

说明书

发明名称: 包含TGF- β RII胞外区片段的融合蛋白、其药物组合物及用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物和医药领域,涉及一种包含TGF- β RII胞外区片段的融合蛋白、其药物组合物及用途。

背景技术

[0002] 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-Müllerian hormone)(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.]。

[0003] 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. Dev Dyn, 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 RI，活化的TGF- β RI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 RI和TGF- β RII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 RII。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).)。

[0004] 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	INHα	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		
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 ; ActRIA/ALK-2	BMPRII ; ActRIIB; ActRII
BMP-6	BMP6	Vgr1 (Vg1-related protein)	BMPRIB/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3 ;	BMPRII ; ActRIIB; ActRII

			ActRIA/ALK-2	
BMP-7	BMP7	OP-1 (osteogenic protein-1)	BMPRII/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3 ; ActRIA/ALK-2	BMPRII ; ActRIIB ; ActRII
BMP-8A	BMP8A	OP-2	BMPRII/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3 ; ActRIA/ALK-2	BMPRII ; ActRIIB ; ActRII
BMP-8B	BMP8B	OP-3	BMPRII/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3 ; ActRIA/ALK-2	BMPRII ; ActRIIB ; ActRII
BMP-9	GDF2	GDF-2	BMPRII/ALK-6 ; ActRLI/ALK-1	BMPRII ; ActRIIB ; ActRII
BMP-10	BMP10		BMPRII/ALK-6 ; ActRLI/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	BMPRII/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3	BMPRII ; ActRIIB ; ActRII
GDF-6	GDF6	CDMP-2, BMP-13	BMPRII/ALK-6 ; BMPRIA/ALK-3	BMPRII ; ActRIIB ; ActRII
GDF-7	GDF7	CDMP-3, BMP-12	BMPRII/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)	BMPRIA/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			

[0005] 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,Battle,Joan,etal.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FasL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。

[0006] 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)。

- [0007] CD155(又称为PVR、Nect5或Tage4)、CD112(又称为PVRL2/necl2)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、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)。

- [0008] 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. PVRIG

and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8+T-cell Function.Cancer ImmunolRes 2019; 7:257-68)。

[0009] 目前，仍有必要开发新的包含TGF- β 受体特别是包含TGF- β RII胞外区片段的融合蛋白，例如同时包含抗TIGIT抗体的融合蛋白。

[0010] 发明内容

[0011] 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- β R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 ，甚至克服了易于断裂或降解的缺陷，具有制备抗肿瘤药物的潜力。由此提供了下述发明：

[0012] 本发明的一个方面涉及一种融合蛋白，其包含：

[0013] 靶向免疫检查点的第一蛋白功能区，和

[0014] 具有TGF- β 结合活性的第二蛋白功能区，

[0015] 其中，

[0016] 所述第二蛋白功能区是TGF- β RII胞外区片段的变体，并且所述TGF- β RII胞外区片段的变体是：

[0017] TGF- β RII胞外区片段的N末端的第一个丝氨酸被替换为丙氨酸、甘氨酸或者苏氨酸；和/或，TGF- β RII胞外区片段中删除了包含SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的片段。

[0018] 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 RII胞外区片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:37所示。

[0019] 在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，被删除的包含SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的片段，其氨基酸序列如SEQ ID NO:59至SEQ ID NO:65中的任一序列所示。

[0020] 在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，

[0021] 所述TGF- β RII胞外区片段的变体的氨基酸序列如SEQ ID NO:49至SEQ ID NO:58中的任一序列所示。

[0022] 在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，所述免疫检查点为选自PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG3和TIGIT中的一种或多种。

- [0023] 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为抗PD-1抗体或其抗原结合片段。
- [0024] 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为抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。
- [0025] 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为抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段。
- [0026] 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为抗LAG3抗体或其抗原结合片段。
- [0027] 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为抗TIGIT抗体或其抗原结合片段。
- [0028] 在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，
- [0029] 所述抗TIGIT抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含HCDR1至HCDR3，所述轻链可变区包含LCDR1至LCDR3，其中：
- [0030] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示、HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示和HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示，并且
- [0031] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示、LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。
- [0032] 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
- [0033] 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。
- [0034] 在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，其中，
- [0035] 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；
- [0036] 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；

- [0037] 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;
- [0038] 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;
- [0039] 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;
- [0040] 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;
- [0041] 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;
- [0042] 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
- [0043] 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。
- [0044] 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。
- [0045] 在本发明的一些实施方式中,所述的融合蛋白,其中,
- [0046] 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。
- [0047] 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或Ig gamma-4 chain C region;轻链恒定区为Ig kappa chain C region。
- [0048] 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)。
- [0049] 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。

- [0050] 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- β 1、TGF- β 2和/或TGF- β 3；优选地，所述EC₅₀通过间接ELISA方法测得。
- [0051] 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。
- [0052] 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，
- [0053] 当所述抗TIGIT抗体的重链恒定区为IgG1时，重链恒定区具有如下突变组合之一：
- [0054] L234A和L235A；
- [0055] L234A和G237A；
- [0056] L235A和G237A；或者
- [0057] L234A、L235A、G237A；
- [0058] 当所述抗TIGIT抗体的重链恒定区为IgG4时，重链恒定区具有如下突变组合之一：
- [0059] F234A和L235A；
- [0060] F234A和G237A；
- [0061] L235A和G237A；或者
- [0062] F234A、L235A、G237A。
- [0063] 在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白：
- [0064] 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。
- [0065] 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述第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接。
- [0066] 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SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:70所示的多肽，或者为由多个(例如2、3、4、5或6个)SEQ ID NO:69所示多肽串联得到的多肽，或者为由多个(例如2、3、4或5

个)SEQ ID NO:69所示多肽串联并进一步与SEQ ID NO:70所示多肽串联得到的多肽;

[0067] 优选地,所述连接片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:66所示。

[0068] 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和第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上。

[0069] 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连接在第一蛋白功能区的C末端。

[0070] 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连接在抗TIGIT抗体的重链的C末端。

[0071] 本发明涉及一种融合蛋白,其包含:

[0072] 靶向TIGIT的第一蛋白功能区,和

[0073] 具有TGF- β 结合活性的第二蛋白功能区;

[0074] 其中,

[0075] 所述第一蛋白功能区为1个,所述第二蛋白功能区为2个;

[0076] 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 RII胞外区片段的变体;

[0077] 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;

[0078] 所述TGF- β RII胞外区片段的变体的氨基酸序列如SEQ ID NO:49至SEQ ID NO:58中的任一序列所示;

[0079] 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;

[0080] 优选地,所述连接片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:66所示。

[0081] 不拘于理论的限制,有一些TGF- β R融合蛋白不稳定,存在TGF- β R断裂的问题,导致融合蛋白结构不完整,为其在生产过程中的工艺和质量控制带来一定的难度,从而影响了融合蛋白的纯度和质量均一性,进而引发药物安全性和有效性方面的问题。在实际生产和应用中,也有必要开发更稳定的抗体/TGF- β R融合蛋白。

- [0082] 在本发明的一些实施方式中，所述的融合蛋白，与使用TGF- β RII胞外区片段(例如SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:37)的融合蛋白相比，所述TGF- β RII胞外区片段的变体在重组表达时具有更少的断裂和/或降解。
- [0083] 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；
- [0084] 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；
- [0085] 优选地，所述非小细胞肺癌为晚期非小细胞肺癌。
- [0086] 在广义上，本发明的融合蛋白也可以称为抗体。
- [0087] 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。
- [0088] 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。
- [0089] 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，或者本发明的载体。
- [0090] 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。
- [0091] 在本发明的一些实施方式中，所述的偶联物，其用于治疗 and/或预防肿瘤；
- [0092] 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；
- [0093] 优选地，所述非小细胞肺癌为晚期非小细胞肺癌。
- [0094] 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。
- [0095] 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或者本发明的偶联物；可选地，所述药物组合物还包括一种或多种药学上可

接受的辅料(例如载体和/或赋形剂);可选地,所述药物组合物还包含一种或多种肿瘤化疗药物。

- [0096] 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、200mg-800mg、300mg-600mg、400mg-500mg或者450mg。
- [0097] 在本发明的一些实施方式中,所述药物组合物为注射剂。
- [0098] 在本发明的一些实施方式中,所述的药物组合物,其中,本发明中任一项所述的融合蛋白或者本发明的偶联物是唯一活性成分。
- [0099] 在本发明的一些实施方式中,所述的药物组合物,其由本发明中任一项所述的融合蛋白或者本发明的偶联物与一种或多种药学上可接受的辅料组成。
- [0100] 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;
- [0101] 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;
- [0102] 优选地,所述非小细胞肺癌为晚期非小细胞肺癌。
- [0103] 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;
- [0104] 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;
- [0105] 优选地,所述非小细胞肺癌为晚期非小细胞肺癌。
- [0106] 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融合蛋白或者本发明的偶联物的步骤为在手术治疗之前或之后,和/或在放射治疗之前或之后。
- [0107] 在本发明的一些实施方式中,所述的方法,其中,

- [0108] 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；
- [0109] 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；
- [0110] 优选地，给药方式为静脉滴注或静脉注射。
- [0111] 应注意的是，剂量可随需要治疗的症状的类型和严重性不同而发生变化。此外，本领域技术人员理解，对于任一特定患者，特定的给药方案应根据患者需要和医生的专业评价而随时间调整；此处给出的剂量范围只用于举例说明目的，而不限定本发明的融合蛋白或者药物组合物的使用或范围。
- [0112] 在本发明中，所述受试者可以为哺乳动物，例如人。
- [0113] 本发明的再一方面涉及一种TGF- β RII胞外区片段的变体，其为：
- [0114] TGF- β RII胞外区片段的N末端的第一个丝氨酸被替换为丙氨酸、甘氨酸或者苏氨酸；或者，
- [0115] TGF- β RII胞外区片段中删除了包含SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的片段；
- [0116] 优选地，所述TGF- β RII胞外区片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:37所示。
- [0117] 在本发明的一些实施方案中，所述的TGF- β RII胞外区片段的变体，其中，所述被删除的包含SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的片段，其氨基酸序列如SEQ ID NO:59至SEQ ID NO:65中的任一序列所示。
- [0118] 在本发明的一些实施方案中，所述的TGF- β RII胞外区片段的变体，其中，
- [0119] 所述TGF- β RII胞外区片段的变体的氨基酸序列如SEQ ID NO:49至SEQ ID NO:58中的任一序列所示。
- [0120] 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)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。

- [0121] 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：
- [0122] 鼠源TIGIT单抗的HCDR和LCDR
- [0123] HCDR1: GHSFTSDYA(SEQ ID NO:3)
- [0124] HCDR2: ISYSDST(SEQ ID NO:4)
- [0125] HCDR3: ARLDYGNYGGAMDY(SEQ ID NO:5)
- [0126] LCDR1: QHVSTA(SEQ ID NO:8)
- [0127] LCDR2: SAS(SEQ ID NO:9)
- [0128] LCDR3: QQHYITPWT(SEQ ID NO:10)
- [0129] 人源化TIGIT单抗的3个HCDR和3个LCDR与鼠源TIGIT单抗相同。
- [0130] 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，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。
- [0131] 如本文中所使用的，术语 EC_{50} 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。
- [0132] 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。

- [0133] 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。
- [0134] 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)。
- [0135] 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. 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; 2:1121-1123)。

[0136] 如本文中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)。

[0137] 如本文中所使用的, 术语“单链抗体(single chain fragment variable, ScFv)”是指, 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: NH_2-V_L -连接片段- V_H-COOH 或 NH_2-V_H -连接片段- V_L-COOH 。合适的现有技术接头由重复的GGGGS(SEQ ID NO:69)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(SEQ ID NO:66)的接头, 但也可使用其变体(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。

[0138] 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

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。

[0139] 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。

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] 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。

- [0144] 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。
- [0145] 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。
- [0146] 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。
- [0147] 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。
- [0148] 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。

[0149] 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。

[0150] 发明的有益效果

[0151] 本发明取得了如下技术效果(1)–(8)项中的任意一项或者多项：

[0152] (1)本发明的融合蛋白能够同时抑制TIGIT和降低TGF- β 水平。

[0153] (2)本发明的融合蛋白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。

[0154] (3)本发明的融合蛋白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。

[0155] (4)本发明的融合蛋白具有良好的制备抗肿瘤药物的潜力。

[0156] (5)本发明的融合蛋白的第一蛋白功能区和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，例如优于单用抗TIGIT抗体。

[0157] (6)本发明的融合蛋白能有效地阻断TIGIT所诱导的免疫细胞的免疫抑制，诱导细胞分泌IL-2。

[0158] (7)本发明的融合蛋白能有效地阻断TGF- β 所诱导的免疫细胞的免疫抑制，诱导细胞分泌INF- γ 。

[0159] (8)本发明的融合蛋白克服了易断裂和降解的缺陷。

附图说明

[0160] 图1：TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、RG6058(hG4)与抗原TIGIT-mFc的结合活性检测结果。

[0161] 图2：TF01、TF02、TGF- β RII-mFc与TGF- β 1的结合活性检测结果。

[0162] 图3：TF01、TF02、TGF- β RII-mFc与TGF- β 2的结合活性检测结果。

[0163] 图4：TF01、TF02、TGF- β RII-mFc与TGF- β 3的结合活性检测结果。

- [0164] 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。
- [0165] 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。
- [0166] 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。
- [0167] 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。
- [0168] 图9: TF01与CD155竞争结合细胞膜表面抗原TIGIT检测结果。
- [0169] 图10: TF01与CD112竞争结合细胞膜表面抗原TIGIT检测结果。
- [0170] 图11: TF01与Fc γ RI的亲和力常数检测结果。
- [0171] 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。
- [0172] 图14: 26B12H2L2(hG1WT)与Fc γ RIIIa_V158的亲和力常数检测结果图。
- [0173] 图15: TF01与Fc γ RIIIa_F158的亲和力常数检测结果。
- [0174] 图16: 26B12H2L2(hG1WT)与Fc γ RIIIa_F158的亲和力常数检测结果。
- [0175] 图17: TF01与Fc γ RIIa_H131的亲和力常数检测结果。
- [0176] 图18: 26B12H2L2(hG1WT)与Fc γ RIIa_H131的亲和力常数检测结果。
- [0177] 图19: TF01与Fc γ RIIa_R131的亲和力常数检测结果。
- [0178] 图20: 26B12H2L2(hG1WT)与Fc γ RIIa_R131的亲和力常数检测结果。
- [0179] 图21: TF01与Fc γ RIIb的亲和力常数检测结果。
- [0180] 图22: 26B12H2L2(hG1WT)与Fc γ RIIb的亲和力常数检测结果。
- [0181] 图23: TF01与C1q的亲和力常数检测结果。
- [0182] 图24: 26B12H2L2(hG1WT)与C1q的亲和力常数检测结果。
- [0183] 图25: RG6058(hG1WT)、RG6058(hG4WT)、26B12H2L2(hG1WT)、TF01的ADCP效应结果。
- [0184] 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。

- [0185] 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。
- [0186] 图28: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白在Jurkat-TIGIT和HT1080-aCD3sc Fv细胞共培养体系中促IL-2分泌的生物活性评价结果。
- [0187] 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。
- [0188] 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: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。
- [0189] 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。
- [0190] 图32: 抗体TF01A、TF01G、TF01T、TF01t31和TF01t37促进Jurkat-TIGIT和HT1080-aCD3sc Fv细胞共培养体系中IL-2分泌的生物活性评价结果。
- [0191] 图33: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白对TGF- β 1抑制IL-4诱导的TF-1增殖的中和作用评价结果。
- [0192] 图34: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白对TGF- β 3抑制IL-4诱导的TF-1增殖的中和作用评价结果。
- [0193] 图35: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白阻断TGF- β 1和TGF- β R相互作用的报告基因实验评价结果。
- [0194] 图36: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白阻断TGF- β 3和TGF- β R相互作用的报告基因实验评价结果。
- [0195] 图37: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白阻断TIGIT和PVR相互作用的报告基因实验评价结果。
- [0196] 图38: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白TF01分子量检测结果。
- [0197] 图39: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白TF01A分子量检测结果。
- [0198] 图40: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白TF01G分子量检测结果。
- [0199] 图41: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白TF01T分子量检测结果。
- [0200] 图42: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白TF01t31分子量检测结果。

- [0201] 图43: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白TF01t37分子量检测结果。
- [0202] 图44: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白TF01的SEC-HPLC分析结果图。
- [0203] 图45: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白TF01T的SEC-HPLC分析结果图。
- [0204] 图46: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白与TGF- β 1的结合活性结果图。
- [0205] 图47: 混合淋巴细胞反应检测抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白促IFN- γ 分泌的生物活性。
- [0206] 涉及保藏的生物材料:
- [0207] 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。
- [0208] 本发明涉及的部分序列如下:
- [0209] 1. 26B12VH的氨基酸序列
- EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGHSFTSDYAWNWIRQFPGNRLEWMG
YISYSDSTNYPNPSLKSRLSITRDTSKNQFFLQMNSVTTEDTATYYCARLDYGNYG
GAMDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO: 1)**
- [0210] 2. 26B12VH的核酸序列
- GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCTGGTGAAACCCTCTCAG
TCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCCACTCATTACACAGTGATTATG
CCTGGAACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAGACTGGAGTGGATGGGCT
ACATAAGCTACAGTGATAGCACTAACTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAAT
CTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTTGCAGATGAATTCT
GTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGATTGGACTATGGTA
ACTACGGTGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGGACCTCAGTCACCGTCT
CCTCA(SEQ ID NO: 2)**
- [0211] 3.HCDR1:
- GHSFTSDYA(SEQ ID NO: 3)**
- [0212] 4.HCDR2:
- ISYSDST(SEQ ID NO: 4)**
- [0213] 5.HCDR3:
- ARLDYGNYGAMDY(SEQ ID NO: 5)**

[0214] 6.26B12VL的氨基酸序列

DIVLTQSHEFMSTSLRDRVSITCKSSQHVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS

YRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVKAEDLAVYYCQQHYITPWTFGGGTKLEI

K(SEQ ID NO: 6)

[0215] 7. 26B12VL的核酸序列

**GATATTGTGCTAACTCAGTCTCACGAATTCATGTCCACCTCATTACGAG
ACAGGGTCAGCATCACCTGCAAATCCAGTCAACATGTGAGTACTGCTGTAGC
CTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTCGGCA
TCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGA
CGGATTTCACTTTACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA
TTACTGTCAGCAACATTATATTACTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAG
CTGGAAATAAAA(SEQ ID NO: 7)**

[0216] 8.LCDR1:

QHVSTA(SEQ ID NO: 8)

[0217] 9.LCDR2:

SAS(SEQ ID NO: 9)

[0218] 10.LCDR3:

QQHYITPWT(SEQ ID NO: 10)

[0219] 11. 26B12H1VH的氨基酸序列

**DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWNWIQFPGKGLEWIGY
ISYSDSTNYPNPSLKSRITISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCARLDYGNVGG
AMDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO: 11)**

[0220] 12. 26B12H1VH的核酸序列

**GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCCAG
ACCTGTCTCTGACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTCACATCCGACTACG
CCTGGAAGTGGATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCT**

ACATCTCTTATAGCGACTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGAT
CACCATCAGCAGAGATACATCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGC
GTGACAGCCGCCGACACCGCCACATACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTG
AGCTCC(SEQ ID NO: 12)

[0221] 13. 26B12H2VH的氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKLEWIGY
ISYSDSTNYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGYGG
AMDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO: 13)

[0222] 14. 26B12H2VH的核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAG
ACCCGTGCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACG
CCTGGTCTTGGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCT
ACATCTCTATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTCGGGT
GACCATCTCTAGAGATACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCC
GTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCGGTGACAGTG
TCTAGC(SEQ ID NO: 14)

[0223] 15. 26B12H3VH的氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKLEWIGY
ISYSDSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGYGG
AMDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO: 15)

[0224] 16. 26B12H3VH的核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAG
ACCCGTGCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACG
CCTGGTCTTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCT

ACATCTCTATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTAGAGT
GACCATCTCTGTGGATACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCC
GTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCGGTGACAGTG
TCTAGC(SEQ ID NO: 16)

[0225] 17. 26B12H4VH的氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWNWIRQFPGKGLEWMG
YISYSDSTNYPNPSLKSRLTISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCARLDYGNYG
GAMDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO: 17)

[0226] 18. 26B12H4VH的核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCCAG
ACCTGTCTCTGACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTCACATCCGACTACG
CCTGGAAGTGGATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCT
ACATCTCTTATAGCGACTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGAT
CACCATCAGCAGAGATACATCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGC
GTGACAGCCGCCGACACCGCCACATACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTG
AGCTCC(SEQ ID NO: 18)

[0227] 19. 26B12L1VL的氨基酸序列

DIQMTQSPKSLSTSVGDRVITICRSSQHVSTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSAS
YRYSQVPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 19)

[0228] 20. 26B12L1VL的核酸序列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCCTGTCTACAAGCGTGGGCG
ATCGGGTGACCATCACATGTAGAAGCTCCCAGCACGTGTCTACCGCAGTGG
CATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCG

CCTCTTACAGGTATTCCGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCTCTG
GCACCGATTTCACCTTTACAATCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCAC
ATACTATTGCCAGCAGCACTACATCACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACA
AAGCTGGAGATCAAG(SEQ ID NO: 20)

[0229] 21. 26B12L2VL的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLASVGDRTITICRSSQHVSTALAWYQQKPGKSPKLLIYSAS
SRYSGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK(
SEQ ID NO: 21)

[0230] 22. 26B12L2VL的核酸序列

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

[0231] 23. 26B12L3VL的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQHVSTALAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK(
SEQ ID NO: 23)

[0232] 24. 26B12L3VL的核酸序列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGC
GATAGGGTGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGCACGTGAGCACAGCCCTG
GCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTATAGC
GCCTCTAGCCTGCAGTCCGGAGTGCCATCTCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCC
GGAACCGACTTTACCCTGACAATCTCCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTCCGCA

CATACTATTGCCAGCAGCACTACATCACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCAC
CAAGCTGGAGATCAAG(SEQ ID NO: 24)

[0233] 25. 26B12L4VL的氨基酸序列

DIQMTQSPKSMSTSVGDRTITCRSSQHVSTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSAS
YRYSQVPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 25)

[0234] 26. 26B12L4VL的核酸序列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCATGTCTACAAGCGTGGGCG
ACAGGGTGACCATCACATGTAGAAGCTCCCAGCACGTGTCTACCGCAGTGG
CATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCG
CCTCTTACAGGTATTCCGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCTCTG
GCACCGATTTACCTTTACAATCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCAC
ATACTATTGCCAGCAGCACTACATCACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACA
AAGCTGGAGATCAAG(SEQ ID NO: 26)

[0235] 27. 26B12H2L2(hG4DM)重链的氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGY
ISYSDSTNYPNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGNYYGG
AMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTITTCNVDPKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVME
ALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 27)

[0236] 28. 26B12H2L2(hG4DM)重链的核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAG

ACCCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCGGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACG
CCTGGTCTTGGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCT
ACATCTCCTATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTCGGGT
GACCATCTCTAGAGATACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCC
GTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTG
TCTAGCGCCTCCACAAAGGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCA
GGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCGAACCAGGTGACGGTGTCGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG
TACACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG
CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAA
CGTAGATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAA
ATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCTGGGGGACC
ATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAG
GTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAAGGCCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCAGGAGGAGA
TGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA
AGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAG
GCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCTGGGT(SEQ ID NO: 28)

[0237] 29. 26B12H2L2(hG4DM)轻链的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRSSQHVSTALAWYQQKPGKSPKLLIYSAS
SRYSGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQGHYITPWTFGGGTKLEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC(S
EQ ID NO: 29)

[0238] 30. 26B12H2L2(hG4DM)轻链的核酸序列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGGCG
ATAGGGTGACCATCACATGTAGATCTAGCCAGCACGTGTCTACAGCCCTGGC
ATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGC
CTCCTCTAGGTATTCTGGAGTGCCAGACCGGTTTTCCGGCTCTGGCAGCGGC
ACCGATTTACCTTTACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACAT
ACTATTGCCAGCAGCACTATATCACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACCA
GCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCAGCCCCATCTGTCTTCATTTTTCCCCCT
AGTGACGAGCAGCTGAAATCCGGAACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAAC
AATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGTCGATAACGCTCTGC
AGAGTGGCAATTCACAGGAGAGCGTGACTGAACAGGACTCCAAGGATTCTA
CCTATAGTCTGAGCTCCACTCTGACCCTGTCCAAAGCAGATTACGAAAAGCA
CAAAAGTGATGCCTGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGTTCTCCAGTCAC
CAATCCTTCAACAGAGGCGAATGT (SEQ ID NO: 30)

[0239] 31. 26B12H2L2(hG1DM)重链氨基酸序列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKLEWIGY
ISYSDSTNYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGN YGG
AMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 31)

[0240] 32. 26B12H2L2(hG1DM)重链核酸序列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAG
ACCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACG
CCTGGTCTTGGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCT
ACATCTCCTATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTCGGGT
GACCATCTCTAGAGATACAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCC
GTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGC
AATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTG
TCTAGCGCCTCTACCAAGGGGGCCAGCGTGTTTCTCTCGCCCCCTCCTCCA
AAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACT
TCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAG
TCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAG
CGTTCGTACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAA
CGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAA
ATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAAGCTGCT
GGAGGCCCTAGCGTCTTCTCTTTCTCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGA
TCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTCTGTCGTGGATGTCAGCCATGAGG
ACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCTGATGGCGTCGAGGTGCACAACG
CCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGT
CCGTGCTGACAGTCTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCATTGAGAAGACCATCAGCA
AGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCA
GGGACGAACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCT
TTTATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGA
ATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCTCTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTT
GTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTT
CTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAG
CCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA (SEQ ID NO: 32)

[0241] 33.TGF- β RII胞外区片段(截取)的氨基酸序列:

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKK
PGETFFMCSRSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 33)

[0242] 34.TGF- β R I 的氨基酸序列: (下划线部分为胞外区的序列)

MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAALLPGATALLQCFCHLCTKDNFTCVT
DGLCFVSVTETTTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDH
CNKIELPTTVKSSPGLGPVELAAVIAGPVCFVCISLMLMVYICHNRTVIHHRVPN
EEDPSLDRPFISEGTTTKDLIYDMTTSGSGSGLPLLQRTIARTIVLQESIGKGRF
GEVWRGKWRGEEVAVKIFSSREERSWFREAEIYQTVMLRHENILGFIAADNKD
NGTWTQLWLVS DYHEHGS LFDYLNRYTVTVEGMIKLALSTASGLAHLHMEIVG
TQGKPAIAHRDLKSKNILVKNGTCCIADLGLAVRHDSATDTIDIAPNHRVGTK
RYMAPEVLDD SINMKHFESFKRADIYAMGLVFWEIARRCSIGGIHEDYQLPYD
LVPSDPSVEEMRKVVCEQKL RP NIPNRWQSCEALRVMAKIMREC WYANGAAR
LTALRIKKTLSQLSQEGIKM (SEQ ID NO: 34)

[0243] 35.TGF- β R I 胞外区的氨基酸序列:

LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFV
CAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPVEL (SEQ ID NO: 35)

[0244] 36.TGF- β R II 的氨基酸序列: (下划线部分为胞外区序列)

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQL
CKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPOEVCVAVWRKNDENITLETVCHDP
KLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETTFMCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPDL
LLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQKLSSTWETGKTRKLMFSEHC
AILED RSDISSTCANNINHNTELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFE
TVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAEERKTEL GKQYWLITAF
HAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSSLARGIAHLSDHTPCGRPKMPIVHRDL
KSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQVGTARYMAPEVLESRM
NLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFSGSKVREHPCVESM

KDNVLRDRGRPEIPSWLNLHQGIQMV CETLTECWDHDP EARLTAQCVAERFSE
LEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK (SEQ ID NO: 36)

[0245] 37.TGF- β R II 胞外区的氨基酸序列:

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSI
TSICEKPOEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKK
KPGETTFMCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPDLLLVIQ (SEQ ID NO: 37)

[0246] 38.TGF- β R III 的氨基酸序列: (下划线部分为胞外区序列)

MTSHYVIAIFALMSSCLATAGPEPGALCELSPVASHPVQALMESFTVLSGC
ASRGTTGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQLQREVTLHLNPISSVHIIHKSVVFLLS
PHPLVWHLKTERLATGVSRLFLVSEGSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHL
LNWARKEYGAVTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFLSLNYLAEYLQ
KAAEGCVMSSQPONEEVHIIELITPNSNPYSAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILI
LKCKKSVNWVIKSFQVKGSLKIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDDIPSTQGNL
VKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHLRLNNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPG
ALPALQNPPIRGGEGQNGGLPFPFDPISRRVWNEEGEDGLPRPKDPVIPSILF
GLREPEEVQGSVDIALSVKCDNEKMIVAVEKDSFOASGYSGMDVTLDDPTCKAK
MNGTHFVLESPLNGCGTRPRWSALDGVVYYNSIVIQVPALGDSSGWPDPGYEDL
ESGDNGFPGDMDEGDASLFTREIVVFNCSLQQVRNPSSFQEQPHGNITFNMEL
YNTDLFLVPSQGVFSVPENGHVYVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSPDRMSH
YTHIENICPKDES VKFYSPKRVHFPPIQADMDKKRFSFVFKPVFNTSLLFLQCELT
LCTKMEKHPQKLPKCVPPDEACTSLDASHWAMMQNKKTFTKPLAVIHHEAES
KEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDTLTYMGIAFAAFVIGALLTGALWYIYSHTGETA
 GRQQVPTSPASENSSAAHSIGSTQSTPCSSSTA (SEQ ID NO: 38)

[0247] 39.TGF- β R III 胞外区的氨基酸序列:

GPEPGALCELSPVASHPVQALMESFTVLSGCASRGTTGLPQEVHVLNLRT
 AGQGPGQLQREVTLHLNPISSVHIIHKSVVFLLSPHPLVWHLKTERLATGVS
 RFLVSEGSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLNWARKEYGAVTSFTELKIA

 RNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFLSLNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHII
 ELITPNSNPYSAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILKCKKSVNWVIKSFQVKGSL
 KIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDDIPSTQGNLVKWALDNGYSPITSYTMAPV
 ANRFHLRLNNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALPALQNPPIRGGEGQNGGL
 PFPFDPISRRVWNEEGEDGLPRPKDPVIPSILFPGGLREPEEVQGSVDIALSVKCD
 NEKMIVAVEKDSFQASGYSGMDVTLDDPTCKAKMNGTHFVLESPLNGCGTRPR
 WSALDGVVYYNSIVIQVPALGDSSGWPDPGYEDLES GDNGFPGDMDEGDASLFT
 REIVVFNC SLQQVRNPSSFQEQPHGNITFNMEYNTDLFLVPSQGVFSVPENGHV
 YVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSPDRMSHYTHIENICPKDES VKFYSPKRVH
 FPIQADMDKKRFSFVFKPVFNTSLLFLQCELT LCTKMEKHPQKLPKCVPPDEA
 CTSLDASHWAMMQNKKTFTKPLAVIHHEAESKEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDT
 LTV (SEQ ID NO: 39)

[0248] 40.Tiragolumab重链的氨基酸序列:

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLG
KTYRFRKWYSDYAVSVKGRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTRESTTY
DLLAGPFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

[0249] 41. Tiragolumab轻链的氨基酸序列:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKKYLAWYQQKPGQPPN
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSTPFTFGP
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSF
NRGEC (SEQ ID NO: 41)

[0250] 42. RG6058(hG4)重链可变区的氨基酸序列:

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLG
KTYRFRKWYSDYAVSVKGRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTRESTTY
DLLAGPFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 42)

[0251] 43. RG6058(hG4)轻链可变区的氨基酸序列:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKKYLAWYQQKPGQPPN
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSTPFTFGP
GTKVEIK (SEQ ID NO: 43)

[0252] 44. 连接片段的氨基酸序列:

GGGGSGGGSGGGSGGGGSG (SEQ ID NO: 44)

[0253] 45. anti-HEL&TGF β 抗体重链氨基酸序列

EVQLEQSGAELMKPGASVKISKATGYTFTTYWIEWIKQRPGHSLEWIGEI
LPGSDSTYYNEKVKGKVTFTADASSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGFYVY
WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTITTCNVDPKPSNTKVDKRV
SKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNH
YTQKSLSLSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGA
VKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPEVCVAVWRKNDENITL
TVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCKIMKEKKKPGETTFMCSGSSDECNDNIIFSEY
NTSNPD (SEQ ID NO: 45)

[0254] 46.anti-HEL&TGF β 抗体轻链氨基酸序列

DIELTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSSNNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQ

SMSGIPSRFSGSGGTDFTLINSVETEDFGVYFCQQSGSWPRTFGGGTKLDIKR
TVAAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 46)

[0255] 47.RG6058(G1DM)的重链氨基酸序列

EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLG
KTYIRFKWYSDYAVSVKGRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTRESTTY
DLLAGPFDYWGGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 47)

[0256] 48.RG6058(G1DM)的轻链氨基酸序列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKKYLAWYQQKPGQPPN
LLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLAEDVAVYYCQYYSTPFTFGP
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC (SEQ ID NO: 48)

[0257] 49.TF01A的TGF- β RII胞外区片段变体的氨基酸序列:

IPPHVQKAVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKIMKEKKK
PGETFFMCSSDECNDNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 49)

[0258] 50.TF01G的TGF- β RII胞外区片段变体的氨基酸序列:

IPPHVQKGVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT

SICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKIMKEKKK
PGETFFMCSSDECNDNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 50)

[0259] 51.TF01T的TGF- β RII胞外区片段变体的氨基酸序列:

IPPHVQKTVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT
SICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKIMKEKKK
PGETFFMCSSDECNDNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 51)

[0260] 52.TF01t31抗体TGF- β RII胞外区片段变体的氨基酸序列:

VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE
VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKIMKEKKKPPGETFFM
CSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 52)

[0261] 53.TF01t37抗体TGF- β RII胞外区片段变体的氨基酸序列:

VTNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW
RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKIMKEKKKPPGETFFMCSSDE
CNDNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 53)

[0262] 54.TGF- β RII胞外区片段的变体

NNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV
CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKIMKEKKKPPGETFFMC
SSDECNDNIIFSEYNTSNPD (SEQ ID NO: 54)

[0263] 55.TGF- β RII胞外区片段的变体

NDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVVC
VAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKKPGETFFMCSC
SSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 55)

[0264] 56.TGF- β RII胞外区片段的变体

DMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCV

AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKKPGETFFMCSCS
SDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 56)

[0265] 57.TGF- β RII胞外区片段的变体

MIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CVA
VWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKKPGETFFMCSCSS
DECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 57)

[0266] 58.TGF- β RII胞外区片段的变体

IVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV CAV
WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKKPGETFFMCSCSSD
ECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 58)

[0267] 59.TGF- β RII胞外区片段中被删除的片段

IPPHVQKS (SEQ ID NO: 59)

[0268] 60.TGF- β RII胞外区片段中被删除的片段

IPPHVQKSVNNDMI (SEQ ID NO: 60)

[0269] 61.TGF- β RII胞外区片段中被删除的片段

IPPHVQKSV (SEQ ID NO: 61)

[0270] 62.TGF- β RII胞外区片段中被删除的片段

IPPHVQKSVN (SEQ ID NO: 62)

[0271] 63.TGF- β RII胞外区片段中被删除的片段

IPPHVQKSVNN (SEQ ID NO: 63)

[0272] 64.TGF- β RII胞外区片段中被删除的片段

IPPHVQKSVNND (SEQ ID NO: 64)

[0273] 65.TGF- β RII胞外区片段中被删除的片段

IPPHVQKSVNNDM (SEQ ID NO: 65)

[0274] 66.连接片段

GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 66)

[0275] 67.hIgG4WT重链恒定区氨基酸序列

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS
LSLG (SEQ ID NO: 67)

[0276] 68.hIgG1WT重链恒定区氨基酸序列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 68)

[0277] 69.连接片段

GGGGS (SEQ ID NO: 69)

[0278] 70.连接片段

GGGGSG (SEQ ID NO: 70)

[0279] 71.B12-hG1重链氨基酸序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFIHWVRQAPGQRFWMG
WINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYS
WDDSPQDNYYMDVWGKGTTIVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
NHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 71)

[0280] 72.B12-hG1轻链氨基酸序列

EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSHISIRSRVAVYQHKGQAPRLVIHGV
SNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLER
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 72)

具体实施方式

[0281] 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。

[0282] BALB/c小鼠购自广东省医学实验动物中心。

[0283] C57小鼠购自广州中医药大学实验动物中心。

[0284] MDA-MB-231细胞，U87-MG细胞和TF-1细胞购自ATCC。

[0285] A549购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

[0286] 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。

[0287] 本发明所述Tiragolumab与RG6058(hG1WT)为同一个抗体。

[0288] 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。

- [0289] 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, 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。
- [0290] 在本发明的下述实施例中, 所用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。
- [0291] 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。
- [0292] 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。
- [0293] TGF- β 1蛋白购自Sino Biological Inc.公司, 货号: LC13DE3108。
- [0294] TGF- β 2蛋白购自peprotech公司, 货号: 0420345E0620。
- [0295] TGF- β 3蛋白购自peprotech公司, 货号: 0713410A0219。
- [0296] 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)。

- [0297] 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 LJ 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)。
- [0298] 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 LJ 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)。
- [0299] 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 LJ Virol.1998.72(11):8463-8471.其中所使用的慢病毒表达载体为pCDH-aCD3scFv-Puro(其中aCD3scFv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)。
- [0300] 在本发明的下述实施例中，所用的293T-TGF β R2-Luc细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。293T-TGF β R2-Luc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pCDH–hTGFB β 2FL–puro和pCDH–Smad3/4–Luc2P–Hygro(其中hTGFB β 2FL Genebank ID:NP_003233.4；载体pCDH–CMV–MCS–EF1–Puro，购自优宝生物，产品编号：VT1480；pCDH–Smad3/4–Luc2P–Hygro由康方构建)。

[0301] 在本发明的下述实施例中，所用的Jurkat–TIGIT–NFAT–Luc细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。Jurkat–TIGIT–NFAT–Luc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和pCDH–NFAT–hygro(其中TIGIT，Genebank ID:NP_776160.2；载体plenti6.3/V5 TOPO购自Invitrogen公司，产品编号：K531520；pCDH–NFAT–hygro由康方构建)。

[0302] 在本发明的下述实施例中，所用的CHO–aAPC–PDL1–PVR细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。CHO–aAPC–PDL1–PVR细胞系由PD–L1 aAPC/CHO–K1细胞(购自Promega公司)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–PVRFL–Puro(其中PVRFL Genebank ID:NP_006496.4；载体pCDH–CMV–MCS–EF1–Puro，购自优宝生物，产品编号：VT1480)。

[0303] 实施例1：抗TIGIT抗体的制备

[0304] 1.杂交瘤细胞株LT019的制备

[0305] 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命名为杂交瘤细胞株LT019，其分泌的单克隆抗体命名为26B12。

[0306] 杂交瘤细胞株LT019(又称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。

[0307] 2.抗TIGIT抗体26B12的制备

[0308] 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℃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。

[0309] 实施例2：抗TIGIT抗体26B12序列分析

[0310] 按照培养细胞细菌总RNA提取试剂盒(Tiagen，货号DP430)的方法，从实施例1中培养的LT019细胞株中提取mRNA。

[0311] 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。

[0312] 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。

[0313] 将TA克隆的产物直接进行测序，测序结果如下：

[0314] 重链可变区的核酸序列如SEQ ID NO:2所示，片段长363bp。

[0315] 其编码的氨基酸序列为SEQ ID NO:1所示，长度为121个氨基酸。

[0316] 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。

[0317] 轻链可变区的核酸序列如SEQ ID NO:7所示，长度为321bp。

[0318] 其编码的氨基酸序列为SEQ ID NO:6所示，长度为107个氨基酸。

[0319] 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。

[0320] 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

[0321] 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

[0322] 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)。

[0323] 设计的可变区序列如下面的表1所示。

[0324] 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

[0325] 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。

[0326] 并且上述8个抗体具有相同的HCDR1-HCDR3和LCDR1-LCDR3，如下：

[0327] 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；

[0328] 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。

- [0329] 2.人源化抗体26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4和26B12H4L4的制备
- [0330] 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。
- [0331] 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:
- [0332] pUC57simple-26B12H1、pUC57simple-26B12L1;
- [0333] pUC57simple-26B12H4、pUC57simple-26B12L1;
- [0334] pUC57simple-26B12H2、pUC57simple-26B12L2;
- [0335] pUC57simple-26B12H3、pUC57simple-26B12L2;
- [0336] pUC57simple-26B12H2、pUC57simple-26B12L3;
- [0337] pUC57simple-26B12H3、pUC57simple-26B12L3;
- [0338] pUC57simple-26B12H1、pUC57simple-26B12L4; 和
- [0339] pUC57simple-26B12H4、pUC57simple-26B12L4。
- [0340] 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ProteinA柱进行亲和纯化获得人源化抗体。

- [0341] 人源化抗体26B12H2L2本发明中也称为26B12H2L2(hG1WT)。
- [0342] 3、人源化抗体26B12H2L2(hG1DM)、26B12H2L2(hG4DM)的设计
- [0343] 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。
- [0344] 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号位点引进了苯丙氨酸到丙氨酸的点突变(F234A),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;轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示。
- [0345] 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。
- [0346] 实施例4: 抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白的序列设计和制备
- [0347] 1.序列设计
- [0348] 本发明中的抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白的组成如下面的表2。
- [0349] 表2: 抗TIGIT抗体和TGF-β R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

- [0350] 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。
- [0351] 2.抗体的表达和纯化
- [0352] 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。
- [0353] 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-β R的融合蛋白TF01和TF02。
- [0354] 实施例5：抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白(突变体)的序列设计和制备
- [0355] 对本发明中的抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白TF01中的TGF-β RII胞外区片段进行点突变，将TGF-β RII胞外区片段(SEQ ID NO:33)第8位的丝氨酸分别突变为丙氨酸、甘氨酸或苏氨酸，得到新的抗体分别命名为TF01A、TF01G和TF01T，其制备参考实施例4。
- [0356] 表3：抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白(突变体)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 胞外区片段变体	轻链
TF01A	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 29
TF01G	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 29
TF01T	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 29

- [0357] 实施例6：抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白(截断体)的序列设计和制备
- [0358] 将本发明中的抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白TF01中的TGF-β RII胞外区片段进行部分截断，删除序列IPPHVQKS，得到的融合蛋白命名为TF01c31；

删除序列IPPHVQKSVNNDMI，得到的融合蛋白命名为TF01t37，其制备参考实施例4。

[0359] 表4：抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白(截断体)的重链和轻链的组成

融合蛋白	IgG 部分的重	连接片段	TGF-βRII 胞外区片	轻链
------	----------	------	---------------	----

命名	链		段变体	
TF01t31	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 29
TF01t37	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 29

[0360] 实施例7：ELISA方法测定TF01、TF02与抗原或TGF-β 的结合活性

[0361] 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

[0362] 具体方法如下：

[0363] 用2μ g/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1μ g/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5)，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。

[0364] 检测结果如表5和图1所示。

[0365] 表5：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	

[0366] 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。

[0367] 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。

[0368] 2.间接ELISA方法分别测定TF01、TF02、TGF-β RII-mFc与TGF-β 1、TGF-β 2、TGF-β 3的结合活性

[0369] 具体方法如下：

[0370] 将TGF-β 1、TGF-β 2、TGF-β 3分别按照1 μg/mL、2 μg/mL、1 μg/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。

[0371] 检测结果如表6、表7、表8和图2、图3和图4所示。

[0372] 表6：ELISA检测TF01、TF02、TGF-β RII-mFc与TGF-β 1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	

[0373] 表7：ELISA检测TF01、TF02、TGF-β RII-mFc与TGF-β 2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	

[0374] 表8：ELISA检测TF01、TF02、TGF-β RII-mFc与TGF-β 3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)
EC ₅₀ (nM)	0.215	0.234	0.402

- [0375] 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-β 1、TGF-β 2、TGF-β 3的结合效率EC₅₀分别为0.207nM、0.477nM、0.215nM，TF02与TGF-β 1、TGF-β 2、TGF-β 3的结合效率EC₅₀分别为0.224nM、0.594nM、0.234nM，TGF-β R2-mFc(作为阳性对照)与TGF-β 1、TGF-β 2、TGF-β 3的结合效率EC₅₀分别为0.356nM、1.029nM、0.402nM。
- [0376] 结果显示，TF01、TF02具有有效结合TGF-β 1、TGF-β 2、TGF-β 3的活性，且呈剂量依赖关系。结果还显示，TF01、TF02、TGF-β RII-mFc均分别与TGF-β 1、TGF-β 2、TGF-β 3能够有效地结合，并且TF01、TF02与TGF-β 1、TGF-β 2、TGF-β 3的结合能力强于TGF-β RII-mFc。
- [0377] 实施例8：竞争ELISA方法分别测定TF01、TF02与TGF-β RII-His-Biotin竞争结合人TGF-β 1、TGF-β 3的活性
- [0378] 实验步骤：将TGF-β 1和TGF-β 3，2μg/mL分别包被酶标板后，4℃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-β 1酶标板：室温孵育60分钟后用PBST洗板3次后加入0.01μg/mL的TGF-β RII-His-Biotin置于室温条件下孵育10分钟，针对TGF-β 3酶标板：37℃孵育30分钟后用PBST洗板3次后加入0.01μg/mL的TGF-β RII-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。

[0379] 抗体与TGF-β RII-His-Biotin竞争结合TGF-β 1和TGF-β 3的活性的结果见表9、表10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-β RII-His-Biotin竞争结合TGF-β 1和TGF-β 3的EC₅₀，结果如下表9、表10所示。

[0380] 表9：TF01、TF02与TGF-β RII-His-Biotin竞争结合TGF-β 1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	

[0381] 表10：TF01、TF02与TGF-β RII-His-Biotin竞争结合TGF-β 3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	

- [0382] 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-β RII-His-Biotin竞争结合TGF-β 1的结合效率EC₅₀分别为5.579nM、7.469nM、6.475nM，TF01、TF02、TGF-β RII-mFc与TGF-β RII-His-Biotin竞争结合TGF-β 3的结合效率EC₅₀分别为3.569nM、3.879nM、2.808nM。
- [0383] 结果显示，TF01、TF02能够有效地结合TGF-β 1和TGF-β 3，且呈剂量依赖关系。并且TF01结合TGF-β 1的能力要强于TGF-β RII-His-Biotin。TF01与TGF-β RII-His-Biotin竞争结合TGF-β 1的能力要强于TGF-β RII-mFc。
- [0384] 实施例9：竞争ELISA方法测定TF01、TF02与CD155-hFc-Biotin竞争结合人TIGIT-mFc的活性
- [0385] 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4 μg/mL(终浓度为2 μg/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。
- [0386] 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11)。

[0387] 表11：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	

- [0388] 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。
- [0389] 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)。
- [0390] 实施例10：FACS检测TF01与293T-TIGIT膜表面TIGIT的结合活性
- [0391] 收集对数生长期293T-TIGIT细胞，按3x10⁵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400 μ LPBSA重悬细胞沉淀，并转移至流式管，FACS Calibur检测。

[0392] 实验结果如表12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。

[0393] 表12：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

[0394] 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。

[0395] 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)。

[0396] 实施例11：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

[0397] 取293T-TIGIT细胞常规消化，每个样本3x10⁵个细胞/孔，离心洗涤；加入相应梯度稀释的抗体，每孔100 μ L，冰上孵育30min；每孔加入100 μ LCD155/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100 μ L 1:300 稀释的APC Goat anti-mouse IgG抗体(Biolegend, 货号: 405308), 空白样本则加入100 μ L 1 % 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。

[0398] 结果如图9和图10所示, EC₅₀值见表13。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。

[0399] 表13: 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

[0400] 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。

[0401] 实施例12: TF01与Fc受体Fc γ RI亲和力检测

[0402] Fc受体Fc γ RI(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Fc γ RI的亲和力常数, 以评价抗体的ADCC活性。

[0403] ForteBio Octet分子相互作用仪检测相应抗体与Fc γ RI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 μg/mL的Fc γ RI(购自Sinobio)溶液，固定时间50s，以使得Fc γ RI固定于传感器表面。抗体与Fc γ 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3.12–50nM(两倍梯度稀释)。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，得到亲和力和常数。

[0404] Fc γ RI与TF01的亲和力常数测定结果如表14和图11—图12所示。

[0405] 表14： TF01与Fc γ RI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)	6.51E-09	5.58E+05	2.90E+03	3.64E-03	1.54E-05	0.30-0.37

[0406] 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。

[0407] 结果显示，26B12H2L2(hG1WT)可以与Fc γ RI结合，亲和力常数为6.51E-09M，TF01由于与Fc γ 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。

[0408] 结果表明，TF01与Fc γ RI的结合活性被有效地消除。

[0409] 实施例13： TF01与Fc受体Fc γ RIIIa及其亚型的亲和力测定

[0410] (1)Fc γ RIIIa_V158与TF01的亲和力常数测定

[0411] Fc受体Fc γ 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Fc γ RIIIa_V158的亲和力常数，以评价抗体的ADCC活性。

[0412] 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：样品稀释缓冲液为PBS，0.02% Tween–20，0.1% BSA，pH7.4。5 μg/mL的Fc γ 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Fc γ RIIIa_V158与各抗体结合，抗体浓度为31.25–500nM(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。

[0413] Fc γ RIIIa_V158与TF01的亲合力常数测定结果如表15和图13—图14所示。

[0414] 表15： TF01与Fc γ RIIIa_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

[0415] 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。

[0416] 结果显示，26B12H2L2(hG1WT)可以与Fc γ RIIIa_V158结合，亲合力常数为5.54E-08M，TF01由于与Fc γ RIIIa_V158没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析。

[0417] 结果表明，TF01与Fc γ R IIIa_V158的结合活性被有效地消除。

[0418] (2)Fc γ RIIIa_F158与TF01的亲合力常数测定

[0419] Fc受体Fc γ RIIIa_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Fc γ RIIIa_F158的亲合力常数，以评价各抗体的ADCC活性。

[0420] Fortebio Octet分子相互作用仪检测TF01与Fc γ RIIIa_F158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 μ g/mL的Fc γ RIIIa_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Fc γ RIIIa_F158与各抗体结合，抗体浓度为31.25-500nM(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，得到亲合力常数。

[0421] Fc γ RIIIa_F158与TF01的亲合力常数测定结果如表16和图15至图16所示。

[0422] 表16： TF01Fc γ RIIIa_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

- [0423] 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。
- [0424] 结果显示，26B12H2L2(hG1WT)可以与Fc γ RIIIa_F158结合，亲和力常数为9.97E-08M，TF01与Fc γ RIIIa_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。
- [0425] 结果表明，TF01与Fc γ RIIIa_F158的结合活性被有效地消除。
- [0426] 实施例14：TF01与Fc受体Fc γ RIIa及其亚型的亲和力测定
- [0427] (1)Fc γ RIIa_H131与TF01的亲和力常数测定
- [0428] Fc受体Fc γ RIIa_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Fc γ RIIa_H131的亲和力常数，以评价各待测抗体与Fc受体的结合能力。
- [0429] Fortebio Octet分子相互作用仪检测TF01与Fc γ RIIa_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 μ g/mL的Fc γ RIIa_H131固定在NTA传感器上，固定高度约为1.0nm，传感器在缓冲液中平衡60s，固定在传感器上的Fc γ RIIa_H131与各抗体结合，抗体浓度为12.5-200nM(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。
- [0430] Fc γ RIIa_H131与TF01的亲和力常数测定结果如表17和图17至图18所示。
- [0431] 表17：TF01与Fc γ RIIa_H131结合的动力学参数

Sample ID	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)	3.90E-08	4.81E+05	1.60E+04	1.88E-02	2.82E-04	0.50-1.01

- [0432] 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。
- [0433] 结果显示，26B12H2L2(hG1WT)可以与Fc γ RIIa_H131结合，亲和力常数为3.90E-08M，TF01与Fc γ RIIa_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。
- [0434] 结果表明，TF01与Fc γ RIIa_H131的结合活性被有效地消除。
- [0435] (2)Fc γ RIIa_R131与TF01的亲和力常数测定
- [0436] Fc受体Fc γ RIIa_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Fc γ RIIa_R131的亲和力常数，以评价各待测抗体与Fc受体的结合能力。
- [0437] ForteBio Octet分子相互作用仪检测TF01与Fc γ RIIa_R131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 μ g/mL的Fc γ RIIa_R131固定在NTA传感器上，固定高度约为1.0nm，传感器在缓冲液中平衡60s，固定在传感器上的Fc γ RIIa_R131与各抗体结合，抗体浓度为12.5-200nM(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。
- [0438] Fc γ RIIa_R131与TF01的亲和力常数测定结果如表18和图19至图20所示。
- [0439] 表18:TF01与Fc γ RIIa_R131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)	3.22E-08	5.11E+05	1.38E+04	1.65E-02	2.14E-04	1.08-1.55

[0440] 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。

[0441] 结果显示，26B12H2L2(hG1WT)可以与Fc γ RIIa_H131结合，亲和力常数为3.22E−08M，TF01由于与Fc γ RIIa_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。

[0442] 结果表明，TF01与Fc γ RIIa_R131的结合活性被有效地消除。

[0443] 实施例15：Fc γ RIIb与TF01的亲和力常数测定

[0444] Fc受体Fc γ RIIb(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Fc γ RIIb的亲和力常数，以评价TF01与Fc受体的结合能力。

[0445] Fortebio Octet分子相互作用仪检测TF01与Fc γ RIIb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 μ g/mL的Fc γ RIIb固定在NTA传感器上，固定高度约为1.0nm，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12.5−200nM(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。

[0446] Fc γ RIIb与TF01的亲和力常数测定结果如表19和图21至图22所示。

[0447] 表19：TF01与Fc γ RIIb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)	4.12E-08	3.42E+05	9.61E+03	1.41E-02	2.04E-04	0.50-0.78

- [0448] 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。
- [0449] 结果显示，26B12H2L2(hG1WT)可以与Fc γ RIib结合，亲和力常数为4.12E-08M，TF01由于与Fc γ RIib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。
- [0450] 结果表明，TF01与Fc γ RIib的结合活性被有效地消除。
- [0451] 实施例16：TF01与C1q的亲和力测定
- [0452] 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。
- [0453] 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 μ g/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0.625-10nM(两倍梯度稀释)，时间60s，抗原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度，检测频率为5.0Hz。数据以1:1模型拟合分析，得到亲和力常数。数据采集软件为Fortebio Data Acquisition 7.0，数据分析软件为Fortebio Data Analysis 7.0。
- [0454] TF01与C1q的亲和力常数测定结果如表20和图23至图24所示。
- [0455] 表20：TF01与C1q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)	1.28E-09	2.40E+06	4.79E+04	3.05E-03	7.33E-05	0.53-0.63

- [0456] 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。

- [0457] 结果显示, 26B12H2L2(hG1WT)可以与C1q结合, 亲和力常数为 $1.28\text{E}-09\text{M}$, TF01由于与C1q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。
- [0458] 结果表明, TF01与C1q的结合活性被有效地消除。
- [0459] 实施例17: TF01抗体介导的对CHO-K1-TIGIT细胞的抗体介导的细胞吞噬的活性
- [0460] 为检测抗体介导的细胞吞噬(antibody dependent cellular phagocytosis, ADCP)活性, 以鼠源巨噬细胞为效应细胞, 过表达TIGIT的细胞系为靶细胞, 检测其介导的ADCP效应。
- [0461] 取冻存的MBMM(mouse bone marrow-derived macrophages)(来源于C57小鼠), 加入DMEM+10%FBS+100ng/mL M-CSF(巨噬细胞集落刺激因子, peprotech, 货号: 315-02), 1200xg离心5min, 收集细胞, 加入DMEM+10%FBS+100ng/mL M-CSF培养基, 复苏过夜。
- [0462] 收集靶细胞(CHO-K1-TIGIT), 170xg离心5min, 用PBS洗涤一次。台盼蓝计数, CFSE(5(6)-羧基二乙酸荧光素琥珀酰亚胺酯, Biolegend, 货号: 423801)用PBS稀释至 $2.5\mu\text{M}$, 取适量稀释后的CFSE重悬细胞(染色密度: 1×10^7 细胞/mL), 放置培养箱孵育20min; 加入6mL的DMEM完全培养基(含10%FBS)终止染色, 170xg离心5min, 弃上清; 加入1mL DMEM完全培养基, 放置培养箱孵育10min; 用DMEM完全培养基稀释抗体至所需浓度, 并设计同型对照抗体; 将靶细胞(1.5×10^5 /孔)加入到96孔锥底板中, 加入抗体($100\mu\text{L}$)混匀, 冰上孵育40min, 170xg离心5min洗涤两次; 收集巨噬细胞(MBMM), 750xg离心5min, 弃上清计数, 用DMEM完全培养基重悬细胞, 调整浓度巨噬细胞(5×10^4 / $100\mu\text{L}$), 加至已含靶细胞的96孔锥底板, 重悬混匀, 放置37℃培养箱孵育2h; 每孔加 $100\mu\text{L}$ 常温的1%PBSA, 750xg离心5min, 弃上清; 用 $200\mu\text{L}$ 的PBSA洗涤一次; 按 $100\mu\text{L}$ /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40min; 每孔加 $100\mu\text{L}$ 1%PBSA, 750xg离心5min, 弃上清; 每孔用 $200\mu\text{L}$ PBSA洗涤一次; 每管加 $200\mu\text{L}$ 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：

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

[0463] 结果如图25所示。

[0464] 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。

[0465] 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。

[0466] 实施例18：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

[0467] 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

[0468] 2 μg/mL抗人CD3抗体(康方生物制备，批号:20170830)在37℃下包被96孔板(Corning，型号：3599)2h；去掉包被液，用预冷PBS(300 μL)洗一次；Jurkat-TIGIT细胞(康方生物构建)计数，96孔板中，每孔种入5x10⁴细胞；按照实验设计加入抗体，37℃孵育30min；按照实验设计加入CD112-hFc(康方生物制备，批号:20180209)；THP-1细胞(购自中科院，货号：3131C0001000700057)计数，96孔板中，每孔种入5x10⁴细胞；放入培养箱中培养48h；收集培养液上清，用IL-2ELISA检测试剂盒(达科为，货号：1110202)检测IL-2含量。

[0469] 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)。

[0470] 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

- [0471] 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细胞(康方生物构建)计数, 96孔板中, 每孔种入 5×10^4 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细胞(购自中科院, 货号: 3131C0001000700057)计数, 96孔板中, 每孔种入 5×10^4 细胞; 放入培养箱中培养48h; 收集培养液上清, 用IL-2ELISA检测试剂盒(达科为, 货号: 1110202)检测IL-2含量。
- [0472] 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。
- [0473] 实施例19: 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
- [0474] 收集对数生长期Jurkat-TIGIT细胞(康方生物构建)和HT1080-aCD3scFv细胞(康方生物构建)并计数, Jurkat-TIGIT每孔 5×10^4 个, HT1080-aCD3scFv细胞每孔 1×10^4 个; 加入稀释好抗体(抗体梯度3nM、30nM、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-2ELISA检测试剂盒(达科为, 货号: 1110202)检测IL-2含量。
- [0475] 结果如图28所示。
- [0476] 结果显示, 抗体TF01、TF02和RG6058(hG4)均能有效促进Jurkat-TIGIT和HT1080-aCD3scFv细胞共培养体系中的IL-2分泌, 且活性相当。
- [0477] 实施例20: 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
- [0478] 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, 2×10^5 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0.02 μ g/mL, Mabtech, 货号: 3619-1)和TGF- β 1(终浓度为3ng/mL, Genscript, 货号: Z03411), 终体积为200 μ L。(TGF- β 1和抗体37°C孵育10mi

n)。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。

[0479] 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- β 1对体系IFN- γ 分泌有明显的抑制作用。抗体TF01、anti-HEL&TGF β 以及anti-HEL&TGF β +26B12H2L2(hG1DM)联用均能有效阻断TGF- β 1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&TGF β ，与anti-HEL&TGF β +26B12H2L2(hG1DM)联用阻断活性相当。

[0480] 实施例21：抗TIGIT抗体和TGF- β R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

[0481] 为检测抗TIGIT抗体和TGF- β R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21。给药后测量各组肿瘤的长宽，计算肿瘤体积。

[0482] 表21：抗TIGIT抗体和TGF- β R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	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,

		鼠，乳腺脂肪	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	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	2.5×10 ⁶ hPBMC ； 在分组后第 8 天 腹 腔 注 射 3x10 ⁶ 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

- [0483] 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-β R的融合蛋白TF01能有效抑制小鼠肿瘤的生长。
- [0484] 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。
- [0485] 实施例22：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
- [0486] 收集对数生长期Jurkat-TIGIT细胞(康方生物构建)和HT1080-aCD3scFv细胞(康方生物构建)并计数，Jurkat-TIGIT细胞每孔5x10⁴个，HT1080-aCD3scFv细胞每孔1x10⁴个；加入稀释好抗体(抗体终浓度3nM、30nM、300nM)；加入soluble抗人CD28抗体(3 μg/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-2ELISA检测试剂盒(达科为，货号：1110202)检测IL-2含量。
- [0487] 结果如图32所示。
- [0488] 结果显示，抗体TF01A、TF01G、TF01T、TF01t31和TF01t37均能有效促进Jurkat-TIGIT和HT1080-aCD3scFv细胞共培养体系中的IL-2分泌，且活性与TF01相当。
- [0489] 实施例23：抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白对TGF-β 抑制IL-4诱导的TF-1细胞增殖的中和作用

- [0490] 收集TF-1细胞(购自ATCC, 货号: CRL-2003), 110xg离心5min, 分析培养基(1640+10%FBS+2.5g/L葡萄糖)洗涤两次, 重悬计数, 在96孔圆底板加入 2×10^4 /100 μ L的细胞悬液; 按实验设计稀释好的IL-4(终浓度为0.1nM)(购自Peprotech, 货号: 200-04)、TGF- β 1(终浓度为3ng/mL)(购自Genscript, 货号: Z03411)、TGF- β 3(终浓度为3ng/mL)(购自Peprotech, 货号: 100-36E)、抗体(终浓度为1000nM、100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM); 八联管中每孔加入等体积的抗体与TGF- β 1/3, 并设计同型对照和空白对照, 室温孵育30min; 然后96孔板每孔加入50 μ L对应浓度的抗体与TGF- β 1以及TGF- β 3的预孵液, 再加入50 μ L的0.4nM IL-4, 混匀, 37°C, 5% CO₂培养箱中孵育72h; 72h后, 加入20 μ L/孔CCK-8(购自日本同仁, 货号: CK04), 置于37°C, 5% CO₂培养箱中孵育4h(孵育期间观察颜色变化); 混匀后转移150 μ L至干净的96孔平底板中, 酶标仪450nm处读取OD值。
- [0491] 结果如图33和图34所示。
- [0492] 结果显示, 抗体TF01G、TF01T、TF01t31和TF01均能有效中和TGF- β 1和TGF- β 3抑制IL-4诱导的TF-1细胞的增殖, 且其活性相当。
- [0493] 实施例24: 抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白阻断TGF- β 1/3和TGF- β R相互作用的报告基因实验
- [0494] 按实验设计分别用DMEM+10%FBS培养基稀释抗体以及TGF- β 1/TGF- β 3(配制浓度为4ng/mL, 终浓度为1ng/mL)(TGF- β 1购自Genscript, 货号: Z03411; TGF- β 3购自peprotech, 货号: 100-36E)。取出96孔黑板每孔对应加入25 μ L抗体和25 μ L TGF- β 1/TGF- β 3, 并设计同型对照和空白对照, 37°C, 5% CO₂细胞培养箱中孵育30min。收集293T-TGF β R2-Luc细胞(康方生物构建), 用DMEM+10%FBS培养基重悬细胞计数及活率, 96孔板中每孔加入 5×10^4 细胞/50 μ L的细胞悬液, 放入37°C, 5% CO₂细胞培养箱中孵育过夜; 加入50 μ L Bright-Glo™ Luciferase Assay Reagent(购自Promega, 货号: E2620), 室温孵育30min; Envision多标记微孔板检测仪读取RLU(Relative Light Units, 相对荧光强度单位)值。
- [0495] 结果如表22和图35至图36所示。

[0496] 表22

/	因子	TF01G	TF01T	TF01t31	TF01
EC ₅₀ (nM)	TGF-β1	0.0197	0.0194	0.0189	0.0153
EC ₅₀ (nM)	TGF-β3	0.0163	0.0149	0.0777	0.0182

- [0497] 结果显示，抗体TF01G、TF01T和TF01t31均能有效阻断TGF-β 1/3和TGF-β R2的相互作用，且活性与TF01相当。
- [0498] 实施例25：抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白阻断TIGIT和PVR相互作用的报告基因实验
- [0499] CHO-aAPC-PDL1-PVR细胞(康方生物构建)2x10⁴细胞/孔接种于96孔平底黑板(Corning，型号：3916)培养过夜，每孔100 μ L(培养基为该细胞的生长培养基：Ham F-12+10%FBS)；次日，去板内培养基，按1x10⁵细胞/孔加入Jurkat-TIGIT-NFAT-Luc细胞(康方生物构建)，50 μ L/孔(培养基为：1640+10%FBS)；加入抗体终浓度为0.037nM、0.37nM、3.7nM、11.1nM、33.3nM、100nM、300nM、1000nM或3000nM)30 μ L/孔，设置同型对照组和阴性对照组，终体积为80 μ L/孔，置于培养箱孵育4.5h；取出培养板，平衡至室温，加入Bright-Glo™ Luciferase Assay System 80 μ L/孔(购自Promega，货号：E2650)，避光孵育2min后读取RLU值。
- [0500] 结果如图37所示。
- [0501] 结果显示，抗体TF01G、TF01T、和TF01t31均能有效阻断TIGIT和PVR的相互作用，活化效应细胞NFAT通路，激活荧光素酶报告基因的表达，且活性与TF01、26B12H2L2(hG1WT)和26B12H2L2(G4DM)相当。
- [0502] 实施例26：抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白分子量检测
- [0503] 抗体用50mM碳酸氢铵(pH7.8)稀释至1mg/ml，取50ml稀释样品加入2 μ l PNGase-F(购自：NEB，货号:P0705L)酶切1小时；取酶切后样品10 μ l加入40 μ l 6M盐酸胍(购自：Sigma，货号:V900385-500G)与5 μ l 0.5M TCEP(三(2-羧乙基)

膦，购自：Thermo Fisher，货号:77720)，混匀后常温变性还原30min。C4柱分离后，进质谱检测。

- [0504] 结果如图38至图43所示。
- [0505] 结果显示：抗体TF01的重链发生断裂，由65.7KD断裂为51.1KD，而抗体TF01A的重链发生少量断裂，而TF01G、TF01T、TF01t31和TF01t37的重链均未发生断裂。
- [0506] 实施例27：抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白SEC-HPLC检测
- [0507] 将TF01和TF01T蛋白样品进行SEC-HPLC分析，使用UV检测器；检测波长为280nm；流动相：25mM十二水合磷酸氢二钠，25mM无水磷酸二氢钠，300mM氯化钠，pH6.5；流速：0.8mL/min；进样量：100 μg；运行时间：等度洗脱20分钟。
- [0508] 结果如表23以及图44至图45所示。
- [0509] 表23：抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白SEC-HPLC纯度检测

/	SEC-HPLC (%)				
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5
TF01	0.2	1.7	67.3	27.5	3.3
TF01T	2.6	94.4	3.0	/	/

- [0510] 结果显示，TF01有明显的降解片段特征峰，而经突变改造后的TF01T，降解问题得以解决，降解片段特征峰消失，HPLC主峰纯度明显增加。
- [0511] 实施例28：ELISA方法测定抗TIGIT抗体和TGF-β R的融合蛋白与TGF-β 的结合活性
- [0512] 将TGF-β 1按照1 μg/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。

[0513] 检测结果如表所示。

[0514] 表24：ELISA检测TF01、TF01T、TGF-β RII-mFc与TGF-β 1的结合

抗体稀释	TGF-β1(1μg/ml)，50μl/孔
------	-----------------------

梯度 (μg/ml)	TF01T		TF01		TGF-β RII-mFc	
1.000	3.014	3.182	3.166	3.131	2.702	2.542
0.333	3.062	3.212	3.208	3.213	2.705	2.703
0.111	2.971	3.111	3.068	3.115	2.565	2.536
0.037	2.861	2.285	1.979	2.091	1.894	1.929
0.012	1.701	0.677	0.541	0.587	0.601	0.716
0.004	0.580	0.245	0.212	0.222	0.172	0.177
0.001	0.057	0.139	0.126	0.136	0.091	0.098
0.000	0.289	0.099	0.095	0.103	0.056	0.052
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)	0.100		0.164		0.271	

[0515] 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TF01T、TF01、TGF-β RII-mFc(作为阳性对照)与TGF-β 1的结合效率EC₅₀分别为0.100nM、0.164nM、0.271nM。

[0516] 结果如图46所示。

[0517] 结果显示，TF01T、TF01具有有效结合TGF-β 1的活性，且呈剂量依赖关系。结果还显示，TF01T、TF01、TGF-β RII-mFc均能够分别与TGF-β 1有效地结合，并且TF01T、TF01与TGF-β 1的结合能力强于TGF-β RII-mFc。

- [0518] 实施例29：混合淋巴细胞反应检测抗TIGIT抗体和TGF- β R的融合蛋白促IFN- γ 分泌的生物活性
- [0519] 按分离液Ficoll-PaqueTM Plus操作说明书分离获得正常人PBMC(来自健康捐献者)并冻存。复苏PBMC培养过夜后，去除悬浮细胞，贴壁细胞加入1640完全培养基，补充GM-CSF(购自peprotech，货号：300-03)，IL-4各2000U/mL(购自peprotech，货号：200-04)，置于37℃，5%二氧化碳培养箱中培养三天；半量换液，加入GM-CSF2000U/mL、IFN- γ (购自sinobiological，货号：11725-HNAS-100)50ng/mL、LPS(购自SIGMA，货号：L4391)100ng/mL，置于37℃，5%二氧化碳培养箱中培养两天。两天后，常规收集诱导得到的DC细胞并冻存。
- [0520] 实验前两天，复苏PBMC，2h后加入终浓度为0.1 μ g/mL的SEB(金黄色葡萄球菌肠毒素抗原，购自Toxin technology，货号：BT202)刺激诱导2天。实验当天，常规收集经SEB刺激的PBMC，250xg离心5min，去上清，用分析培养基(即RPMI 1640+10%FBS)洗一遍后重悬细胞，并计数。实验当天，提前2小时复苏DC细胞(诱导自健康捐献者的PBMC)，于37℃，5%二氧化碳培养箱培养2h。收集DC，250xg离心5min，去上清，分析培养基重悬细胞，并计数。然后，按照40 μ L/孔/细胞将DC细胞(1×10^4 /孔)、PBMC(1×10^5 /孔)、A549人肺癌细胞(购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心，货号：SCSP-503)(2×10^4 /孔)铺于96孔平底板。按实验设计各40 μ L/孔将终浓度为3ng/mL的TGF- β 1和终浓度为3nM、30nM或300nM的抗体加入到相应的实验组孔，混匀，于培养箱中孵育5天。5天后收集上清，进行IFN- γ ELISA检测。
- [0521] 结果如图47所示。
- [0522] 结果显示，与同型对照B12-hG1相比，抗体TF01T以及26B12H2L2(hG1WT)均能诱导PBMC进一步分泌IFN- γ ，且TF01T促IFN- γ 分泌活性要强于抗TIGIT单抗26B12H2L2(hG1WT)。
- [0523] 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。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种融合蛋白，其包含：
靶向免疫检查点的第一蛋白功能区，和
具有TGF-β结合活性的第二蛋白功能区，
其中，
所述第二蛋白功能区是TGF-βRII胞外区片段的变体，并且所述
TGF-βRII胞外区片段的变体是：
TGF-βRII胞外区片段的N末端的第一个丝氨酸被替换为丙氨酸、
甘氨酸或者苏氨酸；和/或，TGF-βRII胞外区片段中删除了包含
SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的片段。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的融合蛋白，其中，所述TGF-βRII胞外区片
段的氨基酸序列如SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:37所示。
- [权利要求 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，被删
除的包含SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的片段，其氨基酸序列如
SEQ ID NO:59至SEQ ID NO:65中的任一序列所示。
- [权利要求 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TGF-βRII胞外区片段的变体的氨基酸序列如SEQ ID NO:49
至SEQ ID NO:58中的任一序列所示。
- [权利要求 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，所述免
疫检查点为选自PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG3和TIGIT中的一种
或多种。
- [权利要求 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，所述第
一蛋白功能区为抗TIGIT抗体或其抗原结合片段。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的融合蛋白，其中，
所述抗TIGIT抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区
包含HCDR1至HCDR3，所述轻链可变区包含LCDR1至LCDR3，
其中：

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示、HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示和HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示，并且

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示、LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[权利要求 8]

根据权利要求7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。

[权利要求 9]

根据权利要求7至8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。

- [权利要求 10] 根据权利要求7至9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。
- [权利要求 11] 根据权利要求7至10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。
- [权利要求 12] 根据权利要求7至11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或Ig gamma-4 chain C region；轻链恒定区为Ig kappa chain C region。
- [权利要求 13] 根据权利要求7至12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)。
- [权利要求 14] 根据权利要求7至13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。
- [权利要求 15] 根据权利要求7至14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-β 1、TGF-β 2或TGF-β 3；优选地，所述EC₅₀通过间接ELISA方法测得。
- [权利要求 16] 根据权利要求7至15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。

- [权利要求 17] 根据权利要求7至16中任一权利要求所述的融合蛋白，其中，按照EU编号系统，
当所述抗TIGIT抗体的重链恒定区为IgG1时，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；
当所述抗TIGIT抗体的重链恒定区为IgG4时，重链恒定区具有如下突变组合之一：
F234A和L235A；
F234A和G237A；
L235A和G237A；或者
F234A、L235A、G237A。
- [权利要求 18] 根据权利要求7至17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。
- [权利要求 19] 根据权利要求1至18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。
- [权利要求 20] 根据权利要求19所述的融合蛋白，其中，所述连接片段为SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:70所示的多肽，或者为由多个(例如2、3、4、5或6个)SEQ ID NO:69所示多肽串联得到的多肽，或者为由多个(例如2、3、4或5个)SEQ ID NO:69所示多肽串联并进一步与SEQ ID NO:70所示多肽串联得到的多肽；
优选地，所述连接片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:66所示。

- [权利要求 21] 根据权利要求1至20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。
- [权利要求 22] 根据权利要求1至21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连接在第一蛋白功能区的C末端。
- [权利要求 23] 根据权利要求7至22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连接在抗TIGIT抗体的重链的C末端。
- [权利要求 24] 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 RII胞外区片段的变体；
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TGF- β RII胞外区片段的变体的氨基酸序列如SEQ ID NO:49至SEQ ID NO:58中的任一序列所示；
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或SEQ ID NO:66所示。
- [权利要求 25] 分离的核酸分子，其编码权利要求1至24中任一权利要求所述的融合蛋白。
- [权利要求 26] 一种载体，其包含权利要求25所述的分离的核酸分子。
- [权利要求 27] 一种宿主细胞，其包含权利要求25所述的分离的核酸分子，或者权利要求26所述的载体。

- [权利要求 28] 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24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、有色物质或酶。
- [权利要求 29] 一种药物组合物，其包含权利要求1至24中任一权利要求所述的融合蛋白或者权利要求28所述的偶联物；可选地，所述药物组合物还包括一种或多种药学上可接受的辅料；
可选地，所述药物组合物还包含一种或多种肿瘤化疗药物。
- [权利要求 30] 据权利要求29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。
- [权利要求 31] 权利要求1至24中任一权利要求所述的融合蛋白或者权利要求28所述的偶联物在制备治疗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。
- [权利要求 32] 根据权利要求1至24中任一权利要求所述的融合蛋白或者权利要求28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。

- [权利要求 33] 一种治疗或预防肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的根据权利要求1至24中任一权利要求所述的融合蛋白或者权利要求28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。
- [权利要求 34] TGF- β RII胞外区片段的变体，其为：
- TGF- β RII胞外区片段的N末端的第一个丝氨酸被替换为丙氨酸、甘氨酸或者苏氨酸；或者，
- TGF- β RII胞外区片段中删除了包含SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的片段；
- 优选地，所述TGF- β RII胞外区片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:37所示。
- [权利要求 35] 根据权利要求34所述的TGF- β RII胞外区片段的变体，其中，被删除的包含SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的片段，其氨基酸序列如SEQ ID NO:59至SEQ ID NO:65中的任一序列所示。
- [权利要求 36] 根据权利要求34至35中任一权利要求所述的TGF- β RII胞外区片段的变体，其中，
- 所述TGF- β RII胞外区片段的变体的氨基酸序列如SEQ ID NO:49至SEQ ID NO:58中的任一序列所示。