



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107530420 B

(45) 授权公告日 2021.10.08

(21) 申请号 201580071388.7

(72) 发明人 汪正一 胡雪玲 杨淑斌 吴云佩

(22) 申请日 2015.10.27

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107530420 A

代理人 崔佳佳 陆凤

(43) 申请公布日 2018.01.02

(51) Int.CI.

A61K 39/395 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 16/28 (2006.01)

1419094.6 2014.10.27 GB

A61P 31/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 35/00 (2006.01)

2017.06.27

A61P 37/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/SG2015/050414 2015.10.27

CN 102492038 A, 2012.06.13

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 2013006490 A2, 2013.01.10

W02016/068802 EN 2016.05.06

CN 103079644 A, 2013.05.01

(73) 专利权人 新加坡科技研究局

审查员 李恩

地址 新加坡新加坡市

权利要求书3页 说明书31页

序列表24页 附图19页

(54) 发明名称

抗TIM-3抗体

(57) 摘要

公开了抗TIM-3抗体,以及包含这种抗体的药物组合物,以及使用这种抗体的用途和方法,例如在治疗癌症或感染性疾病或T细胞功能障碍性疾病方面。还公开了针对TIM-3和其它靶标的双特异性抗体,在优选的实施方案中双特异性抗体针对TIM-3和CD3。

1B9 克隆

QSVLTQPPSVAAPGQKVTCSCGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWWRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCEAWDYYVAAGYFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:1)

LC-CDR1: SGSSSNIGNNNYVS (SEQ ID NO:10)

LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: EAWDYYVAAGY (SEQ ID NO:12)

1H9 克隆

QSVLTQPPSVAAPGQKVTCSCGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWWRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCDSWDSADASGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:2)

LC-CDR1: SGSSSNIGNNNYVS (SEQ ID NO:10)

LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: DSWDSADASGV (SEQ ID NO:13)

1H10

QSVLTQPPSVAAPGQKVTCSCGSSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWWRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCDSWDYDYAAGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:3)

LC-CDR1: SGSSSNIGNNNYVS (SEQ ID NO:10)

LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: DSWDYDYAAGV (SEQ ID NO:14)

1. 一种抗体或抗原结合片段, 其能够结合至TIM-3, 具有

(i) 包含以下CDR的轻链可变区:

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: DSWDSADASGV (SEQ ID NO:13); 和

包含以下CDR的重链可变区:

HC-CDR1: GYYWS (SEQ ID NO:61), 或

GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGFDD (SEQ ID NO:33);

或

(ii) 包含以下CDR的轻链可变区:

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: DSWDYDYAAGV (SEQ ID NO:14); 和

包含以下CDR的重链可变区:

HC-CDR1: GYYWS (SEQ ID NO:61), 或

GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGFDS (SEQ ID NO:34);

或

(iii) 包含以下CDR的轻链可变区:

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: ESWDYDYASGV (SEQ ID NO:16); 和

包含以下CDR的重链可变区:

HC-CDR1: GYYWS (SEQ ID NO:61), 或

GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGSDA (SEQ ID NO:36)。

2. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合片段, 包含重链可变区序列和轻链可变区序列, 其中:

所述重链可变区序列与SEQ ID NO:22的重链可变区序列具有至少85%的序列同一性, 和

所述轻链可变区序列与SEQ ID NO:2的轻链可变区序列具有至少85%的序列同一性。

3. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合片段, 包含重链可变区序列和轻链可变区序列, 其中:

所述重链可变区序列与SEQ ID NO:23的重链可变区序列具有至少85%的序列同一性, 和

所述轻链可变区序列与SEQ ID NO:3的轻链可变区序列具有至少85%的序列同一性。

4. 根据权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,包含重链可变区序列和轻链可变区序列,其中:

所述重链可变区序列与SEQ ID NO:25的重链可变区序列具有至少85%的序列同一性,和

所述轻链可变区序列与SEQ ID NO:5的轻链可变区序列具有至少85%的序列同一性。

5. 根据权利要求1至4中任一一所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体是细胞毒性的。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体有效恢复显示T细胞耗尽或T细胞无反应性的T细胞中的T细胞功能。

7. 一种抗体或抗原结合片段,能够结合至TIM-3,所述抗体或抗原结合片段是双特异性抗体或双特异性抗原结合片段,其包含 (i) 根据权利要求1至6中任一项所述的抗原结合片段,和 (ii) 能够结合除TIM-3之外的靶蛋白的抗原结合结构域。

8. 权利要求7所述的抗体或抗原结合片段,其中能够结合除TIM-3之外的靶蛋白的抗原结合结构域能够结合至CD3或CD3多肽。

9. 一种体外复合物,其包含根据权利要求1至8中任一项所述的与TIM-3结合的抗体或抗原结合片段。

10. 一种组合物,其包含权利要求1至8中任一项所述的抗体或抗原结合片段和至少一种药学上可接受的载体。

11. 一种分离的核酸,其编码权利要求1至8中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

12. 一种载体,其包含权利要求11所述的核酸。

13. 一种宿主细胞,其包含权利要求12所述的载体。

14. 一种制备权利要求1至8中任一项所述的抗体或抗原结合片段的方法,包括在适于表达编码所述抗体或抗原结合片段的载体的条件下培养权利要求13所述任一宿主细胞,并回收所述抗体或抗原结合片段。

15. 根据权利要求1至8中任一项所述的抗体,或抗原结合片段在制备用于治疗急性骨髓性白血病(AML)的药物中的用途。

16. 一种体外杀伤表达TIM-3的细胞的方法,包括将根据权利要求1至8中任一项所述的抗体或抗原结合片段和T细胞施用于表达TIM-3的细胞,其中,细胞通过T细胞介导的细胞杀伤作用被杀死。

17. 一种权利要求1至8中任一项所述的抗体或抗原结合片段在制备检测试剂盒中的用途,所述用途用于如下方法中,所述方法包括将含有或怀疑含有TIM-3的样品与所述的抗体或抗原结合片段接触,并检测抗体或抗原结合片段与TIM-3的复合物的形成。

18. 一种权利要求1至8中任一项所述的抗体或抗原结合片段在制备诊断试剂盒中的用途,所述用途用于诊断受试者的疾病或病症的方法中,其中所述方法包括在体外将来自受试者的样品与所述的抗体或抗原结合片段接触,并检测抗体或抗原结合片段与TIM-3的复合物的形成。

19. 一种权利要求1至8中任一项所述的抗体或抗原结合片段在制备诊断试剂盒中的用途,所述用途用于对受试者进行选择或分层以便用TIM-3信号调节剂治疗的方法中,其中所

述方法包括在体外将来自受试者的样品与所述的抗体或抗原结合片段接触，并检测抗体或抗原结合片段与TIM-3的复合物的形成。

20. 根据权利要求1-8中任一项所述的抗体或抗原结合片段的用途，用于制备体外检测TIM-3的检测试剂盒。

21. 一种用于扩增T细胞群体的方法，其中T细胞在体外或离体与根据权利要求1至8中任一项所述的抗体或抗原结合片段接触。

22. 一种嵌合抗原受体 (CAR) , 其包含权利要求1-8中任一项所述的抗原结合片段。

抗TIM-3抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及结合至T细胞免疫球蛋白粘蛋白3 (TIM-3) 的抗体。

背景技术

[0002] T细胞耗竭是许多慢性感染和癌症中出现的T细胞功能障碍的状态。它定义为T细胞效应子功能不良,抑制性受体的持续表达和与功能性效应子或记忆性T细胞的转录状态不同的转录状态。耗尽可以防止感染和肿瘤的最佳控制。(E John Wherry, *Nature Immunology* 12,492-499 (2011))。

[0003] T细胞耗竭的特征在于T细胞功能的逐步和渐进性丧失。在慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒感染期间,耗竭是明确的,并且通常在许多慢性感染(包括乙型肝炎病毒,丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒感染)后的抗原持久性的条件下以及肿瘤转移期间发生。耗竭不是一致的无能力情况,因为表型和功能缺陷的分级可以显化,这些细胞与原型效应细胞,记忆和无能T细胞不同。耗竭的T细胞在高等级慢性感染期间最常出现,抗原刺激的水平和持续时间是该过程的关键决定因素。(Yi等, *Immunology* Apr 2010;129 (4) :474-481)。

[0004] 循环人肿瘤特异性CD8+T细胞可能是细胞毒性的并且在体内产生细胞因子,表明自身和肿瘤特异性的人CD8⁺T细胞在有效的免疫治疗,如用肽,不完全弗氏佐剂(IFA)和CpG接种或过继转移后,能够达到功能的能力。与外周血相比,转移的T细胞功能缺陷,细胞因子产生异常低,并且抑制性受体PD-1,CTLA-4和TIM-3上调。功能缺陷是可逆的,因为从黑素瘤组织分离的T细胞在短期体外培养后可以恢复IFN- γ 产生。然而,仍然要确定这种功能障碍是否涉及进一步的分子途径,可能类似于动物模型中定义的T细胞耗尽或无反应性。(Baitsch等, *J Clin Invest.* 2011;121 (6) :2350-2360)。

[0005] 程序性细胞死亡(受体)1 (PD-1),也称为CD279,是PDCD1基因在人中编码的I型膜蛋白。它有两个配体PD-L1和PD-L2。

[0006] PD-1途径是T细胞耗竭的关键免疫抑制介质。阻断该途径可导致T细胞活化,扩增和增强的效应子功能。因此,PD-1负调节T细胞反应。已经将PD-1鉴定为慢性疾病状态中耗竭的T细胞的标志物,并且已经显示阻断PD-1:PD-1L相互作用部分恢复T细胞功能。(Sakuishi等, *JEM* 第207卷,2010年9月27日,pp2187-2194)。

[0007] 纳武单抗(Nivolumab) (BMS-936558)是2014年7月在日本被批准用于治疗黑色素瘤的抗PD-1抗体。其他抗PD-1抗体描述于WO 2010/077634,WO 2006/121168中。

[0008] T细胞免疫球蛋白粘蛋白3 (TIM-3)是被鉴定为在耗尽的CD8⁺T细胞上上调的免疫调节剂(Sakuishi等, *JEM* Vol. 207,2010年9月27日,pp2187-2194)。最初鉴定出TIM-3在分泌IFN- γ 的Th1和Tc1细胞上选择性表达。TIM-3与其配体Galectin(半乳糖凝集素)-9的相互作用在TIM-3⁺T细胞中触发细胞死亡。抗TIM-3抗体描述于Ngiow等(*Cancer Res.*, 2011年5月15日;71 (10) :3540-51),以及US 8,552,156中。

[0009] TIM-3和PD-1可以作为T细胞反应的负调节因子,并且TIM-3和PD-1途径的组合靶向在控制肿瘤生长方面比单独靶向任何一个途径更有效。(Sakuishi等, *JEM* Vol. 207,2010

年9月27日,pp2187-2194;和Ngiow等Cancer Res.2011年5月15日;71(10):3540-51)。

[0010] TIM-3也可以在肿瘤细胞,特别是造血起源的肿瘤细胞表面表达,例如急性骨髓性白血病细胞(Kikushige等,Cell Stem Cell 2010;3:7(6)708-17),因此,在某些情况下,TIM-3可能是可能被特异性抗体靶向的肿瘤相关抗原。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明涉及与TIM-3结合的抗体或抗原结合片段。还公开了重链和轻链多肽。所述抗体,抗原结合片段和多肽可以分离和/或纯化形式提供,并且可以配制成为适用于研究,治疗和诊断的组合物。

[0013] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段或多肽是细胞毒性的,例如针对表达TIM-3的细胞,如表达TIM-3的T细胞或肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段或多肽由于其细胞毒性作用而可用于治疗癌症。合适的癌症包括白血病,例如急性骨髓性白血病。

[0014] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段或多肽可有效恢复显示T细胞耗竭或T细胞无反应性的T细胞,例如,CD8⁺T细胞中的T细胞功能。

[0015] 在本发明的一个方面,提供了一种抗体或抗原结合片段,所述抗体的氨基酸序列可以包含氨基酸序列i)至iii)或氨基酸序列iv)至vi),或优选地氨基酸序列i)至vi):

i) LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

ii) LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

iii) LC-CDR3: X₁X₂WDX₃X₄X₅X₆X₇GX₈ (SEQ ID NO:41)

[0016] iv) HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO: 61)

v) HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

vi) HC-CDR3: GYZ1AGZ2DZ3 (SEQ ID NO:42)

[0017] 或其变体,其中序列(i)至(vi)中一个或多个序列中的一个或两个或三个氨基酸被另一个氨基酸替代,其中X₁=E或D,X₂=A或S,X₃=Y,S或A,X₄=Y,A,D或S,X₅=V,D,Y,L或A,X₆=A或S,X₇=A或S,X₈=Y,V或S和Z₁=V或Y,Z₂=S,F,Y或D,Z₃=A,D,S或Y。

[0018] 关于本发明的所有方面,在其中HC-CDR1:GYYWS (SEQ ID NO:61)的实施方案中,该序列可被包含于较大序列GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30)中。

[0019] 在一些实施方案中,LC-CDR3是下组之一:EAWDYYVAAGY (SEQ ID NO:12),DSWDSADASGV (SEQ ID NO:13),DSWDYDYAAGV (SEQ ID NO:14),DSWDSYLAAGV (SEQ ID NO:15),ESWDYDYASGV (SEQ ID NO:16),DSWDSSDSSGV (SEQ ID NO:17),EAWDSAYAAGS (SEQ ID NO:18)DSWDAALSAGV (SEQ ID NO:19)或ESWDAAAAAGY (SEQ ID NO:20)。

[0020] 在一些实施方案中,HC-CDR3是下组之一:GYVAGSDA (SEQ ID NO:32),GYVAGFDD (SEQ ID NO:33),GYVAGFDS (SEQ ID NO:34),GYVAGYDY (SEQ ID NO:35),GYVAGSDA (SEQ ID NO:36),GYVAGFDS (SEQ ID NO:37),GYYAGDDY (SEQ ID NO:38),GYVAGYDY (SEQ ID NO:39),或GYVAGSDA (SEQ ID NO:40)。

[0021] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的

轻链可变区：

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)
[0022] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)
LC-CDR3: EAWDYYVAAGY (SEQ ID NO:12)

[0023] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的轻链可变区：

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)
[0024] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)
LC-CDR3: DSWDSADASGV (SEQ ID NO:13)

[0025] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的轻链可变区：

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)
[0026] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)
LC-CDR3: DSWDYDYAAGV (SEQ ID NO:14)

[0027] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的轻链可变区：

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)
[0028] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)
LC-CDR3: DSWDSYLAAGV (SEQ ID NO:15)

[0029] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的轻链可变区：

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)
[0030] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)
LC-CDR3: ESWDYDYASGV (SEQ ID NO:16)

[0031] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的轻链可变区：

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)
[0032] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)
LC-CDR3: DSWDSSDSSGV (SEQ ID NO:17)

[0033] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的轻链可变区：

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYV (SEQ ID NO:10)

[0034] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: EAWDSAYAAGS (SEQ ID NO:18)

[0035] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的轻链可变区:

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

[0036] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: DSWDAALSAGV (SEQ ID NO:19)

[0037] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的轻链可变区:

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

[0038] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: ESWDAAAAAGY (SEQ ID NO:20)

[0039] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的重链可变区:

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或

[0040] GYYWS (SEQ ID NO:61)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

[0041] HC-CDR3: GYVAGSDA (SEQ ID NO:32)

[0042] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的重链可变区:

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或

[0043] GYYWS (SEQ ID NO:61)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGFDD (SEQ ID NO:33)

[0044] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的重链可变区:

[0045] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的重链可变区:

[0046] HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)
HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)
HC-CDR3: GYVAGFDS (SEQ ID NO:34)

[0047] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的重链可变区:
HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)
HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)
HC-CDR3: GYVAGYDY (SEQ ID NO:35)

[0049] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的重链可变区:
HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)
HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)
HC-CDR3: GYVAGSDA (SEQ ID NO:36)

[0051] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的重链可变区:
HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)
HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)
HC-CDR3: GYVAGFDS (SEQ ID NO:37)

[0053] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的重链可变区:
HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)
HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)
HC-CDR3: GYYAGDDY (SEQ ID NO:38)

[0055] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的重链可变区:

	HC-CDR1:	GGSFSGYYWS	(SEQ ID NO:30), 或
		GYYWS	(SEQ ID NO:61)
[0056]	HC-CDR2:	EINHSGSTNYNPSLKS	(SEQ ID NO:31)
	HC-CDR3:	GYVAGYDY	(SEQ ID NO:39)

[0057] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段可以包含至少一个包含以下CDR的重链可变区:

	HC-CDR1:	GGSFSGYYWS	(SEQ ID NO:30), 或
		GYYWS	(SEQ ID NO:61)
[0059]	HC-CDR2:	EINHSGSTNYNPSLKS	(SEQ ID NO:31)
	HC-CDR3:	GYVAGSDA	(SEQ ID NO:40)

[0060] 所述抗体可以包含至少一个包含图1或图2所示CDR的轻链可变区。所述抗体可以包含至少一个包含图1或图3所示CDR的重链可变区。

[0061] 所述抗体可以包含至少一个包含选自下组之一的氨基酸序列的轻链可变区(V_L): SEQ ID N0s 1,10,11,12或2,10,11,13或3,10,11,14或4,10,11,15或5,10,11,16或6,10,11,17或7,10,11,18或8,10,11,19或9,10,11,20;或图1所示的任一氨基酸序列;或与SEQ ID N0s 1,10,11,12或2,10,11,13或3,10,11,14或4,10,11,15或5,10,11,16或6,10,11,17或7,10,11,18或8,10,11,19或9,10,11,20之一或图1所示的 V_L 链氨基酸序列的氨基酸序列具有至少70%,更优选地至少75%,80%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列相同性的氨基酸序列。

[0062] 所述抗体可以包含至少一个包含选自下组之一的氨基酸序列的重链可变区(V_H): SEQ ID N0s 21,30或61,31,32;或22,30或61,31,33;或23,30或61,31,34;或24,30或61,31,35;或25,30或61,31,36;或26,30或61,31,37;或27,30或61,31,38;或28,30或61,31,39;或29,30或61,31,40;或图2所示的任一氨基酸序列;或与SEQ ID N0s 21,30或61,31,32;或22,30或61,31,33;或23,30或61,31,34;或24,30或61,31,35;或25,30或61,31,36;或26,30或61,31,37;或27,30或61,31,38;或28,30或61,31,39;或29,30或61,31,40之一;或图2所示的 V_H 链氨基酸序列的氨基酸序列具有至少70%,更优选地至少75%,80%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列相同性的氨基酸序列。

[0063] 所述抗体可以包含至少一个包含选自下组之一氨基酸序列的轻链可变区:SEQ ID N0s 1,10,11,12或2,10,11,13或3,10,11,14或4,10,11,15或5,10,11,16或6,10,11,17或7,10,11,18或8,10,11,19或9,10,11,20;或图1所示的任一氨基酸序列(或与SEQ ID N0s 1,10,11,12或2,10,11,13或3,10,11,14或4,10,11,15或5,10,11,16或6,10,11,17或7,10,11,18或8,10,11,19或9,10,11,20之一或图1所示的 V_L 链氨基酸序列的氨基酸序列具有至少70%,更优选地至少75%,80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%序列相同性的氨基酸序列);和至少一个包含选自下组之一氨基酸序列的重链可变区:SEQ ID N0s 21,30或61,31,32;或22,30或61,31,33;或23,30或61,31,34;或24,30或61,31,35;或25,30

或61,31,36;或26,30或61,31,37;或27,30或61,31,38;或28,30或61,31,39;或29,30或61,31,40;或图2所示的任一氨基酸序列(或与SEQ ID N0s21,30或61,31,32;或22,30或61,31,33;或23,30或61,31,34;或24,30或61,31,35;或25,30或61,31,36;或26,30或61,31,37;或27,30或61,31,38;或28,30或61,31,39;或29,30或61,31,40之一;或图2所示的V_H链氨基酸序列的氨基酸序列具有至少70%,更优选地至少75%,80%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%序列相同性的氨基酸序列)。

[0064] 所述抗体可以任选地结合至TIM-3。所述抗体可以任选地具有如上所述的氨基酸序列组分。抗体可以是IgG。在一个实施方案中,提供了包含与TIM-3结合的本文所述的抗体或抗原结合片段的,任选地分离的体外复合物。

[0065] 在本发明的一个方面,提供了分离的重链可变区多肽,所述重链可变区多肽包含以下CDR:

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或

GYYWS (SEQ ID NO:61)

[0066] HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYZ₁AGZ₂DZ₃ (SEQ ID NO:42)

[0067] 其中Z₁=V或Y,Z₂=S,F,Y或D,Z₃=A,D,S或Y。

[0068] 在一些实施方案中,HC-CDR3是下组之一:GYVAGSDA (SEQ ID NO:32),GYVAGFDD (SEQ ID NO:33),GYVAGFDS (SEQ ID NO:34),GYVAGYDY (SEQ ID NO:35),GYVAGSDA (SEQ ID NO:36),GYVAGFDS (SEQ ID NO:37),GYYAGDDY (SEQ ID NO:38),GYVAGYDY (SEQ ID NO:39),或GYVAGSDA (SEQ ID NO:40)。

[0069] 在本发明的一个方面,提供了一种抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含重链和轻链可变区序列,其中:

[0070] 所述重链包含HC-CDR1,HC-CDR2,HC-CDR3,与以下具有至少85%的总序列相同性:

[0071] HC-CDR1:GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30) 或GYYWS (SEQ ID NO:61)

[0072] HC-CDR2:EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31),

[0073] HC-CDR3:分别是下组之一:

[0074] GYZ₁AGZ₂DZ₃ (SEQ ID NO:42),GYVAGSDA (SEQ ID NO:32),GYVAGFDD (SEQ ID NO:33),GYVAGFDS (SEQ ID NO:34),GYVAGYDY (SEQ ID NO:35),GYVAGSDA (SEQ ID NO:36),GYVAGFDS (SEQ ID NO:37),GYYAGDDY (SEQ ID NO:38),GYVAGYDY (SEQ ID NO:39),或GYVAGSDA (SEQ ID NO:40),其中Z₁=V或Y,Z₂=S,F,Y,或D,Z₃=A,D,S或Y;

[0075] 和

[0076] 所述轻链包含LC-CDR1,LC-CDR2,LC-CDR3,与以下具有至少85%总序列相同性:

[0077] LC-CDR1:SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10),

[0078] LC-CDR2:GNNWRPS (SEQ ID NO:11),

[0079] LC-CDR3:分别是下组之一:

[0080] X₁X₂WDX₃X₄X₅X₆X₇GX₈ (SEQ ID NO:41),EAWDYYVAAGY (SEQ ID NO:12),DSWDSADASGV (SEQ ID NO:13),DSWDYDYAAGV (SEQ ID NO:14),DSWDSYLAAGV (SEQ ID NO:15),

ESWDYDYASGV (SEQ ID NO:16) , DSWDSSDSSGV (SEQ ID NO:17) , EAWDSAYAAGS (SEQ ID NO:18) DSWDAALSAGV (SEQ ID NO:19) or ESWDAAAAGY (SEQ ID NO:20) , 其中 $X_1 = E$ 或 D , $X_2 = A$ 或 S , $X_3 = Y$, S 或 A , $X_4 = Y$, A , D 或 S , $X_5 = V$, D , Y 或 L 或 A , $X_6 = A$ 或 S , $X_7 = A$ 或 S , $X_8 = Y$, V 或 S 。

[0081] 在一些实施方案中,序列相同性可以是86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0082] 在本发明的另一方面,提供了任选分离的抗体或抗原结合片段,其包含重链和轻链可变区序列,其中:

[0083] 重链序列与SEQ ID NO:21至29(图2)之一的重链序列具有至少85%的序列相同性,和

[0084] 轻链序列与SEQ ID NO:1至9(图1)之一的轻链序列具有至少85%的序列相同性。

[0085] 在一些实施方案中,序列相同性程度可以是86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、99%或100%。

[0086] 在一些实施方案中,抗体、抗原结合片段或多肽还根据HCFR1:HC-CDR1:HCFR2:HC-CDR2:HCFR3:HC-CDR3:HCFR4的排列在CDR之间包含可变区重链框架序列。所述框架序列可以源自人共有框架序列。

[0087] 在本发明的一个方面,提供了分离的轻链可变区多肽,任选地与本文所述的重链可变区多肽组合,所述轻链可变区多肽包含以下CDR:

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

[0088] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: $X_1X_2WDX_3X_4X_5X_6X_7GX_8$ (SEQ ID NO:41)

[0089] 其中 $X_1 = E$ 或 D , $X_2 = A$ 或 S , $X_3 = Y$, S 或 A , $X_4 = Y$, A , D 或 S , $X_5 = V$, D , Y 或 L 或 A , $X_6 = A$ 或 S , $X_7 = A$ 或 S , $X_8 = Y$, V 或 S 。

[0090] 在一些实施方案中,LC-CDR3是下组之一: EAWDYYVAAGY (SEQ ID NO:12) , DSWDSADASGV (SEQ ID NO:13) , DSWDYDYAAGV (SEQ ID NO:14) , DSWDSYLAAGV (SEQ ID NO:15) , ESWDYDYASGV (SEQ ID NO:16) , DSWDSSDSSGV (SEQ ID NO:17) , EAWDSAYAAGS (SEQ ID NO:18) DSWDAALSAGV (SEQ ID NO:19) 或 ESWDAAAAGY (SEQ ID NO:20) 。

[0091] 在一些实施方案中,抗体,抗原结合片段或多肽还根据LCFR1:LC-CDR1:LCFR2:LC-CDR2:LCFR3:LC-CDR3:LCFR4的排列在CDR之间包含可变区轻链框架序列。所述框架序列可以源自人共有框架序列。

[0092] 在一些实施方案中,抗体或抗体结合片段可进一步包含人恒定区。例如选自下组之一:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0093] 在一些实施方案中,抗体或抗体结合片段可进一步包含鼠恒定区。例如选自下组之一:IgG1、IgG2A、IgG2B和IgG3。

[0094] 在本发明的另一方面,提供了任选地分离的抗体或抗原结合片段,其能够结合至TIM-3,并且是双特异性抗体或双特异性抗原结合片段。在一些实施方案中,所述双特异性抗体或双特异性抗原结合片段包含能够结合至如本文所述的TIM-3的抗原结合片段或多肽,并且另外包含能够结合另一靶蛋白(例如TIM-3以外的靶蛋白)的抗原结合结构域。在一些实施方案中,所述靶蛋白是细胞表面受体。在一些实施方案中,所述靶蛋白是在免疫细胞

(例如T细胞)的细胞表面上表达的细胞表面受体。在一些实施方案中,能够结合另一个靶蛋白的抗原结合结构域能够结合至T细胞受体 (TCR) 复合物或其组分。在一些实施方案中,抗原结合结构域可以能够结合至CD3或CD3多肽。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域可以能够结合至一种或多种CD3多肽CD3 γ ,CD3 δ ,CD3 ζ ,或CD3 ϵ 。在一些实施方案中,所述双特异性抗体是双特异性T细胞衔接抗体。在一些实施方案中,所述靶蛋白可以是CD28家族的成员。在一些实施方案中,所述CD28家族的成员选自下组:PD-1、LAG3、ICOS、CTLA4、BTLA或CD28。

[0095] 在本发明的另一方面,提供了一种组合物,例如药物组合物或药物。所述组合物可以包含本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽和至少一种药学上可接受的载体,赋形剂,佐剂或稀释剂。

[0096] 在本发明的另一方面,提供了编码本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽的分离的核酸。所述核酸可以具有SEQ ID NO 43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60(图4)之一的序列,或由于遗传密码的简并的编码序列,或者可以具有与其至少70%,任选的75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的核苷酸序列。

[0097] 在本发明的一个方面,提供了包含本文所述的核酸的载体。在本发明的另一方面,提供了包含所述载体的宿主细胞。例如,所述宿主细胞可以是真核生物,或哺乳动物,例如中国仓鼠卵巢(CHO),或人的细胞或可以是原核细胞,例如大肠杆菌。在本发明的一个方面,提供了一种制备本文所述的抗体或抗原结合片段或多肽的方法,所述方法包括在适于表达编码所述抗体或抗原结合片段或多肽的载体的条件下培养本文所述的宿主细胞,并回收所述抗体或抗原结合片段或多肽。

[0098] 在本发明的另一方面,提供了一种用于治疗或用于医学治疗方法的抗体,抗原结合片段或多肽。在本发明的另一方面,提供用于治疗癌症或T细胞功能障碍的本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽。在本发明的另一方面,提供了本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽在制备用于治疗癌症或T细胞功能障碍的药物或药物组合物中的用途。

[0099] 在另一方面,提供了体外或体内杀伤表达TIM-3的细胞的方法,所述方法包括将如本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽施用于表达(或过表达)TIM-3的细胞。所述细胞可以是癌细胞,例如白血病或急性骨髓性白血病细胞,白细胞或T细胞。在一些实施方案中,所述急性骨髓性白血病细胞可以是干细胞;例如,在一些实施方案中,所述急性骨髓性白血病细胞可以是CD34⁺。

[0100] 在本发明的另一方面,提供了一种增强T细胞功能的方法,其包括将本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽施用于功能失调的T细胞。所述方法可以在体外或体内进行。

[0101] 在本发明的另一方面,提供了一种治疗癌症或T细胞功能障碍的方法,所述方法包括向患有癌症或T细胞功能障碍的患者施用本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽。

[0102] 在本发明的另一方面,提供了一种治疗感染性疾病的方法,所述方法包括向患有感染性疾病的患者施用本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽。

[0103] 在本发明的另一方面,提供了一种调节受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽,使得受试者中的免疫应答被调节。

[0104] 在本发明的另一方面,提供了一种抑制受试者中肿瘤细胞生长的方法,所述方法

包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽。

[0105] 在本发明的另一方面,提供了一种方法,所述方法包括将包含或怀疑包含TIM-3的样品与本文所述的抗体或抗原结合片段接触,并检测抗体或抗原结合片段与TIM-3的复合物的形成。

[0106] 在本发明的另一方面,提供了一种诊断受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括:在体外将来自受试者的样品与本文所述的抗体或抗原结合片段接触,并检测抗体或抗原结合片段与TIM-3的复合物的形成。

[0107] 在本发明的另一方面,提供了对受试者进行选择或分层以便使用TIM-3信号传导调节剂治疗的方法,所述方法包括:在体外将来自受试者的样品与本发明的抗体或抗原结合片段接触,并检测抗体或抗原结合片段与TIM-3的复合物的形成。

[0108] 本发明的一个方面是选择患者以便使用TIM3信号调节剂如抗TIM3抗体或抗TIM3剂治疗的方法,所述方法包括:在体外将来自受试者的样品与本文所述的抗体或抗原结合片段接触,并检测抗体或抗原结合片段与TIM-3的复合物的形成。

[0109] 在本发明的另一方面,提供了本文所述的抗体或抗原结合片段用于体外检测TIM-3的用途。在本发明的另一方面,提供了本文所述的抗体或抗原结合片段作为体外诊断试剂的用途。

[0110] 在本发明的另一方面,提供了一种扩增T细胞群体的方法,其中T细胞在体外或离体与本发明的抗体,抗原结合片段或多肽接触。

[0111] 在本发明的另一方面,提供了治疗患有T细胞功能障碍的受试者的方法,所述方法包括在本发明的抗体,抗原结合片段或多肽存在下培养自受试者的血液样品获得的T细胞,以扩增T细胞群体,收集扩增的T细胞,并将扩增的T细胞施用于需要治疗的受试者。

[0112] 在本发明的方法中,可以提供抗体,抗原结合片段或多肽作为本文所述的组合物。

[0113] 在一些实施方案中,所述抗体可以是克隆1B9、1H9、1H10、2C7、2F4、2G6、1D9、1F4、2C8之一。

[0114] 描述

[0115] 抗体

[0116] 本发明的抗体优选结合至TIM-3(所述抗原),优选人或恒河猴TIM-3,任选地Kd(s⁻¹)范围在 1.0×10^{-6} 至 4.0×10^{-4} 内。

[0117] 在本发明的任何方面,所述抗体优选特异性结合TIM-3(例如人或恒河猴)。

[0118] 本发明的抗体可以以分离的形式提供。

[0119] 本发明的抗体可以显示出以下性质中的至少一种:

[0120] a)结合至人TIM-3,Kd为 1×10^{-6} 或更低,优选 $\leq 1 \times 10^{-5}$, $\leq 1 \times 10^{-4}$,或 $\leq 1 \times 10^{-3}$;

[0121] b)对表达TIM-3的细胞,例如表达TIM-3的急性骨髓性白血病细胞具有细胞毒性(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,ADCC);

[0122] c)增加混合淋巴细胞反应(MLR)测定中的T细胞增殖(例如参见Bromelow等J. Immunol. Methods,2001年1月1日;247(1-2):1-8)

[0123] d)增加MLR测定中的干扰素-γ产生;或

[0124] e)增加MLR测定中的白介素-2(IL-2)分泌。

[0125] 通过“抗体”,我们包括其片段或衍生物,或合成抗体或合成抗体片段。

[0126] 鉴于目前关于单克隆抗体技术的技术,抗体可以制备成针对大多数抗原。抗原结合部分可以是抗体(例如Fab片段)或合成抗体片段(例如单链Fv片段[ScFv])的一部分。针对所选抗原的合适单克隆抗体可以通过已知技术制备,例如在“单克隆抗体:技术手册”,H Zola (CRC出版社,1988)和“单克隆杂交瘤抗体:技术和应用”,J G R Hurrell (CRC出版社,1982)。Neuberger等人(1988,第八届国际生物技术论坛(8th International Biotechnology Symposium)部分2,792-799)讨论了嵌合抗体。

[0127] 单克隆抗体(mAb)可用于本发明的方法,并且是特异性靶向抗原上单个表位的抗体的均质群体。

[0128] 多克隆抗体可用于本发明的方法。单特异性多克隆抗体是优选的。可以使用本领域熟知的方法制备合适的多克隆抗体。

[0129] 抗体的抗原结合片段,例如Fab和Fab2片段也可以与遗传工程改造的抗体和抗体片段一样使用/提供。抗体的可变重(V_H)和可变轻(V_L)结构域参与抗原识别,这一事实首先通过早期蛋白酶消化实验识别。通过啮齿动物抗体的“人源化”进一步确认。啮齿动物来源的可变结构域可以融合到人源的恒定结构域,使得所得抗体保留啮齿动物亲本抗体的抗原特异性(Morrison等(1984)Proc.Natl.Acad.Sd.USA 81,6851-6855)。

[0130] 该抗原特异性由可变结构域赋予,并且独立于恒定结构域是从涉及抗体片段的细菌表达的实验中得知的,所述抗体片段全部含有一个或多个可变结构域。这些分子包括Fab样分子(Better等(1988)Science 240,1041);Fv分子(Skerra等(1988)Science 240,1038);单链Fv(ScFv)分子,其中 V_H 和 V_L 配对结构域通过柔性寡肽连接(Bird等(1988)Science 242,423;Huston等(1988)Proc.Natl.Acad.Sd.USA 85,5879)和包含分离的V结构域的单结构域抗体(dAbs)(Ward等(1989)Nature 341,544)。参与合成保留其特异性结合位点的抗体片段的技术的一般综述可在Winter和Milstein(1991)Nature 349,293-299中找到。

[0131] “ScFv分子”是指 V_H 和 V_L 配对结构域共价连接的分子,例如通过柔性寡肽。

[0132] Fab,Fv,ScFv和dAb抗体片段都可以在大肠杆菌中表达和分泌,从而允许容易地产生大量的所述片段。

[0133] 全抗体和 $F(ab')片段是“二价”的。“二价”是指所述抗体和 $F(ab')片段具有两个抗原结合位点。相比之下,Fab,Fv,ScFv和dAb片段是单价的,仅具有一个抗原结合位点。与TIM-3结合的合成抗体也可以使用本领域熟知的噬菌体展示技术来制备。$$

[0134] 本发明的诸方面包括双特异性抗体,例如,由两种不同抗体的两个不同片段组成,使得所述双特异性抗体结合两种类型的抗原。抗原之一是TIM-3,所述双特异性抗体包含与TIM-3结合的本文所述的片段。抗体可以含有对第二抗原具有亲和力的不同片段,其(第二抗原)可以是任何所需的抗原,例如已经用于癌症免疫治疗以结合细胞毒性细胞的CD3,募集并将其靶向肿瘤部位。用于制备双特异性抗体的技术是本领域公知的,例如参见Mueller,D等,(2010Biodrugs 24 (2):89-98),Wozniak-Knopp G等,(2010Protein Eng Des 23 (4):289-297.Baeuerle,PA等,(2009Cancer Res 69 (12):4941-4944)。

[0135] 因此,本发明提供能够与TIM-3结合并且是双特异性抗体或双特异性抗原结合片段的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,所述双特异性抗体或双特异性抗原结合片段可以是分离的。

[0136] 在一些实施方案中,所述双特异性抗体和双特异性抗原结合片段包含本发明的抗原结合片段或多肽。在一些实施方案中,所述双特异性抗体和双特异性抗原结合片段包含能够结合至TIM-3的抗原结合结构域,其中所述能够结合至TIM-3的抗原结合结构域包含本发明的抗原结合片段或多肽,或由本发明的抗原结合片段或多肽组成。

[0137] 在一些实施方案中,所述双特异性抗体和双特异性抗原结合片段包含能够结合至TIM-3的抗原结合结构域和能够结合至另一靶蛋白的抗原结合结构域。

[0138] 能够结合至另一个靶蛋白的抗原结合结构域能够结合TIM-3以外的另一蛋白质。在一些实施方案中,所述靶蛋白是细胞表面受体。在一些实施方案中,所述靶蛋白是在免疫细胞的细胞表面上表达的细胞表面受体。在一些实施方案中,所述靶蛋白是在T细胞的细胞表面上表达的细胞表面受体。

[0139] 在一些实施方案中,所述能够结合另一个靶蛋白的抗原结合结构域能够结合至T细胞受体(TCR)复合物或其组分。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域能够结合至CD3或CD3多肽。在一些实施方案中,所述抗原结合结构域能够结合至一种或多种CD3多肽CD3 γ ,CD3 δ ,CD3 ζ ,或CD3 ϵ 。在一些实施方案中,所述双特异性抗体能够指导针对表达TIM-3的细胞的T细胞活性(例如细胞毒性)。在一些实施方案中,所述双特异性抗体是双特异性T细胞衔接抗体(T-cell engager antibody)。在一些实施方案中,所述双特异性抗体或片段能够指导针对表达TIM-3的细胞的T细胞活性(例如细胞毒性)。也就是说,在一些实施方案中,在双特异性抗体或片段的存在下,针对表达TIM-3的细胞的T细胞活性(例如细胞毒活性)增加(例如,相对于在不存在双特异性抗体或片段时针对表达TIM-3的细胞的活性)。可以通过本领域技术人员熟知的方法在体外测定针对表达TIM-3的细胞的T细胞活性,例如通过将T细胞与表达TIM-3的细胞一起孵育并测量如本文所述的细胞裂解。

[0140] 在一些实施方案中,提供双特异性抗体作为两个单链可变片段(scFV)形式的融合蛋白,包含本发明的TIM-3结合抗体或抗体片段的V_H和V_L以及能够结合CD3或CD3多肽的抗体或抗体片段的V_H和V_L。

[0141] 在一些实施方案中,所述CD3或CD3多肽的抗原结合结构域可以包含例如抗-CD3抗体克隆OKT3(eBioscience),克隆CD3-12(AbD Serotec),克隆UCHT1(Southern Biotech)克隆SP7(Thermo Scientific Pierce Antibodies),克隆SPV-T3b(Thermo Fisher Scientific),克隆S4.1(7D6)(Thermo Fisher Scientific),克隆MEM-57(AbD Serotec),克隆37895(Miltenyi Biotec),克隆CA-3(Abcam),克隆4D10A6(Abbiotec),克隆HIT3a(Abbiotec),克隆LT3(Source BioScience),克隆B-B11(MyBioSource.com),克隆17A2(Novus Biologicals),克隆BC3(BioLegend),克隆HAM25-1352(MBL International),克隆CA-3(Bosterbio),克隆RBT-CD3(Lifespan BioSciences),Ham25-1157(Merck Millipore),克隆CRIS-7(Peninsula Laboratories International),克隆5B2,克隆2Q1160(Santa Cruz Biotechnology),克隆M01,克隆B1.1(Abnova Corporation),克隆EP449E(BioGenex),克隆6B8D1G5,克隆6B1C12F3(Sino Biological),克隆CL1297(Atlas Antibodies),克隆CC23(Creative Diagnostics),克隆TR66(Enzo Life Sciences),克隆MEM-92(Cedarlane),克隆EPR4516(Origene Technologies),克隆3A12H2(Proteintech Group),克隆33-2A3(ALPCO),克隆E272(Biocare Medical),克隆SP162,克隆MRQ-39(Sigma Aldrich),或克隆F7.2.38(Dako)的CDR,轻链和重链可变结构域或其它CD3或CD3多肽结合

片段。

[0142] 在一些实施方案中,所述靶蛋白可以是CD28家族的成员。在一些实施方案中,所述靶蛋白可以是CD28家族的成员,例如PD-1 (CD279) ,LAG3 (CD223) ,ICOS (CD278) ,CTLA4 (CD152) ,BTLA (CD272) 或CD28。

[0143] 在一些具体实施方案中,所述双特异性抗体或双特异性抗原结合片段包含能够结合至CD3或CD3多肽的抗原结合结构域,以及在CDR中包含能够结合至TIM-3的抗原结合结构域,本文所述的克隆2C7的轻链和重链可变结构域或其它TIM-3结合片段。

[0144] 在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体可以表现出以下性质中的至少一种:

[0145] a) 增加或增强表达TIM-3的细胞的细胞杀伤(例如T细胞介导的细胞杀伤)(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,ADCC),例如表达TIM-3的急性骨髓性白血病细胞;

[0146] b) 增加或增强表达TIM-3的干细胞的细胞杀伤(例如T细胞介导的细胞杀伤)(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,ADCC),例如表达TIM-3的CD34+急性骨髓性白血病细胞;

[0147] 在一些实施方案中,所述PD-1的抗原结合结构域可以包含例如抗-PD-1抗体克隆J116,克隆MIH4 (eBioscience) ,克隆7A11B1 (Rockland Immunochemicals Inc.) ,克隆192106 (R&D Systems) ,克隆J110,克隆J105 (MBL International) ,克隆12A7D7,克隆7A11B1 (Abbiotec) ,克隆#9X21 (MyBioSource.com) ,克隆4H4D1 (Proteintech Group) ,克隆D3W4U,克隆D304S (Cell Signaling Technology) ,克隆RMP1-30,克隆RMP1-14 (Merck Millipore) ,克隆EH12.2H7 (BioLegend) ,克隆10B1227 (United States Biological) ,克隆UMAB198,或克隆UMAB197 (Origene Technologies) 的CDRs,轻链和重链可变结构域或其它PD-1结合片段。在一些实施方案中,所述LAG3的抗原结合结构域可以包含例如抗-LAG3抗体克隆17B4 (Enzo Life Sciences) ,克隆333210 (R&D Systems) ,或克隆14L676 (United States Biological) 的CDRs,轻链和重链可变结构域或其它LAG3结合片段。在一些实施方案中,所述ICOS的抗原结合结构域可以包含例如抗-ICOS抗体克隆ISA-3 (eBioscience) ,克隆SP98 (Novus Biologicals) ,克隆1G1,克隆3G4 (Abnova Corporation) ,克隆669222 (R&D Systems) ,克隆TQ09 (Creative Diagnostics) ,或克隆C398.4A (BioLegend) 的CDRs,轻链和重链可变结构域或其它ICOS结合片段。在一些实施方案中,所述CTLA4的抗原结合结构域可以包含例如抗-CTLA4抗体克隆2F1,克隆1F4 (Abnova Corporation) ,克隆9H10 (EMD Millipore) ,克隆BNU3 (GeneTex) ,克隆1E2,克隆AS32 (LifeSpan BioSciences) 克隆A3.4H2.H12 (Acris Antibodies) ,克隆060 (Sino Biological) ,克隆BU5G3 (Creative Diagnostics) ,克隆MIH8 (MBL International) ,克隆A3.6B10.G1,或克隆L3D10 (BioLegend) 的CDRs,轻链和重链可变结构域或其它CTLA4结合片段。在一些实施方案中,所述BTLA的抗原结合结构域可以包含例如抗-BTLA抗体克隆1B7,克隆2G8,克隆4C5 (Abnova Corporation) ,克隆4B8 (antibodies-online) ,克隆MIH26 (Thermo Scientific Pierce Antibodies) ,克隆UMAB61 (OriGene Technologies) ,克隆330104 (R&D Systems) ,克隆1B4 (LifeSpan BioSciences) ,克隆440205,克隆5E7 (Creative Diagnostics) 的CDRs,轻链和重链可变结构域或其它BTLA结合片段。在一些实施方案中,所述CD28的抗原结合结构域可以包含例如抗-CD28抗体克隆CD28.6 (eBioscience) ,克隆CD28.2,克隆JJ319 (Novus Biologicals) ,克隆204.12,克隆B-23,克隆10F3 (Thermo Scientific Pierce Antibodies) ,克隆37407 (R&D Systems) ,克隆204-12 (Abnova Corporation) ,克隆15E8

(EMD Millipore), 克隆204-12, 克隆YTH913.12 (AbD Serotec), 克隆B-T3 (Acris Antibodies), 克隆9H6E2 (Sino Biological), 克隆C28/77 (MyBioSource.com), 克隆KOLT-2 (ALPCO), 克隆152-2E10 (Santa Cruz Biotechnology), 或克隆XPH-56 (Creative Diagnostics) 的CDRs, 轻链和重链可变结构域或其它CD28结合片段。

[0148] 本发明的双特异性抗体或双特异性抗原结合片段的抗原结合结构域可以是能够结合至抗原的多肽的任何结构域。在一些实施方案中, 所述抗原结合结构域包含至少三个轻链CDR (即LC-CDR1, LC-CDR2和LC-CDR3) 和三个重链CDR (即HC-CDR1, HC-CDR2和HC-CDR3), 其共同决定抗体或抗原结合片段的抗原结合区。在一些实施方案中, 抗原结合结构域可以包含抗体或抗原结合片段的轻链可变结构域和重链可变结构域。在一些实施方案中, 抗原结合结构域可以包含抗体或抗原结合片段的轻链多肽和重链多肽。

[0149] 本发明的双特异性抗体和双特异性抗原结合片段可以以任何合适的形式提供, 例如Kontermann MAbs 2012, 4 (2) :182-197中所述的那些形式, 其全部内容通过引用并入本文。例如, 双特异性抗体或双特异性抗原结合片段可以是双特异性抗体偶联物 (例如IgG2, F (ab')₂或CovX-体), 双特异性IgG或IgG样分子 (例如IgG, scFv₄-Ig, IgG-scFv, scFv-IgG, DVD-Ig, IgG-sVD, sVD-IgG, 1-IgG, mAb²或Tandemab common LC中的2种), 不对称双特异性IgG或IgG样分子 (例如, kih IgG, kih IgG common LC, CrossMab, kih IgG-scFab, mAb-Fv, 电荷对或SEED-体), 小双特异性抗体分子 (例如Diabody (Db), dsDb, DART, scDb, tandemAbs, 串联scFv (taFv), 串联dAb/VHH, 三重体, 三重头, Fab-scFv, 或F (ab')₂-scFv₂), 双特异性Fc and C_H3融合蛋白 (例如taFv-Fc, Di-双抗体, scDb-C_H3, scFv-Fc-scFv, HCAb-VHH, scFv-kih-Fc, 或scFv-kih-C_H3), 或双特异性融合蛋白 (例如scFv₂-白蛋白, scDb-白蛋白, taFv-毒素, DNL-Fab₃, DNL-Fab₄-IgG, DNL-Fab₄-IgG-细胞因子₂)。特别参见Kontermann MAbs 2012, 4 (2) :182-19的图2。

[0150] 技术人员能够设计和制备根据本发明的双特异性抗体和双特异性抗原结合片段。

[0151] 用于产生双特异性抗体的方法包括抗体或抗体片段的化学交联, 例如使用可还原的二硫键或不可还原的硫醚键, 例如Segal和Bast, 2001. 双特异性抗体的生产, 最新免疫学方案.14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16中所述, 其全部内容通过引用并入本文。例如, N-琥珀酰亚胺基-3-(-2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (SPDP) 可用于化学交联, 例如通过铰链区SH-基团的Fab片段, 产生二硫键连接的双特异性F (ab)₂异二聚体。

[0152] 用于产生双特异性抗体的其它方法包括融合产生抗体的杂交瘤, 例如使用聚乙二醇以产生能够分泌双特异性抗体的细胞杂交瘤细胞 (quadroma cell), 例如在D.M.和Bast, B.J. 2001. 双特异性抗体的生产, 目前的免疫学方案14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16中所述。

[0153] 本发明的双特异性抗体和双特异性抗原结合片段也可以重组生产, 通过从例如编码抗原结合分子多肽的核酸构建体表达, 例如在抗体工程:方法和方案, 第二版 (Humana出版社, 2012), 第40章: 双特异性抗体的生产: 双抗体和串联scFv (Hornig和Färber-Schwarz) 或法文, 如何制备双特异性抗体, Methods Mol. Med. 2000; 40:333-339中所述, 二者全部内容通过引用并入本文。

[0154] 例如, 编码两个抗原结合结构域的轻链和重链可变结构域的DNA构建体 (即, 能够结合至TIM-3的抗原结合结构域的轻链和重链可变结构域, 以及能够结合至另一个靶蛋白的抗原结合结构域的轻链和重链可变域), 并且包括编码抗原结合结构域之间的合适连接

子或二聚化结构域的序列可以通过分子克隆技术制备。此后可以通过在合适的宿主细胞(例如哺乳动物宿主细胞)中表达(例如体外)所述构建体来产生重组双特异性抗体,然后任选地纯化表达的重组双特异性抗体。

[0155] 本发明的抗体,抗原片段或多肽也可用于构建嵌合抗原受体(CAR;也称为人工T细胞受体),其中通过重组技术将受体工程化以将选择的特异性移植到免疫细胞上。例如,单克隆抗体的特异性可以移植到T细胞上,并且修饰的T细胞可用于治疗疾病,例如癌症。CAR的一种形式是包含本发明的抗体,抗原片段或多肽的scFv与合适的受体支架的跨膜和内部结构域的融合。用于产生CAR的技术描述于Pule, M等(2003) *Cytotherapy* 5 (3) :211-26)中。

[0156] 抗体可以通过亲和力成熟的过程产生,其中产生与未修饰的亲本抗体相比,抗体对抗原的亲和力有改善的修饰的抗体。亲和力成熟抗体可以通过本领域已知的方法生产,例如Marks等,Rio/Technology 10:779-783 (1992);Barbas等Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994);Schier等Gene 169:147-155 (1995);Yelton等J. Immunol. 155:1994-2004 (1995);Jackson等,J. Immunol. 154 (7) :3310-15 9 (1995);和Hawkins等J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)。

[0157] 本发明的抗体优选表现出与TIM-3的特异性结合。相比于结合其它靶标,特异性结合靶分子的抗体优选结合靶标的亲和力更高和/或持续时间更长。在一个实施方案中,抗体与无关靶标的结合程度小于例如通过ELISA或放射免疫测定(RIA)测量的抗体与靶标的结合的约10%。或者,结合特异性可以反映在结合亲和力方面,其中本发明的抗TIM-3抗体结合至TIM-3的Kd为至少0.1个数量级(即 0.1×10^n ,其中n为一表示大小数量级的整数)大于抗体针对另一靶标分子的的Kd,例如,TIM-3家族的另一成员。这可以任选地为至少0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5或2.0中的一个。

[0158] 本发明的抗体优选具有 $\leq 1 \times 10^{-6}$, $\leq 1 \times 10^{-5}$, $\leq 1 \times 10^{-4}$,或 $\leq 1 \times 10^{-3}$ 之一的解离常数(Kd)。通常依据其解离常数(Kd)来描述抗体对其靶标的结合亲和力。结合亲和力可以通过本领域已知的方法,例如通过表面等离子体共振(SPR)或通过用抗体和抗原分子的Fab版本进行的放射性标记的抗原结合测定(RIA)来测量。

[0159] 本发明的抗体可以是抑制或降低其结合的抗原的生物活性的“拮抗剂”抗体。阻断TIM-3有助于通过抑制由TIM-3介导的免疫抑制信号通路来恢复T细胞功能。

[0160] 在一些方面,抗体是1B9,或1B9的变体。1B9包含以下CDR序列:

[0161] 轻链:

[0162] LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

[0163] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

[0163] LC-CDR3: EAWDYYVAAGY (SEQ ID NO:12)

[0164] 重链:

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或

GYYWS (SEQ ID NO:61)

[0165] HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGSDA (SEQ ID NO:32)

[0166] CDR序列由Kabat定义确定。

[0167] 在一些方面,抗体是1H9,或1H9的变体。1H9包含以下CDR序列:

[0168] 轻链:

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

[0169] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: DSWDSADASGV (SEQ ID NO:13)

[0170] 重链:

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)

[0171] HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGFDD (SEQ ID NO:33)

[0172] CDR序列由Kabat定义确定。

[0173] 在一些方面,抗体是1H10,或1H10的变体。1H10包含以下CDR序列:

[0174] 轻链:

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

[0175] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: DSWDYDYAAGV (SEQ ID NO:14)

[0176] 重链:

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)

[0177] HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGFDS (SEQ ID NO:34)

[0178] CDR序列由Kabat定义确定。

[0179] 在一些方面,抗体为2C7,或2C7的变体。2C7包含以下CDR序列:

[0180] 轻链:

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

[0181] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: DSWDSYLAAGV (SEQ ID NO:15)

[0182] 重链:

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)

[0183] HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGYDY (SEQ ID NO:35)

[0184] CDR序列由Kabat定义确定。

[0185] 在一些方面,抗体是2F4,或2F4的变体。2F4包含以下CDR序列:

[0186] 轻链:

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

[0187] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: ESWDYDYASGV (SEQ ID NO:16)

[0188] 重链:

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或

GYYWS (SEQ ID NO:61)

[0189] HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGSDA (SEQ ID NO:36)

[0190] CDR序列由Kabat定义确定。

[0191] 在一些方面,抗体是2G6,或2G6的变体。2G6包含以下CDR序列:

[0192] 轻链:

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

[0193] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: DSWDSSDSSGV (SEQ ID NO:17)

[0194] 重链:

[0195] HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或

GYYWS (SEQ ID NO:61)

[0196] HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGFDS (SEQ ID NO:37)

[0197] CDR序列由Kabat定义确定。

[0198] 在一些方面,抗体是1D9,或1D9的变体。1D9包含以下CDR序列:

[0199] 轻链:

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYV (SEQ ID NO:10)

[0200] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: EAWDSAYAAGS (SEQ ID NO:18)

[0201] 重链:

[0202] HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或

GYYWS (SEQ ID NO:61)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYYAGDDY (SEQ ID NO:38)

[0203] CDR序列由Kabat定义确定。

[0204] 在一些方面,抗体是1F4,或1F4的变体。1F4包含以下CDR序列:

[0205] 轻链：

LC-CDR1:	SGSSSNIGNNYVS	(SEQ ID NO:10)
----------	---------------	----------------

[0206] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

[0207] LC-CDR3: DSWDAALSAGV (SEQ ID NO:19)

[0208] 重链：

HC-CDR1:	GGSFSGYYWS	(SEQ ID NO:30), 或
	GYYWS	(SEQ ID NO:61)

[0209] HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

[0210] HC-CDR3: GYVAGYDY (SEQ ID NO:39)

[0211] [0209] CDR序列由Kabat定义确定。

[0212] [0210] 在一些方面,抗体是2C8,或2C8的变体。2C8包含以下CDR序列：

[0213] 轻链：

LC-CDR1:	SGSSSNIGNNYVS	(SEQ ID NO:10)
----------	---------------	----------------

[0214] [0213] LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

[0215] LC-CDR3: ESWDAAAAAGY (SEQ ID NO:20)

[0216] 重链：

HC-CDR1:	GGSFSGYYWS	(SEQ ID NO:30), 或
	GYYWS	(SEQ ID NO:61)

[0217] [0216] HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

[0218] HC-CDR3: GYVAGSDA (SEQ ID NO:40)

[0219] [0217] CDR序列由Kabat定义确定。

[0220] 本发明的抗体可以包含克隆1B9、1H9、1H10、2C7、2F4、2G6、1D9、1F4、2C8之一或SEQ ID NO:1和21、2和22、3和23、4和24、5和25、6和26、7和27、8和28或9和29之一的CDR。在本发明的抗体中,六个CDR序列中的一个或两个或三个或四个可以变化。变体可以在六个CDR序列中的一个或两个中具有一个或两个氨基酸取代。

[0221] [0220] 抗TIM-3克隆的V_H和V_L链的氨基酸序列示于图1和图2。编码核苷酸序列示于图4。

[0222] 轻链和重链CDR也可以尤其用于与许多不同框架区结合。因此,具有LC-CDR1-3或HC-CDR1-3的轻链和/或重链可以具有替代的框架区。合适的框架区域在本领域中是众所周知的,并且例如在M.Lefranc和G.Le:franc (2001) "The Immunoglobulin FactsBook",学术出版社中被描述,其通过引用并入本文。

[0223] 在本说明书中,抗体可以具有V_H和/或V_L链,所述V_H和/或V_L链包含与SEQ ID NO 1和21、2和22、3和23、4和24、5和25、6和26、7和27、8和28或9和29所示V_H和/或V_L氨基酸序列的一个或多个或图1和2所示氨基酸序列的一个或多个具有高百分比序列相同性的氨基酸序列。

[0224] 例如,本发明的抗体包括结合TIM-3并具有包含V_H链的抗体,所述V_H链具有与SEQ ID NO 1和21、2和22、3和23、4和24、5和25、6和26、7和27、8和28或9和29之一的V_H链氨基酸

序列或图1和2所示的氨基酸序列的一个或多个具有至少70%，更优选至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%之一的序列相同性的氨基酸序列。

[0222] 本发明的抗体可以被可检测地标记或至少能够检测。例如，抗体可以用放射性原子或有色分子或荧光分子或可以以任何其它方式容易地检测的分子进行标记。合适的可检测分子包括荧光蛋白、荧光素酶、酶底物和放射性标记。结合部分可以用可检测标记直接标记，或者可以间接标记。例如，结合部分可以是未标记的抗体，其可以被自身被标记的另一抗体检测。或者，第二抗体可能具有与其结合的生物素，并且将标记的链霉亲和素与所述生物素结合用于间接标记第一抗体。

[0223] 检测方法

[0224] 本文所述的抗体或抗原结合片段可用于涉及将所述抗体或抗原结合片段与TIM-3结合的方法。这样的方法可能涉及检测抗体或抗原结合片段和TIM-3的结合复合物。因此，在一个实施方案中，提供了一种方法，所述方法包括将含有或怀疑含有TIM-3的样品与本文所述的抗体或抗原结合片段接触，并检测抗体或抗原结合片段和TIM-3的复合物的形成。

[0225] 合适的方法格式在本领域中是众所周知的，包括免疫测定，例如夹心测定法如ELISA。该方法可以包括将抗体或抗原结合片段或TIM-3或两者用可检测标记(例如荧光、发光或放射性标记)进行标记。

[0226] 这种方法可以提供需要TIM-3检测和定量的疾病或病症的诊断方法的基础。这样的方法可以在体外在患者样品上进行，或者在患者样品的加工之后进行。一旦收集到样品，就不需要患者在实施用于诊断的体外方法时在场，因此该方法可以是不在人体或动物体上实施的方法。

[0227] 这样的方法可以涉及测定患者样品中存在的TIM-3的量。该方法还可以包括将测定的量与标准或参考值进行比较，作为达到诊断的过程的一部分。其他诊断测试可与本文所述的相结合，以增强诊断或预后的准确性，或确认通过使用本文所述测试获得的结果。

[0228] 存在于患者样品中的TIM-3的水平可以指示患者可能对抗TIM-3抗体的治疗有反应。样品中存在高水平的TIM-3可用于选择患者使用抗TIM-3抗体治疗。

[0229] 因此，本发明的抗体可用于选择患者进行抗TIM-3治疗。

[0230] 在TIM-3样品中的检测可以用于诊断患者的T细胞功能障碍或癌性病症的目的，诊断为癌性病症的倾向或提供癌性病症的预后(预测)。诊断或预后可能涉及可能是良性或恶性的现有(先前诊断的)癌性病症，可能涉及可疑的癌性病症，或可能涉及患者(可能以前未被诊断的)癌性病症的筛查。

[0231] 在一个实施方案中，可以检测CD8+T细胞上TIM3表达的水平，以便指示T细胞耗竭的程度和疾病状态的严重程度。在一些情况下，T细胞或肿瘤细胞上的TIM-3表达水平可用于选择患者以便使用TIM3信号传导调节剂如抗TIM3抗体或抗TIM3试剂进行治疗。

[0232] 样品可以从任何组织或体液中取出。样品可以包括或可以衍生自：一定量的血液；来自个体血液的血清的量可以包含除去纤维蛋白凝块和血细胞后获得的血液的流体部分；组织样本或活检；或从所述个体分离的细胞。

[0233] 根据本发明的方法优选在体外进行。术语“体外”旨在包括用培养物中的细胞的实验，而术语“体内”旨在包括用完整的多细胞生物体的实验。

[0234] 治疗应用

[0235] 本发明的抗体,抗原结合片段和多肽以及包含此类试剂的组合物可提供用于医学治疗方法中。可以向需要治疗的患有疾病或病症的受试者提供治疗。该疾病或病症可能是T细胞功能障碍性疾病之一,包括与癌症相关的T细胞功能障碍性疾病,癌症或感染性疾病。

[0236] T细胞功能障碍性疾病可以是正常T细胞功能受损的疾病或病症,导致受试者对例如,由外源性试剂如微生物,细菌和病毒的感染产生,或由宿主在某些疾病状态例如某些形式的癌症(例如以肿瘤相关抗原的形式)产生的致病性抗原的免疫应答的下调。

[0237] T细胞功能障碍可能包括T细胞耗竭或T细胞无反应性。T细胞耗竭包括响应于抗原刺激时,CD8⁺T细胞不能增殖或发挥T细胞效应子功能如细胞毒性和细胞因子(例如IFN γ)分泌的状态。耗竭的T细胞的特征还可能是持续上调TIM-3,其中阻断TIM-3:半乳糖凝集素9相互作用可逆转T细胞耗竭并恢复抗原特异性T细胞应答。

[0238] T细胞功能障碍性疾病可能表现为感染,或无法对感染产生有效的免疫应答。所述感染可能是慢性的,持续的,潜伏的或缓慢的,可能是细菌、病毒、真菌或寄生虫感染的结果。因此,可以向患有细菌、病毒或真菌感染的患者提供治疗。细菌感染的实例包括感染幽门螺杆菌感染。病毒感染的例子包括感染艾滋病毒、乙型肝炎或丙型肝炎感染。

[0239] T细胞功能障碍性疾病可能与癌症相关,如肿瘤免疫逃逸。许多人肿瘤表达可被T细胞识别并能诱导免疫应答的肿瘤相关抗原。然而,免疫逃避是常见的,并且被认为是由许多可溶性因子(包括半乳聚糖9)介导的。因此,阻断TIM-3和半乳凝素9的相互作用可以抑制对肿瘤细胞的这种负免疫调节信号并增强肿瘤特异性CD8+T细胞免疫。

[0240] 也可以在没有T细胞功能障碍性疾病如T细胞耗竭的迹象的情况下治疗癌症。本发明的抗体可能对表达TIM-3的细胞具有细胞毒性,例如T细胞,例如耗尽的T细胞或癌细胞如急性骨髓性白血病细胞。因此,本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽可用于涉及抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)的方法,或以招募免疫效应子功能以杀伤靶细胞的任何方法,如CAR细胞或靶向CD3的双特异性抗体。

[0241] 本发明的抗体,抗原结合片段或多肽的使用允许受试者抑制TIM-3信号传导,并在有限的损伤,逃避或诱导肿瘤免疫逃逸的情况下发挥有效的免疫应答。在这种治疗中,所述抗体,抗原结合片段或多肽可以提供涉及预防肿瘤免疫逃逸发展的癌症治疗。

[0242] 该治疗可以旨在预防T细胞功能障碍性疾病,例如,预防感染或癌症的发展或进展。因此,抗体,抗原结合片段和多肽可以用于配制药物组合物或药物,并且受试者可以针对疾病状态的发展进行预防性治疗。这可能发生在疾病状态的症状发生之前,和/或可能被给予被认为具有更大的感染或发展癌症风险的受试者。

[0243] 治疗可以包括使用疫苗,例如,T细胞疫苗的共同治疗,其可以涉及同时,单独或连续的治疗,或者在单一组合物中联合施用疫苗和抗体,抗原结合片段或多肽。就此而言,可以提供抗体,抗原结合片段或多肽作为该疫苗的佐剂。耗竭的T细胞的有限的增殖潜力被归结为是T细胞免疫治疗失败的主要原因,并且能够阻断或逆转T细胞耗竭的药物的组合是提高T细胞免疫治疗功效的潜在策略(Barber等,Nature Vol 439, No. 9p682-687 2006年2月)。

[0244] 抗体,抗原结合片段或多肽的施用优选为“治疗有效量”,这足以显示对个体的益处。施用的实际量,施用的速率和时间过程将取决于所治疗疾病的性质和严重程度。治疗的

处方,例如关于剂量等的决定在全科医生和其他医生的责任范围内,并且通常考虑待治疗的病症,个体患者的状况,递送的地点,给药方法以及从业者已知的其他因素。上述技术和方案的实例可以参见雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第20版,2000,Lippincott, Williams&Wilkins出版。

[0245] 制备药学上有用的组合物和药物

[0246] 本发明的抗体,抗原结合片段和多肽可以配制成为用于临床应用的药物组合物,并且可以包含药学上可接受的载体,稀释剂,赋形剂或佐剂。

[0247] 根据本发明,还提供了用于生产药学上有用的组合物的方法,这种生产方法可以包括选自下组的一个或多个步骤:分离本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽;和/或将分离的本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽与药学上可接受的载体,佐剂,赋形剂或稀释剂混合。

[0248] 例如,本发明的另一方面涉及配制或生产用于治疗T细胞功能障碍性疾病的药物或药物组合物的方法,所述方法包括通过将本文所述的抗体,抗原结合片段或多肽与药学上可接受的载体,佐剂,赋形剂或稀释剂混合来配制药物组合物或药物。

[0249] 感染

[0250] 感染可以是任何感染或感染性疾病,例如细菌、病毒、真菌或寄生虫感染。在一些实施方案中,它可能是特别期望的是治疗慢性/持续性感染,例如,其中这种感染与T细胞功能障碍或T细胞耗竭相关。

[0251] 已经确定,T细胞耗竭是许多慢性感染(包括病毒,细菌和寄生虫)以及癌症中出现的T细胞功能障碍的状态(Wherry Nature Immunology 12卷, No.6, 492-499页,2011年6月)。

[0252] 已经报道TIM-3表达在患有慢性感染(例如,由Golden-Mason L等,J Virol.2009;83 (18):9122-9130报道)的患者中起重要的致病作用。

[0253] 可以治疗的细菌感染的实例包括芽孢杆菌(*Bacillus spp.*),百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*),梭菌(*Clostridium spp.*),棒状杆菌(*Corynebacterium spp.*),霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*),葡萄球菌(*Staphylococcus spp.*),链球菌(*Streptococcus spp.*)大肠杆菌(*Escherichia*),克雷伯杆菌(*Klebsiella, Proteus*),耶尔森菌(*Yersinia*),欧文氏菌(*Erwina*),沙门氏菌(*Salmonella*),李斯特菌(*Listeria sp*),幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*),分枝杆菌(*mycobacteria*)(例如结核分枝杆菌)和绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。例如,细菌感染可能是败血症或结核病。

[0254] Yao等(树突状细胞上的PD-1阻碍了针对细菌感染的先天免疫.Blood113 (23):5811-5818 2009年6月4日)建立了PD-1在单核细胞增生利斯特氏菌感染的先天免疫反应中对DC功能的负调控.Brahmamdam等(延迟施用抗PD-1抗体逆转免疫功能障碍并改善败血症期间的存活率.Journal of Leukocyte Biology 88卷,no.2 233-240,2010年8月)报道了败血症后24小时施用抗PD-1抗体阻止败血症引起的淋巴细胞和DCs消耗,增加Bcl-xL,阻断凋亡和改善生存。已有报道Tim3:半乳凝素-9(Galectin-9)相互作用介导T细胞耗竭并介导结核分枝杆菌感染的先天和适应性免疫反应(Jayaraman等,The Journal of Immunology 2012,188,70.6)。

[0255] 可以治疗的病毒感染的实例包括流感病毒,麻疹病毒、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型

肝炎病毒(HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、单纯疱疹病毒和人乳头状瘤病毒。

[0256] 慢性病毒感染,如由HCV、HBV和HIV引起的病毒感染通常涉及逃避免疫清除的机制。已经鉴定出PD-1和TIM-3的表达与对丙型肝炎病毒(HCV)的有缺陷的T细胞应答相关(McMahan等人,The Journal of Clinical Investigation 120卷, No.12 4546-4557页,2010年12月)。在HCV中,McMahan等(同上)发现,HCV特异性CTL上的双重TIM-3和PD-1表达水平先于病毒持久性的发展,提供了预后信息。Barber等(Nature 439卷, No.9 682-687页2006年2月)报道,PD-1在慢性病毒感染期间上调。在感染LCMV的小鼠中,他们报道,阻断PD-1/PD-L1抑制途径对CD8T细胞具有有益作用,恢复其进行增殖的能力,分泌细胞因子,杀死感染的细胞并降低病毒载量。PD-1也在HIV感染中上调(Said等,Nature Medicine 16卷, No.4 452-460页2010年4月)。阻断PD-1和PD-L1之间的相互作用有助于慢性病毒感染的动物模型中的病毒清除和改善的T细胞功能(Said等,同上)。

[0257] 可以治疗的真菌感染的实例包括链格孢属(*Alternaria* sp),曲霉属(*Aspergillus* sp),假丝酵母属(*Candida* sp)和组织胞浆菌属(*Histoplasma* sp)的感染。真菌感染可能是真菌败血症或组织胞浆菌病(*histoplasmosis*)。

[0258] Chang等(阻断负共刺激分子PD-1和CTLA-4改善了原发性和继发性真菌性败血症的存活,Critical Care 2013,17:R85)报道,抗PD1抗体在改善原发性和继发性真菌性败血症的存活方面是非常有效的。Lázár-Molnár等人(PD-1/PD-L共刺激途径严重影响宿主对病原真菌组织胞浆菌的抗性PNAS vol.105,no.7,p2658-2663,19 2008年2月)报道,抗PD-1抗体显着增加感染组织胞浆菌的小鼠的存活率。因此,T细胞耗竭在介导真菌感染中的重要性已经确立。可以治疗的寄生虫感染的实例包括疟原虫种类的感染(例如恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*),卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*),间日疟原虫或夏氏疟原虫(*Plasmodium chabaudi chabaudi*)。寄生虫感染可能是一种疾病,如疟疾,利什曼病和弓形虫病。

[0259] 人感染恶性疟原虫已经显示导致PD-1的更高表达和T细胞耗尽小鼠(Butler等人,Nature Immunology Vol.13, No.12, p 188-195 2012年2月)。使用抗PD-L1和抗LAG-3单克隆抗体在体内阻断PD-L1和LAG-3有助于CD4⁺T细胞功能的恢复,滤泡辅助T细胞、生发中心B细胞和浆细胞数量的扩增,增强保护性抗体,并在小鼠中快速清除血液疟疾。还显示阻断慢性感染的发展(Butler等,同上)。

[0260] 癌症

[0261] 癌症可以是任何不想要的细胞增殖(或任何通过不想要的细胞增殖表现的疾病)、赘生物或肿瘤,或增加的不想要的细胞增殖、赘生物或肿瘤的风险或倾向。癌症可能是良性或恶性的,可能是原发性或继发性的(转移性)。赘生物或肿瘤可以是细胞的任何异常生长或增殖,并且可以位于任何组织中。组织实例包括肾上腺、肾上腺髓质、肛门、阑尾、膀胱、血液、骨骼、骨髓、脑、乳腺、盲肠、中枢神经系统(包括或排除脑)小脑、子宫颈、结肠、十二指肠、子宫内膜、上皮细胞(例如肾上皮细胞)、胆囊、食道、胶质细胞、心脏、回肠、空肠、肾、泪腺、喉、肝、肺、淋巴、淋巴结、淋巴母细胞、上颌、纵隔、肠系膜、子宫肌层、鼻咽、网膜、口腔、卵巢、胰腺、腮腺、周围神经系统、腹膜、胸膜、胸膜、前列腺、唾液腺、乙状结肠、皮肤、小肠、软组织、脾脏、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、舌头、扁桃体、气管、子宫、外阴、白细胞。

[0262] 待治疗的肿瘤可以是神经系统或非神经系统肿瘤。神经系统肿瘤可能起源于中枢或外周神经系统,例如神经胶质瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、神经纤维瘤、室管膜瘤、神经鞘瘤、神经纤维肉瘤、星形细胞瘤和少突神经胶质瘤。非神经系统癌症/肿瘤可能起源于任何其他非神经组织,例如黑素瘤、间皮瘤,淋巴瘤、骨髓瘤、白血病、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤、慢性骨髓性白血病(CML)、急性骨髓性白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、肝癌、表皮样癌,前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌、胰腺癌、胸腺癌、NSCLC、血液癌和肉瘤。

[0263] 过继性T细胞转移治疗

[0264] 过继性T细胞转移治疗通常是指从受试者中除去白细胞的过程,通常是通过抽出血液样品从中分离白细胞,体外或离体扩增并返回到相同的受试者或不同的受试者。治疗通常旨在增加受试者中所需T细胞群体的活性形式的量/浓度。这种治疗对于经历T细胞耗竭的受试者可能是有益的。

[0265] 能够阻断T细胞耗竭机制或逆转T细胞耗竭的抗体提供了增强T细胞活性和促进T细胞扩增的方法。

[0266] 因此,在本发明的另一方面,提供了一种用于扩增T细胞群体的方法,其中T细胞在体外或离体与本发明的抗体,抗原结合片段或多肽接触。

[0267] 该方法可以任选地包括一个或多个以下步骤:从受试者取血样;从血液样品中分离T细胞;在体外或离体细胞培养物(其中它们可以与抗体,抗原结合片段或多肽接触)中培养T细胞,收集扩增的T细胞群;将T细胞与佐剂,稀释剂或载体混合;将扩增的T细胞施用于受试者。

[0268] 因此,在本发明的一些方面,提供了治疗患有T细胞功能障碍的受试者的方法,所述方法包括从需要治疗的受试者获取血液样品,在本发明的抗体,抗原结合片段或多肽的存在下培养从血液样品获得的T细胞以扩增T细胞群体,收集扩增的T细胞,并将经扩增的T细胞施用于需要治疗的受试者。

[0269] T细胞可以从需要治疗的受试者获得,并且可以被分离和/或纯化。它们可以是CD4⁺和/或CD8⁺T细胞群体。所述T细胞可以代表经历T细胞耗尽的群体,并且可以任选地具有TIM-3的上调表达。

[0270] 在培养期间,T细胞可以在允许将T细胞扩增到所需的细胞数目的条件下和合适的时间段内,与抗体,抗原结合片段或多肽接触。在合适的时间段之后,可以收集T细胞,任选地浓缩,并且可以与合适的载体,佐剂或稀释剂混合并返回到受试者体内。受试者可经历一轮或多轮此类治疗。

[0271] T细胞扩增的方法是本领域公知的,例如在Kalamasz等,J Immunother 2004年9月-10月Oct;27 (5) :405-18;Montes等,Clin Exp Immunol 2005年11月;142 (2) :292-302;Wölfel和Greenburg Nature Protocols 9 950-966页27 2014年3月;Trickett和Kwan Journal of Immunological Methods 275卷,Issues 1-2,12003年4月,251-255页;Butler等PLoS ONE 7 (1) 12 2012年1月。

[0272] 同时或依次施用

[0273] 依赖于待治疗的病症,组合物可以单独或与其它治疗组合施用,或者同时或依次给予。

[0274] 在本说明书中,本发明的抗体,抗原结合片段或多肽和抗感染剂或化学治疗剂(治疗剂)可以同时或依次施用。

[0275] 在一些实施方案中,使用本发明的抗体,抗原结合片段或多肽进行治疗可伴随着化学疗法。

[0276] 同时施用是指将抗体,抗原结合片段或多肽和治疗剂一起施用,例如作为含有两种试剂的药物组合物(组合制剂),或者彼此紧接着,并且任选地经由相同的施用途径,例如施用到同一动脉、静脉或其他血管。

[0277] 依次施用是指施用抗体,抗原结合片段或多肽或治疗剂之一随后在给定的时间间隔之后,分开施用其它药剂。不要求两个试剂通过相同的途径施用,尽管在一些实施方案中是这种情况。时间间隔可以是任何时间间隔。

[0278] 抗感染剂

[0279] 在治疗感染时,本发明的抗体,抗原结合片段或多肽可与抗感染剂组合施用,如上所述。抗感染剂可以是已知对负责感染的微生物或病毒具有作用的药剂。

[0280] 合适的抗感染剂包括抗生素(例如青霉素、头孢菌素、利福霉素、台勾霉素(liparmycins)、喹诺酮类、磺胺类、大环内酯类、林可胺类(lincosamides),四环素、环状脂肽、甘氨环素、恶唑烷酮(oxazolidinones)和台勾霉素(liparmycins),抗病毒剂(如逆转录酶抑制剂、整合酶抑制剂、转录因子抑制剂、反义和siRNA剂和蛋白酶抑制剂),抗真菌剂(例如多烯、咪唑类、三唑、噻唑、烯丙胺和棘白菌素)和抗寄生虫剂(如抗线虫剂、抗绦虫剂、抗吸虫剂、抗变形虫剂和抗原虫剂)。

[0281] 化疗

[0282] 化疗是指用药物或电离辐射治疗癌症(例如使用X射线或 γ 射线的放射治疗)。在优选的实施方案中,化疗是指用药物治疗。所述药物可以是化学实体,例如小分子药物、抗生素、DNA嵌入剂、蛋白质抑制剂(例如激酶抑制剂)或生物制剂,例如抗体、抗体片段、核酸或肽适体、核酸(例如DNA, RNA)、肽、多肽、或蛋白质。所述药物可以配制成药物组合物或药物。制剂可以包含一种或多种药物(例如一种或多种活性剂)以及一种或多种药学上可接受的稀释剂,赋形剂或载体。

[0283] 治疗可能涉及一种以上药物的施用。所述药物可以单独施用或与其他治疗组合施用,或者同时或依次,依赖于待治疗的病症。例如,化疗可以是涉及施用两种药物的联合治疗,其中一种或多种可以用于治疗癌症。

[0284] 化疗可以通过一种或多种给药途径施用,例如肠胃外、静脉内注射、口服,皮下、皮内或肿瘤内。

[0285] 化疗可以根据治疗方案执行。治疗方案可以是可由内科医师或医师准备的预定时间表、计划、方案或化疗方案,并且可以被定制以适合需要治疗的患者。

[0286] 治疗方案可以指示一种或多种:施用于患者的化学疗法的类型;每种药物或辐射的剂量;施用(给药)之间的时间间隔;每次治疗的长度;任何治疗假期(如果有的话)的数量和性质等。对于联合治疗,可以提供单一治疗方案,其指示每种药物如何施用。

[0287] 化疗药物和生物制剂可以选自:

[0288] • 烷化剂如顺铂、卡铂、氮芥、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺;

[0289] • 嘧啶或嘧啶抗代谢物如咪唑硫唑嘌呤或巯嘌呤;

[0290] • 生物碱和萜类化合物,如长春花生物碱(如长春新碱、长春花碱、长春瑞滨、长春地辛)、鬼臼毒素、依托泊昔、替尼泊昔、紫杉烷如紫杉醇(TaxolTM)、多西紫杉醇;

[0291] • 拓扑异构酶抑制剂,如I型拓扑异构酶抑制剂喜树碱伊立替康和托扑替康,或II型拓扑异构酶抑制剂安吖啶(amsacrine)、依托泊昔、磷酸依托泊甙、替尼泊昔;

[0292] • 抗肿瘤抗生素(例如蒽环类抗生素)如更生霉素,多柔比星(阿霉素TM),表柔比星、博来霉素、雷帕霉素;

[0293] • 基于抗体的药剂,例如抗-PD-1抗体、抗-PD-L1、抗-CTLA-4、抗-LAG-3、抗-4-1BB、抗-GITR、抗-CD27、抗-BLTA、抗-OX40、抗-VEGF、抗-TNF- α 、抗-IL-2、抗-GpIIb/IIIa、抗-CD-52、抗-CD20、抗-RSV、抗-HER2/neu(erbB2)、抗-TNF受体、抗-EGFR抗体、多克隆抗体或抗体片段、示例包括:西妥昔单抗、帕尼单抗、英夫利昔单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗(Avastin[®])、阿昔单抗、达利珠单抗、吉妥珠单抗、阿仑单抗、利妥昔单抗(Mabthera[®])、帕利珠单抗、曲妥珠单抗、依那西普、阿达木单抗、尼妥珠单抗;

[0294] • EGFR抑制剂,如厄洛替尼、西妥昔单抗和吉非替尼;

[0295] • 抗血管生成剂如贝伐珠单抗(Avastin[®])

[0296] • 抗癌疫苗,如西普鲁塞(Sipuleucel-T(Provenge[®]))

[0297] 在一个实施方案中,化学治疗剂是抗-PD-1抗体或抗-PD-L1、抗-CTLA-4、抗-LAG-3、抗-4-1BB、抗-GITR、抗-CD27、抗-BLTA、抗-OX40、抗-VEGF、抗-TNF- α 、抗-IL-2、抗-GpIIb/IIIa、抗-CD-52、抗-CD20、抗-RSV、抗-HER2/neu(erbB2)抗-TNF受体、抗-EGFR抗体。在一些实施方案中,所述化学治疗剂是免疫检查点抑制剂或共刺激分子。

[0298] 其他化学治疗药物可以选自:13-顺-视黄酸,2-氯脱氧腺苷,5-氮杂胞嘧啶核苷,5-氟尿嘧啶,6-巯基嘌呤,6-硫代鸟嘌呤,白蛋白结合型紫杉醇(Abraxane),维甲酸[®],放线菌素-D放线菌素[®],氟尿嘧啶[®],依维莫司[®],盐酸阿那格雷[®],氢化可的松[®],阿地白介素,阿仑单抗,爱宁达,阿利维A酸,Alkaban-AQ[®],马法兰[®],全反式维甲酸,干扰素 α ,六甲蜜胺,氨甲蝶呤,氨磷汀,氨鲁米特,阿那格雷,尼鲁米特[®],阿那曲唑,阿糖胞嘧啶,安然爱斯普[®],阿可达[®],瑞宁得[®],依西美坦[®],奈拉滨[®],三氧化二砷,天冬酰胺酶,ATRA安维汀[®],阿扎胞苷,BCG,BCNU,苯达莫司汀,贝伐单抗,贝沙罗汀(Bexarotene),托西莫单抗[®],比卡鲁胺,BiCNU,博莱霉素[®],博来霉素,硼替佐米,白消安,白舒非[®],甲酰四氢叶酸钙,阿仑单抗[®],伊立替康[®],开普拓-11,卡培他滨,氟尿嘧啶(CaracTM),卡铂,卡莫司汀,康士得[®](Casodex[®]),CC-5013,CCI-779,CCNU,CDDP,CeeNU,柔红霉素[®](Cerubidine[®]),西妥昔单抗,苯丁酸氮芥,顺铂,嗜橙菌因子,克拉屈滨,可的松,更生霉素[®],CPT-11,环磷酰胺,氨鲁米特[®],阿糖胞苷阿糖胞苷[®],癌得星[®],达克金,放线菌素,达依泊汀 α ,达沙替尼,道诺霉素,柔红霉素,盐酸柔红霉素,柔红霉素脂质体,柔红霉素[®],地塞米松,地西他滨,强的松龙[®],去氢可的松[®],地尼白介素(Denileukin,

Diftitox), 阿糖胞昔TM, 地塞米松, 醋酸地塞美松, 地塞米松磷酸钠, 地塞米松磷酸钠 (Dexasone), 右雷佐生, DHAD, DIC, Didex, 多西他赛, Doxil®, 阿霉素, 阿霉素脂质体, 羟基脲胶囊 (DroxiaTM), DTIC, DTIC-Dome®, Duralone®, EligardTM, EllenceTM, EloxatinTM, Elspar®, Emcyt®, 表阿霉素, 阿法依泊汀, 爱必妥, 埃罗替尼, 欧文氏菌左旋天冬酰胺酶, 雌莫司汀, Ethyol Etopophos®, 依托泊昔, 磷酸依托泊甙, Eulexin®, 依维莫司, Evista®, 依西美坦, Faslodex®, Femara®, 非格司亭, 氟尿昔, Fludara®, 氟达拉滨, Fluoroplex®, 氟脲嘧啶, 氟甲睾酮, 氟他胺, 亚叶酸, FUDR®, 氟维司群, 吉非替尼, 吉西他滨, 吉妥单抗, GleevecTM, Gliadel® Wafer, 戈舍瑞林, 粒细胞集落刺激因子, 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子, 赫塞汀®, 地塞米松, Hexalen®, 六甲嘧胺, HMM, Hycamtin®, Hydrea®, Hydrocort Acetate®, 氢化可的松, 氢化可的松磷酸钠, 氢化可的松琥珀酸钠, 氢化可的松磷酸 (Hydrocortone Phosphate), 羟基脲, 替伊莫单抗, 替伊莫单抗提希坦 (Tiuxetan), Idamycin®, 伊达比星, Ifex®, α干扰素, 异环磷酰胺, IL-11, IL-2, 甲磺酸伊马替尼, 吡唑甲酰胺, α-干扰素, α-干扰素-2b (PEG偶联), 白细胞介素-2, 白细胞介素-11, Intron A® (α-干扰素-2b), Iressa®, 伊立替康, 异维甲酸, 伊沙匹隆, IxempraTM, 天冬酰胺酶, Lanacort®, 拉帕替尼, 左旋天冬酰胺酶, LCR, 来那度胺, 来曲唑, 亚叶酸, 苯丁酸氮芥, LeukineTM, 亮丙瑞林, 长春新碱, LeustatinTM, 脂质体Ara-C, LiquidPred®, 环己亚硝脲, L-PAM, L-沙可来新, Lupron®, Lupron Depot®, Matulane®, 地塞米松, 氮芥, 盐酸氮芥, Medralone®, Medrol®, Megace®, 甲地孕酮, 醋酸甲地孕酮, 美法伦, 疏嘌呤, 美司钠, MesnexTM, 甲氨蝶呤, 甲氨蝶呤钠, 甲基强的松龙, Meticorten®, 丝裂霉素, 丝裂霉素-C, 米托蒽醌, M-Prednisol®, MTC, MTX, Mustargen®, 盐酸氮芥, Mutamycin®, Myleran®, MylocelTM, Mylotarg®, Navelbine®, 奈拉滨, Neosar®, NeulastaTM, Neumega®, Neupogen®, Nexavar®, Nilandron®, 尼鲁米特, Nipent®, 氮芥, Novaldex®, Novantrone®, 奥曲肽, 醋酸奥曲肽, Oncospars®, Oncovin®, Ontak®, OnxalTM, 奥普瑞白介素 (Oprelvekin), Orapred®, Orasone®, 奥沙利铂, 紫杉醇, 蛋白结合的紫杉醇, 帕米膦酸二钠, 帕尼单抗, Panretin®, Paraplatin®, Pediapred®, 聚乙二醇化干扰素, 培门冬酶, 乙二醇化非格司亭PEG-INTRONTM, PEG-L-天冬酰胺酶, 培美曲塞, 喷司他丁, 苯丙氨酸氮芥, Platinol®, Platinol-AQ®, 强的松, 强的松, Prealone®, 甲基苄肼, PROCRIT®, Proleukin®, 具有卡莫司汀植入剂Purinethol®的普利司盘 (Prolifeprospan) 20, 雷洛昔芬, Revlimid®, Rheumatrex®, Rituxan®, 利妥昔单抗, Roferon-A® (干扰素α-2a), Rubex®, 柔红霉素盐酸盐, Sandostatin® Sandostatin LAR®, 沙格司亭,

Solu-Cortef®, Solu-Medrol®, 索拉非尼, SPRYCEL™, STI-571, 链脲佐菌素, SU11248, 舒尼替尼, Sutent®, 它莫西芬, Tarceva®, Targretin®, Taxol®, Taxotere®, Temodar®, 替莫唑胺, 西罗莫司脂化物, 替尼泊昔, TESPA, 沙利度胺, Thalomid®, TheraCys®, 硫鸟嘌呤, 硫鸟嘌呤 Tabloid®, 硫磷酰胺, Thioplex®, 嘤替派, TICE®, Toposar®, 拓扑替康, 托瑞米芬, Torisel®, 托西莫单抗, 曲妥珠单抗, Treanda®, 维甲酸, Trexall™, Trisenox®, TSPA, TYKERB®, VCR, Vectibix™, Velban®, Velcade®, VePesid®, Vesanoid®, Viadur™, Vidaza®, 长春花碱, 硫酸长春碱, Vincasar Pfs®, 长春新碱, 长春瑞滨, 酒石酸长春瑞滨, VLB, VM-26, 伏立诺他, VP-16, Vumon®, Xeloda®, Zanosar®, Zevalin™, Zinecard®, Zoladex®, 哒来膦酸, 伏立诺他胶囊 (Zolinza), Zometa®。

[0299] 施用途径

[0300] 本发明的诸方面的抗体,抗原结合片段,多肽和其它治疗剂,药物和药物组合物可以配制通过多种途径施用,包括但不限于胃肠外、静脉内、动脉内、肌肉内、皮下、皮内、瘤内和口服。抗体,抗原结合片段,多肽和其它治疗剂可以配制成为流体或固体形式。可以将流体制剂配制通过注射给人或动物体的选定区域来施用。

[0301] 剂量方案

[0302] 可以提供抗体,抗原结合片段或多肽的多个剂量。剂量中的一种或多种或每种可伴随着同时或依次施用另一种治疗剂。

[0303] 多个剂量可以分开预定的时间间隔,其可以选择为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、或31天、或1、2、3、4、5或6个月中之一。例如,可以每7、14、21或28天(加或减3、2或1天)给予剂量一次。

[0304] 试剂盒

[0305] 在本发明的一些方面,提供了诸零件形成的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒可以具有至少一个具有预定量的抗体,抗原结合片段或多肽的容器。所述试剂盒可以以药物或药物组合物的形式提供抗体,抗原结合片段或多肽,并且可以与用于施用于患者以治疗特定疾病或病症的说明书一起提供。所述抗体,抗原结合片段或多肽可以配制以便适于注射或输注到肿瘤或血液。

[0306] 在一些实施方案中,所述试剂盒还可以包含至少一个具有预定量的另一种治疗剂(例如抗感染剂或化疗剂)的容器。在这样的实施方案中,所述试剂盒还可以包含第二药物或药物组合物,使得两种药物或药物组合物可以同时或分开放用,使得它们为特定疾病或病症提供组合治疗。所述治疗剂也可以配制以便适于注射或输注到肿瘤或血液。

[0307] 受试者

[0308] 待治疗的受试者可以是任何动物或人。受试者优选哺乳动物,更优选人。受试者可以是非人哺乳动物,但更优选是人。受试者可以是男性或女性。受试者可以是患者。受试者可能被诊断为患有需要治疗的疾病或病症,或被怀疑患有这种疾病或病症。

[0309] 蛋白表达

[0310] 适用于在细胞中生产本发明的多肽的分子生物学技术是本领域公知的,例如

Sambrook等,分子克隆:实验手册,纽约:冷泉港实验室出版社,1989中所记载的那些。

[0311] 多肽可以从核苷酸序列表达。所述核苷酸序列可以包含在存在于细胞中的载体中,或可以并入细胞的基因组中。

[0312] 本文所用的“载体”是用作将外源遗传物质转移入细胞的载体的寡核苷酸分子(DNA或RNA)。所述载体可以是用于在细胞中表达所述遗传物质的表达载体。这样的载体可以包括可操作地连接到编码待表达的基因序列的核苷酸序列的启动子序列。载体还可以包括终止密码子和表达增强子。本领域已知的任何合适的载体,启动子,增强子和终止密码子可用于从根据本发明的载体表达多肽。合适的载体包括质粒,二元载体,病毒载体和人工染色体(例如酵母人工染色体)。

[0313] 在本说明书中,术语“可操作地连接”可以包括这种情形,其中所选择的核苷酸序列和调节核苷酸序列(例如启动子和/或增强子)以这样的方式共价连接以将核苷酸序列的表达置于调控序列的影响或控制下(从而形成表达盒)。因此,如果调控序列能够影响核苷酸序列的转录,则调控序列可操作地连接到所选择的核苷酸序列。在合适的情况下,所得到的转录物然后可以翻译成所需的蛋白质或多肽。

[0314] 适于多肽表达的任何细胞可用于制备根据本发明的肽。所述细胞可以是原核生物或真核生物。合适的原核细胞包括大肠杆菌。真核细胞的实例包括酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。在某些情况下,细胞不是原核细胞,因为一些原核细胞不允许与真核生物相同的翻译后修饰。此外,非常高的表达水平在真核生物中是可能的并且蛋白质可以更容易使用适当的标签从真核生物纯化。还可以使用特异性质粒,其增强蛋白质分泌到培养基中。

[0315] 产生感兴趣多肽的方法可以涉及修饰以表达多肽的细胞的培养或发酵。所述培养或发酵可以在生物反应器中进行,所述生物反应器具有适当的营养物质,空气/氧气和/或生长因子供应。可以通过分离细胞与培养基/发酵液,提取蛋白质内容物,并分离各个蛋白以分离分泌的多肽来收集分泌的蛋白质。培养,发酵和分离技术是本领域技术人员所熟知的。

[0316] 生物反应器包括其中可以培养细胞的一个或多个容器。生物反应器中的培养物可以连续发生,反应物连续流入反应器,并从中连续流出培养的细胞。或者,培养物可以分批进行。生物反应器监测和控制环境条件,例如pH,氧气,进入和离开的流速,以及容器内的搅动,以便为被培养的细胞提供最佳条件。

[0317] 在表达感兴趣的多肽的细胞培养后,优选分离该多肽。可以使用本领域已知用于从细胞培养物分离多肽/蛋白质的任何合适的方法。为了从培养物中分离感兴趣的多肽/蛋白质,可能有必要首先将培养的细胞从含有感兴趣的多肽/蛋白质的培养基中分离出来。如果感兴趣的多肽/蛋白从细胞分泌,则可以通过离心从含有分泌的多肽/蛋白质的培养基中分离细胞。如果感兴趣的多肽/蛋白质在细胞内收集,则有必要在离心之前破坏细胞,例如使用超声处理,快速冻融或渗透裂解。离心将产生含有培养细胞或培养细胞的细胞碎片的沉淀物,以及含有培养基和上述感兴趣的多肽/蛋白质的上清液。

[0318] 然后可能需要从可能含有其它蛋白质和非蛋白质组分的上清液或培养基中分离感兴趣的多肽/蛋白质。从上清液或培养基中分离多肽/蛋白质组分的常见方法是通过沉淀。不同溶解度的多肽/蛋白质在不同浓度的沉淀剂如硫酸铵中沉淀。例如,在低浓度的沉

淀剂中,提取水溶性蛋白质。因此,通过添加增加浓度的沉淀剂,可以区分不同溶解度的蛋白质。随后可以使用透析从分离的蛋白质中除去硫酸铵。

[0319] 用于区分不同多肽/蛋白质的其它方法是本领域已知的,例如离子交换色谱和尺寸色谱。这些可以用作沉淀的替代物,或者可以在沉淀后进行。

[0320] 一旦已经从培养物中分离出感兴趣的多肽/蛋白质,则可能需要浓缩所述蛋白质。用于浓缩感兴趣的蛋白质的许多方法是本领域已知的,例如超滤或冻干。

[0321] 序列相同性

[0322] 用于确定百分比氨基酸或核苷酸序列相同性的比对可以以本领域技术人员已知的各种方式实现,例如使用公知的计算机软件,例如ClustalW 1.82。T-coffee或Megalign (DNASTAR) 软件。当使用这样的软件时,优选使用默认参数,例如,对于空位罚分和延伸罚分。ClustalW 1.82的默认参数为:蛋白空位开放罚分=10.0,蛋白空位延伸罚分=0.2,蛋白矩阵=预测,蛋白/DNA ENDGAP=-1,蛋白/DNA GAPDIST=4。

[0323] 本发明包括所描述的方面和优选特征的组合,除了这种组合是明显不允许的或明确避免的。

[0324] 本文使用的部分标题仅用于组织目的,不应被解释为限制所描述的主题。

[0325] 现在将参考附图,通过示例的方式来说明本发明的方面和实施例。其他方面和实施例对于本领域技术人员将是显而易见的。本文中提及的所有文件均通过引用并入本文。

[0326] 在整个说明书中,包括以下权利要求书,除非上下文另有要求,否则词语“包括”和诸如“包括”和“包含”之类的变体将被理解为意指包含所述整数或步骤或整数或步骤组,但不排除任何其他整数或步骤或整数或步骤组。

[0327] 必须指出的是,如在说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“一”,“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文另有明确规定。范围可以在本文中表示为“约”一个特定值,和/或“约”另一特定值。当表示这样的范围时,另一个实施例包括从一个特定值和/或到另一特定值。类似地,当值被表示为近似值时,通过使用先行词“约”,可以理解为所述特定值形成另一个实施例。

[0328] 附图简要说明

[0329] 现在将参考附图来讨论说明本发明的原理的实施例和实验,其中:

[0330] 图1.抗-TIM-3抗体1B9、1H9、1H10、2C7、2F4、2G6、1D9、1F4、2C8(人IgG4)的轻链可变区序列.CDR用下划线表示,并分别示出。

[0331] 图2.抗-TIM-3抗体克隆1B9、1H9、1H10、2C7、2F4、2G6、1D9、1F4、2C8(人IgG4)的重链可变区序列.CDR用下划线表示,并分别示出。

[0332] 图3.表显示了抗-TIM-3抗体克隆1B9、1H9、1H10、2C7、2F4、2G6、1D9、1F4、2C8的轻链和重链CDR序列。

[0333] 图4.抗-TIM-3抗体克隆1B9、1H9、1H10、2C7、2F4、2G6、1D9、1F4、2C8(人IgG4)的重链和轻链可变结构域序列的核苷酸和编码氨基酸序列。

[0334] 图5.表显示了克隆1B9、1H9、1H10、2C7、2F4、2G6、1D9、1F4、2C8的解离速率。

[0335] 图6.图显示了抗-TIM-3克隆2C7-抗CD3双特异性抗体对纯化的T细胞和急性骨髓性白血病(AML)细胞的作用。将AML细胞与纯化的T细胞以1:1的比例混合,并以不同的浓度加入抗体。孵育24小时后,测定裂解。

[0336] 图7.图显示了抗-TIM-3克隆2C7-抗CD3双特异性抗体对AML活组织检查(即AML干细胞)中CD34+细胞的CD34特异性杀伤作用。选择后,将CD34+细胞(样品>99%CD34+纯度)与纯化的T细胞以1:1的比例混合,并以不同的浓度加入抗体。孵育24小时后,测定裂解。

[0337] 图8.串联单链双特异性抗体形式的示意图。

实施例

[0338] 抗人TIM-3抗体的分离

[0339] 通过三轮生物淘选过程中的体外选择,从人抗体噬菌体展示文库中分离抗TIM-3抗体。

[0340] 基本上,将链霉亲和素磁珠用生物素化的人TIM-3包被,并用于使用磁珠分选找出抗TIM-3特异性噬菌体。在选择过程中添加了去除潜在的抗生物素抗体的一些步骤。

[0341] 在HB2151细胞小规模诱导后,通过ELISA筛选Fab抗体。简言之,用人TIM-3包被ELISA板并用酪蛋白溶液封闭。在PBS Tween-20中大量洗涤之后,在有PBS配制的7%牛奶存在下,将来自诱导板的上清液转移到ELISA板中。在室温下,在搅拌和大量洗涤90分钟后,加入与HRP偶联的山羊抗人Fab抗体。1小时后,洗涤板,加入TMB底物。用1M HCl终止反应,并在450nm处测量光密度,参考值为670nm。选择吸光度大于0.1的抗体为阳性。通过DNA指纹图谱进行第一次克隆筛选;然后通过测序证实克隆状态。

[0342] 亲和力成熟

[0343] 进一步工程改造在体外中和TIM-3中显示良好特征的克隆。将其序列恢复到种系样的框架后,该抗体通过CDR工程进行亲和力成熟。通过噬菌体展示法进行特异性亲和力成熟的抗TIM-3抗体的选择,并通过ELISA进行筛选。

[0344] 为了在ELISA阳性克隆中选择一些前导物,通过表面等离子体共振(SPR)分析TIM-3结合/解离曲线。简言之,将与Fc偶联的人TIM-3固定在传感器芯片上,然后将抗体作为流动相施加到芯片上。使用ProteOn XPR36生物分析仪(Biorad)记录结合和解离速率。基于它们与TIM-3的快速/强结合以及与蛋白质的缓慢解离,选择了9个克隆(1B9、1H9、1H10、2C7、2F4、2G6、1D9、1F4、2C8)(图5)。

[0345] 双特异性抗TIM-3抗CD3抗体对来自患者的急性骨髓性白血病细胞的特异性杀伤

[0346] 抗TIM-3克隆2C7用于构建一方面能够结合T细胞(CD3的特异性)并且在另一方面靶向TIM-3的双特异性抗体。所述双特异性抗体包含两个单链可变片段(scFvs)作为融合蛋白。scFv中的一个包含克隆2C7的V_H和V_L序列(即SEQ ID NO:4和24),并且另一个scFv包含抗CD3抗体克隆的V_H和V_L序列。

[0347] 串联单链双特异性抗体的形式如图8所示。

[0348] 然后测试含抗CD3呈串联单链双特异性形式的抗TIM-3克隆2C7(抗TIM-3克隆2C7-抗CD3双特异性抗体),以评估其杀伤从AML患者的活组织检查获得的急性骨髓性白血病(AML)细胞的能力。

[0349] 简言之,将纯化的T细胞与获自3线化疗治疗难治性的患者的AML细胞以1:1的比例混合。以各种浓度加入双特异性抗体,并将混合物孵育24小时。孵育后,测量AML细胞裂解。

[0350] 结果如图6所示。抗TIM-3克隆2C7-抗CD3双特异性抗体被证明是体外对杀伤来自化疗难治性患者中的AML细胞是有效的。

[0351] 然后在AML干细胞,即表达高水平CD34的AML活组织检查细胞上测试克隆2C7-抗CD3双特异性抗体。选择之后,将CD34+细胞(样品>99%CD34+纯度)与纯化的T细胞以1:1的比例混合,并以不同的浓度加入抗体。孵育24小时后,测定裂解。

[0352] 结果如图7所示。抗TIM-3克隆2C7-抗CD3双特异性抗体显示出以中等至高浓度离体杀伤AML干细胞的能力。

[0001] 序列表
[0002] <110> 新加坡科技研究局
[0003] <120> 抗TIM-3抗体
[0004] <130> RIC/FP7157985
[0005] <150> GB 1419094.6
[0006] <151> 2014-10-27
[0007] <160> 61
[0008] <170> PatentIn version 3.3
[0009] <210> 1
[0010] <211> 110
[0011] <212> PRT
[0012] <213> 人工序列
[0013] <220>
[0014] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1B9的轻链可变结构域序列
[0015] <400> 1
[0016] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
[0017] 1 5 10 15
[0018] Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
[0019] 20 25 30
[0020] Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
[0021] 35 40 45
[0022] Ile Tyr Gly Asn Asn Trp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
[0023] 50 55 60
[0024] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
[0025] 65 70 75 80
[0026] Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Ala Trp Asp Tyr Tyr Val
[0027] 85 90 95
[0028] Ala Ala Gly Tyr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0029] 100 105 110
[0030] <210> 2
[0031] <211> 110
[0032] <212> PRT
[0033] <213> 人工序列
[0034] <220>
[0035] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1H9的轻链可变结构域序列
[0036] <400> 2
[0037] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
[0038] 1 5 10 15

[0039]	Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn			
[0040]	20	25	30	
[0041]	Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
[0042]	35	40	45	
[0043]	Ile Tyr Gly Asn Asn Trp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
[0044]	50	55	60	
[0045]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln			
[0046]	65	70	75	80
[0047]	Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asp Ser Trp Asp Ser Ala Asp			
[0048]	85	90	95	
[0049]	Ala Ser Gly Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
[0050]	100	105	110	
[0051]	<210> 3			
[0052]	<211> 110			
[0053]	<212> PRT			
[0054]	<213> 人工序列			
[0055]	<220>			
[0056]	<223> 合成序列: 抗TIM-3抗体克隆 1H10的轻链可变结构域序列			
[0057]	<400> 3			
[0058]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln			
[0059]	1	5	10	15
[0060]	Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn			
[0061]	20	25	30	
[0062]	Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
[0063]	35	40	45	
[0064]	Ile Tyr Gly Asn Asn Trp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
[0065]	50	55	60	
[0066]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln			
[0067]	65	70	75	80
[0068]	Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asp Ser Trp Asp Tyr Asp Tyr			
[0069]	85	90	95	
[0070]	Ala Ala Gly Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
[0071]	100	105	110	
[0072]	<210> 4			
[0073]	<211> 110			
[0074]	<212> PRT			
[0075]	<213> 人工序列			
[0076]	<220>			
[0077]	<223> 合成序列: 抗TIM-3抗体克隆 2C7的轻链可变结构域序列			

[0078] <400> 4

[0079] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln

[0080] 1 5 10 15

[0081] Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

[0082] 20 25 30

[0083] Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

[0084] 35 40 45

[0085] Ile Tyr Gly Asn Asn Trp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

[0086] 50 55 60

[0087] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

[0088] 65 70 75 80

[0089] Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asp Ser Trp Asp Ser Tyr Leu

[0090] 85 90 95

[0091] Ala Ala Gly Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[0092] 100 105 110

[0093] <210> 5

[0094] <211> 110

[0095] <212> PRT

[0096] <213> 人工序列

[0097] <220>

[0098] <223> 合成序列: 抗TIM-3抗体克隆 2F4的轻链可变结构域序列

[0099] <400> 5

[0100] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln

[0101] 1 5 10 15

[0102] Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

[0103] 20 25 30

[0104] Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

[0105] 35 40 45

[0106] Ile Tyr Gly Asn Asn Trp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

[0107] 50 55 60

[0108] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

[0109] 65 70 75 80

[0110] Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Ser Trp Asp Tyr Asp Tyr

[0111] 85 90 95

[0112] Ala Ser Gly Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[0113] 100 105 110

[0114] <210> 6

[0115] <211> 110

[0116] <212> PRT

[0117] <213> 人工序列

[0118] <220>

[0119] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 2G6的轻链可变结构域序列

[0120] <400> 6

[0121] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln

[0122] 1 5 10 15

[0123] Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

[0124] 20 25 30

[0125] Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

[0126] 35 40 45

[0127] Ile Tyr Gly Asn Asn Trp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

[0128] 50 55 60

[0129] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

[0130] 65 70 75 80

[0131] Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asp Ser Trp Asp Ser Ser Asp

[0132] 85 90 95

[0133] Ser Ser Gly Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[0134] 100 105 110

[0135] <210> 7

[0136] <211> 110

[0137] <212> PRT

[0138] <213> 人工序列

[0139] <220>

[0140] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1D9的轻链可变结构域序列

[0141] <400> 7

[0142] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln

[0143] 1 5 10 15

[0144] Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

[0145] 20 25 30

[0146] Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

[0147] 35 40 45

[0148] Ile Tyr Gly Asn Asn Trp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

[0149] 50 55 60

[0150] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

[0151] 65 70 75 80

[0152] Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Ala Trp Asp Ser Ala Tyr

[0153] 85 90 95

[0154] Ala Ala Gly Ser Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[0155] 100 105 110

[0156] <210> 8
 [0157] <211> 110
 [0158] <212> PRT
 [0159] <213> 人工序列
 [0160] <220>
 [0161] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1F4的轻链可变结构域序列
 [0162] <400> 8
 [0163] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 [0164] 1 5 10 15
 [0165] Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 [0166] 20 25 30
 [0167] Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 [0168] 35 40 45
 [0169] Ile Tyr Gly Asn Asn Trp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 [0170] 50 55 60
 [0171] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 [0172] 65 70 75 80
 [0173] Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asp Ser Trp Asp Ala Ala Leu
 [0174] 85 90 95
 [0175] Ser Ala Gly Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0176] 100 105 110
 [0177] <210> 9
 [0178] <211> 110
 [0179] <212> PRT
 [0180] <213> 人工序列
 [0181] <220>
 [0182] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 2C8的轻链可变结构域序列
 [0183] <400> 9
 [0184] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 [0185] 1 5 10 15
 [0186] Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 [0187] 20 25 30
 [0188] Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 [0189] 35 40 45
 [0190] Ile Tyr Gly Asn Asn Trp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 [0191] 50 55 60
 [0192] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 [0193] 65 70 75 80
 [0194] Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Ser Trp Asp Ala Ala Ala

[0195]	85	90	95
[0196]	Ala Ala Gly Tyr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
[0197]	100	105	110
[0198]	<210> 10		
[0199]	<211> 13		
[0200]	<212> PRT		
[0201]	<213> 人工序列		
[0202]	<220>		
[0203]	<223> 合成序列: LC-CDR1		
[0204]	<400> 10		
[0205]	Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser		
[0206]	1 5 10		
[0207]	<210> 11		
[0208]	<211> 7		
[0209]	<212> PRT		
[0210]	<213> 人工序列		
[0211]	<220>		
[0212]	<223> 合成序列: LC-CDR2		
[0213]	<400> 11		
[0214]	Gly Asn Asn Trp Arg Pro Ser		
[0215]	1 5		
[0216]	<210> 12		
[0217]	<211> 11		
[0218]	<212> PRT		
[0219]	<213> 人工序列		
[0220]	<220>		
[0221]	<223> 合成序列: LC-CDR3		
[0222]	<400> 12		
[0223]	Glu Ala Trp Asp Tyr Tyr Val Ala Ala Gly Tyr		
[0224]	1 5 10		
[0225]	<210> 13		
[0226]	<211> 11		
[0227]	<212> PRT		
[0228]	<213> 人工序列		
[0229]	<220>		
[0230]	<223> 合成序列: LC-CDR3		
[0231]	<400> 13		
[0232]	Asp Ser Trp Asp Ser Ala Asp Ala Ser Gly Val		
[0233]	1 5 10		

[0234] <210> 14
[0235] <211> 11
[0236] <212> PRT
[0237] <213> 人工序列
[0238] <220>
[0239] <223> 合成序列: LC-CDR3
[0240] <400> 14
[0241] Asp Ser Trp Asp Tyr Asp Tyr Ala Ala Gly Val
[0242] 1 5 10
[0243] <210> 15
[0244] <211> 11
[0245] <212> PRT
[0246] <213> 人工序列
[0247] <220>
[0248] <223> 合成序列: LC-CDR3
[0249] <400> 15
[0250] Asp Ser Trp Asp Ser Tyr Leu Ala Ala Gly Val
[0251] 1 5 10
[0252] <210> 16
[0253] <211> 11
[0254] <212> PRT
[0255] <213> 人工序列
[0256] <220>
[0257] <223> 合成序列: LC-CDR3
[0258] <400> 16
[0259] Glu Ser Trp Asp Tyr Asp Tyr Ala Ser Gly Val
[0260] 1 5 10
[0261] <210> 17
[0262] <211> 11
[0263] <212> PRT
[0264] <213> 人工序列
[0265] <220>
[0266] <223> 合成序列: LC-CDR3
[0267] <400> 17
[0268] Asp Ser Trp Asp Ser Ser Asp Ser Ser Gly Val
[0269] 1 5 10
[0270] <210> 18
[0271] <211> 11
[0272] <212> PRT

[0273] <213> 人工序列

[0274] <220>

[0275] <223> 合成序列: LC-CDR3

[0276] <400> 18

[0277] Glu Ala Trp Asp Ser Ala Tyr Ala Ala Gly Ser

[0278] 1 5 10

[0279] <210> 19

[0280] <211> 11

[0281] <212> PRT

[0282] <213> 人工序列

[0283] <220>

[0284] <223> 合成序列: LC-CDR3

[0285] <400> 19

[0286] Asp Ser Trp Asp Ala Ala Leu Ser Ala Gly Val

[0287] 1 5 10

[0288] <210> 20

[0289] <211> 11

[0290] <212> PRT

[0291] <213> 人工序列

[0292] <220>

[0293] <223> 合成序列: LC-CDR3

[0294] <400> 20

[0295] Glu Ser Trp Asp Ala Ala Ala Ala Gly Tyr

[0296] 1 5 10

[0297] <210> 21

[0298] <211> 116

[0299] <212> PRT

[0300] <213> 人工序列

[0301] <220>

[0302] <223> 合成序列: 抗TIM-3抗体克隆 1B9的重链可变结构域序列

[0303] <400> 21

[0304] Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

[0305] 1 5 10 15

[0306] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

[0307] 20 25 30

[0308] Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

[0309] 35 40 45

[0310] Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

[0311] 50 55 60

[0312] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 [0313] 65 70 75 80
 [0314] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 [0315] 85 90 95
 [0316] Arg Gly Tyr Val Ala Gly Ser Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 [0317] 100 105 110
 [0318] Thr Val Ser Ser
 [0319] 115
 [0320] <210> 22
 [0321] <211> 116
 [0322] <212> PRT
 [0323] <213> 人工序列
 [0324] <220>
 [0325] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1H9的重链可变结构域序列
 [0326] <400> 22
 [0327] Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 [0328] 1 5 10 15
 [0329] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 [0330] 20 25 30
 [0331] Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 [0332] 35 40 45
 [0333] Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 [0334] 50 55 60
 [0335] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 [0336] 65 70 75 80
 [0337] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 [0338] 85 90 95
 [0339] Arg Gly Tyr Val Ala Gly Phe Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 [0340] 100 105 110
 [0341] Thr Val Ser Ser
 [0342] 115
 [0343] <210> 23
 [0344] <211> 116
 [0345] <212> PRT
 [0346] <213> 人工序列
 [0347] <220>
 [0348] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1H10的重链可变结构域序列
 [0349] <400> 23
 [0350] Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

[0351]	1	5	10	15
[0352]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr			
[0353]	20	25	30	
[0354]	Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
[0355]	35	40	45	
[0356]	Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys			
[0357]	50	55	60	
[0358]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
[0359]	65	70	75	80
[0360]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
[0361]	85	90	95	
[0362]	Arg Gly Tyr Val Ala Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
[0363]	100	105	110	
[0364]	Thr Val Ser Ser			
[0365]	115			
[0366]	<210> 24			
[0367]	<211> 116			
[0368]	<212> PRT			
[0369]	<213> 人工序列			
[0370]	<220>			
[0371]	<223> 合成序列: 抗TIM-3抗体克隆 2C7的重链可变结构域序列			
[0372]	<400> 24			
[0373]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu			
[0374]	1	5	10	15
[0375]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr			
[0376]	20	25	30	
[0377]	Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
[0378]	35	40	45	
[0379]	Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys			
[0380]	50	55	60	
[0381]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
[0382]	65	70	75	80
[0383]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
[0384]	85	90	95	
[0385]	Arg Gly Tyr Val Ala Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
[0386]	100	105	110	
[0387]	Thr Val Ser Ser			
[0388]	115			
[0389]	<210> 25			

[0390] <211> 116

[0391] <212> PRT

[0392] <213> 人工序列

[0393] <220>

[0394] <223> 合成序列: 抗TIM-3抗体克隆 2F4的重链可变结构域序列

[0395] <400> 25

[0396] Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

[0397] 1 5 10 15

[0398] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

[0399] 20 25 30

[0400] Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

[0401] 35 40 45

[0402] Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

[0403] 50 55 60

[0404] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

[0405] 65 70 75 80

[0406] Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

[0407] 85 90 95

[0408] Arg Gly Tyr Val Ala Gly Ser Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

[0409] 100 105 110

[0410] Thr Val Ser Ser

[0411] 115

[0412] <210> 26

[0413] <211> 116

[0414] <212> PRT

[0415] <213> 人工序列

[0416] <220>

[0417] <223> 合成序列: 抗TIM-3抗体克隆 2G6的重链可变结构域序列

[0418] <400> 26

[0419] Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

[0420] 1 5 10 15

[0421] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

[0422] 20 25 30

[0423] Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

[0424] 35 40 45

[0425] Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

[0426] 50 55 60

[0427] Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

[0428] 65 70 75 80

[0429]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
[0430]	85	90	95	
[0431]	Arg Gly Tyr Val Ala Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
[0432]	100	105	110	
[0433]	Thr Val Ser Ser			
[0434]	115			
[0435]	<210> 27			
[0436]	<211> 116			
[0437]	<212> PRT			
[0438]	<213> 人工序列			
[0439]	<220>			
[0440]	<223> 合成序列: 抗TIM-3抗体克隆 1D9的重链可变结构域序列			
[0441]	<400> 27			
[0442]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu			
[0443]	1	5	10	15
[0444]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr			
[0445]	20	25	30	
[0446]	Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
[0447]	35	40	45	
[0448]	Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys			
[0449]	50	55	60	
[0450]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
[0451]	65	70	75	80
[0452]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
[0453]	85	90	95	
[0454]	Arg Gly Tyr Tyr Ala Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
[0455]	100	105	110	
[0456]	Thr Val Ser Ser			
[0457]	115			
[0458]	<210> 28			
[0459]	<211> 116			
[0460]	<212> PRT			
[0461]	<213> 人工序列			
[0462]	<220>			
[0463]	<223> 合成序列: 抗TIM-3抗体克隆 1F4的重链可变结构域序列			
[0464]	<400> 28			
[0465]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu			
[0466]	1	5	10	15
[0467]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr			

[0468]	20	25	30
[0469]	Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
[0470]	35	40	45
[0471]	Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys		
[0472]	50	55	60
[0473]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu		
[0474]	65	70	75
[0475]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
[0476]	85	90	95
[0477]	Arg Gly Tyr Val Ala Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
[0478]	100	105	110
[0479]	Thr Val Ser Ser		
[0480]	115		
[0481]	<210> 29		
[0482]	<211> 116		
[0483]	<212> PRT		
[0484]	<213> 人工序列		
[0485]	<220>		
[0486]	<223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 2C8的重链可变结构域序列		
[0487]	<400> 29		
[0488]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu		
[0489]	1 5 10 15		
[0490]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr		
[0491]	20 25 30		
[0492]	Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
[0493]	35 40 45		
[0494]	Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys		
[0495]	50 55 60		
[0496]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu		
[0497]	65 70 75		80
[0498]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
[0499]	85 90 95		
[0500]	Arg Gly Tyr Val Ala Gly Ser Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
[0501]	100 105 110		
[0502]	Thr Val Ser Ser		
[0503]	115		
[0504]	<210> 30		
[0505]	<211> 10		
[0506]	<212> PRT		

[0507] <213> 人工序列

[0508] <220>

[0509] <223> 合成序列: HC-CDR1

[0510] <400> 30

[0511] Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser

[0512] 1 5 10

[0513] <210> 31

[0514] <211> 16

[0515] <212> PRT

[0516] <213> 人工序列

[0517] <220>

[0518] <223> 合成序列: HC-CDR2

[0519] <400> 31

[0520] Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

[0521] 1 5 10 15

[0522] <210> 32

[0523] <211> 8

[0524] <212> PRT

[0525] <213> 人工序列

[0526] <220>

[0527] <223> 合成序列: HC-CDR3

[0528] <400> 32

[0529] Gly Tyr Val Ala Gly Ser Asp Ala

[0530] 1 5

[0531] <210> 33

[0532] <211> 8

[0533] <212> PRT

[0534] <213> 人工序列

[0535] <220>

[0536] <223> 合成序列: HC-CDR3

[0537] <400> 33

[0538] Gly Tyr Val Ala Gly Phe Asp Asp

[0539] 1 5

[0540] <210> 34

[0541] <211> 8

[0542] <212> PRT

[0543] <213> 人工序列

[0544] <220>

[0545] <223> 合成序列: HC-CDR3

[0546] <400> 34

[0547] Gly Tyr Val Ala Gly Phe Asp Ser

[0548] 1 5

[0549] <210> 35

[0550] <211> 8

[0551] <212> PRT

[0552] <213> 人工序列

[0553] <220>

[0554] <223> 合成序列: HC-CDR3

[0555] <400> 35

[0556] Gly Tyr Val Ala Gly Tyr Asp Tyr

[0557] 1 5

[0558] <210> 36

[0559] <211> 8

[0560] <212> PRT

[0561] <213> 人工序列

[0562] <220>

[0563] <223> 合成序列: HC-CDR3

[0564] <400> 36

[0565] Gly Tyr Val Ala Gly Ser Asp Ala

[0566] 1 5

[0567] <210> 37

[0568] <211> 8

[0569] <212> PRT

[0570] <213> 人工序列

[0571] <220>

[0572] <223> 合成序列: HC-CDR3

[0573] <400> 37

[0574] Gly Tyr Val Ala Gly Phe Asp Ser

[0575] 1 5

[0576] <210> 38

[0577] <211> 8

[0578] <212> PRT

[0579] <213> 人工序列

[0580] <220>

[0581] <223> 合成序列: HC-CDR3

[0582] <400> 38

[0583] Gly Tyr Tyr Ala Gly Asp Asp Tyr

[0584] 1 5

[0585] <210> 39
[0586] <211> 8
[0587] <212> PRT
[0588] <213> 人工序列
[0589] <220>
[0590] <223> 合成序列: HC-CDR3
[0591] <400> 39
[0592] Gly Tyr Val Ala Gly Tyr Asp Tyr
[0593] 1 5
[0594] <210> 40
[0595] <211> 8
[0596] <212> PRT
[0597] <213> 人工序列
[0598] <220>
[0599] <223> 合成序列: HC-CDR3
[0600] <400> 40
[0601] Gly Tyr Val Ala Gly Ser Asp Ala
[0602] 1 5
[0603] <210> 41
[0604] <211> 11
[0605] <212> PRT
[0606] <213> 人工序列
[0607] <220>
[0608] <223> 合成序列: LC-CDR3
[0609] <220>
[0610] <221> 变体
[0611] <222> (1) .. (1)
[0612] <223> Xaa = Glu 或 Asp
[0613] <220>
[0614] <221> 变体
[0615] <222> (2) .. (2)
[0616] <223> Xaa = Ala 或 Ser
[0617] <220>
[0618] <221> 变体
[0619] <222> (5) .. (5)
[0620] <223> Xaa = Tyr, Ser 或 Ala
[0621] <220>
[0622] <221> 变体
[0623] <222> (6) .. (6)

[0624] <223> Xaa = Tyr, Ala, Asp 或Ser

[0625] <220>

[0626] <221> 变体

[0627] <222> (7) .. (7)

[0628] <223> Xaa = Val, Asp, Tyr, Leu 或Ala

[0629] <220>

[0630] <221> 变体

[0631] <222> (8) .. (8)

[0632] <223> Xaa = Ala 或Ser

[0633] <220>

[0634] <221> 变体

[0635] <222> (9) .. (9)

[0636] <223> Xaa = Ala 或Ser

[0637] <220>

[0638] <221> 变体

[0639] <222> (11) .. (11)

[0640] <223> Xaa = Tyr, Val 或Ser

[0641] <400> 41

[0642] Xaa Xaa Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa

[0643] 1 5 10

[0644] <210> 42

[0645] <211> 8

[0646] <212> PRT

[0647] <213> 人工序列

[0648] <220>

[0649] <223> 合成序列: HC-CDR3

[0650] <220>

[0651] <221> 变体

[0652] <222> (3) .. (3)

[0653] <223> Xaa = Val 或Tyr

[0654] <220>

[0655] <221> 变体

[0656] <222> (6) .. (6)

[0657] <223> Xaa = Ser, Phe, Tyr 或Asp

[0658] <220>

[0659] <221> 变体

[0660] <222> (8) .. (8)

[0661] <223> Xaa = Ala, Asp, Ser 或Tyr

[0662] <400> 42

[0663] Gly Tyr Xaa Ala Gly Xaa Asp Xaa

[0664] 1 5

[0665] <210> 43

[0666] <211> 330

[0667] <212> DNA

[0668] <213> 人工序列

[0669] <220>

[0670] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1B9的轻链可变结构域序列的核苷酸序列

[0671] <400> 43

[0672] cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa agtcaccatc 60

[0673] tcctgctctg gaagcagctc caacatttggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120

[0674] ccaggaacag ccccaaact cctcattttat ggcaataatt ggccaccctc agggattcct 180

[0675] gaccgcttct ctggctccaa gtctggcacc tcagccaccc tggcatcac cgacttcag 240

[0676] actggggacg aggccgatta ttactgcgaa gcttgggatt attatgtgc tgctgggtat 300

[0677] ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

[0678] <210> 44

[0679] <211> 330

[0680] <212> DNA

[0681] <213> 人工序列

[0682] <220>

[0683] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1H9的轻链可变结构域序列的核苷酸序列

[0684] <400> 44

[0685] cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa agtcaccatc 60

[0686] tcctgctctg gaagcagctc caacatttggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120

[0687] ccaggaacag ccccaaact cctcattttat ggcaataatt ggccaccctc agggattcct 180

[0688] gaccgcttct ctggctccaa gtctggcacc tcagccaccc tggcatcac cgacttcag 240

[0689] actggggacg aggccgatta ttactgcgat tcttgggatt ctgctgatgc ttctgggtt 300

[0690] ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

[0691] <210> 45

[0692] <211> 330

[0693] <212> DNA

[0694] <213> 人工序列

[0695] <220>

[0696] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1H10的轻链可变结构域序列的核苷酸序列

[0697] <400> 45

[0698] cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa agtcaccatc 60

[0699] tcctgctctg gaagcagctc caacatttggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120

[0700] ccaggaacag ccccaaact cctcattttat ggcaataatt ggccaccctc agggattcct 180

[0701] gaccgcttct ctggctccaa gtctggcacc tcagccaccc tggcatcac cgacttcag 240

[0702] actggggacg aggccgatta ttactgcgt tcttggatt atgattatgc tgctgggtt 300
[0703] ttccggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
[0704] <210> 46
[0705] <211> 330
[0706] <212> DNA
[0707] <213> 人工序列
[0708] <220>
[0709] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 2C7的轻链可变结构域序列的核苷酸序列
[0710] <400> 46
[0711] cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtgt tctgcggccc caggacagaa agtcaccatc 60
[0712] tcctgctctg gaagcagctc caacatttggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
[0713] ccaggaacag ccccaaact cctcattttat ggcaataatt ggccgaccctc agggattcct 180
[0714] gaccgcttct ctggctccaa gtctggcacc tcagccaccc tgggcatcac cggaacttcag 240
[0715] actggggacg aggccgatta ttactgcgt tcttggatt cttatctgc tgctgggtt 300
[0716] ttccggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
[0717] <210> 47
[0718] <211> 330
[0719] <212> DNA
[0720] <213> 人工序列
[0721] <220>
[0722] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 2F4的轻链可变结构域序列的核苷酸序列
[0723] <400> 47
[0724] cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtgt tctgcggccc caggacagaa agtcaccatc 60
[0725] tcctgctctg gaagcagctc caacatttggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
[0726] ccaggaacag ccccaaact cctcattttat ggcaataatt ggccgaccctc agggattcct 180
[0727] gaccgcttct ctggctccaa gtctggcacc tcagccaccc tgggcatcac cggaacttcag 240
[0728] actggggacg aggccgatta ttactgcgt tcttggatt atgattatgc ttctgggtt 300
[0729] ttccggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
[0730] <210> 48
[0731] <211> 330
[0732] <212> DNA
[0733] <213> 人工序列
[0734] <220>
[0735] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 2G6的轻链可变结构域序列的核苷酸序列
[0736] <400> 48
[0737] cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtgt tctgcggccc caggacagaa agtcaccatc 60
[0738] tcctgctctg gaagcagctc caacatttggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
[0739] ccaggaacag ccccaaact cctcattttat ggcaataatt ggccgaccctc agggattcct 180
[0740] gaccgcttct ctggctccaa gtctggcacc tcagccaccc tgggcatcac cggaacttcag 240

[0741] actggggacg aggccgatta ttactgcgt tcttggatt cttctgattc ttctgggtt 300
[0742] ttccggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
[0743] <210> 49
[0744] <211> 330
[0745] <212> DNA
[0746] <213> 人工序列
[0747] <220>
[0748] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1D9的轻链可变结构域序列的核苷酸序列
[0749] <400> 49
[0750] cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa agtcaccatc 60
[0751] tcctgctctg gaagcagctc caacatttggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
[0752] ccaggaacag ccccaaact cctcattttat ggcaataatt ggccgaccctc agggattcct 180
[0753] gaccgcttct ctggctccaa gtctggcacc tcagccaccc tgggcatcac cggaacttcag 240
[0754] actggggacg aggccgatta ttactgcgtt gcttggatt ctgcttatgc tgctgggtct 300
[0755] ttccggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
[0756] <210> 50
[0757] <211> 330
[0758] <212> DNA
[0759] <213> 人工序列
[0760] <220>
[0761] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1F4的轻链可变结构域序列的核苷酸序列
[0762] <400> 50
[0763] cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa agtcaccatc 60
[0764] tcctgctctg gaagcagctc caacatttggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
[0765] ccaggaacag ccccaaact cctcattttat ggcaataatt ggccgaccctc agggattcct 180
[0766] gaccgcttct ctggctccaa gtctggcacc tcagccaccc tgggcatcac cggaacttcag 240
[0767] actggggacg aggccgatta ttactgcgtt tcttggatg ctgcttttc tgctgggtt 300
[0768] ttccggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
[0769] <210> 51
[0770] <211> 330
[0771] <212> DNA
[0772] <213> 人工序列
[0773] <220>
[0774] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 2C8的轻链可变结构域序列的核苷酸序列
[0775] <400> 51
[0776] cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa agtcaccatc 60
[0777] tcctgctctg gaagcagctc caacatttggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
[0778] ccaggaacag ccccaaact cctcattttat ggcaataatt ggccgaccctc agggattcct 180
[0779] gaccgcttct ctggctccaa gtctggcacc tcagccaccc tgggcatcac cggaacttcag 240

[0780] actggggacg aggccgatta ttactgcgaa tcttggatg ctgctgctgc tgctggat 300
[0781] ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
[0782] <210> 52
[0783] <211> 348
[0784] <212> DNA
[0785] <213> 人工序列
[0786] <220>
[0787] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1B9的重链可变结构域序列的核苷酸序列
[0788] <400> 52
[0789] caggtgcagc tacagcagt gggcgagg ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
[0790] acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccggcagccc 120
[0791] ccagggagg ggctggagt gattgggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
[0792] ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gtttccttg 240
[0793] aaactgagct ctgtgaccgc cgccggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggctatgtt 300
[0794] gctggctctg atgcttggg ccagggaaacc ctggtcacccg tctcaagc 348
[0795] <210> 53
[0796] <211> 348
[0797] <212> DNA
[0798] <213> 人工序列
[0799] <220>
[0800] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1H9的重链可变结构域序列的核苷酸序列
[0801] <400> 53
[0802] caggtgcagc tacagcagt gggcgagg ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
[0803] acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccggcagccc 120
[0804] ccagggagg ggctggagt gattgggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
[0805] ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gtttccttg 240
[0806] aaactgagct ctgtgaccgc cgccggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggctatgtt 300
[0807] gctggctttg atgattggg ccagggaaacc ctggtcacccg tctcaagc 348
[0808] <210> 54
[0809] <211> 348
[0810] <212> DNA
[0811] <213> 人工序列
[0812] <220>
[0813] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1H10的重链可变结构域序列的核苷酸序列
[0814] <400> 54
[0815] caggtgcagc tacagcagt gggcgagg ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
[0816] acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccggcagccc 120
[0817] ccagggagg ggctggagt gattgggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
[0818] ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gtttccttg 240

[0819] aaactgagct ctgtgaccgc cgccggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggctatgtt 300
[0820] gctggcttg attcttgggg ccagggAACcc ctggtcaccg tctcaagc 348
[0821] <210> 55
[0822] <211> 348
[0823] <212> DNA
[0824] <213> 人工序列
[0825] <220>
[0826] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 2C7的重链可变结构域序列的核苷酸序列
[0827] <400> 55
[0828] caggtgcagc tacagcagt gggcgccagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
[0829] acctgcgctg tctatgggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccggccagccc 120
[0830] ccagggaaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
[0831] ccgtccctca agagtcgagt caccatata gtagacacgt ccaagaacca gttctccttg 240
[0832] aaactgagct ctgtgaccgc cgccggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggctatgtt 300
[0833] gctggctatg attattgggg ccagggAACcc ctggtcaccg tctcaagc 348
[0834] <210> 56
[0835] <211> 348
[0836] <212> DNA
[0837] <213> 人工序列
[0838] <220>
[0839] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 2F4的重链可变结构域序列的核苷酸序列
[0840] <400> 56
[0841] caggtgcagc tacagcagt gggcgccagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
[0842] acctgcgctg tctatgggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccggccagccc 120
[0843] ccagggaaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
[0844] ccgtccctca agagtcgagt caccatata gtagacacgt ccaagaacca gttctccttg 240
[0845] aaactgagct ctgtgaccgc cgccggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggctatgtt 300
[0846] gctggctctg atgcttgggg ccagggAACcc ctggtcaccg tctcaagc 348
[0847] <210> 57
[0848] <211> 348
[0849] <212> DNA
[0850] <213> 人工序列
[0851] <220>
[0852] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 2G6的重链可变结构域序列的核苷酸序列
[0853] <400> 57
[0854] caggtgcagc tacagcagt gggcgccagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
[0855] acctgcgctg tctatgggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccggccagccc 120
[0856] ccagggaaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
[0857] ccgtccctca agagtcgagt caccatata gtagacacgt ccaagaacca gttctccttg 240

[0858] aaactgagct ctgtgaccgc cgccggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggctatgtt 300
[0859] gctggcttg attcttgggg ccagggAACcc ctggtcaccg tctcaagc 348
[0860] <210> 58
[0861] <211> 348
[0862] <212> DNA
[0863] <213> 人工序列
[0864] <220>
[0865] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1D9的重链可变结构域序列的核苷酸序列
[0866] <400> 58
[0867] caggtgcagc tacagcagt gggcgccagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
[0868] acctgcgctg tctatgggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccggccagccc 120
[0869] ccagggaaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
[0870] ccgtccctca agagtcgagt caccatata gtagacacgt ccaagaacca gttctccttg 240
[0871] aaactgagct ctgtgaccgc cgccggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggctattat 300
[0872] gctggcgatg attattgggg ccagggAACcc ctggtcaccg tctcaagc 348
[0873] <210> 59
[0874] <211> 348
[0875] <212> DNA
[0876] <213> 人工序列
[0877] <220>
[0878] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 1F4的重链可变结构域序列的核苷酸序列
[0879] <400> 59
[0880] caggtgcagc tacagcagt gggcgccagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
[0881] acctgcgctg tctatgggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccggccagccc 120
[0882] ccagggaaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
[0883] ccgtccctca agagtcgagt caccatata gtagacacgt ccaagaacca gttctccttg 240
[0884] aaactgagct ctgtgaccgc cgccggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggctatgtt 300
[0885] gctggctatg attattgggg ccagggAACcc ctggtcaccg tctcaagc 348
[0886] <210> 60
[0887] <211> 348
[0888] <212> DNA
[0889] <213> 人工序列
[0890] <220>
[0891] <223> 合成序列：抗TIM-3抗体克隆 2C8的重链可变结构域序列的核苷酸序列
[0892] <400> 60
[0893] caggtgcagc tacagcagt gggcgccagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
[0894] acctgcgctg tctatgggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccggccagccc 120
[0895] ccagggaaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
[0896] ccgtccctca agagtcgagt caccatata gtagacacgt ccaagaacca gttctccttg 240

[0897] aaactgagct ctgtgaccgc cgccggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggctatgtt 300

[0898] gctggctctg atgcttgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcaagc 348

[0899] <210> 61

[0900] <211> 5

[0901] <212> PRT

[0902] <213> 人工序列

[0903] <220>

[0904] <223> 合成序列: HC-CDR1

[0905] <400> 61

[0906] Gly Tyr Tyr Trp Ser

[0907] 1 5

1B9 克隆

QSVLTQPPSVAAPGQKVTISCGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCEAWDYYVAAGYFGGGKLTVL (SEQ ID NO:1)

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)
LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)
LC-CDR3: EAWDYYVAAGY (SEQ ID NO:12)

1H9 克隆

QSVLTQPPSVAAPGQKVTISCGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCDSWDSADASGVFGGGKLTVL (SEQ ID NO:2)

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)
LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)
LC-CDR3: DSWDSADASGV (SEQ ID NO:13)

1H10

QSVLTQPPSVAAPGQKVTISCGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCDSWDYDYAAGVFGGGKLTVL (SEQ ID NO:3)

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)
LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)
LC-CDR3: DSWDYDYAAGV (SEQ ID NO:14)

图1

2C7 克隆

QSVLTQPPSVAAPGQKVTCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCDSWDSYLAAGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:4)

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: DSWDSYLAAGV (SEQ ID NO:15)

2F4 克隆

QSVLTQPPSVAAPGQKVTCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCESWDYDYASGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:5)

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: ESWDYDYASGV (SEQ ID NO:16)

2G6 克隆

QSVLTQPPSVAAPGQKVTCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCDSWDSSDSSGVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:6)

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: DSWDSSDSSGV (SEQ ID NO:17)

图1 (续)

1D9 克隆

QSVLTQPPSVAAPGQKVTCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCEAWDSAYAAGSFGGGKLTVL (SEQ ID NO:7)

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYV (SEQ ID NO:10)

LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: EAWDSAYAAGS (SEQ ID NO:18)

1F4 克隆

QSVLTQPPSVAAPGQKVTCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCDSWDAALSAGVFGGGKLTVL (SEQ ID NO:8)

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: DSWDAALSAGV (SEQ ID NO:19)

2C8 克隆

QSVLTQPPSVAAPGQKVTCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGI
PDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCESWDAAAAGYFGGGKLTVL (SEQ ID NO:9)

LC-CDR1: SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)

LC-CDR2: GNNWRPS (SEQ ID NO:11)

LC-CDR3: ESWDAAAAGY (SEQ ID NO:20)

图1 (续)

1B9 克隆

QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGSDAWGQGTLTVSS(
SEQ ID NO:21)

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGSDA (SEQ ID NO:32)

1H9 克隆

QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGFDDWGQGTLTVSS(
SEQ ID NO:22)

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGFDD (SEQ ID NO:33)

1H10

QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGFDSWGQGTLTVSS(
SEQ ID NO:23)

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGFDS (SEQ ID NO:34)

图2

2C7 克隆

QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGYDYWGQGTLTVSS(
SEQ ID NO:24)

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGYDY (SEQ ID NO:35)

2F4 克隆

QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGSDAWGQGTLTVSS(
SEQ ID NO:25)

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGSDA (SEQ ID NO:36)

2G6 克隆

QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGFDSWGQGTLTVSS(
SEQ ID NO:26)

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGFDS (SEQ ID NO:37)

图2(续)

1D9 克隆

QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYAGDDYWGQGTLTVSS(
SEQ ID NO:27)

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYYAGDDY (SEQ ID NO:38)

1F4 克隆

QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGYDYWGQGTLTVSS(
SEQ ID NO:28)

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGYDY (SEQ ID NO:39)

2C8 克隆

QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGSDAWGQGTLTVSS(
SEQ ID NO:29)

HC-CDR1: GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), 或
GYYWS (SEQ ID NO:61)

HC-CDR2: EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)

HC-CDR3: GYVAGSDA (SEQ ID NO:40)

图2(续)

克隆	CDR L1	CDR L2	CDR L3
轻链			
1B9	SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)	GNNWRPS (SEQ ID NO:11)	EAWDYYVAAGY (SEQ ID NO:12)
1H9	SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)	GNNWRPS (SEQ ID NO:11)	DSWDSADASGV (SEQ ID NO:13)
1H10	SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)	GNNWRPS (SEQ ID NO:11)	DSWDYDYAAGV (SEQ ID NO:14)
2C7	SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)	GNNWRPS (SEQ ID NO:11)	DSWDSYLAAGV (SEQ ID NO:15)
2F4	SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)	GNNWRPS (SEQ ID NO:11)	ESWDYDYASGV (SEQ ID NO:16)
2G6	SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)	GNNWRPS (SEQ ID NO:11)	DSWDSSDSSGV (SEQ ID NO:17)
1D9	SGSSSNIGNNYVV (SEQ ID NO:10)	GNNWRPS (SEQ ID NO:11)	EAWDSAYAAGS (SEQ ID NO:18)
1F4	SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)	GNNWRPS (SEQ ID NO:11)	DSWDAALSAGV (SEQ ID NO:19)
2C8	SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)	GNNWRPS (SEQ ID NO:11)	ESWDAAAAAGY (SEQ ID NO:20)
共有序列	SGSSSNIGNNYVS (SEQ ID NO:10)	GNNWRPS (SEQ ID NO:11)	$X_1 X_2 W D X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 G X_8$ $X_1 = E \text{ 或 } D$ $X_2 = A \text{ 或 } S$ $X_3 = Y, S \text{ 或 } A$ $X_4 = Y, A, D \text{ 或 } S$ $X_5 = V, D, Y, L \text{ 或 } A$ $X_6 = A \text{ 或 } S$ $X_7 = A \text{ 或 } S$ $X_8 = Y, V \text{ 或 } S$ (SEQ ID NO:41)

图3

克隆	CDR H1	CDR H2	CDR H3
重链			
1B9	GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), or GYYWS (SEQ ID NO:61)	EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)	GYVAGSDA (SEQ ID NO:32)
1H9	GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), or GYYWS (SEQ ID NO:61)	EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)	GYVAGFDD (SEQ ID NO:33)
1H10	GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), or GYYWS (SEQ ID NO:61)	EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)	GYVAGFDS (SEQ ID NO:34)
2C7	GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), or GYYWS (SEQ ID NO:61)	EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)	GYVAGYDY (SEQ ID NO:35)
2F4	GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), or GYYWS (SEQ ID NO:61)	EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)	GYVAGSDA (SEQ ID NO:36)
2G6	GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), or GYYWS (SEQ ID NO:61)	EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)	GYVAGFDS (SEQ ID NO:37)
1D9	GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), or GYYWS (SEQ ID NO:61)	EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)	GYYAGDDY (SEQ ID NO:38)
1F4	GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), or GYYWS (SEQ ID NO:61)	EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)	GYVAGYDY (SEQ ID NO:39)
2C8	GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), or GYYWS (SEQ ID NO:61)	EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)	GYVAGSDA (SEQ ID NO:40)
共有序列	GGSFSGYYWS (SEQ ID NO:30), or GYYWS (SEQ ID NO:61)	EINHSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO:31)	GYZ ₁ AGZ ₂ DZ ₃ Z ₁ = V 或 Y Z ₂ = S, F, Y, D Z ₃ = A, D, S, Y (SEQ ID NO:42)

图3 (续)

轻链可变结构域**1B9 克隆**

>1B9_aa_L

QSVLTQPPSVAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGIPDRFSGS
KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCEAWDYYVAAGYFGGGKLTVL [SEQ ID NO. 1]

>1B9_ntd_L

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCAGGACAGAAAGTCACCATCTCCTGC
TCTGGAAGCAGCTCCAACATGGGAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACAGCC
CCCAAACCTCTCATTTATGGCAATAATTGGCGACCCCTCAGGGATTCCTGACCGCTCTGGCTCC
AAGTCTGGCACCTCAGCCACCCCTGGGCATCACCGGACTTCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTAC
TGCAGCTGGGATTATTATGTTGCTGCTGGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
[SEQ ID NO. 43]

1H9 克隆

>1H9_aa_L

QSVLTQPPSVAAPGQKVTISCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGIPDRFSGS
KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCDSWDSADASGVFGGGKLTVL [SEQ ID NO. 2]

>1H9_ntd_L

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCAGGACAGAAAGTCACCATCTCCTGC
TCTGGAAGCAGCTCCAACATGGGAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACAGCC
CCCAAACCTCTCATTTATGGCAATAATTGGCGACCCCTCAGGGATTCCTGACCGCTCTGGCTCC
AAGTCTGGCACCTCAGCCACCCCTGGGCATCACCGGACTTCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTAC
TGCAGCTGGGATTCTGCTGATGCTTCTGGGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
[SEQ ID NO. 44]

图4

1H10 克隆

>1H10_aa_L

QSVLTQPPSVAAPGQKVТИSCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGIPDRFSGS
KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCDSWDYDYAAGVFGGTKLTVL [SEQ ID NO. 3]

>1H10_ntd_L

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCAGGACAGAAAGTCACCATCTCCTGC
TCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGAAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACAGCC
CCCAAACCTCTCATTTATGGCAATAATTGGCGACCCCTCAGGGATTCCCTGACCGTTCTGGCTCC
AAGTCTGGCACCTCAGCCACCCCTGGGCATCACCGGACTTCAGACTGGGACGAGGCCGATTATTAC
TGCATTCTGGGATTATGATTATGCTGCTGGGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
[SEQ ID NO. 45]

2C7 克隆

>2C7_aa_L

QSVLTQPPSVAAPGQKVТИSCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGIPDRFSGS
KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCDSWDSYLAAGVFGGTKLTVL [SEQ ID NO. 4]

>2C7_ntd_L

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCAGGACAGAAAGTCACCATCTCCTGC
TCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGAAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACAGCC
CCCAAACCTCTCATTTATGGCAATAATTGGCGACCCCTCAGGGATTCCCTGACCGTTCTGGCTCC
AAGTCTGGCACCTCAGCCACCCCTGGGCATCACCGGACTTCAGACTGGGACGAGGCCGATTATTAC
TGCATTCTGGGATTCTTATCTTGCTGCTGGGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
[SEQ ID NO. 46]

图4(续)

2F4 克隆

>2F4_aa_L

QSVLTQPPSVAAPGQKVТИSCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGIPDRFSGS
KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCESWDYDYASGVFGGGTKLTVL [SEQ ID NO. 5]

>2F4_ntd_L

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCAGGACAGAAAGTCACCATCTCCTGC
TCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGAAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACAGCC
CCCAAACCTCTCATTTATGGCAATAATTGGCGACCCCTCAGGGATTCCCTGACCGTTCTGGCTCC
AAGTCTGGCACCTCAGCCACCCCTGGGCATCACCGGACTTCAGACTGGGACGAGGCCGATTATTAC
TGCAGATCTGGGATTATGATTATGCTTCTGGGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
[SEQ ID NO. 47]

2G6 克隆

>2G6_aa_L

QSVLTQPPSVAAPGQKVТИSCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGIPDRFSGS
KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCDSWDSSDSSGVFGGGTKLTVL [SEQ ID NO. 6]

>2G6_ntd_L

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCAGGACAGAAAGTCACCATCTCCTGC
TCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGAAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACAGCC
CCCAAACCTCTCATTTATGGCAATAATTGGCGACCCCTCAGGGATTCCCTGACCGTTCTGGCTCC
AAGTCTGGCACCTCAGCCACCCCTGGGCATCACCGGACTTCAGACTGGGACGAGGCCGATTATTAC
TGCAGATTCTGGGATTCTCTGATTCTTCTGGGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
[SEQ ID NO. 48]

图4(续)

1D9 克隆

>1D9_aa_L

QSVLTQPPSVAAPGQKVТИSCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGIPDRFSGS
KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCEAWDSAYAAGSFGGTKLTVL [SEQ ID NO. 7]

>1D9_ntd_L

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCAGGACAGAAAGTCACCATCTCCTGC
TCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGAAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACAGCC
CCCAAACCTCTCATTTATGGCAATAATTGGCGACCCCTCAGGGATTCCCTGACCGTTCTGGCTCC
AAGTCTGGCACCTCAGCCACCCCTGGGCATCACCGGACTTCAGACTGGGACGAGGCCGATTATTAC
TGCAGCTGGGATTCTGCTTATGCTGCTGGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
[SEQ ID NO. 49]

1F4 克隆

>1F4_aa_L

QSVLTQPPSVAAPGQKVТИSCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGIPDRFSGS
KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCDSWDAALSAGVFGGTKLTVL [SEQ ID NO. 8]

>1F4_ntd_L

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCAGGACAGAAAGTCACCATCTCCTGC
TCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGAAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACAGCC
CCCAAACCTCTCATTTATGGCAATAATTGGCGACCCCTCAGGGATTCCCTGACCGTTCTGGCTCC
AAGTCTGGCACCTCAGCCACCCCTGGGCATCACCGGACTTCAGACTGGGACGAGGCCGATTATTAC
TGCAGCTGGGATGCTGCTTTCTGCTGGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
[SEQ ID NO. 50]

图4(续)

2C8 克隆

>2C8_aa_L

QSVLTQPPSVAAPGQKVТИSCSGSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYGNNWRPSGIPDRFSGS
KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCESWDAAAAGYFGGGKLTVL [SEQ ID NO. 9]

>2C8_ntd_L

CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCAGGACAGAAAGTCACCATCTCCTGC
TCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGAAATAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACAGCC
CCCAAACCTCTCATTTATGGCAATAATTGGCGACCCTCAGGGATTCCCTGACCGTTCTGGCTCC
AAGTCTGGCACCTCAGCCACCCCTGGGCATCACCGGACTTCAGACTGGGACGAGGCCGATTATTAC
TGCAGATCTTGGGATGCTGCTGCTGCTGGGTATTCGGCGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA
[SEQ ID NO. 51]

重链可变结构域**1B9 克隆**

>1B9_aa_H

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKS
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGSDAWGQGTLTVSS [SEQ ID NO. 21]

>1B9_ntd_H

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGC
GCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAAGGG
CTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAAGCACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGA
GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAAGCTCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCG
GACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGGCTATGTTGCTGGCTCTGATGCTTGGGCCAGGGAAACC
CTGGTCACCGTCTCAAGC [SEQ ID NO. 52]

图4(续)

1H9 克隆

>1H9_aa_H

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLCSR
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGFDDWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO. 22]

>1H9_ntd_H

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGC
GCTGTCTATGGTGGTCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGG
CTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA
GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCG
GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTATGTTGCTGGCTTGATGATTGGGCCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCAAGC [SEQ ID NO. 53]

1H10 克隆

>1H10_aa_H

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLCSR
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGFDSWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO. 23]

>1H10_ntd_H

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGC
GCTGTCTATGGTGGTCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGG
CTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA
GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCG
GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTATGTTGCTGGCTTGATTCTGGGCCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCAAGC [SEQ ID NO. 54]

图4(续)

2C7 克隆

>2C7_aa_H

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKS
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGYDYGQGTLVTVSS [SEQ ID NO. 24]

>2C7_ntd_H

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGC
GCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAAGGGG
CTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA
GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCG
GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTATGTTGCTGGCTATGATTATTGGGCCAGGGAAACC
CTGGTCACCGTCTCAAGC [SEQ ID NO. 55]

2F4 克隆

>2F4_aa_H

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKS
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGSDAWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO. 25]

>2F4_ntd_H

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGC
GCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAAGGGG
CTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA
GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCG
GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTATGTTGCTGGCTCTGATGCTGGGCCAGGGAAACC
CTGGTCACCGTCTCAAGC [SEQ ID NO. 56]

图4(续)

2G6 克隆

>2G6_aa_H

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLCSR
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGFDSWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO. 26]

>2G6_ntd_H

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGC
GCTGTCTATGGTGGTCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAGGGGG
CTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA
GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCG
GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGCTATGTTGCTGGCTTGATTCTGGGCCAGGGAAACC
CTGGTCACCGTCTCAAGC [SEQ ID NO. 57]

1D9 克隆

>1D9_aa_H

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLCSR
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYAGDDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO. 27]

>1D9_ntd_H

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGC
GCTGTCTATGGTGGTCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAGGGGG
CTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA
GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCG
GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGCTATTATGCTGGCGATGATTATTGGGCCAGGGAAACC
CTGGTCACCGTCTCAAGC [SEQ ID NO. 58]

图4(续)

1F4 克隆

>1F4_aa_H

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKS
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGYDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO. 28]

>1F4_ntd_H

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGC
GCTGTCTATGGTGGTCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAGGGGG
CTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA
GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCG
GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGCTATGTTGCTGGCTATGATTATTGGGCCAGGGAAACC
CTGGTCACCGTCTCAAGC [SEQ ID NO. 59]

2C8 克隆

>2C8_aa_H

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKS
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVAGSDAWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO. 29]

>2C8_ntd_H

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGC
GCTGTCTATGGTGGTCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAGGGGG
CTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA
GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAACTGAGCTCTGTGACCGCCGCG
GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGCTATGTTGCTGGCTCTGATGCTGGCTTGGGCCAGGGAAACC
CTGGTCACCGTCTCAAGC [SEQ ID NO. 60]

图4(续)

克隆	培养上清液 SPR 测定中的解 离率 $K_d (s^{-1})$	粗周质提取物的 SPR 测定中的解离 率 $K_d (s^{-1})$
1H10	2.9×10^{-5}	2.3×10^{-5}
1B9	4.3×10^{-5}	2.8×10^{-5}
2F4	8.7×10^{-5}	1.4×10^{-4}
2G6	1.3×10^{-4}	2.2×10^{-4}
1H9	1.6×10^{-4}	7.0×10^{-5}
1D9	1.8×10^{-4}	1.8×10^{-4}
2C7	2.1×10^{-4}	1.9×10^{-4}
1F4	3.0×10^{-4}	2.9×10^{-4}
2C8	4.1×10^{-4}	3.9×10^{-4}

图5

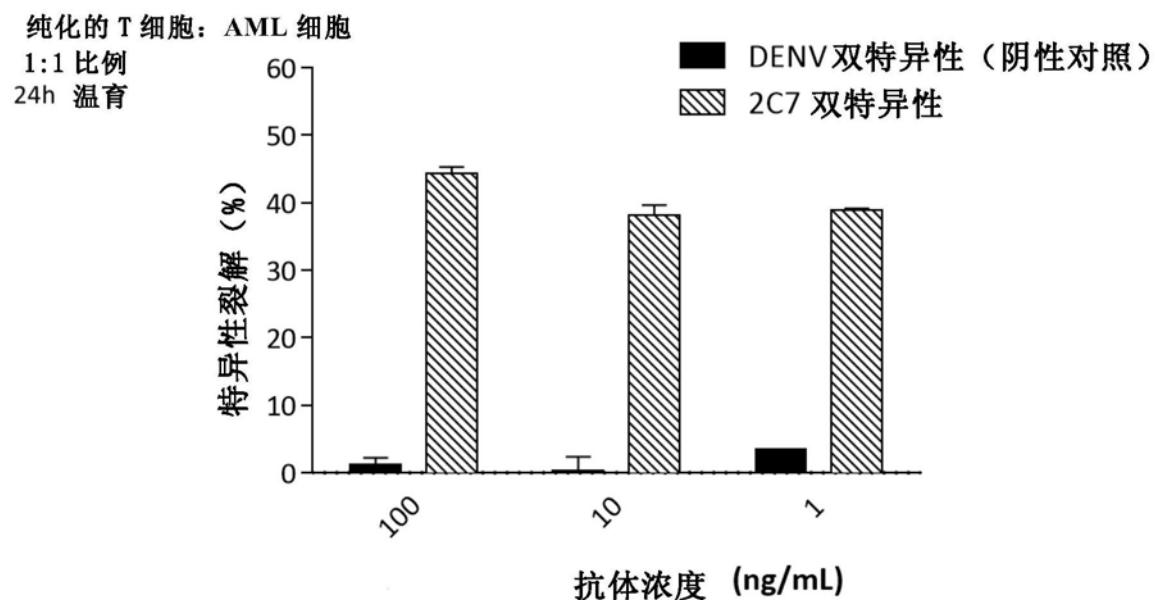


图6

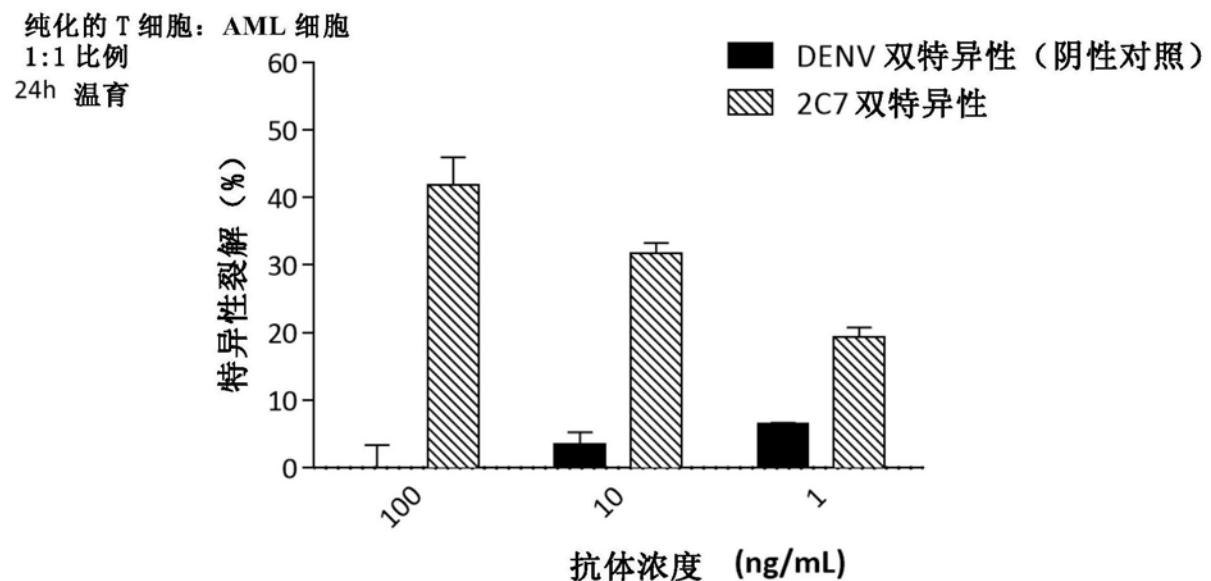


图7

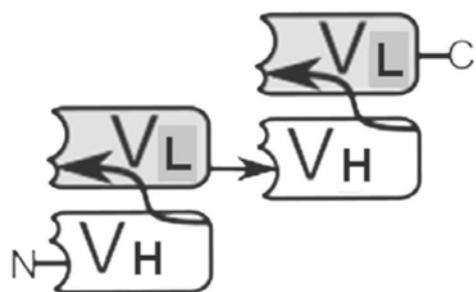


图8