

抗 PVRIG 蛋白抗体或抗体片段及其用途

本申请要求申请号为 202110250342.9，申请日为 2021 年 03 月 08 日的中国专利申请的优先权，并将其全部内容引用到本申请中。

5

技术领域

本发明涉及医药领域，更具体地，本发明涉及抗 PVRIG 蛋白抗体或抗体片段以及在癌症治疗方面的用途。

背景技术

10 肿瘤细胞通过多种机制逃避免疫系统的监视。免疫检查点通路用于自身耐受的维持以及活化的淋巴细胞效应功能的控制，但癌细胞可利用该通路来避免受到破坏。最近报道指出，PVRIG 是一个非常重要的免疫检查点。PVRIG 主要表达于活化的 T 细胞和 NK 细胞上，通过与表达在靶细胞或者 DC 细胞上的配体 CD112 相互作用，来抑制 T 细胞和 NK 细胞的效应功能。多种肿瘤细胞表面高表达 CD112，从而通过 PVRIG 信号通路来抑制免疫系统的功能，实现免疫逃逸。

15 已经有研究表明，PVRIG 的缺失，可以导致 CD8⁺ T 细胞的效应功能增强。此外，使用阻断 PVRIG 与其配体 CD112 结合的抗体也能够有效恢复肿瘤浸润的 CD8⁺ T 细胞的功能并抑制肿瘤的生长。已经有一种靶向人 PVRIG 的抗体正在进行临床实验，表现出了较好的治疗效果。

靶向 PVRIG 的抗体还需要进一步改进。

发明内容

20 本发明的目的是提供一种能够促进抗肿瘤功能的抗体或抗体片段及其用途。所提供的抗体或者抗体片段，能够有效结合 PVRIG，并能够阻断 PVRIG 与其配体 CD112 的结合。所提供的抗体或者抗体片段经过验证，与人 PVRIG 具有高的亲和力和。且能够有效阻断人 PVRIG 和 CD112 的相互作用。

本发明的第一方面，本发明提供了一种抗体或抗体片段，所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

25 其中 HCDR1 选自 GYTFSSFS、GYTFSTFA 或 GYSFTAYT 所示序列，
HCDR2 选自 ILPGSNST、ILPGINNT、ILPGGNNT 或者 INPYNGGT 所示序列，
HCDR3 选自 SSYWFAY、STYWFAY 或 AREGNYGSRGDFDY 所示序列；
所述轻链包括轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

30 其中，LCDR1 选自 QSLNSGNQKNY 或 QTIVTN 所述序列，

LCDR2 选自 GAS 或 YAS 所示序列；

LCDR3 选自 QNAHSYPPT、QNAHSYPPA 或 QQSHSWPFT 所示序列。

在本发明的第二方面，本发明提供了一种抗体或抗体片段，所述抗体或抗体片段分别选自下列中的一种：

35 (1) 所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区和轻链互补决定区，所述重链互补决定区包括 GYTFSSFS、ILPGSNST 和 SSYWFAY；所述轻链互补决定区包括 QSLNSGNQKNY、GAS 和 QNAHSYPPT；

(2) 所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区和轻链互补决定区，所述重链互补决定区包括 GYTFSTFA、ILPGINNT 和 STYWFAY；所述轻链互补决定区包括 QSLNSGNQKNY、GAS 和 QNAHSYPPT；

(3) 所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区和轻链互补决定区，所述重链互补决定区包括 GYTFSTFA、ILPGGNNT 和 STYWFAY；所述轻链互补决定区包括 QSLNSGNQKNY、GAS 和 QNAHSYPPA；

40 (4) 所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区和轻链互补决定区，所述重链互补决定区包括 GYSFTAYT、INPYNGGT 和 AREGNYGSRGDFDY；所述轻链互补决定区包括 QTIVTN、YAS 和 QQSHSWPFT。

在本发明的第三方面，本发明提供了一种抗体或抗体片段，所述抗体或抗体片段选自下列至少之一：

(1) 所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:1 所示序列或者与 SEQ ID NO:1 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:2 所示序列或者与 SEQ ID NO:2 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列；

45 (2) 所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33 所示序列或者与 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列；

50 (3) 所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:39 所示序列或者与 SEQ ID NO:39 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:40 所示序列或者与 SEQ ID NO:40 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列；

(4) 所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:41 所示序列或者与 SEQ ID NO:41 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:42 所示序列或者与 SEQ ID NO:42 所示

序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列；

(5) 所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:43 所示序列或者与 SEQ ID NO: 43 所示序列具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:44 所示序列或者与 SEQ ID NO:44 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

5 在本发明的第四方面，本发明提供了一种可分离的核酸，所述核酸编码上述任一所述的抗体或抗体片段。

在本发明的第五方面，本发明提供了一种表达载体，所述表达载体含有上述所述的核酸。

在本发明的第六方面，本发明提供了一种重组细胞，所述重组细胞表达上述任一所述的抗体或抗体片段。

在本发明的第七方面，本发明提供了一种药物组合物，所述药物组合物包括上述所述抗体或抗体片段和药学上可接受的载体。

10 在本发明的第八方面，本发明提供了一种上述所述抗体或抗体片段或者上述所述的药物组合物在制备治疗癌症的药物中的用途。

在本发明的第九方面，本发明提供了一种药物联合，包括：(1) 上述所述的抗体或抗体片段，或者上述所述的药物组合物；和(2) 不同于(1) 的用于癌症治疗的抗体。

15 在本发明的第十方面，本发明提供了一种预防或者治疗癌症的方法，包括给予受试者有效量的上述所述的抗体或抗体片段或者上述所述的药物组合物。

在本发明的第十一方面，本发明提供了一种在体外抑制样本中 PVRIG 蛋白活性的方法，包括将所述样本和上述任一所述的抗体或抗体片段，或者上述所述的药物组合物接触。根据本发明的实施例，所述样本可以为细胞样本。

本发明所提供的抗体或抗体片段能够特异性结合 PVRIG 抗原，且能够大幅提升人 PBMC 的杀伤效果，并且在小鼠模型中表现出较好的抗肿瘤效果。本发明的其它特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

20

附图说明

图 1 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体结合人 PVRIG 的 ELISA 分析结果图；

图 2 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体结合细胞膜表面人 PVRIG 的分析结果图；

图 3 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体阻断人 PVRIG 与人 CD112 结合的分析结果图；

25 图 4 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体竞争性结合细胞膜表面人 PVRIG 的分析结果图；

图 5 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体结合细胞膜表面食蟹猴 PVRIG 以及小鼠 PVRIG 的活性结果图；

图 6 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体结合食蟹猴 PVRIG 的 ELISA 分析结果图；

图 7 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体检测 NKG 细胞系膜表面 PVRIG 的活性结果图；

图 8 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体检测淋巴细胞表面 PVRIG 的活性结果图；

30 图 9 是本发明一种实施方式中人类肿瘤细胞系表面 CD112 表达的结果图；

图 10 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体促进 NK 细胞的细胞毒作用的结果图；

图 11 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体促进人 PBMC 的细胞毒作用的结果图；

图 12 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体促进 NK 细胞的效应分子表达的结果图；

图 13 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体促进 NK 细胞分泌 IFN- γ 的 ELISA 分析结果图；

35 图 14 是本发明一种实施方式中的鼠源抗体抑制肿瘤体内生长的分析结果图；

图 15 是本发明一种实施方式中的人源化抗体结合人 PVRIG 的 ELISA 分析结果图；

图 16 是本发明一种实施方式中的人源化抗体结合细胞膜表面人 PVRIG 的分析结果图；

图 17 是本发明一种实施方式中的人源化抗体结合细胞膜表面食蟹猴 PVRIG 的分析结果图；

图 18 是本发明一种实施方式中的人源化抗体阻断人 PVRIG 与人 CD112 结合的分析结果图；

40 图 19 是本发明一种实施方式中的人源化抗体促进人 PBMC 的细胞毒作用的结果图。

具体实施方式

下面详细描述本发明的实施例，实施例旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。另外，对于本文中的一些术语进行了说明和解释，这些说明和解释用于方便本领域技术人员理解，而不应看作是对本发明保护范围的限制。

45 本文中，术语“抗体”是指能与抗原相互作用的（例如可以通过结合、空间位阻、稳定化空间分布）包括通过二硫键连接的两个重链和两个轻链的蛋白质。每个重链包括重链可变区（缩写为 VH）和重链恒定区。重链恒定区包括三个结构域 CH1、CH2 和 CH3。每个轻链包括轻链可变区（常缩写为 VL）和轻链恒定区。轻链恒定区包括一个结构域 CL。重链可变区和轻链可变区可以进一步细分成互补决定区（CDR）。每个重链可变区和每个轻链可变区从氨基端到羧基端分别排列有三个 CDR 区：CDR1、CDR2 和 CDR3。本文中，为了区别，将重链的三个 CDR 区称为 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

将轻链的三个 CDR 区称为 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

本文中所提到的抗体或抗体片段中的抗体包括但不限于单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、骆驼化(camelised)抗体和嵌合抗体。抗体可以是任意同种型的,例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY 等。

术语“抗体片段”是指抗体保持与抗原特异性相互作用(例如,通过结合、空间位阻、稳定化空间分布)的能力的一个或多个部分。抗体片段的例子包括但不限于 Fab 片段,由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段;F(ab)₂ 片段,包括两个在铰链区通过二硫桥连接的 Fab 片段的二价片段;由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段;由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段;以及分离的互补决定区(CDR)等。而且,尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 通过单独的基因编码,但它们可以使用重组方法通过能够使其成为单个蛋白质链的合成连接部分接合,其中 VL 和 VH 区域成对形成单价分子(称作单链 Fv(scFv);参见,例如,Bird 等人,(1988)Science 242:423-426;和 Huston 等人,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883)。这些单链抗体也包括在术语“抗体片段”内。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的常规技术得到,筛选与完整抗体以相同方式具有实用性的片段。

“人源化抗体”通过是指:(i)源自非人来源(例如,携带异源免疫系统的转基因小鼠),该抗体基于人种系序列,或者(ii)是 CDR-接枝的,其中可变结构域的 CDR 来自非人来源,而可变结构域的一个或多个框架是人来源的,并且如果存在恒定结构域,则是人来源的。

术语“嵌合抗体”是指具有来源于或对应于一物种中发现的序列的恒定抗体区和来源于另一物种的可变抗体区。优选地,恒定抗体区来源于或者对应于在人中例如在人种系细胞或体细胞中发现的序列,可变抗体区(例如,VH、VL、CDR 或 FR 区)来源于非人动物例如小鼠、大鼠、兔或仓鼠中发现的序列。

如本文所用,术语“重组抗体”包括所有通过重组方式制备、表达、产生或分离的抗体,例如,自免疫球蛋白基因转基因或转染色体动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤分离的抗体,自转化表达抗体的宿主细胞分离的抗体,自重组、组合人抗体文库选择和分离的抗体,和通过任何其他涉及剪接部分或全部人免疫球蛋白基因、序列至其他 DNA 序列的方式制备、表达、产生或分离的抗体。优选地,这些重组抗体具有可变区,其中框架区和 CDR 区源自人种系免疫球蛋白序列。

本文中,术语“单克隆抗体”是指单一分子组成的抗体分子制剂。单克隆抗体表现出独特的结合位点,其对于特定表位具有独特的结合特异性和亲和力。

为此,本发明的一个方面,提供了一种抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,和轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;其中 HCDR1 选自 GYTFSSFS、GYTFSTFA 或 GYSFTAYT 所示序列,HCDR2 选自 ILPGSNST、ILPGINNT、ILPGGNNT 或者 INPYNGGT 所示序列,HCDR3 选自 SSYWFAY、STYWFAY 或 AREGNYGSRGDFDY 所示序列;LCDR1 选自 QSLNSGNQKNY 或 QTIVTN 所示序列,LCDR2 选自 GAS 或 YAS 所示序列;LCDR3 选自 QNAHSYPPT、QNAHSYPPA 或 QQSHSWPFT 所示序列。本发明提供的抗体或者抗体片段能够以高亲和力结合 PVRIG 蛋白。

在至少一些实施方式中,本发明提供了一种抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区和轻链互补决定区,所述重链互补决定区包括 GYTFSSFS、ILPGSNST 和 SSYWFAY;所述轻链互补决定区包括 QSLNSGNQKNY、GAS 和 QNAHSYPPT。

在至少一些实施方式中,本发明提供了一种抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区为 SEQ ID NO:1 所示序列或者与 SEQ ID NO:1 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列;所述轻链可变区为 SEQ ID NO:2 所示序列或者与 SEQ ID NO:2 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

其中重链可变区 SEQ ID NO:1 所示序列如下所示:

QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKATGYTFSSFSIEWVKQRPQGHGLAWIGEILPGSNSTNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYM
QLSSLTSEDSAVYYCSSYWFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 1)。

轻链可变区 SEQ ID NO:2 所示序列如下所示:

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTI
SSVQAEDLAVYYCQNAHSYPPTFAAGTKLELK (SEQ ID NO:2)。

根据所提供的抗体或抗体片段序列经过人源化改造,经过人源化改造的抗体或抗体片段如下所示:

在至少一些实施方式中,所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区为 SEQ ID NO:3 所示序列或者与 SEQ ID NO:3 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列,所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

在至少一些实施方式中,所述抗体为抗体 4-hu1,所述抗体 4-hu1 的重链可变区为 SEQ ID NO:3 所示序列,轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列。在至少一些优选实施方式中,抗体 4-hu1 的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:4,相应地编码该重链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示;抗体 4-hu1 的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:37 所示,相应地编码

该轻链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEO ID NO:38 所示。

在至少一些实施方式中,所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区为 SEQ ID NO:6 所示序列或者与 SEQ ID NO:6 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列,所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

5 在至少一些优选实施方式中,所述抗体为抗体 4-hu2,所述抗体 4-hu2 的重链可变区为 SEQ ID NO:6 所示序列,轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列。在至少一些优选实施方式中,抗体 4-hu2 的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:7 所示,相应地编码该重链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:8 所示;抗体 4-hu2 的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:37 所示,相应地编码该轻链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:38 所示。

在至少一些实施方式中，所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:9 所示序列或者与 SEQ ID NO:9 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

在至少一些优选实施方式中，所述抗体为抗体 4-hu3，所述抗体 4-hu3 的重链可变区为 SEQ ID NO:9 所示序列，轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列。在至少一些优选实施方式中，抗体 4-hu3 的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:10 所示，相应地编码该重链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:11 所示；抗体 4-hu3 的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:37 所示，相应地编码该轻链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:38 所示。

在至少一些实施方式中,所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区为 SEQ ID NO:12 所示序列或者与 SEQ ID NO:12 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列,所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

在至少一些优选实施方式中，所述抗体为抗体 4-hu4，所述抗体 4-hu4 的重链可变区为 SEQ ID NO:12 所示序列，轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列。在至少一些优选实施方式中，抗体 4-hu4 的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:13 所示，相应地编码该重链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；抗体 4-hu4 的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:37 所示，相应地编码该轻链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:38 所示。

在至少一些实施方式中,所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区为 SEQ ID NO:15 所示序列或者与 SEQ ID NO:15 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列,所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

在至少一些优选实施方式中,所述抗体为抗体 4-hu5,所述抗体 4-hu5 的重链可变区为 SEQ ID NO:15 所示序列,轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列。在至少一些优选实施方式中,抗体 4-hu5 的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:16 所示,相应地编码该重链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:17 所示;抗体 4-hu5 的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:37 所示,相应地编码该轻链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:38 所示。

30 在至少一些实施方式中,所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区为 SEQ ID NO:18 所示序列或者与 SEQ ID NO:18 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列,所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

在至少一些优选实施方式中，所述抗体为抗体 4-hu6，所述抗体 4-hu6 的重链可变区为 SEQ ID NO:18 所示序列，轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列。在至少一些优选实施方式中，抗体 4-hu6 的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:19 所示，相应地编码该重链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:20 所示；抗体 4-hu6 的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:37 所示，相应地编码该轻链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:38 所示。

在至少一些实施方式中,所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区为 SEQ ID NO:21 所示序列或者与 SEQ ID NO:21 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列,所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

40 在至少一些优选实施方式中, 所述抗体为抗体 4-hu7, 所述抗体 4-hu7 的重链可变区为 SEQ ID NO:21 所示序列, 轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列。在至少一些优选实施方式中, 抗体 4-hu7 的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:22 所示, 相应地编码该重链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:23 所示; 抗体 4-hu7 的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:37 所示, 相应地编码该轻链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:38 所示。

在至少一些实施方式中，所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:24 所示序列或者与 SEQ ID NO:24 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

在至少一些优选实施方式中，所述抗体或抗体片段为抗体 4-hu8，所述抗体 4-hu8 的重链可变区为 SEQ ID NO:24 所示序列，轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列。在至少一些优选实施方式中，抗体 4-hu8 的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:25 所示，相应地编码该重链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:26 所示；抗体 4-hu8 的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:37 所示，相应地编码该轻链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:38 所示。

- 5 在至少一些实施方式中，所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:27 所示序列或者与 SEQ ID NO:27 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

- 10 在至少一些优选实施方式中，所述抗体为抗体 4-hu9，所述抗体 4-hu9 的重链可变区为 SEQ ID NO:27 所示序列，轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列。在至少一些优选实施方式中，抗体 4-hu9 的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:28 所示，相应地编码该重链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:29 所示；抗体 4-hu9 的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:37 所示，相应地编码该轻链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:38 所示。

在至少一些实施方式中，所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:30 所示序列或者与 SEQ ID NO:30 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

- 15 在至少一些优选实施方式中，所述抗体为抗体 4-hu10，所述抗体 4-hu10 的重链可变区为 SEQ ID NO:30 所示序列，轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列。在至少一些优选实施方式中，抗体 4-hu10 的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:31 所示，相应地编码该重链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:32 所示；抗体 4-hu10 的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:37 所示，相应地编码该轻链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:38 所示。

- 20 在至少一些实施方式中，所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:33 所示序列或者与 SEQ ID NO:33 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

- 25 在至少一些优选实施方式中，所述抗体为抗体 4-hu11，所述抗体 4-hu11 的重链可变区为 SEQ ID NO:33 所示序列，轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列。在至少一些优选实施方式中，抗体 4-hu11 的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:34 所示，相应地编码该重链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:35 所示；抗体 4-hu11 的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:37 所示，相应地编码该轻链氨基酸序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO:38 所示。

其中抗体 4-hu1 重链可变区 SEQ ID NO:3 所示序列为：

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSNSSTNYNEKFKGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARYWFAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:3)。

抗体 4-hu1 重链氨基酸序列 SEQ ID NO:4 所示序列如下 (IgG4 S228P 突变)：

- 30 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSNSSTNYNEKFKGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARYWFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTEPTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
35 NKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:4)。S228P 突变是发生在铰链区的突变，该
突变能够防止半抗体的形成 (所谓半抗体即为 IgG4 抗体中半分子动态交换的现象)。

抗体 4-hu1 重链氨基酸序列编码核酸序列如 SEQ ID NO:5 所示：

- GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCTTCCG
GCGGCACCTTTTCCAGCTTCTCCATCGAGTGGGTGAGGCAGGCCCGGCCAGGGATTGGAGTGATGGGCGAGAT
40 CCTGCCTGGCTCCAACAGCACCAACTACAATGAGAAGTTTAAGGGCAGGGTGACCATCACCGCTGACGAGTCCACC
TCCACCGCTACATGGAGCTGTCTCCCTCGCGGTCCGAGGATACCGCTGTGTACTATTGTGCCAGGTATTGGTTCGCT
TATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCCGCTCCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCTCCCTG
TAGCCGGTCCACGAGCTCCACCGCTGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTATTCCCCGAGCCCGTGACCGTGA
GCTGGAATAGCGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACATTCCTGCTGTGCTGCAGAGCTCCGGCTGTATAGCCTG
45 TCCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTATACCTGCAATGTGGACCACAAGCCAGCAA
ACCAAGGTGGACAAGAGGGTGAGAGCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCTTGCCCCGCTCCAGAGTTCCTGGGC

GGCCCAAGCGTGTTCCTGTTTCTCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCAGGACCCCTGAGGTGACCTGCGT
GGTGGTGGATGTGTCCAGGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCC
AAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGAGCGTGTGACCGTGTGCACCAGGATT
GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCTGCCTAGCAGCATCGAGAAGACCATCTCCA
5 AGGCCAAGGGCCAGCCCAGGGAGCCTCAGGTGTATACCCTGCCCCCTAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
TGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTTTATCCTAGCGATATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCGA
GAACAATAACAAGACCACCCCTCCCGTGTGATAGCGACGGCTCCTTCTTTCTGTACTCCCGGCTGACCGTGGATA
AGTCCAGGTGGCAGGAGGCAATGTGTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTATACCCAGAA
GTCCCTGTCCCTGTCCCTCGGCAAG (SEQ ID NO:5)

10

抗体 4-hu2 重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSNSTNYNEKFKGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDYAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:6)

抗体 4-hu2 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示 (IgG4 S228P 突变):

15 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSNSTNYNEKFKGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDYAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
LPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR
20 LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:7)

抗体 4-hu2 重链氨基酸序列编码核酸序列如 SEQ ID NO:8 所示:

GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCAGCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCTCC
GGCGGCACCTTCTCCAGCTTTTCCATCGAGTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCCAGGGACTGGAGTGGATGGGCGAGAT
25 CCTGCCTGGCAGCAATTCCACCAACTATAATGAGAAGTTCAAGGGCCGGGTGACCATCACCGCTGACGAGAGCACCT
CCACCGCTTACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGGTCCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGTAGCTCCTATTGGTTCGCTT
ACTGGGGCCAGGGACACCTGGTGACCGTGTCTCCGCCAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCCCTGGCTCCCTGC
AGCCGGAGCACCTCTGAGTCCACCGCCGCCCTGGGTGTCTGGTGAAAGATTACTTTCCTGAGCCCGTGACCGTGAG
CTGGAATAGCGGCGCTCTGACACGCGGCGTGACACCTTTCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGT
30 CCTCCGTGGTGACCGTGCCTAGCTCCAGCCTGGGCACCAAGACCTATACCTGTAATGTGGATCACAAAGCCTAGCAATA
CCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCCAAGTACGGCCCCCCTGCCCTCCCTGCCAGCTCCTGAATTTCTGGGCGGC
CCCAGCGTGTTCCTGTTTCTCCCAAGCCTAAGGATACCCTGATGATCTCCAGGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTG
GTGGACGTGTCCAGGAGGATCCCAGGTGCAGTTAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGA
CCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACAGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTG
35 AATGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCTGCCCTCCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCA
AGGGCCAGCCCCGGGAGCCTCAGGTTTATACCCTGCCCCCTAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG
ACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCCGAGAACAATTAT
AAGACCACCCCTCCCGTGTGATTCCGACGGCAGCTTTTTCTGTACTCCCGGCTGACCGTGGATAAGAGCCGGTG
GCAGGAGGGCAATGTGTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCC
40 TGTCCTGGGCAAG (SEQ ID NO:8)

抗体 4-hu3 重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSNSTNYNEKFKGRVTFTADESTSTAY
MELSSLRSEDYAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:9)

45

抗体 4-hu3 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示 (IgG4 S228P 突变):

抗体 4-hu3 重链氨基酸序列编码核酸序列如 SEQ ID NO:11 所示:

抗体 4-hu4 重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示:

抗体 4-hu4 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示 (IgG4 S228P 突变):

40 抗体 4-hu4 重链氨基酸序列编码核酸序列如 SEQ ID NO:14 所示:

7

GGAACAGCGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTATAGCCTGTCC
TCCGTGGTGACCGTGCCAGCTCCAGCCTGGGCACCAAGACCTATACCTGCAACGTGGATCACAAGCCTTCCAATACC
AAGGTGGACAAGCGGGTGGAGAGCAAGTATGGCCCCCTGTCTCCTTGCCCTGCTCCTGAGTTCCTGGGCGGCCC
CAGCGTCTTCTGTTTTCCCCCTAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGG
5 TGGATGTGTCCAGGAGGATCCTGAGGTGCAGTTTAACTGGTATGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCCGGGAGGAGCAGTTTAAACAGCACCTATAGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAA
CGGCAAGGAGTATAAGTGTAAGGTGAGCAATAAGGGCCTGCCTAGCTCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAG
GGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCCCTCCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAGGTGAGCCTGA
CCTGTCTGGTGAAGGGCTTTTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCTGAGAACAAATTATA
10 AGACCACCCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCAGCTTTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGATAAGAGCCGTGG
CAGGAGGGCAATGTGTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGAGCCTGAGCCT
GAGCCTCGGCAAG (SEQ ID NO:14)

抗体 4-hu5 重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示:

15 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGSNSTNYNEKFKGRVFTADTSTNTAYM
ELSSLRSEDTAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:15)

抗体 4-hu5 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示 (IgG4 S228P 突变):

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGSNSTNYNEKFKGRVFTADTSTNTAYM
20 ELSSLRSEDTAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPAPEFLGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLGK (SEQ ID NO:16)

抗体 4-hu5 重链氨基酸序列编码核酸序列如 SEQ ID NO:17 所示:

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCTCCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCTTCCG
GCGGCACCTTTTCCAGCTTTAGCATCGAGTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGAGATC
CTGCCTGGCTCCAACAGCACCAACTACAATGAGAAGTTAAGGGCCGGGTGACCTTACCCTGACACCTCCACCAA
30 CACCGCTTATATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACCGCTGTGTACTATTGCAGCAGCTATTGGTTCGCTTAC
TGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCCGCCAGCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCTGTAG
CCGGTCCACCTCCGAGAGCACCGCCGCTCTGGGTGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTT
GGAATCCGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACATTCCCTGCTGTGCTGCAGAGCTCCGGCCTGTACTCCCTGAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCTCCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAATGTGGACCACAAGCCCTCCAATAC
35 CAAGGTGGACAAGAGGGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCCTGTCTCCTTGGCCCTGCCCTGAGTTTCTGGGCGGCC
CTAGCGTGTCTCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGG
TGGATGTGTCCAGGAGGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCTAGGGAGGAGCAGTTTAACTCCACCTACAGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA
TGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGAGCAACAAGGGCCTGCCTTCCAGCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCTAAG
40 GGCCAGCCTCGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA
CCTGCCTGGTGAAGGGCTTTTATCCCTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAAATTATA
AGACCACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCCTTCTTCTGTACTCCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGGAGGGCAATGTGTTCTCCTGTAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCT
GTCCCTCGGCAAG (SEQ ID NO:17)

抗体 4-hu6 重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGSNSTNYNEKFKGKATFTADTSTNTAY
MELSSLRSEDVAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:18)

抗体 4-hu6 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示 (IgG4 S228P 突变) :

5 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGSNSTNYNEKFKGKATFTADTSTNTAY
MELSSLRSEDVAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR
10 LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:19)

抗体 4-hu6 重链氨基酸序列编码核酸序列如 SEQ ID NO:20 所示:

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCAGCTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCTTCCG
GCGGCACCTTCTCTCTTTTCCATCGAGTGGGTGAGGCAGGCCCCGGCCAGGGATTGGAGTGGATCGGCGAGATC
15 CTGCCTGGCAGCAACTCCACCAATTATAATGAGAAGTTTAAGGGCAAGGCTACCTTCACCGCTGACACCAGCACCAAT
ACCGCCTATATGGAGCTGTCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTATTATTGTAGCAGCTATTGGTTCGCTACT
GGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTTCCTCTGGCTCCTTGTTCC
AGGTCCACCAGCGAGAGCACCGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGATTACTTTCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTG
GAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTTCCCGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGCTGTATTCCCTGTCCA
20 GCGTGGTGACCGTGCCAGCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTATACCTGCAACGTGGATCACAAGCCCTCCAATACC
AAGGTGGACAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCCTGTCTGCTCCTGAGTTCCTGGGCGGCC
TTCCGTGTTTCTGTTTCCCCCTAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGT
GGATGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTGCAGTTTAATTGGTATGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCTAAGACCA
AGCCTAGGGAGGAGCAGTTTAACAGCACCTATCGGGTGGTGGAGCGTGTGACCGTGTGACACGAGGACTGGCTGAA
25 CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGGCCTGCCTAGCTCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAG
GGCCAGCCTAGGGAGCCCCAGGTGTATACCCTGCCCCCTTCCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAGGTGAGCCTGAC
CTGTCTGGTGAAGGGCTTTTATCCTAGCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAATAATTACAA
GACCACCCCCCTGTGCTGGATTCCGATGGCAGCTTTTCTGTATTCCCGGCTGACCGTGGATAAGTCCCGGTGGCA
GGAGGGCAACGTGTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGT
30 CCCTGGGCAAG (SEQ ID NO:20)

抗体 4-hu7 重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:21 所示:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSNSTNYNEKFKGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDVAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:21)

35

抗体 4-hu7 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:22 所示 (IgG4 S228P 突变) :

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSNSTNYNEKFKGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDVAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
40 TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:22)

抗体 4-hu7 重链氨基酸序列编码核酸序列如 SEQ ID NO:23 所示:

45 GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCTTCC
GGCTACACCTTTTCCAGCTTCAGCATCGAGTGGGTGCGGCAGGCTCCCGGCCAGGGATTGGAGTGGATGGGCGAGAT

CCTGCCTGGCAGCAACTCCACCAATTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAGGGTGACCATCACCGCTGACGAGAGCACCT
CCACCGCTTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCCGTGTATTACTGCAGCAGCTATTGGTTTGCCT
ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCTCCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCTCCTTGC
AGCAGGTCCACCAGCGAGAGCACCGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGT
5 TTGGAATAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCTGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTC
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCTCCTCCCTGGGCACCAAGACCTATACCTGCAATGTGGATCACAAGCCTAGCAATAC
CAAGGTGGACAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCCCCTTGCCCTCCTTGCCCCGCTCCTGAGTTCCTGGGCGGGC
CTTCCGTGTTCTGTTTCCCCCTAAGCCCAAGGACACCTGATGATCTCCCGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGG
TGGATGTGAGCCAGGAGGACCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGAC
10 CAAGCCTAGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCAATAAGGGCTGCCTTCTCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAA
GGGCCAGCCTCGGGAGCCTCAGGTGTATACCCTGCCTCCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG
ACCTGCCTGGTGAAGGGCTTTTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAATAATTAC
AAGACCACCCCTCCTGTGCTGGATAGCGACGGCAGCTTTTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGATAAGAGCCGGTG
15 GCAGGAGGGCAACGTGTTACGTGCAGCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTATACCCAGAAGAGCCTGTCCC
TGAGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO:23)

抗体 4-hu8 重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:24 所示:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSNSTNYNEKFKGRVTFDADESTSTAY
20 MELSSLRSEDVAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:24)

抗体 4-hu8 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 所示 (IgG4 S228P 突变):

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGSNSTNYNEKFKGRVTFDADESTSTAY
MELSSLRSEDVAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
25 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
LPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:25)

30 抗体 4-hu8 重链氨基酸序列编码核酸序列如 SEQ ID NO:26 所示:

GAGGTGCAGCTGGTGACAGCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCCGGCTCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTTCCG
GCTATACCTTCTCCAGCTTTAGCATCGAGTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGAGATC
CTGCCTGGCAGCAATTCCACCAACTATAACGAGAAGTTCAAGGGCCGGGTGACCTTCACCGCCGATGAGTCCACCTC
CACCGCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGTCCGAGGATACCGCCGTGTACTATTGCAGCAGCTATTGGTTCGCTTAT
35 TGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCTCCGCTTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTTCCCCCTGGCCCCCTGCTC
CCGGTCCACCTCCGAATCCACCGCCGCCCTGGGTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCCGTGACCGTGTCTT
GGAATCCGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACATTTCCCGTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTATAGCTGTCCA
GCGTGGTGACCGTGCTAGCTCCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAATGTGGATCACAAGCCCAGCAATACC
AAGGTGGATAAGAGGGTGGAGTCCAAGTACGGCCCCCTTGTCTCCTTGTCCCGCCCCAGAGTTCCTGGGCGGGCC
40 ATCTGTGTTTCTGTTTCCCCCAAGCCTAAGGACACCTGATGATCTCCCGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGGT
GGACGTGTCCCAGGAGGATCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACC
AAGCCCAGGGAGGAGCAGTTTAACAGCACCTATCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAA
TGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGAGCAATAAGGGCTGCCCTCCAGCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCTAAGG
GCCAGCCCCGGGAGCCTCAGGTGTACACCTGCCTCCCAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC
45 CTGTCTGGTGAAGGGCTTTTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAATAACA
AGACCACCCCTCCCGTGTGACTCCGATGGCTCCTTTTCTGTATTCCAGGCTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGC

AGGAGGGCAACGTGTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTATAACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG
AGCCTGGGCAAG (SEQ ID NO:26)

抗体 4-hu9 重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:27 所示:

- 5 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGSNSTNYNEKFKGRVTFTADESTSTAYM
ELSSLRSED TAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:50)

抗体 4-hu9 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示 (IgG4 S228P 突变):

- 10 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGSNSTNYNEKFKGRVTFTADESTSTAYM
ELSSLRSED TAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:28)

15

抗体 4-hu9 重链氨基酸序列编码核酸序列如 SEQ ID NO:29 所示:

- 20 GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCTCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTTCCG
GCTATACCTTCTCCAGCTTCAGCATCGAGTGGGTGAGCAGGCCCGCCAGGGATTGGAGTGGATCGGCGAGATC
CTGCCTGGCAGCAATAGCACCAACTATAATGAGAAGTTCAAGGGCAGGGTGACCTTCACCGCCGATGAGAGCACCTC
CACCGCTTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGATACCGCTGTGTATTATTGTAGCAGCTATTGGTTTGCTTA
CTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCTTGT
CCCGGTCCACCTCCGAGAGCACCGCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTATTCCCTGAGCCCGTGACCGTGAGC
TGGAACCTCCGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCAGCGGCGTGTACTCCCTGTC
CAGCGTGGTGACCGTGCCAGCTCCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGATCACAAGCCCTCCAATA
25 CCAAGGTGGACAAGAGGGTGGAGAGCAAGTATGGCCCTCCCTGTCCCCCTGCCCTGCCCTGAATTTCTGGGCGGC
CCCTCCGTGTTTCTGTTTCTCCTAAGCCTAAGGATACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGTGG
TGGATGTGAGCCAGGAGGACCCGAGGTGCAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGAC
CAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTATAGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA
ACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGAGCAATAAGGGCCTGCCCTCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCTAAG
30 GGCCAGCCCCGGGAGCCTCAGGTGTACACCTGCCCCCTAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGA
CCTGCCTGGTGAAAGGCTTTTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCTGAGAACAAATTACA
AGACCACCCCTCCCGTGCTGGATTCCGACGGCAGCTTCTTCTGTATTCCAGGCTGACCGTGGATAAGTCCCGGTGGC
AGGAGGGCAACGTGTTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG
TCCCTGGGCAAG (SEQ ID NO:29)

35

抗体 4-hu10 重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:30 所示:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGSNSTNYNEKFKGRVTFTADTSTNTAYM
ELSSLRSED TAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:30)

- 40 抗体 4-hu10 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 所示 (IgG4 S228P 突变):

- EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWIGEILPGSNSTNYNEKFKGRVTFTADTSTNTAYM
ELSSLRSED TAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
45 PSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:31)

抗体 4-hu10 重链氨基酸序列编码核酸序列如 SEQ ID NO:32 所示:

GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCTTCC
GGCTACACCTTTTCCAGCTTCAGCATCGAGTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGCGAGAT
5 CCTGCCTGGCAGCAATAGCACCAATTACAACGAGAAGTTCAAGGGCCGGGTGACCTTCACCGCCGACACCAGCACC
AATACCGCTATATGGAGCTGAGCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCTGTGTATTATTGCTCCAGCTATTGGTTCGCCT
ACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCTTGC
AGCAGGTCCACCAGCGAGAGCACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGATTACTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTG
TTGGAACAGCGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGACACATTTCTGCTGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTATAGCTGA
10 GCAGCGTGGTGACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAATGTGGATCACAAGCCCTCCAAC
ACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTGTCTGCTCTGAGTTTCTGGGCGG
CCCTAGCGTGTCTGTTCCTCCTAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGT
GGTGGACGTGTCCAGGAGGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAG
ACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTTTAACAGCACCTATAGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCT
15 GAACGCAAGGAGTATAAGTGTAAAGTGTCCAACAAGGCCTGCCTTCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCTA
AGGGCCAGCCTAGGGAGCCTCAGGTGTATACCTGCCTCCCTCCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTG
ACCTGCCTGGTGAAAGGCTTTTACCCAGCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAATAATTA
CAAGACCACCCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCAGCTTCTTTCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGT
GGCAGGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTC
20 CCTGAGCCTCGGCAAG (SEQ ID NO:32)

抗体 4-hu11 重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:33 所示:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWIGELPGSNSTNYNEKFKGKATFTADTSTNTAY
MELSSLRSEDVAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:33)

25

抗体 4-hu11 重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示 (IgG4 S228P 突变):

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSFSIEWVRQAPGQGLEWIGELPGSNSTNYNEKFKGKATFTADTSTNTAY
MELSSLRSEDVAVYYCSSYWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVERSKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
30 TLMISRTEPVCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYCKKVSNTKG
LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR
LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:34)

抗体 4-hu11 重链氨基酸序列编码核酸序列如 SEQ ID NO:35 所示:

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCTTCC
GGCTATACCTTCAGCTCCTTCAGCATCGAGTGGGTGCGCAGGCTCCTGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGCGAGAT
CCTGCCCCGCAGCAATTCCACCAACTATAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCTACCTTCACCGCCGACACCTCCACCA
ATACCGCTATATGGAGCTGTCCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCTCCAGCTACTGGTTTGCCT
ATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTTCACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTGT
40 AGCAGGAGCACCTCCGAGTCCACCGTGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTATTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTG
CTGGAACAGCGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACAGCCTGA
GCTCCGTGGTGACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTATACCTGCAACGTGGATCACAAGCCTAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGTCCAAGTACGGCCCTCCCTGTCCCCCTTGCCCCGCTCCTGAGTTTCTGGGCGG
CCCTTCCGTGTTTCTGTTCCTCCCTAAGCCCAAGGATACCTGATGATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGT
45 GGTGGATGTGTCCAGGAGACCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAG
ACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTTAACAGCACCTATCGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCT

GAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCT
AAGGGCCAGCCCCGGGAGCCCCAGGTTTACACCCTGCCCCCTAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCC
TGACCTGCCTGGTGAAAGGCTTCTATCCCTCCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCGAGAACAAC
TACAAGACCACCCCTCCCGTGTGGATAGCGACGGCAGCTTCTTTCTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGAGCCG
5 GTGGCAGGAGGGCAATGTGTTCTCTGTTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGT
CCCTGAGCCTCGGCAAG (SEQ ID NO:35)

抗体 4 人源化抗体轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT
10 SSLQAEDVAVYYCQNAHSYPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:36)

抗体 4 人源化抗体轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:37 所示:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQAEDVAVYYCQNAHSYPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAVQWKVDNALQS
15 GNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:37)

抗体 4 人源化抗体轻链氨基酸序列编码核酸序列如 SEQ ID NO:38 所示:

GACATCGTGATACCCAGAGCCCGATTCCCTGGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGGGCTACCATCAATTGCAAGTCCTCC
CAGAGCCTGCTGAATAGCGGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGC
20 TGCTGATCTACGGCGCCTCCACCCGGGAGAGCGCGTTCCTGACAGGTTTAGCGGCTCCGGCAGCGGCACCGATTTC
ACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTATTATTGCCAGAATGCCCCACTCCTATCCCCCACC
TTTGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCTTCCGTGTTTATCTTCCCCCCTCCGACGA
GCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTACCCAGGGAGGCTAAGGTGCAGTGG
AAGGTGGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCCACCTACT
25 CCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGATTATGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAG
GGCCTGAGCTCCCCGTGACCAAGTCCTTCAATAGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO:38)

在至少又一些实施方式中,本发明提供了一种抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区和轻链互补决定区,所述重链互补决定区包括 GYTFSTFA、ILPGINNT 和 STYWFAY;所述轻链互补决定区包括 QSLNSGNQKNY、GAS 和 QNAHSYPPT。

30 在至少一些实施方式中,本发明提供了一种抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区为 SEQ ID NO:39 所示序列或者与 SEQ ID NO:39 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列,所述轻链可变区为 SEQ ID NO:40 所示序列或者与 SEQ ID NO:40 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。

其中重链可变区 SEQ ID NO:39 所示序列如下所示:

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSTFAIDWIKRPGPGLAWIGEILPGINNTNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYM
35 HLSSLTSEDSAVYYCSTYWFAYWGQGLTVTVSA
(SEQ ID NO:39)。

轻链可变区 SEQ ID NO:40 所示序列如下所示:

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMTCKSSQSLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLMYGASTRESGVPDRFTGSGSGTD
FTLTISSVQAEDLAVYYCQNAHSYPPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:40)。

40 在至少另一些实施方式中,本发明提供了一种抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区和轻链互补决定区,所述重链互补决定区包括 GYTFSTFA、ILPGNNT 和 STYWFAY;所述轻链互补决定区包括 QSLNSGNQKNY、GAS 和 QNAHSYPPTA。

在至少一些实施方式中,本发明提供了一种抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区为 SEQ ID NO:41 所示序列或者与 SEQ ID NO:41 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列,所述轻链可变区为 SEQ ID NO:42 所示序列或者与 SEQ ID NO:42 所示序列相比至少具有一个氨基酸取代的序列。

45 其中,重链可变区 SEQ ID NO:41 所示序列如下所示:

QVQLQQSGAELTKPGASVKISCKATGYTFSTFAIDWIKRPGHGLAWIGEILPGNNTNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYM
HLSSLTSEDSAVYYCSTYWFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:41);

轻链可变区 SEQ ID NO:42 所示序列如下所示:

50 DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLMYGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT

ISSVQAEDLAVYYCQNAHSYPFAGAGTKLELK (SEQ ID NO:42)。

在至少一些实施方式中，本发明提供了一种抗体或抗体片段，所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区和轻链互补决定区，所述重链互补决定区包括 GYSFTAYT、INPYNGGT 和 AREGNYGSRGDFDY；所述轻链互补决定区包括 QTIVTN、YAS 和 QQSHSWPFT。

- 5 在至少一些实施方式中，本发明提供了一种抗体或抗体片段，所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:43 所示序列或者与 SEQ ID NO:43 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:44 所示序列或者与 SEQ ID NO:44 所示序列相比至少具有一个氨基酸取代的序列。

其中重链可变区 SEQ ID NO:43 所示序列如下所示：

- EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTAYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQKFKGKATLTGDKSSSTA
10 YMELLSVTSEDSAVYFCAREGNYGSRGDFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:43)

轻链可变区 SEQ ID NO:44 所示序列如下所示：

- DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQTIVTNILWYQQRTNGSPRLIRYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIAHY
YCQQSHSWPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:44)

- 15 上述所提到的抗体或者抗体片段是可分离的。术语“可分离的”是指除了所提供的抗体，基本上不含有其他具有不同抗原特异性的抗体或者抗体片段。而且，可分离的抗体或者抗体片段可以基本上不含其它的细胞材料和/或化学物质。因此，在一些方面，提供的抗体是分离的抗体，其已经与具有不同特异性的抗体分离。分离的抗体可以是单克隆抗体。分离的抗体可以是重组的单克隆抗体。但是，与目标表位、同种型或变体特异性结合的分离的抗体可以与其他相关抗原例如来自其他物种者(例如物种同源物)具有交叉反应性。

- 本文中，所提到的至少一个氨基酸取代可以作为一个氨基酸取代、两个氨基酸取代、三个氨基酸取代、四个氨基酸取代或者五个氨基酸取代，甚至是更多。根据本发明的优选实施，所述氨基酸取代优选为保守氨基酸取代。本文中，保守氨基酸取代即不会损害抗体与 PVRIG 抗原的结合的氨基酸取代。

- 保守氨基酸取代包括一种类别中的氨基酸被相同类别的氨基酸取代，其中所述类别由共同的氨基酸侧链物理化学性质和自然中发现的同源蛋白质中的高取代频率来定义，例如通过标准 Dayhoff 频率交换基质或 BLOSUM 基质确定的。已经将氨基酸侧链分类为六大类，并且包括：I 类(Cys)；II 类(Ser、Thr、Pro、Ala、Gly)；III 类(Asn、Asp、Gln、Glu)；
25 IV 类(His、Arg、Lys)；V 类(Ile、Leu、Val、Met)以及 VI 类(Phe、Tyr、Trp)。举例来说，用另一 III 类残基 Asn、Gln 或 Glu 取代 Asp 是保守取代。因此，抗 EGFR 抗体中预计的非必需氨基酸残基优选地用来自同一类别的另一种氨基酸残基置换。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中熟知的。

- 本发明还提供了一种可分离的核酸，所述核酸编码上述提到的抗体或抗体片段。所提到的可分离的核酸是指核酸基本上可以与其他物质进行分离，而基本上不含有材料或者化学物质。核酸可存在于完整细胞中、细胞裂解产物中，或以部分纯化的或基本上纯的形式存在。当通过包括碱性/SDS 处理、CsCl 显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳以及其它本领域中熟知的技术在内的标准技术来从其它细胞组分或其它杂质，例如其它细胞核酸或蛋白质中纯化出来时，核酸是“分离的”或“基本上纯的”。

- 本发明还提供了一种表达载体，所述表达载体含有所述的核酸。可以使用许多种表达载体来表达编码本文所提到的抗体或结合片段的多核苷酸。可以使用基于病毒的和非病毒的表达载体在哺乳动物宿主细胞中产生抗体。非病毒载体和系统包括质粒，附加型载体，通常具有用于表达蛋白质或 RNA 的表达组件，和人工染色体(参见，例如，Harrington 等人，(1997)Nat Genet 15:345)。例如，可用于在哺乳动物(例如人)细胞中表达多核苷酸和多肽的非病毒载体包括 pThioHis A,B&C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A,B&C(Invitrogen, San Diego, CA)、MPSV 载体和大量本领域已知的用于表达其他蛋白质的其他载体。可用的病毒载体包括基于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒的载体，基于 SV40、乳头瘤病毒、HBV Epstein Barr 病毒、牛痘病毒载体和塞姆利基森林病毒(SFV)的载体。参见，Brent 等人，(1995)Annu.Rev.Microbiol.49:807；
40 和 Rosenfeld 等人，(1992)Cell 68:143。

- 表达载体含有与编码抗体或抗体片段的多核苷酸可操作连接的启动子和其他调节序列(例如增强子)。在一些实施方式中，可以使用诱导型启动子，以防止在诱导条件以外表达插入的序列。诱导型启动子包括但不限于阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热休克启动子。除启动子以外，还可以要求或需要其他的调节元件，用以高效表达抗体或抗体片段。这些元件通常包括 ATG 起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其他序列。此外，通过包括适合于所用细胞系统的增强子，例如使用 SV40 增强子或 CMV 增强子，以增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

- 45 本发明还提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞表达上述所述的抗体或抗体片段。根据本发明的实施例，所述宿主细胞含有上述所述的表达载体，能够用来表达本申请提到的抗体。其中表达载体可以整合在宿主细胞的基因组上。所述宿主细胞可以为哺乳动物细胞，包括但不限于 CHO 或 HEK293 细胞。

用于带有并表达抗体或抗体片段的宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。例如原核宿主细胞大肠杆菌(E.coli)。其他适合使用的微生物宿主包括芽孢杆菌,例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),和其他肠杆菌科,例如沙门氏菌(*Salmonella*)、沙雷氏菌(*Serratia*)和各种假单胞菌(*Pseudomonas*)物种。在这些原核宿主中,也可以产生表达载体,其通常含有与宿主细胞相容的表达控制序列。此外,这些宿主细胞中还含有启动子,例如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常任选地与操作子序列一起控制表达,并具有核糖体结合位点序列等,用于引发和完成转录和翻译。也可以使用其他的微生物例如酵母来表达本公开内容的多肽。也可以与杆状病毒载体结合使用昆虫细胞。

在一些优选实施方式中,使用哺乳动物宿主细胞表达和产生本公开内容的抗PVRIG抗体或抗体片段。例如,它们可以是表达内源性免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系。优选地,使用带有外源性表达载体的哺乳动物细胞系,包括任何正常的致死或者正常或异常的永生动物或人细胞,例如,SP2/0骨髓瘤细胞、CHO细胞、HeLa细胞、PER.C6细胞、COS细胞、HKB11细胞、NS0细胞。例如,已经开发出多种能够分泌完整免疫球蛋白的适当宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B-细胞和杂交瘤。宿主细胞中含有的合适的启动子可以是组成型、细胞类型特异性、阶段特异性和/或可调控或可调节的。可用的启动子包括但不限于,金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP polIII启动子、组成型MPSV启动子、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

可以通过熟知的方法将含有目标多核苷酸序列(例如,编码抗体多肽的核酸以及表达控制序列)的载体转入至宿主细胞中,其根据细胞宿主的类型而变化。例如,对于原核细胞常使用氯化钙转染,而对于其他细胞宿主可以使用磷酸钙处理或电穿孔。其他方法例如可以为电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和微注射、病毒体、免疫脂质体、聚阳离子核酸缀合物、裸DNA、人工病毒体等。

本发明还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括上述所述的抗体和药学上可接受的载体。

药学上可接受的载体包括任何和所有生理相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。优选地,该载体适于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用(例如,通过注射或输注施用)。根据不同的施用途径,可以将活性化合物,即抗体包裹在某种材料中,以保护该化合物免受酸作用和其它可能使该化合物失活的自然条件的影响。

所提供的药物组合物可以通过本领域已知的多种方法施用。抗体可以与合适的载体一起制备,例如控释制剂,包括植入物、透皮贴片和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。许多用于制备此类制剂的方法已经获得专利或是本领域技术人员普遍已知的。

根据本发明的实施例,所提供的抗体可用某种材料包裹或与某种材料共同施用该组合物以防止其失活。例如,可以将组合物在适当的载体,例如脂质体或稀释剂中施用给受试者。可接受的稀释剂包括盐水和水性缓冲液。脂质体包括水包油包水CGF乳液以及常规脂质体。

根据本发明的实施例,药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散体等制备为无菌注射溶液或无菌粉末。本文所提供的药物组合物可以通过本领域技术人员已知的常规方法配制成为药学上可接受的剂型。

本发明还提供了上述所述的抗体或者上述所述的药物组合物在制备治疗癌症的药物中用途。

本发明还提供了一种预防或者治疗癌症的方法,包括给予受试者有效量的上述所述的抗体或者上述所述的药物组合物。

“治疗有效量”或“有效量”是指引起期望生物响应所需的PVRIG抗体的量。根据本发明,治疗有效量是治疗和/或预防疾病所需的PVRIG抗体的量。

本文提供的抗体的治疗有效量取决于抗体和组合的相对活性(例如,抑制细胞生长的活性),并且取决于接受治疗的受试者和疾病状况、受试者的体重和年龄、疾病状况的严重性、施用方式等而变化,本领域普通技术人员可以很容易地确定治疗有效量。用于施用的剂量可以在以下范围内:例如,约1ng至约6000mg、约5ng至约5500mg、约10ng至约5000mg、约20ng至约4500mg、约30ng至约5000mg、约300ng至约4,500mg、约500ng至约4,000mg、约1 μ g至约3,500mg、约5 μ g至约3,000mg、约10 μ g至约2,600mg、约20 μ g至约2,575mg、约30 μ g至约2,550mg、约40 μ g至约2,500mg、约50 μ g至约2,475mg、约100 μ g至约2,450mg、约200 μ g至约2,425mg、约300 μ g至约2,000、约400 μ g至约1,175mg、约500 μ g至约1,150mg、约0.5mg至约1,125mg、约1mg至约1,100mg、约1.25mg至约1,075mg、约1.5mg至约1,050mg、约2.0mg至约1,025mg、约2.5mg至约1,000mg、约3.0mg至约975mg、约3.5mg至约950mg、约4.0mg至约925mg、约4.5mg至约900mg、约5mg至约875mg、约10mg至约850mg、约20mg至约825mg、约30mg至约800mg、约40mg至

约 775mg、约 50mg 至约 750mg、约 100mg 至约 725mg、约 200mg 至约 700mg、约 300mg 至约 675mg、约 400mg 至约 650mg、约 500mg 或约 525mg 至约 625mg 的抗体。

本文中，“受试者”是指任何动物，包括啮齿类动物，例如小鼠或大鼠，灵长类动物，例如食蟹猴(*Macaca fascicularis*)、恒河猴(*Macaca mulatta*)或人(*Homo sapiens*)。优选地，受试者是灵长类动物，更优选人。本文中，“预防”是指致力于防止疾病发作或延缓疾病发作的方法。

本文中，癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤以及白血病。更具体的示例包括：鳞状上皮细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃癌、胰腺癌、胶质细胞肿瘤如胶质细胞瘤和神经纤维瘤病、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳癌、结肠癌、黑色素瘤、结肠直肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾脏癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌以及各种类型的头颈癌。在具体的实施方案中，使用本文公开的方法治疗或诊断的癌症选自黑色素瘤、乳癌、卵巢癌、肾癌、肠胃/结肠癌、肺癌以及前列腺癌。根据本发明的优选实施例，所述癌症包括但不限于黑色素瘤、肺癌、头颈癌、结直肠癌、胰腺癌、胃癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌或肝癌。

本发明还提供了一种药物联合，其除了上述提到的抗体或抗体片段之外，还可以含有其他用于治疗癌症的药物。组合物可以单独施用或以联合治疗施用，即，与其它药剂联合施用。例如，联合治疗可以包括本文提供的组合物以及至少一种或多种另外的治疗剂如本文描述的抗癌剂。该组合物还可以与放射治疗和/或手术联合施用。抗 EGFR 抗体的特定组合也可以与或不与另外的治疗剂分开施用或顺序施用。

例如，所提供的其他治疗癌症的药物可以为抗体，例如可以为抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 LAG-3 抗体、抗 TIM-3 抗体、抗 BTLA 抗体或者其他抗肿瘤抗体组合应用。

本发明所提供的示例性抗体，无论是鼠源抗体还是人源化抗体均能够以高亲和力结合人 PVRIG 蛋白，并且能够促进人 PBMC 对肿瘤细胞的杀伤。此外，所提供的抗体还表现出了在体内抑制肿瘤生长的活性。

本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1

(I) 抗人 PVRIG 单克隆抗体的制备

参照常规杂交瘤细胞融合技术稍作调整后制备抗 PVRIG 的单克隆抗体，具体如下：

(1) 重组融合蛋白的制备

人工合成编码人 PVRIG 蛋白（如 SEQ ID NO:45 所示）的全长基因，并使用 PCR 扩增如 SEQ ID NO:46 所示的蛋白片段，并在目的序列的 C 端引入人 IgG1 恒定区（如 SEQ ID NO:47 所示）的蛋白片段，并克隆入 pLVX-IRES-zsGreen 载体中，通过包装慢病毒，感染 HEK293T 细胞系，得到过表达人 PVRIG-人 IgG1 Fc 融合蛋白，随后通过常规细胞培养，收集细胞培养上清，并通过 Protein G 亲和层析方法（GE Healthcare）纯化得到纯度大于 90% 的重组人 PVRIG-人 IgG1 Fc 融合蛋白。质谱鉴定显示，目的蛋白的肽段和 PVRIG 序列匹配，证明该重组蛋白即为重组人 PVRIG-人 IgG1 Fc 融合蛋白。

人 PVRIG 全长氨基酸序列：

MRTEAQVPALQPPEPGLEGAMGHRTLVLPWVLLTLCVTAAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGP
NGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGLPPSSDPGLSAPP
TPAPILRADLAGILGVSGVLLFGCVYLLHLLRRHKHRPAPRLQPSRTSPQAPRARAWAPSQASQAALHVPYATINTSCRPAT
LDTAHPHGGPSWWASLPTHAHRPQGPAAWASTPIPARGSFVSVENGLYAQAGERPPHTGPGTLTFPDPRGPRAMEGPLG
VR (SEQ ID NO:45)

人 PVRIG 胞外段氨基酸序列：（41-172）

TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGS
GASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGLPPSSDPGLSAPPTAPILRADL (SEQ ID NO:46)

人 IgG1 恒定区氨基酸序列：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO:47)

5

采用类似地方法，我们制备得到了重组人 CD112-人 IgG1 Fc 融合蛋白。其中人 CD112 全长氨基酸序列如 SEQ ID NO:48 所示，人 CD112 胞外段氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 所示。

人 CD112 全长氨基酸序列：

10 MARAAALLPSRSPPTLLWPLLLLLLLETGAQDVRVQVLPEVRGQLGGTVLPCHELLPPVPGLYISLVTWQRPDAPANHQ
NVAAFHPKMGSPSPKPGSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTCEFATFPKGSVRGMTWLRVIA
KPKNQAEAKVTFSDPTTVALCISKEGRPPARISWSSLDWEAKETQVSGTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTCKV
EHESFEPPALIPVTLVSRYPPEVSISGYDDNWYLGRDADLSCDVRNPEPTGYDWSTTSGTFPTSAVAQGSQQLVIHAVDSL
NTTFVCTVTNAVGMGRAEQVIFVRETPNTAGAGATGGIIGGIIAIIATAVAATGILICRQQRKEQTLQGAEEDELEGPPSY
15 KPPTPKAKLEAQEMPSQLFTLGASEHSPLKTPYFDAGASCTEQEMPRYHELPTLEERSGPLHPGATSLGSPVPPGPPAVE
DVSLDLEDEEGEEEEYLDKINPIYDALSYSSPSDSYQKGKFVMSRAMYV (SEQ ID NO:48)

人 CD112 胞外段氨基酸序列：(32-360)

QDVRVQVLPEVRGQLGGTVLPCHELLPPVPGLYISLVTWQRPDAPANHQNVAAFHPKMGSPSPKPGSERLSFVSAKQST
20 GQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTCEFATFPKGSVRGMTWLRVIAKPKNQAEAKVTFSDPTTVALCISKEGRPPA
RISWSSLDWEAKETQVSGTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTCKVEHESFEPPALIPVTLVSRYPPEVSISGYDDNWY
LGRDADLSCDVRNPEPTGYDWSTTSGTFPTSAVAQGSQQLVIHAVDSLNTTFVCTVTNAVGMGRAEQVIFVRETPNTAG
AGATGG (SEQ ID NO:49)

25 采用类似地方法，制备获得了食蟹猕猴 PVRIG-人 IgG1 Fc 融合蛋白。其中食蟹猕猴 PVRIG 氨基酸序列如 SEQ ID NO:50 所示，食蟹猕猴 PVRIG 胞外段序列如 SEQ ID NO:51 所示。

食蟹猕猴 PVRIG 氨基酸序列：

MRTEAQVLAQLQSPLEGAMGRRTLALPWLLTLCVTAQTPEVWVQVQMEATELSSFTVHCGFLGPGSISLVTVSWGG
30 PDGAGGTKLAVLHPELGTRQWAPARQARWETQSSISLALEDGASSPFANTTFCKFASFPEGSWESCGSLPPSSDPGLSAP
PTVPILRADLAGILGLSGVLLFGCGYLLHLLRRQKHRPTPRLQPSHTNSQALTAQAWAPSQASQAALHDPYATINTSFCPA
TLDTAHPNGWASLPHTAAHQPGPAASASTPILARGSFVSVENGLYTQAGERPPHTGPGLTLFPDCRGPRALEGRFGVR
(SEQ ID NO:50)

35 食蟹猕猴 PVRIG 胞外段序列：(39-171)

AGTPEVWVQVQMEATELSSFTVHCGFLGPGSISLVTVSWGGPDGAGGTKLAVLHPELGTRQWAPARQARWETQSSISLA
EDSGASSPFANTTFCKFASFPEGSWESCGSLPPSSDPGLSAPPTVPILRAD (SEQ ID NO:51)

(2) 动物免疫、杂交瘤细胞融合及克隆筛选

40 将上述获得的重组人 PVRIG-人 IgG1 Fc 融合蛋白与等体积完全弗氏佐剂 (CFA) 充分混合，初次免疫 8-10 周龄的 BALB/c 雌鼠 (购自上海莱斯科，体重 20g 左右)，每只小鼠腹腔注射 40-60μg 的重组人 PVRIG-人 IgG1 Fc 融合蛋白；以后每 2 周免疫一次，相同剂量的重组人 PVRIG-人 IgG1 Fc 融合蛋白与等体积不完全弗氏佐剂混合，总共免疫 5 次后，ELISA 检测小鼠血清效价不低于 1:105 时，最后注射 40-60μg 的重组人 PVRIG-人 IgG1 Fc 融合蛋白进行强化。在强化后的第三天，使用标准技术分离脾细胞，并和鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞 (ATCC 编号 CRL-1581) 融合。

45

在 ELISA 和流式细胞术两者鉴定都显示阳性信号的杂交瘤细胞进行亚克隆筛选，得到四株杂交瘤细胞。

(3) 单克隆抗体的表达及纯化

单克隆抗体的制备采用小鼠腹腔接种法, 首先 500 μ l 无菌的液体石蜡通过腹腔免疫 8-10 周龄的 BALB/c 雌鼠, 一周之后腹腔注射 1×10^6 杂交瘤细胞, 7-10 天左右收集腹水, 高速离心收集上清。通过上述方法获得的上清, 用 Protein G 亲和层析方法纯化得到纯度高于 95% 的单克隆抗体。

5 (II) 抗 PVRIG 单克隆抗体的可变区序列

将候选杂交瘤细胞总数量培养到 10^6 , 800rpm 离心 10 分钟收集细胞, 并以 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 提取总 RNA, 以总 RNA 为模板, 逆转录合成 cDNA 文库 (Invitrogen), 又以 cDNA 为模板 PCR 扩增杂交瘤细胞的所对应的可变区核苷酸序列。随后通过测序得到杂交瘤细胞的重链和轻链可变区氨基酸序列 (包括 CDR 序列)。

其中, 将氨基酸序列鉴定, 各抗体序列分别如下:

10 编号为抗体 4 的重链可变区序列如 SEQ ID NO:1 所示, 轻链可变区序列如 SEQ ID NO:2 所示; 编号为抗体 1 的重链可变区序列如 SEQ ID NO:39 所示, 轻链可变区序列如 SEQ ID NO:40 所示; 编号为抗体 2 的重链可变区序列如 SEQ ID NO:41 所示, 轻链可变区序列如 SEQ ID NO:42 所示; 编号为抗体 3 的重链可变区序列如 SEQ ID NO:43 所示, 轻链可变区序列如 SEQ ID NO:44 所示。

上述编号为抗体 1, 抗体 2, 抗体 3 和抗体 4 的抗体均为鼠源抗体。

15 (III) 人源化抗体的表达和纯化:

对上述不同的抗体可以进行人源化, 其中以抗体 4 为例, 进行了人源化, 所获得的人源化抗体包括但不限于抗体 4-hu1 至 抗体 4-hu11, 可大致通过如下方法进行制备和纯化。通过人工基因合成, 得到含有编码人源化抗体的 HC 和 LC 核酸序列的载体, 取合适的宿主细胞, 例如 HEK293 或 CHO, 采用最佳预设 HC: LC 载体比例(比如 1:1 或 1:2)作为可分泌抗体的表达系统进行瞬时或稳定转染。随后, 可收集细胞培养上清并通过 Protein A 亲和层析纯化得到纯度大于 95% 的人源化抗体。

实施例 2

实施例 2 评价了上述实施例 1 制备的不同的抗体的活性以及抗原结合的特异性。其中所用到的同型对照为小鼠 IgG1, κ (购自 Biolegend)。

25 采用 ELISA 评价了不同克隆的鼠源抗体结合人 PVRIG-Fc 融合蛋白的活性。实验过程如下:

30 用 1 $\times$ PBS (磷酸盐缓冲液) 稀释重组人 PVRIG-人 IgG1 Fc 融合蛋白至 1.0 μ g/ml, 100 μ l/孔, 包被 96 孔 ELISA 板, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用 PBST(0.05%的 Tween20-PBS)清洗 3 遍, 1%的 BSA 封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。PBST 清洗 3 遍, 分别加入经过倍比稀释的鼠源抗体 (抗体 1, 抗体 2, 抗体 3 或抗体 4), 设置 8 个浓度, 用小鼠 IgG1 (购自 Biolegend) 作为阴性对照, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。PBST 清洗 3 遍, 每孔加入 100 μ l 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(购自博士德生物, 1:10000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。清洗后每孔加入 100 μ l 的 TMB 底物液, 避光显色 10-15 分钟, 加入终止液(2M 的 H_2SO_4)100 μ l/孔, 终止后立即用酶标仪进行检测, 读取波长 450nm 的吸光值(OD450), 结果见图 1。

从图 1 可以看出, 不同克隆的鼠源抗体均能够特异性结合人 PVRIG-Fc 融合蛋白。

35 采用流式细胞术评价了不同克隆的鼠源抗体结合细胞膜表面人 PVRIG 蛋白的活性。实验过程如下:

40 收集 293T-人 PVRIG 细胞系, 用 1 $\times$ PBS 洗涤重悬之后, 进行细胞计数。随后在每个 1.5ml Ep 管中放入 2×10^5 个细胞, 分别加入不同浓度的各鼠源抗体 (抗体 1, 抗体 2, 抗体 3 或者抗体 4), 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 随后加入 1 $\times$ PBS 洗涤, 3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 100 μ l 的 1 $\times$ PBS 重悬细胞沉淀, 并加入 AF647 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (购自 Biolegend), 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 分钟, 随后加入 1 $\times$ PBS 洗涤两遍, 3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 200 μ l 的 1 $\times$ PBS 重悬细胞沉淀, 并使用流式细胞仪 (BD LSR II) 进行检测。

从图 2 给出的结果可以看出, 不同克隆的鼠源抗体均能够特异性结合细胞膜表面的人 PVRIG 蛋白。

采用流式细胞术评价了不同克隆的鼠源抗体阻断人 PVRIG 与其配体 CD112 结合的活性。实验过程如下:

45 收集 293T-人 CD112 细胞系, 用 1 $\times$ PBS 洗涤重悬之后, 进行细胞计数。随后在每个 1.5ml Ep 管中放入 2×10^5 个细胞, 分别加入不同浓度的各鼠源抗体 (抗体 1, 抗体 2, 抗体 3 或者抗体 4) 以及 10 μ g/ml 的人 CD112-人 IgG1 Fc 融合蛋白, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 随后加入 1 $\times$ PBS 洗涤, 3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 100 μ l 的 1 $\times$ PBS 重悬细胞沉淀, 并加入 AF647

标记的小鼠抗人 IgG-Fc 抗体（购自 Biolegend），4℃避光孵育 30 分钟，随后加入 1×PBS 洗涤两遍，3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 200μl 的 1×PBS 重悬细胞沉淀，并使用流式细胞仪（BD LSR II）进行检测。

从图 3 的结果来看，不同克隆的鼠源抗体均能够有效阻断人 PVRIG 与其配体 CD112 的结合。

5 采用流式细胞术评价了不同克隆的鼠源抗体竞争性结合人 PVRIG 蛋白的活性。实验过程如下：

收集 293T-human PVRIG 细胞系，用 1×PBS 洗涤重悬之后，进行细胞计数。随后在每个 1.5ml Ep 管中放入 2×10^5 个细胞，分别加入 10μg/ml 的对照抗体小鼠 IgG1 以及不同克隆的各鼠源抗体（抗体 1，抗体 2，抗体 3 或者抗体 4），4℃孵育 30 分钟，随后加入 1×PBS 洗涤，3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 100μl 的 1×PBS 重悬细胞沉淀，并加入 AF647 标记的抗体 4 抗体，4℃避光孵育 30 分钟，随后加入 1×PBS 洗涤两遍，3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 200μl 的 1×PBS 重悬细胞沉淀，并使用流式细胞仪（BD LSR II）进行检测，分析统计结果如图 4 所示。

10 从图 4 可以看出，抗体 1，抗体 2 和抗体 4 具有竞争性结合人 PVRIG 的关系，而抗体 3 与抗体 4 结合不同的人 PVRIG 表位。

采用流式细胞术评价了鼠源抗体结合食蟹猴以及小鼠 PVRIG 的活性。实验过程如下：

15 收集 293T-食蟹猴 PVRIG 以及 293T-小鼠 PVRIG 细胞系，用 1×PBS 洗涤重悬之后，进行细胞计数。随后在每个 1.5ml Ep 管中放入 2×10^5 个细胞，并加入 AF647 标记的抗体 4 鼠源抗体，4℃避光孵育 30 分钟，随后加入 1×PBS 洗涤两遍，3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 200μl 的 1×PBS 重悬细胞沉淀，并使用流式细胞仪（BD LSR II）进行检测，分析统计结果如图 5 所示。

从图 5 可以看出，抗体 4 鼠源抗体能够结合食蟹猴的 PVRIG 蛋白而不能结合小鼠的 PVRIG 蛋白。

20 采用 ELISA 的方法评价了鼠源抗体的食蟹猴 PVRIG 结合活性。实验过程如下：

用 1×PBS（磷酸盐缓冲液）稀释重组食蟹猴 PVRIG-人 IgG1 Fc 融合蛋白至 1.0μg/ml，100μl/孔，包被 96 孔 ELISA 板，4℃过夜，用 PBST(0.05%的 Tween20-PBS)清洗 3 遍，1%的 BSA 封闭，37℃孵育 2 小时。PBST 清洗 3 遍，分别加入经过倍比稀释的鼠源抗体（抗体 4），设置 11 个浓度，用小鼠 IgG1 作为阴性对照，100μl/孔，37℃孵育 1 小时。PBST 清洗 3 遍，每孔加入 100μl 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(购自博士德生物，1：10000 稀释)，37℃孵育 1 小时。清洗后每孔加入 100μl 的 TMB 底物液，避光显色 10-15 分钟，加入终止液(2M 的 H_2SO_4)100μl/孔，终止后立即用酶标仪进行检测，读取波长 450nm 的吸光值(OD450)，结果见图 6。可以看出，抗体 4 鼠源抗体能够结合食蟹猴的 PVRIG 蛋白。

30 采用流式细胞术评价了鼠源抗体结合 NKG 细胞系膜表面 PVRIG 的活性。实验过程如下：

收集 NKG 细胞系，用 1×PBS 洗涤重悬之后，进行细胞计数。随后在每个 1.5ml Ep 管中放入 2×10^5 个细胞，并加入 10μl 小鼠血清，4℃封闭 30 分钟，随后加入 1×PBS 洗涤，3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 100μl 的 1×PBS 重悬细胞沉淀，并加入 AF647 标记的抗体 4，4℃避光孵育 30 分钟，随后加入 1×PBS 洗涤两遍，3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 200μl 的 1×PBS 重悬细胞沉淀，并使用流式细胞仪（BD LSR II）进行检测，检测结果如图 7 所示。

35 从图 7 可以看出，鼠源抗体 4 能够结合 NKG 细胞系表面的人 PVRIG 蛋白。

采用流式细胞术评价了鼠源抗体结合淋巴细胞膜表面 PVRIG 的活性。实验过程如下：

通过使用 Ficoll（外周血淋巴细胞分离液，GE Healthcare）离心分离法，400g，30 分钟，从正常人外周血中分离淋巴细胞，用 1×PBS 重悬，进行细胞计数。随后在每个 1.5ml Ep 管中放入 1×10^6 个细胞，并加入 10μl 小鼠血清，4℃封闭 30 分钟，随后加入 1×PBS 洗涤，3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 100μl 的 1×PBS 重悬细胞沉淀，并加入 AF647 标记的抗体 4，PercP-Cy5.5 标记的小鼠抗人 CD3 抗体（购自 Biolegend），PE-Cy7 标记的小鼠抗人 CD8 抗体（购自 BD），BV421 标记的小鼠抗人 CD4 抗体（购自 BD）和 BV605 标记的小鼠抗人 CD56 抗体（购自 Biolegend），4℃避光孵育 30 分钟，随后加入 1×PBS 洗涤两遍，3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 200μl 的 1×PBS 重悬细胞沉淀，并使用流式细胞仪（BD LSR II）进行检测，检测结果如图 8 所示。

45 从图 8 可以看出，鼠源抗体 4 可以结合人淋巴细胞膜表面的 PVRIG 蛋白。

采用流式细胞术对肿瘤细胞系表面 CD112 的表达进行了评价。实验过程如下：

收集 SW620 结肠癌细胞系（中科院上海细胞库），A375 黑色素瘤细胞系（中科院上海细胞库）和 SK-OV-3 卵巢癌细胞系（中科院上海细胞库），用 1×PBS 洗涤重悬之后，进行细胞计数。随后在每个 1.5ml Ep 管中放入 2×10^5 个细胞，并加入 10μl 小鼠血清，4℃ 封闭 30 分钟，随后加入 1×PBS 洗涤，3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 100μl 的 1×PBS 重悬细胞沉淀，并加入 APC 标记的小鼠抗人 CD112 抗体（购自 Biolegend），4℃ 避光孵育 30 分钟，随后加入 1×PBS 洗涤两遍，3500rpm 离心 5 分钟收集细胞。用 200μl 的 1×PBS 重悬细胞沉淀，并使用流式细胞仪（BD LSR II）进行检测，检测结果如图 9 所示。

从图 9 可以看出，在多种肿瘤细胞系表面都高表达 PVRIG 的配体 CD112。

实验继续评价了鼠源抗体促进 NK 细胞的细胞毒作用。实验过程如下：

通过使用 Ficoll（外周血淋巴细胞分离液，GE Healthcare）离心分离法，400g，30 分钟，从正常人外周血中分离淋巴细胞，用 1×PBS 重悬；随后应用 NK 细胞分选试剂盒（美天妮，Human NK Cell Isolation Kit）纯化出 NK 细胞。随后以纯化的 NK 细胞为效应细胞，CFSE（购自 Thermo Scientific）标记的 SW620 结肠癌细胞系作为靶细胞，按照 1.25: 1，2.5: 1 和 5: 1 的效靶比，放入 96 孔圆底板中，在培养体系中分别加入 10μg/ml 的小鼠 IgG1 作为对照抗体以及鼠源抗体（抗体 4），250g，离心 4 分钟，随后于 37℃ 孵育 4 小时。采用 7AAD 标记被杀伤的肿瘤细胞，并使用流式细胞仪（BD LSR II）进行检测，分析统计结果如图 10 所示。

从图 10 可以看出，在不同的效靶比条件下，鼠源抗体（抗体 4）都能够大幅促进 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤。

实验进一步评价了鼠源抗体促进人 PBMC 的细胞毒作用。实验过程如下：

通过使用 Ficoll（外周血淋巴细胞分离液，GE Healthcare）离心分离法，400g，30 分钟，从正常人外周血中分离淋巴细胞，用 1×PBS 重悬；随后以人 PBMC 细胞为效应细胞，CFSE（购自 Thermo Scientific）标记的 SW620 结肠癌细胞系或者 A375 黑色素瘤细胞或者 SK-OV-3 卵巢癌细胞作为靶细胞，按照 12.5: 1，25: 1 和 50: 1 的效靶比，放入 96 孔圆底板中，在培养体系中分别加入 10μg/ml 的小鼠 IgG1 作为对照抗体以及鼠源抗体（抗体 4），250g，离心 4 分钟，随后于 37℃ 孵育 4 小时。采用 7AAD 标记被杀伤的肿瘤细胞，并使用流式细胞仪（BD LSR II）进行检测，分析统计结果如图 11 所示。

从图 11 可以看出，在不同的效靶比条件下，鼠源抗体 Antibody 4 都能够大幅促进人 PBMC 细胞对多种肿瘤细胞的杀伤。

实验进一步采用流式细胞术评价了鼠源抗体促进 NK 细胞的效应分子表达效果。实验过程如下：

通过使用 Ficoll（外周血淋巴细胞分离液，GE Healthcare）离心分离法，400g，30 分钟，从正常人外周血中分离淋巴细胞，用 1×PBS 重悬；随后以人 PBMC 细胞为效应细胞，SW620 结肠癌细胞系作为靶细胞，按照 25: 1 的效靶比，放入 96 孔圆底板中，在培养体系中分别加入 10μg/ml 的小鼠 IgG1 作为对照抗体以及鼠源抗体（抗体 4），250g，离心 4 分钟，随后于 37℃ 孵育 24 小时。在最后 4 小时孵育时加入 2.5μg/ml 的莫能霉素（购自 Sigma）和 BV510 标记的小鼠抗人 CD107a 抗体（购自 Biolegend）。孵育结束后，收集细胞，并用 1×PBS 洗涤，以 100μl 的 1×PBS 重悬细胞，加入 10μl 的小鼠血清，4℃ 封闭 30 分钟。以 1×PBS 洗涤，以 100μl 的 1×PBS 重悬细胞，分别加入 PercP-Cy5.5 标记的小鼠抗人 CD3 抗体（购自 Biolegend），PE-Cy7 标记的小鼠抗人 CD8 抗体（购自 BD），BV421 标记的小鼠抗人 CD4 抗体（购自 BD）和 BV605 标记的小鼠抗人 CD56 抗体（购自 Biolegend），4℃ 避光孵育 30 分钟，随后加入 1×PBS 洗涤两遍，350g 离心 5 分钟收集细胞。以 Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer（购自 eBioscience）重悬细胞，并加入 FITC 标记的小鼠抗人 IFN-γ（购自 Biolegend）和 PE 标记的小鼠抗人 TNF-α（购自 Biolegend），4℃ 孵育 1 小时。后加入 1×PBS 洗涤两遍，500g 离心 5 分钟收集细胞。以 200μl 的 1×PBS 重悬细胞，并使用流式细胞仪（BD FACS Celesta）进行检测，分析统计结果如图 12 所示。

从图 12 可以看出，鼠源抗体（抗体 4）能够增强 NK 细胞的脱颗粒能力并促进细胞因子的分泌。

实验通过 ELISA 的方法评价了鼠源抗体促进 NK 细胞细胞因子的分泌的效果。实验过程如下：通过使用 Ficoll（外周血淋巴细胞分离液，GE Healthcare）离心分离法，400g，30 分钟，从正常人外周血中分离淋巴细胞，用 1×PBS 重悬；随后应用 NK 细胞分选试剂盒（美天妮，Human NK Cell Isolation Kit）纯化出 NK 细胞。随后以纯化的 NK 细胞为效应细胞，SW620 结肠癌细胞系作为靶细胞，按照 2.5: 1 的效靶比，放入 96 孔圆底板中，在培养体系中分别加入 10μg/ml 的小鼠 IgG1

作为对照抗体以及鼠源抗体(抗体4), 250g, 离心4分钟, 随后于37℃孵育18小时。随后收集细胞培养上清, 通过ELISA试剂盒(购自达科为)来检测培养上清中IFN- γ 的含量。ELISA分析统计结果如图13所示。可以看出, 鼠源抗体(抗体4)能够促进NK细胞分泌IFN- γ 。

5 实验评价了鼠源抗体抑制肿瘤生长的活性。实验过程如下:

体外扩增SW620结肠癌细胞(中科院上海细胞库), 收集细胞, 并用1×PBS洗涤两遍, 800rpm离心5分钟收集细胞, 并用无菌生理盐水重悬细胞, 进行细胞计数, 调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml, 接种100 μ l细胞于6-8周龄的B-NDG小鼠右侧腋窝皮下, 在第7天时, 将荷瘤小鼠进行随机分组, 并进行尾静脉转输经过Ficoll分离得到的人PBMC细胞, 1×10^7 个细胞每只小鼠。于次日开始进行PBS或者小鼠IgG对照抗体或者鼠源抗体Antibody 4(250 μ g/只)的腹腔注射, 每3天给药1次, 共治疗5次。每3天测量一次小鼠皮下肿瘤的长边和短边, 并对小鼠进行称重。按照经验公式(肿瘤大小=长边×短边×短边/2)可以计算得到肿瘤大小, 结果见图14, 结果说明鼠源抗体(抗体4)能够在体内抑制皮下肿瘤的生长。

实验进一步通过ELISA的方法评价了人源化抗体结合人PVRIG的活性。实验过程如下:

用1×PBS(磷酸盐缓冲液)稀释重组人PVRIG-人IgG1 Fc融合蛋白至1.0 μ g/ml, 100 μ l/孔, 包被96孔ELISA板, 4℃过夜, 用PBST(0.05%的Tween20-PBS)清洗3遍, 1%的BSA封闭, 37℃孵育2小时。PBST清洗3遍, 分别加入经过倍比稀释的人源化抗体, 设置8个浓度, 用人IgG4(购自Biolegend)作为阴性对照, 100 μ l/孔, 37℃孵育1小时。PBST清洗3遍, 每孔加入100 μ l辣根过氧化物酶(HRP)标记的小鼠抗人IgG4-Fc抗体(购自Southern Biotech, 1:5000稀释), 37℃孵育1小时。清洗后每孔加入100 μ l的TMB底物液, 避光显色10-15分钟, 加入终止液(2M的H₂SO₄)100 μ l/孔, 终止后立即用酶标仪进行检测, 读取波长450nm的吸光值(OD450), 结果见图15。

20 从图15可以看出, 人源化抗体都能够特异性结合人PVRIG蛋白。

实验通过流式细胞术评价了人源化抗体结合人PVRIG的活性。

收集293T-human PVRIG细胞系, 用1×PBS洗涤重悬之后, 进行细胞计数。随后在每个1.5ml Ep管中放入 2×10^5 个细胞, 分别加入不同浓度的各人源化抗体, 4℃孵育30分钟, 随后加入1×PBS洗涤, 3500rpm离心5分钟收集细胞。用100 μ l的1×PBS重悬细胞沉淀, 并加入AF647标记的小鼠抗人IgG-Fc抗体(购自Biolegend), 4℃避光孵育30分钟, 随后加入1×PBS洗涤两遍, 3500rpm离心5分钟收集细胞。用200 μ l的1×PBS重悬细胞沉淀, 并使用流式细胞仪(BD LSR II)进行检测, 分析统计结果如图16所示。可以看出, 各人源化抗体均能够特异性结合细胞膜表面的人PVRIG蛋白。

实验通过流式细胞术评价了人源化抗体结合食蟹猴PVRIG的活性。实验过程如下:

30 收集293T-食蟹猴PVRIG细胞系, 用1×PBS洗涤重悬之后, 进行细胞计数。随后在每个1.5ml Ep管中放入 2×10^5 个细胞, 分别加入不同浓度的各人源化抗体, 4℃孵育30分钟, 随后加入1×PBS洗涤, 3500rpm离心5分钟收集细胞。用100 μ l的1×PBS重悬细胞沉淀, 并加入AF647标记的小鼠抗人IgG-Fc抗体(购自Biolegend), 4℃避光孵育30分钟, 随后加入1×PBS洗涤两遍, 3500rpm离心5分钟收集细胞。用200 μ l的1×PBS重悬细胞沉淀, 并使用流式细胞仪(BD LSR II)进行检测, 分析统计结果如图17所示。

35 从图17可以看出, 各人源化抗体均能够特异性结合细胞膜表面的食蟹猴PVRIG蛋白。

实验采用流式细胞术评价了人源化抗体阻断人PVRIG与配体结合的活性。实验过程如下:

40 收集293T-人CD112细胞系, 用1×PBS洗涤重悬之后, 进行细胞计数。随后在每个1.5ml Ep管中放入 2×10^5 个细胞, 分别加入人源化抗体以及10 μ g/ml的人PVRIG-人IgG1 Fc融合蛋白, 4℃孵育30分钟, 随后加入1×PBS洗涤, 3500rpm离心5分钟收集细胞。用100 μ l的1×PBS重悬细胞沉淀, 并加入AF647标记的小鼠抗人IgG-Fc抗体(购自Biolegend), 4℃避光孵育30分钟, 随后加入1×PBS洗涤两遍, 3500rpm离心5分钟收集细胞。用200 μ l的1×PBS重悬细胞沉淀, 并使用流式细胞仪(BD LSR II)进行检测。分析统计结果如图18所示, 人源化抗体均能够有效阻断人PVRIG与其配体CD112的结合。

45 实验进一步评价了人源化抗体促进人PBMC的细胞毒作用。实验过程如下:

通过使用Ficoll(外周血淋巴细胞分离液, GE Healthcare)离心分离法, 400g, 30分钟, 从正常人外周血中分离淋巴

细胞，用 1×PBS 重悬；随后以人 PBMC 细胞为效应细胞，CFSE（购自 Thermo Scientific）标记的 SW620 结肠癌细胞系作为靶细胞，按照 25: 1 的效靶比，放入 96 孔圆底板中，在培养体系中分别加入 10μg/ml 的人 IgG4 作为对照抗体，鼠源抗体（抗体 4）及人源化抗体，250g，离心 4 分钟，随后于 37℃孵育 4 小时。采用 7AAD 标记被杀伤的肿瘤细胞，并使用流式细胞仪（BD LSR II）进行检测，分析统计结果如图 19 所示。可以看出，人源化抗体均能够大幅促进人 PBMC 细胞对肿瘤细胞的杀伤。

表面等离子体共振（SPR）测定亲和力常数：
采用表面等离子体共振(Biacore)测定方法对本发明抗体对人 PVRIG 的结合动力学以及解离平衡常数(KD)进行测定。简而言之，在 CM5 芯片上包被 PVRIG-人 IgG1 Fc 融合蛋白，进行封闭之后，将不同浓度的抗体溶液以固定流速通过 CM5 芯片，并与抗原结合 2 分钟，随后转移至解离缓冲液中 6 分钟进行解离率的测定。用 1:1 结合模型分析其动力学。在大致如上所述的实验中，测定得到鼠源抗体的亲和力如表 1 所示，以及各人源化抗体的亲和力如表 2 所示。

表 1 鼠源抗体亲和力大小

克隆	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
抗体 1	1.33E+05	4.19E-05	3.16E-10
抗体 2	9.05E+04	1.37E-04	1.51E-09
抗体 3	8.91E+04	8.82E-05	9.90E-10
抗体 4	2.44E+05	1.00E-06	4.10E-12

表 2 人源化抗体亲和力大小

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
抗体 4-hu1	1.97E+05	2.32E-05	1.18E-10
抗体 4-hu2	2.66E+05	6.38E-05	2.39E-10
抗体 4-hu3	2.12E+05	1.95E-05	9.16E-11
抗体 4-hu4	1.88E+05	4.44E-05	2.36E-10
抗体 4-hu5	2.36E+05	3.54E-06	1.50E-11
抗体 4-hu6	2.81E+05	1.00E-06	3.56E-12
抗体 4-hu7	2.77E+05	1.00E-06	3.61E-12
抗体 4-hu8	1.98E+05	1.00E-06	5.05E-12
抗体 4-hu10	2.50E+05	1.00E-06	4.00E-12
抗体 4-hu11	2.37E+05	1.00E-06	4.22E-12

从上述内容可以看出，所获得的抗体 1~4 以及对应的抗体 4 的人源化抗体均表现出优异的 PVRIG 的亲和力，且能够表现出良好的抗肿瘤效果。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

权利要求书

- 1、一种抗体或抗体片段，其特征在于，所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；
- 5 其中 HCDR1 选自 GYTFSSFS、GYTFSTFA 或 GYSFTAYT 所示序列，
HCDR2 选自 ILPGSNST、ILPGINNT、ILPGGNNT 或者 INPYNGGT 所示序列，
HCDR3 选自 SSYWFAY、STYWFAY 或 AREGNYGSRGDFDY 所示序列；
其中，LCDR1 选自 QLLNSGNQKNY 或 QTIVTN 所示序列，
LCDR2 选自 GAS 或 YAS 所示序列；
- 10 LCDR3 选自 QNAHSYPPT、QNAHSYPPA 或 QQSHSWPFT 所示序列。
- 2、一种抗体或抗体片段，其特征在于，所述抗体或抗体片段分别选自下列中的一种：
- (1) 所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区和轻链互补决定区，所述重链互补决定区包括 GYTFSSFS、ILPGSNST 和 SSYWFAY；所述轻链互补决定区包括 QLLNSGNQKNY、GAS 和 QNAHSYPPT；
- 15 (2) 所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区和轻链互补决定区，所述重链互补决定区包括 GYTFSTFA、ILPGINNT 和 STYWFAY；所述轻链互补决定区包括 QLLNSGNQKNY、GAS 和 QNAHSYPPT；
- (3) 所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区和轻链互补决定区，所述重链互补决定区包括 GYTFSTFA、ILPGGNNT 和 STYWFAY；所述轻链互补决定区包括 QLLNSGNQKNY、GAS 和 QNAHSYPPA；
- (4) 所述抗体或抗体片段包括重链互补决定区和轻链互补决定区，所述重链互补决定区包括 GYSFTAYT、INPYNGGT 和 AREGNYGSRGDFDY；所述轻链互补决定区包括 QTIVTN、YAS 和 QQSHSWPFT。
- 20 3、一种抗体或抗体片段，其特征在于，所述抗体或抗体片段选自下列至少之一：
- (1) 所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:1 所示序列或者与 SEQ ID NO:1 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:2 所示序列或者与 SEQ ID NO:2 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列；
- (2) 所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID
- 25 NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33 所示序列或者与 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:36 所示序列或者与 SEQ ID NO:36 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列；
- (3) 所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:39 所示序列或者与 SEQ ID
- 30 NO:39 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:40 所示序列或者与 SEQ ID NO:40 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列；
- (4) 所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:41 所示序列或者与 SEQ ID NO:41 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:42 所示序列或者与 SEQ ID NO:42 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列；
- 35 (5) 所述抗体或抗体片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区为 SEQ ID NO:43 所示序列或者与 SEQ ID NO:43 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列，所述轻链可变区为 SEQ ID NO:44 所示序列或者与 SEQ ID NO:44 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列。
- 4、根据权利要求 3 所述的抗体或抗体片段，其特征在于，包括重链和轻链，所述重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID
- 40 NO:31、SEQ ID NO:34 所示序列，或者与 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34 所示序列相比具有至少一个氨基酸取代的序列；
- 所述轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:37 所示序列或者与 SEQ ID NO:37 所示序列相比至少具有一个氨基酸取代的序列。
- 5、一种可分离的核酸，其特征在于，所述核酸编码权利要求 1~4 中任一项所述的抗体或抗体片段。
- 45 6、一种表达载体，其特征在于，所述表达载体含有权利要求 5 所述的核酸。
- 7、一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞表达权利要求 1~4 中任一项所述的抗体或抗体片段。
- 8、根据权利要求 7 所述的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞中含有权利要求 6 所述的表达载体。
- 9、一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包括权利要求 1~4 中任一项所述的抗体或抗体片段和药学上可接受的载体。
- 50 10、权利要求 1~4 中任一项所述的抗体或抗体片段或者权利要求 9 所述的药物组合物在制备治疗癌症的药物中的用途。
- 11、一种药物联合，其特征在于，包括：
- (1) 权利要求 1~4 中任一项所述的抗体或抗体片段，或者权利要求 9 所述的药物组合物；和
- (2) 不同与 (1) 的用于癌症治疗的抗体。
- 55 12、一种在体外抑制样本中 PVRIG 蛋白活性的方法，其特征在于，包括将所述样本和权利要求 1~4 中任一项所述的抗体或抗体片段，或者权利要求 9 所述的药物组合物接触。
- 13、一种预防或者治疗癌症的方法，其特征在于，包括给予受试者有效量的权利要求 1~4 中任一项所述的抗体或抗体片段或者权利要求 9 所述的药物组合物。