



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118027197 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 14

(21) 申请号 202311681635.8

(22) 申请日 2018.07.06

(30) 优先权数据

17180070.9 2017.07.06 EP

(62) 分案原申请数据

201880057358.4 2018.07.06

(71) 申请人 美勒斯公司

地址 荷兰乌得勒支

(72) 发明人 塞西利亚·安娜·威廉明娜·热延

林塞·克洛斯特

科内利斯·阿德里安·德克吕夫

保卢斯·约翰内斯·塔肯

马克·思罗斯比 敦·洛格滕伯格

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张福誉 韩晓帆

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

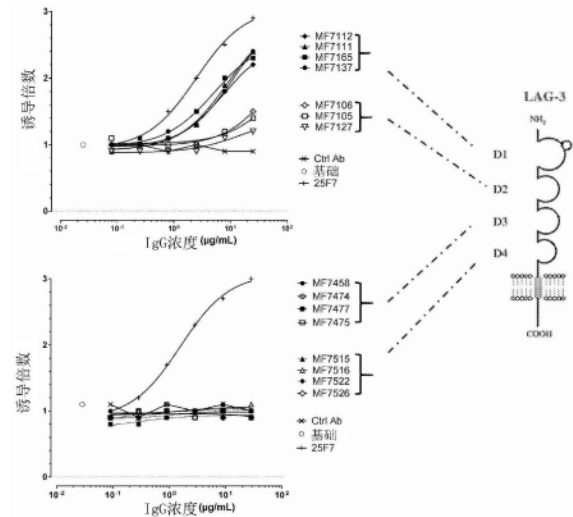
权利要求书4页 说明书48页
序列表(电子公布) 附图32页

(54) 发明名称

调节由细胞表达的生物活性的抗体

(57) 摘要

本发明涉及调节由细胞表达的生物活性的抗体,其中提供了用于在程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)和/或淋巴细胞活化蛋白3(LAG3)阳性细胞中干扰PD-1和LAG3介导的抑制的手段和方法。方法可包括使所述细胞与包含以下的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物接触,从而在所述细胞中抑制PD-1和/或LAG3介导的活性:可与PD-1的胞外部分结合的可变结构域和可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域。本发明还提供了抗体或其变体,所述抗体或其变体包含可与PD-1的胞外部分结合的可变结构域和可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域。



1. 用于在程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 和/或淋巴细胞活化蛋白3 (LAG3) 阳性细胞中干扰PD-1和LAG3介导的抑制的体外方法,所述方法包括使所述细胞与包含以下的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物接触,从而在所述细胞中抑制PD-1和/或LAG3介导的活性:

-能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域,和

-能够与LAG3的胞外部分结合的可变结构域,其包含具有CDR1、CDR2和CDR3区的重链可变区,所述CDR1、CDR2和CDR3区分别具有以下序列:

TYAIN、GIIPIFGTPYYGQRFQG和ERDIGSLYYFDS,
NYAFS、GIIPIFGSTNYAQSFQG和DREMGTLYFFDQ,
SYSWS、YIDYSGTTNPNPSLKS和DLLYKWNVEGFDI,
TYAIN、GIIPIFGTAYYAQEFQD和ERELGALYAFDI,
SHAIS、GIIPLFDKNAQKFQG和DRETGTLYYFDY,
NFAFS、GIIPMFDKAKYAQKFQG和DRAIGTLYYFDY,
TYAIN、GIIPIFGTPYYGQRFQG和DRDSGGLYYFDS,或者
SYGIS、WISAYSGNTNYAQLQG和GSILAAQMWGDI。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述结合PD-1的可变结构域与PD-1的结合阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。

3. 用于刺激免疫突触的形成、稳定性和/或活性的体外方法,其包括提供包含能够通过免疫突触彼此缔合的至少两种细胞的系统,并向所述系统提供包含以下的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物,从而刺激所述至少两种细胞之间的免疫突触的形成、稳定性和/或活性:

-能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域,和

-能够与LAG3的胞外部分结合的可变结构域,其包含具有CDR1、CDR2和CDR3区的重链可变区,所述CDR1、CDR2和CDR3区分别具有以下序列:

TYAIN、GIIPIFGTPYYGQRFQG和ERDIGSLYYFDS,
NYAFS、GIIPIFGSTNYAQSFQG和DREMGTLYFFDQ,
SYSWS、YIDYSGTTNPNPSLKS和DLLYKWNVEGFDI,
TYAIN、GIIPIFGTAYYAQEFQD和ERELGALYAFDI,
SHAIS、GIIPLFDKNAQKFQG和DRETGTLYYFDY,
NFAFS、GIIPMFDKAKYAQKFQG和DRAIGTLYYFDY,
TYAIN、GIIPIFGTPYYGQRFQG和DRDSGGLYYFDS,或者
SYGIS、WISAYSGNTNYAQLQG和GSILAAQMWGDI。

4. 抗体或其变体,所述抗体或其变体包含能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域和能够与LAG3的胞外部分结合的可变结构域,

其中所述能够与LAG3的胞外部分结合的可变结构域包含具有CDR1、CDR2和CDR3区的重链可变区,所述CDR1、CDR2和CDR3区分别具有以下序列:

TYAIN、GIIPIFGTPYYGQRFQG和ERDIGSLYYFDS,
NYAFS、GIIPIFGSTNYAQSFQG和DREMGTLYFFDQ,
SYSWS、YIDYSGTTNPNPSLKS和DLLYKWNVEGFDI,
TYAIN、GIIPIFGTAYYAQEFQD和ERELGALYAFDI,

SHAIS、GIIPLFDTAKNAQKFQG和DRETGTLYYFDY，
NFAFS、GIIPMFDATAKYAQKFQG和DRAIGTLYYFDY，
TYAIN、GIIPIFGTPYYGQRFQG和DRDSGGLYFDS，或者
SYGIS、WISAYSGNTNYAQLQG和GSILAAQMWGDI。

5. 权利要求4所述的抗体或其变体，其中结合PD-1的可变结构域阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。

6. 权利要求4所述的抗体或其变体，其中所述结合LAG3的可变结构域与LAG3胞外结构域1或结构域2结合。

7. 权利要求4所述的抗体或其变体，其中结合PD-1的胞外部分的可变结构域限定为这样的可变区：其当在包含两个所述结合PD-1的可变结构域的二价单特异性抗体中时，与用抗体纳武单抗对Jurkat细胞获得的抑制相比在Jurkat细胞中以20%至150%抑制PD-1/PD-L1抑制。

8. 权利要求4所述的抗体或其变体，其中所述能够与LAG3的胞外部分结合的可变结构域包含重链可变区，所述重链可变区包含根据SEQ ID NO:65、69、75、77、78、79、80或81中任一项的重链可变区的氨基酸序列，其相对于所述重链可变区的氨基酸序列具有至多15个，或0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、替换或其组合。

9. 权利要求8所述的抗体或其变体，其中所述所述能够与LAG3的胞外部分结合的可变结构域包含重链可变区，所述重链可变区包含根据SEQ ID NO:65、69、75、77、78、79、80或81中任一项的重链可变区的氨基酸序列。

10. 权利要求4所述的抗体或其变体，其中结合PD-1的所述可变结构域包含具有CDR1、CDR2和CDR3区的重链可变区，所述重链可变区包含根据SEQ ID NO:47-57中任一项的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列。

11. 权利要求8所述的抗体或其变体，其中所述能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域包含重链可变区，所述重链可变区包含根据SEQ ID NO:47-57中任一项的重链可变区的氨基酸序列，其相对于所述重链可变区的氨基酸序列具有至多15个，或0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、替换或其组合。

12. 权利要求9所述的抗体或其变体，其中所述能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域包含重链可变区，所述重链可变区包含根据SEQ ID NO:47-57中任一项的重链可变区的氨基酸序列。

13. 权利要求4所述的抗体或其变体，其中：

所述能够与LAG-3的胞外部分结合的可变结构域包含重链可变区，所述重链可变区包含根据SEQ ID NO:65、69、75、77、78、79、80或81中任一项的重链可变区的氨基酸序列，其相对于所述重链可变区的氨基酸序列具有至多15个，或0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、替换或其组合；以及

所述能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域包含重链可变区，所述重链可变区包含根据SEQ ID NO:47的重链可变区的氨基酸序列，其相对于所述重链可变区的氨基酸序列具有至多15个，或0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、替换或其组合。

14. 权利要求4所述的抗体或其变体，其中：

所述能够与LAG-3的胞外部分结合的可变结构域包含重链可变区，所述重链可变区包

含根据SEQ ID NO:65、69、75、77、78、79、80或81中任一项的重链可变区的氨基酸序列,其相对于所述重链可变区的氨基酸序列具有至多15个,或0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、替换或其组合;以及

所述能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含根据SEQ ID NO:56的重链可变区的氨基酸序列,其相对于所述重链可变区的氨基酸序列具有至多15个,或0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、替换或其组合。

15. 权利要求4所述的抗体或其变体,其中:

所述能够与LAG-3的胞外部分结合的可变结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含根据SEQ ID NO:65、69、75、77、78、79、80或81中任一项的重链可变区的氨基酸序列,其相对于所述重链可变区的氨基酸序列具有至多15个,或0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、替换或其组合;以及

所述能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含根据SEQ ID NO:51的重链可变区的氨基酸序列,其相对于所述重链可变区的氨基酸序列具有至多15个,或0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、替换或其组合。

16. 抗体或其变体,所述抗体或其变体包含能够与LAG-3的胞外部分结合的可变结构域,其包含重链可变区,所述重链可变区包含根据SEQ ID NO:65、69、75、77、78、79、80或81中任一项的重链可变区的氨基酸序列,其相对于所述重链可变区的氨基酸序列具有至多15个,或0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸插入、缺失、替换或其组合。

17. 前述权利要求中任一项所述的抗体或其变体,所述抗体或其变体包含轻链可变区,所述轻链可变区具有根据SEQ ID NO:30的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3序列,或者与根据SEQ ID NO:30的轻链可变区CDR1和CDR2以及CDR3序列的不同之处在于不超过三个、不超过两个、或者不超过一个氨基酸的CDR1、CDR2和CDR3序列。

18. 权利要求17所述的抗体或其变体,其中所述轻链可变区包含根据SEQ ID NO:30的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3序列。

19. 权利要求18所述的抗体或其变体,所述抗体或其变体包含轻链可变区,所述轻链可变区具有与根据SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少80%同一性的序列。

20. 权利要求19所述的抗体或其变体,所述抗体或其变体包含具有根据SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链可变区。

21. 权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述抗体或其变体是根据权利要求4至20中任一项所述的抗体。

22. 权利要求4所述的抗体或其变体,其用作药物。

23. 权利要求4所述的抗体或其变体,其用于治疗癌症或病原体、病毒或寄生生物感染的方法。

24. 组合物或成套药盒,其包含根据权利要求4至20中任一项所述的至少一种抗体或其变体。

25. 药物组合物,其包含权利要求4至20中任一项所述的至少一种抗体或其变体,以及可药用的载体、稀释剂或赋形剂。

26. 长度为至少15个核苷酸的核酸分子,其编码权利要求4至20中任一项所述的抗体或变体的至少一个CDR区。

27. 根据权利要求26所述的核酸分子,其编码权利要求4至20中任一项所述的抗体或变体的至少重链可变区。

28. 根据权利要求26或27所述的核酸分子,其编码根据SEQ ID NO:47-57或SEQ ID NO:58、59、60、62、64、66或74中任一项的重链可变区。

29. 核酸分子,其编码权利要求4至20中任一项所述的抗体或变体。

30. 载体,其包含根据权利要求26至29中任一项所述的核酸分子或其功能等同物。

31. 分离或重组的细胞,其包含根据权利要求26至29中任一项所述的核酸分子或根据权利要求30所述的载体。

32. 治疗有效量的权利要求4至20中任一项所述的抗体或变体、根据权利要求24或25所述的组合物、根据权利要求26至29中任一项所述的核酸分子、或根据权利要求30所述的载体在制备用于治疗癌症或病原体感染的药物中的用途,所述治疗包括向有此需要的对象进行施用。

33. 用于从单细胞产生权利要求4至20中任一项所述的抗体或其变体的方法,其中所述抗体或其变体包含能够形成界面的两个CH3结构域,所述方法包括提供:

- 具有以下细胞:a) 第一核酸分子,其编码特异性识别PD-1的胞外部分并且包含第一CH3结构域的IgG重链;和b) 第二核酸序列,其编码特异性识别LAG-3的胞外部分并且包含第二CH3结构域的IgG重链,其中所述核酸序列编码用于所述第一CH3结构域与所述第二CH3结构域优先配对的残基,所述方法还包括以下步骤:培养所述细胞并允许表达所述核酸序列,并从培养物中收获所述抗体或其变体。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述细胞具有第三核酸序列,其编码根据SEQ ID NO:30的共同轻链。

35. 根据权利要求33或34所述的方法,其中所述第一核酸编码包含氨基酸替换L351K和T366K(根据EU编号进行编号)的所述第一CH3结构域,并且其中所述第二核酸编码包含氨基酸替换L351D和L368E(根据EU编号进行编号)的所述第二CH3结构域,所述方法还包括以下步骤:培养所述细胞并允许表达所述核酸序列,并从培养物中收获所述抗体或其变体。

调节由细胞表达的生物活性的抗体

[0001] 本申请是申请号为201880057358.4的发明名称为“调节由细胞表达的生物活性的抗体”的中国专利申请的分案申请,原申请是2018年07月06日提交的PCT国际申请PCT/NL2018/050451于2020年03月04日进入中国国家阶段的申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及抗体领域。具体地,本发明涉及用于治疗涉及异常细胞之疾病的治疗性抗体的领域。更具体地,本发明涉及结合两种或更多种膜相关蛋白的胞外部分并由此调节由细胞表达的生物活性的抗体。

背景技术

[0003] 尽管在疾病的治疗方面已取得了许多进展,并且对导致癌症的分子事件的认识提高,但癌症仍然是世界中死亡的主要原因。例如,结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全世界第三最常见的癌症。在2008年,123万人被诊断出患有该疾病。其在欧洲是第二最常见的癌症,其中在2012年诊断出约447,000例新病例(占总数的13%)。结直肠癌是第四最常见的癌症死亡原因,据估计每年可导致608,000(EU 148,000)例死亡。尽管在CRC中已推进一些新的治疗,但许多治疗未通过临床测试;使用常规治疗在很大程度上仍无法治愈转移性CRC。黑素瘤是发生非常频繁的癌症的另一个实例。当检出不够早时,癌症很可能会转移到很难治疗的阶段。免疫干预治疗已显示对患有转移性黑素瘤的至少一些患者有效。非小细胞肺癌是很少在可进行手术的足够早阶段被发现的癌症类型。此外,这些类型的癌症已经通过免疫干预治疗成功治疗。

[0004] 传统上,大多数癌症药物发现均集中在阻断基本细胞功能并杀伤分裂中细胞的药剂上。然而,在晚期癌症的情况下,无论如何积极地应用,甚至达到其中患者遭受来自治疗的威胁生命的副作用的程度,化学治疗也很少实现完全治愈。在大多数情况下,患者中的肿瘤停止生长或暂时缩小(称为缓解)仅是为了再次开始增殖,有时更快(称为复发),并且变得更加越来越难以治疗。最近,癌症药物开发的焦点已经从广泛细胞毒性化学治疗转向具有更低毒性的靶向细胞抑制治疗。晚期癌症的治疗已在白血病和一些其他癌症中得到临床验证。然而,在大多数癌中,靶向方法仍被证明不足以有效地完全消除大多数患者中的癌症。

[0005] 已经使用多种不同的方法实现癌症的靶向,所述方法包括例如针对癌症的存活和/或生长所依赖的信号传导蛋白的小分子;使用肿瘤特异性蛋白的疫苗;使用主动杀伤肿瘤细胞的免疫细胞的细胞治疗和将细胞毒性分子靶向肿瘤的抗体;干扰信号传导和/或使宿主的免疫系统(重新)定向于肿瘤细胞。

[0006] 本发明提供了用于使免疫系统组分(重新)定向的新手段和方法。本发明还涉及用于调节由细胞表达的生物活性的手段和方法。

发明内容

[0007] 本发明提供了用于在程序性细胞死亡蛋白1(Programmed Cell Death 1protein, PD-1)和/或淋巴细胞活化蛋白3(Lymphocyte activation 3,LAG3)阳性细胞中干扰PD-1和LAG3介导的抑制的方法,所述方法包括使所述细胞与包含以下的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物接触,从而在所述细胞中抑制PD-1和/或LAG3介导的活性:

[0008] -可与PD-1的胞外部分结合的可变结构域,和

[0009] -可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域。

[0010] 本发明还提供了用于刺激免疫突触的形成、稳定性和/或活性的方法,其包括提供包含能够通过免疫突触彼此缔合的至少两种细胞的系统,并向所述系统提供包含以下的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物,从而刺激所述至少两种细胞之间的免疫突触的形成、稳定性和/或活性:

[0011] -可与PD-1的胞外部分结合的可变结构域,和

[0012] -可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域。

[0013] 还提供了抗体或其变体,所述抗体或其变体包含可与PD-1的胞外部分结合的可变结构域和可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域。

[0014] 在本发明的一个优选实施方案中,所述结合PD-1的可变结构域与PD-1的结合阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2,优选PD-L1的结合。在本发明的一个优选实施方案中,所述结合LAG3的可变结构域与LAG3的结合阻断LAG3与MHC II类的结合。

[0015] 结合LAG-3的可变结构域优选地为与LAG-3胞外结构域1、2、3或4,优选结构域1或结构域2结合的可变结构域。

[0016] 还提供了抗体或其变体,所述抗体或其变体包含可与PD-1的胞外部分结合的可变结构域和可与LAG-3的胞外部分结合的可变结构域;其中可结合PD-1的可变结构域包含具有CDR3区的重链可变区,所述CDR3区包含针对以下所示的VH之一的可变重链区的CDR3的氨基酸序列:图3中的MF6076、MF6226、MF6236、MF6256、MF6930、MF6932、MF6935、MF6936、MF6972、MF6974或MF6982,优选MF6256、MF6930、MF6076、MF6974或MF6226,优选MF6930、MF6076或MF6974。在一个优选的实施方案中,所述可结合PD-1的可变结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含具有CDR1、CDR2和CDR3区的重链可变区,所述CDR1、CDR2和CDR3区包含针对以下所示的VH之一的可变重链区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列:图3中的MF6076、MF6226、MF6236、MF6256、MF6930、MF6932、MF6935、MF6936、MF6972、MF6974或MF6982,优选MF6256、MF6930、MF6076、MF6974或MF6226,优选MF6930、MF6076或MF6974。

[0017] 还提供了抗体或其变体,所述抗体或其变体包含可与PD-1的胞外部分结合的可变结构域和可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域;其中可结合PD-1的可变结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含如针对以下所示的可变重链区的氨基酸序列:图3中的MF6076、MF6226、MF6236、MF6256、MF6930、MF6932、MF6935、MF6936、MF6972、MF6974或MF6982,优选MF6256、MF6930、MF6076、MF6974或MF6226,优选MF6930、MF6076或MF6974,所述氨基酸序列相对于如针对MF所示的VH的氨基酸序列具有至多15个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换,或其组合。

[0018] 可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域优选地包含具有CDR3区的重链可变区,所述CDR3区包含如针对以下所示的可变重链区的CDR3区的氨基酸序列:图3中的MF7100、

MF7111、MF7116、MF7118、MF7134、MF7136、MF7137、MF7142、MF7146、MF7165、MF7167、MF7185、MF7443、MF7444、MF7515、MF7518、MF7096、MF7097、MF7106、MF7120、MF7133、MF7139、MF7144或MF7524, 优选MF7518、MF7165、MF7116、MF7096、MF7133、MF7139、MF7524或MF7137, 优选MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096。优选地, 可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域包含具有CDR1、CDR2和CDR3区的重链可变区, 所述CDR1、CDR2和CDR3区包含针对以下所示的VH之一的可变重链区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列: 图3中的MF7100、MF7111、MF7116、MF7118、MF7134、MF7136、MF7137、MF7142、MF7146、MF7165、MF7167、MF7185、MF7443、MF7444、MF7515、MF7518、MF7096、MF7097、MF7106、MF7120、MF7133、MF7139、MF7144或MF7524, 优选MF7518、MF7165、MF7116、MF7096、MF7133、MF7139、MF7524或MF7137, 优选MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096。

[0019] 可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域优选地包含重链可变区, 所述重链可变区包含如针对以下所示的可变重链区的氨基酸序列: 图3中的MF7100、MF7111、MF7116、MF7118、MF7134、MF7136、MF7137、MF7142、MF7146、MF7165、MF7167、MF7185、MF7443、MF7444、MF7515、MF7518、MF7096、MF7097、MF7106、MF7120、MF7133、MF7139、MF7144或MF7524, 优选MF7518、MF7165、MF7116、MF7096、MF7133、MF7139、MF7524或MF7137, 优选MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096, 所述氨基酸序列相对于指定MF的氨基酸序列具有至多15个, 优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个, 并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换, 或其组合。

[0020] 本发明的抗体优选地包含重链可变区, 所述重链可变区包含如图3中所示的MF的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中, 抗体还包含轻链可变区, 所述轻链可变区包含图1中所示的轻链可变区的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中, 轻链包含如图1A中所示的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中, 重链包含IgG1抗体, 优选人IgG1抗体的恒定区。在一个优选的实施方案中, 所述IgG1恒定区的CH2区被改造以降低抗体的ADCC和/或CDC活性。在一个优选的实施方案中, CH2区包含如图2E中所示的序列。在一个优选的实施方案中, 抗体的CH3区被改造以有利于重链的异二聚化。在一个优选的实施方案中, 一条重链包含如图2F中所示的序列, 并且另一条重链包含如图2G中所示的序列。

[0021] 还提供了药物组合物, 其包含一种或更多种本发明的抗体或其变体。

[0022] 还提供了核酸分子或核酸分子集合, 其编码本发明的抗体或其变体的重链或重链可变区。

[0023] 还提供了核酸分子或核酸分子集合, 其编码本发明的抗体。

[0024] 还提供了包含一种或更多种核酸分子的细胞, 所述核酸分子单独或一起编码本发明的抗体或其变体。还提供了使用所述细胞产生本发明的抗体或其变体的方法, 优选地, 连同从细胞的培养物中收获抗体或其变体。

[0025] 还提供了包含本发明的抗体或其变体的细胞系统。

[0026] 还提供了用于治疗患有涉及异常细胞的疾病例如癌症或患有慢性病毒或寄生生物感染的个体的方法, 所述方法包括向有此需要的个体施用本发明的抗体或其变体, 优选本发明的双特异性抗体或其变体。

[0027] 本发明还提供了本发明的抗体或其变体; 优选本发明的双特异性抗体或其变体, 其用于治疗患有涉及异常细胞的疾病例如癌症或患有慢性病毒或寄生生物感染的个体。

[0028] 还提供了本发明的抗体或保留所述抗体的结合特异性的其变体、或者本发明的核酸分子或功能等同物,其用作药物。

[0029] 本发明还提供了本发明的抗体或保留本发明抗体的结合特异性的所述抗体的变体,其用于治疗患有涉及异常细胞的疾病例如癌症或患有感染(优选病毒或寄生生物感染)的个体。

[0030] 还提供了根据本发明的抗体或变体用于制备用于治疗或预防癌症和/或感染(优选病毒或寄生生物感染)的药物的用途。

[0031] 在一个优选的实施方案中,寄生生物是胞内寄生生物。

[0032] 还提供了在个体中刺激针对所述个体中异常细胞的免疫应答的方法,所述方法包括向所述个体提供(施用)本发明的抗体或其变体,优选双特异性抗体或其变体。异常细胞优选地为癌细胞、病毒感染的细胞、寄生生物或寄生生物感染的细胞。在一个优选的实施方案中,细胞是癌细胞或赘生性细胞。

附图说明

[0033] 图1:单特异性和双特异性IgG中使用的共同轻链。图1A:共同轻链氨基酸序列。图1B:共同轻链可变结构域DNA序列及翻译物(IGKV1-39/jk1)。图1C:共同轻链恒定区DNA序列及翻译物。图1D:IGKV1-39/jk5共同轻链可变结构域翻译物。图1E:V区IGKV1-39A。

[0034] 图2:用于产生双特异性分子的IgG重链。图2A:VH基因。图2B:CH1区。图2C:铰链区。图2D:CH2区。图2E:包含L235G和G236R沉默替换的CH2区。图2F:包含L351K和T366K替换的CH3结构域(KK)。图2G:包含L351D和L368E替换的CH3结构域(DE)。

[0035] 图2A VH:取决于MF(靶标):图3。

[0036] 图2B CH1:

[0037] 图2C铰链:

[0038] 图2D CH2:

[0039] 图2E包含L235G和G236R沉默替换的CH2:

[0040] 图2F CH3:DEKK中的KK

[0041] 图2G CH3:DEKK中的DE

[0042] 图3:重链可变区的氨基酸序列:

[0043] 图3A:PD-1特异性克隆的重链可变区

[0044] 图3B:LAG-3特异性克隆的重链可变区

[0045] 标记MF是指包含如所示的重链可变区和共同轻链的fab。轻链的氨基酸序列示于图1A中。加下划线的序列分别指示每个氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3区。

[0046] 图4:pIRES-Neo3(MV1363)的载体图谱和特征。

[0047] 图5:pVAX1的载体图谱和特征。

[0048] 图6:用于产生“免疫”噬菌体展示文库的噬菌粒载体MV1473的载体图谱和特征。

[0049] 图7:IgG表达载体MV1452的载体图谱和特征,所述载体用于表达用于双特异性IgG产生的KK变体重链中的PD-1和PD-L1特异性Fab臂。

[0050] 图8:VH基因的氨基酸序列,其当与共同轻链组合为MF1337时具有破伤风毒素特异性,并且存在于用于产生PD-L1xTT和PD-1xTT双特异性IgG分子的DE变体重链中。加下划线

的序列分别指示每个氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3区。

[0051] 图9: IgG表达载体MV1377的载体图谱和特征, 所述载体用于表达用于双特异性IgG产生的DE变体重链中的TT特异性Fab臂MF1337。

[0052] 图10: PD-1/PD-L1阻断测定

[0053] 评估抗PD-1抗体组在10 μ g/ml双特异性IgG的浓度下阻断PD-L1与包被的PD-1相互作用的能力。将数据相对于使用浓度为10 μ g/ml的二价基准PD-L1抗体MPDL3280A获得的数据(100%阻断)进行归一化。示出了PD-1组的一个代表性实例。通过与非PD-1/PD-L1特异性人同种型抗体孵育建立最大结合(相对于0%阻断归一化)。包含图3中所示和在此未表示的MF序列的所有PD-1可变结构域阻断PD-1/PD-L1相互作用>70%。

[0054] 图11

[0055] 在LAG-3阻断报道测定中剂量滴定中抗体组的LAG-3功能活性。示出了LAG-3中结构域映射与LAG-3阻断活性之间的关系, 其在右图中示意性绘制。

[0056] 图12

[0057] 与其亲本二价LAG-3抗体相比的LAG-3xPD-1抗体的IL-2产生的刺激指数。将每个IL-2值与阴性对照抗体(未示出)进行比较以确定SI。

[0058] 图13

[0059] 与亲本PD-1二价抗体和25F7 LAG-3参考抗体相比, 抗LAG-3xPD-1双特异性抗体增强健康供体血细胞中IL-2产生的SEB刺激。

[0060] 图14

[0061] 比较性抗LAG-3抗体。PG1337P300是预期不与细胞结合而与破伤风类毒素结合的对照抗体。

[0062] 左侧图示出了指定抗体与在细胞膜上表达LAG-3的293FF-LAG-3细胞的结合。右侧图示出了活化的人T细胞。用经PE标记的抗IgG F(ab')₂检测抗体与细胞的结合。25F7*, 确定的亲和力为约0.2nM。

[0063] 图15

[0064] 基于FACS的LAG-3组表征。19种LAG-3特异性抗体以单价(PB LAG-3 \times TT)和二价(PG)形式表达。在活化的T细胞和293FF-LAG-3稳定细胞系上测试抗体结合。这两个图示出了在293FF-LAG-3细胞上的MF7116和MF7431(25F7*)单价和二价结合的一个实例。用其中一个臂具有指定LAG-3抗体的VH(以字母MF表示)的双特异性抗体(PB)确定单价结合。抗体的另一臂具有对破伤风类毒素具有特异性的VH(MF1337)。在LAG-3组的一些二价/单价形式之间观察到结合差异, 但在25F7*中未观察到。

[0065] 图16

[0066] LAG-3x PD-1报道测定验证: 双特异性抗体在LAG-3x PD-1报道测定中显示活性。

[0067] 图17

[0068] PD-1+LAG-3报道测定筛选。图A, 具有功能性LAG-3和PD-1臂的LAG-3x PD-1。图B, 具有带有MF5374的非功能性PD-1臂的LAG-3 x PD-1。图C, 具有带有MF7118和MF7167的非功能性LAG-3臂的LAG-3 x PD-1。*表示替代臂。

[0069] 图18

[0070] 图18中示出了报道测定筛选结果的概述。紧随字母MG的四个数字编号表示双特异

性抗体的可变结构域的重链可变区的MF编号。例如,表格的左上角中结果为52.22的双特异性抗体具有带有MF6930的一个臂和带有MF7518的一个臂。值为作为对照的%的曲线下面积(AUC)。

[0071] 图19

[0072] SEB测定筛选:示例性IL-2产生。图A,具有功能性PD-1和LAG-3臂的LAG-3 x PD-1。图B,具有带有VH MF5374的非功能性PD-1臂的LAG-3 x PD-1。图C,具有带有VH MF7118和MF7167的非功能性LAG-3臂的LAG-3 x PD-1。*表示替代抗体。

[0073] 图20

[0074] 报道测定和SEB测定的筛选结果。基于在报道测定中作为二价抗体时的功能性排名的臂(从高至低)。在每一列的顶部是LAG-3臂,在每一行的左侧是PD-1臂。如图19所示,紧随字母MG的四个数字编号表示双特异性抗体的可变结构域的重链可变区的MF编号。值为作为对照的%的AUC:白色=前15%:灰色=中间43%:黑色=最低43%。

[0075] 图21

[0076] LAG-3 x PD-1;PD-1臂的排名。基于在以下中与阳性对照相比的AUC,使用矩阵文件限定前15%的双特异性抗体:1)报道测定;2)SEB筛选供体1(IL-2数据);3)SEB筛选供体2(IL-2数据)。接下来,对在该前15%中存在多少携带特定PD-1Fab臂的双特异性抗体进行评分。在报道测定和SEB测定中,在与大多数LAG-3臂组合时,具有带有MF6974 VH或MF6076 VH的可变结构域的PD-1臂的克隆表现最佳。颜色/灰度编码,越深表示排名越高。

[0077] 图22

[0078] LAG-3 x PD-1;LAG-3臂的排名。基于在以下中与阳性对照相比的AUC,使用矩阵文件限定前15%(左侧)和前25%(右侧)的双特异性抗体:1)报道测定;2)基于IL-2数据的SEB筛选供体1;3)基于IL-2数据的SEB筛选供体2。接下来,对在该前15%中存在多少携带特定LAG-3Fab臂的双特异性抗体进行评分。在前15%中具有相同评分的Fab臂还通过使用前25%评分进一步排名。颜色/灰度编码,越深表示排名越高。

[0079] 图23

[0080] PD1臂的排名。基于排名、序列多样性和结合亲和力的PD-1臂(左列)。

[0081] 图24

[0082] LAG-3臂的排名。基于排名、序列多样性和结合亲和力的LAG-3臂(左列)。

[0083] 图25

[0084] 受试抗体对同种异体mMLR中IFN- γ 产生的作用。从培养7天的CD14+单核细胞制备Mo-DC。在第7天使用未成熟的DC,并且通过在成熟培养基中培养另外的3天产生成熟的DC,然后与通过阴性选择分离的T细胞和受试抗体一起培养4天(mMLR)。通过ELISA在培养物上清液中测量IFN- γ 。将数据相对于载体对照归一化。进行四个单独的MLR。

具体实施方式

[0085] T细胞耗竭由数种抑制性受体介导,其包括程序性细胞死亡蛋白1(PD1)、T细胞免疫球蛋白与黏蛋白结构域3(T cell immunoglobulin and mucin domain 3,TIM-3)和LAG3。LAG3的主要配体是MHC II类,与CD4相比,LAG3以更高的亲和力与MHC II类结合。该蛋白质与CTLA-4和PD-1以类似的方式负调节T细胞的细胞增殖、活化和内稳态,并且已报道在

Treg抑制功能中发挥作用。据报道,LAG3还有助于将CD8+T细胞维持在致耐受性状态。LAG3以许多不同的名称而被知晓,例如淋巴细胞活化蛋白3;淋巴细胞活化基因3蛋白;CD223抗原;蛋白FDC;CD223;LAG-3;或FDC。LAG3的外部Id为:HGNC:6476;Entrez基因:3902;Ensembl:ENSG00000089692;OMIM:153337;和UniProtKB:P18627。LAG-3与CD4密切相关。LAG-3位于人第12号染色体(12p 13.32)上,与CD4基因相邻,并且其序列与CD4具有约20%的同一性。与CD4相比,LAG-3蛋白以更大的亲和力结合主要组织相容性复合体2(MHC II类)的非全纯区(nonholomorphic region)。LAG-3是调节性T细胞(regulatory T cell,Treg)和无变应性T细胞二者上协同上调的多种免疫检查点受体之一。LAG-3可负调节T细胞的增殖、活化和内稳态。

[0086] 程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)是属于CD28受体家族并且在T细胞和原B细胞上表达的细胞表面受体。目前已知PD-1结合两种配体:PD-L1和PD-L2。用作免疫检查点的PD-1通过抑制T细胞的活化在下调免疫系统中发挥重要作用,这转而降低自身免疫并促进自身耐受。认为PD-1的抑制作用通过促进淋巴结中抗原特异性T细胞的凋亡(程序性细胞死亡)同时降低调节性T细胞(抑制性T细胞)的凋亡的双重机制来实现。PD-1也以许多不同的别名而已知,例如PDCD1;程序性细胞死亡1(Programmed Cell Death 1);系统性红斑狼疮易感性蛋白2(Systemic Lupus Erythematosus Susceptibility 2);蛋白PD-1;HPD-1;PD1;程序性细胞死亡1蛋白;CD279抗原;CD279;HPD-L;HSLE1;SLEB2;和PD-1。PD-1的外部Id为HGNC:8760;Entrez基因:5133;Ensembl:ENSG00000188389;OMIM:600244;和UniProtKB:Q15116。阻断PD-1活性的新药物类别PD-1抑制剂激活免疫系统以攻击肿瘤,并且因此成功用于治疗一些类型的癌症。

[0087] PD-L1是在特定事件(例如妊娠、组织同种移植、自身免疫病和另一些疾病状态例如肝炎)期间在抑制免疫应答中发挥作用的1型跨膜蛋白。PD-L1与PD-1或B7.1(CD80)的结合传递抑制性信号,这降低表达PD-1的T细胞的增殖。认为PD-1能够通过凋亡控制外来抗原特异性T细胞的积聚。PD-L1由多种癌细胞表达,并且其表达被认为至少部分导致减弱针对癌细胞的免疫应答。PD-L1是B7蛋白质家族的成员,并且以多个其他名称被知悉,例如CD274分子;CD274抗原;B7同源物1;PDCD1配体1;PDCD1LG1;PDCD1L1;B7H1;PDL1;程序性细胞死亡1配体1(Programmed Cell Death 1Ligand 1);程序性死亡配体1(Programmed Death Ligand 1);B7-H1;和B7-H。CD274的外部Id为HGNC:17635;Entrez基因:29126;Ensembl:ENSG00000120217;OMIM:605402;UniProtKB:Q9NZQ7。

[0088] PD-L2是PD-1的第二配体。PD-L2与PD-1的接合抑制T细胞受体(T cell receptor, TCR)介导的增殖和通过CD4+T细胞的细胞因子产生。在低抗原浓度下,PD-L2/PD-1结合抑制B7-CD28信号。在高抗原浓度下,PD-L2/PD-1结合降低细胞因子产生。通过干扰素 γ 处理,PD-L表达在抗原呈递细胞上上调。其在一些正常组织和多种肿瘤中表达。PD-L1和PD-L2被认为具有重叠的功能并且调节T细胞应答。该蛋白质以许多其他名称而被知悉,例如程序性细胞死亡1配体2(Programmed Cell Death 1Ligand 2);B7树突细胞分子;程序性死亡配体2(Programmed Death Ligand 2);嗜乳脂蛋白B7-DC;PDCD1配体2;PD-1配体2;PDCD1L2;B7-DC;CD273;B7DC;PDL2;PD-1-配体2;CD273抗原;BA574F11.2;和Btdc。PD-L2的外部Id为HGNC:18731;Entrez基因:80380;Ensembl:ENSG00000197646;OMIM:605723;和UniProtKB:Q9BQ51。

[0089] 参照序列标识符以鉴定靶向哪种蛋白质。本发明的抗体还识别其至少一些变体, 例如其等位基因变体、剪接变体和突变变体, 只要该抗体的相应可变结构域识别的表位不受影响即可。一些替代名称也可曾用于或也可未曾用于指代其他蛋白质。这些名称仅出于参考目的而提供。本发明的抗体与如在细胞上表达的蛋白质结合。其也可与蛋白质的变体结合, 只要与该抗体结合的表位是可用的即可。因此, 剪接变体或突变蛋白(如果有的话)也可结合, 只要表位是可用的即可。抗体与指定蛋白质结合的事实意指其在性质上可与蛋白质结合, 并且不暗指该抗体在实际上与靶标结合, 尽管其可以结合。这也不意指该抗体不与其他蛋白质结合。本发明公开了结合PD-1(第一膜蛋白)成员的胞外部分和LAG3(第二膜蛋白)的胞外部分的抗体或其变体, 其优选地是双特异性抗体或其变体。这样的(双特异性)抗体还被称为“本发明的抗体或双特异性抗体”。还提供了组合物和成套药盒(kit of part), 其包含如本文中所述的两种或更多种(双特异性)抗体。

[0090] 抗体通常通过所谓的抗原结合位点结合其靶标。未经修饰的抗原结合位点通常由抗体的可变结构域形成并且存在于抗体的可变结构域中。可变结构域包含所述抗原结合位点。结合抗原的可变结构域是包含结合抗原的抗原结合位点的可变结构域。

[0091] 在一个实施方案中, 抗体可变结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。抗原结合位点可存在于组合的VH/VL可变结构域中, 或仅存在于VH区或仅存在于VL区中。当抗原结合位点存在于可变结构域的两个区域之一中时, 对应的可变区可促进结合可变区的折叠和/或稳定性, 但不显著促进抗原本身的结合。

[0092] 本文中使用的抗原结合是指抗体对其抗原的典型结合能力。抗体与抗原的结合可以以多种方式评估。一种方式是将抗体与抗原(优选表达抗原的细胞)孵育, 去除未结合的抗体(优选通过洗涤步骤进行), 并通过与结合的抗体结合的经标记抗体检测结合的抗体。

[0093] 抗体的抗原结合通常通过抗体的互补决定区(complementarity determining region, CDR)以及抗原和可变结构域二者的特定三维结构来介导, 从而允许这两个结构精确地结合在一起(类似于锁和钥匙的相互作用), 这与随机的、非特异性的蛋白质黏附形成对比。由于抗体通常识别称为抗原表位的抗原部分, 并且由于这样的表位也可存在于其他化合物中, 因此根据本发明的抗体也可识别其他蛋白质, 如果这样的其他化合物包含相同的表位的话。因此, 术语“结合”不排除抗体与包含相同表位的其他蛋白质的结合。这样的其他蛋白质优选地不是人蛋白质。

[0094] 本发明的蛋白质例如抗体通常不与除出生后人, 优选成人中细胞膜上特定靶蛋白之外的其他蛋白质结合。

[0095] 本文中使用的术语“抗体”意指蛋白质性分子, 其优选地属于蛋白质的免疫球蛋白类别, 包含结合抗原上表位的一个或更多个可变结构域, 其中这样的结构域来源于抗体的可变结构域或与抗体的可变结构域具有序列同源性。用于治疗用途的抗体优选地尽可能接近待进行治疗的对象的天然抗体(例如用于人对象的人抗体)。抗体结合可根据特异性和亲和力来表示。特异性决定哪种抗原或其表位被结合结构域特异性结合。亲和力是与特定抗原或表位结合的强度的量度。优选地, 根据本发明的抗体的单独臂的亲和力在纳摩尔范围内。本发明的抗体例如双特异性抗体通常包含天然抗体的恒定结构域(Fc部分), 其可以如本文中其他地方所述进行改造, 以例如降低ADCC和/或CDC活性。本发明的抗体通常是双特异性全长抗体, 其优选地是人IgG亚类的。

[0096] 可变结构域由重链的可变区和轻链的可变区构成。重链的可变区通常由重排的VDJ区形成。轻链的可变区通常由重排的VJ区形成。VDJ/VJ区现在也可使用例如功能性抗体可用的大量序列信息人工产生。

[0097] 本发明的抗体优选地是“全长”抗体。根据本发明的术语“全长”定义为包含基本上完整的抗体,且没有一个或更多个人工添加的尺寸大于20个氨基酸残基的部分,例如如另外的抗原结合位点或另外的活化位点或另外的配体或另外的配体结合部分。然而,全长抗体并非必须具有完整抗体的所有功能。为了避免疑问,全长抗体包含两条重链和两条轻链。每条链包含恒定(C)区和可变(V)区,其对于重链可分解为称为CH1、CH2、CH3、VH的结构域,对于轻链可分解为称为CL、VL的结构域。重链的结构域优选地以天然抗体的顺序存在(VH-CH1-CH2-CH3,意指VH结构域与CH1结构域相邻,随后是CH2结构域,并且然后接着是CH3结构域)。轻链的结构域也优选地以天然抗体的顺序存在(VL-CL:意指VL结构域与CL结构域相邻)。抗体通过包含在Fab片段部分中的可变结构域与抗原结合。抗体可通过恒定结构域、主要是通过Fc部分与免疫系统的分子和细胞相互作用。

[0098] 在一些实施方案中,本发明的抗体是IgG,优选全长IgG。全长IgG抗体是优选的,因为其通常具有有利的半衰期,并且出于免疫原性的原因而期望保持接近完全自体(人)分子。在一些实施方案中,本发明的抗体是全长IgG1、全长IgG2、全长IgG3或全长IgG4抗体。

[0099] 根据本发明的全长抗体涵盖其中可存在提供所期望特征或仅是原始链中那些的替代的突变的抗体。这样的突变应不是任何区域的实质性部分的缺失。然而,在术语“全长抗体”内包括其中一个或数个氨基酸残基插入、缺失、替换,或其组合而基本上不改变所得抗体的抗原结合特性的抗体。例如,IgG抗体可在恒定区中具有1至20个氨基酸残基插入、替换、缺失、或其组合。

[0100] 本发明的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物优选地是双特异性抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物。在一个优选的实施方案中,其是具有降低的效应物功能的双特异性IgG抗体。在一个优选的实施方案中,本发明的抗体是双特异性全长抗体。本发明的抗体优选地是双特异性全长IgG抗体,其优选地在CH2/下铰链区中突变以降低效应物功能。在CH2/下铰链区中发生突变以降低效应物功能的IgG1基于其在人中的长循环半衰期而受到青睐。为了防止在人中的任何免疫原性,优选地根据本发明的双特异性抗体是人抗体。

[0101] 术语“双特异性”(bs)意指抗体(如上定义)的一部分与抗原上的一个表位结合,而第二部分与同一抗原或不同抗原上的不同表位结合。不同的表位通常存在于不同的抗原上。然而,不同的表位也可存在于同一抗原上。根据本发明,所述第一和第二抗原实际上是两种不同的蛋白质。优选的双特异性抗体是包含两种不同单克隆抗体的一部分并且因此可与两个不同表位、优选两种不同抗原上的两个不同表位结合的抗体。根据由双特异性抗体识别的两种抗原的表达水平、(亚)细胞定位和化学计量,抗体的两个Fab臂可同时或可不同时结合其表位。双特异性抗体的一个臂通常包含一种抗体的可变结构域,并且另一个臂包含另一种抗体的可变结构域(即,双特异性抗体的一个臂由一条重链与一条轻链配对而形成,而另一个臂则由不同的重链与轻链配对而形成)。本发明的双特异性抗体的重链可变区通常彼此不同,而在本发明的双特异性抗体中,轻链可变区优选相同。其中不同的重链可变区与相同或共同的轻链可变区缔合的双特异性抗体也称为具有共同轻链可变区(common

light chain variable region, cLcv) 的双特异性抗体。优选的是, 轻链恒定区也相同。这样的双特异性抗体被称为具有共同轻链(common light chain, cLc)。因此, 还提供了其中两个臂包含共同轻链的根据本发明的双特异性抗体。

[0102] 如本文中所述的双特异性抗体优选地包含共同轻链可变结构域, 优选共同轻链。根据本发明的术语“共同轻链”是指可相同或具有一些氨基酸序列差异但不影响全长抗体的结合特异性的轻链。例如, 在如本文中使用的共同轻链的定义的范围内, 可制备或发现不相同但仍在功能上等价的轻链, 例如通过引入和测试保守氨基酸变化, 其是区域中当与重链配对时没有或仅部分促进结合特异性的氨基酸变化, 等等。术语“共同轻链”、“共同LC”、“cLC”、“单轻链”无论是否添加术语“重排的”在本文中均可互换使用。术语“共同轻链可变区”、“共同VL”、“共同LCv”、“cLCv”、“单VL”无论是否添加术语“重排的”在本文中均可互换使用。本发明的一个优选方面是: 双特异性抗体具有可与具有不同结合特异性的至少两个且优选多个重链(可变区) 组合的共同轻链(可变区) 以形成具有功能性抗原结合结构域的抗体(WO2009/157771)。共同轻链(可变区) 优选地是人轻链(可变区)。共同轻链(可变区) 优选具有种系序列。一种优选的种系序列是频繁在人库中使用并且具有良好的热力学稳定性、产率和溶解度的轻链可变区。一个优选的种系轻链是012。共同轻链优选地是重排的种系人 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01(图1A)。共同轻链可变区优选地是重排的种系人 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01的可变区。共同轻链优选地包含具有0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加、或其组合的如图1B或1D中所示的轻链可变区。共同轻链优选地还包含轻链恒定区, 优选 κ 轻链恒定区。可针对用于表达共同轻链蛋白的细胞系统对编码共同轻链的核酸进行密码子优化。编码核酸可偏离种系核酸序列。

[0103] 在一个优选的实施方案中, 轻链包含轻链区, 所述轻链区包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加、或其组合的如图1A中所示的012/IgV κ 1-39*01基因区段的氨基酸序列。在说明书通篇, 词组“012轻链”用作“包含含有具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加、或其组合的如图1A中所示的012/IgV κ 1-39*01基因区段的氨基酸序列的轻链可变区的轻链”的简称。IgV κ 1-39是免疫球蛋白可变 κ 1-39基因的简称。该基因也称为免疫球蛋白K可变1-39; IGKV139; IGKV1-39; 012a或012。该基因的外部Id为HGNC:5740; Entrez基因:28930; Ensembl:ENSG00000242371。IgV κ 1-39的一个优选氨基酸序列在图1E中给出。其列出了V区的序列。V区可与五个J区之一组合。图1B和1D描述了与J区组合的IgV κ 1-39的两个优选序列。连接的序列表示为IGKV1-39/jk1和IGKV1-39/jk5; 替代名称为IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01或IgV κ 1-39*01/IGJ κ 5*01(根据在imgt.org的IMGT数据库万维网的命名)。

[0104] 优选地, 包含012/IgV κ 1-39*01的轻链可变区是种系序列。还优选地, 包含IGJ κ 1*01或/IGJ κ 5*01的轻链可变区是种系序列。在一个优选的实施方案中, IGKV1-39/jk1或IGKV1-39/jk5轻链可变区是种系序列。

[0105] 在一个优选的实施方案中, 轻链可变区包含种系012/IgV κ 1-39*01。在一个优选的实施方案中, 轻链可变区包含 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01或IgV κ 1-39*01/IGJ κ 5*01。在一个优选的实施方案中, IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01。轻链可变区优选包含种系 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01或种系 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IGJ κ 5*01, 优选种系IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01。

[0106] 产生具有012轻链的抗体的成熟B细胞通常产生相对于种系序列(即在生物体的非

淋巴样细胞中的正常序列) 已经历一个或多个突变的轻链。导致这些突变的过程通常称为体细胞(超)突变。所得轻链称为亲和力成熟轻链。这样的轻链当来源于O12种系序列时是O12来源轻链。在本说明书中,词组“O12轻链”将包括O12来源轻链,通过体细胞超突变引入的突变当然也可以在实验室中人工引入。在实验室中,也可在不影响轻链的特性(种类,并非必须在量上)的情况下引入其他突变。如果轻链包含具有0至10个、优选0至5个氨基酸插入、缺失、替换、添加、或其组合的如图1A、图1B、图1D或图1E中所示序列,则其至少是O12轻链。在一个优选的实施方案中,O12轻链是包含具有0至9、0至8、0至7、0至6、0至5、0至4个氨基酸插入、缺失、替换、添加、或其组合的如图1A、1B、1D或1E中所示序列的轻链。在一个优选的实施方案中,O12轻链是包含具有0至5、优选0至4、更优选0至3个氨基酸插入、缺失、替换、添加、或其组合的如图1A、图1B、图1D或图1E中所示序列的轻链。在一个优选的实施方案中,O12轻链是包含具有0至2、更优选0至1、最优选0个氨基酸插入、缺失、替换、添加、或其组合的如图1A、图1B、图1D或图1E中所示序列的轻链。在一个优选的实施方案中,O12轻链是包含具有提及的氨基酸插入、缺失、替换、添加、或其组合的如图1A或图1B中所示序列的轻链。在一个优选的实施方案中,轻链包含图1A的序列。在一个优选的实施方案中,轻链可变区包含图1B的序列。

[0107] 共同轻链(可变区)可以是 λ 轻链,并且因此这在本发明的上下文中也提供了,然而优选 κ 轻链。本发明的共同轻链的恒定部分可以是 κ 或 λ 轻链的恒定区。其优选地是 κ 轻链的恒定区,优选地其中所述共同轻链是种系轻链,优选包含IgVK1-39基因区段的重排种系人 κ 轻链,最优选重排种系人 κ 轻链IgVK1-39*01/IGJK1*01(图1)。术语重排种系人 κ 轻链IgVK1-39*01/IGJK1*01、IGKV1-39/IGKJ1、huVK1-39轻链或简称huVK1-39、或简单地1-39在本申请通篇可互换使用。明显地,本领域技术人员将认识到“共同”也指轻链的氨基酸序列不相同的功能等同物。存在所述轻链的许多变体,其中存在不影响功能性结合区形成的突变(缺失、替换、添加)。

[0108] IgVK1-39是免疫球蛋白可变 κ 1-39基因的简称。该基因也称为免疫球蛋白 κ 可变1-39;IGKV139;IGKV1-39;O12a或O12。该基因的外部Id为HGNC:5740;Entrez基因:28930;Ensembl:ENSG00000242371。IgVK1-39的一个优选氨基酸序列在图1中给出。其列出了V区的序列。V区可与五个J区之一组合。图1描述了与J区组合的IgVK1-39的两个优选序列。连接的序列表示为IGKV1-39/jk1和IGKV1-39/jk5;替代名称为IgVK1-39*01/IGJK1*01或IgVK1-39*01/IGJK5*01(根据在imgt.org的IMGT数据库万维网的命名)。

[0109] 共同轻链可变区优选地与 κ 轻链恒定区连接。在一个优选的实施方案中,轻链包含 κ 轻链IgVK1-39*01/IGJK1*01或IgVK1-39*01/IGJK5*01。在一个优选的实施方案中,IgVK1-39*01/IGJK1*01。

[0110] 产生共同轻链的细胞可产生例如重排的种系人 κ 轻链IgVK1-39*01/IGJK1*01,以及包含与 λ 恒定区融合的所提及轻链的可变区的轻链。

[0111] 如本文中所述的双特异性抗体或其变体优选具有结合PD-1的胞外部分的一个重链可变区/轻链可变区(VH/VL)组合和结合LAG3的胞外部分的第二VH/VL组合。在一个优选的实施方案中,所述第一VH/VL组合中的VL类似于所述第二VH/VL组合中的VL。在一个更优选的实施方案中,第一和第二VH/VL组合中的VL是相同的。在一个优选的实施方案中,双特异性抗体是全长抗体,其具有结合PD-1的胞外部分的一个重链/轻链(H/L)组合和结合LAG3

的胞外部分的一个H/L链组合。在一个优选的实施方案中,所述第一H/L链组合中的轻链类似于所述第二H/L链组合中的轻链。在一个更优选的实施方案中,第一和第二H/L链组合中的轻链是相同的。

[0112] 已经公布了数种方法以有利于双特异性抗体或反之,单特异性抗体的产生。在本发明中,优选地,相对于相应单特异性抗体的产生,细胞更有利于双特异性抗体的产生。这通常通过对重链的恒定区进行修饰以使得其相对于同二聚化更有利于异二聚化(即与另一重链/轻链组合中的重链二聚化)来实现。在一个优选的实施方案中,本发明的双特异性抗体包含具有相容性异二聚化结构域的两条不同的免疫球蛋白重链。多种相容性异二聚化结构域在本领域中已描述。相容性异二聚化结构域优选地是相容性免疫球蛋白重链CH3异二聚化结构域。当使用野生型CH3结构域时,两种不同重链(A和B)和共同轻链的共表达将产生三种不同的抗体物质:AA、AB和BB。AA和BB是两种单特异性二价抗体的表示,以及AB是双特异性抗体的表示。为了提高所期望的双特异性产物(AB)的百分比,可使用CH3改造,或者换言之,可使用具有相容性异二聚化结构域的重链,如下文所定义。本领域描述了其中可实现重链的这样的异二聚化的多种方式。一种方式是产生“杵-臼(knob into hole)”双特异性抗体。参见美国专利申请20030078385(Arathoon et al.)。

[0113] 本文中使用的术语“相容性异二聚化结构域”是指以下蛋白质结构域,其被改造以使得改造的结构域A' 将优先与改造的结构域B' 形成异二聚体,反之亦然,A' -A' 和B' -B' 之间的同二聚化减弱。

[0114] 在通过引用并入本文中的US13/866,747(现授权为US 9,248,181)、US14/081,848(现授权为US 9,358,286)和PCT/NL2013/050294(公布为W02013/157954)中,公开了使用相容性异二聚化结构域产生双特异性抗体的方法和手段。这些手段和方法也可有利地用于本发明。具体地,本发明的双特异性抗体优选包含突变以基本上仅产生双特异性全长IgG分子。优选的突变是第一CH3结构域中的氨基酸替换L351K和T366K(EU编号) (“KK变体”重链)以及第二结构域中的氨基酸替换L351D和L368E (“DE变体”重链),或反之亦然。先前在我们的US 9,248,181和US 9,358,286专利以及W02013/157954PCT申请中证明,DE变体与KK变体优先配对形成异二聚体(所谓的“DEKK”双特异性分子)。由于相同重链之间CH3-CH3界面中带电残基之间的排斥,几乎不会发生DE变体重链的同二聚化(DEDE同二聚体)。

[0115] 双特异性抗体可通过(瞬时)转染编码轻链和两种不同重链的质粒来产生,所述重链经CH3改造以确保有效异二聚化和双特异性抗体的形成。在单细胞中这些链的产生导致相对于单特异性抗体的形成更有利于双特异性抗体的形成。基本上仅产生双特异性全长IgG1分子的优选突变是第一CH3结构域中在第351位和第366位的氨基酸替换,例如L351K和T366K(根据EU编号进行编号) (“KK变体”重链),以及第二CH3结构域中在第351位和第368位的氨基酸替换,例如,L351D和L368E (“DE变体”重链),或反之亦然。

[0116] Fc区介导抗体的效应物功能,例如补体依赖性细胞毒性(complement-dependent cytotoxicity,CDC)、抗体依赖性细胞毒性(antibody-dependent cellular cytotoxicity,ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬(antibody-dependent cell phagocytosis,ADCP)。根据治疗性抗体或Fc融合蛋白的应用,可期望降低或提高效应物功能。降低的效应物功能在本发明中是优选的。如在本发明的一些实施方案中,当需要激活、增强或刺激免疫应答时,可期望降低的效应物功能。具有降低的效应物功能的抗体可用于靶向免疫细胞的

细胞表面分子,等等。

[0117] 发现IgG与Fc γ R或C1q的结合需要位于铰链区和CH2结构域中的残基。CH2结构域的两个区域(图2D)与Fc γ R和C1q结合相关。已显示,将在第233位至第236位的IgG2残基以及第327位、第330位和第331位的IgG4残基替换到人IgG1中大大降低ADCC和CDC (Armour et al.,1999.Eur J Immunol.29(8):2613-24;Shields et al.,2001.J Biol Chem.276(9):6591-604)。此外,Idusogie et al.证明在包括K322的不同位置的丙氨酸替换显著降低补体激活(Idusogie et al.,2000.J Immunol.164(8):4178-84)。

[0118] 由于其降低的效应物功能,IgG4抗体代表用于受体阻断而没有细胞消耗的IgG亚类。IgG4分子可在称为Fab臂交换的动态过程中交换半分子。该现象可在治疗性抗体与内源性IgG4之间发生。S228P突变是确保Fab臂交换能力降低的突变的一个实例(Labrijn et al.,2009.Nat Biotechnol.27(8):767-71)。

[0119] 具有降低的效应物功能的抗体优选地是包含经修饰的CH2/下铰链区例如以降低Fc-受体相互作用或降低C1q结合的IgG抗体。在一些实施方案中,本发明的抗体是具有突变CH2和/或下铰链结构域的IgG抗体,以使得双特异性IgG抗体与Fc- γ 受体的相互作用降低。包含突变CH2区的抗体优选地是IgG1抗体。这样的突变IgG1 CH2和/或下铰链结构域优选地包含在第235位和/或第236位(根据EU编号进行编号)的氨基酸替换,优选L235G和/或G236R替换(图2E)。

[0120] 如本文中所述的抗体或双特异性抗体的变体包含该抗体或双特异性抗体的功能性部分、衍生物和/或类似物。变体维持该(双特异性)抗体的结合特异性。功能性部分、衍生物和/或类似物维持该(双特异性)抗体的结合特异性。如本文中所述,结合特异性由结合PD-1和LAG3的胞外部分的能力限定。

[0121] 如本文中所述的抗体的功能性部分或优选双特异性抗体的功能性部分是包含结合PD-1的胞外部分的可变结构域和结合LAG3的胞外部分的可变结构域的部分。合适的部分例如是如通过用胃蛋白酶消化双特异性抗体产生的F(ab')₂片段。包含所述可变结构域的其他部分也包括在本发明中。

[0122] 如本文中所述的抗体的功能性衍生物或优选双特异性抗体的功能性衍生物是包含由接头连接的结合PD-1的胞外部分的可变结构域和结合LAG3的胞外部分的可变结构域的蛋白质。可变结构域可以是原样的可变结构域,或者是Fab片段或可变结构域样分子,例如包含经由接头连接在一起的VH和VL的单链Fv片段。可变结构域样分子的一些实例是所谓的单域抗体片段。单域抗体片段(single-domain antibody fragment,sdAb)是具有单个单体可变抗体区域的抗体片段。像完整抗体一样,其能够与特定抗原选择性结合。由于分子量为仅12至15kDa,单域抗体片段比由两条重蛋白质链和两条轻链构成的普通抗体(150至160kDa)小得多,并且甚至小于Fab片段(约50kDa,一条轻链和一半重链)和单链可变片段(约25kDa,两个可变区,一个来自轻链,一个来自重链)。单域抗体本身并不比正常抗体(通常为90至100kDa)小得多。单域抗体片段主要是由在骆驼科动物中发现的重链抗体改造而成;这些被称为VHH片段(Nanobodies[®])。一些鱼类也具有仅有重链的抗体(IgNAR,“免疫球蛋白新抗原受体(immunoglobulin new antigen receptor)”),可从中可获得称为VNAR片段的单域抗体片段。一种替代方法是将来于来自人或小鼠的共有免疫球蛋白G(IgG)的二聚体可变结构域分裂为单体。尽管对单域抗体的大多数研究目前都基于重链可变结构

域,但也已显示来源于轻链的纳米抗体(nanobody)与靶表位特异性结合。可变结构域样分子的另一一些非限制性实例是VHH、人结构域抗体(Human Domain Antibody,dAb)和单抗体(Unibody)。一些优选的功能性部分是包含含有重链可变区和轻链可变区的可变结构域的部分。这样的可变结构域的一些非限制性实例是F(ab)片段和单链Fv片段。可变结构域(样)连接的双特异性形式是例如与两个不同的scFv结合的人血清白蛋白(Human Serum Albumine,HSA);包含两个不同scFv的双特异性微型抗体,所述两个不同scFv通过二聚化基序或自缔合二级结构(例如螺旋束或卷曲螺旋)结合在一起以使scFv片段二聚化(Morrison (2007)Nat.Biotechnol 25:1233-34)。合适的HSA接头的一些实例和用于将scFv与接头偶联的方法描述于W02009/126920中。

[0123] 本发明的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物或者优选双特异性抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物优选地用于人。为此,本发明的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物优选地是人抗体或人源化抗体。人对多肽的耐受由许多不同方面决定。免疫,无论是T细胞介导的、B细胞介导的还是其他,都是人对多肽的耐受中所涵盖的变量之一。本发明的双特异性抗体的恒定区优选地包含人重链恒定区,其优选地包含如图2中所示的序列;和人轻链恒定区,其优选地包含如图1C中所示的序列。恒定区可包含与天然存在人抗体的恒定区的一个或更多个,优选不超过10个,优选不超过5个氨基酸差异。优选地,恒定部分完全来源于天然存在的人抗体。本文中产生的多种抗体来源于用相应靶标免疫接种的共同轻链小鼠,如W02009/157771中所述。本文中产生的多种抗体来源于人抗体可变结构域文库。因此,这些可变结构域是人的。独特的CDR区可来源于人,是合成的,或来源于另一生物体。当可变区具有(除CDR区之外)与天然存在人抗体的可变区的氨基酸序列相同的氨基酸序列时,其至少是人可变区。在一些这样的实施方案中,本发明的结合PD-1或LAG3的胞外部分的抗体的可变结构域的VH、或抗体中的轻链可包含与天然存在人抗体的可变区的一个或更多个,优选不超过10个,优选不超过5个氨基酸差异,不计入CDR区的氨基酸序列中的可能差异。在体细胞超突变的背景下,这样的突变也自然发生。

[0124] 至少对于重链可变区,抗体可来源于多种动物物种。常见的实践为人源化,例如如使鼠重链可变区人源化。存在其中可实现人源化的多种方式,其中存在将CDR接枝到具有与鼠重链可变区的3D结构相匹配的3D结构的人重链可变区中;鼠重链可变区的去免疫化,优选通过从鼠重链可变区中去除已知或怀疑的T细胞或B细胞表位来完成。该去除通常是通过将表位中的一个或更多个氨基酸替换为另外的(通常是保守的)氨基酸,以使得表位的序列被修饰从而使其不再是T细胞或B细胞表位来进行。

[0125] 去免疫化的鼠重链可变区在人中的免疫原性低于原始鼠重链可变区。优选地,本发明的可变区或结构域被进一步人源化,例如如镶饰(veneer)。通过使用镶饰技术,免疫系统容易遇到的外部残基被人残基选择性地替换以提供包含弱免疫原性或基本上无免疫原性的镶饰表面的杂合分子。本发明中使用的动物优选地是哺乳动物,更优选灵长类,最优选人。

[0126] 根据本发明的抗体或双特异性抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物优选地包含人抗体的恒定区。根据其重链恒定结构域的差异,抗体分为五个类别或同种型:IgG、IgA、IgM、IgD和IgE。这些类别或同种型包含用相应的希腊字母命名的所述重链中的至少一种。在一个优选的实施方案中,本发明提供了根据本发明的抗体,其中所述恒定区选自IgG

恒定区,即选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。优选地,所述恒定区优选是IgG4或IgG1恒定区(图2),更优选突变的IgG1恒定区。IgG1恒定区的一些变化自然发生和/或在不改变所得抗体的免疫学特性的情况下被允许。通常来说,在恒定区中允许约1至10个氨基酸插入、缺失、替换,或其组合。恒定区可如本文中所述进行突变,以使得能够有效地异二聚化,以降低效应物功能或出于其他原因,包括半衰期、稳定性等。

[0127] 合理的方法已经朝着使人环境中非人残基的含量最小化发展。多种方法可用于将抗体的抗原结合特性成功地接枝到另一抗体上。抗体的结合特性可主要存在于CDR3区的确切序列中,其通常由与可变结构域整体的适当结构组合的可变结构域中的CDR1和CDR2区的序列支持。目前可用多种方法将CDR区接枝到另一抗体的合适可变结构域上。这些方法中的一些综述于J.C.Almagro和J.Fransson(2008)Frontiers in Bioscience 13,1619-1633,其通过引用包括在本文中。

[0128] 包含如图3中所示可变重链序列的可变结构域的轻链可变区优选地是O12的或基于O12的种系轻链,优选重排种系人 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01或其片段或功能性衍生物(根据在imgt.org的IMGT数据库万维网的命名)。使用术语重排种系人 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01、IGKV1-39/IGKJ1、huV κ 1-39轻链或简称huV κ 1-39。轻链可具有1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换,或其组合。提及的1、2、3、4或5个氨基酸替换优选地是保守氨基酸替换,插入、缺失、替换,或其组合优选地不在VL链的CDR3区中,优选地不在VL链的CDR1、CDR2或CDR3区或FR4区中。共同轻链的一个优选序列示于图1中。

[0129] 可用多种方法产生双特异性抗体。一种方法涉及在细胞中表达两种不同的重链和两种不同的轻链,并收集由细胞产生的抗体。以该方式产生的抗体通常将包含具有重链和轻链的不同组合的抗体的集合,其中一些是所期望的双特异性抗体。随后可从集合中纯化双特异性抗体。可以以多种方式提高由细胞产生的双特异性抗体与其他抗体的比例。在本发明的一个优选实施方案中,该比例通过在细胞中不表达两种不同的轻链而是表达两种基本上相同的轻链来提高。这两种基本上相同的轻链可以是具有基本上相同的轻链可变区和不同的轻链恒定区,或者优选地两个基本上相同的轻链恒定区的轻链。该概念在本领域中也称为“共同轻链”方法。当基本上相同的轻链与两种不同的重链共同作用允许形成具有不同抗原结合位点并伴随不同结合特性的可变结构域时,相对于两种基本上不同轻链的表达,由细胞产生的双特异性抗体与其他抗体的比例显著提高。由细胞产生的双特异性抗体的比例可通过相对于两种相同重链的配对而刺激两种不同重链彼此配对来进一步提高。本领域描述了其中可实现重链的这样的异二聚化的多种方式。一种优选的方法描述于美国临时申请61/635,935中,继其之后是美国正式申请No.13/866,747和PCT申请No.PCT/NL2013/050294(WO 2013/157954 A1),其通过引用并入本文中。公开了用于产生双特异性抗体(从单细胞)的方法和手段,由此提供了相对于单特异性抗体的形成更有利于双特异性抗体的形成的手段。这些方法也可有利地用于本发明。因此,本发明提供了用于产生根据本发明的双特异性抗体(从单细胞)的方法,其中所述双特异性抗体包含能够形成界面的两个CH3结构域,所述方法包括在所述细胞中提供:a)第一核酸分子,其编码含第一CH3结构域重链,b)第二核酸分子,其编码含第二CH3结构域重链,其中所述核酸分子提供用于所述含第一CH3结构域重链与含第二CH3结构域重链的优先配对,所述方法还包括培养所述宿主细胞并允许表达所述两种核酸分子并从培养物中收获所述双特异性抗体的步骤。所述第一和第二核

酸分子可以是同一核酸分子、载体或基因递送载体的一部分,并且可以整合在宿主细胞基因组的相同位点。或者,向所述细胞分别提供所述第一和第二核酸分子。宿主细胞包含至少一种轻链,并且优选共同轻链。

[0130] 一个优选的实施方案提供了用于从单细胞产生根据本发明的双特异性抗体的方法,其中所述双特异性抗体包含能够形成界面的两个CH3结构域,所述方法包括提供:

[0131] -具有以下的细胞:a) 第一核酸分子,其编码包含可与PD-1的胞外部分结合的抗原结合位点且含有第一CH3结构域的重链;和b) 第二核酸分子,其编码包含可与LAG3的胞外部分结合的抗原结合位点且含有第二CH3结构域的重链,其中所述核酸分子提供用于所述第一CH3结构域与第二CH3结构域的优先配对,

[0132] 所述方法还包括以下步骤:培养所述细胞并允许表达由所述两种核酸分子编码的蛋白质,并从培养物中收获所述双特异性IgG抗体。在一个特别优选的实施方案中,所述细胞还具有编码共同轻链的第三核酸分子。所述第一、第二和第三核酸分子可以是同一核酸分子、载体或基因递送载体的一部分,并且可以整合在宿主细胞基因组的相同位点。或者,向所述细胞分别提供所述第一、第二和第三核酸分子。如上所述,一个优选的共同轻链基于012,其优选地是重排种系人 κ 轻链IgV κ 1 39*01/IGJ κ 1*01。用于所述第一CH3结构域和所述第二CH3结构域的优先配对的手段优选地是重链编码区的CH3结构域中的相应突变。基本上仅产生双特异性抗体的优选突变是第一CH3结构域中的氨基酸替换L351K和T366K(根据EU编号进行编号)以及第二CH3结构域中的氨基酸替换L351D和L368E,或反之亦然(图2)。因此,还提供了根据本发明的用于产生双特异性抗体的方法,其中所述第一CH3结构域包含氨基酸替换L351K和T366K(根据EU编号进行编号),并且其中所述第二CH3结构域包含氨基酸替换L351D和L368E,所述方法还包括以下步骤:培养所述细胞并允许表达由所述核酸分子编码的蛋白质,并从培养物中收获所述双特异性抗体。还提供了根据本发明的用于产生双特异性抗体的方法,其中所述第一CH3结构域包含氨基酸替换L351D和L368E(根据EU编号进行编号),并且其中所述第二CH3结构域包含氨基酸替换L351K和T366K,所述方法还包括以下步骤:培养所述细胞并允许表达所述核酸分子,并从培养物中收获所述双特异性抗体。可通过这些方法产生的抗体也是本发明的一部分。CH3异二聚化结构域优选地是IgG1异二聚化结构域。包含CH3异二聚化结构域的重链恒定区优选地是IgG1恒定区。

[0133] “阻断”PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合的可变结构域干扰PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。这样的可变结构域可结合PD-1。这样的阻断可变结构域可结合PD-1上的表位,并与PD-L1和/或PD-L2竞争与该表位结合。这样的阻断可变结构域和PD-L1和/或PD-L2也可与PD-1上的不同表位结合。在这样的情况下,阻断活性可例如是由于PD-L1和/或PD-L2的结合减弱,PD-L1和/或PD-L2的置换(在其已与PD-1结合时),或者可通过位阻而阻止与PD-1结合。所有这些和其他机制可至少部分地阻止所述结合配偶体与所述第一膜蛋白结合。

[0134] “阻断”LAG3与MHC II类的结合的可变结构域干扰LAG3与MHC II类的结合。这样的可变结构域结合LAG3。这样的阻断可变结构域结合LAG3上的表位,并与MHC II类竞争与该表位结合。这样的阻断可变结构域和MHC II类也可与LAG3上的不同表位结合。在这样的情况下,阻断活性可以是由于PD-L1和/或PD-L2的结合减弱,MHC II类的置换(在其已与LAG3结合时),或者通过位阻而阻止与LAG3结合。所有这些和其他机制可至少部分地阻止所述结合配偶体与所述第一膜蛋白结合。

[0135] LAG3胞外域由四个Ig样结构域(D1至D4)构成。LAG-3的前两个N端结构域(D1和D2)能够结合MHC II类。在本发明中,发现包含如本文中所述的结合PD-1的胞外部分的可变结构域和结合LAG-3的胞外部分的可变结构域的抗体在刺激免疫应答和/或刺激免疫突触的形成、稳定性和/或活性中有效。当结合LAG-3的可变结构域结合LAG-3的胞外结构域1、胞外结构域2、胞外结构域3或胞外结构域4时,情况就是如此。优选地,结合LAG-3的可变结构域结合胞外结构域1或胞外结构域2。在本文中所述的抗体的情况下,这样的可变结构域更有效。在一个实施方案中,结合LAG-3的可变结构域结合LAG-3的胞外结构域2。

[0136] 当与不存在可变结构域的情况下的结合相比时,如本文中所述的阻断特异性结合对(即PD-1/PD-L1;PD-1/PD-L2或LAG3/MHC II类)结合的可变结构域通常降低该对的结合。这优选在体外测定中测量。通常来说,这通过将可变结构域与可与其结合的膜蛋白孵育并随后将混合物与该对中的另一成员孵育来进行。然后将该对的结合与不存在可变结构域的情况下该对的结合进行比较。可变结构域可完全阻止第一膜蛋白与其结合配偶体的结合。其还可以部分阻止结合对的结合。当与不存在可变结构域的情况下的结合相比时,阻断膜蛋白的特异性结合对的结合的可变结构域优选地使该对的结合降低至少50%,优选至少60%,优选至少70%,优选至少80%,并且更优选至少90%。通过可变结构域的结合阻断在本文中定义为使用包含所述两个相同的所述可变结构域的二价单克隆抗体获得的阻断。所述可变结构域当存在于包含所述可变结构域和结合第二膜蛋白的可变结构域的抗体中时当然也阻断结合。

[0137] 可结合PD-1的胞外部分并且至少部分地阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2结合的特定可变结构域是包含以下VH的氨基酸序列的可变结构域:图3中的MF6076、MF6226、MF6236、MF6256、MF6930、MF6932、MF6935、MF6936、MF6972、MF6974或MF6982,优选MF6256、MF6930、MF6076、MF6974或MF6226,优选MF6930、MF6076或MF6974。可结合LAG3的胞外结构域并且阻断LAG3与MHC II类结合的特定可变结构域是包含以下VH的氨基酸序列的可变结构域:图3中的MF7100、MF7111、MF7116、MF7118、MF7134、MF7136、MF7137、MF7142、MF7146、MF7165、MF7167、MF7185、MF7443、MF7444、MF7515、MF7518、MF7096、MF7097、MF7106、MF7120、MF7133、MF7139、MF7144或MF7524,优选MF7518、MF7165、MF7116、MF7096、MF7133、MF7139、MF7524或MF7137,优选MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096。

[0138] 本发明还提供了使T细胞接合和/或活化的方法,其包括:提供包含T细胞和待与所述T细胞接合或活化的细胞(第二细胞)的系统;以及向所述系统提供至少一种抗体,优选至少一种双特异性抗体,其包含可结合PD-1的可变结构域和可结合LAG3的可变结构域;以及在允许T细胞接合和/或活化的条件下孵育所述系统。在一些实施方案中,所述方法是体外方法。待与所述T细胞接合或活化的细胞优选地是免疫细胞,例如抗原呈递细胞、巨噬细胞、赘生性细胞、病毒感染的细胞或胞内寄生生物感染细胞。接合和/或活化T细胞使T细胞针对特定靶标。活化T细胞是活化所述T细胞的T细胞受体。使T细胞接合通常是活化T细胞。接合还可以使已经活化的T细胞针对抗体指定的靶标。允许所述T细胞接合和/或活化的条件通常是培养条件,但是也可以是在非人动物中进行孵育。条件为使得T细胞在不存在抗体的情况下不接合。如果测量了T细胞的集合,则其中一些可已经接合或活化,条件是该集合包含足够的未接合或活化的T细胞。

[0139] 本发明的抗体可使两个细胞紧密靠近在一起,从而允许由除由本发明抗体结合的

PD-1和LAG3以外的蛋白质介导的细胞之间的相互作用。一种这样的相互作用是一个细胞的T细胞受体与另一细胞上的MHC的相互作用。

[0140] 在一个方面中,本发明提供了用于在PD-1和/或LAG3阳性细胞中干扰PD-1和/或LAG3介导的抑制的方法,所述方法包括使所述细胞与包含以下的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物接触,从而在所述细胞中抑制PD-1和/或LAG3介导的活性:

[0141] -可与PD-1的胞外部分结合的可变结构域,和

[0142] -其可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域。

[0143] LAG3或PD-1阳性细胞以可检出的量在细胞膜上表达膜蛋白,所述量通常通过对该膜蛋白具有特异性的单克隆抗体的免疫荧光检出。PD-1阳性细胞是T细胞。LAG3细胞优选地是T细胞,更优选所谓耗竭T细胞。T细胞耗竭是在许多慢性感染和癌症期间出现的T细胞功能障碍的状态。其由差效应物功能、抑制性受体的持续表达和与功能性效应或记忆T细胞的转录状态不同的转录状态限定。耗竭阻止对感染和肿瘤的最佳防治。本发明的抗体通过与相应的膜蛋白结合并阻止蛋白质被该蛋白质的相应结合配偶体刺激来干扰PD-1和LAG3介导的抑制。PD-1的已知结合配偶体是PD-L1和PD-L2。LAG3的已知结合配偶体是MHC II类。该抗体阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2;和/或LAG3与MHC II类的相互作用,并由此至少部分地阻止PD-1在PD-1阳性细胞中的抑制活性和/或LAG3在LAG3阳性细胞中的抑制活性。在本发明的一个优选实施方案中,所述结合PD-1的可变结构域与PD-1的结合阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2,优选PD-L1的结合。在本发明的一个优选实施方案中,所述结合LAG3的可变结构域与LAG3的结合阻断LAG3与MHC II类的结合。所述细胞中PD-1和/或LAG3介导的活性的抑制可以以多种方式测量。通常但并非必须,通过测量CD4⁺或CD8⁺T细胞的活化来测量活性。这可通过使用健康的CD4⁺或CD8⁺T细胞来进行,但是对耗竭的作用通常最好是在耗竭的T细胞上测量。这样的T细胞例如对于LAG3是阳性的。活性优选在HIV特异性T细胞中测量,其优选地从患有进行性疾病对象收集。增殖是合适的参数。可在存在和不存在抗体的情况下确定增殖速率。增殖速率的差异是这些细胞中LAG3和/或PD-1的活性的抑制水平的量度。合适的T细胞的另一些实例是从患有非小细胞肺癌(non-small-cell lung carcinoma, NSCLC)的对象收集的TIL。干扰素 γ 的产生是合适的参数。可在存在和不存在抗体的情况下确定干扰素 γ 的产生。干扰素 γ 产生的差异是这些细胞中LAG3和/或PD-1的活性的抑制水平的量度。增殖和/或干扰素 γ 产生提高指示这些细胞中LAG3和/或PD-1的活性的抑制。在一个优选的实施方案中,相对于不存在抗体的情况下检测到的水平或速率,所述提高为提高至少10%,优选至少20%,更优选至少40%,更优选至少80%。

[0144] 本发明还提供了用于刺激免疫突触的形成、稳定性和/或活性的方法,其包括提供包含能够通过免疫突触彼此缔合的至少两种细胞的系统,并向所述系统提供包含以下的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物,从而刺激所述至少两种细胞之间的免疫突触的形成、稳定性和/或活性:

[0145] -可与PD-1的胞外部分结合的可变结构域,和

[0146] -可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域。

[0147] 抗体通过与在细胞膜上包含PD-1或LAG3的细胞上的PD-1和/或LAG3结合来促进免疫突触的形成、稳定性和/或活性。结合抑制PD-1和/或LAG3的活性。这具有刺激免疫突触的形成、稳定性和/或活性的作用。可结合PD-1的可变结构域优选阻断PD-1与PD-L1和/或PD-

L2, 优选PD-L1的结合。可结合LAG3的可变结构域优选阻断LAG3与MHC II类的结合。所述两种细胞是能够形成免疫突触的细胞。所述细胞中的至少一种是T细胞受体阳性细胞。另一种细胞通常但并非必须是抗原呈递细胞。免疫突触由于T细胞与抗原呈递细胞 (antigen-presenting cell, APC) 的紧密连接 (apposition) 而形成, 并且其是其中T细胞受体 (TCR) 被其存在于APC膜中的抗原配体 (肽-MHC复合物) 触发的位点。T细胞膜中的免疫突触通常具有膜受体及其下面的细胞骨架和信号传导蛋白的三个同心环。内环或中央超分子激活簇 (central supramolecular activation cluster, cSMAC) 集中了大多数的TCR和CD28, 并且其被由整联蛋白形成的外周SMAC包围。最后, 最外环或远端SMAC (dSMAC) 是具有大胞外域的蛋白质所在的地方, 例如CD43和CD45, 远离cSMAC。

[0148] 本发明还提供了抗体或其变体, 所述抗体或其变体包含可与PD-1的胞外部分结合的可变结构域和可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域。

[0149] 在本发明的方法、抗体 (或其变体) 或用途的一个优选的实施方案中, 结合PD-1的可变结构域阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。结合LAG3的可变结构域优选阻断LAG3与MHC II类的结合。优选地, 这两个可变结构域阻断相应结合配偶体的结合。

[0150] 结合PD-1的胞外部分的可变结构域优选地限定为这样的可变结构域: 其当以包含两个所述结合PD-1的可变结构域的二价单特异性抗体形式时, 与在用抗体纳武单抗对Jurkat细胞获得的抑制相比以20%至150%抑制T细胞受体介导的Jurkat细胞活化的PD-1/PD-L1介导的抑制。

[0151] 当与用抗体纳武单抗对Jurkat细胞获得的抑制相比时, 对TCR介导的所述Jurkat细胞活化的PD-1抑制的抑制优选为50%至150%, 优选80%至150%, 更优选100%至150%。在一个优选的实施方案中, 当与用抗体纳武单抗对所述Jurkat细胞获得的抑制相比时, 所述抑制为至少100%。TCR介导的Jurkat细胞活化的PD-1抑制优选通过测量Jurkat细胞中PD-1/PD-L1结合的免疫减弱作用来测量, 所述Jurkat细胞在可由于所述抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物的存在而通过T细胞受体活化的条件下进行孵育。

[0152] 本发明还提供了组合物或成套药盒, 其包含含有可与PD-1的胞外部分结合的可变结构域和可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域的一种或更多种抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物;

[0153] 其中所述抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物中的第一种和第二种结合:

[0154] -PD-1上的不同表位;

[0155] -LAG3上的不同表位; 或

[0156] -PD-1和LAG3上的不同表位。包括涉及如在该段落中指定的具有结合PD-1和LAG3的可变结构域的一种或更多种抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物的方法、用途、组合物或成套药盒的实施方案也被称为“Oligoclonics”实施方案。这样的Oligoclonics实施方案的一些实例是具有所述第一和第二抗体的实施方案。“Oligoclonics”是注册商标。WO 2013/157953和WO2004/009618中公开了用于制造这样的 **Oligoclonics®** 产品的一般方法, 并且其在此通过引用并入。

[0157] 在Oligoclonics实施方案中, 第一抗体和第二抗体包含结合PD-1和LAG3的可变结构域。具有结合相同PD-1或LAG3的可变结构域的抗体可结合相同的单独蛋白质, 但这并非必须如此。与PD-1或LAG3结合的本发明抗体结合所述蛋白质上的表位。表位是抗原、在该情

况下由抗体识别的膜蛋白的部分。结合膜蛋白上不同表位的第一和第二抗体可结合膜上的同一单独蛋白质。为此,不同的表位优选是非重叠的表位。换言之,不同的表位在膜蛋白上充分分离,以至于两种抗体可同时与同一单独蛋白质结合。出人意料地发现,Oligoclomics (第一抗体和第二抗体或更多抗体的组合)可比相同量的每种单独抗体更有效。

[0158] 优选地,两种或更多种抗体或功能性部分、衍生物和/或类似物中的至少一种包含结合PD-1的可变结构域,其阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2,优选PD-L1的结合。在一个优选的实施方案中,两种或更多种抗体或功能性部分、衍生物和/或类似物中的至少两种包含结合PD-1的可变结构域,其阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2,优选PD-L1的结合。

[0159] 优选地,两种或更多种抗体或功能性部分、衍生物和/或类似物中的至少一种包含结合LAG3的可变结构域,其阻断LAG3与MHC II类的结合。在一个优选的实施方案中,两种或更多种抗体或功能性部分、衍生物和/或类似物中的至少两种包含结合LAG3的可变结构域,其阻断LAG3与MHC II类的结合。

[0160] 优选地,两种或更多种抗体或功能性部分、衍生物和/或类似物中的至少一种包含:结合PD-1的可变结构域,其阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2,优选PD-L1的结合;和结合LAG3的可变结构域,其阻断LAG3与MHC II类的结合。优选地,两种或更多种抗体或功能性部分、衍生物和/或类似物中的至少两种包含:结合PD-1的可变结构域,其阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2,优选PD-L1的结合;和结合LAG3的可变结构域,其阻断LAG3与MHC II类的结合。

[0161] 在一个方面中,本发明提供了如本文中所述的方法和用途,其中使用两种或更多种抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物,并且其中这两种或更多种抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物包含可与PD-1的胞外部分结合的可变结构域和可与LAG3的胞外部分结合的可变结构域;

[0162] 其中所述抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物中的第一种和第二种结合:

[0163] -PD-1上的不同表位;

[0164] -LAG3上的不同表位;或

[0165] -PD-1和LAG3上的不同表位。通过结合PD-1的可变结构域来阻断PD-L1和/或PD-L1的结合以及通过结合LAG3的可变结构域来阻断LAG3与MHC II类的结合的优先性与Oligoclomics实施方案中描述的不同。

[0166] 抗体或其部分、衍生物或类似物优选包含如所描述的两个可变结构域。这样的抗体优选地是双特异性抗体或其功能性部分、衍生物或类似物。可将两个或更多个抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物连接在一起。多种方法是本领域中已知的。一种合适的方法是缀合。另外,制造多特异性抗体的技术已经进展到还包括与正常单特异性抗体具有相同总体结构的双特异性抗体,但是其中该抗体的两个臂各自结合不同的靶标。双特异性抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物优选具有带有相容性异二聚化结构域的两条重链。轻链优选地是共同轻链。抗体优选地是全长双特异性抗体,其由具有相容性异二聚化结构域的两条重链组成。轻链优选地是共同轻链。

[0167] 本文中使用的术语“缀合物”是指已经共价连接、任选地通过连接区共价连接的两个或更多个分子。例如,在一些实施方案中,缀合物是通过连接区与第二蛋白质或非蛋白质部分连接的第一蛋白质或非蛋白质部分。例如,在本发明的结合分子的一些实施方案中,其包含已经共价连接的两个或更多个抗体,或由其组成。缀合物不限于第一和第二部分,而且

在一些实施方案中,其还可具有通过另外的连接区连接的第三、第四或更多部分。如本申请中其他地方所述,蛋白质部分的一些实例包括但不限于:多肽、肽模拟物或抗体(或如本申请中其他地方所述的抗体部分、衍生物或类似物)。非蛋白质部分的一些实例包括但不限于适配体。可使用多种类型的接头,并且将根据缀合物中的分子类型和对接头所期望的特性(长度、柔性、对蛋白酶活性的抗性和其他类似特征)选择合适的接头。这样的接头可包含核苷酸、多肽或合适的合成材料。例如,接头可以是柔性肽接头。在某些实施方案中,接头可以是可切割的接头,从而允许缀合物的部分彼此分离。在另一些实施方案中,肽接头可以是螺旋接头。用于连接蛋白质和其他分子的多种实例和试剂盒是本领域中公知的。本文中使用的术语“融合蛋白”是指包含已经通过重组在DNA水平连接并作为单个多肽一起表达的两个或更多个多肽或蛋白质的蛋白质。融合蛋白还可包含也由DNA编码且与融合蛋白一起表达的肽连接区。可将为融合蛋白一部分的肽接头设计成具有特定的特性,例如柔性、亲水性、蛋白酶抗性、可切割性等。可在DNA序列中设计所有这些特性,并且用于设计接头的方法在本领域中是公知的。例如,抗体可通过本领域中公知的方法连接在一起,并且如本文中所述,以形成双特异性或多重靶向抗体。此外,双特异性抗体可通过本领域中已知的多种方法,例如通过使用例如 **Biclomics**[®] (参见例如W02013/157954) 的技术来构建。双特异性单克隆抗体 (BsMAb, BsAb) 通常包含两种不同单克隆抗体的结合结构域,并且因此与两种不同表位结合。**Biclomics**[®] 分子以及其他全长IgG双特异性抗体具有由scFv的Fab的全长IgG分子的两个不同可变区编码的两种不同抗原结合特异性。**Biclomics**[®] 可通过将单独细胞用编码两种不同共同轻链 (cLC) 抗体的遗传构建体共转染产生,如本文中其他地方所述。CH3改造确保有效的异二聚化和基本上纯双特异性抗体的形成。

[0168] 本发明的抗体优选地是双特异性抗体。抗体通常通过所谓的抗原结合位点结合其靶标。未经修饰的抗原结合位点通常由抗体的可变结构域形成并且存在于抗体的可变结构域中。可变结构域包含抗原结合位点。可结合抗原的可变结构域是包含可与抗原结合的抗原结合位点的可变结构域。

[0169] 抗体可变结构域通常包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)。抗原结合位点可存在于组合的VH/VL可变结构域中,或仅存在于VH区或仅存在于VL区中。当抗原结合位点存在于可变结构域的两个区域之一中时,对应的可变区可促进结合可变区的折叠和/或稳定性,但不显著促进抗原本身的结合。

[0170] 如本文中使用的抗原结合是指抗体对其抗原的典型结合能力。抗体与抗原的结合可以以多种方式评估。一种方式是将抗体与抗原(优选表达抗原的细胞)一起孵育,去除未结合的抗体(优选通过洗涤步骤进行),并通过与结合的抗体结合的经标记抗体检测结合的抗体。

[0171] 抗体的抗原结合通常通过抗体的互补决定区 (CDR) 以及抗原和可变结构域二者的特定三维结构介导,从而允许这两个结构精确地结合在一起(类似于锁和钥匙的相互作用),这与随机的、非特异性的蛋白质黏附相对。由于抗体通常识别称为抗原表位的抗原部分,并且由于这样的表位也可存在于其他化合物中,因此根据本发明的抗体也可识别其他蛋白质,如果这样的其他化合物包含相同表位的话。因此,术语“结合”不排除抗体与包含相同表位的其他蛋白质的结合。这样的其他蛋白质优选地不是人蛋白质。

[0172] 抗体通常不与除出生后人,优选成人中细胞膜上特定靶蛋白之外的其他蛋白质结

合。

[0173] 可结合PD-1的胞外部分的本发明的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物中的可变结构域与PD-1结合,并且在其他方面相同的条件下,与同一物种的CD28家族中另一成员的胞外部分以低至少100倍结合。结合PD-1的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物的可变结构域与PD-1结合,并且在其他方面相同的条件下与同一物种的CD28、CTLA4、ICOS、BTLA、Nkp30和TMIGD2以低至少100倍结合。考虑到PD-1是一种细胞表面蛋白,所述结合通常在于细胞表面上表达成员的细胞上评估。

[0174] 可结合LAG3的胞外部分的本发明的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物中的可变结构域与LAG3结合,并且在其他方面相同的条件下,与同一物种的CD4的胞外部分以低至少100倍结合。考虑到LAG3是一种细胞表面蛋白,所述结合通常在于细胞表面上表达成员的细胞上评估。

[0175] 本发明还提供了用于治疗患有癌症的个体的方法,所述方法包括向有此需要的个体施用本发明的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物或者本发明的双特异性抗体。所述个体优选地是患有癌症的个体。在一些实施方案中,癌症是包含表达膜蛋白的癌细胞的癌症。在一个优选的实施方案中,癌症是包含表达PD-L1和/或PD-L2的癌细胞的癌症。所述癌症优选地是腺癌。一些优选的癌症是结直肠癌;胰腺癌;肺癌;乳腺癌;肝癌;前列腺癌;卵巢癌;宫颈癌;子宫内膜癌;头颈癌;黑素瘤;睾丸癌;尿路上皮癌;肾癌;胃癌;或类癌。在一个优选的实施方案中,癌症是结直肠癌;胰腺癌;肺癌;乳腺癌;肝癌;前列腺癌;卵巢癌;宫颈癌;子宫内膜癌;头颈癌;或黑素瘤。在一个特别优选的实施方案中,癌症是结直肠癌;胰腺癌;肺癌;乳腺癌;或肝癌。在一个特别优选的实施方案中,癌症是胃肠癌。在一个优选的实施方案中,癌症是结直肠癌。在该实施方案中,抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物优选地是具有可结合PD-1的可变结构域和可结合LAG3的可变结构域的抗体。结合PD-1的可变结构域优选地阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2,优选PD-L1的结合。结合LAG3的可变结构域优选地阻断LAG3与MHC II类的结合。优选地,所述方法包括两种或更多种的所述抗体或其功能性部分,如针对Oligoclones实施方案所述的。

[0176] 还提供了用于在个体中刺激针对所述个体中异常细胞的免疫应答的方法,所述方法包括向所述个体提供本发明的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物。异常细胞优选地是癌细胞、病毒感染的细胞、寄生生物或寄生生物感染的细胞。在一个优选的实施方案中,细胞是癌细胞或赘生性细胞。在该实施方案中,抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物优选地是具有可结合PD-1的可变结构域和可结合LAG3的可变结构域的抗体。在该实施方案中,结合PD-1的可变结构域优选地阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2,优选PD-L1的结合。结合LAG3的可变结构域优选地阻断LAG3与MHC II类的结合。优选地,该方法包括两种或更多种所述抗体或其功能性部分,如针对Oligoclones实施方案所述的。

[0177] 赘生物是组织的异常生长,并且当其也形成团块时通常称为肿瘤。本发明中的赘生物通常形成团块。赘生性细胞是来自已形成团块的赘生物体的细胞。世界卫生组织(World Health Organization,WHO)将赘生物分类为四个主要组群:良性赘生物、原位赘生物、恶性赘生物和行为不确定或未知的赘生物。恶性赘生物也简称为癌症。

[0178] 刺激免疫应答涵盖诱导免疫应答和增强已经存在的免疫应答。个体中的免疫应答可通过在适用情况下测量个体的肿瘤负荷、个体的病毒负荷、个体的寄生生物负荷来测量。

[0179] 所述病毒感染的细胞优选地是经以下感染的细胞:免疫缺陷病毒;疱疹病毒,优选单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒;巨细胞病毒或EB病毒(Epstein-Barr virus);乳头瘤病毒;肝炎病毒,优选甲型、乙型或丙型肝炎病毒;麻疹病毒或腺病毒。该病毒优选地是已知能够在个体中持续存在的病毒。持续性感染表征为其中病毒未被清除而仍保留在被感染个体的特定细胞中的感染。持续性感染可涉及沉默性感染和生产性感染两个阶段,而不会迅速杀伤宿主细胞,或甚至不会对其造成过度破坏。持续性病毒-宿主相互作用可以是潜伏的、慢性的和/或缓慢的感染。

[0180] 寄生生物感染的细胞是被胞内寄生生物感染的细胞。这样的寄生生物是能够在宿主的细胞内生长和繁殖的寄生性微生物。一些胞内寄生生物也可以在细胞外生活。这样的寄生生物是所谓的兼性胞内寄生生物。一些非限制性实例是单核细胞性李斯特菌(*Listeria monocytogene*)、军团菌(*Legionella*),分枝杆菌属(*mycobacterium*)的某些物种,和新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)。一些优选的胞内寄生生物是不能在宿主细胞外生长的寄生生物,一些优选的实例是衣原体(*Chlamydia*)及密切相关物种;分枝杆菌属的某些物种,例如麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*);某些原生动物的,包括:顶复门原虫(*Apicomplexan*) (疟原虫属(*Plasmodium spp.*))、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)和微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)以及锥虫(*trypanosomatids*)。

[0181] 本发明还提供了编码根据本发明的抗体重链可变区的核酸分子。核酸分子(通常是体外的、分离的或重组的核酸分子)优选编码如图3中所示重链可变区或具有1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换、或其组合的如图3中所示重链可变区中的任一个。在一个优选的实施方案中,核酸分子包含如图3中所示的序列。核酸分子优选地使用针对在待使用的抗体产生细胞中表达而优化的密码子。优选地,对编码如图3中所示重链可变区或具有1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换、或其组合的如图3中所示重链可变区的核酸进行密码子优化以在人细胞优选Per.C6TM、或中国仓鼠优选CHO中表达。本发明还提供了编码提及的重链可变区和图2的重链恒定区的核酸分子。

[0182] 本发明中使用的核酸分子通常是但并非绝对是核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)。替代核酸可为本领域技术人员所用。根据本发明的核酸分子例如包含在细胞中。当所述核酸分子在所述细胞中表达时,所述细胞可产生根据本发明的抗体。因此,在一个实施方案中,本发明提供了包含根据本发明的抗体和/或根据本发明的核酸分子的细胞。当所述细胞产生重链和轻链时,产生抗体。提供了可产生本发明的抗体的细胞。所述细胞优选包含编码包含抗体重链可变区的抗体重链的核酸分子,所述抗体重链可变区在与共同轻链组合时可结合所述第一膜蛋白。所述细胞优选地还包含编码包含抗体重链可变区的抗体重链的核酸分子,所述抗体重链可变区在与共同轻链组合时可结合所述第二膜蛋白。所述细胞优选地还包含编码共同轻链的核酸分子。所述细胞优选为动物细胞,更优选为哺乳动物细胞,更优选为灵长类细胞,最优选为人细胞。出于本发明的目的,合适的细胞是能够包含并且优选产生根据本发明的抗体和/或根据本发明的核酸的任何细胞。

[0183] 本发明还提供了包含根据本发明的抗体的细胞。还提供了包含单独或一起编码本发明抗体的一种或更多种核酸分子的细胞。一种或更多种核酸分子是可表达的核酸分子,意指它们包含用于RNA转录和蛋白质编码结构域翻译所需的顺式信号。优选地,所述细胞(通常是体外的、分离的或重组的细胞)产生所述抗体。在一个优选的实施方案中,所述细胞

是杂交瘤细胞、中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞、NS0细胞或PER-C6TM细胞。在一个特别优选的实施方案中,所述细胞是CHO细胞。还提供了包含根据本发明的细胞的细胞培养物。多家机构和公司已经开发了用于大规模生产抗体的细胞系,例如用于临床应用。这样的细胞系的一些非限制性实例是CHO细胞、NS0细胞或PER.C6TM细胞。这些细胞还用于其他目的,例如蛋白质的产生。为工业规模生产蛋白质和抗体而开发的细胞系在本文中又称为工业细胞系。因此,在一个优选的实施方案中,本发明提供了开发用于大规模生产抗体的细胞系用于生产本发明的抗体的用途。本发明还提供了用于产生抗体的细胞,其包含编码如图3、1和2中所示的VH、VL和/或重链的核酸分子。优选地,所述核酸分子包含如图1和2中所示的序列。

[0184] 本发明还提供了用于产生抗体的方法,其包括培养本发明的细胞并从所述培养物中收获所述抗体。优选地,所述细胞在无血清培养基中培养。优选地,所述细胞适合于悬浮生长。还提供了可通过根据本发明的用于产生抗体的方法获得的抗体。优选从培养物的培养基中纯化抗体。优选地,对所述抗体进行亲和纯化。

[0185] 本发明的细胞例如是杂交瘤细胞系、CHO细胞、293F细胞、NS0细胞或本领域中已知的适合于用于临床目的的抗体产生,特别是适合于产生用于在人中施用的抗体的任何其他细胞类型。在一个特别优选的实施方案中,所述细胞是人细胞,优选被腺病毒E1区或其功能等同物转化的细胞。这样的细胞系的一个优选实例是PER.C6TM细胞系或其等同物。在一个特别优选的实施方案中,所述细胞是CHO细胞或其变体,优选使用谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 载体系统表达抗体的变体。

[0186] 本发明还提供了药物组合物,其包含根据本发明的一种或更多种抗体或其变体。药物组合物优选地包含优选可药用的赋形剂或载体。本发明的抗体或其变体还可包含标记,优选用于体内成像的标记。这样的标记对于治疗应用来说通常是非必需的。例如,在诊断背景下,标记可有所帮助。例如,可用于使体内的靶细胞可视化。多种标记是合适的,并且许多标记是本领域中公知的。在一个优选的实施方案中,标记是用于检测的放射性标记。在另一个优选的实施方案中,标记是红外标记。优选地,红外标记适合于体内成像。多种红外标记对于本领域技术人员而言是可用的。一些优选的红外标记是例如IRDye 800;IRDye 680RD;IRDye 680LT;IRDye750;IRDye 700DX;IRDye 800RS IRDye 650;IRDye 700亚磷酰胺;IRDye 800亚磷酰胺 (LI-COR USA;4647 Superior Street;Lincoln,Nebraska)。

[0187] 待施用于患者的根据本发明的抗体的量通常在治疗窗内,意指使用足够的量以获得治疗作用,而该量不超过导致不可接受程度的副作用的阈值。获得期望治疗作用所需的抗体量越低,治疗窗通常越大。因此,优选在低剂量下发挥足够治疗作用的根据本发明的抗体。剂量可在纳武单抗的给药方案的范围内。剂量也可以更低。

[0188] 与具有可变结构域的二价单特异性抗体的组合相比,根据本发明的抗体或其变体并且特别是双特异性抗体或其变体可具有更少的副作用。阻断抑制性和/或共刺激性分子的抗体的组合有益于对现有免疫治疗无响应的患者。然而,已显示免疫调节受体 (immunomodulatory receptor, iMOD) 的双重阻断提高免疫相关毒性。根据本发明的抗体或其变体并且特别是双特异性抗体或其变体适合于解决iMOD的双重阻断,因为其可发挥单克隆抗体组合不能再现的功能活性,并且可更选择性地靶向特定细胞群,这降低了患者中的安全责任。

[0189] 鉴于以上所述,优选将根据本发明的双特异性抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物用于治疗应用。

[0190] 通过将抗体克隆至互补性表达载体中而作为双特异性抗体产生抗体,所述互补性表达载体包含驱动重链进行异二聚化的在CH3区中的突变。许多双特异性抗体以小规模产生,并且在结合和功能测定中对癌细胞系进行测试。本发明的抗体,特别是本发明的双特异性抗体可将低毒性谱与高效力组合。本发明的抗体可用于多种类型和线的免疫靶向治疗。当与用两个臂结合相同抗原的抗体相比时,本发明的抗体可具有提高的治疗窗。

[0191] 还提供了根据本发明的双特异性抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物用于制备用于治疗或预防异常细胞、肿瘤和/或转移形成的药物的用途。所述转移来源于的肿瘤优选地是对PD-L1和/或PD-L2呈阳性的肿瘤。

[0192] 在悬浮293F细胞中瞬时转染之后,本发明的抗体可以以>50mg/L的水平产生。可将双特异性抗体纯化至大于98%的纯度,产率>70%。分析型表征研究表明,双特异性IgG1抗体谱与二价单特异性IgG1相当。

[0193] 出于清楚和简明描述的目的,本文中特征作为相同或分开的实施方案的一部分进行描述,然而,应当理解,本发明的范围可包括具有所描述的特征中全部或一些的组合的实施方案。

[0194] 还提供了用于治疗患有癌症的个体的方法,所述方法包括向有此需要的个体施用本发明的蛋白质或本发明的双特异性抗体。

[0195] 本发明还提供了本发明的蛋白质或本发明的双特异性抗体,其用于治疗患有癌症的个体。

[0196] 本发明的抗体或其变体优选地包含可与PD-1的胞外部分结合并且包含具有CDR3区的重链可变区的可变结构域,所述CDR3区包含针对以下所示的VH之一的可变重链区的CDR3的氨基酸序列:图3中的MF6076、MF6226、MF6236、MF6256、MF6930、MF6932、MF6935、MF6936、MF6972、MF6974或MF6982,优选MF6256、MF6930、MF6076、MF6974或MF6226,优选MF6930、MF6076或MF6974。所述结合PD-1的可变结构域优选地包含重链可变区,所述重链可变区包含具有CDR1、CDR2和CDR3区的重链可变区,所述CDR1、CDR2和CDR3区包含针对以下所示的VH之一的可变重链区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列:图3中的MF6076、MF6226、MF6236、MF6256、MF6930、MF6932、MF6935、MF6936、MF6972、MF6974或MF6982,优选MF6256、MF6930、MF6076、MF6974或MF6226,优选MF6930、MF6076或MF6974。

[0197] 抗体或其变体优选地包含可与PD-1的胞外部分结合并且包含重链可变区的可变结构域,所述重链可变区包含如针对以下所示的可变重链区的氨基酸序列:图3中的MF6076、MF6226、MF6236、MF6256、MF6930、MF6932、MF6935、MF6936、MF6972、MF6974或MF6982,优选MF6256、MF6930、MF6076、MF6974或MF6226,优选MF6930、MF6076或MF6974,所述氨基酸序列相对于如针对MF所示的VH的氨基酸序列具有至多15个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换,或其组合。

[0198] 抗体或其变体优选地包含可与LAG3的胞外部分结合并且包含具有CDR3区的重链可变区的可变结构域,所述CDR3区包含如针对以下所示的可变重链区的CDR3区的氨基酸序列:图3中的MF7100、MF7111、MF7116、MF7118、MF7134、MF7136、MF7137、MF7142、MF7146、MF7165、MF7167、MF7185、MF7443、MF7444、MF7515、MF7518、MF7096、MF7097、MF7106、MF7120、

MF7133、MF7139、MF7144或MF7524,优选MF7518、MF7165、MF7116、MF7096、MF7133、MF7139、MF7524或MF7137,优选MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096。所述结合LAG3的可变结构域优选包含重链可变区,所述重链可变区包含具有CDR1、CDR2和CDR3区的重链可变区,所述CDR1、CDR2和CDR3区包含针对以下所示的VH之一的可变重链区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列:图3中的MF7100、MF7111、MF7116、MF7118、MF7134、MF7136、MF7137、MF7142、MF7146、MF7165、MF7167、MF7185、MF7443、MF7444、MF7515、MF7518、MF7096、MF7097、MF7106、MF7120、MF7133、MF7139、MF7144或MF7524,优选MF7518、MF7165、MF7116、MF7096、MF7133、MF7139、MF7524或MF7137,优选MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096。

[0199] 抗体或其变体优选地包含可与LAG3的胞外部分结合并且包含重链可变区的可变结构域,所述重链可变区包含如针对以下所示的可变重链区的氨基酸序列:图3中的MF7100、MF7111、MF7116、MF7118、MF7134、MF7136、MF7137、MF7142、MF7146、MF7165、MF7167、MF7185、MF7443、MF7444、MF7515、MF7518、MF7096、MF7097、MF7106、MF7120、MF7133、MF7139、MF7144或MF7524,优选MF7518、MF7165、MF7116、MF7096、MF7133、MF7139、MF7524或MF7137,优选MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096,所述氨基酸序列相对于指定MF的氨基酸序列具有至多15个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换,或其组合。

[0200] 在以下实施例中进一步解释本发明。这些实施例不限制本发明的范围,而仅用于阐明本发明。

[0201] 实施例

[0202] 如本文中使用的其中X独立地为数字0至9的“MFXXXX”是指包含其中VH具有由4个数字标识的氨基酸序列的可变结构域的Fab。除非另有说明,否则可变结构域的轻链可变区通常具有图1A、通常图1B的序列。“MFXXXX VH”是指由4个数字标识的VH的氨基酸序列。MF还包含轻链的恒定区和通常与轻链的恒定区相互作用的重链的恒定区。PG是指包含相同重链和轻链的单特异性抗体。PB是指具有两条不同重链的双特异性抗体。重链的可变区不同,并且通常CH3区也不同,其中一条重链具有其CH3结构域的KK突变,并且另一条重链具有其CH3结构域的互补性DE突变(参考PCT/NL2013/050294(公布为W02013/157954))。

[0203] 实施例:1

[0204] 用于选择和筛选的材料的生产

[0205] 细胞系的培养

[0206] Freestyle 293F细胞(cat.no.p/n51-0029)从Invitrogen获得,并且常规维持在293FreeStyle培养基中。HEK293T(cat.no.ATCC-CRL-11268)细胞从ATCC购得,并且常规维持在补充有L-谷氨酰胺(Gibco)和FBS(Lonza)的DMEM/F12(Gibco)中,以及CHO-S(cat.no.11619-012)细胞系从Gibco购得,并且常规维持在补充有L-谷氨酰胺的Freestyle CHO表达培养基(Invitrogen)中。

[0207] 用于免疫接种以及用于产生稳定细胞系和瞬时转染的PD-1和LAG3表达载体的产生

[0208] 每个靶标的包含用于克隆的独特限制性位点和用于有效翻译的kozak共有序列的全长cDNA是合成的或者通过用特异性引物对包含靶cDNA的可商购获得表达构建体进行PCR扩增获得,所述特异性引物引入用于克隆的独特限制性位点和用于有效翻译的kozak共有

序列。将每个靶标的cDNA通过NheI/EcoRI分别克隆到真核表达构建体例如pIRES-Neo3 (Clontech;图4)或pVAX1(Thermo Fisher Scientific;图5)中,从而产生pIRES-Neo3_[靶标名称]和pVAX1_[靶标名称]。通过与NCBI参考氨基酸序列进行比较验证插入序列。pIRES-Neo3构建体用于产生稳定细胞系和瞬时转染。pVAX1构建体用于免疫接种目的。关于所得构建体的名称的概述,参见表1。

[0209] 用于在细胞表面上表达的氨基酸序列全长huPD-1插入序列(在pIRES-Neo3和pVAX1二者中)(与GenBank:NP_005009.2相同):

[0210] MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATF
TCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRD
FHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPS
PRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDP
SAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGS
ADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

[0211] 其中:

[0212] MQIPQAPWPVVWAVLQLGWR:信号肽。

[0213] PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPS
NQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAI huPD-1的ECD。
SLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV :

[0214] VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI:预测的TM区。

[0215] CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQ
TEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL :胞内尾。

[0216] 用于在细胞表面上表达的氨基酸序列全长猕猴(食蟹猴(*macaca fascicularis*))PD-1插入序列(在pIRES-Neo3和pVAX1二者中)(与GenBank:ABR15751.1相同):

[0217] MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLESPDRPWNAPTTFSPALLLVTEGDNATF
TCSFSNASESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTRLPNGRD
FHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPS
PRPAGQFQALVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAAQGTIEARRTGQPLKEDP
SAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPAPCVPEQTEYATIVFPSGLGTSSPARRGSA
DGPRSPRPLRPEDGHCSWPL

[0218] 其中:

[0219] MQIPQAPWPVVWAVLQLGWR:信号肽。

[0220] PGWFLESPDRPWNAPTTFSPALLLVTEGDNATFTCSFSNASESFVLNWYRMSPS
NQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTRLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAI maPD-1的ECD。
SLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQALV :

[0221] VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI:预测的TM区。

[0222] CSRAAQGTIEARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPAPCVPEQ
TEYATIVFPSGLGTSSPARRGSADGPRSPRPLRPEDGHCSWPL :胞内尾。

[0223] 用于在细胞表面上表达的氨基酸序列全长人LAG3插入序列(在pIRES-Neo3和

pVAX1二者中) (与GenBank:NP_002277.4相同):

[0224] MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAIEVPVWVAQEGAPAQLPCSPTIPLQDL
SLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGP
GGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALS
CRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVP
VRESPIHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLPEPT
PLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTTRSFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLR
LEDVSQAQAGTYTCHIHLEQQLNATVTLAHTVTPKSFSGPSLGKLLCEVTPV
SGQERFVWSSLDTPSQRFSFGPWLEAQEAQLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYF
TELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFLILGVLSLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPR
RFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL

[0225] 其中:

[0226] MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKP:信号肽。

LQPGAIEVPVWVAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAA
PGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQ
RGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRA

[0227] SDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPIHHHLAESFLFLPQVSPM
DSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLPEPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGV
GTRSFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLEQQ
LNATVTLAHTVTPKSFSGPSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRFSFGP
WLEAQEAQLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGH
L: ECD.

[0228] LLLFLILGVLSLLLLVTGAFGF:预测的TM区。

[0229] HLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL:胞内尾。

[0230] 用于在细胞表面上表达的氨基酸序列全长大鼠(褐家鼠(*Rattus norvegicus*))
LAG-3插入序列(在pIRES-Neo3和pVAX1二者中) (与GenBank:NP_997678.2相同):

[0231] MRQDLFLDLLLQLLWEAPVSSGPGKELSVVWVAQEGAPVHLPCSLEFPHLDP
NFLRRGWVTWQHRPDSQPASIPALDLLQGMPSTRRHPPHRYTVLSVAPGGLR
SGRQPLLSHVQLEKRGPRGDFSLWLRPATRKDAGEYHAFVRLPDRDFSCSLR
LRVGQASMIASPPGTLKPSDWVILNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQSRVPVHNSPR
HYLAESFLLLPQVSPLDSTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVQGLEPVAPLTVYA
AEGSRVELPCHLPPVVGTPSLLIAKWTPPGGGPELPVTGKSGNFTLQLENVGRA
QAGTYTCSIHLQGRQLSAAVTLAVITVTPKSFGLPGSPQKLLCEVVPASGEGRFV
WRPLSDLSRSSLGPVLELQEAQLLAEQWQCQLYEGQKLLGATVYTAESSGAW
SAKRISGDLKGGHLFLSLILGALALFLLVTGAFGFHLWRRQLLRRRFSALEHGIR
PPPQVSKIEELEREPETEMEPETEPDPEPQPEPELEPEPESRQL

[0232] 其中:

[0233] MRQDLFLDLLLLQLLWEAPVVSS:信号肽。

GPGKELSVVWAQEGAPVHLPCSLEFPHLDPNFLRRGWVTWQHRPDSQDPASIP
ALDLLQGMPSTRRHPPHRYTVLSVAPGGLRSRQPLLSHVQLEKRGPPQRGDFS
LWLRPATRKDAGEYHAFVRLPDRDFSCSLRLRVGQASMIASPPGTLKPSDWVIL
NCSFSRPDRPVSVHWFQGGSRVPVHNSPRHYLAESFLLLPQVSPLDSGTWGCV
[0234] LTYRDGFNVSITYNLKVQGLEPVAPLTVYAAEGSRVELPCHLPPVVGTPSLLIAK
WTPPGGGPELPVTGKSGNFTLQLENVGRAQAGTYTCSIHLQGRQLSAAVTLAVI
TVTPKSFGLPGSPQKLLCEVVPASGEGRFVWRPLSDLSRSSLGPPVLELQEAKLL
AEQWQCQLYEGQKLLGATVYTAESSSGAWSAKRISGDLKGGHL: ECD.

[0235] FLSLILGALALFLLVTGAFGF:预测的TM区。

[0236] HLWRRQLRRRFSALEHGIRPPPQSKIEELEREPETEMEPETEPDPEPQPEPE
LEPESRQL

胞内
:

尾。

[0237] 用于在细胞表面上表达的氨基酸序列全长猕猴(恒河猴(Macacaulatta))LAG3插入序列(在pIRES-Neo3和pVAX1二者中)(与GenBank:恒河猴相同):

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPPQPGAEISVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLS
LLRRAGVTWQHQPDSGPPAPAPGHPPAPGHRPAAPYSWGPRPRRYTVLSVGP
GLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRATVHLRDRALSC
RLRLRVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRSRGQGRVPV
[0238] QGSPHHHLAESFLFLPHVGPMDSGLWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLPAT
PLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFLTAKWAPPGGPDLLVAGDNGDFTLR
LEDVSQAQAGTYICHIRLQGGQLNATVTLAHTVTPKSFSGPSLGKLLCEVTPA
SGQEHFVWSPLNTPSQRFSFGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLHQGETLLGAAVYF
TESSPGAQRSGRAPGALRAGHLPLFLILGVLFLLLLVTGAFGFHLWRRQWRPR
RFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPELEPEPELERELGPEPEPEPEPEPEQL

[0239] 其中:

[0240] MWEAQFLGLLLFLQPLWVAPVKP:信号肽。

PQPGAEISVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAPAP
 GHPPAPGHRPAAPYSWGPRPRRYTVLSVGGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQR
 GDFSLWLRPARRADAGEYRATVHLRDRALSCRLRLRVGQASMTASPPGSLRTS
 DWVILNCSFSRPDRPASVHWFRRSRGQGRVPVQGSPHHHLAESFLFLPHVGPMD
 [0241] SGLWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVG
 TQSFLTAKWAPPGGPDLLVAGDNGDFTLRLEDVVSQAQAGTYICHIRLQGQQL
 NATVTLAHTVTPKSFSGPSLGLKLLCEVTPASGQEHFVWSPLNTPSQRFSFGPW
 LEAQEAQLLSQPWQCQLHQGETLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHL:
 ECD.

[0242] PLFLILGVLFLLLLVTGAFGF:预测的TM区。

[0243] HLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIIEELEQEPELEPEPELERELGPEPEPG
 PEPEPEQL :胞内尾。

[0244] 表达PD-1和LAG-3的稳定细胞系的产生

[0245] pIRES-Neo3_[靶标名称]表达构建体(表1)用于产生稳定表达相应蛋白质的CHO-S或Freestyle 293F克隆。使用lipofectamine转染将构建体瞬时转染到CHO-S和Freestyle 293F细胞中,并使用与相应蛋白质反应的抗体通过FACS进行筛选。在确认表达之后,将瞬时转染的细胞以有限的稀释度接种,并在与所使用表达构建体相关的选择压力下培养以获得稳定的细胞克隆。在2至3周的选择之后,通过FACS筛选克隆。所选择克隆通过连续传代扩增,在FACS中再测试并冷冻至-150℃。稳定表达异源蛋白的克隆的名称为CHO-S_[靶标名称]细胞或Freestyle 293F_[靶标名称]细胞。关于用于产生稳定细胞系的构建体及其所得名称的概述,参见表1。

[0246] 实施例2

[0247] 免疫接种、选择和筛选

[0248] 用于免疫接种的小鼠

[0249] 为了产生与huPD-1和huLAG-3结合的人抗体,针对人VK1-39轻链(共同轻链小鼠,参见W02009/157771)和针对人重链(HC)小基因座(包含人V基因区段、所有人D和所有人J的选择)的转基因小鼠进行免疫接种。这些小鼠称为“MeMo®”小鼠。用重组蛋白抗原或编码该蛋白质抗原的DNA对小鼠进行免疫接种,如下简述。

[0250] 蛋白质免疫接种

[0251] 通过皮下注射重组蛋白和Gerbu佐剂MM(Gerbu Biotechnik;cat.no.3001)对“MeMo®”小鼠进行免疫接种。重组huPD-1-Fc(R&D;cat.no.1086-PD)和huLAG-3-His(Abcam;cat.no.Ab184729)用于免疫接种。用与40μl佐剂混合的在PBS中的40μg重组蛋白以100μl的总体积对小鼠进行免疫接种。随后在第14天和第28天用在PBS中的20μg重组蛋白以及20μl佐剂以50μl的总体积对小鼠进行加强免疫接种。在第35天收集小鼠血清以确定血清效价。针对人和/或猕猴靶标具有低血清反应性的小鼠接受用重组人或猕猴蛋白质抗原进行的加强免疫接种和血清分析的另外的周期。每个周期由以下组成:使用在50μl PBS中的20μg重组蛋白进行每周两次免疫接种,随后在一周之后通过血清收集以进行效价分析。针对人和猕猴靶标表现出高血清效价的小鼠接受最后的加强免疫接种,其由连续三天每天注

射在50 μ l PBS中的20 μ g重组蛋白组成。在最后的注射之后一天,收集小鼠淋巴样组织。

[0252] DNA免疫接种

[0253] 使用微色素沉着装置通过DNA文身术(DNA tattooing)对MeMo®小鼠进行免疫接种。用编码靶抗原的20 μ g质粒DNA(pVAX1_[靶标名称],表1)进行DNA文身免疫接种。用编码人靶标(PD-1和LAG-3)的DNA对小鼠进行免疫接种,或通过用编码人和大鼠靶标(LAG-3)的DNA进行交替免疫接种对小鼠进行免疫接种以获得物种交叉反应性抗体。在第0、3、6、14、17、28和31天对小鼠进行免疫接种。在第35天收集小鼠血清以确定血清效价。针对人和/或猕猴靶标具有低血清反应性的小鼠接受用人DNA抗原进行加强免疫接种并进行血清分析的另外的周期。每个周期由以下组成:每周两次的DNA免疫接种,随后在一周之后通过血清收集以进行效价分析。针对表达人和猕猴靶标的细胞表现出强血清反应性的小鼠接受最后的加强免疫接种,随后在3天之后收集淋巴样组织。

[0254] 血清效价的确定

[0255] 血清效价使用表达人和猕猴靶抗原的细胞系通过FACS分析来确定。

[0256] 合成噬菌体Fab文库的产生

[0257] 合成文库基于种系人VH基因的库构建,所述种系人VH基因针对频繁用于天然库和规范序列多样性进行选择。使用PCR向这些VH基因添加合成的HCDR3区。这使用与VH基因的框架1退火并包含用于克隆的SfI限制性位点的正向引物进行。反向引物包含与VH基因的框架3退火的序列,随后是用于编码HCDR3多样性的随机序列和也包含用于克隆的BstEII和XhoI限制性位点的框架4编码序列。基于HCDR3中某些位置上氨基酸残基的使用频率,合成的CDR3区是完全随机的或编码更加限制性的多样性。使用上述限制性酶,将编码VH基因的PCR产物克隆至与噬菌体M13基因3蛋白融合并且还包含共同轻链编码基因的噬菌体展示载体中。大规模连接和大肠杆菌(E' coli) TG1转化产生展示在噬菌体上的合成Fab片段的大文库,其用于淘选抗原或细胞以鉴定抗原特异性Fab片段。

[0258] 通过RT-PCR从经免疫接种小鼠的组织产生“免疫”噬菌体Fab文库

[0259] 从观察到针对相应靶蛋白的显著体液应答的小鼠中取出脾和引流淋巴结。由脾和腹股沟淋巴结二者产生单细胞悬液,并随后将这些组织在Trizol LS试剂(Thermo Scientific c#10296028)中裂解,并储存在-80 $^{\circ}$ C下直至使用。

[0260] 将来自经成功免疫接种的小鼠的腹股沟淋巴结用于构建“免疫”噬菌体抗体库。从淋巴样组织的单细胞悬液中提取RNA。将1 μ g的总RNA用于使用IgG-CH1特异性引物的RT反应。然后,基本上如Marks et al. (J Mol Biol.1991 Dec 5;222(3):581-97)中所述,将所得cDNA用于使用内部适应的VH特异性引物扩增编码VH的cDNA的多克隆库。然后将所得PCR产物克隆至噬菌粒载体(图6)中用于在噬菌体上展示Fab片段,如de Haard et al. (J Biol Chem.1999 Jun 25;274(26):18218-30)中所述,不同之处在于轻链(图1A和1B)对于每种抗体是相同的并且由载体编码。在连接之后,将噬菌粒用于转化大肠杆菌TG1细菌,并将经转化的细菌平板接种到包含氨苄青霉素和葡萄糖的LB琼脂板上。所有噬菌体文库包含 $>4 \times 10^5$ 个转化体,且插入频率为 $>90\%$ 。在过夜生长之后收获细菌,并根据已建立的方案(de Haard et al., J Biol Chem.1999 Jun 25;274(26):18218-30)将其用于制备噬菌体。

[0261] 使用重组蛋白从合成和“免疫”噬菌体Fab文库选择携带与人靶蛋白特异性结合的Fab片段的噬菌体

[0262] 将产生的噬菌体Fab文库用于在直接包被的重组蛋白上使用噬菌体展示选择靶标特异性Fab。对于PD-1,使用huPD-1-Fc (R&D; cat.no.1086-PD) 和huPD-1生物素 (BPS bioscience; cat.no.71109)。对于LAG-3,使用huLAG-3-Fc (R&D; cat.no.2319-L3)、huLAG-3-Fc (Enzo; cat.no.ALX-522-078)、huLAG-3-His (Abcam; cat.no.Ab184729) 和大鼠LAG-3His (SinoBiological; cat.no.80367-R08H)。

[0263] 对于使用非生物素化重组蛋白的选择(“淘选”),将蛋白质包被到MAXISORP™ ELISA板的孔上。将MAXISORP™ ELISA板用在PBS中的4%干脱脂乳(Marvel)封闭。噬菌体Fab文库也用4%Marvel封闭并且当使用经Fc标记的重组蛋白时,还使用过量的人IgG进行封闭以在将噬菌体文库添加至包被的抗原之前耗尽Fc区结合剂。

[0264] 将噬菌体文库与经包被蛋白质在室温下于摇动条件下进行孵育1.5小时。然后将板或管用在PBS中的0.05%吐温-20洗涤15次,随后用PBS洗涤5次。将结合的噬菌体使用胰蛋白酶洗脱20分钟,在此之后用AEBSF胰蛋白酶抑制剂(Sigma)使胰蛋白酶中和。

[0265] 对于使用生物素化蛋白质的选择(“溶液内选择”),将中性抗生物素蛋白包被在MAXISORP™ ELISA板的孔上。将MAXISORP™ ELISA板用在PBS中的1%酪蛋白封闭。并行地,在单独的Eppendorf管中,在包含过量人IgG的在PBS中的0.5%酪蛋白中,将生物素化蛋白质和噬菌体Fab文库封闭30分钟。在此之后,将封闭的噬菌体和生物素化蛋白质混合并在室温下孵育2小时。在此之后,将混合物添加至中性抗生物素蛋白包被的孔中20分钟以捕获与生物素化蛋白质结合的噬菌体Fab颗粒。然后将板用在PBS中的0.05%吐温-20洗涤15次,随后用PBS洗涤5次。将结合的噬菌体使用胰蛋白酶洗脱20分钟,在此之后用AEBSF胰蛋白酶抑制剂(Sigma)使胰蛋白酶中和。

[0266] 将两种选择策略(“淘选和溶液内”)的洗脱液添加至大肠杆菌TG-1,并在37℃下孵育以进行噬菌体感染。随后将感染的细菌平板接种在包含氨苄青霉素和葡萄糖的琼脂板上,并在37℃下孵育过夜。根据靶标在ELISA或FACS中针对靶标结合筛选来自选择输出的单克隆。

[0267] 对于使用合成噬菌体Fab文库的选择,在第一轮选择输出的拯救之后,使用与上述第一轮选择相同的方案进行第二轮选择。在第一轮中使用的相同选择抗原也用于第二轮,不同之处在于:在第一轮raLAG-3-His选择之后用huLAG-3-His进行第二轮选择。

[0268] 使用稳定表达靶蛋白的细胞从“免疫”噬菌体Fab文库选择携带与人靶标特异性结合的Fab片段的噬菌体

[0269] 在表达相应靶标的细胞上使用噬菌体展示选择从经靶标免疫接种小鼠产生的噬菌体Fab文库。表达PD-1或LAG-3的稳定细胞系(表1)用于第1轮选择。将细胞用在PBS中的10%FBS封闭。在封闭之后,将拯救的噬菌体与封闭的细胞一起孵育。将细胞加噬菌体在4℃下孵育1小时。使用1ml在PBS中的10%FBS进行洗涤细胞(5次)。将结合的噬菌体使用胰蛋白酶洗脱20分钟,在此之后用AEBSF胰蛋白酶抑制剂(Sigma)使胰蛋白酶中和。将洗脱液添加至大肠杆菌TG-1,并在37℃下孵育以进行噬菌体感染。随后,将经噬菌体感染的细菌平板接种在包含氨苄青霉素和葡萄糖的琼脂板上,并在37℃下孵育过夜。

[0270] 在ELISA中靶标特异性Fab克隆的筛选

[0271] 对于单个克隆,制备可溶性Fab或噬菌体(J Mol Biol.1991 Dec 5;222(3):581-97;J Biol Chem.1999 Jun 25;274(26):18218-30)。将获得的可溶性Fab或噬菌体样品在

PBS中的4%干脱脂乳(Marvel)(封闭缓冲液)中稀释(分别1:5或1:10),并在ELISA中测试其与孔的结合,所述孔包被有用于选择的相同抗原,或者包被有huLAG-3-His(Abcam; cat.no.Ab184729),对于用大鼠LAG-3His(SinoBiological;cat.no.80367-R08H)进行的所有选择输出。

[0272] 将结合的Fab通过用经在封闭缓冲液中以1:1000稀释的抗myc抗体(Roche; cat.no.11667203001),随后经在封闭缓冲液中以1:5000稀释的HRP缀合的抗小鼠IgG抗体(Jackson Immunoresearch;cat.no.715-035-150)染色来检测。将结合的噬菌体通过用经在封闭缓冲液中以1:5000稀释的HRP缀合的单克隆抗M13抗体(GE healthcare;cat.no.27-9421-01)染色来检测。

[0273] 在每种抗体染色之后,将孔用PBS-T(PBS-0.05%v/v吐温20)洗涤。通过TMB/H₂O₂染色可视化结合的二抗,并通过OD_{450nm}测量对染色进行定量。当OD450nm高于用阴性对照Fab获得的背景信号的至少三倍时,认为克隆与靶标结合。

[0274] 对所有靶标特异性克隆的VH编码cDNA进行测序。然后在FACS中基于与在细胞上表达的PD-L1结合分析序列身份和聚类分析的独特克隆选择,如下文针对从细胞选择输出获得的克隆所述的。

[0275] 在FACS中靶标特异性Fab克隆的筛选

[0276] 对于在表达相应靶标的细胞上选择的单个克隆,如所描述的(J Mol Biol.1991 Dec 5;222(3):581-97;J Biol Chem.1999 Jun 25;274(26):18218-30)制备可溶性Fab或噬菌体。Fab样品与表达人和猕猴靶标的细胞(表1)的结合通过以下在FACS中测试:与经1:5稀释的Fab样品与经1:1000稀释的抗myc抗体(Gentaur;cat.no.04-CMYC-9E10)的混合物在FACS缓冲液(在PBS中的0.5%HI-FBS)中孵育。结合的Fab/抗myc复合物通过与经在FACS缓冲液中以1:500稀释的APC缀合的山羊抗小鼠IgG抗体(BD Bioscience;cat.no.550826)孵育来检测。

[0277] 通过以下在FACS中测试噬菌体样品的结合:将噬菌体样品在封闭缓冲液中以1:3稀释并与靶标表达细胞孵育1小时。结合的噬菌体通过用生物素化抗M13抗体(Fitzgerald, cat.nr.61R-M101ABTB62-FEZ,以1:125在FACS缓冲液中,在冰上30分钟)和经PE标记的链霉抗生物素蛋白(Invitrogen,cat.nr.SA1004-4;以1:400在FACS缓冲液中,在冰上15分钟)染色来检测。在每种抗体孵育之后,将孔用FACS缓冲液洗涤三次。将经染色的细胞使用FACS Accuri C6仪器(Becton and Dickinson)进行分析。当平均荧光强度高于用阴性对照Fab获得的背景信号的至少三倍时,认为克隆是阳性的。

[0278] 实施例3

[0279] IgG形式的huLAG-3和huPD-1特异性Fab克隆的表征

[0280] 将人LAG-3和PD-1特异性Fab再克隆为IgG形式

[0281] 然后,根据标准分子生物学技术,使用SfiI-BstEII消化和经消化cDNA的库的连接,将对结合细胞上表达的人和猕猴靶蛋白的基于CDR3序列和VH种系差异的独特克隆的选择再克隆成IgG表达质粒,例如MV1452(图7),其包含共同轻链(图1)。

[0282] 包含人LAG-3或人PD-1特异性Fab和破伤风毒素特异性Fab的双特异性IgG的表达

[0283] 双特异性抗体通过以下产生:瞬时共转染编码具有不同VH结构域的IgG的两个质粒,使用专有CH3改造技术以确保有效的异二聚化和双特异性抗体形成。存在于这两个包含

重链的质粒上的共同轻链也被共转染在同一细胞中。在我们的共同待决申请(例如W02013/157954和W02013/157953;通过引用并入本文中)中,我们公开了用于从单细胞产生双特异性抗体的方法和手段,从而提供了相对于单特异性抗体的形成更有利于双特异性抗体的形成的手段。这些方法也可有利地用于本发明。具体地,基本上仅产生双特异性全长IgG分子的一些优选突变是第一CH3结构域中在第351位和第366位的氨基酸替换,例如L351K和T366K(根据EU编号进行编号) (“KK变体”重链),以及第二CH3结构域中在第351位和第368位的氨基酸替换,例如L351D和L368E (“DE变体”重链),或反之亦然(图2)。先前在我们的共同待决申请中已证明,带负电荷的DE变体重链和带正电荷的KK变体重链优先配对以形成异二聚体(所谓的“DEKK”双特异性分子)。由于相同重链之间CH3-CH3界面中带电荷残基之间的强排斥,因此几乎不发生DE变体重链的同二聚化(DE-DE同二聚体)或KK变体重链的同二聚化(KK-KK同二聚体)。

[0284] 将上述编码结合人LAG-3和PD-1的抗体的VH基因克隆至编码带正电荷的CH3结构域的MV1452 IgG表达载体中。将破伤风毒素(TT)靶向抗体(图8)克隆至编码带负电荷的CH3结构域的MV1377 IgG表达载体(图9)中。为了以IgG形式表达LAG-3和PD-1抗体组,也将整个组克隆至带负电荷的CH3结构域载体中,以能够产生二价LAG-3或PD-1 IgG。将适合悬浮生长的293F Freestyle细胞在摇动平台上的T125烧瓶中培养,直至密度为 3.0×10^6 个细胞/ml。将细胞以 0.3×10^6 至 0.5×10^6 个活细胞/ml的密度接种在24深孔板的每个孔中。将细胞用克隆至专有载体系统中的编码不同抗体的两种质粒的混合物进行瞬时转染。在转染之后7天,收获细胞上清液,并通过 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器(Sartorius)过滤。将无菌上清液储存在 4°C 下直至对抗体进行纯化。

[0285] 双特异性IgG的纯化

[0286] 使用蛋白A亲和色谱法以小规模($<500\mu\text{g}$)进行IgG的纯化。小规模纯化在无菌条件下使用过滤在24孔滤板中进行。首先,将培养基的pH调节至pH 8.0,并且随后将包含IgG的上清液与蛋白A Sepharose CL-4B珠(50%v/v)(Pierce)在摇动平台上以600rpm于 25°C 下孵育2小时。接下来,通过过滤收获珠。将珠用pH 7.4的PBS洗涤两次。然后用0.1M柠檬酸盐缓冲液在pH 3.0下洗脱结合的IgG,并立即使用Tris pH 8.0使洗脱液中和。通过使用多筛 Ultracel 10多板(Millipore)离心进行缓冲液交换。最后将样品收获在pH7.4的PBS中。使用Octet测量IgG浓度。蛋白质样品储存在 4°C 下。

[0287] 使用Octet的IgG定量

[0288] 为了确定纯化的IgG的量,使用总人IgG(Sigma Aldrich,cat.nr.I4506)作为标准,使用蛋白A生物传感器(Forte-Bio,根据供应商的推荐)通过Octet分析确定抗体的浓度。

[0289] huLAG-3和huPD-1IgG的特异性分析

[0290] 在FACS中测试抗体(二价LAG-3抗体和双特异性PD-1xTT抗体)与表达相关人和猕猴直系同源物的稳定细胞系(表1)和wt细胞的结合。因此,收获细胞并在FACS缓冲液(PBS/0.5%BSA/0.5mM EDTA)中稀释至 10^6 个细胞/ml。向U型底96孔板中的每个孔添加 1×10^5 至 2×10^5 个细胞。将细胞在 4°C 下以300g离心2分钟。通过倒置板弃去上清液。添加 $50\mu\text{l}$ 浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 的每种IgG样品,并在冰上孵育1小时。将细胞离心一次,除去上清液,并将细胞用 $150\mu\text{l}$ 的FACS缓冲液洗涤两次。添加 $50\mu\text{l}$ 经稀释1:400的山羊抗人IgG PE(Invitrogen),并

在暗处在冰上孵育30分钟。在添加FACS缓冲液之后,将细胞离心一次,除去上清液,并将细胞用FACS缓冲液洗涤两次。在FACSCanto流式细胞仪(Becton and Dickinson)上在HTS设置下分析细胞。通过测量经染色细胞群的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)来评估抗体与细胞的结合。当MFI是用(阴性对照)非结合抗体(针对破伤风类毒素)染色的相同细胞群的MFI的至少五倍时,则认为抗体与其靶标结合。

[0291] 基于配体阻断能力对存在于PD-1xTT双特异性IgG中的huPD-1特异性Fab臂进行分箱(bin)

[0292] 测试huPD-1结合克隆阻断PD-L1与PD-1相互作用的能力。因此,将PD1-Fc(R&D systems;cat.no.1086-PD)以1 μ g/ml包被至maxisorp板。将经包被的孔用在PBS中的4%BSA封闭。在此之后,在存在或不存在0.15至20 μ g/ml的IgG的情况下,添加0.55 μ g/ml的生物素化PD-L1(BPS bioscience;cat.no.71105)。将结合的生物素化PD-L1用经在封闭缓冲液中以1:2000稀释的HRP缀合的链霉抗生物素蛋白(BD bioscience;cat.no.554066)来检测。在每个孵育步骤之后,将ELISA板用PBS-T(PBS-0.05%v/v吐温20)洗涤三次。结合的链霉抗生物素蛋白通过TMB/H₂O₂染色可视化,并且通过OD_{450nm}测量对染色进行定量。当与其中添加TT特异性竞争抗体的对照相比ELISA信号在IgG(PD-1xTT)浓度为10 μ g/ml时降低超过70%时,则认为克隆阻断PD-1与PD-L1的相互作用。对于用作为PD-1xTT双特异性分子测试的PD-1抗体组的代表性选择所获得的结果,参见图10。

[0293] 存在于LAG-3xTT和PD-1xTT双特异性IgG中的huLAG-3和huPD-1特异性Fab臂的亲合力排名

[0294] 在FACS中显示结合相应人和猕猴直系同源物的双特异性抗体基于在FACS中对两种直系同源物的表观亲和力进行排名。因此,收获表达相应直系同源物的稳定细胞系(表1),并在FACS缓冲液(PBS/0.5%BSA/0.5mM EDTA)中稀释至10⁶个细胞/ml。将细胞在4 $^{\circ}$ C下以300g离心2分钟。通过倒置板弃去上清液。添加50 μ l在11步、2倍稀释系列(10至0.01 μ g/ml)中的每个IgG样品,并在冰上孵育1小时。将细胞离心一次,除去上清液,并将细胞用150 μ l的FACS缓冲液洗涤两次。添加50 μ l经稀释1:400的山羊抗人IgG PE(Invitrogen),并在暗处于冰上孵育30分钟。在添加FACS缓冲液之后,将细胞离心一次,除去上清液,并将细胞用FACS缓冲液洗涤两次。在FACSCanto流式细胞仪(Becton and Dickinson)上在HTS设置下分析细胞。抗体与细胞的结合通过测量经染色细胞群的平均荧光强度(MFI)来评估。当MFI是用(阴性对照)非结合抗体(针对破伤风类毒素)染色的相同细胞群的MFI的至少五倍时,则认为抗体与其靶标结合。

[0295] 基于结构域特异性对存在于LAG-3xLAG-3二价IgG中的huLAG-3特异性Fab臂进行分箱:在HEK293T细胞上在FACS中测试二价IgG形式的huLAG-3结合克隆的结构域特异性,所述HEK293T细胞用五种不同的pIRES-Neo3小鼠/人LAG-3杂合表达构建体、FL小鼠LAG-3pIRES-Neo3表达构建体(参见下文的氨基酸插入序列)或用于产生稳定huLAG-3表达Freestyle 293F细胞的pIRES-Neo3_huLAG-3表达构建体(表1)瞬时转染。使用与上文在抗体组的特异性分析期间所述的相同的FACS方案。为了产生杂合构建体,将小鼠和人LAG-3的胞外结构域分为5个结构域;基于Uniprot参考序列P18627(huLAG-3)和Q61790(moLAG-3)的4个Ig样结构域,以及从Ig样结构域4的末端至跨膜结构域的1个铰链结构域。将以下氨基酸插入序列通过NheI/EcoRI克隆至pIRES-Neo3(图4)中;粗体字是信号肽。加下划线的字是与

人LAG-3相同的序列。斜体字表示跨膜和胞内结构域序列。

[0296] 氨基酸序列全长小鼠LAG-3插入序列

MREDLLLGFLLLGLLWEAPVVSSGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNL
DPNFLRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGG
LRSGRQPLHPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALS
CSLRRLRVGQASMIASPSGVLKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNS
PRHFLAETFLLLQVSPLDSTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAPLTV
YAAEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPGGGPELPAVAGKSGNFTLHLEAVG
LAQAGTYTCSIHLQGGQLNATVTLAVITVTPKSFGLPGSRGKLLCEVTPASGKER
FVWRPLNLSRSCPGPVLEIQEARLLAERWQCQLYEGQRLLGATVYAAESSGA
HSARRISGDLKGGHLVVLILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFSALEHG
IQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL

[0297]

[0298] 氨基酸序列mo/huLAG-3嵌合插入序列A (其中小鼠信号肽和Ig样结构域1被人信号肽和Ig样结构域1替换的全长小鼠LAG-3序列)

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGA**EVVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQ**
DLSSLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPRRYTVLSV
GPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRA
LSCRLRLRLGQASMIASPSGVLKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVP
VYNSPRHFLAETFLLLQVSPLDSTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVA
PLTVYAAEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPGGGPELPAVAGKSGNFTLHL
EAVGLAQAGTYTCSIHLQGGQLNATVTLAVITVTPKSFGLPGSRGKLLCEVTPAS
GKERFVWRPLNLSRSCPGPVLEIQEARLLAERWQCQLYEGQRLLGATVYAAE
SSSGAHSARRISGDLKGGHLVVLILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFS
ALEHGIQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL

[0299]

[0300] 氨基酸序列mo/huLAG-3嵌合插入序列B (其中小鼠Ig样结构域2被人Ig样结构域2替换的全长小鼠LAG-3序列)

MREDLLLGFLLLGLLWEAPVVSSGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNL
DPNFLRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGG
LRSGRQPLHPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALS
CSLRRLRVGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFNRNRGQGRVPVR
ESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAPL
TVYAAEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPGGGPELPAVAGKSGNFTLHLEA
VGLAQAGTYTCSIHLQGGQLNATVTLAVITVTPKSFGLPGSRGKLLCEVTPASG
KERFVWRPLNLSRSCPGPVLEIQEARLLAERWQCQLYEGQRLLGATVYAAES
SSGAHSARRISGDLKGGHLVVLILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFSA
LEHGIQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL

[0301]

[0302] 氨基酸序列mo/huLAG-3嵌合插入序列C(其中小鼠Ig样结构域3被人Ig样结构域3替换的全长小鼠LAG-3序列)

MREDLLLGFLLGLLWEAPVVSSGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNL
 DPNFLRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGG
 LRSGRQPLHPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCS
 LRLRVGQASMIASPSGVLKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNS
 PRHFLAETFLLLQVSPLDSTWGCVLTYRDGFNVSIMYNLTVLGLPEPTPLTV
YAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDV
SQAQAGTYTCHIHLEQQLNATVTAVITVTPKSFGLPGSRGKLLCEVTPASGK
 ERFVWRPLNNSRSCPGPVLEIQEARLLAERWQCQLYEGQRLLGATVYAAESSS
 GAHSARRISGDLKGGHLVLVLILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFSALE
HGIQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL

[0303]

[0304] 氨基酸序列mo/huLAG-3嵌合插入序列D(其中小鼠Ig样结构域4被人Ig样结构域4替换的全长小鼠LAG-3序列)

MREDLLLGFLLGLLWEAPVVSSGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNL
 DPNFLRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGG
 LRSGRQPLHPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCS
 LRLRVGQASMIASPSGVLKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNS
 PRHFLAETFLLLQVSPLDSTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAPLTV
 YAAEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPGGGPELPVAGKSGNFTLHLEAVG
 LAQAGTYTCSIHLQGGQLNATVTLAITVTTPKSFSGPSLGKLLCEVTPVSGQER
FVWSSLDTPSQRFSFGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGATVYAAESSS
 GAHSARRISGDLKGGHLVLVLILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFSALE
HGIQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL

[0305]

[0306] 氨基酸序列mo/huLAG-3嵌合插入序列E(其中小鼠Ig样结构域4(包括直至跨膜序列的铰链)被人Ig样结构域4(包括铰链)替换的全长小鼠LAG-3序列)

MREDLLLGFLLGLLWEAPVVSSGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNL
 DPNFLRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGG
 LRSGRQPLHPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCS
 LRLRVGQASMIASPSGVLKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNS
 PRHFLAETFLLLQVSPLDSTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAPLTV
 YAAEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPGGGPELPVAGKSGNFTLHLEAVG
 LAQAGTYTCSIHLQGGQLNATVTLAITVTTPKSFSGPSLGKLLCEVTPVSGQER
FVWSSLDTPSQRFSFGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELESS
PGAQRSGRAPGALPAGHLVLVLILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFSAL
EHGIQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL

[0307]

[0308] 表3和表4示出了基于结构域特异性分配给每个LAG-3xLAG-3二价IgG的箱。

[0309] 参考抗体

[0310] 抑制PD-1和LAG-3的功能的抗体是本领域中已知的。对于抗PD-1抗体纳武单抗的信息是基于CA2607147中公开的信息生成,并且在CHO-S细胞中表达。抗LAG-3抗体25F7是基于W02010/019570A2 (Medarex, Inc) 中提供的信息再产生,再克隆在IgG1骨架中并在293FFreestyle细胞中表达。

[0311] LAG-3阻断报道测定

[0312] 使用由Promega开发的LAG-3阻断报道测定进行LAG-3阻断报道测定,其使用基于表达MHCII的Raji细胞和过表达LAG-3的Jurkat/NFAT-RE报道细胞系的双细胞系统。Jurkat细胞的活化是通过超抗原SED,葡萄球菌肠毒素D (Staphylococcal Enterotoxin D) 来控制。LAG-3Jurkat效应细胞由Promega以细胞增殖模型 (Cell Propagation Model, CPM) 形式提供,并且在RPMI 1640 (+L-谷氨酰胺、10%热灭活的FBS、100 μ M MEM非必需氨基酸、1mM丙酮酸钠、200 μ g/ml潮霉素和500 μ g/ml G418) 中增殖。Raji细胞在RPMI 1640 (+L-谷氨酰胺和10%热灭活的FBS) 中增殖。收获在对数期生长的细胞,并以 2×10^6 个细胞/ml (Raji) 和 4×10^6 个细胞/ml (Jurkat/NFAT-RE细胞) 的浓度将其重悬在包含1%热灭活的FBS的RPMI 1640中。接下来,向96孔板 (Corning, Cat#3917) 的内孔添加25 μ l Jurkat/NFAT-RE细胞悬液。接下来,向每个孔添加系列稀释 (起始浓度25 μ g/ml) 中的在测定培养基 (包含1%FBS的RPMI 1640) 中的25 μ l受试抗体。每个板均包含用作参考对照的阴性抗体 (PG1337) 和阳性对照抗体25F7的系列稀释液。最后,添加25 μ l的Raji细胞与(100ng/ml) SED (Toxin Technologies) 的1:1混合物。将板在95%相对湿度中于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育6小时。第二天添加40 μ l的萤光素酶 (Bio-Glo萤光素酶测定系统, cat.no.G794L), 并使用BioTek Synergy 2多模式微板阅读仪测量萤光素酶活性的量。以二价形式筛选LAG-3抗体,以确定其LAG-3阻断能力 (图11)。

[0313] PD-1/PD-L1阻断报道测定

[0314] 所使用的PD-1/PD-L1阻断报道测定由Promega开发,并且基于双细胞系统;表达PD-L1和T细胞活化物的CHO细胞,以及过表达PD-1的Jurkat/NFAT-RE报道细胞系。PD-1/PD-L1阻断报道测定是使用Promega的解冻和使用形式来进行。将表达PD-L1的细胞 (cat.no.C187103) 在14.5ml细胞恢复培养基 (包含10%FBS的DMEM/F12) 中解冻。接下来,向96孔半面积板 (Corning, cat.no.3688) 的内孔添加50 μ l细胞悬液。将板在95%相对湿度中于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育过夜。第二天,除去培养基,并向每个孔添加连续稀释 (起始浓度10 μ g/ml) 的在测定培养基 (包含4%FBS的RPMI 1640) 中的20 μ l受试抗体。每个板均包含用作参考对照的阴性 (Ctrl Ab) 和阳性对照抗体 (纳武单抗) 的系列稀释液。在5.9ml测定培养基中解冻PD-1效应细胞 (cat no.C187105), 并向每个孔添加20 μ l细胞悬液。将板在95%相对湿度中于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育6小时或过夜。在第二天添加40 μ l的萤光素酶 (Bio-Glo萤光素酶测定系统, cat.no.G794L), 并使用BioTek Synergy 2多模式微板阅读仪测量萤光素酶活性的量。以与阴性对照抗体相比的萤光素酶活性测量效力。

[0315] PBMC分离

[0316] 从血沉棕黄层 (Sanquin) 获得人全血,并用PBS以1:1稀释。向Leucosep管 (Greiner Bio-One cat.no.227 290) 填充在室温 (RT) 下温热的17.5m Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences cat.no.17-1440-02)。将Ficoll-Paque Plus在RT下以1000 \times g旋转沉降30

秒。将30ml稀释的全血倒在上面。将管在RT下以 $1000 \times g$ 旋转10分钟,并收获单个核细胞PBMC界面,在PBS中洗涤两次,并重悬于 $250 \mu\text{l}$ PBS中。将PBMC在组织培养基(具有10%FCS的DMEM)中计数并重新调整至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,并通过添加等体积的冰冷的冷冻培养基(80%培养基/20%DMSO)将其冷冻。将细胞以1ml等分样品储存在 -150°C 下直至进一步使用。

[0317] SEB测定

[0318] 通过使用由葡萄球菌肠毒素B(SEB)刺激的PBMC确定双特异性抗体的功能活性。SEB特异性活化表达 $\text{V}\beta 3$ 和 $\text{V}\beta 8\text{T}$ 细胞受体链的T细胞。将来自3个供体的PBMC解冻,洗涤,计数并重悬在培养基(RPMI 1640加上10%热灭活的FBS)中,至浓度为 2×10^6 个细胞/ml。在存在SEB(2000或125ng/ml)的情况下,将细胞接种在平底96孔板(2×10^5 个细胞/孔)中。添加从 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 开始的抗体系列稀释液。每个板均包含用作参考对照的阴性抗体(Ctrl Ab)和阳性对照抗体(纳武单抗和LAG-3(25F7))的系列稀释液。将细胞在95%相对湿度中于 37°C 、5% CO_2 下刺激3天,然后测试细胞因子分泌和/或抗原的细胞表面表达。

[0319] 细胞因子测定

[0320] ELISA:在以不同时间刺激T细胞或PBMC之后,将板离心并除去培养基。通过AlphaLISA根据制造商的说明(Perkin Elmer)检测细胞因子水平。基于标准曲线计算浓度。

[0321] Luminex测定:用于体外确定细胞因子产生的另一种方法是使用由eBioscience开发的luminex分析。按照制造商的说明在培养物上清液中测量IL-2的水平。结果通过eBioscience分析软件进行分析。

[0322] PD-1抗体组的筛选

[0323] 来自PD-1抗体组的VH在24孔形式中产生,并作为二价抗体在PD-1/PD-L1阻断报道测定中在半对数连续滴定(起始浓度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)中进行测试,以针对与纳武单抗相比的阻断效力对抗体进行排名。基于活性数据,从PD-1抗体组中选择抗体用于随后的PD1xLAG-3双特异性筛选。表2中示出了所选择候选物在报道测定中的活性。PD-1Fab组由在两个抗体聚类即A和B中的功能活性变体构成。

[0324] PD1xLAG-3抗体组的筛选

[0325] 将来自PD-1和LAG-3抗体组的VH再克隆至带电荷的改造Fc沉默载体中,以使得在转染之后,在抗体重链表达后,迫使重链的异二聚化,从而产生双特异性抗体。将PD-1Fab臂克隆在MV1625载体中,而将LAG-3Fab臂再克隆在MV1624载体中。将代表不同箱的十五个LAG-3Fab臂(表3)与显示出不同PD-1阻断活性的三个PD-1Fab臂(MF6226、MF6930和MF6256)(表2)组合。通过SEB的系列稀释(2000-500-125-31-8-2ng/mL),测试双特异性LAG-3xPD-1抗体(表4)、其二价亲本LAG-3抗体和阴性对照抗体活化T细胞的能力。图12示出了与具有不同PD-1亲和力的LAG-3xPD-1抗体相比两种LAG-3二价抗体对经 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ SEB刺激的PBMC细胞的活性。活性表示为刺激指数。将每个IL-2值与阴性对照抗体进行比较,以确定SI(SI, IL-2为2意指当与对照抗体相比时,IL-2产生提高了200%)。与二价LAG-3抗体相比,LAG-3xPD-1双特异性抗体在SEB测定中诱导更多的IL-2。随后,在SEB测定中以系列稀释筛选代表每个箱的双特异性抗体的选择,在此用 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ SEB刺激PBMC(图13)。大多数的双特异性LAG-3xPD-1抗体在诱导IL-2释放方面比亲本PD-1二价抗体或参考LAG-3抗体效力更高。与MHC II类相互作用结构域之外的其他结构域(即结构域3和4)结合的LAG-3xPD-1双特异性抗体在诱导IL-2释放方面也比亲本PD-1二价抗体或参考LAG-3抗体效力更高。

[0326] 实施例4:PD1xLAG-3抗体组的筛选

[0327] 如上文实施例3中所述,将抗体25F7(一种LAG-3抗体)的Fab克隆并以人IgG1形式作为PG7431产生。将25F7的可变结构域也克隆成单价LAG-3抗体形式作为PB22283,其中第一臂包含25F7可变结构域,并且第二臂包含破伤风类毒素结合可变结构域(MF1337)。这些抗体的结合在图14中示出。PG1337P300是预期不与细胞结合而与破伤风类毒素结合的对照抗体。

[0328] 将这些抗体的结合与具有两个带有MF7116的可变结构域的二价抗体PG7116和其中第一臂包含MF7116的可变结构域且第二臂包含含有MF1337的破伤风类毒素可变结构域的单价LAG-3抗体形式进行比较。

[0329] 二价形式的抗体的结合类似于在左侧图中通过比较PG7431与PG7116的结合所看到的,其中抗体对Freestyle 293F_huLAG-3(293FF LAG-3)进行滴定。25F7的单价可变结构域的结合类似于二价形式的结合(在图15右侧图中将PB22283与PG7431进行比较,其中抗体对活化的T细胞进行滴定)。当与二价抗体PG7116相比时,具有MF7116的单价可变结构域的结合降低(将PB21775与PG7116进行比较,图15,左侧图)。

[0330] 因此,LAG-3IgG在结合测定中以二价和单价形式进行了测试,并与25F7(PG7431)抗体进行比较。二价形式的LAG-3抗体与基准抗体显示出类似的结合曲线。与二价分子相比,单价LAG-3xTT抗体通常显示出降低的结合活性。

[0331] 为了进一步表征PD-1xLAG-3双特异性抗体,如表5中所示创建双特异性PD-1 x LAG-3抗体组,并在PD-1xLAG-3报道测定中进行功能性测试。

[0332] 在PD1/Lag3报道测定中,将如上所述的Jurkat效应细胞(经修饰以过表达PD-1和LAG-3)与靶Raji细胞(经修饰以过表达PD-L1)、SED和LAG-3抗体混合并孵育。Jurkat细胞系包含可通过NFAT(活化T细胞的核因子)途径活化的萤光素酶报道基因。MHCII与LAG-3的相互作用将抑制该信号,并且通过生物制剂阻断MHCII/LAG-3相互作用可释放该信号,通过针对PD-1受体的生物制剂阻断PD-1/PD-L1信号也如此。

[0333] 在PD-1/LAG-3报道测定中滴定PD-1 x LAG-3双特异性抗体,并将其活性与二价LAG-3抗体25F7和二价PD-1抗体(二者均如上文实施例3中所述)进行比较。与单特异性二价对照抗体相比,双特异性抗体以显著更低的浓度促进Jurkat细胞的活化。活性与组合两种对照抗体时的活性相当,尽管事实是双特异性抗体对于每一种靶标都是单价的,其如上所述可降低单价LAG-3抗体与LAG-3结合(参见图16)。

[0334] 图17示出了报道测定筛选的一个代表性实例:示出了LAG-3和PD-1可变结构域的多种组合。

[0335] 图A示出了具有结合PD-1和LAG-3并且阻断天然配体与受体(分别为PD-L1/L2和MHC II类)结合的可变结构域的双特异性抗体。与具有针对PD-1和25F7的两种单特异性二价抗体的参考相比,图A中示出的特定双特异性抗体允许Jurkat报道细胞的活化。图B示出了具有相同结合LAG-3的可变结构域但其现在与结合PD-1但不阻断PD-1/PD-L1信号传导的PD-1可变结构域组合的双特异性抗体。清楚的是,图A中的双特异性抗体的活性至少由结合PD-1并且阻断PD-1/PD-L1信号传导的臂介导。图C示出了相反的实例:图A的PD-1臂与结合但不阻断MHC II/LAG-3信号传导的结合LAG-3的可变结构域组合。结果表明,图A中示出的双特异性抗体的活性至少由阻断MHC II类与LAG-3结合的LAG-3结合臂介导。

[0336] 图18概述了报道筛选的结果,并且示出了相对于对照的曲线下面积。

[0337] 如实施例3中所述进行SEB测定。图19示出了如本文中所述的PD-1/LAG-3双特异性抗体的SEB滴定测定的一个代表性实例。该图示出了与具有不同PD-1亲和力的PD-1xLAG-3抗体相比两种LAG-3二价抗体对用2 μ g/ml SE刺激的PBMC细胞的活性。

[0338] 图A示出了具有结合PD-1和LAG-3并且阻断天然配体与相应受体结合的可变结构域的双特异性抗体的结果。这些抗体促进PBMC细胞中IL-2的产生。图B示出了具有结合PD-1但不阻断PD-L1与受体结合的PD-1可变结构域的双特异性PD-1 x LAG-3抗体的结果。LAG-3可变结构域阻断LAG-3与MHC II的结合。图C示出了具有结合LAG-3但不阻断LAG-3与MHC II结合的可变结构域的双特异性抗体的结果。结合PD-1的可变结构域阻断PD-1与PD-L1的结合。

[0339] 图20中示出了表5中所述的双特异性组的筛选的概述。对PD-1可变结构域从上至下进行排名,这基于二价抗体在报道测定中(上图)和基于2个供体的SEB测定(中间图和下图)中的活性进行,其中在报道测定中具有最高活性的PD-1可变结构域位于最上。对LAG-3可变结构域在报道测定(上图)和基于2个供体的SEB测定(中间图和下图)中从高至低进行排名,其中以二价抗体形式具有最高活性的可变结构域在第一列中。

[0340] 基于在以下中与阳性对照相比的AUC百分比通过确定PD-1xLAG3双特异性抗体中给定臂在前15%双特异性抗体中出现的次数,对双特异性PD-1xLAG3抗体中的PD-1臂进行排名:1)报道测定;2)SEB筛选供体1(IL-2数据);3)SEB筛选供体2(IL-2数据)。参见图21和23。该排名示出在图23的最右两列中。

[0341] 可以看出,在报道测定和SEB测定中在大多数LAG-3臂的情况下,基于上述标准,具有带有MF6974 VH或MF6076 VH的可变结构域的PD-1臂的克隆排名最高。

[0342] 对携带特定LAG-3臂的双特异性抗体也采用了相同的方法,所述特定LAG-3臂也基于其存在于前15%中的次数进行评分(前15%中具有相同评分的这些臂进一步通过使用前25%评分进行排名)。最终排名在图22中示出。

[0343] 基于在报道测定中阳性对照的AUC百分比,根据上述小鼠/人LAG-3杂合体分箱实验结合LAG3结构域1的数种二价单特异性抗体(以IgG形式)评分最高。然而,基于报道测定和SEB测定中IL-2诱导排名最高的结合PD1和LAG3的双特异性抗体是结合结构域2的那些(如根据小鼠/人LAG-3杂合体实验确定的)。

[0344] 这概述于图24中。如基于PD1/LAG3-报道测定和SEB排名的前八种双特异性抗体中,有六种包含结合结构域2的LAG3臂(如根据小鼠/人LAG-3杂合体实验确定的)。如通过以二价单特异性形式进行LAG3报道测定确定的来自这6种双特异性抗体的LAG3臂的活性(基于对照的AUC百分比)通常低于确定结合结构域1的以相同形式测试的LAG3臂的活性。

[0345] 实施例5

[0346] 双特异性PD-1 x LAG3抗体在混合淋巴细胞反应中增强通过CD14+T细胞的IFN γ 产生

[0347] 混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction,MLR)测定通常用于了解抗体对T细胞活化和增殖的作用。这样的测定有助于理解这样的化合物是否将影响T细胞在肿瘤微环境中引发应答的潜力。此处,我们使用具有未成熟DC的同种异体MLR方案来确定与基准参考抗体的能力相比,双特异性PD-1 x LAG-3抗体增强通过CD14+T细胞的IFN γ 产生的能力。

通过测量培养物上清液中IFN γ 的水平对T细胞的响应性进行定量。

[0348] 为此,由血沉棕黄层制备来自健康供体的人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。通过使用磁性激活细胞分选(magnetic activated cell sorting, MACS)分离CD14⁺细胞(EasySep Stemcell,批号16C69672)并在分化培养基中培养这些细胞七天制备未成熟的单核细胞来源树突细胞(monocyte-derived dendritic cell, Mo-DC)。使用用于获得未被触及的T细胞的T细胞分离试剂盒(EasySep Stemcell,批号16D70573),在所需当日由冷冻保存的PBMC制备来源于与Mo-DC使用的不同的供体的响应性T细胞。进行六个单独的MLR以提供生物学重复。

[0349] 对于所述测定,在存在或不存在终浓度为10 μ g/mL的受试抗体的情况下,将1 \times 10⁴个未成熟的Mo-DC与1 \times 10⁵个CD14⁺T细胞共培养4天。培养以一式三份进行。在培养期结束时收集上清液,并通过ELISA(R&DBioTechne,批号342687)根据制造商的说明评估IFN γ ,并在450nm读取板。

[0350] 结果

[0351] MLR研究包括LAG3/PD1双特异性(PB15307=MF7137(LAG3)和MF6930(PD1))的实验组和LAG3同种型对照组(针对LAG-3的单特异性抗体(二价单特异性抗体PG7431)、破伤风和mIgG1)。还包括单细胞对照和载剂对照组。

[0352] 培养以一式三份进行以提供技术重复。在4天的培养期结束时,收集上清液并根据制造商的说明进行ELISA以评估抗体对IFN- γ 产生的作用,并在450nm读取板。

[0353] 在D0分选CD14⁺细胞并培养7天,在D7使用未成熟的DC,并通过在成熟培养基中培养另外的3天获得成熟的DC。在D0评估CD14阳性以确认最初分选的纯度,并分别在D7和D10在未成熟和成熟的DC中评估CD14阳性以确认CD14的下调以指示向Mo-DC的分化(数据未示出)。还对未成熟和成熟的DC二者评估了生存力和活化标志物(CD80、CD83和CD86)以确认分化和成熟。将Mo-DC(未成熟或成熟的)与响应性T细胞培养4天,之后收集上清液,并进行ELISA以评估受试抗体对IFN- γ 产生的作用。在成熟的MLR(mMLR)中,供体差异为使得将数据相对于每个供体的载剂对照进行归一化(原始数据和归一化的)。

[0354] 在图25中示出了测试的结果。对PD-1/LG-3具有特异性的双特异性抗体相对于对照和LAG3替代单特异性抗体在MLR中通过CD14⁺T细胞的IFN- γ 产生显著表现得更佳。

[0355] 表1:用于DNA免疫接种(基于pVAX1载体)和用于产生稳定Freestyle 293F或CHO-S细胞系(基于pIRES-neo3载体或类似方式)的针对每个靶标的表达构建体

靶标	载体	稳定细胞系
[0356] PD-1	pVAX1_huPD-1	NA
	pIRES-neo3_huPD-1	CHO-S_huPD-1
	pIRES-neo3_maPD-1	CHO-S_maPD-1
LAG-3	pVAX1_huLAG-3	NA
	pVAX1_raLAG-3	NA
	pIRES-neo3_huLAG-3	Freestyle 293F_huLAG-3
	pIRES-neo3_maLAG-3	Freestyle 293F_maLAG-3

[0357] hu=人,ma=猕猴,ra=大鼠,NA=不适用

[0358] 表2

[0359] 与阳性对照纳武抗体相比的作为二价抗体在PD-1/PD-L1阻断报道测定中测量的PD-1Fab臂的功能活性。测试了显示不同PD-1阻断活性的同一聚类(B)的变体。

克隆	CDR3	聚类	%阳性对照的活性
MF6226	GGYSGYGGDSFDL	A	47.77614647
MF6256	GTVEATLLDFD	B	57.85260834
MF6930	GTVEATLLFDY	B	51.50445453

[0361] 表3:描述了基于FACS谱、结构域结合和作为二价抗体的LAG-3阻断活性的分箱的LAG-3Fab臂的组

ID	CDR3H	VH	箱	LAG-3 阻断
7111	IPLTGEFDY	VH4-59	D1	是
7165	GGTYYYGSGSYTLDY	VH1-24	D1	是
7116	DGDNWDVFDI	VH3-30	D1	是
7100	ERGWDVFDI	VH3-30	D1	是
7137	GGTYYYGSGSYTLDY	VH1-24	D1	是
7518	DGSGWDDFDY	VH1-18	D1+D4	是
7134	EPNWGVYFDY	VH7-4-1	D2	是
[0362] 7146	DREVGAIYFDY	VH1-69	D2	是
7142	ERDIGSLYFDS	VH1-69	D2	是
7185	DREMFTLYFFDQ	VH1-69	D2	是
7136	DSTYYTSGSYSVFDY	VH3-23	D2	否
7118	VPAAATPSGTYYWIFDL	VH3-23	D3	否
7443	DTSTWQRGGYKAFDY	VH3-23	D3	否
7167	DRGYDYSYHNWFDP	VH3-23	D4	否
7515	RPGPALGLDS	VH1-18	D4	否
7444	DTGQSWSNYYHAFDY	VH3-23	hu/mo 交叉反应性 - hu D3	否

[0363] 表4:描述了基于FACS谱和结构域结合的分箱的LAG-3Fab臂的组

ID	CDR3H	VH	箱
7096	DLLYKWNVVEGFDI	VH4-59	D1
7097	DLLYKWNVVEGFDI	VH4-59	D1
7106	DKAVAGLYYFDS	VH1-69	D2
7118	VPAAATPSGTYYWIFDL	VH3-23	D3
7120	ERELGALYAFD1	VH1-69	D2
7133	DRETGTLYYFDY	VH1-69	D2
7139	DRA1GTLYYFDY	VH1-69	D2
7144	DRDSGLLYYFDS	VH1-69	D2
7524	GS1LAAQMWGD1	VH1-18	hu/mo交叉反应性-mo 1

[0365] 表5:PB编号及其MF组成的概述

	PD-1		
LAG-3	MF6930	MF6226	MF6256

MF7111	PB15292	PB16336	PB15254
MF7116	PB15296	PB16367	PB15258
MF7100	PB15289	PB16369	PB15251
MF7137	PB15307	PB16365	PB15269
MF7518	PB15383	PB16364	PB15347
MF7134	PB15305	PB16337	PB15267
MF7146	PB15313	PB16338	PB15275
MF7142	PB15311	PB16339	PB15273
MF7165	PB15317	PB16366	PB15279
MF7185	PB15363	PB16340	PB15359
MF7136	PB15306	PB16341	PB15268
MF7118	PB15297	PB16342	PB15259
MF7443	PB15369	PB16343	PB15333
MF7444	PB15403	PB16346	PB15393
MF7167	PB15318	PB16344	PB15280
MF7515	PB15380	PB16345	PB15344

[0367] 表5:LAG-3臂和PD-1臂以及在双特异性抗体中与该可变结构域缔合的重链的概述

靶标	MF	靶标	MF
LAG-3	7096	PD-1	5743
	7097		6076
	7100		6225
	7106		6227
	7111		6930
	7116		6932
	7118		6935
	7120		6974
	7133		6983
	7134		
	7137		
	7139		
	7142		
	7144		
	7167		
	7185		
	7444		
7518			
7524			

[0368]

[0369] 本申请母案的权利要求在此作为说明书的一部分并入本文：

[0370] 1. 用于在程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 和/或淋巴细胞活化蛋白3 (LAG3) 阳性细胞中干扰PD-1和LAG3介导的抑制的方法, 所述方法包括使所述细胞与包含以下的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物接触, 从而在所述细胞中抑制PD-1和/或LAG3介导的活性:

[0371] -能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域, 和

[0372] -能够与LAG3的胞外部分结合的可变结构域。

[0373] 2. 权利要求1所述的方法, 其中所述结合PD-1的可变结构域与PD-1的结合阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。

[0374] 3. 用于刺激免疫突触的形成、稳定性和/或活性的方法, 其包括提供包含能够通过

免疫突触彼此缔合的至少两种细胞的系统,并向所述系统提供包含以下的抗体或其功能性部分、衍生物和/或类似物,从而刺激所述至少两种细胞之间的免疫突触的形成、稳定性和/或活性:

[0375] -能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域,和

[0376] -能够与LAG3的胞外部分结合的可变结构域。

[0377] 4. 抗体或其变体,所述抗体或其变体包含能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域和能够与LAG3的胞外部分结合的可变结构域。

[0378] 5. 权利要求4所述的抗体或其变体,其中结合PD-1的可变结构域阻断PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。

[0379] 6. 权利要求4或5所述的抗体或其变体,其中所述结合LAG-3的可变结构域与LAG-3胞外结构域1、2、3或4,优选结构域1或结构域2,优选结构域2结合。

[0380] 7. 权利要求4至6中任一项所述的抗体或其变体,其中结合PD-1的胞外部分的可变结构域限定为这样的可变区:其当在包含两个所述结合PD-1的可变结构域的二价单特异性抗体中时,与用抗体纳武单抗对Jurkat细胞获得的抑制相比在Jurkat细胞中以20%至150%抑制PD-1/PD-L1抑制。

[0381] 8. 权利要求4至7中任一项所述的抗体或其变体,所述抗体或其变体包含能够与PD-1的胞外部分结合并且包含具有CDR3区的重链可变区的可变结构域,所述CDR3区包含针对以下所示的VH之一的可变重链区的CDR3的氨基酸序列:图3中的MF6076、MF6226、MF6236、MF6256、MF6930、MF6932、MF6935、MF6936、MF6972、MF6974或MF6982,优选MF6256、MF6930、MF6076、MF6974或MF6226,优选MF6930、MF6076或MF6974。

[0382] 9. 权利要求8所述的抗体或其变体,其中所述结合PD-1的可变结构域包含重链可变区,所述重链可变区包含具有CDR1、CDR2和CDR3区的重链可变区,所述CDR1、CDR2和CDR3区包含针对以下所示的VH之一的可变重链区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列:图3中的MF6076、MF6226、MF6236、MF6256、MF6930、MF6932、MF6935、MF6936、MF6972、MF6974或MF6982,优选MF6256、MF6930、MF6076、MF6974或MF6226,优选MF6930、MF6076或MF6974。

[0383] 10. 权利要求4至7中任一项所述的抗体或其变体,所述抗体或其变体包含能够与PD-1的胞外部分结合并且包含重链可变区的可变结构域,所述重链可变区包含如针对以下所示的可变重链区的氨基酸序列:图3中的MF6076、MF6226、MF6236、MF6256、MF6930、MF6932、MF6935、MF6936、MF6972、MF6974或MF6982,优选MF6256、MF6930、MF6076、MF6974或MF6226,优选MF6930、MF6076或MF6974,所述氨基酸序列相对于如针对MF所示的VH的氨基酸序列具有至多15个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换,或其组合。

[0384] 11. 权利要求4至10中任一项所述的抗体或其变体,所述抗体或其变体包含能够与LAG3的胞外部分结合并且包含具有CDR3区的重链可变区的可变结构域,所述CDR3区包含如针对以下所示的可变重链区的CDR3区的氨基酸序列:图3中的MF7100、MF7111、MF7116、MF7118、MF7134、MF7136、MF7137、MF7142、MF7146、MF7165、MF7167、MF7185、MF7443、MF7444、MF7515、MF7518、MF7096、MF7097、MF7106、MF7120、MF7133、MF7139、MF7144或MF7524,优选MF7518、MF7165、MF7116、MF7096、MF7133、MF7139、MF7524或MF7137,优选MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096。

[0385] 12. 权利要求11所述的抗体或其变体,所述抗体或其变体包含能够与LAG3的胞外部分结合并且包含具有CDR1、CDR2和CDR3区的重链可变区的可变结构域,所述CDR1、CDR2和CDR3区包含针对以下所示的VH之一的可变重链区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列:图3中的MF7100、MF7111、MF7116、MF7118、MF7134、MF7136、MF7137、MF7142、MF7146、MF7165、MF7167、MF7185、MF7443、MF7444、MF7515、MF7518、MF7096、MF7097、MF7106、MF7120、MF7133、MF7139、MF7144或MF7524,优选MF7518、MF7165、MF7116、MF7096、MF7133、MF7139、MF7524或MF7137,优选MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096。

[0386] 13. 权利要求4至10中任一项所述的抗体或其变体,所述抗体或其变体包含能够与LAG3的胞外部分结合并且包含重链可变区的可变结构域,所述重链可变区包含如针对以下所示的可变重链区的氨基酸序列:图3中的MF7100、MF7111、MF7116、MF7118、MF7134、MF7136、MF7137、MF7142、MF7146、MF7165、MF7167、MF7185、MF7443、MF7444、MF7515、MF7518、MF7096、MF7097、MF7106、MF7120、MF7133、MF7139、MF7144或MF7524,优选MF7518、MF7165、MF7116、MF7096、MF7133、MF7139、MF7524或MF7137,优选MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096,所述氨基酸序列相对于指定MF的氨基酸序列具有至多15个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换,或其组合。

[0387] 14. 权利要求4至7中任一项所述的抗体或其变体,其中所述抗体包含:

[0388] 能够与LAG-3的胞外部分结合的可变结构域,其包含重链可变区,所述重链可变区包含如针对以下所示的可变重链区的氨基酸序列:MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096(图3中),所述氨基酸序列相对于指定MF的氨基酸序列具有至多15个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换,或其组合;和

[0389] 能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域,其包含重链可变区,所述重链可变区包含如针对MF6076(如图3中所示)所示的可变重链区的氨基酸序列,所述氨基酸序列相对于如针对MF所示的VH的氨基酸序列具有至多15个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换,或其组合。

[0390] 15. 权利要求4至7中任一项所述的抗体或其变体,其中所述抗体包含:

[0391] 能够与LAG-3的胞外部分结合的可变结构域,其包含重链可变区,所述重链可变区包含如针对以下所示的可变重链区的氨基酸序列:MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096(图3中),所述氨基酸序列相对于指定MF的氨基酸序列具有至多15个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换,或其组合;和

[0392] 能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域,其包含重链可变区,所述重链可变区包含如针对MF6974(如图3中所示)所示的可变重链区的氨基酸序列,所述氨基酸序列相对于如针对MF所示的VH的氨基酸序列具有至多15个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换,或其组合。

[0393] 16. 权利要求4至7中任一项所述的抗体或其变体,其中所述抗体包含:

[0394] 能够与LAG-3的胞外部分结合的可变结构域,其包含重链可变区,所述重链可变区包含如针对以下所示的可变重链区的氨基酸序列:MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096(图3中),所述氨基酸序列相对于指定MF的氨基酸序列具有至多15个,优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换,或其组合;和

[0395] 能够与PD-1的胞外部分结合的可变结构域,其包含重链可变区,所述重链可变区

包含如针对MF6930 (如图3中所示) 所示的可变重链区的氨基酸序列, 所述氨基酸序列相对于如针对MF所示的VH的氨基酸序列具有至多15个, 优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个, 并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换, 或其组合。

[0396] 17. 抗体或其变体, 所述抗体或其变体包含能够与PD-1的胞外部分结合并且包含重链可变区的可变结构域, 所述重链可变区包含如针对以下所示的可变重链区的氨基酸序列: MF6076、MF6974或MF6930 (如图3中所示), 所述氨基酸序列相对于如针对MF所示的VH的氨基酸序列具有至多15个, 优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个, 并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换, 或其组合。

[0397] 18. 抗体或其变体, 所述抗体或其变体包含能够与LAG-3的胞外部分结合并且包含重链可变区的可变结构域, 所述重链可变区包含如针对以下所示的可变重链区的氨基酸序列: MF7139、MF7524、MF7133、MF7518或MF7096 (图3中), 所述氨基酸序列相对于指定MF的氨基酸序列具有至多15个, 优选0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个, 并且优选具有0、1、2、3、4或5个氨基酸插入、缺失、替换, 或其组合。

[0398] 19. 前述权利要求中任一项所述的抗体或其变体, 所述抗体或其变体包含轻链可变区, 所述轻链可变区具有如图1B中所示轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3序列, 或者与图1B中所示轻链可变区CDR1和CDR2以及CDR3序列的不同之处在于不超过三个、优选不超过两个、更优选不超过一个氨基酸的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0399] 20. 前述权利要求中任一项所述的抗体或其变体, 所述抗体或其变体包含轻链可变区, 所述轻链可变区具有与如图1B或图1A中所示氨基酸序列至少80%同一性的序列。

[0400] 21. 权利要求1至3中任一项所述的方法, 其中所述抗体或其变体是根据权利要求4至20中任一项所述的抗体。

[0401] 22. 权利要求4至20中任一项所述的抗体或其变体, 其用作药物。

[0402] 23. 权利要求4至20中任一项所述的抗体或其变体, 其用于治疗癌症或病原体感染例如病毒或寄生生物感染的方法。

[0403] 24. 组合物或成套药盒, 其包含根据权利要求4至20中任一项所述的至少一种抗体或其变体。

[0404] 25. 药物组合物, 其包含权利要求4至20中任一项所述的至少一种抗体或其变体, 以及可药用的载体、稀释剂或赋形剂。

[0405] 26. 长度为至少15个核苷酸的核酸分子, 其编码权利要求4至20中任一项所述的抗体或变体的至少一个CDR区。

[0406] 27. 根据权利要求26所述的核酸分子, 其编码权利要求4至20中任一项所述的抗体或变体的至少重链可变区。

[0407] 28. 根据权利要求26或27所述的核酸分子, 其编码如图3中所示的重链可变区。

[0408] 29. 核酸分子, 其编码权利要求4至20中任一项所述的抗体或变体。

[0409] 30. 载体, 其包含根据权利要求26至29中任一项所述的核酸分子或其功能等同物。

[0410] 31. 分离或重组的细胞、或非人动物, 其包含根据权利要求26至29中任一项所述的核酸分子或根据权利要求30所述的载体。

[0411] 32. 用于治疗癌症或病原体感染的方法, 其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的权利要求4至20中任一项所述的抗体或变体、根据权利要求24或25所述的组合物、根据

权利要求26至29中任一项所述的核酸分子、或根据权利要求30所述的载体。

[0412] 33. 用于从单细胞产生权利要求4至20中任一项所述的抗体或其变体的方法,其中所述抗体或其变体包含能够形成界面的两个CH3结构域,所述方法包括提供:

[0413] -具有以下的细胞:a) 第一核酸分子,其编码特异性识别PD-1的胞外部分并且包含第一CH3结构域的IgG重链;和b) 第二核酸序列,其编码特异性识别LAG-3的胞外部分并且包含第二CH3结构域的IgG重链,其中所述核酸序列编码用于所述第一CH3结构域与所述第二CH3结构域优先配对的残基,所述方法还包括以下步骤:培养所述细胞并允许表达所述核酸序列,并从培养物中收获所述抗体或其变体。

[0414] 34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述细胞具有第三核酸序列,其编码共同轻链,优选重排种系人 κ 轻链IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01。

[0415] 35. 根据权利要求33或34所述的方法,其中所述第一核酸编码包含氨基酸替换L351K和T366K(根据EU编号进行编号)的所述第一CH3结构域,并且其中所述第二核酸编码包含氨基酸替换L351D和L368E(根据EU编号进行编号)的所述第二CH3结构域,所述方法还包括以下步骤:培养所述细胞并允许表达所述核酸序列,并从培养物中收获所述抗体或其变体。

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
 EQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图1A

gacatccagatgacccagtcctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 atcaacttgccgggaagtcagagcattagcagctacttaaattggatcagcagaaacca
 I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P
 gggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatca
 G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S
 aggttcagtgccagtggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacct
 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 gaagatlltgcaacttactactgtcaacagagttacagtacccctccaacgttcggccaa
 E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P T F G Q
 gggaccaagtgagatcaaa
 G T K V E I K

图1B

cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatct
 R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S
 ggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag
 G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
 tggaaagtgataaacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggac
 W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
 agcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacgag
 S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
 aaacacaaagctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcctgcacaaag
 K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K
 agcttcaacaggggagagtggttag
 S F N R G E C -

图1C

图1

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFLLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIK

图1D

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFLLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP

图1E

图1(续)

VH: 取决于MF (靶标): 图3

图2A

```

gctagcaccaagggcccatcggttcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
ggcacagcggccctgggctgctggtaaggactacttccccgaaccggtgacgggtgtcg
G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
tggaaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcaacaccttcccggtgtcctacagtctca
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
ggactctactccctcagcagcgtcgtgaccgtgcctccagcagcttgggcaaccagacc
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt
Y I C N V N H K P S N T K V D K R V

```

图2B

```

gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccca
E P K S C D K T H T C P P C P

```

图2C

```

gcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttctcttccccccaaaaaccaagacacc
A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
ctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagac
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaag
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
ccgcgggaggagcagtagaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaa
P I E K T I S K A K

```

图2D

图2


```

gcacctgaaactcggcaggggaccgtcagttcttctcttcccccaaaacccaaggacacc
A P E L G R G P S V F L F P P K P K D T
ctcatgatctccccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagac
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
cctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaag
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
cccggggaggagcagtlacaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
cccacgcagaaaaccatctccaaagccaaa
P I E K T I S K A K

```

图2E

```

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccaagcccccatcccgggaggagatgaccaag
G Q P R E P Q V Y T K P P S R E E M T K
aaccaggtcagcctgaagtgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
N Q V S L K C L V K G F Y P S D I A V E
tgggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
gacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
ctctccctgtctccgggttga
L S L S P G -

```

图2F

图2(续)

```

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccgaccccccatcccgggaggagatgaccaag
G Q P R E P Q V Y T D P P S R E E M T K
aaccaggtcagcctgacctgaggtgcaaggttctatcccagcgacatcgccgtggag
N Q V S L T C E V K G F Y P S D I A V E
tgggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
gacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
ctctccctgtctccgggttga
L S L S P G -

```

图2G

图2(续)

MF6076

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSTDSLGFYFWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSAN
FNPSLKSRVTMSIDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYFCARGGYTGYGGDWFDPWGQG
TLVTVSS

MF6226

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSIGYYFWSWIRQPPGKGLEWIGYVYYSGSNN
LNPSLKSRVTLSVDTSKNQFSLRLNSMTAADTAVYYCARGGYSGYGGDSEDLWGQGT
TVTVSS

MF6236

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIGYYFWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTN
FNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLNLRSVTTADTAVYYCARGGYTGHGGDWFDPWGQG
TLVTVSS

MF6256

EVQLVQSGAEVKKPGSSMKVSKASGGTFSSYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIIPVFDT
SSYEKKFQGRVTIIADKSTSTVYLELSSLRSEDAAVYYCARGTVEATLLFDFWGGQTLV
TVSS

MF6930

EVQLVQSGAEVKKPGSSMKVSKASGGTFSNYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIIPVFET
ATYEKKFQGRVTIIADKSTSTVYMESSLRSEDAAVYYCARGTVEATLLFDYWGQGT
LTVSS

MF6932

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIIPFFDT
ANYAQKFQGRVTITADKSTSTASMELESLRSEDTAVYYCARGTVSATLVFDYWGQGT
LTVSS

图3A

图3

MF6935

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIPIFDT
ANYAQKFKGRVTITADKSTSTASMELRSLRSEDTAVVYCARGTVSGTLVFDYWGQGT
LVTVSS

MF6936

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFSSNYVINWVRQAPGQGLEWMGMIIPIVFDT
TSYERKFKGRVTITADKSTSTAYMELTSLRSEDTAVVYCARGTVGATLLFDNWGQGT
LVTVSS

MF6972

EVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSISTYFWSWIRQPPGKGLEWIGYIIYSGSTNY
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVVYCARGGYSGYGGDDEFDIWGQGT
VTVSS

MF6974

EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGA
NIYYADSVKGRFTISRDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCASPYGSGYFDVWGQGT
LVTVSS

MF6982

EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGTN
IYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAGDTAVVYCASPYGSGYLDVWGQGT
LVTVSS

图3A

图3 (续)

MF7100

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDTHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARERGWDFDIWGQGTL
VTVSS

MF7111

QVQLQESGGGLVKPSETLSLTCTVSDDSISDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGNTK
YNPSLKNRVTISVDTSKSKQFSLKLTSVTAADTAVYYCARIPLTGEFDYWAQGLTVTVSS

MF7116

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYHGS
DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGDNWDFDIWGQG
TLVTVSS

MF7118

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGGGVS
TFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVPAAATPSGTYWIFDL
WGRGLTVTVSS

MF7134

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTTNALNWVRQAPGQGLEWMGWINTHTG
NPTYAQGFGRFVFSLDTSVSTAYLQIRSLKAEDTAVYYCAREPNWGVYFDYWGQGT
LTVTVSS

MF7136

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGRS
TYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSTYYTSGSYSVFDY
WGQGLTVTVSS

图3B

图3 (续)

MF7137

QVQLVQSGAEVVKRPGASVKVSKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGSDPEH
GETVDAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTGGTYYYGSGSYTLDY
DFWGQGTTLTVSS

MF7142

QVQLVQSGAEVVKRPGSSVMVSKKASGGTFNTYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGT
PYYGQRFQGRVTITADKSTNTVFMELSSLRSEDTAMYFCARERDIGSLYYFDSWGQG
TLVTTVSS

MF7146

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGGTFNNYFITWVRQAPGQGLEWMGGIIPSEGT
CNYAQKFQGRVAITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAIYYCVRDREVGAIYYFDYWGQG
TMVTVSS

MF7165

QVQLVQSGAEVVKRPGASVKVSKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWMGAFDPEDG
ETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYFCATGGTYYYGSGSYTLDY
WGQGTTLTVSS

MF7167

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTISGSGVS
TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCAKDRGYDYSYHNWFD
PWGQGTTLTVSS

MF7185

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKTSGGTFSNYAFSWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGS
TNYAQSEFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDREMGTLYFFDQWGQG
TTVTVSS

图 3B (续)

图3 (续)

MF7443

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
 TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCAKDTSTWQRGGYKAFDY
 WGQGTLVTVSS

MF7444

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
 TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCAKDTGQSWSNYYHAFDY
 WGQGTLVTVSS

MF7515

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSG
 NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVVYCARRPGPALGDLDSWGQ
 GTLVTVSS

MF7518

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSG
 NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVVYCARDGSGWDDFDYWGQ
 GTLVTVSS

MF7096

QVQLQESGPGLVRPSETLSLTCTVSGGSISSYSWSWIRQPPGKGLEWIGYIDYSGSTNY
 NPSLKSRVTISVDTSKTQFSLKLSVSAADTAVVYCAKDLLYKWNYVEGFDIWGQGT
 TVSS

MF7097

QVQLQESGPGLVKRPSETLSLTCTVSGGSISSYSWSWIRQPPGKGLEWIGYIDYSGTIN
 FNPSLKSRVTISVDTSKTQFSLKLSVSAADTAVVYCAKDLLYKWNYVEGFDIWGQGT
 MVTVSS

图 3B (续)

图3 (续)

MF7106

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSKYVVSWVRQAPGQGFDWMGGIIPMEG
TANYAQMFQGRVTITADKSTSTVNMELSSLRSEDTAVYYCVRDKAVAGLYYFDSWGQ
GTLVTVSS

MF7120

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFSTYAINWIRQAPGQGLEWMGGIIPFGTA
YYAQEFQDRVTITADKSTSTGYMEMSSLISEDTAVYYCARERELGALYAFDIWGQGT
MVTVSS

MF7133

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSHAISWVRQVPGQGLEWMGGIIPLFDT
AKNAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDRETGTLYYFDYWGQG
TLVTVSS

MF7139

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNFAFSWVRQAPGQGLEWMGGIIPMED
TAKYAQKFQGRVTIHADKSTNTAYMDLNSLRSEDTAVYYCVRDRAIGTLYYFDYWGQ
GTLVTVSS

MF7144

QVQLVQSGAEVRKPGSSVMVSCKASGGTFSYAINWLRQAPGQGLEWMGGIIPFGT
PYYGQRFQGRVTITADKSTNTVFMESSLRSEDTAIYYCARDRDSGGLYYFDSWGQG
TLVTVSS

MF7524

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSG
NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGSILAAQMWGDIWG
QGTLVTVSS

图 3B (续)

图3 (续)

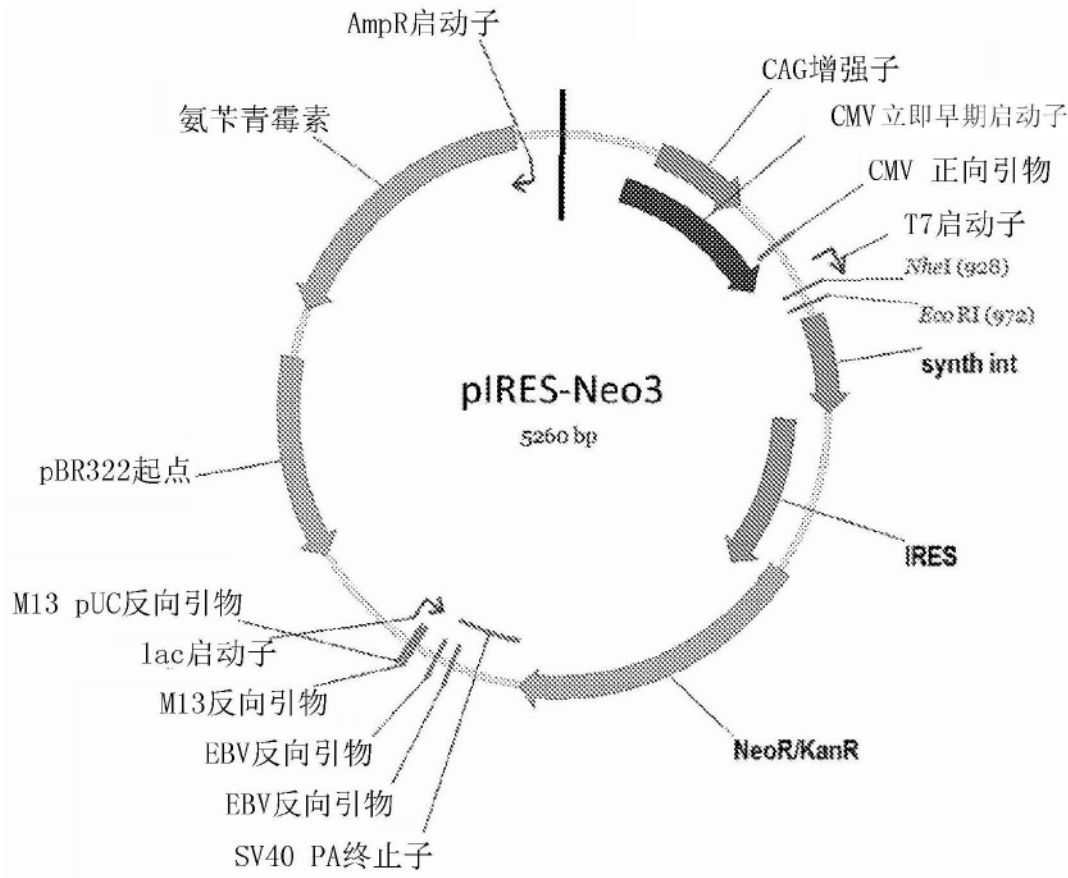


图4

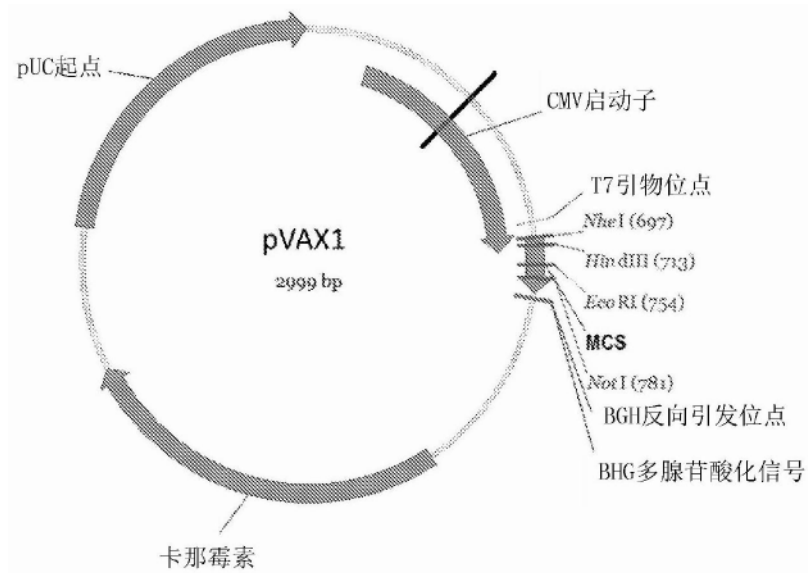


图5

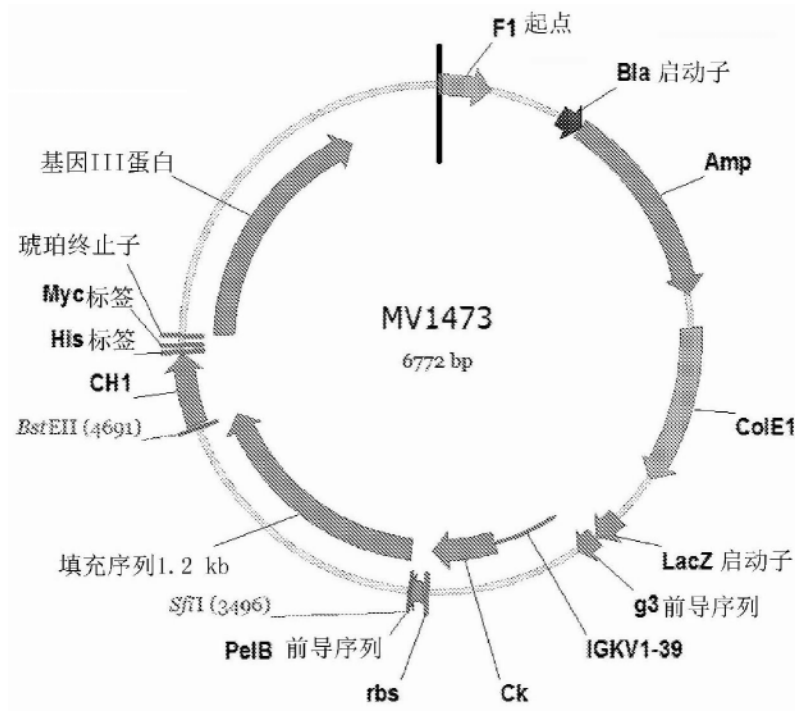


图6

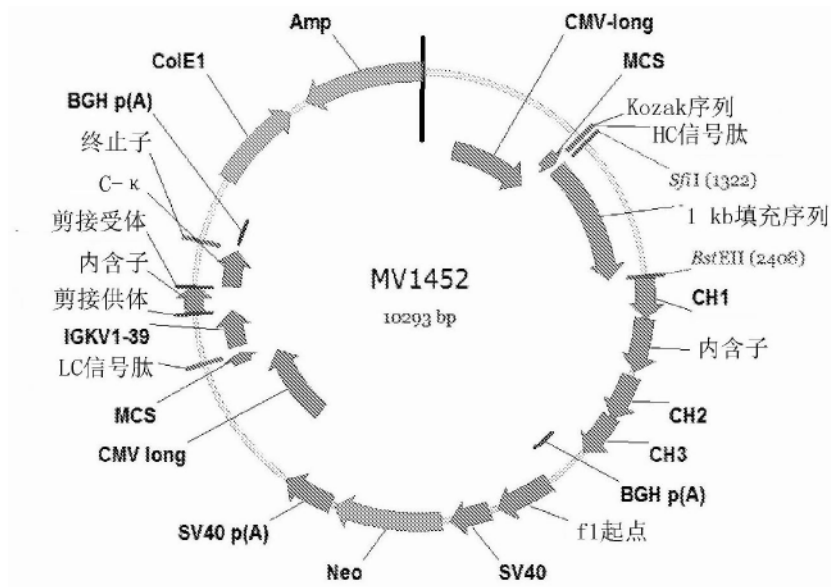


图7

EVQLVETGAEVKKPGASVKVSKKASDYIFTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWSANTGNTGYAOKFKQGRVTMTRDTS
 INTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTEETAPYYHFALDVWVGQTTVTVSS

图8

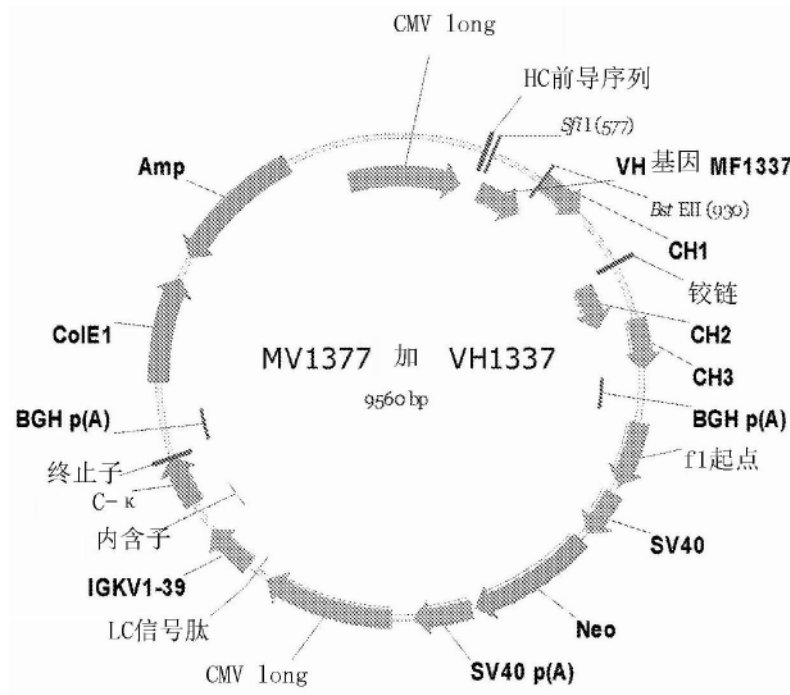


图9

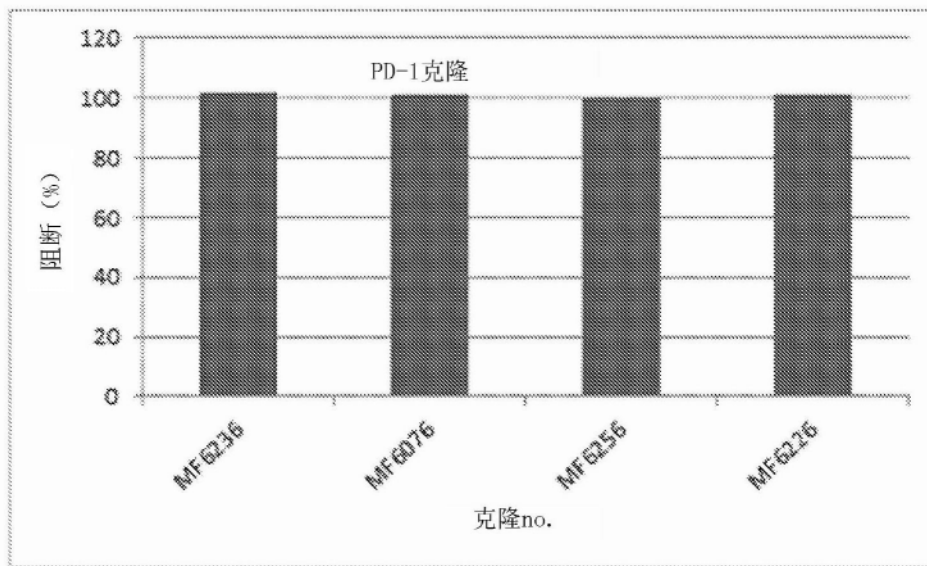


图10

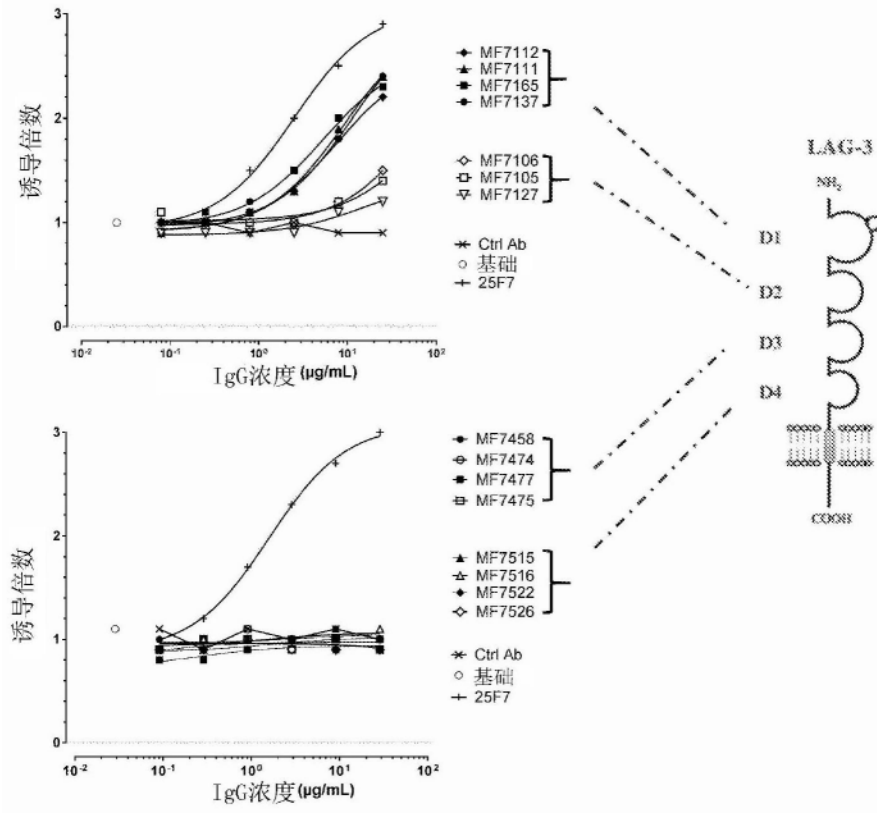


图11

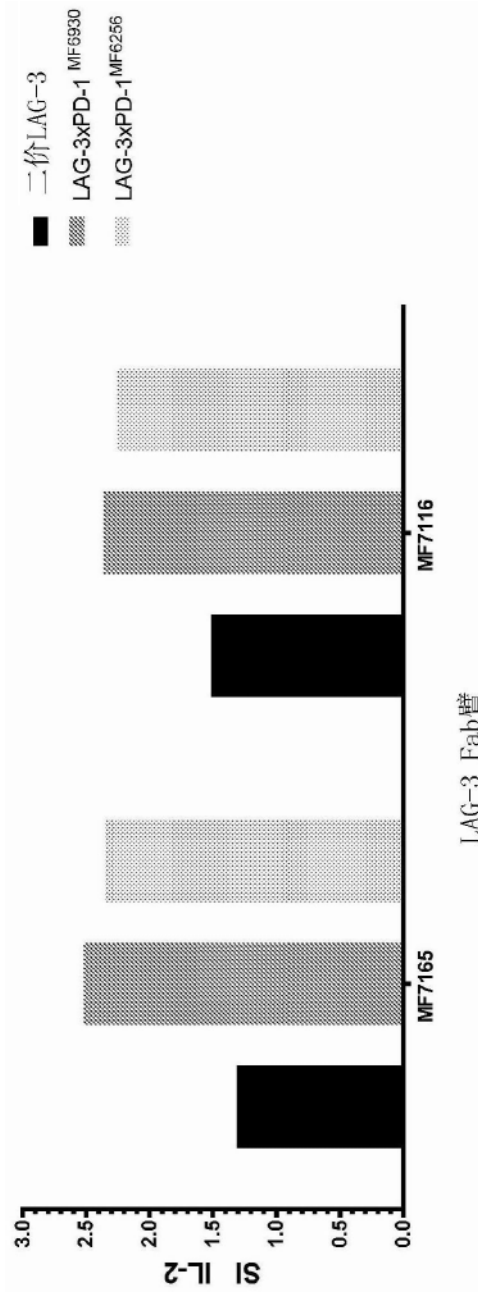


图12

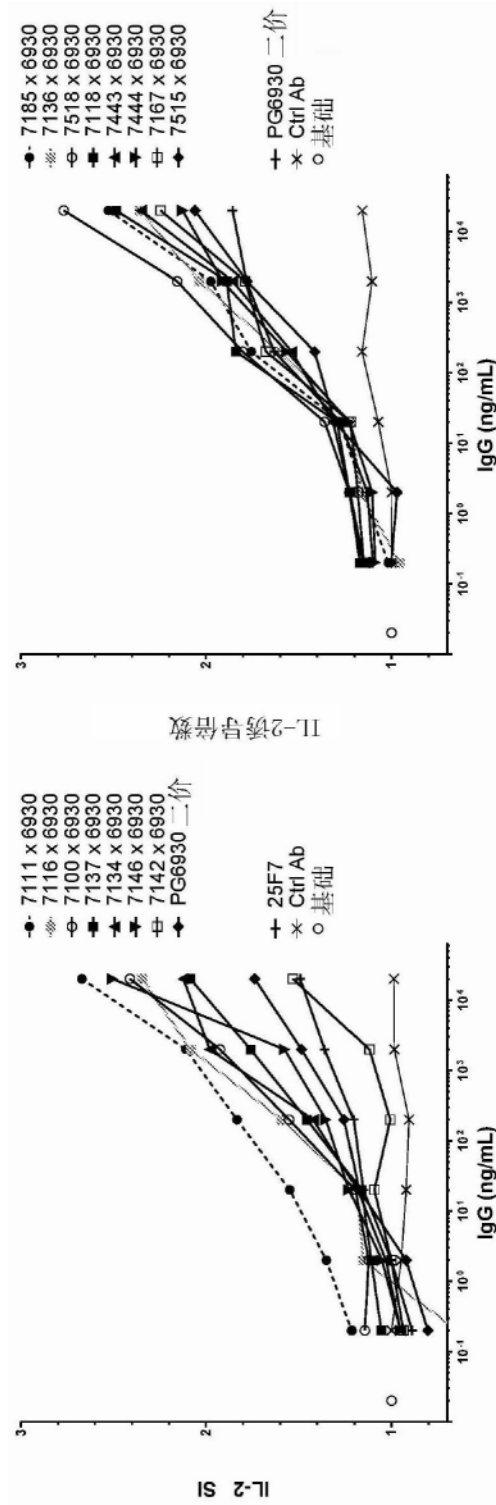


图13

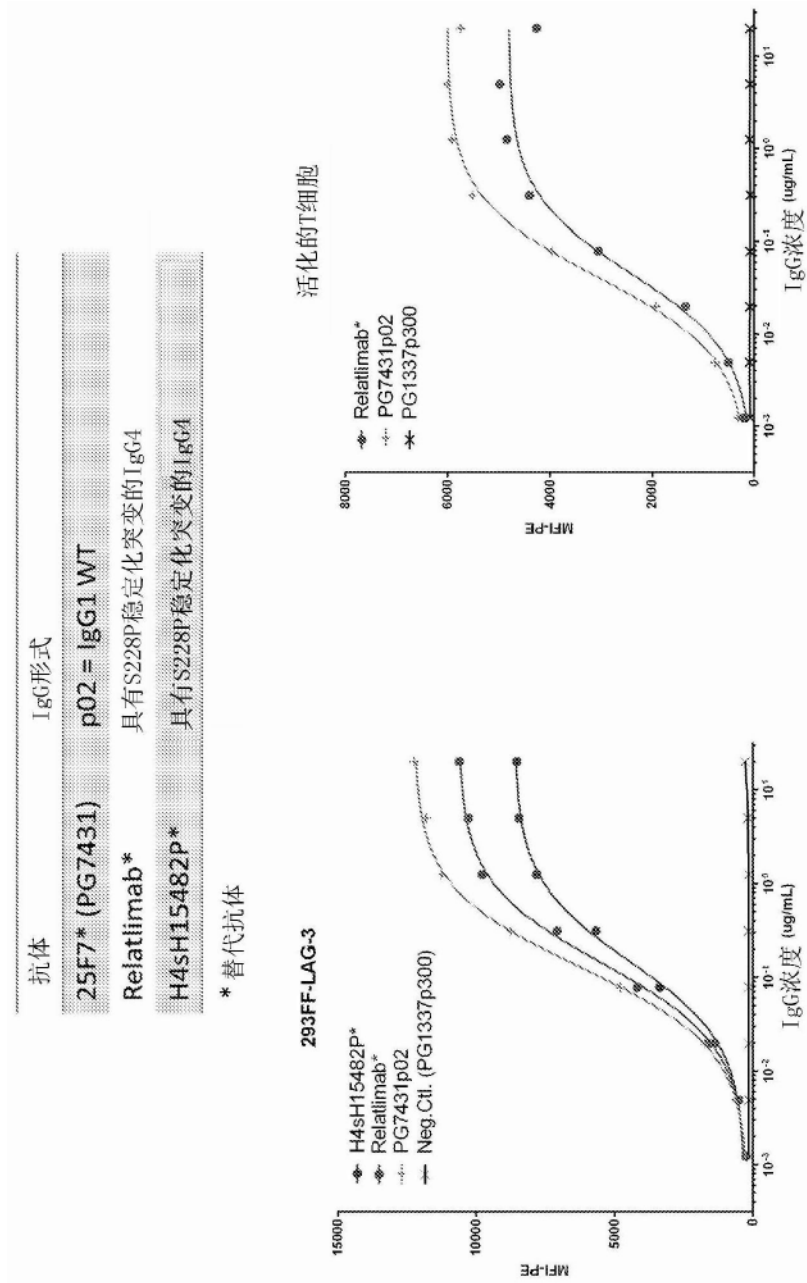


图14

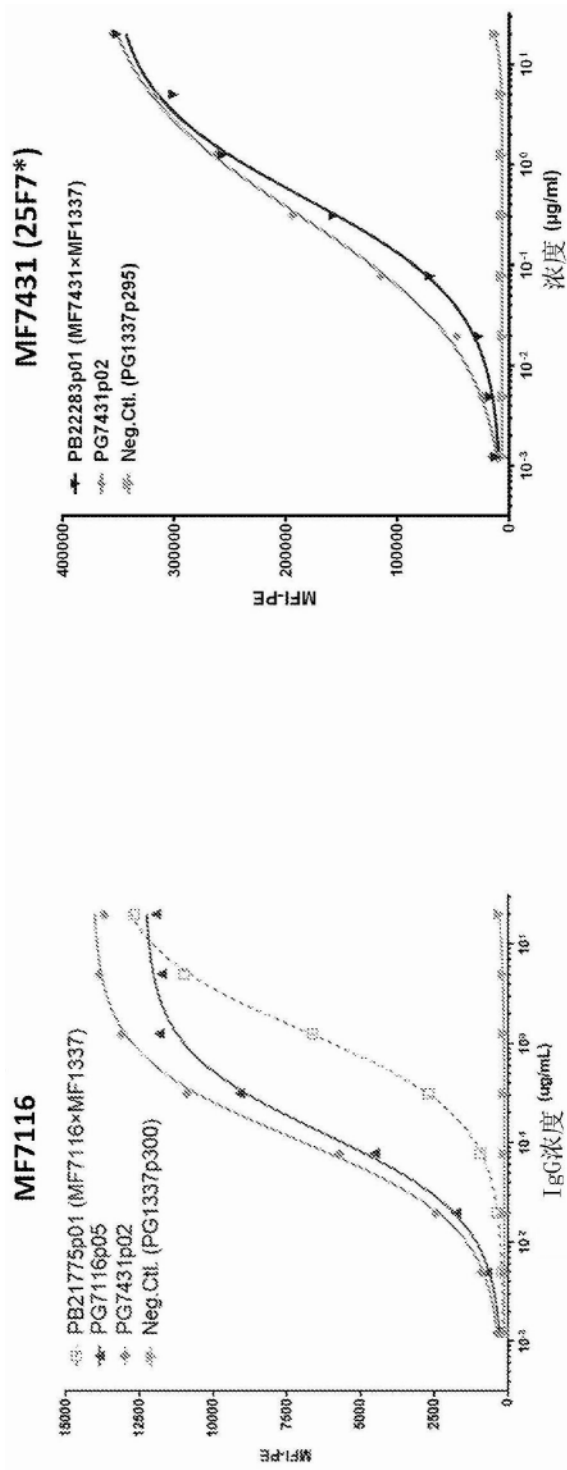


图15

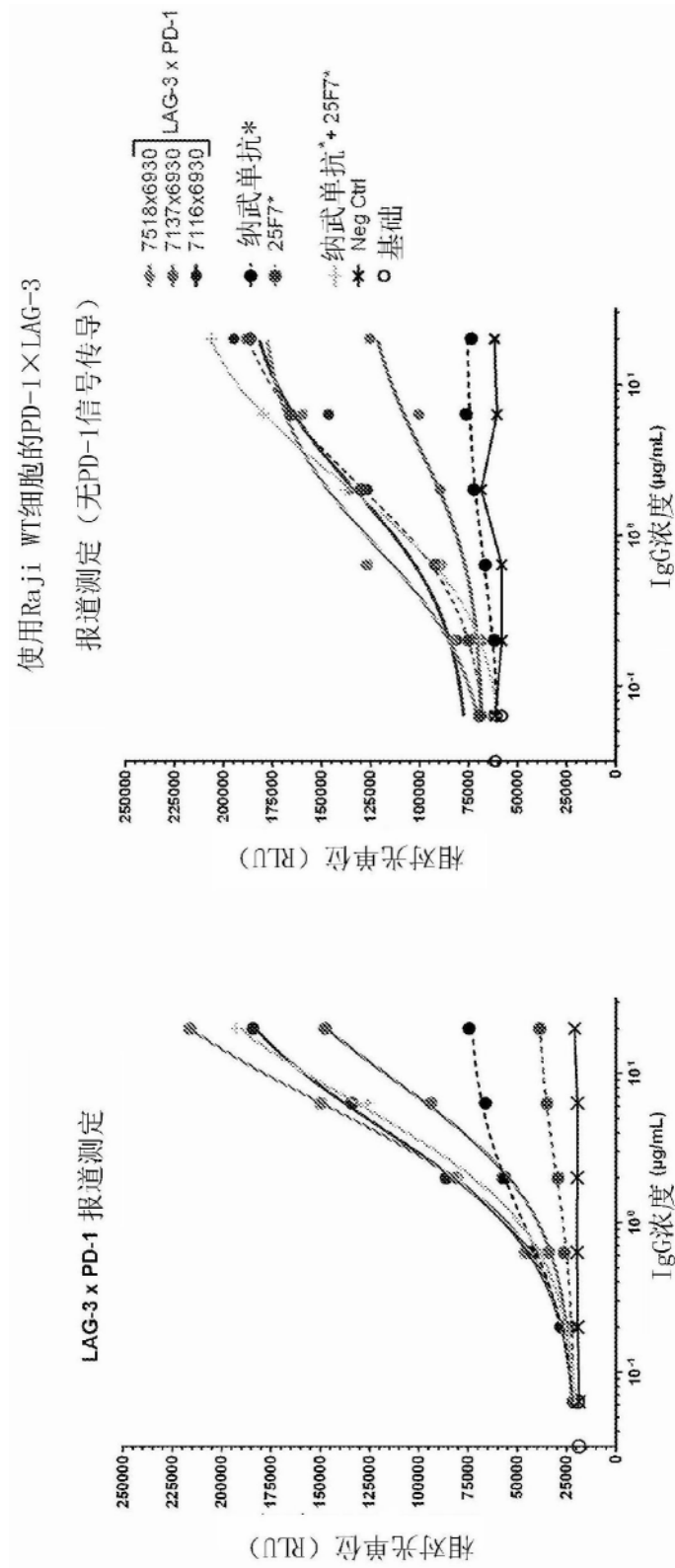


图16

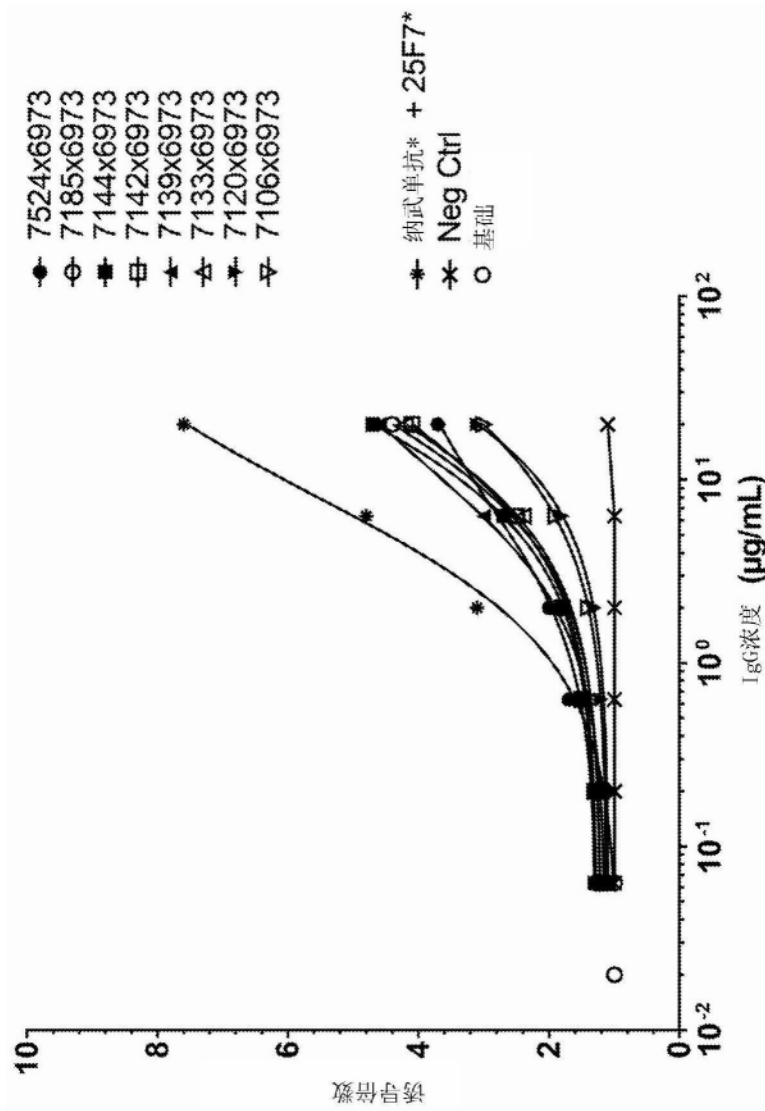


图17A

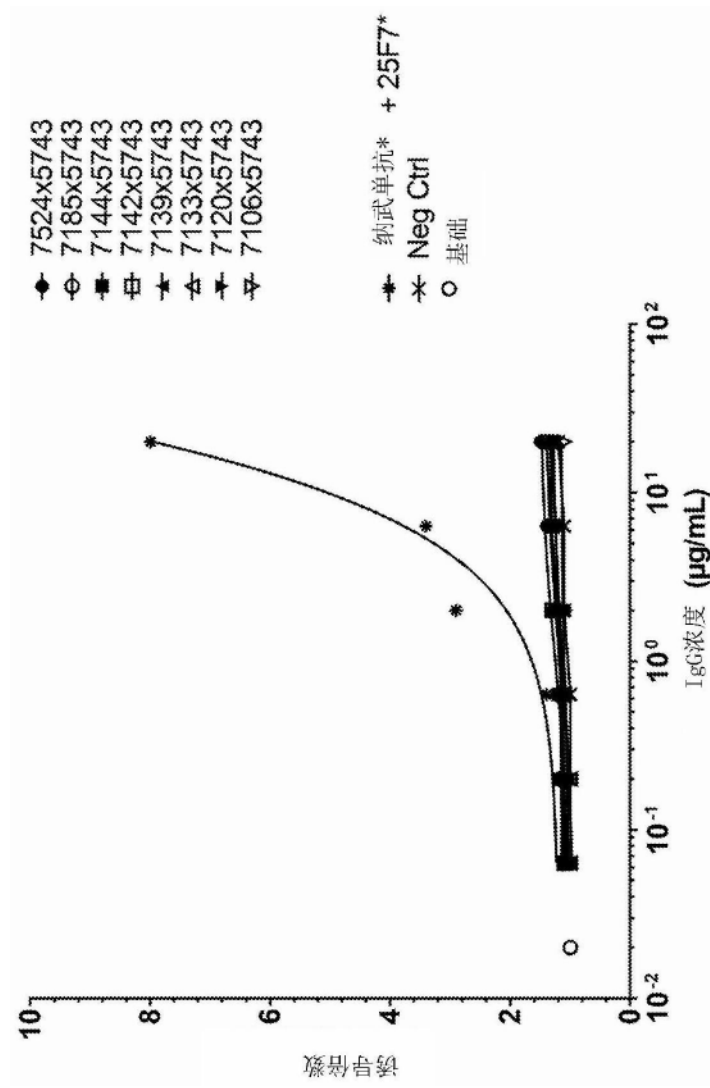


图17B

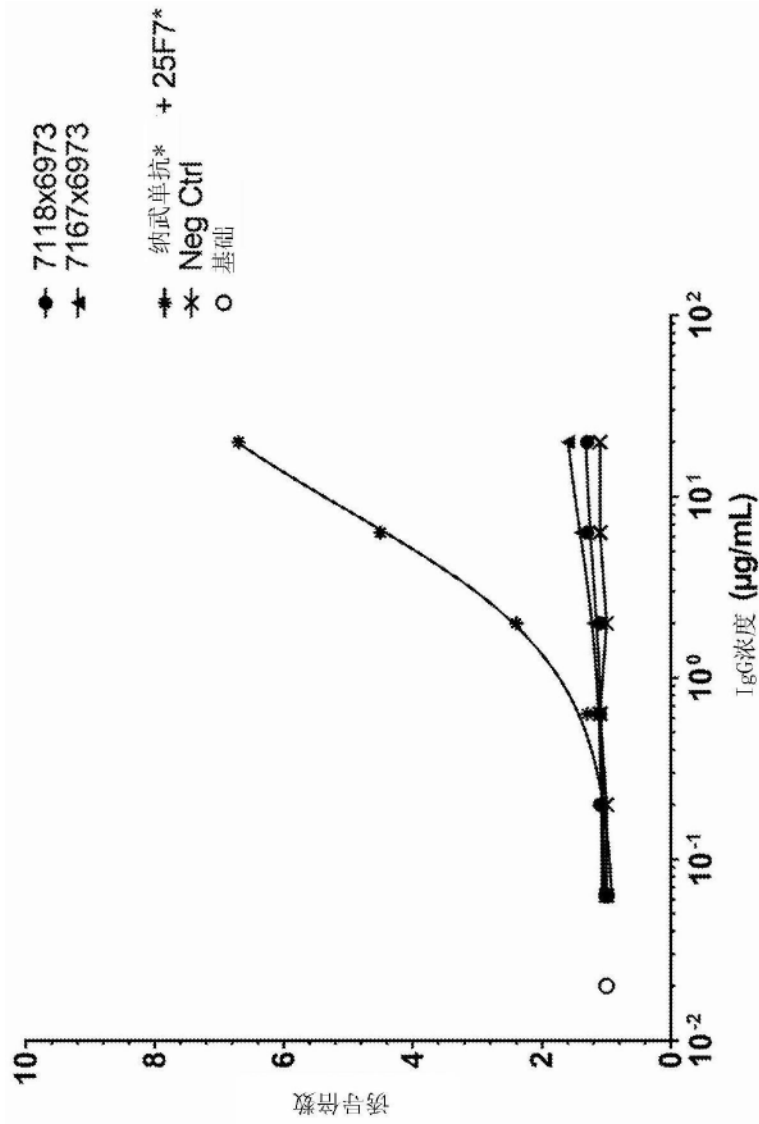


图17C

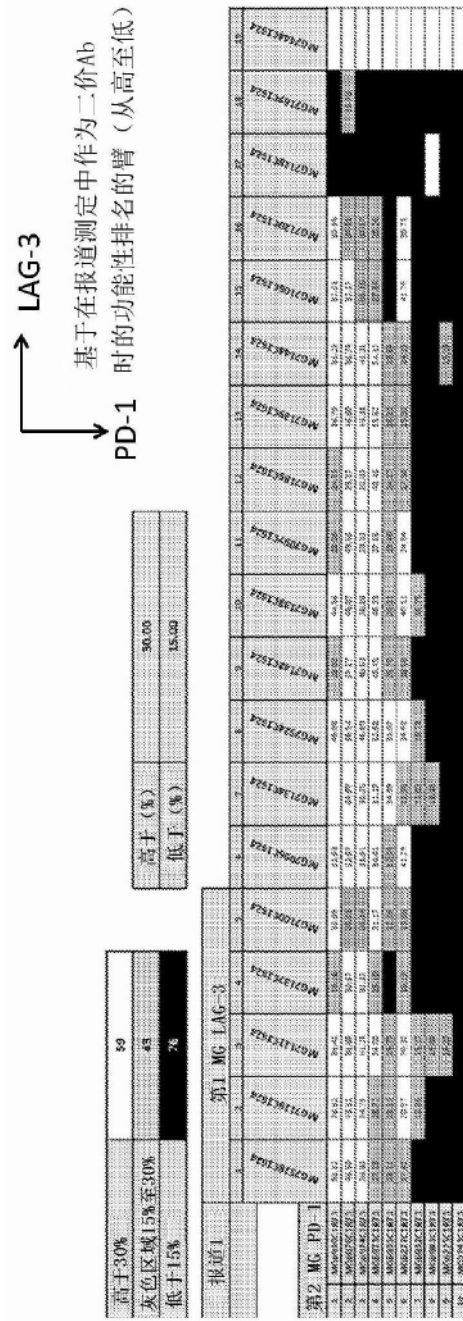


图18

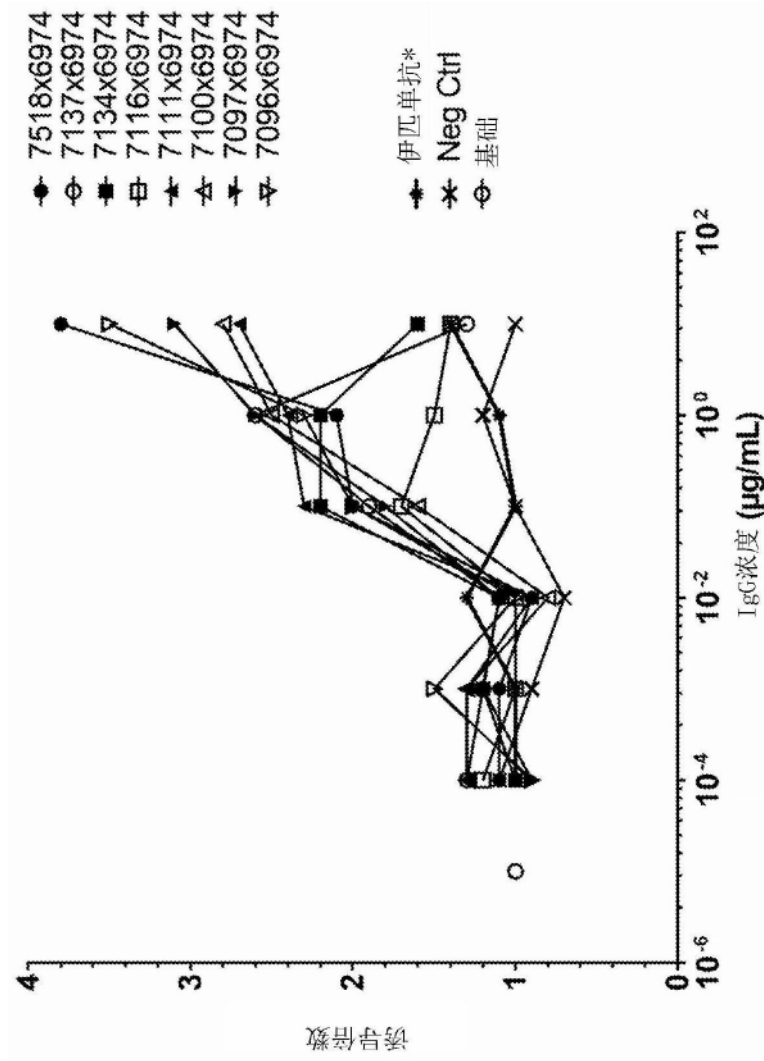


图19A

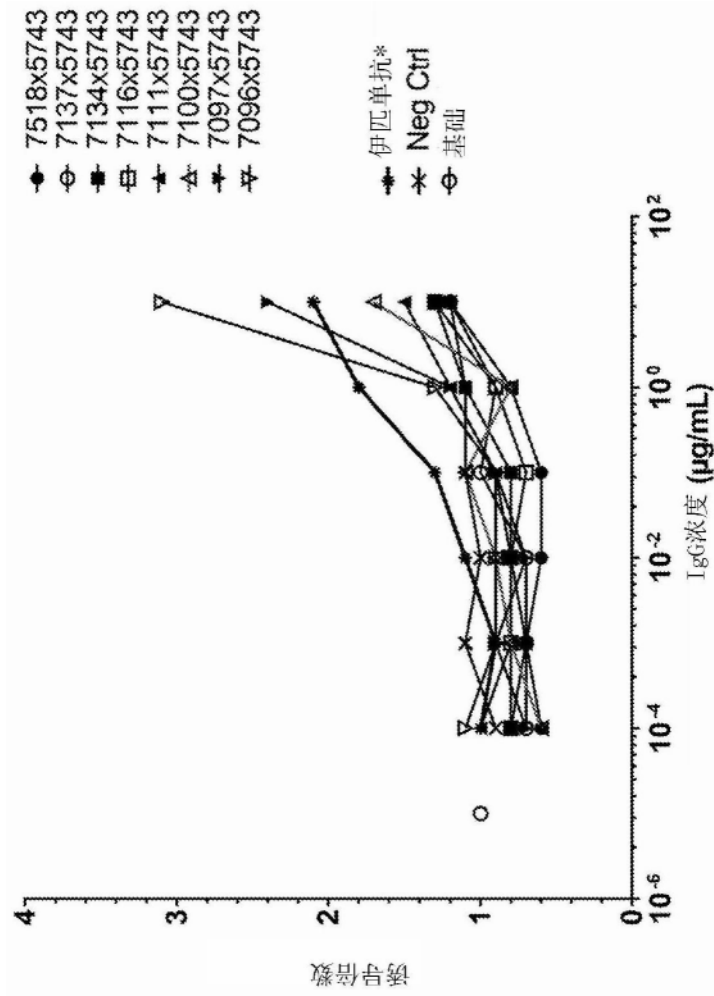


图19B

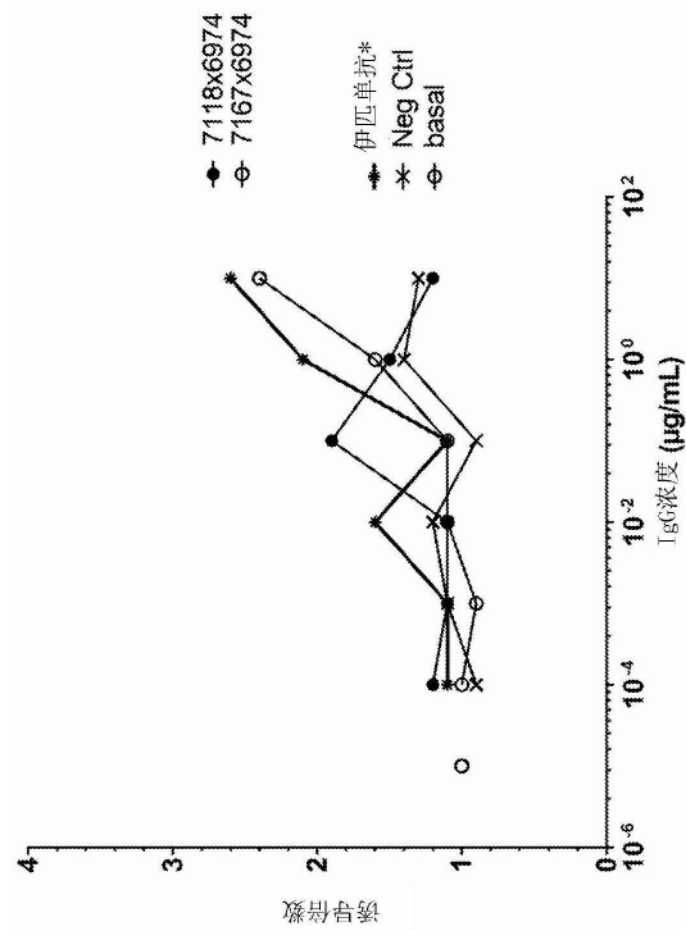


图19C

	报道	SEB供体1	SEB供体2	总和	平均值
MG6930C1873	3	0	0	3	1.0
MG6076C1873	8	8	2	18	6.0
MG6974C1873	6	10	8	24	8.0
MG6973C1873	6	8	1	15	5.0
MG6935C1873	0	1	3	4	1.3
MG6227C1873	3	0	4	7	2.3
MG6932C1873	0	0	1	1	0.3
MG6983C1873	0	0	2	2	0.7
MG6225C1873	0	0	0	0	0.0
MG5743C1873	0	0	6	6	2.0

图21

	报道	SEB供体1	SEB供体2	总和	平均值	排名	报道	SEB供体1	SEB供体2	总和	平均值
MG7518C1624	2	1	2	5	1.7	7	MG7518C1624	3	2	5	3.3
MG7116C1624	1	1	0	2	0.7		MG7116C1624	3	1	4	1.7
MG7111C1624	1	1	0	2	0.7		MG7111C1624	4	1	5	2.3
MG7137C1624	0	1	2	3	1.0		MG7137C1624	0	1	3	1.0
MG7100C1624	0	1	0	1	0.3		MG7100C1624	0	1	1	0.3
MG7096C1624	2	1	1	4	1.3	10	MG7096C1624	2	2	4	2.0
MG7134C1624	2	1	0	3	1.0		MG7134C1624	2	1	3	1.3
MG7524C1624	4	2	3	9	3.0	2	MG7524C1624	5	2	7	3.7
MG7142C1624	2	2	2	6	2.0	5	MG7142C1624	3	5	8	3.7
MG7133C1624	4	2	2	8	2.7	3	MG7133C1624	5	5	10	4.3
MG7097C1624	1	2	1	4	1.3	9	MG7097C1624	3	2	5	2.0
MG7185C1624	1	2	3	6	2.0	6	MG7185C1624	2	3	5	3.0
MG7139C1624	3	3	3	9	3.0	1	MG7139C1624	4	5	9	4.0
MG7144C1624	2	3	2	7	2.3	4	MG7144C1624	4	3	7	3.3
MG7106C1624	1	1	0	2	0.7		MG7106C1624	3	2	5	2.7
MG7120C1624	0	0	5	5	1.7	8	MG7120C1624	2	2	4	3.0
MG7118C1624	0	2	1	3	1.0		MG7118C1624	0	3	3	2.0
MG7167C1624	0	1	0	1	0.3		MG7167C1624	0	4	4	1.3

图22

单特异性活性
(作为二价 IgG) 筛选结果

克隆信息

MF	CDRS	CDRS 长度	种类	阳性对照的MIC	报道的排名	SPH测定的排名
MF6076	GGYTYGGDWFDP	13	IGHV4-59	49.2	1	2
MF6974	PYSGYFDV	9	IGHV3-23	46.5	2/3	1
MF6973	PYSGYFDV	9	IGHV3-23	39.1	2/3	3
MF6930	GTVSATLFDY	11	IGHV1-69	51.5	4	
MF6227	GGYSGYGGDDFDI	13	IGHV4-59	21.5	5	
MF6935	GTVSGTLVFDY	11	IGHV1-69	32.0		
MF6932	GTVSATLVFDY	11	IGHV1-69	15.9		
MF6983	PYDSGYFDV	9	IGHV3-23	11.1		
MF6225	GGYSGYGGDSMDV	13	IGHV4-59	7.7		
MF5743	AYCSGNSCYTDYFDY	15	IGHV3-13			

图23

MF	CDR3	结构域特异性	二价活性 (AUC, %对照)	T细胞结合 (AUC), 单价	EC50单价 (µg/ml)	SEB和报 道的排名
MG7139	DRAIGTLYYFDY	hu D2	20.00	2854	5.71	1
MG7524	GSILAAQMWGDI	hu/mo 交叉反应性 - mo D1	29.41	5551	4.2	2
MG7133	DREIGTLYYFDY	hu D2	26.67	4611	11.23	3
MG7144	DRDSGGLYYFDS	hu D2	19.39	1896	10.19	4
MG7142	ERDGSLYYFDS	hu D2	27.62	5276	3.45	5
MG7185	DREMGTLYFFDQ	hu D2	20.95	2796	4.49	6
MG7518	DGSGWDDFDY	Hu D1 + D4	64.71	12450	0.9	7
MG7120	EREIGALYAFDI	hu D2	14.29	1597	66.19	8
MG7097	DILYKWNYYVEGFDI	hu D1	21.43	5400	2.7	9
MG7096	DILYKWNYYVEGFDI	hu D1	35.71	5950	1.66	10
MG7111	IPLTGEFDY	hu D1	51.16	11445	1.52	>10
MG7100	ERGWDVFDI	hu D1	39.80	10615	1.14	>10
MG7134	EPNWGVYFDY	hu D1	34.29	10368	0.49	>10
MG7116	DGPNWDDVFDI	hu D1	57.14	10307	0.68	>10
MG7137	GGTYYGSGSYTILDF	hu D1	51.16	8588	1.68	>10
MG7106	DKAVAGLYYFDS	hu D2	16.28	2883	26.52	>10
MG7118	VPAAATPSGTYWIFDL	hu D3	2.04	ND	ND	>10
MG7167	DRGYDYGSGYHNWFDL	hu D4	-1.33	ND	ND	>10
MG7444	DTGQSWSNYYHAFDY	hu/mo 交叉反应性 - hu D3	-4.35	ND	ND	ND

图24

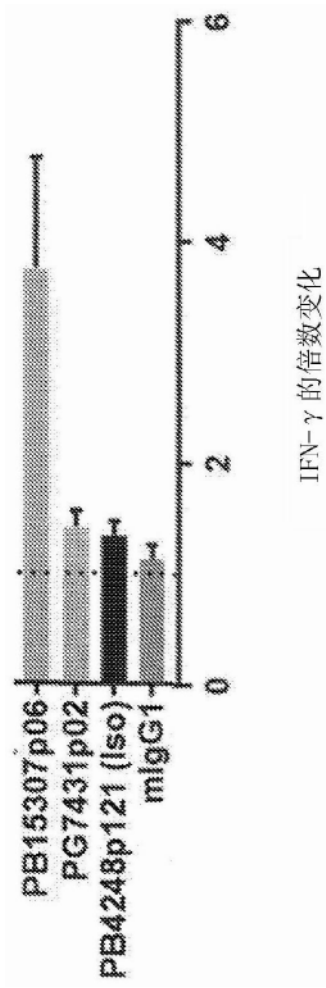


图25