



(10) 授权公告号 CN 108738324 B

(45) 授权公告日 2022.06.21

(21) 申请号 201680079209.9

(22) 申请日 2016.11.17

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108738324 A

(43) 申请公布日 2018.11.02

(30) 优先权数据

62/257,599 2015.11.19 US

62/303,990 2016.03.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.07.17

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/062540 2016.11.17

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/087678 EN 2017.05.26

(73) 专利权人 百时美施贵宝公司  
地址 美国新泽西州

(72) 发明人 C·王 N·朗伯格  
艾伦·J·科曼 M·J·塞尔比  
M·斯里尼瓦桑 K·A·亨宁  
M·M·韩 G·陈 R·黄

I·查克拉博蒂 H·黄

S·C-S·王 H·李

B·C·巴恩哈特 A·P·亚尼克

M·雷 L·施魏策尔 S·V·哈彻

A·赖帕尔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.  
C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106459203 A, 2017.02.22

US 2015064204 A1, 2015.03.05

Ann L White. Conformation of the human  
immunoglobulin G2 hinge imparts  
superagonistic properties to  
immunostimulatory anticancer antibodies.  
《CANCER CELL》. 2015, 第27卷 (第1期), 第138-  
148页.

审查员 张智贤

权利要求书2页 说明书232页 附图98页

(54) 发明名称

抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体  
(GITR) 抗体及其用途

(57) 摘要

本申请提供了与糖皮质激素诱导的TNF受体  
(GITR) 结合的抗体或其抗原结合部分。还提供了  
这些蛋白质在治疗应用中的用途, 比如在治疗癌  
症中的用途。进一步提供了产生抗体的细胞、编  
码所述抗体的重链和/或轻链可变区的多核苷  
酸、以及包含编码所述抗体的重链和/或轻链可  
变区的多核苷酸的载体。

1. 一种分离的抗体,其与人糖皮质激素诱导的TNF受体 (GITR) 结合并包含重链恒定区,所述重链恒定区由氨基酸序列SEQ ID NO:394,或与氨基酸序列SEQ ID NO:394有一个氨基酸的取代、添加或缺失而不同的重链恒定区组成,其中所述一个氨基酸的取代、添加或缺失不是在SEQ ID NO:394的氨基酸位置16、20、21、75、76、82、86、97、100、102、104和105处,其中所述抗体包含分别由SEQ ID NO:20、21和22组成的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别由SEQ ID NO:23、24和25组成的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

2. 权利要求1的抗体,其中所述抗体包含分别如SEQ ID NO:13和14所示的重链和轻链可变区序列。

3. 权利要求1或2的抗体,其包含具有增强的与活化性Fc $\gamma$ R结合的Fc。

4. 权利要求1-3中任一项的抗体,其由重链恒定区中的S267E取代,其中该编号依照EU索引。

5. 一种双特异性分子,其包含与具有第二结合特异性的分子连接的权利要求1-4中任一项的抗体。

6. 一种核酸,其编码权利要求1-4中任一项的抗体的重链和轻链。

7. 一种表达载体,其包含权利要求6的核酸分子。

8. 一种重组细胞,其经下述(i)或(ii)转化:

(i) 权利要求7的表达载体;或

(ii) 包含编码权利要求1-4中任一项的抗体的重链的核酸的表达载体,以及包含编码权利要求1-4中任一项的抗体的轻链的核酸的另一表达载体。

9. 一种免疫缀合物,其包含与药剂连接的权利要求1-4中任一项的抗体。

10. 一种组合物,其包含权利要求1-4中任一项的抗体、权利要求5的双特异性分子或权利要求9的免疫缀合物,以及载体。

11. 一种试剂盒,其包含权利要求1-4中任一项的抗体、权利要求5的双特异性分子或权利要求9的免疫缀合物,以及使用说明书。

12. 一种制备抗GITR抗体的方法,其包括:在权利要求8的细胞中表达所述抗体,并从所述细胞分离所述抗体。

13. 权利要求1-4中任一项的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于在刺激抗原特异性T细胞应答的方法中使用,所述方法包括使T细胞与权利要求1-4中任一项的抗体接触,从而刺激抗原特异性T细胞应答。

14. 权利要求1-4中任一项的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于在活化或共刺激效应T细胞的方法中使用,所述方法包括使效应T细胞与权利要求1-4中任一项的抗GITR抗体以及CD3接触,其中所述效应T细胞被活化或共刺激。

15. 权利要求1-4中任一项的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于在增加T细胞中IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生的方法中使用,所述方法包括使T细胞与有效量的权利要求1-4中任一项的抗体接触。

16. 权利要求1-4中任一项的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于在增加T细胞增殖的方法中使用,所述方法包括使所述细胞与有效量的权利要求1-4中任一项的抗体接触。

17. 权利要求1-4中任一项的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于在增加受试者的T细胞中IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生的方法中使用,所述方法包括施用有效量的权利要求1-4中



任一项的抗体,以增加所述T细胞的IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生。

18. 权利要求1-4中任一项的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于在减少或耗竭有需要的受试者的肿瘤中的调节性T细胞的数量中使用,所述方法包括施用有效量的权利要求1-4中任一项的抗体,其中所述抗体具有效应子功能或增强的效应子功能,以减少肿瘤中调节性T细胞的数量。

19. 权利要求1-4中任一项的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于在刺激受试者中的免疫应答的方法中使用,所述方法包括向受试者施用权利要求1-4中任一项的抗体,使得受试者中的免疫应答被刺激。

20. 权利要求19的用途,其中所述受试者患有肿瘤,并且针对该肿瘤的免疫应答被刺激。

21. 权利要求1-4中任一项的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于抑制受试者中的肿瘤细胞生长的方法中使用,所述方法包括向受试者施用权利要求1-4中任一项的抗体,从而抑制受试者中的肿瘤的生长。

22. 权利要求1-4中任一项的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗癌症的方法中使用,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求1-4中任一项的抗体,从而治疗所述癌症。

23. 权利要求22的用途,其中所述癌症选自下组:膀胱癌、乳腺癌、子宫/子宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、食道癌、胃肠癌、胰腺癌、结肠直肠癌、结肠癌、肾癌、头颈癌、肺癌、胃癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统的新生物、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤及病毒相关癌症。

24. 权利要求22或23的用途,其中所述癌症是转移性癌症、难治性癌症或复发性癌症。

25. 权利要求17-24中任一项的用途,其进一步包括施用一种或多种另外的治疗剂。

26. 权利要求25的用途,其中所述另外的治疗是抗PD1抗体、抗LAG-3抗体、抗CTLA-4抗体或抗PD-L1抗体。

## 抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体 (GITR) 抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求分别于2015年11月19日和2016年3月4日提交的美国临时申请No. 62/257,599和62/303,990的优先权。将上述申请的内容通过提述并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包括已经以电子方式以ASCII格式提交的序列表,其通过提述完整并入本申请中。该ASCII副本创建于2017年11月17日,命名为2016-11-15\_MXI-547PC\_ST25.txt,大小为1,011,555个字节。

[0005] 背景

[0006] 糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白 (GITR) 是一种共刺激分子,又称TNFRSF18、AITR、CD357和GITR-D,是TNF受体家族的成员,其最初在用地塞米松处理的鼠T细胞系中被鉴定出(Nocentini等人,PNAS1997;94:6216-21)。TNF受体家族的其他相关成员包括CD40、CD27、4-1BB和OX40。虽然幼稚CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞中GITR表达低,但GITR在调节性T细胞中呈组成性表达(Tone等人,PNAS 2003;100:15059-64)。然而,一旦GITR的表达在效应T细胞上被诱导,GITR衔接作用可促进效应T细胞的活化、增殖和细胞因子产生(Watts,Annual Reviews in Immunology 2005;23:23-68)。关于CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞(Tregs),Shimizu报道,利用混合培养抑制测定法,GITR衔接抑制了它们的功能(Shimizu等人,Nature Immunology 2002;3:135-42)。然而,Stephans等人(JI 2004 15;173(8):5008-20)的后续工作确定,GITR在效应T(T<sub>eff</sub>)细胞上的衔接使所述效应T细胞对Treg抑制较不敏感,从而解释了在Treg-T<sub>eff</sub>细胞共培养中所观察到的抑制减少。DTA-1(大鼠抗小鼠GITR)抗体介导的GITR刺激在多种肿瘤模型中促进了抗肿瘤免疫。

[0007] GITR-L(GITR的配体)在抗原呈递细胞(例如,B细胞、树突细胞)中以低水平表达,但是在例如通过病毒感染激活后,其在这些细胞中瞬时上调(Suvas等人,J Virol.2005;79:11935-42)。

[0008] 由于面临着改进针对癌症等疾病的策略的需要、人们非常希望从增强的免疫应答特别是T细胞应答,调节GITR活性的新型药剂和方法获益。

[0009] 概述

[0010] 本申请提供了分离的抗体,例如单克隆抗体,特别是人单克隆抗体,其特异性结合GITR并且具有期望的功能性质。这些特性包括与人GITR的高亲和力结合、与猴GITR(例如,食蟹猴GITR)的结合以及刺激抗原特异性T细胞应答的能力。本文所述的抗体可用于刺激抗原特异性T细胞应答,例如在带有肿瘤或带有病毒(病毒感染)的受试者中刺激抗原特异性T细胞应答,并可用于检测样品中的GITR蛋白。

[0011] 在一个方面,本申请提供了分离的抗体或其抗原结合部分,其与GITR结合并包含重链恒定区,所述重链恒定区包含(1)选自SEQ ID NO:223-226、283-290、383-446和480-543的氨基酸序列,或(2)与氨基酸序列SEQ ID NO:223-226、283-290、383-446和480-543有至多5个氨基酸不同或至少95%、96%、97%、98%或99%相同的重链恒定区,其中氨基酸修饰不位于SEQ ID NO:223-226、283-290、383-446和480-543中这样的特定氨基酸处:所述特

定氨基酸在天然存在的人重链恒定区中不存在。在某些实施方案中,抗体展现以下性质中的至少一项:

- [0012] (a) 与可溶性人GITR结合;
- [0013] (b) 与膜结合的人GITR结合;
- [0014] (c) 与膜结合的食蟹猴GITR结合;
- [0015] (d) 诱导或增强T细胞活化,例如,抗原特异性T细胞活化;
- [0016] (e) 抑制GITR配体与3A9-hGITR细胞上的GITR结合;
- [0017] (f) 至多部分地抑制GITR配体与活化的T细胞上的GITR结合;
- [0018] (g) 与成熟人GITR (SEQ ID NO:4) 上的构象表位结合;
- [0019] (h) 与O-连接的和N-糖基化的及未糖基化的人GITR结合;
- [0020] (i) 在没有与Fc受体结合时具有激动剂活性,但其中与Fc受体的结合进一步增强该激动剂活性;及

[0021] (j) 在任一方向或两个方向上与抗体28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10及6G10中的一者或多者竞争结合人GITR。

[0022] 在某些实施方案中,本文所述抗GITR抗体或其抗原结合部分刺激抗肿瘤免疫应答,例如,抗原特异性T细胞应答。在某些实施方案中,抗GITR抗体或其抗原结合部分增加表达GITR的T细胞中的细胞因子(例如,IL-2和/或IFN- $\gamma$ )产生和/或增加T细胞增殖。

[0023] 在某些实施方案中,抗GITR抗体或其抗原结合部分不与Fc受体结合。在某些实施方案中,抗GITR抗体或其抗原结合部分结合一种或多种Fc $\gamma$ R,例如活化或抑制性Fc $\gamma$ R。

[0024] 在某些实施方案中,抗GITR抗体或其抗原结合部分以如通过Biacore测量的10nM或更小的 $K_D$ 与可溶性人GITR结合,以如通过Scatchard测量的1nM或更小的 $K_D$ 与膜结合的人GITR结合,以如通过FACS测量的1nM或更小的 $EC_{50}$ 与膜结合的人GITR结合,以如通过FACS测量的10nM或更小的 $EC_{50}$ 与膜结合的食蟹猴GITR结合,诱导或增强T细胞(例如 $T_{eff}$ 细胞)活化而无需多价交联,以如通过FACS测量的1 $\mu$ g/mL或更小的 $EC_{50}$ 抑制GITR配体与GITR结合,和/或在成熟人GITR (SEQ ID NO:4) 的区域PTGGPGCGPGRLLLGTTG (SEQ ID NO:217) 和CRDYPGEE (SEQ ID NO:218) 内结合。

[0025] 本申请提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其与GITR特异性地结合,并且包含选自下列的可变重链和可变轻链对中的三个可变重链CDR和三个可变轻链CDR:

- [0026] (a) SEQ ID NO:13和14;
- [0027] (b) SEQ ID NO:26和27;
- [0028] (c) SEQ ID NO:39和40;
- [0029] (d) SEQ ID NO:52和53;
- [0030] (e) SEQ ID NO:52和54;
- [0031] (f) SEQ ID NO:71和72;
- [0032] (g) SEQ ID NO:84和85;
- [0033] (h) SEQ ID NO:97和98;
- [0034] (i) SEQ ID NO:97和99;
- [0035] (j) SEQ ID NO:115和116;
- [0036] (k) SEQ ID NO:128和129;

[0037] (1) SEQ ID NO:128和130;以及

[0038] (m) SEQ ID NO:335和336;并且

[0039] 包含重链恒定区,所述重链恒定区包含(1)选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:223-226、283-290、383-446和480-543或(2)与氨基酸序列SEQ ID NO:223-226、283-290、383-446和480-543有至多5个氨基酸不同或至少95%、96%、97%、98%或99%相同的重链恒定区,其中氨基酸修饰不位于SEQ ID NO:223-226、283-290、383-446和480-543中这样的特定氨基酸处:所述特定氨基酸在天然存在的人重链恒定区中不存在。

[0040] 本申请提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其与GITR结合并且包含:

[0041] (a) 分别包含SEQ ID NO:20、21和22的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:23、24和25的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0042] (b) 分别包含SEQ ID NO:33、34和35的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:36、37和38的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或(c) 分别包含SEQ ID NO:46、47和48的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:49、50和51的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0043] (d) 分别包含SEQ ID NO:62、63和64的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:65、66和67的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0044] (e) 分别包含SEQ ID NO:62、63和64的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:68、69和70的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0045] (f) 分别包含SEQ ID NO:78、79和80的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:81、82和83的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0046] (g) 分别包含SEQ ID NO:91、92和93的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:94、95和96的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0047] (h) 分别包含SEQ ID NO:106、107和108的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:109、110和111的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0048] (i) 分别包含SEQ ID NO:106、107和108的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:112、113和114的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0049] (j) 分别包含SEQ ID NO:122、123和124的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:125、126和127的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0050] (k) 分别包含SEQ ID NO:138、139和140的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:141、142和143的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[0051] (l) 分别包含SEQ ID NO:138、139和140的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:144、145和146的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或

[0052] (m) 分别包含SEQ ID NO:342、343和344的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:345、346和347的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列,并且包含这样的重链恒定区,所述重链恒定区包含(1)选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:223-226、283-290、383-446和480-543或(2)与氨基酸序列SEQ ID NO:223-226、283-290、383-446和480-543有至多5个氨基酸不同或至少95%、96%、97%、98%或99%相同的重链恒定区,其中氨基酸修饰不位于SEQ ID NO:223-226、283-290、383-446和480-543中这样的特定氨基酸处:所述特定氨基酸在天然存在的人重链恒定区中不存在。

[0053] 本申请提供了与GITR结合并且包含重链和轻链可变区的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述重链可变区包含与选自下组的氨基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:13、26、39、52、71、84、97、115、128和335。

[0054] 本申请提供了与GITR结合并且包含重链和轻链可变区的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述轻链可变区包含与选自下组的氨基酸序列至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、27、40、53、54、72、85、98、99、116、129、130和336。

[0055] 本申请提供了与GITR结合并且包含重链和轻链可变区序列的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述重链和轻链可变区序列与选自下组的氨基酸序列至少85%相同,例如90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同:

[0056] (a) 分别为SEQ ID NO:13和14;

[0057] (b) 分别为SEQ ID NO:26和27;

[0058] (c) 分别为SEQ ID NO:39和40;

[0059] (d) 分别为SEQ ID NO:52和53;

[0060] (e) 分别为SEQ ID NO:52和54;

[0061] (f) 分别为SEQ ID NO:71和72;

[0062] (g) 分别为SEQ ID NO:84和85;

[0063] (h) 分别为SEQ ID NO:97和98;

[0064] (i) 分别为SEQ ID NO:97和99;

[0065] (j) 分别为SEQ ID NO:115和116;

[0066] (k) 分别为SEQ ID NO:128和129;

[0067] (l) 分别为SEQ ID NO:128和130;以及

[0068] (m) 分别为SEQ ID NO:335和336。

[0069] 本申请提供了与GITR结合并且包含重链和轻链序列的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,所述重链和轻链序列与选自下组的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同:

[0070] (a) 分别为SEQ ID NO:15和16;

[0071] (b) 分别为SEQ ID NO:17和19;

[0072] (c) 分别为SEQ ID NO:18和19;

[0073] (d) 分别为SEQ ID NO:28和29;

[0074] (e) 分别为SEQ ID NO:30和32;

[0075] (f) 分别为SEQ ID NO:31和32;

[0076] (g) 分别为SEQ ID NO:41和42;

[0077] (h) 分别为SEQ ID NO:43和45;

[0078] (i) 分别为SEQ ID NO:44和45;

[0079] (j) 分别为SEQ ID NO:55和56;

[0080] (k) 分别为SEQ ID NO:55和57;

[0081] (l) 分别为SEQ ID NO:58和60;

- [0082] (m) 分别为SEQ ID NO:59和60;  
[0083] (n) 分别为SEQ ID NO:58和61;  
[0084] (o) 分别为SEQ ID NO:59和61;  
[0085] (p) 分别为SEQ ID NO:73和74;  
[0086] (q) 分别为SEQ ID NO:75和77;  
[0087] (r) 分别为SEQ ID NO:76和77;  
[0088] (s) 分别为SEQ ID NO:86和87;  
[0089] (t) 分别为SEQ ID NO:88和90;  
[0090] (u) 分别为SEQ ID NO:89和90;  
[0091] (v) 分别为SEQ ID NO:102和104;  
[0092] (w) 分别为SEQ ID NO:103和104;  
[0093] (x) 分别为SEQ ID NO:100和101;  
[0094] (y) 分别为SEQ ID NO:100和371;  
[0095] (z) 分别为SEQ ID NO:102和105;  
[0096] (za) 分别为SEQ ID NO:103和105;  
[0097] (zb) 分别为SEQ ID NO:117和118;  
[0098] (zc) 分别为SEQ ID NO:119和121;  
[0099] (zd) 分别为SEQ ID NO:120和121;  
[0100] (ze) 分别为SEQ ID NO:131和132;  
[0101] (zf) 分别为SEQ ID NO:134和136;  
[0102] (zg) 分别为SEQ ID NO:135和136;  
[0103] (zh) 分别为SEQ ID NO:131和133;  
[0104] (zi) 分别为SEQ ID NO:134和137;  
[0105] (zj) 分别为SEQ ID NO:135和137;  
[0106] (zk) 分别为SEQ ID NO:337和338;  
[0107] (zl) 分别为SEQ ID NO:339和341;以及  
[0108] (zm) 分别为SEQ ID NO:340和341。

[0109] 在某些实施方案中,分离的单克隆抗体或其抗原结合部分(a)与28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和/或6G10结合GITR上的相同表位,并且(b)将28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、和/或6G10与活化T细胞上的GITR的结合抑制至少50%、60%、70%、80%或90%,如通过(例如)FACS所测量的。

[0110] 在某些实施方案中,抗GITR抗体或其抗原结合部分在成熟人GITR(SEQ ID NO:4)的区域PTGGPGCGPGRLLLTGT(SEQ ID NO:217)和CRDYPGEE(SEQ ID NO:218)内结合。在一些实施方案中,本文所述的抗GITR抗体或其抗原结合部分与人GITR和食蟹猴GITR两者都结合。

[0111] 在某些实施方案中,抗GITR抗体或其抗原结合部分为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体或其变体。在某些实施方案中,抗GITR抗体或其抗原结合部分包含无效应子的(effectorless) IgG1Fc,例如具有以下突变的无效应子IgG1Fc:L234A、L235E、G237A、A330S

和P331S。在某些实施方案中,抗GITR抗体或其抗原结合部分包含这样的Fc:其与活化性Fc $\gamma$ R结合,或具有增强的(例如相对于野生型IgG1Fc)与活化性Fc $\gamma$ R的结合。在某些实施方案中,抗GITR抗体或其抗原结合部分的CDR区中的甲硫氨酸残基被不受氧化的氨基酸残基取代。在某些实施方案中,抗GITR抗体或其抗原结合部分是人抗体或人源化抗体。

[0112] 本申请提供了与GITR结合的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含修饰的重链恒定区,所述修饰的重链恒定区包含IgG2铰链和非IgG2同种型的CH1、CH2和CH3中的至少一者,其中所述抗GITR抗体相对于相同但具有非IgG2铰链的抗GITR抗体具有增强的激动剂活性。

[0113] 在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包括:包含选自SEQ ID NO:223-226、283-290、383-446和480-543的氨基酸序列的重链恒定区,或与SEQ ID NO:223-226、283-290、383-446和480-543的氨基酸序列有至多5个氨基酸不同或至少95%、96%、97%、98%或99%相同的重链恒定区。

[0114] 在某些实施方案中,重链包括:选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:15、17、18、28、30、31、41、43、44、55、58、59、73、75、76、86、88、89、100、102、103、117、119、120、131、134、135、227-275、337、339、340、348-352、361和362,或与氨基酸序列SEQ ID NO:15、17、18、28、30、31、41、43、44、55、58、59、73、75、76、86、88、89、100、102、103、117、119、120、131、134、135、227-275、337、339、340、348-352、361和362有至多10个氨基酸不同或至少95%、96%、97%、98%或99%相同的重链。

[0115] 在某些实施方案中,轻链包括:选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:16、19、29、32、42、45、56、57、60、61、74、87、90、101、104、105、118、121、132、133、136、137、338、341和371,或与氨基酸序列SEQ ID NO:16、19、29、32、42、45、56、57、60、61、74、87、90、101、104、105、118、121、132、133、136、137、338、341和371有至多10个氨基酸不同或至少95%、96%、97%、98%或99%相同的轻链。

[0116] 本申请提供了双特异性分子,其包含抗GITR抗体及与之连接的具有第二结合特异性的分子。

[0117] 本申请提供了编码抗GITR抗体或其抗原结合部分的重链和/或轻链可变区的核酸、包含核酸分子的表达载体以及用所述表达载体转化的细胞。

[0118] 本申请提供了免疫缀合物,其包含本文所述的抗GITR抗体以及与之连接的药剂。

[0119] 本申请提供了包含抗GITR抗体或其抗原结合部分和载体的组合物。本文还提供了包含抗GITR抗体或其抗原结合部分及使用说明书的试剂盒。

[0120] 本申请提供了制备抗GITR抗体的方法,其包括使抗GITR抗体在细胞中表达并从所述细胞中分离所述抗体。

[0121] 本申请提供了刺激抗原特异性T细胞应答的方法,其包括使T细胞与抗GITR抗体或其抗原结合部分接触,从而刺激抗原特异性T细胞应答。

[0122] 本申请提供了活化或共刺激T细胞(例如,效应T细胞)的方法,其包括使细胞(例如,效应T细胞)与抗GITR抗体或其抗原结合部分和CD3接触,其中效应T细胞被活化或共刺激。

[0123] 本申请提供了增加T细胞中IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生和/或T细胞增殖的方法,其包括使T细胞与有效量的抗GITR抗体或其抗原结合部分接触。

[0124] 本申请提供了增加受试者中T细胞中IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生的方法,其包括施用有效量的抗GITR抗体或其抗原结合部分、包含抗GITR抗体的双特异性分子或缀合物、或包含抗GITR抗体的组合物,以增加T细胞的IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生。

[0125] 本申请提供了减少或耗竭有需要的受试者的肿瘤中的调节T性细胞的数目的方法,其包括施用有效量的抗GITR抗体或其抗原结合部分、双特异性分子或缀合物,以减少肿瘤中的调节T性细胞的数目,其中抗体或其抗原结合部分具有效应子功能或增强的效应子功能。

[0126] 本申请提供了刺激受试者中的免疫应答的方法,其包括向受试者施用有效量的抗GITR抗体或其抗原结合部分、双特异性分子或缀合物,使得受试者中的免疫应答被刺激。在一些实施方案中,受试者患有肿瘤并且针对肿瘤的免疫应答被刺激。

[0127] 本申请提供了抑制受试者中的肿瘤细胞生长的方法,其包括向受试者施用抗GITR抗体或其抗原结合部分、双特异性分子或缀合物,使得受试者中的肿瘤生长被抑制。

[0128] 本申请提供了治疗癌症,例如通过免疫疗法治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的抗GITR抗体或其抗原结合部分、包含抗GITR抗体的双特异性分子或缀合物、或包含抗GITR抗体的组合物,以治疗癌症。在某些实施方案中,癌症是膀胱癌、乳腺癌、子宫/子宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、食道癌、胃肠癌、胰腺癌、结肠直肠癌、结肠癌、肾癌、头颈癌、肺癌、胃癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统的新生物、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤及病毒相关癌症。在某些实施方案中,癌症是转移性癌症、难治性癌症或复发性癌症。

[0129] 在某些实施方案中,本文所述的方法进一步包括与抗GITR抗体(例如,抗PD1抗体、LAG-3抗体、CTLA-4抗体和/或PD-L1抗体)一起施用一或多种另外的治疗剂。

[0130] 本申请提供了检测样品中GITR的存在的方法,其包括在容许在抗体或其抗原结合部分与GITR之间形成复合物的条件下使样品与抗GITR抗体或其抗原结合部分接触,并检测复合物的形成。

[0131] 本申请提供了本文所述的抗GITR抗体用于治疗癌症、刺激受试者中的免疫应答、刺激抗原特异性T细胞应答、活化或共刺激T细胞、增加T细胞中的IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生和/或T细胞的增殖、减少或耗竭肿瘤中的调节性T细胞的数目和/或抑制肿瘤细胞生长的用途。本文中还提供了本文所述的抗GITR抗体用于制备用于刺激受试者中的免疫应答、刺激抗原特异性T细胞应答、活化或共刺激T细胞、增加T细胞中的IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生和/或T细胞的增殖、减少或耗竭肿瘤中的调节性T细胞的数目和/或抑制肿瘤细胞生长的药剂的用途。

[0132] 本公开的其他特征和优点在下面的详细说明和实施例的基础上是不言自明的,这些详细说明和实施例不应解释为限制本发明。

[0133] 附图简述

[0134] 图1显示了单克隆抗体28F3(分别为SEQ ID NO:13和14)、18E10(分别为SEQ ID NO:39和40)和19D3(分别为SEQ ID NO:26和27)的重链和轻链可变区的氨基酸序列。28F3的VH和VL CDR加下划线。

[0135] 图2A显示了28F3人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:147)和氨基酸序列(SEQ ID NO:13)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:20)、CDR2(SEQ ID NO:21)和CDR3(SEQ ID NO:22)区并且指示了V、D和J种系来源。



[0136] 图2B显示了28F3人单克隆抗体的κ轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:148)和氨基酸序列(SEQ ID NO:14)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:23)、CDR2(SEQ ID NO:24)和CDR3(SEQ IDNO:25)区并且指示了V和J种系来源。

[0137] 图3A显示了18E10人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:158)和氨基酸序列(SEQ ID NO:39)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:46)、CDR2(SEQ ID NO:47)和CDR3(SEQ IDNO:48)区并且指示了V、D和J种系来源。

[0138] 图3B显示了18E10人单克隆抗体的κ轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:159)和氨基酸序列(SEQ ID NO:40)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:49)、CDR2(SEQ ID NO:50)和CDR3(SEQ IDNO:51)区并且指示了V和J种系来源。

[0139] 图4A显示了19D3人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:154)和氨基酸序列(SEQ ID NO:26)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:33)、CDR2(SEQ ID NO:34)和CDR3(SEQ IDNO:35)区并且指示了V、D和J种系来源。

[0140] 图4B显示了19D3人单克隆抗体的κ轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:155)和氨基酸序列(SEQ ID NO:27)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:36)、CDR2(SEQ ID NO:37)和CDR3(SEQ IDNO:38)区并且指示了V和J种系来源。

[0141] 图5A显示了3C3人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:162)和氨基酸序列(SEQ ID NO:52)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:62)、CDR2(SEQ ID NO:63)和CDR3(SEQ IDNO:64)区并且指示了V、D和J种系来源。

[0142] 图5B显示了3C3人单克隆抗体的κ轻链可变区(VK1)的核苷酸序列(SEQ ID NO:163)和氨基酸序列(SEQ ID NO:53)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:65)、CDR2(SEQ ID NO:66)和CDR3(SEQ IDNO:67)区并且指示了V和J种系来源。

[0143] 图5C显示了3C3人单克隆抗体的κ轻链可变区(VK2)的核苷酸序列(SEQ ID NO:164)和氨基酸序列(SEQ ID NO:54)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:68)、CDR2(SEQ ID NO:69)和CDR3(SEQ IDNO:70)区并且指示了V和J种系来源。

[0144] 图6A显示了2G6人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:168)和氨基酸序列(SEQ ID NO:71)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:78)、CDR2(SEQ ID NO:79)和CDR3(SEQ IDNO:80)区并且指示了V、D和J种系来源。

[0145] 图6B显示了2G6人单克隆抗体的κ轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:169)和氨基酸序列(SEQ ID NO:72)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:81)、CDR2(SEQ ID NO:82)和CDR3(SEQ IDNO:83)区并且指示了V和J种系来源。

[0146] 图7A显示了8A6人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:172)和氨基酸序列(SEQ ID NO:84)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:91)、CDR2(SEQ ID NO:92)和CDR3(SEQ IDNO:93)区并且指示了V、D和J种系来源。

[0147] 图7B显示了8A6人单克隆抗体的κ轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:173)和氨基酸序列(SEQ ID NO:85)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:94)、CDR2(SEQ ID NO:95)和CDR3(SEQ IDNO:96)区并且指示了V和J种系来源。

[0148] 图8A显示了9G7人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:176)和氨基酸序列(SEQ ID NO:97)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:106)、CDR2(SEQ ID NO:107)和CDR3(SEQ IDNO:108)区并且指示了V、D和J种系来源。

[0149] 图8B显示了9G7人单克隆抗体的 $\kappa$ 轻链可变区(VK1)的核苷酸序列(SEQ ID NO:177)和氨基酸序列(SEQ ID NO:98)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:109)、CDR2(SEQ ID NO:110)和CDR3(SEQ ID NO:111)区并且指示了V和J种系来源。

[0150] 图8C显示了9G7人单克隆抗体的 $\kappa$ 轻链可变区(VK2)的核苷酸序列(SEQ ID NO:178)和氨基酸序列(SEQ ID NO:99)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:112)、CDR2(SEQ ID NO:113)和CDR3(SEQ ID NO:114)区并且指示了V和J种系来源。

[0151] 图9A显示了14E3人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:182)和氨基酸序列(SEQ ID NO:115)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:122)、CDR2(SEQ ID NO:123)和CDR3(SEQ ID NO:124)区并且指示了V、D和J种系来源。

[0152] 图9B显示了14E3人单克隆抗体的 $\kappa$ 轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:183)和氨基酸序列(SEQ ID NO:116)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:125)、CDR2(SEQ ID NO:126)和CDR3(SEQ ID NO:127)区并且指示了V和J种系来源。

[0153] 图10A显示了19H8人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:186)和氨基酸序列(SEQ ID NO:128)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:138)、CDR2(SEQ ID NO:139)和CDR3(SEQ ID NO:140)区并且指示了V、D和J种系来源。

[0154] 图10B显示了19H8人单克隆抗体的 $\kappa$ 轻链可变区(VK1)的核苷酸序列(SEQ ID NO:187)和氨基酸序列(SEQ ID NO:129)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:141)、CDR2(SEQ ID NO:142)和CDR3(SEQ ID NO:143)区并且指示了V和J种系来源。

[0155] 图10C显示了19H8人单克隆抗体的 $\kappa$ 轻链可变区(VK2)的核苷酸序列(SEQ ID NO:188)和氨基酸序列(SEQ ID NO:130)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:144)、CDR2(SEQ ID NO:145)和CDR3(SEQ ID NO:146)区并且指示了V和J种系来源。

[0156] 图11A显示了6G10人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:353)和氨基酸序列(SEQ ID NO:335)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:342)、CDR2(SEQ ID NO:343)和CDR3(SEQ ID NO:344)区并且指示了V、D和J种系来源。

[0157] 图11B显示了6G10人单克隆抗体的 $\kappa$ 轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:354)和氨基酸序列(SEQ ID NO:336)。描绘了CDR1(SEQ ID NO:345)、CDR2(SEQ ID NO:346)和CDR3(SEQ ID NO:347)区并且指示了V和J种系来源。

[0158] 图12显示了28F3的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:13)与人种系V<sub>H</sub> 3-33、3-10和JH6氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:192、193和196)的比对。

[0159] 图13显示了28F3的轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:14)与人种系V<sub>K</sub> L18和JK2氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:204和205)的比对。

[0160] 图14显示了18E10的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:39)与人种系V<sub>H</sub> 3-33、6-19和JH6氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:192、199和197)的比对。

[0161] 图15显示了18E10的轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:40)与人种系V<sub>K</sub> L15和JK2氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:207和205)的比对。

[0162] 图16显示了19D3的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:26)与人种系V<sub>H</sub> 3-33、3-16和JH6氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:192、200和198)的比对。

[0163] 图17显示了19D3的轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:27)与人种系V<sub>K</sub> L15和JK2氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:207和205)的比对。

[0164] 图18显示了3C3的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:52)与人种系VH 4-34和JH3氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:201和202)的比对。

[0165] 图19A显示了3C3的轻链可变区(VK1)的氨基酸序列(SEQ ID NO:53)与人种系Vk L15和JK2氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:207和205)的比对。

[0166] 图19B显示了3C3的轻链可变区(VK2)的氨基酸序列(SEQ ID NO:54)与人种系Vk L20和JK2氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:208和206)的比对。

[0167] 图20显示了2G6的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:71)与人种系VH 3-33和JH6氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:192和197)的比对。

[0168] 图21显示了2G6的轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:72)与人种系VkL15和JK2氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:207和205)的比对。

[0169] 图22显示了8A6的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:84)与人种系VH 3-33、3-10和JH6氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:192、193和197)的比对。

[0170] 图23显示了8A6的轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:85)与人种系VkL18和JK2氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:204和205)的比对。

[0171] 图24显示了9G7的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:97)与人种系VH 3-15、3-10和JH6氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:203、194和198)的比对。

[0172] 图25A显示了9G7的轻链可变区(VK1)的氨基酸序列(SEQ ID NO:98)与人种系Vk A27和JK1氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:209和210)的比对。

[0173] 图25B显示了9G7的轻链可变区(VK2)的氨基酸序列(SEQ ID NO:99)与人种系Vk A27和JK5氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:209和212)的比对。

[0174] 图26显示了14E3的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:115)与人种系VH 4-34和JH3氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:201和202)的比对。

[0175] 图27显示了14E3的轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:116)与人种系Vk L15和JK1氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:207和211)的比对。

[0176] 图28显示了19H8的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:128)与人种系VH 3-33、3-10和JH6氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:192、195和196)的比对。

[0177] 图29A显示了19H8的轻链可变区(VK1)的氨基酸序列(SEQ ID NO:129)与人种系Vk L18和JK1氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:204和211)的比对。

[0178] 图29B显示了19H8的轻链可变区(VK2)的氨基酸序列(SEQ ID NO:130)与人种系Vk L6和JK4氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:213和214)的比对。

[0179] 图30显示了6G10的重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:335)与人种系VH 3-33、3-10和JH6氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:192、195和196)的比对。

[0180] 图31显示了6G10的轻链可变区(VK1)的氨基酸序列(SEQ ID NO:336)与人种系Vk L18和JK2氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:204和205)的比对。

[0181] 图32显示了通过FACS评估的各种抗GITR抗体对于活化的人T细胞的结合亲和力(以nM表示),其中无抗体、IgG1和hIgG2抗体作为对照。

[0182] 图33显示了通过FACS评估的各种抗GITR抗体对于活化食蟹猴T细胞的结合亲和力(以nM表示),其中无抗体、hIgG1和hIgG2抗体作为对照。

[0183] 图34A和34B显示了各种抗GITR抗体抑制GITR配体(GITR-L)与GITR3A9细胞结合的

能力,其中hIgG1、hIgG2、无抗体以及仅有细胞作为对照。

[0184] 图34C显示了重组GITR-L与活化人CD4及CD8T细胞的结合。

[0185] 图34D显示,GITR-L部分地阻断了28F3-hIgG1与活化人CD4<sup>+</sup> T细胞的结合。28F3-hIgG1在0.5μg/mL的固定浓度下与活化T细胞的结合被预结合的GITR-L以0.0024μg/mL的IC50部分阻断。

[0186] 图34E显示,28F3-hIgG1不阻断0.6μg/mL的GITR-L与活化的人T细胞的结合。在将GITR-L以0.6mg/mL、约90%饱和度添加至CD4<sup>+</sup> T细胞时,在100mg/mL至0.00056mg/mL范围内的预结合的28F3-hIgG1不能阻断GITR-L。

[0187] 图34F显示,28F3-hIgG1部分地阻断0.02μg/mL的GITR-L与活化的人T细胞的结合。GITR-L在20ng/mL的固定浓度下与活化T细胞的结合被预结合的28F3-hIgG1以0.075μg/mL的IC50部分阻断。

[0188] 图35A显示了Western印迹,其展示抗GITR抗体28F3与天然人GITR结合而不与变性的人GITR结合,并且该结合不受N-连接糖基化的存在或不存在的影响。“+”符号指示经N-糖酰胺酶(PNGase)F处理以去除N-连接糖基化的样品。

[0189] 图35B为考马斯蓝(Coomassie blue)染色的凝胶,其显示在转移至硝基纤维素上用于Western印迹分析之前所有形式的人GITR的存在。

[0190] 图36A-36B显示了28F3和3C3抗体与通过用蛋白内切酶Arg-C(1)、蛋白内切酶Lys-C(2)、胰蛋白酶(3)、蛋白内切酶Glu-C(4)或蛋白内切酶Asp-N(5)消化生成的天然GITR片段的结合。

[0191] 图37显示了抗GITR抗体28F3与利用蛋白内切酶Glu-C和胰蛋白酶(“Glu-C和胰蛋白酶”)、蛋白内切酶Arg-C(“Arg-C”)、蛋白内切酶Lys-C和胰蛋白酶(“Lys-C和胰蛋白酶”)、胰蛋白酶、或蛋白内切酶Asp-N和蛋白内切酶Glu-C(“AspN和GluC”)消化天然人GITR蛋白生成的人GITR肽片段的结合的热图视图,从而鉴定与28F3抗体结合的表位的位置(加框区)。人GITR的成熟细胞外结构域的氨基酸序列以深灰色显示,连接于其C端的小鼠Fc的序列以浅灰色显示。

[0192] 图38A显示了在包被28F3的珠子与来自天然人GITR的胰蛋白酶消化产生的肽温育之后的流过级分中的肽。

[0193] 图38B显示了两种主要的28F3结合肽(以星号指示)。

[0194] 图38C显示通过LC-MS将图34B中的两个峰中的第一个鉴定为对应于具有所示的序列并且没有O-连接糖基化的N端肽。

[0195] 图38D显示通过LC-MS将图34B中的两个峰中的第二个鉴定为对应于具有所示的序列并且在T20上具有O-连接糖基化的N端肽。

[0196] 图38E显示了与28F3一起温育过的较长肽在用蛋白内切酶Asp-N原位消化后剩余的GITR肽。

[0197] 图39A显示了重组人GITR/Fc以及重组人GITR/Fc与28F3IgG1的蛋白复合物的胃酶解肽的列表,其对GITR的N端区的序列覆盖率达到86%。

[0198] 图39B显示了在28F3IgG1mAb(“GITR.6”)不存在/存在下通过HDX质谱(MS)的氘摄取水平。

[0199] 图39C描绘了如通过HDX MS确定的成熟人GITR中被28F3结合的两个区。

[0200] 图40显示了在板结合的抗CD3抗体存在下各种激动剂抗GITR抗体对3A9-hGITR细胞的IL-2分泌的作用。

[0201] 图41A显示了激动剂抗GITR抗体18E10、13H2 (与28F3相同) 和28F3对由特异性抗原活化的3A9-hGITR细胞的IL-2分泌的作用。

[0202] 图41B显示了激动剂抗GITR抗体3C3 (显示为“GITR.3”)、28F3、19D3和18E10对由特异性抗原活化的3A9-hGITR细胞的IL-2分泌的作用。

[0203] 图42A显示了各种激动剂抗GITR HuMab抗体对经CHO-OKT3细胞 (即, 表达OKT3scfv的CHO细胞) 刺激的T细胞的干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 分泌的作用。

[0204] 图42B显示了激动剂抗GITR抗体28F3对经表达OKT3的CHO细胞刺激的CD4<sup>+</sup> T细胞的IL-2分泌的作用, 其中T细胞来自第一供体。

[0205] 图42C显示了抗GITR抗体28F3对经表达OKT3的CHO细胞刺激的CD4<sup>+</sup>T细胞的IFN- $\gamma$ 分泌的作用, 其中T细胞来自第一供体。

[0206] 图42D显示了抗GITR抗体28F3对经表达OKT3的CHO细胞刺激的CD4<sup>+</sup>T细胞的IL-2分泌的作用, 其中T细胞来自第二供体。

[0207] 图42E显示了抗GITR抗体28F3对经表达OKT3的CHO细胞刺激的CD4<sup>+</sup>T细胞的IFN- $\gamma$ 分泌的作用, 其中T细胞来自第二供体。

[0208] 图43显示了在HEL48-63肽存在下抗GITR抗体28F3 (IgG2)、28F3-F(ab')<sub>2</sub>片段和28F3-Fab对经LK35.2细胞刺激的3A9-hGITR细胞的IL-2分泌的作用。

[0209] 图44显示了使用单克隆抗体28F3-FITC的人扁桃体标本的免疫组织化学。

[0210] 图45A-45D显示了大鼠抗小鼠GITR抗体DTA-1的不同同种型在MC38结肠腺癌模型中对抗肿瘤活性的影响, 所述抗肿瘤活性通过经这些同种型治疗的小鼠个体中的肿瘤体积变化来加以度量: (图45A) 对照小鼠IgG1抗体 (10mg/kg); (图45B) DTA-1大鼠IgG2b (10mg/kg); (图45C) DTA-1小鼠IgG1 (10mg/kg); (图45D) DTA-1小鼠IgG2a (10mg/kg)。针对10只小鼠的每个组显示每组无肿瘤 (TF) 小鼠的数目。

[0211] 图46A和46B显示了在经不同同种型的DTA-1抗体 (10mg/kg) 治疗的小鼠组中的MC38肿瘤的平均肿瘤体积 (图46A) 和中位肿瘤体积 (图46B) 的变化。

[0212] 图47A-47F显示了经不同抗GITR (DTA-1) 和抗CTLA-4 (9D9) 同种型以及指示的对照抗体治疗的荷MC38肿瘤的小鼠的脾淋巴细胞 (图47A-47C) 和肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) (图47D-47F) 的流式细胞分析。(图47A) 脾中的CD8<sup>+</sup>T细胞的百分比; (图47B) 脾中的CD4<sup>+</sup>细胞的百分比; (图47C) 脾中亦为Foxp3<sup>+</sup>的CD4<sup>+</sup>细胞的百分比; (图47D) TIL中CD8<sup>+</sup>T细胞的百分比; (图47E) TIL中CD4<sup>+</sup>细胞的百分比; (图47F) TIL中亦为Foxp3<sup>+</sup>的CD4<sup>+</sup>细胞的百分比。

[0213] 图48A-48F显示了经重新改造以使聚集最小化的大鼠抗小鼠GITR抗体DTA-1 (称为“mGITR.7”) 的不同同种型在MC38模型中对抗肿瘤活性的影响, 所述抗肿瘤活性通过经这些同种型治疗的小鼠个体中的肿瘤体积变化来加以度量: (图48A) 对照小鼠IgG1抗体; (图48B) mGITR.7mIgG1; (图48C) mGITR.7mIgG1-D265A; (图48D) mGITR.7mIgG2a; (图48E) mGITR.7mIgG2b; (图48F) mGITR.7大鼠IgG2b。针对9只小鼠的每个组显示每组TF小鼠的数目。

[0214] 图49A和49B显示了在经不同同种型的重新改造的DTA-1抗体治疗的小鼠组中的MC38肿瘤的平均肿瘤体积 (图49A) 和中位肿瘤体积 (图49B) 的变化。

[0215] 图50A和50B显示了不同DTA-1 (经重新改造的“mGITR”DTA-1或最初改造的“DTA-1”抗体) 和抗CTLA-4 (9D9) 同种型对荷MC38肿瘤的小鼠的脾 (图50A) 和TIL (图50B) 中的Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>的影响的流式细胞分析。

[0216] 图51A-51E显示了不同的小鼠DTA-1同种型在Sa1N纤维肉瘤小鼠模型中的抗肿瘤活性,所述抗肿瘤活性通过在经这些同种型治疗的小鼠个体中的肿瘤体积的变化来度量: (图51A) 对照小鼠IgG1抗体; (图51B) DTA-1小鼠IgG2a; (图51C) DTA-1大鼠IgG2b; (图51D) DTA-1小鼠IgG1; (图51E) DTA-1小鼠IgG1-D265A。针对至多10只小鼠的每个组显示每组TF小鼠的数目。

[0217] 图52A和52B显示了在经不同同种型的DTA-1抗体治疗的小鼠组中的Sa1N肿瘤的平均肿瘤体积 (图52A) 和中位肿瘤体积 (图52B) 的变化。

[0218] 图53A和53B显示了不同DTA-1和抗CTLA-4 (9D9) 同种型对荷Sa1N肿瘤的小鼠的脾 (图53A) 和TIL (图53B) 中的Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Treg的影响。

[0219] 图54A-54D显示了使用分期的MC38结肠腺癌模型的大鼠抗GITR抗体DTA-1对肿瘤体积的影响。在第7、10和14天用 (图54A) 对照mIgG1、(图54B) mIgG+DTA-1、(图54C) mIgG+PD-1和 (图54D) PD-1+DTA-1治疗小鼠。针对10只小鼠的每个组显示每组无肿瘤 (TF) 小鼠的数目。

[0220] 图55A和55B显示了抗GITR抗体28F3中的VH CDR3的突变的各种组合对与3A9-hGITR细胞结合的影响。

[0221] 图56A-56F显示了在板结合的抗CD3存在下抗GITR抗体28F3中的VHCDR3的突变的各种组合对3A9-hGITR细胞的IL-2分泌水平的影响。

[0222] 图57显示了指示的抗GITR抗体对活化T细胞的结合亲和力。所测试的抗体包含以下重链恒定区中的一者: IgG1恒定区 (“抗GITR.g1f”)、无效效应子的IgG1恒定区 (“抗GITR.g1.1f”)、IgG2恒定区 (“抗GITR-G2”)、IgG2铰链及IgG1Fc结构域 (“抗GITR.G2.G1f”) 以及IgG2铰链及无效效应子IgG1Fc结构域 (“抗GITR.G2.G1.1f”)。

[0223] 图58A-58C显示了用具有不同重链恒定区的可溶性抗人GITR抗体刺激的供体CD4T细胞的IFN- $\gamma$  和IL-2的分泌。图58A显示了用表达OKT3的CHO细胞和不同浓度的具有IgG2-IgG1恒定区的抗人GITR抗体刺激的供体CD4T细胞的IFN- $\gamma$  分泌。图58B显示了用表达OKT3的CHO细胞和不同浓度的IgG1重链恒定结构域或IgG2-IgG1杂合重链恒定结构域刺激的供体CD4T细胞的IL-2分泌。图58C显示了用表达OKT3的CHO细胞和不同浓度的图55A和B中的抗体的无效效应子型式 (IgG1.1) 刺激的供体CD4T细胞的IL-2分泌。

[0224] 图59显示了在板结合的抗CD3存在下指示的抗GITR抗体对3A9-hGITR细胞的IL-2分泌的比较。

[0225] 图60A-60D显示了28F3.IgG1和28F3.IgG1.1对Treg及Teff细胞的增殖的影响。

[0226] 图61A-61F显示了28F3.IgG1 (“GITR.6IgG1”) 和28F3.IgG1.1 (“GITR.6IgG1.1”) 对来自两种不同供体的活化CD4<sup>+</sup>细胞、CD8<sup>+</sup>细胞和T<sub>reg</sub>富集细胞的NK细胞诱导的溶解 (NK cell induced analysis) 的影响。

[0227] 图62A-62C显示了对照hIgG1抗体、28F3.IgG1 (“抗GITR IgG1”) 和28F3.IgG1.1 (“抗GITR IgG1.1”) 对MC38肿瘤生长的影响。

[0228] 图63A和63B分别显示了用对照hIgG1抗体、28F3.IgG1 (“抗GITR IgG1”) 和

28F3.IgG1.1 (“抗GITR IgG1.1”)治疗的小鼠中的MC38肿瘤的平均体积和中位体积。

[0229] 图64A和64B分别显示了用对照hIgG1抗体、28F3.IgG1 (“抗GITR IgG1”)和28F3.IgG1.1 (“抗GITR IgG1.1”)治疗的具有MC38肿瘤的小鼠的体重变化的均值%和体重变化中位值%。

[0230] 图65显示了在MC38肿瘤模型中28F3.IgG1 (“GITR IgG1”)相对于同种型对照对T<sub>reg</sub>细胞耗竭的影响。

[0231] 图66显示了在MC38肿瘤模型中28F3.IgG1 (“GITR IgG1”)相对于同种型对照对CD8+T细胞的百分比的影响。

[0232] 图67显示了可溶性交联28F3.IgG1 (“GITR.6IgG1”)和28F3.IgG1.1 (“GITR.6IgG1.1”)对在与CHO-OKT3和CHO-OKT3-CD32a细胞共培养时的T细胞的IFN- $\gamma$ 分泌的影响。

[0233] 图68显示了可溶性交联的28F3.IgG1 (“GITR.6IgG1”)和28F3.IgG1.1 (“GITR.6IgG1.1”)对在与CHO-OKT3和CHO-OKT3-CD32a细胞共培养时的T细胞的增殖的影响。

[0234] 图69显示了在具有指示的恒定区的抗GITR抗体存在下与CHO-OKT3细胞共培养的CD4+ T细胞分泌的IL-2的水平。

[0235] 图70显示了抗体与抗his抗体Fab捕获的Fc $\gamma$ R-his蛋白的结合。假定1:1mAb:Fc $\gamma$ R结合化学计量,将结合反应绘制为理论R<sub>max</sub>的百分比。按照幻灯片底部的颜色图例提供的顺序显示每种抗体的条形图。

[0236] 图71显示了抗体与抗his抗体Fab捕获的Fc $\gamma$ R-his蛋白的结合。假定1:1mAb:Fc $\gamma$ R结合化学计量,将结合反应绘制为理论R<sub>max</sub>的百分比。按照幻灯片底部的颜色图例提供的顺序显示每种抗体的条形图。

[0237] 图72显示了抗GITR抗体的内化时程分析。

[0238] 图73A显示了在零时间的GITR和早期内体标志物EEA2共定位分析。

[0239] 图73B显示了在时间30分钟和120分钟的GITR和早期内体标志物EEA2共定位分析。

[0240] 图73C显示了在图73A和73B中所示的内体共定位的定量结果,将其绘制为共定位像素强度相对于总染色的比率。

[0241] 图74A显示了用指示的抗GITR抗体处理的CD8+T细胞中的NF $\kappa$ B信号转导激活。

[0242] 图74B显示了用指示的抗GITR抗体处理的CD4+ T细胞中的NF $\kappa$ B信号转导激活。

[0243] 图75显示了用指示的抗GITR抗体处理的CD4+ T细胞中的P38活化。

[0244] 图76A显示了在具有指示的恒定区的不同浓度的抗GITR抗体存在下与CHO-OKT3细胞共培养的CD4+ T细胞分泌的IL-2的水平。

[0245] 图76B显示了在具有指示的恒定区的5 $\mu$ g/ml的抗GITR抗体存在下与CHO-OKT3细胞共培养的CD4+ T细胞分泌的IL-2的水平(与图76A中的实验相同)。

[0246] 图76C显示了在具有指示的恒定区的1.25 $\mu$ g/ml的抗GITR抗体存在下与CHO-OKT3细胞共培养的CD4+ T细胞分泌的IL-2的水平(与图76A中的实验相同)。

[0247] 图76D显示了在具有指示的恒定区的0.313 $\mu$ g/ml的抗GITR抗体存在下与CHO-OKT3细胞共培养的CD4+ T细胞分泌的IL-2的水平(与图76A中的实验相同)。

[0248] 发明详述

[0249] 本文中描述了与GITR特异性地结合、且由此激活下游GITR信号转导的分离的抗体(“激动剂抗GITR抗体”),尤其是单克隆抗体,例如人单克隆抗体。在某些实施方案中,本文所述的抗体衍生自特定的重链和轻链种系序列和/或含有包含特定氨基酸序列的特定结构特征,比如CDR区。本申请提供了分离的抗体、制造这样的抗体的方法、包含这样的抗体的免疫缀合物和双特异性分子以及经配制为含有所述抗体的药物组合物。本文中还提供了单独地或与其他免疫刺激剂(例如,抗体)和/或癌症疗法联合使用所述抗体用于免疫应答增强的方法。因此,本文所述的抗GITR抗体可用于多种治疗应用中的治疗,包括(例如)抑制肿瘤生长和治疗病毒感染。

[0250] 定义

[0251] 为了更易于理解本说明,首先对某些术语进行了定义。其他定义在整个详细说明中进行阐述。

[0252] 如本文中使用的术语“糖皮质激素诱导的TNF受体”或“GITR”是指一种与GITR配体(GITR-L)结合的受体,其为TNF受体超家族的成员。GITR也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员18(TNFRSF18)、AITR和CD357。术语“GITR”包括由细胞天然表达的GITR的任何变体或同等型。因此,本文所述的抗体可与来自除了人以外的物种的GITR(例如,食蟹猴GITR)交叉反应。或者,抗体对人GITR可以是特异的,而与其他物种可能不展现出任何交叉反应性。GITR或其任何变体和同等型可以分离自天然表达它们的细胞或组织,或使用本领域熟知的技术和/或本文所述的技术以重组方式产生。

[0253] 已经鉴定了人GITR的三个同等型,三者均共有相同的细胞外结构域,但C端部分除外。变体1(登录号NP\_004186;SEQ ID NO:1)由241个氨基酸组成,代表最长的转录物。与变体2相比,其含有导致移码的额外编码区段。与同等型2相比,所得的蛋白质(同等型1)含有不同的较短的C端。变体2(登录号NP\_683699;SEQ ID NO:2)编码最长的蛋白质(同等型2),其由255个氨基酸组成,且是可溶的。与变体2相比,变体3(登录号NP\_683700;SEQ ID NO:3)含有导致移码的额外编码区段。与同等型2相比,所得的蛋白质(同等型3)含有不同的较短的C端,且由234个氨基酸组成。

[0254] 以下是三个已知的人GITR同等型、食蟹猴GITR和GITR-L的氨基酸序列。

[0255] 人GITR同等型1(登录号NP\_004186;SEQ ID NO:1;由具有登录号NM\_004195.2的核苷酸序列编码):

[0256] MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSE  
WDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCQFGFLTVPFPGN  
KTHNAVCPVGPSPAEPLGWLTVVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFP  
EE  
ERGERSAEEKGRLGDLWV

[0257] 人GITR同等型2(登录号NP\_683699.1;SEQ ID NO:2;由具有登录号NM\_148901.1的核苷酸序列编码):

[0258] MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSE  
WDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCWRCRRRPKT  
PE  
AASSPRKSGASDRQRRRGWETCGCEPGRPPGPPTAASPSPGAPQAAGALRSALGRALLPWQKQWVQEGGSDQ  
RPGP  
CSSAAAAGPCRRERETQSWPPSSLAGPDGVGS

[0259] 人GITR同等型3(登录号NP\_683700.1;SEQ ID NO:3;由具有登录号NM\_148902.1的



核苷酸序列编码)：

[0260] MAQHGMAGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTCTQFGFLTVPFGNKTHNAVCPGSPPAEPLGWLTVVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRKTLLEVPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWV

[0261] 同等型1-3的信号序列对应于氨基酸1-25。因此,成熟同等型1、2和3分别由氨基酸26至241、255或234组成。成熟GITR的细胞外结构域由氨基酸26-162组成且具有以下氨基酸序列：

[0262] QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTCTQFGFLTVPFGNKTHNAVCPGSPPAEP (SEQ ID NO:4)

[0263] 食蟹猴GITR蛋白序列 (SEQ ID NO:5)：

[0264] MCASGTLCLALLCAASLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGKDARCCRVHPTTRCCRDYQGECCSEWDCVCVQPEFHCGNPCCTTCQHHPGPSGQGVQPQKFSFGFRCDALGTFSRGHDGHCKPWTCTQFGFLTVPFGNKTHNAVCPGSPPAEPPGWLTIILLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQPTGPRETQLLEVPSTEDASSCQFPEEERGERLAEKGRLGDLWV

[0265] 人GITR-L蛋白序列 (登录号NP\_005083.2;SEQ ID NO:6)：

[0266] MTLHPSPITCEFLFSTALISPKMCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSI VMLLFLCSFSWLIFIFLQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFIS如本文中使用的术语“抗体”包括全抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。在一个实施方案中,“抗体”是指包含由二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。每条重链包含重链可变区(在本文中缩写为 $V_H$ )和重链恒定区。在某些天然存在的抗体中,重链恒定区包含三个结构域CH1、CH2和CH3。在某些天然存在的抗体中,每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为 $V_L$ )和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域CL。 $V_H$ 区和 $V_L$ 区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),互补决定区与更为保守的被称为框架区(FR)的区域间隔。 $V_H$ 和 $V_L$ 各自由3个CDR和4个FR组成,按下列顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q))结合。

[0267] 抗体一般以高亲和力与其同源抗原特异性结合,反映在解离常数( $K_D$ )上为 $10^{-5}$ 到 $10^{-11}$ M或更低。大于约 $10^{-4}$ M的任何 $K_D$ 通常被认为指示非特异性结合。如本文中使用的,与抗原“特异性结合”的抗体是指以高亲和力与抗原及基本上相同的抗原结合的抗体,高亲和力意味着 $K_D$ 为 $10^{-7}$ M或更低、优选地 $10^{-8}$ M或更低、甚至更优选地 $5 \times 10^{-9}$ M或更低、最优选地在 $10^{-8}$ M和 $10^{-10}$ M之间或更低,但是不会以高亲和力与无关抗原结合。如果一种抗原相对于给定抗原展现出高度的序列同一性,例如如果它相对于给定抗原的序列展现出至少80%、至少90%、优选地至少95%、更优选地至少97%、或者甚至更优选地至少99%的序列同一性,则该抗原与给定抗原“基本上相同”。作为举例,与人GITR特异性结合的抗体也可以和来自某些灵长类物种的GITR抗原(例如,食蟹猴GITR)具有交叉反应性,但是不会和来自其他物种

的GITR抗原、或者与除GITR之外的抗原交叉反应。

[0268] 免疫球蛋白可来自公知的同种型中的任一者,包括但不限于IgA、分泌型IgA、IgG和IgM。IgG同种型在某些物种中分成亚类:在人类中为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,在小鼠中为IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3。在某些实施方案中,本文所述的抗GITR抗体属IgG1或IgG2亚型。免疫球蛋白(例如,IgG1)存在若干同种异型,这些同种异型以至多少数个氨基酸而彼此不同。作为举例,“抗体”包括天然和非天然抗体;单克隆和多克隆抗体;嵌合和人源化抗体;人和非人抗体;全合成抗体;以及单链抗体。

[0269] 如本文中使用的,术语抗体的“抗原结合部分”是指保留与抗原(例如,人GITR)特异性结合能力的抗体的一个或多个片段。这样的“片段”的长度是,例如,约8个至约1500个氨基酸,适合的长度是约8个至约745个氨基酸,适合的长度是约8个至约300,例如约8个至约200个氨基酸,或者约10个至约50或100个氨基酸。已经显示,抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来执行。术语抗体(例如,本文所述的抗GITR抗体)的“抗原结合部分”所涵盖的结合片段的实例包括:(i) Fab片段,由 $V_L$ 、 $V_H$ 、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包含通过铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) Fd片段,由 $V_H$ 和CH1结构域组成;(iv) Fv片段,由抗体单臂的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域组成;(v) dAb片段(Ward等人,(1989) Nature 341:544-546),其由 $V_H$ 结构域组成;和(vi) 分离的互补决定区(CDR)或(vii) 两个或更多个分离的CDR的组合,它们可以任选地通过合成接头连接。此外,尽管Fv片段的两个结构域 $V_L$ 和 $V_H$ 由单独的基因编码,但可使用重组方法通过合成接头将它们连接,使它们能够以单个蛋白链的形式产生,其中 $V_L$ 区和 $V_H$ 区配对形成单价分子(称作单链Fv(scFv);参见,例如,Bird等人,(1988) Science 242:423-426;Huston等人,(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体预期也包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并通过与完整抗体相同的方式筛选具有实用性的片段。抗原结合部分可以通过重组DNA技术产生、或通过完整免疫球蛋白的酶切割或化学切割产生。

[0270] “双特异性”或“双功能抗体”是具有两个不同的重链/轻链对和两个不同的结合位点的人工杂合抗体。双特异性抗体可以通过多种方法产生,包括杂交瘤融合或Fab'片段的连接。参见,例如,Songsivilai&Lachmann,Clin.Exp.Immunol.79:315-321(1990);Kostelny等人,J.Immunol.148,1547-1553(1992)。

[0271] 如本文中使用的,术语“单克隆抗体”是指对抗体的特定表位或组合物展示单一结合特异性和亲和力的抗体,其中所有抗体都对特定表位展示单一结合特异性和亲和力。因此,术语“人单克隆抗体”指展示单一结合特异性且具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和任选的恒定区的抗体或抗体组合物。在一个实施方案中,人单克隆抗体由杂交瘤产生,所述杂交瘤包括与永生化细胞融合的获自转基因非人动物(例如,转基因小鼠)的B细胞,所述B细胞的基因组包含人重链转基因和轻链转基因。

[0272] 如本文中使用的,术语“重组人抗体”包括所有通过重组手段制备、表达、创建或分离的人抗体,例如(a)从针对人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体的动物(例如,小鼠)或从此类动物制备的杂交瘤分离的抗体,(b)从被转化而表达该抗体的宿主细胞,例如从转染瘤分离的抗体,(c)从重组、组合人抗体文库分离的抗体,和(d)通过任何其他涉及将人免疫球蛋白基因序列与其他DNA序列剪接的方法而制备、表达、创建或分离的抗体。这样的重组

人抗体包含这样的可变区和恒定区,它们利用由种系基因编码的特定人种系免疫球蛋白序列,但包括在例如抗体成熟期间发生的后续重排和突变。如本领域中已知的(参见,例如, Lonberg (2005) Nature Biotech. 23 (9):1117-1125),可变区含有由多个基因编码的抗原结合结构域,这些基因发生重排以形成外来抗原特异性的抗体。除了重排之外,可以进一步通过多个单氨基酸改变(称为体细胞突变或超突变)修饰可变区,以增加抗体与外来抗原的亲合力。恒定区会进一步响应于抗原而改变(即,同种型转换)。因此,响应于抗原的编码轻链和重链免疫球蛋白多肽的经过重排和体细胞突变的核酸分子与原始的核酸分子可能不具有序列同一性,而是基本上相同或者相似(即,具有至少80%的同一性)。

[0273] “人”抗体(HuMAb)是指具有如下可变区的抗体,其中框架区和CDR区都衍生自人种系免疫球蛋白序列。此外,如果抗体含有恒定区,则恒定区也衍生自人种系免疫球蛋白序列。本文所述的抗体可以包括并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机诱变或定点诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文中使用的,术语“人抗体”不意图包括这样的抗体:其中源自另一个哺乳动物物种种系例如小鼠的CDR序列被移植到人框架序列上。术语“人”抗体和“全人”抗体可作为同义词使用。

[0274] “人源化”抗体是指这样的抗体,其中非人抗体CDR结构域外部的一些、大多数或全部氨基酸被衍生自人免疫球蛋白的相应氨基酸代替。在人源化抗体形式的一个实施方案中,CDR结构域外部的一些、大多数或全部氨基酸被来自人免疫球蛋白的氨基酸代替,而一个或多个CDR区域内的一些、大多数或全部氨基酸没有改变。少量氨基酸的添加、缺失、插入、取代或修饰也允许的,只要它们不会消除抗体结合特定抗原的能力即可。“人源化”抗体保留与原始抗体相似的抗原特异性。

[0275] “嵌合抗体”是指这样的抗体:其中可变区衍生自一个物种而恒定区衍生自另一个物种,比如这样的抗体:其中可变区衍生自小鼠抗体而恒定区衍生自人抗体。

[0276] 如本文中使用的,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE抗体)。

[0277] “同种异型”指特定同种型组内的天然变体,所述变体有少数氨基酸不同(例如,参见Jefferis等人(2009) mAbs 1:1)。本文所述的抗体可属于任何同种异型。如本文中使用的,称为“IgG1f”或“IgG1.1f”同种型的抗体分别是同种异型“f”的IgG1抗体及无效应子的IgG1.1抗体,即根据如Kabat中的EU索引具有214R、356E和358M,正如例如SEQ ID NO:7中所示(参见表15的SEQ ID No:7中的加下划线的残基)。

[0278] 短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”在本文中可与术语“与抗原特异性地结合的抗体”互换使用。

[0279] 如本文中使用的“分离的抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,与GITR特异性地结合的分离的抗体基本上不含与除GITR以外的抗原特异性地结合的抗体)。然而,与GITR的表位特异性结合的分离的抗体可与来自不同物种的其他GITR蛋白具有交叉反应性。

[0280] 如本文中使用的,“抑制GITR-L与GITR结合”的抗体意指在本领域公认的方法(例如,本文所述的基于FACS的结合测定)中,例如在使用3A9-hGITR细胞的结合测定中,以如下EC50抑制GITR-L与GITR结合的抗体:约1μg/mL或更小,比如约0.9μg/mL或更小、约0.85μg/mL或更小、约0.8μg/mL或更小、约0.75μg/mL或更小、约0.7μg/mL或更小、约0.65μg/mL或更

小、约0.6μg/mL或更小、约0.55μg/mL或更小、约0.5μg/mL或更小、约0.45μg/mL或更小、约0.4μg/mL或更小、约0.35μg/mL或更小、约0.3μg/mL或更小、约0.25μg/mL或更小、约0.2μg/mL或更小、约0.15μg/mL或更小、或约0.1μg/mL或更小。

[0281] “效应子功能”是指抗体Fc区与Fc受体或配体的相互作用或因其产生的生物化学事件。示例性的“效应子功能”包括C1q结合、补体依赖性细胞毒作用(CDC)、Fc受体结合、Fc $\gamma$ R介导的效应子功能(比如ADCC和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP))和细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)的下调。这样的效应子功能通常需要Fc区与结合结构域(例如,抗体可变结构域)组合。

[0282] “Fc受体”或“FcR”是与免疫球蛋白的Fc区结合的受体。与IgG抗体结合的FcR包括Fc $\gamma$ R家族的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc $\gamma$ R家族由三种活化性受体(小鼠中为Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIII和Fc $\gamma$ RIV;人类中为Fc $\gamma$ RIA、Fc $\gamma$ RIIA和Fc $\gamma$ RIIIA)及一种抑制性受体(Fc $\gamma$ RIIB)组成。表1中总结了人Fc $\gamma$ R的各种性质。大多数先天效应细胞类型共表达一或多种活化性Fc $\gamma$ R和抑制性Fc $\gamma$ RIIB,而小鼠和人类中的自然杀伤(NK)细胞选择性地表达一种活化性Fc受体(小鼠中为Fc $\gamma$ RIII,人类中为Fc $\gamma$ RIIIA)而不表达抑制性Fc $\gamma$ RIIB。人IgG1与大部分人Fc受体结合,且就其结合的活化性Fc受体的类型而言被认为等同于鼠IgG2a。

[0283] 表1.人Fc $\gamma$ R的性质

[0284]

| Fc $\gamma$       | 等位基因变体 | 对人 IgG 的亲和力               | 同种型优先性      | 细胞分布                              |
|-------------------|--------|---------------------------|-------------|-----------------------------------|
| Fc $\gamma$ RI    | 未描述    | 高(K <sub>D</sub> 约 10 nM) | IgG1=3>4>>2 | 单核细胞、巨噬细胞、活化的嗜中性粒细胞、树突状细胞?        |
| Fc $\gamma$ RIIA  | H131   | 低至中等                      | IgG1>3>2>4  | 嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、树突细胞、血小板  |
|                   | R131   | 低                         | IgG1>3>4>2  |                                   |
| Fc $\gamma$ RIIIA | V158   | 中等                        | IgG1=3>>4>2 | NK 细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、树突细胞? |
|                   | F158   | 低                         | IgG1=3>>4>2 |                                   |
| Fc $\gamma$ RIIB  | I232   | 低                         | IgG1=3=4>2  | B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、肥大细胞          |
|                   | T232   | 低                         | IgG1=3=4>2  |                                   |

[0285] “Fc区”(片段可结晶区)或“Fc结构域”或“Fc”是指抗体重链C端的区域,其介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合(包括与位于免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)上的Fc受体或与经典补体系统的第一组分(C1q)结合))。因此,Fc区包含抗体的恒定区,但第一恒定区免疫球蛋白结构域(例如,CH1或CL)除外。在IgG、IgA和IgD抗体同种型中,Fc区包

含衍生自抗体的两条重链的第二(C<sub>H2</sub>)和第三(C<sub>H3</sub>)恒定结构域的两个相同的蛋白质片段；IgM和IgE<sub>FC</sub>区在每一多肽链中包含三个重链恒定结构域(C<sub>H</sub>结构域2-4)。对于IgG而言，Fc区包含免疫球蛋白结构域C<sub>γ</sub>2和C<sub>γ</sub>3及以及在C<sub>γ</sub>1与C<sub>γ</sub>2之间的铰链。虽然免疫球蛋白重链的Fc区的边界可以变化，但通常将人IgG重链Fc区定义为从位置C226或P230处的氨基酸残基(或这两个氨基酸之间的氨基酸)延伸至重链的羧基端，其中编号的根据是如Kabat中的EU索引。人IgG Fc区的C<sub>H2</sub>结构域从约氨基酸231延伸至约氨基酸340，而C<sub>H3</sub>结构域位于Fc区中的C<sub>H2</sub>结构域的C端侧上，即，其从IgG的约氨基酸341延伸至约氨基酸447。如本文中使用的，Fc区可以是天然序列Fc(包括任何同种异型变体)或变体Fc(例如，非天然存在的Fc)。Fc还可以是指这个区域处于分离状态或处于包含Fc的蛋白多肽的背景下，所述包含Fc的蛋白多肽例如“包含Fc区的结合蛋白”，也称为“Fc融合蛋白”(例如，抗体或免疫粘附素)。

[0286] “天然序列Fc区”或“天然序列Fc”包含与自然界中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1Fc区；天然序列人IgG2Fc区；天然序列人IgG3Fc区；和天然序列人IgG4Fc区以及其天然存在的变体。天然序列Fc包括Fc的各种同种异型(例如，参见Jefferis等人(2009)mAbs 1:1)。

[0287] “铰链”、“铰链结构域”或“铰链区”或“抗体铰链区”是指重链恒定区中将CH1结构域与CH2结构域连接的结构域，其包括铰链的上部、中间及下部部分(Roux等人，J.Immunol.1998 161:4083)。铰链提供在抗体的结合区与效应子区之间的不同程度的柔性，并且还提供在两个重链恒定区之间的分子间二硫键合位点。如本文中使用的，对于所有IgG同种型而言，铰链始于Glu216且止于Gly237(Roux等人，1998J Immunol 161:4083)。野生型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4铰链的序列示于表2和表9中。

[0288] 表2.

[0289] 铰链区氨基酸

|        | Ig类型          | C端C <sub>H1</sub> * |    | 上部铰链             | 中间铰链                           | 下部铰链             |
|--------|---------------|---------------------|----|------------------|--------------------------------|------------------|
|        |               | SEQ ID NO:          | ID |                  |                                |                  |
| [0290] | IgG1          | VDKRV               |    | EPKSCDKTHT       | CPPCP                          | APELLGG          |
|        |               | (SEQ ID NO: 299)    |    | (SEQ ID NO: 301) | (SEQ ID NO: 305)               | (SEQ ID NO: 313) |
|        | IgG2          | VDKTV               |    | ERK              | CCVECP                         | APPVAG           |
|        |               | (SEQ ID NO: 300)    |    |                  | (SEQ ID NO: 306)               | (SEQ ID NO: 314) |
|        | IgG3          | VDKRV               |    | ELKTPLGDTTHT     | CPRCP                          | APELLGG          |
|        | (17-15-15-15) | (SEQ ID NO: 299)    |    | (SEQ ID NO: 302) | (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>3</sub> | (SEQ ID NO: 313) |
|        |               |                     |    |                  | (SEQ ID NO: 307)               |                  |

|        |                    |                              |                                  |                                                                   |                                |
|--------|--------------------|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
|        | IgG3<br>(17-15-15) | VDKRV<br>(SEQ ID<br>NO: 299) | ELKTPLGDTTHT<br>(SEQ ID NO: 302) | CPRCP<br>(EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub><br>(SEQ ID NO: 308)       | APELLGG<br>(SEQ ID NO:<br>313) |
|        | IgG3 (17-15)       | VDKRV<br>(SEQ ID<br>NO: 299) | ELKTPLGDTTHT<br>(SEQ ID NO: 302) | CPRCP<br>(EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>1</sub><br>(SEQ ID NO: 309)       | APELLGG<br>(SEQ ID NO:<br>313) |
| [0291] | IgG3<br>(15-15-15) | VDKRV<br>(SEQ ID<br>NO: 299) | EPKS<br>(SEQ ID NO: 303)         | CDTPPPCPRCP<br>(EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub><br>(SEQ ID NO: 310) | APELLGG<br>(SEQ ID NO:<br>313) |
|        | IgG3 (15)          | VDKRV<br>(SEQ ID<br>NO: 299) | EPKS<br>(SEQ ID NO: 303)         | CDTPPPCPRCP<br>(SEQ ID NO: 311)                                   | APELLGG<br>(SEQ ID NO:<br>313) |
|        | IgG4               | VDKRV<br>(SEQ ID<br>NO: 299) | ESKYGPP<br>(SEQ ID NO: 304)      | CPSCP<br>(SEQ ID NO: 312)                                         | APEFLGG<br>(SEQ ID NO:<br>313) |

[0292] \*CH1结构域的C端氨基酸序列。

[0293] 术语“铰链”包括野生型铰链(如在表15列出的那些)以及其变体(例如,非天然存在的铰链或修饰的铰链)。例如,术语“IgG2铰链”包括如表15中所示的野生型IgG2铰链以及具有1、2、3、4、5、1-3、1-5、3-5和/或至多5、4、3、2或1个突变(例如,取代、缺失或添加)的变体。示例性IgG2铰链变体包括其中1、2、3或全部4个半胱氨酸(C219、C220、C226及C229)变为另一个氨基酸的IgG2铰链。在特定实施方案中,IgG2包含C219S取代。在某些实施方案中,铰链是包含来自至少两个同种型的序列的杂合铰链。例如,铰链可包含来自一个同种型的上部、中间或下部铰链,且铰链的其余部分来自一个或多个其他同种型。例如,铰链可以是IgG2/IgG1铰链,且可包含,例如,IgG2的上部和中间铰链以及IgG1的下部铰链。铰链可具有效应子功能或丧失效应子功能。例如,野生型IgG1的下部铰链提供效应子功能。

[0294] 术语“CH1结构域”是指重链恒定结构域中将可变结构域与铰链连接的重链恒定区域。如本文中使用的,CH1结构域始于A118且止于V215。术语“CH1结构域”包括野生型CH1结构域(例如,对于IgG1,具有SEQ ID NO:278;对于IgG2,具有SEQ ID NO:279;表15)以及其变体(例如,非天然存在的CH1结构域或修饰的CH1结构域)。例如,术语“CH1结构域”包括野生型CH1结构域以及具有1、2、3、4、5、1-3、1-5、3-5个和/或至多5、4、3、2或1个突变(例如,取代、缺失或添加)的变体。示例性CH1结构域包括具有改变抗体的生物活性(比如ADCC、CDC或半衰期)的突变的CH1结构域。本申请提供了影响抗体的生物活性的CH1结构域的修饰。

[0295] 术语“CH2结构域”是指重链恒定结构域中将铰链与CH3结构域连接的重链恒定区域。如本文中使用的,CH2结构域始于P238且止于K340。术语“CH2结构域”包括野生型CH2结构域(例如,对于IgG1,具有SEQ ID NO:280;对于IgG2,具有SEQ ID NO:297;表15)以及其变体(例如,非天然存在的CH2结构域或修饰的CH2结构域)。例如,术语“CH2结构域”包括野生型CH2结构域以及具有1、2、3、4、5、1-3、1-5、3-5个和/或至多5、4、3、2或1个突变(例如,取代、缺失或添加)的变体。示例性CH2结构域包括具有改变抗体的生物活性(比如ADCC、CDC或半衰期)的突变的CH2结构域。在某些实施方案中,CH2结构域包含降低效应子功能的取代A330S/P331S。本申请提供了影响抗体的生物活性的CH2结构域的其他修饰。

[0296] 术语“CH3结构域”是指重链恒定结构域中在CH2结构域C端的重链恒定区域。如本文中使用的,CH3结构域始于G341且止于K447。术语“CH3结构域”包括野生型CH3结构域(例

如,对于IgG1,具有SEQ ID NO:282;对于IgG2,具有SEQ ID NO:298;表15)以及其变体(例如,非天然存在的CH3结构域或修饰的CH3结构域)。例如,术语“CH3结构域”包括野生型CH3结构域以及具有1、2、3、4、5、1-3、1-5、3-5个和/或至多5、4、3、2或1个突变(例如,取代、缺失或添加)的变体。示例性CH3结构域包括具有改变抗体的生物活性(比如ADCC、CDC或半衰期)的突变的CH3结构域。本申请提供了影响抗体的生物活性的CH3结构域的修饰。

[0297] “天然序列Fc区”或“天然序列Fc”包含与自然界中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1Fc区;天然序列人IgG2Fc区;天然序列人IgG3Fc区;和天然序列人IgG4Fc区以及其天然存在的变体。天然序列Fc包括Fc的各种同种异型(例如,参见Jefferis等人(2009)mAbs 1:1)。

[0298] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指免疫球蛋白或抗体与其特异性地结合的抗原(例如,GITR)上的位点。表位可由蛋白质的连续氨基酸形成(通常是线性表位),或者由通过蛋白质的三级折叠而并置的非连续氨基酸形成(通常是构象表位)。由连续氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂时通常会但不总是保留,而通过三级折叠形成的表位在使用变性溶剂处理时通常会丧失。表位一般包括处于独特空间构象的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。用于确定什么表位被给定抗体结合的方法(即,表位作图)是本领域熟知的,并且包括,例如,免疫印迹测定法和免疫沉淀测定法,其中测试了重叠或连续肽(例如,来自GITR的)与给定抗体(例如,抗GITR抗体)的反应性。确定表位空间构象的方法包括本领域和本文中描述的那些技术,例如,X射线晶体学、2维核磁共振和HDX-MS(参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,Vol.66,G.E.Morris,Ed.(1996))。

[0299] 术语“表位作图”是指鉴定抗体-抗原识别的分子决定簇的过程。

[0300] 关于两种或更多种抗体的术语“与相同表位结合”意指所述抗体与相同的氨基酸残基区段结合,正如通过给定方法所确定。确定抗体与本文所述的抗体是否结合“GITR上的相同表位”的技术包括,例如,表位作图方法,例如抗原:抗体复合物的晶体的x射线分析,其提供表位的原子解析,以及氢/氘交换质谱(HDX-MS)。其他方法监测抗体与抗原片段或抗原的突变变异的结合,其中由于抗原序列内氨基酸残基的修饰导致的结合丧失经常被认为是表位组分的指示。另外,还可以使用表位作图的计算组合方法。这些方法依赖于感兴趣抗体从组合噬菌体展示肽文库中亲和分离特异性短肽的能力。预期具有相同VH和VL或相同CDR1、2和3序列的抗体结合相同的表位。

[0301] “与另一抗体竞争结合靶标”的抗体是指抑制(部分或完全地)另一抗体与靶标结合的抗体。可使用已知的竞争实验确定两个抗体是否彼此竞争结合靶标,即,一个抗体是否抑制另一抗体与靶标的结合及其抑制程度。在某些实施方案中,抗体与另一抗体竞争结合靶标且使另一抗体与靶标的结合抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。抑制或竞争的程度可取决于哪个抗体是“阻断抗体”(即,先与靶标一起温育的冷抗体)而不同。竞争测定法可如下所述进行:例如,Ed Harlow and David Lane,Cold Spring Harb Protoc;2006;doi:10.1101/pdb.prot4277或“Using Antibodies”的第11章,Ed Harlow and David Lane,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,USA 1999。竞争性抗体结合相同的表位、重叠表位或相邻表位(例如,如通过空间位阻所证明)。

[0302] 其他的竞争性结合测定法包括:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见Stahli等人,Methods in Enzymology 9:242 (1983));固相直接生物素-亲和素EIA(参见Kirkland等人,J.Immunol.137:3614 (1986));固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press (1988));使用I-125标记物的固相直接标记RIA(参见Morel等人,Mol.Immunol.25(1):7 (1988));固相直接生物素-亲和素EIA(Cheung等人,Virology 176:546 (1990));和直接标记RIA(Moldenhauer等人,Scand.J.Immunol.32:77 (1990))。

[0303] 如本文中使用的,术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”、和“特异性地结合”是指抗体与预定抗原上的表位的结合。一般来说,抗体(i)在通过(例如)在Biacore 2000仪器中使用预定抗原(例如,重组人GITR)作为分析物和抗体作为配体的表面等离子体共振(SPR)技术、或抗体与抗原阳性细胞的结合的Scatchard分析测定时,以约低于 $10^{-7}$ M、比如约低于 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M或甚至更低的平衡解离常数(KD)结合,及(ii)结合预定抗原的亲和力较其与预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)的结合亲和力大至少两倍。因此,“与人GITR特异性地结合”的抗体是指以 $10^{-7}$ M或更低,例如约低于 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M或甚至更低的 $K_D$ 与可溶性或细胞结合的人GITR结合的抗体。“与食蟹猴GITR交叉反应”的抗体是指以 $10^{-7}$ M或更低,例如约低于 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M或甚至更低的 $K_D$ 与食蟹猴GITR的结合的抗体。在某些实施方案中,这些不与来自非人物种的GITR交叉反应的抗体在标准结合测定中基本上未显示可检测出的针对这些蛋白质的结合。

[0304] 如本文中使用的,术语“k<sub>assoc</sub>”或“k<sub>a</sub>”意指特定的抗体-抗原相互作用的缔合速率,而如本文中使用的,术语“k<sub>dis</sub>”或“k<sub>d</sub>”意指特定的抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文中使用的,术语“K<sub>D</sub>”意指解离常数,其从k<sub>d</sub>与k<sub>a</sub>的比值(即,k<sub>d</sub>/k<sub>a</sub>)获得,并表示为摩尔浓度(M)。可使用本领域良好建立的方法确定抗体的K<sub>D</sub>值。用于确定抗体K<sub>D</sub>的优选方法借助于使用表面等离子体共振,优选地使用诸如Biacore®系统的生物传感器系统或流式细胞术和Scatchard分析。

[0305] 如本文中使用的,对于IgG抗体,术语“高亲和力”是指对靶抗原具有 $10^{-8}$ M或更低,更优选地 $10^{-9}$ M或更低,甚至更优选地 $10^{-10}$ M或更低的K<sub>D</sub>的抗体。然而,“高亲和力”结合对于其他抗体同种型可能有变化。例如,对于IgM同种型,“高亲和力”结合是指具有 $10^{-7}$ M或更低,更优选地 $10^{-8}$ M或更低的K<sub>D</sub>的抗体。

[0306] 在使用抗体或其抗原结合片段的体外或体内测定的背景下,术语“EC50”是指抗体或其抗原结合部分诱导出最大反应的50%(即,最大反应与基线之间的半程)的反应时的浓度。

[0307] 术语“与固定的GITR结合”是指本文所述的抗体与GITR结合,例如与在细胞表面上表达的或附接在固体支持物上的GITR结合的能力。

[0308] 如本文中使用的,术语“交叉反应”是指本文所述的抗体与来自不同物种的GITR结合的能力。例如,结合人GITR的本文所述的抗体也可以结合另一个物种的GITR(例如,食蟹猴GITR)。如本文中使用的,通过检测在结合测定(例如,SPR、ELISA)中与纯化抗原的特异反应性、或检测与生理上表达GITR的细胞结合或在功能上的相互作用,可以测量交叉反应性。用于确定交叉反应性的方法包括如本文所述的标准结合测定,例如借助于使用Biacore™



2000SPR仪器 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 的Biacore™表面等离子体共振 (SPR) 分析、或流式细胞技术。

[0309] 如本文中使用的适用于客体的术语“天然存在”是指这样的事实,即所述客体可以在自然界中找到。例如,可以从自然界的来源分离但是尚未在实验室中被人有意修饰的存在于生物(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0310] “多肽”是指包含至少两个连续连接的氨基酸残基的链,链的长度没有上限。蛋白质中的一个或多个氨基酸残基可含有修饰,例如但不限于,糖基化、磷酸化或二硫键形成。“蛋白质”可包含一个或多个多肽。

[0311] 如本文中使用的,术语“核酸分子”意图包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,并且可以是cDNA。

[0312] 还提供了在本文中(例如,表15中)列出的序列比如在SEQ ID NO:13-191中的“保守序列修饰”,即,不消除由核苷酸序列编码或含有氨基酸序列的抗体与抗原的结合的核苷酸和氨基酸序列修饰。这样的保守序列修饰包括保守核苷酸和氨基酸取代、以及核苷酸及氨基酸添加和缺失。例如,可通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变和PCR介导的诱变)向表15中的序列(例如SEQ ID NO:13-191)中引入修饰。“保守氨基酸取代”包括其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基置换的取代。本领域中已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(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、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有β分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及具有芳香族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,抗GITR抗体中的预测的非必需氨基酸残基优选被来自相同侧链家族的另一氨基酸残基置换。鉴定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守取代的方法是本领域熟知的(例如,参见Brummell等人,Biochem.32:1180-1187(1993); Kobayashi等人,Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA94:412-417(1997))。或者,在另一个实施方案中,可以例如通过饱和诱变沿着抗GITR抗体编码序列的全部或部分随机引入突变,并且可以筛选所得的修饰的抗GITR抗体的结合活性。

[0313] 对于核酸而言,术语“实质同源性”表明,两个核酸或它们的指定序列在最佳比对和比较(其中适当插入或缺失核苷酸)时有至少约80%的核苷酸、通常至少约90%至95%且更优选至少约98%至99.5%的核苷酸相同。或者,当多个区段在选择性杂交条件下将会与链的互补物杂交时,存在实质同源性。

[0314] 对于多肽而言,术语“实质同源性”表明,两个多肽或它们的指定序列在最佳比对和比较(其中适当插入或缺失氨基酸)时有至少约80%的氨基酸、通常至少约90%至95%且更优选至少约98%至99.5%的氨基酸相同。

[0315] 考虑为了两个序列的最佳比对而需要引入的空位的数目和每个空位的长度,两个序列之间的同一性百分比是序列所共有的相同位置的数目的函数(即,同源性% = 相同位置#/总位置# × 100)。序列的比较和两个序列之间同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成,如下文的非限制性实施例所述。

[0316] 可以使用GCG软件包(可在<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵,空位权重40、50、60、70、或80,长度权重1、2、3、4、5、或6,确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。也可以使用纳入ALIGN程序(2.0版)中的E.Meyers和W.Miller(CABIOS, 4:11-17(1989))的算法,使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12、和空位罚分4,确定两个核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比。另外,可以使用纳入GCG软件包(可在<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序中的Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol. (48):444-453(1970))算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,空位权重16、14、12、10、8、6、或4,长度权重1、2、3、4、5、或6,确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比。

[0317] 本文所述的核酸和蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”针对公共数据库进行搜索,以便例如鉴定相关序列。可以使用Altschul等人,(1990)J.Mol.Biol.215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)进行这样的搜索。可以用NBLAST程序以得分=100、字长=12进行BLAST核苷酸搜索,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序以得分=50、字长=3进行BLAST蛋白质搜索,以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。出于比较的目的,为了获得带空位的比对,可以如Altschul等人,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402所述利用带空位的BLAST。当利用BLAST和带空位的BLAST程序时,可以使用对应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)。

[0318] 核酸可存在于全细胞中,存在于细胞溶解物中,或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过标准技术将核酸与其他细胞组分或其他污染物(例如其他细胞核酸(例如染色体的其他部分)或蛋白质)纯化分离时,核酸是“分离的”或“基本上纯化的”,所述标准技术包括碱/SDS处理、CsCl显带法、柱色谱法、琼脂糖凝胶电泳和本领域熟知的其他方法。参见,F.Ausubel等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing and Wiley Interscience,New York(1987)。

[0319] 可根据标准技术使核酸(例如cDNA)突变以提供基因序列。对于编码序列,这些突变可以根据需要影响氨基酸序列。具体地说,构思了与天然V、D、J、恒定、开关序列、以及本文所述的其他这类序列基本上同源、或衍生自这些序列的DNA序列(其中“衍生”是指序列与另一个序列相同或从另一个序列修饰而得)。

[0320] 如本文中使用的术语“载体”意指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体为“质粒”,其指的是另外的DNA区段可连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中可以将另外的DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)能够在其中引入它们的宿主细胞中自主复制。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可以在引入到宿主细胞中之后整合到所述宿主细胞的基因组中,由此与宿主基因组一起复制。而且,某些载体能够指导与其可操作连接的基因的表达。这样的载体在本文中称为“重组表达载体”(或者简单地称为“表达载体”)。一般而言,用于重组DNA技术中的表达载体常常为质粒形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换地使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,还包括具有等同功能的其他形式的表达载体,比如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0321] 如本文中使用的术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)意指这样的细胞,所述细胞包含非天然存在于所述细胞中的核酸,并且可以是其中已引入重组表达载体的细

胞。应当理解,这样的术语不仅意指特定的受试细胞,还意指此类细胞的后代。由于突变或环境影响而在后续世代中可能发生一些修饰,事实上这样的后代可能与亲本细胞不同,但是仍然包括在本文中使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0322] 如本文中使用的,术语“抗原”是指任何天然或合成的免疫原性物质,例如蛋白质、肽或半抗原。抗原可以是GITR或其片段。抗原也可以是肿瘤抗原,其中针对它的保护或治疗性免疫应答是期望的,例如由肿瘤细胞表达的抗原(例如,在与抗GITR抗体组合的疫苗中)。抗原包括用于预防或治疗癌症的肿瘤相关抗原。肿瘤相关抗原的实例包括但不限于包含以下的序列的全部或一部分的序列:βhCG、gp100或Pmel17、HER2/neu、WT1、间皮素、CEA、gp100、MART1、TRP-2、黑色素-A、NY-ESO-1、NY-BR-1、NY-CO-58、MN(gp250)、独特型、MAGE-1、MAGE-3、MAGE-A3、酪氨酸酶、端粒酶、SSX2和MUC-1抗原及生殖细胞衍生的肿瘤抗原。肿瘤相关抗原还包括血型抗原,例如Le<sup>a</sup>、Le<sup>b</sup>、LeX、LeY、H-2、B-1、B-2抗原。或者,在构建体中可包括多于一种的抗原。例如,可将MAGE抗原与其他抗原(例如黑色素A、酪氨酸酶和gp100)以及佐剂(比如GM-CSF或IL-12)组合,并与抗APC抗体连接。

[0323] 上述抗原的序列是本领域熟知的。例如,MAGE-3cDNA序列的实例提供于US 6,235,525(Ludwig Institute for Cancer Research)中;NY-ESO-1核酸和蛋白质序列的实例提供于US 5,804,381和US 6,069,233(Ludwig Institute for Cancer Research)中;黑色素-A核酸和蛋白质序列的实例提供于US 5,620,886和US 5,854,203(Ludwig Institute for Cancer Research)中;NY-BR-1核酸和蛋白质序列的实例提供于US 6,774,226和US 6,911,529(Ludwig Institute for Cancer Research)中并且NY-CO-58核酸和蛋白质序列的实例提供于WO 02090986(Ludwig Institute for Cancer Research)中;HER-2/neu蛋白质的氨基酸序列的实例可以GENBANK®登录号AAA58637获得;并且人癌胚抗原样1(CEA-1)的核苷酸序列(mRNA)可以GENBANK®登录号NM020219获得。

[0324] “免疫应答”是指脊椎动物内针对外来物质的生物应答,所述应答保护生物抵抗这些物质和由它们引起的疾病。免疫应答由免疫系统的细胞(例如,T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突细胞或嗜中性粒细胞)及由这些细胞中的任一者或肝产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用介导,其导致脊椎动物体内的入侵病原体、病原体感染的细胞或组织、癌性或其他异常细胞、或在自身免疫或病理性炎症的情况下的正常人细胞或组织的选择性靶向、结合、损伤、破坏和/或消除。免疫应答包括例如T细胞(例如,效应T细胞)或Th细胞(比如CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>T细胞)的活化或抑制或Treg细胞的抑制。

[0325] “免疫调制剂”或“免疫调节剂”是指可能涉及调制、调节或修饰免疫应答的作用剂,例如信号转导通路的组分。“调制”、“调节”或“修饰”免疫应答指免疫系统的细胞或这些细胞(例如,效应T细胞)的活性的任何改变。这样的调制包括免疫系统的刺激或抑制,其可表现为各种细胞类型的数目的增加或减少、这些细胞的活性的增加或降低、或可在免疫系统内发生的任何其他变化。已经鉴定了抑制性和刺激性免疫调制剂,其中一些在肿瘤微环境中可具有增强的功能。在优选的实施方案中,免疫调制剂位于T细胞表面上。“免疫调制性靶标”或“免疫调节性靶标”是被某种物质、作用剂、模块、化合物或分子靶向结合,且其活性通过所述结合而被改变的免疫调制剂。免疫调制性靶标包括例如细胞表面上的受体(“免疫调制性受体”)和受体配体(“免疫调制性配体”)。

[0326] 术语“免疫疗法”是指通过包括诱导、增强、抑制或以其他方式修饰免疫应答在内的方法治疗罹患疾病或处于患上疾病或遭受疾病复发风险的受试者。

[0327] “免疫刺激疗法”或“免疫刺激性疗法”是指引起受试者中的免疫应答增加(诱导或增强)以便例如治疗癌症的疗法。

[0328] “增强内源性免疫应答”意指增加受试者中现有的免疫应答的有效性或效力。这种有效性和效力的增加可通过例如克服抑制内源性宿主免疫应答的机制或通过刺激增强内源性宿主免疫应答的机制来实现。

[0329] “效应T”(“T<sub>eff</sub>”)细胞指具有细胞溶解活性的T细胞(例如,CD4+和CD8+T细胞)以及T辅助(Th)细胞,其分泌细胞因子且激活和指导其他免疫细胞,但不包括调节性T细胞(Treg细胞)。本文所述的抗GITR抗体激活T<sub>eff</sub>细胞,例如CD4+和CD8+T<sub>eff</sub>细胞。

[0330] 刺激免疫应答或免疫系统的能力提高可以来自T细胞共刺激受体的激动剂活性增强和/或抑制性受体的拮抗剂活性增强。可以在测量免疫应答的测定法中,例如在测量细胞因子或趋化因子释放、细胞溶解活性(在靶细胞上直接测定或经由检测CD107a或颗粒酶间接测定)以及增殖方面的变化的测定法中,通过EC<sub>50</sub>或最大活性水平的倍数增加反映刺激免疫应答或免疫系统的能力提高。刺激免疫应答或免疫系统活性的能力可增强至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。

[0331] 在某些实施方案中,包含修饰的重链恒定区的抗体相对于不包含修饰的重链恒定区的相同抗体具有更有效力的激动剂活性。例如,可以如实施例中所示通过例如测量与抗体接触过的T细胞的IFN- $\gamma$ 或IL-2的分泌水平来确定抗体的激动剂活性增强。激动剂活性可增强至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多,正如通过以下所定义:效应T细胞的细胞因子释放增加或增殖增加;调节性T细胞活性的降低(如果Treg上的衔接降低Treg功能的话);或Treg耗竭增加。例如,T细胞用包含修饰的重链恒定区的抗体刺激后分泌的IFN- $\gamma$ 或IL-2的量,与用不包含修饰的重链恒定区的相同抗体刺激过的T细胞相比,可以高至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。

[0332] 如本文中使用的,术语“连接”是指两个或更多个分子的结合。连接可以是共价或非共价的。连接也可以是遗传的(即,重组融合)。这样的连接可以使用多种本领域公认的技术来实现,比如化学缀合和重组蛋白生产。

[0333] 如本文中使用的,“给药”或“施用”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任何一种将包含治疗剂的组合物以物理方式引入到受试者中。本文所述的抗体的优选给药途径包括静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、脊柱或其他肠胃外给药途径(例如通过注射或输注)。如本文中使用的短语“肠胃外给药”是指通常通过注射而不是肠内和局部给药的给药方式,包括但不限于静脉内、腹膜内、肌肉内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注、以及体内电穿孔。或者,本文所述的抗体可经由非肠胃外途径给药,比如局部、表皮或粘膜给药途径,例如鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。还可以例如一次、多次、和/或经一个或多个延长的时期进行给药。

[0334] 如本文中使用的术语“T细胞介导的应答”是指由T细胞(包括效应T细胞(例如,CD8+细胞)和辅助T细胞(例如,CD4+细胞))介导的应答。T细胞介导的应答包括例如T细胞细胞毒性和增殖。

[0335] 如本文中使用的术语“细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 应答”指由细胞毒性T细胞诱导的免疫应答。CTL应答主要由CD8+T细胞介导。

[0336] 如本文中使用的, 术语“抑制”或“阻断”(例如, 在提及抑制/阻断GITR-L与细胞上的GITR的结合时)可互换使用, 并且涵盖部分和完全抑制/阻断。在一些实施方案中, 例如, 正如本文中进一步描述所确定的, 抗GITR抗体将GITR-L与GITR的结合抑制至少约50%, 例如约60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。在一些实施方案中, 例如, 正如本文中进一步描述所确定的, 抗GITR抗体将GITR-L与GITR的结合抑制不超过50%, 例如约40%、30%、20%、10%、5%或1%。

[0337] 如本文中使用的, 术语“抑制肿瘤的生长”包括肿瘤生长的任何可测量的降低, 例如, 肿瘤生长抑制至少约10%, 例如至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约99%或100%。

[0338] 如本文中使用的, “癌症”是指以体内异常细胞的不受控制的生长为特征的广泛的疾病。不受调节的细胞分裂和生长可以导致恶性肿瘤或细胞的形成, 所述恶性肿瘤或细胞侵袭邻近组织并且可能通过淋巴系统或血流转移到身体的远处部位。

[0339] 如本文中使用的术语“治疗”(“treat”)、“治疗”(“treating”)和“治疗”(“treatment”)是指为了逆转、减轻、改善、抑制、或减缓或预防与疾病相关的症状进展、发展、严重性或复发、并发症、病症或生化标记而对受试者进行的或施用活性剂的任何类型的干预或过程。治疗可针对患有疾病的受试者或无疾病的受试者(例如, 用于预防)。

[0340] “血液恶性肿瘤”包括淋巴瘤、白血病、骨髓瘤或淋巴恶性肿瘤以及脾和淋巴结的癌症。示例性淋巴瘤包括B细胞淋巴瘤(B细胞血液癌)和T细胞淋巴瘤。B细胞淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤和大部分非霍奇金淋巴瘤。B细胞淋巴瘤的非限制性实例包括弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴细胞性淋巴瘤(与慢性淋巴细胞白血病重叠)、套细胞淋巴瘤(MCL)、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、纵膈大B细胞淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、结内边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病。T细胞淋巴瘤的非限制性实例包括结外T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤和血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤。血液恶性肿瘤还包括白血病, 例如但不限于继发性白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病和急性淋巴母细胞白血病。血液恶性肿瘤进一步包括骨髓瘤, 例如但不限于多发性骨髓瘤和冒烟型多发性骨髓瘤。术语血液恶性肿瘤涵盖其他血液和/或B细胞-或T细胞-相关的癌症。

[0341] 术语“有效剂量”或“有效药量”被定义为足以实现或者至少部分实现期望效果的量。药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是药物的在单独或与其他治疗剂联合使用时能够促进疾病消退的任何量, 其中疾病消退的证据是疾病症状的严重程度降低、疾病无症状期的频率或持续时间增加、或防止由于疾病痛苦导致的损害或失能。药物的治疗有效量或剂量包括“预防有效量”或“预防有效剂量”, 这是药物的在向具有疾病发生风险或正在遭受疾病复发的受试者单独或与其他治疗剂联合给药时能够抑制疾病发生或复发的任何量。治疗剂促进疾病消退或抑制疾病发生或复发的能力可以使用多种技术人员已知的方法进行评估, 例如在临床试验期间的人类受试者中, 在预测在人体内效力的动物模型系统中, 或者通过体外测定法中测定药剂的活性。

[0342] 作为举例,抗癌剂是促进受试者体内癌症消退的药物。在优选的实施方案中,药物的治疗有效量促进癌症消退直至癌症消除。“促进癌症消退”是指有效量的药物单独给药或与抗肿瘤剂联合给药导致肿瘤生长降低或大小变小、肿瘤坏死、至少一种疾病症状的严重程度降低、疾病无症状期的频率和持续时间增加、防止由于疾病痛苦导致的受损或失能、或者以其他方式缓解患者的疾病症状。另外,对于治疗而言,术语“有效的”和“有效性”既包括药理有效性也包括生理安全性。药理有效性是指药物促进患者体内癌症消退的能力。生理安全性是指毒性水平或其他的由于药物施用导致的细胞、器官和/或生物体水平上的不良生理效应(不良作用)的水平。

[0343] 作为肿瘤治疗的实例,相对于未治疗的受试者,治疗有效量或治疗有效剂量的药物优选抑制细胞生长或肿瘤生长的至少约20%,更优选地至少约40%,甚至更优选地至少约60%,并且还更优选地至少约80%。在最优选的实施方案中,治疗有效量或剂量的药物完全抑制细胞生长或肿瘤生长,即,优选地抑制细胞生长或肿瘤生长的100%。化合物抑制肿瘤生长的能力可以使用下文描述的测定法进行评价。或者,组合物的这种特性可以通过检验所述化合物抑制细胞生长的能力加以评价,这种抑制可以通过本领域技术人员已知的测定法进行体外测量。在本文所述的其他优选的实施方案中,肿瘤消退可以观察到,并且持续的时期为至少约20天,更优选地至少约40天,或甚至更优选地至少约60天。

[0344] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性治疗的人和其他哺乳动物受试者。

[0345] 如本文中使用的,术语“受试者”包括任何人或非人类的动物。例如,本文所述的方法和组合物可用于治疗患有癌症的受试者。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0346] 如本文中使用的,术语“ug”和“uM”可与“μg”和“μM”互换使用。

[0347] 在以下小节中进一步详细描述本文所述的各个方面。

[0348] I. 抗GITR抗体

[0349] 本文中描述了其特征在于特定功能特征或性质的抗体,例如全人抗体。例如,抗体特异性地结合人GITR。另外,抗体可与来自一种或多种非人灵长类动物的GITR(如食蟹猴GITR)交叉反应。

[0350] 除了与可溶性和/或膜结合的人GITR特异性地结合以外,本文所述的抗体展现以下功能性质中的一者或多者:

[0351] (a) 与食蟹猴GITR结合:

[0352] (b) 刺激或增强免疫应答:

[0353] (c) 激活T细胞(如通过例如增强的细胞因子分泌和/或增殖证明的);

[0354] (d) 抑制GITRL与3A9-hGITR细胞上的GITR结合:

[0355] (e) 至多部分地抑制GITR配体与活化的T细胞上的GITR结合;

[0356] (f) 与人GITR的N端部分中的构象表位结合;

[0357] (g) 与糖基化的和未糖基化人GITR结合;以及

[0358] (h) 在没有与Fc受体结合时具有激动剂活性,但其中与Fc受体的结合进一步增强激动剂活性。

[0359] 优选地,抗G1TR抗体以高亲和力,例如以 $10^{-7}$ M或更低、 $10^{-8}$ M或更低、 $10^{-9}$ M或更低、 $10^{-10}$ M或更低、 $10^{-11}$ M或更低、 $10^{-12}$ M或更低、 $10^{-12}$ M至 $10^{-7}$ M、 $10^{-11}$ M至 $10^{-7}$ M、 $10^{-10}$ M至 $10^{-7}$ M或 $10^{-12}$ M至 $10^{-7}$ M。

$10^{-9}$ M至 $10^{-7}$ M的 $K_D$ 与GITR结合。在某些实施方案中,如通过Biacore所测定,抗GITR抗体例如以 $10^{-7}$ M或更低、 $10^{-8}$ M或更低、 $10^{-9}$ M(1nM)或更低、 $10^{-10}$ M或更低、 $10^{-12}$ M至 $10^{-7}$ M、 $10^{-11}$ M至 $10^{-7}$ M、 $10^{-10}$ M至 $10^{-7}$ M、 $10^{-9}$ M至 $10^{-7}$ M或 $10^{-8}$ M至 $10^{-7}$ M的 $K_D$ 与可溶性人GITR结合。在某些实施方案中,如通过流式细胞术和Scatchard图所测定,抗GITR抗体例如以 $10^{-7}$ M或更低、 $10^{-8}$ M或更低、 $10^{-9}$ M(1nM)或更低、 $10^{-10}$ M或更低、 $10^{-12}$ M至 $10^{-7}$ M、 $10^{-11}$ M至 $10^{-8}$ M、 $10^{-10}$ M至 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M至 $10^{-8}$ M、 $10^{-11}$ M至 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M至 $10^{-9}$ M的 $K_D$ 与例如活化的人T细胞上的结合的(例如,细胞膜结合的)人GITR结合。在某些实施方案中,如通过FACS所测定,抗GITR抗体例如以 $10^{-7}$ M或更低、 $10^{-8}$ M或更低、 $10^{-9}$ M(1nM)或更低、 $10^{-10}$ M或更低、 $10^{-12}$ M至 $10^{-7}$ M、 $10^{-11}$ M至 $10^{-8}$ M、 $10^{-10}$ M至 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M至 $10^{-8}$ M、 $10^{-11}$ M至 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M至 $10^{-9}$ M的 $EC_{50}$ 与例如活化的人T细胞上的结合的(例如,细胞膜结合的)人GITR结合。在某些实施方案中,抗GITR抗体以 $10^{-7}$ M或更低、 $10^{-8}$ M或更低、 $10^{-9}$ M(1nM)或更低、 $10^{-10}$ M或更低、 $10^{-12}$ M至 $10^{-7}$ M、 $10^{-11}$ M至 $10^{-7}$ M、 $10^{-10}$ M至 $10^{-7}$ M、 $10^{-9}$ M至 $10^{-7}$ M、或 $10^{-8}$ M至 $10^{-7}$ M的 $K_D$ 与可溶性人GITR结合,并且以 $10^{-7}$ M或更低、 $10^{-8}$ M或更低、 $10^{-9}$ M(1nM)或更低、 $10^{-10}$ M或更低、 $10^{-12}$ M至 $10^{-7}$ M、 $10^{-11}$ M至 $10^{-8}$ M、 $10^{-10}$ M至 $10^{-8}$ M、 $10^{-9}$ M至 $10^{-8}$ M、 $10^{-11}$ M至 $10^{-9}$ M或 $10^{-10}$ M至 $10^{-9}$ M的 $K_D$ 或 $EC_{50}$ 与细胞膜结合的人GITR结合。

[0360] 如例如通过FACS测量的(例如,如实施例中所述),抗GITR抗体可以例如以100nM或更低、10nM或更低、100nM至0.01nM、100nM至0.1nM、100nM至1nM、或10nM至1nM的 $EC_{50}$ 与食蟹猴GITR结合,例如与膜结合的食蟹猴GITR结合。

[0361] 抗GITR抗体可刺激或增强免疫应答,例如通过激活 $T_{eff}$ 细胞、限制Treg细胞对效应T细胞的抑制、耗竭和/或抑制肿瘤Treg细胞和/或激活例如肿瘤中的NK细胞。例如,抗GITR抗体可激活或共刺激 $T_{eff}$ 细胞,如通过例如增强的细胞因子(例如,IL-2和IFN- $\gamma$ )分泌和/或增强的增殖证明的。在某些实施方案中,还提供了CD3刺激。在某些实施方案中,GITR抗体使IL-2分泌增加50%、100%(即,2倍)、3倍、4倍、5倍或更大的因数,任选地最大值为至多10倍、30倍、100倍,正如例如在原代人T细胞或表达人GITR的T细胞上所测量的(例如,如实施例中进一步描述)。在某些实施方案中,GITR抗体使IFN- $\gamma$ 分泌增加50%、100%(即,2倍)、3倍、4倍、5倍或更大的因数,任选地最大值为至多10倍、30倍、100倍,如例如在原代人T细胞或表达人GITR的T细胞上所测量的(例如,如实施例中进一步描述的)。

[0362] 抗GITR抗体可以例如以10 $\mu$ g/ml或更低、1 $\mu$ g/ml或更低、0.01 $\mu$ g/ml至10 $\mu$ g/ml、0.1 $\mu$ g/ml至10 $\mu$ g/ml或0.1 $\mu$ g/ml至1 $\mu$ g/ml的 $EC_{50}$ 抑制人GITRL与细胞(例如,表达人GITR的3A9细胞)上的人GITR结合(参见实施例5)。

[0363] 在某些实施方案中,抗GITR抗体仅仅至多部分地抑制人GITRL与细胞(例如,活化T细胞)上的人GITR结合(参见实施例5)。

[0364] 抗GITR抗体可结合表位,例如人GITR的N端部分中的构象表位,例如位于成熟人GITR的氨基酸1至39内的表位(参见实施例9),如例如通过抗体与人GITR的片段(例如人GITR的天然(即,非变性)片段)的结合确定的。抗GITR抗体可结合成熟人GITR的氨基酸1至20或位于这些氨基酸内的表位,如例如通过抗体与人GITR的片段[例如,人GITR的天然(即,非变性)片段]结合,随后的酶切割或HDX所确定的(分别参见实施例11和12)。抗GITR抗体可结合成熟人GITR的氨基酸3至20(PTGGPGCGPGRLLLTGT,SEQ ID NO:217)或这些氨基酸内的表位。抗GITR抗体可结合成熟人GITR的氨基酸3至20和氨基酸33至40(即,氨基酸序列PTGGPGCGPGRLLLTGT(SEQ ID NO:217)和CRDYPGEE(SEQ ID NO:218))或这些氨基酸内的表

位。在某些实施方案中,抗GITR抗体与糖基化的和未糖基化的人GITR结合。在某些实施方案中,抗GITR抗体结合氨基酸序列PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO:217) 和CRDYPGEE (SEQ ID NO:218),如例如使用实施例列出的方案通过HDX确定的。

[0365] 抗GITR抗体可与包含本文所述的CDR或可变区的抗GITR抗体例如28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10和/或6G10竞争结合GITR (或抑制后者的结合)。在某些实施方案中,抗GITR抗体使28F3、3C3、2G6、8A6、9G7、14E3、19H8、19D3、18E10和/或6G10与人GITR的结合抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在某些实施方案中,28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10和/或6G10使抗GITR抗体与人GITR的结合抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在某些实施方案中,抗GITR抗体使28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10和/或6G10与人GITR的结合抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%,并且28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10和/或6G10使抗GITR抗体与人GITR的结合抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100% (例如,双向竞争)。

[0366] 在某些实施方案中,抗GITR抗体诱导或增强T细胞活化而无需多价交联,如通过例如并不需要FcR结合确定的。在某些实施方案中,抗GITR抗体是多价的,例如二价。在某些实施方案中,抗GITR抗体不是单价的。本文中已显示F' (ab) 2片段比Fab片段更有效地激活T细胞 (参见实施例)。

[0367] 在某些实施方案中,抗GITR抗体的激动剂活性无需经由Fc受体的交联,然而,所述抗GITR抗体与Fc受体的交联相对于未结合Fc受体的相同抗体增强了它们的激动剂活性。

[0368] 在某些实施方案中,抗GITR抗体具有以下特征中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11个或12个:

[0369] (1) 与可溶性人GITR结合,例如以10nM或更低 (例如,0.01nM至10nM) 的 $K_D$ ,如例如通过Biacore测量的;

[0370] (2) 与膜结合的人GITR结合,例如以1nM或更低 (例如,0.01nM至1nM) 的 $K_D$ ,如例如通过Scatchard测量的;

[0371] (3) 与膜结合的人GITR结合,例如以1nM或更低 (例如,0.01nM至1nM) 的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0372] (4) 与食蟹猴GITR结合,例如与膜结合的食蟹猴GITR结合,例如以10nM或更低 (例如,0.01nM至10nM) 的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0373] (5) 诱导或增强T细胞活化,比如在CD3衔接存在下 (例如,在次最佳抗CD3浓度存在下),如通过 (i) 在表达GITR的T细胞中的IL-2和/或IFN- $\gamma$  产生增加和/或 (ii) T细胞增殖增强证明的;

[0374] (6) 诱导或增强T细胞活化而无需多价交联;

[0375] (7) 在没有与Fc受体结合时具有激动剂活性,但其中与Fc受体的结合进一步增强激动剂活性;

[0376] (8) 抑制GITR配体与GITR结合,例如以1 $\mu$ g/mL或更低的 $EC_{50}$ ,如例如在利用3A9-hGITR细胞的测定中通过FACS测量的;



[0377] (9) 至多部分地抑制GITR配体与活化的T细胞上的GITR结合；

[0378] (10) 结合成熟人GITR (SEQ ID NO:4) 上的构象表位, 例如在氨基酸序列PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO:217) 和CRDYPGEE (SEQ ID NO:218) 内的不连续表位；

[0379] (11) 与O-连接的和N-连接的糖基化的及未糖基化的人GITR结合；以及

[0380] (12) 在任一方向或两个方向上与28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10和/或6G10竞争结合人GITR。

[0381] 抗GITR抗体还可以诱导GITR例如在10分钟、30分钟或60分钟内在活化T细胞 (例如CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞) 中内化以及后续的信号转导, 例如p65NF- $\kappa$ B和p38MAP激酶的激活 (即, 磷酸化)。

[0382] 因此, 应理解, 如根据本领域已知和本文所述的方法确定的, 相对于在抗体不存在时 (例如, 或在具有不相关特异性的对照抗体存在时) 观察到的活性, 展现这些功能性质中的一者或多者 (例如, 生物化学、免疫化学、细胞、生理学或其他生物活性等) 的抗体涉及特定活性的统计学显著性差异。优选地, 抗GITR抗体诱导的测量参数 (例如, T细胞增殖、细胞因子产生) 的增加实现了所述测量参数在统计学上显著增加至少10%, 更优选至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100% (即, 2倍)、3倍、5倍或10倍, 并且在某些优选实施方案中, 本文所述的抗体可使测量参数增加大于92%、94%、95%、97%、98%、99%、100% (即, 2倍)、3倍、5倍或10倍。相反, 抗GITR抗体诱导的测量参数 (例如, 肿瘤体积、GITR-L与GITR的结合、肿瘤中的调节性T细胞的量) 的降低实现了所述测量参数在统计学上显著降低至少10%, 更优选至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%, 并且在某些优选实施方案中, 本文所述的抗体可使测量参数降低大于92%、94%、95%、97%、98%或99%。

[0383] 评价抗体对不同物种的GITR的结合能力的标准测定法是本领域已知的, 包括例如ELISA、Western印迹和RIA。适合的测定法详细描述于实施例1中。还可以通过本领域已知的标准测定法 (比如通过Biacore分析) 评估抗体的结合动力学 (例如, 结合亲和力)。评价抗体对GITR的功能性质 (例如, 配体结合、T细胞增殖、细胞因子产生) 的影响的测定法进一步详细描述于下文和实施例中。

[0384] 在某些实施方案中, 抗GITR抗体不是天然抗体、或者不是天然存在的抗体。例如, 抗GITR抗体具有不同于天然存在的抗体的翻译后修饰, 例如具有更多、更少或不同类型的翻译后修饰。

[0385] II. 示例性的抗GITR抗体

[0386] 本文所述的特定抗体是具有如实施例1中所述分离并在结构上表征的抗体28F3、19D3、18E10、3C3、2G6、8A6、9G7、14E3、19H8和6G10的CDR和/或可变区序列的抗体 (例如, 单克隆抗体), 以及与这些抗体的可变区或CDR序列具有至少80%同一性 (例如, 至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性) 的抗体。28F3、19D3、18E10、3C3 (3C3-1和3C3-2)、2G6、8A6、9G7 (9G7-1和9G7-2)、14E3、19H8 (19H8-1和19H8-2) 和6G10的V<sub>H</sub>氨基酸序列分别列于SEQ ID NO:13、26、39、52、71、84、97、115、128和335中。28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10的V<sub>L</sub>氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:14、27、40、53、54、72、85、98、99、116、129、130和336中。

[0387] 因此, 本申请提供了包含重链和轻链可变区的分离的抗体或其抗原结合部分, 其中重链可变区包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO:13、26、39、52、71、84、97、115、128和335。

[0388] 还提供了包含重链和轻链可变区的分离的抗体或其抗原结合部分,其中轻链可变区包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、27、40、53、54、72、85、98、99、116、129、130和336。

[0389] 本申请提供了分离的抗体或其抗原结合部分,其包含:

[0390] (a) 分别包含SEQ ID NO:13和14的重链和轻链可变区序列;

[0391] (b) 分别包含SEQ ID NO:26和27的重链和轻链可变区序列;

[0392] (c) 分别包含SEQ ID NO:39和40的重链和轻链可变区序列;

[0393] (d) 分别包含SEQ ID NO:52和53的重链和轻链可变区序列;

[0394] (e) 分别包含SEQ ID NO:52和54的重链和轻链可变区序列;

[0395] (f) 分别包含SEQ ID NO:71和72的重链和轻链可变区序列;

[0396] (g) 分别包含SEQ ID NO:84和85的重链和轻链可变区序列;

[0397] (h) 分别包含SEQ ID NO:97和98的重链和轻链可变区序列;

[0398] (i) 分别包含SEQ ID NO:97和99的重链和轻链可变区序列;

[0399] (j) 分别包含SEQ ID NO:115和116的重链和轻链可变区序列;

[0400] (k) 分别包含SEQ ID NO:128和129的重链和轻链可变区序列;

[0401] (l) 分别包含SEQ ID NO:128和130的重链和轻链可变区序列;或

[0402] (m) 分别包含SEQ ID NO:335和336的重链和轻链可变区序列。

[0403] 抗GITR抗体可包含28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10或其组合的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3。28F3、19D3、18E10、3C3 (3C3-1和3C3-2)、2G6、8A6、9G7 (9G7-1和9G7-2)、14E3、19H8 (19H8-1和19H8-2) 和6G10的V<sub>H</sub> CDR1的氨基酸序列分别列于SEQ ID NO:20、33、46、62、78、91、106、122、138和342中。28F3、19D3、18E10、3C3 (3C3-1和3C3-2)、2G6、8A6、9G7 (9G7-1和9G7-2)、14E3、19H8 (19H8-1和19H8-2) 和6G10的V<sub>H</sub> CDR2的氨基酸序列分别列于SEQ ID NO:21、34、47、63、79、92、107、123、139和343中。28F3、19D3、18E10、3C3 (3C3-1和3C3-2)、2G6、8A6、9G7 (9G7-1和9G7-2)、14E3、19H8 (19H8-1和19H8-2) 和6G10的V<sub>H</sub> CDR3的氨基酸序列列于SEQ ID NO:22、35、48、64、80、93、108、124、140和344中。28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10的V<sub>L</sub> CDR1的氨基酸序列分别列于SEQ ID NO:23、36、49、65、68、81、94、109、112、125、141、144和345中。28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10的V<sub>L</sub> CDR2的氨基酸序列分别列于SEQ ID NO:24、37、50、66、69、82、95、110、113、126、142、145和346中。28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10的V<sub>L</sub> CDR3的氨基酸序列分别列于SEQ ID NO:25、38、51、67、70、83、96、111、114、127、143、146和347中。CDR区是使用Kabat系统 (Kabat,E.A.等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版, U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242) 划分的。

[0404] 鉴于这些抗体中的每一者都与GITR结合,并且抗原结合特异性主要是由CDR1、2和3区提供的,可以将V<sub>H</sub> CDR1、2和3序列与V<sub>L</sub> CDR1、2和3序列“混合并匹配”(即,可以混合并匹配来自不同抗体的CDR,不过每一抗体必须含有V<sub>H</sub> CDR1、2和3以及V<sub>L</sub> CDR1、2和3),从而产生本文所述的其他抗GITR结合分子。可使用上文及实施例中所描述的结合测定法(例如,ELISA)来测试这些“混合并匹配”的抗体的GITR结合。优选地,当混合并匹配V<sub>H</sub> CDR序列时,来自特定V<sub>H</sub>序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列被置换为结构相似的CDR序列。同样,当混合并

匹配 $V_L$  CDR序列时,来自特定 $V_L$ 序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列优选地被置换为结构相似的CDR序列。普通技术人员容易想到,通过将一个或多个 $V_H$ 和/或 $V_L$  CDR区序列取代为来自本文中公开的单克隆抗体28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10的CDR序列的结构相似的序列,可以产生新的 $V_H$ 和 $V_L$ 序列。

[0405] 本申请提供了分离的抗体或其抗原结合部分,其包含:

[0406] (a) 包含选自下组的氨基酸序列的重链可变区CDR1:SEQ ID NO:20、33、46、62、78、91、106、122、138和342;

[0407] (b) 包含选自下组的氨基酸序列的重链可变区CDR2:SEQ ID NO:21、34、47、63、79、92、107、123、139和343;

[0408] (c) 包含选自下组的氨基酸序列的重链可变区CDR3:SEQ ID NO:22、35、48、64、80、93、108、124、140和344;

[0409] (d) 包含选自下组的氨基酸序列的轻链可变区CDR1:SEQ ID NO:23、36、49、65、68、81、94、109、112、125、141、144和345;

[0410] (e) 包含选自下组的氨基酸序列的轻链可变区CDR2:SEQ ID NO:24、37、50、66、69、82、95、110、113、126、142、145和346;以及

[0411] (f) 包含选自下组的氨基酸序列的轻链可变区CDR3:SEQ ID NO:25、38、51、67、70、83、96、111、114、127、143、146和347;

[0412] 其中抗体与人GITR特异性地结合。

[0413] 在一个实施方案中,抗体包含重链和轻链可变区,其中重链可变区CDR1、CDR2和CDR3区包含:

[0414] (a) SEQ ID NO:20-22;

[0415] (b) SEQ ID NO:33-35;

[0416] (c) SEQ ID NO:46-48;

[0417] (d) SEQ ID NO:62-64;

[0418] (e) SEQ ID NO:78-80;

[0419] (f) SEQ ID NO:91-93;

[0420] (g) SEQ ID NO:106-108;

[0421] (h) SEQ ID NO:122-124;

[0422] (i) SEQ ID NO:138-140;或

[0423] (j) SEQ ID NO:342-344;

[0424] 其中抗体与人GITR特异性地结合。

[0425] 在另一个实施方案中,抗体包含重链和轻链可变区,其中轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3区包含:

[0426] (a) SEQ ID NO:23-25;

[0427] (b) SEQ ID NO:36-38;

[0428] (c) SEQ ID NO:49-51;

[0429] (d) SEQ ID NO:65-67;

[0430] (e) SEQ ID NO:68-70;

[0431] (f) SEQ ID NO:81-83;

- [0432] (f) SEQ ID NO:94-96;
- [0433] (g) SEQ ID NO:109-111;
- [0434] (h) SEQ ID NO:112-114;
- [0435] (i) SEQ ID NO:125-127;
- [0436] (j) SEQ ID NO:141-143;
- [0437] (k) SEQ ID NO:144-146;或
- [0438] (l) SEQ ID NO:345-347;
- [0439] 其中抗体与人GITR特异性地结合。
- [0440] 在具体实施方案中,抗体包含重链和轻链可变区,其中:
- [0441] (a) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:20-22,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:23-25;
- [0442] (b) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:33-35,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:36-38;
- [0443] (c) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:46-48,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:49-51;
- [0444] (d) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:62-64,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:65-67;
- [0445] (e) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:62-64,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:68-70;
- [0446] (f) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:78-80,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:81-83;
- [0447] (g) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:91-93,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:94-96;
- [0448] (h) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:106-108,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:109-111;
- [0449] (i) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:106-108,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:112-114;
- [0450] (j) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:122-124,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:125-127;
- [0451] (k) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:138-140,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:141-143;
- [0452] (l) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:138-140,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:144-146;或(m) 重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:342-344,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:345-347。
- [0453] 其中抗体与人GITR特异性地结合。
- [0454] 可以将本文所述的VH结构域或其一个或多个CDR与恒定结构域连接而形成重链,例如全长重链。类似地,可以将本文所述的VL结构域或其一个或多个CDR与恒定结构域连接而形成轻链,例如全长轻链。全长重链(C端赖氨酸(K)除外或C端甘氨酸及赖氨酸(GK)除外,它们可以不存在)和全长轻链组合而形成全长抗体。

[0455] 本文所述的VH结构域可融合至人IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4,其是天然存在的或经修饰的)的恒定结构域,例如,如本文进一步描述的。例如,VH结构域可包含与以下人IgG1氨基酸序列融合的本文所述的任何VH结构域的氨基酸序列:

```
ASTKGP SVFPLAPSSK STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV
LQSSGLYSL SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
[0456] LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
NGQPENNYKT TTPVLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG (SEQ
ID NO: 7)
```

[0457] 人IgG1恒定结构域也可以是同种异型变体的恒定结构域。例如,IgG1的同种异型变体包含R107K、E189D及M191L(在上文中加下划线且编号系根据SEQ ID NO:7中的编号)。在全长重链区内,这些氨基酸取代的编号为R214K、E356D和M358L。

[0458] 本文所述的VL结构域可融合至人 $\kappa$ 或 $\lambda$ 轻链的恒定结构域。例如,VL结构域可包含与以下人IgG1 $\kappa$ 轻链氨基酸序列融合的本文所述的任何VL结构域的氨基酸序列:

```
RTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD
[0459] STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 12)
```

[0460] 在某些实施方案中,重链恒定区包含在C端处的赖氨酸或另一氨基酸,例如,其包含以下最后的氨基酸:对于重链为LSPGK (SEQ ID NO:220)。在某些实施方案中,重链恒定区在C端处缺少一个或多个氨基酸,并且例如具有C端序列LSPG (SEQ ID NO:276) 或LSP。

[0461] 示例性重链和轻链的氨基酸序列描述于表15中,重链对应于SEQ ID NO:15、17、18、28、30、31、41、43、44、55、58、59、73、75、76、86、88、89、100、102、103、117、119、120、131、134、135、227-275、337、339、340、348-352、361和362,并且轻链对应于SEQ ID NO:16、19、29、32、42、45、56、57、60、61、74、87、90、101、104、105、118、121、132、133、136、137、338、341和371。

[0462] 包含与表15中列出的任何重链或轻链(或其可变区)(例如SEQ ID NO:13-19、26-32、40-45、52-61、71-77、84-90、97-105、116-121、128-137、227-275、337-341、348-352、361、362和371)至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%或70%相同的氨基酸序列的重链和轻链可用于形成具有期望的特征(例如本文中进一步描述的)的抗人GITR抗体。示例性变体是包含例如恒定结构域的同种异型变化和/或可变区或恒定区的突变(如本文公开的突变)的变体。包含与表15中列出的任何重链或轻链(或其可变区)至多1-30、1-25、1-20、1-15、1-10、1-5、1-4、1-3、1-2或1个氨基酸不同(通过取代、添加或缺失)的氨基酸序列的重链和轻链可用于形成具有期望特征(例如本文中进一步描述的)的抗人GITR抗体。

[0463] 在不同的实施方案中,上述抗体展现以下功能性质中的一项或多项、两项或更多项、三项或更多项、四项或更多项、五项或更多项、六项或更多项、七项或更多项、八项或更多项、九项或更多项、十项或更多项、十一项或全部:

[0464] (1) 与可溶性人GITR结合,例如以10nM或更低(例如,0.01nM至10nM)的 $K_D$ ,如例如通过Biacore测量的;

[0465] (2) 与膜结合的人GITR结合,例如以1nM或更低(例如,0.01nM至1nM)的 $K_D$ ,如例如通过Scatchard测量的;

[0466] (3) 与膜结合的人GITR结合,例如以1nM或更低(例如,0.01nM至1nM)的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0467] (4) 与食蟹猴GITR结合,例如与膜结合的食蟹猴GITR结合,例如以10nM或更低(例如,0.01nM至10nM)的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0468] (5) 诱导或增强T细胞活化,比如在CD3衔接存在下(例如,在次最佳抗CD3浓度存在下),如通过(i)在表达GITR的T细胞中的IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生增加和/或(ii)T细胞增殖增强证明的;

[0469] (6) 诱导或增强T细胞活化而无需多价交联;

[0470] (7) 抑制GITR配体与3A9-hGITR细胞上的GITR结合,例如以1 $\mu$ g/mL或更低的 $EC_{50}$ ,如通过FACS测量的;

[0471] (8) 至多部分地抑制GITR配体与活化的T细胞上的GITR结合;

[0472] (9) 结合成熟人GITR(SEQ ID NO:4)上的构象表位,例如在氨基酸序列PTGGPGCGPGRLLLGTGT(SEQ ID NO:217)和CRDYPGEE(SEQ ID NO:218)内的不连续表位;

[0473] (10) 与O-连接的和N-连接的糖基化的及未糖基化的人GITR结合;

[0474] (11) 在没有与Fc受体结合时具有激动剂活性,但其中与Fc受体的结合进一步增强激动剂活性;以及

[0475] (12) 在任一方向或两个方向上与28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10和/或6G10竞争结合人GITR。

[0476] 这样的抗体包括例如人抗体、人源化抗体、或嵌合抗体。

[0477] 在一个实施方案中,本文所述的抗GITR抗体与糖基化的(例如,N-连接或O-连接糖基化)和未糖基化的人GITR结合。

[0478] 在一个实施方案中,本文所述的抗GITR抗体与构象表位结合。

[0479] 在一个实施方案中,本文所述的抗GITR抗体结合成熟人GITR(SEQ ID NO:4)的以下区域内的氨基酸残基:

[0480] QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGE(SEQ ID NO:215),

[0481] 对应于成熟人GITR同等型1、2或3(SEQ ID NO:4)的氨基酸残基1-39。

[0482] 在一个实施方案中,本文所述的抗GITR抗体结合成熟人GITR(SEQ ID NO:4)的以下区域内的氨基酸残基:

[0483] QRPTGGPGCGPGRLLLGTGT(SEQ ID NO:216),

[0484] 对应于成熟人GITR同等型1、2或3(SEQ ID NO:4)的氨基酸残基1-20。

[0485] 在一个实施方案中,本文所述的抗GITR抗体结合成熟人GITR(SEQ ID NO:4)的以下区域内的氨基酸残基:

[0486] PTGGPGCGPGRLLLGTGT(SEQ ID NO:217)和CRDYPGEE(SEQ ID NO:218)。

[0487] 修饰的重链恒定结构域

[0488] 如本文中进一步论述,本文所述的抗GITR抗体的重链恒定区可属于任一同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4或其组合和/或其修饰形式。抗GITR抗体可具有效应子功能、或可具有降低的效应子功能、或没有效应子功能。在某些实施方案中,抗GITR抗体包含为所述抗体提供增强的性质的修饰的重链恒定区。如实施例中所示,具有包含IgG2铰链的修饰的重链恒定区的抗GITR抗体相对于具有相同可变区但具有非IgG2铰链的抗体是更有效力的

激动剂。例如,包含IgG2铰链、IgG1同种型的CH2和CH3结构域且具有或没有效应子功能的抗体具有增强的激动剂活性,如通过与抗体一起温育的T细胞的IFN- $\gamma$ 和IL-2分泌增强所量度的。不希望限于具体的作用机制,假设具有IgG2铰链的抗GITR抗体形成较大的抗体/抗原复合物且被更有效地内化,由此获得增加的激动剂活性。大复合物的形成被认为是由于IgG2铰链相对于其他同种型(例如,IgG1、IgG3和IgG4)的铰链的刚度较高所致。如实施例中进一步描述的,增强的激动剂活性似乎与抗体的较高或较低亲和力无关。因此,本申请提供了具有修饰的重链恒定区的抗GITR抗体,其中抗GITR抗体具有增强的激动剂活性,并且其中,具有修饰的重链恒定区的抗体与GITR结合的亲和力与具有相同可变区但具有不同重链恒定区的抗体类似。

[0489] 因此,本文中还提供了增强抗GITR抗体的激动剂活性的方法,其包括提供具有非IgG2铰链的抗GITR抗体,并且用IgG2铰链置换非IgG2铰链。可受益于这样的修饰的抗体包括任何抗GITR抗体,比如本领域已知的那些,例如抗体6C8或具有6C8的CDR的人源化抗体,如例如在W02006/105021中所述;在W02011/028683、JP2008278814、KR20080105674、US20040072566、US2001472565、US20140065152中或在W02015/031667中所述的抗体。

[0490] 在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包含IgG2同种型的铰链(“IgG2铰链”)以及CH1、CH2和CH3结构域。在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包含IgG2铰链以及CH1、CH2和CH3结构域,其中CH1、CH2和CH3结构域中的至少一者不属于IgG2同种型。IgG2铰链可以是野生型IgG2铰链,例如野生型人IgG2铰链(例如,ERKCCVECPPCPAPPVAG;SEQ ID NO:291)或其变体,条件是IgG2铰链保留对抗体赋予相对于包含非IgG2铰链的相同抗体的增强的活性的能力。在某些实施方案中,IgG2铰链变体保留与野生型IgG2铰链类似的刚性或刚度。通过例如计算机建模、电子显微镜、光谱学(比如核磁共振(NMR))、X射线晶体学(B-因子)或沉降速度分析超速离心法(AUC)测量或比较包含铰链的抗体的回转半径,可以确定铰链的刚性。某个铰链相对于另一铰链可具有相似或较高的刚性,条件是包含所述某个铰链的抗体在前一句中所述的测试之一中获得的值与具有不同铰链(例如,IgG1铰链)的相同抗体的值相差小于5%、10%、25%、50%、75%或100%。根据这些测试,通过解释这些测试的结果,本领域技术人员将能够确定铰链是否与另一铰链具有至少相似的刚性。示例性的人IgG2铰链变体是包含对四个半胱氨酸残基(即,C219、C220、C226和C229)中的一者或多者用另一氨基酸取代的IgG2铰链。半胱氨酸可置换为丝氨酸。示例性的IgG2铰链是包含C219X突变或C220X突变的人IgG2铰链,其中X是除了丝氨酸外的任何氨基酸。在某些实施方案中,IgG2铰链不包含C219X和C220X取代这两者。在某些实施方案中,IgG2铰链包含C219S或C220S,但不包含C219S和C220S两者(例如,ERKSCVECPPCPAPPVAG;SEQ ID NO:292)。其他可使用的IgG2铰链变体包括包含C220、C226和/或C229取代(例如C220S、C226S或C229S突变(其可与C219S突变组合))的人IgG2铰链。IgG2铰链也可以是这样的IgG2铰链,其中铰链的一部分是另一同种型的铰链(即,其为嵌合铰链或杂合铰链),条件是嵌合铰链的刚性至少与野生型IgG2铰链的刚性相似。例如,IgG2铰链可以是这样的IgG2铰链,其中下部铰链(如表2中定义的)属于IgG1同种型,并且是例如野生型IgG1下部铰链。可用于IgG2铰链中的其他IgG2铰链突变包括SE(S267E)、SELF(S267E/L328F)、SDIE(S239D/I332E)、SEFF和GASDALIE(G236A/S239D/A330L/I332E)突变。

[0491] 如果“杂合”或“嵌合”铰链的一半以上的连续氨基酸来自某种特定的同种型,则称

铰链属于所述同种型。例如,具有IgG2的上部铰链和中部铰链以及IgG1的下部铰链的铰链被视为IgG2铰链。

[0492] 在某些实施方案中,抗GITR抗体含有包含IgG2铰链的修饰的重链恒定区,所述IgG2铰链包含以下序列之一:

- [0493] ERKCCVECPCPAPPVAG (SEQ ID NO:447);
- [0494] ERKSCVECPCPAPPVAG (SEQ ID NO:448);
- [0495] ERKCSVECPCPAPPVAG (SEQ ID NO:449);
- [0496] ERKXCVECPCPAPPVAG (SEQ ID NO:450);
- [0497] ERKCXVECPCPAPPVAG (SEQ ID NO:451);
- [0498] ERKCCVECPCPAPPVAGX (SEQ ID NO:452);
- [0499] ERKSCVECPCPAPPVAGX (SEQ ID NO:453);
- [0500] ERKCSVECPCPAPPVAGX (SEQ ID NO:454);
- [0501] ERKXCVECPCPAPPVAGX (SEQ ID NO:455);
- [0502] ERKCXVECPCPAPPVAGX (SEQ ID NO:456);
- [0503] ERKCCVECPCPAPELLGG (SEQ ID NO:457);
- [0504] ERKSCVECPCPAPELLGG (SEQ ID NO:458);
- [0505] ERKCCSVECPCPAPELLGG (SEQ ID NO:459);
- [0506] ERKXCVECPCPAPELLGG (SEQ ID NO:460);
- [0507] ERKCXVECPCPAPELLGG (SEQ ID NO:461);
- [0508] ERKCCVECPCPAPELLG (SEQ ID NO:462);
- [0509] ERKSCVECPCPAPELLG (SEQ ID NO:463);
- [0510] ERKCCSVECPCPAPELLG (SEQ ID NO:464);
- [0511] ERKXCVECPCPAPELLG (SEQ ID NO:465);
- [0512] ERKCXVECPCPAPELLG (SEQ ID NO:466);
- [0513] ERKCCVECPCPAP (SEQ ID NO:467);
- [0514] ERKSCVECPCPAP (SEQ ID NO:468);
- [0515] ERKCSVECPCPAP (SEQ ID NO:469);
- [0516] ERKXCVECPCPAP (SEQ ID NO:470);或
- [0517] ERKCXVECPCPAP (SEQ ID NO:471);

[0518] 其中X是除半胱氨酸外的任何氨基酸,

[0519] 或任何上述序列,其中1-5、1-3、1-2或1个氨基酸插入氨基酸残基CVE和CPP之间。在某些实施方案中,插入THT和GGG。在某些实施方案中,1、1-2或1-3个氨基酸插入铰链和CH2结构域之间。例如,可以将甘氨酸插入铰链和CH2结构域之间。

[0520] 在某些实施方案中,铰链包含SEQ ID NO:447、448、449、450或451,其中1、2、3个或全部4个氨基酸P233、V234、A235和G237 (对应于C端4个氨基酸“PVAG” (SEQ ID NO:472) 缺失或被另一氨基酸取代,例如IgG1铰链ELLG (SEQ ID NO:473) 或ELLGG (SEQ ID NO:474) 的C端氨基酸。在某些实施方案中,铰链包含SEQ ID NO:447、448、449、450或451,其中V234、A235和G237缺失或被另一氨基酸取代。在某些实施方案中,铰链包含SEQ ID NO:447、448、449、450或451,其中A235和G237缺失或被另一氨基酸取代。在某些实施方案中,铰链包含SEQ ID



N0:447、448、449、450或451,其中G237缺失或被另一氨基酸取代。在某些实施方案中,铰链包含SEQ ID N0:447、448、449、450或451,其中V234和A235缺失或被另一氨基酸取代。用IgG1铰链,即(ELLG(SEQ ID N0:473)或ELLGG(SEQ ID N0:474))的相应氨基酸取代IgG2中的PVAG(SEQ ID N0:472)以获得例如上文所示的杂合铰链,其提供具有IgG2铰链的优点和IgG1铰链的效应子功能的铰链。

[0521] 在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包含由上文所示的序列之一(例如SEQ ID N0:447-471中的任一个)组成或基本上由其组成的铰链,并且在某些实施方案中,不包含另外的铰链氨基酸残基。

[0522] 在某些实施方案中,抗CD73抗体包含含有IgG1或IgG2恒定区的修饰的重链恒定区,其中铰链包含1-10个氨基酸的缺失。如实施例中所示,缺乏氨基酸残基SCDKTHT(S219、C220、D221、K222、T223、H224和T225;SEQ ID N0:475)的IgG1抗体比具有野生型IgG1恒定区的相同抗体更有效地赋予抗体介导的CD73内化。类似地,在IgG2抗体的背景下,缺乏CCVE氨基酸残基CCVE(C219、C220、V222和E224;SEQ ID N0:476)的IgG2抗体比具有野生型IgG1恒定区的相同抗体更有效地赋予抗体介导的CD73内化。因此,本申请提供了修饰的重链恒定区,其中铰链包含选自IgG1抗体的残基S219、C220、D221、K222、T223、H224和T225的1、2、3、4、5、6个或7个氨基酸残基以及IgG2抗体的残基C219、C220、V222和E224的缺失。

[0523] 在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包含CH1结构域,其为IgG1或IgG2同种型的野生型CH1结构域(分别为“IgG1CH1结构域”或“IgG2CH1结构域”)。还可以使用IgG3和IgG4同种型的CH1结构域(分别为“IgG3CH1结构域”和“IgG2CH1结构域”)。CH1结构域还可以是野生型CH1结构域的变体,例如野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4CH1结构域的变体。CH1结构域的示例性变体包括A114C和T173C和/或C131(例如C131S)。

[0524] CH1结构域,例如IgG2CH1结构域可以包含取代C131S,所述取代赋予IgG2抗体或具有IgG2CH1和铰链B型(或构象)的抗体。

[0525] 在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包含属于IgG2同种型的CH1结构域。在某些实施方案中,CH1结构域是野生型IgG2CH1结构域,例如具有以下氨基酸序列:ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV(SEQ ID N0:477)。在某些实施方案中,CH1结构域是SEQ ID N0:477的变体,并且包含相对于SEQ ID N0:477的1-10、1-5、1-2个或1个氨基酸取代或缺失。如实施例中进一步描述的,本文中已经表明,IgG2CH1结构域或其变体相对于IgG1抗体赋予抗GITR抗体增强的或改变的内化性质,并且当抗体还包含IgG2铰链时甚至赋予更加增强或改变的内化。在某些实施方案中,IgG2CH1变体在一个或多个以下氨基酸残基处不包含氨基酸取代或缺失:C131、R133、E137和S138,所述氨基酸残基以粗体显示并在上文所示的SEQ ID N0:477中加下划线。例如,修饰的重链恒定区可以包含IgG2CH1结构域,其中R133、E137和S138没有一个被另一氨基酸取代或缺失,或其中C131、R133、E137和S138没有一个被另一氨基酸取代或缺失。在某些实施方案中,C131被另一氨基酸取代,例如C131S,所述取代触发抗体采取构象B。本文中显示,具有修饰的重链恒定区的构象A和构象B抗体相对于具有IgG1恒定区的相同抗体具有增强的活性。

[0526] 在某些实施方案中,N192和/或F193(在上文所示的SEQ ID N0:477中显示为斜体和加下划线的残基)被另一氨基酸取代,例如用IgG1中的相应氨基酸取代,即,N192S和/或

F193L。

[0527] 在某些实施方案中，IgG2CH1结构域的一个或多个氨基酸残基被IgG4中的相应氨基酸残基取代。例如，N192可以是N192S；F193可以是F193L；C131可以是C131K；和/或T214可以是T214R。

[0528] 抗体可以含有包含IgG2CH1结构域或其变体和IgG2铰链或其变体的修饰的重链恒定区。铰链和CH1结构域可以是本文所述的任何IgG2铰链和IgG2CH1结构域的组合。在某些实施方案中，IgG2CH1和铰链包含以下氨基酸序列：ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCCPAPPVAG (SEQ ID NO:478)，或与其有至多1-10个氨基酸不同的氨基酸序列。氨基酸变体如针对以上铰链和CH1结构域所述。在某些实施方案中，抗体至少包含IgG2铰链，并且任选地还包含IgG2CH1结构域或铰链的片段或衍生物和/或CH1结构域，并且抗体采用(构象)A型(例如，参见Allen等人(2009) *Biochemistry* 48:3755)。在某些实施方案中，抗CD73抗体至少包含IgG2铰链，并且任选地还包含IgG2CH1结构域或铰链的片段或衍生物和/或CH1结构域，并且抗体采用B型(例如，参见Allen等人(2009) *Biochemistry* 48:3755)。

[0529] 在某些实施方案中，修饰的重链恒定区包含CH2结构域，其为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的野生型CH2结构域(分别为“IgG1CH2结构域”、“IgG2CH2结构域”、“IgG3CH2结构域”或“IgG4CH2结构域”)。CH2结构域还可以是野生型CH2结构域的变体，例如野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4CH2结构域的变体。CH2结构域的示例性变体包括调节抗体的Fc区的生物活性(比如ADCC或CDC)或调节抗体的半衰期或其稳定性的变体。在一个实施方案中，CH2结构域是具有A330S和P331S突变的人IgG1CH2结构域，其中CH2结构域相对于没有突变的相同CH2突变具有降低的效应子功能。CH2结构域可以具有增强的效应子功能。CH2结构域可以包含一个或多个以下突变：SE (S267E)、SELF (S267E/L328F)、SDIE (S239D/I332E)、SEFF和GASDALIE (G236A/S239D/A330L/I332E) 和/或在以下氨基酸处的一个或多个突变：E233、G237、P238、H268、P271、L328和A330。其他突变进一步在本文中别处陈述。

[0530] 在某些实施方案中，修饰的重链恒定区包含CH3结构域，其为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的野生型CH3结构域(分别为“IgG1CH3结构域”、“IgG2CH3结构域”、“IgG3CH3结构域”或“IgG4CH3结构域”)。CH3结构域还可以是野生型CH3结构域的变体，例如野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4CH3结构域的变体。CH3结构域的示例性变体包括调节抗体的Fc区的生物活性(比如ADCC或CDC)或调节抗体的半衰期或其稳定性的变体。

[0531] 通常，CH1、铰链、CH2或CH3结构域的变体可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个突变、和/或至多10、9、8、7、6、5、4、3、2个或1个突变、或1-10个或1-5个突变，或包含与相应野生型结构域(分别为CH1、铰链、CH2或CH3结构域)的氨基酸序列至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列，条件是包含特定变体的重链恒定区保留必需的生物活性。

[0532] 表3列出了包含人CH1、铰链、CH2和/或CH3结构域的示例性人重链恒定区，其中每个结构域是为重链恒定区提供期望的生物活性的野生型结构域或其变体。表3中的未填充单元格指示结构域存在或不存在，如果存在，则可以属于任一同种型，例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。例如，包含表3中的重链恒定区1的抗体是包含至少包含IgG2铰链的重链恒定区的抗体，并且还可包含CH1、CH2和/或CH3结构域，并且如果存在的话，则CH1、CH2和/或CH3结构域属于

IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。作为理解表3的另一实例,包含重链恒定区8的抗体是含有包含IgG1CH1结构域、及IgG2铰链、IgG1CH2结构域的重链恒定区的抗体,并且还可包含或可以不包含CH3结构域,如果存在的话,则CH3结构域可以属于IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

[0533] 表3.人重链恒定区的示例性构型

[0534]

| MHCCR* | CH1  | 铰链   | CH2  | CH3  |
|--------|------|------|------|------|
| 1      |      | IgG2 |      |      |
| 2      | IgG1 | IgG2 |      |      |
| 3      | IgG2 | IgG2 |      |      |
| 4      |      | IgG2 | IgG1 |      |
| 5      |      | IgG2 | IgG2 |      |
| 6      |      | IgG2 |      | IgG1 |
| 7      |      | IgG2 |      | IgG2 |
| 8      | IgG1 | IgG2 | IgG1 |      |
| 9      | IgG1 | IgG2 | IgG2 |      |
| 10     | IgG2 | IgG2 | IgG1 |      |
| 11     | IgG2 | IgG2 | IgG2 |      |
| 12     | IgG1 | IgG2 |      | IgG1 |
| 13     | IgG1 | IgG2 |      | IgG2 |
| 14     | IgG2 | IgG2 |      | IgG1 |
| 15     | IgG2 | IgG2 |      | IgG2 |
| 16     |      | IgG2 | IgG1 | IgG1 |
| 17     |      | IgG2 | IgG1 | IgG2 |
| 18     |      | IgG2 | IgG2 | IgG1 |
| 19     |      | IgG2 | IgG2 | IgG2 |
| 20     | IgG1 | IgG2 | IgG1 | IgG1 |
| 21     | IgG1 | IgG2 | IgG1 | IgG2 |
| 22     | IgG1 | IgG2 | IgG2 | IgG1 |
| 23     | IgG1 | IgG2 | IgG2 | IgG2 |
| 24     | IgG2 | IgG2 | IgG1 | IgG1 |
| 25     | IgG2 | IgG2 | IgG1 | IgG2 |

|        |    |      |      |      |      |
|--------|----|------|------|------|------|
| [0535] | 26 | IgG2 | IgG2 | IgG2 | IgG1 |
|        | 27 | IgG2 | IgG2 | IgG2 | IgG2 |

[0536] \*修饰的重链恒定区

[0537] 在某些实施方案中,相对于包含重链恒定区(不含特定的重链恒定区)的相同抗体或相对于包含IgG1恒定区的相同抗体,包含表3中所示的重链恒定区的抗体具有增强的生物活性。

[0538] 在某些实施方案中,用于提高包含非IgG2铰链和/或非IgG2CH1结构域的GITR抗体的生物活性的方法包括:提供包含非IgG2铰链和/或非IgG2CH1结构域的抗GITR抗体,并且分别用IgG2铰链和IgG2CH1结构域置换非IgG2铰链和非IgG2CH1结构域。用于提高不包含修饰的重链恒定区的GITR抗体的生物活性的方法可以包括:提供不包含修饰的重链恒定区的抗GITR抗体,并且用修饰的重链恒定区置换其重链恒定区。

[0539] 可以与抗GITR可变区连接的示例性的修饰的重链恒定区(例如本文所述的那些)提供在表4中,其中列出了每个结构域的身份。

[0540] 表4:示例性的修饰的重链恒定区

| [0541] | 修饰的重链恒定区           | CH1                      | 铰链                              | CH2                      | CH3                      | 全MHCCR的SEQ ID NO |
|--------|--------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|
|        | IgG1-IgG2-IgG1f    | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:278 | IgG2/IgG1<br>SEQ ID NO:293      | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:280 | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:282 | SEQ ID NO:283    |
|        | IgG1-IgG2-IgG1f2   | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:278 | IgG2野生型<br>SEQ ID NO:291        | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:280 | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:282 | SEQ ID NO:287    |
|        | IgG1-IgG2CS-IgG1f  | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:278 | IgG2C219S/IgG1<br>SEQ ID NO:294 | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:280 | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:282 | SEQ ID NO:284    |
|        | IgG1-IgG2CS-IgG1f2 | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:278 | IgG2 C219S<br>SEQ ID NO:292     | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:280 | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:282 | SEQ ID NO:288    |
|        | IgG2-IgG1f         | IgG2野生型<br>SEQ ID NO:279 | IgG2/IgG1<br>SEQ ID NO:293      | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:280 | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:282 | SEQ ID NO:223    |
|        | IgG2-IgG1f2        | IgG2野生型<br>SEQ ID NO:279 | IgG2野生型<br>SEQ ID NO:291        | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:280 | IgG1野生型<br>SEQ ID NO:282 | SEQ ID NO:289    |

[0542]

|                     |                             |                                 |                                         |                             |                   |
|---------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| IgG2CS-IgG1f        | IgG2野生型<br>SEQ ID<br>NO:279 | IgG2C219S/IgG1<br>SEQ ID NO:294 | IgG1野生型<br>SEQ ID<br>NO:280             | IgG1野生型<br>SEQ ID<br>NO:282 | SEQ ID<br>NO:225  |
| IgG2CS-IgG1f2       | IgG2野生型<br>SEQ ID<br>NO:279 | IgG2 C219S<br>SEQ ID NO:292     | IgG1野生型<br>SEQ ID<br>NO:280             | IgG1野生型<br>SEQ ID<br>NO:282 | SEQ ID<br>NO:290  |
| IgG1-IgG2-IgG1.1f   | IgG1野生型<br>SEQ ID<br>NO:278 | IgG2野生型<br>SEQ ID NO:291        | IgG1<br>A330S/P331S<br>SEQ ID<br>NO:281 | IgG1野生型<br>SEQ ID<br>NO:282 | SEQ ID<br>NO: 285 |
| IgG1-IgG2CS-IgG1.1f | IgG1野生型<br>SEQ ID<br>NO:278 | IgG2 C219S<br>SEQ ID NO:292     | IgG1<br>A330S/P331S<br>SEQ ID<br>NO:281 | IgG1野生型<br>SEQ ID<br>NO:282 | SEQ ID<br>NO: 286 |
| IgG2-IgG1.1f        | IgG2野生型<br>SEQ ID<br>NO:279 | IgG2野生型<br>SEQ ID NO:291        | IgG1<br>A330S/P331S<br>SEQ ID<br>NO:281 | IgG1野生型<br>SEQ ID<br>NO:282 | SEQ ID<br>NO:224  |
| IgG2CS-IgG1.1f      | IgG2野生型<br>SEQ ID<br>NO:279 | IgG2 C219S<br>SEQ ID NO:292     | IgG1<br>A330S/P331S<br>SEQ ID<br>NO:281 | IgG1野生型<br>SEQ ID<br>NO:282 | SEQ ID<br>NO: 226 |

[0543] 在某些实施方案中,抗GITR抗体包含修饰的重链恒定区,所述修饰的重链恒定区含有包含SEQ ID NO:291、292、293、294和447-471中的任一者的IgG2铰链或其变体,比如包含这样的氨基酸序列的IgG2铰链,所述氨基酸序列(i)与SEQ ID NO:291、292、293、294和447-471中的任一者因有1、2、3、4个或5个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(ii)与SEQ ID NO:291、292、293、294和447-471中的任一者因有至多5、4、3、2个或1个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(iii)与SEQ ID NO:291、292、293、294和447-471中的任一者因有1-5、1-3、1-2、2-5个或3-5个氨基酸取代、添加或缺失而不同,和/或(iv)包含与SEQ ID NO:291、292、293、294和447-471中的任一者至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-(iv)中的任一者中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中修饰的重链恒定区相对于另一重链恒定区(例如,包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的修饰的重链恒定区为抗GITR抗体提供增强的激动剂活性。

[0544] 在某些实施方案中,抗GITR抗体包含修饰的重链恒定区,所述修饰的重链恒定区含有包含SEQ ID NO:278的IgG1CH1结构域或包含SEQ ID NO:279的IgG2CH1结构域、或SEQ ID NO:278或279的变体,所述变体(i)与SEQ ID NO:278或279因有1、2、3、4个或5个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(ii)与SEQ ID NO:278或279因有至多5、4、3、2个或1个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(iii)与SEQ ID NO:278或279因有1-5、1-3、1-2、2-5个或3-5个氨基酸取代、添加或缺失而不同,和/或(iv)包含与SEQ ID NO:278或279至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-(iv)中的任一者中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中包含修饰的重链恒定区的抗GITR抗体相对于具有另一重链恒定区(例如,包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于具有包含非IgG2铰链的相同的修饰的重链恒定区的抗GITR抗体具有增强的激动剂活性。

[0545] 在某些实施方案中,抗GITR抗体包含修饰的重链恒定区,所述修饰的重链恒定区

含有包含SEQ ID NO:280或281的IgG1CH2结构域、或SEQ ID NO:280或281的变体,所述变体(i)与SEQ ID NO:280或281因有1、2、3、4个或5个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(ii)与SEQ ID NO:280或281因有至多5、4、3、2个或1个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(iii)与SEQ ID NO:280或281因有1-5、1-3、1-2、2-5个或3-5个氨基酸取代、添加或缺失而不同,和/或(iv)包含与SEQ ID NO:280或281至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-(iv)中的任一者中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中修饰的重链恒定区相对于另一重链恒定区(例如,包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的修饰的重链恒定区为抗GITR抗体提供增强的激动剂活性。

[0546] 在某些实施方案中,抗GITR抗体包含修饰的重链恒定区,所述修饰的重链恒定区含有包含SEQ ID NO:282的IgG1CH3结构域、或SEQ ID NO:282的变体,所述变体(i)与SEQ ID NO:282因有1、2、3、4个或5个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(ii)与SEQ ID NO:282因有至多5、4、3、2个或1个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(iii)与SEQ ID NO:282因有1-5、1-3、1-2、2-5个或3-5个氨基酸取代、添加或缺失而不同,和/或(iv)包含与SEQ ID NO:282至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-(iv)中的任一者中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中修饰的重链恒定区相对于另一重链恒定区(例如,包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的修饰的重链恒定区提供增强的激动剂活性。

[0547] 修饰的重链恒定区还可包含上述CH1、铰链、CH2和CH3结构域的组合。

[0548] 在某些实施方案中,抗GITR抗体包含修饰的重链恒定区,所述修饰的重链恒定区包含SEQ ID NO:223、224、225、226、283、284、285、286、287、288、289、290、383-446和480-543中的任一者或SEQ ID NO:223、224、225、226、283、284、285、286、287、288、289、290、383-446和480-543中的任一者的变体,所述变体(i)与SEQ ID NO:223、224、225、226、283、284、285、286、287、288、289、290、383-446和480-543中的任一者因有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(ii)与SEQ ID NO:223、224、225、226、283、284、285、286、287、288、289、290、383-446和480-543中的任一者因有至多10、9、8、7、6、5、4、3、2个或1个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(iii)与SEQ ID NO:223、224、225、226、283、284、285、286、287、288、289、290、383-446和480-543中的任一者因有1-5、1-3、1-2、2-5、3-5、1-10个或5-10个氨基酸取代、添加或缺失而不同,和/或(iv)包含与选自SEQ ID NO:223、224、225、226、283、284、285、286、287、288、289、290、383-446和480-543的序列至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-(iv)中的任一者中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且在SEQ ID NO:223、224、225、226、283、284、285、286、287、288、289、290、383-446和480-543中的这样的氨基酸位置处不发生修饰,其中在所述位置处的氨基酸与野生型氨基酸不同;并且,其中修饰的重链恒定区相对于另一重链恒定区(例如,包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的修饰的重链恒定区提供增强的激动剂活性。

[0549] 修饰的重链恒定区可具有(i)相对于野生型重链恒定区的相似、降低或增加的效应子功能(例如,与Fc $\gamma$ R结合)及或(ii)相对于野生型重链恒定区的相似、降低或增加的半衰期(或与FcRn受体结合)。

[0550] III. 具有特定种系序列的抗体

[0551] 在某些实施方案中,抗GITR抗体包含来自特定种系重链免疫球蛋白基因的重链可变区和/或来自特定种系轻链免疫球蛋白基因的轻链可变区。

[0552] 如本文中展示的,制备了对GITR特异的人抗体,其包含作为人种系VH 3-33基因、VH 3-10基因、VH 3-15基因、VH 3-16、VH JH6b基因、VH 6-19基因、VH 4-34基因和/或VH JH3b基因的产物、或衍生自上述基因的重链可变区。因此,本申请提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含作为选自下组的人VH种系基因的产物或衍生自这些基因的重链可变区:VH 3-33、VH 3-10、VH 3-15、VH 3-16、VH JH6b、VH 6-19、VH 4-34和/或VH JH3b。

[0553] 制备了对GITR特异的人抗体,其包含作为人种系VK L6基因、VK L18基因、VK L15基因、VK L20基因、VK A27基因、VK JK5基因、VK JK4基因、VK JK2基因和VK JK1基因的产物或衍生自这些基因的轻链可变区。因此,本申请提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含作为选自下组的人VK种系基因的产物或衍生自这些基因的轻链可变区:VK L6、VK L18、VK L15、VK L20、VK A27、VK JK5、VK JK4、VK JK2和VK JK1。

[0554] 本文所述的优选抗体是这样的抗体:其包含作为上文列出的人种系VH基因之一的产物或衍生自所述基因的重链可变区,并且还包含作为上文列出的人种系VK基因之一的产物或衍生自所述基因的轻链可变区,如图2-11中所示。

[0555] 如本文中使用的,如果人抗体的可变区是从使用人种系免疫球蛋白基因的系统获得的,则该抗体包含作为该特定种系序列的“产物”或“衍生自”该特定种系序列的重链或轻链可变区。这样的系统包括:用感兴趣的抗原免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠,或用感兴趣的抗原筛选展示在噬菌体上的人免疫球蛋白基因文库。如此,通过比较人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列,并选择在序列上最接近人抗体序列(即,最大同一性%)的人种系免疫球蛋白序列,可以鉴定作为人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“衍生自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体。由于例如天然存在的体细胞突变或有意引入定点突变,与种系序列相比,作为特定的人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“衍生自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体可含有氨基酸差异。然而,选择的人抗体的氨基酸序列通常与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少90%相同,并且含有当与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如,鼠种系序列)相比时将人抗体标识为人的氨基酸残基。在某些情况下,人抗体的氨基酸序列可与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少95%、或甚至至少96%、97%、98%或99%相同。通常,衍生自特定的人种系序列的人抗体与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列将展现不超过10个氨基酸的差异。在某些情况下,人抗体与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列可展现不超过5个或甚至不超过4个、3个、2个或1个氨基酸的差异。

[0556] IV. 同源抗体

[0557] 本文涵盖具有重链和轻链可变区的抗体,所述重链和轻链可变区包含与本文所述的优选抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列,并且其中抗体保留本文所述的抗GITR抗体的期望的功能性质。

[0558] 例如,分离的抗GITR抗体或其抗原结合部分可包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0559] (a) 重链可变区包含与选自下组的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、

97%、98%或99%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:13、26、39、52、71、84、97、115、128和335,或包含相对于选自下组的氨基酸序列的1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4、1-5、1-10、1-15、1-20、1-25个或1-50个氨基酸变化(即,氨基酸取代、添加或缺失):SEQ ID NO:13、26、39、52、71、84、97、115、128和335;

[0560] (b) 轻链可变区包含与选自下组的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、27、40、53、54、72、85、98、99、116、129、130和336,或包含相对于选自下组的氨基酸序列的1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4、1-5、1-10、1-15、1-20、1-25个或1-50个氨基酸变化(即,氨基酸取代、添加或缺失):SEQ ID NO:14、27、40、53、54、72、85、98、99、116、129、130和336;

[0561] (c) 抗体与GITR特异性地结合,并且

[0562] (d) 抗体展现以下功能性质中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11项或全部:

[0563] (1) 与可溶性人GITR结合,例如以10nM或更低(例如,0.01nM至10nM)的 $K_D$ ,如例如通过Biacore测量的;

[0564] (2) 与膜结合的人GITR结合,例如以1nM或更低(例如,0.01nM至1nM)的 $K_D$ ,如例如通过Scatchard测量的;

[0565] (3) 与膜结合的人GITR结合,例如以1nM或更低(例如,0.01nM至1nM)的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0566] (4) 与食蟹猴GITR结合,例如与膜结合的食蟹猴GITR结合,例如以10nM或更低(例如,0.01nM至10nM)的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0567] (5) 诱导或增强T细胞活化,比如在CD3衔接存在下(例如,在次最佳抗CD3浓度存在下),如通过(i)在表达GITR的T细胞中的IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生增加和/或(ii)T细胞增殖增强证明的;

[0568] (6) 诱导或增强T细胞活化而无需多价交联;

[0569] (7) 抑制GITR配体与3A9-hGITR细胞上的GITR结合,例如以1 $\mu$ g/mL或更低的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0570] (8) 至多部分地抑制GITR配体与活化的T细胞上的GITR结合;

[0571] (9) 结合成熟人GITR(SEQ ID NO:4)上的构象表位,例如在氨基酸序列PTGGPGCGPGRLLLTGT(SEQ ID NO:217)和CRDYPGEE(SEQ ID NO:218)内的不连续表位;

[0572] (10) 与O-连接的和N-连接的糖基化的及未糖基化的人GITR结合;

[0573] (11) 在没有与Fc受体结合时具有激动剂活性,但其中与Fc受体的结合进一步增强激动剂活性;

[0574] (12) 在任一方向或两个方向上与28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10和6G10竞争结合人GITR。

[0575] 在不同的实施方案中,抗体可展现如上文(1)至(12)项列出的功能性质中的一项或多项、两项或更多项、三项或更多项、四项或更多项、五项或更多项、六项或更多项、七项或更多项、八项或更多项、九项、十项、十一项或全部。抗体可以是例如人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0576] 分离的抗GITR抗体或其抗原结合部分可包含重链和轻链,其中:

[0577] (a) 重链包含与选自下组的氨基酸序列的至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、



98%或99%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:15、17、18、28、30、31、41、43、44、55、58、59、73、75、76、86、88、89、100、102、103、117、119、120、131、134、135、227-275、337、339、340、348-352、361和362,或包含相对于选自下组的氨基酸序列的1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4、1-5、1-10、1-15、1-20、1-25或1-50个氨基酸变化(即,氨基酸取代、添加或缺失):SEQ ID NO:15、17、18、28、30、31、41、43、44、55、58、59、73、75、76、86、88、89、100、102、103、117、119、120、131、134、135、227-275、337、339、340、348-352、361和362,前提条件是在某些实施方案中,如果序列是无效应子重链的序列,则使得重链无效应子的突变不被修饰(即,不对A234、E235、A237、S330和S331进行修饰)。

[0578] (b) 轻链包含与选自下组的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:16、19、29、32、42、45、56、57、60、61、74、87、90、101、104、105、118、121、132、133、136、137、338、341和371,或包含相对于选自下组的氨基酸序列的1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4、1-5、1-10、1-15、1-20、1-25或1-50个氨基酸变化(即,氨基酸取代、添加或缺失):SEQ ID NO:16、19、29、32、42、45、56、57、60、61、74、87、90、101、104、105、118、121、132、133、136、137、338、341和371;

[0579] (c) 抗体与GITR特异性地结合,并且

[0580] (d) 抗体展现以下功能性质中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11项或全部:

[0581] (1) 与可溶性人GITR结合,例如以10nM或更低(例如,0.01nM至10nM)的 $K_D$ ,如例如通过Biacore测量的;

[0582] (2) 与膜结合的人GITR结合,例如以1nM或更低(例如,0.01nM至1nM)的 $K_D$ ,如例如通过Scatchard测量的;

[0583] (3) 与膜结合的人GITR结合,例如以1nM或更低(例如,0.01nM至1nM)的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0584] (4) 与食蟹猴GITR结合,例如与膜结合的食蟹猴GITR结合,例如以10nM或更低(例如,0.01nM至10nM)的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0585] (5) 诱导或增强T细胞活化,比如在CD3衔接存在下(例如,在次最佳抗CD3浓度存在下),如通过(i)在表达GITR的T细胞中的IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生增加和/或(ii)T细胞增殖增强证明的;

[0586] (6) 诱导或增强T细胞活化而无需多价交联;

[0587] (7) 抑制GITR配体与3A9-hGITR细胞上的GITR结合,例如以1 $\mu$ g/mL或更低的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0588] (8) 至多部分地抑制GITR配体与活化的T细胞上的GITR结合;

[0589] (9) 结合成熟人GITR(SEQ ID NO:4)上的构象表位,例如在氨基酸序列PTGGPGCGPGRLLLTGT(SEQ ID NO:217)和CRDYPGEE(SEQ ID NO:218)内的不连续表位;

[0590] (10) 与O-连接的和N-连接的糖基化的及未糖基化的人GITR结合;

[0591] (11) 在没有与Fc受体结合时具有激动剂活性,但其中与Fc受体的结合进一步增强激动剂活性;以及

[0592] (12) 在任一方向或两个方向上与28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10和6G10竞争结合人GITR。

[0593] 还提供了包含与28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-

2、19D3、18E10和/或6G10的相应CDR因有1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个氨基酸变化(即,氨基酸取代、添加或缺失)而不同的VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和/或VLCDR3的抗GITR抗体。在某些实施方案中,相对于28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10和/或6G10中的相应序列,抗GITR抗体包含在1、2、3、4、5或6个CDR的每一个中的1-5个氨基酸变化。在某些实施方案中,相对于28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10和/或6G10中的CDR,抗GITR抗体包含在所有CDR中的总共1-5个氨基酸变化。

[0594] 在某些实施方案中,抗GITR抗体包含由28F3的VH和VL CDR组成的VH和VL CDR,其中一个或多个CDR中的一个或多个氨基酸是本文中公开的其他抗GITR抗体之一的一个或多个氨基酸。

[0595] 例如,在某些实施方案中,抗GITR抗体含有包含相对于SYGMH (SEQ ID NO:20)的一个或多个氨基酸修饰的VHCDR1,并且可包含例如以下简并序列之一:

[0596] SYGXH (SEQ ID NO:372), 其中X是任何氨基酸,例如M或F;

[0597]  $X_1YGX_2H$ , 其中 $X_1$ 是任何氨基酸,例如S、N或D;并且 $X_2$ 是任何氨基酸,例如M或F;和

[0598]  $X_1YGX_2X_3$ , 其中 $X_1$ 是任何氨基酸,例如S、N或D; $X_2$ 是任何氨基酸,例如M或F,并且 $X_3$ 是任何氨基酸,例如H或Q。

[0599] 在某些实施方案中,抗GITR抗体含有包含相对于VIWYEGSNKYADSVKG (SEQ ID NO:21)的一个或多个氨基酸修饰的VHCDR2,并且可包含例如以下简并序列之一:

[0600]  $VIWYX_1GSNKX_2YADSVKG$  (SEQ ID NO:373), 其中 $X_1$ 是任何氨基酸,例如E或A;并且 $X_2$ 是任何氨基酸,例如Y或F;和

[0601]  $VIWYX_1GSNKX_2YX_3DSVKG$  (SEQ ID NO:374), 其中 $X_1$ 是任何氨基酸,例如E、A、G或D; $X_2$ 是任何氨基酸,例如Y或F;且 $X_3$ 是任何氨基酸,例如A或V。

[0602] 在某些实施方案中,抗GITR抗体含有包含相对于GGSMVRGDYYYGMDV (SEQ ID NO:22)的一个或多个氨基酸修饰的VHCDR3,并且可包含例如以下简并序列之一:

[0603]  $GGSX_1VRGDYYYGMDV$  (SEQ ID NO:375), 其中 $X_1$ 是任何氨基酸,例如M或V、L、I或A。

[0604]  $GGSX_1VRGX_2YYYGMDV$  (SEQ ID NO:376), 其中 $X_1$ 是任何氨基酸,例如M或V、L、I或A;并且 $X_2$ 是任何氨基酸,例如D或E。 $X_1$ 与 $X_2$ 的具体组合陈述于实施例。

[0605]  $GG(6-7aa)MDVWYX_1MDVW$  (SEQ ID NO:377), 其中 $X_1$ 是任何氨基酸,例如G、S或V。在某些实施方案中,这里的6-7个氨基酸对应于本文中公开的抗GITR抗体的VHCDR3序列中该位置处的氨基酸。

[0606] 在某些实施方案中,抗GITR抗体含有包含相对于RASQGISSALA (SEQ ID NO:23)的一个或多个氨基酸修饰的VLCDR1,并且可包含例如以下简并序列之一:

[0607]  $RASQGISSXLA$  (SEQ ID NO:378), 其中X是任何氨基酸,例如A或W(或A、W或Y);和

[0608]  $RASQ(2-3aa)SX_1LA$  (SEQ ID NO:379), 其中 $X_1$ 是任何氨基酸,例如W、Y或A,并且这里的2-3个氨基酸是任何氨基酸,例如GI、SVS或SVT。

[0609] 在某些实施方案中,抗GITR抗体含有包含相对于DASSLES (SEQ ID NO:24)的一个或多个氨基酸修饰的VLCDR2,并且可包含例如以下简并序列之一:

[0610]  $DASSLXS$  (SEQ ID NO:380), 其中X是任何氨基酸,例如E或Q;和

[0611]  $X_1ASSX_2X_3X_4$ , 其中 $X_1$ 是任何氨基酸,例如A、D或G; $X_4$ 是任何氨基酸,例如L或R; $X_3$ 是

任何氨基酸,例如Q、E或A;并且X<sub>4</sub>是任何氨基酸,例如S或T。

[0612] 在某些实施方案中,抗GITR抗体含有包含相对于QQFNSYPYT (SEQ ID NO:25) 的一个或多个氨基酸修饰的VLCDR3,并且可包含例如以下简并序列之一:

[0613] QQXNSYPYT (SEQ ID NO:381),其中X是任何氨基酸,例如F或Y;和

[0614] QQX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>SX<sub>3</sub>PX<sub>4</sub>T (SEQ ID NO:382),其中X<sub>1</sub>是任何氨基酸,例如F或Y;X<sub>2</sub>是任何氨基酸,例如N或G;X<sub>3</sub>是任何氨基酸,例如Y或S;并且X<sub>4</sub>是任何氨基酸,例如Y、W、I、P或Q。

[0615] 通过诱变(例如,定点或PCR介导的诱变)编码SEQ ID NO:147、154、158、162、168、172、176、182、186、353和/或SEQ ID NO:148、155、159、163、164、169、173、177、178、183、187、188、354或SEQ ID NO:149、151、152、156、160、165、170、174、179、184、189、355和/或SEQ ID NO:150、153、157、161、166、171、175、180、185、190、191、356的核酸分子,可以获得具有与28F3、3C3、2G6、8A6、9G7、14E3、19H8、19D3、18E10和/或6G10的那些序列具有同源性的序列(例如分别具有SEQ ID NO:13、26、39、52、71、84、97、115、128和335以及SEQ ID NO:14、27、40、53、54、72、85、98、99、116、129、130和336的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区,或分别具有SEQ ID NO:15、17、18、28、30、31、41、43、44、55、58、59、73、75、76、86、88、89、100、102、103、117、119、120、131、134、135和337以及SEQ ID NO:16、19、29、32、42、45、56、60、61、74、87、90、101、104、105、118、121、132、133、136、137和338的重链和轻链,或CDR)的抗体,然后使用本文所述的功能测定法测试编码的改变的抗体的保留功能(即,在上文(1)至(12)项中陈述的功能)。

[0616] V. 具有保守修饰的抗体

[0617] 抗GITR抗体可含有包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区以及包含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中这些CDR序列中的一个或多个包含基于本文所述的优选抗体(例如,28F3、19D3、18E10、3C3、2G6、8A6、9G7、14E3、19H8和6G10)的指定氨基酸序列或其保守修饰形式,并且其中所述抗体保留本文所述的抗GITR抗体的期望的功能性质。因此,分离的抗GITR抗体或其抗原结合部分可含有包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区以及包含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中:

[0618] (a) 重链可变区CDR3序列包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:22、35、48、64、80、93、108、124、140和344的氨基酸序列及其保守修饰形式,例如1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个保守氨基酸取代;

[0619] (b) 轻链可变区CDR3序列包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:25、38、51、67、70、83、96、111、114、127、143、146和347的氨基酸序列及其保守修饰形式,例如1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个保守氨基酸取代;

[0620] (c) 抗体与GITR特异性地结合,并且

[0621] (d) 抗体展现以下功能性质中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11项或全部:

[0622] (1) 与可溶性人GITR结合,例如以10nM或更低(例如,0.01nM至10nM)的K<sub>D</sub>,如例如通过Biacore测量的;

[0623] (2) 与膜结合的人GITR结合,例如以1nM或更低(例如,0.01nM至1nM)的K<sub>D</sub>,如例如通过Scatchard测量的;

[0624] (3) 与膜结合的人GITR结合,例如以1nM或更低(例如,0.01nM至1nM)的EC<sub>50</sub>,如例如通过FACS测量的;

[0625] (4) 与食蟹猴GITR结合,例如与膜结合的食蟹猴GITR结合,例如以10nM或更低(例

如,0.01nM至10nM)的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0626] (5) 诱导或增强T细胞活化,比如在CD3衔接存在下(例如,在次最佳抗CD3浓度存在下),如通过(i)在表达GITR的T细胞中的IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生增加和/或(ii)T细胞增殖增强证明的;

[0627] (6) 诱导或增强T细胞活化而无需多价交联;

[0628] (7) 抑制GITR配体与3A9-hGITR细胞上的GITR结合,例如以1 $\mu$ g/mL或更低的 $EC_{50}$ ,如通过FACS测量的;

[0629] (8) 至多部分地抑制GITR配体与活化的T细胞上的GITR结合;

[0630] (9) 结合成熟人GITR(SEQ ID NO:4)上的构象表位,例如在氨基酸序列PTGGPGCGPGRLLLTGT(SEQ ID NO:217)和CRDYPGEE(SEQ ID NO:218)内的不连续表位;

[0631] (10) 与O-连接的和N-连接的糖基化的及未糖基化的人GITR结合;

[0632] (11) 在没有与Fc受体结合时具有激动剂活性,但其中与Fc受体的结合进一步增强激动剂活性;以及

[0633] (12) 在任一方向或两个方向上与28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10和/或6G10竞争结合人GITR。

[0634] 在优选的实施方案中,重链可变区CDR2序列包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:21、34、47、63、79、92、107、123、139和343的氨基酸序列及其保守修饰形式,例如1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个保守氨基酸取代;并且轻链可变区CDR2序列包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:24、37、50、66、69、82、95、110、113、126、142、145和346的氨基酸序列及其保守修饰形式,例如1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个保守氨基酸取代。在另一优选的实施方案中,重链可变区CDR1序列包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:20、33、46、62、78、91、106、122、138和342的氨基酸序列及其保守修饰形式,例如1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个保守氨基酸取代;并且轻链可变区CDR1序列包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:23、36、49、65、68、81、94、109、112、125、141、144和345的氨基酸序列及其保守修饰形式,例如1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个保守氨基酸取代。

[0635] 在不同的实施方案中,抗体可展现如上文(1)至(12)项列出的功能性质中的一项或多项、两项或更多项、三项或更多项、四项或更多项、五项或更多项、六项或更多项、七项或更多项、八项或更多项、九项、或全部。这样的抗体可以是例如人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0636] 还可以在非CDR或除CDR外的抗体部分中进行保守氨基酸取代。例如,可以在框架区中或在Fc区中进行保守氨基酸修饰。相对于本文中提供的抗GITR抗体序列,可变区或重链或轻链可包含1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4、1-5、1-10、1-15、1-20、1-25或1-50个保守氨基酸取代。在某些实施方案中,抗GITR抗体包含保守和非保守氨基酸修饰的组合。

[0637] VI. 与本文所述的抗体结合GITR上的相同表位或与本文所述的抗体竞争结合GITR的抗体

[0638] 还提供了与本文所述的特定抗GITR抗体(例如,抗体28F3、19D3、18E10、3C3、2G6、8A6、9G7、14E3、19H8和6G10)竞争结合GITR的抗体。基于抗体在标准GITR结合测定中竞争性抑制单克隆抗体28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10中的一者或多者与GITR结合的能力,可以鉴定这样的竞争性抗体。例如,可以

使用标准ELISA测定法或竞争性ELISA测定法,其中将重组人GITR蛋白固定在平板上,添加不同浓度的未标记的第一抗体,洗涤平板,添加标记的第二抗体,并测量标记物的量。如果递增浓度的未标记的(第一)抗体(也称为“阻断抗体”)抑制了标记的(第二)抗体的结合,则称第一抗体抑制了第二抗体与平板上的靶标的结合,或称与第二抗体竞争结合。另外地或可替代地,可以使用BIAcore分析来评估抗体竞争的能力。测试抗体抑制本文所述的抗GITR抗体与GITR的结合的能力证明所述测试抗体能够与抗体竞争结合GITR。

[0639] 因此,本申请提供了这样的抗GITR抗体:其将本文所述抗GITR抗体与细胞(例如,活化T细胞)上的GITR的结合抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%,和/或其与细胞(例如,活化T细胞)上的GITR的结合被抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%,如例如通过ELISA或FACS,如通过使用以下段落中描述的测定法测量的。

[0640] 可以如下进行示例性竞争实验,以确定例如第一抗体是否阻断第二抗体的结合(即,“与其竞争”):如下制备活化的人T细胞:使用Ficoll梯度从人全血分离外周血单核细胞(PBMC)并用10 $\mu$ g/mL的植物凝血素(PHA-L)(USBiol编号P3370-30)和200IU/mL的重组IL-2(Peprotech编号200-02)活化3天。将活化的T细胞重悬于FACS缓冲液(具有5%胎牛血清的PBS)中,并以10<sup>5</sup>个细胞/样品孔接种在96孔板中。将平板设置在冰上,随后以0至50 $\mu$ g/mL范围内的浓度(从50 $\mu$ g/mL的最高浓度开始三倍滴定)添加未缀合的第一抗体。可以使用无关IgG作为第一抗体的同种型对照且将其以相同的浓度(从50 $\mu$ g/mL的最高浓度开始三倍滴定)添加。可以包括与50 $\mu$ g/mL未标记的第二抗体一起预温育的样品作为竞争阻断(100%抑制)的阳性对照,并可使用在初始温育中无抗体的样品作为阴性对照(无竞争;0%抑制)。温育30分钟后,在不洗涤的情况下以2 $\mu$ g/mL/孔的浓度添加标记的(例如,生物素化的)第二抗体。将样品在冰上再温育30分钟。通过用FACS缓冲液洗涤细胞去除未结合的抗体。利用检测标记物的试剂(例如,用于检测生物素的PE缀合的链霉亲和素(Invitrogen,目录号S21388))检测与细胞结合的标记的第二抗体。在FACS Calibur流式细胞仪(BD, San Jose)上获取样品,并用Flowjo软件(Tree Star公司, Ashland, OR)进行分析。可将结果表示为抑制%(即,用100%减去每一浓度下标记物的量,除以在无阻断抗体情况下获得的标记物的量)。通常,然后逆向进行相同的实验,即,以第一抗体作为第二抗体,并且以第二抗体作为第一抗体。在某些实施方案中,抗体至少部分地(例如,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%)或完全(100%)阻断另一抗体与靶标(例如,人GITR或其部分)结合,并且与在一种抗体或另一种抗体作为第一抗体时是否发生抑制无关。在第一抗体和第二抗体彼此双向竞争时(即,在首先添加第一抗体的竞争实验中以及在首先添加第二抗体的竞争实验中),第一和第二抗体“交叉阻断”彼此与靶标的结合。在某些实施方案中,抗GITR抗体与本文所述的抗GITR抗体(例如,抗体28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10)结合相同表位,如例如通过给定的表位作图技术测定的。如本文中进一步论述的,28F3抗体结合在人GITR中的QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDA RCCRVTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO:215)的区域内。因此,在某些实施方案中,抗GITR抗体结合在区域QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDA RCCRVTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO:215)内的氨基酸残基,对

应于成熟人GITR (SEQ ID NO:4) 的氨基酸残基1-39。在一个实施方案中,抗GITR抗体结合成熟人GITR的区域QRPTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO:216) 内的氨基酸残基。在一个实施方案中,本文所述的抗GITR抗体结合成熟人GITR的区域PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO:217) 和CRDYPGEE (SEQ ID NO:218) 内的氨基酸残基。在某些实施方案中,抗GITR抗体结合氨基酸序列PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO:217) 和CRDYPGEE (SEQ ID NO:218),如例如使用实施例下列出的方案通过HDX确定的。

[0641] 确定抗体与本文所述的抗体结合“GITR上的相同表位”的技术包括,例如,表位作图方法,例如抗原:抗体复合物的晶体的x射线分析,其提供表位的原子解析。其他方法监测抗体与抗原片段或抗原的突变变异的结合,其中由于抗原序列内氨基酸残基的修饰导致的结合丧失经常被认为是表位组分的指示。另外,还可以使用表位作图的计算组合方法。这些方法也可能依赖于感兴趣的抗体从组合噬菌体展示肽文库中亲和分离出特异性短肽(呈天然三维形式或呈变性形式)的能力。然后,将这些肽看作是界定对应于用于筛选肽文库的抗体的表位的前导。对于表位作图,还开发了已证明可以对构象不连续表位进行作图的计算方法。

[0642] 可通过使用本领域已知的方法鉴定与本文所述的抗GITR抗体竞争结合或与其结合相同表位的抗体。例如,可以用本文所述的人GITR免疫小鼠,产生杂交瘤,并从所得的单克隆抗体筛选与本文所述的抗体竞争结合GITR的能力。也可以用含有抗体所结合的表位的GITR的较小片段免疫小鼠。可以例如通过筛选与跨越GITR的一系列重叠肽的结合来定位表位或包含表位的区域。或者,可以使用Jespersen等人,Biotechnology 12:899,1994的方法来指导选择与本文所述的抗GITR抗体具有相同表位、并因此具有相似性质的抗体。利用噬菌体展示,首先将抗GITR抗体的重链与(优选人的)轻链库进行配对,以选择结合GITR的抗体,然后将新的轻链与(优选人的)重链库进行配对,以选择与本文所述的抗GITR抗体具有相同表位或表位区域的(优选人的)结合GITR的抗体。或者,可通过诱变编码抗体的重链和轻链的cDNA获得本文所述抗体的变体。

[0643] 还可以使用如Cunningham和Wells,(1989) Science 244:1081-1085所述的丙氨酸扫描诱变或在GITR中的氨基酸残基的一些其他形式的点诱变来确定抗GITR抗体的功能表位。然而,诱变研究还可能揭示对于GITR的整体三维结构至关重要、但是不直接参与抗体-抗原接触的氨基酸残基,因此可能需要其他方法来确认使用这种方法确定的功能表位。

[0644] 还可以通过评估抗体与包含GITR的片段(例如,非变性或变性片段)的肽的结合来确定被特异性抗体结合的表位或表位区域(“表位区域”是包含表位或与表位重叠的区域)。可合成一系列涵盖GITR(例如,人GITR)的序列的重叠肽,并且例如通过直接ELISA、竞争性ELISA(其中评估肽阻止抗体结合与微量滴定板的孔结合的GITR的能力)或在芯片上筛选结合。这样的肽筛选方法可能无法检测一些不连续的功能表位,即涉及在GITR多肽链的一级序列上不连续的氨基酸残基的功能表位。

[0645] 还可通过基于MS的蛋白质足迹法(例如氢/氘交换质谱(HDX-MS)和蛋白质的快速光化学氧化(FPOP))鉴定表位。例如可以如实施例以及Wei等人(2014) Drug Discovery Today 19:95(其方法通过提述明确并入本文)中进一步描述的那样进行HDX-MS。例如可以如Hambley和Gross(2005) J.American Soc.Mass Spectrometry 16:2057(其方法通过提述明确并入本文)描述的那样进行FPOP。

[0646] 还可以通过结构学方法(比如,X射线晶体结构测定(例如,W02005/044853))、分子建模和核磁共振(NMR)光谱法(包括GITR中的不稳定酰胺氢在游离时以及结合在具有感兴趣的抗体的复合物中时的H-D交换速率的NMR测定)确定被抗GITR抗体结合的表位(Zinn-Justin等人(1992) *Biochemistry* 31,11335-11347;Zinn-Justin等人(1993) *Biochemistry* 32,6884-6891)。

[0647] 关于X射线结晶学,可使用任何本领域已知的方法来完成结晶(例如Giege等人(1994) *Acta Crystallogr.* D50:339-350;McPherson(1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1-23),这些方法包括微批量法(microbatch)(例如Chayen(1997) *Structure* 5:1269-1274)、悬滴汽相扩散法(例如McPherson(1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300-6303)、接种和透析。需要使用具有至少约1mg/mL、且优选约10mg/mL至约20mg/mL浓度的蛋白质制剂。在含有聚乙二醇1000-20,000(PEG;平均分子量在约1000Da至约20,000Da的范围内,优选约5000Da至约7000Da,更优选约6000Da)的沉淀剂溶液中可以最佳地实现结晶,其中浓度在约10%至约30%(w/v)的范围内。还期望包括蛋白稳定剂,例如甘油,其浓度在约0.5%至约20%的范围内。在沉淀剂溶液中还需要适宜的盐(比如氯化钠、氯化锂或柠檬酸钠),其浓度优选在约1mM至约1000mM范围内。优选地将沉淀剂缓冲至约3.0至约5.0、优选约4.0的pH。可用于沉淀剂溶液中的具体缓冲剂可以变化并且是本领域熟知的(Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 第三版, (1994) Springer-Verlag, New York)。有用的缓冲剂的实例包括但不限于HEPES、Tris、MES和乙酸盐。晶体可以在宽范围的温度(包括2°C、4°C、8°C和26°C)下生长。

[0648] 可使用熟知的X射线衍射技术研究抗体:抗原晶体,并且可使用电脑软件(比如X-PLOR(Yale University,1992,由Molecular Simulations公司发布;例如参见Blundell&Johnson(1985) *Meth. Enzymol.* 114&115,H.W.Wyckoff等人编辑,Academic Press;美国专利申请公开号2004/0014194)以及BUSTER(Bricogne(1993) *Acta Cryst.* D49:37-60;Bricogne(1997) *Meth. Enzymol.* 276A:361-423,Carter和Sweet编辑;Roversi等人(2000) *Acta Cryst.* D56:1313-1323)对其进行精制,将这些参考文献的公开内容通过提述完整并入本文。

[0649] 抗GITR抗体可与任何具有本文所述的氨基酸序列的抗GITR抗体结合相同表位,如通过表位作图技术(如本文所述的技术)确定的。

[0650] VII. 工程改造的修饰的抗体

[0651] VH和VL区

[0652] 还提供了工程改造的修饰的抗体,所述抗体可以使用具有本文中公开的一个或多个V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>序列的抗体作为起始材料将修饰的抗体工程改造而制得,所述修饰的抗体可具有相比于起始抗体的改变的性质。可以通过修饰例如处于一个或多个CDR区和/或一个或多个框架区内的一个或两个可变区(即,V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>)内的一个或多个残基将抗体工程改造。另外地或可替代地,可以通过修饰恒定区内的残基将抗体工程改造,以便例如改变抗体的效应子功能。

[0653] 可以实施的可变区工程改造的一种类型是CDR移植。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)内的氨基酸残基与靶抗原相互作用。由于这个原因,在各个抗体之间的CDR内的氨基酸序列比CDR外部的序列更加多样化。由于CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,因此有可能通过构建表达载体来表达模拟特定的天然存在抗体的性质的重组抗

体,所述表达载体包含来自特定的天然存在的抗体的CDR序列,这些CDR序列被移植到来自具有不同性质的不同抗体的框架序列上(参见,例如,Riechmann,L.等人,(1998) *Nature* 332:323-327; Jones,P.等人,(1986) *Nature* 321:522-525; Queen,C.等人,(1989) *Proc.Natl.Acad.* 参见U.S.A.86:10029-10033;授予Winter的美国专利No.5,225,539和授予Queen等人的美国专利No.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0654] 因此,本文所述的另一实施方案涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含分别选自下组的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:20、33、46、62、78、91、106、122、138和342;SEQ ID NO:21、34、47、63、79、92、107、123、139和343;以及SEQ ID NO:22、35、48、64、80、93、108、124、140和344;所述轻链可变区包括包含分别选自下组的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:23、36、49、65、68、81、94、109、112、125、141、144和345;SEQ ID NO:24、37、50、66、69、82、95、110、113、126、142、145和346;以及SEQ ID NO:25、38、51、67、70、83、96、111、114、127、143、146和347。因此,这样的抗体含有单克隆抗体28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub> CDR序列,但也可含有与这些抗体不同的框架序列。

[0655] 这样的框架序列可以从公共DNA数据库或公开的包含种系抗体基因序列的参考文献中获得。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”人种系序列数据库(可以在互联网[www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)访问)以及下列文献中找到:Kabat,E.A.等人,(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242; Tomlinson,I.M.等人,(1992) "The Repertoire of Human Germline V<sub>H</sub> Sequences Reveals about Fifty Groups of V<sub>H</sub> Segments with Different Hypervariable Loops" *J.Mol.Biol.* 227:776-798;和Cox,J.P.L.等人,(1994) "A Directory of Human Germ-line V<sub>H</sub> Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur.J.Immunol.* 24:827-836;将每一文献的内容明确地通过提述并入本文。

[0656] 用于本文所述的抗体的优选框架序列是与本文所述的抗体所用的框架序列在结构上相似的那些框架序列。V<sub>H</sub> CDR1、2和3序列以及V<sub>L</sub> CDR1、2和3序列可以被移植到具有与在框架区序列所来源的种系免疫球蛋白基因中发现的相同的序列的框架区上,或者CDR序列可以被移植到与种系序列相比含有一个或多个突变的框架区上。例如,已经发现,在某些情况下,对框架区内的残基进行突变以保持或增强抗体的抗原结合能力是有利的(参见,例如授予Queen等人的美国专利No.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0657] 本文所述的工程改造的抗体包括其中V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>内的框架残基被修饰的那些,例如以便改进抗体的性质。一般来说,为了降低抗体的免疫原性而进行这样的框架修饰。例如,一个方法是将一个或多个框架残基“回复突变”成相应的种系序列。更具体地说,经过体细胞突变的抗体可能含有与该抗体所来源的种系序列不同的框架残基。这样的残基可以通过比较抗体框架序列与抗体所来源的种系序列加以鉴定。为了使所述框架区序列恢复其种系构型,可以通过例如定点诱变或PCR介导的诱变将体细胞突变“回复突变”成其种系序列。预期也涵盖这样的“回复突变”的抗体。

[0658] 另一个类型的框架修饰涉及突变在框架区内、或甚至在一个或多个CDR区内的一



个或多个残基,以去除T细胞表位,由此降低抗体的潜在免疫原性。这种方法也称为“去免疫(deimmunization)”,并且在授予Carr等人的美国专利公开No.20030153043中有更详细的描述。

[0659] 另一种类型的可变区修饰是突变 $V_H$ 和/或 $V_L$ CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基,由此提高感兴趣抗体的一种或多种结合性质(例如,亲和力)。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入突变,并且可以在如本文所述并且在实施例中提供的体外或体内测定中评价对抗体结合或其他感兴趣的功能性质的影响。优选地,引入保守修饰(如上文论述)。突变可以是氨基酸取代、添加或缺失,但优选取代。而且,一般改变CDR区内的不超过一个、二个、三个、四个或五个残基。

[0660] 因此,还提供了包含重链可变区的分离的抗GITR单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:(a)  $V_H$  CDR1区,其包含选自SEQ ID NO:20、33、46、62、78、91、106、122、138和342的氨基酸序列或与SEQ ID NO:20、33、46、62、78、91、106、122、138和342相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(b)  $V_H$  CDR2区,其包含选自SEQ ID NO:21、34、47、63、79、92、107、123、139和343的氨基酸序列或与SEQ ID NO:21、34、47、63、79、92、107、123、139和343相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(c)  $V_H$  CDR3区,其包含选自SEQ ID NO:22、35、48、64、80、93、108、124、140和344的氨基酸序列或与SEQ ID NO:22、35、48、64、80、93、108、124、140和344相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(d)  $V_L$  CDR1区,其包含选自SEQ ID NO:23、36、49、65、68、81、94、109、112、125、141、144和345的氨基酸序列或与SEQ ID NO:23、36、49、65、68、81、94、109、112、125、141、144和345相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(e)  $V_L$  CDR2区,其包含选自SEQ ID NO:24、37、50、66、69、82、95、110、113、126、142、145和346的氨基酸序列或与SEQ ID NO:24、37、50、66、69、82、95、110、113、126、142、145和346相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;以及(f)  $V_L$  CDR3区,其包含选自SEQ ID NO:25、38、51、67、70、83、96、111、114、127、143、146和347的氨基酸序列或与SEQ ID NO:25、38、51、67、70、83、96、111、114、127、143、146和347相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。

[0661] 抗体CDR中的甲硫氨酸残基可能被氧化,导致潜在的化学降解和随后抗体效力的降低。因此,还提供了这样的抗GITR抗体,其重链和/或轻链CDR中的一个或多个甲硫氨酸残基被不会发生氧化降解的氨基酸残基代替。在一个实施方案中,抗体28F3、18E10、19D3和6G10的CDR中的甲硫氨酸残基被不会发生氧化降解的氨基酸残基代替。

[0662] 类似地,可以从抗GITR抗体、具体而言从CDR中去除脱酰胺化位点。

[0663] Fc和修饰的Fc

[0664] 本文所述的抗GITR可变区可与Fc连接(例如,共价连接或融合),例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc,其可属于任何同种异型或异同种异型(isoallotype),例如对于IgG1:G1m、G1m1(a)、G1m2(x)、G1m3(f)、G1m17(z);对于IgG2:G2m、G2m23(n);对于IgG3:G3m、G3m21(g1)、G3m28(g5)、G3m11(b0)、G3m5(b1)、G3m13(b3)、G3m14(b4)、G3m10(b5)、G3m15(s)、G3m16(t)、G3m6(c3)、G3m24(c5)、G3m26(u)、G3m27(v);并且对于K:Km、Km1、Km2、Km3(例如,参见Jefferies等人(2009)mAbs 1:1)。

[0665] 在某些实施方案中,本文所述的抗GITR可变区与结合一或多种活化Fc受体(Fc $\gamma$  I、Fc $\gamma$  IIa或Fc $\gamma$  IIIa)的Fc连接,由此刺激ADCC并可引起T细胞耗竭。在某些实施方案中,本文所述的抗GITR可变区与可引起耗竭的Fc连接。如实施例(实施例16和17)中进一步描述的,在几种小鼠肿瘤模型中,小鼠IgG2a和大鼠IgG2b同种型(在与小鼠活化FcR的结合方面等效于小鼠IgG2a)诱导了肿瘤生长的最大抑制。抗GITR mG2a、mG2b和rG2b同种型对外周Treg群体的影响很小或诱导外周中Treg群体的小量增加,但诱导了肿瘤环境中的显著Treg耗竭(其与肿瘤生长抑制相关)。相反,mIgG2a同种型引起肿瘤部位处CD8+细胞的百分比增加,而mIgG1和大鼠IgG2b不引起CD8+细胞的百分比增加或仅引起略微增加。因此,在某些实施方案中,本文所述的抗GITR可变区与人IgG1或IgG3Fc连接,即抗体属于IgG1或IgG3同种型。在某些实施方案中,抗GITR抗体是消耗性抗体,具体而言它们使肿瘤微环境中的T<sub>reg</sub>细胞耗竭(由此增强抗肿瘤活性),但不使肿瘤微环境中的T<sub>eff</sub>细胞显著耗竭,并且介导抗肿瘤效应,和/或不使肿瘤外部例如在外周的T<sub>reg</sub>和T<sub>eff</sub>细胞显著耗竭。在某些实施方案中,抗GITR抗体属于这样的同种型(天然存在或非天然存在的(例如,包括突变)同种型),其刺激肿瘤部位的T<sub>reg</sub>细胞耗竭或消除以及T<sub>eff</sub>细胞的伴随活化。在某些实施方案中,抗GITR抗体在肿瘤部位产生升高的T<sub>eff</sub>与T<sub>reg</sub>比率,这指示有效力的抗肿瘤活性,且优选地不使肿瘤外部例如在外周的T<sub>reg</sub>和T<sub>eff</sub>细胞显著耗竭。在某些实施方案中,抗GITR抗体阻断Treg的免疫抑制性活性。在某些实施方案中,抗GITR抗体具有无FcR结合或具有降低的FcR结合(例如,降低的与活化FcR的结合)的Fc受体。在某些实施方案中,抗GITR抗体具有与FcRIIb结合或具有增强的与FcRIIb的结合的Fc,这可以提供增强的激动作用。

[0666] 在某些实施方案中,通过包括选择、设计或修饰抗体的Fc区以便增强所述Fc区与活化Fc受体的结合的方法使抗GITR抗体增强内源性免疫应答的效力增强、优化或最大化。在一个实施方案中,抗GITR抗体是TRX-518。

[0667] 在某些实施方案中,本文所述的抗GITR可变区与无效应子或大部分无效应子的Fc连接,例如IgG2或IgG4。

[0668] 本文所述的抗GITR可变区可与非天然存在的Fc区(例如,无效应子Fc或具有增强的与一种或多种活化Fc受体(Fc $\gamma$  I、Fc $\gamma$  IIa或Fc $\gamma$  IIIa)的结合的Fc)连接,例如以增强肿瘤环境中的T<sub>reg</sub>耗竭。

[0669] 通常,通常为了改变抗体的一种或多种功能性质,比如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞介导的细胞毒性,本文所述的可变区可与包含一个或多个修饰的Fc连接。此外,为了改变抗体的一或多种功能性质,本文所述的抗体可被化学修饰(例如,可将一个或多个化学模块附接至抗体)或被修饰为改变其糖基化。这些实施方案的每一者进一步详述于下文。Fc区中残基的编号依据为Kabat的EU索引。

[0670] Fc区包括衍生自免疫球蛋白,优选人免疫球蛋白的恒定区的结构域,包括恒定区的片段、类似物、变体、突变体或衍生物。适合的免疫球蛋白包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4,和其他类型如IgA、IgD、IgE和IgM。免疫球蛋白的恒定区定义为与免疫球蛋白C端区同源的天然存在或合成产生的多肽,且可包括单独的CH1结构域、铰链、CH2结构域、CH3结构域或CH4结构域,或其组合。

[0671] 免疫球蛋白的恒定区负责许多重要的抗体功能,包括Fc受体(FcR)结合和补体结合。有五种主要的重链恒定区类别,分类为IgA、IgG、IgD、IgE、IgM,每一种具有由同种型指

定的特征性效应子功能。例如, IgG可以分成4个亚类, 称作IgG1、IgG2、IgG3、和IgG4。

[0672] Ig分子与多种类别的细胞受体相互作用。例如, IgG分子与对IgG抗体类别特异的三种类别的Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)相互作用, 即Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII、和Fc $\gamma$ RIII。已经报道与Fc $\gamma$ R受体结合的IgG的重要序列位于CH2和CH3结构域中。抗体的血清半衰期受到抗体与Fc受体(FcR)结合的能力的影响。

[0673] 在某些实施方案中, Fc区是变体Fc区, 例如, Fc序列相对于亲本Fc序列(例如, 未经修饰的Fc多肽, 其随后被修饰以产生变体)已被修饰(例如, 通过氨基酸取代、缺失和/或插入), 以提供期望的结构特征和/或生物活性。

[0674] 例如, 可以在Fc区中进行修饰以产生具有(a)增加或降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、(b)增加或降低的补体介导的细胞毒作用(CDC)、(c)增加或降低的对C1q的亲合力、和/或(d)相对于亲本Fc增加或降低的亲合力的Fc变体。这样的Fc区变体通常包括Fc区中的至少一个氨基酸修饰。组合性氨基酸修饰被认为是特别期望的。例如, 变体Fc区可以在其中包含二个、三个、四个、五个等取代, 例如在本文中鉴定的特定Fc区位置的取代。

[0675] 变体Fc区还可包含序列改变, 其中参与二硫键形成的氨基酸被去除或被其他氨基酸代替。这样的去除可避免与用于产生本文所述的抗体的宿主细胞中存在的其他含半胱氨酸的蛋白质反应。即使在半胱氨酸被去除后, 单链Fc结构域仍能够形成非共价地保持在一起的二聚体Fc结构域。在其他实施方案中, 可以修饰Fc区, 使其与选定的宿主细胞更加相容。例如, 可以去除典型的天然Fc区N端附近的PA序列, 该序列可以被大肠杆菌内的消化酶, 如脯氨酸亚氨基肽酶识别。在其他实施方案中, 可以去除Fc结构域内的一个或多个糖基化位点。通常被糖基化的残基(例如, 天冬酰胺)可提供细胞溶解反应。可以使这样的残基缺失或者用非糖基化的残基(例如, 丙氨酸)取代。在其他实施方案中, 可以将参与补体相互作用的位点, 例如C1q结合位点, 从Fc区中去除。例如, 可以缺失或取代人IgG1的EKK序列。在某些实施方案中, 可以去除影响与Fc受体结合的位点, 优选为补救受体结合位点之外的位点。在其他实施方案中, 可以修饰Fc区以去除ADCC位点。ADCC位点是本领域已知的; 关于IgG1中的ADCC位点参见例如Molec. Immunol. 29(5):633-9(1992)。变体Fc结构域的具体实例公开于例如W097/34631和W0 96/32478中。

[0676] 在一个实施方案中, 修饰Fc的铰链区而使得铰链区中的半胱氨酸残基数目改变, 例如增加或减少。这个方法进一步描述于授予Bodmer等人的美国专利No. 5,677,425中。改变Fc铰链区中的半胱氨酸残基数目是为了, 例如, 促进轻链和重链的组装、或增加或降低抗体的稳定性。在一个实施方案中, 使抗体的Fc铰链区突变以缩短抗体的生物半衰期。更具体地说, 在Fc-铰链片段的CH2-CH3结构域界面区内引入一个或多个氨基酸突变, 使得相对于天然Fc-铰链结构域与葡萄球菌蛋白A(SpA)的结合, 该抗体与SpA结合受损。这个方法进一步详细描述于授予Ward等人的美国专利No. 6,165,745中。

[0677] 在其他实施方案中, 通过用不同的氨基酸残基代替至少一个氨基酸残基改变Fc区, 从而改变抗体的效应子功能。例如, 选自氨基酸残基234、235、236、237、297、318、320和322的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸残基代替, 使得抗体对效应子配体的亲和力改变, 但是保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力被改变的效应子配体可以是, 例如, Fc受体或补体的C1组分。这个方法更详细地描述于授予Winter等人的美国专利No. 5,624,821和

5,648,260中。

[0678] 在另一个实例中,选自氨基酸残基329、331和322的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸残基代替,使得抗体的C1q结合改变和/或补体依赖的细胞毒作用(CDC)降低或消除。这个方法进一步详细描述于授予Idusogie等人的美国专利No.6,194,551中。

[0679] 在另一个实例中,氨基酸位置231和239内的一个或多个氨基酸残基被改变,从而改变抗体结合补体的能力。这个方法进一步描述于授予Bodmer等人的PCT公开W0 94/29351中。

[0680] 在又一个实例中,可通过修饰以下位置处的一个或多个氨基酸来修饰Fc区以增加抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和/或增加对Fc $\gamma$ 受体的亲和力:234、235、236、238、239、240、241、243、244、245、247、248、249、252、254、255、256、258、262、263、264、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、299、301、303、305、307、309、312、313、315、320、322、324、325、326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、433、434、435、436、437、438或439。示例性取代包括236A、239D、239E、268D、267E、268E、268F、324T、332D、和332E。示例性变体包括239D/332E、236A/332E、236A/239D/332E、268F/324T、267E/268F、267E/324T、和267E/268F/324T。其他用于增强Fc $\gamma$ R和补体相互作用的修饰包括但不限于如下取代:298A、333A、334A、326A、247I、339D、339Q、280H、290S、298D、298V、243L、292P、300L、396L、305I、和396L。这些和其他修饰综述于Strohl,2009,Current Opinion in Biotechnology 20:685-691中。

[0681] 增加与Fc $\gamma$ 受体结合的Fc修饰包括在Fc区的如下氨基酸位置的任何一个或多个处的氨基酸修饰:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、279、280、283、285、298、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、312、315、324、327、329、330、335、337、338、340、360、373、376、379、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439,其中Fc区中残基的编号根据是Kabat中的EU索引(W000/42072)。

[0682] 可以对Fc进行的其他Fc修饰包括为了减少或消减与Fc $\gamma$ R和/或补体蛋白结合、由此减少或消减Fc介导的效应子功能(比如ADCC、ADCP、和CDC)的修饰。示例性修饰包括但不限于在位置234、235、236、237、267、269、325、和328处的取代、插入和缺失,其中编号的根据是EU索引。示例性取代包括但不限于234G、235G、236R、237K、267R、269R、325L、和328R,其中编号的根据是EU索引。Fc变体可以包括236R/328R。其他为了降低Fc $\gamma$ R和补体相互作用的修饰包括取代297A、234A、235A、237A、318A、228P、236E、268Q、309L、330S、331S、220S、226S、229S、238S、233P、和234V,以及通过突变或酶学手段或通过在不使蛋白质糖基化的生物(如细菌)中生产而去除在位置297处的糖基化。这些和其他修饰综述于Strohl,2009,Current Opinion in Biotechnology 20:685-691中。

[0683] 任选地,Fc区可以包含在本领域技术人员已知的另外和/或替代位置处的非天然存在的氨基酸残基(参见,例如美国专利No.5,624,821;6,277,375;6,737,056;6,194,551;7,317,091;8,101,720;PCT专利公开W0 00/42072;W0 01/58957;W0 02/06919;W0 04/016750;W0 04/029207;W0 04/035752;W0 04/074455;W0 04/099249;W0 04/063351;W0 05/070963;W0 05/040217;W0 05/092925和W0 06/020114)。

[0684] 还可以使用增强对抑制性受体Fc $\gamma$ R11b的亲合力的Fc变体。这样的变体可以给Fc融合蛋白提供与Fc $\gamma$ R11b<sup>+</sup>细胞(包括,例如,B细胞和单核细胞)相关的免疫调制活性。在一个实施方案中,Fc变体提供了相对于一种或多种活化受体的选择性增强的与Fc $\gamma$ R11b的亲合力。用于改变与Fc $\gamma$ R11b结合的修饰包括选自在根据EU索引的位置234、235、236、237、239、266、267、268、325、326、327、328、和332处的一个或多个修饰。用于增强Fc $\gamma$ R11b亲和力的示例性取代包括但不限于:234D、234E、234F、234W、235D、235F、235R、235Y、236D、236N、237D、237N、239D、239E、266M、267D、267E、268D、268E、327D、327E、328F、328W、328Y、和332E。示例性取代包括235Y、236D、239D、266M、267E、268D、268E、328F、328W、和328Y。其他为了增强与Fc $\gamma$ R11b结合的Fc变体包括235Y/267E、236D/267E、239D/268D、239D/267E、267E/268D、267E/268E、和267E/328F。

[0685] Fc区与其配体的亲和力和结合性质可以通过本领域已知的多种体外测定方法(基于生物化学或免疫学的测定法)加以确定,包括但不限于,平衡法(例如,酶联免疫吸附测定法(ELISA)、或放射免疫测定(RIA))、或动力学(例如,BIACORE分析)、和其他方法,如间接结合测定法、竞争性抑制测定法、荧光共振能量转移(FRET)、凝胶电泳和色谱法(例如,凝胶过滤)。这些方法和其他的方法可以利用位于一个或多个被检查的组分上的标记物和/或采用多种检测方法,包括但不限于,生色、荧光、发光、或同位素标记物。关于结合亲和力和动力学的详细描述可以在侧重于抗体-免疫原相互作用的Paul, W.E. 编辑的Fundamental Immunology, 第4版, Lippincott-Raven, Philadelphia (1999) 中找到。

[0686] 在某些实施方案中,修饰抗体以增加其生物半衰期。不同的方法是可能的。例如,这可以通过增加Fc区对FcRn的结合亲和力来实现。例如,下列残基中的一个或多个可以被突变:252、254、256、433、435、436,如美国专利No. 6,277,375所述。具体的示例性取代包括以下一者或多者:T252L、T254S和/或T256F。可替代地,为了增加生物半衰期,可以改变抗体的CH1或CL区,使之含有取自IgG Fc区CH2结构域的两个环的补救受体结合表位,如Presta等人的美国专利No. 5,869,046和6,121,022中所述。增加与FcRn结合和/或改善药代动力学性质的其他示例性变体包括在位置259、308、428、和434处的取代,包括例如259I、308F、428L、428M、434S、434H、434F、434Y、和434M。其他增加Fc与FcRn结合的变体包括:250E、250Q、428L、428F、250Q/428L (Hinton等人,2004,J. Biol. Chem. 279 (8):6213-6216, Hinton等人,2006 Journal of Immunology 176:346-356)、256A、272A、286A、305A、307A、307Q、311A、312A、376A、378Q、380A、382A、434A (Shields等人, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (9):6591-6604)、252F、252T、252Y、252W、254T、256S、256R、256Q、256E、256D、256T、309P、311S、433R、433S、433I、433P、433Q、434H、434F、434Y、252Y/254T/256E、433K/434F/436H、308T/309P/311S (Dall'Acqua等人, Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua等人, 2006, Journal of Biological Chemistry 281:23514-23524)。其他用于调制FcRn结合的修饰描述于Yeung等人, 2010, J. Immunol, 182:7663-7671中。在某些实施方案中,可以使用具有特定生物学特征的杂合IgG同种型。例如,通过将IgG1的CH2和/或CH3区中的位置替换为来自IgG3中的在这两种同种型之间存在差异的位置上的氨基酸,可以构建IgG1/IgG3杂合变体。因此,可以构建这样的杂合变体IgG抗体,其包含一个或多个取代,例如274Q、276K、300F、339T、356E、358M、384S、392N、397M、422I、435R、和436F。在本文所述的其他实施方案中,通过将IgG2的CH2和/或CH3区中的位置替换为来自

IgG1中的在这两种同种型之间存在差异的位置上的氨基酸,可以构建IgG1/IgG2杂合变体。因此,可以构建这样的杂合变体IgG抗体,其包含一个或多个取代,例如一个或多个如下的氨基酸取代:233E、234L、235L、-236G(是指位置236处插入甘氨酸)、和327A。

[0687] 而且,人IgG1上的针对Fc $\gamma$ R1、Fc $\gamma$ RII、Fc $\gamma$ RIII和FcRn的结合位点已经被定位,并且具有改善结合的变体已有描述(参见Shields,R.L.等人(2001)J.Biol.Chem.276:6591-6604)。在位置256、290、298、333、334和339的特定突变显示可改善与Fc $\gamma$ RIII的结合。另外,以下组合突变体显示出改善Fc $\gamma$ RIII结合:T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A和S298A/E333A/K334A,已显示其展现增强的Fc $\gamma$ RIIIa结合和ADCC活性(Shields等人,2001)。已鉴定了具有强烈增强的与Fc $\gamma$ RIIIa结合的其他IgG1变体,包括具有S239D/I332E和S239D/I332E/A330L突变的变体,其在食蟹猴中显示对Fc $\gamma$ RIIIa的亲合力最大增加、Fc $\gamma$ RIIb结合减少以及强的细胞毒活性(Lazar等人,2006)。抗体(比如阿伦单抗(alemtuzumab)(CD52特异性)、曲妥珠单抗(trastuzumab)(HER2/neu特异性)、利妥昔单抗(rituximab)(CD20特异性)和西妥昔单抗(cetuximab)(EGFR特异性))中三重突变的引入转换成大大增强的体外ADCC活性,并且S239D/I332E变体在猴中显示增强的使B细胞耗竭的能力(Lazar等人,2006)。另外,已鉴定了含有L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L突变的IgG1突变体,其在B细胞恶性肿瘤和乳腺癌模型中在表达人Fc $\gamma$ RIIIa的转基因小鼠中展现增强的Fc $\gamma$ RIIIa结合和同时增强的ADCC活性(Stavenhagen等人,2007;Nordstrom等人,2011)。可使用的其他Fc突变体包括:S298A/E333A/L334A、S239D/I332E、S239D/I332E/A330L、L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L和M428L/N434S。

[0688] 在某些实施方案中,选择具有降低的与Fc $\gamma$ R结合的Fc。具有降低的Fc $\gamma$ R结合的示例性Fc(例如,IgG1Fc)包含以下三个氨基酸取代:L234A、L235E和G237A。

[0689] 在某些实施方案中,选择具有降低的补体结合的Fc。具有降低的补体结合的示例性Fc(例如,IgG1Fc)具有以下两个氨基酸取代:A330S和P331S。

[0690] 在某些实施方案中,选择基本上无效应子功能的Fc,即,它具有降低的与Fc $\gamma$ R结合及降低的补体结合。无效应子的示例性Fc(例如,IgG1Fc)包含以下五个突变:L234A、L235E、G237A、A330S和P331S。包含这些突变的示例性重链在表15中列出。

[0691] 在使用IgG4恒定结构域时,其通常优选包括取代S228P,该取代模拟IgG1中的铰链序列并由此使IgG4分子稳定。

[0692] 在又一个实施方案中,抗体的糖基化被修饰。例如,可以制造无糖基化抗体(即,缺乏糖基化的抗体)。可以改变糖基化,以便例如增加抗体对抗原的亲合力。这样的碳水化合物修饰可以通过,例如,改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或更多个氨基酸取代,其导致一个或更多个可变区框架糖基化位点的消除,由此消除该位点的糖基化。这种无糖基化可以增加抗体对抗原的亲合力。这样的方法更详细地描述于授予Co等人的美国专利No.5,714,350和6,350,861中。

[0693] 通过将N297残基突变成另一残基(例如,N297A)和/或通过突变相邻氨基酸(例如,298)由此降低N297上的糖基化,可以防止恒定区N297上的糖基化。

[0694] 另外地或替代地,可以制造具有改变的糖基化类型的抗体,比如具有减少的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化抗体或者具有增加的二等分G1cNac结构的抗体。这种改变的糖基化模式已被证明可增加抗体的ADCC能力。可以通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细

胞中表达抗体来实现这样的碳水化合物修饰。具有改变的糖基化机制的细胞在本领域已有描述,并可以将其用作在其中表达本文所述的重组抗体的宿主细胞,由此产生具有改变的糖基化的抗体。例如,Hanai等人的EP 1,176,195描述了一种细胞系,其具有功能破坏的FUT8基因(该基因编码岩藻糖基转移酶),使得在这种细胞系中表达的抗体表现出低岩藻糖化。Presta的PCT公开W0 03/035835描述了一种变体CHO细胞系Lec13细胞,其具有降低的将岩藻糖附接在Asn(297)-连接的碳水化合物上的能力,同样导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖化(另见Shields,R.L.等人,(2002) J.Biol.Chem. 277:26733-26740)。Umana等人的PCT公开W0 99/54342描述了这样的细胞系,其被工程改造为表达糖蛋白修饰性糖基转移酶(例如, $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖氨基转移酶III(GnTIII)),使得在所述工程改造的细胞系中表达的抗体展现增加的二等分GlcNac结构,导致抗体的ADCC活性增加(另见,Umana等人(1999) Nat.Biotech. 17:176-180)。

[0695] 本文所述的抗体的另一修饰是聚乙二醇化。可以将抗体聚乙二醇化,以便例如增加抗体的生物(例如,血清)半衰期。为了将抗体聚乙二醇化,通常在一个或多个PEG基团附接在抗体或抗体片段上的条件下,使抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)比如PEG的反应性酯或醛衍生物反应。优选地,通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应进行聚乙二醇化。如本文中使用的,术语“聚乙二醇”意图涵盖任何形式的用于衍生化其他蛋白质的PEG,比如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中,有待聚乙二醇化的抗体是无糖基化抗体。用于聚乙二醇化蛋白质的方法是本领域已知的,并可用于本文所述的抗体。参见例如,Nishimura等人的EP 0 154 316和Ishikawa等人的EP 0 401 384。

[0696] VIII. 抗体的物理性质

[0697] 本文所述的抗体可在轻链或重链可变区中含有一个或多个糖基化位点。由于改变的抗原结合,这样的糖基化位点可增加抗体的免疫原性或改变抗体的pK(Marshall等人(1972) Annu Rev Biochem 41:673-702;Gala和Morrison(2004) J.Immunol 172:5489-94;Wallick等人(1988) J Exp Med 168:1099-109;Spiro(2002) Glycobiology 12:43R-56R;Parekh等人(1985) Nature 316:452-7;Mimura等人(2000) Mol Immunol 37:697-706)。已知糖基化在含有N-X-S/T序列的基序处发生。在一些情况下,优选具有不含可变区糖基化的抗GITR抗体。这可以通过选择可变区中不含糖基化基序的抗体或通过使糖基化区域内的残基突变来实现。

[0698] 在某些实施方案中,本文所述的抗体不含天冬酰胺同分异构位点。可在N-G或D-G序列上发生天冬酰胺的脱酰胺,导致生成异天冬氨酸残基,该残基向多肽链中引入扭结,降低其稳定性(异天冬氨酸效应)。

[0699] 每一抗体将具有独特等电点(pI),其通常在6与9.5之间的pH范围内。IgG1抗体的pI通常通常在7-9.5的pH范围内,IgG4抗体的pI通常在6-8的pH范围内。有推测认为,pI在正常范围外的抗体可能在体内条件下具有一定的展开和不稳定性。因此,优选具有含有在正常范围内的pI值的抗GITR抗体。这可通过选择pI在正常范围内的抗体或使带电表面残基突变来实现。

[0700] 每一抗体将具有特征性熔融温度,其中熔融温度越高指示体内总稳定性越好(Krishnamurthy R和Manning M C(2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71)。通常,优选

地,  $T_{m1}$  (初始展开的温度) 大于60℃、优选大于65℃、甚至更优选大于70℃。可使用差示扫描量热法 (Chen等人 (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando等人 (1999) Immunol Lett 68: 47-52) 或圆二色性 (Murray等人 (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9) 来测量抗体的熔点。

[0701] 在优选的实施方案中, 选择不快速降解的抗体。可使用毛细管电泳 (CE) 和MALDI-MS (Alexander A J和Hughes D E (1995) Anal Chem 67:3626-32) 来测量抗体的降解。

[0702] 在另一优选的实施方案中, 选择具有最小聚集效应的抗体, 聚集效应可导致触发不期望的免疫应答和/或改变的或不利的药代动力学性质。通常, 聚集度为25%或更小、优选20%或更小、甚至更优选15%或更小、甚至更优选10%或更小且甚至更优选5%或更小的抗体是可接受的。可通过若干技术 (包括尺寸排阻色谱柱 (SEC)、高效液相色谱法 (HPLC) 和光散射) 来测量聚集度。

[0703] IX. 工程改造抗体的方法

[0704] 如上文论述的, 可使用具有本文中公开的 $V_H$ 和 $V_L$ 序列的抗GITR抗体, 以便通过修饰 $V_H$ 和/或 $V_L$ 序列或与其附接的恒定区来产生新的抗GITR抗体。因此, 在本文所述的另一方面, 使用本文所述的抗GITR抗体 (例如28F3、19D3、18E10、3C3、2G6、8A6、9G7、14E3、19H8和6G10) 的结构特征以产生结构相关的抗GITR抗体, 其保留本文所述抗体的至少一种功能性质, 比如与人GITR和食蟹猴GITR结合。例如, 可将28F3、19D3、18E10、3C3、2G6、8A6、9G7、14E3、19H8和6G10或其突变的一个或多个CDR区与已知框架区和/或其他CDR以重组方式组合以产生另外的重组工程改造的本文所述的抗GITR抗体, 如上文论述的。其他类型的修饰包括在前一部分中描述的那些。用于工程改造方法的起始材料为在本文中提供的 $V_H$ 和/或 $V_L$ 序列或其一个或多个CDR区中的一种或多种。为产生工程改造的抗体, 不必在实际上制备 (即, 表达为蛋白质) 具有在本文中提供的 $V_H$ 和/或 $V_L$ 序列或其一个或多个CDR区中的一种或多种的抗体。而是, 使用序列中所含的信息作为起始材料以产生衍生自初始序列的“第二代”序列, 且然后制备“第二代”序列并使其表达为蛋白质。

[0705] 因此, 本申请提供了制备抗GITR抗体的方法, 其包括:

[0706] (a) 提供: (i) 重链可变区抗体序列, 其包含选自SEQ ID NO: 20、33、46、62、78、91、106、122、138和342的CDR1序列、选自SEQ ID NO: 21、34、47、63、79、92、107、123、139和343的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO: 22、35、48、64、80、93、108、124、140和344的CDR3序列; 以及 (ii) 轻链可变区抗体序列, 其包含选自SEQ ID NO: 23、36、49、65、68、81、94、109、112、125、141、144和345的CDR1序列、选自SEQ ID NO: 24、37、50、66、69、82、95、110、113、126、142、145和346的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO: 25、38、51、67、70、83、96、111、114、127、143、146和347的CDR3序列;

[0707] (b) 改变重链可变区抗体序列和/或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基以产生至少一个改变的抗体序列; 并且

[0708] (c) 使所述改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0709] 可使用标准分子生物学技术来制备和表达所述改变的抗体序列。

[0710] 优选地, 由所述改变的抗体序列编码的抗体是保留本文所述的抗GITR抗体的功能性质中的一项、一些或全部的抗体, 这些功能性质包括:

[0711] (1) 与可溶性人GITR结合, 例如以10nM或更低 (例如, 0.01nM至10nM) 的 $K_D$ , 如例如通过Biacore测量的;



[0712] (2) 与膜结合的人GITR结合,例如以1nM或更低(例如,0.01nM至1nM)的 $K_D$ ,如例如通过Scatchard测量的;

[0713] (3) 与膜结合的人GITR结合,例如以1nM或更低(例如,0.01nM至1nM)的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0714] (4) 与食蟹猴GITR结合,例如与膜结合的食蟹猴GITR结合,例如以10nM或更低(例如,0.01nM至10nM)的 $EC_{50}$ ,如例如通过FACS测量的;

[0715] (5) 诱导或增强T细胞活化,比如在CD3衔接存在下(例如,在次最佳抗CD3浓度存在下),如通过(i)在表达GITR的T细胞中的IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生增加和/或(ii)T细胞增殖增强证明的;

[0716] (6) 诱导或增强T细胞活化而无需多价交联;

[0717] (7) 抑制GITR配体与3A9-hGITR细胞上的GITR结合,例如以1 $\mu$ g/mL或更低的 $EC_{50}$ ,如通过FACS测量的;

[0718] (8) 至多部分地抑制GITR配体与活化的T细胞上的GITR结合;

[0719] (9) 结合成熟人GITR(SEQ ID NO:4)上的构象表位,例如在氨基酸序列PTGGPGCGPGRLLLTGT(SEQ ID NO:217)和CRDYPGEE(SEQ ID NO:218)内的不连续表位;

[0720] (10) 与O-连接的和N-连接的糖基化的及未糖基化的人GITR结合;

[0721] (11) 在没有与Fc受体结合时具有激动剂活性,但其中与Fc受体的结合进一步增强激动剂活性;以及

[0722] (12) 在任一方向或两个方向上与28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10和/或6G10竞争结合人GITR。

[0723] 所述改变的抗体可展现如上文(1)至(12)项列出的功能性质中的一项或多项、两项或更多项、三项或更多项、四项或更多项、五项或更多项、六项或更多项、七项或更多项、八项或更多项、九项或更多项、十项或更多项、十一项或全部。可使用本领域可获得的和/或本文所述的标准测定法(例如,在实施例列出的那些(例如,ELISA、FACS))来评估所述改变的抗体的功能性质。

[0724] 在工程改造本文所述的抗体的方法的某些实施方案中,可沿抗GITR抗体编码序列的全部或部分随机或选择性地引入突变,且可针对如本文所述的结合活性和/或其他功能性质来筛选所得的修饰的抗GITR抗体。突变方法在本领域已有描述。例如,Short的PCT公开W0 02/092780描述了使用饱和诱变、合成连接装配或其组合来产生和筛选抗体突变的方法。或者,Lazar等人的PCT公开W0 03/074679描述了使用计算筛选方法来优化抗体的生理化学性质的方法。

[0725] X. 核酸分子

[0726] 本文所述的另一方面涉及编码本文所述的抗体的核酸分子。核酸可存在于全细胞中,存在于细胞溶解物中,或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过标准技术将核酸与其他细胞组分或其他污染物(例如,其他细胞核酸(例如,其他染色体DNA,例如在自然界中与分离的DNA连接的染色体DNA)或蛋白质)纯化分离时,核酸是“分离的”或“使得基本上纯的”,所述标准技术包括碱/SDS处理、CsCl显带法、柱色谱法、限制酶、琼脂糖凝胶电泳和本领域熟知的其他方法。参见,F.Ausubel等人编辑,(1987)Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing and Wiley Interscience,New York。本文所述

的核酸例如可以是DNA或RNA,且可含有或不含有内含子序列。在某些实施方案中,核酸是cDNA分子。

[0727] 可使用标准分子生物学技术来获得本文所述的核酸。对于由杂交瘤(例如,从携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤,如下文进一步描述的)表达的抗体,可通过标准PCR扩增或cDNA克隆技术来获得编码通过杂交瘤制得的抗体的轻链和重链的cDNA。对于从免疫球蛋白基因文库获得的抗体(例如,使用噬菌体展示技术),可从文库中回收编码所述抗体的核酸。

[0728] 本文所述的优选核酸分子是编码28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10单克隆抗体的VH和VL序列的那些。编码28F3、19D3、18E10、3C3、2G6、8A6、9G7、14E3、19H8和6G10的VH序列的示例性DNA序列分别在SEQ ID NO: 147、154、158、162、168、172、176、182、186和353中列出。编码28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10的VL序列的示例性DNA序列分别在SEQ ID NO: 148、155、163、164、169、173、177、178、183、187、188和354中列出。编码28F3、19D3、18E10、3C3 (3C3-1和3C3-2)、2G6、8A6、9G7 (9G7-1和9G7-2)、14E3、19H8 (19H8-1和19H8-2)和6G10的重链序列的示例性DNA序列分别在SEQ ID NO: 149、156、160、165、170、174、179、184、189和355中列出。编码28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10的轻链序列的示例性DNA序列分别在SEQ ID NO: 150、157、161、166、167、171、175、181、180、185、190、191和356中列出。

[0729] 编码28F3.IgG1和28F3.IgG1.1(相同可变区)抗体的成熟VH和VL结构域的示例性核酸分别列为SEQ ID NO: 147和148。编码28F3.IgG1和28F3.IgG1.1抗体的成熟重链的示例性核酸分别列为SEQ ID NO: 151和152,且编码28F3.IgG1和28F3.IgG1.1抗体的成熟轻链的示例性核酸列为SEQ ID NO: 153。

[0730] 具有信号肽的28F3.IgG1和28F3.IgG1.1(相同的可变区)抗体的示例性VH和VL结构域分别列为SEQ ID NO: 357和358,且编码这些结构域的核苷酸序列分别列为SEQ ID NO: 359和360。

[0731] 具有信号肽的28F3.IgG1和28F3.IgG1.1抗体的示例性重链分别列为SEQ ID NO: 361和362,且编码这些重链的示例性核苷酸序列分别列为SEQ ID NO: 363和364。具有信号肽的28F3.IgG1和28F3.IgG1.1抗体的示例性轻链列为SEQ ID NO: 365,且编码它的示例性核苷酸序列列为SEQ ID NO: 366。

[0732] 用于制造28F3.IgG1的方法可包括:在包含编码具有信号肽的重链和轻链的核苷酸序列(例如,分别为SEQ ID NO: 363和365)的细胞系中表达重链和轻链。用于制造28F3.IgG1.1的方法可包括:在包含编码具有信号肽的重链和轻链的核苷酸序列(例如,分别为SEQ ID NO: 364和366)的细胞系中表达重链和轻链。本文中涵盖包含这些核苷酸序列的宿主细胞。

[0733] 一旦获得编码VH和VL区段的DNA片段,可通过标准重组DNA技术进一步操作这些DNA片段,以便例如将可变区基因转变成全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,编码VL或VH的DNA片段与编码另一蛋白质(比如,抗体恒定区或柔性接头)的另一DNA片段可操作连接。如本上下文中使用的术语“可操作连接”意指将两个DNA片段连接,使得由这两个DNA片段编码的氨基酸序列保持在框内。

[0734] 通过将编码VH的DNA与编码重链恒定区(铰链、CH1、CH2和/或CH3)的另一DNA分子可操作连接,可将编码VH区的分离的DNA转化成长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(例如,参见Kabat,E.A.等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开No.91-3242),且可通过标准PCR扩增来获得涵盖这些区域的DNA片段。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,例如IgG1区。对于Fab片段重链基因,编码VH的DNA与仅编码重链CH1恒定区的另一DNA分子可操作连接。

[0735] 通过将编码VL的DNA与编码轻链恒定区CL的另一DNA分子可操作连接,可将编码VL区的分离的DNA转化成长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(例如,参见Kabat,E.A.等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开No.91-3242),且可通过标准PCR扩增来获得涵盖这些区域的DNA片段。轻链恒定区可以是 $\kappa$ 或 $\lambda$ 恒定区。

[0736] 为产生scFv基因,将编码VH和VL的DNA片段与编码柔性接头(例如,编码氨基酸序列(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>)的另一片段可操作连接,使得VH和VL序列可表达为连续的单链蛋白,其中VL区和VH区通过柔性接头连接(例如,参见Bird等人(1988) Science 242:423-426;Huston等人(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;McCafferty等人,(1990) Nature 348:552-554)。

[0737] 本文中还提供了编码与28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10单克隆抗体的那些序列同源的VH和VL序列的核酸分子。示例性核酸分子编码与编码28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10单克隆抗体的VH和VL序列的核酸分子至少70%相同(例如,至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相同)的VH和VL序列。本文中还提供了例如针对密码子优化的具有保守取代(即,在核酸分子翻译后不改变所得氨基酸序列的取代)的核酸分子。

#### [0738] XI. 抗体生产

[0739] 可使用多种已知技术(比如由Kohler和Milstein,Nature 256:495(1975)描述的标准体细胞杂交技术)来产生本文所述的单克隆抗体。虽然体细胞杂交程序是优选的,但原则上也可采用产生单克隆抗体的其他技术,例如B淋巴细胞的病毒转化或致癌性转化、使用人抗体基因文库的噬菌体展示技术。

[0740] 制备杂交瘤的优选动物系统是鼠系统。在小鼠中产生杂交瘤是已良好建立的程序。用于融合的免疫脾细胞的免疫方案和分离技术是本领域已知的。融合配偶体(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。

[0741] 基于如上文所述制备的鼠单克隆抗体的序列,可以制备本文所述的嵌合抗体或人源化抗体。可以从感兴趣的鼠杂交瘤获得编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA,并使用标准分子生物学技术将其工程改造为含有非鼠(例如,人)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可使用本领域已知的方法将鼠可变区与人恒定区连接(例如,参见授予Cabilly等人的美国专利No.4,816,567)。为了产生人源化抗体,可使用本领域已知的方法将鼠CDR区插入人框架中(例如,参见授予Winter的美国专利No.5,225,539以及授予Queen等人的美国专利

No.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0742] 在一个实施方案中,本文所述的抗体是人单克隆抗体。可使用携带人免疫系统而非小鼠系统的部分的转基因或转染色体小鼠来生成这种针对GITR的人单克隆抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括在本文中分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,且在本文中统称为“人Ig小鼠”。

[0743] HuMAb mouse® (Medarex公司) 含有编码未重排的人重链( $\mu$ 和 $\gamma$ )及 $\kappa$ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因迷你基因座以及使内源性 $\mu$ 和 $\kappa$ 链基因座失活的靶向突变(例如,参见Lonberg等人(1994) *Nature* 368(6474):856-859)。因此,小鼠展现降低的小鼠IgM或 $\kappa$ 表达,并且响应于免疫,引入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变而生成高亲和力和人IgG $\kappa$ 单克隆(Lonberg,N.等人(1994),上文;综述于Lonberg,N.(1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101;Lonberg,N.和Huszar,D.(1995) *Intern.Rev.Immunol.* 13:65-93,以及Harding,F.和Lonberg,N.(1995) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 764:536-546)。HuMAb小鼠的制备和用途以及由这样的小鼠携带的基因组修饰进一步描述于Taylor,L.等人(1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295;Chen,J.等人(1993) *International Immunology* 5:647-656;Tuailon等人(1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:3720-3724;Choi等人(1993) *Nature Genetics* 4:117-123;Chen,J.等人(1993) *EMBO J.* 12:821-830;Tuailon等人(1994) *J.Immunol.* 152:2912-2920;Taylor,L.等人(1994) *International Immunology* 6:579-591;以及Fishwild,D.等人(1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851,所有这些文献的内容明确地通过提述完整并入本文。进一步参见所有授予Lonberg和Kay的美国专利No.5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,789,650;5,877,397;5,661,016;5,814,318;5,874,299;和5,770,429;授予Surani等人的美国专利No.5,545,807;所有授予Lonberg和Kay的PCT公开号WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884和WO 99/45962;以及授予Korman等人的PCT公开号WO 01/14424。

[0744] 在某些实施方案中,本文所述的抗体是使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠(比如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠)产生的。这样的小鼠(在本文中称为“KM小鼠”)详细描述于授予Ishida等人的PCT公开WO 02/43478中。

[0745] 更进一步地,本领域可获得表达人免疫球蛋白基因的替代转基因动物系统,并且可将其用于产生本文所述的抗GITR抗体。例如,可使用被称为Xenomouse (Abgenix公司)的替代转基因系统;这样的小鼠描述于例如授予Kucherlapati等人的美国专利No.5,939,598;6,075,181;6,114,598;6,150,584和6,162,963中。

[0746] 而且,本领域可获得表达人免疫球蛋白基因的替代转染色体动物系统,并且可将其用于产生本文所述的抗GITR抗体。例如,可使用被称为“TC小鼠”的携带人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠;这样的小鼠描述于Tomizuka等人(2000) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 97:722-727中。此外,携带人重链和轻链转染色体的牛已在本领域有描述(Kuroiwa等人(2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894),并且可将其用于产生本文所述抗GITR抗体。

[0747] 本领域描述的用于产生人抗体(例如,人抗GITR抗体)的其他小鼠系统包括(i) **VelocImmune®**小鼠(Regeneron Pharmaceuticals公司),其中内源性小鼠重链和轻链可

变区已通过同源重组而被人重链和轻链可变区代替,与内源性小鼠恒定区可操作连接,使得在小鼠中产生嵌合抗体(人V/小鼠C),随后使用标准重组DNA技术将其转化成人抗体;和(ii)MeMo®小鼠(MerusBiopharmaceuticals公司),其中小鼠含有未重排的人重链可变区而非单个重排的常见的人轻链可变区。这样的小鼠及其产生抗体的用途描述于例如WO 2009/15777、US 2010/0069614、WO 2011/072204、WO 2011/097603、WO 2011/163311、WO 2011/163314、WO 2012/148873、US 2012/0070861及US 2012/0073004中。

[0748] 还可使用用于筛选人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示方法来制备本文所述的人单克隆抗体。这样的用于分离人抗体的噬菌体展示方法已在本领域已良好建立。例如参见:授予Ladner等人的美国专利No.5,223,409;5,403,484;和5,571,698;授予Dower等人的美国专利No.5,427,908和5,580,717;授予McCafferty等人的美国专利No.5,969,108和6,172,197;以及授予Griffiths等人的美国专利No.5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915和6,593,081。

[0749] 还可使用SCID小鼠来制备本文所述的人单克隆抗体,所述小鼠中已经重建了人免疫细胞,使其在免疫后能产生人抗体应答。这样的小鼠描述于例如授予Wilson等人的美国专利No.5,476,996和5,698,767中。

#### [0750] 免疫

[0751] 为了生成针对GITR的全人抗体,可利用GITR抗原和/或表达GITR或其片段的细胞的纯化或富集制剂免疫含有人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体小鼠(例如,HCo12、HCo7或KM小鼠),如针对其他抗原由例如Lonberg等人(1994)Nature 368(6474):856-859;Fishwild等人(1996)Nature Biotechnology 14:845-851和WO 98/24884所述。或者,可以用编码人GITR或其片段的DNA免疫小鼠。优选地,小鼠在首次输注时为6-16周龄。例如,可使用重组GITR抗原的纯化或富集制剂(5-50 $\mu$ g)经腹膜内免疫HuMAb小鼠。如果使用GITR抗原的纯化或富集制剂免疫未产生抗体,还可用表达GITR的细胞(例如,细胞系)免疫小鼠以促进免疫应答。示例性细胞系包括过表达GITR的稳定CHO和Raji细胞系。

[0752] 利用各种抗原的累积经验已显示,在最初用Ribi佐剂中的抗原经腹膜内(IP)或皮下(SC)免疫、随后用Ribi佐剂中的抗原每隔一周IP/SC免疫(直至总共10次)时,HuMAb转基因小鼠的应答最佳。在免疫方案过程中,可用通过眶后采血获得的血浆样品来监测免疫应答。可通过ELISA和FACS(如下文所述)筛选血浆,并且可使用具有足够的抗GITR人免疫球蛋白效价的小鼠进行融合。可在处死并去除脾和淋巴结之前3天将小鼠用抗原经静脉内加强免疫。预计对每次免疫可能需要进行2-3次融合。通常,针对每一抗原免疫6只到24只小鼠。通常,使用HCo7、HCo12和KM品系。另外,可将HCo7和HCo12转基因在一起配种到具有两种不同的人重链转基因(HCo7/HCo12)的单只小鼠中。

#### [0753] 产生抗GITR单克隆抗体的杂交瘤的生成

[0754] 为了生成产生本文所述的人单克隆抗体的杂交瘤,可从免疫的小鼠分离脾细胞和/或淋巴结细胞并与适当的永生化细胞系如小鼠骨髓瘤细胞系融合。可针对抗原特异性抗体的产生筛选所得的杂交瘤。例如,可使用50%PEG将来自免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液与Sp2/0非分泌性小鼠骨髓瘤细胞(ATCC,CRL 1581)融合。将细胞以约 $2 \times 10^5$ 接种在平底微量滴定板中,随后在含有10%胎牛克隆血清、18%“653”条件培养基、5%origen(IGEN)、4mM-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、5mM HEPES、0.055mM 2-巯基乙醇、50单位/ml青霉

素、50mg/ml链霉素、50mg/ml庆大霉素和1X HAT(Sigma)的选择性培养基中温育两周。约两周后,可在其中HAT被HT代替的培养基中培养细胞。然后可针对人单克隆IgM和IgG抗体通过ELISA筛选单独的孔。一旦出现杂交瘤广泛生长,通常即可在10-14天后观察培养基。可将分泌抗体的杂交瘤再接种平板,再次筛选,且如果人IgG仍为阳性,则可通过有限稀释将单克隆抗体亚克隆至少两次。然后可在体外培养稳定的亚克隆,以在用于表征的组织培养基中生成少量抗体。

[0755] 为了纯化人单克隆抗体,可使选择的杂交瘤在用于单克隆抗体纯化的两升旋转烧瓶中生长。可将上清液过滤并浓缩,然后用蛋白A-琼脂糖(Pharmacia,Piscataway,N.J.)进行亲和色谱。可通过凝胶电泳和高效液相色谱检查洗脱的IgG以确保纯度。可将缓冲溶液更换为PBS,并且可使用消光系数1.43按照OD280来测定浓度。可将单克隆抗体分装并储存在-80℃下。

[0756] 产生抗GITR单克隆抗体的转染瘤的生成

[0757] 可使用如例如本领域熟知的重组DNA技术和基因转染方法的结合在宿主细胞转染瘤中产生抗体(Morrison,S.(1985)Science 229:1202)。

[0758] 例如,为了表达抗体或其抗体片段,可通过标准分子生物学技术(例如,PCR扩增或使用表达感兴趣的抗体的杂交瘤的cDNA克隆)获得编码部分或全长轻链和重链的DNA,并且可将DNA插入表达载体中,使得基因与转录和翻译控制序列可操作连接。在这种背景下,术语“可操作连接”意指使抗体基因与载体连接,使得载体内的转录和翻译控制序列发挥其调控抗体基因的转录和翻译的预期功能。表达载体和表达控制序列经选择与所使用的表达宿主细胞相容。可将抗体轻链基因和抗体重链基因插入单独的载体中,或将两种基因插入同一表达载体中。通过标准方法(例如,将抗体基因片段上的互补限制位点与载体连接,或者,如果不存在限制位点,则采用平端连接)将抗体基因插入表达载体中。可以使用本文所述的抗体的轻链和重链可变区,通过将其插入已经编码期望的同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,使 $V_H$ 区段与载体内的 $C_H$ 区段可操作连接,并且使 $V_L$ 区段与载体内的 $C_L$ 区段可操作连接,从而产生任何抗体同种型的全长抗体基因。

[0759] 另外地或替代地,重组表达载体能够编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可将抗体链基因克隆到载体中,使得信号肽与抗体链基因的氨基端在框内连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白的蛋白质的信号肽)。

[0760] 在示例性实施方案中,可使用来自人抗体重链和轻链的以下信号肽:MEFGLSWVFLVALLRGVQC(SEQ ID NO:315);MKHLWFFLLLVAAPRWVLS(SEQ ID NO:321);MEFGLNWVFLVALLRGVQC(SEQ ID NO:327);MEFGLSWIFLAAILKGVQC(SEQ ID NO:329);MKHLWFFLLLVAAPRWVLS(SEQ ID NO:333);MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC(SEQ ID NO:323);MEAPAQLLFLLLLWLPD TTG(SEQ ID NO:325);MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC(SEQ ID NO:317);MRVLAQLLGLLLLCFPGARC(SEQ ID NO:319);和METPAQLLFLLLLWLPD TTG(SEQ ID NO:331)。

[0761] 抗GITR抗体的重链和轻链可与对应的信号序列一起表达,所述信号序列在这些抗体的克隆来源的杂交瘤中与各个链连接。以下是存在于克隆抗GITR抗体的杂交瘤中的各种抗GITR抗体的信号序列,这些信号序列可用于表达同一抗体或另一抗体:

[0762] 28F3 VH信号序列:

[0763] MEFGLSWVFLVALLRGVQC(SEQ ID NO:315)

- [0764] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 316)
- [0765] 28F3 VL信号序列:
- [0766] MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC (SEQ ID NO:317)
- [0767] ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGAT (SEQ ID NO:318)
- [0768] 18E10 VH信号序列:
- [0769] MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO:315)
- [0770] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 316)
- [0771] 18H10 VL信号序列:
- [0772] MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC (SEQ ID NO:317)
- [0773] ATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAGGTGCCAGAT (SEQ ID NO:318)
- [0774] 19D3 VH信号序列:
- [0775] MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO:315)
- [0776] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 316)
- [0777] 19D3 VL信号序列:
- [0778] MRVLAQLLGLLLLCFPGARC (SEQ ID NO:319)
- [0779] ATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO:320)
- [0780] 3C3 VH信号序列:
- [0781] MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO:321)
- [0782] ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCC (SEQ ID NO: 322)
- [0783] 3C3 VL1信号序列:
- [0784] MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC (SEQ ID NO:323)
- [0785] ATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO:324)
- [0786] 3C3 VL2信号序列:
- [0787] MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG (SEQ ID NO:325)
- [0788] ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO:326)
- [0789] 8A6 VH信号序列:
- [0790] MEFGLNWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO:327)
- [0791] ATGGAGTTTGGGCTGAACTGGGTTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 328)
- [0792] 8A6 VL信号序列:

- [0793] MDMRVPAQLLGLLLLWLP GARC (SEQ ID NO:317)
- [0794] ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO:318)
- [0795] 9G7 VH信号序列:
- [0796] MEFGLSWIFLAAILKGVQC (SEQ ID NO:329)
- [0797] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGATTTTCCTTGCTGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGT (SEQ ID NO:330)
- [0798] 9G7 VL1和VL2信号序列:
- [0799] METPAQLLFLLLLWLPDTTG (SEQ ID NO:331)
- [0800] ATGGAACCCCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO:332)
- [0801] 14E3 VH信号序列:
- [0802] MKHLWFFLLLVAAPRWLS (SEQ ID NO:333)
- [0803] ATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCC (SEQ ID NO:334)
- [0804] 14E3 VL信号序列:
- [0805] MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC (SEQ ID NO:323)
- [0806] ATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO:324)
- [0807] 19H8 VH信号序列:
- [0808] MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO:315)
- [0809] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT (SEQ ID NO:316)
- [0810] 19H8 VL1信号序列:
- [0811] MDMRVPAQLLGLLLLWLP GARC (SEQ ID NO:317)
- [0812] ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO:318)
- [0813] 19H8 VL2信号序列:
- [0814] MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG (SEQ ID NO:325)
- [0815] ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGA (SEQ ID NO:326)
- [0816] 6G10 VH信号序列:
- [0817] MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO:315)
- [0818] ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT (SEQ ID NO:316)
- [0819] 6G10 VL信号序列:
- [0820] MDMRVPAQLLGLLLLWLP GARC (SEQ ID NO:317)
- [0821] ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO:318)



[0822] 信号序列MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO:367) 可用于表达重链和轻链。

[0823] 重链和轻链或其部分(例如,提供在表15中的那些)可与本文中提供的信号序列连接。例如,包含例如SEQ ID NO:13、15、17或18的28F3重链或其可变区可与包含MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO:315) 或MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO:367) 或由其组成的信号肽连接或融合。包含例如SEQ ID NO:14、16或19的28F3重链或其可变区可与包含MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC (SEQ ID NO:317) 或MRAWIFFLLCLAGRALA (SEQ ID NO:367) 或由其组成的信号肽连接或融合。

[0824] 除了抗体链基因外,重组表达载体可携带控制抗体链基因在宿主细胞中表达的调控序列。术语“调控序列”预期包括控制抗体链基因转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。这样的调控序列例如由Goeddel描述(Gene Expression Technology.Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,CA (1990))。本领域技术人员将理解,表达载体的设计(包括调控序列的选择)可取决于诸如待转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白质表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调控序列包括在哺乳动物细胞中指导高蛋白质表达水平的病毒元件,比如衍生自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如,腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒的启动子和/或增强子。或者,可使用非病毒调控序列,比如泛素启动子或 $\beta$ -珠蛋白启动子。更进一步地,调控元件由来自不同来源(比如SR $\alpha$ 启动子系统)的序列组成,SR $\alpha$ 启动子系统含有来自SV40早期启动子的序列和人T细胞白血病病毒1型的长末端重复序列(Takebe,Y.等人(1988)Mol.Cell.Biol.8:466-472)。

[0825] 除抗体链基因和调控序列外,重组表达载体可携带另外的序列,比如调控载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制起点)和选择标志物基因。选择标志物基因有利于选择其中已引入载体的宿主细胞(例如,参见均为Axe1等人的美国专利No.4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,通常选择标志物基因赋予其中已引入载体的宿主细胞对药物(例如G418、潮霉素或甲氨蝶呤)的抗性。优选的选择标志物基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于dhfr-宿主细胞的甲氨蝶呤选择/扩增)和neo基因(用于G418选择)。

[0826] 为了表达轻链和重链,通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞中。术语“转染”的各种形式意在涵盖常用于将外源DNA引入原核和真核宿主细胞中的多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。虽然在理论上可能在原核或真核宿主细胞中表达本文所述的抗体,但在真核细胞(且最优选哺乳动物宿主细胞)中表达抗体是最优选的,这是因为这样的真核细胞(且特别是哺乳动物细胞)比原核细胞更可能组装和分泌正确折叠且具有免疫学活性的抗体。已报导抗体基因的原核表达对于产生高产率的活性抗体是无效的(Boss,M.A.和Wood,C.R.(1985)Immunology Today 6:12-13)。

[0827] 用于表达本文所述的重组抗体的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(包括dhfr-CHO细胞,描述于Urlaub和Chasin,(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220中,与DHFR选择标志物一起使用,例如如R.J.Kaufman和P.A.Sharp(1982)Mol.Biol.159:601-621中所述)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。具体而言,对于与NS0骨髓瘤细胞一起使用,另一个优选的表达系统是在WO 87/04462、WO 89/01036和EP 338,841中公开的GS基因表达系统。当将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时,通过培养宿主细胞足够的时间以允许抗体在宿主细胞中表达或者更优选地允许抗体

分泌到宿主细胞所生长的培养基中来产生抗体。可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基回收抗体。

#### [0828] XII. 测定法

[0829] 可通过例如标准ELISA来检测本文所述的抗体的与GITR的结合。简言之,将微量滴定板用PBS中的1-2 $\mu$ g/ml的纯化GITR包被,随后用PBS中的5%牛血清白蛋白封闭。将抗体的稀释物(例如,来自GITR免疫小鼠的血浆的稀释物)添加至每个孔中,在37 $^{\circ}$ C下温育1-2小时。将板用PBS/吐温洗涤,随后在37 $^{\circ}$ C与缀合至辣根过氧化物酶(HRP)的二级试剂(例如,对于人抗体,山羊-抗人IgG Fc特异性多克隆试剂)一起温育1小时。在洗涤后,将板用ABTS底物(Moss公司,产品:ABTS-1000)显影并通过分光光度计在OD<sub>415-495</sub>下进行分析。随后,针对与表达人GITR的细胞系、而非不表达GITR的对照细胞系的结合,通过流式细胞术进一步筛选来自免疫小鼠的血清。简言之,通过将表达GITR的CHO细胞与以1:20稀释的抗GITR抗体一起温育来评估抗GITR抗体的结合。洗涤细胞并用PE标记的抗人IgG Ab检测结合。使用FACScan流式细胞术(Becton Dickinson, San Jose, CA)进行流式细胞分析。优选地,产生最高滴度的小鼠将用于融合。

[0830] 如上文所述的ELISA测定可用于筛选抗体,并因此筛选产生显示与GITR免疫原呈阳性反应性的抗体的杂交瘤。然后可将产生与GITR结合(优选以高亲和力结合)的抗体的杂交瘤亚克隆并进一步表征。随后可从每个杂交瘤选择一个保留亲本细胞的反应性的克隆(通过ELISA),用于制备细胞库并用于抗体纯化。

[0831] 为了纯化人抗GITR抗体,可使选择的杂交瘤在用于单克隆抗体纯化的两升旋转烧瓶中生长。可将上清液过滤并浓缩,然后用蛋白A-琼脂糖(Pharmacia, Piscataway, NJ)进行亲和色谱。可通过凝胶电泳和高效液相色谱检查洗脱的IgG以确保纯度。可将缓冲溶液更换为PBS,并且可使用消光系数1.43按照OD<sub>280</sub>来测定浓度。可将单克隆抗体分装并储存在-80 $^{\circ}$ C下。

[0832] 为确定选择的抗GITR单克隆抗体是否与独特表位结合,可使用市售试剂(Pierce, Rockford, IL)将每一抗体生物素化。可用链霉亲和素标记的探针检测生物素化MAb的结合。可使用如上文所述的GITR包被的ELISA板,进行使用未标记的单克隆抗体和生物素化单克隆抗体的竞争研究。

[0833] 为了确定纯化抗体的同种型,可使用对特定同种型的抗体特异的试剂进行同种型ELISA。例如,为了确定人单克隆抗体的同种型,可将微量滴定板的孔用1 $\mu$ g/ml抗人免疫球蛋白在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。在用1%BSA封闭后,使板与1 $\mu$ g/ml或更低的测试单克隆抗体或纯化同种型对照在环境温度下反应1至2小时。然后可使孔与人IgG1-或人IgM-特异性碱性磷酸酶缀合的探针反应。如上文所述使板显色并加以分析。

[0834] 为了测试单克隆抗体与表达GITR的活细胞的结合,可使用流式细胞术,如实施例所述。简言之,将表达膜结合的GITR的细胞系(在标准生长条件下生长)与含有0.1%BSA的PBS中的不同浓度的单克隆抗体在4 $^{\circ}$ C下混合1小时。在洗涤后,在与一级抗体染色相同的条件下使细胞与荧光素标记的抗IgG抗体反应。可通过FACScan仪器利用光侧向散射性质分析样品以对单细胞设门控,并确定标记抗体的结合。(除了或代替)流式细胞术测定,可采用使用荧光显微镜术的替代测定。可确切地如上文所述将细胞染色,并通过荧光显微镜术进行检查。这种方法允许将单独的细胞可视化,但可能具有减低的灵敏性,取决于抗原的密

度。

[0835] 可通过Western印迹法针对与GITR抗原的反应性进一步测试抗GITR抗体。简言之,可从表达GITR的细胞制备细胞提取物,对其进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。在电泳后,将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜,用20%小鼠血清封闭,并用待测试的单克隆抗体探测。可使用抗IgG碱性磷酸酶检测IgG结合,并用BCIP/NBT底物片(Sigma Chem.公司, St.Louis,MO)使其显色。

[0836] 用于分析各种抗GITR抗体的结合亲和力、交叉反应性和结合动力学的方法包括本领域已知的标准测定法,例如使用Biacore™ 2000 SPR仪器(Biacore AB,Uppsala,Sweden)的Biacore™表面等离子体共振(SPR)分析。

[0837] 在一个实施方案中,抗体与人GITR的细胞外区特异性地结合。抗体可与GITR的细胞外结构域内的特定结构域(例如,功能结构域)特异性地结合。在具体实施方案中,抗体与GITR-L结合的GITR上的位点特异性地结合。在某些实施方案中,抗体与人GITR的细胞外区和食蟹猴GITR的细胞外区特异性地结合。优选地,抗体以高亲和力与人GITR结合。

[0838] XIII.免疫缀合物、抗体衍生物与诊断学

[0839] 本文所述的抗体可用于诊断目的,包括样品测试和体内成像,出于此目的,抗体(或其结合片段)可与适当的可检测试剂缀合,以形成免疫缀合物。出于诊断目的,适当的试剂是包括用于全身成像的放射性同位素的可检测标记物,以及用于样品测试的放射性同位素、酶、荧光标记物和其他适合的抗体标签。

[0840] 可检测标记物可属于当前在体外诊断学领域中使用的任何不同类型,包括颗粒标记物,包括金属溶胶,如胶体金;同位素,如 $I^{125}$ 或 $Tc^{99}$ ,例如与 $N_2S_2$ 、 $N_3S$ 或 $N_4$ 类型的肽螯合剂一起提供;发色团,包括荧光标志物、发光标志物、磷光标志物等,还有将给定底物转化为可检测标志物的酶标记物,以及通过后续扩增例如聚合酶链反应显示的多核苷酸标签。适合的酶标记物包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等等。例如,标记物可以是酶(碱性磷酸酶),其可通过测定在转化下列物质之后化学发光的存在或形成而加以检测:1,2-二氧杂环丁烷底物,如金刚烷基甲氧基磷氧酰苯基二氧杂环丁烷(AMPPD)、3-(4-(甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环{3.3.1.1<sup>3,7</sup>}癸烷}-4-基)苯基磷酸二钠(CSPD),还有CDP和**CDP-star®**或本领域技术人员熟知的其他发光底物,例如适合的镧系元素铽(III)和铕(III)的螯合物。检测手段由选定的标记物决定。在标记物是微粒且以适当水平累积的情况下,利用肉眼或使用仪器,如分光光度计、发光计、荧光计等等可获得标记物或其反应产物的外观,一切都遵循标准实践。

[0841] 优选地,缀合方法产生实质上(或几乎)为非免疫原性的连接,例如肽-(即酰胺-)、硫化-(位阻)、二硫化物-、脰-及醚连接。这些连接几乎是非免疫原性的,并且在血清内显示合理的稳定性(例如,参见Senter,P.D.,Curr.Opin.Chem.Biol.13(2009)235-244;WO 2009/059278;WO 95/17886)。

[0842] 可采用不同的缀合策略,视模块和抗体的生物化学性质而定。在所述模块是50至500个天然或重组氨基酸的情况下,在描述蛋白缀合物的合成化学的教科书中有标准程序,本领域技术人员易于遵循这些标准程序(例如参见Hackenberger,C.P.R.和Schwarzer,D.,Angew.Chem.Int.Ed.Engl.47(2008)10030-10074)。在一个实施方案中,利用马来酰亚胺基模块与抗体或模块内的半胱氨酸残基反应。在使用例如抗体的Fab或Fab'片段的情况下,这

是特别适合的偶联化学。或者,在一个实施方案中,进行了与抗体的C端或模块的偶联。例如,蛋白质(例如,Fab片段)的C端修饰可如所述来进行(Sunbul,M.和Yin,J.,*Org.Biomol.Chem.*7 (2009) 3361-3371)。

[0843] 通常,位点特异性反应和共价偶联的基础是将天然氨基酸转化成具有与存在的其他官能团的反应性正交的反应性的氨基酸。例如,在稀有序列背景中的特定半胱氨酸可经酶转化为醛(参见Frese,M.A.和Dierks,T.,*ChemBioChem.*10 (2009) 425-427)。还可能通过利用某些酶与给定序列背景中的天然氨基酸的特异性酶反应性来获得期望的氨基酸修饰(例如参见Taki,M.等人,*Prot.Eng.Des.Sel.*17 (2004) 119-126;Gautier,A.等人,*Chem.Biol.*15 (2008) 128-136;和Protease-catalyzed formation of C-N bonds is used by Bordusa,F.,*Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403)。

[0844] 还可通过末端氨基酸与适当修饰试剂的选择性反应来实现位点特异性反应和共价偶联。

[0845] 可利用N端半胱氨酸与苯腈(benzonitril)的反应性(参见Ren,H.等人,*Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*48 (2009) 9658-9662)来实现位点特异性共价偶联。

[0846] 天然化学连接也可依赖于C端半胱氨酸残基(Taylor,E.Vogel;Imperiali,B,*Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009),22 (Protein Engineering),65-96)。

[0847] EP 1 074 563描述了一种缀合方法,其基础是一段带负电荷的氨基酸内的半胱氨酸与位于一段带正电荷的氨基酸中的半胱氨酸的较快反应。

[0848] 所述模块也可以是合成肽或肽模拟物。在化学合成多肽的情况下,在这样的合成期间可掺入具有正交化学反应性的氨基酸(例如,参见de Graaf,A.J.等人,*Bioconjug.Chem.*20 (2009) 1281-1295)。由于有许多正交官能团可用且可被引入合成肽中,这样的肽与接头的缀合是标准化学作用。

[0849] 为了获得单标记的多肽,可通过色谱法以1:1化学计量将缀合物与其他缀合副产物分离。通过使用染料标记的结合对成员和带电荷的接头可以促进这个程序。通过使用这种标记且高度带负电荷的结合对成员,容易将单缀合的多肽与未标记的多肽和携带一个以上接头的多肽分离,这是因为可以利用电荷和分子量的差异进行分离。如同标记的单价结合物,荧光染料可用于从未结合的组分纯化复合物。

[0850] 在一个实施方案中,与抗GITR抗体附接的模块选自下组:结合模块、标记模块和生物活性模块。

[0851] 本文所述的抗体也可与治疗剂缀合以形成免疫缀合物,比如抗体-药物缀合物(ADC)。适合的治疗剂包括抗代谢药、烷化剂、DNA小沟结合剂、DNA嵌合剂、DNA交联剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶I或II抑制剂、热休克蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素、和抗有丝分裂剂。在ADC中,抗体和治疗剂优选地经由可裂解的接头缀合,所述接头例如肽基、二硫键、或脲接头。更优选地,接头为肽基接头,如Val-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO:219)、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Cit-Cit、Val-Lys、Lys、Cit、Ser、或Glu。可以如美国专利No.7,087,600;6,989,452;和7,129,261;PCT公开WO 02/096910;WO 07/038658;WO 07/051081;WO 07/059404;WO 08/083312;和WO 08/103693;美国专利公开20060024317;20060004081;和20060247295中所述来制备ADC;将这些公开内容通过提述并入本文。

[0852] 抗GITR抗体(例如本文所述的那些)还可用于检测GITR,比如人GITR,例如组织或组织样品中的人GITR。所述抗体可用于例如ELISA测定中或流式细胞术中。在某些实施方案中,使抗GITR抗体与细胞(例如,组织中的细胞)接触一定的对于发生特异性结合适当的时间,随后添加试剂(例如,检测抗GITR抗体的抗体)。在实施例中提供了示例性测定法。抗GITR抗体可以是全人抗体,或者它可以是嵌合抗体,例如具有人可变区和鼠恒定区的抗体或其部分。用于检测样品(细胞或组织样品)中的GITR(例如人GITR)的示例性方法包括(i)使样品与抗GITR抗体接触足以允许抗GITR抗体与样品中的GITR特异性结合的一段时间,并且(2)使样品与特异性结合抗GITR抗体(例如,结合抗GITR抗体的Fc区)的检测试剂(例如抗体)接触,由此检测被抗GITR抗体结合的GITR。在与抗体和/或检测试剂一起温育后,可包括洗涤步骤。用于这些方法中的抗GITR抗体不必与标记物或检测试剂连接,因为可以使用单独的检测试剂。

[0853] 抗GITR抗体作为例如单一治疗或联合治疗的其他用途提供于本文中的别处,例如涉及联合治疗的部分中。

[0854] XIV. 双特异性分子

[0855] 本文所述的抗体可用于形成双特异性分子。抗GITR抗体或其抗原结合部分可以被衍生化或与另一个功能分子例如另一个肽或蛋白质(例如,另一个抗体或受体的配体)连接,以生成与至少两个不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。例如,抗GITR抗体可以与特异性结合可用作联合治疗的潜在靶标的任何蛋白质(例如,本文所述的蛋白质)的抗体或scFv(例如,针对PD-1、PD-L1或LAG-3的抗体)连接。本文所述的抗体实际上可以被衍生化或与一个以上的其他功能分子连接,以生成与多于两个不同的结合位点和/或靶分子结合的多特异性分子;这样的多特异性分子预期被本文中使用的术语“双特异性分子”涵盖。为了产生本文所述的双特异性分子,本文所述的抗体可以与一个或多个其他结合分子,例如另一个抗体、抗体片段、肽或结合模拟物在功能上连接(例如通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其他方式),从而产生双特异性分子。

[0856] 因此,本申请提供了包含至少一种对GITR的第一结合特异性以及对第二靶表位的第二结合特异性的双特异性分子。在一个本文所述的实施方案中,双特异性分子是多特异性的,所述分子可进一步包括第三结合特异性。

[0857] 在一个实施方案中,本文所述的双特异性分子包含至少一种抗体或其抗体片段(包括例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或单链Fv(scFv))作为结合特异性。抗体还可以是轻链或重链二聚体或其任何最小片段,例如Fv或单链构建体,如Ladner等人在美国专利No.4,946,778中所述,将其内容通过提述明确并入本文。

[0858] 虽然人单克隆抗体是优选的,但可在本文所述的双特异性分子中采用的其他抗体是鼠的、嵌合的和人源化的单克隆抗体。

[0859] 可使用本领域已知的方法通过缀合各组分的结合特异性来制备本文所述的双特异性分子。例如,双特异性分子的每一结合特异性可单独生成,然后彼此缀合。当结合特异性是蛋白质或肽时,可使用多种偶联剂或交联剂进行共价缀合。交联剂的实例包括蛋白A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻亚苯基二马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)(例如,参见

Karpovsky 等人, (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA 等人, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括描述于如下文献的那些方法: Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan 等人 (1985) Science 229:81-83) 和 Glennie 等人 (1987) J. Immunol. 139:2367-2375)。优选的缀合剂是 SATA 和碘基-SMCC, 两者均可获自 Pierce Chemical 公司 (Rockford, IL)。

[0860] 当结合特异性是抗体时, 可经由两条重链的C端铰链区的巯基键合将它们缀合。在特别优选的实施方案中, 在缀合之前将铰链区修饰为含有奇数个 (优选一个) 巯基残基。

[0861] 或者, 两种结合特异性可在同一载体中编码且在同一宿主细胞中表达和装配。这种方法在双特异性分子为 mAb x mAb、mAb x Fab、mAb x (scFv)<sub>2</sub>、Fab x F(ab')<sub>2</sub> 或配体 x Fab 融合蛋白时尤其有用。双特异性抗体可包括在每条重链的C端包含 scFv 的抗体。本文所述的双特异性分子可以是包含一个单链抗体和一个结合决定簇的单链分子、或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可包含至少两个单链分子。用于制备双特异性分子的方法描述于例如美国专利号 5,260,203; 美国专利号 5,455,030; 美国专利号 4,881,175; 美国专利号 5,132,405; 美国专利号 5,091,513; 美国专利号 5,476,786; 美国专利号 5,013,653; 美国专利号 5,258,498; 和美国专利号 5,482,858 中。

[0862] 可使用本领域公认的方法, 如酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射性免疫测定 (RIA)、FACS 分析、生物测定 (例如, 生长抑制) 或 Western 印迹测定来证实双特异性分子与其特异性靶的结合。这些测定法中的每一者通常通过采用标记试剂 (例如, 抗体) 来检测特别感兴趣的蛋白质-抗体复合物的存在, 所述标记试剂对于所述复合物而言是特异的。

[0863] XV. 组合物

[0864] 进一步提供了组合物, 例如药物组合物, 其含有一种本文所述的抗 GITR 抗体或本文所述的抗 GITR 抗体的组合、或本文所述的抗 GITR 抗体与针对其他靶标的抗体的组合、或本文所述的抗 GITR 抗体的抗原结合部分, 与药学上可接受的载体配制在一起。这样的组合物可包括本文所述的抗体或免疫缀合物或双特异性分子中的一种或其组合 (例如不同的两种或更多种)。例如, 本文所述的药物组合物可包含结合靶抗原上的不同表位、或具有互补活性的抗体 (或免疫缀合物或双特异性分子) 的组合。

[0865] 在某些实施方案中, 组合物包含至少 1mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、50mg/ml、100mg/ml、150mg/ml、200mg/ml、1-300mg/ml 或 100-300mg/ml 浓度的抗 GITR 抗体。

[0866] 本文所述的药物组合物还可以在联合治疗中施用, 即与其他药剂联合施用。例如, 联合治疗可包括与至少一种其他抗癌剂和/或 T 细胞刺激 (例如, 活化) 剂联合的本文所述的抗 GITR 抗体。可用于联合治疗中的治疗剂的实例更详细描述于下文关于本文所述的抗体的用途的部分中。

[0867] 在一些实施方案中, 本文中公开的治疗组合物可包括用于治疗癌症的其他化合物、药物和/或药剂。这样的化合物、药物和/或药剂可包括例如化疗药、小分子药物、或刺激针对给定癌症的免疫应答的抗体。在一些情况下, 治疗组合物可包括例如下述抗体的一种或多种: 抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 PDL-1 抗体、抗 OX40 (也称为 CD134、TNFRSF4、ACT35 和/或 TXGP1L) 抗体、抗 CD137 抗体或抗 LAG-3 抗体。

[0868] 如本文中使用的, “药学上可接受的载体” 包括任何及所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌和抗真菌剂、等渗剂及吸收延迟剂以及生理学上相容的其他物质。优选地, 载体适合

于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(例如,通过注射或输注)。取决于施用途径,可在材料中将活性化合物(即抗体、免疫缀合物或双特异性分子)进行包衣,以保护化合物免受酸和其他可使化合物失活的天然条件的作用。

[0869] 本文所述的药物化合物可包括一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保留亲本化合物的期望生物活性且不赋予任何不期望的毒理学效应的盐(例如参见Berge, S.M.等人(1977) J.Pharm.Sci. 66:1-19)。这样的盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些衍生自无毒无机酸比如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸,等等的盐,以及那些衍生自无毒有机酸比如脂肪族单及二羧酸、苯基取代的链烷酸、羧基链烷酸、芳香族酸、脂肪族和芳香族磺酸等等的盐。碱加成盐包括那些衍生自碱土金属比如钠、钾、镁、钙,等等的盐,以及那些衍生自无毒有机胺比如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因,等等的盐。

[0870] 本文所述的药物组合物还可包括药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,比如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠,等等;(2)油溶性抗氧化剂,比如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚,等等;和(3)金属螯合剂,比如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸,等等。

[0871] 可用于本文所述的药物组合物中的适合的水性和非水性载体的实施例包括水、乙醇、多元醇(比如,甘油、丙二醇、聚乙二醇,等等)及其适当的混合物、植物油(比如橄榄油)以及注射用有机酯(比如油酸乙酯)。可以通过例如使用包衣材料诸如卵磷脂借助于维持在分散体情况下所需的粒径并且通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0872] 这些组合物还可含有辅料,比如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过上文的灭菌程序以及通过包括各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸,等等)这两者可确保阻止微生物的存在。这些组合物中还可期望包括等渗剂,比如糖、氯化钠,等等。另外,可通过包括吸收延迟剂(比如单硬脂酸铝和明胶)来实现注射药物形式的延长吸收。

[0873] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时配制无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。针对药学活性物质的此类介质和作用剂的用途是本领域已知的。除了任何常规介质或作用剂与活性化合物不相容之外,对它们在所述药物组合物中的使用予以考虑。药物组合物可包含防腐剂或可不含防腐剂。组合物中还可掺入补充的活性化合物。

[0874] 治疗组合物通常必须无菌并且在制造和储存条件下稳定。可将组合物配制成溶液、微乳剂、脂质体或其他适于高药物浓度的有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如丙三醇、丙二醇、和液态聚乙二醇等等)、和其适合的混合物的溶剂或分散介质。可以通过例如使用包衣诸如卵磷脂借助于维持在分散体情况下所需的粒径和通过使用表面活性剂而维持适当的流动性。在许多情况下,优选的是在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇诸如甘露醇、山梨醇,或氯化钠。可以通过在组合物中包含吸收延迟剂(例如单硬脂酸盐和明胶)来实现注射组合物的延长吸收。

[0875] 可以通过将活性化合物以所需的量掺入适当的溶剂中然后微孔过滤除菌来制备无菌注射溶液,其中所述溶剂根据需要具有一种上文列举的成分或其组合。通常,通过将活性化合物掺入无菌载体中来制备分散体,所述无菌载体含有基础分散介质和所需的来自本

文中列举的其他成分。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法为真空干燥和冷冻干燥(冻干),由此从预先无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何其他期望的成分的粉末。

[0876] 可以与载体材料组合而产生单剂量形式的活性成分的量取决于所治疗的受试者、和具体的给药方式而改变。可以与载体材料组合而产生单剂量形式的活性成分的量通常为产生治疗效果的组合物的量。通常,以百分之百为基准,这个量的范围可以是活性成分占约0.01%至约99%,优选地活性成分占约0.1%至约70%,最优选地约1%至约30%,与药学上可接受的载体组合。

[0877] 剂量方案经过调整以提供最佳期望反应(例如,治疗反应)。可以施用单次推注,可以在一段时间内施用多个分次剂量,或者可以根据治疗情况的紧急事件指示按比例减少或增加剂量。配制剂量单位形式的肠胃外组合物是特别有利的,以便易于施用并且剂量一致。如本文中使用的,“剂量单位形式”是指适合作为单一剂量用于待治疗受试者的物理上离散的单位;每个单位含有经计算与必需的药物载体联合产生期望的治疗效果的预定量的活性化合物。本文所述的剂量单位形式的规格取决于且直接依赖于(a)活性化合物的独特特征和待实现的具体治疗效果、和(b)这种活性化合物用于个体敏感性治疗的配制技术的固有限制。

[0878] 对于抗体施用,剂量范围是约0.0001至100mg/kg,更通常为0.01至5或10mg/kg宿主体重。例如,剂量可以是0.3mg/kg体重、1 mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重、或在1-10mg/kg范围内。示例性治疗方案需要施用每周1次、每两周1次、每三周1次、每四周1次、每月1次、每三个月1次、或每三至六个月1次。本文所述的GITR抗体的优选剂量方案包括1 mg/kg体重或3mg/kg体重,经由静脉内施用,其中抗体是使用如下给药方案之一给予的:(i)每四周一次,六个剂量,然后每三个月一次;(ii)每三周一次;(iii)一次3mg/kg体重,随后1 mg/kg体重,每三周一次。

[0879] 抗GITR抗体可以单一剂量施用(单一剂量方案)。

[0880] 在一些方法中,同时施用两种或更多种具有不同结合特异性的单克隆抗体,在此情况下每种抗体的施用剂量在指示的范围内。通常在多种情况下施用抗体。单个剂量之间的间隔可以是,例如,每周、每月、每三个月或每年。间隔也可以是不规则的,通过测量患者体内针对靶抗原的抗体的血液水平来指示。在一些方法中,调节剂量以实现约1-1000 $\mu$ g/ml的血浆抗体浓度,在一些方法中为约25-300 $\mu$ g/ml。

[0881] 抗GITR抗体可以另一种抗体的剂量方案与另一种抗体一起施用。例如,抗GITR抗体可与抗PD-1抗体(如纳武单抗(OPDIVO))一起施用,每两周一次在60分钟内静脉内输注,直至疾病进展或不可接受的毒性发生为止。抗GITR抗体可与派姆单抗(KEYTRUDA)一起施用,每3周一次在30分钟内静脉内输注,直至疾病进展或不可接受的毒性发生为止。

[0882] 抗体可以作为持续释放制剂施用,在这种情况下,要求以较低频率施用。剂量和频率取决于患者体内的抗体的半衰期而变化。一般而言,人抗体显示的半衰期最长,其次是人源化抗体、嵌合抗体、和非人抗体。施用的剂量和频率可以取决于治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,在一段长时间内以相对低频的间隔施用相对低的剂量。一些患者继续接受治疗持续其一生。在治疗性应用中,有时需要以相对短的时间间隔给予相对高的剂量,直到疾病的进展减慢或终止时为止,优选地直到患者显示出疾病症状的部分或



完全改善时为止。此后,可以对患者施用预防性方案。

[0883] 本文所述的药物组合中活性成分的实际剂量水平可以改变,以获得针对特定患者、组合和施用方式有效地实现期望的治疗反应、而对患者没有毒性的活性成分量。选定的剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括所用的本文所述的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性,施用途径,施用时间,所用特定化合物的排泄速率,治疗持续时间,与所用特定组合物联合使用的其他药物、化合物和/或材料,被治疗患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康和先前病史,以及医学领域熟知的类似因素。

[0884] 本文所述抗的GITR抗体的“治疗有效剂量”优选地降低疾病症状的严重程度,增加无疾病症状时间的频率及持续时间,或预防因疾病折磨所致的损害或残疾。在癌症的上下文中,治疗有效剂量优选可增加存活、和/或预防与癌症相关的身体症状的进一步恶化。癌症的症状是本领域熟知的,例如包括不寻常的痣特征(unusual mole features)、痣的外观变化,包括不对称、边界、颜色和/或直径的变化、新着色的皮肤区域、异常的痣、指甲的变暗区、乳房肿块、乳头变化、乳腺囊肿、乳房疼痛、死亡、体重减轻、虚弱、过度疲劳、进食困难、食欲不振、慢性咳嗽、呼吸困难加重、咳血、尿血、便血、恶心、呕吐、肝转移、肺转移、骨转移、腹部胀满、腹胀(bloating)、腹腔积液、阴道出血、便秘、腹部膨胀(abdominal distension)、结肠穿孔、急性腹膜炎(感染、发热、疼痛)、疼痛、吐血、大量出汗、发热、高血压、贫血、腹泻、黄疸、头晕、畏寒、肌肉痉挛、结肠转移、肺转移、膀胱转移、肝转移、骨转移、肾转移和胰腺转移、吞咽困难,等。

[0885] 治疗有效剂量可预防或延迟癌症发作,这在有疾病的早期或初步征象时可能是期望的。用于诊断癌症的实验室试验涉及化学(包括GITR水平的测量)、血液学、血清学和放射学。因此,监测上述任一者的任何临床或生物化学测定法均可用于确定特定的治疗是否用于治疗癌症的治疗有效剂量。基于诸如受试者的尺寸、受试者症状的严重程度以及特定的组合物或选择的施用途径等因素,本领域的普通技术人员将能够确定这些量。

[0886] 可以使用本领域已知的多种方法中的一种或多种经由一种或多种施用途径施用本文所述的组合物。如本领域技术人员将理解,施用途径和/或方式将视期望的结果而变化。本文所述的抗体的优选施用途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外施用途径(例如通过注射或输注)。如本文中使用的短语“肠胃外施用”表示通常通过注射而不是肠内和局部施用的施用方式,包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0887] 或者,本文所述的抗体可经由非肠胃外途径施用,比如局部、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。

[0888] 活性化合物可与保护该化合物免于快速释放的载体一起制备,比如控制释放制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊化递送系统。可使用生物可降解的生物相容性聚合物,比如乙烯基乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这样的制剂的许多方法已获得专利权或通常为本领域技术人员已知。例如,参见Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J.R.Robinson编辑,Marcel Dekker,Inc., New York,1978。

[0889] 可用本领域已知的医疗器械施用治疗组合物。例如,在优选的实施方案中,可用无

针皮下注射装置(比如公开于美国专利No.5,399,163;5,383,851;5,312,335;5,064,413;4,941,880;4,790,824;或4,596,556中的装置)来施用本文所述的治疗组合物。与本文所述的抗GITR抗体一起使用的熟知的植入物和组件的实例包括:美国专利No.4,487,603,其公开了用于以控制速率分配药物的可植入微量输注泵;美国专利No.4,486,194,其公开了用于经由皮肤施用药物的治疗装置;美国专利No.4,447,233,其公开了用于以精确输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利No.4,447,224,其公开了用于连续药物递送的变流可植入输注设备;美国专利No.4,439,196,其公开了具有多腔区室的渗透药物递送系统;以及美国专利No.4,475,196,其公开了渗透药物递送系统。将这些专利通过提述并入本文。许多其他的此类植入物、递送系统和组件是本领域技术人员已知的。

[0890] 在某些实施方案中,本文所述的抗GITR抗体被配制为确保体内适当分布。例如,血脑屏障(BBB)可排除许多高亲水性化合物。为确保本文所述的治疗化合物越过BBB(如果需要的话,例如,针对脑癌),可以例如将其配制在脂质体中。对于制造脂质体的方法,参见例如美国专利4,522,811;5,374,548;和5,399,331。脂质体可包含一个或多个选择性地运输到特定细胞或器官中的由此增强靶向药物递送的模块(例如,参见V.V.Ranade(1989) J.Clin.Pharmacol.29:685)。示例性靶向模块包括叶酸或生物素(例如,参见授予Low等人的美国专利5,416,016);甘露糖苷(Umezawa等人,(1988) Biochem.Biophys.Res.Commun.153:1038);抗体(P.G.Bloeman等人(1995) FEBS Lett.357:140;M.Owais等人(1995) Antimicrob.Agents Chemother.39:180);表面活性剂蛋白A受体(Briscoe等人(1995) Am.J.Physiol.1233:134);p120(Schreier等人(1994) J.Biol.Chem.269:9090);还参见K.Keinanen;M.L.Laukkanen(1994) FEBS Lett.346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler(1994) Immunomethods 4:273。

#### [0891] XVI.用途和方法

[0892] 本文所述的抗体、抗体组合物和方法具有多种体外和活体内实用性,其涉及例如通过激活GITR信号转导增强免疫应答或检测GITR。在优选的实施方案中,本文所述的抗体是人抗体。例如,本文所述的抗GITR抗体可在体外或离体施用于培养物中的细胞,或体内施用于例如人受试者以增强针对多种疾病的免疫力。因此,本申请提供了修饰受试者中的免疫应答的方法,其包括向受试者施用本文所述的抗体或其抗原结合部分,从而修饰受试者中的免疫应答。优选地,增强、刺激或上调所述应答。

[0893] 优选的受试者包括期望增强免疫应答的人类患者。这些方法尤其适于治疗患有可通过加强免疫应答(例如,T细胞介导的免疫应答,例如抗原特异性T细胞应答)进行治疗的疾患的人类患者。在具体实施方案中,所述方法尤其适于癌症的体内治疗。为了实现抗原特异性免疫增强,本文所述的抗GITR抗体可与感兴趣的抗原一起施用,或者,所述抗原可以已经在待治疗的受试者(例如,带有肿瘤或带有病毒的受试者)中存在。当针对GITR的抗体与另一种药剂一起施用时,两者可单独或同时施用。

[0894] 还涵盖用于检测样品中人GITR抗原的存在或测量人GITR抗原的量的方法,其包括使样品和对照样品与单克隆抗体(例如,与人GITR特异性地结合的人单克隆抗体或其抗原结合部分)在允许在所述抗体或其部分与人GITR之间形成复合物的条件下接触。然后检测复合物的形成,其中样品相比于对照样品之间的复合物形成差异指示样品中人GITR抗原的存在。而且,本文所述的抗GITR抗体可用于经由免疫亲和纯化来纯化人GITR。

[0895] 鉴于本文所述的抗GITR抗体刺激或共刺激T细胞应答(例如,抗原特异性T细胞应答)的能力,本申请提供了使用本文所述的抗体来刺激、增强或上调抗原特异性T细胞应答(例如,抗肿瘤T细胞应答)的体外和体内方法。在某些实施方案中,还提供了CD3刺激(例如,通过与表达膜CD3的细胞共温育),所述刺激可在抗GITR抗体刺激的同时、之前或之后提供。例如,本申请提供了刺激抗原特异性T细胞应答的方法,其包括使所述T细胞与本文所述的抗GITR抗体以及任选的抗CD3抗体接触,从而刺激抗原特异性T细胞应答。可以使用抗原特异性T细胞应答的任何适合的指标来量度抗原特异性T细胞应答。这样的适合的指标的非限制性实例包括:在抗体存在下的T细胞增殖增加和/或在抗体存在下的细胞因子产生增加。在优选的实施方案中,刺激抗原特异性T细胞产生白细胞介素-2和/或干扰素- $\gamma$ 。

[0896] 可用抗GITR抗体增强或共刺激的T细胞包括CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞。T细胞可以是T<sub>eff</sub>细胞,例如CD4<sup>+</sup> T<sub>eff</sub>细胞、CD8<sup>+</sup>T<sub>eff</sub>细胞、辅助性T细胞(T<sub>h</sub>)和细胞毒性T细胞(T<sub>c</sub>)。

[0897] 进一步涵盖刺激受试者中的免疫应答(例如,抗原特异性T细胞应答)的方法,其包括向受试者施用本文所述的抗GITR抗体,从而刺激受试者中的免疫应答(例如,抗原特异性T细胞应答)。在优选的实施方案中,受试者是带有肿瘤的受试者,并且针对所述肿瘤的免疫应答被刺激。肿瘤可以是实体肿瘤或液体肿瘤(例如,血液恶性肿瘤)。在某些实施方案中,肿瘤是免疫原性肿瘤。在某些实施方案中,肿瘤是非免疫原性的。在某些实施方案中,肿瘤是PD-L1阳性的。在某些实施方案中,肿瘤是PD-L1阴性的。受试者也可以是带有病毒的受试者,并且针对所述病毒的免疫应答被刺激。

[0898] 进一步提供了抑制受试者中的肿瘤细胞生长的方法,其包括向受试者施用本文所述的抗GITR抗体,从而抑制受试者中的肿瘤生长。还提供了治疗受试者中的病毒感染的方法,其包括向受试者施用本文所述的抗GITR抗体,从而治疗受试者中的病毒感染。

[0899] 本文中还包括从患有肿瘤(例如,癌性肿瘤)的受试者的肿瘤微环境中耗竭Treg细胞的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的抗GITR抗体,所述抗GITR抗体包含刺激肿瘤微环境中的T<sub>reg</sub>细胞耗竭的Fc。Fc可以是例如具有效应子功能或增强的效应子功能(比如与一种或多种活化Fc受体结合或具有增强的与一或多种活化Fc受体的结合)的Fc。在优选的实施方案中,T<sub>reg</sub>耗竭发生而不显著耗竭或抑制肿瘤微环境中的T<sub>eff</sub>,并且不显著耗竭或抑制肿瘤微环境外部例如外周中的T<sub>eff</sub>细胞和T<sub>reg</sub>细胞。在某些实施方案中,例如在受试者的肿瘤微环境中的T<sub>reg</sub>细胞上相比于T<sub>eff</sub>细胞上具有更高的GITR水平。

[0900] 在某些实施方案中,用具有增强激动作用(例如,与抑制性FcRIIb结合或具有增强的与抑制性FcRIIb的结合)的Fc的抗GITR抗体治疗受试者。用具有不与一种或多种活化FcR结合或具有降低的与一种或多种活化FcR的结合的Fc的抗GITR抗体进行某些治疗。抗GITR抗体可以耗竭肿瘤中的Treg和/或肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中的Treg。

[0901] 在某些实施方案中,给予受试者抗GITR抗体作为辅助治疗。用抗GITR抗体治疗患有癌症的受试者可延长生存,例如相对于当前护理标准的长期持续应答;至少3个月、6个月、9个月、1年、2年、3年、4年、5年、10年或更多年的长期生存,或至少3个月、6个月、9个月、1年、2年、3年、4年、5年或10年或更多年的无复发生存。在某些实施方案中,用抗GITR抗体治疗患有癌症的受试者例如在3个月、6个月、9个月、1年、2年、3年、4年、5年或10年或更多年的时间防止癌症复发或延迟癌症复发。抗GITR治疗可用作一线、二线或三线治疗。

[0902] 在优选的实施方案中,本文所述的抗GITR抗体无显著毒性。例如,GITR抗体对人的

器官(例如肝、肾、脑、肺和心脏中的一者或多者)无显著毒性,如例如在临床试验中确定的。在某些实施方案中,GITR抗体并不显著触发不期望的免疫应答,例如自身免疫或炎症。

[0903] 在某些实施方案中,用抗GITR激动剂(例如,抗GITR抗体)治疗受试者不会引起免疫系统过度刺激以至于到受试者的免疫系统随后攻击受试者自身的程度(例如,自身免疫应答)或导致例如过敏反应。因此,抗GITR抗体优选地不引起过敏反应。

[0904] 在某些实施方案中,用本文所述的抗GITR抗体(例如,包含28F3的CDR或可变区的抗体)治疗受试者不会引起显著的炎症反应,例如免疫介导的肺炎、免疫介导的结肠炎、免疫介导的肝炎、免疫介导的肾炎或肾功能不全、免疫介导的垂体炎、免疫介导的甲状腺功能减退和甲状腺功能亢进、或免疫介导的其他不良反应。在某些实施方案中,包含28F3的CDR或可变区的抗GITR抗体比其他抗GITR抗体较少引起炎症反应,例如免疫介导的肺炎、免疫介导的结肠炎、免疫介导的肝炎、免疫介导的肾炎或肾功能不全、免疫介导的垂体炎、免疫介导的甲状腺功能减退和甲状腺功能亢进、过敏反应或免疫介导的其他不良反应。免疫介导的其他不良反应包括:心脏疾患,例如室性心律失常;眼疾患,例如虹膜睫状体炎;输注相关反应;淀粉酶增加、脂肪酶增加;神经系统疾患,例如头晕、外周和感觉神经病变;皮肤和皮下组织疾患,例如皮疹、瘙痒、剥脱性皮炎、多形性红斑、白癜风或银屑病;呼吸、胸腔和纵膈疾患,例如咳嗽;疲劳;恶心;食欲减退;便秘;关节痛;和腹泻。

[0905] 在某些实施方案中,GITR抗体与另一种癌症疗法(比如刺激免疫系统的化合物(例如,肿瘤免疫药剂),例如本文所述的化合物或调节本文所述靶标的化合物)组合提供协同抗肿瘤效应。

[0906] 下文进一步详细论述本文所述的这些及其他方法。

[0907] 癌症

[0908] 通过抗GITR抗体活化GITR可增强针对患者中的癌细胞的免疫应答。本申请提供了治疗患有癌症的受试者的方法,其包括向受试者施用本文所述的抗GITR抗体,使得受试者得到治疗,例如使得癌性肿瘤的生长被抑制或减慢和/或肿瘤消退和/或实现生存延长。可单独使用抗GITR抗体来抑制癌性肿瘤的生长。或者,抗GITR抗体可与另一种药剂(例如,另一种免疫原性药剂、标准癌症治疗或另一种抗体)联合使用,如下文所述。

[0909] 因此,本申请提供了例如通过抑制受试者中的肿瘤细胞生长来治疗癌症的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的抗GITR抗体(例如28F3.IgG1或28F3.IgG1.1)或其抗原结合部分。所述抗体可以是人抗GITR抗体(比如本文所述的人抗人GITR抗体中的任一者)。另外地或可替代地,所述抗体可以是嵌合或人源化抗GITR抗体,例如包含本文所述的28F3或其他抗GITR抗体的序列的嵌合或人源化抗GITR抗体。

[0910] 使用本发明抗体的可抑制其生长的癌症包括:通常对免疫疗法有反应的癌症以及那些通常对免疫疗法无反应的癌症。癌症可以是具有实体肿瘤的癌症或血液恶性肿瘤(液体肿瘤)。待治疗的癌症的非限制性实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非鳞状NSCLC、神经胶质瘤、胃肠癌、肾癌(例如透明细胞癌)、卵巢癌、肝癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌(例如,肾细胞癌(RCC))、前列腺癌(例如激素难治性前列腺腺癌)、甲状腺癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、胶质母细胞瘤(多形性神经胶质母细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌和头颈癌(或癌瘤)、胃癌、生殖细胞肿瘤、儿科肉瘤、鼻窦自然杀伤细胞淋巴瘤(sinonasal natural killer)、黑色素瘤(例如,转

移性恶性黑色素瘤,例如皮肤或眼内恶性黑色素瘤)、骨癌、皮肤癌、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、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、输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统的新生物(CNS)、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱轴(spinal axis)肿瘤、脑癌、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱导的癌症(包括那些由石棉诱导的癌症)、病毒相关癌症或病毒起源的癌症(例如,人乳头瘤病毒(HPV)相关或起源的肿瘤)、衍生自两种主要血细胞谱系(即,骨髓细胞系(其产生粒细胞、红细胞、凝血细胞、巨噬细胞和肥大细胞)或淋巴细胞系(其产生B、T、NK和浆细胞)中的任一者的血液学恶性肿瘤,比如所有类型的白血病、淋巴瘤和骨髓瘤,例如急性、慢性、淋巴细胞性及/或骨髓性白血病,例如急性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和慢性骨髓性白血病(CML)、未分化的AML(M0)、成髓细胞性白血病(M1)、成髓细胞性白血病(M2;细胞成熟)、前髓细胞性白血病(M3或M3变体[M3V])、骨髓单核细胞性白血病(M4或具有嗜酸性粒细胞增多症的M4变体[M4E])、单核细胞白血病(M5)、红白血病(M6)、巨核细胞白血病(M7)、分离的粒细胞肉瘤和绿色瘤;淋巴瘤,例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、B细胞血液学恶性肿瘤(例如B细胞淋巴瘤)、T细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、单核细胞样B细胞淋巴瘤、粘膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤、间变性(例如,Ki 1 +)大细胞淋巴瘤、成人T细胞淋巴瘤/白血病、套细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、肠T细胞淋巴瘤、原发性纵膈B细胞淋巴瘤、前体T淋巴母细胞性淋巴瘤、T淋巴母细胞性;和淋巴瘤/白血病(T-Lbly/T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤、淋巴母细胞性淋巴瘤、移植后淋巴组织增殖性疾病、真性组织细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤(LBL)、淋巴谱系的造血肿瘤、急性淋巴母细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性组织细胞性淋巴瘤(DHL)、免疫母细胞大细胞淋巴瘤、前体B-淋巴母细胞性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤(CTLC)(也称为蕈样真菌病或塞扎里综合征(Sezary syndrome))和具有瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症的淋巴浆细胞性淋巴瘤(LPL);骨髓瘤,比如IgG骨髓瘤、轻链骨髓瘤、非分泌型骨髓瘤、冒烟型骨髓瘤(也称为惰性骨髓瘤)、孤立性浆细胞瘤和多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞淋巴瘤;骨髓谱系的造血肿瘤、间质起源的肿瘤(包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤);精原细胞瘤、畸胎瘤、中枢和周围神经肿瘤,包括星形细胞瘤、许旺细胞瘤;间质起源的肿瘤,包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤;及其他肿瘤,包括黑色素瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡癌和畸胎瘤、淋巴谱系的造血肿瘤,例如T细胞和B细胞肿瘤,包括但不限于T细胞疾病,例如T前淋巴细胞性白血病(T-PLL),包括小细胞和脑回样细胞型;优选T细胞型的大颗粒淋巴细胞白血病(LGL);a/d T-NHL肝脾淋巴瘤;外周/胸腺后T细胞淋巴瘤(多形性和免疫母细胞亚型);血管中心性(鼻)T细胞淋巴瘤;头或颈癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌;急性骨髓性淋巴瘤,以及所述癌症的任何组合。本文所述的方法也可用于治疗转移性癌症、不可切除和/或难治性癌症(例如,例如用阻断CTLA-4或PD-1或PD-L1抗体的先前免疫疗法难治的癌症)以及复发性癌症。

[0911] 在某些实施方案中,向患有对先前治疗(例如用肿瘤免疫药物的先前治疗)的反应不足的癌症的患者、或患有难治或抗性、固有难治或抗性(例如,用PD-1通路拮抗剂难治)癌症的患者、或其中抗性或难治性状态是获得性的癌症的患者施用抗GITR Ab。例如,对于第

一疗法无反应或反应不足或在治疗(例如抗PD-1治疗)后观察到疾病进展的受试者,可通过单独施用抗GITR抗体或与另一种疗法(例如,抗PD-1疗法)的联合治疗进行治疗。

[0912] 在某些实施方案中,向先前未接受过(即,未治疗)肿瘤免疫药剂(例如,PD-1通路拮抗剂)的患者施用抗GITR抗体。

[0913] 可通过标准护理治疗施用抗GITR抗体。可作为维持疗法(例如,旨在预防肿瘤发生或复发的疗法)施用抗GITR抗体。

[0914] 抗GITR抗体可与另一种治疗(例如,放射、手术或化学疗法)一起施用。例如,当有可能存在微转移的风险时,和/或为了降低复发的风险,可施用抗GITR抗体辅助治疗。

[0915] 抗GITR抗体可作为单一疗法、或作为唯一的免疫刺激疗法施用。针对GITR的抗体(例如,本文所述的抗GITR抗体)还可与免疫原性物质(比如癌细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子)、细胞以及用编码免疫刺激性细胞因子的基因转染的细胞)联合(He等人(2004) *J. Immunol.* 173:4919-28)。可以使用的肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑色素瘤抗原的肽,比如gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶的肽,或经转染表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞(下文进一步论述)。

[0916] 在人类中,一些肿瘤如黑色素瘤已显示具有免疫原性。通过降低经由GITR活化的T细胞活化的阈值,可激活宿主中的肿瘤反应,从而允许治疗非免疫原性肿瘤或那些具有有限的免疫原性的肿瘤。

[0917] 抗GITR抗体(例如,本文所述的抗GITR抗体)可与疫苗接种方案联合。已设计针对肿瘤的疫苗接种的许多实验策略(参见Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring:60-62; Logothetis, C., 2000, *ASCO Educational Book Spring*:300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*:414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*:730-738; 还参见Restifo, N.和Sznol, M., *Cancer Vaccines*, Ch.61, 第3023-3043页, DeVita等人(编辑), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 第五版)。在这些策略其中之一中,使用自体或同种异体肿瘤细胞制备疫苗。已显示这些细胞疫苗在肿瘤细胞被转导为表达GM-CSF时最有效。已显示GM-CSF是用于肿瘤疫苗接种的强力的抗原呈递活化剂(Dranoff等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:3539-43)。

[0918] 在各种肿瘤中基因表达和大规模基因表达模式的研究产生了所谓的肿瘤特异性抗原的定义(Rosenberg, S. A (1999) *Immunity* 10:281-7)。在许多情况下,这些肿瘤特异性抗原是在肿瘤和产生肿瘤的细胞中表达的分化抗原,例如黑色素细胞抗原gp100、MAGE抗原和Trp-2。更重要的是,许多这些抗原可能显示为在宿主中发现的肿瘤特异性T细胞的靶标。GITR活化可与在肿瘤中表达的重组蛋白和/或肽的集合结合使用,以便产生针对这些蛋白质的免疫应答。这些蛋白质通常被免疫系统视为自身抗原并且因此对其具有耐受性。肿瘤抗原可包括蛋白端粒酶,这种酶是染色体端粒合成所需的,并且在高于85%的人类癌症和仅仅有限数目的体细胞组织中表达(Kim等人(1994) *Science* 266:2011-2013)。肿瘤抗原也可以是由于改变蛋白质序列或产生两个无关序列(即,费城染色体中的bcr-abl)的融合蛋白的体细胞突变、或来自B细胞肿瘤的独特型而在癌细胞中表达的“新抗原”。

[0919] 其他肿瘤疫苗可包括来自牵涉人类癌症的病毒(比如人乳头瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV和HCV)和卡波西疱疹肉瘤病毒(KHSV))的蛋白质。可与GITR活化结合使用的另一种

形式的肿瘤特异性抗原是从肿瘤组织自身分离的纯化的热休克蛋白 (HSP)。这些热休克蛋白含有来自肿瘤细胞的蛋白质的片段,并且这些HSP在递送至抗原呈递细胞时高度有效地引出肿瘤免疫 (Suot和Srivastava (1995) Science 269:1585-1588; Tamura等人 (1997) Science 278:117-120)。

[0920] 树突细胞 (DC) 是可用于引发抗原特异性反应的强有力的抗原呈递细胞。DC可离体产生并且装载有各种蛋白质和肽抗原以及肿瘤细胞提取物 (Nestle等人 (1998) Nature Medicine 4:328-332)。还可以通过遗传手段转导DC使之也表达这些肿瘤抗原。还将DC与肿瘤细胞直接融合用于免疫目的 (Kugler等人 (2000) Nature Medicine 6:332-336)。作为疫苗接种的方法,DC免疫可有效地与GITR活化联合,以激活更有力的抗肿瘤反应。

[0921] GITR活化还可与标准癌症治疗 (例如,手术、放射和化学疗法) 联合。GITR活化可有效地与化学治疗方案联合。在这些情况下,有可能减少所施用化学治疗试剂的剂量 (Mokyr等人 (1998) Cancer Research 58:5301-5304)。这样的联合的一个实例是用于治疗黑色素瘤的抗GITR抗体与氨烯咪胺 (decarbazine) 的联合。这样的联合的另一个实例是用于治疗黑色素瘤的抗GITR抗体与白细胞介素-2 (IL-2) 的联合。支持GITR活化与化学疗法联合使用的科学理论基础是:细胞死亡 (这是大部分化学治疗化合物的细胞毒性作用的结果) 会导致在抗原呈递途径中的肿瘤抗原水平增加。可通过细胞死亡与GITR活化产生协同作用的其他联合治疗有放射、手术和激素剥夺。这些方案的每一者在宿主中产生肿瘤抗原的来源。也可将血管生成抑制剂与GITR活化联合。血管生成的抑制导致肿瘤细胞死亡,这可以向宿主抗原呈递途径中输入肿瘤抗原。

[0922] 本文所述的抗GITR抗体还可与双特异性抗体联合使用,所述双特异性抗体将表达Fc $\alpha$ 或Fc $\gamma$ 受体的效应细胞靶向至肿瘤细胞 (例如,参见美国专利No. 5,922,845和5,837,243)。双特异性抗体可用于靶向两种单独的抗原。例如,抗Fc受体/抗肿瘤抗原 (例如,Her-2/neu) 双特异性抗体已用于将巨噬细胞靶向至肿瘤部位。这种靶向可更有效地激活肿瘤特异性反应。可通过GITR的活化加强这些反应的T细胞臂。或者,可通过使用与肿瘤抗原和树突细胞特异性细胞表面标志物结合的双特异性抗体将抗原直接递送至DC。

[0923] 肿瘤通过多种机制逃避宿主免疫监视。通过使肿瘤表达的免疫抑制性蛋白失活,可以克服许多这些机制。这些机制特别包括TGF- $\beta$  (Kehrl等人 (1986) J. Exp. Med. 163:1037-1050)、IL-10 (Howard&O'Garra (1992) Immunology Today 13:198-200)、以及Fas配体 (Hahne等人 (1996) Science 274:1363-1365)。针对这些实体中的每一者的抗体可与抗GITR抗体联合使用,以抵消免疫抑制剂的影响并有利于宿主的肿瘤免疫应答。

[0924] 其他激活宿主免疫应答性的抗体可与抗GITR抗体联合使用。这些抗体包括在树突细胞表面上的激活DC功能和抗原呈递的分子。抗CD40抗体能够有效地取代辅助性T细胞活性 (Ridge等人 (1998) Nature 393:474-478),并且可与抗GITR抗体结合使用。针对T细胞共刺激分子的活化抗体也可以提供增加的T细胞活化水平,所述T细胞共刺激分子例如CTLA-4 (例如,美国专利No. 5,811,097)、OX-40 (Weinberg等人 (2000) Immunol 164:2160-2169)、4-1BB (Melero等人 (1997) Nature Medicine 3:682-685 (1997) 和ICOS (Hutloff等人 (1999) Nature 397:262-266)。PD1或PD-L1的抑制剂也可与抗GITR抗体结合使用。

[0925] 目前正在使用骨髓移植来治疗多种造血起源的肿瘤。虽然移植抗宿主病是这种治疗的后果,但从移植抗肿瘤反应可获得治疗益处。可利用GITR活化增加供体移入的肿



瘤特异性T细胞的有效性。

[0926] 还存在若干实验治疗方案,其涉及抗原特异性T细胞的离体活化与扩增,以及这些细胞到受体中的过继转移以刺激针对肿瘤的抗原特异性T细胞 (Greenberg和Riddell (1999) Science285:546-51)。这些方法还可用于激活针对传染原 (如CMV) 的T细胞应答。在抗GITR抗体存在下的离体活化可增加过继转移的T细胞的频率和活性。

[0927] 感染性疾病

[0928] 本文所述的方法也可用于治疗已暴露于特定毒素或病原体的患者。因此,本文所述的另一方面提供了治疗受试者中的感染性疾病的方法,其包括向受试者施用抗GITR抗体或其抗原结合部分,从而治疗受试者的感染性疾病。另外地或可替代地,抗体可以是嵌合或人源化抗体。

[0929] 类似于如上文论述的抗体的肿瘤应用,抗体介导的GITR活化可以单独使用或作为佐剂与疫苗联合使用,以刺激针对病原体、毒素和自身抗原的免疫应答。对于这种治疗方法可尤其有用的病原体的实例包括目前尚无有效疫苗的病原体或常规疫苗并非完全有效的病原体。这些病原体包括但不限于HIV、肝炎 (甲型、乙型和丙型)、流行性感冒、疱疹、贾第虫属、疟疾、利什曼原虫属、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌。针对由在感染过程中呈现改变抗原的因子 (比如HIV) 建立的感染,GITR活化可以有用。在施用抗人GITR抗体时,这些新的表位被识别为外来物,由此引起强的T细胞应答。

[0930] 引起可通过本文所述的方法治疗的感染的致病病毒的一些实例包括HIV、肝炎 (甲型、乙型或丙型)、疱疹病毒 (例如,VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II和CMV、EB病毒 (Epstein Barr virus))、腺病毒、流感病毒、虫媒病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、痘苗病毒、HTLV病毒、登革热病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC病毒和虫媒病毒性脑炎病毒。

[0931] 引起可通过本文所述的方法治疗的感染的致病菌的一些实例包括衣原体属、立克次体细菌 (rickettsial bacteria)、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、脑膜炎球菌和淋球菌、克雷伯菌属、变形杆菌属、沙雷菌属、假单胞菌属、军团菌属、白喉 (diphtheria)、沙门菌属、芽孢杆菌、霍乱 (cholera)、破伤风 (tetanus)、肉毒中毒 (botulism)、炭疽 (anthrax)、鼠疫 (plague)、钩端螺旋体病 (leptospirosis) 和莱姆病细菌 (Lymes disease bacteria)。

[0932] 引起可通过本文所述的方法治疗的感染的致病性真菌的一些实例包括假丝酵母属 (白色假丝酵母 (albicans)、克鲁斯假丝酵母 (krusei)、光滑假丝酵母 (glabrata)、热带假丝酵母 (tropicalis) 等)、新型隐球菌 (Cryptococcus neoformans)、曲霉菌属 (Aspergillus) (烟曲霉 (fumigatus)、黑曲霉 (niger) 等)、毛霉菌属 (Genus Mucorales) (毛霉 (mucor)、犁头霉 (absidia)、根霉菌 (rhizopus))、申克孢子丝菌 (Sporothrix schenkii)、皮炎芽生菌 (Blastomyces dermatitidis)、巴西副球孢子菌 (Paracoccidioides brasiliensis)、粗球孢子菌 (Coccidioides immitis) 和荚膜组织胞浆菌 (Histoplasma capsulatum)。

[0933] 引起可通过本文所述的方法治疗的感染的致病性寄生虫的一些实例包括溶组织内阿米巴 (Entamoeba histolytica)、结肠小袋纤毛虫 (Balantidium coli)、福氏耐格里原



虫 (*Naegleria fowleri*)、棘阿米巴属 (*Acanthamoeba* sp.)、蓝氏贾第鞭毛虫 (*Giardia lamblia*)、隐孢子虫属 (*Cryptosporidium* sp.)、卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、田鼠巴贝虫 (*Babesia microti*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、巴西日圆线虫 (*Nippostrongylus brasiliensis*)。

[0934] 在所有上述方法中, GITR活化可与其他形式的免疫疗法 (比如细胞因子治疗 (例如, 干扰素、GM-CSF、G-CSF、IL-2) 或双特异性抗体疗法 (其提供增强的肿瘤抗原呈递 (例如, 参见 Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123)) 联合。

[0935] 自身免疫反应

[0936] 抗GITR抗体可激发和放大自身免疫应答。实际上, 使用肿瘤细胞和肽疫苗诱导抗肿瘤反应揭示, 许多抗肿瘤反应涉及抗自身反应性 (van Elsas等人 (2001) *J. Exp. Med.* 194:481-489; Overwijk等人 (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:2982-2987; Hurwitz, (2000), 上文; Rosenberg和White (1996) *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol* 19(1):81-4)。因此, 为了设计疫苗接种方案, 有可能考虑结合使用抗GITR抗体和各种自身蛋白, 以有效产生针对这些自身蛋白的免疫应答来治疗疾病。例如, 阿尔茨海默病涉及Aβ肽在脑中的淀粉样蛋白沉积物中的不适当累积; 针对淀粉样蛋白的抗体应答能够清除这些淀粉样蛋白沉积物 (Schenk等人, (1999) *Nature* 400:173-177)。

[0937] 其他自身蛋白也可用作靶标, 比如用于治疗变态反应和哮喘的IgE、以及用于类风湿性关节炎的TNFα。最后, 可通过使用抗GITR抗体诱导针对各种激素的抗体应答。针对生殖激素的中和抗体应答可用于避孕。针对激素和特定肿瘤的生长所需的其他可溶性因子的中和抗体应答也可以考虑为可能的疫苗接种靶标。

[0938] 如上文针对抗GITR抗体的使用所述的类似方法可用于诱导治疗性自身免疫应答, 以治疗具有其他自身抗原 (例如淀粉样蛋白沉积物, 包括阿尔茨海默病中的Aβ)、细胞因子 (比如TNFα) 和IgE的不适当累积的患者。

[0939] 疫苗

[0940] 通过共同施用抗GITR抗体与感兴趣的抗原 (例如, 疫苗), 本文所述的抗GITR抗体可用于刺激抗原特异性免疫应答。因此, 本申请提供了增强对受试者中的抗原的免疫应答的方法, 其包括向受试者施用: (i) 抗原; 和 (ii) 抗GITR抗体或其抗原结合部分, 从而增强对受试者中的抗原的免疫应答。所述抗体可以是人抗人GITR抗体 (比如本文所述的人抗GITR抗体中的任一者)。另外地或可替代地, 抗体可以是嵌合或人源化抗体。抗原可以是例如肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原或来自病原体的抗原。这样的抗原的非限制性实例包括上文部分中论述的那些, 比如上文论述的肿瘤抗原 (或肿瘤疫苗), 或来自上述病毒、细菌或其他病原体的抗原。

[0941] 在某些实施方案中, 使用包含抗GITR抗体结合的表位的肽或融合蛋白作为疫苗, 作为抗GITR抗体的替代或者补充。

[0942] 体内和体外施用本文所述的抗体组合物 (例如, 人单克隆抗体、多特异性和双特异性分子以及免疫缀合物) 的适合途径是本领域所熟知的, 并且可由本领域普通技术人员选择。例如, 可通过注射 (例如, 静脉内或皮下) 施用抗体组合物。所用分子的适宜剂量将取决

于受试者的年龄和体重以及抗体组合物的浓度和/或配方。

[0943] 如前所述,本文所述的抗GITR抗体可与一种或多种其他治疗剂(例如,细胞毒性剂、放射毒性剂或免疫抑制剂)共同施用。抗体可以与药剂连接(为免疫复合物)或者可以与药剂分开施用。在后一种情况下(单独施用),抗体可在药剂之前、之后或同时施用或可与其他已知疗法(例如抗癌疗法,例如放射)共同施用。这样的治疗剂尤其包括就其自身而言只有在对患者有毒性或亚毒性的水平下才有效的抗新生物剂,比如多柔比星(doxorubicin)(阿霉素(adriamycin))、顺铂、硫酸博来霉素、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、达卡巴嗪和环磷酰胺羟基脲。以100mg/ml剂量每四周一次静脉内施用顺铂,以60-75mg/ml剂量每21天一次静脉内施用阿霉素。本文所述的抗GITR抗体或其抗原结合片段与化学治疗剂的共同施用提供了两种经由不同机制起作用的抗癌剂,其对人肿瘤细胞产生细胞毒作用。这样的共同施用可解决由于发生抗药性或肿瘤细胞的抗原性改变而使其不与抗体反应所致的问题。

[0944] 包含本文所述的抗体组合物(例如,人抗体、双特异性或多特异性分子或免疫缀合物)以及使用说明书的试剂盒也在本文所述的范围内。试剂盒可进一步含有至少一种另外的试剂或一种或多种另外的本文所述的人抗体(例如,具有互补活性的与不同于第一人抗体的GITR抗原中的表位结合的人抗体)。试剂盒通常包括指示试剂盒内容物的预期用途的标签。术语“标签”包括在试剂盒上或与试剂盒一起提供的或以其他方式伴随试剂盒的任何书面或记录材料。

[0945] 联合治疗

[0946] 除上文提供的联合治疗外,抗GITR抗体(例如,本文所述的那些)也可用于在例如用于治疗癌症的联合治疗,如下文所述。

[0947] 本申请提供了联合治疗方法,其中抗GITR抗体与一种或多种另外的药剂(例如,小分子药物、抗体或其抗原结合部分)共同施用,所述另外的药剂在刺激免疫应答中有效,从而进一步增强、刺激或上调受试者中的免疫应答。如实施例所示,向小鼠施用激动剂抗GITR抗体和拮抗剂抗PD-1抗体在抑制肿瘤生长中具有协同作用。

[0948] 通常,例如本文所述的抗GITR抗体可以与在免疫细胞如T细胞上的(i)刺激(例如,共刺激)分子(例如,受体或配体)的激动剂和/或(ii)抑制性信号或分子(例如,受体或配体)的拮抗剂联合,这两者都导致免疫应答比如抗原特异性T细胞应答的放大。在某些方面,肿瘤免疫药剂是在参与先天免疫的细胞,例如NK细胞上的(i)刺激(包括共刺激)分子(例如,受体或配体)的激动剂或(ii)抑制(包括共抑制)分子(例如,受体或配体)的拮抗剂,并且其中肿瘤免疫药剂增强先天免疫。这样的肿瘤免疫药剂通常被称为免疫检查点调节剂,例如免疫检查点抑制剂或免疫检查点刺激剂。

[0949] 在某些实施方案中,抗GITR抗体与靶向作为免疫球蛋白超家族(IgSF)成员的刺激或抑制分子的药剂一起施用。例如,例如本文所述的抗GITR抗体可以与靶向IgSF家族成员的药剂一起施用于受试者,以增进免疫应答。例如,抗GITR抗体可以与靶向(或特异性地结合)膜结合配体B7家族成员的药剂或与B7家族成员特异性结合的共刺激或共抑制受体一起施用,所述B7家族包括B7-1、B7-2、B7(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H2(ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)和B7-H6。

[0950] 抗GITR抗体也可以与靶向TNF和TNFR分子(配体或受体)家族成员的药剂一起施用,所述分子比如CD40和CD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137、

TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT $\beta$ R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDA1、EDA2、TNFR1、淋巴毒素 $\alpha$ /TNF $\beta$ 、TNFR2、TNF $\alpha$ 、LT $\beta$ R、淋巴毒素 $\alpha$ 1 $\beta$ 2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY和NGFR(参见,例如Tansey(2009) Drug Discovery Today 00:1)。

[0951] 可通过本文所述的抗GITR抗体(例如28F3.IgG1和28F3.IgG1.1)与以下药剂中的一种或多种联合来刺激T细胞应答:

[0952] (1) 抑制T细胞活化的蛋白质的拮抗剂(抑制剂或阻断剂)(例如,免疫检查点抑制剂),所述蛋白质例如如上所述的CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2和LAG-3,以及任何以下蛋白质:TIM-3、半乳凝素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳凝素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、B7-H3、B7-H4、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1和TIM-4;和/或

[0953] (2) 刺激T细胞活化的蛋白质的激动剂,所述蛋白质例如B7-1、B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、CD70、CD27、CD40、DR3和CD28H。

[0954] 调节上述蛋白质之一并可与激动剂抗GITR抗体(例如,本文所述用于治疗癌症的那些)联合的示例性药剂包括:Yervoy<sup>TM</sup>(伊匹单抗)或曲美木单抗(针对CTLA-4)、加利昔单抗(针对B7.1)、BMS-936558(针对PD-1)、MK-3475(针对PD-1)、AMP224(针对B7DC)、BMS-936559(针对B7-H1)、MPDL3280A(针对B7-H1)、MEDI-570(针对ICOS)、AMG557(针对B7H2)、MGA271(针对B7H3)、IMP321(针对LAG-3)、BMS-663513(针对CD137)、PF-05082566(针对CD137)、CDX-1127(针对CD27)、抗OX40抗体(Providence Health Services)、huMAbOX40L(针对OX40L)、阿塞西普(针对TACI)、CP-870893(针对CD40)、鲁卡木单抗(针对CD40)、达西珠单抗(针对CD40)、莫罗单抗-CD3(针对CD3)、伊匹单抗(针对CTLA-4)。

[0955] 抗GITR抗体也可与皮地利珠单抗(CT-011)一起施用,不过对其PD-1结合的特异性受到质疑。

[0956] 可以与激动剂抗GITR抗体联合用于治疗癌症的其他分子包括NK细胞上的抑制性受体的拮抗剂或NK细胞上的活化性受体的激动剂。例如,抗GITR激动剂抗体可以与KIR的拮抗剂(例如,立鲁单抗)组合。

[0957] T细胞活化还受到可溶性细胞因子的调节,并且抗GITR抗体可以与抑制T细胞活化的细胞因子的拮抗剂或刺激T细胞活化的细胞因子的激动剂一起施用于例如患有癌症的受试者。

[0958] 在某些实施方案中,抗GITR抗体可以与下列各项联合:(i) 抑制T细胞活化的IgSF家族或B7家族或TNF家族的蛋白质的拮抗剂(或抑制剂或阻断剂)或抑制T细胞活化的细胞因子(例如,IL-6、IL-10、TGF- $\beta$ 、VEGF;“免疫抑制细胞因子”)的拮抗剂和/或(ii) IgSF家族、B7家族或TNF家族的刺激性受体的激动剂,或刺激T细胞活化的细胞因子的激动剂,用于刺激免疫应答,例如用于治疗诸如癌症的增殖性疾病。

[0959] 用于联合治疗的其他药剂还包括抑制或耗竭巨噬细胞或单核细胞的药剂,包括但不限于CSF-1R拮抗剂,比如CSF-1R拮抗剂抗体,包括RG7155(W011/70024、W011/107553、W011/131407、W013/87699、W013/119716、W013/132044)或FPA-008(W011/140249;W013169264;W014/036357)。

[0960] 抗GITR抗体也可以与抑制TGF- $\beta$ 信号转导的药剂一起施用。

[0961] 可以与抗GITR抗体联合的另外的药剂包括增强肿瘤抗原呈递的药剂,例如树突细

胞疫苗、分泌GM-CSF的细胞疫苗、CpG寡核苷酸和咪喹莫特,或增强肿瘤细胞的免疫原性的治疗(例如,葱环类)。

[0962] 可与抗GITR抗体联合的其他治疗还包括耗竭或阻断Treg细胞的治疗,例如与CD25特异性地结合的药剂。

[0963] 另一种可与抗GITR抗体联合的治疗是抑制代谢酶比如吡哆胺双加氧酶(IDO)、双加氧酶、精氨酸酶或一氧化氮合成酶的治疗。

[0964] 另一类可与抗GITR抗体一起使用的药剂包括抑制腺苷形成或抑制腺苷A2A受体的药剂。

[0965] 可以与用于治疗癌症的抗GITR抗体联合的其他治疗包括逆转/预防T细胞无能或耗竭的治疗和在肿瘤部位触发先天免疫激活和/或炎症的治疗。

[0966] 抗GITR抗体可以与多于一种的肿瘤免疫药剂联合,并且可以例如与靶向免疫途径的多种成分的组合方法联合,所述组合方法例如以下一种或多种:增强肿瘤抗原呈递的治疗(例如,树突细胞疫苗,分泌GM-CSF的细胞疫苗、CpG寡核苷酸、咪喹莫特);例如通过抑制CTLA-4和/或PD1/PD-L1/PD-L2途径和/或耗竭或阻断Treg或其他免疫抑制性细胞来抑制负性免疫调节的治疗;刺激正性免疫调节的治疗,例如用刺激CD-137、OX-40和/或GITR途径和/或刺激T细胞效应子功能的激动剂;全身性地增加抗肿瘤T细胞的频率的治疗;耗竭或抑制Treg(比如肿瘤中的Treg)的治疗,例如使用CD25拮抗剂(例如,达利珠单抗)或通过离体抗CD25珠耗竭;影响肿瘤中的抑制性髓样细胞功能的治疗;增强肿瘤细胞的免疫原性的治疗(例如,葱环类);过继性T细胞或NK细胞转移,所述细胞包括遗传修饰的细胞,例如经嵌合抗原受体修饰的细胞(CAR-T疗法);抑制代谢酶如吡哆胺双加氧酶(IDO)、双加氧酶、精氨酸酶或一氧化氮合成酶的治疗;逆转/防止T细胞无能或耗竭的治疗;在肿瘤部位触发先天免疫激活和/或炎症的治疗;免疫刺激性细胞因子的施用;或免疫抑制性细胞因子的阻断。

[0967] 本文所述的激动剂抗GITR抗体可以与一种或多种下列药剂一起使用:连接正性共刺激受体的激动剂;通过抑制性受体减弱信号转导的阻断剂、拮抗剂和一种或多种全身性地增加抗肿瘤T细胞的频率的药剂;克服肿瘤微环境中不同免疫抑制途径(例如,阻断抑制性受体衔接(例如,PD-L1/PD-1相互作用))、耗竭或抑制Treg(例如,使用抗CD25单克隆抗体(例如,达利珠单抗)或通过离体抗CD25珠子耗竭)、抑制代谢酶比如IDO、或逆转/预防T细胞无能或衰竭)的药剂以及在肿瘤部位触发先天免疫激活和/或炎症的药剂。

[0968] 在某些实施方案中,如果受试者为BRAF V600突变阳性,则将抗GITR抗体与BRAF抑制剂一起施用于受试者。

[0969] 在某些实施方案中,与另一种免疫刺激性抗体一起施用的抗GITR抗体是本文所述的抗体。在某些实施方案中,与另一种免疫刺激性抗体一起施用的抗GITR抗体是具有6C8的CDR序列的抗体,例如具有6C8的CDR的人源化抗体,如例如W02006/105021中所述;包含W02011/028683中所述的抗GITR抗体的CDR的抗体;包含JP2008278814中所述的抗GITR抗体的CDR的抗体、包含W02015/031667中所述的抗GITR抗体的CDR的抗体、或本文中描述或提及的其他抗GITR抗体。

[0970] 本申请提供了刺激受试者中的免疫应答的方法,其包括向受试者施用激动剂抗GITR分子,例如抗体和一种或多种另外的免疫刺激性抗体,如抗PD-1拮抗剂(例如,拮抗剂抗体)、抗PD-L1拮抗剂(例如,拮抗剂抗体)、拮抗剂抗CTLA-4拮抗剂(例如,拮抗剂抗体)和/

或抗LAG3拮抗剂(例如,拮抗剂抗体),从而刺激受试者中的免疫应答,以便例如抑制肿瘤生长或刺激抗病毒反应。在一个实施方案中,给受试者施用激动剂抗GITR抗体和拮抗剂抗PD-1抗体。在一个实施方案中,给受试者施用激动剂抗GITR抗体和拮抗剂抗PD-L1抗体。在一个实施方案中,给受试者施用激动剂抗GITR抗体和拮抗剂抗CTLA-4抗体。在一个实施方案中,抗GITR抗体是人抗体,比如本文所述的抗体。或者,抗GITR抗体可以是例如嵌合或人源化抗体(例如,从小鼠抗GITR mAb制备),如本文中进一步描述的那些。在一个实施方案中,至少一种另外的免疫刺激性抗体(例如,拮抗剂抗PD-1、拮抗剂抗PD-L1、拮抗剂抗CTLA-4和/或拮抗剂抗LAG3抗体)是人抗体。或者,至少一种另外的免疫刺激性抗体可以是例如嵌合或人源化抗体(例如,从小鼠抗PD-1、抗PD-L1、抗CTLA-4和/或抗LAG3抗体制备)。

[0971] 本申请提供了治疗过度增殖性疾病(例如,癌症)的方法,其包括向受试者施用激动剂抗GITR抗体和拮抗剂PD-1抗体。在某些实施方案中,抗GITR抗体以亚治疗剂量施用,抗PD-1抗体以亚治疗剂量施用,或两者都以亚治疗剂量施用。本文中还提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病相关的不良事件的方法,其包括向受试者施用抗GITR抗体和亚治疗剂量的抗PD-1抗体。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,抗PD-1抗体是人序列单克隆抗体并且抗GITR抗体是人序列单克隆抗体,比如包含本文所述的28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10的CDR或可变区的抗体(例如,28F3.IgG1或28F3.IgG1.1)或本文所述的另一种激动剂抗GITR抗体。

[0972] 适合用于本文所述的方法的PD-1拮抗剂包括但不限于配体、抗体(例如,单克隆抗体和双特异性抗体)和多价药剂。在一个实施方案中,PD-1拮抗剂是融合蛋白,例如Fc融合蛋白,比如AMP-244。在一个实施方案中,PD-1拮抗剂是抗PD-1或抗PD-L1抗体。

[0973] 示例性抗PD-1抗体是纳武单抗(BMS-936558)或包含WO 2006/121168中所述的抗体17D8、2D3、4H1、5C4、7D3、5F4和4A11之一的CDR或可变区的抗体。在某些实施方案中,抗PD1抗体是WO2012/145493中所述的MK-3475(拉姆布罗力珠单抗(lambrolizumab));和WO 2012/145493中所述的AMP-514。其他已知的PD-1抗体和其他PD-1抑制剂包括在WO 2009/014708、WO 03/099196、WO 2009/114335、WO 2011/066389、WO 2011/161699、WO2012/145493、美国专利No.7,635,757和8,217,149以及美国专利公开号2009/0317368中描述的那些。还可使用在WO2013/173223中公开的抗PD-1抗体中的任一者。与这些抗体之一竞争结合和/或结合PD-1上的相同表位的抗PD-1抗体也可用于联合治疗。靶向PD-1受体的另一种途径是由与IgG1的Fc部分融合的PD-L2(B7-DC)的细胞外结构域组成的重组蛋白(称作AMP-224)。

[0974] 在某些实施方案中,抗PD-1抗体以 $5 \times 10^{-8}$ M或更低的 $K_D$ 与人PD-1结合,以 $1 \times 10^{-8}$ M或更低的 $K_D$ 与人PD-1结合,以 $5 \times 10^{-9}$ M或更低的 $K_D$ 与人PD-1结合,或以 $1 \times 10^{-8}$ M与 $1 \times 10^{-10}$ M之间或更低的 $K_D$ 与人PD-1结合。

[0975] 本申请提供了治疗过度增殖性疾病(例如,癌症)的方法,其包括向受试者施用激动剂抗GITR抗体和拮抗剂PD-L1抗体。在某些实施方案中,抗GITR抗体以亚治疗剂量施用,抗PD-L1抗体以亚治疗剂量施用,或两者都以亚治疗剂量施用。本申请提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病相关的不良事件的方法,其包括向受试者施用抗GITR抗体和亚治疗剂量的抗PD-L1抗体。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是人序列单克隆抗体并且抗GITR抗体是人序列单克隆抗体,比如包含本文所述的28F3、

19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2和6G10的CDR或可变区的抗体(例如,28F3.IgG1或28F3.IgG1.1)或本文所述的另一种激动剂抗GITR抗体。

[0976] 在一个实施方案中,抗PD-L1抗体是BMS-936559(在W0 2007/005874和美国专利No.7,943,743中被称为12A4)、或包含描述于PCT公开W007/005874和美国专利No.7,943,743中的3G10、12A4、10A5、5F8、10H10、1B12、7H1、11E6、12B7和13G4的CDR或可变区的抗体。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是MEDI4736(也称作抗B7-H1)、MPDL3280A(也称作RG7446)、MSB0010718C(W02013/79174)或rHigM12B7。还可使用在W02013/173223、W02011/066389、W02012/145493、美国专利No.7,635,757和8,217,149以及美国公开号2009/145493中公开的抗PD-L1抗体中的任一者。与这些抗体中的任一者竞争和/或结合相同表位的抗PD-L1抗体也可用于联合治疗。

[0977] 在某些实施方案中,抗PD-L1抗体以 $5 \times 10^{-8}$ M或更低的 $K_D$ 与人PD-L1结合,以 $1 \times 10^{-8}$ M或更低的 $K_D$ 与人PD-L1结合,以 $5 \times 10^{-9}$ M或更低的 $K_D$ 与人PD-L1结合,或以 $1 \times 10^{-8}$ M与 $1 \times 10^{-10}$ M之间或更低的 $K_D$ 与人PD-L1结合。

[0978] 本申请提供了治疗过度增殖性疾病(例如,癌症)的方法,其包括向受试者施用本文所述的抗GITR抗体和CTLA-4拮抗剂抗体。在某些实施方案中,抗GITR抗体以亚治疗剂量施用,抗CTLA-4抗体以亚治疗剂量施用,或两者都以亚治疗剂量施用。本申请提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病相关的不良事件的方法,其包括向受试者施用抗GITR抗体和亚治疗剂量的抗CTLA-4抗体。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,抗CTLA-4抗体是选自下组的抗体:Yervoy<sup>TM</sup>(伊匹单抗或抗体10D1,描述于PCT公开W0 01/14424中)、曲美木单抗(以前的替西木单抗,CP-675,206)、描述于以下公开中的任一者中的单克隆或抗CTLA-4抗体:W0 98/42752;W0 00/37504;美国专利No.6,207,156;Hurwitz等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95(17):10067-10071;Camacho等人(2004)J.Clin.Oncology 22(145):摘要号2505(抗体CP-675206);以及Mokyr等人(1998)Cancer Res.58:5301-5304。还可使用在W02013/173223中公开的抗CTLA-4抗体中的任一者。

[0979] 在某些实施方案中,抗CTLA-4抗体以 $5 \times 10^{-8}$ M或更低的 $K_D$ 与人CTLA-4结合,以 $1 \times 10^{-8}$ M或更低的 $K_D$ 与人CTLA-4结合,以 $5 \times 10^{-9}$ M或更低的 $K_D$ 与人CTLA-4结合,或以 $1 \times 10^{-8}$ M与 $1 \times 10^{-10}$ M之间或更低的 $K_D$ 与人CTLA-4结合。

[0980] 本申请提供了治疗过度增殖性疾病(例如,癌症)的方法,其包括向受试者施用抗GITR抗体和LAG-3抗体。在进一步的实施方案中,抗GITR抗体以亚治疗剂量施用,抗LAG-3抗体以亚治疗剂量施用,或两者都以亚治疗剂量施用。本申请提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病相关的不良事件的方法,其包括向受试者施用抗GITR抗体和亚治疗剂量的抗LAG-3抗体。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是人序列单克隆抗体并且抗GITR抗体是人序列单克隆抗体,比如包含本文所述的28F3、19D3、18E10、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2或6G10的CDR或可变区的抗体(例如,28F3.IgG1或28F3.IgG1.1)或本文所述的另一种激动剂抗GITR抗体。抗LAG3抗体的实例包括包含描述于美国专利公开号US2011/0150892、W010/19570和W02014/008218中的抗体25F7、26H10、25E3、8B7、11F2或17E5的CDR或可变区的抗体。在一个实施方案中,抗LAG-3抗体是BMS-986016。可使用的其他本领域公认的抗LAG-3抗体包括描述于US 2011/007023、W008/132601和W009/44273中的IMP731和IMP-321。与这些抗体中的任一者竞争和/

或结合相同表位的抗LAG-3抗体也可用于联合治疗。

[0981] 在某些实施方案中,抗LAG-3抗体以 $5 \times 10^{-8}$ M或更低的 $K_D$ 与人LAG-3结合,以 $1 \times 10^{-8}$ M或更低的 $K_D$ 与人LAG-3结合,以 $5 \times 10^{-9}$ M或更低的 $K_D$ 与人LAG-3结合,或以 $1 \times 10^{-8}$ M与 $1 \times 10^{-10}$ M之间或更低的 $K_D$ 与人LAG-3结合。

[0982] 施用本文所述的抗GITR抗体和针对一种或多种第二靶抗原(比如LAG-3和/或CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1)的拮抗剂(例如,拮抗剂抗体)可增强对患者中的癌细胞的免疫应答。使用本公开抗体的可抑制其生长的癌症包括:通常对免疫疗法有反应的癌症以及那些通常对免疫疗法无反应的癌症。利用本公开的联合治疗进行治疗的癌症的代表性实例包括本文中列举的那些癌症。

[0983] 在某些实施方案中,本文中论述的治疗抗体的联合可以以在药学上可接受的载体中的单一组合物形式同时施用,或以每种抗体在药学上可接受的载体中的单独的组合物形式同时施用。在另一个实施方案中,可依次施用治疗抗体的联合。例如,抗CTLA-4抗体和抗GITR抗体可依次施用,比如首先施用抗CTLA-4抗体并且然后施用抗GITR抗体,或首先施用抗GITR抗体并且然后施用抗CTLA-4抗体。另外地或可替代地,抗PD-1抗体和抗GITR抗体可依次施用,比如首先施用抗PD-1抗体并且然后施用抗GITR抗体,或首先施用抗GITR抗体并且然后施用抗PD-1抗体。另外地或可替代地,抗PD-L1抗体和抗GITR抗体可依次施用,比如首先施用抗PD-L1抗体并且然后施用抗GITR抗体,或首先施用抗GITR抗体并且然后施用抗PD-L1抗体。另外地或可替代地,抗LAG-3抗体和抗GITR抗体可依次施用,比如首先施用抗LAG-3抗体并且然后施用抗GITR抗体,或首先施用抗GITR抗体并且然后施用抗LAG-3抗体。

[0984] 此外,如果依次施用联合治疗的多于一个的剂量,则可将依次施用次序反过来或在每个施用时间点保持相同的次序,依次施用可与同时施用组合,或其任何组合。例如,抗CTLA-4抗体与抗GITR抗体联合的首次施用可以是同时的;第二次施用可以是依次的,其中首先是抗CTLA-4抗体,并且然后是抗GITR抗体;并且第三次施用可以是依次的,其中首先是抗GITR抗体,并且然后是抗CTLA-4抗体,等等。另外地或可替代地,抗PD-1抗体与抗GITR抗体联合的首次施用可以是同时的;第二次施用可以是依次的,其中首先是抗PD-1抗体,并且然后是抗GITR抗体;并且第三次施用可以是依次的,其中首先是抗GITR抗体,并且然后是抗PD-1抗体,等等。另外地或可替代地,抗PD-L1抗体与抗GITR抗体联合的首次施用可以是同时的;第二次施用可以是依次的,其中首先是抗PD-L1抗体,并且然后是抗GITR抗体;并且第三次施用可以是依次的,其中首先是抗GITR抗体,并且然后是抗PD-L1抗体,等等。另外地或可替代地,抗LAG-3抗体与抗GITR抗体联合的首次施用可以是同时的;第二次施用可以是依次的,其中首先是抗LAG-3抗体,并且然后是抗GITR抗体;并且第三次施用可以是依次的,其中首先是抗GITR抗体,并且然后是抗LAG-3抗体,等等。另一个代表性给药方案可涉及首次依次施用,其中首先是抗GITR抗体,并且然后是抗CTLA-4抗体(和/或抗PD-1抗体和/或抗PD-L1抗体和/或抗LAG-3抗体),并且随后的施用可以是同时的。

[0985] 在一个实施方案中,通过向患有可受益于免疫系统的刺激的疾病(例如,癌症或感染性疾病)的受试者施用抗GITR抗体和肿瘤免疫药剂来治疗所述受试者,其中所述肿瘤免疫药剂为CD137(4-1BB)激动剂,比如激动性CD137抗体。适合的CD137抗体包括例如乌瑞鲁单抗(urelumab)或PF-05082566(W012/32433)。

[0986] 在一个实施方案中,通过向患有可受益于免疫系统的刺激的疾病(例如,癌症或感

染性疾病)的受试者施用抗GITR抗体和肿瘤免疫药剂来治疗所述受试者,其中所述肿瘤免疫药剂为OX40激动剂,比如激动性OX40抗体。适合的OX40抗体包括例如MEDI-6383、MEDI-6469或MOXR0916 (RG7888;W006/029879)。

[0987] 在一个实施方案中,通过向患有可受益于免疫系统的刺激的疾病(例如,癌症或感染性疾病)的受试者施用抗GITR抗体和肿瘤免疫药剂来治疗所述受试者,其中所述肿瘤免疫药剂为CD40激动剂,比如激动性CD40抗体。在某些实施方案中,肿瘤免疫药剂为CD40拮抗剂,例如拮抗性CD40抗体。适合的CD40抗体包括例如鲁卡木单抗(HCD122)、达西珠单抗(SGN-40)、CP-870,893或Chi Lob 7/4。

[0988] 在一个实施方案中,通过向患有可受益于免疫系统的刺激的疾病(例如,癌症或感染性疾病)的受试者施用抗GITR抗体和肿瘤免疫药剂来治疗所述受试者,其中所述肿瘤免疫药剂为CD27激动剂,比如激动性CD27抗体。适合的CD27抗体包括例如瓦里木单抗(varlilumab)(CDX-1127)。

[0989] 在一个实施方案中,通过向患有可受益于免疫系统的刺激的疾病(例如,癌症或感染性疾病)的受试者施用抗GITR抗体和肿瘤免疫药剂来治疗所述受试者,其中所述肿瘤免疫药剂为MGA271(针对B7H3)(W011/109400)。

[0990] 在一个实施方案中,通过向患有可受益于免疫系统的刺激的疾病(例如,癌症或感染性疾病)的受试者施用抗GITR抗体和肿瘤免疫药剂来治疗所述受试者,其中所述肿瘤免疫药剂为KIR拮抗剂,比如立鲁单抗(lirilumab)。

[0991] 在一个实施方案中,通过向患有可受益于免疫系统的刺激的疾病(例如,癌症或感染性疾病)的受试者施用抗GITR抗体和肿瘤免疫药剂来治疗所述受试者,其中所述肿瘤免疫药剂为IDO拮抗剂。适合的IDO拮抗剂包括(例如)INCB-024360(W02006/122150、W007/75598、W008/36653、W008/36642)、吲哚莫德(indoximod)、NLG-919(W009/73620、W009/1156652、W011/56652、W012/142237)或F001287。

[0992] 在一个实施方案中,通过向患有可受益于免疫系统的刺激的疾病(例如,癌症或感染性疾病)的受试者施用抗GITR抗体和肿瘤免疫药剂来治疗所述受试者,其中所述肿瘤免疫药剂为Toll样受体激动剂,例如TLR2/4激动剂(例如,卡介苗);TLR7激动剂(例如,Hiltonol或咪喹莫特);TLR7/8激动剂(例如,瑞喹莫德(Resiquimod));或TLR9激动剂(例如,CpG7909)。

[0993] 在一个实施方案中,通过向患有可受益于免疫系统的刺激的疾病(例如,癌症或感染性疾病)的受试者施用抗GITR抗体和肿瘤免疫药剂来治疗所述受试者,其中所述肿瘤免疫药剂为TGF- $\beta$ 抑制剂,例如GC1008、LY2157299、TEW7197或IMC-TR1。

[0994] 在一个方面,在施用第二药剂(例如,肿瘤免疫药剂)之前依次施用抗GITR抗体。在一个方面,抗GITR抗体与第二药剂(例如,肿瘤免疫药剂)同时施用。在再一方面,在施用第二药剂之后依次施用抗GITR抗体。两种药剂施用的开始可以间隔例如30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、3小时、6小时、12小时、24小时、36小时、48小时、3天、5天、7天或一个或多个周的时间,或第二药剂施用的开始可在施用第一药剂之后例如30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、3小时、6小时、12小时、24小时、36小时、48小时、3天、5天、7天或一周或多周。

[0995] 在某些方面,抗GITR抗体和第二药剂(例如,肿瘤免疫药剂)同时施用,例如,经过例如30分钟或60分钟的时间向患者同时输注。抗GITR抗体可与第二药剂(例如,肿瘤免疫药



剂)共同配制。

[0996] 任选地,作为唯一的免疫治疗剂的抗GITR或抗GITR抗体与一种或多种另外的免疫治疗抗体(例如,抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3阻断)的联合,其可进一步与免疫原性物质(比如癌细胞、纯化肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子)、细胞以及用编码免疫刺激性细胞因子的基因转染的细胞)联合(He等人(2004) J. Immunol. 173:4919-28)。可以使用的肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑色素瘤抗原的肽,比如gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶的肽,或经转染表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞(下文进一步论述)。联合的GITR活化与一种或多种另外的抗体(例如,CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断)还可进一步与标准癌症治疗联合。例如,联合的GITR活化与一种或多种另外的抗体(例如,CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断)可与化学治疗方案有效联合。在这些情况下,利用本公开的联合有可能减少所施用的化学治疗试剂的剂量(Mokyr等人(1998) Cancer Research 58:5301-5304)。这样的联合实例为具有或没有另外的抗体(比如抗CTLA-4抗体和/或抗PD-1抗体和/或抗PD-L1抗体和/或抗LAG-3抗体)的抗GITR激动剂抗体的联合,其进一步与氨烯咪胺联合用于治疗黑色素瘤。另一个实例为具有或没有抗CTLA-4抗体和/或抗PD-1抗体和/或抗PD-L1抗体和/或抗LAG-3抗体的抗GITR抗体的联合,其进一步与白细胞介素2(IL-2)联合用于治疗黑色素瘤。支持GITR活化与CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断以及化学疗法的联合使用的科学理论基础是:细胞死亡(这是大部分化学治疗化合物的细胞毒性作用的结果)会导致在抗原呈递途径中的肿瘤抗原水平增加。可通过细胞死亡与具有或没有CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断的联合GITR活化产生协同作用的其他联合治疗包括放射、手术或激素剥夺。这些方案的每一者在宿主中产生肿瘤抗原的来源。血管生成抑制剂还可与联合的GITR活化以及CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断联合。血管生成的抑制导致肿瘤细胞死亡,这可以是输入宿主抗原呈递途径中的肿瘤抗原的来源。

[0997] 作为唯一的免疫治疗剂的抗GITR激动剂抗体或GITR激动性与CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断抗体的联合,其还可与将表达Fc $\alpha$ 或Fc $\gamma$ 受体的效应细胞靶向至肿瘤细胞的双特异性抗体联合使用(例如,参见美国专利No. 5,922,845和5,837,243)。双特异性抗体可用于靶向两种单独的抗原。通过使用联合的GITR活化与CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断,可加强这些反应的T细胞臂。

[0998] 在另一实例中,作为唯一的免疫治疗剂的抗GITR激动剂抗体或抗GITR抗体与另外的免疫刺激剂(例如抗CTLA-4抗体和/或抗PD-1抗体和/或抗PD-L1抗体和/或LAG-3药剂(例如抗体))的联合,其可与抗新生物抗体结合使用,所述抗新生物抗体比如Rituxan®(利妥昔单抗)、Herceptin®(曲妥珠单抗)、Bexxar®(托西莫单抗)、Zevalin®(替伊莫单抗)、Campath®(阿伦单抗)、Lymphocide®(依帕珠单抗(epratuzumab))、Avastin®(贝伐珠单抗)以及 Tarceva®(厄洛替尼),等等。作为举例且不希望受理论的束缚,用抗癌抗体或与毒素缀合的抗癌抗体治疗可导致癌细胞(例如,肿瘤细胞)死亡,其可增强由免疫刺激剂(例如GITR、CTLA-4、PD-1、PD-L1或LAG-3药剂,比如抗体)介导的免疫应答。在示例性实施方案中,过度增殖性疾病(例如,癌症肿瘤)的治疗可包括抗癌剂(例如抗体)与抗GITR以及任选的另外的免疫刺激剂(例如,抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3药剂,比

如抗体)的联合(同时施用或依次施用或其任何组合),其可增强宿主的抗肿瘤免疫应答。

[0999] 肿瘤通过多种机制逃避宿主免疫监视。通过使肿瘤表达的免疫抑制性蛋白失活,可以克服许多这些机制。这些机制特别包括TGF- $\beta$  (Kehrl等人(1986) J. Exp. Med. 163:1037-1050)、IL-10 (Howard&O'Garra (1992) Immunology Today 13:198-200)、以及Fas配体 (Hahne等人(1996) Science 274:1363-1365)。针对这些实体中的每一者的抗体可进一步与具有或没有另外的免疫刺激剂(例如,抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3药剂,比如抗体)的抗GITR抗体联合,以抵消免疫抑制剂的影响并有利于宿主的抗肿瘤免疫应答。

[1000] 可用于激活宿主免疫应答性的其他药剂(例如,抗体)可进一步与具有或没有另外的免疫刺激剂(比如抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3抗体)的抗GITR抗体联合使用。这些抗体包括在树突细胞表面上的激活DC功能和抗原呈递的分子。抗CD40抗体 (Ridge等人,上文)可与抗GITR抗体以及任选的另外的免疫刺激剂(例如,抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3药剂,例如抗体)结合使用。针对T细胞共刺激分子的其他活化抗体 (Weinberg等人,上文;Melero等人,上文;Hutloff等人,上文)也可提供增加的T细胞活化水平。

[1001] 如上文论述的,目前正在使用骨髓移植来治疗多种造血起源的肿瘤。单独的或与CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断联合的抗GITR免疫疗法可用于增加供体移入的肿瘤特异性T细胞中的有效性。

[1002] 若干实验治疗方案涉及抗原特异性T细胞的离体活化与扩增以及这些细胞到受体中的过继转移,以刺激针对肿瘤的抗原特异性T细胞 (Greenberg和Riddell,上文)。这些方法还可用于激活针对传染原(如CMV)的T细胞应答。可预期在具有或没有另外的免疫刺激疗法(例如,抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3抗体)的抗GITR存在下的离体活化可增加过继转移的T细胞的频率和活性。

[1003] 本申请提供了改变与使用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病(例如癌症)相关的不良事件的方法,其包括向受试者施用抗GITR抗体,并且施用或不施用抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3药剂(例如,抗体)。例如,本文所述的方法提供了通过向患者施用非吸收性类固醇来降低免疫刺激性治疗抗体诱导的结肠炎或腹泻的发病率的方法。如本文中使用的,“非吸收性类固醇”是这样的糖皮质激素,其展现广泛的首过代谢,使得其在肝中代谢后,类固醇的生物利用度是低的,即小于约20%。在本文所述的一个实施方案中,非吸收性类固醇是布地奈德。布地奈德是一种局部作用的糖皮质类固醇,其在口服施用后被广泛代谢,主要通过肝脏代谢。ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) 是布地奈德的pH依赖性和时间依赖性口服制剂,是为了优化到回肠和整个结肠的药物递送而开发的。ENTOCORT EC®在美国获准用于治疗涉及回肠和/或升结肠的轻度至中度克罗恩病。用于治疗克罗恩病的ENTOCORT EC®的通常口服剂量为6mg/天至9mg/天。ENTOCORT EC®在肠中释放,之后吸收并保留在肠粘膜中。一旦其穿过肠粘膜靶组织,ENTOCORT EC®即被肝中的细胞色素P450系统广泛代谢成为几乎没有糖皮质激素活性的代谢物。因此,其生物利用度是低的(约10%)。与具有较不广泛的首过代谢的其他糖皮质激素相比,布地奈德的低生物利用度产生了改良的治疗比。相比于全身作用的皮质类固醇,布地奈德产生较少的副作用,包括更小的下丘

脑-垂体抑制。然而,长期施用ENTOCORTEC®可导致全身性糖皮质激素作用,比如肾上腺功能亢进和肾上腺抑制。参见PDR,第58版,2004;608-610。

[1004] 在更进一步的实施方案中,与非吸收性类固醇结合的GITR活化[具有或没有CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断(即,免疫刺激性治疗抗体抗GITR和任选的抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3抗体)]可进一步与水杨酸盐联合。水杨酸盐包括5-ASA剂,例如像:柳氮磺胺吡啶(AZULFIDINE®,Pharmacia&UpJohn);奥沙拉秦(DIPENTUM®,Pharmacia&UpJohn);巴柳氮(COLAZAL®,Salix Pharmaceuticals公司);以及美沙拉秦(ASACOL®,Procter&Gamble Pharmaceuticals;PENTASA®,Shire US;CANASA®,Axcen Scandipharm公司;ROWASA®,Solvay)。

[1005] 根据本文所述的方法,为了降低免疫刺激性抗体诱导的结肠炎的发病率,与抗GITR[具有或没有抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或LAG-3抗体]和非吸收性类固醇联合施用的水杨酸盐可包括水杨酸盐和非吸收性类固醇的任何重叠或依次施用。因此,例如,用于降低本文所述的免疫刺激性抗体诱导的结肠炎的发病率的方法涵盖同时或依次施用水杨酸盐和非吸收性类固醇(例如,在非吸收性类固醇6小时后施用水杨酸盐)或其任何组合。此外,水杨酸盐和非吸收性类固醇可通过相同途径施用(例如,二者都经口施用)或通过不同途径施用(例如,水杨酸盐经口施用,并且非吸收性类固醇经直肠施用),其可不同于用于施用抗GITR以及抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3抗体的途径。

[1006] 本文所述的抗GITR抗体和联合抗体治疗也可与其他熟知的治疗结合使用,这些熟知的治疗的选择依据是针对其治疗的适应症(例如癌症)的特殊有用性。本文所述的抗GITR抗体的联合可与已知的药学上可接受的药剂依次使用。

[1007] 例如,本文所述的抗GITR抗体和联合抗体治疗可与另外的治疗联合使用(例如同时或分开),所述另外的治疗例如照射、化学疗法(例如,使用喜树碱(CPT-11)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、顺铂、多柔比星、伊立替康、紫杉醇、吉西他滨、顺铂、紫杉醇、卡铂-紫杉醇(Taxol)、多柔比星、5-fu或喜树碱+apo21/TRAIL(6X combo))、一种或多种蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米或MG132)、一种或多种Bcl-2抑制剂(例如,BH3I-2'(bcl-x1抑制剂)、吲哚胺加双氧酶-1抑制剂(例如,INCB24360、吲哚莫德、NLG-919或F001287)、AT-101(R-(-)-棉酚衍生物)、ABT-263(小分子)、GX-15-070(奥巴克拉(obatoclastax))或MCL-1(髓性白血病细胞分化蛋白-1)拮抗剂)、iAP(细胞凋亡蛋白的抑制剂)拮抗剂(例如,smac7、smac4、小分子smac模拟物、合成smac肽(参见Fulda等人,Nat Med 2002;8:808-15)、ISIS23722(LY2181308)或AEG-35156(GEM-640))、HDAC(组蛋白去乙酰化酶)抑制剂、抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)、血管生成抑制剂(例如,贝伐珠单抗)、靶向VEGF和VEGFR的抗血管生成剂(例如,癌思停(Avastin))、合成三萜系化合物(参见Hyer等人,Cancer Research 2005;65:4799-808)、c-FLIP(细胞FLICE抑制蛋白)调节剂(例如,PPAR $\gamma$ (过氧化物酶体增殖物活化受体 $\gamma$ )的天然及合成配体、5809354或5569100)、激酶抑制剂(例如,索拉菲尼)、曲妥珠单抗、西妥昔单抗、替西罗莫司(Temsirolimus)、mTOR抑制剂(比如雷帕霉素和替西罗莫司、硼替佐米、JAK2抑制剂、HSP90抑制剂、PI3K-AKT抑制剂、来那度胺(Lenalidomide)、GSK3 $\beta$ 抑制剂、IAP抑制剂和/或遗传毒性药物。

[1008] 本文所述的抗GITR抗体和联合抗体治疗可进一步与一种或多种抗增殖细胞毒性

剂联合使用。可用作抗增殖细胞毒性剂的化合物的类别包括但不限于以下类别：

[1009] 烷化剂(包括但不限于氮芥、次乙亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯)：尿嘧啶氮芥、甲川氯、环磷酰胺(CYTOXAN<sup>TM</sup>)、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、曲他胺(Triethylenemelamine)、三亚乙基硫代磷酰胺、白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、链脲佐菌素、达卡巴嗪和替莫唑胺。

[1010] 抗代谢药(包括但不限于叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂)：甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、磷酸氟达拉滨、喷司他丁(Pentostatine)和吉西他滨。

[1011] 除了本领域已知的其他微管蛋白(microtubuline)稳定剂外,适合于与激动剂抗GITR抗体联合的抗增殖剂包括但不限于：紫杉烷、紫杉醇(紫杉醇以TAXOL<sup>TM</sup>形式市售)、多西他赛、圆皮海绵内酯(discodermolide)(DDM)、dictyostatin(DCT)、Peloruside A、埃博霉素、埃博霉素A、埃博霉素B、埃博霉素C、埃博霉素D、埃博霉素E、埃博霉素F、呋喃埃博霉素D(furanoepothilone D)、去氧埃博霉素B1、[17]-脱氢去氧埃博霉素B、[18]脱氢去氧埃博霉素B、C12,13-环丙基-埃博霉素A、C6-C8桥接埃博霉素A、反式-9,10-脱氢埃博霉素D、顺式-9,10-脱氢埃博霉素D、16-去甲基埃博霉素B、埃博霉素B10、discoderomolide、帕土匹龙(patupilone)(EP0-906)、KOS-862、KOS-1584、ZK-EP0、ABJ-789、XAA296A(圆皮海绵内酯)、TZT-1027(索利多汀(soblidotin))、ILX-651(盐酸泰丝多汀(tasidotin hydrochloride))、软海绵素B(Halichondrin B)、甲磺酸埃日布林(Eribulin mesylate)(E-7389)、哈密特林(Hemiasterlin)(HTI-286)、E-7974、念珠藻素(Cyrtophycin)、LY-355703、美登木素生物碱(Maytansinoid)免疫缀合物(DM-1)、MKC-1、ABT-751、T1-38067、T-900607、SB-715992(伊匹尼塞(ispinesib))、SB-743921、MK-0731、STA-5312、软珊瑚醇(eleutherobin)、17 $\beta$ -乙酰氧基-2-乙氧基-6-氧-B-高-雌-1,3,5(10)-三烯-3-醇、cyclostreptin、isolaulimalide、laulimalide、4-表-7-去羟基-14,16-二去甲基-(+)-圆皮海绵内酯和cryptothilone 1。

[1012] 在希望结合本文所述的抗GITR抗体或在用本文所述的抗GITR抗体治疗之前使得异常增殖细胞休眠的情况下,还可以向患者施用激素和类固醇(包括合成类似物),例如7 $\alpha$ -炔雌醇、己烯雌酚(Diethylstilbestrol)、睾酮、泼尼松、氟甲睾酮、屈他雄酮丙酸酯(Dromostanolone propionate)、睾内酯、醋酸甲地孕酮、甲基泼尼松龙、甲基睾酮、泼尼松龙、曲安西龙、氯烯雌醚、羟孕酮、氨鲁米特、雌莫司汀、醋酸甲羟孕酮、亮丙瑞林、氟他胺、托瑞米芬、ZOLADEX<sup>TM</sup>。当采用本文所述的方法或组合物时,也可根据需要施用在临床情境中用于调节肿瘤生长或转移的其他药剂,比如抗模拟物(antimimetics)。

[1013] 化疗剂的安全有效施用方法是本领域技术人员已知的。另外,它们的施用描述于标准文献中。例如,许多化疗剂的施用描述于Physicians' Desk Reference(PDR),例如1996版(Medical Economics公司, Montvale, N.J. 07645-1742, USA)中;其公开内容通过提述并入本文。

[1014] 可根据本领域熟知的治疗方案施用化疗剂和/或放射治疗。对于本领域技术人员来说显而易见的是,化疗剂和或放射治疗的施用可根据被治疗的疾病以及化疗剂和/或放射治疗对该疾病的已知效果加以改变。同样,根据熟练的临床医师的知识,基于观察到的施用的治疗剂对患者的效果,并且基于观察到的疾病对施用的治疗剂的反应,可以改变治疗

方案(例如,施用的剂量和时间)。

[1015] 示例性实施方案

[1016] 1.一种分离的抗体或其抗原结合部分,其与人糖皮质激素诱导的TNF受体(GITR)结合并且展现以下性质:

[1017] (a)与可溶性人GITR结合;

[1018] (b)与膜结合的人GITR结合;

[1019] (c)与膜结合的食蟹猴GITR结合;

[1020] (d)诱导或增强T细胞活化;

[1021] (e)抑制GITR配体与3A9-hGITR细胞上的GITR结合;

[1022] (f)至多部分地抑制GITR配体与活化的T细胞上的GITR结合;

[1023] (g)与成熟人GITR(SEQ ID NO:4)上的构象表位结合;

[1024] (h)与O-连接的和N-糖基化的及未糖基化的人GITR结合;

[1025] (i)在没有与Fc受体结合时具有激动剂活性,但其中与Fc受体的结合进一步增强激动剂活性;及

[1026] (j)在任一方向或两个方向上与抗体28F3、3C3-1、3C3-2、2G6、8A6、9G7-1、9G7-2、14E3、19H8-1、19H8-2、19D3、18E10及6G10中的一者或多者竞争结合人GITR。

[1027] 2.实施方案1的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体刺激抗肿瘤免疫应答。

[1028] 3.实施方案1或2的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体刺激抗原特异性T细胞应答。

[1029] 4.前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体增加表达GITR的T细胞中的IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生。

[1030] 5.前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体增加T细胞增殖。

[1031] 6.前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体不与Fc受体结合。

[1032] 7.实施方案1-5中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体与一种或多种活化性Fc $\gamma$ R结合。

[1033] 8.前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体以如通过Biacore测量的10nM或更低的 $K_D$ 与可溶性人GITR结合。

[1034] 9.前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体以如通过Scatchard测量的1nM或更低的 $K_D$ 与膜结合的人GITR结合。

[1035] 10.前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体以如通过FACS测量的1nM或更低的 $EC_{50}$ 与膜结合的人GITR结合。

[1036] 11.前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体以如通过FACS测量的10nM或更低的 $EC_{50}$ 与膜结合的食蟹猴GITR结合。

[1037] 12.前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体诱导或增强T细胞活化而无需多价交联。

[1038] 13.前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体以如通过FACS测量的1 $\mu$ g/mL或更低的 $EC_{50}$ 抑制GITR配体与GITR结合。

[1039] 14. 前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体结合成熟人 GITR (SEQ ID NO:4) 的 PTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO:217) 和 CRDYPGEE (SEQ ID NO:218)。

[1040] 15. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其与糖皮质激素诱导的 TNF 受体 (GITR) 特异性地结合, 并且包含选自下组序列的可变重链和可变轻链对中的三个可变重链 CDR 和三个可变轻链 CDR:

[1041] (a) SEQ ID NO:13 和 14;

[1042] (b) SEQ ID NO:26 和 27;

[1043] (c) SEQ ID NO:39 和 40;

[1044] (d) SEQ ID NO:52 和 53;

[1045] (e) SEQ ID NO:52 和 54;

[1046] (f) SEQ ID NO:71 和 72;

[1047] (g) SEQ ID NO:84 和 85;

[1048] (h) SEQ ID NO:97 和 98;

[1049] (i) SEQ ID NO:97 和 99;

[1050] (j) SEQ ID NO:115 和 116;

[1051] (k) SEQ ID NO:128 和 129;

[1052] (l) SEQ ID NO:128 和 130; 以及

[1053] (m) SEQ ID NO:335 和 336。

[1054] 16. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其与糖皮质激素诱导的 TNF 受体 (GITR) 结合, 其包含:

[1055] (a) 分别包含 SEQ ID NO:20、21 和 22 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 和/或分别包含 SEQ ID NO:23、24 和 25 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列;

[1056] (b) 分别包含 SEQ ID NO:33、34 和 35 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 和/或分别包含 SEQ ID NO:36、37 和 38 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列;

[1057] (c) 分别包含 SEQ ID NO:46、47 和 48 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 和/或分别包含 SEQ ID NO:49、50 和 51 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列;

[1058] (d) 分别包含 SEQ ID NO:62、63 和 64 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 和/或分别包含 SEQ ID NO:65、66 和 67 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列;

[1059] (e) 分别包含 SEQ ID NO:62、63 和 64 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 和/或分别包含 SEQ ID NO:68、69 和 70 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列;

[1060] (f) 分别包含 SEQ ID NO:78、79 和 80 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 和/或分别包含 SEQ ID NO:81、82 和 83 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列;

[1061] (g) 分别包含 SEQ ID NO:91、92 和 93 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 和/或分别包含 SEQ ID NO:94、95 和 96 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列;

[1062] (h) 分别包含 SEQ ID NO:106、107 和 108 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 和/或分别包含 SEQ ID NO:109、110 和 111 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列;

[1063] (i) 分别包含 SEQ ID NO:106、107 和 108 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 和/或分别包含 SEQ ID NO:112、113 和 114 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列;

[1064] (j) 分别包含SEQ ID NO:122、123和124的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:125、126和127的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1065] (k) 分别包含SEQ ID NO:138、139和140的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:141、142和143的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;

[1066] (l) 分别包含SEQ ID NO:138、139和140的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:144、145和146的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;或

[1067] (m) 分别包含SEQ ID NO:342、343和344的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:345、346和347的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[1068] 17. 实施方案16的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包含分别包含SEQ ID NO:20、21和22的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:23、24和25的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[1069] 18. 实施方案16的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包含分别包含SEQ ID NO:33、34和35的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:36、37和38的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[1070] 19. 实施方案16的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包含分别包含SEQ ID NO:46、47和48的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:49、50和51的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[1071] 20. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其与糖皮质激素诱导的TNF受体(GITR)结合并且包含重链和轻链可变区,其中所述重链可变区包含与选自下组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:13、26、39、52、71、84、97、115、128和335。

[1072] 21. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其与糖皮质激素诱导的TNF受体(GITR)结合并且包含重链和轻链可变区,其中所述轻链可变区包含与选自下组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、27、40、53、54、72、85、98、99、116、129、130和336。

[1073] 22. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其与糖皮质激素诱导的TNF受体(GITR)结合并且包含与选自下组的氨基酸序列至少85%相同的重链和轻链可变区序列:

[1074] (a) 分别为SEQ ID NO:13和14;

[1075] (b) 分别为SEQ ID NO:26和27;

[1076] (c) 分别为SEQ ID NO:39和40;

[1077] (d) 分别为SEQ ID NO:52和53;

[1078] (e) 分别为SEQ ID NO:52和54;

[1079] (f) 分别为SEQ ID NO:71和72;

[1080] (g) 分别为SEQ ID NO:84和85;

[1081] (h) 分别为SEQ ID NO:97和98;

[1082] (i) 分别为SEQ ID NO:97和99;

[1083] (j) 分别为SEQ ID NO:115和116;

[1084] (k) 分别为SEQ ID NO:128和129;

[1085] (l) 分别为SEQ ID NO:128和130;以及

[1086] (m) 分别为SEQ ID NO:335和336。

[1087] 23. 实施方案22的抗体或其抗原结合部分,其中重链和轻链可变区包含与选自(a) - (m)的重链和轻链可变区至少90%相同的氨基酸序列。

[1088] 24. 实施方案23的抗体或其抗原结合部分,其中重链和轻链可变区包含与选自(a) - (m)的重链和轻链可变区至少95%相同的氨基酸序列。

[1089] 25. 实施方案24的抗体或其抗原结合部分,其中重链和轻链可变区包含选自(a) - (m)的重链和轻链可变区。

[1090] 26. 实施方案25的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括:包含在SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列的重链可变区、和包含在SEQ ID NO:14中列出的氨基酸序列的轻链可变区。

[1091] 27. 实施方案25的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括:包含在SEQ ID NO:26中列出的氨基酸序列的重链可变区、和包含在SEQ ID NO:27中列出的氨基酸序列的轻链可变区。

[1092] 28. 实施方案25的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括:包含在SEQ ID NO:39中列出的氨基酸序列的重链可变区、和/或包含在SEQ ID NO:40中列出的氨基酸序列的轻链可变区。

[1093] 29. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其与糖皮质激素诱导的TNF受体(GITR)结合并且包含与选自下组的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或99%相同的重链和轻链序列:

[1094] (a) 分别为SEQ ID NO:15和16;

[1095] (b) 分别为SEQ ID NO:17和19;

[1096] (c) 分别为SEQ ID NO:18和19;

[1097] (d) 分别为SEQ ID NO:28和29;

[1098] (e) 分别为SEQ ID NO:30和32;

[1099] (f) 分别为SEQ ID NO:31和32;

[1100] (g) 分别为SEQ ID NO:41和42;

[1101] (h) 分别为SEQ ID NO:43和45;

[1102] (i) 分别为SEQ ID NO:44和45;

[1103] (j) 分别为SEQ ID NO:55和56;

[1104] (k) 分别为SEQ ID NO:55和57;

[1105] (l) 分别为SEQ ID NO:58和60;

[1106] (m) 分别为SEQ ID NO:59和60;

[1107] (n) 分别为SEQ ID NO:58和61;

[1108] (o) 分别为SEQ ID NO:59和61;

[1109] (p) 分别为SEQ ID NO:73和74;

[1110] (q) 分别为SEQ ID NO:75和77;

[1111] (r) 分别为SEQ ID NO:76和77;

[1112] (s) 分别为SEQ ID NO:86和87;

[1113] (t) 分别为SEQ ID NO:88和90;

[1114] (u) 分别为SEQ ID NO:89和90;



- [1115] (v) 分别为SEQ ID NO:102和104;
- [1116] (w) 分别为SEQ ID NO:103和104;
- [1117] (x) 分别为SEQ ID NO:100和101;
- [1118] (y) 分别为SEQ ID NO:100和371;
- [1119] (z) 分别为SEQ ID NO:102和105;
- [1120] (za) 分别为SEQ ID NO:103和105;
- [1121] (zb) 分别为SEQ ID NO:117和118;
- [1122] (zc) 分别为SEQ ID NO:119和121;
- [1123] (zd) 分别为SEQ ID NO:120和121;
- [1124] (ze) 分别为SEQ ID NO:131和132;
- [1125] (zf) 分别为SEQ ID NO:134和136;
- [1126] (zg) 分别为SEQ ID NO:135和136;
- [1127] (zh) 分别为SEQ ID NO:131和133;
- [1128] (zi) 分别为SEQ ID NO:134和137;
- [1129] (zj) 分别为SEQ ID NO:135和137;
- [1130] (zk) 分别为SEQ ID NO:337和338;
- [1131] (zl) 分别为SEQ ID NO:339和341;以及
- [1132] (zm) 分别为SEQ ID NO:340和341。
- [1133] 30. 实施方案29的抗体或其抗原结合部分,其中重链和轻链包含选自(a) - (zm)的重链和轻链。
- [1134] 31. 实施方案30的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括包含在SEQ ID NO:17中列出的氨基酸序列的重链和包含在SEQ ID NO:19中列出的氨基酸序列的轻链。
- [1135] 32. 实施方案30的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包括包含在SEQ ID NO:18中列出的氨基酸序列的重链和包含在SEQ ID NO:19中列出的氨基酸序列的轻链。
- [1136] 33. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其(a)与实施方案25的抗体结合GITR上的相同表位,(b)将实施方案25的抗体与活化T细胞上的GITR的结合抑制至少90%,如通过FACS测量的。
- [1137] 34. 实施方案15-33中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体结合成熟人GITR(SEQ ID NO:4)的PTGGPGCGPGRLLLGTGT(SEQ ID NO:217)和CRDYPGEE(SEQ ID NO:218)。
- [1138] 35. 实施方案15-34中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体与人和食蟹猴GITR两者都结合。
- [1139] 36. 前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体选自下组: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体。
- [1140] 37. 实施方案36的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是IgG1抗体。
- [1141] 38. 实施方案36的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包含无效应子IgG1Fc。
- [1142] 39. 实施方案38的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含含有以下突变的无效应子IgG1Fc:L234A、L235E、G237A、A330S和P331S。
- [1143] 40. 实施方案36的抗体,其中所述抗体或其抗原结合部分包含具有增强的与活化

性Fc  $\gamma$  R结合的Fc。

[1144] 41. 前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合部分, 其中CDR区中的甲硫氨酸残基被不受氧化的氨基酸残基取代。

[1145] 42. 实施方案15-41中任一项的抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体或其抗原结合部分是人抗体或人源化抗体。

[1146] 43. 一种双特异性分子, 其包含与具有第二结合特异性的分子连接的前述实施方案中任一项的抗体。

[1147] 44. 一种核酸, 其编码实施方案1-42中任一项的抗体或其抗原结合部分的重链和/或轻链可变区。

[1148] 45. 一种表达载体, 其包含实施方案44的核酸分子。

[1149] 46. 一种细胞, 其经实施方案45的表达载体转化。

[1150] 47. 一种免疫缀合物, 其包含与药剂连接的实施方案1-42中任一项的抗体。

[1151] 48. 一种组合物, 其包含实施方案1-43和47中任一项的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子或免疫缀合物, 以及载体。

[1152] 49. 一种试剂盒, 其包含实施方案1-43和47中任一项的抗体或其抗原结合部分、或双特异性分子或免疫缀合物, 以及使用说明书。

[1153] 50. 一种制备抗GITR抗体或其抗原结合部分的方法, 其包括: 使所述抗体或其抗原结合部分在实施方案46的细胞中表达, 并从所述细胞分离所述抗体或其抗原结合部分。

[1154] 51. 一种刺激抗原特异性T细胞应答的方法, 其包括使T细胞与实施方案1-43和47中任一项的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、或免疫缀合物接触, 从而刺激抗原特异性T细胞应答。

[1155] 52. 一种活化或共刺激效应T细胞的方法, 其包括使效应T细胞与实施方案1-43和47中任一项的抗GITR抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、或免疫缀合物以及CD3接触, 其中所述效应T细胞被活化或共刺激。

[1156] 53. 一种增加T细胞中IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生的方法, 其包括使T细胞与有效量的实施方案1-43和47中任一项的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、或免疫缀合物接触。

[1157] 54. 一种增加T细胞增殖的方法, 其包括使细胞与有效量的实施方案1-43和47中任一项的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、或免疫缀合物接触。

[1158] 55. 一种增加受试者的T细胞中IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生的方法, 其包括施用有效量的实施方案1-43和47中任一项的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、或免疫缀合物, 以增加T细胞的IL-2和/或IFN- $\gamma$ 产生。

[1159] 56. 一种减少或耗竭有需要的受试者的肿瘤中的调节性T细胞的数量方法, 其包括施用有效量的实施方案1-43和47中任一项的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、或免疫缀合物, 其中所述抗体或其抗原结合部分具有效应子功能或增强的效应子功能, 用于减少肿瘤中调节性T细胞的数量。

[1160] 57. 一种刺激受试者中的免疫应答的方法, 其包括向受试者施用实施方案1-43和47中任一项的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、或免疫缀合物, 从而刺激受试者中的免疫应答。

[1161] 58. 实施方案57的方法, 其中所述受试者患有肿瘤并且针对肿瘤的免疫应答被刺

激。

[1162] 59.一种抑制受试者中的肿瘤细胞生长的方法,其包括向受试者施用实施方案1-43和47中任一项的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、或免疫缀合物,从而抑制受试者中的肿瘤的生长。

[1163] 60.一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的实施方案1-43和47中任一项的抗体或其抗原结合部分、双特异性分子、或免疫缀合物,从而治疗所述癌症。

[1164] 61.实施方案60的方法,其中所述癌症选自下组:膀胱癌、乳腺癌、子宫/子宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、食道癌、胃肠癌、胰腺癌、结肠直肠癌、结肠癌、肾癌、头颈癌、肺癌、胃癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统的新生物、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤及病毒相关癌症。

[1165] 62.实施方案60或61的方法,其中所述癌症是转移性癌症、难治性癌症或复发性癌症。

[1166] 63.实施方案56-62中任一项的方法,其进一步包括施用一种或多种另外的治疗剂。

[1167] 64.实施方案63的方法,其中所述另外的治疗是抗PD1抗体、LAG-3抗体、CTLA-4抗体或PD-L1抗体。

[1168] 65.一种检测样品中的糖皮质激素诱导的TNF受体(GITR)的存在的方法,其包括使样品与实施方案1-42中任一项的抗体或其抗原结合部分在允许在所述抗体或其抗原结合部分与GITR之间形成复合物的条件下接触,并检测复合物的形成。

[1169] 66.一种分离的抗GITR抗体,其包含修饰的重链恒定区,所述修饰的重链恒定区包含IgG2铰链和不属于IgG2同种型的CH1、CH2和CH3中的至少一者,其中所述抗GITR抗体相对于具有非IgG2铰链的相同抗GITR抗体具有增强的激动剂活性。

[1170] 67.实施方案66的分离的抗GITR抗体,其中所述修饰的重链恒定区包括包含选自SEQ ID NO:223-226和283-290的氨基酸序列的重链恒定区、或与选自SEQ ID NO:223-226和283-290的氨基酸序列有至多5个氨基酸不同或至少95%、96%、97%、98%或99%相同的重链恒定区。

[1171] 68.实施方案67的分离的抗GITR抗体,其中所述重链包括:选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:15、17、18、28、30、31、41、43、44、55、58、59、73、75、76、86、88、89、100、102、103、117、119、120、131、134、135、227-275、337、339、340、348-352、361和362,或与氨基酸序列SEQ ID NO:15、17、18、28、30、31、41、43、44、55、58、59、73、75、76、86、88、89、100、102、103、117、119、120、131、134、135、227-275、337、339、340、348-352、361和362有至多10个氨基酸不同或至少95%、96%、97%、98%或99%相同的重链。

[1172] 通过下列实施例进一步展示了本公开,这些实施例不应该解释为进一步的限制。所有附图和所有参考文献的内容、Genbank序列、在本申请各处引证的专利和公开的专利申请都通过提述明确并入本文。具体而言,将PCT公开WO 09/045957、WO 09/073533、WO 09/073546、WO 09/054863和PCT/US2013/072918以及美国专利公开号2011/0150892的公开内容通过提述明确并入本文。

## 实施例

[1173] 实施例1:不同抗GITR抗体的生成

[1174] 在HuMAb®转基因小鼠(“HuMAb”是Medarex公司的商标,Princeton,New Jersey)的Hco7、Hco27、Hco20、Hco12、Hco17和Hc2品系以及KM小鼠(KM Mouse®品系含有如PCT公开WO 02/43478中所述的SC20转染色体)中生成抗GITR单克隆抗体。如美国专利No.5,770,429和5,545,806中所述生成HC2/KCo27HuMAb小鼠和KM小鼠,将这些文献的全部公开内容通过提述并入本文。

[1175] 用不同的免疫策略(不同的抗原、不同的剂量、持续时间、施用途径(足垫(fp)、腹膜内(ip)和皮下(sc)),以及佐剂(CFA/IFA、Ribi和抗体),等等)免疫总共94只小鼠,包括转基因小鼠的7个基因型(KM、Hco7、Hco27、Hco20、Hco12、Hco17和Hc2)。进行来自54只小鼠的36次融合并筛选。从这36次融合鉴定出157种抗体,经过进一步表征,分离出特别感兴趣的抗体,包括命名为28F3、19D3、18E10、3C3、2G6、8A6、9G7、14E3、19H8和6G10的抗体。

[1176] cDNA测序鉴定了抗体28F3、19D3、18D10、2G6、8A6、14E3和6G10中的每一者的一条重链和一条轻链,以及抗体3C3、9G7和19H8中的每一者的一条重链和两条轻链(轻链1或“L1”和轻链2或“L2”)。通过蛋白质分析,鉴定了抗体3C3和9G7的单独一条轻链,N端测序和分子量测定表明,所述轻链为3C3的轻链L1和9G7的轻链L2。关于抗体19H8,由杂交瘤表达的抗体中93%含有轻链L1,3%含有轻链L2。抗体3C3-1和3C3-2分别对应于具有轻链L1和L2的抗体3C3。抗体9G7-1和9G7-2分别对应于具有轻链L1和L2的抗体9G7。抗体19H8-1和19H8-1分别对应于具有轻链L1和L2的抗体19H8。3种抗体的轻链中的每一者的氨基酸和核苷酸序列提供在表15中。

[1177] 抗体28F3、19D3、18E10、3C3(3C3-1和3C3-2)、2G6、8A6、9G7(9G7-1和9G7-2)、14E3、19H8(19H8-1和19H8-2)以及6G10的可变区氨基酸序列和同种型在图2-31中列出。每种抗体的轻链和重链的氨基酸及核苷酸序列提供在表15中。28F3的重链和轻链由氨基酸序列SEQ ID NO:15和16组成。19D3的重链和轻链由氨基酸序列SEQ ID NO:28和29组成。18E10的重链和轻链由氨基酸序列SEQ ID NO:41和42组成。3C3的重链和轻链由氨基酸序列SEQ ID NO:55和56组成。2G6的重链和轻链由氨基酸序列SEQ ID NO:73和74组成。8A6的重链和轻链由氨基酸序列SEQ ID NO:86和87组成。9G7的重链和轻链由氨基酸序列SEQ ID NO:100和101组成。14E3的重链和轻链由氨基酸序列SEQ ID NO:117和118组成。19H8-1的重链和轻链由氨基酸序列SEQ ID NO:131和132组成。19H8-2的重链和轻链由氨基酸序列SEQ ID NO:131和133组成。6G10的重链和轻链由氨基酸序列SEQ ID NO:337和338组成。编码这些蛋白质的核苷酸序列提供在表15中。

[1178] 实施例2:抗GITR抗体与活化的人T细胞和食蟹猴T细胞的结合

[1179] 测试了实施例1中生成的人单克隆抗GITR抗体与活化的人T细胞和食蟹猴T细胞(这些细胞的表面上表达GITR)的结合。

[1180] 利用包被在板上的抗CD3抗体(克隆:用于人T细胞活化的为UCHT1;克隆:用于食蟹猴T细胞活化的为SP34;两者均为BD Biosciences产)和可溶性抗CD28抗体(克隆:人和食蟹猴两者均为CD28.2,BD Biosciences)将从人或食蟹猴分离的外周血单核细胞(PBMC)活化4天(人)/或5天(食蟹猴)。在基于荧光激活细胞分选(FACS)的测定法中使用藻红蛋白(PE)缀合的抗人IgG抗体(Jackson ImmunoResearch)测试细胞的GITR mAb结合。在BDFACS Canto

流式细胞仪上分析样品。

[1181] 抗GITR抗体3C3、19D3、18E10和28F3与活化的人T细胞和食蟹猴T细胞两者都结合。如图32中所示,抗体3C3、19D3、18E10和28F3与活化的人T细胞强烈结合,如分别由0.04916nM、0.3633nM、0.1461nM和0.1916nM的EC50值反映的。类似地,抗体18E10和28F3与活化的食蟹猴T细胞结合,其中18E10和28F3的EC50值分别为0.9134nM和1.044nM(图33)。3C3与食蟹猴T细胞不显著结合。

[1182] 实施例3:抗GITR抗体与可溶性GITR的结合

[1183] 通过Biacore测定抗GITR抗体与可溶性GITR的结合。将抗GITR抗体捕获在人κ包被的芯片(约5KRU;Southernbiotech目录号2060-01)上,并且使重组人GITR(rHGITR/Fc;R&D systems,目录号689-GR)以500nM、250nM、125nM、62nM和31nM的浓度流过芯片。mAb/体积的捕获浓度为2-40μg/mL(5μL,10μL/min)。在15μL/min下的抗原结合时间为5分钟,抗原解离时间为6分钟,并且用50mM HCl/50mM NaOH(各自12μL,100μL/min)进行再生。用28F3和几种其他抗GITR抗体获得的结果示于表5中。

[1184] 表5:抗GITR抗体的Kon (ka)、Koff (kd) 和K<sub>D</sub>

| GITR-mab | GITR人抗原(抗体的抗κ捕获) |          |          |
|----------|------------------|----------|----------|
|          | ka (1/Ms)        | kd (1/s) | KD (M)   |
| 2G6      | 1.23E+05         | 1.47E-03 | 1.20E-08 |
| 3C3亚克隆1  | 4.14E+05         | 5.52E-03 | 1.33E-08 |
| 18E10    | 1.82E+05         | 2.41E-03 | 1.33E-08 |
| 3C3亚克隆2  | 4.30E+05         | 6.20E-03 | 1.44E-08 |
| 28F3     | 3.97E+05         | 5.89E-03 | 1.48E-08 |
| 19D3     | 2.76E+05         | 4.50E-03 | 1.63E-08 |
| 9G7      | 2.14E+05         | 7.48E-03 | 3.50E-08 |
| 6G10     | 3.83E+05         | 7.15E-04 | 1.87E-09 |

[1186] 结果表明,上述抗GITR抗体以 $1.2 \times 10^{-8}$ M至 $3.5 \times 10^{-8}$ M范围内的K<sub>D</sub>与可溶性GITR结合。提供了3C3的2个亚克隆的数据,其K<sub>D</sub>在 $1.33 \times 10^{-8}$ M至 $1.44 \times 10^{-8}$ M的范围内。

[1187] 在另一Biacore实验中,测定了具有28F3的可变区和三种不同的恒定区的抗体的结合特征。第一种28F3抗体具有野生型IgG1恒定区(“g1f”,也称为“g1”或“IgG1”或“IgG1f”;重链具有SEQ ID NO:17,轻链具有SEQ ID NO:19)。后缀“f”是指同种异型。第二种抗体具有在Fc区中含三个突变的无效应子IgG1恒定区(“g1.1f”,也称为“g1.1”、“IgG1.1”和“IgG1.1f”,具有L234A、L235E、G237A;重链具有SEQ ID NO:18,轻链具有SEQ ID NO:19);第三种28F3抗体具有含N297A突变的IgG1恒定区。

[1188] 如上文所述进行Biacore实验,不同的是芯片用抗CH1(Invitrogen参考号054500)包被。结果如表6所示,结果表明,所有三种抗体具有相似的结合特征,其中K<sub>D</sub>在 $3.93 \times 10^{-8}$ M至 $4.39 \times 10^{-8}$ M范围内。

[1189] 表6:具有不同Fc的28F3的动力学特征

| 样品          | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M)  | 功能浓度 |
|-------------|-----------|----------|---------|------|
| 28F3-g1f    | 8.85E+4   | 3.88E-3  | 4.39E-8 | 100% |
| 28F3-IgG1.1 | 9.09E+4   | 3.58E-3  | 3.93E-8 | 100% |
| 28F3-N297A  | 7.88E+4   | 3.36E-3  | 4.26E-8 | 100% |

[1191] 实施例4:抗GITR抗体与活化的人T细胞和3A9-huGITR细胞的结合亲和力

[1192] 通过Scatchard分析测定了抗GITR抗体与活化的人T细胞和异位表达人GITR的小鼠T细胞杂交瘤3A9细胞系(3A9-hGITR)上的GITR的结合。这种测定法用4.59mg/mL的28F3.IgG1.1(重链为SEQ ID NO:18,轻链为SEQ ID No:19)来进行。

[1193] 如下进行关于活化人T细胞的Scatchard分析。将从人供体获得的T细胞用培养基(RPMI,含10%FBS、2mM L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、2-巯基乙醇)洗涤一次并且以 $10^6$ 个细胞/mL重悬于补充有1 $\mu$ g/mL抗CD28(CD28.2,BD编号555725)和100U/mL IL-2(Peprotech编号200-02)的相同培养基中。将 $5 \times 10^6$ 个细胞各自接种在6孔板的三个孔中,板已用20 $\mu$ g抗CD3包被(5mL,4 $\mu$ g/mL,在4℃下过夜;UCHT-1,BD编号555329)。将细胞在37℃温育3天,用这些细胞的一半进行Scatchard分析(“第3天”分析)。将另一半细胞的用过的培养基更换为5mL新鲜培养基并将细胞再温育一天,随后与这些细胞一起用于Scatchard分析(“第4天”分析)。

[1194] 对于Scatchard分析,使用**iodo-GEN®**固相碘化试剂(1,3,4,6-四氯-3a-6a-二苯基甘脲;Pierce编号28601),用 $^{125}$ I-Na(Perkin Elmer编号NEZ033H001MC(1mCi)将28F3.IgG1.1放射性碘化。使用脱盐柱(Pierce编号43243)去除过量的碘化物。收集标记的抗体级分,在Wizard 1470  $\gamma$ 计数器(Perkin-Elmer)上分析其放射性。用来自Invitrogen的Qubit™荧光计计算每个级分中的 $^{125}$ I-28F3.IgG1.1浓度。通过对峰蛋白和放射性级分的薄层色谱法(Pinestar Technology编号151-005)证实放射性纯度。

[1195] 通过将活化的人T细胞与一定滴度的 $^{125}$ I-28F3.IgG1.1一起温育来证明放射性碘化的28F3.IgG1.1与活化的人T细胞的结合。通过在100倍摩尔过量滴度的未标记抗体存在下的结合来确定非特异性结合、并且从总CPM减去该非特异性结合来计算特异性结合。使用 $^{125}$ I-28F3.IgG1.1浓度对CPM的线性标准曲线来外推结合的 $^{125}$ I-28F3.IgG1.1的最大nM,由此计算每细胞的受体数目。每个经刺激的人CD4<sup>+</sup> T细胞的人GITR分子的数目在第3天为约8,400个,在第4天为约13,200个。Scatchard分析的结果表明,28F3.IgG1.1以0.7nM的 $K_D$ 与3天刺激的人CD4<sup>+</sup> T细胞特异性地结合,且以0.87nM的 $K_D$ 与4天刺激的人CD4<sup>+</sup> T细胞结合。

[1196] 通过将3A9-huGITR细胞与一定滴度的 $^{125}$ I-28F3.IgG1.1一起温育来证明放射性碘化的28F3.IgG1.1与3A9-huGITR细胞的结合。通过在100倍摩尔过量滴度的未标记抗体存在下的结合来确定非特异性结合,并且从总CPM减去该非特异性结合来计算特异性结合。使用 $^{125}$ I-28F3.IgG1.1浓度对CPM的线性标准曲线来外推结合的 $^{125}$ I-28F3.IgG1.1的最大nM,由此计算每细胞的受体数目。每个3A9-huGITR细胞的人GITR分子的数目为约180,000。Scatchard分析的结果表明,28F3.IgG1.1以0.5nM的 $K_D$ 与3A9-huGITR细胞特异性地结合。

[1197] 在另一个实验中,确定了28F3.IgG1和28F3.IgG1.1与来自人和食蟹猴供体的活化CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的结合。从人和食蟹猴供体分离人和食蟹猴CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞,并用抗CD3和抗CD28抗体处理进行活化。结果表明,28F3.IgG1和28.IgG1.1分别以0.55nM和0.67nM的

EC50类似地与活化的人CD4<sup>+</sup>细胞结合,并且分别以0.56nM和0.65nM的EC50类似地与活化的人CD8<sup>+</sup>细胞结合。28F3-IgG1和28-IgG1.1分别以1nM和0.86nM的EC50与活化的食蟹猴CD4<sup>+</sup>细胞结合,并且分别以1.26nM和0.74nM的EC50类似地与活化的食蟹猴CD8<sup>+</sup>细胞结合。

[1198] 实施例5:人单克隆抗GITR抗体抑制GITR-L与GITR的结合

[1199] 为了确定HuMab抗GITR抗体是否抑制GITR配体与GITR的结合,将异位表达人GITR的小鼠T细胞杂交瘤3A9细胞系(GITR-3A9细胞)与 $10^{-4}$ μg/mL至100μg/mL浓度范围内的GITR mAb一起预温育,之后温育10ng/mL浓度的GITR配体(R&D Systems编号6987-GL)。在基于FACS的测定法中,使用PE缀合的抗血凝素(HA)标签抗体确定细胞上GITR配体的结合,并且在BD FACSCanto流式细胞仪上分析样品。如图34A和34B中所示,在这些条件下,抗体19D3、28F3和GITR.3(3C3)均阻断了GITR-L与GITR-3A9细胞的结合,其中EC50值分别为0.7546、0.2783和0.06934。用抗体19H8获得了相似的结果。

[1200] 在不同条件下进行了另一组实验,以进一步评价抗GITR抗体阻断GITR-L与GITR结合的程度。在这些实验中,将可溶性重组hGITR-L三聚体以 $1.06 \times 10^{-9}$ mg/ml至100mg/ml的浓度添加至活化的人T细胞并且以0.016ug/ml的EC50值以剂量依赖性方式与CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞结合(图34C)。如下进行实验:将重组hGITR-L三聚体(R&D Systems目录号6987-GL)以 $1.06 \times 10^{-9}$ μg/mL至100μg/mL的浓度添加至PHA-活化的T细胞。在30分钟初步温育后,使用PE缀合的抗HA标签抗体(Miltenyi目录号120-002-687)检测细胞结合的GITR-L。在FACS Canto流式细胞仪(BD, San Jose)上获取样品,并用FlowJo软件(Tree Star公司, Ashland, OR)进行分析。

[1201]  $1.06 \times 10^{-9}$ ug/ml至100ug/ml浓度的rhGITR-L与活化T细胞上的预先结合以0.0024ug/ml的IC50阻断了后续的0.5ug/ml 28F3-hIgG1(约90%的饱和度)的结合。由于在100ug/ml下的MFI未达到基线(IgG对照),因此抑制是部分的(图34D)。如下进行实验:首先将PHA活化的T细胞用24点3倍滴定(自100μg/mL开始)的重组GITR-L三聚体(R&D Systems 6987-GL)处理30分钟。随后向细胞混合物中以0.5μg/mL的固定浓度添加28F3-hIgG1,再温育30分钟。使用针对人IgG Fc的PE缀合的第二抗体(Jackson ImmunoResearch目录号109-116-098)检测细胞结合的28F3-hIgG1。使用无关hIgG1Ab作为28F3-hIgG1的同种型对照,同时包括未与GITR-L预温育的样品,以显示在不存在阻断时的28F3-hIgG1的结合。在FACS Canto流式细胞仪(BD, San Jose)上获取样品,并用FlowJo软件(Tree Star公司, Ashland, OR)进行分析。

[1202] 当将活化T细胞与 $1.06 \times 10^{-9}$ ug/ml至100ug/ml浓度范围内的28F3-hIgG1一起预温育时,0.6ug/ml(约90%饱和度)的GITR-L的结合未受影响(图34E)。然而,当添加较低的20ng/ml浓度的GITR-L(接近其EC50)时,其结合被预结合的28F3-hIgG1部分阻断,IC50为0.076mg/ml(图34F)。如下执行实验:将PHA-活化的T细胞与0.00056μg/mL至100μg/mL浓度范围内的28F3-hIgG1一起预温育,之后添加0.6ug/ml或20ng/mL的GITR-L。用PE缀合的抗HA标签抗体检测细胞结合的GITR-L。包括无关hIgG1作为28F3-hIgG1的同种型对照,且使用没有一级抗体的样品,以显示在没有阻断情况下的GITR-L的结合。在FACS Canto流式细胞仪(BD, San Jose)上获取样品,并用FlowJo软件(Tree Star公司, Ashland, OR)进行分析。

[1203] 这些数据显示,28F3-hIgG1可部分地阻断配体,这可能允许GITR-L在体内一定程度地衔接GITR。

[1204] 实施例6:所有抗GITR抗体都分箱(bin)到一个组中

[1205] 用以下抗人GITR抗体进行抗体分箱实验:28F3、18E10、19D3、14E3、8A6、9G7、3C3和6G10。

[1206] 将抗GITR抗体固定在传感器芯片CM5芯片(Series S,GE Healthcare目录号BR-1005-30)表面、流动池2、流动池3和流动池4(5000RU)上,使用流动池1作为阴性对照。将抗体稀释至120 $\mu$ g/mL (2X)的起始浓度。通过用缓冲液稀释1:3浓度的抗体制备8个不同浓度(120 $\mu$ g/mL-0.0 $\mu$ g/mL, 2X)的一系列稀释物,以获得滴定曲线。将每一抗体浓度系列分成两半。在浓度系列的第一半中,在每一孔中添加40nM (2X) GITR抗原(rHGITR/Fc目录号689-GR)以产生终浓度系列(60 $\mu$ g/mL-0.0 $\mu$ g/mL)和20nM的最终抗原浓度。在浓度系列的第二半中,添加缓冲液代替抗原,以将抗体稀释至相同浓度,并将这一半作为空白处理。将复合物温育2小时。将40 $\mu$ L复合物以30 $\mu$ L/min的流速注射到抗体包被的表面上。使用Biacore T200仪器,运行缓冲液为HBE-EP (GE Healthcare目录号BR-1001-88),为过滤脱气的0.01M HEPES (pH7.4)、0.15NaCl、3Mm EDTA、0.005%的表面活性剂P20。将表面用25mM NaOH(订购代码:BR-1003-58,GE Healthcare)以100 $\mu$ L/min再生5秒。使用Microsoft Excel分析数据,其中将抗体的浓度系列针对相应的反应单位作图,以获得滴定曲线。

[1207] 结果表明,所有测试的抗体都被分箱到一个组中,表明它们结合人GITR的细胞外区域中的相似区域。

[1208] 实施例7:抗GITR抗体与构象表位结合

[1209] 这个实施例显示,抗GITR抗体28F3和3C3与非变性人GITR结合,但不与变性人GITR结合,并且该结合不受N-或O-连接糖基化的影响。

[1210] 如下确定抗GITR抗体与具有或没有N-连接糖基化的天然或变性GITR的结合。在具有或没有酶N-聚糖酶PNGase F的情况下,将天然(即,非变性)和变性人GITR的样品在PBS中在37 $^{\circ}$ C下温育过夜以去除N-糖基化。通过在50mM二硫苏糖醇和4M盐酸胍中在37 $^{\circ}$ C还原45分钟并且随后在100mM碘乙酰胺中在室温下烷基化20分钟来完成GITR的变性。对具有或没有N-连接糖基化的天然人GITR的样品进行SDS凝胶电泳,并且对具有或没有N-连接糖基化的变性GITR的样品进行变性SDS凝胶电泳。将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上进行Western印迹分析。将膜与28F3抗体一起温育。通过与缀合辣根过氧化物酶(HRP标记)的、对抗人IgG重链和轻链特异的二级抗体一起温育(Jackson ImmunoResearch Laboratories公司)并且随后检测捕获在膜上的发光来检测结合。图35中所示的结果表明,抗GITR Ab 28F3仅与天然GITR结合,而不与变性形式结合,并且糖基化的存在或不存在不影响结合。用抗GITR抗体3C3获得了相似的结果。

[1211] 由此可见,抗GITR抗体28F3和3C3与一个构象性的、与N-连接和O-连接糖基化无关的表位结合。

[1212] 实施例8:28F3和3C3与天然人GITR肽的结合模式

[1213] 通过SDS-PAGE和Western印迹分析测试28F3和3C3抗体与从天然人GITR生成的肽的结合来研究这些抗体与人GITR的结合模式。如下进行实验。首先对天然人GITR进行蛋白水解:在不存在变性试剂的情况下,将其与内切蛋白酶Arg-C、内切蛋白酶Lys-C、胰蛋白酶、内切蛋白酶Glu-C或内切蛋白酶Asp-N以2%w/w的比率一起在PBS中在37 $^{\circ}$ C下温育5小时。随后对整个反应混合物(2g,来自每一消化物)进行非变性SDS-PAGE电泳,并转移到硝酸纤维



素上进行Western印迹分析。然后将Western印迹与28F3或3C3抗体一起温育,并且通过与缀合辣根过氧化物酶(HRP标记)的、对抗人IgG重链和轻链特异的二级抗体一起温育(Jackson ImmunoResearch Laboratories公司)并且随后检测捕获在膜上的发光来检测结合。图36中所示的结果表明,28F3和3C3的结合模式不同,从而表明这些抗体结合人GITR的区域并不完全相同。

[1214] 实施例9:抗GITR抗体28F3与人GITR的细胞外结构域的N端结合

[1215] 通过测试在溶液中28F3抗体与人GITR的不同非变性片段的结合来确定在与所述抗体结合的人GITR上的区域的位置。如下进行实验:通过在不存在变性试剂的情况下,将人GITR与内切蛋白酶Arg-C、内切蛋白酶Lys-C、胰蛋白酶、内切蛋白酶Glu-C或内切蛋白酶Asp-N以2%w/w的比率一起在PBS中在37℃下温育五小时,生成天然人GITR肽段。随后将肽混合物与抗GITR Ab珠子在PBS中一起在室温下温育二小时。通过与不同的酶在PBS中一起温育一小时将一些样品进行原位二次裂解。通过用PBS洗涤抗GITR Ab珠子两次去除未结合的肽。将结合在抗GITR Ab 28F3上的肽用2%甲酸稀释,然后通过LC-MS进行序列鉴定。结果显示为在图37中的热图,其表明28F3与以下N端氨基酸段内的构象表位结合:

[1216] QRPTGGPGCGPGRLLLGTTGDARCCRVHTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO:215),其对应于成熟人GITR (SEQ ID NO:4) 的氨基酸残基1至39,或与更短的片段

QRPTGGPGCGPGRLLLGTTGDARCCRVHTTR (SEQ ID NO:370) 内的构象表位结合。

[1217] 实施例10:人GITR上的O-连接糖基化不干扰28F3的结合

[1218] 在人GITR的细胞外结构域上尚无已知的或记载过的O-连接糖基化。然而,SEQ ID NO:215的残基T18和T20含有O-糖基化共有序列。这些残基在表位序列中加下划线:

[1219] QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTTGDARCCRVHTTRCCRDYPGE (SEQ ID NO:215)。因此,确定了O-连接糖基化是否影响28F3与人GITR的结合。

[1220] 如下进行28F3与由SEQ ID NO:215组成的糖基化或非糖基化肽的结合:通过与小鼠Fc连接的完整天然人GITR细胞外结构域的蛋白酶解来生成人GITR的部分糖基化和非糖基化N端肽。还通过有机合成生成了由SEQ ID NO:215的氨基酸残基1至39组成的非糖基化GITR肽。28F3与肽的结合的程序描述于前一节中(使用28F3包被的珠子)。如图38B中所示,发现两种肽与28F3包被的珠子结合,并且通过LC-MS将这些肽鉴定为没有O-连接糖基化的N端肽(图38A),且另一种是具有在SEQ ID NO:215的T18和/或T20上的O-连接糖基化的相同N端肽(图38D)。

[1221] 由此可见,无论人GITR在氨基酸T18和/或T20上是否具有O-连接的糖,28F3都与人GITR的N端区结合。

[1222] 实施例11:抗GITR抗体28F3与20聚体的结合

[1223] 作为前述实施例中所述实验的一部分,首先将具有SEQ ID NO:215的不具有任何O-连接糖基化的合成肽结合在28F3包被的珠子上,然后通过用内切蛋白酶Asp-N原位消化进行进一步裂解。剩余的肽由氨基酸序列QRPTGGPGCGPGRLLLGTGT (SEQ ID NO:216) 组成,且含有无O-连接糖基化的氨基酸残基T18和T20,所述肽与28F3结合(图38E)。由此可见,28F3与由SEQ ID NO:216组成的20聚体结合。

[1224] 实施例12:通过HDX-MS的表位定位

[1225] 氢/氘交换质谱(HDX-MS)方法通过监测主链酰胺氢原子的氘交换速率和程度来探

测溶液中的蛋白质构象和构象动力学。HDX的水平取决于主链酰胺氢原子和蛋白质氢键的溶剂可及性。通过MS可以精确测量蛋白质在HDX上的质量增加。当这项技术与酶消化配对时,可解析在肽水平上的结构特征,使得能够区别表面暴露的肽与内部折叠的肽。通常,进行氘标记和随后的淬灭实验,然后进行在线胃蛋白酶消化、肽分离和MS分析。

[1226] 在通过HDX-MS对28F3.IgG1mAb(具有分别由SEQ ID No:17和19组成的重链和轻链)在GITR中的表位作图之前,进行非氘代实验以产生针对重组人GITR/Fc(R&D systems, 10 $\mu$ M,其含有氨基酸取代T20A)和重组人GITR/Fc与28F3.IgG1mAb的蛋白复合物(1:2摩尔比,10 $\mu$ M和20 $\mu$ M)的常见胃酶解肽的列表,从而实现GITR N端区的86%的序列覆盖率(图39A)。在这项实验中,在标记步骤过程中使用10mM磷酸盐缓冲液(pH 7.0),然后加入淬灭缓冲液(含4M GdnCl和0.5M TCEP的200mM磷酸盐缓冲液,pH 2.5,1:1,v/v)。对于表位作图实验,将5 $\mu$ L的各样品(GITR/Fc或具有28F3.IgG1mAb的GITR/Fc(1:2摩尔比))在55 $\mu$ L D<sub>2</sub>O缓冲液(10mM磷酸盐缓冲液,D<sub>2</sub>O,pD 7.0)中稀释以在室温下开始标记反应。反应进行不同的时间:20秒、1分钟、10分钟、60分钟和240分钟。在每个标记反应期结束时,通过加入淬灭缓冲液(1:1v/v)将反应淬灭,并将50 $\mu$ L淬灭的样品注射到Waters HDX-MS系统中用于分析。监测在不存在/存在28F3.IgG1mAb的情况下观察到的常见胃酶解肽的氘摄取水平。

[1227] 从28F3.IgG1mAb在GITR中的HDX-MS测量获得的实验数据示于图39B和39C,这些数据表明,28F3.IgG1mAb具有由GITR N端区中的两个肽区组成(或在其内)的不连续表位,所述两个肽区为:

[1228] 肽区1:PTGGPGCGPGRLLLTGA(SEQ ID NO:217)

[1229] 肽区2:CRDYPGEE(SEQ ID NO:218)

[1230] 基于相对氘摄取水平的变化,可将两个肽区排序为1>2区,其中1区具有最显著的氘摄取变化,并且2区是统计学显著的。

[1231] 实施例13:抗GITR抗体诱导T细胞的IL-2和IFN- $\gamma$ 分泌

[1232] 通过测量与抗体一起温育的T细胞所分泌的IL-2和IFN- $\gamma$ 来测试抗GITR抗体增强体外T细胞活性的能力。

[1233] 在渐增量的19D3、18E10和28F3抗体存在下,在抗CD3单克隆抗体包被的平板上培养异位表达人GITR的小鼠T细胞杂交瘤3A9细胞系(3A9-hGITR)。在用1 $\mu$ g/ml抗CD3抗体(克隆145-2C11;BD Biosciences)包被的板上培养5 $\times 10^4$ 个3A9-hGITR细胞,并用指示浓度的抗体处理24小时。如图40中所示,抗体3C3(GITR.3)、28F3、19D3和18E10都以剂量依赖性方式增强T细胞的IL-2分泌。如预期地,对照hIgG1和hIgG2抗体未增加3A9-hGITR细胞的IL-2分泌。

[1234] 鉴于在刺激性CD3信号存在下抗GITR抗体增强了3A9-hGITR细胞的IL-2分泌,测试了抗体增强用特异性抗原活化的3A9-hGITR细胞的IL-2分泌的能力。在0.4 $\mu$ M HEL48-63肽和指示的抗体存在下,将5 $\times 10^4$ 个3A9-hGITR细胞与2.5 $\times 10^4$ 个LK35.2抗原呈递细胞共培养24小时。如图41A和41B中所示,抗体18E10、13H2(与28F3相同的抗体)、28F3、3C3和19D3以剂量依赖性方式增强了3A9-hGITR细胞的IL-2分泌。

[1235] 在进一步的实验中,在用表达抗CD3scFv(OKT3)的CHO细胞刺激的人供体T细胞上测试了28F3对T细胞的IL-2和IFN- $\gamma$ 分泌的影响。所述CHO细胞表达低水平的OKT3以促进次最佳刺激,以便能够观察抗GITR抗体的激动作用。在一组实验中,用表达OKT3的CHO细胞和

抗GITR抗体刺激来自一个供体的CD3+T细胞,并测量IFN- $\gamma$ 分泌,在第二组实验中,用表达OKT3的CHO细胞和抗GITR抗体刺激来自2个供体(不同于CD3+T细胞的供体)的CD4+ T细胞,并测量IL-2和IFN- $\gamma$ 分泌。如下进行实验。根据制造商的方案,利用Pan T细胞分离试剂盒(Miltenyi编号130-091-156),从分离自Ficoll梯度(Amersham Bioscience 17-1440-03)的人PBMC获得全T细胞。对于CD4+ T细胞的实验,根据制造商的方案,利用RosetteSep人CD4+ T细胞富集混合物(StemCellTechnology编号15062)从人PBMC(供体1和2)获得CD4+ T细胞。将表达抗CD3scFv(OKT3)的CHO细胞(CHO-OKT3)用RPMI培养基洗涤两次并使其经受50K Rad剂量的照射。收获细胞并将其以 $2.5 \times 10^5$ /mL重悬于培养基(RPMI-1640,补充有10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、55mM $\beta$ -巯基乙醇、1mM丙酮酸钠和100U/mL青霉素/链霉素)中。在96孔TC级平底板(Costar)中每孔接种 $2.5 \times 10^4$ 个CHO-OKT3细胞和 $1 \times 10^5$ 个T细胞。将细胞与以20  $\mu$ g/mL开始的8点3倍滴定的GITR抗体一起温育。添加20  $\mu$ g/mL的无关hIgG1作为同种型对照。包括一个仅有细胞的样品,用来表示没有任何处理的基线活性。在第2天收获每一样品的上清液用于IL-2测量(仅针对利用CD4+ T细胞的测定法)(BD opt EIA Human IL-2ELISA试剂盒;BD Bioscience编号555190),并且在第3天收获每一样品的上清液用于IFN- $\gamma$ 测量(BD optEIA human IFN-g ELISA试剂盒;BD Bioscience编号555142)。

[1236] 图42B-E中所示的结果表明,来自两个供体的CD4+ T细胞的IL-2和IFN- $\gamma$ 分泌都呈28F3剂量依赖性增加。

[1237] 还展示了用其他抗GITR抗体刺激的供体T细胞的IFN- $\gamma$ 分泌。如上文所述进行测定。如图42A中所示,抗体28F3、3C3、19D3和18E10都以剂量依赖性方式增强CD3+T细胞的IFN- $\gamma$ 分泌,其中抗体28F3和3C3在这些测试抗体中显示出最大效应。

[1238] 在另一个实验中,在混合淋巴细胞反应(MLR)中观察在抗GITR抗体(具体而言28F3)存在下的T细胞增殖。

[1239] 总的来说,这些数据表明,抗体18E10、19D3和28F3发挥激动性抗GITR抗体的功能,其增强T细胞的细胞因子分泌。

[1240] 实施例14:抗GITR抗体体外激活T细胞应答不依赖于FcR相互作用

[1241] 已报导激动性抗TNFR抗体的体内活性需要Fc $\gamma$ RIIB共衔接(Li等人,CellCycle 2012;11:3343-3344)。为了确定这种需要是否也适用于抗GITR抗体,如实施例13中所述将3A9-hGITR细胞与LK35.2细胞和HEL48-63肽共培养,用全长抗GITR抗体28F3(hIgG2)、28F3的F(ab')<sub>2</sub>片段或28F3的Fab片段处理,并评估mIL-2产生。在图43中列出的结果显示,全长28F3和28F3的F(ab')<sub>2</sub>片段增强了mIL-2产生,但28F3的Fab片段的作用较弱,从而表明二价衔接而非单价衔接促成了抗GITR抗体28F3的作用。这些结果共同表明,虽然激动性抗GITR抗体的体外T细胞增强作用无需Fc $\gamma$ RIIB共衔接,但衔接Fc $\gamma$ RIIB受体可增强激动剂活性。可将抗GITR抗体工程改造以增加与Fc $\gamma$ RIIB受体的结合,从而增进其激动作用。

[1242] 实施例15:抗GITR抗体28F3标记人扁桃体中的淋巴细胞

[1243] 为了确定哪些组织表达GITR,使用抗GITR抗体28F3对各种组织中的GITR进行免疫组织化学检测。在非淋巴组织(包括心脏、肝、肺、肾、皮肤、周围神经、甲状腺、睾丸、前列腺)中未发现特异性染色。仅在淋巴样组织(包括扁桃体、脾和胸腺)和富含淋巴的组织(结肠、胃、子宫的固有层)中的淋巴细胞和/或单核细胞的离散亚群中观察到阳性染色。在扁桃体中的染色示于图44中。在滤泡间/滤泡旁区和生发中心中的离散淋巴细胞中观察到阳性染

色。离散的单核细胞簇(在上皮下方)和上皮浸润淋巴细胞也呈阳性染色。

[1244] 实施例16:变体抗GITR同种型在MC38肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[1245] DTA-1是一种激动性大鼠抗小鼠GITR抗体(Shimizu等人,2002;eBioscience, San Diego, CA)。已显示这种IgG2b抗体在B16黑色素瘤治疗过程中调节 $T_{reg}$ 和 $T_{eff}$ 。另外,DTA-1的全部效应需要 $T_{eff}$ 和 $T_{reg}$ 两者的GITR表达。Cohen等人(2010)表明,虽然通过DTA-1的GITR连接并不全局消除 $T_{reg}$ 抑制活性,但它可减弱 $T_{reg}$ 肿瘤浸润,并导致肿瘤内 $T_{reg}$ 内的Foxp3表达丧失,提示局部化的抑制消除。净结果是肿瘤内 $T_{eff}:T_{reg}$ 比率提高以及肿瘤内更好的 $T_{eff}$ 活化和功能。DTA-1阻断GITR与GITR配体(GITRL)之间的相互作用,并且这种可溶性抗体在促进体外细胞应答中有效。它还在各种肿瘤模型中有效抑制肿瘤生长(例如,参见Turk等人,2004;Cohen等人,2010)。

[1246] a) 实验MC38第1号

[1247] 在分期的MC38结肠腺癌肿瘤模型中评估不同抗GITR(DTA-1)同种型的抗肿瘤活性。给各只C57BL/6小鼠皮下注射 $2 \times 10^6$ 个MC38肿瘤细胞。7天后,将小鼠随机分成5个治疗组,且在第7、10和14天如下所述IP施用200 $\mu$ g/剂量的200 $\mu$ l体积的测试抗体:组1:小鼠IgG1对照(IgG);组2:抗GITR大鼠IgG2bAb(DTA-rG2b);组3:抗GITR小鼠IgG1Ab(DTA-mG1);和组4:抗GITR小鼠IgG 2a Ab(DTA-mG2a)。在第15天收获肿瘤和脾脏。

[1248] 图45C显示,IgG1抗GITR治疗的肿瘤与用小鼠IgG1对照治疗的肿瘤(图45A)以相当的速率生长,到监测小鼠结束时,10只小鼠没有一只无肿瘤的(TF)。然而,DTA-rG2b(图45B)和DTA-mG2a(图45D)显著降低了肿瘤生长的速率,其中10只小鼠中分别有3只和2只是无肿瘤的(TF)。

[1249] 用不同的抗GITR同种型治疗的组的小鼠的平均肿瘤体积和中位肿瘤体积的变化绘制在图46A和46B中。这些绘图证实在图45中所示的小鼠个体数据:抗GITR抗体的IgG2b同种型对MC38肿瘤生长展现最有效的抑制作用,IgG2a同种型的效力仅仅略弱。IgG1同种型显示很小的肿瘤生长抑制作用,其中平均和中位肿瘤体积类似于用小鼠IgG对照治疗的小鼠。

[1250] 还确定了抗GITR同种型对TIL和脾中的MC38T细胞亚群的作用。比较了用不同的抗GITR同种型治疗的小鼠的MC38TIL和脾中的T细胞亚群的群体。在脾中,DTA-m2a和DTA-r2b引起CD8<sup>+</sup>细胞水平轻度降低,而9D9-m2a(抗CTLA-4抗体)和DTA-m1未改变CD8<sup>+</sup>T细胞水平(图47A)。测试的同种型变体对脾中的CD4<sup>+</sup>或CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>细胞的百分比均无显著影响(图47B和47C)。

[1251] 在TIL中,9D9-m2a相比于两个小鼠IgG1对照引起CD8<sup>+</sup>细胞的百分比增加至少2倍(图47D)。DTA-m2a具有较不显著的作用,其使CD8<sup>+</sup>细胞的百分比增加约50%,而DTA-m1和DTA-r2b与小鼠IgG1同种型对照相比并未引起CD8<sup>+</sup>细胞百分比增加,或仅引起CD8<sup>+</sup>细胞百分比略微增加(图47D)。与小鼠IgG1同种型对照相比,9D9-m2a引起CD4<sup>+</sup>细胞百分比小量增加,而DTA-m1未引起CD4<sup>+</sup>变化(图47E)。相比之下,与两个小鼠IgG1同种型相比,DTA-m2a和DTA-r2b两者都使CD4<sup>+</sup>百分比降低40%至50%(图47E)。

[1252] 对于TIL中的CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> $T_{reg}$ 水平观察到最显著的影响。虽然DTA-m1对这个T细胞群没有影响,但与IgG1同种型和DTA-m1相比,9D9-m2a和DTA-m2a诱导了CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> $T_{reg}$ 水平降低约6倍(图47F)。这些数据证明,抗GITR的IgG2a变体明确地降低了肿瘤环境中的 $T_{reg}$ 水平。因此,IgG2a抗GITR同种型诱导了肿瘤部位的CD8<sup>+</sup> $T_{eff}$ 增加和 $T_{reg}$ 减少,导致 $T_{eff}$ 与 $T_{reg}$ 的比率

升高,该比率指示了稳健的抗肿瘤活性。与IgG1对照相比,DTA-r2b也诱导了 $CD4^+Foxp3^+T_{reg}$ 水平显著降低,但不如由9D9-m2a和DTA-m2a诱导的降低那样显著,这与大鼠IgG2b Fc区与鼠活化性Fc $\gamma$ R的结合较低是一致的。这些数据证明,激动剂抗GITR抗体的耗竭活性需要活化性Fc $\gamma$ R的衔接。

[1253] 对MC38TIL和脾中T细胞的不同亚群的GITR表达水平的流式细胞术测量显示,GITR在肿瘤部位的 $T_{reg}$ 上表达最高,表达水平高于外周中的 $T_{reg}$ 或肿瘤部位的 $CD8^+T_{eff}$ 上的表达水平,肿瘤部位的 $CD8^+T_{eff}$ 进而比外周中 $CD8^+$ 或 $CD4^+T_{eff}$ 展现更高的表达。在肿瘤部位的 $CD4^+T_{eff}$ 上观察到GITR表达的最低相对水平。这些数据提示了这样一种机制,通过该机制,T细胞耗竭活性有助于刺激T细胞应答并由此增强Fc融合蛋白的抗肿瘤效能,条件是Fc融合蛋白的靶标在肿瘤部位的 $T_{reg}$ 上相对于靶标在肿瘤部位的 $T_{eff}$ 上的表达是高表达的,并且Fc融合蛋白与介导靶细胞耗竭的活化性FcR结合。

[1254] b) 实验MC38第2号

[1255] 由于DTA-1变体遇到了聚集作用(商业获得的初始形式的DTA-r2b除外),重新工程改造了新一组同种型变体,以获得不会聚集的DTA-1抗体。经追查,观察到的聚集作用是由于在工程改造的同种型变体的轻链中无意掺入了一个额外的氨基酸,通过去除这个外来氨基酸解决了这个问题。在这个2号实验中使用经重新工程改造的抗体。使用分期的MC38模型评估经重新工程改造的抗GITR(DTA-1;GITR.7系列)同种型的抗肿瘤活性。给各只C57BL/6小鼠皮下植入 $2 \times 10^6$ 个MC38细胞。7天后,将小鼠随机分成7个治疗组以便具有相当的约 $148mm^3/2$ 的平均肿瘤体积,在第7、10和14天如下以 $200\mu g$ /剂量(例外的是mIgG对照以 $200\mu g$ 的剂量施用)IP施用测试抗体:组1:小鼠IgG1对照(mIgG或“同种型”);组2:抗GITR小鼠IgG1Ab(mGITR.7.mg1);组3:抗GITR小鼠IgG1D265A同种型(mGITR.7.mg1-D265A);组4:抗GITR小鼠IgG2aAb(mGITR.7.mg2a);组5:抗GITR小鼠IgG2b Ab(mGITR.7.mg2b);和组6:抗GITR大鼠IgG2b Ab(mGITR.7.r2b或DTA-1-rG2b)。在第15天收获肿瘤和脾脏。

[1256] 图48B和48C显示,IgG1和IgG1-D265A抗GITR治疗的肿瘤与用小鼠IgG1对照治疗的肿瘤以相当的速率生长(图48A)。在每种情况下,到移植后35天监测小鼠结束时,9只小鼠都不是为TF。然而,类似于1号MC38实验中的结果,mGITR.7.mg2a(图48D)诱导了最大的肿瘤生长抑制,其中9只小鼠中的2只为TF。小鼠和大鼠抗GITR-2b抗体也以相似的程度显著降低了肿瘤生长速率(图48E和48F),不过在移植后35天时,大鼠2b抗体产生了1只TF小鼠,而小鼠2b抗体未产生任何TF小鼠。

[1257] 平均肿瘤体积和中位肿瘤体积变化显示在图49A和49B中。趋势类似于MC38实验1中所观察到的,不同之处在于IgG2a抗GITR同种型是抑制MC38肿瘤生长最有效的,而IgG2b同种型展现显著,但较前者为低,的抑制肿瘤生长的效力。与小鼠IgG对照相比,IgG1和IgG1-D265A同种型显示低水平的肿瘤生长抑制。

[1258] 不同的抗GITR同种型对经治疗小鼠的TIL和脾中 $T_{reg}$ 群体的影响显示在图50中。如1号实验中所观察到的,测试的同种型变体对脾中 $CD4^+Foxp3^+T$ 的百分比均无巨大影响:最强的影响是用大鼠抗GITR IgG2b同种型治疗诱导的小于40%的增加,而小鼠抗GITR IgG2b同种型略微降低了 $CD4^+Foxp3^+T_{reg}$ 的百分比。测试的其他抗GITR同种型和抗CTLA-4IgG2a(9D9-mG2a)抗体略微增加了 $T_{reg}$ 的百分比(图50A)。

[1259] 相比之下,在TIL中,除IgG1同种型(其与同种型对照相比未引起变化)之外,测试

的所有抗体都诱导了显著的 $T_{reg}$ 百分比降低。与IgG1同种型相比,抗CTLA-4抗体9D9-mG2a引起 $CD4^{+}Foxp3^{+}T_{reg}$ 水平降低约4倍;抗GITR小鼠2a和2b同种型以及大鼠2b同种型都使 $T_{reg}$ 水平降低约2倍,并且IgG1-D265A突变体引起略微较低的降低(图50B)。这些数据证实了在1号实验中观察到的影响,证明抗GITR mG2a、mG2b和rG2b同种型在肿瘤环境中诱导了显著的与肿瘤生长抑制相关的 $T_{reg}$ 耗竭。

[1260] 在2号MC38实验中获得的数据与在1号实验中获得的数据大体上一致,这表明抗体的聚集并未过度干扰抗体的活性。聚集的抗体可能在小鼠中被快速清除,因此抗体聚集在本发明的体内测定法中可能不是很重要的问题。

[1261] 实施例17:变体抗GITR同种型在分期的Sa1N肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[1262] 还在A/J小鼠Sa1N肉瘤模型中评估了抗GITR的抗肿瘤活性。每植入给小鼠皮下注射 $2 \times 10^6$ 个Sa1N细胞。7天后,确定肿瘤体积并将小鼠随机分到治疗组中以便具有相当的平均肿瘤体积(约 $75mm^3/2$ )。在第7、10和12天以 $200\mu g$ /剂量IP施用如实施例10的1号MC38实验中所所述的工程改造为具有不同的同种型的抗GITR(DTA-1)抗体。

[1263] 对肿瘤生长的影响显示在图51中。用IgG2a抗GITR抗体治疗完全抑制了肿瘤生长,且到植入后约第20天时所有10只小鼠都为TF(图51B),并且大鼠IgG2b同种型具有类似作用,其中到约第20天时10只小鼠中的9只为TF(图51C)。与IgG1同种型对照治疗的肿瘤的未抑制生长(图51A)相比,IgG1(图51D)和IgG1D265A(图51E)同种型以一定的程度抑制肿瘤,但比用mIgG2a和rIgG2b同种型观察到的抑制小得多。图52A和52B中所示的平均肿瘤体积和中位肿瘤体积变化证实了mIgG2a和rIgG2b抗体对肿瘤生长的几乎完全的抑制作用,与之相比,mIgG1和mIgG1-D265A同种型展现的肿瘤生长抑制低得多。

[1264] 总的来说,图51和52中的数据确证了用MC38肿瘤模型(实施例10)获得的数据,其显示,抗GITR mIgG2a和rIgG2b同种型展现强有力的抗肿瘤活性,而与之相比,mIgG1(和mIgG1-D265A)同种型展现的抗肿瘤活性低得多。mIgG1和D265A变体抗体在Sa1N模型中的抗肿瘤活性与没有Treg耗竭的GITR的激动作用一致。

[1265] 不同的抗GITR同种型对经治疗小鼠的Sa1N TIL和脾中 $T_{reg}$ 群体的影响显示在图53中。测试的所有抗GITR同种型变体均诱导了脾中 $CD4^{+}Foxp3^{+}T_{reg}$ 水平的约20-40%的相对较小的增加。用小鼠抗GITR IgG2a同种型治疗诱导的增加最高,该同种型治疗引起的增加与用抗CTLA-4IgG2b(9D9-G2b)和IgG1-D265A(9D9-G1-D265A)抗体治疗相同(图53A)。在这项GITR研究中使用后一种抗CTLA-4同种型作为阳性对照,因为先前已用IgG2b同种型观察了 $T_{reg}$ 耗竭。

[1266] 与在外周中的 $T_{reg}$ 效应相比,抗GITR m2a和r2b同种型以及抗CTLA-4 2b同种型全都使肿瘤部位的 $T_{reg}$ 水平降低至少3.5倍(图53B)。抗GITR IgG1同种型和IgG1-D265A突变体两者都诱导了较小的约35%的 $T_{reg}$ 百分比降低,而抗CTLA-4IgG1-D265A突变体未引起TIL中 $T_{reg}$ 百分比变化(图53B)。因此,如在MC38肿瘤模型中观察到的,抗GITR mG2a和rG2b同种型在肿瘤环境中诱导了显著的远远超过IgG1和IgG1-D265A抗体所诱导的 $T_{reg}$ 耗竭,这与肿瘤生长抑制相关。

[1267] 实施例18:抗GITR抗体和抗PD1拮抗剂抗体联合的协同活性

[1268] 为了确定是否可通过将DTA-1抗体与拮抗PD-1(一种提供抗肿瘤机制的抑制信号的分子)的抗体联合获得协同抗肿瘤作用,使用分期的MC38结肠腺癌模型评估了抗体组合

对肿瘤体积的影响。在第7、10和14天将小鼠用 (A) 对照mIgG1、(B) mIgG+DTA-1、(C) mIgG+PD-1 (克隆4H2,BMS) 和 (D) PD-1+DTA-1治疗。

[1269] 对肿瘤生长的影响显示在图54中。用DTA-1抗体或抗PD-1抗体治疗在一定程度上单独地抑制了肿瘤生长,其中10只小鼠中的2只为TF。相比之下,到第30天时,DTA-1抗体与抗PD-1抗体联合大幅增加了TF小鼠的数目,其中10只小鼠中的7只为TF。如预期的那样,施用对照mIgG的小鼠中无TF小鼠。

[1270] 这些结果表明,激动性抗GITR抗体与拮抗性抗PD-1抗体的联合以协同方式起作用来抑制肿瘤生长。

[1271] 实施例19:CDR氨基酸突变对结合亲和力的影响

[1272] 这个实施例显示,28F3的VH CDR3中的某些氨基酸残基可突变成另一氨基酸而不显著影响其结合亲和力。

[1273] 通过使VH CDR3中的以下氨基酸中的一个或多个突变产生了28F3的48个突变体:M102、D106和M111 (根据SEQ ID NO:13编号),并测试了以下活性:与3A9-hGITR细胞的结合、及在平板结合的抗CD3存在下3A9-hGITR细胞的IL-2分泌。如上文所述进行实验。

[1274] 结果显示在图55A和55B (与3A9-hGITR细胞的结合)、图56A-F (IL-2分泌) 以及表7中。

[1275] 表7:CDR氨基酸突变对结合亲和力的影响

[1276]

| 图 55 和 56 中的参考符号 | 突变          | 3A9 细胞中抗体活性的EC50 | 通过 FACS 的抗体结合的EC50 |
|------------------|-------------|------------------|--------------------|
| A1               | M98V, M111L | 1.731            | 0.5297             |
| B1               | M98F, M111L |                  | 7.762              |
| C1               | M98L, M111L | 0.674            | 0.101              |
| D1               | M98I, M111L | 0.218            | 0.155              |
| E1               | M98Q, M111L | 3.274            | 3.259              |
| F1               | M98S, M111L |                  | 9.037              |
| G1               | M98A, M111L |                  | 28.02              |
| H1               | M98Y, M111L |                  | 92.92              |
|                  |             |                  |                    |

[1277]

|    |                    |         |            |
|----|--------------------|---------|------------|
| A2 | M98V, M111F        | 1.338   | 0.5543     |
| B2 | M98F, M111F        |         | ~399.9     |
| C2 | M98L, M111F        |         | 0.2066     |
| D2 | M98I, M111F        | 0.1326  | 0.1999     |
| E2 | M98Q, M111F        |         | 2.489      |
| F2 | M98S, M111F        |         | 36.81      |
| G2 | M98A, M111F        |         | 25.59      |
| H2 | M98Y, M111F        |         | 36.83      |
|    |                    |         |            |
| A3 | M98V, D106E, M111L | 0.7144  | 0.4297     |
| B3 | M98F, D106E, M111L |         | 62.56      |
| C3 | M98L, D106E, M111L | 1.037   | 0.1824     |
| D3 | M98I, D106E, M111L | 0.0883  | 0.1602     |
| E3 | M98Q, D106E, M111L |         | 3.054      |
| F3 | M98S, D106E, M111L |         | ~187.0     |
| G3 | M98A, D106E, M111L |         | 9.292      |
| H3 | M98Y, D106E, M111L |         | 27.37      |
|    |                    |         |            |
| A4 | M98V, D106E, M111F |         | 0.1157     |
| B4 | M98F, D106E, M111F |         | 8.097      |
| C4 | M98L, D106E, M111F | 0.2618  | 0.09559    |
| D4 | M98Q, D106E, M111F | 0.4539  | 0.4984     |
| E4 | M98S, D106E, M111F |         | ~5.77e+006 |
| F4 | M98A, D106E, M111F | 0.2613  | 2.86       |
| G4 | M98Y, D106E, M111F |         | 6.752      |
| H4 | M98V, D106E        | 0.01499 | 0.08696    |
|    |                    |         |            |
| A5 | M98F, D106E        |         | 0.1024     |
| B5 | M98L, D106E        | 0.02552 | 0.04658    |
| C5 | M98I, D106E        | 0.02048 | 0.05227    |
| D5 | M98Q, D106E        | 0.04963 | 0.1451     |
| E5 | M98S, D106E        | 1.01    | 0.3437     |
| F5 | M98A, D106E        | 0.06304 | 0.06008    |
| G5 | M98Y, D106E        | 1.081   | 0.1196     |
| H5 | M98V               | 0.05336 | 0.05104    |
|    |                    |         |            |
| A6 | M98F               |         | 0.1194     |
| B6 | M98L               | 0.1104  | 0.1136     |
| C6 | M98I               | 0.1104  | 0.2126     |



|        |    |         |         |         |
|--------|----|---------|---------|---------|
| [1278] | D6 | M98Q    | 0.08124 | 0.2155  |
|        | E6 | M98S    | 0.1226  | 0.526   |
|        | F6 | M98A    | 3.491   | 0.225   |
|        | G6 | M98Y    |         | 0.252   |
|        | H6 | 未突变28F3 | 0.0418  | 0.05002 |

[1279] 结果表明,几种突变体具有与28F3相当的结合及活性,而其他突变降低了结合和/或IL-2分泌。以下突变体具有相当的结合和活性数据:M98V;M98V/D106E;M98L/D106E;M98I/D160E;和M98A/D106E。

[1280] 实施例20:恒定区修饰对GITR抗体激动剂活性的影响

[1281] 这个实施例证明,包含IgG2铰链的GITR抗体相对于具有IgG1铰链的相同抗体具有增加的诱导T细胞的IL-2和IFN- $\gamma$ 分泌的能力。

[1282] 在上述CHO-OKT3和3A9测定中已观察到,相比于其中重链恒定区转换成IgG1或无效应子IgG1(IgG1.1)的重链恒定区的相同抗体,具有IgG2恒定区的杂交瘤衍生的抗体更有力地刺激细胞因子分泌。因此,在这些测定中进一步测试了IgG2恒定区或铰链对抗GITR抗体的影响。

[1283] 将抗人GITR抗体的重链可变区与以下重链恒定区连接:

[1284] 表8:例示的抗GITR抗体的恒定区构型

| 抗体的名称                                | CH1                     | 铰链                                             | CH2                                      | CH3                     | SEQ ID NO*    |
|--------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|---------------|
| 抗GITR                                | IgG2<br>SEQ ID NO:279   | IgG2<br>SEQ ID NO:291                          | IgG2<br>SEQ ID NO:297                    | IgG2<br>SEQ ID NO:298   | SEQ ID NO:221 |
| 抗GITR-IgG2                           | IgG2<br>SEQ ID NO:279   | IgG2<br>SEQ ID NO:291                          | IgG2<br>SEQ ID NO:297                    | IgG2<br>SEQ ID NO:298   | SEQ ID NO:221 |
| 抗GITR-IgG1                           | IgG1<br>SEQ ID NO:278   | IgG1<br>SEQ ID NO:295                          | IgG1<br>SEQ ID NO:280                    | IgG1<br>SEQ ID NO:282   | SEQ ID NO:7   |
| 抗GITR-IgG1.1                         | IgG1.1<br>SEQ ID NO:278 | IgG1.1<br>(L234A/L235E/G237A)<br>SEQ ID NO:296 | IgG1.1<br>(A330S/P331S)<br>SEQ ID NO:281 | IgG1.1<br>SEQ ID NO:282 | SEQ ID NO:11  |
| 抗 GITR-IgG2-IgG1 或<br>抗GITR.g2.g1    | IgG2<br>SEQ ID NO:279   | IgG2/IgG1杂合体<br>SEQ ID NO:293                  | IgG1<br>SEQ ID NO:280                    | IgG1<br>SEQ ID NO:282   | SEQ ID NO:223 |
| 抗 GITR-IgG2-IgG1.1<br>或抗GITR.g2.g1.1 | IgG2<br>SEQ ID          | IgG2<br>SEQ ID NO:291                          | IgG1.1<br>(A330S/P331S)<br>SEQ ID        | IgG1<br>SEQ ID          | SEQ ID NO:224 |
| [1285]                               |                         |                                                |                                          |                         |               |
| [1286]                               | NO:279                  |                                                | SEQ ID NO:281                            | NO:282                  |               |

[1287] 首先,比较这些GITR抗体的结合亲和力与具有IgG1铰链的GITR抗体的结合亲和力。如实施例2中所述确定结合亲和力。如图57中所示,所有三种具有IgG2铰链的GITR抗体对活化T细胞的亲和力与具有IgG1或IgG1.1恒定区的两种GITR抗体相似。

[1288] 其次,测试了具有IgG1恒定区或IgG2铰链/IgG1Fc结构域的GITR抗体诱导用表达OKT3的CHO细胞刺激的T细胞的IL-2和IFN- $\gamma$ 分泌的能力,如实施例13中所述。如图58A和

58B中所示,具有IgG2铰链/IgG1Fc结构域的抗体(“抗GITR.G2.g1f”)比具有IgG1恒定区的抗体(“抗GITR.g1f”)以更高的程度诱导了T细胞的IFN- $\gamma$ 和IL-2分泌。利用这些恒定结构域的无效应子型式获得了相似的结果(图58C)。

[1289] 为了进一步证实包含IgG2铰链的抗GITR抗体增加了T细胞活化,以不同的实验形式测试了IL-2分泌。在这个实验中,测试了GITR抗体诱导3A9-hGITR细胞(异位表达人GITR的小鼠T细胞杂交瘤3A9细胞系)的IL-2分泌的能力,如实施例13中所述。如图59中所示,所有具有IgG2铰链的抗体(抗GITR.g2、抗GITR.g2.g1f和抗GITR.g2.g1.1f)相比于其含有IgG1恒定区的对应物(“抗GITR.g1f和抗GITR.g1.1f”)均以更高的程度诱导了3A9-hGITR细胞的IL-2分泌。

[1290] 这些结果共同提示,具有IgG2铰链和g1或g1.1恒定区的抗GITR抗体比具有IgG1铰链的相同抗体更有效力。一种可能的机理可以解释含有IgG2铰链的GITR抗体的效果的改善,即:相对于包含IgG1铰链的相同抗体,这些抗体在细胞表面的内化增加和/或复合物形成增加。

[1291] 实施例21:抗GITR抗体诱导的增殖是Teff细胞固有的

[1292] GITR在小鼠和人调节性T(Treg)细胞上表达。文献中的数据已显示,激动性抗GITR抗体在Treg细胞存在下驱动小鼠CD4+Foxp3-效应T(Teff)细胞增殖。另外,已经表明,这种效应的驱动主要借助于抗GITR抗体与Teff细胞的结合,而不是对Treg细胞抑制功能的直接作用。其他出版物显示,抗GITR抗体驱动Treg细胞增殖,并且可诱导以Foxp3丧失为特征的Treg细胞谱系不稳定性。

[1293] 为了检验抗GITR抗体对Treg细胞功能的影响,进行了小鼠Treg细胞抑制测定,其中在APC和滴定数目的Treg细胞存在下用抗CD3和抗小鼠GITR mAbDTA-1的各种同种型刺激Teff细胞。结果显示,与同种型对照相比,DTA-1抗体治疗增加了增殖。此外,IgG1、2a、2b和惰性IgG1D265A同种型在增加Teff细胞增殖中都有效,由此证明FcR结合对于这个系统中的抗GITR抗体功能是不需要的。

[1294] 根据前述实验,尚不清楚增加的Teff增殖是否是由于作用于Treg和/或Teff细胞的抗GITR抗体所致。为了解决这个问题,使用人GITR“敲入”(huGITR KI)小鼠。在这些小鼠中,编码小鼠GITR的基因Tnfrsf18被替换为人TNFRSF18基因,并且以类似于野生型小鼠中的muGITR的方式表达人GITR;人GITR在Teff和Treg细胞上都表达,其中在后者上的水平较高。发现抗人GITR mAb28F3能够驱动huGITR KI小鼠的Teff细胞的增殖。由于28F3结合人GITR而非小鼠GITR,故有可能设定一种Treg抑制测定系统,其中Teff和Treg细胞上的GITR可被有差别地靶向。这个系统也允许检验28F3与人IgG1或惰性IgG1.1Fc区之间的功能差异。

[1295] 基于huGITR KI和WT小鼠的CD4和CD25表达,分选Treg和Teff细胞。将WT和huGITR Treg及Teff细胞混合组合,所述组合允许用28F3进行Treg或Teff细胞(huGITR KI Teff细胞与野生型Treg细胞等)的单区室靶向(unicompartmental targeting)。作为对照,包括其中28F3可与Treg和Teff细胞两者都结合、或都不结合的情况。在APC以及28F3IgG1、28F3IgG1.1或同种型对照存在下,用抗CD3刺激含有Teff和Treg细胞的培养物。

[1296] 结果提供在图60中。如预期地,当28F3可结合Treg和Teff细胞两者时,观察到Teff细胞增殖增加,并且这种效应在28F3仅可结合Teff细胞的条件下得以维持。相比之下,当

28F3仅能够结合Treg细胞时,Teff增殖相对于同种型对照没有增加。关于同种型,在28F3显示作用的条件下,IgG1与IgG1.1Fc之间没有差异。这与上述显示抗GITR激动作用无需Fc交联的数据一致。总的来看,在这个系统中,抗GITR抗体主要通过其调节Teff细胞功能的能力起作用,而不是通过抑制Treg细胞阻遏物的能力起作用。然而,这并不排除GITR信号转导对体内Treg细胞的作用,因为抗GITR抗体可驱动Treg细胞增殖或为ADCC或ADCP提供Treg特异性靶标。

[1297] 实施例22:抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)

[1298] 使用NK92/CD16细胞或原代NK细胞作为效应子评估28F3.IgG1f和28F3.IgG1.1f的体外ADCC活性,使用多种已知表达GITR的细胞作为靶标。

[1299] 在测定之前三天,通过阴性选择分离靶CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞亚群,并通过CD25阳性选择从CD4<sup>+</sup>T细胞进一步分离Treg。将T细胞亚群中的每一者用CD2/CD3/CD28珠子(Miltenyi Biotec)刺激三天以诱导GITR上调。在测定之前一天,通过阴性选择(StemCell Technologies公司)从新鲜PBMC分离原代NK细胞,并在补充有500IU/mL重组IL-2(R&D Systems)和1μM氢化可的松(StemCell)的MyeloCult H5100培养基(StemCell)中温育过夜。在测定当天,在1μg/mL 28F3.IgG1f和28F3.IgG1.1f存在下将效应细胞(原代NK细胞或NK92/CD16)与钙黄绿素AM标记的活化T细胞以指定的效靶比温育。

[1300] 使用原代NK细胞或NK92/CD16细胞作为效应子,28F3.IgG1诱导了活化CD4<sup>+</sup>效应T细胞和Treg细胞溶解,而观察到较少的活化CD8<sup>+</sup>T细胞溶解(图61)。如预期,使用NK92或原代NK细胞作为效应子,28F3.IgG1.1未介导任何靶细胞的ADCC。由此可见,28F3.IgG1诱导了活化CD4<sup>+</sup>效应T细胞和Treg细胞溶解,并且诱导了较低程度的活化CD8<sup>+</sup>T细胞溶解,并且由28F3.IgG1诱导的溶解水平似乎与靶细胞上的GITR表达水平成正比。

[1301] 实施例23:人GITR敲入小鼠中28F3.IgG1抗体的活性

[1302] 本实施例显示,在具有人免疫系统和人GITR蛋白的C57BL/6小鼠中的MC38肿瘤中,28F3.IgG1和28F3IgG1.1具有抗肿瘤活性,并且28F3.IgG1的抗肿瘤活性较强。

[1303] 人GITR敲入小鼠的生成:对C57BL/6小鼠进行遗传工程改造以表达人GITR细胞外结构域(ECD)而不是小鼠GITR ECD,从而保持小鼠跨膜及细胞质序列完整。通过用抗人GITR抗体对抗CD3/CD28活化的脾细胞进行染色证实人/小鼠嵌合GITR的表达。

[1304] 在具有10%热灭活胎牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺、4.5g/L (45%) 葡萄糖(10mL/L)和1mM丙酮酸钠(10mL/L)的DMEM培养基中培养MC38细胞。将细胞每2天以1:10分装。使用两个小鼠群组,且对于两个群组而言,均使用1-cm<sup>3</sup>注射器和25号半英寸针在每只小鼠的右胁腹皮下植入在0.2mL PBS中的75万个MC38细胞。对于群组1,在植入后第7天,根据肿瘤体积( $L \times W \times H/2$ )将40只小鼠随机分成3个组,每组12-13只小鼠。所有组都具有约174mm<sup>3/2</sup>的平均肿瘤体积。在第7、10和14天,以10mg/kg施用媒介物对照或mAb。对于群组2,在植入后第7天,根据肿瘤体积( $L \times W \times H/2$ )将10只小鼠随机分成2个组,每组5只小鼠。所有组都具有约69mm<sup>3/2</sup>的平均肿瘤体积。在第7、10和14天,以10mg/kg施用媒介物对照或28F3.IgG1mAb。

[1305] 以表9中概述的浓度和日期向小鼠腹膜内(IP)给药。

[1306] 表9.

|        | 组                      | 植入后天数     |
|--------|------------------------|-----------|
| [1307] | IgG1 同种型, 10 mg/kg     | 7、10 和 14 |
|        | 28F3.IgG1, 10 mg/kg    | 7、10 和 14 |
|        | 28F3.IgG1.1f, 10 mg/kg | 7、10 和 14 |

[1308] 每周两次测量肿瘤和体重直至研究终止。利用Fowler电子数字卡尺 (62379-531 型; Fred V. Fowler公司, Newton, MA) 以3维测量肿瘤, 且使用来自Studylog Systems公司 (South San Francisco, CA) 的StudyDirector软件以电子方式记录数据。

[1309] 在这项肿瘤研究中, 在植入后第52天将群组1终止。使用Microsoft Excel计算肿瘤体积和体重的平均值、标准偏差 (SD) 和中位值。分别在100%和至少60%的研究动物保留在每个治疗组中时计算平均值和中位值。在第15天从群组2中的小鼠采集肿瘤。

[1310] 结果表明, 在肿瘤植入后第22天, 即在研究中的所有小鼠均存活时的最后一天, 与同种型对照抗体相比, 10mg/kg剂量的28F3.IgG1对MC38异种移植物显示出67%的平均肿瘤生长抑制(TGI)。按照治疗组将肿瘤TGI总结在表10中。按照治疗组将肿瘤生长曲线显示在图62A-62C中。按照治疗组将平均和中位肿瘤生长曲线提供在图63A-63B中。在任何治疗组中的毒性都不明显, 因为平均和中位体重变化小于20%。随着时间过去的小鼠体重和百分比变化显示在图64A-64B中。

[1311] 表10.

| 治疗组                       | 第 22 天                   |         | 第 25 天                   |        |
|---------------------------|--------------------------|---------|--------------------------|--------|
|                           | 平均肿瘤体积(mm <sup>3</sup> ) | TGI (%) | 中位肿瘤体积(mm <sup>3</sup> ) | TGI(%) |
| [1312] 同种型 IgG1, 10 mg/kg | 1342                     | N/A     | 1790                     | N/A    |
| 28F3.IgG1, 10 mg/kg       | 447                      | 67      | 380                      | 79     |
| 28F3.IgG1.1f, 10 mg/kg    | 1049                     | 22      | 1064                     | 41     |

[1313] 结果显示, 在植入后第22天, 28F3.IgG1具有67%的TGI, 而28F3.IgG1.1f具有22%的TGI, 表明两种抗体都降低了在MC38肿瘤模型中的肿瘤生长。另外, 结果提示, 28F3.IgG1的Fc结合在MC38肿瘤模型中增强了抗肿瘤效力。

[1314] 为了研究28F3.IgG1对T细胞群体具有的影响, 在植入后第15天从每个治疗组中的5只小鼠采集组织。在gentleMACS Octo Dissociator™ (Miltenyi, San Diego, CA) 上处理脾和肿瘤。使用流式细胞术 (FACS) 对单细胞悬液进行T细胞标志物染色。在Fortessa (BD Biosciences, San Jose, Ca) 上通过流式细胞术检测抗体荧光, 并且用计算机程序Flowjo (Flowjo, LLC, Ashland, OR) 分析结果。

[1315] 在图65和66中所示的结果显示了相对于同种型对照的降低的Treg细胞百分比, 这与用28F3.IgG1治疗的小鼠中的耗竭一致 (图65)。相反, 在28F3.IgG1组中的CD8+T细胞百分比有增加 (图66)。

[1316] 因此,与同种型对照相比,在用28F3.IgG1治疗的小鼠中的免疫监测提示,可通过Treg耗竭和CD8+T细胞增加来介导TGI。

[1317] 实施例24:交联28F3.IgG1增加其效力

[1318] 本实施例显示,交联28F3.IgG1可增加其增强T细胞的IFN- $\gamma$ 分泌和促进T细胞增殖的效力。

[1319] 在不同浓度的抗GITR抗体或对照试剂存在下,将T细胞与CHO-OKT3细胞或CHO-OKT3-CD32a<sup>高</sup>共培养,并测量干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )分泌和细胞增殖的水平。CHO-OKT3-CD32<sup>高</sup>细胞系具有很高水平的Fc受体CD32a、以及相比于其亲本CHO-OKT3克隆的稍微较高的OKT3表达。

[1320] 如下进行测定。根据制造商的方案,利用CD4T细胞分离试剂盒(Lifetechnologies,目录号113.31D)和CD25微珠(Miltenyi,目录号130-092-983),从分离自Ficoll梯度(Amersham Bioscience 17-1440-03)的人PBMC获得应答T细胞。将表达抗CD3scFv (OKT3)的CHO细胞(CHO-OKT3)或表达抗CD3scFv和CD32a的CHO细胞用RPMI培养基洗涤两次并使其经受50K Rad剂量的照射。收获细胞并将其以 $2.5 \times 10^5$ /mL重悬于培养基(RPMI-1640,补充有10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、55nM $\beta$ -巯基乙醇、1mM丙酮酸钠和100U/mL青霉素/链霉素)中。在96孔TC级平底板(Costar)中每孔接种 $2.5 \times 10^4$ 个CHO细胞和 $1 \times 10^5$ 个T细胞。将细胞与以20 $\mu$ g/mL开始的8点4倍滴定的GITR抗体一起温育。添加20 $\mu$ g/mL的无关hIgG1作为同种型对照。包括一个仅有细胞的样品,用来表示没有任何处理的基线活性。在第3天从每个样品采集上清液用于IFN- $\gamma$ 测量(BD optEIA human IFN-g ELISA试剂盒;BD Bioscience编号555142)。通过<sup>3</sup>H-胸苷掺入评估最后8小时温育的细胞增殖。在图67和68中所示的结果表明,在28F3.IgG1存在下,相对于那些与CHO-OKT3细胞共培养的细胞,与CHO-OKT3-CD32a<sup>高</sup>共培养的T细胞分泌更多的IFN- $\gamma$  (图67)。如预期,对于无效应子28F3.IgG1.1f抗体(其不与CD32a结合)未观察到显著差异。另外,在28F3.IgG1存在下,相对于那些与CHO-OKT3细胞共培养的细胞,在与CHO-OKT3-CD32a<sup>高</sup>共培养的T细胞中观察到更多的T细胞增殖;对于无效应子28F3.IgG1.1f抗体并未观察到这种效应(图68)。因此,交联28F3.IgG1增加了其增强T细胞的IFN- $\gamma$ 分泌和促进T细胞增殖的效力。利用表达较低水平的CD32a的CHO-OKT3细胞也观察到这种对T细胞增殖的增强效应。与GITR.6g1.1f可溶时相比,其在交联时显示更高的IFN- $\gamma$ 水平。这可能是OKT3在CHO-OKT3-CD32a<sup>高</sup>细胞上相对于CHO-OKT3细胞稍微较高的表达水平的反映。用交联的GITR.6g1f观察到的增加大于用惰性同种型所观察到的增加,提示了交联的正面益处。在可溶性抗体展示很小的相对于背景的激动作用的情况下,G1f型式即使在低剂量下也促进了高水平的IFN- $\gamma$ ,再次提示了交联的正面作用。

[1321] 由此可见,28F3.IgG1和无效应子28F3.IgG1抗体两者都可刺激IFN- $\gamma$ 产生并刺激T细胞增殖,然而,交联28F3.IgG1进一步增进了其增强T细胞的IFN- $\gamma$ 分泌和促进T细胞增殖的效力。

[1322] 实施例25:IgG2CH1增强GITR Ab诱导的CD4+ T细胞的IL-2分泌

[1323] 本实施例显示,相对于具有IgG1同种型的CH1结构域的抗体,IgG2同种型的CH1结构域增强了抗GITR抗体诱导的T细胞活性。

[1324] 将表11中所示的修饰的重链恒定区与抗GITR抗体的可变区连接。将供体CD4+ T细

胞与表达OKT3-scFv的CHO细胞和各种抗GITR抗体一起温育,并测量分泌的IL-2的水平。过程如实施例20所述。

[1325] 表11:修饰的重链恒定区:

| 构建体         | 恒 定 区 的        |                                        |                                             |
|-------------|----------------|----------------------------------------|---------------------------------------------|
|             | SEQ ID NO      | 描述                                     |                                             |
| IgG1f       | 383            | 野生型IgG1f                               |                                             |
| IgG1.1f     | 388            | 标准惰性IgG1.1f                            |                                             |
| IgG2.3      | 384            | IgG2 A型(C219S)                         |                                             |
| IgG2.5      | 387            | IgG2 B型(C131S)                         |                                             |
| IgG2.3G1-KH | 386            | IgG2.3的CH1、上部铰链和下部铰链/上部CH2, 所有其他为IgG1f |                                             |
| IgG2.5G1-KH | 395            | IgG2.5的CH1、上部铰链和下部铰链/上部CH2, 所有其他为IgG1f |                                             |
| IgG2.3G1-AY | 385            | IgG2.3的CH1和上部铰链, 所有其他为IgG1f            |                                             |
| IgG2.5G1-AY | 394            | IgG2.5的CH1和上部铰链, 所有其他为IgG1f            |                                             |
| [1326]      | IgG1-G2.3G1-KH | 398                                    | IgG1的CH1、IgG2.3的上部铰链和下部铰链/上部CH2, 所有其他为IgG1f |
|             | IgG1-G2.3G1-AY | 397                                    | IgG1的CH1, IgG2.3的上部铰链, 所有其他为IgG1f           |
|             | IgG2.3G1.1f-KH | 389                                    | IgG2.3的CH1、上部铰链和下部铰链/上部CH2, 所有其他为IgG1.1f    |
|             | IgG2.5G1.1f-KH | 393                                    | IgG2.5的CH1、上部铰链和下部铰链/上部CH2, 所有其他为IgG1.1f    |
|             | IgG1-deltaTHT  | 390                                    | 其中THT序列从铰链中去除的IgG1                          |
|             | IgG2.3-加THT    | 391                                    | 其中THT序列(来自IgG1)添加到铰链中的IgG2.3                |
|             | IgG2.5-加THT    | 396                                    | 其中THT序列(来自IgG1)添加到铰链中的IgG2.5                |
|             | IgG2.3-加GGG    | 392                                    | 其中柔性GGG序列添加到铰链中的IgG2.3                      |

[1327] 图69中所示的结果表明,除了IgG2同种型的铰链之外,具有IgG2同种型的CH1结构域的所有抗GITR抗体在刺激CD4<sup>+</sup> T细胞的IL-2分泌方面比具有IgG1铰链和CH1者更有效。

[1328] 因此,本实施例显示,相对于不具有IgG2同种型的铰链和/或CH1结构域的同抗体,激动性抗GITR抗体中IgG2铰链和IgG2CH1结构域的存在进一步增强了该抗体的激动剂活性。相对于具有IgG2同种型铰链但非IgG2同种型CH1的抗体,具有IgG2同种型的铰链与CH1结构域的抗体具有更强的激动剂作用。另外,相比于具有来自IgG1同种型的CH1结构域的抗体,具有来自IgG2的CH1结构域的抗体具有更强的激动剂活性。相比于具有来自IgG1同种型的CH1与铰链的抗体,具有来自IgG2的铰链和来自IgG1的CH1结构域的抗体具有更强的激动剂活性。

[1329] 实施例26:Fc受体与具有工程改造的恒定结构域的抗体结合

[1330] 本实施例证明,对于具有包含IgG2的CH1和铰链的修饰的重链恒定区的抗体,当所

述抗体含有IgG1的CH1和CH3结构域时,其与Fc $\gamma$ R结合。

[1331] 除了通过可变结构域结合抗原之外,抗体还可以通过与恒定结构域的相互作用来衔接Fc- $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R)。这些相互作用介导效应子功能,比如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。对于IgG1同种型而言,效应子功能活性高,但对IgG2和IgG4很低或不存在,因为这些同种型对Fc $\gamma$ R具有较低的亲和力。另外,可以通过恒定区内的氨基酸残基突变来修饰IgG1的效应子功能,以改变Fc $\gamma$ R亲和力和选择性。

[1332] 使用包括Biacore表面等离子体共振 (SPR) 和Fortebio生物层干涉测量法 (BLI) 的生物传感器技术来研究抗体与Fc $\gamma$ 受体 (Fc $\gamma$ R或Fc $\gamma$ R) 的结合。在25℃下在Biacore T100 仪器 (GE Healthcare) 上进行SPR研究。使用EDC/NHS将来自鼠抗6xHis抗体的Fab片段以约3000RU的密度固定在CM5传感器芯片上。使用30秒的接触时间通过C末端his标签以10 $\mu$ l/min捕获各种带his标签的Fc $\gamma$ R (7 $\mu$ g/ml), 并且在10mM NaPO<sub>4</sub>、130mM NaCl、0.05% p20 (PBS-T) pH7.1的运行缓冲液中评估1.0 $\mu$ M抗体的结合。用于这些实验的Fc $\gamma$ R包括CD64 (Fc $\gamma$ RI)、CD32a-H131 (Fc $\gamma$ RIIa-H131)、CD32a-R131 (Fc $\gamma$ RIIa-R131)、CD32b (Fc $\gamma$ RIIb)、CD16a-V158 (Fc $\gamma$ RIIIa-V158)、CD16b-NA1 (Fc $\gamma$ RIIIb-NA1) 和CD16B-NA2 (Fc $\gamma$ RIIIb-NA2)。在10mM NaPO<sub>4</sub>、130mM NaCl、0.05% p20 (PBS-T) (pH 7.1) 中,在Fortebio Octet RED仪器 (Pall, Fortebio) 上在25℃进行BLI实验。在蛋白A包被的传感器上从未稀释的表达上清液中捕获抗体,随后与1 $\mu$ M hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158或0.1 $\mu$ M hCD64分析物结合。

[1333] 首先,制造含有修饰的IgG1Fc结构域的抗体,其包含取代S267E (SE) 和S267E/L328F (SELF) 以及被称为V4、V7、V8、V9和V12的突变P238D、P271G、H268D、A330R、G237D、E233D的各种组合。通过Biacore SPR研究这些抗体的结合,与IgG1f、IgG2.3 (IgG2-C219S) 和IgG4.1 (IgG4-S228P) 抗体以及经过工程改造以降低与所有Fc $\gamma$ R结合的IgG1.1f进行比较。图70中所示的结果证明了IgG1f、IgG2.3和IgG4.1以及突变的IgG1抗体的预期Fc $\gamma$ R结合特性,其包括:SE和SELF的CD32a-H131、CD32a-R131和CD32b结合增加,以及相对于CD32a-H131和CD32a-R131,V4、V7、V8、V9和V12突变体对CD32b的选择性增加 (图70)。

[1334] 使用下一组构建体将效应子功能工程改造为效应子功能阴性的IgG2同种型。对于这项研究,在IgG2.3恒定区或称为IgG2.3G1-AY的IgG2.3/IgG1f杂合体的背景下引入上述突变 (表12)。抗体以小规模表达为上清液的形式,并使用Fortebio Octet生物层干涉测量法生物传感器技术测试抗体与Fc $\gamma$ R的结合。由于抗体在上清液中以低浓度存在,所以通过使用蛋白A包被的传感器从上清液中捕获抗体,然后在溶液中结合Fc $\gamma$ R分析物来进行实验。还包括纯化的上清液对照IgG1f (包括野生型IgG1、SE、P238D、V4和V12抗体) 用于比较,这些对照抗体中的每一种均显示预期的Fc $\gamma$ R结合特性 (图71)。IgG2.3抗体也显示出预期的结合谱,仅与CD32a-H131有明显的结合。然而,将S267E、L328F、P238D、P271G、H268D、A330R、G237D或E233D突变引入IgG2.3的所有突变都不能概括相应的工程改造的IgG1mAb的Fc $\gamma$ R亲和力 (图71)。相比之下,IgG2.3G1-AY构建体能够完全保留野生型IgG1的Fc $\gamma$ R结合特性,同时保留IgG2.3的CH1和铰链区。另外,含有S267E、L328F、P238D、P271G、H268D、A330R、G237D和E233D的所有IgG2.3G1-AY突变体均显示与含有相同突变的IgG1型mAb相当的Fc $\gamma$ R结合特性 (图71)。这证明了具有与野生型或突变型IgG1的效应子功能相结合的IgG2的CH1和铰链区的抗体的成功工程改造。

[1335] 表12:工程改造的IgG2构建体

| 集合 | ID              | 构建体                                                             | 序列 ID 号 |
|----|-----------------|-----------------------------------------------------------------|---------|
| 1  | IgG2.3          | hHC-IgG2-C219S                                                  | 384     |
|    | IgG2.3-V13      | hHC-IgG2-C219S – P238D                                          | 431     |
|    | IgG2.3-V14      | hHC-IgG2-C219S – P238D,P271G                                    | 432     |
|    | IgG2.3-V15      | hHC-IgG2-C219S – P238D,H268D,P271G                              | 433     |
|    | IgG2.3-V16      | hHC-IgG2-C219S – P238D,P271G,A330R                              | 434     |
|    | IgG2.3-V17      | hHC-IgG2-C219S – P238D,H268D,P271G,A330R                        | 435     |
|    | IgG2.3-V18      | hHC-IgG2-C219S – S267E                                          | 436     |
|    | IgG2.3-V19      | hHC-IgG2-C219S – S267E,L328F                                    | 437     |
| 2  | IgG2.3G1        | hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f                                        | 385     |
|    | IgG2.3G1-AY-V20 | hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D                                | 438     |
|    | IgG2.3G1-AY-V21 | hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,P271G                          | 439     |
|    | IgG2.3G1-AY-V22 | hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,H268D,P271G                    | 440     |
|    | IgG2.3G1-AY-V23 | hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,P271G,A330R                    | 441     |
|    | IgG2.3G1-AY-V24 | hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f<br>P238D,H268D,P271G,A330R             | – 442   |
|    | IgG2.3G1-AY-V25 | hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f<br>G237D,P238D,H268D,P271G,A330R       | – 443   |
|    | IgG2.3G1-AY-V26 | hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f<br>E233D,G237D,P238D,H268D,P271G,A330R | – 444   |
|    | IgG2.3G1-AY-V27 | hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – S267E                                | 445     |
|    | IgG2.3G1-AY-V28 | hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – S267E,L328F                          | 446     |

[1337] 通过如下方式进一步探索这个工程改造策略:产生具备IgG2.3G1-AY、IgG2.3G1-AY-S267E (IgG2.3G1-AY-V27) 以及IgG2-B型变体 (IgG2.5G1-AY和IgG2.5G1-AY-V27) 格式的其他抗体、以及含有IgG1和IgG2恒定结构域的不同组合的其他杂合抗体,并且使用Biacore SPR技术测试这些抗体与抗his Fab捕获的带有his标签的FcγR的结合。与Octet上清液数据一致,SPR数据显示,尽管IgG2.3G1-AY和IgG2.3G1-AY-V27抗体含有A型IgG2抗体 (IgG2.3) 的CH1和铰链区,但分别具有与IgG1f和IgG1f-S267E相当的FcγR结合特性(表13)。使用IgG2.5G1-AY和IgG2.5G1-AY-V27抗体也获得相似的数据,证明具有IgG1f或修饰的IgG1f样效应子功能的B型IgG2抗体(含有C131S突变,称为IgG2.5)的工程改造是成功的。具有IgG2.3G1-AY、IgG2.3G1-AY-V27、IgG2.5G1-AY或IgG2.5G1-AY-V27恒定区但可变区不同的其他几种抗体的数据表明,这个工程策略广泛适用于与可变结构域无关的其他抗体(表13)。证明IgG1f样FcγR结合特性的其他构建体是IgG1-G2.3G1-AY和IgG1δTHT,而几个修饰的恒定区构建体不能保留IgG1f样FcγR结合特性,所述恒定区构建体包括IgG2.3G1-KH、IgG2.5G1-KH、IgG2.3加THT、IgG2.5加THT和IgG2.3加GGG构建体(表13)。

[1338] 表13:1μM抗体与抗his Fab捕获的FcγR-his蛋白结合的R%最大值



[1339]

| mAb                   | hCD64 | hCD32a<br>-H131 | hCD32a<br>-R131 | hCD32b | hCD16a<br>-V158 | hCD16B<br>-NA2 |
|-----------------------|-------|-----------------|-----------------|--------|-----------------|----------------|
| mAb8-IgG1f            | 80%   | 82%             | 51%             | 27%    | 51%             | 21%            |
| mAb9-IgG1f            | 70%   | 33%             | 19%             | 4%     | 28%             | 10%            |
| G1TR.6-IgG1f          | 66%   | 35%             | 25%             | 8%     | 41%             | 19%            |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| G1TR.6-IgG1.1f        | 2%    | 0%              | 3%              | 1%     | 0%              | 0%             |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| mAb11-IgG2.3          | 2%    | 44%             | 17%             | 5%     | 1%              | 0%             |
| mAb6-IgG2.3           | 3%    | 66%             | 14%             | 3%     | 1%              | 0%             |
| G1TR.6-IgG2.3         | 4%    | 40%             | 10%             | 1%     | 2%              | 0%             |
| mAb4-IgG2.3           | 1%    | 39%             | 6%              | 1%     | 1%              | 0%             |
| mAb5-IgG2.3           | 6%    | 100%            | 30%             | 4%     | 3%              | 0%             |
| mAb12-IgG2.3          | 2%    | 39%             | 7%              | 1%     | 1%              | 0%             |
| mAb13-IgG2.3          | 2%    | 40%             | 7%              | 1%     | 1%              | 0%             |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| mAb11-IgG2.5          | 0%    | 40%             | 13%             | 3%     | 0%              | -1%            |
| mAb7-IgG2.5           | 4%    | 72%             | 19%             | 2%     | 2%              | 0%             |
| mAb8-IgG2.5           | 3%    | 59%             | 14%             | 3%     | 2%              | 0%             |
| mAb10-IgG2.5          | 1%    | 29%             | 5%              | 1%     | 1%              | 0%             |
| mAb6-IgG2.5           | 3%    | 75%             | 17%             | 4%     | 2%              | 0%             |
| G1TR.6-IgG2.5         | 4%    | 43%             | 13%             | 2%     | 2%              | 1%             |
| mAb4-IgG2.5           | 2%    | 46%             | 8%              | 1%     | 1%              | 0%             |
| mAb5-IgG2.5           | 6%    | 89%             | 26%             | 5%     | 4%              | 1%             |
| mAb12-IgG2.5          | 1%    | 36%             | 6%              | 1%     | 1%              | 0%             |
| mAb13-IgG2.5          | -2%   | 39%             | 4%              | -2%    | 0%              | -2%            |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| mAb8-IgG2.3G1-AY      | 77%   | 61%             | 38%             | 10%    | 38%             | 13%            |
| mAb10-IgG2.3G1-AY     | 67%   | 23%             | 14%             | 4%     | 24%             | 8%             |
| G1TR.6-IgG2.3G1-AY    | 66%   | 43%             | 33%             | 16%    | 42%             | 21%            |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| mAb7-IgG2.5G1-AY      | 80%   | 73%             | 45%             | 12%    | 47%             | 19%            |
| mAb8-IgG2.5G1-AY      | 77%   | 70%             | 45%             | 17%    | 48%             | 22%            |
| G1TR.6-IgG2.5G1-AY    | 65%   | 38%             | 27%             | 10%    | 41%             | 19%            |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| G1TR.6-IgG2.3G1-KH    | 3%    | 13%             | 3%              | 0%     | 3%              | 1%             |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| G1TR.6-IgG2.5G1- KH   | 2%    | 15%             | 3%              | 0%     | 3%              | 1%             |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| G1TR.6-IgG2.3G1.1f-KH | 2%    | 9%              | 2%              | 0%     | 1%              | 0%             |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| G1TR.6-IgG2.5G1.1f-KH | 3%    | 15%             | 4%              | 0%     | 2%              | 0%             |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| mAb7-IgG2.3G1-AY-V27  | 84%   | 68%             | 92%             | 76%    | 26%             | 7%             |
| mAb8-IgG2.3G1-AY-V27  | 78%   | 67%             | 80%             | 67%    | 24%             | 7%             |
| mAb10-IgG2.3G1-AY-V27 | 69%   | 24%             | 57%             | 40%    | 12%             | 3%             |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| mAb7-IgG2.5G1-AY-V27  | 81%   | 74%             | 89%             | 84%    | 32%             | 9%             |
| mAb8-IgG2.5G1-AY-V27  | 77%   | 76%             | 79%             | 77%    | 33%             | 10%            |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| G1TR.6-IgG1-G2.3G1-AY | 66%   | 36%             | 25%             | 7%     | 42%             | 19%            |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| G1TR.6-IgG1-G2.3G1-KH | 2%    | 21%             | 2%              | 0%     | 5%              | 1%             |
|                       |       |                 |                 |        |                 |                |
| G1TR.6-IgG1δTHT       | 66%   | 57%             | 42%             | 17%    | 48%             | 27%            |

[1340]

|                   |    |     |     |    |    |    |
|-------------------|----|-----|-----|----|----|----|
| G1TR.6-IgG2.3加THT | 6% | 45% | 17% | 2% | 3% | 1% |
|                   |    |     |     |    |    |    |
| G1TR.6-IgG2.5加THT | 5% | 44% | 15% | 2% | 3% | 1% |
|                   |    |     |     |    |    |    |
| G1TR.6-IgG2.3加GGG | 6% | 45% | 17% | 2% | 3% | 1% |

[1341] 总之,这些数据显示,在IgG1中,在铰链区中保守的CPPCPAP (SEQ ID NO:479) 基序紧邻C端的序列赋予了FcγR介导的效应子功能,而抗体的CH1和铰链上部可以被IgG2或修饰的IgG2序列替换,从而可能将IgG1和修饰的IgG1的效应子功能与含有IgG2CH1和/或铰链区的抗体的优越的内化或信号转导特性相结合。

[1342] 实施例27:在具有IgG2铰链和CH1结构域的抗体中GITR激动剂抗体内化作用增强

[1343] 为了诱导GITR表达,将细胞与20ng/ml抗CD3+1000ng/ml CD28在37℃下温育72小时。作为T细胞活化的替代方法,通过三阶段培养方案制备大批量的活化的CD4<sup>+</sup> T细胞。简言之,用补充有1μg/ml可溶性CD28的平板结合的CD3 (1.5μg/ml) 将CD4<sup>+</sup> T细胞在37℃下刺激72小时,在20u/ml IL-2存在下扩大培养14天,最后通过添加10μg/ml PHA、2u/ml IL-2和1μg/ml CD28在37℃下进行72小时的另一轮激活。将刺激过的T细胞接种到384孔PDL成像板中2小时使细胞粘附,在4℃冷却15分钟,然后分别加入Alexa 488标记的GITR抗体,保持1小时。最后通过HCS将平板成像并将数据报告为每细胞的总强度。

[1344] 已经使用上述T细胞活化方法评价了三种不同的GITR抗体。它们是作为G1同种型的GITR.6抗体和不能与Fc受体结合的惰性 (IgG1.1) 同种型,以及具有IgG2铰链而不是IgG1铰链的嵌合体。

[1345] 使用Alexa淬灭测定法格式评估在CD3刺激的CD4<sup>+</sup> T细胞中的GITR抗体诱导的内化。在如上所述的条件下温育新鲜获得的CD4阳性T细胞以诱导GITR表达。刺激后,将细胞重悬于新鲜培养基中,并接种在平板上以便如下进行内化测定。如上所述将细胞与抗体温育,用温热培养基洗涤并在固定和淬灭之前在37℃温育指定的时间。将内化的抗体量度为在零时间观察到的在小的在不能淬灭的信号之上的荧光增加,然后针对最初与细胞结合的总荧光“未淬灭的对照”进行标准化。如图72中所示,对于每种测试的抗体,GITR连接导致内化在30-60分钟之间快速达到峰值,而发现对照抗体维持定位于质膜。结果表明,IgG2铰链区增强了GITR连接诱导的内化。

[1346] 为了进一步剖析内化和相关动力学的详细机理,分析了进入早期内体区室的抗体胞吞作用和递送。在本实验中,用未标记的抗体对细胞进行脉冲追踪分析。固定后,将细胞渗透化处理并用早期内体标记EEA1 (Cell Signaling Technology) 染色,洗涤,然后用Alexa fluor-488缀合的抗兔二级抗体 (EEA1) 和Alexa fluor-647缀合的抗人抗体 (GITR) 加以检测。在具有60X水浸物镜的Opera共焦系统上将板成像。结果表明在膜结合的抗GITR抗体染色与细胞内EEA1信号之间的明确分离。在将培养物加温后,检测到看起来与内体蛋白共定位的一些抗体的聚类。使用HCS Studio Software进行内体共定位的定量,并将结果绘制为共定位的像素强度相对于总染色的比率 (图73A-C)。GITR抗体和早期内体的共定位在30分钟时最突出。在此测试时间点,GITR.6.G2.G1f显示出比GITR.6.G1f抗体更高的共定位分数。共定位结果与使用上述Alexa淬灭方法进行的观察结果相关,并且支持一个这样的模型:该模型提示G2铰链相对于G1诱导GITR内化具有潜在优势。

[1347] 实施例28:在T细胞受体激活的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞中的GITR激动剂抗体信号转导在具有IgG2铰链和CH1结构域的抗体中得到增强

[1348] 为了进一步研究抗GITR激动剂抗体的机制,监测了参与T细胞活化的几种信号转导途径,比如NFκB和P38信号转导途径。

[1349] 用包被平板的0.4μg/ml抗CD3和0.4μg/ml抗CD28激活来自健康供体 (M6576) 的CD4

+和CD8+T细胞。3天后,收集细胞并接种在384孔板上用于信号转导激活。细胞在平板上沉降2小时后,将它们用抗GITR抗体处理15分钟,并通过向测定板中添加甲醛至最终10%来终止信号转导事件。然后将细胞渗透化处理并用磷光体-p65NFKB抗体染色以便进行信号转导检测。如图74A和74B中所示,与CD4+和CD8+T细胞中的GITR.6.G1f相比,GITR.6.G2和GITR.6.G2.G1f抗体具有更高的信号转导反应。虽然没有将内化与信号通路激活关联的直接证据,但有趣的是注意到与GITR的IgG1相比,G2同种型似乎改善了抗体功能活性的两个方面。

[1350] 为了将每种抗体的信号转导活性定量,计算了每种抗体的EC50和Emax,因为这两个参数对于捕获信号转导事件的全范围是关键。选择GITR.6.G2.G1f的反应水平作为100%对照,将所有其他抗体针对它进行标准化。如表14中对于被抗CD3和抗CD28抗体激活的CD4+和CD8+T细胞群所示,就效力(EC50)和效能(Emax%)两者而言,GITR抗体的活性有一定范围。虽然GITR.6.G2、GITR.6.G2.G1f和GITR.6.G1f在约10nM范围内显示出相似的效力(EC50),但不同的同种型的效能(Emax)是完全不同的,这表明G1抗体的信号转导不如G2或嵌合同种型那样有效。

[1351] 表14.GITR HuMab在TCR激活的CD4+和CD8+T细胞中的NFKB信号转导活性总结

[1352]

|               | CD4+ T细胞     |             | CD8+ T细胞     |             |
|---------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| 抗体            | EC50<br>(nM) | Emax<br>(%) | EC50<br>(nM) | Emax<br>(%) |
| GITR.6.G2     | 12.8         | 69          | 9.00         | 85          |
| GITR.6.G2.Gif | 9.00         | 100         | 3.77         | 92          |
| GITR.6.G1f    | 7.3          | 10.8        | 20.05        | 27          |
| hIgG1同种型对照    | 无活性          | 4           | 无活性          | 6           |

[1353] 为了进一步证实如果GITR.6.G2和GITR.6.G2.G1f相比于GITR.6.G1f的信号转导差异仅限于NFkB信号转导,或者如果它也适用于其他信号转导事件,则探索P38MAPK信号转导读出。如图75中所示,在CD4+细胞p38MAPK活化测定中,与GITR.6.G1f抗体相比,GITR.6.G2和GITR.6.G2.G1f抗体具有更高的信号转导反应。由此可见,GITR.6G2同种型相比于G1同种型的更好信号转导活性并不仅限于NFkB信号转导。

[1354] 实施例29:IgG2CH1和铰链中的某些氨基酸残基在改善T细胞上的GITR激动中的相关性

[1355] 制备具有28F3重链恒定区的抗GITR抗体(GITR.6),并在如实施例25所述的IL-2产生测定中进行测试,但其中上清液的收获时间是在40小时而不是48小时。结果显示在图76A-D中。

[1356] 表15:序列表总结

[1357]

| SEQ ID | 说明        | 序列                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | 人GITR同等型1 | MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPG<br>CGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEEC<br>CSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQG<br>VQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWT<br>DCTQFGFLTVPFGNKTHNAVCPVPGSPPAEPLGW<br>LTVVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMW<br>PRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPPEERGERSAE<br>EKGR LGDLWV           |
| 2      | 人GITR同等型2 | MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPG<br>CGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEEC<br>CSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQG<br>VQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWT<br>DCCWRCRRRPKTPEAASSPRKSGASDRQRRRG<br>WETCGCEPGRPPGPPTAASPSPGAPQAAGALRS<br>ALGRALLPWQKQVQEGGSDQRPGPCSSAAAAG<br>PCRRERETQSWPPSSLAGPDGVGS |
| 3      | 人GITR同等型3 | MAQHGMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPG<br>CGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEEC<br>CSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQG<br>VQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWT<br>DCTQFGFLTVPFGNKTHNAVCPVPGSPPAEPLGW<br>LTVVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRKTQLL<br>LEVPPSTEDARSCQFPPEERGERSAEEKGR LG<br>DLWV                  |
| 4      | 人GITR(成熟) | QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCC<br>RDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRH<br>HPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGH<br>EGHCKPWT DCTQFGFLTVPFGNKTHNAVCPVGS<br>PPAEP                                                                                                                               |
| 5      | 食蟹猴GITR   | MCASGTLCC LALLCAASLGQRPTGGPGCGPGR<br>LLGTGKDARCCRVHPTTRCCRDYQGECCSEWDC<br>VCVQPEFHCGNPCCTTCQHHPGPSGQGVQPQK<br>FSFGFRCVDCALGTFSRGHDGHCKPWT DCTQFG<br>FLTVPFGNKTHNAVCPVPGSPPAEP PGWLT I ILL<br>AVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQPTGPRETQL<br>LLEVPPSTEDASSCQFPPEERGERLAEEKGR LG<br>DLWV             |
| 6      | 人GITR-L   | MTLHPSPITCEFLFSTALISPKMCLSHLENMPL<br>SHSRTQGAQRSSWKLWLFCSIVMLLFLCSFSWL                                                                                                                                                                                                                   |

[1358]

|    |                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                  | IFIFLQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPP<br>CVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDV<br>APFEVRLYKNKDMIQTLTNKS <del>SKI</del> QNVGGTYELH<br>VGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFI<br>S                                                                                                                                                                                                                                             |
| 7  | 人IgG1恒定结构域                       | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <u>R</u> VE<br>PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRE <u>E</u> MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                  |
| 8  | 人IgG1恒定结构域(同种异型变体)               | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <u>K</u> VE<br>PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSR <u>D</u> ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                  |
| 9  | 具有L234A、L235E和G237A突变的人IgG1恒定结构域 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <u>R</u> VE<br>PKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLF<br>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>E <u>M</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>N <u>N</u> YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 10 | 具有A330S和P331S突变的人IgG1恒定结构域       | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <u>R</u> VE<br>PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF<br>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKV                                                                                                                                                              |

[1359]

|    |                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                                                 | SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 11 | 人 IgG1.1 恒定结构域<br>(L234A 、 L235E 、<br>G237A、 A330S和P331S<br>突变) | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKHTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                 |
| 12 | 人 IgG1κ 轻链 恒定区<br>(CL)                                          | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY<br>PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY<br>SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 13 | 28F3 (VH)                                                       | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGDY YYGMDVWGQGT TTVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 14 | 28F3 (VL)                                                       | AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQFN SYPYTFG<br>QG TKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 15 | 28F3(全长野生型重链)<br><br>恒定区加下划线                                    | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGDY YYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS<br>NFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDK TVERKCCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG<br>LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 16 | 28F3(全长野生型轻链)<br><br>恒定区加下划线                                    | AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQFN SYPYTFG<br>QG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

[1360]

|    |                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                           | <u>QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH</u><br><u>QGLSSPVTKSFNRGEC</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 17 | 28F3.IgG1 (VH + IgG1)     | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PPS<br>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH<br>TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT P<br>EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK<br>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 18 | 28F3.IgG1.1 (VH + IgG1.1) | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PPS<br>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH<br>TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT P<br>EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK<br>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 19 | 28F3.IgG1 (VL + CL)       | AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES GVP SRFSGSG<br>SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN SYPYTFG<br>QG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 20 | 28F3 VH CDR1              | SYGMH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 21 | 28F3 VH CDR2              | VIWIYEGSNKYYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 22 | 28F3 VH CDR3              | GGSMVRGDYYYGMDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 23 | 28F3 VL CDR1              | RASQGISSALA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 24 | 28F3 VL CDR2              | DASSLES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 25 | 28F3 VL CDR3              | QQFN SYPYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 26 | 19D3 (VH)                 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>FHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

[1361]

|    |                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                              | RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GQLDY YYY YVMDVWGQGTTVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 27 | 19D3 (VL)                    | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVP<br>SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN<br>SYPYTFGQGTKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 28 | 19D3(全长野生型重链)<br><br>恒定区加下划线 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>FHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GQLDY YYY YVMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF<br>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN<br>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSN<br>FGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCVECP<br>CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br>FNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br>PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN<br>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<br>PPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 29 | 19D3(全长野生型轻链)<br><br>恒定区加下划线 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SYPYTFG<br>QGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 30 | 19D3.IgG1 (VH + IgG1)        | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>FHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GQLDY YYY YVMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF<br>PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN<br>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS<br>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKTH<br>CPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE<br>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN<br>YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG       |
| 31 | 19D3.IgG1.1 (VH +<br>IgG1.1) | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>FHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GQLDY YYY YVMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |



[1362]

|    |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                               | PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN<br>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS<br>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTH<br>CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>NKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREE<br>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                         |
| 32 | 19D3.IgG1 (VL + CL)           | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFS<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTF<br>QGTELEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 33 | 19D3 VH CDR1                  | SYGFH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 34 | 19D3 VH CDR2                  | VIWYAGSNKFYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 35 | 19D3 VH CDR3                  | GGQLDYYYYYYVMDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 36 | 19D3 VL CDR1                  | RASQGISWLA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 37 | 19D3 VL CDR2                  | AASSLQS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 38 | 19D3 VL CDR3                  | QQYNSYPYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 39 | 18E10 (VH)                    | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GRIAVAFYYSMVWGQGTTVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 40 | 18E10 (VL)                    | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFS<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTF<br>QGTELEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 41 | 18E10(全长野生型重链)<br><br>恒定区加下划线 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GRIAVAFYYSMVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF<br>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN<br>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSN<br>FGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP<br>CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br>FNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br>PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN<br>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<br>PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[1363]

|    |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 42 | 18E10(全长野生型轻链)<br><br>恒定区加下划线 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG<br>QGTELEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 43 | 18E10.IgG1 (VH + IgG1)        | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GRIAVAFYYSDMVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF<br>PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN<br>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS<br>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPELGGPSVFLF<br>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 44 | 18E10.IgG1.1 (VH + IgG1.1)    | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GRIAVAFYYSDMVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF<br>PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN<br>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS<br>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<br>REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE<br>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG        |
| 45 | 18E10.IgG1 (VL + CL)          | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG<br>QGTELEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 46 | 18E10 VH CDR1                 | SYGMH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

|    |                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 47 | 18E10 VH CDR2                       | VIWYAGSNKYYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 48 | 18E10 VH CDR3                       | GGRIAVAFYYSMDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 49 | 18E10 VL CDR1                       | RASQGISSWLA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 50 | 18E10 VL CDR2                       | AASSLQS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 51 | 18E10 VL CDR3                       | QQYNSYPYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 52 | 3C3 (VH)                            | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WTWIRQPPGKGLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSR<br>VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLG<br>AFDAFDIWGQGTMVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 53 | 3C3 (VL1)                           | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG<br>QGKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 54 | 3C3 (VL2)                           | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYL<br>AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSG<br>PGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWHTFGQ<br>GKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 55 | 3C3(全长野生型重链)<br><br>恒定区加下划线         | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WTWIRQPPGKGLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSR<br>VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLG<br>AFDAFDIWGQGTMVTVSS <u>SASTKGPSVFPLAPSS</u><br><u>KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u><br><u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY</u><br><u>ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA</u><br><u>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV</u><br><u>DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN</u><br><u>STYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKALPA</u><br><u>PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV</u><br><u>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP</u><br><u>VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH</u><br><u>EALHNHYTQKSLSLSPGK</u> |
| 56 | 3C3 L1(全长野生型轻<br>链1)<br><br>恒定区加下划线 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG<br>QGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br><u>QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH</u><br><u>QGLSSPVTKSFNRGEC</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 57 | 3C3 L2(全长野生型轻<br>链2)<br><br>恒定区加下划线 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYL<br>AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSG<br>PGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWHTFGQ<br>GKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br><u>CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ</u><br><u>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ</u><br><u>GLSSPVTKSFNRGEC</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

[1364]

[1365]

|    |                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 58 | 3C3.IgG1 (VH + IgG1)     | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WTWIRQPPGKGLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSR<br>VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLG<br>AFDAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSS<br>KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY<br>ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFLF<br>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 59 | 3C3.IgG1.1 (VH + IgG1.1) | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WTWIRQPPGKGLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSR<br>VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLG<br>AFDAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSS<br>KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY<br>ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA<br>PEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN<br>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS<br>SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV<br>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP<br>VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH<br>EALHNHYTQKSLSLSPG        |
| 60 | 3C3.IgG1 (VL1 + CL)      | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISWL<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG<br>QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 61 | 3C3IgG1.2 (VL2 + CL)     | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYL<br>AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG<br>PGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWHTFGQ<br>GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV<br>CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ<br>GLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 62 | 3C3 VH CDR1              | GYIWT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

[1366]

|    |                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 63 | 3C3 VH CDR2                 | KINHSGNTNYPNPSLKS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 64 | 3C3 VH CDR3                 | LGAFDAFDI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 65 | 3C3 VL1 CDR1                | RASQGISSWLA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 66 | 3C3 VL1 CDR2                | AASSLQS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 67 | 3C3 VL1 CDR3                | QQYNSYPYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 68 | 3C3 VL2 CDR1                | RASQGVSSYLA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 69 | 3C3 VL2 CDR2                | DASN RAT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 70 | 3C3 VL2 CDR3                | QQRSNWHT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 71 | 2G6 (VH)                    | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI LSDYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVTVIWYDGSNKFYVDSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARG<br>GRLATGHFYYVMDVWGQGT TTVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 72 | 2G6 (VL)                    | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQG ISSLW<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFS GSG<br>SGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG<br>QG TKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 73 | 2G6(全长野生型重链)<br><br>恒定区加下划线 | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI LSDYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVTVIWYDGSNKFYVDSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARG<br>GRLATGHFYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSS<br>NFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG<br>LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 74 | 2G6(全长野生型轻链)<br><br>恒定区加下划线 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQG ISSLW<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFS GSG<br>SGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG<br>QG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 75 | 2G6.IgG1 (VH + IgG1)        | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI LSDYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVTVIWYDGSNKFYVDSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARG<br>GRLATGHFYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSS<br>SLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRV EPKSCDKTH                                                                                                                                                                                                                                                            |

[1367]

|    |                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                          | TCPPCPAPELLGGPSVFLF<br>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 76 | 2G6.IgG1.1 (VH + IgG1.1) | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFI <sup>1</sup> LS <sup>2</sup> DY <sup>3</sup> G<br>MHWVRQAPGKGLEWVTVI <sup>4</sup> WYDGSNKFYVDSVKG<br>RFTISRDN <sup>5</sup> SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARG<br>GRLATGHFY <sup>6</sup> YVMDVWGQGT <sup>7</sup> TVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT <sup>8</sup> TSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV <sup>9</sup> TV <sup>10</sup> PSS<br>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV <sup>11</sup> EPKSCDKTH<br>TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT <sup>12</sup> P<br>EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK<br>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 77 | 2G6.IgG1 (VL + CL)       | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTIS <sup>1</sup> SLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG<br>QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDY <sup>2</sup> STYLSSTLTLSKADY <sup>3</sup> EKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 78 | 2G6 VH CDR1              | DYGMH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 79 | 2G6 VH CDR2              | VIWYDGSNKFYVDSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 80 | 2G6 VH CDR3              | GGRLATGHFY <sup>1</sup> YVMDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 81 | 2G6 VL CDR1              | RASQGISSWLA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 82 | 2G6 VL CDR2              | AASSLQS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 83 | 2G6 VL CDR3              | QQYNSYPYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 84 | 8A6 (VH)                 | QVQLVESGGGVVQPG <sup>1</sup> RS <sup>2</sup> LR <sup>3</sup> LSCTASGFTFSSYG<br>MQWVRQAPGKGLEWVA <sup>4</sup> VIWYEGSNKYYADSVKG<br>RFTISR <sup>5</sup> ENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GLMVRGLFY <sup>6</sup> YGMDVWGQGT <sup>7</sup> TVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 85 | 8A6 (VL)                 | AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPGKAPKFLIYDASSLES <sup>1</sup> GVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTIS <sup>2</sup> SLQPEDFATYYCQQFN <sup>3</sup> SY <sup>4</sup> PYTFG<br>QGTKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

[1368]

|    |                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 86 | 8A6(全长野生型重链)<br><br>恒定区加下划线 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYG<br>MQWVRQAPGKGLEWVAVIWEYSNKKYADSVKG<br>RFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GLMVRGLFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG<br>LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 87 | 8A6(全长野生型轻链)<br><br>恒定区加下划线 | AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPKGKAPKFLIYDASSLESQVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQFNSTYPTFG<br>QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 88 | 8A6.IgG1 (VH + IgG1)        | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYG<br>MQWVRQAPGKGLEWVAVIWEYSNKKYADSVKG<br>RFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GLMVRGLFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTH<br>TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK<br>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 89 | 8A6.IgG1.1 (VH + IgG1.1)    | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYG<br>MQWVRQAPGKGLEWVAVIWEYSNKKYADSVKG<br>RFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GLMVRGLFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTH<br>TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK<br>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV                                                                                                                                          |

[1369]

|     |                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                             | SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 90  | 8A6.IgG1 (VL + CL)          | AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPGKAPKFLIYDASSLESGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSTPYTFG<br>QGTELEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 91  | 8A6 VH CDR1                 | SYGMQ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 92  | 8A6 VH CDR2                 | VIWYEGSNKYYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 93  | 8A6 VH CDR3                 | GGLMVRGLFYYGMDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 94  | 8A6 VL CDR1                 | RASQGISSALA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 95  | 8A6 VL CDR2                 | DASSLES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 96  | 8A6 VL CDR3                 | QQFNSTPYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 97  | 9G7 (VH)                    | EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVW<br>MSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPV<br>KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLHTEDTAVYYCT<br>TGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 98  | 9G7 (VL1)                   | EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSY<br>LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS<br>GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWF<br>GQGTKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 99  | 9G7 (VL2)                   | EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSY<br>LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPERFSGS<br>GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITF<br>GQGTRLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 100 | 9G7(全长野生型重链)<br><br>恒定区加下划线 | EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVW<br>MSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPV<br>KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLHTEDTAVYYCT<br>TGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS<br>SSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPC<br>PSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR<br>EEQFNSTYRVVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSN<br>KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<br>KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK |
| 101 | 9G7 L2(全长野生型轻               | EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVTSSY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |



[1370]

|     |                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | 链2)<br><br>恒定区加下划线          | LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPERFSGS<br>GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITF<br>GQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS<br><u>VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT</u><br><u>EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT</u><br><u>HQGLSSPVTKSFNRGEC</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 102 | 9G7.IgG1 (VH + IgG1)        | EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVW<br>MSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPV<br>KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLHTEDTAVYYCT<br>TGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS<br>SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT<br>HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT<br>PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT<br>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK<br>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR<br>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 103 | 9G7.IgG1.1 (VH +<br>IgG1.1) | EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVW<br>MSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPV<br>KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLHTEDTAVYYCT<br>TGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS<br>SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT<br>HTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT<br>PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT<br>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK<br>VSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR<br>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 104 | 9G7.IgG1 (VL1 + CL)         | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSY<br>LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS<br>GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTF<br>GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS<br>VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT<br>EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT<br>HQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 105 | 9G7.IgG1.2 (VL2 + CL)       | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSY<br>LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPERFSGS<br>GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITF<br>GQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

[1371]

|     |                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                              | VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT<br>EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT<br>HQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 106 | 9G7 VH CDR1                  | TVWMS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 107 | 9G7 VH CDR2                  | RIKSKTDGGTTDYAAPVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 108 | 9G7 VH CDR3                  | GQLIPYSYYYGMDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 109 | 9G7 VL1 CDR1                 | RASQSVSSSYLA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 110 | 9G7 VL1 CDR2                 | GASSRAT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 111 | 9G7 VL1 CDR3                 | QQYGSSPWT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 112 | 9G7 VL2 CDR1                 | RASQSVTSSSYLA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 113 | 9G7 VL2 CDR2                 | GASSRAT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 114 | 9G7 VL2 CDR3                 | QQYGSSPIT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 115 | 14E3 (VH)                    | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSR<br>VTISVDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYCARFG<br>SNDAFDIWGQGTMTVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 116 | 14E3 (VL)                    | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSTPPTFG<br>QGTEKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 117 | 14E3(全长野生型重链)<br><br>恒定区加下划线 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSR<br>VTISVDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYCARFG<br>SNDAFDIWGQGTMTVTVSS <u>ASTKGPSVFPLAPSS</u><br><u>KSTSGGTAA</u> <u>LGLV</u> <u>KDYFPEPVTVSWNSGALTS</u><br><u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY</u><br><u>ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA</u><br><u>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV</u><br><u>DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN</u><br><u>STYRVSVLT</u> <u>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA</u><br><u>PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV</u><br><u>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP</u><br><u>VLDS</u> <u>SGSF</u> <u>FLY</u> <u>SKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCSVMH</u><br><u>EALHNHYTQKSLSLSPGK</u> |
| 118 | 14E3(全长野生型轻链)<br><br>恒定区加下划线 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSTPPTFG<br>QGTEKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br><u>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE</u><br><u>QDSK</u> <u>DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH</u><br><u>QGLSSPVTKSFNRGEC</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 119 | 14E3.IgG1 (VH + IgG1)        | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSR<br>VTISVDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYCARFG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

[1372]

|     |                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                           | SNDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS<br>KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY<br>ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFLF<br>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                          |
| 120 | 14E3.IgG1.1 (VH + IgG1.1) | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGNTYYNPSLKS<br>VTISVDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYCARFG<br>SNDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS<br>KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY<br>ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA<br>PEAEAGAPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV<br>DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN<br>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS<br>SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV<br>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP<br>VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH<br>EALHNHYTQKSLSLSPG |
| 121 | 14E3.IgG1 (VL + CL)       | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWL<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFG<br>QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 122 | 14E3 VH CDR1              | GYYS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 123 | 14E3 VH CDR2              | EINHSGNTYYNPSLKS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 124 | 14E3 VH CDR3              | FGSNDAFDI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 125 | 14E3 VL CDR1              | RASQGISSWLA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 126 | 14E3 VL CDR2              | AASSLQS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 127 | 14E3 VL CDR3              | QQYNSYPPT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 128 | 19H8 (VH)                 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG<br>MHWVRQAPGKGLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDNKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

[1373]

|     |                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 129 | 19H8 (VL1)                           | AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPGKAPKFLIYDASSLESGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSTPQTFG<br>QGTVKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 130 | 19H8 (VL2)                           | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL<br>AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPLTFG<br>GGTVKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 131 | 19H8(全长野生型重链)<br><br>恒定区加下划线         | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG<br>MHWVRQAPGKGLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDNKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS<br>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG<br>LPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 132 | 19H8 L1(全长野生型轻<br>链1)<br><br>恒定区加下划线 | AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPGKAPKFLIYDASSLESGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSTPQTFG<br>QGTVKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 133 | 19H8 L2(全长野生型轻<br>链2)                | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL<br>AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNWPLTFG<br>GGTVKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 134 | 19H8.IgG1 (VH + IgG1)                | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG<br>MHWVRQAPGKGLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDNKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS<br>SLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVKPKSCDKTH<br>TCPPCPAPELLGGPSVFLF<br>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN                                                                                                                                                                                           |

[1374]

|     |                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                              | WYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 135 | 19H8.IgG1.1 (VH +<br>IgG1.1) | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG<br>MHWVRQAPGKGLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH<br>TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT<br>EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK<br>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 136 | 19H8.IgG1 (VL1 + CL)         | AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPGKAPKFLIYDASSLESVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN SYPQT<br>FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 137 | 19H8.IgG1.2 (VL2 +<br>CL)    | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL<br>AWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSG<br>SGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFG<br>GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 138 | 19H8 VH CDR1                 | NYGMH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 139 | 19H8 VH CDR2                 | VIWYGGSNKFYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 140 | 19H8 VH CDR3                 | GGAMVRGVYYYGMDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 141 | 19H8 VL1 CDR1                | RASQGISSALA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 142 | 19H8 VL1 CDR2                | DASSLES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 143 | 19H8 VL1 CDR3                | QQFN SYPQT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 144 | 19H8 VL2 CDR1                | RASQSVSSYLA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 145 | 19H8 VL2 CDR2                | DASN RAT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 146 | 19H8 VL2 CDR3                | QQRSNWPLT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

[1375]

|     |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 147 | 28F3(VH)核苷酸序列                                  | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG<br>GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>GCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGC<br>ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG<br>CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGA<br>AGTAATAAATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGC<br>CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC<br>ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC<br>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGG<br>GGGAGTATGGTTCGGGGGGACTACTACTACGGT<br>ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC<br>GTCTCCTCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 148 | 28F3(VL)核苷酸序列                                  | GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCT<br>AAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT<br>CAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC<br>CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 149 | 28F3(全长野生型重链)<br>核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG<br>GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>GCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGC<br>ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG<br>CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGA<br>AGTAATAAATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGC<br>CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC<br>ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC<br>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGG<br>GGGAGTATGGTTCGGGGGGACTACTACTACGGT<br>ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC<br>GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC<br>TTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC<br><u>GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG</u><br><u>GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGG</u><br><u>AACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCC</u><br><u>TTCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC</u><br><u>TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC</u><br><u>AACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTA</u><br><u>GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG</u><br><u>ACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCA</u><br><u>CCGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCA</u><br><u>GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC</u> |

[1376]

|     |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                | CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAG<br>GTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG<br>GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAG<br>CAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC<br>CTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC<br>AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC<br>CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA<br>ACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC<br>ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG<br>AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC<br>TTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG<br>AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC<br>ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC<br>TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC<br>AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC<br>GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG<br>CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA                                                         |
| 150 | 28F3(全长野生型轻链)<br>核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCT<br>AAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT<br>CAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC<br>CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACGTGTG<br>GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT<br>GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACGTGCTCTGTT<br>GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC<br>CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG<br>CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC<br>AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT<br>CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC<br>AACAGGGGAGAGTGT |
| 151 | 28F3.IgG1(VH + IgG1)<br>核苷酸序列                  | caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc<br>gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc<br>tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt<br>agctatggca tgcactgggt ccgccaggct<br>ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt<br>atatggtatg aaggaagtaa taaatattat<br>gcagactccg tgaagggccg attcaccatc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

[1377]

|     |                                |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----|--------------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                |   | tccagagaca attccaagaa cacgctgtat<br>ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac<br>acggctgtgt attactgtgc gagagggggg<br>agtatgggtc ggggggacta ctactacggt<br>atggacgtct gggggccaagg gaccacggtc<br>accgtctcct cagctagcac caagggccca<br>tcggtcttcc ccctggcacc ctccctccaag<br>agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc<br>tgccctgggtca aggactactt ccccgaaccg<br>gtgacgggtgt cgtggaactc aggcgcacctg<br>accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc<br>ctacagtcct caggactcta ctccctcagc<br>agcgtgggtga ccgtgccctc cagcagcttg<br>ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat<br>cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag<br>agagttgagc ccaaattcttg tgacaaaact<br>cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa<br>ctccctggggg gaccgtcagt cttcctcttc<br>ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc<br>tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtgggtg<br>gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc<br>aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag<br>gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag<br>gagcagtaca acagcacgta ccgtgtgggtc<br>agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg<br>ctgaatggca aggagtacaa gtgcaagggtc<br>tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag<br>aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc<br>cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca<br>tcccgggagg agatgaccaa gaaccagggtc<br>agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat<br>cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc<br>aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc<br>acgcctcccg tgctggactc cgacgggtcc<br>ttcttctctt atagcaagct caccgtggac<br>aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc<br>tcatgtctccg tgatgcatga ggctctgcac<br>aaccactaca cgcagaagag cctctccctg<br>tccccggggtt ga |
| 152 | 28F3.IgG1.1(VH<br>IgG1.1)核苷酸序列 | + | cagggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc<br>gtgggtccagc ctgggagggtc cctgagactc<br>tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt<br>agctatggca tgactgggt ccgccaggct<br>ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt<br>atatggtatg aaggaagtaa taaatattat                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |



[1378]

|     |                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                         | gcagactccg tgaagggccg attcaccatc<br>tccagagaca attccaagaa cacgctgtat<br>ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac<br>acggctgtgt attactgtgc gagagggggg<br>agtatggttc ggggggacta ctactacggt<br>atggacgtct gggggccaagg gaccacggtc<br>accgtctcct cagctagcac caagggccca<br>tcggtcttcc ccttggcacc ctccctccaag<br>agcacctctg gggggcacagc ggccctgggc<br>tgccctggtca aggactactt ccccgaaccg<br>gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccttg<br>accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc<br>ctacagtcct caggactcta ctccctcagc<br>agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg<br>ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat<br>cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag<br>agagttgagc ccaaattcttg tgacaaaact<br>cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa<br>gccgaagggg ccccgctcagt cttcctcttc<br>cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac<br>tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg<br>gtggacgtga gccacgaaga cctgaggtc<br>aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag<br>gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag<br>gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc<br>agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg<br>ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc<br>tccaacaaag ccctcccaag cagcatcgag<br>aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc<br>cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca<br>tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc<br>agcctgacct gcctgggtcaa aggttctat<br>cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc<br>aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc<br>acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc<br>ttcttctct atagcaagct caccgtggac<br>aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc<br>tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac<br>aaccactaca cgcagaagag cctctccctg<br>tccccgggtt ga |
| 153 | 28F3.IgG1(VL + CL)核苷酸序列 | gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc<br>ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc<br>atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc<br>agtgtcttag cctgggtatca gcagaaacca<br>gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

[1379]

|     |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                | gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca<br>aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat<br>ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct<br>gaagattttg caacttatta ctgtcaacag<br>tttaatagtt acccgtacac ttttggccag<br>gggaccaagc tggagatcaa acgtacgggtg<br>gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc<br>tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc<br>tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat<br>cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg<br>gataacgccc tccaatcggg taactcccag<br>gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac<br>agcacctaca gcctcagcag caccctgacg<br>ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa<br>gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc<br>ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac<br>aggggagagt gtttag |
| 154 | 19D3(VH)核苷酸序列                                  | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG<br>GTCCAACCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>GCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGC<br>TTCCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG<br>CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGCTGGA<br>AGTAATAAATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGC<br>CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC<br>ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTAAGAGCC<br>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGG<br>GGACAGTTGGACTACTACTACTATTACGTTATG<br>GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC<br>TCCTCA                                                                                                                                                                                        |
| 155 | 19D3(VL)核苷酸序列                                  | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCCT<br>AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTACAGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGC<br>CAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC<br>CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA                                                                                                                                                                                                                                             |
| 156 | 19D3(全长野生型重链)<br>核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG<br>GTCCAACCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>GCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGC<br>TTCCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG<br>CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGCTGGA<br>AGTAATAAATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

[1380]

|     |                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                           | <p>CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC<br/> ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTAAGAGCC<br/> GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGG<br/> GGACAGTTGGACTACTACTACTATTACGTTATG<br/> GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC<br/> TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC<br/> CCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAG<br/> AGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC<br/> TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC<br/> TCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTC<br/> CCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC<br/> CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAAC<br/> TTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT<br/> CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACA<br/> GTTGAGCGCAAATGTTGTGTGCGAGTGCCACCG<br/> TGCCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTC<br/> TTCCTCTTCCCCCCTAAAACCAAGGACACCCCTC<br/> ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTG<br/> GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTC<br/> CAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTC<br/> CATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAG<br/> TTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTC<br/> ACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG<br/> GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC<br/> CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACC<br/> AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC<br/> CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC<br/> CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC<br/> TACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC<br/> AATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACA<br/> CCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC<br/> CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG<br/> TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG<br/> ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG<br/> AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p> |
| 157 | <p>19D3(全长野生型轻链)<br/> 核苷酸序列</p> <p>编码恒定区的序列加下<br/> 划线</p> | <p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTG<br/> TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br/> TGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTA<br/> GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCCT<br/> AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA<br/> AGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGA<br/> TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br/> CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGC<br/> CAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC<br/> CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACCTGTG</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

[1381]

|     |                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                     | GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT<br>GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT<br>GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC<br>CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG<br>CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC<br>AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT<br>CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC<br>AACAGGGGAGAGTGT                                                                                                                                   |
| 158 | 18E10(VH)核苷酸序列      | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG<br>GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>GCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGC<br>ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG<br>CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGCTGGA<br>AGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGC<br>CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC<br>ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC<br>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGG<br>GGGCGTATAGCAGTGGCCTTCTACTACAGTATG<br>GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC<br>TCCTCA                                                                 |
| 159 | 18E10(VL)核苷酸序列      | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCT<br>AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTACAGCGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGC<br>CAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC<br>CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA                                                                                                                         |
| 160 | 18E10(全长野生型重链)核苷酸序列 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG<br>GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>GCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGC<br>ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG<br>CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGCTGGA<br>AGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGC<br>CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC<br>ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC<br>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGG<br>GGGCGTATAGCAGTGGCCTTCTACTACAGTATG<br>GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC<br>TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC<br>CCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAG |

[1382]

|     |                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                     | AGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC<br>TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC<br>TCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTC<br>CCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC<br>CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAAC<br>TTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGAT<br>CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACA<br>GTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCG<br>TGCCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTC<br>TTCCTCTTCCCCCCTAAACCAAGGACACCCCTC<br>ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTG<br>GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTC<br>CAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTG<br>CATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAG<br>TTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTC<br>ACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG<br>GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC<br>CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACC<br>AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC<br>CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC<br>CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC<br>TACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC<br>AATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACA<br>CCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC<br>CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG<br>TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG<br>ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG<br>AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA |
| 161 | 18E10(全长野生型轻链)核苷酸序列 | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCCT<br>AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGC<br>CAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC<br>CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACGTGTG<br>GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT<br>GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT<br>GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC<br>CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG<br>CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC<br>AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

[1383]

|     |                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                               | <u>AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT</u><br><u>CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC</u><br><u>AACAGGGGAGAGTGT</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 162 | 3C3(VH)核苷酸序列                                  | CAGGTGCAACTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTG<br>TTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGC<br>GCTGTCTATGGTGGGTCCCTTCAGTGGTTACTAC<br>TGGACCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGG<br>CTGGAGTGGATTGGGAAAATCAATCATAGTGGA<br>AACACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA<br>GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAG<br>TTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCG<br>GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACTGGGG<br>GCCTTTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGG<br>ACAATGGTCACCGTCTCTTCA             |
| 163 | 3C3(VL1)核苷酸序列                                 | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCT<br>AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGC<br>CAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC<br>CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA                                                |
| 164 | 3C3(VL2)核苷酸序列                                 | GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTG<br>TCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC<br>TGCAGGGCCAGTCAGGGTGTTAGCAGCTACTTA<br>GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC<br>AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC<br>ACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGG<br>CCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTTTATTACTGT<br>CAGCAGCGTAGCAACTGGCACACTTTTGGCCAG<br>GGGACCAAGCTGGAGATCAAA                                                   |
| 165 | 3C3(全长野生型重链)<br>核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | CAGGTGCAACTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTG<br>TTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGC<br>GCTGTCTATGGTGGGTCCCTTCAGTGGTTACTAC<br>TGGACCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGG<br>CTGGAGTGGATTGGGAAAATCAATCATAGTGGA<br>AACACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGA<br>GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAG<br>TTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCG<br>GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACTGGGG<br>GCCTTTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGG<br>ACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAG |

[1384]

|     |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                  | GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCC<br>AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC<br>TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG<br>ACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC<br>GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCC<br>TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC<br>GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC<br>ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC<br>AAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCCAAATCTTGT<br>GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA<br>CCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC<br>TTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC<br>TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG<br>GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC<br>AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT<br>GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC<br>AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC<br>CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC<br>AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCC<br>CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC<br>CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC<br>AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC<br>AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG<br>CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCC<br>GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC<br>AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG<br>CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT<br>GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC<br>CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA |
| 166 | 3C3 L1(全长野生型轻<br>链)核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCCT<br>AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGC<br>CAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC<br>CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTG<br>GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT<br>GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT<br>GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC<br>CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

[1385]

|     |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                  | <u>CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC</u><br><u>AGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG</u><br><u>AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT</u><br><u>CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC</u><br><u>AACAGGGGAGAGTGT</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 167 | 3C3 L2(全长野生型轻<br>链)核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTG<br>TCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC<br>TGCAGGGCCAGTCAGGGTGTTAGCAGCTACTTA<br>GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC<br>AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC<br>ACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGG<br>CCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT<br>CAGCAGCGTAGCAACTGGCACACTTTTGGCCAG<br>GGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCT<br>GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT<br>GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTG<br>TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC<br>AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA<br>TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG<br>GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC<br>ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA<br>CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG<br>GGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC<br>AGGGGAGAGTGT |
| 168 | 2G6(VH)核苷酸序列                                     | CAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG<br>GTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>GCAGCGTCTGGATTCTCTTGAGTGACTATGGC<br>ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGA<br>CTGGAGTGGGTGACAGTTATCTGGTATGATGGA<br>AGTAATAAATTCTATGTAGACTCCGTGAAGGGC<br>CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC<br>ACGTTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTC<br>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGG<br>GGACGTCTAGCAACAGGTCACCTTCTACTACGTT<br>ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC<br>GTCTCCTCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 169 | 2G6(VL)核苷酸序列                                     | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCCT<br>AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |



[1386]

|     |                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                               | CAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC<br>CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 170 | 2G6(全长野生型重链)<br>核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | CAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG<br>GTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>GCAGCGTCTGGATTCATCTTGAGTGACTATGGC<br>ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGA<br>CTGGAGTGGGTGACAGTTATCTGGTATGATGGA<br>AGTAATAAATTCTATGTAGACTCCGTGAAGGGC<br>CGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC<br>ACGTTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTC<br>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGG<br>GGACGTCTAGCAACAGGTCACCTTCTACTACGTT<br>ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC<br>GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC<br>TTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC<br>GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG<br>GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGG<br>AACTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGACACACC<br>TTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC<br>TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC<br>AACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTA<br>GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG<br>ACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCA<br>CCGTGCCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCA<br>GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC<br>CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAG<br>GTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG<br>GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAG<br>CAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC<br>CTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC<br>AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC<br>CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA<br>ACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC<br>ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG<br>AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC<br>TTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG<br>AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC<br>ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC<br>TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC<br>AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC<br>GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG<br>CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA |
| 171 | 2G6(全长野生型轻链)<br>核苷酸序列                         | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

[1387]

|     |                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | 编码恒定区的序列加下划线                            | TGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCCT<br>AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGC<br>CAACAGTATAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC<br>CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTG<br>GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT<br>GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT<br>GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC<br>CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG<br>CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC<br>AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT<br>CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC<br>AACAGGGGAGAGTGT |
| 172 | 8A6(VH)核苷酸序列                            | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG<br>GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>ACAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGC<br>ATGCAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG<br>CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGA<br>AGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGC<br>CGATTCACCATCTCCAGAGAAAATTCCAAGAAC<br>ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC<br>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGC<br>GGTCTTATGGTTCGGGGTCTCTTCTACTACGGT<br>ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC<br>CGTCTCCTCA                                                                                                                                                                                                                                      |
| 173 | 8A6(VL)核苷酸序列                            | GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCT<br>AAGTTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT<br>CAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC<br>CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 174 | 8A6(全长野生型重链)<br>核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG<br>GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>ACAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGC<br>ATGCAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG<br>CTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGAAGGA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

[1388]

|     |                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | 划线                                            | AGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGC<br>CGATTACCATCTCCAGAGAAAATTCCAAGAAC<br>ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC<br>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGC<br>GGTCTTATGGTTCGGGGTCTCTTCTACTACGGT<br>ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC<br>GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC<br>TTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC<br>GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG<br>GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGG<br>AACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACACC<br>TTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC<br>TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC<br>AACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTA<br>GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG<br>ACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGCGAGTGCCCA<br>CCGTGCCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCA<br>GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC<br>CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAG<br>GTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG<br>GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAG<br>CAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC<br>CTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC<br>AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC<br>CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA<br>ACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC<br>ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG<br>AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC<br>TTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG<br>AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC<br>ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC<br>TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC<br>AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC<br>GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG<br>CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA |
| 175 | 8A6(全长野生型轻链)<br>核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCT<br>AAGTTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT<br>CAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

[1389]

|     |                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                       | CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTG<br>GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT<br>GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT<br>GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC<br>CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG<br>CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC<br>AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT<br>CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC<br>AACAGGGGAGAGTGT                                   |
| 176 | 9G7(VH)核苷酸序列          | GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTA<br>GTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGT<br>GCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCGTCTGG<br>ATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG<br>CTGGAGTGGGTTGGCCGTATTAAAAGCAAACT<br>GATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTG<br>AAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGATGATTCA<br>AAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG<br>CACACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACC<br>ACAGGGCAGCTGATCCCTTACTCCTACTACTAC<br>GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCTCGGT<br>CACCGTCTCCTCA |
| 177 | 9G7(VL1)核苷酸序列         | GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTG<br>TCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC<br>TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTAC<br>TTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT<br>CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG<br>GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGT<br>GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC<br>AGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTAC<br>TGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGGACGTTT<br>GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA                                                         |
| 178 | 9G7(VL2)核苷酸序列         | GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTG<br>TCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC<br>TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTACCAGCAGCTAC<br>TTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT<br>CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG<br>GCCACTGGCATCCCAGAGAGGTTTCAGTGGCAGT<br>GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC<br>AGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTAC<br>TGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGATCACCTTC<br>GGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA                                                         |
| 179 | 9G7(全长野生型重链)<br>核苷酸序列 | GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTA<br>GTAAAGCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

[1390]

|     |                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | <p>编码恒定区的序列加下划线</p>                           | <p>GCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCGTCTGG<br/>ATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG<br/>CTGGAGTGGGTGGCCGTATTAAAAGCAAACCT<br/>GATGGTGGGACAACAGACTACGCTGCACCCGTG<br/>AAAGGCAGATTACCATCTCAAGAGATGATTCA<br/>AAAAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG<br/>CACACCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTACC<br/>ACAGGGCAGCTGATCCCTTACTCCTACTACTAC<br/>GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCTCGGTC<br/>ACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCC<br/>GTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACC<br/>TCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTC<br/>AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG<br/>TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC<br/>ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC<br/>TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC<br/>AGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAAC<br/>GTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC<br/>AAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGC<br/>CCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGA<br/>CCATCAGTCTTCCTGTTCCCCC AAAACCCAAG<br/>GACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC<br/>ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGAC<br/>CCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGC<br/>GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG<br/>GAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTC<br/>AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG<br/>AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC<br/>AAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATC<br/>TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG<br/>GTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATG<br/>ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC<br/>AAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAG<br/>TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTAC<br/>AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC<br/>TCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGAC<br/>AAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCA<br/>TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC<br/>TACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT<br/>AAA</p> |
| 180 | <p>9G7 L2(全长野生型轻链)核苷酸序列</p> <p>编码恒定区的序列加下</p> | <p>GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTG<br/>TCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC<br/>TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTACCAGCAGCTAC<br/>TTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT<br/>CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

[1391]

|     |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | 划线                                               | GCCACTGGCATCCCAGAGAGGTTTCAGTGGCAGT<br>GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC<br>AGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTAC<br>TGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGATCACCTTC<br>GGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAAC<br>GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA<br>TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT<br>GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA<br>GAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC<br>CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACA<br>GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC<br>AGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC<br>GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC<br>CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC<br>TTCAACAGGGGAGAGTGT                                                                                                                                                                                          |
| 181 | 9G7 L1(全长野生型轻<br>链)核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTG<br>TCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC<br>TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTAC<br>TTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCT<br>CCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG<br>GCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGT<br>GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC<br>AGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTAC<br>TGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGGACGTTT<br>GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAAC<br>GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA<br>TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT<br>GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA<br>GAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC<br>CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACA<br>GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC<br>AGCAGCACCTTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC<br>GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC<br>CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC<br>TTCAACAGGGGAGAGTGT |
| 182 | 14E3(VH)核苷酸序列                                    | CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTG<br>TTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGC<br>GCTGTCTATGGTGGGTCCCTTCAGTGGTTACTAC<br>TGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGG<br>CTGGAGTGGATTGGAGAAATCAATCATAGTGGAA<br>AACACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGC<br>GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAG<br>TTATCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCG<br>GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATTTGGG<br>AGTAATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

[1392]

|     |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                | ACAATGGTCACCGTCTCTTCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 183 | 14E3(VL)核苷酸序列                                  | GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCCT<br>AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGC<br>CAACAGTATAATAGTTACCCTCCGACGTTTCGGC<br>CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 184 | 14E3(全长野生型重链)<br>核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTG<br>TTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGC<br>GCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGTGGTTACTAC<br>TGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGG<br>CTGGAGTGGATTGGAGAAATCAATCATAGTGGA<br>AACACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGC<br>GTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAG<br>TTATCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCG<br>GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATTTGGG<br>AGTAATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGG<br>ACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAG<br>GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCC<br>AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC<br>TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG<br>ACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC<br>GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCC<br>TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC<br>GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC<br>ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC<br>AAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCCAAATCTTGT<br>GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA<br>CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC<br>TTCCCCCAGAAACCCAAGGACACCCTCATGATC<br>TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG<br>GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC<br>AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT<br>GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC<br>AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTC<br>CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC<br>AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC<br>CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG<br>CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC<br>CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC<br>AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC |

[1393]

|     |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                | <u>AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG</u><br><u>CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC</u><br><u>GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC</u><br><u>AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG</u><br><u>CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT</u><br><u>GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC</u><br><u>CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 185 | 14E3(全长野生型轻链)<br>核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | <u>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTG</u><br><u>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT</u><br><u>TGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTA</u><br><u>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCCT</u><br><u>AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA</u><br><u>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGA</u><br><u>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC</u><br><u>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGC</u><br><u>CAACAGTATAATAGTTACCCTCCGACGTTTCGGC</u><br><u>CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACGTGTG</u><br><u>GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT</u><br><u>GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT</u><br><u>GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG</u><br><u>GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC</u><br><u>CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG</u><br><u>CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC</u><br><u>AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG</u><br><u>AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT</u><br><u>CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC</u><br><u>AACAGGGGAGAGTGT</u> |
| 186 | 19H8(VH)核苷酸序列                                  | <u>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG</u><br><u>GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT</u><br><u>GCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGC</u><br><u>ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG</u><br><u>CTGGAGTGGATGGCAGTTATATGGTATGGTGA</u><br><u>AGTAATAAATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGC</u><br><u>CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC</u><br><u>TCGCTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC</u><br><u>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGG</u><br><u>GGGGCTATGGTTCGGGGAGTCTACTACTACGGT</u><br><u>ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC</u><br><u>CGTCTCCTCA</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 187 | 19H8(VL1)核苷酸序列                                 | <u>GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG</u><br><u>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT</u><br><u>TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTA</u><br><u>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCT</u><br><u>AAGTTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGA</u><br><u>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGA</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |



|     |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                | TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT<br>CAACAGTTTAATAGTTACCCTCAGACGTTTCGGC<br>CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 188 | 19H8(VL2)核苷酸序列                                 | GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTG<br>TCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC<br>TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTA<br>GCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCC<br>AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC<br>ACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGG<br>TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT<br>CAGCAGCGTAGCAACTGGCCGCTCACTTTCGGC<br>GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 189 | 19H8(全长野生型重链)<br>核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG<br>GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>GCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGC<br>ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG<br>CTGGAGTGGATGGCAGTTATATGGTATGGTGG<br>AGTAATAAATTCTATGCAGACTCCGTGAAGGGC<br>CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC<br>TCGCTGTCTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC<br>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGG<br>GGGGCTATGGTTCGGGGAGTCTACTACTACGGT<br>ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC<br>GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC<br>TTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC<br><u>GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG</u><br><u>GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG</u><br><u>AACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACAC</u><br><u>TTCCCAGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTAC</u><br><u>TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC</u><br><u>AACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTA</u><br><u>GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG</u><br><u>ACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCA</u><br><u>CCGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCA</u><br><u>GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC</u><br><u>CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC</u><br><u>GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAG</u><br><u>GTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG</u><br><u>GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAG</u><br><u>CAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC</u><br><u>CTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC</u><br><u>AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC</u><br><u>CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA</u> |

[1394]

[1395]

|     |                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                   | ACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC<br>ACCCTGCCCCCATCCCCGGGAGGAGATGACCAAG<br>AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC<br>TTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG<br>AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC<br>ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC<br>TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC<br>AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC<br>GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG<br>CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 190 | 19H8 L1(全长野生型轻<br>链)核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCT<br>AAGTTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT<br>CAACAGTTTAAATAGTTACCCTCAGACGTTTCGGC<br>CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTG<br>GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT<br>GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTT<br>GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC<br>CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG<br>CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC<br>AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT<br>CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC<br>AACAGGGGAGAGTGT |
| 191 | 19H8 L2(全长野生型轻<br>链)核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTG<br>TCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC<br>TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTA<br>GCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCC<br>AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC<br>ACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGG<br>TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTAGAGCCTGAAGATTTTGCAAGTTTATTACTGT<br>CAGCAGCGTAGCAACTGGCCGCTCACTTTCGGC<br>GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTG<br>GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT<br>GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTT<br>GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC<br>CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG                                                                                                                                                                        |

[1396]

|     |                                              |                                                                                                                                                                    |
|-----|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                              | CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC<br>AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT<br>CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC<br>AACAGGGGAGAGTGT |
| 192 | VH 3-33 (28F3, 18E10, 19D3, 2G6, 8A6, 19H8)  | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR                                                        |
| 193 | VH 3-10 (28F3, 8A6)                          | MVRG                                                                                                                                                               |
| 194 | VH 3-10 (9G7)                                | YYYG                                                                                                                                                               |
| 195 | VH 3-10 (19H8)                               | YYY                                                                                                                                                                |
| 196 | VH JH6 (28F3, 19H8)                          | YYYGMDVWGQGTTVTVSS                                                                                                                                                 |
| 197 | VH JH6 (18E10, 2G6, 8A6)                     | YYGMDVWGQGTTVTVSS                                                                                                                                                  |
| 198 | VH JH6 (19D3, 9G7)                           | YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS                                                                                                                                               |
| 199 | VH 6-19 (18E10)                              | IAVA                                                                                                                                                               |
| 200 | VH 3-16 (19D3)                               | DY                                                                                                                                                                 |
| 201 | VH 4-34 (3C3, 14E3)                          | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSR<br>VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR                                                         |
| 202 | VH JH3 (3C3, 14E3)                           | DAFDIWGQGTMTVTVSS                                                                                                                                                  |
| 203 | VH 3-15 (9G7)                                | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAW<br>MSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPV<br>KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCT<br>T                                                   |
| 204 | VL L18 (28F3, 8A6, 19H8VK1)                  | AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNNT                                                             |
| 205 | VL JK2 (28F3, 18E10, 19D3, 3C3VK1, 8A6, 2G6) | YTFGQGTKLEIK                                                                                                                                                       |
| 206 | VL JK2 (3C3VK2)                              | TFGQGTKLEIK                                                                                                                                                        |
| 207 | VL L15 (18E10, 19D3, 3C3VK1, 2G6, 14E3)      | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWL<br>AWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSY                                                             |
| 208 | VL L20 (3C3VK2)                              | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYL<br>AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSG<br>PGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQRSNW                                                               |
| 209 | VL A27 (9G7VK1, 9G7VK2)                      | EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSY<br>LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS<br>GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS                                                            |
| 210 | VL JK1 (9G7VK1)                              | WTFGQGTKVEIK                                                                                                                                                       |
| 211 | VL JK1 (14E3, 19H8VK1)                       | TFGQGTKVEIK                                                                                                                                                        |

[1397]

|     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 212 | VL JK5 (9G7VK2)  | ITFGQGTRLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 213 | VL L6 (19H8VK2)  | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL<br>AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG<br>SGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNW                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 214 | VL JK4 (19H8VK2) | LTFGGGTKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 215 | G1TR表位           | QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCC<br>RDYPGE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 216 | G1TR表位           | QRPTGGPGCGPGRLLLGTGT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 217 | G1TR表位(1区)       | PTGGPGCGPGRLLLGTGT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 218 | G1TR表位(2区)       | CRDYPGEE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 219 | 肽接头              | PVGVV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 220 | 重链C端             | LSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 221 | G2恒定区            | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNV <del>DH</del> KPSNTKVDKTVE<br>RKCCVECP <del>PC</del> PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVS <del>VL</del> TVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                |
| 222 | G2(C219S)恒定区     | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNV <del>DH</del> KPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECP <del>PC</del> PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVS <del>VL</del> TVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                |
| 223 | G2.g1修饰的恒定区      | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNV <del>DH</del> KPSNTKVDKTVE<br>RKCCVECP <del>PC</del> PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTP <del>EV</del> TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVS <del>VL</del> TVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 224 | G2.g1.1修饰的恒定区    | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

[1398]

|     |                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                               | SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                             |
| 225 | G2(C219S).g1 修饰的恒定区                           | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                   |
| 226 | G2(C219S).g1.1 修饰的恒定区                         | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                    |
| 15  | 28F3 (VH + G2)或<br>28F3-IgG2                  | SEQ ID NO: 15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 227 | 28F3 (VH + G2(C219S))<br>或<br>28F3-IgG2-C219S | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAWIWYEGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGDYYYGMDVWGQGT VTVVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKSCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKG<br>LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG |

[1399]

|     |                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 228 | 28F3 (VH + G2.g1)或<br>28F3-IgG2-IgG1                    | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP<br>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT<br>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br>TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC<br>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 229 | 28F3 (VH + G2.g1.1)或<br>28F3-IgG2-IgG1.1                | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br>LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG  |
| 230 | 28F3 (VH +<br>G2(C219S).g1)或<br>28F3-IgG2-C219S-IgG1    | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGDYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVECP<br>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT<br>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br>TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC<br>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 231 | 28F3 (VH +<br>G2(C219S).g1.1)或<br>28F3-IgG2-C219S-IgG1. | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

[1400]

|     |                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | 1                                         | GSMVRGDYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKSCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br>LPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                   |
| 28  | 19D3 (VH + G2)或<br>19D3-IgG2              | SEQ ID NO: 28                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 232 | 19D3 (VH + G2(C219S))或<br>19D3-IgG2-C219S | QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSSYG<br>FHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GQLDY YYYVMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF<br>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN<br>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN<br>FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKSCVECP<br>CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ<br>FNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL<br>PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN<br>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 233 | 19D3 (VH + G2.g1)或<br>19D3-IgG2-IgG1      | QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSSYG<br>FHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GQLDY YYYVMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF<br>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN<br>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN<br>FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECP<br>CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG  |
| 234 | 19D3 (VH + G2.g1.1)或<br>19D3-IgG2-IgG1.1  | QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSSYG<br>FHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GQLDY YYYVMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

[1401]

|     |                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                              | <u>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u><br><u>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSN</u><br><u>FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECP</u><br><u>CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u><br><u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ</u><br><u>YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u><br><u>PSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</u><br><u>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</u><br><u>TPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC</u><br><u>SV</u><br><u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>                                                                                                                                                                                     |
| 235 | 19D3 (VH +<br>G2(C219S).g1)或<br>19D3-IgG2-C219S-IgG1         | <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG</u><br><u>FHWVRQAPGKGLEWVAWIYAGSNKFYADSVKG</u><br><u>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u><br><u>GQLDY YYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVF</u><br><u>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u><br><u>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSN</u><br><u>FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKSCVECP</u><br><u>CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u><br><u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u><br><u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u><br><u>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK</u><br><u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</u><br><u>TPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC</u><br><u>SV</u><br><u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> |
| 236 | 19D3 (VH +<br>G2(C219S).g1.1)或<br>19D3-IgG2-C219S-IgG1<br>.1 | <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG</u><br><u>FHWVRQAPGKGLEWVAWIYAGSNKFYADSVKG</u><br><u>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u><br><u>GQLDY YYYVMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVF</u><br><u>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u><br><u>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSN</u><br><u>FGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKSCVECP</u><br><u>CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u><br><u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ</u><br><u>YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u><br><u>PSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</u><br><u>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</u><br><u>TPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC</u><br><u>SV</u><br><u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>   |
| 41  | 18E10 (VH + G2)或<br>18E10-IgG2                               | SEQ ID NO: 41                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 237 | 18E10 (VH +<br>G2(C219S))或<br>18E10-IgG2-C219S               | <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG</u><br><u>MHWVRQAPGKGLEWVAWIYAGSNKYYADSVKG</u><br><u>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u><br><u>GRIAVAFYYSM DVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVF</u><br><u>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |



[1402]

|     |                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                            | <u>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN</u><br><u>FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVEC</u><br><u>CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u><br><u>VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ</u><br><u>FNSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL</u><br><u>PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</u><br><u>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT</u><br><u>PPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u><br><u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>                                                                                                                                                                                                                                |
| 238 | 18E10 (VH + G2.g1)或<br>18E10-IgG2-IgG1                     | <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG</u><br><u>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKYYADSVKG</u><br><u>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u><br><u>GRIAVAFYYSM DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF</u><br><u>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u><br><u>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN</u><br><u>FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC</u><br><u>CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u><br><u>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u><br><u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u><br><u>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK</u><br><u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</u><br><u>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS</u><br><u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> |
| 239 | 18E10 (VH + G2.g1.1)<br>或<br>18E10-IgG2-IgG1.1             | <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG</u><br><u>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKYYADSVKG</u><br><u>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u><br><u>GRIAVAFYYSM DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF</u><br><u>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u><br><u>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN</u><br><u>FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC</u><br><u>CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u><br><u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ</u><br><u>YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u><br><u>PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</u><br><u>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT</u><br><u>PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u><br><u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>  |
| 240 | 18E10 (VH +<br>G2(C219S).g1)或<br>18E10-IgG2-C219S-IgG<br>1 | <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG</u><br><u>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKYYADSVKG</u><br><u>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u><br><u>GRIAVAFYYSM DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF</u><br><u>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN</u><br><u>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN</u><br><u>FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVEC</u><br><u>CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u>                                                                                                                                                                                                                                                            |

[1403]

|     |                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                                | <u>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u><br><u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u><br><u>LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK</u><br><u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</u><br><u>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS</u><br><u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 241 | 18E10 (VH +<br>G2(C219S).g1.1)或<br>18E10-IgG2-C219S-IgG<br>1.1 | <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG</u><br><u>MHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYAGSNKYYADSVKG</u><br><u>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u><br><u>GRIAVAFYYSM DVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVF</u><br><u>PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN</u><br><u>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSN</u><br><u>FGTQTYTCNV DHKPSNTKVDK TVERKSCVECPP</u><br><u>CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV</u><br><u>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ</u><br><u>YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</u><br><u>PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</u><br><u>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT</u><br><u>PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u><br><u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> |
| 242 | 3C3 (VH + G2)或<br>3C3-IgG2                                     | <u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC A VYGGSFSGYY</u><br><u>WTWIRQPPGKLEWIGKINHSGNTNYNPSL KSR</u><br><u>VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLG</u><br><u>AFDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS</u><br><u>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS</u><br><u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQTY</u><br><u>TCNV DHKPSNTKVDK TVERKCCVECPPCPAPPV</u><br><u>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH</u><br><u>EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR</u><br><u>VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK</u><br><u>TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC</u><br><u>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PMLDS</u><br><u>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH</u><br><u>NHYTQKSLSLSPG</u>          |
| 243 | 3C3 (VH + G2(C219S))<br>或<br>3C3-IgG2-C219S                    | <u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC A VYGGSFSGYY</u><br><u>WTWIRQPPGKLEWIGKINHSGNTNYNPSL KSR</u><br><u>VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLG</u><br><u>AFDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS</u><br><u>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS</u><br><u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQTY</u><br><u>TCNV DHKPSNTKVDK TVERKSCVECPPCPAPPV</u><br><u>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH</u><br><u>EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR</u><br><u>VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK</u><br><u>TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC</u>                                                                                                                          |

[1404]

|     |                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                    | <u>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDS</u><br><u>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH</u><br><u>NHYTQKSLSLSPG</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 244 | 3C3 (VH + G2.g1)或<br>3C3-IgG2-IgG1                 | <u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY</u><br><u>WTWIRQPPGKGLEWIGKINHSGNTNYPNLSKSR</u><br><u>VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLG</u><br><u>AFDAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPCS</u><br><u>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u><br><u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY</u><br><u>TCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPEL</u><br><u>LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS</u><br><u>HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY</u><br><u>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE</u><br><u>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT</u><br><u>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD</u><br><u>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL</u><br><u>HNHYTQKSLSLSPG</u> |
| 245 | 3C3 (VH + G2.g1.1)或<br>3C3-IgG2-IgG1.1             | <u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY</u><br><u>WTWIRQPPGKGLEWIGKINHSGNTNYPNLSKSR</u><br><u>VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLG</u><br><u>AFDAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPCS</u><br><u>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u><br><u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY</u><br><u>TCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPV</u><br><u>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH</u><br><u>EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR</u><br><u>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEK</u><br><u>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC</u><br><u>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS</u><br><u>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH</u><br><u>NHYTQKSLSLSPG</u>    |
| 246 | 3C3 (VH +<br>G2(C219S).g1)或<br>3C3-IgG2-C219S-IgG1 | <u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY</u><br><u>WTWIRQPPGKGLEWIGKINHSGNTNYPNLSKSR</u><br><u>VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLG</u><br><u>AFDAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPCS</u><br><u>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS</u><br><u>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY</u><br><u>TCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPEL</u><br><u>LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS</u><br><u>HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY</u><br><u>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE</u><br><u>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT</u><br><u>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD</u><br><u>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL</u><br><u>HNHYTQKSLSLSPG</u> |

[1405]

|     |                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 247 | 3C3 (VH + G2(C219S).g1.1)或<br>3C3-IgG2-C219S-IgG1.1 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WTWIRQPPGKGLEWIGKINHSGNTNYPNPSLKSR<br>VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLG<br>AFDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS<br>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTY<br>TCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPV<br>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH<br>EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC<br>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD<br>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSPG            |
| 248 | 2G6 (VH + G2)或<br>2G6-IgG2                          | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFILSDYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVTVIWYDGSNKFYVDSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARG<br>GRLATGHFYVMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG<br>LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 249 | 2G6 (VH + G2(C219S))<br>或<br>2G6-IgG2-C219S         | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFILSDYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVTVIWYDGSNKFYVDSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARG<br>GRLATGHFYVMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG<br>LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 250 | 2G6 (VH + G2.g1)或<br>2G6-IgG2-IgG1                  | QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFILSDYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVTVIWYDGSNKFYVDSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

[1406]

|     |                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                            | <u>GRLATGHFYVMDVWGQGT</u> <u>TVTVSSASTKGPSV</u><br><u>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>TVTVSW</u><br><u>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>TVTPSS</u><br><u>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDK</u> <u>TVRKCCVECP</u><br><u>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVT</u><br><u>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>TKPRE</u><br><u>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK</u> <u>CKVSNK</u><br><u>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP</u> <u>SREEMT</u><br><u>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>PENNYK</u><br><u>TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSC</u><br><u>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>                                                                                                                                                             |
| 251 | 2G6 (VH + G2.g1.1)或<br>2G6-IgG2-IgG1.1                     | <u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASG</u> <u>FILSDYG</u><br><u>MHWVRQAPGKGLEWTVTVIWDG</u> <u>SNKFYVDSVKG</u><br><u>RFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARG</u><br><u>GRLATGHFYVMDVWGQGT</u> <u>TVTVSSASTKGPSV</u><br><u>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>TVTVSW</u><br><u>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>TVTPSS</u><br><u>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDK</u> <u>TVRKCCVECP</u><br><u>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVTC</u><br><u>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>TKPREE</u><br><u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK</u> <u>CKVSNKA</u><br><u>LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP</u> <u>SREEMTK</u><br><u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>PENNYKT</u><br><u>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSCS</u><br><u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> |
| 252 | 2G6 (VH +<br>G2(C219S).g1)或<br>2G6-IgG2-C219S-IgG1         | <u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASG</u> <u>FILSDYG</u><br><u>MHWVRQAPGKGLEWTVTVIWDG</u> <u>SNKFYVDSVKG</u><br><u>RFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARG</u><br><u>GRLATGHFYVMDVWGQGT</u> <u>TVTVSSASTKGPSV</u><br><u>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>TVTVSW</u><br><u>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>TVTPSS</u><br><u>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDK</u> <u>TVRKSCVECP</u><br><u>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS</u> <u>RTPEVT</u><br><u>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>TKPRE</u><br><u>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK</u> <u>CKVSNK</u><br><u>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP</u> <u>SREEMT</u><br><u>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> <u>PENNYK</u><br><u>TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG</u> <u>NVFSC</u><br><u>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> |
| 253 | 2G6 (VH +<br>G2(C219S).g1.1)或<br>2G6-IgG2-C219S-IgG1.<br>1 | <u>QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASG</u> <u>FILSDYG</u><br><u>MHWVRQAPGKGLEWTVTVIWDG</u> <u>SNKFYVDSVKG</u><br><u>RFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARG</u><br><u>GRLATGHFYVMDVWGQGT</u> <u>TVTVSSASTKGPSV</u><br><u>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>TVTVSW</u><br><u>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>TVTPSS</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

[1407]

|     |                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                             | <u>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV</u> <u>VERKSCVECP</u><br><u>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u><br><u>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u><br><u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u><br><u>LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK</u><br><u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</u><br><u>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC</u><br><u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 86  | 8A6 (VH + G2)或<br>8A6-IgG2                  | SEQ ID NO: 86                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 254 | 8A6 (VH + G2(C219S))<br>或<br>8A6-IgG2-C219S | <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYG</u><br><u>MQWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG</u><br><u>RFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u><br><u>GLMVRGLFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV</u><br><u>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW</u><br><u>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS</u><br><u>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV</u> <u>VERKSCVECP</u><br><u>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC</u><br><u>VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</u><br><u>QFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG</u><br><u>LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK</u><br><u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</u><br><u>TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC</u><br><u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>    |
| 255 | 8A6 (VH + G2.g1)或<br>8A6 -IgG2-IgG1         | <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYG</u><br><u>MQWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG</u><br><u>RFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u><br><u>GLMVRGLFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV</u><br><u>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW</u><br><u>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS</u><br><u>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV</u> <u>VERKCCVECP</u><br><u>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT</u><br><u>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE</u><br><u>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u><br><u>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT</u><br><u>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</u><br><u>TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC</u><br><u>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> |
| 256 | 8A6 (VH + G2.g1.1)或<br>8A6 -IgG2-IgG1.1     | <u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYG</u><br><u>MQWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG</u><br><u>RFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG</u><br><u>GLMVRGLFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV</u><br><u>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW</u><br><u>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS</u><br><u>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV</u> <u>VERKCCVECP</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

[1408]

|     |                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                            | PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br>LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 257 | 8A6 (VH +<br>G2(C219S).g1)或<br>8A6-IgG2-C219S-IgG1         | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYG<br>MQWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG<br>RFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GLMVRGLFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS<br>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVECP<br>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT<br>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br>TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC<br>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 258 | 8A6 (VH +<br>G2(C219S).g1.1)或<br>8A6-IgG2-C219S-IgG1.<br>1 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYG<br>MQWVRQAPGKGLEWVAVIWIYEGSNKYYADSVKG<br>RFTISRENSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GLMVRGLFYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS<br>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br>LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 259 | 9G7 (VH + G2)或<br>9G7-IgG2                                 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVW<br>MSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPV<br>KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLHTEDTAVYYCT<br>TGQLIPYSYYYGMDVWGQGTISVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS<br>SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVEC<br>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK                                                                                                                                           |

[1409]

|     |                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                             | GLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT<br>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br>TTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC<br>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 260 | 9G7 (VH + G2(C219S))<br>或<br>9G7-IgG2-C219S | EVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTFSTVW<br>MSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPV<br>KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLHTEDTAVYYCT<br>TGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS<br>SNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKSCVEC<br>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQFNSTFRVSVSLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK<br>GLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT<br>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br>TTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC<br>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG    |
| 261 | 9G7 (VH + G2.g1)或<br>9G7-IgG2-IgG1          | EVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTFSTVW<br>MSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPV<br>KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLHTEDTAVYYCT<br>TGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS<br>SNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVEC<br>PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR<br>EEQYNSTYRVVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<br>KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 262 | 9G7 (VH + G2.g1.1)或<br>9G7-IgG2-IgG1.1      | EVQLVESGGGLVKKPGGSLRLSCAASGFTFSTVW<br>MSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPV<br>KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLHTEDTAVYYCT<br>TGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS<br>SNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVEC<br>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQYNSTYRVVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br>ALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT<br>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br>TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC                            |



[1410]

|     |                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                     | SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 263 | 9G7 (VH + G2(C219S).g1)或<br>9G7-IgG2-C219S-IgG1     | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVW<br>MSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPV<br>KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLHTEDTAVYYCT<br>TGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPS<br>SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKSCVEC<br>PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV<br>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR<br>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<br>KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 264 | 9G7 (VH + G2(C219S).g1.1)或<br>9G7-IgG2-C219S-IgG1.1 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTVW<br>MSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPV<br>KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLHTEDTAVYYCT<br>TGQLIPYSYYYGMDVWGQGTSTVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPS<br>SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKSCVEC<br>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br>CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br>ALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT<br>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br>TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC<br>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 265 | 14E3 (VH + G2)或<br>14E3-IgG2                        | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGNTYYNP SLKSR<br>VTISVDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYCARFG<br>SNDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS<br>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY<br>TCNVDHKPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCPAPPV<br>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH<br>EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR<br>VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK<br>TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC<br>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS<br>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSPG         |
| 266 | 14E3 (VH + G2(C219S))<br>或                          | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGNTYYNP SLKSR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

[1411]

|     |                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | 14E3-IgG2-C219S                                      | VTISVDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYCARFG<br>SNDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCS<br>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY<br>TCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPV<br>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH<br>EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR<br>VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK<br>TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC<br>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS<br>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSPG                                                                           |
| 267 | 14E3 (VH + G2.g1)或<br>14E3-IgG2-IgG1                 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGNTYYNPSLKS<br>VTISVDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYCARFG<br>SNDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCS<br>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY<br>TCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPEL<br>LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS<br>HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY<br>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE<br>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT<br>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSLSPG |
| 268 | 14E3 (VH + G2.g1.1)或<br>14E3-IgG2-IgG1.1             | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGNTYYNPSLKS<br>VTISVDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYCARFG<br>SNDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCS<br>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTY<br>TCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPV<br>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH<br>EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC<br>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSPG   |
| 269 | 14E3 (VH +<br>G2(C219S).g1)或<br>14E3-IgG2-C219S-IgG1 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGNTYYNPSLKS<br>VTISVDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYCARFG<br>SNDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCS<br>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

[1412]

|     |                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                              | GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTY<br>TCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPEL<br>LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS<br>HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY<br>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE<br>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT<br>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                    |
| 270 | 14E3 (VH +<br>G2(C219S).g1.1)或<br>14E3-IgG2-C219S-IgG1<br>.1 | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYY<br>WSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGNTYYNPSLKSR<br>VTISVDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYCARFG<br>SNDAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCS<br>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<br>GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTY<br>TCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCAPPV<br>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH<br>EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC<br>LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH<br>HNHYTQKSLSLSPG              |
| 131 | 19H8 (VH + G2)或<br>19H8-IgG2                                 | SEQ ID NO: 131                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 271 | 19H8 (VH +<br>G2(C219S))或<br>19H8-IgG2-C219S                 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG<br>MHWVRQAPGKGLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GAMVRGVYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTFRVVS LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG<br>LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 272 | 19H8 (VH + G2.g1)或<br>19H8-IgG2-IgG1                         | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG<br>MHWVRQAPGKGLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GAMVRGVYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

[1413]

|     |                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                              | <p>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECP<br/>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br/>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br/>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br/>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT<br/>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br/>TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC<br/>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>                                                                                                                                                                                                                                       |
| 273 | 19H8 (VH + G2.g1.1)或<br>19H8-IgG2-IgG1.1                     | <p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG<br/>MHWVRQAPGKGLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKG<br/>RFTISRDN SKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br/>GAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br/>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br/>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS<br/>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECP<br/>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br/>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br/>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br/>LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br/>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br/>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC<br/>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p> |
| 274 | 19H8 (VH +<br>G2(C219S).g1)或<br>19H8-IgG2-C219S-IgG1         | <p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG<br/>MHWVRQAPGKGLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKG<br/>RFTISRDN SKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br/>GAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br/>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br/>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS<br/>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECP<br/>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br/>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br/>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br/>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT<br/>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br/>TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC<br/>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p> |
| 275 | 19H8 (VH +<br>G2(C219S).g1.1)或<br>19H8-IgG2-C219S-IgG1<br>.1 | <p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG<br/>MHWVRQAPGKGLEWMAVIWYGGSNKFYADSVKG<br/>RFTISRDN SKNSLSLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br/>GAMVRGVYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSV<br/>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br/>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS<br/>NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECP<br/>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br/>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE</p>                                                                                                                                                                                  |

[1414]

|     |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                               | <u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA</u><br><u>LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK</u><br><u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</u><br><u>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS</u><br><u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>                                                                                                                                                                                                                         |
| 276 | 重链C端                          | LSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 277 | -                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 278 | 野生型人IgG1 CH1                  | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 279 | 野生型人IgG2 CH1                  | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 280 | 野生型人IgG1 CH2                  | PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED<br>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT<br>ISKAK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 281 | 具有 A330S/P331S 的人<br>IgG1 CH2 | PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED<br>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP <u>SSIEKT</u><br>ISKAK                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 282 | 野生型人IgG1 CH3                  | GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY<br>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL<br>YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK<br>LSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 283 | IgG1-IgG2-IgG1f               | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV <u>E</u><br><u>RKCCVECPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM</u><br><u>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH</u><br><u>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE</u><br><u>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL</u><br><u>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u><br><u>GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW</u><br><u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> |
| 284 | IgG1-IgG2CS-IgG1f             | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV <u>E</u><br><u>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM</u><br><u>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN</u><br><u>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY</u><br><u>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL</u><br><u>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG</u><br><u>QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ</u>                                           |

[1415]

|     |                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                         | QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 285 | IgG1-IgG2-IgG1.1f       | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE<br>RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLF<br>PSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 286 | IgG1-IgG2CS-IgG1.1f     | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 287 | IgG1-IgG2-IgG1f2        | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE<br>RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 288 | IgG1-IgG2(C219S)-IgG1f2 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 289 | IgG2-IgG1f2             | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI                                                                                                                                                                                                                          |

[1416]

|     |                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                                                                                                   | SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                       |
| 290 | IgG2(C219S)-IgG1f2                                                                                                                | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFQGTQTYTCNV <del>D</del> HKPSNTKVDKTV <u>E</u><br>RKSCVECP <del>P</del> CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 291 | 野生型人IgG2铰链                                                                                                                        | ERKCCVECP <del>P</del> CPAPPVAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 292 | 具有C219S的人IgG2铰链                                                                                                                   | ERKSCVECP <del>P</del> CPAPPVAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 293 | IgG2/IgG1铰链                                                                                                                       | ERKCCVECP <del>P</del> CPAPE <u>LLGG</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 294 | IgG2 (C219S)/IgG1铰链                                                                                                               | ERKSCVECP <del>P</del> CPAPE <u>LLGG</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 295 | 野生型人IgG1铰链                                                                                                                        | EPKSCDKTHTC <del>P</del> PPCPAPE <u>LLGG</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 296 | IgG1.1 铰 链<br>(L234A/L235E/G237A)                                                                                                 | EPKSCDKTHTC <del>P</del> PPCPAPE <u>AEGA</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 297 | 野生型人IgG2 CH2                                                                                                                      | PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED<br>PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV<br>SVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT<br>ISKTK                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 298 | 野生型人IgG2 CH3                                                                                                                      | GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY<br>PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFL<br>YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK<br>LSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 299 | IgG1 C 端 C <sub>H</sub> 1( 对 于<br>IgG3(17-15-15-15) 、<br>IgG3(17-15-15) 、<br>IgG3(17-15) 、<br>IgG3(15-15-15) 、<br>IgG3(15)和IgG4相同 | VDKRV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 300 | IgG2 C端C <sub>H</sub> 1                                                                                                           | VDKTV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 301 | IgG1上部铰链                                                                                                                          | EPKSCDKTHT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 302 | IgG3(17-15-15-15) 上 部<br>铰 链 ( 对 于                                                                                                | ELKTPLGDTTHT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

[1417]

|     |                                                                                                                   |                                                                      |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|     | IgG3(17-15-15) 和<br>IgG3(17-15)相同)                                                                                |                                                                      |
| 303 | IgG3(15-15-15) 上部铰链<br>(对于IgG3(15)相同)                                                                             | EPKS                                                                 |
| 304 | IgG4上部铰链                                                                                                          | ESKYGPP                                                              |
| 305 | IgG1中部铰链                                                                                                          | CPPCP                                                                |
| 306 | IgG2中部铰链                                                                                                          | CCVECPPCP                                                            |
| 307 | IgG3(17-15-15-15) 中部<br>铰链                                                                                        | CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>3</sub>                                 |
| 308 | IgG3(17-15-15) 中部铰<br>链                                                                                           | CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub>                                 |
| 309 | IgG3(17-15)中部铰链                                                                                                   | CPRCPEPKSCDTPPPCPRCP                                                 |
| 310 | IgG3(15-15-15) 中部铰<br>链                                                                                           | CDTPPPCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub>                           |
| 311 | IgG3(15)中部铰链                                                                                                      | CDTPPPCPRCP                                                          |
| 312 | IgG4中部铰链                                                                                                          | CPSCP                                                                |
| 313 | IgG1 下部铰链 (对于<br>IgG3(17-15-15-15) 、<br>IgG3(17-15-15) 、<br>IgG3(17-15) 、<br>IgG3(15-15-15) 、<br>IgG3(15)和IgG4相同) | APELLGG                                                              |
| 314 | IgG2下部铰链                                                                                                          | APPVAG                                                               |
| 315 | 28F3 VH信号序列(对于<br>18E10、19D3、19H8、<br>6G10相同)                                                                     | MEFGLSWVFLVALLRGVQC                                                  |
| 316 | 28F3 VH信号序列(核苷<br>酸序列)                                                                                            | ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTT<br>GCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT         |
| 317 | 28F3 VL信号序列(对于<br>18E10、8A6、19H8VL1、<br>6G10相同)                                                                   | MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC                                               |
| 318 | 28F3 VL信号序列(核苷<br>酸序列)                                                                                            | ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGG<br>CTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGAT |
| 319 | 19D3 VL信号序列                                                                                                       | MRVLAQLLGLLLLCPFGARC                                                 |
| 320 | 19D3 VL信号序列(核苷<br>酸序列)                                                                                            | ATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG<br>CTGCTCTGTTTCCCAGGTGCCAGATGT     |
| 321 | 3C3 VH信号序列(对于<br>14E3相同)                                                                                          | MKHLWFFLLLVAAPRWVLS                                                  |
| 322 | 3C3 VH信号序列(核苷<br>酸序列)                                                                                             | ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTG                                    |



[1418]

|     |                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | 酸序列)                         | GCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 323 | 3C3 VL信号序列(对于14E3相同)         | MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 324 | 3C3 VL信号序列(核苷酸序列)            | ATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCCAGGTGCCAGATGT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 325 | 3C3 VL2信号序列(对于19H8 VL2相同)    | MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 326 | 3C3 VL2信号序列(核苷酸序列)           | ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAACCACCGGA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 327 | 8A6 VH信号序列                   | MEFGLNWVFLVALLRGVQC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 328 | 8A6 VH信号序列(核苷酸序列)            | ATGGAGTTTGGGCTGAACTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 329 | 9G7 VH信号序列                   | MEFGLSWIFLAAILKGVQC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 330 | 9G7 VH信号序列(核苷酸序列)            | ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGATTTTCCTTGCTGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 331 | 9G7 VL1和VL2信号序列              | METPAQLLFLLLLLWLPDTTG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 332 | 9G7 VL1和VL2信号序列(核苷酸序列)       | ATGGAAACCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAACCACCGGA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 333 | 14E3 VH信号序列                  | MKHLWFFLLLVAAAPRWLS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 334 | 14E3 VH信号序列(核苷酸序列)           | ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTCC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 335 | 6G10 (VH)                    | QVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGLYYYGMDVWGQGT TVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 336 | 6G10 (VL)                    | AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSG<br>SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN SYPYTFG<br>QG TKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 337 | 6G10(全长野生型重链)<br><br>恒定区加下划线 | QVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGLYYYGMDVWGQGT TVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PPS<br>NFGTQT YTCNV D HKPSNTKVDK TVERKCCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKG<br>LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK |

[1419]

|     |                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                              | <u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</u><br><u>TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS</u><br><u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 338 | 6G10(全长野生型轻链)<br><br>恒定区加下划线 | AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFGSGG<br>SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN <sup>S</sup> YPYTFG<br>QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 339 | 6G10.IgG1 (VH + IgG1)        | QVQLVESGGDVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSTYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGLYYYGMDVWGQGT <sup>T</sup> TVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS<br>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTH<br>TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP<br>EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK<br>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 340 | 6G10.IgG1.1 (VH + IgG1.1)    | QVQLVESGGDVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSTYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGLYYYGMDVWGQGT <sup>T</sup> TVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS<br>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTH<br>TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP<br>EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK<br>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 341 | 6G10.IgG1 (VL + CL)          | AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSAL<br>AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFGSGG<br>SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN <sup>S</sup> YPYTFG<br>QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE<br>QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                            |

[1420]

|     |                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 342 | 6G10 VH CDR1                                  | TYGMH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 343 | 6G10 VH CDR2                                  | VTWYAGSNKIFYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 344 | 6G10 VH CDR3                                  | GGSMVRGLYYYYGMDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 345 | 6G10 VL CDR1                                  | RASQGISSALA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 346 | 6G10 VL CDR2                                  | DASSLES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 347 | 6G10 VL CDR3                                  | QQFNSYPYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 337 | 6G10 (VH + G2) 或<br>6G10-IgG2                 | SEQ ID NO: 337                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 348 | 6G10 (VH +<br>G2(C219S)) 或<br>6G10-IgG2-C219S | QVQLVESGGDVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSTYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVTWYAGSNKIFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGLYYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDK TVERKSCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QFNSTFRVVS VLT VVH QDWLNGKEYKCKVSNKG<br>LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG   |
| 349 | 6G10 (VH + G2.g1)或<br>6G10-IgG2-IgG1          | QVQLVESGGDVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSTYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVTWYAGSNKIFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGLYYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDK TVERKCCVECP<br>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQYNSTYRVVS VLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNK<br>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT<br>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br>TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC<br>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 350 | 6G10 (VH + G2.g1.1)或<br>6G10-IgG2-IgG1.1      | QVQLVESGGDVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSTYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVTWYAGSNKIFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGLYYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDK TVERKCCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC                                                                                                                                                                                                                       |

[1421]

|     |                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                               | VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br>LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 351 | 6G10 (VH +<br>G2(C219S).g1) 或<br>6G10-IgG2-C219S-IgG1         | QVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGLYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDK TVERKSCVECP<br>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK<br>ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT<br>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br>TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS<br>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 352 | 6G10 (VH +<br>G2(C219S).g1.1) 或<br>6G10-IgG2-C219S-IgG1<br>.1 | QVQLVESGGDVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYG<br>MHWVRQAPGKGLEWVAVTWYAGSNKFYADSVKG<br>RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG<br>GSMVRGLYYYGMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSV<br>FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>NFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDK TVERKSCVECP<br>PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA<br>LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG   |
| 353 | 6G10(VH)核苷酸序列                                                 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACGTG<br>GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>GCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTACCTATGGC<br>ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG<br>CTGGAGTGGGTGGCAGTTACATGGTATGCTGGA<br>AGTAATAAATTTTATGCAGACTCCGTGAAGGGC<br>CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC<br>ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC<br>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGA<br>GGTAGTATGGTTCGGGGACTTTATTATTACGGT<br>ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC                                                                                                           |

[1422]

|     |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                | GTCTCCTCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 354 | 6G10(VL)核苷酸序列                                  | GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG<br>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br>TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTA<br>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCT<br>AAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAA<br>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGA<br>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC<br>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT<br>CAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC<br>CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 355 | 6G10(全长野生型重链)<br>核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACGTG<br>GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGT<br>GCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTACCTATGGC<br>ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGG<br>CTGGAGTGGGTGGCAGTTACATGGTATGCTGGA<br>AGTAATAAATTTTATGCAGACTCCGTGAAGGGC<br>CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAAC<br>ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC<br>GAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGA<br>GGTAGTATGGTTCGGGGACTTTATTATTACGGT<br>ATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC<br>GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC<br>TTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC<br>GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG<br>GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGG<br>AACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACC<br>TTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC<br>TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC<br>AACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTA<br>GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG<br>ACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCA<br>CCGTGCCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCA<br>GTCTTCCTCTTCCCCCCTAAACCCAAGGACACC<br>CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC<br>GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAG<br>GTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG<br>GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAG<br>CAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC<br>CTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC<br>AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC<br>CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA<br>ACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC<br>ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG<br>AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC |

[1423]

|     |                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                                                    | <u>TTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG</u><br><u>AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC</u><br><u>ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC</u><br><u>TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC</u><br><u>AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC</u><br><u>GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG</u><br><u>CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 356 | 6G10(全长野生型轻链)<br>核苷酸序列<br><br>编码恒定区的序列加下<br>划线                                     | <u>GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG</u><br><u>TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT</u><br><u>TGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTA</u><br><u>GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCT</u><br><u>AAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGA</u><br><u>AGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGA</u><br><u>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGC</u><br><u>CTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGT</u><br><u>CAACAGTTTAATAGTTACCCGTACACTTTTGGC</u><br><u>CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACGTGTG</u><br><u>GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT</u><br><u>GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT</u><br><u>GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG</u><br><u>GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC</u><br><u>CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG</u><br><u>CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC</u><br><u>AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG</u><br><u>AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT</u><br><u>CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC</u><br><u>AACAGGGGAGAGTGT</u> |
| 357 | 具有信号肽的<br>28F3(VH)(SEQ ID<br>NO:13)<br>信号肽加下划线                                     | <u>MRAWIFFLLCLAGRALAQVQLVESGGGVVQPGR</u><br><u>SLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA</u><br><u>VIWYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ</u><br><u>MNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDIYYGMDVWG</u><br><u>QGTTVTVSS</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 358 | 具有信号肽的<br>28F3(VL)(SEQ ID<br>NO:14)<br>信号肽加下划线                                     | <u>MRAWIFFLLCLAGRALAAIQLTQSPSSLSASVG</u><br><u>DRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIY</u><br><u>DASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPED</u><br><u>FATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIK</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 359 | 具有信号肽的<br>28F3(VH)的核苷酸序<br>列<br><br>具有编码信号肽的序列<br>的SEQ ID NO:147<br><br>编码信号肽的序列加下 | <u>atgagggccttgatcttctttctgctctgcctg</u><br><u>gccgggagagcgctcgcaCAGGTGCAGCTGGTG</u><br><u>GAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGG</u><br><u>TCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTC</u><br><u>ACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGC</u><br><u>CAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA</u><br><u>GTTATATGGTATGAAGGAAGTAATAAATATTAT</u><br><u>GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCC</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

[1424]

|     |                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | 划线                                                                                   | AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA<br>ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTG<br>TATTACTGTGCGAGAGGGGGGAGTATGGTTCGG<br>GGGGACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGC<br>CAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 360 | 具有信号肽的28F3(VL)<br>的核苷酸序列<br><br>具有编码信号肽的序列<br>的SEQ ID NO:148<br><br>编码信号肽的序列加下<br>划线 | atgaggggcttggatcttctttctgctctgcctg<br>gccggggcgcgcccttggccGCCATCCAGTTGACC<br>CAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA<br>GACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAG<br>GGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAG<br>AAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTAT<br>GATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCA<br>AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTT<br>ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGAT<br>TTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGT<br>TACCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTG<br>GAGATCAAA                                                                                                        |
| 361 | 具有信号肽的<br>28F3.IgG1(VH +<br>IgG1)(SEQ ID NO:17)<br><br>信号肽和恒定区加下划<br>线               | MRAWIFFLLCLAGRALAQVQLVESGGGVVQPGR<br>SLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVA<br>VIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ<br>MNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWG<br>QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL<br>QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS<br>NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL<br>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA<br>KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF<br>LYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQ<br>KSLSLSPG |
| 362 | 具有信号肽的<br>28F3.IgG1.1(VH +<br>IgG1.1)(SEQ ID NO:18)<br><br>信号肽和恒定区加下划<br>线           | MRAWIFFLLCLAGRALAQVQLVESGGGVVQPGR<br>SLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVA<br>VIWYEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ<br>MNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWG<br>QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL<br>QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS<br>NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL<br>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKA<br>KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF                                                  |

[1425]

|     |                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                                                                      | LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ<br>KSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 363 | 具有信号肽的<br>28F3.IgG1(VH + IgG1)<br>的核苷酸序列<br><br>具有编码信号肽的序列<br>的SEQ ID NO:151<br><br>编码信号肽的序列加下<br>划线 | <u>atgagggccttggatcttctttctgctctgcctg</u><br><u>gccgggagagcgctcgcacagggtgcagctgggtg</u><br><u>gagtctgggggaggcgtgggtccagcctgggagg</u><br><u>tccctgagactctcctgtgcagcgtctggattc</u><br><u>accttcagtagctatggcatgcactgggtccgc</u><br><u>caggctccaggcaaggggctggagtgggtggca</u><br><u>gttatatgggtatgaaggaagtaataaatattat</u><br><u>gcagactccgtgaagggccgattcaccatctcc</u><br><u>agagacaattccaagaacacgctgtatctgcaa</u><br><u>atgaacagcctgagagccgaggacacggctgtg</u><br><u>tattactgtgcgagaggggggagtatggttcgg</u><br><u>ggggactactactacgggtatggacgtctggggc</u><br><u>caagggaccacggtcaccgtctcctcagctagc</u><br><u>accaagggcccatcgggtcttccccctggcaccc</u><br><u>tcctccaagagcacctctgggggcacagcggcc</u><br><u>ctgggtgcctgggtcaaggactacttccccgaa</u><br><u>ccggtgacgggtgtcgtggaactcaggcgccctg</u><br><u>accagcggcgtgcacaccttcccggtgtccta</u><br><u>cagtcctcaggactctactccctcagcagcgtg</u><br><u>gtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccag</u><br><u>acctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagc</u><br><u>aacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaa</u><br><u>tcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgc</u><br><u>ccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtc</u><br><u>ttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc</u><br><u>atgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtg</u><br><u>gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtc</u><br><u>aagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtg</u><br><u>cataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcag</u><br><u>tacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc</u><br><u>accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaag</u><br><u>gagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctc</u><br><u>ccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagcc</u><br><u>aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacc</u><br><u>ctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaac</u><br><u>caggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttc</u><br><u>tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc</u><br><u>aatgggcagccggagaacaactacaagaccacg</u><br><u>cctcccgtgctggactccgaaggctccttcttc</u><br><u>ctctatagcaagctcaccgtggacaagagcagg</u><br><u>tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg</u><br><u>atgcatgaggctctgcacaaccactacacgcag</u><br><u>aagagcctctccctgtccccgggttga</u> |



[1426]

|     |                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 364 | 具有信号肽的<br>28F3.IgG1.1(VH +<br>IgG1.1)的核苷酸序列<br><br>具有编码信号肽的序列<br>的SEQ ID NO:152<br><br>编码信号肽的序列加下<br>划线 | <u>atgagggccttggatcttctttctgctctgacctg</u><br><u>gccgggagagcgctcgcacaggtgcagc</u><br>tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc<br>ctgggaggtc cctgagactc tcctgtgcag<br>cgtctggatt caccttcagt agctatggca<br>tgcactgggt ccgccaggct<br>ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt<br>atatggtatg aaggaagtaa taaatattat<br>gcagactccg tgaagggccg attcaccatc<br>tccagagaca attccaagaa cacgctgtat<br>ctgcaaatag acagcctgag agccgaggac<br>acggctgtgt attactgtgc gagagggggg<br>agtatggttc ggggggacta ctactacggt<br>atggacgtct gggggccaagg gaccacggtc<br>accgtctcct cagctagcac caagggccca<br>tcggtcttcc ccctggcacc ctccctccaa<br>agcacctctg ggggacacagc ggccctgggc<br>tgcttggtca aggactactt cccgaaccg<br>gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccttg<br>accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc<br>ctacagtcct caggactcta ctccctcagc<br>agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg<br>ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat<br>cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag<br>agagttgagc ccaaattctg tgacaaaact<br>cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa<br>gccgaagggg ccccgctcagt ctctctcttc<br>cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc<br>tcccggaccc ctgaggtcac atgctgtggtg<br>gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc<br>aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag<br>gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag<br>gagcagtaca acagcacgta ccgtgtgggtc<br>agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg<br>ctgaatggca aggagtacaa gtgcaagggtc<br>tccaacaaag ccctcccaag cagcatcgag<br>aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc<br>cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca<br>tcccgggagg agatgaccaa gaaccagggtc<br>agcctgacct gcctgggtcaa aggtctctat<br>cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc<br>aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc<br>acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc<br>ttcttcctct atagcaagct caccgtggac<br>aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[1427]

|     |                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                                                              | tcattgctccg tgatgcatga ggctctgcac<br>aaccactaca cgcagaagag cctctccctg<br>tccccgggtt ga                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 365 | 具有信号肽的<br>28F3.IgG1(VL+CL)(SE<br>Q ID NO:19)<br><br>信号肽和恒定区加下划<br>线                          | <u>MRAWIFFLLCLAGRALAAIQLTQSPSSLSASVG</u><br><u>DRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIY</u><br><u>DASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED</u><br><u>FATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV</u><br><u>FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW</u><br><u>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT</u><br><u>SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 366 | 具有信号肽的<br>28F3.IgG1(VL+CL) 的<br>核苷酸序列<br><br>具有信号序列的SEQ<br>ID NO:153<br><br>编码信号肽的序列加下<br>划线 | <u>atgagggccttggatcttctttctgctctgcctg</u><br><u>gccggggcgcgcccttggccgccatccagttgacc</u><br><u>cagtctccatcctccctgtctgcatctgtagga</u><br><u>gacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcag</u><br><u>ggcattagcagtgccttagcctggtatcagcag</u><br><u>aaaccagggaaagctcctaagctcctgatctat</u><br><u>gatgcctccagtttggaagtggggtcccatca</u><br><u>aggttcagcggcagtggtctgggacagatttc</u><br><u>actctcaccatcagcagcctgcagcctgaagat</u><br><u>tttgcaacttattactgtcaacagtttaatagt</u><br><u>tacccgtacacttttggccaggggaccaagctg</u><br><u>gagatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtc</u><br><u>ttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaa</u><br><u>tctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaat</u><br><u>aacttctatcccagagaggccaaagtacagtg</u><br><u>aaggtggataacgccctccaatcgggtaactcc</u><br><u>caggagagtggtcacagagcaggacagcaaggac</u><br><u>agcacctacagcctcagcagcaccctgacgctg</u><br><u>agcaaagcagactacgagaaacacaaagtctac</u><br><u>gcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcg</u><br><u>cccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtg</u><br><u>tag</u> |
| 367 | 信号肽                                                                                          | MRAWIFFLLCLAGRALA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 368 | 信号肽核苷酸序列                                                                                     | atgagggccttggatcttctttctgctctgcctg<br>gccggggagagcgctcgca                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 369 | 信号肽核苷酸序列                                                                                     | atgagggccttggatcttctttctgctctgcctg<br>gccggggcgcgcccttggcc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 370 | 人GITR片段                                                                                      | QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 371 | 9G7 L1(全长野生型轻<br>链1)<br><br>恒定区加下划线                                                          | <u>EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSY</u><br><u>LAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS</u><br><u>GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWF</u><br><u>GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS</u><br><u>VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT</u><br><u>EQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

[1428]

|     |             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |             | HQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 372 | 简并VH CDR1   | SYGXH, 其中X是任何氨基酸                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 373 | 简并VH CDR2   | VIWYX <sub>1</sub> GSNKX <sub>2</sub> YADSVKG, 其中X <sub>1</sub> 和X <sub>2</sub> 是任何氨基酸                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 374 | 简并VH CDR2   | VIWYX <sub>1</sub> GSNKX <sub>2</sub> YX <sub>3</sub> DSVKG, 其中X <sub>1</sub> 、X <sub>2</sub> 和X <sub>3</sub> 是任何氨基酸                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 375 | 简并VH CDR3   | GGX <sub>1</sub> VRGDYYYGMDV, 其中X <sub>1</sub> 是任何氨基酸                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 376 | 简并VH CDR3   | GGX <sub>1</sub> VRGX <sub>2</sub> YYYGMDV, 其中X <sub>1</sub> 和X <sub>2</sub> 是任何氨基酸                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 377 | 简并VH CDR3   | GG(6-7aa)MDVWYX <sub>1</sub> MDVW, 其中X <sub>1</sub> 是任何氨基酸, 并且其中6-7氨基酸是任何氨基酸                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 378 | 简并VL CDR1   | RASQGISSXLA, 其中X是任何氨基酸                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 379 | 简并VL CDR1   | RASQG(2-3aa)SX <sub>1</sub> LA, 其中X <sub>1</sub> 是任何氨基酸, 并且其中2-3氨基酸是任何氨基酸                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 380 | 简并VL CDR2   | DASSLXS, 其中X是任何氨基酸                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 381 | 简并VL CDR3   | QQXNSYPYT, 其中X是任何氨基酸                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 382 | 简并VL CDR3   | QQX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> SX <sub>3</sub> PX <sub>4</sub> T, 其中X <sub>1</sub> 、X <sub>2</sub> 、X <sub>3</sub> 和X <sub>4</sub> 是任何氨基酸                                                                                                                                                                                                                                   |
| 383 | IgG1f       | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 384 | IgG2.3      | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK      |
| 385 | IgG2.3G1-AY | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM                                                                                                                                                                                                                            |

[1429]

|     |                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                | ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                       |
| 386 | IgG2.3G1-KH    | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK     |
| 387 | IgG2.5         | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK      |
| 388 | IgG1.1f        | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKHTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 389 | IgG2.3G1.1f-KH | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG                                                                            |

[1430]

|     |                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                    | QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 390 | IgG1- $\delta$ THT | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 391 | IgG2.3-加THT        | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVETHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT<br>LMISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 392 | IgG2.3-加GGG        | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVEGGGCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT<br>LMISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 393 | IgG2.5G1.1f-KH     | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCCVECPPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 394 | IgG2.5G1-AY        | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

[1431]

|     |                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                | PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                        |
| 395 | IgG2.5G1-KH    | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK    |
| 396 | IgG2.5-加THT    | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCCVETHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT<br>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 397 | IgG1-G2.3G1-AY | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE<br>RKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 398 | IgG1-G2.3G1-KH | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY                                                                                                                                                   |

[1432]

|     |                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                 | KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                        |
| 399 | G2-G1-G1-G1<br>IgG2 的 CH1 结构域,<br>其中所有其他为 IgG1  | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTRKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 400 | G2.5-G1-G1-G1<br>IgG2的CH1结构域, 其<br>中所有其他为IgG1   | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTRKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 401 | G1-G2.3-G2-G2<br>IgG1的CH1结构域, 其<br>中所有其他为IgG2.3 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRPKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK     |
| 402 | G1-KRGE GSSNLF<br>IgG1中的CH1区与IgG2<br>中的CH1区交换   | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 403 | G1-KRGE GS                                      | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

[1433]

|     |                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | IgG1中的CH1区与IgG2中的CH1区交换                  | PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                      |
| 404 | G1-SNLF<br>IgG1中的CH1区与IgG2中的CH1区交换       | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 405 | IgG1-ITNDRTPR<br>IgG1中的CH1区与IgG2中的CH1区交换 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 406 | G1-SNLFPR<br>IgG1中的CH1区与IgG2中的CH1区交换     | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>RKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  |
| 407 | G2-RKEGSGNSFL<br>IgG2中的CH1区与IgG1中的CH1区交换 | ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY                                                                                                                                                     |



[1434]

|     |                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                              | KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                             |
| 408 | G2-RKEGSG<br>IgG2中的CH1区与IgG1<br>中的CH1区交换     | ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 409 | G2-NSFL<br>IgG2中的CH1区与IgG1<br>中的CH1区交换       | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 410 | IgG2-TIDNTRRP<br>IgG2中的CH1区与IgG1<br>中的CH1区交换 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE<br>PKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 411 | G2-NSFLRP<br>IgG2中的CH1区与IgG1<br>中的CH1区交换     | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>PKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ                                  |

[1435]

|     |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                | QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 412 | G1-G1-G2-G1-AY<br>具有IgG2的CH2结构域<br>残基的IgG1     | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 413 | G1-G1-G2-G1-KH<br>具有IgG2的CH2结构域<br>残基的IgG1     | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT<br>LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 414 | G2-G2.3-G1-G2-KH<br>具有IgG1的CH2结构域<br>残基的IgG2   | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK    |
| 415 | G2.5-G2.3-G1-G2-KH<br>具有IgG1的CH2结构域<br>残基的IgG2 | ASTKGPSVFPLAPSSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| 416 | G2-G2.3-G1-G2-AY<br>具有IgG1的CH2结构域<br>残基的IgG2   | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM                                                                                                                                                                                                                            |

[1436]

|     |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                | ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                      |
| 417 | G2.5-G2.3-G1-G2-AY<br>具有IgG1的CH2结构域<br>残基的IgG2 | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| 418 | G1-G2.3-G1-G1-KH<br>在IgG1与IgG2之间交换<br>铰链区      | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| 419 | G2-G1-G2-G2-AY<br>在IgG1与IgG2之间交换<br>铰链区        | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 420 | G2.5-G1-G2-G2-AY<br>在IgG1与IgG2之间交换<br>铰链区      | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDK                                      |

[1437]

|     |                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                           | SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 421 | G1-G2-G1-G1-AY<br>在IgG1与IgG2之间交换<br>铰链区   | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE<br>PKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK      |
| 422 | G2-G1-G2-G2-KH<br>在IgG1与IgG2之间交换<br>铰链区   | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT<br>LMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG   |
| 423 | G2.5-G1-G2-G2-KH<br>在IgG1与IgG2之间交换<br>铰链区 | ASTKGPSVFPLAPSSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT<br>LMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 424 | IgG1- $\delta$ 铰链<br>铰链截短                 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE<br>PKCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR<br>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK<br>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK<br>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR<br>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK           |
| 425 | IgG2- $\delta$ 铰链<br>铰链截短                 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP                                                                                                                                                                                                                                   |

[1438]

|     |                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                             | EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK<br>PREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                        |
| 426 | IgG2.5- $\delta$ 铰链<br>铰链截短 | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT<br>EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK<br>PREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK       |
| 427 | IgG1- $\delta$ G237<br>铰链截短 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKHTCTPPCPAPELLGPSVFLFPPKPKDT<br>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 428 | IgG2-加G237<br>铰链截短          | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPAPPVAGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK    |
| 429 | IgG2.4                      | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCSVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ                                        |

[1439]

|     |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |            | QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 430 | IgG2.3/4   | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSSVECPGPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 431 | IgG2.3-V13 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPGPCAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 432 | IgG2.3-V14 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPGPCAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDGEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 433 | IgG2.3-V15 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPGPCAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSDDEDGEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 434 | IgG2.3-V16 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPGPCAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMI                                                                                                                                                                                                                              |

[1440]

|     |                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                 | SRTPEVTCVVVDVSHED <b>G</b> EVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLP <b>R</b> PIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                      |
| 435 | IgG2.3-V17      | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAG <b>D</b> SVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDV <b>S</b> DED <b>G</b> EVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLP <b>R</b> PIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 436 | IgG2.3-V18      | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDV <b>E</b> HEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLP <b>A</b> PIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                   |
| 437 | IgG2.3-V19      | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDV <b>E</b> HEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNK <b>G</b> <b>F</b> PAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK           |
| 438 | IgG2.3G1-AY-V20 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPELL <b>G</b> <b>D</b> SVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRW                                                       |

[1441]

|     |                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                 | QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 439 | IgG2.3G1-AY-V21 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDGEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 440 | IgG2.3G1-AY-V22 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSDDEDGEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 441 | IgG2.3G1-AY-V23 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDGEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 442 | IgG2.3G1-AY-V24 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSDDEDGEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 443 | IgG2.3G1-AY-V25 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLM                                                                                                                                                                                                                             |



[1442]

|     |                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                 | ISRTPEVTCVVVDVSD <b>DED</b> GEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALP <b>R</b> PIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                   |
| 444 | IgG2.3G1-AY-V26 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPPCPAP <b>DLLGDD</b> SVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSD <b>DED</b> GEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALP <b>R</b> PIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK        |
| 445 | IgG2.3G1-AY-V27 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPPCPAPE <b>LLGG</b> PSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDV <b>E</b> HEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALP <b>A</b> PIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK         |
| 446 | IgG2.3G1-AY-V28 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPPCPAPE <b>LLGG</b> PSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDV <b>E</b> HEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNK <b>A</b> <b>F</b> PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 447 | 替代铰链            | ERKCCVECPPCPAPPVAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 448 | 替代铰链            | ERKSCVECPPCPAPPVAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 449 | 替代铰链            | ERKCSVECPPCPAPPVAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 450 | 替代铰链            | ERKXCVECPPCPAPPVAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 451 | 替代铰链            | ERKCXVECPPCPAPPVAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 452 | 替代铰链            | ERKCCVECPPCPAPPVAGX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 453 | 替代铰链            | ERKSCVECPPCPAPPVAGX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

[1443]

|     |                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 454 | 替代铰链                  | ERKCSVECPPCPAPPVAGX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 455 | 替代铰链                  | ERKXCVECPPCPAPPVAGX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 456 | 替代铰链                  | ERKCXVECPPCPAPPVAGX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 457 | 替代铰链                  | ERKCCVECPPCPAPELLGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 458 | 替代铰链                  | ERKSCVECPPCPAPELLGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 459 | 替代铰链                  | ERKCCSVECPPCPAPELLGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 460 | 替代铰链                  | ERKXCVECPPCPAPELLGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 461 | 替代铰链                  | ERKCXVECPPCPAPELLGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 462 | 替代铰链                  | ERKCCVECPPCPAPELLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 463 | 替代铰链                  | ERKSCVECPPCPAPELLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 464 | 替代铰链                  | ERKCCSVECPPCPAPELLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 465 | 替代铰链                  | ERKXCVECPPCPAPELLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 466 | 替代铰链                  | ERKCXVECPPCPAPELLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 467 | 替代铰链                  | ERKCCVECPPCPAP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 468 | 替代铰链                  | ERKSCVECPPCPAP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 469 | 替代铰链                  | ERKCSVECPPCPAP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 470 | 替代铰链                  | ERKXCVECPPCPAP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 471 | 替代铰链                  | ERKCXVECPPCPAP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 472 | 铰链的一部分                | PVAG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 473 | 铰链的一部分                | ELLG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 474 | 铰链的一部分                | ELLGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 475 | 铰链的一部分                | SCDKTHT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 476 | 铰链的一部分                | CCVE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 477 | 野生型 IgG2 CH1 结构域      | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNV <del>DH</del> KPSNTKVDKTV                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 478 | IgG2 CH1和铰链           | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNV <del>DH</del> KPSNTKVDKTV<br>RKCCVECPPCPAPPVAG                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 479 | 铰链的一部分                | CPPCPAP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 480 | IgG2.3G1-AY-V9-D270 E | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNV <del>DH</del> KPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEEGEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDS <del>DS</del> GSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFC <del>SC</del> SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[1444]

|     |                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 481 | IgG2.3G1-AY-V11          | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPPEVTCVVVDVSDDEGEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK      |
| 482 | IgG2.5G1-AY-V9-D270<br>E | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCCVECPPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPPEVTCVVVDVSHEEGEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK      |
| 483 | IgG2.5G1-AY-V11          | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCCVECPPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPPEVTCVVVDVSDDEGEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK      |
| 484 | IgG1f-GASDALIE           | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE<br>PKSCDKHTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[1445]

|     |                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 485 | IgG1f-G236A              | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKHTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 486 | IgG2.3G1-AY-G236A        | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK    |
| 487 | IgG2.3G1-AY-GASDA<br>LIE | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK    |
| 488 | IgG2.5G1-AY-G236A        | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKCCVECPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK    |
| 489 | IgG2.5G1-AY-GASDA<br>LIE | STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFP<br>EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>KCCVECPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN                                                                                                                                                                                            |

[1446]

|     |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                   | AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                           |
| 490 | IgG2.3G1.1f-AY    | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 491 | IgG2.3G1.3f-AY    | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 492 | IgG2.3G1-AY-D265A | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 493 | IgG2.3G1-AY-N297A | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[1447]

|     |                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 494 | IgG2.5G1.1f-AY    | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCCVECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 495 | IgG2.5G1.3f-AY    | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCCVECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 496 | IgG2.5G1-AY-D265A | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPQVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 597 | IgG2.5G1-AY-N297A | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKCCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 498 | CT                | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKHTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPQVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV                                                                                                                                                                                       |

[1448]

|     |              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |              | EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                         |
| 499 | CTf          | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 500 | IgG2.3-CT    | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVESPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| 501 | IgG2.5-CT    | ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKCCVESPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| 502 | IgG1fa-C226S | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKTHTSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[1449]

|     |                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 503 | IgG1fa-C229S       | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE<br>PKSCDKTHTCPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 504 | IgG1fa-C226S,C229S | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE<br>PKSCDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 505 | IgG1fa-P238S       | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE<br>PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 506 | IgG1fa-C226A       | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE<br>PKSCDKTHTAPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 507 | IgG1fa-C229A       | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE<br>PKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV                                                                                                                                                                                           |



[1450]

|     |                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                    | EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                         |
| 508 | IgG1fa-C226A,C229A | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKTHTAPPAPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 509 | IgG1fa-P238K       | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br>PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN<br>GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 510 | IgG2.3-R133K       | ASTKGPSVFPLAPCSKSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 511 | IgG2.3-E137G       | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGSTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |

[1451]

|     |                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 512 | IgG2.3-S138G       | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSEGTAAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 513 | IgG2.3-E137G-S138G | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 514 | IgG2.3-T214R       | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRV<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| 515 | IgG2.3-R217P       | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>PKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 516 | IgG2.3-R217S       | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>SKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN                                                                                                                                                                                         |

[1452]

|     |              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |              | AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                       |
| 517 | IgG2.3-V224A | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCAECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 518 | IgG2.3-E225A | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVACPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 519 | IgG2.3-R133A | ASTKGPSVFPLAPCSASTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 520 | IgG2.3-E137D | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSDSTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>RKSCVECPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[1453]

|     |                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 521 | IgG2.3-E137Q       | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSQSTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 522 | IgG2.3-S138T       | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSETTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 523 | IgG2.3-S138E       | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSEETAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 524 | IgG2.3-E137A-S138I | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSITAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 525 | IgG2.3-E137I-S138A | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSIATAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN                                                                                                                                                                                        |

[1454]

|     |              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |              | AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                        |
| 526 | IgG2.3-R217G | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>GKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 527 | IgG2.3-R217A | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>AKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 528 | IgG2.3-R217I | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>IKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 529 | IgG2.3-R217E | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV<br>EKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLF<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[1455]

|     |                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 530 | IgG2.3-R217K    | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>KKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| 531 | IgG2.3-V224I    | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCIECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| 532 | IgG2.3-E225D    | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVDCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYITLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| 533 | IgG2-G4.1-G4-G4 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQFNSTYRVVSFLTIVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITL<br>PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW<br>QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 534 | IgG4-G2.3-G2-G2 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV<br>SKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN                                                                                                                                                                                           |

[1456]

|     |                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                 | AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                          |
| 535 | IgG2-G4.1-G2-G2 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 536 | IgG4-G2.3-G4-G4 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV<br>SKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ<br>EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLKG  |
| 537 | IgG2-G2.3-G4-G4 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br>RKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI<br>SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ<br>EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLKG  |
| 538 | IgG4-G4.1-G2-G2 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV<br>SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[1457]

|     |                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 539 | IgG4-G4.1-G1-G1 | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVE<br>SKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 540 | IgG4.1          | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVE<br>SKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTP EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW<br>QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK |
| 541 | IgG4.1-R214T    | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKTV<br>SKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTP EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW<br>QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK  |
| 542 | IgG4.1-S217R    | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVE<br>RKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTP EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW<br>QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK |
| 543 | IgG4.1-S217P    | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVE<br>PKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM<br>ISRTP EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH                                                                                                                                                                                        |



[1458]

|  |  |                                                                                                                                                                                    |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW<br>QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[1459] 表15提供了成熟可变区以及重链和轻链的序列及(在标明的情况下)具有信号肽的序列。在其C端显示有K或GK的重链也可以在没有K或GK的情况下使用。

[1460] 等同方案:

[1461] 本领域技术人员将认识到、或能够确定使用不超出常规的实验、本文中公开的具体实施方案的许多等同方案。这样的等同方案预期被下列权利要求涵盖。

```

28F3 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIHWYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYGMDVWGQGTITVTVSS
18E10
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIHWYAGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRIAVAFYYSMDVWGQGTITVTVSS
19D3
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTSSYGFHWVRQAPGKGLEWVAVIHWYAGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQLDYYYVYVMDVWGQGTITVTVSS

VL:
28F3 AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIK
18E10 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPKAPKSLIYAASSLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
19D3 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPKAPKSLIYAASSLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK

```

图1

## 抗 GITR 28F3 VH (hIgG2)

V 区段: 3-33

D 区段: 3-10

J 区段: JH6b

```
1      Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

      L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   CDR1
      CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG

      H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   CDR2
      CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

      W   Y   E   G   S   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
      TGG TAT GAA GGA AGT AAT AAA TAT TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

      T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
      ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

      L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   CDR3
      CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGG AGT ATG

      V   R   G   D   Y   Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T
      GTT CGG GGG GAC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG

      V   T   V   S   S
      GTC ACC GTC TCC TCA
```

图2A

## 抗 GITR 28F3 VK (hKappa)

V 区段: L18

J 区段: JK2

```
1      A   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
      GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

      R   V   T   I   T   C   CDR1
52     AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

      W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   CDR2
103    TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC
      D   A

      S   S   L   E   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154    TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

      T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205    ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

      Y   Y   C   CDR3
256    TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC
      Q   Q   F   N   S   Y   P   Y   T   F   G   Q   G   T

      K   L   E   I   K
307    AAG CTG GAG ATC AAA
```

图2B

## 抗 GITR 18E10 VH (hIgG2)

V 区段: 3-33

D 区段: 6-19

J 区段: JH6b

```
1      Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

52      L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   G   M
      CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG

103      H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I
      CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGC CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

154      W   Y   A   G   S   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
      TGG TAT GCT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205      T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
      ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256      L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   R   I
      CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGG CGT ATA

307      A   V   A   F   Y   Y   S   M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V
      GCA GTG GCC TTC TAC TAC AGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC

358      T   V   S   S
      ACC GTC TCC TCA
```

图3A

## 抗 GITR 18E10 VK (hKappa)

V 区段: L15

J 区段: JK2

```
1      D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

      R   V   T   I   T   C   CDR1
52     AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

      W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   CDR2
103    TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

      S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154    TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

      T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205    ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

      Y   Y   C   CDR3
256    TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

      K   L   E   I   K
307    AAG CTG GAG ATC AAA
```

图3B

## 抗 GITR 19D3 VH (hIgG2)

V 区段: 3-33

D 区段: 3-16

J 区段: JH6b

```
1      Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S
      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAA CCT GGG AGG TCC

      L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  CDR1
      CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC TTC

      H  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  CDR2
      CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

      W  Y  A  G  S  N  K  F  Y  A  D  S  V  K  G  R  F
      TGG TAT GCT GGA AGT AAT AAA TTC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

      T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S
      ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

      L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  CDR3
      CTA AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGA CAG TTG

      D  Y  Y  Y  Y  Y  V  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V
      GAC TAC TAC TAC TAT TAC GTT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC

      T  V  S  S
      ACC GTC TCC TCA
```

图4A

## 抗 GITR 19D3 VK (hKappa)

V 区段: L15

J 区段: JK2

```
1      D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

52      R   V   T   I   T   C   CDR1
      AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

103      W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   CDR2
      TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

154      S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
      TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205      T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
      ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

256      Y   Y   C   CDR3
      TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

307      K   L   E   I   K
      AAG CTG GAG ATC AAA
```

图4B



## 抗 GITR 3C3 VH (hIgG1)

V 区段: 4-34

J 区段: JH3b

```
1      CAG GTG CAA CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC
      L   S   L   T   C   A   V   Y   G   G   S   F   S   CDR1
52     CTG TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG
      CDR2
103    T   W   I   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   I   G   CDR2
      ACC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG AAA ATC
      N   H   S   G   N   T   N   Y   N   P   S   L   K   S   R   V   T
154    AAT CAT AGT GGA AAC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC
      I   S   V   D   T   S   K   N   Q   F   S   L   K   L   S   S   V
205    ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG
      CDR3
256    T   A   A   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   L   G   A   F   D
      ACC GCC GCG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CTG GGG GCC TTT GAT
      A   F   D   I   W   G   Q   G   T   M   V   T   V   S   S
307    GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA
```

图5A

## 抗 GITR 3C3 VK1 (hKappa)

V 区段: L15

J 区段: JK2

```
1      D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

      R   V   T   I   T   C   CDR1
52     AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

      W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   CDR2
103    TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

      S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154    TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

      T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205    ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

      Y   Y   C   CDR3
256    TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

      K   L   E   I   K
307    AAG CTG GAG ATC AAA
```

图5B

## 抗 GITR 3C3 VK2 (hKappa)

V 区段: L20

J 区段: JK2

```
1      E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

      CDR1
52      R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   G   V   S   S   Y   L   A
      AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG GGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

      CDR2
103     W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A
      TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

154     S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   P   G
      TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG CCT GGG

205     T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
      ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

      CDR3
256     Y   Y   C   Q   Q   R   S   N   W   H   T   F   G   Q   G   T   K
      TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG

307     L   E   I   K
      CTG GAG ATC AAA
```

图5C

## 抗 GITR 2G6 VH (hlgG1)

V 区段: 3-33

J 区段: JH6b

```
1      Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  G  S
      CAG GTT CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC

52      L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  I  L  S  CDR1
      CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ATC TTG AGT GAC TAT GGC ATG

103      H  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  T  CDR2
      CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGA CTG GAG TGG GTG ACA GTT ATC

154      W  Y  D  G  S  N  K  F  Y  V  D  S  V  K  G  R  F
      TGG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TTC TAT GTA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205      T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S
      ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG TTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256      L  R  V  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  CDR3
      CTG AGA GTC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGA CGT CTA

307      A  T  G  H  F  Y  Y  V  M  D  V  W  G  Q  G  T  T
      GCA ACA GGT CAC TTC TAC TAC GTT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG

358      V  T  V  S  S
      GTC ACC GTC TCC TCA
```

图6A

抗 GITR 2G6 VK (hKappa)

V 区段: L15

J 区段: JK2

```
1      D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

52      R   V   T   I   T   C   CDR1
      AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

103     W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   CDR2
      TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

154     S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
      TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205     T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
      ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

256     Y   Y   C   CDR3
      TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

307     K   L   E   I   K
      AAG CTG GAG ATC AAA
```

图6B

## 抗 GITR 8A6 VH (hlgG2)

V 区段: 3-33

D 区段: 3-10

J 区段: JH6b

```
1      Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

52      L   R   L   S   C   T   A   S   G   F   T   F   S   CDR1
      CTG AGA CTC TCC TGT ACA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG
                                     S   Y   G   M

103      Q   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   CDR2
      CAG TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA
                                     V   I

154      W   Y   E   G   S   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
      TGG TAT GAA GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205      T   I   S   R   E   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
      ACC ATC TCC AGA GAA AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256      L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   CDR3
      CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGC GGT CTT ATG
                                     G   G   L   M

307      V   R   G   L   F   Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T
      GTT CGG GGT CTC TTC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG

358      V   T   V   S   S
      GTC ACC GTC TCC TCA
```

图7A

抗 GITR 8A6 VK (hKappa)

V 区段: L18

J 区段: JK2

```
1      A   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
      GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

52      R   V   T   I   T   C   CDR1
      AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

103      W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   F   L   I   Y   CDR2
      TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG TTC CTG ATC TAT GAT GCC

154      S   S   L   E   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
      TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205      T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
      ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

256      Y   Y   C   CDR3
      TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

307      K   L   E   I   K
      AAG CTG GAG ATC AAA
```

图7B

## 抗 GITR 9G7 VH (hIgG4)

V 区段: 3-15

D 区段: 3-10

J 区段: JH6b

```
1      E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   K   P   G   G   S
      GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTA AAG CCT GGG GGG TCC

52      L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   T   V   W   M
      CTT AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT ACC GTC TGG ATG
                                CDR1
103      S   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   G   R   I
      AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT GGC CGT ATT
                                CDR2
154      K   S   K   T   D   G   G   T   T   D   Y   A   A   P   V   K   G
      AAA AGC AAA ACT GAT GGT GGG ACA ACA GAC TAC GCT GCA CCC GTG AAA GGC

205      R   F   T   I   S   R   D   D   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M
      AGA TTC ACC ATC TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG

256      N   S   L   H   T   E   D   T   A   V   Y   Y   C   T   T   G   Q
      AAC AGC CTG CAC ACC GAG GAC ACA GCC GTG TAT TAC TGT ACC ACA GGG CAG
                                CDR3
307      L   I   P   Y   S   Y   Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T
      CTG ATC CCT TAC TCC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC

358      S   V   T   V   S   S
      TCG GTC ACC GTC TCC TCA
```

图8A



抗 GITR 9G7 VK1 (hKappa)

V 区段: A27

J 区段: JK1

```
E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
1      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

      R   A   T   L   S   C   CDR1
52      AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA

      CDR2
103     A   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G
      GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

154     A   S   S   R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S
      GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

205     G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A
      GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

      CDR3
256     V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   S   S   P   W   T   F   G   Q   G
      GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG

307     T   K   V   E   I   K
      ACC AAG GTG GAA ATC AAA
```

图8B

## 抗 GITR 9G7 VK2 (hKappa)

V 区段: A27

J 区段: JK5

```
      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
1     GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

      CDR1
      R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   T   S   S   Y   L
52    AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT ACC AGC AGC TAC TTA

      CDR2
      A   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G
103   GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

      A   S   S   R   A   T   G   I   P   E   R   F   S   G   S   G   S
154   GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAG AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

      G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A
205   GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

      CDR3
      V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   S   S   P   I   T   F   G   Q   G
256   GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG

      T   R   L   E   I   K
307   ACA CGA CTG GAG ATT AAA
```

图8C

## 抗 GITR 14E3 VH (hIgG1)

V 区段: 4-34

J 区段: JH3b

```
1      Q   V   Q   L   Q   Q   W   G   A   G   L   L   K   P   S   E   T
      CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC

      L   S   L   T   C   A   V   Y   G   G   S   F   S   CDR1
      CTG TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG

      S   W   I   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   I   G   CDR2
      AGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGA GAA ATC

      N   H   S   G   N   T   Y   Y   N   P   S   L   K   S   R   V   T
      AAT CAT AGT GGA AAC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGC GTC ACC

      I   S   V   D   T   S   K   N   Q   L   S   L   K   L   S   S   V
      ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTA TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG

      T   A   A   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   CDR3
      ACC GCC GCG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA TTT GGG AGT AAT GAT

      A   F   D   I   W   G   Q   G   T   M   V   T   V   S   S
      GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA
```

图9A

抗 GITR 14E3 VK (hKappa)

V 区段: L15

J 区段: JK1

```
1      D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

      CDR1
52     R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
      AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

      CDR2
103    W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
      TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

154    S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
      TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205    T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
      ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

      CDR3
256    Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   P   T   F   G   Q   G   T
      TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC

307    K   V   E   I   K
      AAG GTG GAA ATC AAA
```

图9B

## 抗 GITR 19H8 VH (hIgG2)

V 区段: 3-33

D 区段: 3-10

J 区段: JH6b

```
1      Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S
      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

52      L  R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  N  Y  G  M
      CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG

103      H  W  V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  M  A  V  I
      CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCA GTT ATA

154      W  Y  G  G  S  N  K  F  Y  A  D  S  V  K  G  R  F
      TGG TAT GGT GGA AGT AAT AAA TTC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205      T  I  S  R  D  N  S  K  N  S  L  S  L  Q  M  N  S
      ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC TCG CTG TCT CTG CAA ATG AAC AGC

256      L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  G  G  A  M
      CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGG GCT ATG

307      V  R  G  V  Y  Y  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T
      GTT CGG GGA GTC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG

358      V  T  V  S  S
      GTC ACC GTC TCC TCA
```

图10A

抗 GITR 19H8 VK1 (hKappa)

V 区段: L18

J 区段: JK1

```
1      A   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
      GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

      R   V   T   I   T   C   CDR1
52     AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

      W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   F   L   I   Y   CDR2
103    TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG TTC CTG ATC TAT GAT GCC

      S   S   L   E   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154    TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

      T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205    ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

      Y   Y   C   CDR3
256    TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCT CAG ACG TTC GGC CAA GGG ACC

      K   V   E   I   K
307    AAG GTG GAA ATC AAA
```

图10B

抗 GITR 19H8 VK2 (hKappa)

V 区段: L6

J 区段: JK4

```
1      E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

      R   A   T   L   S   C   CDR1
52     AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

      W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   CDR2
103    TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

      S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G
154    TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG

      T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
205    ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

      Y   Y   C   Q   Q   R   S   N   W   P   L   T   F   G   G   G   T
256    TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

      K   V   E   I   K
307    AAG GTG GAG ATC AAA
```

图10C

## 抗 GITR 6G10 VH (hlgG2)

V 区段: 3-33

D 区段: 3-10

J 区段: JH6b

```

1      Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   D   V   V   Q   P   G   R   S
      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

52      L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   T   Y   G   M
      CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT ACC TAT GGC ATG

103      H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   T
      CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ACA

154      W   Y   A   G   S   N   K   F   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
      TGG TAT GCT GGA AGT AAT AAA TTT TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205      T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
      ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256      L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   S   M
      CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGA GGT AGT ATG

307      V   R   G   L   Y   Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T
      GTT CGG GGA CTT TAT TAT TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG

358      V   T   V   S   S
      GTC ACC GTC TCC TCA

```

图11A



抗 GITR 6G10 VK1 (hKappa)

V 区段: L18

J 区段: JK2

```
1      A   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
      GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

      R   V   T   I   T   C   CDR1
52     AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

      W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   CDR2
103    TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC

      S   S   L   E   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154    TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

      T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205    ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

      Y   Y   C   CDR3
256    TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC

      K   L   E   I   K
307    AAG CTG GAG ATC AAA
```

图11B

## 抗 GITR 28F3 VH (hIgG2)

|         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3-33    | Q | V | Q | L | V | E | S | G | G | G | V | V | Q | P | G | R | S | L | R | L | S | C | A |
| 28F3 VH | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33    | A | S | G | F | T | F | S | S | Y | G | M | H | W | V | R | Q | A | P | G | K | G | L | E |
| 28F3 VH | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33    | W | V | A | V | I | W | Y | D | G | S | N | K | Y | Y | A | D | S | V | K | G | R | F | T |
| 28F3 VH | - | - | - | - | - | - | - | E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33    | I | S | R | D | N | S | K | N | T | L | Y | L | Q | M | N | S | L | R | A | E | D | T | A |
| 28F3 VH | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33    | V | Y | Y | C | A | R |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3-10    |   |   |   |   |   |   |   |   |   | M | V | R | G |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JH6     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Y | Y | Y | G | M | D | V | W | G |   |
| 28F3 VH | - | - | - | - | - | - | G | G | S | - | - | - | - | D | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JH6     | Q | G | T | T | V | T | V | S | S |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 28F3 VH | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

图12

## 抗 GITR 28F3 VK (hKappa)

|         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| L18     | A | I | Q | L | T | Q | S | P | S | S | L | S | A | S | V | G | D | R | V | T | I | T | C |
| 28F3 VK | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L18     | R | A | S | Q | G | I | S | S | A | L | A | W | Y | Q | Q | K | P | G | K | A | P | K | L |
| 28F3 VK | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L18     | L | I | Y | D | A | S | S | L | E | S | G | V | P | S | R | F | S | G | S | G | S | G | T |
| 28F3 VK | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L18     | D | F | T | L | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y | Y | C | Q | Q | F | N |
| 28F3 VK | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L18     | N | Y |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JK2     |   |   |   | Y | T | F | G | Q | G | T | K | L | E | I | K |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 28F3 VK | S | - | P | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |

图13

## 抗 GITR 18E10 VH (hIgG2)

|          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3-33     | Q | V | Q | L | V | E | S | G | G | G | V | V | Q | P | G | R | S | L | R | L | S | C | A |
| 18E10 VH | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33     | A | S | G | F | T | F | S | S | Y | G | M | H | W | V | R | Q | A | P | G | K | G | L | E |
| 18E10 VH | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33     | W | V | A | V | I | W | Y | D | G | S | N | K | Y | Y | A | D | S | V | K | G | R | F | T |
| 18E10 VH | - | - | - | - | - | - | - | A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33     | I | S | R | D | N | S | K | N | T | L | Y | L | Q | M | N | S | L | R | A | E | D | T | A |
| 18E10 VH | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33     | V | Y | Y | C | A | R |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 6-19     |   |   |   |   |   |   |   |   |   | I | A | V | A |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JH6      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Y | Y | G | M | D | V | W | G | Q |
| 18E10 VH | - | - | - | - | - | - | G | G | R | - | - | - | - | F | - | - | S | - | - | - | - | - | - |
| JH6      | G | T | T | V | T | V | S | S |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 18E10 VH | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

图14

## 抗 GITR 18E10 VK (hKappa)

|          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| L15      | D | I | Q | M | T | Q | S | P | S | S | L | S | A | S | V | G | D | R | V | T | I | T | C |
| 18E10 VK | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L15      | R | A | S | Q | G | I | S | S | W | L | A | W | Y | Q | Q | K | P | E | K | A | P | K | S |
| 18E10 VK | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L15      | L | I | Y | A | A | S | S | L | Q | S | G | V | P | S | R | F | S | G | S | G | S | G | T |
| 18E10 VK | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L15      | D | F | T | L | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y | Y | C | Q | Q | Y | N |
| 18E10 VK | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L15      | S | Y |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JK2      |   |   |   | Y | T | F | G | Q | G | T | K | L | E | I | K |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 18E10 VK | - | - | P | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |

图15

## 抗 GITR 19D3 VH (hIgG2)

|         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3-33    | Q | V | Q | L | V | E | S | G | G | G | V | V | Q | P | G | R | S | L | R | L | S | C | A |
| 19D3 VH | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33    | A | S | G | F | T | F | S | S | Y | G | M | H | W | V | R | Q | A | P | G | K | G | L | E |
| 19D3 VH | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33    | W | V | A | V | I | W | Y | D | G | S | N | K | Y | Y | A | D | S | V | K | G | R | F | T |
| 19D3 VH | - | - | - | - | - | - | - | A | - | - | - | - | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33    | I | S | R | D | N | S | K | N | T | L | Y | L | Q | M | N | S | L | R | A | E | D | T | A |
| 19D3 VH | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33    | V | Y | Y | C | A | R |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3-16    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | D | Y |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JH6     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Y | Y | Y | Y | Y | G | M | D | V | W | G | Q |
| 19D3 VH | - | - | - | - | - | - | G | G | Q | L | - | - | - | - | - | - | V | - | - | - | - | - | - |
| JH6     | G | T | T | V | T | V | S | S |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 19D3 VH | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

图16

## 抗 GITR 19D3 VK (hKappa)

|         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| L15     | D | I | Q | M | T | Q | S | P | S | S | L | S | A | S | V | G | D | R | V | T | I | T | C |
| 19D3 VK | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L15     | R | A | S | Q | G | I | S | S | W | L | A | W | Y | Q | Q | K | P | E | K | A | P | K | S |
| 19D3 VK | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L15     | L | I | Y | A | A | S | S | L | Q | S | G | V | P | S | R | F | S | G | S | G | S | G | T |
| 19D3 VK | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L15     | D | F | T | L | T | I | S | S | L | Q | P | E | D | F | A | T | Y | Y | C | Q | Q | Y | N |
| 19D3 VK | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L15     | S | Y |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JK2     |   |   |   | Y | T | F | G | Q | G | T | K | L | E | I | K |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 19D3 VK | - | - | P | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |

图17

## 抗 GITR 3C3 VH (hIgG1)

|      |                                                           |
|------|-----------------------------------------------------------|
| 4-34 | Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A             |
| 输入   | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -             |
| 4-34 | V Y G G S F S <u>CDR1</u> G Y Y W S W I R Q P P G K G L E |
| 输入   | - - - - - - - - - - - - - T - - - - - - - - - - -         |
| 4-34 | W I G E I <u>CDR2</u> N H S G S T N Y N P S L K S R V T I |
| 输入   | - - - K - - - - - N - - - - - - - - - - - - - - -         |
| 4-34 | S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V             |
| 输入   | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -             |
| 4-34 | Y Y C A R <u>CDR3</u>                                     |
| JH3  | D A F D I W G Q G T M V T V                               |
| 输入   | - - - - - L G A F - - - - - - - - - - - - - - - -         |
| JH3  | S S                                                       |
| 输入   | - -                                                       |

图18

## 抗 GITR 3C3 VK1 (hKappa)

|     |                                                           |
|-----|-----------------------------------------------------------|
| L15 | D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C             |
| 输入  | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -             |
| L15 | <u>CDR1</u> R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P E K A P K S |
| 输入  | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -             |
| L15 | L I Y A A <u>CDR2</u> S S L Q S G V P S R F S G S G S G T |
| 输入  | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -             |
| L15 | D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C <u>CDR3</u> Q Q Y N |
| 输入  | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -             |
| L15 | S Y                                                       |
| JK2 | Y T F G Q G T K L E I K                                   |
| 输入  | - - P - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -             |

图19A

## 抗 GITR 3C3 VK2 (hKappa)

|     |                                                       |
|-----|-------------------------------------------------------|
| L20 | E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C         |
| 输入  | - - - - -                                             |
| L20 | CDR1<br>R A S Q G V S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L |
| 输入  | - - - - -                                             |
| L20 | CDR2<br>L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G P G T |
| 输入  | - - - - -                                             |
| L20 | CDR3<br>D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S |
| 输入  | - - - - -                                             |
| L20 | N W                                                   |
| JK2 | T F G Q G T K L E I K                                 |
| 输入  | - - H - - - - -                                       |

图19B

## 抗 GITR 2G6 VH (hIgG2)

|      |                                                       |
|------|-------------------------------------------------------|
| 3-33 | Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A         |
| 输入   | - - - - - G - - - - -                                 |
| 3-33 | CDR1<br>A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E |
| 输入   | - - - - I L - D - - - - -                             |
| 3-33 | CDR2<br>W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T |
| 输入   | - - T - - - - - F - V - - - - -                       |
| 3-33 | I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A         |
| 输入   | - - - - - V - - - - -                                 |
| 3-33 | CDR3<br>V Y Y C A R Y Y G M D V W G                   |
| JH6  |                                                       |
| 输入   | - - - - - G G R L A T G H F - - V - - - -             |
| JH6  | Q G T T V T V S S                                     |
| 输入   | - - - - -                                             |

图20

## 抗 GITR 2G6 VK (hKappa)

|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| L15 | D | I | Q | M | T | Q | S | P | S | S | L | S | A | S | V | G | D | R | V | T | I | T | C |
| 输入  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| L15 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| L15 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| L15 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| L15 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| L15 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| L15 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JK2 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | - | - | P | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

图21

## 抗 GITR 8A6 VH (hIgG2)

|      |   |   |   |   |   |      |      |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------|---|---|---|---|---|------|------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3-33 | Q | V | Q | L | V | E    | S    | G    | G | G | V | V | Q | P | G | R | S | L | R | L | S | C | A |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入   | - | - | - | - | - | -    | -    | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | T |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3-33 | A | S | G | F | T | F    | S    | CDR1 |   |   |   |   | Y | G | M | H | W | V | R | Q | A | P | G | K | G | L | E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入   | - | - | - | - | - | -    | -    | -    | - | - | - | - | Q | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3-33 | W | V | A | V | I | CDR2 |      |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | W | Y | D | G | S | N | K | Y | Y | A | D | S | V | K | G | R | F | T |
| 输入   | - | - | - | - | - | -    | -    | -    | - | - | - | - | E | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3-33 | I | S | R | D | N | S    | K    | N    | T | L | Y | L | Q | M | N | S | L | R | A | E | D | T | A |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入   | - | - | - | E | - | -    | -    | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3-33 | V | Y | Y | C | A | R    | CDR3 |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3-10 |   |   |   |   |   |      |      |      |   |   | M | V | R | G |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JH6  |   |   |   |   |   |      |      |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Y | Y | G | M | D | V | W | G |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入   | - | - | - | - | - | -    | G    | G    | L | - | - | - | - | L | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JH6  | Q | G | T | T | V | T    | V    | S    | S |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入   | - | - | - | - | - | -    | -    | -    | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

图22

## 图23

## 图24



## 抗 GITR 9G7 VK1 (hKappa)

|     |                         |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----|-------------------------|---|---|---|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A27 | E                       | I | V | L | T    | Q | S | P | G | T | L | S | L | S | P | G | E | R | A | T | L    | S | C |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | -                       | - | - | - | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -    | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| A27 | CDR1                    |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | R                       | A | S | Q | S    | V | S | S | S | Y | L | A | W | Y | Q | Q | K | P | G | Q | A    | P | R |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| A27 | -                       | - | - | - | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -    | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| A27 | L                       | L | I | Y | CDR2 |   |   |   |   |   |   |   |   |   | G | A | S | S | R | A | T    | G | I | P | D | R | F | S | G | S | G | S | G |
| 输入  | -                       | - | - | - | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |
| A27 | T                       | D | F | T | L    | T | I | S | R | L | E | P | E | D | F | A | V | Y | Y | C | CDR3 |   |   |   | Q | Q | Y |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | -                       | - | - | - | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |
| A27 | G S S                   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JK1 | W T F G Q G T K V E I K |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | -                       | - | - | P | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |

图25A

## 抗 GITR 9G7 VK2 (hKappa)

|     |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A27 | E    | I | V | L | T | Q | S | P | G | T | L | S | L | S | P | G | E | R | A | T | L | S | C |
| 输入  | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A27 | CDR1 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | R    | A | S | Q | S | V | S | S | S | Y | L | A | W | Y | Q | Q | K | P | G | Q | A | P | R |
|     | -    | - | - | - | - | - | T | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A27 | CDR2 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | L    | L | I | Y | G | A | S | S | R | A | T | G | I | P | D | R | F | S | G | S | G | S | G |
|     | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | E | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A27 | CDR3 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | T    | D | F | T | L | T | I | S | R | L | E | P | E | D | F | A | V | Y | Y | C | Q | Q | Y |
|     | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A27 |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JK5 | G    | S | S |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  |      |   |   | I | T | F | G | Q | G | T | R | L | E | I | K |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     | -    | - | - | P | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |   |   |   |   |   |   |

图25B

## 抗 GITR 14E3 VH (hIgG1)

|      |                                                             |
|------|-------------------------------------------------------------|
| 4-34 | Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A               |
| 输入   | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -       |
| 4-34 | V Y G G S F S <u>CDR1</u> G Y Y W S W I R Q P P G K G L E   |
| 输入   | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -       |
| 4-34 | W I G <u>CDR2</u> E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I   |
| 输入   | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -       |
| 4-34 | S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V               |
| 输入   | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -       |
| 4-34 | Y Y C A R <u>CDR3</u> D A F D I W G Q G T M V T V           |
| JH3  |                                                             |
| 输入   | - - - - - F G S N - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - |
| JH3  | S S                                                         |
| 输入   | - -                                                         |

图26

## 抗 GITR 14E3 VK (hKappa)

|     |                                                           |
|-----|-----------------------------------------------------------|
| L15 | D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C             |
| 输入  | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -     |
| L15 | <u>CDR1</u> R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P E K A P K S |
| 输入  | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -     |
| L15 | L I Y <u>CDR2</u> A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T |
| 输入  | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -     |
| L15 | D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C <u>CDR3</u> Q Q Y N |
| 输入  | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -     |
| L15 | <u>S Y</u> T F G Q G T K V E I K                          |
| JK1 |                                                           |
| 输入  | - - P P - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -         |

图27

## 抗 GITR 19H8 VH (hIgG2)

|      |                                                           |
|------|-----------------------------------------------------------|
| 3-33 | Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A             |
| 输入   | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -             |
| 3-33 | A S G F T F S <u>CDR1</u> S Y G M H W V R Q A P G K G L E |
| 输入   | - - - - - - - - N - - - - - - - - - - - - - - - -         |
| 3-33 | W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T             |
| 输入   | - M - - - - - G - - - - - F - - - - - - - - - - -         |
| 3-33 | I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A             |
| 输入   | - - - - - - - - S - S - - - - - - - - - - - - - -         |
| 3-33 | V Y Y C A R <u>CDR3</u>                                   |
| 3-10 |                                                           |
| JH6  | Y Y Y                                                     |
| 输入   | - - - - - G G A M V R G V - - - - - Y Y Y G M D V W G     |
| JH6  | Q G T T V T V S S                                         |
| 输入   | - - - - - - - - - - -                                     |

图28

## 抗 GITR 19H8 VK1 (hKappa)

|     |                                                           |
|-----|-----------------------------------------------------------|
| L18 | A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C             |
| 输入  | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -             |
| L18 | <u>CDR1</u> R A S Q G I S S A L A W Y Q Q K P G K A P K L |
| 输入  | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - F             |
| L18 | L I Y <u>CDR2</u> D A S S L E S G V P S R F S G S G S G T |
| 输入  | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -             |
| L18 | D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C <u>CDR3</u> Q Q F N |
| 输入  | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -             |
| L18 | <u>N Y</u>                                                |
| JK1 | T F G Q G T K V E I K                                     |
| 输入  | S - P Q - - - - - - - - - - -                             |

图29A

## 抗 GITR 19H8 VK2 (hKappa)

|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| L6  | E | I | V | L | T | Q | S | P | A | T | L | S | L | S | P | G | E | R | A | T | L | S | C |
| 输入  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L6  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| L6  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L6  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| L6  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L6  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| L6  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L6  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| L6  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L6  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| L6  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JK4 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入  | - | - | P | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

图29B

抗 GITR 6G10 VH (hIgG2)

|      |   |   |   |      |   |   |      |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------|---|---|---|------|---|---|------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3-33 | Q | V | Q | L    | V | E | S    | G    | G | G | V | V | Q | P | G | R | S | L | R | L | S | C | A |   |   |
| 输入   | - | - | - | -    | - | - | -    | -    | - | D | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |   |
| 3-33 | A | S | G | F    | T | F | S    | CDR1 |   | S | Y | G | M | H | W | V | R | Q | A | P | G | K | G | L | E |
| 输入   | - | - | - | -    | - | - | -    | T    |   | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33 | W | V | A | CDR2 |   | V | I    | W    | Y | D | G | S | N | K | Y | Y | A | D | S | V | K | G | R | F | T |
| 输入   | - | - | - | -    | T | - | -    | A    |   | - | - | - | - | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-33 | I | S | R | D    | N | S | K    | N    | T | L | Y | L | Q | M | N | S | L | R | A | E | D | T | A |   |   |
| 输入   | - | - | - | -    | - | - | -    | -    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |   |
| 3-33 | V | Y | Y | C    | A | R | CDR3 |      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 3-10 |   |   |   |      |   |   |      |      | M | V | R | G |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| JH6  |   |   |   |      |   |   |      |      |   |   |   |   |   |   | Y | Y | Y | G | M | D | V | W | G |   |   |
| 输入   | - | - | - | -    | - | - | G    |      | G | S | - | - | - | - | L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| JH6  | Q | G | T | T    | V | T | V    | S    | S |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 输入   | - | - | - | -    | - | - | -    | -    | - |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

图30

抗 GITR 6G10 VK1 (hKappa)

L18  
输入

A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C

- - - - -

L18  
输入

CDR1

R A S Q G I S S A L A W Y Q Q K P G K A P K L

- - - - -

L18  
输入

CDR2

L I Y D A S S L E S G V P S R F S G S G S G T

- - - - -

L18  
输入

CDR3

D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N

- - - - -

L18  
JK2  
输入

N Y

Y T F G Q G T K L E I K

S - P - - - - -

图31

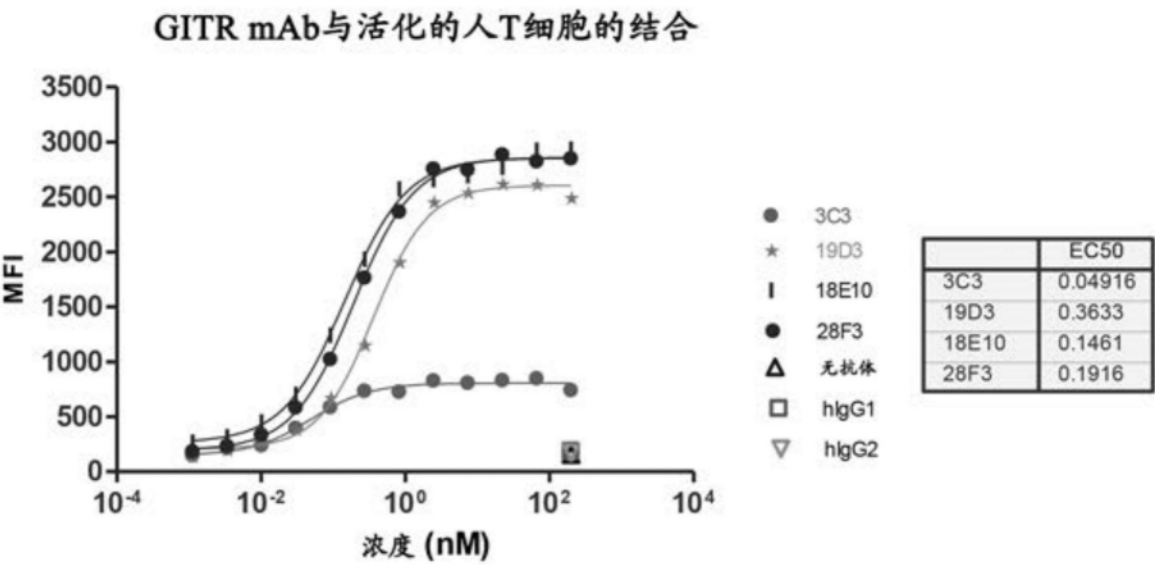


图32

GITR mAb与活化的食蟹猴T细胞的结合

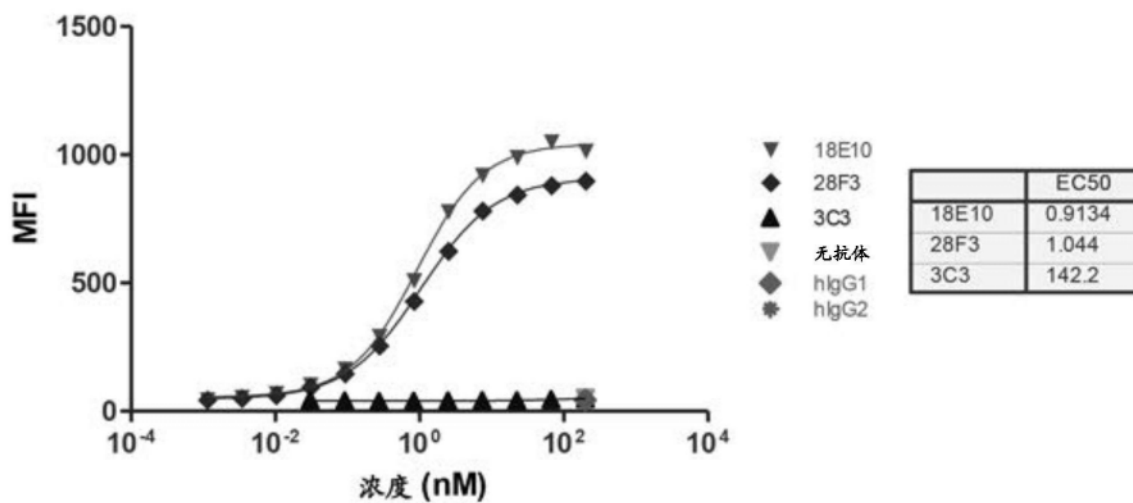


图33

GITR HuMab阻断GITRL与GITR-3A9细胞结合

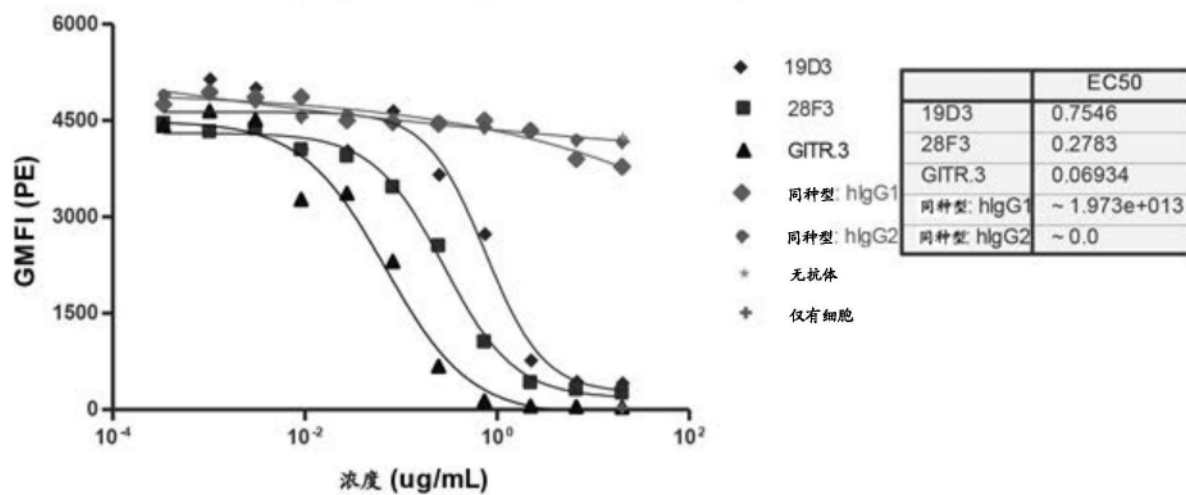


图34A

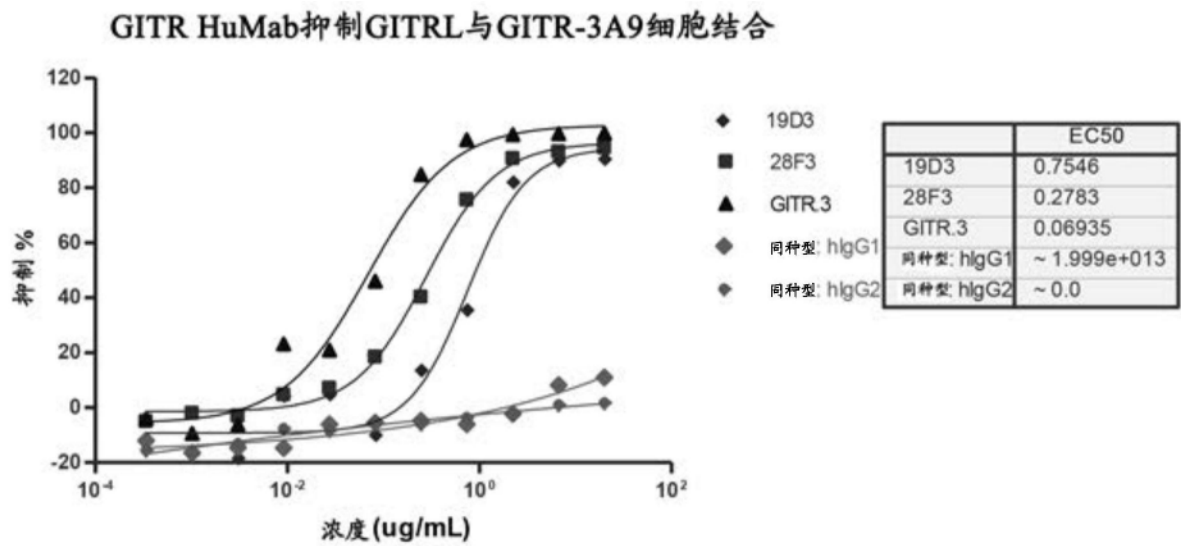
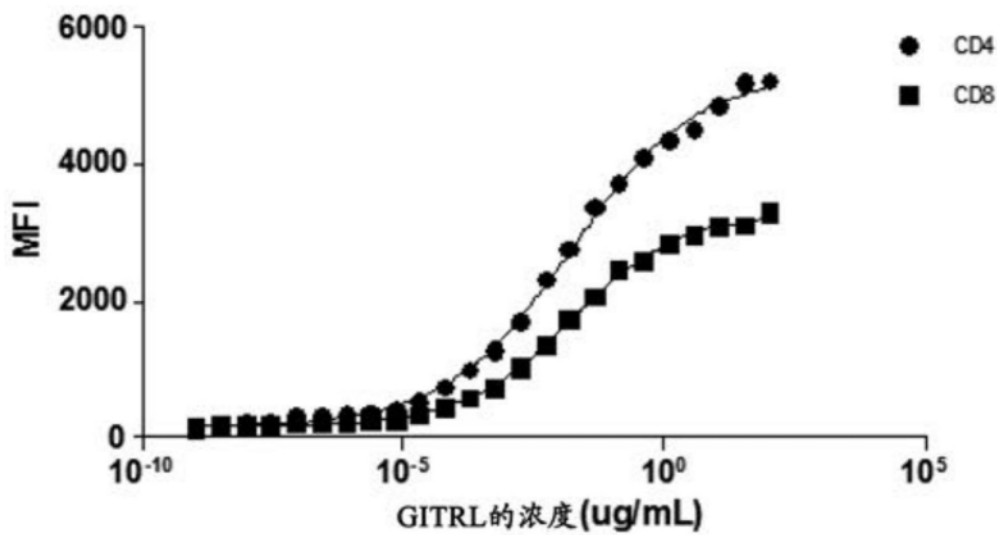


图34B



|      | CD4     | CD8     |
|------|---------|---------|
| IC50 | 0.01605 | 0.01635 |

图34C



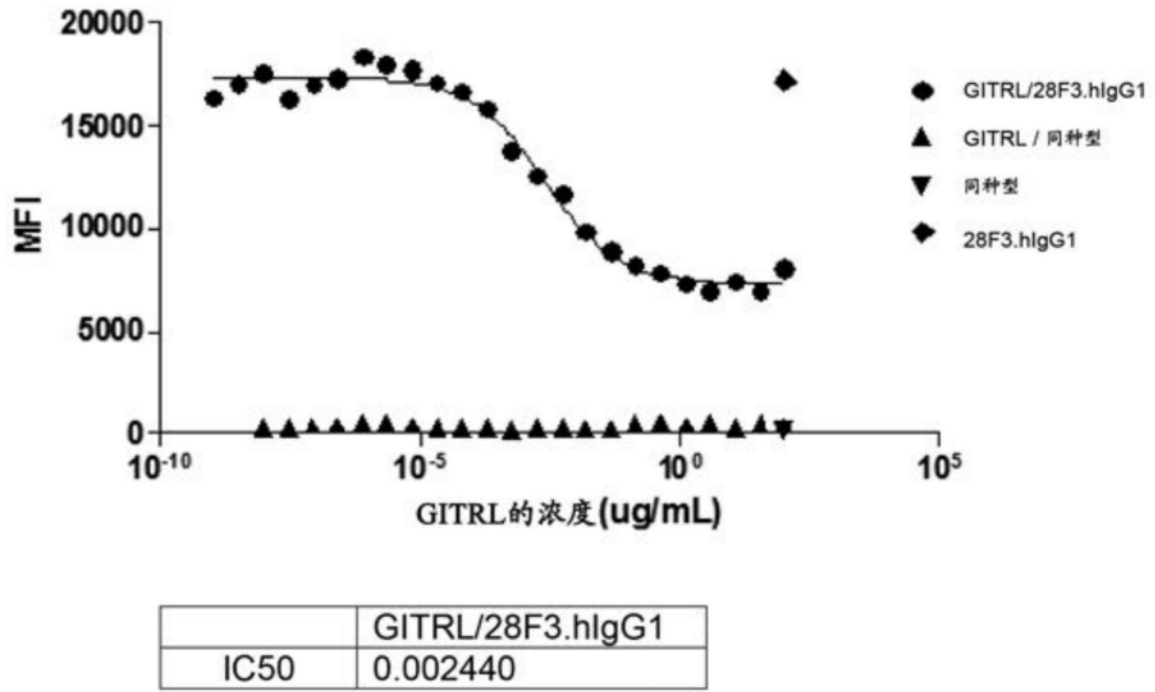


图34D

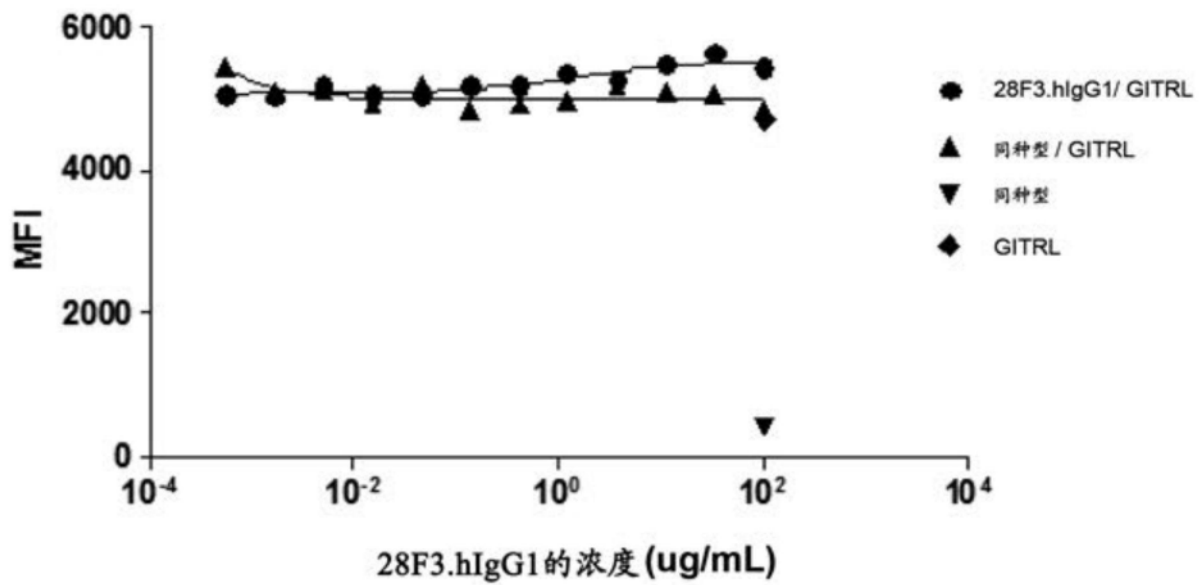
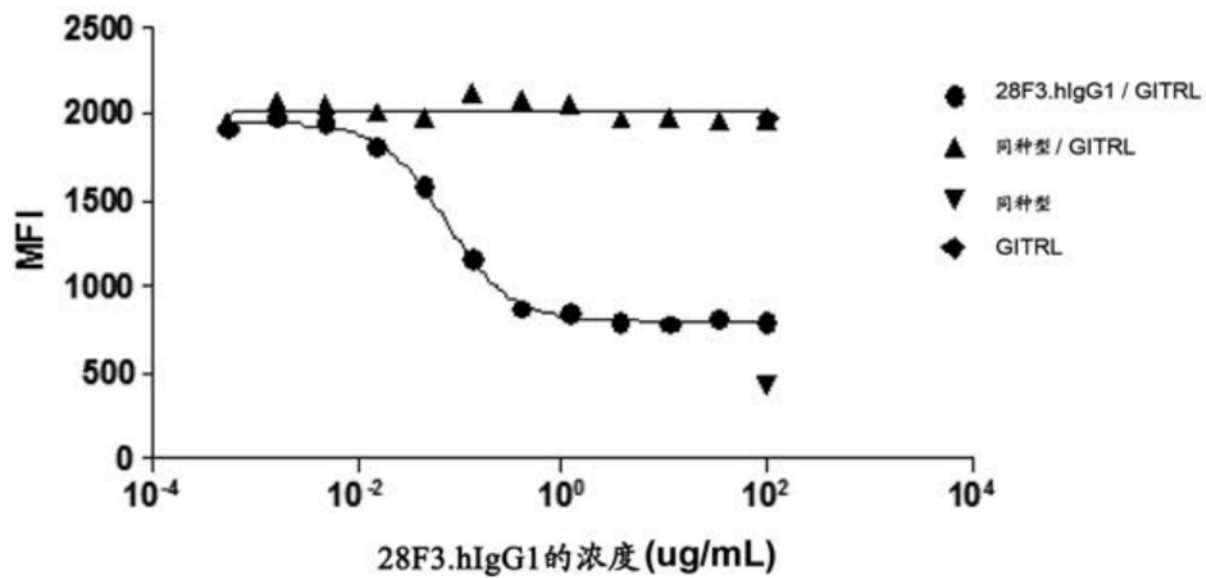


图34E



|      |                    |
|------|--------------------|
|      | 28F3.hlgG1 / GITRL |
| IC50 | 0.07575            |

图34F

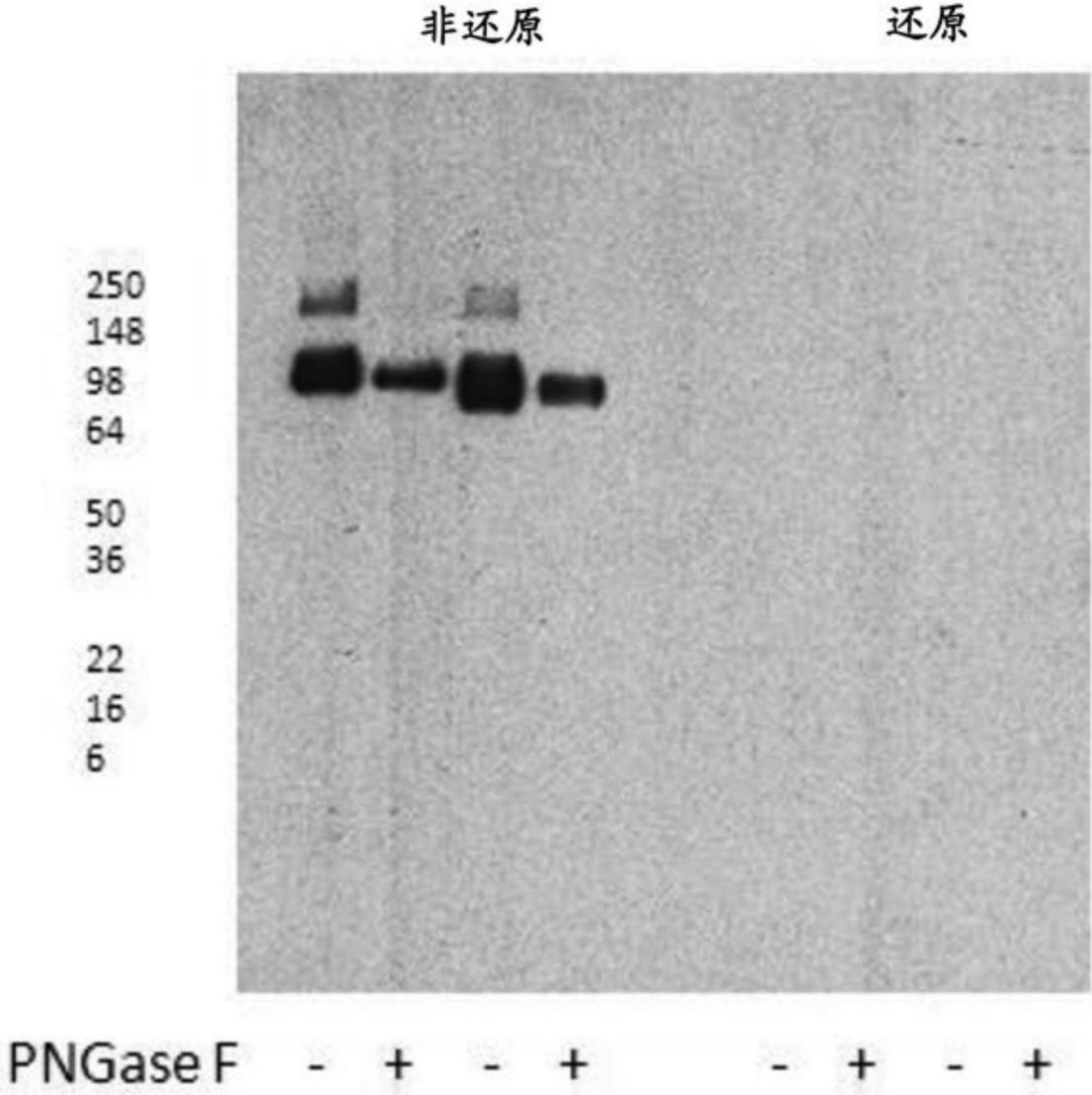


图35A

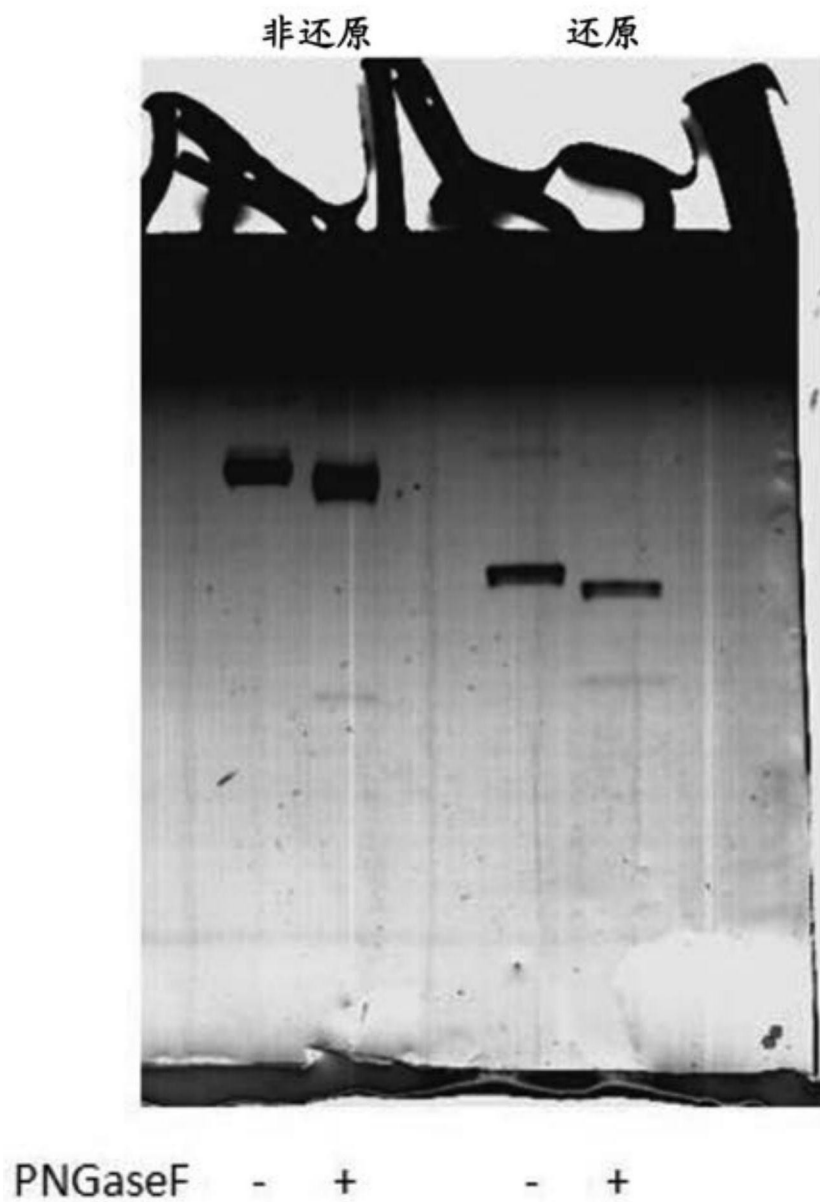


图35B

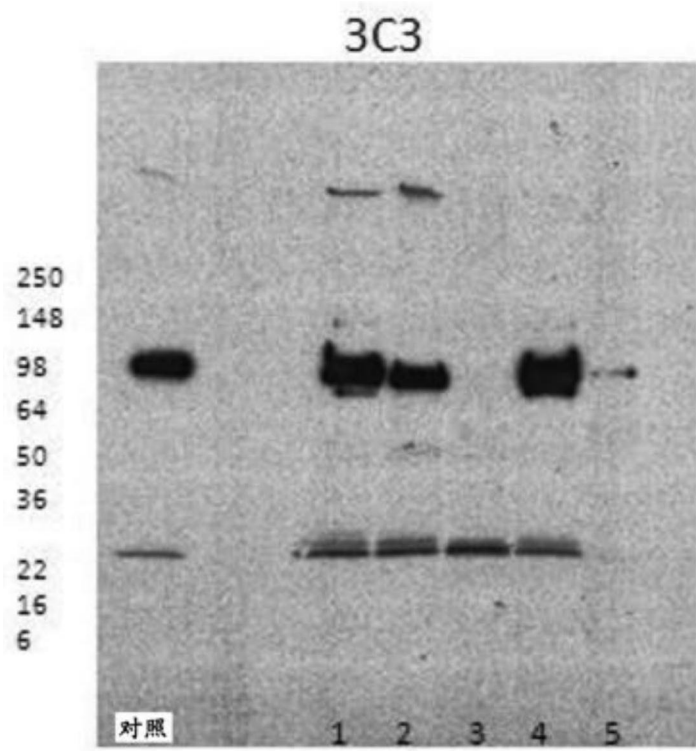


图36A

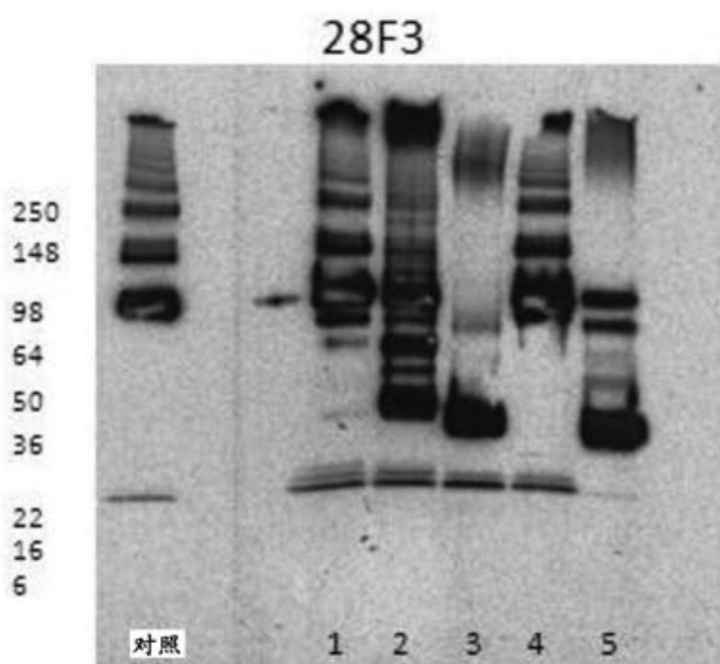


图36B

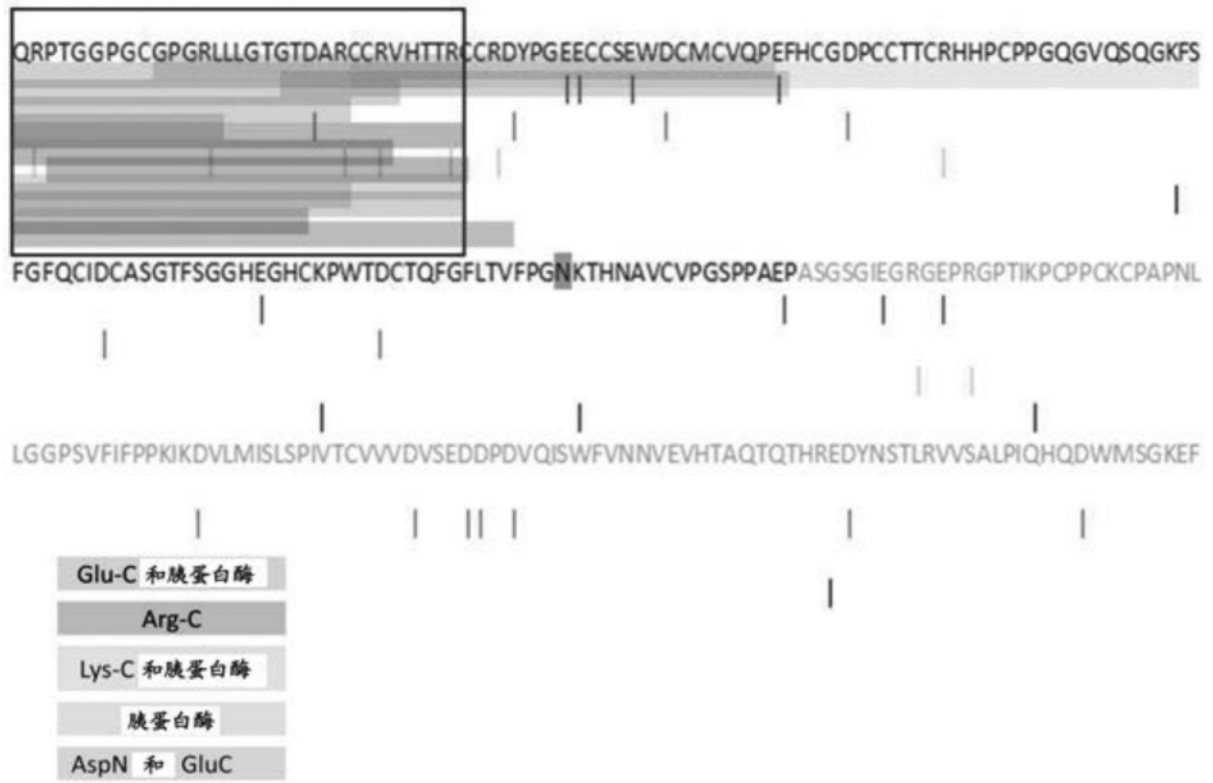


图37

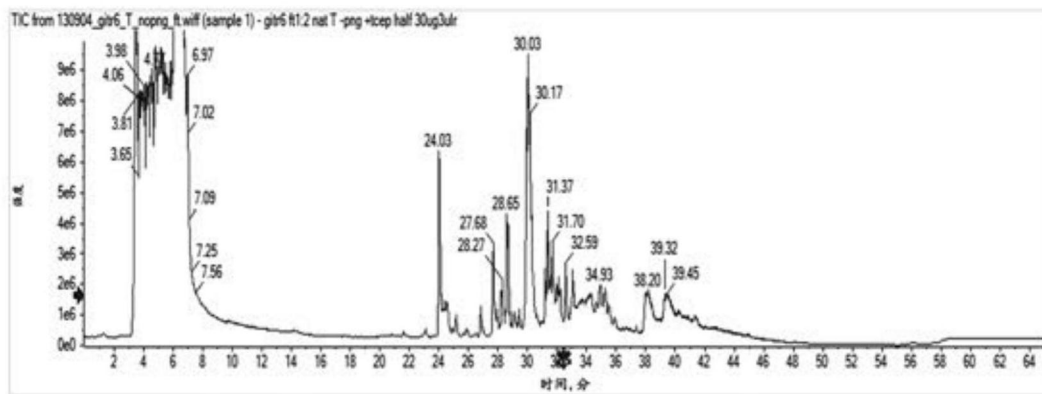


图38A

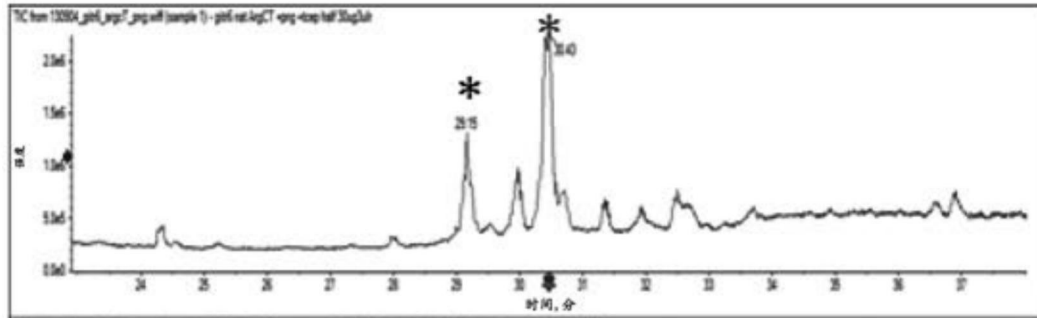


图 38B

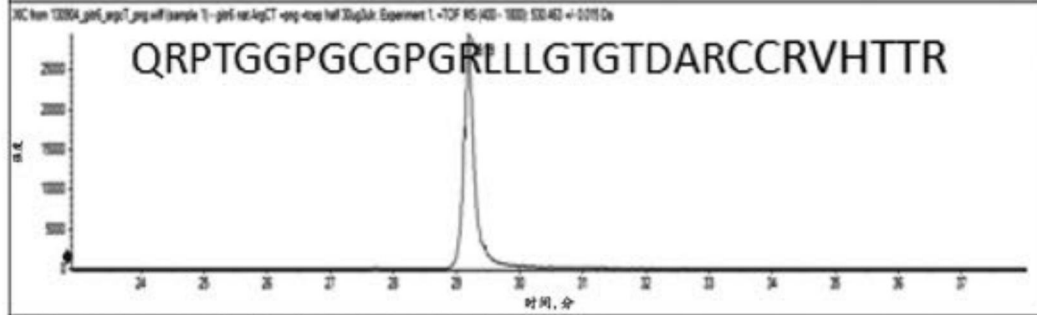


图 38C

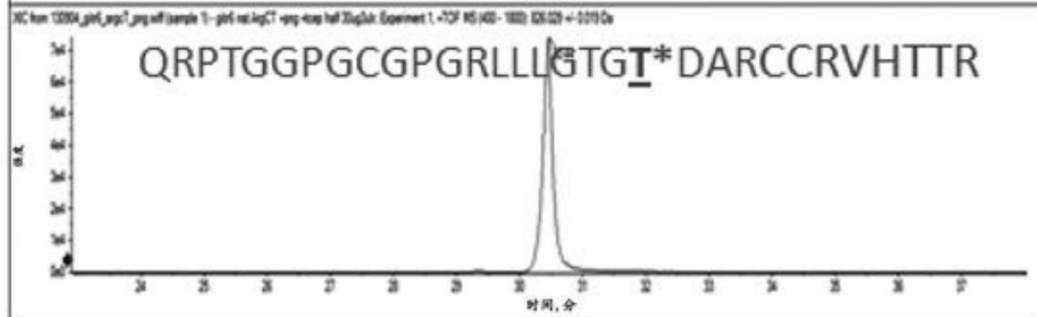


图 38D

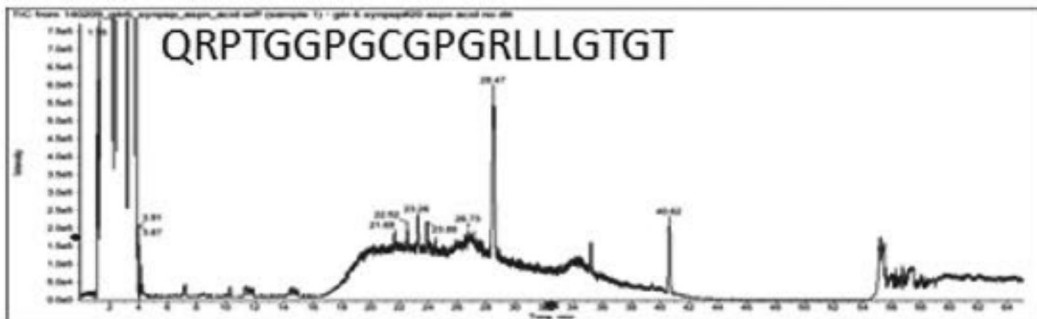


图 38E

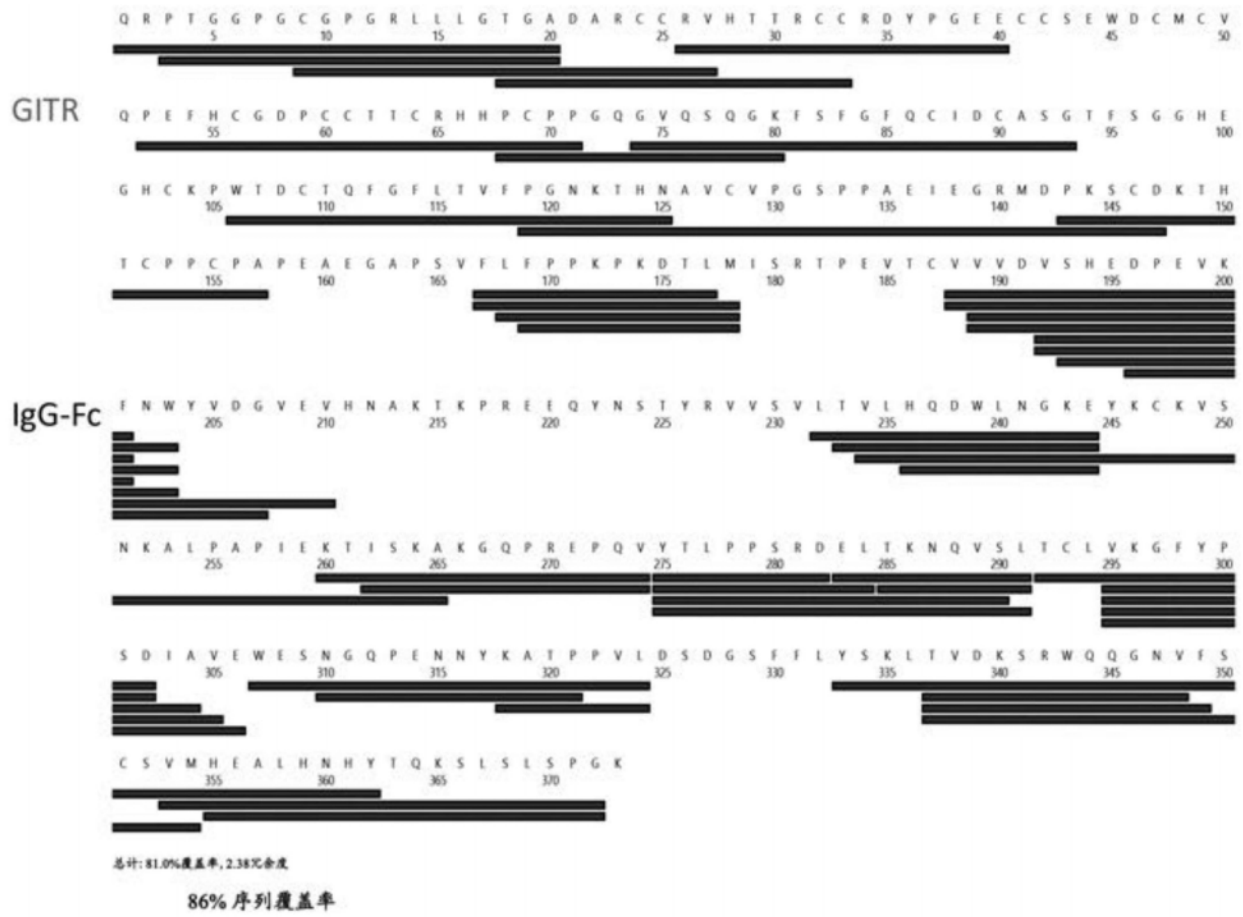


图39A



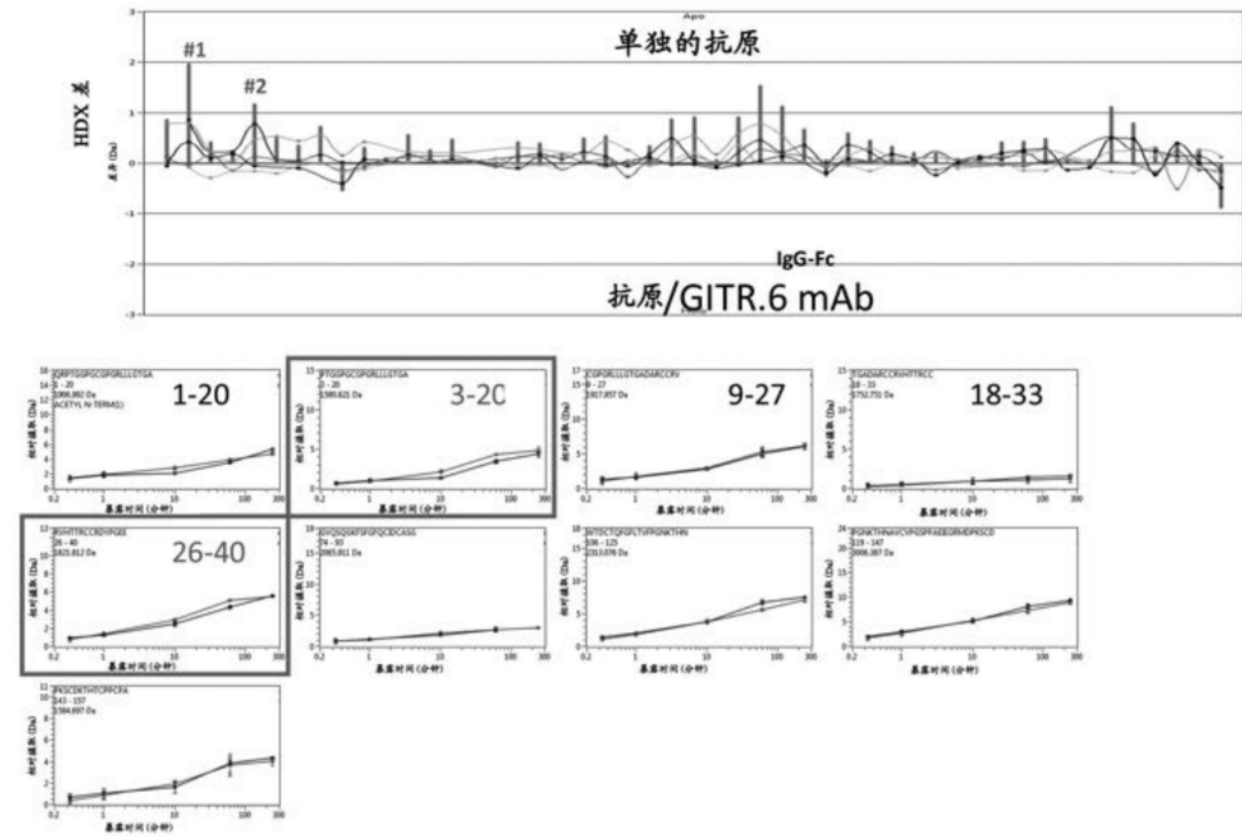


图39B

<sup>1</sup>QRPTGGPGCG <sup>11</sup>PGRLLLGTGA <sup>21</sup>DARCCRVHTT <sup>31</sup>RCCRDYPGEE  
 序号1 Ranking #2  
<sup>41</sup>CCSEWDCMCV <sup>51</sup>QPEFHCGDPC <sup>61</sup>CTTCRHHPCP <sup>71</sup>PGQGVQSQ GK  
<sup>81</sup>FSFGFQCIDC <sup>91</sup>ASGTFSGGHE <sup>101</sup>GHCKPWT DCT <sup>111</sup>QFGFLT VFP G  
<sup>121</sup>NKTHNAV CVP <sup>131</sup>GSPPAEIEGR <sup>141</sup>MD

图39C

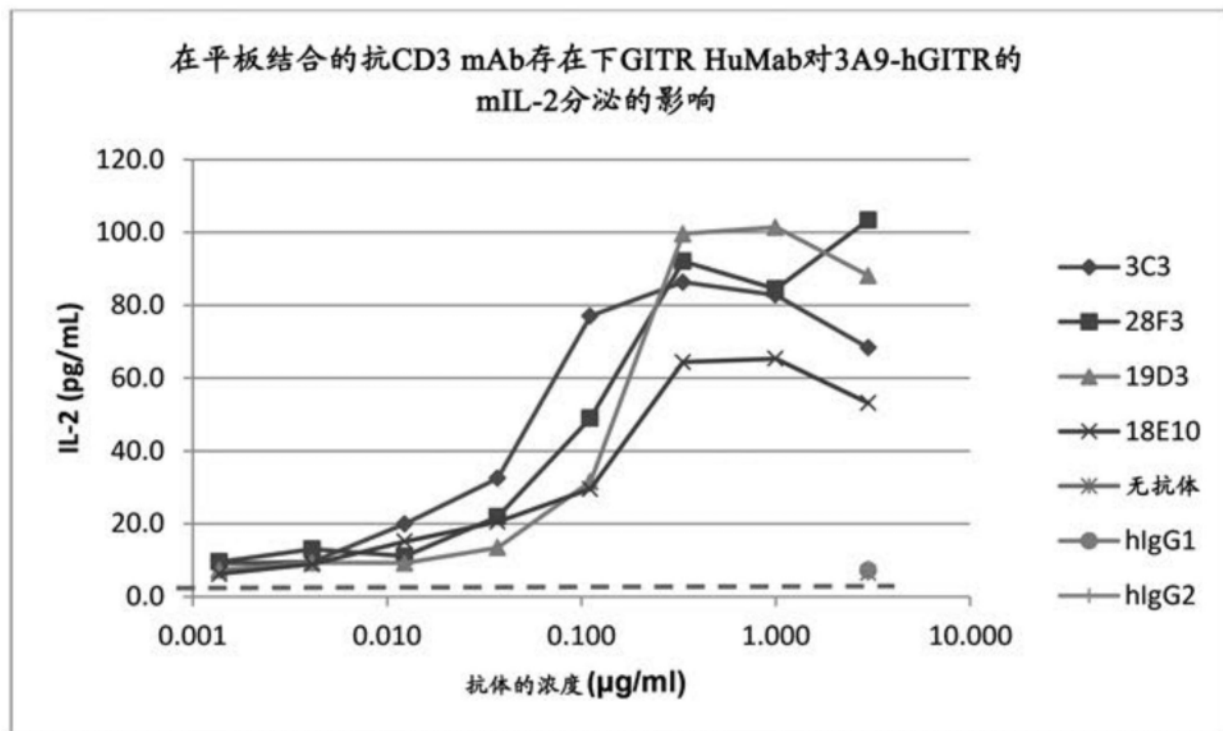


图40

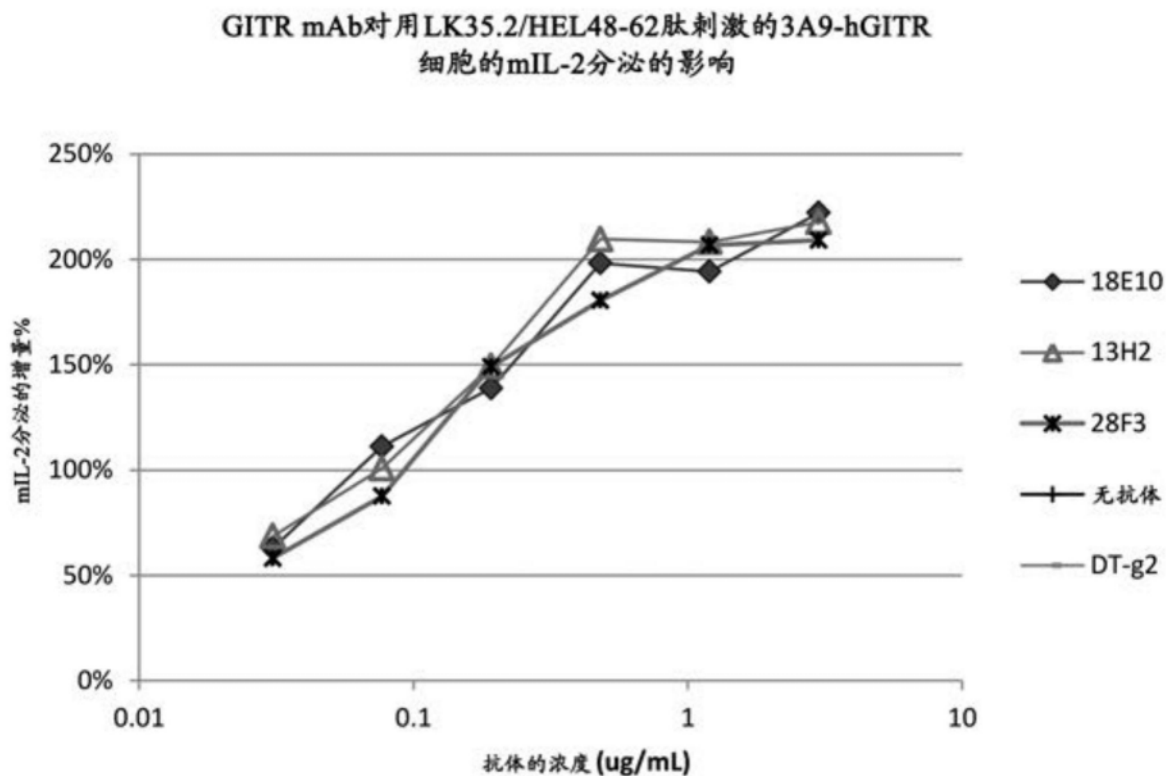


图41A

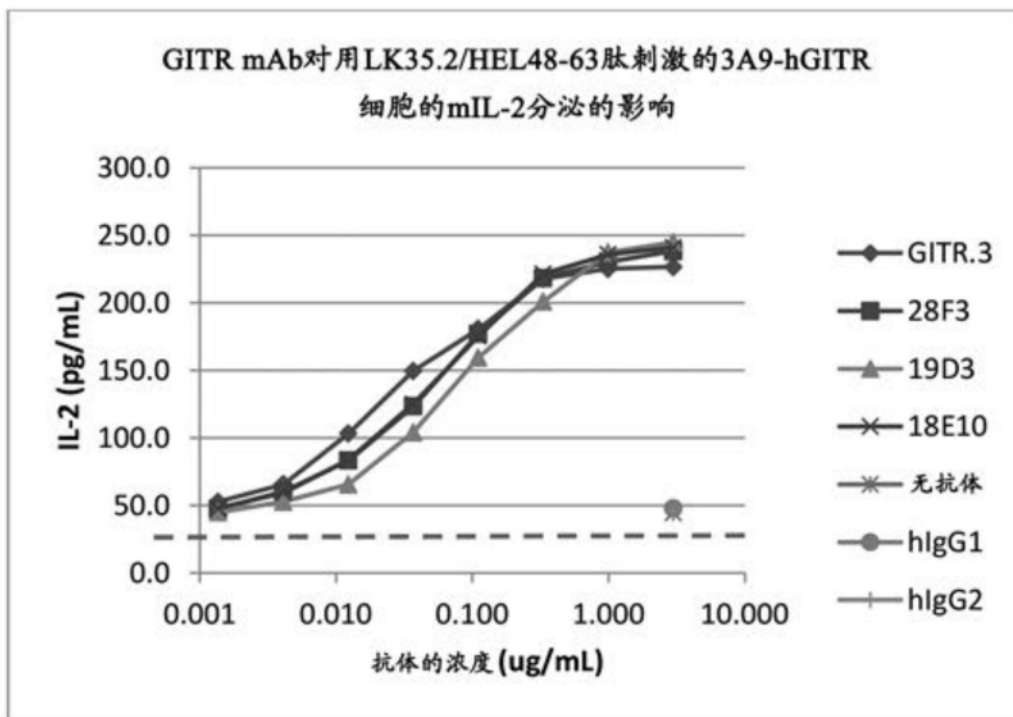


图41B

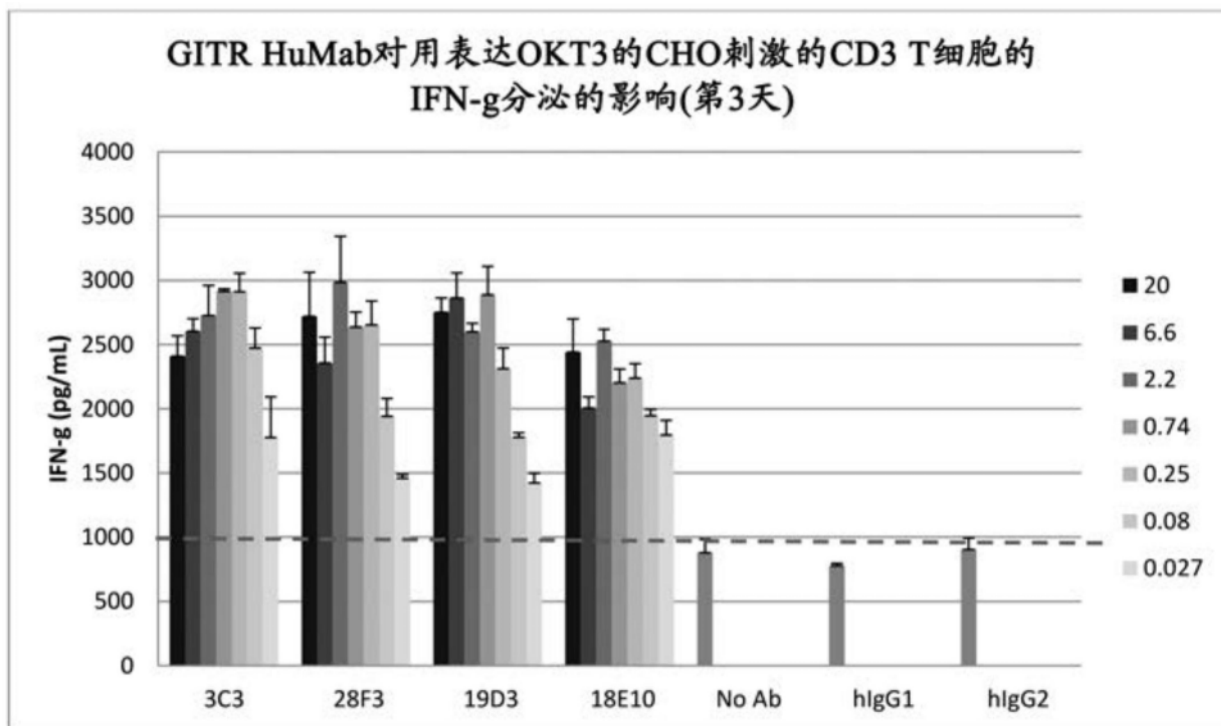


图42A

GITR mAb对用表达OKT3的CHO细胞刺激的CD4 T细胞的IL-2分泌的影响(第2天)-供体1号

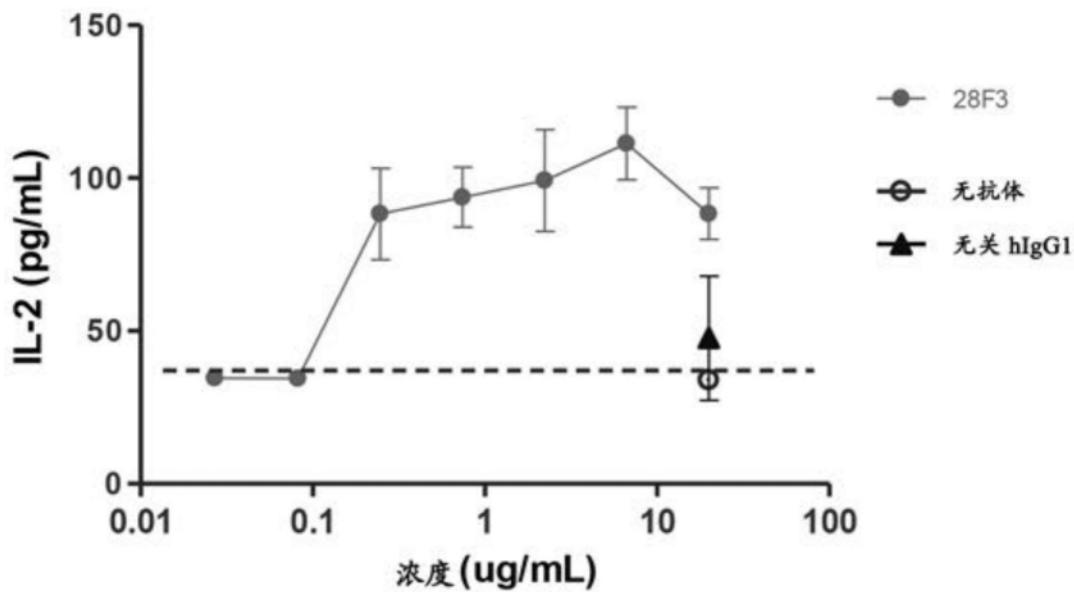


图42B

GITR mAb对用表达OKT3的CHO细胞刺激的CD4 T细胞的IFN-g分泌的影响(第3天)-供体1号

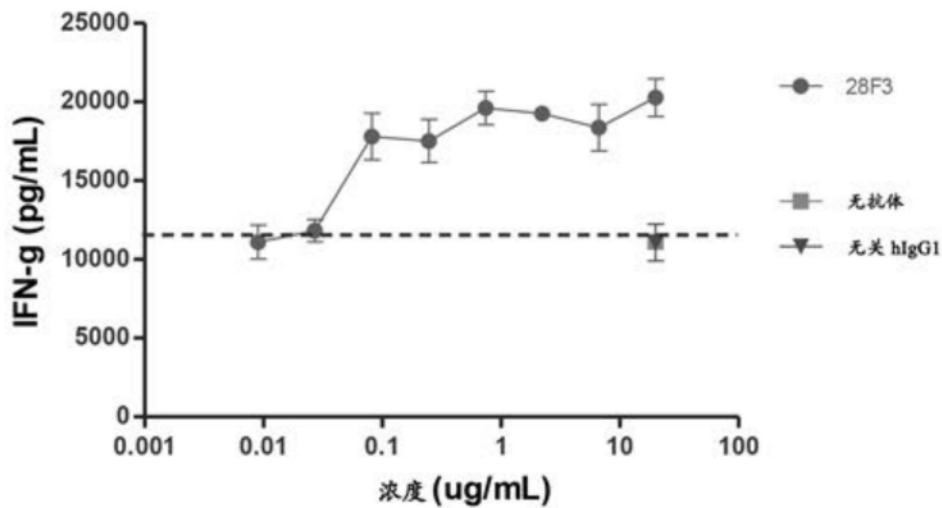


图42C

GITR mAb对用表达OKT3的CHO细胞刺激的CD4 T细胞的IL-2分泌的影响(第3天)-供体2号

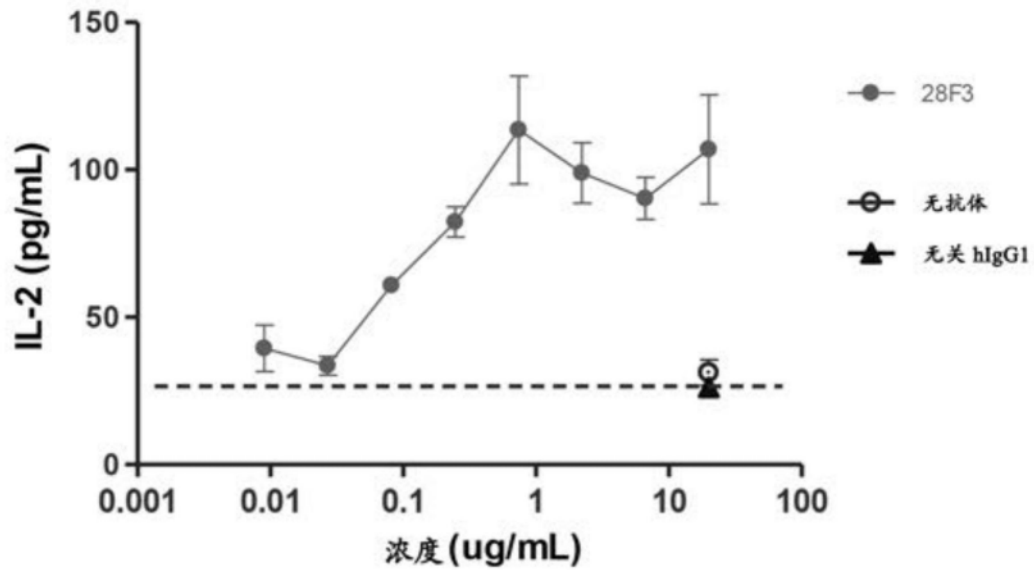


图42D

GITR mAb对用表达OKT3的CHO细胞刺激的CD4 T细胞的IFN-g分泌的影响(第3天)-供体2号

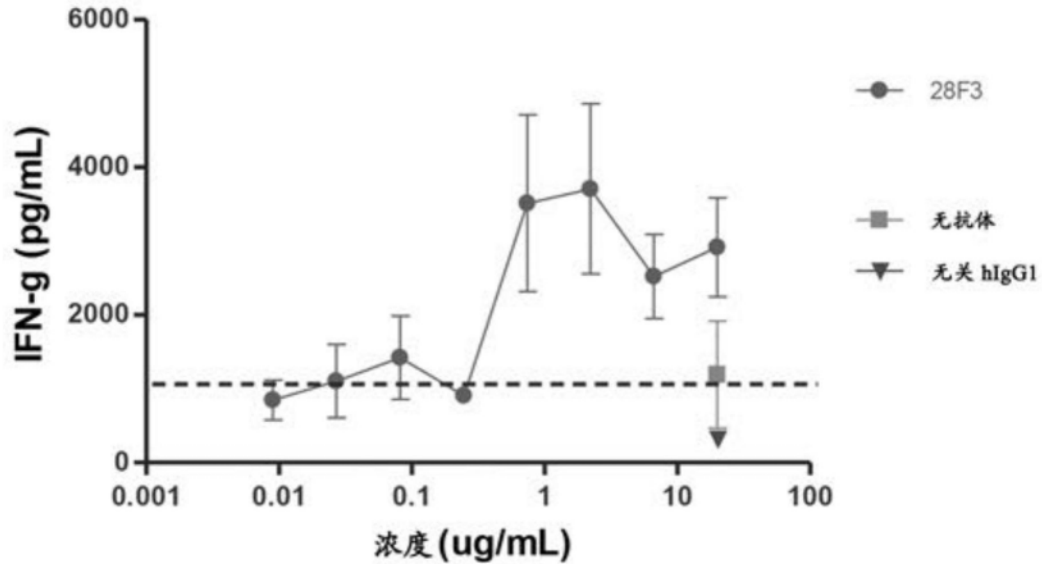


图42E

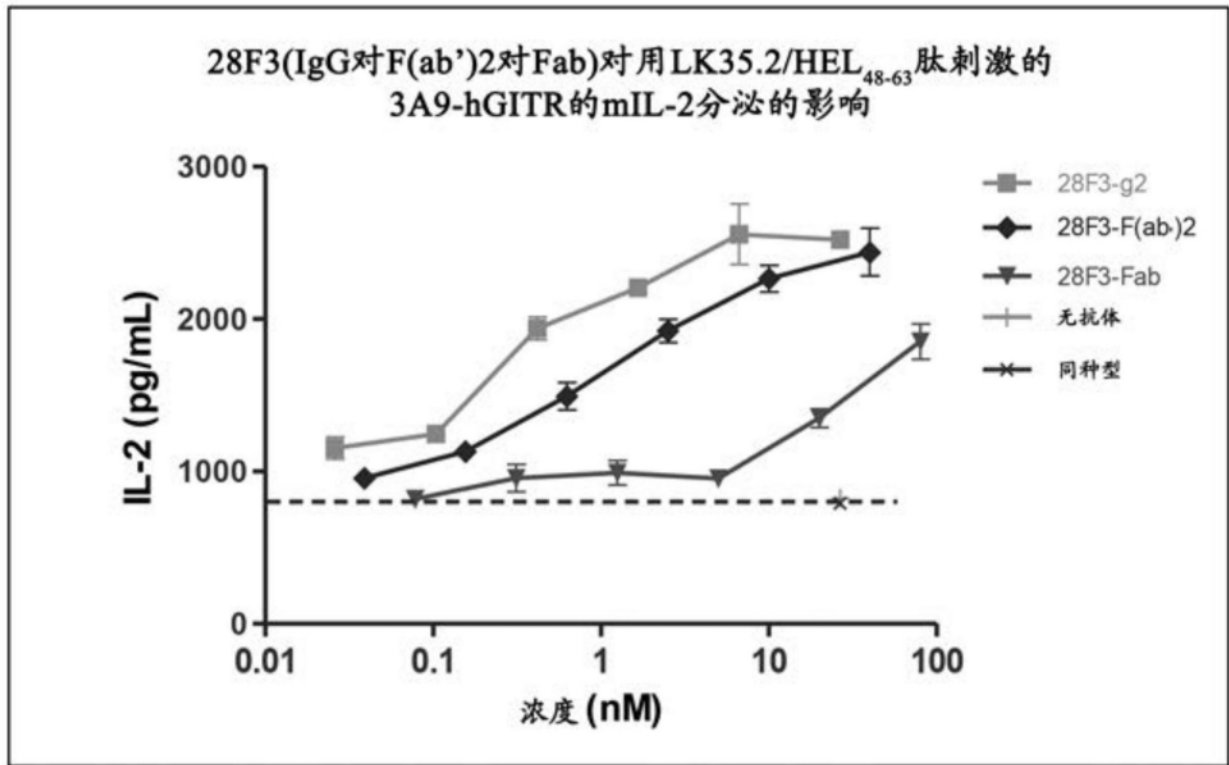


图43

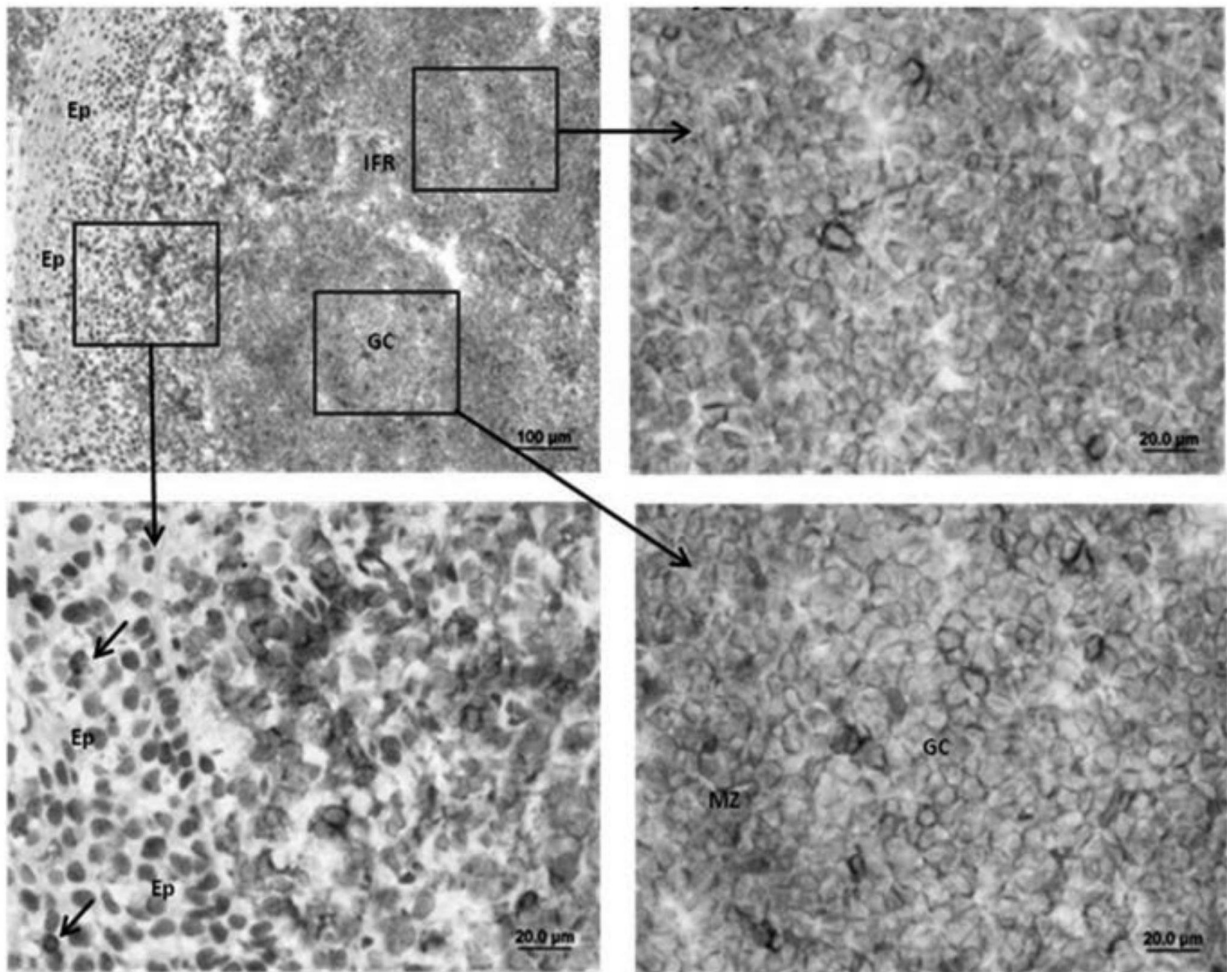


图44

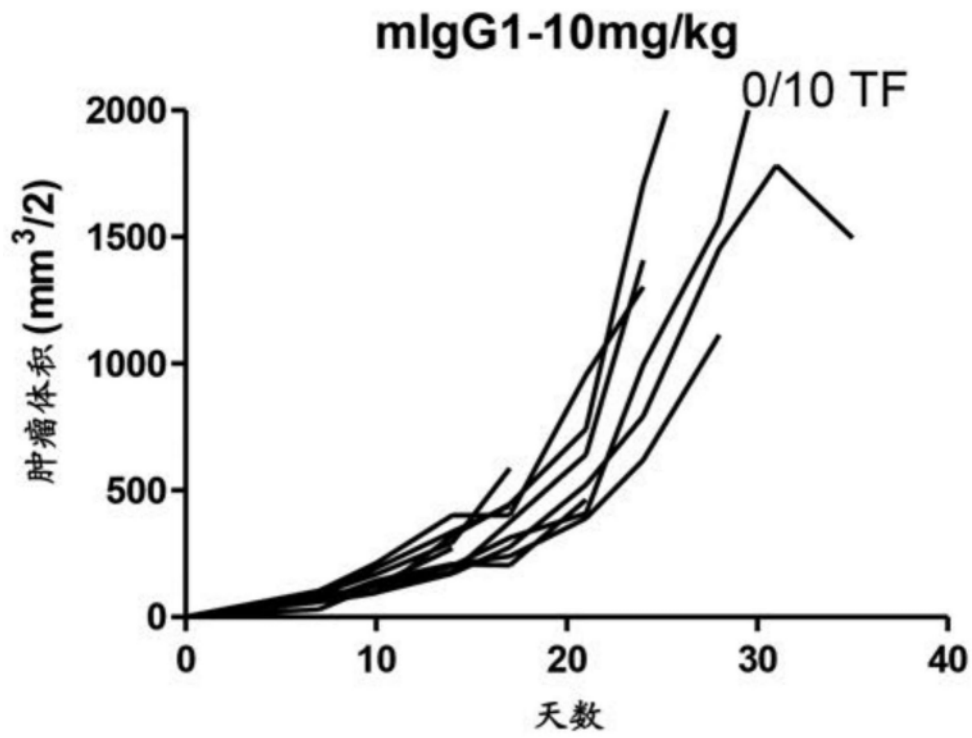


图45A

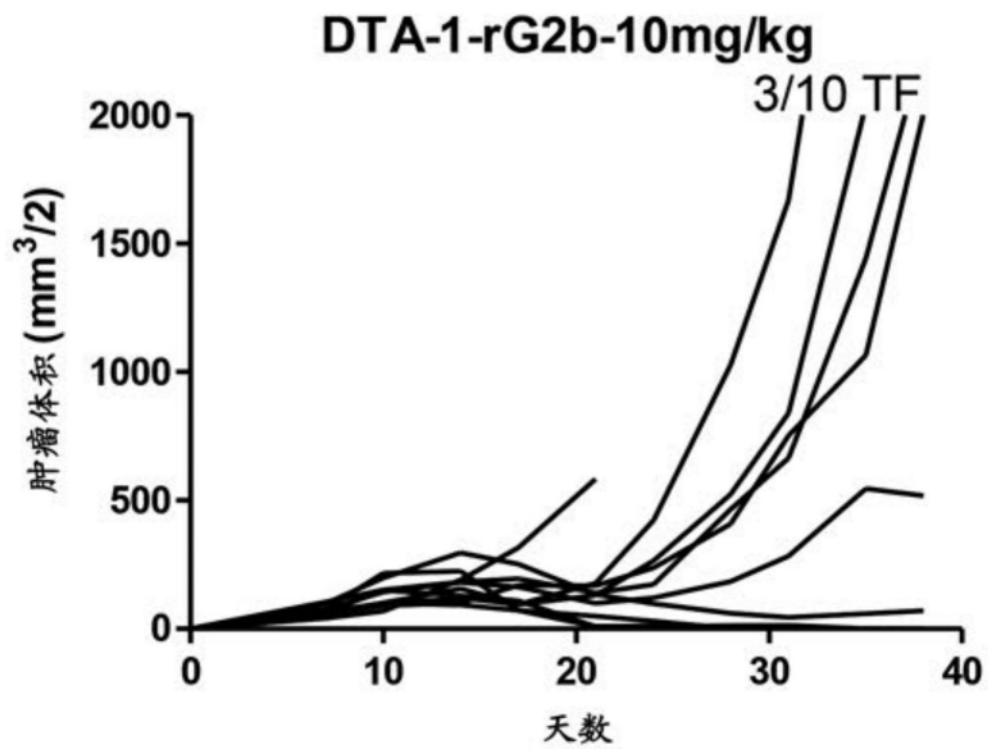


图45B



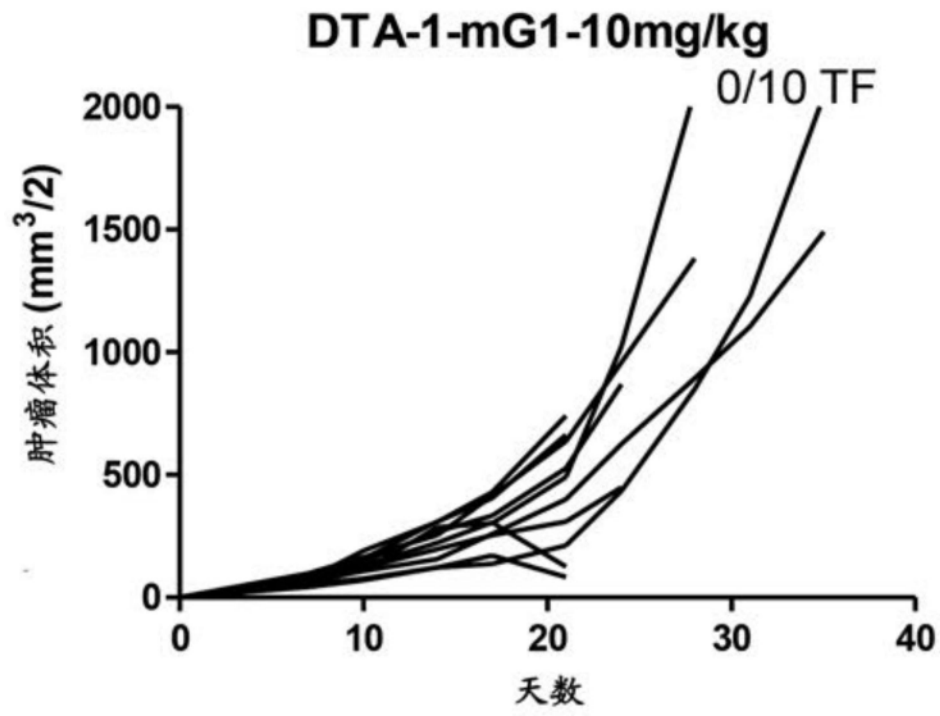


图45C

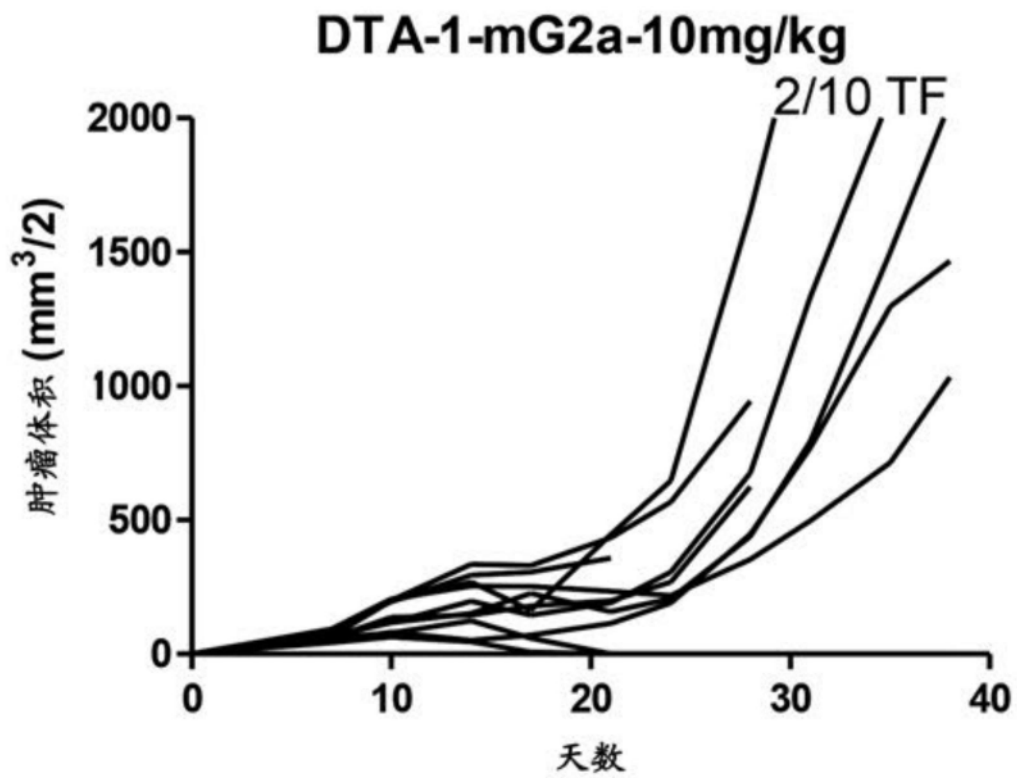


图45D

A.

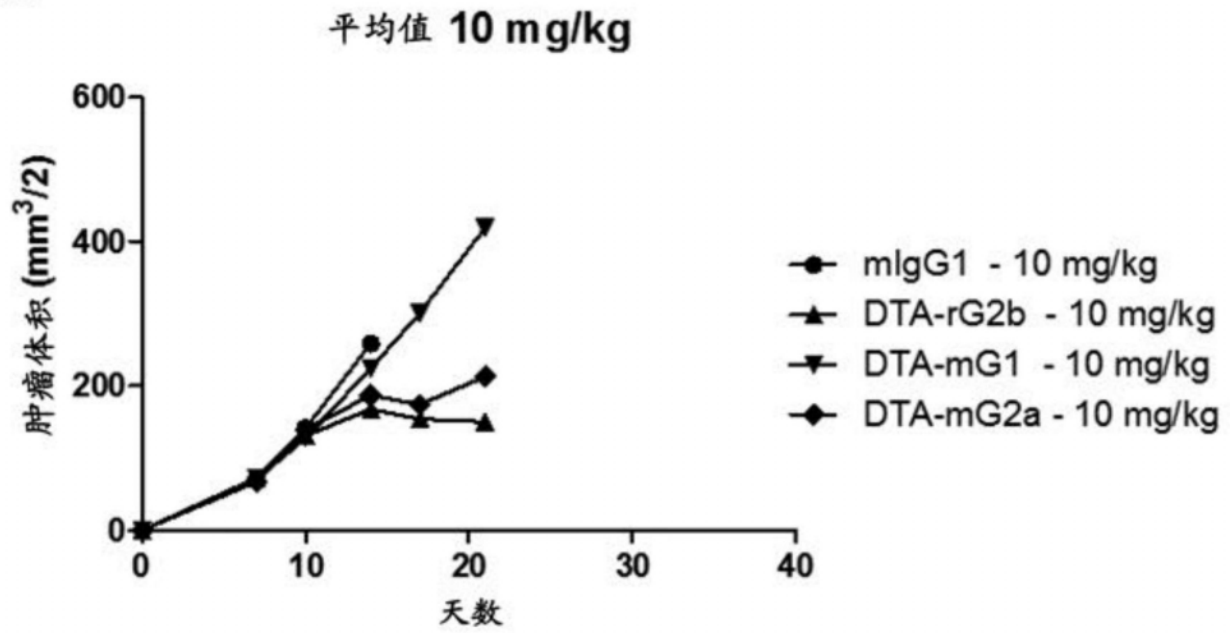


图 46A

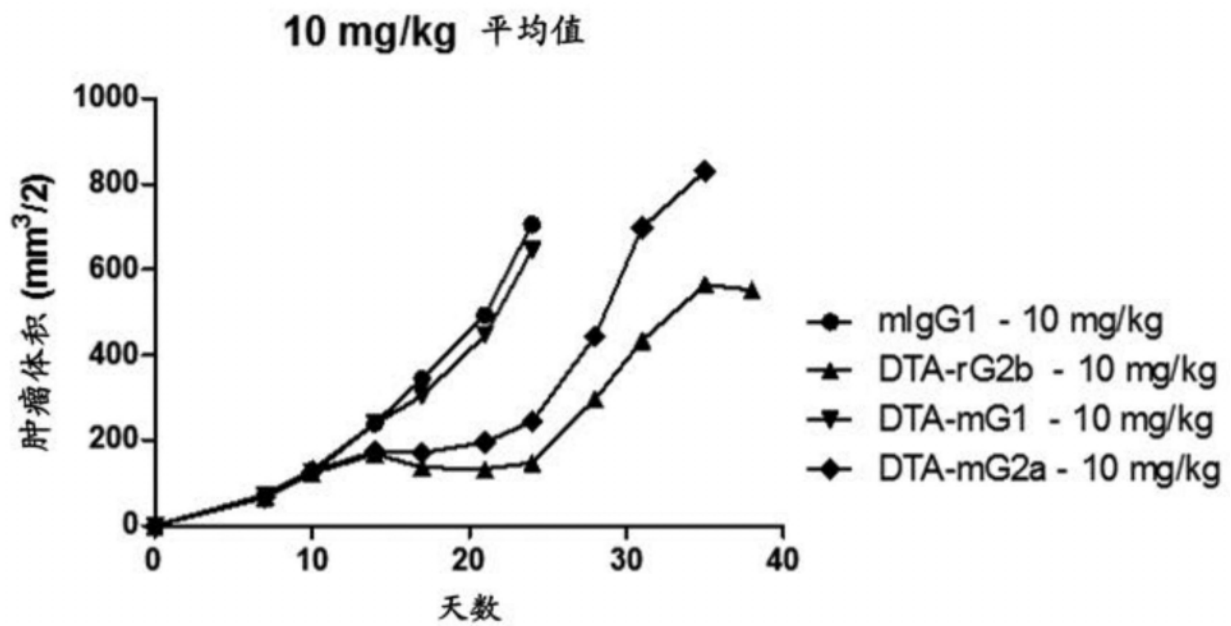


图 46B

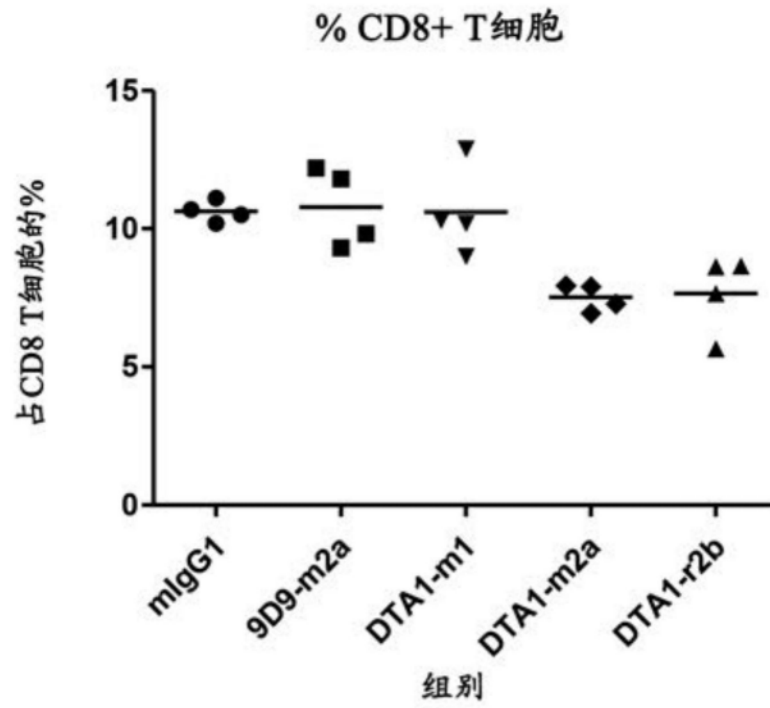


图47A

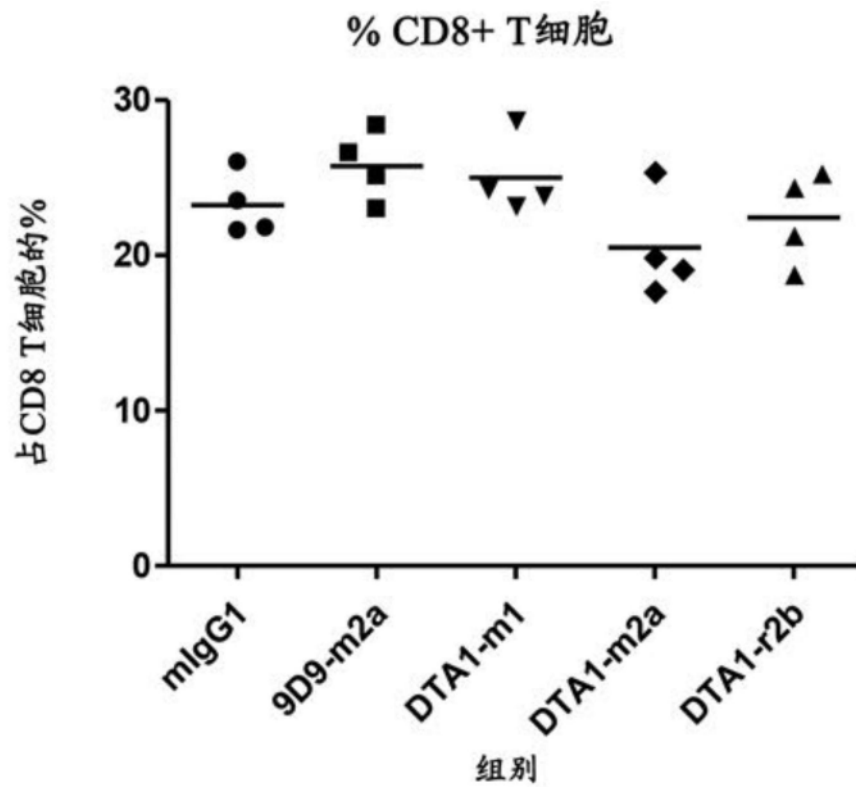


图47B

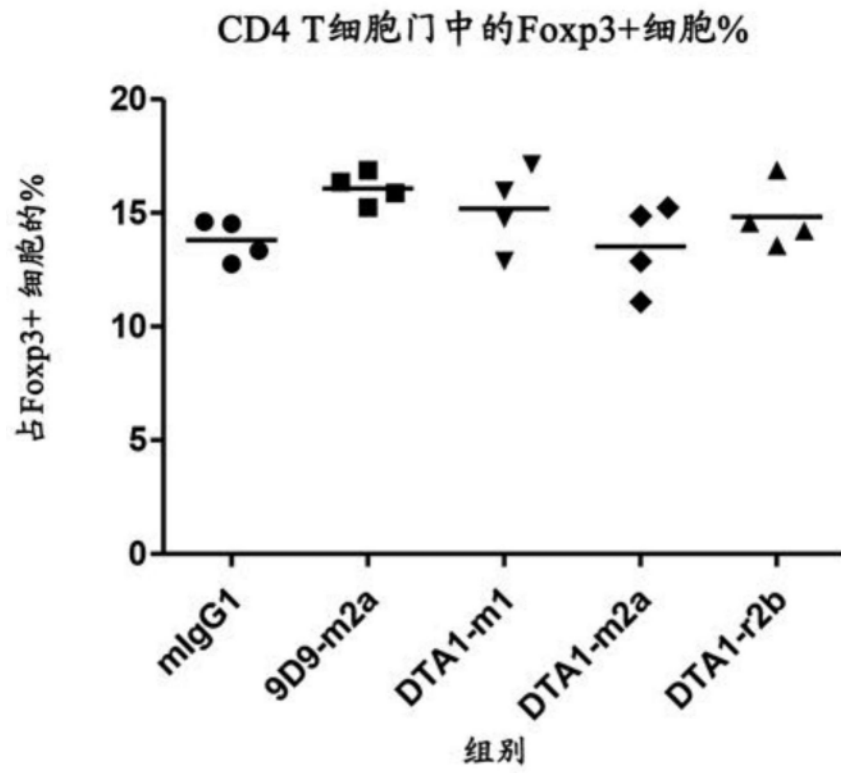


图47C

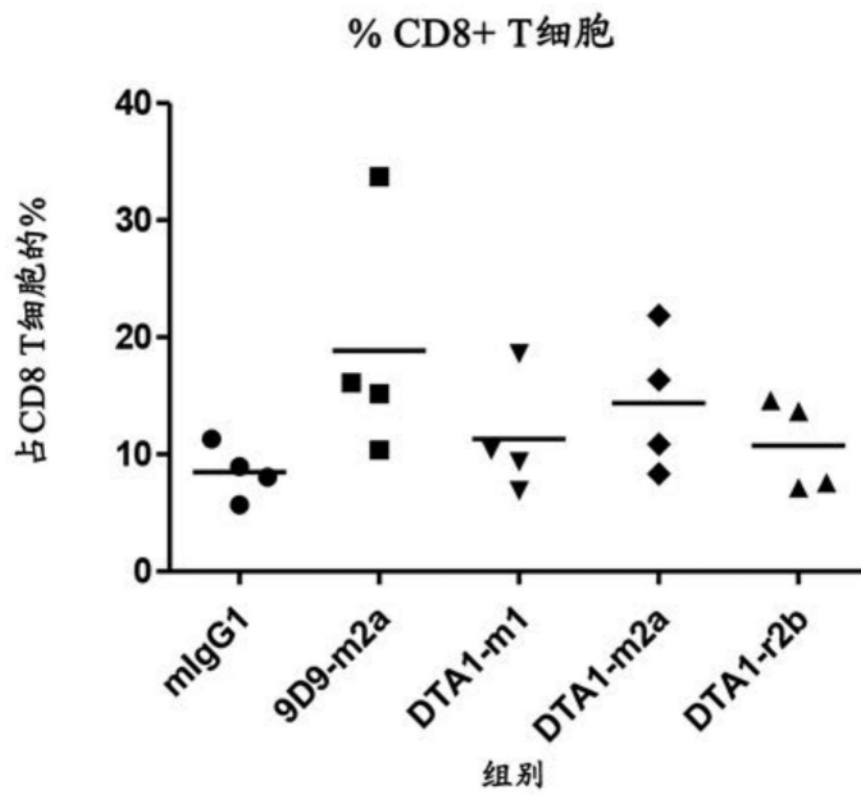


图47D

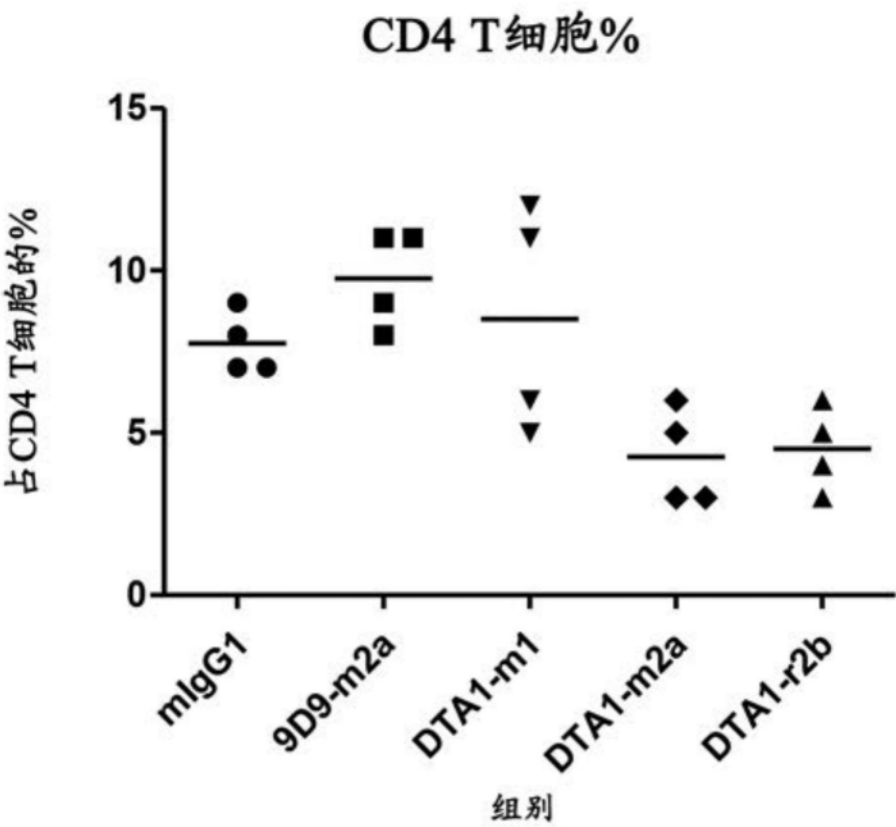


图47E

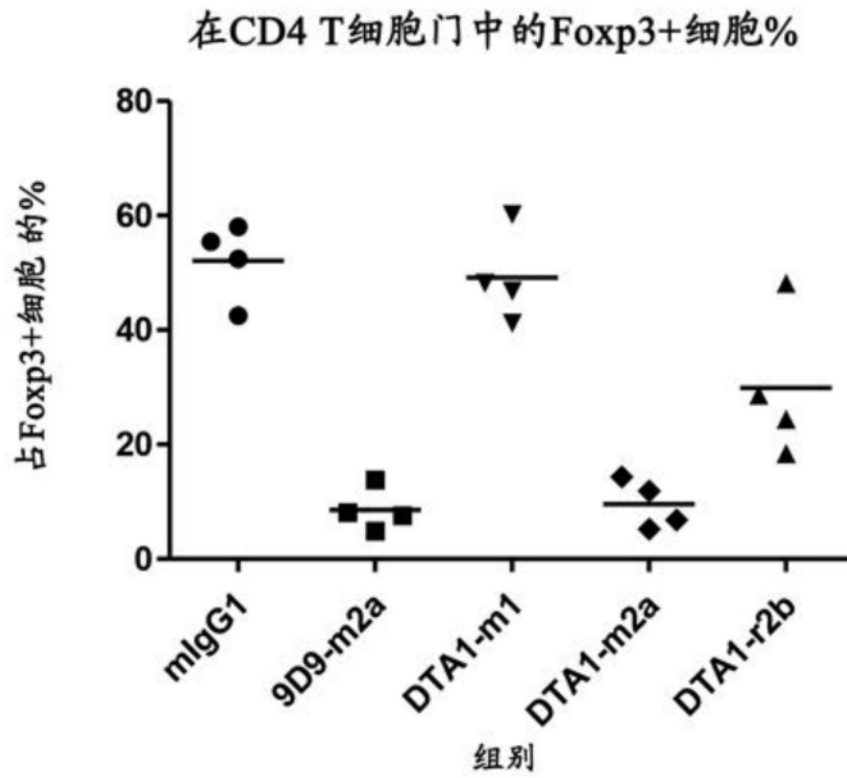


图47F

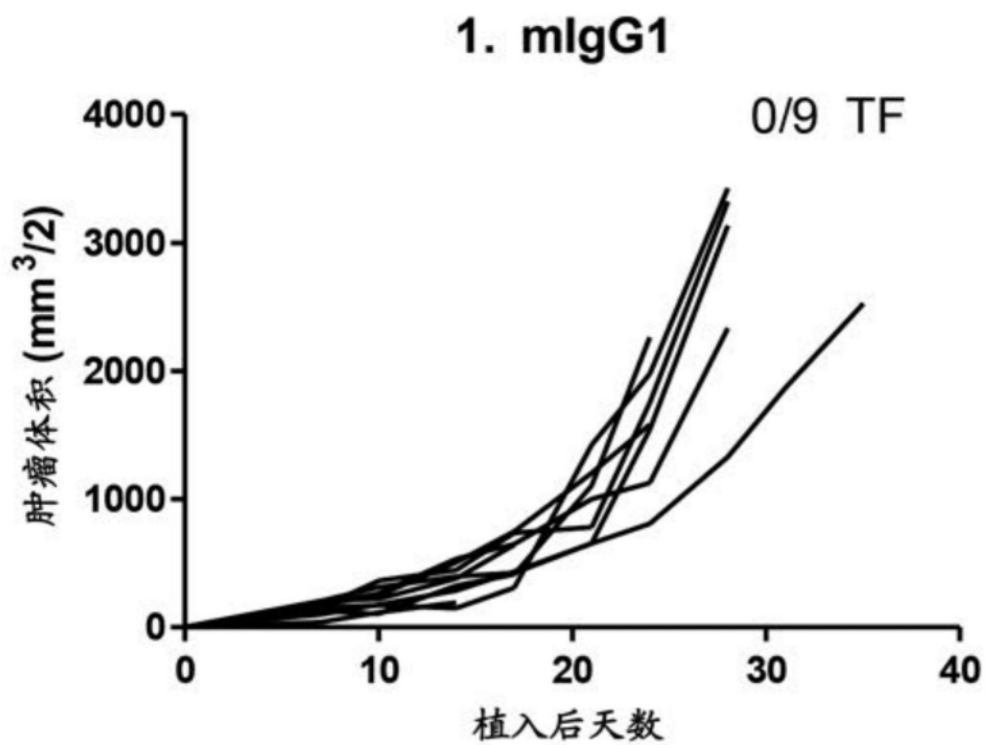


图48A

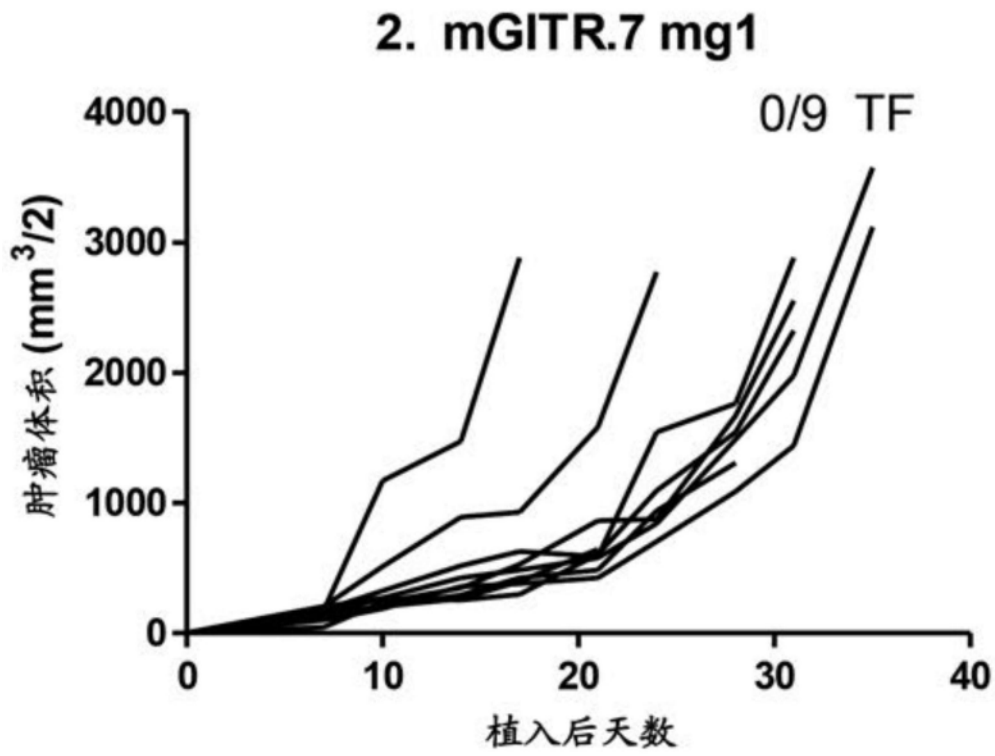


图48B

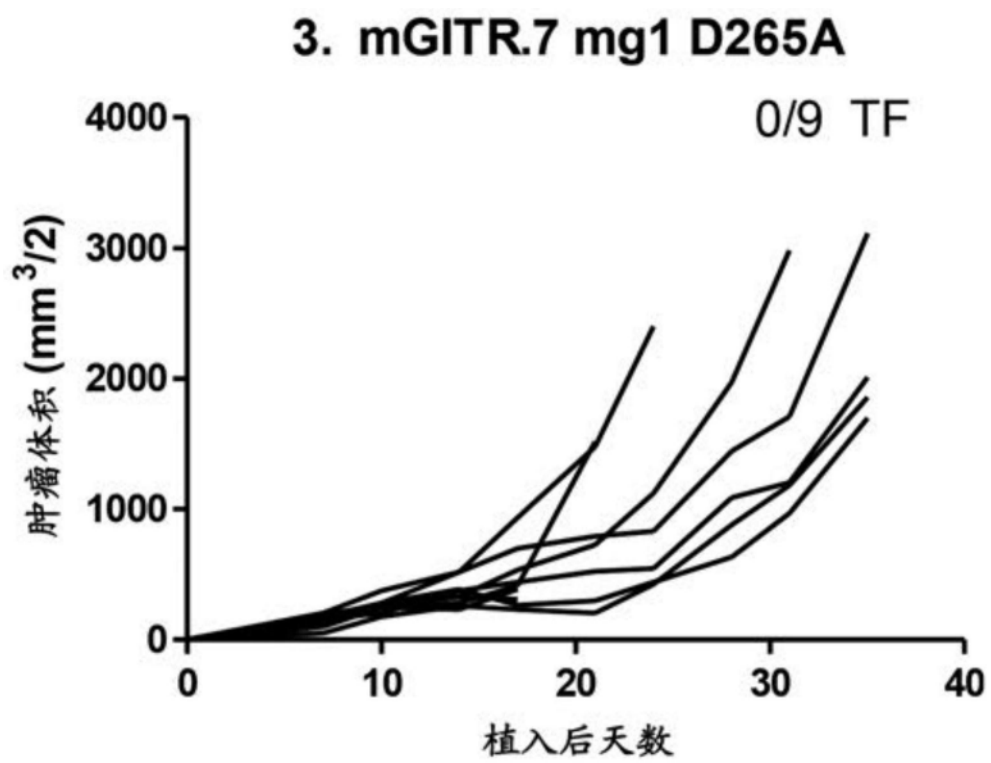


图48C

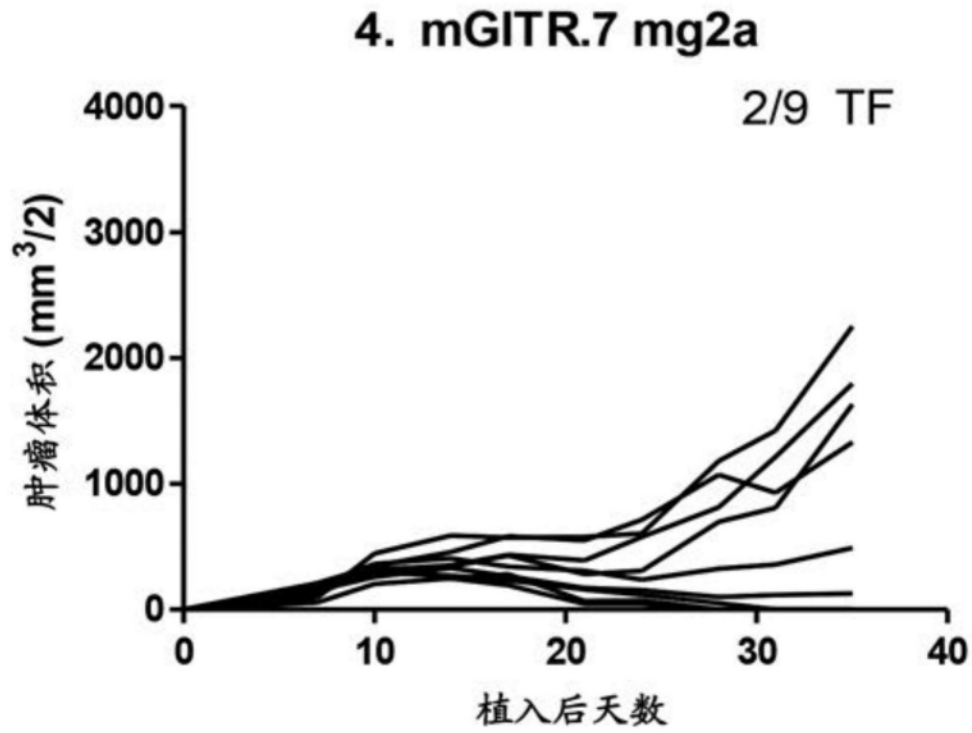


图48D

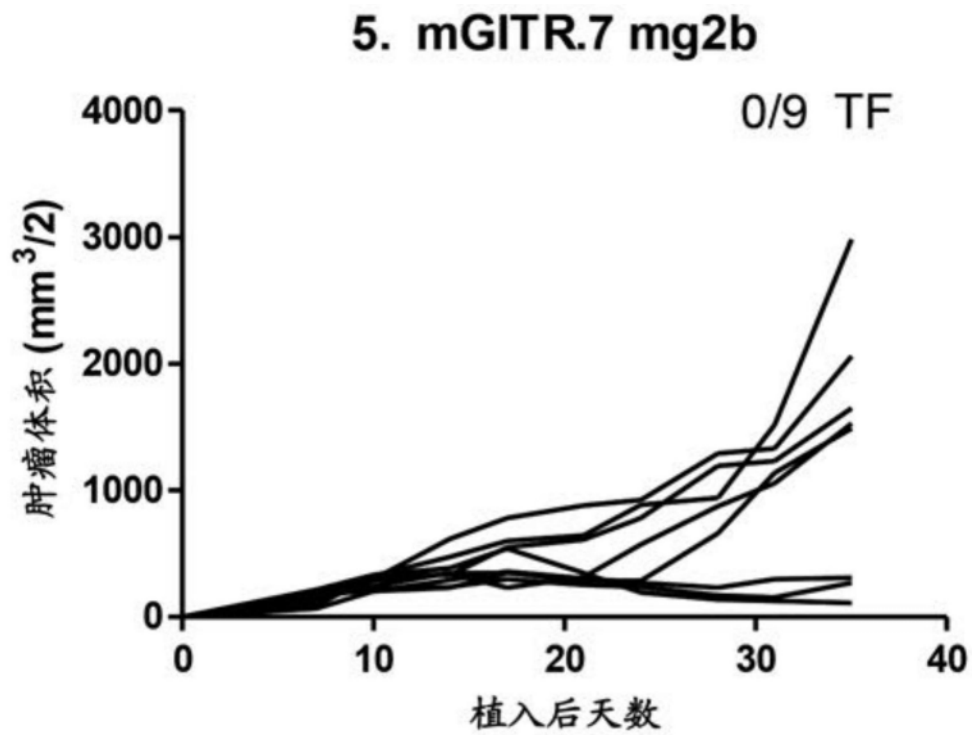


图48E



## 6. mGfTR.7 rg2b

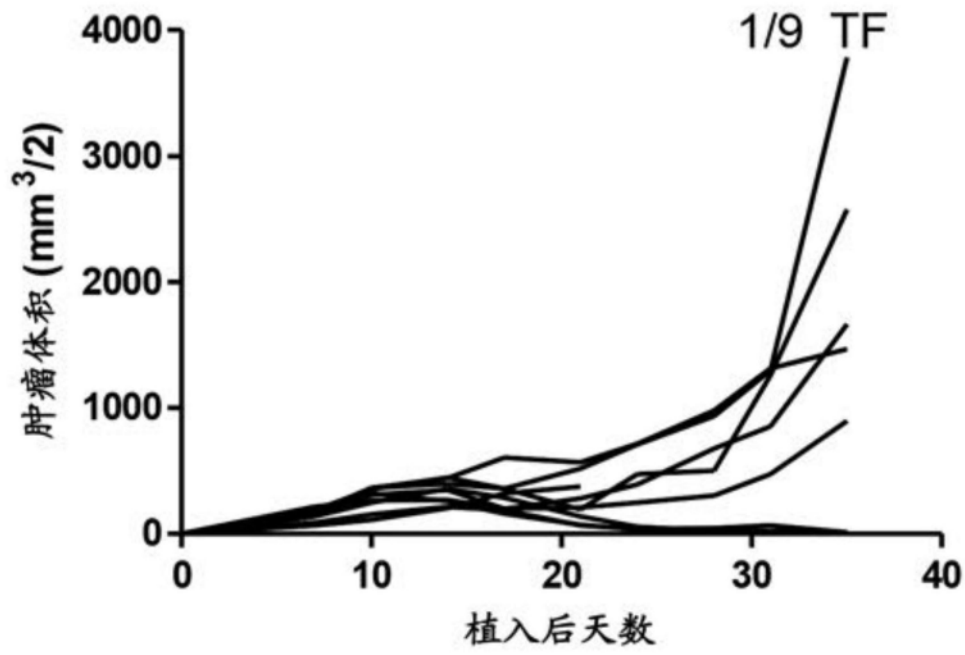


图48F

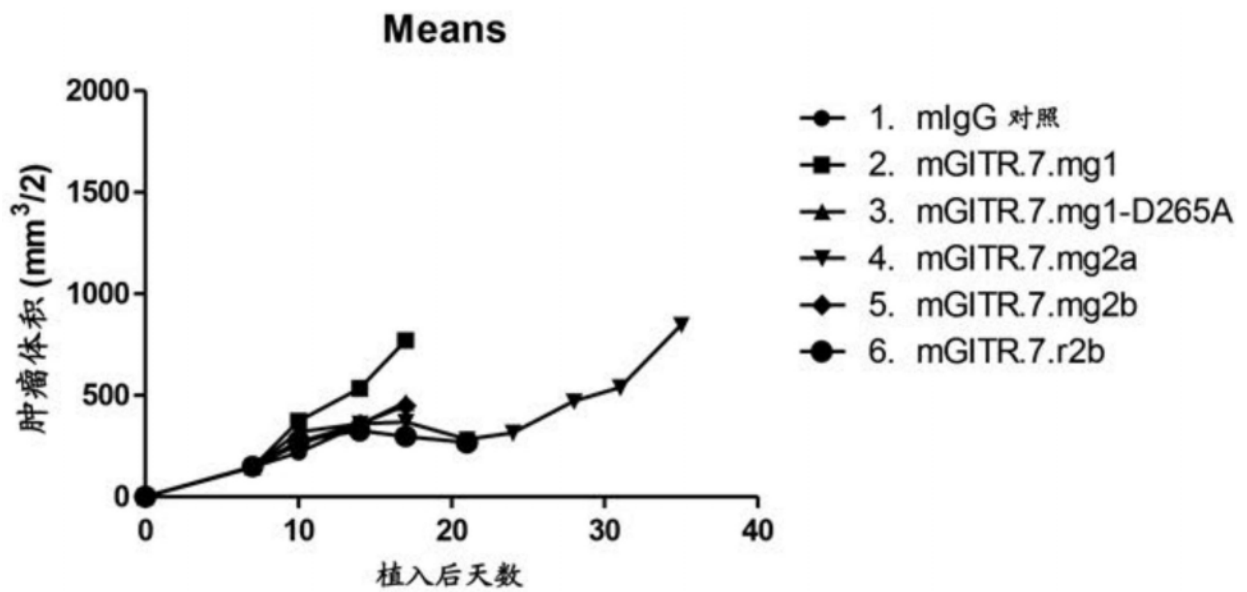


图49A

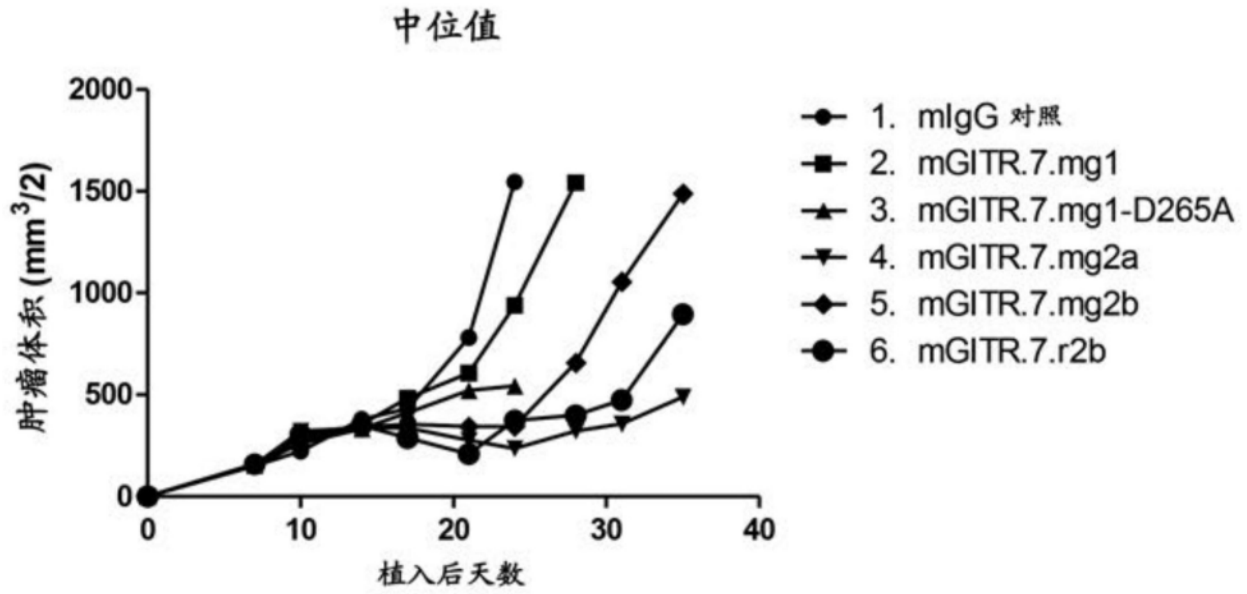


图49B

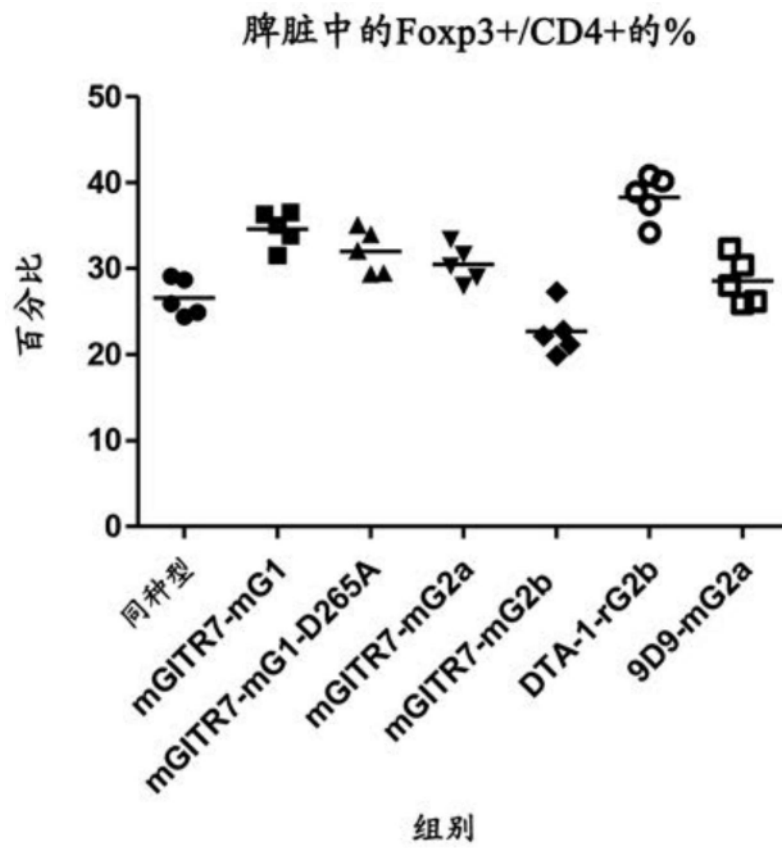


图50A

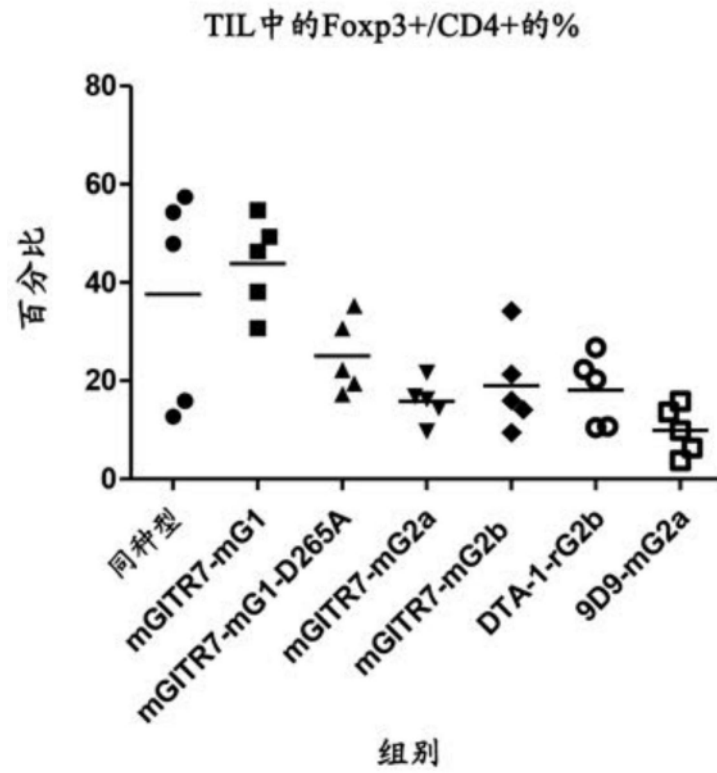


图50B

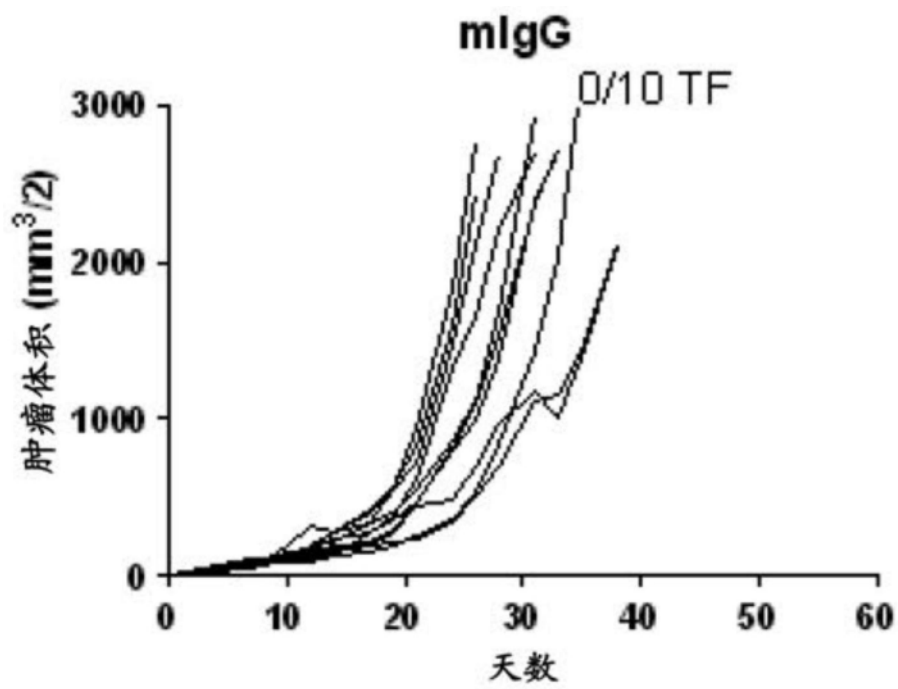


图51A

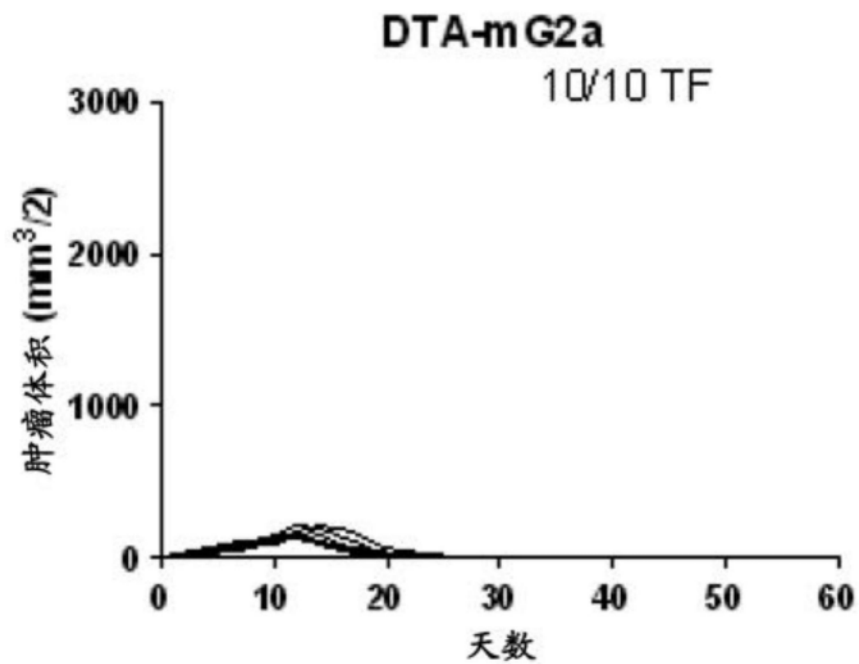


图51B

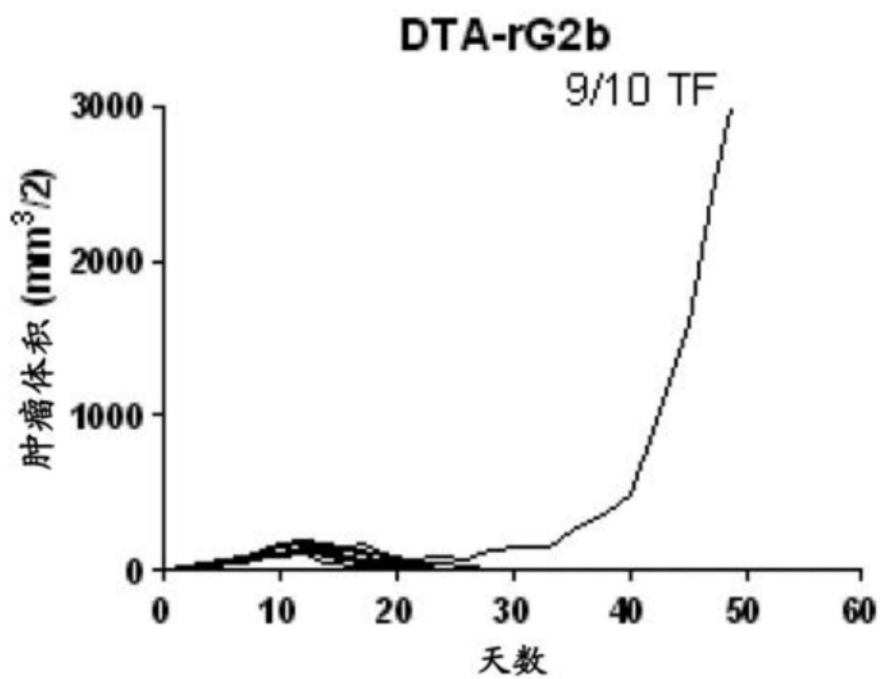


图51C

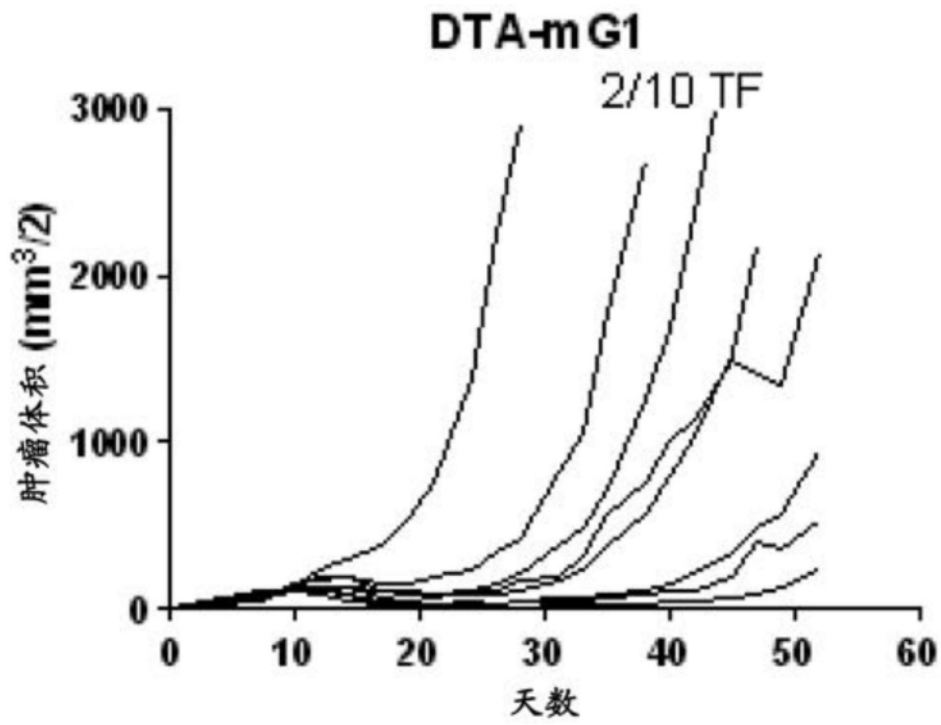


图51D

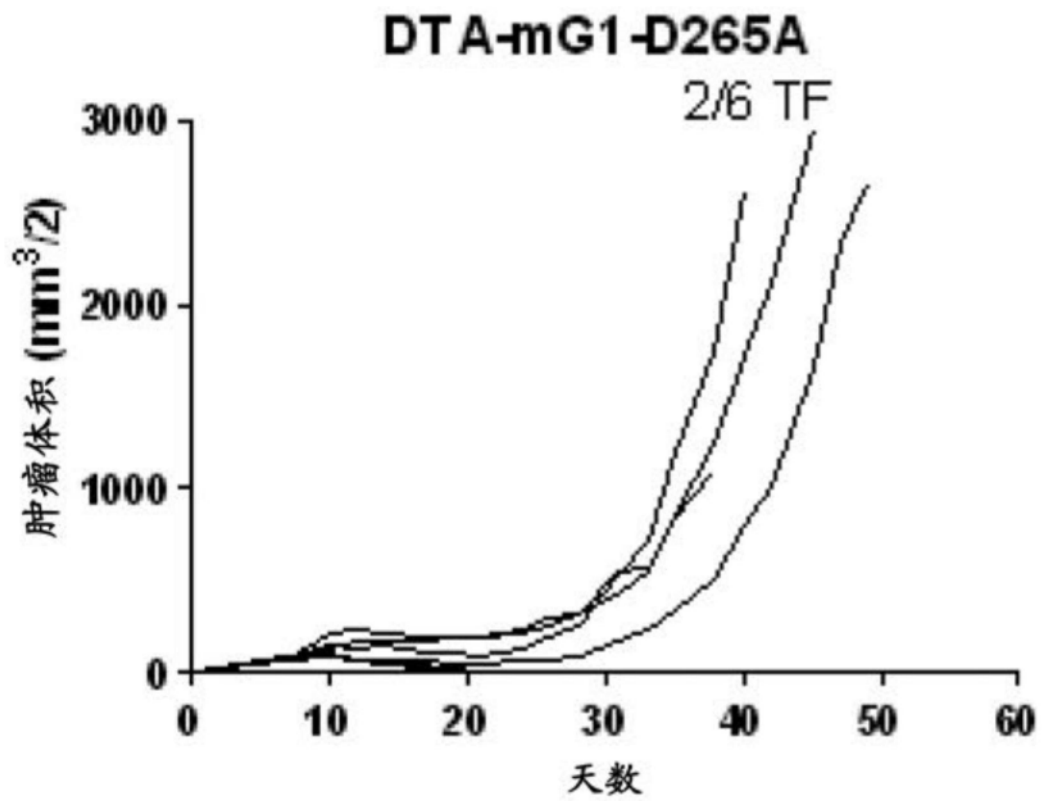


图51E

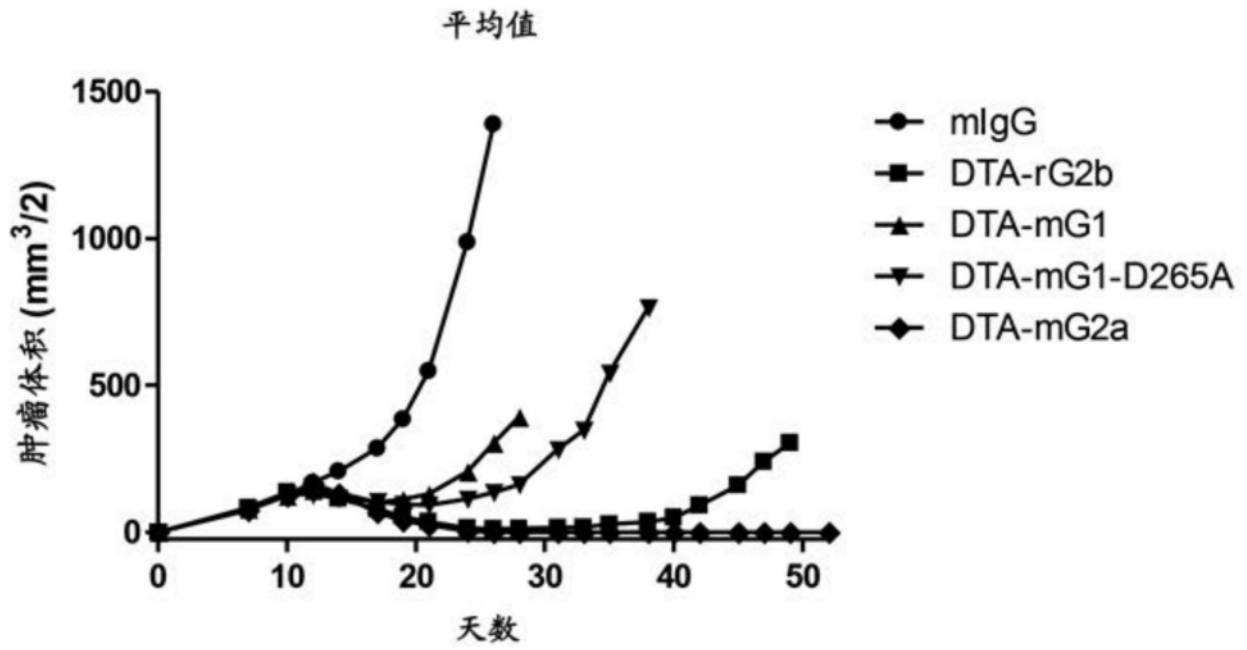


图52A

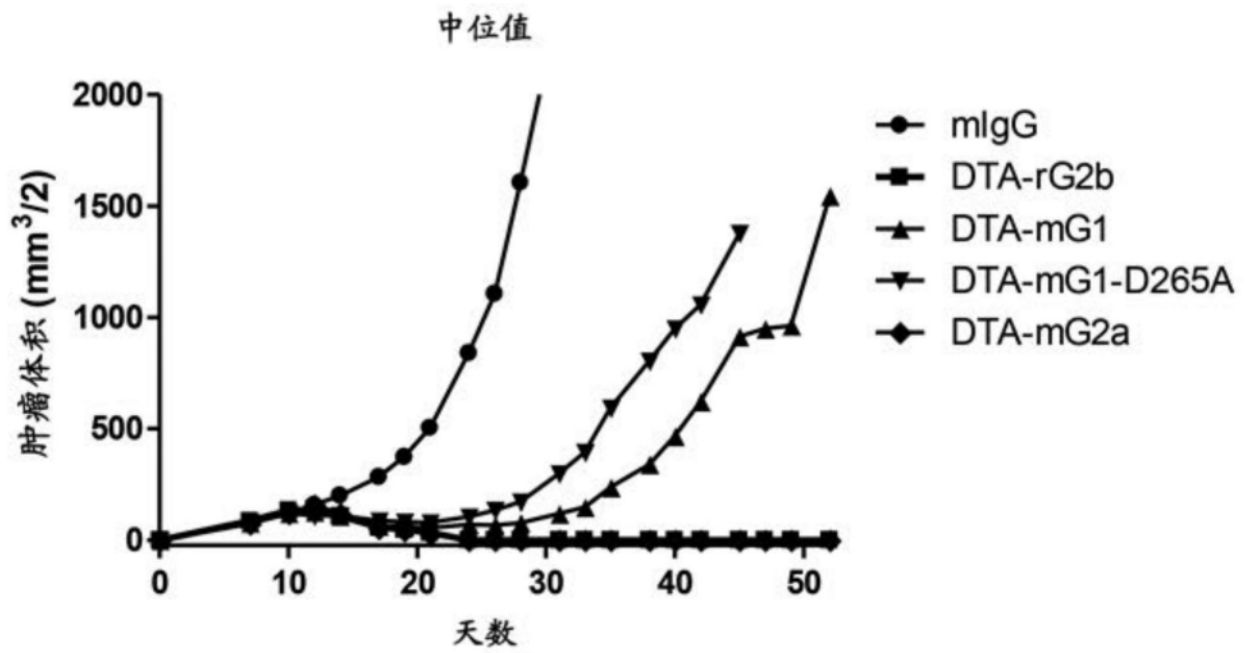


图52B

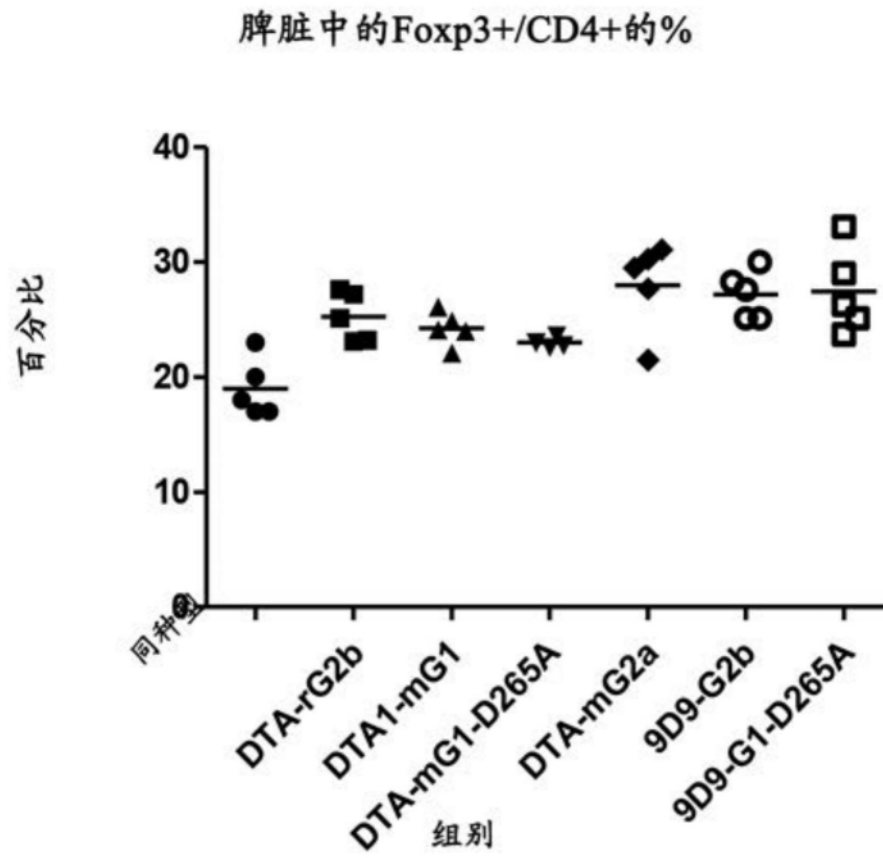


图53A

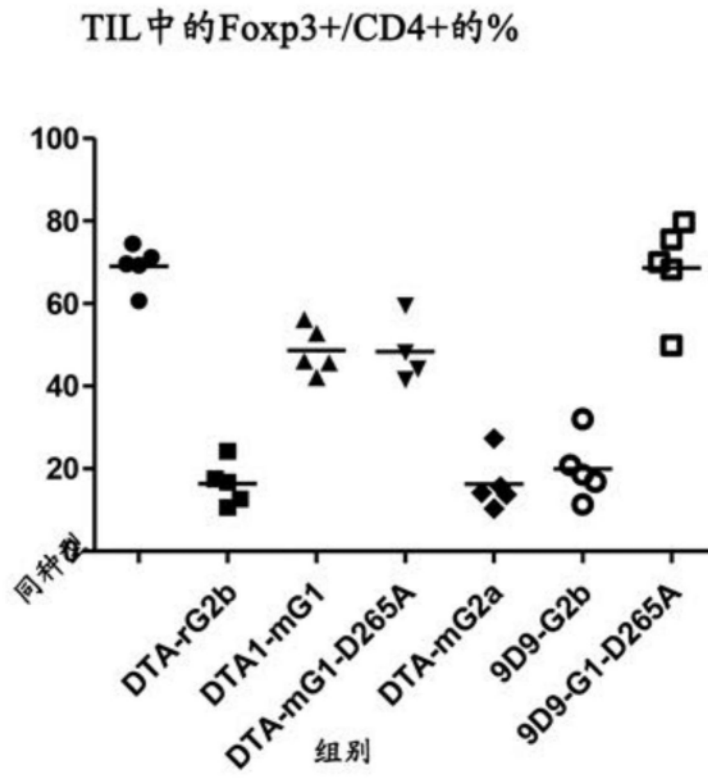


图53B

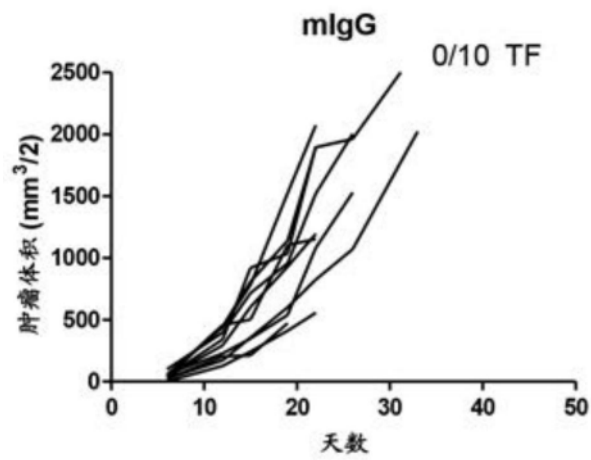


图54A



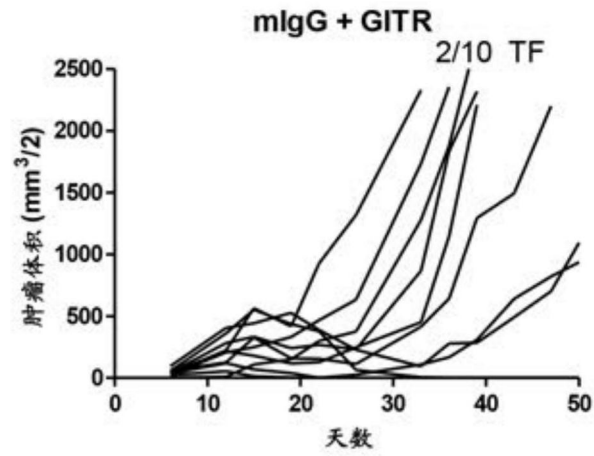


图54B

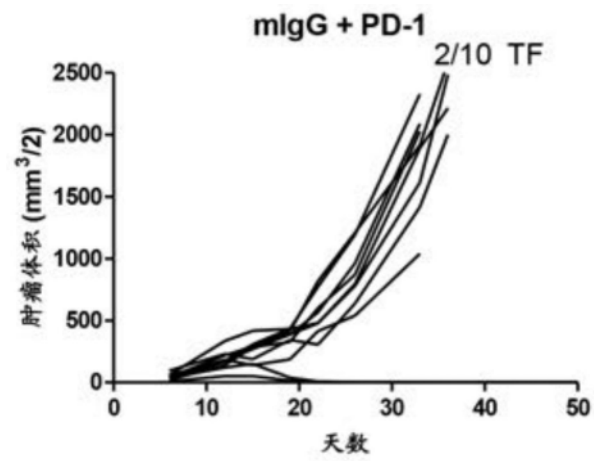


图54C

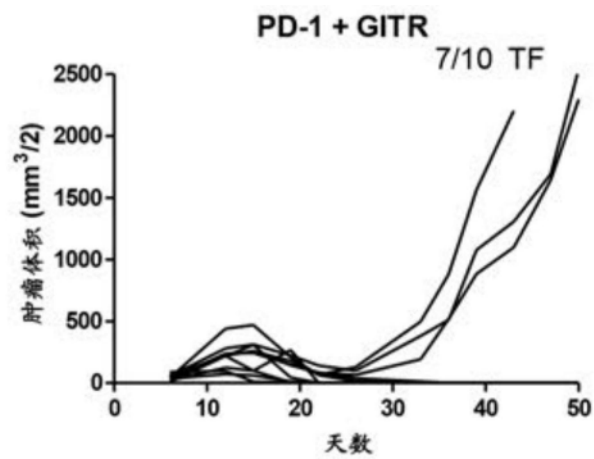


图54D

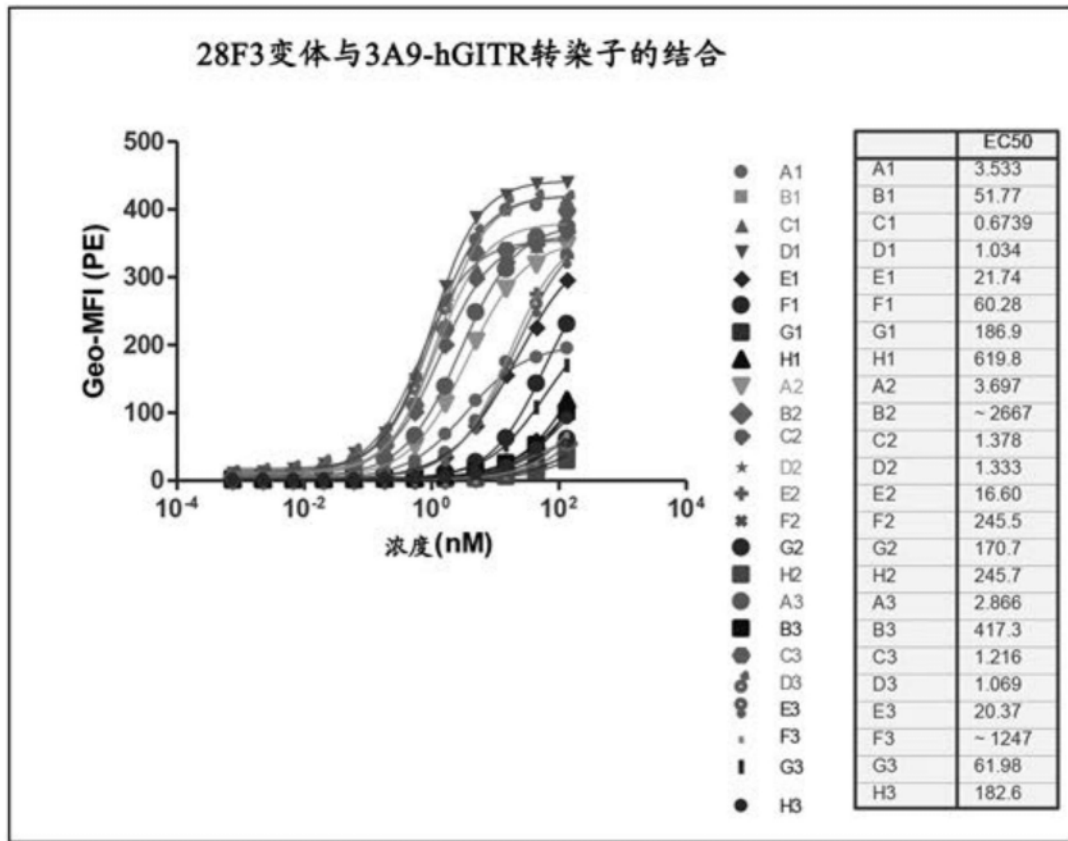


图55A

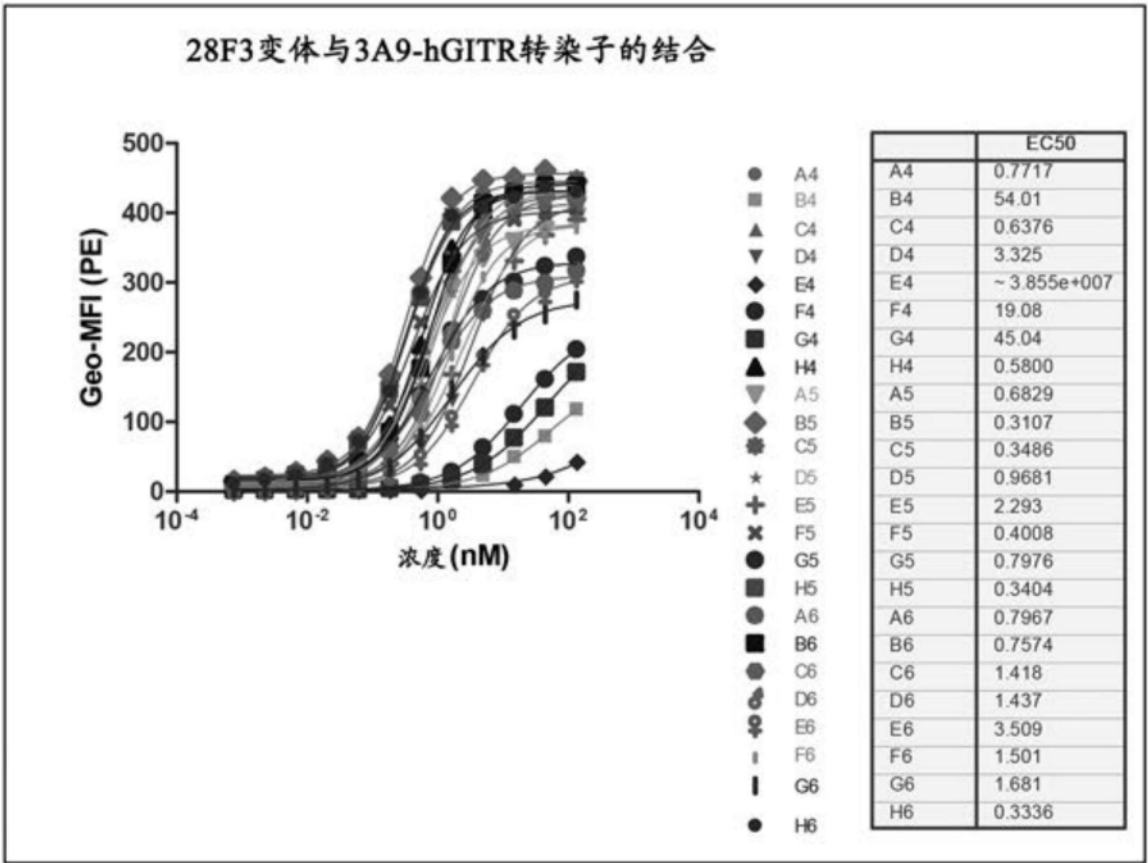


图55B

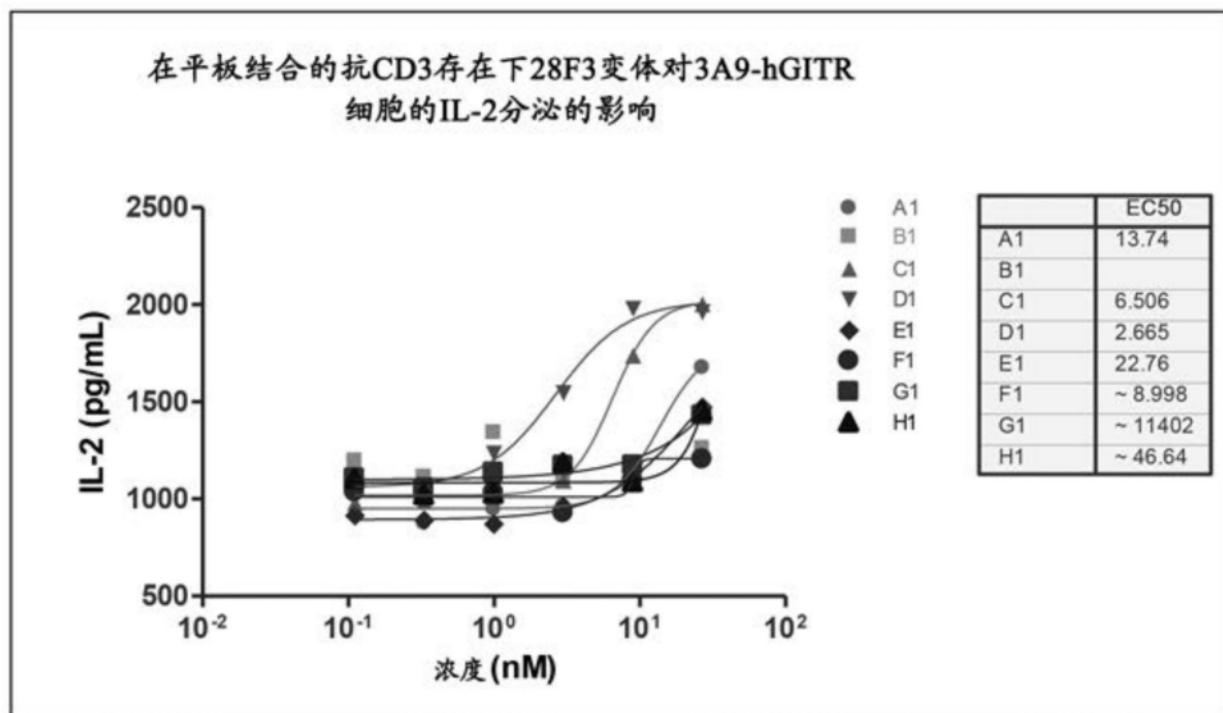


图56A

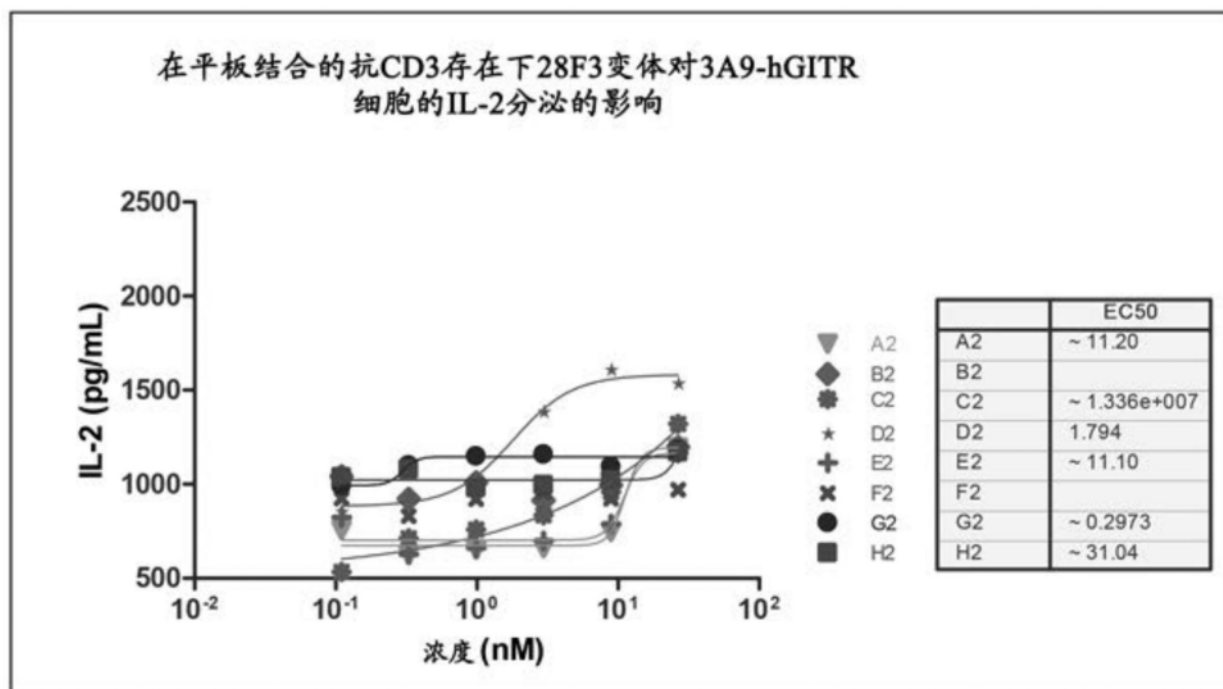


图56B

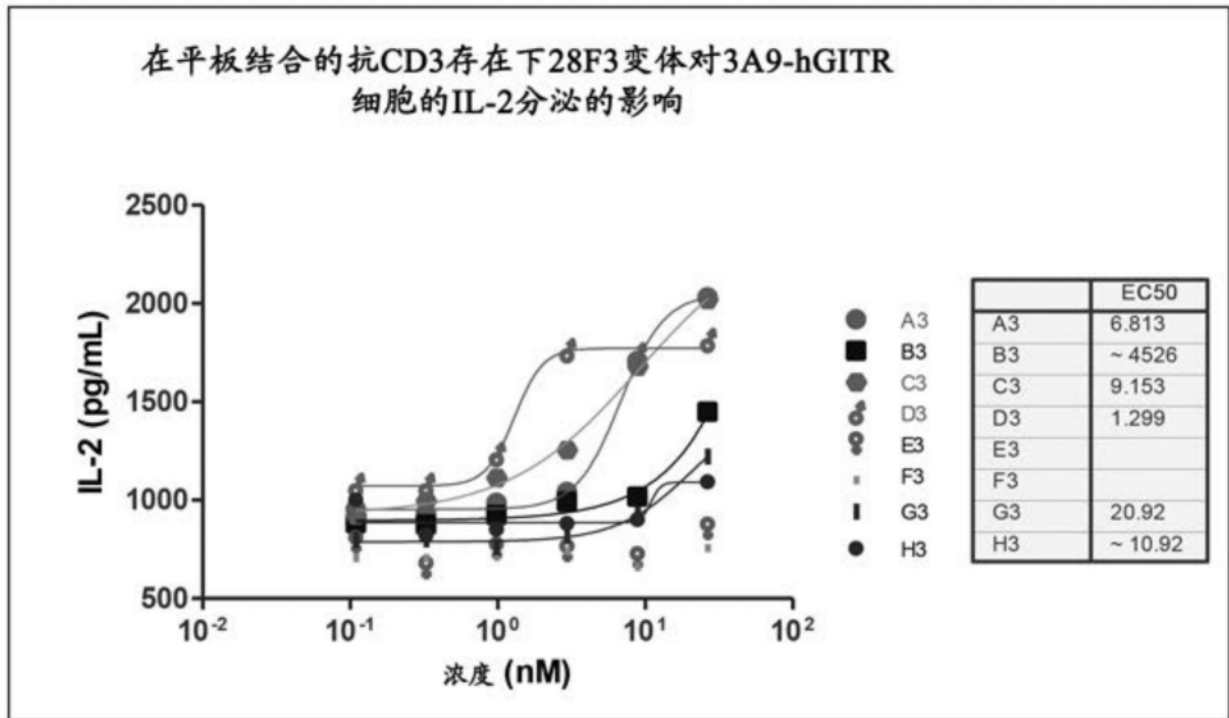


图56C

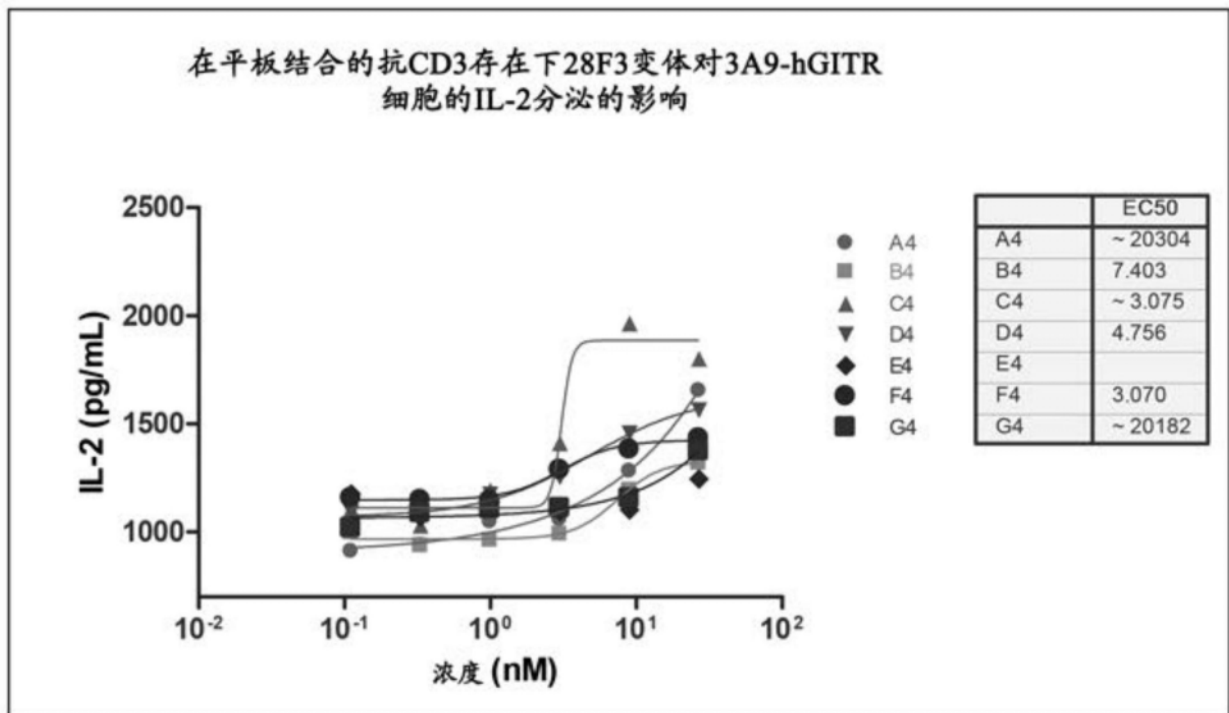


图56D

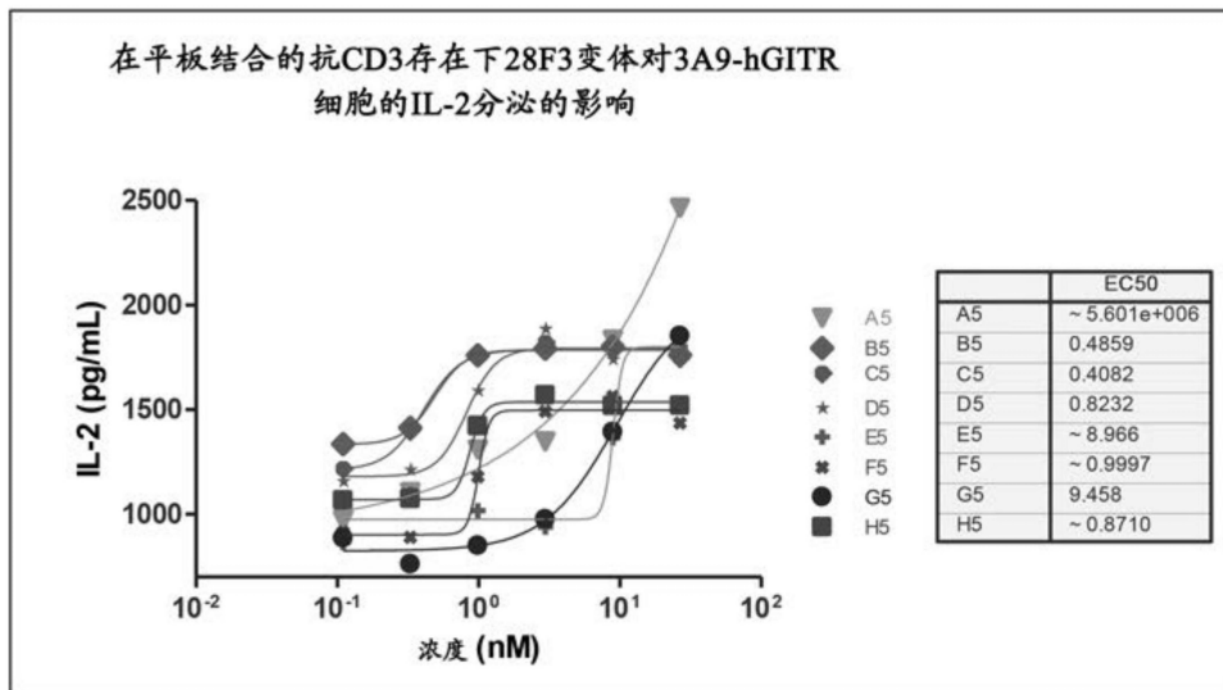


图56E

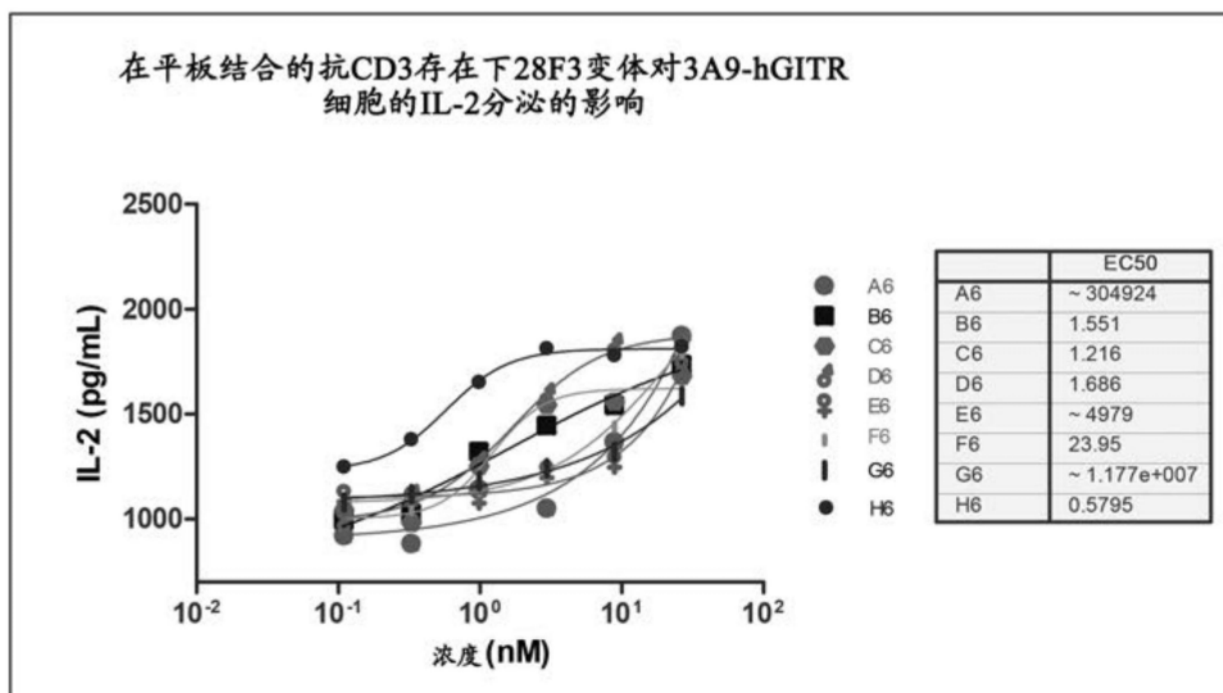
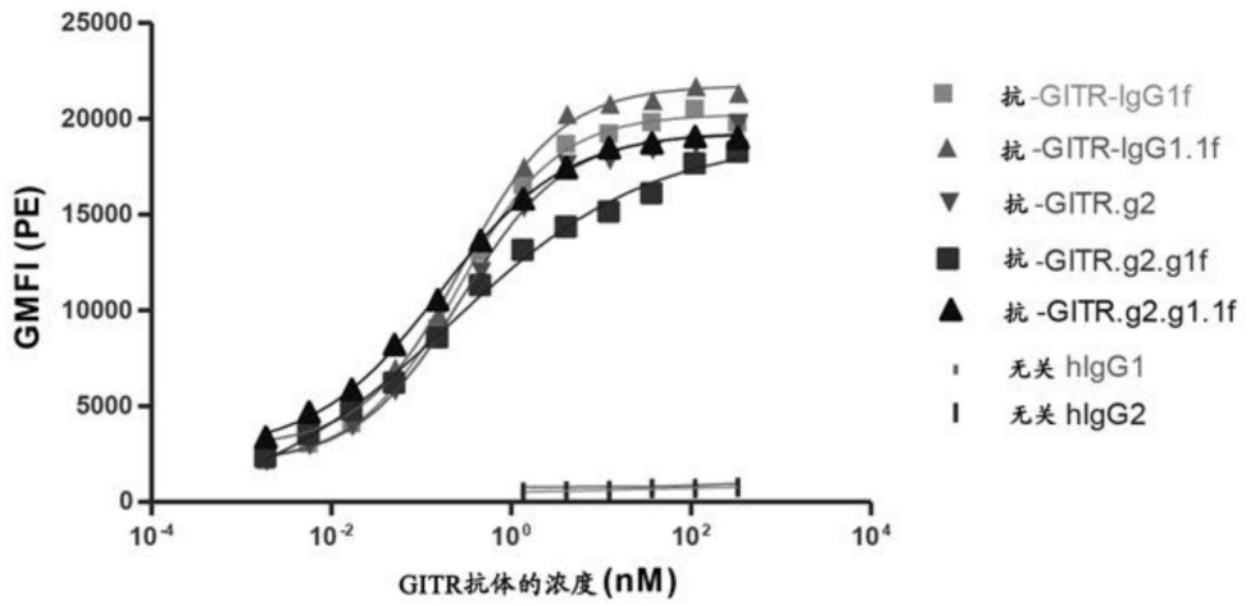


图56F



|                 | EC50   |
|-----------------|--------|
| 抗-GITR-IgG1f    | 0.2566 |
| 抗-GITR-IgG1.1f  | 0.2865 |
| 抗-GITR.g2       | 0.2773 |
| 抗-GITR.g2.g1f   | 0.2034 |
| 抗-GITR.g2.g1.1f | 0.1628 |
| 无关 hlgG1        | 131.8  |
| 无关 hlgG2        | 6.725  |

图57

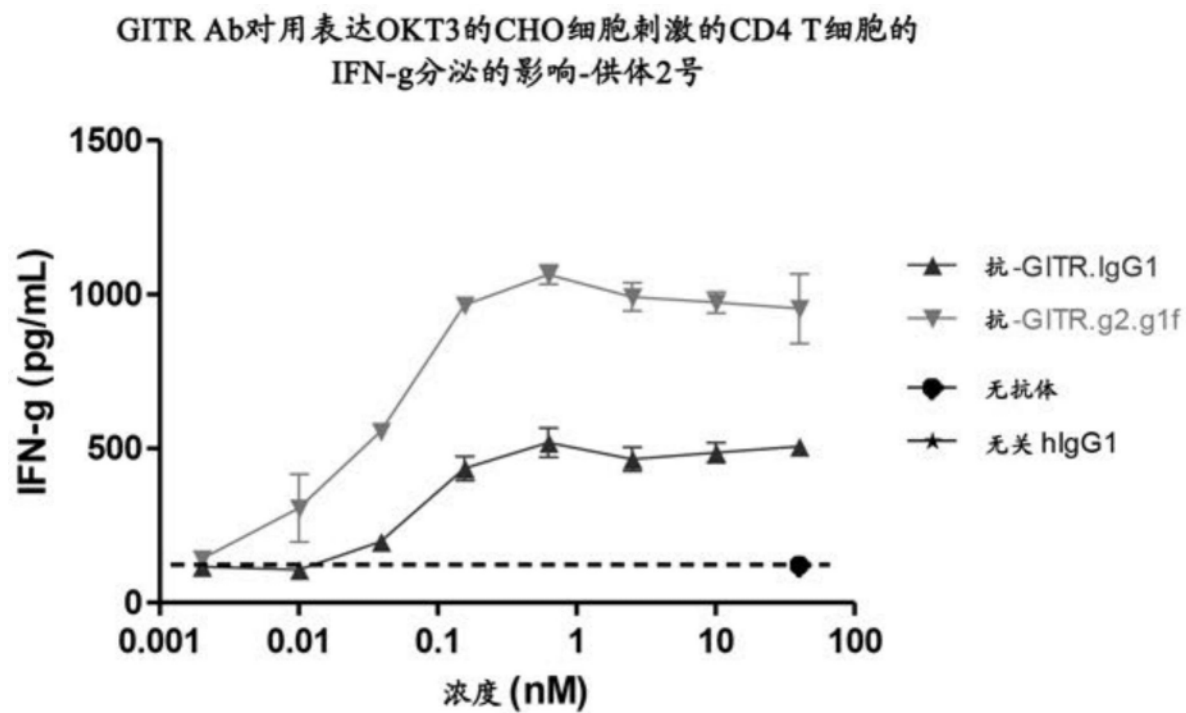


图58A

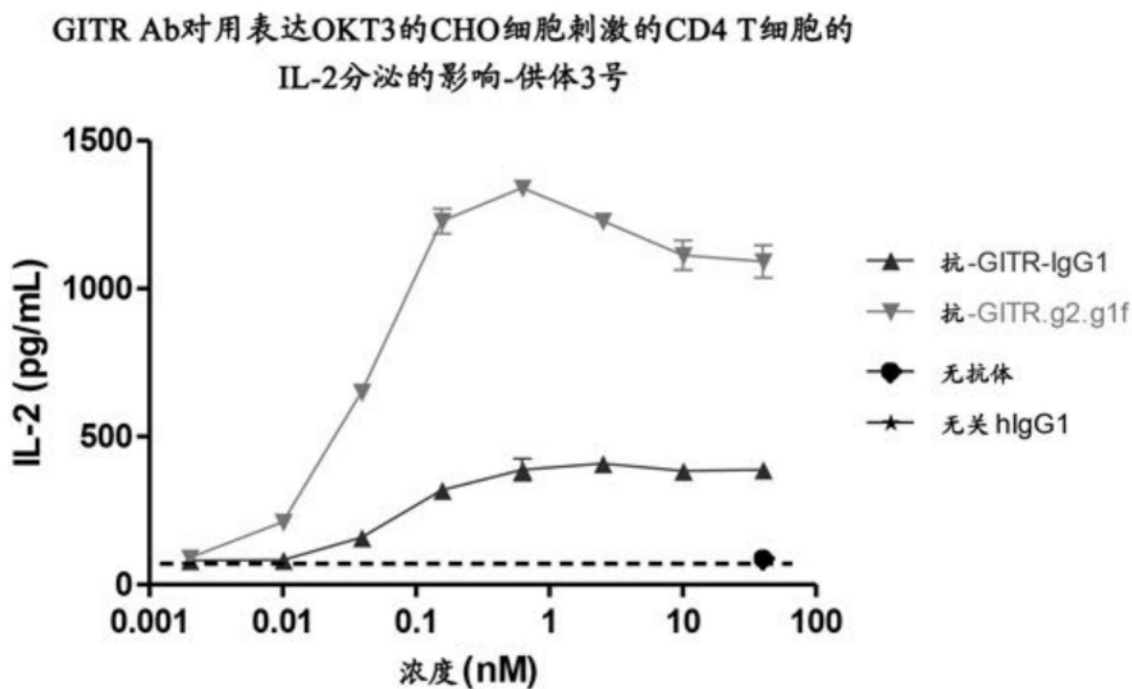


图58B



GITR Ab对用表达OKT3的CHO细胞刺激的CD4 T细胞的  
IL-2分泌的影响-供体3号

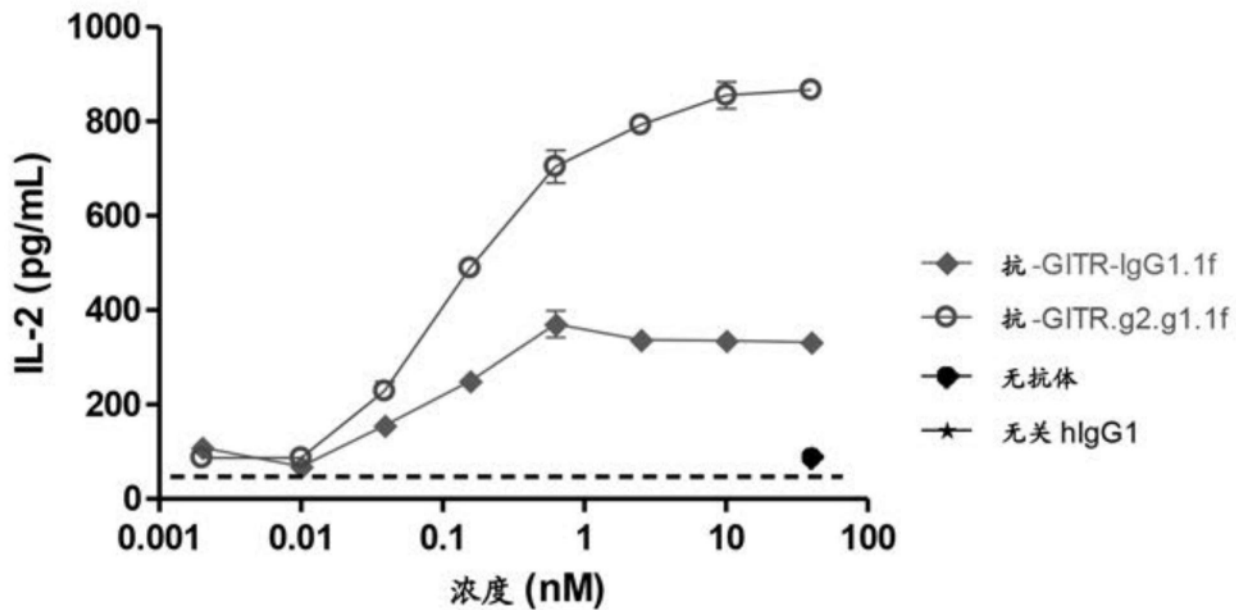


图58C

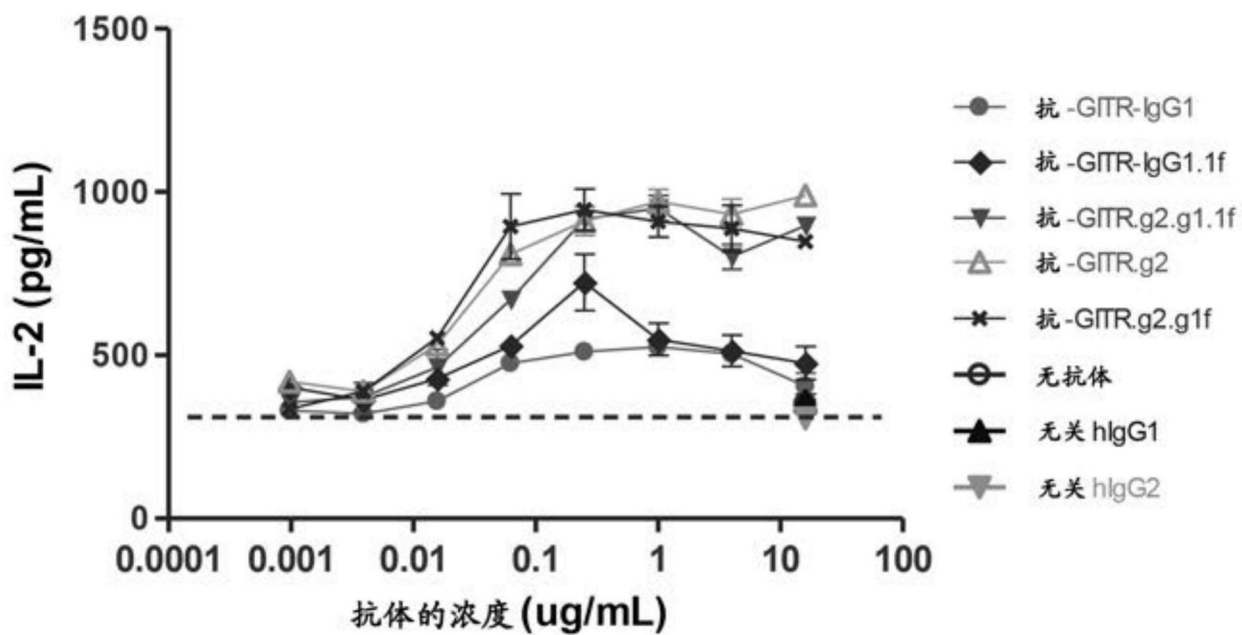


图59

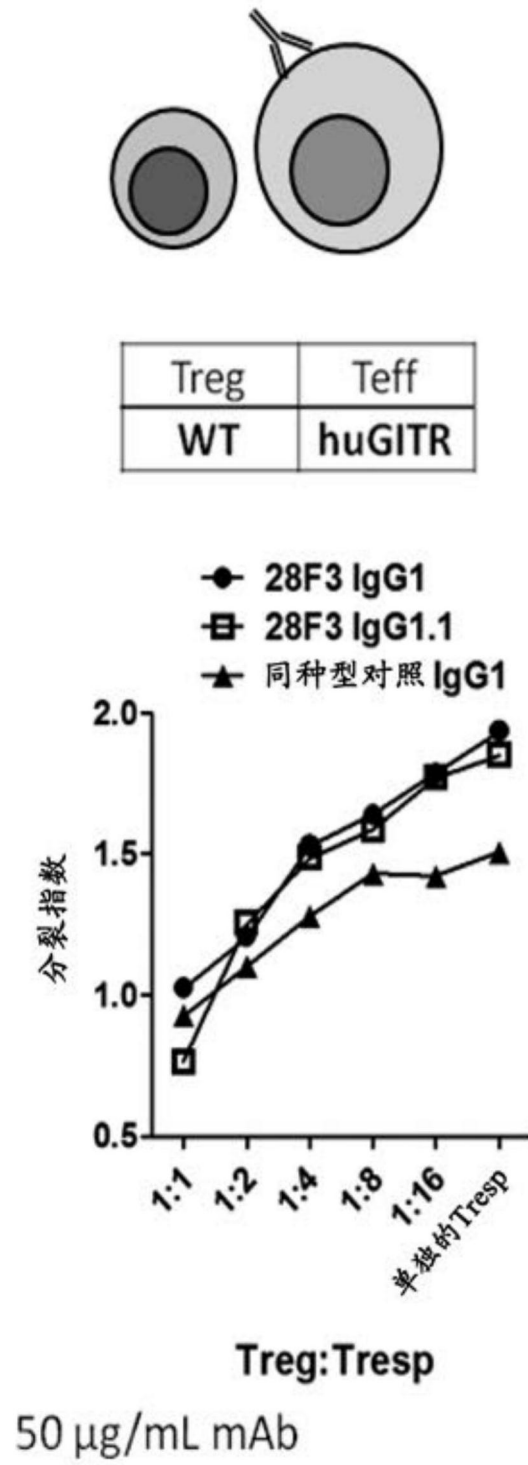


图60A

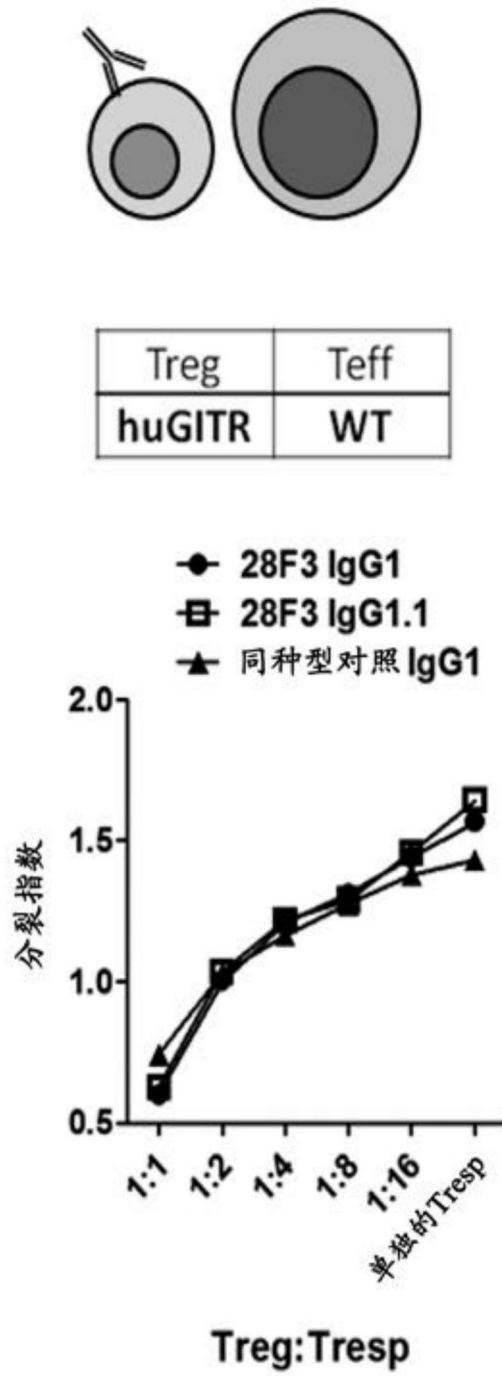


图60B

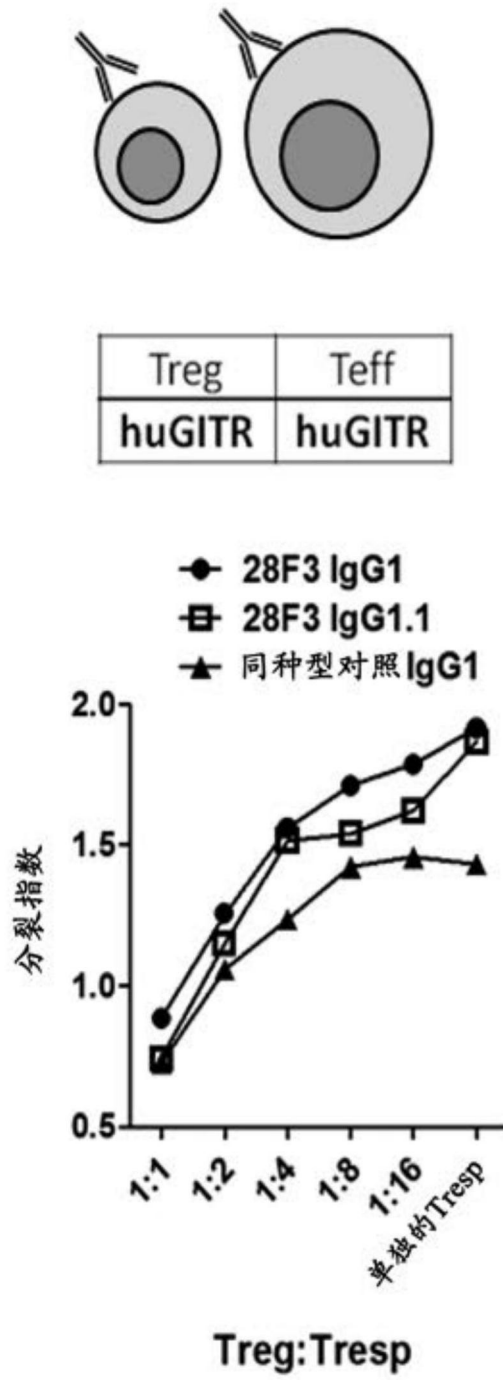


图60C

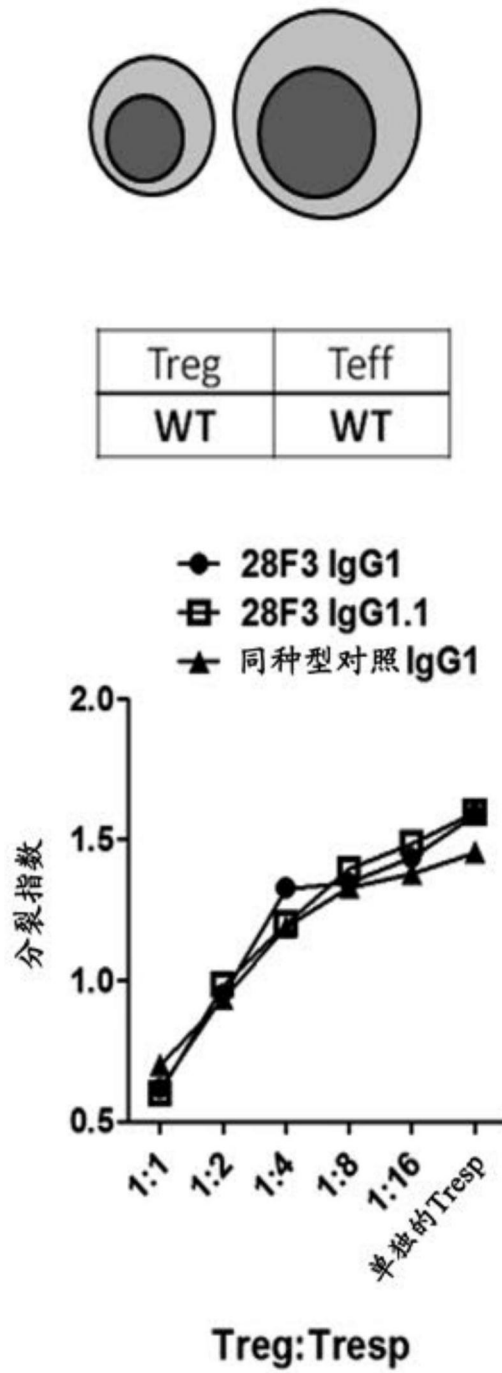


图60D

## 供体 1

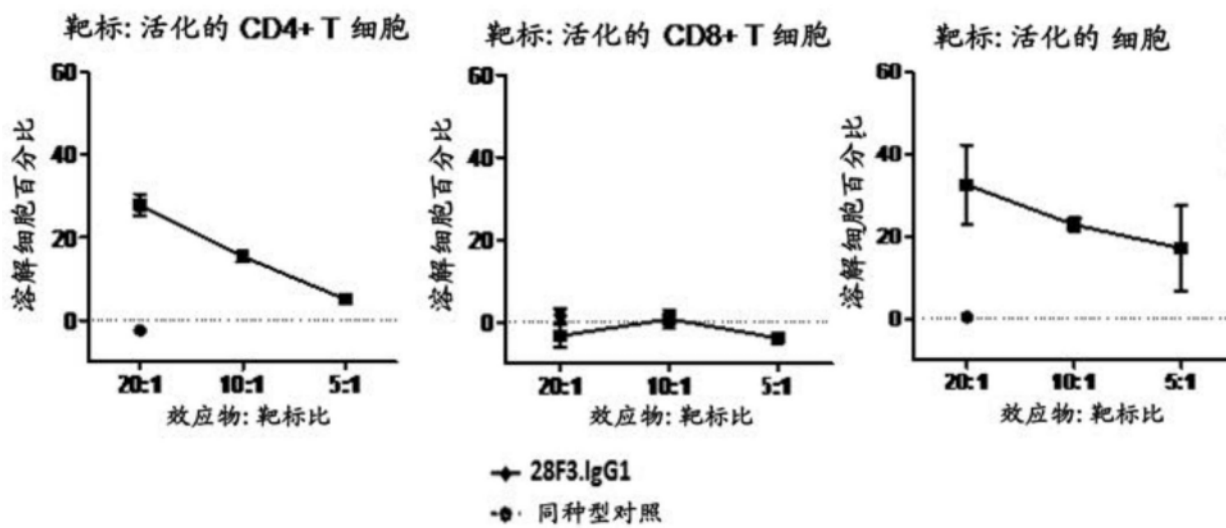


图 61A

图 61B

图 61C

## 供体 2

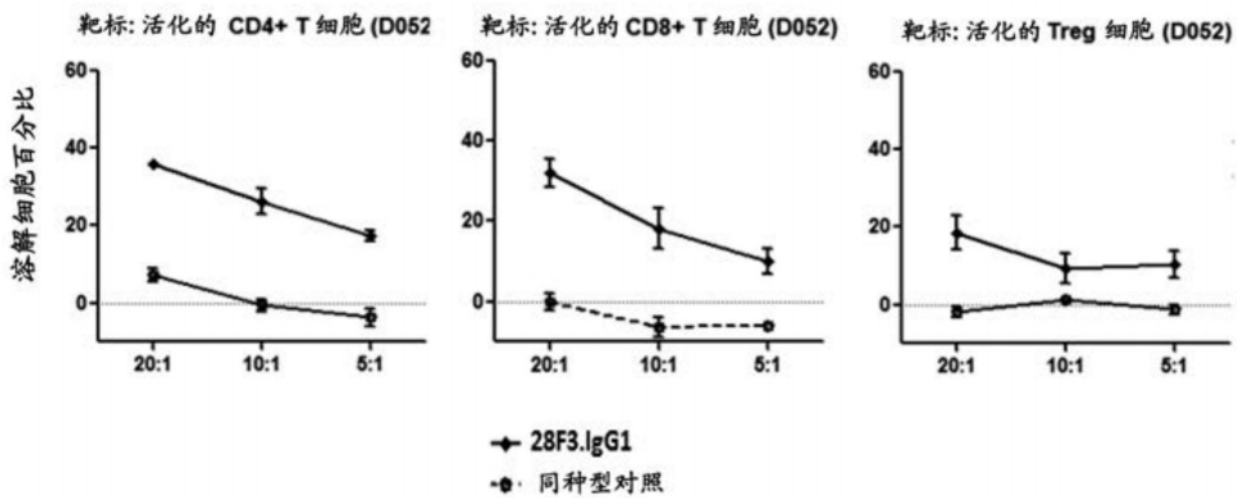


图 61D

图 61E

图 61F

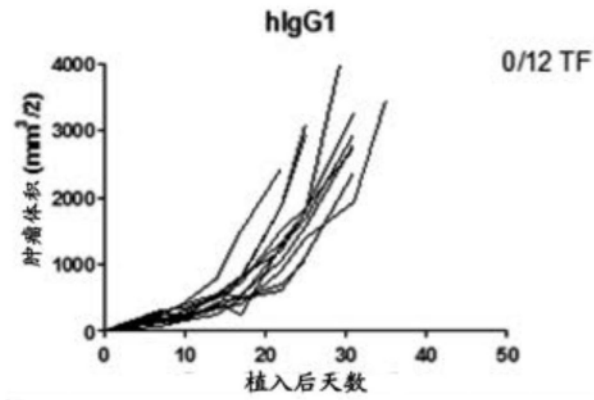


图62A

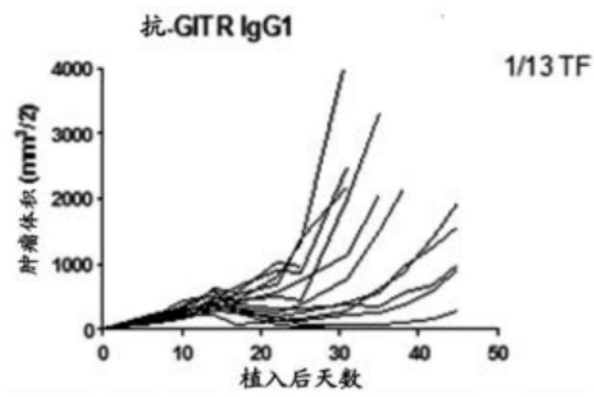


图62B

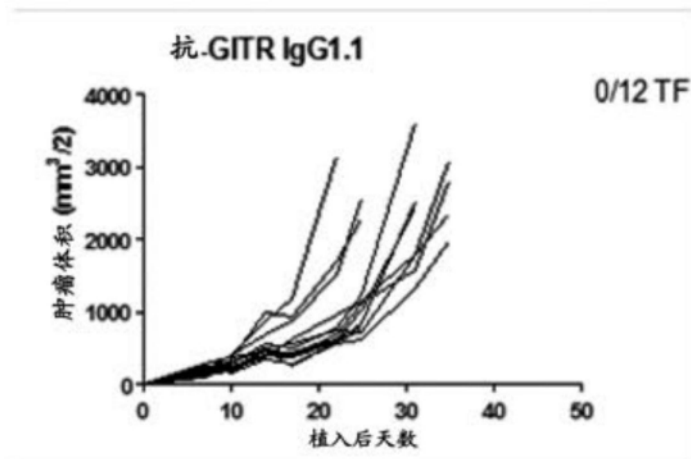


图62C

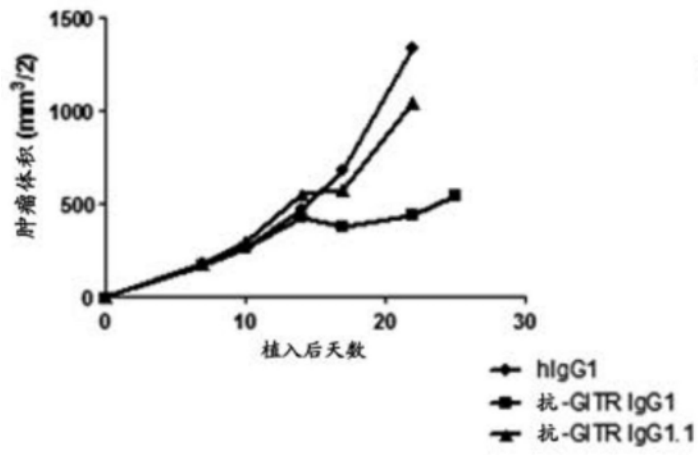


图 63A

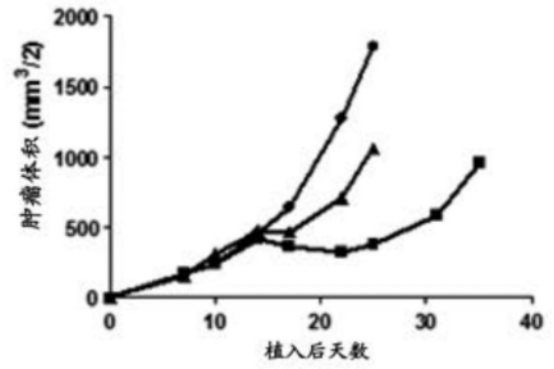


图 63B

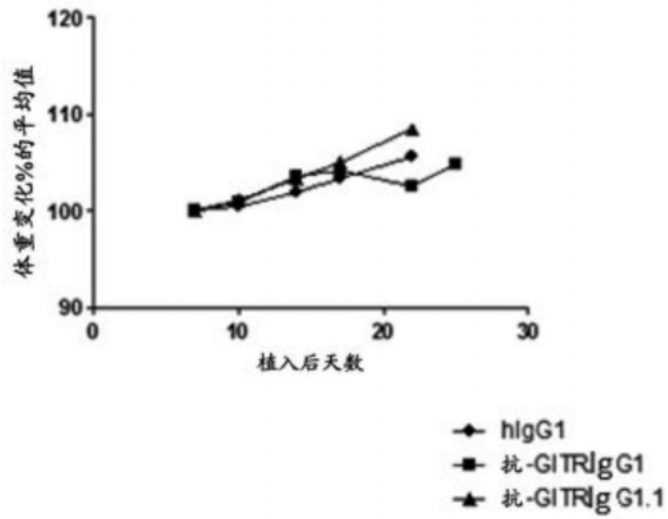


图 64A

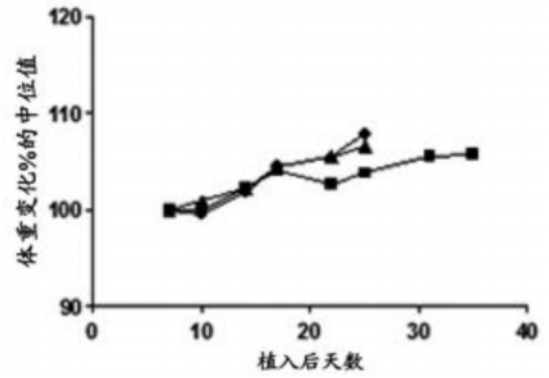


图 64B



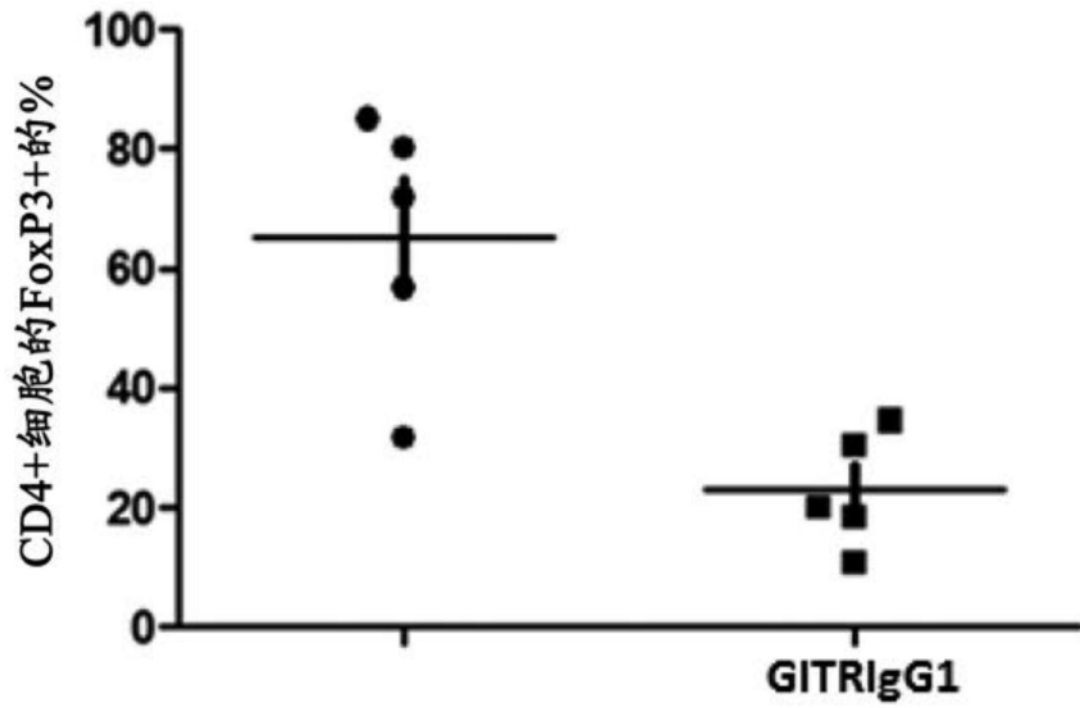


图65

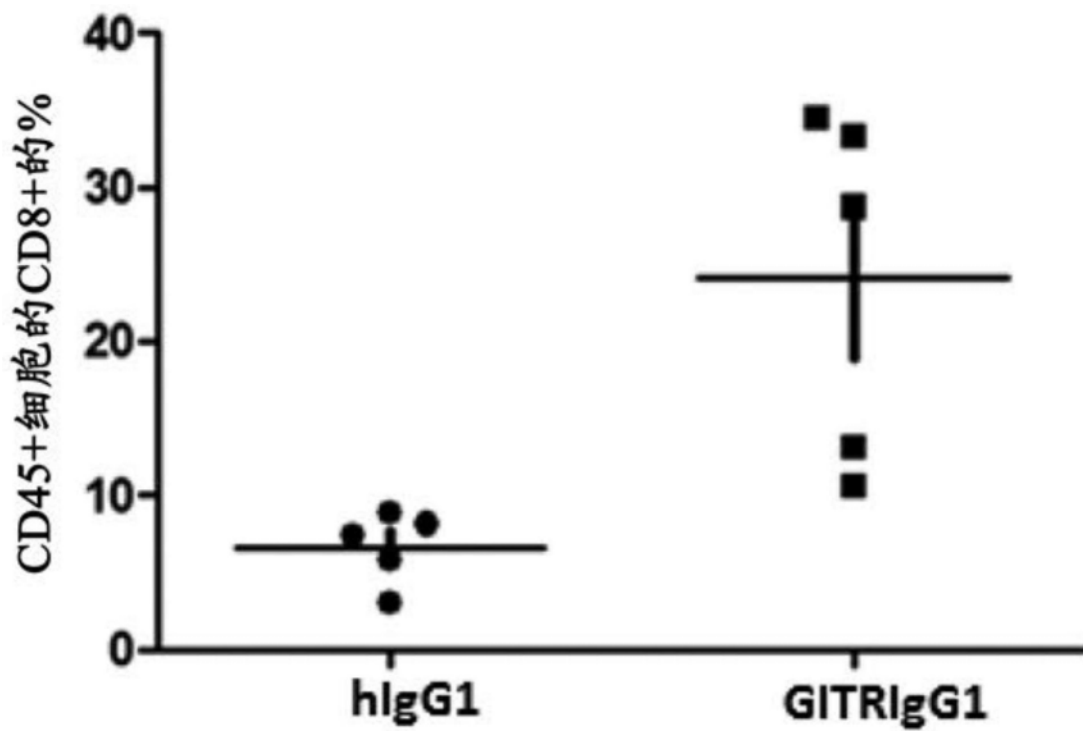
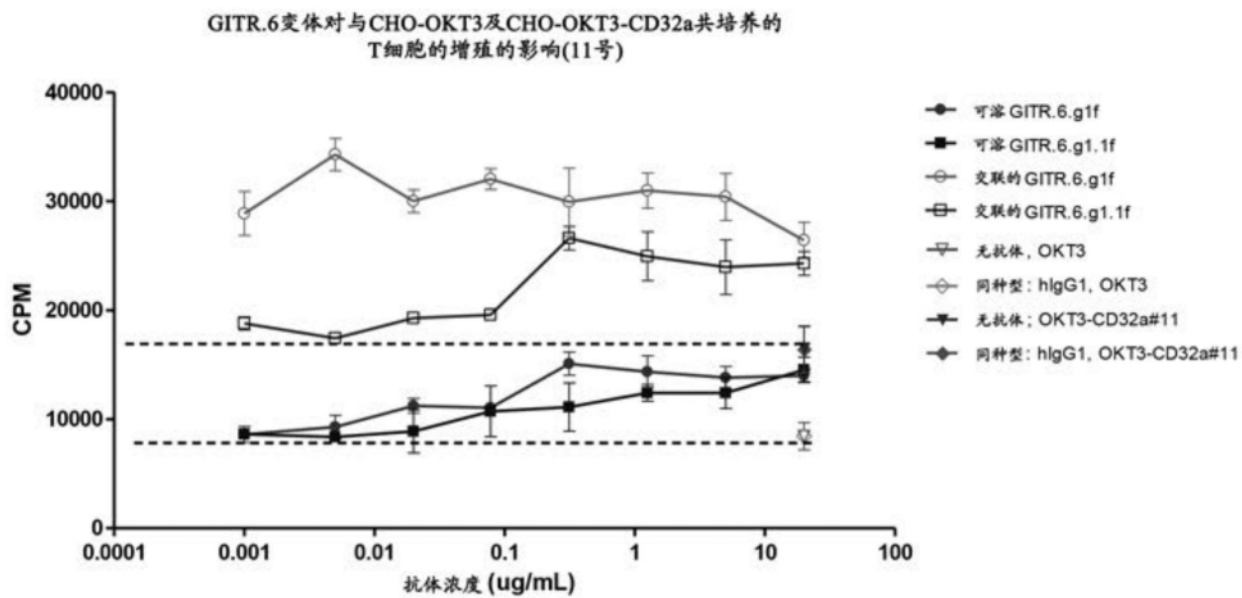
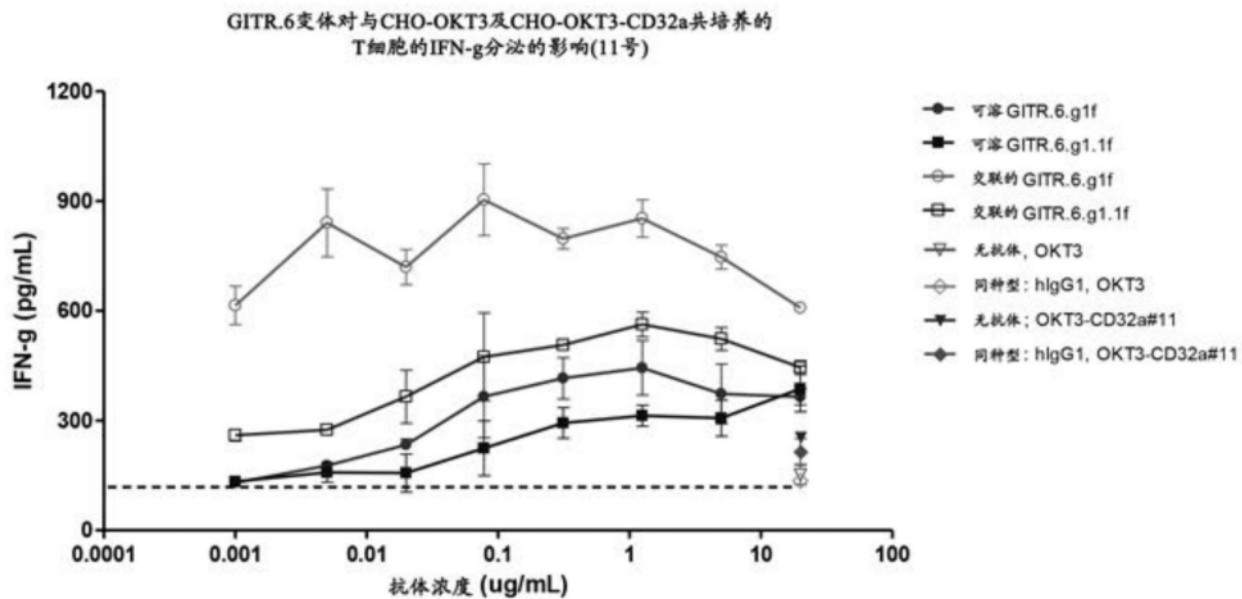


图66



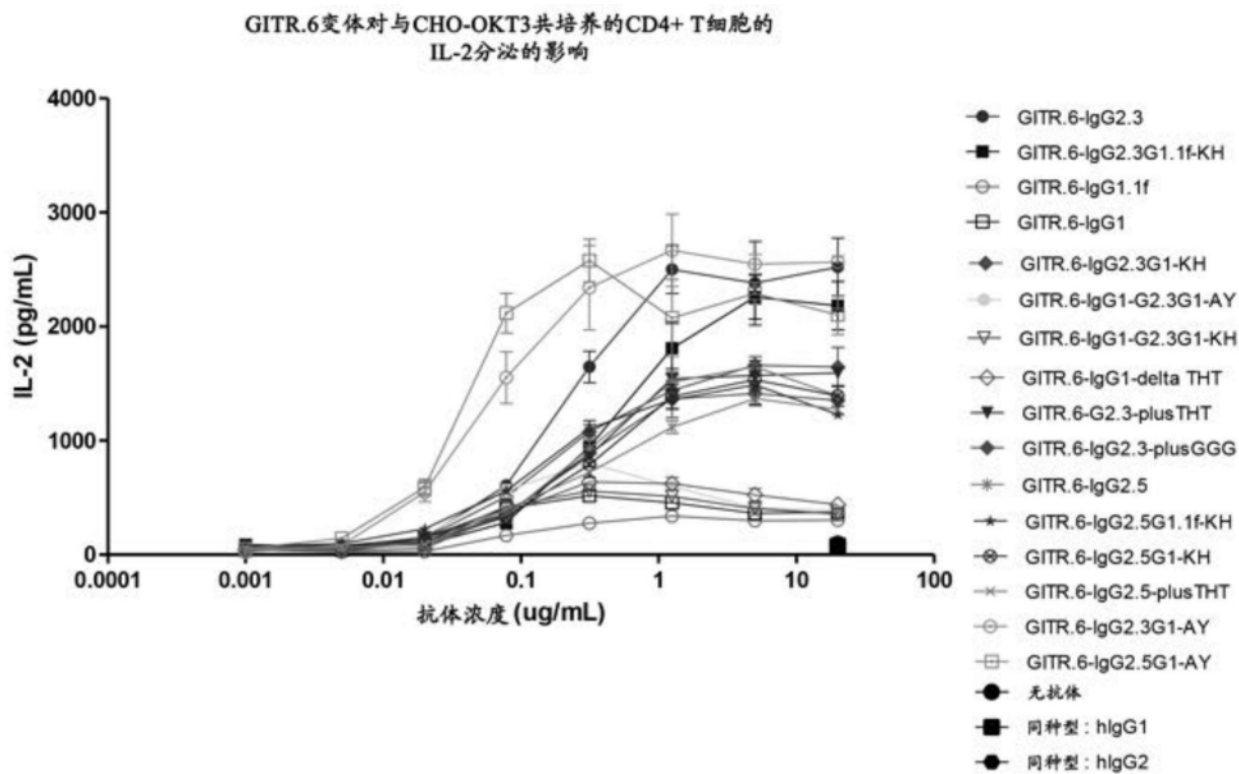


图69

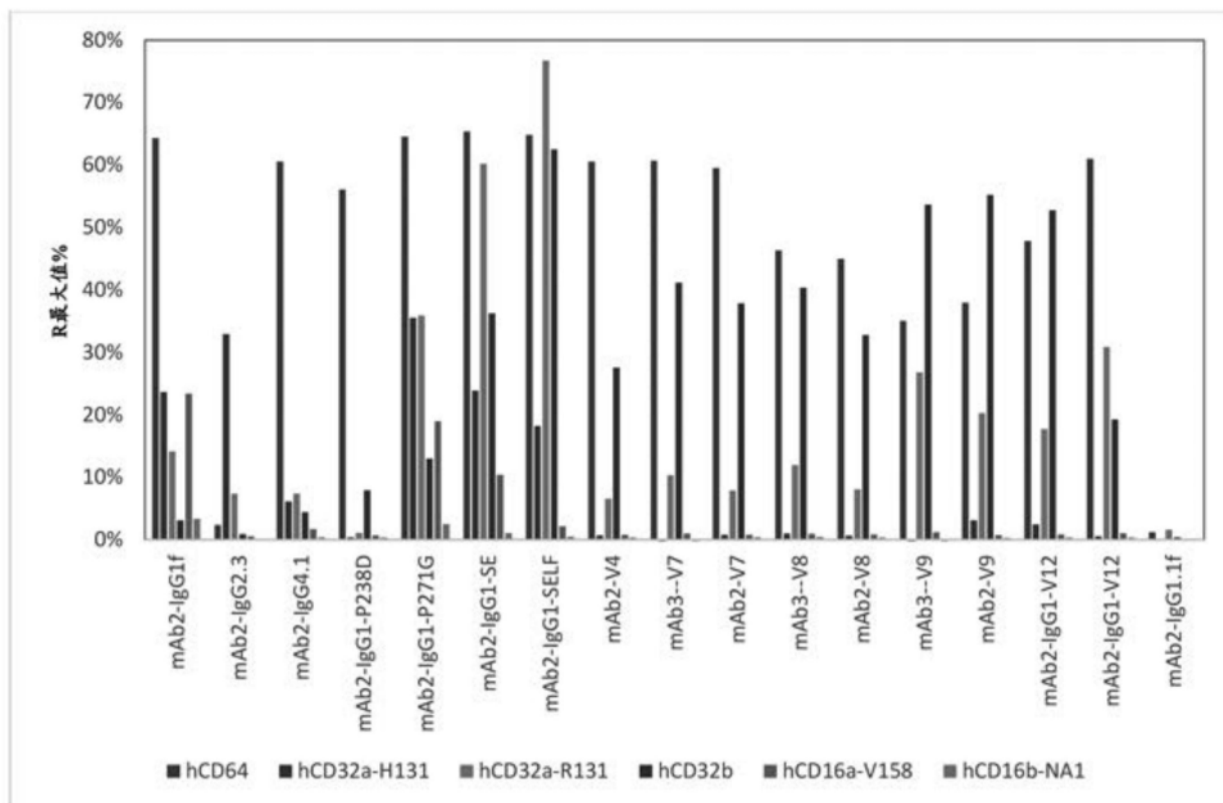


图70

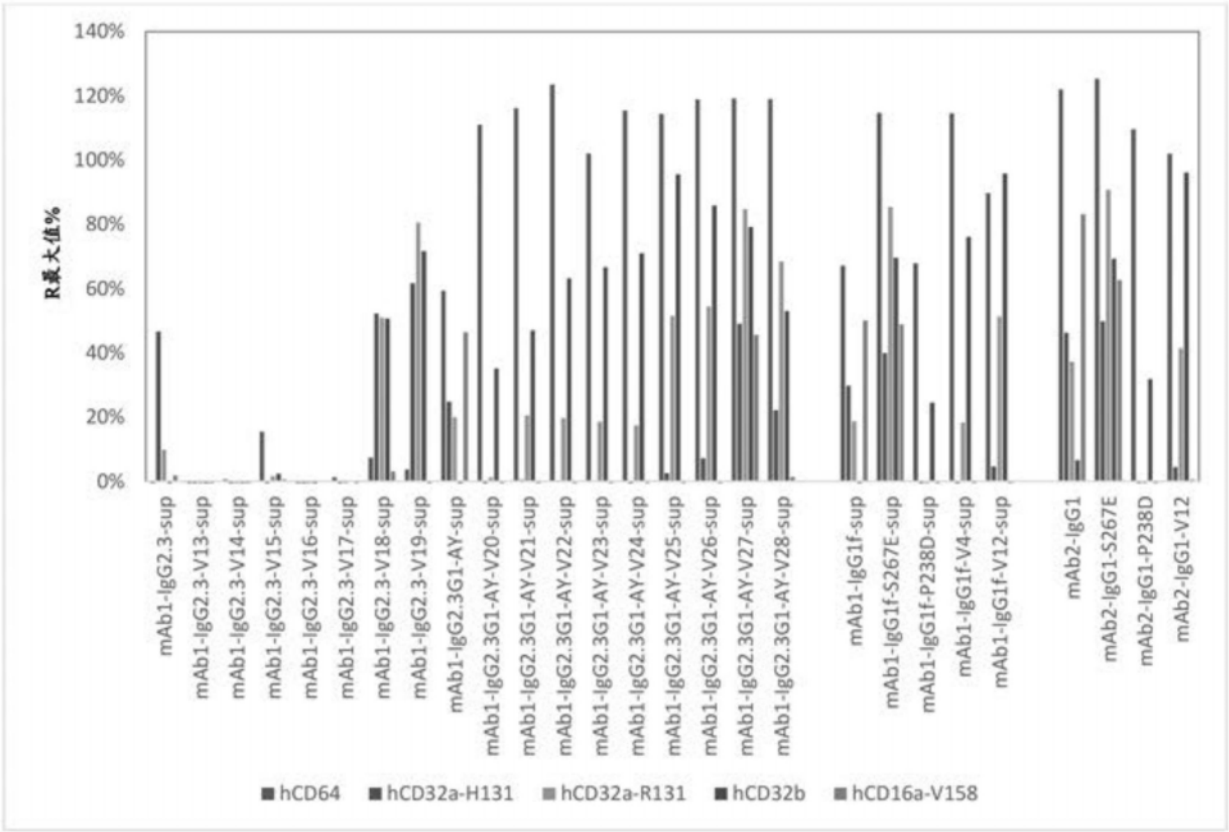


图71

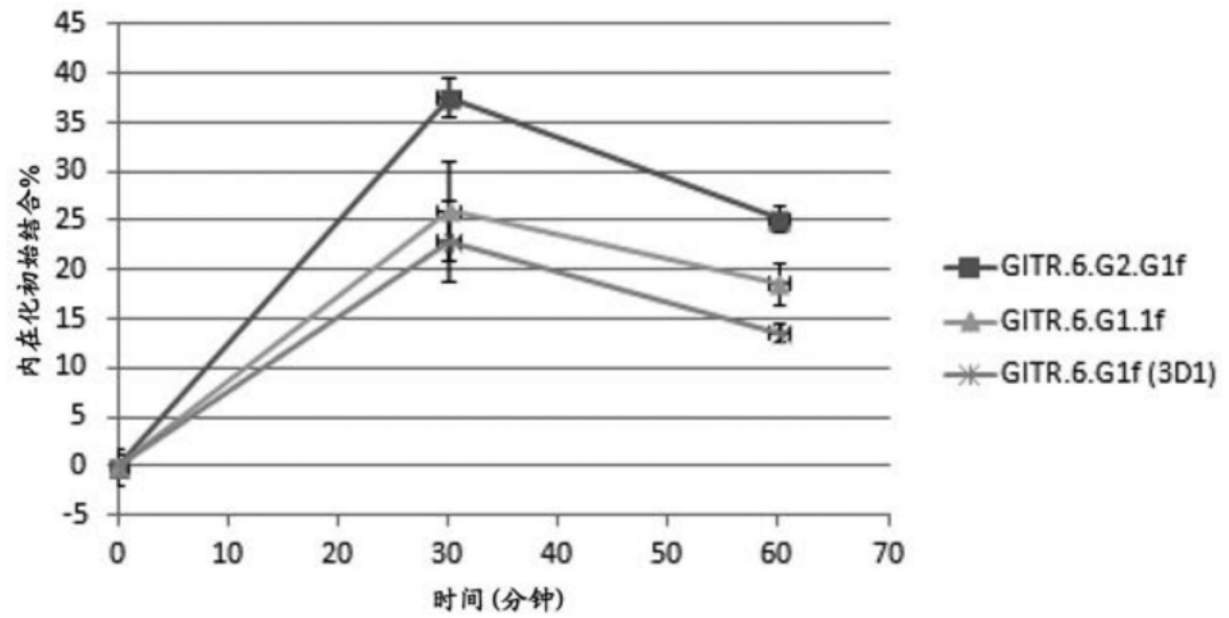


图72

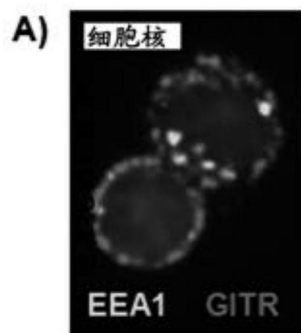


图73A

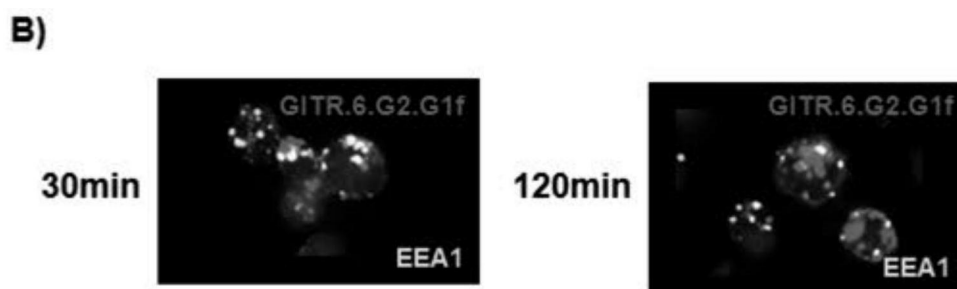
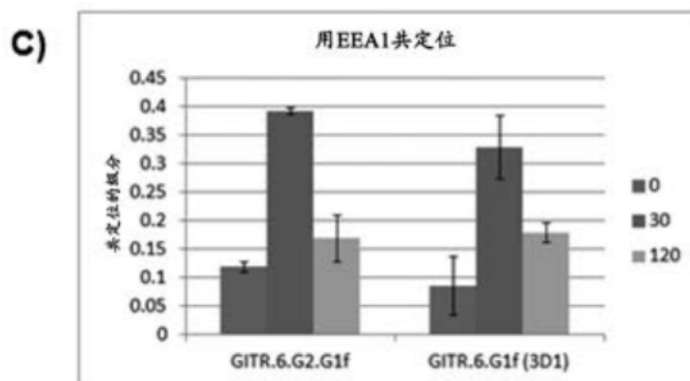


图73B



定量

$$m_1 = \frac{\sum x_{coloc}}{\sum x}$$

图73C

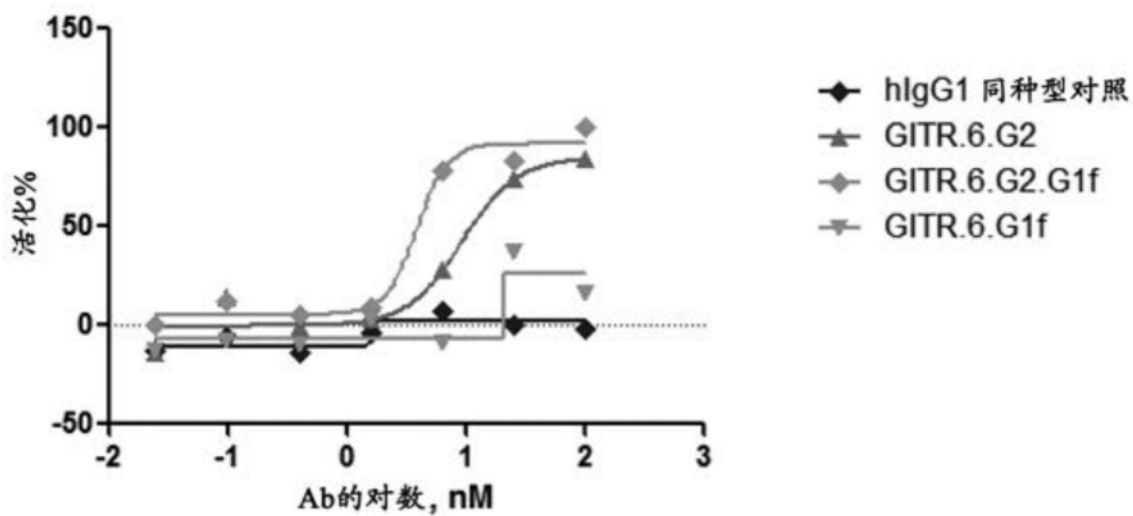
在活化CD8+细胞中的NF $\kappa$ B信号转导

图74A

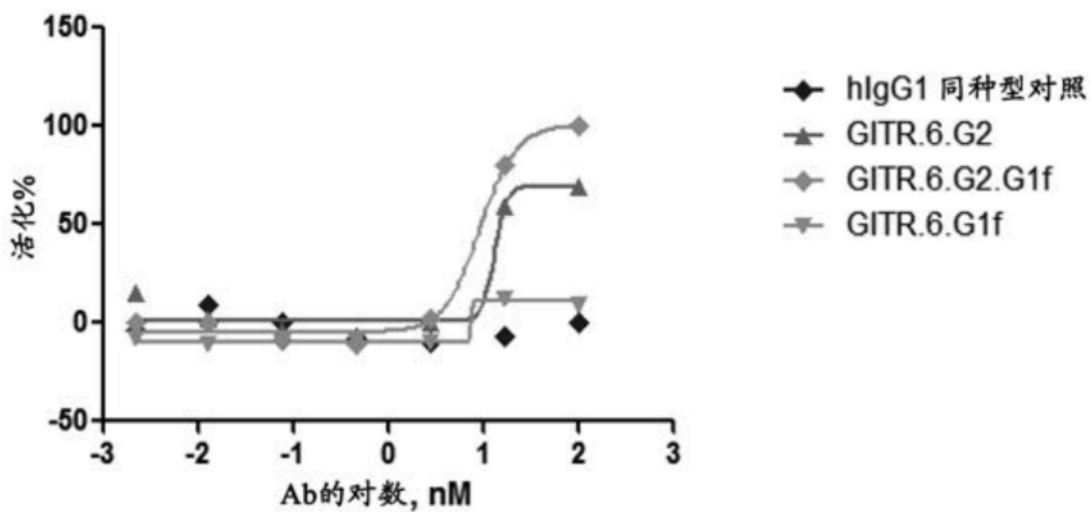
在活化CD4+细胞中的NF $\kappa$ B信号转导

图74B

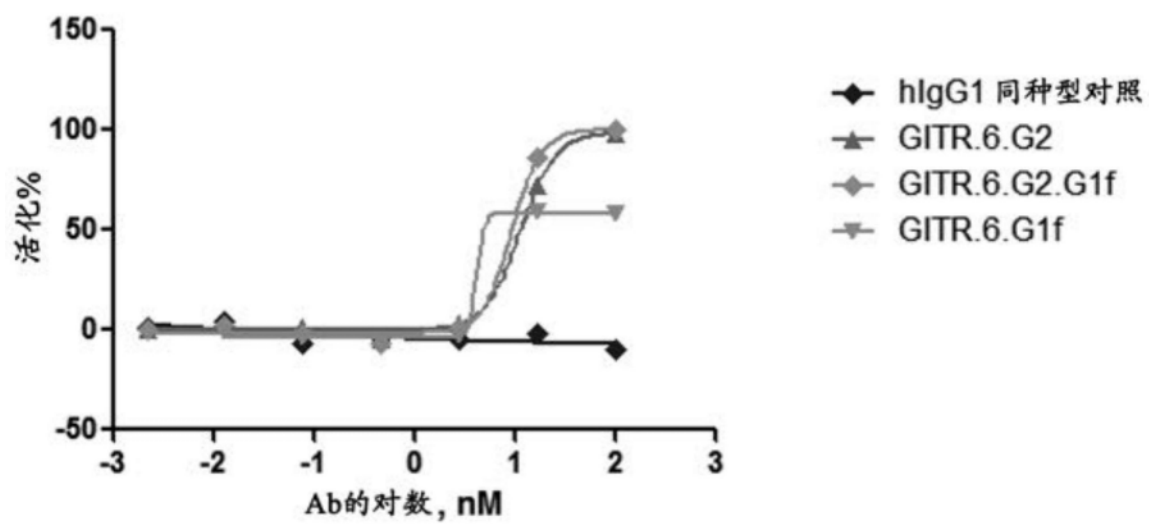


图75

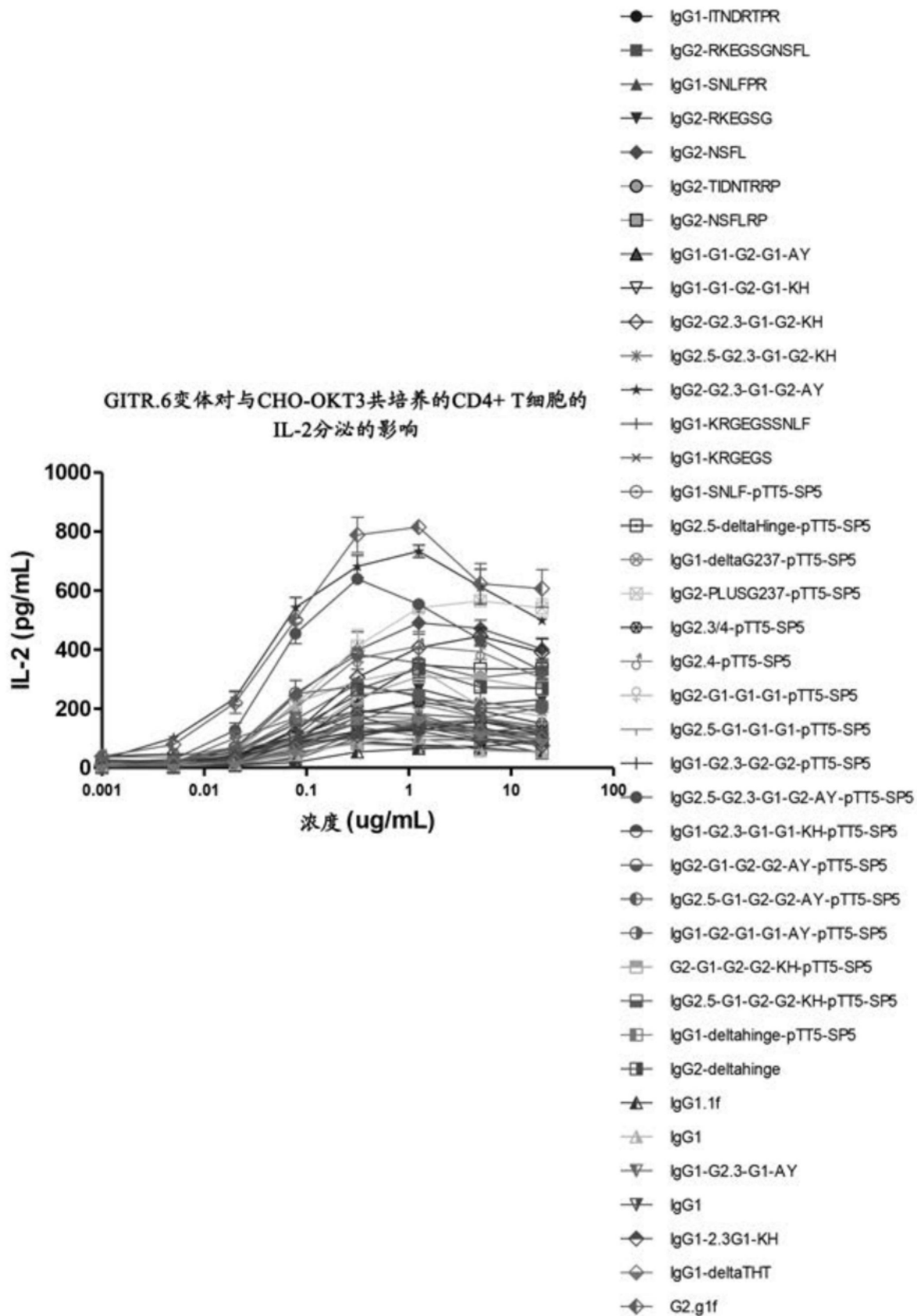


图76A





GITR.6变体对与CHO-OKT3(以1.25ug/mL刺激)共培养的  
CD4<sup>+</sup> T细胞的IL-2分泌的影响

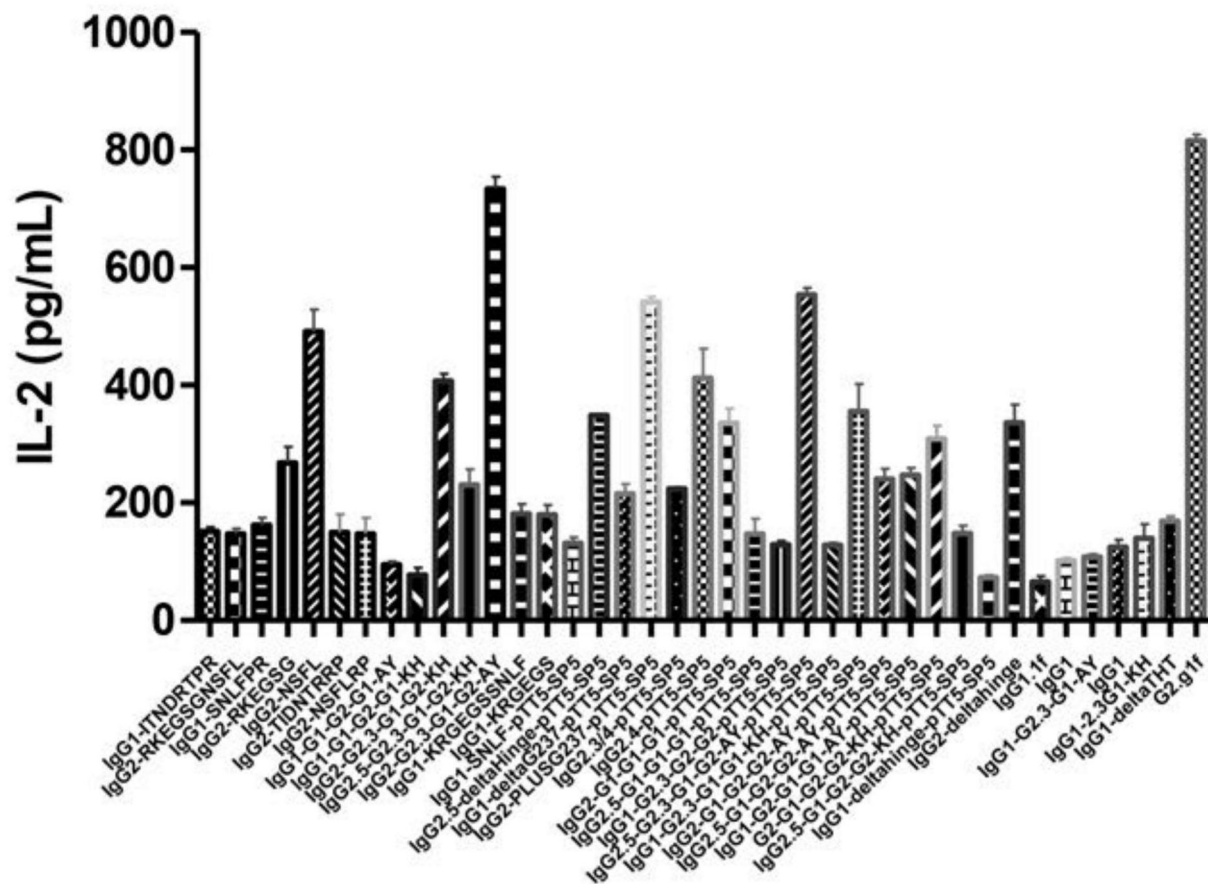


图76C

### GITR.6变体对与CHO-OKT3(以0.313ug/mL刺激) 共培养的CD4+ T细胞的IL-2分泌的影响

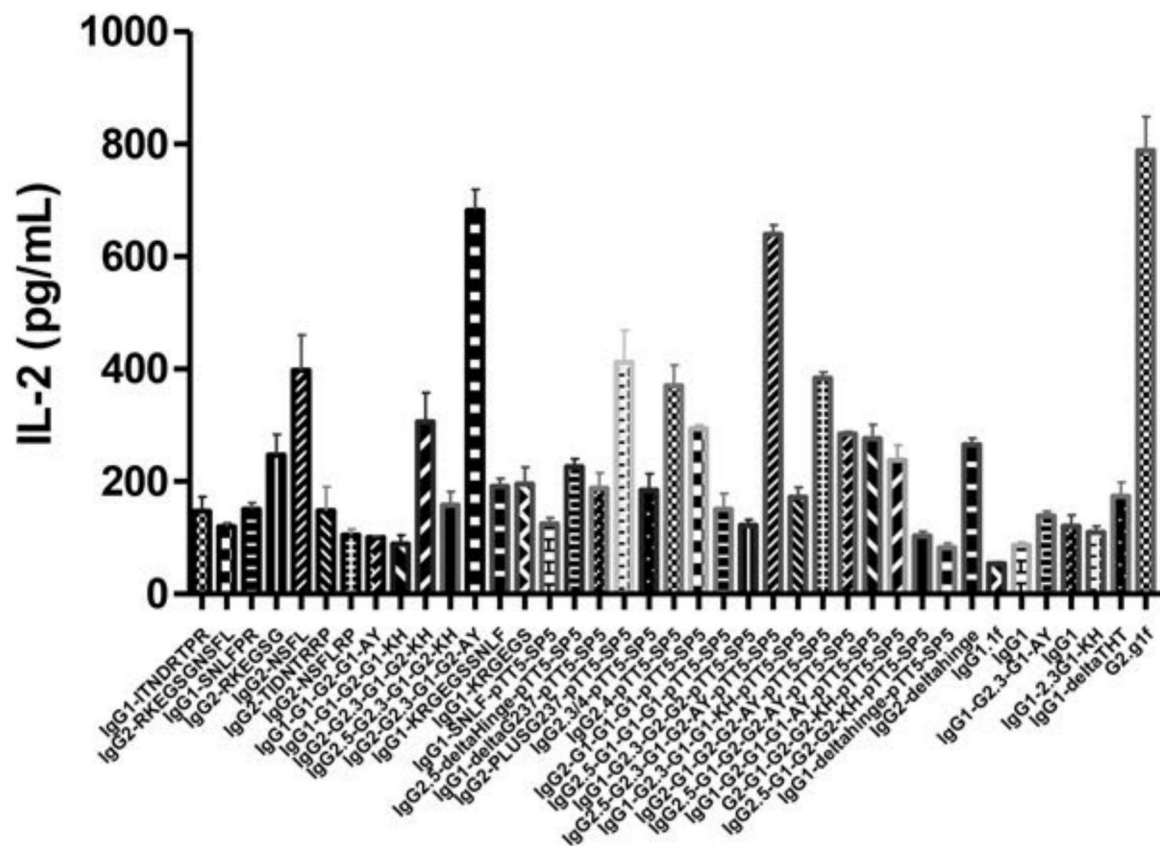


图76D