



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117964768 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 03

(21) 申请号 202410389594.3

G01N 33/577 (2006.01)

(22) 申请日 2024.04.02

G01N 33/574 (2006.01)

(71) 申请人 上海宏成药业有限公司

地址 201318 上海市浦东新区张衡路1227
号2号楼3楼

(72) 发明人 王永辉 闵皓 尹巧汕

(74) 专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理
有限公司 11728

专利代理师 吕鹏云 陈悦军

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

权利要求书2页 说明书20页

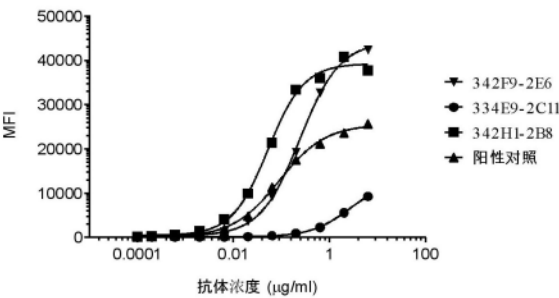
序列表 (电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

抗TREM2抗体及其用途

(57) 摘要

本发明公开了抗TREM2抗体及其用途。本发明属于生物技术领域,所要解决的技术问题是提供一种结合人髓系细胞触发受体2的分离的抗体或其抗原结合片段。本发明提供的抗体或其抗原结合片段与人TREM2结合并表现出较多优良特性。



1. 一种与髓系细胞触发受体2 (TREM2) 具有结合特异性的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3, 所述轻链可变区包含轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3, 并且其中:

所述HCDR1为SEQ ID NO: 10所示的氨基酸序列, 所述HCDR2为SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列, 所述HCDR3为SEQ ID NO: 12所示的氨基酸序列, 所述LCDR1为SEQ ID NO: 14所示的氨基酸序列, 所述LCDR2为SEQ ID NO: 15所示的氨基酸序列, 所述LCDR3为SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段, 其中:

所述重链可变区包含SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代、缺失或插入或其任意组合的序列; 和/或,

所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 13所示的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO: 13所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO: 13所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代、缺失或插入或其任意组合的序列。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段, 其进一步包含重链恒定区、轻链恒定区、Fc区或它们的组合。

4. 根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体, 所述抗体或其抗原结合片段包含轻链和重链;

所述重链包含SEQ ID NO: 29所示的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO: 29所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO: 29所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代、缺失或插入或其任意组合的序列; 所述轻链包含SEQ ID NO: 30所示的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO: 30所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO: 30所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代、缺失或插入或其任意组合的序列; 或

所述重链包含SEQ ID NO: 37所示的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO: 37所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO: 37所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代、缺失或插入或其任意组合的序列; 所述轻链包含SEQ ID NO: 38所示的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO: 38所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO: 38所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代、缺失或插入或其任意组合的序列。

5. 核酸分子, 其编码权利要求1-4任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

6. 重组载体, 其包含权利要求5所述的核酸分子。

7. 重组细胞, 其包含权利要求5所述的核酸分子和/或权利要求6所述的重组载体;

所述重组细胞不是处于各个形成和发育阶段的人体, 也不是动物和植物品种。

8. 制备结合TREM2的抗体或其抗原结合片段的方法, 所述方法包括在适于表达抗体的情况下, 培养包含编码权利要求1-4任一项的抗体或其抗原结合片段的核酸分子的重组细胞, 任选地所述方法还包括从所述重组细胞或培养基中回收所述抗体或其抗原结合片段。

9. 一种组合物, 其包含权利要求1-4任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求5

所述的核酸分子或权利要求6所述的重组载体或权利要求7所述的重组细胞,以及药学上可接受的载体。

10. 权利要求1-4任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求5所述的核酸分子、权利要求6所述的重组载体、权利要求7所述的重组细胞和/或权利要求9所述的组合物在制备如下任一所示的产品中的应用:

- (1) 检测TREM2的产品;
- (2) 刺激或提高免疫应答的产品;
- (3) 预防和/或治疗癌症的产品。

抗TREM2抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及抗TREM2抗体及其用途。

背景技术

[0002] 免疫治疗给全人类克服癌症带来了巨大的希望,但目前以PD-1/PD-L1为主的免疫治疗受益人群较小,仍然未满足临床需要,所以当下寻找下一个免疫治疗靶点极为重要,以便于开启新的免疫治疗时代。

[0003] 髓系细胞触发受体2 (trigger receptor expressed on myeloid cells-2, TREM2) 在肿瘤免疫微环境中的M2型肿瘤相关巨噬细胞表面表达,通过调控肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的功能,发挥肿瘤免疫抑制作用;而微环境中的TAM常常也是PD-1/PD-L1等免疫检查点疗效不佳的原因之一,因此从生物学角度上看,TREM2和免疫检查点具有联用的价值。临床前基因敲出和中和型抗体研究也表明,在肉瘤和结肠癌同系模型中,TREM2单抗和PD-1单抗具有协同增效作用。开发新一代抗TREM2抗体具有重要的科学和应用价值。筛选具有更强亲和力的TREM2抗体将会增强治疗效果。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种结合人髓系细胞触发受体2的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0005] 在第一个方面,本发明提供一种与髓系细胞触发受体2 (TREM2) 具有结合特异性的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,并且其中:

(a) 所述HCDR1为SEQ ID NO: 2所示的氨基酸序列,所述HCDR2为SEQ ID NO: 3所示的氨基酸序列,所述HCDR3为SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列,所述LCDR1为SEQ ID NO: 6所示的氨基酸序列,所述LCDR2为SEQ ID NO: 7所示的氨基酸序列,所述LCDR3为SEQ ID NO: 8所示的氨基酸序列;

(b) 所述HCDR1为SEQ ID NO: 10所示的氨基酸序列,所述HCDR2为SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列,所述HCDR3为SEQ ID NO: 12所示的氨基酸序列,所述LCDR1为SEQ ID NO: 14所示的氨基酸序列,所述LCDR2为SEQ ID NO: 15所示的氨基酸序列,所述LCDR3为SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列;或

(c) 所述HCDR1为SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列,所述HCDR2为SEQ ID NO: 19所示的氨基酸序列,所述HCDR3为SEQ ID NO: 20所示的氨基酸序列,所述LCDR1为SEQ ID NO: 22所示的氨基酸序列,所述LCDR2为SEQ ID NO: 23所示的氨基酸序列,所述LCDR3为SEQ ID NO: 24所示的氨基酸序列。

[0006] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含(a)中所示的CDR,并且所述重链可变区包含SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列具

有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;和/或,所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;

所述抗体或其抗原结合片段包含(b)中所示的CDR,并且所述重链可变区包含SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;和/或,所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 13所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 13所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 13所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;或

所述抗体或其抗原结合片段包含(c)中所示的CDR,并且所述重链可变区包含SEQ ID NO: 17所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 17所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 17所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;和/或,所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 21所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 21所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 21所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列。

[0007] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或其抗原结合片段中,所述抗体或其抗原结合片段进一步包含重链恒定区、轻链恒定区、Fc区或它们的组合。

[0008] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或其抗原结合片段中,所述轻链恒定区是 κ 链或 λ 链恒定区。

[0009] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或其抗原结合片段中,所述重链恒定区是选自IgG、IgM、IgA、IgE或IgD类别。

[0010] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或其抗原结合片段中,所述重链恒定区是选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4子类的重链恒定区。

[0011] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或其抗原结合片段中,所述抗体或其抗原结合片段进一步包含人IgG1重链恒定区或其变体,和/或人 κ 轻链恒定区或其变体。

[0012] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或其抗原结合片段中,所述抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体、人源化抗体。

[0013] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或其抗原结合片段中,所述抗原结合片段为Fab、Fv或scFv片段。

[0014] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或其抗原结合片段中,所述抗体或其抗原结合片段为单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体或多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

[0015] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或其抗原结合片段中,所述抗体是嵌合抗体,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链和重链;

所述重链包含SEQ ID NO: 27所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 27所示的氨基

酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 27所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;所述轻链包含SEQ ID NO: 28所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 28所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 28所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;

所述重链包含SEQ ID NO: 29所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 29所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 29所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;所述轻链包含SEQ ID NO: 30所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 30所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 30所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;

所述重链包含SEQ ID NO: 31所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 31所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 31所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;所述轻链包含SEQ ID NO: 32所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 32所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 32所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;

所述重链包含SEQ ID NO: 35所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 35所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 35所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;所述轻链包含SEQ ID NO: 36所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 36所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 36所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;

所述重链包含SEQ ID NO: 37所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 37所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 37所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;所述轻链包含SEQ ID NO: 38所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 38所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 38所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;或

所述重链包含SEQ ID NO: 39所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 39所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 39所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列;所述轻链包含SEQ ID NO: 40所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 40所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 40所示的氨基酸序列相比具有一个或多个氨基酸取代(例如保守性取代)、缺失或插入或其任意组合的序列。

[0016] 在一些实施方案中,上述任一所述的抗体或其抗原结合片段具有抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)。

[0017] 在第二个方面,本发明提供核酸分子,其编码上述任一所述的抗体或其抗原结合片段;

所述核酸分子可以是DNA,如cDNA、基因组DNA或重组DNA;所述核酸分子也可以是RNA,如mRNA或hnRNA等。

[0018] 在第三个方面,本发明提供重组载体,其包含上述核酸分子。

[0019] 在第四个方面,本发明提供重组细胞,其包含上述核酸分子和/或上述重组载体;所述重组细胞不是处于各个形成和发育阶段的人体,也不是动物和植物品种。

[0020] 本文使用的术语“同一性”可以用肉眼或计算机软件(比如Ausubel et al. eds. (2007)在Current Protocols in Molecular Biology中所述的软件程序)进行评价。当被比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则分子在该位置是同一的。两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示,其可以用来评价相关序列之间的同一性。多聚核苷酸序列或氨基酸序列与另一序列有具有一定百分比(例如90%、95%、98%或者99%)的“序列同一性”是指当序列比对时,所比较的两个序列中该百分比的碱基或氨基酸相同。

[0021] 在第五个方面,本发明提供制备本发明所述的抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在适于表达抗体的情况下,培养包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段的核酸分子的重组细胞。

在一些实施方案中,所述方法还包括:从所述重组细胞或培养基中回收所述抗体或其抗原结合片段。

[0022] 在第六个方面,本发明提供一种组合物,其包含本发明所述的抗体或其抗原结合片段或本发明的核酸分子、重组载体、重组细胞,以及药学上可接受的载体。

[0023] 在一些实施方案中,上述组合物为药物组合物。

[0024] 在一些实施方案中,上述任一所述的组合物中,进一步包含检查点抑制剂;

优选地,所述检查点抑制剂选自以下组成的组:T细胞的检查点抑制剂、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体、抗LAG-3抗体。

[0025] 在第七个方面,本发明提供上述任一所述的抗体或其抗原结合片段、上述任一所述的核酸分子、上述任一所述的重组载体、上述任一所述的重组细胞和/或上述任一所述的组合物在制备如下任一所示的产品中的应用:

- (1) 检测TREM2的产品;
- (2) 刺激或提高免疫应答的产品;
- (3) 预防和/或治疗癌症的产品;

优选地,所述癌症选自以下组成的组:黑色素瘤、肾癌、肝胆癌、头颈部鳞状癌、胰腺癌、结肠癌、膀胱癌、胶质母细胞瘤、前列腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、食道癌和间皮瘤。

[0026] 本发明提供的抗体或其抗原结合片段与人TREM2结合并表现出较多优良特性,这些特性包括以下方面:

1、本发明提供的抗体或其抗原结合片段与人TREM2高亲和力结合,可调控免疫应答;

2、与野生型 hIgG1 Fc相比,本发明的抗体或其抗原结合片段的Fc进行S239D/A330L/I332E的突变可以增强其诱导的ADCC效应。

附图说明

[0027] 图1为抗人TREM2的鼠源单克隆抗体与表达人TREM2的293T细胞系293T-hTREM2-NFAT-RE-EGFP的结合活性。

[0028] 图2为抗人TREM2的鼠源单克隆抗体与人TREM2蛋白 (Human TREM2 Protein, His Tag) 的结合活性。

[0029] 图3为抗人TREM2的鼠源单克隆抗体与食蟹猴TREM2蛋白 (Cynomolgus TREM2 Protein, His Tag) 的结合活性。

[0030] 图4为抗人TREM2的鼠源单克隆抗体与小鼠TREM2 蛋白 (Mouse TREM2 Protein, His Tag) 的结合活性。

[0031] 图5为抗人TREM2嵌合抗体与表达人TREM2的293T细胞系293T-hTREM2-NFAT-RE-EGFP的结合活性。

[0032] 图6为抗人TREM2嵌合抗体与人TREM2蛋白 (Human TREM2 Protein, His Tag) 的结合活性。

[0033] 图7为抗人TREM2嵌合抗体与食蟹猴TREM2蛋白 (Cynomolgus TREM2 Protein, His Tag) 的结合活性。

[0034] 图8为抗人TREM2嵌合抗体与小鼠TREM2 蛋白 (Mouse TREM2 Protein, His Tag) 的结合活性。

具体实施方式

[0035] 以下结合具体实施例,对本发明作进一步说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限制本发明的范围。如非特殊说明,实施例中所用的技术手段均为本领域常规操作,或按照试剂盒及仪器设备厂商所建议的实验方法。实施例中使用的试剂和生物材料如无特殊说明均可从商业途径获得。

[0036] 缩写和定义

除非另作说明,下列术语应当具有下文所述的含义。其他术语或缩写具有本领域公知的含义。

[0037] “抗体”是指表现所需生物学活性(例如抑制配体与其受体的结合或通过抑制配体诱导的受体信号转导)的抗体的任何形式。因此,“抗体”以其最广泛的意义上使用,并明确包括但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和多特异性抗体(例如双特异性抗体)、全人源、人源化、灵长类化、嵌合抗体,单链抗体等。

[0038] “抗原结合片段”指抗体的一部分,例如F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv等。不管其结构如何,抗体片段与被完整抗体识别的同一抗原结合。术语“抗原结合片段”包括适体、镜像异构体和双价抗体。术语“抗原结合片段”还包括通过与特定抗原结合形成复合物起抗体作用的任何合成或基因工程蛋白质。

[0039] “Fab片段”由一条轻链和一条重链的CH1及可变区组成。Fab分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。

[0040] “Fc区”含有包含抗体的CH2和CH3结构域的两个重链片段。两个重链片段由两个或多个二硫键并通过CH3结构域的疏水作用保持在一起。

[0041] “Fv区”包含来自重链和轻链二者的可变区,但缺少恒定区。

[0042] “单链Fv抗体” (或“scFv抗体”) 是指包含抗体的VH和VL结构域的抗体片段, 其中这些结构域存在于单个多肽链中。一般而言, Fv多肽另外在VH和VL结构域之间包含多肽接头, 该接头使得scFv能形成用于抗原结合的所需结构。对于scFv综述, 可参见美国专利第6423538号。

[0043] 本领域技术人员将会理解, 抗体重链的类别包括gamma、mu、alpha、delta或epsilon (γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ), 其中还有一些亚类 (例如 $\gamma 1$ - $\gamma 4$)。该链的性质决定了抗体的“种类”分别为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。免疫球蛋白亚类 (同种型), 例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5等已被充分表征并且赋予的功能特异性也已知。所有的免疫球蛋白种类都在本发明公开的保护范围内。在一些实施方案中, 免疫球蛋白分子为IgG种类。IgG通常包含分子量约23,000道尔顿的两条相同的轻链多肽和分子量约为53,000-70,000的两条相同的重链多肽。这四条链通过二硫键以“Y”构型连接, 其中轻链从“Y”口开始并延续通过可变区包围重链。IgG1形式的抗体为IgG的一种亚类, 其重链为 $\gamma 1$ 亚型。在一些实施方案中, 本发明公开的抗体为IgG1。

[0044] 如本文中所使用的, 术语“重链恒定区”包括衍生自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链恒定区的多肽包含下述中的至少一者: CH1结构域、铰链 (例如, 上部铰链区、中间铰链区和/或下部铰链区) 结构域、CH2结构域、CH3结构域、或其变体或片段。例如, 用于本公开的抗原结合多肽可以包含: 包含CH1结构域的多肽链; 包含CH1结构域、铰链结构域的至少一部分和CH2结构域的多肽链; 包含CH1结构域和CH3结构域的多肽链; 包含CH1结构域、铰链结构域的至少一部分和CH3结构域的多肽链; 或者包含CH1结构域、铰链结构域的至少一部分、CH2结构域和CH3结构域的多肽链。在另一个实施方式中, 本公开的多肽包含含有CH3结构域的多肽链。此外, 用于本公开的抗体可以缺少CH2结构域的至少一部分 (例如, CH2结构域的全部或部分)。如上所述, 本领域普通技术人员将理解的是, 可以修饰重链恒定区, 使得其在氨基酸序列上与天然存在的免疫球蛋白分子不同。

[0045] “超变区”是指负责抗原结合的抗体氨基酸残基。超变区包含以下氨基酸残基: 来自序列比对所界定的“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。“构架”残基或“FR”残基为除本文定义的超变区残基之外的可变结构域残基。

[0046] “分离的抗体”为与全部或部分的天然环境组分分离的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰所述抗体的诊断性或治疗性应用的物质, 可包括酶、激素和其它蛋白质溶质或非蛋白质溶质。在一些实施方案中, 将所述抗体纯化到以下程度: (1) 超过95%重量的抗体, 如超过99%重量, 其由Lowry法测定; (2) 足以通过用旋杯式测序仪获得N-末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度; 或 (3) 通过在还原或非还原条件下用考马斯蓝或银染色的SDS-PAGE确定为同质。分离的抗体包括在重组细胞内的原位的抗体, 因为抗体自然环境中的至少一种组分将不存在。分离的抗体通常由至少一个纯化步骤制备。在一些实施方案中, 分离的抗体的纯度至少为约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%, 或这些数值中的任何两个值之间的范围 (包括终点) 或其中任何值。

[0047] “核酸”或“多核苷酸”是指由单个核苷酸: 腺嘌呤 (a)、胞嘧啶 (c)、鸟嘌呤 (g)、胸腺嘧啶 (t) (或RNA中的尿嘧啶 (u)) 组成的聚合物分子, 例如DNA, RNA或其修饰。核酸分子可以是天然的核酸分子或合成的核酸分子或一种或多种天然的核酸分子与一种或多种合成的核酸分子的组合。核酸的实施例包括但不限于: 基因或基因片段 (例如探针、引物、EST或

SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA (mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核糖酶、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、重组多聚核苷酸、分支的多聚核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。

[0048] “分离的核酸分子”为被鉴定并与至少一种污染性核酸分子分离的核酸分子。分离的核酸分子不同于其天然存在的形式或环境。因此,分离的核酸分子与在其天然细胞中存在的核酸分子有区别。然而,分离的核酸分子包括在如常表达抗体的细胞中所含的核酸分子,例如,所述核酸分子所处的染色体位置不同于天然细胞的染色体位置。

[0049] “单克隆抗体”是指从基本上同种抗体群中获得的抗体,构成所述群的各个抗体是一致的。单克隆抗体具有高度特异性,可针对单个的抗原位点。此外,与通常包括针对多个不同的决定簇(表位)的多种不同抗体的常规(多克隆)抗体制备物相反,每种单克隆抗体仅针对抗原上的单个决定簇。

[0050] 术语“嵌合抗体”是指其中重链和/或轻链的一部分源于一种来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分源于不同来源或物种的抗体。

[0051] “免疫细胞”包括具有造血的起源并在免疫应答中起作用的细胞。免疫细胞包括:B淋巴细胞、T淋巴细胞、天然杀伤细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸细胞、肥大细胞、嗜碱细胞和粒细胞。

[0052] 本文所用序列“变体”是指在一个或多个氨基酸残基处不同于所示的序列但保留所得到的分子的生物学活性的序列。

[0053] “氨基酸”是指既含氨基又含羧基的有机化合物,比如 α -氨基酸,其可直接或以前体的形式由核酸编码。单个氨基酸由三个核苷酸(所谓的密码子或碱基三联体)组成的核酸编码。相同氨基酸可由不同密码子编码称为“遗传密码的简并性”。氨基酸包括天然氨基酸和非天然氨基酸。天然氨基酸包括丙氨酸(三字母代码:ala,一字母代码:A)、精氨酸(arg, R)、天冬酰胺(asn, N)、天冬氨酸(asp, D)、半胱氨酸(cys, C)、谷氨酰胺(gln, Q)、谷氨酸(glu, E)、甘氨酸(gly, G)、组氨酸(his, H)、异亮氨酸(ile, I)、亮氨酸(leu, L)、赖氨酸(lys, K)、甲硫氨酸(met, M)、苯丙氨酸(phe, F)、脯氨酸(pro, P)、丝氨酸(ser, S)、苏氨酸(thr, T)、色氨酸(trp, W)、酪氨酸(tyr, Y)和缬氨酸(val, V)。

[0054] “保守替换的变体”或“保守氨基酸取代”是指本领域技术人员已知的氨基酸取代,进行这种取代通常不改变所得到的分子的生物学活性。一般而言,本领域技术人员公认在多肽非必需区的单个氨基酸取代基本上不改变生物学活性。保守替换可以是由含有化学性质相似侧链的氨基酸取代,比如:1)脂族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸。

[0055] 本文所用术语“约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内,所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。或者,“约”可意味着至多 $\pm 20\%$ 的范围,比如 $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 范围。除非另外说明,否则当具体值在本申请和权利要求中出现时,“约”的含义应该假定为在该具体值的可接受误差范围内。

[0056] 当提及配体/受体、抗体/抗原或其它结合对时,“特异性”结合是指在蛋白和/或其它生物试剂的异质群体中确定是否存在所述蛋白例如TREM2的结合反应。因此,在所指定的

条件下,特定的配体/抗原与特定的受体/抗体结合,并且并不以显著量与样品中存在的其它蛋白结合。

[0057] 当应用于多核苷酸时,术语“编码”是指如果在其天然状态下或者当通过本领域技术人员公知的方法操作时,其可以被转录和/或翻译以产生多肽和/或其片段的mRNA,则被称为“编码”多肽的多核苷酸。反义链是这种核酸的互补物,并且可以从其推导编码序列。

[0058] 当用“给予”和“治疗”提及动物、人、实验对象、细胞、组织、器官或生物液时,是指将外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受治疗者、细胞、组织、器官或生物液接触。“给予”和“治疗”可指例如治疗方法、药动学方法、诊断方法、研究方法和实验方法。治疗细胞包括让试剂与细胞接触以及让试剂与流液接触,其中所述流液与细胞接触。“给予”和“治疗”还意味着例如通过试剂、诊断剂、结合组合物或通过其他细胞对细胞进行体外和离体治疗。

[0059] 术语“治疗”包括病症或其症状的改善或停止。治疗包括抑制,例如降低病症或其症状的整体发作频率。

[0060] 术语“预防”包括避免病症或其症状的初始。

[0061] 本文所用术语“治疗有效量”或“有效量”是指当将抗TREM2抗体或其抗原结合片段单独给予或与另外的治疗剂联合给予细胞、组织或受治疗者时,其有效防止或减缓待治疗的疾病或病症的量。治疗有效剂量进一步指所述抗体或其抗原结合片段足以导致症状减缓的量,所述减缓症状例如为治疗、治愈、防止或减缓相关医学状态,或提高对所述病症的治疗率、治愈率、防止率或减缓率。对具体受治疗者的有效量可视多种因素而变化,例如待治疗的疾病、患者的整体健康状况、给药的方法途径和剂量及副作用的严重性。有效量可为避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。当施用给个体单独给予的活性成分时,治疗有效量是指该单独的成分。当施用组合时,治疗有效量是指产生治疗效果的活性成分的联合的量,而不论其是联合给予、连续给予还是同时给予。

[0062] 药物组合物

本发明还提供了药物组合物。这样的组合物包含有效剂量的抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

[0063] 在一些实施方案中,术语“药学上可接受的载体”是指由政府的监管机构批准的或其他公认的药典中列出的用于动物(特别是用于人类)的物质。此外,“药学上可接受的载体”通常将是任何类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、封装材料或制剂助剂。

[0064] 术语“载体”是指与活性成分一起使用的用于治疗剂的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。这此类药物载体可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。在一些实施方案中,当药物组合物静脉内给药时,载体可以是水。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体,特别是用于注射溶液。合适的药物载体的实例在E. W. Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中有描述,在此通过引用并入本发明。此类组合物将含有临床有效剂量的抗体或抗体片段,连同合适的载体,以提供适合于患者的给药形式。该制剂应该适用于给药模式。制剂可以封装在安瓿瓶、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0065] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物可通过本领域已知的任何合适途径施用,所述途径包括但不限于:口服、鼻、皮内、皮下、静脉、肌内、支气管内、胸膜内、腹膜内、动

脉内、淋巴和/或脑脊髓。

[0066] 在一些实施方案中,根据常规步骤将组合物配制成适合静脉内注射于人体的药物组合物。用于静脉内给药的组合物通常是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。药物组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂如利多卡因,从而缓解注射部位的疼痛。一般而言,有效成分以单位剂量形式单独供给或混在一起供给,如以干燥的冻干粉末或无水浓缩物的形式装在可指示活性剂份量的密封容器(如安瓿瓶或小袋)中。在通过输注施用组合物的情况下,可以用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶来分装组合物。在通过注射施用组合物的情况下,可以使用注射用的无菌水或盐水的安瓿瓶,使得可以在施用之前混合有效成分。

[0067] 本发明的抗体或其抗原结合片段包括其盐的形式。药学上可接受的盐包括衍生自如与盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的阴离子形成的盐,以及衍生自如与钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的阳离子形成的盐。

[0068] 组合治疗

本发明的抗体或抗体片段可以与至少一种额外的治疗剂组合使用(例如包含在同一药物组合物中),例如与检查点抑制剂组合使用;

在一些实施方案中,所述检查点抑制剂为T细胞的检查点抑制剂、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体;

所述抗PD-1抗体可以为派姆单抗Pembrolizumab、纳武单抗Nivolumab、西米普利单抗Cemiplimab、斯鲁利单抗Serplulimab、特瑞普利单抗Toripalimab;

所述抗PD-L1抗体可以为阿特珠单抗Atezolizumab、阿维单抗Avelumab、德瓦鲁单抗Durvalumab;

抗CTLA-4抗体可以为伊匹单抗Ipilimumab。

[0069] 实施例1:产生抗人TREM2的鼠单克隆抗体

1、杂交瘤的获得

采用TREM2蛋白免疫大鼠,SP2/0细胞融合,ELISA筛选阳性克隆,获得杂交瘤。具体方法如下:

动物免疫:将Human TREM2 Protein, His Tag (ACROBiosystems,货号:TR2-H52H5)蛋白作为免疫原,用生理盐水将其稀释到1 mg/mL,然后与等体积快速佐剂Quick Antibody Q5W(北京博奥龙免疫技术有限公司,货号:KX0210041)混合,对SD雌性大鼠(8周周龄,北京维通利华实验动物技术有限公司)以腹腔注射方式进行蛋白免疫(首免100 µg/大鼠,第二次免疫开始每次50 µg/大鼠)。蛋白免疫以2周的时间间隔反复进行5-6次,最后一次免疫14天后再次于腹腔内注射50 µg免疫原进行冲击免疫,3天后取大鼠脾脏进行细胞融合。

[0070] 细胞融合:将大鼠脾细胞与Sp2/0-Ag14细胞(ATCC No. CRL-1581)按2:1细胞个数比例电融合(BTX电融合仪:ECM2001⁺),在96孔培养板中以HAT培养基(Sigma,货号:H0262)培养,10天后进行杂交瘤细胞上清抗体筛选。

[0071] ELISA筛选阳性克隆:将杂交瘤上清液以每孔50 µL分别加入包被了人TREM2蛋白(即上述Human TREM2 Protein, His Tag)、食蟹猴TREM2蛋白(Cynomolgus TREM2 Protein, His Tag(ACROBiosystems,货号:TR2-C52H3))或小鼠TREM2蛋白(Mouse TREM2 Protein, His Tag(ACROBiosystems,货号:TR2-M52H3))的96孔平底检测板(Corning,货

号:9018)中,37℃ 孵育60分钟。PBST洗三遍,每孔加入二抗(HRP Rabbit Anti-Rat IgG (whole molecule) (Sigma,货号:A5795),1:5000稀释),37℃ 孵育30分钟。PBST洗三遍,每孔加入100 μ L TMB(英创生物,货号:EL0009),显色15 分钟后每孔加入50 μ L硫酸终止反应。酶标仪上读取OD值,将阳性克隆培养孔中的细胞混匀后吸入离心管中,加入适量培养基,混匀后吸出少量细胞计数,根据计数结果将杂交瘤细胞稀释至每mL含5个细胞,96孔板每孔加入0.2 mL稀释后的细胞悬液,培养一周后,挑选含有单个细胞集落的培养上清,再次按上述方法进行检测,表1中示出相应克隆。

[0072] 表1阳性克隆杂交瘤上清与人TREM2、食蟹猴TREM2 和小鼠TREM2蛋白的结合能力

克隆号	人TREM2 (OD450)	食蟹猴TREM2 (OD450)	小鼠TREM2 (OD450)
342F9-2E6	3.66	0.70	3.19
334E9-2C11	4.00	3.43	4.00
342H1-2B8	3.81	1.16	4.00

2、抗人TREM2的鼠源单克隆抗体的制备

将表1中的杂交瘤细胞用无血清培养基培养10天后,收集上清,用Protein A柱(博格隆(上海)生物技术有限公司,货号:AA0272)纯化鼠源单克隆抗体获得纯化的单克隆抗体(按照杂交瘤的名称命名)。之后检测纯化的抗人TREM2的鼠源单克隆抗体的活性和功能。

[0073] 3、抗人TREM2的鼠源单克隆抗体的功能鉴定

抗人TREM2的鼠源单克隆抗体与人TREM2、食蟹猴TREM2、小鼠TREM2的结合活性:

(1) 抗人TREM2的鼠源单克隆抗体与表达人TREM2细胞系的结合实验:

用FACS buffer(含1%FBS的PBS溶液)将表达人TREM2的293T细胞系293T-hTREM2-NFAT-RE-EGFP(重庆英茂盛业生物科技有限公司,货号:CS002)的浓度调整至 1×10^6 个细胞/mL,按照100 μ L/孔置于96孔U底孔板,离心后舍弃上清。FACS buffer(含1%FBS的PBS溶液)将抗人TREM2的鼠源单克隆抗体、阳性对照抗体 Anti-TREM2 Rat IgG1 (R&D Systems, 货号:MAB17291)稀释至起始工作浓度,再用FACS buffer进行梯度稀释。将梯度稀释的抗体按照100 μ L/孔加入孔板重悬细胞,吹打混匀,4℃孵育1小时。孵育后细胞经离心,用FACS buffer清洗三次。将AlexaFluor-647标记的抗大鼠的二抗(Invitrogen,货号:A21247)用FACS buffer(含1%FBS的PBS溶液)进行1:1000稀释,每孔加入100 μ L二抗稀释液,重悬细胞团块,吹打混匀,于4℃孵育约45分钟。孵育后细胞经离心,用FACS buffer清洗三次后,FACS buffer 按照100 μ L/孔加入孔板重悬细胞。流式细胞仪(BECKMAN COULTER cytoFLEX)读取平均荧光强度(Median Fluorescence Intensity, MFI),利用Graphpad Prism 8.0软件分析试验数据,以抗体浓度对数为x轴,对应的MFI值为y轴,选用四参数方程回归模型,拟合抗体剂量效应曲线,计算出 EC_{50} 。

[0074] (2) 抗人TREM2的鼠源单克隆抗体与人TREM2蛋白、食蟹猴TREM2蛋白、小鼠TREM2蛋白的结合实验:

包板蛋白为人TREM2蛋白(即上述Human TREM2 Protein, His Tag)、食蟹猴TREM2蛋白(即上述Cynomolgus TREM2 Protein, His Tag)或小鼠TREM2 蛋白(即上述Mouse TREM2 Protein, His Tag),浓度为1 μ g/mL,以50 μ L/孔,4℃包被96孔板过夜;按照150 μ L/孔加入2% BSA封闭液室温孵育1h;按照200 μ L/孔加入PBST(含有0.05%Tween20)洗三遍;用封闭液将样品或阳性对照抗体 Anti-TREM2 Rat IgG1 (R&D Systems,货号:MAB17291),

配置300 μL 浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 的母液;用封闭液对母液进行稀释,稀释倍数为3.16,共11个梯度;按照50 μL /孔加入样品或阳性对照抗体,室温孵育1h;按照200 μL /孔加入PBST(含有0.05%Tween20)洗三遍;加入二抗(HRP Rabbit Anti-Rat IgG (whole molecule) (Sigma, 货号:A5795)),1:5000稀释),以50 μL /孔加入各孔,室温孵育1h;按照200 μL /孔加入PBST(含有0.05%Tween20)洗三遍;拍干后,加入50 μL TMB显色液,显色约15 min,然后用硫酸终止反应。酶标仪读数OD450。利用Graphpad Prism 8.0软件分析数据,以抗体浓度对数为x轴,对应的OD450值为y轴,选用四参数方程回归模型,拟合抗体剂量效应曲线,计算 EC_{50} ,

结果如图1-图4和表2所示。

[0075] 表2 抗人TREM2的鼠源单克隆抗体与人TREM2、食蟹猴TREM2和小鼠TREM2的结合活性

抗体编号	293T-hTREM2-NFAT-RE-EGFP EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$	Human TREM2 Protein, His Tag EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$	Cynomolgus TREM2 Protein, His Tag EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$	Mouse TREM2 Protein, His Tag EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$
342F9-2E6	0.2448	0.04051	0.2804	0.03154
334E9-2C11	0.1083	0.02986	0.04010	0.04494
342H1-2B8	0.05284	0.03213	0.9941	0.01996
阳性对照	0.08930	0.04597	0.07413	0.01482

[0076] 结果表明,342F9-2E6、334E9-2C11和342H1-2B8对人TREM2蛋白具有强结合活性,其中342H1-2B8更优于对照。342H1-2B8对表达人TREM2的293T细胞系结合活性同样优于对照,与小鼠TREM2结合活性和对照相当,也与食蟹猴TREM2具有结合活性。

实施例2:抗人TREM2的鼠源单克隆抗体测序及嵌合抗体功能鉴定

1、抗人TREM2的鼠源单克隆抗体测序及嵌合抗体的制备

将342F9-2E6、334E9-2C11、342H1-2B8进行测序,重链可变区、轻链可变区和CDR序列见表3。

[0077] 表3抗人TREM2的鼠源单克隆抗体的CDR序列以及可变区序列(根据Kabat方案确定)

抗体编号	序列名称	序列（下划线标出的序列为 CDR 区）	SEQ ID NO:
342F9-2E6	342F9-2E6 重链可变区 VH	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTNYIIIHWVR QRSGKSLEWMGRMWNNGDTSYNSAFTSRLSISRDT KSQVFLKMNSLQTEDTGTGYFCVRGSEYGGFFAYWGQ GTLVTVSS	1
	342F9-2E6 重链 CDR1	NYIIIH	2
	342F9-2E6 重链 CDR2	RMWNNGDTSYNSAFTS	3
	342F9-2E6 重链 CDR3	GSEYGGFFAY	4
	342F9-2E6 轻链可变区 VL	DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLSCKASQSIYNNLA WYQ QKVG EAPKLLIYDASSLETGIPSRFSGSGSGTDY TLTISS LQPEDVATYFCQKYYSGYTFGAGTKLEIK	5
	342F9-2E6 轻链 CDR1	KASQSIYNNLA	6
	342F9-2E6 轻链 CDR2	DASSLET	7
	342F9-2E6 轻链 CDR3	QKYYSGYT	8
334E9-2C11	334E9-2C11 重链可变区 VH	QIQLVESGGGVVQPGSRMKLSCAASGFTFNFDMAW VCRTPKKGLEWVAIISYDGSSTYYRDSVKGRFTISRDN AKSTLYLQMDSLRSEDATATYYCARQHGGGLQGTSVT VSS	9
	334E9-2C11 重链 CDR1	NFDMA	10
	334E9-2C11 重链 CDR2	TISYDGSSTYYRDSVKG	11
	334E9-2C11 重链 CDR3	QHGG	12
	334E9-2C11 轻链可变区 VL	NIVMTQSPKSMISVGDRVMSCKASQNVDDNIAWYL QKPGQSPKLLIYAYASHRYTGVPDRFTGGGYGTDFTLTI NGVQAEDAIFYCQRIYNSPYTFGPGTKLDLK	13
	334E9-2C11 轻链 CDR1	KASQNVDDNIA	14
	334E9-2C11 轻链 CDR2	YASHRYT	15

[0078]

	334E9-2C11 轻链 CDR3	QRIYNSPYT	16
342H1-2B8	342H1-2B8 重链可变区 VH	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTNDIVHWVR QHSGKSLEWMGRMWSDGRTSYNSAFTSRLSISRDTSK SQVFLKMNSLQAEDTGIYYCARGSTYGGFFVYWGQG TLVTVSS	17
	342H1-2B8 重链 CDR1	NDIVH	18
	342H1-2B8 重链 CDR2	RMWSDGRTSYNSAFTS	19
	342H1-2B8 重链 CDR3	GSTYGGFFVY	20
	342H1-2B8 轻链可变区 VL	DIQMTQSPSLLASVGDRTLSCKASONIYNNLAWYQ QKLGDPKLLIYDANSLQMGIPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDVATYFCQKYYSGYTFGAGTKLEIK	21
	342H1-2B8 轻链 CDR1	KASONIYNNLA	22
	342H1-2B8 轻链 CDR2	DANSLQM	23
	342H1-2B8 轻链 CDR3	QKYYSGYT	24

[0079] 将轻、重链可变量分别构建到人源恒定区 (IgG1/K, 表4) 上, 构建相应的嵌合抗体 (表5), 并经测序验证序列。嵌合抗体在相应杂交瘤克隆编号上加前缀ch对其进行命名。例如采用杂交瘤克隆342F9-2E6通过本实施例获得的嵌合抗体命名为ch342F9-2E6, 用于体外功能鉴定。

[0080] 将编码嵌合抗体的相应核酸采用Expi293细胞进行表达, 并使用Protein A柱进行纯化, 具体方法如下:

Expi293细胞表达嵌合抗体: 在转染前一天, 将Expi293细胞 (购自Gibco, 货号: A14527) 密度稀释到 1.5×10^6 个细胞/mL, 放于 37°C、8% CO₂摇床中120 rpm进行培养。第二天, 测定活细胞密度和存活率, 细胞转染密度应在 3×10^6 个细胞/mL, 细胞活率大于95%。制备PEI/质粒复合物: 将PEI (1 mg/mL, Polysciences, 货号: 24765-1) 颠倒混匀。用OPM-293 CD05 培养基 (上海奥浦迈生物科技股份有限公司, 货号: 81075-001) 稀释质粒, 质粒总量为1 μg/mL, 稀释质粒的培养基的体积为转染体积的1/20, 轻轻混匀, 轻重链比例为1:1.5。用OPM-293 CD05培养基稀释PEI试剂, 稀释PEI的培养基的体积为转染体积的1/20, 轻轻颠倒混匀, 在室温下孵育5分钟。将稀释的PEI试剂加入到稀释的质粒中, 轻轻颠倒混匀。将PEI/质粒复合物在室温下孵育15分钟, 然后将溶液缓慢滴加到转移摇瓶中, 在加入过程中轻轻旋转摇瓶。转染完毕后将摇瓶放于37°C、8%CO₂的摇床中120 rpm培养。在转染后第二天 (转染后24小时), 在摇瓶中加入10% OPM-293 ProFeed (上海奥浦迈生物科技股份有限公司, 货号: F081918), 在加入过程中轻轻旋转摇瓶, 之后将摇瓶放回摇床中继续培养5-7天, 收获上清。

[0081] Protein A柱纯化抗体: 准备重力层析柱, 打开重力层析柱上盖, 将垫片置于重力柱底部, 压紧。准备填料Protein A (Cytiva, 货号: 17549801), 由目标填料体积和填料的悬

浊比例精确计算出所需填料悬浊液体积,所需填料悬浊液体积=目标填料体积/填料的悬浊比例。将填料充分涡旋震荡,确保填料完全悬浮。填料悬浊液加入重力层析柱底部。添加至少10 CV的平衡缓冲液PBS到重力层析柱,平衡结束后,检测出口pH。如未至目标pH,继续加入平衡缓冲液直至平衡至目标pH。缓慢加入一定体积的样品至重力层析柱中。添加至少10 CV的淋洗缓冲液到重力层析柱。缓慢加入5CV的洗脱缓冲液(10-50 mM NaAc, pH3.0-pH3.5)到重力层析柱,孵育3-5分钟对洗脱液进行收集。根据需要重复洗脱步骤。中和:用中和缓冲液(1M Tris)调节pH至目标pH。用Nanodrop测定蛋白浓度。通过超滤换液将保存抗体的缓冲液置换成PBS。

[0082] 表4恒定区序列

序列名称	序列	SEQ ID NO:
IgG1/K 重链恒定区 CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	25
IgG1/K 轻链恒定区 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	26

[0083] 表5抗人TREM2嵌合抗体

抗体编号	序列名称	序列(下划线标出的序列为 CDR 区)	SEQ ID NO:
ch342F9-2E6	ch342F9-2E6 重链	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTNYIIH WVRQRSGKSLEWMGRMWNNGDTSYNSAFTSRL SISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTGTYFCVRGSEY <u>GGFFAYWGQ</u> GLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
	ch342F9-2E6 轻链	DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLSCKASQSIYNNLA WYQQKVGEPKLLIYD <u>DASSLET</u> GIPSRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDVATYFCQKYYSGYTFGAGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	28

[0084]

ch334E9-2C11	ch334E9-2C11 重链	QIQLVESGGGVVQPGRSMKLSAASGFTFNFDMAWVCRTPKKGLEWVATISYDGSSTYYRDSVKGRFTISRDNASTLYLQMDSLRSEDATYYCARQHGLGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	29
	ch334E9-2C11 轻链	NIVMTQSPKSMSSISVGDRVTMSCKASQNVNNAIYWLQKPGQSPKLLIYYASHRYTGVPDRFTGGGYGTDFTLTINGVQAEDAAFYYCQRIYNSPYTFGPGTKLDLKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	30
ch342H1-2B8	ch342H1-2B8 重链	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTNDIVHWVRQHSQKSLEWMGRMWSHGRTSYNSAFTSRLSISRDTSSKQVFLKMNSLQAEDTGIIYCARGSTYGGFFVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	31
	ch342H1-2B8 轻链	DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLSCKASQNIYNNLAWYQQKLGDPKLLIYDANSIQMGIPIRFGSGSGSDTYTLTISSLQPEDVATYFCQKYISGYTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	32

[0085] 2、抗人TREM2嵌合抗体的功能鉴定

抗人TREM2嵌合抗体与人TREM2、食蟹猴TREM2、小鼠TREM2的结合活性：

(1) 抗人TREM2嵌合抗体与表达人TREM2细胞系的结合实验：

用FACS buffer (含1%FBS的PBS溶液) 将表达人TREM2的293T细胞系293T-hTREM2-NFAT-RE-EGFP (重庆英茂盛业生物科技有限公司, 货号:CS002) 的浓度调整至 1×10^6 个细胞/mL, 100 μ L/孔置于96孔U底孔板, 离心后舍弃上清。FACS buffer (含1%FBS的PBS溶液) 将抗人TREM2嵌合抗体、阳性对照抗体PI37012 (表6) 稀释至起始工作浓度, 再用FACS buffer 进行梯度稀释。将梯度稀释的抗体100 μ L/孔加入孔板重悬细胞, 吹打混匀, 4℃孵育1小时。孵育后细胞经离心, 用FACS buffer清洗三次。将AlexaFluor-647标记的抗人二抗 (Alexa Fluor® 647 AffiniPure™ Goat Anti-Human IgG (H+L) (Jackson Immuno, 货号:109-605-003) 用FACS buffer (含1%FBS的PBS溶液) 进行1:1000稀释, 每孔加入100 μ L二抗稀释液, 重悬细胞团块, 吹打混匀, 于4℃孵育约45分钟。孵育后细胞经离心, 用FACS buffer清洗三次后, FACS buffer 按照100 μ L/孔加入孔板重悬细胞。流式细胞仪 (BECKMAN

COULTER cytoFLEX) 读取平均荧光强度 (Median Fluorescence Intensity, MFI), 利用 Graphpad Prism 8.0 软件分析试验数据, 以抗体浓度对数为 x 轴, 对应的 MFI 值为 y 轴, 选用四参数方程回归模型, 拟合抗体剂量效应曲线, 计算出 EC_{50} 。

[0086] (2) 抗人 TREM2 嵌合抗体与人 TREM2 蛋白、食蟹猴 TREM2 蛋白、小鼠 TREM2 蛋白的结合实验:

按照实施例 1 的步骤 3 中的 (2) 进行该实验, 阳性对照抗体替换为 PI37012, 二抗替换为 Anti-Human IgG HRP (Sigma, 货号: A8867)。

[0087] 结果如图 5-图 8 和表 7 所示。

[0088] 表 6 PI37012 抗体

抗体编号	序列名称	序列	SEQ ID NO:
PI37012	PI37012 重链	EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S N Y Y M A W V R Q A P G K G L E W V S S L T N S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R E W A G S G Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K	33
	PI37012 轻链	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q N V G N N L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y T S N R F T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q R I Y N S P W T F G Q G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C	34

[0089] 表 7 抗人 TREM2 嵌合抗体与人 TREM2、食蟹猴 TREM2 和小鼠 TREM2 的结合活性

抗体编号	293T- hTREM2- NFAT-RE- EGFP EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$	Human TREM2 Protein, His Tag EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$	Cynomolgus TREM2 Protein, His Tag EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$	Mouse TREM2 Protein, His Tag EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$
ch342F9-2E6	0.2098	0.0168	0.05895	0.03036
ch334E9-2C11	0.1258	0.01648	0.02201	0.02132
ch342H1-2B8	0.1911	0.01718	0.2331	0.0193
PI37012	236.7	0.01235	0.03012	0.01075

[0090] 结果表明, 抗人 TREM2 嵌合抗体与阳性对照抗体 PI37012 一致, 对人 TREM2 蛋白和表达人 TREM2 的 293T 细胞系具有强结合活性, 也与食蟹猴 TREM2 和小鼠 TREM2 具有结合活性。

[0091] 实施例 3、Fc 突变抗人 TREM2 嵌合抗体介导的 ADCC 效应

S239D/A330L/I332E 突变增强抗人 TREM2 嵌合抗体与 THP-1 对 Jurkat-human $\text{Fc} \gamma \text{R IIIa}$ (158V) -NFAT 的激活, 抗体恒定区 (Fc) 的 S239D/A330L/I332E 突变可以提高与 $\text{Fc} \gamma \text{R IIIa}$ 的亲合力, 增加抗体介导的 ADCC 效应 (Greg A Lazar et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 和 Jeffrey L Nordstrom et al. Breast Cancer Res. 2011)。该突变已经应用到在

临床上用于增强抗体的ADCC效应 (Rena Liu et al. Antibodies (Basel). 2020)。分别对抗人TREM2嵌合抗体的Fc进行S239D/A330L/I332E (DLE) 突变来增强其诱导的ADCC效应。

[0092] Fc突变抗人TREM2嵌合抗体如表8所示。

[0093] 表8 Fc突变抗人TREM2嵌合抗体

抗体编号	序列名称	序列（下划线标出的序列为 CDR 区）	SEQ ID NO:
ch342F9-2E6_DLE	ch342F9-2E6_DLE 重链	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLT <u>NYIIHWVRQRSGKSLEWMGRMWNNNGDT</u> <u>SYNSAFTSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQT</u> <u>EDTGTYFCVRGSEYGGFFAYWGQGT</u> LVTV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPPEEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	35
	ch342F9-2E6_DLE 轻链	DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLSCKASQSIY <u>NNLAWYQQKVG</u> EAPKLLIYDASSLETGIP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCQK <u>YYSGYTFGAGTKLEIKRTVAAPS</u> VFI DEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	36
ch334E9-2C11_DLE	ch334E9-2C11_DLE 重链	QIQLVESGGGVVQPGRSMKLSCAASGFTF <u>NNFDMAWVCRTPKKGLEWVA</u> TISYDGSS <u>TYRDSVKGRFTISR</u> DNAKSTLYLQMDSL RSEDATATYYCARQHGGGLGQGTSTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSH	37

[0094]

		EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	ch334E9-2C11_DLE 轻链	NIVMTQSPKMSISVGDRVTMSCKASQNV <u>DNNIAWYLQKPGQSPKLLIYYASHRYTGV</u> <u>PDRFTGGGYGTDFTLTINGVQAEDAAFY</u> <u>YCORIYN</u> <u>SPYTF</u> <u>GP</u> <u>GT</u> <u>KL</u> <u>DL</u> <u>KRT</u> <u>VA</u> <u>AP</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>I</u> FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	38
ch342H1-2B8_DLE	ch342H1-2B8_DLE 重链	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTNDIVHWVRQHSGLSLEWMGRMWSDGRTSYNSAFTSRLSISRDTSKQVFLKMNSLQAEEDTGYYCARGSTYGGFFVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	39
	ch342H1-2B8_DLE 轻链	DIQMTQSPSLLSASVGDRVTLSCKASQNTYNNLAWYQQKLGDPKLLIYDANSLOMGI PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCQ <u>KYYSGYTF</u> <u>GAG</u> <u>TK</u> <u>LE</u> <u>IK</u> <u>RT</u> <u>VA</u> <u>AP</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>P</u> SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	40
PI37012_DLE	PI37012_DLE 重链	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMAWVRQAPGKGLEWVSSLTNSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCTREWAGSGYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	41
	PI37012_DLE 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNNLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSNRFTGVP	42

[0095]

		SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQR IYNPWFQGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	
--	--	---	--

[0096] 临床研究发现抗TREM2抗体可以通过ADCC作用清除肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞 (TAM)。采用Jurkat-human Fc γ RIIIa (158V) -NFAT与TREM2表达的 THP-1细胞孵育测定抗TREM2抗体依赖的Fc γ RIIIa激活。TREM2抗体的Fab端与靶细胞THP-1上的靶点 TREM2结合,其Fc端与效应细胞上的Fc γ RIIIa受体结合,进而激活效应细胞内NFAT信号通路,对NFAT通路活化产生的荧光素酶定量来反应抗体的ADCC活性,具体方法如下:

THP-1细胞(购自吉满生物科技(上海)有限公司,货号:GM-C09479) 300 g离心5分钟,用RMPI1640培养基调整细胞浓度至 1.2×10^6 个细胞/mL。每孔50 μ L接种于白色不透明板中,作为靶细胞待用。RMPI1640培养基稀释本申请抗人TREM2嵌合抗体、阳性对照抗体PI37012和突变阳性对照抗体PI37012_DLE至浓度为40 μ g/mL,再用培养基进行4倍梯度稀释。收集的Jurkat-human Fc γ RIIIa (158V) -NFAT细胞(吉满生物科技(上海)有限公司,货号:GM-C05619) 300 g离心5 分钟后弃去上清,加入RMPI1640培养基调整细胞浓度至 1.5×10^6 个细胞/mL。然后取100 μ L细胞加入包含靶细胞的每个培养孔中,同时向各孔加入50 μ L梯度稀释的抗体。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下诱导过夜。室温条件下平衡至少15分钟,每孔加入100 μ L荧光素酶底物溶液(Vazyme,货号:DD1203),混合后在室温条件下避光反应5分钟,用酶标仪在细胞培养板上读取相对光单位数值。利用Graphpad Prism 8.0软件分析试验数据,以抗TREM2抗体浓度对数为x轴,对应的RLU值为y轴,选用四参数方程回归模型,拟合抗TREM2抗体的剂量效应曲线。

[0097] 抗TREM2抗体ADCC效应如表9所示。

[0098] 表9Fc突变抗人TREM2嵌合抗体的ADCC效应

抗体编号	EC ₅₀ , μ g/mL	跨度
ch342F9-2E6	0.01075	295.1
ch342F9-2E6_DLE	0.01969	466.9
ch334E9-2C11	0.005415	194.1
ch334E9-2C11_DLE	0.07286	410.8
ch342H1-2B8	N/A	N/A
ch342H1-2B8_DLE	N/A	N/A
PI37012	N/A	N/A
PI37012_DLE	N/A	N/A

[0099] 备注:N/A表示不适用,没有得到有效的EC₅₀。

[0100] 结果表明,ch342F9-2E6、ch342F9-2E6_DLE和ch334E9-2C11、ch334E9-2C11_DLE可以剂量依赖的激活Jurkat-human Fc γ RIIIa (158V) -NFAT reporter cell,ch342F9-2E6和ch342F9-2E6_DLE嵌合抗体激活活性的EC₅₀分别为0.01075 μ g/mL 和0.01969 μ g/mL,

ch334E9-2C11和ch334E9-2C11_DLE嵌合抗体激活活性的 EC_{50} 分别为0.005415 $\mu\text{g/mL}$ 和0.07286 $\mu\text{g/mL}$ 。根据跨度 (Span) 结果表明,与野生型人IgG1 Fc相比,Fc突变抗体增强了对Jurkat-human Fc γ RIIIa (158V) -NFAT的激活。

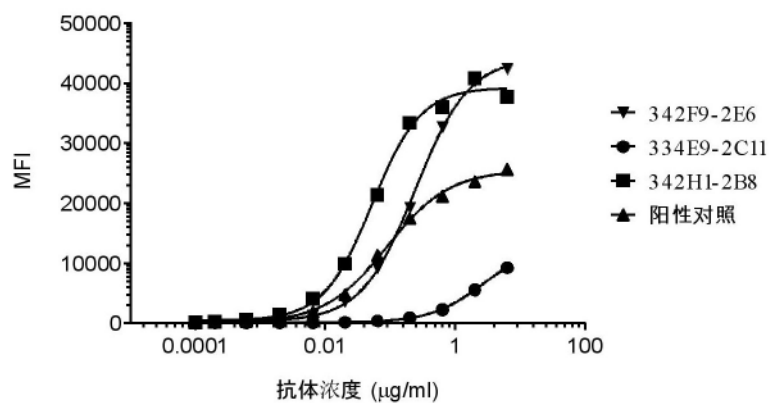


图1

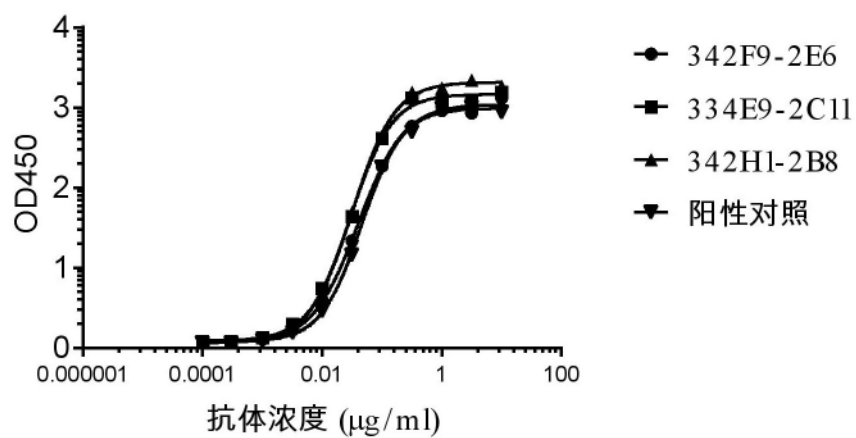


图2

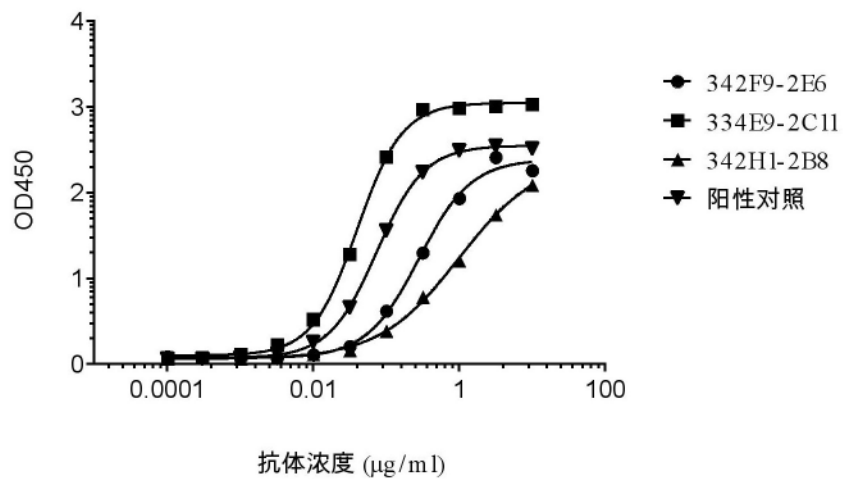


图3

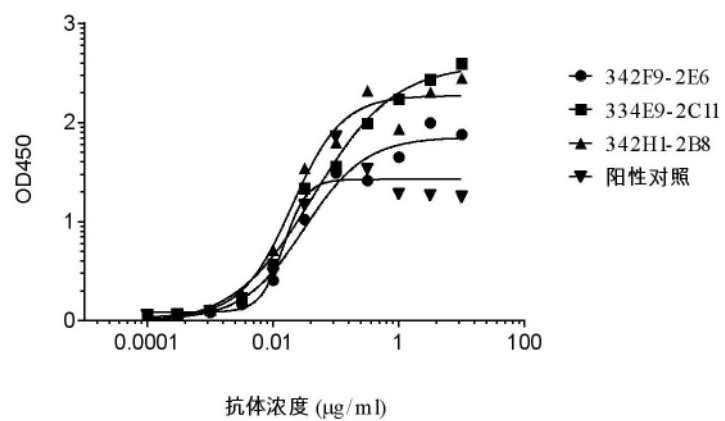


图4

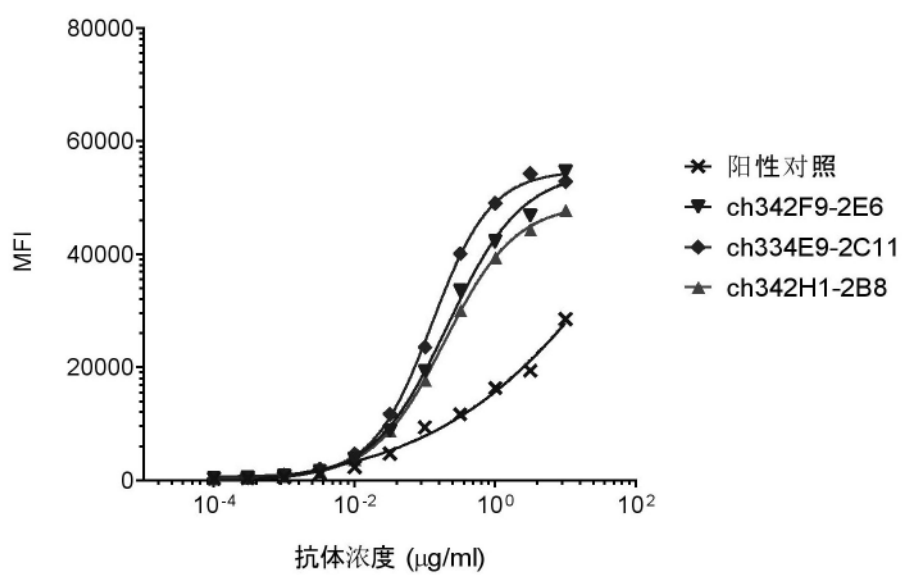


图5

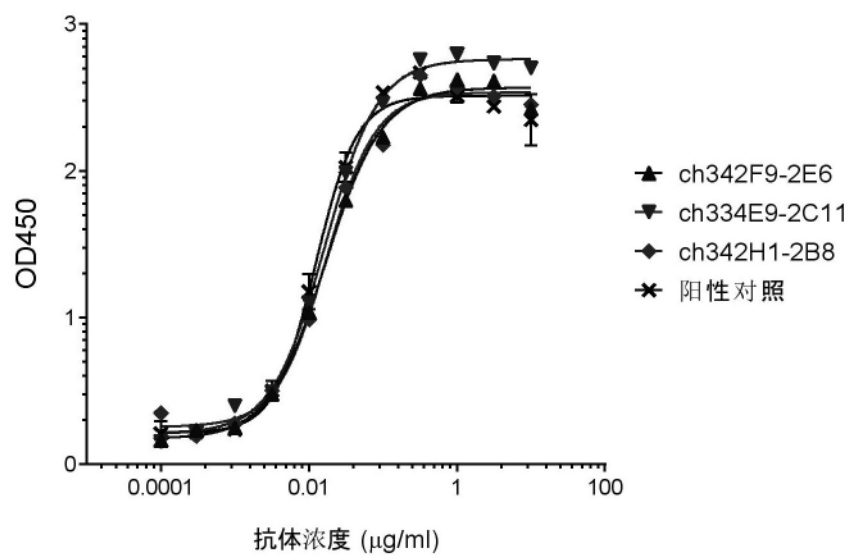


图6

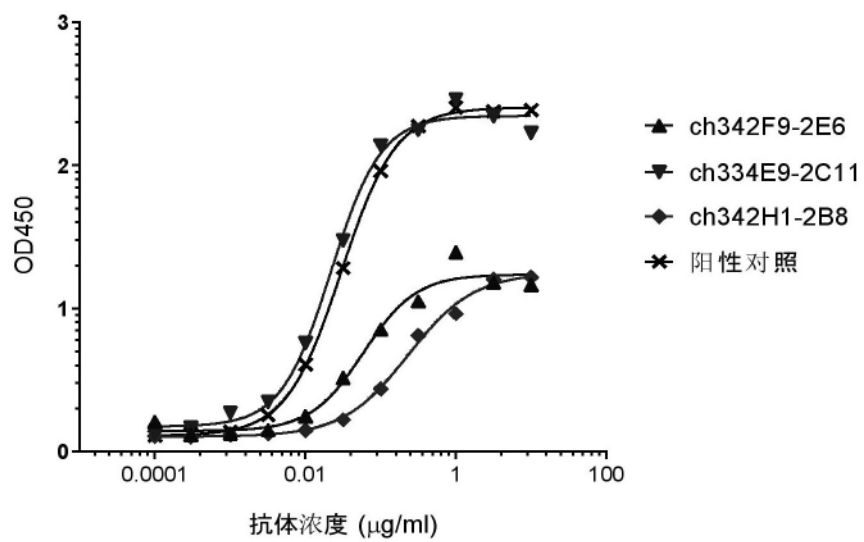


图7

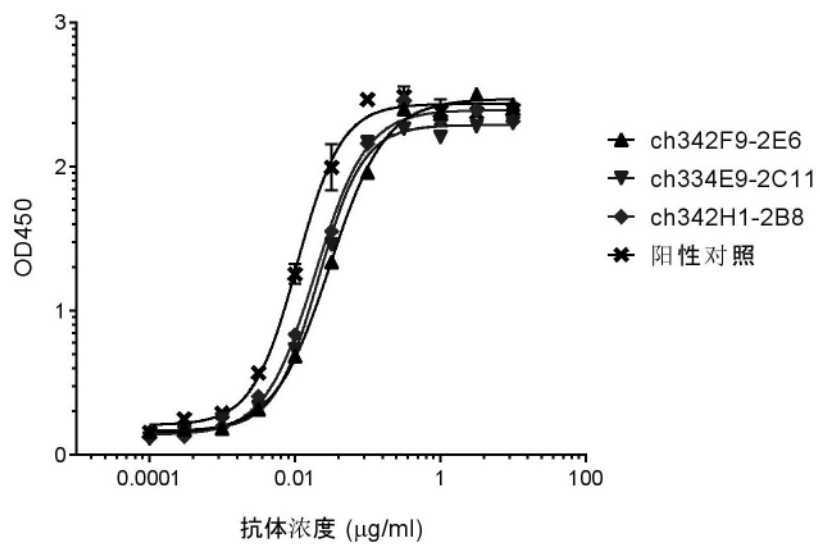


图8