

说明书

发明名称: 抗LAG3抗体、药物组合物及用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是以CN申请号为202310327266.6, 申请日为2023年3月29日的申请为基础, 并主张其优先权, 该CN申请的全部内容在此作为整体引入本申请中。

技术领域

[0003] 本发明属于生物医药领域, 涉及一种抗LAG3抗体、包含所述抗LAG3抗体或其抗原结合片段的药物组合物及用途。

背景技术

[0004] 肿瘤尤其是恶性肿瘤是当今世界严重危害人类健康的疾病, 在各种疾病所致死亡中高居第二位。而且近年来, 其发病率呈明显上升趋势。恶性肿瘤治疗效果差, 晚期转移率高, 预后多不佳。目前临床上所采用的常规治疗方法如放、化疗和手术治疗虽然在很大程度上缓解了病痛, 延长了生存时间, 但这些方法均存在很大的局限性, 其疗效难以进一步提高。

[0005] 淋巴细胞活化基因3(lymphocyte-activation gene 3, LAG3), 即CD223, 是一种由498个氨基酸组成的 I 型跨膜蛋白, 属于免疫球蛋白超家族(immunoglobulin superfamily, IgSF)成员。LAG3主要表达于活化的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞, 另外自然杀伤(natural killer, NK)细胞、B细胞、调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)和浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDC)等细胞也表达LAG3。(Ruffo Elisa, Wu Richard C, Bruno Tullia C et al. Lymphocyte-activation gene 3(LAG3): The next immune checkpoint receptor. [J]. Semin Immunol, 2019, 42: 101305.)。

[0006] LAG3分子基因定位于人12号染色体(20p13.3)上, 与CD4分子基因相邻, 二者具有相同的外显子和内含子。虽然二者的氨基酸序列同源性只有约20%, 但LAG3分子与CD4分子在结构上具有较高的相似性。主要组织相容性复合体 II 类分子(MHC II)、肝窦内皮细胞凝集素(LSECtin)分子和半乳糖凝集素3(galectin-3)分子是LAG3分子的相关配体。MHC II 类分子是LAG3的主要配体, 其与MHC II 类分

子的亲和力(K_d : $60\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)是CD4分子的100倍,表明LAG3分子能够有效竞争CD4与MHC II类分子的结合,抑制T细胞活化。

- [0007] 肿瘤微环境中, T细胞活化24小时后便能检测到免疫抑制分子LAG3分子的表达, 进而导致T细胞失能或者凋亡。LAG3分子通过其D1结构域(含有1个富含脯氨酸的环状结构)形成二聚体分子与CD4⁺T细胞活化第一信号轴“CD3-TCR-MHC II”中MHC II分子特异性结合, 一方面阻断T细胞活化的信号转导通路, 另一方面LAG3分子胞内段(KIEELE基序)产生免疫抑制信号下调CD4⁺T细胞活性。LAG3分子能促进Treg细胞分化, 参与信号转导及转录激活因子5下游信号, 从而增强Treg细胞的抑制作用, 这是肿瘤逃逸免疫系统杀伤的机制之一(Andrews Lawrence P, Marciscano Ariel E, Drake Charles G et al. LAG3(CD223) as a cancer immunotherapy target. [J]. Immunol Rev, 2017, 276: 80-96.)。
- [0008] 多项研究表明, LAG3在各种恶性肿瘤的肿瘤浸润性CD8⁺T细胞中过表达。例如卵巢癌中, 肿瘤浸润的纽约食管鳞状细胞癌1抗原(NY-ESO-1)特异性CD8⁺T细胞表达高水平的PD-1和LAG3, 产生IFN- γ 和TNF- α 的能力降低, 进而导致淋巴细胞失活。Galectin-3和LSECtin主要与LAG3相互作用来调节CD8⁺T细胞的活化与功能。另外从黑色素瘤转移患者中分离的黑色素瘤抗原特异性T细胞在LAG3及其他免疫检查点分子CTLA-4和TIM-3表达上调显著。(刘昊, 李新颖, 罗龙龙等. 淋巴细胞活化基因3分子生物学功能及其抗体药物临床应用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(01): 70-78.)。
- [0009] 目前已有多种LAG3抗体药物进入临床研究阶段, 其中, 百时美施贵宝的Relatlimab进展最快, 目前已开展了10个临床研究, 绝大多数是以Relatlimab与纳武单抗进行联合用药, 用于治疗血液瘤、黑色素瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞瘤和非小细胞肺癌等肿瘤。
- [0010] 目前, 尚需要开发新的抗LAG3抗体药物。
- [0011] 发明内容
- [0012] 本发明人经过深入的研究和创造性的劳动, 得到了一种抗LAG3抗体。本发明人惊奇地发现, 本发明的抗LAG3抗体(也简称为抗体或本发明的抗体)具有优越

的亲和力和/或特异性，在一个或多个方面与阳性对照抗体(例如Relatlimab)相当甚至更优。由此提供了下述发明：

- [0013] 本发明的一个方面涉及一种抗LAG3抗体或其抗原结合片段，所述抗LAG3抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含HCDR1、HCDR2和HCDR3，所述轻链可变区包含LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中，
- [0014] HCDR1包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列，
- [0015] HCDR2包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列，
- [0016] HCDR3包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列；
- [0017] LCDR1包含如SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列，
- [0018] LCDR2包含如SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，
- [0019] LCDR3包含如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。
- [0020] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0021] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示，
- [0022] HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示，
- [0023] HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示；
- [0024] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:17所示，
- [0025] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15所示，
- [0026] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16所示。
- [0027] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0028] LCDR1包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列，
- [0029] LCDR2包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列，和
- [0030] LCDR3包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列；
- [0031] 或者
- [0032] LCDR1包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列，
- [0033] LCDR2包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，和
- [0034] LCDR3包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列；
- [0035] 或者
- [0036] LCDR1包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列，

- [0037] LCDR2包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，和
- [0038] LCDR3包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列；
- [0039] 或者
- [0040] LCDR1包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列，
- [0041] LCDR2包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列，和
- [0042] LCDR3包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列；
- [0043] 或者
- [0044] LCDR1包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列，
- [0045] LCDR2包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，和
- [0046] LCDR3包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列；
- [0047] 或者
- [0048] LCDR1包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列，
- [0049] LCDR2包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列，和
- [0050] LCDR3包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列；
- [0051] 或者
- [0052] LCDR1包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列，
- [0053] LCDR2包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列，和
- [0054] LCDR3如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列；
- [0055] 或者
- [0056] LCDR1包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列，
- [0057] LCDR2包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，和
- [0058] LCDR3包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。
- [0059] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0060] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示，
- [0061] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示，和
- [0062] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示；
- [0063] 或者
- [0064] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示，

- [0065] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示, 和
- [0066] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示;
- [0067] 或者
- [0068] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,
- [0069] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示, 和
- [0070] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示;
- [0071] 或者
- [0072] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,
- [0073] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示, 和
- [0074] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示;
- [0075] 或者
- [0076] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,
- [0077] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示, 和
- [0078] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示;
- [0079] 或者
- [0080] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,
- [0081] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示, 和
- [0082] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示;
- [0083] 或者
- [0084] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,
- [0085] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示, 和
- [0086] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示;
- [0087] 或者
- [0088] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,
- [0089] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示, 和
- [0090] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。
- [0091] 在本发明的一些实施方式中, 所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段, 其中,
- [0092] HCDR1包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列,

- [0093] HCDR2包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列，
- [0094] HCDR3包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列；
- [0095] LCDR1包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列，
- [0096] LCDR2包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列，和
- [0097] LCDR3包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。
- [0098] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0099] HCDR1包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列，
- [0100] HCDR2包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列，
- [0101] HCDR3包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列；
- [0102] LCDR1包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列，
- [0103] LCDR2包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，和
- [0104] LCDR3包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。
- [0105] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0106] HCDR1包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列，
- [0107] HCDR2包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列，
- [0108] HCDR3包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列；
- [0109] LCDR1包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列，
- [0110] LCDR2包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，和
- [0111] LCDR3包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。
- [0112] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0113] HCDR1包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列，
- [0114] HCDR2包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列，
- [0115] HCDR3包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列；
- [0116] LCDR1包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列，
- [0117] LCDR2包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列，和
- [0118] LCDR3包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。
- [0119] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0120] HCDR1包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列，

- [0121] HCDR2包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列，
- [0122] HCDR3包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列；
- [0123] LCDR1包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列，
- [0124] LCDR2包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，和
- [0125] LCDR3包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。
- [0126] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0127] HCDR1包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列，
- [0128] HCDR2包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列，
- [0129] HCDR3包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列；
- [0130] LCDR1包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列，
- [0131] LCDR2包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列，和
- [0132] LCDR3包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。
- [0133] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0134] HCDR1包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列，
- [0135] HCDR2包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列，
- [0136] HCDR3包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列；
- [0137] LCDR1包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列，
- [0138] LCDR2包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列，和
- [0139] LCDR3如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。
- [0140] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0141] HCDR1包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列，
- [0142] HCDR2包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列，
- [0143] HCDR3包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列；
- [0144] LCDR1包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列，
- [0145] LCDR2包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，和
- [0146] LCDR3包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。
- [0147] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0148] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示，

- [0149] HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示，
- [0150] HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示；
- [0151] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示，
- [0152] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示，和
- [0153] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示。
- [0154] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0155] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示，
- [0156] HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示，
- [0157] HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示；
- [0158] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示，
- [0159] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示，和
- [0160] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。
- [0161] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0162] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示，
- [0163] HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示，
- [0164] HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示；
- [0165] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示，
- [0166] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示，和
- [0167] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示。
- [0168] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0169] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示，
- [0170] HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示，
- [0171] HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示；
- [0172] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示，
- [0173] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示，和
- [0174] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。
- [0175] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0176] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示，

- [0177] HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示，
- [0178] HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示；
- [0179] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示，
- [0180] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示，和
- [0181] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示。
- [0182] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0183] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示，
- [0184] HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示，
- [0185] HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示；
- [0186] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示，
- [0187] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示，和
- [0188] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示。
- [0189] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0190] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示，
- [0191] HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示，
- [0192] HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示；
- [0193] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示，
- [0194] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示，和
- [0195] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。
- [0196] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0197] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示，
- [0198] HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示，
- [0199] HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示；
- [0200] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示，
- [0201] LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示，和
- [0202] LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。
- [0203] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，

- [0204] 所述抗LAG3抗体的重链可变区包含如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列，并且轻链可变区包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列；
- [0205] 所述抗LAG3抗体的重链可变区包含如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列，并且轻链可变区包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列；
- [0206] 或者
- [0207] 所述抗LAG3抗体的重链可变区包含如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列，并且轻链可变区包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。
- [0208] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0209] 所述抗LAG3抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示；
- [0210] 所述抗LAG3抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示；
- [0211] 或者
- [0212] 所述抗LAG3抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。
- [0213] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗LAG3抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体或嵌合抗体。
- [0214] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0215] 所述抗LAG3抗体包括非-CDR区，且所述非-CDR区来自人抗体。
- [0216] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0217] 所述的抗LAG3抗体，其恒定区来自人抗体；
- [0218] 优选地，所述抗LAG3抗体的恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区。
- [0219] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- [0220] 所述抗LAG3抗体的重链恒定区为Ig gamma-1chain C region(例如，如SEQ ID NO:18所示)或Ig gamma-4chain C region(例如，如SEQ ID NO:20所示)；轻链恒定区为Ig kappa chain C region(例如，如SEQ ID NO:19所示)。

[0221] IgG1重链恒定区的氨基酸序列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18)

[0222] 在本发明的一些实施方案中，所述抗LAG3抗体为人IgG1亚型，并且按照EU编号系统(EU Numbering System)，其重链恒定区具有如下突变：

[0223] L234A和L235A，

[0224] L234A和G237A，

[0225] L235A和G237A，或者

[0226] L234A、L235A和G237A。

[0227] 在本发明的一些实施方案中，所述抗LAG3抗体为人IgG4亚型，并且按照EU编号系统(EU Numbering System)，其重链恒定区具有如下突变：

[0228] F234A和L235A，

[0229] F234A和G237A，

[0230] L235A和G237A，或者

[0231] F234A、L235A和G237A。

[0232] 本发明中，如果没有特别说明，位点之前的字母表示突变前的氨基酸，位点之后的字母表示突变后的氨基酸。

[0233] 在本发明的一些实施方案中，按照EU编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区还具有选自如下的一个或多个突变：

[0234] N297A、D265A、D270A、P238D、L328E、E233D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D、G236R、G236A、L328R、A330S、P331S、H268A、E318A和K320A。

- [0235] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体为单克隆抗体。
- [0236] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体为免疫球蛋白。
- [0237] 在本发明的一些实施方式中，所述的抗LAG3抗体为单链抗体。
- [0238] 本发明的另一方面涉及抗体药物偶联物(antibody-drug conjugate, ADC)，其包括抗体或其抗原结合片段以及小分子药物，其中，所述抗体或其抗原结合片段为本发明中任一项所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段；优选地，所述小分子药物为小分子细胞毒药物或者细胞激动剂；更优选地，所述小分子药物为肿瘤化疗药物，所述细胞激动剂为免疫细胞的激动剂，例如T细胞或NK细胞的激动剂。
- [0239] 所述化疗药物可以是常规的肿瘤化疗药物，例如烷化剂、抗代谢药、抗肿瘤抗生素、植物类抗癌药、激素、免疫制剂等。
- [0240] 在本发明的一个或多个实施方案中，所述的抗体药物偶联物，其中，所述抗LAG3抗体或其抗原结合片段通过连接子与小分子药物连接；所述连接子可以是本领域技术人员知悉的连接子，例如，所述连接子为胺键、二硫键或肽键。
- [0241] 在本发明的一个或多个实施方案中，所述的抗体药物偶联物，其中，所述抗LAG3抗体或其抗原结合片段与小分子药物的摩尔比为1：(2—4)，例如1：2，1：3或1：4。
- [0242] 本发明的再一方面涉及一种分离的核酸分子，其编码本发明中任一项所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段。
- [0243] 本发明的再一方面涉及一种重组载体，其包含本发明的分离的核酸分子。
- [0244] 本发明的再一方面涉及一种宿主细胞，其包含本发明的分离的核酸分子，或者包含本发明的重组载体。
- [0245] 本发明的再一方面涉及一种制备本发明中任一项所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段的方法，其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述抗LAG3抗体或其抗原结合片段的步骤。
- [0246] 本发明的再一方面涉及一种药物组合物，其包含本发明中任一项所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段或者本发明中任一项所述的抗体药物偶联物；可选地，其还包括药学上可接受的辅料。

- [0247] 本发明的再一方面涉及一种组合产品，其包含独立包装的第一产品和第二产品，其中，
- [0248] 所述第一产品包含其包含本发明中任一项所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段或者本发明中任一项所述的抗体药物偶联物；
- [0249] 所述第二产品包含至少一种抗PD-1抗体或抗CD73的抗体；
- [0250] 优选地，所述第一产品和所述第二产品还独立地包含一种或多种药学上可接受的辅料；
- [0251] 优选地，所述组合产品还包含产品说明书。
- [0252] 在本发明的一些实施方式中，所述的组合产品，其中，
- [0253] 抗LAG3抗体或其抗原结合片段与抗PD-1抗体或抗CD73的抗体的摩尔比为(1: 5)-(5: 1)，例如1: 5、1: 4、1: 3、1: 2、1: 1、2: 1、3: 1、4: 1或5: 1。
- [0254] 在本发明的一些实施方式中，所述的组合产品，其中，所述抗CD73的抗体为前述的任一项中的抗CD73的抗体。
- [0255] 本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段或者本发明中任一项所述的抗体药物偶联物在制备治疗和/或预防肿瘤或贫血病的药物中的用途；
- [0256] 优选地，所述肿瘤为选自卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌和肾癌中的一种或多种；
- [0257] 优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；
- [0258] 优选地，所述血液瘤为白血病；
- [0259] 优选地，所述食管癌为食管鳞癌。
- [0260] 根据本发明中任一项所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段或者本发明中任一项所述的抗体药物偶联物，其用于治疗 and/或预防肿瘤或贫血病；
- [0261] 优选地，所述肿瘤为选自卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌和肾癌中的一种或多种；
- [0262] 优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

- [0263] 优选地，所述血液瘤为白血病；
- [0264] 优选地，所述食管癌为食管鳞癌。
- [0265] 本发明的再一方面涉及一种治疗和/或预防肿瘤或贫血病的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段或者本发明中任一项所述的抗体药物偶联物的步骤；
- [0266] 优选地，所述肿瘤为选自卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌和肾癌中的一种或多种；
- [0267] 优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；
- [0268] 优选地，所述血液瘤为白血病；
- [0269] 优选地，所述食管癌为食管鳞癌。
- [0270] 在本发明的一个或多个实施方式中，所述的治疗或预防肿瘤的方法，其中，
- [0271] 抗LAG3抗体的单次给药剂量为每千克体重0.1–100mg，优选1–15mg、1–12mg、1–10mg(例如1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg或10mg)或6–10mg；或者，抗LAG3抗体的单次给药剂量为每位受试者10–1000mg(例如大约100mg、大约150mg、大约200mg、大约250mg、大约300mg、大约350mg、大约400mg、大约450mg、大约500mg、大约600mg、大约700mg、大约800mg、大约900mg或大约1000mg)，优选50–500mg、100–400mg、150–300mg、150–250mg或200mg；
- [0272] 优选地，每3天、4天、5天、6天、10天、1周、2周或3周给药一次；
- [0273] 优选地，给药方式为静脉滴注或静脉注射。
- [0274] 在一些方案中，抗LAG3抗体的施用治疗以2周(14天)或3周(21天)为一个周期，优选在每个周期第一天(D1)静脉给予抗LAG3抗体。例如，所述抗LAG3抗体以每两周一次(q2w)或者每三周一次(q3w)的频率施用。
- [0275] 但应认识到，本发明药物(例如药物组合物)或者药物活性成分(例如抗LAG3抗体或其抗原结合片段)的总日用量须由主诊医师在可靠的医学判断范围内做出决定。对于任何具体的患者，具体的治疗有效剂量水平须根据多种因素而定，所述因素包括所治疗的具体肿瘤类型和严重程度；所采用的具体药物制剂的形

式；患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食；给药时间、给药途径和排泄率；治疗持续时间；同时使用的其它药物；及医疗领域公知的类似因素。例如，本领域的做法是，给药的剂量从低于为得到所需治疗效果而要求的水平开始，逐渐增加剂量，直到得到所需的效果。

[0276] 在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

[0277] 如本文中所使用的，术语 EC_{50} 是指半最大效应浓度(concentration for 50 % of maximal effect)，是指能引起50 %最大效应的浓度。

[0278] 如本文中所使用的，术语“抗体”是指通常由两对多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由3个结构域(CH1、CH2和CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)的结合。VH和VL区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各VH和VL由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。各重链/轻链对的可变区(VH和VL)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循Bethesda M.d., Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,(1987and 1991)), 或Chothia&Lesk J.Mol.Biol.1987; 196:901-917; Chothia等人Nature1989; 342:878-883，或者IMGT编号系统定义，见Ehrenmann F,Kaas Q,Lefranc M P.IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign:a database and a tool for

immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J]. Nucleic acids research, 2009; 38(suppl_1):D301–D307的定义。

- [0279] 术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG(例如，IgG1，IgG2，IgG3或IgG4亚型)，IgA1，IgA2，IgD，IgE或IgM抗体。
- [0280] 如本文中所使用的，术语“单抗”和“单克隆抗体”是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段，也即除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少2种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用Kohler等首次报道的杂交瘤技术获得(Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. nature, 1975; 256(5517):495)，但也可采用重组DNA技术获得(如参见U.S. Patent 4,816,567)。
- [0281] 如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部或部分CDR区被一非人源抗体(供体抗体)的CDR区替换后得到的抗体或抗体片段，其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源(例如，小鼠、大鼠或兔)抗体。此外，受体抗体的构架区(FR)的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换，或被其他抗体的氨基酸残基替换，以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容，可参见例如，Jones et al., Nature 1986; 321:522–525; Reichmann et al., Nature, 1988; 332:323–329; Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 1992; 2:593–596; 和Clark, Immunol. Today 2000; 21:397–402。
- [0282] 如本文中所使用的，术语“分离的”或“被分离的”指的是，从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为

为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

- [0283] 如本文中所使用的，术语“载体(vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。
- [0284] 如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草杆菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如S2果蝇细胞或Sf9等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO细胞，GS细胞，COS细胞，NSO细胞，HeLa细胞，BHK细胞，HEK 293细胞或人细胞等的动物细胞。
- [0285] 如本文中使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体(或对某抗原具有特异性的抗体)是指，抗体以小于大约 10^{-5}M ，例如小于大约 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的亲和力(K_D)结合该抗原。
- [0286] 如本文中所使用的，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体以小于大约 10^{-5}M ，例如小于大约 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的解离平衡常数(K_D)结合抗原(例如，PD-1蛋白)。可以使用本领域技术人员知悉的方法测定 K_D ，例如使用Fortebio分子相互作用仪测定。

- [0287] 如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用A或Ala表示。
- [0288] 如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995)，并且包括但不限于：pH调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂。例如，pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液；表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如Tween-80；离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。
- [0289] 如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病(例如肿瘤)有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病(例如肿瘤)的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重程度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。
- [0290] 如本文中所使用的，当提及淋巴细胞活化基因3(lymphocyte-activation gene 3, LAG3)的氨基酸序列时，其包括LAG3蛋白的全长，或者LAG3的胞外片段LAG3 ECD或者包含LAG3 ECD的片段；还包括LAG3蛋白的全长的融合蛋白或LAG3 ECD的融合蛋白，例如与小鼠或人IgG的Fc蛋白片段(mFc或hFc)进行融合的片段。然而，本领域技术人员理解，在LAG3蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换，缺失和/或添加)，而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“LAG3”或“LAG3蛋白”应包括所有此类序列，包括其天然或人工的变体。并且，当描述LAG3蛋白的序列片段时，其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

- [0291] 在本发明中，如果没有特别说明，所述“第一”（例如第一产品）和“第二”（例如第二产品）是为了指代上的区分或表述上的清楚，并不具有典型的次序上的含义。
- [0292] 发明的有益效果
- [0293] 本发明取得了如下效果中的一项或多项：
- [0294] (1)本发明的抗LAG3抗体具有优越的亲力和特异性。
- [0295] (2)本发明的抗LAG3抗体能够有效地阻断LAG3与MHC-II相互作用，特异地解除LAG3对机体免疫抑制。
- [0296] (3)本发明的抗体能够有效地治疗或预防肿瘤。

附图说明

- [0297] 图1：ELISA方法测定H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)与抗原人LAG3-mG1Fc的结合活性。
- [0298] 图2：FACS检测H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)与293T-LAG3细胞表面抗原人LAG3的结合活性。
- [0299] 图3：竞争流式细胞法测定H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)与Raji细胞膜表面抗原MHC II竞争结合人LAG3-mG1Fc检测结果。
- [0300] 图4：混合淋巴细胞反应(MLR)检测抗LAG3抗体促IFN- γ 分泌的生物活性检测结果。
- [0301] 图5：混合淋巴细胞反应(MLR)检测抗LAG3抗体促IL-2分泌的生物活性检测结果。
- [0302] 图6：抗LAG3抗体阻断LAG3与MHC-II相互作用的生物学活性检测结果。

具体实施方式

- [0303] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考J.萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版

社)或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,为可以通过市场购买获得的常规产品。

[0304] 阳性对照抗体Relatlimab,其序列参考美国专利公开:US20160326248A1。其中重链氨基酸序列参照该专利公开中的SEQ ID NO:1,轻链氨基酸序列参照该专利公开中的SEQ ID NO:2。Relatlimab是抗LAG3抗体。

[0305] Relatlimab的重链氨基酸序列:

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIG
EINHRGSTNSNP SLKSRVTLSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDEY
NWFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT

VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTK
VDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSG
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 23)

[0306] Relatlimab的轻链氨基酸序列:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASN
RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 24)

[0307] 抗体14C12H1L1(hG1TM)为抗PD-1抗体,由康方生物制备。

[0308] 14C12H1L1(hG1TM)的重链氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVAT
ISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEA
WFAYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
V
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 21)

[0309] 14C12H1L1(hG1TM)的轻链的氨基酸序列

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRAN
RLVSGVPSTRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYVCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 22)

[0310] 人LAG3-mG1Fc的氨基酸序列:

LQPGAIEVPVWVAQEGAPALPCSPITPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPP
AAAPGHPLAPGHPAAPSWSGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERG
RQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSL
RASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHHLAESFLFLPQVSP
MDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAG
VGTRSFLLAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLEQ
QLNATVTLAHTVTPKSGSPGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGP
WLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAG
HLKLENLYFQGPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVT
CVVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW
MSGKEFKCKVNNKDLFAPERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTC
MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVE
RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 25)

[0311] 293T-LAG3细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。293T-LAG3细胞系由HEK293T细胞经病毒感染制得，病毒制备使用的是3rd Generation Lentiviral Systems，参见，例如A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System.Dull T,Zufferey R,Kelly M,Mandel RJ,Nguyen M,Trono D,and Naldini L J Virol.1998.72(11):8463-8471.其中所使用的慢病毒表达载体为plenti6.3/V5-huLAG3FL-BSD(其中LAG3，Genebank ID:NP_002277.4；载体plenti6.3/V5-BSD，购自Invitrogen，产品编号：K5315-20)。

[0312] Raji-PDL1细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。Raji-PDL1细胞系由Raji细胞经病毒感染制得，病毒制备使用的是3rd Generation Lentiviral Systems，参见，例如A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System.Dull T,Zufferey R,Kelly M,Mandel RJ,Nguyen M,Trono D,and Naldini L J Virol.1998.72(11):8463-8471.其中所使用的慢病毒表达载体为plenti6.3/V5-

PDL1(其中PDL1, Genebank ID:NP_054862.1; 载体plenti6.3/V5, 购自Invitrogen, 货号: K5315-20)。

[0313] Jurkat-NFAT-PD1-LAG3细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。Jurkat-NFAT-PD1-LAG3细胞系由PD-1效应细胞(PD-1Effector cells(CPM), 厂家: Promega, 货号: J112A)细胞经病毒感染制得, 病毒制备使用的是3rd Generation Lentiviral Systems, 参见, 例如A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System.Dull T,Zufferey R,Kelly M,Mandel RJ,Nguyen M,Trono D,and Naldini LJ Virol.1998.72(11):8463-8471.其中所使用的慢病毒表达载体为pCDH-huLAG3FL-RFP-NEO(其中LAG3, Genebank ID:NP_002277.4; 载体pCDH-CMV-MCS-EF1-RFP+Neo, 购自优宝生物, 产品编号: VT9005)。

[0314] 制备例1: 抗LAG3抗体的设计和制备

[0315] 1.抗体的设计

[0316] 本发明人根据已有的LAG3蛋白序列(NCBI Reference Sequence:NP_002277.4)及其蛋白三维晶体结构等, 创造性地人工设计了一系列的抗体序列。通过大量的筛选和检测, 最终得到了与LAG3特异性结合的人源化单克隆抗体, 分别命名为H9L8、H9L9、H9L10。该单克隆抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列及其编码序列如下。

[0317] H9L8的重链可变区H9v的核酸序列(360bp):

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGAGCTGGACTGCTGAAACCTAGCGAG
ACACTGAGCCTGACCTGTGCTGTGTACGGCGGATCTATCAGCGATTACTACT
GGAAGTGGATCAGGCAGCCCCCTGGAAAGGGACTGGAATGGATCGGAGAGA
TCAACTACAGGGGCACCACTCCAATCCCTCTCTGAAGAGCAGGGTGA
CACTGAGCCTCGACACAAGCAAGAATCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGGTCCG
TGACCGCTGCTGATACAGCTGTGTACTACTGTGCCTTCGGCTACAGCGATTA
CGAGTACGATTGGTTCGACCCCTTGGGGCCAGGGAACACTGGTTACAGTGAG
CTCC (SEQ ID NO: 1)

[0318] H9L8的重链可变区H9v的氨基酸序列(120aa):

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGISDYWNWIRQPPGKLEWIGE
INYRGTTNSNPSLKSRLTSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDEYD
WFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 2)

[0319] H9L8的轻链可变区L8v的核酸序列(321bp):

GAGATCGTTCTGACCCAGAGCCCAGCTACACTGAGCCTGTCTCCTGGAG
AGAGGGCTACACTGTCCTGCAGAGCTAGCCAGACCATCAGCAGCTACCTGG
CTTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAAGCTCCAAGGCTGCTGATCTACGACG

CCTCTAATAGGGCCACCGGCATCCCTGCTAGATTCTCTGGAAGCGGCAGCG
GAACCGACTTTACTACTGACAATCAGCTCCCTGGAGCCCGAGGATTTCTGCTGT
TTACTACTGTCAGCAGCGCAGCAACTGGCCCATCACATTCGGACAGGGCAC
AAATCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 3)

[0320] H9L8的轻链可变区L8v的氨基酸序列(107aa):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN
RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDEFAVYYCQQRNWPITFGQGTNLEIK
(SEQ ID NO: 4)

[0321] H9L9的重链可变区H9v的核酸序列与H9L8的重链可变区H9v的核酸序列相同，
即SEQ ID NO:1。

[0322] H9L9的重链可变区H9v的氨基酸序列与H9L8的重链可变区H9v的氨基酸序列相
同，即SEQ ID NO:2。

[0323] H9L9的轻链可变区L9v的核酸序列(321bp):

GAGATCGTTCTGACCCAGAGCCCAGCTACACTGAGCCTGTCTCCTGGAG
AGAGGGCTACACTGTCCTGCAGAGCTAGCCAGACCATCAGCAGCTACCTGG
CTTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAAGCTCCAAGGCTGCTGATCTACGACG
GCTCTAATAGGGCCACCGGCATCCCTGCTAGATTCTCTGGAAGCGGCAGCG
GAACCGACTTTACTACTGACAATCAGCTCCCTGGAGCCCGAGGATTTCTGCTGT
TTACTACTGTCAGCAGCGCAGCAACTGGCCCCCTCACATTCGGACAGGGCAC
AAATCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 5)

[0324] H9L9的轻链可变区L9v的氨基酸序列(107bp):

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDGS
NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDEFAVYYCQQRNWPITFGQGTNLEIK
(SEQ ID NO: 6)

- [0325] H9L10的重链可变区H9v的核酸序列与H9L8的重链可变区H9v的核酸序列相同，即SEQ ID NO:1。
- [0326] H9L10的重链可变区H9v的氨基酸序列与H9L8的重链可变区H9v的氨基酸序列相同，即SEQ ID NO:2。
- [0327] H9L10的轻链可变区L10v的核酸序列(321bp):
- GAGATCGTTCTGACCCAGAGCCCAGCTACACTGAGCCTGTCTCCTGGAG
AGAGGGCTACACTGTCCTGCAGAGCTAGCCAGTCCATCAGCAGCTACCTGG
CTTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAAGCTCCAAGGCTGCTGATCTACGACG
GCTCTAATAGGGCCACCGGCATCCCTGCTAGATTCTCTGGAAGCGGCAGCG
GAACCGACTTTACACTGACAATCAGCTCCCTGGAGCCCCGAGGATTTGCTGT
TTACTACTGTCAGCAGCGCAGCAACTGGCCCATCACATTCGGACAGGGCAC
AAATCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 7)**
- [0328] H9L10的轻链可变区L10v的氨基酸序列(107bp):
- EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDGSN
RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTNLEIK
(SEQ ID NO: 8)**
- [0329] 抗体H9L8的CDR的氨基酸序列如下(按照IMGT编号系统):
- [0330] HCDR1: GGSISDY(Y)(SEQ ID NO:9);
- [0331] HCDR2: INYRGTT(SEQ ID NO:10);
- [0332] HCDR3: AFGYSDY(E)YDWFDP(SEQ ID NO:11);
- [0333] LCDR1: QTISSY(SEQ ID NO:12);
- [0334] LCDR2: DAS(SEQ ID NO:13);
- [0335] LCDR3: QQRSNWPIT(SEQ ID NO:14)。
- [0336] 抗体H9L9的CDR的氨基酸序列如下(按照IMGT编号系统):
- [0337] HCDR1: GGSISDY(Y)(SEQ ID NO:9);
- [0338] HCDR2: INYRGTT(SEQ ID NO:10);
- [0339] HCDR3: AFGYSDY(E)YDWFDP(SEQ ID NO:11);
- [0340] LCDR1: QTISSY(SEQ ID NO:12);
- [0341] LCDR2: DGS(SEQ ID NO:15);
- [0342] LCDR3: QQRSNWPLT(SEQ ID NO:16)。

- [0343] 抗体H9L10的CDR的氨基酸序列如下(按照IMGT编号系统):
- [0344] HCDR1: GGSISDY(Y)(SEQ ID NO:9);
- [0345] HCDR2: INYRGTT(SEQ ID NO:10);
- [0346] HCDR3: AFGYSDY(E)DWFD(P)(SEQ ID NO:11);
- [0347] LCDR1: QSISS(Y)(SEQ ID NO:17);
- [0348] LCDR2: DGS(SEQ ID NO:15);
- [0349] LCDR3: QQRSNWPIT(SEQ ID NO:14)。
- [0350] 2.人源化抗体H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)以及H9L10(hG4WT)的表达和纯化
- [0351] 将H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)以及H9L10(hG4WT)的重链cDNA序列(可变区编码序列如SEQ ID NO:1所示; 恒定区是Ig gamma-4 chain C region)和H9L8(hG4WT)轻链的cDNA序列(可变区编码序列如SEQ ID NO:3所示; 恒定区为human Ig kappa chain C region)、H9L9(hG4WT)轻链的cDNA序列(可变区编码序列如SEQ ID NO:5所示; 恒定区为human Ig kappa chain C region)、H9L10(hG4WT)轻链的cDNA序列(可变区编码序列如SEQ ID NO:7所示; 恒定区为human Ig kappa chain C region)分别克隆到pUC57simple(金斯瑞公司提供)载体中, 分别获得pUC57simple-H9和pUC57simple-L8、pUC57simple-L9、pUC57simple-L10质粒。分别将质粒pUC57simple-H9和pUC57simple-L8、pUC57simple-L9、pUC57simple-L10进行酶切(HindIII&EcoRI), 电泳回收得到的重链轻链分别亚克隆到pcDNA3.1载体中, 提取重组质粒共转染293F细胞。细胞培养7天后, 将培养液通过高速离心、上清浓缩后上样至HiTrap MabSelect SuRe柱, 用Elution Buffer一步洗脱蛋白并回收目标样品并换液至PBS。
- [0352] H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)或H9L10(hG4WT)重链恒定区氨基酸序列:
- ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
PCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLS

LSLGK (SEQ ID NO: 20)

[0353] H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)或H9L10(hG4WT)轻链恒定区氨基酸序列:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C (SEQ ID NO: 19)

[0354] 制备例2: 人抗鸡蛋溶酶体抗体的制备

[0355] 人抗鸡蛋溶酶体抗体(human anti-Hen Egg Lysozyme IgG, anti-HEL, 即human IgG, 简称hIgG), 其序列来自于Acierno等人发表的Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies研究中Fab F10.6.6序列的可变区序列(Acierno等人J Mol Biol.2007; 374(1):130-46.)。制备方法如下:

[0356] human IgG委托南京金斯瑞生物对抗体的重轻链(全序列或可变区)基因进行氨基酸的密码子优化和基因合成, 参照《分子克隆实验指南(第三版)》介绍的标准技术, 采用PCR、酶切、DNA胶回收、连接转化、菌落PCR或酶切鉴定等标准的分子克隆技术将重轻链基因分别亚克隆到哺乳动物表达系统的抗体重链表达载体和抗体轻链表达载体, 并进一步对重组表达载体的重轻链基因进行测序分析。测序验证正确后, 中大量制备去内毒素级别的表达质粒并将重轻链表达质粒瞬时共转染HEK293细胞进行重组抗体的表达。培养7天后收集细胞培养液, 进行rProtein A柱(GE)亲和纯化, 收获的抗体样品用SDS-PAGE和SEC-HPLC标准分析技术对其进行质量鉴定。

[0357] 实施例1: ELISA方法测定抗LAG3抗体与抗原的结合活性

[0358] 将人LAG3-mG1Fc, 2 μ g/mL包被酶标板置于4℃孵育过夜, 然后使用PBST洗板包被了抗原的酶标板1次, 再使用1% BSA的PBS溶液作为封闭液在37℃下对酶标板进行封闭2小时。酶标板封闭结束后用PBST洗板3次, 加入PBST溶液梯度稀释的抗体(抗体稀释梯度详见表1), 加入待测抗体的酶标板置于37℃条件下孵育30分钟, 孵育完成后用PBST洗板3次。洗板后加入1:5000比例稀释的HRP标记羊抗人IgG(H+L)(Jackson, 货号: 109-035-088)二抗工作液, 然后置于37℃条件下孵育30分钟。孵育完成后使用PBST洗板4次, 后加入TMB(Neogen, 308177)避光显

色5min，加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中，选择450nm光波 长读取酶标板各孔的OD数值。用SoftMax Pro 6.2.1软件对数据进行分析处理。

[0359] 检测结果如表1和图1所示。

[0360] 表1：ELISA检测H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)与抗原人LAG3-mG1Fc的结合

/	人 LAG3-mG1Fc,2μg/mL,50μL/孔							
	H9L8 (hG4WT)		H9L9 (hG4WT)		H9L10 (hG4WT)		Relatlimab	
1	2.403	2.463	2.485	2.555	2.438	2.471	2.568	2.589
0.3	2.414	2.399	2.420	2.412	2.345	2.419	2.468	2.557
0.1	2.201	2.141	2.200	2.135	2.121	2.107	2.260	2.327
0.03	1.734	1.647	1.783	1.691	1.637	1.657	1.868	1.975
0.01	1.104	1.065	1.089	1.054	1.019	1.018	1.220	1.288
0.003	0.592	0.558	0.567	0.560	0.525	0.540	0.649	0.725
0.001	0.282	0.277	0.298	0.287	0.275	0.282	0.324	0.344
0	0.122	0.123	0.125	0.118	0.121	0.126	0.119	0.121
二抗	Goat Anti Human IgG(H+L), HRP(1:5000)							
EC ₅₀ (nM)	0.123		0.129		0.140		0.097	

[0361] 结果显示：抗体H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)均能有效地结合抗原人LAG3-mG1Fc，结合效率呈剂量依赖关系，且其结合活性与阳性对照抗体Relatlimab相当。

[0362] 实施例2：流式细胞仪方法检测抗LAG3抗体与细胞表面抗原人LAG3的结合活性

[0363] 抗体标记和流式细胞仪检测：采用常规胰酶消化方法消化表达人LAG3抗原的293T-LAG3细胞，并使每个收集管细胞数为3 × 10⁵，用1%PBSA(含1% BSA

的PBS)配制终浓度分别为0.0123nM, 0.123nM, 1.23nM, 3.7nM, 11.1nM, 33.3nM, 100nM, 300nM的LAG3抗体稀释液, 冰上与表达LAG3的293T-LAG3细胞孵育1小时。用1%PBSA离心洗涤数次后, 每管加入100 μ L FITC羊抗人IgG(购自Jackson, 货号: 109-095-098)(1: 300倍稀释)冰上避光孵育40min。用1%PBSA洗1次后加入200 μ L 1%PBSA重悬细胞, 在流式细胞仪上用FITC通道检测荧光信号。

[0364] 人源化抗LAG3抗体与293T-LAG3细胞的结合结果如图2所示。各抗LAG3抗体与293T-LAG3表面抗原的结合EC₅₀如表2所示。

[0365] 表2: 流式细胞仪检测抗LAG3抗体结合293T-LAG3表面抗原的结合活性

抗体	EC ₅₀ (nM)
Relatlimab	4.289
H9L8(hG4WT)	4.862
H9L9(hG4WT)	4.525
H9L10(hG4WT)	3.925

[0366] 由图2可见, 抗LAG3抗体能有效地结合293T-LAG3细胞表面的靶标LAG3蛋白, 且抗LAG3抗体H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)与293T-LAG3细胞表面抗原的结合活性和阳性对照抗体Relatlimab相当。

[0367] 实施例3: 竞争流式细胞法测定抗LAG3抗体与Raji细胞膜表面MHC II竞争性结合人LAG3-mG1Fc抗原

[0368] 将Raji细胞(培养基: 1640+10%FBS)(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 货号: TCHu 44)按30万个细胞/样本加入EP管中, 加入1000 μ L 1%PBSA(含1%BSA的PBS), 600 × g离心5min弃上清。每管加入终浓度为300nM的hIgG1(康方生物制备, 批号: 20190410), 每管100 μ L冰上孵育1h; 向孵育后的Raji细胞加入200 μ L 1%PBSA, 600 × g离心5min, 去上清。按实验设计另取洁净的EP管, 加入相应浓度稀释抗体, 每管60 μ L, 分别将60 μ L的人LAG3-mG1Fc(康方生物制备, 批号: 20190508)加入相应的抗体管中, 混匀, 冰上预孵育30min, 使得抗体终浓度为300nM、100nM、33.3nM、11.1n

M、3.7nM、1.23nM、0.123nM、0.0123nM，人LAG3-mG1Fc的终浓度为3nM。
向细胞加入预孵育完的100 μ L的抗体与蛋白混合液，混匀后冰上避光孵育1h；
加入200 μ L 1%PBSA，600 × g离心5min，去上清，洗两次；加入100 μ L的APC
anti mouse抗体(购自Biolegend，货号：405308)(1:400倍稀释)，混匀后冰上避光孵
育40min；加入200 μ L 1%PBSA，600 × g离心5min，去上清；200 μ L 1%PBSA/
管，重悬细胞，转移至流式上样管，上机测试。

[0369] 结果如图3、表3所示。通过荧光分析和曲线拟合，计算出抗体Relali
mab、H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)的竞争结合EC₅₀分别为
1.153nM、1.459nM、1.482nM、1.435nM。

[0370] 表3：FACS检测Relalimab、H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)
与Raji细胞表面MHC II竞争结合人LAG3-mG1Fc抗原的荧光强度分析

抗体	EC ₅₀ (nM)
Relatlimab	1.153
H9L8(hG4WT)	1.459
H9L9(hG4WT)	1.482
H9L10(hG4WT)	1.435

[0371] 结果显示，抗体H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)能竞争性结
合LAG3，有效地阻断LAG3与Raji细胞表面的MHC II的结合，且呈剂量依赖关
系，其活性与阳性对照抗体Relatlimab相当。

[0372] 实施例4：混合淋巴细胞反应(MLR)检测抗LAG3抗体促IFN- γ 和IL-2分泌的生
物活性

[0373] 1.抗LAG3抗体促Raji-PDL1混合淋巴反应体系分泌IFN- γ 的生物活性检测

[0374] Raji-PDL1细胞常规传代培养；复苏PBMC(来自健康捐献者)，用10mL 1640完
全培养基培养，0.5 μ g/mL的SEB(Staphylococcal enterotoxin B)(德诺泰克，货号：
S010201)刺激两天。Raji-PDL1细胞用工作浓度为2 μ g/mL的MMC(Stressmarq，
货号：SIH-246-10MG)处理，置于37℃、5%CO₂二氧化碳培养箱中1小时；收
集经SEB刺激2天后PBMC和经MMC处理1小时的Raji-PDL1细胞，用PBS洗涤两

次后用完全培养基(即RPMI 1640+10%FBS)重悬计数。将PBMC和Raji-PDL1各按 10×10^4 个细胞/孔加入到U型96孔板(Corning, 型号: 3799)中共培养。并按实验设计加入抗体(单用和联用时各个抗体的终浓度均为300nM、30nM、3nM), 于培养箱共培养3天; 3天后, 250xg离心5min, 收集细胞培养上清, ELISA法进行IFN- γ 检测。

[0375] 如图4所示, 人PBMC和Raji-PDL1细胞混合培养后对PBMC的IFN- γ 的分泌具有促进作用, 而在混合培养体系中同时加入抗体能显著诱导PBMC进一步分泌IFN- γ , 在促IFN- γ 分泌活性水平方面, 抗LAG3抗体H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)分别联用14C12H1L1(hG1TM)、阳性对照抗体Relatlimab联用14C12H1L1(hG1TM)均能促IFN- γ 分泌, 且其活性相当。

[0376] 2.抗LAG3抗体促Raji-PDL1混合淋巴反应体系分泌IL-2的生物活性检测

[0377] Raji-PDL1细胞常规传代培养; 复苏PBMC, 用10mL 1640完全培养基培养, 添加0.5 μ g/mL的SEB(Staphylococcal enterotoxin B, 购自德诺泰克, 货号: S010201)刺激两天。Raji-PDL1细胞用工作浓度为2 μ g/mL的MMC(Stressmarq, 货号: S1H-246-10MG)处理, 置于37°C、5% CO₂二氧化碳培养箱中1小时。收集经SEB刺激2天后的PBMC和经MMC处理1小时的Raji-PDL1细胞, 用PBS洗两次后用完全培养基(即RPMI 1640+10%FBS)重悬计数。将PBMC和Raji-PDL1各按 10×10^4 个细胞/孔加入U型96孔板(Corning, 型号: 3799)中共培养。并按实验设计加入抗体(单用和联用时各个抗体的终浓度均为300nM、30nM、3nM), 共培养3天; 3天后, 250x离心5min, 收集细胞培养上清, ELISA法进行IL-2检测。

[0378] 如图5所示, 人PBMC(来自健康捐献者)和Raji-PDL1细胞混合培养后对PBMC的IL-2的分泌有一定的促进作用, 而在混合培养体系中同时加入抗体能显著诱导PBMC进一步分泌IL-2, 具有显著剂量依赖关系, 在促IL-2分泌活性水平方面, 抗LAG3抗体H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)分别联用14C12H1L1(hG1TM)、阳性对照Relatlimab联用14C12H1L1(hG1TM)均能促IL-2分泌, 且其活性相当。

[0379] 实施例5: 抗LAG3抗体阻断LAG3与MHC-II相互作用的生物学活性评价(报告基因法)

- [0380] 以Jurkat-NFAT-PD1-LAG3细胞和Raji细胞作为报告基因体系，加入SEE超抗原后，激活TCR-NFAT信号通路，诱导荧光素酶的表达。而Jurkat细胞上的LAG3与Raji细胞上的MHC-II结合，抑制NFAT信号通路，下调荧光素酶的表达。抗体通过特异性结合LAG3，解除抑制，上调荧光素酶的表达。
- [0381] 收集Jurkat-NFAT-PD1-LAG3细胞和Raji细胞(购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心，货号：TCHu 44)，110xg离心5min去上清，1640+10%FBS培养基重悬细胞，计数。Jurkat-NFAT-PD1-LAG3细胞按 10^5 个细胞/孔接种至黑底96孔板(Corning，型号：3916)，30 μ L/孔；按实验设计加入抗体(终浓度为0.3nM、3nM、300nM)，10 μ L/孔，置于37℃，5% CO₂培养箱中预先孵育30min。与此同时，向Raji细胞加入SEE(Staphylococcal Enterotoxins E，购自Toxin Technology，货号：ET404)(终浓度0.05ng/mL)后置于37℃，5% CO₂培养箱中孵育30min。30min后，将经SEE处理的Raji细胞按 2×10^4 个细胞/孔(40 μ L/孔)加至上述含有Jurkat-NFAT-PD1-LAG3细胞的96孔板中，体系终体积为80 μ L，混匀后置于37℃，5% CO₂培养箱中孵育6h。孵育完毕后取出培养板，平衡至室温，加入Bright-GloTM Luciferase Assay System(购自Promega，货号：E2650)80 μ L/孔，避光孵育2min后读取RLU值。其中同型对照hG4WT(hIgG4)为康方生物自制，批号：20190910。
- [0382] 结果如图6所示，抗LAG3抗体H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)、阳性对照抗体Relatlimab均能阻断LAG3与MHC-II的相互作用，上调荧光素酶的表达，且抗LAG3抗体H9L8(hG4WT)、H9L9(hG4WT)、H9L10(hG4WT)的活性均优于对照抗体Relatlimab。
- [0383] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权利要求书

- [权利要求 1] 抗LAG3抗体或其抗原结合片段，所述抗LAG3抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含HCDR1、HCDR2和HCDR3，所述轻链可变区包含LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中，
- HCDR1包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列，
- HCDR2包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列，
- HCDR3包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列；
- LCDR1包含如SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列，
- LCDR2包含如SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，
- LCDR3包含如SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
- LCDR1包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列，
- LCDR2包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列，和
- LCDR3包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列；
- 或者
- LCDR1包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列，
- LCDR2包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，和
- LCDR3包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列；
- 或者
- LCDR1包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列，
- LCDR2包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，和
- LCDR3包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列；
- 或者
- LCDR1包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列，

LCDR2包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列, 和

LCDR3包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列;

或者

LCDR1包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,

LCDR2包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列, 和

LCDR3包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列;

或者

LCDR1包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,

LCDR2包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列, 和

LCDR3包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列;

或者

LCDR1包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,

LCDR2包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列, 和

LCDR3如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列;

或者

LCDR1包含如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,

LCDR2包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列, 和

LCDR3包含如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[权利要求 3]

根据权利要求1至2中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段, 其中,

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,

LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示, 和

LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示;

或者

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,

LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示, 和

LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示;

或者

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示，
LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示，和
LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示；

或者

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示，
LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示，和
LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示；

或者

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示，
LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示，和
LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示；

或者

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示，
LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示，和
LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示；

或者

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示，
LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示，和
LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示；

或者

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示，
LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示，和
LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。

[权利要求 4]

根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，

所述抗LAG3抗体的重链可变区包含如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列，并且轻链可变区包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列；

- 所述抗LAG3抗体的重链可变区包含如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列，并且轻链可变区包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列；
或者
所述抗LAG3抗体的重链可变区包含如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列，并且轻链可变区包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。
- [权利要求 5] 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
所述抗LAG3抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示；
所述抗LAG3抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示；
或者
所述抗LAG3抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。
- [权利要求 6] 根据权利要求1至5中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗LAG3抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体或嵌合抗体。
- [权利要求 7] 根据权利要求1至6中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段，其中，
所述抗LAG3抗体包括非-CDR区，且所述非-CDR区来自人抗体；
优选地，所述的抗LAG3抗体，其恒定区来自人抗体；
优选地，所述抗LAG3抗体的恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区；
所述抗LAG3抗体的重链恒定区为Ig gamma-1 chain C region(例如，如SEQ ID NO:18所示)或Ig gamma-4 chain C region(例如，如SEQ

ID NO:20所示); 轻链恒定区为Ig kappa chain C region(例如, 如SEQ ID NO:19所示)。

[权利要求 8]

根据权利要求1至7中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段, 其中,
所述抗LAG3抗体为人IgG1亚型, 并且按照EU编号系统, 其重链恒定区具有如下突变:

L234A和L235A,

L234A和G237A,

L235A和G237A, 或者

L234A、L235A和G237A;

或者

所述抗LAG3抗体为人IgG4亚型, 并且按照EU编号系统, 其重链恒定区具有如下突变:

F234A和L235A,

F234A和G237A,

L235A和G237A, 或者

F234A、L235A和G237A。

[权利要求 9]

抗体药物偶联物, 其包括抗体或其抗原结合片段以及小分子药物, 其中, 所述抗体或其抗原结合片段为权利要求1至8中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段; 优选地, 所述小分子药物为小分子细胞毒药物或者细胞激动剂; 更优选地, 所述小分子药物为肿瘤化疗药物, 所述细胞激动剂为免疫细胞的激动剂, 例如T细胞或NK细胞的激动剂。

[权利要求 10]

根据权利要求9所述的抗体药物偶联物, 其中, 所述抗LAG3抗体或其抗原结合片段通过连接子与小分子药物连接; 例如, 所述连接子为胺键、二硫键或肽键;

优选地, 所述抗LAG3抗体或其抗原结合片段与小分子药物的摩尔比为1: (2—4)。

- [权利要求 11] 分离的核酸分子，其编码权利要求1至8中任一权利要求所述的抗LAG3抗体。
- [权利要求 12] 一种重组载体，其包含权利要求11所述的分离的核酸分子。
- [权利要求 13] 一种宿主细胞，其包含权利要求11所述的分离的核酸分子，或者包含权利要求12所述的重组载体。
- [权利要求 14] 制备权利要求1至8中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段的方法，其包括在合适的条件下培养权利要求13所述的宿主细胞，以及从细胞培养物中回收所述抗LAG3抗体或其抗原结合片段的步骤。
- [权利要求 15] 一种药物组合物，其包含权利要求1至8中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段或者权利要求9至10中任一权利要求所述的抗体药物偶联物；可选地，其还包括药学上可接受的辅料。
- [权利要求 16] 一种组合产品，其包含独立包装的第一产品和第二产品，其中，
所述第一产品包含其包含权利要求1至8中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段或者权利要求9至10中任一权利要求所述的抗体药物偶联物；
所述第二产品包含至少一种抗PD-1抗体或抗CD73抗体；
优选地，所述第一产品和所述第二产品还独立地包含一种或多种药学上可接受的辅料；
优选地，所述组合产品还包含产品说明书。
- [权利要求 17] 根据权利要求16所述的组合产品，其中，
抗LAG3抗体或其抗原结合片段与抗PD-1抗体或抗CD73抗体的摩尔比为(1：5)-(5：1)。
- [权利要求 18] 权利要求1至8中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段或者权利要求9至10中任一权利要求所述的抗体药物偶联物在制备治疗或预防肿瘤的药物中的用途；
优选地，所述肿瘤为选自卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、

直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌和肾癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

优选地，所述血液瘤为白血病；

优选地，所述食管癌为食管鳞癌。

[权利要求 19]

根据权利要求1至8中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段或者权利要求9至10中任一权利要求所述的抗体药物偶联物，其用于治疗或预防肿瘤；

优选地，所述肿瘤为选自卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌和肾癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

优选地，所述血液瘤为白血病；

优选地，所述食管癌为食管鳞癌。

[权利要求 20]

一种治疗或预防肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求1至8中任一权利要求所述的抗LAG3抗体或其抗原结合片段或者权利要求9至10中任一权利要求所述的抗体药物偶联物的步骤；

优选地，所述肿瘤为选自卵巢癌、食管癌、黑色素瘤、血液瘤、神经胶质母细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌和肾癌中的一种或多种；

优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌；

优选地，所述血液瘤为白血病；

优选地，所述食管癌为食管鳞癌。