

抗 TIGIT 抗体及其用途

技术领域

本发明涉及特异性结合 TIGIT 的新型抗体和抗体片段以及含有所述抗体或抗体片段的组合物。此外，本发明涉及编码所述抗体或其抗体片段的核酸及包含其的宿主细胞，以及相关用途。此外，本发明涉及这些抗体和抗体片段的治疗和诊断用途。

背景技术

TIGIT(含 Ig 和 ITIM 结构域的 T 细胞免疫受体，也称为 WUCAM、Vstm3 或 Vsig9)最初是利用生物信息学比对的方法作为 CD28 家族成员之一被发现。TIGIT 是一种表达于多种免疫细胞(自然杀伤细胞/激活的 T 细胞/记忆 T 细胞/调节性 T 细胞/滤泡性 T 辅助细胞等)膜表面的一种共抑制受体，为免疫球蛋白超家族成员之一。据认为，TIGIT 分子可能通过以下三种机制对免疫系统发挥调节作用：1) TIGIT 与一种共刺激受体 CD226 竞争性结合表达于树突状细胞或癌细胞表面的共享配体 CD155/CD112，向表达 TIGIT 的细胞传递抑制信号，抑制这类细胞的激活；2) TIGIT 与共刺激受体 CD226 直接相互作用，破坏 CD226 的同源二聚化进而阻断其向下游传递的激活信号；3) TIGIT 与表达于树突状细胞的 CD155 结合后，胞内段 ITIM 序列传导抑制信号进而表达免疫抑制细胞因子抑制免疫系统的激活。TIGIT 可能在肿瘤微环境中的多种细胞中发挥作用。这些细胞可能是肿瘤浸润的 CD8 阳性 T 细胞，可能是调节性 T 细胞，也可能是 NK 细胞。总体来说，众多研究都表明第一种机制可能是 TIGIT 发挥其免疫抑制性作用的最关键机制。

已经证实，结合人 TIGIT 的抗体可用于治疗癌症。参见例如 WO 2006/124667。在小鼠模型中，PD-L1 和 TIGIT 二者的抗体阻断可以导致协同提高 CD8+ T 细胞介导的肿瘤排斥。Grogan et al. (2014) J. Immunol. 192(1) Suppl. 203.15; Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26:1-15。在黑色素瘤的动物模型中得到类似结果。Inozume et al. (2014) J. Invest. Dermatol. 134:S121 - Abstract 693。

鉴于 TIGIT 在免疫反应中的作用，TIGIT 被认为是一个有吸引力的癌症免疫治疗靶点。因此，本领域存在着开发新的 TIGIT 抗体的需求，尤其是靶向 TIGIT 的 CD155/CD112 阻断型抗体，特别是人抗 TIGIT 抗体，及其组合疗法，用于疾病治疗，尤其是癌症治疗。

发明概述

本发明提供了抗 TIGIT 抗体及其编码基因与应用。通过基因工程手段和酵母表面展示技术，本发明人从展示在酵母表面的人抗体库中筛选出抗人 TIGIT 的全人源抗体，在此基础上进一步获得经亲和力和成熟的高亲和力和抗人 TIGIT 抗体。本发明的全人源抗体分子能够有效地阻断 TIGIT 与其配体 CD155 的结合，减少或消除传递至细胞的抑制性信号，增加 IL-2 产生，并且在体内施用时抑制肿瘤生长，尤其是在与抗 PD-1 抗体联用时，抑瘤效果尤为显著。因此，本发明的抗体可以用于多种用途，包括但不限于增强免疫反应、抑制肿瘤生长、抗感染和检测 TIGIT 蛋白。

本发明因此提供了一种新的结合人 TIGIT 的全人源抗体, 以及其抗原结合片段。

在一些实施方案中, 本发明的抗 TIGIT 抗体具有以下一个或多个特性:

- (i) 以高亲和力与人 TIGIT 结合;
- (ii) 具有与猴和/或鼠 TIGIT 的交叉免疫反应性;
- (iii) 与细胞表面的 TIGIT 有效结合;
- (iv) 阻断 TIGIT 与其配体 CD155 的结合;
- (v) 解除 CD155 与 TIGIT 的结合对 TIGIT 下游 IL-2 信号通路的抑制作用;
- (vi) 增加 T 细胞中的 IL-2 产生;
- (vii) 具有抗肿瘤活性, 例如抑制肿瘤的生长;
- (viii) 与抗 PD-1 抗体组合具有更好的肿瘤抑制作用, 例如能够更好地抑制肿瘤生长。

在一些实施方案中, 本发明提供了结合 TIGIT 的抗体或其抗原结合片段, 包含: SEQ ID NO: 84-103 所示的重链可变区之一的 HCDR1、2 和 3 序列, 和/或 SEQ ID NO: 104-110 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列, 或所述 CDR 序列组合的变体。

在一些实施方案中, 本发明也提供抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段, 所述抗体与本发明示例性抗体(如具有表 B 所列抗体 VH 和 VL 序列组合的抗体)结合相同或重叠的表位和/或竞争结合 TIGIT、和/或抑制(例如, 竞争性抑制)本发明示例性抗体。

在一些实施方案中, 本发明提供了编码本发明抗体或其抗原结合片段的核酸, 包含所述核酸的载体, 包含所述载体的宿主细胞。

在一些实施方案中, 本发明提供了制备本发明抗体或其抗原结合片段的方法。

在一些实施方案中, 本发明提供了包含本发明抗体的免疫缀合物、药物组合物和组合产品。

本发明还提供了利用本发明抗体在受试者中阻断 TIGIT 与 CD155 的结合(例如, 树突细胞或癌细胞表面表达的 CD155)的方法。在一些实施方案中, 通过所述方法, 在表达 TIGIT 的细胞(尤其是 T 细胞、自然杀伤细胞)中降低或消除 TIGIT 介导的抑制信号传导, 刺激 T 细胞和 NK 细胞的激活。在一些实施方案中, 通过所述方法, 增加 T 细胞中 IL-2 的产生。在一些实施方案中, 通过所述方法, 在表达 CD155 的细胞(例如树突细胞)中减少由 CD155 介导的抑制信号传导, 减少免疫抑制细胞因子的表达。在一些实施方案中, 通过所述方法, 促进免疫系统的激活。因此, 本发明也提供了利用本发明抗体预防或治疗癌症或感染的方法。

本发明还涉及在样品中检测 TIGIT 的方法。

在下面的附图和具体实施方案中进一步说明本发明。然而, 这些附图和具体实施方案不应被认为限制本发明的范围, 并且本领域技术人员容易想到的改变将包括在本发明的精神和所附权利要求的保护范围内。

附图说明

图 1A-F 显示了亲和力成熟前后酵母表达的抗体对表达于 CHO 细胞表面的人 TIGIT 的结合。

图 2 显示了 CHO 细胞表达的 7 个候选抗体对表达于 CHO 细胞表面的人 TIGIT 的结合。

图 3A-F 显示了亲和力成熟前后酵母表达的抗体对 CD155 的阻断能力。

图 4 显示了 CHO 细胞表达的 7 个候选抗体对 CD155 的阻断能力。

图 5A-E 显示了亲和力成熟前后酵母表达的抗体的 MOA 生物学活性检测

图 6 显示了 CHO 细胞表达的 7 个候选抗体的 MOA 生物学活性检测

图 7 显示了候选分子 ADI-30293 和 ADI-30278 单独给药(10mg/kg)在人 TIGIT 敲入-MC38 小鼠模型中的药效学研究。

图 8A-B 显示了候选分子 ADI-30293 和 ADI-30278 与抗 PD1 抗体 antibody C (WO2017133540A1) 联合给药 (10+1 mg/kg) 在人 TIGIT 敲入-MC38 小鼠模型中的药效学研究。

图 9 显示了用于本发明实施例中的示例性人 TIGIT 序列。

发明详述

定义

除非另有定义，否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域一般技术人员通常所理解的含义相同的含义。为了本发明的目的，下文定义了以下术语。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5% 的下限和比指定数字数值大 5% 的上限的范围内的数字数值。

术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或多项的组合。

如本文中所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

在本文中，术语“抗体”是指至少包含轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽，所述免疫球蛋白可变区特异性识别并结合抗原。该术语涵盖各种抗体结构，包括、但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体或多链抗体、单特异性或多特异性抗体（例如双特异性抗体）、全人源抗体或嵌合抗体或人源化抗体、全长抗体和抗体片段，只要它们呈现期望的抗原结合活性即可。

本领域技术人员明了，“全抗体”（在本文中可与“全长抗体”、“完全抗体”和“完整抗体”互换使用）包含至少两条重链(H)和两条轻链(L)。每条重链由重链可变区(本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。可变区是抗体的重链或轻链中参与抗体与其抗原结合的结构域。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是显示出多种效应子功能。抗体的轻链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列归入两种类型（称为 kappa (κ) 和 lambda (λ)）中的一种。抗体的重链可以取决于其重链恒定区的氨基酸序列而划分为主要 5 种不同的类型：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，并且这些类型中的几种可以进一步划分成亚类，如，IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4、IgA1 以及 IgA2。对应于该 5 种不同抗体类型的重链恒定区分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。术语“同种型”是指由抗体重链恒定区确

定的抗体类型。参见例如 Fundamental Immunology, Ch.7(Paul, W.编辑, 第二版, Raven Press, N.Y.(1989))(其为所有目的以其整体在此引作参考)。

术语抗体的“抗原结合部分”(在本文中可与“抗体片段”和“抗原结合片段”互换使用),是指并非完整抗体的分子,其包含完整抗体中用于结合该完整抗体所结合的抗原的部分。如本领域技术人员理解的,抗体的抗原结合部分通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。可以通过重组 DNA 技术、或通过酶或化学切割完整的抗体制备抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于 Fab、scFab、Fab'、F(ab')₂、Fab'-SH、Fv、单链 Fv、双链抗体(diabody)、三链抗体(triobody)、四链抗体(tetrabody)、微抗体(minibody)、单结构域抗体(sdAb)。关于抗体片段的更详细的描述,可以参见:基础免疫学(Fundamental Immunology), W. E. Paul 编辑, Raven Press, N.Y. (1993); 邵荣光等人(编辑), 抗体药物研究与应用, 人民卫生出版社(2013); Hollinger 等人, PNAS USA 90:6444-6448(1993); Hudson 等人, Nat.Med.9:129-134(2003)。

术语“人抗体”或“全人源抗体”在本文中可以互换使用,指包括其中构架区和 CDR 区二者均源自人种系免疫球蛋白序列的可变区的抗体。而且,如果抗体含有恒定区,恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸序列(例如,通过体外随机或点特异诱变或体内体细胞突变引入的突变),例如在 CDR——尤其在 CDR3 中。然而,如本文所使用的,术语“人抗体”不包括其中的 CDR 序列衍生自其他哺乳动物物种(如,小鼠)的种系而移植入人构架序列的抗体。

如本文所用,术语“重组人抗体”包括所有通过重组方式制备、表达、产生或分离的人抗体,例如,(a)自用人免疫球蛋白基因进行转基因或转染色体的动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤分离的抗体,(b)自转化成表达人抗体的宿主细胞例如转染瘤分离的抗体,(c)自重组、组合人抗体文库例如酵母展示文库分离的抗体,和(d)通过包括剪接人免疫球蛋白基因至其他 DNA 序列的任意其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。这些重组人抗体具有构架区和 CDR 区源自人种系免疫球蛋白序列的可变区。然而,在某些实施方案中,可以对重组人抗体进行体外诱变(或使用人 Ig 序列转基因动物时为体内体细胞诱变),由此得到的重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列,尽管源自人种系 VH 和 VL 序列并与之相关、但是并不天然存在于体内的人抗体种系库中。

术语“嵌合抗体”是指可变区序列源自一物种、恒定区序列源自另一物种的抗体,例如,其中可变区序列源自小鼠抗体、恒定区序列源自人抗体的抗体。

术语“人源化抗体”是指将源自其他哺乳动物物种例如小鼠种系的 CDR 序列接到人构架序列上的抗体。可以在人构架序列内进行额外的构架区修饰。

“分离的”抗体是已经与它的天然环境中的组分分离的抗体。在一些实施方案中,将抗体纯化至大于 95%或 99%纯度,所述纯度通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如,离子交换或反相 HPLC)确定。关于评价抗体纯度的方法的综述,参见,例如,Flatman, S.等, J.Chrom.B 848 (2007) 79-87。

术语“表位”是指抗体所结合的抗原区域。表位可以由连续的氨基酸形成或者通过蛋白的三级折叠而并置的非连续氨基酸形成。

在本文中, TIGIT 是指“含 Ig 和 ITIM 结构域的 T 细胞免疫受体”。该表述也包括 TIGIT

的变体、同种型、同源物、和物种同源物。术语“人 TIGIT”指的是人序列 TIGIT。一个具体的人 TIGIT 序列示于 SEQ ID NO: 208 中。在一些实施方案中,人 TIGIT 序列与 SEQ ID NO: 208 的人 TIGIT 氨基酸序列具有至少 95%,甚至至少 96%,97%,98%,或 99%氨基酸序列同一性。TIGIT 蛋白也可包括 TIGIT 的片段,诸如包含胞外结构域的片段,例如保持与本发明任何抗体结合能力的片段。在本文中,CD155,也称作 PVR(脊髓灰质炎病毒受体);PVS;HVED;CD155;NECL5;TAGE4;Necl-5,其与 TIGIT 相互作用诱导免疫抑制信号。

术语“特异性结合”表示抗体选择性地或优先地结合抗原。如果在生物光干涉测量中,抗体以大约 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低、大约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低、大约 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、大约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、大约 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D ,与人 TIGIT 结合,则该抗体是“与人 TIGIT 特异性结合”的抗体。然而,特异性结合人 TIGIT 的抗体可以与来自其它物种的 TIGIT 蛋白具有交叉反应性。例如,特异于人 TIGIT 的抗体,在一些实施方案中,可以与非人物种的 TIGIT 蛋白交叉反应。在另一些实施方案中,特异于人 TIGIT 的抗体可以完全特异于人 TIGIT 而不表现出物种或其它类型的交叉反应性,或仅表现出对某些物种的 TIGIT 的交叉反应性。

如本文所用的,术语“交叉反应”是指抗体结合来自不同物种的 TIGIT 的能力。例如,本文所述的结合人 TIGIT 的抗体还可结合来自其它物种的 TIGIT (例如,猴和/鼠 TIGIT)。测定交叉反应性的方法包括实施例所述的方法以及本领域已知的标准测定法,例如通过使用生物光干涉,或流式细胞术技术。

“亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对其配偶物 Y 的亲和力可以通常由平衡解离常数(K_D)代表,平衡解离常数是解离速率常数和结合速率常数(分别是 k_{dis} 和 k_{on})的比值。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中的 ForteBio 动力学结合测定法。

术语“高亲和力”对于 IgG 抗体指,该抗体以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低、优选地 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、更优选地大约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、甚至更优选地大约 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D ,与靶抗原结合。然而,“高亲和力”结合可以随抗体同种型而变。例如对于 IgM 同种型,“高亲和力”指抗体具有 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 或更低、优选地 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低、更优选地大约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 。

与结合例如 TIGIT 的抗原的参考抗体“竞争结合的抗体”是指这样的抗体,所述抗体在竞争检验中阻断参考抗体与抗原(例如 TIGIT)结合的 50%或更多,并且反过来,参考抗体在竞争检验中阻断该抗体与抗原(例如 TIGIT)结合的 50%或更多。示例性竞争检验描述于:“Antibodies”,Harlow and Lane(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY)。竞争结合的抗体可以与参考抗体结合相同的表位区,例如相同表位、相邻表位或重叠表位。

抑制(例如竞争性抑制)参照抗体与其抗原的结合的抗体是指这样的抗体,其抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述参照抗体与其抗原的结合。换言之,参照抗体抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。抗体与其抗原的结合可以亲和力(例如平衡解离常数)衡量。测定亲和力的方法是本领域已知的。

与参照抗体显示相同或相似的结合亲和力和/或特异性的抗体是指这样的抗体,其能够具有参照抗体的至少 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的结合亲和力和/或特异性。这可以通过本领域已知的任何测定结合亲和力和/或特异性的方法进行测定。

本文中的术语“Fc 区”用于定义含有至少一部分的恒定区的免疫球蛋白重链的 C-端区域。

该术语包括天然序列 Fc-区和变体 Fc-区。在一个实施方案中，人 IgG 重链 Fc-区从重链的 Cys226 或从 Pro230 延伸至羧基端。然而，Fc-区的 C-端赖氨酸 (Lys447) 可以存在或可以不存在。除非本文中另外指出，Fc-区或恒定区中的氨基酸残基的编号根据 EU 编号系统，也称为 EU 索引，如 Kabat, E.A.等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242 中所述。

与抗体相关的术语“变体”在本文中是指，与参考抗体相比，包含已经通过至少 1 个，例如 1-30，或 1-20 或 1-10 个，例如 1 或 2 或 3 或 4 或 5 个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的目标抗体区域的抗体，其中变体基本上保持改变之前的抗体分子的至少一个生物学特性(例如，抗原结合能力)。目标抗体区域可以是抗体全长、或重链可变区或轻链可变区或其组合、或(一个或多个)重链 CDR 区或(一个或多个)轻链 CDR 区或其组合。在本文中，相对于参考抗体区域具有氨基酸改变的抗体区域，也称作该抗体区域的“变体”。

在本文中，“序列同一性”是指在比较窗中以逐个核苷酸或逐个氨基酸为基础的序列相同的程度。可以通过以下方式计算“序列同一性百分比”：将两条最佳比对的序列在比较窗中进行比较，确定两条序列中存在相同核酸碱基(例如，A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys 和 Met)的位置的数目以得到匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数(即，窗大小)，并且将结果乘以 100，以产生序列同一性百分比。为了确定序列同一性百分数而进行的最佳比对，可以按本领域已知的多种方式实现，例如，使用可公开获得的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数，包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。

在本发明中，就抗体序列而言，氨基酸序列同一性百分数通过将候选抗体序列与参考抗体序列最佳比对后，在一个优选方案中按照 Kabat 编号规则进行最佳比对后，予以确定。在本文中，在不指定比较窗(即待比较的目标抗体区域)的情况下，将适用于在参考抗体序列的全长上进行比对。在一些实施方案中，就抗体而言，序列同一性可以分布在整个重链可变区和/或整个轻链可变区上，或序列百分数同一性可以仅限于构架区，而对应 CDR 区的序列保持 100%相同。

类似地，就抗体序列而言，基于比对，可以确定相对于参考抗体在目标抗体区域具有氨基酸改变的候选抗体。

在本发明中，“保守性取代”是指导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸的氨基酸改变。可以通过本领域已知的标准方法，例如定点诱变和 PCR 介导的诱变，将氨基酸修饰如取代引入本发明的抗体中。

提供功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。在一个优选的方面，保守取代残基来自以下的保守替代表 A，优选地为表 A 中所示的优选保守取代残基。

表 A

原始残基	示例性取代	优选的保守取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

本发明的各方面将在下面各小节中进一步详述。

I. 本发明的抗 TIGIT 抗体

本发明一方面提供特异性地结合 TIGIT，优选人 TIGIT 蛋白质(例如 SEQ ID NO: 208 的人 TIGIT 序列)的抗体或其抗原结合片段，尤其是全人源抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，本发明抗体的抗原结合片段是选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体例如 scFv、(Fab')₂ 片段、单结构域抗体、双抗体(dAb)或线性抗体。

抗体的有利生物性质

在一些实施方案中，本发明的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段以高亲和力与人 TIGIT 结合，例如，解离平衡常数(K_D)小于 100 x 10⁻⁹ M，小于或等于大约 50 x 10⁻⁹ M，更优选地大约 1-30 x 10⁻⁹ M，更优选地小于或等于大约 1 x 10⁻⁹ M，更优选地大约 1-10 x 10⁻¹⁰ M。优选地，K_D 通过使用生物光干涉测定法(例如 ForteBio 亲和和测量法)测定。在一些实施方案中，K_D 值通过测量抗体 Fab 形式(例如酵母表达的 Fab)与人 TIGIT 的单价亲和力来确定，优选地单价 K_D 值为 1-100 x 10⁻¹⁰ M，更优选 1-50 x 10⁻¹⁰ M，更优选 1-10 x 10⁻¹⁰ M 或 2-5 x 10⁻¹⁰ M。在另一些实施方案中，K_D 值通过测量完整抗体(例如 CHO 细胞表达的完整抗体)与人 TIGIT 的单价亲和力来确定，优选地单价 K_D 值为 1-50 x 10⁻¹⁰ M，更优选 1-30 x 10⁻¹⁰ M 或 1-10 x 10⁻¹⁰ M。

在一些实施方案中，本发明的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段与猴 TIGIT 交叉反应。在一些实施方案中，抗体以高亲和力与猴 TIGIT 结合，其中 K_D 值(例如通过测量完整抗体与猴 TIGIT 的单价亲和力来确定)为大约 0.1-100 x 10⁻⁹ M，更优选 0.1-50 x 10⁻⁹ M 或 1-30 x 10⁻¹⁰ M。

在一些实施方案中,抗体与鼠 TIGIT 交叉反应,其中 K_D 值(例如通过测量完整抗体与鼠 TIGIT 的单价亲和力来确定)为大约 $1-100 \times 10^{-9}M$,例如 $1-10 \times 10^{-7}M$ 或 $1-10 \times 10^{-8}M$,或 $1-10 \times 10^{-9}M$ 。在另一些实施方案中,本发明抗 TIGIT 抗体不与鼠 TIGIT 交叉反应。

在一些实施方案中,本发明抗体或其抗原结合片段以高亲和力结合细胞表面表达的 TIGIT。在一个实施方案中,表面表达人 TIGIT 的细胞是 CHO 细胞。优选地,以流式细胞术(例如 FACS)测定,抗体与表达人 TIGIT 的细胞结合的 EC_{50} 值。在一些实施方案中,抗体为酵母表达的完整抗体, EC_{50} 值小于大约 10nM,例如 0.1-1nM,优选地,小于或等于大约 1nM,更优选地大约 0.2-0.9nM,如 0.9nM、0.6M 或 0.4nM。在另一些实施方案中,抗体为 CHO 细胞表达的完整抗体形式, EC_{50} 值小于大约 10nM,例如 0.1-1nM,优选地,大约 0.1-0.3nM,如 0.3nM、0.2M 或 0.1nM。

在一些实施方案中,本发明抗体或其抗原结合片段抑制 TIGIT 的相关活性。在一些实施方案中,本发明抗体或其抗原结合片段阻断 TIGIT 与其配体 CD155 的结合。优选地,以流式细胞术(例如 FACS)测定抗体阻断人 TIGIT(细胞上表达的 TIGIT)与人 CD155 结合的能力(如 IC_{50} 值)。在一些实施方案中,抗体为酵母表达的完整抗体, IC_{50} 值小于大约 10nM,例如 0.1-2nM,优选地,大约 0.1-1.0nM,如 0.8nM、0.6M、0.4nM 或 0.2nM。在另一些实施方案中,抗体为 CHO 细胞表达的完整抗体形式, EC_{50} 值小于大约 1nM,例如 0.1-0.5nM,优选地,约 0.3nM、0.2M 或 0.1nM。

在一些实施方案中,本发明抗体或其抗原结合片段减少或消除由 TIGIT 结合 CD155 引起的抑制性信号传导。在一些实施方案中,本发明抗体或片段在表达 TIGIT 的细胞(尤其是 T 细胞)中降低或消除 TIGIT 介导的抑制性信号传导。在一些实施方案中,本发明抗体或其抗原结合片段诱导 T 细胞中 IL2 启动子下游基因的表达,在一些实施方案中增加 T 细胞的 IL-2 产生。在一些实施方案中,通过荧光报告基因试验(如实施例 5 的 MOA 试验),检测抗体减少或消除由 TIGIT 结合 CD155 引起的抑制性信号传导的能力(如 EC_{50} 值)。在一些实施方案中,抗体为酵母表达的完整抗体, EC_{50} 值优选小于大约 10nM,例如 0.1-5nM,优选地,大约 0.1-3.0nM,如 2.nM、1.5nM、1.0nM、或 0.5nM。在另一些实施方案中,抗体为 CHO 细胞表达的完整抗体, EC_{50} 值优选地小于 5nM,例如大约 0.1-3.0nM,如 1.6nM、1.2nM、1.0nM、或约 0.18-0.5nM。

在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段抑制含有表达人 TIGIT 的浸润淋巴瘤细胞的肿瘤的生长。在一个实施方案中,肿瘤细胞是胃肠道肿瘤,优选结肠直肠癌。例如,在体内肿瘤移植模型中,例如 MC38 小鼠中,抑制结肠癌细胞的生长。在一些实施方案中,本发明抗体与抗 PD1 抗体联用,获得显著好于单独一种抗体施用时的抗肿瘤效果。

优选地,本发明抗体或其抗原结合片段表现出上述性质中的至少一个、更优选地至少二个、更优选地至少三个、四个、或五个,甚至更优选地上述所有性质。

抗体 CDR 区

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”(在本文中可与超变区“HVR”可以互换使用),是抗体可变区中主要负责与抗原表位结合的氨基酸区域。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3,从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

下表 B 中给出了本发明的一些示例性抗体的 VH 和 VL 序列组合：

抗体	VH, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	VL, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成
1	SEQ ID NO:84	SEQ ID NO:104
2	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:104
3	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:104
4	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:104
5	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:105
6	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:105
7	SEQ ID NO:90	SEQ ID NO:106
8	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:107
9	SEQ ID NO:92	SEQ ID NO:107
10	SEQ ID NO:93	SEQ ID NO:107
11	SEQ ID NO:94	SEQ ID NO:108
12	SEQ ID NO:95	SEQ ID NO:108
13	SEQ ID NO:96	SEQ ID NO:108
14	SEQ ID NO:97	SEQ ID NO:108
15	SEQ ID NO:98	SEQ ID NO:109
16	SEQ ID NO:99	SEQ ID NO:109
17	SEQ ID NO:100	SEQ ID NO:109
18	SEQ ID NO:101	SEQ ID NO:110
19	SEQ ID NO:102	SEQ ID NO:110
20	SEQ ID NO:103	SEQ ID NO:110

本领域公知多种用于在一个给定的 VH 或 VL 氨基酸序列中确定其 CDR 序列的方案。例如, Kabat 互补决定区(CDR)是基于序列变异性确定的并且是最常用的(Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。而 Chothia 指的是结构环的位置(Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM HVR 是 Kabat HVR 和 Chothia 结构环之间的折中, 并且由 Oxford Molecular 的 AbM 抗体建模软件使用。“接触性”(Contact) HVR 基于对可获得的复杂晶体结构的分析。根据不同的 CDR 确定方案, 这些 HVR 中的每一个 HVR/CDR 的残基如下所述。

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55

LCDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
HCDR1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat 编号系统)				
HCDR1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia 编号系统)				
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
(Kabat 编号系统)				

HVR 也可以是根据 Kabat 编号系统位于如下 Kabat 残基位置的 HVR 序列：

VL 中的位置 24-36 或 24-34 (LCDR1)，位置 46-56 或 50-56 (LCDR2)，和位置 89-97 或 89-96 位置 (LCDR3)；和 VH 中的位置 26-35 或 27-35B (HCDR1)，位置 50-65 或 49-65 (HCDR2)，和位置 93-102、94-102 或 95-102 (HCDR3)。

在一个实施方案中，本发明抗体的 HVR 是根据 Kabat 编号系统位于如下 Kabat 残基位置的 HVR 序列：

VL 中的位置 24-34 (LCDR1)、位置 50-56 (LCDR2)、和位置 89-97 (LCDR3)，以及 VH 中的位置 27-35B (HCDR1)、位置 50-65 (HCDR2)、和位置 93-102 (HCDR3)。

在一个实施方案中，本发明抗体的 HVR 是根据 Kabat 编号系统位于如下 Kabat 残基位置的 HVR 序列：

VL 中的位置 24-34 (LCDR1)、位置 50-56 (LCDR2)、和位置 89-97 (LCDR3)，以及 VH 中的位置 26-35B (HCDR1)、位置 50-65 (HCDR2)、和位置 95-102 (HCDR3)。

HVR 也可以基于与参考 CDR 序列(例如本发明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 编号位置而确定。

除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”或“HVR”或“HVR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 HVR 或 CDR 序列。

除非另有说明，否则在本发明中，当提及抗体可变区中的残基位置（包括重链可变区残基和轻链可变区残基）时，是指根据 Kabat 编号系统（Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）的编号位置。

在一个优选的实施方案中，本发明 CDR 序列如表 2 所示，其中 HCDR1 为根据 AbM 方案确定的 CDR 序列；其余 CDR 为根据 Kabat 方案确定的 CDR 序列。

在另一个优选的实施方案中，本发明 CDR 序列如表 1 所示。

下表 C 给出了本发明的一些示例性 CDR 序列组合：

组合	HCDR1, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	HCDR2, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	HCDR3, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	LCDR1, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	LCDR2, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	LCDR3, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成
1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
4	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
5	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
6	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:28
7	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:28
8	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:29
9	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:30
10	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43
11	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43
12	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43
13	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43
14	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:59
15	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:59
16	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:59
17	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:59
18	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:59
19	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:70

20	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:70
21	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:70
22	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:70
23	SEQ ID NO:71	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82	SEQ ID NO:83
24	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82	SEQ ID NO:83
25	SEQ ID NO:73	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82	SEQ ID NO:83
26	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82	SEQ ID NO:83

下表 D 给出了本发明的另一些示例性 CDR 序列组合：

组 合	HCDR1, 其 包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基 酸序列或由 其组成	HCDR2, 其 包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基 酸序列或由 其组成	HCDR3, 其 包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基 酸序列或由 其组成	LCDR1, 其 包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基 酸序列或由 其组成	LCDR2, 其 包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基 酸序列或由 其组成	LCDR3, 其 包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基 酸序列或由 其组成
1	SEQ ID NO:178	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:182	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
2	SEQ ID NO:179	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:183	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
3	SEQ ID NO:180	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:184	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
4	SEQ ID NO:181	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:185	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
5	SEQ ID NO:186	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:188	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:28
6	SEQ ID NO:187	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:188	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:28
7	SEQ ID NO:186	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:188	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:29
8	SEQ ID NO:189	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:191	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43
9	SEQ ID NO:189	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:191	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43
10	SEQ ID NO:190	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:192	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43
11	SEQ ID NO:193	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:196	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:59
12	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID

	NO:194	NO:49	NO:196	NO:57	NO:58	NO:59
13	SEQ ID NO:195	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:197	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:59
14	SEQ ID NO:195	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:198	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:59
15	SEQ ID NO:199	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:201	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:70
16	SEQ ID NO:200	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:201	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:70
17	SEQ ID NO:200	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:202	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:70
18	SEQ ID NO:203	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:206	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82	SEQ ID NO:83
19	SEQ ID NO:204	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:206	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82	SEQ ID NO:83
20	SEQ ID NO:205	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:207	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82	SEQ ID NO:83

具有不同特异性(即, 针对不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的 CDR。然而, 尽管 CDR 在抗体与抗体之间是不同的, 但是 CDR 内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用 Kabat, Chothia, AbM 和 Contact 方法中的至少两种, 可以确定最小重叠区域, 从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。最小结合单位可以是 CDR 的一个子部分。正如本领域技术人员明了, 通过抗体的结构和蛋白折叠, 可以确定 CDR 序列其余部分的残基。因此, 本发明也考虑本文所给出的任何 CDR 的变体。例如, 在一个 CDR 的变体中, 最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变, 而根据 Kabat 或 Chothia 定义的其余 CDR 残基可以被保守氨基酸残基替代。

在一些实施方案中, 本发明的抗体有至少一个、两个、三个、四个、五个或六个 CDR 与表 B 所列任一抗体的可变区序列中的对应 CDR 相同, 或是其变体。在一些实施方案中, 本发明的抗体有至少一个、两个、或三个 HCDR 与表 B 所列任一抗体的可变区序列中的对应重链 CDR 相同, 或是其变体。在一些实施方案中, 本发明的抗体有至少一个、两个、或三个 LCDR 与表 B 所列任一抗体的可变区序列中的对应轻链 CDR 相同, 或是其变体。在本文中, “对应 CDR”是指, 在最佳比对后, 在候选抗体的可变区氨基酸序列中与参考抗体的 CDR 位于最相似位置上的 CDR。在本文中, CDR 变体是已经通过至少一个, 例如 1 或 2 或 3 个氨基酸取代、缺失和/或插入而修饰的 CDR, 其中包含 CDR 变体的抗原结合分子基本上保持包含未修饰 CDR 的抗原结合分子的生物学特性, 例如, 保持至少 60%, 70%, 80%, 90%, 或 100% 的生物学活性(例如抗原结合能力)。可以理解, 各 CDR 可以单独修饰或组合修饰。优选地, 氨基酸修饰为氨基酸取代, 尤其是保守氨基酸取代, 例如表 A 中列出的优选保守氨基酸置换。在一些实施方案中, 氨基酸取代优选发生在与本文提供的共有 CDR 序列(例如, SEQ ID NO: 5, 10, 15, 21, 24, 30, 33, 37, 40, 47, 52, 56, 62, 65, 68, 74, 77, 80)的 X 残基相对应的氨基酸位置上。

此外, 本领域已知, CDR3 区, 独立于 CDR1 和/或 CDR2 区, 单独可以确定抗体对关联抗原的结合特异性。并且, 可以基于共同 CDR3 序列, 产生具有相同结合特异性的多种其它抗体。参见例如, US Patents Nos. 6,951,646; 6,914,128; 6,090,382; 6,818,216; 6,156,313;

6,827,925; 5,833,943; 5,762,905 和 5,760,185。所有这些参考文献并入本文作为参考。

因此，在一个实施方案中，本发明抗体包含来自表 B 所示任一抗体的重链和/或轻链可变区序列的 CDR3 序列，其中所述抗体能够特异地结合人 TIGIT。在再一实施方案中，所述抗体还可以包含来自同一抗体的重链和/或轻链可变区的 CDR2，或来自不同的 TIGIT 抗体的重链和/或轻链可变区的 CDR2。在再一实施方案中，所述抗体还可以包含来自同一抗体的重链和/或轻链可变区的 CDR1，或来自不同的 TIGIT 抗体的重链和/或轻链可变区的 CDR1。可以通过本文描述的测定方法，表征这些抗体的活性，包括与人 TIGIT 的结合活性、阻断 TIGIT 与 CD155 分子结合的活性、和/或抑制肿瘤生长的活性。

再一方面，考虑到抗原结合特异性主要由 CDR1、2 和 3 区提供，在一些实施方案中，可以将 VH CDR1、2 和 3 序列和 VL CDR1、2 和 3 序列“混合并匹配”(即，可以混合并匹配来自结合同一 TIGIT 抗原的不同抗体的 CDR，不过每种抗体优选地含有 VH CDR1、2 和 3 和 VL CDR1、2 和 3)，以产生结合 TIGIT 的本发明其他分子。可以使用本领域已知的结合测定法(例如，ELISA、SET、Biacore)和实施例 1 中描述的那些测定法，测试这类“混合和匹配的”抗体与 TIGIT 的结合。当混合并匹配 VH CDR 序列时，来自特定 VH 序列的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 序列优选地替换为结构上相似的 CDR 序列。同样，当混合并匹配 VL CDR 序列时，来自特定 VL 序列的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 序列优选地替换为结构上相似的 CDR 序列。可以在本发明表 3 所示抗体之间进行 CDR 的“混合和匹配”。此外，本领域技术人员明了，也可以通过用来自其它不同抗体的一个或多个 VH 和/或 VL CDR 区序列，置换本文所示抗体的结构上相似的 CDR 序列，以产生本发明的其它抗体。

因此，在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区，所述重链可变区包含重链互补决定区 3(HCDR3)，所述 HCDR3：

- (i) 与表 B 列出的任一抗体的重链可变区的 HCDR3 相同；或
- (ii) 与表 C 或 D 所列任一 HCDR3 序列相同；或
- (iii) 相对于(i)或(ii)的 HCDR3，包含至少 1 个 (优选 1-2 个或更优选 1 个)氨基酸改变(优选取代、更优选保守取代)。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，且所述抗体的重链互补决定区 3(HCDR3)和轻链互补决定区 3(LCDR3)：

- (i) 与表 B 列出的任一抗体的重链和轻链可变区序列的 HCDR3 和 LCDR3 相同；或
- (ii) 与表 C 或 D 所列任一组合中的 HCDR3 和 LCDR3 序列相同；或
- (iii) 相对于(i)或(ii)的 HCDR3 和 LCDR3，共包含至少 1 个 (优选 1-2 个或更优选 1 个)氨基酸改变(优选取代、更优选保守取代)。

在一个实施方案中，本发明抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)，其中所述 VH 包含：

- (i) 表 B 所列任一抗体的 VH 序列中所含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列；或
- (ii) 表 C 或 D 所列任一组合中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列；或
- (iii) 相对于(i)或(ii)的序列，在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2、或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸取代，优选保守取代)的序列。

在另一个实施方案中，本发明抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区(VL)，其中所述 VL

包含:

- (i) 表 B 所列任一抗体的 VL 序列中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列; 或
- (ii) 表 C 或 D 所列任一组合中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列; 或
- (iii) 相对于(i)或(ii)的序列, 在所述三个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2、或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸取代, 优选保守取代)的序列。

在另一个实施方案中, 本发明抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 其中所述抗体包含:

- (i) 表 B 所列任一抗体的 VH 和 VL 序列中所含的 6 个 CDR 序列; 或
- (ii) 表 C 或 D 所列任一组合中的 6 个 CDR 序列; 或
- (iii) 相对于(i)或(ii)的序列, 在 6 个 CDR 区上共包含至少一个且不超过 10 或 5、4、3、2、1 个氨基酸改变(优选氨基酸取代, 优选保守取代)的序列。

在一个实施方案中, 本发明抗体或其抗原结合片段包含:

(i) 如 SEQ ID NO:84、85、86、或 87 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列, 以及如 SEQ ID NO:104 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列, 或者

(ii) 如 SEQ ID NO:88、89 或 90 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列, 以及如 SEQ ID NO:105 或 106 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列, 或者

(iii) 如 SEQ ID NO:91、92 或 93 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列, 以及如 SEQ ID NO:107 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列, 或者

(iv) 如 SEQ ID NO:94、95、96 或 97 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列, 以及如 SEQ ID NO:108 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列, 或者

(v) 如 SEQ ID NO:98、99 或 100 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列, 以及如 SEQ ID NO:109 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列, 或者

(vi) 如 SEQ ID NO:101、102 或 103 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列, 以及如 SEQ ID NO:110 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列。

在一个优选实施方案中, 本发明抗体或其抗原结合片段包含重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR, 以及轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR, 其中

(i) HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:1-5 和 178-181 的氨基酸序列或由其组成, HCDR2 包含选自 SEQ ID NO:6-10 的氨基酸序列或由其组成, HCDR3 包含选自 SEQ ID NO:11-15 和 182-185 的氨基酸序列或由其组成, LCDR1 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列或由其组成, LCDR2 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列或由其组成, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(ii) HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:19-21 和 186-187 的氨基酸序列或由其组成, HCDR2 包含选自 SEQ ID NO:22-24 的氨基酸序列或由其组成, HCDR3 包含 SEQ ID NO:25 和 188 的氨基酸序列或由其组成, LCDR1 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列或由其组成, LCDR2 包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列或由其组成, 且 LCDR3 包含选自 SEQ ID NO:28-30 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:31-33 和 189-190 的氨基酸序列或由其组成, HCDR2 包含选自 SEQ ID NO:34-37 的氨基酸序列或由其组成, HCDR3 包含选自 SEQ ID NO:38-40 和

191-192 的氨基酸序列或由其组成, LCDR1 包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列或由其组成, LCDR2 包含 SEQ ID NO:42 的氨基酸序列或由其组成, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:43 的氨基酸序列或由其组成; 或者;

(iv) HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:44-47 和 193-195 的氨基酸序列或由其组成, HCDR2 包含选自 SEQ ID NO:48-52 的氨基酸序列或由其组成, HCDR3 包含选自 SEQ ID NO:53-56 和 196-198 的氨基酸序列或由其组成, LCDR1 包含 SEQ ID NO:57 的氨基酸序列或由其组成, LCDR2 包含 SEQ ID NO:58 的氨基酸序列或由其组成, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:59 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(v) HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:60-62 和 199-200 的氨基酸序列或由其组成, HCDR2 包含选自 SEQ ID NO:63-65 的氨基酸序列或由其组成, HCDR3 包含选自 SEQ ID NO:66-68 和 201-202 所示的氨基酸序列或由其组成, LCDR1 包含 SEQ ID NO:69 的氨基酸序列或由其组成, LCDR2 包含 SEQ ID NO:70 的氨基酸序列或由其组成, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:71 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(vi) HCDR1 包含选自 SEQ ID NO:71-74 和 203-205 的氨基酸序列或由其组成, HCDR2 包含选自 SEQ ID NO:75-77 的氨基酸序列或由其组成, HCDR3 包含选自 SEQ ID NO:78-80 和 206-207 所示的氨基酸序列或由其组成, LCDR1 包含 SEQ ID NO:81 的氨基酸序列或由其组成, LCDR2 包含 SEQ ID NO:82 的氨基酸序列或由其组成, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:83 的氨基酸序列或由其组成。

在一个优选实施方案中, 本发明抗体或其抗原结合片段包含表 C 所列组合之一的 6 个 CDR 序列。

在另一个优选实施方案中, 本发明抗体或其抗原结合片段包含表 D 所列组合之一的 6 个 CDR 序列。

抗体可变区

“可变区”或“可变结构域”是抗体的重链或轻链中参与抗体与其抗原的结合的结构域。重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)可以进一步再划分为高变区(HVR, 又称作互补决定区(CDR)), 其间插有较保守的区域(即, 构架区(FR))。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和 4 个 FR 组成, 从氨基端到羧基端以如下顺序排列: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。在一些情况下, 单个 VH 或 VL 结构域足以赋予抗原-结合特异性。此外, 结合特定抗原的抗体可以使用来自结合所述抗原的抗体的 VH 或 VL 结构域筛选互补 VL 或 VH 结构域文库而分离(参见, 例如, Portolano, S.等, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T.等, Nature 352 (1991) 624-628)。

本领域已知, 可以对两个可变区之一或两者(即 VH 和/或 VL)中的一个或多个残基进行修饰, 例如, 对一个或多个 CDR 区和/或对一个或多个构架区进行残基修改, 尤其是保守残基取代, 而修饰后的抗体仍基本上保持改变之前的抗体分子的至少一个生物学特性(例如, 抗原结合能力)。例如, 可以突变 CDR 区的残基, 改善抗体的一种或多种结合性质(例如亲和性)。可以在体外或体内测定试验中, 评估突变后的抗体的抗体结合性质或其它功能性质。优选地, 引入保守替代。优选地, 在 CDR 区中引入的残基改变不超过 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个。此外, 可以突变构架区残基, 例如以改善抗体的性质。例如, 可以将一个或多个构架残基“回复突变”为对应的种系序列残基。

CDR 移植是本领域已知的另一种抗体可变区修饰方式。由于 CDR 序列负责大多数抗体-

抗原相互作用, 故可以构建模拟已知抗体的性质的重组抗体变体。在该抗体变体中, 来自已知抗体的 CDR 序列被移植到具有不同性质的不同抗体的构架区上。因此, 在一个实施方案中, 本发明涉及这样的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段, 所述抗体包含来自表 B 抗体之一的重链和轻链可变区的 CDR 序列, 但具有不同的构架区序列。可以从公共 DNA 数据库, 包括种系抗体基因序列, 或从公开文献报道的 TIGIT 抗体序列, 获得用于替换的构架区序列。例如, 可以从 GenBank 数据库获得编码人重链和轻链可变区基因的种系 DNA。可以将抗体蛋白序列与数据库中的蛋白序列, 使用序列相似性检索工具, 例如 Gapped BLAST, 进行比较。优选, 用于替代的构架序列, 与选择进行改变的本发明抗体的构架序列, 具有结构相似性, 例如, 具有序列同一性至少 80%, 85%, 90%, 或 95%、96%、97%、98%、99% 以上的构架序列。

在再一实施方案中, 可以“混合并匹配”来自本发明示例性抗体(表 B 所示抗体之一)与其它不同抗 TIGIT 抗体(优选地, 表 B 所示另一抗体)的 VH 和 VL 序列, 以产生结合 TIGIT 的本发明其他抗体。在混合和匹配这些链时, 优选地, 将来自具体 VH/VL 配对的 VH 序列替换为结构相似的 VH 序列。同样, 来自特定 VH/VL 配对的 VL 序列优选地替换为结构上相似的 VL 序列。可以使用本领域已知的结合测定法(例如, ELISA, 和实施例部分中描述的其他测定法)测试这类“混合和匹配的”抗体与 TIGIT 的结合。

因此, 在一个实施方案中, 本发明的抗体包含表 B 所列任一抗体的重链可变区 VH 序列, 或由所述氨基酸序列组成。在再一实施方案中, 本发明的抗体包含所述 VH 序列的变体。

在另一个实施方案中, 本发明的抗体包含表 B 所列任一抗体的轻链可变区 VL 序列, 或由所述氨基酸序列组成。在再一实施方案中, 本发明的抗体包含所述 VL 序列的变体。

在再一实施方案中, 本发明的抗体包含:

(i) 包含 SEQ ID NO:84 或 85 或 86 或 87 所示的氨基酸序列的 VH 序列或其变体, 和/或包含 SEQ ID NO:104 所示的氨基酸序列的 VL 序列或其变体, 或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:88 或 89 或 90 所示的氨基酸序列的 VH 序列或其变体, 和/或包含 SEQ ID NO:105 或 106 所示的氨基酸序列的 VL 序列或其变体, 或者

(iii) 包含 SEQ ID NO:91 或 92 或 93 所示的氨基酸序列的 VH 序列或其变体, 和/或包含 SEQ ID NO:107 所示的氨基酸序列的 VL 序列或其变体, 或者

(iv) 包含 SEQ ID NO:94 或 95 或 96 或 97 所示的氨基酸序列的 VH 序列或其变体, 和/或包含 SEQ ID NO:108 所示的氨基酸序列的 VL 序列或其变体, 或者

(v) 包含 SEQ ID NO:98 或 99 或 100 所示的氨基酸序列的 VH 序列或其变体, 和/或包含 SEQ ID NO:109 所示的氨基酸序列的 VL 序列或其变体;

(vi) 包含 SEQ ID NO:101 或 102 或 103 所示的氨基酸序列的 VH 序列或其变体, 和/或包含 SEQ ID NO:110 所示的氨基酸序列的 VL 序列或其变体。

在一个实施方案中, VH 序列的变体在氨基酸序列上, 与参考 VH 序列相比, (优选地, 在全长上或在 CDR1、2 和 3 三个区域上), 具有至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高同一性。在一个实施方案中, VH 序列的变体在氨基酸序列上, 与参考 VH

序列相比, (优选地, 在全长上或在 CDR1、2 和 3 三个区域上), 包含至少一个且不超过 30 个、10 个、或 5、4、3、2、1、0 氨基酸改变(优选氨基酸取代, 优选保守取代)。优选地序列差异不发生在 CDR 区中。

在一个优选的实施方案中, VL 序列的变体在氨基酸序列上, 与参考 VL 序列相比, (优选地, 在全长上或在 CDR1、2 和 3 三个区域上), 具有至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性。在一个优选的实施方案中, VL 序列的变体在氨基酸序列上, 与参考 VL 序列相比, (优选地, 在全长上或在 CDR1、2 和 3 三个区域上), 包含至少一个且不超过 30 个、10 个、或 5、4、3、2、1、0 氨基酸改变(优选氨基酸取代, 优选保守取代)。优选地序列差异不发生在 CDR 区中。

在一个优选的实施方案中, 本发明的抗体包含表 B 所列任一抗体的重链可变区和轻链可变区 VH/VL 序列对, 或由所述氨基酸序列对组成。本发明也提供该抗体的变体, 例如在 VH、VL 或 VH 和 VL 上具有至少 95-99%同一性或包含不超过 10 个氨基酸改变的变体。

在上述任一实施方案中, 优选地, 相对于参考抗体, 抗体变体的重链可变区在 1 个或多个 CDR(优选全部 3 个 CDR)区域上包含不超过 10 个, 优选不超过 5 个(例如, 3、2、1 或 0 个)氨基酸改变(优选氨基酸取代, 优选保守取代)。

在上述任一实施方案中, 优选地, 相对于参考抗体, 抗体变体的轻链可变区 VL 在 1 个或多个 CDR(优选全部 3 个 CDR)区域上包含不超过 10 个, 优选不超过 5 个(例如, 3、2、1 或 0 个)氨基酸改变(优选氨基酸取代, 优选保守取代)。

抗体重链和轻链

在一些实施方案中, 本发明抗体包含重链 Fc 区, 例如 IgG1, IgG2 或 IgG4 同种型的 Fc 区。在一个实施方案中, 本发明抗体含有 IgG4-Fc 区, 其中在氨基酸残基 228 位置(EU 编号)具有丝氨酸至脯氨酸突变(S228P)。在再一优选实施方案中, 本发明抗体包含 IgG4-PAA Fc 部分。该 IgG4-PAA Fc 部分在位置 228 具有丝氨酸至脯氨酸突变(S228P), 并且在位置 234(EU 编号)具有苯丙氨酸至丙氨酸突变, 在位置 235(EU 编号)具有亮氨酸至丙氨酸突变。S228P 突变是肿瘤恒定区的铰链区的突变, 可以减少或消除重链间二硫桥异质性。F234A 和 L235A 突变可以进一步降低(已经具有低效应子功能的)人 IgG4 同种型的效应子功能。在一些实施方案中, 本发明抗体含有去除了重链 C 末端赖氨酸(des-Lys)的 IgG4-PAA Fc 部分。在一些实施方案中, 本发明抗体包含 κ 轻链恒定区, 例如人 κ 轻链恒定区。

在再一优选的实施方案中, Fc 区包含 SEQ ID NO: 177 的氨基酸序列, 或相对于 SEQ ID NO: 177 的氨基酸序列包含至少一个, 两个或三个, 但不超过 20 个, 10 个或 5 个氨基酸改变的氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 177 的氨基酸序列具有至少 95-99%同一性的序列。

在一个优选的实施方案中, 本发明抗体包含轻链恒定区。在一个优选实施方案中, 轻链恒定区为人 κ 轻链恒定区。在再一优选实施方案中, 轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 209 的氨基酸序列, 或相对于 SEQ ID NO: 209 的氨基酸序列包含至少一个, 两个或三个, 但不超过 20 个, 10 个或 5 个氨基酸改变的氨基酸序列, 或与 SEQ ID NO: 209 的氨基酸序列具有至少 95-99%同一性的序列。

在一些优选的实施方案中, 本发明抗体包含重链, 并且所述重链包含选自 SEQ ID

NO:111-130 的氨基酸序列、或相对于其包含至少一个，两个或三个，但不超过 20 个，10 个或 5 个氨基酸改变的氨基酸序列，或与其具有至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。优选地，氨基酸改变不发生在 CDR 区中，更优选地，不发生在可变区中。

在一些优选的实施方案中，本发明抗体包含轻链，并且所述轻链包含选自 SEQ ID NO:137-143 的氨基酸序列、或相对于其包含至少一个，两个或三个，但不超过 20 个，10 个或 5 个氨基酸改变的氨基酸序列，或与其具有至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。优选地，氨基酸改变不发生在 CDR 区中，更优选地，不发生在可变区中。

在一个优选实施方案中，本发明的抗体包含选自以下的重链序列和/或轻链序列：

(a)包含选自 SEQ ID NO:111-114 的氨基酸序列的重链序列或其变体，和/或包含 SEQ ID NO:137 的氨基酸序列的轻链序列或其变体；

(b) 包含选自 SEQ ID NO:115-117 的氨基酸序列的重链序列或其变体，和/或包含 SEQ ID NO:138 或 139 的氨基酸序列的轻链序列或其变体；

(c) 包含选自 SEQ ID NO:118-120 的氨基酸序列的重链序列或其变体，和/或包含 SEQ ID NO:140 的氨基酸序列的轻链序列或其变体；

(d)包含选自 SEQ ID NO:121-124 的氨基酸序列的重链序列或其变体，和/或包含 SEQ ID NO:141 的氨基酸序列的轻链序列或其变体；

(e)包含选自 SEQ ID NO:125-127 的氨基酸序列的重链序列或其变体，和/或包含 SEQ ID NO:142 的氨基酸序列的轻链序列或其变体；

(d) 包含选自 SEQ ID NO:128-130 的氨基酸序列的重链序列或其变体，和/或包含 SEQ ID NO:143 的氨基酸序列的轻链序列或其变体，

其中所述变体与对应的参考序列相比包含至少一个，两个或三个，但不超过 20 个，10 个或 5 个氨基酸改变的氨基酸序列，或具有至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。优选地，氨基酸改变不发生在 CDR 区，更优选地不发生在可变区。

在一个实施方案中，在抗体的恒定区中进行残基修饰，以例如改变抗体的性质，例如效应子功能。

在一些实施方案中，本发明抗 TIGIT 抗体或其片段的重链和/或轻链还包含信号肽序列，例如 METDTLLLWVLLLWVPGSTG。

示例性抗体序列

本发明提供如实施例中分离并表征的特异性结合 TIGIT(例如人 TIGIT)的全人源抗体。下表 3 中列出了本发明这些示例性抗体的抗体可变区 VH 和 VL 序列。下表 1 和 2 中列出了抗体的示例性 CDR 序列。序列表显示了本发明示例性抗体的重链和轻链氨基酸序列和本发明示

例性抗体可变区 VH 和 VL 的编码核苷酸序列。

抗体变体

在一方面,本发明提供在本文中所述及的任何抗体,尤其是表 B 所列示例性抗体的变体。在一个实施方案中,抗体变体保持改变前抗体的至少 60%, 70%, 80%, 90%, 或 100% 的生物学活性(例如抗原结合能力)。在一些实施方案中,所述改变不导致抗体变体丧失对抗原的结合,但任选地可以赋予诸如提高的抗原亲和力和不同的效应子功能等性质。

可以理解的,抗体的重链可变区或轻链可变区、或各 CDR 区可以单独改变或组合改变。在一些实施方案中,在一个或多个或全部三个重链 CDR 中的氨基酸改变不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个。优选地,所述氨基酸改变为氨基酸取代,优选保守取代。在一些实施方案中,在一个或多个或全部三个轻链 CDR 中的氨基酸改变不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个。在一些实施方案中,在一个或多个或全部 6 个 CDR 中的氨基酸改变不超过 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个。优选地,所述氨基酸改变为氨基酸取代,优选保守取代。在一些实施方案中,抗体变体与参考抗体在目标抗体序列区域上具有至少 80%、85%、90%或 95%或 99% 或更高的氨基酸同一性。例如,在一个实施方案中,本发明抗体,与参考抗体(例如表 3 所列抗体之一)相比,在 3 个重链 CDR 区域上具有至少 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 或 99% 或更高的同一性。在一个实施方案中,本发明抗体,与参考抗体(例如表 3 所列抗体之一)相比,在 3 个轻链 CDR 区域上具有至少 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 或 99% 或更高的同一性。在另一实施方案中,本发明抗体,与参考抗体(例如表 3 所列抗体之一)相比,在 6 个 CDR 区域上具有至少 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 或 99% 或更高的同一性。在再一实施方案中,本发明抗体,与参考抗体(例如表 3 所列抗体之一)相比,在重链可变区上具有至少 80%、85%、90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 或 99% 或更高的序列同一性。在再一实施方案中,本发明抗体,与参考抗体(例如表 3 所列抗体之一)相比,在轻链可变区上具有至少 80%、85%、90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 或 99% 或更高的序列同一性。在再一实施方案中,本发明抗体,与参考抗体(例如表 3 所列抗体之一)相比,在重链可变区和/或轻链可变区上具有至少 80%、85%、90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 或 99% 或更高的序列同一性。

此外,可以对抗体的 Fc 区进行改变。Fc 区的改变可以单独进行,或与上述对构架和/或 CDR 区的改变相组合。可以改变 Fc 区,例如,以改变抗体的一种或多种功能,例如血清半衰期,补体固定、Fc 受体结合、和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,还可以对本发明抗体进行化学修饰(例如,与 PEG 连接)或改变其糖基化模式。

在某些实施方案中,Fc 区可以包含具有一个或多个提高 ADCC 活性的氨基酸置换的 Fc-区,例如,Fc-区的位置 298、333 和/或 334 的置换(残基的 EU 编号)。在一些实施方案中,也可以对 Fc-区进行改变,以导致改变的(即,提高的或降低的)C1q 结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)(参见,例如,US6,194,551、WO99/51642 和 Idusogie, E. E.等, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184)。

在另一些实施方案中,可以对 Fc 进行改变以增加或降低其糖基化程度和/或改变其糖基

化模式。对 Fc 的糖基化位点的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以便产生或移除一或多个糖基化位点而方便地实现。举例而言,可实施一或多种氨基酸取代以消除一或多个糖基化位点,由此消除该位点处的糖基化。可制备具有改变类型的糖基化的抗体,例如具有减小量的岩藻糖基残基的低或无岩藻糖化抗体或具有增加的等分 GlcNac 结构的抗体。这类改变的糖基化模式已显示可增加抗体的 ADCC 能力。本发明也考虑在与 Fc 区连接的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这些抗体变体可具有提高的 CDC 功能。

在某些实施方案中,本发明也考虑具有一些但非所有效应子功能的抗体变体,这使其成为某些应用的理想候选物,在所述应用中抗体的体内半衰期是重要的,但某些效应子功能(如补体和 ADCC)是不必要或有害的。例如,Fc 区可以包含消除或减弱效应子功能的突变,例如具有突变 P329G 和/或 L234A 和 L235A 的人 IgG1 Fc 区,或具有突变 P329G 和/或 S228P 和 L235E 的人 IgG4 Fc 区。

在某些实施方案中,可能需要产生经半胱氨酸工程改造的抗体,例如“硫代 MAb”,其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基置换。例如,可以改变抗体铰链区中的半胱氨酸残基数目,以例如利于轻链和重链的装配或增加或降低抗体的稳定性。参见例如美国专利号 5,677,425。

在某些实施方案中,本文中所提供的抗体可进一步经修饰为含有非蛋白质部分。适合抗体衍生的部分包括,但不限于,水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括,但不限于,聚乙二醇(PEG),以例如增加抗体的(例如血清)半衰期。用于蛋白质 PEG 化的方法是本领域已知的,可以将其应用于本发明的抗体。参见例如 EP 0154 316 和 EP 0401384。

II. 多核苷酸、载体和宿主

本发明提供编码以上任何抗 TIGIT 抗体或其片段的核酸。还提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中,载体是表达载体。还提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中,宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞或 293 细胞)。在另一个实施方案中,宿主细胞是原核的。

在一方面,本发明提供编码以上任何抗 TIGIT 抗体或其片段的核酸。所述核酸可以包含编码抗体的轻链可变区和/或重链可变区的氨基酸序列的核酸,或包含编码抗体的轻链和/或重链的氨基酸序列的核酸。示例性的编码抗体重链可变区的核酸序列包含与选自 SEQ ID NO:150-169 的核酸序列具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的核酸序列,或者包含选自 SEQ ID NO: 150-169 的核酸序列。示例性的编码抗体轻链可变区的核酸序列包括与选自 SEQ ID NO:170-176 的核酸序列具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的核酸序列,或者包含选自 SEQ ID NO:170-176 的核酸序列。从适宜的表达载体表达时,由这些多核苷酸编码的多肽能够显示 TIGIT 抗原结合能力。

本发明中还提供多核苷酸,所述多核苷酸编码来自上文所述的结合 TIGIT 的抗体的重链 VH 或轻链 VL 序列的至少一个 CDR 区和通常全部三个 CDR 区。一些进一步的实施方案中,多核苷酸编码上文所述的结合 TIGIT 的抗体的重链和/或轻链的完整或基本上完整可变区序列。

如本领域技术人员明了的,因为密码子简并性,每一个抗体或多肽氨基酸序列可以由多种核酸序列编码。

在一个优选实施方案中，编码抗体的本发明核酸还包含编码重链 Fc 区的核苷酸序列，例如 SEQ ID NO: 177 中所示的 Fc 区序列或与其基本相同的序列。

在一个优选实施方案中，编码抗体的本发明核酸还包含编码轻链恒定区序列的核苷酸序列，例如 SEQ ID NO: 209 中所示的序列或与其基本相同的序列。

可以采用本领域熟知的方法，通过从头固相 DNA 合成或通过 PCR 诱变编码结合 TIGIT 的抗体或其抗原结合片段的现有序列(例如，SEQ ID NO: 150-169 中所示的 VH DNA 序列，SEQ ID NO: 170-176 中所示的 VL DNA 序列)，产生这些多核苷酸序列。

在一个实施方案中，提供包含本发明核酸的一个或多个载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在优选的实施方案中，本发明的表达载体是 pTT5 表达载体。

在一个实施方案中，提供包含所述载体的宿主细胞。用于克隆或表达编码抗体的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如，抗体可在细菌中产生，特别当不需要糖基化和 Fc 效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达，见，例如，美国专利号 5,648,237，5,789,199 和 5,840,523，还见 Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 卷 248(B.K.C.Lo, 编辑, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第 245-254 页，其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。在表达后，在可溶级分中的抗体可以与细菌细胞糊状物分离，并且可以进一步纯化。

在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。例如，真核微生物诸如丝状真菌或酵母是用于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。例如，糖基化途径已经进行“人源化”的真菌和酵母菌株导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见 Gerngross, *Nat.Biotech.*22: 1409-1414(2004)，和 Li 等, *Nat.Biotech.*24: 210-215(2006)。适于表达糖基化抗体的宿主细胞也可以衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。也可以将脊椎动物细胞用作宿主。例如，可以使用被改造以适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的一些实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚肾系(293HEK 或 293 细胞，如例如 Graham 等, *J.Gen Virol.* 36 : 59(1977) 中所描述的) 等。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞，包括 DHFR⁻ CHO 细胞(Urlaub 等, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77 : 216(1980))；以及骨髓瘤细胞系如 Y0, NS0 和 Sp2/0。关于适合产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述见例如 Yazaki 和 Wu, *Methods in Molecular Biology*, 卷 248 (B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), 第 255-268 页(2003)。

III. 抗体的制备

在一个实施方案中，提供了制备抗 TIGIT 抗体的方法，其中所述方法包括，在适合抗体表达的条件下，培养包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。为了重组产生抗 TIGIT 抗体，分离编码抗体(例如上文所描述的抗体)的核酸，并将其插入一个或多个载体，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸易于使用常规规程分离和测序(例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针进行)。

IV. 测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的抗 TIGIT 抗体鉴定, 筛选, 或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

一方面, 对本发明的抗体测试其抗原结合活性。例如, 可以通过本领域已知的方法, 诸如 ELISA, Western 印迹等, 或本文实施例公开的例示性方法, 来测定与人 TIGIT 的结合。例如, 可以使用流式细胞术进行测定, 其中抗体与表达人 TIGIT 的细胞系, 例如经转染在细胞表面上表达人 TIGIT 的 CHO 细胞, 进行反应。其它的细胞也适用于流式细胞术, 包括表达天然 TIGIT 的 T 细胞。备选地, 抗体的结合, 包括结合动力学(例如 K_D 值), 可以使用重组 TIGIT 蛋白, 在生物光干涉测定法中测定。在一些实施方案中, 使用例如 Fortebio 亲和测量法。

另一方面, 可使用竞争测定法来鉴定与本文中公开的任何抗 TIGIT 抗体竞争结合 TIGIT 的抗体。在某些实施方案中, 此类竞争性抗体结合与本文中公开的任何抗 TIGIT 抗体所结合表位相同或重叠的表位(例如线性或构象表位)。用于定位抗体所结合表位的详细例示性方法见 Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols”, Methods in Molecular Biology vol.66(Humana Press, Totowa, NJ)。

本发明还提供了用于鉴定具有生物学活性的抗 TIGIT 抗体的测定法。生物学活性可以包括例如结合 TIGIT(例如人 TIGIT), 阻断 TIGIT(例如人 TIGIT)与 CD155 分子的结合、阻断 TIGIT 介导的抑制性信号传导、增加 T 细胞的 IL2 产生、和/或抑制肿瘤生长。例如, 在体内肿瘤抑制模型中(参见例如实施例 6), 测试抗体抑制肿瘤生长的能力。在本发明也提供在体内和/或在体外具有此类生物学活性的抗体。

可以理解的是, 能够使用本发明的免疫缀合物或多特异性抗体替换或补充抗 TIGIT 抗体来进行任何上述测定。

V. 多特异性抗体

在再一方面, 本发明提供特异性地结合 TIGIT (优选人 TIGIT) 的多特异性(包括双特异性)抗体分子。在一个实施方案中, 在多特异性抗体中, 本发明的抗体(或其抗原结合片段)形成针对 TIGIT 的第一结合特异性。在再一实施方案中, 所述多特异性抗体还具有第二特异性、或在再一实施方案中还包含第二和第三结合特异性。在再一实施方案中, 所述多特异性抗体是双特异性抗体。

在一个实施方案中, 结合特异性由抗体的“结合位点”或“抗原结合位点”(抗体分子中与抗原实际结合的区域)提供。在一个优选的实施方案中, 抗原结合位点由抗体轻链可变结构域(VL)和抗体重链可变结构域(VH)组成的 VH/VL 对构成。因此, 在一个实施方案中, “多特异性”抗体是具有至少两个抗原结合位点的抗体, 所述至少两个抗原结合位点中的每一个抗原结合位点可以与相同抗原的不同表位或与不同抗原的不同表位结合。

有关多特异性抗体及其制备, 可以参见例如 WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792 和 WO 2010/145793 中的描述。

VI. 免疫缀合物

再一方面，本发明提供通过将本发明抗体缀合于异源分子而产生的免疫缀合物。在一个实施方案中，在免疫缀合物中，本发明的抗体(或其抗原结合片段)与治疗剂或诊断剂缀合。在一些实施方案中，本发明抗体可以以全长抗体或抗体片段的形式与异源分子缀合。例如，以 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)'₂ 片段、单链 scFab 抗体、单链 scFv 等片段形式进行缀合。

在一些实施方案中，本发明的抗体与治疗性分子缀合。可以使用接头来共价连接抗体与治疗性分析。适宜的接头包括化学接头或肽接头。

在另一些实施方案中，本发明的抗体可以与诊断剂或可检测剂缀合。这类缀合物可以作为临床检验方法的部分(如确定特定疗法的效力)，用于监测或预测疾病或病症的发作、形成、进展和/或严重性。可以通过将抗体与可检测剂偶联实现这类诊断和检测。

VII. 药物组合物和药物制剂

本发明还包括包含抗 TIGIT 抗体或其免疫缀合物或多特异性抗体的组合物(包括药物组合物或药物制剂)和包含编码抗 TIGIT 抗体或其免疫缀合物或多特异性抗体的多核苷酸的组合物。这些组合物还可以任选地包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。

在一个实施方案中，组合物还包含第二治疗剂。所述第二治疗剂可以选自包括但不限于：例如抗-PD-1 抗体和抗-PD-L1 抗体。优选地，第二治疗剂是 PD-1 拮抗剂，尤其是抗 PD-1 抗体。

适用于本发明的药用载体可以是无菌液体，如水和油，包括来自石油、动物、植物或合成起源的那些，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时，水是优选的载体。还可以将盐水溶液和水性右旋糖以及甘油溶液用作液体载体，特别是用于可注射溶液。合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、干燥的脱脂乳、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。对于赋形剂的使用及其用途，亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”，第五版，R.C.Rowe, P.J.Seskey 和 S.C.Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。若期望的话，所述组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂，或 pH 缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉末、持续释放配制剂等的形式。口服制剂可以包含标准载体，如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精。

可以通过将具有所需纯度的本发明抗 TIGIT 抗体、免疫缀合物或多特异性抗体，与一种或多种任选的药用辅料(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编(1980)) 混合，来制备包含本发明的药物制剂，优选地以冻干制剂或水溶液的形式。

示例性的冻干抗体制剂描述于美国专利号 6,267,958。水性抗体制剂包括美国专利号 6,171,586 和 WO2006/044908 中所述的那些，后一种制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

本发明的药物组合物或制剂还可以包含一种或多种其它活性成分，所述活性成分是被治疗的特定适应症所需的，优选具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些活性成分。例如，理想的是还提供其它抗癌活性成分，例如 PD-1 结合拮抗剂或 PD-L1 结合拮抗剂，例如抗 PD-1

抗体或抗 PD-L1 抗体。所述活性成分以对于目的用途有效的量合适地组合存在。

可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半渗透基质，所述基质呈成形物品，例如薄膜或微囊形式。

关于药物制剂的其它组分，还可以参见 WO2015/153513 中公开的那些。

VIII. 组合产品

在一方面，本发明还提供了组合产品，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段，双特异性抗体或免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂（例如化疗剂、其他抗体、细胞毒性剂、疫苗、抗感染活性剂等）。本发明的组合产品可用于本发明的治疗方法中。

在一些实施方案中，本发明提供组合产品，其中所述其它治疗剂为例如有效刺激免疫反应从而进一步增强、刺激或上调受试者的免疫反应的治疗剂如抗体。在一些实施方案中，其它抗体为例如抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体。

在一些实施方案中，所述组合产品用于预防或治疗肿瘤。在一些实施方案中，肿瘤为癌症，例如胃肠道癌症，例如胃癌、直肠癌、结肠癌、结肠直肠癌等；或皮肤癌，例如恶性黑色素瘤。在一些实施方案中，所述组合产品用于预防或治疗感染，例如细菌感染、病毒感染、真菌感染、原生动感染等。

IX. 治疗方法和用途

在本文中，术语“个体”或“受试者”可互换地使用，是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如，奶牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类(例如，人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。特别地，受试者是人。

在本文中，术语“治疗”指意欲改变正在接受治疗的个体中疾病之天然过程的临床介入。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态，以及缓解或改善预后。

在一方面中，本发明涉及在受试者中增强机体的免疫应答的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何抗 TIGIT 抗体或其片段，或包含所述抗体或片段的免疫缀合物、多特异性抗体，或药物组合物。在一些实施方案，将本发明的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合部分施用于携带肿瘤的受试者，刺激抗肿瘤免疫应答。在另一些实施方案中，将本发明的抗体或其抗原结合部分施用于携带感染的受试者，刺激抗感染免疫应答。

在另一方面中，本发明涉及治疗受试者肿瘤，例如癌症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何抗 TIGIT 抗体或其片段，或包含所述抗体或片段的免疫缀合物、多特异性抗体，或药物组合物。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。

已经证实，TIGIT 在人肿瘤浸润性 CD8⁺ T 细胞上高表达。在一些实施方案中，本发明方法用于治疗癌症，尤其是表达 TIGIT 的肿瘤浸润性淋巴细胞浸润的实体肿瘤。

在一个实施方案中，癌症是胃肠道癌症如结肠癌。

在一些实施方案中，肿瘤或肿瘤细胞可以选自结直肠肿瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤、肺肿瘤、肺肿瘤，肝肿瘤，乳房肿瘤，肾肿瘤，前列腺肿瘤，胃肠肿瘤，黑色素瘤，宫颈肿瘤，膀

胱肿瘤,成胶质细胞瘤和头颈部肿瘤。在一些实施方案中,癌症可以选自结直肠癌,卵巢癌,胰腺癌,肺癌,肝癌,乳腺癌,肾癌,前列腺癌,胃肠癌,黑素瘤,宫颈癌,膀胱癌,成胶质细胞瘤和头颈癌。

在一些实施方案中,本文提供了治疗肿瘤(如癌症)的方法,包括给予受试者本发明的抗-TIGIT 抗体和拮抗性抗 PD-1 抗体。在一些实施方案中,用于治疗共表达 TIGIT 和 PD-1 的肿瘤,例如,共表达 TIGIT 和 PD-1 的黑素瘤(Chauvin et al. (2015) J. Clin. Invest. 125:2046), 和非小细胞肺癌(NSCLC)和肾细胞癌(RCC)。

在另一方面中,本发明涉及治疗受试者感染性疾病,例如慢性感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何抗 TIGIT 抗体或其片段,或包含所述抗体或片段的免疫缀合物、多特异性抗体,或药物组合物。在一个实施方案中,所述感染是病毒感染。

在一些实施方案中,所述感染性疾病是由于病毒感染引起的。致病性病毒的一些例子包括(甲型、乙型和丙型)肝炎病毒、(甲型、乙型和丙型)流感病毒、HIV、疱疹病毒(例如, VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II、CMV、Epstein Barr 病毒+),腺病毒、黄病毒、艾柯病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞体病毒、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、登革病毒、乳头状瘤、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC 病毒和虫媒脑炎病毒。

一些实施方案中,本文所述的方法还包括向所述受试者联合施用一种或多种疗法(例如治疗方式和/或其它治疗剂)。在一些实施方案中,治疗方式包括手术治疗和/或放射疗法。

在一些实施方案中,可通过本发明的抗-TIGIT 抗体和一种或多种治疗剂的组合,刺激 T 细胞反应。在一些实施方案中,除了施用本发明抗体外,本发明方法还包括施用至少一种其它的免疫刺激性抗体,例如抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体,这些抗体可以是例如全人源的、嵌合的、或人源化的抗体。

在另一些实施方案中,可以与本发明抗体联合使用的其它治疗剂选自 PD-1 结合拮抗剂和 PD-L1 结合拮抗剂。"PD-1"的备选名称包括 CD279 和 SLEB2。"PD-L1"的备选名称包括 B7-H1、B7-4、CD274 和 B7-H。在一些实施方案中,PD-1、PD-L1 是人 PD-1、PD-L1。在一些实施方案中,PD-1 结合拮抗剂是抑制 PD-1 结合其配体结合配偶的分子。在一个具体方面,PD-1 配体结合配偶是 PD-L1。在另一个实施方案中,PD-L1 结合拮抗剂是抑制 PD-L1 结合其结合配偶的分子。在一个具体方面,PD-L1 结合配偶是 PD-1。拮抗剂可以是抗体,抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。在一些实施方案中,PD-1 结合拮抗剂是抗 PD-1 抗体(例如人抗体,人源化抗体,或嵌合抗体)。在一些实施方案中,抗 PD-1 抗体选自下组: IBI308 (信迪利单抗, WO2017/025016A1), MDX-1106(nivolumab, OPDIVO), Merck 3475(MK-3475, pembrolizumab, KEYTRUDA)和 CT-011(Pidilizumab)。在一些实施方案中,抗 PD-1 抗体是 MDX-1106。在一些实施方案中,抗 PD-1 抗体是 nivolumab(CAS 注册号: 946414-94-4)。在优选的实施方案中,抗 PD-1 抗体是本文所述的"Antibody C"。

在进一步的一些实施方案中,单独或与 PD-1 结合拮抗剂或与 PD-L1 结合拮抗剂组合的抗 TIGIT 抗体或其片段,还能与一种或多种其它疗法例如治疗方式和/或其它治疗剂组合施用。在一些实施方案中,治疗方式包括外科手术(例如肿瘤切除术);放射疗法(例如,外粒子束疗法,它涉及其中设计照射区域的三维适形放射疗法)、局部照射(例如,指向预选靶或器官的

照射)或聚焦照射等。

在一些实施方案中,本发明的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段可以与化疗或化疗剂联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段可以与放疗或放疗剂联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段可以与靶向疗法或靶向治疗剂联合施用。在一些实施方案中,本发明的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段可以与免疫疗法或免疫治疗剂,例如单克隆抗体联合施用。

本发明的抗体(以及包含其的药物组合物或免疫缀合物,以及任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方法给药,包括肠胃外给药,肺内给药和鼻内给药,并且,如果局部治疗需要,病灶内给药。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。在一定程度上根据用药是短期或长期性而定,可通过任何适合途径,例如通过注射,例如静脉内或皮下注射用药。本文中涵盖各种用药时程,包括,但不限于,单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

为了预防或治疗疾病,本发明的抗体的合适剂量(当单独或与一种或多种其他的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和进程、所述抗体是以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答,和主治医师的判断力。所述抗体以一次治疗或经过一系列治疗合适地施用于患者。

在上述本发明方法中,可以替代本发明抗体或抗原结合部分,施用本发明的组合物、多特异性抗体或免疫缀合物。或者,在这些方法中,除了施用本发明抗体或抗原结合部分,还可以进一步施用本发明的组合物、多特异性抗体或免疫缀合物。

再一方面,本发明提供本发明抗 TIGIT 抗体、组合物、免疫缀合物、多特异性抗体在制备用于前述方法(例如用于治疗)的药物中的用途。

X. 用于诊断和检测的方法和组合物

再一方面,本发明涉及检测样品中 TIGIT 的方法和试剂盒,其中所述方法包括:(a)将所述样品与本发明抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物接触;和(b)检测所述抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物和 TIGIT 蛋白之间复合物的形成。在一些实施方案中,样品来自癌症患者,例如皮肤癌患者。所述检测可以是体外的或体内的。

术语“检测”用于本文中时,包括定量或定性检测,示例性的检测方法可以涉及免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术(例如, FACS)、抗体分子复合的磁珠、ELISA 测定法、PCR-技术(例如, RT-PCR)。在某些实施方案中,生物样品是血、血清或生物来源的其他液体样品。在某些实施方案中,生物样品包含细胞或组织。在一些实施方案中,生物样品来自过度增生性或癌性病灶。在某些实施方案中,待检测的 TIGIT 是人 TIGIT。

在一个实施方案中,抗 TIGIT 抗体被用于选择适合利用抗 TIGIT 抗体的治疗的受试者,例如其中 TIGIT 是用于选择所述受试者的生物标记物。在一个实施方案中,可以使用本发明抗体诊断癌症或肿瘤,例如评价(例如,监测)对象中本文所述疾病(例如,过度增生性或癌性疾病)的治疗或进展、其诊断和/或分期。

在某些实施方案中,提供标记的抗 TIGIT 抗体。标记包括但不限于,被直接检测的标记

或部分(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记), 以及被间接检测的部分, 如酶或配体, 例如, 通过酶促反应或分子相互作用。示例性标记包括但不限于, 放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I , 荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物, 罗丹明及其衍生物, 丹酰(dansyl), 伞形酮(umbelliferone), 荧光素酶(luciferase), 例如, 萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利号 4,737,456), 荧光素, 2, 3-二氢酞嗪二酮, 辣根过氧化物酶(HR), 碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶, 葡糖淀粉酶, 溶解酶, 糖类氧化酶, 例如, 葡萄糖氧化酶, 半乳糖氧化酶, 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶, 以及利用过氧化氢氧化染料前体的酶如 HR, 乳过氧化物酶, 或微过氧化物酶(micropoxidase), 生物素/亲和素, 自旋标记, 噬菌体标记, 稳定的自由基, 等等。

描述以下实施例以辅助对本发明的理解。不意在且不当以任何方式将实施例解释成限制本发明的保护范围。

表 1: 本发明示例性抗体 CDR 序列

抗体名称	HCDR1	SE Q ID NO :	HCDR2	SE Q ID NO :	HCDR3	SE Q ID NO :	LCDRI	SE Q ID NO :	LCDR2	SE Q ID NO :	LCDR3	SE Q ID NO :
Kabat 编号 位置	H27-35B		H50-65		H93-102		L24-34		L50-56		L89-97	
ADI-2723 8	YTFTSYMS	1	IINPSGGSTSYAQQFQG	6	ARARYPSSWPYGMIDV	11	RASQINSYLN	16	AASSL QS	17	QQSLTTP FT	18
ADI-3026 3	YTFLSYMIN	2	IIDPSGGRTSYAQQFQG	7	ARARYPSSWPYGTIDV	12	RASQINSYLN	16	AASSL QS	17	QQSLTTP FT	18
ADI-3026 7	YTFRSYYMS	3	IIDPSGGRTSFAQKFQG	8	ARARYPESWPYGMIDV	13	RASQINSYLN	16	AASSL QS	17	QQSLTTP FT	18
ADI-3026 8	YTFGSYYMG	4	IIDPSGGRTSYARKFQG	9	ARARTPSWPYGMIDV	14	RASQINSYLN	16	AASSL QS	17	QQSLTTP FT	18
共有序列	YTFXSYVMIX ₂ (其中 X ₁ 选自 T、L 或 R 或 G 或其保守取代残基, X ₂ 选自 S 或 N 或 G 或其保守取代残基)	5	IIXPSGGX ₁ TSX ₂ AX ₃ KFQG (其中 X ₁ 选自 N 或 D 或其保守取代残基, X ₂ 选自 S 或 R 或其保守取代残基, X ₃ 选自 Y 或 F 或其保守取代残基, X ₄ 选自 Q 或 R 或其保守取代残基)	10	ARARX ₁ PSSWPYGX ₂ DV (其中 X ₁ 选自 Y 或 T 或其保守取代残基, X ₂ 选自 M 或 T 或其保守取代残基)	15	RASQINSYLN	16	AASSL QS	17	QQSLTTP FT	18
ADI-2724 3	GSISSSRYWVG	19	SIYYSGSTYYNPSLKS	22	ARDGLYHTPEYFQH	25	RASQSVSSYLA	26	DASNR AT	27	QQRFAFP YT	28
ADI-3030 2	GSIGSSQYYWVG	20	SIYRSGGTYYNPSLKS	23	ARDGLYHTPEYFQH	25	RASQSVSSYLA	26	DASNR AT	27	QQRFAFP YT	28
ADI-3033 6	GSISSSRYWVG	19	SIYYSGSTYYNPSLKS	22	ARDGLYHTPEYFQH	25	RASQSVSSYLA	26	DASNR AT	27	QQRFAH PYT	29
共有序列	GSIXSSX ₂ YYWVG (其中 X ₁ 选自 S 或 G 或其保守取代残基, X ₂ 选自 R 或 Q 或其保守取代残基)	21	SIXXSGX ₂ YYNPSLKS (其中 X ₁ 选自 Y 或 R 或其保守取代残基, X ₂ 选自 S 或 G 或其保守取代残基)	24	ARDGLYHTPEYFQH	25	RASQSVSSYLA	26	DASNR AT	27	QQRFAH PYT (其中 X ₁ 选自 F 或 H 或其保守取代残基)	30
ADI-2727 8	FTFSSYSMN	31	YISGSSSTIYYADSVKVG	34	ARHRIADSPSRAFDI	38	KSSQSVLFSSNNK NYLA	41	WASTR ES	42	QQSVFFP T	43
ADI-3029 3	FTFSSYSMN	31	YI-SSSGTINYADSVKVG	35	ARHRIADSPSRAFDI	38	KSSQSVLFSSNNK NYLA	41	WASTR ES	42	QQSVFFP T	43
ADI-3029 6	FTIGGYSMN	32	YI-SSSSTIHYADSVKVG	36	ARHRIGRSPSRAFDI	39	KSSQSVLFSSNNK NYLA	41	WASTR ES	42	QQSVFFP T	43
共有序列	FTX ₁ X ₂ YSMN (其中 X ₁ 选自 F 或 I 或其保守取代残基, X ₂ 选自 S 或 G 或其保守取代残基, X ₃ 选自 S 或 G 或其保守取代残基)	33	YIX ₁ X ₂ SSX ₃ TIK ₄ YADSVKVG (其中 X ₁ 选自 A 或 G 或其保守取代残基, X ₂ 选自 G 或 S 或其保守取代残基, X ₃ 选自 S 或 G 或其保守取代残基, X ₄ 选自 S 或 G 或其保守取代残基)	37	ARHRIK ₁ X ₂ SPSRAFDI (其中 X ₁ 选自 A 或 G 或其保守取代残基, X ₂ 选自 D 或 R 或其保守取代残基)	40	KSSQSVLFSSNNK NYLA	41	WASTR ES	42	QQSVFFP T	43

ADI-2729 1	取代残基, X ₃ 选自S或G或其保守取代残基)	44	或其保守取代残基, X ₄ 选自Y、N或H或其保守取代残基)	48	AKDPGTDSSGYYYIWR Y	53	RASQSVSSNLA	57	SASTR AT	58	QQYVPH PPFT	59
ADI-3028 3	FTFSSYAMS	45	SISSGGSTIYYADSVKG	49	AKDPGTDSSGYYYIWR Y	53	RASQSVSSNLA	57	SASTR AT	58	QQYVPH PPFT	59
ADI-3028 6	FTFSPYGMS	46	SISSGGSTIYYADSVKG	50	AKDPGTHYSGYYYIWR Y	54	RASQSVSSNLA	57	SASTR AT	58	QQYVPH PPFT	59
ADI-3028 8	FTFGPYGMS	46	SISSGGSTIWHADSVKG	51	AKDPGTDSTGYYYIWR Y	55	RASQSVSSNLA	57	SASTR AT	58	QQYVPH PPFT	59
共有序列	FTFX ₁ X ₂ YX ₃ MS (其中X ₁ 选自S或G或其保守取代残基, X ₂ 选自S或P或其保守取代残基, X ₃ 选自A或G或其保守取代残基)	47	X ₁ ISGSX ₂ X ₃ TX ₄ ADSVKG (其中X ₁ 选自A或S或其保守取代残基, X ₂ 选自G或A或其保守取代残基, X ₃ 选自S或R或其保守取代残基, X ₄ 选自Y或W或其保守取代残基, X ₅ 选自Y或H或其保守取代残基)	52	AKDPGTXX ₁ XX ₂ GYYYIW RY (其中X ₁ 选自D或H或其保守取代残基, X ₂ 选自S或Y或其保守取代残基, X ₃ 选自S或I或其保守取代残基)	56	RASQSVSSNLA	57	SASTR AT	58	QQYVPH PPFT	59
ADI-2729 7	YTFYSYMH	60	IIPSGGSTSYAQKFQG	6	ARDHDIAAAGRLADY	66	RASQGISSWLA	69	AASSL QS	17	QQAVILP IT	70
ADI-3027 2	YTFTEYYMH	61	IIPSAGSTSYAQKFQG	63	ARDHDIAAAGRLADY	66	RASQGISSWLA	69	AASSL QS	17	QQAVILP IT	70
ADI-3027 8	YTFTEYYMH	61	IIPSAGSTIKYAQKFQG	64	ARDHDIRLAGRLADY	67	RASQGISSWLA	69	AASSL QS	17	QQAVILP IT	70
共有序列	YTFTX ₁ YYMH (其中X ₁ 选自S或E或其保守取代残基)	62	IIX ₁ PSX ₂ GSTX ₃ YAQKFQG (其中X ₁ 选自N或S或其保守取代残基, X ₂ 选自G或A或其保守取代残基, X ₃ 选自S或K或其保守取代残基)	65	ARDHDIX ₁ X ₂ AGRLADY (其中X ₁ 选自A或R或其保守取代残基, X ₂ 选自A或L或其保守取代残基)	68	RASQGISSWLA	69	AASSL QS	17	QQAVILP IT	70
ADI-2730 1	GSISSSSYYWG	71	SIYSGSTIYYNPSLKS	22	AREAGRGTGTLFFDY	78	RASQSISSWLA	81	KASSL ES	82	QQYGILP RT	83
ADI-3030 6	GSISSSLYYWG	72	SIYSGSTIYYNPSFKS	75	AREAGRGTGTLFFDY	78	RASQSISSWLA	81	KASSL ES	82	QQYGILP RT	83
ADI-3031 1	GSIASSYYWG	73	SIYSGSTIYYNPSLKS	76	AREAGRGTGTLFFDY	79	RASQSISSWLA	81	KASSL ES	82	QQYGILP RT	83
共有序列	GSIX ₁ SSX ₂ YYWG (其中X ₁ 选自A或S或其保守取代残基, X ₂ 选自S、L或V或其保守取代残基)	74	SIYSGSTIYYNPSX ₃ KS (其中X ₁ 选自Y或F或W或其保守取代残基, X ₂ 选自L或F或其保守取代残基)	77	AREAGRXX ₁ TGTLFFDY (其中X ₁ 选自G或T或其保守取代残基, X ₂ 选自T或G或其保守取代残基)	80	RASQSISSWLA	81	KASSL ES	82	QQYGILP RT	83

表 2: 本发明示例性抗体 CDR 序列

抗体名称	HCDR1-AbM	SE Q	HCDR2-Kabat	SE Q	HCDR3-Kabat	SE Q	LCDR1-Kabat	SE Q	LCDR2-Kabat	SE Q	LCDR3-Kabat	SE Q
ADI-27238	GYFTSYVMS	178	IINPSGGSTSYAQKFQ	6	ARYPSSWPYGMVDV	182	RASQSINSYLN	16	AASSLQS	17	QQSLTPFT	18
ADI-30263	GYFTLSYMN	179	IIDPSGGRTSYAQKFQ	7	ARYPSSWPYGTIDV	183	RASQSINSYLN	16	AASSLQS	17	QQSLTPFT	18
ADI-30267	GYFTRSYVMS	180	IIDPSGGRTSYAQKFQ	8	ARYPSSWPYGMVDV	184	RASQSINSYLN	16	AASSLQS	17	QQSLTPFT	18
ADI-30268	GYFTGSYYMG	181	IIDPSGGRTSYARKFQ	9	ARTPSSWPYGMVDV	185	RASQSINSYLN	16	AASSLQS	17	QQSLTPFT	18
ADI-27243	GGSSSSRYW G	186	SIVYSGSTYYNPSLKS	22	DGLYHTPEYFQH	188	RASQSVSSYLA	26	DASNRAT	27	QQRFAFPYT	28
ADI-30302	GGSGSSQYYW G	187	SIVRSGGTYYNPSLKS	23	DGLYHTPEYFQH	188	RASQSVSSYLA	26	DASNRAT	27	QQRFAFPYT	28
ADI-30336	GGSSSSRYW G	186	SIVYSGSTYYNPSLKS	22	DGLYHTPEYFQH	188	RASQSVSSYLA	26	DASNRAT	27	QQRFAHPYT	29
ADI-27278	GFTESSYMN	189	YISGSSSTIYYADSVK	34	HRIADSPSRAFDI	191	KSSQSVLFSSNNKNYL A	41	WASTRES	42	QQSYFPPT	43
ADI-30293	GFTESSYMN	189	YI-SSSGTINVADSVK	35	HRIADSPSRAFDI	191	KSSQSVLFSSNNKNYL A	41	WASTRES	42	QQSYFPPT	43
ADI-30296	GFITGGYMN	190	YI-SSSSSTIHYADSVK	36	HRIGRSPSRAFDI	192	KSSQSVLFSSNNKNYL A	41	WASTRES	42	QQSYFPPT	43
ADI-27291	GFTESSYAMS	193	AISGSGGSTYYADSVK G	48	DPGTDSSGYYIWR Y	196	RASQSVSSNLA	57	SASTRAT	58	QQYVPHPPF T	59
ADI-30283	GFTESPYGMS	194	SISGSGGRTYYADSVK G	49	DPGTDSSGYYIWR Y	196	RASQSVSSNLA	57	SASTRAT	58	QQYVPHPPF T	59
ADI-30286	GFTEGYPYGMS	195	AISGSGASTWYADSVK G	50	DPGTHYSGYYIWR Y	197	RASQSVSSNLA	57	SASTRAT	58	QQYVPHPPF T	59
ADI-30288	GFTEGYPYGMS	195	AISGSGASTWHADSVK G	51	DPGTDSTGYYIWR Y	198	RASQSVSSNLA	57	SASTRAT	58	QQYVPHPPF T	59
ADI-27297	GYFTSYVMH	199	IINPSGGSTSYAQKFQ	6	DHDIAAAGRLADY	201	RASQGISSWLA	69	AASSLQS	17	QQAVILPIT	70
ADI-30272	GYTFTEVYMH	200	IISPSAGSTSYAQKFQ	63	DHDIAAAGRLADY	201	RASQGISSWLA	69	AASSLQS	17	QQAVILPIT	70
ADI-30278	GYTFTEVYMH	200	IISPSAGSTKYAQKFQ	64	DHDIRLAGRLADY	202	RASQGISSWLA	69	AASSLQS	17	QQAVILPIT	70
ADI-27301	GGSSSSSYW	203	SIVYSGSTYYNPSLKS	22	EAGRGTTGLLFDY	206	RASQSISSWLA	81	KASSLES	82	QQYGILPRT	83

ADI-3028 3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSPYGMWVRQAPGKGLVWVSSISGSGGRITYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTDSSGYYIWRYYWGQGLVTVSS	95
ADI-3028 6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGPYGMWVRQAPGKGLVWVSAISGSGASTWYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTHYSGYYIWRYYWGQGLVTVSS	96
ADI-3028 8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGPYGMWVRQAPGKGLVWVSAISGSGASTWYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPGTDSTGYYIWRYYWGQGLVTVSS	97
ADI-2729 7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPFGSGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDHDIADAAAGRLADYWGQGLVTVSS	98
ADI-3027 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTTEYYMHVVRQAPGQGLEWMGIHSPSAGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDHDIADAAAGRLADYWGQGLVTVSS	99
ADI-3027 8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTTEYYMHVVRQAPGQGLEWMGIHSPSAGSTKYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDHDIRLAGRLADYWGQGLVTVSS	100
ADI-2730 1	QLQLQESGPGLVKPSSETSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPGKGLVWIGSIYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREAGRTTGLLFDYWGQGLVTVSS	101
ADI-3030 6	QLQLQESGPGLVKPSSETSLTCTVSGGSISSSLYYWGWRQPPGKGLVWIGSIYSGSTFYNPSFKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREAGRTTGLLFDYWGQGLVTVSS	102
ADI-3031 1	QLQLQESGPGLVKPSSETSLTCTVSGGSIASSVYYWGWRQPPGKGLVWIGSIYSGSTWYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREAGRTTGLLFDYWGQGLVTVSS	103
示例性抗体 VL 序列		
抗体名称	VL	SEQ ID NO:
ADI-27238	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVTITTCRASQINSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSLLTPFTFGGGTKVEIK	104
ADI-30263	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVTITTCRASQINSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSLLTPFTFGGGTKVEIK	104
ADI-30267	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVTITTCRASQINSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSLLTPFTFGGGTKVEIK	104
ADI-30268	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVTITTCRASQINSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSLLTPFTFGGGTKVEIK	104
ADI-27243	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRFAFPYTFGGGTKVEIK	105
ADI-30243	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRFAFPYTFGGGTKVEIK	105

302	PYTFGGGKVEIK		
ADI-30 336	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLIIYDASNRTGIPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRFA HPYTFGGGKVEIK		106
ADI-27 278	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVTPDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQSYFFPTFGGKVEIK		107
ADI-30 293	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVTPDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQSYFFPTFGGKVEIK		107
ADI-30 296	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLFSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVTPDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQSYFFPTFGGKVEIK		107
ADI-27 291	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLA WYQQKPGQAPRLIIYSASTRATGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQSEDFAVYYCQYVVP HPFTFGGKVEIK		108
ADI-30 283	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLA WYQQKPGQAPRLIIYSASTRATGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQSEDFAVYYCQYVVP HPFTFGGKVEIK		108
ADI-30 286	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLA WYQQKPGQAPRLIIYSASTRATGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQSEDFAVYYCQYVVP HPFTFGGKVEIK		108
ADI-30 288	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLA WYQQKPGQAPRLIIYSASTRATGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQSEDFAVYYCQYVVP HPFTFGGKVEIK		108
ADI-27 297	DIQMTQSPSSVSASVGDVRVTTTCRASQGISWLA WYQQKPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSFGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQA VI LPITFGGKVEIK		109
ADI-30 272	DIQMTQSPSSVSASVGDVRVTTTCRASQGISWLA WYQQKPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSFGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQA VI LPITFGGKVEIK		109
ADI-30 278	DIQMTQSPSSVSASVGDVRVTTTCRASQGISWLA WYQQKPGKAPKLLISAASSLQSGVPSRFSFGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQA VI LPITFGGKVEIK		109
ADI-27 301	DIQMTQSPSTLSASVGDVRVTTTCRASQGISWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLESQVPSRFSFGSGGTDFTLTISSLQPDDEFATYYCQY GIL PRTFGGGKVEIK		110
ADI-30 306	DIQMTQSPSTLSASVGDVRVTTTCRASQGISWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLESQVPSRFSFGSGGTDFTLTISSLQPDDEFATYYCQY GIL PRTFGGGKVEIK		110
ADI-30 311	DIQMTQSPSTLSASVGDVRVTTTCRASQGISWLA WYQQKPGKAPKLLIYKASSLESQVPSRFSFGSGGTDFTLTISSLQPDDEFATYYCQY GIL PRTFGGGKVEIK		110

表 4: 本发明涉及到的各抗体相关序列的 SEQ ID NO: 编号

抗体名称	HCDR1	HCDR2	HCDR3	VH	HC	VH DNA	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VL	LC	VL DNA
ADI-27238	1	6	11	84	111	150	16	17	18	104	137	170
ADI-30263	2	7	12	85	112	151	16	17	18	104	137	170
ADI-30267	3	8	13	86	113	152	16	17	18	104	137	170
ADI-30268	4	9	14	87	114	153	16	17	18	104	137	170
共有序列	5	10	15									
ADI-27243	19	22	25	88	115	154	26	27	28	105	138	171
ADI-30302	20	23	25	89	116	155	26	27	28	105	138	171
ADI-30336	19	22	25	90	117	156	26	27	29	106	139	172
共有序列	21	24	25						30			
ADI-27278	31	34	38	91	118	157	41	42	43	107	140	173
ADI-30293	31	35	38	92	119	158	41	42	43	107	140	173
ADI-30296	32	36	39	93	120	159	41	42	43	107	140	173
共有序列	33	37	40									
ADI-27291	44	48	53	94	121	160	57	58	59	108	141	174
ADI-30283	45	49	53	95	122	161	57	58	59	108	141	174
ADI-30286	46	50	54	96	123	162	57	58	59	108	141	174
ADI-30288	46	51	55	97	124	163	57	58	59	108	141	174
共有序列	47	52	56									
ADI-27297	60	6	66	98	125	164	69	17	70	109	142	175
ADI-30272	61	63	66	99	126	165	69	17	70	109	142	175
ADI-30278	61	64	67	100	127	166	69	17	70	109	142	175
共有序列	62	65	68									
ADI-27301	71	22	78	101	128	167	81	82	83	110	143	176
ADI-30306	72	75	78	102	129	168	81	82	83	110	143	176
ADI-30311	73	76	79	103	130	169	81	82	83	110	143	176
共有序列	74	77	80									

注: HC 通过将 VH 序列融合至 SEQ ID NO: 177 的 IgG4_PAA 部分形成; LC 通过将 VL 序列融合至 SEQ ID NO: 209 的 Cκ 链形成。

本发明下面实施例涉及的 20 个示例性抗体 (ADI-27238, ADI-30263, ADI-30267, ADI-30268, ADI-27243, ADI-30302, ADI-30336, ADI-27278, ADI-30293, ADI-30296, ADI-27291, ADI-30283, ADI-30286, ADI-30288, ADI-27297, ADI-30272, ADI-30278, ADI-27301, ADI-30306, ADI-30311)、以及这些抗体的 CDR 区、轻链可变区和重链可变区、轻链和重链的氨基酸序列,以及对应的核苷酸序列在本申请的表 1-3 和序列表部分列出,并且其对应序列编号汇总在表 4 中。

实施例

实施例 1: 抗体的制备

酵母展示技术筛选抗 TIGIT 全人源抗体

基于酵母的抗体展示文库(Adimab),按照现有的方法(WO2009036379; WO 2010105256; WO2012009568)进行扩增,其中每个库的多样性达到 1×10^9 。简言之,前两轮筛选使用 Miltenyi 公司的 MACS 系统进行磁珠细胞分选。首先,将文库的酵母细胞($\sim 1 \times 10^{10}$ 细胞/文库)分别在 FACS 洗涤缓冲液中(磷酸盐缓冲液,含有 0.1%牛血清蛋白)室温孵化 15 分钟,缓冲液中含有 100 nM 生物素标记的人 TIGIT 抗原(Acro Biosystems, TIT-H52H3)。使用 50 ml 预冷的 FACS 洗涤缓冲液洗一次,再用 40 ml 相同洗涤缓冲液重悬细胞,并加入 500 μ l 链霉亲和素微珠(Miltenyi LS)于 4 °C 孵化 15 分钟。1000rpm 离心 5min 弃去上清后用 5 ml FACS 洗涤缓冲液重悬细胞,将细胞溶液加到 Miltenyi LS 柱中。加样完成后,用 FACS 洗涤缓冲液洗柱 3 次,每次 3 ml。从磁性区域取下 Miltenyi LS 柱,用 5 ml 生长培养基洗脱,收集洗脱的酵母细胞并在 37°C 过夜生长。

使用流式细胞仪进行下一轮的分选:将经过 MACS 系统筛选获得的大约 1×10^8 的酵母细胞用 FACS 缓冲液洗三次,于含有低浓度生物素(100-1 nM)标记的 TIGIT 抗原中室温下培养。弃去培养液,细胞用 FACS 洗涤缓冲液洗两次之后,将细胞与 LC-FITC (FITC 标记的抗人免疫球蛋白 kappa 轻链抗体, Southern Biotech) (1: 100 稀释)混合,并与 SA-633 (链霉亲和素-633, Molecular Probes) (1:500 稀释)或 SA-PE (链霉亲和素-PE, Sigma) (1:50 稀释)试剂混合,4°C 下培养 15 分钟。用预冷的 FACS 洗涤缓冲液洗脱两次,并重悬于 0.4 ml 缓冲液中,将细胞转移到带滤器的分离管中。使用 FACS ARIA (BD Biosciences) 分选细胞。

将通过筛选获得的表达抗 TIGIT 抗体的酵母细胞在 30°C 下震荡诱导 48 小时以表达抗 TIGIT 的抗体。诱导结束之后,1300rpm 离心 10min 去除酵母细胞,收获上清液。使用 Protein A 对上清液中的抗 TIGIT 抗体进行纯化,pH2.0 醋酸溶液洗脱,收获抗 TIGIT 抗体,抗体纯度 >95%。使用木瓜蛋白酶消化并用 KappaSelect (GE 生命医疗集团)进行纯化可获得相应的 Fab 片段。本次筛选获得抗 TIGIT 抗体 ADI-27301, ADI-27238, ADI-27278, ADI-27243, ADI-27297, ADI-27291。

抗人 TIGIT 抗体的亲和力优化

为了获得更高亲和力的抗人 TIGIT 抗体,我们通过以下方法对抗体 ADI-27301, ADI-27238, ADI-27278, ADI-27243, ADI-27297, ADI-27291 进行了优化。

VHmut 筛选

该方法是通过常规的错配 PCR 的方法向抗体重链区域引入突变。PCR 过程中,通过使用 1 μ M 高突变的碱基类似物 dPTP 和 8-oxo-dGTP,从而将碱基错配概率提高至约 0.01 bp。

获得的错配 PCR 的产物通过同源重组的方法构建入含有重链恒定区的载体中。通过这种方法,在包括 TIGIT 抗原滴度、未标记抗原竞争以及使用母抗体竞争的筛选压力下,我们获得了库容量为 1×10^7 的次级库。通过 FACS 方法进行了 3 轮成功筛选。

CDRH1/CDRH2 筛选

把 VHmut 方法获得的子代抗体的 CDRH3 基因构建入 1×10^8 多样性的 CDRH1/CDRH2 基因库中,并对其进行了 3 轮筛选。第一轮使用 MACS 方法,而第二、三轮使用 FACS 方法,对抗体抗原结合物进行亲和力加压,筛选出最高亲和力的抗体。

经过以上对 6 株亲本抗体的亲和力成熟过程,我们获得了 14 株亲和力提高的抗人 TIGIT 单克隆抗体 ADI-30263/ADI-30267/ADI-30268 (ADI-27238 子代)、ADI-30302/ADI-30336 (ADI-27243 子代)、ADI-30293/ADI-30296 (ADI-27278 子代)、ADI-30283/ADI-30286/ADI-30288 (ADI-27291 子代)、ADI-30272/ADI-30278 (ADI-27297 子代)、ADI-30306/ADI-30311 (ADI-27301 子代)。

将通过筛选获得的表达抗 TIGIT 抗体的酵母细胞在 30°C 下震荡诱导 48 小时以表达抗 TIGIT 的抗体。诱导结束之后,1300rpm 离心 10min 去除酵母细胞,收获上清液。使用 Protein A 对上清液中的抗 TIGIT 抗体进行纯化,pH2.0 醋酸溶液洗脱,收获抗 TIGIT 抗体,抗体纯度 $>95\%$ 。使用木瓜蛋白酶消化并用 KappaSelect (GE 生命医疗集团) 进行纯化可获得相应的 Fab 片段。

抗体的表达及纯化

本申请涉及的各个抗人 TIGIT 抗体的序列信息及编号如表 1-9 所示,其中亲本以及亲和力成熟后的子代抗体均以上述方法由酵母表达纯化。

在 HEK293 细胞中表达并且纯化实施例中使用下述对照抗体:22G2 是在 HEK293 细胞中瞬时表达的来自百时美施贵宝公司的抗人 TIGIT 抗体,其轻重链可变区序列与专利申请 WO2016/106302 A1 中的抗体“22G2”的序列相同。31C6 是在 HEK293 细胞中瞬时表达的来自默沙东的抗人 TIGIT 抗体,其轻重链可变区序列与专利申请 WO2016/028656 A1 中的抗体“31C6”的序列相同。10A7 和 1F4 均是在 HEK293 细胞中瞬时表达的来自基因泰克公司的抗人 TIGIT 抗体,其轻重链可变区序列与专利申请 WO2015009856A2 中的抗体“10A7”、“1F4”的序列分别相同。4 个对照抗体的恒定区均采用野生型 IgG4 序列。

对于 HEK293 细胞中抗体的瞬时表达,使用载体 pTT5。首先将抗体的重链和轻链分别克隆到单独的 pTT5 载体中。使用化学转染的方法将带有抗体分子重链和轻链的 pTT5 载体转入 HEK293 细胞中。采用的化学转染试剂为 PEI(购自 Polysciences),按照生产商提供的方案瞬时转染培养的 HEK293 细胞。首先在超净工作台中准备质粒 DNA 和转染试剂,将 F17 培养基 (Gibco) (体积为转染体积的 1/5) 各一半加入 50ml 离心管中,一份加入已过滤的质粒 ($130 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$),另一半加入已过滤的 PEI(1 g/L , Polysciences) (质量比(质粒:PEI)=1:3),混匀 5 min,将二者轻柔混匀 20 次,静置 15-30 min,不要超过 30min。将 DNA/PEI 混合物轻柔倒入 HEK293 细胞并混匀,在 37°C , $8\% \text{ CO}_2$ 的条件下培养细胞 7 天,每 48 小时流加新鲜培养基。7 天后或者连续培养至细胞活力 $\leq 60\%$ 时,13000rpm 离心 20min。取上清液,用 Protein A 纯化上清液,使抗体的纯度 $>95\%$ 。

此外,在 CHO 细胞中表达并且纯化完整抗体 ADI-30268, ADI-30278, ADI-30286, ADI-30288, ADI-30293, ADI-30306, ADI-30336。

CHO 细胞中表达和纯化:根据制造商的说明书,使用 Horizon 的 HD-BIOP1(GS Null

CHO-K1)产生表达抗体的 CHO 细胞系。首先将抗体分子重链和轻链的 DNA 序列分别插入到来自 ATUM 公司的 pD2531 质粒中。之后采用电转染法将构建的质粒转入 CHO 细胞系, 转染 24 小时之后利用 ForteBio 检测抗体产量以判断转染效率。转染后的细胞经过加压筛选得到高表达抗体的细胞池(pool)。之后扩增细胞池, 大量表达抗体, 并收集细胞上清用 Protein A 以及凝胶过滤纯化上清液, 使抗体的纯度>95%。

实施例 2 抗体亲和力测定

采用生物光干涉测量 (ForteBio) 测定法测定本发明上述 20 个示例抗体结合人 TIGIT 的平衡解离常数 (K_D)。

ForteBio 亲和力测定按照现有的方法 (Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): p. 270-8) 进行。

测量候选抗体 Fab 与 TIGIT-FC 的单价亲和力: 传感器在分析缓冲液中线下平衡 20 分钟, 然后线上检测 120 秒建立基线。加载人 TIGIT-FC 至 AHQ 传感器 (ForteBio) 上进行 ForteBio 亲和测量。将已加载抗原的传感器置于含 100nM Fab 的溶液中直至平台期, 之后将传感器转移至分析缓冲液解离至少 2 分钟用于解离速率测量。使用 1:1 结合模型进行动力学的分析。

测量完整候选抗体与人 (ACRO, TIT-H52H3)、鼠 (ACRO, TIT-M52E6)、猴 TIGIT-his (ACRO, TIT-C5223) 的单价亲和力: 传感器在分析缓冲液中线下平衡 20 分钟, 然后线上检测 120 秒建立基线, 加载经纯化的抗体至 AHQ 传感器 (ForteBio) 上至厚度为 1 纳米进行 ForteBio 亲和测量。将已加载抗体的传感器于 100 nM 的 TIGIT-his 抗原中作用至平台期, 之后将传感器转移至分析缓冲液解离至少 2 分钟用于解离速率测量。使用 1:1 结合模型进行动力学的分析。

在如以上测定法所述进行的实验中, 20 个酵母表达的候选抗体 (Fab) 的 K_D 值如表 5 所示。

表 5. 20 个酵母表达的候选抗体 (Fab) 与人 TIGIT-FC 的单价 K_D

亲本	子代		
ADI-27238 1.38E-08	ADI-30263 7.95E-10	ADI-30267 1.66E-09	ADI-30268 5.71E-10
ADI-27243 9.47E-09	ADI-30302 3.29E-10	ADI-30336 5.66E-10	
ADI-27278 1.09E-08	ADI-30293 3.49E-09	ADI-30296 2.43E-09	
ADI-27291 6.48E-09	ADI-30283 5.53E-10	ADI-30286 4.36E-10	ADI-30288 5.47E-10
ADI-27297 3.21E-08	ADI-30272 1.19E-09	ADI-30278 2.43E-10	
ADI-27301 8.01E-09	ADI-30306 7.29E-10	ADI-30311 8.07E-10	

在如以上测定法所述进行的实验中, 7 个 CHO 表达的候选完整抗体的人、鼠、猴 TIGIT 单价 K_D 如表 6 所示。

表 6. 7 个 CHO 表达候选抗体及对照抗体与人、鼠、猴 TIGIT 的单价 KD

序号	KD (人)	KD (猴)	KD (鼠)
ADI-30268	3.29E-09	6.23E-08	4.64E-08
ADI-30278	1.75E-09	4.53E-09	N.B.
ADI-30286	1.76E-09	1.06E-08	1.34E-07
ADI-30288	1.31E-09	7.19E-09	5.70E-09
ADI-30293	7.89E-10	3.49E-08	1.30E-08
ADI-30306	2.70E-09	3.44E-09	N.B.
ADI-30336	1.46E-09	5.56E-10	N.B.
22G2(BMS)	3.50E-09	4.20E-09	N.B.
31C6(MSD)	2.34E-09	4.72E-10	N.B.

由以上图表结果可见：（1）亲和力成熟后，各子代抗体与其亲代抗体相比，与人 TIGIT 的亲和力均有显著提高；（2）亲和力成熟后选取的 7 株 CHO 表达的抗体与人 TIGIT 的亲和力与对照抗体相比类似或更高；7 株候选抗体均能与猴 TIGIT 交叉反应；7 株候选抗体中有 4 株（ADI-30268/ ADI-30286/ ADI-30288/ ADI-30293）能与小鼠交叉反应。

实施例 3 抗 TIGIT 抗体与表达于细胞上的人 TIGIT 的结合

基于流式细胞术测定法测量本发明的上述 20 个示例抗体与表达于 CHO 细胞表面的人 TIGIT 的结合能力。通过比较不同抗体与表达于 CHO 细胞表面的人 TIGIT 的结合曲线来测定其结合能力。

具体地，在亲和力成熟后，使用酵母表达亲代及子代抗体。得到抗体后（纯度约 70%），进行这些抗体与表达于 CHO 细胞表面的人 TIGIT 结合实验。具体实验过程为：（1）使用构建于 pCHO1.0 的人 TIGIT 质粒转染 CHOS 细胞，使用氨甲喋呤以及嘌呤霉素筛选转染后的细胞得到稳定细胞 pool。（2）使用不同浓度的候选抗体与稳定细胞 pool 于 4℃ 孵育 30 分钟。PBS 清洗三次后，使用 PE 标记的鼠抗人二抗与之 4℃ 孵育 30 分钟。PBS 再次清洗三次后，使用 100ul PBS 重悬细胞。（3）使用流式细胞仪测定其二通道中位荧光度值。以抗体浓度以 10 为底的对数为横坐标，以二通道中位荧光度值为纵坐标作图，比较其 EC50 及曲线峰值。结果如下表和图 1 所示(EC50: nM)。

抗体	IgG1	10A7	1F4	22G2	31C6	
EC50	~1.388e+007	0.2690	0.7096	0.5106	0.4358	
抗体	ADI-27238	ADI-30267	ADI-30268	ADI-27243	ADI-30302	ADI-30336
EC50	0.7512	0.7402	0.3293	0.5873	0.3262	0.6291
抗体	ADI-27278	ADI-30293	ADI-30296	ADI-27291	ADI-30286	ADI-30288
EC50	0.9682	0.9003	0.3714	0.8522	0.4459	0.4755
抗体	ADI-27297	ADI-30272	ADI-30278	ADI-27301	ADI-30306	ADI-30311
EC50	0.4958	0.6098	0.4086	0.8990	0.7634	0.7566

由上面的实验结果可以得出如下结论：（1）亲和力成熟后，各子代抗体与表达于 CHO 细胞表面的人 TIGIT 的结合能力较其亲代抗体有增强（表现为结合曲线上平台更高）。（2）亲和力成熟后的子代抗体与表达于 CHO 细胞表面的人 TIGIT 的结合能力均强于来自基因泰克公司的两个分子 10A7 和 1F4，与来自百时美施贵宝公司的分子 22G2 以及来自默沙东的分子 31C6 的结合能力相当。

此外,在亲和力成熟后,对筛选出来的7个分子使用CHO系统表达纯化得到高纯度的抗体,进行与表达于CHO细胞表面的人TIGIT的结合实验。在如以上测试法所述进行的实验中,ADI-30268、ADI-30336、ADI-30293、ADI-30286、ADI-30288、ADI-30278和ADI-30306结合CHO细胞上过表达的人TIGIT,EC₅₀值分别为0.1392nM、0.1300nM、0.2288nM、0.1758nM、0.1860nM、0.1321nM和0.1999nM,高于对照抗体22G2、1F4与CHO细胞上过表达的人TIGIT的结合能力(对照抗体22G2及1F4的EC₅₀值分别为0.7249nM和0.6073nM),与对照抗体31C6类似(EC₅₀值为0.1846nM)。虽然对照抗体10A7与7个候选抗体有着类似的EC₅₀值(0.1949nM),但是观察该抗体的结合曲线可知:与其他7个候选抗体相比,其曲线的上平台较低。一般认为这是由其较快的解离特性导致(参见图2)。因此也认为7个候选抗体与表达于CHO细胞表面的人TIGIT结合能力强于10A7。

实施例4 抗TIGIT抗体对其配体CD155的阻断

采用流式细胞术的方法测定候选抗体的配体阻断能力。具体方法为:构建稳定过表达人TIGIT的CHOS细胞pool,将50nM的带小鼠IgG2aFC段的人CD155蛋白

(ACRO,TIT-H5253-1MG)以及不同浓度的抗体与细胞于4摄氏度共孵育30分钟。PBS清洗三遍后,使用1%浓度的羊抗鼠FC、带APC荧光素标记的二抗(Biolegend,405308)染色细胞上残留的配体CD155。PBS再次清洗3遍后,上流式细胞仪检测相应通道(C6,4通道)的中间荧光度值。以抗体浓度(nM)的以10为底的对数为横坐标,以各抗体浓度点对应的中间荧光度值为纵坐标作图。通过分析曲线的IC₅₀区分不同抗体对CD155的阻断能力。

以IgG1为阴性对照抗体,以10A7、22G2、31C6为阳性对照抗体,做亲和力成熟前后的候选分子对CD155的阻断能力检测。图3和下表显示了亲和力成熟前后酵母表达的抗体对CD155的阻断能力(IC₅₀: nM)。

抗体	IgG1	10A7	22G2	31C6		
IC ₅₀	~0.03904	0.7408	0.1786	0.1536		
抗体	ADI-27238	ADI-30267	ADI-30268	ADI-27243	ADI-30302	ADI-30336
IC ₅₀	0.4181	0.2775	0.2209	0.8188	0.2808	0.4093
抗体	ADI-27278	ADI-30293	ADI-30296	ADI-27291	ADI-30286	ADI-30288
IC ₅₀	0.5859	0.8586	0.2781	1.614	0.2965	0.6677
抗体	ADI-27297	ADI-30272	ADI-30278	ADI-27301	ADI-30306	ADI-30311
IC ₅₀	0.6029	0.4036	0.2175	0.6411	0.5281	0.5313

从实验结果可得出:大部分亲和力成熟后的子代抗体较其亲本对CD155的阻断能力有提高,与对照抗体22G2和31C6类似且强于10A7。

使用7株CHO表达的高纯度抗体做CD155与TIGIT的阻断实验。在如以上测试法所述进行的实验中,以IgG4为阴性对照,22G2、31C6以及10A7为阳性对照。由实验结果可得出:ADI-30268、ADI-30336、ADI-30278的IC₅₀分别为0.1402nM、0.1219nM、0.1164nM,低于22G2(0.6069nM)、31C6(0.1659nM)、10A7(0.3252nM)三个对照抗体,表明这三株抗体有较对照抗体更强的配体(CD155)阻断能力;其他4个候选抗体ADI-30293、ADI-30286、ADI-30288、ADI-30306的IC₅₀分别为0.2510nM、0.1893nM、0.2238nM、0.2420nM,分别都小于对照抗体22G2和10A7但大于31C6,表明这四株抗体有较22G2和10A7更强但较31C6弱的配体(CD155)阻断能力。结果如下表和图4所示(IC₅₀: nM)。

抗体	IgG1	22G2	31C6	10A7
IC50	~1.152	0.6069	0.1659	0.3252
抗体	ADI-30268	ADI-30336	ADI-30293	ADI-30286
IC50	0.1402	0.1219	0.2510	0.1893
抗体	ADI-30288	ADI-30278	ADI-30306	
IC50	0.2238	0.1164	0.2420	

实施例 5 MOA 方法检测候选抗体的生物学活性

抗 TIGIT 抗体能够通过阻断 TIGIT 和 CD155 的结合,从而解除 CD155 对下游 IL2 信号通路的抑制作用。本实施例使用 Promega 公司提供的 MOA 检测细胞株 (J2201),通过检测荧光报告基因的表达,反映 IL2 信号的激活情况,从而检测抗体对 TIGIT 与 CD155 结合的抑制作用。按照 Promega 提供的标准方法进行该检测,过程如下:稳定表达人 TIGIT 以及 IL2 启动子控制下的荧光素酶报告基因的 Jurkat 细胞,与稳定表达人 CD155 以及 T 细胞激活元件的 CHO-K1 细胞、以及不同浓度梯度的抗人 TIGIT 抗体,于 37°C 二氧化碳细胞培养箱共同孵育,6 小时后检测荧光信号。

实验结果表明:亲和力成熟后的子代分子(由酵母直接表达,纯度约 70%)较亲代分子在体外生物学活性上有显著提升,大都达到与 22G2 和 31C6 两个对照抗体类似的水平。结果如下表和图 5 所示(EC50: nM)。

抗体	IgG1	10A7	22G2	31C6
EC50	~272.8	~77.84	2.113	0.8383
抗体	ADI-27238	ADI-30267	ADI-30268	
EC50	68.70	2.064	1.224	
抗体	ADI-27243	ADI-30302	ADI-30336	
EC50	297.1	0.9831	3.334	
抗体	ADI-27278	ADI-30293	ADI-30296	
EC50	~1.405e+008	1.559	1.088	
抗体	ADI-27297	ADI-30272	ADI-30278	
EC50	~25059	1.489	0.5228	
抗体	ADI-27301	ADI-30306	ADI-30311	
EC50	~1.085e+012	1.645	1.824	

使用 7 株 CHO 表达的高纯度抗体做 MOA 生物学活性实验。在如以上测试法所述进行的实验中,以 IgG4 为阴性对照,31C6 为阳性对照。由实验结果可得出:候选抗体 ADI-30278 在该实验中的 EC50 为 0.1856 nM,较其他候选抗体以及对照抗体 31C6 (0.3424 nM) 更小,显示出其更高的体外生物学活性;ADI-30268、ADI-30286、ADI-30288、ADI-30306 的 EC50 分别为 0.5065 nM、0.3963 nM、0.3844 nM、0.3984 nM,显示出与对照抗体 31C6 类似的生物学活性;ADI-30336 以及 ADI-30293 的 EC50 分别为 1.274 nM 和 1.624 nM,显示出其较弱的生物学活性。结果如下表和图 6 所示(EC50: nM)。

抗体	IgG4	31C6	ADI-30268
EC50	0.0	0.3424	0.5065
抗体	ADI-30336	ADI-30293	ADI-30286
EC50	1.274	1.624	0.3963
抗体	ADI-30288	ADI-30278	ADI-30306
EC50	0.3844	0.1856	0.3984

实施例 6 动物体内药效试验

本实验利用人 TIGIT 敲入-MC38 小鼠肿瘤模型研究抗 TIGIT 抗体的抗肿瘤活性。

研究了候选分子 ADI-30293 和 ADI-30278 单独给药 (10mg/kg) 在人 TIGIT 敲入-MC38 小鼠模型中的药效学。小鼠结肠癌 MC38 细胞(上海和元生物, HYC0116)被移植到雌性 TIGIT 转基因小鼠(北京百奥赛图基因生物技术有限公司)。细胞移植后的第 6 天, 第 10 天, 第 13 天, 第 17 天, 给各组小鼠分别经皮下注射抗体, 移植后第 6 天、第 10 天、第 13 天、第 17 天、第 21 天、第 25 天测量肿瘤体积, 之后对小鼠实施安乐死。结果如图 7 所示。

观察图 7 实验结果, 可见本申请的抗 TIGIT 单克隆抗体 ADI-30293 和 ADI-30278 与 Ig4 阴性对照抗体相比, 在单独使用时对肿瘤的生长有一定的抑制作用。与 31C6 阳性对照相比, 两个候选抗体单独使用时其肿瘤抑制作用均与 31C6 无明显区别。

进一步, 研究了候选分子 ADI-30293 和 ADI-30278 与抗 PD1 抗体 antibody C (WO2017133540A1) 联合给药 (10+1 mg/kg) 在人 TIGIT 敲入-MC38 小鼠模型中的药效学。

小鼠结肠癌细胞 MC38 (上海和元生物, HYC0116) 用 DMEM 培养基培养。在 0.2 ml DMEM 基础培养基悬液中的 1×10^6 MC38 细胞被移植到雌性 TIGIT 转基因小鼠 (上海南方模式生物科技股份有限公司) 的右侧。肿瘤大小和体重在整个研究周期中每周测定 2 次, 肿瘤细胞移植 8 天后, 使用游标卡尺测量肿瘤长度和宽度, 根据如下公式计算肿瘤体积: 宽 $2 \times$ 长 $/2$ (mm³); 肿瘤体积平均约为 71 mm³ 的小鼠按每组 6 只随机分组, 当肿瘤体积达到检测终点或小鼠体重降低 20% 以上时即对小鼠实施安乐死。细胞移植后的第 8 天, 第 12 天, 第 15 天, 第 19 天, 给各组小鼠分别经皮下注射 h-IgG (10 mg/kg), antibody C (1 mg/kg) 以及 10 mg/kg 的 anti-TIGIT 抗体或其同型抗体。终点肿瘤平均体积在细胞移植后的第 29 天测定, 之后对实验小鼠实施安乐死。结果如图 8 所示。

观察图 8 实验结果可知: 当使用抗 TIGIT 抗体 ADI-30293 与抗 PD1 抗体 antibody C 联合用药时, 表现出了较抗 TIGIT 抗体或抗 PD1 抗体单独给药时更强的肿瘤抑制效果, 且 ADI-30293+anti-PD1 抗体的联用效果好于 31C6+anti-PD1 抗体的联用效果。同样的, ADI-30278 与 anti-PD1 抗体联合用药的效果好于 31C6+anti-PD1 抗体 antibody C 的联用效果。

本研究所有组小鼠在接种后 29 天, 小鼠体重均无明显变化。

权利要求

1. 结合 TIGIT 的抗体或其抗原结合片段, 其包含

(i) 如 SEQ ID NO:84、85、86、或 87 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列, 以及如 SEQ ID NO:104 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列, 或者

(ii) 如 SEQ ID NO:88、89 或 90 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列, 以及如 SEQ ID NO:105 或 106 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列, 或者

(iii) 如 SEQ ID NO:91、92 或 93 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列, 以及如 SEQ ID NO:107 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列, 或者

(iv) 如 SEQ ID NO:94、95、96 或 97 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列, 以及如 SEQ ID NO:108 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列, 或者

(v) 如 SEQ ID NO:98、99 或 100 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列, 以及如 SEQ ID NO:109 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列, 或者

(vi) 如 SEQ ID NO:101、102 或 103 所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列, 以及如 SEQ ID NO:110 所示的轻链可变区的 LCDR1、2 和 3 序列。

2. 结合 TIGIT 的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR, 以及轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR, 其中:

(a) HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 或 2 或 3 或 4 或 5 所示的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO:6 或 7 或 8 或 9 或 10 所示的氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO:11 或 12 或 13 或 14 或 15 所示的氨基酸序列, LCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列; 或

(b) HCDR1 包含 SEQ ID NO:19 或 20 或 21 所示的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO:22 或 23 或 24 所示的氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列, LCDR1 包含 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:28 或 29 或 30 所示的氨基酸序列; 或

(c) HCDR1 包含 SEQ ID NO:31 或 32 或 33 所示的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO:34 或 35 或 36 或 37 所示的氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO:38 或 39 或 40 所示的氨基酸序列, LCDR1 包含 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO:42 所示的氨基酸序列, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:43 所示的氨基酸序列; 或

(d) HCDR1 包含 SEQ ID NO:44 或 45 或 46 或 47 所示的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO:48 或 49 或 50 或 51 或 52 所示的氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO:53 或 54 或 55 或 56 所示的氨基酸序列, LCDR1 包含 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO:58 所示的氨基酸序列, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列; 或

(e) HCDR1 包含 SEQ ID NO:60 或 61 或 62 所示的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO:63 或 64 或 65 所示的氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO:66 或 67 或 68 所示的氨基酸序列, LCDR1 包含 SEQ ID NO:69 所示的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列; 或

基酸序列, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列; 或

(f) HCDR1 包含 SEQ ID NO:71 或 72 或 73 或 74 所示的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO:22 或 75 或 76 或 77 所示的氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO:78 或 79 或 80 所示的氨基酸序列, LCDR1 包含 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列; 或

(g) HCDR1 包含 SEQ ID NO:178 或 179 或 180 或 181 所示的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO:6 或 7 或 8 或 9 所示的氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO:182 或 183 或 184 或 185 所示的氨基酸序列, LCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列; 或

(h) HCDR1 包含 SEQ ID NO:186 或 187 所示的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO:22 或 23 所示的氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO:188 所示的氨基酸序列, LCDR1 包含 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:28 或 29 所示的氨基酸序列; 或

(i) HCDR1 包含 SEQ ID NO:189 或 190 所示的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO:34 或 35 或 36 所示的氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO:191 或 192 所示的氨基酸序列, LCDR1 包含 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO:42 所示的氨基酸序列, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:43 所示的氨基酸序列; 或

(j) HCDR1 包含 SEQ ID NO:193 或 194 或 195 所示的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO:48 或 49 或 50 或 51 所示的氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO:196 或 197 或 198 所示的氨基酸序列, LCDR1 包含 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO:58 所示的氨基酸序列, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:59 所示的氨基酸序列; 或

(k) HCDR1 包含 SEQ ID NO:199 或 200 所示的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO:6 或 63 或 64 所示的氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO:201 或 202 所示的氨基酸序列, LCDR1 包含 SEQ ID NO:69 所示的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列; 或

(l) HCDR1 包含 SEQ ID NO:203 或 204 或 205 所示的氨基酸序列, HCDR2 包含 SEQ ID NO:22 或 75 或 76 所示的氨基酸序列, HCDR3 包含 SEQ ID NO:206 或 207 所示的氨基酸序列, LCDR1 包含 SEQ ID NO:81 所示的氨基酸序列, LCDR2 包含 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列, 且 LCDR3 包含 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 至 2 中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其包含

(i) 包含与 SEQ ID NO:84 或 85 或 86 或 87 所示的氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列的重链可变区, 和/或包含与 SEQ ID NO:104 所示的氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区, 或者

(ii) 包含与 SEQ ID NO:88 或 89 或 90 所示的氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列的重链可变区, 和/或包含与 SEQ ID NO:105 或 106 所示的氨基酸序

列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区，或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:91 或 92 或 93 所示的氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列的重链可变区，和/或包含与 SEQ ID NO:107 所示的氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区，或者

(iv) 包含与 SEQ ID NO:94 或 95 或 96 或 97 所示的氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列的重链可变区，和/或包含与 SEQ ID NO:108 所示的氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区；

(v) 包含与 SEQ ID NO:98 或 99 或 100 所示的氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列的重链可变区，和/或包含与 SEQ ID NO:109 所示的氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区；

(vi) 包含与 SEQ ID NO:101 或 102 或 103 所示的氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列的重链可变区，和/或包含与 SEQ ID NO:110 所示的氨基酸序列具有至少 80%、85% 或 90% 序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

4. 权利要求 1 至 3 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含选自以下的重链可变区和轻链可变区

(i) 包含 SEQ ID NO:84 或 85 或 86 或 87 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO:104 所示的氨基酸序列的轻链可变区，或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:88 或 89 或 90 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO:105 或 106 所示的氨基酸序列的轻链可变区，或者

(iii) 包含 SEQ ID NO:91 或 92 或 93 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO:107 所示的氨基酸序列的轻链可变区，或者

(iv) 包含 SEQ ID NO:94 或 95 或 96 或 97 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO:108 所示的氨基酸序列的轻链可变区；

(v) 包含 SEQ ID NO:98 或 99 或 100 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO:109 所示的氨基酸序列的轻链可变区；

(vi) 包含 SEQ ID NO:101 或 102 或 103 所示的氨基酸序列的重链可变区，和包含 SEQ ID NO:110 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

5. 前述权利要求任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是 IgG1, IgG2, 或 IgG4 形式的抗体或其抗原结合片段，优选具有 S228P, F234A 和 L235A 突变的 IgG4 Fc 区。

6. 前述权利要求任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是全人源抗体、或人源化抗体、或嵌合抗体。

7. 前述权利要求任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段是选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体例如 scFv、(Fab')₂ 片段、单结构域抗体、双抗体(dAb)或线性抗体。

8. 前述权利要求任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体具有以下一个或多个特

性：

- (i) 以高亲和力与人 TIGIT 结合；
- (ii) 具有与猴和/或鼠 TIGIT 的交叉免疫反应性；
- (iii) 与细胞表面的 TIGIT 有效结合；
- (iv) 阻断 TIGIT 与其配体 CD155 的结合；
- (v) 解除 TIGIT 与 CD155 结合对下游 IL-2 信号通路的抑制作用；
- (vi) 增加 T 细胞中的 IL-2 产生；
- (vii) 具有抗肿瘤活性，例如抑制肿瘤的生长；
- (viii) 与抗 PD-1 抗体组合具有更好的肿瘤抑制作用，例如能够更好地抑制肿瘤生长。

9. 一种分离的核酸，其编码前述权利要求任一项的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段。

10. 一种载体，其包含权利要求 9 的核酸，优选地所述载体是表达载体。

11. 一种宿主细胞，其包含权利要求 9 的核酸或权利要求 10 的载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，更优选的酵母细胞、哺乳动物细胞（例如 293 细胞或 CHO 细胞）。

12. 制备抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括在适于表达编码前述权利要求 1-8 中任一项的抗体或其抗原结合片段的核酸的条件下培养权利要求 11 的宿主细胞，任选地分离所述抗体或其抗原结合片段，任选地所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段。

13. 免疫缀合物，其包含与治疗剂或诊断剂缀合的前述权利要求 1-8 中任一项的抗体或其抗原结合片段。

14. 包含前述权利要求 1-8 任一项的抗体或其抗原结合片段的多特异性抗体，优选地，所述多特异性抗体是双特异性抗体。

15. 药物组合物，其包含前述权利要求 1-8 任一项的抗体或其抗原结合片段，以及任选地药用辅料。

16. 权利要求 15 的药物组合物，其包含第二治疗剂；优选地，所述第二治疗剂选自抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体。

17. 在受试者中预防或治疗肿瘤或感染性疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的前述权利要求 1-8 任一项的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 15 或 16 的药物组合物，优选地，所述肿瘤是胃肠道癌症，例如结肠癌。

18. 在受试者中阻断 TIGIT 与 CD155 的结合以降低或消除 TIGIT 的免疫抑制作用的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的前述权利要求 1-8 任一项的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 15 或 16 的药物组合物。

19. 检测样品中 TIGIT 的方法，所述方法包括

(a) 将样品与前述权利要求 1-8 中任一项的抗体或其抗原结合片段接触；和

(b) 检测所述抗体或其抗原结合片段和 TIGIT 间的复合物的形成；任选地，抗体是被可检测地标记的。