



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116135884 A

(43) 申请公布日 2023.05.19

(21) 申请号 202111359665.8

(22) 申请日 2021.11.17

(71) 申请人 普米斯生物技术(珠海)有限公司
地址 519080 广东省珠海市香洲区唐家湾镇科技七路1号4栋10-B单元

(72) 发明人 戴爽 翟天航 黄威峰 彭绍岗 孙左宇

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 刘海罗

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

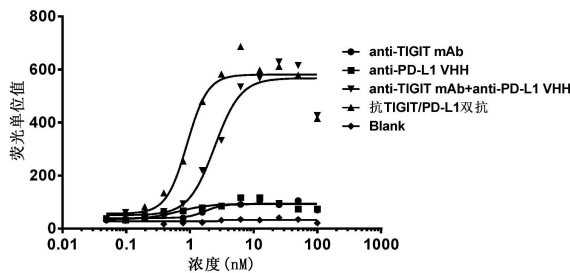
权利要求书2页 说明书23页
序列表13页 附图12页

(54) 发明名称

抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体、其药物组合物及用途

(57) 摘要

本发明属于生物医药领域,本发明属于医药领域,涉及一种抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体、其药物组合物及用途。具体地,本发明涉及一种双特异性抗体,其包括:靶向TIGIT的第一蛋白功能区,和靶向不同于TIGIT的靶点(例如PD-L1)的第二蛋白功能区;其中:所述第一蛋白功能区为抗TIGIT抗体或其抗原结合片段;所述抗TIGIT抗体的重链可变区包含氨基酸序列如SEQ ID NO: 10所示的HCDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO: 11所示的HCDR2以及氨基酸序列如SEQ ID NO: 12所示的HCDR3;并且所述抗TIGIT抗体的轻链可变区包含氨基酸序列如SEQ ID NO: 13所示的LCDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO: 14所示的LCDR2以及氨基酸序列如SEQ ID NO: 15所示的LCDR3。本发明的双特异性抗体具有针对TIGIT和PD-L1双靶点的高亲和力,具有良好的应用前景。



1. 一种双特异性抗体,其包括:
 靶向TIGIT的第一蛋白功能区,和
 靶向不同于TIGIT的靶点(例如PD-L1)的第二蛋白功能区;
 其中:
 所述第一蛋白功能区为抗TIGIT免疫球蛋白或其抗原结合片段;
 所述抗TIGIT免疫球蛋白的重链可变区包含氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示的HCDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示的HCDR2以及氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示的HCDR3;并且
 所述抗TIGIT免疫球蛋白的轻链可变区包含氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示的LCDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示的LCDR2以及氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的LCDR3。
2. 根据权利要求1所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接;
 优选地,所述连接片段为(GGGGS)_m,m为正整数,例如1、2、3、4、5或6;
 优选地,所述连接片段为(GGGGS)_nG,n为正整数,例如1、2、3、4、5或6;
 优选地,所述连接片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。
3. 根据权利要求1至2中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上。
4. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,
 所述第一蛋白功能区为抗TIGIT免疫球蛋白或其抗原结合片段,并且所述第二蛋白功能区为靶点不同于TIGIT的单域抗体或单链抗体;
 优选地,所述单域抗体为抗PD-L1单域抗体;
 优选地,所述单链抗体为抗PD-L1单链抗体。
5. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,
 所述第一蛋白功能区为抗TIGIT单链抗体,并且所述第二蛋白功能区为靶点不同于TIGIT的免疫球蛋白或其抗原结合片段;
 优选地,靶点不同于TIGIT的免疫球蛋白为抗PD-L1免疫球蛋白。
6. 根据权利要求5所述的双特异性抗体,其中,
 所述抗PD-L1单域抗体包含一个重链可变区,所述重链可变区包含氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的HCDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示的HCDR2以及氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示的HCDR3;
 优选地,所述抗PD-L1单域抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。
7. 根据权利要求1至6中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,
 所述抗TIGIT免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示,并且其轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示;
 优选地,
 所述抗TIGIT免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,其轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。
8. 根据权利要求1至7中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,
 所述抗TIGIT免疫球蛋白或者靶点不同于TIGIT的免疫球蛋白的恒定区来自人抗体;

优选地,所述恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区。

9. 根据权利要求1至8中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,

所述抗TIGIT免疫球蛋白或者靶点不同于TIGIT的免疫球蛋白的重链恒定区为人Ig gamma-1chain C region(例如NCBI ACCESSION:P01857)或人Ig gamma-4chain C region(例如NCBI ACCESSION:P01861.1),并且其轻链恒定区为人Ig kappa chain C region(例如NCBIACCESSION:P01834);

优选地,所述抗TIGIT免疫球蛋白的重链恒定区还包含按照EU编号系统的L234A突变和L235A突变。

10. 根据权利要求4和6至9中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述单域抗体或单链抗体连接在抗TIGIT免疫球蛋白的C末端或N末端,例如,所述单域抗体或单链抗体为两个,每个单域抗体或单链抗体的一端分别连接在抗TIGIT免疫球蛋白的两条重链的C末端或N末端。

11. 根据权利要求4和6至10中任一权利要求所述的双特异性抗体,其中,所述单域抗体为抗PD-L1单域抗体,单域抗体连接在抗TIGIT免疫球蛋白得到的肽链的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

12. 根据权利要求4和6至11中任一权利要求所述的双特异性抗体,其为由两条相同的第一肽链和两条相同的第二肽链形成的四聚体,其中,

所述第一肽链的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;并且所述第二肽链的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。

13. 分离的核酸分子,其编码权利要求1至12中任一权利要求所述的双特异性抗体。

14. 一种载体,其包含权利要求13所述的分离的核酸分子。

15. 一种宿主细胞,其包含权利要求13所述的分离的核酸分子,或者权利要求14所述的载体。

16. 制备权利要求1至12中任一权利要求所述的双特异性抗体的方法,其包括在合适的条件下培养权利要求15的宿主细胞,以及从细胞培养物中回收所述双特异性抗体的步骤。

17. 偶联物,其包括双特异性抗体以及偶联部分,其中,所述双特异性抗体为权利要求1至12中任一权利要求所述的双特异性抗体,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。

18. 试剂盒,其包含权利要求1至12中任一权利要求所述的双特异性抗体,或者包含权利要求17所述的偶联物;

优选地,所述试剂盒还包含第二抗体,其能够特异性结合所述双特异性抗体;任选地,所述第二抗体还包括可检测的标记,例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

19. 一种药物组合物,其包含权利要求1至12中任一权利要求所述的双特异性抗体或者包含权利要求17所述的偶联物;可选地,其还包括药学上可接受的辅料。

20. 权利要求1至12中任一权利要求所述的双特异性抗体或者权利要求17所述的偶联物在制备预防和/或治疗恶性肿瘤的药物中的用途;优选地,所述恶性肿瘤选自黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、结肠癌、乳腺癌、食道癌和头颈癌。

抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体、其药物组合物及用途

技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,涉及一种抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体、其药物组合物及用途。

背景技术

[0002] T细胞免疫球蛋白和ITIM结构域(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains,TIGIT,又称WUCAM、Vstm3、VSIG9)是一种新型免疫抑制性受体,由活化的CD8⁺T和CD4⁺T细胞、自然杀伤(NK)细胞、调节性T细胞(Tregs)和滤泡辅助性T细胞表达。

[0003] TIGIT在肿瘤免疫中参与了一个复杂的调控网络,涉及多个免疫抑制受体(例如,CD96/TACTILE,CD112R/PVRIG)、一个竞争性共刺激受体(DNAM-1/CD226)和多个配体(例如,CD155(PVR/NECL-5),CD112(Nectin-2/PVRL2))。DNAM-1、TIGIT和CD96在T细胞和NK细胞上表达,并以配体形式共享CD155。

[0004] TIGIT在肿瘤免疫抑制中的作用和PD-1/PD-L1类似,目前的研究已经提出了几种TIGIT介导的效应T细胞和NK细胞抑制作用的机制:(1)T/NK细胞表面TIGIT与CD155结合,使TIGIT胞内的免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)磷酸化,直接转导抑制性信号;(2)TIGIT通过与DCs上的CD155结合,促进形成免疫耐受性DCs,降低白细胞介素(IL)-12的产生和IL-10的增加,间接抑制T细胞应答;(3)具有抑制作用的TIGIT以比共刺激受体CD226更高的亲和力竞争结合CD155,从而限制CD226介导的激活。另外,TIGIT还直接在细胞上顺式结合CD226,破坏其与CD155的同源二聚体的结合能力;(4)表达TIGIT的Tregs具有高度抑制性,TIGIT+Tregs激活后产生IL-10和纤维蛋白原样蛋白2(Fg12),介导T细胞抑制;(5)来自核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*,一种与结直肠癌相关的厌氧革兰氏共生菌)的Fap2蛋白,可直接与TIGIT结合,但不与CD226结合,从而抑制NK细胞和T细胞介导的肿瘤免疫,调节先天免疫反应。

[0005] 程序性死亡因子1配体1(programmed death 1ligand 1,PD-L1)又称CD274,为B7家族成员,是PD-1的配体。PD-L1属于I型跨膜蛋白,共290个氨基酸,包含1个IgV样区、1个IgC样区、1个跨膜疏水区和1个由30个氨基酸组成的胞内区。与其他B7家族分子不同的是,PD-L1具有负向调节免疫应答的作用。研究发现,PD-L1主要表达于活化的T细胞、B细胞、巨噬细胞和树突状细胞等,除淋巴细胞外,PD-L1也表达于其它多种组织如胸腺、心脏、胎盘等的内皮细胞,以及各类非淋巴系如黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、结肠癌、乳腺癌、食道癌、头颈癌等(Akintunde Akinleye&Zoaib Rasool,Journal of Hematology&Oncology volume 12,Article number:92(2019))。PD-L1在调节自身反应性T、B细胞和免疫耐受方面具有一定广泛性,并且在外周组织T和B细胞应答起作用。PD-L1在肿瘤细胞上的高表达与癌症患者的不良预后相关。

[0006] 双特异性抗体虽然是抗体药物研发的一个方向,但面临诸多挑战,比如临床前评价模型、表达量低、稳定性差、工艺复杂、质控差异性大等问题,因此一直以来双特异性抗体的研发困难重重。

[0007] 因此,需要开发一种特异性佳、疗效好且易于制备的针对TIGIT和PD-L1两个靶点的双特异性抗体。

发明内容

[0008] 本发明人经过深入的研究和创造性的劳动,得到了一种抗TIGIT抗体,并基于该抗体构建了抗TIGIT-抗PD-L1的双特异性抗体。本发明人惊奇地发现,本发明的抗TIGIT抗体(也简称为抗体或本发明的抗体)和抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体(也简称为双特异性抗体或本发明的双特异性抗体)与PD-L1和TIGIT的结合亲和力高(甚至在一个或多个方面优于阳性对照抗体该双特异性抗体),可以分别阻断PD-L1与其配体PD-1的结合以及TIGIT与其配体CD155/CD112的结合,减少或消除传递至细胞的抑制信号,在动物模型中施用本发明的抗体可以显著抑制肿瘤生长。由此提供了下述发明:

[0009] 本发明的一个方面设计一种双特异性抗体,其包括:

[0010] 靶向TIGIT的第一蛋白功能区,和

[0011] 靶向不同于TIGIT的靶点(例如PD-L1)的第二蛋白功能区;

[0012] 其中:

[0013] 所述第一蛋白功能区为抗TIGIT免疫球蛋白或其抗原结合片段;

[0014] 所述抗TIGIT免疫球蛋白的重链可变区包含氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示的HCDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示的HCDR2以及氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示的HCDR3;并且

[0015] 所述抗TIGIT免疫球蛋白的轻链可变区包含氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示的LCDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示的LCDR2以及氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的LCDR3。

[0016] 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。本发明的抗体或其抗原结合片段含有的CDR可根据本领域已知的各种编号系统确定。在某些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段含有的CDR优选地通过Kabat、Chothia,AbM HVR或IMGT编号系统确定。除非另有说明,否则本发明中抗体或其抗原结合片段含有的CDR优选地通过Kabat编号系统(kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institute of Health,Bethesda,Md.(1991))确定的编号位置。

[0017] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段(linker,也称为连接肽)连接;

[0018] 优选地,所述连接片段为(GGGGS)_m,m为正整数,例如1、2、3、4、5或6;

[0019] 优选地,所述连接片段为(GGGGS)_nG,n为正整数,例如1、2、3、4、5或6;

[0020] 优选地,所述连接片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0021] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上。

[0022] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区为1个,并且所述第二蛋白功能区为2个。

[0023] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,所述第一蛋白功能区为2个,并且所述第二蛋白功能区为1个。

[0024] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,

[0025] 所述第一蛋白功能区为抗TIGIT免疫球蛋白或其抗原结合片段,并且所述第二蛋白功能区为靶点不同于TIGIT的单域抗体或单链抗体;

[0026] 优选地,所述单域抗体为抗PD-L1单域抗体;

[0027] 优选地,所述单链抗体为抗PD-L1单链抗体。

[0028] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,

[0029] 所述第一蛋白功能区为抗TIGIT免疫球蛋白或其抗原结合片段,并且所述第二蛋白功能区为抗PD-L1单域抗体或抗PD-L1单链抗体

[0030] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,

[0031] 所述第一蛋白功能区为抗TIGIT单链抗体,并且所述第二蛋白功能区为靶点不同于TIGIT的免疫球蛋白或其抗原结合片段;

[0032] 优选地,靶点不同于TIGIT的免疫球蛋白为抗PD-L1免疫球蛋白。

[0033] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,

[0034] 所述第一蛋白功能区为抗TIGIT单链抗体,并且所述第二蛋白功能区为抗PD-L1免疫球蛋白或其抗原结合片段。

[0035] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,

[0036] 所述抗PD-L1单域抗体包含一个重链可变区,所述重链可变区包含氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示的HCDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示的HCDR2以及氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示的HCDR3;

[0037] 优选地,所述抗PD-L1单域抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0038] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,

[0039] 所述抗TIGIT免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示,并且其轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示;

[0040] 优选地,

[0041] 所述抗TIGIT免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,其轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。

[0042] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb和互补决定区片段。

[0043] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,

[0044] 所述抗TIGIT免疫球蛋白或者靶点不同于TIGIT的免疫球蛋白的恒定区来自人抗体;

[0045] 优选地,所述恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区。

[0046] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,

[0047] 所述抗TIGIT免疫球蛋白或者靶点不同于TIGIT的免疫球蛋白的重链恒定区为人Ig gamma-1chain C region(例如NCBI ACCESSION:P01857)或人Ig gamma-4chain C region(例如NCBI ACCESSION:P01861.1),并且其轻链恒定区为人Ig kappa chain C region(例如NCBI ACCESSION:P01834);优选地,所述抗TIGIT免疫球蛋白的重链恒定区还

包含按照EU编号系统的L234A突变和L235A突变。

[0048] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,所述单域抗体或单链抗体连接在抗TIGIT免疫球蛋白的C末端或N末端,例如,所述单域抗体或单链抗体为两个,每个单域抗体或单链抗体的一端分别连接在抗TIGIT免疫球蛋白的两条重链的C末端或N末端。

[0049] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,所述抗PD-L1单域抗体或抗PD-L1单链抗体连接在抗TIGIT免疫球蛋白的C末端或N末端,例如,所述抗PD-L1单域抗体或抗PD-L1单链抗体为两个,每个抗PD-L1单域抗体或抗PD-L1单链抗体的一端分别连接在抗TIGIT免疫球蛋白的两条重链的C末端或N末端。

[0050] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,所述单域抗体为抗PD-L1单域抗体,单域抗体连接在抗TIGIT免疫球蛋白得到的肽链的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0051] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其为由两条相同的第一肽链和两条相同的第二肽链形成的四聚体,其中,

[0052] 所述第一肽链的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;并且所述第二肽链的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。

[0053] 在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,包括:

[0054] 靶向TIGIT的第一蛋白功能区,和

[0055] 靶向PD-L1的第二蛋白功能区;

[0056] 所述第一蛋白功能区为1个,所述第二蛋白功能区为2个;

[0057] 其中,所述第一蛋白功能区为抗TIGIT免疫球蛋白,所述第二蛋白功能区为抗PD-L1单域抗体;

[0058] 所述抗TIGIT免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,并且其轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示;

[0059] 所述抗PD-L1单域抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示;

[0060] 两个抗PD-L1单域抗体分别通过相同或不同的连接片段连接在抗TIGIT免疫球蛋白的每条重链的C末端;

[0061] 优选地,所述连接片段为(GGGGS)_m,m为正整数,例如1、2、3、4、5或6;

[0062] 优选地,所述连接片段为(GGGGS)_nG,n为正整数,例如1、2、3、4、5或6;

[0063] 优选地,所述连接片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0064] 在本发明的一个或多个实施方式中,所述的双特异性抗体,其为IgG-VHH形式。

[0065] 在本发明的一个或多个实施方式中,所述的双特异性抗体,其为IgG-scFv形式即Morrison模式。

[0066] 在本发明的一个或多个实施方式中,所述的双特异性抗体,其中,所述单域抗体或单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的C末端。由于免疫球蛋白由两条重链,因此,一个免疫球蛋白分子连接有两个单域抗体分子或两个单链抗体分子。优选地,两个单域抗体分子相同。优选地,两个单链抗体分子相同。优选地,所述单域抗体或单链抗体通过前述连接片段与免疫球蛋白的重链的C末端形成酰胺键连接。

[0067] 在本发明的一个或多个实施方式中,所述的双特异性抗体,其与人PD-L1、食蟹猴

PD-L1、人TIGIT和/或食蟹猴TIGIT抗原结合的单价亲和力,分别与其单端抗体分子与人PD-L1、食蟹猴PD-L1、人TIGIT和/或食蟹猴TIGIT抗原结合的单价亲和力相同或更优。

[0068] 本发明的另一方面涉及分离的核酸分子,其编码权本发明中任一项所述的双特异性抗体。

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 本发明的再一方面涉及制备本发明中任一项所述的双特异性抗体的方法,其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞,以及从细胞培养物中回收所述双特异性抗体的步骤。

[0072] 本发明的再一方面涉及一种偶联物,其包括双特异性抗体以及偶联部分,其中,所述双特异性抗体为本发明中任一项所述的双特异性抗体,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。

[0073] 本发明的再一方面涉及一种试剂盒,其包含本发明中任一项所述的双特异性抗体,或者包含本发明的偶联物;

[0074] 优选地,所述试剂盒还包含第二抗体,其能够特异性结合所述双特异性抗体;任选地,所述第二抗体还包括可检测的标记,例如放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

[0075] 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双特异性抗体或者包含本发明的偶联物;可选地,其还包括药学上可接受的辅料。

[0076] 本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物在制备预防和/或治疗恶性肿瘤的药物中的用途;优选地,所述恶性肿瘤选自黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、结肠癌、乳腺癌、食道癌和头颈癌。

[0077] 本发明的再一方面涉及一种治疗和/或预防恶性肿瘤的方法,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双特异性抗体或者本发明的偶联物的步骤;优选地,所述恶性肿瘤选自黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、结肠癌、乳腺癌、食道癌和头颈癌。

[0078] 在本发明的一些实施方式中,所述治疗和/或预防恶性肿瘤的方法,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双特异性抗体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。

[0079] 在本发明的一些实施方式中,所述治疗和/或预防恶性肿瘤的方法,其中,

[0080] 本发明的双特异性抗体的单次给药剂量为每千克体重0.1-100mg,优选4.8-24mg或1-10mg;或者,本发明的双特异性抗体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;

[0081] 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;

[0082] 优选地,给药方式为静脉滴注或静脉注射。

[0083] 根据本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物,其用于治疗 and/或预防恶性肿瘤;优选地,所述恶性肿瘤选自黑色素瘤、肝癌、胃癌、肾细胞癌、卵巢癌、结肠癌、乳腺癌、食道癌和头颈癌。

[0084] 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。

[0085] 术语“EC₅₀”是指半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect),是指能引起50%最大效应的浓度。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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)。

[0089] 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:NH₂-V_L-连接片段-V_H-COOH或NH₂-V_H-连接片段-V_L-COOH。合适的

现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成。例如,可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄的接头,但也可使用其变体(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。

[0090] 如本文中所使用的,术语“分离的”或“被分离的”指的是,从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分,那么可能是其所处的天然环境发生了改变,或从天然环境下分离出该物质,或二者情况均有发生。例如,某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽,而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质,也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

[0091] 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。

[0092] 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,NS0细胞,HeLa细胞,BHK细胞,HEK 293细胞或人细胞等的动物细胞。

[0093] 如本文中所使用的,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。

[0094] 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蛋白或PD-L1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。

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 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)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,对于治疗用途有效的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。

[0098] 如本文中所使用的,当提及PD-L1蛋白(Programmed death-ligand 1,NCBI GenBank ID:NP_054862.1)的氨基酸序列时,其包括人PD-L1蛋白的全长,或者人PD-L1的胞外片段PD-L 1ECD(例如氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示)或者包含PD-L 1ECD的片段;还包括PD-L1 ECD的融合蛋白,例如与小鼠或人IgG的Fc蛋白片段(mFc或hFc)进行融合的片段。然而,本领域技术人员理解,在PD-L1蛋白的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“PD-L1蛋白”应包括所有此类序列,包括所示的序列以及其天然或人工的变体。并且,当描述PD-L1蛋白的序列片段时,其不仅包括的序列片段,还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

[0099] 如本文中所使用的,当提及TIGIT蛋白(T细胞免疫球蛋白和ITIM结构域T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains,NCBI GenBank ID:NP_776160.2)的氨基酸序列时,其包括人TIGIT蛋白的全长,或者人TIGIT的胞外片段TIGIT ECD(例如氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示)或者包含TIGIT ECD的片段;还包括TIGIT蛋白的全长的融合蛋白或TIGIT ECD的融合蛋白,例如与小鼠或人IgG的Fc蛋白片段(mFc或hFc)进行融合的片段。然而,本领域技术人员理解,在TIGIT蛋白的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“添加),蛋白”应包括所有此类序列,包括其天然或人工的变体。并且,当描述TIGIT蛋白的序列片段时,其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

[0100] 如本文中所使用的,当提及PD-1蛋白(NCBI GenBank:NM_005018)的氨基酸序列时,其包括人PD-1蛋白的全长,或者人PD-1的胞外片段PD-1ECD或者包含PD-1ECD的片段;还包括PD-1蛋白的全长的融合蛋白或PD-1ECD的融合蛋白,例如与小鼠或人IgG的Fc蛋白片段(mFc或hFc)进行融合的片段。然而,本领域技术人员理解,在PD-1蛋白的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“添加),蛋白”应包括所有此类序列,包括其天然或人工的变体。并且,当描述PD-1蛋白的序列片段时,其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

[0101] 本发明中,术语“单域抗体”、“VHH”、“纳米抗体”具有相同的含义,指克隆抗体重链的可变区,构建仅由一个重链可变区组成的纳米抗体(VHH),它是具有完整功能的最小的抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区1(CH1)的抗体后,再克隆抗体重链的

可变区,构建仅由一个重链可变区组成的纳米抗体(VHH)。

[0102] 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、第一肽链)和“第二”(例如第二蛋白功能区、第二肽链)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。

[0103] 本发明中,所述单端抗体分子,如果没有特别说明,是指与双特异性抗体中的第一蛋白功能区分子或第二蛋白功能区分子相同或类似的抗体分子。例如与双特异性抗体中的第一蛋白功能区分子或第二蛋白功能区分子相同或类似的抗TIGIT单抗、抗PD-L1单抗、或抗PD-L1单域抗体。

[0104] 发明的有益效果

[0105] 本发明取得了如下效果中的一项或多项:

[0106] (1) 本发明的抗TIGIT抗体具有优越的亲力和特异性;

[0107] (2) 本发明的双特异性抗体能够很好地特异性与TIGIT结合;

[0108] (3) 本发明的双特异性抗体能够很好地特异性与PD-L1结合。

[0109] (4) 本发明的双特异性抗体能够同时结合人TIGIT和人PD-L1蛋白;

[0110] (5) 本发明的双特异性抗体中的第一蛋白功能区和第二蛋白功能区之间具有协同作用。例如:本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体可以分别解除CD155/CD112介导的TIGIT下游抑制信号通路以及PD-L1介导的PD-1下游抑制信号通路,活性优于两单端抗体分子的联合;和/或体内抗肿瘤活性优于两单端抗体分子联用。

[0111] (6) 本发明的双特异性抗体的生产简便。

[0112] (7) 本发明的双特异性抗体的稳定性好,半衰期长。

附图说明

[0113] 图1:本发明的双特异性抗体的结构示意图。

[0114] 图2A:本发明的双特异性抗体对于CHO细胞上过表达的人PD-L1的结合曲线图。

[0115] 图2B:本发明的双特异性抗体对于CHO细胞上过表达的食蟹猴PD-L1的结合曲线图。

[0116] 图2C:本发明的双特异性抗体阻断人PD-L1与CHO细胞上过表达的人PD-1结合的曲线图。

[0117] 图3A:本发明的双特异性抗体对于CHO细胞上过表达的人TIGIT的结合曲线图。

[0118] 图3B:本发明的双特异性抗体对于CHO细胞上过表达的食蟹猴TIGIT的结合曲线图。

[0119] 图3C:本发明的双特异性抗体对于CHO细胞上过表达的小鼠TIGIT的结合曲线图。

[0120] 图3D:本发明的双特异性抗体阻断人CD155与CHO细胞上过表达的人TIGIT结合的曲线图。

[0121] 图3E:本发明的双特异性抗体阻断小鼠CD155与CHO细胞上过表达的小鼠TIGIT结合的曲线图。

[0122] 图4:本发明的双特异性抗体同时结合人PD-L1和人TIGIT蛋白的曲线图。

[0123] 图5:本发明的双特异性抗体阻断PD-1/PD-L1与TIGIT/CD155/CD112信号通路的曲线图。

[0124] 图6A和图6B:本发明的双特异性抗体在混合淋巴细胞试验中细胞因子释放量的统计图。其中图6A和图6B中使用的PBMC细胞样品来自不同的捐献者。

[0125] 图7:本发明的双特异性抗体在混合接种A375和人PBMC的B-NDG小鼠模型的药效曲线图。

[0126] 图8:本发明的双特异性抗体在混合接种A375和人PBMC的B-NDG小鼠模型的剂量依赖药效曲线图。

[0127] 图9:本发明的双特异性抗体在人PD-L1/PD-1/TIGIT转基因小鼠CT26肿瘤模型中的药效曲线图。

[0128] 图10:本发明的双特异性抗体在小鼠体内半衰期曲线。

[0129] 图11:本发明抗TIGIT抗体对于CHO细胞上过表达的人TIGIT的结合曲线图。

[0130] 图12:本发明抗TIGIT抗体对于CHO细胞上过表达的食蟹猴TIGIT的结合曲线图。

[0131] 图13:本发明抗TIGIT抗体对于CHO细胞上过表达的小鼠TIGIT的结合曲线图。

[0132] 图14:本发明抗TIGIT抗体阻断人CD155与CHO细胞上过表达的人TIGIT结合的曲线图。

[0133] 图15:本发明抗TIGIT抗体阻断小鼠CD155与CHO细胞上过表达的小鼠TIGIT结合的曲线图。

[0134] 图16:本发明抗TIGIT抗体与激活的人原代T细胞上TIGIT的结合曲线图。

[0135] 本发明涉及的序列如下面的表A所示。

[0136] 表A

| 名称或含义 | 序列 | SEQ ID NO: |
|--------------------------------|--|------------|
| [0137] 抗 TIGIT 完整野生型 IgG1 抗体重链 | QLQLQESGPGGLVKPAETLSLTCTVSGGSISSY DHYWTWIRQPPGKGLEWIGTVYYSGSTFHN PSLKSRVTIPVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARVGPDVSHPPFDYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP | 1 |

| | | |
|-----------------------------|---|---|
| | <p>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG</p> | |
| 连接片段 G ₄ S | GGGGSGGGGS | 2 |
| 抗 PD-L1 单域抗体 (VHH) | <p>EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY WMYWLRQAPGKGLEWVSSINSDSSSTYYRDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSIEDTAVY YCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS</p> | 3 |
| 抗 TIGIT-抗 PD-L1 双特异性抗体的肽链#1 | <p>QLQLQESGPGLVKPAETLSLTCTVSGGSISSY DHYWTWIRQPPGKGLEWIGTVYYSGSTFHN PSLKSRVTIPVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARVGPDVSHPPFDYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY</p> | 4 |

[0138]

| | | |
|---|---|---|
| | TQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSEVQLQESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRQAP GKGLEWVSSINSDDSSSTYYRDSVKGRFTISR NAKNTLYLQMNSLKSEDVAVYYCAKDPGGYA KGQGTQVTVSS | |
| 抗 TIGIT-抗 PD-L1 双特异性抗体的肽链 #2 (抗 TIGIT kappa 轻链) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWKYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPITF GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 5 |
| 人 PD-L1 的胞外段氨基酸序列 | FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLD LAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSS YRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAG VYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRIL VVDVPTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQ VLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTNE IFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNER | 6 |
| 食蟹猴 PD-L1 的胞外段氨基酸序列 | FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLD LTSLIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSN YRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAG VYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRIL VVDVPTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQ VLSGKTTTTNSKREEKLLNVTSTLRINTTANE IFYCIFRRLDPEENHTAELVIPELPLALPPNER | 7 |
| 人 TIGIT 的胞外段氨基酸序列 | MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQ VTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDR VAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDG | 8 |

[0139]

[0140]

| | | |
|--|--|-----------|
| | TYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP | |
| 食蟹猴 TIGIT 的胞外段氨基酸 序列 | MMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSTMA QVTQVNWEQHDHSLLAIRNAELGWHIYPAF KDRVAPGPGGLGLTLQSLTMNDTGEYFCTYHT YPDGTYRGRIFLEVLESSVAEHSARFQIP | 9 |
| 抗 TIGIT 完整 野生型 IgG1 重 链 抗 体 的 HCDR1 | GSISSYDHYWT | 10 |
| 抗 TIGIT 完整 野生型 IgG1 重 链 抗 体 的 HCDR2 | TVYYSGSTFHNPSLKS | 11 |
| 抗 TIGIT 完整 野生型 IgG1 重 链 抗 体 的 HCDR3 | ARVGPDVSHPPFDY | 12 |
| 抗 TIGIT kappa 轻链的 LCDR1 | RASQSISSYLN | 13 |
| 抗 TIGIT kappa 轻链的 LCDR2 | AASSLQS | 14 |
| 抗 TIGIT kappa 轻链的 LCDR3 | QSYSTPIT | 15 |
| 抗 PD-L1 VHH 的 HCDR1 | GFTFSSYWMY | 16 |
| 抗 PD-L1 VHH 的 HCDR2 | SINNSDSSTYYRDSVKG | 17 |
| 抗 PD-L1 VHH 的 HCDR3 | AKDPGGYA | 18 |

| | | | |
|--------|-------------------------------|---|----|
| | 抗 TIGIT 完整野生型 IgG1 重链可变区 (VH) | QLQLQESGPGLVKPAETLSLTCTVSGGSISSY DHYWTWIRQPPGKGLEWIGTVYYSGSTFHN PSLKSRVTIPVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVY YCARVGPDVSHPPFDYWGQGLVTVSS | 19 |
| [0141] | 抗 TIGIT kappa 轻链可变区 (VL) | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGS GSGTDFTLTISSLQPEDEATYYCQQSYSTPITF GGGTKVEIK | 20 |
| | 小鼠 TIGIT 的胞外段氨基酸序列 | TIDTKRNISAEEGGSVILQCHFSSDTAEVTQV DWKQQDQLLAIYSVDLGWHVASVFSDRVVP GPSLGLTFQSLTMNDTGEYFCTYHTYPPGGIY KGRIFLKVQESSDDRNGLAQFQTAPLG | 21 |

具体实施方式

[0142] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0143] 对照抗体Atezolizumab:抗PD-L1单抗,商品名Tecentriq,罗氏Roche。

[0144] 对照抗体Tiragolumab:抗TIGIT单抗,罗氏Roche。

[0145] 实施例1:抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体的表达与纯化

[0146] 在本实施例中,采用全基因合成方式合成抗TIGIT抗体重链可变区 (VH) 序列 (SEQ ID NO: 19), 将其重组至野生型hIgG1抗体重链构成完整“VH-CH1-CH2-CH3”抗体重链 (SEQ ID NO: 1), 并在其重链C末端通过2个连接片段G₄S (SEQ ID NO: 2) 连接抗PD-L1 VHH (SEQ ID NO: 3), 得到的肽链#1的全长氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示。此外,全基因合成抗TIGIT轻链可变区 (VL) 序列 (SEQ ID NO: 20), 将其重组至kappa轻链构成完整“VL-CL”抗体轻链结构,得到的肽链#2的全长氨基酸序列如SEQ ID NO: 5所示。

[0147] 利用分子克隆技术将重链和轻链序列分别构建到pcDNA3.1表达框内,通过Expi-293表达系统进行常规表达。转染方法按照商品说明书操作,细胞培养5天后收集上清,采用蛋白A磁珠(购自金斯瑞)分选法纯化目的蛋白。将磁珠用适当体积的结合缓冲液(PBS+0.1%吐温20,pH 7.4)重悬(1-4倍磁珠体积)后加入至待纯化样品中,室温孵育1小时,期间温柔振荡。样品置于磁力架上(购自海狸),弃去上清,磁珠用结合缓冲液清洗3遍。按照磁珠体积的3-5倍体积加入洗脱缓冲液(0.1M sodium citrate,pH 3.2)室温振荡5-10min,置回磁力架上,收集洗脱缓冲液,转移至已加入中和缓冲液(1M Tris,pH 8.54)的收集管中混

匀。

[0148] 获得抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体(本发明中也称为抗TIGIT/PD-L1双抗),其示意结构如图1所示。

[0149] 实施例2:抗体亲和力检测

[0150] 采用生物膜层光学干涉技术(ForteBio)测定实施例1获得的双特异性抗体及其对应单端抗体分子结合人和食蟹猴PD-L1、TIGIT的结合解离常数(K_D)。ForteBio亲和力测定按照现有方法(Este,P等人High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning.Mabs,2013.5(2):p.270-8)进行,其中人PD-L1的胞外段氨基酸序列、食蟹猴PD-L1的胞外段氨基酸序列、人TIGIT的胞外段氨基酸序列、食蟹猴TIGIT的胞外段氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:6-9所示。

[0151] 具体操作如下:传感器在分析缓冲液中线下平衡30分钟,然后线上检测60s建立基线,加载经纯化获得的完整抗体至AHQ传感器至厚度1nm进行亲和力检测。将已加载抗体的传感器于100nM人或食蟹猴PD-L1、TIGIT-his抗原中作用至平台期,然后将传感器转移到分析缓冲液中至少2分钟用于解离速率测量。使用1:1结合模型进行动力学分析。

[0152] 双特异性抗体及其对应单端抗体分子结合人、食蟹猴PD-L1及TIGIT的 K_D 值如下面的表1所示。

[0153] 表1:抗TIGIT-抗PD-L1双抗及对应单端抗体的 K_D 值

| 抗体 | 人 PD-L1-his (K_D) | 食蟹猴 PD-L1-his (K_D) | 人 TIGIT-his (K_D) | 食蟹猴 TIGIT-his (K_D) |
|------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 抗 TIGIT/PD-L1 双抗 | 4.20E-09 | 3.40E-09 | 1.50E-09 | 1.60E-08 |
| Anti-PD-L1 VHH | 5.20E-09 | 5.30E-09 | N.B. | N.B. |
| Anti-TIGIT mAb | N.B. | N.B. | 1.40E-09 | 1.30E-08 |

[0155] 注:"N.B.":no binding。

[0156] 结果显示,抗TIGIT/PD-L1双抗与人PD-L1、食蟹猴PD-L1、人TIGIT、食蟹猴TIGIT抗原结合的单价亲和力,分别与单端抗体分子与人PD-L1、食蟹猴PD-L1、人TIGIT、食蟹猴TIGIT抗原结合的单价亲和力相似甚至更优。

[0157] 实施例3:抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体与过表达人/食蟹猴PD-L1CHO细胞的结合活性及阻断活性

[0158] 3.1基于流式细胞术检测法检测抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体与过表达在CHO细胞上人/食蟹猴PD-L1的结合活性。

[0159] 具体地,通过转染克隆到MCS的人PD-L1和食蟹猴PD-L1的pCH01.0载体(购自Invitrogen)加压筛选产生过表达人PD-L1的CHO-S细胞(CHO-huPD-L1细胞)和过表达食蟹猴PD-L1的CHO-S细胞(CHO-cynoPD-L1细胞)。将扩大培养的过表达细胞调整至合适细胞密度加入96孔流式板,离心后加入梯度稀释的待测样品,4℃孵育30分钟。PBS清洗两次,加入

对应稀释至合适浓度的荧光二抗,4℃孵育30分钟。PBS清洗两次,加入PBS重悬细胞,在CytoFlex流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。采用Graphpad软件作图分析获得EC₅₀数值。

[0160] 结果如表2、图2A和图2B所示。

[0161] 表2:抗TIGIT-抗PD-L1双抗与过表达PD-L1/PD-1细胞结合阻断活性

| 抗体 | 过表达人PD-L1 CHO 细胞结合 EC ₅₀ (nM) | 过表达食蟹猴PD-L1 CHO 细胞结合 EC ₅₀ (nM) | 基于过表达人PD-1 CHO 细胞人PD-L1 结合阻断 IC ₅₀ (nM) |
|------------------|--|--|--|
| 抗 TIGIT/PD-L1 双抗 | 1.78 | 4.60 | 1.17 |
| Anti-PD-L1 VHH | 2.14 | 5.24 | 1.51 |

[0163] 结果显示,本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体与过表达在CHO细胞上人/食蟹猴PD-L1的结合活性与其PD-L1端单抗分子(anti-PD-L1 VHH)相似。

[0164] 3.2基于流式细胞术检测法检测抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体对于人PD-L1与过表达在CHO细胞上人PD-1的结合的阻断活性。

[0165] 具体地,通过转染克隆到MCS的人PD-1的pCHO1.0载体(购自Invitrogen)加压筛选产生过表达人PD-1的CHO-S细胞(CHO-huPD-1细胞)。将纯化的待测抗体用PBS稀释,将稀释好的样品60μL/孔加入96孔流式板中。然后60μL/孔加入生物素化标记的人PD-L1蛋白,终浓度为0.5μg/mL,混匀后4℃孵育30分钟。将扩大培养的CHO-huPD-1细胞调整细胞密度至2×10⁶细胞/mL,100μL/孔加入96孔流式板,离心后弃上清。100μL/孔加入上述共孵育完成的抗体抗原混合液,4℃孵育30分钟。PBS清洗两次,100μL/孔加入用PBS稀释100倍的链霉素亲和素-R-藻红蛋白偶联物(SAPE),4℃孵育30分钟。PBS清洗两次,100μL/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。采用Graphpad软件作图分析获得IC₅₀数值。

[0166] 结果如表2和图2C所示。结果显示,本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体对于人PD-L1与过表达在CHO细胞上人PD-1的结合的阻断活性与其PD-L1端单抗分子(anti-PD-L1 VHH)相似甚至更优。

[0167] 实施例4:抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体与过表达人/食蟹猴/小鼠TIGITCHO细胞的结合活性及阻断活性

[0168] 4.1基于流式细胞术检测法检测抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体与过表达在CHO细胞上人/食蟹猴/小鼠TIGIT的结合活性。

[0169] 具体地,通过转染克隆到MCS的人TIGIT、食蟹猴TIGIT、小鼠TIGIT cDNA的pCHO1.0载体(购自Invitrogen)加压筛选产生过表达人TIGIT的CHO-S细胞(CHO-huTIGIT细胞),过表达食蟹猴TIGIT的CHO-S细胞(CHO-cynoTIGIT细胞)以及过表达小鼠TIGIT的CHO-S细胞(CHO-muTIGIT细胞)。将扩大培养的过表达细胞调整至合适细胞密度加入96孔流式板,离心后加入梯度稀释的待测样品,4℃孵育30分钟。PBS清洗两次,加入对应稀释至合适浓度的荧光二抗,4℃孵育30分钟。PBS清洗两次,加入PBS重悬细胞,在CytoFlex流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。采用Graphpad软件作图分析获得EC₅₀数值。

[0170] 结果如表3、图3A至图3C所示。

[0171] 表3:抗TIGIT-抗PD-L1双抗与过表达TIGIT细胞结合阻断活性

| 抗体 | 过表达人TIGIT CHO细胞结合EC ₅₀ (nM) | 过表达食蟹猴TIGIT CHO细胞结合EC ₅₀ (nM) | 过表达小鼠TIGIT CHO细胞结合EC ₅₀ (nM) | 基于过表达人TIGIT CHO细胞结合阻断IC ₅₀ (nM) | 基于过表达小鼠TIGIT CHO细胞结合阻断IC ₅₀ (nM) |
|------------------|--|--|---|--|---|
| 抗 TIGIT/PD-L1 双抗 | 0.83 | 2.32 | 1.94 | 0.43 | 0.75 |
| Anti-TIGIT mAb | 0.80 | 2.80 | 2.40 | 0.33 | 0.54 |

[0173] 结果显示,本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体与过表达在CHO细胞上人/食蟹猴/小鼠TIGIT的结合活性与其TIGIT端单抗分子(anti-TIGIT mAb)相似或者更优。

[0174] 4.2基于流式细胞术检测法检测抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体对于人CD155与过表达在CHO细胞上人TIGIT的结合,小鼠CD155与过表达在CHO细胞上小鼠TIGIT的结合的阻断活性。

[0175] 具体地,将扩大培养的CHO-huTIGIT细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/mL,100 μ L/孔加入96孔流式板,离心备用。将纯化的单克隆抗体用PBS稀释,400nM开始3倍稀释共12个点。将稀释好的样品60 μ L/孔加入上述带有细胞的96孔流式板中,4 $^{\circ}$ C共孵育30分钟。然后60 μ L/孔加入带有Mouse IgG2a Fc Tag的人CD155蛋白,终浓度为2 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C共孵育30分钟。PBS清洗两次,100 μ L/孔加入用PBS稀释100倍的APC羊抗鼠IgG抗体,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。PBS清洗两次,100 μ L/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。

[0176] 将扩大培养的CHO-muTIGIT细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/mL,100 μ L/孔加入96孔流式板,离心备用。将纯化的单克隆抗体用PBS稀释,400nM开始3倍稀释共12个点。将稀释好的样品60 μ L/孔加入上述带有细胞的96孔流式板中,4 $^{\circ}$ C共孵育30分钟。然后60 μ L/孔加入带有Mouse IgG2a Fc Tag的小鼠CD155蛋白,终浓度为2 μ g/mL,4 $^{\circ}$ C共孵育30分钟。PBS清洗两次,100 μ L/孔加入用PBS稀释100倍的APC羊抗鼠IgG抗体,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。PBS清洗两次,100 μ L/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。采用Graphpad软件作图分析获得IC₅₀数值。

[0177] 结果如表3、图3D至图3E所示。结果显示,本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体对于人CD155与过表达在CHO细胞上人TIGIT的结合,小鼠CD155与过表达在CHO细胞上小鼠TIGIT的结合的阻断活性与其TIGIT端单抗分子(anti-TIGIT mAb)相似。

[0178] 实施例5:抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体与人TIGIT和人PD-L1共结合活性

[0179] 基于酶联免疫吸附剂检测法(ELISA)检测本发明抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体与人TIGIT和人PD-L1蛋白共结合活性。

[0180] 具体地,人TIGIT蛋白按照说明书溶解,用1 \times ELISA包被液稀释至1 μ g/mL,100 μ L/孔包被96孔ELISA板中,4 $^{\circ}$ C覆膜过夜。弃去包被液,1 \times PBST清洗3次,200 μ L/孔加入5%BSA/PBS室温封闭2小时。弃去封闭液,100 μ L/孔加入1%BSA/PBS梯度稀释的待测抗体,室温孵育

2小时。弃去抗体稀释液,1×PBST清洗3次,100μL/孔加入1%BSA/PBS稀释的生物素标记的PD-L1蛋白,终浓度为1μg/mL,室温孵育1小时。弃去抗原稀释液,1×PBST清洗3次,100μL/孔加入1%BSA/PBS稀释的SA-HRP,室温孵育1小时。弃去SA-HRP稀释液,1×PBST清洗3次,100μL/孔加入ELISA显色液室温反应1-3分钟,50μL/孔加入ELISA终止液,读取450nm处吸光度数值。采用Graphpad软件作图获得浓度-吸光度值的结合曲线图。

[0181] 结果如图4所示,本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体可同时结合人TIGIT和人PD-L1蛋白。

[0182] 实施例6:抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体在荧光素酶报告基因系统对PD-1/PD-L1与TIGIT/CD155/CD112信号通路的阻断活性

[0183] 为进一步在细胞水平检测抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体同时阻断PD-1/PD-L1与TIGIT/CD155/CD112信号通路的活性,本实施例构建了如下荧光素酶报告基因系统。简言之,利用慢病毒转染细胞,构建了过表达人CD155、人CD112、人PD-L1和OKT-3scFv的CHO-K1细胞株(CHO-K1-CD155-CD112-PD-L1),构建了过表达人TIGIT、人PD-1和NF-AT luciferase报告基因(购自promega)的Jurkat细胞株(Jurkat-TIGIT-PD-1-luc),后续利用这一报告基因系统开展相关试验。

[0184] 具体地,消化获取CHO-K1-CD155-CD112-PD-L1功能细胞,调整细胞密度,100μL/孔加入96孔白底板中,贴壁培养过夜。第二天,制备Jurkat-TIGIT-PD-1-luc效应细胞悬液,将待测样品用反应培养基梯度稀释。取出白底板,吸去培养上清,将上述稀释好的样品40μL/孔加入白底板,同时40μL/孔加入Jurkat-TIGIT-PD-1-luc效应细胞悬液,置于37℃,5%CO₂培养箱培养6h,期间将Bio-Glo™ reagent恢复至室温。培养完成,取出细胞,室温平衡5分钟,80μL/孔加入Bio-Glo™ reagent,使用多功能酶标仪读取荧光信号值。

[0185] 结果如图5所示。结果显示,本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体可以分别解除CD155/CD112介导的TIGIT下游抑制信号通路,以及PD-L1介导的PD-1下游抑制信号通路,上调报告基因荧光素酶表达,且活性优于两单端抗体分子的联合。

[0186] 实施例7:抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体在混合淋巴细胞试验中对T细胞激活的活性

[0187] 本实施例通过混合淋巴细胞反应实验(MLR)检测抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体激活T细胞的活性。具体实验方法如下:

[0188] 复苏PBMC细胞(购自SAILYBIO,XFB-HP100B),离心,用10mL X-VIVO-15培养基(购自LONZA)重悬PBMC,于细胞培养箱内37℃贴壁培养2h,吸去未贴壁细胞。加入10mL DC培养基:X-VIVO-15培养基加入10ng/mL GM-CSF(购自R&D),20ng/mL IL-4(购自R&D),培养3天,补加5mL DC培养基,继续培养至第6天,加入DC成熟培养基:X-VIVO-15培养基加入1000U/mL TNF-α(购自R&D),10ng/mL IL-6(购自R&D),5ng/mL IL-1β(购自R&D),1μM PGE2(购自Tocris),培养2天,收集成熟的DC细胞,用X-VIVO-15培养基调整细胞密度为2×10⁵细胞/mL。

[0189] 复苏另一位捐献者的PBMC细胞(购自SAILYBIO,XFB-HP100B),离心,用10mL X-VIVO-15培养基重悬PBMC。用T细胞分选试剂盒(购自Stemcell)富集T细胞,X-VIVO-15重悬T细胞,调整细胞密度为2×10⁶细胞/mL。将T细胞悬液与上述收集的成熟DC细胞悬液按1:1体积比混合,100μL/孔加入96孔U底板。

[0190] 用X-VIVO-15培养基稀释待测抗体样品,200nM开始10倍稀释共5个点,100 μ L/孔加入上述混合细胞孔,培养5天,收集上清,ELISA(购自eBioscience)方法检测IFN- γ 表达量。

[0191] 结果如图6A和图6B所示。结果显示,抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体在MLR实验中显示较好的生物学活性,且T细胞激活水平与两单端抗体分子联合的活性相似。

[0192] 实施例8:抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体在B-NDG小鼠混合接种A375和人PBMC体内药效学研究

[0193] 本实验在B-NDG小鼠混合接种A375(购自Addexbio,C0020004,一种人恶性黑色素瘤细胞),人PBMC细胞(上海妙顺,A10S033014/PB100C)的模型(A375 huPBMC模型)中测定本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体的抗肿瘤作用。其中,通过将人的免疫细胞(PBMC)接种至免疫缺陷小鼠中,产生局部重组人类免疫系统的人源化肿瘤小鼠模型。

[0194] 具体地,首先A375细胞与人PBMC 1:1等体积混合成0.1mL细胞悬液,在小鼠右腹沟以皮下注射的方式建立A375 huPBMC模型,待平均肿瘤体积长至200mm³左右时进行分组,腹腔注射给予不同剂量、相同给药体积的PBS或抗体治疗,每组6只小鼠。监测各组小鼠瘤体积和体重变化,监测频率均为2-3天/次,连续监测2到3周,给药剂量和方式如表4。

[0195] 表4:抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体A375 huPBMC模型给药方案

| 组别 | 给药剂量 | 给药频率/次数 |
|--------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| PBS | N/A | Q2d \times 3 |
| Anti-PD-L1 VHH | 2.5 mg/kg | Q2d \times 3 |
| [0196] Anti-TIGIT mAb | 5 mg/kg | Q2d \times 3 |
| Anti-PD-L1 VHH+Anti-TIGIT mAb | 2.5 mg/kg+5 mg/kg | Q2d \times 3 |
| 抗 TIGIT/PD-L1 双抗 | 6 mg/kg | Q2d \times 3 |

[0197] 备注:Anti-PD-L1 VHH、Anti-TIGIT mAb、抗TIGIT/PD-L1双抗分子量分别约为75KD、150KD、175KD,给药剂量按各组分等摩尔浓度剂量给药。

[0198] 结果如图7所示。结果表明,本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体具有显著的抗肿瘤作用,且效果优于两单端抗体分子联用。

[0199] 实施例9:抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体在B-NDG小鼠混合接种A375和人PBMC体内剂量依赖药效学研究

[0200] 本实验采用皮下混合接种的方式建立A375 huPBMC模型(建模步骤与实施例8相同),待平均肿瘤体积长至300mm³左右时进行分组,腹腔注射给予不同剂量、相同给药体积的PBS或双特异性抗体治疗,每组6只小鼠。监测各组小鼠瘤体积和体重变化,监测频率均为2-3天/次,连续监测2到3周,给药剂量和方式如表5。

[0201] 表5:抗TIGIT-抗PD-L1双抗剂量依赖性肿瘤抑制活性试验方案

| 组别 | 给药剂量 | 给药频率/次数 |
|----------------|----------|------------------|
| PBS | N/A | Q3-4d \times 3 |
| 抗TIGIT/PD-L1双抗 | 1.2mg/kg | Q3-4d \times 3 |

| | | |
|----------------|---------|---------|
| 抗TIGIT/PD-L1双抗 | 6mg/kg | Q3-4d×3 |
| 抗TIGIT/PD-L1双抗 | 30mg/kg | Q3-4d×3 |

[0203] 结果如图8所示,本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体能够显著抑制小鼠肿瘤的生长,且呈一定的剂量依赖关系。

[0204] 实施例10:抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体在huPD-L1/PD-1/TIGIT KI小鼠体内药效学研究

[0205] 本实验采用在人PD-L1/PD-1/TIGIT转基因小鼠(huPD-L1/PD-1/TIGIT KI小鼠)体内移植CT-26-huPD-L1肿瘤细胞(人PD-L1敲入CT26小鼠结肠癌细胞,购自江苏集萃药康)测定本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体的抗肿瘤作用。

[0206] 具体地,首先制备CT-26-huPD-L1细胞悬液,在小鼠右腹沟皮下注射0.1mL约 5×10^5 细胞建立CT-26-huPD-L1荷瘤小鼠模型,待平均肿瘤体积长至80-120mm³时进行分组,腹腔注射给予不同剂量、相同给药体积的PBS或抗体治疗,每组6只小鼠。监测各组小鼠瘤体积和体重变化,监测频率均为2-3天/次,连续监测2到3周,给药剂量和方式如表6。

[0207] 表6:抗TIGIT-抗PD-L1双抗huPD-L1/PD-1/TIGIT KI小鼠模型给药方案

| 组别 | 给药剂量 | 给药频率/次数 |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| PBS | N/A | Q2d × 6 |
| Atezolizumab | 10 mg/kg | Q2d × 6 |
| [0208] Tiragolumab | 10 mg/kg | Q2d × 6 |
| Atezolizumab+Tiragolumab | 10mg/kg 10mg/kg | + Q2d × 6 |
| 抗 TIGIT/PD-L1 双抗 | 12mg/kg | Q2d × 6 |

[0209] 结果如图9所示,本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体与临床上的用药组合(Atezolizumab+Tiragolumab)具有相似的药效,且抗肿瘤活性优于两个单抗用药组。

[0210] 实施例11:抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体小鼠体内半衰期研究

[0211] 采用尾静脉单次注射法,检测本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体在小鼠体内半衰期。

[0212] 具体地,实验用Balb/c小鼠,雌雄各3只,12/12小时光/暗调节,温度24℃±2℃,湿度40%-70%,自由进水饮食。实验当天对Balb/c小鼠单次尾静脉注射单克隆抗体分子,注射剂量为10mg/kg。取血时间点:给药后5分钟、0.5小时、2小时、6小时、24小时、48小时、96小时、168小时、336小时、504小时于小鼠眼眶采血。全血样品2℃-8℃放置30分钟,12000rpm离心5分钟收集血清,所得血清再于2℃-8℃,12000rpm离心5分钟,-80℃保存,ELISA检测血清中双特异性抗体分子含量。

[0213] 结果如图10所示。结果表明,本发明的抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体单次注射在小鼠体内半衰期为189小时。

[0214] 制备例1:抗TIGIT单抗的制备

[0215] 将抗TIGIT单抗的重链可变区(氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示)分别重组到人

IgG1重链恒定区,以及人IgG1重链L234A、L235A改造的恒定区中。此外,将轻链可变区(氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示)重组到人kappa轻链恒定区,将抗TIGIT单抗分别命名为55796-G1、55796-G1LALA。经由HEK293表达系统瞬时表达纯化。具体操作如下:使用化学转染的方法将带有抗体重链和轻链的pcDNA3.1载体转入HEK293细胞中,在37℃,8%CO₂条件下,培养7天。收集细胞液,13000rpm离心20分钟。取上清液,Protein A纯化上清液,SEC检测抗体纯度,同时控制内毒素含量。

[0216] 制得的抗TIGIT单抗55796-G1、55796-G1LALA,用于下面的试验例1-3。

[0217] 试验例1:抗TIGIT单抗的亲合力检测

[0218] 采用生物膜层光学干涉技术(ForteBio)测定制备例1制得的抗TIGIT单抗结合人、食蟹猴、小鼠TIGIT的结合解离常数(K_D)。ForteBio亲合力测定按照现有方法(Este,P等人 High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. *Mabs*, 2013.5(2):p.270-8)进行。其中人TIGIT的胞外段氨基酸序列、食蟹猴TIGIT的胞外段氨基酸序列、小鼠TIGIT的胞外段氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:8-9和21所示。

[0219] 测量完整抗体(即,通过Adimab原始获得的全长IgG)与人、食蟹猴、小鼠TIGIT-his蛋白的单价亲合力:传感器在分析缓冲液中线下平衡20分钟,然后线上检测120s建立基线,加载完整的TIGIT抗体至AHQ传感器至厚度1nm进行亲合力检测。将已加载抗体的传感器于100nM TIGIT-his抗原中作用至平台期,然后将传感器转移到分析缓冲液中至少2分钟用于解离速率测量。使用1:1结合模型进行动力学分析。

[0220] 在如上测定方法中,测得的K_D值如下表7所示:

[0221] 表7:抗TIGIT单抗的K_D值

| 抗体 | IgG 与 TIGIT-his 蛋白结合单价亲合力 | IgG 与食蟹猴 TIGIT-his 蛋白单价亲合力 | IgG 与小鼠 TIGIT-his 蛋白单价亲合力 |
|-----------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| [0222] 55796-G1 | 1.99E-10 | 4.72E-09 | 9.60E-08 |
| 55796-G1LALA | 2.10E-10 | 4.90E-09 | 6.10E-08 |
| Tiragolumab | 8.70E-10 | 3.50E-09 | NA |

[0223] 注:"NA":not available。

[0224] 由表7结果可见:(1)抗TIGIT单抗与人TIGIT-his蛋白的单价亲合力高于对照分子Tiragolumab;(2)抗TIGIT单抗与食蟹猴TIGIT-his蛋白的单价亲合力与对照分子Tiragolumab相当;(3)抗TIGIT单抗和小鼠TIGIT有交叉结合活性。

[0225] 试验例2:抗TIGIT单抗与过表达人/食蟹猴/小鼠TIGITCHO细胞的结合活性及阻断活性

[0226] 2.1基于流式细胞术检测法检测抗TIGIT单抗与过表达在CHO细胞上人/食蟹猴/小鼠TIGIT的结合活性。

[0227] 具体地,通过转染克隆到MCS的人TIGIT、食蟹猴TIGIT、小鼠TIGIT cDNA的pCH01.0载体(购自Invitrogen)加压筛选产生过表达人TIGIT的CHO-S细胞(CHO-huTIGIT细胞),过

表达食蟹猴TIGIT的CHO-S细胞(CHO-cynoTIGIT细胞)以及过表达小鼠TIGIT的CHO-S细胞(CHO-muTIGIT细胞)。将扩大培养的过表达细胞调整至合适细胞密度加入96孔流式板,离心后加入梯度稀释的待测样品,4℃孵育30分钟。PBS清洗两次,加入对应稀释至合适浓度的荧光二抗,4℃孵育30分钟,PBS清洗两次。加入PBS重悬细胞,在CytoFlex流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。采用Graphpad软件作图分析获得EC50数值。结果如表8和图11至图13所示。

[0228] 2.2基于流式细胞术检测法检测抗TIGIT单抗,阻断人CD155与过表达在CHO细胞上人TIGIT的结合,阻断小鼠CD155与过表达在CHO细胞上小鼠TIGIT的结合的阻断活性。

[0229] 具体地,将扩大培养的CHO-huTIGIT细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/mL,100μL/孔加入96孔流式板,离心备用。将纯化的单克隆抗体用PBS稀释,400nM开始3倍稀释共12个点。将稀释好的样品60μL/孔加入上述带有细胞的96孔流式板中,4℃共孵育30分钟。然后60μL/孔加入带有Mouse IgG2a Fc Tag的人CD155蛋白,终浓度为2μg/mL,4℃共孵育30分钟,PBS清洗两次。100μL/孔加入用PBS稀释100倍的APC羊抗鼠IgG抗体,4℃孵育30分钟,PBS清洗两次。100μL/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。

[0230] 将扩大培养的CHO-muTIGIT细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/mL,100μL/孔加入96孔流式板,离心备用。将纯化的单克隆抗体用PBS稀释,400nM开始3倍稀释共12个点。将稀释好的样品60μL/孔加入上述带有细胞的96孔流式板中,4℃共孵育30分钟。然后60μL/孔加入带有Mouse IgG2a Fc Tag的小鼠CD155蛋白,终浓度为2μg/mL,4℃共孵育30分钟,PBS清洗两次。100μL/孔加入用PBS稀释100倍的APC羊抗鼠IgG抗体,4℃孵育30分钟,PBS清洗两次。100μL/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。采用Graphpad软件作图分析获得IC₅₀数值。结果如表8和图14至图5所示。

[0231] 表8:抗TIGIT单抗过表达细胞结合阻断活性汇总表

| 抗体 | 过表达人TIGIT CHO 细胞结合 EC ₅₀ (nM) | 过表达食蟹猴 TIGIT CHO 细胞结合 EC ₅₀ (nM) | 过表达小鼠 TIGIT CHO 细胞结合 EC ₅₀ (nM) | 基于过表达人TIGIT CHO 细胞人CD155结合阻断 IC ₅₀ (nM) | 基于过表达小鼠 TIGIT CHO 细胞小鼠CD155结合阻断 IC ₅₀ (nM) |
|---------------------|--|---|--|--|---|
| [0232] 55796-G1 | 0.96 | 1.32 | 2.96 | 0.24 | 1.50 |
| [0233] 55796-G1LALA | 0.84 | 1.34 | 3.36 | 0.37 | 1.56 |
| Tiragolumab | 1.35 | 4.18 | N.B. | 0.63 | NA |

[0234] 注:“N.B.”:no binding;and“NA”:not available.

[0235] 由表8和图11至图13可见:本发明的抗TIGIT单抗,(1)与CHO细胞表面过表达的人TIGIT蛋白结合活性优于对照分子Tiragolumab;(2)与CHO细胞表面过表达的食蟹猴TIGIT蛋白结合活性优于对照分子Tiragolumab;(3)与CHO细胞表面过表达的小鼠TIGIT蛋白有明显结合。

[0236] 由表8和图14至图15可见:本发明的抗TIGIT单抗,(1)阻断人CD155与CHO细胞表面过表达的人TIGIT蛋白结合的能力优于对照分子Tiragolumab;(2)与CHO细胞表面过表达的小鼠TIGIT蛋白有结合的抗TIGIT抗体分子可以明显阻断小鼠CD155与CHO细胞表面过表达

的小鼠TIGIT蛋白的结合。

[0237] 试验例3:抗TIGIT单抗与原代T细胞表面TIGIT结合

[0238] 基于流式细胞术检测法检测发明抗TIGIT抗体与激活T细胞表面的TIGIT结合活性。

[0239] 具体地,将人PBMC按照STEMCELL公司提供的试验方案(stemcell,货号:#17951C)进行分选获得human total T细胞。用X-VIVO15培养基(购自lonza,货号:04-418Q)调整T细胞浓度至 1.0×10^6 cells/mL,加入1 μ L IL-2储备液(100万IU),同时1:1 (bead-to-cell)加入CD3/CD28 Dynabeads(购自gibco,货号:11132D),于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱内培养48小时。将活化后的T细胞调整至合适细胞密度加入96孔流式板,离心后加入梯度稀释的待测样品,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。PBS清洗两次,加入对应稀释至合适浓度的荧光二抗,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。加入PBS重悬细胞,在CytoFlex流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。

[0240] 结果如图16所示。结果表明,本发明抗TIGIT抗体55796-G1、55796-G1LALA能够结合T细胞表面的TIGIT分子,且结合活性优于对照分子Tiragolumab。

[0241] 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。

SEQUENCE LISTING

<110> 普米斯生物技术(珠海)有限公司
 <120> 抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体、其药物组合物及用途
 <130> IDC210351
 <160> 21
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 抗TIGIT完整野生型IgG1抗体重链
 <400> 1

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Leu | Gln | Leu | Gln | Glu | Ser | Gly | Pro | Gly | Leu | Val | Lys | Pro | Ala | Glu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Thr | Leu | Ser | Leu | Thr | Cys | Thr | Val | Ser | Gly | Gly | Ser | Ile | Ser | Ser | Tyr |
| | | | | 20 | | | | 25 | | | | | | 30 | |
| Asp | His | Tyr | Trp | Thr | Trp | Ile | Arg | Gln | Pro | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu |
| | | | | 35 | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Trp | Ile | Gly | Thr | Val | Tyr | Tyr | Ser | Gly | Ser | Thr | Phe | His | Asn | Pro | Ser |
| | | | | 50 | | | 55 | | | | 60 | | | | |
| Leu | Lys | Ser | Arg | Val | Thr | Ile | Pro | Val | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Gln | Phe |
| 65 | | | | | | 70 | | | | 75 | | | | | 80 |
| Ser | Leu | Lys | Leu | Ser | Ser | Val | Thr | Ala | Ala | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr |
| | | | | | | 85 | | | | 90 | | | | | 95 |
| Cys | Ala | Arg | Val | Gly | Pro | Asp | Val | Ser | His | Pro | Pro | Phe | Asp | Tyr | Trp |
| | | | | 100 | | | | | | 105 | | | | 110 | |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro |
| | | | | 115 | | | | | | 120 | | | | 125 | |
| Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr |
| | | | | | | 130 | | | | | | | | 140 | |
| Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr |
| 145 | | | | | | 150 | | | | | | 155 | | | 160 |
| Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro |
| | | | | | | 165 | | | | | | | | 170 | 175 |
| Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr |
| | | | | | | 180 | | | | | | | | 185 | 190 |
| Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn |

| | | |
|---|-----|-----|
| 195 | 200 | 205 |
| His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu | | |
| | 245 | 250 |
| Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser | | |
| | 260 | 265 |
| His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu | | |
| | 275 | 280 |
| Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr | | |
| | 290 | 295 |
| Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro | | |
| | 325 | 330 |
| Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln | | |
| | 340 | 345 |
| Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val | | |
| | 355 | 360 |
| Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val | | |
| | 370 | 375 |
| Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr | | |
| | 405 | 410 |
| Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val | | |
| | 420 | 425 |
| Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu | | |
| | 435 | 440 |
| Ser Pro Gly | | 445 |
| 450 | | |
| <210> 2 | | |
| <211> 10 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220> | | |
| <223> 连接片段G4S | | |

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 抗PD-L1单域抗体

<400> 3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Asn Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 4

<211> 576

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体 的肽链#1

<400> 4

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ala Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp His Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Thr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Phe His Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Pro Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Val Gly Pro Asp Val Ser His Pro Pro Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

| | | |
|---|-----|-----|
| 355 | 360 | 365 |
| Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Tyr | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Asn Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser | | |
| 565 | 570 | 575 |
| <210> 5 | | |
| <211> 214 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Artificial Sequence | | |
| <220> | | |
| <223> 抗TIGIT-抗PD-L1双特异性抗体 的肽链#2 | | |
| <400> 5 | | |
| Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly | | |
| 1 | 5 | 10 |
| Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr | | |
| 20 | 25 | 30 |
| Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile | | |

35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 6
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 人PD-L1的胞外段氨基酸序列
 <400> 6
 Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
 1 5 10 15
 Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
 20 25 30
 Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
 35 40 45
 Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
 50 55 60
 Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|-----|
| | 100 | | 105 | | 110 | | | | | | | | | | | | | | |
| Asn | Ala | Pro | Tyr | Asn | Lys | Ile | Asn | Gln | Arg | Ile | Leu | Val | Val | Asp | Pro | | | | |
| | 115 | | 120 | | 125 | | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Thr | Ser | Glu | His | Glu | Leu | Thr | Cys | Gln | Ala | Glu | Gly | Tyr | Pro | Lys | | | | |
| | 130 | | 135 | | 140 | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Glu | Val | Ile | Trp | Thr | Ser | Ser | Asp | His | Gln | Val | Leu | Ser | Gly | Lys | | | | |
| 145 | | | 150 | | 155 | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Thr | Thr | Thr | Asn | Ser | Lys | Arg | Glu | Glu | Lys | Leu | Leu | Asn | Val | Thr | | | | |
| | | | 165 | | 170 | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Thr | Leu | Arg | Ile | Asn | Thr | Thr | Ala | Asn | Glu | Ile | Phe | Tyr | Cys | Ile | | | | |
| | | | 180 | | 185 | | | | | | | | | | | | | | |
| Phe | Arg | Arg | Leu | Asp | Pro | Glu | Glu | Asn | His | Thr | Ala | Glu | Leu | Val | Ile | | | | |
| | | | 195 | | 200 | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Glu | Leu | Pro | Leu | Ala | Leu | Pro | Pro | Asn | Glu | Arg | | | | | | | | |
| | 210 | | 215 | | 220 | | | | | | | | | | | | | | |
| <210> | 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <211> | 120 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <213> | Artificial Sequence | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <220> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <223> | 人TIGIT的胞外段氨基酸序列 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <400> | 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Met | Met | Thr | Gly | Thr | Ile | Glu | Thr | Thr | Gly | Asn | Ile | Ser | Ala | Glu | Lys | | | | |
| 1 | | 5 | | | 10 | | | | | | | | | 15 | | | | | |
| Gly | Gly | Ser | Ile | Ile | Leu | Gln | Cys | His | Leu | Ser | Ser | Thr | Thr | Ala | Gln | | | | |
| | | 20 | | | 25 | | | | | | | | | 30 | | | | | |
| Val | Thr | Gln | Val | Asn | Trp | Glu | Gln | Gln | Asp | Gln | Leu | Leu | Ala | Ile | Cys | | | | |
| | | 35 | | | 40 | | | | | | | | | 45 | | | | | |
| Asn | Ala | Asp | Leu | Gly | Trp | His | Ile | Ser | Pro | Ser | Phe | Lys | Asp | Arg | Val | | | | |
| | | 50 | | | 55 | | | | | | | | 60 | | | | | | |
| Ala | Pro | Gly | Pro | Gly | Leu | Gly | Leu | Thr | Leu | Gln | Ser | Leu | Thr | Val | Asn | | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Asp | Thr | Gly | Glu | Tyr | Phe | Cys | Ile | Tyr | His | Thr | Tyr | Pro | Asp | Gly | Thr | | | | |
| | | | | | 85 | | | | | | | | | 90 | | | | | 95 |
| Tyr | Thr | Gly | Arg | Ile | Phe | Leu | Glu | Val | Leu | Glu | Ser | Ser | Val | Ala | Glu | | | | |
| | | | | | 100 | | | | | | | | | 105 | | | | | 110 |
| His | Gly | Ala | Arg | Phe | Gln | Ile | Pro | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | 115 | | | | | | | | | 120 | | | | | |
| <210> | 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

<211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 食蟹猴TIGIT的胞外段氨基酸序列
 <400> 9
 Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Lys Lys
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Val Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Met Ala Gln
 20 25 30
 Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln His Asp His Ser Leu Leu Ala Ile
 35 40 45
 Arg Asn Ala Glu Leu Gly Trp His Ile Tyr Pro Ala Phe Lys Asp Arg
 50 55 60
 Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Met
 65 70 75 80
 Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly
 85 90 95
 Thr Tyr Arg Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala
 100 105 110
 Glu His Ser Ala Arg Phe Gln Ile Pro
 115 120
 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 抗TIGIT完整野生型IgG1重链抗体的HCDR1
 <400> 10
 Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Asp His Tyr Trp Thr
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 抗TIGIT完整野生型IgG1重链抗体的HCDR2
 <400> 11
 Thr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Phe His Asn Pro Ser Leu Lys Ser

| | | | |
|---|---|----|----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| <210> 12 | | | |
| <211> 14 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Artificial Sequence | | | |
| <220> | | | |
| <223> 抗TIGIT完整野生型IgG1重链抗体的HCDR3 | | | |
| <400> 12 | | | |
| Ala Arg Val Gly Pro Asp Val Ser His Pro Pro Phe Asp Tyr | | | |
| 1 | 5 | 10 | |
| <210> 13 | | | |
| <211> 11 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Artificial Sequence | | | |
| <220> | | | |
| <223> 抗TIGIT kappa轻链的LCDR1 | | | |
| <400> 13 | | | |
| Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn | | | |
| 1 | 5 | 10 | |
| <210> 14 | | | |
| <211> 7 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Artificial Sequence | | | |
| <220> | | | |
| <223> 抗TIGIT kappa轻链的LCDR2 | | | |
| <400> 14 | | | |
| Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser | | | |
| 1 | 5 | | |
| <210> 15 | | | |
| <211> 9 | | | |
| <212> PRT | | | |
| <213> Artificial Sequence | | | |
| <220> | | | |
| <223> 抗TIGIT kappa轻链的LCDR3 | | | |
| <400> 15 | | | |
| Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile Thr | | | |
| 1 | 5 | | |
| <210> 16 | | | |
| <211> 10 | | | |

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 抗PD-L1 VHH的HCDR1
 <400> 16
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Tyr
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 抗PD-L1 VHH的HCDR2
 <400> 17
 Ser Ile Asn Asn Ser Asp Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 抗PD-L1 VHH的HCDR3
 <400> 18
 Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala
 1 5
 <210> 19
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> 抗TIGIT完整野生型IgG1重链可变区
 <400> 19
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ala Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp His Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Thr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Phe His Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Pro Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Val Gly Pro Asp Val Ser His Pro Pro Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 抗TIGIT kappa轻链可变区

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 小鼠TIGIT的胞外段氨基酸序列

<400> 21

Thr Ile Asp Thr Lys Arg Asn Ile Ser Ala Glu Glu Gly Gly Ser Val

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ile Leu Gln Cys His Phe Ser Ser Asp Thr Ala Glu Val Thr Gln Val | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| Asp Trp Lys Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Tyr Ser Val Asp Leu | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Gly Trp His Val Ala Ser Val Phe Ser Asp Arg Val Val Pro Gly Pro | | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| Ser Leu Gly Leu Thr Phe Gln Ser Leu Thr Met Asn Asp Thr Gly Glu | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Tyr Phe Cys Thr Tyr His Thr Tyr Pro Gly Gly Ile Tyr Lys Gly Arg | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Ile Phe Leu Lys Val Gln Glu Ser Ser Asp Asp Arg Asn Gly Leu Ala | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Gln Phe Gln Thr Ala Pro Leu Gly | | | |
| | 115 | 120 | |

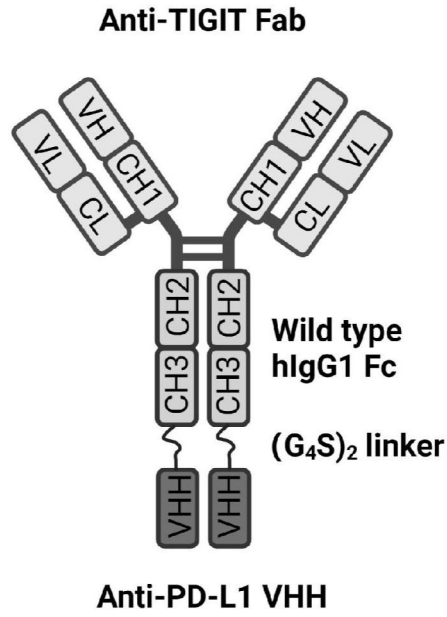


图1

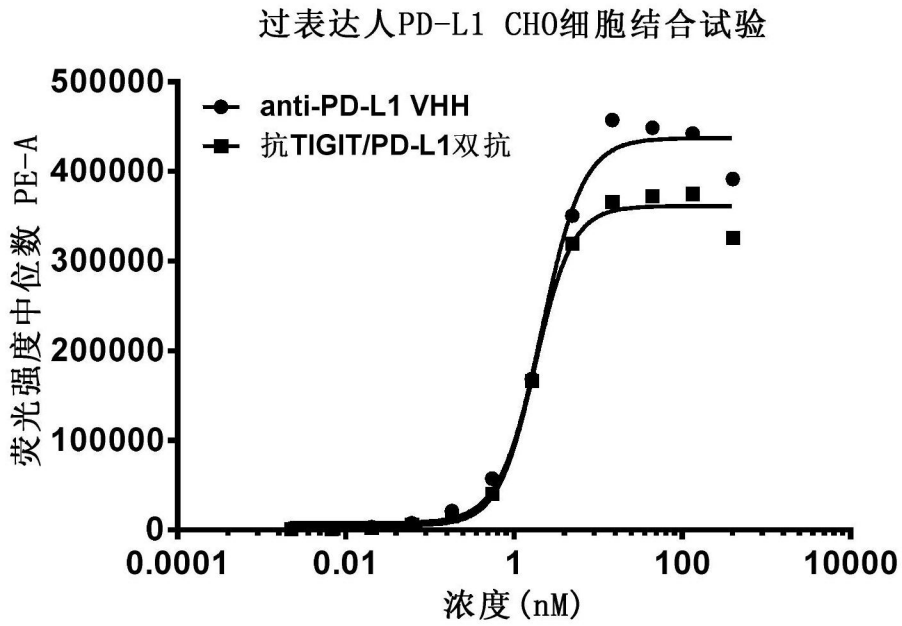


图2A

过表达食蟹猴PD-L1 CHO细胞结合试验

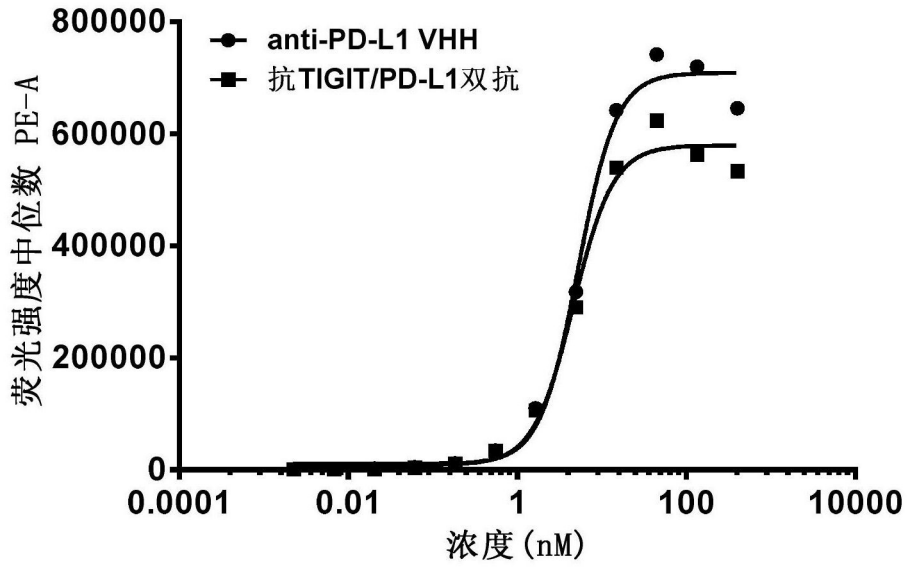


图2B

基于过表达人PD-1 CHO细胞PD-L1阻断试验

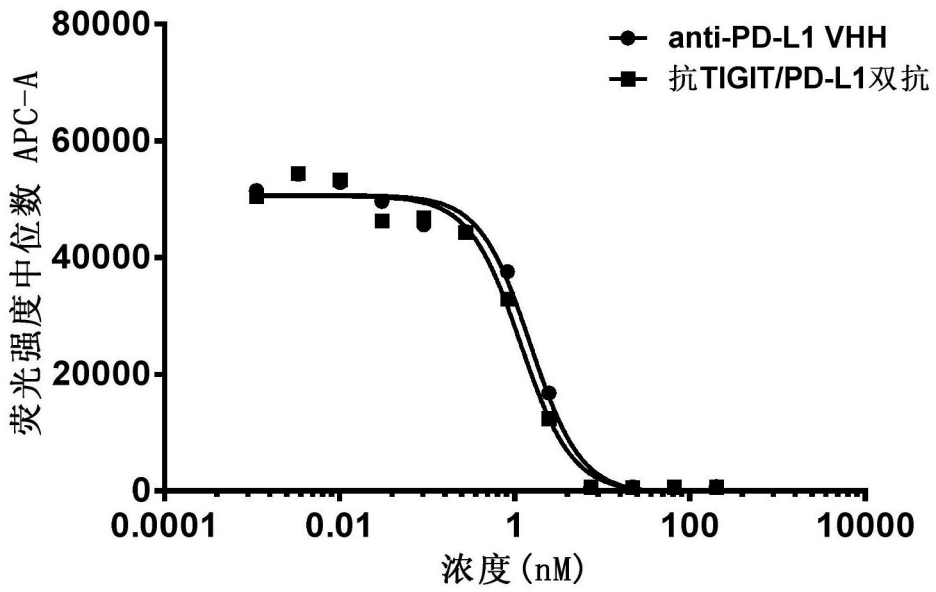


图2C

过表达人TIGIT CHO细胞结合试验

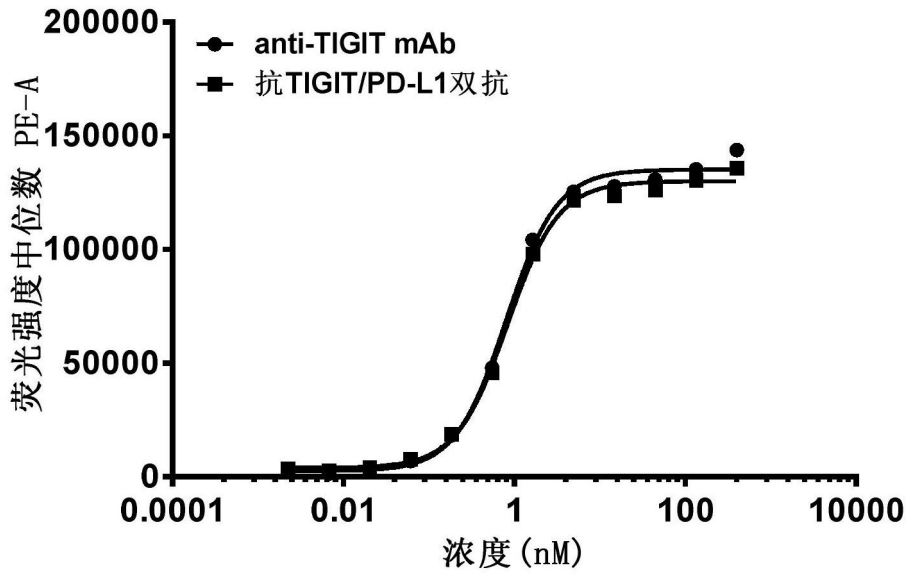


图3A

过表达食蟹猴TIGIT CHO细胞结合试验

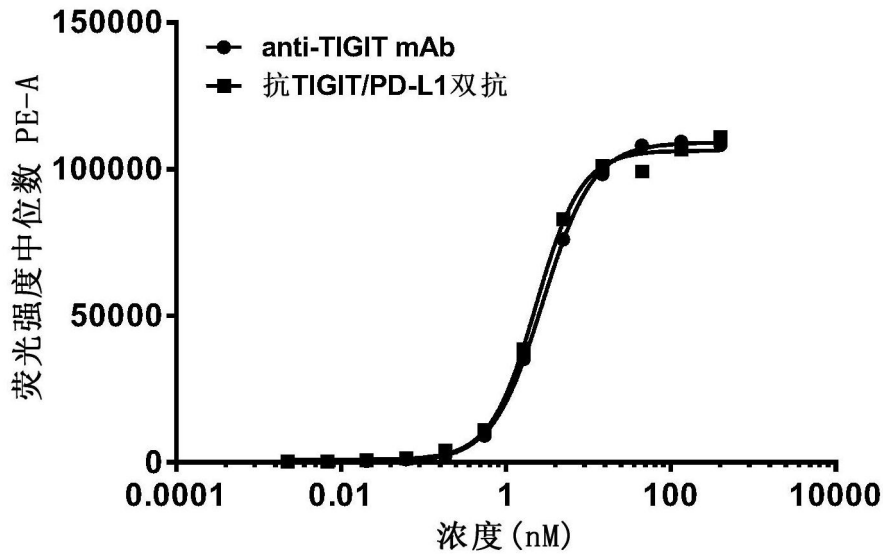


图3B

过表达小鼠TIGIT CHO细胞结合试验

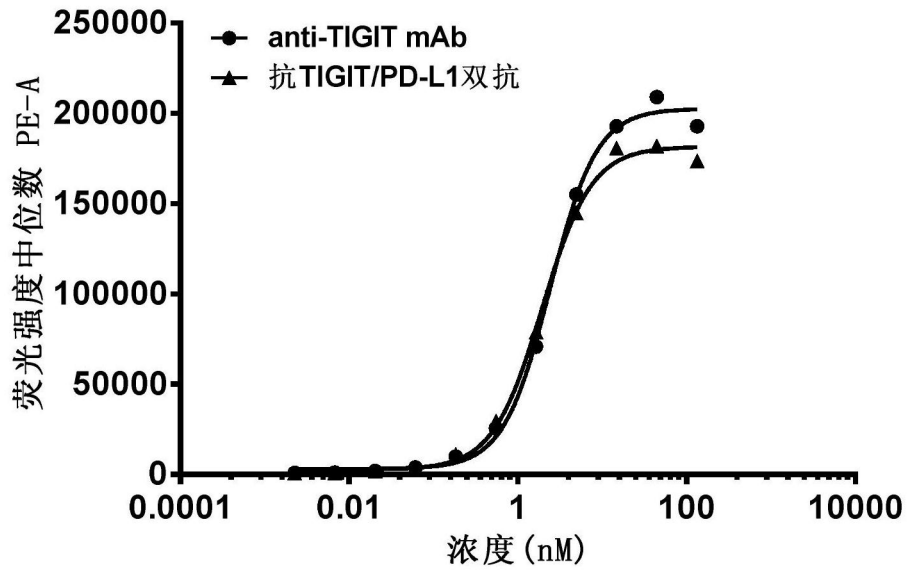


图3C

基于过表达人TIGIT CHO细胞CD155结合阻断试验

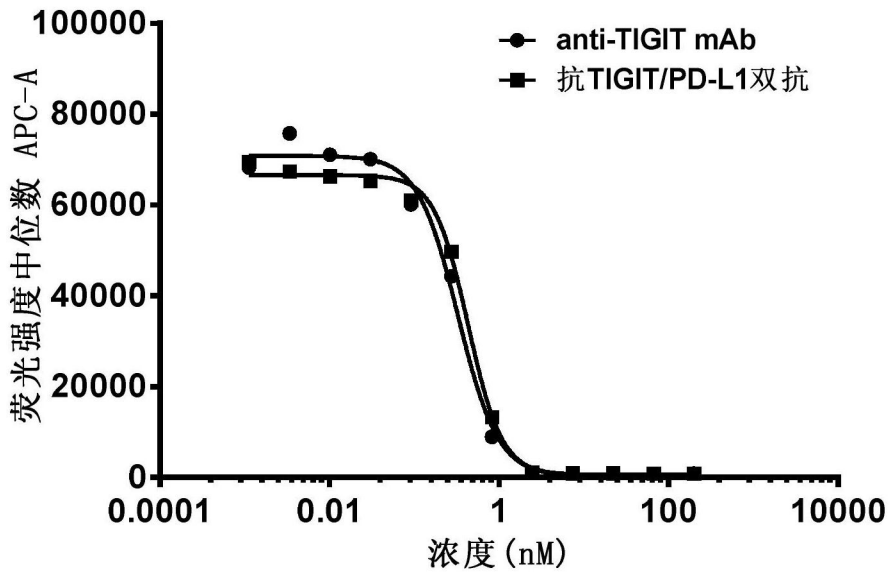


图3D

基于过表达小鼠TIGIT CHO细胞小鼠CD155结合阻断试验

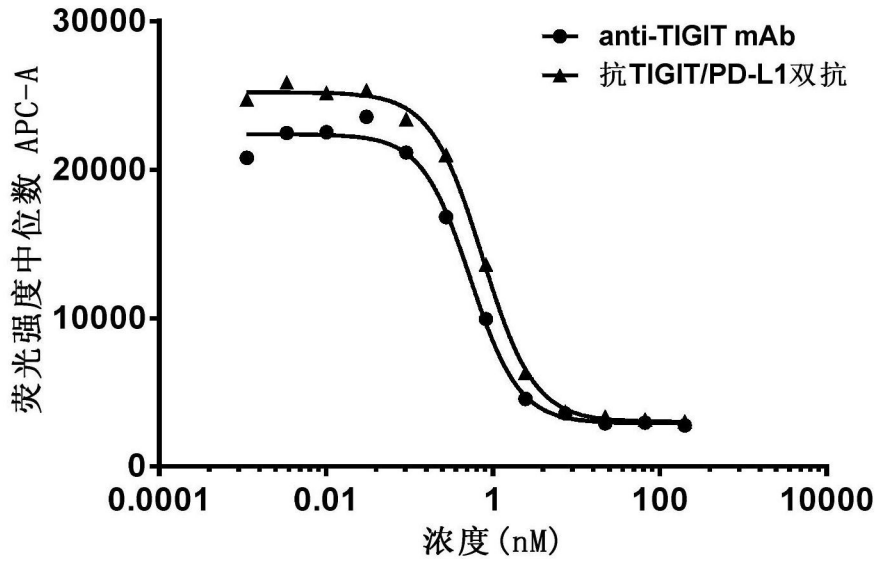


图3E

基于ELISA PD-L1/TIGIT共结合试验

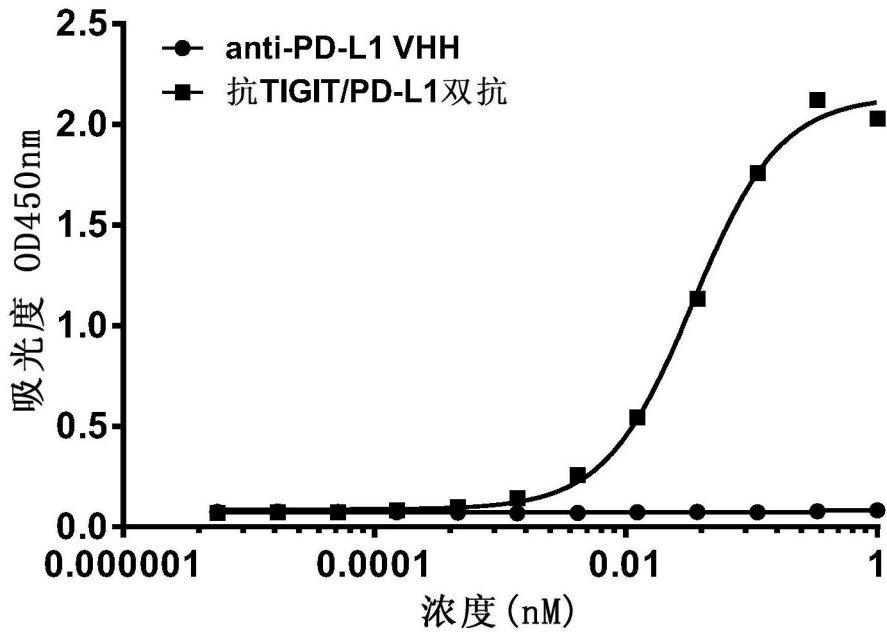


图4

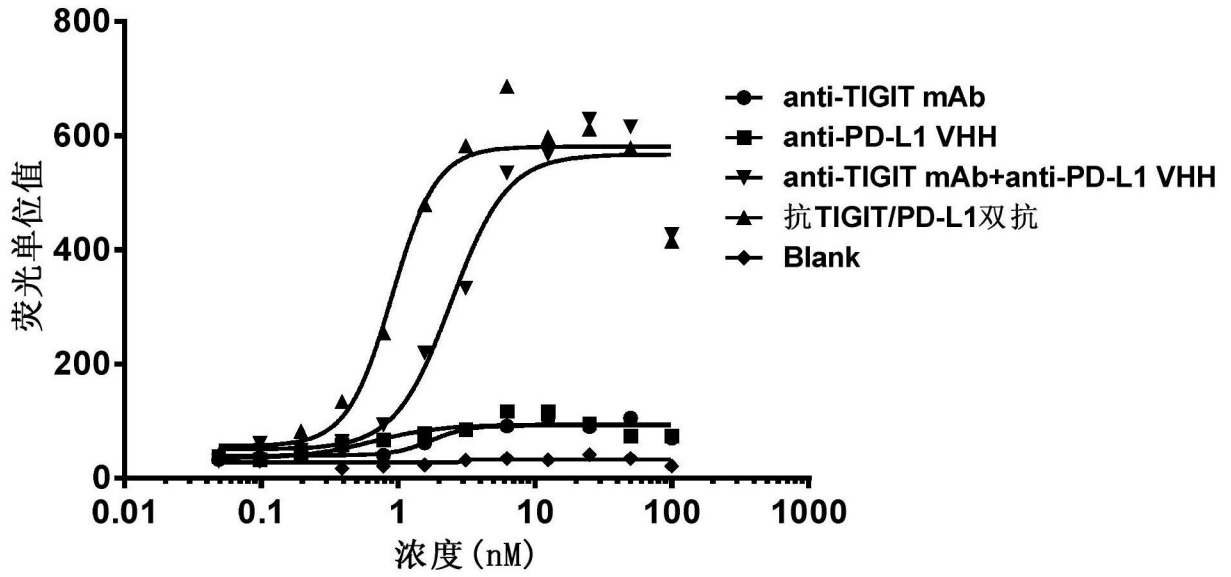


图5

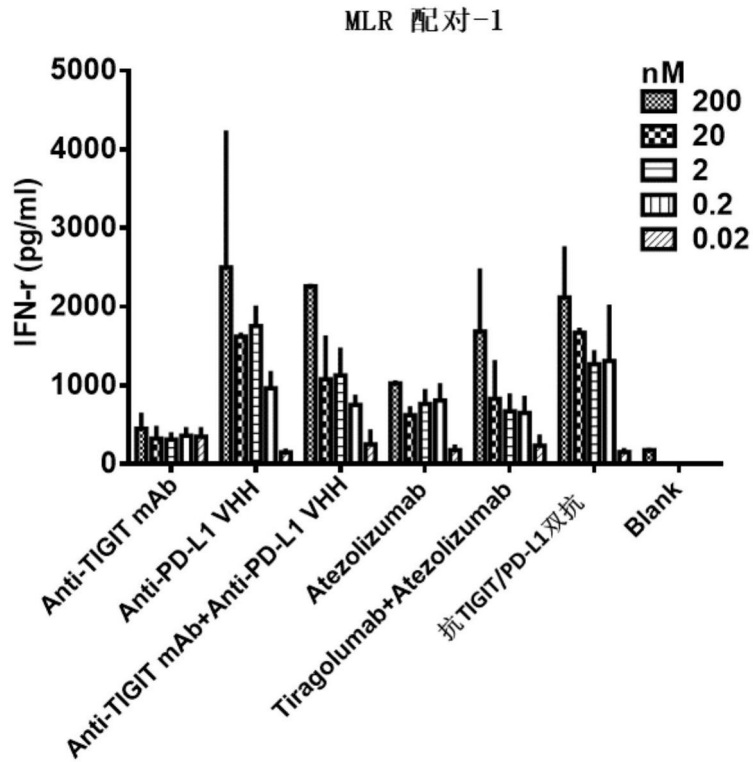


图6A

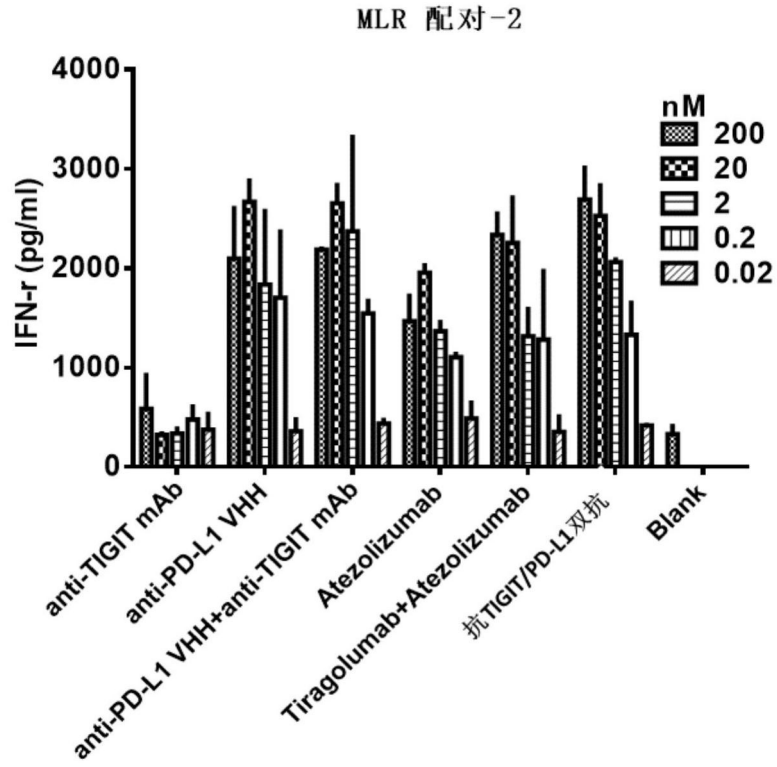


图6B

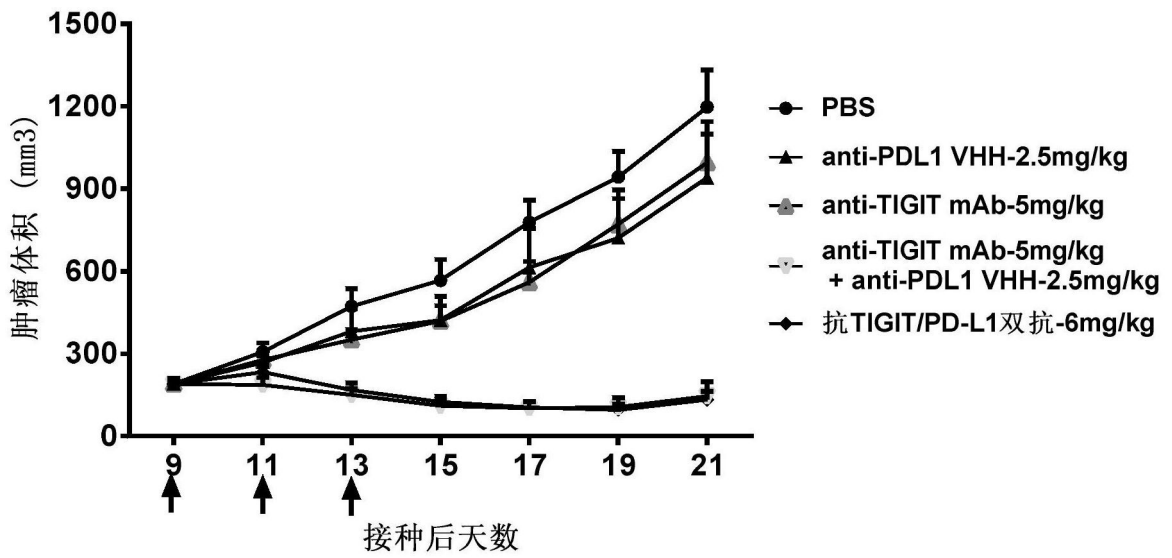


图7

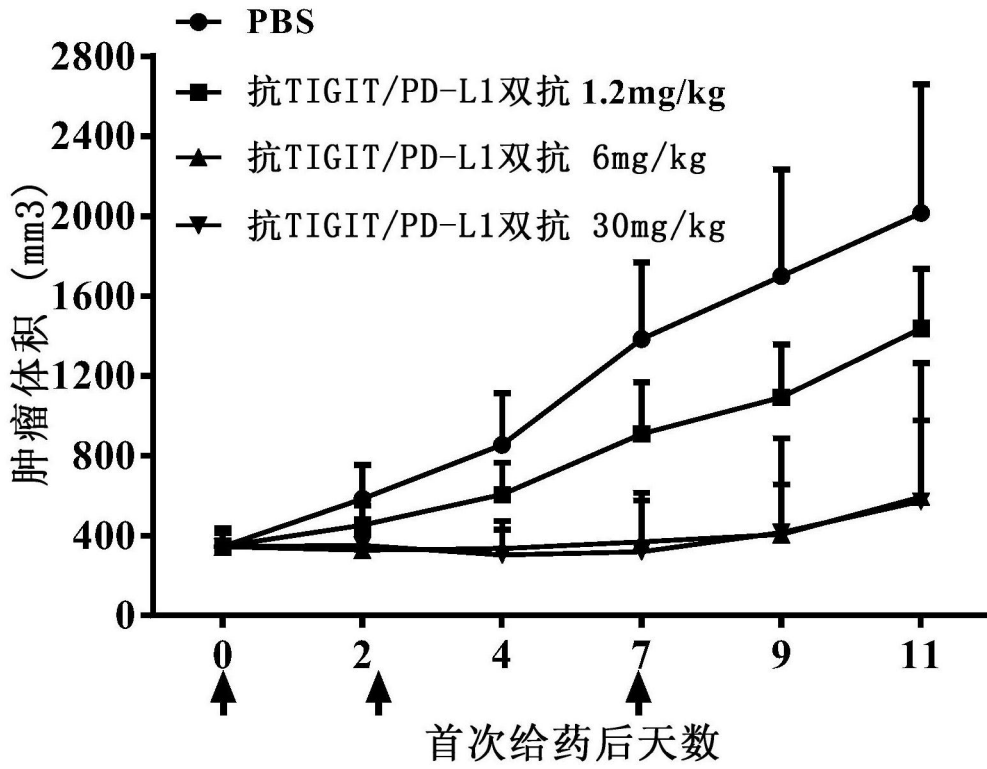


图8

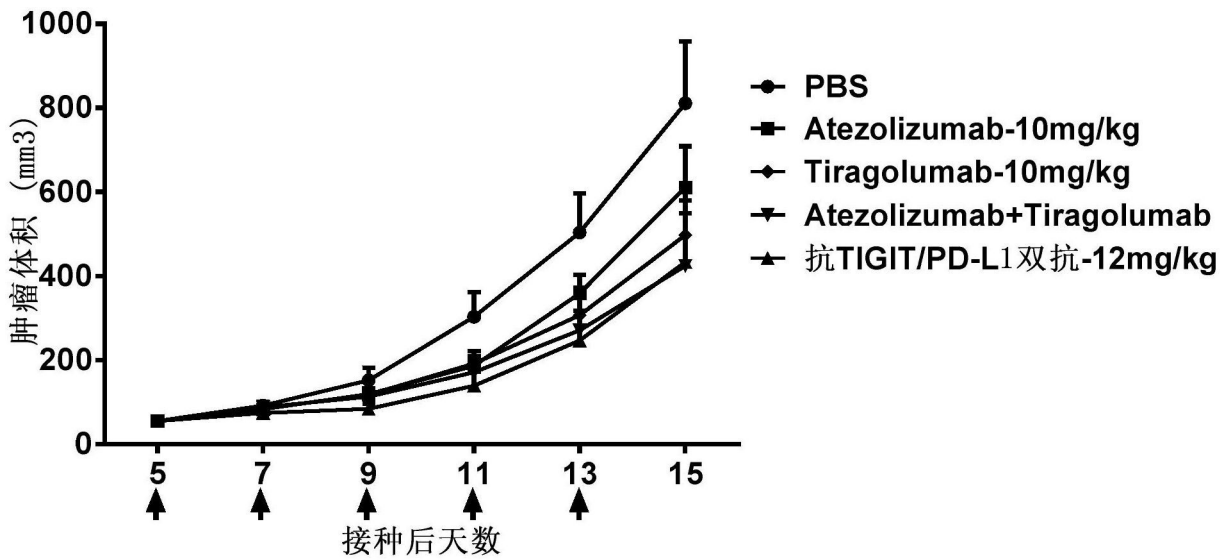


图9

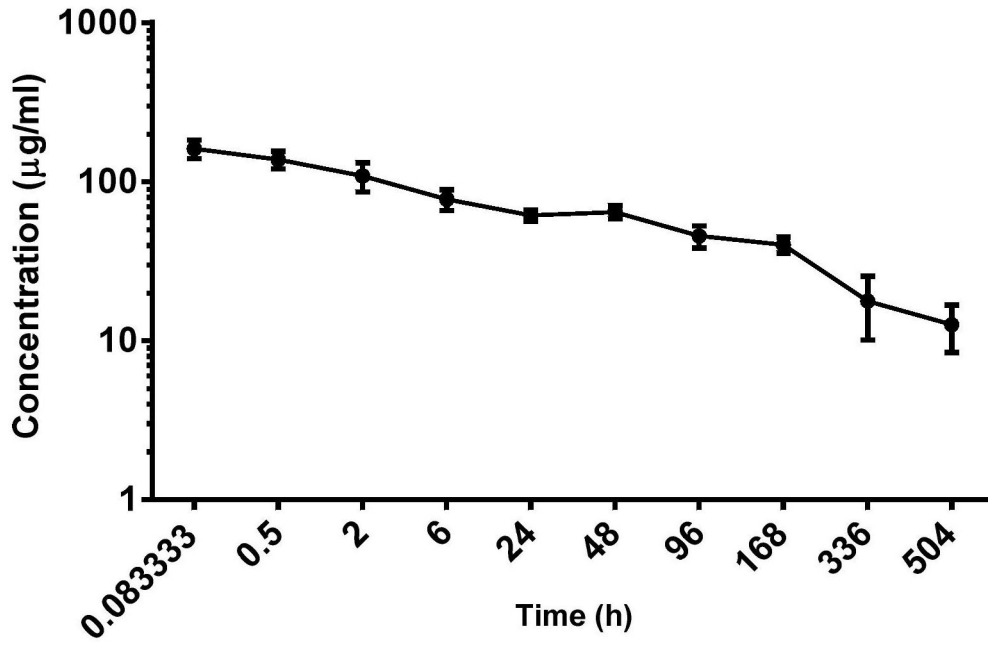


图10

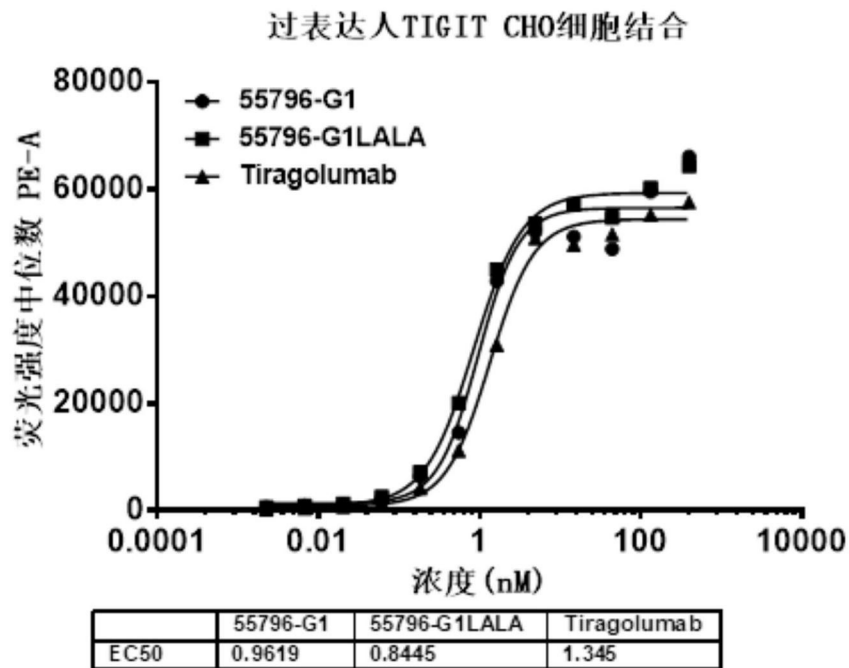


图11

过表达食蟹猴TIGIT CHO细胞结合

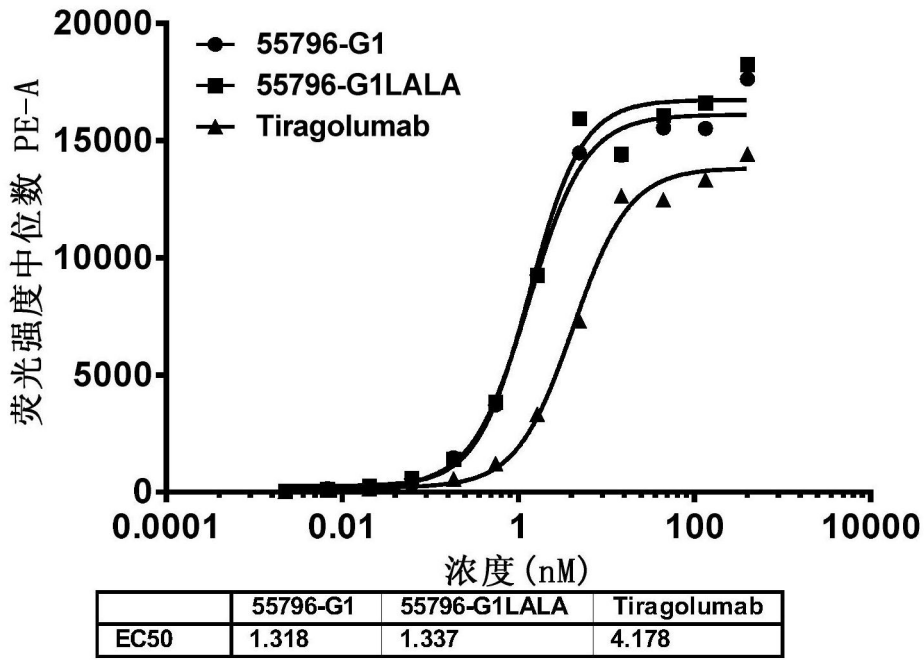


图12

过表达小鼠TIGIT CHO细胞结合

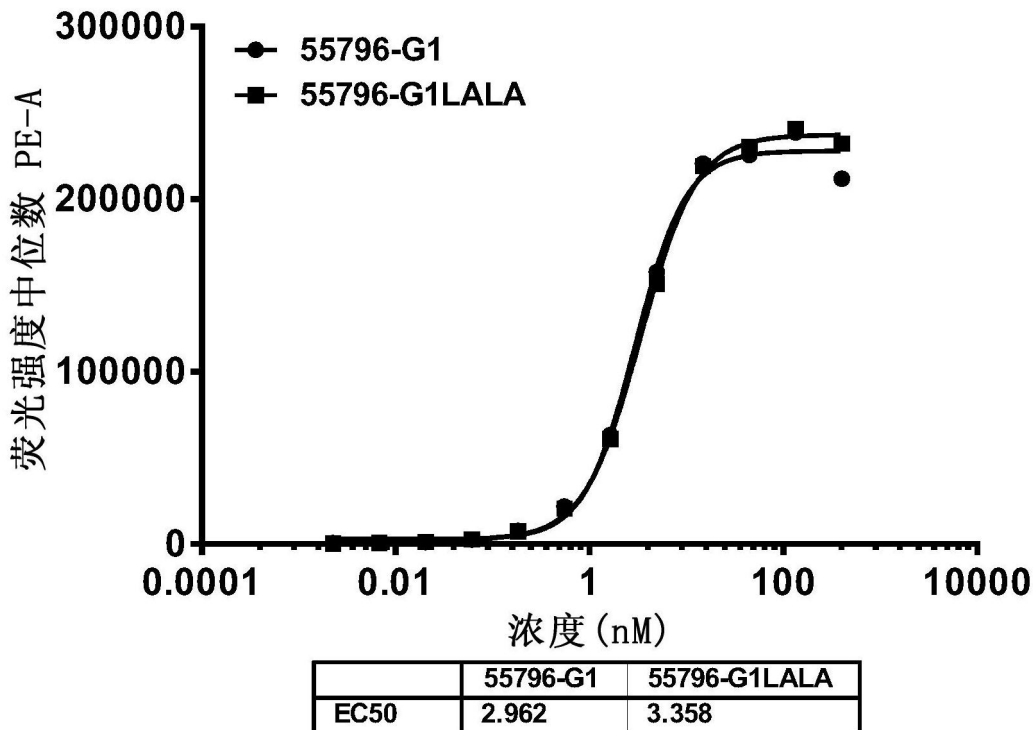


图13

基于过表达人TIGIT CHO细胞CD155结合阻断试验

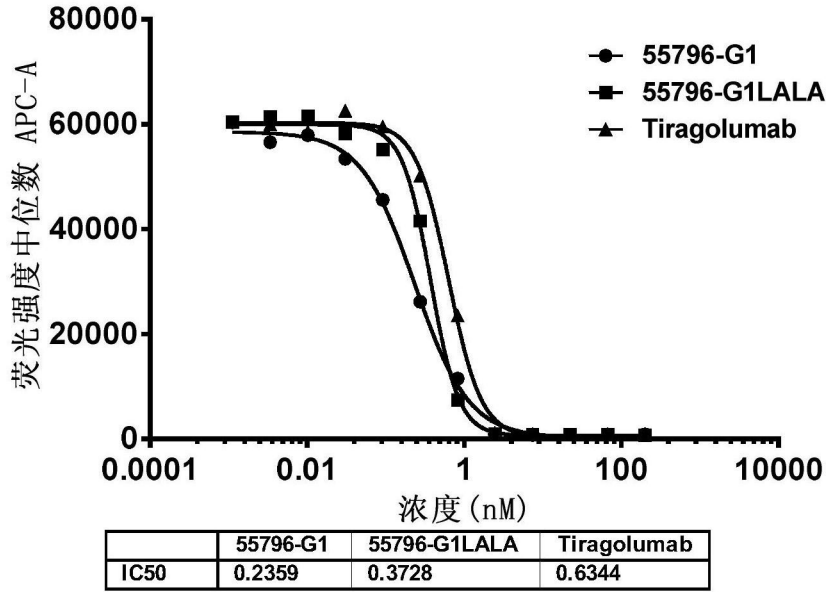


图14

基于过表达小鼠TIGIT CHO细胞小鼠CD155结合阻断试验

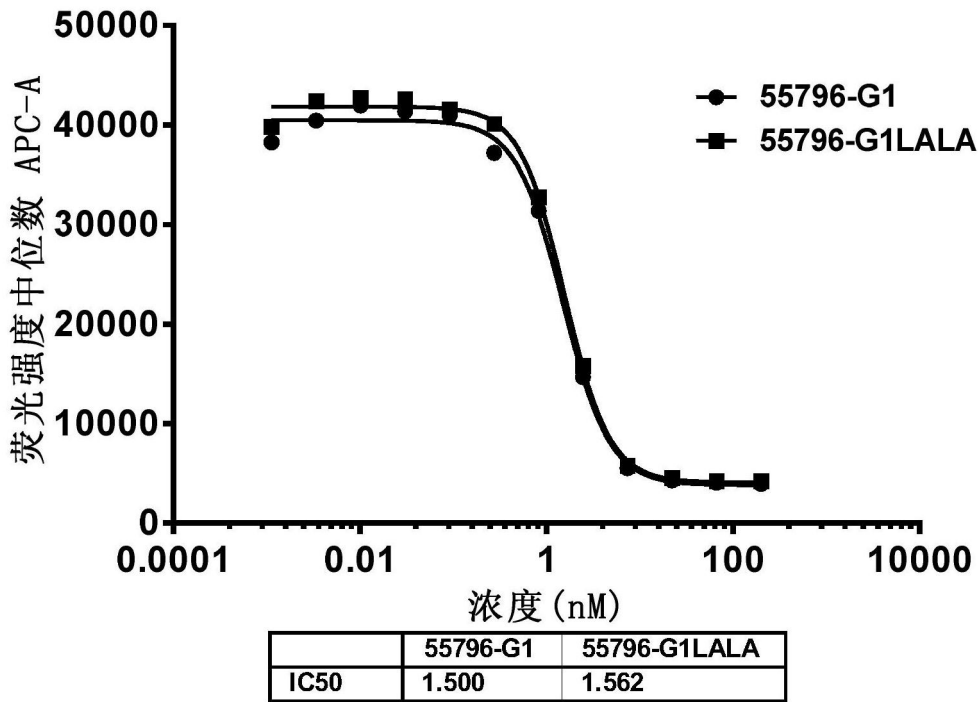


图15

激活T细胞结合试验

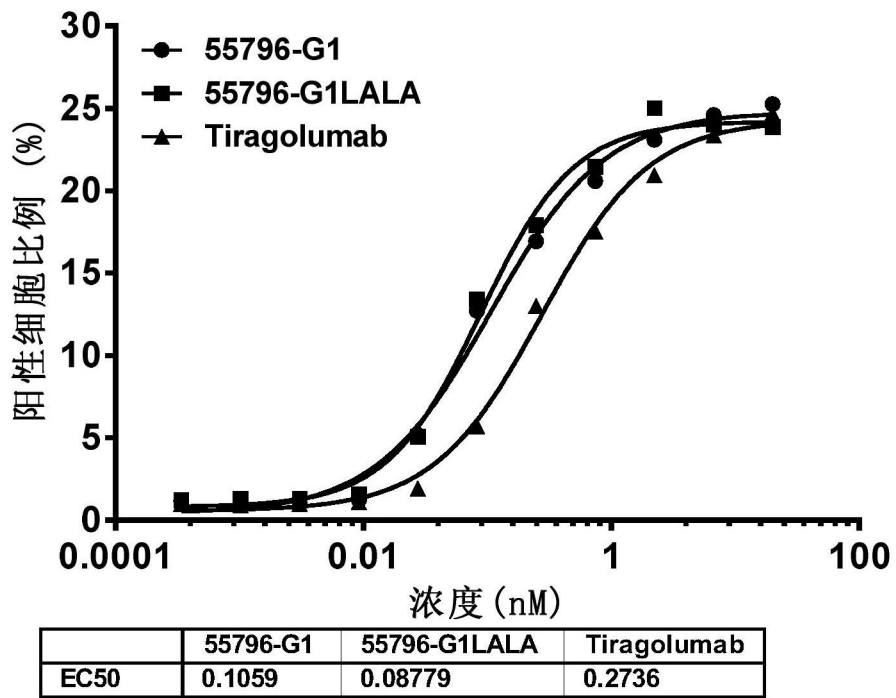


图16