

包含抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白、其药物组合物及用途

技术领域

本发明属于生物和医药领域，涉及一种包含抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白、
5 其药物组合物及用途。

背景技术

TIGIT (T cell Ig and ITIM domain, 又称为 WUCAM, Vstm3, VSIG9) 是脊髓灰质炎病毒受体 (PVR)/Nectin 家族的成员。TIGIT 由细胞外免疫球蛋白可变区 (IgV) 结构域, 1 型跨膜结构域和具有经典免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM) 和免疫球蛋白酪氨酸尾 (ITT) 基序的细胞内结构域组成。TIGIT 在淋巴细胞中高表达, 特别是在效应和调节性 CD4+T 细胞 (Treg 细胞), 滤泡辅助 CD4+T 细胞, 效应 CD8+T 细胞以及自然杀伤细胞 (NK 细胞) (Yu X, Harden K, Gonzalez L C, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells[J]. Nature immunology, 2009, 10(1): 48)。

CD155 (又称为 PVR、Nect5 或 Tage4)、CD112 (又称为 PVRL2/nectin 2) 和 CD113 (又称为 PVRL3) 是 TIGIT 结合的配体 (Martinet L, Smyth M J. Balancing natural killer cell activation through paired receptors[J]. Nature Reviews Immunology, 2015, 15(4): 243-254.), 其中 CD155 是 TIGIT 的高亲和力配体。在 NK 细胞中 TIGIT 结合配体 CD155 和 CD112 可以抑制 NK 细胞对 CD155 和 CD112 高表达细胞的杀伤作用 (Stanitsky N, Simic H, Arapovic J, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(42): 17858-17863)。而有报道发现在同时阻断 PD-1 和 TIGIT 时, 可以增强 CD8+T 细胞的杀伤作用 (Johnston R J, Comps-Agrar L, Hackney J, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8+ T cell effector function[J]. Cancer cell, 2014, 26(6): 923-937)。在最新的研究中发现, TIGIT 作为 NK 细胞的免疫检查点, 肿瘤发展过程中 TIGIT 可导致 NK 细胞耗竭, 并证明抗 TIGIT 单抗可逆转 NK 细胞耗竭并用于多种肿瘤例如非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、黑色素瘤、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、
30 B 淋巴细胞瘤、浆细胞瘤等的免疫治疗 (Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al. Blockade of

the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity[J]. *Nature immunology*, 2018,19(7):723-732)。

此外有报道, TIGIT 阻断剂单独或与 PD-1 阻滞剂联合使用再加上 CD96 阻断剂, 可以显著降低野生型和 CD155-/-小鼠模型中 B16 黑色素瘤的生长 (Li X-Y, Das I, Lepletier A, et al.. Cd155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms. *J Clin Invest* 2018;128:2613-25)。CD112R 阻断剂单独或与 TIGIT 阻断剂和/或 PD-1 阻断剂联合使用, 能增加卵巢瘤、子宫内膜瘤和肺肿瘤中 TIL 产生细胞因子的能力 (Whelan S, Ophir E, Kotturi MF, et al. . PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8+ T-cell Function. *Cancer ImmunolRes* 2019;7:257-68)。

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族是一类功能多样的细胞因子, 其又分为 TGF- β 、激活素 (Activins)、抑制素 (inhibins)、生长分化因子 (GDF)、胶质源性神经营养因子 (GDNFs)、Nodal、Lefty 和抗缪勒管激素 (anti-Müllerianhormone) (表 A) 等亚家族。3 种 TGF- β 亚家族的蛋白为别被称为 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3, 其中 TGF- β 1 是表达最高的亚型。TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 与受体结合后通过 Smad 与非 Smad 信号通路介导一系列的生物学反应, 包括促细胞上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transitions, EMT)、促组织纤维化、促血管生成、促肿瘤的免疫逃逸、抑癌和促癌双重作用等 (J Massagué. TGFbeta in Cancer.[J]. *Cell*, 2008, 134(2):215-230.)。

TGF- β 受体 (TGF- β receptor, TGF- β R) 广泛分布在人的正常细胞和肿瘤细胞表面, 包括 3 种受体超家族, I 型经典 TGF- β 受体家族包括 ALK1-7, 其中 TGF- β R I (亦写作 T β RI) 也称为 ALK5; II 型经典 TGF- β 受体家族包括 TGF- β RII (亦写作 T β RII), ActRII, ActRIIB, AMHRII 以及 BMPRII; III 型 TGF- β 受体超家族包括 Betaglycan (也称为 TGF- β RIII) 和 Endoglin; 其中 TGF- β R I、TGF- β RII、TGF- β RIII 各自均可与 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 结合 (Pawlak John B, Blobe Gerard C, TGF- β superfamily co-receptors in cancer. *DevDyn*, 2021)。TGF- β 家族及受体见表 A (基于 Carl-Henrik Heldin¹ and Aristidis Moustakas. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016. 的综述总结)。TGF- β R I 和 TGF- β R II 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体。在 TGF- β 信号通路中 TGF- β RII 是信号转导的核心关键分子, 可高亲和力与 TGF- β 结合继而与 TGF- β RI 二聚体形成异源四聚体受体复合物, 通过 TGF- β RII 自身磷酸化进而磷酸化

并激活 TGF- β R I，活化的 TGF- β R I 磷酸化下游 Smad 通路相关蛋白，调控下游靶基因的转录翻译，进而引发疾病相关的生物学反应。TGF- β RIII 与 TGF- β 的亲和力较 TGF- β R I 和 TGF- β R II 弱，且不具有胞内段，无法接到下游信号通路，其功能为俘获 TGF- β 并递呈给 TGF- β R II。其它 TGF- β 受体亦可结合于 TGF- β （桑晓宏等，靶向 TGF- β 及受体的小分子抑制剂研究进展[J].药学学报,2019(9).）。

表 A: TGF- β 家族及受体

蛋白名称	基因名称	其它名称	受体	
TGF-β1	TGFB1	CIF-A (cartilage-inducing factor-A), differentiation-inhibiting factor	ActRL1/ALK-1 ; TβRI/ALK-5	TβRII
TGF-β2	TGFB2	G-TsF (glioblastoma-derived T-cell suppressor factor), BSC-1GI (BSC-1 cell-growth inhibitor), polyergin, CIF-B (cartilage-inducing factor-B)		
TGF-β3	TGFB3			
Inhibinα	INHA	InhibinA	ActRIB/ALK-4	ActRIIB; ActRII
InhibinβA	INHBA	FRP (follicle-stimulating hormone-releasing protein), EDF (erythroid differentiation factor), XTC-MIF (Xenopus XTC cell mesoderm-inducing factor)	ActRIB/ALK-4 ; ActRIC/ALK-7	
InhibinβB	INHBB	InhibinB and activinB or AB,a,b XTC-MIF		
InhibinβC	INHBC	ActivinCc		
InhibinβE	INHBE	ActivinEc		
Nodal	NODAL	BMP-16	ActRIB/ALK-4	ActRIIB; ActRII
Myostatin	MSTN	GDF-8	TβRI/ALK-5 ; ActRIB/ALK-4	ActRIIB
BMP-2	BMP2		BMPRIA/ALK-3 ; BMPRIB/ALK-6	BMPRII ; ActRIIB; ActRII
BMP-3	BMP3	Osteogenin		
BMP-4	BMP4	BMP-2B	BMPRIA/ALK-3 ; BMPRIB/ALK-6	BMPRII ; ActRIIB; ActRII
BMP-5	BMP5		BMPRIB/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3 ;	BMPRII ; ActRIIB; ActRII

			ActRIA/ALK-2	
BMP-6	BMP6	Vgr1 (Vg1-related protein)	BMPRIB/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3 ; ActRIA/ALK-2	BMPRII ; ActRIIB; ActRII
BMP-7	BMP7	OP-1 (osteogenic protein-1)	BMPRIB/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3 ; ActRIA/ALK-2	BMPRII ; ActRIIB; ActRII
BMP-8A	BMP8A	OP-2	BMPRIB/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3 ; ActRIA/ALK-2	BMPRII ; ActRIIB; ActRII
BMP-8B	BMP8B	OP-3	BMPRIB/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3 ; ActRIA/ALK-2	BMPRII ; ActRIIB; ActRII
BMP-9	GDF2	GDF-2	BMPRIB/ALK-6 ; ActRL1/ALK-1	BMPRII ; ActRIIB; ActRII
BMP-10	BMP10		BMPRIB/ALK-6 ; ActRL1/ALK-1	BMPRII ; ActRIIB; ActRII
GDF-1	GDF1		ActRIB/ALK-4 ; ActRIC/ALK-7	ActRIIB; ActRII
GDF-3	GDF3	Vgr2	ActRIB/ALK-4 ; ActRIC/ALK-7	ActRIIB; ActRII
GDF-5	GDF5	CDMP-1 (cartilage-derived morpho genetic protein-1), BMP-14	BMPRIB/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3	BMPRII ; ActRIIB; ActRII
GDF-6	GDF6	CDMP-2, BMP-13	BMPRIB/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3	BMPRII ; ActRIIB; ActRII
GDF-7	GDF7	CDMP-3, BMP-12	BMPRIB/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3	BMPRII ; ActRIIB; ActRII

GDF-9	GDF9	GDF-9A	TβRI/ALK-5 ; ActRIB/ALK-4 ; ActRIC/ALK-7	ActRIIB
GDF-9B	BMP15	BMP-15	BMPRII/ALK-6	
GDF-10	GDF10	BMP-3b	ActRIB/ALK-4 ; ActRIB/ALK-4	ActRII
GDF-11	GDF11	BMP-11	TβRI/ALK-5 ; ActRIB/ALK-4	ActRIIB; ActRII
GDF-15	GDF15	Placental TGF-β, placental BMP (PLAB), PDF (prostate-derived factor), NAG-1 (nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1), MIC-1 (macrophage inhibitory cytokine-1)	BMPRII/ALK-3	ActRIIB
MIS (Müllerian-inhibiting substance)	AMH	AMH (anti-Müllerian hormone)	ActRIA/ALK-2 ;	AMHRII
LeftyA	LEFTY2	EBAF (endometrial bleeding-associated factor), TGF-β4, Stra3		
LeftyB	LEFTY1			

在肿瘤进展过程中，肿瘤微环境(TME)中肿瘤细胞、间充质成纤维细胞和其他细胞大量分泌 TGF-β，介导免疫抑制。TGF-β 抑制初始 T 细胞向介导抗肿瘤活性的 Th1 的分化，缺失了 TGF-βR II 的 T 细胞 Th1 反应增强(Eduard, Batlle, Joan, et al. Transforming Growth Factor-β Signaling in Immunity and Cancer.[J]. Immunity, 2019.)。具有肿瘤杀伤活性的效应 T 细胞的颗粒酶 A、颗粒酶 B、穿孔素、γ-干扰素 (IFN-γ) 和 Fas L 在 TGF-β 影响下表达量下降，导致肿瘤细胞免疫逃逸。Treg 是肿瘤微环境介导肿瘤免疫抑制的关键细胞，可抑制肿瘤杀伤活性的效应性 T 细胞的功能；肿瘤细胞产生的 TGF-β 诱导 TME 的 Treg 大量出现，增强了肿瘤抗原的耐受，促使产生肿瘤免疫逃逸 (陈丹, 冉燕. TGF-β 对肿瘤细胞及肿瘤相关免疫细胞调控的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2020, 36(09):1354-1358.)。目前处于临床阶段的靶向 TGF-β 分子的在研抗体类药物适应症包括黑色素瘤、肾细胞癌、乳腺癌、宫颈癌、晚期非小细胞肺癌、前列腺癌、胰腺导管腺癌、晚期实体瘤和转移性实体瘤。

Fc 受体是表达在特定免疫细胞表面，用于识别抗体 Fc 区域介导免疫应答的免疫球蛋白家族蛋白。抗体 Fab 区域识别抗原后，其抗体 Fc 区域与免疫细胞（如杀伤细胞）上的 Fc 受体结合，启动免疫细胞的应答功能，如吞噬作用及 ADCC。

根据 Fc 受体识别抗体类型及表达细胞的不同，Fc 受体主要分为 FcγR、FcαR 和 FcεR 三种类型，FcγR 又可分为 FcγRI（亦称为 CD64）、FcγRII（亦称为 CD32）、FcγRIII（亦称为 CD16）和 FcRn（亦称为 Neonatal Fc receptor）四种亚型。其中 FcγRI、FcγRII、FcγRIII 与 ADCC 效应密切相关。FcγRIII 是介导 ADCC 的最主要分子，在不同细胞类型中具有高度同源的 FcγRIIIa 和 FcγRIIIb 两种亚型，在 FcγRIIIa 人群中存在单核多态性（SNP）位点引起的高亲和力 FcγRIIIa 亚型，分别称为 FcγRIIIa_V158 和低亲和力 FcγRIIIa_F158 两个亚型。FcγRI 对 IgG 的 Fc 区域具有较高的亲和力，参与 ADCC 过程；FcγRII 有 FcγRIIa，FcγRIIb 和 FcγRIIc（亦分别称为 CD32a，CD32b，CD32c）三个亚型，其中 FcγRIIa 具有 ADCC 活性；FcγRIIa 在人群中存在由于单核苷酸突变导致的两种亚型，分别称为 FcγRIIa_H131 和 FcγRIIa_R131；FcγRIIb 为抑制性受体，FcγRIIb 是典型的抑制性 FcγR，可抑制附近的 ITAM 通路。例如，免疫复合物与 BCR 结合后，Fc 段会结合同一细胞上的 FcγRIIb，负性调节 B 细胞激活，减少抗体、细胞因子的分泌（Hogarth PM, Pietersz GA. 2012, NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 11(4):311-331）。

目前，尚需要开发一种同时抑制 TIGIT 和 TGF-β 信号通路的药物。

20 发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，制得了一种包含抗 TIGIT 抗体和 TGF-βR 的融合蛋白，本发明人惊奇地发现，所述融合蛋白能够有效地同时结合 TIGIT 和 TGF-β，具有制备抗肿瘤药物的潜力。由此提供了下述发明：

25 本发明的一个方面涉及一种融合蛋白，其包含：

靶向 TIGIT 的第一蛋白功能区，和

具有 TGF-β 结合活性的第二蛋白功能区；

其中，

所述第一蛋白功能区为抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段；

30 并且所述的抗 TIGIT 抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 3-5

所示的 HCDR1-HCDR3; 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 8-10 所示的 LCDR1-LCDR3。

在本发明的一些实施方式中, 所述的融合蛋白, 其中, 所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 17; 并且

所述抗TIGIT抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 25。

在本发明的一些实施方式中, 所述的融合蛋白, 其中,

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示;

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 19所示;

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 19所示;

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 21所示;

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 23所示;

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 15所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 21所示;

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 15所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 23所示;

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 25所示; 或者

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 25所示。

在本发明的一些实施方式中, 所述的融合蛋白, 其中, 所述抗TIGIT抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。

在本发明的一些实施方式中, 所述的融合蛋白, 其中,

所述抗TIGIT抗体包括非-CDR区，且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种，例如来自人抗体。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，所述抗TIGIT抗体的重链恒定区为Ig gamma-1 chain C region(例如NCBI ACCESSION: P01857)或Ig gamma-4 chain C region(例如NCBI ACCESSION: P01861.1)；轻链恒定区为Ig kappa chain C region(例如NCBI ACCESSION: P01834)。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白与配体CD155-hFc-Biotin结合的能力强于对照抗体RG6058(hG4)。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白以小于0.08nM或小于0.10nM的EC₅₀结合TIGIT-mFc；优选地，所述EC₅₀通过间接ELISA方法测得。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白以小于0.3nM、小于0.4nM、小于0.5nM或小于0.6的EC₅₀结合TGF-β1、TGF-β2和/或TGF-β3；优选地，所述EC₅₀通过间接ELISA方法测得。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，所述抗TIGIT抗体是由杂交瘤细胞株LT019产生的抗体，所述杂交瘤细胞株LT019保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏编号为CCTCC NO: C2020208。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，

按照EU编号系统，所述抗TIGIT抗体的重链恒定区具有如下突变组合之一：

L234A 和 L235A；

L234A 和 G237A；

L235A 和 G237A；或者

L234A、L235A、G237A。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，

所述第二蛋白功能区为TGF-β受体、其胞外区或具有TGF-β受体功能的TGF-β受体胞外区的截短片段；

优选地，所述TGF-β受体为TGF-βR I、TGF-βRII或TGF-βRIII，或者为TGF-βR I、TGF-βRII或TGF-βRIII的胞外区，或者为TGF-βR I、TGF-βRII或TGF-βRIII的胞外区的截短片段；

优选地，所述第二蛋白功能区的氨基酸序列如SEQ ID NOs: 33-39中任一序列所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白：

所述抗 TIGIT 抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 或 SEQ ID NO: 31 所示，并且其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，所述第一蛋白功能区与所
5 述第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，所述连接片段为(GGGGS) n 或(GGGGS) n G， n 为正整数；优选地， n 为 1、2、3、4、5 或 6。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，所述第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区独立地为 1 个、2 个或者 2 个以上。

10 在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，所述 TGF- β 受体或其胞外片段连接在抗 TIGIT 抗体的重链的 C 末端。

本发明涉及一种融合蛋白，其包含：

靶向 TIGIT 的第一蛋白功能区，和

具有 TGF- β 结合活性的第二蛋白功能区；

15 其中，

所述第一蛋白功能区为 1 个，所述第二蛋白功能区为 2 个；

所述第一蛋白功能区为抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，所述第二蛋白功能区为 TGF- β 受体、其胞外区或具有 TGF- β 受体功能的 TGF- β 受体胞外区的截短片段；

20 所述抗 TIGIT 抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 或 SEQ ID NO: 31 所示，并且其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示；

所述第二蛋白功能区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示；

所述第二蛋白功能区通过连接片段连接在抗 TIGIT 抗体的重链的 C 末端；

优选地，所述连接片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示。

在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其用于治疗 and/或预防肿瘤；

25 优选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、黑色素瘤、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、B 淋巴细胞瘤、浆细胞瘤、肾细胞癌、前列腺癌和胰腺导管腺癌中的一种或多种；

优选地，所述非小细胞肺癌为晚期非小细胞肺癌。

在广义上，本发明的融合蛋白也可以称为抗体。

本发明的另一方面涉及分离的核酸分子，其编码本发明中任一项所述的融合蛋白。

本发明的再一方面涉及一种载体，其包含本发明的分离的核酸分子。

本发明的再一方面涉及一种宿主细胞，其包含本发明的分离的核酸分子，或者本
5 发明的载体。

本发明的再一方面涉及一种偶联物，其包括融合蛋白部分以及偶联部分，其中，所述融合蛋白部分为本发明中任一项所述的融合蛋白，所述偶联部分为可检测的标记；优选地，所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

10 在本发明的一些实施方式中，所述的偶联物，其用于治疗 and/or 预防肿瘤；

优选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、黑色素瘤、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、B 淋巴细胞瘤、浆细胞瘤、肾细胞瘤、前列腺癌和胰腺导管腺癌中的一种或多种；

优选地，所述非小细胞肺癌为晚期非小细胞肺癌。

15

本发明的再一方面涉及本发明的融合蛋白或者本发明的偶联物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 TIGIT 和/或 TGF- β 在样品中的存在或其水平。

本发明的再一方面涉及一种药物组合物，其包含本发明中任一项所述的融合蛋白
20 或者本发明的偶联物；可选地，所述药物组合物还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在本发明的一些实施方式中，所述的药物组合物，其还包含一种或多种肿瘤化疗药物；

优选地，所述肿瘤化疗药物为酪氨酸激酶抑制剂；更优选地，所述肿瘤化疗药物
25 为安罗替尼或其可药用盐（例如盐酸盐），或者仑伐替尼或其可药用盐（例如甲烷磺酸盐）。

在本发明的一些实施方式中，所述的药物组合物，其中，所述药物组合物的单位剂量，按照其中的所述融合蛋白的质量计算，为 100mg-1500mg、200mg-1000mg、
30 200mg-800mg、300mg-600mg、400mg-500mg 或者 450mg。

在本发明的一些实施方式中，所述药物组合物为注射剂。

本发明的再一方面涉及一种组合产品，其包含独立包装的第一产品和第二产品，其中，

所述第一产品包含本发明中任一项所述的融合蛋白、本发明的偶联物或者本发明
5 中任一项所述的药物组合物；

所述第二产品包含一种或多种肿瘤化疗药物；优选地，所述肿瘤化疗药物为酪氨酸激酶抑制剂；更优选地，所述肿瘤化疗药物为安罗替尼或其可药用盐（例如盐酸盐），或者仑伐替尼或其可药用盐（例如甲烷磺酸盐）；

优选地，所述第一产品和所述第二产品还独立地包含一种或多种药学上可接受的
10 辅料；

优选地，所述组合产品还包含产品说明书。

在本发明的一些实施方式中，所述的组合产品，其中，所述第一产品的单位剂量，按照其中的所述融合蛋白的质量计算，为 100mg-1500mg、200mg-1000mg、200mg-800mg、300mg-600mg、400mg-500mg 或者 450mg。

15 在本发明的一些实施方式中，所述的组合产品，其中，所述第二产品的单位剂量，按照其中的所述活性成分的质量计算，为 0.1mg-100mg、0.5mg-50mg、1mg-20mg、2mg-15mg、4mg-12mg 或者 8mg-12mg。

在本发明的一些实施方式中，所述的药物组合，其中，
所述第一产品和第二产品独立地为注射剂。

20

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的融合蛋白或者本发明的偶联物在制备治疗和/或预防肿瘤的药物中的用途；

优选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、黑色素瘤、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、B 淋巴细胞瘤、浆细胞瘤、肾细胞癌、前列腺癌和胰腺导管腺癌中的一种或多种；
25

优选地，所述非小细胞肺癌为晚期非小细胞肺癌。

本发明的再一方面涉及一种治疗和/或预防肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的融合蛋白或者本发明的偶联物的步骤；

优选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、黑色素瘤、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、B 淋巴细胞瘤、浆细
30

胞癌、肾细胞癌、前列腺癌和胰腺导管腺癌中的一种或多种；

优选地，所述非小细胞肺癌为晚期非小细胞肺癌。

在本发明的一些实施方式中，所述的方法，其中，给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的药物组合的步骤为在手术治疗之前或之后，和/或在放射治疗

5 之前或之后。

在本发明的一些实施方式中，所述的方法，其中，

本发明的融合蛋白的单次给药剂量为每千克体重 0.1-100mg，优选 1-10mg；或者，本发明的融合蛋白的单次给药剂量为每位受试者 10-1000mg，优选 50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg 或 200mg；

10 优选地，每 3 天、4 天、5 天、6 天、10 天、1 周、2 周或 3 周给药一次；

优选地，给药方式为静脉滴注或静脉注射。

轻链和重链的可变区决定抗原的结合；每条链的可变区均含有三个高变区，称互补决定区（CDR），其中重链(H)的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链（L）

15 的 CDR 包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3。本发明中，CDR 由 IMGT 编号系统定义，请参见 Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J].Nucleic acids research,2009;38(suppl_1):D301-D307。

20

通过本领域技术人员所熟知的技术手段，例如根据 IMGT 定义分析下面单克隆抗体序列的 CDR 的氨基酸序列，结果如下：

鼠源 TIGIT 单抗的 HCDR 和 LCDR

HCDR1: GHSFTSDYA(SEQ ID NO: 3)

25 HCDR2: ISYSDST(SEQ ID NO: 4)

HCDR3: ARLDYGNYGGAMDY(SEQIDNO:5)

LCDR1: QHVSTA(SEQIDNO:8)

LCDR2: SAS(SEQIDNO:9)

LCDR3: QQHYITPWT(SEQIDNO:10)

30 人源化 TIGIT 单抗的 3 个 HCDR 和 3 个 LCDR 与鼠源 TIGIT 单抗相同。

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本
5 发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语 **EC₅₀** 是指半最大效应浓度（**concentration for 50% of maximal effect**），是指能引起 50% 最大效应的浓度。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指通常由两对多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重
10 链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 **IgM**、**IgD**、**IgG**、**IgA** 和 **IgE**。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。抗体的恒定区可
15 介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区 (FR) 的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成
20 抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 **Bethesda M.d., Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, (1987 and 1991))**，或 **Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 1987;196:901-917**；**Chothia 等人 Nature 1989;342:878-883**，或者 **IMGT 编号系统定义**，见 **Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J]. Nucleic acids research, 2009;38(suppl_1):D301-D307** 的定义。

术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，**IgG**(例如，**IgG1**，**IgG2**，**IgG3** 或 **IgG4** 亚型)，**IgA1**，**IgA2**，**IgD**，**IgE** 或 **IgM** 抗体。

30 如本文中所使用的，术语“单抗”和“单克隆抗体”是指，来自一群高度同源的抗体

分子中的一个抗体或抗体的一个片段，也即除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得

5 (Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. nature,1975;256(5517):495)，但也可采用重组 DNA 技术获得(如参见 U.S.Patent 4,816,567)。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，人源免疫球蛋白（受体抗体）的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体（供体抗体）的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段，其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源（例如，小鼠、大鼠或兔）抗体。此外，受体抗体的构架区（FR）的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换，或被其他抗体的氨基酸残基替换，以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容，可参见例如，Jones et al.,Nature 1986; 321:522 525; Reichmann et al.,Nature,1988;332:323329; Presta, Curr. Op. Struct. Biol.

15 1992; 2:593-596;和 Clark,Immunol. Today 2000; 21: 397 402。在一些情况下，抗体的抗原结合片段是双抗体(Diabodies)，其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见，例如,Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:6444-6448 和 Poljak R. J. et al.,Structure 1994;

20 2:1121-1123)。

如本文中所所述的融合蛋白是一种通过 DNA 重组得到的两个基因共表达的蛋白产物。现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法(如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8 章和 15 章)。

如本文中所使用的，术语“单链抗体(single chain fragment variable, ScFv)”是指，

25 包含通过连接体连接的抗体重链可变区(V_H)和抗体轻链可变区(V_L)的分子。其中 V_L 和 V_H 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见，例如，Bird et al, Science 1988; 242:423-426 和 Huston et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:5879-5883)。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂-V_L-连接片段-V_H-COOH 或 NH₂-V_H-连接片段-V_L-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄ 的接头，但也可使用其变体

30

(Holliger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan et al, Protein Eng. 1995; 8:725-731, Choi et al, Eur. J. Immunol. 2001; 31: 94-106, Hu et al, Cancer Res. 1996; 56:3055-3061, Kipriyanov et al, J. Mol. Biol. 1999; 293:41-56 和 Roovers et al, Cancer Immunology, Immunotherapy, 2001, 50(1): 51-59.描述。

如本文中所使用的, 术语“分离的”或“被分离的”指的是, 从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分, 那么可能是其所处的天然环境发生了改变, 或从天然环境下分离出该物质, 或二者情况均有发生。例如, 某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽, 而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质, 也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

如本文中所使用的, 术语“载体 (vector)”是指, 可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时, 载体称为表达载体。载体可以通过转化, 转导或者转染导入宿主细胞, 使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的, 包括但不限于: 质粒; 噬菌粒; 柯斯质粒; 人工染色体, 例如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或 P1 来源的人工染色体 (PAC); 噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于, 逆转录酶病毒 (包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒 (如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒 (如 SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件, 包括但不限于, 启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外, 载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的, 术语“宿主细胞”是指, 可用于导入载体的细胞, 其包括但不限于, 如大肠杆菌或枯草杆菌等的原核细胞, 如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞, 如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞, 或者如纤维原细胞, CHO 细胞, GS 细胞, COS 细胞, NSO 细胞, HeLa 细胞, BHK 细胞, HEK293 细胞或人细胞等的动物细胞。

本发明中, 术语“ADCP”是指抗体依赖的细胞介导的细胞吞噬 (antibody dependent cellular phagocytosis)。结合于细胞表面抗原的抗体的 Fc 段与具有吞噬活性的细胞如巨噬细胞的 Fc 受体结合, 进而介导吞噬细胞吞噬结合了抗体的细胞。

本发明中, 术语“ADCC”是指抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用

(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)。抗体的 Fab 段结合病毒感染的细胞或肿瘤细胞的抗原表位，其 Fc 段与杀伤细胞 (NK 细胞、巨噬细胞等) 表面的 Fc 受体 (Fc Receptor, FcR) 结合，介导杀伤细胞直接杀伤靶细胞。

本发明中，术语“CDC”是指补体依赖的细胞毒性 (complement dependent cytotoxicity)。当抗体与细胞膜表面相应抗原特异性结合后，形成复合物而激活补体系统，进而在靶细胞表面形成 MAC，导致靶细胞溶解。补体能导致多种细菌和其他病原生物细胞的溶解，是机体抵抗病原生物感染的重要防御机制。

如本文中使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体 (或对某抗原具有特异性的抗体) 是指，抗体以小于大约 10^{-5}M ，例如小于大约 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的亲和力 (K_D) 结合该抗原。

如本文中所使用的，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体以小于大约 10^{-5}M ，例如小于大约 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的解离平衡常数 (K_D) 结合抗原 (例如，TIGIT 蛋白)。可以使用本领域技术人员知悉的方法测定 K_D ，例如使用 ForteBio 分子相互作用仪测定。

如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的辅料”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的 (参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995)，并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液；表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80；离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病 (例如肿瘤) 有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病 (例如肿瘤) 的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患

者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途的有效量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

- 5 在本发明中，如果没有特别说明，所述“第一”（例如第一蛋白功能区或者第一产品）和“第二”（例如第二蛋白功能区或者第二产品）是为了指代上的区分或表述上的清楚，并不具有典型的次序上的含义。

发明的有益效果

- 10 本发明取得了如下技术效果（1）-（9）项中的任意一项或者多项：

（1）本发明的融合蛋白（例如 TF01 或 TF02）能够同时抑制 TIGIT 和降低 TGF- β 水平。

- 15 （2）本发明的融合蛋白（例如 TF01 或 TF02）能够非常特异性地与 TIGIT 结合，并且能够十分有效地阻断 TIGIT 与 CD155 的结合，特异地解除 TIGIT 对机体免疫抑制。

（3）本发明的融合蛋白（例如 TF01 或 TF02）能够非常特异性地与 TGF- β 结合，并且能够十分有效地阻断 TGF- β 与 TGF- β 受体的结合，特异地解除 TGF- β 对机体免疫抑制，激活免疫反应。

（4）本发明的融合蛋白具有良好的制备抗肿瘤药物的潜力。

- 20 （5）本发明的融合蛋白的第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区具有协同增效的效果，优于单用其中的一个蛋白功能区。

（6）本发明的融合蛋白特别是 TF01，完全消除了其与 Fc 受体 Fc γ RI、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa_H131 和/或 Fc γ RIIIa_R131、Fc γ RIIIa_V158 和/或 Fc γ RIIIa_F158 的结合活性，进而消除了其 ADCC 活性或 ADCP 活性。

- 25 （7）本发明的融合蛋白特别是 TF01，完全消除了其与补体 C1q 的结合活性，进而完全消除了其 CDC 活性。

（8）本发明的融合蛋白特别是 TF01 和 TF02 均能有效地阻断 TIGIT 所诱导的免疫细胞的免疫抑制，诱导细胞分泌 IL-2。

- 30 （9）本发明的融合蛋白特别是 TF01 能有效地阻断 TGF- β 所诱导的免疫细胞的免疫抑制，诱导细胞分泌 INF- γ 。

附图说明

图 1: TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、RG6058(hG4)与抗原 TIGIT-mFc 的结合活性检测结果。

5 图 2: TF01、TF02、TGF- β RII-mFc 与 TGF- β 1 的结合活性检测结果。

图 3: TF01、TF02、TGF- β RII-mFc 与 TGF- β 2 的结合活性检测结果。

图 4: TF01、TF02、TGF- β RII-mFc 与 TGF- β 3 的结合活性检测结果。

图 5: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白与 TGF- β RII-His-Biotin 竞争结合人 TGF- β 1 的活性检测结果。

10 图 6: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白与 TGF- β RII-His-Biotin 竞争结合人 TGF- β 3 的活性检测结果。

图 7: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白与人 CD155-hFc-Biotin 竞争结合人 TIGIT-mFc 的活性检测结果。

15 图 8: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白与 293T-TIGIT 膜表面 TIGIT 的结合活性检测结果。

图 9: TF01 与 CD155 竞争结合细胞膜表面抗原 TIGIT 检测结果。

图 10: TF01 与 CD112 竞争结合细胞膜表面抗原 TIGIT 检测结果。

图 11: TF01 与 Fc γ RI 的亲和力常数检测结果。

20 图 12: 26B12H2L2(hG1WT)与 Fc γ RI 的亲和力常数检测结果。图 13: TF01 与 Fc γ RIIIa_V158 的亲和力常数检测结果。

图 14: 26B12H2L2(hG1WT)与 Fc γ RIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。

图 15: TF01 与 Fc γ RIIIa_F158 的亲和力常数检测结果。

图 16: 26B12H2L2(hG1WT)与 Fc γ RIIIa_F158 的亲和力常数检测结果。

图 17: TF01 与 Fc γ RIIa_H131 的亲和力常数检测结果。

25 图 18: 26B12H2L2(hG1WT)与 Fc γ RIIa_H131 的亲和力常数检测结果。

图 19: TF01 与 Fc γ RIIa_R131 的亲和力常数检测结果。

图 20: 26B12H2L2(hG1WT)与 Fc γ RIIa_R131 的亲和力常数检测结果。

图 21: TF01 与 Fc γ RIIb 的亲和力常数检测结果。

图 22: 26B12H2L2(hG1WT)与 Fc γ RIIb 的亲和力常数检测结果。

30 图 23: TF01 与 C1q 的亲和力常数检测结果。

图 24: 26B12H2L2(hG1WT)与 C1q 的亲合力常数检测结果。

图 25: RG6058(hG1WT)、RG6058(hG4WT)、26B12H2L2(hG1WT)、TF01 的 ADCP 效应结果。

图 26: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白对 CD112 抑制 Jurkat-TIGIT 和 THP-1 细胞共培养体系中 IL-2 分泌的阻断活性评价结果。

图 27: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白对 CD155 抑制 Jurkat-TIGIT 和 THP-1 细胞共培养体系中 IL-2 分泌的阻断活性评价结果。

图 28: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白在 Jurkat-TIGIT 和 HT1080-aCD3scFv 细胞共培养体系中促 IL-2 分泌的生物活性评价结果。

图 29: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白对 PBMC 二次免疫应答 CMV 抗原过程中 TGF- β 1 抑制体系 IFN- γ 分泌的阻断活性评价结果。

图 30: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白对 Scid Beige 小鼠 MDA-MB-231 移植瘤模型药效。结果以平均值 $\pm$ 标准误差表示, 并进行双因素方差分析, Bonferroni 检验, 与同型对照组相比: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

图 31: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白对 Scid Beige 小鼠 MDA-MB-231 移植瘤模型体重影响。

涉及保藏的生物材料:

杂交瘤细胞株 LT019 (TIGIT-26B12), 其于 2020 年 10 月 23 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为 CCTCC NO: C2020208, 保藏地址为中国.武汉.武汉大学, 邮编: 430072。

本发明涉及如下的序列 1-48:

1. 26B12VH 的氨基酸序列

EVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCTVTGHSFTSDYAWNWIHQFPGNRLEWMG
YISYSDSTNYPNPSLKSRIISITRDTSKNQFFLQMNSVTTEDTATYYCARLDYGNYG
GAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 1)

2. 26B12VH 的核酸序列

GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCTGGTGAACCCCTCTCAG

TCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCCACTCATTACCAGTGATTATG
CCTGGAACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAGACTGGAGTGGATGGGCT
ACATAAGCTACAGTGATAGCACTAACTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAAT
CTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTTGCAGATGAATTCT
5 GTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGATTGGACTATGGTA
ACTACGGTGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCTCAGTCACCGTCT
CCTCA(SEQ ID NO: 2)

3. HCDR1:

10 GHSFTSDYA(SEQ ID NO: 3)

4. HCDR2:

ISYSDST(SEQ ID NO: 4)

15 5. HCDR3:

ARLDYGNYGGAMDY(SEQ ID NO: 5)

6. 26B12VL 的氨基酸序列

DIVLTQSHEFMSTSLRDRVSITCKSSQHVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS
20 YRYTGVPDRFTGSGSGTDFFTISSVKAEDLAVYYCQQHYITPWTFGGGTKLEI
K(SEQ ID NO: 6)

7. 26B12VL 的核酸序列

GATATTGTGCTAACTCAGTCTCACGAATTCATGTCCACCTCATTACGAG
25 ACAGGGTCAGCATCACCTGCAAATCCAGTCAACATGTGAGTACTGCTGTAGC
CTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAACTACTGATTTACTCGGCA
TCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGA
CGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA
T TACTGTCAGCAACATTATATTACTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAG
30 CTGGAAATAAAA(SEQ ID NO: 7)

8. LCDR1:**QHVSTA(SEQ ID NO: 8)**

5

9. LCDR2:**SAS(SEQ ID NO: 9)****10. LCDR3:****QQHYITPWT(SEQ ID NO: 10)**

10

11. 26B12H1VH 的氨基酸序列

**DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWNWIWIRQFPGKGLEWIGY
ISYSDSTNYPNPSLKSRTISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCARLDYGNVGG
AMDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO: 11)**

15

12. 26B12H1VH 的核酸序列

**GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCCAG
ACCCTGTCTCTGACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTCACATCCGACTACG
CCTGGAACTGGATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCT
20 ACATCTCTTATAGCGACTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGAT
CACCATCAGCAGAGATACATCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGC
GTGACAGCCGCCGACACCGCCACATACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTG
AGCTCC(SEQ ID NO: 12)**

25

13. 26B12H2VH 的氨基酸序列

**DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGY
ISYSDSTNYPNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGNVGG
AMDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO: 13)**

30

14. 26B12H2VH 的核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAG
ACCCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACG
CCTGGTCTTGGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCT
5 ACATCTCCTATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTCGGGT
GACCATCTCTAGAGATACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCC
GTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCCGGCTGGACTACGGC
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTG
TCTAGC(SEQ ID NO: 14)

10

15. 26B12H3VH 的氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGY
ISYSDSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGN YGG
AMDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO: 15)

15

16. 26B12H3VH 的核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAG
ACCCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACG
CCTGGTCTTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCT
20 ACATCTCCTATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTAGAGT
GACCATCTCTGTGGATACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCC
GTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCCGGCTGGACTACGGC
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTG
TCTAGC(SEQ ID NO: 16)

25

17. 26B12H4VH 的氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWN WIRQFP GKGLEWMG
YISYSDSTNYPNPSLKSRTISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCARLDYGN YG
GAMDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO: 17)

30

18. 26B12H4VH 的核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCCAG
ACCCTGTCTCTGACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTCACATCCGACTACG
CCTGGAAGTGGATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCT
5 ACATCTCTTATAGCGACTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGAT
CACCATCAGCAGAGATACATCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGC
GTGACAGCCGCCGACACCGCCACATACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTG
AGCTCC(SEQ ID NO: 18)

10

19. 26B12L1VL 的氨基酸序列

DIQMTQSPKSLSTSVGDRVITICRSSQHVSTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSAS
YRYSQVPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 19)

15

20. 26B12L1VL 的核酸序列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCCTGTCTACAAGCGTGGGCG
ATCGGGTGACCATCACATGTAGAAGCTCCCAGCACGTGTCTACCGCAGTGG
CATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCG
20 CCTCTTACAGGTATTCCGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCTCTG
GCACCGATTTACCTTTACAATCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCAC
ATACTATTGCCAGCAGCACTACATCACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACA
AAGCTGGAGATCAAG(SEQ ID NO: 20)

25

21. 26B12L2VL 的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLASVSGDRVITICRSSQHVSTALAWYQQKPGKSPKLLIYSAS
SRYSGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK(
SEQ ID NO: 21)

30

22. 26B12L2VL 的核酸序列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGGGCG
ATAGGGTGACCATCACATGTAGATCTAGCCAGCACGTGTCTACAGCCCTGGC
ATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGC
CTCCTCTAGGTATTCTGGAGTGCCAGACCGGTTTTCCGGCTCTGGCAGCGGC
5 ACCGATTTACCTTTACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACAT
ACTATTGCCAGCAGCACTATATCACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACCAA
GCTGGAGATCAAG(SEQ ID NO: 22)

23. 26B12L3VL 的氨基酸序列

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQHVSTALAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK(
SEQ ID NO: 23)

24. 26B12L3VL 的核酸序列

15 GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGC
GATAGGGTGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGCACGTGAGCACAGCCCTG
GCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATAGC
GCCTCTAGCCTGCAGTCCGGAGTGCCATCTCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCC
GGAACCGACTTTACCCTGACAATCTCCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTGCCA
20 CATACTATTGCCAGCAGCACTACATCACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCAC
CAAGCTGGAGATCAAG(SEQ ID NO: 24)

25. 26B12L4VL 的氨基酸序列

DIQMTQSPKSMSTSVGDRVITICRSSQHVSTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSAS
25 YRYSQVPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 25)

26. 26B12L4VL 的核酸序列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCATGTCTACAAGCGTGGGGCG
30 ACAGGGTGACCATCACATGTAGAAGCTCCCAGCACGTGTCTACCGCAGTGG

CATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCG
CCTCTTACAGGTATTCCGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCTCTG
GCACCGATTTCACCTTTACAATCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCAC
ATACTATTGCCAGCAGCACTACATCACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACA
5 AAGCTGGAGATCAAG(SEQ ID NO: 26)

27. 26B12H2L2(hG4DM)重链的氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGY
ISYSDSTNYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGNYG
10 AMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
15 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVME
ALHNHYTQKSLSLGLG(SEQ ID NO: 27)

28. 26B12H2L2(hG4DM)重链的核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAG
20 ACCCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACG
CCTGGTCTTGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCT
ACATCTCCTATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTCGGGT
GACCATCTCTAGAGATACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCC
GTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC
25 AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTG
TCTAGCGCCTCCACAAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCA
GGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG
TACACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG
30 CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAA

CGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAA
ATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCTGGGGGACC
ATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAG
5 GTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGGCCTCCCGTCCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGA
10 TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAG
GCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG
15 TCTCTGGGT(SEQ ID NO: 28)

29. 26B12H2L2(hG4DM)轻链的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQHVSTALAWYQQKPGKSPKLLIYSAS
SRYSGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK
20 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(S
EQ ID NO: 29)

30. 26B12H2L2(hG4DM)轻链的核酸序列

25 GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGGCG
ATAGGGTGACCATCACATGTAGATCTAGCCAGCACGTGTCTACAGCCCTGGC
ATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGC
CTCCTCTAGGTATTCTGGAGTGCCAGACCGGTTTTCCGGCTCTGGCAGCGGC
ACCGATTTACCTTTACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACAT
30 ACTATTGCCAGCAGCACTATATCACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACCAA

GCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCAGCCCCATCTGTCTTCATTTTTCCCCCT
AGTGACGAGCAGCTGAAATCCGGAACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAAC
AATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCTCTGC
AGAGTGGCAATTACAGGAGAGCGTGACTGAACAGGACTCCAAGGATTCTA
5 CCTATAGTCTGAGCTCCACTCTGACCCTGTCCAAAGCAGATTACGAAAAGCA
CAAAGTGTATGCCTGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGTTCTCCAGTCAC
CAAATCCTTCAACAGAGGCGAATGT (SEQ ID NO: 30)

31. 26B12H2L2(hG1DM)重链氨基酸序列

10 DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGY
ISYSDSTNYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGNYG
AMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
15 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 31)

20 32. 26B12H2L2(hG1DM)重链核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAG
ACCCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACG
CCTGGTCTTGGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCT
ACATCTCCTATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTCGGGT
25 GACCATCTCTAGAGATACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCC
GTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTG
TCTAGCGCCTCTACCAAGGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCA
AAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACT
30 TCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAG

TCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAG
CGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAA
CGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAA
ATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCCTGTCCTGCTCCCGAAGCTGCT
5 GGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCTCCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGA
TCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGG
ACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACG
CCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGT
CCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
10 GCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCA
AGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCTCCCTCCA
GGGACGAACTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCT
TTTATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGA
ATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT
15 GTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTT
CTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAG
CCTGTCCCTGAGCCCCGGCAA (SEQ ID NO: 32)

33. TGF- β RII 胞外区截取片段的氨基酸序列:

20 IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKK
PGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 33)

34. TGF- β R I 的氨基酸序列: (下划线部分为胞外区的序列)

25 MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCTKDNFTCVT
DGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDH
CNKIELPTTVKSSPGLGPVELAAAVIAGPVCFVCISLMLMVYICHNRTVIHHRVPN
EEDPSLDRPFISEGTTLKDLIYDMTTSGSGSGLPLL VQRTIARTIVLQESIGKGRF
GEVWRGKWRGEEVAVKIFSSREERSWFREAEIYQTVMLRHENILGFIAADNKD
30 NGTWTQLWLVS DYHEHGS LFDYLNRYTVTVEGMIKLALSTASGLAHLHMEIVG

TQGKPAIAHRDLKSKNILVKKNGTCCIALDLGLAVRHDSATDTIDIAPNHRVGTK
RYMAPEVLDD SINMKHFESFKRADIYAMGLVFWEIARRCSIGGIHEDYQLPYD
LVPSDPSVEEMRKVVCEQKL RPNIPNRWQSCEALRVMAKIMREC WYANGAAR
LTALRIKKTLSQLSQEGIKM (SEQ ID NO: 34)

5

35. TGF- β R I 胞外区的氨基酸序列:

LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFV
CAPSSKTGSVTTTCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVEL (SEQ ID NO: 35)

10

36. TGF- β R II 的氨基酸序列: (下划线部分为胞外区序列)

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQL
CKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC
HDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDL
LLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMEFSEHC
15 AIILED RSDISSTCANNINHNTPELLFIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFE
TVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAERKTEL GKQYWLITAF
HAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSS LARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDL
KSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQVGTARYMAPEVLESRM
NLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVREHPCVESM
20 KDNVLRDRGRPEIPSWLNLHQGIQMCETLTECWDHDPEARLTAQCVAERFSE
LEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK (SEQ ID NO: 36)

37. TGF- β R II 胞外区的氨基酸序列:

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCI
25 TSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC HDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKK
KPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLL VIFQ (SEQ ID NO: 37)

38. TGF- β R III 的氨基酸序列: (下划线部分为胞外区序列)

MTSHYVIAIFALMSSCLATAGPEPGALCELS PVSASHPVQALMESFTVLSCG
30 ASRGT TGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQLQREVT LHLNPISSVHIHHSVVFLLNS

PHPLVWHLKTERLATGVSRFLVSEGSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHL
LNWARKEYGAVTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFLSLNYLAEYLQP
KAAEGCVMSSQPQNEEVHIIELITPNSNPYSAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILI
LKCKKSVNWVIKSFVDVKGSLKIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDDIPSTQGNL
5 VKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHLRLLENNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPG
ALPALQNPPIRGGEGQNGGLPFPFPDISRRVWNEEGEDGLPRPKDPVIPSILFP
GLREPEEVQGSVDIALSVKCDNEKMIVAVEKDSFQASGYSGMDVTLLDPTCKAK
MNGTHFVLESPLNGCGTRPRWSALDGVVYYNSIVIQVPALGDSSGWPDPGYEDL
ESGDNGFPGDMDEGDASLFTRPEIVVFNCSLQQVRNPSSFQEQPHGNITFNMEL
10 YNTDLFLVPSQGVFSVPENGHVYVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPSNPDRMSH
YTHIENICPKDES VKFYSPKRVHFPIQADMDKKRFSFVKPVFNTSLLFLQCELT
LCTKMEKHPQKLPKCVPPDEACTSLDASIIWAMMKNKKTFTKPLAVIHHEAES
KEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDTLTVMGIAFAAFVIGALLTGALWYIYSHTGETA
GRQQVPTSPPASSENSAAHSIGSTQSTPCSSSTA (SEQ ID NO: 38)

15

39. TGF- β RIII胞外区的氨基酸序列:

GPEPGALCELSPVSASHPVQALMESFTVLSGCASRGTTGLPQEVHVLNLR
AGQGPQQLQREVTLHLNPISSVHIIHKSVVFLNNSPHPLVWHLKTERLATGVSR
LFLVSEGSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARKEYGAVTSFTELKIA
20 RNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFLSLNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHII
ELITPNSNPYSAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILKCKKSVNWVIKSFVDVKGSL
KIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDDIPSTQGNLVKWALDNGYSPITSYTMAPV
ANRFHLRLLENNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALPALQNPPIRGGEGQNGGL
PFPFPDISRRVWNEEGEDGLPRPKDPVIPSILFPGLREPEEVQGSVDIALSVKCD
25 NEKMIVAVEKDSFQASGYSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLESPLNGCGTRPR
WSALDGVVYYNSIVIQVPALGDSSGWPDPGYEDLESGDNGFPGDMDEGDASLFTR
PEIVVFNC SLQQVRNPSSFQEQPHGNITFNMEL YNTDLFLVPSQGVFSVPENGHV
YVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPSNPDRMSHYTHIENICPKDES VKFYSPKRVH
FPIQADMDKKRFSFVKPVFNTSLLFLQCELT LCTKMEKHPQKLPKCVPPDEA
30 CTSLDASIIWAMMKNKKTFTKPLAVIHHEAESKEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDT

LTV (SEQ ID NO: 39)

40. Tiragolumab 重链的氨基酸序列:

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLG
5 KTYRFRKWYSDYAVSVKGRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTRESTTY
DLLAGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
10 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

41. Tiragolumab 轻链的氨基酸序列:

15 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKKYLAWYQQKPGQPPN
LLIWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPFTFGP
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC (SEQ ID NO: 41)

20

42. RG6058(hG4)重链可变区的氨基酸序列:

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLG
KTYRFRKWYSDYAVSVKGRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTRESTTY
DLLAGPFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 42)

25

43. RG6058(hG4)轻链可变区的氨基酸序列:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKKYLAWYQQKPGQPPN
LLIWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPFTFGP
GTKVEIK (SEQ ID NO: 43)

30

44. 连接片段的氨基酸序列:**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG (SEQ ID NO: 44)****45. anti-HEL&TGF β 抗体重链氨基酸序列**

5 EVQLEQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFTTYWIEWIKQRPGHSLEWIGEI
LPGSDSTYYNEKVKGKVTFTADASSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGFYVY
WGQGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVE
SKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
10 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGA
VKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVVRKNDENITLE
15 TVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEY
NTSNPD (SEQ ID NO: 45)

46. anti-HEL& TGF β 抗体轻链氨基酸序列

DIELTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQ
20 SMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSGSWPRTFGGGTKLDIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 46)

25 **47. RG6058(G1DM)的重链氨基酸序列**

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLG
KTYIRFKWYSYAVSVKGRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTRESTTY
DLLAGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
30 SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC

VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 47)

5

48. RG6058(G1DM)的轻链氨基酸序列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKKYLAWYQQKPGQPPN
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPFTFGP
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
10 QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC (SEQ ID NO: 48)

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会
15 理解，下列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
明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。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。

BALB/c 小鼠购自广东省医学实验动物中心。

20 C57 小鼠购自广州中医药大学实验动物中心。

MDA-MB-231 细胞和 U87-MG 细胞购自 ATCC。

阳性对照抗体 Tiragolumab，其重链氨基酸序列、轻链氨基酸序列来源于 WHO.
Proposed INN: List 117. WHO Drug Information, 31(2): p104, 2017 中所述的抗体，序
列分别与 SEQ ID NOs: 40-41 相同。

25 本发明所述 Tiragolumab 与 RG6058(hG1WT)为同一个抗体。

阳性对照抗体 RG6058(hG4)，其序列来源于公开专利 CN108290946A 中所述的抗
体，其重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列分别与 SEQ ID NOs: 42-43 相
同。

阳性对照抗体 RG6058(hG1DM)，在中山康方生物医药有限公司实验室制备而成，
30 批号 20180816。其重链氨基酸序列如 SEQ ID NOs:47 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ

ID NOs: 48 所示。

在本发明的下述实施例中，所用到同型对照抗体为人抗鸡蛋溶酶体（human anti-Hen Egg Lysozyme IgG, anti-HEL, 即 human IgG, 简称 hIgG），其可变区序列来自于 Acierno 等人发表的 Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies（Acierno 等人. J Mol Biol. 2007; 374(1): 130-46.。实施例中所用到的 hIgG1DM 和 hIgG4WT 即是 anti-HEL 带有 hG1DM 和 hG4WT 恒定区序列的同型对照抗体，在中山康方生物医药有限公司实验室制备而成。

anti-HEL & TGF β 抗体由人 hG4DM, k 亚型的 anti-HEL 抗体的重链 C 末端融合 TGF β RII 蛋白构建而成，在中山康方生物医药有限公司实验室制备而成。其重链氨基酸序列如 SEQ ID NOs:45 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 46 所示。

TIGIT-mFc 蛋白（批号 20171110）、TGF- β RII-mFc（批号 20200528）、CD155-hFc-Biotin（批号 20170721）、CD155-mFc（批号 20190726）、CD112-mFc（批号 20190726）均由中山康方生物医药有限公司按照已知序列生产，其中 mFc 表示小鼠 IgG 的 Fc 蛋白片段；hFc 表示人 IgG 的 Fc 蛋白片段。

TGF- β 1 蛋白购自 Sino Biological Inc.公司，货号：LC13DE3108。

TGF- β 2 蛋白购自 peprotech 公司，货号：0420345 E0620。

TGF- β 3 蛋白购自 peprotech 公司，货号：0713410 A0219。

在本发明的下述实施例中，所用的 293T-TIGIT 细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。293T-TIGIT 细胞系由 HEK293T 细胞（武汉大学）经病毒感染制得，病毒制备使用的是 3rd Generation Lentiviral Systems，参见，例如 A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471. 其中所使用的慢病毒表达载体为 plenti6.3/V5-TIGITFL-BSD（其中 TIGIT, Genebank ID: NP_776160.2；载体 plenti6.3/V5 TOPO 购自 Invitrogen 公司，产品编号：K531520）。

在本发明的下述实施例中，所用的 CHO-K1-TIGIT 细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。CHO-K1-TIGIT 细胞系由 CHO-K1 细胞（中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心）经病毒感染制得，病毒制备使用的是 3rd Generation Lentiviral Systems，参见，例如 A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471. 其中所使用的慢病毒表达载体为

plenti6.3/V5-TIGITFL-BSD（其中 TIGIT，Genebank ID: NP_776160.2；载体 plenti6.3/V5 TOPO 购自 Invitrogen 公司，产品编号：K531520）。

在本发明的下述实施例中，所用的 Jurkat-TIGIT 细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。Jurkat-TIGIT 细胞系由 Jurkat 细胞（中国科学院细胞中心）经病毒感染制得，病毒制备使用的是 3rd Generation Lentiviral Systems，参见，例如 A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471. 其中所使用的慢病毒表达载体为 plenti6.3/V5-TIGITFL-BSD（其中 TIGIT，Genebank ID: NP_776160.2；载体 plenti6.3/V5 TOPO 购自 Invitrogen 公司，产品编号：K531520）。

在本发明的下述实施例中，所用的 HT1080-aCD3scFv 细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。HT1080-aCD3scFv 细胞系由 HT-1080 细胞（中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心）经病毒感染制得，病毒制备使用的是 3rd Generation Lentiviral Systems，参见，例如 A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471. 其中所使用的慢病毒表达载体为 pCDH-aCD3scFv-Puro（anti-CD3scFv 序列来源于 anti-human CD3 的 Mus musculus OKT3 hybridoma 抗体；载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro，购自优宝生物，产品编号：VT1480）。

20

实施例 1：抗 TIGIT 抗体的制备

1. 杂交瘤细胞株 LT019 的制备

制备抗 TIGIT 抗体所用的抗原为人 TIGIT-mFc（TIGIT 为 Genbank ID: NP_776160.2）。取免疫后的小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合，制成杂交瘤细胞。以人 TIGIT-hFc 作为抗原，对杂交瘤细胞进行间接 ELISA 法筛选，获得能够分泌与 TIGIT 特异性结合的抗体的杂交瘤细胞。对筛选得到的杂交瘤细胞，经过有限稀释法得到稳定的杂交瘤细胞株。将以上杂交瘤细胞株分别命名为杂交瘤细胞株 LT019，其分泌的单克隆抗体分别命名为 26B12。

杂交瘤细胞株 LT019（又称 TIGIT-26B12），其于 2020 年 10 月 23 日保藏于中

30

国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2020208，保藏地址为中国.武汉.武汉大学，邮编：430072。

2. 抗 TIGIT 抗体 26B12 的制备

- 用 CD 培养基（Chemical Defined Medium，含 1%青链霉素）对上面制得的 LT019 细胞株在 5% CO₂，37°C 条件下进行培养。7 天后收集细胞培养上清，通过高速离心、微孔滤膜抽真空过滤，并使用 HiTrap protein A HP 柱进行纯化，制得抗体 26B12。

实施例 2：抗 TIGIT 抗体 26B12 序列分析

- 按照培养细胞细菌总 RNA 提取试剂盒（Tiangen，货号 DP430）的方法，从实施例 1 中培养的 LT019 细胞株中提取 mRNA。

按照 Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA，并进行 PCR 扩增。

PCR 扩增产物直接进行 TA 克隆，具体操作参考 pEASY-T1 Cloning Kit（Transgen CT101）试剂盒说明书进行。

- 将 TA 克隆的产物直接进行测序，测序结果如下：
- 重链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，片段长 363bp。
- 其编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1 所示，长度为 121 个氨基酸。
- 其中重链 HCDR1 的序列如 SEQ ID NO: 3 所示，HCDR2 的序列如 SEQ ID NO: 4 所示，HCDR3 的序列如 SEQ ID NO: 5 所示。
- 轻链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示，长度为 321bp。
- 其编码的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 6 所示，长度为 107 个氨基酸。
- 其中轻链 LCDR1 的序列如 SEQ ID NO: 8 所示，LCDR2 的序列如 SEQ ID NO: 9 所示，LCDR3 的序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

实施例 3：抗人 TIGIT 的人源化抗体以及突变抗体的设计和制备

1. 抗人 TIGIT 的人源化抗体 26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4 的轻链和重链设计

- 根据人 TIGIT 蛋白的三维晶体结构以及实施例 2 获得的抗体 26B12 的序列，设计得到抗体 26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4 的可变区序列（抗体恒定区序列，来自 NCBI

的数据库，重链恒定区均采用 Ig gamma-1 chain C region，ACCESSION:P01857；轻链恒定区为 Ig kappa chain C region，ACCESSION:P01834）。

设计的可变区序列如下面的表 1 所示。

表 1：抗人 TIGIT 的人源化抗体的可变区序列

命名	重链可变区的氨基酸序列 SEQ ID NO:	重链可变区的核酸序列 SEQ ID NO:	轻链可变区的氨基酸序列 SEQ ID NO:	轻链可变区的核酸序列 SEQ ID NO:
26B12H1L1	11	12	19	20
26B12H4L1	17	18	19	20
26B12H2L2	13	14	21	22
26B12H2L3	13	14	23	24
26B12H3L2	15	16	21	22
26B12H3L3	15	16	23	24
26B12H1L4	11	12	25	26
26B12H4L4	17	18	25	26

5

以上的 8 个抗体 26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4，重链可变区的核酸序列的长度均为 363bp，其编码的氨基酸序列的长度均为 121aa；轻链可变区的核酸序列的长度均为 321bp，其编码的氨基酸序列的长度均为 107aa。

10 并且上述 8 个抗体具有相同的 HCDR1-HCDR3 和 LCDR1-LCDR3，如下：

HCDR1 的序列如 SEQ ID NO: 3 所示，HCDR2 的序列如 SEQ ID NO: 4 所示，HCDR3 的序列如 SEQ ID NO: 5 所示；

LCDR1 的序列如 SEQ ID NO: 8 所示，LCDR2 的序列如 SEQ ID NO: 9 所示，LCDR3 的序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

15

2.人源化抗体 26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4 的制备

重链恒定区均采用 Iggamma-1 chain C region，ACCESSION: P01857；轻链恒定区均采用 Ig kappa chain C region，ACCESSION:P01834。

将 26B12H1L1 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、26B12H4L1 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、26B12H2L2 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、26B12H3L2 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、26B12H2L3 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、26B12H3L3 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、26B12H1L4 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、26B12H2L4 重链 cDNA 和轻链的 cDNA 以及 26B12H4L4 重链 cDNA 和轻链的 cDNA，分别克隆到 pUC57simple（金斯瑞公司提供）载体中，分别获得：

pUC57simple-26B12H1、pUC57simple-26B12L1；
pUC57simple-26B12H4、pUC57simple-26B12L1；
pUC57simple-26B12H2、pUC57simple-26B12L2；
10 pUC57simple-26B12H3、pUC57simple-26B12L2；
pUC57simple-26B12H2、pUC57simple-26B12L3；
pUC57simple-26B12H3、pUC57simple-26B12L3；
pUC57simple-26B12H1、pUC57simple-26B12L4；和
pUC57simple-26B12H4、pUC57simple-26B12L4。

15 参照《分子克隆实验指南（第二版）》介绍的标准技术，EcoRI&HindIII 酶切合成的重、轻链全长基因，通过限制酶(EcoRI&HindIII)的酶切亚克隆到表达载体 pcDNA3.1 中获得表达质粒 pcDNA3.1-26B12H1、pcDNA3.1-26B12L1、pcDNA3.1-26B12H4、pcDNA3.1-26B12H2、pcDNA3.1-26B12L2、pcDNA3.1-26B12H3、pcDNA3.1-26B12L3 和 pcDNA3.1-26B12L4，并进一步对重组表达质粒的重/轻链基因
20 进行测序分析。随后将含有相应的轻、重链重组质粒设计基因组合（pcDNA3.1-26B12H1/pcDNA3.1-26B12L1、pcDNA3.1-26B12H4/pcDNA3.1-26B12L1、pcDNA3.1-26B12H2/pcDNA3.1-26B12L2、pcDNA3.1-26B12H3/pcDNA3.1-26B12L2、pcDNA3.1-26B12H2/pcDNA3.1-26B12L3、pcDNA3.1-26B12H3/pcDNA3.1-26B12L3、pcDNA3.1-26B12H1/pcDNA3.1-26B12L4 和 pcDNA3.1-26B12H4/pcDNA3.1-26B12L4）
25 分别共转染 293F 细胞后收集培养液进行纯化。测序验证正确后，制备去内毒素级别的表达质粒并将质粒瞬时转染 HEK293 细胞进行抗体表达，培养 7 天后收集细胞培养液，采用 ProteinA 柱进行亲和纯化获得人源化抗体。

人源化抗体 26B12H2L2 本发明中也称为 26B12H2L2 (hG1WT)。

3、人源化抗体 26B12H2L2(hG1DM)、26B12H2L2(hG4DM)的设计

30 本发明人在 26B12H2L2 的基础上，通过在其重链恒定区的第 234 号位点（按照

EU 编号系统，下同）引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变（L234A），和第 235 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变（L235A）获得了恒定区突变的人源化抗体 26B12H2L2(hG1DM)。26B12H2L2(hG1DM)的重链 26B12H2(hG1DM)的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示；轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示。

5 本发明人在 26B12H2L2 的基础上，抗体可变区不变，采用 Ig gamma-4 chain C region，ACCESSION: P01861.1 作为重链恒定区，并通过在其重链恒定区的第 234 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变（L234A），和第 235 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变（L235A）获得了恒定区突变的人源化抗体 26B12H2L2(hG4DM)。26B12H2L2(hG4DM)的重链 26B12H2(hG4DM)的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示；

10 轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示。

人源化抗体 26B12H2L2(hG1DM)、26B12H2L2(hG4DM)的制备可以参照上面步骤 2 中的方法。

实施例 4：抗 TIGIT 抗体和 TGF-βR 的融合蛋白的序列设计和制备

15 1. 序列设计

本发明中的抗 TIGIT 抗体和 TGF-βR 的融合蛋白的组成如下面的表 2。

表 2：抗 TIGIT 抗体和 TGF-βR 的融合蛋白的重链和轻链的组成

融合蛋白命名	IgG 部分的重链	连接片段	TGF-βRII 胞外区截取片段	轻链
TF01	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 29
TF02	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 29

TGF-β 受体部分分别有两条肽链，分别通过连接片段连接至 IgG 部分的重链的 C 末端。

20 2. 抗体的表达和纯化

分别将 TF01、TF02 的重链 cDNA 序列和轻链的 cDNA 序列克隆到 pUC57simple（金斯瑞公司提供）载体中，分别获得 pUC57simple-TF01H、pUC57simple-TF02H 和 pUC57simple-TF02L、pUC57simple-TF02L 质粒。

分 别 将 质 粒 pUC57simple-TF01H/pUC57simple TF01L 和

pUC57simple-TF02H/pUC57simple TF02L 进行酶切 (HindIII&EcoRI)，电泳回收得到的重链轻链分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中，提取重组质粒共转染 293F 细胞。细胞培养 7 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩后上样至 HiTrap MabSelect SuRe 柱，用 Elution Buffer 一步洗脱蛋白并回收目标样品并换液至 PBS。由此制得抗 TIGIT 抗体和 TGF-βR 的融合蛋白 TF01 和 TF02。

实施例 5: ELISA 方法测定 TF01、TF02 与抗原或 TGF-β 的结合活性
1. 间接 ELISA 方法分别测定 TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、RG6058(hG4) 与抗原 TIGIT-mFc 的结合活性

具体方法如下：

用 2μg/mL 的羊抗鼠 IgG Fc (Jackson, 货号: 115-005-071) 包被酶标板置于 4℃ 孵育过夜，然后使用 PBST 洗板 1 次，再使用 1% BSA 的 PBS 溶液作为封闭液在 37℃ 下对酶标板进行封闭 2 小时。酶标板封闭结束后用 PBST 洗板 3 次，加入 1μg/mL 的 TIGIT-mFc 在 37℃ 孵育 30 分钟后用 PBST 洗板 3 次后，加入 PBST 溶液梯度稀释的抗体 (抗体稀释梯度详见表 3)，加入待测抗体的酶标板置于 37℃ 条件下孵育 30 分钟，孵育完成后用 PBST 洗板 3 次。洗板后加入 1:5000 比例稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG(H+L)(Jackson, 货号: 109-035-098) 二抗工作液，然后置于 37℃ 条件下孵育 30 分钟。孵育完成后使用 PBST 洗板 4 次，后加入 TMB (Neogen, 308177) 避光显色 5min，加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中，选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

检测结果如表 3 和图 1 所示。

表 3: ELISA 检测 TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、RG6058(hG4)与 TIGIT-mFc 的结合

TIGIT-mFc(1μg/mL), 50μL/孔								
抗体稀 释梯度 (nM)	TF01		TF02		26B12H2L2(hG4D M)		RG6058(hG4)	
	抗体起始浓度（μg/mL）							
	0.399		0.399		0.325		0.332	
2.240	2.965	2.902	2.950	2.911	2.952	2.999	3.032	3.017

0.747	2.921	2.862	2.861	2.819	2.972	2.993	3.018	3.040
0.249	2.625	2.473	2.374	2.350	2.703	2.650	2.691	2.739
0.083	1.808	1.669	1.475	1.438	2.054	2.117	1.898	2.015
0.028	0.889	0.818	0.700	0.685	1.134	1.158	0.992	1.081
0.009	0.404	0.362	0.305	0.307	0.529	0.546	0.460	0.505
0.0031	0.210	0.178	0.165	0.167	0.252	0.265	0.223	0.261
0	0.109	0.102	0.097	0.105	0.098	0.117	0.113	0.131
二抗	羊抗人 IgG (H+L), HRP(1:5000)							
EC ₅₀ (nM)	0.067		0.091		0.046		0.055	

由图可知, TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、RG6058(hG4)与抗原 TIGIT-mFc 能够有效地结合, 且呈剂量依赖关系, 各剂量的 EC₅₀ 值见表 3, 通过对结合的抗体进行吸光度定量分析, 曲线模拟计算获得 TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、RG6058(hG4) (作为对照) 的结合效率 EC₅₀ 分别为 0.067nM、0.091nM、0.046nM、0.055nM。

以上实验结果表明, TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、RG6058(hG4)具有有效结合 TIGIT-mFc 的活性。

2. 间接 ELISA 方法分别测定 TF01、TF02、TGF-β RII -mFc 与 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 的结合活性

具体方法如下:

将 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 分别按照 1μg/mL、2μg/mL、1μg/mL 包被酶标板置于 4℃孵育过夜, 然后使用 PBST 洗板包被了抗原的酶标板 1 次, 再使用 1% BSA 的 PBS 溶液作为封闭液在 37℃下对酶标板进行封闭 2 小时。酶标板封闭结束后用 PBST 洗板 3 次, 加入 PBST 溶液梯度稀释的抗体及 TGF-β RII -mFc, 加入待测抗体及 TGF-β RII -mFc 的酶标板置于 37℃条件下孵育 30 分钟, 孵育完成后用 PBST 洗板 3 次。洗板后加入 1:5000 比例稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG(H+L) (Jackson,货号: 109-035-098) 和 HRP 标记羊抗鼠 IgG Fc (Jackson,货号: 115-035-071) 二抗工作液, 然后置于 37℃条件下孵育 30 分钟。孵育完成后使用 PBST 洗板 4 次, 后加入 TMB (Neogen, 308177) 避光显色 5min, 加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入

酶标仪中，选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

检测结果如表 4、表 5、表 6 和图 2、图 3 和图 4 所示。

表 4：ELISA 检测 TF01、TF02、TGF-βRII-mFc 与 TGF-β1 的结合

抗体稀释 梯度 (μg/ml)	TGF-β1(1μg/ml), 50μl/孔					
	TF01		TF02		TGF-β RII-mFc	
1.000	2.885	2.823	2.786	2.819	1.896	2.007
0.333	2.811	2.771	2.695	2.769	1.949	1.909
0.111	2.515	2.432	2.379	2.411	1.787	1.721
0.037	1.525	1.352	1.358	1.304	1.136	1.044
0.012	0.663	0.611	0.612	0.548	0.673	0.602
0.004	0.233	0.206	0.206	0.190	0.240	0.206
0.001	0.113	0.100	0.103	0.092	0.119	0.099
0.000	0.063	0.056	0.057	0.060	0.053	0.224
二抗	羊抗人 IgG(H+L), HRP(1:5000), 50μl/孔				羊抗鼠 IgG mFc, HRP(1:5000), 50μl/孔	
EC ₅₀ (nM)	0.207		0.224		0.356	

5

表 5：ELISA 检测 TF01、TF02、TGF-βRII-mFc 与 TGF-β2 的结合

抗体稀释梯度 (nM)	TGF-β2 (2 μg/mL)					
	TF01		TF02		TGF-β RII-mFc	
蛋白起始浓度 (μg/mL)	2.001		2.000		0.971	
11.23 nM	2.874	2.896	2.821	2.812	1.462	1.436

1:3	2.782	2.769	2.764	2.716	1.336	1.322
1:9	2.411	2.353	2.224	2.186	0.908	0.925
1:27	1.507	1.353	1.197	1.199	0.432	0.462
1:81	0.707	0.430	0.548	0.554	0.253	0.211
1:243	0.364	0.350	0.314	0.316	0.202	0.158
1:729	0.237	0.243	0.231	0.243	0.184	0.152
0	0.164	0.171	0.181	0.191	0.176	0.160
二抗	羊抗人 IgG(H+L)-HRP(1:5000)				羊抗鼠 IgG Fc-HRP(1:5000)	
EC ₅₀ (nM)	0.477		0.594		1.029	

表 6: ELISA 检测 TF01、TF02、TGF-βRII-mFc 与 TGF-β3 的结合

抗体稀释梯度 (nM)	TGF-β3(1 μg/mL)					
	TF01		TF02		TGF-β RII-mFc	
蛋白起始浓度 (μg/mL)	2.001		2.000		0.971	
11.23 nM	3.065	3.042	3.009	3.035	1.663	1.765
1:3	3.058	3.048	3.048	3.054	1.667	1.649
1:9	2.957	2.976	2.931	2.944	1.411	1.447
1:27	2.382	2.409	2.269	2.213	0.912	0.934
1:81	0.993	0.980	0.964	0.913	0.338	0.340
1:243	0.263	0.278	0.270	0.252	0.113	0.114
1:729	0.120	0.118	0.116	0.115	0.071	0.074
0	0.057	0.055	0.054	0.055	0.056	0.059
二抗	羊抗人 IgG(H+L)-HRP(1:5000)				羊抗鼠 IgG	

			Fc-HRP(1:5000)
EC₅₀(nM)	0.215	0.234	0.402

通过对结合的抗体进行吸光度定量分析，曲线模拟计算获得 TF01 与 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 的结合效率 EC₅₀ 分别为 0.207nM、0.477nM、0.215nM，TF02 与 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 的结合效率 EC₅₀ 分别为 0.224nM、0.594nM、0.234nM，
 5 TGF-βR2-mFc（作为阳性对照）与 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 的结合效率 EC₅₀ 分别为 0.356nM、1.029nM、0.402nM。

结果显示，TF01、TF02 具有有效结合 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 的活性，且呈剂量依赖关系。结果还显示，TF01、TF02、TGF-βRII-mFc 均分别与 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 能够有效地结合，并且 TF01、TF02 与 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3 的结合能力
 10 强于 TGF-βRII-mFc。

实施例 6：竞争 ELISA 方法分别测定 TF01、TF02 与 TGF-βRII-His-Biotin 竞争结合人 TGF-β1、TGF-β3 的活性

实验步骤：将 TGF-β1 和 TGF-β3，2μg/mL 分别包被酶标板后，4℃孵育过夜。
 15 孵育结束后使用 PBST 漂洗包被了抗原的酶标板 1 次，后使用 1% BSA 的 PBS 溶液作为酶标板封闭液，封闭 2 小时。酶标板结束封闭后用 PBST 洗板 3 次。在酶标板内加入 PBST 溶液梯度稀释的抗体及 TGF-β RII-mFc，针对 TGF-β1 酶标板：室温孵育 60 分钟后用 PBST 洗板 3 次后加入 0.01 μg/mL 的 TGF-βRII-His-Biotin 置于室温条件下孵育 10 分钟，针对 TGF-β3 酶标板：37℃孵育 30 分钟后用 PBST 洗板 3 次后加入 0.01
 20 μg/mL 的 TGF-βRII-His-Biotin 置于 37℃条件下孵育 30 分钟，孵育完成后用 PBST 洗板 3 次。洗板后加入 1:4000 比例稀释的 SA-HRP 工作液，置于 37℃条件下孵育 30 分钟。孵育完成后使用 PBST 洗板 4 次后加入 TMB（Neogen，308177）避光显色 4min，加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中，选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

25 抗体与 TGF-βRII-His-Biotin 竞争结合 TGF-β1 和 TGF-β3 的活性的结果见表 7、表 8 和图 5、图 6 所示。以抗体浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标进行曲线拟合，计算抗体与 TGF-βRII-His-Biotin 竞争结合 TGF-β1 和 TGF-β3 的 EC₅₀，结果如下表 7、

表 8 所示。

表 7: TF01、TF02 与 TGF-βRII-His-Biotin 竞争结合 TGF-β1 的活性检测结果

抗体稀释梯度 (nM),100μl/孔	TGF-β1, 2μg/ml 50μl/孔					
	TF01		TF02		TGF-β RII-mFc	
蛋白起始浓度 (μg/mL)	10.000		9.998		4.851	
56.134	0.252	0.281	0.256	0.279	0.294	0.317
28.067	0.275	0.270	0.222	0.266	0.305	0.311
14.034	0.324	0.317	0.316	0.350	0.396	0.361
7.017	0.714	0.815	0.961	1.032	0.933	0.828
3.508	1.267	1.296	1.385	1.508	1.435	1.360
1.754	1.491	1.497	1.590	1.618	1.601	1.576
0.877	1.561	1.573	1.524	1.595	1.609	1.543
0	1.629	1.561	1.570	1.545	1.609	1.603
TGF-βR2-His-Biotin,0.01μg/ml,50μl/孔						
二抗: SA-HRP(1:4000),50μl/孔						
EC ₅₀ (nM)	5.759		7.469		6.475	

表 8: TF01、TF02 与 TGF-βRII-His-Biotin 竞争结合 TGF-β3 的活性检测结果

抗体稀释梯 度,50μl/孔	TGF-β3 (2μg/mL),50μL/孔					
	TF01		TF02		TGF-β RII-mFc	
蛋白起始浓度 (μg/mL)	10.000		9.998		4.851	
56.134	0.232	0.213	0.210	0.220	0.181	0.197
28.067	0.249	0.233	0.233	0.299	0.198	0.218
14.034	0.307	0.293	0.299	0.279	0.255	0.277
7.017	0.364	0.378	0.486	0.456	0.372	0.335
3.508	0.897	0.892	0.973	0.937	0.813	0.601
1.754	1.294	1.344	1.327	1.323	1.272	1.040

0.877	1.427	1.466	1.436	1.466	1.476	1.311
0	1.511	1.500	1.535	1.508	1.575	1.453
TGF-βRII-His-Biotin,0.01μg/ml,50μl/孔						
二抗	SA-HRP(1:4000)					
EC ₅₀ (nM)	3.569		3.879		2.808	

通过对结合的抗体进行吸光度定量分析，曲线模拟计算获得 TF01、TF02、TGF-β RII-mFc 与 TGF-βRII-His-Biotin 竞争结合 TGF-β1 的结合效率 EC₅₀ 分别为 5.579nM、7.469nM、6.475nM，TF01、TF02、TGF-β RII-mFc 与 TGF-βRII-His-Biotin 竞争结合 TGF-β3 的结合效率 EC₅₀ 分别为 3.569nM、3.879nM、2.808nM。

结果显示，TF01、TF02 能够有效地结合 TGF-β1 和 TGF-β3，且呈剂量依赖关系。并且 TF01 结合 TGF-β1 的能力要强于 TGF-βRII-His-Biotin。TF01 与 TGF-βRII-His-Biotin 竞争结合 TGF-β1 的能力要强于 TGF-β RII-mFc。

实施例 7：竞争 ELISA 方法测定 TF01、TF02 与 CD155-hFc-Biotin 竞争结合人 TIGIT-mFc 的活性

将人 TIGIT-mFc (TIGIT Genbank ID:NP_776160.2) 以 2 μg/mL 包被酶标板后，4℃孵育过夜。孵育结束后用 1%BSA 的 PBS 溶液在 37℃条件下对酶标板进行封闭 2 小时，封闭结束后洗板三次并拍干。在稀释板上以 20.18nM(终浓度为 10.09nM)作为起始浓度按照 1:3 的稀释比例将抗体进行梯度稀释至 7 个浓度，并设空白对照，然后加入等体积的 4μg/mL (终浓度为 2μg/mL) 的人 CD155-hFc-Biotin 溶液，混匀后在室温孵育 20 分钟。然后将反应后混合液加入到包被好的酶标板，在 37℃条件下孵育 30 分钟。孵育结束用 PBST 洗板三次并拍干，加入 SA-HRP (KPL, 14-30-00) 工作液，在 37℃条件下孵育 30 分钟。孵育完成后洗板四次拍干，后加入 TMB (Neogen, 308177) 避光显色 5min，加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中，选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值，用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

检测结果如图 7 所示。各剂量的 OD 值见表 9。通过对结合的抗体进行吸光强度定量分析，曲线模拟抗体的结合效率获得结合 EC₅₀ (表 9)。

表 9：TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、RG6058(hG4)与 CD155-hFc-Biotin

竞争结合 TIGIT-mFc 的活性检测结果

抗体稀释(nM)	TIGIT-mFc (2μg/ml), 50μl/孔							
	TF01		TF02		26B12H2L2 (hG4DM)		RG6058(hG4)	
抗体起始终浓度 (μg/ml)	1.797		1.797		1.463		1.496	
10.090	0.055	0.051	0.052	0.049	0.049	0.046	0.047	0.052
3.363	0.085	0.086	0.221	0.212	0.066	0.065	0.151	0.127
1.121	0.786	0.765	0.923	0.949	0.865	0.874	0.913	0.974
0.374	0.982	1.059	1.099	1.106	1.148	1.117	1.170	1.199
0.125	0.993	1.042	1.148	1.180	1.123	1.150	1.153	1.169
0.042	1.028	1.051	1.118	1.144	1.174	1.141	1.203	1.144
0.0138	1.080	0.979	1.036	1.083	1.155	1.165	1.137	1.139
0	1.001	1.039	1.011	1.058	1.095	1.130	1.182	1.126
一抗	CD155-hFc-Biotin, (2μg/ml),50μl/孔							
二抗	SA-HRP(1:4000)							
EC ₅₀ (nM)	1.463		1.963		1.423		1.675	

TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、RG6058(hG4) (作为对照) 阻断 TIGIT-mFc 与其配体 CD155-hFc-Biotin 结合的 EC₅₀ 分别为 1.463nM、1.963nM、1.423nM、1.675nM。

- 5 结果表明, TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、RG6058(hG4) (作为对照) 能有效地阻断抗原人 CD155-hFc-Biotin 与其受体人 TIGIT-mFc 的结合, 且阻断效率呈现剂量依赖关系, TF01 阻断 TIGIT-mFc 与其配体 CD155-hFc-Biotin 结合的能力强于对照抗体 RG6058(hG4)。

10 实施例 8: FACS 检测 TF01 与 293T-TIGIT 膜表面 TIGIT 的结合活性

收集对数生长期 293T-TIGIT 细胞, 按 3×10^5 个细胞/孔将细胞转移到透明尖底 96 孔板中, 加入 1%PBSA, 350g 离心 5min, 去上清; 加入经 1%PBSA 稀释后的抗体 100μL(终浓度分别为 100nM、33.33nM、11.11nM、3.7nM、1.23nM、0.41nM、0.041nM、0.0041nM 和 0.00041nM), 轻柔混匀后于冰上孵育 1h; 加入 1%PBSA, 350g 离心 5min,

去上清；加入 350 倍稀释的 FITC 标记羊抗人 IgG 二抗（Jackson,货号：109-095-098）重悬混匀，冰上避光孵育 0.5h；加入 1%PBSA,350g 离心 5min，去上清；加入 400μLPBSA 重悬细胞沉淀，并转移至流式管，FACS Calibur 检测。

实验结果如表 10 和图 8 所示，TF01 和 RG6058(hG4)（对照抗体）均可特异性与 293T-TIGIT 膜表面 TIGIT 结合。

表 10: FACS 检测 TF01 和 RG6058(hG4)与 293T-TIGIT 细胞表面 TIGIT 的结合活性

抗体稀释梯度(nM)	TF01	RG6058(hG4)
0.00041	8.83	9.07
0.0041	10.00	10.30
0.041	18.50	19.50
0.41	97.40	106.00
1.23	244.00	251.00
3.7	497.00	508.00
11.1	596.00	629.00
33.3	604.00	630.00
100	589.00	630.00
EC ₅₀ (nM)	1.540	1.612
R2	0.9981	0.9981

在相同实验条件下，TF01 和 RG6058(hG4)与 293T-TIGIT 细胞结合的 EC₅₀ 分别为 1.540nM 和 1.612nM。

结果表明，TF01 具有有效结合 293T-TIGIT 膜表面 TIGIT 的活性并呈剂量依赖关系，且其结合能力强于对照抗体 RG6058(hG4)。

实施例 9: 竞争流式细胞法测定 TF01 与 CD155 或 CD112 竞争结合细胞膜表面抗原 TIGIT

取 293T-TIGIT 细胞常规消化，每个样本 30 万个细胞/孔，离心洗涤；加入相应梯度稀释的抗体，每孔 100μL，冰上孵育 30min；每孔加入 100μLCD155/CD112-mFc(康方生物制备，批号:20190726/批号：20190726)，混匀，使得最终浓度为 10nM/30nM，冰上孵育 1 小时；加入 1%PBSA，350g 离心 5min，去上清；每孔加入 100μL 1:300

稀释的 APC Goat anti-mouse IgG 抗体（Biolegend，货号：405308），空白样本则加入 100μL1%PBSA，混匀后冰上避光孵育 30min；离心洗涤重悬，转移至流式上样管，上机测试。

结果如图 9 和图 10 所示，EC₅₀ 值见表 11。通过荧光定量分析和曲线拟合，计算出 TF01 的竞争结合 EC₅₀ 分别为 1.2720nM 和 0.7445nM。

表 11：FACS 检测 TF01 竞争结合 293T-TIGIT 表面抗原的荧光强度分析

抗体稀释梯度(nM)	CD155		CD112	
	TF01	Tiragolumab	TF01	Tiragolumab
0.00041	1499.0	1725.0	350.0	421.0
0.0041	1449.0	1739.0	339.0	418.0
0.041	1432.0	1754.0	359.0	382.0
0.41	1220.0	1469.0	267.0	314.0
1.23	802.0	956.0	125.0	168.0
3.7	113.0	95.8	42.7	88.1
11.1	25.9	30.4	33.1	40.6
33.3	25.5	30.0	33.1	38.2
100	25.0	31.1	32.5	38.3
EC ₅₀ (nM)	1.2720	1.2760	0.7445	0.8370
R2	0.9958	0.9957	0.9985	0.9962

结果显示，TF01 抗体能有效地阻断 CD155 和/或 CD112 对 293T-TIGIT 宿主细胞表面的 TIGIT 的结合，且呈剂量依赖关系。

10 **实施例 10：TF01 与 Fc 受体 FcγRI 亲和力检测**

Fc 受体 FcγRI（又名 CD64）可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，参与抗体依赖细胞介导的细胞毒作用（ADCC）。治疗性抗体与 Fc 受体结合的能力影响到该抗体的安全性和有效性。本实验使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 TF01 与 FcγRI 的亲和力常数，以评价抗体的 ADCC 活性。

15 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测相应抗体与 FcγRI 的亲和力常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4 的溶液。HIS1K

传感器上加入浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ (购自 Sinobio) 溶液, 固定时间 50s, 以使得 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 固定于传感器表面。抗体与 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 的结合和解离参数的测定均在缓冲液中进行, 抗体浓度为 3.12 - 50 nM(两倍梯度稀释)。样品板震动速率为 1000rpm, 检测温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 频率为 5.0Hz。数据以 1:1 模型拟合分析, 得到亲和力常数。

5 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 与 TF01 的亲和力常数测定结果如表 12 和图 11—图 12 所示。

表 12: TF01 与 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 结合的动力学参数

抗体	K_D (M)	$k_{on}(1/Ms)$	$SE(k_{on})$	$k_{dis}(1/s)$	$SE(k_{dis})$	$R_{max}(nm)$
TF01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26B12H2L2(hG1WT)	6.51E-09	5.58E+05	2.90E+03	3.64E-03	1.54E-05	0.30-0.37

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低, 没有对结果进行分析, 故未能获得相应数据。

结果显示, 26B12H2L2(hG1WT)可以与 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 结合, 亲和力常数为 6.51E-09 M,
10 TF01 由于与 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 没有结合或结合信号极低, 没有对结果进行分析, 故而未能获得相应数据。

结果表明, TF01 与 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 的结合活性被有效地消除。

实施例 11: TF01 与 Fc 受体 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 及其亚型的亲和力测定

15 (1) $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ V158 与 TF01 的亲和力常数测定

Fc 受体 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}_V158$ (又名 CD16a_V158), 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合, 介导 ADCC 效应。实验中使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 TF01 与 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}_V158$ 的亲和力常数, 以评价抗体的 ADCC 活性。

Fortebio Octet 分子相互作用仪检测相应抗体亲和力常数实验方法简述如下: 样
20 品稀释缓冲液为 PBS, 0.02% Tween-20, 0.1% BSA, pH7.4。5 $\mu\text{g/mL}$ 的 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}_V158$ 固定在 HIS1K 传感器上, 时间 60s, 传感器在缓冲液中平衡 60s, 固定在传感器上的 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}_V158$ 与各抗体结合, 抗体浓度为 31.25-500 nM (两倍稀释), 时间 60s, 抗体在缓冲液中解离, 时间 60s。样品板震动速率为 1000rpm, 检测温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 频率为 5.0Hz。数据以 1:1 模型拟合分析, 得到亲和力常数。

25 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}_V158$ 与 TF01 的亲和力常数测定结果如表 13 和图 13—图 14 所示。

表 13: TF01 与 FcγRIIIa_V158 结合的动力学参数

抗体	K _D (M)	kon(1/Ms)	SE (kon)	kdis(1/s)	SE(kdis)	Rmax(nm)
TF01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26B12H2L2 (hG1WT)	5.54E-08	4.02E+05	1.68E+04	2.23E-02	3.84E-04	0.18-0.39

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示，26B12H2L2(hG1WT)可以与 FcγRIIIa_V158 结合，亲和力常数为 5.54E-08M，TF01 由于与 FcγRIIIa_V158 没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析。

结果表明，TF01 与 FcγRIIIa_V158 的结合活性被有效地消除。

(2) FcγRIIIa_F158 与 TF01 的亲和力常数测定

Fc 受体 FcγRIIIa_F158（又名 CD16a_F158）可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，介导 ADCC。本实验使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 TF01 与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数，以评价各抗体的 ADCC 活性。

ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 TF01 与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4。5 μg/mL 的 FcγRIIIa_F158 固定在 HIS1K 传感器上，时间 120s，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的 FcγRIIIa_F158 与各抗体结合，抗体浓度为 31.25-500 nM（两倍稀释），时间 60s，抗体在缓冲液中解离，时间 60s。样品板震动速率为 1000rpm，检测温度为 30℃，频率为 5.0Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。

FcγRIIIa_F158 与 TF01 的亲和力常数测定结果如表 14 和图 15—图 16 所示。

表 14: TF01FcγRIIIa_F158 结合的动力学参数

抗体	K _D (M)	kon(1/Ms)	SE (kon)	kdis(1/s)	SE(kdis)	Rmax(nm)
TF01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26B12H2L2 (hG1WT)	9.97E-08	4.03E+05	2.28E+04	4.02E-02	7.95E-04	0.00-0.16

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示，26B12H2L2(hG1WT)可以与 FcγRIIIa_F158 结合，亲和力常数为 9.97E-08M，TF01 与 FcγRIIIa_F158 没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故而未能获得相应数据。

结果表明，TF01 与 FcγRIIIa_F158 的结合活性被有效地消除。

实施例 12：TF01 与 Fc 受体 FcγRIIa 及其亚型的亲和力测定

(1) FcγRIIa_H131 与 TF01 的亲和力常数测定

Fc 受体 FcγRIIa_H131 (又名 CD32a_H131) 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，参与抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)。治疗性抗体与 Fc 受体结合的能力影响到该抗体的安全性和有效性。本实验使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 TF01 与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数，以评价各待测抗体与 Fc 受体的结合能力。

ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 TF01 与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4。5 μg/mL 的 FcγRIIa_H131 固定在 NTA 传感器上，固定高度约为 1.0 nm，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的 FcγRIIa_H131 与各抗体结合，抗体浓度为 12.5-200 nM (两倍梯度稀释)，时间 60s，抗体在缓冲液中解离，时间 60s。样品板震动速率为 1000rpm，检测温度为 30℃，频率为 5.0Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。。

FcγRIIa_H131 与 TF01 的亲和力常数测定结果如表 15 和图 17—图 18 所示。

表 15：TF01 与 FcγRIIa_H131 结合的动力学参数

Sample ID	K _D (M)	kon(1/Ms)	SE (kon)	kdis(1/s)	SE(kdis)	Rmax(nm)
TF01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26B12H2L2 (hG1WT)	3.90E-08	4.81E+05	1.60E+04	1.88E-02	2.82E-04	0.50-1.01

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示，26B12H2L2(hG1WT)可以与 FcγRIIa_H131 结合，亲和力常数为 3.90E-08M，TF01 与 FcγRIIa_H131 没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，

故而未能获得相应数据。

结果表明，TF01 与 FcγRIIa_H131 的结合活性被有效地消除。

(2) FcγRIIa_R131 与 TF01 的亲合力常数测定

5 Fc 受体 FcγRIIa_R131 (又名 CD32a_R131) 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，参与抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)。治疗性抗体与 Fc 受体结合的能力影响到该抗体的安全性和有效性。本实验使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 TF01 与 FcγRIIa_R131 的亲合力常数，以评价各待测抗体与 Fc 受体的结合能力。

10 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 TF01 与 FcγRIIa_R131 的亲合力常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4。5 μg/mL 的 FcγRIIa_R131 固定在 NTA 传感器上，固定高度约为 1.0 nm，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的 FcγRIIa_R131 与各抗体结合，抗体浓度为 12.5-200 nM (两倍梯度稀释)，时间 60s，抗体在缓冲液中解离，时间 60s。样品板震动速率为 1000rpm，检测温度为 30℃，频率为 5.0Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲合力常数。

15 FcγRIIa_R131 与 TF01 的亲合力常数测定结果如表 16 和图 19—图 20 所示。

表 16:TF01 与 FcγRIIa_R131 结合的动力学参数

抗体	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	SE(kon)	k _{dis} (1/s)	SE(kdis)	R _{max} (nm)
TF01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26B12H2L2 (hG1WT)	3.22E-08	5.11E+05	1.38E+04	1.65E-02	2.14E-04	1.08-1.55

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示，26B12H2L2(hG1WT)可以与 FcγRIIa_H131 结合，亲合力常数为
20 3.22E-08M，TF01 由于与 FcγRIIa_R131 没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故而未能获得相应数据。

结果表明，TF01 与 FcγRIIa_R131 的结合活性被有效地消除。

实施例 13: FcγRIIb 与 TF01 的亲合力常数测定

25 Fc 受体 FcγRIIb (又名 CD32b) 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合。本实验使用 ForteBio

Octet 分子相互作用仪检测各待测抗体与 FcγRIIb 的亲和力常数，以评价 TF01 与 Fc 受体的结合能力。

Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 TF01 与 FcγRIIb 的亲和力常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液为 PBS，0.02% Tween-20，0.1% BSA，pH7.4。5μg/mL 的 FcγRIIb 固定在 NTA 传感器上，固定高度约为 1.0 nm，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的 hFCGR2B-his 与各抗体结合，抗体浓度为 12.5-200 nM（两倍梯度稀释），时间 60s，抗体在缓冲液中解离，时间 60s。样品板震动速率为 1000rpm，检测温度为 30℃，频率为 5.0Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。

FcγRIIb 与 TF01 的亲和力常数测定结果如表 17 和图 21—图 22 所示。

10表 17：TF01 与 FcγRIIb 结合的动力学参数

抗体	K _D (M)	kon(1/Ms)	SE(kon)	kdis(1/s)	SE(kdis)	Rmax(nm)
TF01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26B12H2L2 (hG1WT)	4.12E-08	3.42E+05	9.61E+03	1.41E-02	2.04E-04	0.50-0.78

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示，26B12H2L2(hG1WT)可以与 FcγRIIb 结合，亲和力常数为 4.12E-08M，TF01 由于与 FcγRIIb 没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故而未能获得相应数据。

结果表明，TF01 与 FcγRIIb 的结合活性被有效地消除。

实施例 14： TF01 与 C1q 的亲和力测定

血清补体 C1q 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，介导 CDC 效应，治疗性抗体与 C1q 结合的能力影响到该抗体的安全性和有效性。本实验使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 TF01 与 C1q 的亲和力常数，以评价这些抗体的 CDC 活性。

Fortebio Octet 分子相互作用仪检测相应抗体与 C1q 的亲和力常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液为 PBS，0.02% Tween-20，0.1% BSA，pH7.4。50 μg/mL 的抗体固定在 FAB2G 传感器上，固定高度约为 2.0nm，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的抗体与抗原 C1q 结合,抗原浓度为 0.625-10 nM（两倍梯度稀释），时间

孔)加入到 96 孔锥底板中,加入抗体(100 μ L)混匀,冰上孵育 40min, 170xg 离心 5min 洗涤两次;收集巨噬细胞(MBMM), 750 xg 离心 5 min, 弃上清计数,用 DMEM 完全培养基重悬细胞,调整浓度巨噬细胞(5 万/100 μ L),加至已含靶细胞的 96 孔锥底板,重悬混匀,放置 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 2 h;每孔加 100 μ L 常温的 1%PBSA, 750 xg 离心 5 min, 弃上清;用 200 μ L 的 PBSA 洗涤一次;按 100 μ L/孔将 APC anti-mouse/human CD11b antibody (Biolegend, 货号: 101212) (用 PBSA 500 倍稀释)加至相应样本中,混匀,冰上孵育 40 min;每孔加 100 μ L 1%PBSA, 750 xg 离心 5 min, 弃上清;每孔用 200 μ L PBSA 洗涤一次;每管加 200 μ L 1%PBSA 重悬,上机。上机体系中巨噬细胞为 APC 阳性,发生吞噬作用的巨噬细胞则为 APC 和 CFSE 双阳性。以双阳性细胞数与 APC 阳性细胞数比例作为吞噬率,并以此评价抗体介导的 ADCP 活性。按如下公式计算各组 ADCP 活性,以 P%表示:

$$P\% = \frac{\text{发生吞噬作用巨噬细胞细胞数}}{\text{巨噬细胞总数}} \times 100\%$$

结果如图 25 所示。

结果显示,同浓度时 RG6058(hG1WT)、RG6058(hG4)、26B12H2L2(hG1WT) 具有 ADCP 效应;同浓度时 TF01 的吞噬率与同型对照抗体组相当,说明 TF01 不具有 ADCP 效应。

结果表明,TF01 所引入的氨基酸突变能够有效地消除其 ADCP 效应。

20 实施例 16: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白对 CD112/CD155 抑制共培养体系中 IL-2 分泌的阻断活性评价

1、抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白对 CD112 抑制 Jurkat-TIGIT 和 THP-1 细胞共培养体系中 IL-2 分泌的阻断活性评价

2 μ g/mL 抗人 CD3 抗体 (康方生物制备,批号:20170830)在 37 $^{\circ}$ C 下包被 96 孔板 (Corning, 型号: 3599) 2h; 去掉包被液,用预冷 PBS (300 μ L) 洗一次; Jurkat-TIGIT (康方生物构建) 细胞计数, 96 孔板中, 每孔种入 5 万细胞; 按照实验设计加入抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min; 按照实验设计加入 CD112-hFc(康方生物制备,批号:20180209); THP-1 (购自中科院, 货号: 3131C0001000700057) 细胞计数, 96 孔板中, 每孔种入 5 万细胞; 放入培养箱中培养 48h; 收集培养液上清, 用 IL-2 ELISA 检测试剂盒 (达科为, 货号: 1110202) 检测 IL-2 含量。

结果如图 26 所示。结果显示, CD112 对于 IL-2 分泌有明显的抑制作用。抗体 26B12H2L2(hG4DM)、TF01、TF02、RG6058(hG1DM)、RG6058(hG4)均能有效阻断 CD112 对体系 IL-2 分泌的抑制, 且 TF01、TF02 的活性强于阳性对照抗体 RG6058(hG1DM)、RG6058(hG4)。

5

2、抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白对 CD155 抑制 Jurkat-TIGIT 和 THP-1 细胞共培养体系中 IL-2 分泌的阻断活性评价

2 μ g/mL 抗人 CD3 抗体 (康方生物制备, 批号:20170830)在 37°C 下包被 96 孔板 (Corning, 型号: 3599) 2h; 去掉包被液, 用预冷 PBS (300 μ L) 洗一次; Jurkat-TIGIT (康方生物构建) 细胞计数, 96 孔板中, 每孔种入 5 万细胞; 按照实验设计加入抗体, 37°C 孵育 30min; 按照实验设计加入 CD155-hFc(康方生物制备, 批号:20180209); THP-1 (购自中科院, 货号: 3131C0001000700057) 细胞计数, 96 孔板中, 每孔种入 5 万细胞; 放入培养箱中培养 48h; 收集培养液上清, 用 IL-2 ELISA 检测试剂盒 (达科为, 货号: 1110202) 检测 IL-2 含量。

15 结果如图 27 所示。结果显示, CD155 对于 IL-2 分泌有明显的抑制作用。抗体 TF01、RG6058(hG1DM)均能有效阻断 CD155 对体系 IL-2 分泌的抑制, 且活性相当。

实施例 17: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白在 Jurkat-TIGIT 和 HT1080-aCD3scFv 细胞共培养体系中促 IL-2 分泌的生物活性评价

20 收集对数生长期 Jurkat-TIGIT 和 HT1080-aCD3scFv 细胞 (康方生物构建) 并计数, Jurkat-TIGIT 每孔 5 万个, HT1080-aCD3scFv 每孔 1 万个; 加入稀释好抗体 (抗体梯度 3 nM、30 nM、300nM); 加入 soluble 抗人 CD28 抗体 (3 μ g/mL) (R&D, 货号: MAB342-500); 放入培养箱中培养 48h; 收集培养液上清, 用 IL-2 ELISA 检测试剂盒 (达科为, 货号: 1110202) 检测 IL-2 含量。

25 结果如图 28 所示。

结果显示, 抗体 TF01、TF02 和 RG6058(hG4)均能有效促进 Jurkat-TIGIT 和 HT1080-scFv 细胞共培养体系中的 IL-2 分泌, 且活性相当。

实施例 18: 抗 TIGIT 抗体和 TGF- β R 的融合蛋白对 PBMC 二次免疫应答 CMV 抗原过程中 TGF- β 1 抑制体系 IFN- γ 分泌的阻断活性评价

30

复苏 PBMC（来自健康捐献者），接种于完全培养基（RPMI 1640 + 10%FBS）置于培养箱中培养过夜。次日，收集细胞，计数及活率，20 万细胞/孔接种于圆底 96 孔板（Corning，货号：3799）。同时按实验设计加入梯度稀释的抗体、CMV（终浓度为 0.02μg/mL，Mabtech，货号：3619-1）和 TGF-β1（终浓度为 3ng/mL，Genscript，货号：Z03411），终体积为 200 μL。（TGF-β1 和抗体 37℃ 孵育 10min）。置于培养箱中培养 4 天。4 天后，收集细胞培养上清液，IFN-γ ELISA 检测试剂盒（达科为，货号：1110002）检测 IFN-γ 的含量。

结果如图 29 所示。结果显示，CMV 抗原可引起 PBMC 二次免疫应答分泌 IFN-γ，TGF-β1 对体系 IFN-γ 分泌有明显的抑制作用。抗体 TF01、anti-HEL&TGFβ 以及 anti-HEL&TGFβ+26B12H2L2(hG1DM)联用均能有效阻断 TGF-β1 对体系 IFN-γ 分泌的抑制，26B12H2L2(hG1DM)单用无效。TF01 阻断活性优于对照抗体 anti-HEL&TGFβ，与 anti-HEL&TGFβ+26B12H2L2(hG1DM)联用阻断活性相当。

15 实施例 19：抗 TIGIT 抗体和 TGF-βR 的融合蛋白在小鼠肿瘤细胞皮下移植模型中的药效学评价

为检测抗 TIGIT 抗体和 TGF-βR 的融合蛋白体内抑瘤活性，首先用 MDA-MB-231 细胞（购自 ATCC），接种于 6.71-9.57 周龄的雌性 Scid Bseige 小鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司）乳腺脂肪垫皮下。接种后 17 天，小鼠根据肿瘤体积随机分成 3 组，每组 8 只。每只小鼠腹腔注射人外周血单核细胞（hPBMC）并给药，分组当天定义为 D0 天。给药方式为腹腔注射，每周给药 1 次，共给药 6 次。在分组后第 8 天腹腔注射 hPBMC。造模与具体给药方式见表 19。给药后测量各组肿瘤的长宽，计算肿瘤体积。

表 19：抗 TIGIT 抗体和 TGF-βR 的融合蛋白治疗 Scid Beige 小鼠 MDA-MB-231 移植瘤模型的给药方案

分组	动物数量	接种信息	给药信息
同型对照 30mg/kg	8	MDA-MB-231, 2×10 ⁶ 个细胞, Scid Beige 小鼠, 乳腺脂肪	Anti-HEL(hIgG4)(中山康方生物医药有限公司生产, 批号: 20190910), 30mg/kg; 腹腔注射, 每周给药 1 次, 连续给药 6 周

TF01 3.6mg/kg	8	垫皮下接种； 接种细胞后第 17 天分组,腹腔 注射 2.5×10 ⁶ 万	TF01（中山康方生物医药有限公司生产，批号：A130Y20210301）， 3.6mg/kg,; 腹腔注射，每周给药 1 次， 连续给药 6 周
TF01 36mg/kg	8	hPBMC； 在分组后第 8 天 腹腔注射 300 万 hPBMC。	TF01（中山康方生物医药有限公司生产，批号：A130Y20210301）， 36mg/kg，腹腔注射，每周给药 1 次， 连续给药 6 周

结果如图 30 所示。结果表明：相比同型对照抗体，抗 TIGIT 抗体和 TGF-βR 的融合蛋白 TF01 能有效抑制小鼠肿瘤的生长。

此外，如图 31 所示，荷瘤鼠对受试药 TF01 的耐受性均良好，各组对荷瘤小鼠体重无影响。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 一种融合蛋白，其包含：

靶向 TIGIT 的第一蛋白功能区，和

具有 TGF- β 结合活性的第二蛋白功能区；

其中，

所述第一蛋白功能区为抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段；

并且所述的抗 TIGIT 抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 3-5 所示的 HCDR1-HCDR3；并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 8-10 所示的 LCDR1-LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白，其中，所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 17；并且

所述抗TIGIT抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 25。

3. 根据权利要求1至2中任一权利要求所述的融合蛋白，其中，

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 6所示；

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 19所示；

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 19所示；

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 21所示；

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 23所示；

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 15所示，并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 21所示；

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 15所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 23所示;

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 25所示; 或者

所述抗TIGIT抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示, 并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 25所示。

4. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的融合蛋白, 其中, 所述抗TIGIT抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。

5. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的融合蛋白, 其中,
所述抗TIGIT抗体包括非-CDR区, 且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种, 例如来自人抗体。

6. 根据权利要求1至5中任一权利要求所述的融合蛋白, 其中, 所述抗TIGIT抗体的重链恒定区为Ig gamma-1 chain C region (例如NCBI ACCESSION: P01857) 或Ig gamma-4 chain C region (例如NCBI ACCESSION: P01861.1); 轻链恒定区为Ig kappa chain C region (例如NCBI ACCESSION: P01834)。

7. 根据权利要求1至6中任一权利要求所述的融合蛋白, 其中, 所述融合蛋白与配体CD155-hFc-Biotin结合的能力强于对照抗体RG6058(hG4)。

8. 根据权利要求1至7中任一权利要求所述的融合蛋白, 其中, 所述融合蛋白以小于0.08nM或小于0.10nM的EC₅₀结合TIGIT-mFc; 优选地, 所述EC₅₀通过间接ELISA方法测得。

9. 根据权利要求1至8中任一权利要求所述的融合蛋白, 其中, 所述融合蛋白以小于0.3nM、小于0.4nM、小于0.5nM或小于0.6的EC₅₀结合TGF-β1、TGF-β2或TGF-β3; 优选地, 所述EC₅₀通过间接ELISA方法测得。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一权利要求所述的融合蛋白，其中，所述抗 TIGIT 抗体是由杂交瘤细胞株 LT019 产生的抗体，所述杂交瘤细胞株 LT019 保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2020208。

11. 根据权利要求 1 至 10 中任一权利要求所述的融合蛋白，其中，
按照 EU 编号系统，所述抗 TIGIT 抗体的重链恒定区具有如下突变组合之一：
L234A 和 L235A；
L234A 和 G237A；
L235A 和 G237A；或者
L234A、L235A、G237A。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一权利要求所述的融合蛋白，其中，
所述第二蛋白功能区为 TGF- β 受体、其胞外区或具有 TGF- β 受体功能的 TGF- β 受体胞外区的截短片段；

优选地，所述 TGF- β 受体为 TGF- β R I、TGF- β R II 或 TGF- β R III，或者为 TGF- β R I、TGF- β R II 或 TGF- β R III 的胞外区，或者为 TGF- β R I、TGF- β R II 或 TGF- β R III 的胞外区的截短片段；

优选地，所述第二蛋白功能区的氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 33-39 中任一序列所示。

13. 根据权利要求 1 至 12 中任一权利要求所述的融合蛋白，其中，
所述抗 TIGIT 抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 或 SEQ ID NO: 31 所示，并且其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示。

14. 根据权利要求 1 至 13 中任一权利要求所述的融合蛋白，其中，所述第一蛋白功能区与所述第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接。

15. 根据权利要求 14 所述的融合蛋白，其中，所述连接片段为 (GGGGS) n 或 (GGGGS) n G， n 为正整数；优选地， n 为 1、2、3、4、5 或 6。

16. 根据权利要求 1 至 15 中任一权利要求所述的融合蛋白，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为 1 个、2 个或者 2 个以上。

17. 根据权利要求 1 至 16 中任一权利要求所述的融合蛋白，其中，所述 TGF- β 受体或其胞外片段连接在抗 TIGIT 抗体的重链的 C 末端。

18. 一种融合蛋白，其包含：

靶向 TIGIT 的第一蛋白功能区，和

具有 TGF- β 结合活性的第二蛋白功能区；

其中，

所述第一蛋白功能区为 1 个，所述第二蛋白功能区为 2 个；

所述第一蛋白功能区为抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，所述第二蛋白功能区为 TGF- β 受体、其胞外区或具有 TGF- β 受体功能的 TGF- β 受体胞外区的截短片段；

所述抗 TIGIT 抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 或 SEQ ID NO: 31 所示，并且其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示；

所述第二蛋白功能区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示；

所述第二蛋白功能区通过连接片段连接在抗 TIGIT 抗体的重链的 C 末端；

优选地，所述连接片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示。

19. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的融合蛋白。

20. 一种载体，其包含权利要求 19 所述的分离的核酸分子。

21. 一种宿主细胞，其包含权利要求 19 所述的分离的核酸分子，或者权利要求 20 所述的载体。

22. 偶联物，其包括融合蛋白部分以及偶联部分，其中，所述融合蛋白部分为权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的融合蛋白，所述偶联部分为可检测的标记；优选地，所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

23. 权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的融合蛋白或者权利要求 22 所述的偶联物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 TIGIT 和/或 TGF- β 在样品中的存在或其水平。

24. 一种药物组合物，其包含权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的融合蛋白或者权利要求 22 所述的偶联物；可选地，所述药物组合物还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

25. 根据权利要求 24 所述的药物组合物，其还包含一种或多种肿瘤化疗药物；

优选地，所述肿瘤化疗药物为酪氨酸激酶抑制剂；更优选地，所述肿瘤化疗药物为安罗替尼或其可药用盐（例如盐酸盐），或者仑伐替尼或其可药用盐（例如甲烷磺酸盐）。

26. 根据权利要求 24 或 25 所述的药物组合物，其中，所述药物组合物的单位剂量，按照其中的所述融合蛋白的质量计算，为 100mg-1500mg、200mg-1000mg、200mg-800mg、300mg-600mg、400mg-500mg 或者 450mg。

27. 一种组合产品，其包含独立包装的第一产品和第二产品，

其中，

所述第一产品包含权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的融合蛋白、权利要求 22 所述的偶联物或者权利要求 24 至 26 中任一权利要求所述的药物组合物；

所述第二产品包含一种或多种肿瘤化疗药物；优选地，所述肿瘤化疗药物为酪氨酸激酶抑制剂；更优选地，所述肿瘤化疗药物为安罗替尼或其可药用盐（例如盐酸盐），或者仑伐替尼或其可药用盐（例如甲烷磺酸盐）；

优选地，所述第一产品和所述第二产品还独立地包含一种或多种药学上可接受的辅料；

优选地，所述组合产品还包含产品说明书。

28. 根据权利要求 27 所述的组合产品，其中，所述第一产品的单位剂量，按照其中的所述融合蛋白的质量计算，为 100mg-1500mg、200mg-1000mg、200mg-800mg、

300mg-600mg、400mg-500mg 或者 450mg。

29. 根据权利要求 27 或 28 所述的组合产品，其中，所述第二产品的单位剂量，按照其中的活性成分的质量计算，为 0.1mg-100mg、0.5mg-50mg、1mg-20mg、2mg-15mg、4mg-12mg 或者 8mg-12mg。

30. 权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的融合蛋白或者权利要求 22 所述的偶联物在制备治疗和/或预防肿瘤的药物中的用途；

优选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、黑色素瘤、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、B 淋巴细胞瘤、浆细胞瘤、肾细胞癌、前列腺癌和胰腺导管腺癌中的一种或多种；

优选地，所述非小细胞肺癌为晚期非小细胞肺癌。

31. 根据权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的融合蛋白或者权利要求 22 所述的偶联物，其用于治疗 and/或预防肿瘤；

优选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、黑色素瘤、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、B 淋巴细胞瘤、浆细胞瘤、肾细胞癌、前列腺癌和胰腺导管腺癌中的一种或多种；

优选地，所述非小细胞肺癌为晚期非小细胞肺癌。

32. 一种治疗和/或预防肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的权利要求 1 至 18 中任一权利要求所述的融合蛋白或者权利要求 22 所述的偶联物的步骤；

优选地，所述肿瘤选自非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、黑色素瘤、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、B 淋巴细胞瘤、浆细胞瘤、肾细胞癌、前列腺癌和胰腺导管腺癌中的一种或多种；

优选地，所述非小细胞肺癌为晚期非小细胞肺癌。