



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 110997720 B

(45) 授权公告日 2024.10.01

(21) 申请号 201880048693.8

(22) 申请日 2018.07.26

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110997720 A

(43) 申请公布日 2020.04.10

(30) 优先权数据

20175535 2017.07.31 BE

17184102.6 2017.07.31 EP

62/606,159 2017.07.27 US

62/660,640 2018.04.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/043968 2018.07.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/023504 EN 2019.01.31

(73) 专利权人 ITEOS比利时公司

地址 比利时戈斯利

(72) 发明人 A·库珀 C·奎瓦 S·丹尼斯

C·胡夫德 J·邱恩德

G·德赖森斯 F·兰博莱茨

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理人 陈文平 黄海波

(51) Int.CI.

C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2016355589 A1, 2016.12.08

审查员 蔡锐钿

(54) 发明名称

抗TIGIT抗体

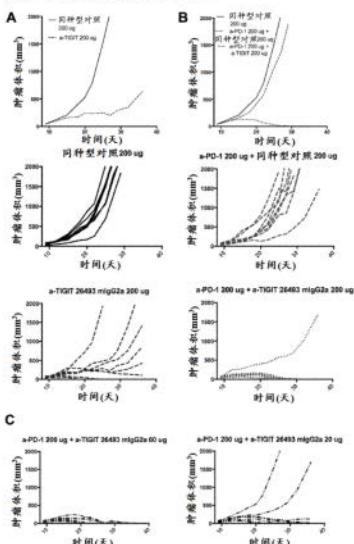
(57) 摘要

提供了抑制TIGIT介导的信号传导的抗TIGIT抗体及其抗原结合片段,以及包含所述抗体或其抗原结合片段的组合及它们的使用方法。

权利要求书2页 说明书71页

序列表121页 附图50页

图16-抗TIGIT结合性抗体的抗肿瘤功效



1. 一种与人TIGIT结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的组合,其中:

HCDR1为SEQ ID NO:16 (YTFTSYYMH) ,
HCDR2为SEQ ID NO:17 (VIGPSGASTSYAQKFQG) ,
HCDR3为SEQ ID NO:18 (ARDHSDYWSGIMEV) ,
LCDR1为SEQ ID NO:61 (RASQSVRSSYLA) ,
LCDR2为SEQ ID NO:62 (GASSRAT) ,并且
LCDR3为SEQ ID NO:63 (QQYFSPPWT) 。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中重链可变结构域包含SEQ ID NO:221所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,并且轻链可变结构域包含SEQ ID NO:222所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段是人IgG抗体。

4. 根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段是人IgG1抗体。

5. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段选择性地耗竭表达TIGIT的Treg细胞。

6. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段对表达TIGIT的Treg细胞和对表达TIGIT的CD8+T细胞表现出等同的亲和力。

7. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段降低CD8+T细胞上和/或Treg细胞上的TIGIT表达。

8. 一种分离的多核苷酸或分离的多核苷酸的组合,所述分离的多核苷酸或分离的多核苷酸的组合编码根据权利要求中1-6任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

9. 一种分离的多核苷酸或分离的多核苷酸的组合,所述分离的多核苷酸或分离的多核苷酸的组合编码抗TIGIT抗体的VH结构域和VL结构域,其中所述分离的多核苷酸或分离的多核苷酸的组合包含SEQ ID NO:251和SEQ ID NO:252。

10. 一种表达载体,所述表达载体包含与调控序列可操作地连接的根据权利要求8或权利要求9所述的多核苷酸或多核苷酸的组合,所述调控序列容许抗体或其抗原结合片段在宿主细胞中表达。

11. 一种宿主细胞,所述宿主细胞含有权利要求10所述的表达载体。

12. 一种产生重组抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在容许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下培养权利要求11所述的宿主细胞,以及回收表达的抗体或其抗原结合片段。

13. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段用于治疗方法中。

14. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段用于治疗癌症的方法中。

15. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或

其抗原结合片段和至少一种药学上可接受的载剂或赋形剂。

16. 根据权利要求15所述的药物组合物,所述药物组合物用于疗法中。

17. 根据权利要求15所述的药物组合物,所述药物组合物用于治疗癌症的方法中。

抗TIGIT抗体

背景技术

[0001] 癌症免疫疗法依赖于对免疫系统的调节以提高对肿瘤细胞的识别和反应。这种调节可以通过包括活化免疫细胞上存在的共刺激分子或经由抑制共抑制受体在内的多种机制实现。免疫响应的活化是一种复杂的机制,涉及许多细胞群,如对于启动抗原特异性反应而言重要的抗原呈递细胞以及负责破坏肿瘤细胞的效应细胞。调节效应细胞如细胞毒性T细胞的活性的机制很多,并且代表了癌症免疫疗法背景下选择的靶标。

[0002] TIGIT(具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体),也称为WUCAM、VSIG9或Vstm3,是在NK、CD8+和CD4+T细胞以及调节性T细胞(Treg细胞,或简称为“Treg”)上优先表达的共抑制受体。TIGIT是跨膜蛋白,其含有在其细胞内部分中的已知ITIM结构域、跨膜结构域和在该受体的细胞外部分上的免疫球蛋白可变结构域。描述了几种配体会与TIGIT受体结合,其中CD155/PVR显示出最佳亲和力,其次是CD113/PVRL3和CD112/PVRL2(Yu等(2009)Nat. Immunol. 10:48)。DNAM/CD226,一种也在NK和T细胞上表达的已知共刺激受体,与TIGIT竞争结合CD155和CD112但亲和力较低,这表明严格控制这些效应细胞的活化可避免对表达CD155配体的正常细胞的不受控制的细胞毒性。

[0003] 在肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)上和在疾病环境诸如HIV感染中,TIGIT的表达增高。与TIGIT阴性对应物相比,TIGIT表达标志着具有较低效应子功能的耗竭性T细胞(Kurtulus等(2015)J. Clin. Invest. 276:112; Chew等(2016)Plos Pathogens. 12)。相反,与TIGIT阴性Treg群体相比,表达TIGIT的Treg细胞显示出增强的免疫抑制活性(Joller等(2014)Immunity. 40:569)。

[0004] 如已经证明是免疫治疗的相关靶标并且其拮抗性抗体已被批准用于治疗人癌症的其它在T细胞上表达的共抑制受体(PD1或CTLA4)一样,拮抗性抗TIGIT抗体的开发可帮助开启免疫系统并且更好地对抗癌细胞。已经有人提出,单一疗法或与a-PD1抗体组合的拮抗性抗TIGIT抗体可以在临床前模型中实现强的抗肿瘤功效(Johnston等(2014)Cancer Cell 26:1; WO2016/028656; US2016/0176963; US2016/0376365,其全部通过引用并入本文)。

[0005] 因此,可抑制TIGIT受体活性的对TIGIT具有特异性的拮抗性抗体提供了降低与肿瘤微环境相关的免疫抑制作用并且由此提高对肿瘤细胞的抗肿瘤免疫响应的机会。

发明内容

[0006] 本发明提供了可以降低TIGIT介导的信号传导的免疫抑制作用的抗TIGIT抗体。具体而言,本发明的抗体或抗原结合片段可以通过阻止T细胞(常规 $\alpha\beta$ T细胞和非常规 $\gamma\delta$ T细胞)和NK细胞上的配体结合和/或耗竭TIGIT阳性Treg细胞,和/或通过诱导TIGIT受体的内化来抑制TIGIT介导的免疫抑制。

[0007] 在一个方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其与人TIGIT结合并且包含含有选自图1所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3)的重链可变结构域,并且还包含含有选自图2所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)的轻链可变结构域。

[0008] 在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的组合,其中所述组合选自由来自图1中各抗体的HCDR与来自图2中相应抗体的LCDR形成的组合的组。

[0009] 在某些实施方案中,根据本发明的抗体或抗原结合片段可以包含重链可变结构域,所述重链可变结构域具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID No:211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、327、329和331,以及与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;并且任选地包含轻链可变结构域,所述轻链可变结构域具有选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID No:212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、328、330和332的氨基酸序列,以及与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0010] 在某些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域的组合,其中所述组合选自由来自图5中各抗体的VH或与其表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列与来自图5中相同抗体的VL或与其表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列形成的组合的组。

[0011] 本文提供的最优选的抗体和抗原结合片段是基于本文提供的抗体31282的CDR或完全可变结构域的那些。

[0012] 如本文所证明的,基于抗体31282的这些优选的抗TIGIT抗体和抗原结合片段具有特别令人惊讶且有利的特性。这些特性包括:与先前描述的每种受试抗TIGIT抗体相比,对在CD8 T细胞(来自健康供体或来自癌症患者)上表达的TIGIT的亲和力更高;与先前描述的每种受试抗TIGIT抗体相比,与CD155/PVR竞争的IC₅₀更佳;与先前描述的每种受试抗TIGIT抗体相比,在T细胞活化测定中的EC₅₀更佳;以及强力地提高来自癌症患者外周血的T细胞中并且重要的是肿瘤浸润淋巴细胞中的活性。此外,本文令人惊讶地显示,根据本发明的抗体和抗原结合片段,特别是基于抗体31282的那些,优先耗竭Treg细胞。也就是说,与常规CD4和CD8T细胞相比,暴露于所提供的抗TIGIT抗体的表达TIGIT的Treg细胞经历更大比例的裂解。这令人惊讶,因为常规CD4和CD8 T细胞也表达TIGIT,但在与所述抗体接触时不会经历同样程度的细胞裂解。还令人惊讶地显示,根据本发明的抗体和抗原结合片段,特别是基于抗体31282的那些,不仅促进常规T细胞的促炎活性,而且还提高非常规 $\gamma\delta$ T细胞的活性。

[0013] 因此,在某些优选的实施方案中,本文提供了包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的抗体或抗原结合片段,其中:

[0014] HCDR1包含SEQ ID NO:16(YTFTSYYMH)或由其组成,

[0015] HCDR2包含SEQ ID NO:17(VIGPSGASTSYAQKFQG)或由其组成,

[0016] HCDR3包含SEQ ID NO:18(ARDHSDYWSGIMEV)或由其组成,

[0017] LCDR1包含SEQ ID NO:61(RASQSVRSSYLA)或由其组成,

[0018] LCDR2包含SEQ ID NO:62(GASSRAT)或由其组成,并且

[0019] LCDR3包含SEQ ID NO:63(QQYFSPPWT)或由其组成。

[0020] 在某些此类实施方案中,重链可变结构域包含以下或由以下组成:根据SEQ ID NO:221的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列;并且轻链可变结构域包含以下或由以下组成:根据SEQ ID NO:222的氨

基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0021] 在某些优选的实施方案中,抗TIGIT抗体是本文所述的抗体31282。

[0022] 在另一个方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其与根据本发明第一方面的抗体(例如本文例示的抗体)交叉竞争结合人TIGIT。

[0023] 在另一个方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其与根据本发明第一方面的抗体(例如本文例示的抗体)结合相同的表位。

[0024] 在另一个方面,本发明提供了抗体或其抗原结合片段,其结合包含TIGIT残基Q56和I109,任选地包含残基Q56、N58和I109的人TIGIT表位。在一些优选的实施方案中,提供了抗体或其抗原结合片段,其结合包含TIGIT残基Q56、N58、E60、I68、L73、H76和I109的人TIGIT表位。

[0025] 在某些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合由TIGIT残基Q56、N58、E60、I68、L73、H76和I109组成的人TIGIT表位。

[0026] 在另一个方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其与人TIGIT结合而不与CD155竞争结合TIGIT。

[0027] 在某些实施方案中,与人TIGIT结合而不与CD155竞争结合TIGIT的抗体或抗原结合片段包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中HCDR1包含SEQ ID NO:280或由其组成,HCDR2包含SEQ ID NO:281或由其组成,HCDR3包含SEQ ID NO:282或由其组成,并且LCDR1包含SEQ ID NO:292或由其组成,LCDR2包含SEQ ID NO:293或由其组成,并且LCDR3包含SEQ ID NO:294或由其组成。

[0028] 在某些此类实施方案中,重链可变结构域包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:333所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,并且轻链可变结构域包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:334所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0029] 在某些优选的实施方案中,与人TIGIT结合而不与CD155竞争结合TIGIT的抗体包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中HCDR1包含SEQ ID NO:353,HCDR2包含SEQ ID NO:354,HCDR3包含SEQ ID NO:355,并且LCDR1包含SEQ ID NO:356,LCDR2包含SEQ ID NO:357,且LCDR3包含SEQ ID NO:358。

[0030] 在某些此类实施方案中,重链可变结构域可以包含SEQ ID NO:367所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,并且轻链可变结构域可以包含SEQ ID NO:368所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0031] 在另一个方面,本发明提供了分离的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其优先耗竭表达TIGIT的Treg细胞,任选地其中所述抗体或抗原结合片段是根据本发明第一方面的抗体或抗原结合片段,例如本文例示的抗体。

[0032] 在另一个方面,本发明提供了根据本发明其它方面的抗体(例如本文例示的抗体)的亲和力变体(affinity variant)。

[0033] 在另一个方面,本发明提供了分离的多核苷酸或分离的多核苷酸的组合,其编码

根据本发明的任何其它方面的抗体或抗原结合片段,例如本文例示的抗体。

[0034] 在另一个方面,本发明提供了编码抗TIGIT抗体的VH和/或VL结构域的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含选自由SEQ ID No:241-270、335-342和369-370组成的组的一个或多个序列。

[0035] 在另一个方面,本发明提供了表达载体,其包含与调控序列可操作地连接的根据本发明的多核苷酸或多核苷酸的组合,所述调控序列容许抗原结合多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达。

[0036] 在另一个方面,本发明提供了含有根据本发明的表达载体的宿主细胞或无细胞表达系统。

[0037] 在另一个方面,本发明提供了产生重组抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在容许所述抗体或抗原结合片段表达的条件下培养根据本发明的宿主细胞或无细胞表达系统,以及回收所表达的抗体或抗原结合片段。

[0038] 在另一个方面,本发明提供了药物组合物,其包含根据本发明的抗体或抗原结合片段(例如本文例示的抗体)和至少一种药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0039] 在另一个方面,本发明提供了根据本发明的抗体或抗原结合片段或者根据本发明的药物组合物用于疗法中。

[0040] 在另一个方面,本发明提供了根据本发明的抗体或抗原结合片段(例如本文例示的抗体)或者根据本发明的药物组合物用于治疗癌症的方法中。

[0041] 在另一个方面,本发明提供了根据本发明的抗体或抗原结合片段(例如本文例示的抗体)或者根据本发明的药物组合物用于治疗病毒感染,任选地CMV感染的方法中。

[0042] 在另一个方面,本发明提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据本发明的抗体或抗原结合片段(例如本文例示的抗体)或者根据本发明的药物组合物,从而治疗癌症。

[0043] 在另一个方面,提供了治疗受试者的病毒感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据本发明的抗体或抗原结合片段或者根据本发明的药物组合物,从而治疗病毒感染。在优选的实施方案中,所述病毒感染是CMV感染。

[0044] 在另一个方面,提供了促进T细胞活性的方法,所述方法包括使T细胞群与根据本发明的抗体或抗原结合片段接触。在某些实施方案中,所述方法促进 $\alpha\beta$ T细胞活性。在某些实施方案中,所述方法促进 $\gamma\delta$ T细胞活性。在某些实施方案中,所述方法在体外进行。在某些实施方案中,所述方法在体内进行,例如在人受试者体内进行。

[0045] 在某些实施方案中,提供了根据本发明的方法,或者用于根据本发明的方法中的抗体或抗原结合片段或者药物组合物,其中所述方法还包括施用一种或多种附加治疗剂。在某些优选实施方案中,所述一种或多种附加的剂选自:化学治疗剂、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗41BB抗体、抗OX40抗体、抗GITR抗体和抗ICOS抗体。

[0046] 在另一个方面,提供了组合,其包含抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,以及化学治疗剂、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗41BB抗体、抗OX40抗体、抗GITR抗体和抗ICOS抗体中的一种或多种。在另一个方面,提供了根据本发明的组合用于疗法中。在另一个方面,提供了根据本发明的组合用于治疗癌症的方法中或用于治疗病毒感染的方法中。在另一个方面,提供了根据本发明的组合用于根据本发明的方法中。在一个优选的实施方案中,抗TIGIT抗体

或其抗原结合片段是本发明的抗体或其抗原结合片段。

[0047] 在所有相关方面,优选任何待治疗的受试者是人受试者。在所有相关方面,优选与根据本发明的抗体接触的细胞(例如T细胞)是人细胞(例如人T细胞)。

[0048] 除非在技术上不兼容或指出相反,否则所描述的任何优选实施方案均可以任选地与所有其它优选实施方案中的一个或多个组合使用。

附图说明

- [0049] 图1提供本发明抗体的重链可变结构域(VH)互补性决定区(CDR)序列的表格
- [0050] 图2提供本发明抗体的轻链可变结构域(VL)CDR序列的表格
- [0051] 图3提供本发明抗体的重链可变结构域(VH)框架(FR)序列的表格
- [0052] 图4提供本发明抗体的轻链可变结构域(VL)框架(FR)序列的表格
- [0053] 图5提供本发明抗体的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)氨基酸序列的表格
- [0054] 图6提供编码根据本发明的抗体的VH和VL结构域的多核苷酸序列的表格
- [0055] 图7示出了hCD155和抗TIGIT抗体结合Jurkat-hTIGIT的竞争测定结果的图表
- [0056] 图8(A)示出了来自7个健康人供体的PBMC的特异性T细胞群中TIGIT阳性细胞的比例的图表。(B)示出了来自7个健康人供体的PBMC的不同免疫群体中TIGIT阳性细胞的比例的图表。
- [0057] 图9示出了Jurkat-hTIGIT上的抗TIGIT抗体的结合测定结果的图表
- [0058] 图10(A和B)示出了在来自人健康PBMC的原代CD8⁺T细胞上的抗TIGIT抗体的结合测定结果的图表。(C)示出了来自人健康PBMC的原代记忆CD8⁺T细胞和Treg上的抗TIGIT抗体的结合测定结果的图表
- [0059] 图11示出了在来自食蟹猴健康PBMC的原代CD8⁺T细胞上的抗TIGIT抗体的结合测定结果的图表
- [0060] 图12示出了抗TIGIT抗体在CHO-TCR-CD155和Jurkat-hTIGIT生物测定中的作用的图表
- [0061] 图13示出了在对来自用CHO-TCR-CD155细胞活化的健康供体的人原代CD8⁺T细胞的功能测定中抗TIGIT抗体提高IFNg分泌的作用的图表
- [0062] 图14示出了在对来自用CHO-TCR-CD155细胞活化的卵巢腹水的人原代CD8⁺TIL的功能测定中抗TIGIT抗体提高IFNg分泌的作用的直方图
- [0063] 图15(A)示出了小鼠CD155和抗TIGIT抗体之间结合Jurkat-mTIGIT的竞争测定结果的图表。(B)示出了在对小鼠OT-1T细胞的功能测定中抗TIGIT抗体提高IFNg分泌的作用的图表。(C)示出了在对小鼠OT-1T细胞的功能测定中抗TIGIT抗体提高细胞毒性的作用的图表。
- [0064] 图16(A)示出了单一疗法的抗TIGIT抗体在CT26肿瘤模型中的抗肿瘤功效的图表。(B和C)示出了与抗PD1组合的抗TIGIT抗体在CT26肿瘤模型中的抗肿瘤功效的图表。
- [0065] 图17(A)示出了单一疗法的抗TIGIT抗体在CT26肿瘤模型中的同种型依赖性抗肿瘤功效的图表。(B)示出了与抗PD1组合的抗TIGIT抗体在CT26肿瘤模型中的同种型依赖性抗肿瘤功效的图表。

[0066] 图18(A和G)示出了在用单一疗法或与抗PD1组合的抗TIGIT抗体处理的CT26肿瘤中对总CD4⁺T细胞群中Treg细胞比例的调节的图表。(B和H)示出了在用单一疗法或与抗PD1组合的抗TIGIT抗体处理的CT26肿瘤中对总CD45⁺群体中CD8⁺T细胞比例的调节的图表。(C和I)示出了在用单一疗法或与抗PD1组合的抗TIGIT抗体处理的CT26肿瘤中对CD8⁺/Treg T细胞比率的调节的图表。(D和J)示出了在用单一疗法或与抗PD1组合的抗TIGIT抗体处理的CT26肿瘤中对分泌IFNg的CD4⁺T细胞的调节的图表。(E)示出了在用抗TIGIT抗体处理的CT26肿瘤中对分泌IFNg的CD8⁺T细胞的调节的图表。(L和F)示出了在用单一疗法或与抗PD1组合的抗TIGIT抗体处理的CT26肿瘤中分泌IFNg/IL-10的CD4⁺T细胞的比率的图表。(K)示出了在用与抗PD1抗体组合的抗TIGIT抗体处理的CT26肿瘤中对分泌IL-10的CD4⁺T细胞的调节的图表。

[0067] 图19(A)示出了抗TIGIT抗体处理调节CT26肿瘤中的基因表达的作用并且通过NanoString分析测量的火山图(Volcano plot)。(B)示出了在用单一疗法或与抗PD1组合的抗TIGIT抗体处理的CT26肿瘤中对细胞毒性评分的调节的箱形图。(C)示出了在用单一疗法或与抗PD1组合的抗TIGIT抗体处理的CT26肿瘤中对CD8⁺T细胞评分的调节的箱形图

[0068] 图20(A)示出了来自人健康志愿者的PBMC中TIGIT⁺CD4⁺、CD8⁺T细胞和Treg群体的比例的直方图。(B)示出了抗TIGIT抗体对来自人健康志愿者的PBMC中的常规CD4⁺、CD8⁺T细胞和Treg群体的体外细胞毒性作用的图表。

[0069] 图21示出了抗TIGIT抗体对CT26肿瘤中的常规CD4⁺、CD8⁺T细胞和Treg群体的离体细胞毒性作用的图表。

[0070] 图22(A)示出了在Jurkat-hTIGIT细胞上的抗TIGIT抗体克隆的结合测定结果的图表。(B)示出了在来自健康人PBMC的原代CD8⁺T细胞上的抗TIGIT抗体克隆的结合测定结果的图表。(C)示出了在来自癌症患者PBMC的原代CD8⁺T细胞上的抗TIGIT抗体克隆的结合测定结果的图表。

[0071] 图23示出了人CD155和抗TIGIT抗体克隆结合Jurkat-hTIGIT的竞争测定结果的图表

[0072] 图24示出了拮抗剂a-TIGIT克隆的功能表征的图表。(A)示出了抗TIGIT抗体在使用Jurkat-hTIGIT效应细胞的功能测定(荧光素酶报告基因测定)中的作用的图表。(B)示出了抗TIGIT抗体在测量来自健康志愿者的人原代CD8⁺T细胞的IFNg分泌的功能测定中的作用的图表。(C)示出了抗TIGIT抗体克隆31282在测量来自PBMC的癌症患者CD3⁺T细胞的IFNg分泌的功能测定中的作用的图表。(D)示出了抗TIGIT抗体克隆31282在测量癌症患者TIL或PBMC中的细胞内细胞因子染色的功能测定中的作用的图表。

[0073] 图25 a-TIGIT克隆31282对来自癌症患者的PBMC中的总记忆CD4⁺或CD8⁺T细胞和Treg群体的细胞毒活性

[0074] 图26示出了来自癌症患者的免疫群体上的TIGIT表达的表征的图表。(A)来自癌症患者PBMC和TIL的免疫群体上的TIGIT表达频率。(B)对来自癌症患者PBMC和TIL的免疫群体上的TIGIT表达的绝对定量。

[0075] 图27(A)显示为带状图的Fab:TIGIT复合物的结构;(B)克隆31282和TIGIT之间的完全结合界面;(C)克隆31282和TIGIT之间的结合界面,示出了接触的残基。

[0076] 图28抗TIGIT克隆31282和32959之间的竞争测定。

[0077] 图29在食蟹猴中以0.1mg/kg(顶行)、1mg/kg(中行)或10mg/kg(下行)单剂量静脉注射后抗TIGIT克隆31282的血浆浓度的测量结果。左列:31282IgG1;右列31282IgG4。

[0078] 图30示出了对来自赛谢综合征患者的恶性和正常CD4⁺T细胞群上的TIGIT表达的表征的图表。(A)分离恶性和正常CD4⁺T细胞的门控(gating)策略。(B)对2个不同群体进行TIGIT染色的MFI。

[0079] 图31示出了对来自CLL患者的恶性和正常B细胞群上的TIGIT表达的表征的图表。(A)分离恶性和正常B细胞的门控策略。(B)对2个不同群体进行TIGIT染色的MFI。

[0080] 图32(A至C)示出了接种有EL4-mTIGIT肿瘤的小鼠中的肿瘤生长曲线的图表。(A)中值肿瘤生长曲线。(B)用hIgG1同种型对照抗体处理的小鼠中的个体肿瘤生长曲线。(C)用小鼠替代拮抗剂a-TIGIT抗体(hIgG1)处理的小鼠中的个体肿瘤生长曲线。(D至F)示出了接种有EL4-GFP肿瘤的小鼠中的肿瘤生长曲线的图表。(D)中值肿瘤生长曲线。(E)用hIgG1同种型对照抗体处理的小鼠中的个体肿瘤生长曲线。(F)用替代拮抗剂a-TIGIT(hIgG1)处理的小鼠中的个体肿瘤生长曲线。

[0081] 图33(A至D)示出了接种有CT26肿瘤的小鼠中的肿瘤生长曲线的图表。(A)用抗TIGIT和抗4-1BB抗体处理的小鼠的中值和个体肿瘤生长曲线。(B)用抗TIGIT和抗OX-40抗体处理的小鼠的中值和个体肿瘤生长曲线。(C)用抗TIGIT和抗GITR抗体处理的小鼠的中值和个体肿瘤生长曲线。(D)用抗TIGIT和抗ICOS抗体处理的小鼠的中值和个体肿瘤生长曲线。

[0082] 图34示出了抗TIGIT抗体对 $\gamma\delta$ T细胞的作用的图表。(A)来自CMV阳性和阴性人供体的PBMC的V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T细胞群中TIGIT阳性细胞的中值比例和TIGIT MFI信号。(B)示出了在对分离的人原代V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T细胞的功能测定中抗TIGIT Ab提高IFNg分泌的活性的图表。(C)示出了在对总PBMC的功能测定中抗TIGIT Ab提高IFNg分泌的活性的图表。

具体实施方式

[0083] 如本文所用,术语“免疫球蛋白”包括具有两条重链和两条轻链的组合的多肽,无论其是否具有任何相关的特异性免疫反应性。“抗体”是指对目标抗原(例如TIGIT)具有显著的已知特异性免疫反应活性的此类组合体。术语“TIGIT抗体”或“抗TIGIT抗体”在本文中用于指对TIGIT蛋白表现出免疫学特异性的抗体。抗体和免疫球蛋白包含轻链和重链,在它们之间有或无链间共价连接。脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构已得到相对充分的了解。

[0084] 通用术语“免疫球蛋白”包括五个不同类别的可以在生物化学上区分的抗体。虽然五类抗体全部在本发明的范围内,但以下讨论总体上针对IgG类的免疫球蛋白分子。关于IgG,免疫球蛋白包含两条相同的分子量为约23,000道尔顿的多肽轻链和两条相同的分子量为53,000至70,000的重链。四条链通过二硫键连接成“Y”构型,其中轻链从“Y”的开口开始并继续通过可变区而括住重链。

[0085] 抗体的轻链分类为kappa或lambda(κ 、 λ)。每个重链类别均可与 κ 或 λ 轻链结合。一般而言,轻链和重链彼此共价结合,并且当通过B细胞或经基因工程改造的宿主细胞产生免疫球蛋白时,两条重链的“尾”部通过共价二硫键或非共价键彼此键合。在重链中,氨基酸序列从Y构型叉形末端的N端延伸到每条链底部的C端。本领域的技术人员将理解,将重链分类

为gamma、mu、alpha、delta或epsilon(γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ)，其中还有一些亚类(例如 γ 1- γ 4)。该链的性质将抗体的“类别”分别确定为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等已经充分表征并且已知赋予功能特化。鉴于本公开，本领域的技术人员容易辨别这些类别和同种型中每一种的经修饰形式，并且这些经修饰形式因此在本发明的范围内。

[0086] 如上所述，抗体的可变区允许抗体选择性地识别并且特异性地结合抗原上的表位。也就是说，抗体的VL结构域和VH结构域组合形成限定三维抗原结合位点的可变区。这种四级抗体结构形成了存在于Y的每个臂末端的抗原结合位点。更具体地，抗原结合位点由VH和VL链中每一条上的三个互补性决定区(CDR)限定。

[0087] 如本文所用，术语“TIGIT蛋白”或“TIGIT抗原”或“TIGIT”可互换使用，并且是指结合脊髓灰质炎病毒受体(PVR-也称为CD155)的人T细胞免疫受体(GenBank登录号：NM_173799)。TIGIT也称为VSIG9、VSTM3或WUCAM。对TIGIT的提及包括在人宿主中和/或在人培养细胞系表面上天然表达的天然人TIGIT蛋白，及其重组形式和片段，还有天然存在的突变体形式。

[0088] 如本文所用，术语“结合位点”包含负责选择性结合目标靶抗原(例如TIGIT)的多肽区域。结合结构域包含至少一个结合位点。示例性结合结构域包括抗体可变结构域。本发明的抗体分子可以包含单个结合位点或多个(例如，两个、三个或四个)结合位点。

[0089] 如本文所用的术语“来源于”指定蛋白质(例如TIGIT抗体或其抗原结合片段)是指多肽的来源。在一个实施方案中，来源于特定起始多肽的多肽或氨基酸序列是CDR序列或与其相关的序列。在一个实施方案中，来源于特定起始多肽的氨基酸序列不是连续的。例如，在一个实施方案中，一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR来源于起始抗体。在一个实施方案中，来源于特定起始多肽或氨基酸序列的多肽或氨基酸序列具有与起始序列或其部分的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列，或者对于本领域的普通技术人员而言可以其它方式鉴定为其来源于该起始序列的氨基酸序列，其中所述部分由至少3至5个氨基酸、至少5至10个氨基酸、至少10至20个氨基酸、至少20至30个氨基酸或至少30至50个氨基酸组成。在一个实施方案中，改变来源于起始抗体的所述一个或多个CDR序列以产生变体CDR序列(例如亲和力变体)，其中变体CDR序列保持TIGIT结合活性。

[0090] 如本文所用，“保守性氨基酸取代”是其中氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基置换的取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族，包括碱性侧链(例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如，天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、 β -支化侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此，免疫球蛋白多肽中的非必需氨基酸残基可以来自同一侧链家族的另一氨基酸残基置换。在另一个实施方案中，一串氨基酸可以用侧链家族成员的顺序和/或组成方面不同的结构相似串置换。

[0091] 如本文所用，术语“重链部分”包括来源于免疫球蛋白重链的恒定结构域的氨基酸序列。包含重链部分的多肽包含以下中的至少一个：CH1结构域、铰链(例如，上、中和/或下铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域，或其变体或片段。在一个实施方案中，本发明的抗

体或抗原结合片段可以包含免疫球蛋白重链的Fc部分(例如,铰链部分、CH2结构域和CH3结构域)。在另一个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段可缺少恒定结构域的至少一部分(例如,整个或一部分CH2结构域)。在某些实施方案中,至少一个并且优选所有恒定结构域来源于人免疫球蛋白重链。例如,在一个优选实施方案中,重链部分包含全人铰链结构域。在其它优选实施方案中,重链部分包含全人Fc部分(例如,来自人免疫球蛋白的铰链、CH2和CH3结构域序列)。

[0092] 在某些实施方案中,重链部分的组成恒定结构域来自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链部分可以包含来源于IgG1分子的CH2结构域和来源于IgG3或IgG4分子的铰链区。在其他实施方案中,恒定结构域是嵌合结构域,其包含不同免疫球蛋白分子的部分。例如,铰链可以包含来自IgG1分子的第一部分和来自IgG3或IgG4分子的第二部分。如上所述,本领域的普通技术人员将理解,重链部分的恒定结构域可以进行修饰,使其与天然存在的(野生型)免疫球蛋白分子在氨基酸序列上不同。也就是说,本文公开的本发明多肽可以包含对一个或多个重链恒定结构域(CH1、铰链、CH2或CH3)和/或对轻链恒定区结构域(CL)的改变或修饰。示例性的修饰包括一个或多个结构域中一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。

[0093] 如本文所用,术语“可变区”和“可变结构域”可互换使用并且旨在具有等同含义。术语“可变”是指以下事实:可变结构域VH和VL的某些部分在抗体之间在序列上广泛不同,并且用于每种特定抗体对其靶抗原的结合和特异性。然而,可变性并非均匀地分布在抗体的整个可变结构域中。可变性集中在VL结构域和VH结构域中的每一个中形成抗原结合位点的一部分的称为“高变环”的三个区段中。 V_{λ} 轻链结构域的第一、第二和第三高变环在本文中称为L1(λ)、L2(λ)和L3(λ),并且可以定义为包含VL结构域中的残基24-33(L1(λ),由9、10或11个氨基酸残基组成)、49-53(L2(λ),由3个残基组成)和90-96(L3(λ),由5个残基组成)(Morea等,Methods 20,267-279,2000)。 V_{κ} 轻链结构域的第一、第二和第三高变环在本文中称为L1(κ)、L2(κ)和L3(κ),并且可以定义为包含VL结构域中的残基25-33(L1(κ),由6、7、8、11、12或13个残基组成)、49-53(L2(κ),由3个残基组成)和90-97(L3(κ),由6个残基组成)(Morea等,Methods 20,267-279,2000)。VH结构域的第一、第二和第三高变环在本文中称为H1、H2和H3,并且可以定义为包含VH结构域中的残基25-33(H1,由7、8或9个残基组成)、52-56(H2,由3或4个残基组成)和91-105(H3,长度高度可变)(Morea等,Methods 20,267-279,2000)。

[0094] 除非另有说明,否则术语L1、L2和L3分别指VL结构域的第一、第二和第三高变环,并且涵盖从 V_{κ} 和 V_{λ} 同种型获得的高变环。术语H1、H2和H3分别指VH结构域的第一、第二和第三高变环,并且涵盖从任何已知的重链同种型(包括 γ 、 ϵ 、 δ 、 α 或 μ)获得的高变环。

[0095] 如下文所定义,高变环L1、L2、L3、H1、H2和H3可各自包含“互补性决定区”或“CDR”的一部分。术语“高变环”和“互补性决定区”不是严格同义的,因为高变环(HV)是基于结构定义的,而互补性决定区(CDR)是基于序列可变性定义的(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service, National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991)并且HV和CDR的限制在一些VH和VL结构域中可以是不同的。

[0096] VL和VH结构域的CDR通常可以定义为包含以下氨基酸:轻链可变结构域中的残基

24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3), 以及重链可变结构域中的残基 31-35 或 31-35b (HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3); (Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)。因此, HV 可以包含在相应的 CDR 内, 并且除非另有说明, 否则本文对 VH 和 VL 结构域的“高变环”的提及应被解释为也涵盖相应的 CDR, 反之亦然。

[0097] 如下文所定义, 可变结构域的更高度保守的部分称为框架区 (FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR (分别为 FR1、FR2、FR3 和 FR4), 主要采用通过三个高变环连接的 β -折叠构型。每条链中的高变环通过 FR 紧密保持在一起, 并且与来自另一条链的高变环一起促成抗体的抗原结合位点形成。抗体的结构分析揭示了由互补性决定区形成的结合位点的序列与形状之间的关系 (Chothia 等, J. Mol. Biol. 227, 799-817, 1992; Tramontano 等, J. Mol. Biol. 215, 175-182, 1990)。虽然其具有高序列可变性, 但六个环中的五个仅采用少量主链构象, 称为“规范结构”。这些构象首先由环的长度决定, 其次由环和框架区中某些位置的关键残基的存在决定, 关键残基通过其堆积、氢键键合或呈现不寻常的主链构象的能力来决定构象。

[0098] 如本文所用, 术语“CDR”或“互补性决定区”意指在重链和轻链多肽二者的可变区内发现的非连续抗原结合位点。这些特定区域已由以下文献描述: Kabat 等, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616, 1977; Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991; Chothia 等, J. Mol. Biol. 196, 901-917, 1987; 以及 MacCallum 等, J. Mol. Biol. 262, 732-745, 1996, 其中定义包括当彼此进行比较时氨基酸残基的重叠或子集。示出涵盖如上文引用的每篇参考文献所定义的 CDR 的氨基酸残基用于比较。优选地, 术语“CDR”是 Kabat 基于序列比较所定义的 CDR。

[0099] 表 1: CDR 定义。

	CDR 定义		
	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
[0100]	V _H CDR1	31-35	26-32
	V _H CDR2	50-65	47-58
	V _H CDR3	95-102	93-101
	V _L CDR1	24-34	26-32
	V _L CDR2	50-56	46-55
	V _L CDR3	89-97	91-96

[0101] ¹ 残基编号按照 Kabat 等 (同上) 的命名法

[0102] ² 残基编号按照 Chothia 等 (同上) 的命名法

[0103] ³ 残基编号按照 MacCallum 等 (同上) 的命名法

[0104] 如本文所用, 术语“框架区”或“FR 区”包括是可变区的一部分但不是 CDR 的一部分的氨基酸残基 (例如, 使用 CDR 的 Kabat 定义)。因此, 可变区框架的长度为约 100 至 120 个氨基酸, 但仅包括在 CDR 之外的那些氨基酸。对于重链可变结构域的具体实例和由 Kabat 等定义的 CDR, 框架区 1 对应于涵盖氨基酸 1-30 的可变区结构域; 框架区 2 对应于涵盖氨基酸 36-49 的可变区结构域; 框架区 3 对应于涵盖氨基酸 66-94 的可变区结构域; 并且框架区 4 对应于从

氨基酸103到可变区末端的可变区结构域。轻链的框架区类似地由每一个轻链可变区CDR分开。类似地,使用Chothia等或McCallum等的CDR定义,框架区边界由如上所述的相应CDR末端分开。在一些优选实施方案中,CDR如Kabat所定义。

[0105] 在天然存在的抗体中,存在于每个单体抗体上的六个CDR是短的、非连续的氨基酸序列,该氨基酸序列在抗体在水性环境中呈现其三维构型时特别地定位以形成抗原结合位点。重链和轻链可变结构域的其余部分在氨基酸序列上显示出较小的分子间可变性,并且称为框架区。框架区主要采用 β -折叠构型,并且CDR形成连接 β -折叠结构并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分的环。因此,这些框架区起到形成支架的作用,该支架通过链间非共价相互作用将六个CDR定位在正确的方向上。由定位的CDR形成的抗原结合位点限定了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。该互补表面促进抗体与免疫反应性抗原表位的非共价结合。本领域的普通技术人员可以容易地鉴定CDR的位置。

[0106] 如本文所用,术语“片段”是指抗体或抗体链的局部或部分,其包含的氨基酸残基少于完整或完全抗体或抗体链。术语“抗原结合片段”是指免疫球蛋白或抗体的多肽片段,其结合抗原或与完整抗体(即,与多肽片段所来源于的完整抗体)竞争结合抗原(即,特异性结合TIGIT)。如本文所用,术语抗体分子的“片段”包括抗体的抗原结合片段,例如,抗体轻链可变结构域(VL)、抗体重链可变结构域(VH)、单链抗体(scFv)、F(ab')2片段、Fab片段、Fd片段、Fv片段以及单结构域抗体片段(DAb)。片段可以例如通过完整或完全抗体或抗体链的化学或酶促处理或者通过重组手段获得。

[0107] 如本文所用,术语“效价”是指多肽中潜在靶结合位点的数目。每个靶结合位点特异性结合一个靶分子或靶分子上的一个特定位点。当多肽包含多于一个靶结合位点时,每个靶结合位点可以特异性结合相同或不同的分子(例如,可以结合不同的配体或不同的抗原,或相同抗原上的不同表位)。本发明的结合分子具有至少一个对TIGIT具有特异性的结合位点。

[0108] 如本文所用,术语“特异性”是指与给定靶标(例如,TIGIT)结合(例如,免疫反应)的能力。多肽可以是单特异性的并且含有一个或多个特异性结合靶标的结合位点,或者多肽可以是多特异性的并且含有两个或更多个特异性结合相同或不同靶标的结合位点。在一个实施方案中,本发明的抗体对多于一种靶标具有特异性。例如,在一个实施方案中,本发明的多特异性结合分子结合TIGIT和第二靶分子。在这种情况下,第二靶分子是除TIGIT以外的分子。

[0109] 如本文所用,关于多肽的术语“合成”包括含有非天然存在的氨基酸序列的多肽。例如,非天然存在的多肽,其为天然存在的多肽的修饰形式(例如,包含诸如添加、取代或缺失的突变)或包含第一氨基酸序列(其可以是或可以不是天然存在的),第一氨基酸序列以线性氨基酸序列与在自然界中不是与第一氨基酸序列天然连接的第二氨基酸序列(其可以是或可以不是天然存在的)连接。

[0110] 如本文所用,术语“工程改造”包括通过合成手段(例如通过重组技术、体外肽合成,通过肽的酶促或化学偶联或者这些技术的一些组合)对核酸或多肽分子的操纵。优选地,已经工程改造了本发明的抗体以改善一种或多种特性,诸如抗原结合、稳定性/半衰期或效应子功能。

[0111] 如本文所用,术语“经修饰的抗体”包括合成形式的抗体,其被改变使其不是天然

存在的,例如,包含至少两个重链部分而不是两个完全重链的抗体(诸如,结构域缺失的抗体或微抗体(minibody));多特异性形式的抗体(例如双特异性、三特异性等),其被改变以结合两种或更多种不同抗原或单一抗原上的不同表位;连接于scFv分子的重链分子,等等。scFv分子是本领域已知的并且例如在美国专利5,892,019中有描述。另外,术语“经修饰的抗体”包括多价形式的抗体(例如,与相同抗原的三个或更多个拷贝结合的三价、四价抗体等)。在另一个实施方案中,本发明的经修饰的抗体是融合蛋白,其包含至少一个缺少CH2结构域的重链部分,并且包含含有受体配体对中一个成员的结合部分的多肽的结合结构域。

[0112] 术语“经修饰的抗体”在本文中也可用于指本发明的TIGIT抗体的氨基酸序列变体。本领域的技术人员将理解,可以修饰本发明的TIGIT抗体以产生变体TIGIT抗体,变体TIGIT抗体与其所来源于的TIGIT抗体相比在氨基酸序列上不同。例如,可以进行在“非必需”氨基酸残基处产生保守性取代或变化的核苷酸或氨基酸取代(例如,在CDR和/或框架残基中)。氨基酸取代可包括用天然存在的或非天然的氨基酸置换一个或多个氨基酸。

[0113] “抗体片段”包含全长抗体的一部分,通常是其抗原结合结构域或可变结构域。抗原结合抗体片段的一些实例包括Fab、Fab'、F(ab')2、双特异性Fab和Fv片段、双抗体、线性抗体、单链抗体分子、单链可变片段(scFv)和由抗体片段形成的多特异性抗体(参见Holliger和Hudson,Nature Biotechnol.23:1126-1136,2005,其内容通过引用并入本文)。

[0114] 如本文所用,术语“亲和力变体”是指与本发明的参考TIGIT抗体相比在氨基酸序列上表现出一个或多个变化的变体抗体,其中所述亲和力变体与参考抗体相比对TIGIT表现出改变的亲和力。优选地,与参考TIGIT抗体相比,亲和力变体将会对TIGIT表现出改善的亲和力。这种改善可以表现为对TIGIT的KD更低,或对TIGIT的解离速度更慢。与参考TIGIT抗体相比,亲和力变体通常在CDR的氨基酸序列上表现出一个或多个变化。此类取代可以导致CDR中给定位置处存在的原始氨基酸被不同的氨基酸残基置换,所述不同的氨基酸残基可以是天然存在的氨基酸残基或非天然存在的氨基酸残基。氨基酸取代可以是保守性的或非保守性的。

[0115] 如本文所用,术语“亲和力”或“结合亲和力”应基于抗体结合背景下本领域的通常含义来理解,并且反映了抗原与抗体或其抗原结合片段上的结合位点之间的结合强度和/或稳定性。

[0116] 本文提供的抗TIGIT抗体的特征在于与人TIGIT的高亲和力结合。可以使用本领域技术人员已知的标准技术评估对TIGIT的结合亲和力。

[0117] 结合亲和力也可以表示为特定抗体的解离常数或 K_D 。 K_D 值越小,抗体与其靶抗原之间的结合相互作用越强。在一个实施方案中,可以通过使用本领域已知的方法,例如通过ForteBioTM系统,通过MSD-溶液平衡滴定(SET)或通过表面等离子体共振,例如使用如所附实施例中所述的BiacoreTM系统来评估包含限定的VH/VL配对的Fab克隆的结合亲和力。根据本发明的抗体的Fab片段对TIGIT通常表现出通过ForteBioTM测量的在 1×10^{-10} 至 5×10^{-8} M,任选地 7×10^{-10} 至 4×10^{-8} M范围内的 K_D 。在该范围内的 K_D 可以作为Fab和相应二价mAb表现出与hTIGIT的高亲和力结合的指示。包含两个对hTIGIT(单独地)表现出在规定范围内的 K_D 的Fab的二价mAb也被认为表现出与hTIGIT的高亲和力结合。在 1×10^{-11} 至 5×10^{-9} ,任选地 2×10^{-11} 至 1×10^{-9} 范围内的MSD K_D 可作为与hTIGIT高亲和力结合的指示。根据本发明的抗体的Fab片段对TIGIT通常表现出通过BiacoreTM测量的在 1×10^{-10} M至 1×10^{-9} M,任选地

1×10^{-10} 至 7×10^{10} ,任选地 2×10^{-10} 至 7×10^{-10} M范围内的 K_D 。在该范围内的 K_D 可以作为Fab和相应二价mAb表现出与hTIGIT高亲和力结合的指示。

[0118] 还可以使用如所附实施例中所述的基于细胞的系统评估对人TIGIT的结合亲和力,其中测试了mAb与哺乳动物细胞(表达TIGIT的细胞系或离体细胞)的结合,例如使用ELISA或流式细胞术进行测试。例如,通过流式细胞术(例如FACS)分析(诸如实施例10中所述的分析)测量的不超过0.5nM的EC₅₀可以指示对TIGIT的高亲和力。在某些实施方案中,本发明的抗体表现出不超过0.5nM,任选不超过0.2nM的细胞结合EC₅₀。表示为EC₅₀的基于细胞的亲和力测定值优选使用表达hTIGIT的Jurkat细胞或来自人外周血单核细胞(PBMC)的原代CD8 T细胞测定。

[0119] 如本文所使用的“Treg细胞”或简称“Treg”是指调节性CD4+T细胞-即,降低常规T细胞(CD8或CD4 T细胞)的效应子功能的T细胞。可以根据本领域已知的方法鉴定Treg,例如使用流式细胞术来鉴定表达高水平CD25和低水平CD127或不存在CD127的CD4细胞。

[0120] 如上所概述的,本发明至少部分地涉及与TIGIT结合的抗体及其抗原结合片段。现在将更详细地描述根据本发明的TIGIT抗体和抗体片段的特性和特征。

[0121] **抗TIGIT抗体**

[0122] 在一个方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段与人TIGIT结合并且包含含有选自图1所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3)的重链可变结构域,并且所述分离的抗体或其抗原结合片段还包含含有选自图2所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)的轻链可变结构域。也就是说,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,所述分离的抗体或其抗原结合片段与人TIGIT结合并且包含含有重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)和重链CDR3(HCDR3)的重链可变结构域,其中:

[0123] (i) HCDR1选自由SEQ ID No:1、4、7、10、13、16、19、22、25、28、31、34、37、40、43、271、274和277组成的组;

[0124] (ii) HCDR2选自由SEQ ID No:2、5、8、11、14、17、20、23、26、29、32、35、38、41、44、272、275和278组成的组;

[0125] (iii) HCDR3选自由SEQ ID No:3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、273、276和279组成的组;

[0126] 并且所述分离的抗体或其抗原结合片段还包含含有轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3)的轻链可变结构域,其中

[0127] (iv) LCDR1选自由SEQ ID No:46、49、52、55、58、61、64、67、70、73、76、79、82、85、88、283、286和289组成的组;

[0128] (v) LCDR2选自由SEQ ID No:47、50、53、56、59、62、65、68、71、74、77、80、83、86、89、284、287和290组成的组;并且

[0129] (vi) LCDR3选自由SEQ ID No:48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、285、288和291组成的组。

[0130] 包含与VL结构域配对形成抗原(人TIGIT)结合位点的VH结构域的任何给定抗TIGIT抗体或其抗原结合片段将包含以下6个CDR的组合:可变重链CDR3(HCDR3)、可变重链

CDR2 (HCDR2)、可变重链CDR1 (HCDR1)、可变轻链CDR3 (LCDR3)、可变轻链CDR2 (LCDR2) 和可变轻链CDR1 (LCDR1)。虽然选自以上所列的CDR序列组的6个CDR的许多不同组合是容许的并且在本发明的范围内,但是特别优选6个CDR的某些组合;这些是在表现出与人TIGIT的高亲和力结合的单一mAb内的“天然”组合。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的组合,其中所述组合选自由来自图1中各抗体的HCDR与来自图2中相应抗体的LCDR形成的组合的组。

[0131] 也就是说,在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的组合,其中所述组合选自由以下组成的组:

[0132] (i) 包含SEQ ID NO:1的HCDR1、包含SEQ ID NO:2的HCDR2、包含SEQ ID NO:3的HCDR3、包含SEQ ID NO:46的LCDR1、包含SEQ ID NO:47的LCDR2和包含SEQ ID NO:48的LCDR3;

[0133] (ii) 包含SEQ ID NO:4的HCDR1、包含SEQ ID NO:5的HCDR2、包含SEQ ID NO:6的HCDR3、包含SEQ ID NO:49的LCDR1、包含SEQ ID NO:50的LCDR2和包含SEQ ID NO:51的LCDR3;

[0134] (iii) 包含SEQ ID NO:7的HCDR1、包含SEQ ID NO:8的HCDR2、包含SEQ ID NO:9的HCDR3、包含SEQ ID NO:52的LCDR1、包含SEQ ID NO:53的LCDR2和包含SEQ ID NO:54的LCDR3;

[0135] (iv) 包含SEQ ID NO:10的HCDR1、包含SEQ ID NO:11的HCDR2、包含SEQ ID NO:12的HCDR3、包含SEQ ID NO:55的LCDR1、包含SEQ ID NO:56的LCDR2和包含SEQ ID NO:57的LCDR3;

[0136] (v) 包含SEQ ID NO:13的HCDR1、包含SEQ ID NO:14的HCDR2、包含SEQ ID NO:15的HCDR3、包含SEQ ID NO:58的LCDR1、包含SEQ ID NO:59的LCDR2和包含SEQ ID NO:60的LCDR3;

[0137] (vi) 包含SEQ ID NO:16的HCDR1、包含SEQ ID NO:17的HCDR2、包含SEQ ID NO:18的HCDR3、包含SEQ ID NO:61的LCDR1、包含SEQ ID NO:62的LCDR2和包含SEQ ID NO:63的LCDR3;

[0138] (vii) 包含SEQ ID NO:19的HCDR1、包含SEQ ID NO:20的HCDR2、包含SEQ ID NO:21的HCDR3、包含SEQ ID NO:64的LCDR1、包含SEQ ID NO:65的LCDR2和包含SEQ ID NO:66的LCDR3;

[0139] (viii) 包含SEQ ID NO:22的HCDR1、包含SEQ ID NO:23的HCDR2、包含SEQ ID NO:24的HCDR3、包含SEQ ID NO:67的LCDR1、包含SEQ ID NO:68的LCDR2和包含SEQ ID NO:69的LCDR3;

[0140] (ix) 包含SEQ ID NO:25的HCDR1、包含SEQ ID NO:26的HCDR2、包含SEQ ID NO:27的HCDR3、包含SEQ ID NO:70的LCDR1、包含SEQ ID NO:71的LCDR2和包含SEQ ID NO:72的LCDR3;

[0141] (x) 包含SEQ ID NO:28的HCDR1、包含SEQ ID NO:29的HCDR2、包含SEQ ID NO:30的HCDR3、包含SEQ ID NO:73的LCDR1、包含SEQ ID NO:74的LCDR2和包含SEQ ID NO:75的LCDR3;

[0142] (xi) 包含SEQ ID NO:31的HCDR1、包含SEQ ID NO:32的HCDR2、包含SEQ ID NO:33

的HCDR3、包含SEQ ID NO:76的LCDR1、包含SEQ ID NO:77的LCDR2和包含SEQ ID NO:78的LCDR3；

[0143] (xii) 包含SEQ ID NO:34的HCDR1、包含SEQ ID NO:35的HCDR2、包含SEQ ID NO:36的HCDR3、包含SEQ ID NO:79的LCDR1、包含SEQ ID NO:80的LCDR2和包含SEQ ID NO:81的LCDR3；

[0144] (xiii) 包含SEQ ID NO:37的HCDR1、包含SEQ ID NO:38的HCDR2、包含SEQ ID NO:39的HCDR3、包含SEQ ID NO:82的LCDR1、包含SEQ ID NO:83的LCDR2和包含SEQ ID NO:84的LCDR3；

[0145] (xiv) 包含SEQ ID NO:40的HCDR1、包含SEQ ID NO:41的HCDR2、包含SEQ ID NO:42的HCDR3、包含SEQ ID NO:85的LCDR1、包含SEQ ID NO:86的LCDR2和包含SEQ ID NO:87的LCDR3；

[0146] (xv) 包含SEQ ID NO:43的HCDR1、包含SEQ ID NO:44的HCDR2、包含SEQ ID NO:45的HCDR3、包含SEQ ID NO:88的LCDR1、包含SEQ ID NO:89的LCDR2和包含SEQ ID NO:90的LCDR3；

[0147] (xvi) 包含SEQ ID NO:271的HCDR1、包含SEQ ID NO:272的HCDR2、包含SEQ ID NO:273的HCDR3、包含SEQ ID NO:283的LCDR1、包含SEQ ID NO:284的LCDR2和包含SEQ ID NO:285的LCDR3；

[0148] (xvii) 包含SEQ ID NO:274的HCDR1、包含SEQ ID NO:275的HCDR2、包含SEQ ID NO:276的HCDR3、包含SEQ ID NO:286的LCDR1、包含SEQ ID NO:287的LCDR2和包含SEQ ID NO:288的LCDR3；

[0149] (xviii) 包含SEQ ID NO:277的HCDR1、包含SEQ ID NO:278的HCDR2、包含SEQ ID NO:279的HCDR3、包含SEQ ID NO:289的LCDR1、包含SEQ ID NO:290的LCDR2和包含SEQ ID NO:291的LCDR3。

[0150] 在某些实施方案中，抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域，所述重链可变结构域具有选自由以下组成的组的氨基酸序列：SEQ ID No:211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、327、329和331，以及与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列；并且任选地包含轻链可变结构域，所述轻链可变结构域具有选自由以下组成的组的氨基酸序列：SEQ ID No:212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、328、330和332的氨基酸序列，以及与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0151] 虽然选自以上所列的VH和VL结构域序列组的VH结构域和VL结构域的所有可能配对都是容许的并且在本发明的范围内，但是特别优选某些VH和VL组合；这些是在表现出与人TIGIT的高亲和力结合的单一mAb内的“天然”组合。

[0152] 在某些实施方案中，抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域的组合，其中所述组合选自由来自图5中各抗体的VH或与其表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列与来自图5中相同抗体的VL或与其表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列形成的组合的组。在某些实施方案中，抗体或抗原结合片段包含重链可变结构域和轻链可变结构域的组合，其中所述组合选自由以下组成的组：

- [0153] (i) 包含SEQ ID NO:211的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:212的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0154] (ii) 包含SEQ ID NO:213的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:214的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0155] (iii) 包含SEQ ID NO:215的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:216的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0156] (iv) 包含SEQ ID NO:217的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:218的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0157] (v) 包含SEQ ID NO:219的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:220的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0158] (vi) 包含SEQ ID NO:221的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:222的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0159] (vii) 包含SEQ ID NO:223的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:224的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0160] (viii) 包含SEQ ID NO:225的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:226的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0161] (ix) 包含SEQ ID NO:227的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:228的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0162] (x) 包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:230的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0163] (xi) 包含SEQ ID NO:231的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:232的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0164] (xii) 包含SEQ ID NO:233的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:234的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0165] (xiii) 包含SEQ ID NO:235的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:236的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0166] (xiv) 包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0167] (xv) 包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列的重链可变结构域和包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0168] (xvi) 包含SEQ ID NO:327的氨基酸序列或与所述氨基酸序列的同一性为至少90%的氨基酸序列的重链可变结构域以及包含SEQ ID NO:328的氨基酸序列或与所述氨基酸序列的同一性为至少90%的氨基酸序列的轻链可变结构域；
- [0169] (xvii) 包含SEQ ID NO:329的氨基酸序列或与所述氨基酸序列的同一性为至少90%的氨基酸序列的重链可变结构域以及包含SEQ ID NO:330的氨基酸序列或与所述氨基酸序列的同一性为至少90%的氨基酸序列的轻链可变结构域；和
- [0170] (xviii) 包含SEQ ID NO:331的氨基酸序列或与所述氨基酸序列的同一性为至少90%的氨基酸序列的重链可变结构域以及包含SEQ ID NO:332的氨基酸序列或与所述氨基酸序列的同一性为至少90%的氨基酸序列的轻链可变结构域。

[0171] 对于以上所列的特定VH/VL组合中的每一种,将具有与所叙述的VH结构域序列的同一性为至少90%、92%、95%、97%或99%的氨基酸序列的VH结构域跟具有与所叙述的VL结构域序列的同一性为至少90%、92%、95%、97%或99%的氨基酸序列的VL结构域进行组合也是容许的并且在本发明的范围内。尽管如此,其中VH结构域的氨基酸序列与给定的参考VH序列表现出低于100%序列同一性的实施方案可包含与参考序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3相同的重链CDR,然而在框架区内表现出氨基酸序列变异。同样地,尽管如此,其中VL结构域的氨基酸序列与给定的参考序列表现出低于100%序列同一性的实施方案可包含与参考序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3相同的轻链CDR,然而在框架区内表现出氨基酸序列变异。

[0172] 在前一段落和本文其它部分,抗体/抗原结合片段的结构基于与所叙述的参考序列(与给定SEQ ID NO)的%序列同一性来限定。在这种情况下,两个氨基酸序列之间的%序列同一性可以通过比较以最佳方式比对的这两个序列而确定,并且其中待比较的氨基酸序列可以相对于参考序列包含添加或缺失以在这两个序列之间进行最佳比对。通过以下方式计算同一性百分比:确定两个序列之间氨基酸残基相同的相同位置的数目,将该相同位置的数目除以比较窗口中的位置总数并将得到的结果乘以100以获得这两个序列之间的同一性百分比。通常,比较窗口对应于所比较序列的全长。例如,可以使用BLAST程序“BLAST 2sequences”(Tatusova等,“Blast 2sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”,FEMS Microbiol Lett.174:247-250),其可在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html>网站获得,使用的参数是默认给出的那些(特别是参数“开放空位罚分”:5,和“延伸空位罚分”:2;所选矩阵是例如该程序提出的矩阵“BLOSUM 62”),待比较的两个序列之间的同一性百分比通过该程序直接计算。确定查询序列与参考序列的序列同一性在技术人员的能力范围内,并且可以使用可商购的分析软件诸如BLASTTM进行。

[0173] 在某些优选的实施方案中,抗体或抗原结合片段可以包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中HCDR1包含SEQ ID NO:16,HCDR2包含SEQ ID NO:17,HCDR3包含SEQ ID NO:18,并且LCDR1包含SEQ ID NO:61,LCDR2包含SEQ ID NO:62且LCDR3包含SEQ ID NO:63。

[0174] 在某些此类实施方案中,重链可变结构域可包含SEQ ID NO:221所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,并且轻链可变结构域可包含SEQ ID NO:222所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在某些此类实施方案中,重链可变结构域和轻链可变结构域是本文提供的抗体31282的VH和VL结构域。

[0175] 本文提供的抗体31282来源于抗体29489。抗体31282由29489通过VH FR4区域中氨基酸116处的M-T取代产生。了解该取代会去除抗体的潜在氧化位点,并且从而改善稳定性而不影响功能。因此,抗体31282和29489共有相同的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,仅框架有所不同。

[0176] 因此,在本发明的抗体或抗原结合片段的某些实施方案中,重链可变结构域可包含SEQ ID NO:219所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,并且轻链可变结构域可包含SEQ ID NO:220所示的氨基酸序列与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在某些此类实施方案中,重链可变结构域和轻链可变结构域是本文提供的抗体

29489的VH和VL结构域。

[0177] 尽管如此,其中VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:221或219所示序列表现出低于100%序列同一性的实施方案可包含与SEQ ID NO:221和219的HCDR1、HCDR2和HCDR3相同的重链CDR(分别为SEQ ID NO:16、17和18),然而在框架区内表现出氨基酸序列变异。同样地,尽管如此,其中VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:222或220所示序列表现出低于100%序列同一性的实施方案可包含与SEQ ID NO:222和220的LCDR1、LCDR2和LCDR3相同的轻链CDR(分别为SEQ ID NO:61、62和63),然而在框架区内表现出氨基酸序列变异。

[0178] 本文描述的具有图1至图5中所示序列的示例性TIGIT抗体由5种亲本抗体克隆开发而成。表2汇总了本文所述抗体的谱系。在酵母中表达原初(*naïve*)亲本人抗TIGIT抗体,并且选择那些对TIGIT表现出高功能活性的抗体(灰色行,命名为26……),并进行亲和力成熟。然后,在哺乳动物细胞中表达选定的亲和力成熟抗体(每个亲本下面的白色行,命名为29……或3……)。另外,抗体31282是由29489通过VH FR4区域中氨基酸116处的M-T取代产生的。了解该取代会去除抗体的潜在氧化位点,并且从而改善稳定性而不影响功能。另外,抗体31288是由29494通过VH FR1区域中氨基酸2处的V-L取代和VH FR4区域中氨基酸120处的M-T取代产生的。了解V-L取代会恢复VH4-39种系的序列,并且M-T取代会去除抗体的潜在氧化位点并且从而改善稳定性而不影响功能。

[0179] 表2

抗体克隆	VH CDR3 谱系	优化方法	VH 种系
26518	26518	亲本	VH3-07
29478	26518	H1/H2/H3	VH3-30
26452	26452	亲本	VH1-46
29487	26452	H1/H2/H3	VH1-46
29489	26452	H1/H2/H3	VH1-46
31282	29489	M116T 氨基酸突变	VH1-46
26486	26486	亲本	VH4-0B
29499	26486	H1/H2/H3	VH4-39
29494	26486	H1/H2/H3	VH4-39
31288	29494	种系逆转 +M116T 氨基酸	VH4-39

[0180]

		突变	
[0181]	32919	31288	L1/L2/L3
	32931	31288	L1/L2/L3
	26521	26521	亲本
	29513	26521	H1/H2/H3
	26493	26493	亲本
	29520	26493	H1/H2/H3
	29523	26493	H1/H2/H3
	29527	26493	H1/H2/H3
	26432	26432	亲本
	32959	26432	H1/H2/H3

[0182] 第二代抗体表现出比相应亲本抗体更高的亲和力。

[0183] 在某些实施方案中,本发明提供了抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中VH结构域来源于选自以下的人V区种系序列:VH3-07、VH3-30、VH1-46、VH4-0B、VH4-39、VH1-69、VH3-09、VH3-33、VH3-30。在某些优选的实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含来源于人V区种系VH1-46的VH结构域。

[0184] 如果重链可变区的序列更可能来源于给定种系而不是任何其它种系,则VH结构域“来源于”特定的V区种系序列。

[0185] TIGIT表位

[0186] 本发明还提供了抗体或其抗原结合片段,其在包含残基Q56和I109的表位处与人TIGIT结合。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段至少在残基Q56、N58和I109处结合人TIGIT。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段在包含残基Q56、N58和I109以及任选地包含残基E60、I68、L73和H76中的一个或多个的表位处结合人TIGIT。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段在包含残基Q56、N58、E60、I68、L73、H76和I109的表位处结合人TIGIT。

[0187] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段在由TIGIT残基Q56、N58、E60、I68、L73、H76和I109组成的表位处与人TIGIT结合。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与抗体31282结合相同的表位。

[0188] 在抗体或抗原结合片段结合包含指定TIGIT残基的人TIGIT表位的情况下,抗体结合这些残基中的每一个且任选地结合TIGIT的其它残基。在抗体或抗原结合片段结合由TIGIT残基Q56、N58、E60、I68、L73、H76和I109组成的人TIGIT表位的情况下,抗体结合这些残基中的每一个而不结合TIGIT的其它残基。

[0189] 如果抗体或抗原结合片段在与TIGIT结合时与指定的TIGIT氨基酸残基接触,则其在给定表位处与人TIGIT结合。如本文所用,如果在通过抗体-TIGIT结合形成的蛋白质复合物中,残基符合以下每一项标准,则抗体与该TIGIT残基接触: (i) 残基的计算结合自由能贡献大于0.3kcal/mol, (ii) 残基的实验平均B因子低于X射线结构中所有残基的平均B因子, (iii) 残基以小于或等于4.0埃的距离与抗体原子形成至少3对重原子的原子间接触, (iv) 残基不产生仅溶剂暴露性氢键或离子相互作用, (v) 如果残基是非芳族极性残基(Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys或Arg),则与抗体产生至少一个氢键或离子相互作用。结合自由能的

计算在技术人员的能力范围内。优选使用经验力场计算结合自由能,优选FoldX。FoldX对于技术人员来说是熟悉的,并且可以在<http://foldxsuite.crg.eu/>公开获得。使用FoldX计算结合自由能也在Guerois等J.Mol.Biol.2002;320(2):369-87中有描述,其通过引用并入本文。如技术人员所熟悉的,重原子都是非氢原子(包括C、N、O、S)。

[0190] 因此,本发明还提供了至少在残基Q56和I109处与人TIGIT接触的抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段至少在残基Q56、N58和I109处与人TIGIT接触。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段至少在残基Q56、N58和I109以及任选地在残基E60、I68、L73和H76中的一个或多个处与人TIGIT接触。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段至少在残基Q56、N58、E60、I68、L73、H76和I109处与人TIGIT接触。

[0191] 在某些此类实施方案中,抗体或其抗原结合片段仅在残基Q56、N58、E60、I68、L73、H76和I109处与人TIGIT接触。

[0192] 用于确定抗体或抗原结合片段所接触的TIGIT残基的方法是技术人员熟悉的,包括X射线晶体学,诸如在实施例23中所描述的。

[0193] 还提供了与本文所述的抗体或抗原结合片段结合相同表位的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0194] 抗体亚型

[0195] TIGIT抗体可以采用其中存在VH结构域和VL结构域两者等多种不同的实施方案。术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用,并且涵盖但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体),只要它们对人TIGIT蛋白表现出适当的免疫学特异性即可。如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同源的抗体群体获得的抗体,即除了可少量存在的可能天然发生的突变以外,构成该群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体具有高度特异性,针对单一抗原位点。此外,与通常包含针对抗原上不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇或表位。

[0196] 在非限制性实施方案中,本文提供的TIGIT抗体可包含以下CH1结构域和/或CL结构域,其氨基酸序列完全或基本上是人的。如果TIGIT抗体旨在用于人治疗用途,则抗体的整个恒定区或其至少一部分通常具有完全或基本上是人的氨基酸序列。因此,CH1结构域、铰链区、CH2结构域、CH3结构域和CL结构域(以及CH4结构域,若存在)中的一个或多个或者任何组合就其氨基酸序列而言可以完全或基本上是人的。此类抗体可以是任何人同种型的,其中特别优选人IgG4和IgG1。

[0197] 有利地,CH1结构域、铰链区、CH2结构域、CH3结构域和CL结构域(以及CH4结构域,若存在)可以全部具有完全或基本上是人的氨基酸序列。在人源化或嵌合抗体或者抗体片段的恒定区的背景下,术语“基本上是人的”是指与人恒定区至少90%,或至少92%,或至少95%,或至少97%,或至少99%的氨基酸序列同一性。在本上下文中,术语“人氨基酸序列”是指由人免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列,人免疫球蛋白基因包括种系、重排和体细胞突变的基因。此类抗体可以是任何人同种型,其中特别优选人IgG4和IgG1。

[0198] 还提供了以下TIGIT抗体,其包含相对于人序列通过一个或多个氨基酸添加、缺失或取代而改变的“人”序列恒定结构域。

[0199] 本文提供的TIGIT抗体可以是任何同种型。旨在用于人治疗用途的抗体通常将是

IgA、IgD、IgE、IgG、IgM型,常常是IgG型,在这种情况下,其可以属于IgG1、IgG2a和b、IgG3或IgG4四个亚类中的任何一个。在这些亚类中的每一种中,容许在Fc部分内进行一个或多个氨基酸取代、插入或缺失,或者进行其它结构修饰,例如以增强或降低Fc依赖性功能。

[0200] 在某些优选的实施方案中,本文提供的TIGIT抗体是IgG抗体。在某些实施方案中,根据本发明的抗体是IgG1抗体。在某些替代实施方案中,根据本发明的抗体是IgG4抗体。

[0201] 已知IgG4抗体会经历Fab臂交换 (FAE),其可产生IgG4抗体的不可预测的药效学特性。已证实FAE受铰链区中的S228P突变阻止 (Silva等, J Biol Chem. 2015年2月27日; 290 (9): 5462-5469)。因此,在其中根据本发明的抗体是IgG4抗体的某些此类实施方案中,抗体包含突变S228P-即在位置228处丝氨酸突变成脯氨酸(根据EU编号)。

[0202] 在非限制性实施方案中,预计可在重链和/或轻链的恒定区内,特别是在Fc区内进行一个或多个氨基酸取代、插入或缺失。氨基酸取代可导致经取代的氨基酸被不同的天然存在的氨基酸或被非天然或经修饰的氨基酸取代。还容许其它结构修饰,例如糖基化模式的改变(例如通过N-或O-连接的糖基化位点的添加或缺失)。根据TIGIT抗体的预期用途,可期望就其与Fc受体的结合特性(例如调节效应子功能)来修饰本发明的抗体。

[0203] 在某些实施方案中,TIGIT抗体可以包含给定抗体同种型(例如人IgG1)的Fc区,修饰Fc区以降低或基本上消除与该抗体同种型天然相关的一种或多种抗体效应子功能。

[0204] 如本文所证明的,具有细胞裂解效应子功能的抗体可有效地减少Treg细胞群,但令人惊讶的是,不会对常规效应T细胞群产生不利影响。这种选择性可以允许更强烈地抑制Treg的调控作用,同时保留抗肿瘤效应T细胞。

[0205] 因此,在某些替代实施方案中,TIGIT抗体保留与该抗体同种型天然相关的一种或多种抗体效应子功能。例如,本发明的TIGIT抗体可以是保留ADCC功能性的IgG1抗体。在另一些实施方案中,TIGIT抗体可以包含给定抗体同种型(例如人IgG1)的Fc区,修饰Fc区以增强与该抗体同种型天然相关的一种或多种抗体效应子功能。在该上下文中,“抗体效应子功能”包括抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)、补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 中的一种或多种或者全部。

[0206] 在某些实施方案中,抗TIGIT抗体是经修饰的抗体。

[0207] 在某些实施方案中,提供了双特异性抗体,其包含对TIGIT具有特异性的第一臂和对第二靶标具有特异性的第二臂。在一些优选的实施方案中,第二靶标是免疫检查点分子。在某些实施方案中,第二靶标是OX40。在某些实施方案中,第二靶标是ICOS。在某些实施方案中,第二靶标是GITR。在某些实施方案中,第二靶标是4-1BB。在某些实施方案中,第二靶标是PD-1。在某些实施方案中,第二靶标是PD-L1。在某些实施方案中,对TIGIT具有特异性的第一臂包含根据本发明的抗体的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的组合。在某些实施方案中,第一臂包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中HCDR1包含SEQ ID NO:16, HCDR2包含SEQ ID NO:17, HCDR3包含SEQ ID NO:18, 并且LCDR1包含SEQ ID NO:61, LCDR2包含SEQ ID NO:62且LCDR3包含SEQ ID NO:63。

[0208] 与本文公开的TIGIT抗体“交叉竞争”的单克隆抗体或其抗原结合片段是在与结合本发明TIGIT抗体的位点相同或重叠的位点处结合人TIGIT的那些。竞争性单克隆抗体或其抗原结合片段可以例如通过抗体竞争测定来鉴定。例如,可以使纯化或部分纯化的人TIGIT的样品结合至固体支持物。然后,添加本发明的抗体化合物或其抗原结合片段和怀疑能够

与此本发明抗体化合物竞争的单克隆抗体或其抗原结合片段。标记了两种分子中的一种。如果标记的化合物和未标记的化合物与TIGIT上分开且不连续的位点结合，则标记的化合物将有相同的结合水平，无论怀疑的竞争性化合物是否存在。然而，如果相互作用位点相同或重叠，则未标记的化合物将会竞争，并且与抗原结合的标记化合物的量将会降低。如果未标记的化合物过量存在，则极少(如果有的话)标记化合物将会结合。

[0209] 出于本发明的目的，竞争性单克隆抗体或其抗原结合片段是使本发明抗体化合物与TIGIT的结合降低约50%、约60%、约70%、约80%、约85%、约90%、约95%或约99%的那些。进行此类竞争测定的程序的详情在本领域中是熟知的，并且可以例如在Harlow和Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988, 567-569, 1988, ISBN 0-87969-314-2中找到。可以通过使用纯化抗体对这些测定进行定量。通过将一种抗体针对其自身进行滴定来建立标准曲线，即，对于标记和竞争物使用相同的抗体。滴定未标记的竞争性单克隆抗体或其抗原结合片段抑制标记分子与板结合的能力。绘制结果，并比较达到所需结合抑制程度所必需的浓度。

[0210] 本发明的抗体对TIGIT表现出高亲和力并且与CD155竞争

[0211] 在某些实施方案中，本发明的抗体或抗原结合片段对人TIGIT表现出高亲和力。在某些实施方案中，根据本发明的抗体的Fab片段对TIGIT表现出通过ForteBioTM测量的在 1×10^{-10} 至 5×10^{-8} M，任选地 7×10^{-10} 至 4×10^{-8} M范围内的 K_D 。在某些实施方案中，根据本发明的抗体表现出在 1×10^{-11} 至 5×10^{-9} M，任选地 2×10^{-11} 至 1×10^{-9} 范围内的MSD K_D 。在某些实施方案中，根据本发明的抗体的Fab片段对TIGIT表现出通过BiacoreTM测量的在 1×10^{-10} M至 1×10^{-9} M，任选地 1×10^{-10} 至 7×10^{-10} M、任选地 2×10^{-10} 至 7×10^{-10} M范围内的 K_D 。

[0212] 表3

克隆	ForteBio Fab KD 生物素化人 TIGIT HIS (M) 单价	ForteBio Fab KD 小鼠 TIGIT-Fc (M) 单价	ForteBio Fab KD 食蟹猴 TIGIT-Fc (M) 单价	ForteBio IgG KD Human Avid	MSD-单价 KD (M), 人 TIGIT-His	Biacore-单价 KD (M), 人 TIGIT-His	细胞结合 Jurkat	细胞结合 Jurkat 小鼠 TIGIT FON (高于阴性的倍数)	
[0213]	2651 8	1.24E-09	N.B.	4.47E-09	6.30E-10		154	233	
	2947 8	7.03E-10	9.18E-08	1.26E-09	5.27E-10		182	500	
	2645 2	5.08E-09	N.B.	N.B.	4.74E-10		164	47	
	2948 7	2.08E-09	N.B.	1.55E-07	3.96E-10		161	95	
	2948 9	8.81E-10	N.B.	3.52E-08	3.53E-10	1.1E-10	2.48E-10	162	187

[0214]	3128 2	1.34E-09	N.B.	3.77E-08			2.94E-10		
	2648 6	2.19E-08	N.B.	N.B.	5.89E-10			143	199
	2949 9	1.66E-09	2.55E-08	1.45E-08	3.19E-10	1.9E-11		164	541
	2949 4	1.66E-09	5.36E-08	1.86E-08	3.76E-10	7.0E-11	2.70E-10	164	511
	3128 8	2.09E-09		2.51E-08			1.92E-10		
	3291 9	1.42E-09		6.57E-09				680	
	3293 1	1.18E-09		1.97E-09				741	
	2949 9	1.66E-09	2.55E-08	1.45E-08	3.19E-10	1.9E-11		164	541
	2652 1	9.87E-09	N.B.	1.49E-07	5.41E-10			146	218
	2951 3	7.74E-10	8.55E-08	9.56E-09	3.92E-10	2.5E-11		156	406
	2649 3	4.06E-08	2.67E-08	N.B.	1.49E-09			80	463
	2952 0	1.31E-09	1.95E-09	2.68E-09	3.84E-10	2.1E-10	7.16E-10	166	535
	2952 3	3.84E-09	1.89E-08	2.79E-08	5.31E-10	1.7E-09		150	502
	2952 7	1.33E-09	2.02E-08	1.76E-08	3.50E-10	6.4E-10		142	414
	2643 2	1.31E-08	N.B.	N.B.	4.62E-09				

[0215] 如实施例中所证明的,抗体31282对转基因细胞上表达的TIGIT表现出惊人的高亲和力。因此,在某些实施方案中,本文提供的抗TIGIT抗体或抗原结合片段表现出对人TIGIT的结合EC₅₀小于0.5nM。在优选的此类实施方案中,抗体或抗原结合片段表现出约0.05至约0.4nM,优选约0.05至约0.3nM,优选约0.05至约0.2nM,优选约0.05至约0.15nM的结合EC₅₀。在某些优选的实施方案中,抗体或抗原结合片段表现出对人TIGIT的结合EC₅₀为约0.1nM。在优选的实施方案中,抗体包含抗体31282的CDR。优选地,使用表达人TIGIT的Jurkat细胞测定EC₅₀,如实施例18中所述。在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段与小鼠TIGIT和/或食蟹猴TIGIT交叉反应。

[0216] 由于“29……”第二代抗体是高功能性亲本抗体的亲和力成熟后代,预期它们将表现出与亲本抗体至少相似或等同的功能特性,反之亦然。

[0217] 如本文所述,在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段对CD8T细胞表达的TIGIT和Treg细胞表达的TIGIT具有等同的亲和力。如本文所用,如果对CD8 T细胞的亲和力在对Treg细胞的亲和力的0.5-1.5倍范围内,则抗体或抗原结合片段对CD8 T细胞和Treg细胞具有“等同的亲和力”。例如,对Treg细胞表现出0.03nM的亲和力的对CD8 T细胞和Treg细胞具有等同的亲和力的抗体将会对CD8 T细胞表现出在0.015-0.045nM范围内的亲和力。

[0218] 表3提供了对本发明的抗TIGIT抗体的亲和力特性的汇总,其中灰色单元格指示亲本抗体克隆,其中每个谱系的第二代和第三代抗体显示在相应亲本抗体的正下方(还请参见表2)。

[0219] 如实施例中所证明的,抗体31282对人原代CD8+T细胞上表达的TIGIT表现出惊人

的高亲和力。因此,在某些实施方案中,本文提供的抗TIGIT抗体或抗原结合片段表现出对人TIGIT的结合EC₅₀小于0.5nM。在优选的此类实施方案中,抗体或抗原结合片段表现出约0.05至约0.4nM,优选约0.1至约0.3nM的结合EC₅₀。在某些优选的实施方案中,抗体或抗原结合片段表现出对人TIGIT的结合EC₅₀为约0.2nM。在优选的实施方案中,抗体或抗原结合片段包含抗体31282的CDR。优选地,如实施例18中所述,使用来自人PBMC(优选来自健康个体)的CD8+T细胞测定EC₅₀。

[0220] 如所附实施例中所证明的,在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段对表达TIGIT的CD8 T细胞表现出高亲和力,并且对表达TIGIT的Treg细胞表现出高亲和力。在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段对表达TIGIT的CD8 T细胞和表达TIGIT的Treg细胞表现出特征在于EC₅₀小于0.5nM,优选小于0.3nM,优选小于0.2nM的亲和力。在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段对表达TIGIT的CD8 T细胞和表达TIGIT的Treg细胞表现出等同的亲和力。

[0221] 根据本发明的抗体(例如抗体31282)对来自癌症患者CD8+T细胞表现出惊人的高亲和力。这是特别有利的,因为通过抑制TIGIT信号传导提高来自癌症患者的T细胞的效应子活性可以产生更有效的肿瘤控制。因此,在某些实施方案中,本文提供的抗TIGIT抗体或抗原结合片段对来自癌症患者的人CD8+T细胞上的人TIGIT表现出小于0.5nM的结合EC₅₀。在优选的此类实施方案中,抗体或抗原结合片段表现出约0.05至约0.4nM,优选约0.1至约0.3nM的结合EC₅₀。在某些优选的实施方案中,抗体或抗原结合片段对人TIGIT表现出为约0.1nM至约0.2nM的EC₅₀。在优选的实施方案中,抗体或抗原结合片段包含抗体31282的CDR。优选地,使用来自癌症患者获取的PBMC的CD8+T细胞测定EC₅₀,如实施例18中所述。

[0222] 如所附实施例中所证明的,在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段与CD155/PVR竞争结合TIGIT。在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段表现出与CD155竞争,其特征在于IC₅₀为0.2nM或更低,优选0.1nM或更低。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段表现出与CD155竞争,其特征在于IC₅₀为约0.05nM或更低。在某些优选的实施方案中,所表现出的IC₅₀为约0.05nM。不希望受理论束缚,预期抗体与CD155竞争结合TIGIT会降低CD155诱导的TIGIT介导的信号传导的水平,从而提高效应T细胞活化的水平。

[0223] 本发明还提供了本文所述抗体的“亲和力变体”。

[0224] 本发明还提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其与本文所述的抗体或抗原结合片段交叉竞争结合人TIGIT。

[0225] 本发明的抗体促进促炎性T细胞活性

[0226] 根据本发明的抗体(例如抗体31282)在促进CD8+T细胞的促炎活性方面惊人地有效。如实施例中所证明的,根据本发明的抗体或抗原结合片段(特别是31282)比对比抗TIGIT抗体更有效地促进促炎性CD8+T细胞活性(由IFNg释放指示)(参见图24)。在表达TIGIT的转基因Jurkat报告细胞和原代CD8 T细胞中证明了这种相对于对比抗体改善的功效。因此,在某些实施方案中,如实施例19中所述,本文提供的抗TIGIT抗体或抗原结合片段对Jurkat报告细胞表达的人TIGIT表现出小于5nM的活化EC₅₀。在优选的此类实施方案中,抗体或抗原结合片段表现出约1nM至约4nM,优选约2nM至约4nM的EC₅₀。

[0227] 在某些实施方案中,如实施例19中所述,本文提供的抗TIGIT抗体或抗原结合片段对来自健康个体的CD8 T细胞表现出小于0.4nM的活化EC₅₀。CD8 T细胞活性(即促炎活性)可

以通过炎性细胞因子(例如IFNg)的产生来测量。在优选的此类实施方案中,抗体或抗原结合片段表现出约0.05nM至约0.4nM、优选约0.1nM至约0.2nM的EC₅₀。优选地,使用来自健康个体获取的PBMC的CD8+T细胞测定EC₅₀,如实施例19中所述。

[0228] 在所附实施例中另外地且令人惊讶地证明,所提供的抗TIGIT抗体有效地提高gamma-delta(γδ,或g/d)T细胞(即表达与常规αβTCR亚基完全不同的γδTCR亚基的T细胞)的活性。此类γδT细胞形成免疫系统独特且重要的组分,并且本文提供的抗体促进这些细胞的活性的能力凸显了所述抗体的效用。

[0229] 因此,本文还提供了促进γδT细胞活性的方法,所述方法包括使γδT细胞群与抗TIGIT抗体接触。在某些实施方案中,所述方法在体外进行。在某些实施方案中,所述方法在人受试者体内进行。在某些此类实施方案中,人受试者患有癌症。在某些实施方案中,抗TIGIT抗体或抗原结合片段包含根据本发明的抗体的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的组合。在某些实施方案中,抗TIGIT抗体包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中HCDR1包含SEQ ID NO:16, HCDR2包含SEQ ID NO:17, HCDR3包含SEQ ID NO:18,并且LCDR1包含SEQ ID NO:61, LCDR2包含SEQ ID NO:62且LCDR3包含SEQ ID NO:63。

[0230] T-REG细胞的选择性耗竭

[0231] 如本文所证明的,抗TIGIT抗体能够选择性地耗竭表达TIGIT的Treg细胞。也就是说,抗TIGIT抗体降低表达TIGIT的Treg细胞相对于T细胞总群的比例,程度大于其降低效应或记忆CD4或CD8 T细胞的比例。

[0232] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段选择性地耗竭表达TIGIT的Treg细胞。

[0233] 表达TIGIT的Treg细胞的这种选择性耗竭可以通过表达TIGIT的Treg的选择性裂解来(例如通过ADCC或CDC(参见图20、图21和图25))介导。认为表达TIGIT的Treg是比不表达TIGIT的Treg更强的调节性细胞。不希望受理论束缚,预期通过裂解表达TIGIT的Treg细胞进行的选择性耗竭会通过耗竭Treg细胞的总数而且耗竭表现出更强调调节功能的那些Treg细胞来提高T细胞效应子功能(例如T细胞介导的细胞毒性、促炎细胞因子释放)。图24中证明了这种提高的T细胞效应子功能。

[0234] 因此,在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段选择性地裂解表达TIGIT的Treg细胞。

[0235] 表达TIGIT的Treg细胞的选择性耗竭也可以通过诱导TIGIT受体内化使其不再在细胞膜上表达来介导。不希望受理论束缚,通过诱导TIGIT内化使得TIGIT+Treg细胞成为TIGIT-Treg细胞,预期这些细胞的调节功能会变得不那么强(因为TIGIT+Treg是更强的调节性细胞)。由于受体内化和随后这些Treg的调节效力下降,预期T细胞效应子功能会提高。因此,在某些实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段抑制表达TIGIT的Treg细胞的抑制活性,优选通过诱导表达TIGIT的Treg细胞进行TIGIT内化来抑制。

[0236] 特别有利的是,根据本发明的抗TIGIT抗体对CD8 T细胞和Treg细胞表现出高亲和力,并且还表现出Treg细胞的选择性耗竭,从而通过两种机制促进T细胞效应子功能。抗体效应子功能(例如ADCC、CDC)的保持导致Treg的有效耗竭,并且该选择性意味着抗体效应子功能不会导致效应T细胞的不必要耗竭。该选择性特别令人惊讶,因为先前产生抗TIGIT抗体的尝试已经试图消除抗体效应子功能以避免表达TIGIT的效应T细胞的裂解。而且,由于本发明的TIGIT抗体对效应T细胞(例如CD8 T细胞)表现出亲和力,因此可以通过竞争CD155

结合和/或诱导效应T细胞上的TIGIT内化来抑制这些细胞中TIGIT介导的信号传导。相结合地,本发明抗体的这些作用可导致T细胞效应子功能的显著上调。

[0237] 根据本发明的抗体和抗原结合片段表现出的另一些令人惊讶的有利特性包括提高肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的T细胞效应子功能(例如促炎细胞因子的释放)。暴露于肿瘤微环境可导致TIL表现出无变应性或所谓的“耗竭”表型,这可能是由于抗原过度暴露和/或免疫抑制性肿瘤微环境造成的。增强TIL的效应子功能是合乎期望的,因为正是这些细胞浸润肿瘤本身并因此定位在最适合降低肿瘤大小或生长的基因座;然而由于许多TIL的无变应性或耗竭表型,预期难以增强其效应子功能。因此,暴露于本发明的抗体之后来自TIL的促炎反应的增加令人惊讶,并且表明所述抗体可以是特别有效的治疗剂。

[0238] 抗体和抗原结合片段表现出的另一些令人惊讶的有利特性包括提高gamma-delta ($\gamma \delta$) T细胞的促炎活性的能力。先前尚未报导过抗TIGIT抗体促进非常规T细胞诸如 $\gamma \delta$ T细胞的活性的能力,并且这种能力提供了治疗除癌症以外的已知其中 $\gamma \delta$ T细胞很重要的疾病的潜力。例如,据报导 $\gamma \delta$ T细胞参与对致病性感染(细菌、病毒(例如CMV)、真菌)的反应以及在预防自身免疫性疾病方面具有作用。另外,令人惊讶的促进非常规T细胞活性的能力为抗体的抗肿瘤作用提供了进一步的效力。

[0239] 在另一个方面,提供了从T细胞群中选择性耗竭Treg细胞的方法,所述方法包括使T细胞群与抗TIGIT抗体或其抗原结合片段接触,由此抗TIGIT抗体选择性地耗竭Treg细胞群。在某些实施方案中,该方法在体外进行。在某些实施方案中,该方法在人受试者体内进行。在某些此类实施方案中,人受试者患有癌症。在某些实施方案中,抗TIGIT抗体或抗原结合片段包含根据本发明的抗体的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3序列的组合。在某些实施方案中,抗TIGIT抗体包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中HCDR1包含SEQ ID NO:16, HCDR2包含SEQ ID NO:17, HCDR3包含SEQ ID NO:18,并且LCDR1包含SEQ ID NO:61, LCDR2包含SEQ ID NO:62且LCDR3包含SEQ ID NO:63。

[0240] 如所附实施例中所证明的,本发明还提供了不与CD155/PVR竞争结合TIGIT的抗TIGIT抗体。因此,在另一个方面,本发明提供了不与CD155/PVR竞争结合人TIGIT的人TIGIT抗体或其抗原结合片段。在某些此类实施方案中,根据本发明的CD155非竞争性抗TIGIT抗体的Fab片段对TIGIT表现出通过ForteBioTM测量的在 5×10^{-9} 至 5×10^{-8} M,任选地 1×10^{-8} 至 3×10^{-8} M范围内的 K_d 。

[0241] 在某些优选的实施方案中,抗体可包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中HCDR1包含SEQ ID NO:280, HCDR2包含SEQ ID NO:281, HCDR3包含SEQ ID NO:282,并且LCDR1包含SEQ ID NO:292, LCDR2包含SEQ ID NO:293且LCDR3包含SEQ ID NO:294。在某些此类实施方案中,重链可变结构域可包含SEQ ID NO:333所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,并且轻链可变结构域可包含SEQ ID NO:334所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0242] 尽管如此,其中VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:333所示序列表现出低于100%序列同一性的实施方案可包含与SEQ ID NO:333的HCDR1、HCDR2和HCDR3相同的重链CDR(分别为SEQ ID NO:280、281和282),然而在框架区内表现出氨基酸序列变异。同样地,尽管如此,其中VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:334所示的序列表现出低于100%序列

同一性的实施方案可包含与SEQ ID NO:334的LCDR1、LCDR2和LCDR3相同的轻链CDR (分别为SEQ ID NO:292、293和294) ,然而在框架区内表现出氨基酸序列变异。

[0243] 在某些优选的实施方案中,抗体可包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中HCDR1包含SEQ ID NO:353,HCDR2包含SEQ ID NO:354,HCDR3包含SEQ ID NO:355,并且LCDR1包含SEQ ID NO:356,LCDR2包含SEQ ID NO:357且LCDR3包含SEQ ID NO:358。在某些此类实施方案中,重链可变结构域可包含SEQ ID NO:367所示的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,并且轻链可变结构域可包含SEQ ID NO:368所示的氨基酸序列或与所述氨基酸序列表现出至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0244] 尽管如此,其中VH结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:367所示序列表现出低于100%序列同一性的实施方案可包含与SEQ ID NO:367的HCDR1、HCDR2和HCDR3相同的重链CDR (分别为SEQ ID NO:353、354和355) ,然而在框架区内表现出氨基酸序列变异。同样地,尽管如此,其中VL结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:368所示序列表现出低于100%序列同一性的实施方案可包含与SEQ ID NO:368的LCDR1、LCDR2和LCDR3相同的轻链CDR (分别为SEQ ID NO:356、357和358) ,然而在框架区内表现出氨基酸序列变异。

[0245] 多核苷酸、载体和表达系统

[0246] 本发明还提供了编码本发明TIGIT抗体的多核苷酸分子,还提供了含有与容许在宿主细胞或无细胞表达系统中表达抗原结合多肽的调控序列可操作地连接的编码本发明TIGIT抗体的核苷酸序列的表达载体,以及含有该表达载体的宿主细胞或无细胞表达系统。

[0247] 编码本发明TIGIT抗体的多核苷酸分子包括例如重组DNA分子。如本文所用,术语“核酸”、“多核苷酸”或“多核苷酸分子”可互换并且指任何单链或双链的DNA或RNA分子,并且如果是单链,则还指其互补序列的分子。在讨论核酸分子时,本文可根据以5'至3'方向提供序列的常规惯例描述特定核酸分子的序列或结构。在本发明的一些实施方案中,核酸或多核苷酸是“分离的”。当应用于核酸分子时,该术语是指与在其所来源的生物体的天然存在的基因组中同其紧密相邻的序列分开的核酸分子。例如,“分离的核酸”可包含插入到载体(诸如质粒或病毒载体)中,或整合到原核细胞或真核细胞或者非人宿主生物体的基因组DNA中的DNA分子。当应用于RNA时,术语“分离的多核苷酸”主要是指由如上定义的分离的DNA分子编码的RNA分子。可替代地,该术语可以指这样的RNA分子:其已经从在其天然状态下(即在细胞或组织中)与其缔合的其它核酸纯化/分开的RNA分子。分离的多核苷酸(DNA或RNA)还可以表示通过生物或合成手段直接产生并且与在其产生期间存在的其它组分分开的分子。

[0248] 为了重组产生根据本发明的TIGIT抗体,可以制备编码该抗体的重组多核苷酸(使用标准分子生物学技术)并将其插入可复制载体中以在所选宿主细胞或无细胞表达系统中表达。合适的宿主细胞可以是原核生物、酵母或高等真核生物细胞,特别是哺乳动物细胞。可用的哺乳动物宿主细胞系的实例是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚肾系(293细胞或亚克隆用于在悬浮培养物中生长的293细胞,Graham等,J.Gen.Viro1.36:59-74,1977);幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO,Urlaub等,Proc.Nat1.Acad.Sci.USA 77:4216,1980;或CHO来源的克隆,如CHO-K1,ATCC CCL-61,Kao和Puck,Genetics of somatic mammalian cells,VII.Induction

and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells, Proc. Natl. Acad. Sci. 60: 1275-1281, 1968); 小鼠塞尔托利细胞(TM4; Mather, Biol. Reprod. 23: 243-252, 1980); 小鼠骨髓瘤细胞SP2/0-AG14(ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287)或NS0(HPA培养物保藏号85110503); 猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34); 布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞(W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI细胞(Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68, 1982); MRC 5细胞; FS4细胞; 和人肝癌细胞系(Hep G2), 以及DSM的PERC-6细胞系。适合用于这些宿主细胞中的每一种的表达载体也是本领域通常已知的。

[0249] 应注意,术语“宿主细胞”通常是指培养的细胞系。将其中已引入编码根据本发明的抗原结合多肽的表达载体的完整人明确排除在“宿主细胞”的定义之外。

[0250] 在一个重要方面,本发明还提供了产生本发明TIGIT抗体的方法,该方法包括在容许TIGIT抗体表达的条件下培养含有编码TIGIT抗体的多核苷酸(例如表达载体)的宿主细胞(或无细胞表达系统),以及回收所表达的TIGIT抗体。这种重组表达方法可用于大规模生产根据本发明的TIGIT抗体,包括旨在用于人治疗用途的单克隆抗体。用于大规模制造适于体内治疗用途的重组抗体的合适载体、细胞系和生产方法通常是本领域可获得的并且是本领域的技术人员熟知的。

[0251] 因此,根据本发明,提供了分离的多核苷酸或分离的多核苷酸的组合,其编码包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的组合的抗体或抗原结合片段,其中所述组合选自由以下组成的组:

[0252] (i) 包含SEQ ID NO:16的HCDR1、包含SEQ ID NO:17的HCDR2、包含SEQ ID NO:18的HCDR3、包含SEQ ID NO:61的LCDR1、包含SEQ ID NO:62的LCDR2和包含SEQ ID NO:63的LCDR3;

[0253] (ii) 包含SEQ ID NO:4的HCDR1、包含SEQ ID NO:5的HCDR2、包含SEQ ID NO:6的HCDR3、包含SEQ ID NO:49的LCDR1、包含SEQ ID NO:50的LCDR2和包含SEQ ID NO:51的LCDR3;

[0254] (iii) 包含SEQ ID NO:7的HCDR1、包含SEQ ID NO:8的HCDR2、包含SEQ ID NO:9的HCDR3、包含SEQ ID NO:52的LCDR1、包含SEQ ID NO:53的LCDR2和包含SEQ ID NO:54的LCDR3;

[0255] (iv) 包含SEQ ID NO:10的HCDR1、包含SEQ ID NO:11的HCDR2、包含SEQ ID NO:12的HCDR3、包含SEQ ID NO:55的LCDR1、包含SEQ ID NO:56的LCDR2和包含SEQ ID NO:57的LCDR3;

[0256] (v) 包含SEQ ID NO:13的HCDR1、包含SEQ ID NO:14的HCDR2、包含SEQ ID NO:15的HCDR3、包含SEQ ID NO:58的LCDR1、包含SEQ ID NO:59的LCDR2和包含SEQ ID NO:60的LCDR3;

[0257] (vi) 包含SEQ ID NO:1的HCDR1、包含SEQ ID NO:2的HCDR2、包含SEQ ID NO:3的HCDR3、包含SEQ ID NO:46的LCDR1、包含SEQ ID NO:47的LCDR2和包含SEQ ID NO:48的LCDR3;

[0258] (vii) 包含SEQ ID NO:19的HCDR1、包含SEQ ID NO:20的HCDR2、包含SEQ ID NO:21的HCDR3、包含SEQ ID NO:64的LCDR1、包含SEQ ID NO:65的LCDR2和包含SEQ ID NO:66的LCDR3；

[0259] (viii) 包含SEQ ID NO:22的HCDR1、包含SEQ ID NO:23的HCDR2、包含SEQ ID NO:24的HCDR3、包含SEQ ID NO:67的LCDR1、包含SEQ ID NO:68的LCDR2和包含SEQ ID NO:69的LCDR3；

[0260] (ix) 包含SEQ ID NO:25的HCDR1、包含SEQ ID NO:26的HCDR2、包含SEQ ID NO:27的HCDR3、包含SEQ ID NO:70的LCDR1、包含SEQ ID NO:71的LCDR2和包含SEQ ID NO:72的LCDR3；

[0261] (x) 包含SEQ ID NO:28的HCDR1、包含SEQ ID NO:29的HCDR2、包含SEQ ID NO:30的HCDR3、包含SEQ ID NO:73的LCDR1、包含SEQ ID NO:74的LCDR2和包含SEQ ID NO:75的LCDR3；

[0262] (xi) 包含SEQ ID NO:31的HCDR1、包含SEQ ID NO:32的HCDR2、包含SEQ ID NO:33的HCDR3、包含SEQ ID NO:76的LCDR1、包含SEQ ID NO:77的LCDR2和包含SEQ ID NO:78的LCDR3；

[0263] (xii) 包含SEQ ID NO:34的HCDR1、包含SEQ ID NO:35的HCDR2、包含SEQ ID NO:36的HCDR3、包含SEQ ID NO:79的LCDR1、包含SEQ ID NO:80的LCDR2和包含SEQ ID NO:81的LCDR3；

[0264] (xiii) 包含SEQ ID NO:37的HCDR1、包含SEQ ID NO:38的HCDR2、包含SEQ ID NO:39的HCDR3、包含SEQ ID NO:82的LCDR1、包含SEQ ID NO:83的LCDR2和包含SEQ ID NO:84的LCDR3；

[0265] (xiv) 包含SEQ ID NO:40的HCDR1、包含SEQ ID NO:41的HCDR2、包含SEQ ID NO:42的HCDR3、包含SEQ ID NO:85的LCDR1、包含SEQ ID NO:86的LCDR2和包含SEQ ID NO:87的LCDR3；

[0266] (xv) 包含SEQ ID NO:43的HCDR1、包含SEQ ID NO:44的HCDR2、包含SEQ ID NO:45的HCDR3、包含SEQ ID NO:88的LCDR1、包含SEQ ID NO:89的LCDR2和包含SEQ ID NO:90的LCDR3；

[0267] (xvi) 包含SEQ ID NO:271的HCDR1、包含SEQ ID NO:272的HCDR2、包含SEQ ID NO:273的HCDR3、包含SEQ ID NO:283的LCDR1、包含SEQ ID NO:284的LCDR2和包含SEQ ID NO:285的LCDR3；

[0268] (xvii) 包含SEQ ID NO:274的HCDR1、包含SEQ ID NO:275的HCDR2、包含SEQ ID NO:276的HCDR3、包含SEQ ID NO:286的LCDR1、包含SEQ ID NO:287的LCDR2和包含SEQ ID NO:288的LCDR3；

[0269] (xviii) 包含SEQ ID NO:277的HCDR1、包含SEQ ID NO:278的HCDR2、包含SEQ ID NO:279的HCDR3、包含SEQ ID NO:289的LCDR1、包含SEQ ID NO:290的LCDR2和包含SEQ ID NO:291的LCDR3。

[0270] 在某些实施方案中,提供了分离的多核苷酸或分离的多核苷酸的组合,其编码包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的组合的抗体或抗原结合片段,其中:

[0271] (i) HCDR1包含SEQ ID NO:16或由其组成,HCDR2包含SEQ ID NO:17或由其组成,

HCDR3包含SEQ ID NO:18或由其组成,LCDR1包含SEQ ID NO:61或由其组成,LCDR2包含SEQ ID NO:62或由其组成,并且LCDR3包含SEQ ID NO:63或由其组成。

[0272] 此外,根据本发明,提供了编码本文所述抗体或抗原结合片段的分离的多核苷酸或分离的多核苷酸的组合。在某些实施方案中,提供了编码本文提供的抗体31282或其抗原结合片段的分离的多核苷酸。

[0273] 此外,根据本发明,提供了编码抗TIGIT抗体的VH和/或VL结构域的分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含选自由SEQ ID No:241-270、335-342和369-370组成的组的一个或多个序列。在某些实施方案中,分离的多核苷酸包含根据SEQ ID NO:251的序列和/或根据SEQ ID NO:252的序列。在其中多核苷酸包含根据SEQ ID NO:251的序列和根据SEQ ID NO:252的序列的某些实施方案中,所述序列是连续的。在其中多核苷酸包含根据SEQ ID NO:251的序列和根据SEQ ID NO:252的序列的某些实施方案中,所述序列不是连续的。

[0274] 此外,根据本发明,提供了表达载体,其包含与调控序列可操作地连接的根据本发明的多核苷酸,所述调控序列容许抗原结合多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达。

[0275] 此外,根据本发明,提供了含有根据本发明的表达载体的宿主细胞或无细胞表达系统。

[0276] 此外,根据本发明,提供了产生重组抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在容许抗体或抗原结合片段表达的条件下培养根据本发明的宿主细胞或无细胞表达系统,以及回收所表达的抗体或抗原结合片段。

[0277] 药物组合物

[0278] 本文还提供了药物组合物,其包含与一种或多种药学上可接受的载剂或赋形剂一起配制的根据本发明的抗体或抗原结合片段。此类组合物可包含一种TIGIT抗体或(例如,两种或更多种不同的)TIGIT抗体的组合。用于配制用于人治疗用途的抗体的技术是本领域熟知的,并且在例如Wang等,Journal of Pharmaceutical Sciences,第96卷,第1-26页,2007中进行了综述。

[0279] 本文提供的TIGIT抗体和药物组合物可用于疗法中,特别是疾病,特别是受益于抑制TIGIT功能的疾患的治疗性治疗。

[0280] 组合产品

[0281] 如本文所证明的,当与免疫检查点抑制剂-特别是抗ICOS拮抗剂抗体或抗PD-1抗体(即,对于人免疫调节分子PD-1具有特异性的拮抗剂抗体)组合施用时,本发明的抗体或其抗原结合片段特别有效。与单独的任一种抗体相比,与抗ICOS或抗PD-1抗体组合施用抗TIGIT抗体导致肿瘤生长的协同降低。预期使用根据本发明的抗TIGIT抗体和抗PD-L1抗体的组合会观察到类似效果。

[0282] 本文进一步证明,当与对免疫检查点共刺激分子具有特异性的激动剂抗体-特别是抗4-1BB、抗OX40或抗GITR激动剂抗体组合施用时,本发明的抗体或其抗原结合片段特别有效。与单独的任一种抗体相比,与抗4-1BB、抗OX40或抗GITR激动剂抗体组合施用抗TIGIT抗体导致肿瘤生长的协同降低。

[0283] 在另一个方面,提供了组合产品,其包含抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,以及化学治疗剂、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗41BB抗体、抗OX40抗体、抗GITR抗体和抗ICOS抗体中的一种或多种。在某些优选的实施方案中,抗TIGIT抗体或抗原结合片段是根据本发明提供

的抗体或抗原结合片段。在一个最优选的实施方案中,抗TIGIT抗体或抗原结合片段包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的组合,其中:

- [0284] HCDR1包含SEQ ID NO:16 (YTFTSYMMH) ,
- [0285] HCDR2包含SEQ ID NO:17 (VIGPSGASTSYAQKFQG) ,
- [0286] HCDR3包含SEQ ID NO:18 (ARDHSDYWSGIMEV) ,
- [0287] LCDR1包含SEQ ID NO:61 (RASQSVRSSYLA) ,
- [0288] LCDR2包含SEQ ID NO:62 (GASSRAT) ,并且
- [0289] LCDR3包含SEQ ID NO:63 (QQYFSPPWT) 。

[0290] 还提供了如本文提供的用于治疗癌症或病毒感染的方法中的组合,任选地其中病毒感染是CMV感染。还提供了如本文提供的用于本文提供的方法中的组合。

[0291] 如本文所用,在两种或更多种活性剂作为“组合”、“治疗组合”或“组合疗法”(这些术语可互换使用)提供的情况下,这不要求或排除将活性剂配制成单一组合物。给予组合疗法常规解释:施用两种或更多种活性剂,使得患者可以从每种剂获得益处。“组合疗法”不会使其配制、共施用、同时施用或固定剂量配制成为必需。

[0292] 治疗方法

[0293] 本文提供的TIGIT抗体或其抗原结合片段以及药物组合物可用于抑制体内癌性肿瘤细胞的生长,并且因此可用于治疗肿瘤。

[0294] 因此,本发明的另一些方面涉及抑制人患者中肿瘤细胞生长的方法,以及治疗或预防癌症的方法,所述方法包括向有此需要的患者施用有效量的如本文所述的TIGIT抗体或抗原结合片段,如本文所述的药物组合物,或如本文所述的组合。

[0295] 本发明的另一方面提供了如本文所述的TIGIT抗体或抗原结合片段用于抑制人患者中的肿瘤细胞生长。本发明的另一方面提供了如本文所述的TIGIT抗体或抗原结合片段用于治疗或预防人患者的癌症。

[0296] 在另一方面,本发明提供了选择性地耗竭癌症患者中的Treg细胞的方法,该方法包括向患者施用抗TIGIT抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,抗TIGIT抗体结合在人TIGIT上的表位处,所述表位包含残基Q56、N58、E60、I68 L73、H76和I109,优选由残基Q56、N58、E60、I68 L73、H76和I109组成。在某些实施方案中,抗TIGIT抗体是本文提供的抗TIGIT抗体。

[0297] 在某些实施方案中,抗TIGIT抗体包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3的组合,其中:HCDR1包含SEQ ID NO:16 (YTFTSYMMH) 或由其组成,HCDR2包含SEQ ID NO:17 (VIGPSGASTSYAQKFQG) 或由其组成,HCDR3包含SEQ ID NO:18 (ARDHSDYWSGIMEV) 或由其组成,LCDR1包含SEQ ID NO:61 (RASQSVRSSYLA) 或由其组成,LCDR2包含SEQ ID NO:62 (GASSRAT) 或由其组成,并且LCDR3包含SEQ ID NO:63 (QQYFSPPWT) 或由其组成。

[0298] 在某些优选的实施方案中,待治疗的患者患有选自以下的癌症:肾癌(例如,肾细胞癌)、乳腺癌、脑肿瘤、慢性或急性白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病)、淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、淋巴细胞性淋巴瘤、原发性CNS淋巴瘤、B细胞淋巴瘤(例如CLL)、T细胞淋巴瘤(如Sezary综合征))、鼻咽癌、黑素瘤(例如转移性恶性黑素瘤)、前列腺癌、结肠癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌(例如头颈部鳞状细胞癌

(HNSCC)）、皮肤癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌症、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)赘生物、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮样癌、鳞状细胞癌、间皮瘤。在某些实施方案中，受抑制的癌症是肺癌、膀胱癌、乳腺癌、肾癌(例如肾脏癌)、头颈癌(例如HNSCC)或结肠癌(例如结肠腺癌)。在某些实施方案中，癌症是结肠癌(例如结肠腺癌)或肺癌。在某些实施方案中，癌症是血癌。在某些此类实施方案中，癌症是淋巴瘤。在某些实施方案中，癌症是T细胞淋巴瘤或B细胞淋巴瘤。

[0299] 在某些实施方案中，治疗癌症的方法还包括施用附加治疗剂，例如化学治疗剂。

[0300] 如本文所证明的，当与免疫检查点抑制剂-特别是抗ICOS拮抗剂抗体或抗PD-1抗体(即，对人免疫调节分子PD-1具有特异性的拮抗剂抗体)组合施用时，本发明的抗体或其抗原结合片段特别有效。与单独的任一种抗体相比，与抗ICOS或抗PD-1抗体组合施用抗TIGIT抗体导致肿瘤生长的协同降低。预期使用根据本发明的抗TIGIT抗体和抗PD-L1抗体的组合会观察到类似效果。

[0301] 本文还证明，当与对免疫检查点共刺激分子具有特异性的激动剂抗体-特别是抗4-1BB、抗OX40或抗GITR激动剂抗体组合施用时，本发明的抗体或其抗原结合片段特别有效。与单独的任一种抗体相比，与抗4-1BB、抗OX40或抗GITR激动剂抗体组合施用抗TIGIT抗体导致肿瘤生长的协同降低。

[0302] 因此，本文还提供了治疗受试者的癌症的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的根据本发明的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，并且还施用有效量的抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗41BB抗体、抗OX40抗体和抗GITR抗体，或抗ICOS抗体。

[0303] 另外，本文提供的证明抗TIGIT抗体可以提高 $\gamma\delta$ 细胞以及常规T细胞的活性的数据表明抗TIGIT抗体可用于治疗除癌症以外的疾患。具体而言，已知 $\gamma\delta$ T细胞在对感染(例如细菌、真菌或病毒感染)的响应中很重要。如实施例29所示，当与抗TIGIT抗体接触时，来自CMV血清阳性受试者的 $\gamma\delta$ T细胞表现出显著提高的活化，其特征在于IFNg分泌增加。以这种方式促进CMV患者中的 $\gamma\delta$ T细胞活化的能力表明施用抗TIGIT抗体将促进 $\gamma\delta$ T细胞的抗病毒活性。

[0304] 因此，本文提供了治疗受试者的病毒感染的方法，所述方法包括施用有效量的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段。还提供了治疗受试者的病毒感染的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本文提供的抗TIGIT抗体或抗原结合片段或者药物组合物，从而治疗病毒感染。在优选的实施方案中，病毒感染是CMV感染。

[0305] 在某些实施方案中，所述方法还包括施用一种或多种附加治疗剂。在某些实施方案中，所述一种或多种治疗剂选自：抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗41BB抗体、抗OX40抗体、抗GITR抗体和抗ICOS抗体。

[0306] 如实施例中所证明的，本文公开的抗TIGIT抗体有效地促进T细胞活性，特别是促炎性T细胞活性。可以通过本领域技术人员熟悉的方法测量T细胞活性，例如如实施例中所述通过测量IFNg的产生来测量T细胞活性。

[0307] 因此，本文还提供了促进T细胞活性的方法，所述方法包括使T细胞群与本文所述

的抗体或抗原结合片段接触。

[0308] 在某些实施方案中,促进T细胞活性的方法在体外进行。在某些实施方案中,促进T细胞活性的方法在人受试者体内进行。在某些此类实施方案中,人受试者患有癌症。在某些实施方案中,人受试者患有病毒感染,例如CMV感染。

[0309] 在某些实施方案中,所述方法促进常规 $\alpha\beta$ T细胞活性。在某些实施方案中,所述方法促进CD4 T细胞活性。在某些实施方案中,所述方法促进CD8T细胞活性。在某些实施方案中,所述方法促进 $\gamma\delta$ (gamma-delta)T细胞活性。

[0310] 在实施例中还证明,当与抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗41BB抗体、抗OX40抗体、抗GITR抗体或抗ICOS抗体组合使用时,本文公开的抗TIGIT抗体将特别有效地促进T细胞活性。显著的是,该组合提供了T细胞活性的协同(即高于加和)提高。

[0311] 因此,在某些实施方案中,促进T细胞活性的方法还包括使T细胞群与抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗41BB抗体、抗OX40抗体、抗GITR抗体和抗ICOS抗体中的一种或多种接触。

[0312] 本文描述的但不脱离本发明的精神和范围的本发明实施方案的变型方案和等效方案将是技术人员熟悉的。将参考以下非限制性实施例进一步理解本发明。

[0313] 实施例

[0314] 实施例1:TIGIT抗原结合蛋白的选择

[0315] TIGIT ABP选自以IgG形式在酵母细胞表面上表达并呈递的人抗体的合成文库,通常如例如WO2009036379;WO2010105256;WO2012009568;以及Xu等,Protein Eng Des Sel.,第26(10)卷,第663-670页(2013)中所述,更具体地如下文所提供的。图1至图6中提供了从重组文库分离的ABP的序列和特征。

[0316] 如先前所述,使八个各具有 $\sim 10^9$ 多样性的原初人合成酵母文库增殖(参见例如,Xu等,2013;WO2009036379;WO2010105256和WO2012009568)。对于前两轮选择,如所述(参见例如Siegel等,2004),进行利用Miltenyi MACS系统的磁珠分选技术。简单地说,将酵母细胞(约 $\sim 10^{10}$ 个细胞/文库)与生物素化TIGIT-Fc抗原(Creative Biomart)在FACS洗涤缓冲液(磷酸盐缓冲盐水(PBS)/0.1%牛血清白蛋白(BSA))中一起孵育。用50mL冰冷的洗涤缓冲液洗涤一次后,使细胞沉淀重悬于40mL洗涤缓冲液中,并将链霉亲和素微珠(Streptavidin MicroBead)(500 μ l)添加到酵母中并在4°C下孵育15分钟。接下来,使酵母沉淀,重悬于5mL洗涤缓冲液中,并上样到Miltenyi LS柱上。上样5mL后,将柱用3mL FACS洗涤缓冲液洗涤3次。然后从磁场中取出该柱,用5mL生长培养基洗脱酵母,然后使其生长过夜。使用流式细胞术进行以下轮次的分选。将大约 1×10^8 个酵母沉淀,用洗涤缓冲液洗涤三次,并在室温下在平衡条件下与生物素化TIGIT-Fc融合抗原(10nM)一起孵育。然后将酵母洗涤两次并用LC-FITC(1:100稀释)和SA-633(1:500稀释)或EA-PE(1:50稀释)二级试剂在4°C下染色15分钟。用冰冷的洗涤缓冲液洗涤两次后,将细胞沉淀重悬于0.4mL洗涤缓冲液中并转移至盖有过滤器的分选管中。使用FACS ARIA分选器(BD Biosciences)进行分选,并分配分选门以选择相对于背景对照的特异性结合物。采用随后几轮的选择以减少利用来自CHO细胞的可溶性膜蛋白的非特异性结合物的数量(参见,例如,WO2014179363和Xu等,Protein Eng Des Sel.,第26(10)卷,第663-670页(2013)),并使用TIGIT-Fc抗原鉴定对TIGIT具有改善的亲和力的结合物。在最后一轮分选后,将酵母铺板并挑选个体菌落用于表征和指定用于亲和纯化的克隆。针对功能活性对63个克隆进行筛选。根据筛选,克隆26518、26452、26486、26521

和26493具有最佳功能活性，并被选择用于进一步优化。

[0317] 实施例2:抗体优化

[0318] 使用三种成熟化策略进行原初克隆的优化:轻链多样化;HCDR1和HCDR2的多样化;以及在所选HCDR1和HCDR2多样性库(pool)内的HCDR3多样化。

[0319] 轻链多样化:从原初输出物(如上所述)中提取重链可变区并将其转化到多样性为 1×10^6 的轻链文库中。如上所述进行选择,进行一轮MACS分选和三轮FACS分选,对各轮使用10nM或1nM生物素化TIGIT-HIS抗原(Creative Biomart)。

[0320] HCDR1和HCDR2选择:将来自轻链多样化程序选择的克隆的HCDR3重组到具有多样性为 1×10^8 的HCDR1和HCDR2变体的预制文库中,并使用单体HIS-TIGIT抗原进行选择。通过在室温下在平衡条件下使用递减浓度的生物素化HIS-TIGIT抗原(100至1nM)来施加亲和压力。

[0321] HCDR3/HCDR1/HCDR2选择:从IDT订购寡核苷酸,其包含HCDR3以及HCDR3每一侧的同源侧翼区。通过在整个HCDR3上以每个寡核苷酸两个位置的NNK多样性,使HCDR3中的氨基酸位置有差异(variegated)。使用与HCDR3的侧翼区退火的引物将HCDR3寡核苷酸双链化。重链可变区的剩余FWR1至FWR3从具有改善的亲和力的抗体库中扩增,所述抗体是从上文所选择的HCDR1和HCDR2多样性中分离的。然后通过将双链HCDR3寡核苷酸、FWR1至FWR3合并片段和重链表达载体转化到已含有初始原初亲本的轻链的酵母中来产生文库。如使用FACS分选的先前循环期间那样进行四轮选择。对于每轮FACS,评估文库的PSR结合、物种交叉反应性和亲和压力,并进行分选以获得具有所需特征的群体。如上所述在HCDR1和HCDR2选择中进行这些选择的亲和压力。

[0322] 实施例3:抗体产生和纯化

[0323] A.在酵母中产生

[0324] 为了产生足够量的优化和未优化的所选抗体用于进一步表征,使酵母克隆生长至饱和,然后在30°C下在振荡下诱导48小时。诱导后,使酵母细胞沉淀,收获上清液用于纯化。使用蛋白A柱纯化IgG,并用pH 2.0的乙酸洗脱。通过木瓜蛋白酶消化产生Fab片段,并在蛋白A(GE LifeSciences)和KappaSelect(GE Healthcare LifeSciences)的两步过程中纯化。

[0325] B.在哺乳动物细胞中产生

[0326] 为了产生足够量的优化和未优化的所选抗体用于进一步表征,产生编码特定抗体克隆的DNA载体并将其转导到HEK细胞中。在Geneart订购抗体可变结构域的人密码子优化的合成DNA片段。将可变结构域序列无缝连接到含有小鼠Igκ信号序列和相应抗体类别的恒定区的pUPE表达载体中。通过限制性分析和DNA测序验证表达载体。对于瞬时转染,产生无内毒素DNA maxiprep(Sigma),并根据已建立的方案,在Freestyle培养基(ThermoFisherScientific)中将重链和轻链载体共转染至HEK293EBNA1细胞。转染后24小时添加Primatone(0.55%终体积)。转染后6天收获条件化培养基。通过Mabselect sureLX(GE Healthcare)亲和色谱法分批纯化抗体。用含有1M NaCl的PBS和PBS分两步洗涤结合的抗体。用20mM柠檬酸盐150mM NaCl pH3洗脱抗体,并用1/6体积的1M K2HP04/KH2P04 pH 8中和至约pH 7。

[0327] 接下来,使用在PBS中平衡的Superdex200柱通过凝胶过滤进一步纯化抗体。通过

NuPAGE分析级分,并合并含有抗体的级分。终产物经0,22 μ M注射器过滤器灭菌。通过NuPAGE分析产物,并通过LAL测定测量内毒素水平。

[0328] 实施例4:抗TIGIT抗体与重组人TIGIT蛋白结合的亲和力测定

[0329] A.ForteBio K_D 测量

[0330] 通常如先前所述进行所选抗体的ForteBio亲和力测量(参见,例如,Estep等,Mabs,第5(2)卷,第270-278页(2013))。简单地说,通过将IgG联机上样到AHQ传感器上来进行ForteBio亲和力测量。将传感器在测定缓冲液中脱机平衡30分钟,然后联机监测60秒以进行基线建立。将具有上样的IgG的传感器暴露于100nM抗原(人TIGIT-Fc、人TIGIT-His或食蟹猴TIGIT-Fc)5分钟,然后将它们转移至测定缓冲液5分钟以进行解离速率测量。使用1:1结合模型分析动力学。通过ForteBio测试了超过90种抗体的亲和力,表3提供了15种所选抗TIGIT抗体的数据,证明了与重组TIGIT蛋白的强烈结合。

[0331] B.MSD-SET K_D 测量

[0332] 通常如先前所述(Estep等,Mabs,第5(2)卷,第270-278页(2013))进行所选抗体的平衡亲和力测量。简单地说,在PBS+0.1%无IgG的BSA(PBSF)中进行溶液平衡滴定(SET),其中抗原(TIGIT-His单体)保持恒定为10至100pM,并与3至5倍连续稀释的Fab或mAb(始于10pM至10nM)一起孵育。将抗体(在PBS中20nM)涂到标准结合MSD-ECL板上,在4°C下过夜或在室温下30分钟。然后将板在700rpm振荡下用BSA封闭30分钟,然后用洗涤缓冲液(PBSF+0.05%吐温20(Tween 20))洗涤三次。施加SET样品并在700rpm振荡下在板上孵育150秒,然后洗涤一次。通过在板上孵育3分钟,用PBSF中的250ng/mL sulfotag标记的链霉亲和素检测板上捕获的抗原。将板用洗涤缓冲液洗涤三次,然后使用具有表面活性剂的1x读数缓冲液T在MSD Sector Imager 2400仪器上读数。在Prism中根据滴定抗体的变化对游离抗原百分比作图,并拟合二次方程以提取 K_D 。为了提高处理量,在整个MSD-SET实验(包括SET样品制备)中使用液体处理机器人。通过MSD测试所选抗体的亲和力,表4提供7种抗TIGIT克隆的数据,证明与重组TIGIT蛋白的强烈结合。

[0333] 表4:对所选抗TIGIT抗体亲和力的MSD分析

克隆	MSD 亲和力 单价 K_D (M)人 TIGIT-His
29489	1,1E-10
29494	7,0E-11
29499	1,9E-11
29513	2,5E-11
29520	2,1E-10
29523	1,7E-09
29527	6,4E-10

[0335] C.Biacore测量

[0336] 在25°C下,在HBS-EP缓冲体系(10mM HEPES pH 7.3,150mM NaCl,3mM EDTA,0.05%表面活性剂P20)中,使用与CM5传感器芯片对接的Biacore 8K光学生物传感器(GE Healthcare,Marlboro,MA)进行生物传感器分析。将样品集(sample hotel)保持在8°C下。

使用标准胺偶联化学将山羊抗人 IgG 捕获抗体 (特异性Fc γ 片段, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; 109-005-098) 固定 (11700+/-200RU) 至传感器芯片的两个流动池。该表面类型提供了在每个再生步骤后可重复捕获新鲜分析抗体的形式。流动池2用于分析捕获的抗体 (60-90RU) , 而流动池1用作参考流动池。在运行缓冲液中制备30至0.123nM (3倍稀释) 的抗原浓度。每种抗原样品浓度作为单次重复运行。还运行两次空白 (缓冲液) 注射并用于评估和减去系统假像 (artefact)。所有抗原浓度的缔合 (300秒) 和解离 (600秒) 阶段以30uL/分钟的流速进行。通过以30uL/分钟的流速三次连续注射 (15秒、15秒和60秒) 10mM甘氨酸 (pH 1.5) 再生表面。使用Biacore 8K评估软件1.0版对数据进行比对、双重参考并拟合成1:1结合模型。通过Biacore测试所选抗体的亲和力, 表5提供5个抗TIGIT克隆的数据, 证明与重组TIGIT蛋白的强烈结合。

[0337] 表5: 对所选抗TIGIT抗体亲和力的Biacore分析

克隆	Biacore: 单价 KD (M) (CM5 芯片上的 IgG, 溶液中的人 TIGIT-HIS (起始浓度 25nM, 3x 稀释))
[0338]	29489 2,48E-10
	31282 2,94E-10
	29494 2,70E-10
	29520 7,16E-10
	29527 1,20E-09
	31288 1.92E-10

[0339] 实施例5: 抗TIGIT抗体和TIGIT天然配体之间的竞争测定

[0340] A. Octet Red384表位重新分级 (Epitope Binning) /配体阻断

[0341] 使用标准夹心形式交叉阻断测定进行所选抗体的表位重新分级/配体阻断。将对照抗靶标IgG上样到AHQ传感器上, 并用不相关的人IgG1抗体阻断传感器上未被占据的Fc结合位点。然后将传感器暴露于100nM靶抗原 (hTIGIT, Creative Biomart) , 接着暴露于第二抗靶标抗体或配体 (抗TIGIT抗体和CD155或CD113或CD112) 。使用ForteBio的数据分析软件7.0处理数据。抗原结合后第二抗体或配体的另外结合表明有未被占据的表位 (非竞争物) , 而无结合则表明表位阻断 (竞争物或配体阻断)。测试亲本抗体 (优化前) 与天然配体的竞争, 表6汇总了针对CD155、CD112和CD113竞争所获得的数据。发现亲本克隆26432不与CD155竞争结合TIGIT。所有其它所选抗TIGIT抗体与天然配体竞争结合重组人TIGIT蛋白。

[0342] 表6: 未优化的抗TIGIT抗体的针对TIGIT天然配体的重新分级分析

克隆	CD155 竞争	CD112 竞争	CD113 竞争
26518	是	是	是
26452	是	是	是

	26486	是	是	是
[0344]	26521	是	是	是
	26493	是	是	是
	26432	否		

[0345] B. 在Jurkat-hTIGIT上抗TIGIT拮抗性抗体与CD155的竞争

[0346] 收集过表达人TIGIT的Jurkat细胞 (Jurkat-hTIGIT) ,按 10^5 个细胞/孔分配,并在37°C下在完全培养基中与以下浓度的抗人TIGIT抗体一起孵育45分钟:166,6;53,24;17,01;5,43;1,73;0,55;0,17;0,05;0,01;5,78 $\times 10^{-3}$;1,85 $\times 10^{-3}$;5,9 $\times 10^{-3}$ nM。洗涤过量的抗体,然后将细胞与5 μ g/ml的CD155-His (Creative Biomart, PVR-3141H) 在37°C下孵育45分钟。然后,使用抗His标签-PE (Biolegend, 362603,每次测试2 μ l) 检测结合的CD155-His,在4°C下孵育30分钟。使用BD LSRIFortessa通过FACS分析细胞,并基于几何平均荧光计算防止CD155结合的半数浓度(IC_{50})。

[0347] 结果如下:对于克隆29489而言为0,101nM;对于克隆29494而言为0,07nM;对于克隆29520为0,102nM,并且对于克隆29527为0,078nM,结果在图7中示出。测试的其它抗体的值汇总在下表7中。总之,该结果证明测试的拮抗性抗TIGIT抗体与CD155强烈竞争结合膜表达的TIGIT。

[0348] 表7:关于TIGIT的CD155竞争的 IC_{50} 数据

[0349]	克隆	CD155竞争结合TIGIT的 IC_{50} (nM)
	29489	0,101
	29494	0,070
	29499	0,103
	29513	0,094
	29520	0,102
	29523	0,079
	29527	0,078

[0350] 实施例6:疏水相互作用色谱的表征 (MAbs. 2015年5-6月; 7(3):553-561)

[0351] 使用Zeba 40kDa 0.5mL离心柱 (Thermo Pierce, 目录号87766) 将抗TIGIT IgG1抗体样品缓冲交换为pH 6.5的1M硫酸铵和0.1M磷酸钠。在Dionex ProPac HIC-10柱上建立盐梯度,从1.8M硫酸铵,0.1M磷酸钠(pH 6.5)到不含硫酸铵的相同条件。该梯度以0.75ml/分钟的流速运行17分钟。在运行结束时添加乙腈洗涤步骤以去除任何残余的蛋白质,并在下一个注射循环之前将柱用7个柱体积重新平衡。在A280吸光度下监测峰保留时间,并基于梯度和流速计算洗脱时的硫酸铵浓度。表8汇总了对于15种所选抗TIGIT抗体获得的结果。

[0352] 表8:所选抗TIGIT抗体的疏水相互作用色谱分析

[0353]	克隆	疏水相互作用色谱 (HIC) 保留时间 (分钟)
	26518	10,4
	29478	12,7
	26452	9,3
	29487	9,9

29489	10,6
26486	11,0
29494	9,7
29499	9,1
26521	12,4
29513	12,5
26493	8,8
29520	9,6
29523	8,7
29527	8,6
26432	11,1
32919	9,0
32931	9,3
32959	12,0

[0354] 实施例7:多特异性试剂PSR制剂的表征

[0355] A.多特异性试剂的制备:

[0356] 根据Xu等,mAbs 2013制备多特异性试剂(PSR)。简单地说,使用2.5升CHO-S细胞作为原材料。使细胞在填充至400mL的500mL离心瓶中以2,400x g沉淀5分钟。合并细胞沉淀,然后使其重悬于25ml缓冲液B中,并以2,400x g沉淀3分钟。倾析缓冲液并重复洗涤一次。使用polytron匀化器使细胞沉淀重悬于3x沉淀体积的含有1x蛋白酶抑制剂(Roche, c0mplete, 无EDTA)的缓冲液B中,将细胞保持在冰上。然后将匀浆以2,400x g离心5分钟,保留上清液并再沉淀一次(2,400x g/5分钟)以确保去除未破碎的细胞、细胞碎片和细胞核;所得上清液是总蛋白制剂。然后将上清液转移到两支Nalgene Oak Ridge 45mL离心管中,并在4°C以40,000 x g沉淀40分钟。然后将含有分离的细胞溶质蛋白(SCP)的上清液转移到干净的Oak Ridge管中,再以40,000x g离心一次。并行地,保留含有膜级分(EMF)的沉淀,并以40,000离心20分钟以去除残留的上清液。然后用缓冲液B冲洗EMF沉淀。然后将8mL缓冲液B添加到膜沉淀中以移出沉淀并转移到Dounce匀化器中。在沉淀匀化后,将它们转移到50mL锥形管中并且代表最终的EMF制剂。

[0357] 将~ 10^6 - 10^7 个细胞/mL的10亿哺乳动物细胞(例如CHO、HEK293、Sf9)从组织培养环境中转移到4x250mL锥形管中,并以550x g沉淀3分钟。所有后续步骤均用冰冷的缓冲液在4°C下或在冰上进行。用100mL PBSF(1x PBS+1mg/mL BSA)洗涤细胞,并合并到一支锥形管中。去除上清液后,然后使细胞沉淀重悬于30mL缓冲液B(50mM HEPES、0.15M NaCl、2mM CaCl2、5mM KC1、5mM MgCl2、10%甘油,pH 7.2)中,并以550x g沉淀3分钟。倾析缓冲液B上清液,使细胞重悬于3x沉淀体积的缓冲液B加上2.5x蛋白酶抑制剂(Roche, c0mplete, 无EDTA)中。从此处开始包括缓冲液B中的蛋白酶抑制剂。将细胞匀化4次,每次30秒脉冲(Polyton匀化器,PT1200E),并将膜级分在4C下以40,000x g沉淀1小时。用1mL缓冲液B冲洗沉淀;保留上清液并代表s。将沉淀转移到具有3mL缓冲液B的Dounce匀化器中,并通过缓慢上下移动研棒30-35次使其重悬。将富集的膜级分(EMF)移入新的收集管中,冲洗研棒以收集所有可能的蛋白质。使用Dc-蛋白测定试剂盒(BioRad)测定纯化的EMF的蛋白浓度。为了

溶解EMF,转移到增溶缓冲液(50mM HEPES、0.15M NaCl、2mM CaCl₂、5mM KC₁、5mM MgCl₂、1% 正十二烷基-β-D-麦芽吡喃糖苷(DDM)、1x蛋白酶抑制剂, pH 7.2)中达到终浓度为1mg/mL。将混合物在4°C旋转过夜,然后在50mL Oak Ridge管(Fisher Scientific, 050529-ID)中以40,000x g离心1小时。收集代表可溶性膜蛋白(SMP)的上清液,并如上所述对蛋白产率进行定量。

[0358] 对于生物素化,根据制造商的方案(Pierce, Thermo Fisher)制备NHS-LC-生物素原液。简单地说,每1mg EMF样品添加20ul生物素试剂,并在轻轻搅拌下于4°C下孵育3小时。用缓冲液B将体积调节至25mL并转移至Oak Ridge离心管中。将生物素化EMF(b-EMF)以40,000x g沉淀1小时,并在不干扰沉淀的情况下用3mL缓冲液C(缓冲液B减去甘油)冲洗两次。去除残留溶液。如前所述,用Dounce匀化器使沉淀重悬于3mL缓冲液C中。重悬的沉淀现在代表生物素化EMF(b-EMF),并如上所述溶解以制备b-SMP。

[0359] B.PSR结合分析

[0360] 通常如WO2014/179363中所述进行PSR分析。简单地说,为了表征在酵母上呈递的单克隆抗体的PSR谱,将200万个IgG呈递酵母转移到96孔测定板中并以3000x g沉淀3分钟以去除上清液。使沉淀重悬于50ul新鲜制备的b-PSR原液的1:10稀释液中,并在冰上孵育20分钟。用200ul冷PBSF洗涤细胞两次,并使沉淀重悬于50ul的次级标记混合物(Extravidin-R-PE、抗人LC-FITC和碘化丙啶)中。将该混合物在冰上孵育20分钟,然后用200ul冰冷的PBSF洗涤两次。使细胞重悬于100ul冰冷的PBSF中,并使用HTS进样器使板在FACS Canto(BD Biosciences)上运行。分析流式细胞术数据的R-PE通道中的平均荧光强度,并相对于适当的对照归一化以评估非特异性结合。表9汇总了针对15种所选抗TIGIT抗体获得的多特异性试剂结合的结果,其确认了大多数克隆的评分较低。

[0361] 表9:多特异性试剂的分析

克隆	多特异性试剂(PSR)评分(0-1)
26518	0,00
29478	0,01
26452	0,00
29487	0,01
29489	0,01
26486	0,00
29494	0,00
29499	0,10
[0362] 26521	0,00
29513	0,01
26493	0,00
29520	0,32
29523	0,12
29527	0,12
26432	0,00
31288	0.00
32919	0.00
32931	0.00

[0363]	32959	0.1
--------	-------	-----

[0364] 实施例8:来自健康人PBMC的免疫群体上TIGIT表达的表征

[0365] A.T细胞亚群上的TIGIT表达谱

[0366] 进行流式细胞术分析以评估从健康个体新鲜分离的PBMC中的免疫细胞亚群上的TIGIT表达。缀合的抗体购自Ebioscience/Thermo Fisher Scientific,BioLegend或BD Biosciences。使用经过滤的FACS缓冲液(PBS+2mM EDTA+0.1% BSA)和Brilliant Stain缓冲液(BD#563794)按照制造商的说明对细胞进行染色。在染色之前用适当的人FcBlock(BD#564220)封闭细胞,并在采集之前使用IC固定缓冲液(eBioscience#00-8222-49)固定。在FACS Fortessa(BD Biosciences)上进行采集,并用FlowJo软件(FlowJo,LLC)进行分析。在前向和侧向散射处对活细胞进行门控。门控以下的各种免疫细胞亚群:CD19⁺(B细胞)、CD3⁻CD19⁻CD14⁺(单核细胞)、CD3⁺TCRab⁻(TCRgd T细胞)、CD3⁺TCRab⁺(TCRab T细胞)、CD3⁻CD19⁻CD14⁻HLA-DR⁻CD56^{低/高}(NK细胞)、CD3⁻CD19⁻CD14⁻HLA-DR⁺(树突细胞)、CD3⁺TCRab⁺CD4⁺CD127^低CD25⁺(调节性T细胞)、CD3⁺TCRab⁺CD4⁺或CD8⁺CD45RO⁻CCR7⁺(CD4或CD8原初T细胞)、CD3⁺TCRab⁺CD4⁺或CD8⁺CD45RO⁺(记忆T细胞)以及CD45RO⁻CD62L⁻(效应T细胞)。

[0367] 如图8A和图8B所示,TIGIT优先在NK细胞、调节性T细胞和CD8记忆T细胞上表达。它在其它T细胞亚群上较少存在,其中低比例的原初T细胞显示出TIGIT表达。另外,TIGIT不在单核细胞、树突细胞和B细胞上表达(图8B)。这组数据与公布的数据一致(Yu等NI 2008和Wang等EJI 2015)。

[0368] 实施例9:抗TIGIT拮抗性抗体的细胞结合

[0369] A.抗TIGIT抗体与Jurkat-hTIGIT和Jurkat-mTIGIT的结合

[0370] 已使用用人TIGIT转导的Jurkat E6.1细胞 (Jurkat hTIGIT) 或小鼠TIGIT转导的Jurkat E6.1细胞 (Jurkat-mTIGIT) 测量人抗TIGIT抗体的亲和力。为了分析所选抗体对hTIGIT或mTIGIT的亲和力,每孔分配 10^5 个细胞,并与100nM单剂量的抗TIGIT抗体(表3)或与浓度递减(166,6;53,24;17,01;5,43;1,73;0,55;0,17;0,05;0,01;5,78 $\times 10^{-3}$;1,85 $\times 10^{-3}$;5,9 $\times 10^{-3}$ nM)的所选抗体一起孵育(图9)。将抗体与细胞在4°C下在FACS缓冲液中孵育20分钟。洗涤后,将细胞与抗人Ig (Fc γ 特异性) -PE (eBioscience, 12-4998-82, 2,5 μ g/ml) 在冰上孵育20分钟并洗涤两次。使用LSR BD Fortessa分析几何平均荧光强度。对于每种抗体,将细胞结合记录为与未转染的细胞系相比,转染细胞系上PE的中值荧光强度(表3)。为了计算EC₅₀结合,在Prism中使用四变量曲线拟合方程计算与hTIGIT-Jurkat的半数最大结合浓度(EC₅₀),并且获得的值如下:对于克隆29489而言为0,082nM;对于克隆29494而言为0,07nM;对于克隆29520而言为0,119nM并且对于克隆29527而言为0,05nM,数据在图9中所示。结果证明所测试的抗TIGIT抗体与膜表达的人TIGIT强烈结合。

[0371] B. 抗TIGIT拮抗性抗体与人原代T细胞的结合

[0372] 分析来自健康志愿者的分离的人PBMC与拮抗性抗TIGIT抗体的结合。按每孔5 $\times 10^5$ 个细胞来分配细胞。将细胞与抗CD16(克隆3G8, BioLegend 302002)、CD32(克隆FLI8.26, BD Bioscience 557333)和CD64(BD Bioscience 555525)在室温下孵育10分钟,并且直接添加指定的抗人TIGIT抗体,在FACS缓冲液中的终浓度如下:12,65;4,1,26;0,40;0,126;0,040;0,12和4 $\times 10^{-3}$ nM,并在4°C下孵育20分钟。洗涤后,将细胞与抗人Ig (Fc γ 特异性) -PE (eBioscience, 12-4998-82, 2.5 μ g/ml) 在4°C下孵育20分钟。然后,针对图10A和图10B的结果,洗涤细胞并与以下抗体和LVD混合物一起孵育:抗CD4-PercP-Cy5.5(克隆A161A1, BioLegend 357414);抗CD8-BV510(克隆SK1, BD Bioscience 563919)和LVD efluor 520(eBioscience 65-0867-14)。对于图10C,洗涤细胞并与以下抗体和LVD混合物一起孵育:LVD efluor 520(eBioscience 65-0867-14)、抗TCRab-PercP-Cy5.5(克隆IP26, Biolegend 306723)、抗CD4-BV510(克隆SK3, BD Horizon 562970)、抗CD8-APC-Cy7(克隆SK1, Biolegend 344714)、抗CD25-BV605(克隆2A3, Biolegend 562660)、抗CD127-APC(A019D5, Biolegend 351316)、抗CCR7-BV421(克隆G043H7, Biolegend 353207)和抗CD45RO-PE-Cy7(克隆UCHL1, Biolegend 304229)。

[0373] 使用门控LVD⁻CD8⁺T细胞上阳性TIGIT染色细胞的%来计算与CD8⁺人原代T细胞结合的EC₅₀值(图10A和图10B)。使用门控LVD⁻TCRab⁺CD45RO⁺CD8⁺T细胞(对于记忆CD8⁺T细胞)或门控LVD⁻TCRab⁺CD127^{lo}CD25^{hi}CD4⁺T细胞(对于Treg)上阳性TIGIT染色细胞的%计算与人记忆CD8⁺或Treg原代T细胞结合的EC₅₀值,并且示出在图10C中。

[0374] 如图10A所示,与总人CD8⁺T细胞结合的EC₅₀值如下:对于克隆29489而言为0,123nM;对于克隆29520而言为0,181nM,并且对于克隆29527而言为0,253nM。进行了29489和31282(在残基116上具有M至T的突变的29489突变体)之间的直接比较,并且EC₅₀值分别为0,057nM和0,086nM,证明这2种克隆对于人原代CD8⁺T细胞具有强而相似的结合功效(图10B)。获得的与记忆CD8⁺T细胞和Treg结合的EC₅₀值分别为0,039nM和0,03nM,证明对两个群体具有强而相似的亲和力(图10C)。

[0375] C. 抗TIGIT拮抗性抗体与食蟹猴原代T细胞的结合

[0376] 来自食蟹猴(*Macaca fascicularis*)的分离的PBMC获自BioPRIM。将细胞解冻并使

用用于非人灵长类动物的T细胞活化/扩增试剂盒(Miltenyi Biotec)按照制造商的说明以1:2(珠粒:细胞比率)进行刺激。第二天,收集细胞,计数并以每孔 5×10^4 个细胞分配。将细胞与抗CD16(克隆3G8,BioLegend 302002)、CD32(克隆FLI8.26, BD Bioscience 557333)和CD64(BD Bioscience 555525)在室温下孵育10分钟,并且直接添加所选抗人TIGIT抗体,在FACS缓冲液中的终浓度如下:12,65、4、1,26、0,40、0,126、0,040、0,12和 4×10^{-3} nM,并在4℃下孵育20分钟。洗涤后,将细胞与抗人Ig(Fc γ 特异性)-PE(eBioscience,12-4998-82,2,5 μ g/ml)在4℃下孵育20分钟。然后,针对图11A和图11B中所示数据,洗涤细胞并与以下抗体和LVD混合物一起孵育:抗CD4-PercP-Cy5.5(克隆A161A1,BioLegend 357414);抗CD8-BV510(克隆SK1,BD Bioscience 563919),CD69-APC-Cy7(克隆FN50,BioLegend,310914)和LVD eFluor 520(eBioscience 65-0867-14)。使用BD LSR Fortessa通过FACS分析染色的细胞。使用LVD⁻CD69⁺CD8⁺T细胞上门控的阳性TIGIT染色细胞的%计算结合的EC₅₀值。如图11所示,与食蟹猴CD8⁺T细胞结合的EC₅₀值如下:对于克隆29489而言为0,487nM,对于克隆29520而言为1,73nM并且对于克隆29527而言为0,378nM。还对克隆29489和31282(在残基116上具有M至T的突变的29489突变体)进行了比较,EC₅₀值分别为0,25nM和0,26nM,如图11B中所示,证明这2种克隆对食蟹猴原代CD8⁺T细胞具有相似且强的亲和力。

[0377] 实施例10:拮抗性抗TIGIT活性的体外功能表征

[0378] A. 对CHO-TCR-CD155和Jurkat-hTIGIT共培养物的TIGIT生物测定

[0379] 为了表征阻断人TIGIT受体的功能后果,我们将表达hTIGIT和在TCR接合时活化的荧光素酶报告蛋白的Jurkat细胞(来自Promega的解冻使用的TIGIT效应细胞)和经工程改造以表达人CD155和TCR活化物的CHO-K1细胞系(来自Promega的解冻使用的CD155 aAPC/CHO-K1)共培养。过表达TIGIT的Jurkat细胞的活化可以通过在Jurkat细胞上在TCR接合时与表达CD155的CHO-K1细胞的接触来诱导,并且可以在拮抗性抗TIGIT抗体的存在下增加。为了比较不同抗体增加Jurkat细胞活化的效力,在递增的抗体浓度存在下进行实验并计算EC₅₀值。

[0380] 根据制造商的建议,接种解冻使用的CD155 aAPC/CHO-K1(Promega,CS198811)细胞,并在37℃下在5%CO₂培养箱0/N中孵育。第二天,根据制造商的建议,将解冻使用的TIGIT效应细胞(Promega,CS198811)添加到含有新鲜完全培养基的CD155 aAPC/CHO-K1细胞板中并在37℃、5%CO₂下孵育6小时,新鲜完全培养基具有133nM的抗TIGIT抗体(图12A)或递增浓度(0,22,0,54,1,36,3,41,8,53,21,3,53,3,133,33和333nM)的抗TIGIT抗体(图12B)。

[0381] 孵育6小时后,通过使用Bio-GloTM荧光素酶测定系统(Promega,G7941)测量荧光素酶活性来评估TIGIT效应细胞的活化。

[0382] 图12A显示与同种型对照相比,添加所选克隆对荧光素酶信号的影响。数据证明了那些导致Jurkat-hTIGIT细胞更强活化的抗体的拮抗活性。表10汇总了相对于同种型对照克隆(03847),对于不同抗TIGIT抗体获得的荧光素酶表达的倍数变化诱导。

[0383] 表10:相对于同种型对照的倍数变化诱导

克隆名称		相对应同种型对照的诱导 (倍数变化)
[0384]	26518	2,89
[0385]	29478	3,57
	26452	2,9
	29487	3,22
	29489	4,08
	26486	1,9
	29494	3,42
	29499	3,68
	26521	2,66
	29513	3,26
	26493	0,96
	29520	2,52
	29523	2,4
	29527	2,96
	03847	1

[0386] 如图12B所示,用0,22nM至333nM的抗TIGIT抗体评估Jurkat-hTIGIT细胞活化,给出了以下EC₅₀值:对于克隆29489而言为3,0nM;对于克隆29494而言为4,4nM;对于克隆29520而言为2,3nM并且对于克隆29527而言为32nM;对于克隆32919而言为2,7nM且对于克隆32931为3,2nM,证明了连续阻断TIGIT抑制信号传导的强功能活性。还比较了克隆29489和31282(在残基116上具有M至T的突变的29489突变体),EC₅₀值分别为4.3nM和8.1nM,如图12C中所示,证明这2个克隆的相似功能活性。

[0387] B. 基于人原代CD8⁺T细胞的功能测定

[0388] 为了表征阻断人TIGIT受体的功能后果,我们将来自健康人供体的PBMC的人原代CD8⁺T细胞与经工程改造以表达人CD155和活化人T细胞的CHO-K1细胞系共培养。我们观察到,通过用抗TIGIT拮抗性抗体阻断hTIGIT,可以增加在经工程改造的表达CD155的CHO-K1细胞的存在下CD8⁺T细胞的IFNg释放。为了比较这些抗体增加IFNg释放的效力,在递增的抗体浓度存在下进行实验并计算EC₅₀值。

[0389] 根据制造商的建议将解冻使用的CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) 细胞接种在U形底96孔板中,并在37°C下在5%CO₂培养箱0/N中孵育。第二天,根据制造商的建议,通过使用阴性选择试剂盒 (Stemcell Technologies, 17953) 从分离自健康供体全血的冷冻人外周血单核细胞 (Immunehealth) 中纯化CD8⁺T细胞。然后将纯化的CD8⁺T细胞与递增浓度(0,11nM,0,33nM,1,06nM,3,3nM,10,6nM,33,3nM,105,5nM和333nM)的抗体(100,000个CD8⁺T细胞/100u1含有抗体的完全培养基)一起孵育1小时。之后,将抗体-CD8混合物添加到含有50μl新鲜完全培养基的CD155aAPC/CHO-K1细胞板中,并在37°C、5%CO₂下孵育5天。最后,使用根据制造商的建议进行的ELISA测定 (Affymetrix eBioscience, 88-7316-86) 评估细胞上清液中的IFNg浓度。

[0390] 如图13A所示,与同种型对照相比,所有抗TIGIT抗体均增加IFNg分泌。对于克隆

29489观察到最高的增加(6,4倍),然后是29494(5,8倍)、29520(5,4倍)、29499(5,2倍)、29527(4,5倍)和29513(3,2倍)。

[0391] 还进行了剂量范围研究(0,22nM至333nM的抗TIGIT抗体)以评估人原代CD8 T细胞的IFNg分泌增加的EC₅₀值。如图13B所示,抗TIGIT抗体29489显示出最佳活性,EC₅₀为3,5nM,接着是克隆29527EC₅₀=5,1nM)、克隆29494(EC₅₀=6,1nM)和克隆29520(EC₅₀=11,1nM)。最后,并行测试了克隆29489及其突变体31282,并证明了相似的活性,EC₅₀值分别为0,49nM和0,50nM(图13C)。总之,这些数据证明了拮抗性抗TIGIT抗体阻断CD8⁺人T细胞中的TIGIT抑制信号和提高效应子功能的强功能活性,如通过IFNg产生的强烈增加所表征的。

[0392] C. 人TIL功能测定

[0393] 为了表征阻断来自癌症患者的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)上的人TIGIT受体的功能后果,我们将来自卵巢腹水患者TIL的人原代CD8⁺T细胞与经工程改造以表达人CD155和活化人T细胞的CHO-K1细胞系共培养。我们观察到,通过用抗TIGIT拮抗性抗体阻断hTIGIT,可以增加在经工程改造的表达CD155的CHO-K1细胞的存在下CD8⁺T细胞的IFNg释放。

[0394] 根据制造商的建议将解冻使用CD155 aAPC/CHO-K1(Promega,CS198811)细胞接种在U形底96孔板中,并在37°C下在5%CO₂培养箱0/N中孵育。第二天,根据制造商的建议,通过使用阴性选择试剂盒(Stemcell Technologies,17953)从分离自卵巢腹水的冷冻的人TIL(Immunehealth)中纯化CD8 T细胞。然后将纯化的CD8⁺T细胞与抗TIGIT抗体克隆26452(克隆29489和31282的未优化亲本)(100,000个CD8⁺T细胞/100μl含有抗体的完全培养基)孵育1小时。之后,将抗体-CD8混合物添加到含有50ul新鲜完全培养基的CD155aAPC/CHO-K1细胞板中,并在37°C、5%CO₂下孵育5天。

[0395] 最后,使用根据制造商的建议运行的ELISA测定(Affymetrix eBioscience,88-7316-86)评估细胞上清液中的IFNg浓度。如图14中所见,当将抗TIGIT抗体添加至共培养物时,IFNg分泌增加几乎2倍。这些数据证明了拮抗性抗TIGIT抗体阻断CD8⁺人TIL中的TIGIT抑制信号和提高肿瘤环境中T细胞的效应子功能的强功能活性。

[0396] 实施例11:在小鼠中具有功能活性的抗TIGIT拮抗性抗体的表征

[0397] A. 替代抗TIGIT拮抗性抗体的小鼠CD155竞争测定

[0398] 对于该测定,使用经工程改造以过表达小鼠TIGIT(Jurkat-mTIGIT)的Jurkat细胞(克隆E6-1,ATCC TIB-152)。抗TIGIT抗体26493用作替代物,因为该抗体显示出对小鼠TIGIT的交叉反应性以及与人TIGIT的结合。在37°C下将细胞与不同浓度的抗TIGIT抗体克隆26493(0.03至10μg/ml)在25μl完全培养基(RPMI+10%FBS)中预孵育45分钟。将细胞洗涤一次,并在培养箱中与4μg/ml小鼠CD155-His-Fc标签蛋白(Thermo Fisher,50259M03H50)一起在50μl完全培养基中孵育45分钟。将细胞洗涤一次,并在4°C下用PE-抗His抗体(Biolegend,362603)染色30分钟。通过FACS测量的中值荧光强度(MFI)用作CD155与Jurkat-mTIGIT结合的量度。图15A显示抗TIGIT克隆26493对CD155竞争的剂量-响应曲线,确定IC₅₀为2,3nM(上方虚线代表来自同种型的信号,下方虚线代表来自没有CD155的细胞的信号)。这些结果证明了抗TIGIT抗体与CD155配体竞争小鼠TIGIT的功能功效。

[0399] B. 小鼠功能体外测定:抗原特异性细胞毒性(OT-I)

[0400] 为了评估OT-I CD8⁺T细胞对OVA脉冲靶细胞的抗原特异性细胞毒活性以及抗TIGIT抗体在该测定中的作用,通过机械解离从C57BL/6-Tg^(TcraTcrb)1100Mjb/Crl小鼠

(Charles River) 的脾分离OT1细胞,然后使用EasySepTM小鼠T细胞分离试剂盒 (Stemcell, 目录号19851) 对小鼠T细胞进行阴性选择。作为抗原呈递细胞,将天然表达CD155的Pan02癌细胞用丝裂霉素C (25 μ g/ml) 处理,随后用OVA-肽 (S7951-1MG, Sigma Aldrich, 1 μ g/ml, 在37 °C下1小时) 脉冲。将CD8⁺T细胞和Pan02在133nM的抗TIGIT克隆26493或同种型对照存在下共培养3天。在第3天,收集上清液用于通过ELISA检测IFNg (图15B) 和T细胞用于细胞毒性测定 (图15C)。使用OVA脉冲的Pan02作为靶细胞。根据制造商的说明,分别用CFSE (C1157, ThermoFisher) 和CellTraceTMFar Red细胞增殖试剂盒 (C34564, ThermoFisher) 标记靶细胞和未脉冲的Pan02细胞 (非靶标内部对照) (各1 \times 10⁶)。将这些细胞混合 (1:1比率) 并以每孔2 \times 10⁴个细胞铺板。以1 \times 10⁵个细胞/孔 (效应细胞) 添加经刺激的OT-1CD8⁺T细胞,在133nM的抗-TIGIT克隆26493或同种型对照存在下得到10:1的效应子与靶标比率。24小时后,用PBS洗涤细胞并通过胰蛋白酶消化提升细胞。然后将细胞用活/死的可固定紫色死细胞染色试剂盒 (Molecular Probes, L34955) 染色。然后通过流式细胞术监测活靶细胞与非靶细胞的比率变化来测量靶细胞的细胞毒性杀伤。

[0401] 图15B显示抗TIGIT抗体使IFNg产生增加几乎2倍,而图15C显示小鼠OT-1 CD8⁺T细胞的细胞毒活性增加约60%。总之,这些结果证实了抗TIGIT抗体提高小鼠CD8⁺T细胞效应子功能的功能活性。

[0402] 实施例12:单一疗法和与抗PD1抗体组合的抗TIGIT拮抗性抗体在小鼠模型中的抗肿瘤活性

[0403] A. 单一疗法的抗TIGIT拮抗性抗体的体内抗肿瘤活性

[0404] 对于该实验,在哺乳动物细胞中的小鼠IgG2a同种型上产生抗TIGIT克隆26493。对8周龄的雌性Balb/c小鼠皮下接种500,000个CT26结肠癌细胞 (ATCC® CRL-2638TM)。在接种后第9天,当肿瘤体积平均为45mm³左右时,将小鼠随机分组在具有相等肿瘤体积的处理组中 (每组n=8)。在第9天、第12天和第15天,通过腹膜内注射用200 μ g抗TIGIT或同种型对照 (mIgG2a, BioXcell),或用200 μ g抗PD-1 (RMP1-14, BioXcell) 和200 μ g同种型对照 (mIgG2a, BioXcell),或用200 μ g抗PD-1 (RMP1-14, BioXcell) 和不同浓度的抗TIGIT (200 μ g、60 μ g、20 μ g) 处理小鼠。监测肿瘤生长并从第9天到第36天每周三次用电子卡尺测量肿瘤体积。当肿瘤体积超过2000mm³时处死小鼠。通过线性混合模型统计分析肿瘤生长曲线。通过测试时间*处理组的相互作用来评估处理组之间的差异。为了测试抗TIGIT和抗PD-1之间的协同作用,通过两个变量的组合来对处理组进行记录;抗TIGIT (是/否) 和抗PD-1 (是/否)。除了每种处理的加性作用 (抗TIGIT*时间和抗PD-1*时间) 之外,还通过测试抗TIGIT*抗PD-1*时间的相互作用项来评估协同作用。

[0405] 图16A显示了每组的中值肿瘤生长曲线以及用单一疗法的抗TIGIT抗体处理的小鼠的个体生长曲线。虽然对照组中,没有小鼠的肿瘤消退,但是用抗TIGIT处理的2/8的小鼠具有完全响应。在其余小鼠中,存在明显的肿瘤生长延迟。在对照组中,没有小鼠存活超过30天,而在处理组中,7/8的小鼠存活超过30天。

[0406] 图16B显示了每组的中值肿瘤生长曲线以及用单一疗法或与抗TIGIT组合的抗PD1处理的小鼠的个体生长曲线。与抗PD-1单一疗法相比,用抗TIGIT+抗PD-1处理的小鼠中的肿瘤生长受到显著抑制 (p<0.0001)。抗TIGIT+抗PD-1的组合实现了协同抗肿瘤功效,其超过了两种单一疗法处理的加性作用 (p=0.02)。抗TIGIT (200 μ g) 与抗PD1抗体的组合导致7/

8的小鼠显示出完全响应。抗PD1和较低剂量的抗TIGIT的组合维持抗肿瘤功效,当抗TIGIT抗体减少至60 μ g时,8/8的小鼠实现完全反应,当抗TIGIT抗体进一步减少至20 μ g时,5/8的小鼠实现完全反应(图16C)。这些数据证明了单一疗法($p<0.0001$)或与抗PD1抗体组合($p<0.0001$)的抗TIGIT疗法用于治疗预先建立的肿瘤的显著抗肿瘤功效。

[0407] 实施例13:单一疗法和与抗PD1抗体组合的抗TIGIT拮抗性抗体在小鼠模型中的同种型依赖性抗肿瘤活性。

[0408] 对于该实验,在哺乳动物细胞中的小鼠IgG2a和小鼠IgG1同种型上产生抗TIGIT克隆26493。对8周龄的雌性Balb/c小鼠皮下接种500.000个CT26结肠癌细胞(ATCC®CRL-2638™)。在接种后第10天,当肿瘤体积平均为100 mm^3 左右时,将小鼠随机分组在具有相等肿瘤体积的处理组中(每组n=10)。为了评估单一疗法,在第10天、第13天和第16天通过腹膜内注射用200 μ g抗TIGIT或同种型对照(mIgG2a,BioXcel1)处理小鼠。为了评估与抗PD-1的组合,在第10天、第13天和第16天,通过腹膜内注射用200 μ g抗PD-1(RMP1-14,BioXcel1)和200 μ g同种型对照(mIgG2a,BioXcel1)或用200 μ g抗PD-1(RMP1-14,BioXcel1)和200 μ g抗TIGIT的组合处理小鼠。监测肿瘤生长,并且从第10天至第33天每周三次用电子卡尺测量肿瘤体积。当肿瘤体积超过2000 mm^3 时,处死小鼠。

[0409] 图17A显示了每组的中值肿瘤生长曲线以及用抗TIGIT抗体进行单一疗法的个体生长曲线,图17B显示了抗TIGIT和抗PD1抗体的组合疗法的个体生长曲线。在单一疗法和与抗PD-1的组合中,当作为小鼠IgG2a同种型施用时,用抗TIGIT抗体处理产生显著的抗肿瘤功效(分别为 $p=0.0001$ 和 $p=0.009$)。然而,用抗-TIGIT作为小鼠IgG1同种型未观察到抗肿瘤功效,这表明Fc受体与mIgG2a的相互作用对于鼠CT26模型中抗TIGIT拮抗性抗体的抗肿瘤活性很重要。这些数据证明了单一疗法或组合的抗TIGIT疗法用于治疗预先建立的肿瘤的同种型依赖性抗肿瘤功效。

[0410] 实施例14:抗TIGIT拮抗性抗体体内抗肿瘤活性作用机制的表征

[0411] A.脾脏和肿瘤的流式细胞术分析

[0412] 为了研究拮抗性抗TIGIT抗体的体内作用模式,用单一疗法和与抗PD-1组合的抗TIGIT抗体26493(IgG2a)处理后,通过流式细胞术分析肿瘤的免疫细胞浸润。如实施例12所述对小鼠进行接种和处理。第二次处理后两天,处死小鼠(每组8只小鼠)并收获肿瘤。用肿瘤解离试剂盒(Miltenyi Biotec)解离肿瘤。对于直接离体染色,在用活力染料(Molecular Probes,L34955)和Fc-block染色后,用抗CD45、抗CD4、抗CD8和抗FoxP3(均来自eBioscience)对细胞染色。对于离体刺激,将细胞与细胞刺激混合物(eBioscience)和蛋白质转运抑制剂(eBioscience)一起孵育3小时。在这之后用抗CD4和抗CD8抗体以及Fc-block染色。在用商用缓冲液(IC固定缓冲液和透化缓冲液)固定和透化后,将细胞用抗IL-10和抗IFNg(均来自eBioscience)染色。在所有图中,显示了与相关对照组(单一疗法的同种型对照,组合的抗PD-1)相比的百分比变化,其中负值表示与对照组相比减小,而正值表示增加。

[0413] 图18A显示用抗TIGIT mIgG2a抗体体内处理肿瘤导致CD4⁺TIL群体内调节性T细胞的比例与对照组相比降低28%,这在用抗TIGIT mIgG1处理后未观察到。这表明存在TIGIT⁺Treg细胞的耗竭,从而可能解释了如实施例14中讨论的两种同种型的差异性功效。图18B显示无CD8⁺TIL的耗竭,而是对于两种同种型观察到略微增加(mIgG1与对照相比增加17%,mIgG2a增加16%)。这些发现一起得出在用抗TIGIT mIgG2a处理的肿瘤中CD8/Treg比率增

加超过50% (图18C)。对于用抗TIGIT mIgG2a抗体处理的组,瘤内T细胞的功能也得到改善,CD4⁺ (图18D) 和CD8⁺TIL (图18E) 两者的IFNg产生强烈增加。这导致在CD4⁺TIL/CD8⁺群体中离体刺激后产生IFN-g的细胞/产生IL-10的细胞的比率强烈增加 (图18F)。

[0414] 图18G显示与抗PD-1单一疗法相比,将抗TIGIT mIgG2a与抗PD-1组合导致调节性T细胞减少33%。同样,对于CD8⁺T细胞,情况正好相反,与抗PD-1单一疗法相比,mIgG1和mIgG2a同种型的CD8⁺T细胞浸润分别增加22%和28% (图18H)。总之,对于与抗TIGIT mIgG2a的组合而言,这导致肿瘤中CD8⁺TIL与Treg比率增加超过两倍 (图18I)。另外,抗TIGIT抗体mIgG2a与抗PD-1组合处理展示出肿瘤内CD4⁺T细胞的Th1与Th2表型的转变,其中产生IFNg的CD4细胞明显增加 (图18J),而产生IL-10的CD4细胞减少 (图18K)。与用单一疗法的抗PD-1处理的小鼠相比,这导致在CD4⁺TIL群体中离体刺激后产生IFNg/IL-10的细胞强烈增加 (图18L)。

[0415] 表11:抗TIGIT mIgG2a和媒介物处理的小鼠之间差异性表达的基因

基因符号	Log2 倍数变 化	校正的 p-值
Ccr2	-1,29	0,0000668
Prf1	1,79	0,0000668
Ctsg	2,13	0,0000668
Ctla4	1,72	0,00309
Gzmb	1,51	0,00309
Ccl2	0,56	0,0174
Il2ra	1,61	0,0174
Cd55	1,64	0,0213
Il2rb	0,872	0,0379
Cd274	0,982	0,0385
Klrg1	1,3	0,0402
Icos	1,26	0,0402

Il1rn	0,87	0,0402
Cx3cr1	-0,82	0,0428
C1ra	0,896	0,0428
Cd33	-0,906	0,0479
Ccl4	0,886	0,0518

[0418] 表12:抗TIGIT mIgG2a+抗PD-1和抗PD1处理的小鼠之间差异性表达的基因

基因符号	Log2 倍数变化	校正的 p-值
Ctsg	2,34	0,0000375
Prf1	1,69	0,000255
Gzmb	1,71	0,000766
Cd55	2,08	0,00131
Entpd1	0,839	0,00131
Klrg1	1,76	0,00132
Itga1	0,874	0,0017
Ctla4	1,72	0,00173
Il2ra	1,82	0,00237
Itgb3	0,863	0,00237
Slc11a1	0,849	0,00329
Cd36	1,44	0,0049
Cd180	0,899	0,00602
Icam1	0,893	0,00802
Cd274	1,06	0,00993
[0419]	Cd40	0,926
	Eomes	1,28
	Abcg1	0,869
	Ccr2	-0,781
	Thy1	0,868
	Ccl2	0,501
	Gbp5	1,12
	Icos	1,24
	Tgfbr2	0,458
	H2 K1	0,292
	Sh2d1a	0,999
	Il2rb	0,808
	Selplg	0,64
	Bst1	0,702
	Cd247	1
	Irf8	0,699
	Il21r	0,899
	Gbp2b	1,11
	Stat1	0,865
	C4b	0,922
	Abca1	0,537
	Trem2	0,482

[0420]	Gbp2b	1,11	0,0392
	Stat1	0,865	0,0427
	C4b	0,922	0,0428
	Abca1	0,537	0,044
	Trem2	0,482	0,0454

[0421] B. 通过NanoString对肿瘤的转录组学分析

[0422] 为了研究抗TIGIT抗体的体内作用模式,通过转录组学分析(Nanostring)分析用单一疗法和与抗PD-1组合的抗TIGIT处理的肿瘤的免疫细胞浸润。如实施例12所述对小鼠

进行接种和处理。在用抗TIGIT和/或抗PD1抗体进行第三次处理后两天,处死小鼠并收获肿瘤。提取RNA并用nCounter技术(PanCancer免疫分析组,Nanostring;由VIB Nucleomics Core进行)直接定量选择的参与癌症免疫学的770个基因的表达。用nSolver软件(Nanostring)分析数据。

[0423] 图19A显示了在媒介物处理的小鼠与抗TIGIT mIgG2a处理的小鼠之间受差异性调控的基因的火山图。高度统计学显著的基因落在图的顶部,并且高度差异性表达的基因落到任一侧(左侧:在抗TIGIT处理的小鼠中下调,右侧:在抗TIGIT处理的小鼠中上调)。高度上调的基因的实例包括穿孔素(perforin)、颗粒酶B(granzyme B)和CTLA-4。实线表示未校正的p值为0.01,虚线表示校正的p值为0.05(Benjamini-Hochberg校正)。表11和表12分别显示了抗TIGIT mIgG2a与媒介物相比以及aPD-1+抗TIGIT mIgG2a与抗PD1相比,显著差异性表达的基因。当针对免疫细胞的功能亚群按评分汇总多个基因时,最显著的发现是细胞毒性细胞和CD8⁺T细胞评分的增加(图19B)。与单独的抗PD-1相比,用抗PD-1+抗TIGIT mIgG2a处理的小鼠中存在相同的变化。在用单一疗法或与抗PD-1组合的抗TIGIT mIgG1处理的小鼠中未观察到变化。

[0424] 总之,这些结果证明,用抗TIGIT抗体体内处理后观察到的抗肿瘤功效是由肿瘤中Treg浸润减少而CD8⁺效应T细胞群增加介导的。另外,提高了CD4⁺和CD8⁺TIL的效应子功能,如通过产生IFNg的细胞的比例更高,向Th1反应的转变和对T细胞细胞毒性功能重要的基因表达增加所示。

[0425] 实施例15:抗TIGIT拮抗性抗体诱导的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性

[0426] A.来自健康供体的人PBMC上的体外ADCC

[0427] 将来自健康人供体的分离的PBMC重悬于完全RPMI培养基(补充有10%热灭活的FBS+50U青霉素+50U链霉素,并补充有200IU IL-2/ml)中。在96U孔板中每孔分配2,5x10⁵个人PBMC。将在哺乳动物细胞中产生的抗人TIGIT抗体克隆26452或IgG1同种型对照(Biolegend,403102)以66,6,0,66和0,006nM的终浓度添加到每个相应的孔中。将细胞在37°C、5%CO₂下孵育20小时。然后收集细胞并用以下抗体组染色:LVD efluor 520(eBioscience 65-0867-14)、抗-TCRab-PercP-Cy5.5(克隆IP26,Biolegend 306723)、抗CD4-BV510(克隆SK3,BD Horizon 562970)、抗CD8-APC-Cy7(克隆SK1,Biolegend 344714)、抗CD25-BV605(克隆2A3,Biolegend 562660)、抗CD127-APC(A019D5,Biolegend 351316)、抗CCR7-BV421(克隆G043H7,Biolegend 353207)和抗CD45R0-PE-Cy7(克隆UCHL1,Biolegend 304229)。呈现了门控活细胞上的结果。CD45⁺CD4⁺或CD45⁺CD8⁺代表总CD4⁺或CD8⁺T细胞。CD45⁺RO⁺CD4⁺或CD45⁺RO⁺CD8⁺细胞代表记忆CD4⁺或CD8⁺T细胞,而CD25^{hi}CD127^{low}CD4⁺代表Treg细胞。如图20A所示,门控Treg上TIGIT⁺细胞的比例高于在门控记忆CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞上的比例。

[0428] 使用AccuCheck计数珠粒(Life technologies)按照制造商的说明进行绝对定量。在计算每μl的绝对细胞数后,使用以下公式计算特异性裂解的% = (1 - (26452TIGIT抗体处理的样品上每μl的绝对细胞数/无抗体处理的一式三份的平均值)) × 100。如图20B所示,抗TIGIT 26452hIgG1抗体对Treg触发的特异性裂解(62.22%)高于总CD8⁺T细胞(12.2%)或总CD4⁺T细胞(16.36%)。

[0429] B.小鼠肿瘤上的离体ADCC

[0430] 为了证实抗TIGIT小鼠IgG2a抗体可耗竭TIGIT⁺调节性T细胞,建立了离体ADCC测定。对8周龄的雌性Balb/c小鼠皮下接种500.000个CT26结肠癌细胞(ATCC® CRL-2638TM)。接种三周后,收获肿瘤并用肿瘤解离试剂盒(Miltenyi Biotec)解离。将单细胞悬浮液与133nM抗TIGIT抗体26493(mIgG1或mIgG2a同种型)一起孵育20小时(在RPMI+10%FBS中1百万个细胞/200μl)。20小时后,在用活力染料(Molecular Probes,L34955)和Fc-block染色后,用抗CD4、抗TIGIT、抗CD8和抗FoxP3抗体(均来自eBioscience)对细胞染色。

[0431] 图21显示对于不同的TIGIT⁺免疫亚群,与同种型对照处理相比绝对TIGIT⁺细胞计数的%降低。在调节性T细胞中显而易见用抗TIGIT mIgG2a抗体处理后的最强降低(降低40%左右),表明这些细胞比常规CD4⁺或CD8⁺T细胞更易受ADCC影响。

[0432] 总之,这些结果证明了抗TIGIT hIgG1或mIgG2a耗竭TIGIT⁺免疫细胞的功效,在Treg群体上展现出更强的活性。

[0433] 实施例16:使用计算机分析的免疫原性预测

[0434] 使用EpiMatrix蛋白质评分(De Groot等,(2009)Clinical Immunol 131:189)通过计算机预测评估克隆29494和29489及其变体31282的免疫原性潜力。为了完成该分析,将输入序列解析为重叠的9聚体框架,并且关于一组八个常见的II类HLA等位基因评估每个框架。这些等位基因是“超类型”。每一个在功能上与许多其它等位基因“家族成员”等效或几乎等效。总的来说,这八个超类型等位基因及其各自的家族成员“覆盖”了超过95%的人口(Southwood等,(1998)J. Immunol 160:3363)。每个框架逐个等位基因的“评估”陈述了预测的HLA结合亲和力。EpiMatrix评估评分范围为约-3至+3,并且是正态分布的。EpiMatrix评估评分高于1.64定义为“命中”;也就是说,具有潜在免疫原性并值得进一步考虑。

[0435] 在所有其它因素相同的情况下,给定蛋白质中所含的HLA配体(即EpiMatrix命中)越多,蛋白质诱导免疫响应的可能性越大。EpiMatrix蛋白质评分是预期会在给定大小的蛋白质中发现的预测T细胞表位的数目与EpiMatrix系统预测的推定表位的数目之间的差异。EpiMatrix蛋白质评分与观察到的免疫原性相关。EpiMatrix蛋白质评分“归一化”,可以根据标准化量表绘制。“平均”蛋白质的EpiMatrix蛋白质评分为零。EpiMatrix蛋白质评分高于零表明存在过量的MHC配体并且表示免疫原性潜力更高,而评分低于零表明存在比预期更少的潜在MHC配体并且免疫原性潜力更低。评分高于+20的蛋白质被认为具有显著的免疫原性潜力。

[0436] 调节性T细胞表位的存在的调节

[0437] 抗体是独特的蛋白质,因为其可变结构域(特别是其互补决定区(CDR))的氨基酸序列可以在极大程度上变化。正是这种可变性使抗体识别各种各样的抗原。然而,控制抗体成熟化的重组和突变事件也可以产生新的或新T细胞表位。这些新表位对于循环T细胞来说似乎是“外来的”。抗体序列中新表位的存在可导致形成人抗人抗体响应;也称为HAHA响应或ADA(抗药物抗体)。

[0438] 调节性T细胞在抑制对外周的全人蛋白(包括含有突变和/或高度可变序列诸如抗体CDR的那些蛋白)的免疫响应中起重要作用。调节性T细胞通过调节性T细胞表位进行接合和活化。与抗体序列中新表位的存在相关的固有风险似乎通过天然存在的调节性T细胞表位的存在得以平衡。

[0439] 通过筛选许多人抗体分离物的序列,EpiVax已经鉴定出几种认为具有调节潜力的

高度保守的HLA配体。实验证据表明,在大多数受试者中,这些肽中的许多实际上是有致耐受活性的(actively tolerogenic)。这些高度保守的、调节性且混杂的T细胞表位目前称为Tregitope(De Groot等(2008)Blood 112:3303)。

[0440] 在许多情况下,在大量Tregitope的存在下,可以有效地控制人源化抗体中所含的新表位的免疫原性潜力。出于抗体免疫原性分析的目的,EpiVax已经开发了经Tregitope调节的EpiMatrix评分和相应的抗治疗性抗体反应预测。为了计算经Tregitope调节的EpiMatrix评分,从EpiMatrix蛋白质评分中扣除Tregitope的评分。已证实经Tregitope调节的评分与一组23种商用抗体的观察到的临床免疫响应具有良好的相关性(De Groot等,(2009)Clinical Immunol.131:189)。

[0441] 克隆29489、29494和31282抗体序列评分在EpiMatrix量表的下端,表明免疫原性的潜力有限。对于抗体克隆29489和31282,得到许可的单克隆抗体的回归分析预测~0%的暴露患者中有ADA响应。对于克隆29494,分析预测对于基线VH序列而言2.78%的暴露患者中有ADA反应,对于变体VH序列而言则为2.88%。数据汇总在下表13中。

[0442] 表13:EpiMatrix评分和经Tregitope调节的EpiMatrix评分

输入序列	长度	评估	命中	EpiMatrix评分	经 Tregitope 调节的 EpiMatrix 评分
29489_VH	121	904	40	-19.41	-47.26
29489_VL	108	800	39	-17.58	-51.75
[0443]	31282_VH	121	904	40	-19.41
	31282_VL	108	800	39	-17.58
	29494_VH	125	936	54	2.68
	29494_VL	107	792	40	-12.2

[0444] 实施例17:抗TIGIT克隆与重组人TIGIT蛋白结合的亲和力测定

[0445] 将抗体31282与其它专利申请中描述的抗TIGIT抗体克隆进行比较。具体地,将31282与以下进行比较:4.1D3.Q1E(也称为4.1D3,来自W02017/053748);22G2(来自W02016106302);31C6(来自W02016/028656);313M2(来自W02016/191643);以及TIG1(来自W02017/152088)。比较的抗体克隆的参考和序列在下表14中示出:

[0446] 表14:对比抗TIGIT抗体的VH和VL结构域序列

a-TIGIT 克隆	参考	序列
[0447] 4.1D3.Q 1E	VH: WO2017/053748 的 SEQ ID NO: 34 VL: WO2017/053748 的 SEQ ID NO: 36	VH 序列: EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAIS GDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEW LGKTYYRFKWYSDYAVSVKGRTI NPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFY CTRESTTYDLLAGPFDYWGQGTLV TVSS (本文的 SEQ ID NO: 343) VL 序列: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QTVLYSSNNKKYLAWYQQKPGQPP NLLIYWASTRESGPDRFSGSGST DFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYST PFTFGPGTKVEIK(本文的 SEQ ID NO: 36)

		NO: 344)
22G2	VH: WO2016/106302 的 SEQ ID NO:7 VL: WO2016/106302 的 SEQ ID NO:9	VH 序列: QVHLQESGPGLVKPSETSLTCTVS GGSVSSGIYYWSWIRQPPGKGLEWI GYIYYSGSTNYNPSLKSRTVTISVDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARD YYVSGNYYNVDYYFFGVDVWGQ GTTVTVSS (本文的 SEQ ID NO: 345) VL 序列: EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASN RATGIPARFSGSGSGTDFLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLFTFG PGTKVDIK (本文的 SEQ ID NO: 346)
31C6 (MEB12 5.31C6. A1.205 VH4/VL 1) [0448]	VH: WO2016/028656 的 SEQ ID NO:127 VL: WO2016/028656 的 SEQ ID NO:130	VH 序列: EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFSSYVMHWVRQAPGQGLEW IGYIDPYNDGAKYAQKFQGRVTLTS DKSTSTVYMELOSSLRSEDTAVYYC ARGGPYGWWYFDVVGQGTTVTVSS (本文的 SEQ ID NO: 347) VL 序列: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SEHIYSYLSWYQQKPGKAPKLLIYN AKT LAEGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQHHFGSPLTFGQG TRLEIK (本文的 SEQ ID NO: 348)
313M32	VH: WO2016/191643 的 SEQ ID NO:67 VL: WO2016/191643 的 SEQ ID NO:68	VH 序列: QVQLQESGPGLVKPSETSLTCAVS GYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWI GYISYSGSTS YNPSLRSRTVTISRDTS KNQFFLKLSSVTAADTAVYYCARR QVGLGFAYWGQGTLTVSS (本文 的 SEQ ID NO: 349) VL 序列: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASYRTGVPSRFSGSGSGTDFFTI SSLQPEDIATYYCQQHYSTPWTFG (本文的 SEQ ID NO: 350)
TIG1	VH: WO2017/152088 的 SEQ ID NO:10 VL: WO2017/152088 的 SEQ ID NO:14	VH 序列: DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAA SGFTFSNFGMHWVRQAPEKGLEW VAFISSGSSSIYYADTVKGRTFISRD NPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYCA RMR LDYYAMDYWGQGTSVTVSS (本文的 SEQ ID NO: 351) VL 序列:

[0449]		<p>DVQITQSPSYLAASPGETITINCRAS KSISKYLAWYQEKGKTNKLLIYSG STLQSGIPSRSFGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAMYYCQQHNEYWPWTFGGG TKLEIK (本文的 SEQ ID NO: 352)</p>
--------	--	---

[0450] A. 在哺乳动物细胞中产生

[0451] 为了产生足够量的所选a-TIGIT克隆用于进一步表征,产生编码特定抗体克隆(克隆31282_up、4.1D3、22G2、31C6、313M32和TIG1)的DNA载体并将其转导到HEK细胞中以用于产生人IgG1同种型。在Geneart订购抗体可变结构域的人密码子优化的合成DNA片段。可变结构域序列无缝连接到含有小鼠Igκ信号序列和相应抗体类别恒定区的pUPE表达载体中。通过限制性分析和DNA测序验证表达载体。对于瞬时转染,产生无内毒素DNA maxipreps (Sigma),并根据已建立的方案,在Freestyle培养基(ThermoFisherScientific)中将重链和轻链载体共转染至HEK293EBNA1细胞。转染后24小时添加Primatone (0.55%终体积)。转染后6天收获条件化培养基。通过Mabselect sureLX(GE Healthcare)亲和色谱法分批纯化抗体。用含有1M NaCl的PBS和PBS分两步洗涤结合的抗体。用20mM柠檬酸盐150mM NaCl pH3洗脱抗体,并用1/6体积的1M K2HP04/KH2P04 pH 8中和至约pH 7。

[0452] 接下来,使用在PBS中平衡的Superdex200柱通过凝胶过滤进一步纯化抗体。通过NuPAGE分析分级,并合并含有抗体的分级。终产物经0,22μM注射器过滤器灭菌。通过NuPAGE分析产物,并通过LAL测定测量内毒素水平。

[0453] 另外,还在CHO-K1细胞中,如下(克隆31282_wu)在IgG1或IgG4同种型上产生克隆31282。构建编码抗体的DNA载体并将其转染到CHO-K1细胞中。合成用于抗体可变结构域的CHO密码子优化的DNA片段,并将其连接到含有信号序列和相应抗体类别的恒定区的表达载体中。通过限制性分析和DNA测序验证表达载体。根据已建立的方案,通过电穿孔(Bio-rad)将重链和轻链载体共转染至CHO-K1细胞。将转染的培养物按比例增加并接种到补料分批培养物中。分批补料培养14天后收获条件化培养基。

[0454] 首先用串联连接的D0HC和A1HC(Millipore)通过两个深度过滤阶段澄清收获的细胞培养物。然后,首先用MabSelect SuRe(GE Healthcare)通过亲和色谱纯化澄清的收获物。用含有1M NaCl的50mM NaAc-HAc(pH 5.5)和50mM NaAc-HAc(pH 5.5)分两步洗涤结合的抗体。然后用50mM NaAc-HAc(pH 3.5)洗脱抗体,并用1M Tris-HCl(pH 9.0)中和至约pH 5.5。

[0455] 接下来,使用POROS HQ50(Life Tech)以流通模式通过阴离子交换色谱法(AEX)进一步精制(polish)中和的中间体。在上样之前,将柱用50mM NaAc-HAc(pH 5.5)平衡。在上样和回收步骤期间收集的AEX流通物使用POROS XS(Life Tech.)通过阳离子交换色谱法(CEX)以结合-洗脱模式进一步精制。将CEX柱在50mM NaAc-HAc(pH 5.5)中平衡,并通过线性梯度洗脱(LGE)将抗体洗脱,以到达10CV的含有0.5M NaCl的50mM NaAc-HAc(pH 5.5)中。使用Pellicon 3,ultrace1 30kD,A型(Millipore)进行最终的超滤和渗滤(UF/DF)以将CEX洗脱液和交换缓冲液浓缩到20mM His-HCl(pH 5.5)中。之后,将聚山梨酯80(PS80)和蔗糖添加到经过渗滤的样品中,以得到在20mM His-HCl、0.01% (w/w) PS 80和9% (w/v) 蔗糖(pH 5.5)的缓冲液中浓度为约20g/L的终产物。该产物已通过所有PQA测试。SEC纯度、内毒素水

平和其它标准均符合要求。

[0456] B.Biacore测量

[0457] 使用Biacore T200技术,CM5传感器芯片(在Novalix,France下运行),在25°C下在HBS-EP缓冲体系(10mM HEPES pH 7.3、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%吐温20)中进行生物传感器分析。将样品集保持在8°C下。使用标准胺偶联化学将山羊抗人IgG捕获抗体(Fc γ 片段特异性,Jackson ImmunoResearch Laboratories)固定(10000RU)至传感器芯片的两个流动池。该表面类型提供了在每个再生步骤后可重复捕获新鲜分析抗体的形式。流动池2用于分析捕获的抗体,而流动池1用作参考流动池。在运行缓冲液中制备从30至0.123nM的6种不同的抗原浓度。除了3.33nM一式两份运行外,每种抗原样品浓度作为单个重复运行。还运行两次空白(缓冲液)注射并将其用于评估和减去系统假像。所有抗原浓度的缔合(300秒)和解离(600秒)阶段以30uL/分钟的流速进行。通过三次连续注射(15秒、15秒和60秒)10mM甘氨酸-HCl(pH 1.5)来再生表面。将获得的传感图全局拟合至1:1模型(假设应用的所有浓度具有相同的动力学值)。亲和力也由克隆313M32的稳态确定,因为1:1动力学模型拟合不太可靠,在缔合时间结束时显示与人TIGIT平衡。表15中报告了不同a-TIGIT克隆所获得的结果。

[0458] 表15:动力学和亲和力评估

克隆	动力学模型 1:1 结合				稳态模型	
	K _a (1/s)	K _d (1/s)	K _d (nM)	R _{max} (RU)	K _d (nM)	R _{max} (RU)
31282_wu	3.86 ⁺⁰⁶	4.62 ⁻⁰⁴	0.120	16.7		
31282_up	3.70 ⁺⁰⁶	4.75 ⁻⁰⁴	0.128	15.3		
4.1D3	1.07 ⁺⁰⁶	4.72 ⁻⁰⁵	0.044	14.4		
22G2	2.51 ⁺⁰⁶	1.78 ⁻⁰⁴	0.071	11.1		
31C6	3.10 ⁺⁰⁶	2.09 ⁻⁰⁴	0.067	16.7		
313M32	不适用	不适用	不适用	不适用	10.1	17.2
TIG1	5.24 ⁺⁰⁶	1.31 ⁻⁰²	2.49	11.1		

[0460] 实施例18:抗TIGIT拮抗性抗体的细胞结合

[0461] A. 抗TIGIT克隆与Jurkat-hTIGIT的结合

[0462] 已使用用人TIGIT(Jurkat hTIGIT)转导的Jurkat E6.1细胞测量人抗TIGIT抗体的亲和力。为了分析所选抗体对hTIGIT的亲和力,每孔分配 10^5 个细胞并与递减浓度(8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062、0.031、0.016、 8×10^{-3} 和 4×10^{-3} nM)的各种抗TIGIT拮抗性抗体克隆一起孵育(图2)。将抗体与细胞在4°C下在FACS缓冲液中孵育20分钟。洗涤后,将细胞与抗人Ig(Fc γ 特异性)-PE(eBioscience,12-4998-82,2.5 μ g/ml)在冰上孵育20分钟并洗涤两次。使用LSR BD Fortessa分析荧光强度,并将细胞结合记录为在其表面表达TIGIT的细胞中PE的中值荧光强度。

[0463] 在Prism中使用四变量曲线拟合方程计算与Jurkat-hTIGIT结合的半数最大浓度(EC₅₀)。结果如图22A所示,值汇总在下表16中。对于克隆31282,结合Jurkat-hTIGIT的EC₅₀值非常接近,在HEK细胞(31282_up,0.13nM)或CHO-K1细胞(31282_wu,0.10nM)中产生的抗体之间没有显著差异。克隆31C6和TIG1也显示出低于0.2nM的EC₅₀值,而其它克隆(4.1D3、22G2和313M32)的亲和力更低,结果显示EC₅₀值范围为0.267至0.445nM。结果证明,对于抗

TIGIT克隆31282、31C6和TIG1而言,与工程改造系统中膜表达的人TIGIT强烈结合,而其它克隆具有较低的亲和力。

[0464] 表16:不同a-TIGIT克隆与Jurkat-hTIGIT结合的EC₅₀数据和比较

克隆	与 Jurkat-hTIGIT 结合的 EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ 相对于最佳克隆 (31282_wu) 的 EC ₅₀ 的倍数变化
31282_wu	0.10	1
31282_up	0.13	1.3
313M32	0.44	4.2
4.1D3	0.27	2.5
22G2	0.32	3.0
31C6	0.13	1.2
TIG1	0.17	1.6

[0465] [0466] B. 抗TIGIT克隆与来自健康人PBMC的原代CD8⁺T细胞的结合

[0467] 分析来自健康志愿者的分离的人PBMC与拮抗性抗TIGIT抗体的结合。按每孔1x10⁵个细胞分配细胞。将细胞与抗CD16 (克隆3G8, BioLegend 302002)、CD32 (克隆FLI8.26, BD Bioscience 557333) 和CD64 (BD Bioscience 555525) 在室温下孵育10分钟,并直接添加指定的抗人TIGIT抗体克隆,在FACS缓冲液中的终浓度为8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062、0.031、0.016、8x10⁻³和4x10⁻³nM,并在4℃下孵育20分钟。洗涤后,将细胞与抗人Ig (Fc γ 特异性) -PE (eBioscience, 12-4998-82, 2.5μg/ml) 在4℃下孵育20分钟。然后,洗涤细胞并将其与以下抗体和LVD混合物一起孵育:抗CD4-PercP-Cy5.5 (克隆A161A1, BioLegend 357414);抗CD8-BV510 (克隆SK1, BD Bioscience 563919) 和LVD efluor 660 (eBioscience 65-0864-18)。

[0468] 使用活的TIGIT⁺CD8⁺T细胞上的MFI信号计算与CD8⁺人原代T细胞结合的EC₅₀值。结果如图22B所示,EC₅₀浓度汇总在下表17中。对于克隆31282而言,结合人原代CD8⁺T细胞的EC₅₀值非常接近,在HEK细胞 (31282_up, 0.21nM) 或CHO-K1细胞 (31282_wu, 0.19nM) 中产生的抗体之间没有显著差异。拮抗性a-TIGIT抗体的不同克隆之间的比较显示克隆31282_wu (0.19nM) 和克隆31282_up (0.21nM) 对人原代CD8⁺T细胞的结合有最佳EC₅₀值。克隆31C6和TIG1显示EC₅₀的差异为2倍,而克隆22G2、313M32和4.1D3的差异为6.1至9.7倍。总之,31282_wu和31282_up与人原代CD8⁺T细胞上膜表达的TIGIT显示出最佳结合。

[0469] 表17:不同a-TIGIT克隆与人原代CD8⁺T细胞结合的EC₅₀数据和比较

克隆	与 CD8 ⁺ T 细胞结合的 EC ₅₀ 浓度(nM)	EC ₅₀ 相对于最佳克隆 (31282_wu) 的 EC ₅₀ 的倍数变化
31282_wu	0.19	1
31282_up	0.21	1.1
313M32	1.45	7.5
4.1D3	1.88	9.7
22G2	1.17	6.1
31C6	0.39	2.0
TIG1	0.38	2.0

[0471] C. 抗TIGIT克隆与来自癌症患者PBMC的原代CD8⁺T细胞的结合

[0472] 分析来自癌症患者的分离的人PBMC与不同的拮抗性抗TIGIT抗体克隆的结合。按每孔1x10⁵个细胞分配细胞。将细胞与抗CD16 (克隆3G8, BioLegend 302002)、CD32 (克隆FLI8.26, BD Bioscience 557333) 和CD64 (BD Bioscience 555525) 在室温下孵育10分钟，并且直接添加指定的抗人TIGIT抗体，在FACS缓冲液中的终浓度为8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062和0.031nM，并在4℃下孵育20分钟。洗涤后，将细胞与抗人Ig (Fc γ 特异性) -PE (eBioscience, 12-4998-82, 2, 5 μ g/ml) 在4℃下孵育20分钟。然后，洗涤细胞并与以下抗体和生命活力染料 (LVD) 混合物一起孵育：抗CD4-PercP-Cy5.5 (克隆A161A1, BioLegend 357414)；抗CD8-BV510 (克隆SK1, BD Bioscience 563919) 和LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14)。洗涤并固定细胞，并使用BD LSR Fortessa对表面染色定量。使用FlowJo V10.1分析流式细胞术数据。将门控LVD⁻TIGIT⁺CD8⁺细胞上的TIGIT MFI用于计算EC₅₀值。非线性回归曲线示于图22C中，并且值汇总在下表18中。

[0473] 克隆31282_wu和31282_up对于来自癌症患者的CD8⁺T细胞的结合显示出非常接近的EC₅₀值，其浓度分别为0.14和0.12nM。其余克隆显示出较低的亲和力，其中克隆31C6、TIG1和22G2分别显示出低1.5、2.7和3.1倍的亲和力。与克隆31282_up相比，克隆313M32的EC₅₀测量值低8.3倍。克隆4.1D3显示出最低的亲和力，与所测试的最佳克隆的结合差异为9.5倍。

[0474] 表18：不同a-TIGIT克隆与来自癌症患者的人原代CD8⁺T细胞结合的EC₅₀数据和比较

克隆	CD8 ⁺ T 细胞结合的 EC ₅₀ 值(nM)	EC ₅₀ 相对于最佳克隆 (31282) 的 EC ₅₀ 的倍数变化
31282_wu	0.14	1.2
31282_up	0.12	1.0
313M32	1.0	8.3
4.1D3	1.15	9.5
22G2	0.37	3.1
31C6	0.18	1.5
TIG1	0.33	2.7

[0476] 实施例19:抗TIGIT拮抗性抗体克隆和TIGIT天然配体(CD155)之间的竞争测定

[0477] 收集过表达人TIGIT(Jurkat-hTIGIT)的Jurkat细胞,按 5.10^4 个细胞/孔分配,并在37°C下与以下浓度的抗人TIGIT抗体一起在完全培养基中孵育45分钟:133,33,42,20、13,33,4,22,1,33,0,422,0,133,0,042,0,0133,4,2x10⁻³、1,3x10⁻³、4,2x10⁻⁴、1,3x10⁻⁴、4,2x10⁻⁵nM。洗涤过量的抗体,然后将细胞与15 μ g/ml的CD155-His(Creative Biomart,PVR-3141H)在37°C下孵育45分钟。然后,使用抗His标签-PE(Biolegend,362603,每次测试2 μ l)检测结合的CD155-His,在4°C下孵育30分钟。使用BD LSRFortessa通过FACS分析细胞,并且基于总细胞中PE的中值荧光强度计算防止CD155结合的半数浓度(IC_{50})。

[0478] 结果在图23中示出,并且值汇总在下表19中。抗TIGIT克隆31282_wu和31282_up在经工程改造以表达hTIGIT的Jurkat细胞上对于CD155竞争显示出最佳 IC_{50} 值,浓度分别为0.05和0.04nM。其它克隆(4.1D3,22G2,31C6,TIG1)的 IC_{50} 值为0.07至0.09nM,而克隆313M32克隆与CD155竞争结合TIGIT的效率低得多(0.65nM)。

[0479] 表19:不同a-TIGIT克隆在人TIGIT上对于CD155竞争的 IC_{50} 数据和比较

[0480] 克隆	CD155 竞争结合 TIGIT 的 IC_{50} (nM)	IC_{50} 相对于最佳克隆(31282_up)的 IC_{50} 的倍数变化
31282_wu	0.05	1.3
31282_up	0.04	1
313M32	0.65	16.7
4.1D3	0.07	1.9
22G2	0.09	2.2
31C6	0.07	1.7
TIG1	0.06	1.6

[0482] 实施例20:拮抗性抗TIGIT克隆的功能表征

[0483] A. 使用Jurkat-hTIGIT细胞的TIGIT功能测定

[0484] 为了表征阻断人TIGIT受体的功能后果,我们将表达hTIGIT和在TCR接合时活化的荧光素酶报告基因的Jurkat细胞(来自Promega的解冻使用的TIGIT效应细胞)和经过工程改造以表达人PVR/CD155和TCR活化物的CHO-K1细胞系(来自Promega的解冻使用的CD155 aAPC/CHO-K1)共培养。过表达TIGIT的Jurkat细胞的活化可以通过在Jurkat细胞上TCR接合时与表达CD155的CHO-K1细胞接触来诱导,并且可以在拮抗性抗TIGIT抗体的存在下增加。为了比较不同a-TIGIT克隆增加Jurkat细胞活化的效力,在递增的抗体浓度存在下进行实验并计算 EC_{50} 值。

[0485] 根据制造商的建议接种CD155 aAPC/CHO-K1(Promega,CS198811)细胞,并在37°C下在5%CO₂培养箱0/N中孵育。第二天,根据制造商的建议,将TIGIT效应细胞(Promega,CS198811)添加到含有具有浓度递增的抗TIGIT抗体(0,03,0,11,0,33,1,06,3,34,10,56,33,38,105,49;和333nM)的新鲜完全培养基的CD155 aAPC/CHO-K1细胞板中,并在37°C、5%CO₂下孵育6小时。孵育6小时后,通过使用Bio-GloTM荧光素酶测定系统(Promega,G7941)测

量荧光素酶活性来评估TIGIT效应细胞的活化。

[0486] 如图24A所示以及如表20中所汇总的,在测定中,抗TIGIT抗体31282就EC₅₀值和荧光素酶信号的最大诱导方面而言具有最佳功效。在HEK (31282_up) 或CHO-K1 (31282_wu) 细胞中产生的克隆所观察到的活性相当,其最大荧光素酶信号为对照同种型 (Bioexcell, BE0297) 的8倍,并且测量的EC₅₀浓度分别为3.3nM和3.5nM。通过比较,克隆4.1D3、22G2和31C6具有为同种型对照的5.3至6.7倍的最大活性,这与5至10nM的EC₅₀相关。由于在测试浓度下活性低且曲线拟合不佳,无法测定克隆313M32和TIG1的EC₅₀值 (图24A)。

[0487] 表20:不同a-TIGIT克隆对Jurkat-hTIGIT细胞功能活性的EC₅₀数据和比较

克隆名称	相对于同种型对照的诱导(倍数变化)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ 相对于最佳克隆(31282_up)的EC ₅₀ 的倍数变化
31282_wu	8.4	3.5	1.1
31282_up	8.0	3.3	1
313M32	/	P.F.	/
4.1D3	5.8	10.3	3.1
22G2	5.3	5.2	1.6
31C6	6.7	5.3	1.6
TIG1	/	P.F.	/

[0488] [0489] P.F.:拟合不佳

[0490] B.来自健康志愿者的人原代CD8⁺T细胞的TIGIT功能测定

[0491] 为了表征阻断人TIGIT受体的功能后果,我们将来自健康人供体的PBMC的人原代CD8⁺T细胞与经工程改造以表达人PVR/CD155和活化人T细胞的CHO-K1细胞系共培养。我们观察到,通过用抗TIGIT拮抗性抗体阻断hTIGIT,可以使在经工程改造的表达CD155的CHO-K1细胞的存在下CD8⁺T细胞的IFNg释放增加。为了比较这些抗体增加IFNg释放的效力,在递增的抗体浓度存在下进行实验并计算EC₅₀值。

[0492] 根据制造商的建议将CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) 细胞接种在U形底96孔板中,并在37°C下在5%CO₂培养箱0/N中孵育。第二天,根据制造商的建议,使用阴性选择试剂盒 (Stemcell Technologies, 17953) 从分离自健康供体 (Immunehealth) 的全血的冷冻人外周血单核细胞中纯化CD8⁺T细胞。然后将纯化的CD8T细胞和递增浓度 (0, 011nM、0, 033nM、0, 11nM、0, 33nM、1, 06nM、3, 3nM、10, 6nM、33, 3nM和105, 5nM) 的抗体添加到CD155 aAPC/CHO-K1 (100, 000个CD8 T细胞/100uL含有抗体的完全培养基) 中,并在37°C、5%CO₂下孵育5天。最后,使用根据制造商的建议运行的ELISA测定 (Affymetrix eBioscience, 88-7316-86) 评估细胞上清液中的IFNg浓度。

[0493] 如图24B所示并且如表21中所汇总的,a-TIGIT克隆31282和4.1D3显示出最佳的IFNg分泌诱导,其相对于同种型对照抗体分别增加2.7和2.9倍。就测量为0.13nM的EC₅₀浓度而言,克隆31282具有诱导IFNg产生的最佳功效。与克隆31282相比,克隆31C6显示出相差2.3倍的EC₅₀值,而克隆22G2和4.1D3的效力低3.1和10.8倍。由于在测试浓度下的活性低和曲线拟合不佳,因此无法测定克隆313M32的值 (图24B)。

[0494] 表21:不同a-TIGIT克隆对人原代CD8⁺T细胞的功能活性的EC₅₀数据和比较

克隆	相对于同种型对照的诱导(倍数变化)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ 相对于最佳克隆(31282_wu)的EC ₅₀ 的倍数变化
31282_wu	2.7	0.13	1
313M32	/	P.F.	/
4.1D3	2.9	1.43	10.8
22G2	1.5	0.41	3.1
31C6	1.6	0.30	2.3

[0496] C.来自癌症患者的人原代CD3⁺T细胞的TIGIT功能测定

[0497] 为了表征阻断来自癌症患者T细胞上的人TIGIT受体的功能后果,将来自癌症患者的PBMC的人原代CD3⁺T细胞与经工程改造以表达人PVR/CD155和活化人T细胞的CHO-K1细胞系(CHO-TCR-CD155)共培养。我们观察到,通过用抗TIGIT拮抗性抗体31282阻断hTIGIT,可以增加在经工程改造的表达CD155的CHO-K1细胞存在下CD3⁺T细胞的IFNg释放。

[0498] 根据制造商的建议将CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) 细胞接种在U形底96孔板中,并在37°C下在5%CO₂培养箱0/N中孵育。第二天,根据制造商的建议,使用阴性选择试剂盒(Stemcell Technologies, 17951)从新鲜的人外周血单核细胞中纯化CD3⁺T细胞,所述新鲜的人外周血单核细胞是从24小时前收集的癌症患者(HNSCC)的全血中分离的(Biopartners)。然后将纯化的CD3⁺T细胞与66,7nM抗体添加到CD155 aAPC/CHO-K1 (100,000CD3 T细胞/100u1含有抗体的完全培养基)中,并在37°C、5%CO₂下孵育5天。最后,使用根据制造商的建议运行的ELISA测定(Affymetrix eBioscience, 88-7316-86)评估细胞上清液中的IFNg浓度。

[0499] 如图24C所示,抗体31282诱导强功能活性以增加IFNg分泌,证明了该a-TIGIT抗体重新活化来自癌症患者的PBMC T细胞的潜力。

[0500] D.a-TIGIT克隆31282增加来自癌症患者PBMC以及解离肿瘤细胞(DTC)的T细胞中的细胞内细胞因子的产生

[0501] 在该实施例中,进行细胞内流式细胞术染色以评估来自肾癌癌症患者的新鲜分离的匹配PBMC和解离肿瘤细胞(DTC)内肿瘤浸润的淋巴细胞的T细胞细胞因子产生。对于DTC,将肿瘤机械破碎,然后按照制造商对特定肿瘤类型的说明,用肿瘤解离试剂盒(Miltenyi Biotech#130-095-929)在gentleMACS解离器中在旋转下孵育。在进行细胞内染色之前,将细胞用T细胞刺激珠粒混合物(Dynabeads, Thermo Fisher)刺激16小时。在刺激的最后3小时期间,将蛋白质转运抑制剂混合物(eBioscience)和细胞刺激混合物(eBioscience)添加到细胞中。缀合抗体购自Ebioscience/Thermo Fisher Scientific, BioLegend或BD Biosciences。使用经过滤的FACS缓冲液(PBS+2mM EDTA+0,1% BSA)和Brilliant Stain缓冲液(BD#563794)按照制造商的说明进行表面染色。在表面染色之前,用适当的人FcBlock(BD#564220)封闭细胞。对于细胞内染色,使用BD Cytofix/cytoperm溶液(BD Biosciences)将细胞固定并透化。细胞用以下抗体组染色:抗CD45-BB515(克隆HI30, BD Horizon 564585)、抗CD73-BV421(克隆AD2, BD Horizon 562430)、抗CD8a-BV510(克隆SK1,

BD Horizon 563919)、抗CD3-BV650(克隆SK7, BD Horizon 563999)、抗IFN γ -BV711(克隆4S.B3, BD Horizon 564793)、抗IL-2-APC(MQ1-17H12, eBioscience 17-7029-82)、抗CD4-APC-R700(克隆RPA-T4, BD Horizon 564975)、LVD efluor 780(eBioscience 65-0865-14)、抗TIGIT-PE(克隆MBSA43, eBioscience E13456-108)、抗CD39-PE-Dazzle594(克隆A1, Biolegend 328224)以及TNF α -PE-cy7(克隆Mab11, eBioscience 25-7349-82)。在FACS Fortessa(BD Biosciences)上进行采集,并用FlowJo软件(FlowJo, LLC)进行分析。在前向和侧向散射处对活细胞进行门控。T细胞亚群如下门控:PBMC的CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ 以及DTC的CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ 和CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ 。使用未染色和未刺激的对照对分泌细胞因子的T细胞进行门控。

[0502] 图24D显示在a-TIGIT克隆31282的存在下IL2、IFNg和TNFa的细胞内含量在活化后均增加。根据图24C中所示的数据,在来自PBMC的CD3 $^{+}$ T细胞中观察到这种增加,但在来自解离肿瘤细胞的CD4 $^{+}$ 和CD8 $^{+}$ TIL中也观察到这种增加。这证明了a-TIGIT克隆31282增加来自癌症患者T细胞的PBMC和TIL群体的活化的潜力。

[0503] 实施例21:a-TIGIT克隆31282在来自癌症患者的PBMC中诱导Treg的优先细胞毒性

[0504] 在该实施例中,将来自肺癌患者的分离的PBMC重悬于完全RPMI培养基(补充有10%热灭活FBS+50U青霉素+50U链霉素)中。在96U孔板中每孔分配 2.5×10^5 个人PBMC。将抗人TIGIT抗体克隆31282、人IgG1同种型对照(BioXcell BE0297)或利妥昔单抗(Rituximab)(InvivoGen hcd20-mab1)以6.6nM的终浓度添加至每个相应的孔。将细胞在37°C、5%CO2下孵育20小时。然后收集细胞并用以下抗体组染色:LVD efluor 520(eBioscience 65-0867-14)、抗TCRab-PercP-Cy5.5(克隆IP26, Biolegend 306723)、抗CD4-BV510(克隆SK3, BD Horizon 562970)、抗CD8-APC-Cy7(克隆SK1, Biolegend 344714)、抗CD25-BV605(克隆2A3, Biolegend 562660)、抗CD127-APC(A019D5, Biolegend 351316)、抗CCR7-BV421(克隆G043H7, Biolegend 353207)以及抗CD45R0-PE-Cy7(克隆UCHL1, Biolegend 304229)。呈现了门控活细胞上的结果。使用AccuCheck计数珠粒(Life technologies)按照制造商的说明进行绝对定量。在计算每 μ l的绝对细胞数后,使用下式计算特异性裂解的% = (1 - (经31282TIGIT抗体处理的样品上每 μ l的绝对细胞数/对照同种型处理的样品一式三份的平均值)) $\times 100$ 。结果表示为一式三份的特异性裂解的平均% +/- SD。通过测量在与利妥昔单抗一起孵育后门控CD19 $^{+}$ 细胞上特异性细胞裂解的%来评估ADCC/ADCP效应细胞的细胞毒活性。

[0505] 如图25所示,抗TIGIT克隆31282在Treg细胞上引发的特异性裂解(30.1% +/- 3%)比在CD45R0 $^{+}$ CCR7 $^{+/-}$ CD8 $^{+}$ T细胞(总记忆CD8 $^{+}$ T细胞)(-1.48% +/- 6%)或CD45R0 $^{+}$ CCR7 $^{+/-}$ CD4 $^{+}$ T(总记忆CD4 $^{+}$ T细胞)(0.64% +/- 3%)上更高。利妥昔单抗阳性对照在门控CD19 $^{+}$ 细胞上引发77.9%(+/- 6.8%)的特异性裂解。总体数据表明,与总记忆CD4 $^{+}$ 和CD8 $^{+}$ T细胞群相比,来自癌症患者PBMC的Treg细胞优先耗竭。使用来自患有结肠腺癌的患者的细胞观察到类似的Treg细胞优先耗竭。

[0506] 实施例22:来自癌症患者PBMC和解离肿瘤细胞的免疫群体上的TIGIT表达的表征

[0507] 进行流式细胞术分析以评估来自癌症患者的新鲜分离的匹配PBMC和解离肿瘤细胞(DTC)内的肿瘤浸润的淋巴细胞的免疫细胞亚群上的TIGIT表达。获得来自不同适应症的样品:卵巢癌、肾癌、HNSSC、皮肤癌、黑素瘤和肺癌。对于DTC,将肿瘤机械破碎,然后按照制造商对特定肿瘤类型的说明,用肿瘤解离试剂盒(Miltenyi Biotech#130-095-929)在

gentleMACS解离器中在旋转下孵育。在密度梯度培养基(Lymphoprep Axis-Shield#1115758)上从全血中分离出PBMC。将表型数据与从健康个体分离的冷冻PBMC进行比较(n=10)。

[0508] 使用经过滤的FACS缓冲液(PBS+2mM EDTA+0.1% BSA)和Brilliant Stain缓冲液(BD#563794)按照制造商的说明对细胞进行染色。在染色之前用适当的人FcBlock(BD#564220)封闭细胞,并在采集之前使用IC固定缓冲液(eBioscience#00-8222-49)固定。将DTC用以下抗体组染色:抗CD45-BB515(克隆HI30,BD Horizon 564585)、抗CD73-BV421(克隆AD2,BD Horizon 562430)、抗CD8a-BV510(克隆SK1,BD Horizon 563919)、抗CD3-BV650(克隆SK7,BD Horizon 563999)、抗CD56-BV711(克隆5.1H11,Biolegend 362542)、抗CD279-BV785(克隆EH12.2H7,Biolegend 329930)、抗CD127-APC(克隆A019D5,Biolegend 351316)、抗CD4-APC-R700(克隆RPA-T4,BD Horizon 564975)、LVD efluor 780(eBioscience 65-0865-14)、抗TIGIT-PE(克隆MBSA43,eBioscience E13456-108)、抗CD39-PE-Dazzle594(克隆A1,Biolegend 328224)以及CD25-PE-cy7(克隆BC96,Biolegend 302612)。将PBMC用以下抗体组染色:抗CD45R0-BB515(克隆UCHL1,BD Horizon 564529)、抗CD73-BV421(克隆AD2,BD Horizon 562430)、抗CD8a-BV510(克隆SK1,BD Horizon 563919)、抗CD3-BV650(克隆SK7,BD Horizon 563999)、抗CD56-BV711(克隆5.1H11,Biolegend 362542)、抗CD197-BV786(克隆3D12,BD Horizon 563710)、抗CD127-APC(克隆A019D5,Biolegend 351316)、抗CD4-APC-R700(克隆RPA-T4,BD Horizon 564975)、LVD efluor 780(eBioscience 65-0865-14)、抗TIGIT-PE(克隆MBSA43,eBioscience E13456-108)、抗CD39-PE-Dazzle594(克隆A1,Biolegend 328224)以及CD25-PE-cy7(克隆BC96,Biolegend 302612)。在FACS Fortessa(BD Biosciences)上进行采集,并用FlowJo软件(FlowJo,LLC)进行分析。在前向和侧向散射处对活细胞进行门控。门控如下的各种免疫细胞亚群:CD3⁺CD4⁺CD127⁺CD25⁻(CD3⁺CD4⁺非Treg细胞)、CD3⁺CD4⁺CD127^低CD25⁺(调节性T细胞)、CD3⁺CD8⁺(CD3⁺CD8⁺T细胞)、CD3⁻CD56⁺(NK细胞)、CD3⁺CD56⁺(NKT细胞)、CD3⁻CD56⁻(非T/NK细胞)。Quantibrite PE珠粒(BD#340495)在相同的仪器设置下运行并用于将荧光数据转换成每个细胞结合的抗体数。

[0509] 使用Tukey方法计算百分位数,使用盒须图示,在图26A中表示了不同免疫群体上的TIGIT表达频率,在图26B中表示了每个亚群的TIGIT密度。

[0510] 数据显示,与来自健康供体的PBMC相比,在来自癌症患者的PBMC上,T细胞亚群上的TIGIT频率更高。在DTC TILs上该频率进一步提高(图26A)。虽然检查CD3⁺CD4⁺非Treg细胞和CD4⁺Treg细胞表面上的TIGIT密度获得了相同的观察结果,但对于CD3⁺CD8⁺T细胞,DTC TILs上每个细胞的TIGIT分子数量减少(图26B)。

[0511] 实施例23:TIGIT和克隆31282的结构和功能表位作图

[0512] 为了进一步表征和理解抗TIGIT mAb克隆31282与TIGIT重组蛋白之间的相互作用,通过X射线衍射确定与TIGIT复合的31282的晶体结构。

[0513] A. TIGIT和Fab的表达、纯化和结晶

[0514] 人TIGIT残基23-128由Proteros Biostructures GmbH生产。将具有N-端HIS-标签(凝血酶可裂解)的TIGIT(23-128)克隆到pET15b中,并在B121(DE3)中在LB培养基中于37℃下在包涵体中表达。用含有Tris/HCl pH 7.4和Tris/HCl pH 7.4、0.05% Brij-35的缓冲液

洗涤包涵体 (IB)。用6M Gdm/HCl、50mM Tris pH 8.5和10mM DTT使IB变性。在50mM Tris/HCl pH 8、1mM GSH、0.5mM GSSG、150mM NaCl中进行复性 (refolding)。在HIS-trap上纯化复性蛋白。通过凝血酶裂解去除N-端HIS-标签，并在50mM Tris/HCl pH 7.5、200mM NaCl中平衡的Superdex-75上进一步纯化。

[0515] 为了表达Fab片段,使HEK293F细胞在含有1% 青霉素/链霉素、2mM L-谷氨酰胺和0.1%Pluronic的Freestyle F17中生长。用于转染的扩增培养物在3L Erlenmeyer烧瓶中培养(Corning, 2L细胞培养工作体积,37°C,8%v/v CO₂,80-120rpm,50mm振幅)。在转染前一天稀释培养物,并将细胞数调节至1x10⁶个细胞/ml。表达培养物的体积为6L。用Fab的轻链和重链的质粒进行瞬时转染。在纯F17培养基中制备DNA/FectoPro的MasterMix (FectoPro,PolyPlus) 并孵育10分钟(根据PolyPlus方案)。将该转染混合物滴加到细胞悬浮液中,并立即添加Booster。转染后18小时,向培养物中供给3g/L葡萄糖。

[0516] 为了纯化Fab片段,在转染后6天通过离心收获6L HEK293细胞培养物上清液,并施加于30ml KappaSelect柱上。将KappaSelect用pH 7.4的PBS洗涤,用pH 3的柠檬酸钠洗脱,并用Tris缓冲液中和含有Fab的级分。在Superdex S-200柱上进一步纯化Fab(所述柱在20mM Tris pH 8,100mM NaCl中平衡),并储存在-80°C直至进一步使用。

[0517] 为了形成Fab-TIGIT复合物,将纯化的TIGIT与纯化的Fab以1.5:1的比率混合,并在Superdex-200上纯化复合物,所述Superdex-200在20mM Tris pH 8、100mM NaCl中平衡。将Fab-TIGIT复合物浓缩至35mg/ml用于结晶。使用蒸气扩散法,通过将0.1μl蛋白质溶液(35.3mg/ml,在20mM TRIS pH 8.0;100mM NaCl中)与储库溶液(0.10M二甲胂酸钠pH 6.00;15% (w/v) PEG4000)以1:1的比率混合,使Fab-TIGIT复合物在277K下结晶。通过将晶体浸入添加有25% 甘油的储库溶液中来对其进行冷冻保护。

[0518] B. 数据收集和处理

[0519] 使用Proteros Biostructures GmbH标准方案建立低温方案。晶体已经快速冷冻并在100K的温度下测量。在SWISS LIGHT SOURCE (SLS, Villigen, Switzerland) 使用低温条件从Fab:TIGIT复合晶体收集X射线衍射数据。晶体属于空间群P1。使用程序XDS和XSCALE处理数据。数据收集和处理统计数据可在表22中找到。

[0520] 表22:数据收集和处理统计数据

[0521]	X-射线源	PXII/X10SA (SLS ¹)
	波长[Å]	1.0000
	检测器	PILATUS 6M
	温度[K]	100
	空间群	P1
	池: a; b; c; [Å] α; β; γ; [°]	41.73; 71.46; 110.26 96.7; 95.8; 106.5
	分辨率[Å]	2.31 (2.56-2.31)
	独特反射	50537 (13271)
	多样性	2.0 (1.9)
	完整性[%]	96.1 (95.3)
	R _{系统} [%]	8.1 (43.5)
	R _{平均} [%]	11.0 (59.1)
	平均值(I)/sd ³	8.11 (1.94)

[0522] ¹SWISS光源(SLS,Villigen,Switzerland)

[0523] ²括号中的值是指最高分辨率面元

[0524] ³从独立反射计算的

[0525] C.结构建模和细化

[0526] 通过分子置换获得确定和分析结构所必需的相信息。先前解析的Fab结构用作搜索模型。根据标准方案用软件包CCP4和COOT执行后续模型构建和细化。对于自由R因子(交叉验证最终模型的正确性的一种量度)的计算,将约2.5%的测量反射值排除在细化程序之外(见表23)。

[0527] 已经进行了TLS细化(使用REFMAC5,CCP4),这导致较低的R因子和较高的电子密度图质量。已应用自动生成的本地NCS限制(较新REFMAC5版本的关键词“ncsr local”)。配体参数化和相应文库文件的生成分别用CHEMSKETCH和LIBCHECK(CCP4)进行。

[0528] 用COOT的“Find waters”算法,通过将水分子置于3.0处有波状轮廓的Fo-Fc图谱的峰值,然后用REFMAC5进行细化,并用COOT验证工具检查所有水来建立水模型。疑似水列表的标准是:B因子大于80 Å²,2Fo-Fc图小于1.2σ,与最近接触的距离小于2.3 Å或大于3.5 Å。手动检查疑似水分子和配体结合位点中的那些水分子(与配体的距离小于10 Å)。最终的复合物结构用PHENIX细化。我们选择了细化参数,包括XYZ坐标、真实空间、个体B因子和组B因子。优化X射线/立体化学重量并且还选择NCS限制用于细化。最终模型的拉马钱德兰图(Ramachandran Plot)显示优选区域中所有残基的95.39%,允许区域中为3.95%。表23中列出了最终结构和细化过程的统计数据。

[0529] 表23:细化统计数据¹

[0530]	分辨率[\AA]	108.40-2.31
	反射数量(工作/测试)	49289/1247
	$R_{\text{工作}}$	0.2025
	$R_{\text{自由}} [\%]$	0.2466
	原子总数:	
	蛋白质	8282
	水	676
	与理想几何形状的偏差: ³	0.003
	键长[\AA]	0.771
	键角[度]	
[0531]	拉马钱德兰图: ²	
	优选区域[%]	95.39
	允许区域[%]	3.95
	禁止区域[%]	0.66

[0531] ¹PHENIX中测定的值

[0532] ²用COOT计算的

[0533] D. 总体结构

[0534] 人Fab抗体片段的重链和轻链显示出人抗体的典型折叠(图27A)。在不对称单元中存在两个具有基本相同的整体构象的异源三聚体。该模型包含TIGIT的残基23至128, 克隆31282的重链的残基1至224和克隆31282的轻链的残基1至214。重链的一个短环区未由电子密度完全限定, 因此尚未包括在该模型中。

[0535] 使用FoldX程序分析衍射图像以估计残基的能量贡献并定义相互作用的热点。形成结合界面的氨基酸残基在电子密度图中明确限定。解释的X射线衍射数据清楚地显示了Fab和TIGIT之间的相互作用(图27B和27C)。克隆31282轻链CDR与TIGIT的2个区域相互作用, 其中CDR L1 Arg30和Tyr33与TIGIT残基Asn58和Glu60接触; CDR L1 Arg30和CDR L3 Phe93与TIGIT残基Ile109接触。CDR L2与TIGIT没有接触(表24)。克隆31282重链与TIGIT的不同区域相互作用, 其中CDR H1 Tyr33与TIGIT在残基Leu73上接触; CDR H2 Val50、Ser54和Ser57与TIGIT在残基Leu73上接触; CDR H3 Asp102、Tyr103和Trp104与TIGIT在残基Gln56、Ile68、Leu73和His76上接触。

[0536] 基于a-TIGIT克隆31282/TIGIT复合物的这种晶体结构, 确定与克隆31282接触的TIGIT残基(克隆31282结合的TIGIT表位残基)和与TIGIT接触的克隆31282的残基(TIGIT结合的克隆31282的互补位残基)。表24和25以及图27C显示了与克隆31282的轻链(表24)或重链(表25)残基接触的TIGIT残基。接触残基定义为满足以下每项标准的每种氨基酸: (i) 其计算的结合自由能贡献大于0.3kcal/mol, (ii) 其实验平均B因子低于X射线结构中所有残基的平均B因子, (iii) 其以小于或等于4.0埃的距离与抗体原子形成至少3对重原子的原子间接触, (iv) 其不产生仅溶剂暴露性氢键或离子相互作用, (v) 如果其为非芳族极性残基(Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys或Arg), 则与抗体产生至少一个氢键或离子相互作用。

[0537] 表24: TIGIT的表位残基和克隆31282轻链上的相应互补位残基的汇总

TIGIT 氨基酸		克隆 31282 氨基酸轻链
Asn 58		Tyr 33
Glu 60		Arg 30 Tyr 33
Ile 109		Arg30 Phe 93

[0539] 表25:TIGIT的表位残基和克隆31282重链上的相应互补位残基的汇总

TIGIT 氨基酸		克隆 31282 氨基酸重链
Gln 56		Trp 104

Ile 68	Tyr 103 Trp104
Leu 73	Tyr33 Val50 Ser 54 Val 50
His 76	Asp 102 Tyr 103 Trp104

[0542] 实施例24:a-TIGIT克隆31282和32959之间的竞争测定。

[0543] 在HEK细胞中产生人IgG1同种型的抗TIGIT抗体克隆32959,并如上文实施例17中所述进行纯化。

[0544] 收集过表达人TIGIT的Jurkat细胞(Jurkat-hTIGIT),以 5.10^4 个细胞/孔分配,并与以下浓度的拮抗性a-TIGIT克隆31282一起孵育:0nM(无抗体)、0.08nM、0.16nM、0.8nM和8nM,这些浓度表示为该克隆Kd的0至100倍的浓度范围。洗涤过量的抗体,并将细胞与递减浓度(8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062、0.031、0.016、0.008和0.004nM)的直接偶联的(AF647)抗TIGIT克隆32959在4℃下孵育30分钟。使用LSR BD Fortessa分析几何平均荧光强度。将细胞结合记录为AF647的中值荧光强度。为了计算克隆32959的EC₅₀结合,在Prism中使用四变量曲线拟合方程计算与hTIGIT-Jurkat结合的半数最大浓度(EC₅₀),所得到的值如表26所示且在图28中示出。结果显示a-TIGIT克隆32959的强烈结合,不依赖于克隆31282的浓度,证明不存在与拮抗性a-TIGIT抗体的竞争。

[0545] 表26:在递增浓度的拮抗性a-TIGIT克隆31282存在下,a-TIGIT克隆32959与Jurkat-hTIGIT结合的EC₅₀浓度

	0nM 的 a-TIGIT 31282	0.08nM 的 a-TIGIT 31282	0.16nM 的 a-TIGIT 31282	0.8nM 的 a-TIGIT 31282	8nM 的 a-TIGIT 31282
a-TIGIT 克隆 32959 结合的 EC₅₀ (nM)	0.22	0.33	0.37	0.49	0.39

[0547]	对于 a-TIGIT 克隆 32959 而 言细胞结合 Jurkat 人 TIGIT 的 FON (相对于 阴性的倍数)	588			
--------	--	-----	--	--	--

[0548] 实施例25:在食蟹猴中单次静脉注射后测定克隆31282的药代动力学特性

[0549] 食蟹猴通过静脉内推注接受a-TIGIT克隆31282IgG1或IgG4。将抗体以3种不同浓度(0.1mg/kg、1mg/kg、10mg/kg)施用于2只动物(1只雄性和1只雌性)。在第1天给药后504小时收集血液。将血液样品处理为血浆并使用ELISA方法分析a-TIGIT克隆31282IgG1或IgG4的浓度。在Phoenix WinNonlin(版本6.3,Pharsight,a Certara Company,Princeton,NJ)中使用血管内模型,使用来自个体动物的血浆浓度-时间数据计算静脉给药后a-TIGIT克隆31282IgG1和IgG4的毒理动力学参数值。

[0550] 在静脉内推注给药0.1、1和10mg/kg的a-TIGIT克隆31282IgG1和IgG4后,可分别在给药后240小时、336小时和504小时对雄性和雌性猴血浆中的IgG1浓度进行定量,并且可分别在给药后168小时、240小时和504小时对IgG4进行定量(图29和表27)。在静脉内推注给药a-TIGIT克隆31282IgG1或IgG4后,对IgG1和IgG4的全身暴露没有明显的性别相关差异(Cmax和AUClast),比率(雄性/雌性)范围为0.855至1.16。

[0551] 在向雄性和雌性猴静脉内推注给药a-TIGIT克隆31282IgG1后,血浆IgG1浓度在所有剂量水平下双相下降,平均终末半衰期(t_{1/2})范围为84.7至174小时(图29)。在所研究的剂量范围内,系统清除率(CL)是一致的,范围为0.280至0.392mL/小时/kg。稳态分布(V_{ss})的表观体积在测试的剂量水平之间是一致的,值的范围为53.7至66.5mL/kg。a-TIGIT克隆31282IgG1剂量在0.1至1mg/kg和1至10mg/kg范围内增加10倍导致暴露大致成比例增加(增加9.57至14.5倍)。

[0552] 在向雄性和雌性猴静脉施用a-TIGIT克隆31282IgG4后,血浆IgG4浓度在测试的所有剂量水平下双相下降,t_{1/2}为148至334小时(图29和表28)。CL在测试的剂量水平中是一致的,范围为0.160至0.219mL/小时/kg。平均V_{ss}范围为41.2至70.7mL/kg。a-TIGIT克隆31282IgG4剂量在0.1至1mg/kg和1至10mg/kg范围内增加10倍导致IgG4暴露的大致成比例增加(增加9.32至12.5倍)。

[0553] 表27:在食蟹猴中静脉内推注后a-TIGIT克隆31282人IgG1的平均毒理动力学参数的汇总

a-TIGIT 克隆 31282 人 IgG1			
[0554]	剂量(mg/kg)	0.1	1
	C _{max} (ug/ml)	2.34	22.4
	t _{max} (h)	1	1
	AUC _{last} (h*ug/ml)	224	2330
	t _{1/2} (h)	174	84.7
	Cl (mL/h/kg)	0.292	0.392
	V _{ss} (mL/kg)	66.5	57.2

[0555] 表28:在食蟹猴中静脉内推注后a-TIGIT克隆31282人IgG4的平均毒理动力学参数的汇总

a-TIGIT 克隆 31282 人 IgG4			
[0556]	剂量(mg/kg)	0.1	1
	C _{max} (ug/ml)	2.81	26.2
	t _{max} (h)	1	1
	AUC _{last} (h*ug/ml)	238	2690
	t _{1/2} (h)	251	334
	Cl (mL/h/kg)	0.190	0.160
	V _{ss} (mL/kg)	65.7	70.7

[0557] 实施例26:人肿瘤细胞群上TIGIT表达的表征

[0558] 进行流式细胞术分析以评估来自具有不同血癌适应症的癌症患者的血液样品中的正常和肿瘤T或B细胞上的TIGIT表达。

[0559] 测试赛谢综合征患者样品以比较恶性和正常CD4⁺T细胞群上的TIGIT表达。为了分离这些群体,使用Beckman Coulter TCR-Vb谱系试剂盒 (#IM3497) 进行恶性克隆TCR-Vb重排的预先确定。一旦鉴定出恶性克隆,就使用以下商用试剂分析赛谢综合征患者的免疫细胞上的TIGIT表达:抗CD3Krome Orange (#B00068)、抗CD4-PE (#A07751)、抗CD8-PC7 (#737661)、抗CD56-PC5 (#A07789)、抗CD45-Pacific Blue (#A74763)、抗CD19-AF750 (#A94681) 和抗Vb8-FITC (#IM1233) (均来自Beckman-Coulter) 以及抗TIGIT-APC(克隆MBSA43,ebiosciences#17-9500-42)。在CytoFlex装置(Beckman-Coulter) 上进行赛谢综合征患者样品的流式细胞术分析。用FloJo软件(FlowJo,LLC) 分析数据。

[0560] 图30A中示出了代表性实例。图30A中示出了具有恶性TCR-Vb8克隆的这种群体的门控策略,其中恶性细胞为CD45⁺CD3⁺CD4⁺Vb8⁺,且正常CD4⁺T细胞为CD45⁺CD3⁺CD4⁺Vb8⁻。与正常CD4⁺T细胞相比,在恶性CD4⁺T细胞上观察到TIGIT的强烈表达(MFI分别为999和4987) (图30B)。

[0561] 类似地,进行流式细胞术分析以评估来自CLL患者的骨髓样品中的正常和恶性B细胞上的TIGIT表达。样品用以下抗体组染色:LVD eFluor 780 (eBioscience 65-0865-14)、抗CD45-BB515(克隆HI30, BD Horizon 564585)、抗CD5-BV510(克隆UCHT2, Biolegend

363381)、抗CD19-BV711(克隆SJ25C1, BD Horizon 563036)以及抗TIGIT-PE(克隆MBSA43, eBioscience E13456-108)。在FACS Fortessa(BD Biosciences)上进行采集,并用FlowJo软件(FlowJo, LLC)进行分析。在前向和侧向散射处对活细胞进行门控。对如下各种细胞亚群进行门控:CD45⁺CD19⁺CD5⁻(正常B细胞)和CD45⁺CD19⁺CD5⁺(恶性B-CLL)。

[0562] 图31中示出了代表性实例,其中门控策略如图31A所示。与正常B细胞(1%)相比,高比例的恶性B-CLL细胞对TIGIT呈阳性(75%)(分别为1440和810的MFI)(图31B)。

[0563] 总之,获得的数据表明肿瘤细胞在特定的血癌适应症中表达TIGIT。

[0564] 实施例27:在小鼠T细胞淋巴瘤模型中单一疗法的抗TIGIT拮抗性抗体的抗肿瘤活性。

[0565] 对于该实验,将EL4 T细胞淋巴瘤细胞(ATCC® TIB-39TM)工程改造以稳定表达小鼠TIGIT(EL4-mTIGIT)。将用编码GFP的类似载体转导的EL4细胞用作对照(EL4-GFP)。将细胞库亚克隆以获得EL4-mTIGIT和EL4-GFP的克隆。所用的抗TIGIT抗体是抗体29527的修饰形式(经修饰使得VH FR3的残基27从L突变为V并且其中VH FR4的残基6从M突变为T)并在人IgG1同种型上产生。对8周的雌性Balb/c小鼠皮下接种1.000.000个EL4-mTIGIT细胞或200.000个EL4-GFP细胞。在接种后第7天,当肿瘤体积平均为110mm³左右时,将小鼠随机分组在具有相等肿瘤体积的处理组中(对于EL4-mTIGIT而言每组n=15,对于EL4-GFP而言每组n=10)。在肿瘤接种后第7天、第10天、第13天和第16天通过腹膜内注射用200μg抗TIGIT或同种型对照抗体(hIgG1, BioXcell)处理小鼠。监测肿瘤生长,并且从第7天至第26天每周三次用电子卡尺测量肿瘤体积。当肿瘤体积超过2000mm³时处死小鼠。通过线性混合模型统计分析肿瘤生长曲线。通过测试时间*处理组的相互作用来评估处理组之间的差异。

[0566] 图32显示了用EL4-mTIGIT(A-C)或EL4-GFP(D-F)接种的小鼠的肿瘤生长曲线。示出了用hIgG1同种型对照(B和E)或拮抗性a-TIGIT Ab(C和F)处理的小鼠的中值肿瘤生长曲线(A和D)以及个体肿瘤生长曲线。在接种了EL4-mTIGIT细胞的小鼠中,与同种型对照处理组相比,当用抗TIGIT Ab处理时,肿瘤生长受显著抑制(p<0.001)。然而在用同种型对照抗体处理的组中,15只小鼠中有3只在模型结束时显示出肿瘤生长控制,体积低于700mm³,在用拮抗性抗TIGIT抗体处理的组中,这个数量增加到15只小鼠中有8只。当将拮抗性a-TIGIT处理与同种型对照抗体进行比较时,在携带EL4-GFP肿瘤的小鼠中无法观察到抗肿瘤功效或完全反应。总之,这些数据证明拮抗性a-TIGIT抗体(hIgG1)在具有表达TIGIT的肿瘤细胞的模型中具有显著的抗肿瘤功效。

[0567] 实施例28:在CT26结肠癌小鼠模型中与免疫检查点抗体组合的抗TIGIT拮抗性抗体的抗肿瘤活性

[0568] 除了抗TIGIT Ab与抗PD1抗体的组合之外(实施例12、13和14),还评估了抗TIGIT抗体与对共刺激分子4-1BB、OX40和GITR有特异性的激动剂抗体以及对检查点抑制分子ICOS有特异性的拮抗性抗体组合的抗肿瘤功效。

[0569] CT26肿瘤细胞系购自ATCC®(CRL-2638TM)。将8周龄的雌性balb/c小鼠在右侧皮下接种500.000个细胞。在接种后第9天,当肿瘤体积平均为75mm³左右时,将小鼠随机分组在肿瘤体积相等的处理组中(每组n=10只小鼠)。从随机分组当天开始,每3天腹膜内给予所有抗体,总共注射3次。使用的抗TIGIT抗体是在小鼠IgG2a同种型上产生的抗体29527的修饰形式(经修饰使得VH FR3的残基27从L突变为V,并且其中VH FR4的残基6从M突变为T)。

T), 其以20 μ g/只小鼠给予。以5 μ g/只小鼠给予抗4-1BB(克隆3H3, BioXCell, BE0239), 以20 μ g/只小鼠给予a-OX-40(克隆OX-86, BioXCell, BE0031), 以10 μ g/只小鼠给予a-GITR(克隆DTA-1, BioXCell, BE0063); 并且以200 μ g/只小鼠给予a-ICOS(克隆7E.17G9, BioXCell, BE0059)。监测肿瘤生长, 并且从第7天至第35天每周三次用电子卡尺测量肿瘤体积。当肿瘤体积超过2000 mm^3 时, 处死小鼠。通过线性混合模型基于对数转化的肿瘤体积来统计分析肿瘤生长曲线。通过测试时间*处理组的相互作用来评估处理组之间的差异。这导致了绝大多数数据的良好模型拟合, 除非常小的肿瘤体积(低于10 mm^3)以外。因此, 将这些小肿瘤体积视为缺失值。为了测试将抗TIGIT抗体与相应的免疫检查点抗体(IC-即抗41BB、抗OX40、抗GITR和抗ICOS)组合而产生的协同作用, 将处理组用两个变量的组合重新编码: 抗TIGIT(是/否)和IC(是/否)。除了每种处理的加性作用(抗TIGIT*时间和IC*时间)之外, 通过测试抗TIGIT*IC*时间的相互作用项来评估协同作用。

[0570] 图33A显示了每组的肿瘤中值生长曲线以及用单一疗法或与抗4-1BB组合的抗TIGIT处理的小鼠的个体生长曲线。与抗TIGIT或抗4-1BB单一疗法(分别为p=0.0005和p<0.0001)相比, 用抗TIGIT+抗4-1BB处理的小鼠中的肿瘤生长受到显著抑制。与分别用a-TIGIT或a-4-1BB作为单一剂处理的组中的1/10或0/10完全反应相比, 抗TIGIT和抗4-1BB抗体的组合导致6/10小鼠显示处完全响应(其中肿瘤<30 mm^3 并且被认为是不可测量的)。这些数据证明了抗TIGIT疗法与抗4-1BB组合用于治疗预先建立的肿瘤的显著抗肿瘤功效。

[0571] 图33B显示了每组的肿瘤中值生长曲线以及用单一疗法或与抗OX-40组合的抗TIGIT处理的小鼠的个体生长曲线。与抗TIGIT或抗OX-40单一疗法(分别为p=0.0002和p<0.0001)相比, 用抗TIGIT+抗OX-40处理的小鼠中的肿瘤生长受到显著抑制。抗TIGIT+抗OX-40的组合实现了协同抗肿瘤功效, 这超过了两种单一疗法处理的加性作用(p=0.02)。与分别用a-TIGIT或a-OX-40作为单一剂处理的组中的1/10或0/10完全反应相比, 抗TIGIT和抗OX-40抗体的组合导致7/10小鼠显示出完全响应。这些数据证明了抗TIGIT疗法与抗OX-40组合用于治疗预先建立的肿瘤的显著协同抗肿瘤功效。

[0572] 图33C显示了每组的肿瘤中值生长曲线以及用单一疗法或与抗GITR组合的抗TIGIT处理的小鼠的个体生长曲线。与抗TIGIT或抗GITR单一疗法相比, 用抗TIGIT+抗GITR处理的小鼠中的肿瘤生长受到显著抑制(p<0.0001)。抗TIGIT+抗GITR的组合实现了协同抗肿瘤功效, 这超过了两种单一疗法处理的加性作用(p=0.01)。与分别用抗TIGIT或抗GITR作为单一剂处理的组中的1/10或0/10相比, 抗TIGIT和抗GITR抗体的组合导致6/10小鼠显示出完全反应。这些数据证明了抗TIGIT疗法与抗GITR组合用于治疗预先建立的肿瘤的显著和协同抗肿瘤功效。

[0573] 图33D显示了每组的肿瘤中值生长曲线以及用单一疗法或与抗ICOS组合的抗TIGIT处理的小鼠的个体生长曲线。与抗TIGIT或抗ICOS单一疗法(分别为p=0.003和p=0.0001)相比, 用抗TIGIT+抗ICOS处理的小鼠中的肿瘤生长受到显著抑制。与分别用抗TIGIT或抗ICOS抗体作为单一剂处理的组中的1/10或0/10相比, 抗TIGIT和抗ICOS抗体的组合导致1/10小鼠显示出完全反应(其中肿瘤<30 mm^3 并且被认为是不可测量的)。这些数据证明了抗TIGIT疗法与抗ICOS组合用于治疗预先建立的肿瘤的显著协同抗肿瘤功效。

[0574] 实施例29: 抗TIGIT拮抗性抗体对 $\gamma\delta$ T细胞的活性

[0575] $\gamma\delta$ (gamma-delta或g/d) T细胞是具有描述的抗肿瘤活性(Zhao等2018. J Transl

Med. 16:122) 和抗病毒活性(例如CMV感染)的非常规T细胞群,并且还涉及自身免疫性疾病(Malik S等,2016.Front Immunol.7:14)。

[0576] 进行流式细胞术分析以评估从对巨细胞病毒(CMV)具有血清阴性或血清阳性状态(CMV状态由EFS Nouvelle Aquitaine, Bordeaux, France进行评估)的健康个体新鲜分离的PBMC上的 $\gamma\delta$ T细胞上的TIGIT表达。使用经过滤的FACS缓冲液(PBS+2mM EDTA+0.1% BSA)按照制造商的说明对细胞进行染色。在FACS Fortessa (BD Biosciences) 上进行采集,并用BD FACS DIVA软件(BD Biosciences)进行分析。基于前向和侧向散射及活力对细胞进行门控。对如下 $\gamma\delta$ T细胞:CD3⁺TCR $\gamma\delta^+$ V δ 2⁻(V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T细胞),使用以下抗体进行门控:抗TCR $\gamma\delta$ APC,来自Miltenyi的克隆REA591#130-109-280;抗-TCR V δ 2-PE-Vio 770,来自Miltenyi的克隆REA771,#130-111-012;BV421小鼠抗人CD3,来自BD Biosciences的克隆UCHT1,#560365;来自Biolegend的Zombie Aqua可固定活力试剂盒#423101。

[0577] 与常规 $\alpha\beta$ T细胞相似,非常规V δ 2⁻ $\gamma\delta$ T细胞在CMV阴性和阳性两种人群中表达TIGIT(抗TIGIT,来自eBioscience的克隆MBSA43,#12-98500-42)(图34A)。为了表征阻断TIGIT受体对该细胞群的功能后果,在存在或不存在TIGIT-配体CD155(来自R&D Systems的#9174-CD-050)的情况下,用抗V δ 1(10ug/ml)(克隆R9.1,来自Beckman Coulter的#IM1761)和IL-15(20ng/ml),来自Peprotech的#200-15-50UG)活化来自CMV阳性供体的磁性分离的V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T细胞(抗TCR Vd1-FITC,克隆REA173#130-100-532和抗FITC微珠#130-048-701,两者均来自Miltenyi)或总PBMC,另外将IL-2(100U/ml,#200-02-1MG Peprotech)添加到分离的V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T细胞中。图34B显示通过添加TIGIT-配体CD155(0、0.1、1和10ug/ml)介导的IFN γ 分泌(ELISA试剂盒,来自Mabtech的#3420-1h-20)的剂量依赖性降低,在1ug/ml的CD155下达到最大抑制。添加抗TIGIT抗体克隆31282(10ug/ml)使IFN γ 产生完全恢复至与没有CD155配体的条件相同或更高的水平,而人IgG1同种型对照具有非常有限的作用。图34C展示了将a-TIGIT克隆31282添加到混合物中时,在总PBMC的抗V δ 1活化和IFN γ 分泌完全恢复后由CD155(10 μ g/ml)介导的类似抑制作用。这些数据证明,与 $\alpha\beta$ T细胞相似,CD155与TIGIT连接可损害 $\gamma\delta$ T细胞的活性,并且抗TIGIT抗体可完全防止这种抑制作用。

序列表

<110> ITEOS 治疗公司 (ITEOS THERAPEUTICS SA)

<120> 抗 TIGIT 抗体

<130> NLW/P153274W000

<140> PCT/US2018043968

<141> 2018-07-26

<150> US62/606159

<151> 2017-07-27

<150> EP17184102. 6

<151> 2017-07-31

<150> BE20175535

<151> 2017-07-31

<150> US62/660640

<151> 2018-04-20

<160> 370

[0001]

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Leu Arg Trp Ala Glu
 1 5 10 15

Tyr Phe Gln His
 20

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4

Phe Thr Phe Glu Ser Tyr Gly Met Val
 1 5

[0002]

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 5

Ser Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 6
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6

Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Val Glu Leu Arg Trp Ala Glu

1

5

10

15

Tyr Phe Gln His
20

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8

[0003]

Val Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Leu Asp Val
1 5 10

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10

Tyr Thr Phe Glu Lys Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11

Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0004] <400> 12

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Leu His Ser
 1 5 10

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14

Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 15

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Met Glu Val
1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 16

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His
1 5

[0005]

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 17

Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 18

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Met Glu Val
1 5 10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 19

Tyr Ser Ile Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Ala
 1 5 10

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 20

Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

[0006] <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 21

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Tyr Tyr Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp
 1 5 10 15

Ile

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 22

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 23

<211> 16
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 23

Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
1 5 10 15

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 24

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp
1 5 10 15

Ile

[0007] <210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 25

Gly Ser Ile Ser Ser Ser Arg Tyr Tyr Trp Ala
1 5 10

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 26

Ser Ile Gly Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 27

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Arg Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp
1 5 10 15

Ile

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 28

Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

[0008] <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 29

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 30

Ala Arg Leu His Leu Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 31

Gly Thr Phe Gln Asn Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 32

Val Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 15

[0009] <212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 33

Ala Arg Leu His Leu Gly Gln Lys Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 34

Phe Thr Phe Gly Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 35

Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 36

Ala Lys Pro Val Pro Lys Ser Arg Gly Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0010] <400> 37

Phe Thr Phe Arg Asp Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 38

Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Leu Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 39

Ala Lys Pro Val Pro Arg Leu Arg Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 40

Phe Thr Phe Gly Ser Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 41

Val Ile Trp Pro Asp Gly Ser Asn Lys Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[0011] 1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 42

Ala Lys Pro Val Pro Lys Ser Arg Ala Leu Asp Val
1 5 10

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 43

Phe Thr Phe Ser Ser Ser Tyr Met His

1 5

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 44

Val Ile Gly Ala Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 45

[0012]

Ala Lys Pro Val Pro Arg Arg Arg Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 46

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 47

Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 48

Gln Gln Val His Asn Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 49

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

[0013] <210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 50

Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 51

Gln Gln Val His Asn Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 52
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 52

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 53

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 54

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr
1 5

[0014]

<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 55

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 56

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 57

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr
1 5

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 58

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

[0015] <400> 59

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 60

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr
1 5

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 61

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 62

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 63

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr
1 5

[0016] <210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 64

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 65

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 66

Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 68

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

[0017]

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 69

Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 70

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 71
<211> 7

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 71

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 72

Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

[0018] <400> 73

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 74

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 75

Gln Gln Arg Tyr Val Phe Pro Pro Thr

1 5

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 76

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 77

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

[0019] <210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 78

Gln Gln Arg Tyr Val Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 79
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 79

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 80
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 80

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 81

Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 82

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
[0020] 1 5 10

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 83

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 84

Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 85

<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 85

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 86

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

[0021]

<400> 87

Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 88

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 89

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 90

Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 91
<211> 26
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 91

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0022]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25

<210> 92
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 92

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 93
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 93

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 94
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 94

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 95
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 95

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

[0023]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

<210> 96
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 96

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 97
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 97

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 98
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 98

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 99
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 99

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

[0024]

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 20 25

<210> 100
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 100

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 101
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 101

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 102
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 102

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 103
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 103

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

[0025]

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 20 25

<210> 104
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 104

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 105
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 105

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

1	5	10	15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
20	25	30	

<210> 106
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 106

1	5	10	
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser			

<210> 107
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 107

[0026] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly			
20	25		

<210> 108
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 108

1	5	10	
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly			

<210> 109
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 109

Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 110
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 111
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 111

[0027]

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 20 25

<210> 112
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 112

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 113
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 113

Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 114
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 114

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 115
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0028] <400> 115

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 Ser Gly
 20 25

<210> 116
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 116

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 117
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 117

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 118

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 119

<211> 26

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

[0029]

<400> 119

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 Thr Val Ser Gly
 20 25

<210> 120

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 120

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 121

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 121

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 122

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 123

<211> 26

<212> PRT

[0030] <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 123

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly

20 25

<210> 124

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 124

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 125

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 125

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Thr Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 126

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 126

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 127

<211> 26

[0031] <212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 127

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
20 25

<210> 128

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 128

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 129

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 129

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 130

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 130

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 131

[0032] <211> 26

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 131

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
20 25

<210> 132

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 132

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 133

<211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 133

Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 134
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 134

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

[0033]

<210> 135
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 135

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

<210> 136
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 136

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 137
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 137

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 138
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 138

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

[0034]

<210> 139
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 139

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

<210> 140
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 140

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 141
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 141

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 142
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 142

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

[0035]

<210> 143
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 143

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

<210> 144
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 144

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 145
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 145

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 146
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 146

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

[0036]

<210> 147
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 147

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

<210> 148
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 148

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

1	5	10
---	---	----

<210> 149
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 149

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1															
															15

Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
20													30

<210> 150
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 150

[0037] Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1		5		10	
---	--	---	--	----	--

<210> 151
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 151

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1															15

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
20						

<210> 152
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 152

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 153
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 153

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 154
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 154

[0038]

Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 155
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 155

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 156
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 156

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 157
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 157

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 158
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0039] <400> 158

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 159
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 159

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 160
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 160

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 161

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 161

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 162

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

[0040]

<400> 162

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 163

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 163

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 164

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 164

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 165

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 165

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 166

<211> 10

<212> PRT

[0041] <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 166

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 167

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 167

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 168

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 168

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 169

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 169

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 170

<211> 10

[0042] <212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 170

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 171

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 171

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 172

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 172

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 173

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 173

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 174

[0043]

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 174

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 175

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 175

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

20

<210> 176

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 176

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 177

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 177

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

[0044]

<210> 178

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 178

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 179

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 179

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
20

<210> 180
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 180

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 181
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 181

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

[0045]

<210> 182
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 182

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 183
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 183

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
 20

<210> 184
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 184

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 185
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 185

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

[0046]

<210> 186
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 186

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 187
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 187

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
 20

<210> 188
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 188

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 189
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 189

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

[0047]

<210> 190
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 190

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 191
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 191

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

20

<210> 192
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 192

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 193
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 193

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

[0048]

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 194
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 194

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 195
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 195

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 196
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 196

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 197
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 197

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

[0049]

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 198
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 198

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 199
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 199

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 200
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 200

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 201
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 201

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

[0050]

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 202
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 202

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 203
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 203

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 204
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 204

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 205
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 205

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

[0051]

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 206
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 206

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 207
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 207

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 208
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 208

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 209
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 209

[0052] Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 210
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 210

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 211
<211> 127
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 211

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

[0053] Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Leu Arg Trp Ala Glu
 100 105 110

Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 212

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 212

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala 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 Val His Asn Phe Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 213

<211> 127

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 213

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

[0054] 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Ser Tyr

20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Ser Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Asp Ser Val Glu Leu Arg Trp Ala Glu

100 105 110

Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 214
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 214

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

[0055]

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 Val His Asn Phe Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 215
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 215

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20	25	30
----	----	----

Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
35															

Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
50															

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
65															

Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85															

Ala	Arg	Asp	His	Ser	Asp	Tyr	Trp	Ser	Gly	Ile	Leu	Asp	Val	Trp	Gly
100															

Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser
115								

[0056]

<210> 216

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 216

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1															

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Arg	Ser	Ser
20															

Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
35															

Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
50															

Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu

Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 217
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人(*Homo sapiens*)

〈400〉 217

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Glu Lys Tyr
 20 25 30

[0057]

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Leu His Ser Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

218

<211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 218

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

[0058]

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 219
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 219

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Met Glu Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 220
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0059]

<400> 220

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 221
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 221

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 [0060] 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Met Glu Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 222
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 222

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro
 85 90 95

[0061] Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 223

<211> 124

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 223

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 Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr 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 Ile Glu Gly Ala Asn Tyr Tyr Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp
 100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 224
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 224

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 [0062] 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala 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 Ser Pro Pro Trp Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 225
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 225

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 Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

[0063] Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe
 100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 226
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 226

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 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala 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 Ser Pro Pro Trp Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

[0064] <210> 227
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 227

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Arg Tyr Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Gly Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Thr Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Arg Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe
 100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 228

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 228

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 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

[0065]

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala 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 Ser Pro Pro Trp Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 229

<211> 122

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 229

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

[0066]

Ala Arg Leu His Leu Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 230

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 230

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Val Phe Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 231

<211> 122

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 231

[0067]

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Gln Asn Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Val Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu His Leu Gly Gln Lys Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 232
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 232

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

[0068]

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Val Phe Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 233
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 233

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Pro Val Pro Lys Ser Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

[0069] Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 234
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 234

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 235

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 235

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr
[0070] 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Leu Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Pro Val Pro Arg Leu Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 236
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 236

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

[0071] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 237
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 237

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Pro Asp Gly Ser Asn Lys Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Pro Val Pro Lys Ser Arg Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

[0072] <210> 238
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 238

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 239
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 239

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0073] 35 40 45

Ala Val Ile Gly Ala Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Pro Val Pro Arg Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 240
 <211> 107
 <212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 240

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp
[0074] 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 241

<211> 381

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 241

gaggtgcagc tggtgagtc tgggggaggc ttggccagc ctggggggtc cctgagactc 60

tccctgtcag cctctggatt caccttagt agctatggta tgagctgggt ccgccaggt 120

ccagggaaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat 180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcggtgt actactgcgc tagagtatct 300

tactactacg acagcagcaa actacgatgg gcagaatact tccaacactg gggacaggg 360

acattggtca ccgtctcctc a 381

<210>	242	
<211>	321	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
 <400>	242	
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttgt ctccagggga aagagccacc	60	
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtagca acagaaacct	120	
ggccaggctc ccaggctct catctatgtat gcatccaaaa gggccactgg catcccagcc	180	
agttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcaactca ccatcagcag cctagagcct	240	
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag gtccacaatt tccctctcac ttttggcgga	300	
gggaccaagg ttgagatcaa a	321	
 <210>	243	
<211>	381	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
 [0075] <400>	243	
gaagtccagc tggtggaatc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggc cctgagactc	60	
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcgag agctatggca tggttgggt ccggcaggcc	120	
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcatcg atattgtatg atggaagtaa tagatactat	180	
gcagactccg tgaaggcccg attcaccgtc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat	240	
ctgcaaataa acagectgag agccgaggac acggcggtt actactgcgc tagatgtatct	300	
tactactacg acagcggtga gctacgatgg gcagaataact tccaacactg gggacagggt	360	
acattggtca ccgtctccctc a	381	
 <210>	244	
<211>	321	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
 <400>	244	
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttgt ctccagggga aagagccacc	60	
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtagca acagaaacct	120	

ggccaggctc ccaggctcct catctatgtat gcatccaaaa gggccactgg catcccagcc	180
agtttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	240
gaagattttc cagtttatta ctgtcagcag gtccacaatt tccctctcac ttttggcggaa	300
gggaccaagg ttgagatcaa a	321
<210> 245	
<211> 363	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 245	
caggtgcagtc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60
tccgtcaagg catctggata caccttcacc agtactata tgcactgggt gcgcacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtc atcaacccta gtggtggttag cacaagctac	180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggtgt actactgcgc cagagaccac	300
[0076] tccgactact ggagcggaaat actagacgta tgggtcagg gtacaatggt caccgtctcc	360
tca	363
<210> 246	
<211> 324	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 246	
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggaa aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtcgatca gagtgtagg agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtggtt gttctggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtat ttactgtcag cagttttca gtccttccttgc gacttttgcc	300
ggagggacca aggtttagat caaa	324
<210> 247	

<211>	363					
<212>	DNA					
<213>	智人(Homo sapiens)					
 <400>	247					
caggtgcagc	tgggcagtc	tgggcgttag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtt	60
tcctgcaagg	catctggata	cacccctcgag	aagtactata	tgcactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggagtg	atcggtccta	gtggtgctag	cacaagctac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcaccatg	accaggacac	cgtccacgag	cacagtctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggcggtgt	actactgcgc	cagagaccac	300
tccgactact	ggagcggaat	actacattcg	tgggtcagg	gtacaatggt	caccgtctcc	360
tca						363
 <210>	248					
<211>	324					
<212>	DNA					
<213>	智人(Homo sapiens)					
 [0077]	 <400>	248				
gaaattgtgt	tgacgcagtc	tccaggcacc	ctgttttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	ggcccgatca	gagtgttagg	agcagctact	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccgatgt	cctcatctat	ggtgcatcca	gcagggccac	tggcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtg	gtctggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgt	ttactgtcag	cagtacttca	gtcctccttg	gactttggc	300
ggagggacca	agggtttagat	caaa				324
 <210>	249					
<211>	363					
<212>	DNA					
<213>	智人(Homo sapiens)					
 <400>	249					
caggtgcage	tgggcagtc	tgggcgttag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtt	60
tcctgcaagg	catctggata	cacccctcgact	agctactata	tgcactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggagtg	atcggtccta	gtggtgctag	cacaagctac	180

gcacagaagt tccagggcag agtcacccctg accagggaca cgtccacgag cacagtctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggtgt actactgcgc cagagaccac	300
tccgactact ggagcggaat aatggaggtta tggggtcagg gtacaatggt caccgtctcc	360
tca	363
<210> 250	
<211> 324	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 250	
gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagg agcagctact tagcctggta ccagcagaaaa	120
cctggccagg ctcggcaggct cctcatctat ggtgcattcca gcagggccac tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagttgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagttttca gtcctccttgc gactttggc	300
[0078] ggagggacca aggtttagat caaa	324
<210> 251	
<211> 363	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 251	
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggcttagt gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt	60
tcctgcaagg catctggata cacccactt agctactata tgcactgggt ggcacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtg atcggctcta gtgggtcttag cacaagctac	180
gcacagaagt tccagggcag agtcacccctg accagggaca cgtccacgag cacagtctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggtgt actactgcgc cagagaccac	300
tccgactact ggagcggaat aatggaggtta tggggtcagg gtacaactgt caccgtctcc	360
tca	363
<210> 252	
<211> 324	

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 252

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgc ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtc gagtgttagg agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggtc cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagttgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagttactca gtcctccttgc gactttggc 300

ggagggacca aggttgagat caaa 324

<210> 253

<211> 372

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 253

caggtgcagc tgcaggagtc gggccagga ctggtaagc ctgcggagac cctgtccctc 60

[0079] acctgcgcgt tctctggta ctccatcagc agtggttact actgggcttgc gatccggcag 120

cccccaggaa aggggctgga gtggattggg agtatctatc atatgggag cacctactac 180

aacccgtccc tcaagagtcg agtcaccata tcagtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 240

ctgaagctga gttctgtgac cggcgacac acggcggtgt actactgcgc catagaagga 300

gctaactact acgacttcgg atatgttagca ttgcacatat ggggtcaggg tacaatggtc 360

accgtctcttca 372

<210> 254

<211> 321

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 254

gaaatagtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtc gagtgttagc agcaacttag cctggatcca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180

agttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcaactctca ccatcagcag cctgcagtc 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tccccccct ggcctaggac ttttggcgga	300
gggaccaagg ttgagatcaa a	321
<210> 255	
<211> 375	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 255	
caggtgcage tgcaggagtc gggcccagga ctggtaaagc cttcgagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggagtt actacttggc gtggatccgc	120
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct ttccggatgg gagcacctac	180
tacaaccgt ccctcgagag tcgagtcacc atatcgtagt acacgtccaa gaaccagttc	240
tccctgaagc tgagttctgt gaccggcga gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa	300
ggagctaact ttaaggactt cggatatgta gcattcgaca tatgggtca gggtacaatg	360
gtcaccgtct cctca	375
[0080]	
<210> 256	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 256	
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcaacttag cctggatcca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc	180
agttcagtgc cagtggttc tgggacagag ttcaactctca ccatcagcag cctgcagtct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tccccccct ggcctaggac ttttggcgga	300
gggaccaagg ttgagatcaa a	321
<210> 257	
<211> 375	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	

<400> 257
 cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaaagc cttcgagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtaggt actactggc gtggatccgc 120
 cagccccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatcg ggacgagttg gacacactac 180
 tacaaccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtat acacgtccaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagttctgt gaccgccaca gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa 300
 ggagctaact ttcgggactt cggatatgtt gcattcgaca tatgggtca gggtacaatg 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 258
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0081] <400> 258
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggaa aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtttagc agcaacttag cctggtagcc gcagaaacct 120
 gcccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc 180
 agttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
 gaagattttt cagtttattt ctgtcagcag tccccccctt ggccttaggac ttttggcgaa 300
 gggaccaagg ttgagatcaa a 321

<210> 259
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 259
 caggtgcagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtccctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggagg caccttcage agctatgtta tcagctgggt ggcacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtagc agcaaactac 180
 gcacagaagt tccaggccag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggtgt actactgcgc tagttgcac 300

ctgggatcca	gcccata	cggcatggat	gtatgggcc	aggaaacaac	tgtcaccgtc	360
tcctca						366
<210>	260					
<211>	321					
<212>	DNA					
<213>	智人 (Homo sapiens)					
<400>	260					
gacatecaga	tgaccaggc	tccatctcc	ctgtctgcat	ctgttaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	ggcaaggta	gagcatttgc	agctattttaa	attggtatca	gcagaaacca	120
ggaaagccc	ctaagctct	gatctatgt	gatccagg	tgcaaagtgg	ggtcccatca	180
agttcagtg	gcagtggatc	tggcacat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagattttg	caacttacta	ctgtcagcaa	agatacgtct	tccctctac	ttttggcgg	300
ggaccaagg	ttgagatcaa	a				321
<210>	261					
[0082]	<211>	366				
	<212>	DNA				
	<213>	智人 (Homo sapiens)				
<400>	261					
caggtgcagc	tgggcagtc	tgggcgttag	gtgaagaagc	ctgggtctc	ggtgaaggc	60
tcctgcaagg	cttctggagg	cacccatccag	aactatgcta	tcaatgggt	gcgcacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagt	gatggagtt	atcgtgccta	tcttggtag	agcaaaactac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcacgg	accgcggacg	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggcgggt	actactgcgc	tagttgcac	300
ctgggacaga	aggcctacta	cggcatggat	gtatgggcc	aggaaacaac	tgtcaccgtc	360
tcctca						366
<210>	262					
<211>	321					
<212>	DNA					
<213>	智人 (Homo sapiens)					
<400>	262					

gacatccaga tgacccagtc tccatctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctattaa attggatatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
agttcagtg gcagtggatc tggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcaa agatacgtct tccctctac ttttggcggaa	300
gggaccaagg ttgagatcaa a	321

<210> 263
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 263 gaagtgcagc tggggagtc tgggggaggc ttggtagc cttggcaggc cttggagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttggt gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct ccagggagg gcctggagtg ggtctcaggat attacttggaa atagtggtag cataggctat [0083] gcgactctg tgaaggcccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat ctgcaaataatga acagtctgag agctgaggac acggcggtgt actactgcgc caagccagtg ccaaaaatcta gaggcctaga cgtatgggt cagggtacaa tggtcaccgt ctccctca	60
	120
	180
	240
	300
	357

<210> 264
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 264 gacatccagt tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc atcacttgcc gggcgagtca gggatttgc agctggtag cctggatatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagctct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca agttcagcg gcagtggatc tggacagat ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct gaagattttg caacttattatctgtcagcag gcatttacc tcccttggac ttttggcggaa gggaccaagg ttgagatcaa a	60
	120
	180
	240
	300
	321

<210> 265
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 265
 caggtgcagc tggggagtc tggggaggc ttgttacagc ctggcaggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcgg gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
 ccaggaaagg gcctggagt ggtctcaggt attacttggaa atagtggttt gataggctat 180
 gggactctg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaata gacgtctgag agctgaggac acggcgttgtt actactgcgc caagccagtg 300
 ccacgttga gaggcctaga cgtatgggtt cagggtacaa tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 266
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 266
 [0084] gacatccagt tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc 60
 atcacttgc gggcgagtca gggatttgc agctggtagt cctggatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctctt gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 agttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatttttcaacttattt ctgtcagcag gcattctacc tcccttggac ttttggcgg 300
 gggaccaagg ttgagatcaa a 321

<210> 267
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 267
 gaagtccagc tgggtgaatc tggggaggc gtggtccagc ctgggaggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcggg agctattata tgcactgggtt ccggcaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagt ggtggcagtt atatggcctg atggaagtaa taaaactgtat 180
 gcagactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaa atga acaggcctgag agccgaggac acggcgttgc actactgcgc caagccatg	300
ccaaaatcta gagcgcttga cgtatgggt caggta caa tggtcaccgt ctccctca	357
<210> 268	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 268	
gacatccagt tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc	60
atcacttgc gggcagtc ggttattagc agctggtag cctggtatca gcagaaacca	120
ggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccagg ttgaaagtgg ggtccatca	180
agttcagcg gcagtggatc tggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttg caacttattta ctgtcagcag gcatttctacc tcccttggac ttttggcga	300
gggaccaagg ttgagatcaa a	321
[0085] <210> 269	
<211> 357	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 269	
caggtgcagc tggggagtc tggggaggc gtggccagc ctgggaggc cctgagactc	60
tcctgtcag cgtctggatt caccttca gactttata tgcactgggt ccgcaggct	120
ccaggcaagg ggctggatg ggtggcagg ataggtgcgg atgaaatgaa taaatactat	180
gcagactccg tggagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaa atga acaggcctgag agctgaggac acggcgttgc actactgcgc caagccatg	300
ccacggcgta gaggcctaga cgtatgggt caggta caa tggtcaccgt ctccctca	357
<210> 270	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 270	
gacatccagt tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttaggaga cagagtcacc	60

atcacttgtc gggcagtc gggatttgc agctggtag cctggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagcg gcagtggate tggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagect	240
gaagatttg caacttatta ctgtcagcag gcatttacc tcccttggac ttttggcga	300
gggaccaagg ttgagatcaa a	321

<210> 271
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 271

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala		
1	5	10

[0086] <210> 272
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 272

Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser			
1	5	10	15

<210> 273
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 273

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp			
1	5	10	15

Ile

<210> 274
 <211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 274

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 275

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 275

Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser

1 5 10 15

<210> 276

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

[0087]

<400> 276

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp

1 5 10 15

Ile

<210> 277

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 277

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 278

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 278

Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
1 5 10 15

<210> 279

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 279

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp
1 5 10 15

Ile

<210> 280

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

[0088]

<400> 280

Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 281

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 281

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 282

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 282

Ala Arg Glu Ala Gln Ser Tyr Arg Val Pro Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 283

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 283

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 284

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 284

[0089] Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 285

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 285

Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 286

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 286

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 287
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 287

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 288
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 288

Gln Gln Glu Asn Pro Arg Pro Arg Thr
 1 5

[0090] <210> 289
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 289

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 290
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 290

Phe Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

<210> 291
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 291

Gln Gln Thr Ser Pro Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 292
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 292

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 293
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 293

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

[0091]

<210> 294
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 294

Gln Gln Tyr Ala Ile Trp Pro Pro Phe Thr
 1 5 10

<210> 295
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 295

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
 20 25

<210> 296
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 296

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 297
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 297

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

[0092]

<210> 298
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 298

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 299
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 299

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
 20 25

<210> 300
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 300

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 301
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 301

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

[0093]

<210> 302
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 302

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 303
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 303

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly

20

25

<210> 304
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 304

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 305
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 305

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

[0094]

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 306
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 306

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 307
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 307

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
20 25

<210> 308
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 308

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 309
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 309

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

[0095]

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 310
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 310

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 311
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 311

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
20

<210> 312
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 312

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 313
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 313

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

[0096]

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 314
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 314

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 315
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 315

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 316
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 316

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 317
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 317

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

[0097]

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 318
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 318

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 319
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 319

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
20

<210> 320

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 320

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 321

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 321

[0098]

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 322

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 322

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 323

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 323

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
 20

<210> 324
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 324

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 325
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 325

[0099]

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 326
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 326

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 327
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 327

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

[0100] Cys Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe
 100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 328

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 328

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 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala 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 Ser Pro Pro Trp Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 329

<211> 125

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 329

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 [0101] 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe
 100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 330
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 330

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

[0102] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala 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 Glu Asn Pro Arg Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 331
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 331

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe
100 105 110

[0103] Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 332

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 332

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 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Ala 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 Thr Ser Pro Trp Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 333

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 333

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0104] 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ala Gln Ser Tyr Arg Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 334
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 334

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 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala 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
 [0105]

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ile Trp Pro Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 335
 <211> 375
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 335

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccgagga ctggtaagc cttcgagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcage agtgggagtt actacttggc gtggatccgc 120
 cagcccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct ttcggagtgg gagcacctac 180
 tacaaccgtt ccctcgagag tcgagtcacc atatcggttag acacgtccaa gaaccagtcc 240
 tccctgaagc tgagttctgt gaccggcga gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa 300

ggagctaact ttaaggactt cggatatgt a cattcgaca tatgggtca gggtacaact	360
gtcaccgtct cctca	375
<210> 336	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 336	
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccaggaga aagagccacc	60
ctctctgtca gggccagtc gagttttagc agcaacttag cctggatcca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc	180
agttcagtgc agtgggtc tggacacagag ttcaactctca ccatcagcag cctgcagtc	240
gaagatttttgc agtttattatgttc ctttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc	300
ggaccaagg ttgagatcaa a	321
<210> 337	
[0106] <211> 375	<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 337	
cagctgcagtc tgcaggagtc gggccagga ctggtaagc ctggagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctgggg ctccatcagc agtgggagtt actacttggc gtggatccgc	120
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtttctt tcggatgg gagcacctac	180
tacaacccgt ccctcgagag tcgagtccacc atatcggtac acacgtccaa gaaccagttc	240
tccctgaagc tgagttctgt gaccggcga gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa	300
ggagctaact ttaaggactt cggatatgt a cattcgaca tatgggtca gggtacaact	360
gtcaccgtct cctca	375
<210> 338	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 338	

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttgc ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtggtagc agctacttag cctggtagcc acagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgtat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
agttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcaactctca ccatcagcag cctagagcct	240
gaagatttg cagtttata ctgtcagcag gaaaacccca ggcctaggac ttttggcgga	300
gggaccaagg ttgagatcaa a	321
<210> 339	
<211> 375	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 339	
cagctgcagc tgcaggagtc gggccagga ctggtaagc ctgcggagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctgggtt ctccatcagc agtgggagtt actacttggc gtggatccgc	120
cagccccccag ggaagggct ggagtggatt gggagtatct ttggagtgg gggcacctac	180
[0107] tacaaccgt ccctcgagag tcgagtcacc atatcggtat acacgtccaa gaaccagttc	240
tcctgaagc tgagttctgt gaccggcga gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa	300
ggagctaact ttaaggactt cggatatgtt gcattcgaca tatgggtca gggtaact	360
gtcacgtct cctca	375
<210> 340	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<400> 340	
gaaatagtgt tgacgcagtc tccagccacc ctgtcttgc ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtaa aagtgttcc agcaacttag cctggtagcc gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatttc gcatccacca gggccaccgg tatcccagcc	180
agttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcaactctca ccatcagcag cctgcagtct	240
gaagatttg cagtttata ctgtcagcag acttcgcct ggcctaggac ttttggcgga	300
gggaccaagg ttgagatcaa a	321

<210> 341
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 341

caggtgcagc tggcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggc	60
tcctgcaagg cttctggagg cacccatcagc agctatgcta tcagctgggt gcgcacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggta agcaaactac	180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggtgt actactgcgc cagagaggct	300
caatcctaca gggttccatt cgacatatgg ggtcaggta caatggtcac cgtctcctca	360

<210> 342
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0108]

<400> 342

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcaacttag cctggtagca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc	180
agttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tacgccatct ggcctcctt cactttggc	300
ggagggacca aggtttagat caaa	324

<210> 343
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠(Rattus norvegicus)

<400> 343

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1															

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Gly Lys Thr Tyr Tyr Arg Phe Lys Trp Tyr Ser Asp Tyr Ala
 50 55 60

Val Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95

Phe Tyr Cys Thr Arg Glu Ser Thr Thr Tyr Asp Leu Leu Ala Gly Pro
 100 105 110

[0109] Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 344

<211> 113

<212> PRT

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 344

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Thr Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 345

<211> 130

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 345

Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
[0110] 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
20 25 30

Ile Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr
100 105 110

Tyr Phe Phe Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 115 120 125

Ser Ser
130

- <210> 346
- <211> 109
- <212> PRT
- <213> 小家鼠(*Mus musculus*)

〈400〉 346

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

[0111]

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala 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 Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 347
<211> 119
<212> PRT
<213> 小家鼠(*Mus musculus*)

〈400〉 347

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr			
20	25	30	

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe			
50	55	60	

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr			
65	70	75	80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	

[0112]

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
115			

<210> 348

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 348

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr			
20	25	30	

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
---	--	--	--

50	55	60
----	----	----

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65															

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Phe	Gly	Ser	Pro	Leu
85															95

Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys
100										105

<210> 349

<211> 118

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 349

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1															
			5					10					15		

[0113]

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp
20														30	

Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
35															45

Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
50															60

Arg	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe
65															80

Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85															95

Ala	Arg	Arg	Gln	Val	Gly	Leu	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
100															110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 350
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 350

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 Ser 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

[0114]

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 His Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly

<210> 351
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 351

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

[0115] <210> 352
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <400> 352

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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 353
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 353

Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Leu Ile Ser
 1 5

<210> 354
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0116] <400> 354

Gly Ile Tyr Pro Ile Phe Ala Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 355
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 355

Ala Arg Glu Ala Gln Ser Tyr Arg Val Pro Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 356
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 356

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 357

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 357

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 358

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 358

[0117] Gln Gln Tyr Ala Ile Trp Pro Pro Phe Thr
1 5 10

<210> 359

<211> 26

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 359

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
20 25

<210> 360

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 360

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 361
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 361

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 362
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 362

[0118]

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 363
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 363

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
 20

<210> 364
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 364

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 365
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 365

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 366
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 366

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 367
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 367

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Ile Phe Ala Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ala Gln Ser Tyr Arg Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 368

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 368

[0120]

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 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala 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 Ala Ile Trp Pro Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 369

<211> 360

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 369

caggtgcagc tggcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggc 60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctacctca tcagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atctacccta tcttcgcaac agcaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggtgt actactgcgc cagagaggct 300

[0121] caatcctaca gggttccatt cgacatatgg ggtcaggta caatggcac cgtctcctca 360

<210> 370

<211> 324

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 370

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtc gaggtagc agcaacttag cctggtagca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc 180

agttcagtgc cagttggtc tggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtc 240

gaagattttt cagtttattt ctgtcagcag tacccatct ggcctcctt cactttggc 300

ggagggacca aggtttagat caaa 324

抗体	VH CDR1	SEQ ID NO:	VH CDR2	SEQ ID NO:	VH CDR3	SEQ ID NO:
26518	FTFSSYGM	1	NIKQDGSEKYYVDSVKG	2	ARVYYYYDSSKLRWALEYFQH	3
29478	FTFESYGMV	4	SILYDGSNRYYADSVKG	5	ARVYYYYDSVELRWALEYFQH	6
26452	YTFTSYYMH	7	VINPSGGSTSYYAQKFQG	8	ARDHSDDYWSGLDVL	9
29487	YTFEKYYMH	10	VIGPSGAASTSYYAQKFQG	11	ARDHSDDYWSGLHS	12
29489	YTFTSYYMH	13	VIGPSGAASTSYYAQKFQG	14	ARDHSDDYWSGIMEV	15
31282	YTFTSYYMH	16	VIGPSGAASTSYYAQKFQG	17	ARDHSDDYWSGIMEV	18
26486	YSSSSGYYWA	19	SIYHSGGSTYYNPSLKS	20	AIEGANYYDFGYVAFDI	21
29494	GSISSGSSYLA	22	SIFRSGGSTYYNPSLES	23	AIEGANFKDFGYVAFDI	24
29499	GSISSSRYYWA	25	SIGTSGGSTYYNPSLKS	26	AIEGANFRDFGYVAFDI	27
26521	GTFSSYAI	28	GIIPIFGTANYAQKFQG	29	ARLHLGSSAYYGMDV	30
29513	GTFQNYAI	31	VIVPIFGTANYAQKFQG	32	ARLHLGQKAYYGMDV	33
26493	FTFGDYAMH	34	GITWNSSIGYADSVKG	35	AKPVPKSRSGLDV	36
29520	FTFRDYAMH	37	GITWNSSGLIGYADSVKG	38	AKPVPRLRGLDV	39
29523	FTFGSYYMH	40	VIWPDGSNKLYYADSVKG	41	AKPVPKSRA LDV	42
29527	FTFSSSYMH	43	VIGADGSNKKYYADSVEG	44	AKPVPRRRGLDV	45
31288	GSISSGSSYLA	271	SIFRSGGSTYYNPSLES	272	AIEGANFKDFGYVAFDI	273
32919	GSISSGSSYLA	274	SIFRSGGSTYYNPSLES	275	AIEGANFKDFGYVAFDI	276
32931	GSISSGSSYLA	277	SIFRSGGSTYYNPSLES	278	AIEGANFKDFGYVAFDI	279
26432	GTFSSYAI	280	GIIPIFGTANYAQKFQG	281	AREAQSYYRVPFDI	282
32959	GTFSSYLI	353	GIYPIFATANYAQKFQG	354	AREAQSYYRVPFDI	355

图1-VH CDR序列

抗体	VL CDR1	SEQ ID NO:	VL CDR2	SEQ ID NO:	VL CDR3	SEQ ID NO:
26518	RASQSVSSYLA	46	DASKRAT	47	QQVHNFPLT	48
29478	RASQSVSSYLA	49	DASKRAT	50	QQVHNFPLT	51
26452	RASQSVRSSYLA	52	GASSRAT	53	QQYFSPPWT	54
29487	RASQSVRSSYLA	55	GASSRAT	56	QQYFSPPWT	57
29489	RASQSVRSSYLA	58	GASSRAT	59	QQYFSPPWT	60
31282	RASQSVRSSYLA	61	GASSRAT	62	QQYFSPPWT	63
26486	RASQSVSSNLA	64	GASTRAT	65	QQSPPWPRT	66
29494	RASQSVSSNLA	67	GASTRAT	68	QQSPPWPRT	69
29499	RASQSVSSNLA	70	GASTRAT	71	QQSPPWPRT	72
26521	RASQSISSYLN	73	AASSLQS	74	QQRYVFPPT	75
29513	RASQSISSYLN	76	AASSLQS	77	QQRYVFPPT	78
26493	RASQGISSWLA	79	GASSLQS	80	QQAFYLPWT	81
29520	RASQGISSWLA	82	GASSLQS	83	QQAFYLPWT	84
29523	RASQGISSWLA	85	GASSLQS	86	QQAFYLPWT	87
29527	RASQGISSWLA	88	GASSLQS	89	QQAFYLPWT	90
31288	RASQSVSSNLA	283	GASTRAT	284	QQSPPWPRT	285
32919	RASQSVSSYLA	286	DASN RAT	287	QQENPRPRT	288
32931	RASKSVSSNLA	289	FASTRAT	290	QQTSPWPRT	291
26432	RASQSVSSNLA	292	GASTRAT	293	QQYAIWPPFT	294
32959	RASQSVSSNLA	356	GASTRAT	357	QQYAIWPPFT	358

图2-VL CDR序列

抗体	VH FR1	SEQ ID NO:	VH FR2	SEQ ID NO:	VH FR3	SEQ ID NO:	VH FR4	SEQ ID NO:
26518	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASG	91	WVRQAPGKGLEWA	92	RFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYC	93	WGQGTL VTVSS	94
29478	EVQLVESGGGVQPG RSLRLSCAASG	95	WVRQAPGKGLEWA	96	RFTISRDNAKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYC	97	WGQGTL VTVSS	98
26452	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCAASG	99	WVRQAPGQGLEWMG	100	RVTMTRDTSTSYVMELSSL RSEDTAVYYC	101	WGQGTM VTVSS	102
29487	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCAASG	103	WVRQAPGQGLEWMG	104	RVTMTRDTSTSYVMELSSL RSEDTAVYYC	105	WGQGTM VTVSS	106
29489	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCAASG	107	WVRQAPGQGLEWMG	108	RVTLTRDTSTSYVMELSSL RSEDTAVYYC	109	WGQGTM VTVSS	110
31282	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCAASG	111	WVRQAPGQGLEWMG	112	RVTLTRDTSTSYVMELSSL RSEDTAVYYC	113	WGQGTT VTVSS	114
26486	QVQLQESGPGLVKPS ETSLTCAVSG	115	WIRQPPGKGLEWIG	116	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYC	117	WGQGTM VTVSS	118
29494	QVQLQESGPGLVKPS ETSLTCTVSG	119	WIRQPPGKGLEWIG	120	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYC	121	WGQGTM VTVSS	122
29499	QLQLQESGPGLVKPSE TLSLTCTVSG	123	WIRQPPGKGLEWIG	124	RVTITADESTSTAYMELSSLR ATDTAVYYC	125	WGQGTM VTVSS	126
26521	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCAASG	127	WVRQAPGQGLEWMG	128	RVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	129	WGQGTT VTVSS	130
29513	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCAASG	131	WVRQAPGQGLEWMG	132	RVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	133	WGQGTT VTVSS	134
26493	EVQLVESGGGLVQPG RSLRLSCAASG	135	WVRQAPGKGLEWS	136	RFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTALYYC	137	WGQGTM VTVSS	138
29520	QVQLVESGGGLVQPG RSLRLSCAASG	139	WVRQAPGKGLEWS	140	RFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTALYYC	141	WGQGTM VTVSS	142
29523	EVQLVESGGGVQPG RSLRLSCAASG	143	WVRQAPGKGLEWA	144	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTALYYC	145	WGQGTM VTVSS	146
29527	QVQLVESGGGVQPG RSLRLSCAASG	147	WVRQAPGKGLEWA	148	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTALYYC	149	WGQGTM VTVSS	150
31288	QLQLQESGPGLVKPSE TLSLTCTVSG	295	WIRQPPGKGLEWIG	296	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYC	297	WGQGTT VTVSS	298
32919	QLQLQESGPGLVKPSE TLSLTCTVSG	299	WIRQPPGKGLEWIG	300	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYC	301	WGQGTT VTVSS	302

图3-VH FR序列

32931	QLQQESGPGLVKPSE TLSLTCTVSG	303	WIRQPPGKGLEWIG	304	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYC	305	WGQQGTT VTVSS	306
26432	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASG	307	WWRQAPGQGLEWIG	308	RVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	309	WGQQGTM VTVSS	310
32959	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASG	359	WWRQAPGQGLEWIG	360	RVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYC	361	WGQQGTM VTVSS	362

图3 (续)

抗体	VL FR1	SEQ ID NO:	VL FR2	SEQ ID NO:	VL FR3	SEQ ID NO:	VL FR4	SEQ ID NO:
26518	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSC	151	WYQQKPGQQAPRLLY	152	GIPARFSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYC	153	FGGGTK VEIK	154
29478	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSC	155	WYQQKPGQQAPRLLY	156	GIPARFSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYC	157	FGGGTK VEIK	158
26452	EIVLTQSPGTLSSLSPGE RATLSC	159	WYQQKPGQQAPRLLY	160	GIPDRFSGSGSGTDFTLTSSR LEPEDFAVYYC	161	FGGGTK VEIK	162
29487	EIVLTQSPGTLSSLSPGE RATLSC	163	WYQQKPGQQAPRLLY	164	GIPDRFSGSGSGTDFTLTSSR LEPEDFAVYYC	165	FGGGTK VEIK	166
29489	EIVLTQSPGTLSSLSPGE RATLSC	167	WYQQKPGQQAPRLLY	168	GIPDRFSGSGSGTDFTLTSSR LEPEDFAVYYC	169	FGGGTK VEIK	170
31282	EIVLTQSPGTLSSLSPGE RATLSC	171	WYQQKPGQQAPRLLY	172	GIPDRFSGSGSGTDFTLTSSR LEPEDFAVYYC	173	FGGGTK VEIK	174
26486	EIVMTQSPATLSSVSPG ERATLSC	175	WYQQKPGQQAPRLLY	176	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	177	FGGGTK VEIK	178
29494	EIVMTQSPATLSSVSPG ERATLSC	179	WYQQKPGQQAPRLLY	180	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	181	FGGGTK VEIK	182
29499	EIVMTQSPATLSSVSPG ERATLSC	183	WYQQKPGQQAPRLLY	184	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	185	FGGGTK VEIK	186
26521	DIQMTQSPSSLSASVG DRVTIC	187	WYQQKPGKAPKLLY	188	GVPSRFSGGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC	189	FGGGTK VEIK	190
29513	DIQMTQSPSSLSASVG DRVTIC	191	WYQQKPGKAPKLLY	192	GVPSRFSGGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC	193	FGGGTK VEIK	194
26493	DIQLTQSPSSVSASVG DRVTIC	195	WYQQKPGKAPKLLY	196	GVPSRFSGGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC	197	FGGGTK VEIK	198
29520	DIQLTQSPSSVSASVG DRVTIC	199	WYQQKPGKAPKLLY	200	GVPSRFSGGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC	201	FGGGTK VEIK	202
29523	DIQLTQSPSSVSASVG DRVTIC	203	WYQQKPGKAPKLLY	204	GVPSRFSGGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC	205	FGGGTK VEIK	206
29527	DIQLTQSPSSVSASVG DRVTIC	207	WYQQKPGKAPKLLY	208	GVPSRFSGGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC	209	FGGGTK VEIK	210
31288	EIVMTQSPATLSSVSPG ERATLSC	311	WYQQKPGQQAPRLLY	312	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	313	FGGGTK VEIK	314
32919	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSC	315	WYQQKPGQQAPRLLY	316	GIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYC	317	FGGGTK VEIK	318

图4-VL FR序列

32931	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	319	WYQQKPGQAPRLLIY	320	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	321	FGGGTK VEIK	322
26432	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	323	WYQQKPGQAPRLLIY	324	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	325	FGGGTK VEIK	326
32959	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC	363	WYQQKPGQAPRLLIY	364	GIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC	365	FGGGTK VEIK	366

图4 (续)

抗体	VH蛋白	SEQ ID NO.	VL蛋白	SEQ ID NO.
26518	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWSWR QAPGKGLEW/ANIKQDGSEKYYDSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSYYDDSSLRWAEEYFQ HWGQGTLTVSS	211	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSL EPEDFAVYYCQQVHNFPILTGGGTKEIK	212
29478	EVQLVESGGGV/QPGRSLRLSCAASGFTFESYGMWVR QAPGKGLEW/ASILYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNAKN NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVSYYDDSSLRWAEEYFQ HWGQGTLTVSS	213	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSL EPEDFAVYYCQQVHNFPILTGGGTKEIK	214
26452	QVQLVQSGAEV/KPGASVK/VSKASGYFTSYMMHWVR QAPGQGLEMMGVINPSGGSTSVAQKFGQGRVTMTRDTST STVYMEISSLRSED/TAVYYCARDHSDYWSGILDWVGQG TMVTVSS	215	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYFSPPWTFGGGTKEIK	216
29487	QVQLVQSGAEV/KPGASVK/VSKASGYFTSYMMHWVR QAPGQGLEMMGVIGPSGASTSYAQKFGQGRVTMTRDTST STVYMEISSLRSED/TAVYYCARDHSDYWSGILHSGWQG TMVTVSS	217	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYFSPPWTFGGGTKEIK	218
29489	QVQLVQSGAEV/KPGASVK/VSKASGYFTSYMMHWVR QAPGQGLEMMGVIGPSGASTSYAQKFGQGRVTLTRDTST STVYMEISSLRSED/TAVYYCARDHSDYWSGIMEVWQG TMVTVSS	219	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYFSPPWTFGGGTKEIK	220
31282	QVQLVQSGAEV/KPGASVK/VSKASGYFTSYMMHWVR QAPGQGLEMMGVIGPSGASTSYAQKFGQGRVTLTRDTST STVYMEISSLRSED/TAVYYCARDHSDYWSGIMEVWQG TTVTVSS	221	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYFSPPWTFGGGTKEIK	222
26486	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISGGYYWAWIR QPPGKGLEWIGSIYHSGSTYYNPSLKSRSVTISVDTSKNQF SKLSSVTAAADTAVYYCAIEGANYYDFGYVAFDIWQGT MTVTVSS	223	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTSSL QSEDFAVYYCQQSPPWPRTFGGGTKEIK	224
29494	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISGGYYWAWIR QPPGKGLEWIGSIYHSGSTYYNPSLESRVTISVDTSKNQF SKLSSVTAAADTAVYYCAIEGANFKDFGYVAFDIWQGT MTVTVSS	225	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTSSL QSEDFAVYYCQQSPPWPRTFGGGTKEIK	226

图5-可变结构域蛋白序列

29499	QLQESGPGLVKPSETLSLCTVSGGSISSSSRYWAWI RQPPGKGLEWIGSITSGSTYNNPLSKSRNTISVDTSKNQ FSKLSSVTTATDTAVYYCAIEGANFRDFGYVAFDIWGQGT MVTVSS	227	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSTEFTLTSSL QSEDFAVYYCQQSPPWRTFGGGTKVEIK	228
26521	QVQLVQSGAEVKKPGLOSSVKVSCKASGGTFSYYAISW/R QAPGQGLEMMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLHLGSSAYYGMDVWQGT TVTVSS	229	DIQMTQSPSSLSASVVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSL QPEDFATYYCQQRYVFPPTFGGGTKVEIK	230
29513	QVQLVQSGAEVKKPGLOSSVKVSCKASGGTFSYYAISW/R QAPGQGLEMMGVIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTST TAYMELSSLRSEDTAVYYCARLHLGQKAYYGMDVWQGT TVTVSS	231	DIQMTQSPSSLSASVVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSL QPEDFATYYCQQRYVFPPTFGGGTKVEIK	232
26493	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASAGFTFDYAMHWR QAPGKGLEWVSGITWNSSIGYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPVKPSRGIDVWQGTMV TVSS	233	DIQLTQSPSSVSASVVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSL LQPEDFATYYCQQAFYLWPWTFGGGTKVEIK	234
29520	EVQLVESGGGVQFGRSLRLSCAASAGFTFDYAMHWR QAPGKGLEWVAVIPDGNSNKLYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPVKPSRALDVGQGTMV TVSS	235	DIQLTQSPSSVSASVVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSL LQPEDFATYYCQQAFYLWPWTFGGGTKVEIK	236
29523	EVQLVESGGGVQFGRSLRLSCAASAGFTFGSYMMHWR QAPGKGLEWAVIWDGSNKLYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPVKPSRALDVGQGTMV TVSS	237	DIQLTQSPSSVSASVVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSL LQPEDFATYYCQQAFYLWPWTFGGGTKVEIK	238
29527	EVQLVESGGGVQFGRSLRLSCAASAGFTFSSSSYMMHWR QAPGKGLEWAVIAGDGSNKKYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPVKPRRGIDVWQGTMV TVSS	239	DIQLTQSPSSVSASVVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSL LQPEDFATYYCQQAFYLWPWTFGGGTKVEIK	240
31288	QLQESGPGLVKPSETLSLCTVSGGSISSSSYYLAWIRQPGKG LEWIGSIFRSGSTYNNPLSLESRVTSVDTSKNQFSLKSSVTAADTA VYCAIEGANFKDFGYVAFDIWQGTTVVSS	327	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSTEFTLTSSLQSEDFAVYYCQ QSPPMPPRTFGGGTKVEIK	328
32919	QLQESGPGLVKPSETLSLCTVSGGSISSSSYYLAWIRQPGKG LEWIGSIFRSGSTYNNPLSLESRVTSVDTSKNQFSLKSSVTAADTA VYCAIEGANFKDFGYVAFDIWQGTTVVSS	329	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLQSEDFAVYYCQ ENPRPRITFGGGTKVEIK	330
32931	QLQESGPGLVKPSETLSLCTVSGGSISSSSYYLAWIRQPGKG LEWIGSIFRSGSTYNNPLSLESRVTSVDTSKNQFSLKSSVTAADTA VYCAIEGANFKDFGYVAFDIWQGTTVVSS	331	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASKSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYFASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTSSLQSEDFAVYYCQ QTSPWPRITFGGGTKVEIK	332

图5 (续)

26432	QVQLVQSGAEV/KKPSSV/KVSCKASGGTSSYAIISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTTADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAREAQSYRVPFDIWGQGTMVTVSS	333	EIVMTQSPTATSPGERATLSRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQ QYAIWPPFTGGTKVEIK	334
32959	QVQLVQSGAEV/KKPSSV/KVSCKASGGTSSYIISWVRQAPGQ LEWMGGIPIFA TANYAQKFQGRVTTADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAREAQSYRVPFDIWGQGTMVTVSS	367	EIVMTQSPTATSPGERATLSRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQ QYAIWPPFTGGTKVEIK	368

图5 (续)

图6-可变结构域DNA序列

抗体	SEQ ID NO:	VL DNA	
		VH DNA	SEQ ID NO:
29489	249	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGTCAGTGAAAGTGAAGAAGGCC TGGGGCCTCAAGTGAAAGTTTCCCTGCAAGGCATCTGGATAAC CTTCACTAGCTACTATATGCACTGGTGCACAGGGCCCTGG ACAAGGGCTTGTAGTGGATGGGAGTGTAGTGGTGT CTAGCCACAAGCTACGCCACAGTCACGGTGTACTACTGGCTG ACGAGCCTGAGATCTGAGACACGGCGGTGTACTACTGGCTG CAGAGACCACTCCGACTACGGTACAATGGTCAACGGCTCCTCA GGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGTCAGTGAAAGTGAAGAAGGCC TGGGGCCTCAAGTGAAAGTTTCCCTGCAAGGCATCTGGATAAC CTTCACTAGCTACTATATGCACTGGTGCACAGGGCCCTGG ACAAGGGCTTGTAGTGGATGGGAGTGTAGTGGTGT CTAGCCACAAGCTACGCCACAGTCACGGTGTACTACTGGCTG ACGAGCCTGAGATCTGAGACACGGCGGTGTACTACTGGCTG CAGAGACCACTCCGACTACGGTACAATGGTCAACGGCTCCTCA GGGTAGGGTACAACACTGGTCAACGGCTCCTCA CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGGCCAGGACTGGTGAAGC CTCGGGAGAACCTCTGTCCTCACCTGGCTGTCTCTGGTTACT CCATCGAGCAGTGGTTACTACTGGGCTTGGATCTATCATAG CCAGGGAAAGGGCTGGTGAAGTGGGATGGGAGTATCTGGTGAAGC TGGGAGGACACTACAGTCAACCCGTCCTCAAGGTGAGTGAAGCT CATATCAGTAGACACTACGGTCCAAGAACACAGTCTGGTGAAGCT GAGTTCTGTGACCGGCCAGAACACGGGGGTGACTACTGG COATAGAAGGAGCTAACACTACGACTTCGGATATGTAGCAT TCGACATATGGGTCAAGGTACAATGGTCAACGGCTCCTCA CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGGCCAGGACTGGTGAAGC CTCGGGAGAACCTCTGTCCTCACCTGGCTGTCTCTGGCT COATCGAGCAGTGGGAGTTACTACTGGGCTTGGATCTGGTGAAGC CCCGAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGAGTGGGAGTATCTGGTGAAGC GAGTGGGGAGAACCTACTACAAACCCGTCCTCAAGGAACCTGA TCACCATATGGTAGACACGTCCAAGAACACAGTCTGGTGAAGCT AGCTGAGTTCTGTGACCGGCCAGAACACGGGGGTGACTACTGG TCGCCCCATAGAAGGAGCTAACCTTAAGGACTTCGGATATGTA GCAATTGGCATATGGGTCAAGGTACAATGGTCAACGGCTCCTCA TCA	GAATTGGTGTGACGCAGTCAGGCACCCCTGGTCTGGTC TCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTGGCAGGGCAGTCAG AGTGTAGGAGCAGCTACCTAGCCTGGTACCCAGCAGAAAC TGCCAGGGCTCCAGGGCTCCATCTATGGTGCATCCAGCAGAA AGGGCCACTGGATCCAGACAGGTTAGTGGCAGTGGGT CTGGGACAGACGACTTCACACTCACCAACCAACGGACTGGAC GAAGATTTGAGTGTATTACTGTGACAGTACTTCAGTCCT CTTGGACTTTGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
31282	251	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGTCAGTGAAAGTGAAGAAGGCC TGGGGCCTCAAGTGAAAGTTTCCCTGCAAGGCATCTGGATAAC CTTCACTAGCTACTATATGCACTGGTGCACAGGGCCCTGG ACAAGGGCTTGTAGTGGATGGGAGTGTAGTGGTGT CTAGCCACAAGCTACGCCACAGTCACGGTGTACTACTGGCTG ACGAGCCTGAGATCTGAGACACGGCGGTGTACTACTGGCTG CAGAGACCACTCCGACTACGGTACAATGGTCAACGGCTCCTCA GGGTAGGGTACAACACTGGTCAACGGCTCCTCA CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGGCCAGGACTGGTGAAGC CTCGGGAGAACCTCTGTCCTCACCTGGCTGTCTCTGGTTACT CCATCGAGCAGTGGTTACTACTGGGCTTGGATCTATCATAG CCAGGGAAAGGGCTGGTGAAGTGGGATGGGAGTATCTGGTGAAGC TGGGAGGACACTACAGTCAACCCGTCCTCAAGGTGAGTGAAGCT CATATCAGTAGACACTACGGTCCAAGAACACAGTCTGGTGAAGCT GAGTTCTGTGACCGGCCAGAACACGGGGGTGACTACTGG COATAGAAGGAGCTAACACTACGACTTCGGATATGTAGCAT TCGACATATGGGTCAAGGTACAATGGTCAACGGCTCCTCA CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGGCCAGGACTGGTGAAGC CTCGGGAGAACCTCTGTCCTCACCTGGCTGTCTCTGGCT COATCGAGCAGTGGGAGTTACTACTGGGCTTGGATCTGGTGAAGC CCCGAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGAGTGGGAGTATCTGGTGAAGC GAGTGGGGAGAACCTACTACAAACCCGTCCTCAAGAACCTGA TCACCATATGGTAGACACGTCCAAGAACACAGTCTGGTGAAGCT AGCTGAGTTCTGTGACCGGCCAGAACACGGGGGTGACTACTGG TCGCCCCATAGAAGGAGCTAACCTTAAGGACTTCGGATATGTA GCAATTGGCATATGGGTCAAGGTACAATGGTCAACGGCTCCTCA TCA	GAATTAGTGTGACGCAGTCAGGCACCCCTGGTCTGGTC TCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTGGCAGGGCAGTCAG AGTGTAGGAGCAGCTACCTAGCCTGGTACCCAGCAGAAAC TGCCAGGGCTCCAGGGCTCCATCTATGGTGCATCCAGCAGAA CCAGGGCTCCAGGGCTCCATCTATGGTGCATCCAGCAGAA GCACTGGTATCCAGCAGGGTTAGTGGCAGTGGGTCTG GAACAGAGTTCACTCTCACCACTCACCAACGGACTGGCAGTC GATTGGCAGTTTACTGTGACAGTACTTCAGTCCT TAGGACTTTGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
26486	253	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGTCAGTGAAAGTGAAGAAGGCC TGGGGCCTCAAGTGAAAGTTTCCCTGCAAGGCATCTGGATAAC CTTCACTAGCTACTATATGCACTGGTGCACAGGGCCCTGG ACAAGGGCTTGTAGTGGATGGGAGTGTAGTGGTGT CTAGCCACAAGCTACGCCACAGTCACGGTGTACTACTGGCTG ACGAGCCTGAGATCTGAGACACGGCGGTGTACTACTGGCTG CAGAGACCACTCCGACTACGGTACAATGGTCAACGGCTCCTCA GGGTAGGGTACAACACTGGTCAACGGCTCCTCA CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGGCCAGGACTGGTGAAGC CTCGGGAGAACCTCTGTCCTCACCTGGCTGTCTCTGGTTACT CCATCGAGCAGTGGTTACTACTGGGCTTGGATCTATCATAG CCAGGGAAAGGGCTGGTGAAGTGGGATGGGAGTATCTGGTGAAGC TGGGAGGACACTACAGTCAACCCGTCCTCAAGGTGAGTGAAGCT CATATCAGTAGACACTACGGTCCAAGAACACAGTCTGGTGAAGCT GAGTTCTGTGACCGGCCAGAACACGGGGGTGACTACTGG COATAGAAGGAGCTAACACTACGACTTCGGATATGTAGCAT TCGACATATGGGTCAAGGTACAATGGTCAACGGCTCCTCA CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGGCCAGGACTGGTGAAGC CTCGGGAGAACCTCTGTCCTCACCTGGCTGTCTCTGGCT COATCGAGCAGTGGGAGTTACTACTGGGCTTGGATCTGGTGAAGC CCCGAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGAGTGGGAGTATCTGGTGAAGC GAGTGGGGAGAACCTACTACAAACCCGTCCTCAAGAACCTGA TCACCATATGGTAGACACGTCCAAGAACACAGTCTGGTGAAGCT AGCTGAGTTCTGTGACCGGCCAGAACACGGGGGTGACTACTGG TCGCCCCATAGAAGGAGCTAACCTTAAGGACTTCGGATATGTA GCAATTGGCATATGGGTCAAGGTACAATGGTCAACGGCTCCTCA TCA	GAATAATAGTGTGACGCAGTCAGGCACCCCTGGTCTGGTC TCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTGGCAGGGCAGTCAG AGTGTAGGAGCAGCTACCTAGCCTGGTACCCAGCAGAAAC TGCCAGGGCTCCAGGGCTCCATCTATGGTGCATCCAGCAGAA CCAGGGCTCCAGGGCTCCATCTATGGTGCATCCAGCAGAA GCACTGGTATCCAGCAGGGTTAGTGGCAGTGGGTCTG GAACAGAGTTCACTCTCACCACTCACCAACGGACTGGCAGTC GATTGGCAGTTTACTGTGACAGTACTTCAGTCCT TAGGACTTTGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
29494	255	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGTCAGTGAAAGTGAAGAAGGCC TGGGGCCTCAAGTGAAAGTTTCCCTGCAAGGCATCTGGATAAC CTTCACTAGCTACTATATGCACTGGTGCACAGGGCCCTGG ACAAGGGCTTGTAGTGGATGGGAGTGTAGTGGTGT CTAGCCACAAGCTACGCCACAGTCACGGTGTACTACTGGCTG ACGAGCCTGAGATCTGAGACACGGCGGTGTACTACTGGCTG CAGAGACCACTCCGACTACGGTACAATGGTCAACGGCTCCTCA GGGTAGGGTACAACACTGGTCAACGGCTCCTCA CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGGCCAGGACTGGTGAAGC CTCGGGAGAACCTCTGTCCTCACCTGGCTGTCTCTGGTTACT CCATCGAGCAGTGGTTACTACTGGGCTTGGATCTATCATAG CCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGAGTGGGAGTATCTGGTGAAGC TGGGAGGACACTACTACAAACCCGTCCTCAAGAACCTGA TCACCATATGGTAGACACGTCCAAGAACACAGTCTGGTGAAGCT AGCTGAGTTCTGTGACCGGCCAGAACACGGGGGTGACTACTGG TCGCCCCATAGAAGGAGCTAACCTTAAGGACTTCGGATATGTA GCAATTGGCATATGGGTCAAGGTACAATGGTCAACGGCTCCTCA TCA	GAATAATAGTGTGACGCAGTCAGGCACCCCTGGTCTGGTC TCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTGGCAGGGCAGTCAG AGTGTAGGAGCAGCTACCTAGCCTGGTACCCAGCAGAAAC TGCCAGGGCTCCAGGGCTCCATCTATGGTGCATCCAGCAGAA CCAGGGCTCCAGGGCTCCATCTATGGTGCATCCAGCAGAA GCACTGGTATCCAGCAGGGTTAGTGGCAGTGGGTCTG GAACAGAGTTCACTCTCACCACTCACCAACGGACTGGCAGTC GATTGGCAGTTTACTGTGACAGTACTTCAGTCCT TAGGACTTTGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA

图6 (续)

图6(续)

抗体	VH DNA	SEQ ID NO:	VL DNA	SEQ ID NO:
29520	CAGGTGCAGCTGGAGCTGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAGCCTCTGGATTAC CTTCGGGATTATGCCATGCCACTGGTCCGGCAAGCTCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTACTTGGAAATAGT GGTTTGTAGGGCTATGGGACTCTGTGAAGGGCTGGATTAC ATCTCAGAGACAAGCAACTCCCTGTATCTGCAAATG AACAGTCTGAGAGCTGAGGGCTGGTACTACTGCGC CAAGCCAGTGCCACGTTGAGAGGCTAGACGTATGGGTCA AGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA	265	GACATCCAGTTGACCCAGTCCCATTTCCGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACCACTCACTGTGGGGAGTCAG GGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATAGCAGAAACCCAGG GAAAGCCCTTAAGCTCTGTATCTAGGTTCAAGGTTCCCA AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACCTCACCATCAGCAGCCTGAGCCTGAAG ATTTCAGCAACTTATTACTGTAGCAGGCCATTCTACCTCCCTT GGACTTTGGGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAA	266
29523	GAAGTCCAGCTGGTGAATCTGGGGAGGGTGGTCCAGCC TGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAGCCTCTGGATTAC CTTCGGGAGCTTATATAGCACTGGTCCGGCAAGGCTCCAG GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATAGTGGCTGTATGGA AGTAATAACCTGTATGCAAGACTCCGTGAAGGGGCAATT AACTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGGAGAACACGGGAGCTGGTACTACTGCGC CAAGCCAGTGCCAAATCTAGAGCCTGAGCTTAGACGTATGGGTCA GGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA	267	GACATCCAGTTGACCCAGTCCCATTTCCGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACCACTCACTGTGGGGAGTCAG GGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATAGCAGAAACCCAGG GAAAGCCCTTAAGCTCTGTATCTAGGTTCAAGGTTCCCA AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACCTCACCATCAGCAGCCTGAGCCTGAAG ATTTCAGCAACTTATTACTGTAGCAGGCCATTCTACCTCCCTT GGACTTTGGGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAA	268
29527	CAGGTGCAGCTGGAGCTGGGAGGCTGGTCCAGC CTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAGCCTCTGGATTCA CTTCAGTAGCTCTTATGCACTGGTCCGGCCAGGCTCCAG GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTAGGTGGGATGGA AGTAATAACCTATGCAAGACTCCGTGAAGGGGCAATT AACTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGAGAGGAGCTGAGGAGAACACGGGCTGGTACTACTGCGC CAAGCCAGTGCCACGGCGTAGGGCTAGACGTATGGGTCA AGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA	269	GACATCCAGTTGACCCAGTCCCATTTCCGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACCACTCACTGTGGGGAGTCAG GGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATAGCAGAAACCCAGG GAAAGCCCTTAAGCTCTGTATCTAGGTTCAAGGTTCCCA AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACCTCACCATCAGCAGCCTGAGCCTGAAG ATTTCAGCAACTTATTACTGTAGCAGGCCATTCTACCTCCCTT GGACTTTGGGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAA	270
31288	CAGCTGCAGCTGCCAGGAGCTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCC TTCGGGAGACCCCTGTCCTCACCTGCACGTCTCTGGGCTC CATCAGCAGTGGGAGTTACTCTGGCCTGGATCTTGG COCGAGGGAGGAGCAGCTACTACAACCCGTTCCCTCGAGAGTCAG AGTGGGGAGGAGCAGCTACTACAACCCGTTCCCTCGAGAGTCAG CACCATATGGGTAGACAGCTCCAAAGAACCCAGTTCTCCCTGAA GCTGAGATTCTGTGACCCGCGAGAACACGGGGGTGTTACTACT GCCTGACATAGGGAGCTAACCTTAAGGGACCTGGGATATGTAG CATTTCGACATATGGGTAGGGTACAAACTGTACCCGTCCTCT CA	335	GAATAGTGTAGTACGGCAGTCTCCAGGCCACCCCTGTCCTGTGTC TCAGGGGAAAGGGCAGGCCACCCCTCTCCAGGGCAGTCAG AGTTAGCAGCAACTTGGTACCCAGGCTCCATCTAGTGGCATACCCAGG CCAGGCTCCAGGCTCCATCTAGTGGCATACCCAGG GCACTGGTATCCAGCAGGTTCAAGGGCAGTGGGCTG GGACAGAGTTCACTCTACCATCAGCAGCCTGAGCTGAA GATTTTGCAAGTTATTACTGTAGCAGGTTGGGGACCAAGGTTGAGATCAAA TAGGACTTTGGGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAA	336

图6 (续)

抗体	VH DNA	SEQ ID NO:	VL DNA	SEQ ID NO:
32919	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTGGTGGCCAGGACTGGTGAAGCCT TCGGAGACCCTGTCCCTACCTGCACITGTCGGCTCCA TCAGCAGTGGGAGTTACTACTTGGGTGGATTCGGCTCAGCCCC CAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTGGAGTG GGAGCACCTACTACAACCCGGTCCAGAAGAACAGTTCTGGAGCT ATCGGTAGACGTGGCCAGAACACGGGGTGTACTACTGGCCATA TCGTGTGACAGCTAACCTGGTACATGGATATGTGACATTGGACAT ATGGGGTCAGGGTACAAACTGTACCGGTCTCCCA	337	GAATTAGTGTGACACAGTCCAGGCCACCCCTGTCGTGTC CAGGGGAAAGGGCAGCCACCTCTCTGGAGGGCAGTAAAG GTAGCAGCTACTAGCTGGTACCCAGCAGAAACCTGGCCA GCTCCAGGCTCTCATCTATTTCGATCCACAGGGCCAC CGTATCCAGCAGGTTCACTGGCAGTGGCTGGAGACAG AGTTCACITCACCATCAGCAGCCTGCACTGTGAAGATTTTG CAGTTTATTACTGTCAAGCAGACTTCGGCCCTGGCTAGGACTT TTGGGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	340
32931	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTGGTGGCCAGGACTGGTGAAGCCT TCGGAGACCCTGTCCCTACCTGCACITGTCGGCTCCA TCAGCAGTGGGAGTTACTACTTGGGTGGATTCGGCTCAGCCCC CAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTGGAGTG GGAGCACCTACTACAACCCGGTCCAGAAGAACAGTTCTGGAGCT ATCGGTAGACGTGGCCAGAACACGGGGTGTACTACTGGCCATA TCGTGTGACAGCTAACCTGGTACATGGATATGTGACATTGGACAT ATGGGGTCAGGGTACAACTGTACCGGTCTCCCA	339	GAATTAGTGTGACCGAGTCCAGGCCACCCCTGTCGTGTC CAGGGGAAAGGGCAGCCACCTCTCTGGAGGGCAGTAAAG GTAGCAGCAACTAGCCTGGTACCCAGCAGAAACCTGGCCA GCTCCAGGCTCTCATCTATTTCGATCCACCCAGGGCOA CTGGTATCCAGCAGGTTCACTGGCAGTGGCTGGGACAC GAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCACTGTGAAGATTTT GCAGTTTATTACTGTCAAGCAGACTTCGGCCCTGGCTAGGACTT TTGGGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	342
26432	CAGGTGCAGCTGGTCAAGGGCTGAGGTGAAGAACGCT GGGTCCCTCGTGAAGGTCTCTGCAGGGCTCTGGAGGCCACC TTAGCAGCTATGCTATCAGCTGGTGCAGGGCCCTGG CAAGGGCTTGAAGTGGATGGAGGATCATCCCTATTTGGTA CAGCAAACCTGGCAGAAGTGGCAGGAGTGGCAGATTAC CGGGGAGCAATCCAGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAG CTGGAGATCTGGACACGGGGTTGACTACTGGCCAGAGA GGCTCAATTCTACAGGGTCCATTGACATATGGGTCAAGGT ACAAATGGTCACCGGTCTCTCA	341	GAATTAGTGTGACCGAGTCCAGGCCACCCCTGTCGTGTC CAGGGGAAAGGGCAGCCACCTCTCTGGAGGGCAGTAAAG GTAGCAGCAACTAGCCTGGTACCCAGCAGAAACCTGGCCA GCTCCAGGCTCTCATCTATTTCGATCCACCCAGGGCOA CTGGTATCCAGCAGGTTCACTGGCAGTGGCTGGGACAC GAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCACTGTGAAGATTTT GCAGTTTATTACTGTCAAGCAGACTTCGGCCCTGGCTAGGACTT TTGGGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	342
32959	CAGGTGCAGCTGGTCAAGGGCTGAGGTGAAGAACGCT GGGTCCCTCGTGAAGGTCTCTGCAGGGCTCTGGAGGCCACC TTAGCAGCTACCTCACTAGCTGGGAGTGGAGGATCTACCC CAAGGGCTTGAAGTGGATGGAGGAGTCACTATCTCGCAA CAGCAAACCTGGCAGAAGTGGCAGGAGTGGCAGATTAC CGGGGAGCAATCCAGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAG CTGGAGATCTGGACACGGGGTTGACTACTGGCCAGAGA GGCTCAATTCTACAGGGTCCATTGACATATGGGTCAAGGT ACAAATGGTCACCGGTCTCTCA	369	GAATTAGTGTGACCGAGTCCAGGCCACCCCTGTCGTGTC CAGGGGAAAGGGCAGCCACCTCTCTGGAGGGCAGTAAAG GTAGCAGCAACTAGCCTGGTACCCAGCAGAAACCTGGCCA GCTCCAGGCTCTCATCTATTTCGATCCACCCAGGGCOA CTGGTATCCAGCAGGTTCACTGGCAGTGGCTGGGACAC GAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCACTGTGAAGATTTT GCAGTTTATTACTGTCAAGCAGACTTCGGCCATCTGGCCCTGGG CTTTGGGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	370

图6 (续)

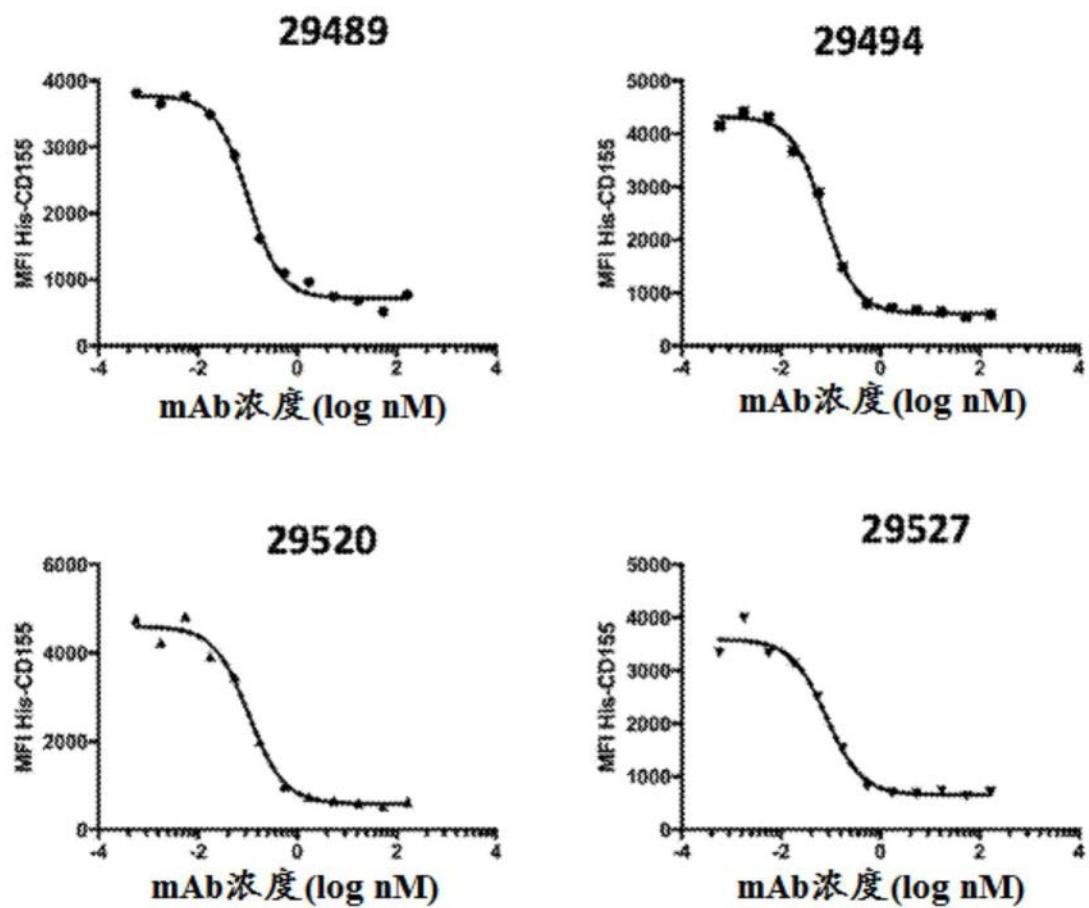


图7-与人CD155配体的竞争

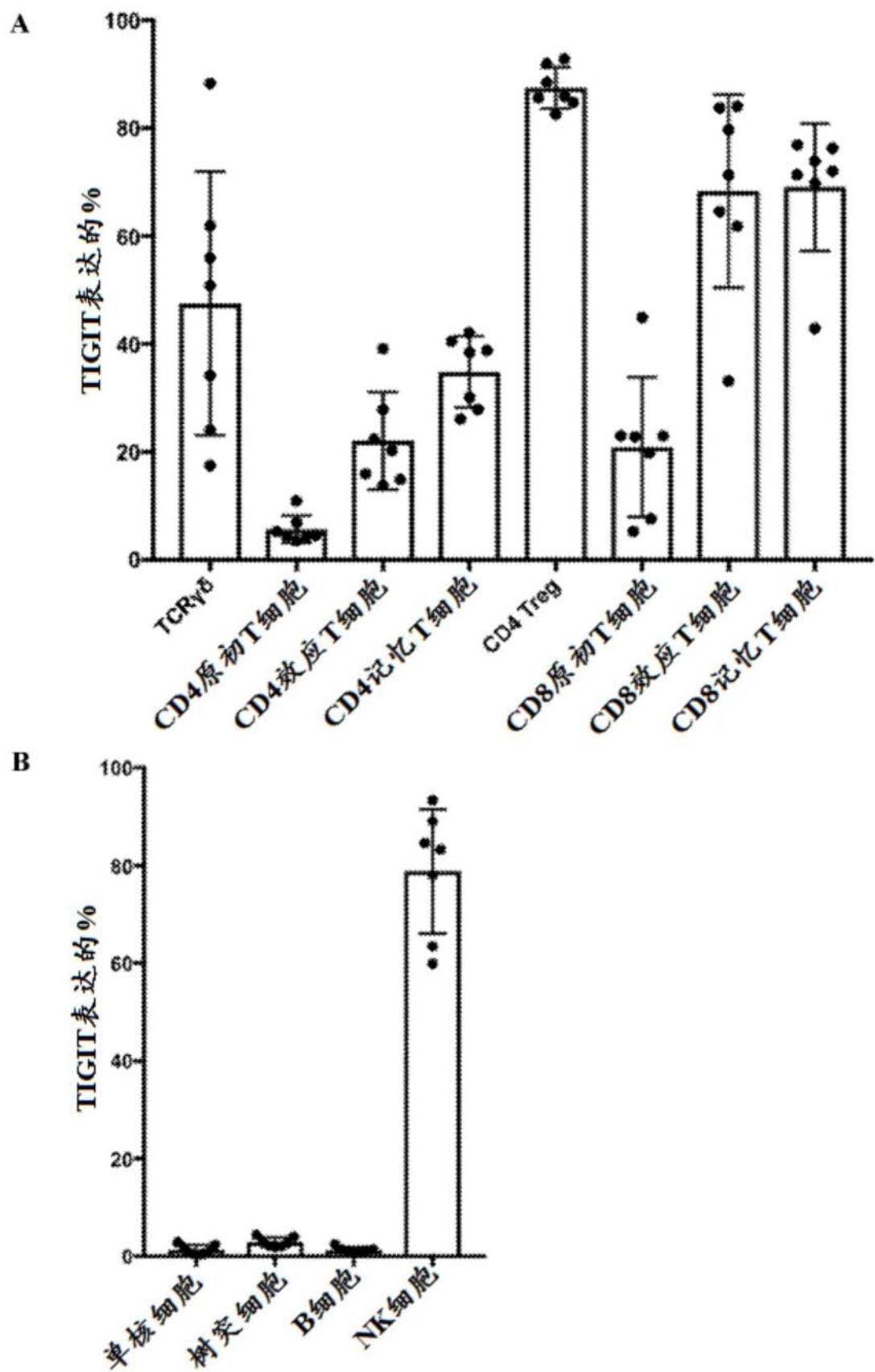


图8-来自健康供体PBMC的不同免疫群体上的TIGIT表达

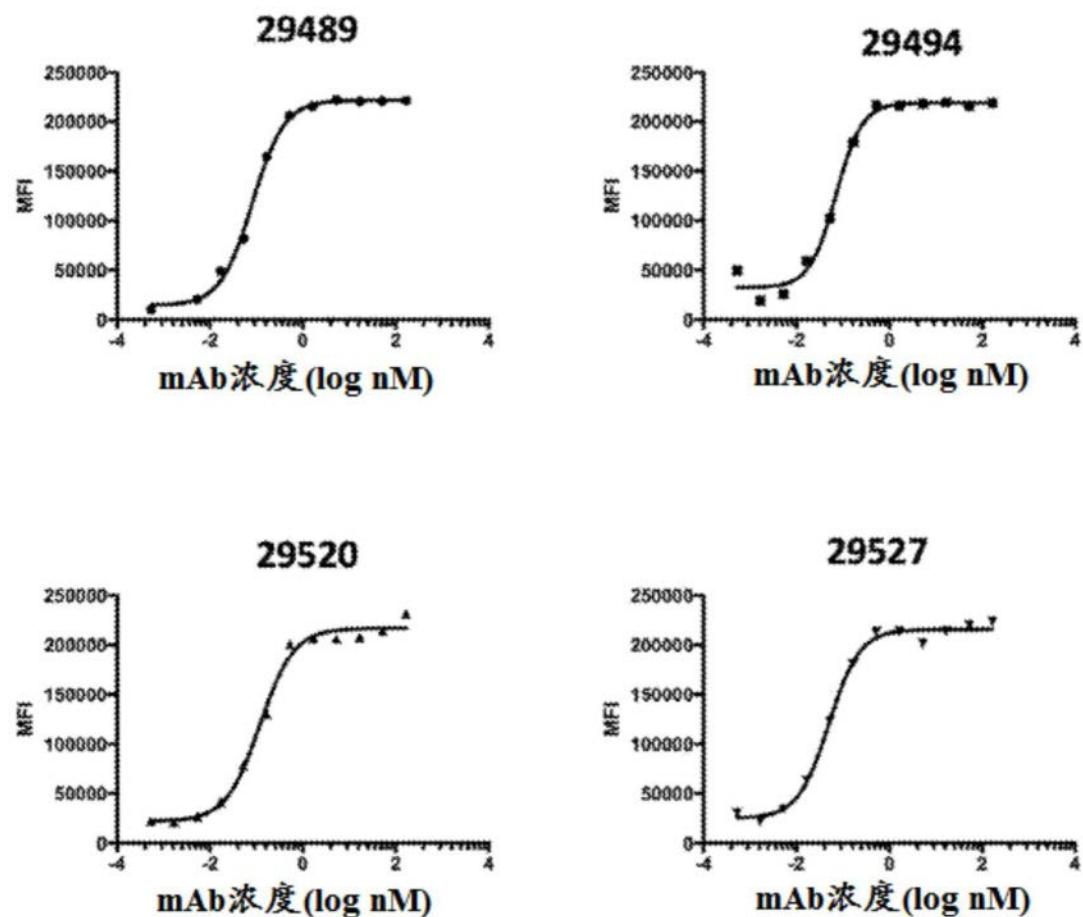


图9-与Jurkat-hTIGIT的结合

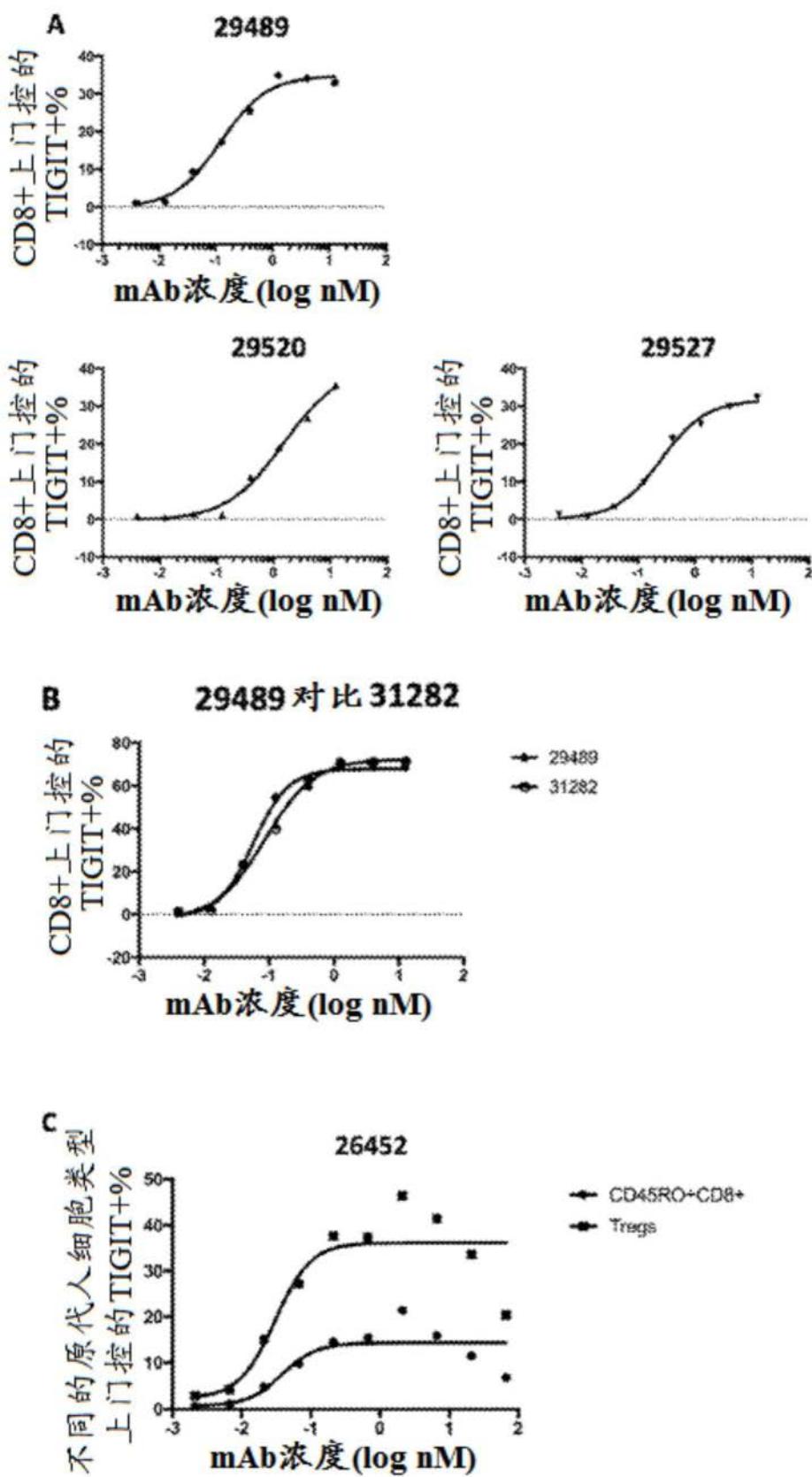


图10-与人原代CD8+T细胞的结合

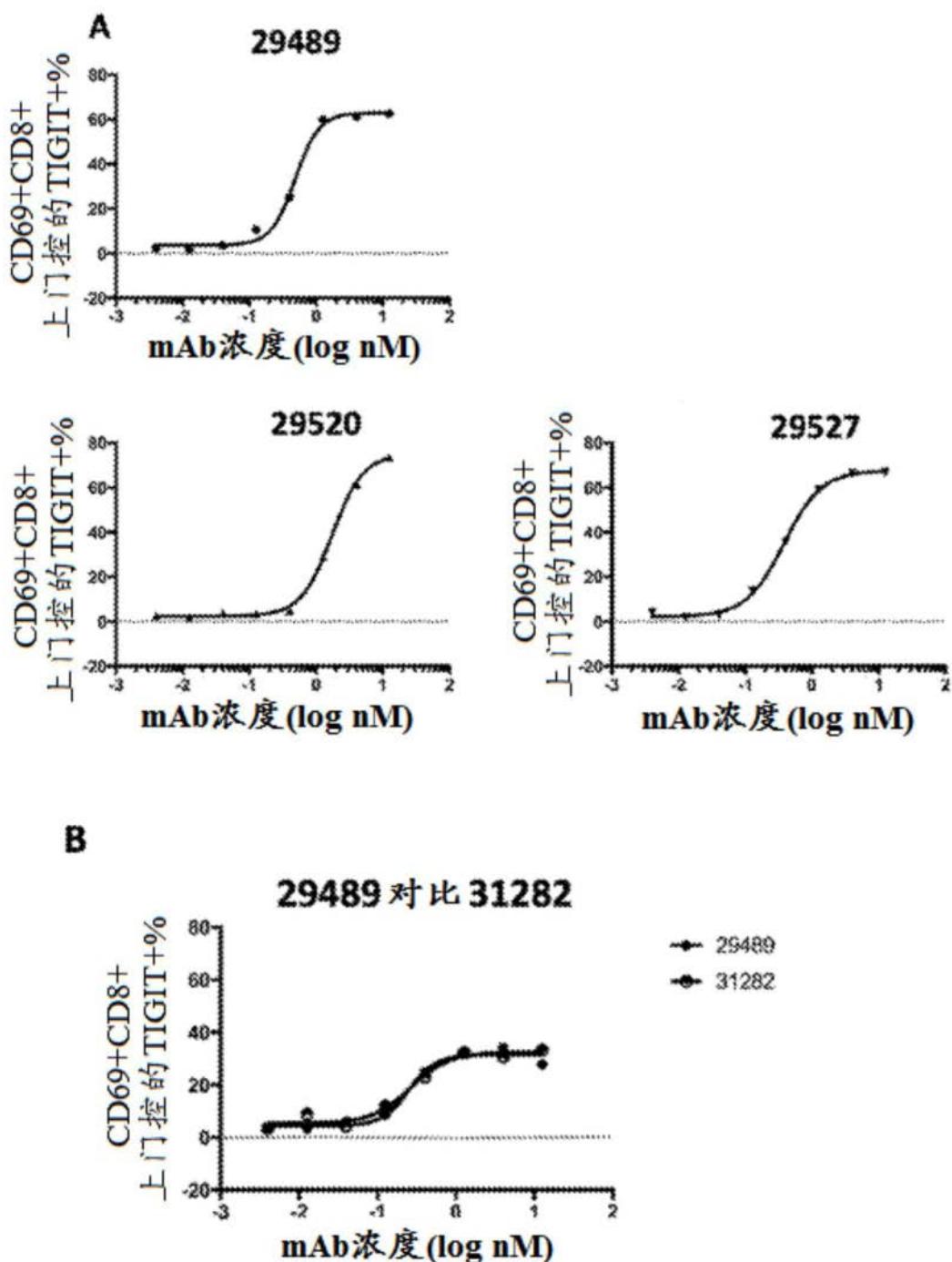
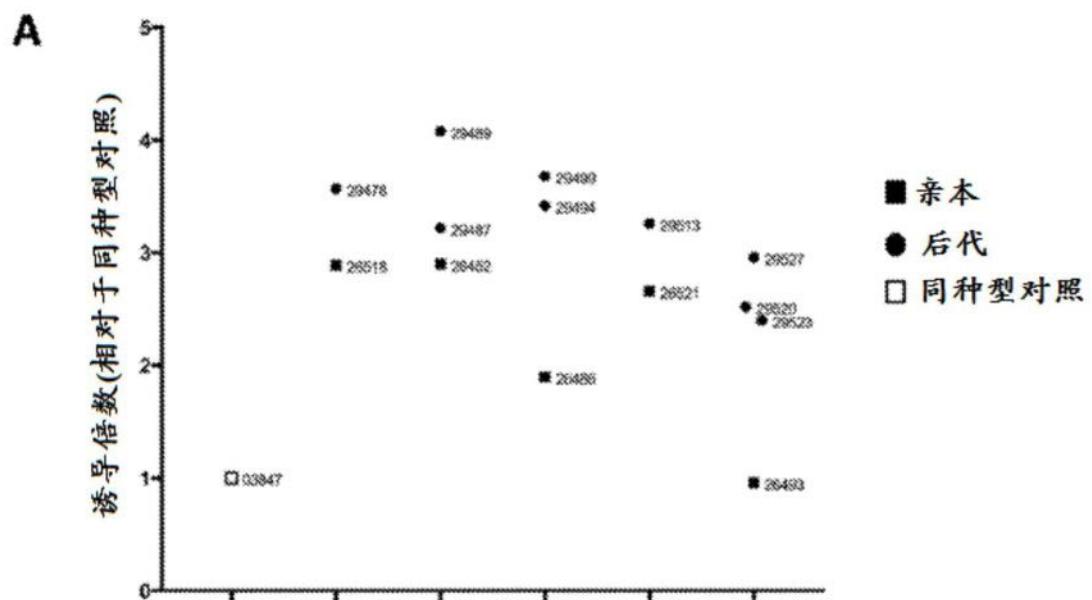


图11-与食蟹猴原代CD8+T细胞的结合



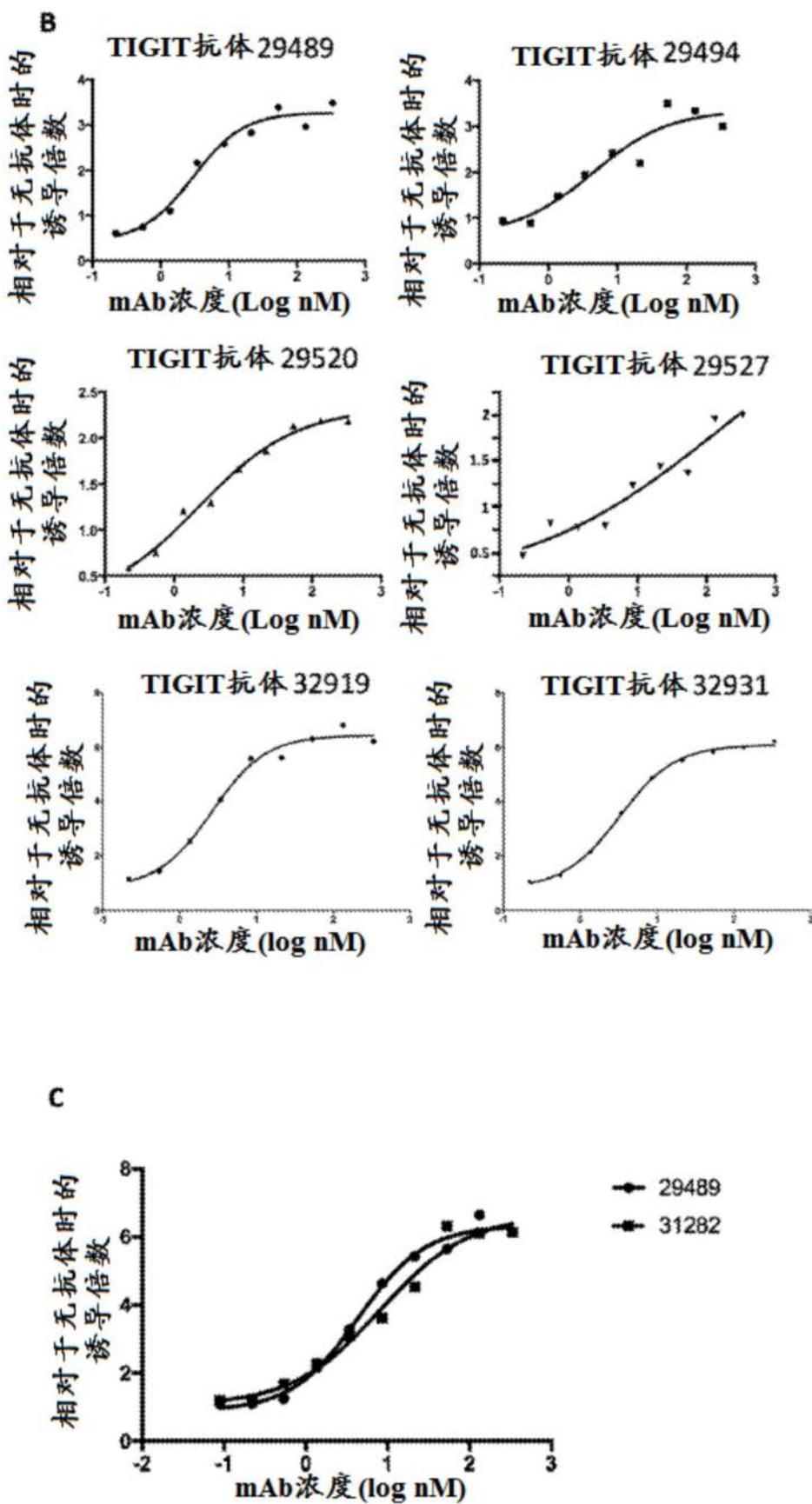


图12-抗TIGIT抗体在CHO-TCR-CD155和Jurkat-hTIGIT生物测定中的作用

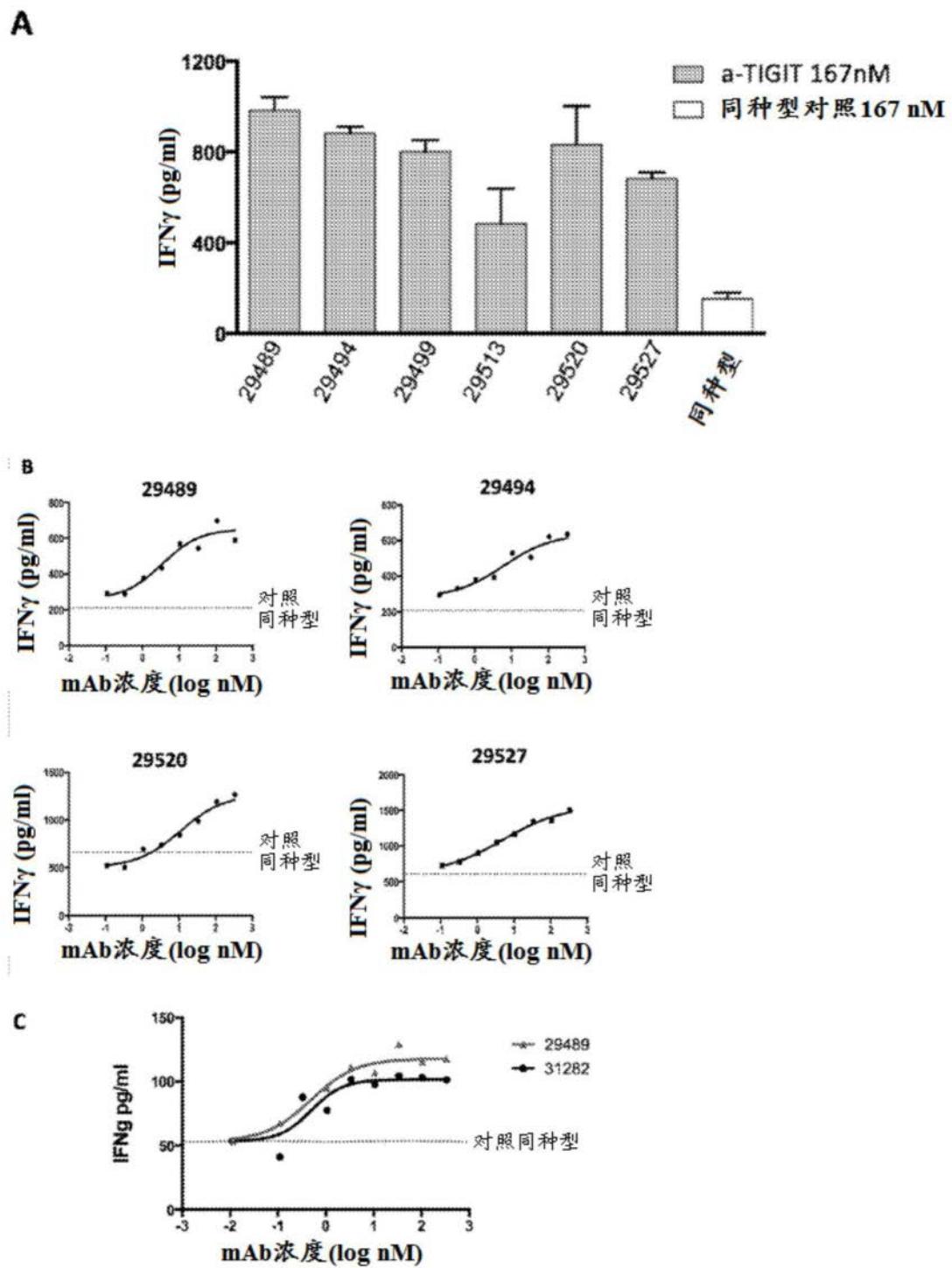


图13-抗TIGIT抗体在基于人CD8+T细胞的功能测定中的作用

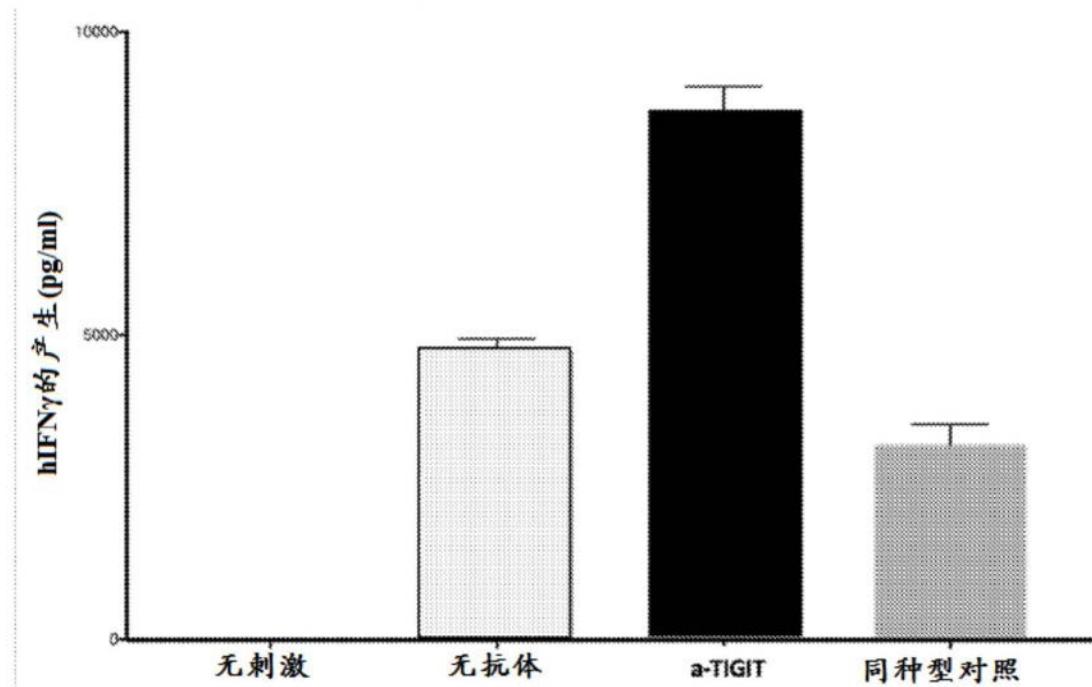


图14-抗TIGIT抗体在基于人TIL的功能测定中的作用

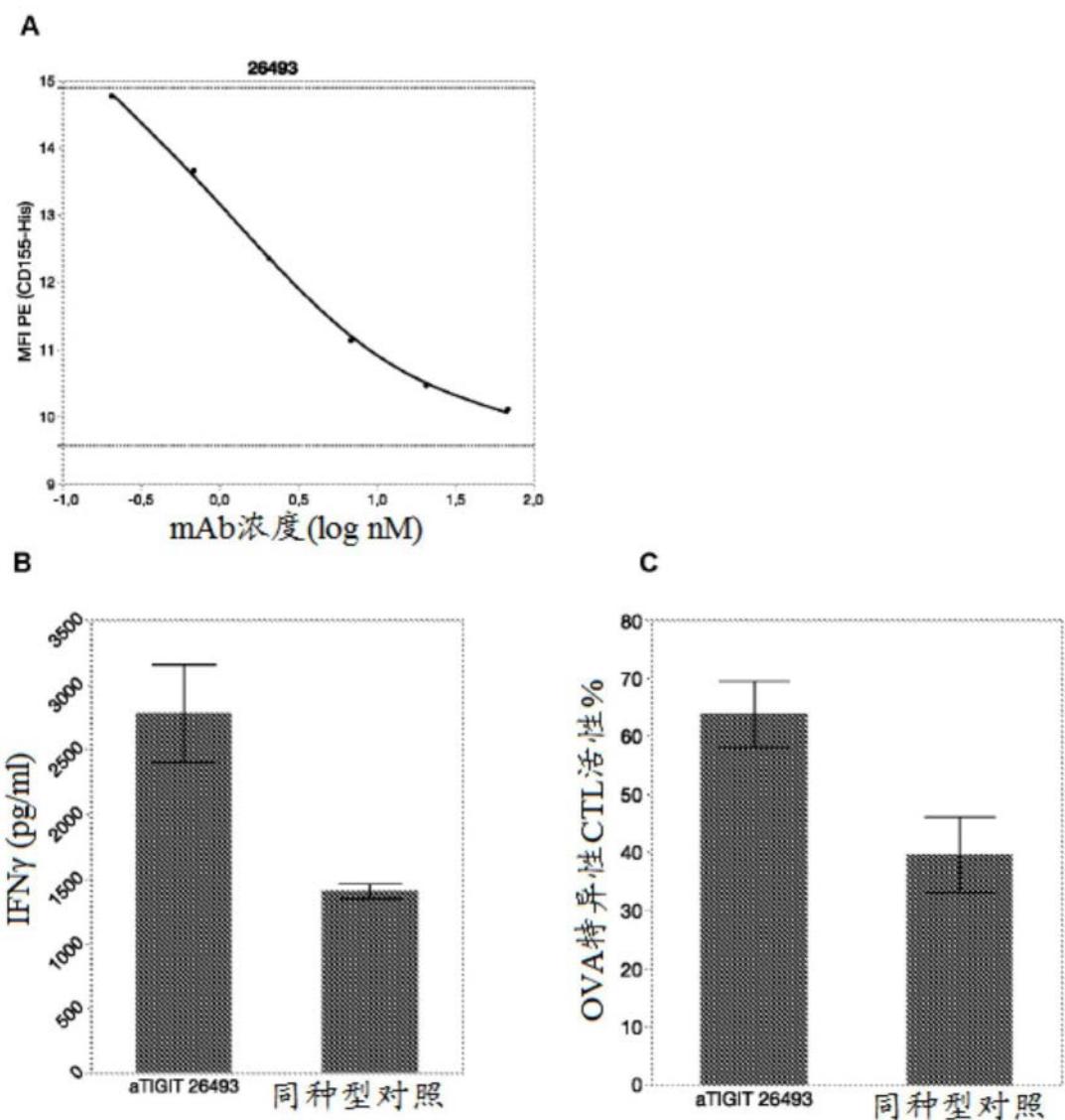


图15-在小鼠中展现出功能活性的小鼠替代抗TIGIT抗体的表征

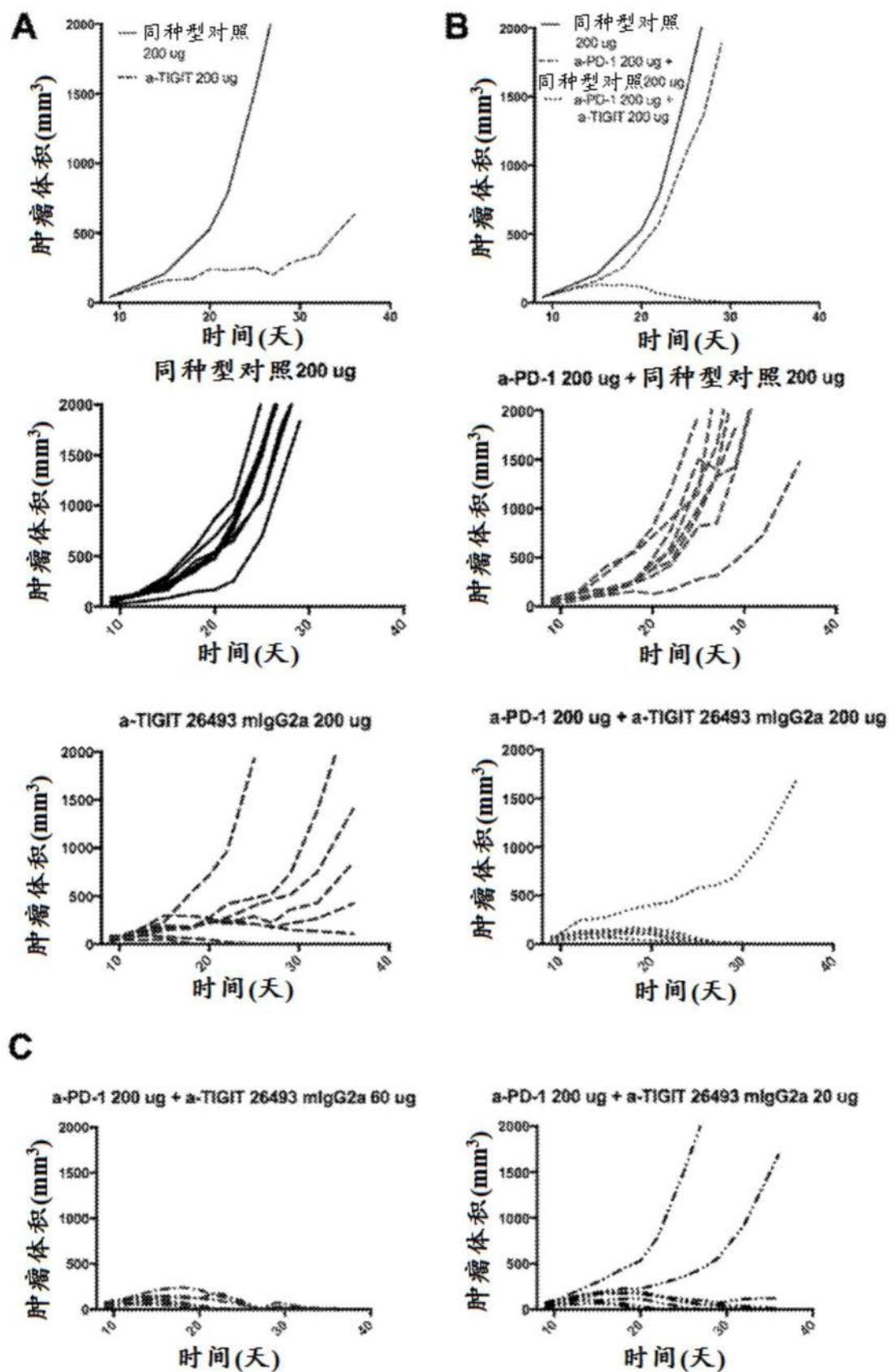
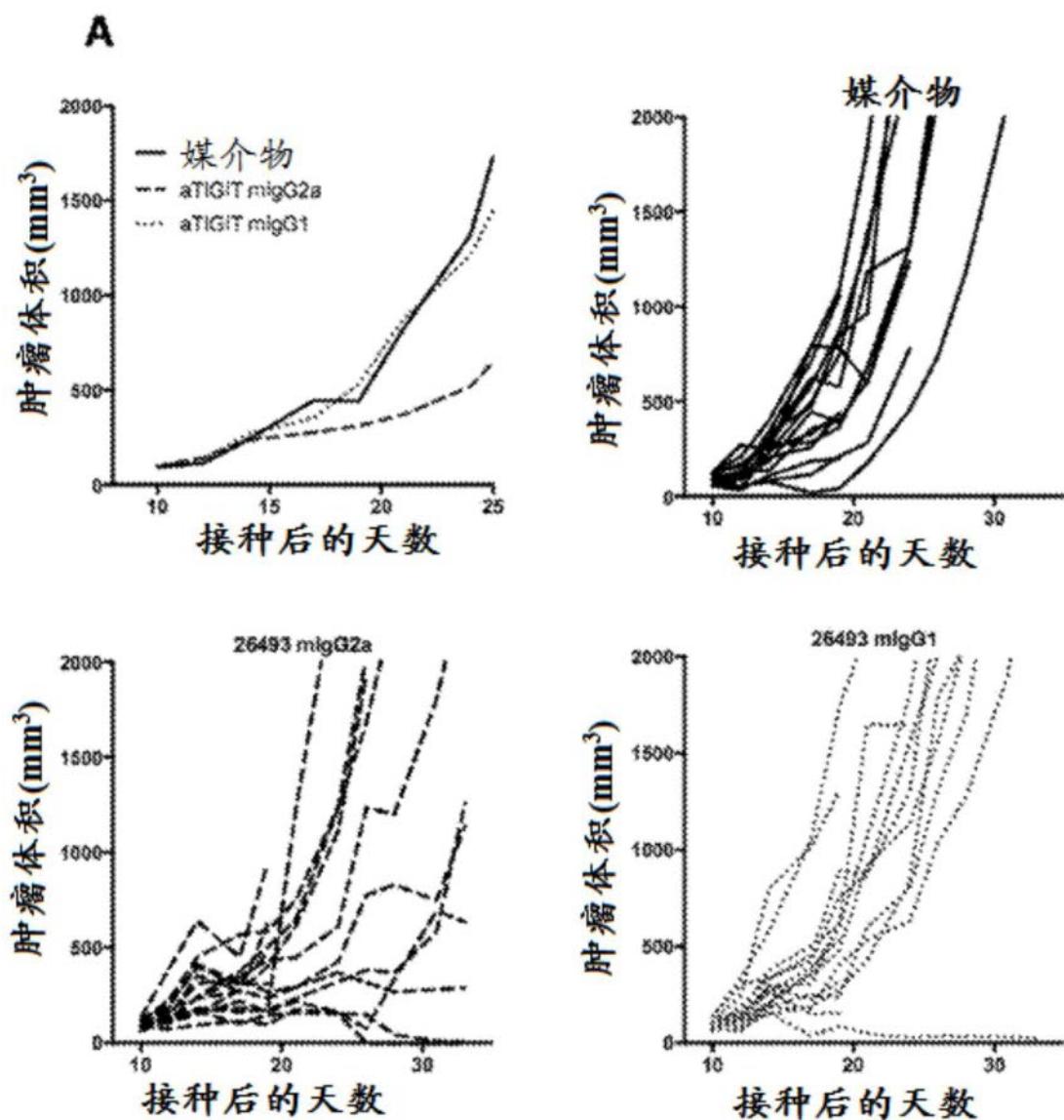


图16-抗TIGIT拮抗性抗体的抗肿瘤功效



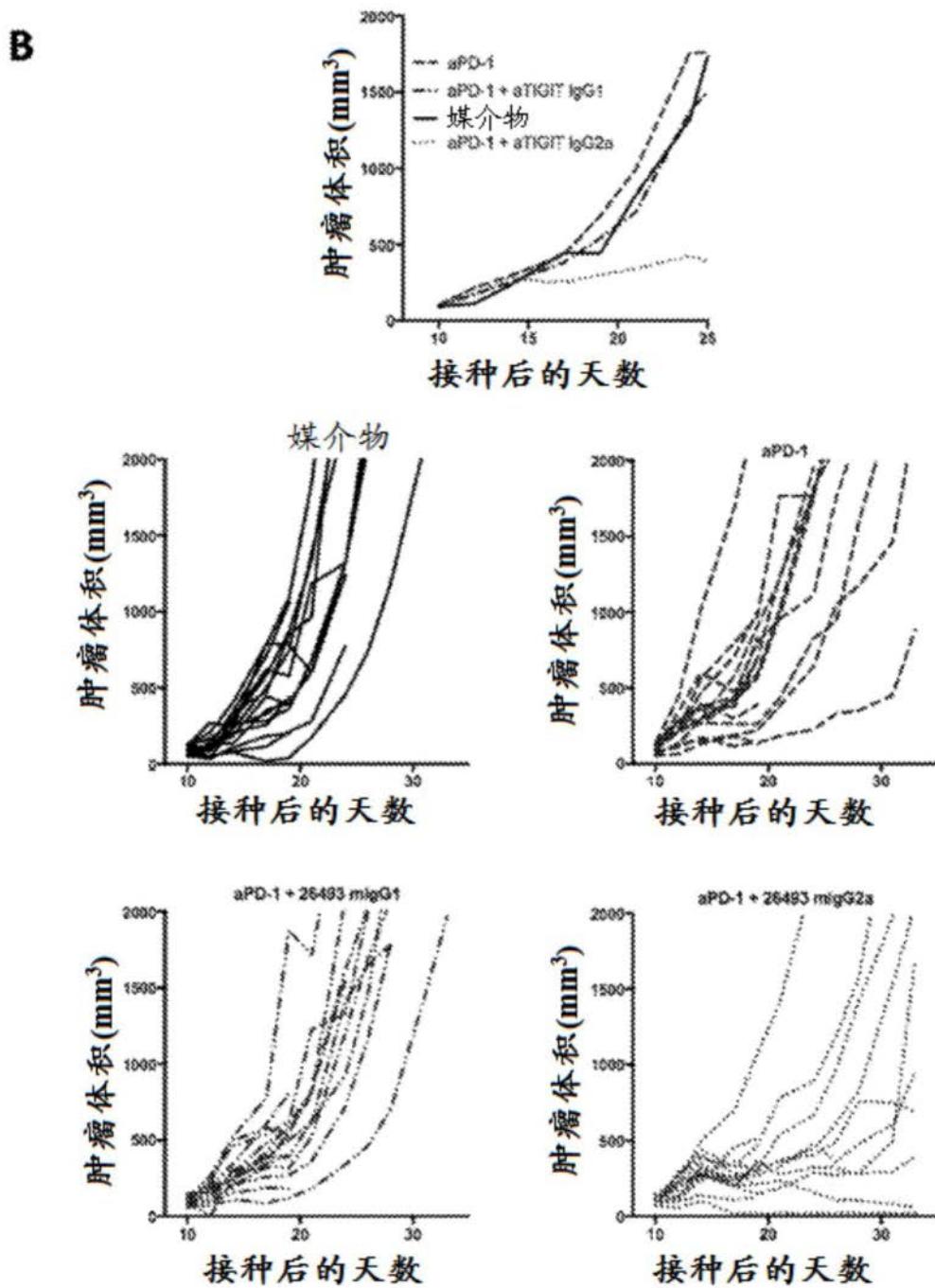
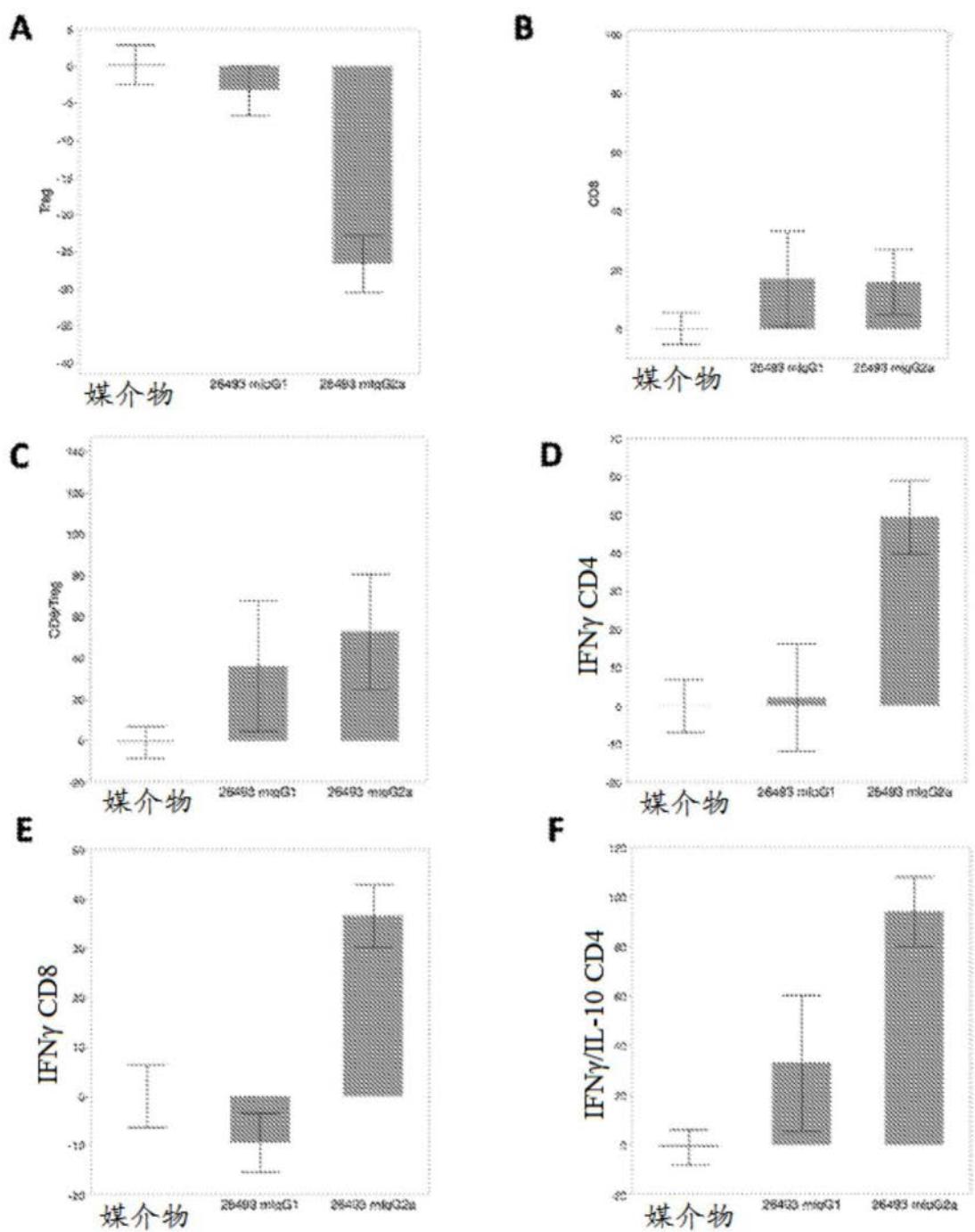


图17-抗TIGIT拮抗性抗体的同种型依赖性抗肿瘤功效



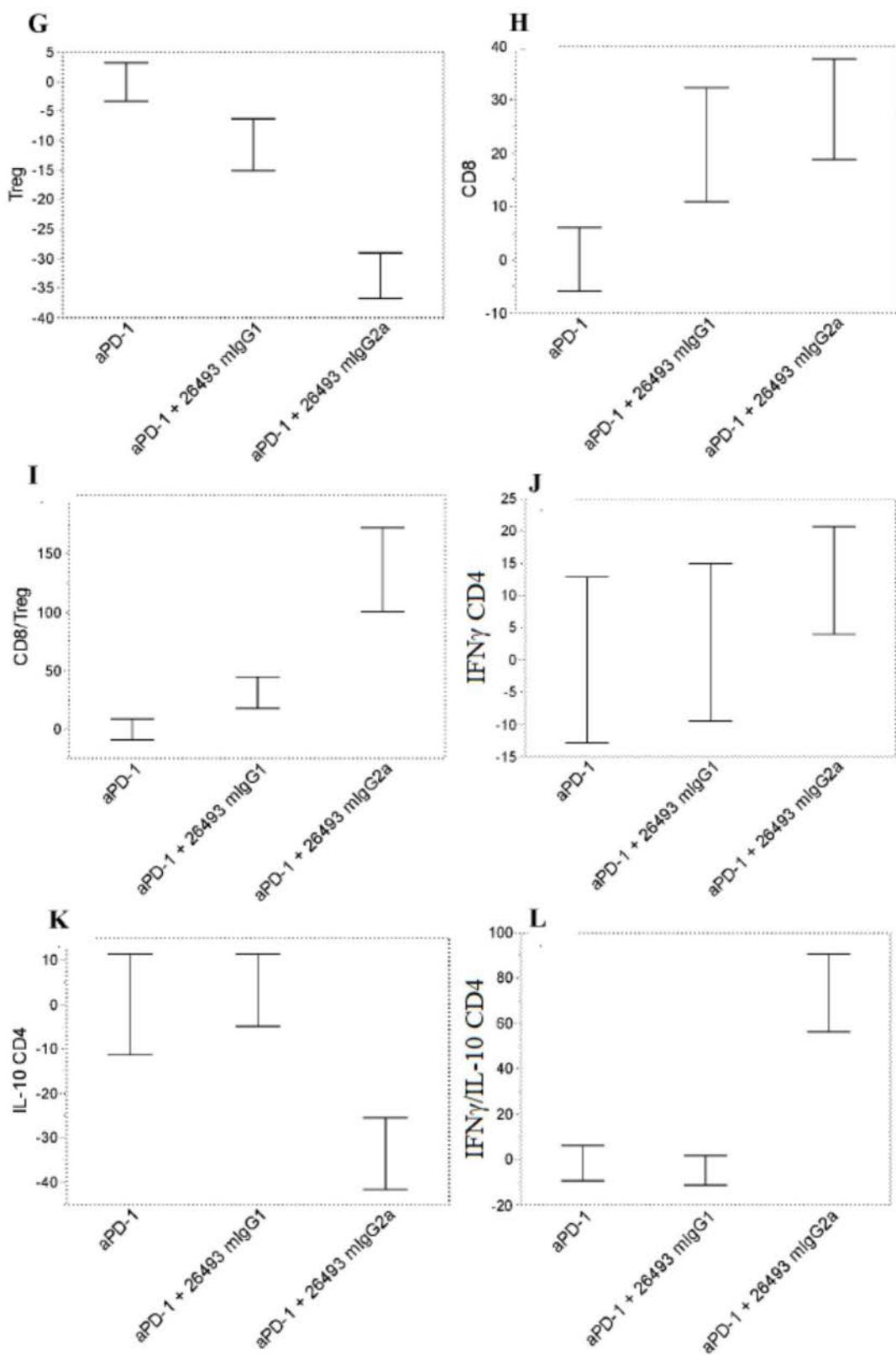
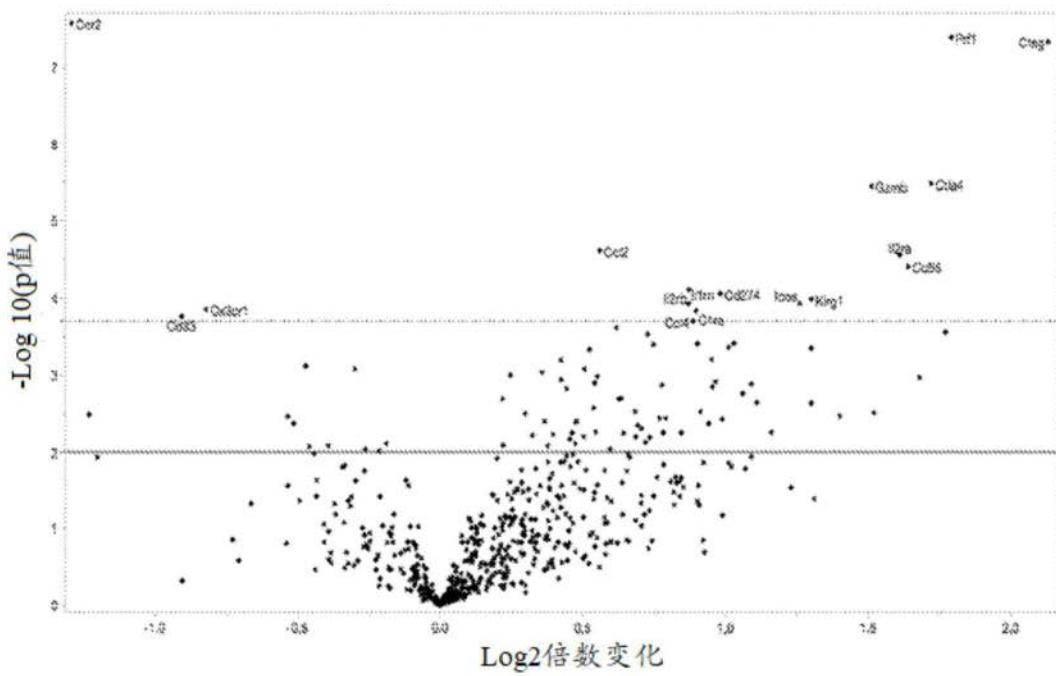
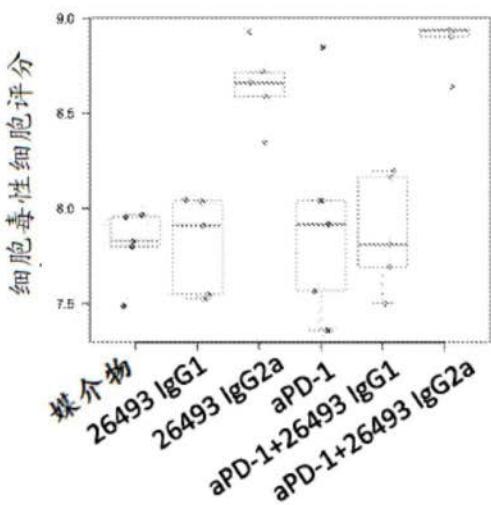


图18-抗TIGIT拮抗性抗体的抗肿瘤功效的机制

A



B



6

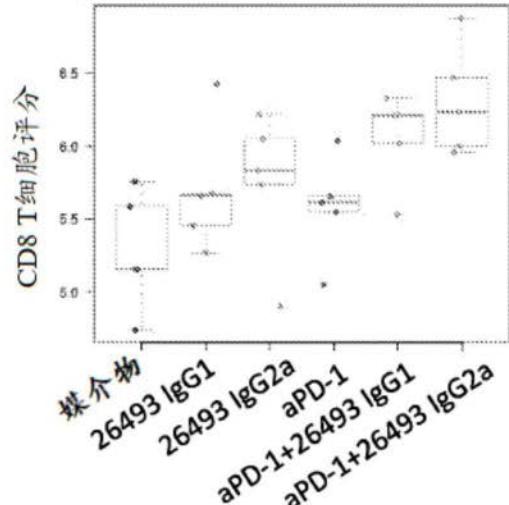


图19-抗TIGIT拮抗性抗体的抗肿瘤功效的机制(转录分析)

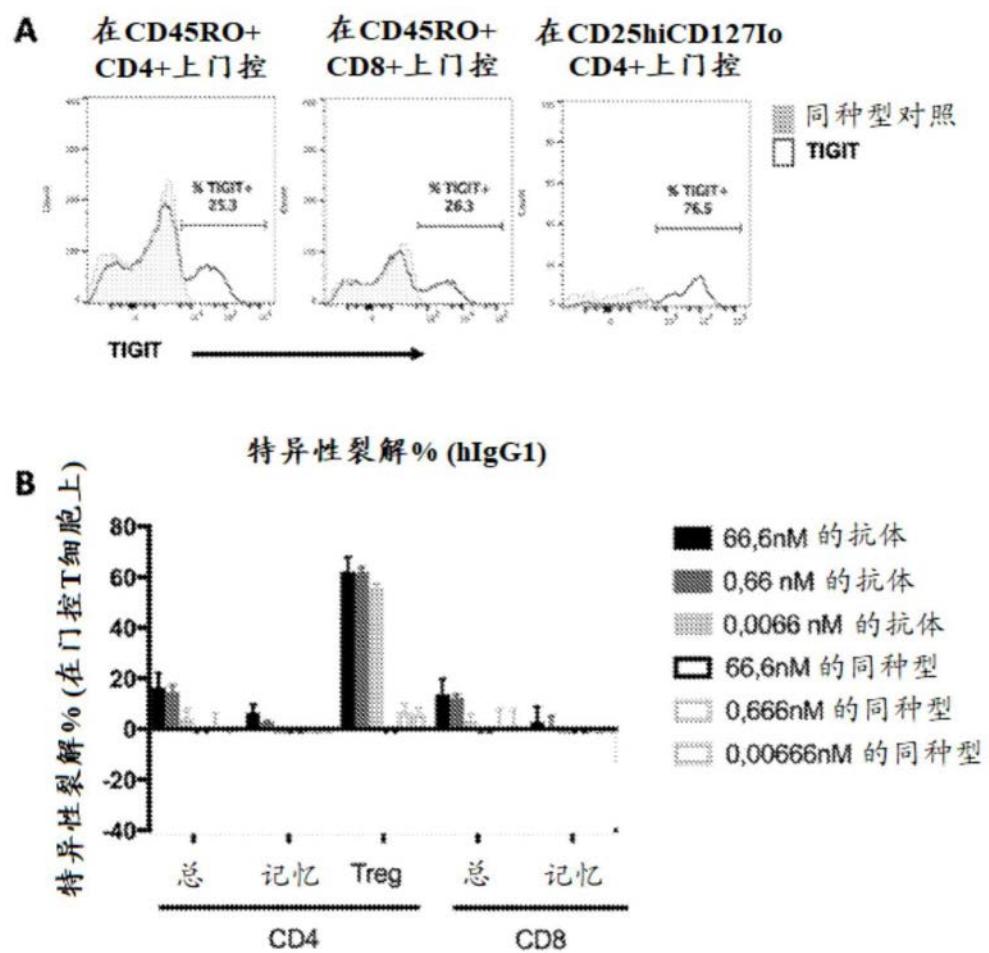


图20-对健康人PBMC的ADCC活性

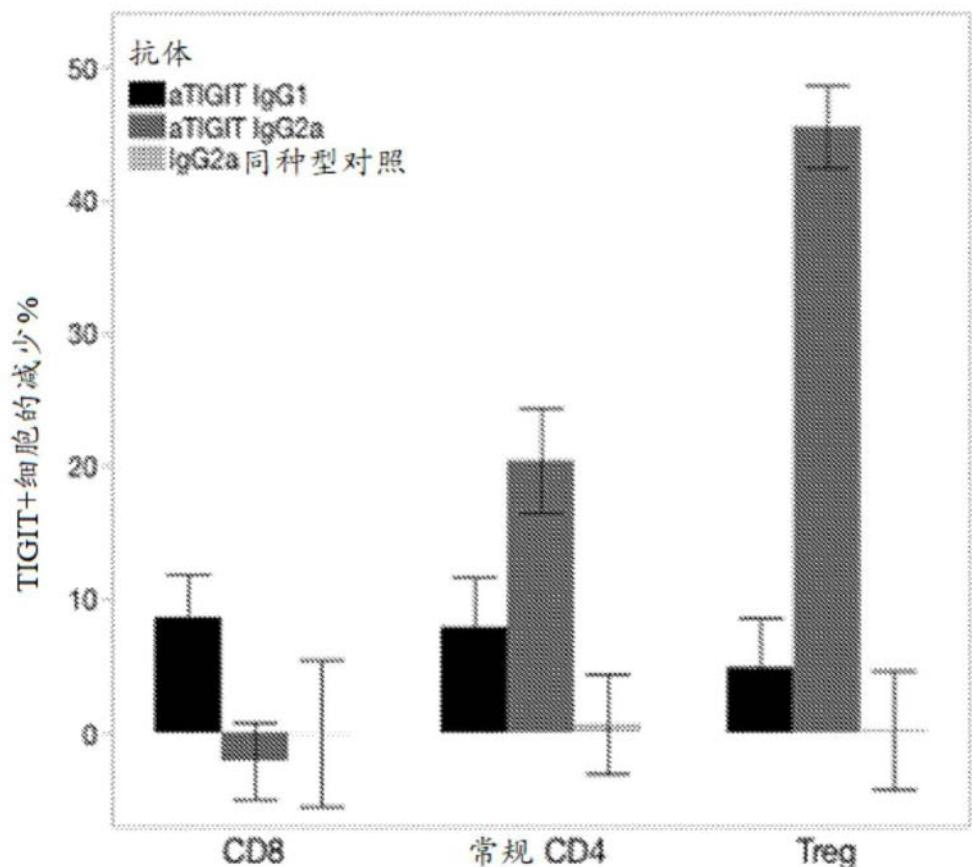


图21-小鼠肿瘤悬浮液中Treg细胞的优先消耗

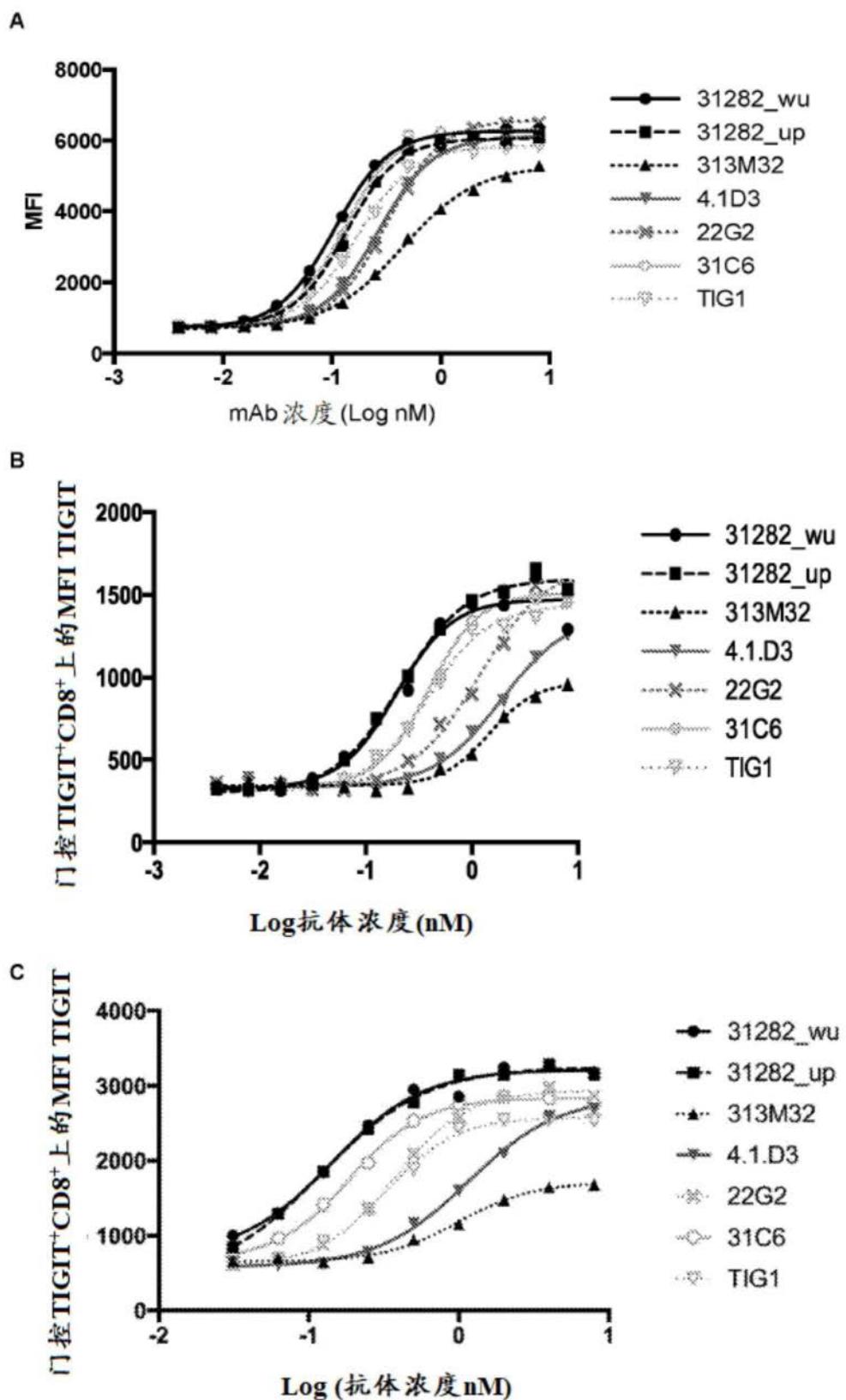


图22

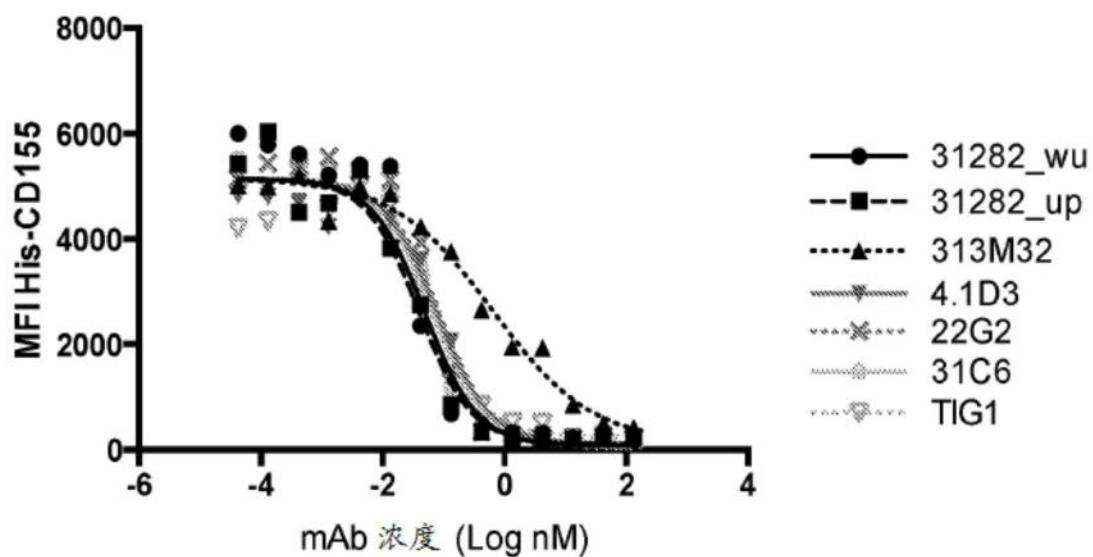


图23

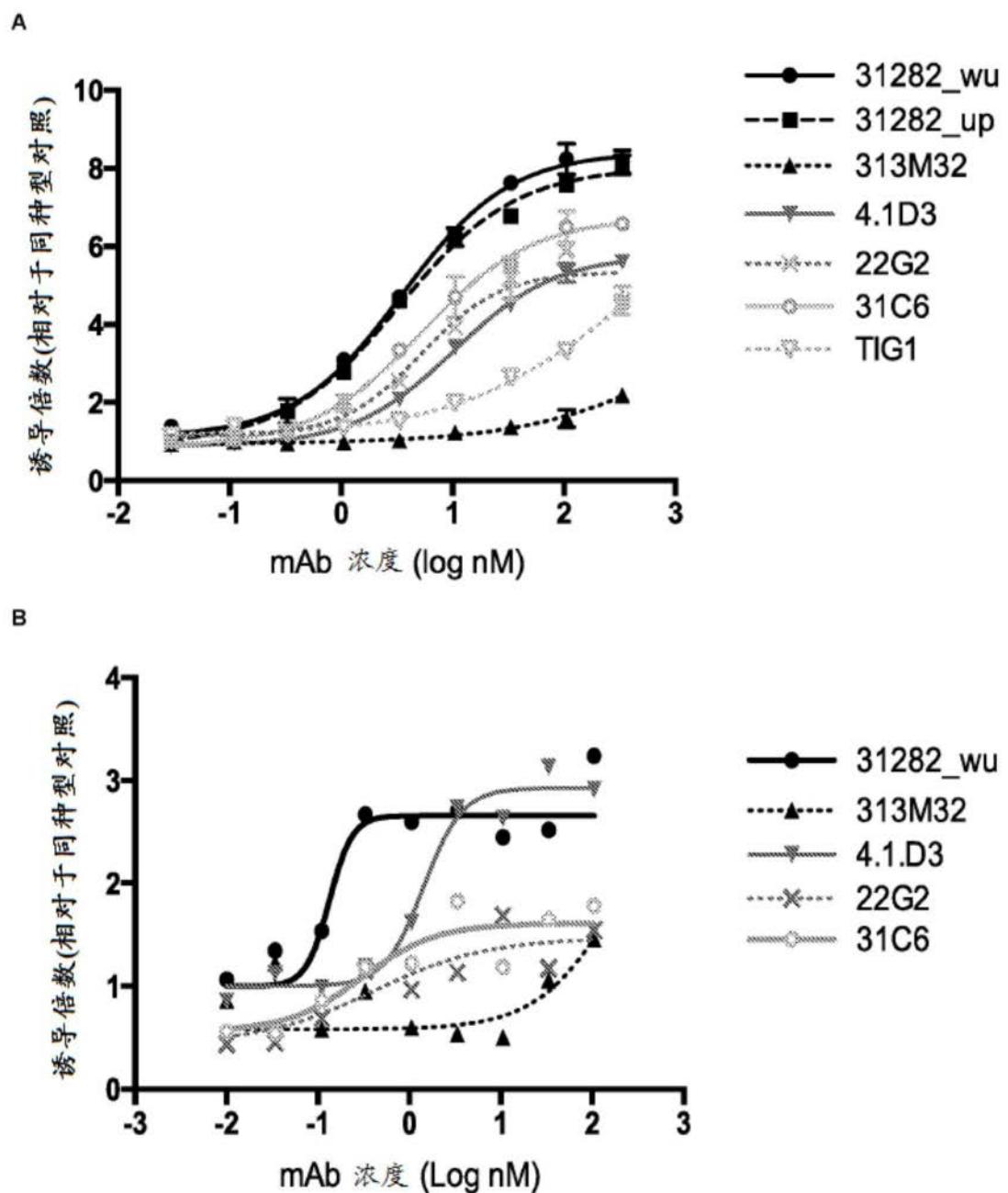
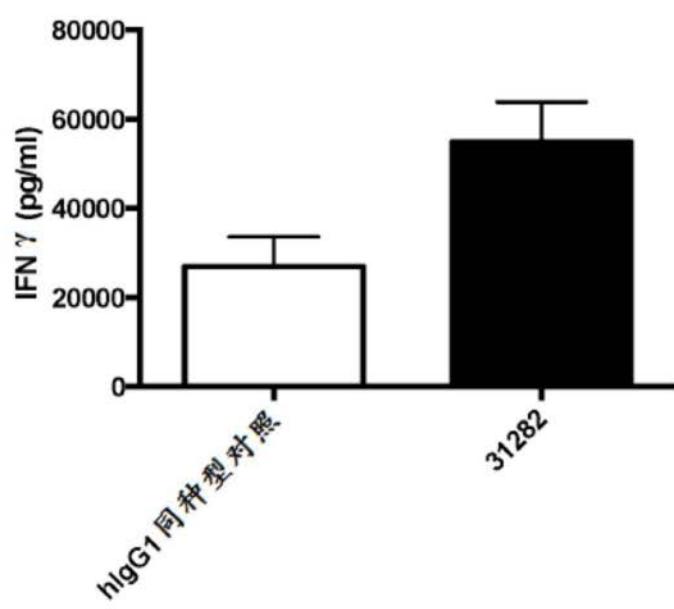


图24

C



D

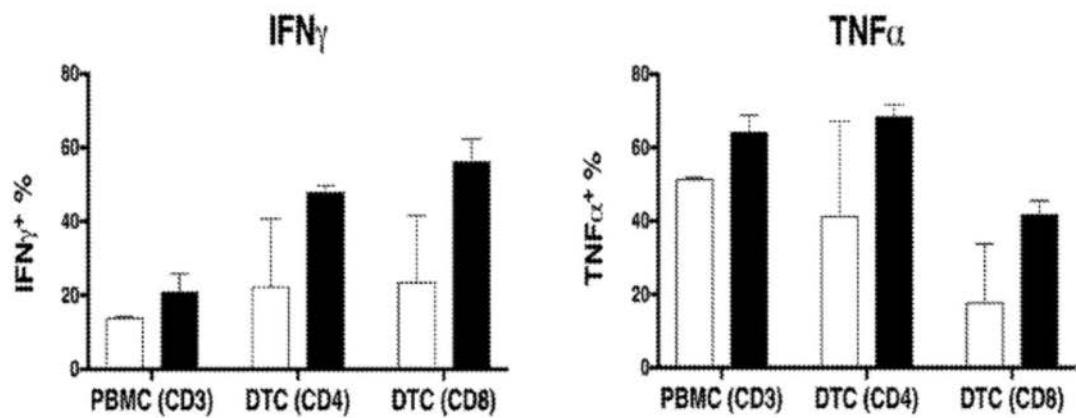
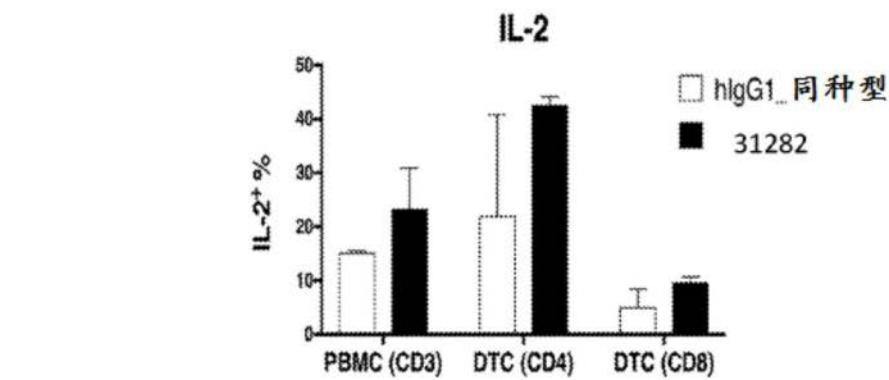


图24(续)

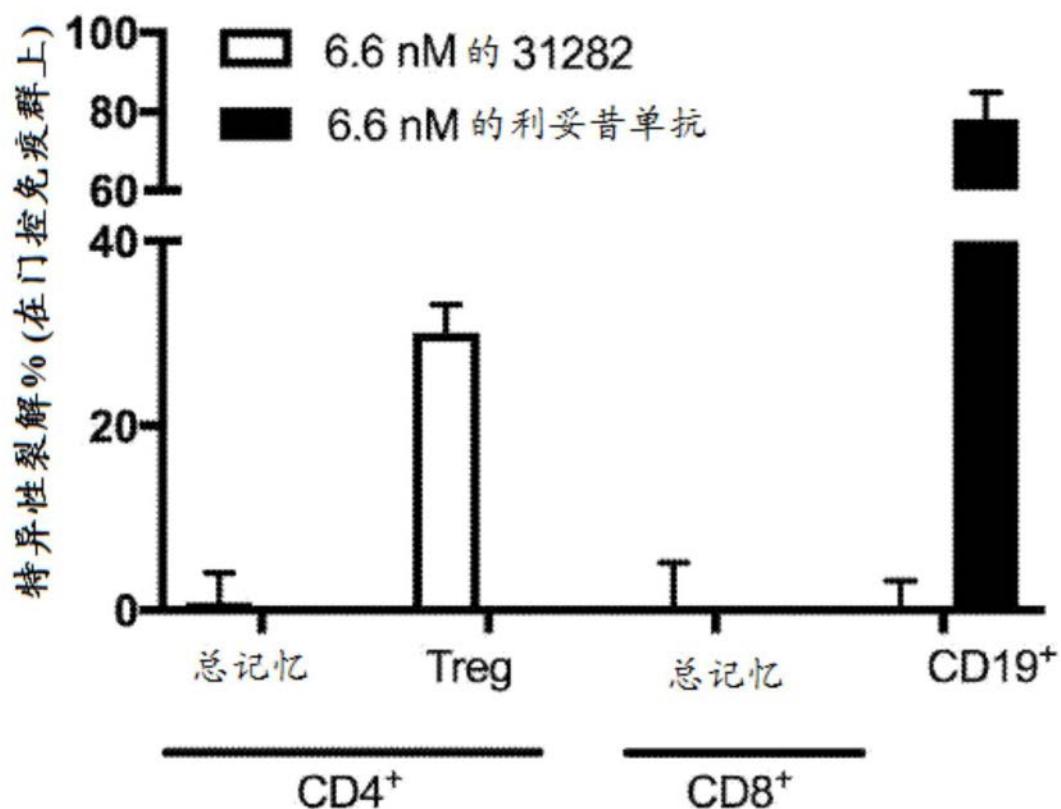


图25

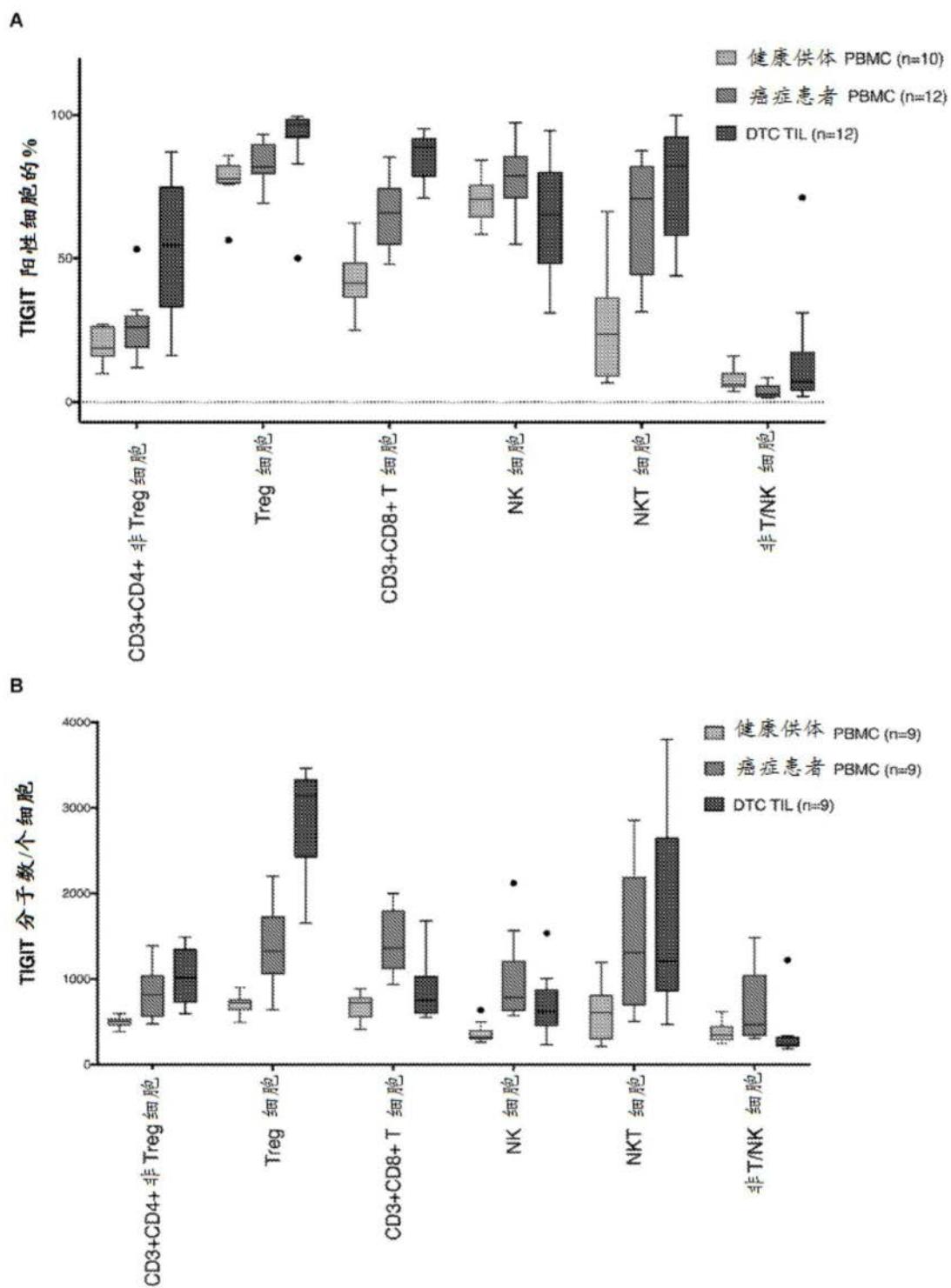
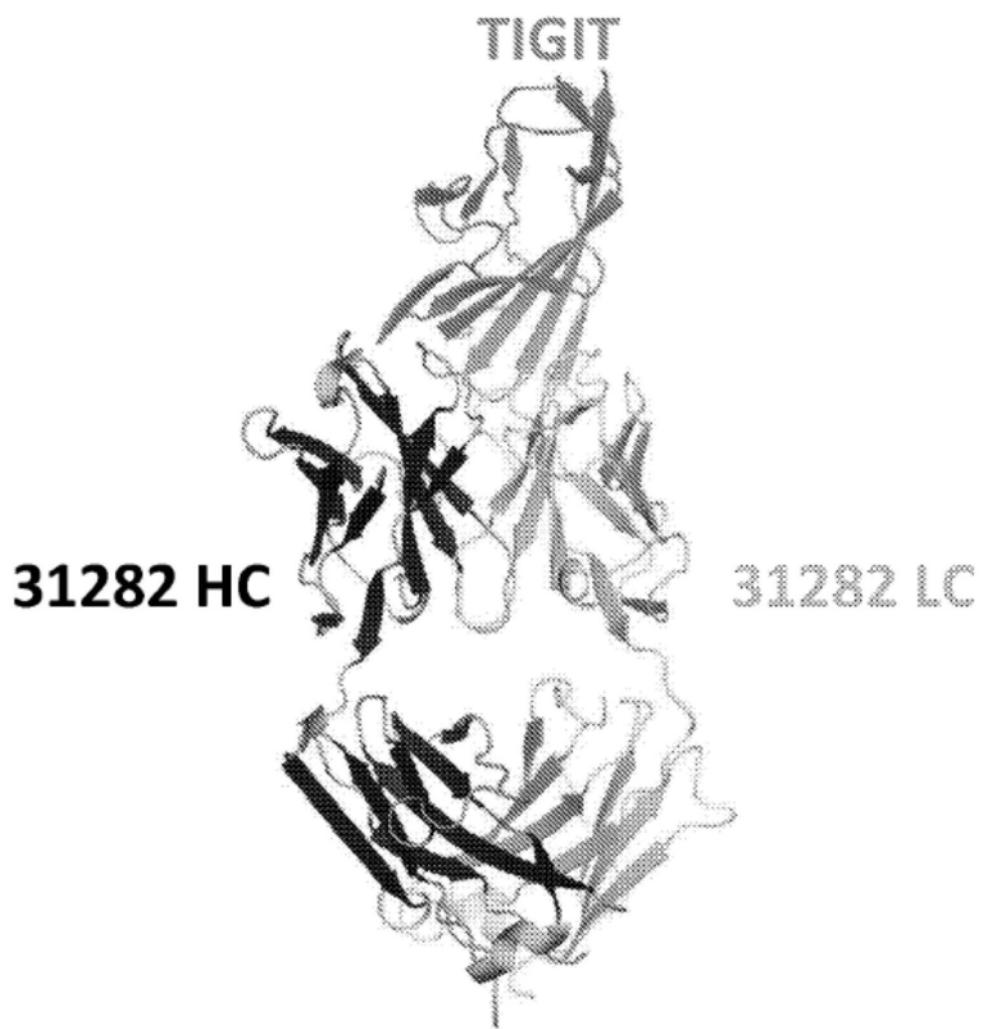


图26

A



B

TIGIT



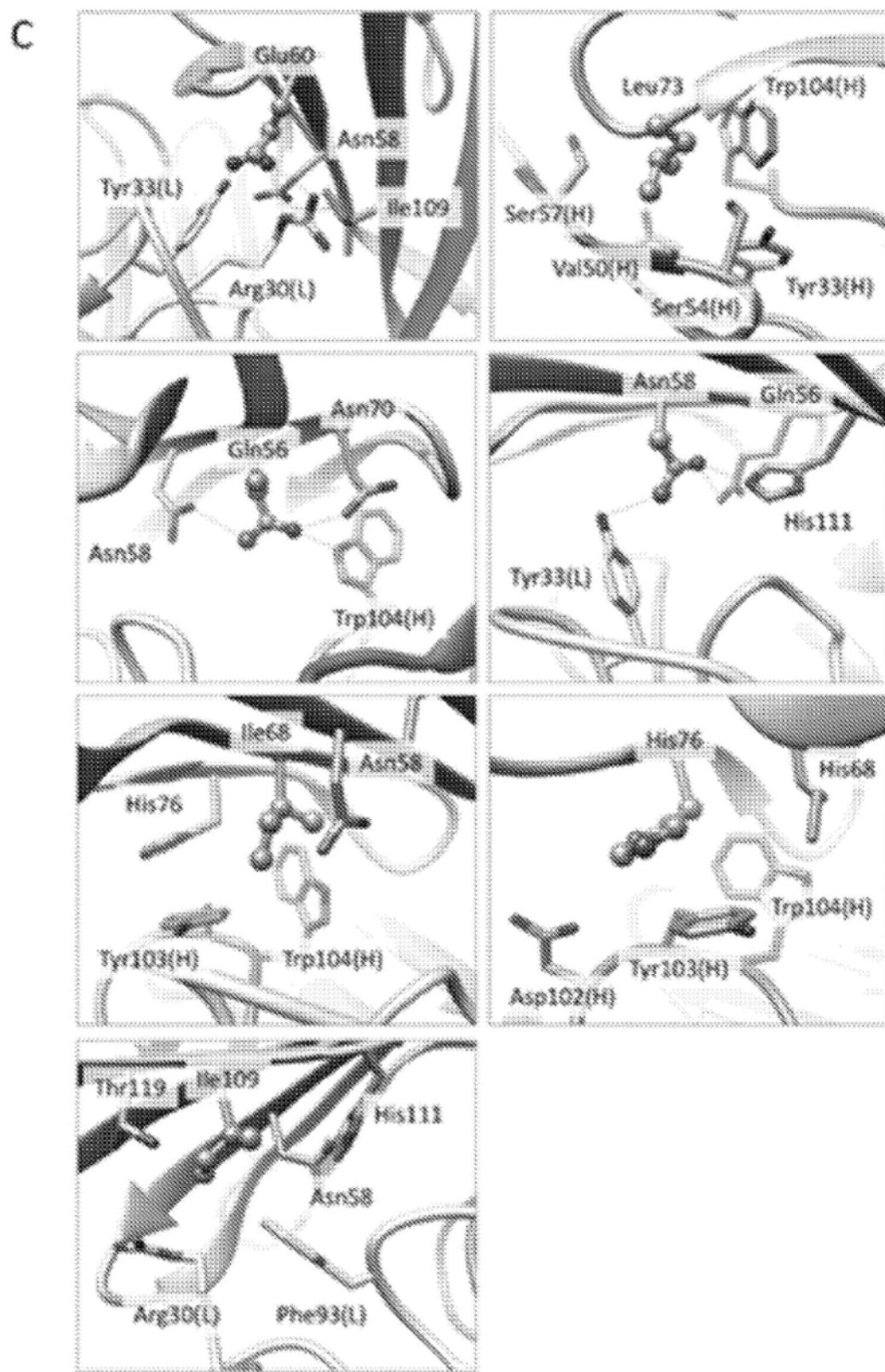


图27

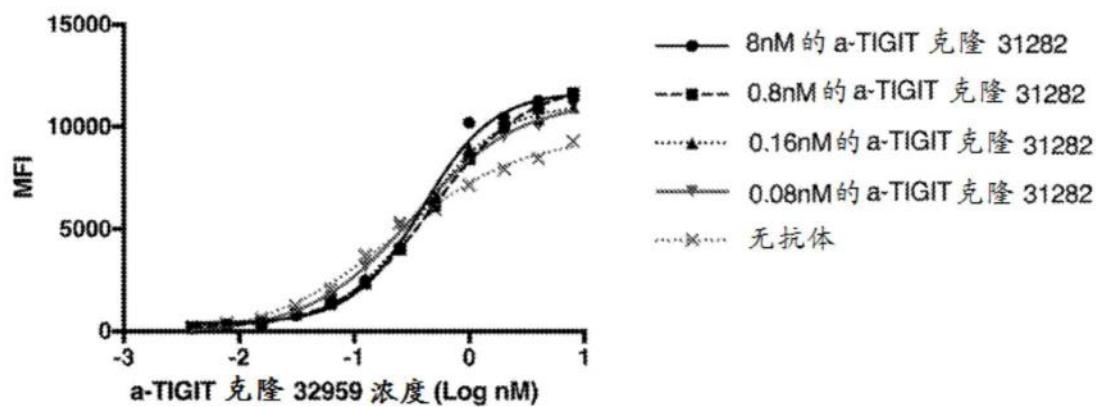


图28

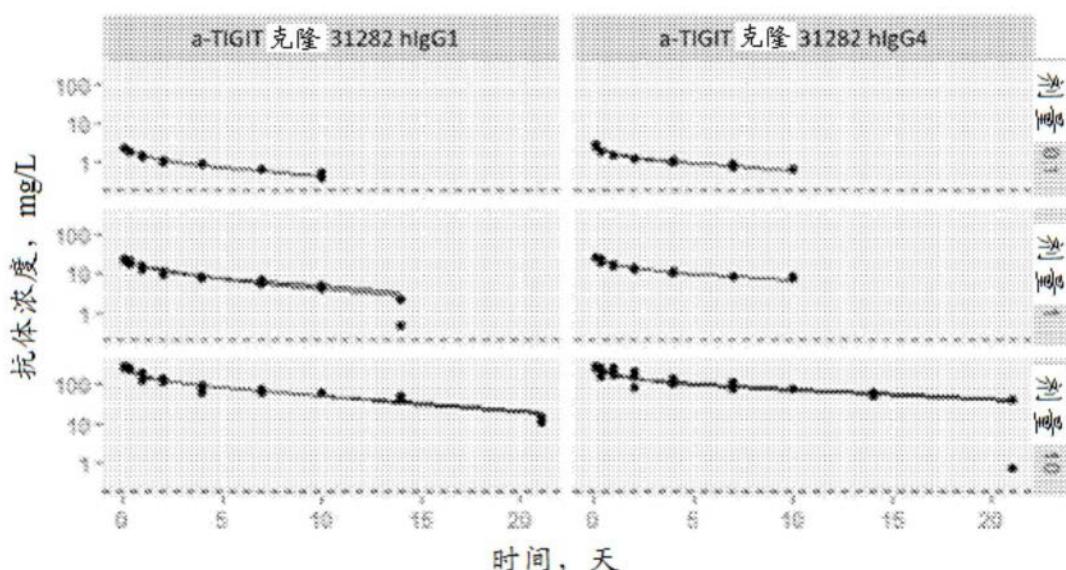
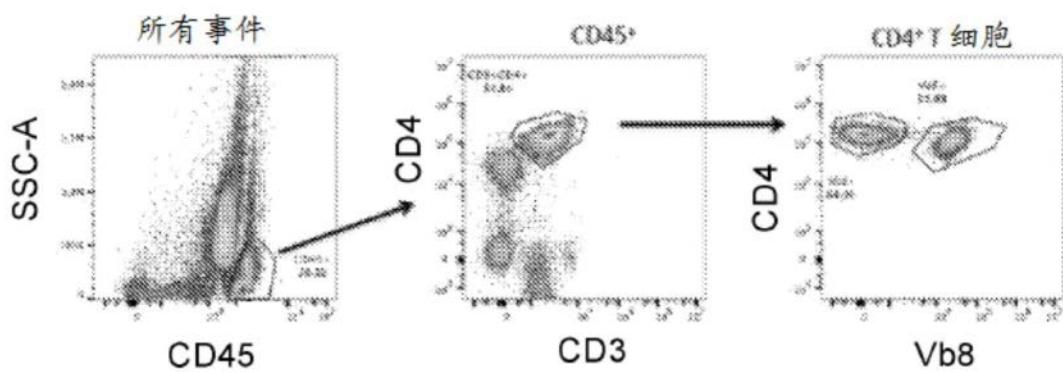


图29

A



B

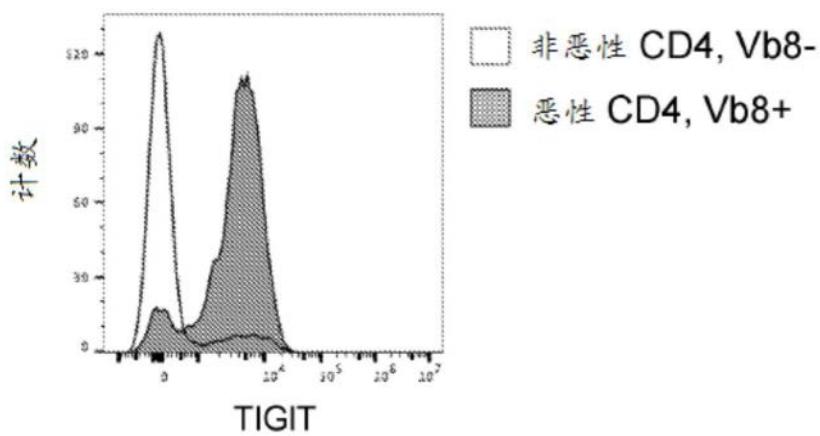
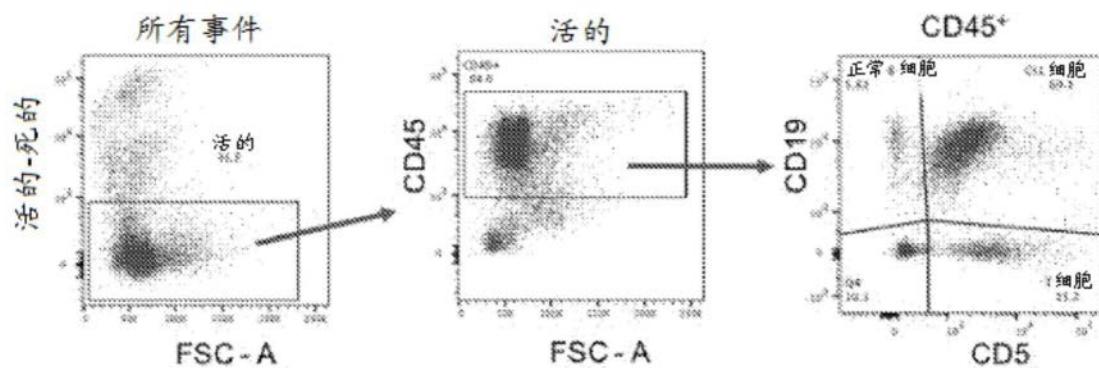


图30

A



B

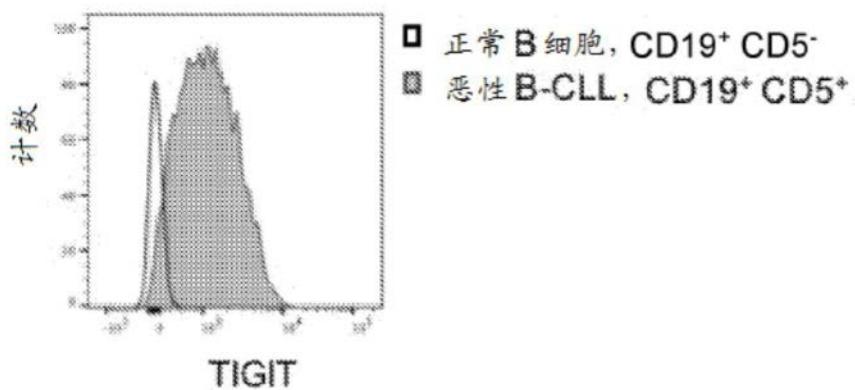


图31

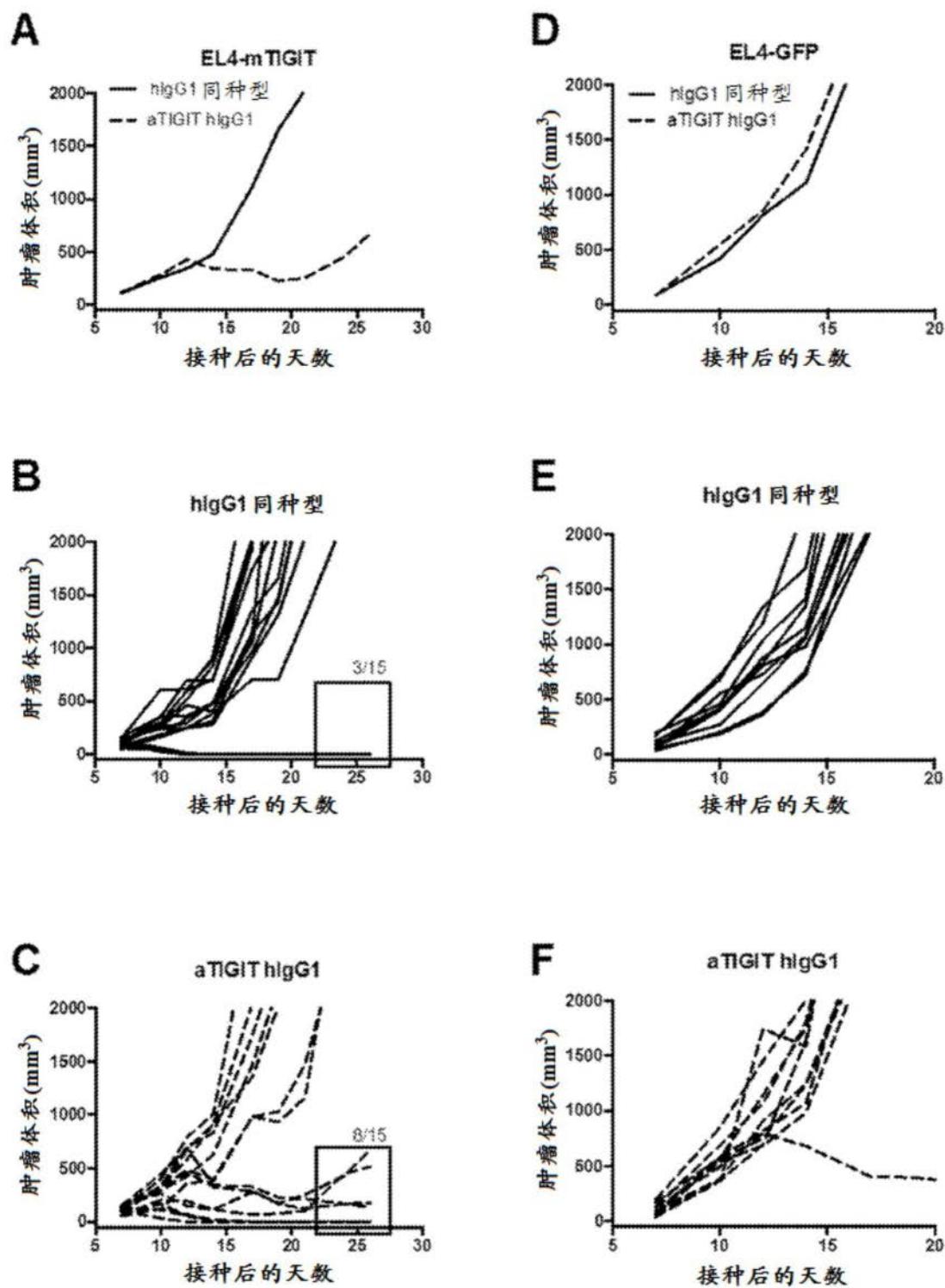
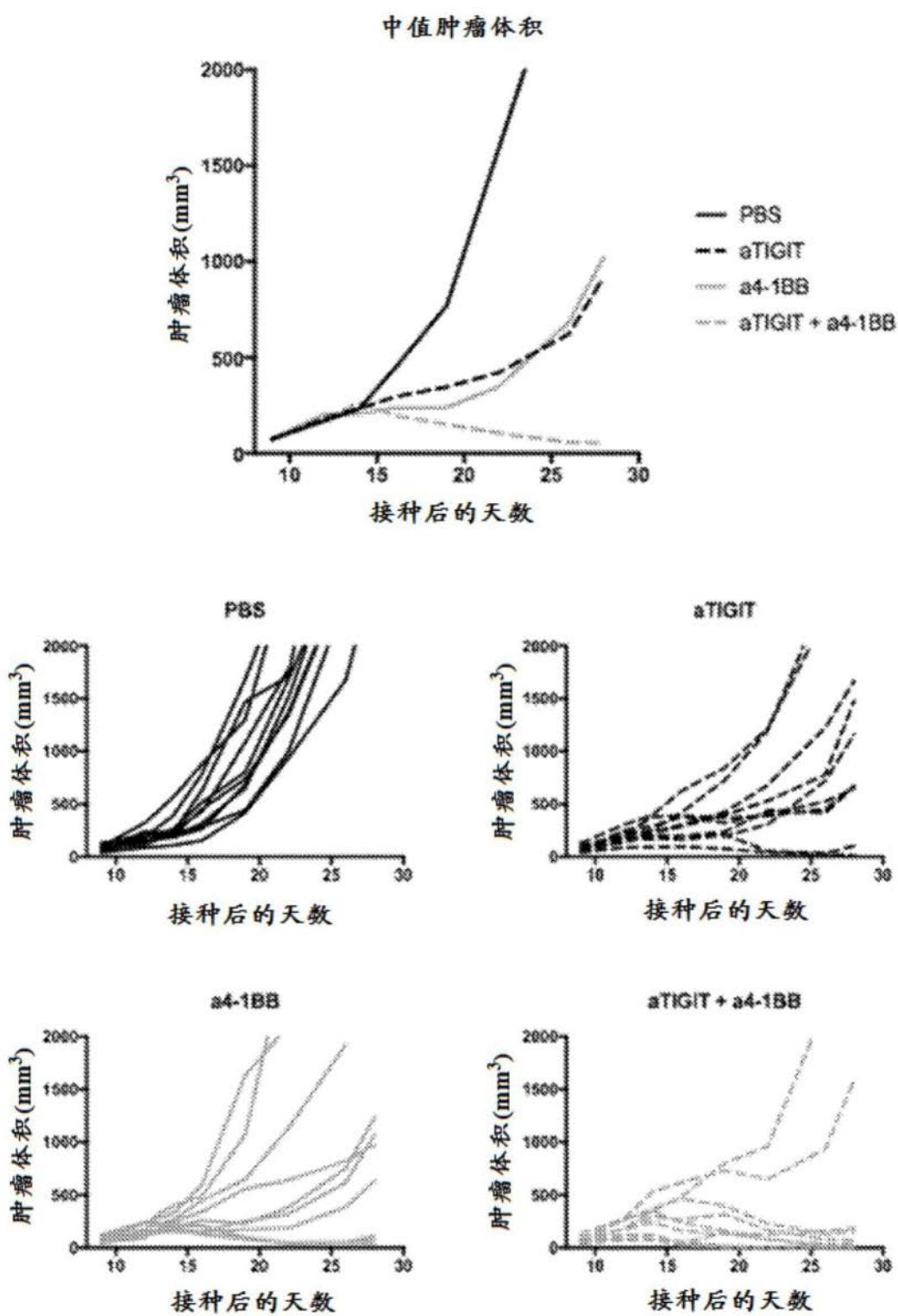
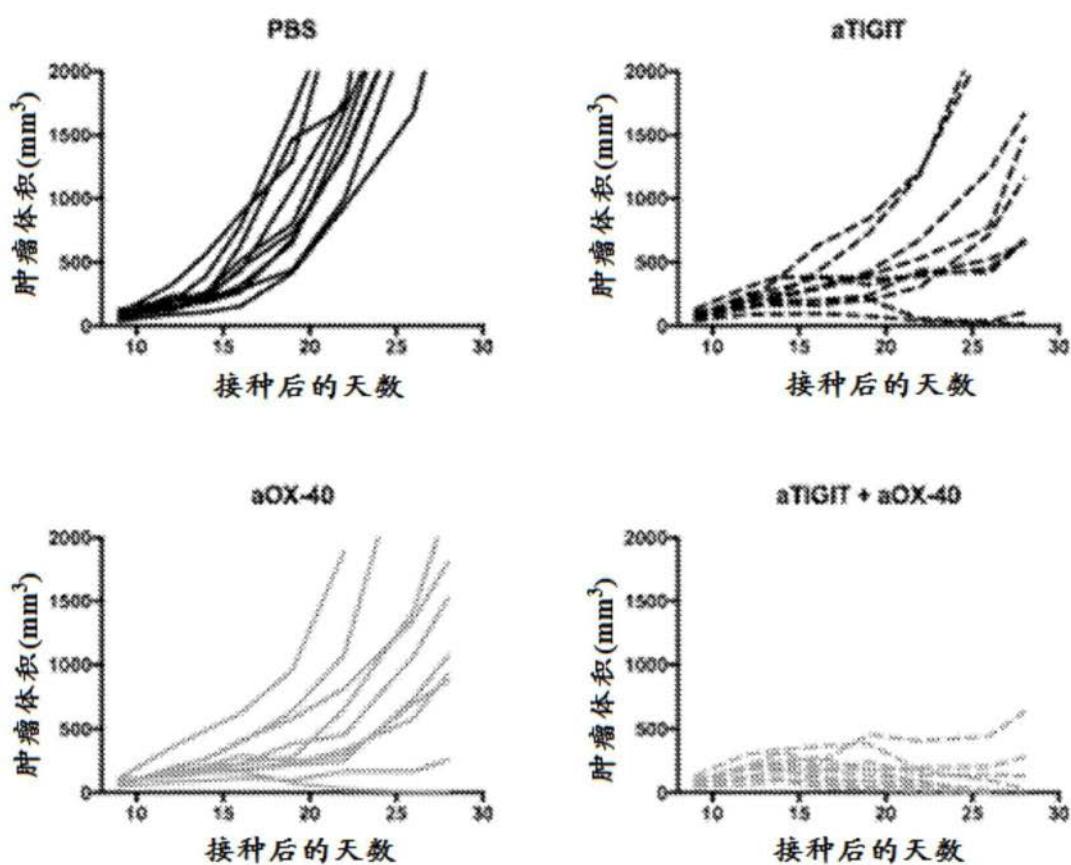
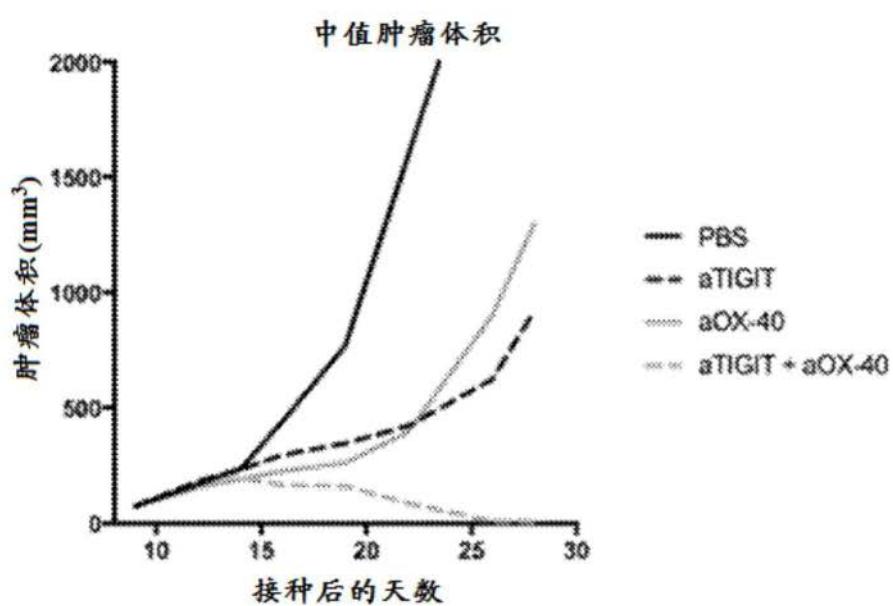


图32

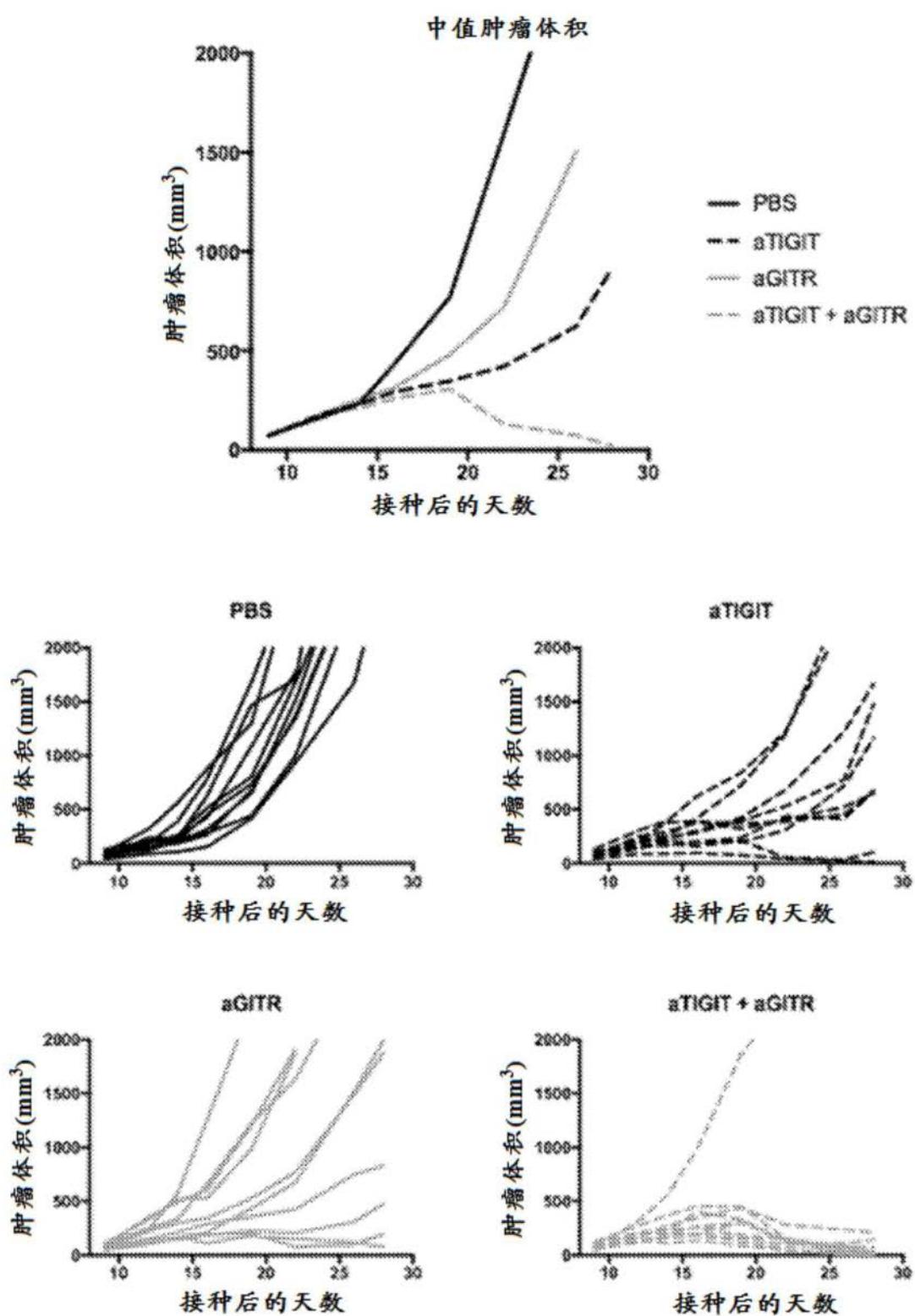
A



B



C



D

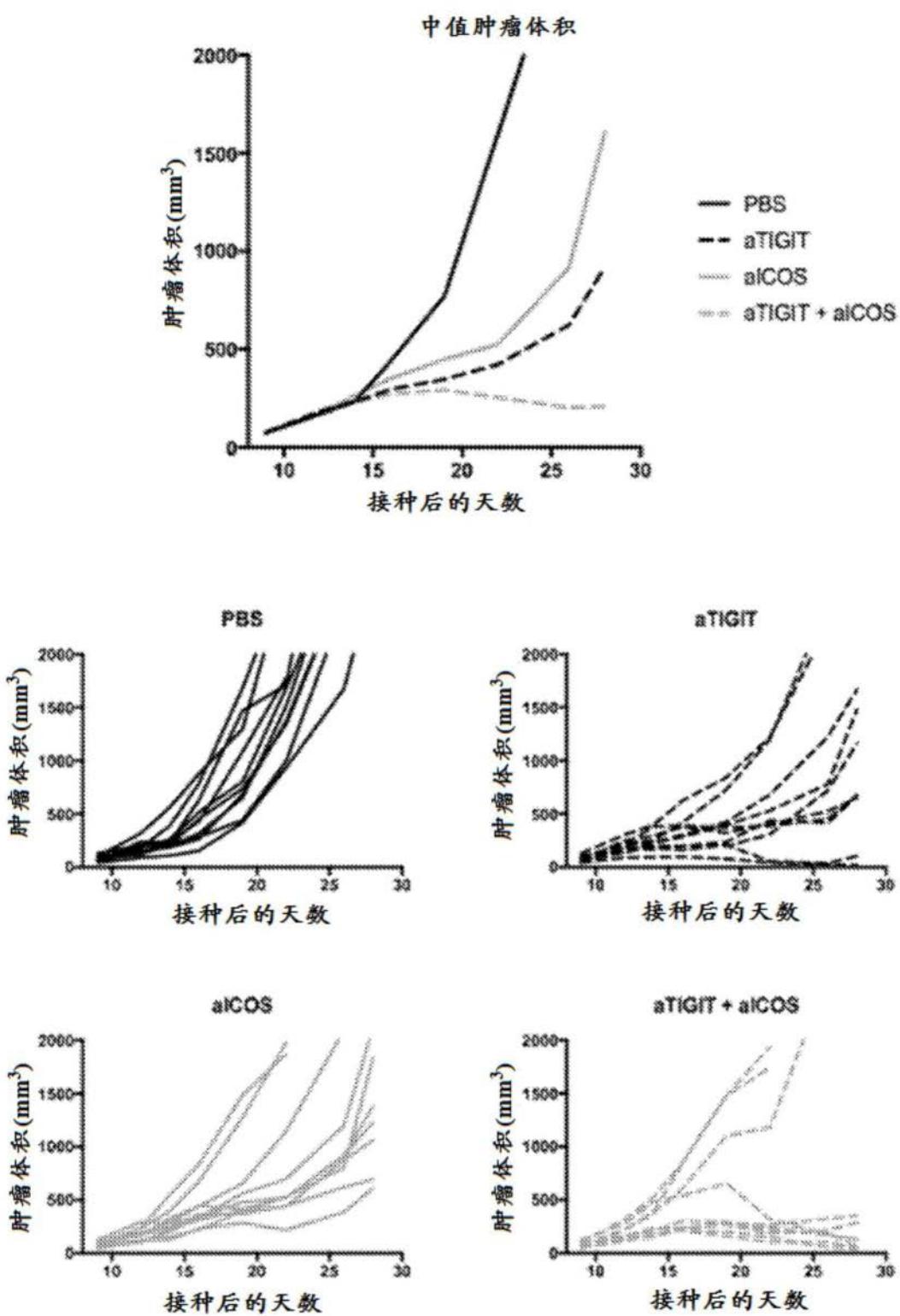


图33

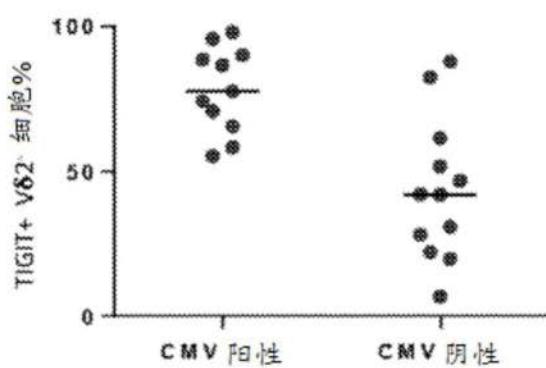
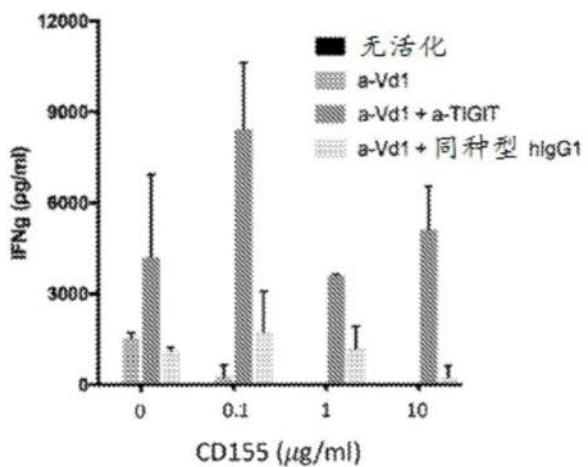
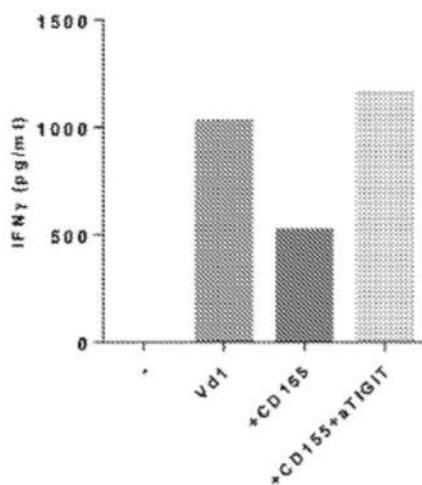
A**B****C**

图34