



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111989343 A

(43) 申请公布日 2020.11.24

(21) 申请号 201980026851.4

A·布佐克 M·马捷蒂

(22) 申请日 2019.04.17

S·基什纳

(30) 优先权数据

18168053.9 2018.04.18 EP

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.10.19

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/060008 2019.04.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/202041 EN 2019.10.24

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 S·邓格尔 S·芬恩 J·费舍尔

C·克尔斯滕普法 S·克洛斯特曼

J·莫勒肯 G·蒂芬塔勒

权利要求书3页 说明书104页

序列表55页 附图24页

(54) 发明名称

多特异性抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及结合HLA-G和T细胞活化性抗原的多特异性抗体,它们的制备,配制剂和及其使用方法。

1. 一种结合人HLA-G和人CD3的多特异性抗体,其包含结合人HLA-G的第一抗原结合模块和结合人CD3的第二抗原结合模块,

其中该多特异性抗体并不与包含SEQ ID NO:44的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物(其中HLA-G特异性氨基酸已经用HLA-A共有氨基酸替换)交叉反应。

2. 依照权利要求1的多特异性抗体,其中该抗体是双特异性的;且

其中该结合人HLA-G的第一抗原结合模块抗体包含

A) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

B) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;或

C) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;或

D) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;

且其中该结合T细胞活化性抗原的第二抗原结合模块结合人CD3,且包含

E) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3。

3. 依照权利要求2的双特异性抗体,

其中该第一抗原结合模块

A)

vii) 包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列;或

viii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体;或

ix) 包含SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列;或

B)

- 包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列;或
- C)
- 包含SEQ ID NO:23的VH序列和SEQ ID NO:24的VL序列;或
- D)
- 包含SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列;且
其中该第二抗原结合模块
- E)
- 包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列。
4. 依照权利要求3的双特异性抗体,
其中该第一抗原结合模块包含i) SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列;或
ii) SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列;且
其中该第二抗原结合模块包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列。
5. 依照权利要求1至4任一项的多特异性抗体,其中该抗体
- a) 并不与包含SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:37的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物交叉反应;
和/或
- b) 并不与包含SEQ ID NO:45的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或
- c) 并不与包含SEQ ID NO:47的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或
- d) 抑制ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43);和/或
- e) 将ILT2结合三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50%(在一个实施方案中,超过60%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时);和/或
- f) 将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50%(在一个实施方案中,超过80%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时);和/或
- g) 抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(超过50%(在一个实施方案中,超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时);和/或
- h) 结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(见实施例5),并抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(超过50%(在一个实施方案中,超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时);和/或
- i) 将CD8a结合HLA-G抑制超过80%(当与没有抗体的情况中的结合比较时);和/或
- j) 恢复与JEG-3细胞(ATCC HTB36)共培养的单核细胞的HLA-G特异性受遏制免疫应答;
和/或
- k) 在HLA-G表达性肿瘤细胞(例如JEG-3细胞(ATCC HTB36)存在下诱导T细胞介导的细胞毒性。
6. 权利要求1至5任一项的多特异性抗体,其中该第一和该第二抗原结合模块是Fab分子。
7. 权利要求1至6任一项的多特异性抗体,其中该第二抗原结合模块是Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH或恒定域CL和CH1,特别是可变域VL和VH是彼此替换的。
8. 权利要求1至7任一项的多特异性抗体,其中该第一抗原结合模块是Fab分子其中在

恒定域中位置124处的氨基酸是用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代的(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸是用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代的(编号方式依照Kabat),且在恒定域CH1中位置147处的氨基酸是用谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)独立替代的(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸是用谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)独立替代的(编号方式依照Kabat EU索引)。

9. 权利要求1至8任一项的多特异性抗体,其中该第一和该第二抗原结合模块是彼此融合的,任选经由肽接头。

10. 权利要求1至9任一项的多特异性抗体,其中该第一和该第二抗原结合模块每个是Fab分子且其中或是(i)该第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该第一抗原结合模块的Fab重链的N端,或是(ii)该第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该第二抗原结合模块的Fab重链的N端。

11. 权利要求1至10任一项的多特异性抗体,其包含第三抗原结合模块。

12. 权利要求11的多特异性抗体,其中该第三抗原模块与该第一抗原结合模块相同。

13. 分离的核酸,其编码依照前述权利要求任一项的多特异性抗体。

14. 一种药学配制剂,其包含依照权利要求1至12任一项的多特异性抗体和药学可接受载剂。

15. 依照权利要求1至12任一项的多特异性抗体,其供治疗癌症中使用。

多特异性抗体及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及结合HLA-G和T细胞活化性抗原的多特异性抗体,它们的制备,配制剂及其使用方法。

[0002] 发明背景

[0003] 人主要组织相容性复合物, I类, 6, 也称作人白细胞抗原G (HLA-G), 是一种在人中由HLA-G基因编码的蛋白质。HLA-G属于HLA非经典I类重链种内同源物(paralogue)。这种I类分子是由重链和轻链(β 2微球蛋白)组成的异二聚体。重链锚定在膜中但也能脱落/分泌。

[0004] • 重链由三个域组成: α 1, α 2和 α 3。 α 1和 α 2域形成肽结合沟, 侧翼是两个 α 螺旋。小肽(大约9聚物)能像其它MHC I蛋白质那样结合这个沟。

[0005] • 第二链是 β 2微球蛋白, 与其它MHC I蛋白质类似地结合重链。

[0006] 对于HLA-G, 存在7种同等型, 3种分泌的和4种膜结合的形式(如图1中示意性显示的)。

[0007] HLA-G能形成功能上有活性的复杂寡聚结构(Kuroki, K. et al., Eur J Immunol. 37 (2007) 1727-1729)。在两个HLA-G分子的Cys42之间形成二硫化物连接的二聚体(Shiroishi, M. et al., J Biol Chem 281 (2006) 10439-10447)。三聚体和四聚体复合物也已经有描述(例如Kuroki, K. et al., Eur J Immunol. 37 (2007) 1727-1729; Allan, D. S. et al., J Immunol Methods 268 (2002) 43-50和Gonen-Gross, T. et al., J Immunol 171 (2003) 1343-1351)。

[0008] HLA-G主要在胎盘中的细胞滋养层上表达。数种肿瘤(包括胰腺, 乳腺, 皮肤, 结肠直肠, 胃和卵巢)表达HLA-G(Lin, A. et al., Mol Med. 21 (2015) 782-791; Amiot, L. et al., Cell Mol Life Sci. 68 (2011) 417-431)。还已经报告表达与病理学状态有关, 像炎症疾病, GvHD和癌症。已经报告HLA-G的表达与癌症中较差的预后有关。肿瘤细胞经由HLA-G表达通过诱导免疫耐受/遏制来逃避宿主免疫监视。

[0009]

HLA家族多态性概览	
• HLA-A:	2579种序列
• HLA-B:	3283种序列
• HLA-C:	2133种序列
<u>经典I类MHC</u>	
• HLA-E:	15种序列
• HLA-F:	22种序列
• HLA-G:	50种序列
<u>非经典I类MHC</u>	

[0010] HLA-G与其它MHC I分子分享高同源性(>98%), 因此难以生成没有对其它MHC I分子的交叉反应性的真正HLA-G特异性抗体。

[0011] 先前描述了某些以不同方式与HLA-G相互作用的抗体:Tissue Antigens 55 (2000) 510-518涉及单克隆抗体, 例如87G, 和MEM-G/9; Neoplasma 50 (2003) 331-338涉及某些识别完整HLA-G寡聚复合物(例如87G和MEM-G9)以及无HLA-G的重链(例如4H84, MEM-G/1和MEM-

G/2) 二者的单克隆抗体;Hum Immunol.64 (2003) 315-326涉及数种在HLA-G表达性JEG3肿瘤细胞上测试的抗体(例如, MEM-G/09和-G/13唯独与天然HLA-G1分子反应。MEM-G/01识别(与4H84单抗相似)变性的所有同等型的HLA-G重链,而MEM-G/04选择性识别变性的HLA-G1,-G2,和-G5同等型);Wiendl et al.,Brain(2003) 176-85涉及不同单克隆HLA-G抗体,例如87G,4H84, MEM-G/9。

[0012] 上述出版物报告了结合人HLA-G或人HLA-G/ β 2M MHC复合物的抗体。然而,由于HLA家族的高多态性和高同源性,大多数抗体缺乏真正特异性的HLA-G结合特性且常常还与其它HLA家族成员(或是作为与 β 2M的MHC复合物或是处于它的无 β 2M的形式)结合或交叉反应,或者它们根本不抑制HLA-G β 2M MHC复合物对它的受体ILT2和/或ILT4的结合(且认为是非拮抗性抗体)。

[0013] 结合靶细胞上的表面抗原和T细胞上的激活性T细胞抗原(诸如CD3)的双特异性抗体(在本文中称作T细胞双特异性抗体或“TCB”)对于多种癌症的治疗具有广阔前景。此类抗体对它的两种靶物的同时结合会迫使靶细胞和T细胞之间的暂时相互作用,引起T细胞受体的交联和随后任何细胞毒性T细胞的激活和随后靶细胞的裂解。鉴于它们在靶细胞杀伤中的效力,靶物的选择和靶向性抗体的特异性对于T细胞双特异性抗体避免上和脱靶毒性是最为重要的。细胞内蛋白质(诸如WT1)代表有吸引力的靶物,但是仅仅对结合在细胞表面上呈递自细胞内蛋白质衍生的肽抗原的主要组织相容性复合物(MHC)的T细胞受体(TCR)样抗体可及。TCR样抗体的一个内在问题是与MHC分子本身或呈递除了期望肽以外的肽的MHC分子的潜在交叉反应性,这可能损害器官或组织选择性。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明提供一种结合人HLA-G和T细胞活化性抗原(特别是人CD3)的多特异性抗体,其包含结合人HLA-G的第一抗原结合模块和结合T细胞活化性抗原(特别是人CD3)的第二抗原结合模块。

[0016] 在一个方面,该包含结合人HLA-G的第一抗原结合模块和结合人CD3的第二抗原结合模块的结合人HLA-G和人CD3的多特异性抗体并不与包含SEQ ID NO:44的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物(其中该HLA-G特异性氨基酸已经用HLA-A共有氨基酸替换)交叉反应。

[0017] 在本发明的一个实施方案中,该多特异性抗体是双特异性的;且

[0018] 该结合人HLA-G的第一抗原结合模块抗体包含

[0019] A) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0020] B) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;

[0021] C) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列

的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0022] D) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;且

[0023] 该结合T细胞活化性抗原的第二抗原结合模块结合人CD3,且包含

[0024] E) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3。

[0025] 在本发明的一个实施方案中,该第一抗原结合模块

[0026] A)

[0027] i) 包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列;或

[0028] ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体;或

[0029] iii) 包含SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列;或

[0030] B)

[0031] 包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列;或

[0032] C)

[0033] 包含SEQ ID NO:23的VH序列和SEQ ID NO:24的VL序列;或

[0034] D)

[0035] 包含SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列;且

[0036] 该第二抗原结合模块

[0037] E)

[0038] 包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列。

[0039] 在本发明的一个实施方案中,

[0040] 该第一抗原结合模块包含i) SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列;或ii) SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列;且

[0041] 该第二抗原结合模块包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列。

[0042] 在本发明的一个实施方案中,该多特异性抗体

[0043] a) 并不与包含SEQ ID NO:44的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0044] b) 并不与包含SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:37的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0045] c) 并不与包含SEQ ID NO:45的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0046] d) 并不与包含SEQ ID NO:47的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0047] e) 抑制ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43);和/或

[0048] f) 将ILT2结合三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50% (在一个实施方案中,超过60%) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例4b);和/或

[0049] g) 将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50% (在一个实施方案中,超过80%) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例4b);和/或

[0050] h) 抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36) (上的HLA-G) (超过50% (在一个实施方案中,超过80%)) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例6);和/或

[0051] i) 结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36) (上的HLA-G) (见实施例5), 并抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36) (上的HLA-G) (超过50% (在一个实施方案中,超过80%)) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例6);和/或

[0052] j) 将CD8a结合HLA-G抑制超过80% (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例4c);和/或

[0053] k) 恢复与JEG-3细胞(ATCC HTB36) 共培养的单核细胞的HLA-G特异性受遏制免疫应答(例如受遏制肿瘤坏死因子(TNF) α 释放);和/或。

[0054] l) 在HLA-G表达性肿瘤细胞(例如JEG-3细胞(ATCC HTB36) 存在下诱导T细胞介导的细胞毒性(见实施例12)。

[0055] 在本发明的一个实施方案中,该第一和该第二抗原结合模块是Fab分子(每个是Fab分子)。

[0056] 在本发明的一个实施方案中,该第二抗原结合模块是Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH或恒定域CL和CH1,特别是可变域VL和VH是彼此替换的。

[0057] 在本发明的一个实施方案中,该第一抗原结合模块是Fab分子,其中在恒定域中位置124处的氨基酸是用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代的(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸是用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代的(编号方式依照Kabat),且在恒定域CH1中位置147处的氨基酸是用谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)独立替代的(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸是用谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)独立替代的(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0058] 在本发明的一个实施方案中,该第一和该第二抗原结合模块是彼此融合的,任选经由肽接头。

[0059] 在本发明的一个实施方案中,该第一和该第二抗原结合模块每个是Fab分子且其中或是(i) 该第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该第一抗原结合模块的Fab重链的N端,或是(ii) 该第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该第二抗原结合模块的Fab重链的N端。

[0060] 在本发明的一个实施方案中,该多特异性抗体包含第三抗原结合模块。

[0061] 在本发明的一个实施方案中,此类第三抗原模块与该第一抗原结合模块相同。

[0062] 在本发明的一个实施方案中,该多特异性抗体包含由第一和第二亚基构成的Fc域。

[0063] 在本发明的一个实施方案中,该第一,该第二和,在存在时,该第三抗原结合模块每个是Fab分子;且其中或是(i) 该第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该第一抗原结

合模块的Fab重链的N端且该第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该Fc域的第一亚基的N端,或是(ii)该第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该第二抗原结合模块的Fab重链的N端且该第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该Fc域的第一亚基的N端;且其中该第三抗原结合模块,在存在时,在Fab重链的C端融合至该Fc域的第二亚基的N端。

[0064] 本发明提供一种分离的核酸,其编码依照前述实施方案任一项的抗体。

[0065] 本发明提供一种宿主细胞,其包含此类核酸。

[0066] 本发明提供一种生成抗体的方法,其包括培养该宿主细胞,使得该抗体生成。

[0067] 本发明提供此类生成抗体的方法,其进一步包括自该宿主细胞回收该抗体。

[0068] 本发明提供一种药物配制剂,其包含本文中描述的抗体和药学可接受载剂。

[0069] 本发明提供本文中描述的抗体,其用作药物。

[0070] 本发明提供本文中描述的抗体,其用于治疗癌症。

[0071] 本发明提供本文中描述的抗体在制造药物中的用途。在一个实施方案中,该药物用于治疗癌症。

[0072] 本发明提供一种治疗具有癌症的个体的方法,其包括对该个体施用有效量的本文中描述的抗体。

[0073] 凭借本文中描述的筛选方法,能选择新的抗HLA-G抗体。这些抗体显示高度有价值的特性,像强烈抑制ILT2结合JEG3细胞上表达的HLA-G或抑制ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物。

[0074] 而且,依照本发明的抗体能够恢复HLA-G特异性受遏制免疫应答,即恢复与HLA-G表达性细胞的共培养物中的单核细胞的LPS诱导的TNF α 生成。

[0075] 另外,该抗体是高度特异性的且并不显示与HLA-A MHC I复合物或来自小鼠或大鼠起源的MHC I复合物的交叉反应性。

[0076] 附图简述

[0077] 图1:HLA-G的不同同等型

[0078] 图2:图2A:HLA-G的示意图,其中分子与 β 2M联合

[0079] 图2B:与某些受体联合的HLA-G分子的结构:与给定受体诸如ILT4和KIR2DL1复合的HLA-G结构。ILT4结构(PDB代码:2DYP)。KIR2DL1结构取自PDB代码:1IM9(KIR2DL1:HLA-Cw4复合物结构)且通过HLA-Cw4和HLA-G结构的叠加而放置在HLA-G上。受体以带展示来显示,HLA-G以分子表面展示来显示。在其它HLA种内同源基因(paralog)中独特或保守的HLA-G残基分别着白色和灰色。

[0080] 在嵌合反抗原中独特表面残基用HLA共有序列替换。

[0081] 图3:抑制(或刺激)HLA-G与ILT2和ILT4以及CD8相互作用/结合的HLA-G抗体:

[0082] 图3A:ILT2抑制

[0083] 图3B:ILT4抑制

[0084] 图3C:CD8抑制

[0085] 图4:在JEG3(天然表达HLA-G的细胞),SKOV-3细胞(野生型(wt)对HLA-G转染细胞(HLA-G+)),和PA-TU-8902细胞(野生型(wt)对HLA-G转染细胞(HLA-G+))上使用HLA-G抗体的HLA-G的细胞表面表达的流式细胞术分析:

[0086] 图4A:HLA-G-0031(#0031);图4B:HLA-G-0039(#0039);

[0087] 图4C:HLA-G-0041 (#0041);图4D:HLA-G-0090 (#0090)

[0088] 图5:图5A:抗HLA-G抗体(0031,0039,0041和0090)阻断/调控人ILT2 Fc嵌合物与JEG3细胞上表达的HLA-G的相互作用:

[0089] 通过使用缀合有Alexa488的抗大鼠IgG二抗来评估新颖的抗HLA-G抗体对细胞表面HLA-G的染色(上部行)。FACS柱形图中显示的是用单独的二抗染色的细胞(灰色虚线)和用抗HLA-G抗体染色的细胞(黑色实线)。在下部行中描绘结合至JEG3细胞上的HLA-G的人ILT2-Fc(黑色虚线),与用单独的二抗染色的细胞(灰色虚线)比较。能看出将JEG3细胞与HLA-G抗体一起预温育对ILT2 Fc嵌合物结合的影响(黑色实线):HLA-G-0031和HLA-G-0090显示几乎完全抑制ILT2-Fc嵌合物对JEG3细胞的结合。有趣的是,0039和0041这两种抗体甚至提高ILT2:fc对细胞的结合。

[0090] 图5B:商品化/参照抗HLA-G抗体对ILT2 Fc嵌合物结合JEG3细胞上的HLA-G的影响:

[0091] 通过使用缀合有Alexa488的物种特异性二抗来评估商品化/参照抗HLA-G抗体对细胞表面HLA-G的染色(上部行)。FACS柱形图中显示的是用单独的二抗染色的细胞(灰色虚线)和用抗HLA-G抗体染色的细胞(黑色实线)。在下部行中描绘结合至JEG3细胞上的HLA-G的人ILT2 Fc嵌合物(黑色虚线),与用单独的二抗染色的细胞(灰色虚线)比较。能看出将JEG3细胞与参照抗体一起预温育对ILT2 Fc嵌合物结合的影响(黑色实线)。测试的参照抗体无一能阻断ILT2 Fc嵌合物与JEG3细胞上的细胞表面HLA-G的相互作用。

[0092] 图6:在不同供体上评估的用抑制性抗HLA-G抗体阻断HLA-G对TNF α 生成恢复的影响。

[0093] 图6A:在一名代表性单核细胞供体上评估的抗HLA-G抗体HLA-G-0031 (#0031),HLA-G-0039 (#0039),和HLA-G-0041 (#0041)。

[0094] 图6B:在另一名单核细胞供体上评估的抗HLA-G抗体HLA-G-0090 (#0090)。

[0095] 图6C:wt JEG-3细胞和敲低变体中的HLA-G表达的Western印迹分析。

[0096] 图7:HLA-G TCB抗体抗HLA-G/抗CD3双特异性抗体(P1AA1185和P1AD9924)对在细胞上表达的天然或重组HLA-G的结合(如通过FACS分析评估的)。

[0097] 图8:HLA-G TCB介导的T细胞激活(抗HLA-G/抗CD3双特异性TCB抗体(P1AA1185和P1AD9924))。

[0098] 图9:HLA-G TCB介导的T细胞的IFN γ 分泌(抗HLA-G/抗CD3双特异性TCB抗体P1AA1185和P1AD9924)。

[0099] 图10:抗HLA-G/抗CD3双特异性TCB抗体(P1AA1185和P1AD9924)的T细胞介导的细胞毒性/肿瘤细胞杀伤的诱导。

[0100] 图11:本发明的双特异性抗原结合分子的例示性构造。(A,D)“1+1CrossMab”分子的示图。(B,E)“2+1IgG Crossfab”分子的示图,其具有备选(alternative)次序的Crossfab和Fab构件(“倒转的”)。(C,F)“2+1IgG Crossfab”分子的示图。(G,K)“1+1IgG Crossfab”分子的示图,其具有备选(alternative)次序的Crossfab和Fab构件(“倒转的”)。(H,L)“1+1IgG Crossfab”分子的示图。(I,M)“2+1IgG Crossfab”分子的示图,其具有两个CrossFab。(J,N)“2+1IgG Crossfab”分子的示图,其具有两个CrossFab和备选(alternative)次序的Crossfab和Fab构件(“倒转的”)。(O,S)“Fab-Crossfab”分子的示图。(P,T)“Crossfab-Fab”

分子的示图。(Q,U)“(Fab)₂-Crossfab”分子的示图。(R,V)“Crossfab-(Fab)₂”分子的示图。(W,Y)“Fab-(Crossfab)₂”分子的示图。(X,Z)“(Crossfab)₂-Fab”分子的示图。黑点:任选的Fc域中促进异二聚化的修饰。++,--:CH1和CL域中任选引入的相反电荷的氨基酸。Crossfab分子描绘为包含VH和VL区交换,但是在其中在CH1和CL域中没有引入电荷修饰的实施方案中可以备选地包含CH1和CL域的交流。

[0101] 图12:抗HLA-G/抗CD3双特异性TCB抗体(P1AA1185和P1AD9924)的体内抗肿瘤功效。

[0102] 发明详述

[0103] 在本文中使用时,术语“HLA-G”,“人HLA-G”指HLA-G人主要组织相容性复合物,I类,G,也称作人白细胞抗原G(HLA-G)(例示性的SEQ ID NO:35)。典型地,HLA-G与β2微球蛋白(B2M或β2m)一起形成MHC I类复合物。在一个实施方案中,HLA-G指HLA-G和β2微球蛋白的MHC I类复合物。

[0104] 如本文中使用的,“结合人HLA-G”,“特异性结合人HLA-G”的抗体或“抗HLA-G抗体”指以K_D值为5.0x 10⁻⁸mol/l或更低,在一个实施方案中,K_D值为1.0x 10⁻⁹mol/l或更低,在一个实施方案中,K_D值为5.0x 10⁻⁸mol/l至1.0x10⁻¹³mol/l的结合亲和力特异性结合人HLA-G抗原或其胞外域(ECD)的抗体。在一个实施方案中,抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β2M MHC I复合物。

[0105] 结合亲和力是用标准结合测定法,诸如表面等离子共振技术(BIAcore®,GE-Healthcare Uppsala,Sweden),例如使用包含HLA-G胞外域(例如处于它的天然发生三维结构)的构建物测定的。在一个实施方案中,结合亲和力是使用包含包含SEQ ID NO:43的MHC I类复合物的例示性可溶性HLA-G用标准结合测定法测定的。

[0106] HLA-G具有规则的MHC I折叠且由两条链组成:链1由三个域组成:α1,α2和α3。α1和α2域形成肽结合沟,侧翼是两个α螺旋。小肽(大约9聚物)能像其它MHC I蛋白质那样结合这个沟。链2是与多种其它MHC I蛋白质分享的β2微球蛋白。

[0107] HLA-G能形成功能有活性的复杂寡聚结构(Kuroki,K.et al.,Eur J Immunol.37(2007)1727-1729)。在两个HLA-G分子的Cys42之间形成二硫化物连接的二聚体(Shiroishi,M.et al.,J Biol Chem 281(2006)10439-10447)。三聚体和四聚体复合物也已经有描述(例如Kuroki,K.et al.,Eur J Immunol.37(2007)1727-1729;Allan,D.S.et al.,J Immunol Methods 268(2002)43-50和Gonen-Gross,T.et al.,J Immunol 171(2003)1343-1351)。不像大多数其它MHC I类分子,HLA-G具有数个游离半胱氨酸残基。报告了重组可溶性形式的HLA-G5能以分子间Cys42-Cys42二硫键形成二硫化物连接的二聚体(Boyson et al.,Proc Nat Acad Sci USA,99:16180(2002))。另外,膜结合形式的HLA-G1也能在内源表达HLA-G的Jeg3细胞系的细胞表面上形成二硫化物连接的二聚体。还已经在滋养层细胞的细胞表面上找到二硫化物连接的二聚体形式的HLA-G1和HLA-G5(Apps,R.,Tissue Antigens,68:359(2006))。

[0108] HLA-G主要在胎盘中的细胞滋养层上表达。数种肿瘤(包括胰腺,乳腺,皮肤,结肠直肠,胃和卵巢)表达HLA-G(Lin,A.et al.,Mol Med.21(2015)782-791;Amiot,L.et al.,Cell Mol Life Sci.68(2011)417-431)。还已经报告表达与病理学状态有关,像炎症疾病,GvHD和癌症。已经报告HLA-G的表达与癌症中较差的预后有关。肿瘤细胞经由HLA-G表达通

过诱导免疫耐受/遏制来逃避宿主免疫监视。

[0109] 对于HLA-G,存在7种同等型,3种分泌的和4种膜结合的形式(如图1中示意性显示的)。HLA-G的最重要的功能性同等型包括b2-微球蛋白联合的HLA-G1和HLA-G5。然而,这些同等型的耐受原性免疫学效果是不同的且取决于配体的形式(单体,二聚体)和配体-受体相互作用的亲和力。

[0110] HLA-G蛋白质可使用标准分子生物学技术来生成。HLA-G同等型的核酸序列是本领域已知的。见例如GENBANK登录号AY359818。

[0111] 各HLA-G同等型形式经由ILT,特别是ILT2,ILT4,或其组合促进信号转导。

[0112] ILT:ILT代表Ig类型的牵涉调节免疫细胞激活和控制免疫细胞功能的激活性和抑制性受体(Borges,L.et al.,Curr Top Microbial Immunol,244:123-136(1999))。ILT分成三组:(i)抑制性的,那些含有胞质免疫受体基于酪氨酸的抑制性基序(ITIM)且转导抑制性信号的(ILT2,ILT3,ILT4,ILT5,和LIR8);(ii)激活性的,那些含有短胞质尾和跨膜域中的带电荷氨基酸残基(ILT1,ILT7,ILT8,和LIR6a)且经由Fc受体的联合共同 γ 链的胞质免疫受体基于酪氨酸的激活性基序(ITAM)投递激活性信号的;和(iii)缺乏跨膜域的可溶性分子ILT6。一些最新的研究已经突显抗原呈递细胞(APC)的表面上的ILT的免疫调节作用。表征最多的免疫抑制性受体,ILT2,ILT3,和ILT4受体主要在髓样和浆细胞样DC上表达。ILT3和ILT4因未成熟DC暴露于已知的免疫遏制性因子,包括IL-10,维生素D3,或抑制性CD8 T细胞而上调(Chang,C.C.et al.,Nat Immunol,3:237-243(2002))。DC上ILT的表达受到炎性刺激,细胞因子,和生长因子的紧密控制,而且在DC激活后下调(Ju,X.S.et al.,Gene,331:159-164(2004))。ILT2和ILT4受体的表达受到组蛋白乙酰化高度调节,这有助于唯独在髓样谱系的细胞中严格控制基因表达(Nakajima,H.,J Immunol,171:6611-6620(2003))。

[0113] 抑制性受体ILT2和ILT4的啮合改变单核细胞的细胞因子和趋化因子分泌/释放概况且能抑制Fc受体信号传导(Colonna,M.et al.,J Leukoc Biol,66:375-381(1999))。Suciu-Foca小组已经精确描述了ILT3在DC上的作用和功能(Suciu-Foca,N.,Int Immunopharmacol,5:7-11(2005))。虽然ILT3的配体是未知的,但是已知ILT4结合HLA I类分子(HLA-A,HLA-B,HLA-C,和HLA-G)的第三域,与CD8竞争MHC I类结合(Shiroishi,M.,Proc Natl Acad Sci USA,100:8856-8861(2003))。数种抑制性ILT受体的优先配体是HLA-G。HLA-G在母体-胎儿耐受中和在肿瘤细胞逃避免疫识别和破坏的机制中发挥潜在作用(Hunt,J.S.et al.,Faseb J,19:681-693(2005))。最有可能的是通过HLA-G-ILT相互作用调节DC功能是DC的生物学中的一种重要途径。已经确定高度表达ILT2和ILT4受体的人单核细胞衍生的DC在用HLA-G处理并用同种异体T细胞刺激时仍然维持稳定的耐受原性样表型(CD80低,CD86低,HLA-DR低),具有诱导T细胞无反应性的潜力(Ristich,V.et al.,Eur J Immunol,35:1133-1142(2005))。此外,HLA-G与高度表达ILT2和ILT4受体的DC的相互作用导致数种牵涉MHC II类呈递途径的基因下调。由专业性APC丰富表达的溶酶体硫醇还原酶IFN- γ 诱导型溶酶体硫醇还原酶(GILT)在HLA-G修饰的DC中大大降低。引发的CD4+T细胞的全集可受到GILT的DC表达影响,因为在靶向基因破坏后在缺乏GILT的动物中降低了针对选定抗原的体内T细胞应答(Marie,M.et al.,Science,294:1361-1365(2001))。DC上的HLA-G/ILT相互作用干扰MHC II类分子的组装和转运至细胞表面,这可能导致结构上异常的MHC

II类分子的呈递或表达不太有效。确定了HLA-G显著降低高度表达ILT抑制性受体的人单核细胞衍生的DC上不变链(CD74),HLA-DMA,和HLA-DMB基因的转录(Ristich,V.et al.,Eur J Immunol,35:1133-1142(2005))。

[0114] HLA-G的另一种受体是KIR2DL4,因为KIR2DL4结合表达HLA-G的细胞(US2003232051;Cantoni,C.et al.,Eur J Immunol 28(1998)1980;Rajagopalan,S.and E.O.Long,[published erratum appears in J Exp Med 191(2000)2027]J Exp Med 189(1999)1093;Ponte,M.et al.,PNAS USA 96(1999)5674)。KIR2DL4(也称作2DL4)是一个KIR家族成员(也称作CD158d),与激活性和抑制性受体二者分享结构特征(Selvakumar,A.et al.,Tissue Antigens 48(1996)285)。2DL4具有胞质ITIM(提示抑制性功能),和跨膜区中的带正电荷氨基酸(激活性KIR典型的一个特征)。不像其它克隆分布的KIR,2DL4由所有NK细胞转录(Valiante,N.M.et al.,Immunity 7(1997)739;Cantoni,C.et al.,Eur J Immunol 28(1998)1980;Rajagopalan,S.and E.O.Long,[published erratum appears in J Exp Med 191(2000)2027]J Exp Med 189(1999)1093)。

[0115] HLA-G还已经显示与细胞毒性T细胞上的CD8相互作用(Sanders et al.,J.Exp.Med.,1991)且诱导活化的CD8阳性细胞毒性T细胞中由CD95介导的凋亡(Fournel et al.,J.Immun.,2000)。这种消除细胞毒性T细胞的机制已经报告是妊娠,炎性疾病和癌症中的免疫逃逸和耐受诱导的机制之一(Amodio G.et al.,Tissue Antigens,2014)。

[0116] 如本文中使用的,与包含SEQ ID NO:44的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:45的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:47的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:37的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物“并不交叉反应”或“并不特异性结合”的抗HLA-G抗体指实质性并不结合任何这些反抗原的抗HLA-G抗体。在一个实施方案中,与包含SEQ ID NO:44的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:45的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:47的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物,和/或包含SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:37的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物“并不交叉反应”或“并不特异性结合”的抗HLA-G抗体指仅仅以KD值为 5.0×10^{-6} mol/l或更高(直至不再能检测到结合亲和力)的结合亲和力显示非特异性结合的抗HLA-G抗体。结合亲和力是用标准结合测定法,诸如表面等离子共振技术(BIAcore®,GE-Healthcare Uppsala,Sweden),用各自抗原:包含SEQ ID NO:44的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:45的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:47的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物,和/或包含SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:37的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物测定的。测定法设置以及抗原的构建/制备在实施例中描述。

[0117] 术语“抑制ILT2结合JEG-3细胞(ATCC HTB36)上的HLA-G”指在如例如实施例6中所述测定法中抑制重组ILT2的结合相互作用。

[0118] 术语“HLA-G特异性受遏制免疫应答的恢复”或“恢复HLA-G特异性受遏制免疫应答”指恢复与HLA-G表达性细胞,特别是JEG-3细胞的共培养物中的单核细胞的由脂多糖(LPS)诱导的TNF α 生成。如此,与未处理的共培养的JEG-3细胞相比,本发明的抗体恢复HLA-G表达性JEG-3细胞(ATCC HTB36)和单核细胞的脂多糖(LPS)刺激的共培养物中TNF α 的HLA-G特异性释放(以未处理的共培养物作为0%阴性参照;以仅有单核细胞的培养物作为100%阳性参照,其中TNF α 分泌没有受到任何HLA-G/IL-2特异性效应遏制(见实施例7))。在此语

境中,“HLA-G特异性受遏制免疫应答”指JEG-3细胞上的HLA-G表达所致单核细胞的免疫遏制。与之对比,本发明的抗HLA-G抗体不能恢复与具有HLA-G敲除的JEG3细胞共培养的单核细胞的免疫应答。由于其它商品化抗HLA-G抗体能够诱导与具有HLA-G敲除的JEG3细胞共培养的单核细胞的TNF α ,所以这些抗体有非HLA-G特异性TNF α 释放。

[0119] 如本文中使用的,“活化性T细胞抗原”指在T淋巴细胞,特别是细胞毒性T淋巴细胞的表面上表达的抗原性决定簇,其在与抗体相互作用后能诱导T细胞活化。具体地,抗体与活化性T细胞抗原的相互作用可诱导T细胞活化,其通过触发T细胞受体复合物的信号传导级联进行。在一个特定的实施方案中,所述活化性T细胞抗原是CD3,特别是CD3的 ϵ 亚基(对于人序列,参见UniProt no.P07766(版本189),NCBI RefSeq no.NP_000724.1,SEQ ID NO:76;或对于食蟹猴[*Macaca fascicularis*]序列,参见UniProt no.Q95LI5(版本49),NCBI GenBank no.BAB71849.1,SEQ ID NO:77)。

[0120] 除非另外指示,“CD3”指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物,诸如灵长类(例如人),非人灵长类(例如食蟹猴)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)的任何天然CD3。该术语涵盖“全长”,未加工的CD3以及起因于细胞中加工的CD3的任何形式。该术语还涵盖CD3的天然存在变体,例如剪接变体或等位变体。在一个实施方案中,CD3是人CD3,特别是人CD3的厄普西隆亚基(CD3 ϵ)。人CD3 ϵ 的氨基酸序列显示于UniProt(www.uniprot.org)登录号P07766(版本189),或NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/)RefSeq NP_000724.1。还见SEQ ID NO:76。食蟹猴[*Macaca fascicularis*]CD3 ϵ 的氨基酸序列显示于NCBI GenBank no.BAB71849.1。还见SEQ ID NO:77。

[0121] 如本文中使用的,“结合人CD3的抗体”,“特异性结合人CD3的抗体”或“抗人CD3抗体”指以K_D值为 5.0×10^{-8} mol/1或更低的,在一个实施方案中,K_D值为 1.0×10^{-9} mol/1或更低,在一个实施方案中,K_D值为 5.0×10^{-8} mol/1至 1.0×10^{-13} mol/1的结合亲和力特异性结合人CD3抗原或其胞外域(ECD)的抗体。在一个实施方案中,抗体结合包含SEQ ID NO:76的CD3。

[0122] 结合亲和力是用标准结合测定法,诸如表面等离子共振技术(BIAcore®,GE-Healthcare Uppsala,Sweden)测定的,例如使用包含HLA-G胞外域(例如处于它的天然发生三维结构)的构建物。在一个实施方案中,结合亲和力是用标准结合测定法测定的,使用包含SEQ ID NO:76的例示性CD3。

[0123] 如本文中使用的,“T细胞活化”指T淋巴细胞,特别是细胞毒性T淋巴细胞的一种或多种细胞应答,其选自:增殖,分化,细胞因子分泌,细胞毒性效应分子释放,细胞毒性活性和活化标志物的表达。合适的测量T细胞活化的测定法是本领域已知的且在本文中有描述。

[0124] 出于本文中的目的,“受体人框架”指包含自人免疫球蛋白框架或如下文定义的人共有框架衍生的轻链可变域(VL)框架或重链可变域(VH)框架的氨基酸序列的框架。自人免疫球蛋白框架或人共有框架“衍生”的受体人框架可以包含其相同的氨基酸序列,或者它可以含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,氨基酸变化的数目是10或更少,9或更少,8或更少,7或更少,6或更少,5或更少,4或更少,3或更少,或2或更少。在一些实施方案中,VL受体人框架与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列在序列上相同。用于所获得的抗体HLAG-0031的人源化变体的一种优选VH受体人框架是HUMAN_IGHV1-3。用于所获得的抗体HLAG-0031的人源化变体的一种优选VL受体人框架是HUMAN_IGKV1-17(V域,具有位置R46F

处的一处另外的回复突变,Kabat编号方式)。

[0125] 本文中的术语“抗体”以最广义使用,并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体,多特异性抗体(例如双特异性抗体),和抗体片段,只要它们展现出期望的抗原结合活性。

[0126] “抗体片段”指与完整抗体不同的分子,其包含完整抗体中与完整抗体结合的抗原结合的部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv,Fab,Fab',Fab'-SH,F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和自抗体片段形成的多特异性抗体。

[0127] 与参照抗体“结合相同表位的抗体”指在竞争测定法中将参照抗体对其抗原的结合阻断50%或更多的抗体,且相反,参照抗体在竞争测定法中将该抗体对其抗原的结合阻断50%或更多。本文中提供了一种例示性竞争测定法。

[0128] 术语“双特异性”意指抗体能够特异性结合至少两种不同的抗原性决定簇。通常,双特异性抗体包含两种抗原结合位点,其中每种特异于不同的抗原性决定簇。在某些实施方案中,所述双特异性抗体能够同时结合两种抗原性决定簇,特别是在两种不同的细胞上表达的两种抗原性决定簇。

[0129] 如本文中使用的,术语“价”指抗体中规定数目的抗原结合位点的存在。因而,术语“对抗原的单价结合”指抗体中一个(且不超过一个)特异于抗原的抗原结合位点的存在。

[0130] “抗原结合位点”指抗体上提供与抗原相互作用的位点,即一个或多个氨基酸残基。例如,抗体的抗原结合位点包含来自互补性决定区(CDR)的氨基酸残基。天然的免疫球蛋白分子通常具有两个抗原结合位点,Fab分子通常具有单个抗原结合位点。

[0131] 如本文中使用的,术语“抗原结合模块”指特异性结合抗原性决定簇的多肽分子。在一个实施方案中,抗原结合模块能够将其附接的实体(例如第二抗原结合模块)引导至靶部位,例如至特定类型的携有抗原性决定簇的肿瘤细胞。在另一个实施方案中,抗原结合模块能够经其靶抗原(例如T细胞受体复合物抗原)来激活信号传导。抗原结合模块包括如本文中另外定义的抗体及其片段。具体的抗原结合模块包括抗体的抗原结合域,其包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区。在某些实施方案中,抗原结合模块可以包含抗体恒定区,如本文中另外定义和本领域中已知的。可用的重链恒定区包括以下5种同种型中的任何一种: α , δ , ϵ , γ 或 μ 。可用的轻链恒定区包括以下2种同种型中的任何一种: κ 和 λ 。

[0132] 如本文中使用的,术语“抗原性决定簇”或“抗原”指多肽大分子上与抗原结合模块结合,形成抗原结合模块-抗原复合物的位点。可用的抗原性决定簇可以例如在肿瘤细胞表面上,在病毒感染的细胞的表面上,在其它患病细胞的表面上,在免疫细胞的表面上,游离在血液血清中和/或在胞外基质(ECM)中找到。

[0133] 术语“嵌合”抗体指其中的重和/或轻链的一部分自特定来源或物种衍生,而重和/或轻链的剩余部分自不同来源或物种衍生的抗体。

[0134] 抗体的“类”指其重链拥有的恒定域或恒定区的类型。抗体有5大类:IgA,IgD,IgE,IgG,和IgM,并且这些中的几种可以进一步分成亚类(同种型),例如,IgG₁,IgG₂,IgG₃,IgG₄,IgA₁,和IgA₂。与不同类免疫球蛋白对应的重链恒定域分别称作 α , δ , ϵ , γ ,和 μ 。

[0135] 药剂(例如药物配制剂)的“有效量”指在必需的剂量和时段上有效实现期望的治疗或预防结果的量。

[0136] 本文中术语“Fc域”或“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链中至少含有恒定区的一部

分的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。虽然IgG重链的Fc区的边界可以略微变化,但是人IgG重链Fc区通常定义为自Cys226或Pro230延伸至重链的羧基端。然而,由宿主细胞生成的抗体可能经历翻译后切割,自重链的C端切除一个或多个,特别是一个或两个氨基酸。因此,通过表达编码全长重链的特定核酸分子由宿主细胞生成的抗体可包括全长重链,或者它可包括全长重链的切割变体(在本文中称作“切割变体重链”)。当重链的最终两个C端氨基酸是甘氨酸(G446)和赖氨酸(K447,编号方式依照Kabat EU索引)时可能就是这种情况。因此,Fc区的C端赖氨酸(Lys447),或C端甘氨酸(Gly446)和赖氨酸(K447)可以存在或不存在。如果没有另外指明的话,包括Fc域(或本文中定义的Fc域的亚基)的重链的氨基酸序列在本文中表示无C端甘氨酸-赖氨酸二肽的。在本发明的一个实施方案中,依照本发明的抗体或双特异性抗体中包含的包括本文中规定的Fc域的一个亚基的重链包含另外的C端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,编号方式依照Kabat的EU索引)。在本发明的一个实施方案中,依照本发明的抗体或双特异性抗体中包含的包括本文中规定的Fc域的一个亚基的重链包含另外的C端甘氨酸残基(G446,编号方式依照Kabat的EU索引)。本发明的组合物,诸如本文所述药学组合物,包含本发明的抗体或双特异性抗体的群体。抗体或双特异性抗体的群体可包含具有全长重链的分子和具有切割变体重链的分子。抗体或双特异性抗体的群体可以由具有全长重链的分子和具有切割变体重链的分子的混合物组成,其中至少50%,至少60%,至少70%,至少80%或至少90%的抗体或双特异性抗体具有切割变体重链。在本发明的一个实施方案中,包含本发明的抗体或双特异性抗体的群体的组合物包含如下的抗体或双特异性抗体,其包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基及另外的C端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,编号方式依照Kabat的EU索引)的重链。在本发明的一个实施方案中,包含本发明的抗体或双特异性抗体的群体的组合物包含如下的抗体或双特异性抗体,其包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基及另外的C端甘氨酸残基(G446,编号方式依照Kabat的EU索引)的重链。在本发明的一个实施方案中,此类组合物包含由如下分子构成的抗体或双特异性抗体的群体:包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基的重链的分子;包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基及另外的C端甘氨酸残基(G446,编号方式依照Kabat的EU索引)的重链的分子,和包含包括本文中规定的Fc域的一个亚基及另外的C端甘氨酸-赖氨酸二肽(G446和K447,编号方式依照Kabat的EU索引)的重链的分子。除非本文中另外指定,Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号方式依照EU编号系统,也称作EU索引,如记载于Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991(也参见上文)。如本文中使用的,Fc域的“亚基”指形成二聚体Fc域的两个多肽之一,即包含免疫球蛋白重链中能够稳定自身联合的C端恒定区的多肽。例如,IgG Fc域的亚基包含IgG CH2和IgG CH3恒定域。

[0137] “框架”或“FR”指除高变区(HVR)残基外的可变域残基。一般地,可变域的FR由4个FR域组成:FR1,FR2,FR3,和FR4。因而,HVR和FR序列在VH(或VL)中一般以如下顺序出现:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0138] 术语“全长抗体”,“完整抗体”,和“全抗体”在本文中可互换使用,指与天然抗体结构具有基本上类似的结构或者具有含有本文中定义的Fc区的重链的抗体。

[0139] “融合”意指构件(例如Fab分子和Fc域亚基)直接地或经由一种或多种肽接头通过肽键连接。

[0140] “Fab分子”指由免疫球蛋白的重链(“Fab重链”)的VH和CH1域以及轻链(“Fab轻链”)的VL和CL域组成的蛋白质。

[0141] “交换”Fab分子(也称作“Crossfab”)意指其中Fab重链和轻链的可变域或恒定域交换(即彼此替换)的Fab分子,即交换Fab分子包含由轻链可变域VL和重链恒定域1CH1构成的肽链(VL-CH1,N至C端方向),和由重链可变域VH和轻链恒定域CL构成的肽链(VH-CL,N至C端方向)。为了清楚,在其中Fab轻链和Fab重链的可变域交换的交换Fab分子中,包含重链恒定域1CH1的肽链在本文中称作(交换)Fab分子的“重链”。相反,在其中Fab轻链和Fab重链的恒定域交换的交换Fab分子中,包含重链可变域VH的肽链在本文中称作(交换)Fab分子的“重链”。

[0142] 与之相反,“常规”Fab分子意指处于它的天然型式的Fab分子,即包含由重链可变和恒定域构成的重链(VH-CH1,N至C端方向),和由轻链可变和恒定域构成的轻链(VL-CL,N至C端方向)。

[0143] 术语“宿主细胞”,“宿主细胞系”,和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且指已经导入有外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”,其包括原代的经转化的细胞及自其衍生的后代而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同,而是可以含有突变。本文中包括具有与在初始转化细胞中筛选或选择的功能或生物学活性相同的功能或生物学活性的突变体后代。

[0144] “人抗体”指拥有与由人或人细胞生成的或利用人抗体全集或其它人抗体编码序列自非人来源衍生的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列的抗体。人抗体的此定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0145] “人共有框架”指代表人免疫球蛋白VL或VH框架序列选集中最常存在的氨基酸残基的框架。通常,人免疫球蛋白VL或VH序列选集来自可变域序列亚组。通常,序列亚组是如Kabat,E.A.et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th ed.,Bethesda MD(1991),NIH Publication 91-3242,Vols.1-3中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,亚组是如Kabat等,见上文中的亚组卡帕I。在一个实施方案中,对于VH,亚组是如Kabat等,见上文中的亚组III。

[0146] “人源化”抗体指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体会包含至少一个,通常两个基本上整个可变域,其中所有或基本上所有HVR(例如CDR)对应于非人抗体的那些,且所有或基本上所有FR对应于人抗体的那些。任选地,人源化抗体可以至少包含自人抗体衍生的抗体恒定区的一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”指已经经历人源化的抗体。

[0147] 如本文中使用的,术语“高变区”或“HVR”指抗体可变域中在序列上高变的(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上定义的环的(“高变环”)和/或含有抗原接触残基的(“抗原接触”)每一个区域。一般地,抗体包含6个HVR;三个在VH中(H1,H2,H3),且三个在VL中(L1,L2,L3)。本文中的例示性HVR包括:

[0148] (a) 高变环,其存在于氨基酸残基26-32(L1),50-52(L2),91-96(L3),26-32(H1),53-55(H2),和96-101(H3)(Chothia and Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0149] (b) CDR,其存在于氨基酸残基24-34(L1),50-56(L2),89-97(L3),31-35b(H1),50-65(H2),和95-102(H3)(Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological

Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

[0150] (c) 抗原接触, 其存在于氨基酸残基27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), 和93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)); 和

[0151] (d) (a), (b), 和/或(c)的组合, 包括HVR氨基酸残基24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35 (H1), 50-63 (H2), 和95-102 (H3)。

[0152] 除非另有指示, 可变域中的HVR残基和其它残基(例如FR残基)在本文中依照Kabat et al., Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 编号。

[0153] “免疫缀合物”指与一种或多种异源分子(包括但不限于细胞毒剂)缀合的抗体。

[0154] “个体”或“受试者”指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如牛, 绵羊, 猫, 犬, 和马), 灵长类(例如人和非人灵长类, 诸如猴), 家兔, 和啮齿类(例如小鼠和大鼠)。在某些实施方案中, 个体或受试者是人。

[0155] “分离的”抗体指已经与其天然环境的成分分开的抗体。在一些实施方案中, 抗体纯化至大于95%或99%的纯度, 如通过例如电泳(例如SDS-PAGE, 等电聚焦(IEF), 毛细管电泳)或层析(例如离子交换或反相HPLC)测定的。关于用于评估抗体纯度的方法的综述参见例如Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)。

[0156] “分离的”核酸指已经与其天然环境的成分分开的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中含有的核酸分子, 但是核酸分子在染色体外或在与其天然染色体位置不同的染色体位置处存在。

[0157] “编码抗HLA-G抗体的分离的核酸”指编码抗体重和轻链(或其片段)的一种或多种核酸分子, 包括单一载体或分开的载体中的此类核酸分子, 和存在于宿主细胞中的一个或多个位置的此类核酸分子。

[0158] 如本文中使用的, 术语“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体获得的抗体, 即构成群体的各个抗体是相同的和/或结合相同表位, 除了例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体制备物的生成期间发生的可能的变体抗体外, 此类变体一般以极少量存在。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同, 单克隆抗体制备物的每个单克隆抗体对抗原上的单一决定簇。如此, 修饰语“单克隆”指示抗体自一群基本上同质的抗体获得的特征, 而不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如, 可以通过多种技术来生成要依照本发明使用的单克隆抗体, 包括但不限于杂交瘤方法, 重组DNA方法, 噬菌体展示方法, 和利用含有整个或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法, 本文中描述了用于生成单克隆抗体的此类方法和其它例示性方法。

[0159] “促进Fc域的第一亚基和第二亚基联合的修饰”是降低或防止包含Fc域亚基的多肽与相同多肽联合以形成同二聚体的肽主链操作或Fc域亚基的翻译后修饰。如本文中使用的, 具体地, 促进联合的修饰包括对期望联合的两个Fc域亚基(即Fc域的第一亚基和第二亚基)中的每一个进行的分开的修饰, 其中所述修饰彼此互补, 从而促进两个Fc域亚基的联合。例如, 促进联合的修饰可以改变一种或两种Fc域亚基的结构或电荷, 从而在立体或静电上分别使它们的联合有利。如此, (异)二聚化在包含第一Fc域亚基的多肽和包含第二Fc域亚基的多肽之间发生, 其在融合至每个亚基的别的构件(例如抗原结合模块)不同这一意义

上讲可能是不相同的。在一些实施方案中,促进联合的修饰包含在Fc域中的氨基酸突变,具体为氨基酸替代。在一个具体的实施方案中,促进联合的修饰包含Fc域的两个亚基的每一个中分开的氨基酸突变,具体为氨基酸替代。

[0160] “天然抗体”指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚糖蛋白,由成二硫键的两条相同轻链和两条相同重链构成。从N至C端,每条重链具有一个可变区(VH),又称作可变重域或重链可变域,接着是三个恒定域(CH1,CH2,和CH3)。类似地,从N至C端,每条轻链具有一个可变区(VL),又称作可变轻域或轻链可变域,接着是一个恒定轻(CL)域。根据其恒定域氨基酸序列,抗体轻链可归入两种型中的一种,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

[0161] 术语“包装插页”用于指治疗产品的商业包装中通常包含的用法说明书,其含有关于涉及此类治疗产品应用的适应症,用法,剂量,施用,联合疗法,禁忌症和/或警告的信息。

[0162] 关于参照多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为比对序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时,候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以以本领域技术范围内的多种方式实现,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如BLAST,BLAST-2,ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员能决定用于比对序列的适宜参数,包括对所比较序列全长实现最大对比需要的任何算法。然而,为了本发明的目的,%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生的。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech公司编写,并且源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局(Washington D.C.,20559),在那里其以美国版权注册号TXU510087注册。公众自Genentech公司(South San Francisco,California)可获得ALIGN-2程序,或者可以从源代码编译。ALIGN-2程序应当编译成在UNIX操作系统(包括数码UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定且不变。

[0163] 在采用ALIGN-2来比较氨基酸序列的情况中,给定氨基酸序列A相对于(to),与(with),或针对(against)给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(或者可表述为具有或包含相对于,与,或针对给定氨基酸序列B的某一%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A)如下计算:

[0164] 分数 X/Y 乘100,其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序的A和B比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,且其中Y是B中的氨基酸残基的总数。应当领会,在氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等的情况下,A相对于B的%氨基酸序列同一性会不等于B相对于A的%氨基酸序列同一性。除非另有明确说明,本文中使用的所有%氨基酸序列同一性值都是依照上一段所述,使用ALIGN-2计算机程序获得的。

[0165] 术语“药物配制剂”指所处形式使得允许其中含有的活性组分的生物学活性是有效的,且不含对会接受配制剂施用的受试者具有不可接受的毒性的别的成分的制剂。

[0166] “药学可接受载剂”指药物配制剂中与活性成分不同,且对受试者无毒的组分。药学可接受载剂包括但不限于缓冲剂,赋形剂,稳定剂,或防腐剂。

[0167] 如本文中使用的,“治疗/处理”(及其语法变型)指试图改变所治疗个体的天然过程的临床干预,并且可以为了预防或者在临床病理学的过程期间实施。期望的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或再发生,减轻症状,减轻/减少疾病的任何直接或间接病理后

果,预防转移,降低疾病进展速率,改善或减轻疾病状态,和消退或改善的预后。在一些实施方案中,使用本发明的抗体来延迟疾病的形成或减缓疾病的进展。

[0168] 术语“可变区”或“可变域”指抗体重或轻链中牵涉抗体结合抗原的域。天然抗体的重链和轻链可变域(分别为VH和VL)一般具有类似的结构,其中每一个域包含4个保守的框架区(FR)和3个高变区(HVR)(参见例如Kindt,T.J.et al.,Kuby Immunology,6th ed.,W.H.Freeman and Co.,N.Y.(2007),page 91)。单个VH或VL域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以分别使用来自结合抗原的抗体的VH或VL域筛选互补VL或VH域的文库来分离结合特定抗原的抗体。参见例如Portolano,S.et al.,J.Immunol.150:880-887(1993); Clarkson,T.et al.,Nature 352:624-628(1991))。

[0169] 如本文中使用的,术语“载体”指能够增殖与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自身复制型核酸结构的载体以及并入接受其导入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0170] I. 组合物和方法

[0171] 一方面,本发明部分基于下述发现,如本文中描述的多特异性抗体(例如双特异性抗体)利用选定抗HLA-G抗体作为第一抗原结合位点/模块。这些抗HLA-G抗体以高特异性(与其它物种和人HLA-A共有序列没有交叉反应性)结合HLA-G的某些表位,而且有能力特异性抑制ILT2和/或ILT4结合HLA-G。它们抑制例如ILT2结合HLA-G且通过适宜刺激(用例如脂多糖(LPS))后升高的免疫调控性细胞因子(像TNF α)的分泌来特异性恢复HLA-G介导的单核细胞的免疫遏制,而且显示对HLA-G敲除细胞没有效果。

[0172] 同时,如本文中描述的多特异性抗体(例如双特异性抗体)以第二抗原结合位点(模块)结合T细胞活化性抗原(特别是CD3,尤其是CD3 ϵ)。

[0173] A. 例示性多特异性抗HLA-G/抗CD3抗体

[0174] 在本发明的一个实施方案中,该多特异性抗体是结合人HLA-G和人CD3的双特异性抗体,包含结合人HLA-G的第一抗原结合模块和结合人CD3的第二抗原结合模块。

[0175] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G的第一抗原结合模块抗体包含

[0176] A) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0177] B) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;且

[0178] 该结合T细胞活化性抗原的第二抗原结合模块结合人CD3,且包含。

[0179] C) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列

的HVR-L3。

[0180] 在本发明的一个实施方案中,该第一抗原结合模块

[0181] A)

[0182] 包含SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列;或

[0183] B)

[0184] 包含SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列;且

[0185] 该第二抗原结合模块

[0186] C)

[0187] 包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列。

[0188] 在本发明的一个实施方案中,

[0189] 该第一抗原结合模块包含SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列;且

[0190] 该第二抗原结合模块包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列。

[0191] 在本发明的一个实施方案中,

[0192] 该第一抗原结合模块包含SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列;且

[0193] 该第二抗原结合模块包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列。

[0194] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G(在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物)的第一结合模块包含

[0195] A) (a) 如下的VH域,该VH域包含 (i) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少95%, 96%, 97%, 98%, 99% 或100% (在一个优选实施方案中, 98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列;和 (b) 如下的VL域,该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:34的氨基酸序列具有至少95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100% (在一个优选实施方案中, 98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列;或

[0196] B) (a) 如下的VH域,该VH域包含 (i) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100% (在一个优选实施方案中, 98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列;和 (b) 如下的VL域,该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100% (在一个优选实施方案中, 98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列;或

[0197] C) (a) 如下的VH域,该VH域包含 (i) 包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100% (在一个优选实施方案中, 98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列;和 (b) 如下的VL域,该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;

且其中该VL域包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100% (在一个优选实施方案中,98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列;或

[0198] D) (a) 如下的VH域,该VH域包含 (i) 包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和 (iii) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100% (在一个优选实施方案中,98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列;和 (b) 如下的VL域,该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和 (iii) 包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100% (在一个优选实施方案中,98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列。

[0199] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G (在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物) 的第一结合模块包含

[0200] (a) 如下的VH域,该VH域包含 (i) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和 (iii) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和 (b) 如下的VL域,该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和 (iii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;且

[0201] 其中该抗体以与包含SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列的抗体实质性相同的结合亲和力 (在一个实施方案中,以与之相比降低至多10倍的结合亲和力的KD值,在一个实施方案中,以与之相比降低至多5倍的结合亲和力的KD值) 结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物 (如在表面等离子共振测定法中测定的)。

[0202] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G (在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物) 的第一结合模块包含

[0203] (a) 如下的VH域,该VH域包含 (i) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和 (iii) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100% (在一个优选实施方案中,98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列;和 (b) 如下的VL域,该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和 (iii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:34的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100% (在一个优选实施方案中,98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列;且

[0204] 其中该抗体以与包含SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列的抗体实质性相同的结合亲和力 (在一个实施方案中,以与之相比降低至多10倍的结合亲和力的KD值,在一个实施方案中,以与之相比降低至多5倍的结合亲和力的KD值) 结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物 (如在表面等离子共振测定法中测定的);和/或

[0205] 其中该抗体独立地特征在于下述特性:该抗HLA-G抗体

[0206] a) 并不与包含SEQ ID NO:44的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0207] b) 并不与包含SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:37的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0208] c) 并不与包含SEQ ID NO:45的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

- [0209] d) 并不与包含SEQ ID NO:47的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或
- [0210] e) 抑制ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43);和/或
- [0211] f) 将ILT2结合三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50% (在一个实施方案中,超过60%) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例4b);和/或
- [0212] g) 将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50% (在一个实施方案中,超过80%) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例4b);和/或
- [0213] h) 抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(超过50% (在一个实施方案中,超过80%)) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例6);和/或
- [0214] i) 结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(见实施例5),且抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(超过50% (在一个实施方案中,超过80%)) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例6);和/或
- [0215] j) 将CD8a结合HLA-G抑制超过80% (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例4c);和/或
- [0216] k) 恢复与JEG-3细胞(ATCC HTB36)共培养的单核细胞的HLA-G特异性受遏制免疫应答(例如受遏制肿瘤坏死因子(TNF) α 释放)。
- [0217] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G(在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物)的第一结合模块与包含SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列的抗体结合相同表位。
- [0218] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G(在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物)的第一结合模块包含
- [0219] (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;且
- [0220] 其中该抗体以与包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列的抗体实质性相同的结合亲和力(在一个实施方案中,以与之相比降低至多10倍的结合亲和力的KD值,在一个实施方案中,以与之相比降低至多5倍的结合亲和力的KD值)结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物(如在表面等离子共振测定法中测定的)。
- [0221] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G(在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物)的第一结合模块包含
- [0222] (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100% (在一个优选实施方案中,98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL

域包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;且

[0223] 其中该抗体以与包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列的抗体实质性相同的结合亲和力(在一个实施方案中,以与之相比降低至多10倍的结合亲和力的KD值,在一个实施方案中,以与之相比降低至多5倍的结合亲和力的KD值)结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物(如在表面等离子共振测定法中测定的);和/或

[0224] 其中该抗体独立地特征在于下述特性:该抗HLA-G抗体

[0225] a) 并不与包含SEQ ID NO:44的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0226] b) 并不与包含SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:37的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0227] c) 并不与包含SEQ ID NO:45的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0228] d) 并不与包含SEQ ID NO:47的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0229] e) 抑制ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43);和/或

[0230] f) 将ILT2结合三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50%(在一个实施方案中,超过60%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例4b);和/或

[0231] g) 将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50%(在一个实施方案中,超过80%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例4b);和/或

[0232] h) 抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(超过50%(在一个实施方案中,超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例6);和/或

[0233] i) 结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(见实施例5),且抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(超过50%(在一个实施方案中,超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例6);和/或

[0234] j) 将CD8a结合HLA-G抑制超过80%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例4c);和/或

[0235] k) 恢复与JEG-3细胞(ATCC HTB36)共培养的单核细胞的HLA-G特异性受遏制免疫应答(例如受遏制肿瘤坏死因子(TNF) α 释放)。

[0236] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G(在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物)的第一结合模块与包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列的抗体结合相同表位。

[0237] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G(在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物)的第一结合模块包含

[0238] (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;且

[0239] 其中该抗体以与包含SEQ ID NO:23的VH序列和SEQ ID NO:24的VL序列的抗体实

质性相同的结合亲和力(在一个实施方案中,以与之相比降低至多10倍的结合亲和力的KD值,在一个实施方案中,以与之相比降低至多5倍的结合亲和力的KD值)结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物(如在表面等离子共振测定法中测定的)。

[0240] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G(在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物)的第一结合模块包含

[0241] (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;和
(b) 如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;且

[0242] 其中该抗体以与包含SEQ ID NO:23的VH序列和SEQ ID NO:24的VL序列的抗体实质性相同的结合亲和力(在一个实施方案中,以与之相比降低至多10倍的结合亲和力的KD值,在一个实施方案中,以与之相比降低至多5倍的结合亲和力的KD值)结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物(如在表面等离子共振测定法中测定的);和/或

[0243] 其中该抗体独立地特征在于下述特性:该抗HLA-G抗体

[0244] a) 并不与包含SEQ ID NO:44的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0245] b) 并不与包含SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:37的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0246] c) 并不与包含SEQ ID NO:45的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0247] d) 并不与包含SEQ ID NO:47的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0248] e) 抑制ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43);和/或

[0249] f) 将ILT2结合三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50%(在一个实施方案中,超过60%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例4b);和/或

[0250] g) 将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50%(在一个实施方案中,超过80%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例4b);和/或

[0251] h) 抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(超过50%(在一个实施方案中,超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例6);和/或

[0252] i) 结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(见实施例5),且抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(超过50%(在一个实施方案中,超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例6);和/或

[0253] j) 将CD8a结合HLA-G抑制超过80%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例4c);和/或

[0254] k) 恢复与JEG-3细胞(ATCC HTB36)共培养的单核细胞的HLA-G特异性受遏制免疫应答(例如受遏制肿瘤坏死因子(TNF) α 释放)。

[0255] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G(在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物)的第一结合模块与包含SEQ ID NO:23的VH序列和SEQ ID NO:24的VL序列的抗体结合相同表位。

[0256] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G(在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物)的第一结合模块包含

[0257] (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;且

[0258] 其中该抗体以与包含SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列的抗体实质性相同的结合亲和力(在一个实施方案中,以与之相比降低至多10倍的结合亲和力的KD值,在一个实施方案中,以与之相比降低至多5倍的结合亲和力的KD值)结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物(如在表面等离子共振测定法中测定的)。

[0259] 在一个实施方案中,该结合人HLA-G(在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物)的第一结合模块包含

[0260] (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;且

[0261] 其中该抗体以与包含SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列的抗体实质性相同的结合亲和力(在一个实施方案中,以与之相比降低至多10倍的结合亲和力的KD值,在一个实施方案中,以与之相比降低至多5倍的结合亲和力的KD值)结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物(如在表面等离子共振测定法中测定的);和/或

[0262] 其中该抗体独立地特征在于下述特性:该抗HLA-G抗体

[0263] a) 并不与包含SEQ ID NO:44的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0264] b) 并不与包含SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:37的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0265] c) 并不与包含SEQ ID NO:45的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0266] d) 并不与包含SEQ ID NO:47的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或

[0267] e) 抑制ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43);和/或

[0268] f) 将ILT2结合三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50%(在一个实施方案中,超过60%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例4b);和/或

[0269] g) 将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ

ID NO:43) 抑制超过50% (在一个实施方案中, 超过80%) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例4b); 和/或

[0270] h) 抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36) (上的HLA-G) (超过50% (在一个实施方案中, 超过80%)) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例6); 和/或

[0271] i) 结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36) (上的HLA-G) (见实施例5), 且抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36) (上的HLA-G) (超过50% (在一个实施方案中, 超过80%)) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例6); 和/或

[0272] j) 将CD8a结合HLA-G抑制超过80% (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例4c); 和/或

[0273] k) 恢复与JEG-3细胞(ATCC HTB36) 共培养的单核细胞的HLA-G特异性受遏制免疫应答(例如受遏制肿瘤坏死因子(TNF) α 释放)。

[0274] 在一个实施方案中, 该结合人HLA-G (在一个实施方案中, 包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物) 的第一结合模块与包含SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列的抗体结合相同表位。

[0275] 在一个实施方案中, 该结合人CD3 (在一个实施方案中, 包含SEQ ID NO:76的CD3) 的第二结合模块包含

[0276] (a) 如下的VH域, 该VH域包含(i) 包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2, 和(iii) 包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3; 和(b) 如下的VL域, 该VL域包含(i) 包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2, 和(iii) 包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3。

[0277] 在一个实施方案中, 该结合人CD3 (在一个实施方案中, 包含SEQ ID NO:76的CD3) 的第二结合模块包含

[0278] 包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列。

[0279] 在一个实施方案中, 该结合人HLA-G (在一个实施方案中, 包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物) 的第一结合模块包含

[0280] (a) 如下的VH域, 该VH域包含(i) 包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2, 和(iii) 包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3; 且其中该VH域包含与SEQ ID NO:62的氨基酸序列具有至少95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100% (在一个优选实施方案中, 98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列; 和(b) 如下的VL域, 该VL域包含(i) 包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2, 和(iii) 包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3; 且其中该VL域包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100% (在一个优选实施方案中, 98%或99%或100%) 序列同一性的氨基酸序列。

[0281] 在一个实施方案中, 该结合人HLA-G (在一个实施方案中, 包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物) 的第一结合模块包含

[0282] (a) 如下的VH域, 该VH域包含(i) 包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2, 和(iii) 包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3; 且其中该VH域包含与SEQ ID NO:62的氨基酸序列具有至少95%, 96%, 97%, 98%,

99%或100% (在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;和 (b) 如下的VL域,该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和 (iii) 包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100% (在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;且

[0283] 其中该抗体以与包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列的抗体实质性相同的结合亲和力 (在一个实施方案中,以与之相比降低至多10倍的结合亲和力的KD值,在一个实施方案中,以与之相比降低至多5倍的结合亲和力的KD值) 结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物 (如在表面等离子共振测定法中测定的)。

[0284] 多特异性抗体

[0285] 在一个优选实施方案中,本文中提供的多特异性抗体是双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两种不同位点 (即不同抗原上的不同表位或相同抗原上的不同表位) 具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,多特异性抗体具有三种或更多种结合特异性。在某些实施方案中,结合特异性之一针对HLA-G,而其它 (两种或更多种) 特异性针对CD3。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合HLA-G的两种 (或更多种) 不同表位。多特异性抗体可以以全长抗体或抗体片段制备。

[0286] 用于生成多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两对免疫球蛋白重链-轻链的重组共表达 (见Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)), 和“节-入-穴”工程化 (见例如美国专利No.5,731,168和Atwell et al., J.Mol.Biol.270:26 (1997))。也可以通过用于生成抗体Fc-异二聚体分子的工程化静电操纵效应 (见例如W0 2009/089004); 交联两种或更多种抗体或片段 (见例如美国专利No.4,676,980,和Brennan et al., Science, 229:81 (1985)); 使用亮氨酸拉链来生成双特异性抗体 (见例如Kostelny et al., J.Immunol., 148 (5):1547-1553 (1992) 和W0 2011/034605); 使用共同轻链技术来规避轻链错配问题 (见例如W0 98/50431); 使用用于生成双特异性抗体片段的“双抗体”技术 (见例如Hollinger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:6444-6448 (1993)); 和使用单链Fv (sFv) 二聚体 (见例如Gruber et al., J.Immunol., 152:5368 (1994)); 和如例如Tutt et al. J.Immunol.147:60 (1991) 中所描述的, 制备三特异性抗体来生成多特异性抗体。

[0287] 本文中还包括具有三个或更多个抗原结合位点的工程化改造抗体, 包括例如“章鱼抗体”或DVD-Ig (见例如W0 2001/77342和W0 2008/024715)。具有三个或更多个抗原结合位点的多特异性抗体的其它例子可以在W02010/115589, W0 2010/112193, W0 2010/136172, W02010/145792, 和W02013/026831中找到。双特异性抗体或其抗原结合片段还包括包含结合HLA-G和另一种不同抗原, 或HLA-G的两种不同表位的抗原结合位点的“双重作用Fab”或“DAF” (见例如US 2008/0069820和W0 2015/095539)。

[0288] 多特异性抗体还可以以不对称形式提供, 其具有一个或多个具有相同抗原特异性的结合臂中的域交换, 即通过交换VH/VL域 (见例如W02009/080252和W0 2015/150447), CH1/CL域 (见例如W0 2009/080253) 或整个Fab臂 (见例如W0 2009/080251, W0 2016/016299, 还见Schaefer et al., PNAS, 108 (2011) 1187-1191, 和Klein et al., MAbs 8 (2016) 1010-20)。还可以通过将带电荷的或不带电荷的氨基酸突变引入域界面以指导正确的Fab配对来改造不对称Fab臂。见例如W0 2016/172485。

[0289] 多特异性抗体的各种别的分子型式是本领域知道的且包括在本文中(见例如 Spiess et al., Mol Immunol 67(2015) 95-106)。

[0290] 本文中还包括的一种特定类型的多特异性抗体是设计成同时结合靶细胞,例如肿瘤细胞上的表面抗原和T细胞受体(TCR)复合物的激活性的,不变的构件,诸如CD3,从而再靶向T细胞以杀死靶细胞的双特异性抗体。因此,在某些实施方案中,本文中提供的抗体是多特异性抗体,特别是双特异性抗体,其中结合特异性之一针对HLA-G且另一针对CD3。

[0291] 对于这个目的可能有用的双特异性抗体型式的例子包括但不限于所谓的“BiTE”(双特异性T细胞啮合剂)分子,其中通过柔性接头融合两个scFv分子(见例如W02004/106381, W02005/061547, W02007/042261, 和W02008/119567, Nagorsen and B auerle, Exp Cell Res 317, 1255-1260 (2011)); 双抗体(Holliger et al., Prot Eng 9, 299-305 (1996))及其衍生物,诸如串联双抗体(“TandAb”; Kipriyanov et al., J Mol Biol 293, 41-56 (1999)); “DART”(双重亲和力再靶向)分子,它们基于双抗体型式但特征在于实现额外稳定化的C端二硫桥(Johnson et al., J Mol Biol 399, 436-449 (2010)),和所谓的 triomab,它们是完整杂合小鼠/大鼠IgG分子(综述见Seimetz et al., Cancer Treat Rev 36, 458-467 (2010))。本文中包括的特定T细胞双特异性抗体型式描述于W02013/026833, W02013/026839, W0 2016/020309; Bacac et al., Oncoimmunology 5(8) (2016) e1203498。

[0292] 结合HLA-G和CD3的双特异性抗体

[0293] 本发明还提供一种双特异性抗体,即包含能够特异性结合两种截然不同抗原性决定簇(第一和第二抗原)的至少两种抗原结合模块的抗体。

[0294] 基于他们开发的HLA-G抗体,发明人开发了结合HLA-G和别的抗原,特别是活化性T细胞抗原,诸如CD3的双特异性抗体。

[0295] 如实施例中显示的,这些双特异性抗体具有多项引人注目的特性,包括较好的功效和较低的毒性。

[0296] 如此,在某些方面,本发明提供一种双特异性抗体,其包含(a)结合第一抗原的第一抗原结合模块,其中该第一抗原是HLA-G,和(b)特异性结合第二抗原的第二抗原结合模块,其中该双特异性抗体具有任何下述特征。

[0297] 本发明的双特异性抗体特异性诱导T细胞介导的表达HLA-G的细胞的杀伤。在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体特异性诱导T细胞介导的表达HLA-G的细胞的杀伤。在一个更加具体实施方案中,该双特异性抗体特异性诱导T细胞介导的表达HLA-G的细胞的杀伤。

[0298] 在一个实施方案中,双特异性抗体对T细胞介导的杀伤的诱导是使用HLA-G表达细胞测定的。

[0299] 在一个实施方案中,双特异性抗体对T细胞的激活是通过测量(特别是通过流式细胞术)在HLA-G表达性细胞,特别是经肽脉冲的T2细胞存在下与双特异性抗体一起温育后T细胞的CD25和/或CD69表达测定的。

[0300] 在一个具体实施方案中,双特异性抗体对T细胞介导的杀伤的诱导是如下测定的:

[0301] 在用重组HLA-G转染的SKOV3细胞(SKOV3HLA-G)上测试在HLA-G表达性肿瘤细胞存在下抗HLA-G/抗CD3 TCB激活T细胞的能力。通过T细胞上细胞表面激活标志物CD25和早期激活标志物CD69的FACS分析评估T细胞的激活。简言之,使用淋巴细胞分离介质管(PAN#P04-

60125) 通过密度梯度离心自人外周血分离PBMC。在96孔U底板中以比率10:1接种PBMC和SKOV3HLA-G细胞。然后如实施例10中所述将共培养物与不同浓度的HLA-G-TCB一起温育并在具有5%CO₂的温箱中于37℃温育24小时。次日,通过流式细胞术测量CD25和CD69的表达。

[0302] 对于流式细胞术分析,于4℃将细胞用PerCP-Cy5.5小鼠抗人CD8 (BD Pharmingen# 565310), PE小鼠抗人CD25 (eBioscience#9012-0257) 和APC小鼠抗人CD69 (BD Pharmingen# 555533) 染色。简言之,将抗体稀释至2倍浓度并在具有25μl预清洗共培养物的每个孔中添加25μl抗体稀释液。将细胞于4℃染色30分钟并用200μl/孔染色缓冲液清洗两次并以300g离心5分钟。在200μl染色缓冲液中重悬浮细胞团粒并以2μg/ml的终浓度用DAPI染色进行活死区分。然后使用BD LSR流式细胞仪测量样品。使用FlowJo V.10.1软件实施数据分析。输出均值荧光强度的几何均值并计算同种型和抗体的几何均值之比。

[0303] 本发明的双特异性抗体在表达HLA-G的细胞存在下特异性激活T细胞。在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体在表达HLA-G的细胞存在下特异性激活T细胞。在一个更加具体实施方案中,双特异性抗体在表达HLA-G的细胞存在下特异性激活T细胞。

[0304] 在一个实施方案中,双特异性抗原结合并不显著诱导T细胞介导的表达HLA-G的细胞的杀伤或在表达HLA-G的细胞存在下激活T细胞。在一个实施方案中,双特异性抗体以比诱导T细胞介导的表达HLA-G的细胞的杀伤或在表达HLA-G的细胞存在下激活T细胞的EC₅₀低至少5,至少10,至少15,至少20,至少25,至少50,至少75或至少100倍的EC₅₀诱导T细胞介导的表达HLA-G的细胞的杀伤和/或在表达HLA-G的细胞存在下激活T细胞。

[0305] 依照本发明的特定实施方案,双特异性抗体中包含的抗原结合模块是Fab分子(即由各自包含可变和恒定域的重和轻链构成的抗原结合域)。在一个实施方案中,第一和/或第二抗原结合模块是Fab分子。在一个实施方案中,所述Fab分子是人的。在一个特定实施方案中,所述Fab分子是人源化的。在还有另一个实施方案中,所述Fab分子包含人重和轻链恒定域。

[0306] 优选地,抗原结合模块中至少一个是交换Fab分子。此类修饰减少来自不同Fab分子的重链和轻链的错误配对,由此改进了重组生产中本发明的双特异性抗体的产量和纯度。在可用于本发明的双特异性抗体的一种具体的交换Fab分子中,Fab轻链和Fab重链的可变域(分别是VL和VH)是交换的。然而,甚至在有这种域交换的情况下,由于错配的重和轻链之间所谓的Bence Jones型相互作用,双特异性抗体的制备物可能包含某些副产物(参见Schaefer et al,PNAS,108(2011)11187-11191)。为了进一步减少来自不同Fab分子的重和轻链的错配及由此提高想要的双特异性抗体的纯度和产量,可以在结合第一抗原(HLA-G)的Fab分子或结合第二抗原活化性T细胞抗原,诸如CD3的Fab分子的CH1和CL域中的特定氨基酸位置引入具有相反电荷的带电荷的氨基酸,如本文中进一步描述的。在双特异性抗体中包含的常规Fab分子中(诸如例如图11A-C,G-J中所示)或在双特异性抗体中包含的VH/VL交换Fab分子中(诸如例如图11D-F,K-N中所示)(但并不在二者中都)进行电荷修饰。在具体的实施方案中,在双特异性抗体中包含的常规Fab分子(它在具体的实施方案中结合第一抗原,即HLA-G)中进行电荷修饰。

[0307] 在依照本发明的一个具体的实施方案中,双特异性抗体能够同时结合第一抗原(即HLA-G)和第二抗原(例如活化性T细胞抗原,特别是CD3)。在一个实施方案中,双特异性抗体能够通过同时结合HLA-G和活化性T细胞抗原来交联T细胞和靶细胞。在一个甚至更具

体的实施方案中,此类同时结合导致靶细胞(特别是HLA-G表达性肿瘤细胞)的裂解。在一个实施方案中,此类同时结合导致T细胞的活化。在其它实施方案中,此类同时结合导致T淋巴细胞(特别是细胞毒性T淋巴细胞)的细胞应答,其选自下组:增殖,分化,细胞因子分泌,细胞毒性效应分子释放,细胞毒性活性,和活化标志物的表达。在一个实施方案中,在没有同时结合HLA-G的情况下双特异性抗体对活化性T细胞抗原,特别是CD3的结合不导致T细胞活化。

[0308] 在一个实施方案中,双特异性抗体能够将T细胞的细胞毒性活性重定向于靶细胞。在一个具体的实施方案中,所述重定向不依赖于靶细胞的MHC介导的肽抗原呈递和/或T细胞的特异性。

[0309] 具体地,依照本发明任何实施方案的T细胞是细胞毒性T细胞。在一些实施方案中,T细胞是CD4⁺或CD8⁺T细胞,特别是CD8⁺T细胞。

[0310] 第一抗原结合模块

[0311] 本发明的双特异性抗体包含至少一个结合HLA-G(第一抗原)的抗原结合模块,特别是Fab分子。在某些实施方案中,双特异性抗体包含两个结合HLA-G的抗原结合模块,特别是Fab分子。在一个特定此类实施方案中,每个这些抗原结合模块结合相同的抗原性决定簇。在一个甚至更加特定实施方案中,所有这些抗原结合模块是相同的,即它们包含相同的氨基酸序列,包括与本文中描述的相同的CH1和CL域中氨基酸替代(如果有的话)。在一个实施方案中,双特异性抗体包含不超过两个结合HLA-G的抗原结合模块,特别是Fab分子。

[0312] 在特定实施方案中,结合HLA-G的抗原结合模块是常规Fab分子。在此类实施方案中,结合第二抗原的抗原结合模块是如本文中描述的交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CH1和CL是彼此交换/替换的Fab分子。

[0313] 在备选实施方案中,结合HLA-G的抗原结合模块是如本文中描述的交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CH1和CL是彼此交换/替换的Fab分子。在此类实施方案中,结合第二抗原的抗原结合模块是常规Fab分子。

[0314] HLA-G结合模块能够将双特异性抗体指导至靶部位,例如特定类型的表达HLA-G的肿瘤细胞。

[0315] 双特异性抗体的第一抗原结合模块可单一地或组合地并入本文中涉及结合HLA-G的抗体描述的任何特征,除非在科学上明显不合理或不可能。

[0316] 如此,在一个方面,本发明提供一种双特异性抗体,其包含(a)结合第一抗原的第一抗原结合模块,其中该第一抗原是HLA-G且该第一抗原结合模块包含

[0317] 本发明的一个实施方案是一种(分离的)结合人HLA-G的抗体(在一个实施方案中,该抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物),其中该抗体包含

[0318] A) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0319] B) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)

包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0320] C) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0321] D) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3。

[0322] 本发明的一个实施方案是一种分离的结合人HLA-G的抗体(在一个实施方案中,该抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物),其中该抗体

[0323] A)

[0324] i) 包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列;或

[0325] ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体;或

[0326] iii) 包含SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列;或

[0327] B)

[0328] i) 包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列;或

[0329] C)

[0330] i) 包含SEQ ID NO:23的VH序列和SEQ ID NO:24的VL序列;或

[0331] D)

[0332] i) 包含SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列。

[0333] 本发明的一个实施方案是一种(分离的)结合人HLA-G的抗体(在一个实施方案中,该抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物),其中该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3。

[0334] 本发明的一个实施方案是一种(分离的)结合人HLA-G的抗体(在一个实施方案中,该抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物),其中该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0335] 本发明的一个实施方案是一种(分离的)结合人HLA-G的抗体(在一个实施方案中,该抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物),其中该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1;(e)

包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3。

[0336] 本发明的一个实施方案是一种(分离的)结合人HLA-G的抗体(在一个实施方案中,该抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物),其中该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3。

[0337] 本发明的一个实施方案是一种(分离的)结合人HLA-G的抗体(在一个实施方案中,该抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物),其中该抗体包含

[0338] i) SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列;或

[0339] ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体。

[0340] 本发明的一个实施方案是一种(分离的)结合人HLA-G的抗体(在一个实施方案中,该抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物),其中该抗体包含

[0341] i) SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列。

[0342] 本发明的一个实施方案是一种(分离的)结合人HLA-G的抗体(在一个实施方案中,该抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物),其中该抗体包含

[0343] SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列。

[0344] 本发明的一个实施方案是一种(分离的)结合人HLA-G的抗体(在一个实施方案中,该抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物),其中该抗体包含

[0345] SEQ ID NO:23的VH序列和SEQ ID NO:24的VL序列。

[0346] 本发明的一个实施方案是一种(分离的)结合人HLA-G的抗体(在一个实施方案中,该抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物),其中该抗体包含

[0347] SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列。

[0348] 本发明的一个实施方案是一种(分离的)结合人HLA-G的抗体(在一个实施方案中,该抗体结合包含SEQ ID NO:43的HLA-G β 2M MHC I复合物),其中该抗体包含

[0349] A) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:34的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;或

[0350] B) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ

ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;或

[0351] C) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;或

[0352] D) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列。

[0353] 在一个实施方案中,第一抗原结合模块包含人恒定区。在一个实施方案中,第一抗原结合模块是包含人恒定区,特别是人CH1和/或CL域的Fab分子。人恒定区的例示性序列在SEQ ID NO:51和52(分别是人卡帕和拉姆达CL域)和SEQ ID NO:53(人IgG₁重链恒定域CH1-CH2-CH3)中给出。在一些实施方案中,第一抗原结合模块包含包含与SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52的氨基酸序列,特别是SEQ ID NO:51的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链恒定区。特别地,轻链恒定区可包含如本文中在“电荷修饰”下描述的氨基酸突变且/或可包含一个或多个(特别是两个)N端氨基酸的删除或替代,如果在交换Fab分子中的话。在一些实施方案中,第一抗原结合模块包含包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列中包含的CH1域序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链恒定区。特别地,重链恒定区(具体是CH1域)可包含如本文中在“电荷修饰”下描述的氨基酸突变。

[0354] 结合T细胞活化抗原,特别是CD3的第二抗原结合模块

[0355] 本发明的双特异性抗体包含至少一个结合T细胞活化抗原,特别是CD3的抗原结合模块,特别是Fab分子。

[0356] 在特定实施方案中,结合T细胞活化抗原,特别是人CD3的抗原结合模块是如本文中描述的交流Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CH1和CL是彼此交换/替换的Fab分子。在此类实施方案中,结合HLA-G的抗原结合模块优选是常规Fab分子。在双特异性抗体中包含超过一个结合T细胞活化抗原,特别是CD3的抗原结合模块,特别是Fab分子的实施方案中,结合T细胞活化抗原,特别是CD3的抗原结合模块优选是交换Fab分子且结合HLA-G的抗原结合模块是常规Fab分子。

[0357] 在备选实施方案中,结合第二抗原的抗原结合模块是常规Fab分子。在此类实施方案中,结合第一抗原(即HLA-G)的抗原结合模块是如本文中描述的交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CH1和CL是彼此交换/替换的Fab分子。在双特异性抗体中包含超过一个结合第二抗原的抗原结合模块,特别是Fab分子的实施方案中,结合HLA-G的抗原结合模块优选是交换Fab分子且结合CD3的抗原结合模块是常规Fab分子。

[0358] 在一些实施方案中,第二抗原是激活性T细胞抗原(在本文中也称作“激活性T细胞抗原结合模块,或激活性T细胞抗原结合Fab分子”)。在一个特定实施方案中,双特异性抗体包含不超过一个能够特异性结合激活性T细胞抗原的抗原结合模块。在一个实施方案中,双特异性抗体提供对激活性T细胞抗原的单价结合。

[0359] 在特定实施方案中,第二抗原是CD3,特别是人CD3(SEQ ID NO:76)或食蟹猴CD3(SEQ ID NO:77),最特别是人CD3。在一个实施方案中,第二抗原结合模块对人和食蟹猴CD3是交叉反应的(即特异性结合)。在一些实施方案中,第二抗原是CD3的厄普西隆亚基(CD3 ϵ)。

[0360] 在一个实施方案中,该结合人CD3的第二抗原结合模块包含(a)如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3。

[0361] 在一个实施方案中,该结合人CD3的第二抗原结合模块包含(a)如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:62的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列。

[0362] 在一些实施方案中,第二抗原结合模块是(衍生自)人源化抗体。在一个实施方案中,VH是人源化VH且/或VL是人源化VL。在一个实施方案中,第二抗原结合模块包含如任何上述实施方案中的CDR,而且进一步包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0363] 在一个实施方案中,结合人CD3的第二抗原结合模块包含与SEQ ID NO:62的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的VH序列。在一个实施方案中,第二抗原结合模块包含与SEQ ID NO:63的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的VL序列。

[0364] 在一个实施方案中,结合人CD3的第二抗原结合模块包含包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL。

[0365] 在一个实施方案中,结合人CD3的第二抗原结合模块包含人恒定区。在一个实施方案中,第二抗原结合模块是包含人恒定区,特别是人CH1和/或CL域的Fab分子。人恒定域的

例示性序列在SEQ ID NO:51和52(分别是人卡帕和拉姆达CL域)和SEQ ID NO:53(人IgG1重链恒定域CH1-CH2-CH3)中给出。在一些实施方案中,第二抗原结合模块包含包含与SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52的氨基酸序列,特别是SEQ ID NO:51的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链恒定区。特别地,轻链恒定区可包含如本文中在“电荷修饰”下描述的氨基酸突变且/或可包含一个或多个(特别是两个)N端氨基酸的删除或替代,如果在交换Fab分子中的话。在一些实施方案中,第二抗原结合模块包含包含与SEQ ID NO:53的氨基酸序列中包含的CH1域序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链恒定区。特别地,重链恒定区(具体是CH1域)可包含如本文中在“电荷修饰”下描述的氨基酸突变。

[0366] 在一些实施方案中,第二抗原结合模块是其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH或恒定域CL和CH1,特别是可变域VL和VH是彼此替换的Fab分子(即依照此类实施方案,第二抗原结合模块是交换Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变或恒定域是交换的)。在一个此类实施方案中,第一(和第三,如果有的话)抗原结合模块是常规Fab分子。

[0367] 在一个实施方案中,双特异性抗体中存在不超过一个结合第二抗原(例如激活性T细胞抗原诸如CD3)的抗原结合模块(即双特异性抗体提供对第二抗原的单价结合)。

[0368] 电荷修饰

[0369] 本发明的双特异性抗体可以在其中包含的Fab分子中包含如下的氨基酸替代,其特别有效地减少轻链与非匹配重链的错配(Bence-Jones型副产物),在它们的一个(或多个,在分子包含超过两个抗原结合Fab分子的情况中)结合臂具有VH/VL交换的基于Fab的双特异性抗体的生产中可发生错配(还可参见PCT公开文本No.WO 2015/150447,特别是其中的实施例,通过援引完整收入本文)。在它们的结合臂之一中具有VH/VL域交换的双特异性抗体中发生的想要的双特异性抗体与不想要的副产物,特别是Bence Jones型副产物相比的比率可以通过在CH1和CL域中的特定氨基酸位置处引入具有相反电荷的带电荷的氨基酸来改善(在本文中有时称作“电荷修饰”)。

[0370] 因而,在其中双特异性抗体的第一和第二抗原结合模块均是Fab分子,且在抗原结合模块(特别是第二抗原结合模块)之一中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的一些实施方案中,

[0371] i) 在第一抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用带正电荷的氨基酸替代(编号方式依照Kabat),且其中在第一抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用带负电荷的氨基酸替代(编号方式依照Kabat EU索引);或

[0372] ii) 在第二抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用带正电荷的氨基酸替代(编号方式依照Kabat),且其中在第二抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用带负电荷的氨基酸替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0373] 双特异性抗体没有同时包含i)和ii)下提到的修饰。具有VH/VL交换的抗原结合模块的恒定域CL和CH1没有彼此替换(即保持不交换)。

[0374] 在一个更加具体的实施方案中,

[0375] i) 在第一抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且在第一抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式

依照Kabat EU索引);或

[0376] ii) 在第二抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且在第二抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0377] 在一个此类实施方案中,在第一抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且在第一抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0378] 在又一个实施方案中,在第一抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且在第一抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0379] 在一个特定实施方案中,在第一抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且在第一抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0380] 在一个更加具体的实施方案中,在第一抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat),且在第一抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0381] 在一个甚至更加具体的实施方案中,在第一抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat),且在第一抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0382] 在特定实施方案中,如果在第一抗原结合模块的恒定域CL和恒定域CH1中进行依照上述实施方案的氨基酸替代的话,第一抗原结合模块的恒定域CL是卡帕同种型的。

[0383] 或者,依照上文实施方案的氨基酸替代可以在第二抗原结合模块的恒定域CL和恒定域CH1中进行,代替在第一抗原结合模块的恒定域CL和恒定域CH1中进行。在特定的此类实施方案中,第二抗原结合模块的恒定域CL是卡帕同种型的。

[0384] 因而,在一个实施方案中,在第二抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且在第二抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸或位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0385] 在又一个实施方案中,在第二抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用

赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且在第二抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0386] 在仍有另一个实施方案中,在第二抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且在第二抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0387] 在一个实施方案中,在第二抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat),且在第二抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0388] 在另一个实施方案中,在第二抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat),且在第二抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0389] 在一个特定实施方案中,本发明的双特异性抗体包含

[0390] I) 结合HLA的第一抗原结合模块,其中该第一抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子:

[0391] A) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0392] B) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0393] C) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0394] D) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,

(ii) 包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii) 包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;

[0395] 和

[0396] II) 结合人CD3的第二抗原结合模块,其中该第二抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的:

[0397] E) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i) 包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,(ii) 包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii) 包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和(b) 如下的VL域,该VL域包含(i) 包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1,(ii) 包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii) 包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3;且

[0398] 其中在第一抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个特定实施方案中用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个特定实施方案中用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代),且在第一抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0399] 在一个特定实施方案中,本发明的双特异性抗体包含

[0400] I) 结合HLA的第一抗原结合模块,其中该第一抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子:

[0401] A)

[0402] i) 包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列;或

[0403] ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体;或

[0404] iii) 包含SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列;或

[0405] B)

[0406] 包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列;或

[0407] C)

[0408] 包含SEQ ID NO:23的VH序列和SEQ ID NO:24的VL序列;或

[0409] D)

[0410] 包含SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列;

[0411] 和

[0412] II) 结合人CD3的第二抗原结合模块,其中该第二抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的:

[0413] E) SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列;且

[0414] 其中在第一抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个特定实施方案中用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)(在一个特定实施方案中用赖氨酸(K)或精氨酸(R)独立替代),且在第一抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替

代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0415] 双特异性抗体型式

[0416] 依照本发明的双特异性抗体的各构件可以以多种构造彼此融合。例示性的构造绘于图11中。

[0417] 在具体的实施方案中,双特异性抗体中包含的抗原结合模块是Fab分子。在此类实施方案中,第一,第二,第三等抗原结合模块在本文中分别可以称作第一,第二,第三等Fab分子。

[0418] 在一个实施方案中,双特异性抗体的第一和第二抗原结合模块彼此融合,任选经由肽接头。在特定实施方案中,第一和第二抗原结合模块各自是Fab分子。在一个此类实施方案中,第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至第一抗原结合模块的Fab重链的N端。在另一个此类实施方案中,第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至第二抗原结合模块的Fab重链的N端。在其中或是(i)第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至第一抗原结合模块的Fab重链的N端或是(ii)第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至第二抗原结合模块的Fab重链的N端的实施方案中,另外地第一抗原结合模块的Fab轻链和第二抗原结合模块的Fab轻链可以彼此融合,任选经由肽接头。

[0419] 具有单一能够特异性结合靶细胞抗原诸如HLA-G的抗原结合模块(诸如Fab分子)的双特异性抗体(例如如图11A,D,G,H,K,L中显示的)是有用的,特别是在预期靶细胞抗原在高亲和力抗原结合模块的结合后内在化的情况中。在此类情况中,存在超过一个对靶细胞抗原特异性的抗原结合模块可增强靶细胞抗原的内在化,由此降低它的利用度。

[0420] 然而,在其它情况中,包含两个或更多个对靶细胞抗原特异性的抗原结合模块(诸如Fab分子)的双特异性抗体会是有利的(见图11B,11C,11E,11F,11I,11J,11M或11N中显示的例子),例如为了优化对靶部位的靶向或容许靶细胞抗原的交联。

[0421] 因而,在特定实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含第三抗原结合模块。

[0422] 在一个实施方案中,第三抗原结合模块结合第一抗原,即HLA-G。在一个实施方案中,第三抗原结合模块是Fab分子。

[0423] 在特定实施方案中,第三抗原模块与第一抗原结合模块相同。

[0424] 双特异性抗体的第三抗原结合模块可单一地或组合地并入本文中涉及第一抗原结合模块和/或结合HLA-G的抗体描述的任何特征,除非在科学上明显不合理或不可能。

[0425] 在一个实施方案中,该第三抗原结合模块结合HLA-G且包含

[0426] A) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0427] B) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0428] C) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0429] D) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3。

[0430] 在一个实施方案中,该第三抗原结合模块结合HLA-G且包含

[0431] A) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ IDNO:33的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:34的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;或

[0432] B) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;或

[0433] C) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1, (ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列;或

[0434] D) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1, (ii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;且其中该VH域包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序

列;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;且其中该VL域包含与SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少95%,96%,97%,98%,99%或100%(在一个优选实施方案中,98%或99%或100%)序列同一性的氨基酸序列。

[0435] 在一个实施方案中,该第三抗原结合模块

[0436] A)

[0437] i) 包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列;或

[0438] ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体;或

[0439] iii) 包含SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列;或

[0440] B)

[0441] 包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列;或

[0442] C)

[0443] 包含SEQ ID NO:23的VH序列和SEQ ID NO:24的VL序列;或

[0444] D)

[0445] 包含SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列。

[0446] 在一些实施方案中,第三抗原结合模块是(衍生自)人抗体。在一个实施方案中,VH是人VH且/或VL是人VL。在一个实施方案中,第三抗原结合模块包含如任何上述实施方案中的CDR,而且进一步包含人框架,例如人免疫球蛋白框架。

[0447] 在一个实施方案中,该第三抗原结合模块包含

[0448] (i) 包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的VH,和包含与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的VL;

[0449] (ii) 包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的VH,和包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的VL;

[0450] (iii) 包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的VH,和包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的VL;

[0451] (iv) 包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的VH,和包含与SEQ ID NO:32的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的VL;或

[0452] (v) 包含与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的VH,和包含与SEQ ID NO:34的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的VL。

[0453] 在一个实施方案中,该第三抗原结合模块包含

[0454] (i) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL;

[0455] (ii) 包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL;

[0456] (iii) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列

的VL;

[0457] (iv) 包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VL;或

[0458] (iv) 包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VL。

[0459] 在一个实施方案中,该第三抗原结合模块包含包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL。

[0460] 在一个实施方案中,该第三抗原结合模块包含包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL。

[0461] 在一个实施方案中,该第三抗原结合模块包含包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VL。

[0462] 在一个实施方案中,该第三抗原结合模块包含包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VL。

[0463] 在一个实施方案中,该第三抗原结合模块包含包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH,和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VL。

[0464] 在一个实施方案中,第三抗原结合模块包含人恒定区。在一个实施方案中,第三抗原结合模块是包含人恒定区,特别是人CH1和/或CL域的Fab分子。人恒定区的例示性序列在SEQ ID NO:51和52(分别是人卡帕和拉姆达CL域)和SEQ ID NO:53(人IgG₁重链恒定域CH1-CH2-CH3)中给出。在一些实施方案中,第三抗原结合模块包含包含与SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52的氨基酸序列,特别是SEQ ID NO:51的氨基酸序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的轻链恒定区。特别地,轻链恒定区可包含如本文中在“电荷修饰”下描述的氨基酸突变和/或可包含一个或多个(特别是两个)N端氨基酸的删除或替代,如果在交换Fab分子中的话。在一些实施方案中,第三抗原结合模块包含包含与SEQ ID NO:51的氨基酸序列中包含的CH1域序列至少约95%,96%,97%,98%,99%或100%同一的氨基酸序列的重链恒定区。特别地,重链恒定区(具体是CH1域)可包含如本文中在“电荷修饰”下描述的氨基酸突变。

[0465] 在特定实施方案中,第三和第一抗原结合模块各自是Fab分子且第三抗原结合模块与第一抗原结合模块相同。如此,在这些实施方案中,第一和第三抗原结合模块包含相同的重和轻链氨基酸序列且具有相同的域排列(即常规的或交换的)。而且,在这些实施方案中,第三抗原结合模块包含与第一抗原结合模块相同的氨基酸替代,如果有的话。例如,会在第一抗原结合模块和第三抗原结合模块中每个的恒定域CL和恒定域CH1中进行本文中作为“电荷修饰”描述的氨基酸替代。或者,可以在第二抗原结合模块(其在特定实施方案中还是Fab分子)的恒定域CL和恒定域CH1中进行,但是在第一抗原结合模块和第三抗原结合模块的恒定域CL和恒定域CH1中不进行所述氨基酸替代。

[0466] 像第一抗原结合模块一样,第三抗原结合模块特别是常规Fab分子。然而,还涵盖其中第一且第三抗原结合模块是交换Fab分子(且第二抗原结合模块是常规Fab分子)的实施方案。如此,在特定实施方案中,第一和第三抗原结合模块各自是常规Fab分子,且第二抗原结合模块是如本文中描述的交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CL和CH1是彼此交换/替换的Fab分子。在其它实施方案中,第一和第三抗原结合模块各自是

交换Fab分子且第二抗原结合模块是常规Fab分子。

[0467] 如果存在第三抗原结合模块的话,在一个特定实施方案中,第一和第三抗原模块结合HLA-G,且第二抗原结合模块结合第二抗原,特别是激活性T细胞抗原,更加特别是CD3,最特别是CD3 ϵ 。

[0468] 在特定实施方案中,双特异性抗体包含由第一和第二亚基构成的Fc域。Fc域的第一和第二亚基能够稳定联合。

[0469] 依照本发明的双特异性抗体可具有不同的构造,即第一,第二(和任选地第三)抗原结合模块可以以不同方式彼此和与Fc域融合。各构件可以直接或优选地经由一个或多个合适的肽接头彼此融合。在Fab分子融合至Fc域的亚基的N端的情况中,它典型地经由免疫球蛋白铰链区。

[0470] 在一些实施方案中,第一和第二抗原结合模块各自是Fab分子且第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端。在此类实施方案中,第一抗原结合模块可以在Fab重链的C端融合至第二抗原结合模块的Fab重链的N端或Fc域的另一亚基的N端。在特定此类实施方案中,所述第一抗原结合模块是常规Fab分子,且第二抗原结合模块是如本文中描述的交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CL和CH1是彼此交换/替换的Fab分子。在其它此类实施方案中,所述第一Fab分子是交换Fab分子且第二Fab分子是常规Fab分子。

[0471] 在一个实施方案中,第一和第二抗原结合模块各自是Fab分子,第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端,且第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至第二抗原结合模块的Fab重链的N端。在一个具体实施方案中,双特异性抗体本质上由第一和第二Fab分子,由第一和第二亚基构成的Fc域,和任选地一个或多个肽接头组成,其中第一Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端,且第二Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端。此类构造示意性地在图11G和11K中描绘(这些例子中的第二抗原结合域是VH/VL交换Fab分子)。任选地,第一Fab分子的Fab轻链和第二Fab分子的Fab轻链可以另外彼此融合。

[0472] 在另一个实施方案中,第一和第二抗原结合模块各自是Fab分子且第一和第二抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至Fc域的亚基之一的N端。在一个具体实施方案中,双特异性抗体本质上由第一和第二Fab分子,由第一和第二亚基构成的Fc域,和任选地一个或多个肽接头组成,其中第一和第二Fab分子各自在Fab重链的C端融合至Fc域的亚基之一的N端。此类构造示意性地在图11A和11D中描绘(在这些例子中第二抗原结合域是VH/VL交换Fab分子且第一抗原结合模块是常规Fab分子)。第一和第二Fab分子可以直接或经由肽接头融合至Fc域。在一个特定实施方案中,第一和第二Fab分子各自经由免疫球蛋白铰链区融合至Fc域。在一个具体实施方案中,免疫球蛋白铰链区是人IgG₁铰链区,特别是在Fc域是IgG₁ Fc域的情况中。

[0473] 在一些实施方案中,第一和第二抗原结合模块各自是Fab分子且第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端。在此类实施方案中,第二抗原结合模块可以在Fab重链的C端融合至第二抗原结合模块的Fab重链的N端或(如上文描述的)Fc域的亚基之另一的N端。在特定此类实施方案中,所述第一抗原结合模块是常规Fab分子,且第二抗原结合模块是如本文中描述的交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或

恒定域CL和CH1是彼此交换/替换的Fab分子。在其它此类实施方案中,所述第一Fab分子是交换Fab分子且第二Fab分子是常规Fab分子。

[0474] 在一个实施方案中,第一和第二抗原结合模块各自是Fab分子,第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端,且第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至第一抗原结合模块的Fab重链的N端。在一个具体实施方案中,双特异性抗体本质上由第一和第二Fab分子,由第一和第二亚基构成的Fc域,和任选地一个或多个肽接头组成,其中第二Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端,且第一Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端。此类构造示意性地在图11H和11L中描绘(在这些例子中第二抗原结合域是VH/VL交换Fab分子且第一抗原结合模块是常规Fab分子)。任选地,第一Fab分子的Fab轻链和第二Fab分子的Fab轻链可以另外彼此融合。

[0475] 在一些实施方案中,第三抗原结合模块,特别是第三Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一或第二亚基的N端。在特定此类实施方案中,所述第一和第三Fab分子各自是常规Fab分子,且第二Fab分子是如本文中描述的交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CL和CH1是彼此交换/替换的Fab分子。在其它此类实施方案中,所述第一和第三Fab分子各自是交换Fab分子且第二Fab分子是常规Fab分子。

[0476] 在一个特定此类实施方案中,第二且第三抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至Fc域的亚基之一的N端,且第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端。在一个具体实施方案中,双特异性抗体本质上由第一,第二和第三Fab分子,由第一和第二亚基构成的Fc域,和任选地一个或多个肽接头组成,其中第一Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端,且第二Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一亚基的N端,且其中第三Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第二亚基的N端。此类构造示意性地在图11B和11E(在这些例子中第二抗原结合模块是VH/VL交换Fab分子,且第一且第三抗原结合模块是常规Fab分子),和图11J和11N(在这些例子中第二抗原结合模块是常规Fab分子,且第一和第三抗原结合模块是VH/VL交换Fab分子)中描绘。第二和第三Fab分子可以直接或经由肽接头融合至Fc域。在一个特定实施方案中,第二和第三Fab分子各自经由免疫球蛋白铰链区融合至Fc域。在一个具体实施方案中,免疫球蛋白铰链区是人IgG₁铰链区,特别是在Fc域是IgG₁ Fc域的情况中。任选地,第一Fab分子的Fab轻链和第二Fab分子的Fab轻链可以另外彼此融合。

[0477] 在另一个此类实施方案中,第一和第三抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至Fc域的亚基之一的N端,且第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至第一抗原结合模块的Fab重链的N端。在一个具体实施方案中,双特异性抗体本质上由第一,第二和第三Fab分子,由第一和第二亚基构成的Fc域,和任选地一个或多个肽接头组成,其中第二Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端,且第一Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第一亚基的N端,且其中第三Fab分子在Fab重链的C端融合至Fc域的第二亚基的N端。此类构造示意性地在图11C和11F(在这些例子中第二抗原结合模块是VH/VL交换Fab分子,且第一且第三抗原结合模块是常规Fab分子)和图11I和11M(在这些例子中第二抗原结合模块是常规Fab分子,且第一和第三抗原结合模块是VH/VL交换Fab分子)中描绘。第一和第三Fab分子可以直接或经由肽接头融合至Fc域。在一个特定实施方案中,第一和第三Fab分子各自经由免疫球蛋白铰链区融合至Fc域。在一个具体实施方案中,免疫球蛋白铰链区是人IgG₁

铰链区,特别是在Fc域是IgG₁ Fc域的情况中。任选地,第一Fab分子的Fab轻链和第二Fab分子的Fab轻链可以另外彼此融合。

[0478] 在其中Fab分子在Fab重链的C端经由免疫球蛋白铰链区融合至Fc域的每个亚基的N端的双特异性抗体的构造中,两个Fab分子,铰链区和Fc域本质上形成免疫球蛋白分子。在一个特定实施方案中,免疫球蛋白分子是IgG类免疫球蛋白。在一个甚至更加特定实施方案中,免疫球蛋白是IgG₁亚类免疫球蛋白。在另一个实施方案中,免疫球蛋白是IgG₄亚类免疫球蛋白。在又一个特定实施方案中,免疫球蛋白是人免疫球蛋白。在其它实施方案中,免疫球蛋白是嵌合免疫球蛋白或人源化免疫球蛋白。在一个实施方案中,免疫球蛋白包含人恒定区,特别是人Fc区。

[0479] 在本发明的一些双特异性抗体中,第一Fab分子的Fab轻链和第二Fab分子的Fab轻链彼此融合,任选经由肽接头。取决于第一和第二Fab分子的构造,第一Fab分子的Fab轻链可以在它的C端融合至第二Fab分子的Fab轻链的N端,或者第二Fab分子的Fab轻链可以在它的C端融合至第一Fab分子的Fab轻链的N端。第一和第二Fab分子的Fab轻链的融合进一步降低不匹配Fab重和轻链的错配,而且还减少表达本发明的一些双特异性抗体需要的质粒的数目。

[0480] 抗原结合模块可以直接或经由肽接头融合至Fc域或彼此融合,肽接头包含一个或多个氨基酸,通常约2-20个氨基酸。肽接头是本领域中已知且本文中记载的。合适的,非免疫原性的肽接头包括例如(G₄S)_n, (SG₄)_n, (G₄S)_n或G₄(SG₄)_n肽接头。“n”一般是1至10,通常是2至4的整数。在一个实施方案中,所述肽接头具有至少5个氨基酸的长度,在一个实施方案中5至100个氨基酸的长度,在又一个实施方案中10至50个氨基酸的长度。在一个实施方案中,所述肽接头是(G_xS)_n或(G_xS)_nG_m,其中G=甘氨酸,S=丝氨酸,且(x=3,n=3,4,5或6,和m=0,1,2或3)或(x=4,n=2,3,4或5和m=0,1,2或3),在一个实施方案中,x=4和n=2或3,在又一个实施方案中,x=4和n=2。在一个实施方案中,所述肽接头是(G₄S)₂。一种特别适合于将第一和第二Fab分子的Fab轻链彼此融合的肽接头是(G₄S)₂。一种适合于连接第一和第二Fab片段的Fab重链的例示性肽接头包含序列(D)-(G₄S)₂(SEQ ID NO:110和111)。另一种合适的此类接头包含序列(G₄S)₄。另外,接头可包含免疫球蛋白铰链区(的一部分)。特别地,当Fab分子融合至Fc域亚基的N端时,其可以在有或无另外的肽接头的情况下经由免疫球蛋白铰链区或其部分融合。

[0481] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含其中重链可变区用轻链可变区替换的交换Fab重链),其继而与Fc域亚基分享羧基末端肽键(VL₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)),和如下多肽,其中第一Fab分子的Fab重链与Fc域亚基分享羧基末端肽键(VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4))。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(VH₍₂₎-CL₍₂₎)和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在某些实施方案中,多肽是共价连接的,例如通过二硫键。

[0482] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含重链恒定区用轻链恒定区替换的交换Fab重链),其继而与Fc域亚基分享羧基末端肽键

(VH₍₂₎-CL₍₂₎-CH₂-CH₃ (-CH₄)), 和如下多肽, 其中第一Fab分子的Fab重链与Fc域亚基分享羧基末端肽键(VH₍₁₎-CH₁₍₁₎-CH₂-CH₃ (-CH₄))。在一些实施方案中, 双特异性抗体进一步包含如下多肽, 其中第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(VL₍₂₎-CH₁₍₂₎) 和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在某些实施方案中, 多肽是共价连接的, 例如通过二硫键。

[0483] 在一些实施方案中, 双特异性抗体包含如下多肽, 其中第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含其中重链可变区用轻链可变区替换的交换Fab重链), 其继而与第一Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键, 其继而与Fc域亚基分享羧基末端肽键(VL₍₂₎-CH₁₍₂₎-VH₍₁₎-CH₁₍₁₎-CH₂-CH₃ (-CH₄))。在其它实施方案中, 双特异性抗体包含如下多肽, 其中第一Fab分子的Fab重链与第二Fab分子的Fab轻链可变区分享羧基末端肽键, 其继而与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含其中重链可变区用轻链可变区替换的交换Fab重链), 其继而与Fc域亚基分享羧基末端肽键(VH₍₁₎-CH₁₍₁₎-VL₍₂₎-CH₁₍₂₎-CH₂-CH₃ (-CH₄))。

[0484] 在一些这些实施方案中, 双特异性抗体进一步包含第二Fab分子的交换Fab轻链多肽, 其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(VH₍₂₎-CL₍₂₎), 和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在其它这些实施方案中, 双特异性抗体进一步包含如下多肽, 其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键, 其继而与第一Fab分子的Fab轻链多肽分享羧基末端肽键(VH₍₂₎-CL₍₂₎-VL₍₁₎-CL₍₁₎), 或如下多肽, 其中第一Fab分子的Fab轻链多肽与第二Fab分子的Fab重链可变区分享羧基末端肽键, 其继而与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(VL₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎), 在适宜时。

[0485] 依照这些实施方案的双特异性抗体可进一步包含(i) Fc域亚基多肽(CH₂-CH₃ (-CH₄)), 或(ii) 如下多肽, 其中第三Fab分子的Fab重链与Fc域亚基分享羧基末端肽键(VH₍₃₎-CH₁₍₃₎-CH₂-CH₃ (-CH₄)) 和第三Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。在某些实施方案中, 多肽是共价连接的, 例如通过二硫键。

[0486] 在一些实施方案中, 双特异性抗体包含如下多肽, 其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含重链恒定区用轻链恒定区替换的交换Fab重链), 其继而与第一Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键, 其继而与Fc域亚基分享羧基末端肽键(VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH₁₍₁₎-CH₂-CH₃ (-CH₄))。在其它实施方案中, 双特异性抗体包含如下多肽, 其中第一Fab分子的Fab重链与第二Fab分子的Fab重链可变区分享羧基末端肽键, 其继而与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含重链恒定区用轻链恒定区替换的交换Fab重链), 其继而与Fc域亚基分享羧基末端肽键(VH₍₁₎-CH₁₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎-CH₂-CH₃ (-CH₄))。

[0487] 在一些这些实施方案中, 双特异性抗体进一步包含第二Fab分子的交换Fab轻链多肽, 其中第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(VL₍₂₎-CH₁₍₂₎), 和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在其它这些实施方案中, 双特异性抗体进一步包含如下多肽, 其中第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键, 其继而与第一Fab分子的Fab轻链多肽分享羧基末端肽键(VL₍₂₎-CH₁₍₂₎-VL₍₁₎-CL₍₁₎), 或如下多肽, 其中第一Fab分子的Fab轻链多肽与第二Fab分子的

Fab重链可变区分享羧基末端肽键,其继而与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(VL₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CL₍₂₎),在适宜时。

[0488] 依照这些实施方案的双特异性抗体可进一步包含(i)Fc域亚基多肽(CH₂-CH₃(-CH₄)),或(ii)如下多肽,其中第三Fab分子的Fab重链与Fc域亚基分享羧基末端肽键(VH₍₃₎-CH₁₍₃₎-CH₂-CH₃(-CH₄))和第三Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。在某些实施方案中,多肽是共价连接的,例如通过二硫键。

[0489] 在某些实施方案中,双特异性抗体不包含Fc域。在特定此类实施方案中,所述第一和,如果存在的话第三Fab分子各自是常规Fab分子,且第二Fab分子是如本文中描述的交换Fab分子,即其中Fab重和轻链的可变域VH和VL或恒定域CL和CH1是彼此交换/替换的Fab分子。在其它此类实施方案中,所述第一和,如果存在的话第三Fab分子各自是交换Fab分子且第二Fab分子是常规Fab分子。

[0490] 在一个此类实施方案中,双特异性抗体本质上由第一和第二抗原结合模块,和任选地一个或多个肽接头组成,其中第一和第二抗原结合模块均是Fab分子且第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至第二抗原结合模块的Fab重链的N端。此类构造示意性地在图110和11S中描绘(在这些例子中第二抗原结合域是VH/VL交换Fab分子且第一抗原结合模块是常规Fab分子)。

[0491] 在另一个此类实施方案中,双特异性抗体本质上由第一和第二抗原结合模块,和任选地一个或多个肽接头组成,其中第一和第二抗原结合模块均是Fab分子且第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至第一抗原结合模块的Fab重链的N端。此类构造示意性地在图11P和11T中描绘(在这些例子中第二抗原结合域是VH/VL交换Fab分子且第一抗原结合模块是常规Fab分子)。

[0492] 在一些实施方案中,第一Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端,且双特异性抗体进一步包含第三抗原结合模块,特别是第三Fab分子,其中所述第三Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端。在某些此类实施方案中,双特异性抗体本质上由第一,第二和第三Fab分子,和任选地一个或多个肽接头组成,其中第一Fab分子在Fab重链的C端融合至第二Fab分子的Fab重链的N端,且第三Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端。此类构造示意性地在图11Q和11U(在这些例子中第二抗原结合域是VH/VL交换Fab分子且第一和第三抗原结合模块各自是常规Fab分子),或图11X和11Z(在这些例子中第二抗原结合域是常规Fab分子且第一和第三抗原结合模块各自是VH/VL交换Fab分子)中描绘。

[0493] 在一些实施方案中,第二Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端,且双特异性抗体进一步包含第三抗原结合模块,特别是第三Fab分子,其中所述第三Fab分子在Fab重链的N端融合至第一Fab分子的Fab重链的C端。在某些此类实施方案中,双特异性抗体本质上由第一,第二和第三Fab分子,和任选地一个或多个肽接头组成,其中第二Fab分子在Fab重链的C端融合至第一Fab分子的Fab重链的N端,且第三Fab分子在Fab重链的N端融合至第一Fab分子的Fab重链的C端。此类构造示意性地在图11R和11V(在这些例子中第二抗原结合域是VH/VL交换Fab分子且第一和第三抗原结合模块各自是常规Fab分子),或图11W和11Y(在这些例子中第二抗原结合域是常规Fab分子且第一和第三抗原结合模块各自是VH/VL交换Fab分子)中描绘。

[0494] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第一Fab分子的Fab重链与第二Fab分子的Fab轻链可变区分享羧基末端肽键,其继而与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含其中重链可变区用轻链可变区替换的交换Fab重链)($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}$)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键($VH_{(2)}-CL_{(2)}$)和第一Fab分子的Fab轻链多肽($VL_{(1)}-CL_{(1)}$)。

[0495] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含其中重链可变区用轻链可变区替换的交换Fab重链),其继而与第一Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}$)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键($VH_{(2)}-CL_{(2)}$)和第一Fab分子的Fab轻链多肽($VL_{(1)}-CL_{(1)}$)。

[0496] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含重链恒定区用轻链恒定区替换的交换Fab重链),其继而与第一Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键($VH_{(2)}-CL_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}$)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$)和第一Fab分子的Fab轻链多肽($VL_{(1)}-CL_{(1)}$)。

[0497] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含其中重链可变区用轻链可变区替换的交换Fab重链),其继而与第一Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}$)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键($VH_{(2)}-CL_{(2)}$)和第一Fab分子的Fab轻链多肽($VL_{(1)}-CL_{(1)}$)。

[0498] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第三Fab分子的Fab重链与第一Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键,其继而与第二Fab分子的Fab轻链可变区分享羧基末端肽键,其继而与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含其中重链可变区用轻链可变区替换的交换Fab重链)($VH_{(3)}-CH1_{(3)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}$)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键($VH_{(2)}-CL_{(2)}$)和第一Fab分子的Fab轻链多肽($VL_{(1)}-CL_{(1)}$)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含第三Fab分子的Fab轻链多肽($VL_{(3)}-CL_{(3)}$)。

[0499] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第三Fab分子的Fab重链与第一Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键,其继而与第二Fab分子的Fab重链可变区分享羧基末端肽键,其继而与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含其中重链恒定区用轻链恒定区替换的交换Fab重链)($VH_{(3)}-CH1_{(3)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}$)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键($VL_{(2)}-CH1_{(2)}$)和第一Fab分子的Fab轻链多肽($VL_{(1)}-CL_{(1)}$)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含第

三Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

[0500] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含其中重链可变区用轻链可变区替换的交换Fab重链),其继而与第一Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键,其继而与第三Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键(VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₃₎-CH1₍₃₎)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(VH₍₂₎-CL₍₂₎)和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含第三Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

[0501] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab重链可变区与第二Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(即第二Fab分子包含其中重链恒定区用轻链恒定区替换的交换Fab重链),其继而与第一Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键,其继而与第三Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键(VH₍₂₎-CL₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₃₎-CH1₍₃₎)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab轻链可变区与第二Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(VL₍₂₎-CH1₍₂₎)和第一Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₁₎-CL₍₁₎)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含第三Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₃₎-CL₍₃₎)。

[0502] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab重链与第一Fab分子的Fab轻链可变区分享羧基末端肽键,其继而与第一Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(即第一Fab分子包含其中重链可变区用轻链可变区替换的交换Fab重链),其继而与第三Fab分子的Fab轻链可变区分享羧基末端肽键,其继而与第三Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(即第三Fab分子包含其中重链可变区用轻链可变区替换的交换Fab重链)(VH₍₂₎-CH1₍₂₎-VL₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₃₎-CH1₍₃₎)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第一Fab分子的Fab重链可变区与第一Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(VH₍₁₎-CL₍₁₎)和第二Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第三Fab分子的Fab重链可变区与第三Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(VH₍₃₎-CL₍₃₎)。

[0503] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第二Fab分子的Fab重链与第一Fab分子的Fab重链可变区分享羧基末端肽键,其继而与第一Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(即第一Fab分子包含其中重链恒定区用轻链恒定区替换的交换Fab重链),其继而与第三Fab分子的Fab重链可变区分享羧基末端肽键,其继而与第三Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(即第三Fab分子包含其中重链恒定区用轻链恒定区替换的交换Fab重链)(VH₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₃₎-CL₍₃₎)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第一Fab分子的Fab轻链可变区与第一Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(VL₍₁₎-CH1₍₁₎)和第二Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第三Fab分子的Fab轻链可变区与第三Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(VL₍₃₎-CH1₍₃₎)。

[0504] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第三Fab分子的Fab轻链可变区与第三Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(即第三Fab分子包含

其中重链可变区用轻链可变区替换的交换Fab重链),其继而与第一Fab分子的Fab轻链可变区分享羧基末端肽键,其继而与第一Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(即第一Fab分子包含其中重链可变区用轻链可变区替换的交换Fab重链),其继而与第二Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键(VL₍₃₎-CH1₍₃₎-VL₍₁₎-CH1₍₁₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第一Fab分子的Fab重链可变区与第一Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(VH₍₁₎-CL₍₁₎)和第二Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第三Fab分子的Fab重链可变区与第三Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(VH₍₃₎-CL₍₃₎)。

[0505] 在某些实施方案中,依照本发明的双特异性抗体包含如下多肽,其中第三Fab分子的Fab重链可变区与第三Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(即第三Fab分子包含其中重链恒定区用轻链恒定区替换的交换Fab重链),其继而与第一Fab分子的Fab重链可变区分享羧基末端肽键,其继而与第一Fab分子的Fab轻链恒定区分享羧基末端肽键(即第一Fab分子包含其中重链恒定区用轻链恒定区替换的交换Fab重链),其继而与第二Fab分子的Fab重链分享羧基末端肽键(VH₍₃₎-CL₍₃₎-VH₍₁₎-CL₍₁₎-VH₍₂₎-CH1₍₂₎)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第一Fab分子的Fab轻链可变区与第一Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(VL₍₁₎-CH1₍₁₎)和第二Fab分子的Fab轻链多肽(VL₍₂₎-CL₍₂₎)。在一些实施方案中,双特异性抗体进一步包含如下多肽,其中第三Fab分子的Fab轻链可变区与第三Fab分子的Fab重链恒定区分享羧基末端肽键(VL₍₃₎-CH1₍₃₎)。

[0506] 在一个实施方案中,本发明提供一种双特异性抗体,其包含

[0507] a) 结合HLA的第一抗原结合模块,其中该第一抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子:

[0508] A) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0509] B) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0510] C) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0511] D) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;

[0512] 和

[0513] b) 结合人CD3的第二抗原结合模块,

[0514] 其中该第二抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH或恒定域CL和CH1是彼此替换的:

[0515] E) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1;包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3;和

[0516] c) 由第一和第二亚基构成的Fc域;

[0517] 其中

[0518] (i) 在a)下的第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在b)下的第二抗原结合模块的Fab重链的N端,且在b)下的第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在c)下的Fc域的亚基之一的N端,或

[0519] (ii) 在b)下的第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在a)下的第一抗原结合模块的Fab重链的N端,且在a)下的第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在c)下的Fc域的亚基之一的N端。

[0520] 在一个特定实施方案中,本发明提供一种双特异性抗体,其包含

[0521] a) 结合HLA的第一抗原结合模块,其中该第一抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子:

[0522] A) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0523] B) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0524] C) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0525] D) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;

[0526] 和

[0527] b) 结合人CD3的第二抗原结合模块,

[0528] 其中该第二抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH或恒定域CL和CH1是彼此替换的:

[0529] E) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的

VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3;和

[0530] c) 结合第一抗原且与第一抗原结合模块相同的第三抗原结合模块;和

[0531] d) 由第一和第二亚基构成的Fc域;

[0532] 其中

[0533] (i) 在a)下的第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在b)下的第二抗原结合模块的Fab重链的N端,且在b)下的第二抗原结合模块和在c)下的第三抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至在d)下的Fc域的亚基之一的N端,或

[0534] (ii) 在b)下的第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在a)下的第一抗原结合模块的Fab重链的N端,且在a)下的第一抗原结合模块和在c)下的第三抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至在d)下的Fc域的亚基之一的N端。

[0535] 在另一个实施方案中,本发明提供一种双特异性抗体,其包含

[0536] a) 结合HLA的第一抗原结合模块,其中该第一抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子:

[0537] A) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0538] B) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0539] C) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0540] D) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;

[0541] 和

[0542] b) 结合人CD3的第二抗原结合模块,

[0543] 其中该第二抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH或恒定域CL和CH1是彼此替换的:

[0544] E) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3;和c) 由第一和第二亚基构成的Fc域;

[0545] 其中

[0546] 在a)下的第一抗原结合模块和在b)下的第二抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至在c)下的Fc域的亚基之一的N端。

[0547] 在依照本发明的双特异性抗体的所有不同构造中,本文中描述的氨基酸替代,如果存在的话,可以在第一和(如果存在的话)第三抗原结合模块/Fab分子的CH1和CL域中,或在第二抗原结合模块/Fab分子的CH1和CL域中。优选地,它们在第一和(如果存在的话)第三抗原结合模块/Fab分子的CH1和CL域中。依照本发明的概念,如果在第一(和,如果存在的话,第三)抗原结合模块/Fab分子中进行如本文中描述的氨基酸替代的话,在第二抗原结合模块/Fab分子中不进行此类氨基酸替代。相反,如果在第二抗原结合模块/Fab分子中进行如本文中描述的氨基酸替代的话,在第一(和,如果存在的话,第三)抗原结合模块/Fab分子中不进行此类氨基酸替代。特别是在包含其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH1是彼此替换的Fab分子的双特异性抗体中进行氨基酸替代。

[0548] 在依照本发明的双特异性抗体的特定实施方案中,特别是其中在第一(和,如果存在的话,第三)抗原结合模块/Fab分子中进行如本文中描述的氨基酸替代,第一(和,如果存在的话,第三)Fab分子的恒定域CL是卡帕同种型的。在依照本发明的双特异性抗体的其它实施方案中,特别是其中在第二抗原结合模块/Fab分子中进行如本文中描述的氨基酸替代,第二抗原结合模块/Fab分子的恒定域CL是卡帕同种型的。在一些实施方案中,第一(和,如果存在的话,第三)抗原结合模块/Fab分子的恒定域CL和第二抗原结合模块/Fab分子的恒定域CL是卡帕同种型的。

[0549] 在一个实施方案中,本发明提供一种双特异性抗体,其包含

[0550] a) 结合HLA的第一抗原结合模块,其中该第一抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子:

[0551] A) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0552] B) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;

[0553] 和

[0554] b) 结合人CD3的第二抗原结合模块,

[0555] 其中该第二抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的:

[0556] E) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3;和

[0557] c) 由第一和第二亚基构成的Fc域;

[0558] 其中在a)下的第一抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)或精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat)(最特别是通过精氨酸(R)),且其中在a)下的第一抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引);且

[0559] 其中

[0560] (i)在a)下的第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在b)下的第二抗原结合模块的Fab重链的N端,且在b)下的第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在c)下的Fc域的亚基之一的N端,或

[0561] (ii)在b)下的第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在a)下的第一抗原结合模块的Fab重链的N端,且在a)下的第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在c)下的Fc域的亚基之一的N端。

[0562] 在一个特定实施方案中,本发明提供一种双特异性抗体,其包含

[0563] a)结合HLA的第一抗原结合模块,其中该第一抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子:

[0564] A)如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0565] B)如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;

[0566] 和

[0567] b)结合人CD3的第二抗原结合模块,

[0568] 其中该第二抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的:

[0569] E)如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3;和

[0570] c)结合第一抗原且与第一抗原结合模块相同的第三抗原结合模块;和

[0571] d)由第一和第二亚基构成的Fc域;

[0572] 其中在a)下的第一抗原结合模块和在c)下的第三抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)或精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat)(最特别通过精氨酸(R)),且其中在a)下的第一抗原结合模块和在c)下的第三抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引);且

[0573] 其中

[0574] (i) 在a)下的第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在b)下的第二抗原结合模块的Fab重链的N端,且在b)下的第二抗原结合模块和在c)下的第三抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至在d)下的Fc域的亚基之一的N端,或

[0575] (ii) 在b)下的第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在a)下的第一抗原结合模块的Fab重链的N端,且在a)下的第一抗原结合模块和在c)下的第三抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至在d)下的Fc域的亚基之一的N端。

[0576] 在另一个实施方案中,本发明提供一种双特异性抗体,其包含

[0577] a) 结合HLA的第一抗原结合模块,其中该第一抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子:

[0578] A) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0579] B) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;

[0580] 和

[0581] b) 结合人CD3的第二抗原结合模块,

[0582] 其中该第二抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的:

[0583] E) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3;和

[0584] c) 由第一和第二亚基构成的Fc域;

[0585] 其中在a)下的第一抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)或精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat)(最特别通过精氨酸(R)),且其中在a)下的第一抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引);且

[0586] 其中在a)下的第一抗原结合模块和在b)下的第二抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至在c)下的Fc域的亚基之一的N端。

[0587] 在一个实施方案中,本发明提供一种双特异性抗体,其包含

[0588] a) 结合HLA的第一抗原结合模块,其中该第一抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子:

[0589] A) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,

该VL域包含包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0590] B) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;

[0591] 和

[0592] b) 结合人CD3的第二抗原结合模块,

[0593] 其中该第二抗原结合模块是包含下述各项的Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的:

[0594] E) 如下的VH域,该VH域包含包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和如下的VL域,该VL域包含包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3;和

[0595] c) 由第一和第二亚基构成的Fc域;

[0596] 其中在a)下的第一抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K)替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)或精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat)(最特别通过精氨酸(R)),且其中在a)下的第一抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引);且

[0597] 其中

[0598] (i) 在a)下的第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在b)下的第二抗原结合模块的Fab重链的N端,且在b)下的第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在c)下的Fc域的亚基之一的N端,或

[0599] (ii) 在b)下的第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在a)下的第一抗原结合模块的Fab重链的N端,且在a)下的第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在c)下的Fc域的亚基之一的N端。

[0600] 在一个特定实施方案中,本发明提供一种双特异性抗体,其包含

[0601] 在一个特定方面,本发明提供一种双特异性抗体,其包含

[0602] a) 结合第一抗原的第一和第三抗原结合模块;其中第一抗原是HLA-G且其中第一和第二抗原结合模块各自是包含(i)包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的轻链可变区,或(ii)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的轻链可变区的(常规)Fab分子;

[0603] b) 结合第二抗原的第二抗原结合模块;其中第二抗原是CD3且其中第二抗原结合模块是包含包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的轻链可变区的其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH是彼此替换的Fab分子;

[0604] c) 由第一和第二亚基构成的Fc域;

[0605] 其中

[0606] 在a)下的第一和第三抗原结合模块的恒定域CL中位置124处的氨基酸用赖氨酸

(K) 替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K)或精氨酸(R)替代(编号方式依照Kabat)(最特别通过精氨酸(R)),且其中在a)下的第一和第三抗原结合模块的恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E)替代(编号方式依照Kabat EU索引);

[0607] 且其中进一步地

[0608] 在a)下的第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至在b)下的第二抗原结合模块的Fab重链的N端,且在b)下的第二抗原结合模块和在a)下的第三抗原结合模块各自在Fab重链的C端融合至在c)下的Fc域的亚基之一的N端。

[0609] 在依照本发明的这些方面的一个实施方案中,在Fc域的第一亚基中位置366处的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W),且在Fc域的第二亚基中位置407处的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V)且任选地位置366处的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且位置368处的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A)(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0610] 在依照本发明的这些方面的又一个实施方案中,在Fc域的第一亚基中另外地位置354处的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换(S354C)或位置356处的谷氨酸残基用半胱氨酸残基替换(E356C)(特别是位置354处的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换),且在Fc域的第二亚基中另外地位置349处的酪氨酸残基用半胱氨酸残基替换(Y349C)(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0611] 在依照本发明的这些方面的仍有又一个实施方案中,在Fc域的第一和第二亚基每个中位置234处的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L234A),位置235处的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L235A)且位置329处的脯氨酸残基用甘氨酸残基替换(P329G)(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0612] 在依照本发明的这些方面仍有又一个实施方案中,Fc域是人IgG₁ Fc域。

[0613] 本发明的一个具体实施方案是结合人HLA-G和人CD3的双特异性抗体,其中该抗体包含包含与SEQ ID NO:64的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%同一的氨基酸序列的多肽,包含与SEQ ID NO:65的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%同一的氨基酸序列的多肽,包含与SEQ ID NO:66的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%同一的氨基酸序列的多肽,和包含与SEQ ID NO:67的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%同一的氨基酸序列的多肽。

[0614] 在又一个具体实施方案中,该双特异性抗体包含包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的多肽,包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的多肽,包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的多肽和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的多肽。

[0615] 本发明的一个具体实施方案是结合人HLA-G和人CD3的双特异性抗体,其中该抗体包含包含与SEQ ID NO:68的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%同一的氨基酸序列的多肽,包含与SEQ ID NO:69的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%同一的氨基酸序列的多肽,包含与SEQ ID NO:70的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%同一的氨基酸序列的多肽,和包含与SEQ ID NO:71的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%同一的氨基酸序列的多肽。

[0616] 在又一个具体实施方案中,该双特异性抗体包含包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的多肽,包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的多肽,包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的多肽

和包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的多肽。

[0617] 本发明的一个具体实施方案是结合人HLA-G和人CD3的双特异性抗体,其中该抗体包含包含与SEQ ID NO:72的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%同一的氨基酸序列的多肽,包含与SEQ ID NO:73的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%同一的氨基酸序列的多肽,包含与SEQ ID NO:74的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%同一的氨基酸序列的多肽,和包含与SEQ ID NO:75的序列至少95%,96%,97%,98%,或99%同一的氨基酸序列的多肽。

[0618] 在又一个具体实施方案中,该双特异性抗体包含包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的多肽,包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的多肽,包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的多肽和包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的多肽。

[0619] Fc域

[0620] 在特定实施方案中,本发明的双特异性抗体包含由第一和第二亚基构成的Fc域。理解的是,本文中涉及双特异性抗体描述的Fc域的特征可同等应用于本发明的抗体中包含的Fc域。

[0621] 双特异性抗体的Fc域由一对包含免疫球蛋白分子重链域的多肽链组成。例如,免疫球蛋白G(IgG)分子的Fc域是二聚体,其每个亚基包含CH2和CH3IgG重链恒定域。Fc域的两个亚基能够彼此稳定联合。在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体包含不超过一个Fc域。

[0622] 在一个实施方案中,双特异性抗体的Fc域是IgG Fc域。在一个具体的实施方案中,Fc域是IgG₁ Fc域。在另一个实施方案中,Fc域是IgG₄ Fc域。在一个更加具体的实施方案中,Fc域是包含位置S228(Kabat EU索引编号方式)处的氨基酸替代,特别是氨基酸替代S228P的IgG₄ Fc域。此氨基酸替代降低IgG₄抗体的体内Fab臂交换(参见Stubenrauch等,Drug Metabolism and Disposition38,84-91(2010))。在又一个具体的实施方案中,Fc域是人Fc域。在一个甚至更加具体的实施方案中,Fc域是人IgG₁ Fc域。

[0623] 促进异二聚化的Fc域修饰

[0624] 依照本发明的双特异性抗体包含不同的抗原结合模块,其可以融合至Fc域的两个亚基之一或另一个,如此Fc域的两个亚基通常包含在两条不相同的多肽链中。这些多肽的重组共表达和随后二聚化导致两种多肽的数种可能组合。为了改进重组生产中双特异性抗体的产量和纯度,如此在双特异性抗体的Fc域中引入促进期望多肽联合的修饰会是有利的。

[0625] 因而,在具体的实施方案中,依照本发明的双特异性抗体的Fc域包含促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰。人IgG Fc域的两个亚基之间最广泛的蛋白质-蛋白质相互作用的位点在Fc域的CH3域中。如此,在一个实施方案中,所述修饰在Fc域的CH3域中。

[0626] 有数种办法来修饰Fc域的CH3域以加强异二聚化,它们详细记载于例如W0 96/27011,W0 98/050431,EP 1870459,W0 2007/110205,W02007/147901,W0 2009/089004,W0 2010/129304,W0 2011/90754,W02011/143545,W0 2012058768,W0 2013157954,W0 2013096291。典型地,在所有此类办法中,Fc域的第一亚基的CH3域和Fc域的第二亚基的CH3域二者以互补方式进行工程化改造使得每个CH3域(或包含它的重链)不再能与其自身同二聚化但被迫与互补工程化改造的其它CH3域异二聚化(使得第一和第二CH3域异二聚化且两

个第一CH3域或两个第二CH3域之间不形成同二聚体)。涵盖这些用于改善重链异二聚化的不同办法作为不同备选,与双特异性抗体中的减少重/轻链错配和Bence Jones型副产物的重-轻链修饰(例如一个结合臂中的VH和VL交换/替换及在CH1/CL界面中引入具有相反电荷的带电荷的氨基酸的替代)组合。

[0627] 在一个特定的实施方案中,所述促进Fc域的第一亚基和第二亚基联合的修饰是所谓的“节-入-穴”修饰,其包含在Fc域的两个亚基之一中的“节”修饰和在Fc域的两个亚基之另一中的“穴”修饰。

[0628] 节-入-穴技术记载于例如US 5,731,168;US 7,695,936;Ridgway等,Prot Eng 9, 617-621(1996)和Carter, J Immunol Meth 248, 7-15(2001)。一般地,方法牵涉在第一多肽的界面处引入隆起(“节”)并在第二多肽的界面中引入相应的空腔(“穴”),使得隆起可以置于空腔中从而促进异二聚体形成并阻碍同二聚体形成。通过将来自第一多肽界面的小氨基酸侧链用更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换来构建隆起。在第二多肽的界面中创建具有与隆起相同或相似大小的互补性空腔,其通过将大氨基酸侧链用更小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换进行。

[0629] 因而,在一个具体的实施方案中,在双特异性抗体的Fc域的第一亚基的CH3域中,一个氨基酸残基用具有更大侧链体积的氨基酸残基替换,由此在第一亚基的CH3域内生成隆起,其可安置于第二亚基的CH3域内的空腔中,而且在Fc域的第二亚基的CH3域中,一个氨基酸残基用具有更小侧链体积的氨基酸残基替换,由此在第二亚基的CH3域内生成空腔,其中可安置第一亚基的CH3域内的隆起。

[0630] 优选地,所述具有更大侧链体积的氨基酸残基选自下组:精氨酸(R),苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),和色氨酸(W)。

[0631] 优选地,所述具有更小侧链体积的氨基酸残基选自下组:丙氨酸(A),丝氨酸(S),苏氨酸(T),和缬氨酸(V)。

[0632] 可以通过改变编码多肽的核酸,例如通过位点特异性诱变或通过肽合成来生成隆起和空腔。

[0633] 在一个特定的实施方案中,在Fc域第一亚基(的CH3域)(“节”亚基)中,第366位的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W),而在Fc域第二亚基(的CH3域)(“穴”亚基)中,第407位的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V)。在一个实施方案中,在Fc域第二亚基中,另外,第366位的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且第368位的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A)(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0634] 在还有又一个实施方案中,在Fc域的第一亚基中,另外,第354位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换(S354C)或第356位的谷氨酸残基用半胱氨酸残基替换(E356C)(特别是,第354位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换),而在Fc域的第二亚基中,另外,第349位的酪氨酸残基用半胱氨酸残基替换(Y349C)(编号方式依照Kabat EU索引)。这两个半胱氨酸残基的引入导致在Fc域的两个亚基之间形成二硫桥,进一步稳定了二聚体(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15(2001))。

[0635] 在一个具体的实施方案中,Fc域的第一亚基包含氨基酸替代S354C和T366W,且Fc域的第二亚基包含氨基酸替代Y349C, T366S, L368A和Y407V(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0636] 在一个具体的实施方案中,将结合第二抗原(例如激活性T细胞抗原)的抗原结合

模块融合(任选地经由结合HLA-G的第一抗原结合模块和/或肽接头)至Fc域的第一亚基(其包含“节”修饰)。不希望受理论束缚,结合第二抗原,诸如激活性T细胞抗原的抗原结合模块与Fc域的含节的亚基的融合会(进一步)使包含两个结合激活性T细胞抗原的抗原结合模块的抗体的生成最小化(两条含节的多肽的空间碰撞)。

[0637] 涵盖修饰CH3以增强异二聚化的其它技术作为依照本发明的备选,它们记载于例如WO 96/27011,WO 98/050431,EP 1870459,WO 2007/110205,WO2007/147901,WO 2009/089004,WO 2010/129304,WO 2011/90754,WO2011/143545,WO 2012/058768,WO 2013/157954,WO 2013/096291。

[0638] 在一个实施方案中,备选地使用EP 1870459中记载的异二聚化办法。这种办法基于在Fc域的两个亚基之间的CH3/CH3域界面中的特定氨基酸位置引入具有相反电荷的带电荷的氨基酸。本发明的双特异性抗体的一个优选的实施方案是(Fc域的)两个CH3域之一中的氨基酸突变R409D;K370E和Fc域的CH3域之另一中的氨基酸突变D399K;E357K(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0639] 在另一个实施方案中,本发明的双特异性抗体包含Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变T366W和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变T366S,L368A,Y407V,和另外的Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变R409D;K370E和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变D399K;E357K(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0640] 在另一个实施方案中,本发明的双特异性抗体包含Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变S354C,T366W和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变Y349C,T366S,L368A,Y407V,或所述双特异性抗体包含Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变Y349C,T366W和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变S354C,T366S,L368A,Y407V和另外的Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸突变R409D;K370E和Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸突变D399K;E357K(所有编号方式依照Kabat EU索引)。

[0641] 在一个实施方案中,备选地使用WO 2013/157953中记载的异二聚化办法。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变T366K且第二CH3域包含氨基酸突变L351D(编号方式依照Kabat EU索引)。在又一个实施方案中,第一CH3域进一步包含氨基酸突变L351K。在又一个实施方案中,第二CH3域进一步包含选自Y349E,Y349D和L368E的氨基酸突变(优选L368E)(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0642] 在一个实施方案中,备选地使用WO 2012/058768中记载的异二聚化办法。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变L351Y,Y407A且第二CH3域包含氨基酸突变T366A,K409F。在又一个实施方案中,第二CH3域进一步包含位置T411,D399,S400,F405,N390,或K392处的氨基酸突变,例如选自a) T411N,T411R,T411Q,T411K,T411D,T411E或T411W,b) D399R,D399W,D399Y或D399K,c) S400E,S400D,S400R,或S400K,d) F405I,F405M,F405T,F405S,F405V或F405W,e) N390R,N390K或N390D,f) K392V,K392M,K392R,K392L,K392F或K392E(编号方式依照Kabat EU索引)。在又一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变L351Y,Y407A且第二CH3域包含氨基酸突变T366V,K409F。在又一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变Y407A且第二CH3域包含氨基酸突变T366A,K409F。在又一个实施方案中,第二CH3域进一步包含氨基酸突变K392E,T411E,D399R和S400R(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0643] 在一个实施方案中,备选地使用WO 2011/143545中记载的异二聚化办法,例如凭借选自下组的位置处的氨基酸修饰:368和409(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0644] 在一个实施方案中,备选地使用WO2011/090762中记载的异二聚化办法,它也使用上文所述节-入-穴技术。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变T366W且第二CH3域包含氨基酸突变Y407A。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变T366Y且第二CH3域包含氨基酸突变Y407T(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0645] 在一个实施方案中,双特异性抗体或它的Fc域是IgG₂亚类的且备选地使用WO 2010/129304中记载的异二聚化办法。

[0646] 在一个备选的实施方案中,促进Fc域的第一和第二亚基联合的修饰包含介导静电操纵效应(electrostatic steering effect)的修饰,例如如记载于PCT公开文本WO 2009/089004的。一般地,此方法涉及将在两个Fc域亚基界面处的一个或多个氨基酸残基替换为带电荷的氨基酸残基,从而在静电上不利于同二聚体形成而在静电上有利于异二聚化。在一个此类实施方案中,第一CH3域包含带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E),或天冬氨酸(D))对K392或N392的氨基酸替代(优选K392D或N392D)且第二CH3域包含带正电荷的氨基酸(例如赖氨酸(K)或精氨酸(R))对D399,E356,D356,或E357的氨基酸替代(优选D399K,E356K,D356K,或E357K,更优选D399K和E356K)。在又一个实施方案中,第一CH3域进一步包含带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E),或天冬氨酸(D))对K409或R409的氨基酸替代,优选K409D或R409D。在又一个实施方案中,第一CH3域进一步或二选一地包含带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E),或天冬氨酸(D))对K439和/或K370的氨基酸替代(所有编号方式依照Kabat EU索引)。

[0647] 在还有又一个实施方案中,备选地使用WO 2007/147901中记载的异二聚化办法。在一个实施方案中,第一CH3域包含氨基酸突变K253E,D282K,和K322D且第二CH3域包含氨基酸突变D239K,E240K,和K292D(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0648] 在仍有另一个实施方案中,可以备选地使用WO 2007/110205中记载的异二聚化办法。

[0649] 在一个实施方案中,Fc域的第一亚基包含氨基酸替代K392D和K409D,且Fc域的第二亚基包含氨基酸替代D356K和D399K(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0650] 降低Fc受体结合和/或效应器功能的Fc域修饰

[0651] Fc域赋予双特异性抗体(或抗体)以有利的药动学特性,包括长血清半衰期,其有助于在靶组织中的较好积累和有利的组织-血液分配比。然而,同时它可能导致不想要的双特异性抗体(或抗体)对表达Fc受体的细胞而非优选的携带抗原的细胞的靶向。此外,Fc受体信号传导途径的共激活可能导致细胞因子释放,其与双特异性抗体的T细胞活化特性(例如在其中第二抗原结合模块结合激活性T细胞抗原的双特异性抗体的实施方案中)和长半衰期组合,在系统性施用后引起细胞因子受体的过度活化和严重的副作用。(携带Fc受体的)免疫细胞而非T细胞的活化甚至可能降低双特异性抗体(特别是其中第二抗原结合模块结合激活性T细胞抗原的双特异性抗体)的功效,原因是例如通过NK细胞对T细胞的潜在破坏。

[0652] 因而,在具体的实施方案中,依照本发明的双特异性抗体的Fc域展现出与天然IgG₁ Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能。在一个此类实施方

案中, Fc域(或包含所述Fc域的双特异性抗体)展现出与天然IgG₁ Fc域(或包含天然IgG₁ Fc域的双特异性抗体)相比少于50%, 优选少于20%, 更优选少于10%且最优选少于5%的对Fc受体的结合亲和力, 和/或与天然IgG₁ Fc域(或包含天然IgG₁ Fc域的双特异性抗体)相比少于50%, 优选少于20%, 更优选少于10%且最优选少于5%的效应器功能。在一个实施方案中, Fc域(或包含所述Fc域的双特异性抗体)没有实质性结合Fc受体和/或诱导效应器功能。在一个具体的实施方案中, Fc受体是Fc γ 受体。在一个实施方案中, Fc受体是人Fc受体。在一个实施方案中, Fc受体是活化性Fc受体。在一个特定的实施方案中, Fc受体是活化性人Fc γ 受体, 更具体地是人Fc γ RIIIa, Fc γ RI或Fc γ RIIa, 最具体地是人Fc γ RIIIa。在一个实施方案中, 效应器功能是选自下组的一项或多项: CDC, ADCC, ADCP, 和细胞因子分泌。在一个具体的实施方案中, 效应器功能是ADCC。在一个实施方案中, Fc域展现出与天然IgG₁ Fc域相比基本相似的对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力。当Fc域(或包含所述Fc域的双特异性抗体)展现出超过约70%, 特别是超过约80%, 更特别是超过约90%的天然IgG₁ Fc域(或包含天然IgG₁ Fc域的双特异性抗体)对FcRn的结合亲和力时, 实现基本相似的对FcRn的结合。

[0653] 在某些实施方案中, Fc域工程化改造为具有与非工程化Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能。在具体的实施方案中, 双特异性抗体的Fc域包含一处或多处降低Fc域对Fc受体的结合亲和力和/或效应器功能的氨基酸突变。通常, Fc域的两个亚基的每一个中存在相同的一处或多处氨基酸突变。在一个实施方案中, 氨基酸突变降低Fc域对Fc受体的结合亲和力。在一个实施方案中, 氨基酸突变将Fc域对Fc受体的结合亲和力降低至少2倍, 至少5倍, 或至少10倍。在有超过一处降低Fc域对Fc受体的结合亲和力的氨基酸突变的实施方案中, 这些氨基酸突变的组合可以将Fc域对Fc受体的结合亲和力降低至少10倍, 至少20倍, 或甚至至少50倍。在一个实施方案中, 包含工程化Fc域的双特异性抗体展现出与包含非工程化Fc域的双特异性抗体相比少于20%, 特别是少于10%, 更特别是少于5%的对Fc受体的结合亲和力。在一个具体的实施方案中, Fc受体是Fc γ 受体。在一些实施方案中, Fc受体是人Fc受体。在一些实施方案中, Fc受体是活化性Fc受体。在一个特定的实施方案中, Fc受体是活化性人Fc γ 受体, 更特别是人Fc γ RIIIa, Fc γ RI或Fc γ RIIa, 最特别是人Fc γ RIIIa。优选地, 对这些受体的每一种的结合是降低的。在一些实施方案中, 对补体成分的结合亲和力, 特别是对C1q的结合亲和力也是降低的。在一个实施方案中, 对新生儿Fc受体(FcRn)的结合亲和力没有降低。当Fc域(或包含所述Fc域的双特异性抗体)展现出非工程化形式的Fc域(或包含所述非工程化形式的Fc域的双特异性抗体)对FcRn的结合亲和力的超过约70%时, 实现基本相似的对FcRn的结合, 即保留Fc域对所述受体的结合亲和力。Fc域或包含所述Fc域的本发明的双特异性抗体可以展现出超过约80%和甚至超过约90%的此类亲和力。在某些实施方案中, 双特异性抗体的Fc域工程化改造为具有与非工程化Fc域相比降低的效应器功能。降低的效应器功能可包括但不限于下列一项或多项: 降低的补体依赖性细胞毒性(CDC), 降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC), 降低的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP), 降低的细胞因子分泌, 降低的免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原摄取, 降低的对NK细胞的结合, 降低的对巨噬细胞的结合, 降低的对单核细胞的结合, 降低的对多形核细胞的结合, 降低的诱导凋亡的直接信号传导, 降低的靶物结合的抗体的交联, 降低的树突细胞成熟, 或降低的T细胞引发。在一个实施方案中, 降低的效应器功能

是选自下组的一项或多项:降低的CDC,降低的ADCC,降低的ADCP,和降低的细胞因子分泌。在一个具体的实施方案中,降低的效应器功能是降低的ADCC。在一个实施方案中,降低的ADCC是小于20%的由非工程化Fc域(或包含非工程化Fc域的双特异性抗体)诱导的ADCC。

[0654] 在一个实施方案中,降低Fc域对Fc受体的结合亲和力和/或效应器功能的氨基酸突变是氨基酸替代。在一个实施方案中,Fc域包含在选自下组的位置处的氨基酸替代:E233,L234,L235,N297,P331和P329(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个更特定的实施方案中,Fc域包含在选自下组的位置处的氨基酸替代:L234,L235和P329(编号方式依照Kabat EU索引)。在一些实施方案中,Fc域包含氨基酸替代L234A和L235A(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个此类实施方案中,Fc域是IgG₁ Fc域,特别是人IgG₁ Fc域。在一个实施方案中,Fc域包含在位置P329处的氨基酸替代。在一个更加特定的实施方案中,氨基酸替代是P329A或P329G,特别是P329G(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个实施方案中,Fc域包含在位置P329处的氨基酸替代和又一处在选自以下位置处的氨基酸替代:E233,L234,L235,N297和P331(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个更加特定的实施方案中,又一处氨基酸替代是E233P,L234A,L235A,L235E,N297A,N297D或P331S。在具体的实施方案中,Fc域包含在位置P329,L234和L235处的氨基酸替代(编号方式依照Kabat EU索引)。在更具体的实施方案中,Fc域包含氨基酸突变L234A,L235A和P329G(“P329G LALA”,“PGLALA”或“LALAPG”)。具体而言,在具体的实施方案中,Fc域的每个亚基包含氨基酸替代L234A,L235A和P329G(Kabat EU索引编号方式),即在Fc域的第一和第二亚基每个中,第234位的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L234A),第235位的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L235A)且第329位的脯氨酸残基用甘氨酸残基替换(P329G)(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0655] 在一个此类实施方案中,Fc域是IgG₁ Fc域,特别是人IgG₁ Fc域。氨基酸替代组合“P329G LALA”几乎完全消除了人IgG₁ Fc域的Fc γ 受体(以及补体)结合,如记载于PCT公开文本no.WO 2012/130831,其通过提述完整并入本文。WO 2012/130831还描述了制备此类突变体Fc域的方法和用于测定其特性(诸如Fc受体结合或效应器功能)的方法。

[0656] IgG₄抗体展现出与IgG₁抗体相比降低的对Fc受体的结合亲和力和降低的效应器功能。因此,在一些实施方案中,本发明的双特异性抗体的Fc域是IgG₄ Fc域,特别是人IgG₄ Fc域。在一个实施方案中,IgG₄ Fc域包含在位置S228处的氨基酸替代,具体是氨基酸替代S228P(编号方式依照Kabat EU索引)。为了进一步降低其对Fc受体的结合亲和力和/或其效应器功能,在一个实施方案中,IgG₄ Fc域包含在位置L235处的氨基酸替代,具体是氨基酸替代L235E(编号方式依照Kabat EU索引)。在另一个实施方案中,IgG₄ Fc域包含在位置P329处的氨基酸替代,具体是氨基酸替代P329G(编号方式依照Kabat EU索引)。在一个具体的实施方案中,IgG₄ Fc域包含在位置S228,L235和P329处的氨基酸替代,具体是氨基酸替代S228P,L235E和P329G(编号方式依照Kabat EU索引)。此类IgG₄ Fc域突变体及其Fc γ 受体结合特性记载于PCT公开文本No.WO 2012/130831,其通过提述完整并入本文。

[0657] 在一个具体的实施方案中,展现出与天然IgG₁ Fc域相比降低的对Fc受体的结合亲和力和/或降低的效应器功能的Fc域是包含氨基酸替代L234A,L235A和任选地P329G的人IgG₁ Fc域,或包含氨基酸替代S228P,L235E和任选地P329G的人IgG₄ Fc域(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0658] 在某些实施方案中,已消除Fc域的N-糖基化。在一个此类实施方案中,Fc域包含在

位置N297处的氨基酸突变,特别是用丙氨酸(N297A)或天冬氨酸(N297D)替换天冬酰胺的氨基酸替代(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0659] 在上文和PCT公开文本no.WO 2012/130831中描述的Fc域以外,具有降低的Fc受体结合和/或效应器功能的Fc域还包括那些具有Fc域残基238,265,269,270,297,327和329中一个或多个的替代的(美国专利No.6,737,056)(编号方式依照Kabat EU索引)。此类Fc突变体包括具有在氨基酸位置265,269,270,297和327的两个或更多个处的替代的Fc突变体,包括所谓的“DANA”Fc突变体,其具有残基265和297到丙氨酸的替代(美国专利No.7,332,581)。

[0660] 可以使用本领域中公知的遗传或化学方法通过氨基酸删除,替代,插入或修饰来制备突变体Fc域。遗传方法可以包括编码DNA序列的位点特异性诱变,PCR,基因合成等。正确的核苷酸变化可以通过例如测序来验证。

[0661] 可以容易地测定对Fc受体的结合,例如通过ELISA或通过使用标准仪器诸如BIAcore仪(GE Healthcare)的表面等离子共振(SPR)进行,并且Fc受体诸如可通过重组表达获得。或者,可使用已知表达特定Fc受体的细胞系,如表达Fc γ IIIa受体的人NK细胞来估测Fc域或包含Fc域的双特异性抗体对Fc受体的结合亲和力。

[0662] 可通过本领域中已知的方法来测量Fc域或包含Fc域的双特异性抗体的效应器功能。评估感兴趣分子的ADCC活性的体外测定法的例子记载于美国专利No.5,500,362; Hellstrom等,Proc Natl Acad Sci USA 83,7059-7063(1986)和Hellstrom等,Proc Natl Acad Sci USA 82,1499-1502(1985);美国专利No.5,821,337;Bruggemann等,J Exp Med 166,1351-1361(1987)。或者,可采用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定法(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA);和CytoTox96®非放射性细胞毒性测定法(Promega, Madison, WI))。对于此类测定法有用的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外,可体内评估感兴趣分子的ADCC活性,例如在动物模型中,诸如披露于Clynes等,Proc Natl Acad Sci USA 95,652-656(1998)的。

[0663] 在一些实施方案中,Fc域对补体成分(特别是对C1q)的结合是降低的。因而,在其中Fc域工程化为具有降低的效应器功能的一些实施方案中,所述降低的效应器功能包括降低的CDC。可实施C1q结合测定法来测定Fc域或包含Fc域的双特异性抗体是否能够结合C1q并因此具有CDC活性。参见例如WO2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可实施CDC测定法(参见例如Gazzano-Santoro等,J Immunol Methods 202,163(1996);Cragg等,Blood 101,1045-1052(2003);以及Cragg和Glennie,Blood 103,2738-2743(2004))。

[0664] 还可以使用本领域已知的方法来实施FcRn结合和体内清除/半衰期测定(参见例如Petkova,S.B.et al.,Int'l Immunol.18(12):1759-1769(2006);WO2013/120929)。

[0665] 在又一个方面,依照上述实施方案任一的抗HLA-G抗体可以单一地或组合地并入下文1-6节描述的任何特征:

[0666] 1. 抗体亲和力

[0667] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq 0.1\text{nM}$, $\leq 0.01\text{nM}$, 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M , 例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的

解离常数KD。

[0668] 在一个优选实施方案中,KD是使用表面等离子共振测定法使用BIACORE®于25℃使用固定化抗原CM5芯片在约10个响应单位(RU)测量的。简言之,依照供应商的用法说明书用盐酸N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5,BIACORE,Inc.)。将抗原用10mM乙酸钠pH 4.8稀释至5μg/ml(约0.2μM),然后以5μl/分钟的流速注射以获得约10个响应单位(RU)的偶联蛋白质。注入抗原后,注入1M乙醇胺以封闭未反应基团。为了动力学测量,于25℃以约25μl/分钟的流速注入在含0.05%聚山梨酯20(TWEEN-20™)表面活性剂的PBS(PBST)中两倍连续稀释的Fab(0.78nM至500nM)。使用简单一对一朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIACORE® Evaluation软件版本3.2)通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率(k_{on} 或 k_a)和解离速率(k_{off} 或 k_d)。平衡解离常数(KD)以比率 k_d/k_a (k_{off}/k_{on})计算。参见例如Chen et al., J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法,结合速率超过 $10^6 M^{-1} s^{-1}$,那么可使用荧光淬灭技术来测定结合速率,即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯进行的测量,在存在浓度渐增的抗原的情况下,测量PBS pH 7.2中20nM抗抗原抗体(Fab形式)于25℃的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的升高或降低。

[0669] 2. 抗体片段

[0670] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 和scFv片段,及下文描述的其它片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson,P.J.et al.,Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如Plueckthun,A.,In:The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,Vol.113,Rosenburg and Moore(eds.),Springer-Verlag,New York(1994),pp.269-315;还可参见W0 93/16185;及美国专利No.5,571,894和No.5,587,458。关于包含补救受体结合表位残基且具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利No.5,869,046。

[0671] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的。参见例如EP 0 404 097;W0 1993/01161;Hudson,P.J.et al.,Nat.Med.9:129-134(2003);及Holliger,P.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。三抗体和四抗体也记载于Hudson,P.J.et al.,Nat.Med.9:129-134(2003)。

[0672] 单域抗体是包含抗体的整个或部分重链可变域或整个或部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方案中,单域抗体是人单域抗体(Domantis,Inc.,Waltham,MA;参见例如美国专利No.6,248,516 B1)。

[0673] 可以通过多种技术,包括但不限于对完整抗体的蛋白水解消化及重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)的生成来生成抗体片段,如本文中所描述的。

[0674] 3. 嵌合抗体和人源化的抗体

[0675] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体记载于例如美国专利No.4,816,567;及Morrison,S.L.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984)。在一个例子中,嵌合抗体包含非人可变区(例如自小鼠,大鼠,仓鼠,家兔,或非人灵长类,诸如猴衍生的可变区)和人恒定区。在又一个例子中,嵌合抗体是“类转换的”抗体,其

中类或亚类已经自亲本抗体的类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0676] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般地,人源化抗体包含一个或多个可变域,其中HVR,例如CDR(或其部分)自非人抗体衍生,而FR(或其部分)自人抗体序列衍生。任选地,人源化抗体还会至少包含人恒定区的一部分。在一些实施方案中,将人源化抗体中的一些FR残基用来自非人抗体(例如衍生HVR残基的抗体)的相应残基替代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0677] 人源化抗体及其生成方法综述于例如Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), 并且进一步记载于例如Riechmann, I. et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen, C. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); 美国专利No. 5,821,337, No. 7,527,791, No. 6,982,321, 和No. 7,087,409; Kashmiri, S.V. et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (记载SDR(a-CDR)嫁接); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (记载“重修表面”); Dall'Acqua, W.F. et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (记载“FR改组”); Osbourn, J. et al., *Methods* 36:61-68 (2005) 及Klimka, A. et al., *Br. J. Cancer* 83:252-260 (2000) (记载FR改组的“引导选择”办法)。

[0678] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合(best-fit)”方法选择的框架区(见例如Sims, M.J.等, *J. Immunol.* 151:2296-2308 (1993)); 自轻或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列衍生的框架区(见例如Carter, P.等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289 (1992); 及Presta, L.G.等, *J. Immunol.*, 151:2623-2632 (1993)); 人成熟的(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(见例如Almagro, J.C.和Fransson, J., *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); 和通过筛选FR文库衍生的框架区(见例如Baca, M.等, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 及Rosok, M.J.等, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

[0679] 4. 人抗体

[0680] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是人抗体。可以使用本领域中已知的多种技术来生成抗体。一般地,人抗体记载于van Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-374 (2001) 及Lonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)。

[0681] 可以通过对转基因动物施用免疫原来制备人抗体,所述转基因动物已经修饰为响应抗原性攻击而生成完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有整个或部分人免疫球蛋白基因座,其替换内源免疫球蛋白基因座,或者其在染色体外存在或随机整合入动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,一般已经将内源免疫球蛋白基因座灭活。关于自转基因动物获得人抗体的方法的综述参见Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。还可参见例如美国专利No. 6,075,181和No. 6,150,584,其描述了XENOMOUSE™技术;美国专利No. 5,770,429,其描述了HUMAB®技术;美国专利No. 7,041,870,其描述了K-MOUSE®技术,和美国专利申请公开文本No. US2007/0061900,其描述了VELOCIMOUSE®技术。可以例如通过与不同人恒定区组合进一步修饰来自此类动物生成的完整抗体的人可变区。

[0682] 也可以通过基于杂交瘤的方法生成抗体。已经描述了用于生成人单克隆抗体的

人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系(参见例如Kozbor,D.,*J.Immunol.*133:3001-3005 (1984);Brodeur,B.R.et al.,*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*,Marcel Dekker,Inc.,New York(1987),pp.51-63;及Boerner,P.et al.,*J.Immunol.*147:86-95(1991))。经由人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体也记载于Li,J.et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*103:3557-3562(2006)。其它方法包括那些记载于例如美国专利No.7,189,826(其描述了自杂交瘤细胞系生成单克隆人IgM抗体)及Ni,J.,*Xiandai Mianyixue* 26:265-268(2006)(其描述了人-人杂交瘤)的。人杂交瘤技术(Trioma技术)也记载于Vollmers,H.P.and Brandlein,S.,*Histology and Histopathology* 20:927-937(2005)及Vollmers,H.P.and Brandlein,S.,*Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27:185-191(2005)。

[0683] 也可以如下生成抗体,即分离自人衍生的噬菌体展示文库选择的Fv克隆可变域序列。然后,可以将此类可变域序列与期望的人恒定域组合。下文描述了自抗体文库选择人抗体的技术。

[0684] 5.文库衍生的抗体

[0685] 可以通过对组合文库筛选具有期望的一种或多种活性的抗体来分离本发明的抗体。例如,用于生成噬菌体展示文库及对此类文库筛选拥有期望结合特征的抗体的多种方法是本领域中已知的。此类方法综述于例如Hoogenboom,H.R.et al.,*Methods in Molecular Biology* 178:1-37(2001),并且进一步记载于例如McCafferty,J.et al.,*Nature* 348:552-554(1990);Clackson,T.et al.,*Nature* 352:624-628(1991);Marks,J.D.et al.,*J.Mol.Biol.*222:581-597(1992);Marks,J.D.and Bradbury,A.,*Methods in Molecular Biology*248:161-175(2003);Sidhu,S.S.et al.,*J.Mol.Biol.*338:299-310(2004);Lee,C.V.et al.,*J.Mol.Biol.*340:1073-1093(2004);Fellouse,F.A.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101:12467-12472(2004);及Lee,C.V.et al.,*J.Immunol.Methods*284:119-132(2004)。

[0686] 在某些噬菌体展示方法中,将VH和VL基因的全集分别通过聚合酶链式反应(PCR)克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以对所述噬菌体文库筛选抗原结合噬菌体,如记载于Winter,G.et al.,*Ann.Rev.Immunol.*12:433-455(1994)。噬菌体通常以单链Fv(scFv)片段或以Fab片段展示抗体片段。来自经免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。或者,可以(例如自人)克隆未免疫全集以在没有任何免疫的情况下提供针对一大批非自身和还有自身抗原的抗体的单一来源,如由Griffiths,A.D.et al.,*EMBO J*,12:725-734(1993)描述的。最后,也可以通过自干细胞克隆非重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物编码高度可变的CDR3区并在体外实现重排来合成生成未免疫文库,如由Hoogenboom,H.R.and Winter,G.,*J.Mol.Biol.*227:381-388(1992)所描述的。描述人抗体噬菌体文库的专利公开文本包括例如:美国专利No.5,750,373及美国专利公开文本No.2005/0079574,2005/0119455,2005/0266000,2007/0117126,2007/0160598,2007/0237764,2007/0292936和2009/0002360。

[0687] 认为自人抗体文库分离的抗体或抗体片段是本文中的人抗体或人抗体片段。

[0688] 6.抗体变体

[0689] 在某些实施方案中,涵盖本文中提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能期望改

善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。可以通过将适宜的修饰引入编码抗体的核苷酸序列中,或者通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如对抗体的氨基酸序列内的残基的删除,和/或插入和/或替代。可以进行删除,插入,和替代的任何组合以得到最终的构建体,只要最终的构建体拥有期望的特征,例如抗原结合。

[0690] a) 替代,插入,和删除变体

[0691] 在某些实施方案中,提供具有一处或多处氨基酸替代的抗体变体。替代诱变感兴趣的位点包括HVR和FR。例示性变化在表1中在“例示性替代”的标题下提供,并且如下文参照氨基酸侧链类别进一步描述的。保守替代在表1中在“优选的替代”的标题下显示。可以将氨基酸替代引入感兴趣的抗体中,并且对产物筛选期望的活性,例如保留/改善的抗原结合,降低的免疫原性,或改善的ADCC或CDC。

[0692] 表1

初始残基	例示性替代	优选的替代
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
[0693] His(H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile(I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸; 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
[0694] Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0695] 依照共同的侧链特性,氨基酸可以如下分组:

[0696] (1) 疏水性的: 正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0697] (2) 中性, 亲水性的: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0698] (3) 酸性的: Asp, Glu;

[0699] (4) 碱性的: His, Lys, Arg;

[0700] (5) 影响链取向的残基: Gly, Pro;

[0701] (6) 芳香族的: Trp, Tyr, Phe。

[0702] 非保守替代会需要用这些类别之一的成员替换另一个类别的。

[0703] 一类替代变体牵涉替代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般地,为进一步研究选择的所得变体相对于亲本抗体会具有某些生物学特性的改变(例如改善)(例如升高的亲和力,降低的免疫原性)和/或会基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。一种例示性替代变体是亲和力成熟抗体,其可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术诸如本文中所述的那些技术来方便地生成。简言之,将一个或多个HVR残基突变,并将变体抗体在噬菌体上展示,并对其筛选特定的生物学活性(例如结合亲和力)。

[0704] 可以在HVR中做出变化(例如替代),例如以改善抗体亲和力。可以在HVR“热点”中,即由在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子编码的残基(参见例如Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), 和/或SDR(a-CDR)做出此类变化,对所得变体VH或VL测试结合亲和力。通过次级文库的构建和再选择进行的亲和力成熟已经记载于例如Hoogenboom, H.R. et al., in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2002)。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错PCR, 链改组, 或寡核苷酸指导的诱变)任一将多样性引入为成熟选择的可变基因。然后,创建次级文库。然后,筛选文库以鉴定具有期望亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法牵涉HVR指导的办法,其中将数个HVR残基(例如一次4-6个残基)随机化。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性鉴定牵涉抗原结合的HVR残基。特别地,经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0705] 在某些实施方案中,可以在一个或多个HVR内发生替代,插入,或删除,只要此类变化不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如,可以在HVR中做出保守变化(例如保守替代,如本文中提供的),其没有实质性降低结合亲和力。此类变化可以在HVR“热点”或SDR以外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR或是未改变的,或是含有不多于1, 2或3处氨基酸替代。

[0706] 一种可用于鉴定抗体中可作为诱变靶位的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如记载于Cunningham, B.C. and Wells, J.A., *Science*, 244:1081-1085 (1989)。在这种方法中,鉴定一个残基或一组靶残基(例如带电荷的残基,诸如arg, asp, his, lys, 和glu),并用中性或带负电荷的氨基酸(例如丙氨酸或多丙氨酸)替换以测定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在对初始替代表明功能敏感性的氨基酸位置引入进一步的替代。或者/另外,利用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体与抗原之间的接触点。作为替代的候选,可以靶向或消除此类接触残基和邻近残基。可以筛选变体以确定它们是否含有期望特性。

[0707] 氨基酸序列插入包括长度范围为1个残基至含有100或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N或C端与酶(例如对于ADEPT)或延长抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0708] b) Fc区变体

[0709] 在某些实施方案中,可以将一处或多处氨基酸修饰引入本文中提供的抗体的Fc区中,由此生成Fc区变体。Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置包含氨基酸修饰(例如替代)的人Fc区序列(例如人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4Fc区)。

[0710] 具有降低的效应器功能的抗体包括那些具有Fc区残基238,265,269,270,297,327和329中的一个或多个的替代的(美国专利No.6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265,269,270,297和327中的两处或更多处具有替代的Fc突变体,包括残基265和297替代成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利No.7,332,581)。

[0711] 描述了具有改善的或降低的对FcR的结合的某些抗体变体(参见例如美国专利No.6,737,056;WO 2004/056312;及Shields,R.L.et al.,J.Biol.Chem.276:6591-6604(2001))。

[0712] 在本发明的一个实施方案中,此类抗体是具有突变L234A和L235A或具有突变L234A,L235A和P329G的IgG1,在另一个实施方案中,或具有突变S228P和L235E或S228P,L235E或和P329G的IgG4(编号方式依照Kabat et al,Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991的EU索引)。

[0713] 具有延长的半衰期和改善的对新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体记载于US 2005/0014934,新生儿Fc受体(FcRn)负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer,R.L.et al.,J.Immunol.117:587-593(1976)及Kim,J.K.et al.,J.Immunol.24:2429-2434(1994))。那些抗体包含其中具有改善Fc区对FcRn的结合的一处或多处替代的Fc区。此类Fc变体包括那些在Fc区残基238,256,265,272,286,303,305,307,311,312,317,340,356,360,362,376,378,380,382,413,424或434中的一处或多处具有替代,例如Fc区残基434的替代的(美国专利No.7,371,826)。

[0714] 还可参见Duncan,A.R.and Winter,G.,Nature 322:738-740(1988);US5,648,260;US 5,624,821;及WO 94/29351,其关注Fc区变体的其它例子。

[0715] c) 经半胱氨酸工程化改造的抗体变体

[0716] 在某些实施方案中,可能期望创建经半胱氨酸工程化改造的抗体,例如“thioMab”,其中抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基替代。在特定实施方案中,替代的残基存在于抗体的可接近位点。通过用半胱氨酸替代那些残基,反应性硫醇基团由此定位于抗体的可接近位点,并且可以用于将抗体缀合至其它模块,诸如药物模块或接头-药物模块,以创建免疫缀合物,如本文中进一步描述的。在某些实施方案中,可以用半胱氨酸替代下述残基之任一个或多个:轻链的V205(Kabat编号方式);重链的A118(EU编号方式);和重链Fc区的S400(EU编号方式)。可以如例如美国专利No.7,521,541所述生成经半胱氨酸工程化改造的抗体。

[0717] d) 抗体衍生物

[0718] 在某些实施方案中,可以进一步修饰本文中提供的抗体以含有本领域知道的且易于获得的另外的非蛋白质性质模块。适合于抗体衍生化的模块包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG),乙二醇/丙二醇共聚物,羧甲基纤维素,右旋糖苷,聚乙烯醇,聚乙烯吡咯烷酮,聚-1,3-二氧戊环,聚-1,3,6-三噁烷,乙烯/马来酸酐共聚物,聚氨基酸(均聚物或随机共聚物),和右旋糖苷或聚(n-乙烯吡咯烷

酮) 聚乙二醇, 丙二醇均聚物, 环氧丙烷/环氧乙烷共聚物, 聚氧乙烯化多元醇(例如甘油), 聚乙烯醇, 及其混合物。由于其在水中的稳定性, 聚乙二醇丙醛在生产中可能具有优势。聚合物可以是任何分子量, 而且可以是分支的或不分支的。附着至抗体的聚合物的数目可以变化, 而且如果附着了多于一个聚合物, 那么它们可以是相同或不同的分子。一般而言, 可根据下述考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型, 包括但不限于抗体要改进的具体特性或功能, 抗体衍生物是否会用于指定条件下的治疗, 等。

[0719] 在另一个实施方案中, 提供抗体和可以通过暴露于辐射而选择性加热的非蛋白质性质模块的缀合物。在一个实施方案中, 非蛋白质性质模块是碳纳米管(Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005))。辐射可以是任何波长的, 而且包括但不限于对普通细胞没有损害, 但是将非蛋白质性质模块加热至抗体-非蛋白质性质模块附近的细胞被杀死的温度的波长。

[0720] B. 重组方法和组合物

[0721] 可使用重组方法和组合物来生成抗体, 例如如记载于美国专利No. 4,816,567的。在一个实施方案中, 提供编码本文所述抗HLA-G抗体的分离的核酸。此类核酸可编码包含抗体VL的氨基酸序列和/或包含抗体VH的氨基酸序列(例如抗体的轻和/或重链)。在又一个实施方案中, 提供包含此类核酸的一种或多种载体(例如表达载体)。在又一个实施方案中, 提供包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施方案中, 宿主细胞包含(例如已经用下述各项转化): (1) 包含核酸的载体, 所述核酸编码包含抗体VL的氨基酸序列和包含抗体VH的氨基酸序列, 或(2) 第一载体和第二载体, 所述第一载体包含编码包含抗体VL的氨基酸序列的核酸, 所述第二载体包含编码包含抗体VH的氨基酸序列的核酸。在一个实施方案中, 宿主细胞是真核的, 例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞, HEK293细胞或淋巴样细胞(例如Y0, NS0, Sp20细胞)。在一个实施方案中, 提供生成抗HLA-G抗体的方法, 其中该方法包括在适合于抗体表达的条件下培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞, 如上文提供的, 并任选自宿主细胞(或宿主细胞培养液)回收抗体。

[0722] 对于抗HLA-G抗体的重组生成, 分离编码抗体的核酸(例如如上文所描述的), 并插入一种或多种载体中, 用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可使用常规规程将此类核酸容易地分离并测序(例如通过使用寡核苷酸探针来进行, 所述寡核苷酸探针能够特异性结合编码抗体重和轻链的基因)。

[0723] 适合于克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括本文所述原核或真核细胞。例如, 可以在细菌中生成抗体, 特别是在不需要糖基化和Fc效应器功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达, 参见例如US 5,648,237; US5,789,199; 及US 5,840,523。还可参见Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol.248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp.245-254, 其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。表达后, 可以在可溶性级分中自细菌细胞浆分离抗体, 并可以进一步纯化。

[0724] 在原核生物之外, 真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是适合于编码抗体的载体的克隆或表达宿主, 包括其糖基化途径已经“人源化”, 导致生成具有部分或完全人的糖基化样式的抗体的真菌和酵母菌株。参见Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004); 及Li, H. et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)。

[0725] 适合于表达糖基化抗体的宿主细胞也是自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动

物) 衍生的。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定出许多杆状病毒株, 其可以与昆虫细胞联合使用, 特别是用于转染草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞。

[0726] 也可利用植物细胞培养物作为宿主。参见例如美国专利No.5,959,177;No.6,040,498;No.6,420,548;No.7,125,978;及No.6,417,429(其描述用于在转基因植物中生成抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0727] 也可使用脊椎动物细胞作为宿主。例如, 适应悬浮生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用哺乳动物宿主细胞系的其它例子有经SV40转化的猴肾CV1系(COS-7); 人胚肾系(293或293细胞, 如记载于例如Graham,F.L.et al., *J.Gen Virol.* 36:59-74(1977)); 幼仓鼠肾细胞(BHK); 小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4细胞, 如记载于例如Mather,J.P., *Biol.Reprod.* 23:243-252(1980)); 猴肾细胞(CV1); 非洲绿猴肾细胞(VERO-76); 人宫颈癌细胞(HELA); 犬肾细胞(MDCK); 牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A); 人肺细胞(W138); 人肝细胞(Hep G2); 小鼠乳房肿瘤(MMT 060562); TRI细胞, 如记载于例如Mather,J.P.et al., *Annals N.Y.Acad.Sci.* 383:44-68(1982); MRC 5细胞; 和F54细胞。其它有用哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞, 包括DHFR⁻CHO细胞(Urlaub,G.et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:4216-4220(1980)); 和骨髓瘤细胞系诸如Y0, NS0和Sp2/0。关于适合于抗体生成的某些哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如Yazaki,P.and Wu,A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol.248, Lo,B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp.255-268。

[0728] C. 测定法

[0729] 可通过本领域已知的多种测定法对本文中提供的抗HLA-G抗体鉴定, 筛选, 或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

[0730] 1. 结合测定法和其它测定法

[0731] 一方面, 对本发明的抗体测试其抗原结合活性, 例如通过已知方法诸如ELISA, Western印迹, 等。

[0732] 另一方面, 可使用竞争测定法来鉴定与HLA-G-0032(包含VH序列SEQ ID NO:7和VL序列SEQ ID NO:8)竞争对HLA-G的结合的抗体。本发明的一个实施方案是与包含VH序列SEQ ID NO:7的所有3种HVR和VL序列SEQ ID NO:8的所有3种HVR的抗HLA-G抗体竞争对人HLA-G的结合的抗体。在某些实施方案中, 此类竞争性抗体结合与抗HLA-G抗体HLA-G-0032所结合表位相同的表位(例如线性或构象表位)。在一个实施方案中, 提供与包含VH序列SEQ ID NO:7和VL序列SEQ ID NO:8的抗体结合HLA-G上相同表位的抗HLA-G抗体。另一方面, 可使用竞争测定法来鉴定与HLA-G-0037(包含VH序列SEQ ID NO:15和VL序列SEQ ID NO:16)竞争对HLA-G的结合的抗体。本发明的一个实施方案是与包含VH序列SEQ ID NO:15的所有3种HVR和VL序列SEQ ID NO:16的所有3种HVR的抗HLA-G抗体竞争对人HLA-G的结合的抗体。在某些实施方案中, 此类竞争性抗体结合与抗HLA-G抗体HLA-G-0037所结合表位相同的表位(例如线性或构象表位)。在一个实施方案中, 提供与包含VH序列SEQ ID NO:15和VL序列SEQ ID NO:16的抗体结合HLA-G上相同表位的抗HLA-G抗体。用于定位抗体所结合表位的详细例示性方法参见Morris,G.E. (ed.) (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology*, vol.66 (Humana Press, Totowa, NJ)。

[0733] 在一种例示性竞争测定法中, 在包含第一经标记抗体(其结合HLA-G, 例如抗HLA-G

抗体HLA-G-0032或HLA-G-0037) 和第二未标记抗体(其要测试与第一抗体竞争对HLA-G的结合的能力)的溶液中温育固定化HLA-G。第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照,在包含第一标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中温育固定化HLA-G。在允许第一抗体结合HLA-G的条件下温育后,除去过量的未结合抗体,并测量与固定化HLA-G联合的标记物的量。如果测试样品中与固定化HLA-G联合的标记物的量相对于对照样品实质性减少,那么这指示第二抗体与第一抗体竞争对HLA-G的结合。参见Harlow, E. and Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988)。另一种例示性竞争测定法见实施例2(表位作图ELISA/结合竞争测定法)。

[0734] 2. 活性测定法

[0735] 一方面,提供了用于鉴定具有生物学活性的抗HLA-G抗体的测定法。生物学活性可包括例如增强不同免疫细胞,包括T细胞的活化和/或增殖的能力。例如,它们增强免疫调控性细胞因子(例如干扰素伽马($IFN\ \gamma$)和/或肿瘤坏死因子阿尔法($TNF\ \alpha$))的分泌。增强或能增强的其它免疫调控性细胞因子有例如结合不同细胞类型的 $IL1\beta$, $IL6$, $IL12$, 粒酶B, 等。还提供了在体内和/或在体外具有此类生物学活性的抗体。

[0736] 在某些实施方案中,对本发明的抗体测试此类生物学活性,如记载于例如下文实施例。

[0737] D. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0738] 在某些实施方案中,本文中提供的任何抗HLA-G抗体对于检测生物学样品中HLA-G的存在是有用的。如本文中使用的,术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中,生物学样品包括细胞或组织,诸如免疫细胞或T细胞浸润物和/或肿瘤细胞。

[0739] 在一个实施方案中,提供在诊断或检测方法中使用的抗HLA-G抗体。在又一方面,提供检测生物学样品中HLA-G的存在的方法。在某些实施方案中,该方法包括在允许抗HLA-G抗体结合HLA-G的条件下使生物学样品与本文所述抗HLA-G抗体接触,并检测是否在抗HLA-G抗体与HLA-G之间形成复合物。此类方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,使用抗HLA-G抗体来选择适合用抗HLA-G抗体治疗的受试者,例如其中HLA-G是一种用于选择患者的生物标志物。

[0740] 在某些实施方案中,提供经标记的抗HLA-G抗体。标记物包括但不限于直接检测的标记物或模块(诸如荧光,发色,电子致密,化学发光,和放射性标记物),以及例如经由酶促反应或分子相互作用间接检测的模块,诸如酶或配体。例示性标记物包括但不限于放射性同位素 ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , 3H , 和 ^{131}I , 荧光团诸如稀土螯合物或荧光素及其衍生物,罗丹明(rhodamine)及其衍生物,丹酰,伞形酮,萤光素酶例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利No. 4,737,456),萤光素,2,3-二氢酞嗪二酮,辣根过氧化物酶(HRP),碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶,葡糖淀粉酶,溶菌酶,糖氧化酶例如葡萄糖氧化酶,半乳糖氧化酶,和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,杂环氧化酶诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶(其与采用过氧化氢氧化染料前体的酶诸如HRP偶联),乳过氧化物酶,或微过氧化物酶,生物素/亲合素,自旋标记物,噬菌体标记物,稳定的自由基,等等。

[0741] E. 药物配制剂

[0742] 通过混合具有期望纯度的本文所述抗HLA-G抗体与一种或多种任选的药学可接受

载剂来制备此类抗体的药物配制剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)), 处于冻干配制剂或水性溶液形式。一般地, 药学可接受载剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的, 而且包括但不限于: 缓冲剂, 诸如磷酸盐, 柠檬酸盐, 和其它有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂 (诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵; 氯化己烷双胺; 苯扎氯铵; 苜索氯铵; 酚, 丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烃基酯, 诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量 (少于约10个残基) 多肽; 蛋白质, 诸如血清清蛋白, 明胶, 或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 诸如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 诸如甘氨酸, 谷氨酰胺, 天冬酰胺, 组氨酸, 精氨酸, 或赖氨酸; 单糖, 二糖, 和其它碳水化合物, 包括葡萄糖, 甘露糖, 或糊精; 螯合剂, 诸如EDTA; 糖, 诸如蔗糖, 甘露醇, 海藻糖或山梨醇; 成盐反荷离子, 诸如钠; 金属复合物 (例如Zn-蛋白质复合物); 和/或非离子表面活性剂, 诸如聚乙二醇 (PEG)。本文中的例示性药学可接受载剂进一步包括间质药物分散剂, 诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白 (sHASEGP), 例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白, 诸如rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)。某些例示性sHASEGP和使用方法 (包括rhuPH20) 记载于美国专利公开文本No. 2005/0260186和No. 2006/0104968。在一方面, 将sHASEGP与一种或多种别的糖胺聚糖酶诸如软骨素酶组合。

[0743] 例示性冻干抗体配制剂记载于美国专利No. 6, 267, 958。水性抗体配制剂包括那些记载于美国专利No. 6, 171, 586和WO 2006/044908的, 后一种配制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0744] 本文中的配制剂还可含有所治疗具体适应症所必需的多于一种活性组分, 优选活性互补且彼此没有不利影响的那些。例如, 可能想要进一步提供。合适的是, 此类活性组分以对于预定目的有效的量组合存在。

[0745] 活性组分可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中 (例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚 (甲基丙烯酸甲酯) 微胶囊), 在胶状药物投递系统中 (例如脂质体, 清蛋白微球体, 微乳剂, 纳米颗粒和纳米胶囊) 或在粗滴乳状液中。此类技术披露于例如Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)。

[0746] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质, 该基质为成形制品形式, 例如膜或微胶囊。

[0747] 用于体内施用的配制剂一般是无菌的。无菌性可容易地实现, 例如通过穿过无菌滤膜过滤。

[0748] F. 治疗性方法和组合物

[0749] 本文中提供的任何抗HLA-G抗体 (或抗原结合蛋白) 可用于治疗方法。

[0750] 一方面, 提供了抗HLA-G抗体, 其用作药物。又一些方面, 提供了抗HLA-G抗体, 其用于治疗癌症。在某些实施方案中, 提供了抗HLA-G抗体, 其用于治疗癌症。在某些实施方案中, 本发明提供抗HLA-G抗体, 其用于治疗具有癌症的个体的方法, 包括对该个体施用有效量的抗HLA-G抗体。

[0751] 在又一些实施方案中, 本发明提供抗HLA-G抗体, 其用作免疫调控剂/用于直接或间接诱导免疫细胞的增殖, 免疫细胞的激活 (例如通过分泌免疫刺激性细胞因子, 像TNF α (TNF α) 和IFN γ (IFN γ)) 或进一步募集。在某些实施方案中, 本发明提供抗HLA-G抗体, 其用于在个体中免疫调控剂/用于直接或间接诱导免疫细胞的增殖, 免疫细胞的激活 (例如通过

分泌免疫刺激性细胞因子,像TNF α 和IFN γ)或进一步募集的方法,包括对该个体施用有效量的该抗HLA-G抗体从而免疫调控或直接或间接诱导免疫细胞的增殖,免疫细胞的激活(例如通过分泌免疫刺激性细胞因子,像TNF α 和IFN γ)或免疫细胞的进一步募集。

[0752] 在又一些实施方案中,本发明提供抗HLA-G抗体,其用作免疫刺激剂和/或用于刺激肿瘤坏死因子 α (TNF α)分泌。在某些实施方案中,本发明提供抗HLA-G抗体,其用于在个体中免疫调控用于直接或间接诱导免疫细胞的增殖,激活(例如通过分泌免疫刺激性细胞因子,像TNF α 和IFN γ)或进一步募集的方法,包括对该个体施用有效量的该抗HLA-G抗体从而免疫调控以直接或间接诱导免疫细胞的增殖,激活(例如通过分泌免疫刺激性细胞因子,像TNF α 和IFN γ)或进一步募集,如抑制肿瘤中的免疫遏制。

[0753] 依照任何上述实施方案,“个体”优选为人。又一方面,本发明提供抗HLA-G抗体在制造或制备药物中的用途。在一个实施方案中,该药物用于治疗癌症。在又一个实施方案中,该药物用于治疗癌症的方法,包括对具有癌症的个体施用有效量的药物。在又一个实施方案中,该药物用于诱导细胞介导的癌细胞裂解。在又一个实施方案中,该药物用于在罹患癌症的个体中诱导细胞介导的癌细胞裂解的方法,包括对该个体施用有效量的药物以诱导癌细胞凋亡和/或抑制癌细胞增殖。依照任何上述实施方案,“个体”可以为“人”。

[0754] 又一方面,本发明提供用于治疗癌症的方法。在一个实施方案中,该方法包括对具有癌症的个体施用有效量的抗HLA-G抗体。依照任何上述实施方案,“个体”可以为“人”。

[0755] 又一方面,本发明提供用于在罹患癌症的个体中诱导细胞介导的癌细胞裂解的方法。在一个实施方案中,该方法包括对该个体施用有效量的抗HLA-G抗体以在罹患癌症的个体中诱导细胞介导的癌细胞裂解。在一个实施方案中,“个体”为人。

[0756] 又一方面,本发明提供包含本文中提供的任何抗HLA-G抗体的药物配制剂,其用于例如任何上述治疗方法。在一个实施方案中,药物配制剂包含本文中提供的任何抗HLA-G抗体和药学可接受载体。

[0757] 可以通过任何合适手段,包括胃肠外,肺内,和鼻内,及若期望用于局部治疗的话,损伤内施用来施用本发明的抗体(和任何别的治疗剂)。胃肠外输注包括肌肉内,静脉内,动脉内,腹膜内,或皮下施用。部分根据施用是短暂的还是长期的,剂量给药可以通过任何合适路径(例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射)进行。本文中涵盖各种剂量给药日程表,包括但不限于单次施用或在多个时间点的多次施用,推注施用,和脉冲输注。

[0758] 本发明的抗体应当以一种与较好医学实践一致的方式配制,定剂量,和施用。关于这一点考虑的因素包括所治疗的具体病症,所治疗的具体哺乳动物,患者个体的临床状态,病症的起因,药剂递送部位,施用方法,施用日程表,及医学从业人员知道的其它因素。抗体无需但任选与一种或多种当前用于预防或治疗所讨论病症的药剂一起配制。此类其它药剂的有效量取决于配制剂中存在的抗体的量,病症或治疗的类型,及上文讨论的其它因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和施用路径,或者以本文所述剂量的约1-99%,或者以凭经验/在临床上确定为适宜的任何剂量和任何路径使用。

[0759] 对于疾病的预防或治疗,本发明的抗体(当单独地或与一种或多种其它别的治疗剂组合地使用时)的适宜剂量会取决于要治疗的疾病的类型,抗体的类型,疾病的严重性和病程,施用抗体是出于预防还是治疗目的,之前的疗法,患者的临床史和对抗体的响应,及主治医师的判断。抗体恰当地以一次或一系列治疗施用于患者。取决于疾病的类型和严重

性,约1 μ g/kg至15mg/kg(例如0.5mg/kg至10mg/kg)的抗体可作为施用于患者的初始候选剂量,无论是例如通过一次或多次分开的施用或是通过连续输注。取决于上文所述因素,一个典型日剂量的范围可以为约1 μ g/kg至100mg/kg或更多。对于几天或更长时间的重复施用,取决于状况,治疗一般会持续直至出现疾病症状的期望遏制。抗体的一种例示性剂量会在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围中。如此,可以对患者施用一剂或多剂约0.5mg/kg,2.0mg/kg,4.0mg/kg或10mg/kg(或其任意组合)。此类剂量可间歇施用,例如每周或每三周(例如使得患者接受约2剂至约20剂,或例如约6剂抗体)。可施用一个较高的初始加载剂量,接着是一个或多个较低的剂量。一种例示性剂量给药方案包括施用约4mg/kg的初始加载剂量,接着是约2mg/kg抗体的每周一次维持剂量。然而,其它剂量摄生法可能是有用的。这种疗法的进展易于通过常规技术和测定法来监测。

[0760] 应当理解,可使用本发明的免疫缀合物实施任何上述配制剂或治疗性方法,作为抗HLA-G抗体的替代或补充。

[0761] 应当理解,可使用本发明的免疫缀合物实施任何上述配制剂或治疗性方法,作为抗HLA-G抗体的替代或补充。

[0762] II. 制品

[0763] 在本发明的另一方面,提供一种制品,其包含对于治疗,预防和/或诊断上文所述病症有用的材料。制品包括容器和容器上或与容器联合的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶,管形瓶,注射器,IV溶液袋,等。容器可以自多种材料诸如玻璃或塑料形成。容器装有单独或与另一种组合物组合有效治疗,预防和/或诊断疾患的组合物,并且可具有无菌存取口(例如,容器可以是具有由皮下注射针可刺穿的塞子的管形瓶或静脉内溶液袋)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗体。标签或包装插页指示使用组合物来治疗选择的状况。此外,制品可包括(a)其中装有组合物的第一容器,其中该组合物包含本发明的抗体;和(b)其中装有组合物的第二容器,其中该组合物包含别的细胞毒性或其它方面治疗性的药剂。在本发明的这个实施方案中的制品可进一步包括包装插页,其指示可使用组合物来治疗特定状况。或者/另外,制品可进一步包括第二(或第三)容器,其装有药学可接受缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI),磷酸盐缓冲盐水,林格(Ringer)氏溶液和右旋糖溶液。它可进一步包括从商业和用户立场看期望的其它材料,包括其它缓冲液,稀释剂,滤器,针,和注射器。

[0764] 提供下面的实施例和附图来帮助理解本发明,其真实范围在所附权利要求书中列出。理解的是,可以在不背离本发明的精神的情况下在列出的规程中进行修饰。

[0765] 氨基酸序列的描述

[0766] 抗HLA-G抗原结合位点(可变区和高变区(HVR)):

[0767] SEQ ID NO:1重链HVR-H1,HLA-G-0031

[0768] SEQ ID NO:2重链HVR-H2,HLA-G-0031

[0769] SEQ ID NO:3重链HVR-H3,HLA-G-0031

[0770] SEQ ID NO:4轻链HVR-L1,HLA-G-0031

[0771] SEQ ID NO:5轻链HVR-L2,HLA-G-0031

[0772] SEQ ID NO:6轻链HVR-L3,HLA-G-0031

[0773] SEQ ID NO:7重链可变域VH,HLA-G-0031

- [0774] SEQ ID NO:8轻链可变域VL,HLA-G-0031
- [0775] SEQ ID NO:9重链HVR-H1,HLA-G-0039
- [0776] SEQ ID NO:10重链HVR-H2,HLA-G-0039
- [0777] SEQ ID NO:11重链HVR-H3,HLA-G-0039
- [0778] SEQ ID NO:12轻链HVR-L1,HLA-G-0039
- [0779] SEQ ID NO:13轻链HVR-L2,HLA-G-0039
- [0780] SEQ ID NO:14轻链HVR-L3,HLA-G-0039
- [0781] SEQ ID NO:15重链可变域VH,HLA-G-0039
- [0782] SEQ ID NO:16轻链可变域VL,HLA-G-0039
- [0783] SEQ ID NO:17重链HVR-H1,HLA-G-0041
- [0784] SEQ ID NO:18重链HVR-H2,HLA-G-0041
- [0785] SEQ ID NO:19重链HVR-H3,HLA-G-0041
- [0786] SEQ ID NO:20轻链HVR-L1,HLA-G-0041
- [0787] SEQ ID NO:21轻链HVR-L2,HLA-G-0041
- [0788] SEQ ID NO:22轻链HVR-L3,HLA-G-0041
- [0789] SEQ ID NO:23重链可变域VH,HLA-G-0041
- [0790] SEQ ID NO:24轻链可变域VL,HLA-G-0041
- [0791] SEQ ID NO:25重链HVR-H1,HLA-G-0090
- [0792] SEQ ID NO:26重链HVR-H2,HLA-G-0090
- [0793] SEQ ID NO:27重链HVR-H3,HLA-G-0090
- [0794] SEQ ID NO:28轻链HVR-L1,HLA-G-0090
- [0795] SEQ ID NO:29轻链HVR-L2,HLA-G-0090
- [0796] SEQ ID NO:30轻链HVR-L3,HLA-G-0090
- [0797] SEQ ID NO:31重链可变域VH,HLA-G-0090
- [0798] SEQ ID NO:32轻链可变域VL,HLA-G-0090
- [0799] SEQ ID NO:33人源化变体重链可变域VH,
- [0800] HLA-G-0031-0104 (HLA-G-0104)
- [0801] SEQ ID NO:34人源化变体轻链可变域VL,
- [0802] HLA-G-0031-0104 (HLA-G-0104)
- [0803] 别的序列:
- [0804] SEQ ID NO:35例示性人HLA-G
- [0805] SEQ ID NO:36例示性人HLA-G胞外域 (ECD)
- [0806] SEQ ID NO:37例示性人 β 2M
- [0807] SEQ ID NO:38修饰的人HLA-G (其中HLA-G特异性氨基酸已经用HLA-A共有氨基酸替换 (=去嫁接的HLA-G还见图1) ECD)
- [0808] SEQ ID NO:39例示性人HLA-A2
- [0809] SEQ ID NO:40例示性人HLA-A2 ECD
- [0810] SEQ ID NO:41例示性小鼠H2Kd ECD
- [0811] SEQ ID NO:42例示性大鼠RT1A ECD

- [0812] SEQ ID NO:43例示性人HLA-G β2M MHC I类复合物
- [0813] SEQ ID NO:44例示性修饰的人HLA-G β2M MHC I类复合物(其中HLA-G特异性氨基酸已经用HLA-A共有氨基酸替换(=去嫁接的HLA-G) 还见图1)
- [0814] SEQ ID NO:45例示性小鼠H2Kd β2M MHC I类复合物
- [0815] SEQ ID NO:46例示性人HLA-G/小鼠H2Kd β2M MHC I类复合物,其中对人HLA-G特异性的位置嫁接到小鼠H2Kd框架上
- [0816] SEQ ID NO:47例示性大鼠RT1A β2M MHC I类复合物
- [0817] SEQ ID NO:48例示性人HLA-G/大鼠RT1A β2M MHC I类复合物,其中对人HLA-G特异性的位置嫁接到大鼠RT1A框架上
- [0818] SEQ ID NO:49接头和His标签
- [0819] SEQ ID NO:50肽
- [0820] SEQ ID NO:51人κ轻链恒定区
- [0821] SEQ ID NO:52人λ轻链恒定区
- [0822] SEQ ID NO:53自IgG1衍生的人重链恒定区
- [0823] SEQ ID NO:54自IgG1衍生的具有突变L234A,L235A和P329G的人重链恒定区
- [0824] SEQ ID NO:55自IgG4衍生的人重链恒定区
- [0825] 抗CD3抗原结合位点(可变区和高变区(HVR)):
- [0826] SEQ ID NO:56重链HVR-H1,CH2527
- [0827] SEQ ID NO:57重链HVR-H2,CH2527
- [0828] SEQ ID NO:58重链HVR-H3,CH2527
- [0829] SEQ ID NO:59轻链HVR-L1,CH2527
- [0830] SEQ ID NO:60轻链HVR-L2,CH2527
- [0831] SEQ ID NO:61轻链HVR-L3,CH2527
- [0832] SEQ ID NO:62重链可变域VH,CH2527
- [0833] SEQ ID NO:63轻链可变域VL,CH2527
- [0834] 双特异性抗HLA-G/抗CD3 T细胞双特异性(TCB) 抗体:
- [0835] P1AA1185(基于HLA-G-0031和CH2527):
- [0836] SEQ ID NO:64轻链1P1AA1185
- [0837] SEQ ID NO:65轻链2P1AA1185
- [0838] SEQ ID NO:66重链1P1AA1185
- [0839] SEQ ID NO:67重链2P1AA1185
- [0840] P1AA1185-104(基于HLA-G-0031-0104和CH2527)
- [0841] SEQ ID NO:68轻链1P1AA1185-104
- [0842] SEQ ID NO:69轻链2P1AA1185-104
- [0843] SEQ ID NO:70重链1P1AA1185-104
- [0844] SEQ ID NO:71重链2P1AA1185-104
- [0845] P1AD9924(基于HLA-G-0090和CH2527)
- [0846] SEQ ID NO:72轻链1P1AD992
- [0847] SEQ ID NO:73轻链2P1AD992

- [0848] SEQ ID NO:74重链1P1AD992
- [0849] SEQ ID NO:75重链2P1AD992
- [0850] 别的序列:
- [0851] SEQ ID NO:76例示性人CD3
- [0852] SEQ ID NO:77例示性食蟹猴CD3
- [0853] 抗HLA-G结合模块的氨基酸序列(带有下划线和粗体高变区(HVR)的可变区):
- [0854] SEQ ID NO:7:重链可变域VH,HLA-G-0031:
QVKLMQSGAALVKPGTSVKMSCNASGYTFT**DIYWVS**WVKQSHGKRLEW
- [0855] **VGEISPNSGASNFDENFKDKATLTVDKSTSTAYMELSRLTSEDSAIYYCTR**
SSHGSRWFAYWGQGLTVTVSS
- [0856] SEQ ID NO:8:轻链可变域VL,HLA-G-0031:
AIVLNQSPSSIVASQGEKVTITC**RASSSVSSNHLHWY**QKPGAFPKEFVIYS
- [0857] **TSQRAS**GIPSRFSGSGSGTSYSFTISRVEAEDVATYYC**QQGSSNPYTFGAG**
TKLELK
- [0858] SEQ ID NO:33:人源化变体重链可变域VH,HLA-G-0031-0104 (HLA-G-0104):
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT**DIYWVS**WVRQAPGQRLEW
- [0859] **MGEISPNSGASNFDENFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED**TAVYYCT
RSSHGSRWFAYWGQGLTVTVSS
- [0860] SEQ ID NO:34:人源化变体轻链可变域VL,HLA-G-0031-0104 (HLA-G-0104):
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSVSSNHLHWY**QKPGKAPKFLIY
- [0861] **STSQRAS**GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC**QQGSSNPYTFGQ**
GTKLEIK
- [0862] SEQ ID NO:15:重链可变域VH,HLA-G-0039:
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSS**SYAMN**WVRQAPGKGLEWVS
- [0863] **VISGSGVSTYYADSVKGR**RFTISRDNRSNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAK
DGSYNYGYGDYFDYWGQGLTVTVSS
- [0864] SEQ ID NO:16:轻链可变域VL,HLA-G-0039:
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK**KSSQSVLYSSKNKNYLA**WYQKPGQP
- [0865] PKLFIY**WASTRES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC**QQYYN**
TPRTFGQGTKVEIK
- [0866] SEQ ID NO:23:重链可变域VH,HLA-G-0041:
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF**STYGMS**WVRQAPGKGLEWV
- [0867] **SVISGGGVSTYYADSVKGR**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
KDGSYNYGYGDYFDYWGQGLTVTVSS
- [0868] SEQ ID NO:24:轻链可变域VL,HLA-G-0041:

- DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQNVLYSSNNKNYLA**WYQQKPGQP
- [0869] **PKLLIYWASTRES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC**QQYYN**
TPRTFGQGTKVEIK
- [0870] SEQ ID NO:31:重链可变域VH,HLA-G-0090:
QVQLQQSGPGLLKPSQTLSTCAISGDSVSS**SNRAAWN**WIRQSPSRGLEWL
- [0871] **GRTYYRSK**WYNDY**AVSVQGR**ITLIPDTSKNQFSLRLNSVTPEDTAVYYC
ASVRAVAPFDYWGQGVLVTVSS
- [0872] SEQ ID NO:32:轻链可变域VL,HLA-G-0090:
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQSVLNSSNNKNNLA**WYQQQPGQP
- [0873] **PKLLIYWASTRES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFC**QQYYRT**
PWTFGQGTKVEIK
- [0874] 抗CD3结合模块的氨基酸序列(带有下划线和粗体高变区(HVR)的可变区):
- [0875] SEQ ID NO:62重链可变域VH,CH2527
- [0876] EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNT**TYAMN**WVRQAPGKGLEWV
ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYY
- [0877] **CVRHGNFGNSYVSWFAY**WGQGLTVTS
- [0878] SEQ ID NO:63轻链可变域VL,CH2527
QAVVTQESALTTSPGETVTLTC**RSSTGAVTTSNYAN**WVQEKPDHLFTGL
- [0879] **IGGTNKRAP**GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC**ALWYSNLW**
YFGGGTKLTVLSSASTK
- [0880] 抗HLA-G/抗CD3双特异性抗体的氨基酸序列:
- [0881] P1AA1185(基于HLA-G-0031和CH2527):
- [0882] SEQ ID NO:64轻链1P1AA1185
- [0883] EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNT**TYAMN**WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVAASVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC
- [0884] SEQ ID NO:65轻链2P1AA1185
- [0885] AIVLNQSPSSIVASQGEKVTITCRASSVSSNHLHWYQQKPGAFPKFVIYSTSRASGIPSRFSGSGSG
TSYSFTISRVEADVATYYCQQGSSNPYTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0886] SEQ ID NO:66重链1P1AA1185
- [0887] QVKLMQSGAALVKPGTSVKMCSNASGYTFTDYWVSWVKQSHGKRLEWVGEISPNSGASNFDENFKDKAT
LTVDKSTSTAYMELSRLTSEDSAIYYCTRSSHGSRWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSP

[0888] SEQ ID NO:67重链2P1AA1185

[0889] QVKLMQSGAALVKPGTSVKMSCNASGYTFTDYVWSWKQSHGKRLEWVGEISPNSGASNFDENFKDKAT
LTVDKSTSTAYMELSRITSEDSAIYYCTRSSHGSFRWFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
DGGGGSGGGGSQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSG
SLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSP

[0890] P1AA1185-104 (基于HLA-G-0031-0104和CH2527)

[0891] SEQ ID NO:68轻链1P1AA1185-104

[0892] EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSQSILYLQMNLIKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSAASVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC

[0893] SEQ ID NO:69轻链2P1AA1185-104

[0894] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASSVSSNHLHWYQQKPKGKAPKFLIYSTSRASGVPSRFSGSGSG
TEFTLTISSLQPEDFATYYCQQGSSNPYTFGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNFPYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0895] SEQ ID NO:70重链1P1AA1185-104

[0896] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYVWSWVRQAPGQRLEWMGEISPNSGASNFDENFQGRVT
ITRDTASASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSHGSFRWFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSL

[0897] SLSP

[0898] SEQ ID NO:71重链2P1AA1185-104

[0899] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYVWSWVRQAPGQRLEWMGEISPNSGASNFDENFQGRVT
ITRDTASASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSSHGSFRWFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
DGGGGSGGGGSQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSG
SLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSP

[0900] P1AD9924 (基于HLA-G-0090和CH2527)

[0901] SEQ ID NO:72轻链1P1AD992

[0902] EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSQSILYLQMNLIKTEDTAMYCVRHGNGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSAASVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC

[0903] SEQ ID NO:73轻链2P1AD992

[0904] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLNSSNNKNLAWYQQPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFLTITSSSLQAEDVAVYFCQQYYRTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNFPY
APREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0905] SEQ ID NO:74重链1P1AD992

[0906] QVQLQQSGPGLLKPSQTLSTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKQWYNDYAVSVQG
RITLIPDTSKNQFSLRLNSVTPEDTAVYYCASVRAVAPFDYWGQGVLTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSP

[0907] SEQ ID NO:75重链2P1AD992

[0908] QVQLQQSGPGLLKPSQTLSTCAISGDSVSSNRAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKQWYNDYAVSVQG
RITLIPDTSKNQFSLRLNSVTPEDTAVYYCASVRAVAPFDYWGQGVLTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKS
CDGGGSGGGGSQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFS
GSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSP

[0909] 下面列出本发明的具体实施方案:

[0910] 1. 一种结合人HLA-G和T细胞活化性抗原(特别是人CD3)的多特异性抗体,其包含结合人HLA-G的第一抗原结合模块和结合T细胞活化性抗原(特别是人CD3)的第二抗原结合模块。

[0911] 2. 依照实施方案1的多特异性抗体,其中该抗体是双特异性的;且

[0912] 其中该结合人HLA-G的第一抗原结合模块抗体包含

[0913] A) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0914] B) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0915] C) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0916] D) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-L3;且

[0917] 其中该结合T细胞活化性抗原的第二抗原结合模块结合人CD3,且包含

[0918] E) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i)包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)如下的VL域,该VL域包含(i)包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii)包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L3。

[0919] 3. 依照实施方案2的双特异性抗体,其中该第一抗原结合模块

[0920] A)

[0921] i) 包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列;或

[0922] ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体;或

[0923] iii) 包含SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列;或

[0924] B)

[0925] 包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列;或

[0926] C)

[0927] 包含SEQ ID NO:23的VH序列和SEQ ID NO:24的VL序列;或

[0928] D)

[0929] 包含SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列;且

[0930] 其中该第二抗原结合模块

[0931] E)

[0932] 包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列。

[0933] 4. 依照实施方案3的双特异性抗体,

[0934] 其中该第一抗原结合模块包含i) SEQ ID NO:31的VH序列和SEQ ID NO:32的VL序列;或ii) SEQ ID NO:33的VH序列和SEQ ID NO:34的VL序列;且

[0935] 其中该第二抗原结合模块包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列。

- [0936] 5. 依照实施方案1至4任一项的多特异性抗体,其中该抗体
- [0937] a) 并不与包含SEQ ID NO:44的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或
- [0938] b) 并不与包含SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:37的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或
- [0939] c) 并不与包含SEQ ID NO:45的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或
- [0940] d) 并不与包含SEQ ID NO:47的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物交叉反应;和/或
- [0941] e) 抑制ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43);和/或
- [0942] f) 将ILT2结合三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50% (在一个实施方案中,超过60%) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例4b);和/或
- [0943] g) 将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:43)抑制超过50% (在一个实施方案中,超过80%) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例4b);和/或
- [0944] h) 抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(超过50% (在一个实施方案中,超过80%)) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例6);和/或
- [0945] i) 结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(见实施例5),且抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC No.HTB36)(上的HLA-G)(超过50% (在一个实施方案中,超过80%)) (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例6);和/或
- [0946] j) 将CD8a结合HLA-G抑制超过80% (当与没有抗体的情况中的结合比较时) (见实施例4c);和/或
- [0947] k) 恢复与JEG-3细胞(ATCC HTB36)共培养的单核细胞的HLA-G特异性受遏制免疫应答(例如受遏制肿瘤坏死因子(TNF) α 释放);和/或
- [0948] l) 在HLA-G表达性肿瘤细胞(例如JEG-3细胞(ATCC HTB36)存在下诱导T细胞介导的细胞毒性(见实施例12)。
- [0949] 6. 实施方案1至5任一项的多特异性抗体,其中该第一和该第二抗原结合模块是Fab分子。
- [0950] 7. 实施方案1至6任一项的多特异性抗体,其中该第二抗原结合模块是Fab分子,其中Fab轻链和Fab重链的可变域VL和VH或恒定域CL和CH1,特别是可变域VL和VH是彼此替换的。
- [0951] 8. 实施方案1至7任一项的多特异性抗体,其中该第一抗原结合模块是Fab分子,其中在恒定域中位置124处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat)且位置123处的氨基酸用赖氨酸(K),精氨酸(R)或组氨酸(H)独立替代(编号方式依照Kabat),且在恒定域CH1中位置147处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)且位置213处的氨基酸用谷氨酸(E),或天冬氨酸(D)独立替代(编号方式依照Kabat EU索引)。
- [0952] 9. 实施方案1至8任一项的多特异性抗体,其中该第一和该第二抗原结合模块彼此融合,任选经由肽接头。
- [0953] 10. 实施方案1至9任一项的多特异性抗体,其中该第一和该第二抗原结合模块每个是Fab分子且其中或是(i)该第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该第一抗原结合

模块的Fab重链的N端,或是(ii)该第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该第二抗原结合模块的Fab重链的N端。

[0954] 11. 实施方案1至10任一项的多特异性抗体,其包含第三抗原结合模块。

[0955] 12. 实施方案11的多特异性抗体,其中该第三抗原模块与该第一抗原结合模块相同。

[0956] 13. 实施方案1至12任一项的多特异性抗体,其包含由第一和第二亚基构成的Fc域。

[0957] 14. 实施方案13的多特异性抗体,其中该第一,该第二和,在存在时,该第三抗原结合模块每个是Fab分子;

[0958] 且其中或是(i)该第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该第一抗原结合模块的Fab重链的N端且该第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该Fc域的第一亚基的N端,或是(ii)该第一抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该第二抗原结合模块的Fab重链的N端且该第二抗原结合模块在Fab重链的C端融合至该Fc域的第一亚基的N端;

[0959] 且其中该第三抗原结合模块,在存在时,在Fab重链的C端融合至该Fc域的第二亚基的N端。

[0960] 15. 实施方案13或14的多特异性抗体,其中该Fc域是IgG,特别是IgG1,Fc域。

[0961] 16. 实施方案13至15任一项的多特异性抗体,其中该Fc域是人Fc域。

[0962] 17. 实施方案13至16任一项的多特异性抗体,其中该Fc域包含降低对Fc受体的结合和/或效应器功能的一处或多处氨基酸替代。

[0963] 18. 依照实施方案17的多特异性抗体,其中该抗体是具有突变L234A,L235A和P329G(编号方式依照Kabat的EU索引)的IgG1同种型的。

[0964] 19. 实施方案13至18任一项的多特异性抗体,其中该Fc域的第一亚基的CH3域中的氨基酸残基用具有更大侧链体积的氨基酸残基替换,由此生成该第一亚基的CH3域内的隆起,其可放置在该第二亚基的CH3域内的空腔中,且该Fc域的第二亚基的CH3域中的氨基酸残基用具有更小侧链体积的氨基酸残基替换,由此生成该第二亚基的CH3域内的空腔,其内可放置该第一亚基的CH3域内的隆起。

[0965] 20. 依照实施方案19的多特异性抗体,其中该抗体是IgG1同种型的,有该Fc域的第一亚基中的突变T366W且有该Fc域的第二亚基中的突变Y407V,T366S和L368A(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0966] 21. 依照实施方案20的多特异性抗体,其中该抗体包含该Fc域的第一亚基中的另外的突变S354C和该Fc域的第二亚基中的另外的突变Y349C(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0967] 22. 依照实施方案20的多特异性抗体,其中该抗体包含该Fc域的第一亚基中的另外的突变Y349C和该Fc域的第二亚基中的另外的S354C突变(编号方式依照Kabat EU索引)。

[0968] 23. 一种分离的核酸,其编码依照前述实施方案任一项的多特异性抗体。

[0969] 24. 一种宿主细胞,其包含实施方案23的核酸。

[0970] 25. 一种生成多特异性抗体的方法,其包括培养实施方案24的宿主细胞,使得该抗体生成。

[0971] 26. 实施方案25的方法,其进一步包括自该宿主细胞回收该多特异性抗体。

[0972] 27. 一种药物配制剂,其包含依照实施方案1至22任一项的多特异性抗体和药学可

接受载剂。

[0973] 28. 依照实施方案1至22任一项的多特异性抗体,其用作药物。

[0974] 29. 依照实施方案1至22任一项的多特异性抗体,其用于治疗癌症。

[0975] 30. 依照实施方案1至22任一项的多特异性抗体在制造药物中的用途。

[0976] 31. 实施方案30的用途,其中该药物用于治疗癌症。

[0977] 32. 一种治疗具有癌症的个体的方法,其包括对该个体施用有效量的实施方案1至22的多特异性抗体。

实施例

[0978] 重组DNA技术

[0979] 使用标准方法来操作DNA,如Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述。依照制造商的说明书使用分子生物学试剂。

[0980] 基因和寡核苷酸合成

[0981] 在Geneart GmbH (Regensburg, Germany) 通过化学合成制备期望的基因区段。将合成的基因片段克隆入大肠杆菌质粒进行繁殖/扩增。通过DNA测序来检验亚克隆的基因片段的DNA序列。或者,通过化学合成的寡核苷酸的退火或经由PCR来组装短合成DNA片段。由Metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Germany) 制备各自寡核苷酸。

[0982] 基本/标准哺乳动物表达质粒的描述

[0983] 为了表达期望的基因/蛋白质(例如全长抗体重链,全长抗体轻链,或MHC I类分子,例如HLA-G,或与肽和 β 2-微球蛋白融合的MHC I类分子,例如与HLA-G结合肽和/或 β 2-微球蛋白融合的HLA-G),使用包含下述功能性元件的转录单元:

[0984] -来自人巨细胞病毒(P-CMV)的立即早期增强子和启动子,包括内含子A,

[0985] -人重链免疫球蛋白5' -非翻译区(5' UTR),

[0986] -鼠免疫球蛋白重链信号序列,

[0987] -要表达的基因/蛋白质(例如全长抗体重链或MHC I类分子),和

[0988] -牛生长激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

[0989] 在包括要表达的期望的基因的表达单元/盒以外,基本/标准哺乳动物表达质粒含有

[0990] -来自载体pUC18的复制起点,其容许这种质粒在大肠杆菌中复制,和

[0991] - β -内酰胺酶基因,其在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性。

[0992] 蛋白质测定

[0993] 使用基于多肽的氨基酸序列计算的摩尔消化系数,通过测定280nm处的光密度(OD)来测定纯化的多肽的蛋白质浓度。

[0994] 实施例1

[0995] 用于筛选和反筛选的HLA-G嵌合分子的生成

[0996] 由于与其它MHC I分子的高同源性(>98%),免疫接种HLA-G分子导致生成由MHC-I交叉反应性抗体以及真正HLA-G特异性抗体的混合物构成的多克隆血清。

[0997] 迄今没有提供选择没有对其它人MHC-I(例如HLA-A)的交叉反应性的真正HLA-G特

异性抗体,和进一步选择具有受体阻断功能的那些的工具。

[0998] 我们鉴定出独特HLA-G位置,与结构一致性(conformity)和受体相互作用(ILT2/4和KIR2DL4)必需的位置组合。

[0999] 然后将人HLA-G的独特和近端位置“嫁接”到来自不同啮齿动物物种(诸如大鼠RT1A和小鼠H2kd)的MHC I类复合物分子上以生成“嵌合”免疫原/筛选抗原。

[1000] 将生成的抗体提交针对结合/特异性(和分别是对反抗原无结合/特异性)的严格筛选。

[1001] 筛选抗原:

[1002] -作为包含SEQ ID NO:43的人HLA-G β 2M MHC复合物表达的重组HLA-G

[1003] -嫁接到大鼠RT-1和小鼠H2kd上的HLA-G特异性序列(SEQ ID NO:46:人HLA-G/小鼠H2K d β 2M MHC I类复合物,其中人HLA-G特异性的位置嫁接到小鼠H2Kd框架上和SEQ ID NO:48:人HLA-G/大鼠RT1A β 2M MHC I类复合物,其中人HLA-G特异性的位置嫁接到大鼠RT1A框架上)

[1004] -天然HLA-G MHC I类复合物表达性细胞(例如Jeg3细胞),或人HLA-G转染细胞系SKOV3 HLA-G+和PA-TU-8902HLA-G+筛选反抗原:

[1005] -其它HLA-A序列(用HLA-A共有序列去嫁接的HLA-A2和HLA-G)与不同肽组合的反抗原(MHC I类复合物)(见例如SEQ ID NO:40(HLA-A2)和SEQ ID NO:44(HLA-G框架上的HLA-A共有序列)

[1006] -来自其它物种诸如大鼠RT-1和小鼠H2kd的反抗原(MHC I类复合物)(SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:47)

[1007] -未修饰的肿瘤细胞系SKOV3和PA-TU-8902,其特征不在于HLA-G表达缺失。

[1008] 用于免疫接种和筛选HLA特异性抗体生成的嵌合HLA-G抗原(见图1)的设计

[1009] 用于免疫接种野生型(wt)和转基因大鼠,或家兔和小鼠等,和/或用于筛选测定法的携带HLA-G独特位置的嵌合大鼠MHC I分子(RT1-A)(SEQ ID NO:48)的设计:

[1010] 通过比对来自IMGT(如2014年2月6日可得的)的2579种HLA-A,3283种HLA-B,2133种HLA-C,15种HLA-E,22种HLA-F,和50种HLA-G序列鉴定出HLA-G独特位置。将HLA-G中在3个序列集合(HLA-A,HLA-B,和HLA-C+HLA-E+HLA-F组合集)任一的少于1%(大多~0%)的序列中发生的那些残基称作HLA-G独特位置。

[1011] 4个核心HLA-G独特位置(α 1中的2个和 α 3中的2个)显示在HLA-G序列集中没有多态性且其它HLA基因无一在这些位置含有HLA-G特异性残基(HLA-A对于M100一次,HLA-B对于Q103一次,和HLA-C对于Q103一次除外)。

[1012] 将大鼠RT1-A的晶体结构(Rudolph,M.G.et al.,J.Mol.Biol.324:975-990(2002);PDB代码:1KJM)叠加到人HLA-G的晶体结构(Clements,C.S.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA102:3360-3365(2005);PDB代码:1YDP)上。 α 链和联合的 β 2-微球蛋白的总体结构是保守的。

[1013] 通过序列比较和结构比对在RT1-A结构中鉴定出HLA-G独特位置。第一步,鉴定出在HLA-G和RT1-A的分子表面上暴露,因而对抗体可及的独特HLA-G位置。将在蛋白质折叠内埋藏的独特位置排除在改造之外。第二步,鉴定出也需要交换以使得相应的区域成为“HLA-G样”(即生成含有独特位置的真实HLA-G表位而非生成会成为伪像的HLA-G/大鼠RT1-A嵌合

表位)的结构上近端的残基。对如此为突变选择的所有位置分析来自HLA-G的各自残基的结构拟合以避免突变后分子结构的可能的局部扰乱。

[1014] 类似地生成用于免疫接种和/或用于筛选测定法的携带HLA-G独特位置的嵌合小鼠MHC I分子(H2Kd)(SEQ ID NO:46)。

[1015] 通过HLA-G独特位置朝向HLA-A共有序列的“去嫁接”在筛选中用作反抗原的基于HLA-A的反抗原(SEQ ID NO:44)的设计

[1016] 在人HLA-G的晶体结构(PDB代码:1YDP)中分析自多序列比对衍生的独特位置。第一,将没有在HLA-G表面上暴露,因而对抗体不可及的位置排除在改造之外。第二,对表面暴露残基分析氨基酸交换的可行性(即排除有关位置突变后分子结构的可能的局部扰动)。为交换验证了总共14个位置。朝向自下载自IMGT(如2014年2月6日可得的)的2579种HLA-A序列的多序列比对衍生的HLA-A共有序列突变验证位置中的氨基酸。

[1017] 用于可溶性经典和非经典MHC I类分子的表达质粒的生成

[1018] 重组MHC I类基因编码:N端延伸融合分子,由已知受到各自MHC I类分子结合的肽, β 2-微球蛋白,和各自MHC I类分子组成。

[1019] 在可溶性MHC I类分子表达盒以外,用于瞬时表达可溶性MHC I类分子的表达质粒包含来自载体pUC18的复制起点(其容许这种质粒在大肠杆菌中复制),和 β -内酰胺酶基因(其在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性)。

[1020] 可溶性MHC I类分子的转录单元包含下述功能性元件:

[1021] -来自人巨细胞病毒(P-CMV)的立即早期增强子和启动子,包括内含子A,

[1022] -人重链免疫球蛋白5' -非翻译区(5' UTR),

[1023] -鼠免疫球蛋白重链信号序列,

[1024] -N端截短的金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)分选酶A编码核酸,和

[1025] -牛生长激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

[1026] 自各种物种衍生的成熟可溶性MHC I类分子的氨基酸序列是:

[1027] SEQ ID NO:43:例示性人HLA-G β 2M MHC I类复合物

[1028] SEQ ID NO:44:例示性修饰的人HLA-G β 2M MHC I类复合物(其中HLA-G特异性氨基酸已经用HLA共有氨基酸替换(=去嫁接的HLA-G),还见图1)

[1029] SEQ ID NO:45:例示性小鼠H2Kd β 2M MHC I类复合物

[1030] SEQ ID NO:46:例示性人HLA-G/小鼠H2Kd β 2M MHC复合物,其中人HLA-G特异性的位置嫁接到小鼠H2Kd框架上

[1031] SEQ ID NO:47:例示性大鼠RT1A β 2M MHC I类复合物

[1032] SEQ ID NO:48:例示性人HLA-G/大鼠RT1A β 2M MHC复合物,其中人HLA-G特异性的位置嫁接到大鼠RT1A框架上

[1033] 对于筛选中使用的例示性HLA-A2 β 2M MHC I类复合物,使用下述构件,在大肠杆菌中表达复合物并纯化。

[1034] MHC I复合物HLA-A2/b2M(SEQ ID NO:40和37)(均具有另外的N端甲硫氨酸)+VLDFAPPGA肽(SEQ ID NO:50)+接头和His标签(SEQ ID NO:49)

[1035] 实施例2

[1036] 免疫接种计划

[1037] A) 小鼠和大鼠的免疫接种

[1038] a. 嵌合蛋白(用于针对非特异性MHC-I/HLA的耐受和对独特HLA-G位置的指向)

[1039] 使用自Charles River Laboratories International, Inc.获得的Balb/C小鼠进行免疫接种。在AAALACi认可的动物设施中依照附录A“动物住宿和护理指南”饲养动物。所有动物免疫接种方案和实验得到上巴伐利亚州政府批准(许可证号55.2-1-54-2531-19-10和55.2-1-54-2532-51-11)并依照德国动物福利方案和欧洲议会和理事会的指令2010/63实施。

[1040] 6-8周龄Balb/C小鼠(n=5)在4周过程里接受5轮嵌合H2Kd/HLA-G分子(SEQ ID NO:46 (“HLA-G-0006”))免疫接种。每次免疫接种前,用氧和异氟烷的气体混合物麻醉小鼠。对于第一次免疫接种,混合在20mM His/HisCl, 140mM NaCl, pH 6.0中溶解的15μg蛋白质与等体积的CFA(BD Difco, #263810)并沿着小鼠的背部,皮下(s.c.)施用于引流淋巴结近端的六个部位,两个部位在颈背处和两个部位在腹股沟和小腿两侧。将在RIBI佐剂(Sigma-Aldrich, #S6322)中乳化的另外15μg蛋白质施用于沿着腹部的六个并列部位,两个部位每个在腋窝,腹股沟,和大腿两侧。以相似方式在第7(10μg), 14(5μg), 21(5μg), 和28(5μg)天给予递减抗原剂量的强化免疫接种,只是始终使用RIBI佐剂,而且仅仅沿着腹部。最终的免疫接种后3天,对小鼠处以安乐死,无菌分离两侧腭,浅表腹股沟,腋窝,和鳃(branchial)淋巴结,并为生成杂交瘤做好准备。第三次和第五次免疫接种后通过ELISA对血清测试重组人HLA-G和免疫原特异性总IgG抗体生成。

[1041] 另一组6-8周龄Balb/C小鼠(n=5)在3个月过程里接受三次嵌合H2Kd/HLA-G分子(HLA-G-0006)免疫接种。对于第一次免疫接种,混合在20mM His/HisCl, 140mM NaCl, pH 6.0中溶解的100μg蛋白质与等体积的CFA(BD Difco, #263810)并腹膜内(i.p.)施用。以相似方式在第28和56天给予强化免疫接种,只是使用不完全弗氏佐剂(IFA来自BD Difco, #DIFC263910)。最后一次免疫接种后4-5周,小鼠静脉内(i.v.)接受无菌PBS中的大约25μg免疫原,72小时后无菌收获脾,并为生成杂交瘤做好准备。第三次免疫接种后通过ELISA对血清测试重组人HLA-G(SEQ ID NO:43 (“HLA-G-0003”)),和免疫原特异性嵌合H2Kd/HLA-G分子(SEQ ID NO:46 (“HLA-G-0006”))并用具有共有HLA-A特异性位置的“去嫁接的”人HLA-G(SEQ ID NO:44 (“HLA-G-0007”))和鼠H2kd蛋白质(SEQ ID NO:45 “HLA-G-0009”))反筛选总IgG抗体生成。

[1042] b. wt HLA-G蛋白质

[1043] 使用自Charles River Laboratories International, Inc.获得的CD大鼠进行免疫接种。在AAALACi认可的动物设施中依照附录A“动物住宿和护理指南”饲养动物。所有动物免疫接种方案和实验得到上巴伐利亚州政府批准(许可证号55.2-1-54-2532-51-11)并依照德国动物福利方案和欧洲议会和理事会的指令2010/63实施。

[1044] 6-8周龄CD大鼠(n=4)在4个月过程里接受4次重组人HLA-G蛋白质(SEQ ID NO:43 (“HLA-G-0003”))免疫接种。对于第一次免疫接种,混合在20mM His/HisCl, 140mM NaCl, pH 6.0中溶解的100μg蛋白质与等体积的CFA(BD Difco, #263810)并腹膜内施用。以相似方式在第28, 56和84天给予强化免疫接种,只是始终使用不完全弗氏佐剂(IFA来自BD Difco, #DIFC263910)。最后一次免疫接种后3-4周,大鼠静脉内接受无菌PBS中的大约75μg免疫原,72小时后无菌收获脾,并为生成杂交瘤做好准备。第三次和第四次免疫接种后通过ELISA对

血清测试重组HLA-G (SEQ ID NO:43 (“HLA-G-0003”)) 特异性IgG1, IgG1a, IgG2b和IgG2c抗体生成并用具有共有HLA-A特异性位置的“去嫁接的”人HLA-G (SEQ ID NO:44 (“HLA-G-0007”)) 反筛选。

[1045] c. JEG3细胞 (ATCC编号HTB36) (天然表达HLA-G)

[1046] 使用自Charles River Laboratories International, Inc.获得的CD大鼠进行免疫接种。在AAALACi认可的动物设施中依照附录A“动物住宿和护理指南”饲养动物。所有动物免疫接种方案和实验得到上巴伐利亚州政府批准 (许可证号AZ.55.2-1-54-2531-83-13) 并依照德国动物福利方案和欧洲议会和理事会的指令2010/63实施。

[1047] 两组6-8周龄CD大鼠 (n=2) 分别在5个月(A)至7个月(B)过程里接受5次(A组)或7次(B组)使用JEG-3细胞 (ATCC HTB36) 的免疫接种。对于第一次免疫接种,混合在无菌PBS中溶解的 1×10^7 个细胞与等体积的CFA (BD Difco, #263810) 并腹膜内施用。以相似方式在第28, 56, 84, 112, 140 (仅B) 和168 (仅B) 天对A和B给予强化免疫接种,只是始终使用不完全弗氏佐剂 (IFA来自BD Difco, #DIFC263910)。最后一次免疫接种后3周,大鼠静脉内接受无菌PBS中的100 μ g重组人HLA-G蛋白质 (SEQ ID NO:43 (“HLA-G-0003”)), 72小时后无菌收获脾,并为生成杂交瘤做好准备。分别在第三次,第五次和第七次免疫接种后通过ELISA对血清测试重组HLA-G (SEQ ID NO:43 (“HLA-G-0003”)) 特异性IgG1, IgG1a, IgG2b和IgG2c抗体生成特异性IgG1, IgG2a, IgG2b和IgG2c抗体生成并用具有共有HLA-A特异性位置的“去嫁接的”人HLA-G (SEQ ID NO:44 (“HLA-G-0007”)) 反筛选。

[1048] d. JEG3/DNA IMS (用于强化效应)

[1049] 使用自Charles River Laboratories International, Inc.获得的CD大鼠进行免疫接种。在AAALACi认可的动物设施中依照附录A“动物住宿和护理指南”饲养动物。所有动物免疫接种方案和实验得到上巴伐利亚州政府批准 (许可证号AZ.55.2-1-54-2531-83-13) 并依照德国动物福利方案和欧洲议会和理事会的指令2010/63实施。

[1050] 6-8周龄CD大鼠 (n=5) 在3个月过程里以交替方案接受质粒DNA和基于细胞的免疫接种。为此目的分别使用编码作为单链分子的人HLA-G的质粒DNA HLA-G-0030 (p17747) 以及天然HLA-G表达性JEG-3细胞 (ATCC HTB36)。

[1051] 对于第一次免疫接种,用异氟烷麻醉动物并皮内 (i.d.) 免疫接种无菌H2O中的100 μ g质粒DNA,应用于剃毛背部处,靠近动物的尾的一个点。皮内应用后,在ECM 830电穿孔系统 (BTX Harvard Apparatus) 上使用下述参数对点进行电穿孔:两次1000V/cm,每次0.1ms,由125ms的间隔分开,继以四次287.5V/cm,持续10ms,也以125ms的间隔分开。对于第14天的第二次免疫接种,动物接受与等体积的CFA (BD Difco, #263810) 混合的在无菌PBS中溶解的 1×10^7 个细胞,并在生成稳定的乳状液后,腹膜内施用。以相似方式在第28 (DNA), 42 (细胞), 56 (DNA), 70 (细胞) 天给予强化免疫接种,只是始终使用不完全弗氏佐剂 (IFA来自BD Difco, #DIFC263910) 进行细胞免疫接种。最后一次免疫接种后4周,大鼠静脉内接受无菌PBS中的100 μ g可溶性重组人HLA-G MHC I类蛋白质 (SEQ ID NO:43 (“HLA-G-0003”)), 72小时后无菌收获脾,并为生成杂交瘤做好准备。分别在第三次,第五次和第六次免疫接种后通过ELISA对血清测试可溶性重组人HLA-G MHC I类蛋白质 (SEQ ID NO:43 (“HLA-G-0003”)) 特异性IgG1, IgG2a, IgG2b和IgG2c抗体生成并用具有共有HLA-A特异性位置的“去嫁接的”人HLA-G (SEQ ID NO:44 (“HLA-G-0007”)) 反筛选。

[1052] 在所有免疫接种策略中诱导了高度多反应性体液免疫应答,识别HLA-G以及用于反筛选的蛋白质(例如重组“去嫁接的”人HLA-G,嵌合H2Kd/HLA-G分子或相关人HLA-A2分子),如使用来自免疫接种动物的多克隆血清以ELISA格式分析的(未显示数据)。

[1053] B) 人源化OMNIRAT 7系大鼠的免疫接种

[1054] OmniRat 7系大鼠自Open Monoclonal Technology, Inc. (2747 Ross Road, Palo Alto, CA94303, USA) 配种,并自Charles River Laboratories International, Inc. 繁殖和获得。在AAALACi认可的动物设施中依照附录A“动物住宿和护理指南”饲养动物。所有动物免疫接种方案和实验得到上巴伐利亚州政府批准(许可证号55.2-1-54-2532-51-11和55.2-1-54-2531-83-13)并依照德国动物福利方案和欧洲议会和理事会的指令2010/63实施。

[1055] 6-8周龄OmniRat 7系大鼠(n=4)在4个月过程里接受4轮重组嵌合HLA-G蛋白质(SEQ ID NO:48 (“HLA-G-0011”))免疫接种。对于第一次免疫接种,混合在20mM His/HisCl, 140mM NaCl, pH 6.0中溶解的100μg蛋白质与等体积的CFA(BD Difco, #263810)并腹膜内施用。以相似方式在第28, 56和84天给予强化免疫接种,只是始终使用不完全弗氏佐剂(IFA来自BD Difco, #DIFC263910)。最后一次免疫接种后3-4周,大鼠接受无菌PBS中的静脉内大约50μg免疫原和腹膜内大约25μg免疫原,72小时后无菌收获脾,并为生成杂交瘤做好准备。第三次和第四次免疫接种后通过ELISA对血清测试重组HLA-G (SEQ ID NO:48 (“HLA-G-0011”))特异性IgG1, IgG2a, IgG2b和IgG2c抗体生成并用具有共有HLA-A特异性位置的“去嫁接的”人HLA-G (SEQ ID NO:44 (“HLA-G-0007”))反筛选。

[1056] 或者,6-8周龄OmniRat 7系大鼠(n=5)在3个月过程里以交替方案接受质粒DNA和基于细胞的免疫接种。为此目的分别使用编码作为单链分子的人HLA-G的质粒DNA(人HLA-G MHC I类蛋白质(SEQ ID NO:43 (“HLA-G-0003”)))以及天然HLA-G表达性JEG-3细胞(ATCC HTB36)。

[1057] 对于第一次免疫接种,用异氟烷麻醉动物并皮内(i.d.)免疫接种无菌H2O中的100 μg质粒DNA,应用于剃毛背部处,靠近动物的尾的一个点。皮内应用后,在ECM 830电穿孔系统(BTX Harvard Apparatus)上使用下述参数对点进行电穿孔:两次1000V/cm,每次0.1ms,由125ms的间隔分开,继以四次287.5V/cm,持续10ms,也以125ms的间隔分开。对于第14天的第二次免疫接种,动物接受与等体积的CFA(BD Difco, #263810)混合的在无菌PBS中溶解的 1×10^7 个细胞,并在生成稳定的乳状液后,腹膜内施用。以相似方式在第28(DNA), 42(细胞), 56(DNA), 70(细胞)天给予强化免疫接种,只是始终使用不完全弗氏佐剂(IFA来自BD Difco, #DIFC263910)进行细胞免疫接种。最后一次免疫接种后4周,大鼠静脉内接受无菌PBS中的100μg可溶性重组人HLA-G MHC I类蛋白质(SEQ ID NO:43 (“HLA-G-0003”)),72小时后无菌收获脾,并为生成杂交瘤做好准备。分别在第三次,第五次和第六次免疫接种后通过ELISA对血清测试可溶性重组人HLA-G MHC I类蛋白质(SEQ ID NO:43 (“HLA-G-0003”))特异性IgG1, IgG2a, IgG2b和IgG2c抗体生成并用具有共有HLA-A特异性位置的“去嫁接的”人HLA-G (SEQ ID NO:44 (“HLA-G-0007”))反筛选。

[1058] 在所有免疫接种策略中诱导了高度多反应性体液免疫应答,识别HLA-G以及用于反筛选的蛋白质(例如重组“去嫁接的”人HLA-G,嵌合H2Kd/HLA-G分子或相关人HLA-A2分子),如使用来自免疫接种动物的多克隆血清以ELISA格式分析的(未显示数据)。

[1059] 获得的抗体

[1060] 使用上文方法获得了下述特异性结合人抗HLA-G的抗体:来自CD大鼠的大鼠HLA-G 0031,来自人源化大鼠的人HLA-G 0039,HLA-G 0041和HLA-G 0090。

[1061] 如下面的实施例中所述测定获得的抗HLA-G特异性抗体的结合特性和生物学活性并与已知的参照抗体比较。将抗体HLA-G-0031使用它的HVR和HUMAN_IGHV1-3的VH受体人框架和HUMAN_IGKV1-17的VL受体人框架(V域,具有位置R46F处的一处另外的回复突变,Kabat编号方式)人源化。

[1062] 为了在HLA-G结合物HLA-G-0031人源化期间鉴定合适的人受体框架,使用两种方法的组合。一方面,采用一种经典办法,即搜索与亲本抗体具有高序列同源性的受体框架,随后在计算机上将CDR区嫁接到这种受体框架上。对所鉴定的框架与亲本抗体的每一处氨基酸差异判断对结合物的结构完整性的影响并在适宜时考虑朝向亲本序列的回复突变。

[1063] 另一方面,使用WO 2016/062734中描述的一种计算机工具来预测人源化型式的VH和VL域朝向彼此的取向。这针对CDR在所有可能人种系组合上的虚拟移植物进行。将结果与亲本结合物的VH VL域取向比较以选择在几何上接近起始抗体的框架组合。

[1064] 抗HLA-G抗体(可变区和高变区(HVR)的SEQ ID No):

[1065]

抗HLA-G抗体	HVR-	HVR-	HVR-	HVR-	HVR-	HVR-	VH	VL
	H1	H2	H3	L1	L2	L3		
HLA-G-0031	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
HLA-G-0031-0104 (HLA-G-0031的人源化变体) (HLA-G-0104)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34
[1066] HLA-G-0039	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
HLA-G-0041	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
HLA-G-0090	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32

[1067] 实施例3

[1068] A) 抗HLA-G抗体对可溶性人HLA-G,可溶性具有HLA-A特异性序列的去嫁接的人HLA-G,人HLA-A2,和大鼠/小鼠H2-Kd的结合

[1069] 对自免疫接种获得的抗体筛选它们对人HLA-G,嵌合的,去嫁接的HLA-G,HLA-A2和 大鼠/小鼠H2-Kd的结合特性。下文描述了各自测定法。对于人HLA-G的测试,使用单体,以及

二聚体和三聚体形式(见下文制备)。

[1070] 人HLA-G MHC I类蛋白质的二聚化/三聚化

[1071] 使用ÄKTA-FPLC于室温以0.2ml/min的流速将含有单体带His标签的可溶性人HLA-G MHC I类蛋白质(SEQ ID NO:23)的上清液加载到有5ml Ni-Sepharose的HisTrap HP柱(GE Healthcare#17-5248-02)上过夜。然后用含有0.5M咪唑(Merck#8.14223.025)的2% DPBS清洗柱直至达到基线。然后用含有0.5M咪唑的2% DPBS中的10mM DTT平衡柱并于室温温育30分钟。用PBS/10mM咪唑自柱清洗掉DTT并以含0.5mM咪唑的2-100% DPBS的梯度洗脱蛋白质。使用Amicon-Ultra 15M/Ultracel 10K浓缩洗出液后,将蛋白质于室温温育24小时,继以4℃ 48小时以容许二聚化/多聚化。然后在Superdex200HiLoad 16/60(GE Healthcare#17-5175-01)中使用SEC实施二聚体和三聚体的分离并用0.5M NaOH清洗过夜。用PBS平衡柱,继以用10mg/ml BSA饱和。然后收集二聚体(级分A9)和三聚体(级分A8),等分并贮存于-80℃直至进一步使用。

[1072] 人wt HLA-G结合ELISA

[1073] 以250ng/ml的浓度用25μl/孔生物素化人wt HLA-G包被链霉亲和素包被板(Nunc, MicroCoat#11974998001)并于4℃温育过夜。清洗(3x90μl/孔,PBST缓冲液)后,添加25μl抗HLA-G样品(在OSEP缓冲液中1:3稀释)或参照抗体(G233,Thermo/Pierce#MA1-19449, 500ng/ml)并于室温温育1小时。清洗(3x90μl/孔,PBST缓冲液)后,添加25μl/孔山羊抗小鼠H+L-POD(Biorad#170-6561,OSEP中1:2000)或驴抗家兔IgG POD(GE#NA9340V,OSEP中1:5000)并在摇床中于室温温育1小时。为了检测大鼠IgG,添加山羊抗大鼠IgG1-POD(Bethyl# A110-106P),山羊抗大鼠IgG2a-POD(Bethyl#A110-109P)和山羊抗大鼠IgG2b-POD(Bethyl# A110-111P)的混合物(OSEP中1:10000)并在摇床上于室温温育1小时。清洗(6x90μl/孔,PBST缓冲液)后,添加25μl/孔TMB底物(Roche,11835033001)并温育直至OD 2-3。在Tecan Safire 2仪器上于370/492nm进行测量。

[1074] 具有HLA-A特异性序列的人去嫁接的HLA-G结合ELISA

[1075] 以250ng/ml的浓度用25μl/孔生物素化人去嫁接的HLA-G包被链霉亲和素包被板(Nunc, MicroCoat#11974998001)并于4℃温育过夜。清洗(3x90μl/孔,PBST缓冲液)后,添加25μl抗HLA-G样品(在OSEP缓冲液中1:3稀释)或大鼠血清(在OSEP中1:600稀释)并于室温温育1小时。清洗(3x90μl/孔,PBST缓冲液)后,添加25μl/孔山羊抗大鼠IgG1-POD(Bethyl# A110-106P),山羊抗大鼠IgG2a-POD(Bethyl#A110-109P)和山羊抗大鼠IgG2b-POD(Bethyl# A110-111P)的混合物(OSEP中1:10000)并在摇床上于室温温育1小时。清洗(6x90μl/孔,PBST缓冲液)后,添加25μl/孔TMB底物(Roche,11835033001)并温育直至OD 2-3。在Tecan Safire 2仪器上于370/492nm进行测量。

[1076] 大鼠MHC I (RT1-A) 结合ELISA

[1077] 以250ng/ml的浓度用25μl/孔生物素化大鼠MHC I (RT1-A) 包被链霉亲和素包被板(Nunc, MicroCoat#11974998001)并于4℃温育过夜。清洗(3x90μl/孔,PBST缓冲液)后,添加25μl抗HLA-G样品(在OSEP缓冲液中1:3稀释)或大鼠血清(在OSEP中1:600稀释)并于室温温育1小时。清洗(3x90μl/孔,PBST缓冲液)后,添加25μl/孔山羊抗大鼠IgG1-POD(Bethyl# A110-106P),山羊抗大鼠IgG2a-POD(Bethyl#A110-109P)和山羊抗大鼠IgG2b-POD(Bethyl# A110-111P)的混合物(OSEP中1:10000)并在摇床上于室温温育1小时。清洗(6x90μl/孔,

PBST缓冲液)后,添加25 μ l/孔TMB底物(Roche,11835033001)并温育直至OD 2-3。在Tecan Safire 2仪器上于370/492nm进行测量。

[1078] HLA-A2结合ELISA

[1079] 以250ng/ml的浓度用25 μ l/孔生物素化人HLA-A2包被链霉亲和素包被板(Nunc, MicroCoat#11974998001)并于4 $^{\circ}$ C温育过夜。清洗(3x90 μ l/孔,PBST缓冲液)后,添加25 μ l抗HLA-G样品(在OSEP缓冲液中1:3稀释)或大鼠血清(在OSEP中1:600稀释)并于室温温育1小时。清洗(3x90 μ l/孔,PBST缓冲液)后,添加25 μ l/孔山羊抗大鼠IgG1-POD(Bethyl#A110-106P),山羊抗大鼠IgG2a-POD(Bethyl#A110-109P)和山羊抗大鼠IgG2b-POD(Bethyl#A110-111P)的混合物(OSEP中1:10000)并在摇床上于室温温育1小时。清洗(6x90 μ l/孔,PBST缓冲液)后,添加25 μ l/孔TMB底物(Roche,11835033001)并温育直至OD 2-3。在Tecan Safire 2仪器上于370/492nm进行测量。

[1080] 抗HLA-G抗体的结合动力学

[1081] 使用BIACORE T200仪器(GE Healthcare)通过表面等离子共振调查抗HLA-G抗体对人HLA-G,去嫁接的人HLA-G和人HLA-A2的结合动力学。于25 $^{\circ}$ C实施所有实验,使用PBS缓冲液(pH 7.4+0.05%Tween20)作为运行缓冲液和PBS缓冲液(+0.1%BSA)作为稀释缓冲液。通过使用由GE Healthcare供应的胺偶联试剂盒于pH 5.0在S系列CM5传感器芯片(GE Healthcare)上固定化抗人Fc(JIR009-005-098, Jackson)或抗大鼠Fc(JIR112-005-071, Jackson)或抗小鼠Fc(JIR115-005-071, Jackson)抗体。在表面上捕捉抗HLA-G抗体,导致50-200RU的捕捉响应。以30 μ l/min以2.5至800nM的浓度(2x1:2和4x1:3稀释系列)将HLA-G分子注射到表面上达180秒(结合期)。通过用运行缓冲液清洗来监测解离期达300-600秒。通过注射H3PO4(0.85%)达60+30秒(用于抗人Fc捕捉抗体),甘氨酸pH 1.5达60秒和甘氨酸pH 2.0达60秒(用于抗大鼠Fc捕捉抗体),H3PO4(0.85%)达80+60秒(用于抗小鼠Fc捕捉抗体)来再生表面。通过减去自模拟表面获得的响应来修正本体(bulk)折射率差异。减去空白注射(双重参照)。使用BIAevaluation软件将派生的曲线拟合1:1朗格缪尔结合模型。

[1082] 抗HLA-G抗体的交叉阻断

[1083] 使用BIACORE T200或B4000仪器(GE Healthcare)通过表面等离子共振调查抗HLA-G抗体结合人HLA-G的交叉阻断实验。于25 $^{\circ}$ C实施所有实验,使用PBS缓冲液(pH 7.4+0.05%Tween20)作为运行缓冲液。

[1084] 依照供应商的方案在S系列CM5传感器芯片(GE Healthcare)上固定化抗人Fab(GE-Healthcare,28-9583-25)抗体以捕捉来自OMT大鼠的含有人Ck域的抗体。以15 μ g/ml的浓度捕捉抗HLA-G抗体达70秒。以500或1000nM的浓度注射wt HLA-G(30 μ l/min)达60秒。然后以30 μ g/ml的浓度注射wt大鼠抗体达90秒。通过用运行缓冲液清洗来监测解离期达60或240秒。通过注射甘氨酸pH 1.5达60秒和另外的90秒的稳定化时段来再生表面。

[1085] 在另一种测定法设置中,依照供应商的方案在S系列CM5传感器芯片(GE Healthcare)上固定化抗人Fab(GE-Healthcare,28-9583-25)抗体以捕捉来自OMT大鼠的含有人Ck域的抗体。以30 μ g/ml的浓度捕捉抗HLA-G抗体达90秒。通过以500 μ g/ml的浓度和30 μ l/min的流速4x120秒注射人IgG(JIR009-000-003)来封闭捕捉抗体上未占据的结合位点。以500nM的浓度注射wt HLA-G(30 μ l/min)达90秒。然后以30 μ g/ml的浓度注射来自OMT大鼠的第二抗体(人Ck域)达90秒。通过用运行缓冲液清洗来监测解离期达240秒。通过注射甘氨

酸pH 1.5达60秒和另外的90秒的稳定化时段来再生表面。

[1086] 表:HLA-G抗体对处于它的单体,二聚体和三聚体形式的重组可溶性HLA-G MHC I类复合物的结合(ELISA)

抗体	HLA-G单体 EC ₅₀ [nM]	HLA-G二聚体 EC ₅₀ [nM]	HLA-G三聚体 EC ₅₀ [nM]
[1087] HLA-G-0031	7.19	1.87	1.86
HLA-G-0039	7.35	4.10	5.29
HLA-G-0041	4.95	5.31	4.87
HLA-G-0090	n.a.	n.a.	n.a.

[1088] 上表汇总自wt蛋白质IMS推导的,不同大鼠抗人HLA-G单克隆抗体的结合。显示的是对重组wt单体,二聚体和三聚体HLA-G蛋白质的各自结合的相对EC₅₀值[ng/ml],如通过ELISA评估的。ELISA是如下设置的,即将生物素化wt HLA-G抗原包被至链霉亲和素板。温育和清洗步骤后,各自抗体在10-0μg的浓度范围中以1:2稀释台阶结合。通过抗Fc-抗体-POD缀合物进行对结合的抗体的检测。在产生半最大信号的抗体浓度自所得结合曲线确定EC₅₀值。在非生物素化HLA-G二聚体和三聚体抗原的情况下,通过测定板上的随机包被进行固定化。

[1089] HLA-G wt对HLA-G去嫁接结合ELISA:

抗体	wt HLA-G (SEQ ID NO: 43) (单体)		去嫁接HLA-G上的 HLA-A共有(SEQ ID NO: 44)	
	相对EC50 [ng/ml]	最大OD	相对EC50 [ng/ml]	最大OD
[1090] HLA-G-0031	7.19	1.6	-	0.13
HLA-G-0039	7.35	1.4	-	0.13
HLA-G-0041	8.60	2.3	-	0.15
HLA-G-0090	10.37	3.4	-	0.2

[1091] 上表汇总自wt以及OMT大鼠二者的wt蛋白质IMS推导的,不同大鼠抗人HLA-G单克隆抗体的结合。显示的是重组wt单体HLA-G蛋白质或所谓的去嫁接HLA-G(HLA-G主链上的HLA-A共有序列)蛋白质的各自结合的相对EC₅₀值[ng/ml]和最大OD,如通过ELISA评估的。ELISA是如下设置的,即将生物素化wt HLA-G或共有抗原包被至链霉亲和素板。温育和清洗步骤后,各自抗体在10-0μg的浓度范围中以1:2稀释台阶结合。通过抗Fc-抗体-POD缀合物进行对结合的抗体的检测。在产生半最大信号的抗体浓度自所得结合曲线确定EC₅₀值。

[1092] HLA-G wt对HLA-G去嫁接结合-表面等离子共振

[1093] HLA-G抗体对重组HLA-G(SEQ ID NO:43)和对照修饰的人HLA-G β2M MHC I类复合物(其中HLA-G特异性氨基酸已经用HLA-A共有氨基酸替换(=去嫁接的HLA-G,SEQ ID NO:44)的结合亲和力(“-”指示检测不到结合)

抗体	wt HLA-G (SEQ ID NO: 43) (单体)				HLA-G去嫁接物上的 HLA-A共有 (SEQ ID NO: 44)			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t1/2 (min)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t1/2 (min)	KD (M)
HLA-G-0031	4.9E +04	3.7E -03	3	7.5E -08	-	-	-	-
[1094] HLA-G-0031-0104 (人源化)	8.3E +04	2.0E -03	6	2.4E -08				
HLA-G-0039	4.6E +05	4.4E -04	27	9.5E -10	-	-	-	-
HLA-G-0041	3.8E +05	4.9E -04	23	1.3E -09	-	-	-	-
HLA-G-0090	2.3E +05	8.5E -04	14	3.6E -09	-	-	-	-

[1095] 上表汇总针对wt和去嫁接的HLA-G的抗体亲和力和t1/2值,如通过表面等离子共振(Biacore)分析评估的。

[1096] 使用BIAcore T200仪器(GE Healthcare)通过表面等离子共振调查抗HLA-G抗体对人HLA-G和去嫁接的人HLA-G的结合动力学。于25°C实施所有实验,使用PBS缓冲液(pH 7.4+0.05%Tween20)作为运行缓冲液和PBS缓冲液(+0.1%BSA)作为稀释缓冲液。通过使用由GE Healthcare供应的胺偶联试剂盒于pH 5.0在S系列CM5传感器芯片(GE Healthcare)固定化抗人Fc(JIR009-005-098, Jackson)或抗大鼠Fc(JIR112-005-071, Jackson)或抗小鼠Fc(JIR115-005-071, Jackson)抗体。在表面上捕捉抗HLA-G抗体,导致50-200RU的捕捉响应。以30 μ l/min以2.5至800nM的浓度(2x1:2和4x1:3稀释系列)将非生物素化HLA-G分子注射到表面上达180秒(结合期)。通过用运行缓冲液清洗来监测解离期达300-600秒。通过注射H3PO4(0.85%)达60+30秒(用于抗人Fc捕捉抗体),甘氨酸pH 1.5达60秒和甘氨酸pH 2.0达60秒(用于抗大鼠Fc捕捉抗体),H3PO4(0.85%)达80+60秒(用于抗小鼠Fc捕捉抗体)来再生表面。通过减去自模拟表面获得的响应来修正本体(bulk)折射率差异。减去空白注射(双重参照)。使用BIAevaluation软件将派生的曲线拟合1:1朗格缪尔结合模型。(上表中的-指示检测不到结合)。

[1097] 在又一项实验中,对下述参照抗体(自不同供应商获得)比较对单体人HLA-G MHC I(SEQ ID NO:43(“HLA-G-0003”))和具有共有HLA-A特异性位置的“去嫁接的”人HLA-G(SEQ ID NO:44(“HLA-G-0007”))的结合:MEM/G9,87G,G233,2A12,4H84,5A6G7,6D463,9-1F10, MEM-G/1, MEM-G/11, MEM-G/2和MEM-G/4(“-”指示检测不到结合)。

抗原	抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t1/2 (Min)	KD (M)
wt HLA-G (SEQ ID NO: 43) (单体)	MEM/G9	1.5E+05	1.1E-03	10	7.7E-09
	87G	-	-	-	-
	G233	1.8E+05	3.7E-03	3	2.0E-08
	2A12	-	-	-	-
	4H84	-	-	-	-
	5A6G7	-	-	-	-
	6D463	-	-	-	-
	9-1F10	-	-	-	-
	MEM-G/1	-	-	-	-
	MEM-G/11	7.4E+04	8.5E-04	14	1.2E-08
	MEM-G/2	-	-	-	-
	MEM-G/4	-	-	-	-

[1098]

抗原	抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t1/2 (Min)	KD (M)
HLA-G去嫁接物上的 HLA-A共有 (SEQ ID NO: 44)	MEM/G9	1.2E+05	3.6E-02	0.3	3.0E-07
	87G	-	-	-	-
	G233	-	-	-	-
	2A12	-	-	-	-
	4H84	-	-	-	-
	5A6G7	-	-	-	-
	6D463	-	-	-	-
	9-1F10	-	-	-	-
	MEM-G/1	-	-	-	-
	MEM-G/11	8.9E+04	1.2E-03	10	1.3E-08
	MEM-G/2	-	-	-	-
	MEM-G/4	-	-	-	-

[1099]

[1100] 有趣的是,大多数测量的抗体并不显示任何对单体人HLA-G MHC I (SEQ ID NO:43 (“HLA-G-0003”))的特异性结合,也包括抗体87G。文献中描述的对寡聚体形式的HLA-G的结合可能是由寡聚体形式的增多的结合位点驱动的亲合力。

[1101] 只有具有 $7.7E^{-09}M$ 的KD值的结合亲合力的抗体MEM/G9,具有 $2.0E^{-08}M$ 的KD值的抗体G233和具有 $1.2E^{-08}M$ 的KD值的结合亲和力的MEM-G/11显示对单体wt人HLA-G MHC I复合物的结合。然而,这些抗体之一MEM-G/11还显示一些对HLA-G去嫁接物上的HLA-A共有 (SEQ ID NO:44)的结合/交叉反应性。另外,另一种抗体 (MEM/G9) 还显示更强的对HLA-G去嫁接物上的HLA-A共有 (SEQ ID NO:44)的非特异性结合。

[1102] 实施例4

[1103] a) 受体结合抑制 (用单体,二聚体和三聚体HLA-G):ILT-2和ILT-4阻断ELISA

[1104] 以500-1000ng/ml的浓度用25 μ l/孔生物素化人wt HLA-G包被链霉亲和素包被板 (Nunc, MicroCoat#11974998001) 并于4 $^{\circ}C$ 温育过夜。清洗 (3x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后,以始于10或3 μ g/ml, 然后以1:3或1:2台阶稀释的递减浓度添加25 μ l抗HLA-G样品并于室温温育1小时。清洗 (3x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后,以200ng/ml的浓度添加25 μ l/孔带c-myc标签的重组ILT-2受体并于室温温育1小时。清洗 (3x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后,添加25 μ l/孔山羊抗c-myc-POD (Bethyl#A190-104P, PBST+0.5%BSA中1:7000) 或抗人Fc γ POD (JIR, 109-036-098,

在PBST+0.5%BSA中1:8000)并在摇床上于室温温育1小时。清洗(3x90 μ l/孔,PBST缓冲液)后,添加25 μ l/孔TMB底物(Roche,11835033001)并温育直至OD 2-3。在Tecan Safire 2仪器上以370/492nm进行测量。

候选	%抑制ILT2 (3 μ g/ml抗体)	%抑制ILT4 (3 μ g/ml抗体)
HLA-G-0031	72.8	39.8
HLA-G-0039	14.0	23.9
HLA-G-0041	17.4	18.4
HLA-G-0090	100	未测试

[1106] 上表汇总相对于不受阻断的HLA-G:受体相互作用,ILT-2和ILT-4阻断不同抗体在3 μ g/ml的浓度结合HLA-G的程度。在另一项实验中对HLA-G-0090测试ILT2阻断,没有评估ILT4阻断。

[1107] b) 使用一种不同测定法设置,抗HLA-G抗体关于它们的ILT2和-4结合抑制特性的生化比较

[1108] 如下设置ELISA,即分别将带Fc标签的ILT2和ILT4包被到Maxisorp微量滴定板上。温育和清洗步骤后,以100nM的浓度添加各自抗体。将可溶性带His标签的单体,二聚体或三聚体HLA-G添加至各孔。温育和清洗步骤后,通过抗His抗体-POD缀合物进行对结合的受体的检测。与自有ILT2/4+HLA-G(单体,二聚体,或三聚体)没有抗HLA-G或ILT2/4抗体的孔获得的值(100%结合=0%抑制)比较来计算百分比抑制(%)。

抗体	ILT2结合的%抑制			ILT4结合的%抑制		
	单体	二聚体	三聚体	单体	二聚体	三聚体
HLAG-0031	101	99	100	17	54	68
HLAG-0039	-450	25	70	-224	-105	-43
HLAG-0041	-437	23	67	-184	-113	-39
HLAG-0090*	92	100	99	31	31	47
MEM-G/9	-442	1	4	-14	-44	-40
87G	-49	19	29	13	18	14
G233	12	-132	3	-898	-20	58
抗ILT2/ILT4	113	100	101	44	60	60

[1110] 上表汇总所描述的HLAG抗体在110nM的浓度(*HLAG-0090以44nM的浓度测试)对重组HLA-G蛋白质(单体和寡聚体)与它的受体ILT2和ILT4之间的相互作用的阻断,如通过ELISA评估的。显示的是对HLA-G/受体相互作用的%抑制(对于ILT2和ILT4)。不太突出的ILT4抑制取决于这种受体的主要 β 2M依赖性相互作用。

[1111] 图4a和b中的条形图显示与商品化抗体比较,由描述的抗HLA-G抗体实现的%抑制。商品化HLA-G抗体87G, MEM/G09和G233并不像描述的抗体那样有效地阻断HLA-G/ILT2或ILT4相互作用。而且,商品化抗体在一些情况中在结合后引起HLA-G对ILT2或ILT4的结合升高。

[1112] c) 抗HLAG抗体对CD8a结合HLAG的抑制

[1113] 用30 μ l/孔封闭液封闭链霉亲和素包被的384孔板。通过在起始封闭剂T20(Thermo

Scientific#37543) 1:10稀释5%聚乙烯醇(PVA, Sigma#P8136)和8%聚乙烯吡咯烷酮(PVP, Sigma#PVP360), 通过将3.5ml PVA和3.5ml PVP添加至35ml起始封闭剂T20来制备封闭液。添加30 μ l在封闭液中稀释的生物素化HLA-G (3 μ g/ml) 至每个孔并在摇床上于室温温育1小时。用100 μ l含有0.1% Tween-20 (Merck#8.22184.500) 的PBS (PAN Biotech#P04-36500) 清洗孔3次。然后一式三份将孔与30 μ l在封闭缓冲液中稀释的抗HLA-G抗体一起在摇床上于室温温育1小时, 然后用100 μ l含有0.1% Tween-20的PBS清洗3次。在封闭缓冲液中稀释重组CD8a (Sino Biological#10980-H08H, 于4 $^{\circ}$ C保存1周时重建) (1.25 μ g/ml), 并添加30 μ l至所有孔并在摇床上于室温温育2小时。用100 μ l含有0.1% Tween-20的PBS清洗孔3次。在3%牛血清清蛋白级分V (Roche#10735086001) /PBS 0.2% Tween20中稀释HRP缀合的多克隆抗CD8a大鼠IgG抗体 (USBiological#033547-HRP) 并添加30 μ l这种稀释液至每个孔。然后将板在摇床上于室温温育1小时并用100 μ l含有0.1% Tween-20的PBS清洗3次。然后添加30 μ l TMB底物 (BM-Blue, 可溶性HRP底物, Roche#11484281001) 至每个孔, 继以在摇床上于室温温育25分钟。然后通过添加25 μ l硫酸至每个孔来停止反应并在读板仪中于450nm测量吸光度。通过自结合值的平均值减去背景值的平均值来计算CD8a对HLA-G的特异性结合。认为在抗体缺失下CD8对HLA-G的总结合是100%结合或0%抑制。

[1114] 图4c中的条形图显示与商品化抗体相比由所描述的抗HLA-G抗体实现的%抑制。在此设置中, 与所描述的抗体相比, 商品化HLA-G抗体87G并不阻断HLA-G/CD8a相互作用, 而MEM/G09和G233部分抑制HLA-G与CD8a相互作用。

[1115] 实施例5

[1116] 抗HLA-G抗体对细胞的结合

[1117] a) 细胞表面HLA-G结合ELISA

[1118] 将25 μ l/孔JEG3细胞(天然表达HLA-G, 20000个细胞/孔), Skov-3细胞或在细胞表面上表达重组HLA-G的Skov-3细胞(均为10000个细胞/孔)接种入组织培养物处理的384孔板(Corning, 3701)并于37 $^{\circ}$ C温育过夜。次日, 添加12.5 μ l抗HLA-G样品(最终稀释度1:3)并于4 $^{\circ}$ C温育2小时。通过添加50 μ l/孔戊二醛至0.05%的终浓度(Sigma目录号G5882; 批号056K5318)来固定细胞。清洗(3x90 μ l/孔, 用PBST缓冲液)后, 添加25 μ l/孔山羊抗小鼠H+L-POD (Biorad#170-6561, OSEP中1:2000) 或驴抗家兔IgG POD (GE#NA9340V, OSE中1:5000) 并在摇床上于室温温育1小时。为了检测大鼠IgG, 添加山羊抗大鼠IgG1-POD (Bethyl#A110-106P), 山羊抗大鼠IgG2a-POD (Bethyl#A110-109P) 和山羊抗大鼠IgG2b-POD (Bethyl#A110-111P) 的混合物(OSEP中1:10000) 并在摇床上于室温温育1小时。清洗(4x90 μ l/孔, PBST缓冲液)后, 添加25 μ l/孔TMB底物 (Roche, 11835033001) 并温育直至OD 2-3。在Tecan Safire 2仪器上于370/492nm进行测量。

抗体	Jeg3	wt Skov3	HLA-G ⁺ Skov3	wt PA-TU-8902	HLA-G ⁺ PA-TU-8902
[1119] HLA-G-0031	+++	-	+++	-	+++
HLA-G-0039	+++	+	+++	-	+++
HLA-G-0041	+++	++	+++	-	+++
HLA-G-0090	+++	-	+++	-	+++

[1120] 上表汇总不同大鼠抗人HLA-G单克隆抗体对不同细胞和细胞系上表达的HLA-G的结合, 如通过FACS分析评估的。描述对天然HLA-G表达性JEG3肿瘤细胞或Skov3或PA-TU-

8902转染子和各自亲本,未转染细胞的结合。

[1121] b) HLA-G抗体对细胞上表达的天然或重组HLA-G的结合(如通过FACS分析评估的)

[1122] 为了流式细胞术分析,将细胞用抗HLA-G单抗于4℃染色。简言之,将25μl/孔每种细胞悬浮液(5x10⁴个细胞/孔)转移入聚丙烯96孔V底板并在冰箱中于5℃预冷却10分钟。将抗HLA-G样品在染色缓冲液中稀释至80μg/ml的2倍起始浓度。实施抗体的4倍连续稀释并将25μl/孔抗体溶液添加至制备的细胞并于5℃温育1小时。将细胞用200μl/孔染色缓冲液清洗两次并以300g离心3分钟。为了检测,将荧光标记的抗物种抗体(缀合有Alexa 488的山羊抗大鼠IgG(H+L),Life technologies#A11006;或山羊抗小鼠IgG(H+L),Life technologies#A11001;或缀合有Alexa 488的山羊抗人IgG(H+L),Life technologies#A11013)在染色缓冲液中稀释至20μg/ml并在50μl/孔检测抗体中重悬浮细胞团粒。于5℃温育1小时后,再次将细胞用染色缓冲液清洗两次,在70μl染色缓冲液中重悬浮并在FACS Canto II上测量。

[1123] 抗HLA-G抗体HLA-G 0031,HLA-G 0039,HLA-G 0041和HLA-G 0090的一种例示性FACS染色在图4的FACS叠加中给出。

[1124] 实施例6

[1125] 抗HLA-G抗体抑制/调控ILT2对JEG3细胞上表达的HLA-G的结合

[1126] 对于分析,有或没有与不同抗HLA-G抗体的预温育的情况下,将JEG3细胞(ATCC HTB36)用ILT2-Fc融合蛋白染色(对照=无抑制)。对于与抗HLA-G抗体的预温育,将25μl/孔细胞悬浮液转移入聚丙烯96孔V底板中并于4℃预冷却10分钟。将抗HLA-G抗体或参照抗体(G233, MEM-G/9或87G)在染色缓冲液中稀释至80μg/ml的2倍浓度并将25μl/孔抗体溶液添加至制备的细胞并于5℃温育1小时。将细胞用200μl/孔染色缓冲液及300g离心3分钟清洗两次,最终在25μl/孔染色缓冲液中重悬浮。

[1127] 对a)与抗HLA-G单抗预温育的JEG3细胞或b)作为参照的未处理的JEG3细胞如下测定人ILT2-Fc嵌合蛋白(RD#2017-T2-050)的检测:简言之,将ILT2-Fc或对照人IgG(Jackson-Immuno-Research#009-000-003)在染色缓冲液中稀释至20μg/ml(ILT2)的2倍浓度并将25μl/孔ILT2-Fc蛋白质溶液添加至制备的细胞并于5℃温育2小时。再次将细胞用200μl/孔染色缓冲液清洗两次。以染色缓冲液中10μg/ml的稀释度用荧光标记的抗人IgG Fc-γ特异性抗体(F(ab')₂片段山羊抗人IgG, Fc γ片段特异性-FITC, Jackson-Immuno-Research#109-096-008)检测人ILT2-Fc蛋白质。在50μl/孔检测抗体中重悬浮细胞团粒。于5℃温育1小时后,将细胞用染色缓冲液清洗两次,在70μl中重悬浮并在FACS Canto II上测量以测定结合至JEG3细胞的ILT2。

[1128] 作为对照,通过以10μg/ml的浓度使用抗物种抗体(缀合有Alexa 488的山羊抗大鼠IgG(H+L)(Life technologies#A11006),或山羊抗小鼠IgG(H+L)-Alexa 488(Life technologies,#A11001))检测结合至JEG3预温育的细胞的抗HLA-G抗体。

[1129] 图5中的图显示不同HLA-G抗体改变重组ILT2对JEG3肿瘤细胞上天然表达的HLA-G的相互作用和结合的各自能力。

[1130] 下表汇总来自各实验的结果。抗HLA-G抗体对JEG3细胞的结合描绘为+=弱结合至+++ =强结合。抗HLA-G抗体抑制/阻断或提高ILT2对HLA-G表达性JEG3细胞的结合的能力。在最后一栏中,显示/量化重组ILT2对细胞的结合或其抑制/阻断(将在抗HLA-G抗体缺失下

的ILT2-Fc的染色设为100%结合,其等于0%抑制,负值指示甚至升高的结合;低于5%的染色信号差异是不显著的,归类为无影响):

抗体	JEG-3细胞上的结合	HLA-G:ILT2相互作用	ILT2结合Jeg3细胞的抑制
无单抗(对照)	-	-	0%抑制=100%结合
HLA-G-0031	+++	抑制ILT2的结合	95.1%抑制
HLA-G-0039	+++	提高ILT2的结合	-72.9% (=提高/刺激ILT2结合)
HLA-G-0041	+++	提高ILT2的结合	-76.7% (=提高/刺激ILT2结合)
HLA-G-0090	+++	抑制ILT2的结合	91.8%抑制
87G	++	无显著影响	2.3%抑制
MEM-G/9	+++	抑制ILT2的结合	-27.9% (=提高/刺激ILT2结合)
G233	+++	抑制ILT2的结合	-55.8% (=提高/刺激ILT2结合)

[1131] 实施例7

[1132] 单核细胞细胞因子恢复测定法(在HLA-G介导的遏制之后)

[1133] 使用下述HLA-G表达性细胞与单核细胞的共培养物测定法在功能上表征不同大鼠抗人HLA-G单克隆抗体。自健康供体的血液分离外周人单核细胞。简言之,在装有抗凝剂的管中收集血液并在PBS中1:2稀释。为了分离外周血单个核细胞(PBMC),将30ml混合物转移至每个预装分离介质的Leucosep管。离心12分钟(1200xg,无中断)后收集PBMC特异性条带,用PBS清洗三次并以300xg离心10分钟。最后,在来自Miltenyi的MACS缓冲液中重悬浮细胞团粒并用来自Miltenyi的人单核细胞分离试剂盒II(#130-091-153)依照制造商的说明书(负选择)经由磁分离自PBMC分离人单核细胞。以 5×10^5 个细胞/ml的密度在原代细胞培养基(RPMI 1640, PAN#P04-17500, 补充有10%FCS, Gibco#10500; 2mM L-谷氨酰胺, Sigma#G7513; 1mM丙酮酸钠, Gibco#11360; MEM非必需氨基酸, Gibco#11140; 0.1mM 2-巯基乙醇, Gibco#31350; MEM维生素, Gibco#11120; 青霉素/链霉素, Gibco#15140)中重悬浮分离的单核细胞。通过流式细胞术监测CD14⁺CD16⁺细胞的富集并分析细胞的ILT2和ILT4表达。对于富集的单核细胞与HLA-G表达性细胞的共培养物测定法,在测定法前1天在100 μ l JEG-3培养基(具有EBSS和L-谷氨酰胺的MEM Eagle, PAN#P04-00509, 补充有10%FCS, Gibco#10500; 1mM丙酮酸钠, Gibco#11360; MEM非必需氨基酸, Gibco#11140)中以 8×10^3 个细胞/孔在96孔平底组织培养板中接种JEG-3细胞(ATCC HTB36)以在测定法那天形成汇合层。在一些实施方案中,如上文所述像JEG-3wt细胞那样使用和接种JEG-3HLAG敲除细胞系。将贴壁JEG-3细胞在原代细胞培养基中与抗HLA-G抗体的4倍连续稀释液一起预温育。因此,取出来自贴壁JEG-3细胞的上清液并添加50 μ l/孔制备的抗体溶液并在增湿气氛中于37 $^{\circ}$ C和5%CO₂温育1小时。在50 μ l原代细胞培养基中以 2.5×10^4 个人单核细胞/孔将人单核细胞添加至抗HLA-G抗体预温育的JEG-3细胞并将共培养物在增湿气氛中于37 $^{\circ}$ C和5%CO₂温育过夜(大约18-20小时)。次日用50ng/ml LPS实施LPS刺激达7小时,之后收获共培养物的上清液。使用来自

eBioscience的人TNFαELISA Ready-SET-Go!® (#88-7346-88) 测定共培养物上清液的TNFα的浓度。

[1135] 下表汇总给定HLA-G抗体在不同抗体特征对特定供体的功能特征。

[1136] 表:功能性抗HLA-G抗体能够恢复HLA-G特异性受遏制免疫应答,即恢复与HLA-G表达性细胞的共培养物中单核细胞的由LPS诱导的TNFα生成:功能性抗HLA-G抗体的百分比% TNF释放(恢复)

[1137] 功能性抗HLA-G抗体能够诱导(恢复受到遏制的)免疫应答,即恢复与HLA-G表达性细胞的共培养物中的单核细胞的由LPS诱导的TNFα生成(对于HLA-G特异性TNF诱导的阴性对照,使用HLA-G敲除细胞系,以区分抗体是显示无TNF诱导(真正是HLA-G特异性的)或是对敲除细胞系显示TNF诱导(不会是HLA-G特异性的))。

[1138] 使用下面的条件计算抗HLA-G抗体的%TNF诱导的值:JEG3细胞和单核细胞的未处理的共培养物=0%,仅有单核细胞的培养物(无HLA-G诱导的遏制)=100%。

细胞系	JEG-3 HLAG 敲除 (ko)	JEG-3 野生型 (wt)	JEG-3 HLAG ko	JEG-3 wt	JEG-3 HLAG ko	JEG-3 wt	JEG-3 HLAG ko	JEG-3 wt
[1139] 抗HLA-G 抗体	HLA-G-0031	HLA-G-0031	HLA-G-0041	HLA-G-0041	87G	87G	G223	G223
40μg/ml	-20%	275%	12%	53%	86%	150%	154%	144%
10μg/ml	6%	216%	16%	41%	40%	85%	50%	104%
2.5μg/ml	-40%	170%	-13%	63%	3%	38%	29%	63%
	0.63μg/ml	83%	-18%	34%	-8%	20%	5%	33%
[1140] 0.16μg/ml	-29%	23%	-1%	43%	-12%	25%	0%	20%
未处理	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
仅单核细胞	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

[1141] 从上表清楚可见,本发明的抗体能够在与HLA-G表达性JEG-3细胞共培养的单核细胞中诱导TNFα释放,然而不能在与具有HLA-G敲除的JEG-3细胞细胞共培养的单核细胞中诱导TNFα释放。

[1142] 从该表清楚可见,参照抗体不是真正HLA-G特异性的,因为它们在HLA-G敲除细胞系中也诱导强TNFα释放。

[1143] 取决于供体(下文的不同供体),百分比%TNF释放(恢复)有变化。

细胞系	JEG-3野生型 (wt)	JEG-3野生型 (wt)	JEG-3野生型 (wt)
抗HLA-G抗体	HLA-G-0090	HLA-G-0031	HLA-G-0041
40μg/ml	214%	77%	
10μg/ml	221%	74%	40%
2.5μg/ml	233%	67%	59%
0.63μg/ml	219%	44%	66%
0.16μg/ml	198%	14%	44%
未处理	0%	0%	0%

仅单核细胞	100%	100%	100%
-------	------	------	------

[1145] 实施例8

[1146] 结合人HLA-G和人CD3的双特异性抗体(抗HLA-G/CD3)的生成

[1147] 重组DNA技术

[1148] 使用标准方法来操作DNA,如Sambrook,J.et al.,Molecular cloning:A laboratory manual;Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989中所述。依照制造商的说明书使用分子生物学试剂。

[1149] 基因和寡核苷酸合成

[1150] 在Geneart GmbH(Regensburg,Germany)通过化学合成制备期望的基因区段。将合成的基因片段克隆入大肠杆菌质粒进行繁殖/扩增。通过DNA测序来检验亚克隆的基因片段的DNA序列。或者,通过化学合成的寡核苷酸的退火或经由PCR来组装短合成DNA片段。由Metabion GmbH(Planegg-Martinsried,Germany)制备各自寡核苷酸。

[1151] 基本/标准哺乳动物表达质粒的描述

[1152] 为了表达期望的基因/蛋白质(例如抗体重链或抗体轻链),使用包含下述功能性元件的转录单元:

[1153] -来自人巨细胞病毒(P-CMV)的立即早期增强子和启动子,包括内含子A,

[1154] -人重链免疫球蛋白5'-非翻译区(5' UTR),

[1155] -鼠免疫球蛋白重链信号序列,

[1156] -要表达的基因/蛋白质(例如全长抗体重链或MHC I类分子),和

[1157] -牛生长激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

[1158] 在包括要表达的期望的基因的表达单元/盒以外,基本/标准哺乳动物表达质粒含有

[1159] -来自载体pUC18的复制起点,其容许这种质粒在大肠杆菌中复制,和

[1160] - β -内酰胺酶基因,其在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性。

[1161] 蛋白质测定

[1162] 使用基于多肽的氨基酸序列计算的摩尔消光系数,通过测定280nm处的光密度(OD)来测定纯化的多肽的蛋白质浓度。

[1163] 用于重组单克隆双特异性抗体的表达质粒的生成

[1164] 重组单克隆抗体基因编码各自免疫球蛋白重链和轻链。

[1165] 在免疫球蛋白重链或轻链表达盒以外,用于瞬时表达单克隆抗体分子的表达质粒包含来自载体pUC18的复制起点(其容许这种质粒在大肠杆菌中复制),和 β -内酰胺酶基因(其在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性)。

[1166] 各自抗体重链或轻链的转录单元包含下述功能性元件:

[1167] -来自人巨细胞病毒(P-CMV)的立即早期增强子和启动子,包括内含子A,

[1168] -人重链免疫球蛋白5'-非翻译区(5' UTR),

[1169] -鼠免疫球蛋白重链信号序列,

[1170] -N端截短的金黄色葡萄球菌(S.aureus)分选酶A编码核酸,和

[1171] -牛生长激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

[1172] 瞬时表达和分析性表征

[1173] 通过瞬时转染在F17培养基(Invitrogen Corp.)中培养的HEK293细胞(人胚胎肾细胞系293衍生的)实施重组生成。对于生成单克隆抗体,用含有各自免疫球蛋白重链和轻链的质粒共转染细胞。对于转染,使用“293-Fectin”转染试剂(Invitrogen)。如制造商的说明书中规定的那样实施转染。转染后三至七(3-7)天收获细胞培养物上清液。于降低的温度(例如-80℃)保存上清液。

[1174] 关于在例如HEK293细胞中重组表达人免疫球蛋白的一般信息见:Meissner,P.et al.,Biotechnol.Bioeng.75(2001)197-203。

[1175] 使用上文描述的重组DNA技术,生成重组单克隆抗体的表达质粒和瞬时表达和分析性表征的方法,生成并分析下面的结合人HLA-G和人CD3的双特异性抗体:

[1176] 结合人HLA-G和人CD3的双特异性抗体(抗HLA-G/CD3)(结合人HLA-G的抗原结合位点和结合人CD3的抗原结合位点的可变区VH/VL和高变区(HVR)的SEQ ID No):

[1177]

抗HLA-G 抗原结合位点	HVR- H1	HVR- H2	HVR- H3	HVR- L1	HVR- L2	HVR- L3	VH	VL
HLA-G-0031	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
HLA-G-0031-0104 (HLA-G-0031的 人源化变体) (HLA-G-0104)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 34
HLA-G-0039	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
HLA-G-0041	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
HLA-G-0090	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32
抗CD3 抗原结合位点	HVR- H1	HVR- H2	HVR- H3	HVR- L1	HVR- L2	HVR- L3	VH	VL
CH2527	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63

[1178] 结合人HLA-G和人CD3的双特异性抗体(抗HLA-G/抗CD3双特异性抗体):此类抗HLA-G/抗CD3双特异性抗体中包含的双特异性抗体链的SEQ ID No(基于结合人HLA-G的抗原结合位点和结合人CD3的抗原结合位点的各自可变区VH/VL):

[1179] P1AA1185(基于HLA-G-0031and CH2527)

- [1180] SEQ ID NO:64轻链1P1AA1185
- [1181] SEQ ID NO:65轻链2P1AA1185
- [1182] SEQ ID NO:66重链1P1AA1185
- [1183] SEQ ID NO:67重链2P1AA1185
- [1184] P1AA1185-104 (基于HLA-G-0031-0104和CH2527)
- [1185] SEQ ID NO:68轻链1P1AA1185-104
- [1186] SEQ ID NO:69轻链2P1AA1185-104
- [1187] SEQ ID NO:70重链1P1AA1185-104
- [1188] SEQ ID NO:71重链2P1AA1185-104
- [1189] P1AD9924 (基于HLA-G-0090和CH2527)
- [1190] SEQ ID NO:72轻链1P1AD992
- [1191] SEQ ID NO:73轻链2P1AD992
- [1192] SEQ ID NO:74重链1P1AD992
- [1193] SEQ ID NO:75重链2P1AD992
- [1194] 实施例9
- [1195] 双特异性抗HLA-G/抗CD3 T细胞双特异性 (TCB) 抗体对在细胞上表达的天然或重组HLA-G的结合 (如通过FACS分析评估的)
- [1196] 通过FACS分析评估抗HLA-G TCB单抗对在不同细胞和细胞系上表达的HLA-G的结合能力。描述对天然HLA-G表达性JEG3肿瘤细胞或Skov3或PA-TU-8902转染子和各自亲本, 未转染细胞的结合。
- [1197] 对于流式细胞术分析, 于4℃将细胞用抗HLA-G TCB单抗染色。简言之, 将25μl/孔每种细胞悬浮液 (5x10⁴个细胞/孔) 转移入聚丙烯96孔V底板并在5℃冰箱中预冷却10分钟。将抗HLA-G样品在染色缓冲液中稀释至80μg/ml的2倍起始浓度。实施抗体的4倍连续稀释并将25μl/孔抗体溶液添加至准备好的细胞并于5℃温育1小时。将细胞用200μl/孔染色缓冲液清洗两次并以300g离心5分钟。之后在25μl染色缓冲液中重悬浮细胞团粒。对于检测, 将荧光标记的与PE缀合的抗物种抗体 (驴抗人IgG (H+L), Jackson Immuno Research#709-116-149) 在染色缓冲液中1:100稀释并将25μl/孔检测抗体添加至细胞悬浮液。于5℃温育1小时后, 将细胞再次用染色缓冲液清洗两次, 在70μl染色缓冲液中重悬浮并于FACS Canto II测量。P1AA1185的结合的结果显示于图7。
- [1198] 实施例10
- [1199] 双特异性抗HLA-G/抗CD3 T细胞双特异性 (TCB) 抗体介导的T细胞激活
- [1200] 在用重组HLAG转染的SKOV3细胞 (SKOV3HLAG) 上测试在HLAG表达性肿瘤细胞存在下抗HLA-G TCB激活T细胞的能力。通过T细胞上细胞表面激活标志物CD25和早期激活标志物CD69的FACS分析评估T细胞的激活。简言之, 使用淋巴细胞分离介质管 (PAN#P04-60125) 通过密度梯度离心自人外周血分离PBMC。在96孔U底板中以比率10:1接种PBMC和SKOV3HLAG细胞。然后如图 (图8) 中所示将共培养物与不同浓度的HLAG-TCB一起温育并在具有5%CO₂的温箱中于37℃温育24小时。次日, 通过流式细胞术测量CD25和CD69的表达。
- [1201] 对于流式细胞术分析, 于4℃将细胞用PerCP-Cy5.5小鼠抗人CD8 (BD Pharmingen#565310), PE小鼠抗人CD25 (eBioscience#9012-0257) 和APC小鼠抗人CD69 (BD Pharmingen#

555533) 染色。简言之,将抗体稀释至2倍浓度并在具有25 μ l预清洗共培养物的每个孔中添加25 μ l抗体稀释液。将细胞于4 $^{\circ}$ C染色30分钟并用200 μ l/孔染色缓冲液清洗两次并以300g离心5分钟。在200 μ l染色缓冲液中重悬浮细胞团粒并以2 μ g/ml的终浓度用DAPI染色进行活死区分。然后使用BD LSR流式细胞仪测量样品。使用FlowJo V.10.1软件实施数据分析。输出均值荧光强度的几何均值并计算同种型和抗体的几何均值之比。双特异性抗HLA-G/抗CD3 T细胞双特异性 (TCB) 抗体P1AA1185和P1AD9924均诱导T细胞激活。

[1202] 实施例11

[1203] 双特异性抗HLA-G/抗CD3 T细胞双特异性 (TCB) 抗体介导的T细胞的IFN γ 分泌

[1204] 在用重组HLAG转染的SKOV3细胞 (SKOV3HLAG) 和表达内源HLAG的JEG3细胞上测试在HLAG表达性肿瘤细胞存在下抗HLA-G TCB诱导T细胞的IFN γ 分泌的能力。通过Luminex技术检测IFN γ 分泌。对于测量TCB处理后T细胞的IFN γ 分泌,将PBMC和SKOV3HLAG细胞或JEG3细胞的共培养物与抗HLAG TCB一起温育。简言之,使用淋巴细胞分离介质管 (PAN#P04-60125) 通过密度梯度离心自人外周血分离PBMC。在96孔U底板中以比率10:1接种PBMC和SKOV3HLAG细胞。然后如图(图9)中所示将共培养物与不同浓度的HLAG-TCB一起温育并在具有5%CO₂的温箱中于37 $^{\circ}$ C温育24小时。次日,收集上清液并使用Milliplex MAP试剂盒 (Luminex technology) 依照制造商的说明书测量IFN γ 分泌。双特异性抗HLA-G/抗CD3 T细胞双特异性 (TCB) 抗体P1AA1185和P1AD9924均诱导T细胞的IFN γ 分泌。

[1205] 实施例12

[1206] 双特异性抗HLA-G/抗CD3 T细胞双特异性 (TCB) 抗体对T细胞介导的细胞毒性/肿瘤细胞杀伤的诱导

[1207] 在用重组HLAG转染的SKOV3细胞 (SKOV3HLAG) 和表达内源HLAG的JEG3细胞上测试在HLAG表达性肿瘤细胞存在下抗HLA-G TCB诱导T细胞介导的细胞毒性的能力。通过测量用HLAG TCB处理后细胞中的胱天蛋白酶8激活来检测细胞毒性。对于测量TCB处理后的胱天蛋白酶8活化,将PBMC和SKOV3HLAG细胞或JEG3细胞的共培养物与抗HLAG TCB一起温育24或48小时并使用胱天蛋白酶8Glo试剂盒 (Promega, #G8200) 测量胱天蛋白酶8激活。简言之,使用淋巴细胞分离介质管 (PAN#P04-60125) 通过密度梯度离心自人外周血分离PBMC。在黑色透明底96孔板中以比率10:1接种PBMC和SKOV3HLAG细胞 (100 μ l每孔)。然后如图(图10)中所示将共培养物与不同浓度的HLAG-TCB一起温育并在具有5%CO₂的温箱中于37 $^{\circ}$ C温育24小时或48小时。次日,将100 μ l胱天蛋白酶8Glo底物添加至每个孔并于室温在摇床上放置1小时。在BioTek Synergy 2机器上测量发光。与胱天蛋白酶8激活/细胞毒性对应的相对发光单位 (RLU) 在图(图10)中绘图。双特异性抗HLA-G/抗CD3 T细胞双特异性 (TCB) 抗体P1AA1185和P1AD9924均在HLAG表达性SKOV3和JEG3细胞中诱导T细胞介导的细胞毒性/抗HLA-G/抗CD3双特异性TCB抗体 (P1AA1185和P1AD9924) 的肿瘤细胞杀伤。

[1208] 实施例13

[1209] 双特异性抗HLA-G/抗CD3 T细胞双特异性 (TCB) 抗体在与人PBMC共移植的用重组HLAG转染的SKOV3人卵巢癌 (SKOV3 HLAG) 中的体内抗肿瘤功效

[1210] 在100 μ l的总体积中对NSG (NOD/scid/IL-2R γ 缺无) 小鼠 (n=10) 皮下注射5 \times 10⁶个SKOV3 HLAG细胞。一旦肿瘤达到300mm³的平均体积,在200 μ l总体积中对每只小鼠注射1 \times 10⁷个人PBMC。PBMC注射后7天将小鼠随机化并一周两次用HLAG TCB (5mg/kg) 处理。作为

对照, 一组小鼠接受两周一次静脉内注射组氨酸缓冲液(媒介)。一周两次测量肿瘤体积直至研究终止。实验的结果显示于图xx。结果显示在不同研究组中通过测径器测量的来自10只小鼠的肿瘤体积的中值和四分位范围(IQR)。双特异性抗HLA-G/抗CD3 T细胞双特异性(TCB)抗体P1AA1185和P1AD9924均显示强肿瘤生长抑制, 其中P1AD9924显示完全消退。

序列表

<110> 豪夫迈·罗氏有限公司(F. Hoffmann-La Roche AG)

<120> 多特异性抗体及其用途

<130> P34774-W0

<150> EP18168053.9

<151> 2018-04-18

<160> 77

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 1

Asp Tyr Trp Val Ser

1 5

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 2

Glu Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ala Ser Asn Phe Asp Glu Asn Phe

1 5 10 15

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 3

Ser Ser His Gly Ser Phe Arg Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Asn His Leu His

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT
 <213> 大鼠
 <400> 5
 Ser Thr Ser Gln Arg Ala Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 大鼠
 <400> 6
 Gln Gln Gly Ser Ser Asn Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 大鼠
 <400> 7
 Gln Val Lys Leu Met Gln Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Asn Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Val Ser Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ala Ser Asn Phe Asp Glu Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Ser His Gly Ser Phe Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 大鼠
 <400> 8
 Ala Ile Val Leu Asn Gln Ser Pro Ser Ser Ile Val Ala Ser Gln Gly

<400> 12

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Lys Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 13

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

Gln Gln Tyr Tyr Asn Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> 人

<400> 15

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Ser
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Gly Ser Tyr Asn Tyr Gly Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Lys Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Phe Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Asn Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 17

Thr Tyr Gly Met Ser
 1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

Val Ile Ser Gly Gly Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 19

Asp Gly Ser Tyr Asn Tyr Gly Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 21

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 22

Gln Gln Tyr Tyr Asn Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 23

<211> 123

<212> PRT

<213> 人

<400> 23

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Ser Gly Gly Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Arg	Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90	95
Ala Lys Asp Gly Ser Tyr Asn Tyr Gly Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr			
	100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 24			
<211> 113			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 24			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Tyr Ser			
	20	25	30
Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	35	40	45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
	50	55	60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
	85	90	95
Tyr Tyr Asn Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile			
	100	105	110
Lys			
<210> 25			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 25			
Ser Asn Arg Ala Ala Trp Asn			
1	5		
<210> 26			
<211> 18			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 26			

Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val
 1 5 10 15
 Gln Gly
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 27
 Val Arg Ala Val Ala Pro Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 28
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 28
 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser Ser Asn Asn Lys Asn Asn Leu
 1 5 10 15
 Ala
 <210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 29
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 30
 Gln Gln Tyr Tyr Arg Thr Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 31
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 31
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

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

<210> 32

<211> 113

<212> PRT

<213> 人

<400> 32

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Arg Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人源化变体重链可变域VH, HLA-G-0031-0104 (HLA-G-0104)

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

<210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人源化变体轻链可变域VL, HLA-G-0031-0104 (HLA-G-0104)

<400> 34

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

<210> 35
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> 人(homo sapiens)
 <400> 35
 Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly
 1 5 10 15
 Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
 20 25 30
 Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg
 35 40 45
 Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr
 50 55 60
 Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr
 65 70 75 80
 Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln
 85 90 95
 Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly
 100 105 110
 Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu
 115 120 125
 Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys
 130 135 140
 Arg Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
 165 170 175
 Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His
 180 185 190
 Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
 195 200 205
 Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
 210 215 220
 Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
 225 230 235 240
 Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg
 245 250 255
 Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu
 260 265 270

Arg Trp Lys Gln Ser Ser Leu Pro Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val
 275 280 285
 Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Ala Val Val Thr Gly Ala Ala Val Ala
 290 295 300
 Ala Val Leu Trp Arg Lys Lys Ser Ser Asp
 305 310
 <210> 36
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> 人(homo sapiens)
 <400> 36
 Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly
 1 5 10 15
 Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
 20 25 30
 Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg
 35 40 45
 Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr
 50 55 60
 Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr
 65 70 75 80
 Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln
 85 90 95
 Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly
 100 105 110
 Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu
 115 120 125
 Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys
 130 135 140
 Arg Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
 165 170 175
 Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His
 180 185 190
 Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
 195 200 205
 Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
 210 215 220

35	40	45
Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu Thr		
50	55	60
Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Val Asn Leu Gly Thr		
65	70	75
Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln		
85	90	95
Trp Met Ile Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly		
100	105	110
Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu		
115	120	125
Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys		
130	135	140
Arg Lys Cys Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu		
145	150	155
Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys		
165	170	175
Glu Thr Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His		
180	185	190
Pro Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe		
195	200	205
Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln		
210	215	220
Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr		
225	230	235
Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg		
245	250	255
Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu		
260	265	270
Arg Trp Lys		
275		
<210> 39		
<211> 341		
<212> PRT		
<213> 人(homo sapiens)		
<400> 39		
Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly		
1	5	10
Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln		

Thr Ala Cys Lys Val
 340
 <210> 40
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 人(homo sapiens)
 <400> 40
 Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
 1 5 10 15
 Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
 20 25 30
 Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
 35 40 45
 Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr
 50 55 60
 Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr
 65 70 75 80
 Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
 85 90 95
 Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
 100 105 110
 Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
 115 120 125
 Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys
 130 135 140
 His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
 165 170 175
 Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
 180 185 190
 Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
 195 200 205
 Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
 210 215 220
 Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
 225 230 235 240
 Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
 245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
 260 265 270
 Arg Trp Glu
 275
 <210> 41
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (mus musculus)
 <400> 41
 Gly Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly
 1 5 10 15
 Leu Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
 20 25 30
 Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro Arg
 35 40 45
 Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr
 50 55 60
 Gln Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg Thr
 65 70 75 80
 Ala Gln Arg Cys Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe Gln
 85 90 95
 Arg Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg Gly
 100 105 110
 Tyr Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu
 115 120 125
 Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Arg
 130 135 140
 Arg Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Asn
 165 170 175
 Glu Thr Leu Leu Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr Tyr His
 180 185 190
 Pro Arg Ser Gln Val Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
 195 200 205
 Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu
 210 215 220
 Thr Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
 225 230 235 240

210	215	220
Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln Trp		
225	230	235
Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr		240
	245	250
Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu Asp		255
	260	265
Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys Arg		270
	275	280
Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu		285
	290	300
Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu		305
	310	315
Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro		320
	325	330
Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr		335
	340	345
Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr		350
	355	360
Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe		365
	370	375
Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr		380
	385	390
Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg		395
	405	410
Trp Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp		415
	420	425
		430
His Glu His His His His His His		
	435	440
<210> 44		
<211> 441		
<212> PRT		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 例示性的经过修饰的人HLA-G 2M MHC I类复合物(其中 HLA-G特异性氨基酸已经用HLA-A共有氨基酸替换 (=去嫁接HLA-G)		
<400> 44		
Arg Ile Ile Pro Arg His Leu Gln Leu Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly		

1	5	10	15														
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ile	Gln	Arg	Thr	Pro	Lys	Ile	Gln		
	20							25					30				
Val	Tyr	Ser	Arg	His	Pro	Ala	Glu	Asn	Gly	Lys	Ser	Asn	Phe	Leu	Asn		
	35							40					45				
Cys	Tyr	Val	Ser	Gly	Phe	His	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Val	Asp	Leu	Leu		
	50							55					60				
Lys	Asn	Gly	Glu	Arg	Ile	Glu	Lys	Val	Glu	His	Ser	Asp	Leu	Ser	Phe		
65								70					75				80
Ser	Lys	Asp	Trp	Ser	Phe	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Thr	Glu	Phe	Thr	Pro		
								85									95
Thr	Glu	Lys	Asp	Glu	Tyr	Ala	Cys	Arg	Val	Asn	His	Val	Thr	Leu	Ser		
								100									110
Gln	Pro	Lys	Ile	Val	Lys	Trp	Asp	Arg	Asp	Met	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
								115									125
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly		
								130									140
Ser	His	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	Arg		
145								150									160
Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Met	Gly	Tyr	Val	Asp	Asp	Thr	Gln	Phe		
								165									175
Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Arg	Met	Glu	Pro	Arg	Ala		
								180									190
Pro	Trp	Val	Glu	Gln	Glu	Gly	Pro	Glu	Tyr	Trp	Asp	Glu	Glu	Thr	Arg		
								195									205
Asn	Thr	Lys	Ala	His	Ala	Gln	Thr	Asp	Arg	Val	Asn	Leu	Gly	Thr	Leu		
								210									220
Arg	Gly	Cys	Tyr	Asn	Gln	Ser	Glu	Ala	Gly	Ser	His	Thr	Leu	Gln	Trp		
225								230									240
Met	Ile	Gly	Cys	Asp	Val	Gly	Ser	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Gly	Tyr		
								245									255
Glu	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Gly	Lys	Asp	Tyr	Leu	Ala	Leu	Asn	Glu	Asp		
								260									270
Leu	Arg	Ser	Trp	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala	Gln	Ile	Ser	Lys	Arg		
								275									285
Lys	Cys	Glu	Ala	Ala	His	Val	Ala	Glu	Gln	Arg	Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu		
								290									300
Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Trp	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu		
305								310									320

Thr Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro
 325 330 335
 Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
 340 345 350
 Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr
 355 360 365
 Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
 370 375 380
 Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr
 385 390 395 400
 Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg
 405 410 415
 Trp Lys Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
 420 425 430
 Trp His Glu His His His His His His
 435 440
 <210> 45
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (mus musculus)
 <400> 45
 Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln
 20 25 30
 Val Tyr Ser Arg His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Ile Leu Asn
 35 40 45
 Cys Tyr Val Thr Gln Phe His Pro Pro His Ile Glu Ile Gln Met Leu
 50 55 60
 Lys Asn Gly Lys Lys Ile Pro Lys Val Glu Met Ser Asp Met Ser Phe
 65 70 75 80
 Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro
 85 90 95
 Thr Glu Thr Asp Thr Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Asp Ser Met Ala
 100 105 110
 Glu Pro Lys Thr Val Tyr Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Leu
 145 150 155 160
 Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe
 165 170 175
 Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro Arg Ala
 180 185 190
 Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr Gln
 195 200 205
 Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg Thr Ala
 210 215 220
 Gln Arg Cys Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe Gln Arg
 225 230 235 240
 Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg Gly Tyr
 245 250 255
 Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp
 260 265 270
 Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Arg Arg
 275 280 285
 Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu Glu
 290 295 300
 Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Asn Glu
 305 310 315 320
 Thr Leu Leu Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr Tyr His Pro
 325 330 335
 Arg Ser Gln Val Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
 340 345 350
 Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr
 355 360 365
 Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
 370 375 380
 Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn Tyr
 385 390 395 400
 Thr Cys His Val His His Lys Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg
 405 410 415
 Trp Lys Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
 420 425 430
 Trp His Glu His His His His His His
 435 440

<210> 46

Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp
 260 265 270
 Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Lys Arg
 275 280 285
 Lys Trp Glu Ala Ala Asn Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu Glu
 290 295 300
 Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Met Leu Gln Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr His His Pro
 325 330 335
 Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
 340 345 350
 Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr
 355 360 365
 Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
 370 375 380
 Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Lys Glu Gln Asn Tyr
 385 390 395 400
 Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg
 405 410 415
 Trp Lys Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
 420 425 430
 Trp His Glu His His His His His His
 435 440
 <210> 47
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> 大鼠
 <400> 47
 Ala Gln Phe Ser Ala Ser Ala Ser Arg Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln
 20 25 30
 Val Tyr Ser Arg His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Phe Leu Asn
 35 40 45
 Cys Tyr Val Ser Gln Phe His Pro Pro Gln Ile Glu Ile Glu Leu Leu
 50 55 60
 Lys Asn Gly Lys Lys Ile Pro Asn Ile Glu Met Ser Asp Leu Ser Phe
 65 70 75 80

Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro
 85 90 95
 Thr Glu Thr Asp Val Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Val Thr Leu Lys
 100 105 110
 Glu Pro Lys Thr Val Thr Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Ser His Ser Leu Arg Tyr Phe Tyr Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Leu
 145 150 155 160
 Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Glu Phe
 165 170 175
 Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Glu Asn Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala
 180 185 190
 Arg Trp Met Glu Arg Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Gln Gln Thr Arg
 195 200 205
 Ile Ala Lys Glu Trp Glu Gln Ile Tyr Arg Val Asp Leu Arg Thr Leu
 210 215 220
 Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Gly Gly Ser His Thr Ile Gln Glu
 225 230 235 240
 Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Ser Leu Leu Arg Gly Tyr
 245 250 255
 Arg Gln Asp Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp
 260 265 270
 Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Phe Ala Ala Gln Ile Thr Arg Asn
 275 280 285
 Lys Trp Glu Arg Ala Arg Tyr Ala Glu Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Glu
 290 295 300
 Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Ser Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Thr Leu Leu Arg Ser Asp Pro Pro Glu Ala His Val Thr Leu His Pro
 325 330 335
 Arg Pro Glu Gly Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
 340 345 350
 Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr
 355 360 365
 Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
 370 375 380
 Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn Tyr

385		390		395		400									
Thr	Cys	Arg	Val	Glu	His	Glu	Gly	Leu	Pro	Lys	Pro	Leu	Ser	Gln	Arg
				405				410						415	
Trp	Gly	Ser	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Glu	Trp
				420				425						430	
His	Glu	His	His	His	His	His	His								
				435				440							
<210>	48														
<211>	440														
<212>	PRT														
<213>	人工的														
<220>															
<223>	例示性的人HLA-G/大鼠 RT1A 2M MHC I类复合物,其中 将人HLA-G特异性的位置嫁接到大鼠RT1A框架上														
<400>	48														
Ala	Gln	Phe	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Arg	Gly	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ile	Gln	Lys	Thr	Pro	Gln	Ile	Gln
				20				25					30		
Val	Tyr	Ser	Arg	His	Pro	Pro	Glu	Asn	Gly	Lys	Pro	Asn	Phe	Leu	Asn
				35				40					45		
Cys	Tyr	Val	Ser	Gln	Phe	His	Pro	Pro	Gln	Ile	Glu	Ile	Glu	Leu	Leu
				50			55						60		
Lys	Asn	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Asn	Ile	Glu	Met	Ser	Asp	Leu	Ser	Phe
65					70					75				80	
Ser	Lys	Asp	Trp	Ser	Phe	Tyr	Ile	Leu	Ala	His	Thr	Glu	Phe	Thr	Pro
					85					90				95	
Thr	Glu	Thr	Asp	Val	Tyr	Ala	Cys	Arg	Val	Lys	His	Val	Thr	Leu	Lys
				100				105						110	
Glu	Pro	Lys	Thr	Val	Thr	Trp	Asp	Arg	Asp	Met	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
				115				120						125	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
				130				135						140	
Ser	His	Ser	Leu	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ala	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	Leu
145					150					155					160
Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Val	Gly	Tyr	Val	Asp	Asp	Thr	Glu	Phe
					165					170				175	
Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Pro	Arg	Met	Glu	Pro	Arg	Ala
				180						185				190	

Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Gln Gln Thr Arg
 195 200 205
 Ile Ala Lys Glu Trp Glu Gln Ile Tyr Arg Met Asp Leu Gln Thr Leu
 210 215 220
 Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Ile Gln Glu
 225 230 235 240
 Met Tyr Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr
 245 250 255
 Arg Gln Asp Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp
 260 265 270
 Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Phe Ala Ala Gln Ile Thr Lys Arg
 275 280 285
 Lys Trp Glu Ala Ala Asn Tyr Ala Glu Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Glu
 290 295 300
 Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Glu Ala His Val Thr His His Pro
 325 330 335
 Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
 340 345 350
 Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr
 355 360 365
 Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
 370 375 380
 Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Ser Gly Lys Glu Gln Asn Tyr
 385 390 395 400
 Thr Cys Arg Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Met Leu Arg
 405 410 415
 Trp Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
 420 425 430
 His Glu His His His His His His
 435 440

<210> 49

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 接头和his标签

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp
 1 5 10 15
 Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu His His His His His
 20 25 30

His

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 肽

<400> 50

Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala
 1 5

<210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> 人(homo sapiens)

<400> 51

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> 52

<211> 105

<212> PRT

<213> 人(homo sapiens)

<400> 52

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

1	5	10	15
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe			
	20	25	30
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val			
	35	40	45
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys			
	50	55	60
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser			
65	70	75	80
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu			
	85	90	95
Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
	100	105	
<210> 53			
<211> 328			
<212> PRT			
<213> 人(homo sapiens)			
<400> 53			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
	115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			

	165		170		175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu					
	180		185		190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn					
	195		200		205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly					
	210		215		220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu					
225		230		235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr					
	245		250		255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn					
	260		265		270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe					
	275		280		285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn					
	290		295		300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr					
305		310		315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro					
	325				
<210> 54					
<211> 328					
<212> PRT					
<213> 人(homo sapiens)					
<400> 54					
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys					
1	5		10		15
Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr					
65		70		75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys					
	85		90		95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys					

	100		105		110										
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
	115		120		125										
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130		135		140										
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145			150		155										
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165		170										
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180		185										
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195		200										
Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			210		215										
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225			230		235										
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245		250										
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260		265										
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
			275		280										
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
			290		295										
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305			310		315										
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro								
			325												

<210> 55

<211> 325

<212> PRT

<213> 人(homo sapiens)

<400> 55

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1			5		10										
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20		25										
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
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 Ser Cys Pro Ala Pro		
100	105	110
Glu Phe Leu 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
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
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
Leu Ser Leu Ser Leu		
325		

<210> 56

<211> 5

<212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 重链HVR-H1, CH2527
 <400> 56
 Thr Tyr Ala Met Asn
 1 5
 <210> 57
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 重链HVR-H2, CH2527
 <400> 57
 Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Asp
 <210> 58
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 重链HVR-H3, CH2527
 <400> 58
 His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 59
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 轻链HVR-L1, CH2527
 <400> 59
 Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 1 5 10
 <210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 轻链HVR-L2, CH2527
 <400> 60
 Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 1 5
 <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 轻链HVR-L3, CH2527
 <400> 61
 Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
 1 5
 <210> 62
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 重链可变域VH, CH2527
 <400> 62
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120
 <210> 63
 <211> 115

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链可变域VL, CH2527

<400> 63

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
 100 105 110
 Ser Thr Lys
 115

<210> 64

<211> 232

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 轻链1 P1AA1185

<400> 64

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

				85					90					95			
Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe		
				100					105					110			
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Val		
				115					120					125			
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys		
				130					135					140			
Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg		
145						150					155				160		
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn		
				165					170					175			
Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser		
				180					185					190			
Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys		
				195					200					205			
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr		
				210					215					220			
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
225							230										
<210>	65																
<211>	215																
<212>	PRT																
<213>	人工的																
<220>																	
<223>	轻链2	P1AA1185															
<400>	65																
Ala	Ile	Val	Leu	Asn	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Ile	Val	Ala	Ser	Gln	Gly		
1				5					10					15			
Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Ser	Asn		
				20					25					30			
His	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Pro	Lys	Phe	Val		
				35					40					45			
Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Gln	Arg	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser		
				50					55					60			
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu		
65						70				75				80			
Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Ser	Ser	Asn	Pro		
				85						90				95			
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala		

100	105	110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe	Pro Pro Ser Asp Arg Lys	Leu Lys Ser
115	120	125
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
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> 66		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 重链1 P1AA1185		
<400> 66		
Gln Val Lys Leu Met Gln Ser	Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro	Gly Thr
1	5	10
Ser Val Lys Met Ser Cys Asn	Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	Asp Tyr
20	25	30
Trp Val Ser Trp Val Lys Gln	Ser His Gly Lys Arg Leu Glu	Trp Val
35	40	45
Gly Glu Ile Ser Pro Asn Ser	Gly Ala Ser Asn Phe Asp Glu	Asn Phe
50	55	60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr	Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr	Ala Tyr
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr	Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr	Tyr Cys
85	90	95
Thr Arg Ser Ser His Gly Ser	Phe Arg Trp Phe Ala 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 Ser Ser	Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr	Ala Ala

130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
145	150	155
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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly		
225	230	235
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 His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 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
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys		
340	345	350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
355	360	365
Ser Cys Ala 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
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp		
405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln 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 Pro		
435	440	445

<210> 67
 <211> 673
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 重链2 P1AA1185
 <400> 67
 Gln Val Lys Leu Met Gln Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Asn Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Val Ser Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ala Ser Asn Phe Asp Glu Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Ser His Gly Ser Phe Arg Trp Phe Ala 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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Glu 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln
 225 230 235 240
 Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys
 245 250 255

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val
 260 265 270
 Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn
 275 280 285
 Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly
 290 295 300
 Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala
 305 310 315 320
 Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly
 325 330 335
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 340 345 350
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 355 360 365
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 370 375 380
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 385 390 395 400
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 405 410 415
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 420 425 430
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 435 440 445
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 450 455 460
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 465 470 475 480
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 485 490 495
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 500 505 510
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 515 520 525
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 530 535 540
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 545 550 555 560
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 69
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 轻链2 P1AA1185-104
 <400> 69
 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 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 His Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Thr Ser Gln Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Asn Pro
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser
 115 120 125
 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> 70
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 重链1 P1AA1185-104
 <400> 70
 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 Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ala Ser Asn Phe Asp Glu Asn Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Ser His Gly Ser Phe Arg Trp Phe Ala 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 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Glu 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr 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 His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 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 Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Ser Cys Ala 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 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln 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 Pro
 435 440 445

<210> 71

<211> 673

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重链2 P1AA1185-104

<400> 71

305	310	315	320
Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly			
	325	330	335
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser			
	340	345	350
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
	355	360	365
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
	370	375	380
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
385	390	395	400
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
	405	410	415
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
	420	425	430
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
	435	440	445
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly			
	450	455	460
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
465	470	475	480
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
	485	490	495
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
	500	505	510
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
	515	520	525
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
	530	535	540
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile			
545	550	555	560
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
	565	570	575
Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
	580	585	590
Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
	595	600	605
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
610	615	620	

	195		200		205
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr					
	210		215		220
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
225			230		
<210> 73					
<211> 220					
<212> PRT					
<213> 人工的					
<220>					
<223> 轻链2 P1AD992					
<400> 73					
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly					
1		5		10	15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser					
	20		25		30
Ser Asn Asn Lys Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Gln					
	35		40		45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val					
	50		55		60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr					
65		70		75	80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln					
	85		90		95
Tyr Tyr Arg Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile					
	100		105		110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp					
	115		120		125
Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn					
	130		135		140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu					
145		150		155	160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp					
	165		170		175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr					
	180		185		190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser					
	195		200		205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					

210	215	220
<210> 74		
<211> 449		
<212> PRT		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 重链1 P1AD992		
<400> 74		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Gln		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn		
	20	25
Arg Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu		
	35	40
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala		
	50	55
Val Ser Val Gln Gly Arg Ile Thr Leu Ile Pro Asp Thr Ser Lys Asn		
65	70	75
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val		
	85	90
Tyr Tyr Cys Ala Ser Val Arg Ala Val Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly		
	100	105
Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
	115	120
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
130	135	140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
145	150	155
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
	165	170
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
	180	185
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
	195	200
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
	210	215
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly		
225	230	235
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Val Ser Val Gln Gly Arg Ile Thr Leu Ile Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Arg Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Ser Val Arg Ala Val Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr
 225 230 235 240
 Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr
 245 250 255
 Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
 260 265 270
 Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr
 275 280 285
 Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile
 290 295 300
 Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu
 305 310 315 320
 Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly
 325 330 335
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 340 345 350
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

355	360	365
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
370	375	380
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
385	390	395
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
405	410	415
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
420	425	430
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
435	440	445
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala		
450	455	460
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
465	470	475
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
485	490	495
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
500	505	510
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
515	520	525
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
530	535	540
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro		
545	550	555
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
565	570	575
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
580	585	590
Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
595	600	605
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
610	615	620
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
625	630	635
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
645	650	655
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
660	665	670

Ser Pro
 <210> 76
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> 人(homo sapiens)
 <400> 76
 Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
 20 25 30
 Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45
 Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
 50 55 60
 Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
 65 70 75 80
 His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
 85 90 95
 Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
 100 105 110
 Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
 115 120 125
 Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
 130 135 140
 Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
 165 170 175
 Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
 180 185 190
 Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195 200 205

<210> 77
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴(Cynomolgus)
 <400> 77

Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr
 20 25 30
 Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45
 Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys
 50 55 60
 Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu
 65 70 75 80
 Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro
 85 90 95
 Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn
 100 105 110
 Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
 115 120 125
 Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
 130 135 140
 Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
 145 150 155 160
 Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
 165 170 175
 Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly
 180 185 190
 Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195

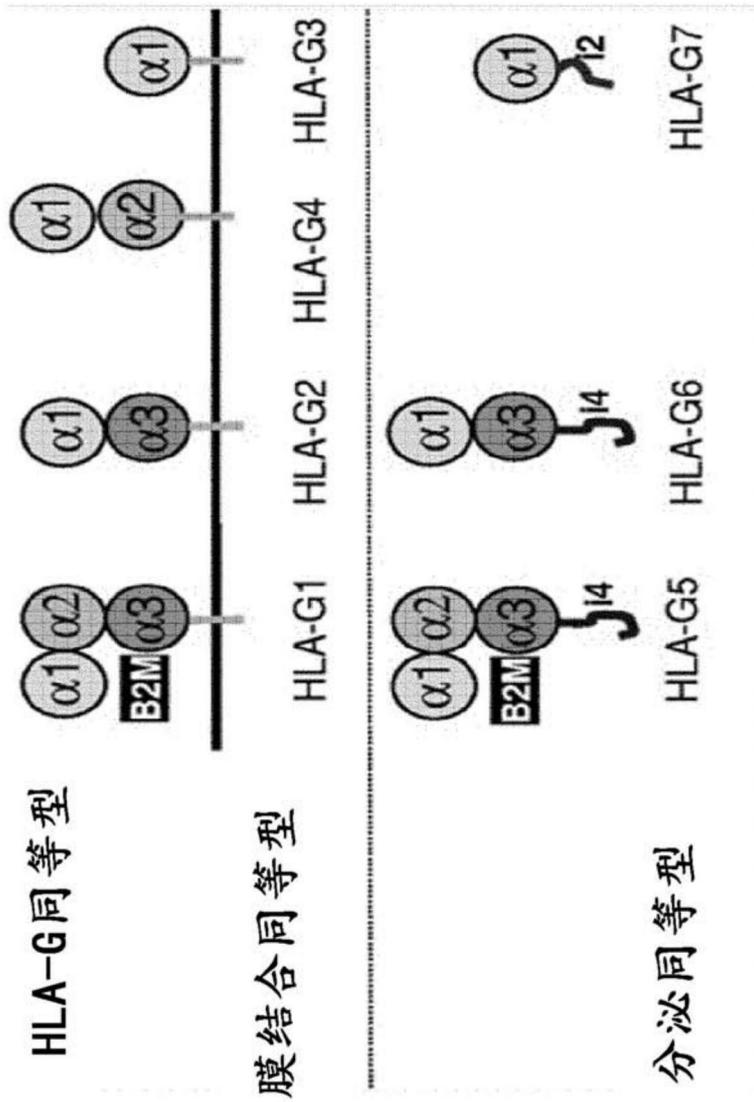


图1

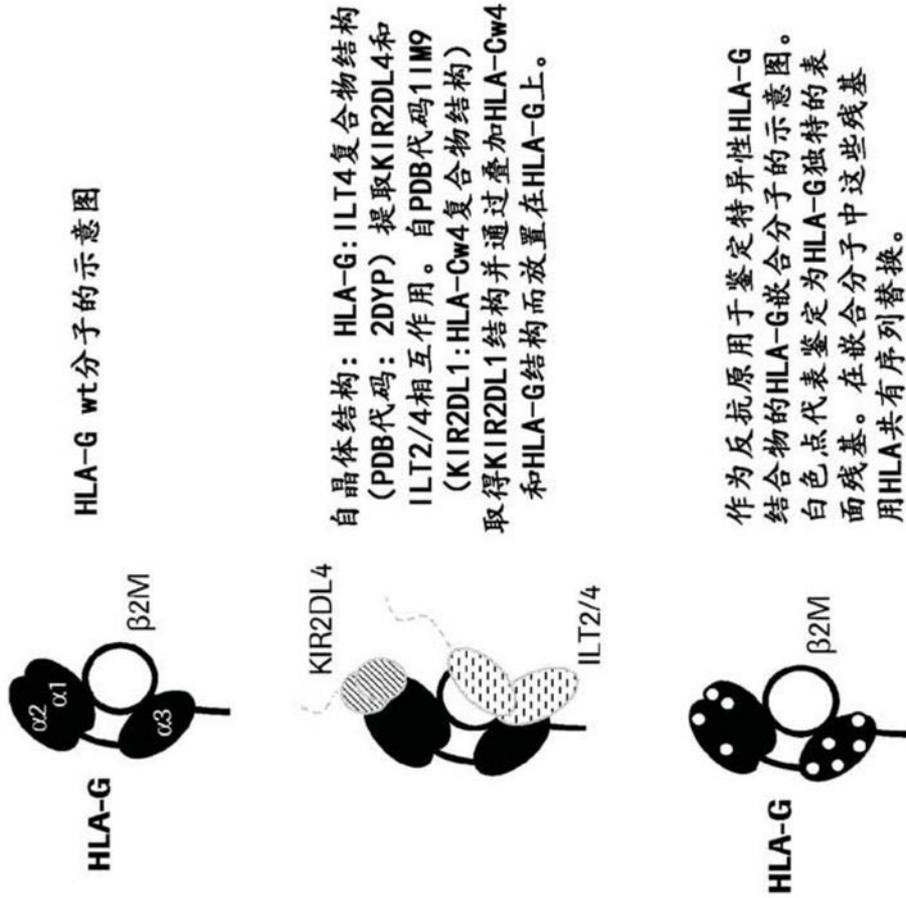


图2A

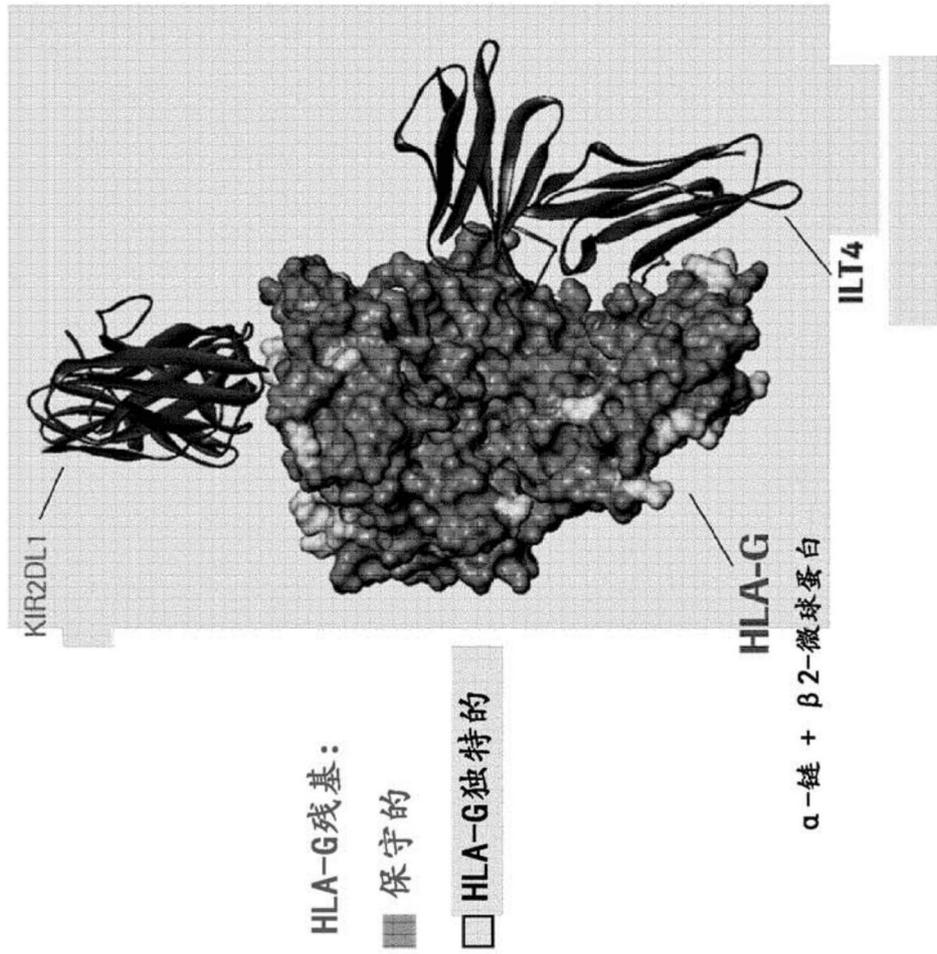


图2B

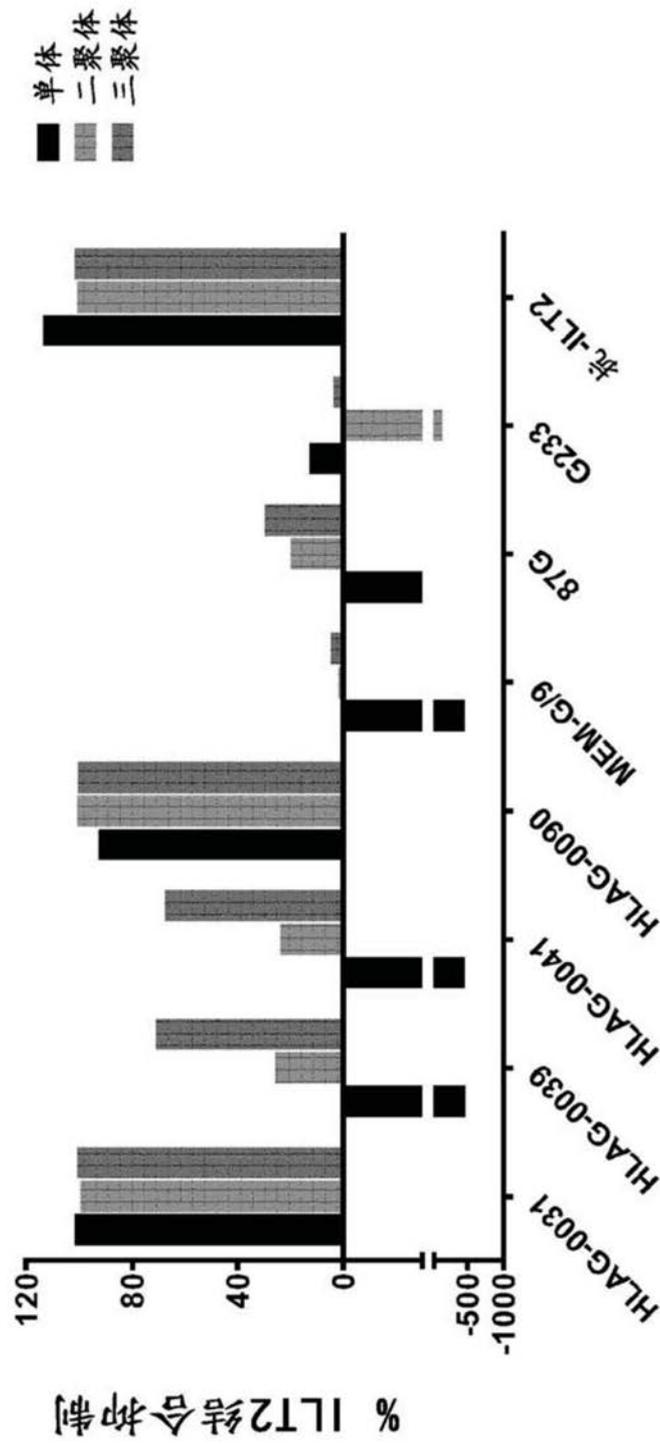


图3A

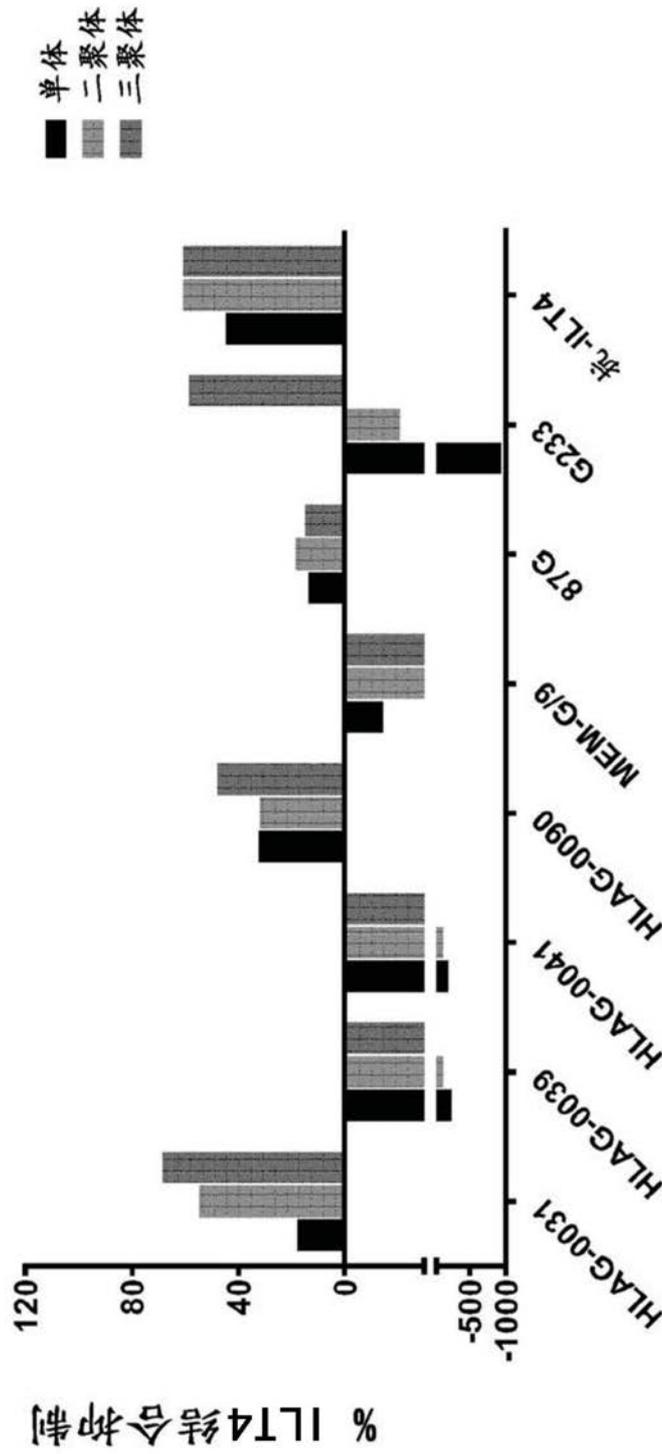


图3B

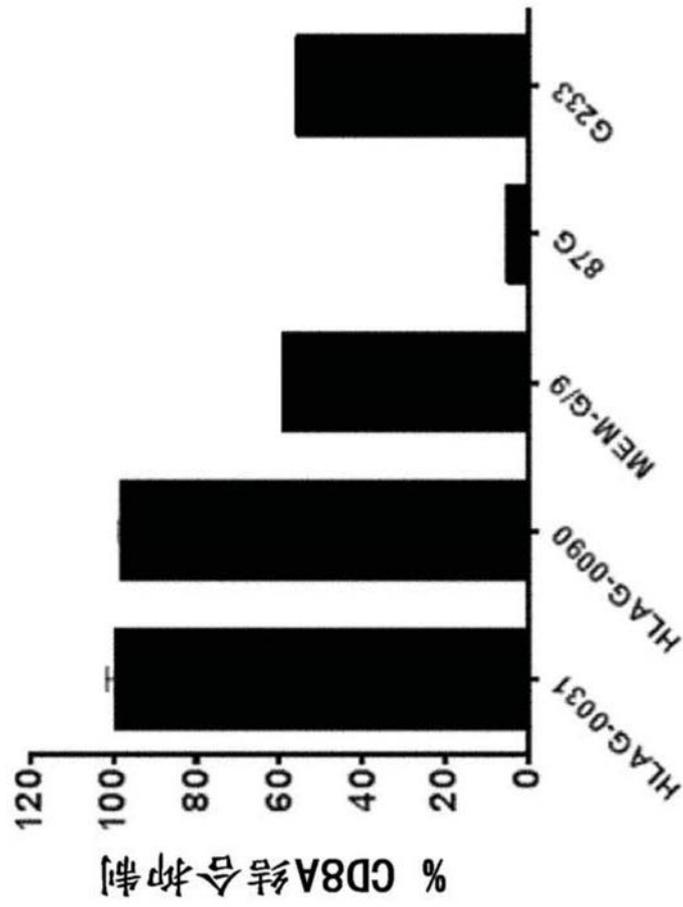


图3C

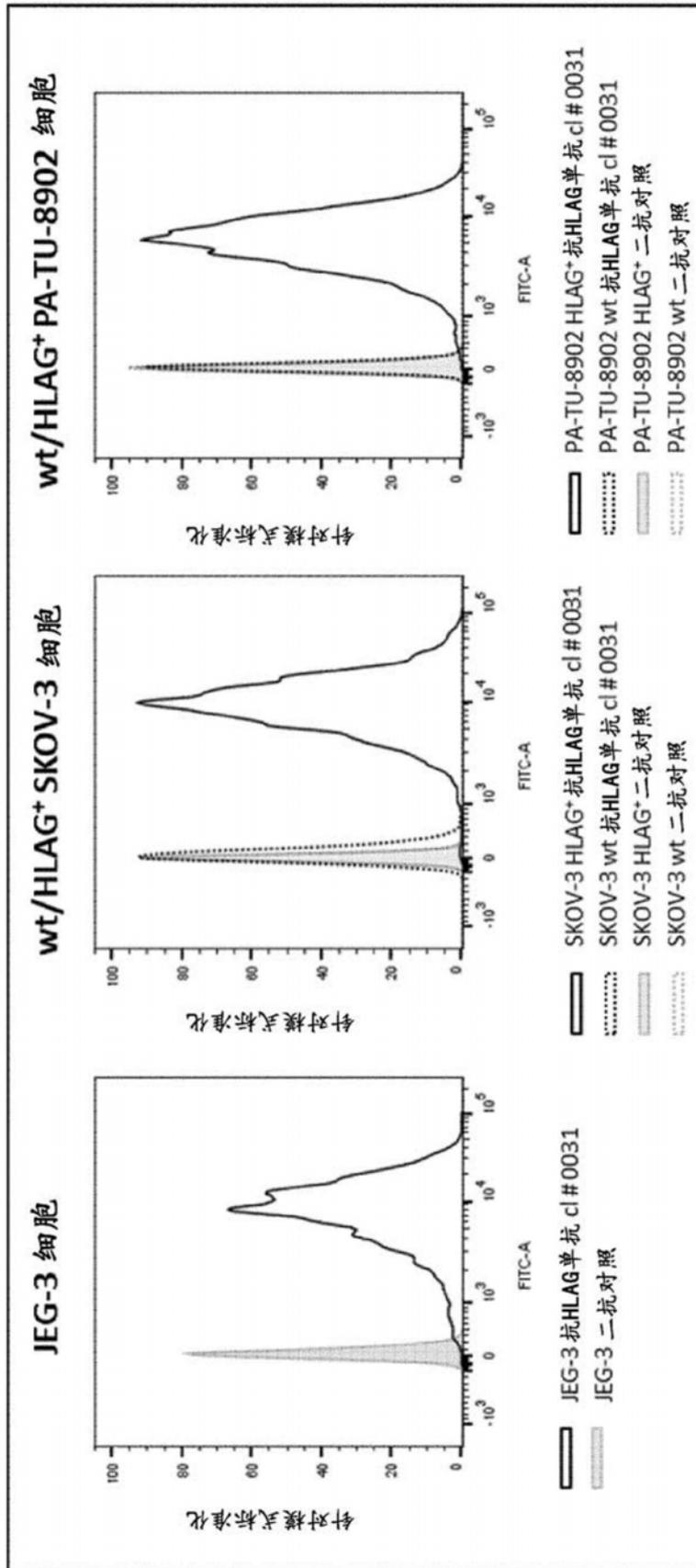


图4A

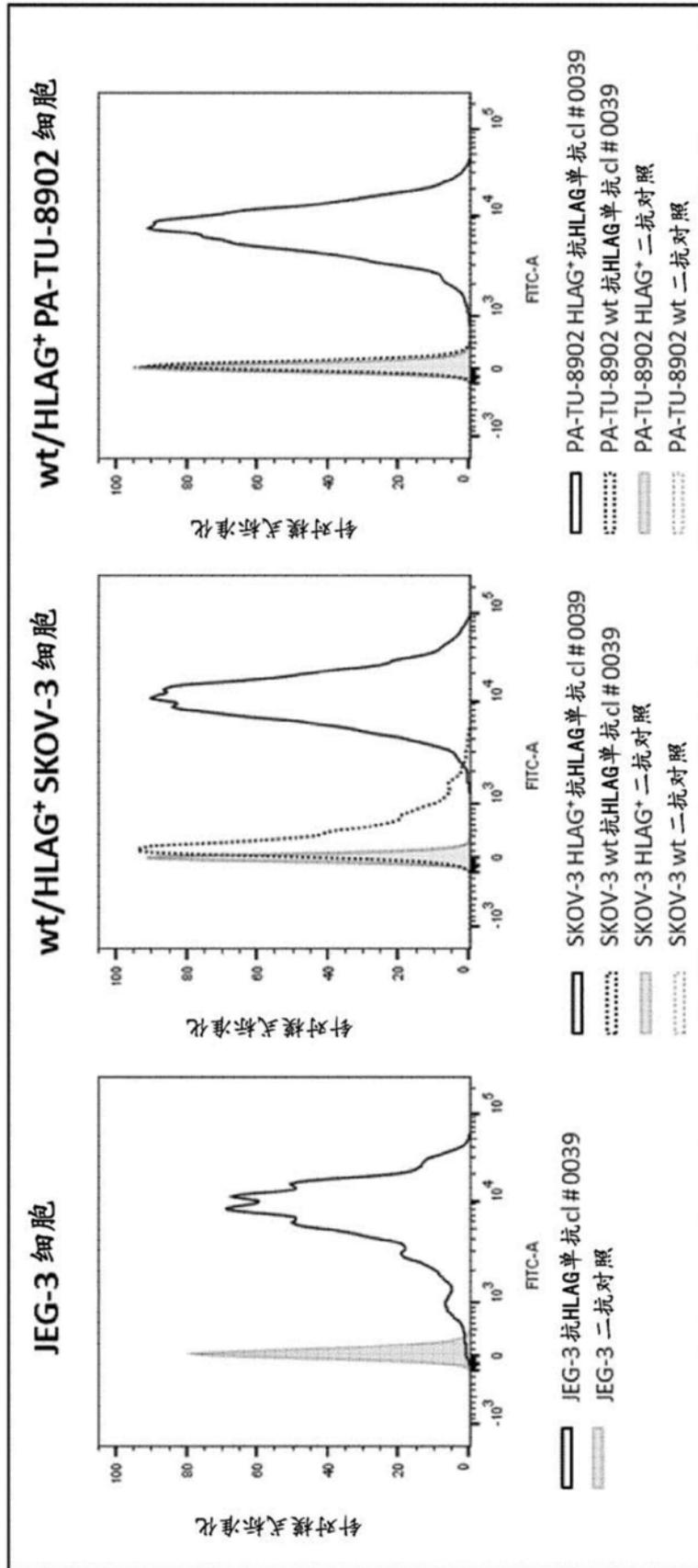


图4B

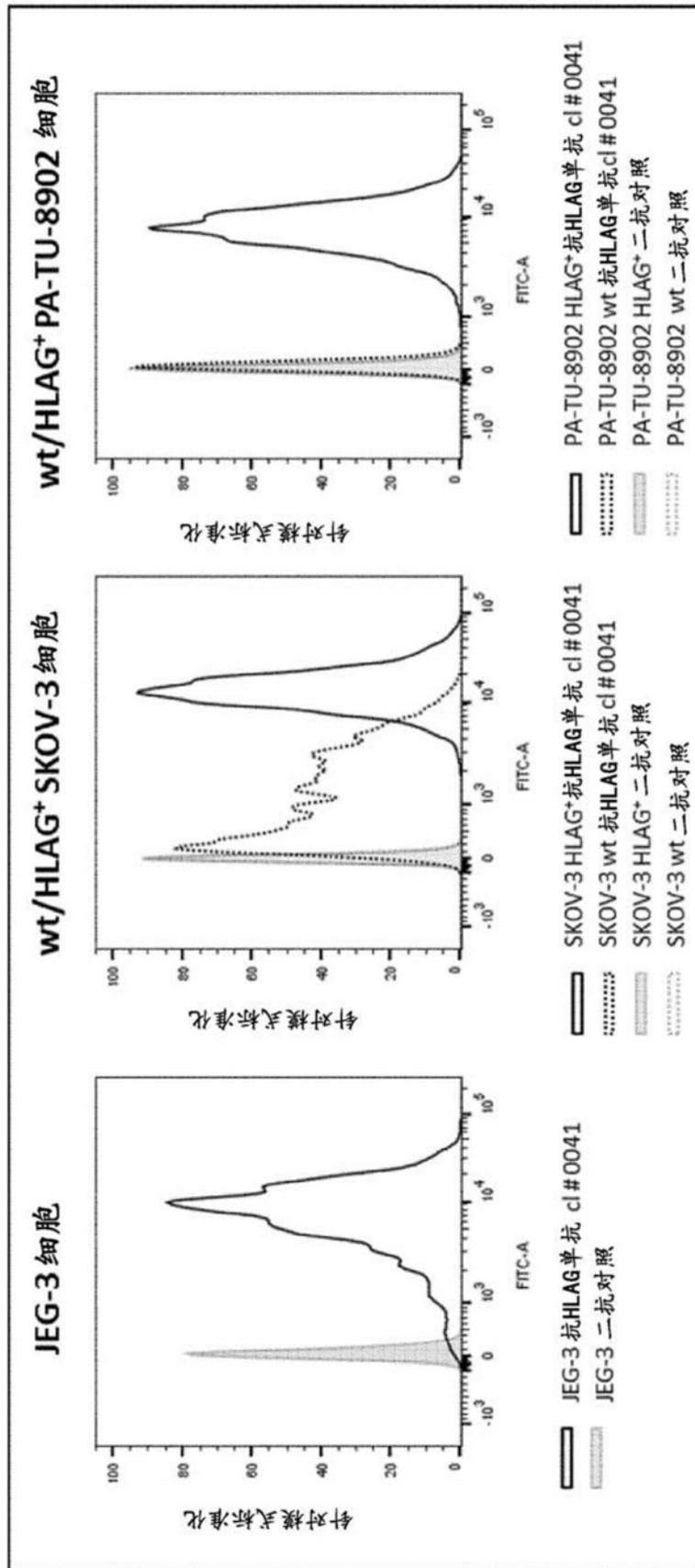


图4C

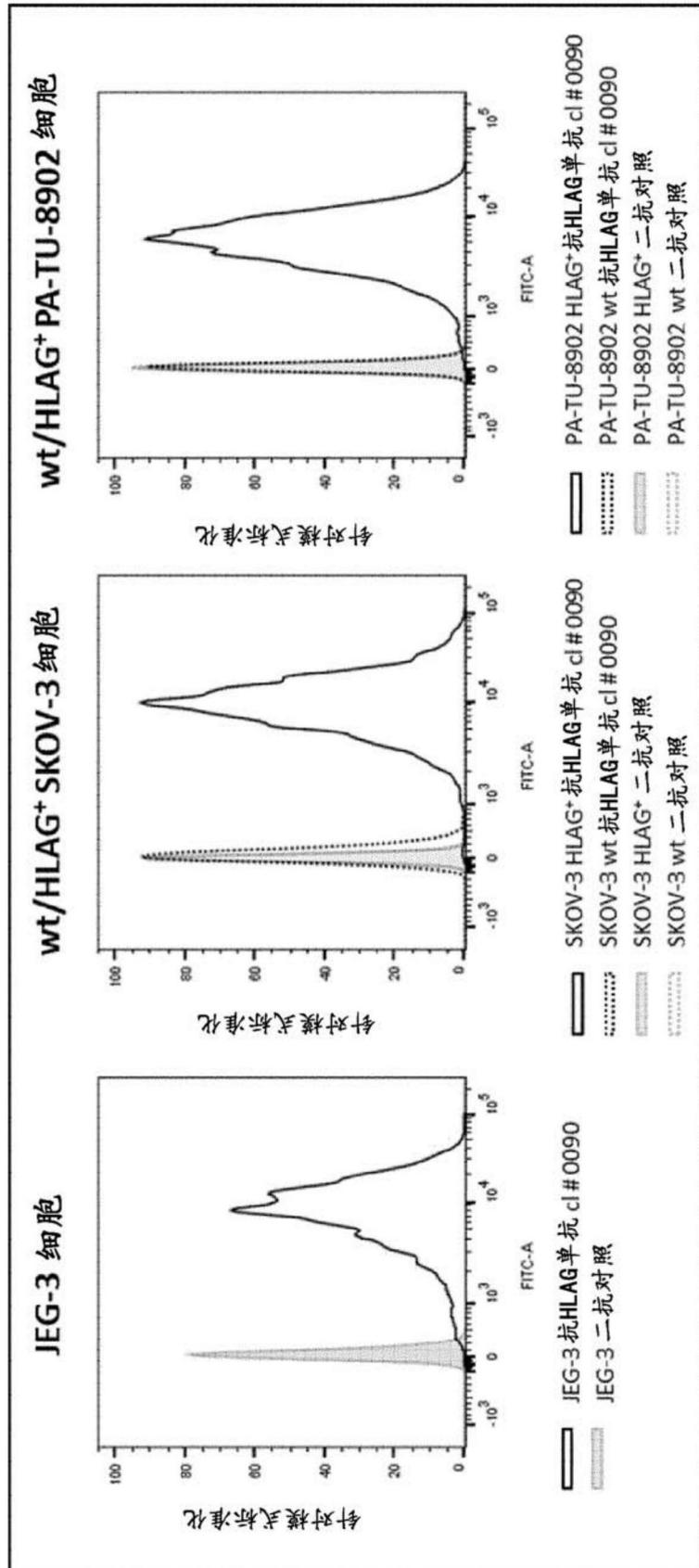


图4D

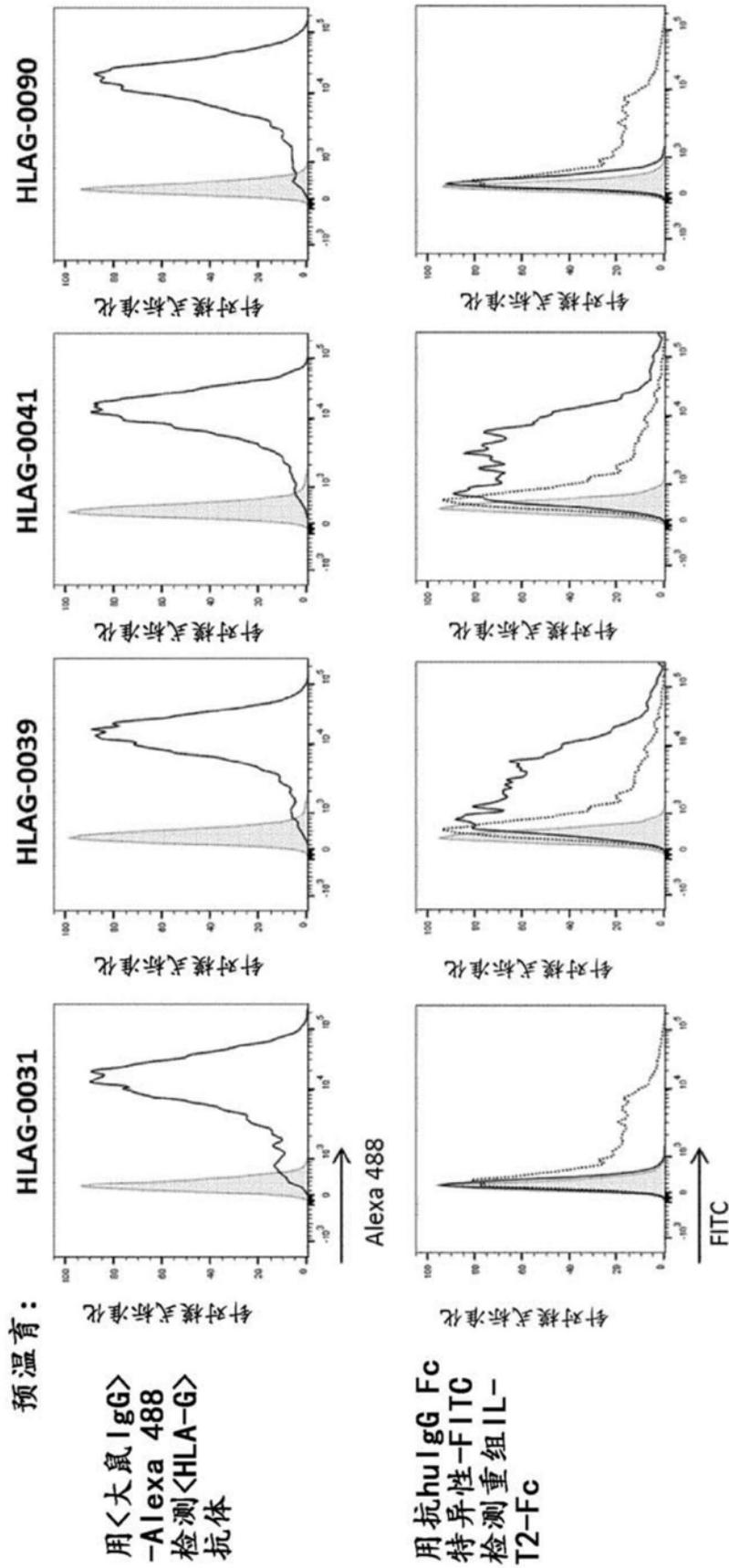


图5A

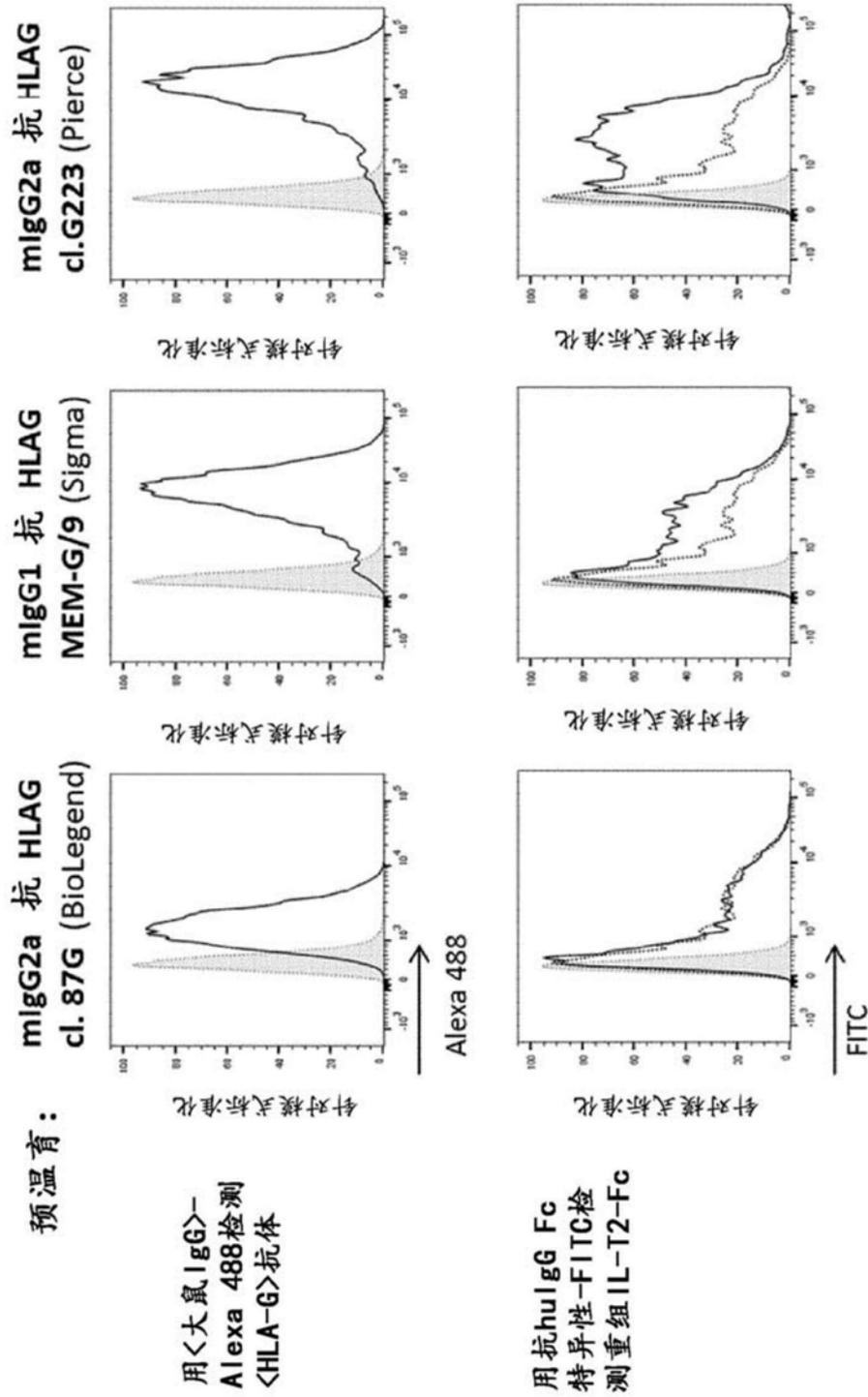


图5B

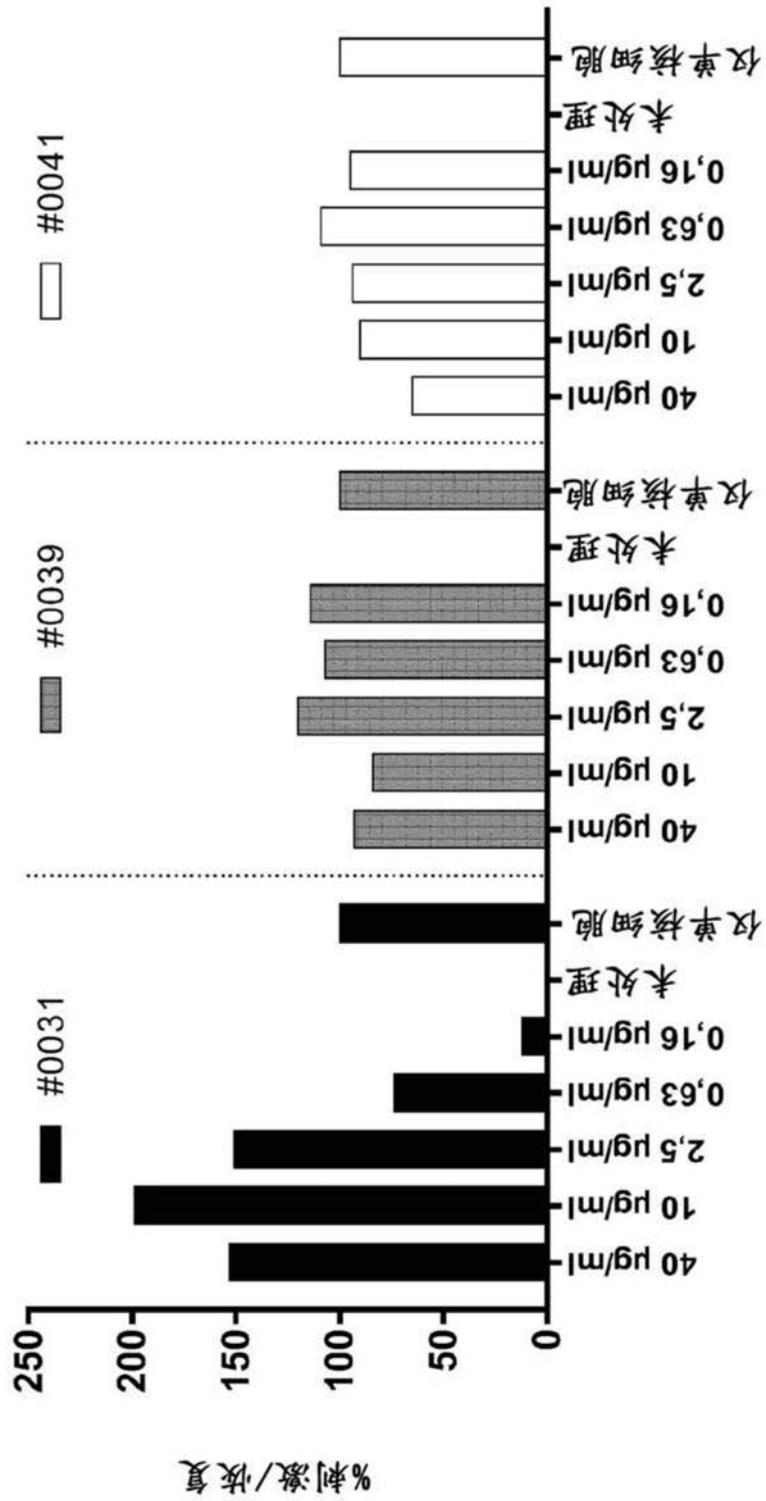


图6A

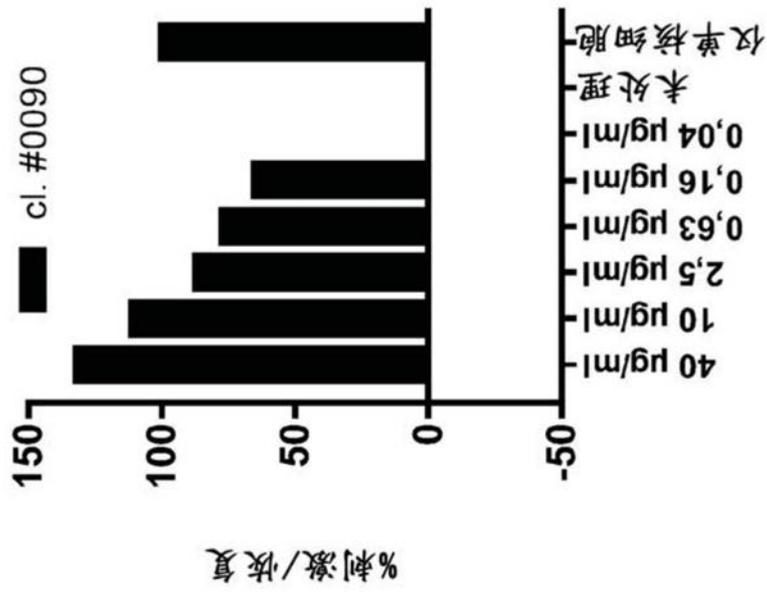


图6B

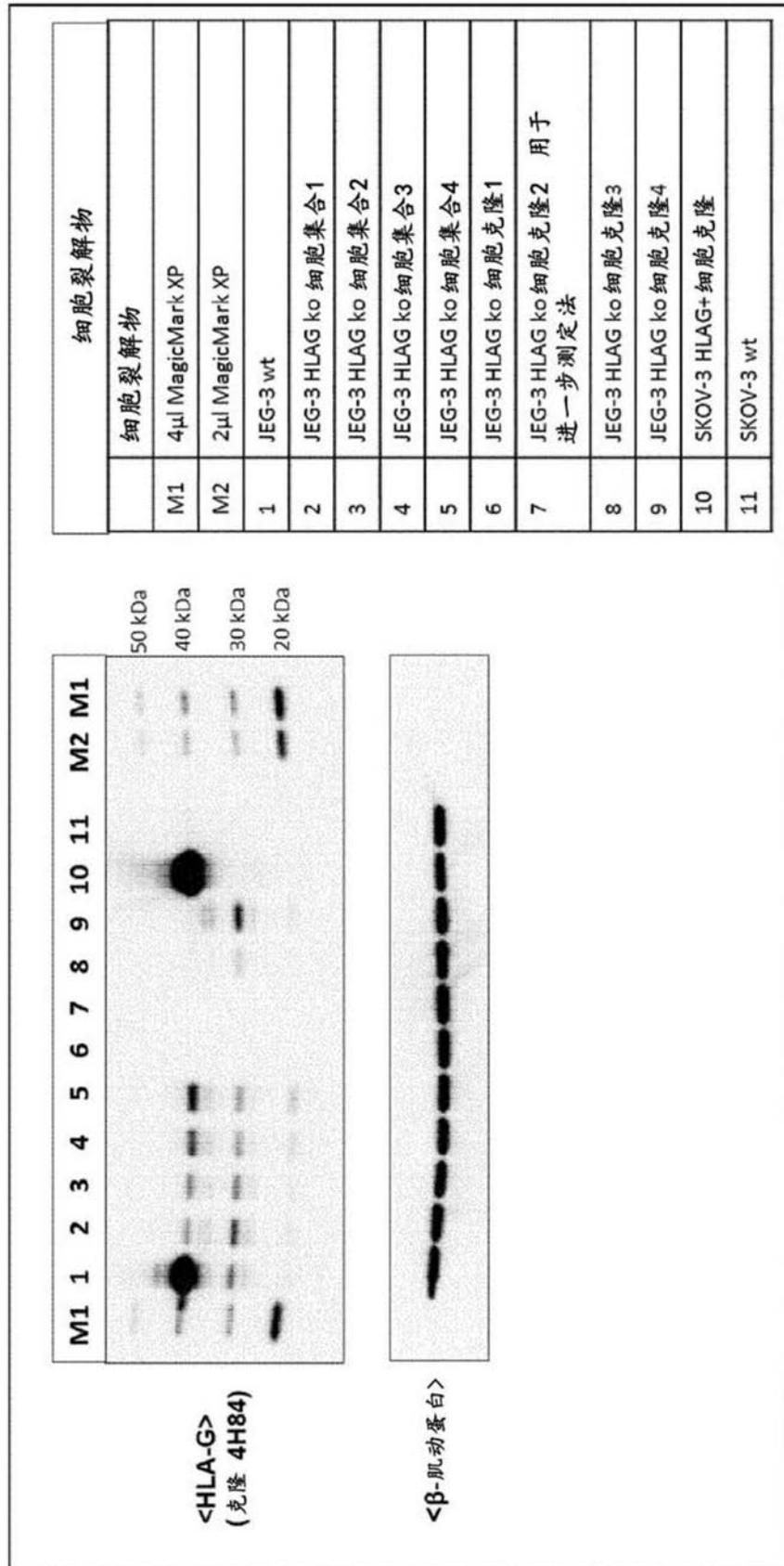


图6C

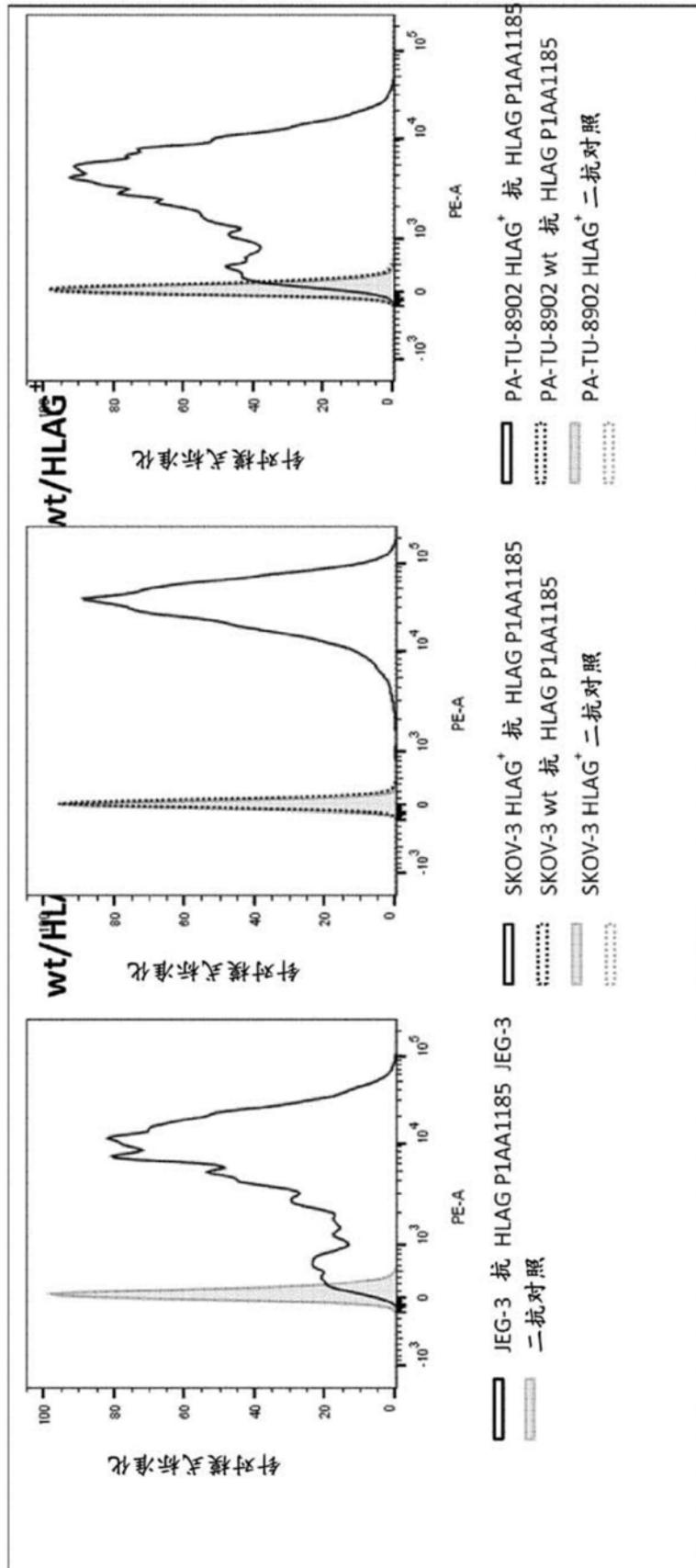


图7

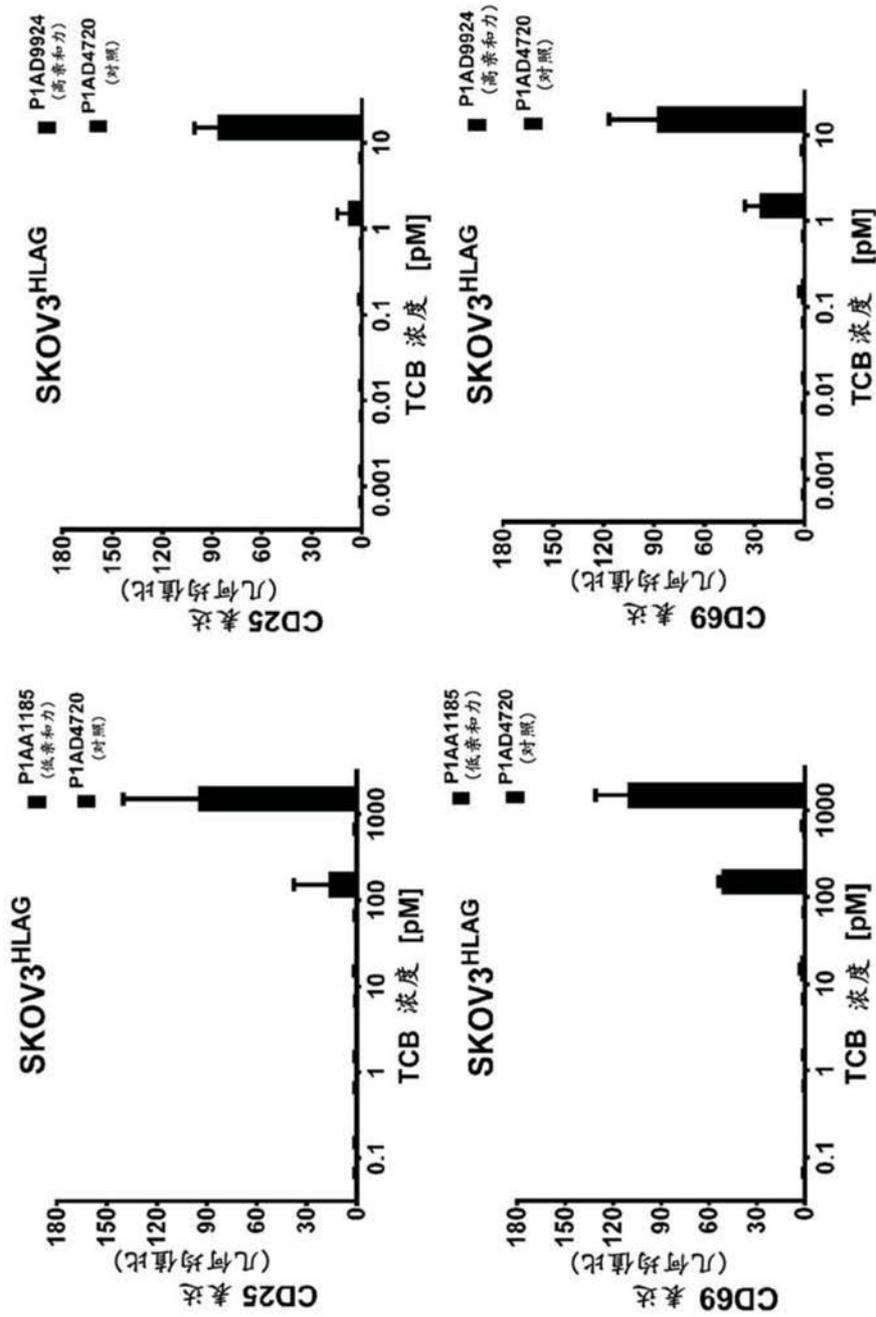


图8

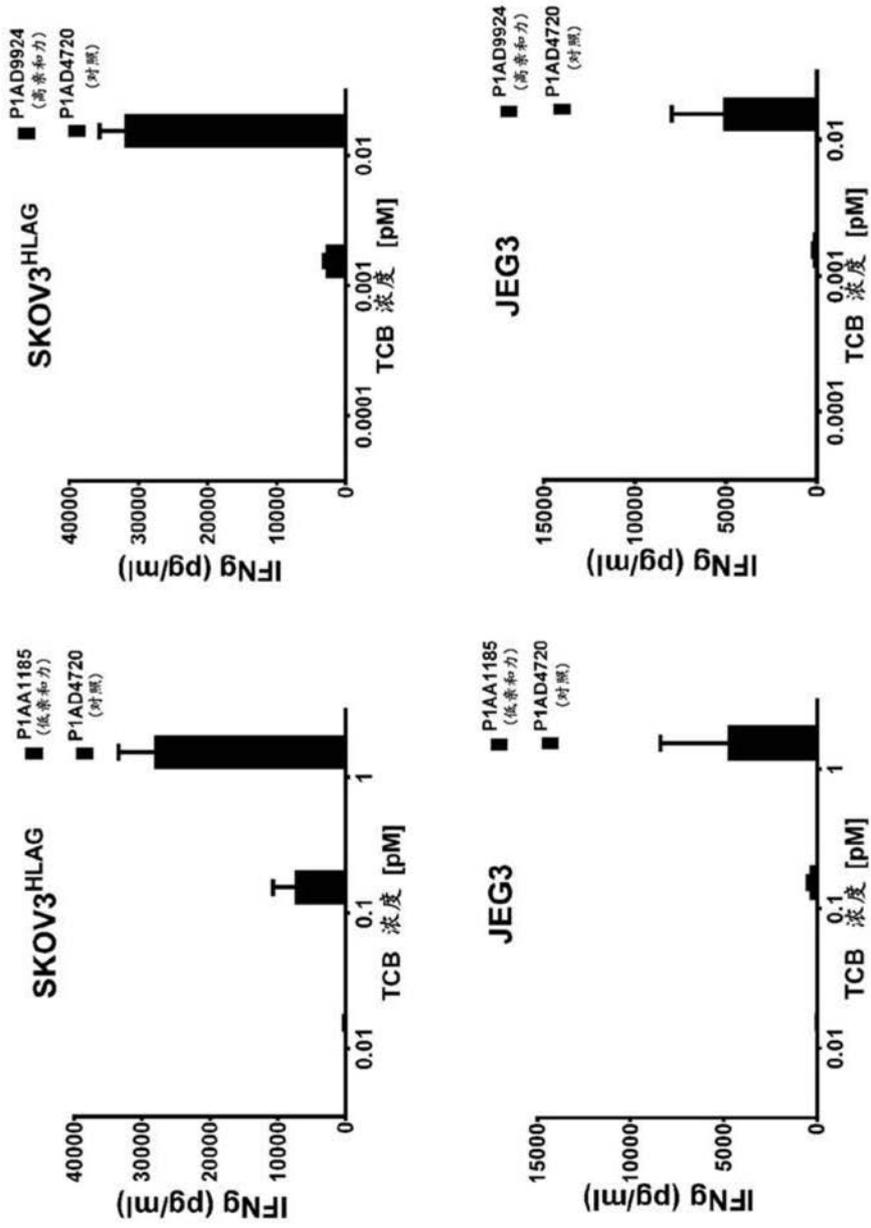


图9

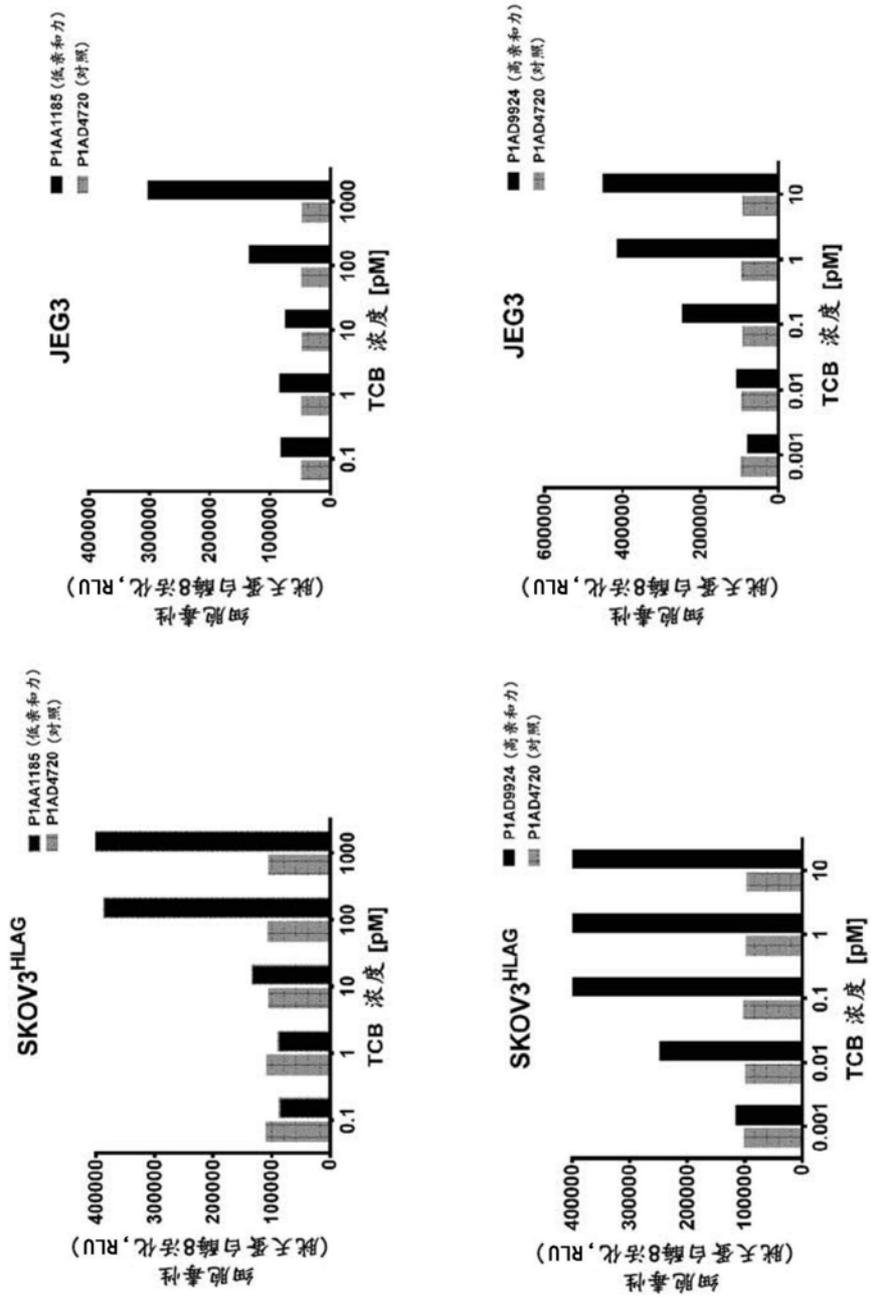


图10

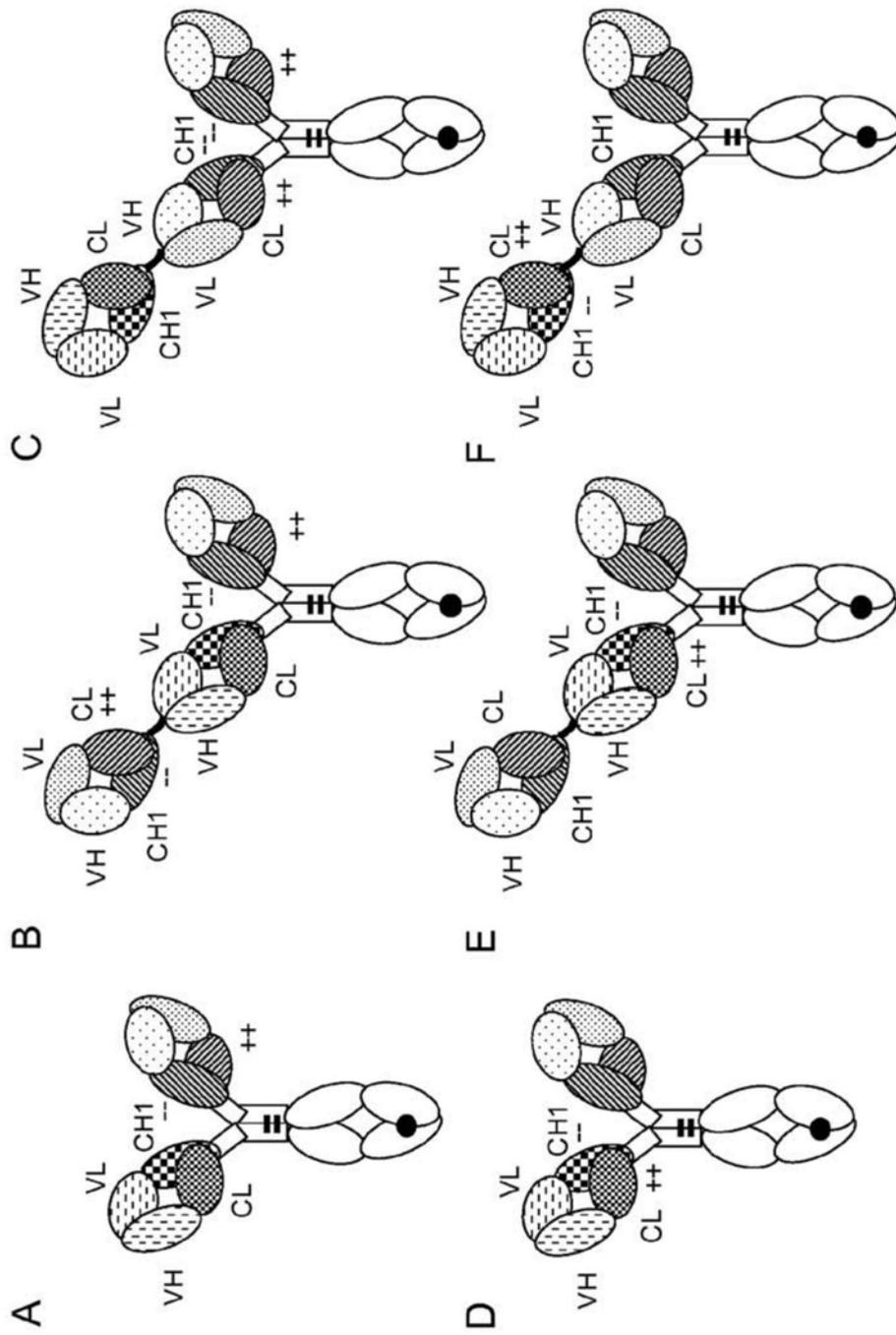


图11

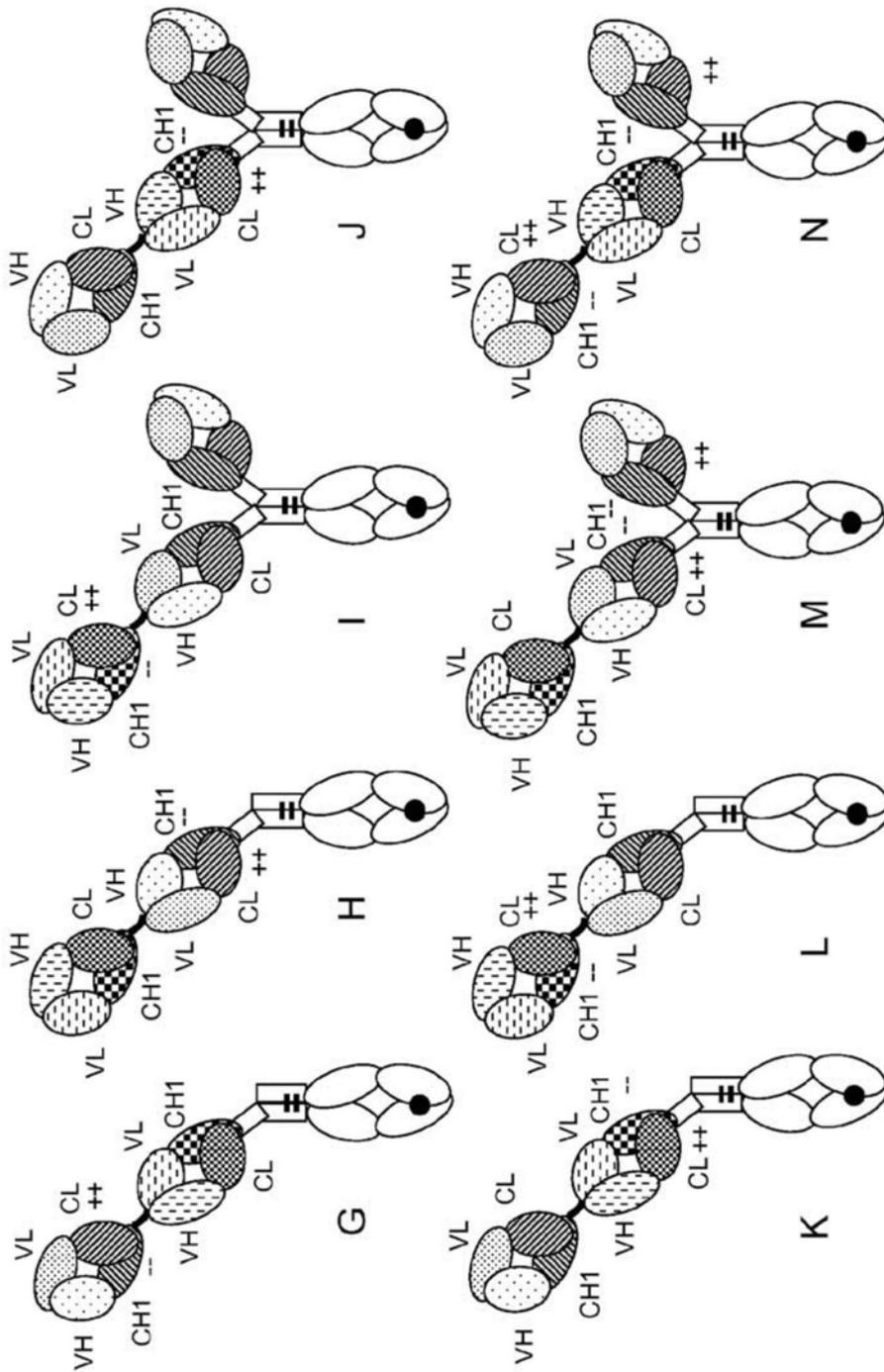


图11(续)

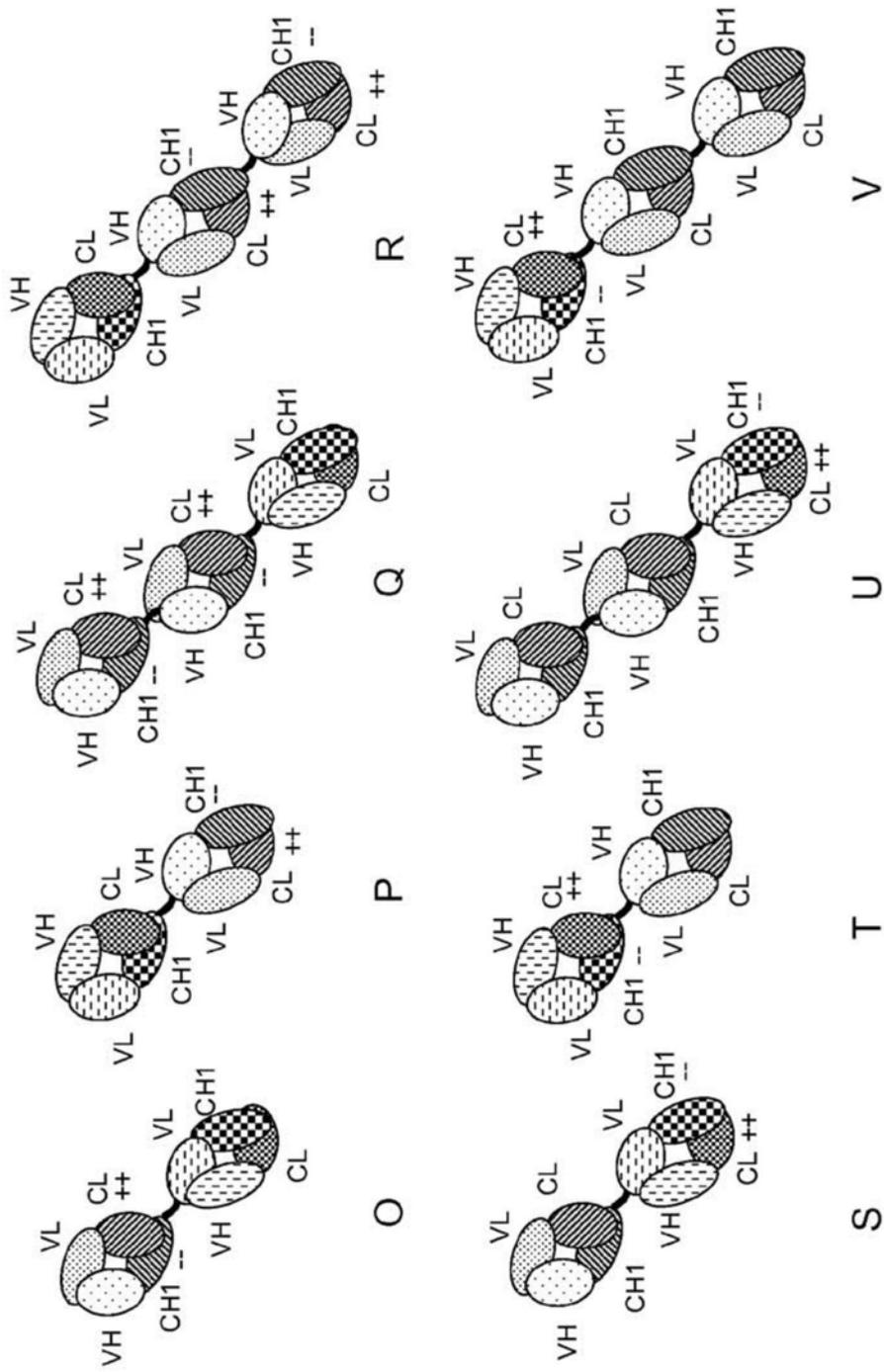


图11(续)

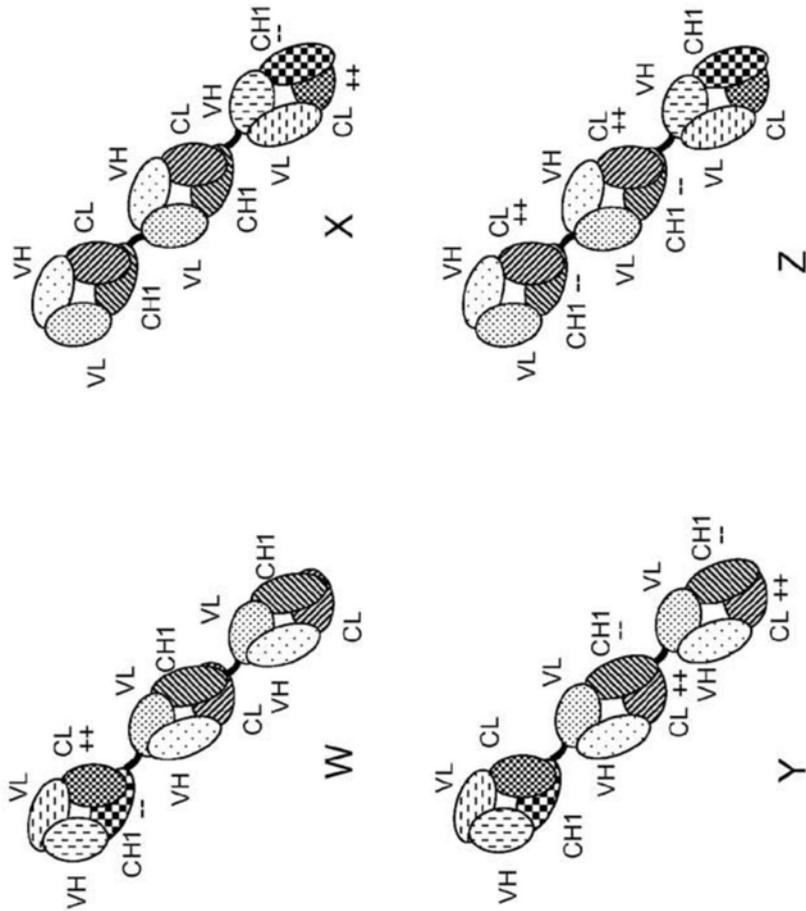


图11(续)

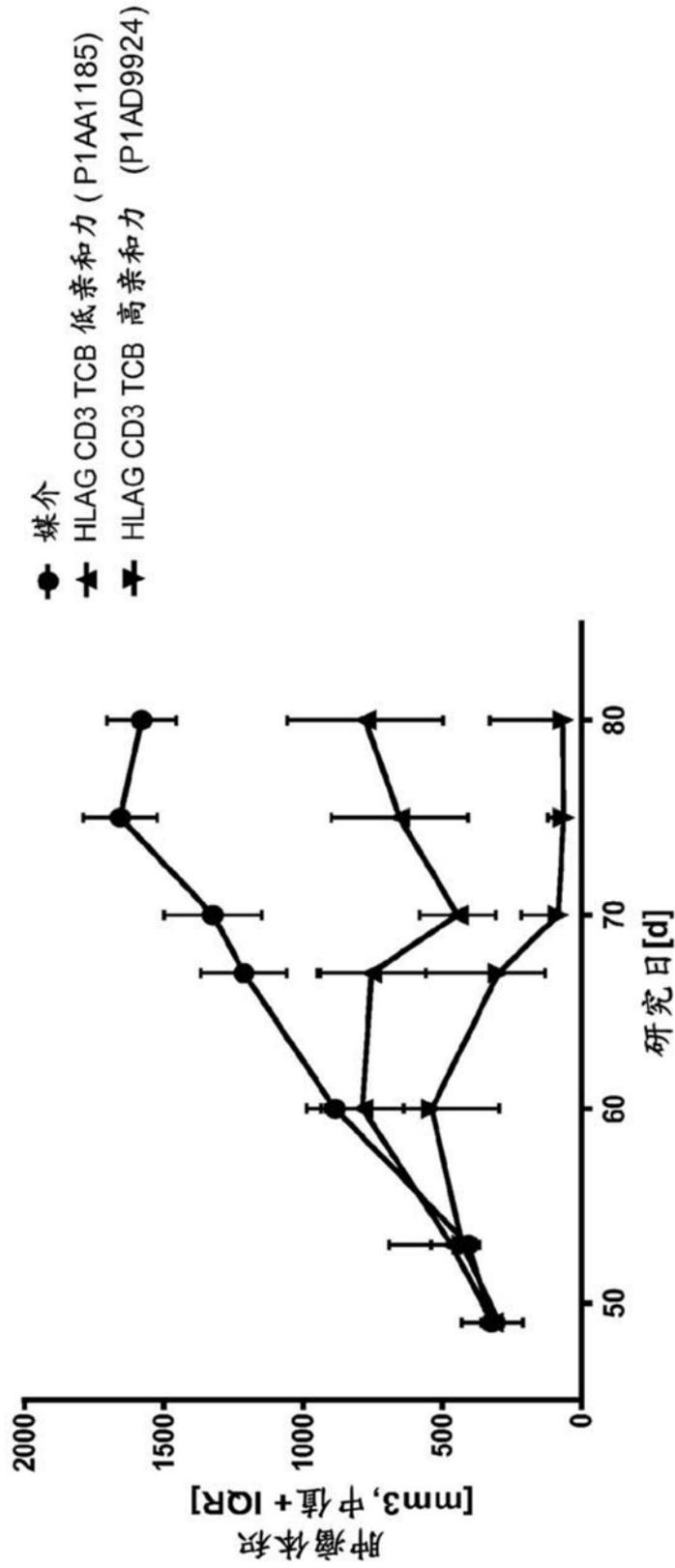


图12