

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021年1月21日 (21.01.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/008523 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/101883

(22) 国际申请日: 2020年7月14日 (14.07.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910634309.9 2019年7月15日 (15.07.2019) CN

(71) 申请人: 上海君实生物医药科技股份有限公司 (SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市中国 (上海) 自由贸易试验区海趣路36、58号2号楼13层, Shanghai 200120 (CN)。苏州君盟生物医药科技有限公司 (SUZHOU JUNMENG BIOSCIENCES CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市吴江经济技术开发区长安路东侧 (吴江科技创业园内), Jiangsu 215002 (CN)。

(72) 发明人: 孟琴 (MENG, Qin); 中国江苏省苏州市吴江经济技术开发区长安路东侧 (吴江科技创业园内), Jiangsu 215002 (CN)。姚剑 (YAO, Jian); 中国江苏省苏州市吴江经济技术开发区长安路东侧 (吴江科技创业园内), Jiangsu 215002 (CN)。冯辉 (FENG, Hui); 中国江苏省苏州市吴江经济技术开发区长安路东侧 (吴江科技创业园内), Jiangsu 215002 (CN)。姚盛 (YAO, Sheng); 中国江苏省苏州市吴江经济技术开发区长安路东侧 (吴江科技创业园内), Jiangsu 215002 (CN)。武海 (WU, Hai); 中国江苏省苏州市吴江经济技术开发区长安路东侧 (吴江科技创业园内), Jiangsu 215002 (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 关于申请人有权要求在先申请的优先权 (细则4.17(iii))

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(54) Title: ANTI-TIGIT ANTIBODIES AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 抗TIGIT抗体及其应用

(57) Abstract: Provided are antibodies that bind specifically to TIGIT or antigen binding fragments of the antibodies and a composition thereof. Also provided are a nucleic acid molecule coding the antibodies or the antigen binding fragments thereof, an expression vector and a host cell for expressing the antibodies or the antigen binding fragments thereof, and therapeutic and diagnostic uses of the antibodies.

(57) 摘要: 提供了与TIGIT特异性结合的抗体或其抗原结合片段及其组合物。还提供了编码所述抗体或其抗原结合片段的核酸分子, 用于表达所述抗体或其抗原结合片段的表达载体和宿主细胞, 以及其治疗和诊断用途。

WO 2021/008523 A1

抗 TIGIT 抗体及其应用

技术领域

本发明涉及抗 TIGIT 抗体，以及这些抗体及其组合物在治疗癌症中的用途。

背景技术

TIGIT (具有 Ig 和 ITIM 结构域的 T 细胞免疫受体)是由一个细胞外免疫球蛋白结构域、I 型跨膜区和两个 ITIM 基序组成的，主要在活化 T 细胞和 NK 细胞上表达的免疫调节受体 (Stanietsky 等, PNAS.2009,106,17858-17863)。TIGIT 识别配体为脊髓灰质炎病毒受体 (PVR, CD155)和连接蛋白 (Nectin) 2 (PVRL2/CD112)，该配体在多种不同的肿瘤细胞上过表达。已报道，TIGIT 与配体 PVR 以高亲和力结合。TIGIT 与配体结合，会激活由 TIGIT 的细胞质尾部中存在的以下两个基序所介导的抑制性信号:免疫受体尾部酪氨酸 (ITT)样基序和免疫优势的基于酪氨酸的抑制性 (ITIM) 基序 (Liu 等, Cell death and differentiation 2013, 20, 456-464; Stanietsky 等, European journal of immunology, 2013, 43, 2138-2150)。肿瘤细胞表面配体通过与 NK 细胞和 T 细胞表面 TIGIT 的 ITIM 结构域结合，抑制 NK 细胞毒性和 T 细胞活性，从而介导肿瘤细胞的免疫逃避机制。已有多篇专利文献报导具有阻断 TIGIT 与其配体结合的抗 TIGIT 抗体，可通过抑制 TIGIT 介导的免疫抑制作用，用于肿瘤等疾病的治疗 (WO2004/024068、WO2009/126688、WO2015/009856、WO2016/028656)。

对于提供能够单独地或与其它药剂相组合，通过降低人类 TIGIT 的抑制活性而使免疫系统的细胞攻击肿瘤细胞的其他更有效、特异、安全和/或稳定的药剂，存在着未满足的需求。

发明概述

本发明提供了抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其特征在于具有独特的 CDR 序列组成，与人类 TIGIT 结合具有高亲和力和高特异性。本发明提供的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段可作为独立的疗法或与其它疗法/或其他抗癌药剂联合，用于诸如癌症的治疗。

本发明一方面提供了与 TIGIT 高特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含选自重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 中的 1 个至 3 个，其中所述的 HCDR1 包含与

选自 SEQ ID NO:1 或 11 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，HCDR2 包含与选自 SEQ ID NO:2 或 12 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，HCDR3 包含与选自 SEQ ID NO:3 或 13 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中所述的 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中所述的 HCDR1 包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO:13 氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含选自轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 中的 1 个至 3 个，其中所述的 LCDR1 包含与 SEQ ID NO:6 或 16 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，LCDR2 包含与 SEQ ID NO:7 或 17 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，LCDR3 包含与 SEQ ID NO:8 或 18 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述的 LCDR1 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列，LCDR3 包含 SEQ ID NO:8 氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述的 LCDR1 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列，LCDR3 包含 SEQ ID NO:18 氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段，其包含重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述的 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列，LCDR1 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列，LCDR3 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段，其包含重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列，LCDR1 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列、LCDR2 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)，所述的重链可变区 (VH) 包含与选自 SEQ ID NO:4、14、21、23、25、27 和 29 的任一氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含轻链可变区(VL)，所述的轻链可变区 (VL) 包含与选自 SEQ ID NO: 9、19、22、24、26、28 和 30 的任一氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含与选自 SEQ ID NO:4、14、21、23、25、27 和 29 的任一氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；和其中所述的 VL 包含与选自 SEQ ID NO: 9、19、22、24、26、28 和 30 的任一氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列和所述的 VL 包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列和所述的 VL 包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列和所述的 VL 包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列和所述的 VL 包含 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可

变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述的 VH 包含 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列和所述的 VL 包含 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列。

在一些实施方式中,本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述的 VH 包含 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列和所述的 VL 包含 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列。

在一些实施方式中,本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述的 VH 包含 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列和所述的 VL 包含 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列。

在一些实施方式中,本发明所述抗体或其抗原结合片段包含轻链和/或重链,所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 或 32 所示,和/或所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 或 34 所示。

在一些实施方式中,本发明所述的抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 所示,轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示;或所述抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:33 所示,轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示。

在一些实施方式中,本发明所述的抗体或其抗原结合片段具有与人 TIGIT 和食蟹猴 TIGIT 蛋白交叉结合的特性。

在一些实施方式中,本发明所述的抗体或其抗原结合片段具有阻断或抑制 TIGIT 与其天然配体 PVR 或/和 PVRL2 结合的特性。

在一些实施方式中,本发明所述的抗体或其抗原结合片段阻断或抑制 TIGIT 参与介导的生物活性作用。

在一些实施方式中,本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段是鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

在一些实施方式中,本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段是完全抗体、单链抗体、Fab 抗体、Fab' 抗体、(Fab')₂ 抗体、或双(多)特异性抗体。

在一些实施方式中,本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段是任何 IgG 亚型,如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

本发明提供了一种分离的核酸分子,其编码上述抗体或其抗原结合片段。

本发明提供了一种重组载体或表达载体,其包含一个或多个上述的核酸序列,其中所述载体适合用于重组产生上述的抗体或其抗原结合片段。

本发明提供了一种宿主细胞,其包含一个或多个上述的重组载体或表达载体,或上述核酸分子,或表达上述任一实施方案所述的抗体。

本发明提供了一种药物组合物,其包含上述的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受

的载体或赋形剂的组合物。

在一些实施方式中，上述药物组合物进一步包含 PD-1 轴拮抗剂。

在一些实施方案中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段具有下列性质中的至少一种：

1) 以至少约 5nM、至少约 1nM、至少约 0.1nM、至少约 0.01nM、至少约 0.001nM 的 K_D 与人 TIGIT 结合；

2) 与食蟹猴 TIGIT 交叉反应。

本发明第二方面还涉及用于产生本发明所述抗体或其抗原结合片段的方法。此类方法包括提供一种编码本发明的抗体或抗原结合片段的分离的核酸分子，或包含此类核酸的表达载体，特别是用于在宿主细胞中重组产生本发明所述的抗体或其抗原结合片段的载体。

本发明第三方面还涉及包含一种或多种上述重组载体或表达载体的宿主细胞以及用于产生本发明所述抗体或包含其抗原结合片段的方法，所述方法包括培养所述宿主细胞、纯化和回收所述抗体或其抗原结合片段。

本发明还提供一种产生上述抗体或其抗原结合片段的方法，包括培养上述的宿主细胞，并从培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

本发明第四方面还涉及治疗受试者癌症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段或其药物组合物。

在一种实施方式中，还涉及本发明所述的任何抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段在制备用于在受试者中治疗癌症的药物的用途。

本发明还提供了上述的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、宿主细胞或药物组合物在制备用于治疗 and/或预防 TIGIT 介导的疾病或病症的药物中的用途；优选地，所述疾病或病症是癌症。

本发明第五方面还涉及向癌症受试者联合施用一种或多种疗法(例如治疗方式和/或其它治疗剂)。在一些实施方案中，上述疗法包括向所述受试者施用有效量的本发明任一实施方案所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段或其药物组合物。在一些实施方案中，治疗方式包括手术治疗和放射疗法。在一些实施方案中，上述其它治疗剂选自化疗剂、PD-1 轴拮抗剂或者其它肿瘤靶向治疗剂；优选 PD-1 轴拮抗剂。

在一些实施方案中，本发明还涉及本文所述的任何抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段与 PD-1 轴拮抗剂组合在制备用于在受试者中治疗癌症的药物中的用途。

在一些实施方案中，所述 PD-1 轴拮抗剂选自抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体。

本发明第六方面还涉及检测样品中 TIGIT 的方法，所述方法包括：a) 将样品与本文

所述的任何抗 TIGIT 抗体或其片段接触; 和 b) 检测抗 TIGIT 抗体或其片段和 TIGIT 间的复合物的形成。在一个实施方案中, 抗 TIGIT 抗体是被可检测地标记的。

在一些实施方案中, 本发明涉及试剂盒或制品, 其包含本文所述的任何抗 TIGIT 抗体或其片段。在一些实施方案中, 所述试剂盒或制品包含本文所述的抗 TIGIT 抗体或其片段与任意的可药用辅料, 以及任意地一种或多种其它治疗剂 (例如化疗剂、PD-1 轴拮抗剂或者肿瘤靶向治疗剂)。

本发明还涵盖本文所述的任何实施方案的任意组合。本文所述的任何实施方案或其任何组合适用于本文所述的发明的任何和所有抗 TIGIT 抗体或其片段、方法和用途。

附图简述

图 1: Luciferase assay 检测杂交瘤抗体对 T 细胞活性的影响。

图 2: Elisa 检测嵌合抗体与 TIGIT 的结合作用。

图 3: Luciferase assay 检测嵌合抗体对 T 细胞活性的影响。

图 4: Elisa 检测人源化抗体与 TIGIT 的结合作用。

图 5: Luciferase assay 检测人源化抗体对 T 细胞活性的影响。

图 6: FACS 检测人源化抗体阻断 TIGIT 与配体 PVR 结合作用。

图 7: 人源化 TIGIT 抗体及其与抗 PD-1 抗体联合在 MC38 荷瘤的 TIGIT 转基因小鼠中的药效研究。

发明详述

本发明提供了抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段, 其特征在于具有独特的 CDR 序列组成, 与人类 TIGIT 结合具有高亲和力和高特异性。本发明提供的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段可作为独立的治疗或与其它疗法/或其他抗癌药剂联合, 用于诸如癌症的治疗。

定义

除非另有说明, 本发明的实施将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术, 这些都在本领域的技术范围内。

为了可以更容易地理解本发明, 某些科技术语具体定义如下。除非本文其它部分另有明确定义, 否则本文所用的科技术语都具有本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。关于本领域的定义及术语, 专业人员具体可参考 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。本文 (包括权利要求书) 所用单数形式包括其相应的复数形式, 除非文中另有明确规定。

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

本文术语“TIGIT”，全称为 T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白(T cell Ig and ITIM domain)，是指来自任何脊椎动物(包括哺乳动物如灵长类动物(例如人)和啮齿类动物(例如，小鼠和大鼠)的任何天然 TIGIT，除非另有说明。该术语涵盖“全长”未加工的 TIGIT 以及由细胞内加工产生的任何形式的 TIGIT 或其任何片段。该术语还包括天然存在的 TIGIT 的变体，例如，剪接变体或等位变体。在一个实施方案中，TIGIT 是指来自人和食蟹猴 TIGIT 全长或其片段(诸如其缺乏信号肽的成熟片段)。在一个实施方案中，人 TIGIT 是指与 Genbank 登录号 NP_776160.2 (SEQ ID NO: 31)氨基酸残基 22-244 序列一致的成熟 TIGIT (氨基酸残基 1-21 为前导肽)。在一个实施方案中，人 TIGIT 是指与 Genbank 登录号 NP_776160.2 氨基酸残基 22-141 序列一致的 TIGIT 胞外结构域。在一个实施方案中，食蟹猴(*Macaca fascicularis*) TIGIT 指与 Genbank 登录号 XP_005548158.1 氨基酸残基 22-245 序列一致的成熟 TIGIT。

“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在将所述序列进行比对(并在必要时导入空位)以获取最大百分比序列同一性，且不将任何保守取代视为序列同一性的部分之后，候选序列中的氨基酸残基与参比多肽序列中的相同氨基酸残基的百分比。可使用本领域各种方法进行序列比对以便测定百分比氨基酸序列同一性，例如，使用公众可得到的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 MEGALIGN(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以决定测量比对的适宜参数，包括对所比较的序列全长获得最大比对所需的任何算法。

“免疫应答”是指由例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和由上述细胞或肝产生可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用，该作用导致从人体选择性损害、破坏或清除侵入的病原体、感染病原体的细胞或组织、癌细胞或者在自体免疫或病理性炎症的情况下的正常人细胞或组织。

“信号转导途径”或“信号转导活性”是指通常由蛋白质间相互作用诸如生长因子对受体的结合启动的生化因果关系，所述关系导致信号从细胞的一部分传递至细胞的另一部分。一般地，传递包括引起信号转导的系列反应中的一种或多种蛋白质上的一个或多个酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基的特定磷酸化。倒数第二过程通常包括细胞核事件，从而导致基因表达的变化。

术语“活性”或“生物活性”，或术语“生物性质”或“生物特征”此处可互换使用，并包括但不局限于表位/抗原亲和力和特异性、在体内或体外中和或拮抗 TIGIT 活性的能力、IC50、抗体的体内稳定性和抗体的免疫原性质。本领域公知的抗体的其它可鉴定的生物学性质或特征包括，例如，交叉反应性(即通常与靶定肽的非人同源物，或与其它

蛋白质或组织的交叉反应性), 和保持哺乳动物细胞中蛋白质高表达水平的能力。使用本领域公知的技术观察、测定或评估前面提及的性质或特征, 所述技术包括但不限于 ELISA、FACS 或 BIACORE 等离子体共振分析、不受限制的体外或体内中和测定、受体结合、细胞因子或生长因子的产生和/或分泌、信号转导和不同来源(包括人类、灵长类或任何其它来源)的组织切片的免疫组织化学。

“抗体”是指具有所需生物活性的任何形式的抗体。因此, 其以最广义使用, 具体包括但不限于单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人源化抗体、完全人抗体、嵌合抗体和骆驼源化单结构域抗体。

“分离的抗体”是指结合化合物的纯化状态, 且在这种情况下意指该分子基本不含其它生物分子, 例如核酸、蛋白质、脂质、糖或其它物质例如细胞碎片和生长培养基。术语“分离(的)”并非意指完全不存在这类物质或不存在水、缓冲液或盐, 除非它们以明显干扰本文所述结合化合物的实验或治疗应用的量存在。

“单克隆抗体”是指获自基本均质抗体群的抗体, 即组成该群的各个抗体除可少量存在的可能天然存在的突变之外是相同的。单克隆抗体是高度特异性的, 针对单一抗原表位。相比之下, 常规(多克隆)抗体制备物通常包括大量针对不同表位(或针对不同表位有特异性)的抗体。修饰语“单克隆”表明获自基本均质抗体群的抗体的特征, 且不得解释为需要通过任何特定方法产生抗体。

“全长抗体”, 天然存在时包含四条肽链的免疫球蛋白分子, 两条重(H)链(全长时约 50-70kDa)和两条轻(L)链(全长时约 25kDa)通过二硫键互相连接。每一条重链由重链可变区(在本文中缩写为 VH)和重链恒定区(在本文中缩写为 CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每一条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 和 VL 区可被进一步细分为具有高可变性的互补决定区(CDR)和其间隔以更保守的称为框架区(FR)的区域。每一个 VH 或 VL 区由按下列顺序: 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。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白对宿主组织或因子(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。

抗体(“亲代抗体”)的“抗原结合片段”包括抗体的片段或衍生物, 通常包括亲代抗体的抗原结合区或可变区(例如一个或多个 CDR)的至少一个片段, 其保持亲代抗体的至少一些结合特异性。抗体结合片段的实例包括但不限于 Fab, Fab', F(ab')₂ 和 Fv 片段; 双抗体; 线性抗体; 单链抗体分子, 例如 sc-Fv; 由抗体片段形成的纳米抗体(nanobody)和多特异性抗体。当抗原的结合活性在摩尔浓度基础上表示时, 结合片段或衍生物通常保

持其抗原结合活性的至少 10%。优选结合片段或衍生物保持亲代抗体的抗原结合亲和力的至少 20%、50%、70%、80%、90%、95%或 100%或更高。还预期抗体的抗原结合片段可包括不明显改变其生物活性的保守或非保守氨基酸取代(称为抗体的“保守变体”或“功能保守变体”)。术语“结合化合物”是指抗体及其结合片段两者。

“单链 Fv”或“scFv”抗体是指包含抗体的 VH 和 VL 结构域的抗体片段，其中这些结构域存在于单条多肽链中。Fv 多肽一般还包含 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，其使 scFv 能够形成用于抗原结合的所需结构。

“结构域抗体”是只含有重链可变区或轻链可变区的免疫功能性免疫球蛋白片段。在某些情况下，两个或更多个 VH 区与肽接头共价连接形成二价结构域抗体。二价结构域抗体的 2 个 VH 区可靶向相同或不同的抗原。

“二价抗体”包含 2 个抗原结合部位。在某些情况下，2 个结合部位具有相同的抗原特异性。然而，二价抗体可以是双特异性的。

“双抗体”是指具有两个抗原结合部位的小抗体片段，所述片段包含在同一多肽链(VH-VL 或 VL-VH)中与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。通过使用短得不允许在同一链的两个结构域之间配对的接头，迫使该结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合部位。

“嵌合抗体”是具有第一抗体的可变结构域和第二抗体的恒定结构域的抗体，其中第一抗体和第二抗体来自不同物种。通常可变结构域获自啮齿动物等实验动物的抗体(“亲代抗体”)，而恒定结构域序列获自人抗体，使得与亲代啮齿动物抗体相比，所得嵌合抗体在人受试者中诱导不良免疫应答的可能性较低。

“人源化抗体”是指含有来自人和非人(例如鼠、大鼠)抗体的序列的抗体形式。一般而言，人源化抗体包含基本所有的至少一个、通常两个可变结构域，其中所有或基本所有的超变环相当于非人免疫球蛋白的超变环，而所有或基本所有的构架(FR)区是人免疫球蛋白序列的构架区。人源化抗体任选可包含至少一部分的人免疫球蛋白恒定区(Fc)。

“完全人抗体”是指只包含人免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。如在小鼠中、在小鼠细胞中或在来源于小鼠细胞的杂交瘤中产生，则完全人抗体可含有鼠糖链。同样，“小鼠抗体”是指仅包含小鼠免疫球蛋白序列的抗体。或者，如果在大鼠中、在大鼠细胞中或在来源于大鼠细胞的杂交瘤中产生，则完全人抗体可含有大鼠糖链。同样，“大鼠抗体”是指仅包含大鼠免疫球蛋白序列的抗体。

“同种型”抗体是指由重链恒定区基因提供的抗体种类(例如，IgM、IgE、IgG 诸如 IgG1、IgG2 或 IgG4)。同种型还包括这些种类之一的修饰形式，其中修饰已被产生来改变 Fc 功能，例如以增强或减弱效应子功能或对 Fc 受体的结合。

术语“PD-1 轴拮抗剂”是指如下的分子，其抑制 PD-1 轴结合配体与一种或多种它的结合配体相互作用，从而去除源自 PD-1 信号传导轴上的信号传导的 T 细胞功能障碍—一项结果是恢复或增强 T 细胞功能(例如增殖，细胞因子生成，靶细胞杀伤)。如本文中使用的，PD-1 轴拮抗剂包括 PD-1 拮抗剂(例如抗 PD-1 抗体)，PD-L1 拮抗剂(例如抗 PD-L1 抗体)和 PD-L2 拮抗剂(例如抗 PD-L2 抗体)。

术语“PD-1 拮抗剂”指如下的分子，其降低、阻断、抑制、消除或干扰源自 PD-1 与一种或多种它的结合配体(诸如 PD-L1, PD-L2)相互作用的信号转导。在一些实施方案中，PD-1 拮抗剂是抑制 PD-1 结合一种或多种其结合配体的分子。在一些具体的实施方案中，PD-1 拮抗剂抑制 PD-1 结合 PD-L1 和/或 PD-L2。例如，PD-1 拮抗剂包括降低、阻断、抑制、消除或干扰源自 PD-1 与 PD-L1 和成 PD-L2 相互作用的信号转导的抗 PD-1 抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽和其它分子。在一个实施方案中，PD-1 拮抗剂降低由或经由 T 淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白质介导的负面共刺激信号(经由 PD-1 介导信号传导)，从而使得功能障碍性 T 细胞不太功能障碍性(例如增强对抗原识别的效应器应答)。在一些实施方案中，PD-1 拮抗剂是抗 PD-1 抗体。在一个具体实施方案中，PD-1 拮抗剂是 nivolumab、pembrolizumab、pidilizumab 或是 WO2014/206107 中公开的任何抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段。

术语“PD-L1 拮抗剂”指如下的分子，其降低、阻断、抑制、消除或干扰源自 PD-L1 与一种或多种它的结合配体(诸如 PD-1, B7-1)相互作用的信号转导。在一些实施方案中，是抑制 PD-L1 结合它的结合配体的分子。在一个特定方面，PD-L1 拮抗剂抑制 PD-L1 结合 PD-1 和/或 B7-1。在一些实施方案中，PD-L1 拮抗剂包括降低、阻断、抑制、消除或干扰源自 PD-L1 与一种或多种它的结合配体(诸如 PD-1, B7-1)相互作用的信号转导的抗 PD-L1 抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽和其它分子。在一个实施方案中，PD-L1 拮抗剂降低由或经由 T 淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白质介导的负面共刺激信号(经由 PD-L1 介导信号传导)，而增强 T 细胞活性(例如增强对抗原识别的效应器应答)。在一些实施方案中，PD-L1 拮抗剂是抗 PD-L1 抗体。在一个具体方面，抗 PD-L1 抗体是 atezolizumab、durvalumab 或是 WO2018/153320 中公开的任何抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段。

术语“PD-L2 拮抗剂”指如下的分子，其降低、阻断、抑制、消除或干扰源自 PD-L2 与一种或多种它的结合配体(诸如 PD-1)相互作用的信号转导。在一些实施方案中，PD-L2 拮抗剂是抑制 PD-L2 结合一种或多种它的结合配体的分子。在一个特定方面，PD-L2 拮抗剂抑制 PD-L2 结合 PD-1。在一些实施方案中，PD-L2 拮抗剂包括降低、阻断、抑制、消除或干扰源自 PD-L2 与一种或多种它的结合配体(诸如 PD-1)相互作用的信号转导的抗

PD-L2 抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽和其它分子。在一个实施方案中，PD-L2 结合拮抗剂降低由或经由 T 淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白质介导的负面共刺激信号(经由 PD-L2 介导信号传导)，从而增强 T 细胞活性 (例如增强对抗原识别的效应器应答)。

术语“etigilimab”是指与 CAS Registry Number: 2044984-83-8 序列一致的抗体或其同种型抗体。在一个具体实施例中，所述的 etigilimab 为其 IgG4 同种型。

术语“核酸”或“多核苷酸”是指脱氧核糖核酸 (DNA)或核糖核酸 (RNA)及其呈单链或双链形式的聚合物。除非明确地限制，否则术语包括具有与参照核酸相似的结合性质并且以与天然存在的核苷酸相似的方式被代谢的含有已知的天然核苷酸的类似物的核酸(参见，属于 Kariko 等人的美国专利 No. 8, 278, 036，其公开了尿苷被假尿苷替代的 mRNA 分子，合成所述 mRNA 分子的方法以及用于在体内递送治疗性蛋白的方法)。除非另有所指，否则特定核酸序列还隐含地包括其保守修饰的变体(例如，简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP 和互补序列以及明确指出的序列。具体地，简并密码子取代可通过生成其中一个或多个选择的 (或全部) 密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现 (Batzer 等人, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka 等人, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); 和 Rossolini 等人, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994))。

“构建体”是指任何重组多核苷酸分子(诸如质粒、粘粒、病毒、自主复制多核苷酸分子、噬菌体或线性或环状单链或双链 DNA 或 RNA 多核苷酸分子)，衍生自任何来源，能够与基因组整合或自主复制，构成如下多核苷酸分子，其中已经以功能操作的方式连接 (即，可操作地连接)一或多个多核苷酸分子。重组构建体通常会包含可操作地连接至转录起始调节序列的本发明的多核苷酸，这些序列会导引多核苷酸在宿主细胞中的转录。可使用异源及非异源(即，内源)启动子两者导引本发明的核酸的表达。

“载体”是指任何重组多核苷酸构建体，该构建体可用于转化的目的 (即将异源 DNA 引入到宿主细胞中)。一种类型的载体为“质粒”，是指环状双链 DNA 环，可将额外 DNA 区段连接至该环中。另一类型的载体为病毒载体，其中可将额外 DNA 区段连接至病毒基因组中。某些载体能够在被引入到的宿主细胞中自主复制 (例如，具有细菌复制起点的细菌载体及游离型哺乳动物载体)。在引入到宿主细胞中后，其他载体(例如，非游离型哺乳动物载体) 整合至宿主细胞的基因组中，且因此与宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够导引被操作性连接的基因的表达。本文将此类载体称为“表达载体”。

本文所用术语“表达载体”是指能够在转化、转染或转导至宿主细胞中时复制及表达目的基因的核酸分子。表达载体包含一或多个表型选择标记及复制起点，以确保维护载体及以在需要的情况下于宿主内提供扩增。

用于细胞或受体的“活化”、“刺激”和“处理”可具有相同含义，例如细胞或受体用配体活化、刺激或处理，除非上下文另外或明确规定。“配体”包括天然和合成配体，例如细胞因子、细胞因子变体、类似物、突变蛋白和来源于抗体的结合化合物。“配体”还包括小分子，例如细胞因子的肽模拟物和抗体的肽模拟物。“活化”可指通过内部机制以及外部或环境因素调节的细胞活化。“应答/反应”，例如细胞、组织、器官或生物体的应答，包括生化或生理行为（例如生物区室内的浓度、密度、粘附或迁移、基因表达速率或分化状态）的改变，其中改变与活化、刺激或处理有关，或者与例如遗传编程等内部机制有关。

如本文中所示，术语任何疾病或病症的“治疗”或“医治”在一个实施方案中是指改善疾病或病症（即，减缓或阻止或减少疾病的进展或其临床症状的至少一个）。在另一个实施方案中，“治疗”或“医治”是指缓解或改善至少一个身体参数，包括可能不能被患者辨别出的那些物理参数。在另一个实施方案中，“治疗”或“医治”是指在身体上（例如，可辨别的症状的稳定）、生理上（例如，身体参数的稳定）或在这两方面调节疾病或病症。除非在本文中明确描述，否则用于评估疾病的治疗和/或预防的方法在本领域中通常是已知的。

“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。如本文中所示，术语“cyno”或“食蟹猴”是指食蟹猴。

“联合”一种或多种其它治疗剂的施用包括同时(共同)施用和任意次序的连续施用。

“治疗有效量”、“治疗有效剂量”和“有效量”是指本发明的 TIGIT 抗体或其抗原结合片段当单独或与其它治疗药物组合给予细胞、组织或受试者时，有效预防或改善一种或多种疾病或病况的症状或该疾病或病况的发展的量。治疗有效剂量还指足以导致症状改善的抗体或其抗原结合片段的量，例如治疗、治愈、预防或改善相关医学病况或者提高这类病况的治疗、治愈、预防或改善的速度的量。当对个体施用单独给予的活性成分时，治疗有效剂量仅是指该成分。当组合施用时，治疗有效剂量是指引起治疗效果的活性成分的综合量，不论是组合、依次给予还是同时给予。治疗剂的有效量将导致诊断标准或参数提高至少 10%，通常至少 20%，优选至少约 30%，更优选至少 40%，最优选至少 50%。

“癌症”和“癌性”指或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调控的生理疾患。此定义中包括良性和恶性癌症以及休眠肿瘤或微转移。癌症的例子包括但不限于癌，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤，和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌，肺癌(包括小细胞肺癌，非小细胞肺癌，肺的腺癌，和肺的鳞癌)，腹膜癌，肝细胞癌，胃的癌或胃癌(包括胃肠癌)，胰腺癌，成胶质细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，肝瘤(hepatoma)，

乳腺癌，结肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜癌或子宫癌，唾液腺癌，肾癌或肾的癌，肝癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌，肝的癌，及各种类型的头和颈癌，以及 B 细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非何杰金氏淋巴瘤(NHL)，小淋巴细胞性(SL)NHL，中级/滤泡性 NHL，中级弥漫性 NHL，高级成免疫细胞性 NHL，高级成淋巴细胞性 NHL，高级小无核裂细胞性 NHL，贮积病 (bulky disease) NHL，套细胞淋巴瘤，AIDS 相关淋巴瘤，和瓦尔登斯特伦氏 (Waldenstrom) 巨球蛋白血症)，慢性淋巴细胞性白血病(CLL)，急性成淋巴细胞性白血病(ALL)，毛细胞性白血病，慢性成髓细胞性白血病，和移植后淋巴增殖性病症(PTLD)，以及与癍痣病 (phakomatoses)，水肿(诸如与脑瘤有关的)和梅格斯氏 (Meigs)综合征有关的异常血管增殖。

抗 TIGIT 抗体及其产生

术语“抗 TIGIT 抗体”、“抗 TIGIT”、“TIGIT 抗体”或“结合 TIGIT 的抗体”是指能够以足够的亲合力结合 TIGIT 蛋白或其片段以致所述抗体可以用作靶向 TIGIT 的诊断剂和/或治疗剂。

可采用用于产生抗体的任何合适方法来产生本发明的抗体。任何合适形式的 TIGIT 都可用作产生抗体的免疫原(抗原)。通过举例而非限制，任何 TIGIT 变体或其片段都可用作免疫原。在一些实施方式中，产生鼠源的单克隆抗人 TIGIT 抗体的杂交瘤细胞可通过本领域公知的方法产生。这些方法包括但不限于最初由 Kohler 等 (1975) (Nature 256 :495-497)研发的杂交瘤技术。优选根据标准方案，分离出小鼠脾细胞，用 PEG 或通过电融合与小鼠骨髓瘤细胞系融合。然后通过筛选分泌抗体具有 TIGIT 抑制活性的杂交瘤细胞。本发明的杂交瘤细胞免疫球蛋白可变区的 DNA 序列可利用基于简并引物 PCR 的方法测定。

来源于啮齿动物(如小鼠)的抗体在体内用作治疗药物时可引起不需要的抗体免疫原性，重复使用导致人体产生针对治疗性抗体的免疫应答，这类免疫应答至少导致丧失治疗功效，而严重的则导致潜在致死过敏反应。降低啮齿动物抗体的免疫原性的一种方法包括嵌合抗体的产生，其中将小鼠可变区与人恒定区融合(Liu 等(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 :3439-43)。然而，嵌合抗体中的完整啮齿动物可变区的保留仍可在患者中引起有害的免疫原性。将啮齿动物可变结构域的互补决定区 (CDR)环移植到人构架上(即人源化)已被用于进一步将啮齿动物序列减至最低(Jones 等(1986)Nature 321 :522 ;Verhoeyen 等(1988)Science 239:1534)。

在一些实施方案中，本发明的嵌合或人源化抗体可基于所述制备的鼠单克隆杂交瘤抗体的序列来制备。编码重链和轻链免疫球蛋白的 DNA 可以从目标鼠杂交瘤中获得，并

且使用标准分子生物学技术进行工程改造以包含非鼠（例如人）免疫球蛋白序列。

在一些实施方案中，本发明所述的嵌合 TIGIT 抗体，可使用本领域已知的方法将杂交瘤来源的编码免疫球蛋白重链和轻链可变区与人 IgG 恒定区有效连接（参见例如属于 Cabilly 等人的美国专利 No.4,816,567），获得嵌合型重链和嵌合型轻链。在一些实施方案中，本发明的嵌合抗体包含的恒定区可选自人 IgG 任何亚型，如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，优选 IgG4。

在一些实施方案中，本发明的嵌合 TIGIT 抗体可由一种嵌合型轻链与一种嵌合型重链表达质粒“混合和匹配”转染表达细胞获得，此类“混合和匹配”的抗体的 TIGIT 结合可使用上述结合测定和其它常规结合测定（例如，ELISA）来进行测试。

本发明的所述抗体的可变区 CDR 的精确氨基酸序列边界可使用许多公知的方案的任何方案来确定，包括基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia(Chothia 等人.(1989)Nature 342:877-883, Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948(1997))基于抗体序列可变性的 Kabat(Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM(University of Bath), Contact(University College London), 国际 ImMunoGeneTics database (IMGT)(1999 Nucleic Acids Research, 27, 209-212), 以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类(affinity propagation clustering)的 North CDR 定义。本发明抗体的 CDR 可以由本领域的技术人员根据本领域的任何方案(例如不同的指派系统或组合)确定边界。

应该注意，基于不同的指派系统获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所差异。即不同指派系统下定义的同一种抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此，在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时，所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体，其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列，但是由于应用了不同的方案(例如不同的指派系统或组合)而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

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

本发明所述的人源化抗体,可以使用本领域已知的方法将鼠源 CDR 区插入人种系框架区。参见 Winter 等人的美国专利 No.5,225,539 及 Queen 等人的美国专利 No.5,530,101、5,585,089、5,693,762 和 6,180,370。简言之,发明人藉由 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)网站中的人类免疫球蛋白基因数据库搜寻与鼠源抗体可变区的 cDNA 序列同源的人类种系 IgG 基因,原则上藉由选定的 CDR 嫁接实现人源化。然而,CDR 环交换仍不能均匀产生具有与起始抗体相同的结合性质的抗体。在人源化抗体中,常常还需要构架残基(FR)(参与 CDR 环支持的残基)改变以保持抗原结合亲和力。简言之,人源化改造过程涉及以下步骤:A、把各候选抗体的基因序列与人胚胎系抗体基因序列进行比对,找出同源性高的序列;B、分析考察 HLA-DR 亲和性,选出亲和力低的人胚胎系框架序列;C、利用计算机模拟技术,应用分子对接分析可变区及其周边的框架氨基酸序列,考察其空间立体结合方式。通过计算静电力,范德华力,亲疏水性和熵值,分析各候选的抗体基因序列中可与 TIGIT 作用以及维护空间构架的关键氨基酸个体,将其嫁接回已经选择的人胚胎系基因框架,并在此基础上标配出必须保留的框架区氨基酸位点,合成人源化抗体。

在一些实施方式中,本发明的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段包括具有已通过氨基酸缺失、插入或取代突变的,但仍与上述抗体(特别地在上述序列中描绘的 CDR 区中)有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的那些抗体。在一些实施方案中,本发明的抗体与本发明具体序列中描绘的 CDR 区相比较时,在 CDR 区中已通过氨基酸缺失、插入或置换的氨基酸突变不超过 1、2、3、4 或 5 个。

在一些实施方案中,本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段,其包含选自重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 中的一个至 3 个,其中所述的 HCDR1 包含与选自 SEQ ID NO:1 或 11 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,HCDR2 包含与选自 SEQ ID NO:2 或 12 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,HCDR3 包含与选自 SEQ ID NO:3 或 13 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中,本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段,其包含重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,其中所述的 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列,HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 氨基酸序列。

在一些实施方式中,本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段,其包含重链互

补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中所述的 HCDR1 包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO:13 氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含选自轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 中的一个至 3 个，其中所述的 LCDR1 包含与 SEQ ID NO:6 或 16 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列，LCDR2 包含与 SEQ ID NO: 7 或 17 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述序列，LCDR3 包含与 SEQ ID NO:8 或 18 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述的 LCDR1 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列，LCDR3 包含 SEQ ID NO:8 氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述的 LCDR1 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列，LCDR3 包含 SEQ ID NO:18 氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段，其包含重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列，LCDR1 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列、LCDR2 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列；

在一些实施方式中，本发明所述的抗体或其抗原结合片段，其包含重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列，LCDR1 包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列、LCDR2 包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)，所述的重链可变区 (VH) 包含与选自 SEQ ID NO:4、14、21、23、25、27 和 29 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含轻链可变区(VL)，所述的轻链可变区(VL)包含与选自 SEQ ID NO: 9、19、22、24、26、28 和 30 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含与选自 SEQ ID NO:4、14、21、23、25、27 和 29 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列；和

其中所述的 VL 包含与选自 SEQ ID NO: 9、19、22、24、26、28 和 30 的氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列，所述的 VL 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含与 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列，所述的 VL 包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含与 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列，所述的 VL 包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含与 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列，所述的 VL 包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含与 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列，所述的 VL 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含与 SEQ ID NO:27 氨基酸序列，所述的 VL 包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中所述的 VH 包含与 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列，所述的 VL 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段是鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段完全抗体、单链抗体、Fab 抗体、Fab' 抗体、(Fab')₂ 抗体、或双（多）特异性抗体。

在一些实施方式中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段是任何 IgG 亚型，如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

在一些实施方式中，可在本文中所提供抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸修饰，以此产生 Fc 区变体。Fc 区变体可包含在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如取代)的人 Fc 区序列(例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区)。

在一些实施方式中，可能需要产生经半胱氨酸工程改造的抗体，例如“硫代 MAb”，其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基取代。

在一些实施方式中，本文中所提供的抗体可进一步经修饰为含有本领域中已知且轻易获得的其他非蛋白质部分。适合抗体衍生作用的部分包括，但不限于，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括，但不限于，聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1, 3-二烷、聚-1, 3, 6-三烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。

在一些实施方案中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段具有以下特性中的一种或多种：(1)特异性结合人 TIGIT 蛋白；(2)与食蟹猴 TIGIT 交叉反应；(3)抑制 TIGIT 与 PVR 和/或 PVRL2 结合；(4)抑制由 TIGIT 介导的活性信号转导；(5)促进 PD-1 轴拮抗剂对 T 细胞的激活作用；(6)单独或与 PD-1 轴拮抗剂联合使用能显著抑制肿瘤的生长。

在一些实施方案中，本发明所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段以约 1nM 的 KD 或更高亲和力(例如 1nM-2pM、1nM、100pM、10pM 或 2pM)特异性结合 TIGIT。在一个实施方案中，特异性结合人 TIGIT 的本发明抗体还与食蟹猴 TIGIT 交叉反应。本文所述的“交叉反应性”是指抗体与来自其它物种的同源蛋白反应的能力。抗体是否特异性结合人 TIGIT 可使用本领域中已知的任何测定法确定。本领域中已知测定结合亲和力的分析的实例包括表面等离子共振(例如，BIAcore)或类似技术(例如，ForteBio)。

在一些实施方案中，本发明所述的 TIGIT 抗体或其抗原结合片段具有抑制活性，例如抑制 TIGIT 的表达(如抑制细胞表面 TIGIT 的表达)、活性和/或信号传递，或干扰 TIGIT 和 PVR 和/或 PVRL2 之间的相互作用。本发明提供的 TIGIT 抗体在结合 TIGIT(如人 TIGIT)

或与其相互作用后完全或部分地降低或调节 TIGIT 的表达或活性。在抗体与人 TIGIT 多肽和/或肽之间相互作用后, TIGIT 生物学功能的降低或调节是完全、显著或部分的。当与不存在同本文所述的抗体相互作用(如结合)时 TIGIT 的表达或活性水平相比,存在抗体时 TIGIT 的表达或活性水平降低了至少 95%(例如降低了 96%、97%、98%、99%或 100%)时,所述抗体被认为能够完全抑制 TIGIT 的表达或活性。与不存在同本文所述的 TIGIT 抗体结合时 TIGIT 的表达或活性水平相比,存在 TIGIT 抗体时 TIGIT 的表达或活性水平降低了至少 50%(例如降低了 55%、60%、75%、80%、85%或 90%),此时所述 TIGIT 抗体被认为能够显著抑制 TIGIT 的表达或活性。与不存在同本文所述的抗体相互作用(如结合)时 TIGIT 的表达或活性水平相比,存在抗体时 TIGIT 的表达或活性水平降低了少于 95%(例如降低了 10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、85%或 90%),此时所述抗体被认为能够部分抑制 TIGIT 的表达或活性。

抗体表达

在一方面,本发明涉及包含一种或多种表达载体的宿主细胞以及用于产生本发明的任何抗体或其片段的方法,所述方法包括培养所述宿主细胞、纯化和回收所述抗体或抗原结合片段。

在一方面,本发明提供了编码以上任何抗 TIGIT 抗体或其片段的核酸。所述核酸可以包含编码抗体的轻链可变区和/或重链可变区的氨基酸序列的核酸,或包含编码抗体的轻链和/或重链的氨基酸序列的核酸。

在一个实施方案中,提供包含所述核酸的一个或多个载体。在一个实施方案中,载体是表达载体。

本发明提供用于表达本发明的重组抗体的哺乳动物宿主细胞,包括可获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)的许多永生化细胞系。这些尤其包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0、SP2/0 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞、A549 细胞、293T 细胞和许多其它细胞系。哺乳动物宿主细胞包括人、小鼠、大鼠、狗、猴、猪、山羊、牛、马和仓鼠细胞。通过测定哪种细胞系具有高表达水平来选择特别优选的细胞系。

在一个实施方案中,本发明提供制备抗 TIGIT 抗体的方法,其中所述方法包括,将表达载体导入哺乳动物宿主细胞中,将宿主细胞培养足够的一段时间,以允许抗体在宿主细胞中表达,或者更优选允许抗体分泌到宿主细胞生长的培养基中,从而产生抗体。可采用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。

很可能由不同细胞系表达或在转基因动物中表达的抗体彼此具有不同的糖基化。然

而,由本文提供的核酸分子编码的或包含本文提供的氨基酸序列的所有抗体是本发明的组成部分,而不论抗体的糖基化如何。同样,在某些实施方式中,非岩藻糖基化抗体是有利的,因为它们通常在体外和体内具有比其岩藻糖基化对应物更强力的功效,并且不可能是免疫原性的,因为它们的糖结构是天然人血清 IgG 的正常组分。

药物组合物和药物制剂

本发明提供了包括一种或多种结合 TIGIT 的单克隆抗体或其抗原结合片段的药物组合物。应理解,本发明提供的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段或其药物组合物可以整合制剂中合适的运载体、赋形剂和其他试剂以联合给药,从而提供改善的转移、递送、耐受等。

术语“药物组合物”指这样的制剂,其允许包含在其中的活性成分的生物学活性以有效的形式存在,并且不包含对施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

可以通过将具有所需纯度的本发明的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段与一种或多种任选的药用辅料(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A.编(1980))混合来制备包含本文所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段的药物制剂,优选地,所述药物制剂为水溶液或冻干制剂的形式。

本发明的药物组合物或制剂还可以包含一种或多种其它活性成分,所述活性成分是被治疗的特定适应证所需的,优选具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些活性成分。在一些实施方式中,其它的活性成分为化疗剂、免疫检查点抑制剂、生长抑制剂、抗生素或已知的各种抗肿瘤或抗癌剂,所述活性成分以对于目的用途有效的量合适地组合存在。在一些实施方式中,本发明的药物组合物还包含编码抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的组合物。

抗体的医药用途

一方面,本发明涉及向受试者施用有效量的本文所述的任何抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段,或包含所述抗体或其抗原结合片段的免疫缀合物,或药物组合物的方法,用于诱导 T 细胞或 NK 细胞介导的抗肿瘤活性或增强机体的免疫应答。

另一方面,本发明涉及向受试者施用有效量的本文所述的任何抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段,或包含所述抗体或抗原结合片段的免疫缀合物,或药物组合物的方法,用于治疗或延缓各种癌症、免疫相关疾病和 T 细胞功能障碍性疾病。

另一方面,本发明涉及向受试者联合施用有效量一种或多种疗法(例如治疗方式和/或其它治疗剂)。在一些实施方案中,所述疗法包括手术治疗和/或放射疗法。在一些实施

方案中，其它治疗剂选自化疗剂、PD-1 轴拮抗剂（例如抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体）。

在其他方面，本发明提供本文所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段在生产或制备药物中的用途，所述药物用于治疗上文提及的相关疾病或病症。本发明还提供本文所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段和 PD-1 轴拮抗剂（例如抗 PD-1 抗体或抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体）在生产或制备药物中的用途，所述药物用于治疗上文提及的相关疾病或病症。

在某些实施方案中，本文所述的方法和用途还包括向所述个体施用一种或多种疗法（例如治疗方式和/或其它治疗剂）。可以单独或与疗法中的其它治疗剂组合使用本发明的抗体。例如，可以与至少一种另外的治疗剂共施用。

用于诊断和检测的方法

在某些实施方案中，本文中提供的任何抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段可以用于检测 TIGIT 在生物样品中的存在。术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测。在某些实施方案中，生物样品是血、血清或生物来源的其他液体样品。在某些实施方案中，生物样品包含细胞或组织。

本发明包括所叙述特定实施方式的所有组合。本发明的进一步实施方式及可应用性的完整范畴将自下文所提供的详细描述变得显而易见。然而，应理解，尽管详细描述及特定实施例指示本发明的优选实施方式，但仅以说明的方式提供这些描述及实施例，因为本发明的精神及范畴内的各种改变及修改将自此详细描述对熟悉此项技术者变得显而易见。出于所有目的，包括引文在内的本文所引用的所有公开物、专利及专利申请将以引用的方式全部并入本文。

本发明采用下述缩略词：

RLU 代表相对发光单位；

BSA 代表牛血清白蛋白。

实施例

实施例 1：重组蛋白 hTIGIT-ECD-mFc

通过常规 PCR 技术扩增编码 TIGIT 胞外结构域的 cDNA 序列，利用常规的克隆技术，将扩增片段克隆到自主构建的真核表达质粒系统（MX2-mFc，包含鼠源 IgG2a Fc 域）中，

其含嘌呤霉素筛选体系，从而产生重组融合蛋白表达质粒 hTIGIT-ECD-mFC。利用表达细胞 293E 表达并纯化获取 hTIGIT-ECD-mFC 重组蛋白。

其中人 TIGIT 胞外结构域 (hTIGIT-ECD) 氨基酸序列为 NCBI 登录号 NM_173799.4 的第 24-155 位氨基酸，用于本发明抗体的免疫原和活性检测。

食蟹猴 TIGIT 胞外结构域(cynoTIGIT-ECD)序列为 NCBI 登录号 XP_015300912.1，用于本发明抗体活性检测。

实施例 2：杂交瘤抗体的制备与筛选

使用标准分子生物学技术来产生杂交瘤抗体。简言之，重组蛋白 hTIGIT-ECD-mFC 作为抗原与等量免疫佐剂混合，取 5 只 6 周大雌性 Balb/c 小鼠进行免疫。在初次免疫以后，在初次免疫后第三周加强免疫一次，之后每两周进行一次加强免疫，共 6 次免疫。在最后一针加强免疫后，选择血清中具有高滴度抗 hTIGIT 抗体的小鼠作为细胞融合实验免疫细胞的来源。使用标准杂交瘤技术，使脾细胞分离，按常规电转方法(参见 BTX 公司电转仪手册)与鼠类骨髓瘤细胞系 SP2/0 细胞 (ATCC)融合。将融合细胞重悬于含有 HAT 的 DMEM 完全培养基(Corning)，涂均匀铺板在含有小鼠饲养细胞的 384 孔板中。

基于初始所希望的抗体/抗原结合特征（诸如对于 TIGIT 结合特异性、阻断 TIGIT 与 PVR 结合的能力、阻断 TIGIT 介导的生物活性），鉴定单克隆杂交瘤分泌上清，其中杂交瘤 2018 和 23020 分泌的上清抗体用于进一步表征。

实施例 3：鼠源抗 TIGIT 抗体对 T 细胞活性的影响

通过刺激识别抗原呈递细胞(APC)上由主要组织相容性复合体 I 类或 II 类蛋白呈递的 T 细胞受体(TCR)来实现 T 细胞活化。活化的 TCR 转而启动信号传导事件的级联，其可通过转录因子(例如活化子-蛋白-1(AP-1)、活化的 T 细胞的核因子(NFAT)或活化的 B 细胞的核因子 κ 轻链增强子(NF κ b))驱动的报道基因来监测。通过在 T 细胞上组成或诱导表达的共同受体的结合(engagement)来调整 T 细胞应答。程序性细胞死亡蛋白(PD1)和 TIGIT 是 T 细胞活性的负调节物。PD-1 和 TIGIT 分别与在包括 APC 或癌症细胞上表达的其配体 (PD-L1) 和 PVR (或/和 PVRL2) 相互作用，这种相互作用导致通过将磷酸酶募集到 TCR 信号小体(signalosome)来递送抑制信号，从而产生正信号传导的抑制。通过构建两个工程化改造的稳定表达细胞系 Jurkat 细胞(Jurkat/NFAT-Luc/hPD-1-hTIGIT) 和 CHO 细胞(CHO/hPD-L1-hPVRL2)来测量 APC 和 T 细胞之间的相互作用诱导的 T 细胞信号传导。

具体地，将稳定表达 hPD-L1/hPVRL2 的 CHO 细胞铺到 96 孔板，每孔细胞量为 5

$\times 10^4$, 37°C、7%CO₂ 培养过夜, 去除细胞上清, 每孔中加入 40 μ L 抗 TIGIT 抗体 (2O18、23O20 或 MBSA43) 稀释液 (起始浓度为 10ug/ml, 3 倍滴定), 和/或预先加入 40 μ L JS001 (0.5 ug/ml), 加入 40 μ L 可以持续表达 hPD-1/hTIGIT/NFAT-荧光素酶的 Jurkat 报告细胞, 总细胞数为 1×10^5 细胞, 37°C、7%CO₂ 培养 6 小时, 加入荧光素酶试剂, 酶标仪检测发光值。

其中, MBSA43 为商业化抗人 TIGIT 抗体, 购自 ThermoFisher, 货号 16-9500-82。

JS001: 君实生物自主研发抗 PD-1 抗体 (CN201310258289, 抗体 38)。

用 GraphPad Prism 5 分析数据, 计算 TIGIT 抗体激活 T 细胞的 EC₅₀ 值, 评估抗 TIGIT 抗体单药或联合抗 PD-1 抗体 (JS001) 对 T 细胞活性的影响。具体见图 1 和下表 1。

表 1: 抗 TIGIT 抗体单药或联合抗 PD-1 抗体 (JS001) 对 T 细胞活性的影响

组别	抗体	RLU 变化倍数	EC ₅₀
组 1	2O18 +JS001	3.3	65.47
组 2	单用 2O18	6.3	51.78
组 3	23O20+JS001	2.3	180.9
组 4	单用 23O20	2.3	195.5
组 5	MBSA43+JS001	2.2	164.3
组 6	单用 MBSA43	2.2	179.7
组 7	mIgG+JS001	1.2	~ 11641
组 8	单用 mIgG	1.2	~ 13058

mIgG: 阴性对照抗体。

结果表明:

- (1) 抗体 2O18 和 23O20 能明显促进 T 细胞活性;
- (2) 抗体 2O18 对 T 细胞的激活作用明显优于商业抗体 MBSA43;
- (3) 抗体 2O18、23O20 和 MBSA43 与抗 PD-1 抗体 JS001 对 T 细胞的激活均具有协同效应。

实施例 4: 嵌合抗体构建与表达

用基于简并引物 PCR 的方法, 测定由杂交瘤 2O18 和 23O20 表达的抗体可变区的 DNA 序列。

2O18 和 23O20 的核苷酸序列和氨基酸序列如表 2 所示。

表 2: 杂交瘤抗体可变区的氨基酸序列

杂交瘤抗体	可变区	氨基酸序列	核苷酸序列
2O18	VH	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5

	VL	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
23O20	VH	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
	VL	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20

从人血细胞(北京血液研究所)中克隆人 IgG4 重链恒定区 Fc 片段 (SEQ ID NO:35) 和轻链恒定区, 联入 pCDNA3.1 质粒加以改造。上述重链和轻链可变区序列片段由 Genscript 公司合成, 重链经 Bspq I 酶切, 轻链经 Bspq I 酶切后, 联入相对应改造的 pCDNA3.1 质粒中, 经测序确定 IgG4 嵌合型的重链 (ch-HC) 或轻链 (ch-LC) 的表达质粒。可将上述不同的嵌合型重链和轻链的表达质粒混合配对转染表达细胞, 获得 4 种嵌合抗体, 编号为 ch1 到 ch4 (见表 3)。

表 3: 嵌合抗体轻/重链来源

	HC	2O18-ch-HC	23O20-ch-HC
LC			
2O18-ch-LC		ch1	ch3
23O20-ch-LC		ch2	ch4

实施例 5: ELISA 检测嵌合抗 TIGIT 抗体与抗原 TIGIT 结合活性

即将 1 μ g/ml 的人 TIGIT-ECD-mFc 包被于 96 孔酶标板, 37 摄氏度恒温孵育 60-90 分钟。然后弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液洗 3 次, 加入含有 2% BSA 的 PBS 溶液封闭 60 分钟。用洗涤缓冲液洗 3 次后加入不同浓度的嵌合抗体稀释液, 37 摄氏度孵育 60 分钟后用洗涤缓冲液冲洗 3 次, 然后加入 1: 5000 倍稀释的抗 IgG4-HRP, 37 摄氏度孵育 30 分钟, 经洗涤缓冲液冲洗三次后, 加入 100 μ L TMB 底物溶液显色, 室温反应 30 分钟后, 以 100 μ L, 2M 的盐酸溶液终止反应并在 450nm 处读出吸光度。

如图 2 所示, 嵌合抗体 ch1, ch4 与人 TIGIT 结合具有较高的特异性, 其 EC₅₀ 分别为 32.49ng/mL 和 8.932ng/mL。

实施例 6. 嵌合抗 TIGIT 抗体对 T 细胞活性的影响

如实施例 3 所述的实验原理和实验方法, 利用萤光素酶报告基因实验(Luciferase Assay)检测嵌合抗体 ch1, ch4 对 T 细胞活性的影响。

如图 3 所示, 嵌合抗体 ch1, ch4 分别能显著增强荧光信号, 即促进 T 血细胞的激活, 其 EC₅₀ 分别为 76.64ng/mL 和 103.9ng/mL。

实施例 7: 抗体的人源化改造

对于抗体的人源化,首先在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)网站中的人类免疫球蛋白基因数据库搜寻与鼠源抗体可变区的 cDNA 序列同源的人类种系 IgG 基因。再藉由 Kabat 编号系统或 IMGT 编号系统定义可变区 CDR 的氨基酸序列及其精确边界,IMGT 定义的鼠源抗体可变区 CDR 序列如表 4 所示。原则上将与鼠源抗体可变区具有高同源性的人类 IGVH 及 IGVk 选为人源化模板,藉由 CDR 嫁接实施人源化。简言之,人源化改造过程涉及以下步骤: A、把各候选抗体的基因序列与人胚胎系抗体基因序列进行比对,找出同源性高的序列; B、分析考察 HLA-DR 亲和性,选出亲和力低的人胚胎系框架序列; C、利用计算机模拟技术,应用分子对接分析可变区及其周边的框架氨基酸序列,考察其空间立体结合方式。通过计算静电力,范德华力,亲疏水性和熵值,分析各候选的抗体基因序列中可与 TIGIT 作用以及维护空间构架的关键氨基酸个体,将其嫁接回已经选择的人胚胎系基因框架,并在此基础上标配出必须保留的框架区氨基酸位点,合成人源化抗体。综合以上各因素,共设计 81 个人源化抗体进行抗体活性筛选。其中抗体 hu3, hu20, hu62, hu69 和 hu81 的氨基酸序列信息如表 5 所示; 抗体 hu3, hu20 的全长氨基酸序列信息如表 6 所示。

表 4: IMGT 定义 CDR

抗体 结构域	2018	23020
VH	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:14
HCDR1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:11
HCDR2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:12
HCDR3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:13
VL	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:19
LCDR1	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:16
LCDR2	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:17
LCDR3	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:18

表 5: 人源化抗体氨基酸序列 (CDR/可变区)

人源化抗体	hu3	hu20	hu62	hu69	hu81
HCDR1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:11
HCDR2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:12
HCDR3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:13
LCDR1	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:16
LCDR2	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:17
LCDR3	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:18
VH	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:29

VL	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:30
----	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

表 6: 人源化抗体全长氨基酸

人源化抗体	HC	LC
hu3	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32
hu20	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34

实施例 8: ELSIA 检测人源化抗体与人 TIGIT 的结合特异性

利用常规 ELISA 检测方法检测人源化抗体与人 TIGIT 结合特异性。即将 0.5 μ g/ml 的人 TIGIT-ECD-mFc 包被于 96 孔酶标板, 37 摄氏度恒温孵育 60-90 分钟。然后弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液洗 3 次, 加入含有 2% BSA 的 PBS 溶液封闭 60 分钟。用洗涤缓冲液洗 3 次后加入不同浓度的抗体稀释液, 37 摄氏度孵育 60 分钟后用洗涤缓冲液冲洗 3 次, 然后加入 1: 5000 倍稀释的抗 IgG4-HRP, 37 摄氏度孵育 30 分钟, 经洗涤缓冲液冲洗三次后, 加入 100 μ L TMB 底物溶液显色, 室温反应 30 分钟后, 以 100 μ L 2M 的盐酸溶液终止反应并在 450nm 处读出吸光度。

如图 4 所示, 抗体 hu3, hu20, hu62, hu69 和 hu81 与人 TIGIT 结合具有较高的特异性, 其 EC₅₀ 分别为 23.20 ng/mL, 37.84 ng/ml, 8.60 ng/mL, 10.66ng/mL 和 9.83 ng/mL; 并且抗体 hu3, hu62, hu69 和 hu81 与 TIGIT 结合的特异性明显优于对照抗体 Etigilimab。

实施例 9: 人源化抗 TIGIT 抗体对 T 细胞活性的影响

如实施例 3 所述的实验原理和实验方法, 利用萤光素酶报告基因实验(Luciferase Assay)检测人源化抗 TIGIT 抗体 hu3, hu20, hu62, hu69 和 hu81 对 T 细胞活性的影响。

如图 5 所示, 抗体 hu3, hu20, hu62, hu69 和 hu81 分别能显著增强荧光信号, 即促进 T 血细胞的激活, 其 EC₅₀ 分别为 139.9ng/mL, 42.39ng/mL, 109.4 ng/mL, 102.7 ng/mL, 88.43 ng/mL; 并且抗体 hu3, hu20, hu62, hu69 和 hu81 促进 T 血细胞的激活作用明显优于对照抗体 Etigilimab。

实施例 10: FACS 检测抗体阻断 hTIGIT 与其配体 hPVR 的结合作用

采用基于竞争性流式细胞(FACS)测定, 检测抗体阻断 hTIGIT 与其配体 hPVR 等的结合作用。简而言之, 将不同浓度的抗体稀释液(起始 30 μ g/ml, 3 倍滴定)与 PVR-mFc (1 μ g/ml, 50 μ L) 混合, 室温孵育 30 分钟。然后将混合物与细胞悬液(293F-hPVR 稳转细胞株, 2.5 \times 10⁴ 细胞/孔)在 37 摄氏度孵育 15 分钟, 以 PBS 洗脱 3 次后, 加入 100 μ L 山羊抗人 IgG-PE 抗体, 避光孵育 30min。以 PBS 洗脱 3 次后, 通过 FACS 检测。根据从

FSC/SSC 对活细胞进行门控，并测量其几何平均荧光。

如图 6 所示，本发明人源化抗体能有效阻断 TIGIT 与细胞表面的 PVR 结合。

实施例 11：Biacore 检测人源化抗体与不同种属 TIGIT 的结合

利用 Biacore T200 (GE) 检测本发明的抗体与 TIGIT 间的亲和力和结合动力学。首先将 S 系列 CM5 芯片 (GE) 装载到仪器上，准备将溶解于醋酸钠-醋酸缓冲液 (pH 5.0) 的 40 $\mu\text{g/mL}$ 羊抗人 Fc 片段抗体 (Jackson ImmuneResearch 公司) 偶联于芯片表面。抗体抗原结合检测使用的缓冲液是 GE 医疗生命科学公司的 HBS-EP+。将抗体 hu3 与 hu20 分别稀释至 8 $\mu\text{g/mL}$ ，并捕获于芯片表面。将抗原 hTIGIT Fc 稀释至 20nM，并以 30 $\mu\text{L/min}$ 的流速注入芯片表面 180s，检测抗体与抗原的结合解离信号。利用 Biacore T200 Evaluation Software 3.0 软件以 1:1 结合模型分析所得数据。拟合得到抗体与抗原间结合的动力学常数结合速率 $k_a(1/\text{Ms})$ ，解离速率 $k_d(1/\text{s})$ ，平衡解离常数 $K_D(\text{M})$ 如下表 7 所示。

表 7：抗体与 TIGIT-Fc 的亲和力

抗体	抗原	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$	$K_D(\text{M})$
hu3	Cyno TIGIT-Fc	2.11E+05	3.00E-04	1.42E-09
hu20	Cyno TIGIT-Fc	2.26E+05	3.29E-04	1.45E-09
hu3	hTIGIT-Fc	9.35E+05	1.21E-04	1.30E-10
hu20	hTIGIT-Fc	7.77E+05	1.63E-04	2.09E-10

结果显示，本发明的抗体与人、食蟹猴的 TIGIT 均具有高亲和力，抗体与人的 K_D 值低至 0.13nM。

实施例 12：人源化抗体对小鼠肿瘤生长的抑制作用

本研究涉及 B-hPD-1/hTIGIT 人源化小鼠 (购自百奥赛图江苏基因生物技术有限公司；雌性) MC38 结肠癌动物模型的建立和抗 TIGIT 抗体和其与抗-PD1 抗体联合给药的协同抗肿瘤效应的研究。

将 PBS 重悬的 MC38 细胞以 5×10^5 个/0.1 mL 浓度，0.1 mL/只体积接种于 B-hPD-1/hTIGIT 人源化小鼠的背部右侧皮下。当平均肿瘤体积达到 80-100 mm^3 时，根据小鼠肿瘤体积和体重选择合适的小鼠入组，平均分配到 8 个实验组中，每组 8 只，分组当天开始给药，具体给药方案见下表 8。

表 8：给药方案

组别	给药抗体	剂量	给药途径	给药	给药次

		(mg/kg) ^a		频率 ^b	数
1	KLH hIgG4	10	i.p	BIW	6
2	JS001	0.3	i.p	BIW	6
3	hu20	1	i.p	BIW	6
4	hu20	3	i.p	BIW	6
5	hu20	10	i.p	BIW	6
6	JS001+hu20	0.3+1	i.p	BIW	6
7	JS001+hu20	0.3+3	i.p	BIW	6
8	JS001+hu20	0.3+10	i.p	BIW	6

注：a：给药体积依实验动物体重按 10 μL/g 计算；

b：BIW 指每周给药 2 次；

i.p：腹腔注射；

KLH hIgG4：阴性对照抗体；

JS001：君实生物自主研发抗 PD-1 抗体（CN2013102582892，抗体 38）。

在整个研究期间从第 6 天（给药前）开始每周测量两次肿瘤体积和动物体重，连续监测 3 周。采用游标卡尺测定肿瘤的长径(L)和短径(W),肿瘤体积(V)按如下公式计算： $V=L \times W^2/2$ 。将来自每组的小鼠的肿瘤体积与时间作图。使用方差分析(ANOVA)来确定统计显著性。< 0.05 的 P 值被视为在所有分析中具有统计显著性。

26 天实验结束时，使小鼠安乐死。分离瘤组织拍照并称重量，测量各组小鼠瘤重和体积（肿瘤终末体积），并且计算相对肿瘤生长抑制率（TGI(%)）。

结果：

(1) 如图 7 所示，单药方面，给药 3 周后，相对于组 1(KLH hIgG4; 10mg/kg)给药组，组 2(JS001; 0.3 mg/kg)、组 3(hu20; 1 mg/kg)、组 4(hu20; 3 mg/kg)和组 5(hu20; 10 mg/kg)给药组对 MC38 荷瘤小鼠中肿瘤增长有明显的抑制作用，瘤体积减小，肿瘤生长也放缓。联合用药方面，联合给药组比单药给药组（组 6 vs 组 3/组 2；组 7 vs 组 4/组 2；组 8 vs 组 5/组 2）对 MC38 荷瘤小鼠中肿瘤增长有抑制作用更显著，即本发明的抗 TIGIT 单抗 hu20 与抗 PD-1 单抗 JS001 联合用药表现出良好的协同抗肿瘤效应。

(2) 本发明还计算了在第 26 天（植瘤后）实验结束时各组小鼠中的相对肿瘤生长抑制率。相对肿瘤生长抑制率的计算公式如下：

$$\text{相对肿瘤生长抑制率 TGI(\%)} = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100\%$$

其中， $T_i - T_0$ = 给药组给药后肿瘤终末体积 - 给药组给药前肿瘤体积； $V_i - V_0$ = 对照组给药后肿瘤终末体积 - 对照组给药前肿瘤体积（第 6 天给药前肿瘤体积）。

计算结果如下表 9 所示：

表 9：抗 TIGIT 抗体对荷瘤小鼠肿瘤组织生长的影响（mm³，Mean ± SD, n=8）

组别	给药抗体;剂量	实验结束后肿瘤平均体积	TGI(%)
----	---------	-------------	--------

		(mm ³ , Mean ±SD, n=8)	
1	KLH hlgG4;10mg/kg	2562±529	N/A
2	JS001;0.3mg/kg	1713±876	34.3%
3	hu20;1mg/kg	1739±956	33.2%
4	hu20;3mg/kg	1540±809	41.3%
5	hu20;10mg/kg	1555±549	40.7%
6	JS001+hu20; 0.3 mg/kg +1 mg/kg	1153±617	56.9%
7	JS001+hu20; 0.3 mg/kg +3mg/kg	1101±712	59.0%
8	JS001+hu20; 0.3 mg/kg +10mg/kg	990±609	63.5%

Mean ±SD: 平均值 ± 标准偏差

结果显示, 在实验终末期 (植瘤后第 26 天), 抗 TIGIT 抗体 hu20 与抗 PD-1 抗体 JS001 联合给药组的相对肿瘤生长抑制率 TGI(%) 明显高于 hu20 或 JS001 单独给药组 (组 6 vs 组 3/组 2; 组 7 vs 组 4/组 2; 组 8 vs 组 5/组 2)。

权 利 要 求 书

1. 一种分离的抗 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包含：

(1) 选自重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 中的 1 个至 3 个，其中所述的 HCDR1 包含与 SEQ ID NO:1 或 11 所示的氨基酸序列一致或具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，HCDR2 包含与 SEQ ID NO:2 或 12 所示的氨基酸序列一致或具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，HCDR3 包含与 SEQ ID NO:3 或 13 所示的氨基酸序列一致或具有至少 90% 同一性的氨基酸序列；和/或

(2) 选自轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 中的 1 个至 3 个，其中所述的 LCDR1 包含与 SEQ ID NO:6 或 16 所示的氨基酸序列一致或具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，LCDR2 包含与 SEQ ID NO: 7 或 17 所示的氨基酸序列一致或具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，LCDR3 包含与 SEQ ID NO:8 或 18 所示的氨基酸序列一致或具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

2. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 和轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其选自：

(1)所述的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列，LCDR1 包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列；或

(2) 所述的 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列，HCDR2 包含 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列，HCDR3 包含 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列，LCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列，LCDR2 包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列和 LCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含重链可变区 (VH)和轻链可变区(VL)，其中：

所述 VH 包含与选自 SEQ ID NO:4、14、21、23、25、27 和 29 的任一氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；和/或

所述 VL 包含与选自 SEQ ID NO: 9、19、22、24、26、28 和 30 的任一氨基酸序列一致或具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨

氨基酸序列。

4. 如权利要求 3 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，所述抗体选自：

(1) VH 包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列和 VL 包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列的抗体；或

(2) VH 包含与 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列和 VL 包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列的抗体；或

(3) VH 包含与 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列和 VL 包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列的抗体；或

(4) VH 包含与 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列和 VL 包含 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列的抗体；或

(5) VH 包含与 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列和 VL 包含 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列的的抗体；或

(6) VH 包含与 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列和 VL 包含 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列的抗体；或

(7) VH 包含与 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列和 VL 包含 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列的抗体。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 或 33 所示，和/或所述抗体的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 或 34 所示。

6. 如权利要求 5 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述的抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:31 所示，轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:32 所示；或所述抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:33 所示，轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:34 所示。

7. 如权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

8. 如权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段是完全抗体、单链抗体、Fab 抗体、Fab' 抗体、(Fab')₂ 抗体、或双（多）特异性抗体。

9. 如权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是任何 IgG 亚型，如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

10. 一种分离的核酸分子，其编码如权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

11. 一种重组载体或表达载体，其包含一个或多个如权利要求 10 所述的核酸序列，其中所述载体适合用于重组产生权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
12. 一种宿主细胞，其包含一个或多个如权利要求 11 所述的重组载体或表达载体或权利要求 10 所述的核酸分子，和/或表达权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
13. 一种药物组合物，其包含如权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体或赋形剂的组合物。
14. 如权利要求 13 所述的药物组合物，其进一步包含 PD-1 轴拮抗剂。
15. 治疗受试者癌症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求 1 至 9 任一项所述的抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 13 至 14 任一项所述的药物组合物。
16. 如权利要求 15 所述的方法，其还包括向所述受试者联合施用一种或多种疗法，所述疗法包括手术治疗和/或放射疗法和/或施用一种或多种其它治疗剂，所述的治疗剂包括化疗剂、PD-1 轴拮抗剂和抗血管生成剂。
17. 如权利要求 16 所述的方法，其中所述治疗剂是 PD-1 轴拮抗剂。
18. 权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 10 所述核酸分子、权利要求 11 所述载体、权利要求 12 所述宿主细胞或权利要求 14 所述药物组合物在制备用于治疗 and/或预防 TIGIT 介导的疾病或病症的药物中的用途；优选地，所述疾病或病症是癌症。
19. 一种产生如权利要求 1-9 任一项所述抗体或其抗原结合片段的方法，包括培养权利要求 12 所述的宿主细胞，并从培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。
20. 权利要求 1-9 任一项所述的抗体或其抗原结合片段与 PD-1 轴拮抗剂组合在制备用于在受试者中治疗癌症的药物中的用途；优选地，所述抗 PD-1 轴拮抗剂选自：PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体或抗 PD-L2 抗体。

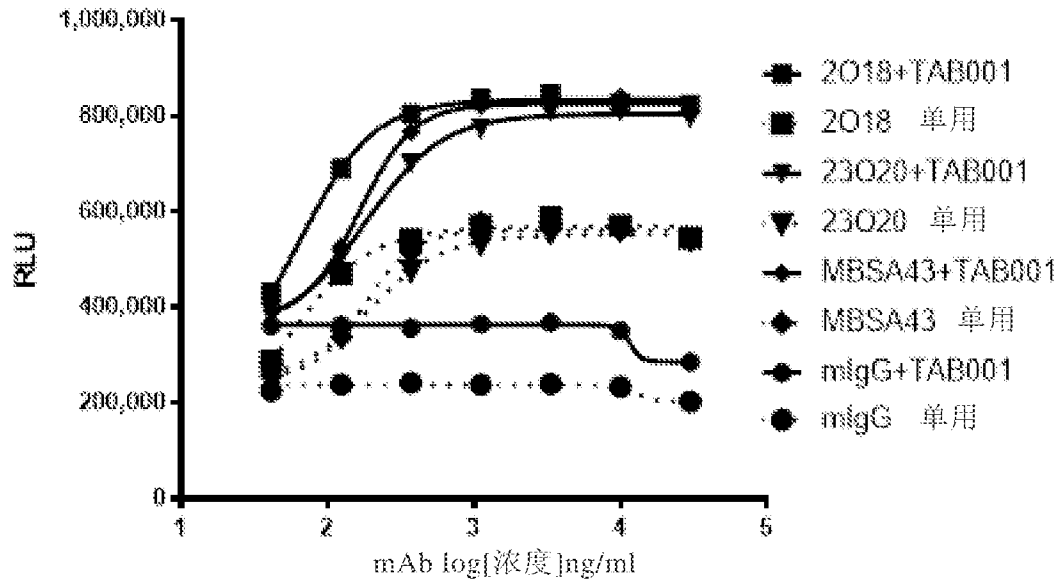


图 1

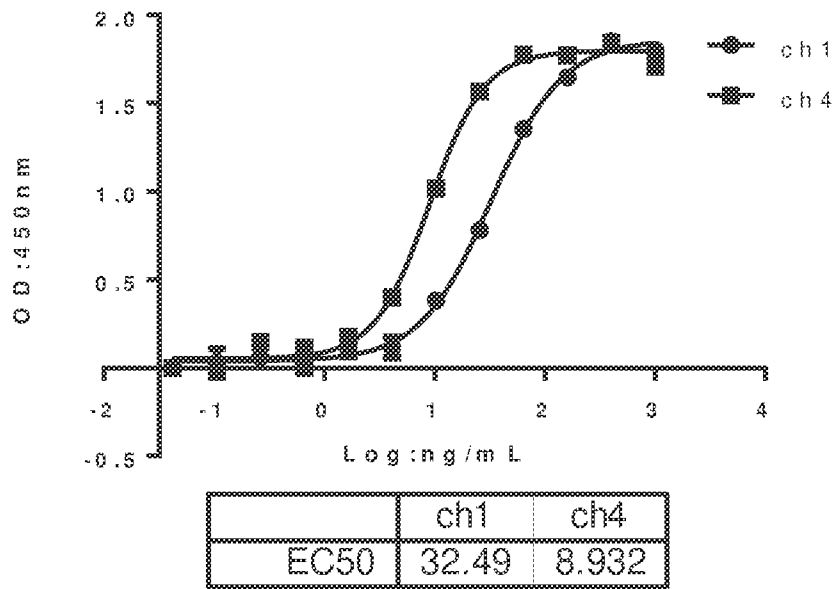


图 2

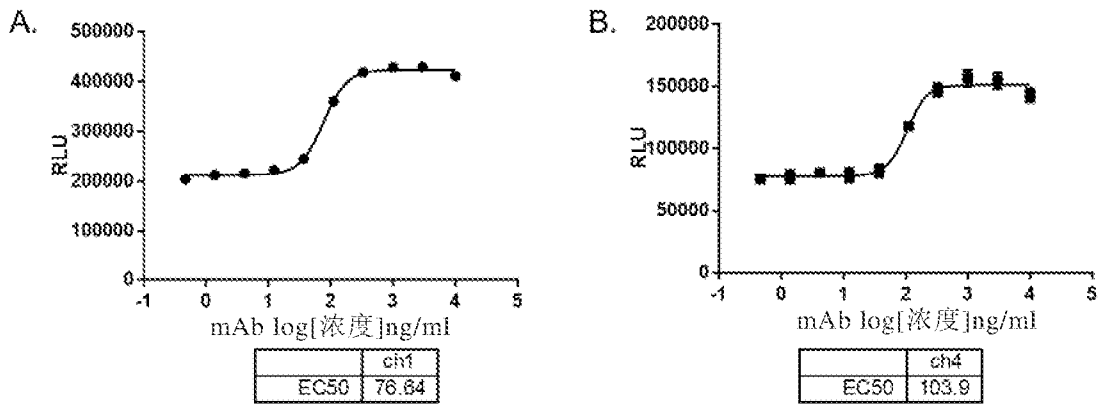


图 3

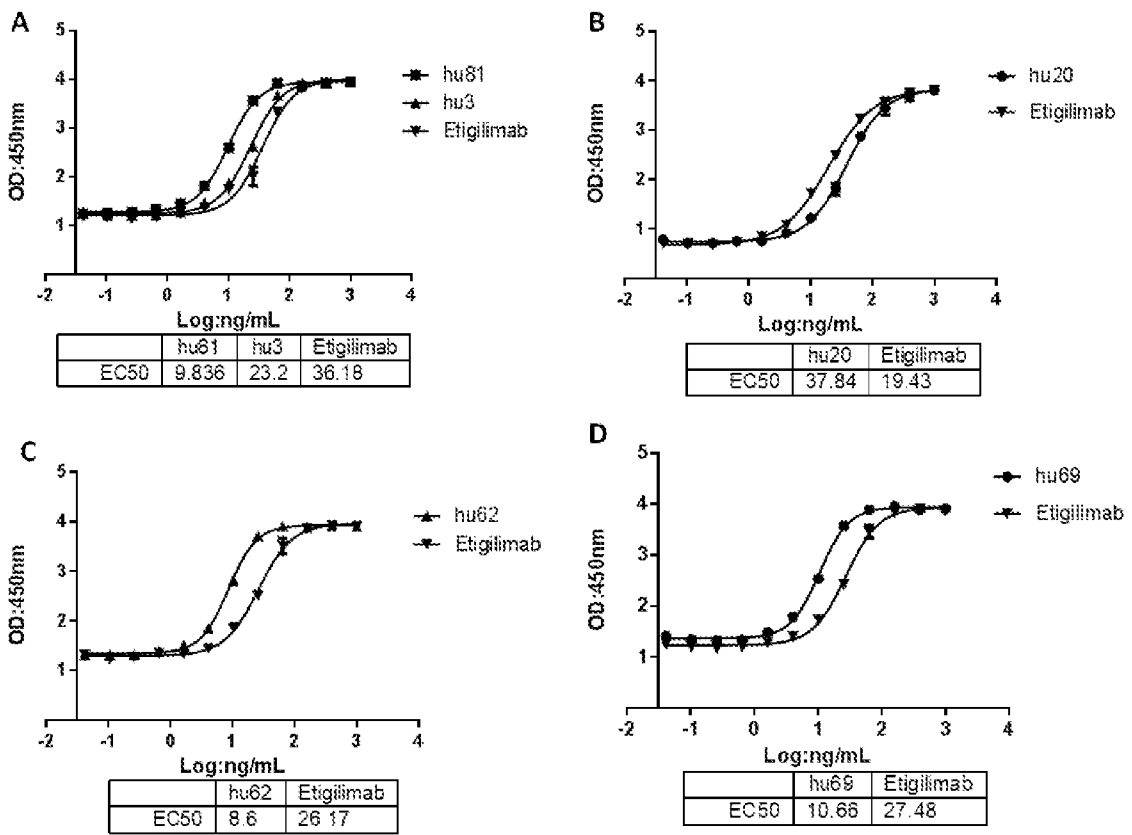


图 4

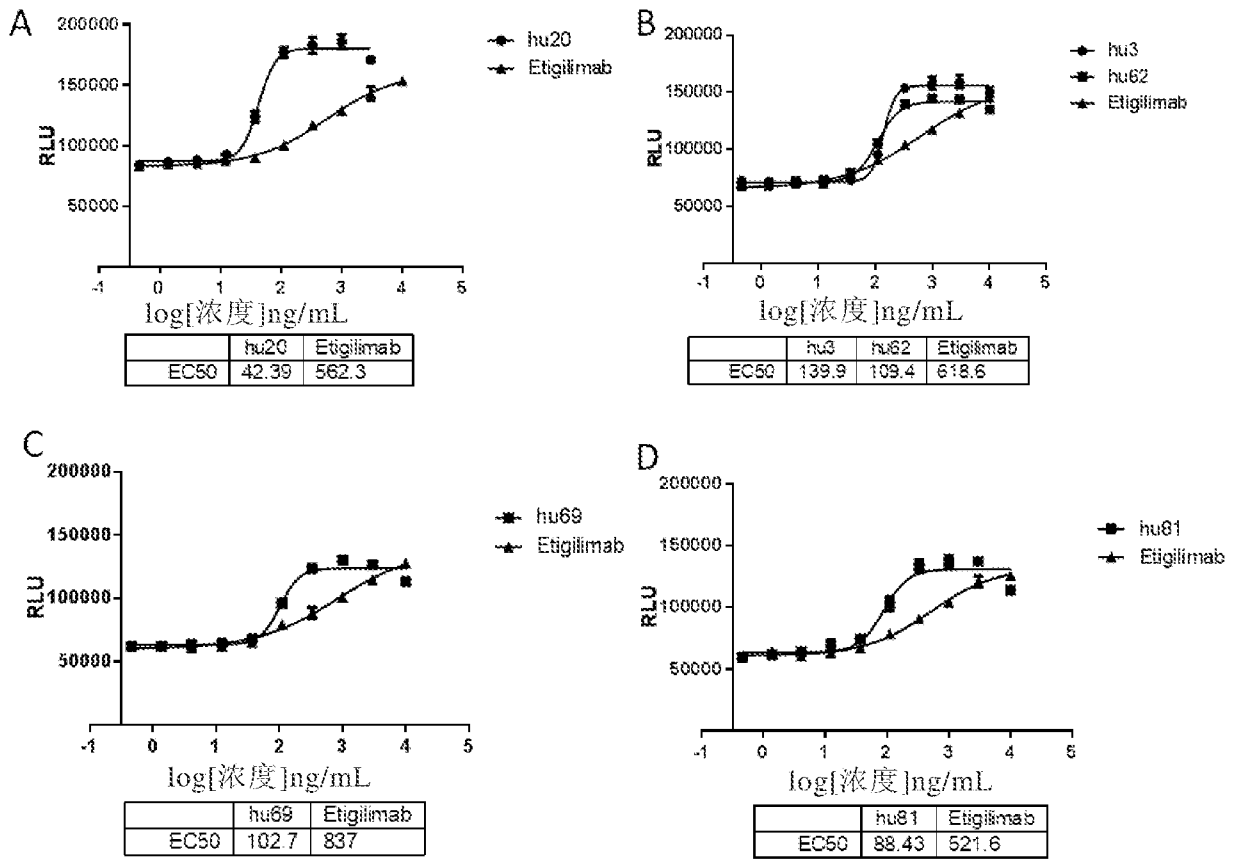


图 5

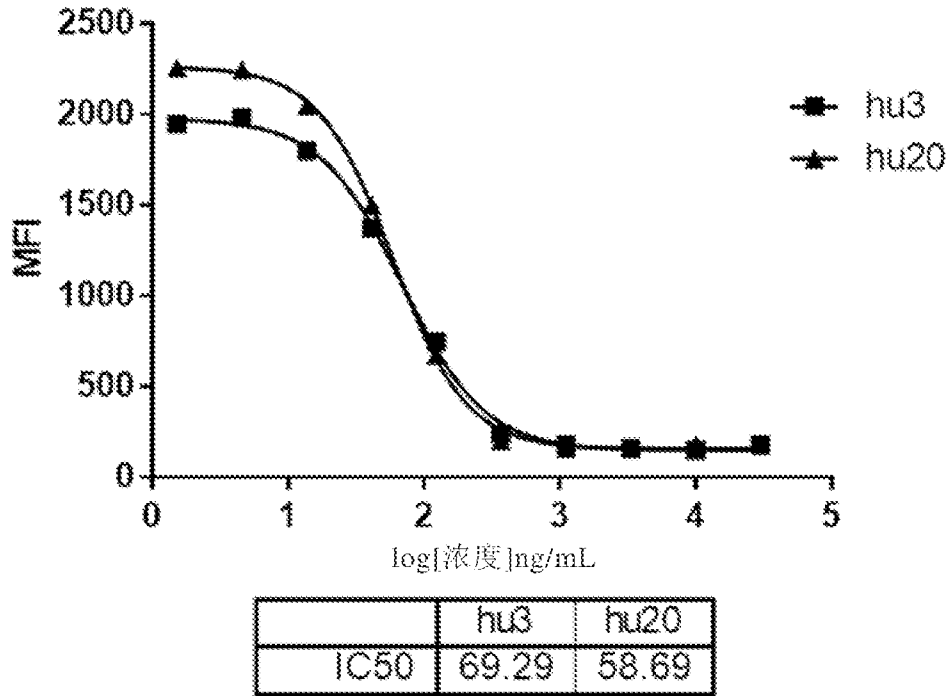


图 6

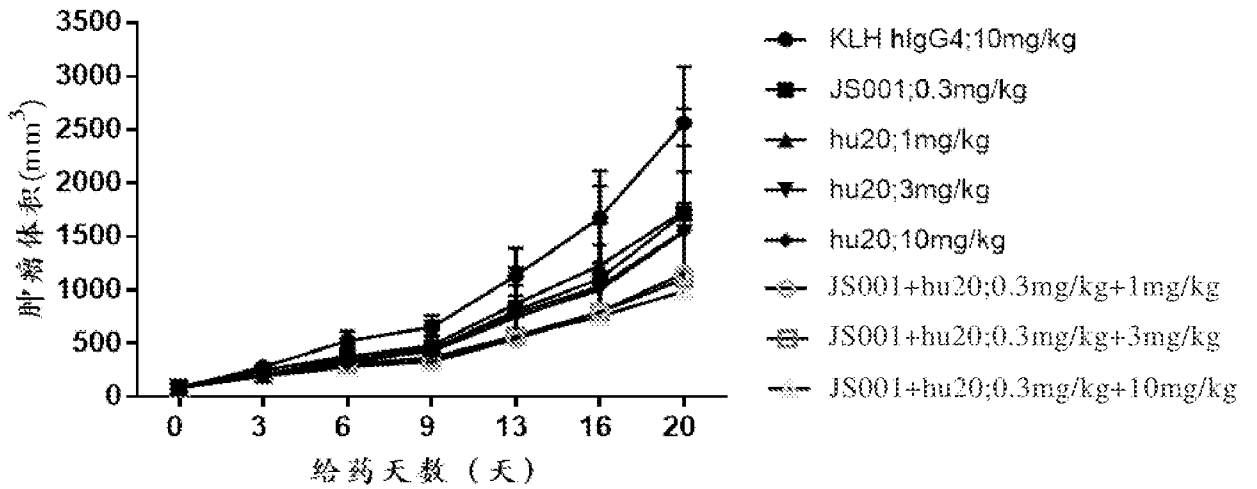


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/101883

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, VEN, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 百度学术, BAIDU XUESHU, Patents, 中国生物序列检索系统, Chinese Biological Sequence Retrieval Database, Bio-Sequence Database of Chinese Patent, NCBI, EBI, STN: 申请人/发明人, applicant/inventor, 抗体, antibody, TIGIT, 含Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体, T cell immune receptor containing Ig and ITIM domains, 序列1-34, sequences 1-34		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 109384846 A (HEFEI RUIDA IMMUNE DRUGS RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.) 26 February 2019 (2019-02-26) entire document	1-20
A	CN 109071656 A (GENSUN BIOPHARMA INC.) 21 December 2018 (2018-12-21) entire document	1-20
A	CN 108290936 A (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 17 July 2018 (2018-07-17) entire document	1-20
A	CN 108368176 A (POTENZA THERAPEUTICS INC.) 03 August 2018 (2018-08-03) entire document	1-20
A	CN 107148430 A (MERCK SHARP & DOHME CORP.) 08 September 2017 (2017-09-08) entire document	1-20
A	CN 108137691 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD. et al.) 08 June 2018 (2018-06-08) entire document	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 September 2020		Date of mailing of the international search report 22 October 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/101883

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107207594 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 26 September 2017 (2017-09-26) entire document	1-20
A	WO 2018033798 A1 (COMPUGEN LTD.) 22 February 2018 (2018-02-22) entire document	1-20
A	WO 2018102746 A1 (RIGEL PHARMACEUTICALS, INC.) 07 June 2018 (2018-06-07) entire document	1-20
A	WO 2018204363 A1 (AGENUS INC.) 08 November 2018 (2018-11-08) entire document	1-20

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **15-17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 15-17 relate to a method for the treatment of cancer in a subject, and the subject matter of which does not warrant a search by the International Searching Authority according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). This international search is made on the basis of the use of the anti-TIGIT antibody or antigen-binding fragment thereof or the pharmaceutical composition in the preparation of drug for the treatment of cancer in subject.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/101883

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109384846	A	26 February 2019	CN	109384846	B	03 March 2020
CN	109071656	A	21 December 2018	US	2018185482	A1	05 July 2018
				CN	109988237	A	09 July 2019
				EP	3565839	A1	13 November 2019
				US	2020164071	A1	28 May 2020
				US	10537637	B2	21 January 2020
				WO	2018128939	A1	12 July 2018
CN	108290936	A	17 July 2018	CA	2994555	A1	23 February 2017
				AU	2016307845	A1	08 March 2018
				EP	3334757	A4	03 April 2019
				US	2018371083	A1	27 December 2018
				EP	3334757	A2	20 June 2018
				JP	2018527919	A	27 September 2018
				WO	2017030823	A3	30 March 2017
				WO	2017030823	A2	23 February 2017
CN	108368176	A	03 August 2018	CO	2018004743	A2	30 November 2018
				WO	2017059095	A1	06 April 2017
				AU	2016331052	A1	26 April 2018
				PH	12018500714	A1	15 October 2018
				JP	2018533371	A	15 November 2018
				AR	109625	A1	09 January 2019
				CA	3000404	A1	06 April 2017
				US	9713641	B2	25 July 2017
				US	10507244	B2	17 December 2019
				BR	112018006531	A2	11 December 2018
				MX	2018003898	A	17 December 2018
				IL	258394	D0	31 May 2018
				US	2020101158	A1	02 April 2020
				SG	10201912736U	A	27 February 2020
				US	2017340735	A1	30 November 2017
				KR	20180068990	A	22 June 2018
				EP	3356413	A1	08 August 2018
				HK	1253235	A1	14 June 2019
				TW	201718636	A	01 June 2017
				US	2017165366	A1	15 June 2017
CN	107148430	A	08 September 2017	AU	2015305754	B2	25 October 2018
				TN	2017000024	A1	04 July 2018
				CA	2957722	A1	25 February 2016
				CR	201700060	A	18 April 2017
				US	10618958	B2	14 April 2020
				CL	2019001926	A1	29 November 2019
				CL	2017000310	A1	18 August 2017
				DO	P2017000046	A	31 August 2017
				AP	201709765	A0	28 February 2017
				US	2017198042	A1	13 July 2017
				US	2016355589	A1	08 December 2016
				AU	2015305754	A1	23 February 2017
				MD	20170032	A2	31 August 2017
				EA	201790413	A1	31 August 2017
				SG	11201701161Q	A	30 March 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/101883

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				IL 250583 D0	30 April 2017
				GT 201700033 A	30 September 2019
				TW 201609813 A	16 March 2016
				AP 201709765 D0	28 February 2017
				PH 12017500296 A1	28 June 2017
				MX 2017002229 A	09 May 2017
				AU 2019200426 A1	07 February 2019
				NI 201700019 A	08 March 2017
				KR 20170041272 A	14 April 2017
				PE 20170289 A1	05 April 2017
				WO 2016028656 A1	25 February 2016
				JP 2017532007 A	02 November 2017
				AP 2017009765 A0	28 February 2017
				EP 3183267 A1	28 June 2017
				BR 112017003108 A2	05 December 2017
				US 2018066055 A1	08 March 2018
				KR 20190133078 A	29 November 2019
				KR 102050082 B1	29 November 2019
CN	108137691	A	08 June 2018	JP 2018532383 A	08 November 2018
				US 2018185480 A1	05 July 2018
				EP 3344658 A1	11 July 2018
				WO 2017037707 A1	09 March 2017
				CA 2997130 A1	09 March 2017
CN	107207594	A	26 September 2017	MX 2017007744 A	05 September 2017
				EP 3237448 A1	01 November 2017
				US 2016176963 A1	23 June 2016
				TN 2017000267 A1	19 October 2018
				CL 2017001660 A1	23 March 2018
				PH 12017501166 A1	11 December 2017
				JP 2020062026 A	23 April 2020
				US 2019112375 A1	18 April 2019
				JP 6633032 B2	22 January 2020
				JP 2018035138 A	08 March 2018
				UY 36471 A	30 June 2016
				AR 103268 A1	26 April 2017
				KR 20170099966 A	01 September 2017
				WO 2016106302 A1	30 June 2016
				EA 201791171 A1	30 November 2017
				IL 253013 D0	31 August 2017
				ZA 201704981 B	28 August 2019
				CN 110256558 A	20 September 2019
				PE 20171244 A1	24 August 2017
				JP 6180663 B2	16 August 2017
				CO 2017006989 A2	05 January 2018
				AU 2015369683 A1	10 August 2017
				TW 201629102 A	16 August 2016
				WO 2016106302 A9	22 June 2017
				JP 2017520512 A	27 July 2017
				SG 11201705063V A	28 July 2017
				CA 2971732 A1	30 June 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/101883

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				BR	112017013385	A2	06 February 2018
				CN	107207594	B	07 May 2019
				US	10189902	B2	29 January 2019
WO	2018033798	A1	22 February 2018	SG	11201901077	R A	28 March 2019
				ES	2774320	T3	20 July 2020
				HR	P20200189	T1	01 May 2020
				CA	3032331	A1	22 February 2018
				SI	3347379	T1	30 April 2020
				EP	3347379	B1	06 November 2019
				DK	3347379	T3	17 February 2020
				US	10124061	B2	13 November 2018
				CL	2019000424	A1	05 July 2019
				AU	2017313405	A1	28 February 2019
				CN	110088132	A	02 August 2019
				DK	3347379	T5	15 June 2020
				US	2018280506	A1	04 October 2018
				PL	3347379	T3	18 May 2020
				PT	3347379	T	18 February 2020
				EP	3347379	B9	25 March 2020
				ES	2774320	T9	21 July 2020
				KR	20190039421	A	11 April 2019
				MX	2019001878	A	01 July 2019
				US	2018305456	A1	25 October 2018
				BR	112019003129	A2	09 July 2019
				JP	2019533984	A	28 November 2019
				EP	3617232	A1	04 March 2020
				CO	2019001980	A2	08 March 2019
				EP	3347379	A1	18 July 2018
				LT	3347379	T	11 May 2020
				US	2018169238	A1	21 June 2018
				US	10213505	B2	26 February 2019
WO	2018102746	A1	07 June 2018	US	2018155422	A1	07 June 2018
WO	2018204363	A1	08 November 2018	US	2018355040	A1	13 December 2018
				AU	2018263857	A1	21 November 2019
				EP	3618863	A1	11 March 2020
				CA	3062061	A1	08 November 2018
				TW	201843178	A	16 December 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/101883

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, VEN, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 百度学术, Patentics, 中国生物序列检索系统, Bio-Sequence Database of Chinese Patent, NCBI, EBI, STN: 申请人/发明人, 抗体, antibody, TIGIT, 含Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体, 序列1-34</p>																										
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 109384846 A (合肥瑞达免疫药物研究有限公司) 2019年 2月 26日 (2019 - 02 - 26) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109071656 A (源晟生物制药股份有限公司) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108290936 A (默沙东公司) 2018年 7月 17日 (2018 - 07 - 17) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108368176 A (波滕扎治疗公司) 2018年 8月 3日 (2018 - 08 - 03) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107148430 A (默沙东公司) 2017年 9月 8日 (2017 - 09 - 08) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108137691 A (耶路撒冷希伯来大学伊萨姆研究发展有限公司 等) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107207594 A (百时美施贵宝公司) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 全文</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 109384846 A (合肥瑞达免疫药物研究有限公司) 2019年 2月 26日 (2019 - 02 - 26) 全文	1-20	A	CN 109071656 A (源晟生物制药股份有限公司) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 全文	1-20	A	CN 108290936 A (默沙东公司) 2018年 7月 17日 (2018 - 07 - 17) 全文	1-20	A	CN 108368176 A (波滕扎治疗公司) 2018年 8月 3日 (2018 - 08 - 03) 全文	1-20	A	CN 107148430 A (默沙东公司) 2017年 9月 8日 (2017 - 09 - 08) 全文	1-20	A	CN 108137691 A (耶路撒冷希伯来大学伊萨姆研究发展有限公司 等) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 全文	1-20	A	CN 107207594 A (百时美施贵宝公司) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 全文	1-20
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
A	CN 109384846 A (合肥瑞达免疫药物研究有限公司) 2019年 2月 26日 (2019 - 02 - 26) 全文	1-20																								
A	CN 109071656 A (源晟生物制药股份有限公司) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 全文	1-20																								
A	CN 108290936 A (默沙东公司) 2018年 7月 17日 (2018 - 07 - 17) 全文	1-20																								
A	CN 108368176 A (波滕扎治疗公司) 2018年 8月 3日 (2018 - 08 - 03) 全文	1-20																								
A	CN 107148430 A (默沙东公司) 2017年 9月 8日 (2017 - 09 - 08) 全文	1-20																								
A	CN 108137691 A (耶路撒冷希伯来大学伊萨姆研究发展有限公司 等) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 全文	1-20																								
A	CN 107207594 A (百时美施贵宝公司) 2017年 9月 26日 (2017 - 09 - 26) 全文	1-20																								
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <table border="0"> <tr> <td> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> </td> <td> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p> </td> </tr> </table>			<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>	<p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																						
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>	<p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																									
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 9月 18日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 10月 22日</p>																									
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>授权官员</p> <p>冯晓亮</p> <p>电话号码 86-(10)-53961927</p>																									

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2018033798 A1 (COMPUGEN LTD.) 2018年 2月 22日 (2018 - 02 - 22) 全文	1-20
A	WO 2018102746 A1 (RIGEL PHARMACEUTICALS, INC.) 2018年 6月 7日 (2018 - 06 - 07) 全文	1-20
A	WO 2018204363 A1 (AGENUS INC.) 2018年 11月 8日 (2018 - 11 - 08) 全文	1-20

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 15-17
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求15-17涉及治疗受试者癌症的方法，属于PCT细则39.1(iv)定义的不要求国际检索单位检索的主题。本次国际检索基于所述抗TIGIT抗体或其抗原结合片段或所述药物组合物在制备用于治疗受试者癌症的药物中的用途进行检索。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/101883

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109384846	A	2019年 2月 26日	CN	109384846	B	2020年 3月 3日
CN	109071656	A	2018年 12月 21日	US	2018185482	A1	2018年 7月 5日
				CN	109988237	A	2019年 7月 9日
				EP	3565839	A1	2019年 11月 13日
				US	2020164071	A1	2020年 5月 28日
				US	10537637	B2	2020年 1月 21日
				WO	2018128939	A1	2018年 7月 12日
CN	108290936	A	2018年 7月 17日	CA	2994555	A1	2017年 2月 23日
				AU	2016307845	A1	2018年 3月 8日
				EP	3334757	A4	2019年 4月 3日
				US	2018371083	A1	2018年 12月 27日
				EP	3334757	A2	2018年 6月 20日
				JP	2018527919	A	2018年 9月 27日
				WO	2017030823	A3	2017年 3月 30日
				WO	2017030823	A2	2017年 2月 23日
CN	108368176	A	2018年 8月 3日	CO	2018004743	A2	2018年 11月 30日
				WO	2017059095	A1	2017年 4月 6日
				AU	2016331052	A1	2018年 4月 26日
				PH	12018500714	A1	2018年 10月 15日
				JP	2018533371	A	2018年 11月 15日
				AR	109625	A1	2019年 1月 9日
				CA	3000404	A1	2017年 4月 6日
				US	9713641	B2	2017年 7月 25日
				US	10507244	B2	2019年 12月 17日
				BR	112018006531	A2	2018年 12月 11日
				MX	2018003898	A	2018年 12月 17日
				IL	258394	D0	2018年 5月 31日
				US	2020101158	A1	2020年 4月 2日
				SG	10201912736U	A	2020年 2月 27日
				US	2017340735	A1	2017年 11月 30日
				KR	20180068990	A	2018年 6月 22日
				EP	3356413	A1	2018年 8月 8日
				HK	1253235	A1	2019年 6月 14日
				TW	201718636	A	2017年 6月 1日
				US	2017165366	A1	2017年 6月 15日
CN	107148430	A	2017年 9月 8日	AU	2015305754	B2	2018年 10月 25日
				TN	2017000024	A1	2018年 7月 4日
				CA	2957722	A1	2016年 2月 25日
				CR	20170060	A	2017年 4月 18日
				US	10618958	B2	2020年 4月 14日
				CL	2019001926	A1	2019年 11月 29日
				CL	2017000310	A1	2017年 8月 18日
				DO	P2017000046	A	2017年 8月 31日
				AP	201709765	A0	2017年 2月 28日
				US	2017198042	A1	2017年 7月 13日
				US	2016355589	A1	2016年 12月 8日
				AU	2015305754	A1	2017年 2月 23日
				MD	20170032	A2	2017年 8月 31日
				EA	201790413	A1	2017年 8月 31日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/101883

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		SG 11201701161Q A	2017年 3月 30日
		IL 250583 D0	2017年 4月 30日
		GT 201700033 A	2019年 9月 30日
		TW 201609813 A	2016年 3月 16日
		AP 201709765 D0	2017年 2月 28日
		PH 12017500296 A1	2017年 6月 28日
		MX 2017002229 A	2017年 5月 9日
		AU 2019200426 A1	2019年 2月 7日
		NI 201700019 A	2017年 3月 8日
		KR 20170041272 A	2017年 4月 14日
		PE 20170289 A1	2017年 4月 5日
		WO 2016028656 A1	2016年 2月 25日
		JP 2017532007 A	2017年 11月 2日
		AP 2017009765 A0	2017年 2月 28日
		EP 3183267 A1	2017年 6月 28日
		BR 112017003108 A2	2017年 12月 5日
		US 2018066055 A1	2018年 3月 8日
		KR 20190133078 A	2019年 11月 29日
		KR 102050082 B1	2019年 11月 29日
CN 108137691 A	2018年 6月 8日	JP 2018532383 A	2018年 11月 8日
		US 2018185480 A1	2018年 7月 5日
		EP 3344658 A1	2018年 7月 11日
		WO 2017037707 A1	2017年 3月 9日
		CA 2997130 A1	2017年 3月 9日
CN 107207594 A	2017年 9月 26日	MX 2017007744 A	2017年 9月 5日
		EP 3237448 A1	2017年 11月 1日
		US 2016176963 A1	2016年 6月 23日
		TN 2017000267 A1	2018年 10月 19日
		CL 2017001660 A1	2018年 3月 23日
		PH 12017501166 A1	2017年 12月 11日
		JP 2020062026 A	2020年 4月 23日
		US 2019112375 A1	2019年 4月 18日
		JP 6633032 B2	2020年 1月 22日
		JP 2018035138 A	2018年 3月 8日
		UY 36471 A	2016年 6月 30日
		AR 103268 A1	2017年 4月 26日
		KR 20170099966 A	2017年 9月 1日
		WO 2016106302 A1	2016年 6月 30日
		EA 201791171 A1	2017年 11月 30日
		IL 253013 D0	2017年 8月 31日
		ZA 201704981 B	2019年 8月 28日
		CN 110256558 A	2019年 9月 20日
		PE 20171244 A1	2017年 8月 24日
		JP 6180663 B2	2017年 8月 16日
		CO 2017006989 A2	2018年 1月 5日
		AU 2015369683 A1	2017年 8月 10日
		TW 201629102 A	2016年 8月 16日
		WO 2016106302 A9	2017年 6月 22日
		JP 2017520512 A	2017年 7月 27日
		SG 11201705063V A	2017年 7月 28日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/101883

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				CA	2971732	A1	2016年 6月 30日
				BR	112017013385	A2	2018年 2月 6日
				CN	107207594	B	2019年 5月 7日
				US	10189902	B2	2019年 1月 29日
WO	2018033798	A1	2018年 2月 22日	SG	11201901077R	A	2019年 3月 28日
				ES	2774320	T3	2020年 7月 20日
				HR	P20200189	T1	2020年 5月 1日
				CA	3032331	A1	2018年 2月 22日
				SI	3347379	T1	2020年 4月 30日
				EP	3347379	B1	2019年 11月 6日
				DK	3347379	T3	2020年 2月 17日
				US	10124061	B2	2018年 11月 13日
				CL	2019000424	A1	2019年 7月 5日
				AU	2017313405	A1	2019年 2月 28日
				CN	110088132	A	2019年 8月 2日
				DK	3347379	T5	2020年 6月 15日
				US	2018280506	A1	2018年 10月 4日
				PL	3347379	T3	2020年 5月 18日
				PT	3347379	T	2020年 2月 18日
				EP	3347379	B9	2020年 3月 25日
				ES	2774320	T9	2020年 7月 21日
				KR	20190039421	A	2019年 4月 11日
				MX	2019001878	A	2019年 7月 1日
				US	2018305456	A1	2018年 10月 25日
				BR	112019003129	A2	2019年 7月 9日
				JP	2019533984	A	2019年 11月 28日
				EP	3617232	A1	2020年 3月 4日
				CO	2019001980	A2	2019年 3月 8日
				EP	3347379	A1	2018年 7月 18日
				LT	3347379	T	2020年 5月 11日
				US	2018169238	A1	2018年 6月 21日
				US	10213505	B2	2019年 2月 26日
WO	2018102746	A1	2018年 6月 7日	US	2018155422	A1	2018年 6月 7日
WO	2018204363	A1	2018年 11月 8日	US	2018355040	A1	2018年 12月 13日
				AU	2018263857	A1	2019年 11月 21日
				EP	3618863	A1	2020年 3月 11日
				CA	3062061	A1	2018年 11月 8日
				TW	201843178	A	2018年 12月 16日