

(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
2023 年 3 月 23 日 (23.03.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/040940 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/118959

(22) 国际申请日: 2022 年 9 月 15 日 (15.09.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202111078575.1 2021年9月15日 (15.09.2021) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司(JIANGSU HENGRUI PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路7号, Jiangsu 222047 (CN)。上海盛迪医药有限公司(SHANGHAI SHENGDI PHARMACEUTICAL CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号, Shanghai 201210 (CN)。

(72) 发明人: 林侃(LIN, Kan); 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号, Shanghai 201210 (CN)。林源(LIN, Yuan); 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号, Shanghai 201210 (CN)。袁吉民(YUAN, Jimin); 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号, Shanghai 201210 (CN)。孙星(SUN, Xing); 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号, Shanghai 201210 (CN)。廖成(LIAO, Cheng); 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号, Shanghai 201210 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司(GE CHENG & CO., LTD); 中国北京市东城区东长安街1号东方广场东三办公楼10层程伟(David W. Cheng), Beijing 100738 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, 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)。

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: USE OF PVRIG/TIGIT BINDING PROTEIN IN COMBINATION WITH IMMUNE CHECKPOINT INHIBITOR IN TREATMENT OF CANCERS

(54) 发明名称: PVRIG/TIGIT结合蛋白联合免疫检查点抑制剂用于治疗癌症

(57) Abstract: Use of a PVRITG/TIGIT binding protein in combination with an immune checkpoint inhibitor in the treatment of cancers. Specifically, provided is the use of a PVRITG/TIGIT binding protein in combination with an immune checkpoint inhibitor in the preparation of a drug for treating cancers.

(57) 摘要: PVRIG/TIGIT 结合蛋白联合免疫检查点抑制剂用于治疗癌症。具体地, 提供PVRIG/TIGIT 结合蛋白与免疫检查点抑制剂联合在制备治疗癌症的药物中的用途。



WO 2023/040940 A1

PVRIG/TIGIT 结合蛋白联合免疫检查点抑制剂用于治疗癌症

本公开要求 2021 年 09 月 15 日提交的中国专利申请(申请号 CN202111078575.1) 的优先权。

5

技术领域

本公开属于医药领域，具体地，本公开涉及 PVRIG/TIGIT 结合蛋白联合免疫检查点抑制剂用于治疗癌症的用途。

10 背景技术

PVRIG(Poliovirus receptor-related Ig domain containing protein)又名 CD112R，与 TIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain)、CD96 和 CD226 等同属于 B7/CD28 超家族，在免疫系统中起重要作用。当 PVRIG 的配体 PVRL2(又名 CD112)结合 PVRIG 时，会活化 PVRIG 胞内区的 ITIM 结构域，使 PVRIG 起到免疫抑制的作用。PVRIG 主要表达在 CD4⁺T 细胞，CD8⁺T 细胞和 NK 细胞的表面。PVRIG 和其配体 PVRL2 在多种实体瘤中高表达，包括肺癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、胃癌、子宫内膜癌、头颈癌等。PVRIG 在这些癌症中的表达与 TIGIT 和 PD-1 有高度相关性。与 PD-1 和 TIGIT 相似，PVRIG 阳性的 T 细胞也会呈现 Eomes 阳性和 Tbet 阴性，表明 PVRIG 与 T 细胞的耗竭有关。因此，PVRIG 可能代表了除了 PD-1 和 TIGIT 之外的有一个新的免疫检查点，并起到冗余(redundancy)的作用。体外细胞实验和小鼠模型中显示，对小鼠 PVRIG 的敲除或抑制，可以有效抑制癌症的生长，并与 PD-1 和 TIGIT 抑制剂发生协调作用。TIGIT 在淋巴细胞上高度表达，包括浸润不同类型癌症的癌症浸润淋巴细胞(TIL)和 Treg。已经证明 TIGIT 与其同源配体 PVR(又名 CD155)的接合通过其细胞质 ITIM 结构域直接抑制 NK 细胞的细胞毒性。PVR 也在癌症中广泛表达，表明 TIGIT-PVR 信号轴可能是癌症的主要免疫逃逸机制。抑制性受体 TIGIT、PVRIG 与激活型受体 DNAM-1 结合同样的配体 CD155 与 CD112，但抑制性受体的亲和力更高 (Y. Zhu 等人 2016, J Exp Med. 213:167-176)。肿瘤病人体内分离的 NK 细胞的 DNAM-1 表达下调，导致 NK 细胞更易受到 TIGIT 或 PVRIG 的抑制，阻断 TIGIT 与 PVRIG 的结合，能够激活 NK 细胞的细胞杀伤功能 (L. Martinet 等人 2015, Cell Reports. 11:85-97)。

虽然 PD-1/PD-L1 是目前临床最成功的免疫检查点抑制剂单抗，但 T 细胞表面其他免疫检查点的表达上调会限制其疗效。TIGIT 和 PVRIG 除了调控 T 细胞的功能，还调控 NK 细胞活性，提示与 PD-1/PD-L1 在 NK 细胞中的功能可能产生协同。文献报道 TIGIT 与 PVRIG 的配体 CD155 与 CD112 在肺癌、卵巢癌、结直肠癌、黑色素瘤中的高表达与 PD-1/PD-L1 治疗不良预后显著相关。如 CD155 表达高的患者对 PD-1 抗体响应差，而 CD155 表达低的患者对 PD-1 响应好(S. Whelan 等人 2019, Cancer Immunol Res. 7:257-268; A. Lepletier 等人 2020, Clin Cancer Res.

26:3671-3681)。

联用抗 PVRIG/TIGIT 双抗与 PD-1/PD-L1 潜在能够从增强 T 细胞、NK 细胞激活，克服 PD-1/PD-L1 耐药与拓展应答患者人群等方面提高抗肿瘤治疗的效果。本公开旨在提供具有抑制体内肿瘤生长的高亲和力、高选择性、高生物活性的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体与免疫检查点抑制剂(如 PD-1 或 PD-L1 抗体)联合用于
5 治疗癌症的用途，并显示了良好的抑瘤效果，有潜力在临床提供比现有 PD-1、TIGIT、PVRIG 药物或其联用更佳的疗效。

发明内容

10 本公开提供 PVRIG 结合蛋白或 PVRIG/TIGIT 结合蛋白与免疫检查点抑制剂联合在制备治疗疾病(例如，癌症)的药物中的用途、或用于治疗疾病(例如，癌症)的方法。

本公开提供一种 PVRIG 结合蛋白和 TIGIT 结合蛋白联合在制备治疗疾病(例如，癌症)的药物中的用途、或用于治疗疾病(例如，癌症)的方法。一些实施方案
15 中，在联合使用时，还进一步包括免疫检查点抑制剂。

本公开提供一种 PVRIG 结合蛋白、TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂联合在制备治疗疾病(例如，癌症)的药物中的用途、或用于治疗疾病(例如，癌症)的方法。

一些实施方案中，提供 PVRIG 结合蛋白(例如，抗 PVRIG 抗体或其抗原结合片段)与免疫检查点抑制剂联合在制备治疗癌症的药物中的用途，所述 PVRIG 结合蛋白包含免疫球蛋白单一可变结构域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含：
20

如 SEQ ID NO: 2、15-19 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，
或

如 SEQ ID NO: 3、21-25 任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3，
25 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的；

一些具体实施方案中，根据 Kabat 编号系统，所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别

如 SEQ ID NO: 4、5、20 所示，

30 如 SEQ ID NO: 4、5、6 所示，或

如 SEQ ID NO: 7、8、9 所示。

一些实施方案中，前述 PVRIG 中的免疫球蛋白单一可变结构域为至少一个，例如，2、3、4、5、6、7、8 个。

一些实施方案中，前述 PVRIG 结合蛋白的免疫球蛋白单一可变结构域是人源化、亲和力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的；
35 一些具体实施方案中，人源化改造过程使用的人种系模板的重链框架区为

IGHV3-7 *01。

一些实施方案中，前述 PVRIG 结合蛋白的免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列分别如

5 SEQ ID NO: 2、15-19 任一所示；或 SEQ ID NO: 3、21-25 任一所示；或与前述序列任一具有至少 80%、至少 90% 序列同一性。

一些实施方案中，前述 PVRIG 结合蛋白还包含人免疫球蛋白 Fc 区；

优选地，所述 Fc 区是人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区；

更优选地，所述人 IgG4 的 Fc 区具有 S228P、F234A、L235A 和/或 K447A 突变。

10 一些实施方案中，提供前述 PVRIG 结合蛋白和 TIGIT 结合蛋白(例如，抗 TIGIT 抗体或其抗原结合片段)与免疫检查点抑制剂联合在制备治疗癌症的药物中的用途。

一些实施方案中，所述 TIGIT 结合蛋白包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

15 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 32、33 和 34 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 35、36 和 37 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat 编号系统定义的。

一些实施方案中，前述特异性结合 TIGIT 结合蛋白包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

20 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 38-40 中任一所示或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，

所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 41 或 42 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；

例如，所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 3 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，

25 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 42 所示或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述 TIGIT 结合蛋白还包含人免疫球蛋白 Fc 区；

优选地，所述 Fc 区是人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区；

30 更优选地，所述人 IgG4 的 Fc 区具有 S228P、F234A、L235A 和/或 K447A 突变。

一些具体实施方案中，前述特异性结合 TIGIT 结合蛋白包含如 SEQ ID NO: 26 所示的重链全长序列或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性，和如 SEQ ID NO: 27 所示的轻链全长序列或与之具有至少 80%、至少 90% 序列同一性。

35 一些实施方案中，提供 PVRIG/TIGIT 结合蛋白(例如，抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体或其抗原结合片段)与免疫检查点抑制剂联合在制备治疗癌症的药物中的

用途,所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白包含特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域和特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域,所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域包含免疫球蛋白单一可变结构域,所述免疫球蛋白单一可变结构域包含:

5 如 SEQ ID NO: 2 和 15-19 中任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3,
或

 如 SEQ ID NO: 3 和 21-25 中任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3,
 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact
编号系统定义的;

10 一些具体实施方案中,根据 Kabat 编号系统,所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别

 如 SEQ ID NO: 4、5 和 20 所示,

 如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示,或

 如 SEQ ID NO: 7、8 和 9 所示。

15 一些实施方案中,前述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域是人源化、亲合力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化改造的;一些具体实施方案中,人源化改造过程使用的人种系模板的重链框架区为 IGHV3-7*01。

 一些实施方案中,前述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域中免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 2 和 15-19 中任一所示;或如
20 SEQ ID NO: 3 和 21-25 中任一所示;或与前述序列任一具有至少 80%序列同一性,例如,至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。

25 一些实施方案中,前述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:

 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 32、33 和 34 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 35、36 和 37 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

30 一些实施方案中,前述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:

 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 38-40 中任一所示或与之具有至少 80%,例如,至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少
35 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列,

 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 41 或 42 所示或与之具有至少 80%,例

如, 至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列;

例如, 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 38 所示或与之具有至少 80%, 例如, 至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列,

所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 42 所示或与之具有至少 80%, 例如, 至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中, 前述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白还包含人免疫球蛋白 Fc 区;

优选地, 所述 Fc 区是人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区;

更优选地, 所述人 IgG4 的 Fc 区具有 S228P、F234A、L235A 和/或 K447A 突变。

一些实施方案中, 前述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域和特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域直接或通过连接子相连接;

例如, 所述连接子为具有如 $(G_4S)_x$ 所示的氨基酸序列, 其中, x 独立地选自 1-20 的整数;

又例如, 所述连接子为 $(G_4S)_2$ 、 $(G_4S)_3$ 、 $(G_4S)_4$ 所示的氨基酸序列。

一些实施方案中, 前述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白中:

所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域的重链可变区的 N 端;

所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域的重链可变区的 C 端;

所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域的轻链可变区的 N 端; 和/或

所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域的轻链可变区的 C 端。

一些实施方案中, 提供 PVRIG/TIGIT 结合蛋白, 其包含第一多肽链和第二多肽链, 其中:

所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO: 28-29 和 43-45 中任一所示、或与其具有至少 80%, 例如, 至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列, 所述第二多肽链包含如 SEQ ID NO: 27 所示、或与其具有至少 80%, 例如, 至少 85%、至少 86%、至少 87%、

至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列；或者

所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO: 26 所示、或与其具有至少 80%，例如，
5 至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列，所述第二多肽链包含如 SEQ ID NO: 30 或 31 所示、或与其具有至少 80%，例如，至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、
10 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列。

一些具体实施方案中，前述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白包含两条相同的第一多肽链和两条相同的第二多肽链。一些实施方案中，如前所述的免疫检查点抑制剂包括但不限于靶向 PD-1/PD-L1、PD-L2、B7-1/CTLA-4、B7-2/CTLA-4、B7-1/CD28、B7-2/CD28、B7-H2/ICOS、B7-H3、B7-H4、B7-H7、VISTA(PD-1H)、BTNL2、TIM3、
15 LAG3、TNFSF/TNFRSF(如 CD40-CD40L、CD27-CD70 或 OX40-OX40L)、白细胞免疫球蛋白样受体(LIR/LILR)或免疫球蛋白样转录子(ILT)、粘连蛋白或类粘连蛋白受体蛋白(如 DNAM-1、CD226、PTA1、TLISA1、CD96、TIGIT、Vstm3 和 VSIG9)、NKG2A、KIRs、NKG2A、Siglecs family (Siglec-7/9)、CD47、CD94、CD200 信号通路的抑制剂。

一些实施方案中，如前所述的免疫检查点抑制剂包括但不限于蛋白或多肽、小分子、核酸类药物。一些具体实施方案中，所述免疫检查点抑制剂为 PD-1 结合蛋白和/或 PD-L1 结合蛋白。在一些实施方案中，所述免疫检查点抑制剂为抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、所述抗体的抗原结合片段、或包含所述抗体或其抗原结合片段的融合蛋白。一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白(例如，包含或为抗 PD-1
25 抗体或其抗原结合片段)包含：

分别如 SEQ ID NO:59、60 和 61 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和分别如 SEQ ID NO:62、63 和 64 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

分别如 SEQ ID NO:67、68 和 69 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，
30 和分别如 SEQ ID NO:70、71 和 72 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

一些具体实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白(例如，包含或为抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段)包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 57 所示或与之具有至少 80%，例如，至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 58 所示或
35 至少 99%序列同一性的氨基酸序列。

与之具有至少 80%，例如，至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 73 所示或与之具有至少 80%，例如，至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 74 所示或与之具有至少 80%，例如，至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白还包含人免疫球蛋白 Fc 区；

优选地，所述 Fc 区是人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区；

更优选地，所述人 IgG4 的 Fc 区具有 S228P、F234A、L235A 和/或 K447A 突变。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白包含重链(HC)和轻链(LC)，其中：

所述重链包含如 SEQ ID NO: 65 所示或与之具有至少 80%，例如，至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 66 所示或与之具有至少 80%，例如，至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列；或

所述重链包含如 SEQ ID NO: 75 所示或与之具有至少 80%，例如，至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列，所述轻链包含如 SEQ ID NO: 76 所示或与之具有至少 80%，例如，至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列。

在一个实施方案中，所述 PD-1 结合蛋白为抗 PD-1 抗体：Camrelizumab；

所述 Camrelizumab 抗体具有如下所示的 CDR：

HCDR1 为 SYMMS (SEQ ID NO: 67)

HCDR2 为 TISGGGANTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 68)

HCDR3 为 QLYYFDY (SEQ ID NO: 69)

LCDR1 为 LASQTIGTWLT (SEQ ID NO: 70)

LCDR2 为 TATSLAD (SEQ ID NO: 71)

LCDR3 为 QQVYSIPWT (SEQ ID NO: 72)

>所述抗 PD-1 抗体 Camrelizumab 抗体的 VH 为

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYMMMSWVRQAPGKGLEWVATISG
GGANTYYPD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDY

5 WGQGT TVTVSS (SEQ ID NO: 73)

>所述抗 PD-1 抗体 Camrelizumab 抗体的 VL 为

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKAPKLLIYTATSLA
DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYSIPWTFGGG GTKVEIK (SEQ
ID NO: 74)

10 上述抗 PD-1 抗体重轻链可变区序列中，下划线部分为 CDR 区，各序列依次
顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

>所述抗 PD-1 抗体 Camrelizumab 的 HC(Fc 区具有 S228P 突变)为

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYMMMSWVRQAPGKGLEWVATISG
GGANTYYPD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDY
15 WGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKR
VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
20 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 75)

>所述抗 PD-1 抗体 Camrelizumab 的 LC 为

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKAPKLLIYTATSLA
DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYSIPWTFGGG GTKVEIKRTVA
25 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 76)。

一些实施方案中，前述 PD-1 结合蛋白包含或为抗 PD-1 抗体或其抗原结合片
段，包括但不限于 sintilimab、cemiplimab、JS-001、nivolumab、tislelizumab、
30 pembrolizumab、AK-103、dostarlimab、PD1-PIK、GLS-010、genolimzumab、
BI-754091、spartalizumab、MGA-012、PF-06801591、XmAb-20717、CS-1003、Sym-021、
AGEN-2034、MEDI-5752、MGD-013、AK-105、AK-104、BCD-100、PF-06753512、
HLX-10、AMP-224、LZM-009。此处全文引入 WO2020156509、WO2017054646
中的抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段。一些实施方案中，前述 PD-L1 结合蛋白(例
35 如，包含或为抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段)包含

分别如 SEQ ID NO:48、49 和 50 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，
和分别如 SEQ ID NO:51、52 和 53 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

一些具体实施方案中，前述 PD-L1 结合蛋白包含重链可变区(VH)和轻链可变

区(VL), 其中:

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 46 所示或与之具有至少 80%, 例如, 至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 47 所示或与之具有至少 80%, 例如, 至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中, 前述 PD-L1 结合蛋白还包含人免疫球蛋白 Fc 区;

例如, 所述 Fc 区是人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区;

又例如, 所述人 IgG4 的 Fc 区具有 S228P、F234A、L235A 和/或 K447A 突变。

一些实施方案中, 前述 PD-L1 结合蛋白包含重链(HC)和轻链(LC), 其中:

所述重链包含如 SEQ ID NO: 54 所示或与之具有至少 80%, 例如, 至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列, 所述轻链包含如 SEQ ID NO: 55 所示或与之具有至少 80%, 例如, 至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列。

一些实施方案中, 前述 PD-L1 结合蛋白为抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段, 包括但不限于 avelumab、atezolizumab、durvalumab、CS-1001、M-7824、KL-A167、CX-072、BGB-A333、GNS-1480、CA-170、BMS-936559。此处全文引入 WO2017084495、WO2020094122 中的抗 PD-L1 抗体。一些实施方案中, 前述 PD-L1 结合蛋白为融合蛋白, 所述融合蛋白包含抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段和 TGF- β trap 或 TGF- β R II ECD; 一些具体实施方案中, 所述 TGF- β R II ECD 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示。

一些实施方案中, 前述融合蛋白中, 所述 TGF- β R II ECD 通过连接子与重链全长的 C 端连接, 所述连接子包含或为如 $(G_4S)_x$ 所示的氨基酸序列, 其中, x 独立地选自 1-20 的整数; 一些具体实施方案中, 所述连接子为 $(G_4S)_4G$ 、 $(G_4S)_3G$ 、 $(G_4S)_2G$ 、 $(G_4S)G$ 。

一些实施方案中, 前述融合蛋白包含第一多肽链和第二多肽链, 其中:

所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO: 77 或 78 所示或与之具有至少 80%, 例如, 至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列, 所述第二多肽链包含如 SEQ ID NO: 55 所示或与之具有至少 80%, 例如, 至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少

89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%序列同一性的氨基酸序列。

一些具体实施方案中，前述 PD-L1 结合蛋白包含两条相同的第一多肽链和两条相同的第二多肽链。

5 一些实施方案中，前述 PD-L1 结合蛋白包含或为抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段与 TGF- β trap 的融合蛋白，包括但不限于 M7824、GS-19、TS-1905、TST-005、HBM-7015、PM-8001、抗 PDL1-TGF β RIIecd。此处全文引入 WO2011109789、WO2015118175、WO2018218215、WO2020248926、WO2019222252、WO2021007428、WO2021063352、WO2021063350 中的抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段与 TGF
10 β RIIecd 或 TGF- β trap 的融合蛋白。本公开提供了一种 PVRIG 结合蛋白和 TIGIT 结合蛋白联合在制备治疗癌症的药物中的用途，具体实施方案中，所述 PVRIG 结合蛋白包含如 SEQ ID NO: 16 所示的免疫球蛋白单一可变结构域，以及所述 TIGIT 结合蛋白包含如 SEQ ID NO: 26 所示的 HC 和如 SEQ ID NO: 27 所示的 LC。本公开提供了一种 PVRIG 结合蛋白、TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂联合在制
15 备治疗癌症的药物中的用途，具体实施方案中，所述 PVRIG 结合蛋白包含如 SEQ ID NO: 16 所示的免疫球蛋白单一可变结构域；所述 TIGIT 结合蛋白包含如 SEQ ID NO: 26 所示的 HC 和如 SEQ ID NO: 27 所示的 LC；以及所述免疫检查点抑制剂选自：

PD-1 结合蛋白，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 65 所示 HC 和氨基酸序列
20 如 SEQ ID NO: 66 所示的 LC；

PD-1 结合蛋白，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 75 所示 HC 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 76 所示的 LC；

PD-L1 结合蛋白，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示 HC 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 55 所示的 LC；或

25 PD-L1 结合蛋白，其包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 77 所示 HC 和氨基酸序列如 SEQ ID NO: 55 所示的 LC。本公开还提供了一种 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂联合在制备治疗癌症的药物中的用途，具体实施方案中，所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白包含如 SEQ ID NO: 43 所示的 HC(即第一多肽链)和如 SEQ ID NO: 27 所示的 LC(即第二多肽链)，以及所述免疫检查点抑制剂选自：

30 PD-1 结合蛋白，其包含如 SEQ ID NO: 65 所示 HC 和如 SEQ ID NO: 66 所示的 LC；

PD-1 结合蛋白，其包含如 SEQ ID NO: 75 所示 HC 和如 SEQ ID NO: 76 所示的 LC；

PD-L1 结合蛋白，其包含如 SEQ ID NO: 54 所示 HC 和如 SEQ ID NO: 55 所
35 示的 LC；或

PD-L1 结合蛋白，其包含如 SEQ ID NO: 77 所示 HC 和如 SEQ ID NO: 55 所

示的 LC。一些实施方案中,所述癌症或肿瘤选自以下或其组合:前列腺癌、肝癌(HCC)、结直肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胰腺癌、胃(stomach/gastric)癌、宫颈癌、头颈癌、甲状腺癌、睾丸癌、尿路上皮癌、肺癌(小细胞肺癌、非小细胞肺癌)、黑色素瘤、非黑素瘤皮肤癌(鳞状和基底细胞癌)、神经胶质瘤、肾癌(RCC)、淋巴瘤(NHL 或 HL)、急性骨髓性白血病(AML)、T 细胞急性淋巴母细胞性白血病(T-ALL)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、间皮瘤、食道癌、默克细胞癌(Merkel Cells cancer)、高 MSI 癌、KRAS 突变肿瘤、成人 T 细胞白血病/淋巴瘤和骨髓增生异常综合征(MDS)。上述病症可以是与 PVRIG 和/或 TIGIT 异常表达相关的。一些具体实施方案中,所述癌症或肿瘤选自自由以下癌症或其组合:黑色素瘤、三阴性乳腺癌、胃癌、肺癌(小细胞肺癌、非小细胞肺癌)、默克细胞癌、高 MSI 癌、KRAS 突变肿瘤、成人 T 细胞白血病/淋巴瘤和骨髓增生异常综合征(MDS)。一些具体实施方案中,所述癌症或肿瘤选自自由以下癌症或其组合:黑色素瘤、三阴性乳腺癌、胃癌、肺癌(小细胞肺癌、非小细胞肺癌)、默克细胞癌和高 MSI 癌。一些具体实施方案中,所述癌症或肿瘤选自黑色素瘤。

一些实施方案中,所述 PVRIG 结合蛋白(或其编码多核苷酸)和 TIGIT 结合蛋白(或其编码多核苷酸),或 PVRIG 结合蛋白(或其编码多核苷酸)、TIGIT 结合蛋白(或其编码多核苷酸)和免疫检查点抑制剂(例如, PD-1/PD-L1 抑制剂),或 PVRIG/TIGIT 结合蛋白(或其编码多核苷酸)和免疫检查点抑制剂(例如, PD-1/PD-L1 抑制剂)联合用于癌症或肿瘤,给药次序可以同时给药、或者前后分开给药。

一些实施方案中,所述联合的给药途径选自经口给药、胃肠外给药、经皮给药,所述胃肠外给药包括但不限于静脉注射、皮下注射、肌肉注射。

本公开还提供了一种药物套组,或者一种药物包装盒,其中含有前述的 PVRIG 结合蛋白和 TIGIT 结合蛋白,或 PVRIG 结合蛋白、TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂,或 PVRIG/TIGIT 结合蛋白或其编码多核苷酸和免疫检查点抑制剂(例如, PD-1/PD-L1 抑制剂)。

本公开还提供了一种药物组合物,包含前述的有效量的 PVRIG 结合蛋白和 TIGIT 结合蛋白,或 PVRIG 结合蛋白、TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂,或 PVRIG/TIGIT 结合蛋白或其编码多核苷酸和免疫检查点抑制剂,以及一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。优选地,所述免疫检查点抑制剂包括但不限于靶向 PD-1/PD-L1、PD-L2、B7-1/CTLA-4、B7-2/CTLA-4、B7-1/CD28、B7-2/CD28、B7-H2/ICOS、B7-H3、B7-H4、B7-H7、VISTA(PD-1H)、BTNL2、TIM3、LAG3、TNFSF/TNFRSF(如 CD40-CD40L、CD27-CD70 或 OX40-OX40L)、白细胞免疫球蛋白样受体(LIR/LILR)或免疫球蛋白样转录子(ILT)、粘连蛋白或类粘连蛋白受体蛋白(如 DNAM-1、CD226、PTA1、TLISA1、CD96、TIGIT、Vstm3 和 VSIG9)、NKG2A、

KIRs、NKG2A、Siglecs family (Siglec-7/9)、CD47、CD94、CD200 信号通路的抑制剂；更优选地，所述免疫检查点抑制剂是 PD-1/PD-L1 信号通路抑制剂；最优选地，所述 PD-1/PD-L1 信号通路抑制剂选自前述的 PD-1 结合蛋白或其编码多核苷酸，和/或前述的 PD-L1 结合蛋白或其编码多核苷酸。

5 本公开提供一种产品，包含前述的有效量的 PVRIG 结合蛋白和 TIGIT 结合蛋白，或 PVRIG 结合蛋白、TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂，或 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂，或 PVRIG 结合蛋白和免疫检查点抑制剂。

另一方面，本公开还提供一种治疗或缓解癌症的方法，包括向有需要的受试者施用治疗或缓解有效量的 PVRIG 结合蛋白和 TIGIT 结合蛋白，或 PVRIG 结合蛋白、TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂，或 PVRIG/TIGIT 结合蛋白或其编码多核苷酸和免疫检查点抑制剂。

以及，本公开提供一种向有需要的受试者联合施用治疗或缓解有效量的 PVRIG 结合蛋白和 TIGIT 结合蛋白，或 PVRIG 结合蛋白、TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂，或 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂，或 PVRIG 结合蛋白和免疫检查点抑制剂用于治疗或缓解癌症的用途。

以及，本公开提供一种前述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白，或前述 PVRIG 结合蛋白和 TIGIT 结合蛋白治疗或缓解癌症的方法，或前述 PVRIG 结合蛋白，包括施用免疫检查点抑制剂。

以及，本公开提供一种免疫检查点抑制剂治疗或缓解癌症的方法，包括施用前述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白，或施用前述 PVRIG 结合蛋白和 TIGIT 结合蛋白，或前述 PVRIG 结合蛋白。

本公开还提供一种活化 NK 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和/或 Th1 细胞的方法，包含向有需要的受试者施用有效量的前述药物组合物或前述产品。

本公开还提供一种增加受试者体内的 IFN- γ 产生和/或促炎性细胞因子分泌的方法，包含向有需要的受试者施用有效量的前述药物组合物或前述产品。

本公开还提供一种抑制 PD-1 活性或促进 T 细胞增殖或使受试者从免疫反应上调获益的方法，包括向受试者施用有效量的前述药物组合物或前述产品；例如，所述受试者的 PD-L1 和/或 PD-L2 的表达是上调的；又例如，所述受试者患有癌症。

一些实施方案中，前述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和前述免疫检查点抑制剂具有抑制癌细胞生长的协同作用，相较于单药疗法，能够显著改善免疫检查点抑制剂的抑癌效果。

本公开全文引入 PCT/CN2021/080470 中的双特异性抗体结构及其制备方法，特别是 1708-30H2 相关的。此外，本公开提供多核苷酸和载体：

本公开提供编码本公开的 PVRIG 结合蛋白、PVRIG/TIGIT 结合蛋白、免疫检查点抑制剂(例如，PD-1 结合蛋白、PD-L1 结合蛋白)的多核苷酸。本公开的多核苷酸可为 RNA、DNA 或 cDNA。根据本公开的一些实施方案，本公开的多核苷酸

是基本上分离的多核苷酸。

本公开的多核苷酸也可呈载体形式，可存在于载体中和/或可为载体的一部分，该载体例如质粒、粘端质粒、YAC 或病毒载体。载体可尤其为表达载体，即可提供 PD-1 结合蛋白体外和/或体内(即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或表达系统中)表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的多核苷酸，其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件(例如启动子、增强子、终止子等)。针对在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本公开的 PVRIG 结合蛋白、PVRIG/TIGIT 结合蛋白、免疫检查点抑制剂(例如，PD-1 结合蛋白、PD-L1 结合蛋白)的表达有用或必需的调控元件及其他元件例如为启动子、增强子、终止子、整合因子、选择标记物、前导序列、报告基因。

本公开的多核苷酸可基于本公开的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式(例如通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术)制备或获得，和/或可从适合天然来源加以分离。此外，本公开提供宿主细胞：

本公开提供表达或能够表达一种或多种本公开的 PVRIG 结合蛋白、PVRIG/TIGIT 结合蛋白、免疫检查点抑制剂(例如，PD-1 结合蛋白、PD-L1 结合蛋白)和/或含有本公开的核酸或载体的重组宿主细胞。一些实施方案中，宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株、变形杆菌属(*Proteus*)菌株及假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株)及革兰氏阳性细菌菌株(例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株、链霉菌属(*Streptomyces*)菌株、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株及乳球菌属(*Lactococcus*)菌株)的细胞。

真菌细胞例如包括木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)及曲菌属(*Aspergillus*)的物种的细胞；或者包括酵母属(*Saccharomyces*)(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)(例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*)(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)及嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*))及汉森酵母属(*Hansenula*)的物种的细胞。

哺乳动物细胞例如包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

然而，本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

本公开的细胞不能发育成完成的植株或动物个体。此外，本公开提供生产、制备方法：

本公开提供制备本公开的 PVRIG 结合蛋白、PVRIG/TIGIT 结合蛋白、免疫检查点抑制剂(例如，PD-1 结合蛋白、PD-L1 结合蛋白)的目的蛋白方法，所述方法通常包含以下步骤：

- 在允许表达本公开的目的蛋白的条件下培养本公开的宿主细胞；及
- 从培养物回收由所述宿主细胞表达的目的蛋白；及
- 任选的，包括进一步纯化和/或修饰本公开的目的蛋白。

本公开的 PVRIG 结合蛋白、PVRIG/TIGIT 结合蛋白、免疫检查点抑制剂(例如，PD-1 结合蛋白、PD-L1 结合蛋白)可在如上所述细胞中以细胞内方式(例如在细胞质中、在周质中或在包涵体中)产生，接着从宿主细胞分离且任选进一步纯化；或其可以细胞外方式(例如在培养宿主细胞的培养基中)产生，接着自培养基分离且任选进一步纯化。

用于重组产生多肽的方法及试剂，例如特定适合表达载体、转化或转染方法、选择标记物、诱导蛋白表达的方法、培养条件等在本领域中是已知的。类似地，适用于制造本公开的结合分子或抗体等目的蛋白的分离及纯化技术为本领域技术人员所公知。生产和纯化抗体的方法在现有技术中熟知和能找到，如冷泉港的抗体实验技术指南(5-8 章和 15 章)。本公开工程化的抗体也可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染细胞。哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端。通过表达与人源抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化、收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛，离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70℃，或者冻干。

然而，本公开 PVRIG 结合蛋白、PVRIG/TIGIT 结合蛋白、免疫检查点抑制剂(例如，PD-1 结合蛋白、PD-L1 结合蛋白)也可以通过本领域已知的其它产生蛋白质的方法获得，例如化学合成，包括固相或液相合成。此外，本公开提供组合物或组合：

本公开提供组合物或组合，包含：

前述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂(例如，PD-1 结合蛋白或 PD-L1 结合蛋白)；或，

前述 PVRIG 结合蛋白和免疫检查点抑制剂(例如，PD-1 结合蛋白或 PD-L1 结合蛋白)。

例如，提供药物组合物，其含有对癌症治疗、缓解或预防有效量的如上所述的组合物或组合，和至少一种可药用的赋形剂、稀释或载体。

在一些具体实施方式中，所述药物组合物单位计量中可含有 0.01 至 99 重量%的前述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂(例如，PD-1 结合蛋白或 PD-L1 结合蛋白)，或药物组合物单位剂量中含前述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂(例如，PD-1 结合蛋白或 PD-L1 结合蛋白)的量为 0.1-2000mg，在一些具体实施方式中为 1-1000mg。

一些实施方案中，提供制品或产品，包含组合物或组合。可选地，制品包含容器和标签。容器例如瓶、注射器和试管。容器容纳有效于治疗病症的组合物或组合。容器上或与容器相连的标签表明所述组合物用于治疗所选病症。示例性的，提供组合物或组合，其含有：

- 5 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和 PD-1 结合蛋白；或
 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和 PD-L1 结合蛋白。

上述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白包含特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域和特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域，其中：

- 所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域包含免疫球蛋白单一可变结构
10 域，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含：如 SEQ ID NO: 4、5、20 所示的 CDR1、
 CDR2 和 CDR3；

如 SEQ ID NO: 4、5、6 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

如 SEQ ID NO: 7、8、9 所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

- 如 SEQ ID NO: 2、15-19 任一所示或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸
15 序列；

如 SEQ ID NO: 3、21-25 任一所示或与之具有至少 90% 序列同一性的氨基酸
序列；

- 所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域包含重链可变区(VH)和轻链可
变区(VL)，所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 38 所示或与之具有至少 90% 序列
20 同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 42 所示或与之具有至
少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

上述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白包含第一多肽链和第二多肽链，其中：

所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO: 28-29、43-45 中任一所示的氨基酸序列，
所述第二多肽链包含如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列；或者

- 25 所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列，所述第二多肽链
包含如 SEQ ID NO: 30、31 所示的氨基酸序列。

上述 PD-1 结合蛋白包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

- 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 59、60、61 所示氨基酸序列的 HCDR1、
HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 62、63、64 所示氨基酸序
30 列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 67、68、69 所示氨基酸序列的 HCDR1、
HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 70、71、72 所示氨基酸序
列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

- 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 57 所示或与之具有至少 90% 同一性的氨
35 基酸序列，轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 58 所示或与之具有至少 90% 同一性的
氨基酸序列；或

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 73 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 74 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列。

上述 PD-1 结合蛋白包含重链全长(HC)和轻链全长(LC), 其中:

- 5 所述重链全长包含如 SEQ ID NO: 65 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 轻链全长包含如 SEQ ID NO: 66 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列; 或

10 所述重链全长包含如 SEQ ID NO: 75 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 轻链全长包含如 SEQ ID NO: 76 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列。

上述 PD-L1 结合蛋白包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL), 其中:

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO:48、49、50 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO:51、52、53 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

- 15 所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 46 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 47 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列。

上述 PD-L1 结合蛋白包含重链全长(HC)和轻链全长(LC), 其中:

- 20 所述重链全长包含如 SEQ ID NO: 54 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列, 轻链全长包含如 SEQ ID NO: 55 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

上述 PD-L1 结合蛋白中还包含 TGF- β RII ECD 结构域, 例如, 所述 TGF- β RII ECD 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示。

- 25 上述 PD-L1 结合蛋白包含第一多肽链和第二多肽链, 所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO: 77 或 78 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列, 所述第二多肽链包含如 SEQ ID NO: 55 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列。

本公开同时提供上述组合物或组合治疗、缓解前述肿瘤的方法或制药用途, 活化 NK 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和/或 Th1 细胞的方法或制药用途, 增加受试者体内的 IFN- γ 产生和/或促炎性细胞因子分泌的方法或用途, 抑制 PD-1 活性或促进 T 细胞增殖或使受试者从免疫反应上调获益的方法或用途, 所述受试者的 PD-L1 和/或 PD-L2 的表达可以是上调的。本公开中, “至少 90%(序列)同一性” 涵盖至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%(序列)同一性; “至少 80%(序列)同一性” 涵盖至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%(序列)同一性。

35

附图说明

图 1 为抗 PVRIG 纳米抗体 30、151 的混合淋巴细胞反应(MLR)实验结果, 使用 Tab5 作为阳性对照, hIgG4 作为阴性对照。

5 图 2 为抗 PVRIG/TIGIT 双抗 1708-151H8 的 MLR 实验结果, 同时检测 151H8、1708, hIgG4、Tab5、Pembrolizumab 作为对照。

图 3A 为抗 PVRIG/TIGIT 双抗 1708-151、1708 和 151 的联用在人黑色素瘤 A375 混合人 PBMC 的小鼠皮下移植瘤模型中的小鼠体重图, 图 3B 为对应的小鼠肿瘤体积图。

10 图 4A 为抗 PVRIG/TIGIT 双抗 1708-151H7 和 1708-30H2 在人黑色素瘤 A375 混合人 PBMC 的小鼠皮下移植瘤模型中的小鼠体重图, 图 4B 为对应的小鼠肿瘤体积图。

图 5A 为药物 A 和 B 单独或联用时对人黑色素瘤 A375 混合 PBMC 皮下移植瘤模型的肿瘤体积的作用结果图, 图 5B 为对应的肿瘤重量图, 图 5C 为对应的小鼠体重图, 图 5D 为对应的小鼠体重相对变化图。

图 6A 为药物 A 和 C 单独或联用时对人黑色素瘤 A375 混合 PBMC 皮下移植瘤模型的肿瘤体积的作用结果图, 图 6B 为对应的肿瘤重量图, 图 6C 为对应的小鼠体重图, 图 6D 为对应的小鼠体重相对变化图。

20 图 7A 为药物 A 和 D 单独或联用时对人黑色素瘤 A375 混合 PBMC 皮下移植瘤模型的肿瘤体积的作用结果图, 图 7B 为对应的肿瘤重量图, 图 7C 为对应的小鼠体重图。

具体实施方式

术语定义

25 为了更容易理解本公开, 以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本公开中另有明确定义, 本公开使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558(1968)中所述。

30 “程序性死亡 1”、“细胞程序性死亡 1”、“蛋白 PD-1”、“PD-1”、“PDCD1”和“hPD-1”可互换使用, 且包括人 PD-1 的变体、同种型、物种同源物、以及与 PD-1 具有至少一个共同表位的类似物。完整的 PD-1 序列可以从 GenBank 登录号 U64863 找到。“程序性死亡配体-1(PD-L1)”是 PD-1 的两种细胞表面糖蛋白配体之一(另一种为 PD-L2), 它在与 PD-1 结合时下调 T 细胞活化和细胞因子分泌。如
35 本文中使用的“PD-L1”包括人 PD-L1(hPD-L1), hPD-L1 的变体、同种型、和种间同源物, 以及与 hPD-L1 具有至少一个共同表位的类似物。完整的 hPD-L1 序列

可以用 GenBank 登录号 Q9NZQ7 查到。

“PVRIG”或“PVRIG 蛋白质”或“PVRIG 多肽”可以任选地包括任何这类蛋白质或其变异体、结合物或片段，包括(但不限于)如本文所述的已知或野生型 PVRIG，以及任何天然产生的剪接变异体、氨基酸变异体或同工型，并且尤其是 PVRIG 的可溶性胞外域(ECD)片段。此处 ECD 的定义如专利 WO2016134333 中的。完整的人类 PVRIG 序列可以 GenBank 登录号 AAH73861.1 找到。

“TIGIT”或“TIGIT 蛋白质”或“TIGIT 多肽”可以任选地包括任何这类蛋白质或其变异体、结合物或片段，包括(但不限于)如本文所述的已知或野生型 TIGIT，以及任何天然产生的剪接变异体、氨基酸变异体或同工型。完整的 TIGIT 序列可以 GenBank 登录号 AAI01289.1 找到。

“与 PVRIG 结合”，指能与 PVRIG 或其表位相互作用，所述 PVRIG 或其表位可以是人源的。“与 TIGIT 结合”，指能与 TIGIT 或其表位相互作用，所述 TIGIT 或其表位可以是人源的。“抗原结合位点”指抗原上不连续的，由本公开抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

“免疫检查点(immune checkpoint)分子”包括刺激性免疫检查点分子和抑制性免疫检查点分子，示例性分子包括 CD27、CD28、CD40、CD40L、CD122、OX40、OX40L、GITR、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、B7-H7、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR(Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor)、LAG3、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、VISTA、TIGIT、NKG2A 等。

“抗体”以最广义使用，涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体(例如双特异性抗体)，全长抗体和抗体片段(或抗原结合片段，或抗原结合部分)，只要它们展现出期望的抗原结合活性。抗体可以指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区(V 区)；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区(C 区)。可变区包括 3 个高变区(CDR)和 4 个序列相对保守的骨架区(FR)。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1，LCDR2，和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。

“抗原结合片段”涵盖单链抗体(即全长重链和轻链); Fab、修饰的 Fab、Fab’、修饰的 Fab’、F(ab’)2、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单结构域抗体(例如 VH 或 VL 或 VHH)、scFv、二价或三价或四价抗体、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetrabody 和上述任意一种的表位结合片段(参见例如 Holliger and Hudson,2005,Nature Biotech.23(9): 1126-1136; Adair and Lawson,2005,Drug Design Reviews-Online 2(3),209-217)。产生和制备这些抗原结合片段的方法在本领域是公知的(参见例如 Verma 等人,1998,Journal of Immunological Methods,216,165-181)。Fab-Fv 形式首先公开于 WO2009/040562, 其二硫键稳定化形式 Fab-dsFv 首先公开于 WO2010/035012。本公开的抗原结合片段还包括描述于 WO2005/003169、WO2005/003170 和 WO2005/003171 中的 Fab 和 Fab’片段。多价抗体可包含多特异性例如双特异性或可以是单特异性的(参见例如 WO92/22583 和 WO05/113605), 后者的一个示例是描述于 WO 92/22583 中的 Tri-Fab(或 TFM)。

“双特异性抗体”涵盖对两个不同抗原或同一抗原的至少两个不同抗原表位特异性结合的抗体(包括抗体或其抗原结合片段, 如单链抗体)。现有技术已公开了各种结构的双特异性抗体, 根据 IgG 分子的完整性可分为 IgG 样双特异性抗体和抗体片段型双特异性抗体, 根据抗原结合区域的数量可分为二价、三价、四价或更多价的双特异性抗体, 根据结构左右是否对称可分为对称结构双特异性抗体和不对称结构双特异性抗体。其中, 基于抗体片段的双特异性抗体, 例如缺乏 Fc 片段的 Fab 片段, 其通过将 2 个或多个 Fab 片段结合在一个分子中形成双特异性抗体, 其具有较低的免疫原性, 且分子量小, 具有较高的肿瘤组织渗透性, 该类型的典型的抗体结构如 F(ab)2、scFv-Fab、(scFv)2-Fab 等双特异性抗体; IgG 样双特异性抗体(例如具有 Fc 片段), 这类抗体相对分子量较大, Fc 片段有助于抗体后期的纯化, 并提高其溶解性、稳定性, Fc 部分还可能会与受体 FcRn 结合, 增加抗体血清半衰期, 典型的双特异性抗体结构模型如 KiH、CrossMAb、Triomab quadroma、Fc Δ Adp、ART-Ig、BiMAb、Biclonics、BEAT、DuoBody、Azymetric、XmAb、2 : 1 TCBs、1Fab-IgG TDB、FynomAb、two-in-one/DAF、scFv-Fab-IgG、DART-Fc、LP-DART、CODV-Fab-TL、HLE-BiTE、F(ab)2- CrossMAb、IgG-(scFv)2、Bs4Ab、DVD-Ig、Tetravalent- DART-Fc、(scFv)4-Fc、CODV-Ig、mAb2、F(ab)4-CrossMAb 等双特异性抗体(参见 Aran F. Labrijn 等, Nature Reviews Drug Discovery volume 18, pages585 - 608(2019); Chen S1 等, J Immunol Res. 2019 Feb 11; 2019: 4516041)。

在未特殊指明的情况下, 本公开的抗体通常使用 Kabat 编号系统。Kabat 中的 EU 编号一般也用于恒定结构域和/或 Fc 结构域。

对于 CDR 的确定或定义, 能够通过分辨抗体的结构和/或分辨抗体-配体复合物的结构来完成 CDR 的确定性描绘和包含抗体的结合位点的残基的鉴定。这可通过本领域技术人员已知的各种技术中的任一种, 例如 X 射线晶体学来实现。多种分析方法可用于鉴定 CDR, 包括但不限于 Kabat 编号系统、Chothia 编号系统、AbM

编号系统、IMGT 编号系统、接触定义、构象定义。

Kabat 编号系统是用于编号抗体中残基的标准并且通常用于鉴定 CDR 区域(参见例如 Johnson&Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 28: 214-8)。Chothia 编号系统与 Kabat 编号系统类似, 但 Chothia 编号系统考虑了某些结构环区域的位置。(参见例如 Chothia 等, 1986, *J.Mol.Biol.*, 196: 901-17; Chothia 等人, 1989, *Nature*, 342: 877-83)。AbM 编号系统使用建模抗体结构的由 Oxford Molecular Group 生产的计算机程序集成套件(参见例如 Martin 等, 1989, *ProcNatl Acad Sci(USA)*, 86: 9268-9272; “AbMTM, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies,” Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd)。AbM 编号系统使用知识数据库和从头开始方法的组合, 从基本序列建模抗体的三级结构(参见 Samudrala 等, 1999, 在 *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3: 194-198 中的 “Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach” 描述的那些)。接触定义基于可用复杂晶体结构的分析(参见例如 MacCallum 等, 1996, *J.Mol.Biol.*, 5: 732-45)。构象定义中, CDR 的位置可鉴定为对抗原结合做出焓贡献的残基(参见例如 Makabe 等, 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283: 1156-1166)。另外其它的 CDR 边界定义可能不严格遵循上述方法之一, 但仍然与 Kabat CDR 的至少一部分重叠, 尽管根据特定残基或残基组不显著影响抗原结合的预测或实验结果, 它们可缩短或延长。如本公开使用的, CDR 可指通过本领域已知的任何方法(包括方法的组合)定义的 CDR。各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的, 示例性的, 如下表中所示。

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

本公开的抗体的 VL 区和 VH 区的 CDR 氨基酸残基在数量和位置符合已知的 Kabat 编号系统。

本公开的抗体可以是多克隆的、单克隆的、异种的、同种异体的、同基因的或其经过修饰的形式, 其中单克隆抗体尤其适用于多个实施例中。一般来说, 本公开的抗体是重组抗体。如本文所用的 “重组” 泛指例如细胞或核酸、蛋白质或载体等产品, 表示所述细胞、核酸、蛋白质或载体已经通过引入异源核酸或蛋白质或改变天然核酸或蛋白质而加以修饰, 或所述细胞来源于如此修饰的细胞。例如, 重组细胞表达天然(非重组)细胞形式内不存在的基因或表达原本异常表达、低表达或完全不表达的天然基因。

多肽或蛋白的“结构域”是指折叠蛋白结构，其能够独立于蛋白的其余部分维持其三级结构。一般而言，结构域负责蛋白的单个功能性质，并在许多情况下可添加、移除或转移至其它蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

“免疫球蛋白结构域”是指抗体链(例如常规四肽链结构抗体的链或重链抗体的链)的球形区域，或是指基本上由这类球形区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于其维持抗体分子的免疫球蛋白折叠特征，其由排列在两个 β 折叠中任选由保守二硫键稳定的约7个反平行 β 折叠股的2层夹层组成。

“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由本领域及下文中分别称为“框架区1”或“FR1”、“框架区2”或“FR2”、“框架区3”或“FR3”、及“框架区4”或“FR4”的四个“框架区”组成的免疫球蛋白结构域，其中所述框架区由本领域及下文中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”、“互补决定区2”或“CDR2”、及“互补决定区3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”间隔开。因此，免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可如下表示为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域因具有抗原结合位点而赋予其对抗原的特异性。

“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由本领域及下文中分别称为“框架区1”或“FR1”、“框架区2”或“FR2”、“框架区3”或“FR3”、及“框架区4”或“FR4”的四个“框架区”组成的免疫球蛋白结构域，其中所述框架区由本领域及下文中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”、“互补决定区2”或“CDR2”、及“互补决定区3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”间隔开。因此，免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可如下表示为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域因具有抗原结合位点而赋予其对抗原的特异性。

“抗体框架(FR)”，是指可变结构域的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。

“免疫球蛋白单一可变结构域”通常用于指可以在不与其他可变结构域相互作用的情况下(例如在没有如常规四链单克隆抗体的VH和VL结构域之间所需要的VH/VL相互作用的情况下)，形成功能性抗原结合位点的免疫球蛋白可变结构域(其可以是重链或轻链结构域，包括VH、VHH或VL结构域)。“免疫球蛋白单一可变结构域”的实例包括纳米抗体(包括VHH、人源化VHH和/或骆驼化VH，例如骆驼化人VH)、IgNAR、结构域、作为VH结构域或衍生自VH结构域的(单结构域)抗体(诸如dAbsTM)和作为VL结构域或衍生自VL结构域的(单结构域)抗体(诸如dAbsTM)。基于和/或衍生自重链可变结构域(诸如VH或VHH结构域)的免疫球蛋白单一可变结构域通常是优选地。免疫球蛋白单一可变结构域的一个具体实例为如下文定义的“VHH结构域”(或简称为“VHH”)。

“VHH结构域”，亦称为重链单域抗体、VHH、VHH结构域、VHH抗体片段、

VHH 抗体、纳米抗体，是称为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域(Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: “Naturally occurring antibodies devoid of light chains”; Nature363, 446-448(1993))。使用术语“VHH 结构域”以将所述可变结构域与存在于常规四肽链结构抗体中的重链可变结构域(其在本公开中称为“VH 结构域”)以及轻链可变结构域(其在本公开中称为“VL 结构域”)进行区分。VHH 结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域(此与常规四肽链结构抗体中的 VH 或 VL 结构域相反,在该情况下表位由 VL 结构域与 VH 结构域一起识别)。VHH 结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。术语“重链单域抗体”、“VHH 结构域”、“VHH”、“VHH 结构域”、“VHH 抗体片段”、“VHH 抗体”、“Nanobody®”以及““Nanobody®结构域””(“Nanobody”为 Ablynx N.V.公司, Ghent, Belgium 的商标)可互换使用。

“VHH 结构域”包括但不限于经骆驼科动物产生的天然抗体,也可以是骆驼科动物产生的抗体后再经人源化的,也可以是经噬菌体展示技术筛选获得的。VHH 结构域中的氨基酸残基的总数将通常在 110 至 120 范围内,常常介于 112 与 115 之间。然而应注意较小及较长序列也可适于本公开所述的目的。获得结合特定抗原或表位的 VHH 的方法,先前已公开于以下文献中: R.van der Linden et al., Journal of Immunological Methods, 240(2000)185-195; Li et al., J Biol Chem., 287(2012)13713-13721; Deffar et al., African Journal of Biotechnology Vol.8(12), pp.2645-2652, 17June, 2009 和 WO94/04678。

如本领域中对于 VH 结构域及 VHH 结构域所公知的,各 CDR 中的氨基酸残基的总数可能不同,且可能不对应于由 Kabat 编号指示的氨基酸残基的总数(即根据 Kabat 编号的一个或多个位置可能在实际序列中未被占据,或实际序列可能含有多于 Kabat 编号所允许数目的氨基酸残基)。这意味着一般而言,根据 Kabat 的编号可能对应或可能不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。其它的编号系统或编码规则包括 Chothia、IMGT、AbM。

“人源化抗体(humanized antibody)”,也称为 CDR 移植抗体(CDR-grafted antibody),是指将非人 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量非人蛋白成分,从而诱导的强烈的免疫应答反应。为避免在免疫原性下降的同时引起活性的下降,可对所述的全人抗体可变区可进行最少反向突变,以保持活性。“人源化”的例子包括可将源自骆驼科的 VHH 结构域通过以人常规四肽链结构抗体 VH 结构域中相应位置处存在的一个或多个氨基酸残基置换原始 VHH 序列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基而“人源化”(本公开中亦称为“序列优化”,除人源化外,“序列优化”也可涵盖通过提供 VHH 改良性质的一个或多个突变对序列进行的其它修饰,例如移除潜在的翻译后修饰位点)。人源化 VHH 结构域可含有一个或多个完全人框架区序列,且在一些具体

实施方案中, 可含 IGHV3 的人框架区序列。“人源化”的又一例子包括将小鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架, 即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量小鼠蛋白成分, 从而诱导的强烈的抗体可变抗体反应。人源化方法例如蛋白表面氨基酸人源化(resurfacing)及抗体人源化通用框架移植法(CDR grafting to a universal framework), 即将 CDR “移植”于其它“支架”(包括但不限于人支架或非免疫球蛋白支架)上。适于所述 CDR 移植的支架及技术在本领域中是已知的。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库, 以及在 Kabat, E.A. 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲合力成熟后的人源化抗体。此外, 为避免免疫原性下降的同时, 引起的活性下降, 可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变, 以保持活性。

“亲和力成熟的”抗体指与不拥有此类改变的亲本抗体相比, 在一个或多个高变区(HVR)中具有一处或多处改变的抗体, 此类改变导致该抗体对抗原的亲合力改善。例如, “亲合力成熟”的 PD-1 结合蛋白或 PD-1 抗体, 在一个或多个 CDR 中具有一个或多个变化, 所述变化导致对抗原的亲合力相比于其亲本抗体有所增加。亲合力成熟的抗体可通过例如由以下所述的本领域中已知的方法来制备: Marks 等人, 1992, Biotechnology 10: 779-783 或 Barbas 等人, 1994, Proc.Nat.Acad.Sci, USA 91: 3809-3813.; Shier 等人, 1995, Gene 169: 147-155; Yelton 等人, 1995, Immunol.155: 1994-2004; Jackson 等人, 1995, J.Immunol.154(7): 3310-9; 及 Hawkins 等人, 1992, J.Mol.Biol.226(3): 889-896; KS Johnson 及 RE Hawkins, “Affinity maturation of antibodies using phage display”, Oxford University Press 1996。

“全人抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本公开的全人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变所引入的突变)。“全人抗体”不包括“人源化抗体”。

当“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和抗体)的情况中时, 意指在抗原结合蛋白之间竞争, 其通过以下测定法来测定: 待检测的抗原结合蛋白(例如抗体或其免疫学功能片段)防止或抑制(例如降低)参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原(例如 PVRIG 抗原或其片段)的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争, 这些测定例如: 固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如 Stahli 等, 1983, Methods in Enzymology 9: 242-253); 固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Kirkland 等, 1986, J.Immunol.137: 3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见例如 Harlow 和 Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual(抗体, 实验室手册), Cold Spring Harbor Press);

用 I-125 标记物的固相直接标记 RIA(参见例如 Morel 等, 1988, Molec.Immunol.25: 7-15); 固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Cheung, 等, 1990, Virology176: 546-552); 和直接标记的 RIA(Moldenhauer 等, 1990, Scand.J.Immunol.32: 77-82)。

通常所述测定法涉及使用能与带有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白结合的纯化抗原(所述抗原在固态表面或细胞表面上)。在待测抗原结合蛋白存在下, 测量结合于固态表面或细胞的标记的量, 来测量竞争性抑制。通常, 待测抗原结合蛋白是过量存在的。由竞争性测定(竞争抗原结合蛋白)鉴定的抗原结合蛋白包括: 与参考抗原结合蛋白相同的表位发生结合的抗原结合蛋白; 以及, 与充分接近参考抗原结合蛋白结合的表位所邻近的表位发生结合的抗原结合蛋白, 所述两个表位在空间上互相妨碍结合的发生。在本公开实施例中提供关于用于测定竞争性结合的方法的其它详细资料。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时, 其将抑制(例如降低)至少 40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或 75%或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下, 结合被抑制至少 80-85%、85-90%、90-95%、95-97%或 97%或更多。可使用本领域技术人员已知的常规技术, 就与相同表位的结合竞争性筛选抗体。例如, 可进行竞争和交叉竞争研究, 以获得彼此竞争或交叉竞争与抗原结合的抗体。基于它们的交叉竞争来获得结合相同表位的抗体的高通量方法描述于国际专利公开 WO03/48731 中。因此, 可使用本领域技术人员已知的常规技术, 获得例如与本公开的抗体分子竞争结合 PD-1 上的相同表位的抗体。

“特异性结合”、“选择性结合”是指抗体与预定的抗原上的表位结合。例如, 当使用人 PD-1 或其表位作为分析物并使用抗体作为配体, 在仪器中通过表面等离子体共振(SPR)技术测定时, 抗体以大约低于 $10^{-7}M$ 或甚至更小的平衡解离常数(KD)与预定的抗原或其表位结合, 并且其与预定抗原或其表位结合的亲和力是其与预定抗原(或其表位)或紧密相关的抗原之外的非特异性抗原(如 BSA 等)结合的亲和力的至少两倍。“识别抗原的抗体”在本公开中可以与“特异性结合的抗体”互换使用。

“结合亲和力”或“亲和力”在本公开中用作两个分子(例如抗体或其部分与抗原)之间的非共价相互作用的强度量度。两个分子之间的结合亲和力可通过确定解离常数(KD)来量化。可通过使用例如表面等离子体共振(SPR)方法(Biacore)测量复合物形成和解离的动力学来确定 KD。对应于单价复合物的结合和解离的速率常数分别被称为结合速率常数 k_a (或 k_{on})和解离速率常数 k_d (或 k_{off})。KD 通过方程 $KD = k_d/k_a$ 与 k_a 和 k_d 有关。解离常数的值可通过众所周知的方法直接确定, 并且甚至可通过例如 Caceci 等人(1984, Byte 9: 340-362)中所述的那些方法对于复杂混合物进行计算。例如, 可使用双重过滤硝化纤维素滤器结合测定如 Wong&Lohman(1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 5428-5432)中公开的那种来确定 KD。评估抗体针对靶抗原的结合能力的其它标准测定是本领域已知的, 包括例如

ELISA、蛋白质印迹、RIA 和流式细胞术分析、以及本公开其它地方例举的其它测定。抗体的结合动力学和结合亲和力也可通过本领域已知的标准测定，例如表面等离子共振(SPR)，例如通过使用 Biacore™ 系统或 KinExA 来评价。可通过比较各个抗体/抗原复合物的 KD 值来比较与不同分子相互作用相关的结合亲和力，例如，不同抗体对于给定抗原的结合亲和力的比较。类似地，相互作用的特异性可通过确定和比较目的相互作用(例如抗体和抗原之间的特异性相互作用)的 KD 值与非目的相互作用(例如已知不结合 PD-1 的对照抗体)的 KD 值进行评价。

“保守性置换”指置换为具有与原始氨基酸残基相似的特性的另一个氨基酸残基。例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有碱性侧链，并且天冬氨酸和谷氨酸具有相似的特性，在于它们具有酸性侧链。此外，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸和色氨酸具有相似的特性，在于它们具有不带电荷极性侧链，并且丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和甲硫氨酸具有相似的特性，在于它们具有非极性侧链。另外，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有芳族侧链。因此，本领域技术人员将显而易见，甚至当置换如上文所述的显示相似特性的组中的氨基酸残基时，它将不显示特性的特定变化。

“同源性”、“同一性”或“序列同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同核苷酸或氨基酸单体占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被相同核苷酸占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100\%$ 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

“核酸”或“多核苷酸”在本文可互换使用，指的是单链或双链的任何 DNA 分子或 RNA 分子以及在单链的情况下，它的互补序列的分子，优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

“宿主细胞”包括各个细胞或细胞培养物，其可为或已是用于掺入多核苷酸插入片段的载体的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代，并且由于天然、偶然或有意的突变，子代可不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态学或基因组 DNA 互补体中)。宿主细胞包括用本公开的多核苷酸在体内转染和/或转化的细胞。“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括其后代。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。

“抑制”或“阻断”可互换使用，并涵盖部分和完全抑制/阻断这两者。“抑制

生长”(例如涉及细胞)旨在包括细胞生长任何可测量的降低。

“阻止...的生长”或“生长抑制”是指抑制细胞的生长或增殖。

“增殖性疾病”指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方案中,增殖性病症指癌症。“肿瘤”指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。“癌症”、“癌性”、“增殖性病症”和“肿瘤”在本公开中提到时并不互相排斥。

“预防癌症”是指在受试者中延迟、抑制或防止癌症发作,所述受试者中癌症发生或肿瘤发生的起始尚未得到证实,但是通过例如遗传筛查或其它方法确定,已鉴定了癌症易感性。该还包括治疗具有癌变前病症的受试者以终止所述癌变前病症向恶性肿瘤的进展或导致其消退。

“给予”、“施用”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触,例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中所述流体与细胞接触。“给予”、“施用”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。当应用于人、兽医学或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断应用。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂,例如包含本公开的任一种结合蛋白或其药物组合物作为治疗剂,所述受试者已经患有、疑似患有、倾向于患有一种或多种增殖性疾病或其症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂,无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床能测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化,例如受试者的疾病状态、年龄和体重,以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法,可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解某个受试者中目标疾病症状方面可能无效,但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验(H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定,其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

“有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于受试者的有效量可依据以下因素而变化:如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。本公开的受试者可以是动物或人类受试者。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生,该

说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。“和/或”应视为特定揭示两种指定特征或组分中的每一者具有或不具有另一者。因此，诸如本公开中“A 和/或 B”的词组中所用的术语“和/或”包括“A 及 B”、“A 或 B”、“A”(单独)及“B”(单独)。除非上下文另外清楚要求，否则在整个说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、

5 “具有”、“包括”等理解为具有包含意义，而不是排他性或穷举性意义；也即，“包括但不限于”的意义。

本公开的“受试者”、“患者”意指哺乳动物，尤其灵长类动物，尤其是人。

发明的详细说明

10 以下结合实施例用于进一步描述，但这些实施例并非限制的范围。

实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience, NY。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

15 **实施例 1. PVRIG/TIGIT 双特异性抗体**

本实施例中，带 his 标签的人 PVRIG (h-PVRIG-his)重组蛋白、带小鼠 IgG2a 的 Fc 标签的人 PVRIG (h-PVRIG-mIgG2a Fc)重组蛋白、带人 IgG1 的 Fc 标签的小鼠 PVRIG (m-PVRIG-hIgG1 Fc)购自 Acrobiosystems 公司。带 his 标签的 PVRL2 购自 AcroBiosystem (PV2-H52E2)。

20 **实施例 1-1. 抗 PVRIG 纳米抗体的筛选和制备**

1、免疫抗原、筛选抗原的序列和制备

表 1. 重组蛋白质的氨基酸序列

名称	氨基酸序列起止	Genbank 登录号
h-PVRIG-his	Thr41-Asp171	Q6DKI7-1
h-PVRIG-mIgG2a Fc	Thr41-Asp171	Q6DKI7-1
m-PVRIG-hIgG1 Fc	Ser35-Asp165	A0A1B0GS01-1

带 his 标签的食蟹猴 PVRIG (cyno-PVRIG-his)重组蛋白序列如下：

TPEVWVQVQMEATELSSFTVHCGFLGPGSISLVTVSWGGPDGAGGTKLAVLHPELGTR
25 QWAPARQARWETQSSISLALED SGASSPFANTTFCCKEASFPEGSWESCGSLPPSSDPGLS
APPTVPILRADHHHHHHH (SEQ ID NO: 1)

2、羊驼免疫、纳米抗体噬菌体展示文库构建和抗体筛选

使用实施例 1-1 的方法，使用带 his 标签的人 PVRIG 重组蛋白(h-PVRIG-his)免疫羊驼。从第 56 天的骆驼外周血中分离 PBMC，提取 RNA，反转录成 cDNA，
30 构建抗人 PVRIG 纳米抗体的噬菌体文库。经过 3 轮筛选，对 400 个克隆测序，其中 2 株的可变区序列如表 2 所示，CDR 如表 3 所示。

表 2. 抗 PVRIG 纳米抗体的可变区

编号	可变区序列
30	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCEASGYSYSGDCMGWFRRAPGKERDEGVATID NAGRIKYADSVKGRFTISHGNGKYILYLQMNSLKPEDTDMYYCAAGWTFGGN CSPADWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 2)
151	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAPGKEREAVAGI DIFGGTTYADSVKGRFTASRDNAGFSLFLQMNDLKPEDTAMYYCAAGDSPDGR CPPLGQGLNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 3)

表 3. 抗 PVRIG 纳米抗体的 CDR(Kabat 编号规则)

编号	CDR 序列	
30	CDR1	GDCMG (SEQ ID NO: 4)
	CDR2	TIDNAGRIKYADSVKG (SEQ ID NO: 5)
	CDR3	GWTFGGNCSPAD (SEQ ID NO: 6)
151	CDR1	YRPYCMA (SEQ ID NO: 7)
	CDR2	GIDIFGGTTYADSVKG (SEQ ID NO: 8)
	CDR3	GDSPDGRCPPLGQGLNY (SEQ ID NO: 9)

将上述抗体可变区与人 IgG4 重链 Fc 区域连接, 重链 Fc 区域包括铰链(hinge)区, 并带有 S228P, F234A, L235A, K447A 突变(Eu 命名系统), 构建全长抗体。

5 >hIgG4 Fc(S228P/F234A/L235A/K447A)

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLA

10 (SEQ ID NO: 10)

>30 全长

HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCEASGYSYSGDCMGWFRRAPGKERDEGVATIDNAGRI
KYADSVKGRFTISHGNGKYILYLQMNSLKPEDTDMYYCAAGWTFGGNCSPADWGQGT
QVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
15 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
A (SEQ ID NO: 11)

>151 全长

20 HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGT
TYADSVKGRFTASRDNAGFSLFLQMNDLKPEDTAMYYCAAGDSPDGRCPPLGQGLNY
WGQGTQVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
25 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLGA (SEQ ID NO: 12)

WO2016134333 中所示的抗 PVRIG 抗体 CPA.7.021 筛选自抗体噬菌体库，其亚型为 IgG1，能与 PVRIG 较好结合，对食蟹猴 PVRIG 则无结合。将 CPA.7.021 的重链和轻链可变区，分别与人 IgG4 重链恒定区(带有 S228P, F234A, L235A, K447A 突变)和人 Kappa 轻链恒定区连接，构建阳性抗体 Tab5。

5 >Tab5 重链全长

EVQLVESGGGVVVKPGGSLRLSCAASGFTFGTSSMNWVRQAPGKGLEWVAVISFDGTEI
HYADSVKGRFTISRDNKSTVFLQMNSLRPDDTALYYCAKGSIGNIFYSGMDVWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEA
10 AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVQLHQLNGLSKYSCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGRVFSCHVMHEALHNHYTQKSLSLGLA (SEQ ID NO: 13)

>Tab5 轻链全长

15 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAGQSISGWLAWFQQKPGKAPNLLIYETSTLESQVPS
RFGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 14)

20 将表达上述氨基酸序列的核酸序列克隆到 pcDNA3.1 表达载体，按常规方法进行抗体表达和纯化，经检测，获得目的抗体。

实施例 1-2. 抗 PVRIG 纳米抗体与抗原 PVRIG 的亲合力鉴定

1、ELISA

用直接包被带 his 标签的 PVRIG 重组蛋白，加入抗体后，通过加入二抗(HRP 偶联的抗一抗 Fc 的抗体)和 HRP 底物 TMB 检测抗体与抗原结合的活性。

25 人、食蟹猴或小鼠 PVRIG 蛋白包被 96 孔板，按 1 μg/mL 浓度每孔 100 μL，4℃ 孵育过夜。洗液洗三遍。加入 300 μL/孔封闭液(PBS+0.05% Tween20+1% BSA)室温孵育 1 小时。洗液洗三遍。每孔加 100 μL 用稀释液稀释好的抗 PVRIG 待测抗体。37℃孵育 1 小时。洗液洗三遍。每孔加入 100 μL HRP 标记的抗人 IgG 二抗(Sigma, A8667)。37℃孵育 1 小时。洗液洗三遍。每孔加入 100 μL TMB，避光反应 15 分钟。加入 50 mL/孔的 0.16M 硫酸。Thermo M_μLtiSkanFc 酶标仪读取 OD450，计算
30 抗 PVRIG 抗体对 PVRIG 的结合 EC₅₀ 值。所有抗体均对人或食蟹猴的 PVRIG 重组蛋白有较强的结合能力，但不结合小鼠 PVRIG 重组蛋白。

表 4. 抗 PVRIG 抗体对不同种系 PVRIG 重组蛋白的结合实验结果

抗体编号	人 PVRIG-his ELISA EC ₅₀ (nM)	猴 PVRIG-his ELISA EC ₅₀ (nM)
30	0.26	0.16
151	2.15	2.43
Tab5	2.86	无结合
hIgG4	无结合	无结合

2、FACS 检测

制备获得表达人或食蟹猴 PVRIG 基因的 HEK293 稳转细胞株。在 96 孔板中每孔接种 2×10^5 个细胞。300g 离心 5 分钟，去上清，加入 100 μ L 待测抗体，4℃孵育 1 小时。离心去除上清，用 200 μ L 洗液(PBS+2% FBS)洗涤 3 次，加入 100 μ L 1:500 稀释的用 Alexa Fluor 488 标记的抗人 IgG 二抗(Invitrogen, A-11013)，4℃孵育 1 小时。离心去除上清，用 200 μ L 洗液(PBS+2% FBS)洗涤 3 次。用 100 μ L PBS 重悬细胞，用流式细胞仪(BD FACS Calibur 或 BD FACS Canto_II)检测。所有抗体均对细胞表面表达的人或食蟹猴的 PVRIG 有较强的结合能力，明显强于阳性抗体 Tab5，而 Tab5 甚至完全不结合食蟹猴 PVRIG。

表 5. 抗 PVRIG 抗体对不同种系 PVRIG 的细胞结合实验结果

抗体编号	人 PVRIG FACS EC ₅₀ (nM)	猴 PVRIG FACS EC ₅₀ (nM)
30	N.A.	0.02
151	0.01	2.23
Tab5	2.13	无结合
hIgG4	无结合	无结合

(注: N.A., not available, 表示结合太强, 在低浓度条件下抗体亦不发生解离, 无法拟合得到准确的 EC₅₀。)

3、Fortebio 检测

将 Protein A 生物传感器(Fortebio, #18-5010)浸泡在 200 μ L 的 KB 缓冲液(PBS, pH 7.4, 0.02% tween-20, 0.1% BSA)中 60 秒, 进行湿润处理。然后, 用 KB 缓冲液将抗 PVRIG 抗体稀释到 10 μ g/mL, 将传感器置于 200 μ L 该溶液中, 待读数为 1.2 nm 时停止。将传感器浸泡于 KB 缓冲液中 100 秒, 以洗脱多余的抗体。将带有 his 标签的人 PVRIG 用 KB 缓冲液以 2 倍梯度稀释至 64 nM-4 nM 之间。将传感器置于该溶液中结合 300 秒, 再置于 KB 缓冲液中解离 600 秒。采用动态 1: 1 结合方式拟合, 则抗 PVRIG 抗体与人 PVRIG 的亲合力如表 6 所示。

结果显示, 所有检测抗体均具有与人 PVRIG 的高亲合力。

表 6. 抗 PVRIG 抗体与人 PVRIG 的亲合力

抗体编号	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	K _D (M)
30	2.84E+05	2.05E-04	7.23E-10
151	2.61E+05	5.22E-05	2.00E-10
Tab5	7.37E+05	1.61E-05	2.19E-10

实施例 1-3. 抗 PVRIG 纳米抗体的功能和活性验证

1、抗 PVRIG 纳米抗体阻断 PVRIG 和 PVRL2 结合实验

人 PVRIG 重组蛋白(h-PVRIG-mIgG2a Fc)包被 96 孔板, 按 1 μ g/mL 浓度每孔 100 μ L, 4℃孵育过夜。洗液洗三遍。加入 300 μ L/孔封闭液室温孵育 1 小时。洗液洗三遍。每孔加 50 μ L 稀释好的抗 PVRIG 待测抗体和 50 μ L 带 his 标签的配体

PVRL2, 37℃孵育 1 小时。洗液洗三遍。每孔加入 100 μL 按 1:2000 倍稀释的用 HRP 标记的抗 his 标签的二抗 (Genscript)。37℃孵育 1 小时。洗液洗三遍。每孔加入 100 μL TMB, 避光反应 15 分钟。加入 50 μL 每孔的 0.16M 硫酸。Thermo MμLtiSkanFc 酶标仪读取 450 nm OD 值, 计算抗 PVRIG 抗体对 PVRIG 与 PVRL2 结合阻断的 IC₅₀ 值。

表 7 结果显示, 所检测抗体均可以强烈抑制人 PVRIG 与人 PVRL2 的结合。

表 7. 抗体对人 PVRIG/PVRL2 结合的阻断实验

抗体编号	ELISA IC ₅₀ (nM)
30	1.11
151	0.37
Tab5	1.16
hIgG4	无阻断

2、抗 PVRIG 纳米抗体报告基因细胞活性实验

首先, 构建 plvx-OS8 (G418 抗性)质粒, 转染 293F 细胞, G418 筛选, 用流式细胞仪检测克隆细胞 OS8 的表达同时检测 OS8 对 Jurkat 细胞的激活, 选择激活程度中等的克隆, 得到 293F-OS8 细胞株; 构建 plvx-PVRL2 质粒, 用它感染 293F-OS8 细胞, 用流式细胞仪筛选出 PVRL2 表达量最高的克隆, 从而得到 293F-OS8-PVRL2 细胞株。

其次, 构建 plvx-NFAT-Luc (Hygromycin 抗性), 包装成慢病毒, 感染 Jurkat E6.1 细胞, 加 Hygromycin 筛选出有抗性的克隆, 用 OKT3 去刺激克隆, 筛选出 Luciferase 信号中等的克隆, 得到 Jurkat-NFAT-Luc 细胞系; 构建 plvx-PVRIG (Puromycin 抗性)载体, 包装成慢病毒, 感染 Jurkat-NFAT-Luc 细胞, 经流式细胞仪筛选出 PVRIG 表达量最高的克隆, 从而得到 Jurkat-NFAT-Luc-PVRIG 细胞株。

将 1E4 个 Jurkat-NFAT-Luc-PVRIG 细胞与待测抗体在 37℃孵育 20 分钟。加入 1E5 个 293F-OS8-PVRL2 细胞, 37℃孵育 5 小时。离心去除上清, 加入 Luciferase 缓冲液(Promega, E6130)裂解细胞, 检测荧光值。计算 EC₅₀ 值评价抗 PVRIG 抗体的体外细胞活性。实验结果如表 8 所示。

结果显示, 所检测抗体有较强的激活 Jurkat 细胞中 Luciferase 的能力, 活性是阳性抗体的至少 10 倍以上, 证明这些抗体可以结合 PVRIG 并阻断 PVRL2 与 PVRIG 的结合。

表 8. 抗 PVRIG 抗体报告基因细胞活性实验结果

抗体编号	PVRIG 报告基因细胞活性实验 EC ₅₀ (nM)
30	0.06
151	0.04
Tab5	0.74

hIgG4	无结合
-------	-----

3、抗 PVRIG 纳米抗体的 NK 细胞杀伤实验

PVRIG 在 NK 细胞上表达, 而 PVRL2 在很多肿瘤细胞(包括 K562 细胞)中表达。抗 PVRIG 抗体可以通过阻断 PVRL2 与 PVRIG 的结合, 解除肿瘤细胞对 NK 细胞活性的抑制作用。

- 5 在 96 孔板中每孔加入 50 μ L (总计 1×10^5 个)人恶性非霍奇金淋巴瘤 NK92 细胞。加入 50 μ L 20 nM 或 100 nM 待测抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。用洗液洗涤两次, 重悬至 2×10^5 个/mL 的密度。加入 50 μ L (总计 1×10^4 个)的人慢性髓系白血病 K562 细胞, 使得 NK92 细胞与 K562 细胞个数的比例为 10:1。37 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时。使用 CytoTox-Glo 细胞毒性系统(Promega, G9292)对杀伤活性进行测量。首先加入 50 μ L AAF-Glo 试剂, 室温孵育 15 分钟, 测量被 NK92 细胞杀死的 K562 细胞的荧光。再加入 50 μ L 裂解液, 室温孵育 15 分钟, 裂解细胞, 测量所有细胞的荧光。准备三种对照组, 分别是只包括培养液的样品(对照组一), 只包括 NK92 细胞的样品(对照组二), 只包括 K562 细胞的样品(对照组三), 进行同样的操作。

根据如下公式, 计算杀伤活性:

- 15 杀伤活性(%)= $\{[(R-BG)-(T-BG)-(E-BG)]/[(TL-BGL)-(T-BG)]\} \times 100$

其中, R 为加入 AAF-Glo 后的荧光值, BG 为对照组一在加入 AAF-Glo 的荧光值, E 为对照组二在加入 AAF-Glo 的荧光值, T 为对照组三在加入 AAF-Glo 的荧光值; TL 为对照组三在加入裂解液后的荧光值, BGL 为对照组一再加入裂解液后的荧光值。

- 20 实验结果如表 9 所示, 表明所有检测的抗 PVRIG 抗体均可以明显的激活 NK92 细胞、杀伤 K562 细胞。

表 9. 抗 PVRIG 抗体的 NK 细胞杀伤实验

抗体编号	杀伤活性 (%) (平均值 $\pm$ 标准差)	
	20 nM 抗体	100 nM 抗体
30	36 $\pm$ 5	39 $\pm$ 5
151	35 $\pm$ 3	33 $\pm$ 2
Tab5	32 $\pm$ 2	32 $\pm$ 3
hIgG4	22 $\pm$ 1	22 $\pm$ 2

4、抗 PVRIG 纳米抗体的混合淋巴细胞反应(MLR)实验

- 25 PVRIG 在 T 细胞上表达, 而 PVRL2 在 DC 细胞上表达。抗 PVRIG 抗体可以通过阻断 PVRL2 与 PVRIG 的结合, 解除 DC 细胞对 T 细胞的抑制, 活化 T 细胞。

从第一个体来源的外周血中分离 PBMC, 将细胞培养于含 10 % FBS 的 RPMI 1640 培养基中, 以 50 ng/mL GM-CSF(Peprotech, 300-03-100UG)和 50 ng/mL IL-4(Peprotech, 200-04-100UG)的终浓度添加, 每 2-3 天添加含细胞因子的新鲜培养基; 培养 6 天后, 加入 1 μ g/mL LPS(Sigma, L2880-25MG)孵育 24 小时, 收集分

化成熟得到的 DC 细胞。从第二个体来源的外周血中分离 PBMC，使用 EasySep 人 CD3⁺T 细胞分离试剂盒(Stemcell, 17952)从中分离 CD3⁺ T 细胞。调整 CD3⁺ T 细胞和 DC 细胞的密度，使得每孔加入 1×10^5 个 CD3⁺T 细胞和 2×10^4 个 DC 细胞。加入待测抗体，37℃ 孵育 120 小时，取上清，用 ELISA 试剂盒(R&D, DY202)检测上清中的 IFN γ 含量。

如表 10 和图 1 所示，相比对照抗体 IgG4，所有检测抗 PVRIG 抗体均可以明显的激活 T 细胞分泌 IFN γ 。并且，在低剂量(如 4 nM、20 nM)时，本公开的抗体 30 和 151 较之阳性对照 Tab5 的效果更优。

表10. 抗PVRIG抗体混合淋巴细胞反应IFN γ 分泌量

抗体编号	IFN γ (pg/mL) (平均值 $\pm$ 标准差)		
	4 nM 抗体	20 nM 抗体	100 nM 抗体
30	1675 $\pm$ 101	1911 $\pm$ 347	1576 $\pm$ 288
151	1498 $\pm$ 175	2224 $\pm$ 162	1798 $\pm$ 373
Tab5	912 $\pm$ 173	1425 $\pm$ 330	2349 $\pm$ 148
hIgG4	984 $\pm$ 335	814 $\pm$ 112	1309 $\pm$ 437

10 实施例1-4. 抗PVRIG纳米抗体的序列改造

通过对选定的抗PVRIG抗体分子进行三维结构同源建模，将抗PVRIG抗体序列与抗体GermLine数据库比较，获得同源性高的人种系模板IGHV3-7 *01。将CDR移植到相应的人源模板中。对移植后的单域抗体再次进行三维结构模拟并分析，对包埋残基、与CDR区有直接相互作用的残基，以及对可变区的构象有重要影响的残基进行回复突变，并对CDR区化学不稳定氨基酸残基优化，产生一系列人源化单域抗体。各个单域抗体的人种系模板以及人源化抗体重链可变区序列如下所示。

>30H1可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGDCMGWFRQAPGKGLEGVATIDNAGRIK
YADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCSPADWGQGTQ
VTVSS (SEQ ID NO: 15)

>30H2可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGDCMGWFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRI
KYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCSPADWGQGT
QVTVSS (SEQ ID NO: 16)

>30H3可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSGDCMGWFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRI
KYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCSPADWGQGT
QVTVSS (SEQ ID NO: 17)

>30H4可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGDCMGWFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRI
KYADSVKGRFTISHGNAKYILYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCSPADWGQGT

QVTVSS (SEQ ID NO: 18)

>30H5可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYSGDCMGWFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRI
KYADSVKGRFTISHGNAKYILYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCSPADWGQGT

5 QVTVSS (SEQ ID NO: 19)

可见, 抗体30H1-30H5包含如GDCMG(SEQ ID NO: 4)所示的CDR1, 如
TIDNAGRIKYADSVKG(SEQ ID NO: 5)所示的CDR2, 如GWTFGGQCSPAD(SEQ
ID NO: 20)所示的CDR3。

>151H2可变区

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTYRPYCMAWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGTTY
ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDSPDGRCPPLGQGLNYWG
QGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 21)

>151H4可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGT
15 TYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDSPDGRCPPLGQGLNYW
GQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 22)

>151H7可变区

HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGT
TYADSVKGRFTASRDNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDSPDGRCPPLGQGLNY
20 WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 23)

>151H8可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGT
TYADSVKGRFTISRDNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDSPDGRCPPLGQGLNYW
GQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 24)

25 >151H9可变区

HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGT
TYADSVKGRFTASRDNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDSPDGRCPPLGQGLNY
WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 25)

将上述人源化抗体重链可变区与人IgG4重链Fc区域连接, 构造形成全长抗
30 PVRIG 抗体。其中重链Fc区域包括铰链(hinge)区, 并带有
S228P/F234A/L235A/K447A, 或S228P/K447A突变。按常规方法进行抗体的表达和
纯化, 经检测, 得到目的抗体。

实施例1-5. 人源化抗PVRIG抗体的活性和功能验证

1、人源化抗PVRIG抗体与表达PVRIG的细胞结合实验

35 依照实施例 1-2 的方法, FACS 检测抗 PVRIG 抗体与人或食蟹猴 PVRIG 的结
合。实验结果如表 11 所示。

表 11. 抗 PVRIG 单域抗体对不同种系 PVRIG 的 FACS 结合实验结果

抗体编号	人 PVRIG FACS EC ₅₀ (nM)	猴 PVRIG FACS EC ₅₀ (nM)
30H1	0.024	0.374
30H2	0.003	0.005
30H3	0.004	0.003
151H4	0.240	0.035
151H7	0.002	0.467
151H8	0.006	N.T.
151H9	0.004	3.942
Tab5	0.160	无结合
hIgG4	无结合	无结合

(注：N.T., not tested, 未测试。)

2、人源化抗PVRIG抗体与PVRIG的亲合力测定

依照实施例 1-2 的 Fortebio 检测方法，检测人源化抗 PVRIG 抗体与人 PVRIG

5 的亲合力。如表 12 所示，所有抗体均具有与人 PVRIG 的高亲合力。

表 12. 人源化抗 PVRIG 抗体与人 PVRIG 的亲合力

抗体编号	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	K _D (M)
20H5	1.93E+05	1.35E-05	6.98E-11
30H2	1.69E+05	3.25E-04	1.92E-09
30H3	1.48E+05	3.58E-04	2.41E-09
151H7	1.57E+05	1.88E-04	1.20E-09

3、人源化抗 PVRIG 抗体报告基因细胞活性实验

依照实施例 1-3 的方法，检测人源化抗 PVRIG 抗体在报告基因细胞中的活性。

实验结果如表 13 所示。表中列出的抗体均具有激活 Jurkat 细胞的能力。

10

表 13. 人源化抗 PVRIG 抗体报告基因细胞活性实验

抗体编号	PVRIG 报告基因细胞活性实验 EC ₅₀ (nM)
30H2	0.176
30H3	0.078
151H7	0.038
151H8	0.058
Tab5	1.380
hIgG4	无激活

4、人源化抗 PVRIG 抗体的活化 NK 细胞杀伤能力实验

依照实施例 1-3 的方法，检测人源化抗 PVRIG 抗体对 NK 细胞的活化能力。

实验结果如表 14-1 和表 14-2 所示。结果显示，所测抗体都有明显的活化 NK 细胞的能力，促进 NK 细胞对于靶细胞 K562 的杀伤。

表 14-1. 人源化抗 PVRIG 抗体的 NK 细胞杀伤实验

抗体编号	杀伤活性 (%) (平均值±标准差)		
	4 nM 抗体	20 nM 抗体	100 nM 抗体
30	10.4±0.9	11.9±0.9	13.3±0.7
30H2	7.7±0.3	14.5±0.8	17.7±0.7
Tab5	5.9±0.1	7.9±0.6	10.0±1.2
PBS	0.8±0.6		

表 14-2. 人源化抗 PVRIG 抗体的 NK 细胞杀伤实验

抗体编号	杀伤活性 (%) (平均值±标准差)		
	4 nM 抗体	20 nM 抗体	100 nM 抗体
151	20.9±1.5	22.9±1.5	24.2±2.3
151H7	16.9±0.8	21.0±0.4	18.4±0.9
hIgG4	11.2±0.4	11.7±2.1	9.2±0.6
PBS	6.6±1.1		

5 实施例 1-6. 抗 PVRIG/TIGIT 双抗的制备

为探索不同构造的抗 PVRIG/TIGIT 双抗对抗体功能的影响，将抗 PVRIG 单域抗体 151 通过 GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 152) 连接子与抗 TIGIT 抗体 1708 的重链或轻链的 N 端或 C 端相连。形成 4 个抗 PVRIG/TIGIT 双抗，命名为 1708-151-1，1708-151-2，1708-151-3，1708-151-4，分别对应 151 被连接在 1708 的重链 N 端，重链 C 端，轻链 N 端和轻链 C 端。抗 TIGIT 抗体 1708 采用人 IgG4 亚型，并带有 S228P (Eu 命名系统) 的突变。抗 TIGIT 抗体 1708 和其与 151 形成的双特异性抗体序列如下表 15 所示。抗 TIGIT 抗体序列信息如表 16 和表 17 所示。此处全文引入 WO2019062832A 中的 TIGIT 抗体。

表 15. 抗 PVRIG/TIGIT 双抗的第一、第二多肽链序列

抗体编号	重/轻链全长氨基酸序列	
1708 (抗 TIGIT 抗体)	第一多肽链	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAP GQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTTRDTSTSTVYMELS SLRSED TAVYYCAREGAYGYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHN HYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 26)

	第二多肽链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASENIYSYLAWYQQKPGKSPK LLIYNARTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYH SGSPLPFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSSTLT SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 27)
1708-151-1 (抗体 151 连接到 1708 重链 N 端)	第一多肽链	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAP GKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTASRDNAGFSLFLQMNDL KPEDTAMYYCAAGDSPDGRCPPLGQGLNYWGQGTQVTVSSGG GGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWM HWVRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGAYGYFDYWGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 28)
	第二多肽链	与 1708 的轻链相同 (SEQ ID NO: 27)
1708-151-2 (151 连接 到 1708 重 链 C 端)	第一多肽链	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAP GQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCAREGAYGYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLGLKGGGGSGGGGSHVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCV ASASGFTYRPYCMAWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGR FTASRDNAGFSLFLQMNDLKPEDTAMYYCAAGDSPDGRCPPL GQGLNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 29)
	第二多肽链	与 1708 的轻链相同 (SEQ ID NO: 27)

	多肽链	
1708-151-3 (151 连接到 1708 轻链 N 端)	第一多肽链	与 1708 的重链相同 (SEQ ID NO: 26)
	第二多肽链	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAP GKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTASRDNAGFSLFLQMNDL KPEDTAMYYCAAGDSPDGRCPLGQGLNYWGQGTQVTVSSGG <u>GGSGGGGS</u> DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASENIYSYLAWY QQKPGKSPKLLIYNARTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 30)
1708-151-4 (151 连接到 1708 轻链 C 端)	第一多肽链	与 1708 的重链相同 (SEQ ID NO: 26)
	第二多肽链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASENIYSYLAWYQQKPGKSPK LLIYNARTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYH SGSPLPFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <u>GGGGSGGGGS</u> HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAP GKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTASRDNAGFSLFLQMNDL KPEDTAMYYCAAGDSPDGRCPLGQGLNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 31)

表16. 抗TIGIT抗体重链及轻链CDR区序列(Kabat编号规则)

抗体	重链		轻链	
1708	HCDR1	NYWMH (SEQ ID NO: 32)	LCDR1	RASENIYSYLA (SEQ ID NO: 35)
	HCDR2	RIDPDSTGSKYNEKFKT (SEQ ID NO: 33)	LCDR2	NARTLAE (SEQ ID NO: 36)
	HCDR3	EGAYGYYFDY (SEQ ID NO: 34)	LCDR3	QYHSGSPLP (SEQ ID NO: 37)

表17. 抗TIGIT抗体重链VH及轻链VL序列

抗体	重链 VH 及轻链 VL 序列
1708-VH1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLE WMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYY CAREGAYGYFFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 38)
1708-VH2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLE WMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYY CAREGAYGYFFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 39)
1708-VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLE WIGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC AREGAYGYFFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 40)
1708-VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYN ARTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGG TKVEIK (SEQ ID NO: 41)
1708-VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKSPKLLIYN ARTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGG TKVEIK (SEQ ID NO: 42)

将不同的人源化抗 PVRIG 抗体可变区(30H2, 151H7, 151H8)连接到抗 TIGIT 抗体 1708 的重链 N 端, 即采用 1708-151-1 类似的双特异性抗体构造, 构建双抗。

>1708-30H2 第一多肽链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGDCMGWFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRI
5 KYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCSPADWGQGT
QVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQ
APGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCA
REGAYGYFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDK
10 RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
(SEQ ID NO: 43)

15 >1708-151H7 第一多肽链

HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPHYCMAWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGT
TYADSVKGRFTASRDNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDSPDGRCPPLGQGLNY
WGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMH
WVRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAV
20 YYCAREGAYGYFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTK
VDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPN
25 NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
(SEQ ID NO: 44)

>1708-151H8 第一多肽链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPHYCMAWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGT
 TYADSVKGRFTISRDNAGFSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAGDSPDGRCPPLGQGLNYW
 GQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYWMHW
 5 VRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVY
 YCAREGAYGYFFDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV D HKPSNTK
 VDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
 QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLT V L HQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
 10 SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
 (SEQ ID NO: 45)

1708-30H2、1708-151H7、1708-151H8 的第二多肽链均与 1708 的轻链相同
 (SEQ ID NO: 27)。

15 按常规方法进行抗体的瞬时转染、表达和纯化，经鉴定，得到本公开的全长
 抗 PVRIG/TIGIT 双抗。均显示了良好的表达量和纯度。

实施例 1-7. 抗 PVRIG/TIGIT 双抗的活性和功能验证

1、双特异性抗体与人 PVRIG 的结合及对配体 PVRL2 的阻断

依照实施例 1-2 的方法，进行实验。结果表明，不同构型的双特异性抗体
 20 1708-151-1、1708-151-2、1708-151-3、1708-151-4，与人 PVRIG 重组蛋白和过表
 达人 PVRIG 细胞的结合，以及对 PVRL2 结合 PVRIG 的阻断，基本一致、无差异。

2、双特异性抗体与人 TIGIT 的结合及对配体 PVR 的阻断

依照实施例 1-2 的方法(相应的受体和配体换为人 TIGIT 和人 PVR)，进行实验，
 结果如表 18 所示。结果表明，不同构型的双特异性抗体 1708-151-1、1708-151-2、
 25 1708-151-3、1708-151-4 和抗 TIGIT 抗体，与人 TIGIT 重组蛋白和过表达人 TIGIT
 细胞的结合，以及对 TIGIT 结合其配体 PVR 的阻断，基本一致、无差异。

可见，抗 PVRIG 抗体无论是连接到抗 TIGIT 抗体的重、轻链的 N 端或 C 端，
 都保持了对 PVRIG/TIGIT 的结合和配体的阻断，并且都显示了良好的表达量、纯
 度。

30 3、人源化抗 PVRIG/TIGIT 双抗与 PVRIG/TIGIT 的结合以及对相应配体的阻
 断

依照实施例 1-2 的方法，检测人源化抗 PVRIG/TIGIT 双抗对人和食蟹猴 PVRIG
 的结合，对人 PVRIG 的配体阻断。结果如表 18 所示。结果表明，各双抗均可以
 结合人 PVRIG，阻断 PVRIG 结合 PVRL2。

35

表 18. 人源化双特异性抗体对 PVRIG 的结合和配体阻断

抗体编号	与人 PVRIG 重组蛋白结合 EC ₅₀ (nM)	与人 PVRIG 过表达细胞结合 EC ₅₀ (nM)	阻断人 PVRIG 与人 PVRL2 结合 IC ₅₀ (nM)
1708-30H2	0.320	0.056	0.552
1708-151H7	0.679	0.043	0.598
1708-151H8	0.390	0.094	0.654
1708	无结合	无结合	未测试
Tab5	1.407	0.789	0.964
hIgG4	无结合	无结合	无阻断

与实施例 1-2 类似地,检测人源化抗 PVRIG/TIGIT 双抗对人和食蟹猴 TIGIT 的结合,对人 TIGIT 与配体结合的阻断,其中将 PVRIG 蛋白替换为 TIGIT,并将 PVRL2 替换为 PVR。结果如表 19 所示。结果表明,各双抗均可以结合人和食蟹猴 TIGIT,阻断 TIGIT 结合 PVR。

表 19. 人源化双特异性抗体对 TIGIT 的结合和配体阻断

抗体编号	与人 TIGIT 重组蛋白结合 EC ₅₀ (nM)	与人 TIGIT 过表达细胞结合 EC ₅₀ (nM)	阻断人 TIGIT 与人 PVR 结合 IC ₅₀ (nM)
1708-30H2	0.153	0.010	1.014
1708-151H7	0.160	0.012	0.773
1708-151H8	0.184	0.006	1.087
1708	0.133	0.0027	0.779
Tab5	无结合	无结合	未测试
hIgG4	无结合	无结合	无阻断

利用 Biacore 检测双抗与人 PVRIG、与人 TIGIT 的亲合力。将人源化双特异性抗体捕获于 Biacore 仪器(Biacore X100, GE)的 Protein A 生物传感芯片(GE lifesciences, 29127557)上,然后于芯片表面流经一系列浓度梯度下的人 PVRIG 抗原(AcroBiosystem, PVG-H52H4)或人 TIGIT 抗原(AcroBiosystem, TIT-H52H3),获得结合和解离曲线。结果见表 20。

表 20. 人源化双特异性抗体与人 PVRIG、人 TIGIT 的亲合力

抗体编号	抗原	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)
1708-30H2	人 PVRIG	1.29E+07	9.12E-03	7.06E-10
1708-151H7		6.06E+06	7.57E-04	1.25E-10
1708-30H2	人 TIGIT	3.08E+06	1.58E-04	5.12E-11
1708-151H7		1.40E+06	1.16E-04	8.28E-11

4、抗 PVRIG/TIGIT 双抗的混合淋巴细胞反应(MLR)实验

依照实施例 1-3 第 4 部分的方法,检测人源化抗 PVRIG/TIGIT 双抗对 T 细胞的活化能力。实验结果如图 2 和表 21 所示。结果显示,人源化抗 PVRIG/TIGIT 双抗 1708-151H8 具有明显的活化 T 细胞的能力,促进 T 细胞分泌 IFN γ 。重要的是,双特异性抗体的活性强于单用抗 PVRIG 抗体 151H8,单用抗 TIGIT 抗体 1708。

表21. 人源化双特异性抗体混合淋巴细胞反应IFN γ 分泌量

抗体编号	IFN γ (pg/mL) (平均值 $\pm$ 标准差)	
	20 nM 抗体	100 nM 抗体
hIgG4	74 $\pm$ 5	89 $\pm$ 12
151H8	124 $\pm$ 29	118 $\pm$ 11
1708	106 $\pm$ 16	125 $\pm$ 16
1708-151H8	303 $\pm$ 40	448 $\pm$ 40
Tab5	128 $\pm$ 8.9	185 $\pm$ 63
Pembrolizumab	未测试	444 $\pm$ 111

实施例 1-8. 抗 PVRIG/TIGIT 双抗体在人黑色素瘤 A375 混合人 PBMC 的小鼠皮下移植瘤模型中的抗肿瘤作用评估

5 为进一步探究双特异性抗体亚型在动物药效中的作用，进行动物药效试验。

其中，1708-IgG1 的重链全长与 1708 相同，只是重链恒定区亚型换为 IgG1；

1708-IgG1 的轻链全长和 1708-151-IgG1 的第二多肽链均与 1708 的轻链相同。

NCG 小鼠，雌性，4-8 周，体重约 18-22 g，购自江苏集萃药康生物科技有限公司。所有的 NCG 小鼠按照 SPF 级动物房 IVC 恒温恒压系统条件培养。

10 A375 细胞培养在含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液中。收集指数生长期的 A375 细胞，HBSS 重悬至适合浓度用于 NCG 小鼠皮下肿瘤接种。共培养所用的 A375 细胞需经过丝裂霉素 C 处理 2 h 后，PBS 洗三次。取正常人外周血，用密度梯度离心法分离人 PBMC，计数。然后用 RPMI1640 培养基(含 IL2 和 10% FBS)将 PBMC 重悬至 3×10^6 个/mL 的浓度，与丝裂霉素 C 处理后的 A375 细胞共培养。

15 共培养 6 天后，收取 PBMC，同时收取新鲜消化下来的 A375 细胞。每只小鼠接种：PBMC 5×10^5 个，A375 细胞 4×10^6 个；接种体积：0.2 mL/只(含 50% Matrigel)；接种于雌性 NCG 小鼠右侧皮下。根据小鼠体重随机进行分组给药，详细的给药方法、给药剂量和给药途径见表 22，分组给药当天为第 0 天。由于抗 PVRIG 抗体和抗 TIGIT 抗体的分子量不同，该给药剂量保证了抗 PVRIG 抗体与抗 TIGIT 抗体拥有同样的起始摩尔浓度。

20

表 22. 给药方案

组别	给药组	N	剂量 (mg/kg)	给药方案 给药方式
1	hIgG1	7	30	Q2D (i.p)
2	151-IgG4	7	16.1	
3	1708-IgG1	7	30	
4	151-IgG4+1708-IgG1	7	16.1+30	
5	1708-151-IgG4	7	35.8	

(注：N：使用动物数量；i.p.：腹腔注射；Q2D：两天一次；给药体积：根据荷瘤鼠体重调整给药体积(0.1mL/10g)。)

给药开始后，小鼠每周 2 次测量体重及肿瘤体积。实验结果分别见表 23 和图 3A、3B。

5 表 23.抗 PVRIG/TIGIT 双抗在小鼠人源 A375 肿瘤模型中的抑瘤效果

组别	第 0 天肿瘤体积 (mm ³)	第 26 天肿瘤体积 (mm ³) (平均值±标准差)	TGI(%)	T/C (%)	p 值
1	0±0	1913.62±188.23	--	--	--
2	0±0	1942.70±223.36	-1.52	101.52	0.916
3	0±0	958.83±204.39	49.89	50.11	<0.001***
4	0±0	876.21±243.70	54.21	45.79	<0.001***
5	0±0	79.99±36.57	95.82	4.18	<0.001***

(注：与对照组(hIgG1)组比较，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001 即认为具有显著性差异。)

实验结束时(给药后第 26 天)，与对照组相比，抗 PVRIG 抗体 151-IgG4 单药组没有明显差异。抗 TIGIT 抗体 1708-IgG1 单药组，抗 PVRIG 抗体 151-IgG4 与抗 TIGIT 抗体 1708-IgG1 联用组，肿瘤体积下降。而 1708-151-IgG4 双抗组甚至可以完全抑制肿瘤的生长，与其它组间具有显著性差异(见图 3B)。

根据小鼠体重随机进行分组给药，详细的给药方法、给药剂量和给药途径见表 24，分组给药当天为第 0 天。

表 24.给药方案

组别	给药组	数量	剂量 (mg/kg)	给药方案 给药方式
1	hIgG4	7	35.8	Q2D (i.p)
2	1708-30H2-IgG4	7	12	
3	1708-151H7-IgG4	7	12	

(注：N：使用动物数量；i.p.：腹腔注射；Q2D：两天一次；给药体积：根据荷瘤鼠体重调整给药体积(0.1mL/10g)。)

给药开始后，小鼠每周 2 次测量体重及肿瘤体积。实验结果分别见表 25 和图 4A-4B。

表 25. 抗 PVRIG/TIGIT 双抗在小鼠人源 A375 肿瘤模型中的抑瘤效果

组别	第 0 天肿瘤体积 (mm ³)	第 28 天肿瘤体积(mm ³) (平均值±标准差)	TGI(%)	T/C (%)	p 值
1	0±0	2239.26±322.87	--	--	--
2	0±0	1435.36±117.61	35.90	64.10	<0.05*
3	0±0	1468.96±67.07	34.40	65.60	<0.05*

(注：与对照组(hIgG1)组比较，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001 即认为具有显著性差异。)

实验结束时(给药后第 28 天)，与对照组相比，1708-30H2 与 1708-151H7 双抗

组均可以在低剂量下有效抑制肿瘤生长，与对照组间具有显著性差异(见图 4B)。

实施例 2. 评价抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体联合抗 PD-L1 抗体对人黑色素瘤 A375 混合 PBMC 皮下移植瘤模型的抗肿瘤作用

1、受试药物及材料

药物 A: 1708-30H2(抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体), 参考前述实施例 1 方法制备, 使用 PBS 配制 3.58 mg/mL 溶液;

药物 B: 抗 PD-L1 抗体(Adebrelimab), 参考 WO2017084495 制备, 使用 NS(生理盐水)配制 1.0 mg/mL 溶液;

阴性对照: 同种型 IgG4, 上海恒瑞医药有限公司提供, 用 PBS 稀释。

细胞: 人黑色素瘤 A375 细胞, 来源于中国科学院上海生命科学研究院。

实验动物: NCG 小鼠, 雌性, 体重约 18-22g。购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。

药物 B(抗 PD-L1 抗体)抗体序列如下:

>抗 PD-L1 抗体重链可变区:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIGPNSG
FTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGGSSYDYFDYWGQGT
VTVSS (SEQ ID NO: 46)

>抗 PD-L1 抗体轻链可变区:

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPKLLIYAASNLES
GVPARFSGSGSGTDFTLTNPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 47)

上述抗体重轻链可变区序列中, 下划线部分为 CDR 区, 各序列依次顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。其中各抗体轻重链中 CDR 序列如表 26 所示。

表26. 抗PD-L1抗体重链及轻链CDR区序列(Kabat编号规则)

抗体	重链		轻链	
药物B	HCDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 48)	LCDR1	RASESVSIHGTHLMH (SEQ ID NO: 51)
	HCDR2	RIGPNSGFTSYNEKFKN (SEQ ID NO: 49)	LCDR2	AASNLES (SEQ ID NO: 52)
	HCDR3	GGSSYDYFDY (SEQ ID NO: 50)	LCDR3	QQSFEDPLT (SEQ ID NO: 53)

>抗 PD-L1 抗体重链全长: (Fc 区带有 S228P, F234A, L235A 突变)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIGPNSG
FTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGGSSYDYFDYWGQGT
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEAA
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 54)

>抗 PD-L1 抗体轻链全长:

5 DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPPELLIYAASNLES
GVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQQSFEDPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO: 55)

2、实验方法

10 A375 细胞培养在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养液中。收集对数生
长期的 A375 细胞，HBSS 重悬至适合浓度用于 NCG 小鼠皮下肿瘤接种。共培养
实验中用的 A375 细胞用丝裂霉素 C 处理 2h，然后 PBS 洗三次。取复苏的 PBMC
加入经丝裂霉素 C 处理的 A375 细胞中，PBMC 与 A375 共培养 5 天，培养液为含
15 IL-2 和 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液。PBMC 与 A375 共培养 5 天后，收取 PBMC
与新鲜消化下来的 A375 细胞，PBMC 4×10⁵ 个，A375 细胞 4×10⁶ 个，接种体积
0.2 mL/只(含 50% 基质胶)，接种于 NCG 小鼠右侧皮下。接种后，根据小鼠体重
随机进行分组给药，详细的给药方法、给药剂量和给药途径见表 27，分组给药当
天为第 0 天。

表 27. 分组及给药方案

组别	实验组	N	剂量	给药方案	给药方式
1	阴性对照	7	--	--	i.p.
2	药物A	7	35.8 mg/kg	BIW*3	i.p.
3	药物B	7	10mg/kg	BIW*3	i.p.
4	药物B+药物A	7	10 mg/kg+35.8 mg/kg	BIW*3	i.p.
				BIW*3	i.p.

20 (注: N: 使用动物数量; i.p.: 腹腔注射; BIW*3: 每周两次, 给药 3 周, 共 6 次)

给药第 14 天, 药物 B 改为每周一次; 给药第 21 天, 只给药物 B 每周一次和药
物 A 每周两次; 给药第 28 天, 只给药物 A 每周两次。

3、评估指标

25 肿瘤体积测量: 使用游标卡尺每周两次测量, 肿瘤体积计算公式为 $V = 0.5 \times a \times b^2$, 其中, a、b 分别代表肿瘤的长径和宽径。

肿瘤生长抑制率 $TGI(\%) = (1 - T/C) \times 100\%$ 。T/C %为肿瘤相对增殖率, $T/C \% = (T_i - T_0) / (V_i - V_0) \times 100\%$, 即在某一时间点, T_i 为给药组开始给药后的平均肿瘤体
积, T₀ 为给药组首次给药时的平均肿瘤体积, V₀ 为溶媒对照组首次给药时的平均
肿瘤体积, V_i 为溶媒对照组开始给药后的平均肿瘤体积。

30 荷瘤鼠体重测量: 所有荷瘤鼠体重每周测量两次。体重变化用公式
 $RCBW \% = (BW_i - BW_0) / BW_0 \times 100\%$, BW_i 是小鼠当前体重, BW₀ 是分组当日的小

鼠体重。

数据均用 Graphpad 进行分析,采用平均值±SEM 表示。用 Graphpad 中 student's t test 比较受试药物组与对照组的组间差异, P < 0.05 认为具有显著性差异。

4、实验结果

5 如表 28 所示,给药第 23 天后,阴性对照组平均肿瘤体积为 1033.50±83.02mm³; 药物 A (35.8mg/kg) 给药组、药物 B (10mg/kg) 给药组、药物 B (10mg/kg) + 药物 A (35.8mg/kg) 给药组的肿瘤平均体积分别为 872.37±78.44mm³、 360.48±63.85mm³、193.20±39.49mm³, 其肿瘤生长抑制率(TGI)分别为 15.59%、 65.12%、81.31%。

10 表 28. 各组小鼠肿瘤平均体积 (平均值±SEM)

组别	实验组	肿瘤体积 (mm ³)			TGI % 第 23 天	T/C % 第 23 天	P 值 第 23 天 (与阴性对照组相比)	P 值 第 23 天 (3 组与 6 组相比)
		第 0 天	第 23 天	第 30 天				
1	阴性对照	0±0	1033.50±83.02	--	--	--	--	--
2	药物 A(35.8mg/kg)	0±0	872.37±78.44	--	15.59	84.41	0.184	--
3	药物 B(10mg/kg)	0±0	360.48±63.85	--	65.12	34.88	<0.001***	--
4	药物 B(10mg/kg)+ 药物 A(35.8mg/kg)	0±0	193.20±39.49	--	81.31	18.69	<0.001***	0.046*

(注: p < 0.05 即认为具有显著性差异。)

如表 29 所示,给药第 24 天时,结束阴性对照组、药物 A(35.8mg/kg)给药组、药物 B(10mg/kg)给药组和药物 B(10mg/kg) +药物 A(35.8mg/kg)给药组实验,其肿瘤平均重量分别为 1.111±0.103g, 0.986±0.078g、0.473±0.071g 和 0.257±0.043g。

15 表 29. 各组小鼠肿瘤平均重量 (平均值±SEM)

组别	实验组	动物数 开始/ 结束	第 24 天 瘤重(g)	T/C% 第 24 天	P 值 第 24 天 (与阴性对照组相比)	P 值 第 24 天 (3 组与 6 组相比)
1	阴性对照	7/7	1.111±0.103	--	--	--
2	药物 A(35.8mg/kg)	7/7	0.986±0.078	88.73	0.353	--
3	药物 B(10mg/kg)	7/7	0.473±0.071	42.61	0.003***	--

4	药物 B(10mg/kg) + 药物 A(35.8mg/kg)	7/7	0.257±0.043	23.12	<0.001***	0.023*
---	------------------------------------	-----	-------------	-------	-----------	--------

(注: * $p < 0.05$ 即认为具有显著性差异。)

参见图 5A 和图 5B、表 28 和表 29, 与阴性对照组相比, 药物 B(10mg/kg)给药组和药物 B(10mg/kg)+药物 A(35.8mg/kg)给药组的肿瘤体积与肿瘤重量均存在统计学上的显著性差异($p < 0.05$), 表明上述药物具有明显抑制肿瘤生长的作用。与

5 药物 B(10mg/kg)给药组相比, 药物 B(10mg/kg)+药物 A(35.8mg/kg)联合给药组的肿瘤体积与肿瘤重量存在统计学上的显著性差异($p < 0.05$), 表明药物 B(10mg/kg)+药物 A(35.8mg/kg)联合给药具有更好抑制肿瘤生长的作用。

此外, 本次实验中, 所有给药组的小鼠均无行为异常表现, 表明荷瘤小鼠对该受试剂量下的药物具有良好的耐受性, 参见图 5C、图 5D 和表 30。

10 表 30. 各组小鼠体重变化情况 (平均值±SEM)

组别	实验组	动物数 开始/结束	平均体重 (g)		体重变化率 (%)
			第 0 天	第 23 天	
1	阴性对照	7/7	20.70±0.38	24.56±0.48	18.79±2.28
2	药物 A(35.8mg/kg)	7/7	20.69±0.49	23.43±0.37	13.51±2.45
3	药物 B(10mg/kg)	7/7	20.67±0.46	22.64±0.71	11.48±2.69
4	药物 B(10mg/kg) + 药物 A(35.8mg/kg)	7/7	20.70±0.53	23.42±0.58	13.44±3.49

实施例 3. 评价抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体联合含抗 PD-L1 抗体的融合蛋白对人黑色素瘤 A375 混合 PBMC 皮下移植瘤模型的抗肿瘤作用

1、受试药物及材料

15 药物 A: 1708-30H2(抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体), 参考 PCT/CN2021/080470 制备, 使用 PBS 配制成 3.58 mg/mL 或 0.72 mg/mL 溶液;

药物 C: 含抗 PD-L1 抗体的融合蛋白(融合蛋白 9), 参考 WO20200941225 中制备, 使用 PBS 配制成 0.1 mg/mL 溶液;

阴性对照: 同种型 IgG4, 上海恒瑞医药有限公司提供, 用 PBS 稀释。

20 细胞: 人黑色素瘤 A375 细胞, 来源于中国科学院上海生命科学研究院。

实验动物: NCG 小鼠, 雌性, 体重约 18-22g。购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。

药物 C 是抗 PD-L1 抗体通过(G₄S)₄G 连接子与 TGF-βRII ECD 连接的融合蛋白, 所述抗 PD-L1 抗体即是实施例 2 中的药物 B 抗体, 其中 TGF-βRII ECD 序列是在

25 N 端有 19 个氨基酸的截短或缺失, 如下所示:

>TGF- β RII ECD

GAVKFPQLCKFCDFVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC
HDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
(SEQ ID NO: 56)

5 >抗 PD-L1 抗体重链全长(Fc 区带有 S228P, F234A, L235A, K447A 突变)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIGPNSG
FTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSSYDYFDYWGQGTT
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEAA
10 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLT
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLA (SEQ ID NO: 78)

>抗 PD-L1 抗体轻链全长(SEQ ID NO:55)

15 >融合蛋白 9(PD-L1 抗体与 TGF- β RII ECD 融合蛋白)的第一多肽链

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIGPNSG
FTSYNEKFKNRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSSYDYFDYWGQGTT
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEAA
20 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLT
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
GAVKFPQLCKFCDFVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC
25 HDPKLPYHDFILEDAAAPKICIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
(SEQ ID NO:77)

下划线为连接子序列, 融合蛋白 9(PD-L1 抗体与 TGF- β RII ECD 融合蛋白)的第二多肽链如 SEQ ID NO:55 所示。

融合蛋白 9 由两条相同的第一多肽链和两条相同的第二多肽链构成。

30 2、实验方法

A375 细胞培养在含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液中。收集对数生长期的 A375 细胞, HBSS 重悬至适合浓度用于 NCG 小鼠皮下肿瘤接种。共培养实验中用的 A375 细胞用丝裂霉素 C 处理 2h, 然后 PBS 洗三次。取正常人外周血, 用密度梯度离心法分离人 PBMC, 计数。然后用 RPMI1640 培养基(含 IL-2 和 10% FBS)
35 将 PBMC 重悬, 与丝裂霉素 C 处理后的 A375 细胞共培养。PBMC 与 A375 共培养 6 天后, 收取 PBMC 与新鲜消化下来的 A375 细胞, PBMC 5×10^5 个, A375 细胞 4×10^6 个, 接种体积 0.2 mL/只(含 50% Matrigel), 接种于 NCG 小鼠右侧皮下。接种后, 根据小鼠体重随机进行分组给药, 详细的给药方法、给药剂量和给药途径见表 31, 分组给药当天为第 0 天。

40

表 31. 分组及给药方案

组别	给药组	IgG	N	剂量	给药方案	给药方式
1	阴性对照	IgG4	7	35.8 mg/kg	BIW*8	i.p.
2	药物A	IgG4	7	7.2 mg/kg	BIW*8	i.p.
3	药物A	IgG4	7	35.8 mg/kg	BIW*8	i.p.
4	药物C	IgG4	7	1 mg/kg	BIW*8	i.p.
5	药物A+药物C	均 IgG4	7	35.8 mg/kg+1 mg/kg	BIW*8	i.p.
					BIW*8	i.p.

(注：N：使用动物数量；i.p.：腹腔注射；BIW*8：每周两次，给药 8 次)

评估指标参考实施例 2。数据均用 Graphpad 进行分析，采用平均值±SEM 表示。用 Graphpad 中 One way ANOVA LSD(L) test 比较受试药物组与对照组的组间差异，P<0.05 即认为具有显著性差异。

3、实验结果

如表 32 所示，给药第 22 天后，给药组的肿瘤生长抑制率(TGI)分别为 44.87%、50.54%、68.14%和 78.93%。瘤重结果参见表 33。

表 32. 各组小鼠肿瘤平均体积 (平均值±SEM)

组别	实验组	肿瘤体积 (mm ³)		TGI%	T/C%	P 值
		第 0 天	第 22 天			
1	阴性对照	0±0	545.66±134.01	--	--	--
2	药物 A(7.2mg/kg)	0±0	300.83±50.17	44.87	55.13	0.011*
3	药物 A(35.8mg/kg)	0±0	269.9±43.09	50.54	49.46	0.004**
4	药物 C(1mg/kg)	0±0	173.84±55.76	68.14	31.86	<0.001***
5	药物 A(35.8mg/kg)+ 药物 C(1mg/kg)	0±0	114.98±9.54	78.93	21.07	<0.001***

(注：p<0.05 即认为具有显著性差异。)

表 33. 各组小鼠肿瘤平均重量 (平均值±SEM)

组别	实验组	动物数 开始/结束	第 22 天 肿瘤重量 (g)	T/C%	P 值
1	阴性对照	7/7	0.550±0.135	--	--
2	药物 A(7.2mg/kg)	7/7	0.311±0.056	56.55	0.017*
3	药物 A(35.8mg/kg)	7/7	0.293±0.044	53.30	0.010*
4	药物 C(1mg/kg)	7/6	0.190±0.065	34.45	<0.001***
5	药物 A(35.8 mg/kg)+药物 C(1 mg/kg)	7/7	0.130±0.009	23.58	<0.001***

(注: $p < 0.05$ 即认为具有显著性差异。)

结果显示, 与阴性对照组相比, 药物 A(7.2mg/kg)给药组、药物 A(35.8mg/kg)给药组、药物 C(1mg/kg)给药组和药物 A(35.8 mg/kg)+药物 C(1 mg/kg)给药组的肿瘤体积与肿瘤重量均存在统计学上的显著性差异($p < 0.05$), 表明上述药物具有明显抑制肿瘤生长的作用(见图 6A、图 6B、表 32 和表 33)。

本次实验过程中, 各组小鼠的体重以及临床前的行为学均未出现明显异常变化(见图 6C 和图 6D), 表明荷瘤小鼠对测试剂量下的各受试药物具有良好的耐受性。

实施例 4. 评价抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体联合抗 PD-1 抗体对人黑色素瘤 A375 混合 PBMC 皮下移植瘤模型的抗肿瘤作用

1、受试药物及材料

药物 A: 1708-30H2(抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体), 参考 PCT/CN2021/080470 制备, 使用 PBS 配制成 3.58 mg/mL 或 0.72 mg/mL 溶液;

药物 D: 抗 PD-1 抗体(Hu23-11.IgG4AA), 参考 WO2020156509 制备, 使用 PBS 配制成 0.1 mg/mL 溶液;

阴性对照: 同种型 IgG4, 上海恒瑞医药有限公司提供, 用 PBS 稀释。

细胞: 人黑色素瘤 A375 细胞, 来源于中国科学院上海生命科学研究院。

实验动物: NCG 小鼠, 雌性, 体重约 18-22g。购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。

药物 D(抗 PD-1 抗体)抗体序列如下:

>抗 PD-1 抗体重链可变区

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS~~DYEMH~~WVRQAPGQGLEWMGL~~LIDPETG~~
GTVYNQKF~~KDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARERFSYYGSTSDWYFDV~~
WGQGTTVTVSS(SEQ ID NO: 57)

>抗 PD-1 抗体轻链可变区:

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASIS~~RSSQSLVHSTGNTYLE~~WYWLQKPGQSPQLLIY~~KVSNRF~~
~~SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGGGTKVEIK~~(SEQ ID
NO: 58)

上述抗体重轻链可变区序列中, 下划线部分为 CDR 区, 各序列依次顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。其中各抗体轻重链中 CDR 序列如表 34 所示。

表34. 抗PD-1抗体重链及轻链CDR区序列

抗体	重链		轻链	
药物D	HCDR1	DYEMH (SEQ ID NO: 59)	LCDR1	RSSQSLVHSTGNTYLE (SEQ ID NO: 62)
	HCDR2	LIDPETGGTVYNQKF KD (SEQ ID NO: 60)	LCDR2	KVSNRFS (SEQ ID NO: 63)
	HCDR3	ERFSYYGSTSDWYFDV	LCDR3	FQGSHPVPT

		(SEQ ID NO: 61)		(SEQ ID NO: 64)
--	--	-----------------	--	-----------------

>抗 PD-1 抗体重链全长

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYEMHWVRQAPGQGLEWMGLIDPETGG
TVYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARERFSYYGSTSDWYFDVW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
5 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK(SEQ ID NO: 65)

10 >抗 PD-1 抗体轻链全长

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPTTFGGGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO: 66)

15 2、实验方法

A375 细胞培养、PBMC 的分离以及二者的共培养和混合接种步骤参考实施例 2。根据小鼠体重随机进行分组给药,具体给药方法、给药剂量和给药途径见表 35, 分组给药当天为第 0 天

表 35. 分组及给药

组别	给药组	N	剂量	给药方案	给药方式
1	阴性对照	7	35.8 mg/kg	Q2D*18	i.p.
2	药物A	7	35.8 mg/kg	Q2D*18	i.p.
3	药物D	7	1 mg/kg	BIW*5	i.p.
4	药物A+药物D	7	35.8 mg/kg+1 mg/kg	Q2D*18+BIW*5	i.p.

20 (N: 使用动物数量; i.p.: 腹腔注射; Q2D*18: 两天一次, 给药 18 次; BIW*5, 每周 2 次, 给药 5 周, 共 10 次)

评估指标参考实施例 2。数据均用 Graphpad 进行分析,采用平均值±SEM 表示。用 Graphpad 中 student's t test 比较受试药物组与对照组的组间差异, $P < 0.05$ 即认为具有显著性差异。

25 3、实验结果

如表 36 所示, 给药第 35 天后, 与阴性对照组相比, 药物 A 组, 药物 D 组, 药物 A+药物 D 联用组的肿瘤体积均减小, 给药组肿瘤生长抑制率(TGI)分别为 33.75%、82.58%和 94.80%, 其中药物 D 组($p < 0.001$)和联用组($p < 0.001$)表现出显著的肿瘤生长的抑制作用。与药物 A 组相比, 联用组能显著抑制肿瘤的生长(33.75% vs 94.80%, $p < 0.05$); 与药物 D 组相比, 联合组虽未显示出显著性差异($p = 0.057$), 但肿瘤体积减小, 联用组的肿瘤生长抑制率更优(82.58% vs 94.80%), 表明药物 A

与药物 D 联合组具有更好的抑瘤效果(见图 7A 和表 36)。

表 36. 各组小鼠肿瘤平均体积 (平均值±SEM)

组别	实验组	肿瘤体积 (mm ³)		TGI% 第 35 天	T/C% 第 35 天	P 值 第 35 天 (与阴性对照相比)	P 值 第 35 天 (与阴性对照相比)
		第 0 天	第 35 天				
1	阴性对照	0±0	2770.97±273.59	--	--	--	<0.001***
2	药物 A(35.8 mg/kg)	0±0	1835.83±436.08	33.75	66.25	0.371	0.003**
3	药物 D(1 mg/kg)	0±0	482.59±142.32	82.58	17.42	<0.001***	0.057
4	药物 A(35.8 mg/kg) + 药物 D(1 mg/kg)	0±0	144.18±40.87	94.80	5.20	<0.001***	--

(注： *p < 0.05 即认为具有显著性差异。)

表 37. 各组小鼠肿瘤平均重量 (平均值±SEM)

组别	实验组	动物数 开始/结束	肿瘤重量 (g) 第 35 天	肿瘤重量 (g) 第 40 天	T/C% 第 35 天	P 值 第 40 天 (3 组与 4 组相比)
1	阴性对照	7/7	2.900±0.343	--	--	--
2	药物 A(35.8 mg/kg)	7/6	1.949±0.488	--	67.22	--
3	药物 D(1 mg/kg)	7/6	--	1.219±0.359	--	--
4	药物 A(35.8 mg/kg) + 药物 D(1 mg/kg)	7/5	--	0.320±0.095	--	<0.05*

5 (注：与药物 D 单药组相比， *p < 0.05，即认为具有显著性差异。)

与药物 D 单药组相比，药物 A+药物 D 联用组的肿瘤重量显著性减小(p< 0.05)，表明药物 A 与药物 D 联合组具有的强的抑制肿瘤生长作用，联合给药表现出更好抑瘤效果(见图 7B 和表 37)。

10 本次实验过程中，药物 A 单药组和药物 A+药物 D 联用组在 D35 和 D32 各出现一只动物死亡，可能小鼠对 PBMC 引起的排斥反应导致的。其他小鼠的体重以及临床前的行为学均未出现明显异常变化，表明荷瘤小鼠对测试剂量下的各受试药物具有良好的耐受性(见图 7C)。

权利要求书:

1. PVRIG/TIGIT 结合蛋白与免疫检查点抑制剂联合在制备治疗癌症的药物中的用途, 其中, 所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白包含特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域和特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域, 所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域包含免疫球蛋白单一可变结构域, 所述免疫球蛋白单一可变结构域包含:

如 SEQ ID NO: 2 和 15-19 中任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3, 或
如 SEQ ID NO: 3 和 21-25 中任一所示氨基酸序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3, 所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的;

优选地, 根据 Kabat 编号系统, 所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别

如 SEQ ID NO: 4、5 和 20 所示,
如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示, 或
如 SEQ ID NO: 7、8 和 9 所示;

更优选地, 所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白为抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体或其抗原结合片段。

20

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中, 所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域为人源化、亲合力成熟、去除 T 细胞表位、降低抗体脱酰胺和/或降低抗体异构化的,

优选地, 人源化改造过程使用的人种系模板的重链框架区为 IGHV3-7 *01。

25

3. 如权利要求 1 或 2 所述的用途, 其中, 所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域中的免疫球蛋白单一可变结构域的氨基酸序列分别如

SEQ ID NO: 2 和 15-19 中任一所示或与之具有至少 90%序列同一性; 或
SEQ ID NO: 3 和 21-25 中任一所示或与之具有至少 90%序列同一性。

30

4. 如前述权利要求中任一项所述的用途, 其中所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL), 其中:

所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 32、33 和 34 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 和所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 35、36 和 37 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

35

5. 如前述权利要求中任一项所述的用途, 其中所述特异性结合 TIGIT 的第二

抗原结合结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 38-40 中任一所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和

所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 41 或 42 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列；

优选地，所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 38 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，和

所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 42 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

10

6. 如前述权利要求中任一项所述的用途，其中所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白还包含人免疫球蛋白 Fc 区；

优选地，所述 Fc 区是人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区；

更优选地，所述人 IgG4 的 Fc 区具有 S228P、F234A、L235A 和/或 K447A 突变。

15

7. 如前述权利要求中任一项所述的用途，其中所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域和特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域直接或通过连接子相连接；

优选地，所述连接子为具有如 $(G_4S)_x$ 所示的氨基酸序列，其中，x 独立地选自 1-20 的整数；

更优选地，所述连接子为 $(G_4S)_2$ 、 $(G_4S)_3$ 、 $(G_4S)_4$ 所示的氨基酸序列。

20

8. 如前述权利要求中任一项所述的用途，其中所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

25

所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域的重链可变区的 N 端；

所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域的重链可变区的 C 端；

所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域的轻链可变区的 N 端；或

30

所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域的免疫球蛋白单一可变结构域位于特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域的轻链可变区的 C 端。

9. 如前述权利要求中任一项所述的用途，其中所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白包含第一多肽链和第二多肽链，其中：

35

所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO: 28-29 和 43-45 中任一所示或与其具有至

少 90% 序列同一性的氨基酸序列，所述第二多肽链包含如 SEQ ID NO: 27 所示或与其具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列；或者

所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO: 26 所示或与其具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列，所述第二多肽链包含如 SEQ ID NO: 30 或 31 所示或与其具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列。

10. 如权利要求 9 所述的用途，其中所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白包含两条相同的第一多肽链和两条相同的第二多肽链。

11. 如前述权利要求中任一项所述的用途，其中所述免疫检查点抑制剂为 PD-1/PD-L1 信号通路抑制剂；

优选地，所述 PD-1/PD-L1 信号通路抑制剂选自抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、所述抗体的抗原结合片段、或包含所述抗体或其抗原结合片段的融合蛋白；

更优选地，所述抗 PD-1 抗体选自 Camrelizumab、Sintilimab、Cemiplimab、JS-001、Nivolumab、Tislelizumab、Pembrolizumab、AK-103、Dostarlimab、PD1-PIK、GLS-010、Genolimzumab、BI-754091、Spartalizumab、MGA-012、PF-06801591、XmAb-20717、CS-1003、Sym-021、AGEN-2034、MEDI-5752、MGD-013、AK-105、AK-104、BCD-100、PF-06753512、HLX-10、AMP-224 和 LZM-009；所述抗 PD-L1 抗体选自 Adebrelimab、Avelumab、Atezolizumab、Durvalumab、CS-1001、M-7824、KL-A167、CX-072、BGB-A333、GNS-1480、CA-170 和 BMS-936559；所述包含 PD-L1 抗体的融合蛋白选自 M7824、GS-19、TS-1905、TST-005、HBM-7015、PM-8001 和抗 PDL1-TGF β RIIcd。

12. 如权利要求 11 所述的用途，其中所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：

所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO:59、60 和 61 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO:62、63 和 64 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO:67、68 和 69 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO:70、71 和 72 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

优选地，所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 57 所示或与之具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 58 所示或与之具有至少 90% 同一性的氨基酸序列；或

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 73 所示或与之具有至少 90% 同一性的氨基酸序列，轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 74 所示或与之具有至少 90% 同一性的

氨基酸序列。

13. 如权利要求 12 所述的用途,其中所述抗 PD-1 抗体或其抗原结合片段还包含人免疫球蛋白 Fc 区;

5 优选地,所述 Fc 区是人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区;

更优选地,所述人 IgG4 的 Fc 区具有 S228P、F234A、L235A 和/或 K447A 突变。

14. 如权利要求 12 或 13 所述的用途,其中所述抗 PD-1 抗体包含重链(HC)和
10 轻链(LC),其中:

所述重链包含如 SEQ ID NO: 65 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列,所述轻链包含如 SEQ ID NO: 66 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列;或

所述重链包含如 SEQ ID NO: 75 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序
15 列,所述轻链包含如 SEQ ID NO: 76 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

15. 如权利要求 11 所述的用途,所述抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中:

20 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO:48、49 和 50 所示氨基酸序列的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO:51、52 和 53 所示氨基酸序列的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

优选地,所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 46 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 47 所示或与之具有至少
25 90%同一性的氨基酸序列。

16. 如权利要求 15 所述的用途,其中所述抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段还包含人免疫球蛋白 Fc 区;

优选地,所述 Fc 区是人 IgG1 或 IgG4 的 Fc 区;

30 更优选地,所述人 IgG4 的 Fc 区具有 S228P、F234A、L235A 和/或 K447A 突变。

17. 如权利要求 15 或 16 所述的用途,其中所述抗 PD-L1 抗体包含重链(HC)和轻链(LC),其中:

35 所述重链包含如 SEQ ID NO: 54 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列,所述轻链包含如 SEQ ID NO: 55 所示或与之具有至少 80%同一性的氨基酸序列。

18. 如权利要求 11、15 至 17 任一项所述的用途，其中所述包含抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段的融合蛋白中还包含 TGF- β RII ECD 结构域，

优选地，所述 TGF- β RII ECD 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示。

5

19. 如权利要求 18 所述的用途，其中所述包含抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段的融合蛋白中，TGF- β RII ECD 结构域通过连接子与重链全长的 C 端连接，所述连接子优选为(G₄S)₄G。

10

20. 如权利要求 19 所述的用途，其中所述包含抗 PD-L1 抗体或其抗原结合片段的融合蛋白包含第一多肽链和第二多肽链，其中：

所述第一多肽链包含如 SEQ ID NO: 77 或 78 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列，所述第二多肽链包含如 SEQ ID NO: 55 所示或与之具有至少 90%同一性的氨基酸序列。

15

21. 如前述权利要求任一项所述的用途，所述癌症选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、结直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌、血液系统癌症，或其任意组合；

优选地，所述癌症为晚期或转移性的。

20

22. 药物组合物，其含有 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂，其中所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白如权利要求 1 至 10 中任一项所定义，所述免疫检查点抑制剂如权利要求 11-20 中任一项所定义；优选地，所述药物组合物进一步包含至少一种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

25

23. 一种治疗或缓解癌症的方法，所述方法包括向有需要的受试者同时、相继、或分开地施用治疗或缓解有效量的 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂；其中，所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白如权利要求 1 至 10 中任一项所定义，所述免疫检查点抑制剂如权利要求 11-20 中任一项所定义；

30

优选地，所述癌症选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、结肠癌、结直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌、血液系统癌症，或其任意组合。

35

24. 用于治疗或缓解癌症的药物组合，其包含 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂；其中，所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白如权利要求 1 至 10 中任一项所定义，所述免疫检查点抑制剂如权利要求 11-20 中任一项所定义；

优选地，所述癌症选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌、食管癌、胃癌、

结肠癌、结直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌、血液系统癌症，或其任意组合。

25. 如权利要求 24 所述的用于治疗或缓解癌症的药物组合，其中所述
5 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和免疫检查点抑制剂具有抑制癌细胞生长的协同作用，相较于单药疗法，能够显著改善免疫检查点抑制剂的抑癌效果。

26. 一种活化 NK 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和/或 Th1 细胞的方法，所述方法包含向有需要的受试者同时、相继、或分开地施用有效量的 PVRIG/TIGIT 结合蛋白和免疫检
10 查点抑制剂；其中，所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白如权利要求 1 至 10 中任一项所定义，所述免疫检查点抑制剂如权利要求 11-20 中任一项所定义。

27. 一种增加受试者体内的 IFN- γ 产生和/或促炎性细胞因子分泌的方法，所述方法包含向有需要的受试者同时、相继、或分开地施用有效量的 PVRIG/TIGIT 结
15 合蛋白和免疫检查点抑制剂；其中，所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白如权利要求 1 至 10 中任一项所定义，所述免疫检查点抑制剂如权利要求 11-20 中任一项所定义。

28. 一种抑制 PD-1 活性或促进 T 细胞增殖或使受试者从免疫反应上调获益的方法，所述方法包括向受试者同时、相继、或分开地施用有效量的 PVRIG/TIGIT
20 结合蛋白和免疫检查点抑制剂；其中，所述 PVRIG/TIGIT 结合蛋白如权利要求 1 至 10 中任一项所定义，所述免疫检查点抑制剂如权利要求 11-20 中任一项所定义。

说明书附图:

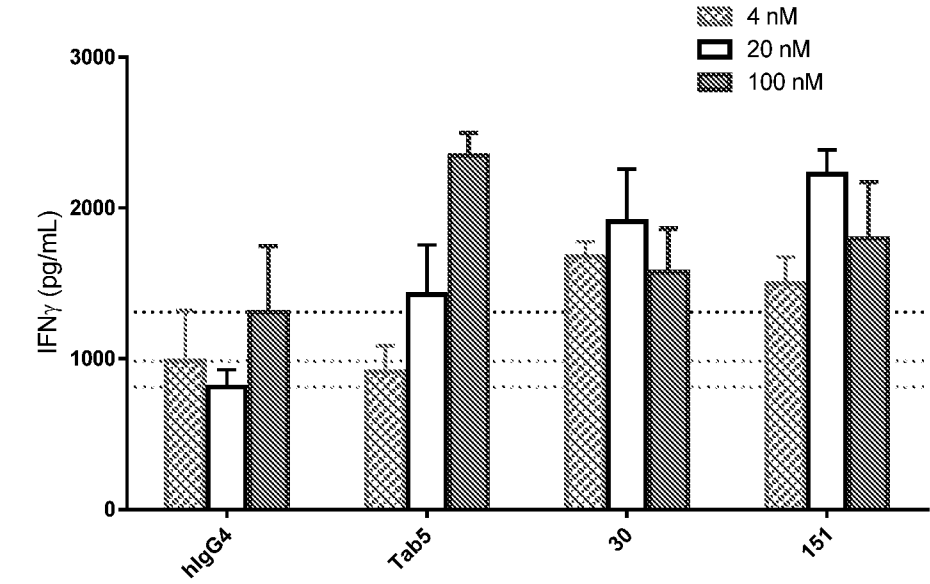


图 1

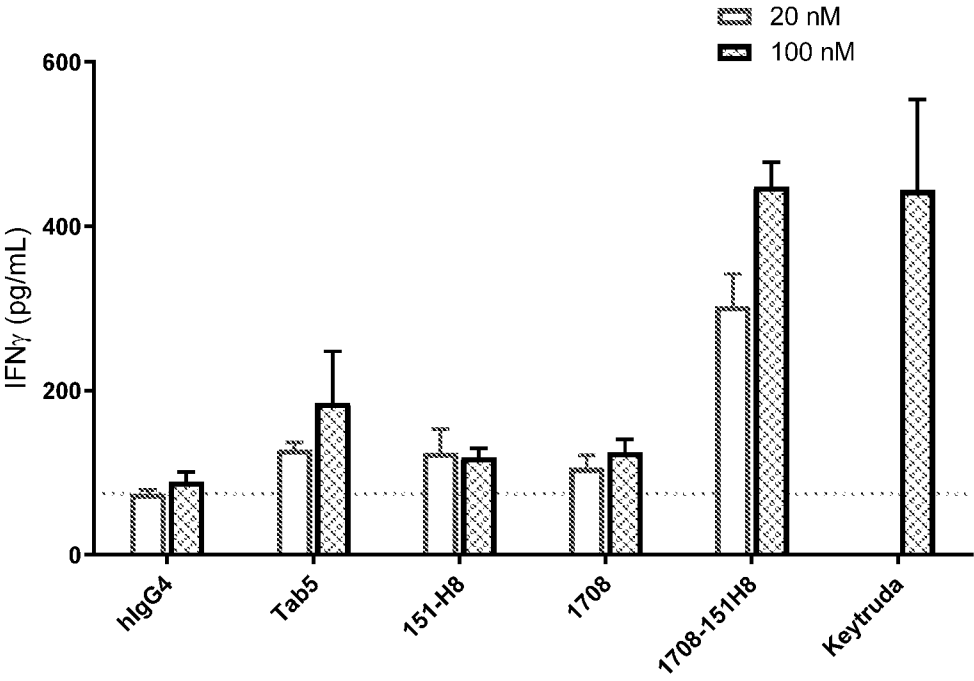


图 2

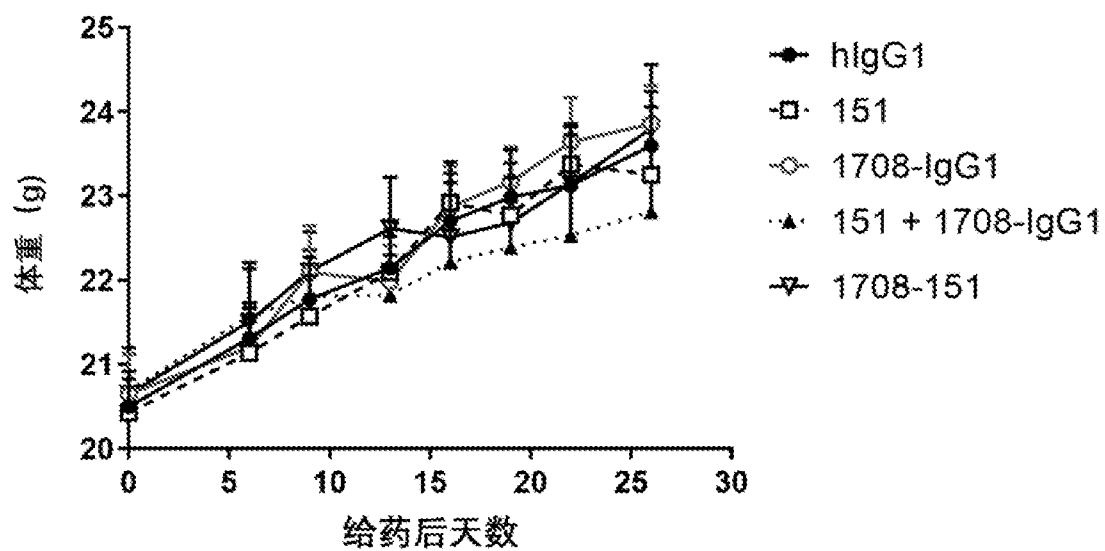


图 3A

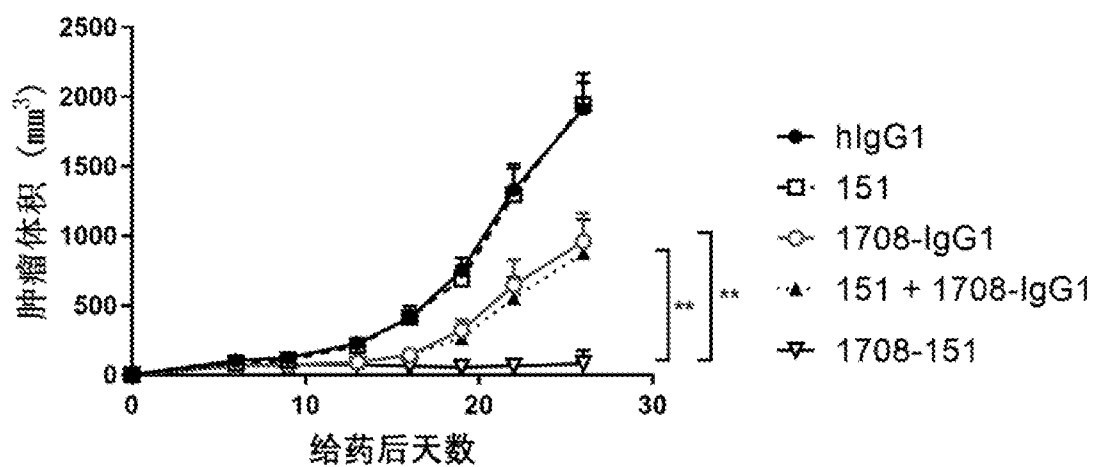


图 3B

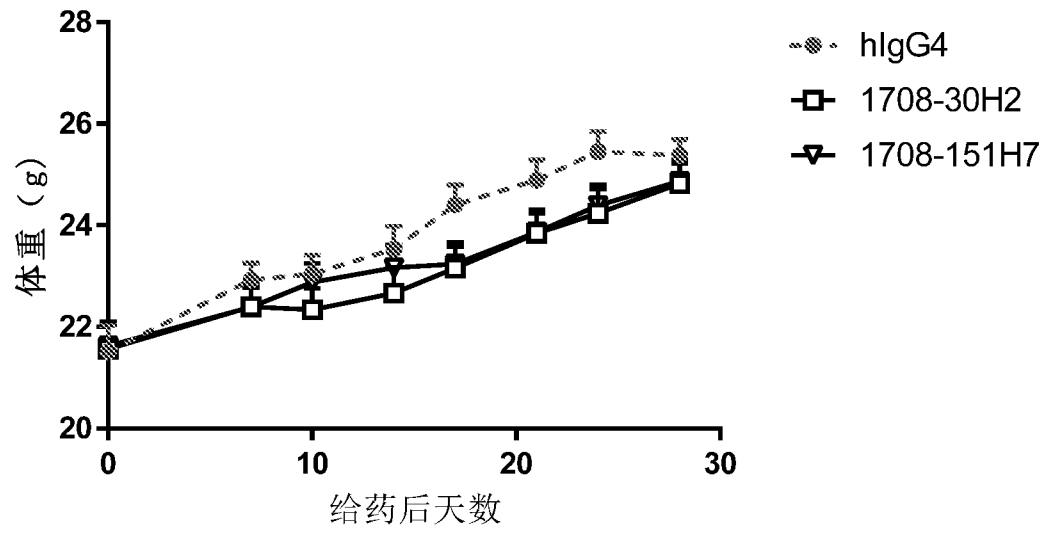


图 4A

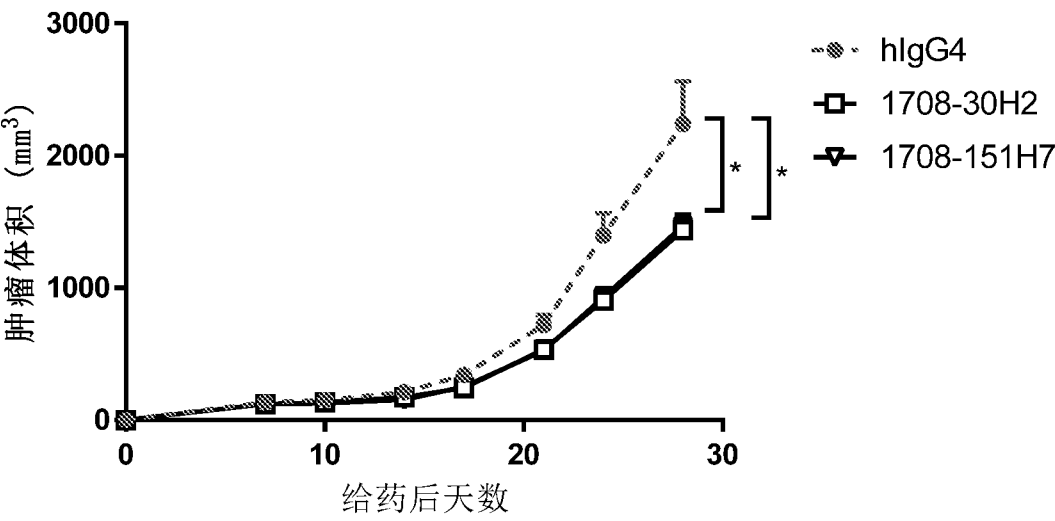


图 4B

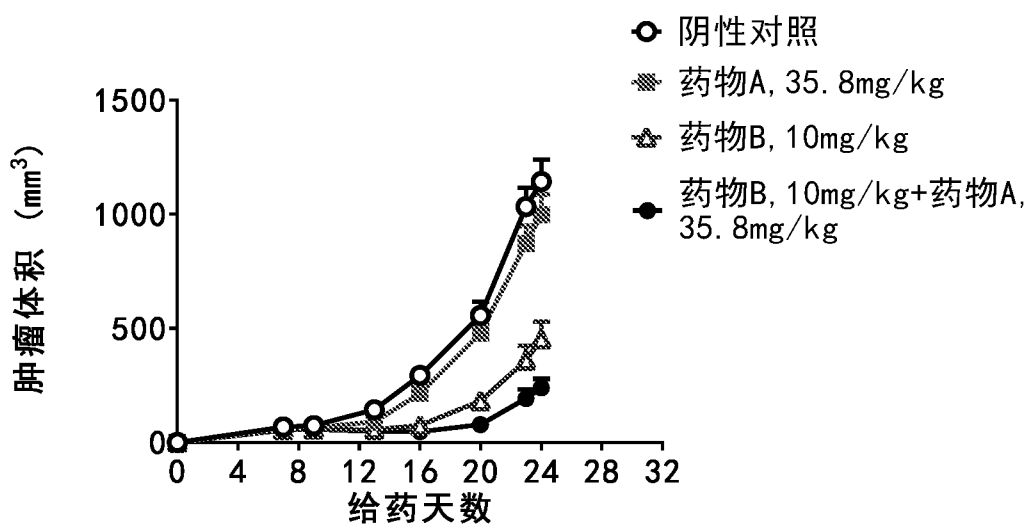


图 5A

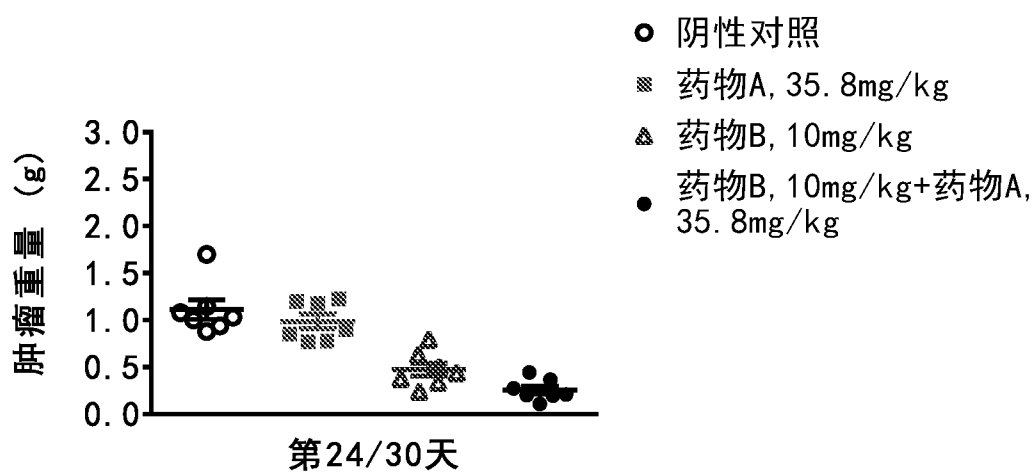


图 5B

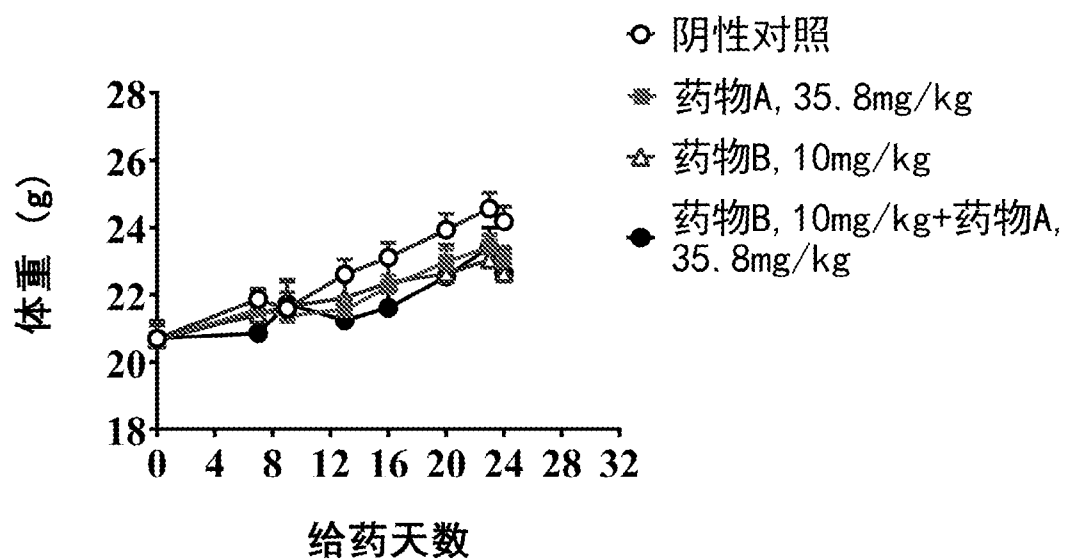


图 5C

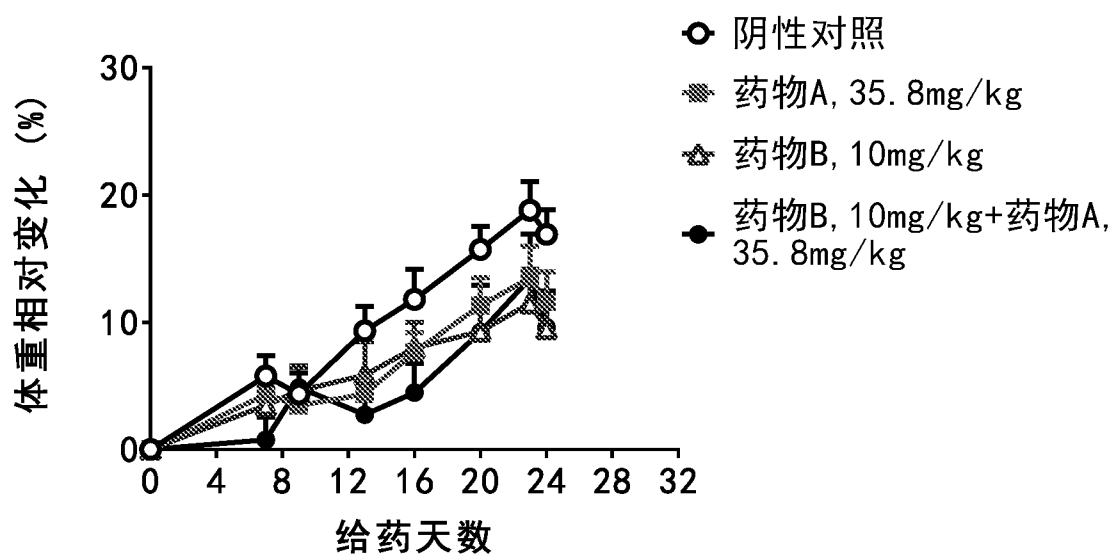


图 5D

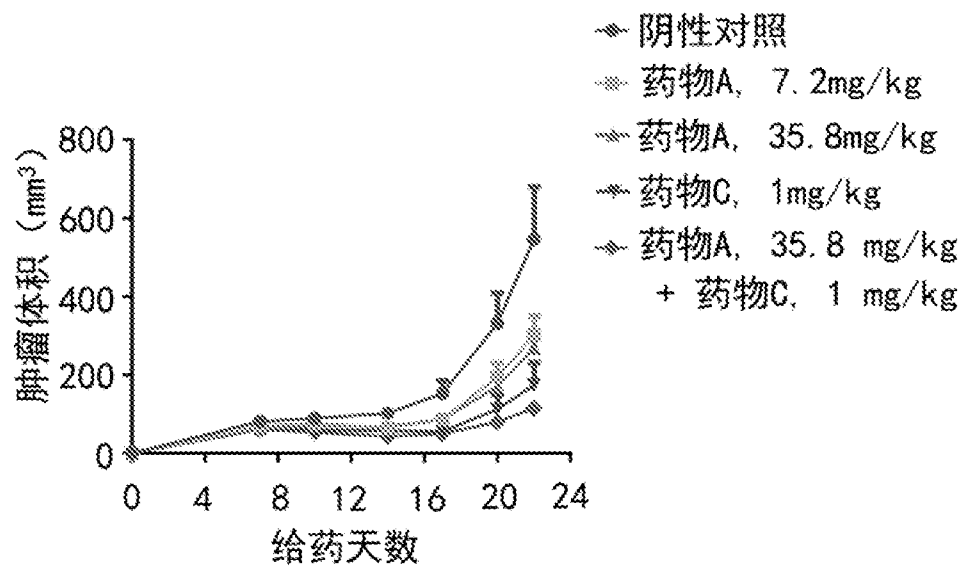


图 6A

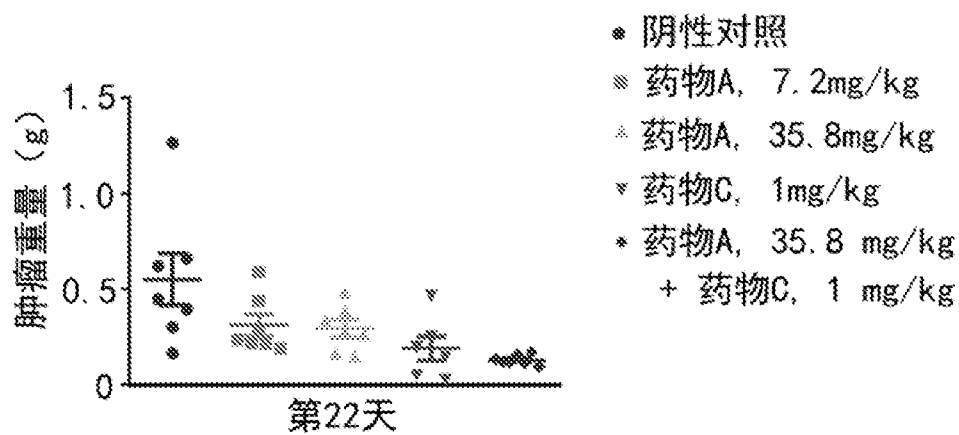


图 6B

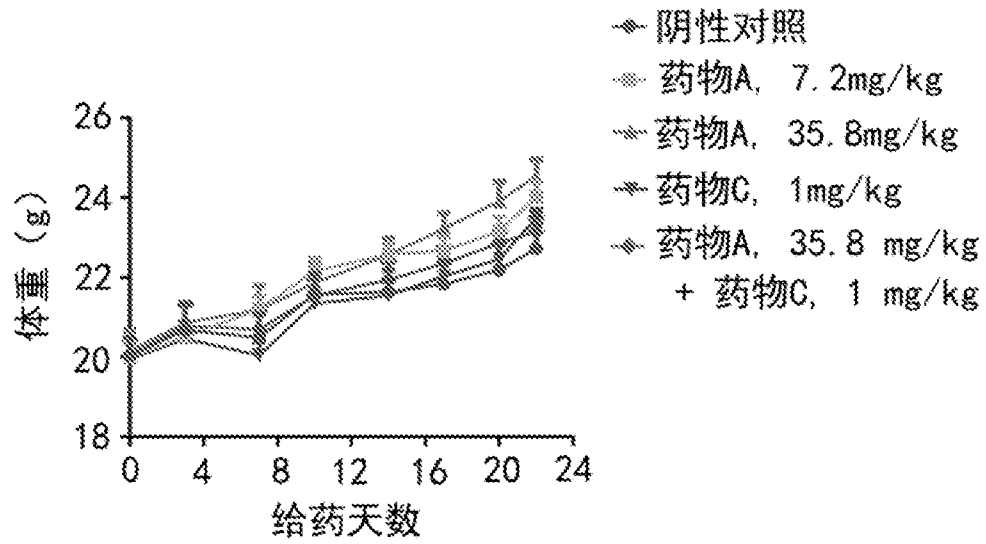


图 6C

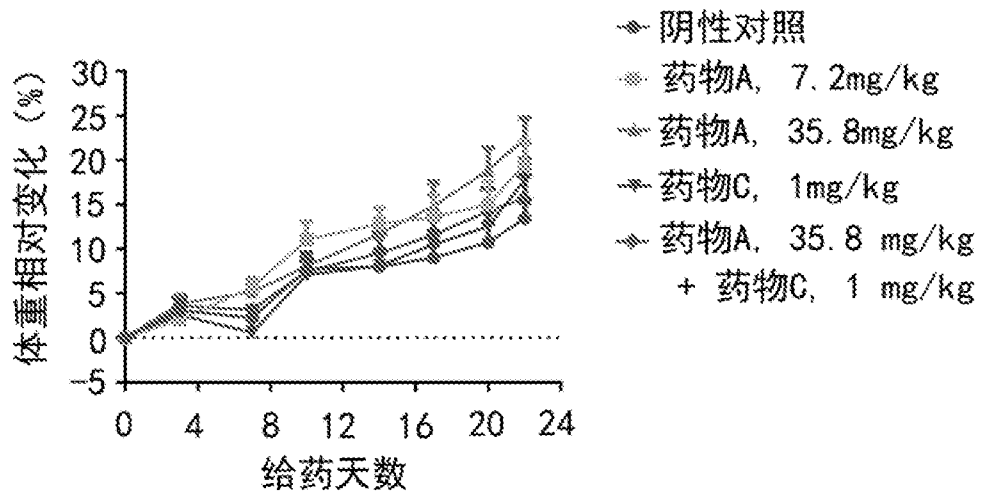


图 6D

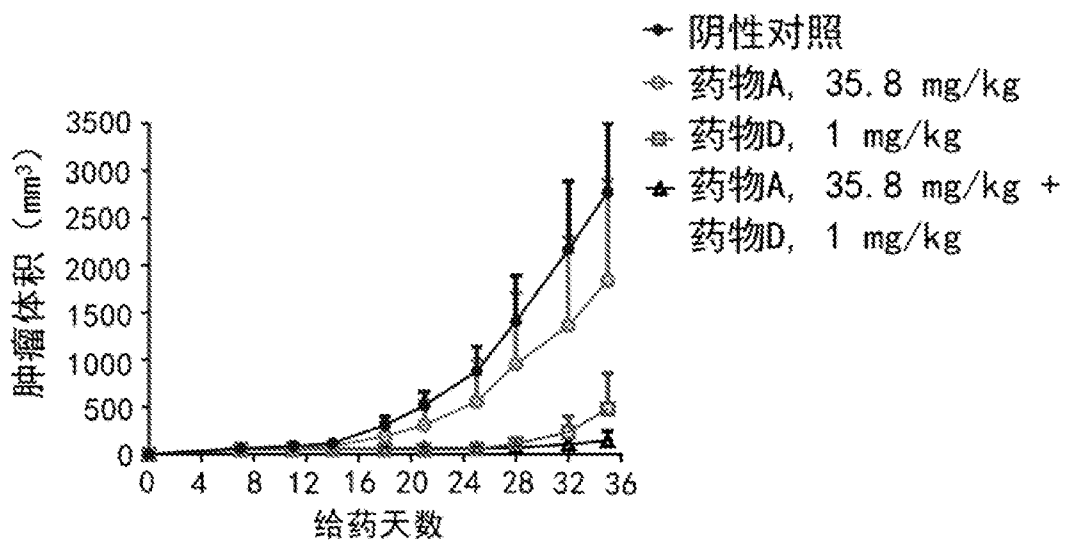


图 7A

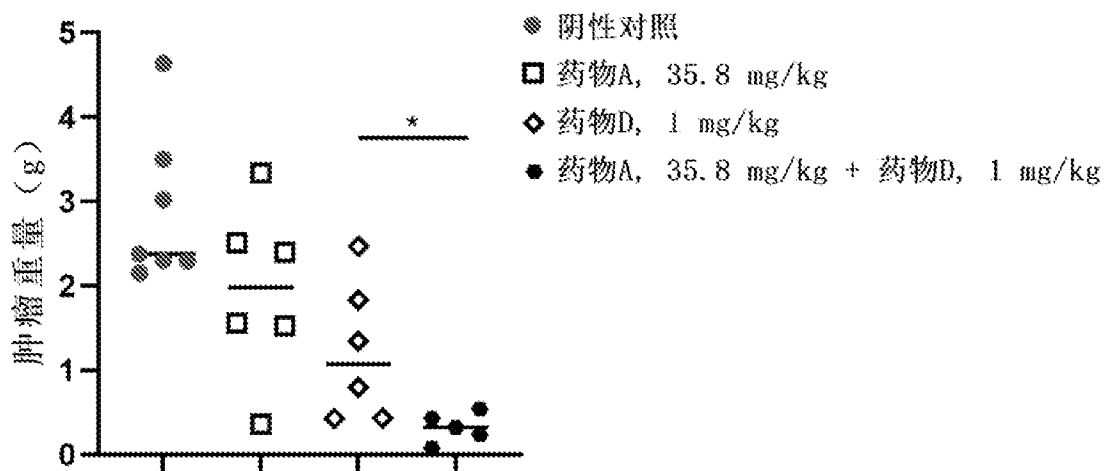


图 7B

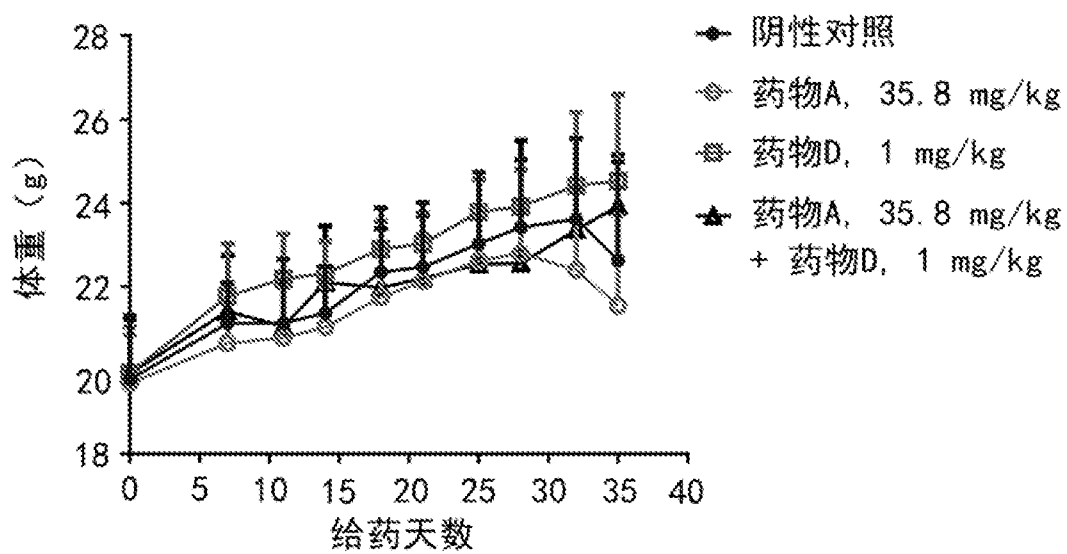


图 7C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/118959

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(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; G01N

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)

CNTXT, ENTXTC, DWPI, ISI WEB OF SCIENCES, PUBMED, ISI WEB OF SCIENCES, NCBI GenBank, STN: 抗体, 肿瘤, 癌症, 单域抗体, PVRIG, CD112R, TIGIT, PD-1, PD-L1, TGF-beta, VHH, antibody, single domain antibody, tumor, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2021180205 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 16 September 2021 (2021-09-16) entire document	1-10, 21-28
A	CN 107580500 A (COMPUGEN LTD.) 12 January 2018 (2018-01-12) entire document	1-28
A	CN 110088132 A (COMPUGEN LTD.) 02 August 2019 (2019-08-02) entire document	1-28
A	CN 112851813 A (SUZHOU SHENGDIYA BIOLOGICAL MEDICINE CO., LTD.) 28 May 2021 (2021-05-28) entire document	1-28
A	CN 113272017 A (MERCK PATENT GMBH) 17 August 2021 (2021-08-17) entire document	1-28
A	WO 2017084495 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 26 May 2017 (2017-05-26) entire document	1-28



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

22 November 2022

Date of mailing of the international search report

15 December 2022

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/CN2022/118959

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019062832 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 04 April 2019 (2019-04-04) entire document	1-28
A	WO 2020156509 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 06 August 2020 (2020-08-06) entire document	1-28
A	XU, Feng et al. "Blockade of CD112R and TIGIT signaling sensitizes human natural killer cell functions" <i>Cancer Immunol Immunother</i> , Vol. 66, No. 10, 31 October 2017 (2017-10-31), pp. 1367-1375	1-28
A	LI, Yangyang et al. "Blockade of checkpoint receptor PVRIG unleashes anti-tumor immunity of NK cells in murine and human solid tumors" <i>J Hematology & Oncology</i> , Vol. 14, 26 June 2021 (2021-06-26), article no. 100	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/118959

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

[1] The sequence table is submitted in the form of a file in C/ST.26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/118959**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.: **23, 26-28**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claim 23 relates to a method for treating or alleviating cancer. Claims 26-28 respectively relate to a method for activating NK cells, $\gamma\delta$ T cells, and/or Th1 cells, a method for increasing IFN- γ production and/or secretion of pro-inflammatory cytokines in a subject, and a method for inhibiting PD-1 activity or promoting T cell proliferation or allowing the subject to benefit from the upregulation of an immune response, all belonging to disease treatment methods, and therefore do not comply with PCT Rule 39.1(iv). A search was still conducted on the basis of a corresponding pharmaceutical use.
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/CN2022/118959

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021180205	A1	16 September 2021	CN	115003333	A	02 September 2022
				TW	202144417	A	01 December 2021
				CA	3170025	A1	16 September 2021
CN	107580500	A	12 January 2018	US	2020148769	A1	14 May 2020
				MX	2017010667	A	15 August 2018
				CA	2976926	A1	25 August 2016
				HK	1247569	A1	28 September 2018
				PT	3295951	T	21 July 2020
				SG	11201706583 P	A	28 September 2017
				HR	P20200572	T1	21 August 2020
				LT	3295951	T	25 September 2020
				DK	3653221	T3	24 October 2022
				PT	3258951	T	18 August 2020
				PL	3258951	T3	27 July 2020
				US	2018244774	A1	30 August 2018
				DK	3258951	T3	06 April 2020
				PL	3295951	T3	05 October 2020
				DK	3295951	T3	20 July 2020
				HU	E049791	T2	28 October 2020
				RU	2017132214	A	19 March 2019
				SI	3295951	T1	30 October 2020
				JP	2022106783	A	20 July 2022
				RU	2020128686	A	13 October 2020
				HR	P20201066	T1	05 February 2021
				US	2017081408	A1	23 March 2017
				IL	254039	D0	31 October 2017
				US	2017029504	A1	02 February 2017
				EP	3258951	A1	27 December 2017
				ES	2786651	T3	13 October 2020
				ES	2806800	T3	18 February 2021
				US	2021188974	A1	24 June 2021
				EP	3295951	A1	21 March 2018
				HK	1247568	A1	28 September 2018
				WO	2016134333	A1	25 August 2016
				ZA	201706323	B	27 May 2020
				EP	3653221	A1	20 May 2020
				AU	2020264349	A1	03 December 2020
				HU	E049032	T2	28 August 2020
				KR	20170137067	A	12 December 2017
				SI	3258951	T1	31 July 2020
				LT	3258951	T	11 May 2020
				AU	2016219835	A1	14 September 2017
				US	2016244521	A1	25 August 2016
				JP	2018512443	A	17 May 2018
CN	110088132	A	02 August 2019	ES	2774320	T3	20 July 2020
				JP	2019533984	A	28 November 2019
				EP	3347379	A1	18 July 2018
				US	2021000952	A1	07 January 2021
				KR	20220041246	A	31 March 2022
				PL	3347379	T3	18 May 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/118959

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
				JP	2022115922 A	09 August 2022
				DK	3347379 T3	17 February 2020
				CO	2019001980 A2	08 March 2019
				PT	3347379 T	18 February 2020
				KR	20190039421 A	11 April 2019
				US	2018169238 A1	21 June 2018
				MX	2019001878 A	01 July 2019
				CA	3032331 A1	22 February 2018
				US	2018305456 A1	25 October 2018
				AU	2017313405 A1	28 February 2019
				EP	3617232 A1	04 March 2020
				LT	3347379 T	11 May 2020
				WO	2018033798 A1	22 February 2018
				US	2018280506 A1	04 October 2018
				SI	3347379 T1	30 April 2020
				BR	112019003129 A2	09 July 2019
				HU	E048313 T2	28 July 2020
				HR	P20200189 T1	01 May 2020
				SG	11201901077 R A	28 March 2019
				CL	2019000424 A1	05 July 2019
CN	112851813	A	28 May 2021	None		
CN	113272017	A	17 August 2021	EP	3873611 A1	08 September 2021
				US	2022081480 A1	17 March 2022
				WO	2020093023 A1	07 May 2020
				CA	3117429 A1	07 May 2020
				IL	282707 A	30 June 2021
				JP	2022505925 A	14 January 2022
				AU	2019371457 A1	20 May 2021
WO	2017084495	A1	26 May 2017	KR	20180071376 A	27 June 2018
				JP	2018536401 A	13 December 2018
				CN	107614529 A	19 January 2018
				HK	1247213 A1	21 September 2018
				BR	112018009064 A2	30 October 2018
				MX	2018005720 A	09 November 2018
				CN	109608544 A	12 April 2019
				CA	3004804 A1	26 May 2017
				US	2020399375 A1	24 December 2020
				TW	201718657 A	01 June 2017
				EP	3378871 A1	26 September 2018
				US	2018334504 A1	22 November 2018
				AU	2016357901 A1	24 May 2018
				RU	2018119165 A	19 December 2019
WO	2019062832	A1	04 April 2019	JP	2020537509 A	24 December 2020
				EP	3689909 A1	05 August 2020
				TW	201915026 A	16 April 2019
				CN	111051347 A	21 April 2020
				US	2020255516 A1	13 August 2020
WO	2020156509	A1	06 August 2020	TW	202045538 A	16 December 2020
				US	2022098304 A1	31 March 2022

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/118959

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 2022518588 A	15 March 2022
		EP 3922647 A1	15 December 2021
		CA 3128104 A1	06 August 2020
		AU 2020213579 A1	02 September 2021
		KR 20210124993 A	15 October 2021
		CN 112969716 A	15 June 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/118959

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P; G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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))

CNXT, ENTXT, DWPI, ISI WEB OF SCIENCES, PUBMED, ISI WEB OF SCIENCES, NCBI GenBank, STN: 抗体, 肿瘤, 癌症, 单域抗体, PVRIG, CD112R, TIGIT, PD-1, PD-L1, TGF-beta, VHH, antibody, single domain antibody, tumor, cancer

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
PX	W0 2021180205 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. 等) 2021年9月16日 (2021 - 09 - 16) 全文	1-10, 21-28
A	CN 107580500 A (康姆普根有限公司) 2018年1月12日 (2018 - 01 - 12) 全文	1-28
A	CN 110088132 A (康姆普根有限公司) 2019年8月2日 (2019 - 08 - 02) 全文	1-28
A	CN 112851813 A (苏州盛迪亚生物医药有限公司) 2021年5月28日 (2021 - 05 - 28) 全文	1-28
A	CN 113272017 A (默克专利有限公司) 2021年8月17日 (2021 - 08 - 17) 全文	1-28
A	W0 2017084495 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. 等) 2017年5月26日 (2017 - 05 - 26) 全文	1-28

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“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)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“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

“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

“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

“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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年11月22日

国际检索报告邮寄日期

2022年12月15日

ISA/CN的名称和邮寄地址

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

传真号 (86-10)62019451

受权官员

李影

电话号码 86-(10)-53961973

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	W0 2019062832 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. 等) 2019年4月4日 (2019 - 04 - 04) 全文	1-28
A	W0 2020156509 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. 等) 2020年8月6日 (2020 - 08 - 06) 全文	1-28
A	XU, F. 等. "Blockade of CD112R and TIGIT signaling sensitizes human natural killer cell functions" Cancer Immunol Immunother., 第66卷, 第10期, 2017年10月31日 (2017 - 10 - 31), 第1367-1375页	1-28
A	LI, Y.Y. 等. "Blockade of checkpoint receptor PVRIG unleashes anti-tumor immunity of NK cells in murine and human solid tumors" J Hematology & Oncology, 第14卷, 2021年6月26日 (2021 - 06 - 26), 第100号文章	1-28

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

[1] 序列表以C/ST. 26文件形式提交。

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： 23, 26-28
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23涉及一种治疗或缓解癌症的方法，权利要求26-28分别涉及一种活化NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和/或Th1细胞的方法，一种增加受试者体内的IFN- γ 产生和/或促炎性细胞因子分泌的方法，一种抑制PD-1活性或促进T细胞增殖或使受试者从免疫反应上调获益的方法，均属于疾病的治疗方法，不符合R39.1(iv)的规定，仍基于其相应制药用途进行了检索。
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/CN2022/118959

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)
WO	2021180205	A1	2021年9月16日	CN	115003333	A	2022年9月2日
				TW	202144417	A	2021年12月1日
				CA	3170025	A1	2021年9月16日
CN	107580500	A	2018年1月12日	US	2020148769	A1	2020年5月14日
				MX	2017010667	A	2018年8月15日
				CA	2976926	A1	2016年8月25日
				HK	1247569	A1	2018年9月28日
				PT	3295951	T	2020年7月21日
				SG	11201706583P	A	2017年9月28日
				HR	P20200572	T1	2020年8月21日
				LT	3295951	T	2020年9月25日
				DK	3653221	T3	2022年10月24日
				PT	3258951	T	2020年8月18日
				PL	3258951	T3	2020年7月27日
				US	2018244774	A1	2018年8月30日
				DK	3258951	T3	2020年4月6日
				PL	3295951	T3	2020年10月5日
				DK	3295951	T3	2020年7月20日
				HU	E049791	T2	2020年10月28日
				RU	2017132214	A	2019年3月19日
				SI	3295951	T1	2020年10月30日
				JP	2022106783	A	2022年7月20日
				RU	2020128686	A	2020年10月13日
				HR	P20201066	T1	2021年2月5日
				US	2017081408	A1	2017年3月23日
				IL	254039	D0	2017年10月31日
				US	2017029504	A1	2017年2月2日
				EP	3258951	A1	2017年12月27日
				ES	2786651	T3	2020年10月13日
				ES	2806800	T3	2021年2月18日
				US	2021188974	A1	2021年6月24日
				EP	3295951	A1	2018年3月21日
				HK	1247568	A1	2018年9月28日
				WO	2016134333	A1	2016年8月25日
				ZA	201706323	B	2020年5月27日
				EP	3653221	A1	2020年5月20日
				AU	2020264349	A1	2020年12月3日
				HU	E049032	T2	2020年8月28日
				KR	20170137067	A	2017年12月12日
				SI	3258951	T1	2020年7月31日
				LT	3258951	T	2020年5月11日
				AU	2016219835	A1	2017年9月14日
				US	2016244521	A1	2016年8月25日
				JP	2018512443	A	2018年5月17日
CN	110088132	A	2019年8月2日	ES	2774320	T3	2020年7月20日
				JP	2019533984	A	2019年11月28日
				EP	3347379	A1	2018年7月18日
				US	2021000952	A1	2021年1月7日
				KR	20220041246	A	2022年3月31日
				PL	3347379	T3	2020年5月18日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/118959

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)
				JP	2022115922	A	2022年8月9日
				DK	3347379	T3	2020年2月17日
				CO	2019001980	A2	2019年3月8日
				PT	3347379	T	2020年2月18日
				KR	20190039421	A	2019年4月11日
				US	2018169238	A1	2018年6月21日
				MX	2019001878	A	2019年7月1日
				CA	3032331	A1	2018年2月22日
				US	2018305456	A1	2018年10月25日
				AU	2017313405	A1	2019年2月28日
				EP	3617232	A1	2020年3月4日
				LT	3347379	T	2020年5月11日
				WO	2018033798	A1	2018年2月22日
				US	2018280506	A1	2018年10月4日
				SI	3347379	T1	2020年4月30日
				BR	112019003129	A2	2019年7月9日
				HU	E048313	T2	2020年7月28日
				HR	P20200189	T1	2020年5月1日
				SG	11201901077R	A	2019年3月28日
				CL	2019000424	A1	2019年7月5日
CN	112851813	A	2021年5月28日	无			
CN	113272017	A	2021年8月17日	EP	3873611	A1	2021年9月8日
				US	2022081480	A1	2022年3月17日
				WO	2020093023	A1	2020年5月7日
				CA	3117429	A1	2020年5月7日
				IL	282707	A	2021年6月30日
				JP	2022505925	A	2022年1月14日
				AU	2019371457	A1	2021年5月20日
				KR	20180071376	A	2018年6月27日
				JP	2018536401	A	2018年12月13日
				CN	107614529	A	2018年1月19日
				HK	1247213	A1	2018年9月21日
				BR	112018009064	A2	2018年10月30日
				MX	2018005720	A	2018年11月9日
				CN	109608544	A	2019年4月12日
				CA	3004804	A1	2017年5月26日
				US	2020399375	A1	2020年12月24日
				TW	201718657	A	2017年6月1日
				EP	3378871	A1	2018年9月26日
				US	2018334504	A1	2018年11月22日
				AU	2016357901	A1	2018年5月24日
				RU	2018119165	A	2019年12月19日
WO	2019062832	A1	2019年4月4日	JP	2020537509	A	2020年12月24日
				EP	3689909	A1	2020年8月5日
				TW	201915026	A	2019年4月16日
				CN	111051347	A	2020年4月21日
				US	2020255516	A1	2020年8月13日
WO	2020156509	A1	2020年8月6日	TW	202045538	A	2020年12月16日
				US	2022098304	A1	2022年3月31日

国际申请号
PCT/CN2022/118959

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)
		JP 2022518588 A	2022年3月15日
		EP 3922647 A1	2021年12月15日
		CA 3128104 A1	2020年8月6日
		AU 2020213579 A1	2021年9月2日
		KR 20210124993 A	2021年10月15日
		CN 112969716 A	2021年6月15日