

抗 TIGIT 抗体、其药物组合物及用途

技术领域

本发明属于医药领域，涉及一种抗 TIGIT 抗体、其药物组合物及用途。具体地，
5 本发明涉及一种抗 TIGIT 的单克隆抗体。

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, I 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 在淋巴细胞特别是在效应和调节性 CD4+ T 细胞、滤泡辅助 CD4+ T 细胞和效应 CD8+ T 细胞以及自然杀伤(NK)细胞中高表达(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)。
10 15

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 TIGIT 高表达细胞的杀伤作用(Stanietzsky 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, 肿瘤发展过程中抑制性受体 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、B 淋巴细胞瘤、浆细胞瘤等的免疫治疗(Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al.
20 25 30

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

随着癌变程度由高到低，肝细胞癌（HCC）患者的癌组织中 TIGIT 和 CD155 的表达水平上调。HCC 术后患者外周血中 TIGIT+cd4+T 细胞和 TIGIT+Treg 细胞频率降低。

- 5 TIGIT 表达增加与 AFP 水平呈正相关。这些结果表明，共抑制受体 TIGIT 可能参与 HCC 的发病机制，并代表了 HCC 诊断和治疗的新靶点（Duan Xiangguo, Liu Juanxi, Cui Jianjian et al. Expression of TIGIT/CD155 and correlations with clinical pathological features in human hepatocellular carcinoma.[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20: 3773-3781.）。

- 10 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
15 TIL 产生细胞因子的能力（Whelan S, Ophir E, Kotturi MF, et al. . PVRIG and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8⁺ T-cell Function. *Cancer Immunol Res* 2019;7:257-68）。

- 抗 TIGIT 抗体药物作为新型免疫检查点抗体药物具有广泛的应用前景，可用于肿瘤的免疫治疗。罗氏制药（Roche）研发的 Tiragolumab 已处于临床 3 期阶段，并且
20 据报道 TIGIT 单抗 Tiragolumab 联合 PD-L1 药物 Tecentrip（阿特珠单抗 Atezolizumab）作为一线疗法，在治疗 PD-L1 阳性转移性非小细胞肺癌（NSCLC）患者的 2 期临床研究中发现 Tiragolumab 与 Tecentriq 的组合耐受性良好，疾病进展风险下降 43%，联用效果显著(Exit C. Roche to present first clinical data on novel anti-TIGIT cancer immunotherapy tiragolumab at ASCO[J])。

- 25 然而，目前现有的抗人 TIGIT 抗体药物的亲和力较低，尚缺少具有高亲和力的抗 TIGIT 抗体。

因此，开发与 TIGIT 具有高亲和力的抗体药物，用于自身免疫疾病的治疗，使其具有更好的治疗效果、更低的毒副作用，具有非常重要的意义。

- 30 发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，利用哺乳动物细胞表达系统表达出重组的人 TIGIT 作为抗原免疫小鼠，经小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤细胞。发明人通过对大量样本的筛选，得到了杂交瘤细胞株 LT019（保藏编号为 CCTCC NO: C2020208）。

5 本发明人惊奇地发现，杂交瘤细胞株 LT019 分别能够分泌产生与人 TIGIT 特异性结合的特异性单克隆抗体（命名为 26B12），并且该单克隆抗体能够十分有效地结合 TIGIT，降低 TIGIT 抑制免疫细胞的作用，促进 T 细胞活性，逆转 NK 细胞耗竭，增强免疫细胞对肿瘤的杀伤作用。进一步地，本发明人创造性地制得了抗人 TIGIT 的人源化抗体（命名为 26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、
10 26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4）。

本发明人还惊奇地发现，本发明的抗体 26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4 具有与 TIGIT 结合的活性，并且具有极强的亲和力；26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4 可以有效地降低
15 TIGIT 的活性。本发明的抗体具有用于治疗和/或预防肿瘤（例如肝癌、肾癌、脑瘤、尿路上皮癌、骨肿瘤、胆管癌、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、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B 淋巴细胞瘤、卵巢癌、浆细胞瘤、子宫内膜癌、前列腺癌、睾丸癌）等疾病的潜力。由此提供了下述发明：

20

本发明的一个方面涉及抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其中，

所述抗体的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；并且所述抗体的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。

25 在本发明的一个或多个实施方式中，所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其中，所述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。

30 在本发明的一个或多个实施方式中，所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其

中，

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20 在本发明的一个或多个实施方式中，所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中，所述的抗体包括非-CDR区，且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种，例如来自人抗体。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体的重链恒定区为Ig gamma-1 chain C region（例如NCBI ACCESSION: 25 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）。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，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。

30 在本发明的一个或多个实施方式中，所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其

中，所述抗体以小于 $4E-10$ 或小于 $4E-11$ 的 K_D 结合TIGIT-mFc；优选地，所述 K_D 通过Fortebio分子相互作用仪测得。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体以小于 $1.5nM$ 、小于 $1.2nM$ 或小于 $1nM$ 的 EC_{50} 结合TIGIT-mFc；优选地，
5 所述 EC_{50} 通过流式细胞仪测得。

在本发明的一些实施方案中，所述的抗TIGIT抗体为单克隆抗体。

在本发明的一些实施方案中，所述的抗TIGIT抗体为人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）。

在本发明的一些实施方式中，所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、
10 Fv、dAb、Fab/c、互补决定区片段、单链抗体（例如，scFv）、人源化抗体、嵌合抗体或双特异性抗体。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中所述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。

15

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抗TIGIT抗体或其抗原结合片段。

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
20 发明的载体。

本发明的再一方面涉及杂交瘤细胞株LT019，其保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为CCTCC NO: C2020208。

本发明的再一方面涉及偶联物，其包括抗体以及偶联部分，其中，所述抗体为本
25 发明中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，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。

本发明的再一方面涉及试剂盒，其包括本发明中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，或者包括本发明的偶联物；

优选地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别所述抗体；任选地，所述第
30 二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或

酶。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的抗体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在样品中的存在或其水平。

5 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抗TIGIT抗体或其抗原结合片段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。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的药物组合物，其还包含一种或多种抗PD-1抗体，或者一种或多种抗PD-L1抗体。

10 在本发明的一个或多个实施方式中，所述的药物组合物，其中，按照抗体的质量计算，抗TIGIT抗体或其抗原结合片段与抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的质量比为（1：5）-（5：1），例如：1：5、1：4、1：3、1：2、1：1、2：1、3：1、4：1或5：1。

本发明的再一方面涉及一种双特异性抗体，其包括第一蛋白功能区和第二蛋白功能区，其中：

15 所述第一蛋白功能区靶向TIGIT，

所述第二蛋白功能区靶向不同于TIGIT的靶点（例如，PD-1），

其中，所述第一蛋白功能区为本发明中任一项所述的抗体或抗原结合片段；

优选地，所述双特异性抗体为IgG-scFv模式；

20 优选地，所述第一蛋白功能区为本发明中任一项所述的抗体且为免疫球蛋白形式，并且所述第二蛋白功能区为单链抗体；或者

优选地，所述第一蛋白功能区为单链抗体，并且所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白形式的抗体。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，本发明中任一项所述的抗体为免疫球蛋白形式。

25 在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述单链抗体为重链可变区-连接片段（linker）-轻链可变区形式。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段（linker）连接；该连接片段和前面单链抗体中的连接片段可以相同或不同，均可以常用本领域常用的连接片段。

30 在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，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。

在本发明的一些实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，所述单链抗体分别连接在免疫球蛋白形式的抗体的两条重链的C末端；优选地，每条重链连接一条单链抗体。

5 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，

所述第一产品包含其包含本发明中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段、本发明的偶联物或者本发明中任一项所述的药物组合物；

所述第二产品包含至少一种抗PD-1抗体或者至少一种抗PD-L1抗体；

10 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（例如载体和/或赋形剂）；

优选地，所述组合产品还包含产品说明书。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的组合产品，其中，按照抗体的质量计算，抗TIGIT抗体或其抗原结合片段与抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的质量比为（1：5）

15 -（5：1），例如：1：5、1：4、1：3、1：2、1：1、2：1、3：1、4：1或5：1。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的偶联物、本发明中任一项所述的双特异性抗体、本发明中任一项所述的药物组合物或者本发明中任一项所述的组合产品在制备治疗和/或预防肿瘤的药物中的用途；优选
20 地，所述肿瘤选自肝癌、肾癌、脑瘤、尿路上皮癌、骨肿瘤、胆管癌、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、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B淋巴细胞瘤、卵巢癌、浆细胞瘤、子宫内膜癌、前列腺癌和睾丸癌中的一种或多种。

根据本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的偶联物、本发明中
25 任一项所述的双特异性抗体、本发明中任一项所述的药物组合物或者本发明中任一项所述的组合产品，其用于治疗 and/或预防肿瘤；优选地，所述肿瘤选自肝癌、肾癌、脑瘤、尿路上皮癌、骨肿瘤、胆管癌、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、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B淋巴细胞瘤、卵巢癌、浆细胞瘤、子宫内膜癌、前列腺癌和睾丸癌中的一种
30 或多种。

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抗体或其抗原结合片段、本发明的偶联物、本发明中任一项所述的双特异性抗体、本发明中任一项所述的药物组合物或者本发明中任一项所述的组合产品的步骤；优选地，所述肿瘤选自肝癌、肾癌、脑瘤、尿路上皮癌、
5 骨肿瘤、胆管癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌、黑色素癌、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B 淋巴细胞瘤、卵巢癌、浆细胞癌、子宫内膜癌、前列腺癌和睾丸癌中的一种或多种。

在本发明的一些实施方式中，所述肝癌是肝细胞癌。

10 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）（重链(H)的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链（L）的 CDR 包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3；其由 Kabat 等人命名，见 Bethesda M.d., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 1991; 1-3:91-3242。

15 优选地，CDR 也可以由 IMGT 编号系统定义，请参见 Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. 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，例如通过 VBASE2 数据库根据 IMGT 定义分析单克隆抗体序列的 CDR 区的氨基酸序列。

本发明的涉及的抗体 26B12、26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、
26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4 具有相同的 CDR：

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

25 HCDR1: GHSFTSDYA (SEQ ID NO: 3)

HCDR2: ISYSDST (SEQ ID NO: 4)

HCDR3: ARLDYGNYGGAMDY (SEQ ID NO: 5);

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1: QHVSTA (SEQ ID NO: 8)

30 LCDR2: SAS (SEQ ID NO: 9)

LCDR3: QQHYITPWT (SEQ ID NO: 10)。

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，当提及 **TIGIT** (NCBI GenBank ID: NP_776160.2) 的氨基酸序列时，其包括 **TIGIT** 蛋白的全长，或者细胞外免疫球蛋白可变区 (**IgV**) 结构域或者包含细胞外免疫球蛋白可变区 (**IgV**) 结构域的片段；还包括 **TIGIT** 的融合蛋白，
10 例如与小鼠或人 **IgG** 的 **Fc** 蛋白片段 (**mFc** 或 **hFc**) 进行融合的片段。然而，本领域技术人员理解，在 **TIGIT** 蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换，缺失和/或添加)，而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“**TIGIT** 蛋白”或“**TIGIT**”应包括所有此类序列，包括所示的序列以及其天然或人工的变体。并且，当描述 **TIGIT** 蛋白的序列片段时，其不仅包括的序列片段，还包括其
15 天然或人工变体中的相应序列片段。

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
20 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 (**V_H**) 和重链恒定区 (**C_H**) 组成。重链恒定区由 3 个结构域 (**C_{H1}**、**C_{H2}** 和 **C_{H3}**) 组成。各轻链由轻链可变区 (**V_L**) 和轻链恒定区 (**C_L**) 组成。轻链恒定区由一个结构域 **C_L** 组成。抗体的恒定区可介导
25 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。**V_H** 和 **V_L** 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 **V_H** 和 **V_L** 由按下列顺序：**FR1**、**CDR1**、**FR2**、**CDR2**、**FR3**、**CDR3**、**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 (**V_H** 和 **V_L**) 分别形成抗原结合
30 部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 **Kabat Sequences of Proteins of**

Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda M.d.(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, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." 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, 特别地, 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。

如本文中所使用的, 术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽, 其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力, 和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合, 其也被称为“抗原结合部分”。通常参见, **Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989))**, 其以其全文通过引用合并入本文, 用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下, 抗原结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如, scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽, 其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

如本文中所使用的, 术语“Fd 片段”意指由 V_H 和 C_H1 结构域组成的抗体片段; 术语“Fv 片段”意指由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的抗体片段; 术语“dAb 片段”意指由 V_H 结构域组成的抗体片段(Ward 等人, Nature 341:544-546 (1989)); 术语“Fab 片段”意指由 V_L、V_H、C_L 和 C_H1 结构域组成的抗体片段; 术语“F(ab')₂ 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段。

在一些情况下, 抗体的抗原结合片段是单链抗体(例如, scFv), 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 等人, Science 242:423-426 (1988) 和 Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988))。此类 scFv 分子可具有一般结构: NH₂-V_L-接头-V_H-COOH 或 NH₂-V_H-接头-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(Holliger 等人(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alftan 等人(1995), Protein Eng. 8:725-731, Choi 等人(2001), Eur. J. Immunol. 31:

94-106, Hu 等人(1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov 等人(1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 和 Roovers 等人(2001), *Cancer Immunol.*描述。

5 在一些情况下, 抗体的抗原结合片段是双抗体, 即, 双价抗体, 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.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), 和 Poljak R. J.等人, *Structure* 2:1121-1123 (1994))。

10 在另一些情况下, 抗体的抗原结合片段是“双特异性抗体”, 指由第一抗体(片段)和第二抗体(片段)或抗体类似物通过偶联臂所形成的偶联物, 偶联的方式包括但不限于化学反应、基因融合和酶促。抗体的抗原结合片段可以是“多特异性抗体”包括例如: 三特异性抗体和四特异性抗体, 前者是具有三种不同抗原结合特异性的抗体, 而后者是具有四种不同抗原结合特异性的抗体。例如, 经设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin), 与 IgG 抗体, scFv-Fc 抗体片段相连或其组合, 如 CN104341529A。抗 IL-17a 的 fynomer 与抗 IL-6R 抗体结合, 如 WO2015141862A1。

15 可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如, 重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体(例如本发明提供的单克隆抗体 26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4)获得抗体的抗原结合片段(例如, 上述抗体片段), 并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

20 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 (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)。

30 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; 332:323-329; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992; 2:593-596; 和 Clark M. *Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'?* [J]. *Immunol. Today*, 2000; 21(8): 397-402。

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,COS细胞,NSO细胞,HeLa细胞,GS细胞,BHK细胞,HEK 293细胞或人细胞等的动物细胞。

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、
5 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；术语“多肽”和“蛋白质”具
10 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“药学上可接受的载体和/或赋形剂”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:
15 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
20 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。

如本文中所使用的，当提及 TIGIT 蛋白（NCBI GenBank: NP_776160.2）的氨基酸序列时，其包括 TIGIT 蛋白的全长，或者 TIGIT 的胞外片段 TIGIT ECD 或者包含
25 TIGIT ECD 的片段；还包括 TIGIT 蛋白的全长的融合蛋白或 TIGIT ECD 的融合蛋白，例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片段（mFc 或 hFc）进行融合的片段。然而，本领域技术人员理解，在 TIGIT 蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异（包括但不限于置换，缺失和/或添加），而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“添加”，蛋白”应包括所有此类序列，包括其天然或人工的变体。并且，当
30 描述 TIGIT 蛋白的序列片段时，其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

如本文中所使用的，术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”可互换使用，并且当提及术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”时，其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。

在本发明中，如果没有特别说明，所述“第一”（例如第一产品）和“第二”（例如第二产品）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。

5

发明的有益效果

本发明的单克隆抗体能够很好地特异性与 TIGIT 结合，并且具有极强的亲和力，降低 TIGIT 抑制免疫细胞的作用，促进 T 细胞活性，逆转 NK 细胞耗竭，增强免疫细胞对肿瘤的杀伤作用。可用于制备抑制 TIGIT 的药物、制备治疗或预防肿瘤（例如
10 肝癌、肾癌、脑瘤、尿路上皮癌、骨肿瘤、胆管癌、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、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B 淋巴细胞瘤、卵巢癌、浆细胞瘤、子宫内膜癌、前列腺癌、睾丸癌）等疾病的药物，具有良好的应用前景和市场价值。

15

附图说明

图 1：26B12H1L1、26B12H2L2、26B12H2L3 和 26B12H3L2 抗体与 TIGIT-mFc 的结合活性检测结果。

图 2：26B12H3L3、26B12H1L4、26B12H4L1 和 26B12H4L4 抗体与 TIGIT-mFc 的结合活性检测结果。

20

图 3：26B12H1L1、26B12H2L2、26B12H2L3 和 26B12H3L2 抗体与人 CD155-hFc-Biotin 竞争结合 TIGIT-mFc 的活性检测结果。

图 4：26B12H3L3、26B12H1L4、26B12H4L1 和 26B12H4L4 抗体与人 CD155-hFc-Biotin 竞争结合 TIGIT-mFc 的活性检测结果。

25

图 5：26B12H3L3 与 TIGIT-mFc 亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 5nM、1.67nM、0.557nM、0.185nM、0.06 nM。

图 6：26B12H1L1 与 TIGIT-mFc 亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 5nM、1.67nM、0.557nM、0.185nM、0.06 nM。

图 7：26B12H2L2 与 TIGIT-mFc 亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 5nM、1.67nM、0.557nM、0.185nM、0.06 nM。

30

图 8：26B12H2L3 与 TIGIT-mFc 亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对

曲线中加入抗体的浓度分别为 5nM、1.67nM、0.557nM、0.185nM、0.06 nM。

图 9: 26B12H3L2 与 TIGIT-mFc 亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 5nM、1.67nM、0.557nM、0.185nM、0.06 nM。

图 10: 26B12H4L4 与 TIGIT-mFc 亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 5nM、1.67nM、0.557nM、0.185nM、0.06 nM。

图 11: 26B12H1L4 与 TIGIT-mFc 亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 5nM、1.67nM、0.557nM、0.185nM、0.06 nM。

图 12: 26B12H4L1 与 TIGIT-mFc 亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 5nM、1.67nM、0.557nM、0.185nM、0.06 nM。

图 13: RG6058 与 TIGIT-mFc 亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 5nM、1.67nM、0.557nM、0.185nM、0.06 nM。

图 14: FACS 检测人源化抗体 26B12H2L2 和 RG6058 与 293T-TIGIT 细胞膜表面抗原 TIGIT 结合活性。

图 15: FACS 检测人源化抗体 26B12H2L2 和 RG6058 与 CD155 竞争结合 293T-TIGIT 细胞膜表面 TIGIT 的活性。

图 16: FACS 检测人源化抗体 26B12H2L2 和 RG6058 与 CD112 竞争结合 293T-TIGIT 细胞膜表面 TIGIT 的活性。

图 17: 检测在 Jurkat-TIGIT 和 HT1080-aCD3scFv 细胞体系中加入 TIGIT 抗体后分泌 IL-2 的量。

图 18: hTIGIT-BALB/c 转基因小鼠 CT26 肿瘤模型效果。

图 19: hTIGIT-BALB/c 转基因小鼠 CT26 肿瘤模型体重变化。

涉及保藏的生物材料:

杂交瘤细胞株 LT019, 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 1-26:

1. 26B12VH 的氨基酸序列

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGHSFSDYAWNWI¹RQFPGNRLEWMGYI²

SYSDSTNYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQMNSVTTEDTATYYCCARLDYGNYGGAM
DYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 1)

2. 26B12VH 的核酸序列

5 GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCTGGTGAAACCCTCTCAGTC
TCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCCACTCATTACCAGTGATTATGCCT
GGAAGTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAGACTGGAGTGGATGGGCTACAT
AAGCTACAGTGATAGCACTAACTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTA
TCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTTGCAGATGAATTCTGTGACT
10 ACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGATTGGACTATGGTAACTACGG
TGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
(SEQ ID NO: 2)

3. HCDR1:GHSFTSDYA (SEQ ID NO: 3)

15

4. HCDR2:ISYSDST (SEQ ID NO: 4)

5. HCDR3:ARLDYGN YGGAMDY (SEQ ID NO: 5)

20 6. 26B12VL 的氨基酸序列

DIVLTQSHEFMSTSLRDRVSITCKSSQHVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASY
RYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVKAEDLAVYYCQQHYITPWTFGGGKLEIK
(SEQ ID NO: 6)

25 7. 26B12VL 的核酸序列

GATATTGTGCTAACTCAGTCTCACGAATTCATGTCCACCTCATTACGAGAC
AGGGTCAGCATCACCTGCAAATCCAGTCAACATGTGAGTACTGCTGTAGCCTG
GTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTTCGGCATCCT
ACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGA
30 TTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACT

GTCAGCAACATTATATTACTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAA
ATAAAA (SEQ ID NO: 7)

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

5

9. LCDR2:SAS (SEQ ID NO: 9)

10. LCDR3:QHYITPWT (SEQ ID NO: 10)

10 11. 26B12H1 的氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFSDYAWNWIRQFPKGKLEWIGYI
SYSDSTNYNPSLKSRTISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCARLDYGNYGAM
DYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 11)

15 12. 26B12H1 的核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCCAGA
CCCTGTCTCTGACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTCACATCCGACTACGCC
TGGAAGTGGATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACA
TCTCTTATAGCGACTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGATCACC
20 ATCAGCAGAGATACATCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGCGTGAC
AGCCGCCGACACCGCCACATACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATG
GCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCC
(SEQ ID NO: 12)

25 13. 26B12H2 的氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFSDYAWSWIRQPPKGKLEWIGYIS
YSDSTNYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGNYGAMD
YWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 13)

30 14. 26B12H2 的核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAGA
CCCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACGCC
TGGTCTTGGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACA
TCTCCTATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTCGGGTGACC
5 ATCTCTAGAGATACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCCGTGAC
CGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTAT
GGCGGAGCCATGGATTACTTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTGTCTAGC
(SEQ ID NO: 14)

10 15. 26B12H3 的氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGYIS
YSDSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCCARLDYGNYGGA
MDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 15)

15 16. 26B12H3 的核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAGA
CCCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACGCC
TGGTCTTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACA
TCTCCTATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTAGAGTGACC
20 ATCTCTGTGGATACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCCGTGAC
CGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTAT
GGCGGAGCCATGGATTACTTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTGTCTAGC
(SEQ ID NO: 16)

25 17. 26B12H4 的氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWNWIWIRQFPKGKLEWMGY
ISYSDSTNYNPSLKSRITISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCCARLDYGNYGGA
MDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 17)

30 18. 26B12H4 的核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCCAGA
CCCTGTCTCTGACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTCACATCCGACTACGCC
TGGAAGTGGATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTACA
TCTCTTATAGCGACTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGATCACC
5 ATCAGCAGAGATACATCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGCGTGAC
AGCCGCCGACACCGCCACATACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATG
GCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCC
(SEQ ID NO: 18)

10 19. 26B12L1 的氨基酸序列

DIQMTQSPKSLSTSVGDRVITICRSSQHVSTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASY
RYSGVDPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 19)

15 20. 26B12L1 的核酸序列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCCTGTCTACAAGCGTGGGCGA
TCGGGTGACCATCACATGTAGAAGCTCCCAGCACGTGTCTACCGCAGTGGCAT
GGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCGCCTCT
TACAGGTATTCCGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCTCTGGCACCG
20 ATTTACACCTTTACAATCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTAT
TGCCCAGCAGCACTACATACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACAAAGCTGG
AGATCAAG (SEQ ID NO: 20)

21. 26B12L2 的氨基酸序列

25 DIQMTQSPSSLASVGDRTITICRSSQHVSTALAWYQQKPGKSPKLLIYSASSR
YSGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 21)

22. 26B12L2 的核酸序列

30 GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGA

TAGGGTGACCATCACATGTAGATCTAGCCCAGCACGTGTCTACAGCCCTGGCAT
GGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTACTTCCGCCTC
CTCTAGGTATTCTGGAGTGCCAGACCGGTTTTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCG
ATTTCACCTTTACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTAT
5 TGCCCAGCAGCACTATATCACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGG
AGATCAAG (SEQ ID NO: 22)

23. 26B12L3 的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQHVSTALAWYQQKPGKAPKLLIYSASS
10 LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 23)

24. 26B12L3 的核酸序列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGA
15 TAGGGTGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGCACGTGAGCACAGCCCTGGCAT
GGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATAGCGCCTC
TAGCCTGCAGTCCGGAGTGCCATCTCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCCGGAACC
GACTTTACCCTGACAATCTCCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTGCCACATACTA
TTGCCCAGCAGCACTACATCACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTG
20 GAGATCAAG (SEQ ID NO: 24)

25. 26B12L4 的氨基酸序列

DIQMTQSPKSMSTSVGDRVTITCRSSQHVSTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASY
RYSVGPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK
25 (SEQ ID NO: 25)

26. 26B12L4 的核酸序列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCATGTCTACAAGCGTGGGCGA
CAGGGTGACCATCACATGTAGAAGCTCCCAGCACGTGTCTACCGCAGTGGCAT
30 GGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCGCCTCT

TACAGGTATTCCGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCTCTGGCACCG
ATTTACCTTTACAATCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTAT
TGCCAGCAGCACTACATCACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACAAAGCTGG
AGATCAAG (SEQ ID NO: 26)

5

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。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J. 萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，为可以通过市场购买获得的常规产品。例如 293T 可以购自 ATCC。

15 在本发明的下述实施例中，使用的 BALB/c 小鼠购自广东省医学实验动物中心。

在本发明的下述实施例中，所用的阳性对照抗体 RG6058，其序列可参照中国发明专利 CN108290946A 中的序列 34 和序列 36。

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 细胞经病毒转染制得，病毒制备使用的是
20 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-CMV-PD-1FL-Puro（其中 TIGIT，Genebank ID: NP_776160.2；载体 pCDH-CMV-Puro，购自优宝生物，产品编号：VT1480）。

25

实施例 1：抗 TIGIT 抗体 26B12 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 GenbankID: 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。
30 以人 TIGIT-mFc 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，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。

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 的抗体 26B12 的序列分析

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 363 bp。

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 321 bp。

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 的人源化抗体的轻链和重链设计和制备

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，通过计算机模拟抗体模型，随后根据模型设计突变，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 A 所示。

编号	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:
1	26B12H1L1	11	12	19	20
2	26B12H4L1	17	18	19	20
3	26B12H2L2	13	14	21	22
4	26B12H2L3	13	14	23	24
5	26B12H3L2	15	16	21	22
6	26B12H3L3	15	16	23	24
7	26B12H1L4	11	12	25	26
8	26B12H4L4	17	18	25	26

10 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 363 bp，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 321 bp，其编码的氨基酸序列的长度均为 107aa。

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

15 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。

20 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 Ig gamma-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、pUC57simple-26B12H3、pUC57simple-26B12L2、pUC57simple-26B12H2、pUC57simple-26B12L3、pUC57simple-26B12H3、pUC57simple-26B12L3、pUC57simple-26B12H1、pUC57simple-26B12L4、pUC57simple-26B12H2、pUC57simple-26B12L4 和 pUC57simple-26B12H4、pUC57simple-26B12L4。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) 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 Protein A 柱进行亲和纯化获得人源化抗体。

实施例 4: ELISA 方法测定抗体与抗原 TIGIT-mFc 的结合活性

实验步骤: 将羊抗鼠 IgG Fc, 2μg/mL 包被酶标板后, 4℃孵育 16 小时。孵育结束后使用 PBST 洗包被了羊抗鼠 IgG Fc 的酶标板 1 次, 后使用 1% BSA 的 PBST 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。再加入抗原 TIGIT-mFc 1 μ g/mL，置于 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 30 分钟后用 PBST 洗板 3 次。在酶标板孔内加入 PBST 溶液梯度稀释的抗体，抗体稀释梯度详见表 1 和表 2。将加入了待测抗体的酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 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 标记的羊抗人 IgG Fc 二抗工作液，置于 37 $^{\circ}$ C 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。

抗体与抗原 TIGIT-mFc 结合的结果如图 1、图 2 所示。各剂量的 OD 值见表 1 和表 2。以抗体浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标进行曲线拟合，计算抗体与抗原的结合 EC_{50} ，结果如表 1、表 2 和图 1、图 2 所示。

表 1: 26B12H1L1、26B12H2L2、26B12H2L3、26B12H3L2 和 RG6058 与 TIGIT-mFc 的结合活性检测结果

包被: 羊抗鼠 IgG Fc (2 μ g/mL)										
抗体稀释 (μ g/mL)	TIGIT-mFc (1 μ g/mL)									
	26B12H1L1	26B12H2L2	26B12H2L3	26B12H3L2	RG6058					
0.3330	2.789	2.701	2.623	2.609	2.560	2.542	2.513	2.430	2.644	2.689
0.1110	2.722	2.771	2.460	2.572	2.413	2.528	2.368	2.394	2.516	2.863
0.0370	2.539	2.676	2.322	2.253	2.162	2.137	2.142	2.292	2.332	2.605
0.0123	2.001	2.126	2.001	1.965	1.853	1.811	1.706	1.861	1.855	2.028
0.0041	1.262	1.349	1.211	1.221	1.038	1.103	1.106	1.092	1.142	1.263
0.0014	0.593	0.613	0.542	0.627	0.506	0.544	0.546	0.527	0.569	0.602
0.0005	0.264	0.265	0.249	0.258	0.237	0.243	0.224	0.229	0.238	0.254
0.0000	0.056	0.051	0.053	0.046	0.052	0.049	0.049	0.050	0.053	0.049
第二抗体	HRP 标记的羊抗人 IgG Fc (1:5000)									
EC_{50} (nM)	0.034	0.033	0.040	0.037	0.036					

表 2: 26B12H3L3、26B12H1L4、26B12H4L1、26B12H4L4 和 RG6058 与 TIGIT-mFc 的结合活性检测结果

包被: 羊抗鼠 IgG Fc (2 μ g/mL)										
抗体稀释 (μ g/mL)	TIGIT-mFc (1 μ g/mL)									
	26B12H3L3	26B12H1L4	26B12H4L1	26B12H4L4	RG6058					
0.3330	2.736	2.788	2.639	2.604	2.709	2.829	2.728	2.608	2.963	3.089
0.1110	2.707	2.774	2.469	2.422	2.625	2.587	2.626	2.788	2.915	3.119
0.0370	2.546	2.538	2.568	2.451	2.392	2.699	2.679	2.660	2.830	2.797
0.0123	1.861	1.881	2.049	1.882	2.113	2.091	1.987	2.045	2.237	2.237
0.0041	1.074	1.012	1.232	1.266	1.252	1.279	1.265	1.239	1.254	1.258

0.0014	0.483	0.477	0.593	0.580	0.582	0.592	0.589	0.593	0.569	0.593
0.0005	0.217	0.211	0.246	0.263	0.256	0.261	0.253	0.253	0.244	0.248
0.0000	0.065	0.060	0.053	0.051	0.051	0.051	0.052	0.054	0.065	0.061
第二抗体	HRP 标记的羊抗人 IgG Fc (1:5000)									
EC ₅₀ (nM)	0.048		0.031		0.033		0.034		0.039	

结果显示, 抗体 26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4 均能有效地与人 TIGIT-mFc 结合, 结合效率呈剂量依赖关系, 结合活性与同靶点阳性药 RG6058 相当, 表明 26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4 具有有效结合 TIGIT 的功能。

实施例 5: 竞争 ELISA 方法分别测定抗体与 CD155-hFc-Biotin 竞争结合 TIGIT-mFc 的活性

实验步骤: 将 TIGIT-mFc, 2 μ g/mL 包被酶标板后, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。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 PBST 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, 抗体浓度详见表 3 和表 4, 室温孵育 10 分钟后加入等体积的 2 μ g/mL (终浓度为 1 μ g/mL) 的 CD155-hFc-Biotin, 和抗体混合均匀后将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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。

抗体与 CD155-hFc-Biotin 竞争结合 TIGIT-mFc 的活性的结果见表 3 和表 4。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 CD155-hFc-Biotin 竞争结合 TIGIT-mFc 的 EC₅₀, 结果如下表 3 和表 4、图 3 和图 4 所示。

表 3: 26B12H1L1、26B12H2L2、26B12H2L3、26B12H3L2 和 RG6058 与 CD155-hFc-Biotin 竞争结合 TIGIT-mFc 的活性检测结果

抗 体 稀 释	抗原包被: TIGIT-mFc (2 μ g/mL)									
	26B12H1L1	26B12H2L2	26B12H2L3	26B12H3L2	RG6058					
3 μ g/mL	0.091	0.097	0.101	0.110	0.106	0.117	0.107	0.113	0.119	0.120
1:3	0.088	0.085	0.082	0.092	0.098	0.100	0.101	0.102	0.104	0.112

1:9	0.104	0.099	0.091	0.097	0.107	0.110	0.121	0.120	0.114	0.121
1:27	0.533	0.491	0.410	0.538	0.510	0.537	0.492	0.549	0.528	0.532
1:81	1.026	1.035	0.996	1.025	0.961	0.990	0.948	1.059	0.951	1.011
1:243	1.210	1.251	1.222	1.221	1.142	1.195	1.089	1.217	1.168	1.209
1:729	1.287	1.360	1.274	1.242	1.201	1.287	1.120	1.236	1.209	1.251
0	1.347	1.387	1.315	1.296	1.279	1.307	1.263	1.340	1.295	1.354
CD155-hFc-Biotin (1 μ g/mL)										
SA-HRP (1:4000)										
EC ₅₀ (nM)	0.255		0.254		0.266		0.283		0.254	

表 4: 26B12H3L3、26B12H1L4、26B12H4L1、26B12H4L4 和 RG6058 与 CD155-hFc-Biotin 竞争结合 TIGIT-mFc 的活性检测结果

抗体稀释	抗原包被: TIGIT-mFc (2 μ g/mL)									
	26B12H3L3	26B12H1L4	26B12H4L1	26B12H4L4	RG6058					
3 μ g/mL	0.087	0.085	0.091	0.084	0.102	0.086	0.091	0.085	0.091	0.093
1:3	0.083	0.082	0.077	0.086	0.086	0.086	0.084	0.082	0.089	0.084
1:9	0.139	0.146	0.094	0.096	0.106	0.102	0.103	0.103	0.101	0.100
1:27	0.646	0.650	0.449	0.495	0.495	0.561	0.516	0.532	0.530	0.539
1:81	1.031	1.027	0.938	0.967	0.931	1.030	0.974	0.999	0.946	1.037
1:243	1.239	1.294	1.171	1.224	1.180	1.232	1.131	1.218	1.152	1.223
1:729	1.318	1.378	1.336	1.382	1.278	1.292	1.123	1.335	1.302	1.346
0	1.410	1.393	1.341	1.361	1.357	1.360	1.258	1.364	1.380	1.427
CD155-hFc-Biotin (1 μ g/mL)										
SA-HRP (1:4000)										
EC ₅₀ (nM)	0.294		0.217		0.250		0.271		0.236	

结果表明, 在相同实验条件下, 26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、
5 26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4 可分别与 CD155-hFc-Biotin 竞争结合抗原 TIGIT-mFc, 活性与同靶点阳性药 RG6058 相当, 提示 26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4 和 26B12H4L4 具有有效的与 CD155-hFc-Biotin 竞争结合 TIGIT-mFc 的功能。

10

实施例 6: 使用 Fortebio 分子相互作用仪测定人源化抗体 26B12H3L3、26B12H1L1、26B12H2L2、26B12H2L3、26B12H3L2、26B12H4L4、26B12H1L4、26B12H4L1 和 RG6058 与抗原 TIGIT-mFc 结合的动力学参数

样品稀释缓冲液为 PBS, 0.02%Tween-20, 0.1%BSA, pH7.4。将 TIGIT-mFc 以

- 3 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度固定于 AMC 传感器上, 时间为 50s, 传感器在缓冲液中平衡 60s, 固定在传感器上的 TIGIT-mFc 与抗体结合, 浓度为 0.06-5 nM (三倍稀释), 时间 120s, 蛋白在缓冲液中解离, 时间 300s。传感器采用 10mM 甘氨酸, pH=1.7 溶液再生。检测温度为 37 度, 检测频率为 0.3 Hz, 样品板震动速率为 1000 rpm。数据以 1:1 模型拟合分析, 得到亲和力常数。

人源化抗体 (作为对照抗体) 与 TIGIT 的亲和力常数测定结果见表 5, 检测结果如图 5 至图 13 所示。

表 5: 人源化抗体与抗原 TIGIT-mFc 亲和力常数检测结果

抗体	分析物最高信号高度 (nm)	K_D (M)	$k_{on}(1/\text{Ms})$	S E (kon)	$k_{dis}(1/\text{s})$	S E (kdis)	R_{max} (nm)
26B12H3L3	0.09	9.64E-11	2.48E+06	3.22E+05	2.39E-04	8.57E-05	0.05-0.13
26B12H1L1	0.15	1.64E-11	5.44E+06	1.92E+05	8.93E-05	3.36E-05	0.06-0.17
26B12H2L2	0.14	8.40E-12	5.47E+06	2.55E+05	4.60E-05	4.40E-05	0.07-0.17
26B12H2L3	0.12	4.85E-11	3.29E+06	2.53E+05	1.59E-04	5.92E-05	0.15-0.31
26B12H3L2	0.12	5.40E-11	3.94E+06	3.60E+05	2.13E-04	7.86E-05	0.13-0.17
26B12H4L4	0.13	3.69E-11	2.81E+06	1.38E+05	1.04E-04	3.23E-05	0.14-0.20
26B12H1L4	0.12	4.63E-11	2.94E+06	1.96E+05	1.36E-04	4.88E-05	0.01-0.15
26B12H4L1	0.12	8.57E-12	2.90E+06	1.34E+05	2.48E-05	3.11E-05	0.11-0.18
RG6058	0.16	3.16E-11	4.56E+06	1.84E+05	1.44E-04	3.46E-05	0.01-0.18

K_D 为亲和力常数; $K_D = k_{dis}/k_{on}$ 。

- 结果显示, 人源化抗体 26B12H3L3、26B12H1L1、26B12H2L2、26B12H2L3、26B12H3L2、26B12H4L4、26B12H1L4、26B12H4L1 和 RG6058 与 TIGIT-mFc 的亲和力常数依次为 9.64E-11M、1.64E-11M、8.40E-12M、4.85E-11M、5.40E-11M、3.69E-11M、4.63E-11M、8.57E-12 M 和 3.16E-11M。

- 结果表明, TIGIT 各抗体与 TIGIT-mFc 结合的亲和力强弱从强到弱依次为: 26B12H2L2、26B12H4L1、26B12H1L1、RG6058、26B12H4L4、26B12H1L4、26B12H2L3、26B12H3L2、26B12H3L3。其中人源化抗体 26B12H2L2、26B12H4L1、26B12H1L1 的亲和力比阳性药物 RG6058 强, 而 26B12H4L4 的亲和力与阳性药物 RG6058 亲和力相当。

实施例 7 : FACS 检测人源化抗体 26B12H2L2 和 RG6058 与 293T-TIGIT 细胞膜表面抗原 TIGIT 的结合活性

实验方法:

TIGIT 载体 plenti6.3/V5-TIGITFL-BSD (载体 pLenti6.3 购自 Invitrogen 公司)

5 转染 293T 细胞, 经筛选获得稳定表达 TIGIT 的细胞株 293T-TIGIT 细胞。

收集 293T-TIGIT 细胞 (DMEM+10%FBS), 离心 5min 后去上清, 重悬, 计数及活率 (P7, 95.79%), 稀释细胞, 透明尖底 96 孔板每个孔中加入 30w 细胞, 每管加 200 μ L 1%PBSA, 离心 5min, 去上清。按实验设计每孔对应加入 100 μ L 抗体 (终浓度为 300 nM, 100nM, 33.3nM, 11.1nM, 3.7nM, 1.23nM, 0.41nM, 0.041nM, 0.0041nM), 10 并设计空白对照及同型对照, 冰上孵育 60min。每管加 200 μ L 1%PBSA, 离心 5min, 去上清, 洗两遍。每个样品加 FITC 羊抗人 IgG 抗体 (用 PBSA 500 倍稀释), 冰上避光孵育 40min; 每管加入 200 μ L PBSA, 离心 5min, 去上清。加入 200 μ L PBSA 重悬细胞, 转移到流式管中, 流式细胞仪检测各浓度下细胞的平均荧光强度。

表 6: FACS 检测人源化抗体 26B12H2L2 和 RG6058 与 293T-TIGIT 细胞膜表面抗原 TIGIT-的结合活性

抗体/ 浓度 (nM)	平均荧光强度									EC ₅₀ (nM)
	300	100	33.33	11.1	3.7	1.23	0.41	0.041	0.0041	
RG6058	505.61	554.87	493.98	537.75	431.36	266.73	109.14	24.47	14.61	1.257
26B12H2L2	514.58	467.29	412.32	645.99	466.99	320.40	122.58	28.76	12.66	0.917

实验结果如表 6 和图 14 所示, 阳性对照抗体 RG6058 与细胞膜表面抗原 TIGIT 结合的 EC₅₀ 为 1.257nM, 而人源化抗体 26B12H2L2 与细胞膜表面抗原 TIGIT-结合的 EC₅₀ 为 0.917nM。

实验结果表明, 人源化抗体 26B12H2L2 结合细胞膜表面抗原 TIGIT 的能力比阳性对照抗体 RG6058 强。

实施例 8: FACS 检测人源化抗体 26B12H2L2 和 RG6058 与 CD155 或者 CD112 竞争结合 293T-TIGIT 细胞膜表面抗原 TIGIT 的活性

实验方法: 收集 293T-TIGIT 细胞, 离心 5min 后去上清, 重悬, 计数及活率 (94.95%), 稀释细胞, 透明尖底 96 孔板每个孔中加入 30w 细胞, 每管加 200 μ L 1%PBSA, 离心 5min, 去上清。按实验设计每孔对应加入 100 μ L 抗体 (终浓度为 300 nM, 100 nM, 33.3nM, 11.1nM, 3.7nM, 1.23nM, 0.123nM, 0.0123nM), 并设计空

白对照及同型对照,冰上孵育 30min。每个样品加 CD155 (终浓度为 10nM)或 CD112(终浓度为 30nM),冰上避光孵育 60min,再每管加 200μL 1%PBSA,离心 5min,去上清,洗两遍。每个样品加 APC 羊抗鼠 IgG (最小交叉反应活性 minimal x-reactivity)抗体 (PBSA 300 倍稀释),冰上避光孵育 40min;每管加入 200μL PBSA,离心 5min,去上清。加入 200 μL PBSA 重悬细胞,转移到流式管中,流式细胞仪检测各浓度下细胞的平均荧光强度。

实验结果分别如表 7 和图 15、以及表 8 和图 16 所示。

表 7: FACS 检测人源化抗体 26B12H2L2 和 RG6058 与 CD155 竞争结合 293T-TIGIT 细胞膜表面抗原 TIGIT 的活性

抗体/ 浓度 (nM)	平均荧光强度								EC ₅₀ (nM)
	300	100	33.3	11.1	3.7	1.23	0.123	0.0123	
RG6058	8.85	7.44	7.6	7.71	52.1	239	530	436	1.212
26B12H2L2	8.3	7.64	7.83	8.2	36.1	200	541	449	1.049

10

表 8: FACS 检测人源化抗体 26B12H2L2 和 RG6058 与 CD112 竞争结合 293T-TIGIT 细胞膜表面抗原 TIGIT 的活性

抗体/ 浓度 (nM)	平均荧光强度								EC ₅₀ (nM)
	300	100	33.3	11.1	3.7	1.23	0.123	0.0123	
RG6058	20.1	17.8	18	19.2	37.1	72	129	126	1.224
26B12H2L2	21.4	19.2	20.3	19.8	37.1	73.1	131	134	1.140

结果显示:阳性对照抗体 RG6058 竞争 CD155 结合 TIGIT 的 EC₅₀ 为 1.212nM,而人源化抗体 26B12H2L2 竞争 CD155 结合 TIGIT 的 EC₅₀ 为 1.049nM;阳性对照抗体 RG6058 竞争 CD112 结合 TIGIT 的 EC₅₀ 为 1.224nM,而人源化抗体 26B12H2L2 竞争 CD112 结合 TIGIT 的 EC₅₀ 为 1.140nM。

结果表明,人源化抗体 26B12H2L2 竞争 CD155 或者 CD112 结合细胞膜表面抗原 TIGIT 的能力比阳性对照抗体 RG6058 强。

20 实施例 9: Jurkat-TIGIT 和 HT1080-aCD3scFv 细胞体系中加入 TIGIT 抗体的混合淋巴反应

实验方法:

- TIGIT 载体 plenti6.3/V5-TIGITFL-BSD (载体 pLenti6.3 购自 Invitrogen 公司) 转染 Jurkat 细胞,经筛选获得稳定表达 TIGIT 的细胞株 Jurkat-TIGIT 细胞; anti-CD3 抗体载体 pCDH-aCD3scFv-puro (载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 购自优宝生物)
- 5 转染 HT-1080 细胞,经筛选获得稳定表达 anti-CD3scFv 于细胞膜上的细胞株 HT1080-aCD3scFv 细胞。

- 收集对数生长期 Jurkat-TIGIT 和 HT1080-aCD3scFv 细胞,在 96 孔板中, Jurkat-TIGIT 每孔加入 5W 细胞和 HT1080-aCD3scFv 每孔加入 1W 细胞。加入稀释的抗体(终浓度为 10 nM, 50 nM, 250nM)并加入抗人 CD28 抗体(3 μ g/mL),放入
- 10 培养箱中培养 48h;收集培养液上清,用 IL-2 ELISA 检测试剂盒检测 IL-2 含量。

实验结果如图 17 所示。

- 结果显示,人源化抗体 26B12H2L2 和阳性对照抗体 RG6058 均可促进体系中 IL-2 的分泌,而且在各浓度下(10 nM, 50 nM, 250nM)人源化抗体 26B12H2L2 与 RG6058 促 IL-2 分泌水平相当。
- 15 结果表明,人源化抗体 26B12H2L2 与阳性对照抗体 RG6058 诱使细胞分泌 IL-2 的能力相当。

实施例 10: 26B12H2L2 对在 hTigit-BALB/c 转基因小鼠接种 CT26 小鼠移植瘤的治疗作用

- 20 采用在 hTigit-BALB/c 转基因小鼠(小鼠购自江苏集萃药康生物科技有限公司,采购的转基因小鼠,该小鼠正常的 mouse TIGIT 基因被 human TIGIT 基因替代)背部接种 50 万/只 CT26 细胞(小鼠结肠癌细胞株,购自 ATCC),实验具体步骤为 5000 万/ml 的 CT26 细胞以每只接种 100 μ l 接种小鼠的方法建立小鼠肿瘤模型。实验小鼠每组 8 只,分组如下:
- 25 同型对照组 G1,给药剂量为 20mg/kg,给药方式为腹腔注射(i.p.),每周两次;
实验组 G2,给药剂量为 4mg/kg,给药方式为腹腔注射(i.p.),每周两次;
实验组 G3,给药剂量为 20mg/kg,给药方式为腹腔注射(i.p.),每周两次,以及
阳性对照组 G4,给药剂量为 20mg/kg,给药方式为腹腔注射(i.p.),每周两次。
具体方案如表 9 所示。

表 9：小鼠 CT26 肿瘤模型的建模和抗体的给药方案

组别	细胞量	动物数量	建模	给药方式
G1	50 万/只	8	CT26 细胞：5000 万/ml	hIgG1 20mg/kg, 腹腔注射(i.p.). 每周两次
G2	50 万/只	8	接种体积：100μl/只	26B12H2L2 4mg/kg, 腹腔注射(i.p.). 每周两次
G3	50 万/只	8	接种体积：100μl/只	26B12H2L2 20mg/kg, 腹腔注射(i.p.). 每周两次
G4	50 万/只	8	接种体积：100μl/只	RG6058 20mg/kg, 腹腔注射(i.p.). 每周两次

实验结果如图 18 所示。

结果显示，与同型对照相比，26B12H2L2 和 RG6058 在 hTIGIT-BALB/c 转基因小鼠 CT26 肿瘤模型上，肿瘤体积有显著的减少。

5 结果表明，26B12H2L2 在 hTIGIT-BALB/c 转基因小鼠 CT26 肿瘤模型上有着很强的药效，效果与 RG6058 相当；26B12H2L2 具有用于治疗 and/or 预防肿瘤特别是结肠癌的潜力。

同时，如图 19 所示，26B12H2L2 对作为 CT26 肿瘤模型的 hTIGIT-BALB/c 转基因小鼠的体重没有影响，表明 26B12H2L2 抗体对小鼠没有产生毒副作用。

10

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. 抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中，

所述抗体的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；并且所述抗体的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所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中，所述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抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中，

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

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

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

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

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

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

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

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示，并且所述抗体的轻

链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 25所示；或者

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示，并且所述抗体的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抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，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抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中，

所述的抗体包括非-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抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中，所述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抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体以小于4E-10或小于4E-11的K_D结合TIGIT-mFc；优选地，所述K_D通过Fortebio分子相互作用仪测得。

8. 根据权利要求1至7中任一权利要求所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体以小于1.5nM、小于1.2nM或小于1nM的EC₅₀结合TIGIT-mFc；优选地，所述EC₅₀通过流式细胞仪测得。

9. 根据权利要求1至8中任一权利要求所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，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。

10. 分离的核酸分子，其编码权利要求1至9中任一权利要求所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段。

11. 一种载体，其包含权利要求10所述的分离的核酸分子。

12. 一种宿主细胞，其包含权利要求10所述的分离的核酸分子，或者权利要求11所述的载体。

13. 杂交瘤细胞株 LT019，其保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2020208。

14. 偶联物，其包括抗体以及偶联部分，其中，所述抗体为权利要求1至9中任一权利要求所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，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。

15. 试剂盒，其包括权利要求1至9中任一权利要求所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段，或者包括权利要求14所述的偶联物；

优选地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别所述抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

16. 权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或者权利要求14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在样品中的存在或其水平。

17. 一种双特异性抗体，其包括第一蛋白功能区和第二蛋白功能区，其中：

所述第一蛋白功能区靶向TIGIT，

所述第二蛋白功能区靶向不同于TIGIT的靶点（例如，PD-1），

其中，所述第一蛋白功能区为权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或抗原结合片段；

优选地，所述双特异性抗体为IgG-scFv模式；

优选地，所述第一蛋白功能区为权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体且为免疫球蛋白形式，并且所述第二蛋白功能区为单链抗体；或者

优选地，所述第一蛋白功能区为单链抗体，并且所述第二蛋白功能区为靶向不同于TIGIT的靶点（例如，PD-1）的免疫球蛋白形式的抗体。

18. 根据权利要求17所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接。

19. 根据权利要求17至18中任一权利要求所述的双特异性抗体，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。

20. 根据权利要求17至19中任一权利要求所述的双特异性抗体，其中，所述单链抗体分别连接在免疫球蛋白形式的抗体的两条重链的C末端。

21. 一种药物组合物，其包含权利要求1至9中任一权利要求所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段或者权利要求14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。

22. 根据权利要求21所述的药物组合物，其还包含一种或多种抗PD-1抗体，或者一种或多种抗PD-L1抗体。

23. 根据权利要求21或22所述的药物组合物，其中，按照抗体的质量计算，抗TIGIT抗体或其抗原结合片段与抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的质量比为(1:5)-(5:1)。

24. 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，

所述第一产品包含其包含权利要求1至9中任一权利要求所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段、权利要求14所述的偶联物或者权利要求21至23中任一权利要求所述的药物组合物；

所述第二产品包含至少一种抗PD-1抗体或者至少一种抗PD-L1抗体；

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。

25. 根据权利要求24所述的组合产品，其中，按照抗体的质量计算，抗TIGIT抗体或其抗原结合片段与抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的质量比为（1:5）-（5:1）。

26. 权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求14所述的偶联物、权利要求17至20中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求21至23中任一权利要求所述的药物组合物在制备治疗和/或预防肿瘤的药物中的用途；

优选地，所述肿瘤选自肝癌、肾癌、脑瘤、尿路上皮癌、骨肿瘤、胆管癌、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、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B淋巴细胞瘤、卵巢癌、浆细胞瘤、子宫内膜癌、前列腺癌和睾丸癌中的一种或多种。

27. 根据权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求17至20中任一权利要求所述的双特异性抗体，其用于治疗 and/或预防肿瘤；

优选地，所述肿瘤选自肝癌、肾癌、脑瘤、尿路上皮癌、骨肿瘤、胆管癌、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、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B淋巴细胞瘤、卵巢癌、浆细胞瘤、子宫内膜癌、前列腺癌和睾丸癌中的一种或多种。

28. 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根据权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求17至20中任一权利要求所述的双特异性抗体的步骤；

优选地，所述肿瘤选自肝癌、肾癌、脑瘤、尿路上皮癌、骨肿瘤、胆管癌、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、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B淋巴细胞瘤、卵巢癌、浆细胞瘤、子宫内膜癌、前列腺癌和睾丸癌中的一种或多种。