



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115698068 A

(43) 申请公布日 2023. 02. 03

(21) 申请号 202180038748.9

(22) 申请日 2021.06.01

(30) 优先权数据

63/033,609 2020.06.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.11.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/035268 2021.06.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/247591 EN 2021.12.09

(71) 申请人 艾库斯生物科学有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 K.S.高西尔 N.P.C.沃克 X.赵

J.利平克特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 涂滔

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书7页 说明书58页

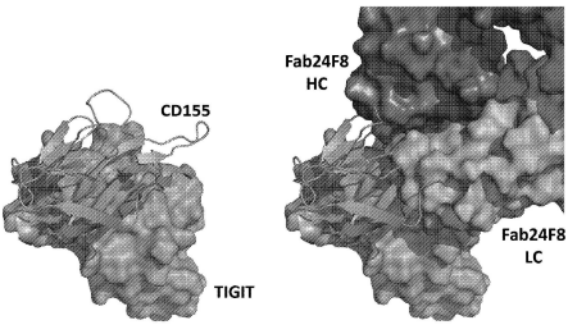
序列表77页 附图28页

(54) 发明名称

抗TIGIT抗体

(57) 摘要

本公开提供了与TIGIT特异性结合的抗体。这些抗体具有通过抑制TIGIT与CD155的结合而显著活化T细胞和自然杀伤细胞的能力。这些抗体可用于治疗癌症和感染性疾病以及其他应用。



1. 一种与人TIGIT特异性结合的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,包括

(a) 重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:36具有至少80%序列同一性的重链(HC)互补决定区(CDR)1,与SEQ ID NO:37具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:38具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:39具有至少80%序列同一性的轻链(LC)CDR1、与SEQ ID NO:40具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:41具有至少80%序列同一性的LC-CDR3;

(b) 重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:42具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:43具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:44具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:45具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:46具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:47具有至少80%序列同一性的LC-CDR3;

(c) 重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:48具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:49具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:50具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:51具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:52具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:53具有至少80%序列同一性的LC-CDR3;

(d) 重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:54具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:55具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:56具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:57具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:58具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:59具有至少80%序列同一性的LC-CDR3;

(e) 重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:60具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:61具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:62具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:63具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:64具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3;

(f) 重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:66具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:67具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:68具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:69具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:70具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:71具有至少80%序列同一性的LC-CDR3;

(g) 重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:72具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:73具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:74具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:75具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:76具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:77具有至少80%序列同一性的LC-CDR3;

(h) 重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:78具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:79具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:80具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:81具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:82具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:83具有至少80%序列同一性的LC-CDR3;

80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:68具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3;或者

(i) 重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:74具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:75具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:67具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:63具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:68具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,包括

(a) 重链可变区,所述重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括具有包含与SEQ ID NO:39的同一性的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的LC-CDR3;

(b) 重链可变区,所述重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的LC-CDR3;

(c) 重链可变区,所述重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的LC-CDR3;

(d) 重链可变区,所述重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的LC-CDR3;

(e) 重链可变区,所述重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的LC-CDR3;

(f) 重链可变区,所述重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的LC-CDR3;

(g) 重链可变区,所述重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的HC-

CDR1、具有包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的LC-CDR3;

(h) 重链可变区,所述重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的LC-CDR3;或者

(i) 重链可变区,所述重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,所述轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的LC-CDR3。

3. 根据权利要求1或2所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,包括

(a) 与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:2具有至少80%序列同一性的轻链可变区;

(b) 与SEQ ID NO:3具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:4具有至少80%序列同一性的轻链可变区;

(c) 与SEQ ID NO:5具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:6具有至少80%序列同一性的轻链可变区;

(d) 与SEQ ID NO:7具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的轻链可变区;

(e) 与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:10具有至少80%序列同一性的轻链可变区;

(f) 与SEQ ID NO:11具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:12具有至少80%序列同一性的轻链可变区;

(g) 与SEQ ID NO:13具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:14具有至少80%序列同一性的轻链可变区;

(h) 与SEQ ID NO:15具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:16具有至少80%序列同一性的轻链可变区;

(i) 与SEQ ID NO:17具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:12具有至少80%序列同一性的轻链可变区;

(j) 与SEQ ID NO:76具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:77具有至少80%序列同一性的轻链可变区;

(k) 与SEQ ID NO:78具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:77具有至少80%序列同一性的轻链可变区;

(l) 与SEQ ID NO:76具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:79具有至少80%序列同一性的轻链可变区;或者

(m) 与SEQ ID NO:78具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:79具有至少80%序列同一性的轻链可变区。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗TIGIT抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗TIGIT抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体、人源化抗体或贴面化抗体。

6. 根据权利要求5所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 其中所述嵌合抗体包括人IgG1/ $\kappa$ Fab恒定结构域。

7. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗TIGIT抗体或其抗原结合片段是人抗体。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗TIGIT抗体或其抗原结合片段抑制TIGIT与CD155的结合, 任选地其中所述抗TIGIT抗体或其抗原结合片段以约0.1nM至约10nM、约0.1nM至约5nM、约0.2nM至约2nM、约0.2nM至约0.8nM、约0.4nM至约0.8nM或约0.6nM至约0.8nM的 $IC_{50}$ 抑制所述结合, 如实施例1中所测量的。

9. 根据权利要求1至5或7至8中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体还包括选自变体人IgG1、变体人IgG2、变体人IgG3或变体人IgG4的变体重链恒定区, 以及任选地人轻链恒定区。

10. 根据权利要求9所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 其中所述变体重链恒定区相对于野生型重链恒定区具有增强或降低的效应子功能。

11. 根据权利要求10所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 其中所述变体人IgG重链恒定区包含SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:99或SEQ ID NO:101。

12. 根据权利要求1至5或7至8中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体还包括野生型人IgG重链恒定区, 以及任选地人轻链恒定区。

13. 根据权利要求12所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 其中所述野生型人IgG重链恒定区包含SEQ ID NO:94。

14. 根据权利要求12或13所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 包括人轻链 $\kappa$ 恒定区, 任选地其中所述人轻链恒定区包含SEQ ID NO:95。

15. 根据权利要求1至5或7至8所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体具有重链和轻链, 其中

(a) 所述重链具有包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列, 并且所述轻链具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列; 或者

(b) 所述重链具有包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列, 并且所述轻链具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列; 或者

(c) 所述重链具有包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列, 并且所述轻链具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列; 或者

(d) 所述重链具有包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列, 并且所述轻链具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其结合片段

(a) 具有通过表面等离子体共振测量的约 $0.01 \times 10^{-11}\text{M}$ 至约 $100 \times 10^{-11}\text{M}$ 、约 $0.1 \times 10^{-11}\text{M}$ 至约 $100 \times 10^{-11}\text{M}$ 、约 $0.1 \times 10^{-11}\text{M}$ 至约 $10 \times 10^{-11}\text{M}$ 、约 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 至约 $100 \times 10^{-11}\text{M}$ 或约 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 至约 $10 \times 10^{-11}\text{M}$ 的平衡结合常数(KD)；

(b) 阻断可溶性人CD155配体与细胞表面人TIGIT的结合，其中半最大抑制浓度(IC50)为约0.2nM至约2nM、约0.2nM至约0.8nM、约0.6nM至约0.8nM或约0.6nM至约0.8nM，如实施例1中所测量的；

(c) 与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合：

(i) SEQ ID NO:80的D72以及SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、S80和K82中的至少一者，

(ii) SEQ ID NO:80的E60和D72以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、S80和K82中的至少一者，

(iii) SEQ ID NO:80的D72和K82以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60和S80中的至少一者，

(iv) SEQ ID NO:80的E60、D72和K82以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58和S80中的至少一者，或者

(v) SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82；或者

(d) (a)、(b)和(c)的任何组合。

17. 根据权利要求16所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段与根据权利要求1至17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段竞争结合到TIGIT。

18. 根据权利要求16或17所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中过量的所述抗体或其抗原结合片段与参考抗体以至少约55%、60%、65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%竞争结合到TIGIT，如在竞争性结合测定中所测量的，其中所述参考抗体包括具有包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链和具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链。

19. 一种与人TIGIT特异性结合的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，包括具有包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链和具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链。

20. 一种抑制TIGIT与CD155结合的方法，所述方法包括使TIGIT与根据前述权利要求中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段接触。

21. 一种治疗癌症或实现癌症预防的方法，所述方法包括向患有癌症或处于癌症风险的受试者施用有效方案或治疗有效量的根据前述权利要求中任一项所述的任一种抗TIGIT抗体或其抗原结合片段。

22. 根据权利要求21所述的方法，其中所述癌症是血液恶性肿瘤、实体瘤、默克尔细胞癌、尿路上皮癌、头颈部鳞状细胞癌、B细胞淋巴瘤、子宫癌、宫颈癌、睾丸癌、胃肠道癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、胆囊癌、心脏癌、肺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、神经节癌、中枢神经系统(CNS)癌和外周神经系统(PNS)癌，以及造血系统的癌症、免疫系统的癌症。

23. 根据权利要求21或22所述的方法，其中向所述受试者施用由所述抗体或其抗原结合片段活化的肿瘤浸润T细胞。

24. 根据权利要求21至23中任一项所述的方法，其中向所述受试者施用诱导针对所述

癌症的免疫应答的疫苗,所述免疫应答通过所述抗体或其抗原结合片段增强。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述疫苗包含在癌细胞表面上表达的抗原或其片段。

26. 根据权利要求21至25中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用自然杀伤细胞,所述自然杀伤细胞对所述癌症的细胞毒性通过所述抗体或其抗原结合片段增强。

27. 根据权利要求21至26中任一项所述的方法,其中还向所述受试者施用针对在癌细胞表面上表达的抗原的第二抗体,由此所述第二抗体对所述癌症的效应子介导的细胞毒性通过所述抗体或其抗原结合片段增强。

28. 根据权利要求21至26中任一项所述的方法,其中还向所述受试者施用针对在免疫细胞表面上表达的抗原的第二抗体。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞或自然杀伤细胞。

30. 根据权利要求27或28所述的方法,其中所述抗原是CTLA-4、PD-1或PD-L1。

31. 根据权利要求21至30中任一项所述的方法,其中还向所述受试者施用选自以下项组成的组的一种或多种疗法:化学疗法、放射疗法、基于细胞的疗法和外科手术。

32. 根据权利要求21至31中任一项所述的方法,其中还向所述受试者施用一种或多种免疫检查点受体或配体的抑制剂。

33. 根据权利要求30所述的方法,其中所述一种或多种免疫检查点受体或配体选自以下项组成的组:CTLA-4、PD-1、PD-L1、TIM-3、LAG-3、PVRIG、BTLA、VISTA、CD96、A<sub>2a</sub>R、A<sub>2b</sub>R、A<sub>2a</sub>/A<sub>2b</sub>R、精氨酸酶、CD39、CD73、IDO和TDO。

34. 根据权利要求32所述的方法,其中所述抑制剂选自以下项组成的组:伊匹单抗、曲美木单抗、纳武单抗、帕博利珠单抗、派姆单抗、西米普利单抗、替雷利珠单抗、赛帕利单抗、度伐利尤单抗和阿替利珠单抗。

35. 一种药物组合物,包含根据权利要求1至19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、以及药学上可接受的载体。

36. 一种与人TIGIT的表位结合的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,包含SEQ ID NO 80的以下氨基酸残基中的至少一者:T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82。

37. 根据权利要求36所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合:

(i) SEQ ID NO:80的D72以及SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、S80和K82中的至少一者;

(ii) SEQ ID NO:80的E60和D72以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、S80和K82中的至少一者;

(iii) SEQ ID NO:80的D72和K82以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60和S80中的至少一者;

(iv) SEQ ID NO:80的E60、D72和K82以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58和S80中的至少一者;或者

(v) SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82。

38. 根据权利要求36或37所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与根据权利要求1至19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段竞争结合到

TIGIT。

39. 根据权利要求36或37所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中过量的所述抗体或其抗原结合片段与参考抗体以至少约55%、60%、65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%竞争结合到TIGIT,如在竞争性结合测定中所测量的,其中所述参考抗体包括具有包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链和具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链。

40. 根据权利要求1至19中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与人TIGIT的表位结合,所述表位包含SEQ ID NO 80的以下氨基酸残基中的至少一者:T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82。

## 抗TIGIT抗体

### 技术领域

[0001] 本文尤其提供了与TIGIT特异性结合的抗体,以及这些抗体用于治疗癌症和感染性疾病以及其他应用的用途。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2020年6月2日提交的美国临时专利申请63/033,609的优先权,该美国临时专利申请的公开内容全文以引用方式并入本文,包括任何附图。

[0004] 序列表的并入

[0005] 本申请包含序列表,该序列表据此全文以引用方式并入本文。命名为050658\_531001W0\_Sequence\_Listing\_ST25的附带序列表文本文件创建于2021年5月31日,并且为143KB。

### 背景技术

[0006] 在肿瘤中,存在高度抑制的微环境,其中T细胞和NK细胞的功能由细胞表面检查点受体调节,从而允许癌细胞避开免疫系统。抑制性检查点受体(诸如细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4)) 和程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 的功能阻断已经为患者带来了令人鼓舞的结果,从而引起了对寻求可能作为潜在干扰靶标的附加共抑制性分子的大量关注。

[0007] TIGIT(具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体)是一种在胞质尾部中具有基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序(ITIM)的免疫球蛋白超家族的成员,它是由调节性T细胞(Treg)、活化的T细胞和自然杀伤(NK)细胞表达的共抑制性受体。一些研究小组报道了,在多种肿瘤中,CD8<sup>+</sup>肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)和Treg上的TIGIT表达升高。研究还报道了,在血液中的HIV感染和淋巴组织中的SIV感染期间,效应子CD8<sup>+</sup>T细胞表现出更高水平的TIGIT。此外,TIGIT阻断在人T细胞培养物中表现出激活活性,并在不同肿瘤的动物模型中表现出治疗有益效果。因此,TIGIT在抗肿瘤免疫中起着重要作用,并且可充当用于管理癌症和其他各种疾病和病症的有前景的治疗靶标。因此,存在可干扰TIGIT结合的分子以用于有益的治疗目的的需求。

### 发明内容

[0008] 本公开尤其涉及抗TIGIT抗体。

[0009] 本文提供了一种抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,包括:(a)重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:36具有至少80%序列同一性的重链(HC)互补决定区(CDR)1、与SEQ ID NO:37具有至少80%序列同一性的HC-CDR2和与SEQ ID NO:38具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:39具有至少80%序列同一性的轻链(LC)CDR1、与SEQ ID NO:40具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:41具有至少80%序列同一性的LC-CDR3;(b)重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:42具有至少80%序列同一性的HC-CDR1、与SEQ ID NO:43具有至少80%序列同一性的HC-CDR2和与SEQ ID NO:44具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括与

SEQ ID NO:45具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:46具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:47具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (c) 重链可变区, 该重链可变区包括与SEQ ID NO:48具有至少80%序列同一性的HC-CDR1、与SEQ ID NO:49具有至少80%序列同一性的HC-CDR2和与SEQ ID NO:50具有至少80%序列同一性的HC-CDR3; 和轻链可变区, 该轻链可变区包括与SEQ ID NO:51具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:52具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:53具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (d) 重链可变区, 该重链可变区包括与SEQ ID NO:54具有至少80%序列同一性的HC-CDR1、与SEQ ID NO:55具有至少80%序列同一性的HC-CDR2和与SEQ ID NO:56具有至少80%序列同一性的HC-CDR3; 和轻链可变区, 该轻链可变区包括与SEQ ID NO:57具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:58具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:59具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (e) 重链可变区, 该重链可变区包括与SEQ ID NO:60具有至少80%序列同一性的HC-CDR1、与SEQ ID NO:61具有至少80%序列同一性的HC-CDR2和与SEQ ID NO:62具有至少80%序列同一性的HC-CDR3; 和轻链可变区, 该轻链可变区包括与SEQ ID NO:63具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:64具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (f) 重链可变区, 该重链可变区包括与SEQ ID NO:60具有至少80%序列同一性的HC-CDR1、与SEQ ID NO:66具有至少80%序列同一性的HC-CDR2和与SEQ ID NO:67具有至少80%序列同一性的HC-CDR3; 和轻链可变区, 该轻链可变区包括与SEQ ID NO:63具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:68具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (g) 重链可变区, 该重链可变区包括与SEQ ID NO:69具有至少80%序列同一性的HC-CDR1、与SEQ ID NO:55具有至少80%序列同一性的HC-CDR2和与SEQ ID NO:70具有至少80%序列同一性的HC-CDR3; 和轻链可变区, 该轻链可变区包括与SEQ ID NO:71具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:68具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (h) 重链可变区, 该重链可变区包括与SEQ ID NO:72具有至少80%序列同一性的HC-CDR1、与SEQ ID NO:73具有至少80%序列同一性的HC-CDR2和与SEQ ID NO:67具有至少80%序列同一性的HC-CDR3; 和轻链可变区, 该轻链可变区包括与SEQ ID NO:63具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:68具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; 或 (i) 重链可变区, 该重链可变区包括与SEQ ID NO:74具有至少80%序列同一性的HC-CDR1、与SEQ ID NO:75具有至少80%序列同一性的HC-CDR2和与SEQ ID NO:67具有至少80%序列同一性的HC-CDR3; 和轻链可变区, 该轻链可变区包括与SEQ ID NO:63具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:68具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3。

[0010] 在一些实施方案中, 抗TIGIT抗体或其抗原结合片段包括: (a) 与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:2具有至少80%序列同一性的轻链可变区; (b) 与SEQ ID NO:3具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:4具有至少80%序列同一性的轻链可变区; (c) 与SEQ ID NO:5具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:6具有至少80%序列同一性的轻链可变区; (d) 与SEQ ID NO:7具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的轻链可变区;

(e) 与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:10具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(f) 与SEQ ID NO:11具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:12具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(g) 与SEQ ID NO:13具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:14具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(h) 与SEQ ID NO:15具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:16具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(i) 与SEQ ID NO:17具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:12具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(j) 与SEQ ID NO:76具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:77具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(k) 与SEQ ID NO:78具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:77具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(l) 与SEQ ID NO:76具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:79具有至少80%序列同一性的轻链可变区；或(m) 与SEQ ID NO:78具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:79具有至少80%序列同一性的轻链可变区；

[0011] 本文提供了抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，该抗TIGIT抗体或其抗原结合片段与包含TIGIT的以下氨基酸残基中的至少一者的表位结合：SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82。在一些实施方案中，该抗TIGIT抗体与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合：SEQ ID NO:80的D72，以及SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、S80和K82中的至少一者。在一些实施方案中，该抗TIGIT抗体与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合：SEQ ID NO:80的E60和D72，以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、S80和K82中的至少一者。在一些实施方案中，该抗TIGIT抗体与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合：SEQ ID NO:80的D72和K82，以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60和S80中的至少一者。在一些实施方案中，该抗TIGIT抗体与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合：SEQ ID NO:80的E60、D72和K82，以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58和S80中的至少一者。在一些实施方案中，这些抗体具有如本文所述的CDR和可变序列的结构特征。

[0012] 本公开的抗TIGIT抗体可以是分离的抗体。在一些实施方案中，抗TIGIT抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。在一些实施方案中，抗TIGIT抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体、人源化抗体或贴面化抗体。在一些实施方案中，嵌合抗体包括人IgG1/kFab恒定结构域。在一些实施方案中，抗TIGIT抗体或其抗原结合片段是人抗体。在一些实施方案中，抗TIGIT抗体或其抗原结合片段抑制TIGIT与CD155的结合。

[0013] 本文提供了一种药物组合物，该药物组合物包含如本公开中描述的抗TIGIT抗体和药学上可接受的载体。

[0014] 本文提供了一种治疗癌症或实现癌症预防的方法，该方法包括向患有癌症或处于癌症风险的受试者施用本公开中描述的有效方案或治疗有效量的任何抗TIGIT抗体。在一些实施方案中，该癌症是血液癌。在一些实施方案中，该癌症是急性髓系白血病或成人T细胞白血病。在一些实施方案中，该癌症是实体瘤、非小细胞肺癌、黑素瘤、宫颈癌、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、胃癌、胃食管接合部腺癌或食道癌。在一些实施方案中，还向受试者施用肿瘤浸润T细胞。在一些实施方案中，还向受试者施用诱导针对癌症的免疫应答的疫苗。在一些实施方案中，该疫苗包括在癌细胞表面上表达的抗原或其片段。在一些实施方案中，还向受试者施用自然杀伤细胞，这些自然杀伤细胞对癌

症的细胞毒性通过抗体增强。在一些实施方案中,还向受试者施用与在癌细胞表面上表达的抗原特异性结合的第二抗体,由此该第二抗体对癌症的效应子介导的细胞毒性通过本公开的抗TIGIT抗体增强。在一些实施方案中,还向受试者施用与在免疫细胞表面上表达的抗原特异性结合的第二抗体。在一些实施方案中,该免疫细胞是T细胞或自然杀伤细胞。在一些实施方案中,该抗原是CTLA-4、PD-1或PD-L1。在一些实施方案中,还向受试者施用选自以下项组成的组的一种或多种疗法:化学疗法、放射疗法、基于细胞的疗法和外科手术。在一些实施方案中,还向受试者施用一种或多种免疫检查点受体或配体的抑制剂。在一些实施方案中,该一种或多种免疫检查点受体或配体选自以下项组成的组:CTLA-4、PD-1、PD-L1、TIM-3、LAG-3、PVRIG、BTLA、VISTA、CD96、A<sub>2a</sub>R、A<sub>2b</sub>R、A<sub>2a</sub>/A<sub>2b</sub>R、精氨酸酶、CD39、CD73、IDO和TDO。在一些实施方案中,该一种或多种免疫检查点受体或配体选自以下项组成的组:CTLA-4、PD-1、PD-L1、A<sub>2a</sub>R、A<sub>2b</sub>R、A<sub>2a</sub>/A<sub>2b</sub>R、精氨酸酶、CD39和CD73。在一些实施方案中,抑制剂选自以下项组成的组:伊匹单抗、曲美木单抗、纳武单抗、帕博利珠单抗(pembrolizumab/lambrolizumab)、西米普利单抗(cemiplimab)、替雷利珠单抗(tislelizumab)、赛帕利单抗、度伐利尤单抗和阿替利珠单抗。

[0015] 本文提供了一种帮助治疗癌症的方法,该方法包括向患有癌症的受试者施用本文所述的治疗有效量的任何抗TIGIT抗体。在一些实施方案中,该癌症是血液癌。在一些实施方案中,该癌症是急性髓系白血病或成人T细胞白血病。在一些实施方案中,该癌症是实体瘤、非小细胞肺癌、黑色素瘤、宫颈癌、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、胃癌、胃食管接合部腺癌或食道癌。在一些实施方案中,还向受试者施用由抗体活化的肿瘤浸润T细胞。在一些实施方案中,还向受试者施用诱导针对癌症的免疫应答的疫苗,该免疫应答通过抗体增强。在一些实施方案中,该疫苗包括在癌细胞表面上表达的抗原或其片段。在一些实施方案中,还向受试者施用自然杀伤细胞,这些自然杀伤细胞对癌症的细胞毒性通过本公开的抗TIGIT抗体增强。在一些实施方案中,还向受试者施用与在癌细胞表面上表达的抗原特异性结合的第二抗体,由此该第二抗体对癌症的效应子介导的细胞毒性通过本公开的抗TIGIT抗体增强。在一些实施方案中,还向受试者施用与在免疫细胞表面上表达的抗原特异性结合的第二抗体。在一些实施方案中,该免疫细胞是T细胞或自然杀伤细胞。在一些实施方案中,该抗原是CTLA-4、PD-1或PD-L1。在一些实施方案中,还向受试者施用选自以下项组成的组的一种或多种疗法:化学疗法、放射疗法、基于细胞的疗法和外科手术。在一些实施方案中,还向受试者施用一种或多种免疫检查点受体或配体的抑制剂。在一些实施方案中,该一种或多种免疫检查点受体或配体选自以下项组成的组:CTLA-4、PD-1、PD-L1、TIM-3、LAG-3、PVRIG、BTLA、VISTA、CD96、A<sub>2a</sub>R、A<sub>2b</sub>R、A<sub>2a</sub>/A<sub>2b</sub>R、精氨酸酶、CD39、CD73、IDO和TDO。在一些实施方案中,该一种或多种免疫检查点受体或配体选自以下项组成的组:CTLA-4、PD-1、PD-L1、A<sub>2a</sub>R、A<sub>2b</sub>R、A<sub>2a</sub>/A<sub>2b</sub>R、精氨酸酶、CD39和CD73。在一些实施方案中,抑制剂选自以下项组成的组:伊匹单抗、曲美木单抗、纳武单抗、帕博利珠单抗、西米普利单抗、替雷利珠单抗、赛帕利单抗、度伐利尤单抗和阿替利珠单抗。

[0016] 除非从实施方案或方面的上下文中明确或清楚地排除,否则本文所述的方面和实施方案中的每个方面和实施方案能够一起使用。

## 附图说明

[0017] 图1A示出了21F8的成熟VH (SEQ ID NO:1) 和21F8的成熟VL (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:36)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:37) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:38)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:39)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:40) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:41)。

[0018] 图1B示出了30M18的成熟VH (SEQ ID NO:3) 和30M18的成熟VL (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:42)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:43) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:44)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:45)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:46) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:47)。

[0019] 图1C示出了24F8的成熟VH (SEQ ID NO:5) 和24F8的成熟VL (SEQ ID NO:6) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:48)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:49) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:50)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:51)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:52) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:53)。

[0020] 图1D示出了5J24的成熟VH (SEQ ID NO:7) 和5J24的成熟VL (SEQ ID NO:8) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:54)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:55) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:56)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:57)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:58) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:59)。

[0021] 图1E示出了21B9的成熟VH (SEQ ID NO:9) 和21B9的成熟VL (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:60)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:61) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:62)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:63)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:64) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:65)。

[0022] 图1F示出了22B22的成熟VH (SEQ ID NO:11) 和22B22的成熟VL (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:60)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:66) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:67)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:63)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:68) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:65)。

[0023] 图1G示出了28P24的成熟VH (SEQ ID NO:13) 和28P24的成熟VL (SEQ ID NO:14) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:69)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:55) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:70)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:71)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:68) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:65)。

[0024] 图1H示出了21B16的成熟VH (SEQ ID NO:15) 和21B16的成熟VL (SEQ ID NO:16) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:72)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:73) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:67)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3

氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:63)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:68) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:65)。

[0025] 图1I示出了28012的成熟VH (SEQ ID NO:17) 和28012的成熟VL (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:74)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:75) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:67)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:63)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:68) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:65)。

[0026] 图1J示出了Hu24F8.1的成熟VH (SEQ ID NO:76) 和Hu24F8.1的成熟VL (SEQ ID NO:77) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:48)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:49) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:50)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:51)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:52) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:53)。

[0027] 图1K示出了Hu24F8.2的成熟VH (SEQ ID NO:78) 和Hu24F8.2的成熟VL (SEQ ID NO:77) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:48)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:49) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:50)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:51)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:52) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:53)。

[0028] 图1L示出了Hu24F8.3的成熟VH (SEQ ID NO:78) 和Hu24F8.3的成熟VL (SEQ ID NO:79) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:48)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:49) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:50)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:51)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:52) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:53)。

[0029] 图1M示出了Hu24F8.4的成熟VH (SEQ ID NO:76) 和Hu24F8.4的成熟VL (SEQ ID NO:79) 的氨基酸序列。将VH的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为HC-CDR1 (SEQ ID NO:48)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:49) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:50)。将VL的CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列加下划线,并且分别标识为LC-CDR1 (SEQ ID NO:51)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:52) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:53)。

[0030] 图2示出了能够与在食蟹猴CD4<sup>+</sup>细胞和CD8<sup>+</sup>细胞上表达的食蟹猴TIGIT结合的Ch24F8、Ch28012和Ch22B22。获得荧光强度 (gMFI) 的几何平均值,并且将数据呈现为相对于同种型对照的gMFI的倍数。

[0031] 图3A是示出人源化抗TIGIT抗体与过表达人TIGIT的CHO-K1细胞结合的图。

[0032] 图3B是示出人源化抗TIGIT抗体与过表达食蟹猴TIGIT的CHO-K1细胞结合的图。

[0033] 图4A是示出人源化抗TIGIT抗体与过表达小鼠TIGIT的CHO-K1细胞结合的图。

[0034] 图4B是示出人源化抗TIGIT抗体与过表达大鼠TIGIT的CHO-K1细胞结合的图。

[0035] 图5A是示出人源化抗TIGIT抗体与未活化的人CD8<sup>+</sup>T细胞结合的图。

[0036] 图5B是示出人源化抗TIGIT抗体与活化的人CD8<sup>+</sup>T细胞结合的图。

[0037] 图6是示出通过人源化抗TIGIT抗体抑制人CD155与过表达人TIGIT的CHO-K1细胞结合的图。

[0038] 图7是示出在Jurkat双报告基因细胞系阻断测定中通过人源化抗TIGIT抗体抑制

人CD155与人TIGIT结合的图。

[0039] 图8示出了Fab24F8与TIGIT的结合。

[0040] 图9示出了与Fab24F8具有氢键、盐桥和范德华相互作用的TIGIT残基。

[0041] 图10A和图10B示出了CD155与TIGIT的结合被Fab24F8阻断。图10A示出了与人TIGIT(表示为分子表面)结合的人CD155(以带状表示)的复杂结构的示意图。图10B示出了CD155以与图10A相同的取向叠加到与TIGIT结合的Fab24F8的晶体结构复合物的示意图上(各自由分子表面表示)。

[0042] 图11示出了单个受试者在存在Hu24F8.2-IgG1、AB122、AB122和Hu24F8.2-IgG1或同种型对照的情况下对SEA的IL-2应答。条形图和误差表示平均值±标准误差平均值。 $^{**}p<0.01$ ,  $^{***}p<0.001$ ,  $^{****}p<0.0001$ , 用Sidak的多重比较检验进行单因素方差分析(Hu24F8.2-IgG1对各个浓度的IgG1, 以及AB122+Hu24F8.2-IgG1对单独的AB122或单独的Hu24F8.2-IgG1)。

[0043] 图12A示出了在存在Hu24F8.2-IgG1或同种型对照的情况下健康受试者或癌症受试者PBMC对SEA的IL-2应答。每个符号表示单个受试者。 $^{*}p<0.05$ , 配对t检验。

[0044] 图12B示出了与AB122和Hu24F8.2-IgG1相比, 在存在AB122的情况下, 健康受试者PBMC的对SEA的IL-2应答。每个符号表示单个受试者。 $^{*}p<0.05$ , 配对t检验。

## 具体实施方式

[0045] 本公开尤其提供了与TIGIT的细胞外结构域特异性结合的抗体。本公开的抗体在本文中也称为“抗TIGIT抗体”, 这些抗体抑制TIGIT与CD155的结合, 并且可因此活化T细胞和/或NK细胞。这些抗体还可用于治疗癌症和感染性疾病以及其他应用的用途。下文进一步详细描述本公开的抗TIGIT抗体的附加结构和功能特征。

### [0046] I. 定义

[0047] 除非另有定义, 否则本文使用的所有技术术语、符号和其他科学术语或专门用语旨在具有本公开所属领域的技术人员通常理解的含义。在一些情况下, 为了清楚起见和/或便于参考, 本文中定义了具有通常理解的含义的术语, 并且本文中包含的此类定义不应被理解为与本领域的一般理解存在实质性差异。本文中描述或引用的许多技术和程序由本领域技术人员充分理解并且通常使用常规方法来采用。

[0048] 除非上下文另有明确规定, 否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代。例如, 术语“细胞”包括一个或多个细胞, 包括其混合物。“A和/或B”在本文中用于包括所有以下替代方案: “A”、“B”、“A或B”和“A和B”。

[0049] 术语“抗体”包括完整抗体及其结合片段, 这些完整抗体及其结合片段与单个抗原特异性结合, 或与多个抗原(例如, 多特异性抗体诸如双特异性抗体、三特异性抗体等)特异性结合。因此, 除非上下文另外要求, 否则对抗体的任何引用应理解是指完整形式的抗体或结合片段。在本公开的上下文中设想的附加功能性(例如, 抗原结合)包括抗PD-1、抗PD-L1、抗TIM-3、抗LAG-3、抗PVRIG、抗VISTA、抗CTLA-4、抗4-1BB、抗BTLA、抗CD39、抗CD73、抗OX40L和抗OX40片段。

[0050] 可与“抗原结合片段”互换使用的术语“结合片段”在本文中是指: 由包括一个或多个CDR的抗体的一部分形成的抗体片段, 或与抗原特异性结合但不包括完整的天然抗体结

构的任何其他抗体片段。抗原结合片段的示例包括但不限于双抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>c</sub>、Fv片段,二硫键稳定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)<sub>2</sub>、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定的双抗体(ds双抗体)、三抗体、四抗体、单链抗体分子(scFv)、scFv二聚体、多特异性抗体、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、微抗体、结构域抗体、二价结构域抗体、IgNAR、V-NAR和hcIgG。通常,结合片段与衍生它们的完整抗体竞争以用于特异性结合。。结合片段可通过重组DNA技术或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学分离来产生。

[0051] 与抗体相关的“Fab”是指该抗体的由通过二硫键与单条重链的可变区和第一恒定区结合的单条轻链(可变区和恒定区两者)组成的部分。

[0052] “Fab'”是指包括铰链区的一部分的Fab片段。

[0053] “F(ab')<sub>2</sub>”是指Fab'的二聚体。

[0054] 与抗体相关的“Fc”是指该抗体的由通过二硫键与第二重链的第二恒定区和第三恒定区结合的第一重链的第二恒定区和第三恒定区组成的部分。抗体的Fc部分负责各种效应子功能,诸如ADCC和CDC,但在抗原结合中不起作用。

[0055] 与抗体相关的“Fv”是指该抗体的最小片段,以承载完整的抗原结合位点。Fv片段由与单条重链的可变区结合的单条轻链的可变区组成。

[0056] “单链Fv抗体”或“scFv”是指由轻链可变区和重链可变区彼此直接连接或经由肽接头序列连接的工程化抗体(Huston J.S.等人,Proc Natl Acad Sci USA,第85卷:第5879页(1988年))。

[0057] “单链Fv-Fc抗体”或“scFv-Fc”是指由连接到抗体的Fc区的scFv组成的工程化抗体。

[0058] “骆驼化单结构域抗体”、“重链抗体”或“HCab”是指含有两个V<sub>H</sub>结构域并且不含轻链的抗体(Riechmann L.和Muyldermans S.,J Immunol Methods.,12月10日,第231卷第1-2期:第25-38页(1999年);Muyldermans S.,J Biotechnol.,6月,第74卷第4期:第277-302页(2001年);W094/04678;W094/25591;美国专利6,005,079)。重链抗体最初来源于骆驼科(骆驼、单峰骆驼和大羊驼)。尽管缺乏轻链,但骆驼化抗体具有真实的抗原结合库(Hamers-Casterman C.等人,Nature.,6月3日,第363卷第6428期:第446-448页(1993年);Nguyen V.K.等人,“Heavy-chain antibodies in Camelidae;a case of evolutionary innovation”,Immunogenetics.,4月,第54卷第1期:第39-47页(2002年);Nguyen V.K.等人,Immunology.,5月,第109卷第1期:第93-101页(2003年))。重链抗体(VHH结构域)的可变结构域表示由适应性免疫应答产生的最小已知抗原结合单元(Koch-Nolte F.等人,FASEB J.,11月,第21卷第13期:第3490-3498页。电子出版于2007年6月15日(2007年))。

[0059] “纳米抗体”是指由来自重链抗体和两个恒定结构域CH2和CH3的VHH结构域组成的抗体片段。

[0060] “双抗体”包括具有两个抗原结合位点的小抗体片段,其中这些片段包括以相同多肽链连接到V<sub>L</sub>结构域的V<sub>H</sub>结构域(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>或V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>) (参见例如,Holliger P.等人,Proc Natl Acad Sci USA.,7月15日,第90卷第14期:第6444-6448页(1993年);EP404097;W093/11161)。通过使用太短而不允许同一链上的两个结构域之间配对的接头,迫使这两个结构域与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。抗原结合位点可靶向相同或不同的抗原(或表位)。

[0061] “结构域抗体”是指仅含有重链的可变区或轻链的可变区的抗体片段。在某些情况下,两个或更多个 $V_H$ 结构域与肽接头共价连接以产生二价或多价结构域抗体。二价结构域抗体的这两个 $V_H$ 结构域可靶向相同或不同的抗原。

[0062] 在某些实施方案中,“(dsFv)<sub>2</sub>”包括三条肽链:两个 $V_H$ 部分,其通过肽接头连接并且通过二硫桥与两个 $V_L$ 部分结合。

[0063] 在某些实施方案中,“双特异性ds双抗体”包括经由 $V_{H1}$ 和 $V_{L1}$ 之间的二硫桥与 $V_{L1}$ - $V_{H2}$ (通过肽接头连接)结合的 $V_{H1}$ - $V_{L2}$ (也通过肽接头连接)。

[0064] 在某些实施方案中,“双特异性dsFv”或“dsFv-dsFv'”包括三条肽链: $V_{H1}$ - $V_{H2}$ 部分,其中重链通过肽接头(例如,长的柔性接头)连接并且经由二硫桥分别与 $V_{L1}$ 部分和 $V_{L2}$ 部分结合,其中每个二硫键配对的重链和轻链具有不同的抗原特异性。

[0065] 在某些实施方案中,“ScFv二聚体”是二价双抗体或二价ScFv(BsFv),包括 $V_H$ - $V_L$ (通过肽接头连接),其与另一个 $V_H$ - $V_L$ 部分二聚,使得一个部分的 $V_H$ 's与另一部分的 $V_L$ 's配位,并形成可靶向相同抗原(或表位)或不同抗原(或表位)的两个结合位点。在其他实施方案中,“ScFv二聚体”是双特异性双抗体,包括 $V_{H1}$ - $V_{L2}$ (通过肽接头连接),其与 $V_{L1}$ - $V_{H2}$ (也通过肽接头连接)缔合,使得 $V_{H1}$ 与 $V_{L1}$ 配位, $V_{H2}$ 与 $V_{L2}$ 配位,并且每个配位对都具有不同的抗原特异性。“分离的”抗体是已经与其天然环境的组分分离的抗体。在一些实施方案中,将分离的抗体纯化至大于95%或99%纯度,如通过本领域已知的方法测定的。

[0066] 如本文所用,“单克隆抗体”是指来源于单个拷贝或克隆(包括,例如,任何真核克隆、原核克隆或噬菌体克隆)的抗体。“单克隆抗体”不限于通过任何特定方法产生的抗体。例如,可使用杂交瘤技术以及重组技术、噬菌体展示技术、合成技术或这类技术与本领域中众所周知的其他技术的组合来产生单克隆抗体。

[0067] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指含有来自人抗体和非人抗体(例如小鼠或大鼠)两者的序列的抗体。

[0068] 如本文所用,术语“人抗体”意指抗体具有氨基酸序列或由氨基酸序列组成,特别是与由人或人免疫细胞产生的抗体对应的抗体的抗原结合残基,或来源于非人来源(诸如利用人抗体库或其他人抗体编码序列的转基因非人动物)。在某些实施方案中,完全人抗体不包含来源于非人抗体的氨基酸残基(特别是抗原结合残基)。

[0069] 碱性抗体结构单元(例如,由天然的完整抗体所例示的)是亚基的四聚体。每个四聚体包括两对相同的多肽链,每对多肽链具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50kDa至70kDa)。每条链的氨基末端部分包括约100至110或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。该可变区最初表达为与可切割信号肽连接。没有信号肽的可变区有时被称为成熟可变区。因此,例如,轻链成熟可变区意指没有轻链信号肽的轻链可变区。每条链的羧基末端部分限定了主要负责效应子功能的恒定区。

[0070] 轻链被分类为 $\kappa$ 或 $\lambda$ 。重链被分类为 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 或 $\epsilon$ ,并且将抗体的同种型分别定义为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过具有约12个或更多个氨基酸的“J”区连接,其中重链还包括具有约10个或更多个氨基酸的“D”区。(一般参见Fundamental Immunology(Paul,W.编辑,第2版,Raven Press,N.Y.,1989年),第7章)(全文以引用方式并入以用于所有目的)。

[0071] 每个轻链/重链对的成熟可变区形成抗体结合位点。因此,完整的天然抗体具有两

个相同的结合位点；双特异性抗体具有两个不相同的结合位点；三特异性抗体具有三个不相同的结合位点；等等。重链和轻链的成熟可变区全部表现出通过三个高变区（也称为互补决定区或CDR）连接的相对保守的框架区（FR）的相同通用结构。来自每对的两条链的CDR通过框架区进行比对，使得能够结合到特异性表位。从N末端到C末端，轻链和重链均包含FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4结构域。每个结构域的氨基酸分配根据以下文献中的定义进行：Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987年和1991年)，或Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* 第196卷：第901-917页 (1987年)；Chothia等人, *Nature*, 第342卷：第878-883页 (1989年)。Kabat还提供了一种广泛使用的编号惯例 (Kabat编号)，其中不同重链之间或不同轻链之间的对应残基被分配相同的编号。

[0072] 术语“表位”是指与抗体结合的抗原上的位点。表位可由邻接氨基酸或通过一个或多个蛋白质的三级折叠而并置的非邻接氨基酸形成。由邻接氨基酸形成的表位（也称为线性表位）通常在暴露于变性溶药剂时保留，而由三级折叠形成的表位（也称为构象表位）通常在用变性溶药剂处理时丧失。表位通常在独特的空间构象中包含至少3个并且更常见的至少5个或8-10个氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括例如X射线晶体学和二维核磁共振。参见例如，“*Epitope Mapping Protocols*”，*Methods in Molecular Biology*，第66卷，Glenn E. Morris编辑，(1996年)。

[0073] 可在显示一种抗体与另一种抗体与靶抗原的结合竞争的能力的简单免疫测定中鉴定识别相同或重叠表位的抗体。抗体的表位也可通过结合到其抗原以鉴定接触残基的抗体的X射线晶体学来定义。另选地，如果抗原中减少或消除一种抗体的结合的所有氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合，则两种抗体具有相同的表位。如果减少或消除一种抗体的结合的一些但不是全部氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合，则两种抗体具有重叠表位。

[0074] 抗体之间的竞争通过其中抗体在测试条件下抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合的测定来确定（参见例如Junghans等人, *Cancer Res.*，第50卷：第1495页，1990年）。如果过量（例如，至少2x、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、15x、20x、25x、30x、35x、40x、45x、50x、60x、70x、80x、90x、100x或更多，包括在这些值之间的数字）的测试抗体将参考抗体的结合抑制至少约50%（诸如至少约75%、90%或99%），则测试抗体与参考抗体竞争。在其他实施方案中，如果过量的测试抗体将参考抗体的结合抑制至少约55%、60%、65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任一者，如在竞争性结合测定中测量的，则测试抗体与参考抗体竞争。通过竞争测定鉴定的抗体（竞争性抗体）包括结合到与参考抗体相同的表位的抗体，以及结合到与参考抗体所结合的表位足够接近的相邻表位以发生空间位阻的抗体。参考抗体可以是可商购获得的功能类似于治疗性抗体候选物的单克隆抗体、功能上与所关注的靶蛋白相互作用的多克隆抗体或根据公共结构域中可用的序列重新构建的抗体。例如但不限于，与TIGIT结合的参考抗体包括重链和轻链，该重链具有包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列，并且该轻链具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

[0075] 如本文所用，术语“特异性结合”和“与…特异性结合”是指可测量和可重复的相互

作用,诸如抗原(例如TIGIT)与抗体之间的结合。例如,与抗原特异性结合的抗体是与其结合其他抗原相比以更大的亲和力、亲合力、更容易地和/或以更长的持续时间结合该靶标的抗体。抗原的亲和力与分子平衡解离常数(KD)是逆相关的。通过低KD值测量对抗原的高亲和力和。如本文所用,与抗原特异性结合的抗体对该抗原的KD为 $10^{-6}$ M或更低、另选地 $10^{-7}$ M或更低、另选地 $10^{-8}$ M或更低、另选地 $10^{-9}$ M或更低、另选地 $10^{-10}$ M或更低、另选地 $10^{-11}$ M或更低;或者KD在 $10^{-6}$ M至 $10^{-13}$ M、或 $10^{-9}$ M至 $10^{-13}$ M、或 $10^{-9}$ M至 $10^{-12}$ M、或 $10^{-10}$ M至 $10^{-13}$ M、或 $10^{-10}$ M至 $10^{-12}$ M、或 $10^{-11}$ M至 $10^{-13}$ M、或 $10^{-10}$ M至 $10^{-11}$ M、或 $10^{-11}$ M至 $10^{-12}$ M范围内,如通过表面等离子体共振测量的。在一个实施方案中,术语“特异性结合”是指其中分子与特定多肽结合或与特定多肽上的表位结合而基本上不与任何其他多肽或多肽表位结合的结合。

[0076] 如本文所用,“个体”或“受试者”包括动物诸如人(例如,人个体)和非人动物。在一些实施方案中,“个体”或“受试者”是在医师护理下的患者。因此,该受试者可以是人患者,或者有风险患有或疑似患有所关注疾病(例如,癌症)和/或该疾病的一种或多种症状的个体。该受试者还可以是在诊断时或之后被诊断出具有所关注病症风险的个体。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物(例如啮齿动物,例如小鼠)、非人灵长类动物和其他哺乳动物(诸如绵羊、狗、牛、鸡)和非哺乳动物(诸如两栖动物、爬行动物等)。

[0077] 如本文所用,与参考氨基酸序列的氨基酸残基“对应(corresponds to/corresponding to/correspondence with)”的所关注氨基酸序列的氨基酸残基表示所关注序列的氨基酸残基位于与参考氨基酸序列中列举的残基同源或等效的位置处。本领域技术人员可确定多肽(诸如TIGIT多肽)中的特定氨基酸残基位置是否与同源参考序列的特定氨基酸残基位置对应。例如,TIGIT多肽的序列可使用已知技术(例如,基于局部比对的搜索工具(BLAST)、ClustalW2、基于结构的序列比对程序(STRAP)等)来与参考序列的序列比对。此外,参考序列的晶体结构坐标可用于帮助确定同源多肽残基的三维结构(Stengel等人,Proc.,Natl.Acad.Sci.USA,第109卷:第5399-5404页,2012年)。在另一方面,可通过以三级结构水平确定同源性来鉴定等效残基。使用此类方法,可根据参考序列的对应氨基酸残基位置编号来编号TIGIT多肽变体的氨基酸残基。例如,SEQ ID NO:80的氨基酸序列可用于确定表位或所关注的人TIGIT变体的每个氨基酸残基的氨基酸残基位置编号。在一些实施方案中,如果一个氨基酸序列与另一氨基酸序列共享至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性,则该氨基酸序列与该另一氨基酸序列对应。

[0078] 出于将氨基酸置换分类为保守性或非保守性的目的,氨基酸分组如下:组I(疏水性侧链):met,ala,val,leu,ile;组II(中性亲水性侧链):cys,ser,thr;组III(酸性侧链):asp,glu;组IV(碱性侧链):asn,gln,his,lys,arg;组V(影响链取向的残基):gly,pro;和组VI(芳族侧链):trp,tyr,phe。保守置换涉及同一类别中的氨基酸之间的置换。非保守置换包括将这些类别中的一个类别的成员与另一个类别的成员交换。

[0079] 百分比序列同一性是通过Kabat编号惯例最大程度比对抗体序列来确定的。比对照后,如果将主题抗体区(例如重链或轻链的整个成熟可变区)与参考抗体的相同区进行比较,主题抗体区和参考抗体区之间的序列同一性百分比是主题抗体区和参考抗体区两者中相同氨基酸占据的位置数除以两个区的比对位置总数,其中空位未计数,乘以100以转化为百分比。

[0080] “包含”或“包括”(或它们的任何语法变体)一个或多个所列举的元素的组合物或方法可包括其他未具体列举的元素。例如,包含抗体的组合物可包含单独的或与其他成分组合的抗体。

[0081] 本文呈现的某些范围的数值前面有术语“约”。用于本文的术语“约”具有其原始含义“近似”并且为其前面的确切数字以及接近或近似该术语前面数字的数字提供字面支持。在确定数字是否接近或近似具体列举的数字时,接近或近似的未列举的数字可以是在呈现其的上下文中提供具体列举的数字的基本等效的数字。例如,如果根据上下文不以另外的方式明确该近似程度,则“约”意指在所提供的值的 $\pm 10\%$ 内,或四舍五入成最接近的有效数字,在所有情况下包括所提供的值。在提供范围的情况下,它们包括边界值。

[0082] 如本文所用,术语“基本上”及其任何语法变体是广泛的术语,并且以其普通含义使用,包括但不限于几乎完全,或很大程度上但不完全。例如,该术语可以是指可能不是100%全部数值的数值,其中该数值可以是该全部数值的小于0.1%、小于0.5%、小于约1%、小于约2%、小于约3%、小于约4%、小于约5%、小于约6%、小于约7%、小于约8%、小于约9%、小于约10%、小于约11%、小于约12%、小于约13%、小于约14%、小于约15%、小于约16%、小于约17%、小于约18%、小于约19%或小于约20%。例如,当受试者抗体或其抗原结合片段与对应的参考抗体或其抗体结合片段具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%的序列同一性时,该受试者抗体或其抗原结合片段可基本上来自该对应的参考抗体或其抗原结合片段。在另一示例中,当受试者抗体中的CDR与参考抗体中的对应CDR具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性时,该受试者抗体中的CDR可基本上来自该参考抗体中的对应CDR。在又一示例中,非限制地,当参照参考抗体中的对应CDR,受试者抗体中的CDR中不超过两个氨基酸被取代、删除或添加时,该受试者抗体中的CDR基本上可来自该参考抗体中的对应CDR。

[0083] 应当理解,为了清楚起见,在单独实施方案的上下文中描述的本公开的某些特征也可以在单个实施方案中以组合方式提供。相反,为了简洁起见,在单个实施方案的上下文中描述的本公开的各种特征也可以单独提供或以任何合适的子组合提供。本公开具体涵盖了与本公开有关的实施方案的所有组合,并且在本文中就如同每种组合都是单独且明确地公开的那样公开。此外,本公开还具体涵盖了各种实施方案及其元素的所有子组合,并且在本文中就如同每种此类子组合都是单独且明确地公开的那样公开。

## [0084] II. 靶分子

[0085] 除非另外指明,否则TIGIT意指人TIGIT(hTIGIT)。Cyno TIGIT或cTIGIT是指食蟹猴TIGIT。

[0086] 示例性的hTIGIT序列被分配Swiss-Prot登录号Q495A1。完整的hTIGIT序列具有244个氨基酸(SEQ ID NO:80),其中氨基酸1至21是信号肽,并且22至244构成成熟蛋白质(SEQ ID NO:81)。大约残基22至141构成hTIGIT的细胞外结构域(SEQ ID NO:82)。大约残基142至162构成hTIGIT的跨膜结构域,并且大约残基163至244构成hTIGIT的细胞质结构域。在一些实施方案中,细胞外结构域hTIGIT是带HIS标签的(SEQ ID NO:83)。示例性的食蟹猴TIGIT序列被分配Swiss-Prot A0A2K5UW92。完整的食蟹猴TIGIT序列具有312个氨基酸(SEQ

ID NO:84)。在一些实施方案中,食蟹猴TIGIT的细胞外结构域是带HIS标签的(SEQ ID NO:85)。

[0087] 除非另外指明,否则CD155是指该蛋白质的人形式。人CD155的示例性人序列被指定为Swiss-Prot P15151,其是具有417个氨基酸的蛋白质,该蛋白质的大约残基1至20是信号肽,21至343构成细胞外结构域(SEQ ID NO:86),344至367构成跨膜结构域,并且368至417构成细胞质结构域。

[0088] 除非上下文另有明确规定,否则提及上述蛋白质之一是指至少该蛋白质的细胞外结构域,并且通常是指除可切割信号肽之外的完整蛋白质的细胞外结构域。

[0089] III. 本公开的抗体

[0090] A. 结合特异性和功能特性

[0091] 本公开提供了与TIGIT特异性结合,更具体地与TIGIT蛋白的细胞外结构域内的表位结合的抗体。在某些实施方案中,本公开的抗TIGIT抗体对TIGIT的KD为 $10^{-8}$ M或更低(例如, $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 等),如通过表面等离子体共振(SPR)测量的。在各种实施方案中,本公开的抗TIGIT抗体对TIGIT的KD在约 $1 \times 10^{-9}$ M至约 $1 \times 10^{-13}$ M、或约 $1 \times 10^{-9}$ M至约 $1 \times 10^{-12}$ M、或约 $1 \times 10^{-10}$ M至约 $1 \times 10^{-13}$ M、或约 $1 \times 10^{-10}$ M至约 $1 \times 10^{-12}$ M、或约 $1 \times 10^{-11}$ M至约 $1 \times 10^{-13}$ M、或约 $1 \times 10^{-10}$ M至约 $1 \times 10^{-11}$ M、或约 $1 \times 10^{-11}$ M至约 $1 \times 10^{-12}$ M的范围内。指定为21F8、30M18、24F8、5J24、21B9、22B22、28P24、21B16和28012的抗体是九种此类示例性小鼠抗体。指定为Ch22B22、Ch21B16、Ch28012、Ch5J24、Ch21B9、Ch24F8和Ch30M18的抗体是七种此类示例性嵌合体抗体。指定为Hu24F8.1、Hu24F8.2、Hu24F8.3和Hu24F8.4的抗体是示例性人源化抗体。小鼠抗体和人源化抗体的重链和轻链成熟可变区以及CDR的序列分别示出在表1和表2中。

[0092] 表1. 重链和轻链成熟可变区的序列

[0093]

| 抗体       | 重链可变区        | 轻链可变区        |
|----------|--------------|--------------|
| 21F8     | SEQ ID NO:1  | SEQ ID NO:2  |
| 30M18    | SEQ ID NO:3  | SEQ ID NO:4  |
| 24F8     | SEQ ID NO:5  | SEQ ID NO:6  |
| 5J24     | SEQ ID NO:7  | SEQ ID NO:8  |
| 21B9     | SEQ ID NO:9  | SEQ ID NO:10 |
| 22B22    | SEQ ID NO:11 | SEQ ID NO:12 |
| 28P24    | SEQ ID NO:13 | SEQ ID NO:14 |
| 21B16    | SEQ ID NO:15 | SEQ ID NO:16 |
| 28012    | SEQ ID NO:17 | SEQ ID NO:12 |
| Hu24F8.1 | SEQ ID NO:76 | SEQ ID NO:77 |
| Hu24F8.2 | SEQ ID NO:78 | SEQ ID NO:77 |
| Hu24F8.3 | SEQ ID NO:78 | SEQ ID NO:79 |
| Hu24F8.4 | SEQ ID NO:76 | SEQ ID NO:79 |

[0094] 表2. 重链和轻链CDR的序列(Kabat定义)

|        |       |                           |                           |                           |                           |                           |                           |
|--------|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| [0095] | 抗体    | HC-CDR1<br>(SEQ ID<br>NO) | HC-CDR2<br>(SEQ ID<br>NO) | HC-CDR3<br>(SEQ ID<br>NO) | LC-CDR1<br>(SEQ ID<br>NO) | LC-CDR2<br>(SEQ ID<br>NO) | LC-CDR3<br>(SEQ ID<br>NO) |
|        | 21F8  | 36                        | 37                        | 38                        | 39                        | 40                        | 41                        |
|        | 30M18 | 42                        | 43                        | 44                        | 45                        | 46                        | 47                        |
| [0096] | 24F8  | 48                        | 49                        | 50                        | 51                        | 52                        | 53                        |
|        | 5J24  | 54                        | 55                        | 56                        | 57                        | 58                        | 59                        |
|        | 21B9  | 60                        | 61                        | 62                        | 63                        | 64                        | 65                        |
|        | 22B22 | 60                        | 66                        | 67                        | 63                        | 68                        | 65                        |
|        | 28P24 | 69                        | 55                        | 70                        | 71                        | 68                        | 65                        |
|        | 21B16 | 72                        | 73                        | 67                        | 63                        | 68                        | 65                        |
|        | 28O12 | 74                        | 75                        | 67                        | 63                        | 68                        | 65                        |

[0097] 本公开的一些抗体与和以下抗体相同或重叠的表位结合：指定为21F8、30M18、24F8、5J24、21B9、22B22、28P24、21B16或28O12的抗体，或指定为Hu24F8.1、Hu24F8.2、Hu24F8.3和Hu24F8.4的抗体。可通过用包括期望表位的TIGIT或其一部分对小鼠进行免疫，以及任选地与21F8、30M18、24F8、5J24、21B9、22B22、28P24、21B16、28O12、Hu24F8.1、Hu24F8.2、Hu24F8.3或Hu24F8.4竞争来筛选与TIGIT的细胞外结构域结合的所得抗体，从而产生具有此类结合特异性的其他抗体。还可针对TIGIT抗原的诱变形式筛选抗体，以鉴定与21F8、30M18、24F8、5J24、21B9、22B22、28P24、21B16、28O12、Hu24F8.1、Hu24F8.2、Hu24F8.3或Hu24F8.4的突变变化集合示出相同或相似的结合特征的抗体。突变可在TIGIT抗体的整个细胞外结构域或通过其中已知表位所在的部分以一定时间或更广泛地间隔的时间被丙氨酸(或丝氨酸，如果已经存在丙氨酸)残基系统性置换取代。在一些实施方案中，本公开的一些抗体与TIGIT的以下表位残基中的至少一者结合：SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82。在一些实施方案中，本公开的一些抗体与TIGIT的以下表位残基中的两者、三者、四者、五者或六者结合：SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82。在一些实施方案中，本公开的一些抗体与TIGIT的以下表位残基结合：T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82。在一些实施方案中，该抗TIGIT抗体与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合：SEQ ID NO:80的D72，以及SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、S80和K82中的至少一者。在一些实施方案中，该抗TIGIT抗体与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合：SEQ ID NO:80的E60和D72，以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、S80和K82中的至少一者。在一些实施方案中，该抗TIGIT抗体与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合：SEQ ID NO:80的D72和K82，以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60和S80中的至少一者。在一些实施方案中，该抗TIGIT抗体与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合：SEQ ID NO:80的E60、D72和K82，以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58和S80中的至少一者。

[0098] 具有所选鼠抗体(例如，21F8、30M18、24F8、5J24、21B9、22B22、28P24、21B16或28O12)或所选人源化抗体(例如，Hu24F8.1、Hu24F8.2、Hu24F8.3或Hu24F8.4)的结合特异性的抗体还可使用噬菌体展示方法的变体产生。参见Winter, WO 92/20791。该方法特别适合于产生人抗体。在该方法中，所选鼠抗体的重链或轻链可变区用作起始材料。例如，如果选择轻链可变区作为起始材料，则构建噬菌体文库，其中成员展示相同的轻链可变区(即，鼠起始材料)和不同的重链可变区。重链可变区可例如从重排的人重链可变区的文库获得。选择了显示对TIGIT具有强特异性结合(例如，至少 $10^8\text{M}^{-1}$ 或至少 $10^9\text{M}^{-1}$ )的噬菌体。然后，来自

该噬菌体的重链可变区用作构建另外的噬菌体文库的起始材料。在该文库中,每个噬菌体展示相同的重链可变区(即,根据第一展示文库鉴定的区域)和不同的轻链可变区。轻链可变区可例如从重排的人可变轻链区的文库获得。同样,选择了显示对TIGIT具有强特异性结合的噬菌体。所得抗体通常具有与鼠起始材料相同或相似的表位特异性。

[0099] 一些抗体具有完全或基本上来自mAb 21F8的成熟重链可变区和成熟轻链区,该成熟重链可变区包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,并且该成熟轻链区包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。一些抗体具有完全或基本上来自mAb 30M18的成熟重链可变区和成熟轻链区,该成熟重链可变区包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,并且该成熟轻链区包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。一些抗体具有完全或基本上来自mAb 24F8的成熟重链可变区和成熟轻链区,该成熟重链可变区包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,并且该成熟轻链区包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。一些抗体具有完全或基本上来自mAb 5J24的成熟重链可变区和成熟轻链区,该成熟重链可变区包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,并且该成熟轻链区包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。一些抗体具有完全或基本上来自mAb 21B9的成熟重链可变区和成熟轻链区,该成熟重链可变区包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,并且该成熟轻链区包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。一些抗体具有完全或基本上来自mAb 22B22的成熟重链可变区和成熟轻链区,该成熟重链可变区包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,并且该成熟轻链区包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。一些抗体具有完全或基本上来自mAb 28P24的成熟重链可变区和成熟轻链区,该成熟重链可变区包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,并且该成熟轻链区包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。一些抗体具有完全或基本上来自mAb 21B16的成熟重链可变区和成熟轻链区,该成熟重链可变区包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,并且该成熟轻链区包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。一些抗体具有完全或基本上来自mAb 28012的成熟重链可变区和成熟轻链区,该成熟重链可变区包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,并且该成熟轻链区包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。CDR可由任何常规定义进行定义,包括Kabat、Chothia、Kabat和Chothia复合编号、AbM或Contact定义,如下文表3所示:

[0100] 表3.

| 环  | Kabat                   | AbM       | Chothia      | Contact   |
|----|-------------------------|-----------|--------------|-----------|
| L1 | L-24--L34               | L24--34   | L24--L34     | L30--L36  |
| L2 | L50--L56                | L50--L56  | L50--L56     | L46--L55  |
| L3 | L89--L97                | L89--97   | L89--L97     | L89--L96  |
| H1 | H31--H35B<br>(Kabat 编号) | H26--H35b | H26--H32..34 | H30--H35B |
| H1 | H31-H35<br>(Chothia 编号) | H26--H35  | H26--H32     | H30--H35  |
| H2 | H50--H65                | H50--H58  | H52--H56     | H47--H58  |
| H3 | H95--H102               | H95--H102 | H95--H102    | H93--H10  |

[0102] 可通过诱变编码示例性抗体(诸如21F8、30M18、24F8、5J24、21B9、22B22、28P24、21B16或28012)的重链和轻链的cDNA来获得其他抗体。与成熟重链和/或轻链可变区的氨基酸序列中的21F8、30M18、24F8、5J24、21B9、22B22、28P24、21B16或28012具有约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的至少任一者的同一性并保持其功能特性的抗体,和/或与相应抗体仅有少量功能上无关紧要的氨基酸取代(例如,保守取代)、缺失或插入不同的抗体也

包括在本公开中。可变区框架中可能对结合很重要的氨基酸可如下文关于人源化的部分所述进行鉴定。具有至少一个如Kabat所定义的CDR并且在一些实施方案中具有全部六个CDR的抗体也包括在内,这些CDR与21F8、30M18、24F8、5J24、21B9、22B22、28P24、21B16或28O12的对应CDR具有约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任一者的同一性。

[0103] 在一些实施方案中,抗体具有以下特征中的一者或多者:(i) 抑制人TIGIT与人CD155的结合;(ii) 抑制TIGIT与其他配体(诸如CD112和CD113)的结合;(iii) 增加抗原特异性T细胞应答;(iv) 活化自然杀伤细胞;(v) 刺激固有的T细胞活化;以及(vi) 刺激一种或多种免疫调节细胞因子的产生和/或通过T细胞和免疫系统的其他细胞减少一种或多种免疫抑制细胞因子的产生。

[0104] 在一些实施方案中,本文所述的抗体完全或部分抑制TIGIT与CD155的结合。本公开的抗TIGIT抗体可抑制此类相互作用,其中抑制的半最大抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为约0.1nM至约10nM,或约0.1nM至约8nM,或约0.1nM至约5nM,或约0.1nM至约4nM,或约0.1nM至约3nM,或约0.1nM至约2nM,或约0.1nM至约1nM,如实施例1中所测量的。在某些实施方案中,本公开的一些抗TIGIT抗体可抑制TIGIT与CD155的结合,其中IC<sub>50</sub>为约0.1nM至约2nM,或约0.2nM至约2nM,如实施例1中所测量的。在某些实施方案中,本公开的一些抗TIGIT抗体可抑制TIGIT与CD155的结合,其中IC<sub>50</sub>为约0.2nM至约2nM、约0.2nM至约0.8nM、约0.4nM至约0.8nM,或约0.6nM至约0.8nM,如实施例1中所测量的。一些抗体可抑制此类相互作用,其中抑制的半最大抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为约25ng/ml至300ng/ml、25ng/ml至75ng/ml、25ng/ml至50ng/ml、40ng/ml至75ng/ml、50ng/ml至75ng/ml、50ng/ml至90ng/ml、50ng/ml至100ng/ml、75ng/ml至100ng/ml、50ng/ml至150ng/ml、75ng/ml至175ng/ml、100ng/ml至200ng/ml、125ng/ml至225ng/ml、100ng/ml至250ng/ml、150ng/ml至300ng/ml、175ng/ml至250ng/ml、200ng/ml至300ng/ml、25ng/ml至275ng/ml、250ng/ml至300ng/ml、49±10%ng/ml、65±10%ng/ml或76±10%ng/ml中的任一者,如实施例1中所测量的。在其他实施方案中,抗体可完全或部分抑制TIGIT与CD155的结合,其中IC<sub>50</sub>为至少约25ng/ml、50ng/ml、75ng/ml、100ng/ml、125ng/ml、150ng/ml、175ng/ml、200ng/ml、225ng/ml、250ng/ml、275ng/ml或300ng/ml或更多中的任一者,包括落入这些值之间的浓度。此外,一些抗体可将抗原特异性T细胞应答增加到1.5倍至3倍,诸如约1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍或3倍或更多倍中的任一者。另选地或除此之外,一些抗体可通过NK细胞和/或T细胞将IL-2、IL-6、TNF $\alpha$ 和TNF $\gamma$ 中的一者、两者、三者或全部的产量增加到1.5倍至3倍,诸如约1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍或3倍或更多倍中的任一者。另选地或除此之外,一些抗体可将固有T细胞活化增加到1.5倍至3倍,诸如约1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍或3倍或更多倍中的任一者。另选地或除此之外,一些抗体可抑制癌症或感染性疾病,如动物模型或临床试验中所示。将人类癌细胞注射到免疫缺陷实验室动物(诸如小鼠或大鼠)体内的癌症动物模型是广泛可用的。

[0105] 在示例性实施方案中,抗体与TIGIT特异性结合并且包括完全或基本上来自抗体24F8的成熟重链可变区和成熟轻链区,该成熟重链可变区包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-

CDR3,并且该成熟轻链区包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在各种实施方案中,抗体可:(i)具有通过表面等离子体共振测量的约 $0.01 \times 10^{-11}$ M至约 $100 \times 10^{-11}$ M、约 $0.1 \times 10^{-11}$ M至约 $100 \times 10^{-11}$ M、约 $0.1 \times 10^{-11}$ M至约 $10 \times 10^{-11}$ M、约 $1 \times 10^{-11}$ M至约 $100 \times 10^{-11}$ M的平衡结合常数(KD);和/或(ii)阻断可溶性人CD155配体与细胞表面人TIGIT的结合,其中半最大抑制浓度(IC50)为约0.2nM至约2nM、约0.2nM至约0.8nM、约0.4nM至约0.8nM,或约0.6nM至约0.8nM,如实施例1中所测量的。另选地和/或除了上述单独结合和阻断特性或它们的组合之外,在一些实施方案中,抗体与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合:(i)SEQ ID NO:80的D72,以及SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、S80和K82中的至少一者;(ii)SEQ ID NO:80的E60和D72,以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、S80和K82中的至少一者;(iii)SEQ ID NO:80的D72和K82,以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60和S80中的至少一者;(iv)SEQ ID NO:80的E60、D72和K82,以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58和S80中的至少一者;或(v)SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82。

[0106] 人源化抗体或嵌合抗体在体内的半衰期相对于起始小鼠抗体增加。例如,在人类中,所得半衰期可以是10天至50天。半衰期可通过药代动力学研究进行测量,诸如Kim等人, *Eur J of Immunol*,第24卷:第542页(1994年)中所述。

#### [0107] B. 非人抗体

[0108] 抗TIGIT的其他非人抗体(例如,鼠、豚鼠、灵长类动物、兔、鸡或大鼠)的生产可通过例如用TIGIT或其片段或携带TIGIT的细胞对动物进行免疫而实现。参见Harlow和Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988年)(以引用方式并入以用于所有目的)。此类免疫原可通过肽合成或通过重组表达从天然来源获得。任选地,免疫原可与载体蛋白融合或以其他方式复合而施用。任选地,免疫原可与佐剂一起施用。如下所述,可使用几种类型的佐剂。完全弗氏佐剂和随后的不完全佐剂可用于实验室动物的免疫。兔或豚鼠通常用于制备多克隆抗体。小鼠通常用于制备单克隆抗体。筛选与TIGIT特异性结合的抗体。任选地,进一步筛选与TIGIT的特异性区域结合的抗体。此类筛选可通过确定抗体与TIGIT的缺失突变体集合的结合,并且确定哪些缺失突变体与该抗体结合而实现。可例如通过蛋白质印迹、FACS或ELISA来评估结合。

#### [0109] C. 人源化抗体

[0110] 减少或消除HAMA(人抗小鼠(也适用于人抗大鼠或人抗兔或人抗仓鼠等)抗体)应答是合适的治疗剂的临床开发的重要方面。参见例如Khaxzaeli等人, *J. Natl. Cancer Inst.* (1988年),第80卷:第937页;Jaffers等人, *Transplantation* (1986年),第41卷:第572页;Shawler等人, *J. Immunol.* (1985年),第135卷:第1530页;Sears等人, *J. Biol. Response Mod.* (1984年),第3卷:第138页;Miller等人, *Blood* (1983年),第62卷:第988页;Hakimi等人, *J. Immunol.* (1991年),第147卷:第1352页;Reichmann等人, *Nature* (1988年),第332卷:第323页;Junghans等人, *Cancer Res.* (1990年),第50卷:第1495页。如本文所述,本公开提供了被人源化以使得HAMA应答被减少或消除的抗体。这些抗体的变体可进一步使用本领域已知的常规方法获得,其中一些抗体在下文进一步描述。

[0111] 人源化抗体是基因工程化抗体,其中来自非人“供体”抗体的CDR被移植到人“受体”抗体序列中(参见例如,Queen, US 5,530,101和5,585,089;Winter, US 5,225,539;Carter, US 6,407,213;Adair, US 5,859,205 6,881,557;Foote, US 6,881,557)。受体抗体

序列可以是例如成熟人抗体序列、此类序列的复合物、人抗体序列的共有序列或种系区域序列。因此,人源化抗体是具有完全或基本上来自供体抗体的一些或全部CDR以及完全或基本上来自人抗体序列的可变区框架序列和恒定区(如果存在的话)的抗体。类似地,人源化重链具有完全或基本上来自供体抗体重链的至少一个、两个并且通常全部三个CDR,以及基本上来自人重链可变区框架和恒定区序列的重链可变区框架序列和重链恒定区(如果存在的话)。类似地,人源化轻链具有完全或基本上来自供体抗体轻链的至少一个、两个并且通常全部三个CDR,以及基本上来自人轻链可变区框架和恒定区序列的轻链可变区框架序列和轻链恒定区(如果存在的话)。此处与本申请中的其他地方一样,当相应CDR之间的对应残基(如Kabat所定义)的至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%是相同的时,受试者抗体中的CDR基本上来自参考抗体中的对应CDR;然而,当相应CDR之间的对应残基(如Kabat所定义)的至少约65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%是相同的时,受试者抗体中如Kabat所定义的CDR H2基本上来自参考抗体中的对应CDR。当由Kabat定义的对应该残基的至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%是相同的时,抗体链的可变区框架序列或抗体链的恒定区基本上分别来自人可变区框架序列或人恒定区。

[0112] 虽然人源化抗体通常掺入了来自非人(例如小鼠)抗体的全部六个CDR(诸如Kabat所定义),但它们也可用来自非人抗体的少于全部CDR(例如,至少3、4或5个CDR)的CDR制备(例如,Pascalis等人,J.Immunol.第169卷:第3076页,2002年;Vajdos等人,Journal of Molecular Biology,第320卷:第415-428页,2002年;Iwahashi等人,Mol.Immunol.,第36卷:第1079-1091页,1999年;Tamura等人,Journal of Immunology,第164卷:第1432-1441页,2000年)。

[0113] 在一些抗体中,仅需要CDR的部分(即结合所需的CDR残基的子集,称为SDR)来保持人源化抗体中的结合。不接触抗原且不在SDR中的CDR残基可基于先前的研究(例如,通常不需要CDR H2中的残基H60-H65),从位于Chothia高变环外的Kabat CDR区(Chothia,J.Mol.Biol.,第196卷:第901页,1987年),通过分子建模和/或凭经验,或如Gonzales等人,Mol.Immunol.,第41卷:第863页,2004年中描述的来鉴定。在其中不存在一个或多个供体CDR残基或其中省略了整个供体CDR的位置处的此类人源化抗体中,占据位置的氨基酸可以是受体抗体序列中占据对应位置(通过Kabat编号)的氨基酸。CDR中要包括的用于供体氨基酸的受体的此类取代的数量反映了竞争考虑的平衡。此类取代在减少人源化抗体中的小鼠氨基酸的数量并因此降低潜在的免疫原性方面具有潜在优势。然而,取代还可能导致亲和力变化,并且可避免亲和力的显著降低。还可凭经验选择在CDR和氨基酸内用于取代的取代位置。

[0114] 虽然受体可与选择的人框架序列(无论是来自人免疫球蛋白还是来自人共有框架)在序列上相同,但本公开考虑受体序列可包括相对于人免疫球蛋白序列或人共有框架序列的预先存在的氨基酸取代。这些预先存在的取代可以是最小的;通常,相对于人免疫球蛋白序列或共有框架序列,仅有四个、三个、二个或一个氨基酸的差异。

[0115] 人受体抗体序列可任选地选自许多已知的人抗体序列,以在供体抗体链的人受体序列可变区框架和对应的可变区框架之间提供高度的序列同一性(例如,65%至85%同一性)。

[0116] 来自人可变区框架残基的某些氨基酸可基于它们对CDR构象和/或与抗原结合的可能影响被选择用于取代。通过对特定位置处的氨基酸的特征进行建模、检查,或凭经验观察特定氨基酸的取代或诱变的影响来研究此类可能影响。

[0117] 例如,当非人可变区框架残基与选择的人可变区框架残基之间的氨基酸不同时,当合理地预期该氨基酸具有以下行为时,该人框架氨基酸可被来自非人抗体的等效框架氨基酸取代:

[0118] (1) 直接非共价结合抗原,

[0119] (2) 与CDR区相邻,

[0120] (3) 以其他方式与CDR区相互作用(例如,在CDR区的约6Å内)。

[0121] 用于取代的其他候选物是在该位置对于人免疫球蛋白不常见的受体人框架氨基酸。这些氨基酸可被来自非人供体抗体的等效位置或来自更典型的人免疫球蛋白的等效位置的氨基酸取代。用于取代的其他候选物是在该位置对于人免疫球蛋白不常见的受体人框架氨基酸。

[0122] 在一些实施方案中,人源化抗TIGIT抗体具有成熟重链可变区,该成熟重链可变区包括:包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的CDR1,其具有零至两个氨基酸取代或缺失;包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的CDR2,其具有零至两个氨基酸取代或缺失;包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的CDR3,其具有零至两个氨基酸取代或缺失;以及与GenBank登录号AAV40102.1的框架区或与GenBank登录号ADX65334.1的框架区具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的框架区;并且具有成熟轻链可变区,该成熟轻链可变区包括:包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的CDR1,其具有零至两个氨基酸取代或缺失;包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的CDR2,其具有零至两个氨基酸取代或缺失;包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的CDR3,其具有零至两个氨基酸取代或缺失;以及与GenBank登录号ACY78416.1的框架区或与GenBank登录号ADU32611.1的框架区具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的框架区。根据Kabat定义确定AAV40102.1、ADX65334.1、ACY78416.1和ADU32611.1的框架区,参见实施例2或参见含有AAV40102.1、ADX65334.1、ACY78416.1和ADU32611.1和供体CDR的框架区的SEQ ID NO:76至79。在一些实施方案中,成熟重链可变区与重链恒定区的至少一部分连接,并且成熟轻链可变区与轻链恒定区的至少一部分连接。在一些实施方案中,对于全长抗体的表达,成熟重链可变区与重链恒定区连接,并且成熟轻链可变区与轻链恒定区连接。合适的恒定区进一步详细描述于部分III(F)。在上述的某些实施方案中,重链恒定区具有功能性Fc $\gamma$ R结合能力。在又一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:94或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。在上述的某些实施方案中,重链恒定区具有降低的功能性Fc $\gamma$ R结合能力。在另一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:97或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。在又一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:101或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ

ID NO:95或由其组成。在上述的某些实施方案中,重链恒定区具有增强的功能性Fc $\gamma$ R结合能力。在另一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:99或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。

[0123] 在一些实施方案中,人源化抗TIGIT抗体具有成熟重链可变区和成熟轻链可变区,该成熟重链可变区与SEQ ID NO:76具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或小于100%同一性,并且该成熟轻链可变区与SEQ ID NO:77具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或小于100%同一性。在一些实施方案中,除了那些被鉴定为可能对结合很重要的残基之外,可在可变区框架残基处发生任何变化。在一些实施方案中,任何变化是保守氨基酸取代。在一些实施方案中,抗体包括具有SEQ ID NO:76的序列的成熟重链可变区和具有SEQ ID NO:77的序列的成熟轻链可变区。本公开的Hu24F8.1抗体包括具有SEQ ID NO:76的序列的成熟重链可变区和具有SEQ ID NO:77的序列的成熟轻链可变区。在上述的一些实施方案中,成熟重链可变区与重链恒定区的至少一部分连接,并且成熟轻链可变区与轻链恒定区的至少一部分连接。在一些实施方案中,对于全长抗体的表达,成熟重链可变区与重链恒定区连接,并且成熟轻链可变区与轻链恒定区连接。合适的恒定区进一步详细描述于部分III(F)。在上述的某些实施方案中,重链恒定区可诱导Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)介导的信号传导,根据制造商的说明在可商购获得的抗体依赖性细胞介导的毒性报告生物测定试剂盒中进行测量。在又一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:94或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。在其他实施方案中,重链恒定区不诱导Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)介导的信号传导,根据制造商的说明在可商购获得的抗体依赖性细胞介导的毒性报告生物测定试剂盒中进行测量。

[0124] 在一些实施方案中,人源化抗TIGIT抗体具有成熟重链可变区和成熟轻链可变区,该成熟重链可变区与SEQ ID NO:78具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或小于100%同一性,并且该成熟轻链可变区与SEQ ID NO:77具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或小于100%同一性。在一些实施方案中,除了那些被鉴定为可能对结合很重要的残基之外,可在可变区框架残基处发生任何变化。在一些实施方案中,任何变化是保守氨基酸取代。在一些实施方案中,抗体包括具有SEQ ID NO:78的序列的成熟重链可变区和具有SEQ ID NO:77的序列的成熟轻链可变区。本公开的Hu24F8.2抗体包括具有SEQ ID NO:78的序列的成熟重链可变区和具有SEQ ID NO:77的序列的成熟轻链可变区。在上述的一些实施方案中,成熟重链可变区与重链恒定区的至少一部分连接,并且成熟轻链可变区与轻链恒定区的至少一部分连接。在一些实施方案中,对于全长抗体的表达,成熟重链可变区与重链恒定区连接,并且成熟轻链可变区与轻链恒定区连接。合适的恒定区进一步详细描述于部分III(F)。在上述的某些实施方案中,重链恒定区可诱导Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)介导的信号传导,根据制造商的说明在可商购获得的抗体依赖性细胞介导的毒性报告生物测定试剂盒中进行测量。在又一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:94或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。在其他实施方案中,重链恒定区不诱导Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)介导的信号

传导,根据制造商的说明在可商购获得的抗体依赖性细胞介导的毒性报告生物测定试剂盒中进行测量。在一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:97或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。在其他实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:101或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。在其他实施方案中,重链恒定区诱导增强的Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)介导的信号传导,根据制造商的说明在可商购获得的抗体依赖性细胞介导的毒性报告生物测定试剂盒中进行测量。在一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:99或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。

[0125] 在一些实施方案中,人源化抗TIGIT抗体具有成熟重链可变区和成熟轻链可变区,该成熟重链可变区与SEQ ID NO:76具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或小于100%同一性,并且该成熟轻链可变区与SEQ ID NO:79具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或小于100%同一性。在一些实施方案中,除了那些被鉴定为可能对结合很重要的残基之外,可在可变区框架残基处发生任何变化。在一些实施方案中,任何变化是保守氨基酸取代。在一些实施方案中,抗体包括具有SEQ ID NO:76的序列的成熟重链可变区和具有SEQ ID NO:79的序列的成熟轻链可变区。本公开的Hu24F8.3抗体包括具有SEQ ID NO:78的序列的成熟重链可变区和具有SEQ ID NO:79的序列的成熟轻链可变区。在上述的一些实施方案中,成熟重链可变区与重链恒定区的至少一部分连接,并且成熟轻链可变区与轻链恒定区的至少一部分连接。在一些实施方案中,对于全长抗体的表达,成熟重链可变区与重链恒定区连接,并且成熟轻链可变区与轻链恒定区连接。合适的恒定区进一步详细描述于部分III(F)。在上述的某些实施方案中,重链恒定区可诱导Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)介导的信号传导,根据制造商的说明在可商购获得的抗体依赖性细胞介导的毒性报告生物测定试剂盒中进行测量。在又一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:94或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。在其他实施方案中,重链恒定区不诱导Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)介导的信号传导,根据制造商的说明在可商购获得的抗体依赖性细胞介导的毒性报告生物测定试剂盒中进行测量。在一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:97或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。在其他实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:101或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。在其他实施方案中,重链恒定区诱导增强的Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)介导的信号传导,根据制造商的说明在可商购获得的抗体依赖性细胞介导的毒性报告生物测定试剂盒中进行测量。在一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:99或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。

[0126] 在一些实施方案中,人源化抗TIGIT抗体具有成熟重链可变区和成熟轻链可变区,该成熟重链可变区与SEQ ID NO:78具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或小于100%同一性,并且该成熟轻链可变区与SEQ ID NO:79具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或小于100%同一性。在一些实施方案中,除了那些被鉴定为可能对结合很重要的残基之外,可在可变区框架残基处发生任何变化。在一些实施方案中,任何变化是保守氨基酸取代。在一些实施方案中,抗体包括具有SEQ ID NO:78的序列的成熟重链可变区和具有SEQ ID NO:

79的序列的成熟轻链可变区。本公开的Hu24F8.4抗体包括具有SEQ ID NO:76的序列的成熟重链可变区和具有SEQ ID NO:79的序列的成熟轻链可变区。在上述的一些实施方案中,成熟重链可变区与重链恒定区的至少一部分连接,并且成熟轻链可变区与轻链恒定区的至少一部分连接。在一些实施方案中,对于全长抗体的表达,成熟重链可变区与重链恒定区连接,并且成熟轻链可变区与轻链恒定区连接。合适的恒定区进一步详细描述于部分III(F)。在上述的某些实施方案中,重链恒定区可诱导Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)介导的信号传导,根据制造商的说明在可商购获得的抗体依赖性细胞介导的毒性报告生物测定试剂盒中进行测量。在又一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:94或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。在其他实施方案中,重链恒定区不诱导Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)介导的信号传导,根据制造商的说明在可商购获得的抗体依赖性细胞介导的毒性报告生物测定试剂盒中进行测量。在一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:97或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。在其他实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:101或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。在其他实施方案中,重链恒定区诱导增强的Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)介导的信号传导,根据制造商的说明在可商购获得的抗体依赖性细胞介导的毒性报告生物测定试剂盒中进行测量。在一些实施方案中,重链恒定区包含SEQ ID NO:99或由其组成,并且轻链恒定区包含SEQ ID NO:95或由其组成。

[0127] 在上述每种其他实施方案中,人源化抗TIGIT抗体可:(i)具有通过表面等离子体共振测量的约 $0.01 \times 10^{-11}$ M至约 $100 \times 10^{-11}$ M、约 $0.1 \times 10^{-11}$ M至约 $100 \times 10^{-11}$ M、约 $0.1 \times 10^{-11}$ M至约 $10 \times 10^{-11}$ M、约 $1 \times 10^{-11}$ M至约 $100 \times 10^{-11}$ M、或甚至约 $1 \times 10^{-11}$ M至约 $10 \times 10^{-11}$ M的平衡结合常数(KD);和/或(ii)阻断可溶性人CD155配体与细胞表面人TIGIT的结合,其中半最大抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为约0.2nM至约2nM、约0.2nM至约0.8nM、约0.4nM至约0.8nM,或约0.6nM至约0.8nM,如实施例1中所测量的。另选地和/或除了上述单独结合和阻断特性或它们的组合之外,在一些实施方案中,人源化抗TIGIT抗体与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合:(i)SEQ ID NO:80的D72,以及SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、S80和K82中的至少一者;(ii)SEQ ID NO:80的E60和D72,以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、S80和K82中的至少一者;(iii)SEQ ID NO:80的D72和K82,以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60和S80中的至少一者;(iv)SEQ ID NO:80的E60、D72和K82,以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58和S80中的至少一者;或(v)SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82。

#### [0128] D. 嵌合抗体和贴面化抗体

[0129] 本公开还提供了非人抗体的嵌合形式和贴面化形式,具体是示例的21F8、30M18、24F8、5J24、21B9、22B22、28P24、21B16和28012抗体。

[0130] 嵌合抗体是其中非人抗体(例如,小鼠)的轻链和重链的成熟可变区与人轻链和重链恒定区组合的抗体。此类抗体基本上或完全保留非人抗体的结合特异性,并且为约三分之二的人序列。

[0131] 贴面化抗体是一种人源化抗体,其保留了非人抗体的一些且通常全部CDR和一些非人可变区框架残基,但置换了可能对B细胞或T细胞表位有贡献的其他可变区框架残基,例如用来自人抗体序列的对应位置的残基替代暴露的残基(Padlan, Mol. Immunol., 第28卷:第489页,1991年)。结果是这样的抗体,其中CDR完全或基本上来自非人抗体,并且非人抗体的可变区框架通过置换而变得更类似于人。21F8、30M18、24F8、5J24、21B9、22B22、

28P24、21B16或28012抗体的贴面化形式包括在本公开中。

[0132] 在一些实施方案中,TIGIT嵌合抗体是具有小鼠可变结构域和人IgG1/κ恒定结构域的小鼠人嵌合体。在一个实施方案中,TIGIT嵌合抗体是由小鼠21F8VH(SEQ ID NO:1)结构域和21F8VL(SEQ ID NO:2)结构域以及人IgG1/κFab恒定结构域(Ch21F8)构建的嵌合体Fab mVH+mVL。在一个实施方案中,TIGIT嵌合抗体是由小鼠30M18VH(SEQ ID NO:3)结构域和30M18VL(SEQ ID NO:4)结构域以及人IgG1/κFab恒定结构域(Ch30M18)构建的嵌合体Fab mVH+mVL。在一个实施方案中,TIGIT嵌合抗体是由小鼠24F8VH(SEQ ID NO:5)结构域和24F8VL(SEQ ID NO:6)结构域以及人IgG1/κFab恒定结构域(Ch24F8)构建的嵌合体Fab mVH+mVL。在一个实施方案中,TIGIT嵌合抗体是由小鼠5J24VH(SEQ ID NO:7)结构域和5J24VL(SEQ ID NO:8)结构域以及人IgG1/κFab恒定结构域(Ch5J24)构建的嵌合体Fab mVH+mVL。在一个实施方案中,TIGIT嵌合抗体是由小鼠21B9VH(SEQ ID NO:9)结构域和21B9VL(SEQ ID NO:10)结构域以及人IgG1/κFab恒定结构域(Ch21B9)构建的嵌合体Fab mVH+mVL。在一个实施方案中,TIGIT嵌合抗体是由小鼠22B22VH(SEQ ID NO:11)结构域和22B22VL(SEQ ID NO:12)结构域以及人IgG1/κFab恒定结构域(Ch22B22)构建的嵌合体Fab mVH+mVL。在一个实施方案中,TIGIT嵌合抗体是由小鼠28P24VH(SEQ ID NO:13)结构域和28P24VL(SEQ ID NO:14)结构域以及人IgG1/κFab恒定结构域(Ch28P24)构建的嵌合体Fab mVH+mVL。在一个实施方案中,TIGIT嵌合抗体是由小鼠21B16VH(SEQ ID NO:15)结构域和21B16VL(SEQ ID NO:16)结构域以及人IgG1/κFab恒定结构域(Ch21B16)构建的嵌合体Fab mVH+mVL。在一个实施方案中,TIGIT嵌合抗体是由小鼠28012VH(SEQ ID NO:17)结构域和28012VL(SEQ ID NO:12)结构域以及人IgG1/κFab恒定结构域(Ch28012)构建的嵌合体Fab mVH+mVL。

#### [0133] E. 人抗体

[0134] 通过下文描述的多种技术来提供抗TIGIT的人抗体。一些人抗体通过竞争性结合实验、通过上述Winter的噬菌体展示方法或以其他方式选择,以具有与特定小鼠抗体(诸如示例中描述的小鼠单克隆抗体中的一个小鼠单克隆抗体)相同的表位特异性。还可通过仅使用TIGIT的片段作为靶抗原和/或通过筛选针对TIGIT的缺失突变体集合的抗体来筛选人抗体,以用于特定的表位特异性。

[0135] 用于产生人抗体的方法包括Oestberg等人,Hybridoma,第2卷:第361-367页(1983年);Oestberg,美国专利4,634,664;和Engleman等人,美国专利4,634,666的三源杂交瘤(trioma)方法,使用包括人免疫球蛋白基因的转基因小鼠(参见例如,Lonberg等人,W093/12227(1993年);US 5,877,397、US 5,874,299、US 5,814,318、US 5,789,650、US 5,770,429、US 5,661,016、US 5,633,425、US 5,625,126、US 5,569,825、US 5,545,806;Nature,第148卷,第1547-1553页(1994年);Nature Biotechnology,第14卷,第826页(1996年);Kucherlapati,W0 91/10741(1991年),以及噬菌体展示方法(参见例如,Dower等人,W0 91/17271和McCafferty等人,W0 92/01047、US 5,877,218、US 5,871,907、US 5,858,657、US 5,837,242、US 5,733,743和US 5,565,332)。

#### [0136] F. 恒定区的选择

[0137] 嵌合抗体、人源化抗体(包括贴面化抗体)或人抗体的重链和轻链可变区可各自与人恒定区的至少一部分连接。在一些实施方案中,上述部分中描述的重链可变结构域与人重链恒定区的一部分连接,并且上述部分中描述的轻链可变结构域与人轻链恒定区的一部

分连接。在一些实施方案中,上述部分中描述的重链可变结构域与人重链恒定区的一部分连接,并且上述部分中描述的轻链可变结构域与全长人轻链恒定区连接。重链恒定区包括Fc(片段可结晶)区,其是与细胞表面受体(Fc受体)以及补体系统的一些蛋白质相互作用的抗体的尾部区。在一些实施方案中,上述部分中描述的重链可变结构域与全长人重链恒定区连接,并且上述部分中描述的轻链可变结构域与全长人轻链恒定区连接。

[0138] 恒定区(或其截短物)的选择部分地取决于是否需要效应子功能,或甚至需要增强效应子功能。“效应子功能”是指可归因于抗体的Fc区并随该抗体同种型变化的生物活性。抗体效应子功能的非限制性示例包括:C1复合物上的C1q结合以及补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体)的向下调节;和B细胞激活。人抗体根据其重链被分类为五个同种型(IgM、IgD、IgG、IgA和IgE),其中每个同种型提供不同的功能。IgG由各自含有不同重链的四个人亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)组成。它们具有高度同源性,并且主要在铰链区和激活宿主免疫系统的程度上有所不同。例如,人同种型IgG1和IgG3可介导补体介导的细胞毒性,而人同种型IgG2和IgG4则没有或在非常低的水平上介导补体介导的细胞毒性。轻链恒定区可以是亚类λ或κ。对于针对癌症或不表达TIGIT的病原体的免疫疗法,除了人IgG1和IgG3之外,可使用人IgG2或IgG4或具有降低的效应子功能的人IgG1的弱化形式。对于人IgG4,可使用在重链上包含S228P(Eu编号)工程化突变以防止Fab臂交换。然而,为了消除表达TIGIT的癌细胞(例如,T细胞或NK细胞的肿瘤)进行免疫抑制,可使用人IgG1或IgG3。例如,为了直接杀死表达TIGIT的癌细胞(例如,一些血液恶性肿瘤)或为了免疫抑制,可使用具有Fc效应子功能的抗体(例如,人IgG1或IgG3)。人IgG1或IgG3的合适序列是本领域已知的,并且包括例如SEQ ID NO:94和US 5,624,821中公开的人IgG3。

[0139] 人恒定区显示不同个体之间的同种异型变异和异同种异型变异,即,恒定区在不同个体中在一个或多个多态性位置处可不同。异同种异型与同种异型的区别在于识别异同种异型的血清与一种或多种其他同种型的非多态性区域结合。提及人恒定区包括具有任何天然同种异型或占据天然同种异型中多态性位置的任何残基排列的恒定区。

[0140] 轻链和/或重链的氨基或羧基末端处的一个或若干个氨基酸,诸如重链的C末端赖氨酸,可在分子的一部分或全部中缺失或衍生化。重链或轻链的N末端谷氨酰胺可被谷氨酸残基取代,以防止焦谷氨酸的形成。可在恒定区中进行取代以降低或增加效应子功能,诸如补体介导的细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)(参见例如,Winter等人,美国专利5,624,821;Tso等人,美国专利5,834,597;以及Lazar等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,第103卷:第4005页,2006年),或延长在人体中的半衰期(参见例如,Hinton等人,J.Biol.Chem.第279卷:第6213页,2004年)。示例性取代包括位置250处的Gln和/或位置428(Eu编号)处的Leu,以用于延长抗体的半衰期。

[0141] 在一些实施方案中,本文所述的抗体包括如上所述的野生型重链恒定区。在一些实施方案中,该野生型重链恒定区是SEQ ID NO:94。SEQ ID NO:92是包含SEQ ID NO:94的野生型恒定区的示例性重链氨基酸序列。在其他实施方案中,本文所述的抗体具有选自变体人IgG1、变体人IgG2、变体人IgG3或变体人IgG4的野生型重链恒定区(或其截短物)的变体。在一些实施方案中,该变体重链恒定区是SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:99或SEQ ID NO:101。SEQ ID NO:96、98和100是包含变体重链恒定区的示例性重链氨基酸序列。

[0142] 本公开的一些抗体通过引入恒定区突变而被工程化,以具有与没有突变的相同抗体相比降低的效应子功能,诸如CDC和ADCC或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。在一些实施方案中,与没有突变的抗体相比,这些效应子功能中的每一者或全部减少了至少50%、75%、90%或95%。其他测定描述于Shields等人,2001年,J.Biol.Chem.,第276卷:第6591-6604页;Chappel等人,1993年,J.Biol.Chem.,第268卷:第25124-25131页;Lazar等人,2006年,PNAS,第103卷:第4005-4010页。

[0143] 例如,位置234、235、236和/或237中的任一者或全部的取代降低了对Fc $\gamma$ 受体(特别是Fc $\gamma$ RI受体)的亲和力(参见例如US 6,624,821)。在一些实施方案中,丙氨酸残基用于取代,诸如L234A/L235A双突变以降低效应子功能。具有降低的效应子功能的突变的其他组合包括L234A/L235A/G237A、E233P/L234V/L235A/ $\Delta$ G236、A327G/A330S/P331S、K322A、L234A和L235A、L234F/L235E/P331S(Eu编号)。任选地,人IgG2中的位置234、236和/或237被丙氨酸取代,并且位置235被谷氨酰胺取代。(参见例如,US 5,624,821。)Eu索引位置330和331处的补体C1q结合位点中的两个氨基酸取代减少了补体固定(参见,Tao等人,J.Exp.Med.,第178卷:第661页(1993年);以及Canfield和Morrison,J.Exp.Med.第173卷:第1483页(1991年))。位置233至236处的IgG2残基以及位置327、330和331处的IgG4残基取代为人IgG1降低了ADCC和CDC(参见例如,Armour KL.等人,1999年,Eur J Immunol.,第29卷第8期:第2613-2624页;以及Shields RL.等人,2001年,J Biol Chem.,第276卷第9期:第6591-6604页)。N297A、N297Q或N297G(Eu编号)突变减少糖基化,并因此降低效应子功能。

[0144] 在一些实施方案中,本公开的抗体可被工程化以增强Fc效应子功能。例如,可通过氨基酸工程化增强Fc $\gamma$ R结合。在一些实施方案中,这可通过在Fc区中取代一个或多个氨基酸来完成。期望的突变可通过例如丙氨酸筛选或合理的设计和文库筛选来确定。可使用这些技术鉴定具有增强的与FcR的结合和增强的效应子功能的IgG变体。另选地,对Fc受体区的若干突变是本领域已知的,例如,如在Smith P.等人,(2012年),PNAS 6181-6186中描述的。

[0145] 在一些实施方案中,本文所述的抗体包括经修饰的IgG1恒定结构域,该恒定结构域与没有修饰的野生型IgG1相比增加了抗体介导ADCC的能力。经修饰的IgG1结构域的特征可在于氨基酸取代L235V、S239D、F243L、R292P、A330L、I332E、P396L(Eu编号)中的一者或多者。在其他实施方案中,经修饰的IgG1结构域的特征在于取代S239D、A330L和I332E(Eu编号)。在一些实施方案中,本文所述的治疗有效量的抗体能够在1、2或3小时内诱导至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%或至少65%的表达TIGIT细胞的细胞死亡,如通过本领域中描述的方法所评估的。

[0146] 另选地,可使用糖型扰动来增强Fc介导的治疗性抗体功能。IgG1抗体上的N连接的Fc糖基化对效应子功能来说很重要。唾液酸化、半乳糖基化、二等分糖和岩藻糖基化可能都会影响IgG分子的结合和活性。控制治疗性抗体上的糖基化模式可通过多种不同的方式完成。产生重组抗体的细胞类型及其培养条件可影响治疗性抗体的糖基化和活性。此外,生物反应器条件和下游加工也可影响聚糖的微异质性。低岩藻糖基化抗体或无岩藻糖基化抗体已被证明能增强Fc介导特性。通过糖工程来实现岩藻糖水平的这种降低的多种方式是本领域众所周知的。一种方式是操纵涉及抗体的翻译后修饰的酶。这可涉及葡萄糖苷酶(诸如 $\beta$ -1-4-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III)的过表达、敲除岩藻糖基转移酶,或使用天然岩藻糖缺

乏或已突变以表达低岩藻糖基化水平的细胞系。此外,N连接的葡萄糖苷酶的抑制剂(诸如栗精胺(castanospermine))也可用于获得低岩藻糖含量的IgG分子。

[0147] 在一些实施方案中,氨基酸工程化变体可对多个Fc $\gamma$ R具有更广泛增强的亲和力,而糖型工程化抗体一般可对增强的Fc $\gamma$ R IIIa结合具有更具特异性的亲和力。糖型与Fc部分上的近端氨基酸相互作用,并且与Ig寡糖接触的氨基酸的置换可产生不同的糖型结构。

#### [0148] G. 重组抗体的表达

[0149] 通常通过重组表达产生嵌合抗体、人源化抗体(包括贴面化抗体)和人抗体。因此,本公开还提供了编码该部分IIIA-G的抗TIGIT抗体的多核苷酸、包含这些多核苷酸的载体和包含这些载体的宿主细胞。

[0150] 编码本公开的抗TIGIT抗体的多核苷酸可被插入载体中以用于扩增、表达或进一步优化。许多载体是可用的。在一些实施方案中,载体系统包括哺乳动物、细菌、酵母系统等,并且包括质粒(诸如但不限于pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pCMV、pEGFP、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS420、pLexA、pACT2.2等),以及其他实验室载体和可商购获得的载体。合适的载体可包括质粒或病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。载体组分一般包括但不限于以下中的一者或多者:信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子(例如SV40、CMV、EF-1 $\alpha$ )和转录终止序列。对于表达,重组多核苷酸构建体通常包括可操作地连接至抗体链的编码序列的表达控制序列,包括天然相关的或异源的启动子区域。在一些实施方案中,表达控制序列是能够转化或转染真核宿主细胞的载体中的真核启动子系统。一旦载体已整合到适当的宿主中,就将宿主保持在适合于核苷酸序列的高水平表达以及重组抗体的收集和纯化的条件下。

[0151] 可将包含编码本公开的抗TIGIT抗体的多核苷酸序列的载体引入宿主细胞以用于克隆或基因表达。用于克隆或表达本文载体中的多核苷酸序列的合适的宿主细胞包括原核生物和真核生物细胞。合适的原核生物的非限制性示例包括真细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),诸如埃希氏杆菌属(*Escherichia*) (例如大肠杆菌(*E.coli*))、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形杆菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*) (例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌属(*Serratia*) (例如,粘质沙雷菌(*Serratia marcescens*)) 和志贺氏菌属(*Shigella*);以及杆菌属(*Bacilli*),诸如枯草杆菌(*B.subtilis*) 和地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*);假单胞菌属(*Pseudomonas*),诸如铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*) 和链霉菌属(*Streptomyces*)。除了原核生物之外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母是适合抗TIGIT抗体编码载体的克隆或表达宿主。非限制性示例包括:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*) 宿主,诸如乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045)、魏氏克鲁维酵母(*K.wickeramii*) (ATCC 24,178)、克鲁维酵母(*K.waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilarum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K.Thermotolerans*) 和马克斯克鲁维酵母(*K.marxianus*);耶氏酵母属(*yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183,070);假丝酵母属(*Candida*);里氏木霉(*Trichoderma*

reesia) (EP 244,234);粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*);许旺酵母属 (*Schwanniomyces*), 诸如西方许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*);和丝状真菌,诸如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主(诸如构巢曲霉 (*A.nidulans*) 和黑曲霉 (*A.niger.*)).合适的宿主细胞还可来源于多细胞生物体。无脊椎动物细胞的示例包括植物细胞和昆虫细胞。已从宿主诸如草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊虫)、亚洲虎蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊虫)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 中鉴定出许多杆状病毒株和变体以及对应的容许昆虫宿主细胞。用于转染的多种病毒株是可公开获得的,例如苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5株,并且根据本发明,这些病毒可用作本文中的病毒,特别是用于草地贪夜蛾细胞的转染。棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛 (*petunia*)、番茄和烟草的植物细胞培养物也可以用作宿主。在一些实施方案中,哺乳动物细胞用作表达编码免疫球蛋白或其片段的核苷酸片段的宿主细胞。参见Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH出版社, NY, 1987)。本领域已经开发出多种能够分泌完整异源蛋白的合适宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种COS细胞系、HeLa细胞、HEK293细胞、L细胞和不产生抗体的骨髓瘤(包括Sp2/0和NS0)。在一些实施方案中,这些细胞是非人的。用于这些细胞的表达载体可包括表达控制序列,诸如复制起点、启动子、增强子(Queen等人, *Immunol. Rev.*, 第89卷:第49页(1986年)),以及必需的加工信息位点,诸如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。在一些实施方案中,表达控制序列是来源于内源性基因、巨细胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒等的启动子。参见Co等人, *J. Immunol.*, 第148卷:第1149页(1992年)。

[0152] 宿主细胞用上述表达或克隆载体转化以产生抗TIGIT抗体,并在常规营养培养基中培养,该常规营养培养基经适当改良以诱导启动子、选择转化体或扩增编码期望序列的基因。一旦表达,就可根据本领域的标准程序纯化抗体,包括HPLC纯化、柱色谱、凝胶电泳等(一般参见Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982年))。

#### [0153] IV. 治疗性应用

[0154] 本公开的抗TIGIT抗体可用于增强癌症和感染性疾病治疗中的免疫应答。可通过本公开的抗体治疗的障碍包括但不限于癌症,包括血液恶性肿瘤、实体瘤、默克尔细胞癌、尿路上皮癌、头颈部鳞状细胞癌、B细胞淋巴瘤、子宫癌、宫颈癌、睾丸癌、胃肠道癌(例如食管、胃食管接合部、口咽、胃、小肠或大肠、结肠或直肠的癌症)、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、胆囊癌、心脏癌、肺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、神经节癌、中枢神经系统(CNS)癌和外周神经系统(PNS)癌,以及造血系统和免疫系统(例如脾脏或胸腺)的癌症。

[0155] 本公开还提供了治疗或预防其他癌症相关的疾病、障碍或病症的方法,包括例如免疫原性肿瘤、非免疫原性肿瘤、休眠肿瘤、病毒诱导的癌症(例如,上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌和乳头瘤病毒)、腺癌、畸胎瘤、化学诱导的癌症、癌细胞转移和血管新生。在具体实施方案中,该肿瘤或癌症是结肠癌、卵巢癌、乳腺癌、黑素瘤、肺癌、胶质母细胞瘤或白血病。术语癌症相关的疾病、障碍和病症的使用意味着广泛地指与癌症直接或间接相关的病症,并且包括例如血管新生和癌前病症,诸如发育异常。在某些实施方案中,癌症可以是转移性的或有变成转移性的风险,或者可发生在弥漫性组织中,包括血液或骨髓的癌症(例如白血病)。

[0156] 此类癌症可表达或可不表达TIGIT或CD155。抗TIGIT抗体对不表达TIGIT的癌症有效,因为抑制TIGIT与CD155的相互作用刺激了对此类癌症的免疫应答。血液恶性肿瘤的示例包括白血病、淋巴瘤和骨髓瘤,包括急性髓系白血病、成人T细胞白血病、T细胞大颗粒淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、急性单核细胞白血病、霍奇金氏淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤以及多发性骨髓瘤。实体瘤的示例包括但不限于卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、肺癌(小细胞或非小细胞)、结肠癌、前列腺癌、宫颈癌、胰腺癌、胃癌、食道癌、肝细胞癌(肝癌)、肾细胞癌(肾癌)、头颈部肿瘤、间皮瘤、黑素瘤、肉瘤和脑肿瘤(例如神经胶质瘤,诸如胶质母细胞瘤)。

[0157] 可在辅助环境中实践本公开的方法。“辅助环境”是指受试者有增殖性疾病(特别是癌症)病史,并且通常(但不一定)对疗法有反应的临床环境,该疗法包括但不限于外科手术、放射疗法和/或化学疗法。然而,由于具有增殖性疾病病史,这些受试者被认为具有患该疾病的风险。“辅助环境”中的治疗或施用是指后续治疗模式。在一些实施方案中,本文提供了一种用于治疗癌症或实现癌症预防的方法,该方法包括在辅助环境中向患有癌症或处于癌症风险的受试者施用治疗有效量的本文所公开的抗体中的任一种抗体。

[0158] 本文提供的方法还可在“新辅助环境”中进行实践,即,该方法可在主要/确定性疗法之前进行。在一些方面,该受试者先前已接受治疗。在其他方面,该受试者先前尚未接受治疗。在一些方面,该治疗是第一线疗法。在一些实施方案中,本文提供了一种用于治疗癌症或实现癌症预防的方法,该方法包括在新辅助环境中向患有癌症或处于癌症风险的受试者施用治疗有效量的本文所公开的抗体中的任一种抗体。

[0159] 可由本公开的抗体治疗的其他障碍包括如下病原的感染性疾病:病毒、细菌、真菌、原生动物和其他病原体(例如,肝炎(A型、B型或C型)、疱疹病毒(例如VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II和CMV、EB病毒)、腺病毒、流感病毒、黄病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV病毒、登革病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC病毒、HIV、SIV和虫媒病毒性脑炎病毒、衣原体、立克次体细菌、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、脑膜炎球菌和淋球菌、克雷伯氏菌、变形杆菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团菌、白喉、沙门氏菌、杆菌、霍乱、破伤风、肉毒杆菌、炭疽、鼠疫、钩端螺旋体病和莱姆病细菌。

#### [0160] A. 抗体的施用

[0161] 本文所述的抗体以有效方案施用,意指延迟障碍的发作、降低其严重程度、抑制其进一步恶化和/或改善其至少一种体征或症状的剂量、施用途径和施用频率。如果受试者已患有障碍,则该方案可被称为治疗有效方案。如果受试者相对于一般人群处于障碍的高风险但尚未经历症状,则该方案可被称为预防有效方案。在一些情况下,相对于同一受试者的历史对照或过去经验,可在个体受试者中观察到治疗性或预防性功效。在其他情况下,治疗性或预防性功效可在临床前或临床试验中在治疗的受试者群体中相对于未治疗的受试者的对照群体来展示。

[0162] 在一些情况下,受试者被鉴定为PD-L1阳性、CD155阳性、TIGIT阳性、MSI高、具有浸润性T细胞、具有活化的T细胞、具有与抗原加工和呈递相关的高水平分子、TMB高或它们的任何组合。在一些实施方案中,基于TIGIT在例如CD8+细胞和/或CD4+细胞和/或NK细胞上相对于对照群体的高表达来选择用本文所述的抗体进行治疗的患者。在一些情况下,受试者

被鉴定为患有癌基因驱动的癌症并且在选自以下项组成的组的至少一个基因中具有突变: TP53、VHL、KRAS、BRAF、MET、FUBP1、RAC1、EGFR、CDK4、CTCF、PGR、RET、RASA1、JAK1、PHF6、NF1、CIC、ARID1A、ZFHX3、ZCCHC12、GNA11、SMAD4、USP9X、CDKN2A、FAT1、PIK3R1、SCAF4、PMS2、RNF43、SMC1A、BCOR、FGFR2、COL5A1、ATM、KMT2B、CTNNB1、MYC、RAD21、PTEN、AXL、HIF1A、EPAS1、PAK4、RHOB、TBL1XR1、KEAP1、ZFP36L2、FGFR3、FOXA1、FLT3、TRAF3、RNF111、PPP2R1A、TXNIP、STAG2、RIT1、TGIF1、FOXQ1、ATR、CYSLTR2、PCBP1、PIK3R2、ASXL1、HIST1H1C、KLF5、PIK3CB、SPOP、MECOM、CACNA1A、CTNND1、DACH1、XP01、ZNF750、FBXW7、MUC6、KDM6A、GATA3、ZBTB20、PIK3CA、RB1、SOX17、SMARCA4、KIT、CHD8、CHD4和APOB。

[0163] 在一些方面,本文所述的任何方法包括向对其有需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的一种或多种抗TIGIT抗体。如本文所用,抗癌疗法(如本文所述的任何抗TIGIT抗体)的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是足以实现有益或期望结果的量。对于治疗用途,有益或期望的结果包括但不限于临床结果,例如减少由癌症引起的一种或多种症状、提高患有癌症的受试者的生活质量、降低治疗癌症所需的其他药物的剂量、增强另一种药物的作用,例如通过靶向、延缓疾病的进展和/或延长生存期。有效剂量可在一次或多次施用中施用。出于本公开的目的,抗癌疗法的有效剂量是足以直接或间接完成治疗性或预防性治疗的量。如在临床上下文中所理解的,治疗有效剂量的抗癌疗法可与另一种抗癌疗法联合使用来实现,也可以不联合使用来实现。

[0164] 本文所述的任何抗体的示例性剂量为约0.1-20mg/kg或0.5-5mg/kg体重(例如,约0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg或20mg/kg)或10-1600mg(诸如小于10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1000mg、1100mg、1200mg、1300mg、1400mg、1500mg或1600mg或更大中的任一者,包括这些数之间的值)作为固定剂量。在一个实施方案中,本文所述的抗体以每三周约300mg至1500mg的量给出。在另一个实施方案中,本文所述的抗体以每四周约300mg至1800mg的量给出。剂量取决于受试者的状况和对先前治疗的响应(如果有的话)、治疗是预防性的还是治疗性的以及障碍是急性的还是慢性的等因素。

[0165] 施用可以是肠胃外、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、瘤内、局部、鼻内或肌内。在一些实施方案中,通过静脉内或皮下施用而施用到体循环中。静脉内施用可例如通过在诸如30分钟-90分钟的时间段内输注来进行。

[0166] 施用频率取决于抗体在循环中的半衰期、受试者的状况和施用途径等因素。频率可以是每天、每周、每月、每季度或响应于受试者状况的变化或所治疗障碍的进展的不规则间隔。在一个实施方案中,频率可以是两周周期。在另一个实施方案中,频率可以是三周周期。在另一个实施方案中,频率是四周周期。在另一个实施方案中,频率是六周周期。静脉内施用的示例性频率在连续原因的治疗内介于每周和每季度之间,但更多或更少频率的给药也是可能的。对于皮下施用,示例性的给药频率是每天至每月,但更多或更少频率的给药也是可能的。

[0167] 施用的剂量数取决于障碍是急性还是慢性的以及障碍对治疗的响应。对于急性障碍或慢性障碍的急性恶化,介于1和10之间的剂量通常是足够的。有时单次推注剂量,任选

地为分开的形式,对于急性障碍或慢性障碍的急性恶化是足够的。对于急性障碍的复发或急性恶化,可重复治疗。对于慢性障碍,抗体可以规则的间隔施用,例如每周、每两周、每月、每季度、每六个月施用,持续至少1年、5年或10年、或受试者的寿命。

[0168] 包括抗TIGIT抗体的治疗可通过将患有癌症的受试者的中位无进展存活期或总生存期时间与对照受试者相比延长至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%,或者将这些时间中的任一者延长2周、1个月、2个月或3个月,或者4个月或6个月或甚至9个月或一年来缓解疾病。除此之外或另选地,包括抗TIGIT抗体的治疗可将受试者的完全缓解率、部分缓解率或客观缓解率(完全+部分)与对照受试者相比增加至少约30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%。除抗TIGIT抗体外,对照受试者接受与接受抗TIGIT抗体的受试者相同的治疗。因此,如果接受抗TIGIT抗体的受试者还接受安慰剂或安慰剂和除抗TIGIT抗体之外的一些化学治疗剂的组合,则对照受试者可单独接受安慰剂或安慰剂和除抗TIGIT抗体之外的一些化学治疗剂的组合。

[0169] 本文公开的抗TIGIT抗体可相对于在不存在本文公开的抗TIGIT抗体之一的情况下CD155表达细胞的NK细胞介导的细胞毒性的量,将CD155表达细胞(诸如但不限于K562细胞)的NK细胞介导的细胞毒性增强约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%或更多。

[0170] 通常,在临床试验(例如,II期、II/III期或III期试验)中,用抗TIGIT抗体治疗的受试者的中位无进展存活率和/或缓解率的增加具有统计学显著性,例如,在 $p=0.05$ 或 $0.01$ 或甚至 $0.001$ 水平。完全和部分缓解率由癌症临床试验中常用的客观标准确定,例如,国家癌症研究所和/或美国食品药品监督管理局列出或接受的标准,并且可包括例如肿瘤体积、肿瘤数量、转移、存活时间和生活质量指标等。

[0171] 用于肠胃外施用的药物组合物可以是无菌且基本上等渗的,并且在GMP条件下制造。药物组合物可以单位剂型(即,单次施用的剂量)提供。药物组合物可使用一种或多种生理学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或助剂来配制。制剂取决于所选择的施用途径。对于注射,可将抗体配制在水溶液中,诸如在生理相容性缓冲液诸如汉克氏溶液、林格氏液或生理盐水或乙酸盐缓冲液中(以减少注射部位处的不适)。溶液可含有配制剂,诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。另选地,抗体可为在使用前用合适的媒介物(例如,不含热原的无菌水)重构的冻干形式。液体制剂中抗体的浓度可在例如约 $10\text{mg/ml}$ 至 $150\text{mg/ml}$ 内变化。在一些制剂中,浓度为约 $20\text{mg/ml}$ 至 $80\text{mg/ml}$ 。

[0172] B. 联合疗法

[0173] 本公开涵盖抗TIGIT抗体的单独使用或与一种或多种活性治疗剂的联合使用。另外的活性治疗剂可以是小的化学分子;大分子,诸如蛋白质、抗体、肽体、肽、DNA、RNA或这些大分子的片段;或者细胞或基因疗法。联合疗法可针对不同但互补的作用机制,从而对潜在的疾病、障碍或病症具有协同的治疗或预防效果。除此之外或另选地,联合疗法可允许减少一种或多种药剂的剂量,从而改善、减少或消除与一种或多种药剂相关的副作用。

[0174] 此类联合疗法中的活性治疗剂可被配制成单一组合物或单独的组合物。如果单独施用,组合中的每种治疗剂可同时或大约同时给药,或者在不同时间给药。此外,即使治疗剂具有不同的施用形式(例如,口服胶囊和静脉内施用)也可“联合”施用,它们以不同的给药间隔给药,一种治疗剂以恒定的给药方案给药而另一种治疗剂则递增滴定、递减滴定或停止给药,或者组合中的每种治疗剂在患者的治疗过程期间独立地递增滴定、递减滴定、增加或减少剂量,或者停止和/或恢复给药。如果组合被配制成单独的组合物,则在一些实施方案中,单独的组合物在试剂盒中一起提供。

[0175] 在某些实施方案中,将本文公开的任何抗TIGIT抗体依次施用或应用于一种或多种另外的活性治疗剂,例如,其中一种或多种另外的活性治疗剂在施用根据本公开的抗TIGIT抗体之前或之后施用。在其他实施方案中,抗体与一种或多种另外的活性治疗剂同时施用,例如,其中该抗TIGIT抗体与一种或多种另外的治疗剂同时或约同时施用;该抗TIGIT抗体与一种或多种另外的治疗剂可存在于两种或更多种单独的制剂中或组合成单一制剂(即,共制剂)。无论另外的药剂与抗TIGIT抗体顺序施用还是同时施用,出于本公开的目的,它们都被认为是联合施用的。

[0176] 本公开的抗体可根据情况以任何合适的方式与至少一种其他(活性)药剂联合使用。在一个实施方案中,用本公开的至少一种活性剂和至少一种抗TIGIT抗体的治疗维持一段时间。在另一个实施方案中,减少或中断用至少一种活性剂进行的治(例如,当受试者稳定时),同时用本公开的抗TIGIT抗体的治疗维持在恒定的给药方案。在又一个实施方案中,减少或中断用至少一种活性剂进行的治疗(例如,当受试者稳定时),同时减少用本公开的抗TIGIT抗体进行的治疗(例如,更低剂量、更低频率的给药或更短的治疗方案)。在又一个实施方案中,减少或中断用至少一种活性剂进行的治疗(例如,当受试者稳定时),并且增加用本公开的抗TIGIT抗体进行的治疗(例如,更高剂量、更高频率的给药或更长的治疗方案)。在又一个实施方案中,维持用至少一种活性剂进行的治疗,同时减少或中断用本公开的抗TIGIT抗体进行的治疗(例如,更低剂量、更低频率的给药或更短的治疗方案)。在又一个实施方案中,减少或中断用至少一种活性剂进行的治疗和用本公开的抗TIGIT抗体进行的治疗(例如,更低剂量、更低频率的给药或更短的治疗方案)。

[0177] 用本公开的抗体进行的治疗可与有效对抗所治疗障碍的其他治疗联合。当用于治疗增殖性病症、癌症、肿瘤或癌前疾病、障碍或病症时,本公开的抗体可与化学疗法、放射疗法(例如,局部放射疗法或全身放射疗法)、干细胞治疗、外科手术或用其他生物制剂的治疗联合。

[0178] 本公开的抗体可与引发针对癌症的免疫应答的疫苗一起施用。通过本公开的抗体增强此类免疫应答。疫苗可包括在癌细胞和/或肿瘤表面上表达的抗原或其片段,该抗原或其片段能有效诱导免疫应答,任选地与载体分子连接。

[0179] 在一些实施方案中,一种或多种另外的治疗剂是免疫调节剂。可用于本公开的合

适的免疫调节剂包括CD40L、B7和B7RP1；针对刺激性受体的活化单克隆抗体(mAb)，诸如抗CD40、抗CD38、抗ICOS和4-1BB配体；树突状细胞抗原负载(体外或体内)；抗癌疫苗，诸如树突状细胞癌疫苗；细胞因子/趋化因子，诸如IL1、IL2、IL12、IL18、ELC/CCL19、SLC/CCL21、MCP-1、IL-4、IL-18、TNF、IL-15、MDC、IFN $\alpha/\beta$ 、M-CSF、IL-3、GM-CSF、IL-13和抗IL-10；细菌脂多糖(LPS)；吡啶胺2,3-双加氧酶1(IDO1)抑制剂和免疫刺激性寡核苷酸。

[0180] 在某些实施方案中，本公开提供了用于抑制肿瘤生长的方法，包括联合施用本文所述的抗TIGIT抗体与信号转导抑制剂(STI)以实现肿瘤生长的加性或协同抑制。如本文所用，术语“信号转导抑制剂”是指选择性抑制信号传导途径中的一个或多个步骤的药剂。本公开考虑的信号转导抑制剂(STI)包括：(i) bcr/abl激酶抑制剂(例如，甲磺酸伊马替尼、GLEEVEC®)；(ii) 表皮生长因子(EGF)受体抑制剂，包括激酶抑制剂(例如，吉非替尼、埃罗替尼、阿法替尼和奥希替尼)和抗体；(iii) her-2/neu受体抑制剂(例如，HERCEPTIN®)；(iv) Akt家族激酶或Akt途径的抑制剂(例如，雷帕霉素)；(v) 细胞周期激酶抑制剂(例如，黄酮哌啶醇(flavopiridol))；和(vi) 磷脂酰肌醇激酶抑制剂。参与免疫调节的药剂也可与本文所述的抗TIGIT抗体联合使用，以抑制癌症患者的肿瘤生长。

[0181] 在一些实施方案中，一种或多种另外的治疗剂是化学治疗剂。化学治疗剂的示例包括但不限于：烷基化剂，诸如噻替哌和环磷酰胺；烷基磺酸盐，诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡；氮丙啶，诸如苯佐替哌、卡波醌、美妥替哌和乌瑞替哌；乙撑亚胺和甲基蜜胺，包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺、三乙撑硫代磷酰胺和三羟甲基三聚氰胺(trimethylolomelamine)；氮芥，诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥；亚硝基脲，诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀；抗生素，诸如阿克拉霉素、放线菌素、蒽霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡奇霉素、卡柔比星、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊马度胺、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星；抗代谢物，诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU)；叶酸类似物，诸如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙；嘌呤类似物，诸如氟达拉滨、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU；雄性激素，诸如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯；抗肾上腺素，诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦；叶酸补充剂，诸如亚叶酸；醋葡萄糖内酯；醛磷酰胺糖苷；氨基乙酰丙酸；安吡啶；布沙莫司汀；比生群；依达曲沙；地磷酰胺；秋水仙胺；地吡醌；依洛尼塞(elformithine)；依利醋铵；依托格鲁；硝酸镓；羟基脲；香菇多糖；氯尼达明；米托胍脲；米托蒽醌；莫哌达醇；二胺硝吡啶；喷司他丁；蛋氨酸；吡柔比星；鬼臼酸；2-乙基酰肼；丙卡巴肼；雷佐生；西佐喃；锗螺胺；细交链孢菌酮酸；三亚胺醌；2,2',2''-三氯三乙胺；乌拉坦；长春地辛；达卡巴嗪；甘露莫司汀；二溴甘露醇；二溴卫矛醇；哌泊溴烷；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖苷(Ara-C)；环磷酰胺；噻替哌；紫杉烷类，例如紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇和多西紫杉醇；苯丁酸氮芥；吉西他滨；6-巯鸟嘌呤；巯嘌呤；甲氨蝶呤；铂和铂配位络合物，诸如顺铂、卡铂和奥沙利铂；长春碱；依托泊苷(VP-16)；异环磷酰胺；丝裂霉素C；

米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺维本;诺消灵;替尼泊苷;道诺霉素;氨喋呤;希罗达;伊班膦酸盐;CPT11;拓扑异构酶抑制剂;二氟甲基鸟氨酸(DMF0);视黄酸;埃斯帕米霉素(esperamicin);卡培他滨;蒽环类;以及上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0182] 化学治疗剂还包括用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,诸如抗雌激素,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、抑制芳香化酶的4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬盐酸盐、奥那司通和托瑞米芬;和抗雄激素,如阿比特龙、恩杂鲁胺、阿帕鲁胺、达罗鲁胺(darolutamide)、氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在某些实施方案中,联合疗法包括含有一种或多种化学治疗剂的化学治疗方案。在某些实施方案中,联合疗法包括施用激素或相关激素剂。

[0183] 可与抗TIGIT抗体联合使用的其他治疗方式包括放射治疗、抗肿瘤抗原的抗体、抗体和毒素的复合物、T细胞佐剂、骨髓移植或抗原呈递细胞(例如,树突状细胞疗法),包括用于刺激这种抗原呈递细胞的TLR激动剂。

[0184] 在某些实施方案中,本公开考虑了将本文所述的抗TIGIT抗体与基于RNA干扰的疗法联合使用来沉默基因表达。RNAi开始于将较长的双链RNA切割成小干扰RNA(siRNA)。将siRNA的一条链整合到已知为RNA诱导的沉默复合物(RISC)的核糖核蛋白复合物中,然后将其用于鉴定与整合的siRNA链至少部分互补的mRNA分子。RISC可结合或切割mRNA,这两者均抑制翻译。

[0185] 在某些实施方案中,本公开考虑了将本文所述的抗TIGIT抗体与调节腺苷水平的药剂联合使用。此类治疗剂可作用于催化将ATP转化为腺苷的外核苷酸,包括将ATP水解为ADP以及将ADP水解为AMP的外核苷酸三磷酸二磷酸水解酶1(ENTPD1,也称为CD39或分化群39),以及将AMP转化为腺苷的胞外5'-核苷酸酶(NT5E或5NT,也称为CD73或分化群73)。在一个实施方案中,本公开考虑了与CD73抑制剂的组合,诸如WO 2017/120508、WO 2018/094148和WO 2018/067424中描述的那些CD73抑制剂。在一个实施方案中,CD73抑制剂是AB680。在另一种方法中,靶向腺苷A2a和A2b受体。还考虑了与A2a和/或A2b受体的拮抗剂的组合。在一个实施方案中,本公开考虑了与WO/2018/136700或WO 2018/204661中描述的腺苷受体拮抗剂的组合。在一个实施方案中,腺苷受体拮抗剂是AB928(etrumadenant)。

[0186] 在某些实施方案中,本公开考虑了本文所述的抗TIGIT抗体与磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)(特别是PI3K $\gamma$ 同种型)的抑制剂的联合使用。PI3K $\gamma$ 抑制剂可通过调节骨髓细胞来刺激抗癌免疫应答,例如通过抑制抑制性骨髓细胞、抑制免疫抑制性肿瘤浸润性巨噬细胞,或通过刺激巨噬细胞和树突状细胞以制备有助于有效T细胞应答的细胞因子,从而导致癌症发生和扩散的减少。可与本文所述的抗TIGIT抗体组合的示例性PI3K $\gamma$ 抑制剂包括WO 2020/0247496A1中描述的那些。在一个实施方案中,PI3K $\gamma$ 抑制剂是IPI-549。

[0187] 在某些实施方案中,本公开考虑了本文所述的抗TIGIT抗体与精氨酸酶抑制剂组合的用途,该精氨酸酶抑制剂已被证明是负责或参与炎症触发的免疫功能障碍、肿瘤免疫逃逸、免疫抑制和感染性疾病的免疫病理学。示例性的精氨酸酶化合物可见于例如PCT/US2019/020507和WO/2020/102646。

[0188] 在某些实施方案中,本公开考虑了根据本公开的抗TIGIT抗体与HIF-2 $\alpha$ 抑制剂一起使用的用途,HIF-2 $\alpha$ 在细胞对低氧可用性的应答中发挥不可或缺的作用。在缺氧条件下,缺氧诱导因子(HIF)转录因子可激活调节代谢、血管新生、细胞增殖和存活、免疫逃避和炎

症应答的基因的表达。HIF-2 $\alpha$ 过表达与患有各种癌症的患者的不良临床结果相关;缺氧在许多急性和慢性炎症性疾病中也很普遍,诸如炎症肠病和类风湿性关节炎。

[0189] 本公开还考虑了本文所述的抗TIGIT抗体与一种或多种RAS信号传导抑制剂的组合。RAS基因家族(例如,HRAS、KRAS和NRAS)中的致癌突变与多种癌症相关。例如,已在多种肿瘤类型中观察到KRAS基因家族中的G12C、G12D、G12V、G12A、G13D、Q61H、G13C和G12S等的突变。已经研究了用于抑制突变型RAS信号传导的直接和间接抑制策略。间接抑制剂靶向RAS信号传导途径中除RAS以外的效应子,并且包括但不限于RAF、MEK、ERK、PI3K、PTEN、SOS(例如,SOS1)、mTORC1、SHP2(PTPN11)和AKT的抑制剂。正在开发的间接抑制剂的非限制性示例包括RMC-4630、RMC-5845、RMC-6291、RMC-6236、JAB-3068、JAB-3312、TN0155、RLY-1971、BI1701963。还开发了RAS突变体的直接抑制剂,并且通常靶向KRAS-GTP复合物或KRAS-GDP复合物。正在开发的示例性直接RAS抑制剂包括但不限于索托拉西布(sotorasib)(AMG510)、MRTX849、mRNA-5671和ARS1620。在一些实施方案中,该一种或多种RAS信号传导抑制剂选自自由以下组成的组:RAF抑制剂、MEK抑制剂、ERK抑制剂、PI3K抑制剂、PTEN抑制剂、SOS1抑制剂、mTORC1抑制剂、SHP2抑制剂和AKT抑制剂。在其他实施方案中,该一种或多种RAS信号传导抑制剂直接抑制RAS突变体。

[0190] 在一些实施方案中,本公开涉及根据本公开的抗TIGIT抗体与一种或多种anexelektin(即,AXL)抑制剂的组合。AXL信号传导途径与肿瘤生长和转移相关,并且被认为介导对多种癌症疗法的抗性。有多种AXL抑制剂正在开发中,它们也抑制TAM家族(即,TYRO3、MERTK)中的其他激酶,以及其他受体酪氨酸激酶,包括MET、FLT3、RON和AURORA等。示例性的多激酶抑制剂包括吉列替尼、梅沙替尼、卡博替尼、BMS777607和福瑞替尼。还开发了AXL特异性抑制剂,例如SGI-7079、TP-0903(即,度博替尼(dabrafenib))、BGB324(即,倍美替尼(bemcentinib))和DP3975。

[0191] 在某些实施方案中,本公开考虑了将本文所述的抗TIGIT抗体与过继性细胞疗法联合使用,过继性细胞疗法是一种新的且有前景的个性化免疫疗法形式,其中向癌症患者施用具有抗肿瘤活性的免疫细胞。使用肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)和经工程化以表达例如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的T细胞来开发过继性细胞疗法。过继性细胞疗法通常涉及从个体收集T细胞,对这些T细胞进行基因修饰以靶向特定抗原或增强它们的抗肿瘤效果,将它们扩增到足够的数量,并将经基因修饰的T细胞输注到癌症患者体内。T细胞可从该患者收集,随后将扩增的细胞再输注给该患者(例如,自体的),或者T细胞可从供体患者收集(例如,同种异体的)。

[0192] T细胞介导的免疫包括多个连续步骤,每个步骤都通过平衡刺激和抑制信号进行调节,以优化应答。虽然免疫应答中几乎所有的抑制信号最终都会调节细胞内信号传导途径,但许多抑制信号通过膜受体引发,其配体要么是膜结合的,要么是可溶的(细胞因子)。虽然调节T细胞活化的共刺激和抑制性受体和配体在癌症中相对于正常组织通常不过表达,但是在组织中调节T细胞效应子功能的抑制性配体和受体在肿瘤细胞或与肿瘤微环境相关的非转化细胞上通常过表达。可使用激动剂抗体(用于共刺激途径)或拮抗剂抗体(用于抑制途径)调节可溶性和膜结合受体(配体免疫检查点)的功能。因此,与目前批准用于癌症疗法的大多数抗体相比,阻断或激动免疫检查点的抗体不直接靶向肿瘤细胞,而是靶向淋巴细胞受体或其配体以增强内源性抗肿瘤活性。[参见Pardoll,(2012年4月),Nature

Rev.Cancer,第12卷:第252-264页]。

[0193] 其中一些在各种类型的肿瘤细胞中选择性上调并且是阻断的候选物的免疫检查点(配体和受体)的示例包括PD-1(程序性细胞死亡蛋白1);PD-L1(程序性细胞死亡蛋白1配体1);BTLA(B和T淋巴细胞衰减子);CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4);TIM-3(T细胞免疫球蛋白粘蛋白3);LAG-3(淋巴细胞活化基因3);TIGIT(具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体);和杀伤抑制剂受体,可基于其结构特征分成两类:i)杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)和ii)C型凝集素受体(II型跨膜受体家族的成员)。文献中已经描述了其他不太明确的免疫检查点,包括受体(例如,2B4(也称为CD244)受体)和配体(例如,某些B7家族抑制性配体,诸如B7-H3(也称为CD276)和B7-H4(也称为B7-S1、B7x和VCTN1))。[参见Pardoll,(2012年4月),Nature Rev.Cancer,第12卷:第252-264页]。

[0194] 本公开考虑了将本文所述的抗TIGIT抗体与前述免疫检查点受体和配体的抑制剂以及尚待描述的免疫检查点受体和配体的抑制剂联合使用。某些免疫检查点调节剂目前已获批准,许多其他调节剂正在开发中。在2011年获批治疗黑素瘤时,全人源化CTLA4单克隆抗体伊匹单抗(例如,**YERVOY**<sup>®</sup>;Bristol Myers Squibb)成为第一个获得美国监管机构批准的免疫检查点抑制剂。包括CTLA4和抗体的融合蛋白(CTLA4-Ig;阿巴西普(例如,**ORENCIA**<sup>®</sup>;Bristol Myers Squibb)已用于治疗类风湿性关节炎,并且其他融合蛋白已被证明在对EB病毒敏感的肾移植患者中有效。下一类获得监管机构批准的免疫检查点抑制剂针对PD-1及其配体PD-L1和PD-L2。已批准的抗PD-1抗体包括纳武单抗(例如,**OPDIVO**<sup>®</sup>;Bristol Myers Squibb)和帕博利珠单抗(例如,**KEYTRUDA**<sup>®</sup>;Merck),用于各种癌症,包括鳞状细胞癌、经典霍奇金淋巴瘤和尿路上皮癌。已批准的抗PD-1抗体包括阿维鲁单抗(例如,**BAVENCIO**<sup>®</sup>;EMD Serono&Pfizer)、阿替利珠单抗(例如,**TECENTRIQ**<sup>®</sup>;Roche/Genentech)和度伐利尤单抗(例如,**IMFINZI**<sup>®</sup>;AstraZeneca),用于某些癌症,包括尿路上皮癌。在本文提供的一些组合中,免疫检查点抑制剂选自MEDI-0680纳武单抗、帕博利珠单抗、阿维鲁单抗、阿特珠单抗、布格利单抗、BI-754091、卡瑞利珠单抗、柯希利单抗、度伐利尤单抗、多塔利单抗、西米普利单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、特瑞普利单抗、瑞弗利单抗、萨善利单抗和赛帕利单抗(AB122)。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是MEDI-0680(AMP-514;WO2012/145493)或匹地利珠单抗(CT-011)。靶向PD-1受体的另一种方法是由与IgG1的Fc部分融合的PD-L2(B7-DC)的细胞外结构域组成的重组蛋白,称为AMP-224。在一个实施方案中,本公开考虑了使用根据本公开的抗TIGIT抗体与PD-1抗体。在一个特定实施方案中,PD-1抗体是赛帕利单抗。在一些实施方案中,抗TIGIT抗体以每三周约200mg至1500mg的量提供,并且抗PD-1抗体以每三周约100mg至1200mg的量提供。在另一个实施方案中,本文所述的抗TIGIT抗体以每四周约300mg至1800mg的量给予,并且抗PD-1抗体以每四周约200mg至1500mg的量提供。在又一个实施方案中,该抗PD-1抗体是赛帕利单抗并且以每三周或四周约360mg或480mg的量提供。

[0195] 在另一方面,本公开考虑了与抑制T细胞活化的细胞因子(例如,IL-6、IL-10、TGF- $\beta$ 、VEGF和其他免疫抑制细胞因子)或刺激T细胞活化的细胞因子的组合,用于刺激免疫应答。

[0196] 在又一方面,可通过所公开的抗TIGIT抗体和以下物质中的一者或多者的组合来刺激T细胞应答:(i)抑制T细胞活化的蛋白质的拮抗剂(例如,免疫检查点抑制剂),诸如CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、PVRIG、半乳糖凝集素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳糖凝集素-1、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1和TIM-4,和/或(ii)刺激T细胞活化的蛋白质的激动剂,诸如B7-1、B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、CD40、DR3和CD2。可与本公开的抗TIGIT抗体联合用于治疗癌症的其他药剂包括NK细胞上的抑制性受体的拮抗剂或NK细胞上的活化受体的激动剂。例如,本文所述的抗TIGIT抗体可与KIR的拮抗剂(诸如利瑞鲁单抗)组合。

[0197] 用于联合疗法的其他药剂包括抑制或耗尽巨噬细胞或单核细胞的药剂,包括但不限于CSF-1R拮抗剂,诸如CSF-1R拮抗剂抗体,包括RG7155(W011/70024、W011/107553、W11/131407、W013/87699、W013/119716、W013/132044)或FPA-008(W011/140249;W013169264;W014/036357)。

[0198] 在另一个方面,所公开的抗TIGIT抗体可与以下物质中的一者或多者组合:连接阳性共刺激受体的激动剂、减弱通过抑制性受体的信号传导的阻断剂、拮抗剂和一种或多种全身性增加抗肿瘤T细胞频率的药剂、克服肿瘤微环境内的不同免疫抑制性途径(例如,阻断抑制性受体参与(例如,PD-L1/PD-1相互作用)、耗尽或抑制Treg(例如,使用抗CD25单克隆抗体(例如,达克珠单抗)或通过离体抗CD25珠耗尽)、或逆转/防止T细胞无能或衰竭)的药剂,以及在肿瘤部位触发先天免疫激活和/或炎症的药剂。

[0199] 在一个方面,免疫肿瘤剂是CTLA-4拮抗剂,诸如拮抗性CTLA-4抗体。合适的CTLA-4抗体包括,例如,伊匹单抗(例如,**YERVOY**<sup>®</sup>;Bristol Myers Squibb)或曲美木单抗。在另一个方面,免疫肿瘤剂是PD-L1拮抗剂,诸如拮抗性PD-L1抗体。合适的PD-L1抗体包括,例如,阿特珠单抗(MPDL3280A;W02010/077634)(例如,**TECENTRIQ**<sup>®</sup>;Roche/Genentech)、度伐利尤单抗(MEDI4736)、BMS-936559(W02007/005874)和MSB0010718C(W02013/79174)。在另一方面,免疫肿瘤剂是LAG-3拮抗剂,诸如拮抗性LAG-3抗体。合适的LAG-3抗体包括例如BMS-986016(W010/19570、W014/08218)或IMP-731或IMP-321(W008/132601、W009/44273)。在另一方面,免疫肿瘤剂是CD137(4-1BB)激动剂,诸如激动性CD137抗体。合适的CD137抗体包括,例如,乌瑞芦单抗和PF-05082566(W012/32433)。在另一方面,免疫肿瘤剂是GITR激动剂,诸如激动性GITR抗体。合适的GITR抗体包括,例如,BMS-986153、BMS-986156、TRX-518(W006/105021、W009/009116)和MK-4166(W011/028683)。在另一方面,免疫肿瘤剂是OX40激动剂,诸如激动性OX40抗体。合适的OX40抗体包括,例如,MEDI-6383或MEDI-6469。在另一方面,免疫肿瘤剂是OX40L拮抗剂,诸如拮抗性OX40抗体。合适的OX40L拮抗剂包括,例如,RG-7888(W006/029879)。在另一方面,免疫肿瘤剂是CD40激动剂,诸如激动性CD40抗体。在又一个实施方案中,免疫肿瘤剂是CD40拮抗剂,诸如拮抗性CD40抗体。合适的CD40抗体包括,例如,卢卡木单抗或达西组单抗。在另一方面,免疫肿瘤剂是CD27激动剂,诸如激动性CD27抗体。合适的CD27抗体包括,例如,伐立鲁单抗。在另一方面,免疫肿瘤剂是MGA271(针对B7H3)(W011/109400)。在又一个实施方案中,考虑了根据本公开的抗TIGIT抗体与针对Trop-2的药剂(例如,抗体药物缀合物,sacituzumab govitecan-hziy)的组合。在又一个实施方案中,考虑了本文所述的抗TIGIT抗体与抑制CD47-SIRPα途径的药剂的组合。

抗CD47抗体的示例是莫洛利单抗。

[0200] 用于治疗心血管和/或代谢相关疾病、障碍和病症的联合疗法的治疗剂的示例包括：他汀类(例如，CRESTOR<sup>®</sup>、LESCOL<sup>®</sup>、LIPITOR<sup>®</sup>、MEVACOR<sup>®</sup>、PRAVACOL<sup>®</sup>和ZOCOR<sup>®</sup>)，其抑制胆固醇的酶促合成；胆汁酸树脂(例如，COLESTID<sup>®</sup>、LO-CHOLEST<sup>®</sup>、PREVALITE<sup>®</sup>、QUESTRAN<sup>®</sup>和WELCHOL<sup>®</sup>)，其螯合胆固醇并防止其吸收；依泽替米贝(ZETIA<sup>®</sup>)，其阻断胆固醇吸收；苯氧酸类(例如，TRICOR<sup>®</sup>)，其降低甘油三酯并可适度增加HDL；烟酸(例如，NIACOR<sup>®</sup>)，其适度降低LDL胆固醇和甘油三酯；和/或上述药物的组合(例如，VYTORIN<sup>®</sup>(依泽替米贝与辛伐他汀)。可以是与本文所述的抗TIGIT抗体联合使用的候选物的替代性胆固醇治疗剂包括各种补充剂和草药(例如，大蒜、二十八烷醇和印度没药)。

[0201] 可用于免疫和炎症相关疾病、障碍或病症的联合疗法的治疗剂的示例包括但不限于以下物质：非甾体抗炎药(NSAID)，诸如阿司匹林、布洛芬和其他丙酸衍生物(阿明洛芬、苯恶洛芬、布氯酸、卡洛芬、芬布芬、非诺洛芬、氟洛芬、氟比洛芬、吲哚洛芬、酮洛芬、咪洛芬、萘普生、奥沙普秦、吡洛芬、普拉洛芬、舒洛芬、噻洛芬酸和硫恶洛芬)、乙酸衍生物(消炎痛、阿西美辛、阿氯芬酸、环氯萘酸、双氯芬酸、芬氯酸、芬克洛酸、芬替酸、fuirofenac、异丁芬酸、伊索克酸、oxpinac、舒林酸、硫平酸、托美丁、齐多美辛和佐美酸)、芬那酸衍生物(氟灭酸、甲氯芬那酸、甲灭酸、尼氟灭酸和托芬那酸)、联苯羧酸衍生物(二氟尼柳和氟苯柳)、昔康类(伊索昔康、吡罗昔康、舒多昔康和替诺昔康)、水杨酸盐(乙酰基水杨酸、柳氮磺吡啶)和吡唑酮类(阿扎丙宗、苄哌立隆(bezpiperylon)、非普拉宗、莫非保松、羟保松、保泰松)。其他组合包括环氧合酶-2(COX-2)抑制剂。

[0202] 用于组合的其他活性剂包括类固醇，诸如泼尼松龙、泼尼松、甲基泼尼松龙、倍他米松、地塞米松或氢化可的松。这种组合可能是特别有利的，因为通过逐渐减少所需的类固醇剂量，可减少或甚至消除类固醇的一种或多种副作用。

[0203] 可用于治疗例如类风湿性关节炎的组合的活性剂的另外的示例包括细胞因子抑制性抗炎药物(CSAID)；其他人细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂，例如，TNF、LT、IL-10、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF或PDGF。

[0204] 活性剂的特定组合可在自身免疫和随后的炎性级联反应的不同点进行干扰，并且包括TNF拮抗剂，诸如嵌合、人源化或人TNF抗体、REMICADE<sup>®</sup>、HUMIRA<sup>®</sup>、抗TNF抗体片段(例如，CDP870)和可溶性p55或p75 TNF受体、其衍生物、p75TNFR1gG(ENBREL<sup>®</sup>)或p55TNFR1gG(来那西普)、可溶性IL-13受体(sIL-13)以及TNF $\alpha$ -转化酶(TACE)抑制剂；类似地，IL-1抑制剂(例如，白细胞介素-1转化酶抑制剂)可以是有效的。其他组合包括白细胞介素11、抗P7和p选择素糖蛋白配体(PSGL)。可与本文所述的A2AR/A2BR抑制剂组合使用的药剂的其他示例包括干扰素-131a(AVONEX<sup>®</sup>)；干扰素-131b(BETASERON<sup>®</sup>)；克帕松；高压氧；静脉注射免疫球蛋白；克拉屈滨；和其他人类细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂(例如，针对CD40配体和CD80的抗体)。

[0205] 在一些实施方案中，组合是本公开的抗体与针对表面抗原的第二抗体，该表面抗

原相对于对照正常组织优先在癌细胞上表达。可与本公开的抗体一起施用用于联合疗法以治疗癌症的抗体的一些示例包括针对HER2抗原的 **Herceptin<sup>®</sup>** (曲妥珠单抗)、针对VEGF的 **Avastin<sup>®</sup>** (贝伐单抗) 或针对EGF受体的抗体诸如 (**Erbitux<sup>®</sup>**, 西妥昔单抗) 和 **Vectibix<sup>®</sup>** (帕尼单抗)。可施用的其他药剂包括PD-1、PD-L1、CTLA-4、4-1BB、BTLA、PVRIG、VISTA、TIM-3 和LAG-3中任一者的抗体或其他抑制剂;或其他下游信号传导抑制剂,例如,mTOR和GSK3 $\beta$ 抑制剂;以及细胞因子,例如,干扰素- $\gamma$ 、IL-2和IL-15。另外的药剂的一些具体示例包括:伊匹单抗、帕唑帕尼、舒尼替尼、达沙替尼、帕博利珠单抗、INCR024360、达拉非尼、曲美替尼、阿特珠单抗 (MPDL3280A)、埃罗替尼 (例如 **TARCEVA<sup>®</sup>**)、考比替尼、纳武单抗和赛帕利单抗。用于联合疗法的第二抗体或其他药剂的选择取决于所治疗的癌症。任选地,测试癌症的抗原表达或优先表达以指导选择合适的抗体。在一些实施方案中,第二抗体的同种型是人IgG1以促进效应子功能,诸如ADCC、CDC和吞噬作用。

[0206] 类似的联合疗法可用于治疗或预防感染性疾病,诸如病毒、细菌、真菌和寄生虫疾病、障碍和病症,以及与其相关的障碍。例如,本公开的抗体可与针对病原体的抗体或针对病原体的疫苗 (例如,针对劳斯肉瘤病毒的帕利珠单抗) 组合。疫苗可以是有效诱导免疫应答的病原体或其片段的蛋白质。本公开的抗体增强了针对该病原体的抗体或疫苗的免疫应答。本公开的抗体还可与离体扩增的T细胞或自然杀伤细胞一起施用。

[0207] 此类联合疗法包括针对各种病毒生命周期阶段并具有不同作用机制的抗病毒剂,包括但不限于以下抗病毒剂:病毒脱壳抑制剂 (例如,金刚烷胺和金刚烷乙胺);逆转录酶抑制剂 (例如,阿昔洛韦、齐多夫定和拉米夫定);靶向整合酶的药剂;阻断转录因子与病毒DNA的连接的药剂;影响翻译的药剂 (例如,反义分子) (例如,福米韦森);调节翻译/核酶功能的药剂;蛋白酶抑制剂;病毒组装调节剂 (例如,利福平);抗逆转录病毒药,例如核苷类似物逆转录酶抑制剂 (例如,叠氮胸苷 (AZT)、ddI、ddC、3TC、d4T);非核苷类逆转录酶抑制剂 (例如,依法韦仑、奈韦拉平);核苷酸类似物逆转录酶抑制剂;以及防止病毒颗粒释放的药剂 (例如,扎那米韦和奥司他韦)。某些病毒感染 (例如,HIV) 的治疗和/或预防通常需要一组 (“混合”) 抗病毒剂。

[0208] 考虑了与本文公开的任何抗TIGIT抗体联合使用的其他抗病毒剂包括但不限于以下抗病毒剂:阿巴卡韦、阿德福韦、金刚烷胺、安普那韦、安普利近、阿比多尔、阿扎那韦、**ATRIPLA<sup>®</sup>**、波普瑞韦、西多福韦、可比韦、达芦那韦、地拉夫定、地达诺新、二十二烷醇、依度尿苷、恩曲他滨、恩夫韦肽、恩替卡韦、泛昔洛韦、福沙那韦、膦甲酸、膦酰乙酸、更昔洛韦、伊巴他滨、异丙肌苷、碘苷、咪喹莫特、茚地那韦、肌苷、各种干扰素 (例如,聚乙二醇化干扰素 $\alpha$ -2a)、洛匹那韦、洛韦胺、马拉韦罗、吗啉胍、甲哌喹酮、奈非那韦、nexavir、喷昔洛韦、帕拉米韦、普来可那立、鬼臼毒素、雷特格韦、利巴韦林、利托那韦、pyrimidine、沙奎那韦、司他夫定、特拉匹韦、替诺福韦、替拉那韦、曲氟尿苷、三协唯、曲金刚胺、**TRUVADA<sup>®</sup>**、伐昔洛韦、缙更昔洛韦、维克韦罗、阿糖腺苷、三氮唑核苷 (viramidine) 和扎西他滨。

[0209] 本公开考虑了本文公开的任何抗TIGIT抗体与抗寄生虫剂的联合使用。此类药剂包括但不限于噻苯达唑、双羟萘酸噻嘧啶、甲苯达唑、吡喹酮、氯硝柳胺、硫双二氯酚、奥沙尼喹、美曲磷酯、伊维菌素、阿苯达唑、依氟鸟氨酸、美拉脾醇、喷他脒、苄硝唑、硝呋莫司和硝基咪唑。技术人员知道可用于治疗寄生虫病的其他药剂。

[0210] 本公开的实施方案考虑了将本文公开的任何抗TIGIT抗体与可用于治疗或预防细菌性疾病的药剂联合使用。抗菌剂可以多种方式分类,包括基于作用机制、基于化学结构和基于活性谱。抗菌剂的示例包括靶向细菌细胞壁(例如,头孢菌素和青霉素)或细胞膜(例如,多粘菌素)或干扰必需的细菌酶(例如,磺胺类、利福霉素和喹啉)的那些抗菌剂。大多数靶向蛋白质合成的抗菌剂(例如,四环素类和大环内酯类)具有抑菌作用,而药剂诸如氨基糖苷类具有杀菌作用。另一种对抗菌剂分类的方式是基于其靶特异性;“窄谱”药剂靶向特定类型的细菌(例如,革兰氏阳性细菌诸如链球菌(*Streptococcus*)),而“广谱”药剂具有针对较宽范围细菌的活性。技术人员知道适用于特定细菌感染的抗菌剂类型。

[0211] 本公开的实施方案考虑了将本文公开的任何抗TIGIT抗体与可用于治疗或预防真菌性疾病的药剂联合使用。抗真菌剂包括多烯类(例如,两性霉素、制霉菌素和匹马霉素);唑类(例如,氟康唑、伊曲康唑和酮康唑);烯丙胺(例如,萘替芬和特比萘芬)和吗啉(例如,阿莫罗芬);和抗代谢物(例如,5-氟胞嘧啶)。

[0212] 本公开涵盖上述任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

#### [0213] V. 其他应用

[0214] 本公开的抗TIGIT抗体可用于在临床诊断或治疗或在研究中检测TIGIT。例如,抗体可用于检测T细胞、自然杀伤细胞和癌细胞上TIGIT的存在,作为受试者患有适于治疗的癌症或感染性疾病的指示。TIGIT在患有癌症或感染性疾病的受试者的T细胞、自然杀伤细胞和/或癌细胞上的表达还提供了盖癌症或感染性疾病适于用本公开的抗体治疗的指示。这些抗体也可作为研究试剂出售,用于检测T细胞、自然杀伤细胞和癌细胞以及它们对各种刺激的应答的实验室研究。在此类用途中,抗体可用一个或多个可检测信号标记,包括但不限于荧光分子、自旋标记分子、酶或放射性同位素,并且可以具有进行TIGIT的测定所需的所有试剂的试剂盒的形式提供。本公开的抗TIGIT抗体也可用于纯化TIGIT,例如通过亲和层析。

#### [0215] VI. 试剂盒

[0216] 抗TIGIT的抗体可与所描述的用于联合疗法的任何第二抗体或试剂组合,作为试剂盒的组成部分。本文公开的公开内容提供了一种或多种试剂盒,其含有一种或多种本文公开的抗体以及一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体(诸如但不限于磷酸盐缓冲盐水溶液、水、无菌水、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、卵磷脂、花生油、芝麻油、乳液诸如油/水乳液或水/油乳液、微乳液、纳米载体和各种类型的润湿剂)。添加剂诸如醇、油、二醇、防腐剂、调味剂、着色剂、悬浮剂等也可与载体、稀释剂或赋形剂一起包含在本公开的试剂盒中。在一个实施方案中,适用于本文所公开的抗体组合物的药学上可接受的载体是无菌的、无病原体的,和/或以其他方式安全施用于受试者而没有相关感染和其他不适当的副作用的风险。在试剂盒中,可在单独的小瓶中提供相应的试剂,并附有组合后施用的说明书或单独施用的说明书。试剂盒还可包括用于适当处理和储存本文公开的任何抗TIGIT抗体的书面说明。

#### [0217] VII. 实施方案

[0218] 实施方案1. 一种与人TIGIT特异性结合的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,包括:  
(a) 重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:36具有至少80%序列同一性的重链(HC)互补决定区(CDR)1、与SEQ ID NO:37具有至少80%序列同一性的HC-CDR2和与SEQ ID NO:38具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:39

具有至少80%序列同一性的轻链(LC)CDR1、与SEQ ID NO:40具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:41具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (b) 重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:42具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:43具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:44具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:45具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:46具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:47具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (c) 重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:48具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:49具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:50具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:51具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:52具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:53具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (d) 重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:54具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:55具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:56具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:57具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:58具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:59具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (e) 重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:60具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:61具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:62具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:63具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:64具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (f) 重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:60具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:66具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:67具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:63具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:68具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (g) 重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:69具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:55具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:70具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:71具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:68具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3; (h) 重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:72具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:73具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:67具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:63具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:68具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3;或 (i) 重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:74具有至少80%序列同一性的HC-CDR1,与SEQ ID NO:75具有至少80%序列同一性的HC-CDR2,以及与SEQ ID NO:67具有至少80%序列同一性的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:63具有至少80%序列同一性的LC-CDR1、与SEQ ID NO:68具有至少80%序列同一性的LC-CDR2和与SEQ ID NO:65具有至少80%序列同一性的LC-CDR3。

[0219] 实施方案2.根据实施方案1所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,包括(a)重链

可变区,该重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括具有包含与SEQ ID NO:39的同一性的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的LC-CDR3;(b) 重链可变区,该重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的LC-CDR3;(c) 重链可变区,该重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的LC-CDR3;(d) 重链可变区,该重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的LC-CDR3;(e) 重链可变区,该重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的LC-CDR3;(f) 重链可变区,该重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的LC-CDR3;(g) 重链可变区,该重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的LC-CDR3;(h) 重链可变区,该重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的LC-CDR3;或(i) 重链可变区,该重链可变区包括具有包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的HC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HC-CDR3;和轻链可变区,该轻链可变区包括具有包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的LC-CDR1、具有包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列的LC-CDR2和具有包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的LC-CDR3。

[0220] 实施方案3.根据实施方案1或2所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,包括(a) 与SEQ ID NO:1具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:2具有至少80%序列

同一性的轻链可变区；(b)与SEQ ID NO:3具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:4具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(c)与SEQ ID NO:5具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:6具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(d)与SEQ ID NO:7具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(e)与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:10具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(f)与SEQ ID NO:11具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:12具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(g)与SEQ ID NO:13具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:14具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(h)与SEQ ID NO:15具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:16具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(i)与SEQ ID NO:17具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:12具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(j)与SEQ ID NO:76具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:77具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(k)与SEQ ID NO:78具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:77具有至少80%序列同一性的轻链可变区；(l)与SEQ ID NO:76具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:79具有至少80%序列同一性的轻链可变区；或(m)与SEQ ID NO:78具有至少80%序列同一性的重链可变区和与SEQ ID NO:79具有至少80%序列同一性的轻链可变区；

[0221] 实施方案4.根据实施方案1至3中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中该抗TIGIT抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。

[0222] 实施方案5.根据实施方案1至4中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中该抗TIGIT抗体或其抗原结合片段是嵌合抗体、人源化抗体或贴面化抗体。

[0223] 实施方案6.根据实施方案5所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中该嵌合抗体包括人IgG1/ $\kappa$ Fab恒定结构域。

[0224] 实施方案7.根据实施方案1至3中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中该抗TIGIT抗体或其抗原结合片段是人抗体。

[0225] 实施方案8.根据前述实施方案中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中该抗TIGIT抗体或其抗原结合片段抑制TIGIT与CD155的结合，任选地其中该抗TIGIT抗体或其抗原结合片段以约0.1nM至约10nM、约0.1nM至约5nM、约0.2nM至约2nM、约0.2nM至约0.8nM、约0.4nM至约0.8nM或约0.6nM至约0.8nM的 $IC_{50}$ 抑制结合，如实施例1中所测量的。

[0226] 实施方案9.根据实施方案1至5或7至8中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中该抗体还包括选自变体人IgG1、变体人IgG2、变体人IgG3或变体人IgG4的变体重链恒定区，以及任选地人轻链恒定区。

[0227] 实施方案10.根据实施方案9所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中该变体重链恒定区相对于野生型重链恒定区具有增强或降低的效应子功能。

[0228] 实施方案11.根据实施方案10所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中该变体人IgG重链恒定区包含SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:99或SEQ ID NO:101。

[0229] 实施方案12.根据实施方案1至5或7至8中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中该抗体还包括野生型人IgG重链恒定区，以及任选地人轻链恒定区。

[0230] 实施方案13.根据实施方案12所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中该野生

型人IgG重链恒定区包含SEQ ID NO:94。

[0231] 实施方案14.根据实施方案12或13所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,包括人轻链 $\kappa$ 恒定区,任选地其中该人轻链恒定区包含SEQ ID NO:95。

[0232] 实施方案15.根据实施方案1至5或7至8所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中该抗体具有重链和轻链,其中 (a) 该重链具有包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列,并且该轻链具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;或 (b) 该重链具有包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列,并且该轻链具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;或 (c) 该重链具有包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列,并且该轻链具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列;或 (d) 该重链具有包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列,并且该轻链具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

[0233] 实施方案16.根据前述实施方案中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其结合片段 (a) 具有通过表面等离子体共振测量的约 $0.01 \times 10^{-11}$ M至约 $100 \times 10^{-11}$ M、约 $0.1 \times 10^{-11}$ M至约 $100 \times 10^{-11}$ M、约 $0.1 \times 10^{-11}$ M至约 $10 \times 10^{-11}$ M、约 $1 \times 10^{-11}$ M至约 $100 \times 10^{-11}$ M或约 $1 \times 10^{-11}$ M至约 $10 \times 10^{-11}$ M的平衡结合常数(KD); (b) 阻断可溶性人CD155配体与细胞表面人TIGIT的结合,其中半最大抑制浓度(IC50)为约0.2nM至约2nM、约0.2nM至约0.8nM、约0.6nM至约0.8nM或约0.6nM至约0.8nM,如实施例1中所测量的; (c) 与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合: (i) SEQ ID NO:80的D72,以及SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、S80和K82中的至少一者; (ii) SEQ ID NO:80的E60和D72以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、S80和K82中的至少一者; (iii) SEQ ID NO:80的D72和K82以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60和S80中的至少一者; (iv) SEQ ID NO:80的E60、D72和K82以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58和S80中的至少一者;或 (v) SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82;或 (d) (a)、(b)和(c)的任何组合。

[0234] 实施方案17.根据实施方案16所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段与根据实施方案1至17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段竞争结合到TIGIT。

[0235] 实施方案18.根据实施方案16或17所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中过量的该抗体或其抗原结合片段与参考抗体以至少约55%、60%、65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%竞争结合到TIGIT,如在竞争性结合测定中所测量的,其中该参考抗体包括具有包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链和具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链。

[0236] 实施方案19.一种与人TIGIT特异性结合的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,包括重链和轻链,该重链具有包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列,并且该轻链具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。

[0237] 实施方案20.一种抑制TIGIT与CD155结合的方法,包括使TIGIT与根据前述实施方案中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段接触。

[0238] 实施方案21.一种治疗受病原体感染的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用有效方案或治疗有效量的根据前述实施方案中任一项所述的抗体。

[0239] 实施方案22.根据实施方案21所述的方法,其中该病原体是病毒、细菌、真菌或原生动物。

[0240] 实施方案23.根据实施方案22所述的方法,其中该病原体是HIV、SIV、肝炎、疱疹病毒、腺病毒、流感病毒、黄病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV病毒、登革病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC病毒、虫媒病毒性脑炎病毒、衣原体、立克次体细菌、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、脑膜炎球菌、淋球菌、克雷伯氏菌、变形杆菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团菌、白喉、沙门氏菌、杆菌、霍乱、破伤风、肉毒杆菌、炭疽、鼠疫、钩端螺旋体病和莱姆病细菌。

[0241] 实施方案24.根据实施方案21至23中任一项所述的方法,其中用针对该病原体诱导免疫应答的疫苗治疗该受试者,该免疫应答通过该抗体增强。

[0242] 实施方案25.根据实施方案24所述的方法,其中该疫苗包括该病原体或其片段的蛋白质。

[0243] 实施方案26.根据实施方案21至25中任一项所述的方法,其中还向该受试者施用针对该病原体的第二抗体,其中通过该抗体增强针对该病原体的第二抗体的效应子介导的细胞毒性。

[0244] 实施方案27.根据实施方案21至26中任一项所述的方法,其中还向该受试者施用抗病毒剂、抗寄生虫剂、抗菌剂或抗真菌剂中的一者或多者。

[0245] 实施方案28.一种治疗癌症或实现癌症预防的方法,包括向患有癌症或处于癌症风险的受试者施用有效方案或治疗有效量的根据前述实施方案中任一项所述的任一种抗TIGIT抗体或其抗原结合片段。

[0246] 实施方案29.根据实施方案28所述的方法,其中该癌症是血液恶性肿瘤、实体瘤、默克尔细胞癌、尿路上皮癌、头颈部鳞状细胞癌、B细胞淋巴瘤、子宫癌、宫颈癌、睾丸癌、胃肠道癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、胆囊癌、心脏癌、肺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、神经节癌、中枢神经系统(CNS)癌和外周神经系统(PNS)癌,以及造血系统的癌症、免疫系统的癌症。

[0247] 实施方案30.根据实施方案28或29所述的方法,其中向该受试者施用由该抗体或其抗原结合片段活化的肿瘤浸润T细胞。

[0248] 实施方案31.根据实施方案28至30中任一项所述的方法,其中向该受试者施用诱导针对该癌症的免疫应答的疫苗,该免疫应答通过该抗体或其抗原结合片段增强。

[0249] 实施方案32.根据实施方案31所述的方法,其中该疫苗包含在癌细胞表面上表达的抗原或其片段。

[0250] 实施方案33.根据实施方案28至32中任一项所述的方法,其中向该受试者施用自然杀伤细胞,该自然杀伤细胞对该癌症的细胞毒性通过该抗体或其抗原结合片段增强。

[0251] 实施方案34.根据实施方案28至33中任一项所述的方法,其中还向该受试者施用针对在癌症细胞表面上表达的抗原的第二抗体,由此该第二抗体对该癌症的效应子介导的细胞毒性通过该抗体或其抗原结合片段增强。

[0252] 实施方案35.根据实施方案28至33中任一项所述的方法,其中还向该受试者施用针对在免疫细胞表面上表达的抗原的第二抗体。

[0253] 实施方案36.根据实施方案35所述的方法,其中该免疫细胞是T细胞或自然杀伤细胞。

[0254] 实施方案37.根据实施方案35或36所述的方法,其中该抗原是CTLA-4、PD-1或PD-L1。

[0255] 实施方案38.根据实施方案28至37中任一项所述的方法,其中还向该受试者施用选自自由以下项组成的组的一种或多种疗法:化学疗法、放射疗法、基于细胞的疗法和外科手术。

[0256] 实施方案39.根据实施方案28至38中任一项所述的方法,其中还向该受试者施用一种或多种免疫检查点受体或配体的抑制剂。

[0257] 实施方案40.根据实施方案39所述的方法,其中该一种或多种免疫检查点受体或配体选自自由以下项组成的组:CTLA-4、PD-1、PD-L1、TIM-3、LAG-3、PVRIG、BTLA、VISTA、CD96、A<sub>2a</sub>R、A<sub>2b</sub>R、A<sub>2a</sub>/A<sub>2b</sub>R、精氨酸酶、CD39、CD73、IDO和TDO。

[0258] 实施方案41.根据实施方案39所述的方法,其中该抑制剂选自自由以下项组成的组:伊匹单抗、曲美木单抗、纳武单抗、帕博利珠单抗、西米普利单抗、替雷利珠单抗、赛帕利单抗、度伐利尤单抗和阿替利珠单抗。

[0259] 实施方案42.一种药物组合物,包含根据实施方案1至19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

[0260] 实施方案43.一种与人TIGIT的表位结合的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,包含SEQ ID NO 80的以下氨基酸残基中的至少一者:T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82。

[0261] 实施方案44.根据实施方案43所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段与包含TIGIT的至少以下残基的表位结合:(i) SEQ ID NO:80的D72,以及SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、S80和K82中的至少一者;(ii) SEQ ID NO:80的E60和D72以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、S80和K82中的至少一者;(iii) SEQ ID NO:80的D72和K82以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60和S80中的至少一者;(iv) SEQ ID NO:80的E60、D72和K82以及任选地SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58和S80中的至少一者;或(v) SEQ ID NO:80的T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82。

[0262] 实施方案45.根据实施方案43或44所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段与根据实施方案1至19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段竞争结合到TIGIT。

[0263] 实施方案46.根据实施方案43或44所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中过量的该抗体或其抗原结合片段与参考抗体以至少约55%、60%、65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%竞争结合到TIGIT,如在竞争性结合测定中所测量的,其中该参考抗体包括具有包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链和具有包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链。

[0264] 实施方案47.根据实施方案1至19中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段与人TIGIT的表位结合,该表位包含SEQ ID NO 80的以下氨基酸残基中的至少一者:T55、Q56、N58、E60、D72、S80和K82。

[0265] 旨在在本说明书通篇给出的每个最大数值限制包括每个较低数值限制,如同这种较低数值限制在本文中明确地写出一样。在本说明书通篇给出的每个最小数值限制将包括每个较高数值限制,如同这种较高数值限制在本文中明确地写出一样。在本说明书通篇给

出的每个数值范围将包括落入这种较宽数值范围内的每个较窄数值范围,如同这种较窄数值范围在本文中均明确地写出一样。

[0266] 上文或下文引用的所有专利文件、网站、其他出版物、登录号等全文以引用方式并入以用于所有目的,其程度如同每个单独的项目被具体地和单独地指出以引用方式并入一样。如果序列的不同版本在不同时间与登录号相关联,则意指与本申请的有效提交日期的登录号相关联的版本。有效提交日期意指实际提交日期或在适用的情况下参考登录号的优先权申请的提交日期中的较早者。同样,如果出版物、网站等的不同版本在不同时间公布,则除非另外指明,否则意指在本申请的有效提交日期最近公布的版本。除非另外特别指明,否则本公开的任何特征、步骤、元件、实施方案或方面可以与任何其他特征、步骤、元件、实施方案或方面组合使用。

[0267] 尽管为了清楚和理解的目的,已经通过举例说明和示例的方式对本公开进行了相当详细的描述,但很明显可以在所附权利要求书的范围内实施某些改变和修改。

#### [0268] 实施例

[0269] 以下实施例讨论了抗人TIGIT抗体的产生、表征和人源化,还提供了可确定本申请中所述抗体的结合特征的示例性方法。

#### [0270] 实施例1. 抗TIGIT抗体的产生

[0271] 从免疫小鼠获得抗TIGIT抗体。具有SEQ ID NO:83的带His标签的人TIGIT蛋白(hTIGIT-His)和具有SEQ ID NO:85细胞外结构域的带His标签的食蟹猴TIGIT蛋白(cTIGIT-His)在HEK293细胞中瞬时表达并通过抗His亲和层析纯化。用重组hTIGIT-His和cTIGIT-His蛋白的混合物进行BALB/c小鼠的RIMMS免疫。在最终加强之前,通过针对免疫原的ELISA测定测试血浆滴度以确认良好的滴度。在最终增强之后,收集末梢血以及脾脏、腹股沟、肱、腋窝和颈部淋巴结。在融合之前,将收集的材料通过B细胞纯化,以产生用于初始筛选的杂交瘤。

[0272] 在融合后10天,使用ELISA测定进行杂交瘤的初级筛选。384孔ELISA板用1 $\mu$ g/mL hTIGIT-His蛋白包被,封闭板后,加入20 $\mu$ L杂交瘤上清液,使其与包被TIGIT的板结合。在室温下孵育后,洗涤板,然后使用HRP缀合的山羊抗小鼠IgG抗体检测与包被TIGIT的板结合的抗体。

[0273] 然后将阳性杂交瘤细胞扩增到48孔板中,并且收集上清液以在ELISA测定中测试抗体特异性。ELISA板用hTIGIT-His蛋白或cTIGIT-His蛋白包被,并且将CD47-His蛋白(Acro Biosystems,目录号CD7-H5227)用作反向测定对照(control counter assay),从而不选择识别免疫原蛋白His标签的抗体。然后测试显示与人TIGIT和食蟹猴TIGIT的结合呈阳性同时与带His标签的对照蛋白的结合呈阴性的抗体对TIGIT/CD155结合的功能性阻断。

[0274] 将人TIGIT细胞外结构域与小鼠Fc序列融合,该hTIGIT-mFc (SEQ ID NO:87)蛋白在HEK293细胞中表达并通过蛋白A亲和层析纯化。使用来自R&D Systems (目录号9174-CD-01M)的包含与人Fc序列融合的细胞外结构域的重组人CD155(hCD155-hFc)来建立CD155/TIGIT相互作用阻断测定。为了测试抗体的功能性阻断活性,使用0.5 $\mu$ g/mL hTIGIT-mFc蛋白来包被ELISA板,在阻断之后,将杂交瘤上清液与0.5 $\mu$ g/mL hCD155-hFc蛋白一起加入。孵育后,洗涤ELISA板,并使用HRP缀合的山羊抗人IgG抗体检测结合的hCD155-hFc。鉴定了能够与人TIGIT和食蟹猴TIGIT两者结合的克隆,并且抗体结合能够阻断CD155/TIGIT相互作用。

用。

[0275] 进一步扩增这些克隆,并且使用蛋白G柱纯化抗体。通过流式细胞术测试这些纯化的抗体与在细胞表面上表达的人TIGIT和食蟹猴TIGIT的结合。开发了表达全长人TIGIT克隆2A7 (Swiss-Prot Q495A1;SEQ ID NO:80) 或全长食蟹猴TIGIT克隆C10 (Swiss-Prot A0A2K5UW92;SEQ ID NO:84) 的稳定CHO-K1细胞系。对于流式测定,收集细胞,并在4℃下且在存在(或不存在)各种浓度的抗体的情况下,将细胞在100μL HBSS缓冲液中孵育1小时。用HBSS洗涤后,在4℃下用2μg/mL Alexa488标记的山羊抗小鼠IgG抗体(ThermoFisher Scientific,目录号A-1 1001)检测细胞上的抗体结合,持续30分钟。然后洗涤细胞并将其重悬于PBS中,并且使用Attune NxT流式细胞仪(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)进行流式细胞术。获得整个单细胞群的荧光强度的几何平均值。进一步测试能够与细胞表面上表达的人TIGIT和食蟹猴TIGIT结合的抗体对重组人CD155与CHO细胞表面上的人TIGIT结合的阻断活性。将CHO-hTIGIT细胞( $10^5$ 个细胞)与2.5μg/mL hCD155-Fc蛋白在各种浓度的抗体存在下于室温孵育1小时用HBSS缓冲液洗涤后,用PerCP-eFluor 710缀合的抗CD155抗体(ThermoFisher,目录号1550-42)检测hCD155-Fc与hTIGIT-CHO细胞的结合。然后洗涤细胞并进行流式细胞术分析。表4示出了与人TIGIT和食蟹猴TIGIT结合的抗体的半最大有效浓度的( $EC_{50}$ ) ( $n=2$ ) 以及抑制CD155与TIGIT结合的 $IC_{50}$ 。

[0276] 表4:纯化的小鼠抗TIGIT抗体与细胞表面上表达的TIGIT的结合

| $\alpha$ -TIGIT 克隆 | hTIGIT<br>$EC_{50}$ (nM) | cTIGIT<br>$EC_{50}$ (nM) | hTIGIT/hCD155<br>$IC_{50}$ (nM) |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| 22B22              | 0.507                    | 0.580                    | 0.83                            |
| 21B16              | 0.498                    | 1.201                    | 1.15                            |
| 28O12              | 0.638                    | 0.710                    | 1.16                            |
| [0277] 5J24        | 0.704                    | 1.634                    | 1.46                            |
| 21B9               | 0.506                    | 0.631                    | 1.66                            |
| 21F8               | 0.952                    | 1.789                    | 1.67                            |
| 28P24              | 0.466                    | 1.260                    | 1.70                            |
| 24F8               | 1.306                    | 1.846                    | 1.79                            |
| 30M18              | 0.825                    | 1.166                    | 2.19                            |

[0278] 基于杂交瘤细胞系对人TIGIT和食蟹猴TIGIT的结合亲和力,以及其阻断CD155与TIGIT结合的能力,筛选出最佳杂交瘤细胞系。扩增这些克隆的杂交瘤,并按照标准程序确定小鼠抗TIGIT抗体的重链可变区和轻链可变区(分别为VH和VL)序列。抗体21F8、30M18、24F8、5J24、21B9、22B22、28P24、21B16和28O12的成熟VH和VL的氨基酸序列显示在图1A至图1I中,将它们的CDR加下划线。CDR序列的分配和氨基酸位置的编号根据Kabat定义。

[0279] 图1A至图1I所示抗体中的七种抗体被重组表达为具有小鼠可变结构域和人IgG1/ $\kappa$ 恒定结构域的小鼠人嵌合体。重组蛋白从HEK293细胞中表达并通过蛋白A亲和层析纯化。

[0280] 利用先前描述的流式细胞术测定证实了这些嵌合抗TIGIT抗体与细胞表面过表达的人TIGIT和食蟹猴TIGIT的结合能力。在将嵌合抗TIGIT抗体与hTIGIT-CHO或cTIGIT-CHO孵育后,使用Alexa488缀合的山羊抗人IgG抗体(ThermoFisher Scientific,目录号A-11013)检测结合的抗体。还利用如前所述的流式测定确定抑制重组hCD155-hFc与hTIGIT-CHO-K1细胞结合的抗体功能活性。测定与人TIGIT和食蟹猴TIGIT结合的抗TIGIT嵌合体抗体的 $EC_{50}$ ,以及抑制hCD155与表达hTIGIT的细胞结合的 $IC_{50}$ ,并将其呈现于表5中。

[0281] 表5: 重组抗TIGIT小鼠/人嵌合体抗体与在CHO-K1细胞表面上过表达的TIGIT的结合, 及其抑制人CD155与人TIGIT结合的阻断活性

| [0282] | $\alpha$ -TIGIT 抗体 | hTIGIT-CHO<br>EC <sub>50</sub> (nM) | cTIGIT-CHO<br>EC <sub>50</sub> (nM) | hTIGIT-CHO/hCD155<br>IC <sub>50</sub> (nM) |
|--------|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------|
|        | Ch22B22            | 0.16                                | 0.24                                | 1.16                                       |
|        | Ch21B16            | 0.12                                | 0.42                                | 0.20                                       |
|        | Ch28O12            | 0.159                               | 0.358                               | 0.48                                       |
|        | Ch5J24             | 0.131                               | 0.212                               | 0.70                                       |
|        | Ch21B9             | 0.102                               | 0.18                                | 0.80                                       |
|        | Ch24F8             | 0.15                                | 0.199                               | 0.62                                       |
|        | Ch30M18            | 0.336                               | 6.138                               | 2.18                                       |

[0283] 使用流式细胞术测定测试嵌合抗TIGIT抗体与在分离的人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞上内源表达的TIGIT结合的能力。人CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞分别使用RosetteSep™人CD4<sup>+</sup>T细胞富集混合物(Stemcell, 目录号15022) 或人CD8<sup>+</sup>T细胞富集混合物(Stemcell, 目录号15022) 从人全血中分离。如表6所示, 观察到重组抗TIGIT抗体与人CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>细胞结合的相当EC<sub>50</sub>, 这与它们对CHO-K1细胞上过表达的全长人TIGIT的结合亲和力相似。然而, 在克隆之间观察到最大结合活性(MFI<sub>max</sub>) 的差异。

[0284] 表6: 重组抗TIGIT小鼠/人嵌合体抗体与分离的人T细胞的结合

| [0285] | $\alpha$ -TIGIT 抗体 | CD4 <sup>+</sup> EC <sub>50</sub><br>(nM) | CD4 <sup>+</sup> MFI <sub>max</sub> | CD8 <sup>+</sup> EC <sub>50</sub><br>(nM) | CD8 <sup>+</sup> MFI <sub>max</sub> |
|--------|--------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|
|        | Ch24F8             | 0.130                                     | 210                                 | 0.177                                     | 5800                                |
|        | Ch5J24             | 0.073                                     | 125                                 | 0.117                                     | 4500                                |
|        | Ch21B9             | 0.029                                     | 150                                 | 0.062                                     | 4500                                |
|        | Ch22B22            | 0.097                                     | 140                                 | 0.175                                     | 5000                                |
|        | Ch21B16            | 0.119                                     | 180                                 | 0.160                                     | 5200                                |
|        | Ch28O12            | 0.141                                     | 190                                 | 0.249                                     | 7200                                |
|        | Ch30M18            | 0.197                                     | 125                                 | 0.293                                     | 3500                                |

[0286] 测试了与食蟹猴全血结合的重组抗TIGIT嵌合体抗体, 以确认抗体与CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞上的内源性食蟹猴TIGIT蛋白结合的能力。将食蟹猴全血与20 $\mu$ g/mL、5 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL和0.2 $\mu$ g/mL的重组抗TIGIT嵌合体抗体一起孵育。在4℃下孵育30分钟后, 在室温下进行15分钟的RBC裂解。然后洗涤细胞并通过离心收集, 并用含有Fc阻断剂(BD Biosciences, 目录号564219) 和Live-dead fixable Aqua染色剂(Invitrogen, 目录号L34957) 的混合物阻断。在4℃下用抗人IgG Fc-生物素(Southern Biotech, 目录号9040-08) 检测细胞结合的抗TIGIT抗体30分钟, 随后洗涤并离心细胞, 并在4℃下用PE缀合的链霉亲和素(Invitrogen, 目录号12-4317-87) 第二次孵育30分钟。野生型人IgG1抗体用作同种型对照, 并且直接缀合的抗人TIGIT-PE(eBiosciences, 目录号12-9500-42) 用作阳性对照。图2示出了能够与在食蟹猴CD4<sup>+</sup>细胞和CD8<sup>+</sup>细胞上表达的食蟹猴TIGIT结合的Ch24F8、Ch28O12和Ch22B22。获得荧光强度(gMFI) 的几何平均值, 并且将数据呈现为相对于同种型对照的gMFI的倍数。

[0287] 使用Bio-Rad ProteOn XPR36仪器通过表面等离子体共振(SPR) 确定这些重组抗TIGIT抗体与人TIGIT的动力学结合。使用蛋白A包被的GLC传感器芯片固定重组抗体, 并使用带His标签的可溶性TIGIT(Acro Biosystems, 目录号TIT-H52H3) 用作分析物。在25℃下测定结合常数。如表7所示, 在测试的七种重组抗TIGIT嵌合体抗体中, 克隆24F8具有通过平

平衡解离常数 ( $K_D$ ) 测量的最高结合亲和力。

[0288] 表7: 重组抗TIGIT抗体与带His标签的人TIGIT的结合动力学

| [0289] $\alpha$ -TIGIT抗体 | $k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) | $k_d$ ( $s^{-1}$ ) | $K_D$ (M) |
|--------------------------|--------------------------|--------------------|-----------|
| Ch24F8                   | 2.15E+06                 | 7.5E-05            | 3.5E-11   |
| Ch28012                  | 1.256E+06                | 1.135E-03          | 9.04E-10  |
| Ch30M18                  | 7.27E+05                 | 1.730E-03          | 2.38E-09  |
| Ch5J24                   | 5.57E+06                 | 2.14E-02           | 3.85E-09  |
| Ch21B16                  | 1.47E+06                 | 9.29E-03           | 6.30E-09  |
| Ch21B9                   | 1.05E+07                 | 7.4E-02            | 7.1E-09   |
| Ch22B22                  | 1.44E+06                 | 1.41E-02           | 9.78E-09  |

[0290] 实施例2. 人源化抗TIGIT抗体的产生

[0291] 使用CDR移植技术选择小鼠抗体24F8用于人源化 (Queen等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 第86卷: 第10029-10033页, 1989年)。24F8的小鼠可变重 (VH) 序列和可变轻 (VL) 序列用于鉴定每条链最接近的两个人种系。对于VH, 发现了具有70%序列同一性的IGHV4-34\*09和具有66%同一性的IGHV4-4\*02。对于VL, 发现了具有70%序列同一性的IGKV1-33\*01和具有67%同一性的IGKV3-15\*01 (表8)。

[0292] 表8. 人种系和受体的鉴定

| [0293] 可变链 | 人种系         | 人/小鼠同一性 (%) | 人受体        |
|------------|-------------|-------------|------------|
| VH1        | IGHV4-34*09 | 70          | AAV40102.1 |
| VH2        | IGHV4-4*02  | 66          | ADX65334.1 |
| VL1        | IGKV1-33*01 | 70          | ACY78416.1 |
| VL2        | IGKV3-15*01 | 67          | ADU32611.1 |

[0294] 根据Kabat定义VH链中三个重链CDR (HC-CDR) 序列和VL链中三个轻链CDR (LC-CDR) 序列的定位。

[0295] 在GenBank数据库中搜索VH框架和VL框架的人受体 (Benson等人, Nucleic Acids Res., 2005年, 第33卷, 第D34-D38页), 并且鉴定编码人cDNA的VH序列和VL序列 (参见表8)。

[0296] 对VH受体使用HC-CDR1 (SEQ ID NO:48)、HC-CDR2 (SEQ ID NO:49) 和HC-CDR3 (SEQ ID NO:50), 对VL受体使用LC-CDR1 (SEQ ID NO:51)、LC-CDR2 (SEQ ID NO:52) 和LC-CDR3 (SEQ ID NO:53), 对每个人受体进行CDR移植。检查所得序列是否引入了任何潜在的翻译后修饰或化学降解位点, 并且确认没有此类不期望的情况。还使用抗体同源性图形建模鉴定了小鼠回复突变的推定残基。

[0297] 将寡核苷酸设计并合成为具有针对两个VH和两个VL移植的人受体的人IgG1/ $\kappa$ 恒定结构域的Fab片段, 并且插入载体系统中以用于高通量筛选表达水平和生物物理特性, 而无需蛋白质纯化 (Zhang和Hirama, 专利申请公开US 2012/0178110)。VH1 (SEQ ID NO:76) 或VH2 (SEQ ID NO:78) 与VL1 (SEQ ID NO:79) 或VL2 (SEQ ID NO:77) (图1J至图1M) 的所有四种组合与由小鼠24F8VH (SEQ ID NO:5) 和24F8VL (SEQ ID NO:6) 结构域和人IgG1/ $\kappa$  Fab恒定结构域构建的嵌合体Fab mVH+mVL一起被筛选。使用Biacore 8K仪器通过表面等离子体共振 (SPR) 来分析作为SASA (抗血清白蛋白的单结构域抗体) 融合蛋白分泌的Fab上清液, 其中使用BSA包被的芯片和带His标签的可溶性TIGIT作为分析物来捕获Fab。五个Fab片段的人

TIGIT和食蟹猴TIGIT的动力学结合数据如表9所示。

[0298] 表9. 人源化Fab片段的动力学结合亲和力数据

| Fab                       | 分析物        | $k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) | $k_d$ ( $s^{-1}$ ) | $K_D$ (M) |
|---------------------------|------------|--------------------------|--------------------|-----------|
| mVH+mVL                   | hTIGIT-His | 1.86E+06                 | 2.37E-06           | 1.27E-12  |
| VH1+VL2<br>(Hu24F8.1 Fab) |            | 3.08E+06                 | 1.11E-04           | 3.61E-11  |
| VH2+VL2<br>(Hu24F8.2 Fab) |            | 2.08E+06                 | 9.39E-05           | 4.50E-11  |
| VH2+VL1<br>(Hu24F8.3 Fab) |            | 1.99E+06                 | 4.81E-04           | 2.42E-10  |
| VH1+VL1<br>(Hu24F8.4 Fab) |            | 3.05E+06                 | 8.55E-04           | 2.80E-10  |
| mVH+mVL                   | cTIGIT-His | 1.54E+06                 | 7.28E-04           | 4.74E-10  |
| VH1+VL2<br>(Hu24F8.1 Fab) |            | 1.11E+06                 | 1.40E-03           | 1.26E-09  |
| VH2+VL2<br>(Hu24F8.2 Fab) |            | 7.42E+05                 | 8.08E-04           | 1.09E-09  |
| VH2+VL1<br>(Hu24F8.3 Fab) |            | 9.74E+05                 | 5.85E-03           | 6.00E-09  |
| VH1+VL1<br>(Hu24F8.4 Fab) |            | 1.35E+06                 | 1.33E-02           | 9.81E-09  |

[0300] 这些数据表明, VH1+VL2和VH2+VL2的人源化可变结构域组合与人TIGIT和食蟹猴TIGIT结合最紧密, 如通过平衡解离常数 ( $K_D$ ) 所测量的, 并且还保留了小鼠/人嵌合体Fab的大部分结合亲和力。因此, 没有研究含有小鼠框架残基回复突变的构建体。选择这两种VH/VL组合(图1J和图1K) 分别用于全长Hu24F8.1 IgG1/ $\kappa$ 抗体和Hu24F8.2 IgG1/ $\kappa$ 抗体的构建体设计。

[0301] Hu24F8.1-IgG1.AA和Hu24F8.2-IgG1.AA是具有氨基酸序列为SEQ ID NO:97的重链恒定区和氨基酸序列为SEQ ID NO:95的轻链恒定区的IgG1/ $\kappa$ 抗体。“IgG1.AA”名称表示重链恒定区在位置234和235(Eu编号)处具有亮氨酸到丙氨酸的氨基酸取代。相反, “IgG1”名称表示野生型IgG1 Fc区。例如, Hu24F8.2-IgG1是具有氨基酸序列为SEQ ID NO:94的重链恒定区和氨基酸序列为SEQ ID NO:95的轻链恒定区的IgG1/ $\kappa$ 抗体。这些实施例中使用的Hu24F8.1-IgG1.AA、Hu24F8.2-IgG1.AA和Hu24F8.2-IgG1抗体在HEK293或CHO细胞中重组产生并通过蛋白A亲和层析纯化。

[0302] 使用Biacore T200仪器通过SPR来分析纯化的全长抗体Hu24F8.1-IgG1.AA(含有VH1+VL2)和Hu24F8.2-IgG1.AA(含有VH2+VL2)连同24F8小鼠VH+VL和人IgG1/ $\kappa$ 恒定结构域的全长嵌合抗体(Ch24F8), 其中使用抗人IgG包被的芯片和可溶性hTIGIT-His或cTIGIT-His作为分析物来捕获抗体。人TIGIT和食蟹猴TIGIT的动力学结合数据如表10所示。

[0303] 表10. 人源化抗体的动力学结合亲和力数据

| [0304] | 抗体               | 分析物        | $k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) | $k_d$ ( $s^{-1}$ ) | $K_D$ (M) |
|--------|------------------|------------|--------------------------|--------------------|-----------|
|        | Ch24F8           | hTIGIT-His | 8.53E+05                 | 1.56E-04           | 1.83E-10  |
|        | Hu24F8.1-IgG1.AA |            | 1.01E+06                 | 1.45E-04           | 1.44E-10  |
|        | Hu24F8.2-IgG1.AA |            | 7.96E+05                 | 1.40E-04           | 1.76E-10  |
|        | Ch24F8           | cTIGIT-His | 6.58E+05                 | 1.09E-03           | 1.66E-09  |
|        | Hu24F8.1-IgG1.AA |            | 8.06E+05                 | 1.40E-03           | 1.74E-09  |
|        | Hu24F8.2-IgG1.AA |            | 6.79E+05                 | 9.97E-04           | 1.47E-09  |

[0305] 两种全长人源化抗体的动力学结合亲和力数据证实了小鼠抗体的结合亲和力已被完全保留,并且不需要引入任何小鼠框架残基回复突变。

### [0306] 实施例3.抗TIGIT抗体的体外结合研究

[0307] 通过流式细胞术检查抗体Hu24F8.1-IgG1.AA和Hu24F8.2-IgG1.AA与在细胞表面上表达的TIGIT的结合。收集在细胞表面上表达TIGIT的细胞,并在4℃下且在存在(或不存在)各种浓度的抗体的情况下,将细胞在100μL HBSS缓冲液中孵育1小时。用HBSS洗涤后,在4℃下用2μg/mL Alexa488标记的山羊抗人IgG抗体(ThermoFisher Scientific,目录号A-11013)检测细胞上的抗体结合,持续30分钟。然后洗涤细胞并将其重悬于PBS中,并且使用Attune NxT流式细胞仪(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)进行流式细胞术。获得整个单细胞群的荧光强度的几何平均值,并且对于瞬时转染,使用未转染的细胞对阳性结合细胞群进行门控以获得阳性细胞的百分比。通过GraphPad Prism使用标准的4参数曲线拟合计算数据。

[0308] 使用表达人TIGIT(克隆2A7)和食蟹猴TIGIT(克隆C10)的稳定CHO-K1细胞系测试Hu24F8.1-IgG1.AA和Hu24F8.2-IgG1.AA分别与人TIGIT和食蟹猴TIGIT的结合,如上所述。Hu24F8.1-IgG1.AA与人TIGIT结合的 $EC_{50}$ 为 $0.447 \pm 0.22$  nM ( $n=8$ ) (图3A),与食蟹猴TIGIT结合的 $EC_{50}$ 为 $0.237 \pm 0.33$  nM ( $n=6$ ) (图3B)。Hu24F8.2-IgG1.AA与人TIGIT结合的 $EC_{50}$ 为 $0.29 \pm 0.15$  nM ( $n=8$ ) (图3A),与食蟹猴TIGIT结合的 $EC_{50}$ 为 $0.35 \pm 0.16$  nM ( $n=6$ ) (图3B)。这些结果表明,Hu24F8.1-IgG1.AA和Hu24F8.2-IgG1.AA两者均与在细胞表面上表达的人TIGIT和食蟹猴TIGIT紧密结合。

[0309] Hu24F8.2-IgG1.AA与小鼠TIGIT的结合(Swiss-Prot Q86176;SEQ ID NO:88)以及与大鼠TIGIT(Swiss-Prot D3ZTQ2;SEQ ID NO:89)的结合使用用全长小鼠或大鼠TIGIT表达构建体瞬时转染的CHO-K1细胞来检查。使用对照抗体GNE10A7(美国专利9,499,596,Clark等人,2016年)确认小鼠TIGIT表达,并且使用对照抗体eBioscience™G1GD7(Invitrogen,目录号12-9501-82)确认大鼠TIGIT表达。当用高达30nM的抗体测试时,Hu24F8.2-IgG1.AA不与小鼠TIGIT(图4A)或大鼠TIGIT(图4B)结合。

[0310] 通过流式细胞术检查Hu24F8.2-IgG1.AA与分离的人CD8<sup>+</sup>T细胞的结合。按照制造商的建议,使用RosetteSep™人CD8<sup>+</sup>T细胞富集混合物(Stemcell,目录号15023)分离CD8<sup>+</sup>T细胞。然后用含20U/mL rhIL-2补充物的抗CD3/CD28珠活化细胞7-9天。在进行流式细胞术抗体结合测定之前,用人Fc阻断剂(BD Biosciences,目录号564219)阻断活化或未活化的CD8<sup>+</sup>细胞。如图5A和图5B所示,Hu24F8.2-IgG1.AA分别与两种CD8<sup>+</sup>细胞结合,对于未活化的细胞, $EC_{50}$ 为 $0.098 \pm 0.013$  nM ( $n=2$ ),而对于活化的CD8<sup>+</sup>细胞, $EC_{50}$ 为 $0.14 \pm 0.036$  nM ( $n=2$ )。虽然活化和未活化的CD8<sup>+</sup>细胞的结合 $EC_{50}$ 相似,但最大结合信号有显著差异,这与活化后细胞表面CD8<sup>+</sup>上TIGIT表达升高一致。

[0311] 实施例4.抗TIGIT抗体的体外阻断研究

[0312] 使用稳定过表达人TIGIT (CHO-hTIGIT) 和人CD155-Fc融合重组可溶性蛋白(hCD155-Fc)的CHO细胞通过流式细胞术分析Hu24F8.1-IgG1.AA和Hu24F8.2-IgG1.AA阻断TIGIT与CD155的相互作用的活性,如实施例1所述。如图6所示,Hu24F8.1-IgG1.AA和Hu24F8.2-IgG1.AA均以剂量依赖性方式阻断细胞表面上hCD155-Fc与CHO-hTIGIT之间的相互作用。Hu24F8.1-IgG1.AA阻断TIGIT-CD155相互作用的 $IC_{50}$ 为0.68nM,并且对于Hu24F8.2-IgG1.AA,其为0.67nM。

[0313] 实施例5.抗TIGIT抗体的Jurkat双报告基因细胞系表征

[0314] 使用Promega的TIGIT/CD155阻断生物测定法(Promega,目录号J2205)测定Hu24F8.1-IgG1.AA和Hu24F8.2-IgG1.AA阻断人TIGIT受体的功能活性。在此测定中,效应细胞系是具有过表达的TIGIT以及在T细胞受体(TCR)下游激活的荧光素酶报告基因的Jurkat细胞系。另一种稳定的细胞系是除了结合并激活TCR的T细胞活化蛋白之外的过表达人CD155的CHO-K1细胞系。此CD155 aAPC/CHO-K1细胞系用作人工抗原呈递细胞。这两种细胞系的共培养导致CHO-K1细胞上的aAPC对TCR的激活,这将激活报告基因构建体,然而,该途径激活被TIGIT/CD155相互作用抑制,导致低荧光素酶信号。抗TIGIT抗体的存在将抑制TIGIT/CD155相互作用,释放TIGIT抑制效应,导致荧光素酶信号增加。根据制造商的方案进行测定,简而言之,在细胞培养箱中的96孔板中过夜回收效应Jurkat细胞,将测试抗体连续稀释并加入到效应细胞中,随后加入抗原呈递CD155 aAPC/CHO-K1细胞。在37℃和5%  $CO_2$ 下共培养6小时后,加入荧光素酶底物Bio-Glo试剂,并在Envision(PerkinElmer)上读取发光信号。如图7所示,Hu24F8.1-IgG1.AA能够以剂量依赖性方式增强报告基因活性,其 $EC_{50}$ 为 $3.35 \pm 0.26$ nM( $n=3$ ),而Hu24F8.2-IgG1.AA显示 $EC_{50}$ 为 $2.78 \pm 0.83$ nM( $n=3$ )。人IgG1对照未显示任何效果。

[0315] 实施例6.抗TIGIT抗体的分子分析

[0316] TIGIT和Fab表达、纯化、结晶

[0317] 人TIGIT的成熟细胞外结构域(残基22-130)的可溶性蛋白在HEK293细胞中重组表达。该构建体(SEQ ID NO:90)含有带(Gly)<sub>4</sub>-Ala-(Gly)<sub>4</sub>接头的C末端六组氨酸标签,并且天冬酰胺残基32和101突变为谷氨酰胺以去除N-糖基化的位点。澄清的上清液通过使用Nickel Sepharose Excel(GE Healthcare Life Sciences)柱的亲层析纯化,然后使用Superdex 200pg(GE Healthcare Life Sciences)柱进行尺寸排阻色谱(SEC)。将浓度为8.4mg/mL的TIGIT蛋白置于20mM Tris pH 7.0、100mM NaCl的最终缓冲液制剂中,并且用液氮快速冷冻。

[0318] 人IgG1抗体Hu24F8.2-IgG1.AA的可溶性Fab片段(Fab24F8)通过如下方式制备:在37℃的磷酸盐缓冲盐水中进行木瓜蛋白酶(Thermo Scientific,目录号20341)消化3小时,然后在室温下过夜消化。使用MabSelect SuRe蛋白A(GE Healthcare Life Sciences)柱去除切割的Fc片段,并使用Superdex 200pg(GE Healthcare Life Sciences)柱通过SEC进一步纯化流过的物质。将浓度为28mg/mL的Fab24F8蛋白置于20mM Tris pH 7.0、100mM NaCl的最终缓冲液制剂中,并且用液氮快速冷冻。

[0319] 将TIGIT与Fab 24F8蛋白以1:1的摩尔比在4℃下搅拌混合60分钟以形成Fab-TIGIT复合物,然后使用Superdex 200pg(GE Healthcare Life Sciences)柱进行最终SEC

纯化,并且蛋白质洗脱液浓度达44mg/mL。纯化的复合物用于在20℃下使用具有大约1500种不同条件的标准筛选进行结晶试验。使用标准策略优化最初获得的条件,系统地改变严重影响结晶的参数。这些条件通过系统地改变pH或沉淀剂浓度来进一步细化。通过使用坐滴蒸汽扩散技术将0.1μL蛋白质溶液(15mg/mL的20mM Tris溶液,pH 7.0;100mM NaCl)与0.1μL储备溶液(20% (w/v) PEG3350;0.20M LiSO<sub>4</sub>)混合来获得适用于结构鉴定的Fab-TIGIT复合物的晶体。

#### [0320] 数据收集与结构解决方案

[0321] 将晶体快速冷冻并在100K的温度下测量。使用低温条件从加拿大光源(CLS, Saskatoon, Canada)的Fab-TIGIT复合物的晶体中收集X射线衍射数据。晶体属于空间群P1。数据使用计算机软件程序autoPROC、XDS和AIMLESS处理(“The CCP4 Suite:Programs for Protein Crystallography.”, Acta Cryst. D50, 第760-763页),参见表11。

#### [0322] 表11. Fab24F8/TIGIT复合物的数据收集和处理统计

|        |                          |                               |
|--------|--------------------------|-------------------------------|
| [0323] | 复合物                      | Hu24F8.2 Fab/人 TIGIT ECD      |
|        | X 射线源                    | CMCF-ID (08ID-1, CLS)         |
|        | 波长[Å]                    | 0.9795                        |
|        | 检测器                      | PILATUS 6M                    |
|        | 温度[K]                    | 100                           |
|        | 空间群                      | P1                            |
|        | 细胞: a; b; c; [Å]         | 85.11; 86.83; 87.83           |
|        | α; β; γ; [°]             | 94.3; 117.0; 116.1            |
|        | 分辨率[Å]                   | 2.24 (2.46-2.24) <sup>1</sup> |
|        | 唯一反射 (Unique reflection) | 53126 (2657)                  |
|        | 多重性                      | 2.2 (2.1)                     |
|        | 完整性[%]                   | 84.8 (76.4)                   |
|        | R <sub>sym</sub> [96]    | 6.2 (48.6)                    |
|        | R <sub>meas</sub> [26]   | 8.2 (64.8)                    |
|        | Mean(I)/σ                | 9.9 (1.7)                     |

[0324] <sup>1</sup>括号中的值是指最高分辨率的分格。

[0325] 通过分子置换获得确定和分析结构所需的相位信息。使用Fab的先前解析的结构(Bohrmann等人, J. Alzheimers Dis. 第28卷: 第49-69页, 2012年)和TIGIT(Stengel等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012年)作为搜索模型。在晶体学不对称单元中存在Fab-TIGIT复合物的三个分子。随后的模型构建和细化分别根据具有程序COOT和软件包CCP4的标准方案进行。对于自由R因子的计算,从细化程序中排除交叉验证最终模型的正确性的量度,即约4.6%的测量反射。进行TLS细化(使用CCP4程序REFMAC5),这得到较低的R因子和更高质量的电子密度图。应用自动生成的局部NCS约束。水模型是用COOT的“查找水”算法建立的,方法是将水分子放入轮廓为3.0σ的Fo-Fc图的峰中,然后用REFMAC5细化,并用COOT的验证工具检查所有水。可疑水列表的标准为:B因子大于80Å<sup>2</sup>, 2fo-Fc图小于1.2σ,与最近接触点的距离小于2.3Å或大于3.5Å。分辨率范围为73.5Å-2.24Å的数据处于细化的最终循环中,并且R<sub>cryst</sub>和R<sub>free</sub>分别为22.3%和26.8%。最终模型的拉氏图显示,89.8%的残基位于最有利区域,8.8%的残基位于额外允许区域,并且0.7%的残基位于宽松允许区域。对于细化

的概述,参见表12。

[0326] 表12.Fab24F8/TIGIT的细化统计

|        |                                       |                          |
|--------|---------------------------------------|--------------------------|
| [0327] | 复合物                                   | Hu24F8.2 Fab/人 TIGIT ECD |
|        | 分辨率[Å]                                | 73.52-2.24               |
|        | 反射次数 (工作/测试)                          | 50688/2467               |
|        | R <sub>cryst</sub> [%]                | 22.3                     |
|        | R <sub>free</sub> [%] <sup>1</sup>    | 26.8                     |
|        | 原子总数:                                 |                          |
|        | 蛋白质                                   | 12244                    |
|        | 水                                     | 427 30                   |
|        | 配体                                    | -                        |
|        | 硫酸盐                                   | 30                       |
|        | 与理想几何形状的偏差: <sup>2</sup>              |                          |
|        | 键长[Å]                                 | 0.010                    |
|        | 键角[°]                                 | 1.47                     |
|        | 粘合的 B 的[Å <sup>2</sup> ] <sup>3</sup> | 17                       |
|        | 拉氏图: <sup>4</sup>                     |                          |
|        | 最有利区域[%]                              | 89.8                     |
|        | 额外允许区域[%]                             | 8.8                      |
|        | 宽松允许区域[%]                             | 0.7                      |
|        | 不允许区域[%]                              | 0.7                      |

[0328] <sup>1</sup>测试组含有4.6%的测量反射

[0329] <sup>2</sup>与几何目标值的均方根偏差

[0330] <sup>3</sup>用MOLEMAN计算

[0331] <sup>4</sup>用PROCHECK计算

[0332] 结合到人TIGIT的Fab24F8的结构

[0333] 在晶体不对称单元中存在复合物的三个独立分子,它们的原子坐标成对地相互叠加,所有非氢原子的均方根偏差为0.53Å-1.13Å。最终模型包含Fab重链的残基Gln1至Ser223、Fab轻链的残基Glu1至Cys214和TIGIT的残基Met22至Ser129。一些短环区域没有完全由电子密度定义,并且不包括在最终模型中。

[0334] Fab重链HC-CDR2和HC-CDR3以及轻链的所有三个LC-CDR与TIGIT的大β-折叠结构(即,β-链C、C'、C''和F以及环C'C''和C''D)形成广泛的相互作用,环C'C''和C''D由SEQ ID NO: 80的多肽链<sup>55</sup>TQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFK<sup>82</sup>和<sup>109</sup>IYH<sup>111</sup>组成(图8和图9)。这种结合相互作用在Fab片段和TIGIT之间产生表面积为790×10Å<sup>2</sup> (n=3)的蛋白质-蛋白质界面(PISA, EMBL-EBI)。这种相互作用的分子性质是亲水的和疏水性的。TIGIT残基Thr55、Gln56、Asn58、Glu60、Asp72、Ser80和Lys82(在图9中以棒状表示出)与Fab重链和轻链CDR的残基形成直接的或水介导的氢键相互作用(供体/受体原子间距离不超过3.1Å)。此外,TIGIT残基Glu60与Fab轻链上的Arg30形成盐桥(表13)。TIGIT疏水性残基Leu65、Ile68、Leu73、Pro79和Ile109(在图9中由球体表示)使范德华力与Fab重链和轻链的残基接触。

[0335] 表13. 与Fab24F8重链和轻链的互补位残基形成氢键和盐桥的TIGIT表位残基

| [0336] | TIGIT 表位 |    | Fab24F8 互补位 (Kabat 编号) |      |    |
|--------|----------|----|------------------------|------|----|
|        | Thr      | 55 | LC-CDR3                | Thr  | 94 |
|        | Gln      | 56 | LC-CDR3                | Tyr  | 92 |
|        |          |    | LC-CDR3                | Trp* | 96 |
|        |          |    | HC-CDR3                | Tyr* | 97 |
|        | Asn      | 58 | LC-CDR3                | Tyr* | 92 |
|        | Glu      | 60 | LC-CDR1                | Arg  | 30 |
|        |          |    | LC-CDR3                | Tyr  | 92 |
|        | Asp      | 72 | HC-CDR2                | Tyr  | 50 |
|        | Ser      | 80 | LC-CDR2                | Tyr  | 53 |
|        | Lys      | 82 | HC-CDR3                | Asn  | 99 |

[0337] \*水介导的氢键

[0338] 图10A显示了与人TIGIT(表示为分子表面)结合的人CD155(以带状表示)的N末端Ig样结构域(SEQ ID NO:91)的复杂结构的示意图,如Stengel等人,2012年所报道的。图10B示出了CD155以与图10A相同的取向叠加到与TIGIT结合的Fab24F8的晶体结构复合物的示意图上(各自由分子表面表示)。可以清楚地证明,Hu24F8.2或衍生自小鼠抗体24F8的其他抗体与TIGIT的细胞外结构域结合将阻断CD155与TIGIT结合。

[0339] 实施例7. 抗TIGIT抗体单独或与抗PD-1抗体联合增强T细胞应答

[0340] 此实施例证明,Hu24F8.2-IgG1单独或与抗PD-1抗体诸如AB122联合增强健康或癌症受试者的人原代T细胞应答。与同种型对照相比,用0.1μg/mL、1μg/mL或10μg/mL Hu24F8.2-IgG1处理的健康受试者和癌症受试者PBMC显著增加了IL-2浓度。在来自健康受试者的PBMC中,与单独的AB122相比,用10μg/mL Hu24F8.2-IgG1和1μg/mL抗人PD-1抗体(AB122,赛帕利单抗)的联合治疗具有显著更高的IL-2水平。

[0341] 健康受试者的PBMC从单采血小板去白细胞(LRS)滤器中分离,癌症受试者的PBMC从CPT管中分离,并在1ng/mL SEA存在下用0.1μg/mL、1μg/mL或10μg/mL Hu24F8.2、1μg/mL AB122或10μg/mL Hu24F8.2-IgG1和1μg/mL AB122的组合进行体外培养。四天后,通过流式细胞仪阵列(CBA)测量上清液中的IL-2浓度。包括IgG1同种型作为阴性对照。

[0342] 方法

[0343] 健康受试者PBMC从LRS滤器中分离,而癌症受试者PBMC从CPT管中分离。PBMC以 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL的浓度重悬,并以100μL/孔等分到96孔圆底板中。将50μL/孔的重悬于CTS Optimizer培养基中的4x浓缩抗体加入适当的孔中:加入Hu24F8.2-IgG1或人IgG1同种型对照,最终浓度为0.1μg/mL、1μg/mL和10μg/mL;并且加入AB122或人IgG4同种型对照,最终浓度为1μg/mL。将测定板在37°C、5% CO<sub>2</sub>下孵育1小时。将50μL/孔的重悬于CTS Optimizer培养基中的4x浓缩葡萄球菌肠毒素A(SEA)加入适当的孔中,最终浓度为1ng/mL。将最终孔体积为200μL的测定板在37°C、5% CO<sub>2</sub>下孵育4天,并收集上清液用于后续定量分泌的IL-2。将上清液在来自人可溶性蛋白主缓冲液试剂盒(Human Soluble Protein Master Buffer Kit)的测定稀释剂中以1:2稀释。使用人IL-2Flex Set与人可溶性蛋白主缓冲液试剂盒,根据制造商的说明进行测定执行、数据采集和定量。

[0344] 结果

[0345] 来自研究中使用的供体的PBMC被证实对SEA刺激有反应的非T调节细胞CD4<sup>+</sup>T细胞群上表达TIGIT,在CD14<sup>+</sup>单核细胞群上表达CD155(TIGIT的配体)。将从10个健康受

试者和7个癌症受试者分离的PBMC各自在1ng/mL SEA存在下用单独的0.1μg/mL、1μg/mL或10μg/mL Hu24F8.2-IgG1、单独的1μg/mL AB122或10μg/mL Hu24F8.2-IgG1和1μg/mL AB122的组合进行体外培养。4天后测量上清液中的IL-2浓度。将Hu24F8.2治疗组的IL-2水平与相应IgG1同种型对照治疗组的IL-2水平进行比较,同时将AB122和Hu24F8.2-IgG1组合治疗组的IL-2水平与AB122单独治疗组的IL-2水平进行比较(表14和表15)。图11中示出了针对所测试的所有浓度的Hu24F8.2-IgG1的一个健康受试者(#566)的IL-2水平的实施例。对于这两个受试者,与相应的IgG1同种型对照相比,在所测试的所有浓度的Hu24F8.2-IgG1下,IL-2分泌都有统计学上显著的增加。对于健康受试者#566,与单独的AB122治疗相比,采用AB122和Hu24F8.2-IgG1组合治疗,IL-2分泌也有统计学上显著的增加。在群体水平上,在健康受试者和癌症受试者两种PBMC中,用10μg/mL Hu24F8.2-IgG1处理的IL-2分泌与IgG1同种型对照相比有统计学上显著的增加(图12A),并且在健康受试者PBMC中,用AB122和Hu24F8.2-IgG1组合处理的IL-2分泌与单独用AB122处理相比有统计学上显著的增加(图12B)。总之,0.1μg/mL Hu24F8.2-IgG1显著增加了IL-2浓度(对比同种型),在6/10健康受试者PBMC样品中为1.1-3.4倍,在2/5癌症受试者PBMC样品中为1.6-1.7倍;1μg/mL Hu24F8.2-IgG1显著增加了IL-2浓度(对比同种型),在7/10健康受试者PBMC样品中为1.4-4.0倍,在4/7癌症受试者PBMC样品中为1.6-2.0倍;10μg/mL Hu24F8.2-IgG1显著增加了IL-2浓度(对比同种型),在7/10健康受试者PBMC样品中为1.2-4.0倍,在4/7癌症受试者PBMC样品中为1.3-2.0倍;并且10μg/mL Hu24F8.2-IgG1+AB122增加了IL-2浓度(对比单独的AB122),在6/10健康受试者PBMC样品中为1.9-8.3倍。

[0346] 表14. 人健康受试者PBMC中的平均<sup>a</sup>IL-2水平 (pg/mL)

|        |                                        |                  |       |      |      |      |      |       |       |       |       |      |
|--------|----------------------------------------|------------------|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|------|
| [0347] | 受试者                                    |                  | 223   | 225  | 226  | 229  | 272  | 273   | 566   | 967   | 568   | 969  |
|        | 0.1μg/mL                               | 同种型              | 452.8 | 3282 | 1552 | 2629 | nt   | nt    | 717.9 | 643.5 | 509.6 | 2625 |
|        |                                        | Hu24F8.2-IgG1    | 377.8 | 3735 | 2353 | 3837 | nt   | nt    | 1763  | 998.8 | 1725  | 6706 |
|        | 显著性 <sup>b</sup>                       |                  | NS    | *    | *    | *    | -    | -     | **    | NS    | ***   | **   |
|        | 倍数变化                                   |                  | 0.83  | 1.13 | 1.51 | 1.45 | -    | -     | 2.45  | 1.55  | 3.38  | 2.55 |
|        | 1.0μg/mL                               | 同种型              | 385.2 | 3276 | 1920 | 2517 | 1035 | 321.4 | 735.9 | 565.1 | 510.6 | 2442 |
|        |                                        | Hu24F8.2-IgG1    | 394.3 | 3671 | 2361 | 3588 | 1944 | 1296  | 2268  | 1270  | 1919  | 8256 |
|        | 显著性 <sup>b</sup>                       |                  | NS    | NS   | NS   | *    | ***  | ****  | ***   | *     | ****  | **** |
|        | 倍数变化                                   |                  | 1.02  | 1.12 | 1.22 | 1.42 | 1.88 | 4.03  | 3.08  | 2.24  | 3.75  | 3.38 |
|        | 10.0μg/mL                              | 同种型              | 380.1 | 3269 | 2017 | 3448 | 1385 | 673.1 | 804.4 | 854.9 | 519.9 | 2847 |
|        |                                        | Hu24F8.2-IgG1    | 294.5 | 3775 | 2329 | 4175 | 1779 | 1006  | 2515  | 1649  | 1949  | 8510 |
|        | 显著性 <sup>b</sup>                       |                  | NS    | *    | NS   | *    | NS   | *     | ****  | *     | ****  | **** |
|        | 倍数变化                                   |                  | 0.77  | 1.15 | 1.15 | 1.21 | 1.87 | 4.03  | 3.12  | 1.92  | 3.74  | 2.98 |
|        | 同种型                                    |                  | 430.2 | 3421 | 2070 | 3025 | 1154 | 785   | 928.1 | 733.3 | 593.4 | nt   |
| [0348] | 受试者                                    |                  | 223   | 225  | 226  | 229  | 272  | 273   | 566   | 967   | 568   | 969  |
|        | AB122                                  |                  | 1080  | 5628 | 3455 | 4841 | 1728 | 1453  | 2650  | 2074  | 1593  | nt   |
|        | 1μg/ml AB122+<br>10μg/ml Hu24F8.2-IgG1 |                  | 1222  | 5762 | 3672 | 7077 | 2240 | 2067  | 7665  | 3614  | 4510  | nt   |
|        | AB122 对比 AB122                         | 显著性 <sup>b</sup> | NS    | NS   | NS   | *    | *    | ***   | ****  | ****  | ****  | -    |
|        | + Hu24F8.2-IgG1                        | 倍数变化             | 2.84  | 1.68 | 1.77 | 2.33 | 1.94 | 2.63  | 8.25  | 4.92  | 7.6   | -    |

[0349] <sup>a</sup>n=3个技术平行测定

[0350] <sup>b</sup>使用Sidak多重比较检验的单向方差分析(同种型对比Hu24F8.2或AB122+Hu24F8.2对比AB122);NS,不显著;nt,未测试;\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001,\*\*\*\*p<0.0001。

[0351] 表15.人癌症受试者PBMC中的平均<sup>a</sup>IL-2水平(pg/mL)

| 受试者              |               | 3    | 29    | 60    | 33    | 27   | 6    | 12   |
|------------------|---------------|------|-------|-------|-------|------|------|------|
| 0.1μg/mL         | 同种型           | nt   | 84.68 | nt    | 47.44 | 1097 | 3438 | 1349 |
|                  | Hu24F8.2-IgG1 | nt   | 98.07 | nt    | 87.85 | 1874 | 5447 | 1871 |
| 显著性 <sup>b</sup> |               | -    | NS    | -     | NS    | ***  | **** | NS   |
| 倍数变化             |               | -    | 1.16  | -     | 1.85  | 1.71 | 1.58 | 1.38 |
| 1.0μg/mL         | 同种型           | 1583 | 95.57 | 792.3 | 170   | 1068 | 3396 | 1295 |
|                  | Hu24F8.2-IgG1 | 2074 | 91.4  | 1557  | 119.8 | 1746 | 5992 | 2221 |
| 显著性 <sup>b</sup> |               | NS   | NS    | *     | NS    | **   | **** | **   |
| 倍数变化             |               | 1.31 | 0.95  | 1.96  | 0.7   | 1.63 | 1.76 | 1.71 |
| 10.0μg/mL        | 同种型           | 1600 | 95.34 | 674.7 | 129.7 | 1153 | 3885 | 1765 |
|                  | Hu24F8.2-IgG1 | 1897 | 53.54 | 1363  | 94.35 | 1934 | 5073 | 3089 |
| 显著性 <sup>b</sup> |               | NS   | NS    | *     | NS    | **   | **   | **** |
| 倍数变化             |               | 1.18 | 0.56  | 2.02  | 0.72  | 1.67 | 1.3  | 1.75 |

[0353] <sup>a</sup>n=3个技术平行测定

[0354] <sup>b</sup>使用Sidak多重比较检验的单向方差分析(同种型对比Hu24F8.2);NS,不显著;nt,未测试;\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001,\*\*\*\*p<0.0001

[0355] 这些数据表明,Hu24F8.2-IgG1单独或与抗PD-1抗体诸如AB122联合增强健康或癌症受试者的人原代T细胞应答。

[0356] 实施例8.通过体外补体依赖性细胞毒性(CDC)测定表征抗体

[0357] CDC是免疫应答,其中补体系统涉及通过补体组分1q(C1q)与抗体的片段可结晶(Fc)区结合的抗体依赖性细胞杀伤。它启动补体级联反应,导致形成膜攻击复合物,该复合物破坏靶细胞的细胞膜,该靶细胞表达由抗体的Fab区识别的靶蛋白。在该实施例中,在正常人血清补体(NHSC,Quidel)存在下,使用GS-J1/TIGIT细胞(GenScript M00693)表征Hu24F8.2-IgG1的CDC活性。

[0358] 通过Cell Titer-Glo<sup>®</sup>测定试剂盒(Promega)确定CDC的细胞裂解,该试剂盒基于ATP的定量确定培养物中的活细胞数量。简而言之,在37℃和5%CO<sub>2</sub>下且在5%、10%或20%NHSC存在下,用10μg/mL Hu24F8.2-IgG1或人IgG1(Abcam)阴性对照处理GS-J1/TIGIT细胞(5000个细胞/孔)4小时(%NHSC优化测定),或在37℃和5%CO<sub>2</sub>下且在5%NHSC存在下,用Hu24F8.2-IgG1(10μg/mL)或人IgG1(10μg/mL)的连续稀释液处理GS-J1/TIGIT细胞(5000个细胞/孔)4小时(CDC浓度反应研究)。作为阳性对照,在37℃和5%CO<sub>2</sub>下且在5%NHSC存在下,用利妥昔单抗(10μg/mL)的连续稀释液处理Raji细胞(ATCC CCL-86,(5000个细胞/孔))4小时。在与测试抗体或对照抗体一起孵育后,添加Cell Titer-Glo<sup>®</sup>试剂,将样品在室温下再孵育10-30分钟,并在PHERAstar FSX(BMG LabTech)上读取发光。由CDC引起的细胞溶解用以下公式计算:%细胞裂解=100%×(1-(RLU<sub>样品</sub>-RLU<sub>NHSC</sub>)/(RLU<sub>细胞+NHSC</sub>-RLU<sub>NHSC</sub>))。

[0359] 系统质控物(针对Raji细胞的利妥昔单抗)的结果在两个测试中满足质量控制标准。然而,在%NHSC优化测定或CDC浓度反应研究中未观察到测试样品(Hu24F8.2-IgG1)或

阴性对照(人IgG1)的浓度依赖性CDC活性。这些结果分别汇总于表16和表17中。Hu24F8.2-IgG1与GS-J1/TIGIT细胞结合的FACS分析用于确认缺乏CDC不是由于缺乏靶细胞结合(数据未示出)。

[0360] 表16. %NHSC优化测定的结果

| 样品                   | 浓度<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 靶细胞         | % NHSC | %靶细胞裂解的<br>平均值 | EC <sub>50</sub><br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|----------------------|----------------------------|-------------|--------|----------------|------------------------------------------|
| 利妥昔单抗                | 10                         | Raji        | 5%     | 93.9           | 0.414                                    |
| [0361] Hu24F8.2-IgG1 | 10                         | GS-J1/TIGIT | 5%     | 5.77           | 不适用                                      |
|                      |                            |             | 10%    | 17.5           |                                          |
|                      |                            |             | 20%    | -15.5          |                                          |
|                      |                            |             | 20%    | -15.5          |                                          |
| 人 IgG1               | 10                         | GS-J1/TIGIT | 5%     | 5.39           | 不适用                                      |
|                      |                            |             | 10%    | 8.44           |                                          |
|                      |                            |             | 20%    | -12.3          |                                          |
|                      |                            |             | 20%    | -12.3          |                                          |

[0362] 表17. CDC浓度反应研究的结果

| 样品            | 最高浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 靶细胞         | % NHSC | EC <sub>50</sub><br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---------------|---------------------------|-------------|--------|------------------------------------------|
| [0363] 利妥昔单抗  | 10                        | Raji        | 5%     | 0.275                                    |
| Hu24F8.2-IgG1 | 10                        | GS-J1/TIGIT | 5%     | 不适用                                      |
| 人 IgG1        | 10                        | GS-J1/TIGIT | 5%     | 不适用                                      |

[0364] 实施例9. 通过SPR进行的抗体表征

[0365] 使用BioRad ProteOn XPR36仪器通过SPR分析Hu24F8.2-IgG1, 其中使用抗人IgG包被的芯片或蛋白A包被的芯片以六种不同的密度来捕获抗体。分析物是可溶性hTIGIT-His (在33.3 $\mu\text{M}$ 下制备的储备溶液), 将其稀释至33nM作为最高浓度, 并在Hu24F8.2-IgG1表面上以三倍稀释系列一式三份进行测试。运行缓冲液含有10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% 吐温20和0.2mg/mL BSA。所有数据均在25 $^{\circ}\text{C}$ 下收集。使用局部R<sub>max</sub>将来自所有六个表面密度的数据全局拟合到1:1相互作用模型。结果在表18中示出。

[0366] 表18. Hu24F8.2-IgG1与人TIGIT结合的动力学结合常数

| 捕获方法         | k <sub>a</sub> ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) | k <sub>d</sub> ( $\text{s}^{-1}$ ) | K <sub>D</sub> (M) |
|--------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| [0367] 抗人IgG | 2.425 (6) E+06                                  | 5.97 (3) E-05                      | 2.46 (1) E-11      |
| 蛋白A          | 1.671 (6) E+06                                  | 6.31 (4) E-05                      | 3.77 (3) E-11      |

[0368] 注意: 括号中的数字表示来自6个不同密度表面的全局拟合的最后报告数字中的标准误差。

## 序列表

&lt;110&gt; 艾库斯生物科学有限公司

&lt;120&gt; 抗TIGIT抗体

&lt;130&gt; 050658-531001W0

&lt;140&gt; 在此

&lt;141&gt; 在此

&lt;150&gt; US 63/033,609

&lt;151&gt; 2020-06-02

&lt;160&gt; 101

&lt;170&gt; PatentIn版本3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 小鼠mAb 21F8重链,氨基酸

&lt;400&gt; 1

Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser

1 5 10 15

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser

20 25 30

Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu

35 40 45

Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Phe Met Ile Thr Thr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser

115 120

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 21F8轻链,氨基酸

<400> 2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | His | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Asp | Arg | Val | Ser | Ile | Thr | Cys | Lys | Ala | Ser | Gln | His | Val | Ser | Thr | Ala |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Val | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Tyr | Ser | Ala | Pro | Tyr | Arg | Tyr | Thr | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Thr | Gly |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Phe | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Gln | Ala |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Glu | Asp | Leu | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | His | Tyr | Asn | Thr | Leu | Trp |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 30M18重链,氨基酸

<400> 3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Pro | Glu | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Thr | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Glu | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |
| Thr | Met | His | Trp | Val | Lys | Gln | Ser | His | Gly | Lys | Ser | Leu | Glu | Trp | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly | Gly | Ile | Asn | Pro | Asn | Asn | Gly | Gly | Thr | Ser | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe |

|                     |                             |                     |
|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| 50                  | 55                          | 60                  |
| Lys Gly Lys Ala Thr | Leu Thr Val Asp Lys Ser     | Ser Ser Thr Ala Tyr |
| 65                  | 70                          | 75                  |
| Met Glu Leu Arg Ser | Leu Thr Ser Glu Asp Ser     | Ala Val Tyr Tyr Cys |
| 85                  | 90                          | 95                  |
| Ala Arg Ser Gly His | Met Asp Tyr Gly Tyr Val Tyr | Trp Gly Gln Gly     |
| 100                 | 105                         | 110                 |
| Thr Thr Leu Thr Val | Ser Ser                     |                     |
| 115                 |                             |                     |

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 小鼠mAb 30M18轻链,氨基酸

&lt;400&gt; 4

|                     |                     |                 |         |
|---------------------|---------------------|-----------------|---------|
| Asp Ile Val Met Thr | Gln Ser His Lys Phe | Met Ser Thr Ser | Val Gly |
| 1                   | 5                   | 10              | 15      |
| Asp Arg Val Ser Ile | Thr Cys Lys Ala Ser | Gln Tyr Val Ser | Thr Ala |
| 20                  | 25                  | 30              |         |
| Val Ala Trp Tyr Gln | Gln Lys Pro Gly Gln | Ser Pro Lys Leu | Leu Ile |
| 35                  | 40                  | 45              |         |
| Tyr Ser Pro Ser Tyr | Arg Tyr Thr Gly Val | Pro Asp Arg Phe | Thr Gly |
| 50                  | 55                  | 60              |         |
| Ser Gly Ser Gly Thr | Asp Phe Thr Phe Thr | Ile Ser Ser Val | Gln Ala |
| 65                  | 70                  | 75              | 80      |
| Glu Asp Leu Ala Val | Tyr Tyr Cys Gln Gln | His Tyr Ser Thr | Pro Trp |
| 85                  | 90                  | 95              |         |
| Thr Phe Gly Gly Gly | Thr Lys Leu Glu Ile | Lys             |         |
| 100                 | 105                 |                 |         |

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 小鼠mAb 24F8重链,氨基酸

&lt;400&gt; 5

```

Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser
1           5           10           15
Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser
          20           25           30
Gly Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Asp
          35           40           45
Trp Met Gly Tyr Val His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
          50           55           60
Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65           70           75           80
Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Phe Tyr
          85           90           95
Cys Ala Arg Met Asp Tyr Gly Asn Tyr Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp
          100          105          110
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 小鼠mAb 24F8轻链,氨基酸

&lt;400&gt; 6

```

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Thr Ala
          20           25           30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

```

|                                                                 |     |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|-----|----|----|
| 65                                                              | 70  | 75 | 80 |
| Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Gln Trp |     |    |    |
|                                                                 | 85  | 90 | 95 |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys                     |     |    |    |
| 100                                                             | 105 |    |    |

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 小鼠mAb 5J24重链,氨基酸

&lt;400&gt; 7

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr |     |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn His |     |     |     |
|                                                                 | 20  | 25  | 30  |
| Trp Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile |     |     |     |
|                                                                 | 35  | 40  | 45  |
| Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe |     |     |     |
|                                                                 | 50  | 55  | 60  |
| Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Met Tyr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Ala Arg Ser Tyr Gly Tyr Asp Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser                                 |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 |     |

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 5J24轻链,氨基酸

<400> 8

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1           5           10           15
Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
           20           25           30
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
           35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gly Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Phe
           85           90           95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
           100          105

```

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 21B9重链,氨基酸

<400> 9

```

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

```

| 100                                                             | 105 | 110 |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Thr Ser Val Thr Val Ser Ser                                     |     |     |
| 115                                                             |     |     |
| <210> 10                                                        |     |     |
| <211> 107                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 合成构建体                                                     |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |     |
| <223> 小鼠mAb 21B9轻链,氨基酸                                          |     |     |
| <400> 10                                                        |     |     |
| Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly |     |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |     |
| Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr |     |     |
| 20 25 30                                                        |     |     |
| Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile |     |     |
| 35 40 45                                                        |     |     |
| Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly |     |     |
| 50 55 60                                                        |     |     |
| Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro |     |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |     |
| Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp |     |     |
| 85 90 95                                                        |     |     |
| Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys                     |     |     |
| 100 105                                                         |     |     |
| <210> 11                                                        |     |     |
| <211> 119                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 合成构建体                                                     |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |     |
| <223> 小鼠mAb 22B22重链,氨基酸                                         |     |     |
| <400> 11                                                        |     |     |
| Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly |     |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |     |

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

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 22B22和小鼠mAb 28012轻链,氨基酸

<400> 12

Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 28P24重链,氨基酸

<400> 13

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1           5           10           15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
           20           25           30
Phe Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Asp Trp Ile
           35           40           45
Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
           50           55           60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Val Arg Phe Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
           100          105          110
Leu Val Thr Val Ser Ala
           115
```

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 28P24轻链,氨基酸

<400> 14

```
Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Cys Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Thr Ile Ser Lys Tyr
           20           25           30
```

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

<210> 15

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 21B16重链,氨基酸

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Phe Pro Asp Thr Val  
 50 55 60  
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Lys Arg Arg Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 21B16轻链,氨基酸

<400> 16

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Val | Gln | Ile | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Tyr | Leu | Ala | Ala | Ser | Pro | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Thr | Ile | Thr | Ile | Asn | Cys | Arg | Ala | Ser | Lys | Ser | Ile | Ser | Lys | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |
| Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Glu | Lys | Pro | Gly | Lys | Thr | Asn | Lys | Leu | Leu | Ile |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |     |
| Tyr | Ser | Gly | Ser | Thr | Leu | Gln | Ser | Gly | Ile | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly |
|     |     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |
| Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Glu | Pro |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Glu | Asp | Phe | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | His | Asn | Glu | Tyr | Pro | Trp |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |
| Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     |     |

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 28012重链,氨基酸

<400> 17

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



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |
| Thr | Ala | Gly | Cys | Thr | Ala | Cys | Ala | Ala | Cys | Cys | Cys | Ala | Thr | Cys | Thr |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |
| Cys | Thr | Cys | Ala | Ala | Ala | Ala | Gly | Thr | Cys | Gly | Ala | Ala | Thr | Cys | Thr |
|     |     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Cys | Thr | Ala | Thr | Cys | Ala | Cys | Thr | Cys | Gly | Ala | Gly | Ala | Cys | Ala | Cys |
|     |     |     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |
| Ala | Thr | Cys | Cys | Ala | Ala | Gly | Ala | Ala | Cys | Cys | Ala | Gly | Thr | Thr | Cys |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |     |
| Thr | Thr | Cys | Cys | Thr | Gly | Cys | Ala | Gly | Thr | Thr | Gly | Ala | Ala | Thr | Thr |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |
| Cys | Thr | Gly | Thr | Gly | Ala | Cys | Thr | Ala | Cys | Thr | Gly | Ala | Gly | Gly | Ala |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |
| Cys | Ala | Cys | Ala | Gly | Cys | Cys | Ala | Cys | Ala | Thr | Ala | Thr | Thr | Ala | Cys |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Thr | Gly | Thr | Gly | Cys | Ala | Ala | Gly | Ala | Thr | Thr | Thr | Ala | Thr | Gly | Ala |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |
| Thr | Thr | Ala | Cys | Gly | Ala | Cys | Gly | Thr | Thr | Thr | Gly | Cys | Thr | Ala | Thr |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |     |     |     |
| Gly | Gly | Ala | Cys | Thr | Ala | Cys | Thr | Gly | Gly | Gly | Gly | Thr | Cys | Ala | Ala |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |     |     |
| Gly | Gly | Ala | Ala | Cys | Cys | Gly | Cys | Ala | Gly | Thr | Cys | Ala | Cys | Cys | Gly |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     | 345 |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Thr | Cys | Thr | Cys | Cys | Thr | Cys | Ala |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     |     |     |     |

$\langle 210 \rangle$  19

 $\langle 211 \rangle$  321

&lt;212&gt; PRT

### 〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$ 

### 〈223〉 合成构建体

〈220〉

&lt;221&gt; MISC FEATURE

〈223〉 小鼠mAb 21F8轻链,核苷酸

<400> 19

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ala | Cys | Ala | Thr | Thr | Gly | Thr | Gly | Ala | Thr | Gly | Ala | Cys | Cys | Cys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ala | Gly | Thr | Cys | Thr | Cys | Ala | Cys | Ala | Ala | Ala | Thr | Thr | Cys | Ala | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Gly Thr Cys Ala Ala Cys Ala Thr Cys Ala Gly Thr Ala Gly Gly Ala |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Thr Cys Ala |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Cys Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Ala |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Gly Cys Ala Thr Gly Thr Gly Ala Gly Thr Ala Cys Thr Gly Cys Thr |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Gly Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Ala Cys |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Thr Cys |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Thr Cys Cys Thr Ala Ala Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Ala Thr Thr |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Thr Ala Cys Thr Cys Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr Ala Cys Cys |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gly Gly Thr Ala Cys Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Cys Cys |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Thr Gly Ala Thr Cys Gly Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Gly Gly Cys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Gly Gly |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Gly Ala Ala Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Ala |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Thr Thr Ala Thr Ala Ala Thr Ala Cys Thr Cys Thr Gly Thr Gly Gly |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Ala                                                             |     |     |
| <210> 20                                                        |     |     |
| <211> 357                                                       |     |     |

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 小鼠mAb 30M18重链,核苷酸

&lt;400&gt; 20

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ala | Gly | Gly | Thr | Cys | Cys | Ala | Gly | Cys | Thr | Gly | Cys | Ala | Ala | Cys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Ala | Gly | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Cys | Cys | Thr | Gly | Ala | Gly | Cys | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly | Gly | Thr | Gly | Ala | Ala | Gly | Cys | Cys | Thr | Gly | Gly | Gly | Gly | Cys | Thr |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |
| Thr | Cys | Ala | Gly | Thr | Gly | Ala | Ala | Gly | Ala | Thr | Ala | Thr | Cys | Cys | Thr |
|     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |
| Gly | Cys | Ala | Ala | Gly | Ala | Cys | Thr | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Thr | Ala |
| 65  |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |
| Cys | Ala | Cys | Ala | Thr | Thr | Cys | Ala | Cys | Thr | Gly | Ala | Ala | Thr | Ala | Cys |
|     |     |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |
| Ala | Cys | Cys | Ala | Thr | Gly | Cys | Ala | Cys | Thr | Gly | Gly | Gly | Thr | Gly | Ala |
|     |     |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |
| Ala | Gly | Cys | Ala | Gly | Ala | Gly | Cys | Cys | Ala | Thr | Gly | Gly | Ala | Ala | Ala |
|     |     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |
| Gly | Ala | Gly | Cys | Cys | Thr | Thr | Gly | Ala | Gly | Thr | Gly | Gly | Ala | Thr | Thr |
|     |     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |
| Gly | Gly | Ala | Gly | Gly | Thr | Ala | Thr | Thr | Ala | Ala | Thr | Cys | Cys | Thr | Ala |
| 145 |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |
| Ala | Cys | Ala | Ala | Thr | Gly | Gly | Thr | Gly | Gly | Thr | Ala | Cys | Thr | Ala | Gly |
|     |     |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |
| Thr | Thr | Ala | Thr | Ala | Ala | Cys | Cys | Ala | Gly | Ala | Ala | Gly | Thr | Thr | Thr |
|     |     |     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |
| Ala | Ala | Gly | Gly | Gly | Cys | Ala | Ala | Gly | Gly | Cys | Cys | Ala | Cys | Ala | Thr |
|     |     |     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |
| Thr | Gly | Ala | Cys | Thr | Gly | Thr | Ala | Gly | Ala | Cys | Ala | Ala | Gly | Thr | Cys |
|     |     |     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |
| Cys | Thr | Cys | Cys | Ala | Gly | Cys | Ala | Cys | Ala | Gly | Cys | Cys | Thr | Ala | Cys |
| 225 |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |
| Ala | Thr | Gly | Gly | Ala | Gly | Cys | Thr | Cys | Cys | Gly | Cys | Ala | Gly | Cys | Cys |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Thr Thr Cys |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Thr Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Gly Cys Ala Ala Gly Ala Thr Cys Gly Gly Gly Gly Cys Ala Thr Ala |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Gly Thr |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly Cys |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Ala Cys Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Ala Gly Thr Cys Thr |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Cys Cys Thr Cys Ala                                             |     |     |
| 355                                                             |     |     |

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 小鼠mAb 30M18轻链,核苷酸

&lt;400&gt; 21

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Gly Ala Cys Ala Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Ala Gly Thr Cys Thr Cys Ala Cys Ala Ala Ala Thr Thr Cys Ala Thr |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Gly Thr Cys Cys Ala Cys Ala Thr Cys Ala Gly Thr Ala Gly Gly Ala |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Thr Cys Ala |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Cys Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Ala |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Ala Thr Ala Thr Gly Thr Gly Ala Gly Thr Ala Cys Thr Gly Cys Thr |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Gly Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Ala Cys |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |

Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Thr Cys  
 115 120 125  
 Thr Cys Cys Thr Ala Ala Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Ala Thr Thr  
 130 135 140  
 Thr Ala Cys Thr Cys Gly Cys Cys Ala Thr Cys Cys Thr Ala Cys Cys  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Thr Ala Cys Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Cys Cys  
 165 170 175  
 Thr Gly Ala Thr Cys Gly Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Gly Gly Cys  
 180 185 190  
 Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Gly Gly  
 195 200 205  
 Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr  
 210 215 220  
 Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr  
 225 230 235 240  
 Gly Ala Ala Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr  
 245 250 255  
 Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Ala  
 260 265 270  
 Thr Thr Ala Thr Ala Gly Thr Ala Cys Thr Cys Cys Gly Thr Gly Gly  
 275 280 285  
 Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala  
 290 295 300  
 Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Ala

<210> 22

<211> 366

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 24F8重链,核苷酸

<400> 22

Thr Cys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys  
 1 5 10 15

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Ala Gly Gly Ala Gly Thr Cys Ala Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Ala |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Cys Thr Thr Cys Thr |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Ala |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Cys Cys Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Cys Thr Gly Gly |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Cys Thr Ala Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Ala Gly Thr |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Gly Gly Thr Thr Ala Thr Ala Gly Cys Thr Gly Gly Cys Ala Cys Thr |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr Cys Cys |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Ala Ala Ala Cys Thr Gly Gly Ala Thr |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Thr Gly Gly Ala Thr Gly Gly Gly Cys Thr Ala Cys Gly Thr Thr Cys |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Ala Cys Thr Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly Thr Ala Gly Cys Ala Cys |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Thr Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Cys Ala Thr Cys Thr |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Cys Thr Cys Ala Ala Ala Ala Gly Thr Cys Gly Ala Ala Thr Cys Thr |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Cys Thr Ala Thr Cys Ala Cys Thr Cys Gly Ala Gly Ala Cys Ala Cys |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Ala Thr Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Thr Thr Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Thr Gly Ala Ala Thr Thr |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Cys Thr Gly Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Ala Thr Thr Thr Thr Ala Cys |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Thr Gly Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Ala Thr Gly Gly Thr Ala Ala Cys Thr Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Gly Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly |     |     |

|                                                                 |     |  |     |  |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|--|-----|--|-----|
|                                                                 | 325 |  | 330 |  | 335 |
| Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 340 |  | 345 |  | 350 |
| Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala         |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 355 |  | 360 |  | 365 |
| <210> 23                                                        |     |  |     |  |     |
| <211> 321                                                       |     |  |     |  |     |
| <212> PRT                                                       |     |  |     |  |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |  |     |  |     |
| <220>                                                           |     |  |     |  |     |
| <223> 合成构建体                                                     |     |  |     |  |     |
| <220>                                                           |     |  |     |  |     |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |  |     |  |     |
| <223> 小鼠mAb 24F8轻链,核苷酸                                          |     |  |     |  |     |
| <400> 23                                                        |     |  |     |  |     |
| Gly Ala Gly Ala Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys |     |  |     |  |     |
| 1                                                               | 5   |  | 10  |  | 15  |
| Ala Gly Thr Cys Thr Cys Ala Cys Ala Ala Ala Thr Thr Cys Ala Thr |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 20  |  | 25  |  | 30  |
| Gly Thr Cys Cys Ala Cys Ala Thr Cys Ala Gly Thr Ala Gly Gly Gly |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 35  |  | 40  |  | 45  |
| Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Thr Cys Ala |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 50  |  | 55  |  | 60  |
| Cys Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Ala |     |  |     |  |     |
| 65                                                              | 70  |  | 75  |  | 80  |
| Gly Gly Ala Thr Gly Thr Gly Ala Gly Ala Ala Cys Thr Gly Cys Thr |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 85  |  | 90  |  | 95  |
| Gly Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Ala Cys |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 100 |  | 105 |  | 110 |
| Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Thr Cys |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 115 |  | 120 |  | 125 |
| Thr Cys Cys Thr Ala Ala Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Ala Thr Thr |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 130 |  | 135 |  | 140 |
| Thr Ala Thr Thr Cys Gly Gly Cys Ala Thr Cys Cys Thr Ala Cys Cys |     |  |     |  |     |
| 145                                                             | 150 |  | 155 |  | 160 |
| Gly Gly Thr Ala Cys Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Cys Cys |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 165 |  | 170 |  | 175 |
| Thr Gly Ala Thr Cys Gly Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Gly Gly Cys |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 180 |  | 185 |  | 190 |

Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Gly Gly  
 195 200 205  
 Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr  
 210 215 220  
 Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr  
 225 230 235 240  
 Gly Ala Ala Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr  
 245 250 255  
 Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Ala Thr Ala  
 260 265 270  
 Thr Thr Ala Thr Ala Gly Thr Ala Cys Thr Cys Ala Gly Thr Gly Gly  
 275 280 285  
 Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala  
 290 295 300  
 Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala  
 305 310 315 320

Ala

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 小鼠mAb 5J24重链,核苷酸

&lt;400&gt; 24

Cys Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr  
 20 25 30  
 Gly Gly Thr Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Thr  
 35 40 45  
 Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Thr Cys Cys Thr  
 50 55 60  
 Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Ala  
 65 70 75 80  
 Cys Ala Cys Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Ala Ala Cys Cys Ala Cys  
 85 90 95

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Thr Gly Gly Ala Thr Ala Gly Gly Thr Thr Gly Gly Gly Thr Ala Ala |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Cys Ala |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Thr Gly Gly Cys Cys Thr Thr Gly Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Thr |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Thr Thr Thr Ala Cys Cys Cys Thr Gly |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Thr Ala Thr Ala Cys Thr Ala Ala |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Cys Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Ala Gly Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Ala Cys Ala Cys |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Thr Gly Ala Cys Thr Gly Cys Ala Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Ala Cys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Ala Thr Gly Thr Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Thr Cys |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Thr Gly Cys Cys Ala Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Gly Cys Ala Ala Gly Ala Thr Cys Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Thr |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Ala Cys Gly Ala Cys Cys Thr Thr Thr Ala Thr Gly Cys Thr Ala Thr |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Ala Ala |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Gly Gly Ala Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala                                 |     |     |
| 355                                                             | 360 |     |

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

### 〈223〉 合成构建体

 $\langle 220 \rangle$ 

&lt;221&gt; MISC FEATURE

〈223〉 小鼠mAb 5J24轻链,核苷酸

<400> 25

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ala | Cys | Ala | Thr | Cys | Cys | Ala | Gly | Ala | Thr | Gly | Ala | Cys | Cys | Cys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ala | Gly | Thr | Cys | Thr | Cys | Cys | Ala | Thr | Cys | Cys | Thr | Cys | Cys | Thr | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ala | Thr | Cys | Thr | Gly | Cys | Cys | Thr | Cys | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Gly | Ala |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| Gly | Ala | Ala | Ala | Gly | Ala | Gly | Thr | Cys | Ala | Gly | Thr | Cys | Thr | Cys | Ala |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Cys | Thr | Thr | Gly | Thr | Cys | Gly | Gly | Gly | Cys | Ala | Ala | Gly | Thr | Cys | Ala |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Gly | Gly | Ala | Ala | Ala | Thr | Thr | Ala | Gly | Thr | Gly | Gly | Thr | Thr | Ala | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| Thr | Thr | Ala | Ala | Gly | Cys | Thr | Gly | Gly | Cys | Thr | Thr | Cys | Ala | Gly | Cys |
|     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |
| Ala | Gly | Ala | Ala | Ala | Cys | Cys | Ala | Gly | Ala | Thr | Gly | Gly | Ala | Ala | Cys |
|     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| Thr | Ala | Thr | Thr | Ala | Ala | Ala | Cys | Gly | Cys | Cys | Thr | Gly | Ala | Thr | Cys |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
| Thr | Ala | Cys | Gly | Cys | Cys | Gly | Cys | Ala | Thr | Cys | Cys | Ala | Cys | Thr | Thr |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |
| Thr | Ala | Gly | Gly | Thr | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Thr | Gly | Thr | Cys | Cys | Cys |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |
| Ala | Ala | Ala | Ala | Ala | Gly | Gly | Thr | Thr | Cys | Ala | Gly | Thr | Gly | Gly | Cys |
|     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |
| Ala | Gly | Thr | Ala | Gly | Gly | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Gly | Thr | Cys | Ala | Gly |
|     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |
| Ala | Thr | Thr | Ala | Thr | Thr | Cys | Thr | Cys | Thr | Cys | Ala | Cys | Cys | Ala | Thr |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |
| Cys | Ala | Gly | Cys | Ala | Gly | Cys | Cys | Thr | Thr | Gly | Ala | Gly | Thr | Cys | Thr |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |
| Gly | Ala | Ala | Gly | Ala | Thr | Thr | Thr | Thr | Gly | Cys | Ala | Gly | Ala | Cys | Thr |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |
| Ala | Thr | Thr | Ala | Cys | Thr | Gly | Thr | Cys | Thr | Ala | Cys | Ala | Ala | Thr | Ala |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |

Thr Gly Ala Thr Ala Gly Thr Thr Ala Thr Cys Cys Gly Thr Thr Cys  
 275 280 285  
 Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Gly Ala  
 290 295 300  
 Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Ala  
 <210> 26  
 <211> 357  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 小鼠mAb 21B9重链,核苷酸  
 <400> 26  
 Gly Ala Ala Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr  
 20 25 30  
 Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Gly  
 35 40 45  
 Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr  
 50 55 60  
 Gly Thr Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr  
 65 70 75 80  
 Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Thr Ala Gly Cys Thr Ala Thr  
 85 90 95  
 Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Cys Thr Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys  
 100 105 110  
 Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Ala  
 115 120 125  
 Gly Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys  
 130 135 140  
 Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Gly Thr Ala Gly Thr Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Cys Cys Thr Ala  
 165 170 175

Cys Thr Ala Thr Ala Cys Ala Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Thr Gly  
 180 185 190  
 Ala Cys Gly Gly Gly Cys Cys Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala  
 195 200 205  
 Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr Gly Cys  
 210 215 220  
 Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys  
 225 230 235 240  
 Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys  
 245 250 255  
 Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys  
 260 265 270  
 Gly Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr  
 275 280 285  
 Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly Gly  
 290 295 300  
 Ala Thr Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Ala Thr Gly Gly Ala  
 305 310 315 320  
 Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala  
 325 330 335  
 Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr  
 340 345 350  
 Cys Cys Thr Cys Ala  
 355

<210> 27

<211> 321

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 21B9轻链,核苷酸

<400> 27

Gly Ala Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr Ala Ala Cys Cys Cys  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Thr Thr Ala Thr Cys Thr  
 20 25 30  
 Thr Gly Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Ala

|           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|           | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |
| Gly       | Ala | Ala | Ala | Cys | Cys | Ala | Thr | Thr | Ala | Cys | Thr | Ala | Thr | Thr | Ala |     |
|           | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Ala       | Thr | Thr | Gly | Cys | Ala | Gly | Gly | Gly | Cys | Ala | Ala | Gly | Thr | Ala | Ala |     |
| 65        |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Gly       | Ala | Gly | Cys | Ala | Thr | Thr | Ala | Gly | Cys | Ala | Ala | Ala | Ala | Thr | Ala | Thr |
|           |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| Thr       | Thr | Ala | Gly | Cys | Cys | Thr | Gly | Gly | Thr | Ala | Thr | Cys | Ala | Ala | Ala | Gly |
|           |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |     |
| Ala       | Gly | Ala | Ala | Ala | Cys | Cys | Thr | Gly | Gly | Gly | Ala | Ala | Ala | Ala | Ala | Cys |
|           | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |
| Thr       | Ala | Ala | Thr | Ala | Ala | Gly | Cys | Thr | Thr | Cys | Thr | Thr | Ala | Thr | Cys |     |
|           | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
| Thr       | Ala | Thr | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Thr | Cys | Cys | Ala | Cys | Thr | Thr |     |
| 145       |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |
| Thr       | Gly | Cys | Ala | Ala | Ala | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Ala | Thr | Thr | Cys | Cys |     |
|           |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |
| Ala       | Thr | Cys | Ala | Ala | Gly | Gly | Thr | Thr | Cys | Ala | Gly | Thr | Gly | Gly | Cys |     |
|           | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |
| Ala       | Gly | Thr | Gly | Gly | Ala | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Thr | Ala | Cys | Ala | Gly |     |
|           | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |
| Ala       | Thr | Thr | Thr | Cys | Ala | Cys | Thr | Cys | Thr | Cys | Ala | Cys | Cys | Ala | Thr |     |
|           | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |
| Cys       | Ala | Gly | Thr | Ala | Gly | Cys | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Gly | Cys | Cys | Thr |     |
| 225       |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |     |
| Gly       | Ala | Ala | Gly | Ala | Thr | Thr | Thr | Thr | Gly | Cys | Ala | Ala | Thr | Gly | Thr |     |
|           |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |     |
| Ala       | Thr | Thr | Ala | Cys | Thr | Gly | Thr | Cys | Ala | Ala | Cys | Ala | Gly | Cys | Ala |     |
|           | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |
| Thr       | Ala | Ala | Thr | Gly | Ala | Ala | Thr | Ala | Cys | Cys | Cys | Gly | Thr | Gly | Gly |     |
|           | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |     |
| Ala       | Cys | Gly | Thr | Thr | Cys | Gly | Gly | Thr | Gly | Gly | Ala | Gly | Gly | Cys | Ala |     |
|           | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |
| Cys       | Cys | Ala | Ala | Gly | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Ala | Ala | Thr | Cys | Ala | Ala |     |
| 305       |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |     |
| Ala       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <210> 28  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> 357 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> PRT |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 小鼠mAb 22B22重链,核苷酸

&lt;400&gt; 28

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ala | Ala | Gly | Thr | Gly | Cys | Ala | Gly | Cys | Thr | Gly | Gly | Thr | Gly | Gly | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Ala | Gly | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Gly | Gly | Gly | Ala | Gly | Gly | Cys | Thr | Thr | 20  | 25  | 30  |     |
| Ala | Gly | Thr | Gly | Ala | Ala | Gly | Cys | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Gly | Gly | Gly | 35  | 40  | 45  |     |
| Thr | Cys | Cys | Cys | Thr | Gly | Ala | Ala | Ala | Cys | Thr | Cys | Thr | Cys | Cys | Thr | 50  | 55  | 60  |     |
| Gly | Thr | Gly | Cys | Ala | Gly | Cys | Cys | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Thr | Thr | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Cys | Ala | Cys | Thr | Thr | Thr | Cys | Ala | Gly | Thr | Ala | Gly | Cys | Thr | Ala | Thr | 85  | 90  | 95  |     |
| Gly | Cys | Cys | Ala | Thr | Gly | Thr | Cys | Thr | Thr | Gly | Gly | Gly | Thr | Thr | Cys | 100 | 105 | 110 |     |
| Gly | Cys | Cys | Ala | Gly | Thr | Cys | Thr | Cys | Cys | Ala | Gly | Ala | Gly | Ala | Ala | 115 | 120 | 125 |     |
| Gly | Ala | Gly | Gly | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Gly | Thr | Gly | Gly | Gly | Thr | Cys | 130 | 135 | 140 |     |
| Gly | Cys | Ala | Gly | Ala | Ala | Ala | Thr | Thr | Ala | Gly | Thr | Ala | Gly | Thr | Gly | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gly | Thr | Gly | Gly | Thr | Ala | Gly | Thr | Thr | Ala | Cys | Ala | Cys | Cys | Thr | Ala | 165 | 170 | 175 |     |
| Cys | Thr | Ala | Thr | Cys | Cys | Ala | Gly | Ala | Cys | Ala | Cys | Thr | Gly | Thr | Gly | 180 | 185 | 190 |     |
| Ala | Cys | Gly | Gly | Gly | Cys | Cys | Gly | Ala | Thr | Thr | Cys | Ala | Cys | Cys | Ala | 195 | 200 | 205 |     |
| Thr | Cys | Thr | Cys | Cys | Ala | Gly | Ala | Gly | Ala | Cys | Ala | Ala | Thr | Gly | Cys | 210 | 215 | 220 |     |
| Cys | Ala | Ala | Gly | Ala | Ala | Cys | Ala | Cys | Cys | Cys | Thr | Gly | Thr | Ala | Cys | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Ala | Ala | Thr | Gly | Ala | Gly | Cys | Ala | Gly | Thr | Cys | 245 | 250 | 255 |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Gly Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly Gly |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Ala Thr Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Cys Cys Thr Cys Ala                                             |     |     |
| 355                                                             |     |     |

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 小鼠mAb 22B22轻链,核苷酸

&lt;400&gt; 29

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Gly Ala Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr Ala Ala Cys Cys Cys |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Thr Thr Ala Thr Cys Thr |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Thr Gly Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Ala |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Thr Thr Ala Cys Thr Ala Thr Thr Ala |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Ala Thr Thr Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Ala Gly Thr Ala Ala |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Gly Ala Gly Cys Ala Thr Thr Ala Gly Cys Ala Ala Ala Thr Ala Thr |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Thr Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Ala Gly |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Cys |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Thr Ala Ala Thr Ala Ala Gly Cys Thr Thr Cys Thr Thr Ala Thr Cys |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Thr Ala Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Cys Ala Cys Thr Thr |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Thr Gly Cys Ala Ala Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Thr Thr Cys Cys |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Ala Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Thr Gly Gly Cys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Ala Gly |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Cys Ala Gly Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Gly Ala Ala Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala Ala Thr Gly Thr |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Thr Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Cys Cys Cys Gly Thr Gly Gly |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| 320                                                             |     |     |
| Ala                                                             |     |     |
| <210> 30                                                        |     |     |
| <211> 354                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 合成构建体                                                     |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |     |
| <223> 小鼠mAb 28P24重链,核苷酸                                         |     |     |
| <400> 30                                                        |     |     |
| Cys Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| 15                                                              |     |     |
| Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala Cys Thr |     |     |

| 20                                                              | 25  | 30  |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Gly Gly Thr Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Thr |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Thr Cys Cys Thr |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Ala |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Cys Ala Cys Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Ala Ala Cys Thr Ala Cys |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Thr Thr Thr Ala Thr Ala Gly Gly Thr Thr Gly Gly Gly Thr Ala Ala |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Cys Ala |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Thr Gly Gly Cys Cys Thr Thr Gly Ala Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Thr Thr Thr Ala Cys Cys Cys Thr Gly |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Thr Ala Thr Ala Cys Thr Ala Ala |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Cys Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Ala Gly Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Ala Cys Ala Cys |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Thr Gly Ala Cys Thr Gly Cys Ala Gly Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Ala Cys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Ala Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Thr Cys |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Thr Gly Cys Cys Ala Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Gly Thr Ala Ala Gly Ala Thr Thr Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Ala |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Ala Cys Thr Ala Cys Gly Thr Gly Thr Thr Thr Gly Cys Thr Thr Ala |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Cys Thr |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |

Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Gly  
 340 345 350  
 Cys Ala  
 <210> 31  
 <211> 321  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 小鼠mAb 28P24轻链,核苷酸  
 <400> 31  
 Gly Ala Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr Ala Ala Cys Cys Cys  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Thr Thr Gly Thr Cys Thr  
 20 25 30  
 Thr Gly Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Ala  
 35 40 45  
 Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Thr Thr Ala Cys Thr Ala Thr Thr Ala  
 50 55 60  
 Ala Thr Thr Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Ala Gly Thr Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Cys Cys Ala Thr Thr Ala Gly Cys Ala Ala Ala Thr Ala Thr  
 85 90 95  
 Thr Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Cys Ala Ala Gly  
 100 105 110  
 Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Cys  
 115 120 125  
 Thr Ala Ala Thr Ala Ala Gly Cys Thr Thr Cys Thr Thr Ala Thr Cys  
 130 135 140  
 Thr Ala Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Cys Ala Cys Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Thr Gly Cys Ala Ala Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Thr Thr Cys Cys  
 165 170 175  
 Ala Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Thr Gly Gly Cys  
 180 185 190  
 Ala Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Ala Gly  
 195 200 205

Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr  
 210 215 220  
 Cys Ala Gly Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr  
 225 230 235 240  
 Gly Ala Ala Gly Ala Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala Ala Thr Gly Thr  
 245 250 255  
 Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala  
 260 265 270  
 Thr Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Cys Cys Cys Gly Thr Gly Gly  
 275 280 285  
 Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala  
 290 295 300  
 Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala  
 305 310 315 320

Ala

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 小鼠mAb 21B16重链,核苷酸

&lt;400&gt; 32

Gly Ala Ala Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr  
 20 25 30  
 Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Gly  
 35 40 45  
 Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr  
 50 55 60  
 Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr  
 65 70 75 80  
 Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Thr Ala Cys Cys Thr Ala Thr  
 85 90 95  
 Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Cys Thr Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys  
 100 105 110

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Ala |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Gly Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Gly Thr Ala Gly Thr Gly |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gly Thr Gly Gly Thr Ala Cys Thr Thr Ala Cys Ala Cys Cys Thr Ala |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Cys Thr Thr Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Thr Gly |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ala Cys Gly Gly Gly Cys Cys Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr Gly Cys |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Gly Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Gly Ala Cys Gly Ala Gly |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Ala Thr Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Cys Cys Thr Cys Ala                                             |     |     |
| 355                                                             |     |     |

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 小鼠mAb 21B16轻链,核苷酸

&lt;400&gt; 33

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ala | Thr | Gly | Thr | Cys | Cys | Ala | Gly | Ala | Thr | Ala | Ala | Cys | Cys | Cys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| Ala | Gly | Thr | Cys | Thr | Cys | Cys | Ala | Thr | Cys | Thr | Thr | Ala | Thr | Cys | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Thr | Gly | Cys | Thr | Gly | Cys | Ala | Thr | Cys | Thr | Cys | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |
| Gly | Ala | Ala | Ala | Cys | Cys | Ala | Thr | Thr | Ala | Cys | Thr | Ala | Thr | Thr | Ala |
|     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |
| Ala | Thr | Thr | Gly | Cys | Ala | Gly | Gly | Gly | Cys | Ala | Ala | Gly | Thr | Ala | Ala |
| 65  |     |     |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     | 80  |
| Gly | Ala | Gly | Cys | Ala | Thr | Thr | Ala | Gly | Cys | Ala | Ala | Ala | Thr | Ala | Thr |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     | 95  |
| Thr | Thr | Ala | Gly | Cys | Cys | Thr | Gly | Gly | Thr | Ala | Thr | Cys | Ala | Ala | Gly |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     | 110 |
| Ala | Gly | Ala | Ala | Ala | Cys | Cys | Thr | Gly | Gly | Gly | Ala | Ala | Ala | Ala | Cys |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     | 125 |
| Thr | Ala | Ala | Thr | Ala | Ala | Gly | Cys | Thr | Thr | Cys | Thr | Thr | Ala | Thr | Cys |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     | 140 |
| Thr | Ala | Cys | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Thr | Cys | Cys | Ala | Cys | Thr | Thr |
| 145 |     |     |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     | 160 |
| Thr | Gly | Cys | Ala | Ala | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Ala | Thr | Thr | Cys | Cys |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     | 175 |
| Ala | Thr | Cys | Ala | Ala | Gly | Gly | Thr | Thr | Cys | Ala | Gly | Thr | Gly | Gly | Cys |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     | 190 |
| Ala | Gly | Thr | Gly | Gly | Ala | Thr | Cys | Thr | Gly | Gly | Thr | Ala | Cys | Ala | Gly |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     | 205 |
| Ala | Thr | Thr | Thr | Cys | Ala | Cys | Thr | Cys | Thr | Cys | Ala | Cys | Cys | Ala | Thr |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     | 220 |
| Cys | Ala | Gly | Thr | Ala | Gly | Cys | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Gly | Cys | Cys | Thr |
| 225 |     |     |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     | 240 |
| Gly | Ala | Ala | Gly | Ala | Thr | Thr | Thr | Thr | Gly | Cys | Ala | Gly | Thr | Gly | Thr |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     | 255 |
| Ala | Thr | Thr | Ala | Cys | Thr | Gly | Thr | Cys | Ala | Ala | Cys | Ala | Gly | Cys | Ala |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     | 270 |
| Thr | Ala | Ala | Thr | Gly | Ala | Ala | Thr | Ala | Cys | Cys | Cys | Gly | Thr | Gly | Gly |
|     |     |     |     |     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     | 285 |

Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala  
 290 295 300  
 Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Ala  
 <210> 34  
 <211> 357  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 小鼠mAb 28012重链,核苷酸  
 <400> 34  
 Gly Ala Ala Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr  
 20 25 30  
 Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Gly  
 35 40 45  
 Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr  
 50 55 60  
 Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr  
 65 70 75 80  
 Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Thr Ala Ala Cys Thr Ala Thr  
 85 90 95  
 Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Cys Thr Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys  
 100 105 110  
 Gly Thr Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Ala  
 115 120 125  
 Gly Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys  
 130 135 140  
 Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Gly Thr Gly Gly Thr Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Cys Gly Thr Ala  
 165 170 175  
 Cys Cys Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Thr Gly  
 180 185 190

Ala Cys Gly Gly Gly Cys Cys Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala  
 195 200 205  
 Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr Gly Cys  
 210 215 220  
 Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys  
 225 230 235 240  
 Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys  
 245 250 255  
 Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys  
 260 265 270  
 Gly Gly Cys Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr  
 275 280 285  
 Gly Cys Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly Gly  
 290 295 300  
 Ala Thr Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala  
 305 310 315 320  
 Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala  
 325 330 335  
 Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr  
 340 345 350  
 Cys Cys Thr Cys Ala  
 355

<210> 35

<211> 322

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 小鼠mAb 28012轻链,核苷酸

<400> 35

Gly Ala Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr Ala Ala Cys Cys Cys  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Thr Thr Ala Thr Cys Thr  
 20 25 30  
 Thr Gly Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Ala  
 35 40 45  
 Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Thr Thr Ala Cys Thr Ala Thr Thr Ala

|                     |                         |                             |
|---------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 50                  | 55                      | 60                          |
| Ala Thr Thr Gly Cys | Ala Gly Gly Gly Cys     | Ala Ala Gly Thr Ala Ala     |
| 65                  | 70                      | 75                          |
| Gly Ala Gly Cys Ala | Thr Thr Ala Gly Cys     | Ala Ala Ala Thr Ala Thr     |
| 85                  | 90                      | 95                          |
| Thr Thr Ala Gly Cys | Cys Thr Gly Gly Thr     | Ala Thr Cys Ala Ala Gly     |
| 100                 | 105                     | 110                         |
| Ala Gly Ala Ala Ala | Cys Cys Thr Gly Gly Gly | Ala Ala Ala Ala Cys         |
| 115                 | 120                     | 125                         |
| Thr Ala Ala Thr Ala | Ala Gly Cys Thr Thr     | Cys Thr Thr Ala Thr Cys     |
| 130                 | 135                     | 140                         |
| Thr Ala Cys Thr Cys | Thr Gly Gly Ala Thr     | Cys Cys Ala Cys Thr Thr     |
| 145                 | 150                     | 155                         |
| Thr Gly Cys Ala Ala | Thr Cys Thr Gly Gly     | Ala Ala Thr Thr Cys Cys     |
| 165                 | 170                     | 175                         |
| Ala Thr Cys Ala Ala | Gly Gly Thr Thr         | Cys Ala Gly Thr Gly Gly Cys |
| 180                 | 185                     | 190                         |
| Ala Gly Thr Gly Gly | Ala Thr Cys Thr         | Gly Gly Thr Ala Cys Ala Gly |
| 195                 | 200                     | 205                         |
| Ala Thr Thr Thr Cys | Ala Cys Thr Cys Thr     | Cys Ala Cys Cys Ala Thr     |
| 210                 | 215                     | 220                         |
| Cys Ala Gly Thr Ala | Gly Cys Cys Thr         | Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr |
| 225                 | 230                     | 235                         |
| Gly Ala Ala Gly Ala | Thr Thr Thr Thr         | Gly Cys Ala Ala Thr Gly Thr |
| 245                 | 250                     | 255                         |
| Ala Thr Thr Ala Cys | Thr Gly Thr Cys         | Ala Gly Cys Ala Gly Cys Ala |
| 260                 | 265                     | 270                         |
| Thr Ala Ala Thr Gly | Ala Ala Thr Ala         | Cys Cys Cys Gly Thr Gly Gly |
| 275                 | 280                     | 285                         |
| Ala Cys Gly Thr Thr | Cys Gly Gly Thr         | Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala |
| 290                 | 295                     | 300                         |
| Cys Cys Ala Ala Gly | Cys Thr Gly Gly         | Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala |
| 305                 | 310                     | 315                         |
| Ala Cys             |                         | 320                         |
| <210>               | 36                      |                             |
| <211>               | 6                       |                             |
| <212>               | PRT                     |                             |
| <213>               | 人工序列                    |                             |
| <220>               |                         |                             |

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21F8 HC-CDR1

<400> 36

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

1 5

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21F8 HC-CDR2

<400> 37

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21F8 HC-CDR3

<400> 38

Phe Met Ile Thr Thr Phe Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21F8 LC-CDR1

<400> 39

Lys Ala Ser Gln His Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21F8 LC-CDR2

<400> 40

Ser Ala Pro Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21F8 LC-CDR3

<400> 41

Gln Gln His Tyr Asn Thr Leu Trp Thr

1 5

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 30M18 HC-CDR1

<400> 42

Glu Tyr Thr Met His

1 5  
 <210> 43  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mAb 30M18 HC-CDR2  
 <400> 43  
 Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 <210> 44  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mAb 30M18 HC-CDR3  
 <400> 44  
 Ser Gly His Met Asp Tyr Gly Tyr Val Tyr  
 1 5 10  
 <210> 45  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mAb 30M18 LC-CDR1  
 <400> 45  
 Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Thr Ala Val Ala  
 1 5 10  
 <210> 46

<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> mAb 30M18 LC-CDR2  
<400> 46  
Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr  
1 5  
<210> 47  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> mAb 30M18 LC-CDR3  
<400> 47  
Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
1 5  
<210> 48  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> mAb 24F8 HC-CDR1  
<400> 48  
Ser Gly Tyr Ser Trp His  
1 5  
<210> 49  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 24F8 HC-CDR2

<400> 49

Tyr Val His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1                      5                      10                      15

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 24F8 HC-CDR3

<400> 50

Met Asp Tyr Gly Asn Tyr Gly Gly Ala Met Asp Tyr

1                      5                      10

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 24F8 LC-CDR1

<400> 51

Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Thr Ala Val Ala

1                      5                      10

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<223> mAb 24F8 LC-CDR2  
<400> 52  
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
1 5  
<210> 53  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> mAb 24F8 LC-CDR3  
<400> 53  
Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Gln Trp Thr  
1 5  
<210> 54  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> mAb 5J24 HC-CDR1  
<400> 54  
Asn His Trp Ile Gly  
1 5  
<210> 55  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> mAb 5J24 和  
mAb 28P24 HC-CDR2

<400> 55

Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 5J24 HC-CDR3

<400> 56

Ser Tyr Gly Tyr Asp Leu Tyr Ala Met Asp Tyr

1

5

10

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 5J24 LC-CDR1

<400> 57

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser

1

5

10

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 5J24 LC-CDR2

<400> 58

Ala Ala Ser Thr Leu Gly Ser

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 5J24 LC-CDR3

<400> 59

Leu Gln Tyr Asp Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21B9 和

mAb 22B22 HC-CDR1

<400> 60

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21B9 HC-CDR2

<400> 61

Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Thr Val Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21B9 HC-CDR3

<400> 62

Lys Arg Arg Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21B9, mAb 22B22,  
mAb 21B16, mAb 21B16, 和 mAb 28012 LC-CDR1

<400> 63

Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21B9 LC-CDR2

<400> 64

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Thr

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21B9, mAb 22B22,  
mAb 28P24, mAb 21B16, 和 mAb 28012 LC-CDR3

<400> 65

Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 22B22 HC-CDR2

<400> 66

Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 22B22, mAb 21B16, 和 mAb 28012 HC-CDR3

<400> 67

Lys Arg Arg Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> mAb 22B22, mAb 28P24,  
mAb 21B16, 和  
mAb 28012 LC-CDR2  
<400> 68  
Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser  
1 5  
<210> 69  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> mAb 28P24 HC-CDR1  
<400> 69  
Asn Tyr Phe Ile Gly  
1 5  
<210> 70  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成构建体  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> mAb 28P24 HC-CDR3  
<400> 70  
Phe Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Ala Tyr  
1 5  
<210> 71  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 28P24 LC-CDR1

<400> 71

Arg Ala Ser Lys Thr Ile Ser Lys Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21B16 HC-CDR1

<400> 72

Thr Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 21B16 HC-CDR2

<400> 73

Glu Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Phe Pro Asp Thr Val Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 74

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 28012 HC-CDR1

<400> 74

Asn Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> mAb 28012 HC-CDR2

<400> 75

Glu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro Asp Thr Val Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 76

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Hu24F8.1 和 HU24F8.4重链,氨基酸

<400> 76

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly

20 25 30

Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Tyr Val His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Met Asp Tyr Gly Asn Tyr Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 77

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Hu24F8.1 和 HU24F8.2轻链,氨基酸

<400> 77

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Thr Ala  
20 25 30  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Gln Trp  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 78

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Hu24F8.2 和 HU24F8.3重链,氨基酸

&lt;400&gt; 78

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
                     20                      25                      30  
 Tyr Ser Trp His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
                     35                      40                      45  
 Ile Gly Tyr Val His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
                     50                      55                      60  
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                     85                      90                      95  
 Ala Arg Met Asp Tyr Gly Asn Tyr Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
                     100                      105                      110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                     115                      120

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; HU24F8.3 和 Hu24F8.4轻链,氨基酸

&lt;400&gt; 79

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 80  
 <211> 244  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> hTIGIT全长,氨基酸  
 <400> 80  
 Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn  
 20 25 30  
 Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser  
 35 40 45  
 Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln  
 50 55 60  
 Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser  
 65 70 75 80  
 Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln  
 85 90 95  
 Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr  
 100 105 110  
 Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu  
 115 120 125  
 Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly  
 130 135 140  
 Ala Met Ala Ala Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val  
 145 150 155 160  
 Val Ala Leu Thr Arg Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu  
 165 170 175  
 Gly Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser  
 180 185 190  
 Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala  
 195 200 205  
 Gly Leu Cys Gly Glu Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu Leu His Asp

| 210                                                             | 215 | 220     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys Ser Phe Phe |     |         |
| 225                                                             | 230 | 235 240 |
| Thr Glu Thr Gly                                                 |     |         |
| <210> 81                                                        |     |         |
| <211> 223                                                       |     |         |
| <212> PRT                                                       |     |         |
| <213> 人工序列                                                      |     |         |
| <220>                                                           |     |         |
| <223> 合成构建体                                                     |     |         |
| <220>                                                           |     |         |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |         |
| <223> 成熟人TIGIT,氨基酸                                              |     |         |
| <400> 81                                                        |     |         |
| Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys |     |         |
| 1 5 10 15                                                       |     |         |
| Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln |     |         |
| 20 25 30                                                        |     |         |
| Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys |     |         |
| 35 40 45                                                        |     |         |
| Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val |     |         |
| 50 55 60                                                        |     |         |
| Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn |     |         |
| 65 70 75 80                                                     |     |         |
| Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr |     |         |
| 85 90 95                                                        |     |         |
| Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu |     |         |
| 100 105 110                                                     |     |         |
| His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala Thr |     |         |
| 115 120 125                                                     |     |         |
| Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val Val Ala Leu Thr Arg |     |         |
| 130 135 140                                                     |     |         |
| Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu Gly Asp Leu Arg Arg |     |         |
| 145 150 155 160                                                 |     |         |
| Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Pro |     |         |
| 165 170 175                                                     |     |         |
| Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly Glu |     |         |
| 180 185 190                                                     |     |         |
| Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu Leu His Asp Tyr Phe Asn Val Leu |     |         |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys Ser Phe Phe Thr Glu Thr Gly     |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| <210> 82                                                        |     |     |
| <211> 120                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 合成构建体                                                     |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |     |
| <223> hTIGIT胞外结构域,氨基酸                                           |     |     |
| <400> 82                                                        |     |     |
| Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro                                 |     |     |
| 115                                                             | 120 |     |
| <210> 83                                                        |     |     |
| <211> 128                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 合成构建体                                                     |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |     |
| <223> hTIGIT-His,氨基酸                                            |     |     |
| <400> 83                                                        |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Met | Thr | Gly | Thr | Ile | Glu | Thr | Thr | Gly | Asn | Ile | Ser | Ala | Glu | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Gly | Gly | Ser | Ile | Ile | Leu | Gln | Cys | His | Leu | Ser | Ser | Thr | Thr | Ala | Gln |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Val | Thr | Gln | Val | Asn | Trp | Glu | Gln | Gln | Asp | Gln | Leu | Leu | Ala | Ile | Cys |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |
| Asn | Ala | Asp | Leu | Gly | Trp | His | Ile | Ser | Pro | Ser | Phe | Lys | Asp | Arg | Val |
|     |     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |
| Ala | Pro | Gly | Pro | Gly | Leu | Gly | Leu | Thr | Leu | Gln | Ser | Leu | Thr | Val | Asn |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Asp | Thr | Gly | Glu | Tyr | Phe | Cys | Ile | Tyr | His | Thr | Tyr | Pro | Asp | Gly | Thr |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Tyr | Thr | Gly | Arg | Ile | Phe | Leu | Glu | Val | Leu | Glu | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Ala | Gly | Gly | Gly | Gly | His | His | His | His | His | His | His | His | His | His |
|     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 312

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; cTIGIT全长, 氨基酸

&lt;400&gt; 84

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |
| His Leu Ser Ser Thr Met Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| His Asp His Ser Leu Leu Ala Ile Arg Asn Ala Glu Leu Gly Trp His |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Ile Tyr Pro Ala Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Met Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Thr Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Arg Gly Arg Ile Phe Leu |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His Ser Ala Arg Phe Gln Ile |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Pro Leu Leu Gly Ala Met Ala Met Met Leu Val Val Ile Cys Ile Ala |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Val Ile Val Val Val Val Leu Ala Arg Lys Lys Lys Ser Leu Arg Ile |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| His Ser Val Glu Ser Gly Leu Gln Arg Lys Ser Thr Gly Gln Glu Glu |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Gln Ile Pro Ser Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Ala Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly Glu Gln Gln Gly Asp Asp Cys Ala |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Glu Leu His Asp Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Ser |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Cys Ser Phe Phe Thr Glu Thr Gly                                 |     |     |
| 305                                                             | 310 |     |
| <210> 85                                                        |     |     |
| <211> 129                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 合成构建体                                                     |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |     |
| <223> cTIGIT-His胞外结构域, 氨基酸                                      |     |     |
| <400> 85                                                        |     |     |
| Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Lys Lys |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
|                                                                 |     | 15  |

Gly Gly Ser Val Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Met Ala Gln  
 20 25 30  
 Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln His Asp His Ser Leu Leu Ala Ile  
 35 40 45  
 Arg Asn Ala Glu Leu Gly Trp His Ile Tyr Pro Ala Phe Lys Asp Arg  
 50 55 60  
 Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Met  
 65 70 75 80  
 Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly  
 85 90 95  
 Thr Tyr Arg Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Gly Gly  
 100 105 110  
 Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly His His His His His His His His His  
 115 120 125

His

<210> 86

<211> 323

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 人CD155的 成熟胞外区域, 氨基酸

<400> 86

Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu Gln  
 20 25 30  
 Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala Arg  
 35 40 45  
 His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly Pro  
 50 55 60  
 Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala Ala Arg Leu Gly  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val Glu  
 85 90 95  
 Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe Pro Gln Gly Ser  
 100 105 110

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn Thr |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro Met Ala |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp His |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val Pro Gly Phe Leu |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser Ser |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser Phe |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr Pro Pro |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly Gln Asn |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val Ala |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn Thr |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala Glu |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly Met |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Ser Arg Asn                                                     |     |     |
| <210> 87                                                        |     |     |
| <211> 339                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 合成构建体                                                     |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |     |
| <223> hTIGIT-mFc,氨基酸                                            |     |     |
| <400> 87                                                        |     |     |
| Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
|                                                                 |     | 15  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gly | Ser | Ile | Ile | Leu | Gln | Cys | His | Leu | Ser | Ser | Thr | Thr | Ala | Gln |
| 20  |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Thr | Gln | Val | Asn | Trp | Glu | Gln | Gln | Asp | Gln | Leu | Leu | Ala | Ile | Cys |
| 35  |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |     |     |
| Asn | Ala | Asp | Leu | Gly | Trp | His | Ile | Ser | Pro | Ser | Phe | Lys | Asp | Arg | Val |
| 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Pro | Gly | Pro | Gly | Leu | Gly | Leu | Thr | Leu | Gln | Ser | Leu | Thr | Val | Asn |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |
| Asp | Thr | Gly | Glu | Tyr | Phe | Cys | Ile | Tyr | His | Thr | Tyr | Pro | Asp | Gly | Thr |
| 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |
| Tyr | Thr | Gly | Arg | Ile | Phe | Leu | Glu | Val | Leu | Glu | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly |
| 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Ala | Gly | Gly | Gly | Gly | Cys | Lys | Pro | Cys | Ile | Cys | Thr | Val | Pro | Glu |
| 115 |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Ser | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Val | Leu | Thr |
| 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ile | Thr | Leu | Thr | Pro | Lys | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Ile | Ser | Lys |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |
| Asp | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Ser | Trp | Phe | Val | Asp | Asp | Val | Glu | Val |
| 165 |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |     |
| His | Thr | Ala | Gln | Thr | Gln | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser | Thr | Phe |
| 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Ser | Val | Ser | Glu | Leu | Pro | Ile | Met | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly |
| 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Glu | Phe | Lys | Cys | Arg | Val | Asn | Ser | Ala | Ala | Phe | Pro | Ala | Pro | Ile |
| 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Thr | Lys | Gly | Arg | Pro | Lys | Ala | Pro | Gln | Val |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |     |
| Tyr | Thr | Ile | Pro | Pro | Pro | Lys | Glu | Gln | Met | Ala | Lys | Asp | Lys | Val | Ser |
| 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Thr | Cys | Met | Ile | Thr | Asp | Phe | Phe | Pro | Glu | Asp | Ile | Thr | Val | Glu |
| 260 |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp | Gln | Trp | Asn | Gly | Gln | Pro | Ala | Glu | Asn | Tyr | Lys | Asn | Thr | Gln | Pro |
| 275 |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ile | Met | Asp | Thr | Asp | Gly | Ser | Tyr | Phe | Val | Tyr | Ser | Lys | Leu | Asn | Val |
| 290 |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln | Lys | Ser | Asn | Trp | Glu | Ala | Gly | Asn | Thr | Phe | Thr | Cys | Ser | Val | Leu |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |     |     |     |
| His | Glu | Gly | Leu | His | Asn | His | His | Thr | Glu | Lys | Ser | Leu | Ser | His | Ser |

| 325                                                             | 330 | 335 |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Pro Gly Lys                                                     |     |     |
| <210> 88                                                        |     |     |
| <211> 249                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 合成构建体                                                     |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |     |
| <223> MTIGIT全长,氨基酸                                              |     |     |
| <400> 88                                                        |     |     |
| Met His Gly Trp Leu Leu Leu Val Trp Val Gln Gly Leu Ile Gln Ala |     |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |     |
| Ala Phe Leu Ala Thr Ala Ile Gly Ala Thr Ala Gly Thr Ile Asp Thr |     |     |
| 20 25 30                                                        |     |     |
| Lys Arg Asn Ile Ser Ala Glu Glu Gly Gly Ser Val Ile Leu Gln Cys |     |     |
| 35 40 45                                                        |     |     |
| His Phe Ser Ser Asp Thr Ala Glu Val Thr Gln Val Asp Trp Lys Gln |     |     |
| 50 55 60                                                        |     |     |
| Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Tyr Ser Val Asp Leu Gly Trp His Val |     |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |     |
| Ala Ser Val Phe Ser Asp Arg Val Val Pro Gly Pro Ser Leu Gly Leu |     |     |
| 85 90 95                                                        |     |     |
| Thr Phe Gln Ser Leu Thr Met Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr |     |     |
| 100 105 110                                                     |     |     |
| Tyr His Thr Tyr Pro Gly Gly Ile Tyr Lys Gly Arg Ile Phe Leu Lys |     |     |
| 115 120 125                                                     |     |     |
| Val Gln Glu Ser Ser Asp Asp Arg Asn Gly Leu Ala Gln Phe Gln Thr |     |     |
| 130 135 140                                                     |     |     |
| Ala Pro Leu Gly Gly Thr Met Ala Ala Val Leu Gly Leu Ile Cys Leu |     |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |     |
| Met Val Thr Gly Val Thr Val Leu Ala Arg Lys Asp Lys Ser Ile Arg |     |     |
| 165 170 175                                                     |     |     |
| Met His Ser Ile Glu Ser Gly Leu Gly Arg Thr Glu Ala Glu Pro Gln |     |     |
| 180 185 190                                                     |     |     |
| Glu Trp Asn Leu Arg Ser Leu Ser Ser Pro Gly Ser Pro Val Gln Thr |     |     |
| 195 200 205                                                     |     |     |
| Gln Thr Ala Pro Ala Gly Pro Cys Gly Glu Gln Ala Glu Asp Asp Tyr |     |     |

|                                                                 |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 210                                                             | 215 | 220     |
| Ala Asp Pro Gln Glu Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Glu |     |         |
| 225                                                             | 230 | 235 240 |
| Ser Phe Ile Ala Val Ser Lys Thr Gly                             |     |         |
| 245                                                             |     |         |
| <210> 89                                                        |     |         |
| <211> 242                                                       |     |         |
| <212> PRT                                                       |     |         |
| <213> 人工序列                                                      |     |         |
| <220>                                                           |     |         |
| <223> 合成构建体                                                     |     |         |
| <220>                                                           |     |         |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |         |
| <223> RTIGIT全长,氨基酸                                              |     |         |
| <400> 89                                                        |     |         |
| Met His Gly Trp Met Leu Leu Val Trp Val Gln Gly Leu Thr Glu Thr |     |         |
| 1 5 10 15                                                       |     |         |
| Ala Phe Leu Ala Ala Gly Ala Thr Ala Gly Thr Met Glu Thr Lys Gly |     |         |
| 20 25 30                                                        |     |         |
| Asn Ile Ser Ala Glu Glu Gly Gly Ser Val Val Leu Gln Cys His Phe |     |         |
| 35 40 45                                                        |     |         |
| Ser Ser Asp Thr Ala Glu Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Arg Asp |     |         |
| 50 55 60                                                        |     |         |
| Gln Leu Leu Ala Val Tyr Ser Val Asp Leu Gly Trp Tyr Val Pro Ser |     |         |
| 65 70 75 80                                                     |     |         |
| Val Phe Ser Asp Arg Val Val Pro Gly Pro Ser Leu Gly Leu Thr Phe |     |         |
| 85 90 95                                                        |     |         |
| Gln Ser Leu Thr Thr Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr His |     |         |
| 100 105 110                                                     |     |         |
| Thr Tyr Pro Asp Gly Ile Tyr Lys Gly Arg Ile Phe Leu Lys Val Gln |     |         |
| 115 120 125                                                     |     |         |
| Glu Ser Ser Val Ala His Phe Gln Ile Ala Leu Pro Gly Gly Thr Met |     |         |
| 130 135 140                                                     |     |         |
| Ala Ala Val Leu Gly Leu Ile Cys Leu Met Ala Thr Gly Val Thr Val |     |         |
| 145 150 155 160                                                 |     |         |
| Leu Ala Arg Lys Lys Ser Ile Arg Met His Ser Val Glu Ser Gly Leu |     |         |
| 165 170 175                                                     |     |         |
| Gly Arg Thr Glu Ala Glu Pro Gln Glu Trp Asn Leu Arg Ile Leu Leu |     |         |
| 180 185 190                                                     |     |         |

Ser Pro Ser Gly Pro Val Gln Thr Gln Ala Ala Pro Ala Asp Leu Cys  
195 200 205  
Gly Glu Gln Thr Glu Asp Asp Tyr Thr Asp Pro Gln Asp Tyr Phe Asn  
210 215 220  
Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Ser Phe Ile Ala Leu Ser Lys Thr  
225 230 235 240

Gly Gln

<210> 90

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> HTIGIT-HIS,氨基酸(晶体学)

<400> 90

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Gln Ile Ser Ala Glu Lys  
1 5 10 15  
Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln  
20 25 30  
Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys  
35 40 45  
Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val  
50 55 60  
Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Gln  
65 70 75 80  
Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr  
85 90 95  
Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Gly Gly Gly  
100 105 110  
Gly Ala Gly Gly Gly Gly His His His His His His  
115 120

<210> 91

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; CD155胞外结构域,氨基酸(晶体学)

&lt;400&gt; 91

```

Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp
1           5           10           15
Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr
           20           25           30
His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met
           35           40           45
Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg
           50           55           60
Leu Glu Phe Val Ala Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser
65           70           75           80
Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys
           85           90           95
Leu Phe Val Thr Phe Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu
           100          105          110
Arg Val Leu Ala
           115

```

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 451

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建体

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; 24F8.2重链全长氨基酸IgG1;野生型IMGT等位基因IGHG1\*01

&lt;400&gt; 92

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
           20           25           30
Tyr Ser Trp His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
           35           40           45
Ile Gly Tyr Val His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
           50           55           60
Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Gln Phe Ser

```

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| Ala Arg Met Asp Tyr Gly Asn Tyr Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 | 125 |
| Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 | 140 |
| Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 | 255 |
| Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val |     |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 | 285 |
| His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 290 | 295 | 300 |
| Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 93  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 24F8.2轻链全长氨基酸序列 (κIMGT等位基因IGKC\*01)  
 <400> 93  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Thr Ala  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Gln Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

|                                                                 |                         |                 |             |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------|-------------|
| 145                                                             | 150                     | 155             | 160         |
| Glu Ser Val Thr                                                 | Glu Gln Asp Ser Lys     | Asp Ser Thr Tyr | Ser Leu Ser |
|                                                                 | 165                     | 170             | 175         |
| Ser Thr Leu Thr                                                 | Leu Ser Lys Ala Asp Tyr | Glu Lys His Lys | Val Tyr     |
|                                                                 | 180                     | 185             | 190         |
| Ala Cys Glu Val Thr                                             | His Gln Gly Leu Ser Ser | Pro Val Thr Lys | Ser         |
|                                                                 | 195                     | 200             | 205         |
| Phe Asn Arg Gly                                                 | Glu Cys                 |                 |             |
| 210                                                             |                         |                 |             |
| <210> 94                                                        |                         |                 |             |
| <211> 330                                                       |                         |                 |             |
| <212> PRT                                                       |                         |                 |             |
| <213> 人工序列                                                      |                         |                 |             |
| <220>                                                           |                         |                 |             |
| <223> 合成构建体                                                     |                         |                 |             |
| <220>                                                           |                         |                 |             |
| <221> MISC_FEATURE                                              |                         |                 |             |
| <223> 重链恒定区IGG1;野生型IMGT等位基因IGHG1*01-EU编号118-447                 |                         |                 |             |
| <400> 94                                                        |                         |                 |             |
| Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys |                         |                 |             |
| 1                                                               | 5                       | 10              | 15          |
| Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr |                         |                 |             |
|                                                                 | 20                      | 25              | 30          |
| Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser |                         |                 |             |
|                                                                 | 35                      | 40              | 45          |
| Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser |                         |                 |             |
|                                                                 | 50                      | 55              | 60          |
| Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr |                         |                 |             |
| 65                                                              | 70                      | 75              | 80          |
| Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys |                         |                 |             |
|                                                                 | 85                      | 90              | 95          |
| Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys |                         |                 |             |
|                                                                 | 100                     | 105             | 110         |
| Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro |                         |                 |             |
|                                                                 | 115                     | 120             | 125         |
| Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys |                         |                 |             |
|                                                                 | 130                     | 135             | 140         |
| Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp |                         |                 |             |
| 145                                                             | 150                     | 155             | 160         |

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 95

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 轻链恒定区, κIMGT等位基因IGKC\*01

<400> 95

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser |     | 80  |
|                                                                 | 85  | 90  |
| Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys                     |     | 95  |
| 100                                                             | 105 |     |
| <210> 96                                                        |     |     |
| <211> 451                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 合成构建体                                                     |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |     |
| <223> 24F8.2重链全长氨基酸IgG1.AA;IMGT等位基因IGHG1*01 (L234A、L235A) eu编号  |     |     |
| <400> 96                                                        |     |     |
| Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly |     | 15  |
|                                                                 | 20  | 25  |
| Tyr Ser Trp His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp |     | 30  |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Ile Gly Tyr Val His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Gln Phe Ser |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     | 80  |
|                                                                 | 85  | 90  |
| Ala Arg Met Asp Tyr Gly Asn Tyr Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly |     | 95  |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala |     | 160 |
|                                                                 | 165 | 170 |
|                                                                 |     | 175 |

|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val   | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro   | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys   | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp   | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly   | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ile   | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu   | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| His   | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg   | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys   | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu   | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Tyr   | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu   | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Trp   | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val   | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp   | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| His   | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro   | Gly | Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <210> | 97  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> | 330 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> | PRT |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 重链恒定区IgG1.AA;IMGT等位基因IGHG1\*01 (L234A、L235A) eu编号

<400> 97

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser |
|     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |
| Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro |
|     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys |
|     |     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |
| Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |
| Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn |
|     |     |     | 195 |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly |
|     |     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |
| Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |
| Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 98

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> 24F8.2重链全长氨基酸IgG1.DLE;IMGT等位基因IGHG1\*01 (S239D、A330L、I332E) eu编号

<400> 98

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val |
| 145 |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
| Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Gly | Pro | Asp | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Leu | Pro | Glu |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |     |
| Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     | 415 |     |     |
| Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     | 430 |     |     |     |
| His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Pro | Gly | Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

450  
 <210> 99  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 重链恒定区IgG1.DLE;IMGT等位基因IGHG1\*01 (S239D、A330L、I332E) eu编号  
 <400> 99  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220



|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445  
 <210> 101  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建体  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> 重链恒定区IgG4.P;IMGT等位基因IGHG4\*01 (S228P) eu编号  
 <400> 101  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140  
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205  
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

---

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp |     | 240 |
|                                                                 | 245 | 250 |
| Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys |     | 255 |
|                                                                 | 260 | 265 |
| Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser |     | 270 |
|                                                                 | 275 | 280 |
| Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser |     | 285 |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys                                     |     | 320 |
|                                                                 | 325 |     |

**21F8 VH**

SDVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGS  
TSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARFMITTFAMDYWGQGTAV  
TVSS

**21F8 VL**

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITTCKASQHVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSAPRYTGV  
PDRFTGSGGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQQHYNTLWTFGGGTKLEIK

图1A

**30M18 VH**

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTFEYTMHWVKQSHGKSLEWIGGINPNNGGT  
SYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSGHMDYGYVYWGQGTTLT  
VSS

**30M18 VL**

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI<sup>1</sup>TC<sup>2</sup>KA<sup>3</sup>QYVSTAVAWYQ<sup>4</sup>QKPGQSPKLLIYSPSYRYTGV  
PDRFTGSGGTDFTFTISSVQ<sup>5</sup>AEDLAVYYC<sup>6</sup>Q<sup>7</sup>QHYSTPWT<sup>8</sup>FGG<sup>9</sup>GTKLEIK

图1B

**24F8 VH**

SDVQLQESGPDLVKPSQSLCTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLDWMGYVHYSGS  
TNYPSLKSRISITRDTSKNQFLQLNSVTTEDTATFYCARMDYGNYGGAMDYWGQGT  
SVTVSS

**24F8 VL**

EIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVRTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASRYTGV  
PDRFTGSGGTDFTTISSVQAEDLAVYYCQQYSTQWTFGGGTKLEIK

图1C

**5J24 VH**

QVQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKAAAGYTFTNHWIGVVKQRPGHGLEWIGDIYPPGGGYT  
NYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMYLSSLTSEDSAIYYCARSYGYDLYAMDYWGQGTSV  
TVSS

**5J24 VL**

DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWLQQKPDGTIKRLIYAASTLGSGV  
PKRFGSRSGDYSLTISSEDFADYYCLQYDSYPFTFGAGTKLELK

图1D

**21B9 VH**

EVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSLKLSCTASGFTFSYAMSWVRQSP<sup>E</sup>KRL<sup>E</sup>WVAEISSGGSYT  
YYTDTVTGRFTISRDN<sup>A</sup>KN<sup>T</sup>LYLEMSLSRSEDTAMYYCARKRRDY<sup>G</sup>MDYWGQGTSTV<sup>T</sup>  
VSS

**21B9 VL**

DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQ<sup>E</sup>KPGKTNKLLIYSGSTLQ<sup>T</sup>GI  
PSRFGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYCQ<sup>Q</sup>QHNEY<sup>P</sup>WTFGGG<sup>T</sup>CKLEIK

图1E

**22B22 VH**

EVQLVESGGGLVKPGSLKLSCAASGFTFSYAMSWVRQSPQSPKEKRLEWVAEISSGGSYT  
YYPDTVTGRFTISRDNAKNTLYEMSSLRSEDTAMYCARKRRDYAMDYWGQGTSVT  
VSS

**22B22 VL**

DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGI  
PSRFSGSGGTDFTLTISSELEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGGTKLEIK

图1F

**28P24 VH**

QVQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKAAGYTFTNYFIGWVKQRPGHGLDWIGDIYPPGGYT  
NYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYCVRFYGNYVFAYWGQGLVTV

SA

**28P24 VL**

DVQITQSPSCLAASPGETITINCRASKTISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGI  
PSRFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGGTKLEIK

图1G

**21B16 VH**

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQSP~~PEKRL~~EWVAEISSGGTYT  
YFPDVTGRFTISRDNAKNTLYLEMSLSRSEDTAMY~~YCARKRRDY~~AMDYWGQGTSTV  
VSS

**21B16 VL**

DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGI  
PSRFSGSGGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQ~~QHNE~~YPWTFGGGTKLEIK

图1H

**28012 VH**

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQSPPEKRLEWVAEISGGSYT  
YHPDTVTGRFTISRDNAKNTLYLEMSSLRSEDTAMYYCARKRRDYYAMDYWGQGTSVT  
VSS

**28012 VL**

DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGI  
PSRFSGSGGTDFTLTISSELEPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGGTKLEIK

图11

**Hu24F8.1 VH**

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVYGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEWIGYVHYSGSTN  
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMDYGNYGGGAMDYWGQGTLLVT  
VSS

**Hu24F8.1 VL**

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVRTAVAWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYTGIP  
ARFSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYSTQWTFGGGTKVEIK

图1J

**Hu24F8.2 VH**

QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGYSITSGYSWHWVRQPPGKGLEWIGYVHYSGST  
NYNPSLKSRTISVDKSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARMGYGNYGGAMDYWGQGTLL  
VTVSS

**Hu24F8.2 VL**

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVRTAVAWYQQKPGQAPRLLIYSASYRTGI  
PARFSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYYSTQWTFGGGTKVEIK

图1K

**Hu24F8.3 VH**

QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGYSITSGYSWHWVRQPPGKGLEWIGYVHYSGSTN  
YNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARMDYGGAMDYWGQGTLLVT  
VSS

**Hu24F8.3 VL**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVRTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRYT  
GVPSRFSGSGTDFTTISSLQPEDIATYYCQQYYSTQWTFGGGTKLEIK

图1L

**Hu24F8.4 VH**

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVYGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEWIGYVHYSGSTN  
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSTAAADTAVYYCARMDYGGAMDYWGQGTLVTVSS

**Hu24F8.4 VL**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVRTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRYT  
GVPSRFSGSGGTDFITISSLQPEDIAITYYCQQYYSTQWTFGGGTKLEIK

图1M

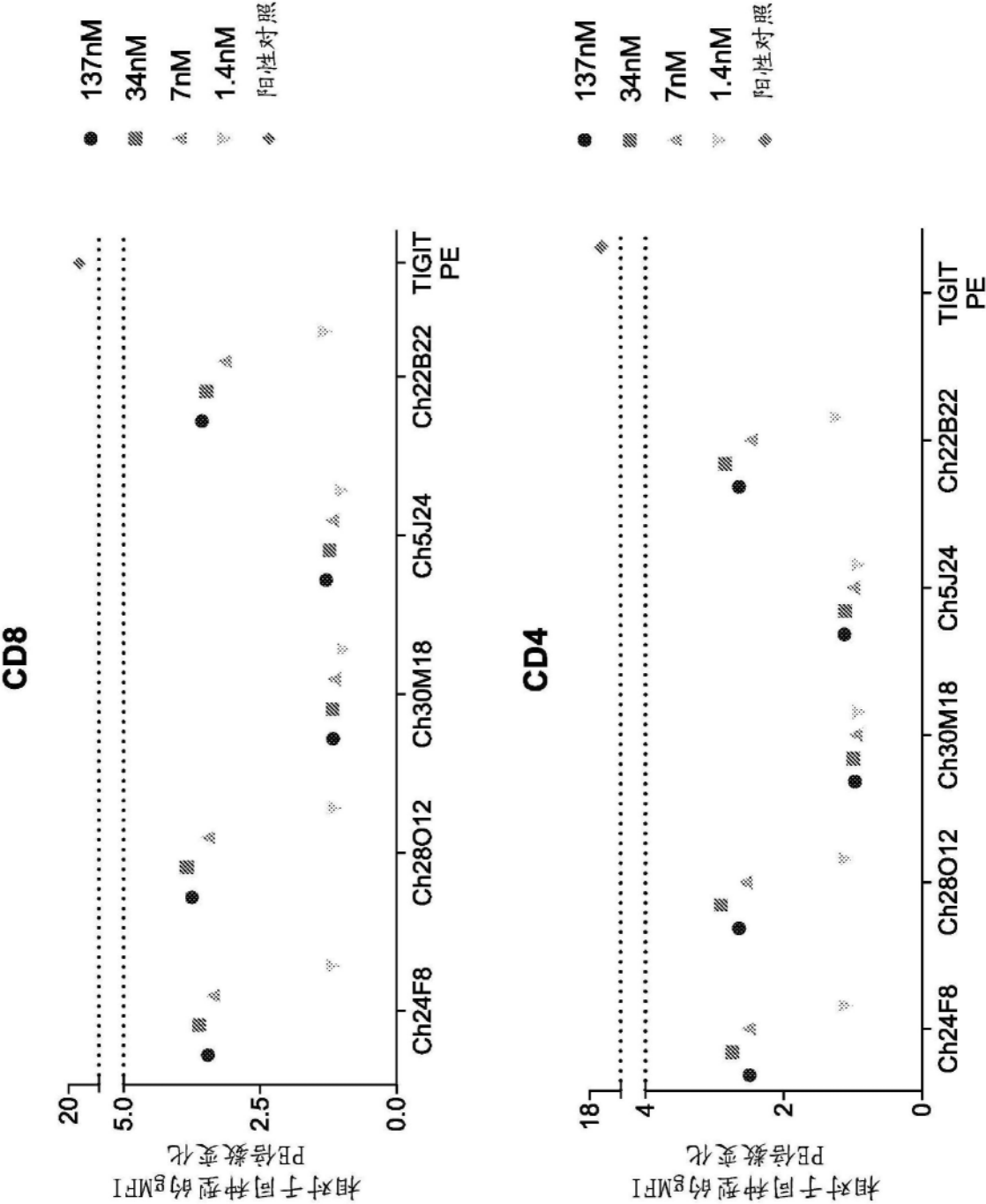


图2

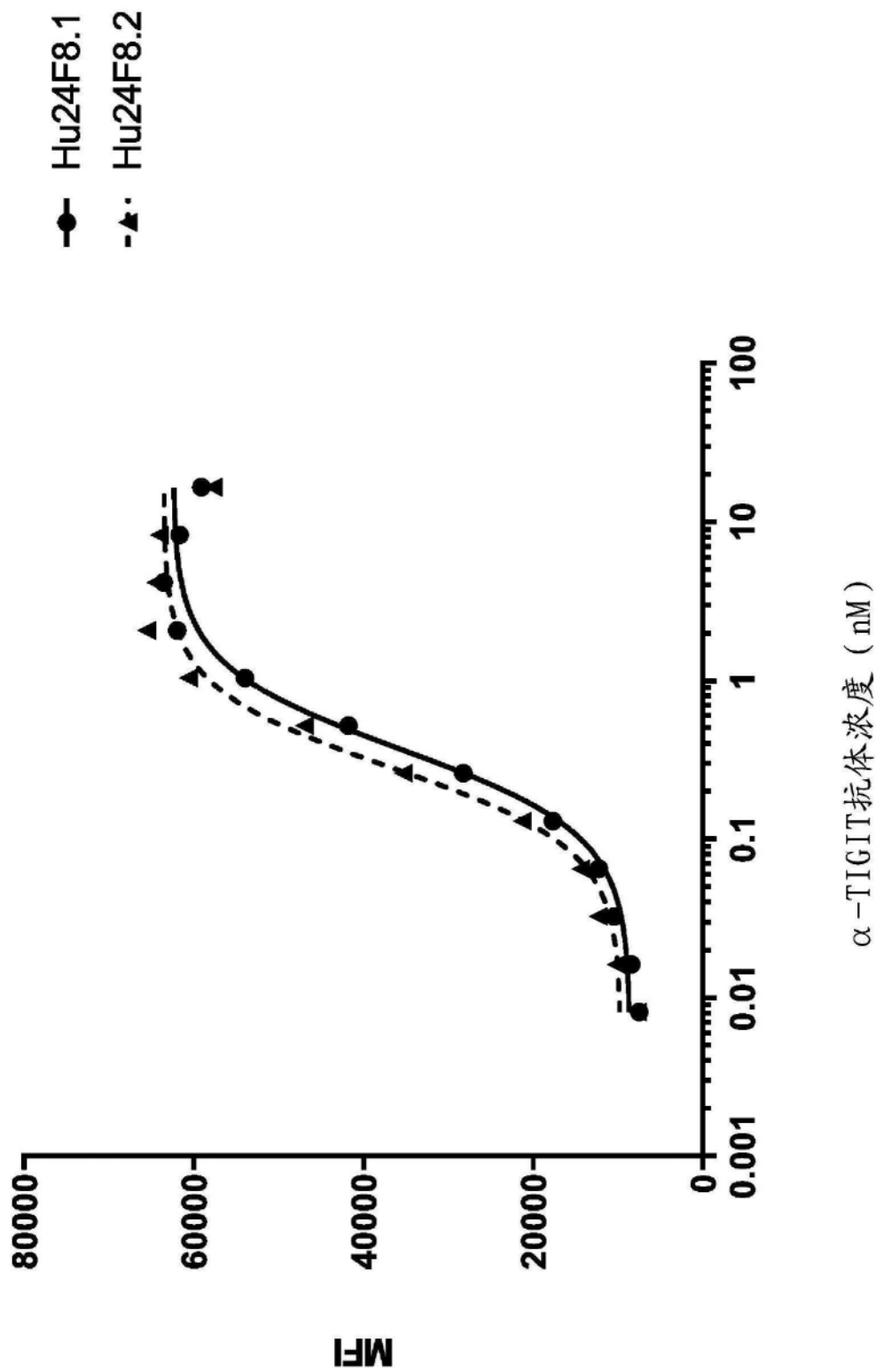


图3A

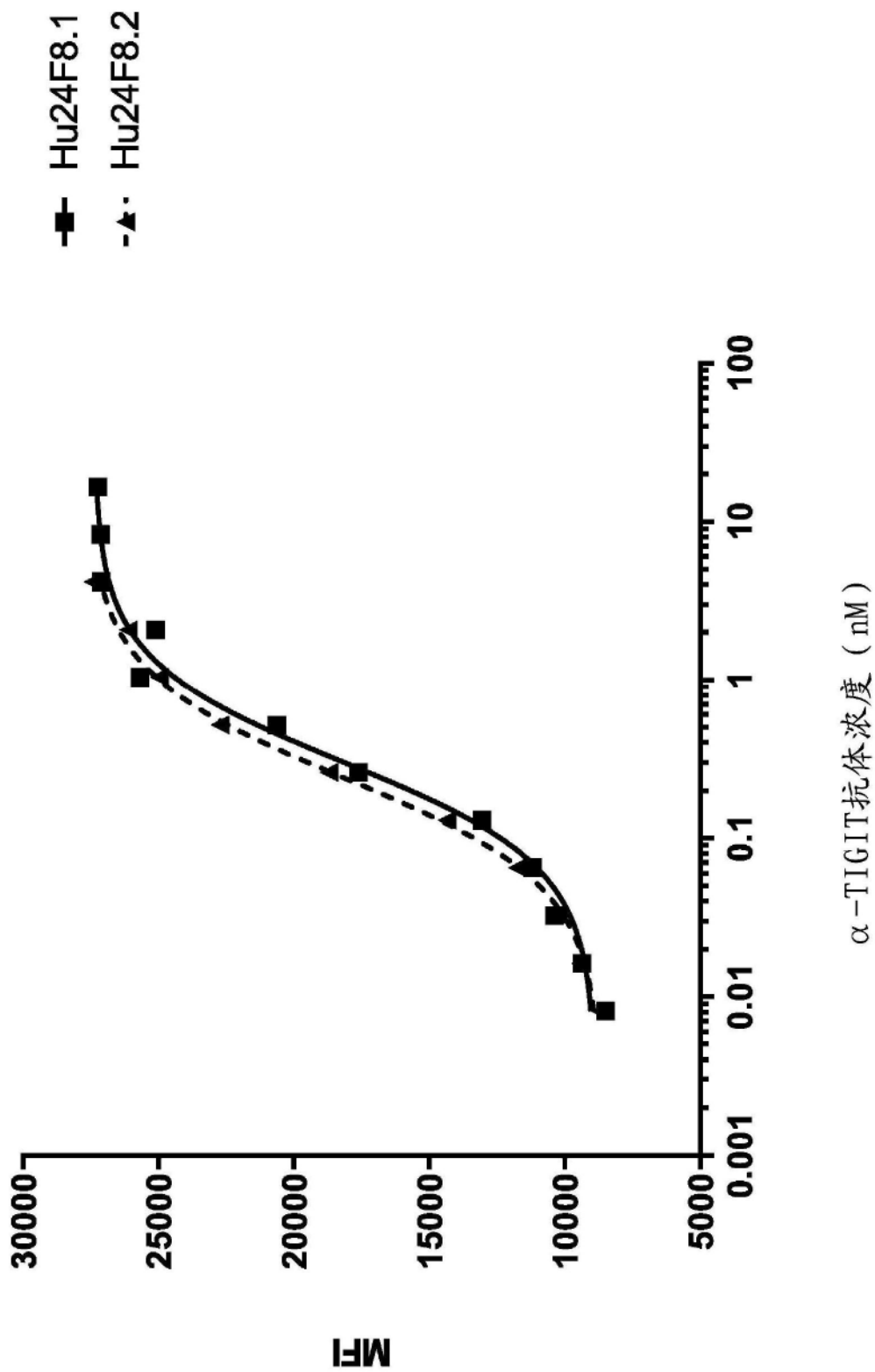


图3B

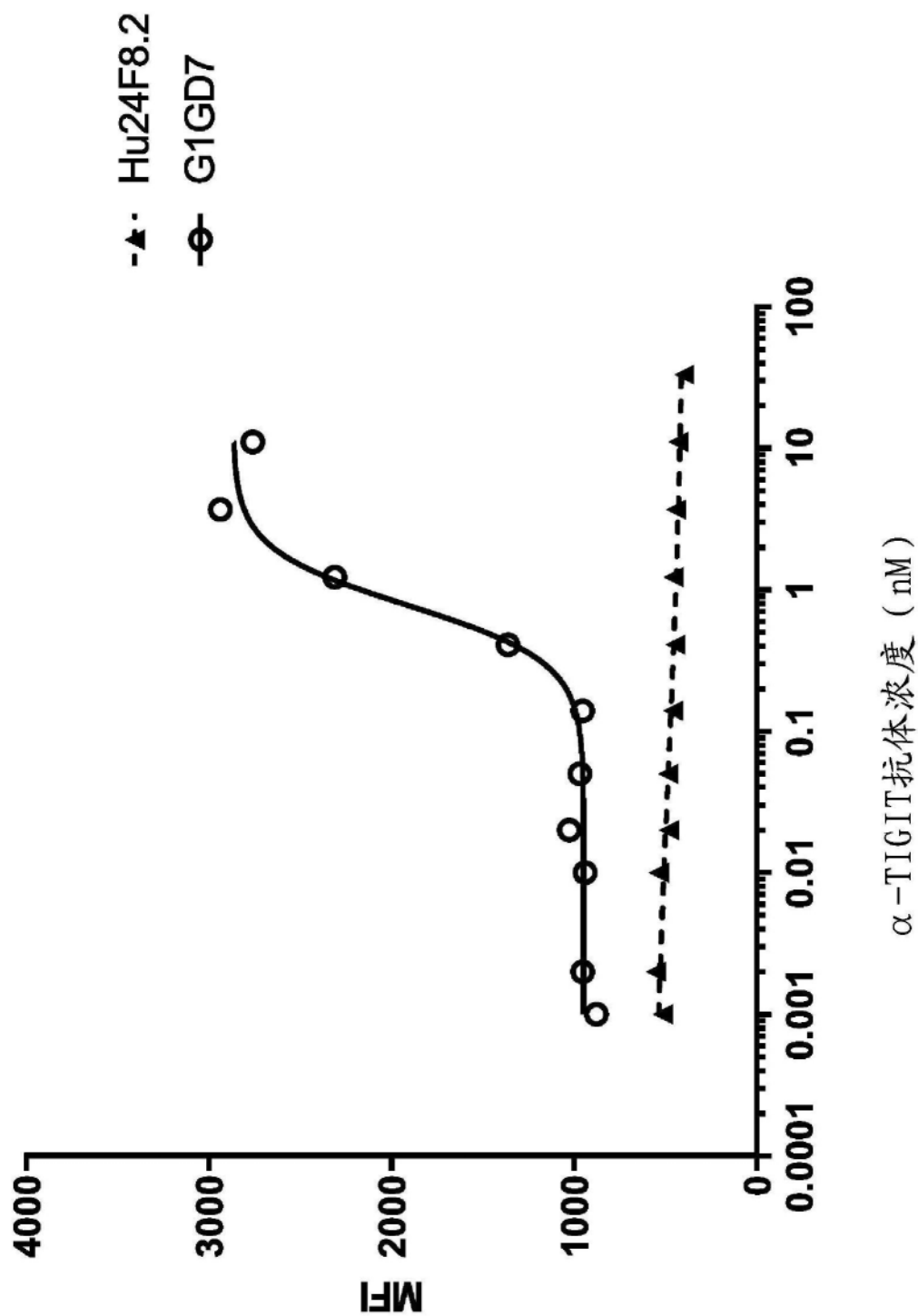


图4A

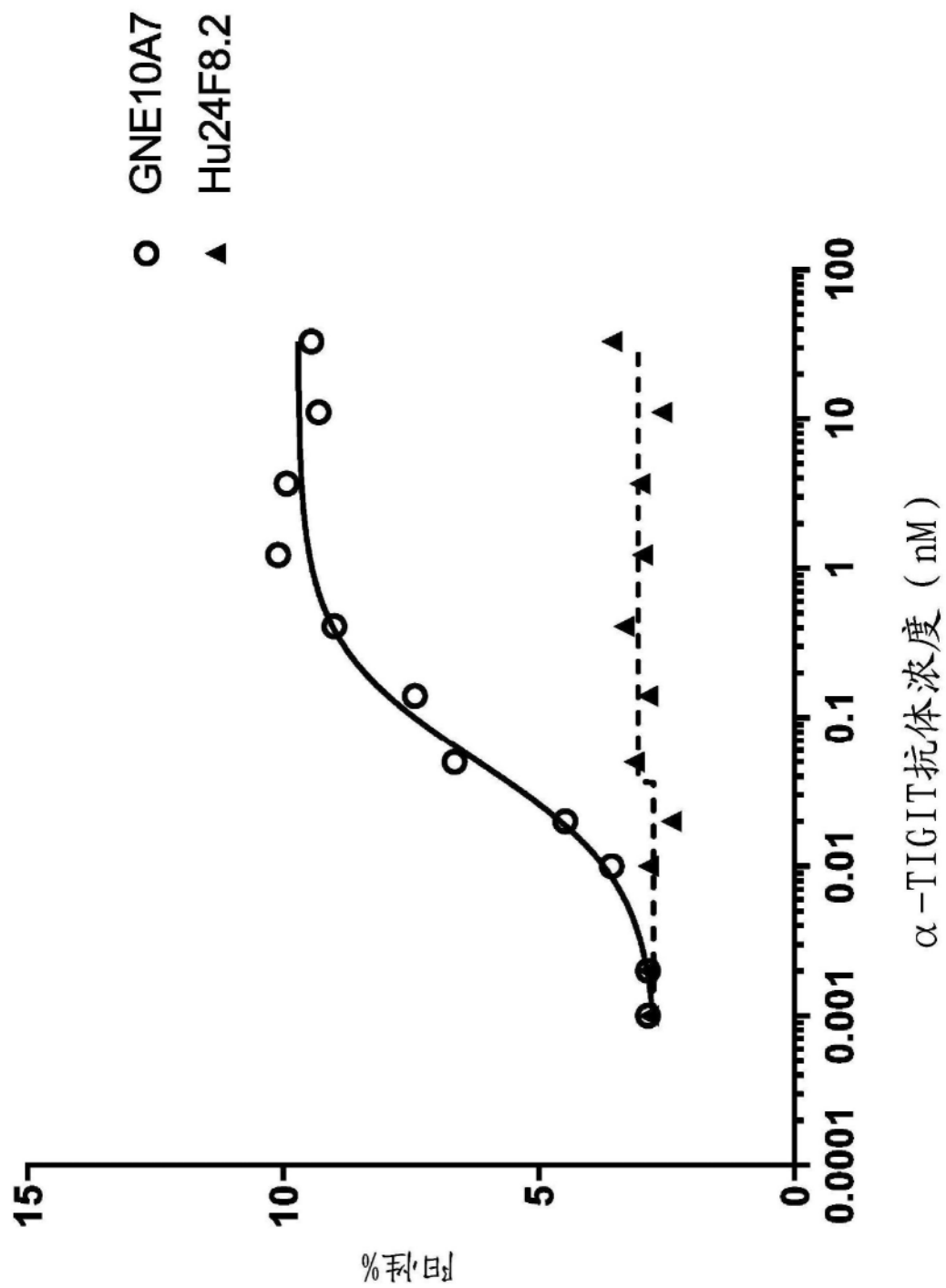


图4B

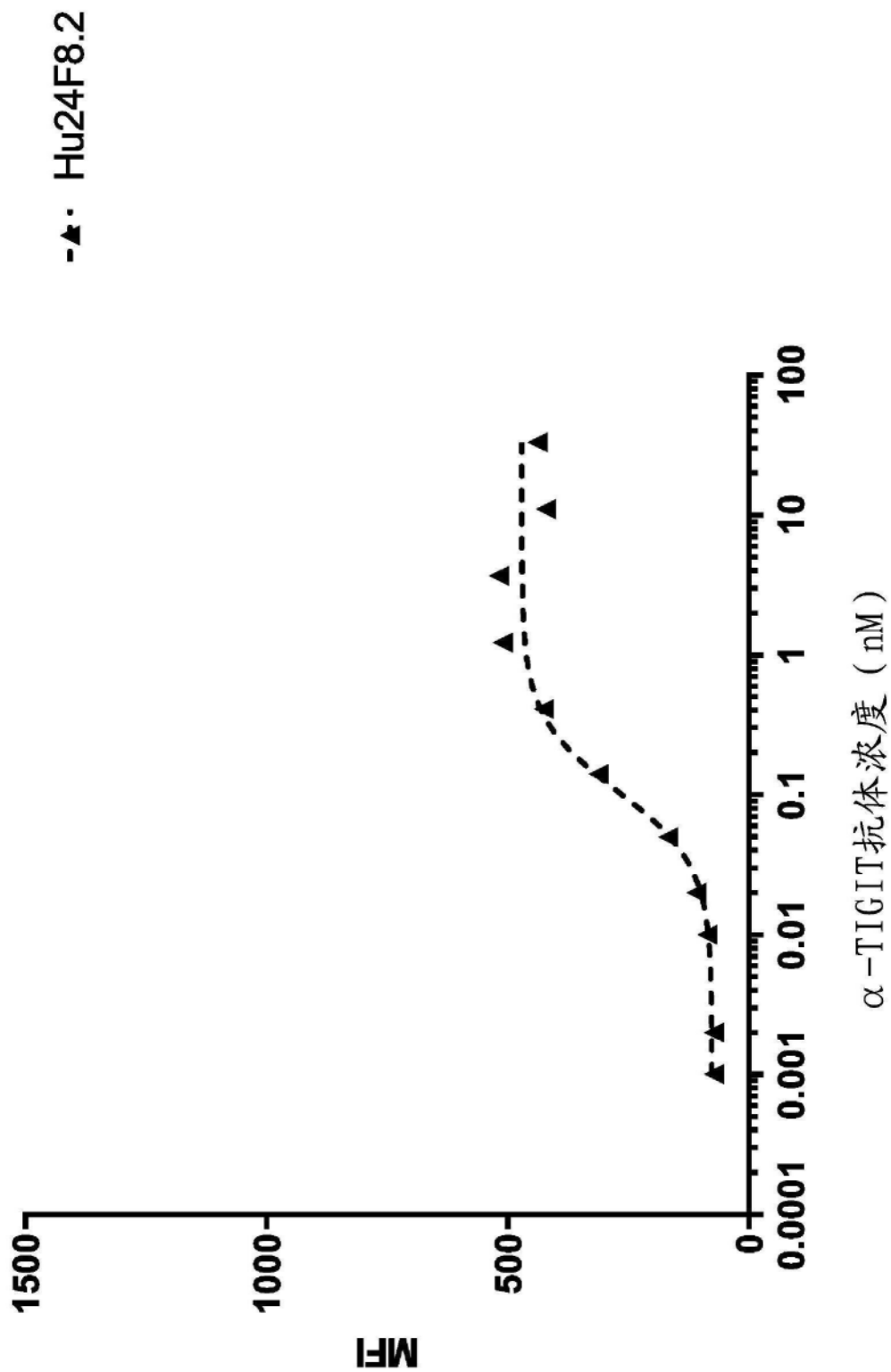


图5A

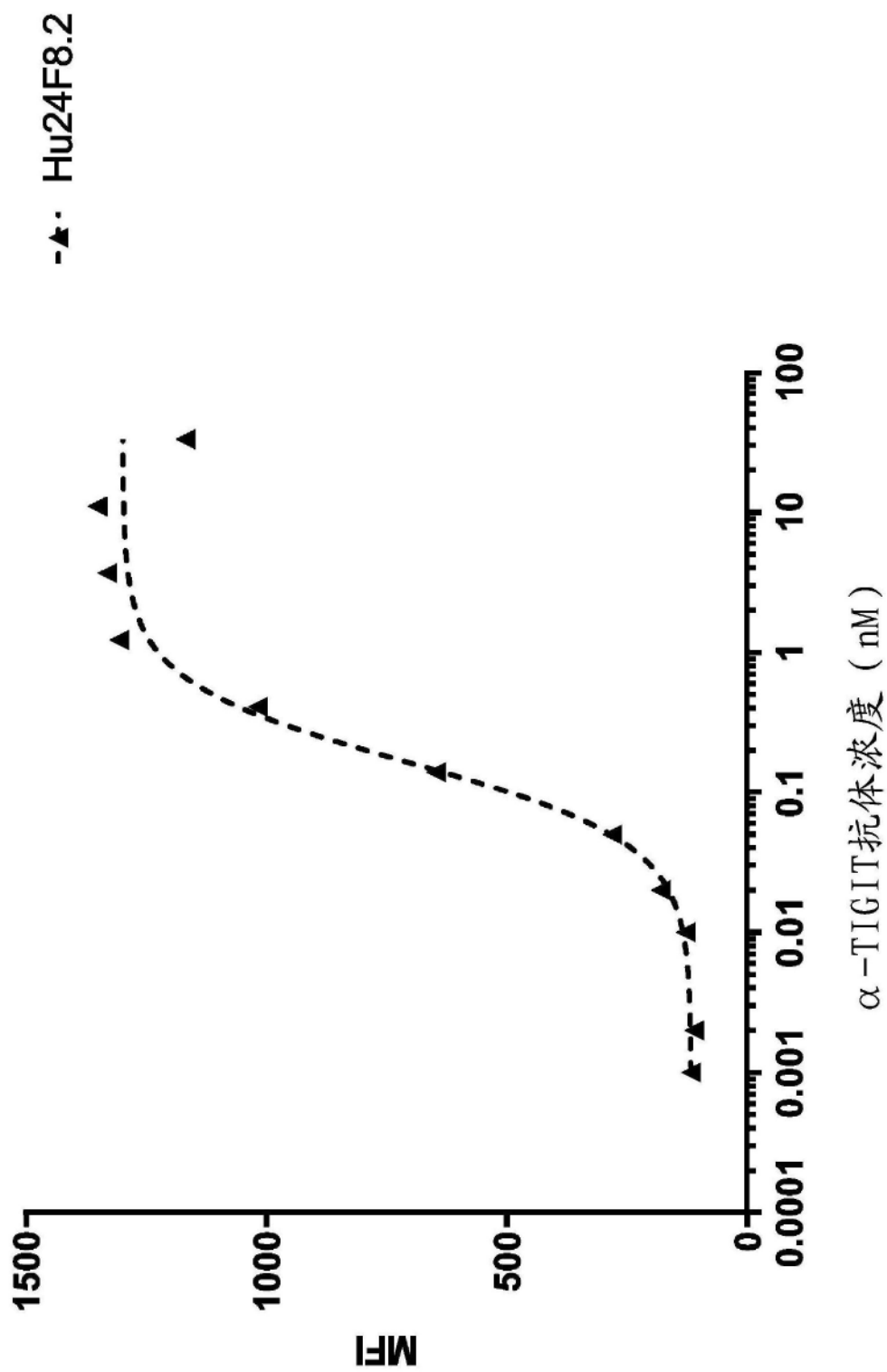


图5B

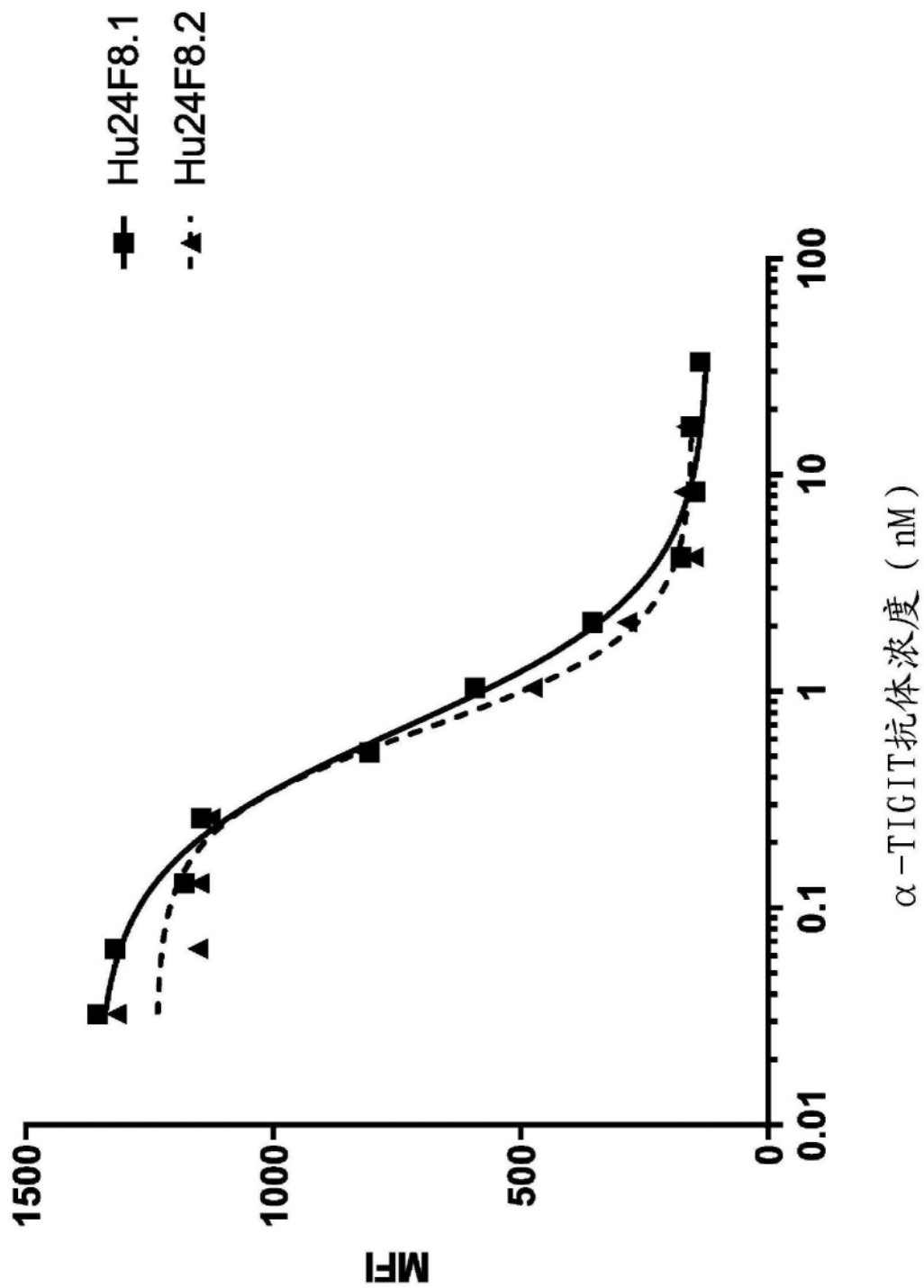


图6

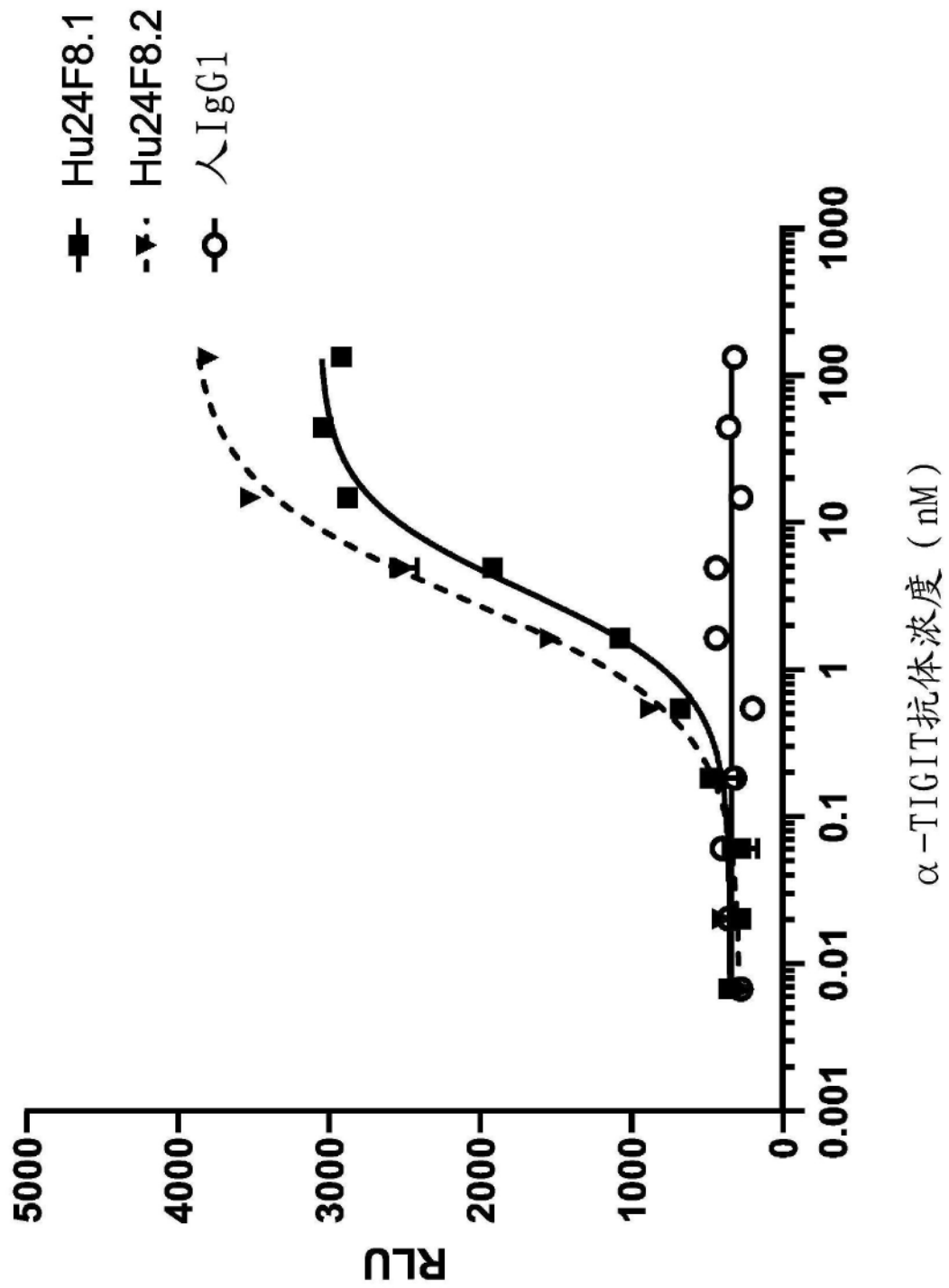


图7

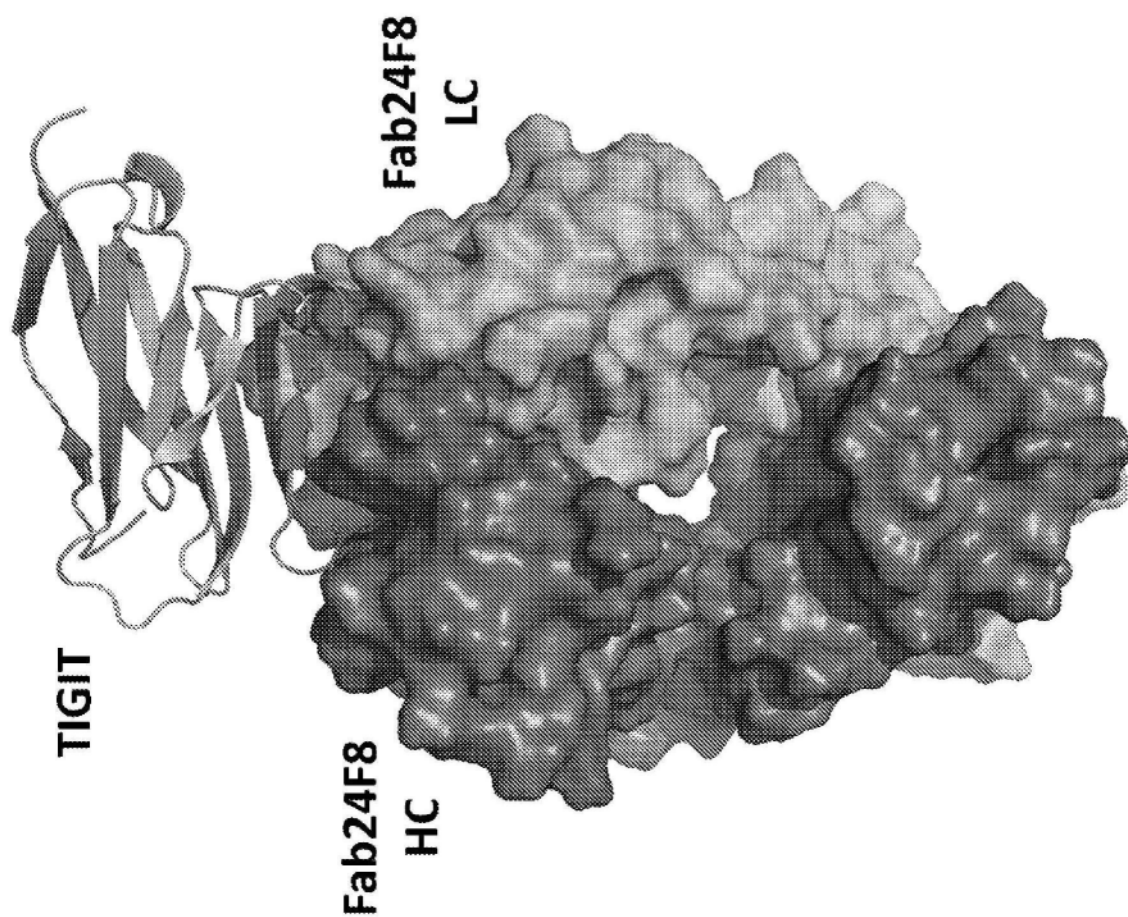


图8

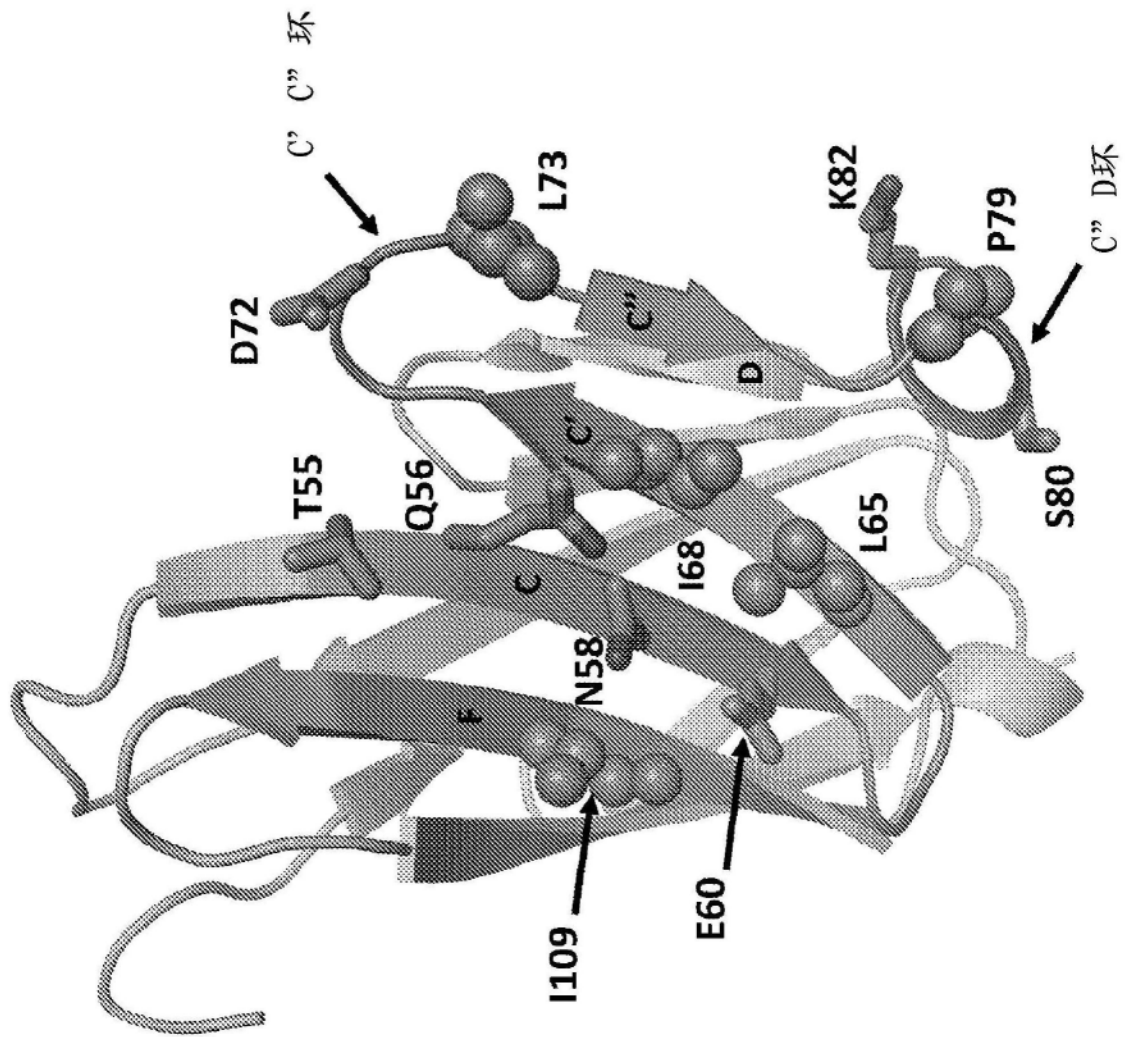


图9

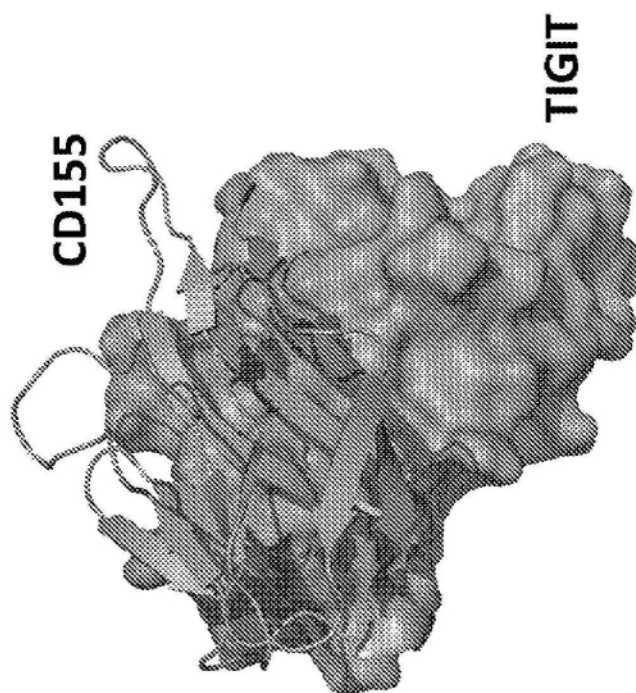


图10A

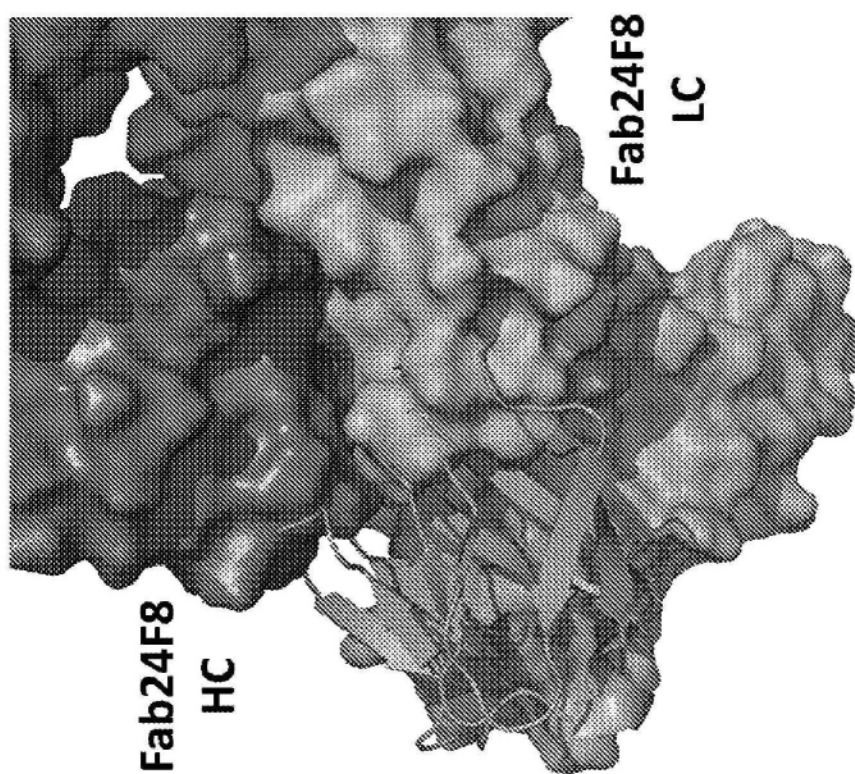


图10B

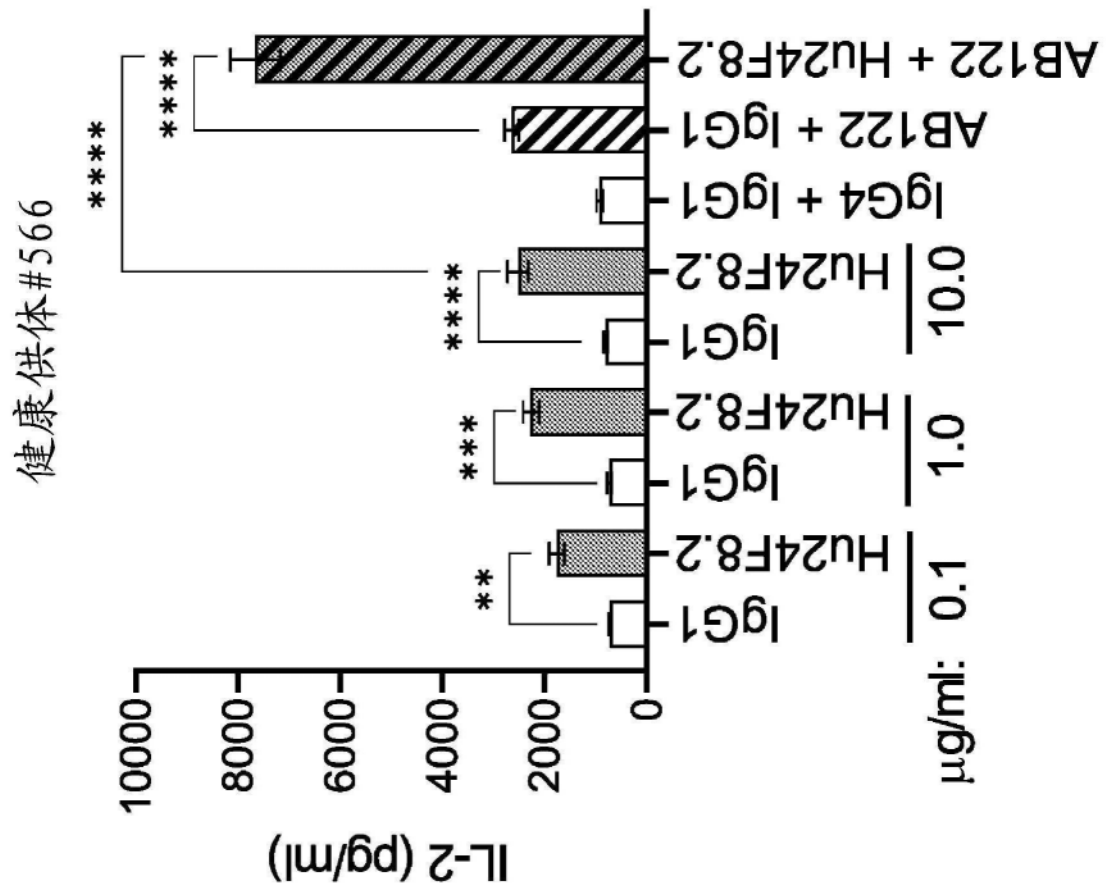


图11

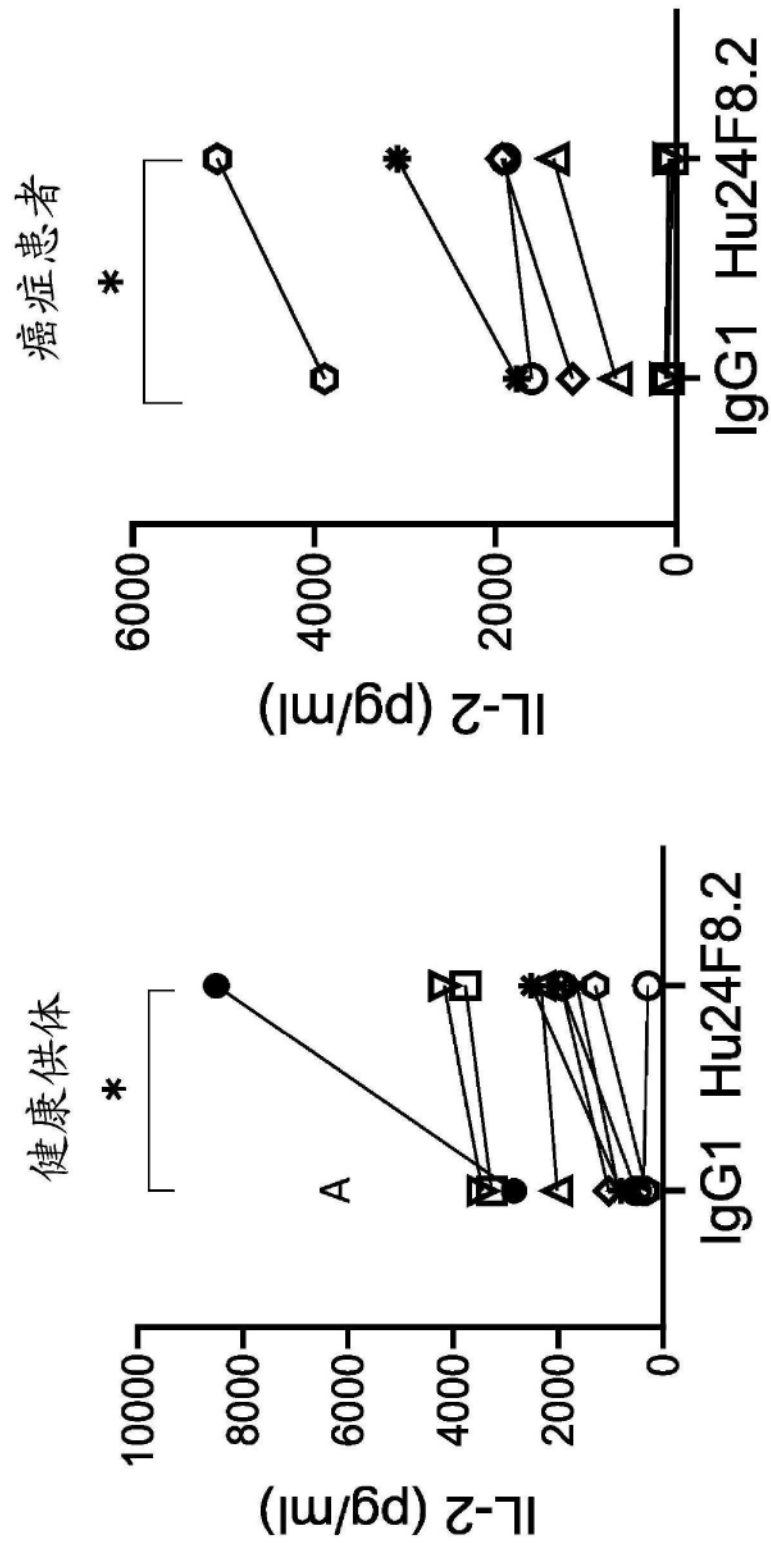


图12A

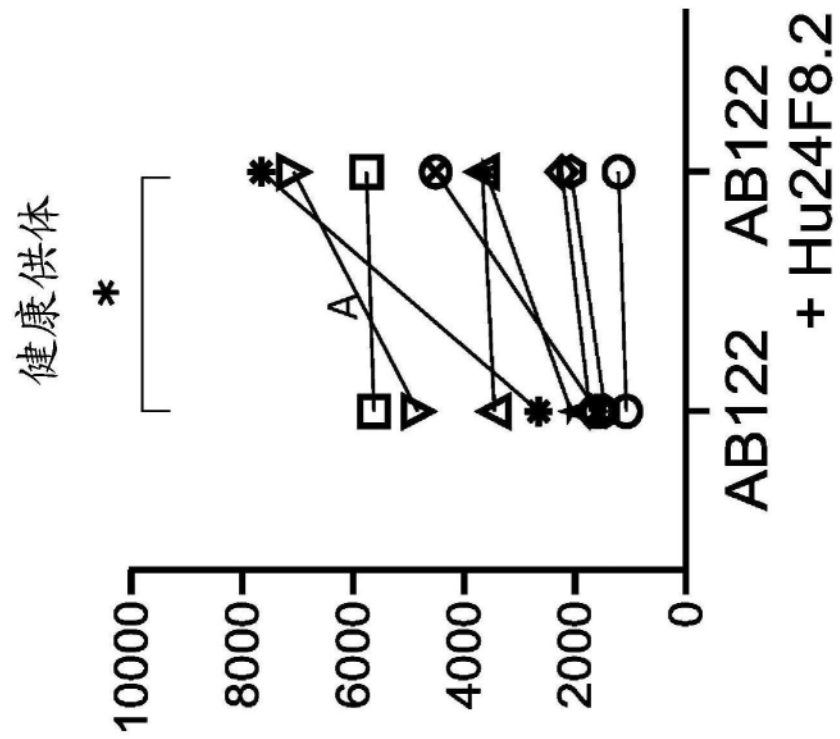


图12B