲代传递至子代。种系序列与成熟B细胞中编码抗体的核苷酸序列作区分,该核苷酸序列在B细胞成熟的过程中已被重组和超突变事件所改变。“利用”特定种系序列的抗体所具有的核苷酸或氨基酸序列与所述种系核苷酸序列或其所限定的氨基酸序列相较于其他种系核苷酸或氨基酸序列更紧密的比对。

[0121] 术语“亲和力”指抗原和抗体之间的吸引的测量。抗体对抗原的内在吸引力典型地由特定抗体-抗原相互作用的结合亲和力平衡常数(K_D)来表示。当 K_D 为 $\leq 1\text{mM}$ 、优选 $\leq 100\text{nM}$ 时,认为抗体与抗原特异性地结合。 K_D 结合亲和力常数可通过(例如)以下方式测量:表面等离子体共振(BIAcore[™])或生物膜干涉测量法,例如使用IBIS Technologies的IBIS MX96SPR系统或ForteBio的Octet[™]系统。

[0122] 术语“ k_{off} ”指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。 k_{off} 解离速率常数可通过(例如)以下方式测量:SPR(表面等离子体共振),例如使用IBIS MX96系统。

[0123] 在此所用的术语“表位”指特异性地结合抗体或相关分子(诸如双特异性结合分子)的抗原的部分(决定区)。表位的决定区一般由分子的具化学活性的表面基团(诸如氨基酸或碳水化合物或糖侧链)组成且一般具有特定三维结构特性,以及特定的电荷特性。表位可为“线性的”或“构象的”。在线性表位中,蛋白质(例如,抗原)和相互作用分子(诸如抗体)之间的所有相互作用点在于线性地沿着该蛋白质之一级氨基酸序列。在构象的表位中,相互作用点遍布于从一级氨基酸序列彼此分离的蛋白质上的氨基酸残基。一旦确定抗原上所需的表位,使用本领域中熟知的技术来产生针对该表位的抗体是可能的。例如,针对线性表位的抗体可通过(例如)以下方式来产生:用具有该线性表位的氨基酸残基的肽使动物产生免疫。针对构象表位的抗体可通过(例如)以下方式来产生:用含有该构象表位的相关的氨

氨基酸残基的小域 (mini-domain) 使动物产生免疫。针对特定表位的抗体也可由 (例如) 以下方式来产生: 用所关注的靶向分子 (例如, LAG-3) 或其相关部分使动物产生免疫, 然后对该表位的结合进行筛选。

[0124] 通过使用本领域中已知的方法, 包括 (不限于) 竞争分析、表位分组 (epitope binning) 和丙氨酸扫描法, 可确定是否抗体如同本发明的抗LAG-3抗体结合相同表位或与本发明的抗LAG-3抗体竞争结合。在一个实施方案中, 可在饱和条件下使本发明的抗LAG-3抗体结合LAG-3, 且随后测量测试抗体结合LAG-3的能力。若测试抗体能够在如与参照抗LAG-3抗体相同的时间下结合LAG-3, 则该测试抗体结合与该参照抗LAG-3抗体不同的表位。然而, 若测试抗体不能在相同的时间下结合LAG-3, 则该测试抗体结合与本发明的抗LAG-3抗体相同的表位、重迭的表位、或位于接近与本发明的抗LAG-3抗体结合的表位之处的表位。此实验可使用 (例如) 以下方式进行: ELISA、RIA、BIACORE™、SPR、生物膜干涉测量法或流式细胞术。为了测试是否抗LAG-3抗体会与另一抗LAG-3抗体交叉竞争, 可在两个方向上使用上述的竞争法, 即确定是否已知的抗体会阻断测试抗体, 反之亦然。此类交叉竞争实验可 (例如) 使用IBIS MX96SPR仪器或Octet™系统来进行。

[0125] 如本发明的抗体结合相同表位的抗体或与本发明的抗体竞争结合的抗体优选具有MHCII阻断活性, 例如使用实施例6所述的流式细胞术竞争分析来测定。如本发明的抗体结合相同表位的抗体或与本发明的抗体竞争结合的抗体可减少结合至少 (例如) 35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或80%, 或优选至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0126] 术语“嵌合抗体”在其最广义上指含有来自一种抗体之一或多个区域和来自一或多种其他抗体之一或多个区域的抗体, 典型地为部分人类来源和部分非人类来源 (即, 部分源自非人类动物, 例如小鼠、大鼠或其他啮齿动物, 或诸如鸡的鸟禽) 的抗体。为了减少人类抗抗体反应的风险, 例如对于鼠类抗体的人类抗小鼠抗体反应, 嵌合抗体相较于非人类抗体是优选的。典型的嵌合抗体的实例为其中可变域序列为鼠类的而恒定区序列为人类的抗体。在嵌合抗体的情况下, 可对其非人类的部分作进一步的改变以使该抗体人源化。在此所述的嵌合抗体可具有 (例如) 鸡的可变域序列和人类的恒定区序列。

[0127] 术语“人源化”指以下事实: 对于完全地或部分地非人类来源的抗体 (例如, 从以所关注的抗原分别进行的小鼠或鸡的免疫作用中获得的鼠类或鸡的抗体, 或基于该鼠类或鸡抗体的嵌合抗体), 可能置换某些氨基酸 (特别是在重和轻链的框架区和恒定区中), 以避免人类中的免疫反应或将人类中的免疫反应减至最小。虽然不可能精确地预测特定抗体的免疫原性并藉此预测人类抗抗体反应, 非人类抗体在人类中有相较于人类抗体更具免疫原性的趋势。已显示, 其中外来的 (如, 啮齿动物或鸟禽) 恒定区已被置换为人类来源的序列的嵌合抗体, 一般相较于完全为外来来源的抗体有较少的免疫原性, 且治疗抗体中的趋势倾向于人源化或完全人类抗体。因此, 嵌合抗体或其他非人类来源的抗体可经人源化以减少人类抗抗体反应的风险。

[0128] 对于嵌合抗体, 人源化典型地涉及可变域序列的框架区的修饰。为互补决定区 (CDR) 的部分的氨基酸残基极少有关于人源化作用的改变, 虽然在某些情况下, 可能会想要改变个别的CDR氨基酸残基, 例如移除糖基化作用位置、脱酰胺作用位置、天冬氨酸异构化作用位置或不想要的半胱氨酸或甲硫氨酸残基。通过寡糖链附接至三肽序列Asn-X-Ser或

Asn-X-Thr中的天冬酰胺残基产生N连接的糖基化作用,其中X可为除了Pro之外的氨基酸。通过将Asn或Ser/Thr突变为不同的残基,优选地通过保守性取代的方式,以达成移除N糖基化作用的位置。天冬酰胺和谷氨酰胺残基的脱酰胺作用将视诸如pH和表面暴露的因素而进行。天冬酰胺残基特别容易进行脱酰胺作用,主要是当存在于序列Asn-Gly中时进行,而在其他诸如Asn-Ala的二肽序列中时,脱酰胺作用程度较低。因此当在CDR序列中存在该脱酰胺作用位置(特别是Asn-Gly)时,会想要移除该位置,典型地通过保守性取代来移除一个相关的残基。

[0129] 本领域中已知许多用于抗体序列的人源化的方法;请参见(例如)Almagro&Fransson之回顾文献,Front Biosci.13:1619-1633(2008)。最常普遍使用的方法为CDR移植,其用于(例如)源自鼠类的嵌合抗体,包含鉴定鼠类可变域基因的人类种系基因对应物以及移植鼠类CDR序列至此框架中。抗体与靶抗原的相互作用的特异性主要在于位于重和轻链的六个CDR的氨基酸残基。因此,相较于在CDR外的序列,在CDR内的氨基酸序列于个别抗体之间的有较多的可变性。因为CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,故可以表达模拟特定天然存在抗体的特性的重组抗体,或更概括地为具有给定的氨基酸序列的任何特定抗体,例如通过从移植到来自不同抗体的框架序列的特定抗体来建构表达CDR序列的表达载体。因此,将非人类抗体“人源化”并仍实质上维持原抗体的结合特异性和亲和力是可能的。CDR移植可基于Kabat的CDR定义,虽然较近期的刊物(Magdelaine-Beuzelin等人,Crit Rev.Oncol Hematol.64:210-225(2007))已暗示IMGT[®]定义(the international ImMunoGeneTics information system[®],www.imgt.org)可改善人源化的结果(参见:Lefranc等人,Dev.Comp Immunol.27:55-77(2003))。

[0130] 在一些情况下,相较于获得CDR的亲代抗体,CDR移植可降低CDR移植抗体的结合特异性及亲和力并因此降低其生物学活性。可引入回复突变(有时称为“框架修复(framework repair)”)于CDR移植抗体的所选定位置(典型地在框架区),以重建亲代抗体的结合特异性及亲和力。可能的回复突变的位置可使用文献和抗体数据库中可得的信息来鉴定。作为回复突变的候选者的氨基酸残基典型地为位于抗体分子的表面的氨基酸残基,而嵌入的或有低程度表面暴露的残基通常不会被改变。对于CDR移植和回复突变的替代性人源化技术为表面重组(resurfacing),其中保留非人类来源的非表面暴露残基,而将表面残基改变为人类残基。

[0131] 在某些情况下,也可能会想要改变一或多个CDR氨基酸残基,以为了改善对于靶表位的结合亲和力。这已知为“亲和力成熟”且任选可与人源化一起进行,例如在抗体的人源化导致结合特异性或亲和力降低且无法仅通过回复突变来改善结合特异性或亲和力的情况下。各种亲和力成熟作用的方法是本领域中已知的,例如Burks等人所述的体外扫描饱和突变诱导方法(in vitro scanning saturation mutagenesis method)(Proc Natl Acad Sci USA,94:412-417(1997))以及Wu等人的逐步体外亲和力成熟方法(Proc Natl Acad Sci USA,95:6037-6042(1998))。

[0132] 术语抗体的“抗原结合部分”(或简称“抗体部分”),如在此所用的,指保有特异性地结合抗原(例如,人类LAG-3或其部分)的能力的抗体的一或多个部分或片段。已显示,全长抗体的某些片段可以表现该抗体的结合抗原的功能。术语“抗原结合部分”所包含的结合片段的实例包括(i)Fab片段:由V_L、V_H、C_L和C_H1域所组成的单价片段;(ii)F(ab')₂片段:包含

以在铰链区的双硫桥连接的两个Fab片段的双价片段；(iii)由 V_H 和 C_H1 域组成的Fd片段；(iv)由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 域组成的Fv片段，(v)由 V_H 域组成的dAb片段；以及(vi)能够特异性地结合抗原的经分离的互补决定区(CDR)。再者，虽然Fv片段的两个域 V_L 和 V_H 由分开的基因编码，但是可使用重组方法使它们连结，通过合成的接头(linker)使其成为单一蛋白质链，其中 V_L 和 V_H 域配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv))。包含 V_H 及/或 V_L 的抗原结合分子也在本发明的中。就 V_H 而言，该分子也可包含CH1、铰链、CH2或CH3区中的一或多个者。抗体的“抗原结合部分”的术语也有意将该单链抗体包括在内。诸如双抗体(diabodies)的其他形式的单链抗体也包括在内。双抗体为二价的、双特异性的抗体，其中 V_H 和 V_L 域在单一多肽链上表达，但使用过短而无法将相同链上的两个域配对的接头，从而被迫使所述域与另一条链的互补域配对并产生两个抗原结合位点。

[0133] 诸如Fab和 $F(ab')_2$ 片段的抗体部分，可从完整的抗体使用常规技术(诸如完整抗体的木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化)来制备。此外，抗体、抗体部分和免疫粘附分子(immunoadhesion molecule)可使用(例如)本文所述的标准重组DNA技术来获得。

[0134] 抗LAG-3抗体的类型(同种型)和亚类可由本领域中已知的任何方法来确定。一般而言，抗体的类型和亚类可使用对特定类型和亚类的抗体具有特异性的抗体来确定。此类抗体体系市售可得的。可通过ELISA、Western印迹以及其他技术来确定类型和亚类。或者，可通过以下方式来确定类型和亚类：测序抗体的重链及/或轻链的恒定区的全部或部分、比较其氨基酸序列与已知的免疫球蛋白的各种类型和亚类的氨基酸序列并确定该抗体的类型和亚类。

[0135] 除非另有指明，此公开内容中所提及的所有抗体氨基酸残基编号为依据IMGT[®]编号方法的编号。

[0136] 抗LAG-3抗体

[0137] 本发明提供针对LAG-3的抗体及其抗原结合部分。在特定实施方案中，本文所公开的抗体为是由能够产生具有人类独特型的抗体的转基因大鼠产生的人类抗体。在另一个实施方案中，抗体为包含鸡CDR序列和人类构架区的鸡来源的嵌合抗体，其中已使该构架区经人源化。

[0138] 本发明的新颖的抗LAG-3抗体的一个优势为其能够增强T细胞的活性，通过增加的IL-2产生所测得；参见(例如)实施例7。虽然不希望被任何特定理论束缚，但认为本发明的抗LAG-3抗体能够阻断LAG-3与其推定的配体(诸如MHCII和LSEctin)之相互作用。该抗体可透过阻断配体结合区域来直接完成这点，如(例如)实施例6中所证实，或透过诱导LAG-3的内化作用，这认为是实施例9中呈现的结果背后可能的作用机制。本发明的抗LAG-3抗体的另一潜在优势为在具有“LALA”突变(L234A/L235A)的抗体中的低水平的二级效应器功能(effector function)，其阻碍了显著抗体与人类FcγR(Fcγ受体)的结合，并因此耗竭效应T细胞。

[0139] 在一个实施方案中，该抗LAG-3抗体具有与SEQ ID NO:37、43、46、50、55、58和64的任一者至少90%序列一致的重链CDR3(H-CDR3)，例如与SEQ ID NO:37、43、46、50、55、58和64的任一者至少92%一致，诸如至少95%、96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

[0140] 在一个实施方案中，该抗LAG-3抗体具有与SEQ ID NO:3、7、11、15、19、23或27的任一者至少90%序列一致的重链可变域(VH)，例如与SEQ ID NO:3、7、11、15、19、23或27的任一者

一者至少92%一致,诸如至少95%、96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

[0141] 在另一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有与SEQ ID NO:3、7、11、15、19、23或27的任一者至少90%序列一致的重链可变域(VH),例如与SEQ ID NO:3、7、11、15、19、23或27的任一者至少92%一致,诸如至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致;以及与SEQ ID NO:30至少90%序列一致的重链恒定区,例如与SEQ ID NO:30至少92%一致,诸如至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

[0142] 在另一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有重链(HC),该重链包含SEQ ID NO:3、7、11、15、19、23或27的任一者的VH氨基酸序列以及SEQ ID NO:30的重链恒定区氨基酸序列。

[0143] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有与SEQ ID NO:40、52、61和67的任一者至少90%序列一致的轻链CDR3(L-CDR3),例如与SEQ ID NO:40、52、61和67的任一者至少92%一致,诸如至少95%、96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

[0144] 在另一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有与SEQ ID NO:4、8、12、16、20、24或28的任一者的VL氨基酸序列至少90%序列一致的轻链可变域(VL),例如与SEQ ID NO:4、8、12、16、20、24或28的任一者至少92%一致,诸如至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

[0145] 在另一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有与SEQ ID NO:4、8、12、16、20或24的任一者的VL氨基酸序列至少90%序列一致的轻链可变域(VL),例如与SEQ ID NO:4、8、12、16、20或24的任一者至少92%一致,诸如至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致;以及与SEQ ID NO:34有至少90%序列一致的轻链恒定区氨基酸序列,例如与SEQ ID NO:34至少92%一致,诸如至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

[0146] 在另一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有与SEQ ID NO:28的VL氨基酸序列至少90%序列一致的轻链可变域(VL),例如与SEQ ID NO:28至少92%一致,诸如至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致;以及与SEQ ID NO:32至少90%序列一致的轻链恒定区氨基酸序列,例如与SEQ ID NO:32至少92%一致,诸如至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致。

[0147] 在另一个实施方案中,该抗LAG-3抗体具有包含SEQ ID NO:4、8、12、16、20或24任一者和SEQ ID NO:34的轻链。

[0148] 在另一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:32的轻链。

[0149] 在某些实施方案中,该抗LAG-3抗体包含上述重链的任一者和上述轻链的任一者。

[0150] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分包含以下H-CDR1-3和L-CDR1-3氨基酸序列:

[0151] a) 分别为SEQ ID NO:35、36、37、38、39和40;

[0152] b) 分别为SEQ ID NO:41、42、43、44、45和40;

[0153] c) 分别为SEQ ID NO:35、42、46、44、47和40;

[0154] d) 分别为SEQ ID NO:48、49、50、51、47和52;

[0155] e) 分别为SEQ ID NO:53、54、55、44、45和40;

[0156] f) 分别为SEQ ID NO:56、57、58、59、60和61;或

[0157] g) 分别为SEQ ID NO:62、63、64、65、66和67。

[0158] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分包含与以下氨基酸序

列有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的H-CDR3和L-CDR3:

[0159] a) 分别为SEQ ID NO:37和40;

[0160] b) 分别为SEQ ID NO:43和40;

[0161] c) 分别为SEQ ID NO:46和40;

[0162] d) 分别为SEQ ID NO:50和52;

[0163] e) 分别为SEQ ID NO:55和40;

[0164] f) 分别为SEQ ID NO:58和61;或

[0165] g) 分别为SEQ ID NO:64和67。

[0166] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分包含与以下氨基酸序列有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致的VH和VL:

[0167] a) 分别为SEQ ID NO:3和4;

[0168] b) 分别为SEQ ID NO:7和8;

[0169] c) 分别为SEQ ID NO:11和12;

[0170] d) 分别为SEQ ID NO:15和16;

[0171] e) 分别为SEQ ID NO:19和20;

[0172] f) 分别为SEQ ID NO:23和24;或

[0173] g) 分别为SEQ ID NO:27和28。

[0174] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分包含具有以下氨基酸序列的VH和VL:

[0175] a) 分别为SEQ ID NO:3和4;

[0176] b) 分别为SEQ ID NO:7和8;

[0177] c) 分别为SEQ ID NO:11和12;

[0178] d) 分别为SEQ ID NO:15和16;

[0179] e) 分别为SEQ ID NO:19和20;

[0180] f) 分别为SEQ ID NO:23和24;或

[0181] g) 分别为SEQ ID NO:27和28。

[0182] 在一些实施方案中,该抗LAG-3抗体包含:

[0183] a) 具有SEQ ID NO:3和30的氨基酸序列的HC以及具有SEQ ID NO:4和34的氨基酸序列的LC;

[0184] b) 具有SEQ ID NO:7和30的氨基酸序列的HC以及具有SEQ ID NO:8和34的氨基酸序列的LC;

[0185] c) 具有SEQ ID NO:11和30的氨基酸序列的HC以及具有SEQ ID NO:12和34的氨基酸序列的LC;

[0186] d) 具有SEQ ID NO:15和30的氨基酸序列的HC以及具有SEQ ID NO:16和34的氨基酸序列的LC;

[0187] e) 具有SEQ ID NO:19和30的氨基酸序列的HC以及具有SEQ ID NO:20和34的氨基酸序列的LC;

[0188] f) 具有SEQ ID NO:23和30的氨基酸序列的HC以及具有SEQ ID NO:24和34的氨基

酸序列的LC;或

[0189] g) 具有SEQ ID NO:27和30的氨基酸序列的HC以及具有SEQ ID NO:28和32的氨基酸序列的LC。

[0190] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分包含抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的H-CDR1-3和L-CDR1-3氨基酸序列。

[0191] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分包含分别与抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的VH和VL至少90%氨基酸序列一致的VH和VL。

[0192] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分包含VH和VL,其分别为抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011的VH和VL。

[0193] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体为抗体15646、15532、15723、15595、15431、15572或15011,或具有与所述抗体相同的氨基酸序列的抗体。

[0194] 本发明亦提供结合具有以下氨基酸残基的人类LAG-3的表位的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分:

[0195] a) 选自SEQ ID NO:68的H85、P86、A87、P89、S91、W92和G93的1、2、3、4、5、6或全部7个氨基酸残基(例如,抗体15532);

[0196] b) 选自SEQ ID NO:68的A40、Q41、P43、P46、P49、D52、T62、Q64、H65、Q66、P67、D68、G93、P94、P96、R98、Y99、T100、V101、P106、G107、R119、E124、R129、G130、D131、S133、R137、P138、D143、R148和R163的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31或全部32个氨基酸残基(例如,抗体15431);

[0197] c) 选自SEQ ID NO:68的A40、Q41、P43、P46、P49、D52、T62、Q64、H65、Q66、P67、D68、P96、Y99、T100、V101、P106、G107、R119、E124、R129、G130、D131、S133、R137、P138、D143、R148和R163的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28或全部29个氨基酸残基(例如,抗体15572);或

[0198] d) 选自SEQ ID NO:68的G107、L109、R110和S111的1、2、3或全部4个的氨基酸残基(例如,抗体15011)。

[0199] 本发明亦提供结合具有残基98-105的人类LAG-3的表位的单克隆抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,该抗体或抗原结合部分结合具有以下氨基酸片段的人类LAG-3的表位:

[0200] a) 选自SEQ ID NO:68的残基78-105和123-131的二或三个氨基酸片段(例如,抗体15532);

[0201] b) 选自SEQ ID NO:68的残基23-30、40-66、88-105、123-137和148-152的一、二、三、四或五个氨基酸片段(例如,抗体15431);

[0202] c) 选自SEQ ID NO:68的残基23-30、40-66、98-105、118-137和148-161的一、二、三、四或五个氨基酸片段(例如,抗体15572);或

[0203] d) SEQ ID NO:68的氨基酸残基98-105(例如,抗体15011)。

[0204] 本发明亦提供结合具有SEQ ID NO:68之残基23-30和40-66的人类LAG-3的表位的单克隆抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,该表位还具有SEQ ID NO:68之残基88-105、123-137及/或148-152。在一些实施方案中,该表位还具有SEQ ID NO:68之残基98-

105、118-137和148-161。

[0205] 本发明亦提供抗LAG-3抗体或其抗原结合部分,其与选自由15532、15646、15723、15595、15431、15572和15011组成的组的抗体竞争或交叉竞争相同表位的结合或结合相同表位。

[0206] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分不与抗体25F7-Lag3.5结合相同的人类LAG-3的表位。

[0207] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分利用选自由以下组成的组的人类重链种系基因:IGHV4-34、IGHV1-24、IGHV6-1、IGHV4-39和IGHV3-23。在某些实施方案中,该重链种系基因与抗LAG3抗体或抗原结合部分中的对应重链序列至少75%、80%、82%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致。在某些实施方案中,所述重链种系基因的框架区序列与抗LAG3抗体或抗原结合部分中的对应重链框架区序列至少75%、80%、82%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致。

[0208] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分利用选自由以下组成的组的人类轻链种系基因:IGKV3-11、IGKV1-12、IGKV1-5和IGLV3-19。在某些实施方案中,该轻链种系基因与抗LAG3抗体或抗原结合部分中的对应轻链序列至少75%、80%、82%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致。在某些实施方案中,所述轻链种系基因的框架区序列与抗LAG3抗体或抗原结合部分中的对应轻链框架区序列至少75%、80%、82%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致。

[0209] 在特定实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分利用上述人类重链种系基因和人类轻链种系基因的任何组合(例如,IGHV4-34和IGKV3-11、IGHV1-24和IGKV1-12、IGHV6-1和IGKV3-11、IGHV4-39和IGKV1-5或IGHV3-23和IGLV3-19)。在一些实施方案中,该重链和轻链种系基因分别与抗LAG3抗体或抗原结合部分中的对应重链和轻链序列至少75%、80%、82%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致。在某些实施方案中,所述重链和轻链种系基因的框架区序列分别与抗LAG3抗体或抗原结合部分中的对应重链和轻链框架区序列至少75%、80%、82%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致。

[0210] 在一些实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者可以下述EC50结合人类LAG-3:(例如)0.2nM或更少、0.15nM或更少、0.1nM或更少、0.09nM或更少、0.08nM或更少、0.07nM或更少、0.06nM或更少、0.05nM或更少或0.04nM或更少。在一些实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者可以(例如)下述EC50结合食蟹猴LAG-3:0.4nM或更少、0.3nM或更少、0.2nM或更少、0.1nM或更少、0.09nM或更少、0.08nM或更少、0.07nM或更少、0.06nM或更少、0.05nM或更少、0.04nM或更少或0.03nM或更少。

[0211] 在一些实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者可以(例如)0.1nM或更少的EC50结合人类LAG-3。在一些实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者可以(例如)0.3nM或更少的EC50结合食蟹猴LAG-3。在特定实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者可以(例如)0.1nM或更少的EC50结合

人类LAG-3并以(例如)0.3nM或更少的EC50结合食蟹猴LAG-3。

[0212] 在一些实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者可抑制诸如II类MHC(MHCII)或LSECtin等配体对LAG-3的结合。例如,在20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,相较于阴性对照抗体存在下的结合,该抗LAG-3抗体或抗原结合部分可将LAG-3与MHCII的结合减少至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%。在一个实施方案中,相较于阴性对照抗体,该抗LAG-3抗体或抗原结合蛋白可将LAG-3与MHCII的结合减少大于85%。在一个实施方案中,相较于阴性对照抗体,该抗LAG-3抗体或抗原结合蛋白可将LAG-3与MHCII的结合减少约35%和85%之间。

[0213] 在一些实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者可阻断LAG-3和II类MHC(例如,在Jurkat细胞上表达之人类LAG-3和在Raji细胞上表达的人类II类MHC)之间的结合(例如在0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度下)。

[0214] 在一些实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者以表面等离子体共振来测量可以下述 K_D 结合人类LAG-3:5.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、4.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、3.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、2.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、1.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、9.0 $\times 10^{-9}$ 或更少、8.0 $\times 10^{-9}$ 或更少、7.0 $\times 10^{-9}$ 或更少、6.0 $\times 10^{-9}$ 或更少、5.0 $\times 10^{-9}$ 或更少、4.0 $\times 10^{-9}$ 或更少、3.0 $\times 10^{-9}$ 或更少、2.0 $\times 10^{-9}$ 或更少或1.0 $\times 10^{-9}$ 或更少。

[0215] 在一些实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者以表面等离子体共振来测量可以下述 K_D 结合食蟹猴LAG-3:1.5 $\times 10^{-7}$ 或更少、1.0 $\times 10^{-7}$ 或更少、9.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、8.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、7.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、6.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、5.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、4.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、3.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、2.0 $\times 10^{-8}$ 或更少或1.0 $\times 10^{-8}$ 或更少。

[0216] 在一些实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者以表面等离子体共振来测量可以下述 K_D 结合小鼠LAG-3:5.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、4.5 $\times 10^{-8}$ 或更少、4.0 $\times 10^{-8}$ 或更少、3.5 $\times 10^{-8}$ 或更少或3.0 $\times 10^{-8}$ 或更少。

[0217] 在一些实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者可刺激IL-2的产生,(例如)从经SEB刺激的PBMC。

[0218] 在一些实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者可减少(例如)在人类T细胞系(诸如过表达LAG-3的人类T细胞系)中的细胞的及/或可溶的LAG-3水平。

[0219] 在一些实施方案中,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者可诱导体内肿瘤生长退化及/或延迟肿瘤生长。

[0220] 在一些实施方案中,相较于抗体25F7-Lag3.5,本文所述的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的任一者可结合不同的人类LAG-3的表位。

[0221] 在一个实施方案中,施用本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分可活化T细胞,使得抗肿瘤活性增加。

[0222] 通过本文所述的方法获得的抗LAG-3抗体的类型可以另一类型或亚类来改变或转换。在本发明的一方面中,使用本领域中熟知的方法来分离编码VL或VH的核酸分子,分别使其不包含编码CL或CH的核酸序列。然后将编码VL或VH的核酸分子分别与来自不同类别的免

疫球蛋白分子的编码CL或CH的核酸序列操作地连接。这可以使用如上所述的包含CL或CH链的载体或核酸分子来达成。例如,最初为IgM的抗LAG-3抗体可以经类别转换为IgG。此外,类别转换可用于将一个IgG亚类转换为另一者,例如从IgG₁转换为IgG₂。可将κ轻链恒定区改变为(例如)λ轻链恒定区。用于产生具有所需的Ig同种型的本发明的抗体的优选的方法包括以下步骤:分离编码抗LAG-3抗体的重链的核酸分子和编码抗LAG-3抗体的轻链的核酸分子,获得重链的可变域,连接该重链的可变域与所需的同种型的重链的恒定区,在细胞中表达轻链和所连接的重链,并收集具有所需同种型的抗LAG-3抗体。

[0223] 本发明的抗LAG-3抗体可为IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子,但典型地为IgG同种型,例如为IgG亚类IgG₁、IgG_{2a}或IgG_{2b}、IgG₃或IgG₄。在一个实施方案中,该抗体为IgG₁。在另一个实施方案中,该抗体为IgG₂。在某些实施方案中,结合本文所述的LAG-3表位的本发明的IgG₁抗体在调控(例如,抑制)LAG-3功能以达成癌症治疗或免疫刺激功效方面,提供优异的活性。

[0224] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体可包含至少一个Fc区域中的突变。已知许多不同的Fc突变,其中这些突变提供改变的效应器功能。例如,在许多情况下,将会需要减少或消除效应器功能,例如在不想要配体/受体相互作用的情况下或在抗体-药物缀合物的情况下。

[0225] 在一个实施方案中,该抗LAG-3抗体包含至少一个减少效应器功能的Fc区域中的突变。可有利于突变以减少效应器功能的Fc区域氨基酸位置包括位置228、233、234和235中的一或多者,其中氨基酸位置根据IMGT[®]编号方法来编号。

[0226] 在一个实施方案中,在位置234和235之一或两个氨基酸残基(例如)从Leu经突变为Ala(L234A/L235A)。这些突变减少IgG₁抗体的Fc区域的效应器功能。额外地或可替代地,在位置228的氨基酸残基可经突变(例如)为Pro。在一些实施方案中,在位置233的氨基酸残基可经突变(例如)为Pro,在位置234的氨基酸残基可经突变(例如)为Val及/或在位置235的氨基酸残基可经突变(例如)为Ala。该氨基酸位置根据IMGT[®]编号方法来编号。

[0227] 在一些实施方案中,其中该抗体为IgG₄亚类,其可包含突变S228P,即在位置228有脯氨酸,其中该氨基酸位置根据IMGT[®]编号方法来编号。已知此突变可减少不想要的Fab臂交换。

[0228] 在某些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合部分可为较大的免疫粘附分子的部分,其通过抗体或抗体部分与一种或多种其他蛋白质或肽的共价或非共价结合而形成。此类免疫粘附分子的实例包括使用链霉抗生物素蛋白(streptavidin)核心区域来制造四聚体的scFv分子(Kipriyanov等人,Human Antibodies and Hybridomas6:93-101(1995))以及使用半胱氨酸残基、标记肽和C端聚组氨酸标签来制造二价的且经生物素化的scFv分子(Kipriyanov等人,Mol.Immunol.31:1047-1058(1994))。其他实例包括,其中来自抗体的一或多个CDR以共价或非共价方式并入分子中以使其成为特异性结合目标抗原的免疫粘附素。在此实施方案中,可将CDR并入作为较大的多肽链的部分,其可共价连接至另一多肽链或可以非共价方式并入。

[0229] 在另一个实施方案中,可制造融合抗体或免疫粘附素,其包含与另一多肽连接的本发明的抗LAG-3抗体的全部或部分。在某些实施方案中,只有抗LAG-3抗体的可变域连接

至多肽。在某些实施方案中,抗LAG-3抗体的VH域连接至第一多肽,而抗LAG-3抗体的VL域连接至第二多肽,该第二多肽与第一多肽相连以使VH和VL域能彼此相互作用而形成抗原结合位点。在另一优选的实施方案中,通过接头分开VH域和VL域以使VH和VL域能够彼此相互作用(例如,单链抗体)。然后将VH-接头-VL抗体连接至目标多肽。此外,可产生其中两个(或更多个)单链抗体彼此连接的融合抗体。若想要在单一多肽链上产生二价或多价抗体或者想产生双特异性抗体,则这是有用的。

[0230] 为了产生单链抗体(scFv),将编码VH和VL的DNA片段操作地连接至编码柔性接头(例如,编码氨基酸序列(Gly4-Ser)3(SEQ ID NO:74)的另一片段,使得VH和VL序列可以表达为具有由柔性接头结合的VL和VH域的连续的单链蛋白质。参见(例如)Bird等人,Science242:423-426(1988);Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988);以及McCafferty等人,Nature348:552-554(1990)。单链抗体可为单价的(若仅使用单一的VH和VL);二价的(若使用两个VH和VL);或多价的(若使用超过两个VH和VL)。例如,可产生特异性结合人类LAG-3和另一分子的双特异性或多价的抗体。

[0231] 在其他实施方案中,可使用编码抗LAG-3抗体的核酸分子来制备其他修饰抗体。例如,可依据说明书的教示使用标准分子生物学技术来制备“κ抗体(kappa body)”(I11等人,Protein Eng.10:949-57(1997))、“微抗体(minibody)”(Martin等人,EMBO J.13:5303-9(1994))、“双抗体(diabody)”(Holliger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448(1993))或“Janusins”(Traunecker等人,EMBO J.10:3655-3659(1991)和Traunecker等人,Int.J.Cancer(Suppl.)7:51-52(1992))。

[0232] 可将本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分衍生或连接至另一分子(例如,另一肽或蛋白质)。一般而言,以使LAG-3结合不受衍生化或标记的不利影响之方式来衍生化抗体或其部分。因此,本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分旨在包含本文所述的人类抗LAG-3抗体的完整和修饰形式两者。例如,本发明的抗体或抗体部分可功能性连接(通过化学偶合、基因融合、非共价性结合或其他方式)至一或多个其他分子实体(molecular entity),诸如可以介导抗体或抗体部分与另一分子(诸如链霉抗生物素蛋白核心区域或聚组氨酸标签)结合的另一抗体(例如,双特异性抗体或双抗体)、检测剂、医药剂及/或蛋白质或肽。

[0233] 一类衍生化抗体通过交联两个或多个抗体来产生(以相同类型或不同类型的抗体(例如)来产生双特异性抗体)。合适的交联剂包括异双官能的、具有两个以合适间隔基(spacer)分开的不同反应性基团者(例如,间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羧基琥珀酰亚胺酯)或同双官能者(例如二琥珀酰亚氨基辛二酸酯)。此类接头可自(例如)Pierce Chemical Company(Rockford,IL)获得。

[0234] 也可以诸如聚乙二醇(PEG)、甲基或乙基或碳水化合物基团等化学基团来衍生化抗LAG-3抗体。这些基团可用于改善该抗体的生物学特性,例如,增加血清半衰期。

[0235] 也可标示根据本发明的抗体。如在此所用的,术语“标示物(label)”或“标示的/被标示的(labeled)”指将另一分子并入抗体中。在一个实施方案中,该标示为可检测的标记(marker),(例如)并入放射性标示的氨基酸或附接至可通过标记的亲合素检测的生物素部分的多肽(例如,含有可通过光学或比色方法检测的酶活性或荧光标记的链霉抗生物素蛋白)。在另一个实施方案中,该标示或标记可为有治疗性的,例如药物缀合物或毒素。标示多肽和糖蛋白的各种方法是本领域中已知的且是可使用的。用于多肽的标示物的实例包括

(但不限于)以下者:放射性同位素或放射性核素(例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、荧光标示物(例如FITC、罗丹明、镧系元素磷光体)、酶标示物(例如辣根过氧化物酶、 β 半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光标记物、生物素基团、由次级报导子(reporter)辨识的预定多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合域、表位标签)、磁性剂(诸如钆螯合物)、诸如百日咳毒素的毒素、紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌素D、溴化乙啶、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春花碱、秋水仙碱、多柔比星(doxorubicin)、道诺霉素、二羟基蒽蒽素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神霉素(mithramycin)、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素类、普鲁卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)和嘌呤霉素及其类似物或同源物。在一些实施方案中,通过各种长度的间隔子臂(spacer arm)来附接标记物以减少潜在的空间位阻。

[0236] 在某些实施方案中,本发明的抗体可为中性形式(包括两性的离子形式)或以带正电或带负电的物质存在。在一些实施方案中,该抗体可与抗衡离子复合以形成医药上可接受的盐。

[0237] 术语“医药上可接受的盐”指包含一或多个抗体以及一或多个抗衡离子之复合物,其中该抗衡离子衍生自医药上可接受的无机和有机酸和碱。

[0238] 双特异性结合分子

[0239] 在另一方面中,本发明提供双特异性结合分子,其具有本文所述的抗LAG-3抗体的结合特异性(例如,包含抗原结合部分)以及另一抗LAG-3抗体(例如,本文所述的另一抗LAG-3抗体)或靶向不同的蛋白质(诸如另一免疫检查点蛋白质、癌症抗原或其活性介导诸如癌症等疾病病状的另一细胞表面分子)的抗体的结合特异性。该双特异性结合分子是本领域中已知的,且本文的其他内容提供了不同类型的双特异性结合分子的实例。

[0240] 核酸分子和载体

[0241] 本发明亦提供编码本文所述的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的核酸分子和序列。在一些实施方案中,不同的核酸分子编码抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的重链和轻链氨基酸序列。在其他实施方案中,相同的核酸分子编码抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的重链和轻链氨基酸序列。

[0242] 除非另有说明,否则对核苷酸序列的引用包含其互补物。因此,引用具有特定序列的核酸应被理解为包含其互补链及其互补序列。本文所引的术语“多核苷酸”是指长度为至少10个碱基的核苷酸的聚合形式,核糖核苷酸或脱氧核苷酸或任一种核苷酸的修饰形式。该术语包括单链和双链形式。

[0243] 本发明亦提供与本文所述的一个或多个核苷酸序列(例如,选自SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17、18、21、22、25和26组成的组的核苷酸序列或编码选自SEQ ID NO:3、4、7、8、11、12、15、16、19、20、23、24、27和28组成的组的氨基酸序列的核苷酸序列)至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%一致的核苷酸序列。核酸序列的背景中的术语“百分比序列一致性”指当以最大对应关系比对时两条序列中的相同残基。序列一致性比较的长度可以是至少约9个核苷酸的片段,通常为至少约18个核苷酸,较常为至少约24个核苷酸,典型地为至少约28个核苷酸,更典型地为至少约32个核苷酸,且优选为至少约36、48

或更多个核苷酸。有许多本领域中已知的不同算法,其可用于测量核苷酸序列一致性。例如,使用FASTA、Gap或Bestfit(其为Wisconsin Package版本10.0,Genetics Computer Group (GCG),Madison,Wisconsin中的程序)来比较多核苷酸序列。FASTA(其包括(例如)FASTA2和FASTA3程序)提供了询问和检索的序列之间最佳重迭区域的比对以及百分比序列一致性(参见,例如Pearson,Methods Enzymol.183:63-98(1990);Pearson,Methods Mol.Biol.132:185-219(2000);Pearson,Methods Enzymol.266:227-258(1996);以及Pearson,J.Mol.Biol.276:71-84(1998);以参考方式并入本文中)。除非另外指明,否则使用特定程序或算法的默认参数。例如,可以使用有默认参数(字大小为6且用于记分矩阵(scoring matrix)的NOPAM因子)的FASTA或者使用有如在GCG版本6.1(以参考方式并入本文中)中提供的默认参数的Gap来确定核酸序列之间的百分比序列一致性。

[0244] 在一方面中,本发明提供核酸分子,其包含选自SEQ ID NO:1、2、5、6、9、10、13、14、17、18、21、22、25和26组成的组的核苷酸序列。在某些实施方案中,该核酸分子包含以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:5和6、SEQ ID NO:9和10、SEQ ID NO:13和14、SEQ ID NO:17和18、SEQ ID NO:21和22或SEQ ID NO:25和26。

[0245] 在上述实施方案之任一者中,该核酸分子可为经分离的。

[0246] 在另一方面中,本发明提供适合用于表达本文所述的抗体或其抗原结合部分的链之一的载体。本文所用的术语“载体”,意指能够运送与其连接的另一核酸的核酸分子。在一些实施方案中,该载体为质粒,即可连接其他DNA片段的DNA的环状双链片段。在一些实施方案中,该载体为病毒载体,其中额外的DNA片段可连接到病毒基因组中。在一些实施方案中,该载体能够在其所导入的宿主细胞中自行复制(例如,具有细菌复制源的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。在其他实施方案中,载体(例如非附加型哺乳动物载体)可在导入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够将导向其所操作地连接的基因的表达。该载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称“表达载体”)。

[0247] 本发明提供包含核酸分子的载体,该核酸分子编码本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的重链、本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的轻链或本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的重链和轻链两者。本发明进一步提供包含编码融合蛋白、修饰抗体、抗体片段和其探针的核酸分子的载体。

[0248] 编码本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的重链及/或轻链的核酸分子可从任何产生该抗体或部分的来源分离。在多个实施方案中,该核酸分子从表达抗LAG-3抗体的B细胞中分离,其从经人类LAG-3抗原免疫化的动物中分离,或从该B细胞所产生的永生化的细胞中分离。分离编码抗体的核酸的方法是本领域所熟知的。mRNA可经分离并用于产生在聚合酶链式反应(PCR)或抗体基因的cDNA克隆的cDNA。在某些实施方案中,本发明的核酸分子可以是合成的,而非经分离的。

[0249] 在一些实施方案中,本发明的核酸分子可包含编码来自本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的VH域的核苷酸序列,其框内(in-frame)接合至编码来自任何来源的重链恒定区的核苷酸序列。同样地,本发明的核酸分子可包含编码来自本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的VL域的核苷酸序列,其框内接合至编码来自任何来源的轻链恒定区的核苷酸序列。

[0250] 在本发明的另一方面中,编码重链(VH)及/或轻链(VL)的可变域的核酸分子可以被“转化”为全长抗体基因。在一个实施方案中,通过插入至已分别编码重链恒定区(CH)或轻链恒定区(CL)的表达载体中,将编码VH或VL域的核酸分子转化为全长抗体基因,使VH片段操作地连接至载体内的CH区段,及/或使VL区段操作地连接至载体内的CL区段。在另一个实施方案中,通过使用标准分子生物学技术来连接(例如,接合(ligating))编码VH及/或VL域的核酸分子至编码CH或CL区域的核酸分子,将编码VH或VL域的核酸分子转化为全长抗体基因。然后,可将编码全长重链及/或轻链的核酸分子从其已经导入的细胞以及经分离的抗LAG-3抗体中表达。

[0251] 核酸分子可以用于重组表达大量的抗LAG-3抗体。如本文所述,核酸分子还可以用于产生嵌合抗体、双特异性抗体、单链抗体、免疫粘附素、双抗体、突变抗体和抗体衍生物。

[0252] 在另一个实施方案中,本发明的核酸分子用作特异性抗体序列的探针或PCR引物。例如,该核酸可用作诊断方法中的探针或作为PCR引物以扩增可用于(特别是)分离编码抗LAG-3抗体的可变域的其他核酸分子的DNA区域。在一些实施方案中,该核酸分子是寡核苷酸。在一些实施方案中,该寡核苷酸来自目标抗体的重和轻链的高度可变域。在一些实施方案中,该寡核苷酸编码本文所述的本发明的抗LAG-3抗体或抗原结合部分的一或多个CDR的全部或部分。

[0253] 在另一个实施方案中,该核酸分子和载体可用于制造突变的抗LAG-3抗体。该抗体可在重及/或轻链的可变域中突变,例如,改变该抗体的结合特性。例如,可在一或多个CDR中制造突变以增加或减少抗LAG-3抗体的 K_D 、增加或减少 k_{off} 、或改变该抗体的结合特异性。在另一个实施方案中,一或多个突变在氨基酸残基上进行,已知所述氨基酸残基相较于本发明的单克隆抗体的种系被改变。可在恒定区或可变域的CDR或框架区中进行突变。在优选的实施方案中,在可变域进行突变。在一些实施方案中,一或多个突变在氨基酸残基上进行,已知所述氨基酸残基相较于本发明的抗体或其抗原结合部分的可变域的CDR或框架区中的种系被改变。

[0254] 在另一个实施方案中,框架区是突变的,使得所产生的框架区具有对应的种系基因的氨基酸序列。突变可在框架区或恒定区中进行以增加抗LAG-3抗体的半衰期。参见例如,PCT公开文件WO 00/09560。也可进行在框架区或恒定区中的突变以改变抗体的免疫原性及/或提供与另一分子共价或非共价结合的位点。根据本发明,单一抗体可以有在恒定区或在可变域的一或多个CDR或框架区中的突变。

[0255] 在一些实施方案中,通过以下方式表达本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分:将(如上所述的方式获得的)编码部分或全长的轻和重链的DNA插入至表达载体,使得该基因操作地连接至必要的表达控制序列,诸如转录和翻译控制序列。表达载体包括质粒、反转录病毒、腺病毒,腺相关病毒(AAV)、植物病毒(诸如花椰菜花叶病毒、烟草花叶病毒)、粘粒、YAC、EBV衍生的附加体等等。可将抗体编码序列连接到载体,使得载体中的转录和翻译控制序列提供其调节该抗体编码序列的转录和翻译的预期功能。表达载体和表达控制序列可选择以使其与所用的表达宿主细胞相容。抗体轻链编码序列和抗体重链编码序列可被插入至不同的载体,并可以经可操作地连接至相同或不同的表达控制序列(例如,启动子)。在一个实施方案中,两种编码序列被插入至相同的载体并可经操作地连接至相同的表达控制序列(例如,共同的启动子),以分离相同的表达控制序列(例如,启动子)或连接至不同的表达

控制序列(例如,启动子)。可通过标准方法(例如,在抗体基因片段和载体上接合互补性限制位点(complementary restriction site),或若无限制位点,则通过平端接合(blunt end ligation)),将抗体编码序列插入至表达载体。

[0256] 适宜的载体为编码功能性完整的人类CH或CL免疫球蛋白序列者,其具有经设计的适当的限制性位点,使得可很容易插入或表达任何VH或VL序列,如上所述。在该载体中编码HC和LC的基因可含有内含子序列,其会通过稳定相关的mRNA来产生增加的整体抗体蛋白质产量。内含子序列侧翼有剪接供体和剪接受体位点(splice acceptor site),它们决定RNA剪接的发生位置。内含子序列的位置可在抗体链的可变区或恒定区中,或当使用多个内含子时,可在可变区和恒定区两者中。多腺核苷酸化和转录终止可发生于编码区下游的天然染色体位点。重组表达载体也可编码信号肽,其促使来自宿主细胞的抗体链的分泌作用。可克隆抗体链基因至载体中,使得信号肽框内连接至免疫球蛋白链的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源的信号肽(即,来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0257] 除了抗体链基因之外,本发明的重组表达载体也可带有控制宿主细胞中的抗体链基因的表达的调节序列。本领域技术人员会认同,表达载体的设计(包括调节序列的选择)可取决于以下因素:诸如待转化的宿主细胞的选择、所需的蛋白质的表达水平等。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选的调节序列包括引导哺乳动物细胞中高水平的蛋白表达的病毒组件,诸如源自以下的启动子及/或增强子:反转录病毒LTR、巨细胞病毒(CMV)(诸如CMV启动子/增强子)、猿病毒40(SV40)(诸如SV40启动子/增强子)、腺病毒(诸如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))、多瘤病毒以及诸如天然免疫球蛋白和肌动蛋白启动子的强哺乳动物启动子。关于病毒调节组件及其序列的进一步描述,可参见例如美国专利5,168,062、4,510,245和4,968,615。在植物中表达抗体的方法(包括启动子和载体的描述以及植物的转化)是本领域中已知的。参见(例如)美国专利6,517,529。在细菌细胞或真菌细胞(例如酵母细胞)中表达多肽的方法也是本领域中熟知的。

[0258] 除了抗体链基因和调节序列之外,本发明的重组表达载体也可带有额外的序列,诸如调控宿主细胞中的载体的复制的序列(例如,复制起点)和选择性标记的基因。选择性标记的基因有助于选择已导入载体的宿主细胞(参见例如,美国专利4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,典型地,选择性标记的基因赋予已导入载体的宿主细胞对药物(例如G418、潮霉素或甲氨蝶呤)的抗性。例如,选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于有甲氨蝶呤选择/扩增的dhfr-宿主细胞)、neo基因(用于G418选择)以及谷氨酸合成酶的基因。

[0259] 本文所用的术语“表达控制序列”意指进行与其接合的编码序列的表达和处理所必需的多核苷酸序列。表达控制序列包括合适的转录启动、终止、启动子和增强子序列;诸如剪接和聚腺苷酸化信号的有效RNA处理信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即,Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;以及(当需要时)增加蛋白质分泌的序列。该控制序列的性质会根据宿主生物体而有差异;在原核生物中,该控制序列一般包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列;在真核生物中,一般而言,该控制序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”意指包括(至少)对于表达和处理必须存在的所有组分,且也可包括额外的有利组分,例如前导序列和融合伴侣序列。

[0260] 宿主细胞及抗体和抗体组合物制造的方法

[0261] 本发明的其他方面系关于产生本发明的抗体组合物以及抗体和其抗原结合部分的方法。本发明的此方面的一个实施方案关于产生本文所定义的抗体的方法,包含提供能够表达该抗体的重组宿主细胞,在适合表达该抗体的条件下温育所述宿主细胞,以及分离所产生的抗体。通过在该重组宿主细胞中表达所产生的抗体在此称为“重组抗体”。本发明亦提供该宿主细胞的子代细胞以及其所产生的抗体。

[0262] 术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”),如本文所用的,意指已引入重组表达载体的细胞。本发明提供可包含(例如)上述本发明的载体的宿主细胞。本发明亦提供包含(例如)以下者的宿主细胞:编码本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的重链或其抗原结合部分的核苷酸序列、编码本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分的轻链或其抗原结合部分的核苷酸序列或两者。应理解,“重组宿主细胞”和“宿主细胞”不仅意指特定的受试细胞,也意指该细胞的子代。由于在后代中可能因突变或环境影响而发生某些修饰,所以这样的子代实际上可能不会与亲代细胞相同,但仍包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0263] 编码抗LAG-3抗体的核酸分子以及包含这些核酸分子的载体可用于合适的哺乳动物、植物、细菌或酵母菌宿主细胞的转染。转化(transformation)可通过任何用于将多核苷酸引入至宿主细胞的任何已知的方法来进行。将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法是本领域熟知的,且包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔,在脂质粒中多核苷酸的包囊、以及直接显微注射DNA至细胞核。此外,可以通过病毒载体将核酸分子引入至哺乳动物细胞中。细胞转化的方法是本领域中所熟知的。参见(例如)美国专利4,399,216、4,912,040、4,740,461和4,959,455。植物细胞转化的方法是本领域中所熟知的,包括(例如)土壤杆菌介导的转化、生物射弹转化、直接注射、电穿孔和病毒转化。细菌和酵母细胞转化的方法也是本领域中所熟知的。

[0264] 可作为表达的宿主的哺乳动物细胞系是本领域中所熟知的,且包括许多可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的永生化细胞系。这些包括(尤其是)中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0细胞、SP2细胞、HEK-293T细胞、293自由式(freestyle)细胞(Invitrogen)、NIH-3T3细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、非洲绿猴肾细胞细胞(COS)、人类肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)、A549细胞以及许多其他细胞系。特定优选的细胞系是通过确定哪些细胞系具有高表达水平来作选择。其他可使用的细胞系是昆虫细胞系,例如Sf9或Sf21细胞。当编码抗体基因的重组表达载体被引入至哺乳动物宿主细胞时,通过温育该宿主细胞一段时间来产生该抗体,所述时间足够使抗体在宿主细胞中表达,或更佳地,使抗体分泌至宿主细胞生长的培养基。使用标准蛋白质纯化方法可从培养基中回收抗体。植物宿主细胞包括(例如)烟草(Nicotiana)、拟南芥(Arabidopsis)、浮萍、玉米、小麦、马铃薯等。细菌宿主细胞包括大肠杆菌(E.coli)和链霉菌(Streptomyces)属物种。酵母宿主细胞包括粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe),酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)。

[0265] 此外,使用许多已知技术可增强来自生产细胞系的本发明的抗体或其抗原结合部分的表达。例如,谷氨酰胺合成酶基因表达系统(GS系统)是在某些条件下增强表达的常用方式。GS系统全部或部分相关地在EP专利0 216 846、0 256 055、0 323 997和0 338 841中进行了讨论。

[0266] 由不同细胞系或转基因动物表达的抗体可能彼此具有不同的糖基化模式。然而，无论抗体的糖基化状态为何，且更概括言之，无论是否存在或没有翻译后修饰，本文所有提供的核酸分子所编码的抗体或包含本文提供的氨基酸序列的抗体，皆为本发明的一部分。

[0267] 医药组合物

[0268] 本发明的另一方面为医药组合物，包含作为活性成分(或作为唯一活性成分)的本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分、双特异性结合分子或抗体组合物。该医药组合物可包含任何本文所述的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分、双特异性结合分子或抗体组合物。在一些实施方案中，该医药组合物意指用于改善，预防及/或治疗LAG-3相关病症及/或癌症。如本文所用，LAG-3相关或介导的病症指可通过调控LAG-3活性而改善或减缓其进展的病症、疾病或病状。在一些实施方案中，该组合物意指用于活化免疫系统。在某些实施方案中，该医药组合物意指用于改善，预防及/或治疗源自诸如以下组织的癌症：皮肤、肺、肠、结肠、卵巢、脑、前列腺、肾、软组织、造血系统、头和颈、肝、膀胱、乳房、胃、子宫和胰脏。在某些实施方案中，该癌症是纤维肉瘤、肺癌或黑素瘤。在某些实施方案中，该癌症是神经胶质母细胞瘤、神经胶质肉瘤或结肠直肠癌。在某些实施方案中，本发明的医药组合物意指用于治疗银屑病。

[0269] 一般而言，本发明的抗体、抗原结合部分和双特异性结合分子适合与一或多个(例如如下所述的)医药上可接受的赋形剂组合作为配制剂来施用。

[0270] 本发明的医药组合物将包含一或多个本发明的抗LAG-3抗体、结合部分或双特异性结合分子，例如一或两个抗LAG-3抗体、结合部分或双特异性结合分子。在一个实施方案中，该组合物包含单一本发明的抗LAG-3抗体或其结合部分。

[0271] 在另一个实施方案中，该医药组合物可包含至少一个抗LAG-3抗体或其抗原结合部分(例如一个抗LAG-3抗体或部分)以及靶向一或多个相关的细胞表面受体(例如一或多个癌症相关的受体)的一或多个其他抗体。

[0272] 本文所用的术语“赋形剂”用于描述除了本发明的化合物以外的任何成分。赋形剂的选择，在很大程度上将取决于诸如特定的施用方式、赋形剂对溶解度和稳定性的功效以及剂型的性质等因素。如本文所用的，“医药上可接受的赋形剂”包括生理上相容的任何和全部的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等等。医药上可接受的赋形剂的一些实例为水、盐水，磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。在许多情况下，组合物中包含等渗剂(例如糖、多元醇如甘露醇，山梨糖醇或氯化钠)是优选的。医药上可接受的物质的其他实例为润湿剂或少量的辅助物质，诸如润湿剂或乳化剂，防腐剂或缓冲剂，其提高抗体的储存期或有效性。

[0273] 本发明的医药组合物和其制备方法对于本领域技术人员是很清楚的。此类组合物和其制备方法可见于(例如)Remington's Pharmaceutical Sciences, 第19版(Mack Publishing Company, 1995)。医药组合物优选是在GMP(良好作业规范)条件下制造。

[0274] 本发明的医药组合物作为单一单位剂量或作为复数个单一单位剂量来制备、包装或批售。如本文所用的，“单位剂量”是包含预定量活性成分的医药组合物的离散量。一般而言，活性成分的量等于被施用至个体的活性成分的剂量或该剂量的合适的分量，例如，该剂量的二分之一或三分之一。

[0275] 本领域所接受的任何施用肽、蛋白质或抗体的方法适用于本发明的抗体和抗原结

合部分。

[0276] 本发明的医药组合物典型地适用于胃肠外施用。如本文所用的,医药组合物的“胃肠外施用”包括以对个体的组织进行物理破坏并透过在组织中的破坏施用医药组合物为特征的任何施用途径,因此一般会导致直接施用至血流中、肌肉中或内部器官中。胃肠外施用因此包括(但不限于)通过以下方式施用医药组合物:透过注射来施用组合物、透过手术切口施用组合物、透过穿透组织的非手术伤口来施用组合物等等。特别是,胃肠外施用被认为包括(但不限于)皮下,腹膜内,肌肉内,胸骨内,静脉内,动脉内,鞘内,心室内,尿道内,颅内,肿瘤内和滑膜内注射或输液;以及肾透析输液技术。区域灌注也被认为包括在其中。特定的实施方案包括静脉内和皮下途径。

[0277] 适用于胃肠外施用的医药组合物的配制剂典型地包含与医药上可接受的载剂(诸如无菌水或无菌等渗盐水)组合的活性成分。该配制剂可以适用于推注施用(bolus administration)或连续施用的形式制备、包装或出售。可注射的配制剂可以单位剂型的方式制备、包装或出售,诸如安瓿或含有防腐剂的多剂量容器中。用于胃肠外施用的配制剂包括(但不限于)悬浮液、溶液、油性或水性媒剂中的乳剂、糊剂等等。该配制剂可进一步包含一或多种其他成分,包括(但不限于)悬浮、稳定或分散剂。在胃肠外施用的配制剂的一个实施方案中,活性成分以干燥(即粉末或颗粒)形式提供,以合适的媒剂(例如,无菌的无热原水)进行重建,之后胃肠外施用重建的组合物。胃肠外配制剂也包括可含有赋形剂(例如盐、碳水化合物和缓冲剂(优选pH3至9)的水溶液,但是对于某些应用,其可以更适合经配制为无菌非水溶液或为与合适的媒剂(例如,无菌的无热原水)结合使用的干燥形式。例示性的胃肠外施用形式包括溶液或在无菌水溶液中的悬浮液,例如丙二醇水溶液或右旋糖水溶液。若有需要,可适当缓冲该剂型。其他可用的胃肠外施用的配制剂包括包含呈微晶形式或在脂质粒制剂中的活性成分的配制剂。用于胃肠外施用的配制剂可经配制以立即及/或改变释放。改变释放配制剂包括延迟释放,持续释放,脉冲释放,控制释放,靶向释放和设计释放(programed release)。

[0278] 例如,在一方面中,可通过将抗LAG-3抗体、其抗原结合部分、双特异性结合分子或抗体组合物以所需的量并入适当溶剂,根据需要,以上面所列举的一或多种成分的组合,随后过滤灭菌来制备无菌可注射的溶液。一般而言,通过将活性化合物并入至含有碱性分散介质和来自以上所列举之所需的其他成分的无菌媒剂中来制备分散剂。在用于制备无菌可注射的溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分及任何其他所需的成分之粉末。通过(例如)使用诸如卵磷脂的包衣、通过在分散的情况下维持所需的粒度并通过使用表面活性剂,以维持溶液的适当的流动性。可通过在组合物中添加延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸盐和明胶)及/或通过使用改变释放的包衣(例如,缓释包衣),来延长可注射组合物的吸收。

[0279] 本发明的抗体也可以经鼻内施用或通过吸入的方式施用,典型地以干粉形式(单独、作为混合物或作为混合组分颗粒,例如与合适的医药上可接受的赋形剂混合),从干粉吸入器施用,干粉吸入器为来自加压容器、泵、喷洒器(spray)、雾化器(atomizer)(优选使用电流体动力学以产生细雾的雾化器)的气雾喷洒器或者喷雾器(nebuliser)(使用或不使用合适的推进剂),或作为滴鼻剂。

[0280] 加压容器,泵,喷洒器,雾化器或喷雾器一般含有本发明的抗体的溶液或悬浮液,

包含(例如)适用于活性成分分散、增溶或延长释放的试剂、作为溶剂的推进剂。

[0281] 在以干粉末或悬浮液配制剂使用之前,一般会使药物产品微粉化至适用于吸入递送的尺寸(典型地小于5微米)。这可通过任何合适的粉碎方法来达成,诸如螺旋喷射研磨、流化床喷射研磨、形成纳米颗粒的超临界流体处理、高压均质化或喷雾干燥。

[0282] 可经配制使得用于吸入器或吹入器的胶囊、药泡(blister)和药筒(cartridge)含有本发明的化合物、合适的粉末基质和性质修饰剂的粉末混合物。

[0283] 适用于电流体动力学以产生细雾的雾化器使用的溶液配制剂,可依致动(actuation)含有合适剂量的本发明的抗体,且致动体积可以例如从1 μ L到100 μ L变化。

[0284] 用于吸入/鼻内施用的配制剂可经配制为立即及/或改变释放的。改变释放配制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放和设计释放。

[0285] 在干粉末吸入器和气雾剂的情况下,以递送经仪表测量的量的阀来确定剂量单元。根据本发明的单元典型地被配置为施用本发明的抗体的经仪表测量的剂或“喷雾(puff)”。总每日剂量典型地将以单一剂量施用,或者更常地以整日分别的剂量施用。

[0286] 本发明的抗体和抗体部分也可经配制以用于口服途径施用。口服施用可能涉及吞咽,使得化合物进入胃肠道及/或含服、舌或舌下施用,藉此使化合物直接从口进入血流。

[0287] 适用于口服施用的配制剂包括固体、半固体和液体系统,诸如锭剂;含有多颗粒或纳米颗粒、液体或粉末的软或硬胶囊;糖锭(lozenge)(包括填充液);咀嚼物;凝胶;快速分散剂型;薄膜;珠剂(ovule);喷洒剂;以及含服/粘膜贴片。

[0288] 液体配制剂包括悬浮液、溶液、糖浆和酏剂。该配制剂可用作为软或硬胶囊(例如由明胶或羟丙基甲基纤维素制成)中的填充剂且典型地包含载剂(例如,水、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、甲基纤维素或合适的油)以及一或多种乳化剂及/或悬浮剂。液体配制剂也可通过固体(例如从小袋)的重建来制备。

[0289] 本发明的抗体和组合物的治疗用途

[0290] 在一方面中,本发明的抗LAG-3抗体和其抗原结合部分、抗LAG-3组合物及双特异性结合分子用于增强或活化有需要的人类的免疫系统。在一些实施方案中,患者为免疫抑制的。例如,内科医生可以通过单独或与其它治疗剂(依序或同时)组合施用本发明的抗LAG-3抗体来增强患者自身免疫系统的抗癌活性。LAG-3抗体调节免疫细胞中LAG-3的活性,使得抗癌免疫力增强。

[0291] 在某些实施方案中,该抗体或其抗原结合部分、组合物或双特异性结合分子用于癌症治疗,例如源自诸如以下组织的癌症:皮肤、肺、肠、结肠、卵巢、脑、前列腺、肾、软组织、造血系统、头和颈、肝、膀胱、乳房、胃、子宫和胰脏,以及依赖LAG-3活性的及/或其中患者表达或过表达LAG-3配体(例如,MHCII、LSECtin或两者)的任何癌症或其他病状。

[0292] 在一些实施方案中,通过本发明的抗LAG-3抗体、抗原结合部分、双特异性结合分子及/或抗体组合物所治疗的癌症可包括(例如)黑色素瘤(例如,晚期或转移性黑色素瘤)、非小细胞肺癌、头和颈鳞状细胞癌、肾细胞癌、何杰金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非何杰金氏淋巴瘤、神经胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、鳞状细胞肺癌、小细胞肺癌、肝细胞癌、膀胱癌、上泌尿道癌、食道癌、胃食道交界部癌、胃癌、肝癌、结肠癌、结直肠癌、多发性骨髓瘤、肉瘤、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征、鼻咽癌、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、小淋巴细胞性淋巴瘤、卵巢癌、胃肠癌,原发性腹

膜癌、输卵管癌,泌尿上皮癌、HTLV相关的T细胞白血病/淋巴瘤、前列腺癌、生殖泌尿癌、脑膜瘤、肾上腺皮质癌、神经胶质肉瘤、纤维肉瘤、肾癌、乳癌、胰脏癌、子宫内膜癌、皮肤基底细胞癌、阑尾癌、胆道癌、唾液腺癌、晚期梅克尔细胞癌(Merkel cell cancer)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、间皮瘤或实体瘤。癌症可以是(例如)早期、中期、晚期或转移期的。

[0293] 在一些实施方案中,通过本发明的抗LAG-3抗体、抗原结合部分、组合物及/或双特异性结合分子所治疗的癌症可包括(例如)血液恶性、神经胶质母细胞瘤(例如,复发的神经胶质母细胞瘤)、神经胶质肉瘤、非小细胞肺癌(例如,晚期的非小细胞肺癌)、结肠直肠癌和实体瘤。

[0294] 在一方面中,本发明的抗LAG-3抗体及其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子可用于治疗免疫介导的病症,诸如银屑病、系统性红斑狼疮、MLS(硬化症)、克罗恩氏病(Crohn's disease)、糖尿病及/或溃疡性结肠炎。

[0295] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体及其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子可用于治疗病毒及/或(例如)其中病原体抑制宿主免疫反应)的寄生性感染。例如,该病原体可以是(例如)HIV、肝炎(A、B或C)、人类乳头瘤病毒(HPV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、腺病毒、黄病毒、埃可病毒(echovirus)、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒(cornovirus)、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、痘病毒、人类T细胞亲淋巴性病毒(HTLV)、登革热病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、John Cunningham(JC)病毒、虫媒脑炎病毒、猿免疫缺陷病毒(SIV)、流感、疱疹、贾第虫属、疟疾,利什曼原虫属(Leishmania),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

[0296] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体及其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子可用于治疗免疫受损或处于免疫受损的风险的患者(例如,由于化学治疗或辐射疗法)。

[0297] 在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体及其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子可用于离体抗原特异性T细胞的活化和扩增。

[0298] “治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”指减轻或消除生物学病症及/或至少一种其伴随的症状的方法。如在此所用的,“减轻”疾病、病症或病状意指降低疾病、病症或病症的症状的严重性及/或发生频率。此外,本文所指的“治疗”包括治疗性的、减缓性的和预防性的治疗。

[0299] “治疗有效量”指将被施用治疗剂的量,其在一定程度上减轻待治疗的病症的一或多个症状。抗癌治疗剂的治疗有效量可(例如)导致肿瘤缩小、增加存活、消除癌细胞、减少疾病进展,逆转转移或医护专业人员所想要的其他临床终点。

[0300] 本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子可单独施用或与一或多种其他药物或抗体(或其任何组合)组合施用。因此,本发明的医药组合物、方法和用途也涵盖与其他活性剂组合(共同施用)的实施方案,如以下所详述。

[0301] 如在此所用的,术语“共同施用(co-administration)”、“共同施用(co-administered)”以及“与…组合”指本发明的抗LAG-3抗体及其抗原结合部分、抗体组合物和双特异性结合分子与一或多种其他治疗剂,意指且确实表示并包括以下内容:

[0302] a) 同时施用本发明的抗体/抗原结合部分/抗体组合物/双特异性结合分子与治疗剂的组合至需要治疗的患者,此时此类组分一起被配制至单一剂型,该单一剂型会实际上同时释放所述组分至所述患者,

[0303] b) 实际上同时施用本发明的抗体/抗原结合部分/抗体组合物/双特异性结合分子与治疗剂的此类组合至需要治疗的患者,此时此类组分被彼此分开配制至分离的剂型,此类剂型实际上同时被所述患者服用,因此所述组分实际上同时被释放至所述患者,

[0304] c) 依序施用本发明的抗体/抗原结合部分/抗体组合物/双特异性结合分子与治疗剂的此类组合至需要治疗的患者,此时此类组分被彼此分开配制至分离的剂型,此类剂型在连续时间被所述患者服用,每次施用之间有显著的时间间隔,因此所述组分在实际上不同的时间被释放至所述患者;以及

[0305] d) 依序施用本发明的抗体/抗原结合部分/抗体组合物/双特异性结合分子与治疗剂的此类组合至需要治疗的患者,此时此类组分一起被配制至单一剂型,该单一剂型以经控制的方式释放所述组分而使得它们同时地、连续地及/或在相同及/或不同时间下重迭地被释放至所述患者,其中每个部分可经由相同或不同的途径施用。

[0306] 本发明的抗LAG-3抗体及其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子可在没有其他治疗性处理的情况下施用,即作为独立疗法(stand-alone therapy)(单一疗法(monotherapy))。或者,以本发明的抗LAG-3抗体及其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子的治疗可包括至少一种其他的治疗性处理(组合疗法),例如,另一种免疫刺激剂、抗癌剂、抗病毒剂或疫苗(例如,肿瘤疫苗)。

[0307] 在一些实施方案中,该抗体或其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子可与另一种用于癌症治疗的药品/药物共同施用或配制。其他治疗性处理可包括(例如)化学治疗、抗肿瘤治疗或抗血管生成剂、不同的抗癌抗体及/或辐射疗法。

[0308] 通过组合本发明的抗体或其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子与已知会诱导癌细胞的末端分化的试剂,可进一步改善功效。该化合物可(例如)选自由以下组成的组:视黄酸、反式-视黄酸、顺式-视黄酸、苯基丁酸盐、神经生长因子、二甲亚砜、活化型维生素D3、过氧化物酶体增殖物(peroxisome proliferator)活化受体 γ 、12-O-十四酰基佛波醇13-乙酸酯、六亚甲基-双-乙酰胺、转化生长因子- β 、丁酸、环状AMP和维力司农(vesnarinone)。在一些实施方案中,该化合物选自由以下组成的组:视黄酸、苯基丁酸盐、全反式视黄酸和活化型维生素D。

[0309] 包含本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子和至少一种其他试剂(例如,化学治疗剂、抗肿瘤剂或抗血管生成剂)的药物可作为组合治疗,用于癌症疗法中的同时、分开或依序施用。其他试剂可为被探讨适合用于特定癌症治疗的任何试剂,例如,选自由以下组成的组的试剂:烷基化剂,例如铂衍生物(诸如顺铂、卡铂及/或奥沙利铂(oxaliplatin));植物生物碱,例如紫杉醇,多西他赛(docetaxel)及/或伊立替康(irinotecan);抗肿瘤抗生素,例如多柔比星(阿霉素(adriamycin))、柔红霉素、表柔比星(epirubicin)、伊达比星(idarubicin)米托蒽醌(mitoxantrone)、更生霉素(dactinomycin)、博莱霉素、放线菌素、藤黄霉素(luteomycin)及/或丝裂霉素;拓朴异构酶抑制剂,诸如托泊替康(topotecan);及/或抗代谢物,例如氟尿嘧啶及/或其他氟嘧啶。在一些实施方案中,其他试剂为达卡巴嗪(dacarbazine)或吉西他滨(gemcitabine)。

[0310] 本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子也可用于与其他抗癌疗法组合,诸如疫苗、细胞因子、酶抑制剂、免疫刺激化合物和T细胞疗法。在疫苗的情况下,其可为(例如)含有一或多种与待治疗的癌症相关的抗原的蛋白质、肽或DNA疫苗,或包含树突细胞以及抗原的疫苗。适合的细胞因子包括(例如)IL-2、IFN- γ 和GM-CSF。具有抗癌活性的酶抑制剂的类型的实例为吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂,例如1-甲基-D-色氨酸(1-D-MT)。过继T细胞疗法指涉及扩大或建立患者自身的T细胞以识别和攻击其肿瘤的各种免疫疗法的技术。

[0311] 也预期本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子可用于与酪氨酸激酶抑制剂相关的辅助疗法。这些为合成的(主要是喹唑啉衍生的)低分子量分子,其与受体的细胞内酪氨酸激酶域相互作用并通过竞争细胞内Mg-ATP结合位点来抑制配体诱导的受体磷酸化。

[0312] 在一些实施方案中,该抗体或其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子可用于与介导免疫系统活化的另一种药品/药物组合使用,包括(但不限于)调控以下者的表达或活性的试剂:A2AR、BTLA、B7-H3、B7-H4、CTLA-4、CD27、CD28、CD40、CD47、CD55、CD73、CD122、CD137、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2、CTLA-3、CEACAM(例如,CEACAM-1及/或CEACAM-5)、GAL9、GITR、HVEM、LY108、LAIR1、ICOS、IDO、KIR、LAIR1、PD-1/PD-L1/PD-L2、OX40、TIGIT、TIM-3、TGFR- β 、VISTA、LILRB2、CMTM6及/或2B4。在某些实施方案中,该试剂为结合上述分子之一的抗体或其抗原结合片段。也预期本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子可用于与以下者组合使用:细胞因子(例如,IL-1、IL-2、IL-12、IL-15或IL-21)、EGFR抑制剂、VEGF抑制剂等。

[0313] 在某些方面中,本发明的抗体及抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子可与LAG-3途径的另一种抑制剂组合来施用,该抑制剂可靶向LAG-3或者一或多种其配体。该抑制剂的实例包括其他抗LAG-3抗体、抗MHCII抗体、抗半乳凝素-3抗体和抗LSECtin抗体。在一些实施方案中,本发明的抗LAG-3抗体或其抗原结合部分、双特异性抗体或抗体组合物可与BMS-986016、GSK2831781、REGN3767、BAP050或BAP050-chi或LAG525组合来施用。

[0314] 可理解,本发明的抗体及其抗原结合部分、抗体组合物和双特异性结合分子可用于本文所述的治疗的方法、可用于本文所述的治疗的用途及/或可用于制造用于本文所述的治疗的药物。本发明亦提供试剂盒和制品,其包含本文所述的抗体及其抗原结合部分、抗体组合物和双特异性结合分子。

[0315] 施用的剂量和途径

[0316] 本发明的抗体或其抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子将以用于治疗所探讨的病状的有效量(即达成所欲结果需要的剂量和时间周期)来施用。治疗有效量可根据诸如以下的因素而改变:待治疗的特定病状、患者的年龄、性别和体重、以及抗体是否作为独立治疗施用或与一或多种其他的抗癌症治疗组合。

[0317] 可调整剂量方案以提供最佳的所欲的反应。例如,可以单次推注(single bolus)、可随着时间施用数个分别剂量或可依治疗情况的紧急程度成比例地减少或增加剂量。以易于施用和剂量的一致性的剂量单位形式来配制胃肠外的组合物是特别有利的。如在此所用的,剂量单位形式指适合作为用于待治疗患者/个体的单位剂量的物理上分离的单位;各单位含有预定量的活性化合物,其经计算以与所需的医药载剂产生所需的治疗效果。本发明

的单位剂量形式的详细说明一般由以下者规定且直接取决于以下者：(a) 化学治疗剂的独特性质和要达成的特定治疗或预防功效，以及 (b) 对于个体的治疗敏感性，配制活性化合物领域中固有的限制。

[0318] 因此，熟练技术人员会认同，基于本文的公开，可依据治疗领域中熟知的方法来调整剂量和给药方案。即，可很容易地确立最大耐受剂量，并且也可确定向患者提供可测得的治疗益处有效剂量的时间要求。因此，虽然在此例示某些剂量和施用方案，但是这些实例完全没有限制实施本发明时可提供患者的剂量和施用方案。

[0319] 需注意到，剂量值可随待缓解的病症的类型和严重程度而改变，且可包括单一或多个剂量。应进一步理解，对于任何特别个体，特定给药方案应随时根据个体需要和施用或督导组合物施用的人员的专业判断做调整，以及在此提供的剂量范围仅为例示性的且不意味着限制所体现组合物的范围和实施。再者，此发明组合物的给药方案可基于各种因素，包括疾病类型、患者的年龄、重量、性别、医疗状况、病况的严重程度、施用途径和所用的特定抗体。因此，虽然给药方案可大幅地变化，但可使用标准方法来常规地决定。例如，可基于药物动力学或药效学参数（其可包括临床功效，诸如毒性效应及/或实验室值）来调整剂量。因此，本发明包含如熟练技术人员可确定的患者内剂量递增。确定适合的剂量和方案是相关本领域中所熟知的，且会被理解为，一旦提供在此公开的教导，可由熟练技术人员所完成。

[0320] 预期本发明的抗体、抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子的合适剂量会在0.1-100mg/kg的范围，诸如约0.5-50mg/kg（例如，约1-20mg/kg）。例如，该抗体、抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子可用以下剂量施用：至少0.25mg/kg，例如至少0.5mg/kg、诸如至少1mg/kg、例如至少1.5mg/kg、诸如至少2mg/kg、例如至少3mg/kg、诸如至少4mg/kg、例如至少5mg/kg；以及例如至多50mg/kg，诸如至多30mg/kg、例如至多20mg/kg、诸如至多15mg/kg。通常在合适的时间间隔重复施用，例如每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次，并且只要负责的医生认为是合适的，其可视情况地根据需要来增加或减少剂量。

[0321] 用于肿瘤疗法的有效量可由其稳定疾病进展及/或改善患者症状的能力来测量，且优选为（例如）通过减少肿瘤大小逆转疾病进展。本发明的抗体、抗原结合部分、抗体组合物或双特异性结合分子的抑制癌症的能力可由以下方式来评估：（例如）实施例所述之体外分析，以及在可预测人类肿瘤的效应的合适动物模型中。将选择适合的给药方案，以提供在每一特定情况下的最佳治疗反应，例如，以单次推注或作为连续灌注施用，且依每一情况的紧急程度所示作可能的剂量调整。

[0322] 诊断用途和组合物

[0323] 本发明的抗体也可用于诊断方法（例如，体外、离体）。例如，该抗体可用于侦测及/或测量来自患者的样品（例如，组织样品，或体液样品，诸如发炎性分泌物、血液、血清、肠液、唾液或尿液）的LAG-3的水平。适合的侦测和测量方法包括免疫学方法，诸如流式细胞术、酶结合免疫吸附分析（ELISA）、化学发光分析、放射免疫分析以及免疫组织学。本发明进一步包括包含在此所述之抗体的试剂盒（例如，诊断试剂盒）。

[0324] 除非本文另有定义，否则所用的与本发明相关的科学和技术术语应具有本领域普通技术一般理解的意义。以下描述例示性的方法和材料，尽管与本文所述相似或相当的方

法和材料也可以用于实施或测试本发明。如有矛盾的情况,则以本说明书(包括定义)为准。

[0325] 一般而言,本文所述的与细胞和组织温育、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、分析化学、合成有机化学、药物和医药化学以及蛋白质与核酸化学和杂交有关的命名和技术为本领域中所熟知且常用者。酶反应和纯化技术根据制造商的说明书进行,如同本领域中通常完成者或如本文所述者。

[0326] 此外,除非本文另有要求,否则单数的术语应包括复数者且复数术语应包括单数者。在整个此说明书和实施方案中,用词“具有(have)”和“包含(comprise)”或诸如“具有(has)”、“具有(having)”、“包含(comprises)”或“包含(comprising)”的变化将被理解为,暗示包括所述的整体或者整体的组,但不排除任何其他整体或整体的组。

[0327] 在此提及的所有刊物和其他参考文件以其全部内容作为参考文献的方式并入本文。虽然本文引用的许多文件,此引用并非承认这些文件形成本领域的通常知识的一部分。

[0328] 为了更佳理解本发明,提供以下实施例。这些实施例仅用于说明之目的,而不应被视为以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0329] 实施例1:抗LAG-3抗体组库(antibody repertoire)的产生和筛选

[0330] 通过以LAG-3细胞外域(ECD)或LAG-3ECD Fc融合蛋白进行的免疫来产生两种抗LAG-3抗体组库。使用Symplex™抗体发现技术(Osborn等人,J Immunol.190(4):1481-90(2013);Meijer等人,J Mol Biol.358(3):764-72(2006)),从免疫化的OmniRat®大鼠的单细胞经分类的B细胞来制备一种抗体库(antibody library)。来自此抗体组库的表达构建体(construct)编码IgG₁形式的完全人免疫球蛋白,其带有已知会降低IgG₁抗体的Fc区的效应器功能的两个突变(L234A/L235A)(Hezareh等人,J Virol.75(24):12161-8(2001))。使用源自免疫的野生型鸡(原鸡,Gallus gallus)的淋巴样器官的单细胞经分类的B细胞构建第二抗体组库。

[0331] 使用在384孔式中的293fectin™转染试剂(Invitrogen,目录编号12347-019),将来自两种抗LAG-3组库的克隆的抗体分别地转染且在HEK293细胞中表达,并在转染后第6天收集含有抗体的上清液。

[0332] 关于基于细胞的抗体筛选,使用FreeStyle™ MAX试剂(Invitrogen,目录编号16447-100)在384孔式中转染CHO-S细胞,以表达GPI锚定的人类LAG-3,并且使用经不相关的、GPI锚定的对照蛋白转染的细胞作为阴性对照。为了允许多重筛选设置,使用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)来标记对照细胞,并将其与未标记的经LAG-3转染的细胞以1:1的比例和 1×10^6 个细胞/mL的密度混合。在384孔板中,将40μL的此细胞混合物与10μL的含有抗体的上清液混合,并通过添加山羊抗人类IgG(H+L)AF647二级抗体(Molecular Probes,目录编号A21445)来显示与细胞结合的抗体。并行地,以相似的设置,针对与食蟹猴LAG-3的结合来筛选抗体。使用高通量流式细胞术(iQue® Screener, Intellicyt)来获得样品,并使用ForeCyt®软件通过绘制CFSE与人类IgG结合(AF647)来分析数据。LAG-3特异性主要命中(hit)鉴定为结合人类和食蟹猴两者的LAG-3-转染的细胞(CSFE阴性)但不结合对照细胞(CFSE阳性)的抗体克隆,并收集板编号和板坐标以供命中挑选和随后序列分析。

[0333] 于以下序列表的章节中,提供六种源自OmniRat®的功能性的抗LAG-3抗体(15646、15532、15723、15595、15431和15572)的重和轻链可变区的DNA和蛋白质序列与一种源自鸡的功能性的抗LAG-3抗体(15011;参见实施例2)。表8和9中提供可变和恒定区DNA和蛋白质序列的SEQ ID编号的总览。CDR的SEQ ID编号可见于表9。根据CDR1和CDR2的IMGT®的定义来决定CDR序列。对于重和轻链CDR3,本文的定义包括一个额外的IMGT-CDR3上游的氨基酸残基(Cys)和一个额外的下游氨基酸残基(对于H-CDR3为Trp,对于L-CDR3为Phe)。表10中显示了六种源自OmniRat®的抗体的种系基因的使用。

[0334] 实施例2:源自鸡的抗LAG-3抗体的人源化

[0335] 进行源自鸡的抗LAG-3抗体的框架区的人源化,以产生当施用至人类时具有最小免疫原性,同时基本上保留了亲代鸡抗体的特异性和亲和力的抗体分子。

[0336] 使用“CDR移植”方式(最初由Jones等人所描述的方法(Nature321(6069):522-5(1986))来进行源自鸡的抗体的人源化。首先,针对人类IgG数据库进行抗体的可变重链(VH)和可变轻链(VL)区域的序列比对,以找出最接近的人类种系基因。这鉴定出IGHV3-23*01(M99660)和人类IGLV3-19*01(X56178)基因,分别为最接近鸡的VH和VL基因者。同样地,对于J-基因区域人源化所选的人类氨基酸序列源自分别针对VH和VL的IGHJ1*01(J00256)和IGLJ6*01(M18338)。随后将该抗体VH和VL基因与鸡免疫球蛋白种系基因比对,以鉴定在抗体功能及/或结构中扮演的角色的框架区中的体细胞突变。最后,考虑以已知在抗体结构、稳定性和功能上扮演重要角色的某些氨基酸位置(所谓的“光标残基(Vernier residue)” (Nishibori等人,Mol Immunol.43(6):634-42(2006)),用于产生替代的人源化抗体变体,该变体包括来自对应种系的人类或鸡的残基。

[0337] 通过计算机仿真(in silico)来进行鸡之CDR和人类框架区的组装,并从Genscript Inc.订购编码人源化VH和VL的合成基因。在带有人类抗体轻链和重链的恒定区的表达载体(质粒)中克隆VH和VL基因。具体言之,将VL加入人类λ恒定IGLC1*01(J00252)。为了增加λ链上游信号肽的正确切割,将λ基因IGLV3.19的第二个氨基酸(Ser)替换为存在于其他人类种系(例如IGLV3.25)的另一氨基酸(Tyr)。

[0338] 此实施例所述产生的抗体克隆的代表性流式细胞术点图显示于图1A-C:(A)与人类LAG-3转染的细胞特异性结合的抗体克隆,(B)非特异性地结合CHO-S细胞的抗体克隆,(C)不与任何筛选中使用的细胞群结合的抗体克隆。

[0339] 实施例3:抗LAG-3参考抗体类似物的克隆

[0340] 分别从美国专利申请公开号2014/0093511(SEQ ID NO:12和14)以及PCT专利申请公开号W0 2015/138920 A1(SEQ ID NO:6和16)获得编码25F7-Lag3.5和BAP050的抗体类似物的重和轻链可变域的氨基酸序列。以人类密码子选择将蛋白质序列反翻译为DNA序列。然后合成对应的DNA序列并将其克隆至包含人类IgG₄重链或κ轻链恒定域的编码序列的表达载体,以表达全长抗体。为了防止Fab臂交换,以脯氨酸来取代在位置228的丝氨酸残基(Angal等人,Mol Immunol.30:105-108(1993))。使用标准蛋白质表达系统,以所产生的表达质粒来转染CHO细胞。使用标准蛋白A纯化柱层析来纯化对应的抗体上清液。

[0341] 实施例4:在SEB+PBMC分析中筛选LAG-3特异性mAb的群组

[0342] 使用来自单一供体的PBMC,来评估大群组的LAG-3特异性mAb刺激经葡萄球菌肠毒

素B(SEB)处理的外周血单个核细胞(PBMC)的IL-2分泌的能力。SEB为超级抗原,其结合II类MHC分子和T细胞受体(TCR)的特定V β 区域并驱使T细胞的非特异性刺激。这导致多克隆T细胞活化/增殖及细胞因子(包括IL-2)的释放。将来自健康供体的血沉棕黄层分离的人类PBMC接种至384孔板中,并且使其保留为未经处理的或用10ng/mL SEB和10 μ g/mL的抗体处理。在潮湿的培养箱中于37°C下温育48小时后,移出上清液并使用IL-2ELISA试剂盒(Life Technologies)来分析IL-2水平。

[0343] 从图2可发现,在以抗LAG-3mAb抗体组库或25F7-Lag3.5类似物处理后IL-2分泌增加。显然地,以不同的抗LAG-3mAb处理后的IL-2水平有大幅的变化,显示虽然抗体组库中的一些抗体在此分析中没有功能性,但其他抗体诱使IL-2分泌至与25F7-Lag3.5类似物相似的水平。

[0344] 实施例5:结合细胞表达的人类或食蟹猴LAG-3之抗体

[0345] 为了通过流式细胞术来测定抗体结合的EC50值,使用FreeStyle™ MAX试剂(Invitrogen,目录编号16447-100)将CHO-S细胞瞬时转染以表达人类或食蟹猴LAG-3。在染色缓冲液(PBS;2%FBS;NaN₃)中从10至0.05 μ g/mL浓度以3倍稀释滴定抗体且将其与人类或食蟹猴LAG-3转染的细胞混合并温育。在染色缓冲液中洗涤两次后,通过添加山羊抗人类IgG(H+L)AF647二级抗体(Molecular Probes,目录编号A21445)来显示细胞结合的抗体。使用高通量流式细胞术(iQue® Screener, Intellicyt)来获得样品并通过使用ForeCyt®软件绘制AF647的抗体浓度对平均荧光强度来分析数据。使用ForeCyt®中的“剂量反应图”功能来计算EC50值。

[0346] 通过滴定测量的抗体结合特性的概述可见于以下表1,其中huLAG-3和cyLAG-3分别为人类和食蟹猴LAG-3转染的细胞。如表1所示,抗体15646、15532、15723、15595、15431和15572结合人类和食蟹猴LAG-3两者。

[0347] 表1. 抗体特性总览

抗体	来源	FACS-huLAG-3的 EC50 (nM)	FACS-cyLAG-3的 EC50 (nM)
15646	OmniRat®	0.10	0.11
15532	OmniRat®	0.07	0.05
[0348] 15723	OmniRat®	0.09	0.26
15595	OmniRat®	0.05	0.03
15431	OmniRat®		0.04
15572	OmniRat®	0.07	0.06
15011	鸡	NA	NA

[0349] 实施例6:抗LAG-3抗体的MHCII阻断活性的流式细胞术分析

[0350] 此实施例说明,如何通过使用表面MHCII阳性A375细胞和荧光染料标记的可溶性LAG-3进行流式细胞术竞争分析,来测试抗LAG-3抗体的主要组织相容性复合物II(major histocompatibility complex II, MHCII)的阻断活性。

[0351] 在使用人类黑素瘤细胞系A375 (ATCC[®] CRL-1619[™]) 的基于细胞的分析中探讨MHCII阻断活性。R-PE-标记的人类LAG-3-Fc嵌合蛋白可特异性地结合A375上的表面表达的MHCII,使得此相互作用可通过流式细胞术来定量。使用Lightning-Link[®]R-藻红蛋白缀合试剂盒 (Innova Biosciences, UK) 将市售的重组人类LAG-3-Fc嵌合蛋白 (R&D Systems, USA) 与R-PE缀合。使用无酶细胞溶解缓冲液 (Gibco[™]) 将A375细胞收集、洗涤并在使其在冷的染色缓冲液 (PBS, 2% FBS, NaN₃) 中再悬浮。将待测试的抗LAG-3抗体装载于96孔式盘并在50 μ L染色缓冲液中将其调至20 μ g/mL。每个孔加入1 μ L的LAG-3-Fc-PE (对应于约0.17 μ g的LAG-3-Fc)、混合并将板在4 $^{\circ}$ C下温育30分钟,以使得LAG-3-抗体复合物形成。在温育期间,将1 \times 10⁵个A375细胞 (于100 μ L染色缓冲液中) 置于96孔式盘,通过离心使其沉淀,并使细胞沉淀物重新悬浮于预温育的LAG-3/抗体混合物中。将细胞在4 $^{\circ}$ C下再温育20分钟,在200 μ L冷的染色缓冲液中洗涤1次,并使其于100 μ L染色缓冲液中重新悬浮以利收集。

[0352] 在七种经测试的抗LAG-3抗体中 (在20 μ g/mL下),有四种 (15532、15595、15431和15011) 诱使结合MHCII (MFI) 的LAG-3相较于阴性对照抗体存在下结合减少约90%,因此认为是相互作用的有效阻断剂。剩余的三种抗体 (15646、15723和15572) 对于LAG-3-MHCII的结合仅具有有限的影响且可被视为差的阻断剂。参考抗体25F7-Lag3.5类似物显示中等的阻断活性。结果概括于表2中。

[0353] 表2. 在抗LAG-3抗体存在下对LAG-3结合A375上的MHCII的阻断

抗体	LAG-3/MHCII阻断 (%) *
15646	49
15532	89
15723	55
15595	94
15431	92
15572	37
15011	92
25F7-Lag3.5类似物	77

[0355] *相对于在阴性对照抗体存在下的LAG-3结合标准化的中间值

[0356] 实施例7: 在SEB+PBMC分析中抗LAG-3单克隆抗体的功效

[0357] 评估七种抗LAG-3mAb刺激经葡萄球菌肠毒素B (SEB) 处理的外周血单个核细胞 (PBMC) 的IL-2分泌的能力。此实施例描述在数个PBMC供体中的七种抗LAG-3mAb的功效。此外,描述了来自其他序列簇 (cluster) 的四种抗LAG-3mAb的功效。序列簇编号显示在该抗体编号后的括号中且在实施例13中进一步描述。如实施例4所述,在SEB+PBMC分析中于10或12.5 μ g/ml下测试抗LAG-3抗体。

[0358] 图3显示在以抗LAG-3mAb 15431、15532、15572、15595、15646、15723和15011或25F7-Lag3.5类似物处理后IL-2分泌增加。每个点表示来自单一PBMC供体的IL-2分泌的水平。显然,在以抗LAG-3mAb处理后的IL-2水平在不同的PBMC供体之间有所不同,但全部七种抗LAG-3mAb刺激IL-2的产生至相似的水平。这与抗LAG-3mAb 15445、15429和15491 (其未增加IL-2的产生) 形成对比。

[0359] 实施例8:在基于细胞的LAG-3-第II类MHC阻断分析中抗LAG-3单克隆抗体的功效

[0360] 为了进一步表征该七种抗LAG-3mAb,在基于细胞的分析中测试其阻断LAG-3-第II类MHC相互作用的能力。

[0361] 以表达II类MHC的Raji细胞系、50ng/mL葡萄球菌肠毒素D (SED) 和如图4所示的不同浓度的单克隆抗体来温育带有NFAT-RE-控制的萤光素酶基因且表达修饰的TCR和LAG-3 (Promega)的Jurkat细胞。在37°C潮湿的培养箱中6小时后,加入萤光素酶底物(Promega)并测量发光。发光为萤光素酶表达的测量,其受TCR信号传导所控制且受LAG-3信号传导所抑制。因此,较少的LAG-3信号传导(例如,通过阻断LAG-3-MHCII相互作用)会使得发光增加。

[0362] 图4显示在以抗LAG-3mAb 15431、15532、15572、15595、15646、1572和15011或25F7-Lag3.5类似物处理后的发光增加。发现所有测试的抗体都增加发光至相似的水平。

[0363] 实施例9:抗LAG-3单克隆抗体对细胞的LAG-3水平的功效

[0364] 为了进一步表征所选择的抗LAG-3mAb,测试其在过表达LAG-3的T-细胞系中下调LAG-3水平的能力。

[0365] 以25mg/mL的如图5所示的单克隆抗体来温育表达修饰的TCR和LAG-3 (Promega)的Jurkat细胞。在37°C潮湿的培养箱中24小时后,收集上清液并使细胞溶解。以抗LAG-3检测抗体(Novus Biologicals)和simple Western技术(Sally Sue,Proteinsimple)来评估细胞中LAG-3的水平。使用抗LAG-3ELISA(R&D Systems)来评估上清液中LAG-3的水平。结合竞争研究确认了,所测试的抗LAG-3抗体不会与ELISA检测抗体竞争对可溶性LAG-3的结合。使用单因子(one-way)ANOVA来进行统计分析,伴随校正以进行多重比较,然后进行Bonferroni校正的事后比较t检验(post hoc t-test)。

[0366] 图5显示在以抗LAG-3mAb15431、15532、15011、25F7-Lag3.5类似物或BAP050类似物处理后细胞的和可溶性LAG-3的水平。15532、15011、25F7-Lag3.5类似物和BAP050类似物降低细胞以及可溶性LAG-3的水平。15532统计学显著地降低细胞的LAG-3水平至相较于25F7-Lag3.5类似物较低的水平,且统计学显著地降低可溶性LAG-3水平至相较于25F7-Lag3.5类似物和BAP050类似物较低的水平。15431没有降低细胞的或可溶性LAG-3水平。

[0367] 实施例10:在两种同系鼠肿瘤模型中的抗体15011的体内功效

[0368] 此实施例证实了在两种同系鼠肿瘤模型中的抗体15011的体内功效。

[0369] 方法

[0370] 将 2×10^5 Sa1N(纤维肉瘤)和 5×10^6 ASB-XIV(肺癌)细胞皮下接种至6-8周龄雌性A/J(Sa1N)或BALB/cAnNRj(ASB-XIV)小鼠的体侧中。通过卡尺以二维方式每周测量肿瘤三次,并且根据以下公式计算以 mm^3 计的肿瘤体积:(宽度) $^2 \times$ 长度 $\times 0.5$ 。在接种后第5-7天,平均肿瘤大小为30-50 mm^3 ,将小鼠随机分为两组,每组十只动物,并开始治疗。通过腹膜内注射媒介剂缓冲液或单克隆抗体15011,每周治疗小鼠三次,共六次治疗,随后进入观察期。抗体治疗施用剂量为10mg/kg。应用Bonferroni多重比较测试的双因子(two-way)ANOVA,来比较治疗组之间在各时间点的肿瘤体积。使用GraphPad Prism 5.0版(GraphPad Software, Inc.)来进行统计分析。

[0371] 结果

[0372] 结果显示,在测试的同系肿瘤模型中抗体15011的显著的肿瘤抑制功效(* $P < 0.001$) (图6)。15011诱使50%的植入Sa1N肿瘤的小鼠的肿瘤生长退化并导致在ASB-XIV同

系肿瘤模型中肿瘤生长延迟。

[0373] 实施例11:在人类PBMC重建并植入人类黑色素瘤A375细胞的NOG小鼠中的抗体15532的体内功效

[0374] 此实施例证实了在半人源化异种移植肿瘤模型中的抗体15532的体内功效,其中以人类PBMC重建NOG小鼠的免疫系统并且对小鼠植入人类黑色素瘤A375细胞。

[0375] 方法

[0376] 在研究第0天,将 $2-4.5 \times 10^6$ A375黑色素瘤细胞皮下注射至NOG小鼠,并在研究第2天经由腹膜内的方式使其接受9或 12×10^6 PBMC。在每一实验中使用来自一种供体的PBMC。在PBMC接种的那天开始治疗,并通过腹膜内注射媒剂缓冲液或单克隆抗体15532 (10mg/kg),每周治疗小鼠三次,共六次或九次治疗,随后进入观察期。通过卡尺以二维方式每周测量肿瘤三次,并且根据以下公式计算以 mm^3 计的肿瘤体积: $(\text{宽度})^2 \times \text{长度} \times 0.5$ 。应用Bonferroni多重比较测试的双因子ANOVA,来比较治疗组之间在每个时间点的肿瘤体积。使用GraphPad Prism 5.0版(GraphPad Software, Inc.)来进行统计学分析。

[0377] 结果

[0378] 图7显示使用对于抗LAG-3治疗有反应的两种不同的人类PBMC供体的两个实验的结果。以15532治疗导致相较于媒剂治疗组的显著肿瘤生长延迟 [$P < 0.05$ (供体1) 及 $P < 0.001$ (供体2)]。

[0379] 实施例12:抗LAG-3单克隆抗体对于人类、食蟹猴和小鼠LAG-3的亲合力的测量

[0380] 此实施例以表面等离子体共振 (SPR) 来测量证实了抗LAG-3抗体对于人类、食蟹猴和小鼠LAG-3胞外域的结合。人类LAG-3的蛋白质序列可从UniProt登录号P18627 (SEQ ID NO:68) 获得。食蟹猴LAG-3的蛋白质序列可从NCBI登录号XP_005570011.1 (SEQ ID NO:69) 获得。小鼠LAG-3的蛋白质序列可从UniProt登录号Q61790 (SEQ ID NO:72) 获得。

[0381] 材料和方法

[0382] 使用与IBIS MX96SPR仪器 (IBIS Technologies, 荷兰) 组合的连续流微点样器 (Continuous Flow Microspotter) (CFM, Wasatch Microfluidics, 盐湖城, US), 通过表面等离子体共振 (SPR) 进行动力学结合分析。

[0383] 使用由Genovis (瑞典) 提供的试剂盒, 通过GingisKHAN酶消化IgG₁抗体来产生抗LAG-3Fab抗体。

[0384] 合成编码人类和食蟹猴LAG-3的细胞外域的LAG-3cDNA, 且将其各者克隆至含有CMV启动子和人类IgG₁Fc序列 (AA P101-K330) 的载体, 使得IgG₁Fc C端融合至克隆的LAG-3ECD。通过标准PCR和工程技术产生LAG-3Fc融合构建体, 并使用ExpiCHO™表达系统在2mL培养物中瞬时表达蛋白质。在9天后收集人类LAG-3Fc融合构建体, 通过SPR测试上清液对于LAG-3Fab抗体的结合亲和力。使用标准程序来纯化抗原, 并使用连续流微点样器 (CFM, Wasatch Microfluidics, 盐湖城, US) 将其捕获至G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, 荷兰) 上15分钟。在点样后, 将SensEye®置于IBIS MX96生物传感器中并阻断剩余的捕获位点。通过应用所谓的动力学滴定系列 (Karlsson R. 2006) 进行动力学分析, 其中以1nM至1000nM的递增浓度来注射本发明抗体的单体Fab片段, 在每次Fab注射后不应用表面再生步骤。进行Fab结合15分钟并进行抗原解离15分钟。将所记录的结合反应拟合至简单Langmuir 1:1结合模型, 以Scrubber 2软件计算结合速率 (kon或ka)、解离速率 (koff或kd) 和亲和力

(K_p) 常数。

[0385] 结果

[0386] 亲和力测量的结果证实,评估的抗体15532、15431、15572、15011和参考抗体类似物25F7-Lag3.5以不同的亲和力结合人类和食蟹猴LAG-3。15011是唯一与小鼠LAG-3有交叉反应性的抗体。详细的结合动力学列于以下表3中。

[0387] 表3.以SPR测量的抗LAG-3Fab片段对于人类、食蟹猴和小鼠LAG-3ECD的结合动力学

抗体	LAG-3 ECD	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (M)
15532	人类	1.1E+05	6.5E-04	5.8E-09
15532	食蟹猴	7.1E+04	4.8E-03	6.8E-08
15532	小鼠	N.B.	N.B.	N.B.
15431	人类	6.6E+04	2.0E-03	3.0E-08
15431	食蟹猴	5.9E+04	6.8E-03	1.2E-07
15431	小鼠	N.B.	N.B.	N.B.
[0388] 15572	人类	1.1E+05	3.0E-03	2.7E-08
15572	食蟹猴	4.0E+04	4.0E-03	1.0E-07
15572	小鼠	N.B.	N.B.	N.B.
15011	人类	1.1E+05	4.8E-04	4.3E-09
15011	食蟹猴	7.0E+04	2.5E-03	3.5E-08
15011	小鼠	7.2E+04	2.3E-03	3.3E-08
25F7-Lag3.5	人类	1.4E+05	1.2E-03	8.5E-09
[0389] 25F7-Lag3.5	食蟹猴	4.2E+03	3.8E-03	9.1E-07
25F7-Lag3.5	小鼠	N.B.	N.B.	N.B.

[0390] *NB: 未结合

[0391] 实施例13:抗LAG-3抗体的表位分仓 (binning)

[0392] 此实施例说明,如何基于夹层分析 (sandwich assay) 中的配对竞争模式将抗LAG-3抗体分组至表位仓 (epitope bin)。属于不同表位仓的抗体辨识在LAG-3ECD上的不同表位。

[0393] 材料和方法

[0394] 使用与IBIS MX96SPR仪器 (IBIS Technologies, 荷兰) 组合的连续流微点样器

(CFM) (Wasatch Microfluidics, US), 通过表面等离子体共振 (SPR) 分析来进行配对抗体竞争的探讨。在山羊抗人类-IgG Fc **SensEye**[®] SPR传感器 (Ssens BV, 荷兰) 上进行表面等离子体共振影像分析。将总共十三种抗LAG-3抗体 (包括参考抗体25F7-Lag3.5) 在含有0.05% Tween 20、pH 7的PBS缓冲液 (PBS-T) 中稀释至7.5 μ g/mL。使用连续流微点样器, 通过点样将抗体捕获至抗Fc传感器表面15分钟。点样后, 将**SensEye**[®] 置于IBIS MX96生物传感器中, 并通过注射30 μ g/mL非特异性人类IgG₁来阻断剩余的抗Fc位点。使用FixIt试剂盒 (Ssens BV, 荷兰) 将捕获的抗体与表面缀合。在传感器制备后, 当注射至传感器上时, 使用固定化的抗体 (配体) 来捕获溶液中的单价LAG-3抗原 (50nM, Acro Biosystems, 中国)。接着, 将LAG-3抗体群组 (于PBS-T缓冲液中稀释至15 μ g/mL) 作为分析物逐一注射至传感器上并测试对于夹层分析中捕获的LAG-3的结合, 以确立抗体竞争模式。在每次抗体注射后, 以100mM的pH 3.0的H₃PO₄缓冲液使传感器表面再生。

[0395] 结果

[0396] 图8呈现十三种抗LAG-3抗体的竞争模式。抗体根据其ID编号命名而簇群列于括号中。预期来自相同簇群的mAb可结合相同的表位仓, 因为来自相同簇群成员的蛋白质序列是高度相关的且仅在少数位置上有差异。

[0397] 成功地将所有抗体进行表位分组; 然而, 抗体15595 (52)、15613 (33) 和15431 (38) 于用作为配体时没有作用, 而只能作为分析物进行测试。将抗体15646 (15) 和15011 (94) 仅作为配体来测试。

[0398] 竞争分析指出, LAG-3抗体群组涵盖6个主要的表位仓 (图8)。抗体15011 (94) 结合独特的表位, 该表位没有被该群组中的任何其他抗体交叉阻断, 而因此将此抗体分配为表位仓1。表位仓2含有七种抗体, 此类抗体与一些来自该群组中的其他mAb交叉竞争, 且这些抗体进一步分成亚群组。当作为配体或分析物测试时, mAb 15584 (54) 的特征在于交叉阻断15532 (17) 和15595 (52) 两者, 但作为分析物测试时, 其没有被参考mAb 25F7-Lag3.5阻断。mAb 15613 (33) 仅作为分析物测试且显示被15723 (39)、15532 (17) 和15646 (15) 阻断, 但没有被25F7-Lag3.5阻断。因此, 虽然15532 (17) 结合与25F7-Lag3.5重叠的表位, 但由于与15584 (84) 和15613 (33) 竞争的差异, 15532 (17) 的表位与25F7-Lag3.5的表位不同, 且因此将这些抗体分配为不同的亚组。同样地, 基于与表位仓2中其他抗体的竞争模式, 将表位仓2中的其他mAb分配为亚组 (图8)。

[0399] 发现mAb 15572 (91) 只会与mAb 15584 (54) 交叉竞争而将其分配为分开的表位仓3。同样地, 将mAb 15431 (83) 分配为分开的表位仓4, 因为此抗体只与mAb 15723 (39) 交叉竞争。最后, 鉴定含有非功能性活性的抗体的两个分开的表位仓。表位仓5含有交叉阻断的抗体15445 (70) 和15491 (84), 而表位仓6含有mAb 15429 (72), 其没有交叉阻断该群组中的任何抗体。表位仓5抗体亦阻断当作为分析物测试时的表位仓2的抗体25F7-Lag3.5、15532 (17) 和15723 (39) (图8)。图9显示配体抗体的竞争模式的概述, 其中基于使用欧几里德距离的簇群来显示mAb的表位相关性。从簇图可观察到, 在高于零点的x轴值处具有分支点的抗体相较于测试的LAG-3群组中其他抗体具有不同的表位。该簇分析不包含mAb 15595 (52)、15613 (33) 和15431 (38), 因为其作为配体没有作用。

[0400] 实施例14: 通过LAG-3诱变来进行LAG-3抗体的表位定位 (mapping)

[0401] 一般可将抗体表位表征为线性表位(也称作连续表位)或构象表位(也称作不连续表位)。虽然线性表位基于单一连续的氨基酸序列来界定,但构象表位可由许多较小的不连续线性序列或单一完整残基组成。聚簇于抗体和抗原之间的分子间蛋白质界面的接触残基的集合也称作热点(Moreira等人,Proteins68(4):803-12(2007))。现已广泛地认知到,大部分的B细胞表位在本质上是不连续的(Sivalingam和Shepherd,Mol Immunol.51(3-4):304-92012(2012),Kringelum等人,Mol Immunol.53(1-2):24-34(2013)),有跨15-22个氨基酸残基的平均表位,其中2-5个氨基酸促成大部分的结合(Sivalingam和Shepherd,同上述)。

[0402] 通过将108种不同LAG-3突变体的结合亲和力分级,此实施例说明,如何将抗LAG-3抗体15532、15431、15572和15011的结合表位分成线性表位和热点,其与由参考抗体25F7-Lag3.5类似物识别的表位有区别。

[0403] 方法

[0404] 人类LAG-3受体(CD223)为525个氨基酸(AA)的跨膜蛋白,其包含427个氨基酸的胞外域(ECD)(残基23-450)、接着有跨膜域(残基451-471)和细胞质域(残基472-525)。LAG-3ECD含有4个免疫球蛋白域(D1-D4),其中第一域(IgV型域)涉及配体结合(MHCII结合),而其余三个域为IgC2型域。单以前两个N端域(D1-D2)足以用于配体结合,且已显示D2对于正确的受体呈现是必需的(Huard等人,Proc Natl Acad Sci USA94:5744-5749(1997),Andrews等人,Immunol Rev.276(1):80-96(2017))。域1含有额外的30个氨基酸的独特延伸(额外环(loop)),其不存在于其他IgV域中,且已显示其对于配体结合是必要的。氨基酸(AA)99、110、125、131和137也经鉴定为对于配体结合是重要的(成熟蛋白质中的Y77、R88、R103、D109、R115)(Huard等人,同上述;Andrews等人,同上述)。没有关于LAG-3的公开的结构。然而,已鉴定了LAG-3和CD4之间的序列和演化同源性,因此使得LAG-3上的结构信息可基于CD4同源性建模获得(Huard等,同上;Andrews等人,同上述)。

[0405] 从UniProt或NCBI下载人类LAG-3和直系同源物的蛋白质序列:人类(P18627;SEQ ID NO:68)、食蟹猴(Macaca fascicularis,XP_005570011.1;SEQ ID NO:69)、大鼠(Rattus norvegicus,Q5BK54;SEQ ID NO:70)和犬(Canis Lupus Familiaris,F1P7Z3;SEQ ID NO:71)。以下表4显示不同LAG-3细胞外域的氨基酸序列的序列一致性。

[0406] 表4. 来自不同物种的LAG-3的细胞外域与人类LAG-3的氨基酸差异和序列一致性的列表

[0407]		氨基酸差异	% 序列一致性
	食蟹猴 LAG-3 ECD	34	92.1
[0408]	大鼠 LAG-3 ECD	140	67.3
	犬 LAG-3 ECD	197	54.1

[0409] 为了将在天然人类LAG-3结构背景中的线性表位定位,设计35种嵌合蛋白,其中将人类LAG-3ECD序列中的10个氨基酸依序交换为与5个氨基酸重迭的片段中的大鼠序列,并且在特别感兴趣的区域(例如,关键的AA插入序列和环延伸)中补充犬和食蟹猴的版本。在

跨氨基酸23-170的人类LAG-3的结构域1中进行序列交换。从基于CD4结晶结构的建构同源性模型(1WIO、1WIQ)和氨基酸序列比对,鉴定表面暴露的氨基酸,并设计80个在人类LAG-3域1上的个别的取代。引入的点突变主要为丙氨酸取代。当表面暴露的残基为丙氨酸时,改变此位置为丝氨酸。

[0410] 基因合成编码人类LAG-3细胞外域(AA 1-266)的域1和2的LAG-3cDNA,并将其克隆至含有CMV启动子和人类IgG₁Fc序列(AA P101-K330)的载体,以使LAG域1-2Fc融合蛋白进行表达。通过标准PCR和工程技术来产生突变的人类LAG-3Fc融合构建体,并使用ExpiCHO™表达系统在2ml培养物中瞬时表达蛋白质。收集人类LAG-3Fc融合构建体、将其纯化并通过表面等离子体共振(SPR)来测试对于抗LAG-3mAb的结合亲和力。使用连续流微点样器(CFM, Wasatch Microfluidics,盐湖城,US),将LAG-3融合蛋白固定至G-a-hu-IgG Fc SensEye®(Ssens BV,荷兰)上15分钟。在点样后,将SensEye®置于IBIS MX96生物传感器中并评估捕获的蛋白质的结合亲和力。应用所谓的动力学滴定系列(Karlsson R.2006)进行动力学分析,其中以0.4nM至300nM的递增浓度来注射本发明抗体的单体Fab片段,在每次Fab注射后不应用表面再生步骤。进行Fab结合15分钟并进行抗原解离15分钟。将所记录的结合反应拟合至简单Langmuir 1:1结合模型,以Scrubber 2软件计算结合速率(kon或ka)、解离速率(koff或kd)和亲和力(K_p)常数。

[0411] 结果

[0412] 就改变的对LAG-3突变构建体的结合而言,评估抗LAG-3抗体15532、15431、15572、15011和参考抗体25F7-Lag3.5类似物的Fab片段的结合亲和力。将结合突变的LAG-3构建体的Fab片段的结合亲和力以KD突变体/KD野生型之间的比例(标准化的结合亲和力)来表示。以下表5和6分别显示对所有测试的嵌合蛋白及用于丙氨酸扫描实验的标准化的结合亲和力。以至少5倍亲和力降低的截留(cutoff)作为准则,以用于侦测对于突变的LAG-3构建体显著降低的结合亲和力。在一些情况下,没有侦测到对特定抗体的结合。将这些构建体列为未结合(N.B.)。

[0413] 分析显示,抗LAG-3抗体15532、15431、15572、15011的结合表位与参考抗体25F7-Lag3.5类似物的结合表位有区别。从具有在位置78-87、84-92、88-97插入的AA的嵌合蛋白(域1额外环内的LAG-3中的集合的氨基酸延伸),15532的结合表位是很明显的。然而,与25F7-Lag3.5不相似,15532的线性表位扩张超过此延伸,包括AA95-100、AA98-105和AA123-131。令人感兴趣的是,在区段99-131中已鉴定了配体相互作用的关键氨基酸(Y99、R125&D131;Huard等人,同上述)。对于配体结合至关重要的区域中的突变,25F7-Lag3.5类似物没有显示任何敏感性。通过丙氨酸取代来测量,鉴定出15532接触残基为H85、P86、A87、P89、S91、W92和G93,然而25F7-Lag3.5类似物没有显示对于P86和S91的敏感性,说明了在AA85-93区域中分化的接触残基。15532能够结合有食蟹猴AA回复突变(P84H;H85R;S90Y)的嵌合构建体#28,但25F7-Lag3.5类似物不行,再次反映在AA84-90区域内分化精细的表位。

[0414] 发现两种抗体15431和15572都结合在片段AA 23-30和40-66的线性表位。进一步的丙氨酸扫描说明,两种抗体在位置A40、Q41、P43、P46、P49、D52、T62、Q64、H65、Q66、P67和D68共同占有相同的接触残基。15431对于嵌合构建体88-97、95-100和98-105格外地敏感(区段AA88-105)。证明该区域AA 98-105为15532、15431、15572和15011之间独特共同占有

的表位。25F7-Lag3.5类似物不与此表位结合。丙氨酸扫描指出,15431和15572共同占有接触残基P96、Y99、T100、V101、P106和G107,但15431有在位置G93、P94和R98上的独特接触。抗体15431也具有在片段AA 123-131、128-137和148-154的线性表位。令人感兴趣的是,先前已经显示,位置125、131和137对于配体结合是重要的(Huard等人,同上述)。这些片段(AA 123-131、128-137和148-154)对于15572也是重要的,15572辨识在片段AA 118-137和148-161中的线性表位。丙氨酸扫描进一步显示,15431和15572两者共同占有在位置R119、E124、R129、G130、D131、S133、R137、P138、D143、R148和R163的接触残基,而25F7-Lag3.5类似物没有显示对于这些表位区域或氨基酸位置之任一者的敏感性。

[0415] 抗体15011含有由具有AA 98-105范围内突变的嵌合构建体所界定的线性表位,且丙氨酸扫描进一步将独特的表位扩及至包括在位置G107、L109、R110和S111的接触残基。令人感兴趣的是,已显示R110对于配体结合是重要的(Huard等人,同上述)。人类、食蟹猴、小鼠和大鼠直系同源物之间在此区域(AA 98-113)的氨基酸序列有很好的保守性,说明了此抗体对鼠和食蟹猴LAG-3的交叉反应性(实施例12)。以下表7显示所收集的表位定位结果的概述。

[0416] 总之,我们通过分析对一组108个LAG-3突变体,在单一氨基酸解析中显示四种抗体15532、15431、15572和15011辨识LAG-3的域1中独特的但部分重迭的表位。此发现与实施例13的表位分组分析一致,显示15532与25F7-Lag3.5类似物交叉竞争,但具有与其他LAG-3抗体分化的竞争模式且因此有不同的表位(表7)。15431、15572和15011没有与15532或25F7-Lag3.5竞争结合且具有与不同的表位仓2抗体的独特的竞争模式。分配的表位仓(实施例13)与揭示各抗体显示独特分化的表位的表位定位十分吻合(表7)。包括嵌合构建体#28的表位数据也更加确认结合亲和力分析(实施例12),其中15532显示对食蟹猴LAG-3有显著的结合,而25F7-Lag3.5并没有,反映了因分化接触残基所致的不同抗体特性。

[0417]

表5. 结合突变的LAG-3 ECD构建体的抗LAG-3抗体的Fab片段的结合亲和力和分析的概述, 该突变的LAG-3 ECD构建体具有插入的大鼠、犬或食蟹猴序列片段。以K_D突变体/K_D野生型表示标准化的结合。

嵌合构建体#	经扫描的区域 人类 LAG-3	突变的区域 人类 LAG-3	从其他物种 所引入的 突变	15532	15431	15572	15011	25F7-Lag3. 5 类似物
1	AA 23-32	AA 23-30	L23S; Q24G; A27K; V29L; P30S	3.2	N.B.	N.B.	0.5	1.3
2	AA 28-37	AA 29-30	V29L; P30S	3.1	N.B.	N.B.	0.5	1.2
3	AA 33-42	AA 40-41	A40V; Q41H	2.2	N.B.	N.B.	0.5	1.3
4	AA 38-47	AA 40-47	A40V; Q41H; P46L; T47E	3.9	N.B.	N.B.	0.5	1.3
5	AA 43-52	AA 46-51	P46L; T47E; I48F; L50H; Q51L	2.7	N.B.	N.B.	0.5	1.3
6	AA 48-57	AA 48-55	I48F; L50H; Q51L; L53P; S54N; L55F	3.4	N.B.	N.B.	0.5	1.4
7	AA	AA	L53P; S54N; L55F;	3.4	N.B.	N.B.	0.5	1.4

[0418]

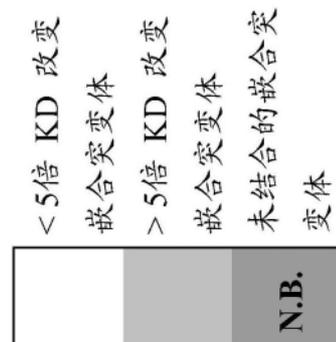
	53-62	53-60	A59G; G60W										
8	AA 58-67	AA 59-66	A59G; G60W; Q66R	2.7	N.B.	N.B.	0.5	1.3					
9	AA 63-72	AA 66-71	Q66R; G70D; P71Q	3.9	0.4	1.1	0.7	1.3					
10	AA 68-77	AA 70-77	G70D; Q71Q; A74S; A75I; G77A	1.1	1.1	0.7	1.8	1.0					
11	AA 73-82	AA 74-82	A74S; A75I; G77A; H78L; P79D; A81L; P82Q	1.5	0.4	0.5	0.6	1.1					
12	AA 78-87	AA 78-87	H78L; P79D; A81L; P82Q; delP84-A87	N.B.	0.8	0.8	0.9	N.B.					
13	AA 83-92	AA 84-92	delP84-A87; A88M; S91T; W92R	N.B.	0.6	1.1	1.3	N.B.					
14	AA 88-97	AA 88-97	A88M; S91T; W92R; G93R; P94H; R95P; R97H	N.B.	N.B.	0.7	0.6	N.B.					
15	AA 93-102	AA 95-100	R95G; R98S; T100V	6.5	N.B.	3.1	1.9	1.5					
16	AA	AA	R98S; T100V; S103M;	6.3	N.B.	N.B.	7.2	1.7					

[0419]

	98-107	98-105	V104R; G105A										
17	AA 108-117	AA 114-117	L114Q; Q117L	1.4	0.5	0.5	2.6	1.3					
18	AA 113-122	AA 114-119	L114Q; Q117L; P118S; R119H	1.1	0.6	0.6	2.1	0.8					
19	AA 118-127	AA 118-127	P118S; R119H; D123E; E124K; R127P	0.5	0.5	N.B.	0.6	0.8					
20	AA 123-132	AA 123-131	D123N; E124S; R125P; R127P; Q128T; delG130-D131	5.4	N.B.	N.B.	0.3	1.3					
21	AA 128-137	AA 128-137	Q128T; delG130-D131; W135A; R137Q	4.7	N.B.	N.B.	0.4	1.4					
22	AA 133-142	AA 140-142	R140T; A142K	1.3	0.6	0.8	0.5	1.2					
23	AA 143-152	AA 148-152	R148H; A150F; H152R	2.5	3.5	N.B.	2.0	0.8					
24	AA 148-156	AA 148-154	R148H; A150F; H152R; R154P	2.6	10.6	N.B.	1.9	0.7					
25	AA	AA	R154P; A157D; L158F	1.1	0.8	N.B.	1.9	0.7					

[0420]

	153-160	154-158										
26	AA 157-165	AA 157-161	A157D; L158F; R161S	1.1	0.6	N.B.	0.7	0.9				
27	AA 161-170	AA 161-166	R161S; L166V	0.8	1.3	1.7	2.3	0.8				
28	AA 83-92	AA 84-90	P84H; H85R; S90Y	4.8	1.1	0.5	0.6	N.B.				



[0421] 表6. 结合点突变扫描的人类LAG-3的抗LAG-3抗体的Fab片段的结合亲和力分析的概述。以 K_D 突变体/ K_D 野生型表示标准化的结合。

[0422]

点突变 #	在人类LAG-3 中 突变的AA	15532	15431	15572	15011	25F7-Lag3.5 类似物
1	A40S	4.4	N.B.	N.B.	0.6	1.1
2	Q41A	3.4	N.B.	N.B.	0.7	1.0
3	P43A	3.8	N.B.	N.B.	0.6	1.2
4	S45A	1.7	0.4	0.6	0.7	1.0
5	P46A	4.0	N.B.	N.B.	0.7	1.1
6	T47A	1.5	0.9	0.6	0.9	0.8
7	P49A	1.7	N.B.	N.B.	0.8	1.1
8	Q51A	0.9	0.7	0.6	0.8	0.8
9	D52A	1.7	N.B.	N.B.	0.7	0.8
10	S54A	0.7	0.5	0.7	0.8	0.8
11	L56A	1.2	0.3	0.7	0.7	0.9
12	R57A	1.1	0.6	0.8	0.7	0.7
13	R58A	0.8	1.2	0.8	1.7	0.8
14	T62A	4.2	N.B.	N.B.	0.6	1.3
15	Q64A	2.9	N.B.	N.B.	0.6	1.3
16	H65A	3.8	N.B.	N.B.	0.5	1.2
17	Q66A	2.7	N.B.	N.B.	0.7	0.9
18	P67A	3.8	N.B.	N.B.	0.6	1.1
19	D68A	3.4	N.B.	N.B.	0.6	0.9
20	A73S	0.7	0.6	0.6	0.7	0.8
21	A74S	1.0	0.8	0.7	0.8	0.9
22	A75S	0.9	0.8	0.7	0.8	0.9
23	P76A	1.0	0.7	0.6	0.8	0.9
24	G77A	1.0	0.7	0.7	0.8	1.0
25	H78A	0.9	0.4	0.5	0.7	0.8

[0423]

26	P79A	0.9	0.4	0.4	0.6	0.8
27	L80A	0.6	0.5	0.6	0.8	0.7
28	A81S	0.6	0.6	0.6	0.8	0.7
29	P82A	1.0	1.0	0.8	0.9	0.9
30	G83A	1.1	0.5	0.5	0.7	1.0
31	P84A	0.5	1.1	0.9	1.0	0.6
32	H85A	7.2	0.8	0.7	0.9	14.1
33	P86A	6.1	0.6	0.7	0.7	2.7
34	A87S	N.B.	1.0	0.9	1.0	N.B.
35	A88S	3.7	0.6	0.6	0.9	3.5
36	P89A	14.2	0.8	0.8	0.9	N.B.
37	S90A	0.6	0.9	0.8	0.9	1.0
38	S91A	5.3	0.7	0.7	0.8	2.2
39	W92A	N.B.	3.6	1.0	1.1	N.B.
40	G93A	7.1	11.6	0.8	1.0	6.2
41	P94A	0.8	N.B.	0.6	0.7	0.8
42	R95A	3.7	1.9	0.6	0.7	1.9
43	P96A	1.4	N.B.	N.B.	0.6	0.7
44	R97A	0.9	1.3	0.6	0.7	0.9
45	R98A	1.6	N.B.	0.9	1.2	0.9
46	Y99A	4.1	N.B.	N.B.	0.5	1.0
47	T100A	3.9	N.B.	N.B.	0.6	1.2
48	V101A	3.5	N.B.	N.B.	0.5	1.0
49	G105A	1.1	0.4	0.4	1.6	1.0
50	P106A	2.7	N.B.	N.B.	4.6	1.0
51	G107A	2.1	N.B.	N.B.	5.7	0.8
52	G108A	1.0	0.3	0.4	0.5	0.9
53	L109A	1.1	1.0	1.0	84.2	0.9
54	R110A	0.9	0.9	0.6	N.B.	0.9
55	S111A	1.0	0.8	0.7	53.4	0.9

[0424]

56	G112A	1.0	0.5	0.5	3.1	0.9
57	R113A	0.6	0.9	0.7	3.3	0.8
58	P115A	1.0	1.1	1.4	1.3	1.0
59	Q117A	0.8	0.4	0.5	0.7	0.8
60	P118A	0.7	1.0	0.9	1.2	0.8
61	R119A	3.2	N.B.	N.B.	0.6	1.1
62	Q121A	0.9	1.0	0.6	0.9	0.9
63	D123A	1.0	0.9	0.5	0.8	1.0
64	E124A	1.8	N.B.	N.B.	0.8	1.1
65	R125A	0.9	1.1	1.1	1.1	0.9
66	G126A	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
67	R127A	0.6	0.9	0.5	0.9	0.7
68	Q128A	0.7	0.8	0.9	1.0	0.7
69	R129A	3.0	N.B.	N.B.	0.7	1.2
70	G130A	4.4	N.B.	N.B.	0.6	1.3
71	D131A	4.2	N.B.	N.B.	0.6	1.2
72	S133A	2.2	N.B.	N.B.	0.6	1.1
73	R137A	3.6	N.B.	N.B.	0.6	1.0
74	P138A	2.7	N.B.	N.B.	0.7	1.0
75	R141A	0.7	1.0	0.9	1.1	0.8
76	D143A	3.8	N.B.	N.B.	0.5	1.0
77	R148A	2.9	N.B.	N.B.	0.7	1.2
78	R154A	0.8	1.0	0.8	1.2	0.8
79	S159A	0.7	0.9	0.3	0.7	0.8
80	R163A	2.5	N.B.	N.B.	0.6	1.0

[0425]

	< 5倍 K_D 改变 点突变
	> 5倍 K_D 改变 点突变
N.B.	未结合的 点突变

[0426]

表7. 测试的抗LAG-3抗体的经鉴定的结合表位的概述

[0427]

抗体	表位 仓	线性表位	完整的残基
15532	2D	78-105 123-131	H85、P86、A87、P89、S91、W92、G93
15431	4	23-30 40-66 88-105 123-137 148-152	A40、Q41、P43、P46、P49、D52 T62、Q64、H65、Q66、P67、D68 G93、P94、P96、R98、Y99、T100、V101、P106、G107 R119、E124 R129、G130、D131、S133、R137、P138、 D143、R148、R163
15572	3	23-30 40-66 98-105 118-137 148-161	A40、Q41、P43、P46、P49、D52 T62、Q64、H65、Q66、P67、D68 P96、Y99、T100、V101、P106、G107 R119、E124 R129、G130、D131、S133、R137、P138、 D143、R148、R163
15011	1	98-105	G107、L109、R110、S111
25F7-Lag3.5 类似物	2E	78-97	H85、A87、P89、W92、G93

[0428] 表8.关于VH、VL、HC和LC的DNA和蛋白质序列的SEQ ID NO

[0429]

SEQ ID NO	序列
1	15646 重链可变域 (VH) DNA 序列
2	15646 轻链可变域 (VL) DNA 序列
3	15646 VH 蛋白质序列
4	15646 VL 蛋白质序列
5	15532 VH DNA 序列
6	15532 VL DNA 序列
7	15532 VH 蛋白质序列
8	15532 VL 蛋白质序列
9	15723 VH DNA 序列
10	15723 VL DNA 序列
11	15723 VH 蛋白质序列
12	15723 VL 蛋白质序列
13	15595 VH DNA 序列
14	15595 VL DNA 序列
15	15595 VH 蛋白质序列
16	15595 VL 蛋白质序列
17	15431 VH DNA 序列
18	15431 VL DNA 序列
19	15431 VH 蛋白质序列
20	15431 VL 蛋白质序列
21	15572 VH DNA 序列
22	15572 VL DNA 序列
23	15572 VH 蛋白质序列
24	15572 VL 蛋白质序列
25	15011 VH DNA 序列
26	15011 VL DNA 序列
27	15011 VH 蛋白质序列

[0430]

28	15011 VL 蛋白质序列
29	IgG ₁ -LALA 重链 (HC) 恒定区 DNA 序列
30	IgG ₁ -LALA 重链 (HC) 恒定区蛋白质序列
31	Ig λ 轻链 (LC) 恒定区 DNA 序列
32	Ig λ 轻链 (LC) 恒定区蛋白质序列
33	Ig κ 轻链 (KC) 恒定区 DNA 序列
34	Ig κ 轻链 (KC) 恒定区蛋白质序列

[0431]

表9. 抗LAG-3抗体的VH和VL的DNA和蛋白质序列以及H-CDR1-3和L-CDR1-3氨基酸序列的SEQ ID NO

抗体	VH (DNA)	VL (DNA)	VH (蛋白质)	VL (蛋白质)	H-CDR 1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
15646	1	2	3	4	35	36	37	38	39	40
15532	5	6	7	8	41	42	43	44	45	40
15723	9	10	11	12	35	42	46	44	47	40
15595	13	14	15	16	48	49	50	51	47	52
15431	17	18	19	20	53	54	55	44	45	40
15572	21	22	23	24	56	57	58	59	60	61
15011	25	26	27	28	62	63	64	65	66	67

[0432]

表10. 抗LAG-3抗体的互补决定区 (CDR) 和OMT源自大鼠的抗体的种系基因来源

抗体编号	IGHV基因	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	SEQ ID NO
15646	IGHV4-34	GGFSFGYY	INHRGST	CTRGEEWESLFFDYW	35-37
15532	IGHV4-34	GESFSGY	INHSGST	CARGWDLLDWNDYWNEYW	41-43
15723	IGHV4-34	GGFSFGYY	INHSGST	CARGEDWGESFFDYW	35、42、46
15595	IGHV1-24	GYSLTEIS	FDPEGET	CATGGWGPNWFDPW	48-50
15431	IGHV6-1	GDSVSSNSA	TYYRSKW	CARDDDDWDFDYW	53-55
15572	IGHV4-39	GDSISSSSYY	IFYSGNT	CAREDDFLTDYYGAFDIW	56-58
15011	IGHV3-23*	GDFFRSYA	INGEVGGSNT	CVKGAGACGCNDDIDAW	62-64

抗体编号	IGKV基因	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3	SEQ ID NO
15646	IGKV3-11	QSISSY	GAS	CQQRSNWPLTF	38-40
15532	IGKV3-11	QSVSSY	DAS	CQQRSNWPLTF	44、45、40
15723	IGKV3-11	QSVSSY	AAS	CQQRSNWPLTF	44、47、40
15595	IGKV1-12	QGISSW	AAS	CQQANSFPFTF	51、47、52
15431	IGKV3-11	QSVSSY	DAS	CQQRSNWPLTF	44、45、40
15572	IGKV1-5	QSISSW	KAS	CQQYNSYLTF	59-61
15011	IGLV3-19*	GSYAGSY	DND	CGSTNDNDDGGLF	65-67

*用于人源化之基因，参见实施例2。

[0433]

序列表

[0434]

VH和VL的DNA和蛋白质序列

[0435]

SEQ ID NO:1(15646VH DNA序列)

[0436]

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGTGCCGCTGCTGAAGCCTTCTGAACTCTGTCTCTGACTTGTGCC

GTCTATGGTGGATCATTACAGCGGCTACTATTGGTCCTGGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGG
CGAGATCAACCACCGGGCTCTACCAACTACAATCCCTCTCTGAAGAGCAGGGTGACCATCTCCGTGGACACATCTA
AGAATCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCCGCTGATACAGCCGTGTACTATTGCACAAGGGGGGAGGAA
TGGGAGTCACTGTTCTTTGATTACTGGGGCAGGGGACACTGGTCACAGTCTCGAGT

[0437] SEQ ID NO:2 (15646VL DNA序列)

[0438] GAAATCGTCCTGACCCAGTCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCCGGAGAAAGAGCCACCCTGTCCTGC
CGAGCAAGCCAGTCCATCAGCTCCTATCTCGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGCCAGGCTCCCCGGCTGCTGATCTA
CGGCGCCTCCAACAGAGCTACAGGAATCCCAGCCCCTCAGCGGCTCCGGCTCTGGCACAGACTTTACCCTGACAA
TCTCTAGCCTGGAGCCTGAGGATTTGCGCGTGTACTATTGCCAGCAGAGATCTAATTGGCCACTGACATTCGGCGGC
GGCACACGGGTGGAGATCAAG

[0439] SEQ ID NO:3 (15646VH蛋白质序列)

[0440] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHRGSTNYNPSLKSRVTI
SVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTRGEWESLFFDYWGQGLVTVSS

[0441] SEQ ID NO:4 (15646VL蛋白质序列)

[0442] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTRVEIK

[0443] SEQ ID NO:5 (15532VH DNA序列)

[0444] CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCCGGCCTGCTGAGACCAAGCGAGACCCTGTCCCTGACATGCGCC
GTGTATGGCGAGAGCTTCTCCGGCTATTACTGGAAGTGGATCCGGCAGCCTCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGG
CGAGATCAATCACTCCGGCTCCACCAATTACAACCCATCCCTGAAGTCTCGGGTGACAATCAGCGTGGATAACAAGCA
AGACCCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACAGCTGCCGATACCGCCGTGTATTACTGCGCCAGAGGCTGGGAC
CTGCTGGATTGGAATGACTACTGGAATGAGTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTGACCGTCTCGAGT

[0445] SEQ ID NO:6 (15532VL DNA序列)

[0446] GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCTCTGTCCCCTGGCGAGCGGGCCACCCTGTCCTGT
AGAGCTTCTCAGTCCGTGTCTTCTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCAAGACTGCTGATCTA
TGACGCTTCCAATCGGGCTACCGCATCCAGCTCGCTTTAGCGGCTCCGGCTCCGGCACCAGACTTACCCTGACAA
TCAGCTCCCTGGAGCCAGAGGATTTGCGCGTGTATTACTGTCAGCAGAGGTCCAATTGGCCACTGACATTTGGCGGC
GGCACAAAGGTTGAGATCAAG

[0447] SEQ ID NO:7 (15532VH蛋白质序列)

[0448] QVQLQQWGAGLLRPSETLSLTCAVYGESFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTI
SVDTSKTFSLKLSVTAADTAVYYCARGWDLDDWYDNEYWGQGLVTVSS

[0449] SEQ ID NO:8 (15532VL蛋白质序列)

[0450] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK

[0451] SEQ ID NO:9 (15723VH DNA序列)

[0452] CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCTGGCCTGCTGAAGCCCTCTGAGACCCTGTCTCTGACCTGTGCC
GTGTATGGCGGCAGCTTCTCCGGCTATTACTGGAAGTGGATCCGCCAGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGG
CGAGATCAACCACTCCGGCTCTACCAACTACAATCCTTCTCTGAAGTCCAGGGTGACAATCAGCGTGGACACCAGCA
AGAACCAGTTTAGCCTGAAGCTGTCCAGCGTGACAGCTGCCGATACAGCCGTGTATTACTGCGCCAGAGGCGAGGAT

TGGGGCGAGAGCTTCTTTGATTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTGACCGTCTCGAGT

[0453] SEQ ID NO:10 (15723VL DNA序列)

[0454] GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCTCTGTCCCCTGGCGAGCGGGCCACCCTGAGCTGT
CGGGCCTCCCAGTCCGTGAGCTCCTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCAAGACTGCTGATCTA
CGCCGCTTCCAATCGGGCCACCGCATCCCCGCCAGATTTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCATTTCACCCTGACAA
TCAGCTCCCTGGAGCCAGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGGTCTAATTGGCCACTGACATTTGGCGGC
GGCACCAAGGTTGAGATCAAG

[0455] SEQ ID NO:11 (15723VH蛋白质序列)

[0456] QVQLQWGWAGLLKPSSETLSLTCVYGGVSGYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTI
SVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGEDWGESFFDYWGQGLVTVSS

[0457] SEQ ID NO:12 (15723VL蛋白质序列)

[0458] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISLPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGKVEIK

[0459] SEQ ID NO:13 (15595VH DNA序列)

[0460] CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGAGCTTCTGTGAAGGTTTCTGTAAAG
GTTTCCGGCTATAGCCTGACCGAGATCTCTATGCACTGGGTACGGCAAGCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGG
CGGCTTTGACCCAGAGGATGGCGAGACCATCTACGCTCAGAGTTTCAGGGGCGCGTGATCATGACCGAGGATACCA
GCACCGATAACGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGATCCGAGGATACCGCCGTGTATTACTGCGCTACTGGTGGC
TGGGGCCCAATTGGTTCGATCCTTGGGGCCAGGGGACCCTGGTGACCGTCTCGAGT

[0461] SEQ ID NO:14 (15595VL DNA序列)

[0462] GACATCCAGATGACACAGTCTCCTTCTCTGTGAGCGCCTCTGTGGGCGACCGCGTGACCATCACATGC
CGCGCTTCCCAGGGGATCTCTTCTGGCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTA
TGCTGCCAGCAGCCTGCAGTCCGGCGTGCCTTCCAGTTTAGCGGCTCCGGCTCCGGCACCAGACTTTACTGACAA
TCAGCTCCCTGCAGCCCAGGATTTTGCCACCTATTACTGTCAGCAGGCGAATTCCTTCCCTTTTACATTCGGCCCT
GGCACCAAGGTTGATATCAAG

[0463] SEQ ID NO:15 (15595VH蛋白质序列)

[0464] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYSLTEISMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDEGETIYAQRFRGRVI
MTEDTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCATGGWPNWFDWPGQGLVTVSS

[0465] SEQ ID NO:16 (15595VL蛋白质序列)

[0466] DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQANSFPFTFGPGTKVDIK

[0467] SEQ ID NO:17 (15431VH DNA序列)

[0468] CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCAAGCCAGACCCTGTCTCTGACATGCGCC
ATCTCCGGCGACAGCGTGTCTCTAACTCCGCCGCTTGAATGGATCCGGCAGTCTCCATCCAGAGGCCTGGAGTG
GCTGGGCAGAACCTATTACCGGTCCAAGTGGTACAACGATTATGCCGTGTCCGTGAAGAGCAGAATCACCATCAACC
CTGATAACAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGCAGCTGAATTCGTGACCCAGAGGATACAGCCGTGTATTACTGTGCT
AGGGACGATGATTGGAATGACTTCGATTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTGACAGTCTCGAGT

[0469] SEQ ID NO:18 (15431VL DNA序列)

[0470] GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCAGCTACACTGTCCCTGTCTCCCGGCGAGCGGGCCACCCTGAGCTGT

AGAGCTTCCCAGTCCGTGTCTTCTATCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCAAGGCTGCTGATCTA
CGACGCCTCCAATAGAGCCACCGGCATCCCAGCTAGATTTTCTGGCTCCGGCTCCGGCACCAGATTTACACTGACCA
TCTCTAGCCTGGAGCCAGAGGATTTTGTGTATATTACTGCCAGCAGCGCAGCAACTGGCCCCTGACATTTGGCGGC
GGCACCAAGGTTGAGATCAAG

[0471] SEQ ID NO:19 (15431VH蛋白质序列)

[0472] QVQLQQSGPGLVKPSQTLNLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKS
RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDDDWDFDYWGQGLVTVSS

[0473] SEQ ID NO:20 (15431VL蛋白质序列)

[0474] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGKVEIK

[0475] SEQ ID NO:21 (15572VH DNA序列)

[0476] CAGCTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCGCCTGGTGAAGCCCTCTGAGACCCTGTCCCTGACATGCACC
GTGAGCGGCATTCCATCAGCTCTTCCAGCTATTACTGGGGCTGGATCCGGCAGCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTG
GATCGGCAGCATCTTCTACTCCGGCAATACATATTATAATCCTTCTCTGAAGAGCAGGGTGACAATCAGCGTGGATA
CCTCCAAGAATCAGTTTAGCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACAGCTGCCGATACAGCCGTGTATTACTGCGCTAGGGAG
GACGATTTTCTGACCGATTATTACGGCGCTTTTCGACATCTGGGGCCAGGGGACAATGGTGACAGTCTCGAGT

[0477] SEQ ID NO:22 (15572VL DNA序列)

[0478] GATATCCAGATGACCCAGTCTCCAAGCACCCCTGAGCGCCTCTGTGGCGATCGGGTGACCATCACATGT
CGGGCTTCTCAGTCCATCAGCAGCTGGCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTA
CAAGGCCTCTTCCAGCGAGAGCGGCGTGCCATCCAGGTTTAGCGGCTCCGGCTCCGGCACCAGATTTACCCTGACCA
TCTCTTCCCTGCAGCCCAGTACTTTGCCACCTACTACTGTGACAGTACAATTCCTATCTGACATTCGGCGGGCGG
ACCAAGGTTGAGATCAAG

[0479] SEQ ID NO:23 (15572VH蛋白质序列)

[0480] QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDISSSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIFYSNGTYYNPSLKSRV
TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREDDFLTDYYGAFDIWGQGMVTVSS

[0481] SEQ ID NO:24 (15572VL蛋白质序列)

[0482] DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSSESGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISLQPDFFATYYCQQYNSYLTFFGGGKVEIK

[0483] SEQ ID NO:25 (15011VH DNA序列)

[0484] GAGGTGCAGCTGCTGGAATCCGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTGGATCCCTGCGACTGAGCTGCGCC
GCTTCTGGCTTCGACTTTAGAAGCTACGCAATGATGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTGGG
AGGGATCAACGGTGAAGTCGGTGGCTCTAATACATACTATGCACCTGCCGTCAAGGGAAGGGCTACTATTAGTCGGG
ACAACTCAAAAAATACCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTATTGCGTGAAA
GGTGTGCGCATGCGGCATCTGTAATGACGATATTGATGCATGGGGACAGGGGACCCTGGTGACAGTCTCGAGT

[0485] SEQ ID NO:26 (15011VL DNA序列)

[0486] AGTTATGAGCTGACTCAGGACCCAGCAGTGTGAGTCGCCCTGGGCCAGACAGTGAGAATCACTTGCAGT
GGGGCTGGTTCATATGCAGGCTCCTACTATTACGGATGGCACCAGCAGAAGCCCGACAGGCACCTGTGACAGTCAT
CTACGACAACGATAAAAGGCCAAGCAATATCCCGACCGGTTCTCTGGGTCCAGCTCTGGTAACACCGCCTCCCTGA
CCATTACTGGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTATTACTGTGGCTCTACAAACGATAATGACGATGGCGGACTG

TTTGGCTCCGGAAC TAAGGTCACCGTCCTA

[0487] SEQ ID NO:27 (15011VH蛋白质序列)

[0488] EVQLLES GGLVQPGGSLRLS CAASGDFRSYAMWVRQAPGKGLEWVGGINGEVGGSNTYYAPAVKGR
ATISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCVK GAGACGICNDDIDAWGQGT LVTVSS

[0489] SEQ ID NO:28 (15011VL蛋白质序列)

[0490] SYELTQDP AVSVALGQTVRITCSGAGSYAGSYYYGWHQQKPGQAPVTVIYDNDKRPSNIPDRFSGSSSG
NTASLTITGAQAEDEADYYCGSTNDNDGGLFGSGTKVTVL

[0491] 恒定区DNA和蛋白质序列

[0492] SEQ ID NO:29 (IgHC恒定区DNA序列)

[0493] GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAAC TACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTT
CCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAG
CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTA AA

[0494] SEQ ID NO:30 (IgHC恒定区蛋白质序列)

[0495] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0496] SEQ ID NO:31 (IgLC恒定区DNA序列)

[0497] GGCCAGCCCAAGGCCAACCCCACTGTACTCTGTTCCTCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAGCCAACAAG
GCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGT
CAAGGCGGGAGTGGAGACCACCAAAACCCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGA
CGCCCCGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG
GCCCTACAGAATGTTCA

[0498] SEQ ID NO:32 (IgLC恒定区蛋白质序列)

[0499] GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAAS
SYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0500] SEQ ID NO:33 (IgKC恒定区DNA序列)

[0501] CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCC

TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC
GGGTAACCTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG
AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0502] SEQ ID NO:34 (IgKC恒定区蛋白质序列)

[0503] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0504] SEQ ID NO:35 (15646/15723H-CDR1)

[0505] GGSFSGYY

[0506] SEQ ID NO:36 (15646H-CDR2)

[0507] INHRGST

[0508] SEQ ID NO:37 (15646H-CDR3)

[0509] CTRGEEWESLFFDYW

[0510] SEQ ID NO:38 (15646L-CDR1)

[0511] QSISSY

[0512] SEQ ID NO:39 (15646 L-CDR2)

[0513] GAS

[0514] SEQ ID NO:40 (15646/15532/15723/15431 L-CDR3)

[0515] CQQRSNWPLTF

[0516] SEQ ID NO:41 (15532 H-CDR1)

[0517] GESFSGYY

[0518] SEQ ID NO:42 (15532/15723 H-CDR2)

[0519] INHSGST

[0520] SEQ ID NO:43 (15532 H-CDR3)

[0521] CARGWLLDWNDYWNEYW

[0522] SEQ ID NO:44 (15532/15723/15431 L-CDR1)

[0523] QSVSSY

[0524] SEQ ID NO:45 (15532/15431 L-CDR2)

[0525] DAS

[0526] SEQ ID NO:46 (15723 H-CDR3)

[0527] CARGEDWGESFFDYW

[0528] SEQ ID NO:47 (15723/15595 L-CDR2)

[0529] AAS

[0530] SEQ ID NO:48 (15595 H-CDR1)

[0531] GYSLTEIS

[0532] SEQ ID NO:49 (15595 H-CDR2)

[0533] FDPEDGET

[0534] SEQ ID NO:50 (15595 H-CDR3)

[0535] CATGGWGPWFDPW

[0536] SEQ ID NO:51 (15595 L-CDR1)
[0537] QGISSW
[0538] SEQ ID NO:52 (15595 L-CDR3)
[0539] CQQANSFPPTF
[0540] SEQ ID NO:53 (15431 H-CDR1)
[0541] GDSVSSNSA
[0542] SEQ ID NO:54 (15431 H-CDR2)
[0543] TYYRSKW
[0544] SEQ ID NO:55 (15431 H-CDR3)
[0545] CARDDDWDFDYW
[0546] SEQ ID NO:56 (15572 H-CDR1)
[0547] GDSISSSSYY
[0548] SEQ ID NO:57 (15572 H-CDR2)
[0549] IFYSGNT
[0550] SEQ ID NO:58 (15572 H-CDR3)
[0551] CAREDDFLTDYYGAFDIW
[0552] SEQ ID NO:59 (15572 L-CDR1)
[0553] QSISSW
[0554] SEQ ID NO:60 (15572L-CDR2)
[0555] KAS
[0556] SEQ ID NO:61 (15572L-CDR3)
[0557] CQQYNSYLTF
[0558] SEQ ID NO:62 (15011H-CDR1)
[0559] GFDFRSYA
[0560] SEQ ID NO:63 (15011H-CDR2)
[0561] INGEVGSNT
[0562] SEQ ID NO:64 (15011H-CDR3)
[0563] CVKGAGACGICNDDIDAW
[0564] SEQ ID NO:65 (15011L-CDR1)
[0565] GSYAGSY
[0566] SEQ ID NO:66 (15011L-CDR2)
[0567] DND
[0568] SEQ ID NO:67 (15011L-CDR3)
[0569] CGSTNDNDGGLF
[0570] SEQ ID NO:68 (人类LAG-3)
[0571] MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAIEVPPVWVWQEGAPALPCSPPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDS
GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGP RPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGE
YRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRDPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAE
SFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLPEPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLTAKWTP

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 西福根有限公司
- [0003] <120> 抗LAG-3抗体及组合物
- [0004] <130> 022675.W0057
- [0005] <140>
- [0006] <141>
- [0007] <150> 62/407,678
- [0008] <151> 2016-10-13
- [0009] <160> 74
- [0010] <170> PatentIn version 3.5
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 357
- [0013] <212> DNA
- [0014] <213> 人工序列
- [0015] <220>
- [0016] <221> 来源
- [0017] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
- [0018] 多核苷酸”
- [0019] <400> 1
- [0020] caggtgcagc tgcagcagtg gggtgccggt ctgctgaagc cttctgaaac tctgtctctg 60
- [0021] acttgtgccg tctatggtgg atcattcagc ggctactatt ggtcctggat caggcagccc 120
- [0022] cctggcaagg gcctggagtg gatcggcgag atcaaccacc ggggctctac caactacaat 180
- [0023] ccctctctga agagcagggt gaccatctcc gtggacacat ctaagaatca gttcagcctg 240
- [0024] aagctgagct ccgtgaccgc cgctgataca gccgtgtact attgcacaag gggggaggaa 300
- [0025] tgggagtcac tgttctttga ttactggggg caggggacac tggtcacagt ctcgagt 357
- [0026] <210> 2
- [0027] <211> 321
- [0028] <212> DNA
- [0029] <213> 人工序列
- [0030] <220>
- [0031] <221> 来源
- [0032] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
- [0033] 多核苷酸”
- [0034] <400> 2
- [0035] gaaatcgtcc tgaccagtc ccccgccacc ctgagcctga gccccggaga aagagccacc 60
- [0036] ctgtcctgcc gagcaagcca gtccatcagc tcctatctcg cctggtatca gcagaaacca 120
- [0037] ggccaggctc cccggctgct gatctacggc gcctccaaca gagctacagg aatcccagcc 180
- [0038] cgcttcagcg gctccggctc tggcacagac tttaccctga caatctctag cctggagcct 240

[0039] gaggatttcg ccgtgtacta ttgccagcag agatctaatt ggccactgac attcggcggc 300
 [0040] ggcacacggg tggagatcaa g 321
 [0041] <210> 3
 [0042] <211> 119
 [0043] <212> PRT
 [0044] <213> 人工序列
 [0045] <220>
 [0046] <221> 来源
 [0047] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0048] 多肽”
 [0049] <400> 3
 [0050] Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 [0051] 1 5 10 15
 [0052] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 [0053] 20 25 30
 [0054] Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 [0055] 35 40 45
 [0056] Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 [0057] 50 55 60
 [0058] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 [0059] 65 70 75 80
 [0060] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 [0061] 85 90 95
 [0062] Arg Gly Glu Glu Trp Glu Ser Leu Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 [0063] 100 105 110
 [0064] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0065] 115
 [0066] <210> 4
 [0067] <211> 107
 [0068] <212> PRT
 [0069] <213> 人工序列
 [0070] <220>
 [0071] <221> 来源
 [0072] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0073] 多肽”
 [0074] <400> 4
 [0075] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [0076] 1 5 10 15
 [0077] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

[0078]	20	25	30
[0079]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
[0080]	35	40	45
[0081]	Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
[0082]	50	55	60
[0083]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
[0084]	65	70	75
[0085]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu		
[0086]	85	90	95
[0087]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys		
[0088]	100	105	
[0089]	<210> 5		
[0090]	<211> 366		
[0091]	<212> DNA		
[0092]	<213> 人工序列		
[0093]	<220>		
[0094]	<221> 来源		
[0095]	<223> /记录=“人工序列的描述:合成		
[0096]	多核苷酸”		
[0097]	<400> 5		
[0098]	caggttcagc tgcagcagtg gggcgccggc ctgctgagac caagcgagac cctgtccctg 60		
[0099]	acatgcgccg tgtatggcga gagcttctcc ggctattact ggaactggat ccggcagcct 120		
[0100]	cccggcaagg gcctggagtg gatcggcgag atcaatcact ccggctccac caattacaac 180		
[0101]	ccatccctga agtctcgggt gacaatcagc gtggatacaa gcaagaccca gttcagcctg 240		
[0102]	aagctgagct ccgtgacagc tgccgatacc gccgtgtatt actgcgccag aggctgggac 300		
[0103]	ctgctggatt ggaatgacta ctggaatgag tactggggcc aggggaccct ggtgaccgtc 360		
[0104]	tcgagt 366		
[0105]	<210> 6		
[0106]	<211> 321		
[0107]	<212> DNA		
[0108]	<213> 人工序列		
[0109]	<220>		
[0110]	<221> 来源		
[0111]	<223> /记录=“人工序列的描述:合成		
[0112]	多核苷酸”		
[0113]	<400> 6		
[0114]	gagatcgtgc tgaccagtc ccctgccacc ctgtctctgt ccctggcga gggggccacc 60		
[0115]	ctgtctctgta gagcttctca gtccgtgtct tcctacctgg cttggtacca gcagaagcca 120		
[0116]	ggacaggccc caagactgct gatctatgac gcttccaatc gggctaccgg catcccagct 180		

[0117] cgcttttagcg gctccggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagctc cctggagcca 240
 [0118] gaggattttg ccggtgatta ctgtcagcag aggtccaatt ggccactgac atttggcggc 300
 [0119] ggcacaaagg ttgagatcaa g 321
 [0120] <210> 7
 [0121] <211> 122
 [0122] <212> PRT
 [0123] <213> 人工序列
 [0124] <220>
 [0125] <221> 来源
 [0126] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0127] 多肽”
 [0128] <400> 7
 [0129] Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Arg Pro Ser Glu
 [0130] 1 5 10 15
 [0131] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Glu Ser Phe Ser Gly Tyr
 [0132] 20 25 30
 [0133] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 [0134] 35 40 45
 [0135] Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 [0136] 50 55 60
 [0137] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Thr Gln Phe Ser Leu
 [0138] 65 70 75 80
 [0139] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 [0140] 85 90 95
 [0141] Arg Gly Trp Asp Leu Leu Asp Trp Asn Asp Tyr Trp Asn Glu Tyr Trp
 [0142] 100 105 110
 [0143] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0144] 115 120
 [0145] <210> 8
 [0146] <211> 107
 [0147] <212> PRT
 [0148] <213> 人工序列
 [0149] <220>
 [0150] <221> 来源
 [0151] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0152] 多肽”
 [0153] <400> 8
 [0154] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [0155] 1 5 10 15

[0156] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 [0157] 20 25 30
 [0158] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 [0159] 35 40 45
 [0160] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 [0161] 50 55 60
 [0162] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 [0163] 65 70 75 80
 [0164] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 [0165] 85 90 95
 [0166] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 [0167] 100 105
 [0168] <210> 9
 [0169] <211> 357
 [0170] <212> DNA
 [0171] <213> 人工序列
 [0172] <220>
 [0173] <221> 来源
 [0174] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0175] 多核苷酸”
 [0176] <400> 9
 [0177] caggttcagc tgcagcagtg gggcgctggc ctgctgaagc cctctgagac cctgtctctg 60
 [0178] acctgtgccg tgtatggcgg cagcttctcc ggctattact ggaactggat ccgccagccc 120
 [0179] cccggcaagg gcctggagtg gatcggcgag atcaaccact ccggtcttac caactacaat 180
 [0180] ctttctctga agtccagggt gacaatcagc gtggacacca gcaagaacca gtttagcctg 240
 [0181] aagctgtcca gcgtgacagc tgccgataca gccgtgtatt actgcgccag aggcgaggat 300
 [0182] tggggcgaga gcttctttga ttactggggc caggggaccc tggtgaccgt ctcgagt 357
 [0183] <210> 10
 [0184] <211> 321
 [0185] <212> DNA
 [0186] <213> 人工序列
 [0187] <220>
 [0188] <221> 来源
 [0189] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0190] 多核苷酸”
 [0191] <400> 10
 [0192] gagatcgtgc tgaccagtc ccctgccacc ctgtctctgt ccctggcga gggggccacc 60
 [0193] ctgagctgtc gggcctccca gtccgtgagc tcctacctgg cttggtatca gcagaagcca 120
 [0194] ggacaggccc caagactgct gatctacgcc gcttccaatc gggccaccgg catccccgcc 180

[0195] agattttccg gctctggctc cggcaccgat ttcaccctga caatcagctc cctggagcca 240
 [0196] gaggacttcg ccggtgacta ctgccagcag aggtctaatt ggccactgac atttggcggc 300
 [0197] ggcaccaagg ttgagatcaa g 321
 [0198] <210> 11
 [0199] <211> 119
 [0200] <212> PRT
 [0201] <213> 人工序列
 [0202] <220>
 [0203] <221> 来源
 [0204] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0205] 多肽”
 [0206] <400> 11
 [0207] Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 [0208] 1 5 10 15
 [0209] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 [0210] 20 25 30
 [0211] Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 [0212] 35 40 45
 [0213] Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 [0214] 50 55 60
 [0215] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 [0216] 65 70 75 80
 [0217] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 [0218] 85 90 95
 [0219] Arg Gly Glu Asp Trp Gly Glu Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 [0220] 100 105 110
 [0221] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0222] 115
 [0223] <210> 12
 [0224] <211> 107
 [0225] <212> PRT
 [0226] <213> 人工序列
 [0227] <220>
 [0228] <221> 来源
 [0229] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0230] 多肽”
 [0231] <400> 12
 [0232] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [0233] 1 5 10 15

[0234]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
[0235]	20 25 30
[0236]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
[0237]	35 40 45
[0238]	Tyr Ala Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[0239]	50 55 60
[0240]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[0241]	65 70 75 80
[0242]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
[0243]	85 90 95
[0244]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0245]	100 105
[0246]	<210> 13
[0247]	<211> 357
[0248]	<212> DNA
[0249]	<213> 人工序列
[0250]	<220>
[0251]	<221> 来源
[0252]	<223> /记录=“人工序列的描述:合成
[0253]	多核苷酸”
[0254]	<400> 13
[0255]	caggttcagc tgggtgcagtc cggcgctgag gtgaagaagc ctggagcttc tgtgaaggtt 60
[0256]	tcctgtaagg tttccggcta tagcctgacc gagatctcta tgcactgggt acggcaagcc 120
[0257]	cccggcaagg gcctggagtg gatgggcggc tttgaccagc aggatggcga gaccatctac 180
[0258]	gctcagaggt ttcaggggcg cgtgatcatg accgaggata ccagcaccga taccgcctac 240
[0259]	atggagctgt ccagcctgag atccgaggat accgccgtgt attactgcgc tactggtggc 300
[0260]	tggggcccca attggttcga tccttggggc caggggaccc tggtgaccgt ctcgagt 357
[0261]	<210> 14
[0262]	<211> 321
[0263]	<212> DNA
[0264]	<213> 人工序列
[0265]	<220>
[0266]	<221> 来源
[0267]	<223> /记录=“人工序列的描述:合成
[0268]	多核苷酸”
[0269]	<400> 14
[0270]	gacatccaga tgacacagtc tccttctctt gtgagcgct ctgtgggcca ccgcgtgacc 60
[0271]	atcacatgcc gcgcttccca ggggatctct tcctggctgg cttggtacca gcagaagccc 120
[0272]	ggcaaggccc ccaagctgct gatctatgct gccagcagcc tgcagtccgg cgtgccttcc 180

[0273] aggttttagcg gctccggctc cggcaccgac tttaactga caatcagctc cctgcagccc 240
 [0274] gaggattttg ccacctatta ctgtcagcag gegaattcct tcctttttac attcggcct 300
 [0275] ggcaccaagg ttgatatcaa g 321
 [0276] <210> 15
 [0277] <211> 119
 [0278] <212> PRT
 [0279] <213> 人工序列
 [0280] <220>
 [0281] <221> 来源
 [0282] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0283] 多肽”
 [0284] <400> 15
 [0285] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0286] 1 5 10 15
 [0287] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ser Leu Thr Glu Ile
 [0288] 20 25 30
 [0289] Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 [0290] 35 40 45
 [0291] Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Arg Phe
 [0292] 50 55 60
 [0293] Gln Gly Arg Val Ile Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 [0294] 65 70 75 80
 [0295] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0296] 85 90 95
 [0297] Ala Thr Gly Gly Trp Gly Pro Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly
 [0298] 100 105 110
 [0299] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0300] 115
 [0301] <210> 16
 [0302] <211> 107
 [0303] <212> PRT
 [0304] <213> 人工序列
 [0305] <220>
 [0306] <221> 来源
 [0307] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0308] 多肽”
 [0309] <400> 16
 [0310] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 [0311] 1 5 10 15

[0312]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
[0313]	20 25 30
[0314]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[0315]	35 40 45
[0316]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0317]	50 55 60
[0318]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0319]	65 70 75 80
[0320]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe
[0321]	85 90 95
[0322]	Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
[0323]	100 105
[0324]	<210> 17
[0325]	<211> 363
[0326]	<212> DNA
[0327]	<213> 人工序列
[0328]	<220>
[0329]	<221> 来源
[0330]	<223> /记录=“人工序列的描述:合成
[0331]	多核苷酸”
[0332]	<400> 17
[0333]	caggttcagc tgcagcagtc cggccccggc ctggtgaagc caagccagac cctgtctctg 60
[0334]	acatgcgcca tctccggcga cagcgtgtcc tctaactccg ccgcttgaa ttggatccgg 120
[0335]	cagtctccat ccagaggcct ggagtggctg ggcagaacct attaccggtc caagtggtag 180
[0336]	aacgattatg ccgtgtccgt gaagagcaga atccatca accctgatac cagcaagaac 240
[0337]	cagttcagcc tgcagctgaa ttccgtgacc ccagaggata cagccgtgta ttactgtgct 300
[0338]	agggacgatg attggaatga cttecgattac tggggccagg ggaccctggt gacagtctcg 360
[0339]	agt 363
[0340]	<210> 18
[0341]	<211> 321
[0342]	<212> DNA
[0343]	<213> 人工序列
[0344]	<220>
[0345]	<221> 来源
[0346]	<223> /记录=“人工序列的描述:合成
[0347]	多核苷酸”
[0348]	<400> 18
[0349]	gagatcgtgc tgaccagtc cccagctaca ctgtccctgt ctcccggcga gcgggccacc 60
[0350]	ctgagctgta gagcttccca gtccgtgtct tcctatctgg cttggtatca gcagaagcca 120

[0351] ggacaggccc caaggctgct gatctacgac gcctccaata gagccaccgg catcccagct 180
 [0352] agattttctg gctccggctc cggcaccgat ttcacactga ccatctctag cctggagcca 240
 [0353] gaggattttg ctgtatatta ctgccagcag cgcagcaact ggcccctgac atttggcggc 300
 [0354] ggcaccaagg ttgagatcaa g 321
 [0355] <210> 19
 [0356] <211> 121
 [0357] <212> PRT
 [0358] <213> 人工序列
 [0359] <220>
 [0360] <221> 来源
 [0361] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0362] 多肽”
 [0363] <400> 19
 [0364] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 [0365] 1 5 10 15
 [0366] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 [0367] 20 25 30
 [0368] Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 [0369] 35 40 45
 [0370] Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 [0371] 50 55 60
 [0372] Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 [0373] 65 70 75 80
 [0374] Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 [0375] 85 90 95
 [0376] Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asp Asp Trp Asn Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
 [0377] 100 105 110
 [0378] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0379] 115 120
 [0380] <210> 20
 [0381] <211> 107
 [0382] <212> PRT
 [0383] <213> 人工序列
 [0384] <220>
 [0385] <221> 来源
 [0386] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0387] 多肽”
 [0388] <400> 20
 [0389] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0390]	1	5	10	15
[0391]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr			
[0392]		20	25	30
[0393]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
[0394]		35	40	45
[0395]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
[0396]		50	55	60
[0397]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
[0398]		65	70	75
[0399]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu			
[0400]		85	90	95
[0401]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[0402]		100	105	
[0403]	<210> 21			
[0404]	<211> 372			
[0405]	<212> DNA			
[0406]	<213> 人工序列			
[0407]	<220>			
[0408]	<221> 来源			
[0409]	<223> /记录=“人工序列的描述:合成			
[0410]	多核苷酸”			
[0411]	<400> 21			
[0412]	cagctgcagc tgcaggaaag cggccccggc ctggtgaagc cctctgagac cctgtccctg 60			
[0413]	acatgcaccg tgagcggcga ttccatcagc tcttccagct attactgggg ctggatccgg 120			
[0414]	cagcccccg gcaagggcct ggagtggatc ggcagcatct tctactccgg caatacatat 180			
[0415]	tataatcctt ctctgaagag cagggtgaca atcagcgtgg atacctccaa gaatcagttt 240			
[0416]	agcctgaagc tgagctccgt gacagctgcc gatacagccg tgtattactg cgctagggag 300			
[0417]	gacgattttc tgaccgatta ttacggcgct ttcgacatct ggggccaggg gacaatggtg 360			
[0418]	acagtctcga gt 372			
[0419]	<210> 22			
[0420]	<211> 318			
[0421]	<212> DNA			
[0422]	<213> 人工序列			
[0423]	<220>			
[0424]	<221> 来源			
[0425]	<223> /记录=“人工序列的描述:合成			
[0426]	多核苷酸”			
[0427]	<400> 22			
[0428]	gatatccaga tgaccagtc tccaagcacc ctgagcgcct ctgtgggcga tcgggtgacc 60			

[0429] atcacatgtc gggctttctca gtccatcagc agctggctgg cttggatatca gcagaagccc 120
 [0430] ggcaaggccc caaagctgct gatctacaag gcctcttcca gcgagagcgg cgtgccatcc 180
 [0431] aggttttagcg gctccggctc cggcaccgag tttaccctga ccatctcttc cctgcagccc 240
 [0432] gatgactttg ccacctacta ctgtcagcag tacaattcct atctgacatt cggcggcggc 300
 [0433] accaaggttg agatcaag 318
 [0434] <210> 23
 [0435] <211> 124
 [0436] <212> PRT
 [0437] <213> 人工序列
 [0438] <220>
 [0439] <221> 来源
 [0440] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0441] 多肽”
 [0442] <400> 23
 [0443] Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 [0444] 1 5 10 15
 [0445] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Ser
 [0446] 20 25 30
 [0447] Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 [0448] 35 40 45
 [0449] Trp Ile Gly Ser Ile Phe Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 [0450] 50 55 60
 [0451] Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 [0452] 65 70 75 80
 [0453] Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 [0454] 85 90 95
 [0455] Cys Ala Arg Glu Asp Asp Phe Leu Thr Asp Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp
 [0456] 100 105 110
 [0457] Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 [0458] 115 120
 [0459] <210> 24
 [0460] <211> 106
 [0461] <212> PRT
 [0462] <213> 人工序列
 [0463] <220>
 [0464] <221> 来源
 [0465] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0466] 多肽”
 [0467] <400> 24

[0507] agttatgagc tgactcagga cccagcagtg tcagtcgccc tgggccagac agtgagaatc 60
 [0508] acttgccagt gggctggttc atatgcaggc tcctactatt acggatggca ccagcagaag 120
 [0509] cccggacagg cacctgtgac agtcatctac gacaacgata aaaggccaag caatattccc 180
 [0510] gaccggttct ctgggtccag ctctggtaac accgcctccc tgaccattac tggggcccag 240
 [0511] gctgaggacg aagctgatta ttactgtggc tctacaaacg ataatgacga tggcggactg 300
 [0512] tttggctccg gaactaaggt caccgtccta 330
 [0513] <210> 27
 [0514] <211> 125
 [0515] <212> PRT
 [0516] <213> 人工序列
 [0517] <220>
 [0518] <221> 来源
 [0519] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0520] 多肽”
 [0521] <400> 27
 [0522] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0523] 1 5 10 15
 [0524] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Arg Ser Tyr
 [0525] 20 25 30
 [0526] Ala Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0527] 35 40 45
 [0528] Gly Gly Ile Asn Gly Glu Val Gly Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Pro
 [0529] 50 55 60
 [0530] Ala Val Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 [0531] 65 70 75 80
 [0532] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0533] 85 90 95
 [0534] Tyr Cys Val Lys Gly Ala Gly Ala Cys Gly Ile Cys Asn Asp Asp Ile
 [0535] 100 105 110
 [0536] Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0537] 115 120 125
 [0538] <210> 28
 [0539] <211> 110
 [0540] <212> PRT
 [0541] <213> 人工序列
 [0542] <220>
 [0543] <221> 来源
 [0544] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0545] 多肽”

[0546] <400> 28
 [0547] Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 [0548] 1 5 10 15
 [0549] Thr Val Arg Ile Thr Cys Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr
 [0550] 20 25 30
 [0551] Tyr Tyr Gly Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Thr Val
 [0552] 35 40 45
 [0553] Ile Tyr Asp Asn Asp Lys Arg Pro Ser Asn Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 [0554] 50 55 60
 [0555] Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln
 [0556] 65 70 75 80
 [0557] Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Thr Asn Asp Asn Asp
 [0558] 85 90 95
 [0559] Asp Gly Gly Leu Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 [0560] 100 105 110
 [0561] <210> 29
 [0562] <211> 990
 [0563] <212> DNA
 [0564] <213> 人工序列
 [0565] <220>
 [0566] <221> 来源
 [0567] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0568] 多核苷酸”
 [0569] <400> 29
 [0570] gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 [0571] ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
 [0572] tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 [0573] ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 [0574] tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
 [0575] aaatcttgtg acaaaactca cacatgceca ccgtgcccag cacctgaagc cgccggggga 360
 [0576] ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacce aaggacacce tcatgatctc ccggaccct 420
 [0577] gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 [0578] tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 [0579] agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctcgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 [0580] gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 [0581] aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 720
 [0582] atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 [0583] gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 840
 [0584] ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900

[0585] cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 [0586] cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 990
 [0587] <210> 30
 [0588] <211> 330
 [0589] <212> PRT
 [0590] <213> 人工序列
 [0591] <220>
 [0592] <221> 来源
 [0593] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0594] 多肽”
 [0595] <400> 30
 [0596] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 [0597] 1 5 10 15
 [0598] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 [0599] 20 25 30
 [0600] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 [0601] 35 40 45
 [0602] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 [0603] 50 55 60
 [0604] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 [0605] 65 70 75 80
 [0606] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 [0607] 85 90 95
 [0608] Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 [0609] 100 105 110
 [0610] Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 [0611] 115 120 125
 [0612] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 [0613] 130 135 140
 [0614] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 [0615] 145 150 155 160
 [0616] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 [0617] 165 170 175
 [0618] Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 [0619] 180 185 190
 [0620] His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 [0621] 195 200 205
 [0622] Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 [0623] 210 215 220

[0624]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
[0625]	225 230 235 240
[0626]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0627]	245 250 255
[0628]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0629]	260 265 270
[0630]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0631]	275 280 285
[0632]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0633]	290 295 300
[0634]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0635]	305 310 315 320
[0636]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0637]	325 330
[0638]	<210> 31
[0639]	<211> 318
[0640]	<212> DNA
[0641]	<213> 人工序列
[0642]	<220>
[0643]	<221> 来源
[0644]	<223> /记录=“人工序列的描述:合成
[0645]	多核苷酸”
[0646]	<400> 31
[0647]	ggccagccca aggcccaacc cactgtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagctccaa 60
[0648]	gccacaagg ccacactagt gtgtctgata agtgacttct acccgggagc tgtgacagtg 120
[0649]	gcctggaagg cagatggcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccaa accctccaaa 180
[0650]	cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag 240
[0651]	tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
[0652]	gccctacag aatgttca 318
[0653]	<210> 32
[0654]	<211> 106
[0655]	<212> PRT
[0656]	<213> 人工序列
[0657]	<220>
[0658]	<221> 来源
[0659]	<223> /记录=“人工序列的描述:合成
[0660]	多肽”
[0661]	<400> 32
[0662]	Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser

[0663]	1	5	10	15												
[0664]	Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp
[0665]		20	25	30												
[0666]	Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro
[0667]		35	40	45												
[0668]	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn
[0669]		50	55	60												
[0670]	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys
[0671]	65	70	75	80												
[0672]	Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val
[0673]		85	90	95												
[0674]	Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser						
[0675]		100	105													
[0676]	<210>	33														
[0677]	<211>	321														
[0678]	<212>	DNA														
[0679]	<213>	人工序列														
[0680]	<220>															
[0681]	<221>	来源														
[0682]	<223>	/记录=“人工序列的描述:合成														
[0683]		多核苷酸”														
[0684]	<400>	33														
[0685]	cgtacggtgg	ctgcaccatc	tgtcttcate	ttcccgccat	ctgatgagca	gttgaaatct	60									
[0686]	ggaactgcct	ctgttgtgtg	cctgctgaat	aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	120									
[0687]	tggaaggtgg	ataacgcctt	ccaatcgggt	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	180									
[0688]	agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	240									
[0689]	aaacacaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	300									
[0690]	agcttcaaca	ggggagagtg	t	321												
[0691]	<210>	34														
[0692]	<211>	107														
[0693]	<212>	PRT														
[0694]	<213>	人工序列														
[0695]	<220>															
[0696]	<221>	来源														
[0697]	<223>	/记录=“人工序列的描述:合成														
[0698]		多肽”														
[0699]	<400>	34														
[0700]	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
[0701]	1	5	10	15												

[0702] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 [0703] 20 25 30
 [0704] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 [0705] 35 40 45
 [0706] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 [0707] 50 55 60
 [0708] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 [0709] 65 70 75 80
 [0710] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 [0711] 85 90 95
 [0712] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [0713] 100 105
 [0714] <210> 35
 [0715] <211> 8
 [0716] <212> PRT
 [0717] <213> 人工序列
 [0718] <220>
 [0719] <221> 来源
 [0720] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0721] 肽”
 [0722] <400> 35
 [0723] Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 [0724] 1 5
 [0725] <210> 36
 [0726] <211> 7
 [0727] <212> PRT
 [0728] <213> 人工序列
 [0729] <220>
 [0730] <221> 来源
 [0731] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0732] 肽”
 [0733] <400> 36
 [0734] Ile Asn His Arg Gly Ser Thr
 [0735] 1 5
 [0736] <210> 37
 [0737] <211> 15
 [0738] <212> PRT
 [0739] <213> 人工序列
 [0740] <220>

[0780] <210> 41
 [0781] <211> 8
 [0782] <212> PRT
 [0783] <213> 人工序列
 [0784] <220>
 [0785] <221> 来源
 [0786] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0787] 肽”
 [0788] <400> 41
 [0789] Gly Glu Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr
 [0790] 1 5
 [0791] <210> 42
 [0792] <211> 7
 [0793] <212> PRT
 [0794] <213> 人工序列
 [0795] <220>
 [0796] <221> 来源
 [0797] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0798] 肽”
 [0799] <400> 42
 [0800] Ile Asn His Ser Gly Ser Thr
 [0801] 1 5
 [0802] <210> 43
 [0803] <211> 18
 [0804] <212> PRT
 [0805] <213> 人工序列
 [0806] <220>
 [0807] <221> 来源
 [0808] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0809] 肽”
 [0810] <400> 43
 [0811] Cys Ala Arg Gly Trp Asp Leu Leu Asp Trp Asn Asp Tyr Trp Asn Glu
 [0812] 1 5 10 15
 [0813] Tyr Trp
 [0814] <210> 44
 [0815] <211> 6
 [0816] <212> PRT
 [0817] <213> 人工序列
 [0818] <220>

- [0819] <221> 来源
- [0820] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
- [0821] 肽”
- [0822] <400> 44
- [0823] Gln Ser Val Ser Ser Tyr
- [0824] 1 5
- [0825] <210> 45
- [0826] <211> 3
- [0827] <212> PRT
- [0828] <213> 人工序列
- [0829] <220>
- [0830] <221> 来源
- [0831] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
- [0832] 肽”
- [0833] <400> 45
- [0834] Asp Ala Ser
- [0835] 1
- [0836] <210> 46
- [0837] <211> 15
- [0838] <212> PRT
- [0839] <213> 人工序列
- [0840] <220>
- [0841] <221> 来源
- [0842] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
- [0843] 肽”
- [0844] <400> 46
- [0845] Cys Ala Arg Gly Glu Asp Trp Gly Glu Ser Phe Phe Asp Tyr Trp
- [0846] 1 5 10 15
- [0847] <210> 47
- [0848] <211> 3
- [0849] <212> PRT
- [0850] <213> 人工序列
- [0851] <220>
- [0852] <221> 来源
- [0853] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
- [0854] 肽”
- [0855] <400> 47
- [0856] Ala Ala Ser
- [0857] 1

- [0858] <210> 48
 [0859] <211> 8
 [0860] <212> PRT
 [0861] <213> 人工序列
 [0862] <220>
 [0863] <221> 来源
 [0864] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0865] 肽”
 [0866] <400> 48
 [0867] Gly Tyr Ser Leu Thr Glu Ile Ser
 [0868] 1 5
 [0869] <210> 49
 [0870] <211> 8
 [0871] <212> PRT
 [0872] <213> 人工序列
 [0873] <220>
 [0874] <221> 来源
 [0875] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0876] 肽”
 [0877] <400> 49
 [0878] Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr
 [0879] 1 5
 [0880] <210> 50
 [0881] <211> 14
 [0882] <212> PRT
 [0883] <213> 人工序列
 [0884] <220>
 [0885] <221> 来源
 [0886] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0887] 肽”
 [0888] <400> 50
 [0889] Cys Ala Thr Gly Gly Trp Gly Pro Asn Trp Phe Asp Pro Trp
 [0890] 1 5 10
 [0891] <210> 51
 [0892] <211> 6
 [0893] <212> PRT
 [0894] <213> 人工序列
 [0895] <220>
 [0896] <221> 来源

- [0897] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
[0898] 肽”
[0899] <400> 51
[0900] Gln Gly Ile Ser Ser Trp
[0901] 1 5
[0902] <210> 52
[0903] <211> 11
[0904] <212> PRT
[0905] <213> 人工序列
[0906] <220>
[0907] <221> 来源
[0908] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
[0909] 肽”
[0910] <400> 52
[0911] Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr Phe
[0912] 1 5 10
[0913] <210> 53
[0914] <211> 9
[0915] <212> PRT
[0916] <213> 人工序列
[0917] <220>
[0918] <221> 来源
[0919] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
[0920] 肽”
[0921] <400> 53
[0922] Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala
[0923] 1 5
[0924] <210> 54
[0925] <211> 7
[0926] <212> PRT
[0927] <213> 人工序列
[0928] <220>
[0929] <221> 来源
[0930] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
[0931] 肽”
[0932] <400> 54
[0933] Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp
[0934] 1 5
[0935] <210> 55

- [0936] <211> 13
- [0937] <212> PRT
- [0938] <213> 人工序列
- [0939] <220>
- [0940] <221> 来源
- [0941] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
- [0942] 肽”
- [0943] <400> 55
- [0944] Cys Ala Arg Asp Asp Asp Trp Asn Asp Phe Asp Tyr Trp
- [0945] 1 5 10
- [0946] <210> 56
- [0947] <211> 10
- [0948] <212> PRT
- [0949] <213> 人工序列
- [0950] <220>
- [0951] <221> 来源
- [0952] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
- [0953] 肽”
- [0954] <400> 56
- [0955] Gly Asp Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr
- [0956] 1 5 10
- [0957] <210> 57
- [0958] <211> 7
- [0959] <212> PRT
- [0960] <213> 人工序列
- [0961] <220>
- [0962] <221> 来源
- [0963] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
- [0964] 肽”
- [0965] <400> 57
- [0966] Ile Phe Tyr Ser Gly Asn Thr
- [0967] 1 5
- [0968] <210> 58
- [0969] <211> 18
- [0970] <212> PRT
- [0971] <213> 人工序列
- [0972] <220>
- [0973] <221> 来源
- [0974] <223> /记录=“人工序列的描述:合成

[0975] 肽”
 [0976] <400> 58
 [0977] Cys Ala Arg Glu Asp Asp Phe Leu Thr Asp Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp
 [0978] 1 5 10 15
 [0979] Ile Trp
 [0980] <210> 59
 [0981] <211> 6
 [0982] <212> PRT
 [0983] <213> 人工序列
 [0984] <220>
 [0985] <221> 来源
 [0986] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0987] 肽”
 [0988] <400> 59
 [0989] Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 [0990] 1 5
 [0991] <210> 60
 [0992] <211> 3
 [0993] <212> PRT
 [0994] <213> 人工序列
 [0995] <220>
 [0996] <221> 来源
 [0997] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [0998] 肽”
 [0999] <400> 60
 [1000] Lys Ala Ser
 [1001] 1
 [1002] <210> 61
 [1003] <211> 10
 [1004] <212> PRT
 [1005] <213> 人工序列
 [1006] <220>
 [1007] <221> 来源
 [1008] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [1009] 肽”
 [1010] <400> 61
 [1011] Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Leu Thr Phe
 [1012] 1 5 10
 [1013] <210> 62

- [1014] <211> 8
- [1015] <212> PRT
- [1016] <213> 人工序列
- [1017] <220>
- [1018] <221> 来源
- [1019] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
- [1020] 肽”
- [1021] <400> 62
- [1022] Gly Phe Asp Phe Arg Ser Tyr Ala
- [1023] 1 5
- [1024] <210> 63
- [1025] <211> 10
- [1026] <212> PRT
- [1027] <213> 人工序列
- [1028] <220>
- [1029] <221> 来源
- [1030] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
- [1031] 肽”
- [1032] <400> 63
- [1033] Ile Asn Gly Glu Val Gly Gly Ser Asn Thr
- [1034] 1 5 10
- [1035] <210> 64
- [1036] <211> 18
- [1037] <212> PRT
- [1038] <213> 人工序列
- [1039] <220>
- [1040] <221> 来源
- [1041] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
- [1042] 肽”
- [1043] <400> 64
- [1044] Cys Val Lys Gly Ala Gly Ala Cys Gly Ile Cys Asn Asp Asp Ile Asp
- [1045] 1 5 10 15
- [1046] Ala Trp
- [1047] <210> 65
- [1048] <211> 7
- [1049] <212> PRT
- [1050] <213> 人工序列
- [1051] <220>
- [1052] <221> 来源

- [1053] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [1054] 肽”
 [1055] <400> 65
 [1056] Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr
 [1057] 1 5
 [1058] <210> 66
 [1059] <211> 3
 [1060] <212> PRT
 [1061] <213> 人工序列
 [1062] <220>
 [1063] <221> 来源
 [1064] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [1065] 肽”
 [1066] <400> 66
 [1067] Asp Asn Asp
 [1068] 1
 [1069] <210> 67
 [1070] <211> 13
 [1071] <212> PRT
 [1072] <213> 人工序列
 [1073] <220>
 [1074] <221> 来源
 [1075] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
 [1076] 肽”
 [1077] <400> 67
 [1078] Cys Gly Ser Thr Asn Asp Asn Asp Asp Gly Gly Leu Phe
 [1079] 1 5 10
 [1080] <210> 68
 [1081] <211> 525
 [1082] <212> PRT
 [1083] <213> Homo sapiens
 [1084] <400> 68
 [1085] Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 [1086] 1 5 10 15
 [1087] Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
 [1088] 20 25 30
 [1089] Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
 [1090] 35 40 45
 [1091] Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln

[1092]	50	55	60
[1093]	His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu		
[1094]	65	70	75 80
[1095]	Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro		
[1096]	85	90	95
[1097]	Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly		
[1098]	100	105	110
[1099]	Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln		
[1100]	115	120	125
[1101]	Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala		
[1102]	130	135	140
[1103]	Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys		
[1104]	145	150	155 160
[1105]	Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro		
[1106]	165	170	175
[1107]	Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser		
[1108]	180	185	190
[1109]	Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln		
[1110]	195	200	205
[1111]	Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser		
[1112]	210	215	220
[1113]	Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly		
[1114]	225	230	235 240
[1115]	Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn		
[1116]	245	250	255
[1117]	Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala		
[1118]	260	265	270
[1119]	Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val		
[1120]	275	280	285
[1121]	Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly		
[1122]	290	295	300
[1123]	Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu		
[1124]	305	310	315 320
[1125]	Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His		
[1126]	325	330	335
[1127]	Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr		
[1128]	340	345	350
[1129]	Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu		
[1130]	355	360	365

[1131]	Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser
[1132]	370 375 380
[1133]	Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala
[1134]	385 390 395 400
[1135]	Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln
[1136]	405 410 415
[1137]	Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser
[1138]	420 425 430
[1139]	Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly
[1140]	435 440 445
[1141]	His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
[1142]	450 455 460
[1143]	Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
[1144]	465 470 475 480
[1145]	Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
[1146]	485 490 495
[1147]	Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
[1148]	500 505 510
[1149]	Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
[1150]	515 520 525
[1151]	<210> 69
[1152]	<211> 533
[1153]	<212> PRT
[1154]	<213> 成束猴(Macaca fascicularis)
[1155]	<220>
[1156]	<221> MOD_RES
[1157]	<222> (74) .. (74)
[1158]	<223> 任何氨基酸
[1159]	<400> 69
[1160]	Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
[1161]	1 5 10 15
[1162]	Val Ala Pro Val Lys Pro Pro Gln Pro Gly Ala Glu Ile Ser Val Val
[1163]	20 25 30
[1164]	Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
[1165]	35 40 45
[1166]	Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
[1167]	50 55 60
[1168]	His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Xaa Ala Pro Gly His Pro Pro
[1169]	65 70 75 80

[1170]	Val	Pro	Gly	His	Arg	Pro	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ser	Trp	Gly	Pro	Arg	Pro
[1171]					85					90					95	
[1172]	Arg	Arg	Tyr	Thr	Val	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Ser	Gly
[1173]					100					105					110	
[1174]	Arg	Leu	Pro	Leu	Gln	Pro	Arg	Val	Gln	Leu	Asp	Glu	Arg	Gly	Arg	Gln
[1175]					115					120					125	
[1176]	Arg	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp	Leu	Arg	Pro	Ala	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala
[1177]															130	
[1178]	Gly	Glu	Tyr	Arg	Ala	Thr	Val	His	Leu	Arg	Asp	Arg	Ala	Leu	Ser	Cys
[1179]															145	
[1180]	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Val	Gly	Gln	Ala	Ser	Met	Thr	Ala	Ser	Pro	Pro
[1181]															165	
[1182]	Gly	Ser	Leu	Arg	Thr	Ser	Asp	Trp	Val	Ile	Leu	Asn	Cys	Ser	Phe	Ser
[1183]															180	
[1184]	Arg	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Ser	Val	His	Trp	Phe	Arg	Ser	Arg	Gly	Gln
[1185]															195	
[1186]	Gly	Arg	Val	Pro	Val	Gln	Gly	Ser	Pro	His	His	His	Leu	Ala	Glu	Ser
[1187]															210	
[1188]	Phe	Leu	Phe	Leu	Pro	His	Val	Gly	Pro	Met	Asp	Ser	Gly	Leu	Trp	Gly
[1189]															225	
[1190]	Cys	Ile	Leu	Thr	Tyr	Arg	Asp	Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Ile	Met	Tyr	Asn
[1191]															245	
[1192]	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ala	Thr	Pro	Leu	Thr	Val	Tyr	Ala
[1193]															260	
[1194]	Gly	Ala	Gly	Ser	Arg	Val	Glu	Leu	Pro	Cys	Arg	Leu	Pro	Pro	Ala	Val
[1195]															275	
[1196]	Gly	Thr	Gln	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Lys	Trp	Ala	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly
[1197]															290	
[1198]	Pro	Asp	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Asp	Asn	Gly	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Leu
[1199]															305	
[1200]	Glu	Asp	Val	Ser	Gln	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ile	Cys	His	Ile	Arg
[1201]															325	
[1202]	Leu	Gln	Gly	Gln	Gln	Leu	Asn	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Ala	Ile	Ile	Thr
[1203]															340	
[1204]	Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Phe	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Leu
[1205]															355	
[1206]	Cys	Glu	Val	Thr	Pro	Ala	Ser	Gly	Gln	Glu	His	Phe	Val	Trp	Ser	Pro
[1207]															370	
[1208]	Leu	Asn	Thr	Pro	Ser	Gln	Arg	Ser	Phe	Ser	Gly	Pro	Trp	Leu	Glu	Ala

[1209]	385	390	395	400
[1210]	Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu His Gln			
[1211]	405	410	415	
[1212]	Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser			
[1213]	420	425	430	
[1214]	Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Arg Ala Gly			
[1215]	435	440	445	
[1216]	His Leu Pro Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Phe Leu Leu Leu Leu			
[1217]	450	455	460	
[1218]	Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro			
[1219]	465	470	475	480
[1220]	Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln			
[1221]	485	490	495	
[1222]	Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Leu Glu Pro Glu Pro			
[1223]	500	505	510	
[1224]	Glu Leu Glu Arg Glu Leu Gly Pro Glu Pro Glu Pro Gly Pro Glu Pro			
[1225]	515	520	525	
[1226]	Glu Pro Glu Gln Leu			
[1227]	530			
[1228]	<210> 70			
[1229]	<211> 525			
[1230]	<212> PRT			
[1231]	<213>褐家鼠 (Rattus norvegicus)			
[1232]	<400> 70			
[1233]	Met Arg Gln Asp Leu Phe Leu Asp Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Trp			
[1234]	1	5	10	15
[1235]	Glu Ala Pro Val Val Ser Ser Gly Pro Gly Lys Glu Leu Ser Val Val			
[1236]	20	25	30	
[1237]	Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Val His Leu Pro Cys Ser Leu Glu Phe			
[1238]	35	40	45	
[1239]	Pro His Leu Asp Pro Asn Phe Leu Arg Arg Gly Trp Val Thr Trp Gln			
[1240]	50	55	60	
[1241]	His Arg Pro Asp Ser Asp Gln Pro Ala Ser Ile Pro Ala Leu Asp Leu			
[1242]	65	70	75	80
[1243]	Leu Gln Gly Met Pro Ser Thr Arg Arg His Pro Pro His Arg Tyr Thr			
[1244]	85	90	95	
[1245]	Val Leu Ser Val Ala Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Gln Pro Leu			
[1246]	100	105	110	
[1247]	Leu Ser His Val Gln Leu Glu Lys Arg Gly Pro Gln Arg Gly Asp Phe			

[1248]	115	120	125
[1249]	Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Thr Arg Lys Asp Ala Gly Glu Tyr His		
[1250]	130	135	140
[1251]	Ala Phe Val Arg Leu Pro Asp Arg Asp Phe Ser Cys Ser Leu Arg Leu		
[1252]	145	150	155
[1253]	Arg Val Gly Gln Ala Ser Met Ile Ala Ser Pro Pro Gly Thr Leu Lys		
[1254]	165	170	175
[1255]	Pro Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg		
[1256]	180	185	190
[1257]	Pro Val Ser Val His Trp Phe Gln Gly Gln Ser Arg Val Pro Val His		
[1258]	195	200	205
[1259]	Asn Ser Pro Arg His Tyr Leu Ala Glu Ser Phe Leu Leu Leu Pro Gln		
[1260]	210	215	220
[1261]	Val Ser Pro Leu Asp Ser Gly Thr Trp Gly Cys Val Leu Thr Tyr Arg		
[1262]	225	230	235
[1263]	Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Thr Tyr Asn Leu Lys Val Gln Gly Leu		
[1264]	245	250	255
[1265]	Glu Pro Val Ala Pro Leu Thr Val Tyr Ala Ala Glu Gly Ser Arg Val		
[1266]	260	265	270
[1267]	Glu Leu Pro Cys His Leu Pro Pro Val Val Gly Thr Pro Ser Leu Leu		
[1268]	275	280	285
[1269]	Ile Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly Pro Glu Leu Pro Val Thr		
[1270]	290	295	300
[1271]	Gly Lys Ser Gly Asn Phe Thr Leu Gln Leu Glu Asn Val Gly Arg Ala		
[1272]	305	310	315
[1273]	Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys Ser Ile His Leu Gln Gly Arg Gln Leu		
[1274]	325	330	335
[1275]	Ser Ala Ala Val Thr Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe		
[1276]	340	345	350
[1277]	Gly Leu Pro Gly Ser Pro Gln Lys Leu Leu Cys Glu Val Val Pro Ala		
[1278]	355	360	365
[1279]	Ser Gly Glu Gly Arg Phe Val Trp Arg Pro Leu Ser Asp Leu Ser Arg		
[1280]	370	375	380
[1281]	Ser Ser Leu Gly Pro Val Leu Glu Leu Gln Glu Ala Lys Leu Leu Ala		
[1282]	385	390	395
[1283]	Glu Gln Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Glu Gly Gln Lys Leu Leu Gly Ala		
[1284]	405	410	415
[1285]	Thr Val Tyr Thr Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala Trp Ser Ala Lys Arg		
[1286]	420	425	430

[1287]	Ile Ser Gly Asp Leu Lys Gly Gly His Leu Phe Leu Ser Leu Ile Leu
[1288]	435 440 445
[1289]	Gly Ala Leu Ala Leu Phe Leu Leu Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His
[1290]	450 455 460
[1291]	Leu Trp Arg Arg Gln Leu Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu His
[1292]	465 470 475 480
[1293]	Gly Ile Arg Pro Pro Pro Val Gln Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Arg
[1294]	485 490 495
[1295]	Glu Pro Glu Thr Glu Met Glu Pro Glu Thr Glu Pro Asp Pro Glu Pro
[1296]	500 505 510
[1297]	Gln Pro Glu Pro Glu Leu Glu Pro Glu Ser Arg Gln Leu
[1298]	515 520 525
[1299]	<210> 71
[1300]	<211> 476
[1301]	<212> PRT
[1302]	<213>家犬(Canis familiaris)
[1303]	<400> 71
[1304]	Met Trp Glu Val Gln Phe Leu Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Trp
[1305]	1 5 10 15
[1306]	Val Ala Pro Val Ala Ala Pro Gly Ser Gly Thr Glu Val Gln Val Val
[1307]	20 25 30
[1308]	Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Val Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
[1309]	35 40 45
[1310]	Pro Leu Gln Asp Val Ser Leu Leu Arg Asn Ala Gly Val Thr Trp Tyr
[1311]	50 55 60
[1312]	His Leu Pro Glu Ser Gly Pro Ala Ala Pro Ala Leu Ser Leu Arg Pro
[1313]	65 70 75 80
[1314]	Ala Ala Pro Ser Ala Arg Gly Pro Gly Pro Arg Ser Tyr Val Val Leu
[1315]	85 90 95
[1316]	Met Arg Ala Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Leu Val Pro Thr Val Asn
[1317]	100 105 110
[1318]	Ala Leu Ala Leu Asn Ser Pro Gly Pro Thr Arg Phe Ser Leu Ala Leu
[1319]	115 120 125
[1320]	Gln Thr Val Ile Ser Leu Pro His Ser Trp Leu Phe Pro Gly Pro Ser
[1321]	130 135 140
[1322]	Ser Leu Pro Gly Gln Pro Leu Ala Ser Cys Trp Pro Ser Pro His Val
[1323]	145 150 155 160
[1324]	Gly Val Gly Cys Val Cys Glu His Pro Pro Phe Ile His Leu Thr Leu
[1325]	165 170 175

[1326]	Leu Pro Ala Arg Gln Ser Pro Leu Leu Phe Leu Leu Pro Ser Leu Gln
[1327]	180 185 190
[1328]	Pro Gln Cys Ser Ala Ser Leu Tyr Leu Ser Leu Ser Ala Ser Thr Leu
[1329]	195 200 205
[1330]	Ala Ser Ser Phe Pro Gly Leu Glu Pro Ser Gly Pro Leu Thr Val Tyr
[1331]	210 215 220
[1332]	Thr Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Pro Gly
[1333]	225 230 235 240
[1334]	Val Gly Thr Gln Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly
[1335]	245 250 255
[1336]	Gly Pro Asp Leu Leu Val Ala Gly Asp Asp Gly Asn Phe Thr Leu Gln
[1337]	260 265 270
[1338]	Leu Glu Val Val Asn Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile
[1339]	275 280 285
[1340]	His Leu Gln Gly Gln Gln Leu Ser Thr Thr Val Thr Leu Ala Val Ile
[1341]	290 295 300
[1342]	Thr Val Thr Pro Lys Ser Ser Gly Leu Pro Gly Asn Leu Arg Lys Leu
[1343]	305 310 315 320
[1344]	Leu Cys Glu Val Thr Pro Ala Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser
[1345]	325 330 335
[1346]	Pro Leu Asp Lys Gln Ser Trp Arg Gly Ser Pro Gly Pro Cys Leu Glu
[1347]	340 345 350
[1348]	Met Gln Glu Thr Arg Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys His Val Tyr
[1349]	355 360 365
[1350]	Gln Ala Glu Arg Leu Leu Gly Thr Ala Val Tyr Leu Ile Asp Pro Ala
[1351]	370 375 380
[1352]	Gly Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Gln Gly Val Leu Lys Thr
[1353]	385 390 395 400
[1354]	Gly His Leu Ser Leu Leu Leu Ile Leu Gly Ile Leu Phe Leu Leu Leu
[1355]	405 410 415
[1356]	Leu Met Thr Gly Ala Phe Gly Phe Gln Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg
[1357]	420 425 430
[1358]	Pro Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Leu Gly Thr His Pro Pro Gln Ala
[1359]	435 440 445
[1360]	Gln Ser Lys Ile Gly Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Leu Glu Leu Glu
[1361]	450 455 460
[1362]	Pro Glu Pro Glu Leu Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu
[1363]	465 470 475
[1364]	<210> 72

[1365] <211> 521
 [1366] <212> PRT
 [1367] <213>小家鼠 (Mus musculus)
 [1368] <400> 72
 [1369] Met Arg Glu Asp Leu Leu Leu Gly Phe Leu Leu Leu Gly Leu Leu Trp
 [1370] 1 5 10 15
 [1371] Glu Ala Pro Val Val Ser Ser Gly Pro Gly Lys Glu Leu Pro Val Val
 [1372] 20 25 30
 [1373] Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Val His Leu Pro Cys Ser Leu Lys Ser
 [1374] 35 40 45
 [1375] Pro Asn Leu Asp Pro Asn Phe Leu Arg Arg Gly Gly Val Ile Trp Gln
 [1376] 50 55 60
 [1377] His Gln Pro Asp Ser Gly Gln Pro Thr Pro Ile Pro Ala Leu Asp Leu
 [1378] 65 70 75 80
 [1379] His Gln Gly Met Pro Ser Pro Arg Gln Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Thr
 [1380] 85 90 95
 [1381] Val Leu Ser Val Ala Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Gln Pro Leu
 [1382] 100 105 110
 [1383] His Pro His Val Gln Leu Glu Glu Arg Gly Leu Gln Arg Gly Asp Phe
 [1384] 115 120 125
 [1385] Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Leu Arg Thr Asp Ala Gly Glu Tyr His
 [1386] 130 135 140
 [1387] Ala Thr Val Arg Leu Pro Asn Arg Ala Leu Ser Cys Ser Leu Arg Leu
 [1388] 145 150 155 160
 [1389] Arg Val Gly Gln Ala Ser Met Ile Ala Ser Pro Ser Gly Val Leu Lys
 [1390] 165 170 175
 [1391] Leu Ser Asp Trp Val Leu Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg
 [1392] 180 185 190
 [1393] Pro Val Ser Val His Trp Phe Gln Gly Gln Asn Arg Val Pro Val Tyr
 [1394] 195 200 205
 [1395] Asn Ser Pro Arg His Phe Leu Ala Glu Thr Phe Leu Leu Leu Pro Gln
 [1396] 210 215 220
 [1397] Val Ser Pro Leu Asp Ser Gly Thr Trp Gly Cys Val Leu Thr Tyr Arg
 [1398] 225 230 235 240
 [1399] Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Thr Tyr Asn Leu Lys Val Leu Gly Leu
 [1400] 245 250 255
 [1401] Glu Pro Val Ala Pro Leu Thr Val Tyr Ala Ala Glu Gly Ser Arg Val
 [1402] 260 265 270
 [1403] Glu Leu Pro Cys His Leu Pro Pro Gly Val Gly Thr Pro Ser Leu Leu

[1404]	275	280	285
[1405]	Ile Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly Pro Glu Leu Pro Val Ala		
[1406]	290	295	300
[1407]	Gly Lys Ser Gly Asn Phe Thr Leu His Leu Glu Ala Val Gly Leu Ala		
[1408]	305	310	315
[1409]	Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys Ser Ile His Leu Gln Gly Gln Gln Leu		
[1410]	325	330	335
[1411]	Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Val Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe		
[1412]	340	345	350
[1413]	Gly Leu Pro Gly Ser Arg Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Ala		
[1414]	355	360	365
[1415]	Ser Gly Lys Glu Arg Phe Val Trp Arg Pro Leu Asn Asn Leu Ser Arg		
[1416]	370	375	380
[1417]	Ser Cys Pro Gly Pro Val Leu Glu Ile Gln Glu Ala Arg Leu Leu Ala		
[1418]	385	390	395
[1419]	Glu Arg Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Glu Gly Gln Arg Leu Leu Gly Ala		
[1420]	405	410	415
[1421]	Thr Val Tyr Ala Ala Glu Ser Ser Ser Gly Ala His Ser Ala Arg Arg		
[1422]	420	425	430
[1423]	Ile Ser Gly Asp Leu Lys Gly Gly His Leu Val Leu Val Leu Ile Leu		
[1424]	435	440	445
[1425]	Gly Ala Leu Ser Leu Phe Leu Leu Val Ala Gly Ala Phe Gly Phe His		
[1426]	450	455	460
[1427]	Trp Trp Arg Lys Gln Leu Leu Leu Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu His		
[1428]	465	470	475
[1429]	Gly Ile Gln Pro Phe Pro Ala Gln Arg Lys Ile Glu Glu Leu Glu Arg		
[1430]	485	490	495
[1431]	Glu Leu Glu Thr Glu Met Gly Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro		
[1432]	500	505	510
[1433]	Gln Leu Glu Pro Glu Pro Arg Gln Leu		
[1434]	515	520	
[1435]	<210> 73		
[1436]	<211> 6		
[1437]	<212> PRT		
[1438]	<213> 未知		
[1439]	<220>		
[1440]	<221> 来源		
[1441]	<223> /记录=“未知者的描述:		
[1442]	LAG-3 基序”		

- [1443] <400> 73
[1444] Lys Ile Glu Glu Leu Glu
[1445] 1 5
[1446] <210> 74
[1447] <211> 15
[1448] <212> PRT
[1449] <213> 人工序列
[1450] <220>
[1451] <221> 来源
[1452] <223> /记录=“人工序列的描述:合成
[1453] 肽”
[1454] <400> 74
[1455] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[1456] 1 5 10 15

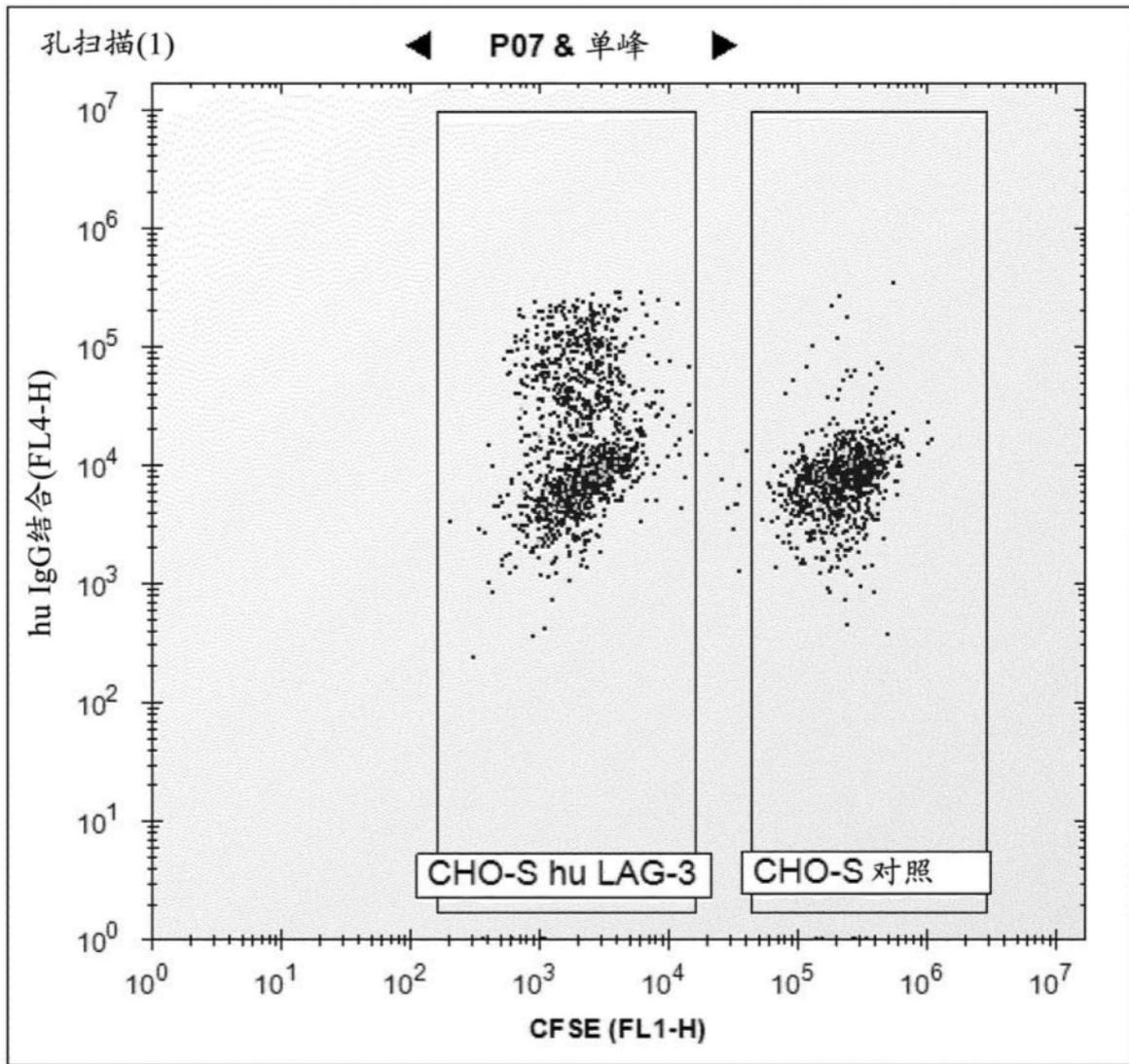


图1A

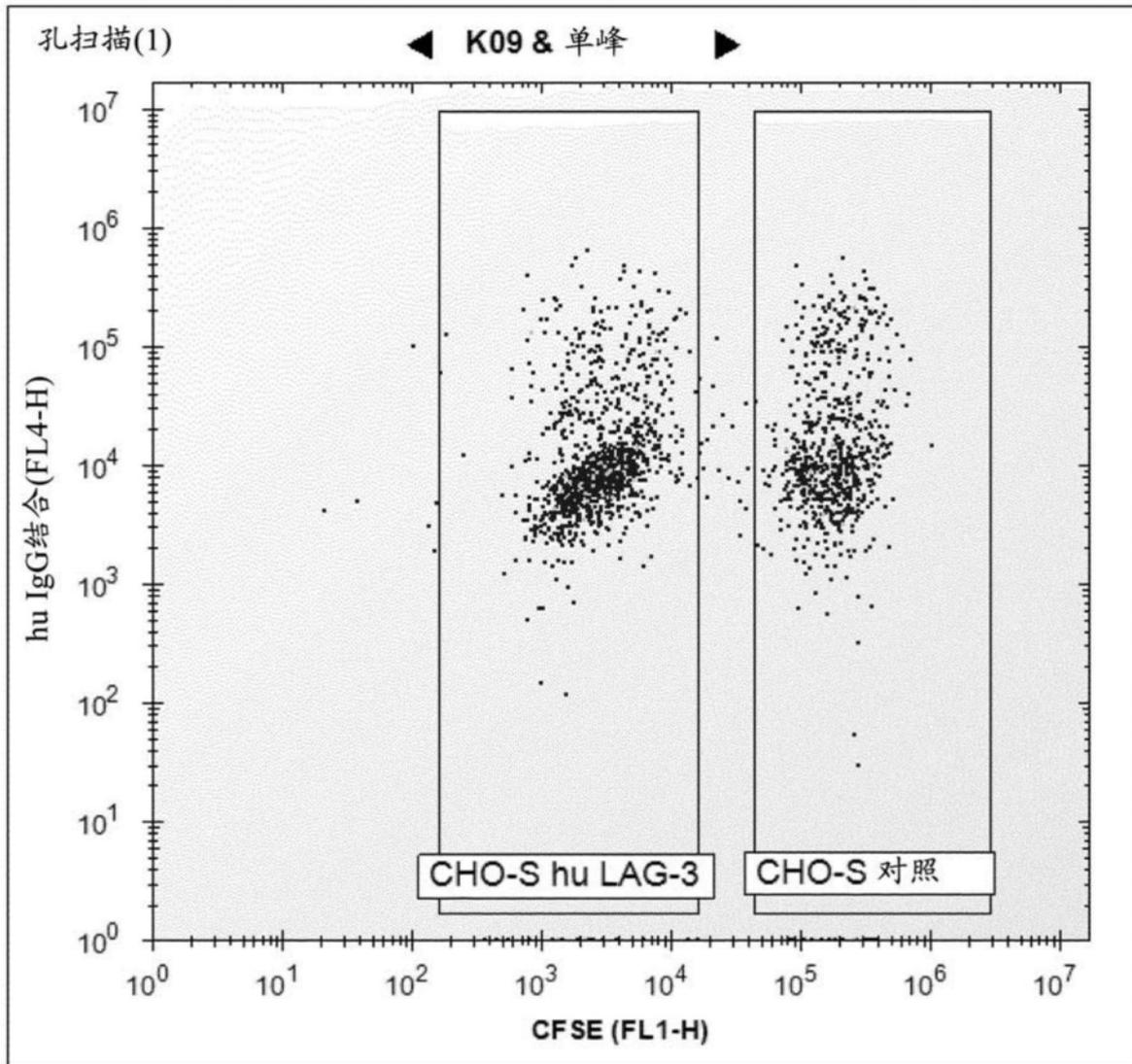


图1B

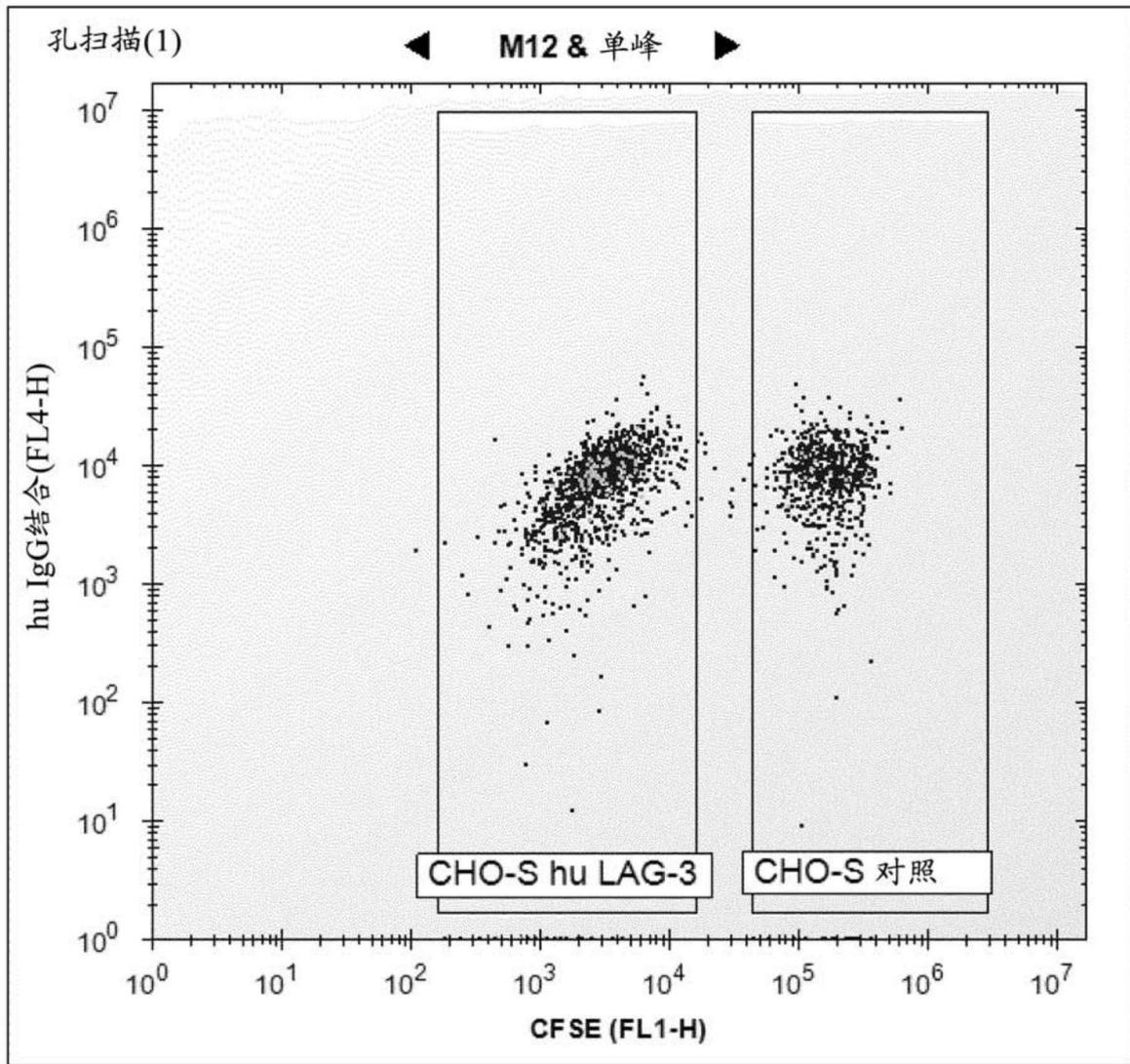


图1C

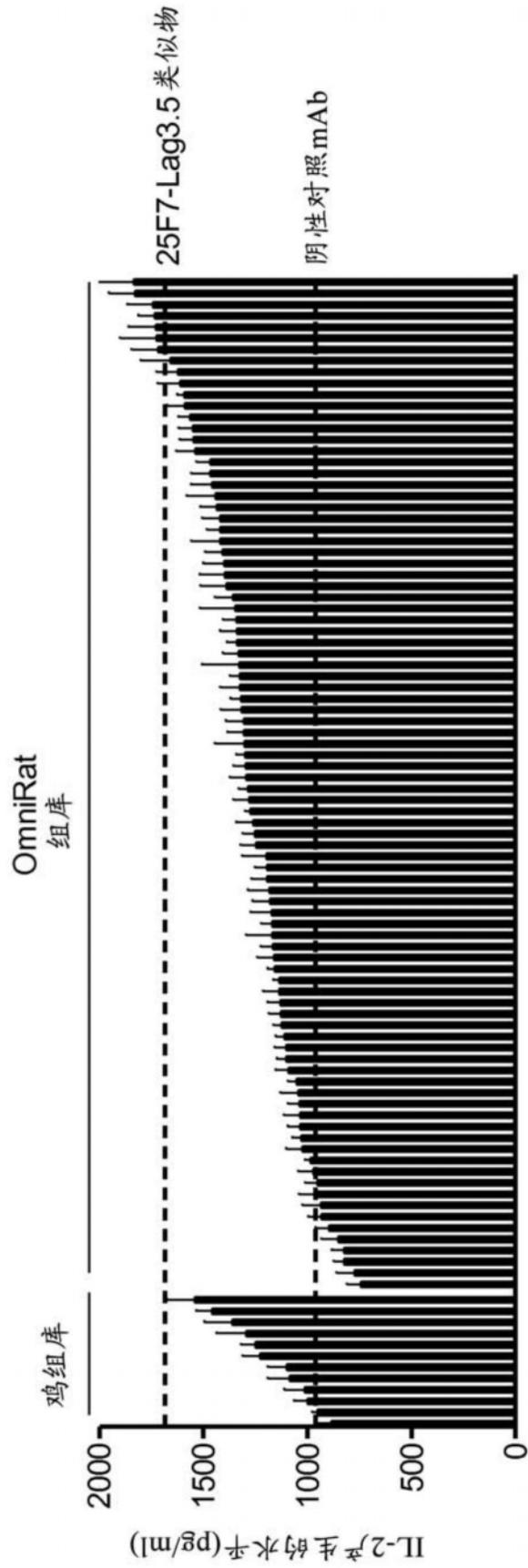


图2

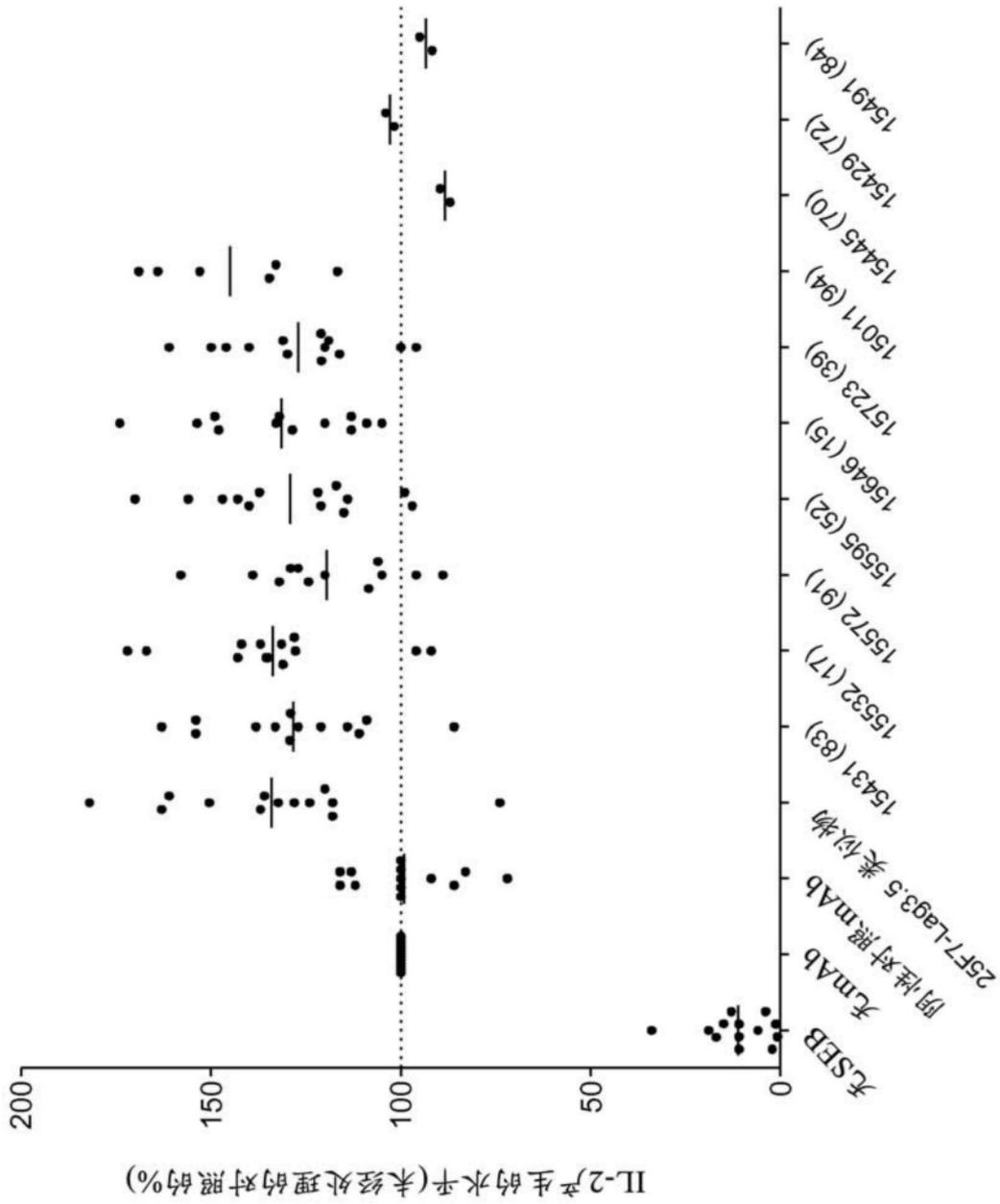


图3

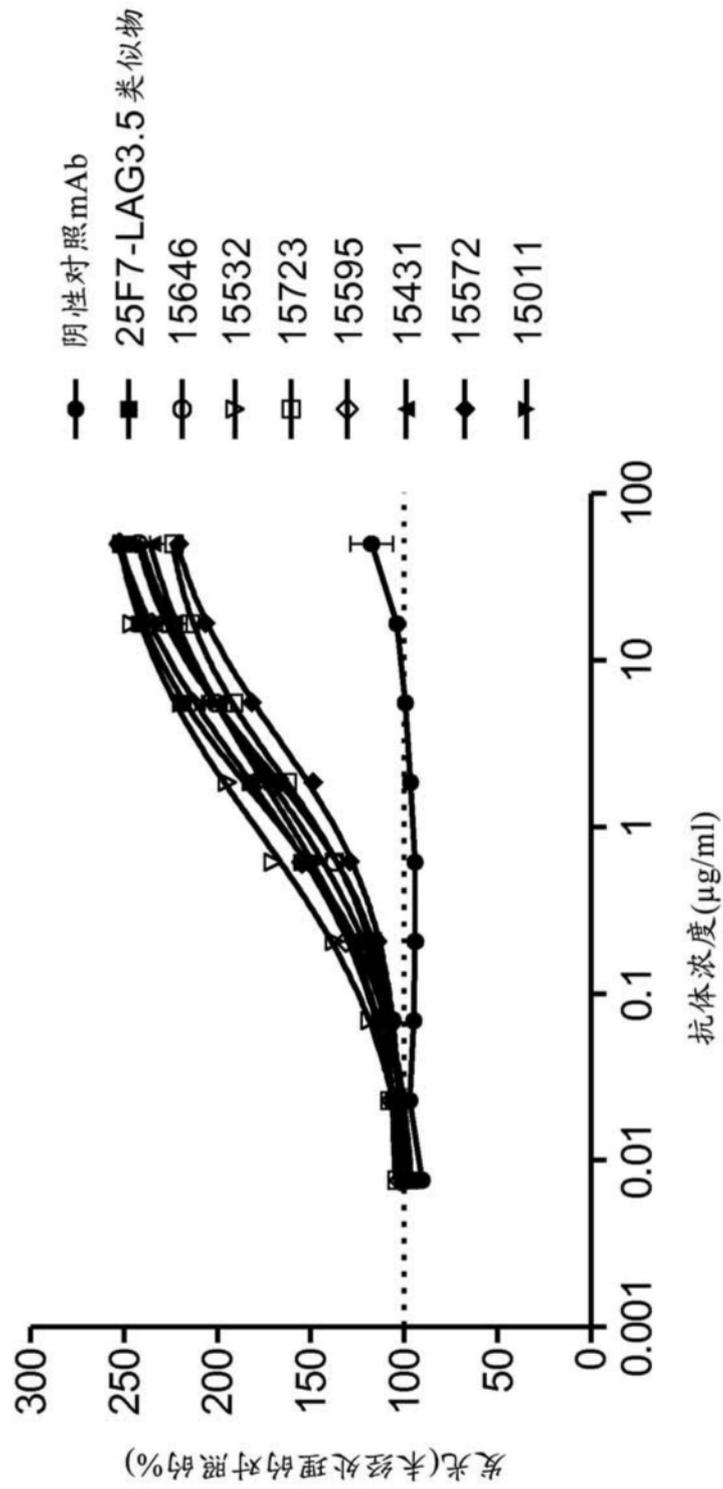


图4

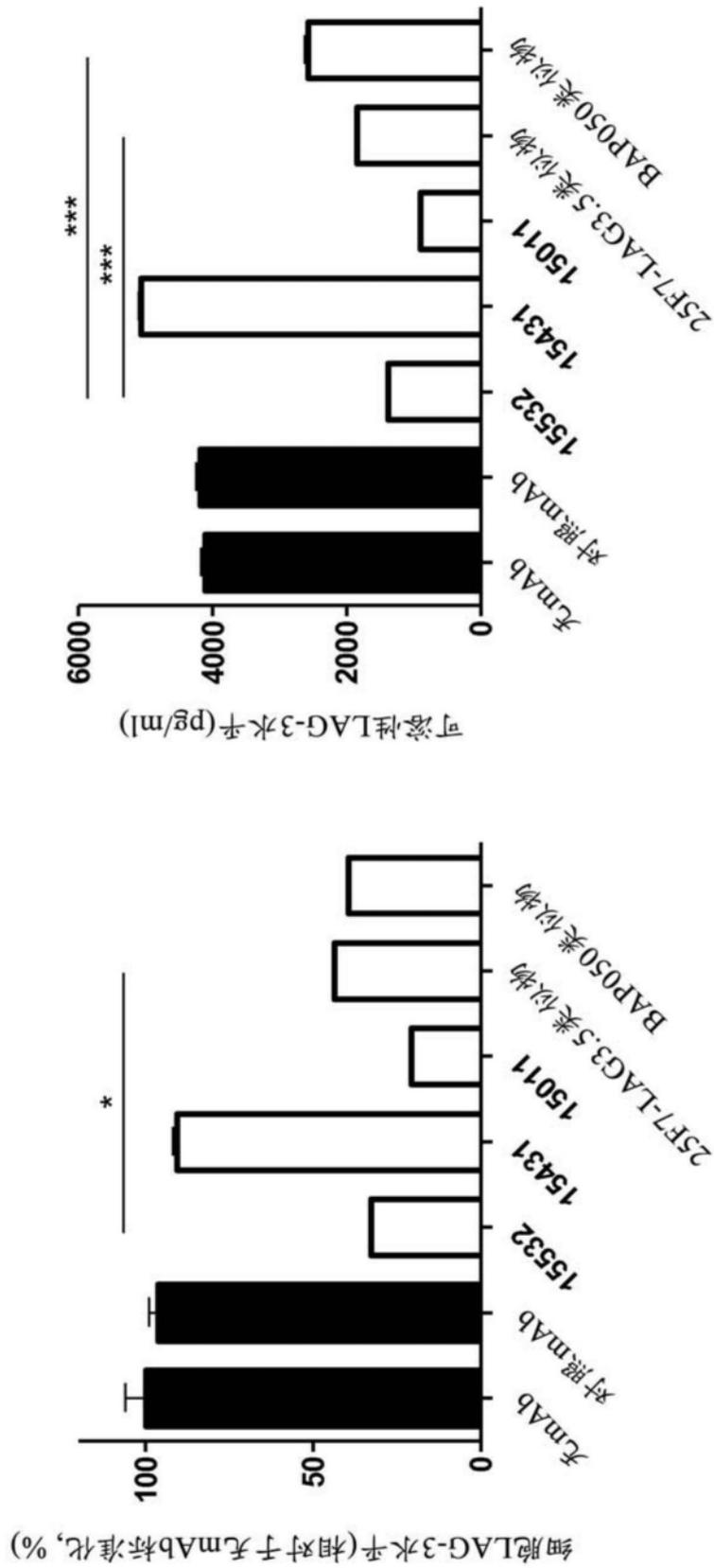


图5

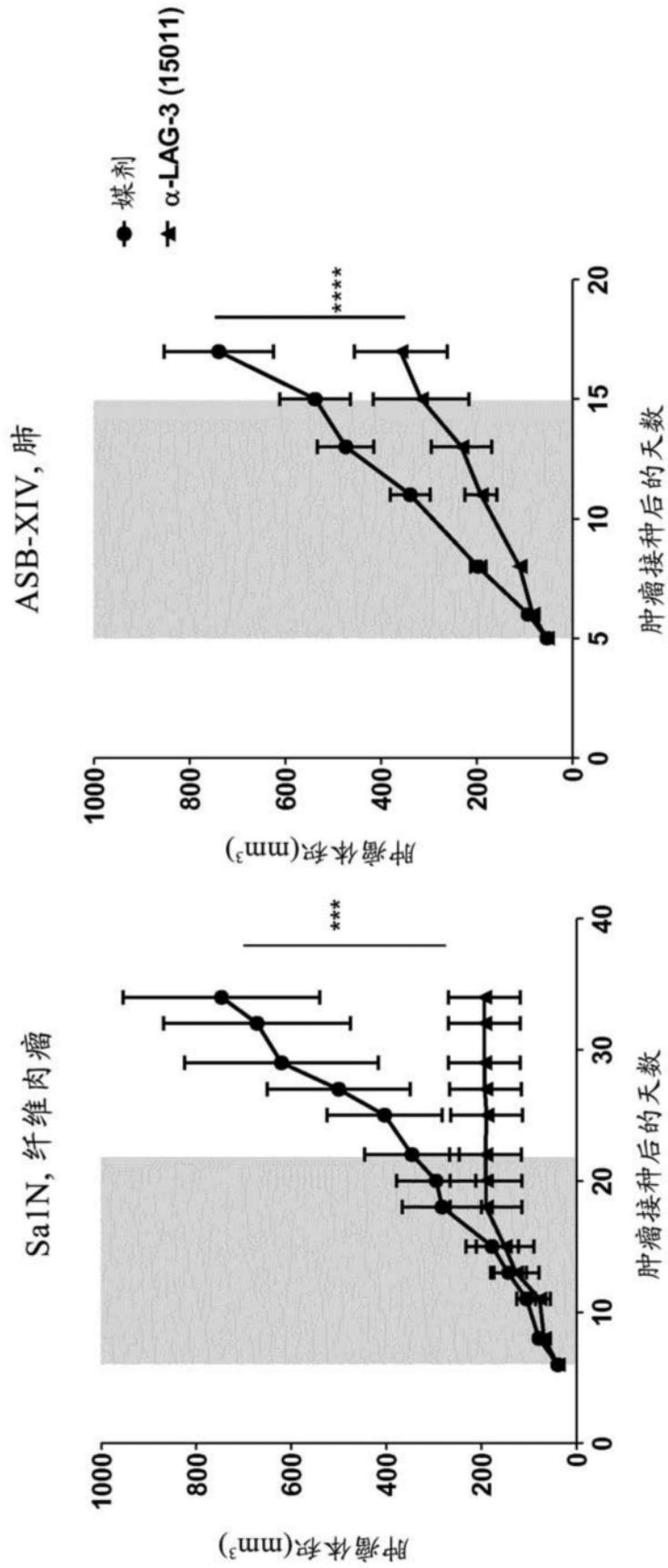


图6

人黑素瘤 A375 异种移植物

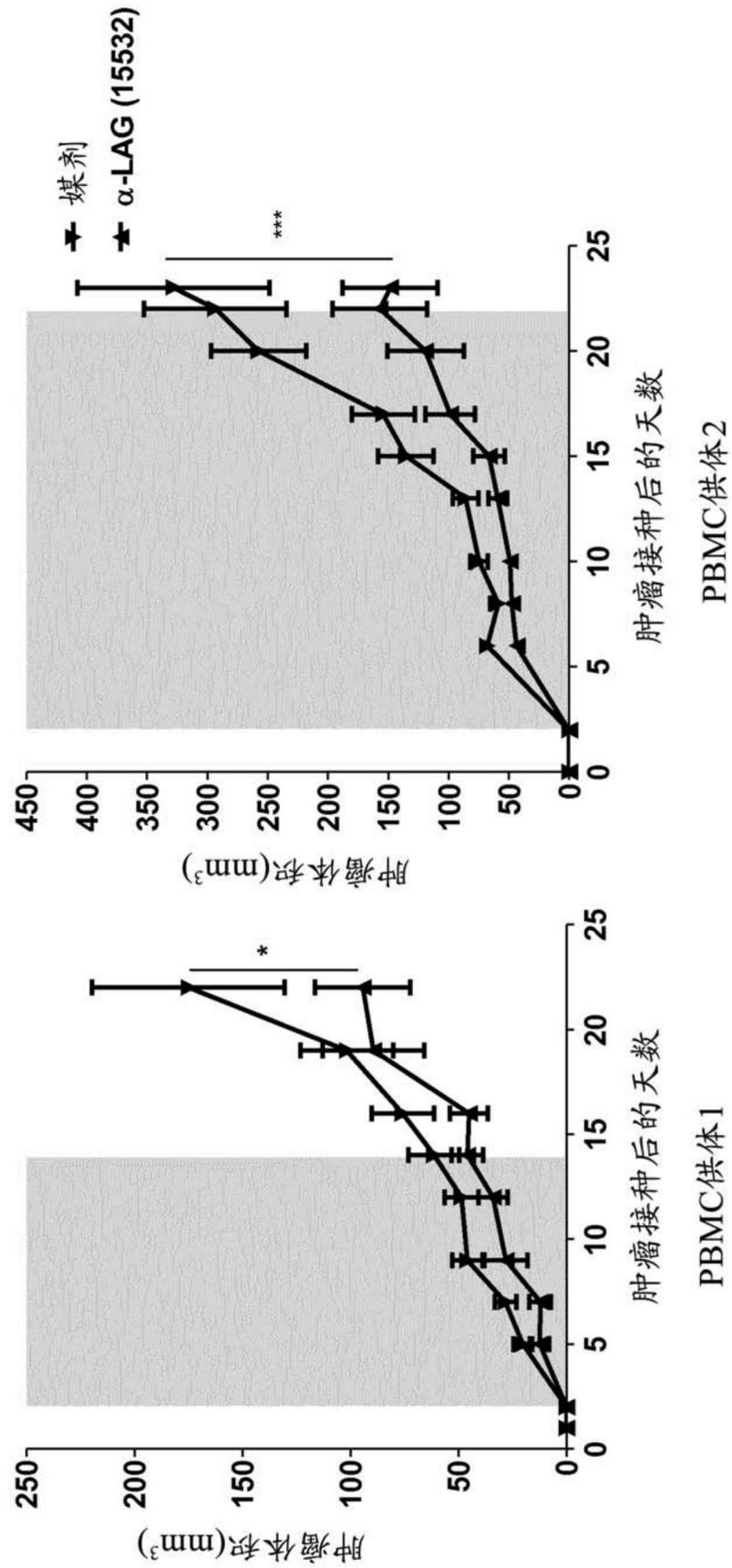


图7

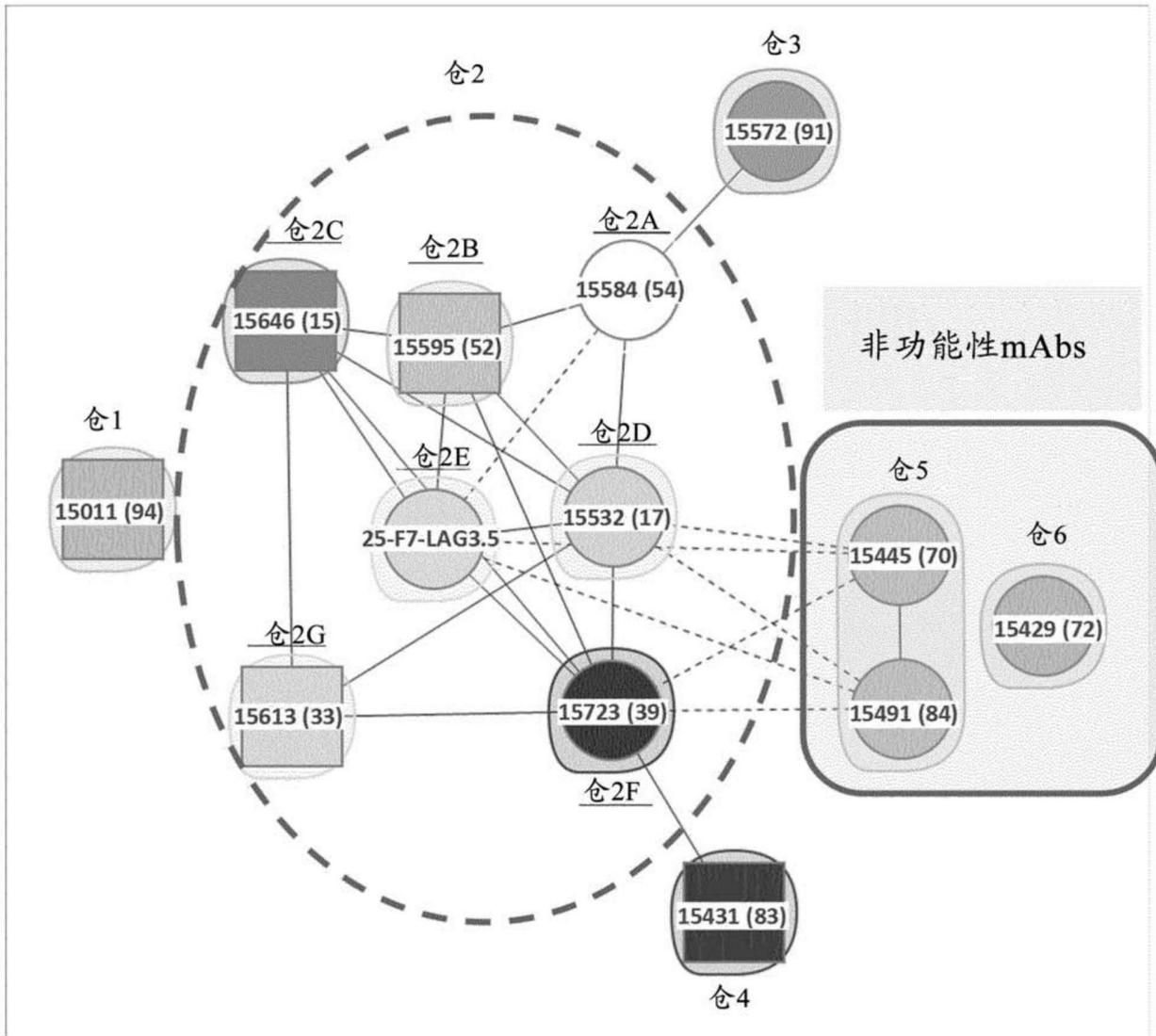


图8

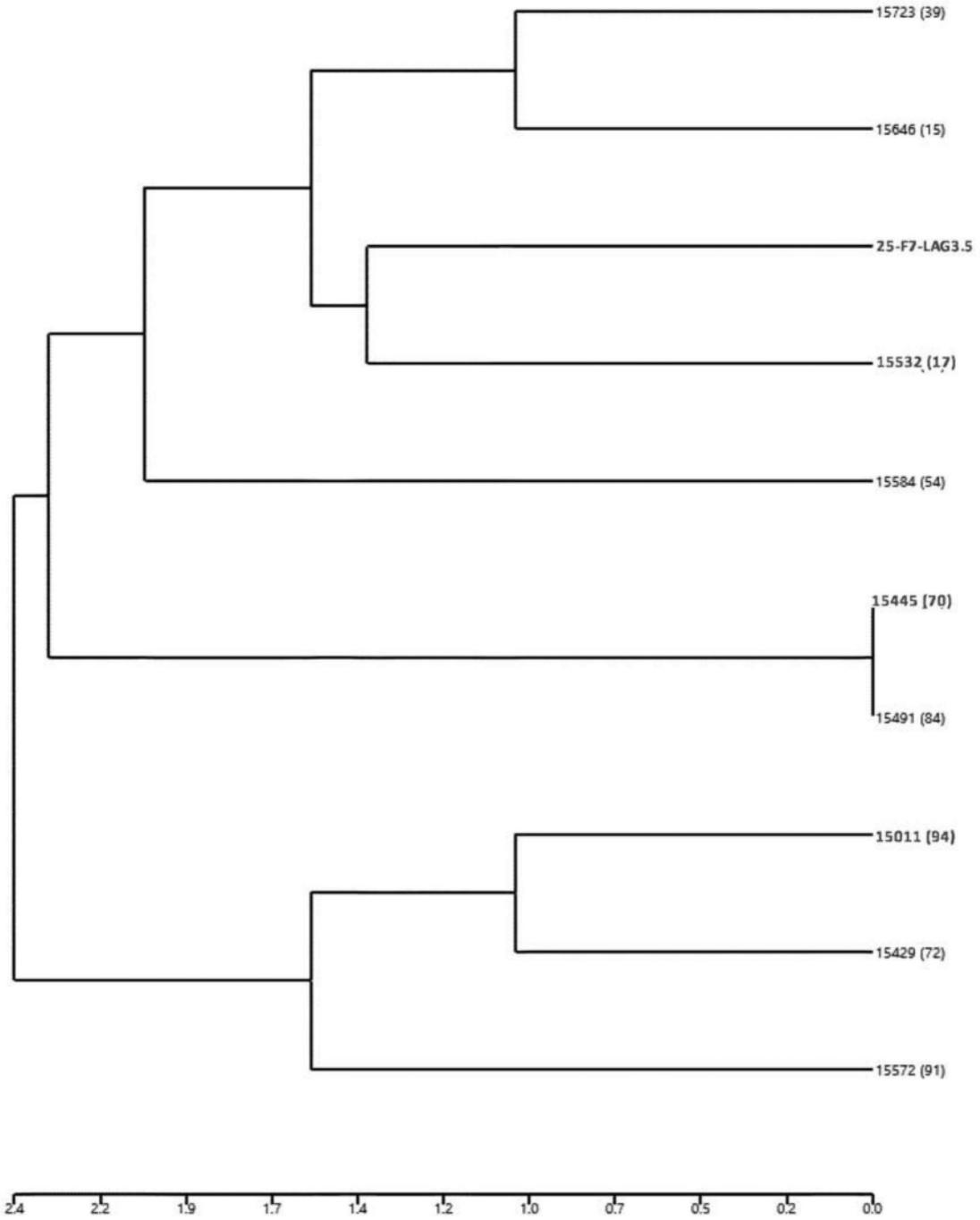


图9