



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202016143 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：108121093

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 18 日

(51)Int. Cl.：

*C07K16/28 (2006.01)**C12N15/13 (2006.01)**C12N15/63 (2006.01)**C12N5/10 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2018/06/19

中國大陸

201810629554.6

(71)申請人：大陸商信達生物製藥（蘇州）有限公司（中國大陸）INNOVENT BIOLOGICS
(SUZHOU) CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：胡化靜 HU, HUAJING (CN)；繆小牛 MIAO, XIAONI (CN)；張攀 ZHANG, PAN
(CN)；劉軍建 LIU, JUNJIAN (CN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：7 共 131 頁

(54)名稱

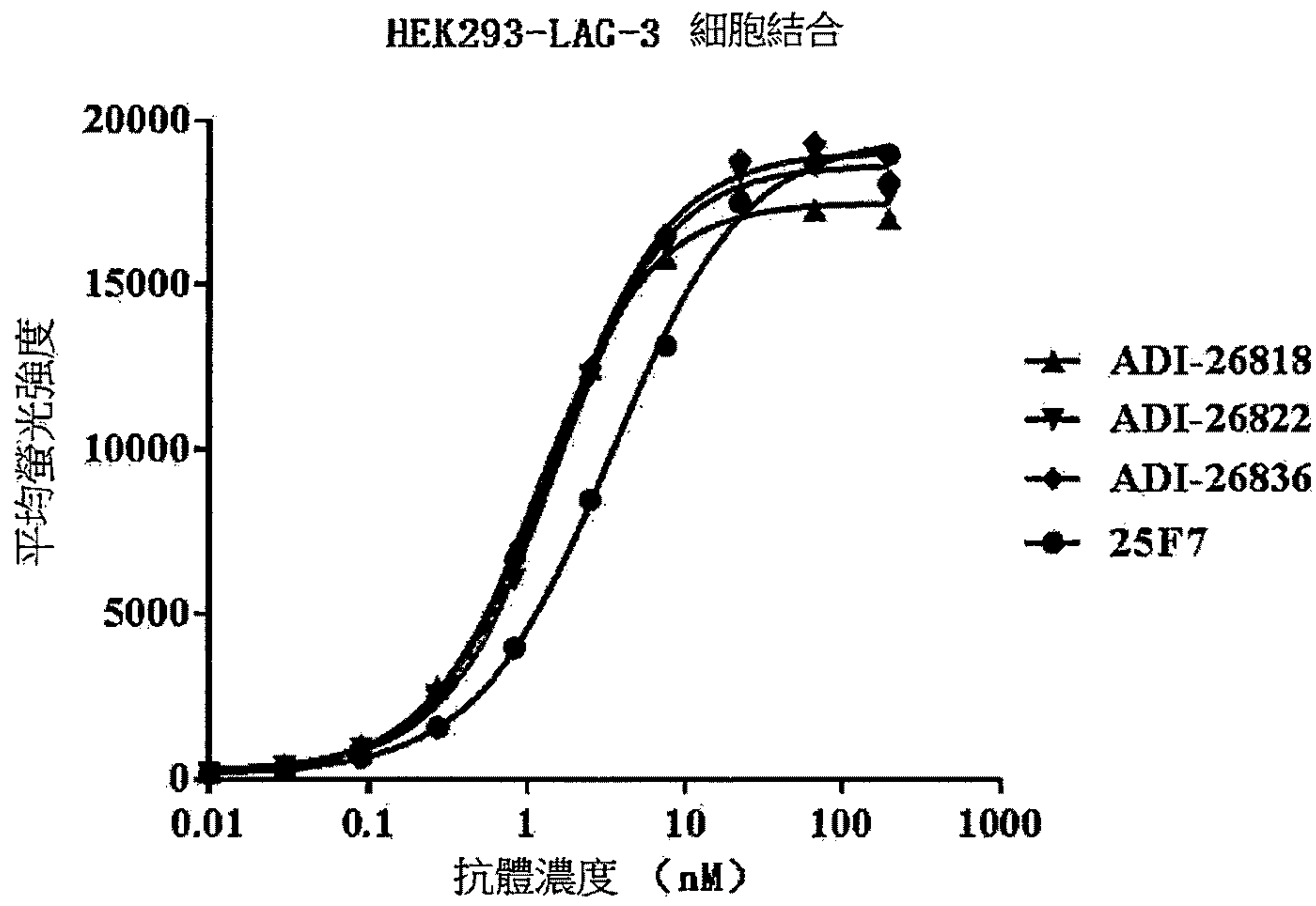
全人源的抗LAG-3抗體及其應用

(57)摘要

本發明涉及特異性結合LAG-3的新型抗體和抗體片段以及含有所述抗體或抗體片段的組合物。此外，本發明涉及編碼所述抗體或其抗體片段的核酸及包含其的宿主細胞，以及其治療和診斷用途。

The present invention is related to a novel antibodies and antibody fragments thereof specifically binding to LAG-3 and a composition comprising the antibodies and antibody fragment thereof. Further, the present invention is related to nucleic acids encoding the antibodies and antibody fragments thereof, and a host cell comprising the nucleic acids, and therapeutic and diagnostic uses.

指定代表圖：



【第1圖】

【發明摘要】

【中文發明名稱】 全人源的抗 LAG-3 抗體及其應用

【英文發明名稱】 FULL HUMANIZED ANTI-LAG-3 ANTIBODIES
AND APPLICATION THEREOF

【中文】

本發明涉及特異性結合 LAG-3 的新型抗體和抗體片段以及含有所述抗體或抗體片段的組合物。此外，本發明涉及編碼所述抗體或其抗體片段的核酸及包含其的宿主細胞，以及其治療和診斷用途。

【英文】

The present invention is related to a novel antibodies and antibody fragments thereof specifically binding to LAG-3 and a composition comprising the antibodies and antibody fragment thereof. Further, the present invention is related to nucleic acids encoding the antibodies and antibody fragments thereof, and a host cell comprising the nucleic acids, and therapeutic and diagnostic uses.

【指定代表圖】 第1圖

【代表圖之符號簡單說明】 無。

【特徵化學式】 無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 全人源的抗 LAG-3 抗體及其應用

【英文發明名稱】 FULL HUMANIZED ANTI-LAG-3 ANTIBODIES
AND APPLICATION THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明涉及特異性結合 LAG-3 的新型抗體和抗體片段以及含有所述抗體或抗體片段的組合物。此外，本發明涉及編碼所述抗體或其抗體片段的核酸及包含其的宿主細胞，以及相關用途。此外，本發明涉及這些抗體和抗體片段的治療和診斷用途。特別地，本發明涉及這些抗體和抗體片段與其它療法，例如治療方式或治療劑，例如抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體的聯合治療。

【先前技術】

【0002】 淋巴細胞激活基因 3(LAG-3)，也稱為 CD223，是由 LAG3 基因在人體中編碼的 I 型跨膜蛋白。LAG-3 的分子性質和生物學功能已經有充分的表徵和描述，參見例如 Sierro 等人，Expert Opin Ther Targets(2011)15(1)：91-101。LAG-3 是一種 CD4 樣蛋白，在 T 細胞(特別是活化的 T 細胞)、自然殺傷細胞、B 細胞和類漿細胞樹突狀細胞表面表達。已顯示 LAG-3 是負共刺激受體，即抑制性受體。

【0003】 已經提出，LAG-3 與 MHC II 類分子的結合在下調 CD4+T 淋巴細胞的抗原依賴性刺激中起作用(Huard 等，(1994)Eur.J.Immunol.24：

3216- 3221)。還認為 LAG3 和 II 類 MHC 之間的相互作用在調節樹突細胞功能中起作用(Andreae 等人. J Immunol 168 : 3874-3880, 2002)。近期的臨床前研究也已經記錄了 LAG-3 在 CD8 T-細胞耗竭中的作用(Blackburn 等人. Nat Immunol 10 : 29-37 , 2009)。

【0004】 研究表明，慢性病毒感染後耗盡的 CD8+T 細胞表達多種抑制性受體(如 PD-1，CD160 和 2B4)。LAG-3 在 LCMV 感染後以高水平表達，並且顯示阻斷 PD-1/PD-L1 途徑與阻斷 LAG-3 顯著降低慢性感染小鼠中的病毒載量(Blackburn 等人，Nat Immunol (2009)10 : 29-37)。還顯示 PD-1/PD-L1 途徑和 LAG-3 阻斷劑的聯合抑制提供了抗腫瘤功效(Jing 等人，Journal for ImmunoTherapy of Cancer(2015)3 : 2)。

【0005】 鑒於 LAG-3 的上述重要作用，需要開發調節其活性的新的抗 LAG-3 抗體，特別是全人源抗體。這類抗體能夠更好地用於治療腫瘤以及其它疾病如感染。此外，也希望獲得能夠與其他療法(例如治療劑，例如抗 PD-1 或抗 PD-L1 抗體)聯合用於治療腫瘤或者感染的新抗 LAG-3 抗體。

【發明內容】

【0006】 本發明提供了全人源的抗人 LAG-3 抗體及其編碼基因與應用。藉由基因工程手段和酵母表面展示技術，本發明人從展示在酵母表面的人抗體庫中篩選出抗人 LAG-3 的全人源抗體，在此基礎上進一步獲得經親和力成熟的高親和力抗人 LAG-3 抗體。本發明的全人源抗體分子能夠有效地阻斷 LAG-3 與主要組織相容性(MHC) II 類分子的結合，結合激活的人 CD4+ T 細胞上表達的 LAG-3，並且在體內施用時抑制腫瘤生長，尤其是在與抗 PD-1 抗體聯用時，抑瘤效果尤為顯著。因此，本發明的抗體可以

用於多種用途，包括但不限於檢測 LAG-3 蛋白和在攜帶腫瘤的受試者中抑制腫瘤生長。

【0007】 因此，一個方面，本發明提供特異性地結合 LAG-3（較佳人 LAG-3 蛋白質）的抗體或其抗原結合片段。

【0008】 在一個實施方案中，本發明特異性結合人 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段包含：

(i) 如 SEQ ID NO：33 或 34 所示的重鏈可變區的 3 個互補決定區 HCDR，以及如 SEQ ID NO：39 所示的輕鏈可變區的 3 個互補決定區 LCDR，或者

(ii) 如 SEQ ID NO：35 或 36 所示的重鏈可變區的 3 個互補決定區 HCDR，以及如 SEQ ID NO：40 或 41 所示的輕鏈可變區的 3 個互補決定區 LCDR；或者

(iii) 如 SEQ ID NO：37 或 38 所示的重鏈可變區的 3 個互補決定區 HCDR，以及如 SEQ ID NO：42 或 43 所示的輕鏈可變區的 3 個互補決定區 LCDR。

【0009】 再一方面，本發明也提供具有以下一個或多個特性的抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段：(i) 抑制(例如，競爭性抑制)表 3 所列的任一抗體與人 LAG-3 的結合；(ii)與表 3 所示的任一抗體結合相同或重疊的表位；(iii)與表 3 所示的任一抗體競爭結合人 LAG-3。

【0010】 在一些實施方案中，本發明的抗體表現出以下一個或多個生物學活性：

(i)以高親和力與人 LAG-3 結合；(ii)以小於 100×10^{-4} ，例如 0.5×10^{-4} 至 50×10^{-4} 的解離常數(K_d)與人 LAG-3 結合；(iii) 以高親和力與細胞表面表達的人 LAG-3 結合；(iv) 阻斷人 LAG-3 與細胞表面 MHCII 分子的結

合；(v) 結合表達人 LAG-3 的激活的 CD4⁺和/或 CD8⁺ T 細胞；(vi) 刺激免疫應答，較佳抗腫瘤免疫應答；(vii) 抑制表達人 LAG-3 的腫瘤細胞，尤其是與抗 PD1 抗體聯用時。較佳地，抗體表現出上述性質中的至少二個、更佳地至少三個、四個、五個，甚至更佳地上述所有性質。

【0011】 再一方面，本發明提供編碼本發明抗體或其片段的核酸，包含所述核酸的載體，包含所述載體的宿主細胞。本發明也提供製備本發明抗體或其片段的方法。

【0012】 再一方面，本發明提供包含本發明抗體的免疫綴合物、多特异性抗體和醫藥組成物。

【0013】 本發明還提供在受試者中刺激免疫應答的方法，以及預防或治療癌症或感染的方法。

【0014】 本發明還涉及在樣品中檢測 LAG-3 的方法。

【圖式簡單說明】

【0015】 第 1 圖顯示，藉由流式細胞術檢測，母抗體（ADI-26818、ADI-26822 和 ADI-26836）與 HEK293 細胞上表達的 hLAG-3 的結合能力。25F7 是參考抗體。

【0016】 第 2 圖顯示，藉由流式細胞術檢測，親和力優化的抗 hLAG-3 抗體與 HEK293 細胞上表達的 hLAG-3 的結合能力。25F7 是參考抗體。

【0017】 第 3 圖顯示，藉由流式細胞術檢測，抗 LAG-3 抗體阻斷人 MHCII（HLA-DR）和 LAG-3 的相互作用。

【0018】 第 4 圖顯示，藉由流式細胞術檢測，流式細胞術檢測抗 LAG-3 抗體和激活的人 CD4⁺ T 細胞的結合能力。

【0019】第 5 圖顯示，抗 LAG-3 抗體在 A375-人 PBMC 模型中的腫瘤抑制效果。ADI-31798 為本發明抗體。Antibody D 為 PCT/CN2016/094122 中公開的抗 PD-1 抗體(“抗體 D”)。

【0020】第 6 圖顯示，本發明示例性抗體 VL 區的比較。

【0021】第 7 圖顯示，本發明示例性抗體 VH 區的比較。

【實施方式】

發明詳述

定義

【0022】除非另有定義，否則本文中使用的所有技術和科學術語均具有與本領域一般技術人員通常所理解的含義相同的含義。為了本發明的目的，下文定義了以下術語。

【0023】術語“約”在與數字數值聯合使用時意為涵蓋具有比指定數字數值小 5%的下限和比指定數字數值大 5%的上限的範圍內的數字數值。

【0024】術語“和/或”應理解為意指可選項中的任一項或可選項中的任意兩項或多項的組合。

【0025】如本文中所用，術語“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整數或步驟，但是不排除任意其他要素、整數或步驟。在本文中，當使用術語“包含”或“包括”時，除非另有指明，否則也涵蓋由所述及的要素、整數或步驟組成的情形。例如，當提及“包含”某個具體序列的抗體可變區時，也旨在涵蓋由該具體序列組成的抗體可變區。

【0026】在本文中，術語“抗體”是指至少包含輕鏈或重鏈免疫球蛋白可變區的多肽，所述免疫球蛋白可變區特異性識別並結合抗原。該術語涵

蓋各種抗體結構，包括、但不限於單株抗體、多株抗體、單鏈抗體或多鏈抗體、單特異性或多特異性抗體（例如雙特異性抗體）、全人源抗體或嵌合抗體或人源化抗體、全長抗體和抗體片段，只要它們呈現期望的抗原結合活性即可。

【0027】 本領域技術人員明瞭，“全抗體”（在本文中可與“全長抗體”、“完全抗體”和“完整抗體”互換使用）包含至少兩條重鏈(H)和兩條輕鏈(L)。每條重鏈由重鏈可變區(本文中縮寫為 VH)和重鏈恆定區組成。重鏈恆定區由 3 個結構域 CH1、CH2 和 CH3 組成。每條輕鏈由輕鏈可變區(本文中縮寫為 VL)和輕鏈恆定區組成。輕鏈恆定區由一個結構域 CL 組成。可變區是抗體的重鏈或輕鏈中參與抗體與其抗原的結合的結構域。恆定區不直接參與抗體與抗原的結合，但是顯示出多種效應子功能。抗體的輕鏈可以基於其恆定結構域的胺基酸序列歸入兩種類型（稱為 kappa (κ) 和 lambda (λ)) 中的一種。抗體的重鏈可以取決於其重鏈恆定區的胺基酸序列而劃分為主要 5 種不同的類型：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，並且這些類型中的幾種可以進一步劃分成亞類，如，IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4、IgA1 以及 IgA2。對應於不同抗體類型的重鏈恆定區分別稱作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。術語“同種型”是指由抗體重鏈恆定區確定的抗體類型。參見例如 Fundamental Immunology, Ch.7(Paul, W.編輯，第二版，Raven Press, N.Y.(1989))(其為所有目的以其整體在此引作參考)。

【0028】 術語抗體的“抗原結合部分”(在本文中可與“抗體片段”和“抗原結合片段”互換使用)，是指並非完整抗體的分子，其包含完整抗體中用於結合該完整抗體所結合的抗原的部分。如本領域技術人員理解的，抗

體的抗原結合部分通常包含來自“互補決定區”或“CDR”的胺基酸殘基。可以藉由重組 DNA 技術、或藉由酶或化學切割完整的抗體製備抗原結合片段。抗原結合片段包括但不限於 Fab、scFab、Fab'、F(ab')₂、Fab'-SH、Fv、單鏈 Fv、雙鏈抗體(diabody)、三鏈抗體(triabody)、四鏈抗體(tetrabody)、微抗體(minibody)、單結構域抗體(sdAb)。關於抗體片段的更詳細的描述，可以參見：基礎免疫學(Fundamental Immunology), W. E. Paul 編輯, Raven Press, N.Y. (1993); 邵榮光等人(編輯)，抗體藥物研究與應用，人民衛生出版社(2013); Hollinger 等人, PNAS USA 90:6444-6448(1993); Hudson 等人, Nat.Med.9: 129-134(2003)。

【0029】 術語“人抗體”或“全人源抗體”在本文中可以互換使用，指包括其中構架區和 CDR 區二者均源自人種系免疫球蛋白序列的可變區的抗體。而且，如果抗體含有恆定區，恆定區也源自人種系免疫球蛋白序列。本發明的人抗體可包括不由人種系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸序列(例如，藉由體外隨機或點特異誘變或體內體細胞突變引入的突變)，例如在 CDR——尤其在 CDR3 中。然而，如本文所使用的，術語“人抗體”不包括其中的 CDR 序列衍生自其他哺乳動物物種(如，小鼠)的種系而移植入人構架序列的抗體。

【0030】 如本文所用，術語“重組人抗體”包括所有藉由重組方式製備、表達、產生或分離的人抗體，例如，(a)自用人免疫球蛋白基因進行轉基因或轉染色體的動物(例如小鼠)或由其製備的融合瘤分離的抗體，(b)自轉化成表達人抗體的宿主細胞例如轉染瘤分離的抗體，(c)自重組、組合人抗體文庫例如酵母展示文庫分離的抗體，和(d)藉由包括剪接人免疫球蛋白基因至其他 DNA 序列的任意其他方式製備、表達、產生或分離的抗體。這些重組人抗體具有構架區和 CDR 區源自人種系免疫球蛋白序列的可變區。

然而，在某些實施方案中，可以對重組人抗體進行體外誘變(或使用人 Ig 序列轉基因動物時為體內體細胞誘變)，由此得到的重組抗體的 VH 和 VL 區的胺基酸序列，儘管源自人種系 VH 和 VL 序列並與之相關、但是並不天然存在於體內的人抗體種系庫中。

【0031】術語“單株抗體”在本文中指，得自基本上同質的抗體群體的抗體，即，除了通常以很少量存在的可能變體抗體（例如，含有天然突變或在單株抗體製品的生產過程中產生的變體抗體）以外，構成所述群體各個抗體是相同的和/或結合相同表位。

【0032】術語“嵌合抗體”是指可變區序列源自一物種、恆定區序列源自另一物種的抗體，例如，其中可變區序列源自小鼠抗體、恆定區序列源自人抗體的抗體。

【0033】術語“人源化抗體”是指將源自其他哺乳動物物種例如小鼠種系的 CDR 序列接到人構架序列上的抗體。可以在人構架序列內進行額外的構架區修飾。

【0034】“分離的”抗體是已經與它的天然環境中的組分分離的抗體。在一些實施方案中，將抗體純化至大於 95%或 99%純度，所述純度藉由例如電泳（例如，SDS-PAGE、等電聚焦（IEF）、毛細管電泳）或色譜（例如，離子交換或反相 HPLC）確定。關於評價抗體純度的方法的綜述，參見，例如，Flatman，S.等，J.Chrom.B 848（2007）79-87。

【0035】術語“表位”是指抗體所結合的抗原區域。表位可以由連續的胺基酸形成或者藉由蛋白的三級折疊而並置的非連續胺基酸形成。

【0036】術語“淋巴細胞活化基因-3”和“LAG-3”可互換使用，包括 LAG-3 的變體、同種型、同源物、和物種同源物。術語“人 LAG-3”指的是人序列 LAG-3，例如，Genbank 登錄號 NP_002277 下的人 LAG-3 的完整

胺基酸序列。人 LAG-3 序列可以不同於 Genbank 登錄號 NP_002277 的人 LAG-3，在序列上具有例如保守突變或在非保守區中的突變，但仍具有基本上相同的生物功能，例如，在胞外域中具有與本發明抗體特異結合的表位，或具有與 MHC II 類分子結合的功能。一般而言，人 LAG-3 序列與 Genbank 登錄號 NP_002277 的人 LAG-3 胺基酸序列具有至少 90% 同一性，並且含有當與其它物種(鼠)的 LAG-3 胺基酸序列進行比較時可以將其鑒定為人的胺基酸序列的胺基酸殘基。在一些實施方案中，人 LAG-3 序列與 Genbank 登錄號 NP_002277 的人 LAG-3 胺基酸序列具有至少 95%，甚至至少 96%，97%，98%，或 99% 胺基酸序列同一性。LAG-3 蛋白也可包括 LAG-3 的片段，諸如包含胞外結構域以及胞外結構域的片段，例如保持與本發明任何抗體結合能力的片段，例如可溶性 LAG-3 分子。

【0037】術語“免疫應答”是指，例如淋巴細胞、抗原呈遞細胞、吞噬細胞、粒細胞、和上述細胞或肝臟產生的可溶性大分子(包括抗體、細胞因子和補體)的作用，該作用導致選擇性的損傷、破壞、或清除入侵的病原體、感染了病原體的細胞或組織、或癌細胞。

【0038】術語“特異性結合”表示抗體選擇性地或優先地結合抗原。如果在生物光干涉測量中，抗體以大約 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低、大約 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低、大約 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、大約 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、大約 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D ，與人 LAG-3 結合，則該抗體是“與人 LAG-3 特異性結合”的抗體。然而，特異性結合人 LAG-3 的抗體可以與來自其它物種的 LAG-3 蛋白具有交叉反應性。例如，特異於人 LAG-3 的抗體，在一些實施方案中，可以與非人物種的 LAG-3 蛋白交叉反應。在另一些實施方案中，特異於人 LAG-3 的抗體可以完全特異於人 LAG-3 而不表現出物種或其它類型的交叉反應性，或僅表現出對某些物種的 LAG-3 的交叉反應性。

【0039】“親和力”或“結合親和力”指反映結合對子的成員之間相互作用的固有結合親和力。分子 X 對其配偶物 Y 的親和力可以通常由平衡解離常數(K_D)代表，平衡解離常數是解離速率常數和結合速率常數(分別是 k_{dis} 和 k_{on})的比值。親和力可以由本領域已知的常見方法測量。用於測量親和力的一個具體方法是本文中的 ForteBio 動力學結合測定法。

【0040】術語“高親和力”對於 IgG 抗體指，該抗體以 $1 \times 10^{-7}M$ 或更低、較佳地 $5 \times 10^{-8}M$ 或更低、更佳地大約 $1 \times 10^{-8}M$ 或更低、甚至更佳地大約 $5 \times 10^{-9}M$ 或更低的 K_D ，與靶抗原結合。然而，“高親和力”結合可以隨抗體同種型而變。例如對於 IgM 同種型，“高親和力”指抗體具有 $1 \times 10^{-6}M$ 或更低、較佳地 $1 \times 10^{-7}M$ 或更低、更佳地大約 $1 \times 10^{-8}M$ 或更低的 K_D 。

【0041】與結合例如 LAG-3 的抗原的參考抗體“競爭結合的抗體”是指這樣的抗體，所述抗體在競爭檢驗中阻斷參考抗體與抗原(例如 LAG-3)結合的 50% 或更多，並且反過來，參考抗體在競爭檢驗中阻斷該抗體與抗原(例如 LAG-3)結合的 50% 或更多。示例性競爭檢驗描述於：“Antibodies”, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)。競爭結合的抗體可以與參考抗體結合相同的表位區，例如相同表位、相鄰表位或重疊表位。

【0042】本文中的術語“Fc 區”用於定義含有至少一部分的恆定區的免疫球蛋白重鏈的 C-端區域。該術語包括天然序列 Fc-區和變體 Fc-區。在一個實施方案中，人 IgG 重鏈 Fc-區從重鏈的 Cys226 或從 Pro230 延伸至羧基端。然而，Fc-區的 C-端賴氨酸 (Lys447) 可以存在或可以不存在。除非本文中另外指出，Fc-區或恆定區中的氨基酸殘基的編號根據 EU 編號

系統，也稱為 EU 索引，如 Kabat，E.A.等，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health，Bethesda，MD（1991），NIH Publication 91-3242 中所述。

【0043】與抗體相關的術語“變體”在本文中指，與參考抗體相比，包含已經藉由至少 1 個，例如 1-30，或 1-20 或 1-10 個，例如 1 或 2 或 3 或 4 或 5 個胺基酸取代、缺失和/或插入而具有胺基酸改變的目標抗體區域的抗體，其中變體基本上保持改變之前的抗體分子的至少一個生物學特性(例如，抗原結合能力)。目標抗體區域可以是抗體全長、或重鏈可變區或輕鏈可變區或其組合、或(一個或多個)重鏈 CDR 區或(一個或多個)輕鏈 CDR 區或其組合。在本文中，相對於參考抗體區域具有胺基酸改變的抗體區域，也稱作該抗體區域的“變體”。

【0044】在本文中，“序列同一性”是指在比較窗中以逐個核苷酸或逐個胺基酸為基礎的序列相同的程度。可以藉由以下方式計算“序列同一性百分比”：將兩條最佳比對的序列在比較窗中進行比較，確定兩條序列中存在相同核酸鹼基(例如，A、T、C、G、I)或相同胺基酸殘基(例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys 和 Met)的位置的數目以得到匹配位置的數目，將匹配位置的數目除以比較窗中的總位置數(即，窗大小)，並且將結果乘以 100，以產生序列同一性百分比。為了確定序列同一性百分數而進行的最佳比對，可以按本領域已知的多種方式實現，例如，使用可公開獲得的計算機軟體如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR)軟體。本領域技

術人員可以確定用於比對序列的適宜參數，包括為實現正在比較的全長序列範圍內或目標序列區域內最大比對所需要的任何算法。

【0045】 在本發明中，就抗體序列而言，胺基酸序列同一性百分數藉由將候選抗體序列與參考抗體序列最佳比對後，在一個較佳方案中按照 Kabat 編號規則進行最佳比對後，予以確定。比對後，將參考抗體上的目標抗體區域(例如，重鏈或輕鏈的整個可變區、或其部分例如一個或多個 CDR 區)與候選抗體上的對應區域進行比較。候選抗體區域和參考抗體區域之間的序列同一性百分數為：在候選抗體區域和參考抗體區域兩者中被相同胺基酸佔據的位置的數目除以兩個區域的比對位置總數(空位不計入)並乘以 100 得到的百分數。因此，在本文中，如果一個候選抗體與參考抗體經比對後在與參考抗體的目標抗體區域相對應的區域上具有 X% 的序列同一性時，則視為所述候選抗體為與參考抗體在目標抗體區域上具有 X% 序列同一性的抗體。在本文中，在不指定目標抗體區域的情況下，將適用於在參考抗體序列的全長上進行比對。在一些實施方案中，就抗體而言，序列同一性可以分佈在整個重鏈可變區和/或整個輕鏈可變區上，或序列百分數同一性可以僅限定於構架區，而對應 CDR 區的序列保持 100% 相同。

【0046】 類似地，就抗體序列而言，基於比對，可以確定相對於參考抗體在目標抗體區域具有胺基酸改變的候選抗體。因此，在本文中，如果一個候選抗體與參考抗體經比對後在與參考抗體的目標抗體區域(如 CDR 區)相對應的區域上具有 X 個胺基酸改變時，則視為所述候選抗體是與參考抗體在目標抗體區域上具有 X 個胺基酸改變的抗體。當 X 為 0 時，則視為所述候選抗體與參考抗體具有相同的目標抗體區域，例如，當目標抗體區

域為 CDR 序列時，則視為候選抗體是與參考抗體具有相同 CDR 序列的抗體。

【0047】 在本發明中，“保守性取代”是指導致某個胺基酸置換為化學上相似的胺基酸的胺基酸改變。可以藉由本領域已知的標準方法，例如定點誘變和 PCR 介導的誘變，將胺基酸修飾如取代引入本發明的抗體中。

【0048】 提供功能上相似胺基酸的保守性置換表是本領域熟知的。在一個較佳的方面，保守取代殘基來自以下的保守替代表 A，較佳地為表 A 中所示的較佳保守取代殘基。

【0049】 表 A

原始殘基	示例性取代	較佳的保守取代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp ; Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正亮胺酸	Leu
Leu (L)	正亮胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正亮胺酸	Leu

【0050】 本發明的各方面將在下面各小節中進一步詳述。

I · 本發明的抗 LAG-3 抗體

【0051】 本發明一方面提供特異性地結合 LAG-3，較佳人 LAG-3 蛋白質的抗體或其抗原結合片段，尤其是全人源抗體或其片段。在一些實施方案中，本發明抗體的抗原結合片段是選自以下的抗體片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、單鏈抗體例如 scFv、(Fab')₂ 片段、單結構域抗體、雙抗體 (dAb) 或線性抗體。

抗體的有利生物性質

【0052】 在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體或其片段以高親和力與人 LAG-3 結合，例如，解離平衡常數(K_D)小於約 100nM，小於或等於大約 50nM，更佳地小於或等於大約 20nM、15nM 或 10nM，例如 0.1-20nM，更佳地小於或等於大約 5nM、4nM、3nM 或 2nM，較佳 0.5-3nM，甚至更佳地，小於或等於大約 1nM、0.5nM。較佳地， K_D 藉由使用生物光干涉測定法（例如 ForteBio 親和測量法）測定。

【0053】 在一些實施方案中，本發明抗體或其片段與人 LAG-3 結合的解離常數(K_{dis})小於 100×10^{-4} 、 60×10^{-4} 、例如 0.5×10^{-4} 至 50×10^{-4} ，較佳 1×10^{-4} 至 10×10^{-4} ，或 1×10^{-4} 至 $6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ，例如約 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 。在一些實施方案中，抗 LAG-3 抗體分子與人 LAG-3 結合的結合常數(K_{on})大於 0.5×10^5 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 或 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，例如以約 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的 K_{on} 與人 LAG-3 結合。較佳地， K_{dis} 和 K_{on} 藉由使用生物光干涉測定法（例如 ForteBio 親和測量法）測定。

【0054】 在一些實施方案中，本發明抗體或其片段以高親和力結合表達 LAG-3 的細胞。在一個實施方案中，表面表達人 LAG-3 的細胞是 293

細胞，例如 HEK293 細胞。較佳地，以流式細胞術(例如 FACS)測定，抗體與表達人 LAG-3 的 HEK293 細胞結合的 EC50 值小於大約 50nM、30nM 或 10M，例如 0.1-10nM，較佳地，小於或等於大約 8nM、5nM、3nM、或 2nM，更佳地小於或等於大約 1.5nM、1.2nM 或 1nM，甚至更佳地小於或等於大約 0.8nM、0.6nM、0.3M 或 0.2nM。

【0055】 在一些實施方案中，本發明抗體或其片段抑制 LAG-3 的相關活性，例如 IC₅₀ 值小於或等於大約 20nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM 或 5nM，更佳 IC₅₀ 小於或等於大約 1-7nM、1-5nM、6.5nM、6nM、5.5nM、5nM、4.5nM、4nM、3.5nM、或 3nM。在一些實施方案中，LAG-3 的相關活性是 MHC II 類分子與 LAG-3 的結合。在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段以小於或等於大約 20nM、10nM，例如 1-9nM、如 1-8nM，更較佳大約 1-7nM、1-2nM、例如，小於或等於 6.5nM、6nM、5.5nM、5nM、4.5nM、4nM、3.5nM 或 3nM 的 IC₅₀，阻斷人 LAG-3 與表達 MHCII 類分子的細胞上的 MHCII 類分子的結合。在一些實施方案中，MHCII 類分子是 HLA-DR。在一些實施方案中，細胞為 CHO 細胞。在一些實施方案中，用流式細胞術（例如 FACS）測量本發明抗體或其片段對 LAG-3 的相關活性的抑制。

【0056】 在一些實施方案中，本發明抗體或其片段結合表面表達人 LAG-3 的激活的 CD4⁺和/或 CD8⁺ T 細胞。較佳地，以流式細胞術(例如 FACS)測定，抗體與激活的人 CD4⁺ T 細胞結合的 EC50 值小於或等於大約 35pM、30pM、25pM、20pM、15pM、或 10pM，較佳大約 1-20pM、6-15pM、6-10pM，例如小於或等於大約 12pM、11pM、10pM、9pM、8pM、7pM、6pM 或 5pM。在一些實施方案中，在 Accuri C6 系統中進行流式細胞術。

【0057】 在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段抑制 LAG-3 的一種或多種活性，例如，導致以下一種或多種：CD4+ T 淋巴細胞的抗原依賴性刺激增加；T 細胞增殖增加；活化抗原(例如，CD25)的表達增加；細胞因子(例如，干擾素- γ (IFN- γ)、白介素-2(IL-2)或白介素-4(IL-4))的表達增加；趨化因子(例如，CCL3、CCL4 或 CCL5)的表達增加；Treg 細胞的阻抑活性減少；T 細胞穩態增加；腫瘤浸潤型淋巴細胞增加；或癌細胞的免疫逃避減少。

【0058】 在一些實施方案中，本發明的抗體或其片段抑制表達人 LAG-3 的腫瘤細胞的生長。在一個實施方案中，腫瘤細胞是皮膚癌細胞，較佳人皮膚癌細胞。例如，在體內腫瘤移植模型中，例如 NOG 小鼠中，抑制人皮膚癌細胞的生長。在一些實施方案中，本發明抗體與抗 PD1 抗體聯用，獲得顯著好於單獨一種抗體施用時的抗腫瘤效果。

【0059】 較佳地，本發明抗體或其抗原結合片段表現出上述性質中的至少一個、更佳地至少二個、更佳地至少三個、四個、或五個，甚至更佳地上述所有性質。

抗體 CDR 區

【0060】 “互補決定區”或“CDR 區”或“CDR”（在本文中與超變區“HVR”可以互換使用），是抗體可變區中主要負責與抗原表位結合的胺基酸區域。重鏈和輕鏈的 CDR 通常被稱作 CDR1、CDR2 和 CDR3，從 N-端開始順序編號。位於抗體重鏈可變結構域內的 CDR 被稱作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位於抗體輕鏈可變結構域內的 CDR 被稱作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

【0061】 本領域公知多種用於在一個給定的 VH 或 VL 胺基酸序列中確定其 CDR 序列的方案。例如，Kabat 互補決定區（CDR）是基於序列變異性確定的並且是最常用的（Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。而 Chothia 指的是結構環的位置（Chothia 和 Lesk，J. Mol. Biol. 196：901-917 (1987)）。AbM HVR 是 Kabat HVR 和 Chothia 結構環之間的折中，並且由 Oxford Molecular 的 AbM 抗體建模軟體使用。“接觸性”(Contact) HVR 基於對可獲得的複雜晶體結構的分析。根據不同的 CDR 確定方案，這些 HVR 中的每一個 HVR/CDR 的殘基如下所述。

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
HCDR1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat 編號系統)				
HCDR1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia 編號系統)				
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
(Kabat 編號系統)				

【0062】 HVR 也可以是根據 Kabat 編號系統位於如下 Kabat 殘基位置的 HVR 序列：

VL 中的位置 24-36 或 24-34(LCDR1)，位置 46-56 或 50-56(LCDR2)，和位置 89-97 或 89-96 位置 (LCDR3)；和 VH 中的位置 26-35 或 27-35B (HCDR1)，位置 50-65 或 49-65 (HCDR2)，和位置 93-102、94-102 或 95-102 (HCDR3)。

【0063】 在一個實施方案中，本發明抗體的 HVR 是根據 Kabat 編號系統位於如下 Kabat 殘基位置的 HVR 序列：

【0064】 VL 中的位置 24-34 (LCDR1)、位置 50-56 (LCDR2)、和位置 89-97 (LCDR3)，以及 VH 中的位置 27-35B (HCDR1)、位置 50-65 (HCDR2)、和位置 93-102 (HCDR3)。

【0065】 在一個實施方案中，本發明抗體的 HVR 是根據 Kabat 編號系統位於如下 Kabat 殘基位置的 HVR 序列：

VL 中的位置 24-34 (LCDR1)、位置 50-56 (LCDR2)、和位置 89-97(LCDR3)，以及 VH 中的位置 26-35B(HCDR1)、位置 50-65(HCDR2)、和位置 95-102 (HCDR3)。

【0066】 HVR 也可以基於與參考 CDR 序列(例如本發明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 編號位置而確定。

【0067】 除非另有說明，否則在本發明中，術語“CDR”或“CDR 序列”或“HVR”或“HVR 序列”涵蓋以上述任一種方式確定的 HVR 或 CDR 序列。

【0068】 除非另有說明，否則在本發明中，當提及抗體可變區中的殘基位置（包括重鏈可變區殘基和輕鏈可變區殘基）時，是指根據 Kabat 編

號系統 (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 的編號位置。

【0069】 在一個較佳的實施方案中，本發明 CDR 序列如表 1 所示。

【0070】 在一個最佳的實施方案中，本發明 CDR 序列如表 2 所示。

【0071】 具有不同特異性(即，針對不同抗原的不同結合位點)的抗體具有不同的 CDR。然而，儘管 CDR 在抗體與抗體之間是不同的，但是 CDR 內只有有限數量的胺基酸位置直接參與抗原結合。使用 Kabat, Chothia, AbM 和 Contact 方法中的至少兩種，可以確定最小重疊區域，從而提供用於抗原結合的“最小結合單位”。最小結合單位可以是 CDR 的一個子部分。正如本領域技術人員明瞭，藉由抗體的結構和蛋白折疊，可以確定 CDR 序列其餘部分的殘基。因此，本發明也考慮本文所給出的任何 CDR 的變體。例如，在一個 CDR 的變體中，最小結合單位的胺基酸殘基可以保持不變，而根據 Kabat 或 Chothia 定義的其餘 CDR 殘基可以被保守胺基酸殘基替代。

【0072】 在一些實施方案中，本發明的抗體有至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個 CDR 與表 3 所列任一抗體的對應 CDR 相同，或是其變體。在一些實施方案中，本發明的抗體有至少一個、兩個、或三個 HCDR 與表 3 所列任一抗體的對應重鏈 CDR 相同，或是其變體。在一些實施方案中，本發明的抗體有至少一個、兩個、或三個 LCDR 與表 3 所列任一抗體的對應輕鏈 CDR 相同，或是其變體。在本文中，“對應 CDR”是指，在最佳比對後，在候選抗體的可變區胺基酸序列中與參考抗體的 CDR 位於最相似位置上的 CDR。在本文中，CDR 變體是已經藉由至少一個，例如 1 或 2

或 3 個胺基酸取代、缺失和/或插入而修飾的 CDR，其中包含 CDR 變體的抗原結合分子基本上保持包含未修飾 CDR 的抗原結合分子的生物學特性，例如，保持至少 60%，70%，80%，90%，或 100%的生物學活性(例如抗原結合能力)。可以理解，各 CDR 可以單獨修飾或組合修飾。較佳地，胺基酸修飾為胺基酸取代，尤其是保守胺基酸取代，例如表 A 中列出的較佳保守胺基酸置換。在一些實施方案中，胺基酸取代較佳發生在與本文提供的共有 CDR 序列(例如，SEQ ID NO：16, 17, 18, 19, 20, 21, 30, 31, 32)的 X 殘基相對應的胺基酸位置上。

【0073】此外，本領域已知，CDR3 區，獨立於 CDR1 和/或 CDR2 區，單獨可以確定抗體對關聯抗原的結合特異性。並且，可以基於共同 CDR3 序列，可產生具有相同結合特異性的多種其它抗體。參見例如，US Patents Nos. 6,951,646；6,914,128；6,090,382；6,818,216；6,156,313；6,827,925；5,833,943；5,762,905 和 5,760,185。所有這些參考文獻併入本文作為參考。

【0074】因此，在一個實施方案中，本發明抗體包含來自表 3 所示抗體之一的重鏈和/或輕鏈可變區的 CDR3，其中所述抗體能夠特異地結合人 LAG-3。在再一實施方案中，所述抗體還可以包含來自同一抗體的重鏈和/或輕鏈可變區的 CDR2，或來自不同的 LAG-3 抗體的重鏈和/或輕鏈可變區的 CDR2。在再一實施方案中，所述抗體還可以包含來自同一抗體的重鏈和/或輕鏈可變區的 CDR1，或來自不同的 LAG-3 抗體的重鏈和/或輕鏈可變區的 CDR1。可以藉由本文描述的測定方法，表徵這些抗體的活性，包括與人 LAG-3 的結合活性、阻斷 LAG-3 與 MHC II 類分子結合的活性、抑制腫瘤生長的活性。

【0075】 再一方面，考慮到抗原結合特異性主要由 CDR1、2 和 3 區提供，在一些實施方案中，可以將 VH CDR1、2 和 3 序列和 VL CDR1、2 和 3 序列“混合並匹配”(即，可以混合並匹配來自結合同一 LAG-3 抗原的不同抗體的 CDR，不過每種抗體較佳地含有 VH CDR1、2 和 3 和 VL CDR1、2 和 3)，以產生結合 LAG-3 的本發明其他分子。可以使用本領域已知的結合測定法(例如，ELISA、SET、Biacore)和實施例中描述的那些測定法，測試這類“混合和匹配的”抗體與 LAG-3 的結合。當混合並匹配 VH CDR 序列時，來自特定 VH 序列的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 序列較佳地替換為結構上相似的 CDR 序列。同樣，當混合並匹配 VL CDR 序列時，來自特定 VL 序列的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 序列較佳地替換為結構上相似的 CDR 序列。可以在本發明表 3 所示抗體之間進行 CDR 的“混合和匹配”。此外，本領域技術人員明瞭，也可以藉由用來自其它不同抗體的一個或多個 VH 和/或 VL CDR 區序列，置換本文中所示抗體的結構上相似的 CDR 序列，以產生本發明的其它抗體。

【0076】 因此，在一些實施方案中，本發明的抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，所述重鏈可變區包含重鏈互補決定區 3(HCDR3)，所述 HCDR3：

- (i) 與表 3 列出的任一抗體的重鏈可變區的 HCDR3 相同；或
- (ii) 相對於(i)的 HCDR3，包含至少 1 個且不超過 3 個(較佳 1-2 個或更佳 1 個)胺基酸改變(較佳取代、更佳保守取代)。較佳地，所述 HCDR3 包含選自 SEQ ID NO： 3, 6, 9, 12, 15, 18 和 21 的胺基酸序列，或由其組成。

【0077】 在一些實施方案中，本發明的抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，且所述抗體的重鏈互補決定區 3(HCDR3)和輕鏈互補決定區 3(LCDR3)：

(i) 與表 3 列出的任一抗體的重鏈和輕鏈可變區序列的 HCDR3 和 LCDR3 相同；或

(ii) 相對於(i)的 HCDR3 和 LCDR3，共包含至少 1 個且不超過 3 個(較佳 1-2 個或更佳 1 個)胺基酸改變(較佳取代、更佳保守取代)。較佳地，所述 HCDR3 和 LCDR3 包含選自以下的胺基酸序列組合：SEQ ID NO: 3/24、6/24、18/24、9/25、9/26、9/30、12/28、15/29 和 21/32 的胺基酸序列。

【0078】 在一個實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區(VH)，其中所述 VH 包含：

(i) 表 3 所列任一抗體的 VH 序列中所含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列；或

(ii) 相對於(i)的序列，在所述三個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 10 或 5、4、3、2、1 個胺基酸改變(較佳胺基酸取代，較佳保守取代)的序列。

【0079】 在另一個實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含輕鏈可變區(VL)，其中所述 VL 包含：

(i) 表 3 所列任一抗體的 VL 序列中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列；或

(ii) 相對於(i)的序列，在所述三個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 10 或 5、4、3、2、1 個胺基酸改變(較佳胺基酸取代，較佳保守取代)的序列。

【0080】 在另一個實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中所述抗體包含：

(i) 與表 3 所列任一抗體的 VH 和 VL 序列中所含的 6 個 CDR 序列分別相同的 6 個 CDR 序列；或

(ii) 相對於(i)的序列，在 6 個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 20、10 或 5、4、3、2、1 個胺基酸改變(較佳胺基酸取代，較佳保守取代)的序列。

【0081】 在一個實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：

(i) 如 SEQ ID NO：33 或 34 所示的重鏈可變區的 3 個互補決定區 HCDR，以及如 SEQ ID NO：39 所示的輕鏈可變區的 3 個互補決定區 LCDR，或者

(ii) 如 SEQ ID NO：35 或 36 所示的重鏈可變區的 3 個互補決定區 HCDR，以及如 SEQ ID NO：40 或 41 所示的輕鏈可變區的 3 個互補決定區 LCDR；或者

(iii) 如 SEQ ID NO：37 或 38 所示的重鏈可變區的 3 個互補決定區 HCDR，以及如 SEQ ID NO：42 或 43 所示的輕鏈可變區的 3 個互補決定區 LCDR。

【0082】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO：33 的重鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列，且輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO：39 的輕鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列。

【0083】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO：34 的重鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列，且輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO：39 的輕鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列。

【0084】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO：35 的重鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列，且輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO：40 的輕鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列。

【0085】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO：36 的重鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列，且輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO：41 的輕鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列。

【0086】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO：37 的重鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列，且輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO：42 的輕鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列。

【0087】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO：38 的重

鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列，且輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO：43 的輕鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列。

【0088】 在一個實施方案中，本發明抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區(VH)，其中所述 VH 包含

(i) 選自以下胺基酸序列組合的重鏈 HCDR 組合(按順序分別為 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3)：

SEQ ID NOs：1/2/3、SEQ ID NOs：4/5/6、SEQ ID NOs：16/17/18、SEQ ID NOs：7/8/9、SEQ ID NOs：10/11/12、SEQ ID NOs：13/14/15，和 SEQ ID NOs：19/20/21；或

(ii) 選自以下胺基酸序列組合的重鏈 HCDR 組合(按順序分別為 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3)：

SEQ ID NOs：70/2/71、SEQ ID NOs：72/5/73、SEQ ID NOs：74/8/75、SEQ ID NOs：76/11/77 和 SEQ ID NOs：78/14/79；或

(iii) (i)或(ii)的 HCDR 組合的變體，所述變體在所述三個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 10 或 5、4、3、2、1 個胺基酸改變(較佳胺基酸取代，較佳保守取代)。

【0089】 在另一個實施方案中，本發明抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段包含輕鏈可變區(VL)，其中所述 VL 包含：

(i) 選自以下胺基酸序列組合的輕鏈 LCDR 組合(按順序分別為 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)：

SEQ ID NOs : 22/23/24、SEQ ID NOs : 31/23/24、SEQ ID NOs : 22/23/25、SEQ ID NOs : 22/23/26、SEQ ID NOs : 31/23/30、SEQ ID NOs : 27/23/28、SEQ ID NOs : 27/23/29 和 SEQ ID NOs : 31/23/32 ;

(ii) (i)的 LCDR 組合的變體，所述變體在所述三個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 10 或 5、4、3、2、1 個胺基酸改變(較佳胺基酸取代，較佳保守取代)。

【0090】 在另一個實施方案中，本發明抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段包含：

(i) 選自以下胺基酸序列組合的重鏈和輕鏈 CDR 組合(按順序分別為 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)：

SEQ ID NOs : 1/2/3/22/23/24、SEQ ID NOs : 4/5/6/22/23/24、SEQ ID NOs : 16/17/18/31/23/24、SEQ ID NOs : 7/8/9/22/23/25, SEQ ID NOs : 7/8/9/22/23/26、SEQ ID NOs : 7/8/9/31/23/30、SEQ ID NOs : 10/11/12/27/23/28、SEQ ID NOs : 13/14/15/27/23/29 和 SEQ ID NOs : 19/20/21/31/23/32 ; 或

(ii) 選自以下胺基酸序列組合的重鏈和輕鏈 CDR 組合(按順序分別為 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)：

SEQ ID NOs : 70/2/71/22/23/24、SEQ ID NOs : 72/5/73/22/23/24、SEQ ID NOs : 74/8/75/22/23/25、SEQ ID NOs : 74/8/75/22/23/26、SEQ ID NOs : 74/8/75/31/23/30、SEQ ID NOs : 76/11/77/27/23/28、和 SEQ ID NOs : 78/14/79/27/23/29 ;

(ii) (i)的重鏈和輕鏈 CDR 組合的變體，所述變體在所述六個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 10 或 5、4、3、2、1 個胺基酸改變(較佳胺基酸取代，較佳保守取代)。

【0091】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區的 3 個互補決定區 HCDR，以及輕鏈可變區的 3 個互補決定區 LCDR，其中

(i) HCDR1 包含 SEQ ID NO：1 或 4 或 16 或 70 或 72 所示的胺基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO：2 或 5 或 17 所示的胺基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO：3 或 6 或 18 或 71 或 73 所示的胺基酸序列，LCDR1 包含 SEQ ID NO：22 或 31 所示的胺基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO：23 所示的胺基酸序列，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO：24 所示的胺基酸序列；或者

(ii) HCDR1 包含 SEQ ID NO：7 或 74 所示的胺基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO：8 所示的胺基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO：9 或 75 所示的胺基酸序列，LCDR1 包含 SEQ ID NO：22 或 31 所示的胺基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO：23 所示的胺基酸序列，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO：25 或 26 或 30 所示的胺基酸序列；或者

(iii) HCDR1 包含 SEQ ID NO：10 或 13 或 19 或 76 或 78 所示的胺基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO：11 或 14 或 20 所示的胺基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO：12 或 15 或 21 或 77 或 79 所示的胺基酸序列，LCDR1 包含 SEQ ID NO：27 或 31 所示的胺基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO：23 所示的胺基酸序列，且 LCDR3 包含 SEQ ID NO：28 或 29 或 32 所示的胺基酸序列。

【0092】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO：1 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO：2 的 HCDR2 序列；

SEQ ID NO : 3 的 HCDR3 序列 ; SEQ ID NO : 22 的 LCDR1 序列 ; SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列 ; SEQ ID NO : 24 的 LCDR3 序列。

【0093】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO : 70 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO : 2 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO : 71 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO : 22 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO : 24 的 LCDR3 序列。

【0094】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO : 4 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO : 5 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO : 6 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO : 22 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO : 24 的 LCDR3 序列。

【0095】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO : 72 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO : 5 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO : 73 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO : 22 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO : 24 的 LCDR3 序列。

【0096】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO : 7 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO : 8 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO : 9 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO : 22 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO : 25 的 LCDR3 序列。

【0097】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO : 74 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO : 8 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO : 75 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO : 22 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO : 25 的 LCDR3 序列。

【0098】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO：7 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO：8 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO：9 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO：22 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO：23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO：26 的 LCDR3 序列。

【0099】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO：74 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO：8 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO：75 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO：22 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO：23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO：26 的 LCDR3 序列。

【0100】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO：10 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO：11 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO：12 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO：27 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO：23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO：28 的 LCDR3 序列。

【0101】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO：76 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO：11 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO：77 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO：27 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO：23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO：28 的 LCDR3 序列。

【0102】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO：13 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO：14 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO：15 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO：27 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO：23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO：29 的 LCDR3 序列。

【0103】 在一個較佳實施方案中，本發明抗體或其抗原結合片段包含：SEQ ID NO：78 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO：14 的 HCDR2 序列；

SEQ ID NO：79 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO：27 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO：23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO：29 的 LCDR3 序列。

抗體可變區

【0104】“可變區”或“可變結構域”是抗體的重鏈或輕鏈中參與抗體與其抗原的結合的結構域。重鏈可變區(VH)和輕鏈可變區(VL)可以進一步再劃分為高變區（HVR，又稱作互補決定區(CDR)），其間插有較保守的區域（即，構架區(FR)）。每個 VH 和 VL 由三個 CDR 和 4 個 FR 組成，從胺基端到羧基端以如下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在一些情況下，單個 VH 或 VL 結構域足以賦予抗原-結合特異性。此外，結合特定抗原的抗體可以使用來自結合所述抗原的抗體的 VH 或 VL 結構域篩選互補 VL 或 VH 結構域文庫而分離（參見，例如，Portolano，S.等，J. Immunol. 150(1993)880-887；Clackson，T.等，Nature 352(1991)624-628）。

【0105】本領域已知，可以對兩個可變區之一或兩者(即 VH 和/或 VL)中的一個或多個殘基進行修飾，例如，對一個或多個 CDR 區和/或對一個或多個構架區進行殘基修改，尤其是保守殘基取代，而修飾後的抗體仍基本上保持改變之前的抗體分子的至少一個生物學特性(例如，抗原結合能力)。例如，可以突變 CDR 區的殘基，改善抗體的一種或多種結合性質(例如親和性)。可以在體外或體內測定試驗中，評估突變後的抗體的抗體結合性質或其它功能性質。較佳地，引入保守替代。較佳地，在 CDR 區中引入的殘基改變不超過 1 個、2 個、3 個、4 個或 5 個。此外，可以突變構架區殘基，例如以改善抗體的性質。例如，可以將一個或多個構架殘基“回復突變”為對應的種系序列殘基。

【0106】 CDR 移植是本領域已知的另一種抗體可變區修飾方式。由於 CDR 序列負責大多數抗體-抗原相互作用，故可以構建模擬已知抗體的性質的重組抗體變體。在該抗體變體中，來自已知抗體的 CDR 序列被移植到具有不同性質的不同抗體的構架區上。因此，在一個實施方案中，本發明涉及這樣的抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段，所述抗體包含來自表 3 抗體之一的重鏈和輕鏈 CDR 序列，但具有不同的構架區序列。可以從公共 DNA 數據庫，包括種系抗體基因序列，或從公開文獻導的 LAG-3 抗體序列，獲得用於替換的構架區序列。例如，可以從 GenBank 數據庫獲得編碼人重鏈和輕鏈可變區基因的種系 DNA。可以將抗體蛋白序列與數據庫中的蛋白序列，使用序列相似性檢索工具，例如 Gapped BLAST，進行比較。較佳，用於替代的構架序列，與選擇進行改變的本發明抗體的構架序列，具有結構相似性，例如，具有序列同一性至少 80%、85%、90%、或 95%、96%、97%、98%、99% 以上的構架序列。

【0107】 在再一實施方案中，可以“混合並匹配”來自本發明示例性抗體(表 3 所示抗體之一)與其它不同抗 LAG-3 抗體(較佳地，表 3 所示另一抗體)的 VH 和 VL 序列，以產生結合 LAG-3 的本發明其他抗體。在混合和匹配這些鏈時，較佳地，將來自具體 VH/VL 配對的 VH 序列替換為結構相似的 VH 序列。同樣，來自特定 VH/VL 配對的 VL 序列較佳地替換為結構上相似的 VL 序列。可以使用本領域已知的結合測定法(例如，ELISA，和實施例部分中描述的其他測定法)測試這類“混合和匹配的”抗體與 LAG-3 的結合。

【0108】 因此，在一個實施方案中，本發明的抗體包含重鏈可變區 VH 序列，所述 VH 序列包含選自 SEQ ID NOs：33、34、35、36、37 和

38 所示的胺基酸序列，或由所述胺基酸序列組成。在再一實施方案中，本發明的抗體包含所述 VH 序列的變體。

【0109】 在另一個實施方案中，本發明的抗體包含輕鏈可變區 VL 序列，所述 VL 序列包含選自 SEQ ID NOs：39、40、41、42 和 43 所示的胺基酸序列，或由所述胺基酸序列組成。在再一實施方案中，本發明的抗體包含所述 VL 序列的變體。

【0110】 在再一實施方案中，本發明的抗體包含重鏈和輕鏈可變區 VH/VL 序列對，其中 VH 序列(i)包含選自 SEQ ID NOs：33、34、35、36、37 和 38 所示的胺基酸序列，或由所述胺基酸序列組成，或(ii)是(i)的 VH 序列的變體；且 VL 序列包含(i)選自 SEQ ID NOs：39、40、41、42 和 43 所示的胺基酸序列，或由所述胺基酸序列組成，或(ii)是(i)的 VL 序列的變體。

【0111】 在一個較佳的實施方案中，本發明的抗體包含選自以下的重鏈可變區和輕鏈可變區序列對：

(a) 包含 SEQ ID NO：33 的胺基酸序列的 VH 序列或其變體，和包含 SEQ ID NO：39 的胺基酸序列的 VL 序列或其變體；

(b) 包含 SEQ ID NO：34 的胺基酸序列的 VH 序列或其變體，和包含 SEQ ID NO：39 的胺基酸序列的 VL 序列或其變體；

(c) 包含 SEQ ID NO：35 的胺基酸序列的 VH 序列或其變體，和包含 SEQ ID NO：40 的胺基酸序列的 VL 序列或其變體；

(d) 包含 SEQ ID NO：36 的胺基酸序列的 VH 序列或其變體，和包含 SEQ ID NO：41 的胺基酸序列的 VL 序列或其變體；

(e) 包含 SEQ ID NO：37 的胺基酸序列的 VH 序列或其變體，和包含 SEQ ID NO：42 的胺基酸序列的 VL 序列或其變體；

(f) 包含 SEQ ID NO：38 的胺基酸序列的 VH 序列或其變體，和包含 SEQ ID NO：43 的胺基酸序列的 VL 序列或其變體。

【0112】 在一個實施方案中，VH 序列的變體在胺基酸序列上，與參考 VH 序列相比，(較佳地，在全長上或在 CDR1、2 和 3 三個區域上)，具有至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性。在一個實施方案中，VH 序列的變體在胺基酸序列上，與參考 VH 序列相比，(較佳地，在全長上或在 CDR1、2 和 3 三個區域上)，包含至少一個且不超過 30 個、10 個、或 5、4、3、2、1、0 個胺基酸改變(較佳胺基酸取代，較佳保守取代)。較佳地序列差異不發生在 CDR 區中。

【0113】 在一個較佳的實施方案中，VL 序列的變體在胺基酸序列上，與參考 VL 序列相比，(較佳地，在全長上或在 CDR1、2 和 3 三個區域上)，具有至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性。在一個較佳的實施方案中，VL 序列的變體在胺基酸序列上，與參考 VL 序列相比，(較佳地，在全長上或在 CDR1、2 和 3 三個區域上)，包含至少一個且不超過 30 個、10 個、或 5、4、3、2、1、0 個胺基酸改變(較佳胺基酸取代，較佳保守取代)。較佳地序列差異不發生在 CDR 區中。

【0114】 在一個較佳的實施方案中，本發明的抗體包含重鏈可變區和輕鏈可變區 VH/VL 序列對，所述 VH/VL 序列對包含選自以下的胺基酸序列對：SEQ ID NOs：33/39、34/39、35/40、36/41、37/42、和 38/43，或由所述胺基酸序列對組成。本發明也提供該抗體的變體，例如在 VH、VL 或 VH 和 VL 上具有至少 95-99%同一性或包含不超過 10 個胺基酸改變的變體。

【0115】 在上述任一實施方案中，較佳地，相對於參考抗體，抗體變體的重鏈可變區在 1 個或多個 CDR(較佳全部 3 個 CDR)區域上包含不超

過 10 個，較佳不超過 5 個(例如，3、2、1 或 0 個)胺基酸改變(較佳胺基酸取代，較佳保守取代)。

【0116】 在上述任一實施方案中，較佳地，相對於參考抗體，抗體變體的輕鏈可變區 VL 在 1 個或多個 CDR(較佳全部 3 個 CDR)區域上包含不超過 10 個，較佳不超過 5 個(例如，3、2、1 或 0 個)胺基酸改變(較佳胺基酸取代，較佳保守取代)。

【0117】 在上述任一實施方案中，較佳地，本發明抗體或其抗原結合片段包含選自以下的 CDR 序列組合(按順序分別為 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)：

SEQ ID NOs：1/2/3/22/23/24、SEQ ID NOs：4/5/6/22/23/24、SEQ ID NOs：16/17/18/31/23/24、SEQ ID NOs：7/8/9/22/23/25、SEQ ID NOs：7/8/9/22/23/26、SEQ ID NOs：7/8/9/31/23/30、SEQ ID NOs：10/11/12/27/23/28、SEQ ID NOs：13/14/15/27/23/29 和 SEQ ID NOs：19/20/21/31/23/32。

抗體重鏈和輕鏈

【0118】 在一些實施方案中，本發明抗體包含重鏈 Fc 區，例如 IgG1，IgG2 或 IgG4 同種型的 Fc 區。在一個實施方案中，本發明抗體含有 IgG4-Fc 區，其中在胺基酸殘基 228 位置(EU 編號)具有絲胺酸至脯胺酸突變(S228P)。在再一較佳實施方案中，本發明抗體包含 IgG4-PAA Fc 部分。該 IgG4-PAA Fc 部分在位置 228 具有絲胺酸至脯胺酸突變(S228P)，並且在位置 234(EU 編號)具有苯丙胺酸至丙胺酸突變，在位置 235(EU 編號)具有亮胺酸至丙胺酸突變。S228P 突變是腫瘤恆定區的鉸鏈區的突變，可以減少或消除重鏈間二硫橋異質性。F234A 和 L235A 突變可以進一步降低

(已經具有低效應子功能的)人 IgG4 同種型的效應子功能。在一些實施方案中，本發明抗體含有去除了重鏈 C 末端賴胺酸(des-Lys)的 IgG4-PAA Fc 部分。在一些實施方案中，本發明抗體包含 κ 輕鏈恆定區，例如人 κ 輕鏈恆定區。

【0119】 在再一較佳的實施方案中，Fc 區包含 SEQ ID NO： 68 的胺基酸序列，或相對於 SEQ ID NO： 68 的胺基酸序列包含至少一個，兩個或三個，但不超過 20 個、10 個或 5 個胺基酸改變的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO： 68 的胺基酸序列具有至少 95-99%同一性的序列。

【0120】 在一個較佳的實施方案中，本發明抗體包含輕鏈恆定區。在一個較佳實施方案中，輕鏈恆定區為人 κ 輕鏈恆定區。在再一較佳實施方案中，輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO： 69 的胺基酸序列，或相對於 SEQ ID NO： 69 的胺基酸序列包含至少一個，兩個或三個，但不超過 20 個、10 個或 5 個胺基酸改變的胺基酸序列，或與 SEQ ID NO： 68 的胺基酸序列具有至少 95-99%同一性的序列。

【0121】 在一些較佳的實施方案中，本發明抗體包含重鏈，並且所述重鏈包含選自 SEQ ID NO： 44、45、46、47、48 和 49 的胺基酸序列、或相對於其包含至少一個，兩個或三個，但不超過 20 個，10 個或 5 個胺基酸改變的胺基酸序列，或與其具有至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性的胺基酸序列。較佳地，胺基酸改變不發生在 CDR 區中，更佳地，不發生在可變區中。

【0122】 在一些較佳的實施方案中，本發明抗體包含輕鏈，並且所述輕鏈包含選自 SEQ ID NO： 63、64、65、66 和 67 的胺基酸序列、或相對於其包含至少一個，兩個或三個，但不超過 20 個，10 個或 5 個胺基酸改

變的胺基酸序列，或與其具有至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性的胺基酸序列。較佳地，胺基酸改變不發生在 CDR 區中，更佳地，不發生在可變區中。

【0123】 在一個較佳實施方案中，本發明的抗體包含選自以下的重鏈序列和/或輕鏈序列：

(a) 包含 SEQ ID NO：44 的胺基酸序列的重鏈序列或其變體，和/或包含 SEQ ID NO：50 的胺基酸序列的輕鏈序列或其變體；

(b) 包含 SEQ ID NO：45 的胺基酸序列的重鏈序列或其變體，和/或包含 SEQ ID NO：50 的胺基酸序列的輕鏈序列或其變體；

(c) 包含 SEQ ID NO：46 的胺基酸序列的重鏈序列或其變體，和/或包含 SEQ ID NO：51 的胺基酸序列的輕鏈序列或其變體；

(d) 包含 SEQ ID NO：47 的胺基酸序列的重鏈序列或其變體，和/或包含 SEQ ID NO：52 的胺基酸序列的輕鏈序列或其變體；

(e) 包含 SEQ ID NO：48 的胺基酸序列的重鏈序列或其變體，和/或包含 SEQ ID NO：53 的胺基酸序列的輕鏈序列或其變體；

(d) 包含 SEQ ID NO：49 的胺基酸序列的重鏈序列或其變體，和/或包含 SEQ ID NO：54 的胺基酸序列的輕鏈序列或其變體，

其中所述變體與對應的參考序列相比包含至少一個，兩個或三個，但不超過 20 個，10 個或 5 個胺基酸改變的胺基酸序列，或具有至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性的胺基酸序列。較佳地，胺基酸改變不發生在 CDR 區，更佳地不發生在可變區。

【0124】 在一個實施方案中，在抗體的恆定區中進行殘基修飾，以例如改變抗體的性質，例如效應子功能。

示例性抗體序列

【0125】 本發明提供了如實施例中分離並表徵的特異性結合 LAG-3(例如人 LAG-3)的全人源抗體。下表 3 中列出了本發明這些示例性抗體的抗體可變區 VH 和 VL 序列。下表 1 和 2 中列出了抗體的示例性 CDR 序列。

抗體變體

【0126】 在一方面，本發明提供在本文中所述及的任何抗體，尤其是表 3 所列示例性抗體，的變體。在一個實施方案中，抗體變體保持改變前抗體的至少 60%，70%，80%，90%，或 100%的生物學活性(例如抗原結合能力)。在一些實施方案中，所述改變不導致抗體變體喪失對抗原的結合，但視需要地可以賦予諸如提高的抗原親和力和不同的效應子功能等性質。

【0127】 可以理解的，抗體的重鏈可變區或輕鏈可變區、或各 CDR 區可以單獨改變或組合改變。在一些實施方案中，在一個或多個或全部三個重鏈 CDR 中的胺基酸改變不超過 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個或 10 個。較佳地，所述胺基酸改變為胺基酸取代，較佳保守取代。在一些實施方案中，在一個或多個或全部三個輕鏈 CDR 中的胺基酸改變不超過 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個或 10 個。在一些實施方案中，在一個或多個或全部 6 個 CDR 中的胺基酸改變不超過 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個或 10 個。較佳地，所述胺基酸改變為胺基酸取代，較佳保守取代。在一些實施方案中，抗體變體與參考抗體在目標抗體序列區域上具有至少 80%、85%、90%或 95%或 99%或更高的胺基酸同一性。例如，在一個實施方案中，本發明抗體，與參考抗體(例如表 3 所列抗體之一)相比，在 3 個重鏈 CDR 區域上具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%或更高的同一性。在一個實施方案中，本發明抗體，與參考抗體(例如表 3

所列抗體之一相比)，在 3 個輕鏈 CDR 區域上具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%或更高的同一性。在另一實施方案中，本發明抗體，與參考抗體(例如表 3 所列抗體之一相比)，在 6 個 CDR 區域上具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%或更高的同一性。在再一實施方案中，本發明抗體，與參考抗體(例如表 3 所列抗體之一)相比，在重鏈可變區上具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%或更高的序列同一性。在再一實施方案中，本發明抗體，與參考抗體(例如表 3 所列抗體之一)相比，在輕鏈可變區上具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%或更高的序列同一性。在再一實施方案中，本發明抗體，與參考抗體(例如表 3 所列抗體之一)相比，在重鏈可變區和/或輕鏈可變區上具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99%或更高的序列同一性。

【0128】此外，可以對抗體的 Fc 區進行改變。Fc 區的改變可以單獨進行，或與上述對構架和/或 CDR 區的改變相組合。可以改變 Fc 區，例如，以改變抗體的一種或多種功能，例如血清半衰期，補體固定、Fc 受體結合、和/或抗原依賴性細胞毒性。此外，還可以對本發明抗體進行化學修飾(例如，與 PEG 連接)或改變其糖基化模式。

【0129】在某些實施方案中，Fc 區可以包含具有一個或多個提高 ADCC 活性的胺基酸置換的 Fc-區，例如，Fc-區的位置 298、333 和/或 334 的置換(殘基的 EU 編號)。在一些實施方案中，也可以對 Fc-區進行改變，以導致改變的(即，提高的或降低的) C1q 結合和/或補體依賴性細胞毒性(CDC)(參見，例如，US6,194,551、WO99/51642 和 Idusogie, E. E.等，J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184)。

【0130】 在另一些實施方案中，可以對 Fc 進行改變以增加或降低其糖基化程度和/或改變其糖基化模式。對 Fc 的糖基化位點的添加或缺失可藉由改變胺基酸序列以便產生或移除一或多個糖基化位點而方便地實現。舉例而言，可實施一或多種胺基酸取代以消除一或多個糖基化位點，由此消除該位點處的糖基化。可製備具有改變類型的糖基化的抗體，例如具有減小量的岩藻糖基殘基的低或無岩藻糖化抗體或具有增加的等分 GlcNac 結構的抗體。這類改變的糖基化模式已顯示可增加抗體的 ADCC 能力。本發明也考慮在與 Fc 區連接的寡糖中具有至少一個半乳糖殘基的抗體變體。這些抗體變體可具有提高的 CDC 功能。

【0131】 在某些實施方案中，本發明也考慮具有一些但非所有效應子功能的抗體變體，這使其成為某些應用的理想候選物，在所述應用中抗體的體內半衰期是重要的，但某些效應子功能（如補體和 ADCC）是不必要或有害的。例如，Fc 區可以包含消除或減弱效應子功能的突變，例如具有突變 P329G 和/或 L234A 和 L235A 的人 IgG1 Fc 區，或具有突變 P329G 和/或 S228P 和 L235E 的人 IgG4 Fc 區。

【0132】 在某些實施方案中，可能需要產生經半胱胺酸工程改造的抗體，例如“硫代 MAbs”，其中抗體的一或多個殘基經半胱胺酸殘基置換。例如，可以改變抗體鉸鏈區中的半胱胺酸殘基數目，以例如利於輕鏈和重鏈的裝配或增加或降低抗體的穩定性。殘基例如美國專利號 5,677,425。

【0133】 在某些實施方案中，本文中所提供的抗體可進一步經修飾為含有非蛋白質部分。適合抗體衍生的部分包括，但不限於，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性實例包括，但不限於，聚乙二醇(PEG)，以例如增

加抗體的(例如血清)半衰期。用於蛋白質 PEG 化的方法是本領域已知的，可以將其應用於本發明的抗體。參見例如 EP 0154 316 和 EP 0401384。

II. 多核苷酸、載體和宿主

【0134】 本發明提供編碼以上任何抗 LAG-3 抗體或其片段的核酸。還提供包含所述核酸的載體。在一個實施方案中，載體是表達載體。還提供包含所述核酸或所述載體的宿主細胞。在一個實施方案中，宿主細胞是真核的。在另一個實施方案中，宿主細胞選自酵母細胞、哺乳動物細胞(例如 CHO 細胞或 293 細胞)。在另一個實施方案中，宿主細胞是原核的。

【0135】 在一方面，本發明提供編碼以上任何抗 LAG-3 抗體或其片段的核酸。所述核酸可以包含編碼抗體的輕鏈可變區和/或重鏈可變區的氨基酸序列的核酸，或包含編碼抗體的輕鏈和/或重鏈的氨基酸序列的核酸。示例性的編碼抗體重鏈可變區的核酸序列包含與選自 SEQ ID NO：57、58、59、60、61 或 62 的核酸序列具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的核酸序列，或者包含選自 57、58、59、60、61 或 62 的核酸序列。示例性的編碼抗體輕鏈可變區的核酸序列包括與選自 SEQ ID NO：50,51,52,53、或 54 的核酸序列具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的核酸序列，或者包括選自 SEQ ID NO：50、51、52、53、或 54 的核酸序列。從適宜的表達載體表達時，由這些多核苷酸編碼的多肽能夠顯示 LAG-3 抗原結合能力。

【0136】 本發明中還提供多核苷酸，所述多核苷酸編碼來自上文所述的結合 LAG-3 的抗體的重鏈 VH 或輕鏈 VL 序列的至少一個 CDR 區和通常全部三個 CDR 區。一些進一步的實施方案中，多核苷酸編碼上文所述的結合 LAG-3 的抗體的重鏈和/或輕鏈的完整或基本上完整可變區序列。

【0137】 如本領域技術人員明瞭的，因為密碼子簡並性，每一個抗體或多肽胺基酸序列可以由多種核酸序列編碼。

【0138】 在一個較佳實施方案中，編碼抗體的本發明核酸還包含編碼重鏈 Fc 區的核苷酸序列，例如 SEQ ID NO： 68 中所示的 Fc 區序列或與其基本相同的序列。

【0139】 在一個較佳實施方案中，編碼抗體的本發明核酸還包含編碼輕鏈恆定區序列的核苷酸序列，例如 SEQ ID NO： 69 中所示的序列或與其基本相同的序列。

【0140】 可以採用本領域熟知的方法，藉由從頭固相 DNA 合成或藉由 PCR 誘變編碼結合 LAG-3 的抗體或其結合片段的現有序列(例如，SEQ ID NO： 57-67 中所示的序列)，產生這些多核苷酸序列。

【0141】 在一個實施方案中，提供包含本發明核酸的一個或多個載體。在一個實施方案中，載體是表達載體，例如真核表達載體。載體包括但不限於病毒、質粒、粘粒、 λ 噬菌體或酵母人工染色體(YAC)。在較佳的實施方案中，本發明的表達載體是 pTT5 表達載體。

【0142】 在一個實施方案中，提供包含所述載體的宿主細胞。用於選殖或表達編碼抗體的載體的適當宿主細胞包括本文描述的原核或真核細胞。例如，抗體可在細菌中產生，特別當不需要糖基化和 Fc 效應子功能時。對於抗體片段和多肽在細菌中的表達，見，例如，美國專利號 5,648,237，5,789,199 和 5,840,523，還見 Charlton，Methods in Molecular Biology，卷 248(B.K.C.Lo，編輯，Humana Press，Totowa，NJ，2003)，第 245-254 頁，其描述抗體片段在大腸桿菌中的表達)。在表達後，抗體可以從可溶級分中的細菌細胞糊狀物分離，並且可以進一步純化。

【0143】 在一個實施方案中，宿主細胞是真核的。在另一個實施方案中，宿主細胞選自酵母細胞、哺乳動物細胞或適用於製備抗體或其抗原結合片段的其它細胞。例如，真核微生物諸如絲狀真菌或酵母是關於編碼抗體的載體的合適純株或表達宿主。例如，糖基化途徑已經進行“人源化”的真菌和酵母菌株導致產生具有部分或完全人糖基化模式的抗體。參見 Gerngross, Nat.Biotech.22:1409-1414(2004)，和 Li 等, Nat.Biotech.24:210-215(2006)。適於表達糖基化抗體的宿主細胞也衍生自多細胞生物體(無脊椎動物和脊椎動物)。也可以將脊椎動物細胞用作宿主。例如，可以使用被改造以適合於懸浮生長的哺乳動物細胞系。有用哺乳動物宿主細胞系的其它實例是用 SV40 轉化的猴腎 CV1 系(COS-7)；人胚腎系(293HEK 或 293 細胞，如例如 Graham 等, J.Gen Virol. 36 : 59(1977) 中所描述的)等。其它有用的哺乳動物宿主細胞系包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括 DHFR-CHO 細胞(Urlaub 等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77 : 216(1980))；以及骨髓瘤細胞系如 Y0，NS0 和 Sp2/0。關於適合產生抗體的某些哺乳動物宿主細胞系的綜述見例如 Yazaki 和 Wu, Methods in Molecular Biology, 卷 248 (B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), 第 255-268 頁(2003)。

III. 抗體的製備

【0144】 在一個實施方案中，提供了製備抗 LAG-3 抗體的方法，其中所述方法包括，在適合抗體表達的條件下，培養包含編碼所述抗體的核酸的宿主細胞，如上文所提供的，和視需要地從所述宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收所述抗體。為了重組產生抗 LAG-3 抗體，分離編碼抗體(例如上文所描述的抗體)的核酸，並將其插入一個或多個載體，用於在宿主細胞中進一步選殖和/或表達。此類核酸易於使用常規規程分離和測序(例如藉

由使用能夠與編碼抗體重鏈和輕鏈的基因特異性結合的寡核苷酸探針進行)。

IV. 測定法

【0145】 可以藉由本領域中已知的多種測定法對本文中提供的抗 LAG-3 抗體鑒定，篩選，或表徵其物理/化學特性和/或生物學活性。

【0146】 一方面，對本發明的抗體測試其抗原結合活性。例如，可以藉由本領域已知的方法，諸如 ELISA，Western 印跡等，或本文實施例公開的例示性方法，來測定與人 LAG-3 的結合。例如，可以使用流式細胞術進行測定，其中抗體與表達人 LAG-3 的細胞系，例如經轉染在細胞表面上表達人 LAG-3 的 HEK293 細胞，進行反應。其它的細胞也適用於流式細胞術，包括表達天然 LAG-3 的激活的 CD4+ T 細胞。備選地，抗體的結合，包括結合動力學(例如 K_D 值)，可以使用重組 LAG-3 蛋白，在生物光干涉測定法中測定。在一些實施方案中，使用生物光干涉測定法(例如 ForteBio 親和測量)。

【0147】 另一方面，可使用競爭測定法來鑒定與本文中公開的任何抗 LAG-3 抗體競爭對 LAG-3 的結合的抗體。在某些實施方案中，此類競爭性抗體結合與本文中公開的任何抗 LAG-3 抗體所結合表位相同或重疊的表位(例如線性或構象表位)。用於定位抗體所結合表位的詳細例示性方法見 Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols”, Methods in Molecular Biology vol.66(Humana Press, Totowa, NJ)。

【0148】 本發明還提供了用於鑒定具有生物學活性的抗 LAG-3 抗體的測定法。生物學活性可以包括例如結合 LAG-3(例如結合人 LAG-3)，阻斷 LAG-3(例如結合人 LAG-3)與細胞表面 MHC II 類分子結合、結合激活的 CD4+和/或 CD8+ T 細胞、抑制腫瘤生長。例如，在體內腫瘤抑制模型

中(參見例如實施例 8)，測試抗體抑制腫瘤生長的能力。在本發明也提供在體內和/或在體外具有此類生物學活性的抗體。

【0149】 可以理解的是，能夠使用本發明的免疫綴合物或多特異性抗體替換或補充抗 LAG-3 抗體來進行任何上述測定。

V · 多特異性抗體

【0150】 在再一方面，本發明提供特異性地結合 LAG-3 (較佳人 LAG-3) 的多特異性(包括雙特異性)抗體分子。在一個實施方案中，在多特異性抗體中，本發明的抗體(或其抗原結合片段)形成針對 LAG-3 的第一結合特異性。在再一實施方案中，所述多特異性抗體還針對以下一種的第二特異性、或還包含針對以下兩種分子的第二和第三結合特異性：PD-1、TIM-3、CEACAM(例如、CEACAM-1 或 CEACAM-5)、PD-L1 或 PD-L2。在再一實施方案中，所述多特異性抗體是結合 LAG-3 和 PD-1、結合 LAG-3 和 PD-L1、或結合 LAG-3 和 PD-L2 的雙特異性抗體。

【0151】 在一個實施方案中，結合特異性由抗體的“結合位點”或“抗原結合位點”(抗體分子中與抗原實際結合的區域)提供。在一個較佳的實施方案中，抗原結合位點由抗體輕鏈可變結構域(VL)和抗體重鏈可變結構域(VH)組成的 VH/VL 對構成。因此，在一個實施方案中，“多特異性”抗體是具有至少兩個抗原結合位點的抗體，所述至少兩個抗原結合位點中的每一個抗原結合位點可以與相同抗原的不同表位或與不同抗原的不同表位結合。

【0152】 有關多特異性抗體及其製備，可以參見例如 WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792 和 WO 2010/145793 中的描述。

VI · 免疫綴合物

【0153】 再一方面，本發明提供藉由將本發明抗體綴合於異源分子而產生的免疫綴合物。在一個實施方案中，在免疫綴合物中，本發明的抗體(或其抗原結合片段)與治療劑或診斷劑。在一些實施方案中，本發明抗體可以以全長抗體或抗體片段的形式與異源分子綴合。例如，以 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)'₂ 片段、單鏈 scFab 抗體、單鏈 scFv 等片段形式進行綴合。

【0154】 可以使用接頭來共價連接綴合物的不同實體。適宜的接頭包括化學接頭或肽接頭。有利地的是，接頭是利於多肽在遞送至靶位點後釋放的“可裂解接頭”。例如，可以使用酸不穩定性接頭、肽酶敏感性接頭、光不穩定性接頭、二甲基接頭或含二硫化物的接頭（Chari 等，Cancer Research 52（1992）127-131；US 5,208,020）。

【0155】 適用於綴合物中的治療劑包括但不限於細胞毒素（例如細胞生長抑制劑或細胞殺傷劑），藥物或放射性同位素。適合於形成免疫綴合物的細胞毒性劑（例如化療劑）的例子是本領域中已知的，參見例如 WO05/103081。例如，細胞毒性劑包括但不限於：放射性同位素；生長抑制劑；酶及其片段如核酸水解酶；抗生素；毒素如小分子毒素或細菌、真菌、植物或動物起源的酶促活性毒素，包括其片段和/或變體；和已知的各種抗腫瘤或抗癌劑。

【0156】 再一方面，本發明的抗體可以與診斷劑或可檢測劑綴合。這類綴合物可以作為臨床檢驗方法的部分(如確定特定療法的效力)，用於監測或預測疾病或病症的發作、形成、進展和/或嚴重性。可以藉由將抗體與可檢測劑偶聯實現這類診斷和檢測，所述可檢測劑包括但不限於多種酶，如但不限於辣根過氧化物酶；輔基，如但不限於鏈黴親和素/生物素和抗生

物素蛋白/生物素；螢光物質；發光物質；放射性物質；和用於各種正電子發射成像術中的正電子發射金屬和非放射性順磁金屬離子。

VII. 醫藥組成物和藥物製劑

【0157】 本發明還包括包含抗 LAG-3 抗體或其免疫綴合物或多特異性抗體的組合物(包括醫藥組成物或藥物製劑)和包含編碼抗 LAG-3 抗體或其免疫綴合物或多特異性抗體的多核苷酸的組合物。這些組合物還可以視需要地包含合適的藥用輔料，如本領域中已知的藥用載體、藥用賦形劑，包括緩衝劑。在一個實施方案中，組合物還包含第二治療劑，較佳地，抗 PD-1 抗體。

【0158】 適用於本發明的藥用載體可以是無菌液體，如水和油，包括那些具有石油、動物、植物或合成起源的，如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油等。當靜脈內施用醫藥組成物時，水是較佳的載體。還可以將鹽水溶液和水性右旋糖以及甘油溶液用作液體載體，特別是用於可注射溶液。合適的藥用賦形劑包括澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、甘油單硬脂酸酯、滑石、氯化鈉、乾燥的脫脂乳、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。對於賦形劑的使用及其用途，亦參見“Handbook of Pharmaceutical Excipients”，第五版，R. C. Rowe, P. J. Seskey 和 S. C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。若期望的話，所述組合物還可以含有少量的潤濕劑或乳化劑，或 pH 緩衝劑。這些組合物可以採用溶液、懸浮液、乳劑、片劑、丸劑、膠囊劑、粉末、持續釋放配製劑等的形式。口服配製劑可以包含標準載體，如藥用級甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精。

【0159】 可以藉由將具有所需純度的本發明的抗 LAG-3 抗體、免疫綴合物或多特異性抗體，與一種或多種視需要的藥用輔料(Remington' s Pharmaceutical Sciences，第 16 版，Osol，A. 編(1980)) 混合，來製備包含本發明的藥物製劑，較佳地以凍乾製劑或水溶液的形式。

【0160】 示例性的凍乾抗體製劑描述於美國專利號 6,267,958。水性抗體製劑包括美國專利號 6,171,586 和 WO2006/044908 中所述的那些，後一種製劑包括組胺酸-乙酸鹽緩衝劑。

【0161】 本發明的醫藥組成物或製劑還可以包含一種或多種其它活性成分，所述活性成分是被治療的特定適應症所需的，較佳具有不會不利地影響彼此的互補活性的那些活性成分。例如，理想的是還提供其它抗癌活性成分，例如化療劑、PD-1 軸結合拮抗劑（例如抗 PD-1 抗體或抗 PD-L1 抗體或抗 PD-L2 抗體）或者抗血管發生劑（例如貝伐珠單抗）。所述活性成分以對於目的用途有效的量合適地組合存在。

【0162】 可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑的合適實例包括含有抗體的固體疏水聚合物的半滲透基質，所述基質呈成形物品，例如薄膜或微囊形式。

【0163】 關於藥物製劑的其它組分，還可以參見 WO2015/153513 中公開的那些。

VIII. 組合產品

【0164】 在一些實施方案中，本發明還提供了組合產品，其包含本發明的抗體或其抗原結合片段，以及或其片段或其免疫綴合物，以及一種或多種其它治療劑（例如化療劑、其他抗體、細胞毒性劑、疫苗、抗感染活性劑等）。在一些實施方案中，其它抗體例如抗 PD-1 抗體或抗 PD-L1 抗體或抗 PD-L2 抗體。

【0165】 在一些實施方案中，所述組合產品用於預防或治療腫瘤。在一些實施方案中，腫瘤為癌症，例如胃腸道癌症，例如胃癌、直腸癌、結腸癌、結腸直腸癌等；或皮膚癌，例如惡性黑素瘤。在一些實施方案中，所述組合產品用於預防或治療感染，例如細菌感染、病毒感染、真菌感染、原生動物感染等。

IX. 治療方法和用途

【0166】 在本文中，術語“個體”或“對象”可互換地使用，是指哺乳動物。哺乳動物包括但不限於馴化動物(例如，奶牛、綿羊、貓、犬和馬)、靈長類(例如，人和非人靈長類如猴)、兔和齧齒類(例如，小鼠和大鼠)。特別地，對象是人。

【0167】 在本文中，術語“治療”指意欲改變正在接受治療的個體中疾病之天然過程的臨床介入。想要的治療效果包括但不限於防止疾病出現或復發、減輕症狀、減小疾病的任何直接或間接病理學後果、防止轉移、降低病情進展速率、改善或緩和疾病狀態，以及緩解或改善預後。

【0168】 在一方面中，本發明涉及在受試者中增強機體的免疫應答的方法，所述方法包括向所述受試者施用有效量的本文所述的任何抗 LAG-3 抗體或其片段，或包含所述抗體或片段的免疫綴合物、多特異性抗體，或醫藥組成物。在一些實施方案，將本發明的抗 LAG-3 抗體或其抗原結合部分施用於攜帶腫瘤的受試者，刺激抗腫瘤免疫應答。在另一些實施方案中，將本發明的抗體或其抗原結合部分施用於攜帶感染的受試者，刺激抗感染免疫應答。

【0169】 在另一方面中，本發明涉及治療受試者腫瘤，例如癌症的方法，所述方法包括向所述受試者施用有效量的本文所述的任何抗 LAG-3 抗

體或其片段，或包含所述抗體或片段的免疫綴合物、多特異性抗體，或醫藥組成物。

【0170】 在一些實施方案中，本文所述的腫瘤，例如癌症，包括但不限於實體瘤、血液學癌(例如，白血病、淋巴瘤、骨髓瘤)及其轉移性病灶。在一個實施方案中，癌症是實體瘤。實體瘤的例子包括惡性腫瘤，例如，多個器官系統的肉瘤和癌(例如，腺癌)，如侵襲肺、乳腺、淋巴、胃腸道或結直腸、生殖器和生殖泌尿道(例如，腎細胞、膀胱細胞、膀胱細胞)、咽、CNS(例如，腦細胞、神經細胞或神經膠質細胞)、皮膚(例如，黑素瘤)、頭部和頸部(例如，頭頸鱗狀細胞癌(HNCC))和胰的那些。例如，黑素瘤、結腸癌、胃癌、直腸癌、腎細胞癌、乳腺癌(例如，不表達一種、兩種或全部雌激素受體、孕酮受體或 Her2/neu 的乳腺癌，例如，三陰性乳腺癌)、肝癌、肺癌(例如，非小細胞肺癌(NSCLC)(例如，具有鱗狀和/或非鱗狀結構的 NSCLC)或小細胞肝癌)、前列腺癌、頭部或頸部癌(例如，HPV+鱗狀細胞癌)、小腸癌和食道癌。血液學癌的例子包括但不限於白血病(例如，髓樣白血病、淋巴樣白血病或慢性淋巴細胞白血病(CLL))、淋巴瘤(例如，霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)、T 細胞淋巴瘤或套細胞淋巴瘤(MCL))和骨髓瘤，例如，多發性骨髓瘤。癌症可以處於早期、中期或晚期或是轉移性癌。

【0171】 在一個實施方案中，癌症是胃腸道癌症如結腸癌，或皮膚癌如惡性黑素瘤等。

【0172】 在另一方面中，本發明涉及治療受試者感染性疾病，例如慢性感染的方法，所述方法包括向所述受試者施用有效量的本文所述的任何抗 LAG-3 抗體或其片段，或包含所述抗體或片段的免疫綴合物、多特異性抗體，或醫藥組成物。在一個實施方案中，所述感染是病毒感染。

【0173】 在一些實施方案中，所述感染性疾病是由於病毒感染引起的。致病性病毒的一些例子包括(甲型、乙型和丙型)肝炎病毒、(甲型、乙型和丙型)流感病毒、HIV、疱疹病毒(例如，VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II、CMV、Epstein Barr 病毒+)、腺病毒、黃病毒、艾柯病毒、鼻病毒、柯薩奇病毒、冠狀病毒、呼吸道合胞體病毒、腮腺炎病毒、輪狀病毒、麻疹病毒、風疹病毒、細小病毒、痘苗病毒、HTLV 病毒、登革病毒、乳頭狀瘤、軟疣病毒、脊髓灰質炎病毒、狂犬病病毒、JC 病毒和蟲媒腦炎病毒。

【0174】 適於用本發明的抗 LAG-3 的抗體或其片段、免疫綴合物和多特異性抗體預防或治療的疾病可進一步參見 WO2015/138920、WO2016/028672、WO2015/042246 等。

【0175】 一些實施方案中，本文所述的方法還包括向所述受試者聯合施用一種或多種療法(例如治療方式和/或其它治療劑)。在一些實施方案中，治療方式包括手術治療和/或放射療法。

【0176】 在一些實施方案中，除了施用本發明抗體外，本發明方法還包括施用至少一種其它的免疫刺激性抗體，例如抗 PD-1 抗體、抗 PD-L1 抗體、和/或抗 CTLA-1 抗體，這些抗體可以是例如全人源的、嵌合的、或人源化的抗體。

【0177】 在另一些實施方案中，其它治療劑選自化療劑、PD-1 軸結合拮抗劑(例如抗 PD-1 抗體或抗 PD-L1 抗體或抗 PD-L2 抗體)或者抗血管發生劑(例如貝伐珠單抗)。

【0178】 在一些實施方案中，PD-1 軸結合拮抗劑包括但不限於 PD-1 結合拮抗劑，PD-L1 結合拮抗劑和 PD-L2 結合拮抗劑。"PD-1"的備選名稱包括 CD279 和 SLEB2。"PD-L1"的備選名稱包括 B7-H1、B7-4、CD274

和 B7-H。"PD-L2"的備選名稱包括 B7-DC、B7-1 和 CD273。在一些實施方案中，PD-1、PD-L1 和 PD-L2 是人 PD-1、PD-L1 和 PD-L2。在一些實施方案中，PD-1 結合拮抗劑是抑制 PD-1 結合其配體結合配偶的分子。在一個具體方面，PD-1 配體結合配偶是 PD-L1 和/或 PD-L2。在另一個實施方案中，PD-L1 結合拮抗劑是抑制 PD-L1 結合其結合配偶的分子。在一個具體方面，PD-L1 結合配偶是 PD-1 和/或 B7.1。在另一個實施方案中，PD-L2 結合拮抗劑是抑制 PD-L2 結合其結合配偶的分子。在一個具體方面，PD-L2 結合配偶是 PD-1。拮抗劑可以是抗體，其抗原結合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。在一些實施方案中，PD-1 結合拮抗劑是抗 PD-1 抗體(例如人抗體，人源化抗體，或嵌合抗體)。

【0179】 在一些實施方案中，抗 PD-1 抗體選自下組：MDX-1106(納武單抗(nivolumab)，OPDIVO)，Merck 3475(MK-3475，匹博利珠單抗(pembrolizumab)，KEYTRUDA)和 CT-011(匹地利珠單抗(Pidilizumab))。在一些實施方案中，抗 PD-1 抗體是 MDX-1106。在一些實施方案中，抗 PD-1 抗體是納武單抗(CAS 註冊號：946414-94-4)。在較佳的實施方案中，抗 PD-1 抗體是本文所述的“Antibody D”。

【0180】 在進一步的一些實施方案中，單獨或與 PD-1 軸結合拮抗劑組合的抗 LAG-3 抗體或其片段還能與一種或多種其它療法例如治療方式和/或其它治療劑組合施用。在一些實施方案中，治療方式包括外科手術(例如腫瘤切除術)；放射療法(例如，外粒子束療法，它涉及其中設計照射區域的三維適形放射療法)、局部照射(例如，指向預選靶或器官的照射)或聚焦照射等。

【0181】 在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體或其片段可以與化療或化療劑聯合施用。在一些實施方案中，本發明的抗 LAG-3 抗體或

其片段可以與放療或放療劑聯合施用。在一些實施方案中，本發明的抗LAG-3抗體或其片段可以與靶向療法或靶向治療劑聯合施用。在一些實施方案中，本發明的抗LAG-3抗體或其片段可以與免疫療法或免疫治療劑，例如單株抗體聯合施用。

【0182】 本發明的抗體(以及包含其的醫藥組成物或免疫綴合物，以及任何另外的治療劑)可以藉由任何合適的方法給藥，包括腸胃外給藥，肺內給藥和鼻內給藥，並且，如果局部治療需要，病灶內給藥。腸胃外輸注包括肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下給藥。在一定程度上根據用藥是短期或長期性而定，可藉由任何適合途徑，例如藉由注射，例如靜脈內或皮下注射用藥。本文中涵蓋各種用藥時程，包括，但不限於，單次給藥或在多個時間點多次給藥、推注給藥及脈衝輸注。

【0183】 為了預防或治療疾病，本發明的抗體的合適劑量(當單獨或與一種或多種其他的治療劑組合使用時)將取決於待治療疾病的類型、抗體的類型、疾病的嚴重性和進程、所述抗體是以預防目的施用還是以治療目的施用、以前的治療、患者的臨床病史和對所述抗體的應答，和主治醫師的判斷力。所述抗體以一次治療或經過一系列治療合適地施用於患者。

【0184】 在上述本發明方法中，可以替代本發明抗體或抗原結合部分，施用本發明的組合物、多特異性抗體或免疫綴合物。或者，在這些方法中，除了施用本發明抗體或抗原結合部分，還可以進一步施用本發明的組合物、多特異性抗體或免疫綴合物。

【0185】 再一方面，本發明提供本發明抗LAG-3抗體、組合物、免疫綴合物、多特異性抗體在製備用於前述方法(例如用於治療)的藥物中的用途。

X. 用於診斷和檢測的方法和組合物

【0186】 再一方面，本發明涉及檢測樣品中 LAG-3 的方法和試劑盒，其中所述方法包括：(a)將所述樣品與本發明抗體或其抗原結合片段或免疫綴合物接觸；和(b)檢測所述抗體或其抗原結合片段或免疫綴合物和 LAG-3 蛋白之間複合物的形成。在一些實施方案中，樣品來自癌症患者，例如皮膚癌患者。所述檢測可以是體外的或體內的。

【0187】 術語“檢測”用於本文中時，包括定量或定性檢測，示例性的檢測方法可以涉及免疫組織化學、免疫細胞化學、流式細胞術(例如，FACS)、抗體分子複合的磁珠、ELISA 測定法、PCR-技術(例如，RT-PCR)。在某些實施方案中，生物樣品是血、血清或生物來源的其他液體樣品。在某些實施方案中，生物樣品包含細胞或組織。在一些實施方案中，生物樣品來自過度增生性或癌性病灶。在某些實施方案中，待檢測的 LAG-3 是人 LAG-3。

【0188】 在一個實施方案中，抗 LAG-3 抗體被用於選擇適合利用抗 LAG-3 抗體的治療的對象，例如其中 LAG-3 是用於選擇所述對象的生物標記物。在一個實施方案中，可以使用本發明抗體診斷癌症或腫瘤，例如評價(例如，監測)對象中本文所述疾病(例如，過度增生性或癌性疾病)的治療或進展、其診斷和/或分期。

【0189】 在某些實施方案中，提供標記的抗 LAG-3 抗體。標記包括但不限於，被直接檢測的標記或部分(如螢光標記、發色團標記、電子緻密標記、化學發光標記和放射性標記)，以及被間接檢測的部分，如酶或配體，例如，藉由酶促反應或分子相互作用。示例性標記包括但不限於，放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I ，螢光團如稀土螯合物或螢光素及其衍生物，羅丹明及其衍生物，丹醯(dansyl)，傘形酮(umbelliferone)，螢光素酶(luciferase)，例如，螢火蟲螢光素酶和細菌螢光素酶(美國專利號

4,737,456), 螢光素, 2, 3-二氫酞嗪二酮, 辣根過氧化物酶(HR), 鹼性磷酸酶, β -半乳糖苷酶, 葡糖澱粉酶, 溶解酶, 糖類氧化酶, 例如, 葡萄糖氧化酶, 半乳糖氧化酶, 和葡萄糖-6-磷酸脫氫酶, 雜環氧化酶如尿酸酶和黃嘌呤氧化酶, 以及利用過氧化氫氧化染料前體的酶如 HR, 乳過氧化物酶, 或微過氧化物酶(microperoxidase), 生物素/親和素, 自旋標記, 噬菌體標記, 穩定的自由基等等。

【0190】 描述以下實施例以輔助對本發明的理解。不意在且不應當以任何方式將實施例解釋成限制本發明的保護範圍。

【0191】 [表 1]

表 1：本發明示例性抗體 CDR 序列

重鏈 CDR 序列							
抗體名稱	HCDR1--AbM	SEQ ID NO	HCDR2--Kabat	SEQ ID NO	HCDR3--Kabat	SEQ ID NO	
ADI-26818	GYTFTSYMH	70	VINPSGGSTSYAQKFQG	2	EETTWPGYFDY	71	
ADI-31798	GYTFRSAYMH	72	VIVPSGGSTTYAQKFQG	5	EELTWPGYFDY	73	
ADI-26822	GGSISSSDYYWG	74	SIYYSGSTYYNPSLKS	8	EGLWSLSLDV	75	
ADI-31815	GGSISSSDYYWG	74	SIYYSGSTYYNPSLKS	8	EGLWSLSLDV	75	
ADI-26836	GYTFTSYGIS	76	WISAYNGNTNYAQKLQG	11	ETFGGEHYYYGMDV	77	
ADI-31836	GYTFTEY AIS	78	WIHSYNGNTNYAQKLQG	14	ETFGGEHYMIGMDV	79	
輕鏈 CDR 序列							
抗體名稱	LCDR1--Kabat	SEQ ID NO	LCDR2--Kabat	SEQ ID NO	LCDR3--Kabat	SEQ ID NO	
ADI-26818	QASQDISNYLN	22	DASNLET	23	QQLYNLIT	24	
ADI-31798	QASQDISNYLN	22	DASNLET	23	QQLYNLIT	24	
ADI-26822	QASQDISNYLN	22	DASNLET	23	QQFANHPPLT	25	
ADI-31815	QASQDISNYLN	22	DASNLET	23	QQVYNHPPLT	26	
ADI-26836	QASQDITNYLN	27	DASNLET	23	QQDDFFPFT	28	
ADI-31836	QASQDITNYLN	27	DASNLET	23	QQTDFFPFT	29	

【0192】 [表 2]

表 2：本發明示例性抗體 CDR 序列

重鏈 CDR 序列							
抗體名稱	HCDR1	SEQ ID No	HCDR2	SEQ ID No	HCDR3	SEQ ID No	
Kabat 編號 位置	H27-H35B		H50-H65		H93-H102		
ADI-26818	YTFTSYMH	1	VINPSGGSTS YAQKFQG	2	AREET TWPGYFDY	3	
ADI-31798	YTFRSAYMH	4	VIVPSGGSTT YAQKFQG	5	AREEL TWPGYFDY	6	
共有序列	YTFX ₁ SX ₂ YMH (其中 X ₁ 選自任意胺 基酸，較佳地 T 或 R 或其保守取代殘基， X ₂ 選自任意胺基酸， 較佳地 Y 或 A 或其 保守取代殘基)	16	VIX ₁ PSGGSTX ₂ Y AQKFQG (其中 X ₁ 選自任意胺基酸， 較佳地 N 或 V 或其保守取代 殘基，X ₂ 選自任意胺基酸， 較佳地 S 或 T 或其保守取代 殘基)	17	AREEX ₁ TWPGYFDY (其中 X ₁ 選自任意胺基酸， 較佳地 T 或 L 或其保守取 代殘基)	18	
ADI-26822	GSISSDYYWG	7	SIYYSGSTYYNPSLKS	8	AREGLWSLSLDV	9	
ADI-31815	GSISSDYYWG	7	SIYYSGSTYYNPSLKS	8	AREGLWSLSLDV	9	

ADI-26836	YTFTSYGIS	10	WISA YNGNTNYAQKLQG	11	ARETFGGEHY Y GMDV	12
ADI-31836	YTFTEY AIS	13	WIHS YNGNTNYAQKLQG	14	ARETFGGEHYMIGMDV	15
共有序列	YFTFX ₁ YX ₂ IS (其中 X ₁ 選自任意胺基酸，較佳地 S 或 E 或其保守取代殘基，X ₂ 選自任意胺基酸，較佳地 G 或 A 或其保守取代殘基)	19	WIX ₁ X ₂ YNGNTNYAQKLQG (其中 X ₁ 選自任意胺基酸，較佳地 S 或 H 或其保守取代殘基，X ₂ 選自任意胺基酸，較佳地 A 或 S 或其保守取代殘基)	20	ARETFGGEHYX ₁ X ₂ GMDV (其中 X ₁ 選自任意胺基酸，較佳地 Y 或 M 或其保守取代殘基，X ₂ 選自任意胺基酸，較佳地 Y 或 I 或其保守取代殘基)	21
	輕鏈 CDR 序列					
	抗體名稱	SEQ ID No	LCDR2	SEQ ID No	LCDR3	SEQ ID No
	Kabat 編號位置		L50-L56		L89-L97	
ADI-26818	QASQDISNYLN	22	DASNLET	23	QQLYNLIT	24
ADI-31798	QASQDISNYLN	22	DASNLET	23	QQLYNLIT	24
共有序列	QASQDIX ₁ NYLN (其中 X ₁ 選自任意胺基酸，較佳地 S 或 T 或其保守取代殘基)	31				

ADI-26822	QASQDISNYLN	22	DASNLET		23	QQFANHPPLT		25	
ADI-31815	QASQDISNYLN	22	DASNLET		23	QQVYNHPPLT		26	
共有序列	QASQDIX ₁ NYLN (其中 X ₁ 選自任意胺基酸，較佳地 S 或 T 或其保守取代殘基)	31				QQX ₁ X ₂ NHPPLT (其中 X ₁ 選自任意胺基酸，較佳地 F 或 V 或其保守取代殘基，X ₂ 選自任意胺基酸，較佳地 A 或 Y 或其保守取代殘基)		30	
ADI-26836	QASQDITNYLN	27	DASNLET		23	QQDDFFPFT		28	
ADI-31836	QASQDITNYLN	27	DASNLET		23	QQTDFFPFT		29	
共有序列	QASQDIX ₁ NYLN (其中 X ₁ 選自任意胺基酸，較佳地 S 或 T 或其保守取代殘基)	31				QQX ₁ DDFFPFT (其中 X ₁ 選自任意胺基酸，較佳地 D 或 T 或其保守取代殘基)		32	

【0193】 [表 3]

表 3：本發明示例性抗體 VH 序列和 VL 序列

抗體名稱	ADI-26818	SEQ ID NO：
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGVINPSGGSTSYA QKFQGRVTIMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAREETTPG YFDYWGQGT LVTVSS	33
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSG SGGTDFTFTISSLPEDIA TYCQQLYNLITFGGGTKVEIK	39
抗體名稱	ADI-31798	
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFERSAYMHWVRQAPGQGLEWMGVINPSGGSTTYA QKFQGRVTIMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAREELTPG YFDYWGQGT LVTVSS	34
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSG SGGTDFTFTISSLPEDIA TYCQQLYNLITFGGGTKVEIK	39
抗體名稱	ADI-26822	
VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGSIYSGSTYYNP SL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCAREGLWSLSDVWGQGTMTVTVSS	35
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSG SGGTDFTFTISSLPEDIA TYCQQFANHPP LTFGGG TKVEIK	40

抗體名稱	ADI-31815	
VH	QLQLQESGPGLVKPSLTLCTVSGGSISSDYWGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNP PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREGLWSLSLDVWGRGTMVTVSS	36
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYYCQQQVYNHPPLTFGGGTKVEIK	41
抗體名稱	ADI-26836	
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWSAYN GNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARETFGGEHYYYGMDVW GQGTTVTVSS	37
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNLYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN LETGVP SRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYYCQQDDFFPFTFGGGTKVEIK	42
抗體名稱	ADI-31836	
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTEYAISWVRQAPGQGLEWMGWIHSY N GNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARETFGGEHYMIGMDVW GQGTTVTVSS	38
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNLYLNWYQQRPGKAPKLLIYDASN LETGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIAITYYCQQTDFFPFTFGGGTKVEIK	43

【0194】 [表 4]

表 4：示例性的重鏈恆定區和輕鏈恆定區序列

重鏈恆定區(IgG4_PAA)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTYLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLS
LGX (SEQ ID NO : 68)	
其中，X 是賴氨酸或缺失	
輕鏈恆定區(κ 輕鏈)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO : 69)

表 5：本發明涉及的各抗體相關序列的 SEQ ID NO：編號

抗體名稱	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	VH	VH DNA	HC	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VL	VL DNA	LC
ADI-26818	1	2	3	33	57	44	22	23	24	39	63	50
ADI-31798	4	5	6	34	58	45	22	23	24	39	63	50
共有序列	16	17	18				31					
ADI-26822	7	8	9	35	59	46	22	23	25	40	64	51
ADI-31815	7	8	9	36	60	47	22	23	26	41	65	52
共有序列							31		30			
ADI-26836	10	11	12	37	61	48	27	23	28	42	66	53
ADI-31836	13	14	15	38	62	49	27	23	29	43	67	54
共有序列	19	20	21				31		32			
參考 25F7						55						56

注：HC 藉由將 VH 序列融合至 SEQ ID NO：68 的 IgG4_PAA 部分形成；LC 藉由將 VL 序列融合至 SEQ ID NO：69 的 Cκ 鍵形成。

【0195】 [表 5]

【0196】 本發明下面實施例涉及 6 個示例性抗體(ADI-26818，ADI-26822，ADI-26836，ADI-31798，ADI-31815 及 ADI-31836)，這些抗體的 CDR 區、輕鏈可變區和重鏈可變區、輕鏈和重鏈的胺基酸序列，以及對應的核苷酸序列在本申請的表 1-3 和序列表中列出。另外，上述本發明示例抗體的輕鏈恆定區、重鏈恆定區、輕鏈可變區和重鏈可變區的序列編號如表 5 所示。

實施例

實施例 1. 抗人 LAG-3 的抗體篩選確定母抗體

酵母展示技術篩選抗 LAG-3 全人源抗體

【0197】 基於酵母的抗體展示(yeast-based antibody presentation)文庫(Adimab)，按照現有的方法(WO2009036379；WO2010105256；WO2012009568)進行擴增，其中每個庫的多樣性達到 1×10^9 。簡言之，前兩輪的篩選使用 Miltenyi 公司的 MACS 系統進行磁性激活細胞分選。首先，將文庫的酵母細胞($\sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/文庫)分別在 FACS 洗滌緩衝液中(磷酸鹽緩衝液，含有 0.1%牛血清蛋白)室溫孵化 15 分鐘，緩衝液中含有 100 nM 生物素標記的人 LAG-3 抗原(Acro Biosystems，目錄號 LA3-H5255-1mg)。使用 50 ml 預冷的 FACS 洗滌緩衝液洗一次，再用 40 ml 相同洗滌緩衝液重懸細胞，並加入 500 μ l 鏈黴親和素微珠(Miltenyi LS)於 4 °C 孵化 15 分鐘。1000 rpm 離心 5 min 棄去上清後用 5 ml FACS 洗滌緩衝液重懸細胞，將細胞溶液加到 Miltenyi LS 管柱中。加樣完成後，用 FACS 洗滌緩衝液洗管柱 3 次，每次 3 ml。從磁性區域取下 Miltenyi LS

管柱，用 5 ml 生長培養基洗脫，收集洗脫的酵母細胞並在 37°C 過夜生長。

【0198】 使用流式細胞儀進行下一輪的分選：將經過 MACS 系統篩選獲得的大約 1×10^8 的酵母細胞用 FACS 緩衝液洗三次，於含有低濃度生物素（100-1 nM）標記的人 LAG-3 抗原中室溫下培養。棄去培養液，細胞用 FACS 洗滌緩衝液洗兩次之後，將細胞與 LC-FITC（FITC 標記的抗人免疫球蛋白 kappa 輕鏈抗體，Southern Biotech）（1：100 稀釋）混合，並與 SA-633（鏈黴親和素-633, Molecular Probes）（1：500 稀釋）或 SA-PE（鏈黴親和素-PE, Sigma）（1：50 稀釋）試劑混合，4°C 下培養 15 分鐘。用預冷的 FACS 洗滌緩衝液洗脫兩次，並重懸於 0.4 ml 緩衝液中，將細胞轉移到帶濾器的分離管中。使用 FACS ARIA（BD Biosciences）分選細胞。

【0199】 將藉由篩選獲得的表達抗人 LAG-3 抗體的酵母細胞在 30°C 下震盪誘導 48 小時以表達抗人 LAG-3 的抗體。誘導結束之後，1300 rpm 離心 10 min 去除酵母細胞，收獲上清液。使用 Protein A 對上清液中的抗人 LAG-3 抗體進行純化，pH2.0 醋酸溶液洗脫，收獲抗人 LAG-3 抗體，抗體純度 > 95%。

【0200】 經篩選獲得抗體 ADI-26818、ADI-26822 及 ADI-26836。

實施例 2 抗人 LAG-3 抗體的親和力優化

【0201】 為了獲得更高親和力的抗人 LAG-3 抗體，我們藉由以下方法對抗體 ADI-26818、ADI-26822 及 ADI-26836 進行了優化。

VHmut 篩選

【0202】該方法是藉由常規的錯配 PCR 的方法向抗體重鏈區域引入突變。PCR 過程中，藉由使用 1uM 高突變的鹼基類似物 dPTP 和 8-oxo-dGTP，從而將鹼基錯配概率提高至約 0.01 bp。

【0203】獲得的錯配 PCR 的產物藉由同源重組的方法構建入含有重鏈恆定區的載體中。藉由這種方法，在包括 LAG-3 抗原滴度、未標記抗原競爭以及使用母抗體競爭的篩選壓力下，我們獲得了庫容量為 1×10^7 的次級庫。藉由 FACS 方法進行了 3 輪成功篩選。

CDRH1/CDRH2 篩選

【0204】把 VHmut 方法獲得的子代抗體的 CDRH3 基因構建入 1×10^8 多樣性的 CDRH1/CDRH2 基因庫中，並對其進行了 3 輪篩選。第一輪使用 MACS 方法，而第二、三輪使用 FACS 方法，對抗體抗原結合物進行親和力加壓，篩選出最高親和力的抗體。

【0205】經過以上親和力成熟過程，我們獲得了親和力提高的抗人 LAG-3 單株抗體 ADI-31798、ADI-31815 和 ADI-31836。

實施例 3. HEK293 細胞中的表達和純化

【0206】根據本領域常規方法，從表達上述抗人 LAG-3 抗體的酵母細胞獲得編碼抗 LAG-3 抗體的基因 DNA，並根據常規方法將該基因 DNA 選殖到新的表達載體（pTT5）。

【0207】將含有目標抗體基因的上述表達載體與轉染試劑 PEI(Polysciences)按照生產產商提供的方案瞬時轉染培養的人腎胚細胞 293 細胞（Invitrogen）。轉染後，棄去培養基並用新鮮的培養基把細胞稀釋到 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 。在 37°C ，5% CO_2 的條件下培養細胞 7 天，每 48 小時流

加新鮮培養基。7 天後，1300rpm 離心 20min。取上清液，用 Protein A 純化上清液，使抗體的純度>95%。獲得具有 IgG4-PAA Fc 部分(SEQ ID No：68)的 IgG4 抗體。

【0208】 在 HEK293 細胞中表達並且純化實施例中使用的下述參考抗體：

參考抗體
25F7

【0209】 25F7 是在 HEK293 細胞中瞬時表達的人 LAG-3 抗體，其序列與美國專利 US20170137514A1 中的抗體“25F7”的序列相同。具有 IgG4-PAA Fc 部分(SEQ ID No：68)的 25F7 抗體的全長重鏈和輕鏈如 SEQ ID No：55 和 SEQ ID NO：56 所示。

實施例 4：本發明抗 LAG-3 抗體的親和力測定

【0210】 採用生物光干涉測量（ForteBio）測定法測定本發明上述 6 個示例抗體結合人 LAG-3（hLAG-3）的平衡解離常數（K_D）。

【0211】 ForteBio 親和力測定按照現有的方法（Estep, P 等人，High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2)： p. 270-8）進行。簡言之，傳感器在分析緩衝液中線下平衡 30 分鐘，然後線上檢測 60 秒建立基線，在線加載如上所述獲得的經純化的抗體至 AHQ 傳感器(ForteBio)上進行 ForteBio 親和測量。再將具有加載的抗體的傳感器暴露於 100 nM 的 LAG-3 抗原中作用 5 分鐘，之後將傳感器轉移至分析緩衝液解離 5 分鐘用於解離速率測量。使用 1：1 結合模型進行動力學的分析。

【0212】 在如以上測定法所述進行的實驗中，ADI-26818、ADI-26822、ADI-26836、ADI-31798、ADI-31815、ADI-31836 以及參考抗體 25F7 親和力如表 6 所示。

【0213】 表 6：藉由生物光干涉測量本發明抗體的結合動力學

抗體	抗體在 AHQ 尖端上， 人 LAG-3-His 在溶液中(100 nM) [單價的親 和力，平衡解離常數 K _D (M)]	結合常數 (M ⁻¹ S ⁻¹)	解離常數 (S ⁻¹)
ADI-26818	2.54E-09	4.45E+05	1.13E-03
ADI-26822	1.71E-08	3.24E+05	5.53E-03
ADI-26836	1.28E-08	2.54E+05	3.24E-03
ADI-31798	9.73E-10	5.05E+05	4.91E-04
ADI-31815	1.30E-09	3.99E+05	5.18E-04
ADI-31836	5.07E-10	3.13E+05	1.59E-04
25F7	9.02E-09	1.12E+05	1.01E-03

【0214】 可見，本發明上述 6 個示例抗體均顯示極高的親和力，其中 ADI-31798、ADI-31815 及 ADI-31836 具有比 25F7 更高的親和力。

實施例 5：本發明抗 LAG-3 抗體與人 LAG-3 的結合

【0215】 在基於流式細胞術的測定法中測量本發明的上述 6 個示例抗體與人 LAG-3 的結合。

【0216】藉由轉染攜帶純株至多選殖位點 MCS 的人 LAG-3 cDNA (Sino Biological) 的 pCHO1.0 載體 (Invitrogen)，產生過表達人 LAG-3 的 293 細胞 (293-hLAG-3 細胞)。

【0217】將 293-hLAG-3 細胞 (0.2×10^6 個細胞) 與不同濃度的實驗抗體 (ADI-26818、ADI-26822、ADI-26836、ADI-31798、ADI-31815、ADI-31836 及參考抗體 25F7) 混合 (抗體稀釋方法為：最高抗體濃度為 500 nM，三倍稀釋在含 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 中，總共測試了 8 個濃度)。冰上孵育 30 分鐘。然後將細胞洗滌至少兩次，加入 1:100 稀釋的二抗 (PE 標記的羊抗人 IgG 抗體，SouthernBiotech，終濃度為 5 μ g/ml)，冰上 (避光) 孵育 30 分鐘。將細胞洗滌至少兩次並藉由流式細胞術進行分析。在 Accuri C6 系統 (BD Biosciences) 上進行流式細胞術檢測，並根據其 MFI 擬合濃度依賴的曲線。

【0218】ADI-26818、ADI-26822 和 ADI-26836 結合 HEK293 細胞上過表達的 hLAG-3，EC50 值分別為 1.181 nM、1.500 nM 和 1.437 nM，與參考抗體 25F7 與 HEK293 細胞上過表達的 hLAG-3 的結合能力相當 (參考抗體 25F7 的 EC50 值為 3.339 nM) (參見第 1 圖)。

【0219】在如以上測試法所述進行的實驗中，親和力優化的抗 hLAG-3 抗體 ADI-31798、ADI-31815 及 ADI-31836 結合 HEK293 細胞上過表達的 hLAG-3，EC50 值分別為 0.201 nM、1.293 nM 和 0.562 nM，優於參考抗體 25F7 與 HEK293 細胞上過表達的 hLAG-3 的結合能力 (EC50 值 3.339 nM)。(參見第 2 圖)

實施例 6. 本發明抗 LAG-3 抗體對人 LAG-3 配體 MHCII 與 LAG-3 相互作用的阻斷

【0220】藉由流式細胞術測量 ADI-31798、ADI-31815 及 ADI-31836

阻斷人 LAG-3 與細胞表面的 MHCII (HLA) 結合的能力。

【0221】藉由轉染攜帶純株至 MCS 的人 HLA-DR(Sino Biological) 的 pCHO1.0 載體 (Invitrogen)，產生過表達人 HLA-DR 的 CHO 細胞 (CHO-DR 細胞)。

【0222】將抗原 rhLAG3 蛋白 (huFc) (Sino Biological) 稀釋至 40 nM，50 μ l/孔。加入不同濃度的抗體 (ADI-31798、ADI-31815 及 ADI-31836 和參考抗體 25F7，從最高濃度 80 nM 開始進行 3 倍梯度稀釋，共 8 個稀釋梯度)，50 μ l/孔，於 PBS 冰上孵育 30 min，抗原終濃度 20 nM，抗體最高終濃度 40 nM。將 CHO-DR 細胞調節至 3×10^5 cell/孔，100 μ l/孔。細胞於 300 g 離心 5 min，棄上清，重懸於抗原抗體混合液。冰上孵育 30 min，加 PBS 100 μ l/孔，300 g 離心 5 min，PBS 清洗 1 次，加 1:100 稀釋的 100 μ l 山羊抗人 IgG-PE (Southern Biotech) /孔，冰浴 20 min，加 PBS 100 μ l/孔，300 g 離心 5 min，PBS 清洗 1 次。用 100 μ l PBS 重懸，細胞流式儀檢測細胞螢光信號值。

【0223】實驗結果表明，ADI-31798、ADI-31815 及 ADI-31836 均可以有效阻斷 LAG-3 和其配體 MHCII (HLA-DR) 的結合，其阻斷能力和參考抗體 25F7 相當。具體而言，ADI-31798、ADI-31815 及 ADI-31836 阻斷人 LAG-3 與 MHCII (HLA-DR) 的結合的能力的 IC₅₀ 分別為 4.701 nM、3.575 nM 及 6.657 nM。參考抗體 25F7 阻斷人 LAG-3 與 MHCII (HLA-DR) 的結合的能力的 IC₅₀ 為 5.141 nM。(參見第 3 圖)

實施例 7. 抗體與激活的 T 細胞結合實驗

【0224】人 CD4⁺ T 細胞被激活後其表面會表達 LAG-3 蛋白，本研

究藉由流式細胞術測量 ADI-31798、ADI-31815、ADI-31836 和激活的人 CD4⁺ T 細胞的結合能力。

【0225】 按照磁珠/CD4⁺ T 細胞=1：1 的比例向 CD4⁺ T 細胞中加入抗 CD3/CD28 磁珠（Gibco）刺激 3 天，調節細胞密度至 1×10^6 個/ml，分裝第一孔 150 μ l/孔，其他孔 100 μ l/孔，第一列孔加抗體，終濃度 10 nM，混勻，吸取 50 μ l 入下一列孔，以此類推。每個樣品做 3 個複孔。冰浴 30 min，400 g 離心 5 min，PBS 清洗 2 次，添加 1：100 稀釋的 PE-抗人 Fc 抗體 50 μ l，冰浴 30 min，400 g 離心 5 min，PBS 清洗 2 次，用 60 μ l PBS 重懸，藉由流式細胞術進行分析。在 Accuri C6 系統（BD Biosciences）上進行流式細胞術，並根據其 MFI 擬合濃度依賴的曲線。

【0226】 實驗結果表明，ADI-31798、ADI-31815 及 ADI-31836 能和激活的人 CD4⁺T 細胞結合，EC50 值分別為 0.00595 nM、0.0128 nM 和 0.0127 nM，結合能力優於參考抗體 25F7（參考抗體的 EC50 值為 0.0356 nM）（參見第 4 圖）。

實施例 8. 本發明抗 LAG-3 抗體的抗腫瘤活性

【0227】 本研究採用 A375（ATCC）人的惡性黑素瘤皮膚癌細胞在 NOG 小鼠上測定抗 LAG-3 抗體的抗腫瘤作用。預先靜脈注射人的 PBMC（AllCells），然後採用皮下接種的方式建立 A375 荷瘤小鼠模型，成瘤後分組，給予不同抗體的治療，監測給藥期間各組小鼠腫瘤體積和體重變化，給藥頻率為 2 次/週，給藥 2 週，共給藥 5 次。監測頻率均為 2 次/週，連續監測 4 週，給藥劑量和方式如下所述。給藥結束後計算相對腫瘤抑制率（TGI%），計算公式如下：TGI%=100% * (h-IgG 對照組腫瘤體積-治療

組腫瘤體積)/(h-IgG 對照組腫瘤體積-h-IgG 對照組給藥前腫瘤體積)，其中 h-IgG 對照組給藥前腫瘤體積平均值為 71 mm³。

【0228】 小鼠：NOG 小鼠，雌性，7-8 週（腫瘤細胞接種時的小鼠週齡），體重 17.6-24.2g，購自北京維通利華實驗動物技術有限公司。小鼠在到達後馴化 7 天，隨後開始研究。

【0229】 細胞：人的皮膚癌細胞 A375(ATCC# CRL-1619)購自 ATCC，並嚴格按照 ATCC 要求進行常規傳代培養用於後續體內實驗。離心收集細胞，在無菌 PBS 中重懸細胞並調整細胞密度為 30×10⁶ 個/ml。NOG 小鼠已經靜脈注射了人的 PBMC 後，右側背部剃毛，皮下注射 A375 細胞 0.2 ml/只。腫瘤細胞接種 7 天後檢測各隻小鼠瘤體積，挑選出瘤平均體積在 70-71 mm³ 範圍內的小鼠按瘤體積隨機分組。按如下給藥方式，檢測抗 LAG-3 抗體單獨使用或與抗 PD-1 抗體聯合使用的抗腫瘤活性。

【0230】 給藥：將小鼠分為四組(每組 6 隻小鼠)，每組分別皮下注射如下劑量的抗體：

- (1) 人 IgG，20mg/kg；
- (2) 抗 PD-1 抗體(Antibody D，PCT/CN2016/094122), 10mg/kg；
- (3) LAG-3(ADI-31798), 10mg/kg；
- (4) LAG-3(ADI-31798), 10mg/kg+抗 PD-1 抗體(Antibody D), 10 mg/kg。

【0231】 抗 PD-1 抗體“Antibody D”為 PCT/CN2016/094122 中公開發的抗人抗 PD-1 抗體。人 IgG 為獲自 Equitech-Bio 的人 IgG 製備物。

【0232】 在腫瘤細胞接種後的第 7 天、第 10 天、第 14 天、第 17 天和第 21 天，分別用如上四組抗體為每組小鼠按如上劑量給藥。

【0233】 分析：在整個研究期間每週測量兩次腫瘤和體重，當腫瘤達到端點時(腫瘤體積>3000 mm³)或當小鼠具有> 20%體重減輕時，使小鼠安樂死。採用遊標卡尺測定腫瘤的最大長軸(L)和最大寬軸(W)，腫瘤體積按如下公式計算： $V=L\times W^2/2$ 。將來自每組的小鼠的腫瘤尺寸與時間作圖。使用方差分析 (ANOVA) 來確定統計顯著性。<0.05 的 P 值被視為在所有分析中具有統計顯著性。

【0234】 實驗結果見表 7 和第 5 圖，可見本申請的抗 LAG-3 單株抗體 ADI-31798 和抗 PD-1 單株抗體“Antibody D”聯合使用時與 IgG 對照 (equitech-Bio)及這兩個抗體分別使用相比，能顯著抑制腫瘤的生長。

【0235】 表 7. 第 24 天腫瘤抑制率

組別	腫瘤體積	腫瘤抑制率 (%)	腫瘤完全消失數目
h-IgG	817.00±717.59	-	0/6
Antibody D	451.38±567.23	52.48	1/6
ADI-31798	287.59±372.30	72.97	1/6
ADI-31798+Antibody D	60.18±109.05	101.41	4/6

【符號說明】

無。

【序列表】

<110> 信達生物製藥(蘇州)有限公司

<120> 全人源的抗LAG-3抗體及其應用

<130> CN 201810629554.6

<160> 79

<170> PatentIn版本3.3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 1

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 2

Val Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 3

Ala Arg Glu Glu Thr Thr Trp Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 4

Tyr Thr Phe Arg Ser Ala Tyr Met His
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 5

Val Ile Val Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 6

Ala Arg Glu Glu Leu Thr Trp Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 7

Gly Ser Ile Ser Ser Ser Asp Tyr Tyr Trp Gly
1 5 10

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 8

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 9

Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ser Leu Ser Leu Asp Val
1 5 10

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 10

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 11

Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 12

Ala Arg Glu Thr Phe Gly Gly Glu His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 13

Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 14

Trp Ile His Ser Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 15

Ala Arg Glu Thr Phe Gly Gly Glu His Tyr Met Ile Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共有序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)

<223> Xaa 可以是任何天然氨基酸

<400> 16

Tyr Thr Phe Xaa Ser Xaa Tyr Met His
1 5

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共有序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa 可以是任何天然氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa 可以是任何天然氨基酸

<400> 17

Val Ile Xaa Pro Ser Gly Gly Ser Thr Xaa Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共有序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa 可以是任何天然氨基酸

<400> 18

Ala Arg Glu Glu Xaa Thr Trp Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 共有序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 19

Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr Xaa Ile Ser
1 5

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共有序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 20

Trp Ile Xaa Xaa Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共有序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 21

Ala Arg Glu Thr Phe Gly Gly Glu His Tyr Xaa Xaa Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 22

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 23

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 24

Gln Gln Leu Tyr Asn Leu Ile Thr
1 5

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 25

Gln Gln Phe Ala Asn His Pro Pro Leu Thr
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 26

Gln Gln Val Tyr Asn His Pro Pro Leu Thr
1 5 10

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 27

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 28

Gln Gln Asp Asp Phe Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 29

Gln Gln Thr Asp Phe Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共有序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> Xaa 可以是任何天然氨基酸

<400> 30

Gln Gln Xaa Xaa Asn His Pro Pro Leu Thr
1 5 10

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共有序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 31

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Xaa Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 共有序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa 可以是任何天然胺基酸

<400> 32

Gln Gln Xaa Asp Phe Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 33
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

100

Ala Arg Glu Glu Leu Thr Trp Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 35

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ser Leu Ser Leu Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 36

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

				20					25					30			
Asp	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu		
		35					40					45					
Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser		
	50					55					60						
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe		
65					70					75					80		
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr		
				85					90					95			
Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Leu	Trp	Ser	Leu	Ser	Leu	Asp	Val	Trp	Gly	Arg		
			100					105						110			
Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115					120										

<210> 37
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 37

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala		
1				5					10					15			
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr		
			20					25						30			
Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met		
		35					40					45					
Gly	Trp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Asn	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Leu		
	50					55					60						
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65					70					75					80		
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			

Ala Arg Glu Thr Phe Gly Gly Glu His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile His Ser Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Thr Phe Gly Gly Glu His Tyr Met Ile Gly Met Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840. 84

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly |
| 1 | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | 15 | |
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Gln | Ala | Ser | Gln | Asp | Ile | Ser | Asn | Tyr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Leu | Asn | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Tyr | Asp | Ala | Ser | Asn | Leu | Glu | Thr | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Phe | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Glu | Asp | Ile | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Phe | Ala | Asn | His | Pro | Pro |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 41
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 41

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Asn His Pro Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asp Phe Phe Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asp Phe Phe Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 44
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成序列

<400> 44

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Glu Thr Thr Trp Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 45
<211> 446
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 45

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Ser Ala
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile Val Pro Ser Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Glu Leu Thr Trp Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

<210> 46

<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 46

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ser Leu Ser Leu Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 47
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 47

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gly Leu Trp Ser Leu Ser Leu Asp Val Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440 445

<210> 48
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 48

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Val | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Ser | Tyr | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| Gly | Ile | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Met | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| Gly | Trp | Ile | Ser | Ala | Tyr | Asn | Gly | Asn | Thr | Asn | Tyr | Ala | Gln | Lys | Leu | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| Gln | Gly | Arg | Val | Thr | Met | Thr | Thr | Asp | Thr | Ser | Thr | Ser | Thr | Ala | Tyr | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| Met | Glu | Leu | Arg | Ser | Leu | Arg | Ser | Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| Ala | Arg | Glu | Thr | Phe | Gly | Gly | Glu | His | Tyr | Tyr | Tyr | Gly | Met | Asp | Val | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr | Ser | Glu | Ser | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Lys | Thr | Tyr | Thr | Cys | Asn | Val | |

| 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val | Glu | Ser | Lys |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | Gln | Glu |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | | 270 | |
| Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | | 285 | | |
| Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | | 300 | | | |
| Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys |
| 305 | | | | | 310 | | | | | | 315 | | | | 320 |
| Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Gly | Leu | Pro | Ser | Ser | Ile | Glu |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | | 350 | |
| Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Gln | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | | 365 | | |
| Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | | 380 | | | |
| Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Arg | Leu | Thr | Val | Asp |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Glu | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | | 430 | |
| Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Leu |

435440445

Gly Lys450

<210> 49<211> 449<212> PRT<213> 人工序列<220><223> 合成序列<400> 49

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala15105

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr202530

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met354045

Gly Trp Ile His Ser Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu505560

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr65707580

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys859095

Ala Arg Glu Thr Phe Gly Gly Glu His Tyr Met Ile Gly Met Asp Val100105110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly115120125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser130135140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val145150155160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe165170175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly

<210> 50
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Asn Leu Ile Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 52
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Asn His Pro Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

100

105

110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115120125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130135140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145150155160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165170175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180185190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

195200205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210215

<210> 53
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 53

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

151015

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asn Tyr

202530

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

354045

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

505560

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65707580

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asp Phe Phe Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 54
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 54

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

505560

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65707580

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asp Phe Phe Pro Phe
859095

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100105110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115120125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130135140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145150155160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165170175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180185190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195200205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 55
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 55

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
151015

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
202530

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

- <210> 56
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成序列

<400> 56

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

- <210> 57
- <211> 360
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成序列

<400> 57
caggtgcaac tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggagccag cgtgaaggtg 60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc tctactaca tgcactgggt gaggcaggct 120
cccggaacagg gactggagtg gatgggctg atcaacccta gcggcggcag caccagctac 180
gcccagaagt tccagggcag ggtgaccatg accagggaca cctccaccag caccgtgtac 240
atggagctgt ccagcctgag gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagagaggag 300
accacctggc ccggctactt cgactactgg ggccagggca ccctggtgac agtgagcagc 360

<210> 58
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 58
caggtgcagc tgggtgcagtc aggagcagaa gtgaagaagc ccggagccag cgtgaaagtg 60
tcttgcaagg ccagcggcta caccttcagg agcgcctata tgcatagggt ccggcaggct 120
ccaggacagg gactggagtg gatgggagtg atcgtgccta gcggaggcag cacaacctac 180
gcccagaagt tccagggcag agtgaccatg accagagaca ccagcaccag caccgtgtac 240
atggagctga gcagcctgag gagcgaggat accgccgtgt actattgcgc cagggaggaa 300
ctgacttggc ccggctactt cgactattgg ggccagggca ccctggtgac agtgagcagc 360

<210> 59
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 59
cagctgcagc tgcaggagag cggacctggc ctggtgaagc ccagcgagac cctgagcctg 60
acctgtaccg tgagcggcgg cagcatcagc agcagcgact actactgggg ctggatcagg 120
cagcctcctg gcaagggcct ggagtggatc ggcagcatct actacagcgg cagcacctac 180
tacaacccca gcctgaagag cagggtgacc atcagcgtgg acaccagcaa gaaccagttc 240
agcctgaagc tgagctccgt gaccgctgcc gataccgccg tgtactattg cgccagagag 300
ggcctgtgga gcctgagcct ggatgtgtgg ggccagggca ccatggtgac agtgagcagc 360

<210> 60
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 60
cagctgcagc tgcaggaaag cggaccagga ctggtgaaac ctagcgagac cctgagcctg 60

acctgtacag tgtccggagg cagcatcagc agcagcgact actattgggg ttggatccgg 120

cagccaccag gaaagggcct ggagtggatt ggcagcatct actacagcgg cagcacctac 180

tacaacccca gcctgaagag ccgcgtgaca atcagcgtgg acaccagcaa gaaccagttc 240

agcctgaagc tgtcttcagt gacagccgcc gacacagccg tgtactattg cgctcgggag 300

ggtctctggt ctctgtctct cgacgtctgg ggaagaggaa ccatggtgac agtgagcagc 360

<210> 61
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 61
caggtgcagc tggtgcagag cggagccgag gtgaagaagc ctggcgccag cgtgaagggtg 60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc tcctacggca tcagctgggt gagacaggcc 120

cctggacagg gactggagtg gatgggctgg atcagcgcct acaacggcaa caccaactac 180

gcccagaagc tgcagggcag ggtgaccatg accaccgaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggagctga ggagcctgag gagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagagacc 300

ttcggcggcg agcactacta ctacggcatg gacgtgtggg gccagggcac caccgtgaca 360

gtgagcagc 369

<210> 62
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 62
caggtgcagc tggtgcagtc aggagcagaa gtgaagaagc ccggagccag cgtgaaagtg 60

tcttgcaagg ccagcggcta caccttcacc gaatacgcca tctcttgggt ccggcaggca 120

ccaggacagg gactggagtg gatgggttgg atccacagct acaacggcaa caccaactac 180

gcccagaagc tgcagggcag agtgacaatg accaccgaca ccagcaccag cacagcctat 240

atggagctgc ggagcctgag aagcgacgat accgccgtgt actattgcgc cagggagaca 300

ttcggcggcg agcactacat gatcggcatg gacgtctggg gacagggtac aacagtgaca 360

gtgagcagc 369

<210> 63
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 63
gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga tagggtgacc 60

atcacctgcc aggccagcca ggacatcagc aactacctga actggtacca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagcaacc tggagaccgg cgtgcctagc 180

agatttagcg gcagcggcag cggcacagac ttcaccttca ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag ctgtacaacc tgatcacctt tggcggcggc 300

accaaggtgg agatcaag 318

<210> 64
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 64
gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga tagggtgacc 60

atcacctgcc aggccagcca ggacatcagc aactacctga actggtacca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagcaacc tggagaccgg cgtgcctagc 180

agatttagcg gcagcggcag cggcacagac ttcaccttca ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag ttgcccaacc acctcccct gacctttggc 300

ggcggcacca aggtggagat caag 324

<210> 65
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 65
gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcta gcgtgggaga tagagtgacc 60

atcacttgcc aggccagcca ggacatcagc aactacctga attggtacca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gcctctaata tggagaccgg cgtgcctagc 180

agattcagcg gaagcggcag cggcacagat ttcaccttca ccatcagcag cctgcagcca 240

gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag gtgtacaacc acctcctct gaccttcggc 300

ggaggcacaa aggtggagat caag 324

<210> 66
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 66
gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcta gcgtgggcga cagagtgacc 60
atcacctgcc aggccagcca ggacatcacc aactacctga actggtacca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagcaacc tggagacagg cgtgcccagc 180
agatttagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccttca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag gacgacttct tcccccttac cttcggcggc 300
ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 67
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 67
gacatccaga tgacccagag ccctagcagc ctgagcgcta gcgtgggaga tagagtgacc 60
atcaacttgcc aggccagcca ggacatcacc aactacctga attggtacca gcagaggcca 120
ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgac gccagcaatc tggagaccgg agtgcctagc 180
agattcagcg gcagcgggaag cggcacagat ttcacctga ccatcagcag cctgcagcca 240
gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag accgacttct tcccccttac cttcggcgga 300
ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 68
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (327)..(327)
<223> Xaa 可以是任何天然氨基酸

<400> 68

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
325

<210> 69
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 69

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 70

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His
1 5 10

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 71

Glu Glu Thr Thr Trp Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 72

Gly Tyr Thr Phe Arg Ser Ala Tyr Met His
1 5 10

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 73

Glu Glu Leu Thr Trp Pro Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 74
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 74

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser Asp Tyr Tyr Trp Gly
1 5 10

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 75

Glu Gly Leu Trp Ser Leu Ser Leu Asp Val
1 5 10

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 76

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 77
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 77

Glu Thr Phe Gly Gly Glu His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 78

Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ala Ile Ser
1 5 10

<210> 79
<211> 14

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列

<400> 79

Glu Thr Phe Gly Gly Glu His Tyr Met Ile Gly Met Asp Val
1 5 10

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種特異性結合人 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其包含

(i) 如 SEQ ID NO : 33 或 34 所示的重鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列，以及如 SEQ ID NO : 39 所示的輕鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列，或者

(ii) 如 SEQ ID NO : 35 或 36 所示的重鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列，以及如 SEQ ID NO : 40 或 41 所示的輕鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列；或者

(iii) 如 SEQ ID NO : 37 或 38 所示的重鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列，以及如 SEQ ID NO : 42 或 43 所示的輕鏈可變區的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列。

【第2項】 一種特異性結合人 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其包含

(a) SEQ ID NO : 1 或 4 或 16 的 HCDR1 序列，SEQ ID NO : 2 或 5 或 17 的 HCDR2 序列，SEQ ID NO : 3 或 6 或 18 的 HCDR3 序列，SEQ ID NO : 22 或 31 的 LCDR1 序列，SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列，和 SEQ ID NO : 24 的 LCDR3 序列；或

(b) SEQ ID NO : 7 的 HCDR1 序列，SEQ ID NO : 8 的 HCDR2 序列，SEQ ID NO : 9 的 HCDR3 序列，SEQ ID NO : 22 或 31 的 LCDR1 序列，SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列，和 SEQ ID NO : 25 或 26 或 30 的 LCDR3 序列；或

(c) SEQ ID NO : 10 或 13 或 19 的 HCDR1 序列，SEQ ID NO : 11 或 14 或 20 的 HCDR2 序列，SEQ ID NO : 12 或 15 或 21 的 HCDR3 序列，SEQ ID NO : 27 或 31 的 LCDR1 序列，SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列，和 SEQ ID NO : 28 或 29 或 32 的 LCDR3 序列；或

(d) SEQ ID NO : 70 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO : 2 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO : 71 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO : 22 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO : 24 的 LCDR3 序列；或

(e) SEQ ID NO : 72 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO : 5 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO : 73 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO : 22 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO : 24 的 LCDR3 序列；或

(f) SEQ ID NO : 74 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO : 8 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO : 75 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO : 22 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO : 25 的 LCDR3 序列；或

(g) SEQ ID NO : 74 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO : 8 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO : 75 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO : 22 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO : 26 的 LCDR3 序列；或

(h) SEQ ID NO : 76 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO : 11 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO : 77 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO : 27 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO : 28 的 LCDR3 序列；或

(i) SEQ ID NO : 78 的 HCDR1 序列；SEQ ID NO : 14 的 HCDR2 序列；SEQ ID NO : 79 的 HCDR3 序列；SEQ ID NO : 27 的 LCDR1 序列；SEQ ID NO : 23 的 LCDR2 序列；SEQ ID NO : 29 的 LCDR3 序列。

【第3項】 一種特異性結合人 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該抗體包含：

(i) 選自以下的 CDR 序列組合；

- 來自 SEQ ID NO：33 的重鏈可變區的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列，和來自 SEQ ID NO：39 的輕鏈可變區的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列；

- 來自 SEQ ID NO：34 的重鏈可變區的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列，和來自 SEQ ID NO：39 的輕鏈可變區的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列；

- 來自 SEQ ID NO：35 的重鏈可變區的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列，和來自 SEQ ID NO：40 的輕鏈可變區的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列；

- 來自 SEQ ID NO：36 的重鏈可變區的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列，和來自 SEQ ID NO：41 的輕鏈可變區的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列；

- 來自 SEQ ID NO：37 的重鏈可變區的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列，和來自 SEQ ID NO：42 的輕鏈可變區的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列；或

- 來自 SEQ ID NO：38 的重鏈可變區的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列，和來自 SEQ ID NO：43 的輕鏈可變區的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列；

或

(ii) 相對於(i)的 CDR 序列組合的變體，其中所述變體在 1、2、3、4、5 或較佳地 6 個 CDR 區上共包含至少一個且不超過 15、10 或 5、4、3、2 或 1 個胺基酸改變(較佳胺基酸取代，較佳保守取代)。

【第4項】 一種特異性結合人 LAG-3 的抗體或其抗原結合片段，其包含

(i) 包含與 SEQ ID NO：33 或 34 所示的胺基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的胺基酸序列的重鏈可變區，和/或包含與 SEQ ID NO：39 所示的胺基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的胺基酸序列的輕鏈可變區，或者

(ii) 包含與 SEQ ID NO：35 或 36 所示的胺基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的胺基酸序列的重鏈可變區，和/或包含與 SEQ ID NO：40 或 41 所示的胺基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的胺基酸序列的輕鏈可變區，或者

(iii) 包含與 SEQ ID NO：37 或 38 所示的胺基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的胺基酸序列的重鏈可變區，和/或包含與 SEQ ID NO：42 或 43 所示的胺基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的胺基酸序列的輕鏈可變區。

【第5項】 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項所述的抗體或其抗原結合片段，其中該抗體包含選自以下的重鏈可變區和輕鏈可變區：

(a) 包含 SEQ ID NO：33 的胺基酸序列的 VH，和包含 SEQ ID NO：39 的胺基酸序列的 VL；

(b) 包含 SEQ ID NO：34 的胺基酸序列的 VH，和包含 SEQ ID NO：39 的胺基酸序列的 VL；

(c) 包含 SEQ ID NO：35 的胺基酸序列的 VH，和包含 SEQ ID NO：40 的胺基酸序列的 VL；

(d) 包含 SEQ ID NO：36 的胺基酸序列的 VH，和包含 SEQ ID NO：41 的胺基酸序列的 VL；

(e) 包含 SEQ ID NO : 37 的胺基酸序列的 VH，和包含 SEQ ID NO : 42 的胺基酸序列的 VL；

(f) 包含 SEQ ID NO : 38 的胺基酸序列的 VH，和包含 SEQ ID NO : 43 的胺基酸序列的 VL。

【第6項】 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項所述的抗體或其抗原結合片段，其中該抗體是 IgG1、IgG2、或 IgG4 形式的抗體或其抗原結合片段，較佳具有 S228P、F234A 和 L235A 突變的 IgG4 Fc 區。

【第7項】 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項所述的抗體或其抗原結合片段，其中該抗體是全人源抗體、或人源化抗體、或嵌合抗體。

【第8項】 如申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項所述的抗體或其抗原結合片段，其中該抗原結合片段是選自以下的抗體片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、單鏈抗體例如 scFv、(Fab')₂ 片段、單結構域抗體、雙抗體(dAb) 或線性抗體。

【第9項】 一種抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段，其中該抗體具有以下一個或多個特性：

- (i) 抑制(例如，競爭性抑制)表 3 所列的任一抗體與人 LAG-3 的結合；
- (ii) 與表 3 所示的任一抗體結合相同或重疊的表位；
- (iii) 與表 3 所示的任一抗體競爭結合人 LAG-3。

【第10項】 如申請專利範圍第 1 至 9 項中任一項所述的抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體具有以下一個或多個特性：

- (i) 以高親和力，例如以小於 100nM，例如小於 50nM，例如 0.1-20nM，較佳 0.5-3nM 的 KD 值，與人 LAG-3 結合；
- (ii) 與人 LAG-3 結合的解離常數(K_d)小於 100×10^{-4} ，例如 0.5×10^{-4} 至 50×10^{-4} ，較佳 1×10^{-4} 至 10×10^{-4} ，或 1×10^{-4} 至 $6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ；

(iii) 以高親和力，例如以小於 100nM，例如小於 50nM，例如 0.1-10nM，較佳小於 1nM，更較佳小於 0.5nM 的 EC50 值，與細胞表面表達的人 LAG-3 結合；

(iv) 阻斷人 LAG-3 與細胞表面 MHCII 分子的結合，較佳地 IC50 值小於 100nM，例如，小於 50nM、20nM，較佳地 1-10nM，更佳地小於 5nM；

(v) 結合表達人 LAG-3 的激活的 CD4+和/或 CD8+ T 細胞，較佳地抗體與激活的人 CD4+ T 細胞結合的 EC50 值小於或等於大約 35pM，較佳大約 1-20pM、6-15pM；

(vi) 刺激免疫應答，較佳抗腫瘤免疫應答；

(vii) 抑制表達人 LAG-3 的腫瘤細胞（較佳地，皮膚癌細胞)的生長，(尤其是與抗 PD1 抗體聯用時)。

【第11項】 一種分離的核酸，其編碼如申請專利範圍第 1 至 10 項中任一項所述的抗體或其抗原結合片段。

【第12項】 一種載體，其包含如申請專利範圍第 11 項所述的核酸，較佳地該載體是表達載體。

【第13項】 一種宿主細胞，其包含如申請專利範圍第 11 項所述的核酸或如申請專利範圍第 12 項所述的載體，較佳地，該宿主細胞是原核的或真核的，更佳的酵母細胞、哺乳動物細胞（例如 293 細胞或 CHO 細胞）。

【第14項】 一種製備抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段的方法，該方法包括在適於表達編碼如申請專利範圍第 1 至 14 項中任一項所述的抗體或其抗原結合片段的核酸的條件下培養如申請專利範圍第 13 項所述的宿主細胞，視需要地分離該抗體或其抗原結合片段，視需要地該方法還包括從該宿主細胞回收該抗體或其抗原結合片段。

【第15項】一種免疫綴合物，其包含與治療劑或診斷劑綴合的如申請專利範圍第 1 至 14 項中任一項所述的抗體或其抗原結合片段。

【第16項】一種包含如申請專利範圍第 1 至 15 項中任一項所述的抗體或其抗原結合片段的多特異性抗體，較佳地，該多特異性抗體是結合 LAG-3 和 PD-1，或結合 LAG-3 和 PD-L1，或結合 LAG-3 和 PD-L2 的雙特異性抗體。

【第17項】一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項所述的抗體或其抗原結合片段或如申請專利範圍第 15 項所述的免疫綴合物或如申請專利範圍第 16 項所述的多特異性抗體，以及視需要地藥用輔料。

【第18項】如申請專利範圍第 17 項所述的醫藥組成物，其包含第二治療劑；較佳地，該第二治療劑選自抗 PD-1 抗體、抗 PD-L1 抗體或抗 PD-L2 抗體。

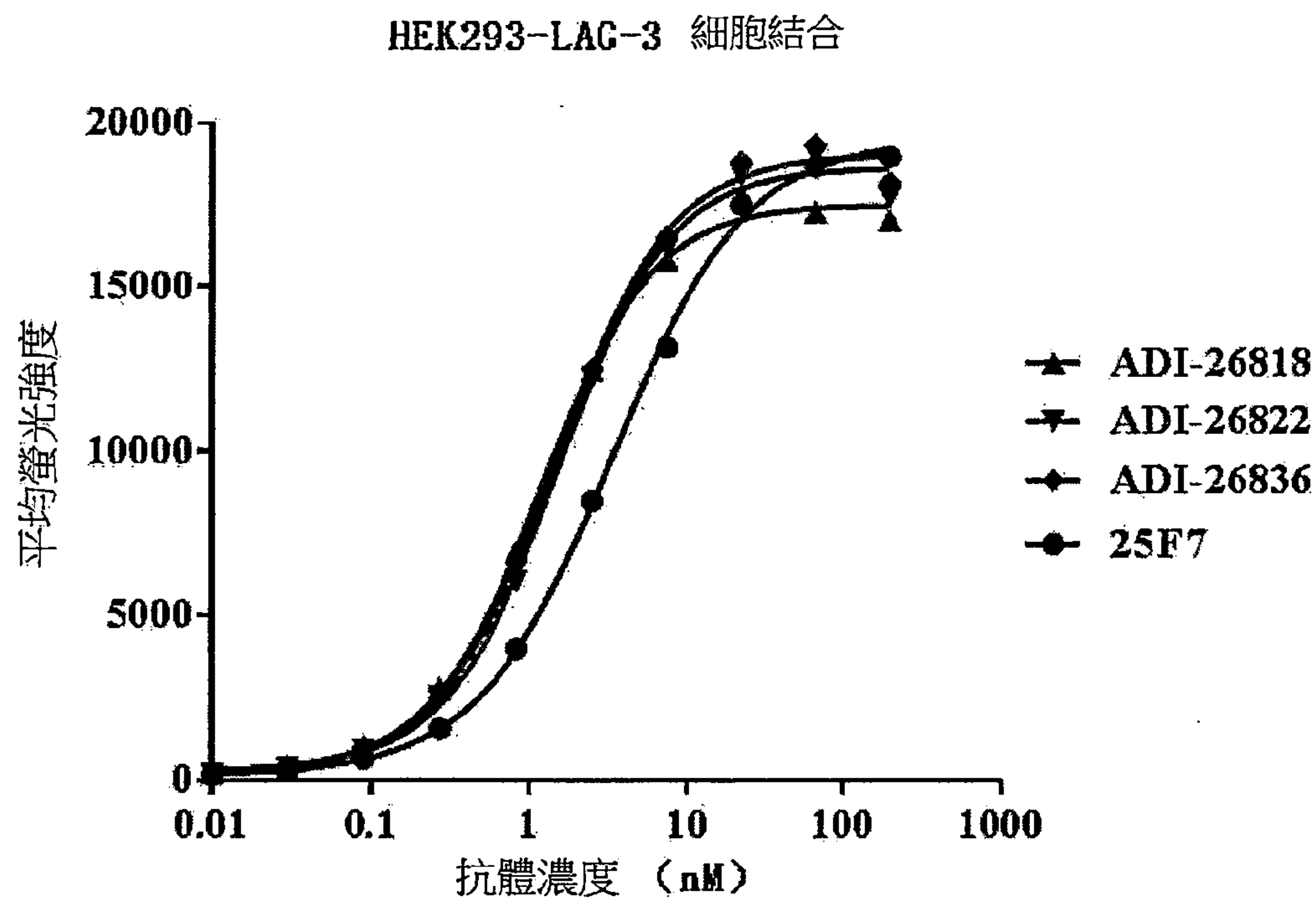
【第19項】一種在對象中預防或治療腫瘤或感染性疾病的方法，該方法包括向所述對象施用有效量的如申請專利範圍第 1 至 18 項中任一項所述的抗體或其抗原結合片段、或如申請專利範圍第 15 項所述的免疫綴合物、或如申請專利範圍第 16 項所述的多特異性抗體、或如申請專利範圍第 17 或 18 項所述的醫藥組成物，較佳地，該腫瘤是皮膚癌，例如惡性黑素瘤。

【第20項】一種檢測樣品中 LAG-3 的方法，該方法包括

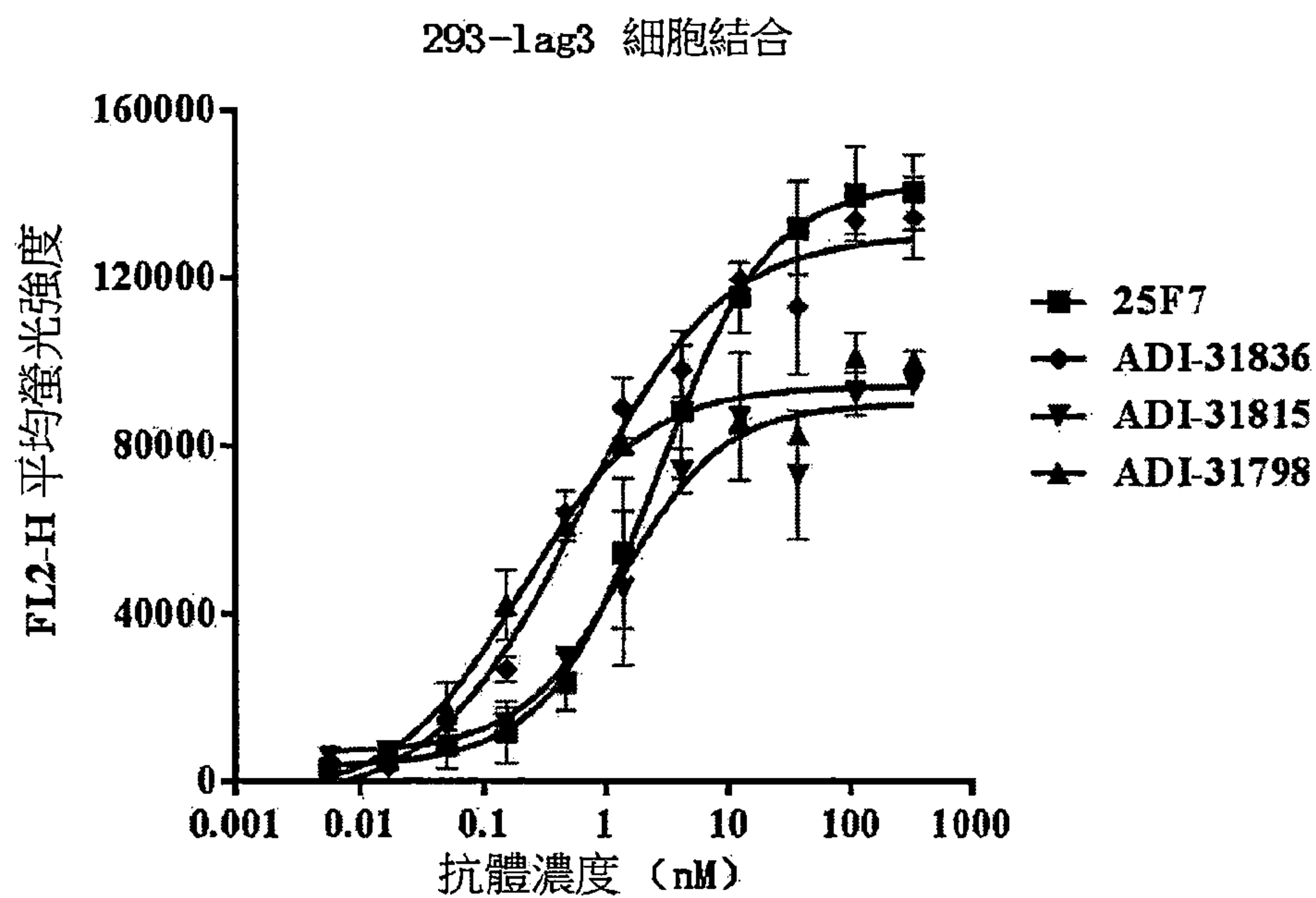
(a) 將樣品與如申請專利範圍第 1 至 19 項中任一項所述的抗體或其抗原結合片段接觸；和

(b) 檢測抗 LAG-3 抗體或其抗原結合片段和 LAG-3 間的複合物的形成；視需要地，抗 LAG-3 抗體是被可檢測地標記的。

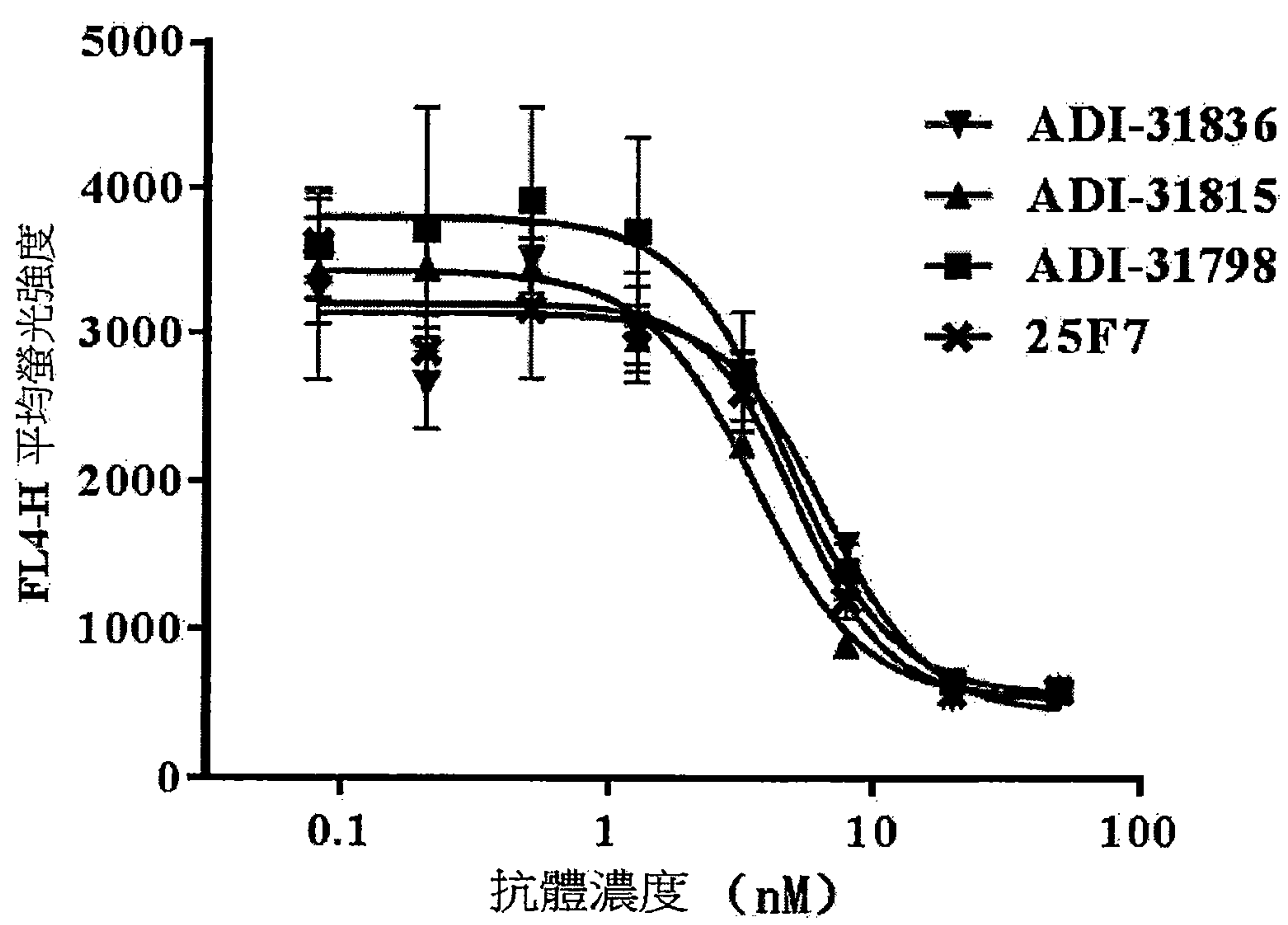
【發明圖式】



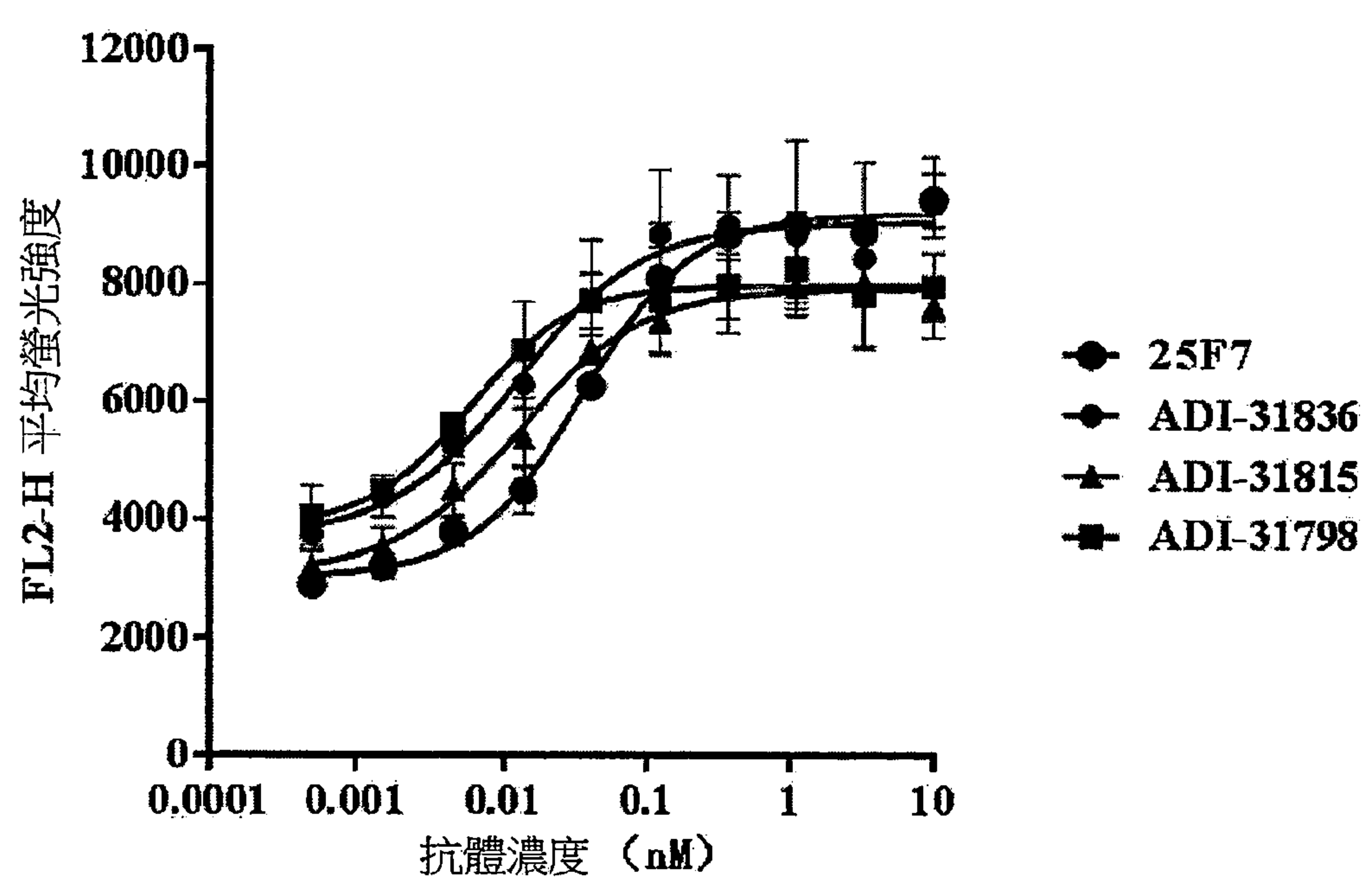
【第1圖】



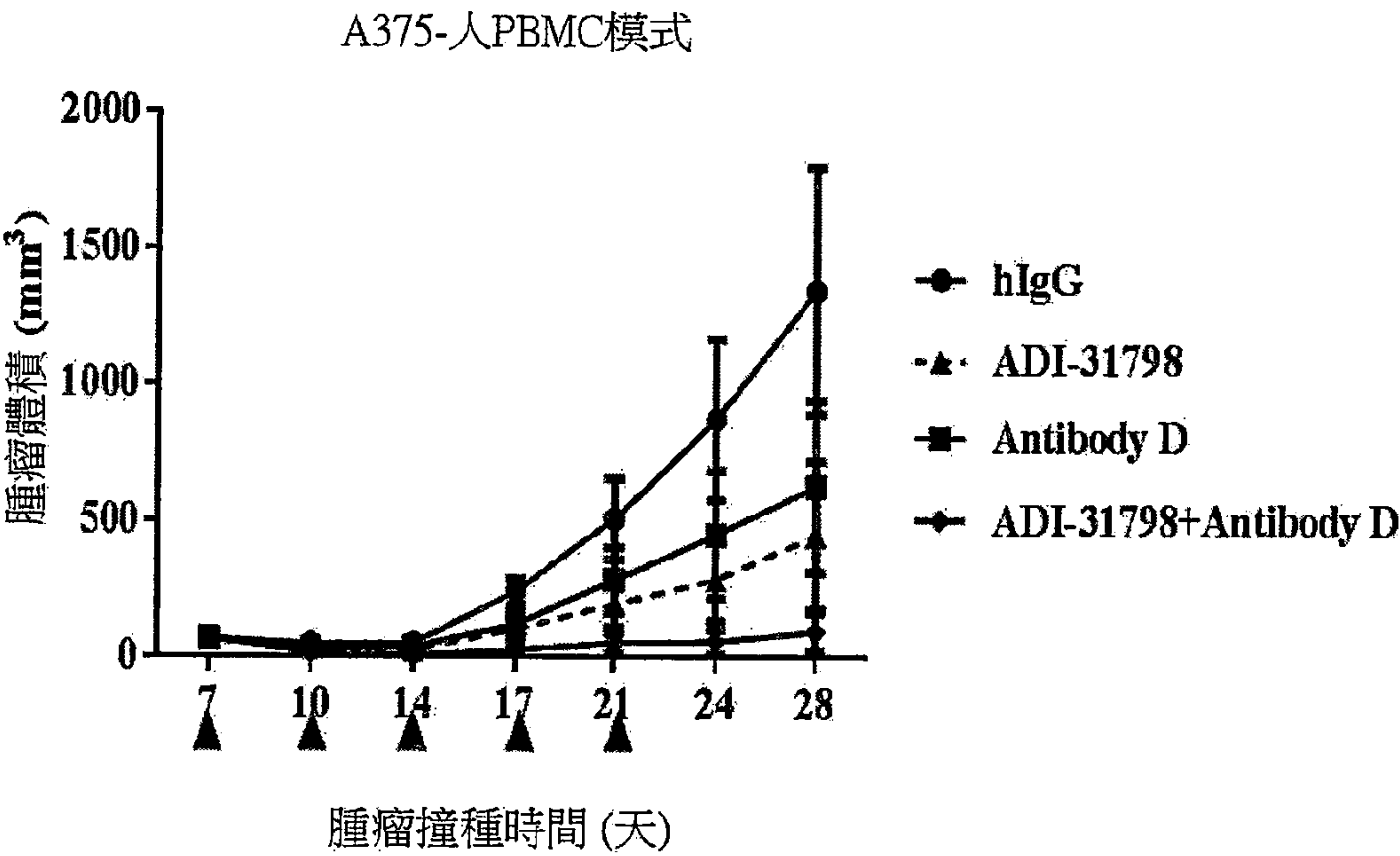
【第2圖】



【第3圖】



【第4圖】



【第5圖】

| 抗體名稱 | VL | SEQ ID NO: |
|-----------|--|------------|
| ADI-26818 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIAITYYCCQLYNLI--TFGGGGTKVEIK | 39 |
| ADI-31798 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIAITYYCCQLYNLI--TFGGGGTKVEIK | 39 |
| ADI-26822 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIAITYYCCQFANHPPLTFGGGGTKVEIK | 40 |
| ADI-31815 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIAITYYCCQVYNHPPLTFGGGGTKVEIK | 41 |
| ADI-26836 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIAITYYCCQDDFFPF-TFGGGGTKVEIK | 42 |
| ADI-31836 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQRPGKAPKLLIYDASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDIAITYYCCQTDFFPF-TFGGGGTKVEIK | 43 |
| 共有序列 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIXNYLNWYQQXPGKAPKLLIYDASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIAITYYCCQXXXXXXTFGGGGTKVEIK | |

【第6圖】

| 抗體名稱 | VH 序列 | SEQ ID NO: |
|-----------|--|------------|
| ADI-26818 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFISYTHWVRQAPGQGLEWVGYNPISGGSISYAQKPKQGRVTWTRDTSTSTVYMELESSLRSEDTAVYYCAREETTPGYYFDYWGQGTILVTVSS | 33 |
| ADI-31798 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFISAVMHWVRQAPGQGLEWVGVIPLPSGGSITTYAQKPKQGRVTWTRDTSTSTVYMELESSLRSEDTAVYYCAREELTPGYYFDYWGQGTILVTVSS | 34 |
| 共有序列 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFKSYTHWVRQAPGQGLEWVGVIKPSGGSITTYAQKPKQGRVTWTRDTSTSTVYMELESSLRSEDTAVYYCAREEXTWPGYYFDYWGQGTILVTVSS | |
| ADI-26822 | QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSDYYWGWIQQPPCKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREGLWSLSLDYWGQGTMTVTSS | 35 |
| ADI-31815 | QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSDYYWGWIQQPPCKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREGLWSLSLDYWGRTMTVTSS | 36 |
| 共有序列 | QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSDYYWGWIQQPPCKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREGLWSLSLDYWGXTMTVTSS | |
| ADI-26836 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFISYGISWVRQAPGQGLEWVGWISAYNGNTNYAQKLGQRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARETFGGEHYYYGMDWWGQGTITVTSS | 37 |
| ADI-31836 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFITEYALSWVRQAPGQGLEWVGWILHSYNGNTNYAQKLGQRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARETFGGEHYNIGMDWWGQGTITVTSS | 38 |
| 共有序列 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFITYYALSWVRQAPGQGLEWVGWILXXYNGNTNYAQKLGQRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARETFGGEHYXXGMDWWGQGTITVTSS | |

【第7圖】