

(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



(10) 国际公布号
WO 2023/040935 A1

(43) 国际公布日
2023 年 3 月 23 日 (23.03.2023)

(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)

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)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/118942

(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

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))。

(30) 优先权:
202111078172.7 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: 杨健健(YANG, Jianjian); 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)。田晨敏(TIAN, Chenmin); 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)。

(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,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING ANTI-PVRIG/TIGIT BISPECIFIC ANTIBODY

(54) 发明名称: 一种含抗PVRIG/TIGIT双特异性抗体的药物组合物

(57) Abstract: A pharmaceutical composition comprising an anti-PVRIG/TIGIT bispecific antibody.

(57) 摘要: 一种含抗PVRIG/TIGIT双特异性抗体的药物组合物。

WO 2023/040935 A1

一种含抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的药物组合物

本申请要求 2021 年 09 月 15 日提交的中国专利申请 202111078172.7 的优先权。

5

技术领域

本披露属于药物制剂领域，具体涉及一种包含双特异性抗体的药物组合物，以及其作为药物的用途。

10 背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

PVRIG，又名 CD112R，是细胞表面表达的蛋白，与 TIGIT、CD96 和 CD226 等同属于 B7/CD28 超家族，在免疫系统中起重要作用。

15 PVRIG 包含一个胞外区，一个跨膜区，和一个胞内区。当其配体 PVRL2（又叫 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 在很多实体瘤中都有高表达，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，可以有效抑制肿瘤的生长，并与 PD-1 和 TIGIT 抑制剂发生协调作用。

25 TIGIT 在淋巴细胞上高度表达，包括浸润不同类型肿瘤的肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）和 Treg。已经证明 TIGIT 信号传导与其同源配体 PVR（也称为 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 也在肿瘤中广泛表达，表明 TIGIT-PVR 信号轴可能是癌症的主要免疫逃逸机制。

30 但是，目前尚未有抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体药物进入临床。现有技术中仍然缺乏能够抑制体内癌症或肿瘤生长的高亲和力（avidity）、高选择性、高生物活性的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的制剂。

发明内容

35 本披露提供一种含抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的药物组合物，该组合物具有治疗活性。此外，该组合物还可具有稳定性好等优势。

在一些实施方案中，本披露提供一种药物组合物，包含抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体和缓冲剂，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含特异性结合 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，所述缓冲剂为组氨酸缓冲剂或醋酸盐缓冲剂。

5 在一些实施方案中，所述缓冲剂为组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂或醋酸-醋酸钠盐缓冲剂。

在一些具体的实施方案中，所述缓冲剂为组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂。

10 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物的 pH 为 5.0-6.5。在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.5；在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.5-6.0；在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为约 6.0。当本披露中提及点值时，应当理解该点值包含了误差范围。这种误差范围是由于实验室环境、人员操作、仪器、方法学、测量误差等因素所致。以 pH 为例，当测值为约 6.0 时，应当理解其包含了误差范围。作为一个示例，采用工业用 pH 计测量制剂时，“约 6.0”表示 6.0 ± 0.2 。

15 在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.0-5.5；在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为约 5.5。

在一些实施方案中，所述药物组合物的 pH 为 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 或 6.5，或者为这些点值之间的任意范围。

20 通常，通过置换缓冲剂获得的药物组合物的 pH 与缓冲剂 pH 几乎一致。同时，本领域技术人员公知，在药物制剂的过程中，有时可能会存在 pH 飘移，但药物制剂的 pH 的飘移一般很小（ ± 0.3 范围内）。在一些实施方案中，药物制剂的 pH 的飘移在 ± 0.1 范围内。

25 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 1mg/mL 至 150mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 1mg/mL 至 100mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 40mg/mL 至 100mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 50mg/mL 至 100mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 40mg/mL 至 30 60mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 100mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 $100\text{mg/mL} \pm 8\text{ mg/mL}$ 。在一些实施方案中，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 50mg/mL。在一些实施方案中，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 $50\text{mg/mL} \pm 5\text{ mg/mL}$ 。在一些实施方案中，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 1mg/mL、10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、45mg/mL、50mg/mL、35 55mg/mL、60mg/mL、65mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mL、100mg/mL、

110mg/mL、120mg/mL、130mg/mL、140mg/mL 或 150mg/mL，或者为这些点值之间的任意范围。

5 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂是非离子表面活性剂。在一些实施方案中，所述表面活性剂选自泊洛沙姆（例如泊洛沙姆 188）、聚山梨酯（例如聚山梨酯 20、聚山梨酯 80）、聚羟亚烃、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸钠、辛基糖甙钠、月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、柯卡酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲基胺、棕榈酰胺基丙基-二甲基胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、甲基油基牛磺酸钠、聚乙二醇、聚丙二醇、乙烯与丙烯二醇的共聚物等。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯或泊洛沙姆。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80、聚山梨酯 20 或泊洛沙姆 188。在一些实施方案中，所述表面活性剂为聚山梨酯 80。

20 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述表面活性剂浓度为 0.05mg/mL 至 1.0mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL 或 1.0mg/mL，或者为这些点值之间的任意范围。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.4mg/mL。在一些实施方案中，所述表面活性剂浓度为 0.4mg/mL $\pm$ 0.1mg/mL。

在一些实施方案中，所述表面活性剂为 0.4mg/mL 的聚山梨酯 80。

25 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包括渗透压调节剂。在一些实施方案中，渗透压调节剂为糖（包括单糖，二糖，三糖，多糖，糖醇，还原性糖，非还原性糖等等）、氨基酸（包括精氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、组氨酸等等）或盐类（氯化钠、氯化钾、氯化钙等）。在一些实施方案中，所述渗透压调节剂为糖，所述糖选自：葡萄糖，蔗糖，海藻糖，乳糖，果糖，麦芽糖，右旋糖苷，甘油，赤藻糖醇，丙三醇，阿拉伯糖醇，木糖醇，山梨糖醇（也称山梨醇），甘露醇，密里二糖，松三糖，蜜三糖，甘露三糖，水苏糖，麦芽糖，乳果糖，麦芽酮糖，麦芽糖醇，乳糖醇和异-麦芽酮糖。在一些实施方案中，所述渗透压调节剂选自蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、精氨酸、甘氨酸和氯化钠组成的组中的一种或多种。在一些实施方案中，所述渗透压调节剂为非还原性二糖；在一些实施方案中，所述渗透压调节剂为海藻糖或蔗糖；在一些实施方案中，所述渗透压调节剂为蔗糖。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，渗透压调节剂浓度为 70mg/mL 至 100mg/mL。在一些实施方案中，渗透压调节剂浓度为 75mg/mL 至 100mg/mL；在一些实施方案中，渗透压调节剂浓度为 75mg/mL 至 90mg/mL；在一些实施方案中，渗透压调节剂浓度为 70mg/mL 至 90mg/mL；在一些实施方案中，渗透压调节剂浓度为 75mg/mL 至 85mg/mL；在一些实施方案中，渗透压调节剂浓度为 75mg/mL 至 80mg/mL；在一些实施方案中，渗透压调节剂浓度为 80mg/mL；在一些实施方案中，渗透压调节剂浓度为 80mg/mL±5mg/mL。在一些实施方案中，渗透压调节剂浓度非限制性实施包括 60mg/mL、65mg/mL、70mg/mL、75mg/mL、80mg/mL、85mg/mL、90mg/mL、95mg/mL、100mg/mL，以及这些点值之间的任一范围。

在一些实施方案中，前述药物组合物为等渗制剂。在一些实施方案中，所述渗透压调节剂使前述药物组合物渗透压控制在 280-320mOsm，在一些实施方案中，渗透压控制在约 290-300 mOsm。在一些实施方案中，渗透压调节剂控制渗透压在 280mOsm、290mOsm、295mOsm、300mOsm、305mOsm、310mOsm、320mOsm，以及这些点值之间的任一范围。

在一些实施方案中，所述渗透压调节剂为 80mg/mL 蔗糖。

在一些实施方案中，所述渗透压调节剂为 80mg/mL±5mg/mL 蔗糖。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，所述缓冲剂的浓度为 5mM 至 100mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 10mM 至 30mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 5mM 至 15mM。在一些实施方案中，所述缓冲剂的浓度为 5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM 或 100mM，以及这些点值之间的任一范围。在一些实施方案中，所述缓冲剂为 10mM His-HCl。在一些实施方案中，所述缓冲剂为 10mM±5mM His-HCl。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，其特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域（如 VHH），所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域（如 VHH）包含三个互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中：CDR1 选自 SEQ ID NO：7、10、13、16、19、22、25、28、31、34、37、40、43、46、49、52、55、58、61、64 任一所示的氨基酸序列或与之具有 3、2、1 个或更多氨基酸差异的氨基酸序列，和/或 CDR2 选自 SEQ ID NO：8、11、14、17、20、23、26、29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65 任一所示的氨基酸序列或与之具有 3、2、1 个或更多氨基酸差异的氨基酸序列，和/或 CDR3 选自 SEQ ID NO：9、12、15、18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、150、151 任一所示的氨基酸序列或与之具有 3、2、1 个或更多氨基酸差异的氨基酸序列；其中，SEQ ID NO：7-21 是依据 Kabat 编码规则，SEQ ID NO：22-36 是

依据 Chothia 编码规则, SEQ ID NO: 37-51 是依据 IMGT 编码规则, SEQ ID NO: 52-66 是依据 AbM 编码规则。

在一些实施方案中,如上任一项所述的药物组合物,其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体,其特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域(如 VHH),所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 2、75-79 任一所示序列中的 CDR1、CDR2、CDR3;或包含 SEQ ID NO: 3、80-84 任一所示序列中的 CDR1、CDR2、CDR3;或包含 SEQ ID NO: 4、86-90 任一所示序列中的 CDR1、CDR2、CDR3;或包含 SEQ ID NO: 5、91-95 任一所示序列中的 CDR1、CDR2、CDR3;或包含 SEQ ID NO: 6、96-100 任一所示序列中的 CDR1、CDR2、CDR3。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 3、80-84 任一所示序列中的 CDR1、CDR2、CDR3。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 81 中的 CDR1、CDR2、CDR3。在一些实施方案中,所述 CDR1、CDR2、CDR3 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的。在一些实施方案中,所述 CDR1、CDR2、CDR3 是根据 Kabat 编号规则确定的。在一些实施方案中,依据 Kabat 编码规则,特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域(如 VHH)包含三个互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3,其中: CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、8、9 所示; CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7、8、150 所示; CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 10、11、12 所示; CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 10、11、151 所示; CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 13、14、15 所示; CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 16、17、18 所示;或 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 19、20、21 所示。在一些实施方案中,依据 Chothia 编码规则,特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域(如 VHH)包含三个互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3,其中: CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 22、23、24 所示; CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 25、26、27 所示; CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 28、29、30 所示; CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 31、32、33 所示;或 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 34、35、36 所示。在一些实施方案中,依据 IMGT 编码规则,特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域(如 VHH)包含三个互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3,其中: CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 37、38、39 所示; CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 40、41、42 所示; CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 43、44、45 所示; CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 46、47、48 所示;或 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 49、50、51 所示。在一些实施方案中,依据 AbM

编码规则，特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域（如 VHH）包含三个互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中：CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 52、53、54 所示；CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 55、56、57 所示；CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 58、59、60 所示；CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 61、62、63 所示；或 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 64、65、66 所示。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，其特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域（如 VHH），所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kabat 编号系统定义，其中，CDR1 包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列，CDR2 包含 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列，和 CDR3 包含 SEQ ID NO: 151 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，其特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域（如 VHH）包含 SEQ ID NO: 2-6、75-84、86-100 任一所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO: 2-6、75-84、86-100 中的至少一条序列具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的第一抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 81 的氨基酸序列。在一些实施方案中，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的第一抗原结合结构域包含与 SEQ ID NO: 81 具有至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 同一性的序列的氨基酸序列。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，其中，特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域为第一抗体，其是 VHH；特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域为第二抗体，在一些实施方案中，第二抗体包括重链（HC）和轻链（LC）；所述第一抗体位于第二抗体的重链或轻链的 N 端和/或 C 端。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含 1 个特异性结合 TIGIT 的第二抗体和 2 个特异性结合 PVRIG 的第一抗体；所述第二抗体包括两条 HC 和两条 LC，第二抗体的一条 HC 的 VH 与一条 LC 的 VL 形成抗原结合部位，另一条 HC 的 VH 与另一条 LC 的 VL 形成抗原结合部位。在一些实施方案中，其中一个第一抗体位于第二抗体的重链或轻链的 N 端，另一个第一抗体位于第二抗体的重链或轻链的 C 端。在一些实施方案中，每个第一抗体分别位于第二抗体的两条重链或两条轻链的 N 端；或者，每个第一抗体分别位于第二抗体的两条重链或两条轻链的 C 端。在一些实施方案中，每个第一抗体分别位于第二抗体的两条重链的 N 端。在一些实施方案中，每个第一抗

体分别位于第二抗体的两条重链的 C 端。在一些实施方案中, 所述 2 个第一抗体是相同的。在一些实施方案中, 所述 2 个第一抗体是不相同的。

5 在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体, 其中第二抗体可以连接有 1、2、3、4、5、6、7、8 个第一抗体, 所述第一抗体可以是相同的或不同的, 可以均连接在第二抗体的重链 N 端, 或均连接在第二抗体的重链 C 端, 或均连接在第二抗体的轻链 N 端, 或均连接在第二抗体的轻链 C 端, 或连接在第二抗体的重链 N 端、重链 C 端、轻链 N 端或轻链 C 端或其任意组合。

10 在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体, 其中第一抗体直接或通过连接子与第二抗体的重链的 N 端或 C 端连接。在一些实施方案中, 所述连接子选自: 如 $(GmSn)_x$ 或 $(GGNGT)_x$ 或 $(YGNGT)_x$ 所示的氨基酸序列, 其中 m、n 各自独立地选自 1-8 的整数 (例如, 1、2、3、4、5、6、7 或 8), x 独立地选自 1-20 的整数 (例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20)。在一些实施方案中, 连接子
15 为 GS、GAP、ASGS (SEQ ID NO: 154)、 G_4S (SEQ ID NO: 155)、 $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 152)、 $(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 156)、 $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO: 157)、 $(G_4S)_5$ (SEQ ID NO: 158)、 $(G_4S)_6$ (SEQ ID NO: 159)、YGNGT (SEQ ID NO: 160)、 $(YGNGT)_2$ (SEQ ID NO: 161)、 $(YGNGT)_3$ (SEQ ID NO: 162)、 $(YGNGT)_4$ (SEQ ID NO: 163)、 $(YGNGT)_5$ (SEQ ID NO: 164) 或 $(YGNGT)_6$ (SEQ ID
20 NO: 165) 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体, 其中所述第二抗体的重链包含重链可变区 (VH) 和重链恒定区 (CH), 轻链包含轻链可变区 (VL) 和轻链恒定区 (CL)。在一些实施方案中, 第二抗体为全长抗体。在一些实施方案中, 所述第二抗体的重链为 IgG 同种型, 例如 IgG1、
25 IgG2、IgG3 或 IgG4, 例如为 IgG1 同种型; 和/或所述第二抗体的轻链为 Kappa 同种型。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体, 其中第二抗体的两条 HC 包含相同的 CDR, 和/或第二抗体的两条 LC 包含相同的 CDR。在一些实施方案中, 所述第二抗体的两条 HC 包含相同的
30 VH 和/或第二抗体的两条 LC 包含相同的 VL。在一些实施方案中, 所述第二抗体的两条 HC 具有相同的氨基酸序列和/或第二抗体的两条 LC 具有相同的氨基酸序列。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含两个第一抗体, 其中所述两个第一抗体具有相同或不相同的氨基酸序列。在一些实施方案中, 两个第一抗体具有相同的氨基酸序列。
35

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述抗 PVRIG/TIGIT

双特异性抗体包含两条第一多肽链和两条第二多肽链，其中对于每条多肽链：

a) 第一多肽链各自独立地包含 VHH 作为第一抗体、和第二抗体的重链(HC)；

和

b) 第二多肽链各自独立地包含第二抗体的轻链(LC)；

5 其中，VHH 直接或通过接头与第二抗体的 HC 的 N 端和/或 C 端相连。或者，
i) 第一多肽链各自独立地包含第二抗体的重链(HC)；和 ii) 第二多肽链各自独立地包含第一抗体和第二抗体的轻链(LC)；其中，VHH 直接或通过接头与第二抗体的 LC 的 N 端和/或 C 端相连。在一些实施方案中，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含两条相同的第一多肽链和两条相同的第二多肽链。

10 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，其中所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域为任意的抗 TIGIT 抗体。此处全文引入 WO2009126688、WO2014089113、WO2015009856、WO2015143343、WO2015174439、WO2016028656、WO2016106302、WO2017053748 、 WO2017030823 、 US20160176963 、 US20130251720 、
15 WO2019232484、WO2019062832 中的 TIGIT 抗体。例如，TIGIT 抗体可以为 CPA.9.083.H4 (S241P)、CPA.9.086.H4 (S241P)、CHA.9.547.7.H4 (S241P) 和 CHA.9.547.13.H4 (S241P) 中的任一种(参见 WO2019232484)。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，其中特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域为第二抗体。在
20 一些实施方案中，全文引入 WO2019062832 中的抗 TIGIT 抗体作为第二抗体。在一些实施方案中，所述第二抗体中：重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 115、116 和 117 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 118、119 和 120 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 121、122 和 123 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和轻链可变区包含
25 分别如 SEQ ID NO: 124、125 和 126 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 127、128 和 129 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 130、131 和 132 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 133、134 和 135 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 136、137 和 138 所示
30 的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 139、140 和 141 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 142、143 和 144 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，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
35 区(VH)和轻链可变区(VL)，其中：所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 121 的氨基酸序列、HCDR2 包含 SEQ ID

NO: 122 的氨基酸序列和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 123 的氨基酸序列, 和所述轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 124 的氨基酸序列、LCDR2 包含 SEQ ID NO: 125 的氨基酸序列和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 126 的氨基酸序列。在一些实施方案中, 所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域包含 SEQ ID NO: 145-147 任一项所示的氨基酸序列的 VH, 或包含与 SEQ ID NO: 145-147 中的至少一条序列具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 的序列同一性的氨基酸序列的 VH, 和/或包含 SEQ ID NO: 148-149 任一项所示的氨基酸序列的 VL, 或包含与 SEQ ID NO: 148-149 中的至少一条序列具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 的序列同一性的氨基酸序列的 VL。在一些实施方案中, 所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域的重链可变区包含 SEQ ID NO: 145 的氨基酸序列, 轻链可变区包含 SEQ ID NO: 149 的氨基酸序列。在一些实施方案中, 其中所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域包含重链 (HC) 和轻链 (LC)。在一些实施方案中, 其中所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域包含与 SEQ ID NO: 102 具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性的氨基酸序列的 HC, 和与 SEQ ID NO: 103 具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的序列同一性的氨基酸序列的 LC。在一些实施方案中, 其中所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域具有: 包含 SEQ ID NO: 102 的氨基酸序列的 HC, 和包含 SEQ ID NO: 103 的氨基酸序列的 LC。在一些实施方案中, 所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域包含如 SEQ ID NO: 145 的重链可变区, 和如 SEQ ID NO: 149 的轻链可变区。在一些实施方案中, 其中所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域具有: 如 SEQ ID NO: 102 的氨基酸序列的 HC, 和如 SEQ ID NO: 103 的氨基酸序列的 LC。

25 在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体, 其中所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域或第一抗体(如 VHH) 包含如 SEQ ID NO: 7、8、9 所示的 CDR1、CDR2、CDR3, 或包含如 SEQ ID NO: 7、8、150 所示的 CDR1、CDR2、CDR3; 特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域或第二抗体的重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 121、122、123 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3, 轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 124、125、126 所示的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

35 在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物, 其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体, 其中所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域或第一抗体(如 VHH) 包含如 SEQ ID NO: 10、11、12 所示的 CDR1、CDR2、CDR3, 或包含如 SEQ ID NO: 10、11、151 所示的 CDR1、CDR2、CDR3; 特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域或第二抗体的重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 121、122、

123 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 124、125、126 所示的 LCDR1、LCDR2、LCDR3。

5 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，其中所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域或第一抗体具有：包含如 SEQ ID NO: 6、79、81、92、98、99 之一所示的氨基酸序列的 VHH，或包含与 SEQ ID NO: 6、79、81、92、98、99 之一具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的氨基酸序列的 VHH；所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域或第二抗体具有：包含如 SEQ ID NO: 145-147 任一项所示的氨基酸序列的 VH 或包含与 SEQ ID NO: 145-147 之一具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的氨基酸序列的 VH，和包含如 SEQ ID NO: 148-149 任一项所示的氨基酸序列的 VL 或包含与 SEQ ID NO: 148-149 之一具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的氨基酸序列的 VL；在一些实施方案中，所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域或第二抗体具有：包含 SEQ ID NO: 102 或与 SEQ ID NO: 102 具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的氨基酸序列的 HC，和包含 SEQ ID NO: 103 或与 SEQ ID NO: 103 具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性的氨基酸序列的 LC。在 20 一些实施方案中，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，其特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域或第一抗体具有如 SEQ ID NO: 81 所示的 VHH，其特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域具有如 SEQ ID NO: 145 所示的 VH 和如 SEQ ID NO: 149 所示的 VL。在一些实施方案中，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，其特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域或第一抗体具有如 SEQ ID NO: 81 所示的 VHH，其特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域具有如 SEQ ID NO: 102 所示的 HC 和如 SEQ ID NO: 103 所示的 LC。

30 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含 Fc 区；在一些实施方案中，所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域或第二抗体包含 Fc 区。在一些实施方案中，所述 Fc 为 IgG 同种型 Fc，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区；在一些实施方案中，所述 Fc 包括选自以下的一个或多个氨基酸突变（突变位点根据 EU 索引）：

i) 改变 CH1 的铰链区中的半胱氨酸残基的数量，以便于轻链和重链的组装或提高或降低抗体的稳定性；

35 ii) 使得与 Fc γ RIIIa 的结合增强的突变，以引起增强的 ADCC，使得与 Fc γ RIIb 的结合减弱的突变，例如 236A、239D、239E、332E、332D、239D/332E、267D、267E、328F、267E/328F、236A/332E、239D/332E/330Y、239D、332E/330L、299T、

297N 或其任意组合；

iii) 延长生物半衰期的突变，例如 T252L、T254S、T256F、428L、434A、434S 428L/434S 或其任意组合；

iv) 234、235、236、237、297、318、320 和 322 位的一个或多个氨基酸突变 5 或其任意组合，以改变抗体对效应配体的亲和力，同时保留亲本抗体的抗原结合能力；

v) 329、331 和 322 位的一个或多个氨基酸突变或其任意组合，使得抗体具有改变了的 C1q 结合和/或降低或消除补体依赖性细胞毒性 (CDC)；

vi) 231-239 内的一个或多个氨基酸突变或其任意组合，使得抗体固定补体的 10 能力改变；

vii) 238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、 270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、 296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、 329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、 15 388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439 中的一个或多个氨基酸突变或其任意组合，以提高 ADCC 的能力和/或提高抗体对 Fcγ 受体的亲和力；

viii) S228P、F234A、L235A 和/或 K447A 的氨基酸突变；

ix) S354C，E356D，M358L 和/或 T366W 的氨基酸突变。

20 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含：如 SEQ ID NO: 104 所示第一多肽链，和如 SEQ ID NO: 103 所示第二多肽链；如 SEQ ID NO: 105 所示第一多肽链，如 SEQ ID NO: 103 所示第二多肽链；如 SEQ ID NO: 102 所示第一多肽链，如 SEQ ID NO: 106 所示第二多肽链；如 SEQ ID NO: 102 所示第一多肽链，如 SEQ ID NO: 107 所示第二多肽 25 链；或如 SEQ ID NO: 108-112、114 任一所示第一多肽链，如 SEQ ID NO: 103 所示所示第二多肽链；或与上述第一多肽链和/或第二多肽链具有至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 的序列同一性的变体。

30 在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链，其中：所述第一多肽链包含 SEQ ID NO: 109 的氨基酸序列，所述第二多肽链包含 SEQ ID NO: 103 的氨基酸序列。 35 在一些实施方案中，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含两条相同的第一多肽链和两条相同的第二多肽链。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体为与如上任一项所述的双特异性抗体竞争性结合的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体具有下述特征中的至少一个：

- (a) 结合人 PVRIG 的 KD 值小于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$;
- (b) 阻断 PVRIG 与其配体（例如，PVRL2）的相互作用;
- 5 (c) 解除树突状细胞对 T 细胞的抑制作用，活化 T 细胞;
- (d) 解除肿瘤细胞对 NK 细胞的抑制作用;
- (e) 抑制肿瘤生长。

在一些实施方案中，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的 KD 值可以小于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ，小于 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ，小于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ，小于 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 。在一些实施方案中，
10 其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体能够抑制肿瘤生长至少约 10%，至少约 20%，至少约 30%，至少约 40%，至少约 50%，至少约 60%，至少约 70%，至少约 80%。

在一些实施方案中，如上任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

- 15 (a) 1mg/mL 至 100mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，
- (b) 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80，
- (c) 75mg/mL 至 90mg/mL 的蔗糖，和
- (d) 10mM 至 30mM 的组氨酸缓冲剂，药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.0。

在一些实施方案中，所述药物组合物包含如下组分：

- 20 (a) 50mg/mL 至 100mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，
- (b) 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80，
- (c) 80mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.0;

25 在一些实施方案中，所述药物组合物包含如下组分：

- (a) 50mg/mL 的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 109 的氨基酸序列的第一多肽链和包含 SEQ ID NO: 103 的氨基酸序列的第二多肽链，(b) 0.4mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 80mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 6.0。

30 在一些实施方案中，所述药物组合物包含如下组分：

- (a) 50mg/mL 至 100mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，
- (b) 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80，
- (c) 80mg/mL $\pm$ 5mg/mL 的蔗糖，和
- 35 (d) 10mM $\pm$ 5mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.0。

在一些实施方案中，所述药物组合物包含如下组分：

(a) 1mg/mL 至 100mg/mL 的所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，(b) 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 70mg/mL 至 90mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10mM 至 30mM 的组氨酸缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.5。

5 在一些实施方案中，所述药物组合物包含如下组分：

(a) 50mg/mL 至 100mg/mL 的所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，(b) 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 75mg/mL 至 80mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.5。

在一些实施方案中，所述药物组合物包含如下组分：

10 (a) 50mg/mL $\pm$ 5mg/mL 的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 109 的氨基酸序列的第一多肽链和包含 SEQ ID NO: 103 的氨基酸序列的第二多肽链，

(b) 0.4mg/mL $\pm$ 0.1mg/mL 的聚山梨酯 80，

(c) 80mg/mL $\pm$ 5mg/mL 的蔗糖，和

15 (d) 10mM $\pm$ 5mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 6.0 $\pm$ 0.2。

在一些实施方案中，所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 40mg/mL 至 60mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体（例如 1708-30H2），

20 (b) 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80，

(c) 75mg/mL 至 80mg/mL 的蔗糖，和

(d) 10mM 至 30mM 的组氨酸缓冲剂，药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.0。

在一些实施方案中，所述的药物组合物，其包含如下组分：

25 (a) 50mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体（例如 1708-30H2），(b) 0.4mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 75mg/mL 至 80mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10mM 至 30mM 的醋酸盐缓冲剂，药物组合物的 pH 为 5.0 至 5.5。

在一些实施方案中，所述的药物组合物，其包含如下组分：

30 (a) 50mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体（例如 1708-30H2），(b) 0.4mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 80mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 醋酸-醋酸钠盐缓冲剂，pH 为 5.0。

在一些实施方案中，所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 50mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体（例如 1708-30H2），(b) 0.4mg/mL 的聚山梨酯 80，(c) 80mg/mL 的蔗糖，和 (d) 10 mM 醋酸-醋酸钠盐缓冲剂，pH 为 5.5。

35 在一些实施方案中，所述的药物组合物，其包含如下组分：

(a) 50mg/mL $\pm$ 5mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体

(例如 1708-30H2),

(b) 0.4mg/mL $\pm$ 0.1mg/mL 的聚山梨酯 80,

(c) 75mg/mL 至 80mg/mL 的蔗糖, 和

(d) 10mM 至 30mM 的醋酸盐缓冲剂, 药物组合物的 pH 为 5.0 至 5.5。

5 在一些实施方案中, 所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 50mg/mL $\pm$ 5mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (例如 1708-30H2),

(b) 0.4mg/mL $\pm$ 0.1mg/mL 的聚山梨酯 80,

(c) 80mg/mL $\pm$ 5mg/mL 的蔗糖, 和

10 (d) 10 mM $\pm$ 5mM 醋酸-醋酸钠盐缓冲剂, pH 为 5.5 $\pm$ 0.2。

在一些实施方案中, 所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 50mg/mL $\pm$ 5mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (例如 1708-30H2), (b) 0.4mg/mL $\pm$ 0.1mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 80mg/mL $\pm$ 5mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10 mM $\pm$ 5mM 醋酸-醋酸钠盐缓冲剂, pH 为 5.5。

15 在一些实施方案中, 所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 50mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (例如 1708-30H2), (b) 0.4mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 80mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10 mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, pH 为 5.5。

在一些实施方案中, 所述的药物组合物, 其包含如下组分:

20 (a) 50mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (例如 1708-30H2), (b) 0.4mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 80mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10 mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, pH 为 6.0。

在一些实施方案中, 所述的药物组合物, 其包含如下组分:

25 (a) 50mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (例如 1708-30H2), (b) 0.4mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 80mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10 mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, pH 为 6.5。

在一些实施方案中, 所述的药物组合物, 其包含如下组分:

30 (a) 100mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (例如 1708-30H2), (b) 0.4mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 80mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10 mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, pH 为 6.0。

在一些实施方案中, 所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 50mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (例如 1708-30H2), (b) 0.2mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 80mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10 mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, pH 为 6.5。

35 在一些实施方案中, 所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 50mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (例如

1708-30H2), (b) 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 80mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10 mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, pH 为 6.5。

在一些实施方案中, 所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 50mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (例如
5 1708-30H2), (b) 0.4mg/mL 的聚山梨酯 20, (c) 80mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10 mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, pH 为 6.5。

在一些实施方案中, 所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 50mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (例如
10 1708-30H2), (b) 0.4mg/mL 的泊洛沙姆 188, (c) 80mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10 mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, pH 为 6.5。

在一些实施方案中, 所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 50mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (例如
1708-30H2), (b) 0.4mg/mL 的聚山梨酯 20, (c) 80mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10 mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, pH 为 5.5。

15 在一些实施方案中, 所述的药物组合物, 其包含如下组分:

(a) 50mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (例如
1708-30H2), (b) 0.4mg/mL 的聚山梨酯 20, (c) 75mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10 mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂, pH 为 5.5。

20 在一些实施方案中, 如上所述的药物组合物, 所述药物组合物是液体制剂。在
一些实施方案中, 所述液体制剂的溶剂是水。

本披露还提供一种的冻干制剂, 其特征在于所述冻干制剂复溶后可形成如上任
一项所述的药物组合物。

本披露还提供一种冻干制剂, 其为如上任一项所述的药物组合物的冻干形式
制剂。

25 本披露还提供一种制备冻干制剂的方法, 其中包括将如上任一项所述的药物组
合物进行冷冻干燥的步骤。在一些实施方案中, 如上任一项所述冷冻干燥依次包
括预冻、一次干燥和二次干燥的步骤。

本披露还提供一种冻干制剂, 所述制剂通过将如上任一项所述的药物组合物经
冷冻干燥获得。

30 本披露还提供一种复溶溶液, 其特征在于所述复溶溶液是通过将如上任一项所
述的冻干制剂经复溶制备获得。

本披露还提供一种复溶溶液, 其为如上任一项所述的冻干制剂的复溶形式制剂。

在一些实施方案中, 如上任一项的所述的复溶溶液, 其组分和含量与前述的药
物组合物的组分和含量相同。

35 在一些实施方案中, 如上任一项所述的复溶溶液, 其包含如下组分:

(a) 1mg/mL 至 150mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗

体, (b) 0.05mg/mL 至 1.0mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 70mg/mL 至 100mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 5mM 至 100mM 的组氨酸缓冲剂, 药物组合物的 pH 为 5.0 至 6.5。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的复溶溶液, 其包含如下组分:

- (a) 1mg/mL 至 100mg/mL 的所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体, (b) 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 70mg/mL 至 90mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10mM 至 30mM 的组氨酸缓冲剂, 所述药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.5。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的复溶溶液, 其包含如下组分:

- (a) 50mg/mL 至 100mg/mL 的所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体, (b) 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 75mg/mL 至 80mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂; 所述药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.5。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的复溶溶液, 其包含如下组分:

(a) 1mg/mL 至 100mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体, (b) 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 75mg/mL 至 90mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10mM 至 30mM 的组氨酸缓冲剂, 药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.0。

- 在一些实施方案中, 所述复溶溶液包含如下组分:

(a) 50mg/mL 至 100mg/mL 的如上任一项所述的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体, (b) 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 80mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂; 所述药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.0。

在一些实施方案中, 所述复溶溶液包含如下组分:

- (a) 50mg/mL 的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体, 所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 109 的氨基酸序列的第一多肽链和包含 SEQ ID NO: 103 的氨基酸序列的第二多肽链, (b) 0.4mg/mL 的聚山梨酯 80, (c) 80mg/mL 的蔗糖, 和 (d) 10mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂; 所述药物组合物的 pH 为 6.0。

- 在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物或复溶溶液, 其为静脉注射制剂、皮下注射制剂、腹腔注射制剂或肌肉注射制剂; 在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物或复溶溶液, 其为静脉注射制剂。

在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物或复溶溶液, 其适于静脉注射、皮下注射、腹腔注射或肌肉注射。

- 在一些实施方案中, 如上任一项所述的药物组合物或复溶溶液或冻干制剂, 其用于制备静脉注射、皮下注射、腹腔注射或肌肉注射的药物。

本披露还提供一种药盒, 其包括至少一个容器, 各容器独立地包含如上任一项所述的药物组合物、如上任一项所述的冻干制剂或如上任一项所述的复溶溶液。

- 在一些实施方案中, 本披露还提供诊断、治疗、缓解受试者病症的方法, 包含向所述受试者施用有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的药盒。

在一些实施方案中, 本披露还提供活化受试者的细胞毒性 T 细胞 (CTL) 的

方法，包含向所述受试者施用有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的药盒，其中所述受试者的所述 CTL 的亚组被活化。

5 在一些实施方案中，本披露还提供活化受试者的 NK 细胞的方法，包含向所述受试者施用有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的药盒，其中所述受试者的所述 NK 细胞的亚组被活化。

10 在一些实施方案中，本披露还提供活化受试者的 $\gamma\delta$ T 细胞的方法，包含向所述受试者施用有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的药盒，其中所述受试者的所述 $\gamma\delta$ T 细胞的亚组被活化。

15 在一些实施方案中，本披露还提供活化受试者的 Th1 细胞的方法，包含向所述受试者施用有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的药盒，其中所述受试者的所述 Th1 细胞的亚组被活化。

在一些实施方案中，本披露还提供活化、减少或消除受试者体内的调节性 T 细胞（Treg）中的至少一种的细胞数量和/或活性的方法，包含向所述受试者施用有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的药盒。

20 在一些实施方案中，本披露还提供增加受试者体内的干扰素- γ 产生和/或促炎性细胞因子分泌的方法，包含向所述受试者施用有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的药盒。

25 在一些实施方案中，本披露还提供抑制受试者体内的 PVRIG 和 PVLR2 的相互作用的方法，包含向所述受试者施用有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的药盒。

在一些实施方案中，本披露还提供如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的药盒在制备治疗疾病的药物中的用途。

30 在一些实施方案中，本披露还提供一种治疗疾病的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的药盒。

在一些实施方案中，本披露还提供如上任一项所述的药物组合物、如上任一项的冻干制剂、如上任一项的复溶溶液或如上任一项所述的药盒，其用于治疗疾病。

35 在一些具体实施方案中，前面任一项所述的疾病为增殖性疾病（例如肿瘤）。在一些具体实施方案中，所述肿瘤选自以下或其组合：前列腺癌、肝癌（HCC）、

结直肠癌（结肠癌、直肠癌）、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌（例如三阴性乳腺癌）、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、非黑色素瘤皮肤癌（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、食管癌（又称“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）。在一些具体实施方案中，上述疾病可以是与 PVRIG 和/或 TIGIT 异常表达相关的疾病。在一些具体实施方案中，所述肿瘤选自以下癌症或其组合：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）。在一些具体实施方案中，所述肿瘤选自以下癌症或其组合：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。在一些具体实施方案中，上述疾病患者具有与 PVRIG 和/或 TIGIT 相关的病况。在一些具体方案中，受试者病况包括表达或不表达 PVRIG 的癌症并且进一步包括非转移性或非浸润性以及浸润性或转移性癌症，其中免疫细胞、基质细胞或发生病变的细胞的 PVRIG 表达抑制抗肿瘤反应和抗浸润性免疫反应。在一些具体方案中，所述疾病为血管化肿瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤选自肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌、血液系统癌症或者任何特征在于不受控细胞生长的其它疾病或病症。

在一些实施方案中，所述疾病为感染或脓毒症。在一些具体方案中，所述感染是病原体感染，以病毒特异性 T 细胞反应的不同程度的功能性障碍为特征，如 HIV、HCV、HBV。在一些具体方案中，所述脓毒症选自重度脓毒症、脓毒性休克、全身炎症反应综合征（SIRS）、菌血症、败血症、毒血症和脓毒性综合征。

附图说明

图 1 为抗 PVRIG 抗体的 PVRIG 报告基因细胞活性检查结果。

图 2 为抗 PVRIG 抗体在 NK 细胞杀伤实验中激活 NK 细胞的活性检测结果。

图 3 为抗 PVRIG 抗体在 MLR 实验中激活 T 细胞的活性检测结果。

图 4A 至图 4B 为人源化的抗 PVRIG 抗体在 PVRIG 报告基因细胞活性检测结果。

图 5A 至图 5B 为人源化的抗 PVRIG 抗体在 NK 细胞杀伤实验中激活 NK 细胞的活性检测结果。

图 6A 至图 6E 分别显示人源化的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体对人 PVRIG 重组蛋白、人 PVRIG 过表达细胞、食蟹猴 PVRIG 重组蛋白、食蟹猴 PVRIG 过表

达细胞的结合活性、以及阻断人 PVRIG 与人 PVRL2 结合的活性检测结果。

图 7A 至图 7E 分别显示人源化的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体对人 TIGIT 重组蛋白、人 TIGIT 过表达细胞、食蟹猴 TIGIT 重组蛋白、食蟹猴 TIGIT 过表达细胞的结合活性、以及阻断人 TIGIT 与人 PVR 结合的活性检测结果。

5 图 8 为人源化的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体在 MLR 实验中激活 T 细胞的活性检测结果。

图 9A 至图 9B 分别显示抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体在人黑色素瘤 A375 混合人 PBMC 的小鼠皮下移植瘤模型中对小鼠体重和肿瘤体积的影响。

10 图 10A 至图 10B 分别显示抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体在人黑色素瘤 A375 混合人 PBMC 的小鼠皮下移植瘤模型中对小鼠体重和肿瘤体积的影响。

具体实施方式

术语

15 为了更容易理解本披露，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，否则本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本披露所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本披露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。

20 “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。

25 “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。

30 “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”指抗原上连续或不连续的，由本披露抗体识别的三维空间位点。

35 “抗体”或“免疫球蛋白”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于传统的抗体（由两条重链和两条轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构抗体），以及具有抗原结合活性的 Fab、Fv、sFv、F(ab')₂、线性抗体、单链

抗体、scFv、sdAb、sdFv、纳米抗体、肽抗体 peptibody、结构域抗体（重链（VH）抗体、轻链（VL）抗体）和多特异性抗体（双特异性抗体、diabody、triabody 和 tetrabody、串联二-scFv、串联三-scFv）。

本披露中使用的术语“抗体”意图涵盖全长抗体、其单个的链、及其任意具有抗原结合活性的部分（也即抗原结合片段）、结构域或片段；以及包含其单个的链及任意具有抗原结合活性的部分、结构域或片段的多特异性抗体（包括但不限于抗原结合结构域或片段，例如 VHH 结构域或 VH/VL 结构域）。传统的抗体或免疫球蛋白通常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。根据重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，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 (kappa) 链或 λ (lambda) 链。在一些实施方案中，本披露的抗体特异性地结合到 PVRIG 和/或 TIGIT。

本披露的“抗原结合片段”包括但不限于：(i) 由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的 Fab 片段；(ii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iii) F(ab')₂ 片段，一种包含两个连接着的 Fab 片段的二价片段；(vii) 单链 Fv 分子 (scFv)，其中 VH 结构域和 VL 结构域通过肽连接子连接，所述肽连接子允许两个结构域结合形成抗原结合位点；(Bird 等人，1988，Science 242: 423-426; Huston 等人，1988，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 85: 5879-5883) 242，通过引用完全并入本文中)；(iv) “双功能抗体”或“三功能抗体”，通过基因融合构造的多价或多特异性片段 (Tomlinson 等人，2000，Methods Enzymol. 326: 461-479; WO94/13804; Holliger 等人，1993，PNAS 90: 6444-6448，全部通过引用完全并入本文中)；(v) “结构域抗体”或“dAb”（有时称为“免疫球蛋白单一可变结构域”），包括来自其它物种的免疫球蛋白单一可变结构域，如啮齿动物（例如，如 WO00/29004 中所公开）、护士鲨和骆驼科 V-HH dAb；(vi) SMIP（小分子免疫药物）、骆驼抗体、纳米抗体以及 IgNAR；(vii) 上述 (i) - (vi) 的人源化抗体。

在未特殊指明的情况下，本披露的抗体通常使用 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。

术语“双特异性抗体”指能够对两个不同抗原或同一抗原的两个不同抗原表位特异性结合的抗体。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。
- 5 Fc 部分还可能会与受体 FcRn 结合，增加抗体血清半衰期。例如，典型的双特异性抗体结构模型如 VHH-IgG、KiH、CrossMAb、Triomab quadroma、FcΔAdp、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
- 10 （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）。

本披露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，本披露的抗体是重组抗体。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。

15

“单克隆抗体”是指由单一 B 细胞克隆产生的并且能够与特定抗原表位发生相互作用的抗体分子群体。而“多克隆抗体”是指含有由多个 B 细胞克隆产生的能够与特定抗原相互作用的抗体分子群体。单克隆抗体典型地对与其发生相互作用的特定抗原展现出单一的结合亲和力。

20

在本文中，抗原被更广义地定义，并且一般预期包括由抗体特异性识别的靶分子。因此包括用于产生抗体的免疫接种过程、或用于抗体文库筛选中使用的分子或模拟物。

25

“同源性”或“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。当两个待比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸残基占据时，如果两个 DNA 分子的一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同一性百分比是两个序列共有的匹配或同源位置数除以待比较的全部位置数×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。

30

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、移除或转移至其他蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

35

“免疫球蛋白结构域”是指抗体链的球形区域，或是指基本上由这类球形区域组成的多肽。在一些实施方式中，“抗原结合结构域”的非限制性的实例包括：Fab 片段、Fd 片段、F(ab')₂ 片段、scFv、全长抗体等。

“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由以下组成的免疫球蛋白结构域：

5 “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”、“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”。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。

10 “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。

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，来完成对 CDR 的确定性描绘或进行对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, Proc Natl 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（enthalpy）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。如本文使用的，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。本文使用的方法可利用根据这些方法中的任一种定义的 CDR。

35 对于包含超过一个 CDR 的任何给定实施例，可根据 Kabat、Chothia、延伸的、AbM、IMGT、接触和/或构象定义中的任一个来定义 CDR。

“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(例如在没有常规四链抗体中 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(其可以是重链结构域或轻链结构域,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,例如人源化 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的。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 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”; Nature 363, 446-448 (1993))。使用术语“VHH 结构域”以将所述可变结构域区别于常规四肽链结构抗体中存在的重链可变结构域(其在本披露中称为“VH 结构域”)以及轻链可变结构域(其在本披露中称为“VL 结构域”)。VHH 结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域(与常规四肽链结构抗体中的 VH 或 VL 结构域不同,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”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。

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。其它适用于 VHH 的编号系统或编码规则包括 Chothia、IMGT、AbM。

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披露所述的目的。

VHH 结构域(单独或作为较大多肽的一部分)提供许多优于使用常规 VH 及 VL 结构域、scFv 或常规抗体片段(例如 Fab-或 F(ab')₂-片段)的显著优势:

-仅需要单一结构域以高亲合力及高选择性结合抗原,从而使得既不需要存在

两个单独结构域，也不需要确保该两个结构域以适当空间构象及构型存在（例如 scFv 一般需要使用经特别设计的接头）；

-VHH 结构域可由单一基因表达且不需要翻译后折叠或修饰；

-VHH 结构域可改造成多价及多特异性格式；

5 -VHH 结构域高度可溶且无聚集趋势；

-VHH 结构域对热、pH、蛋白酶及变性剂高度稳定，且因此可在制备、储存或运输中，降低对冷冻设备的依赖性，从而达成节约成本、时间及环境；

-VHH 结构域可制备且相对廉价，甚至在生产所需的规模上亦如此；

10 -VHH 结构域与常规四肽链结构抗体及其抗原结合片段相比相对较小（大约 15kDa 或大小为常规 IgG 的 1/10），因此相比于常规四肽链结构抗体及其抗原结合片段，显示较高的组织渗透性且可以较高剂量给药；

-VHH 结构域可显示所谓腔结合性质（尤其由于与常规 VH 结构域相比其延长的 CDR3 环），从而可到达常规四肽链结构抗体及其抗原结合片段不可到达的靶及表位。

15 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。

“Fc 变异体”或“变异体 Fc”意指在 Fc 结构域中包含氨基酸修饰的蛋白质。

20 本披露的 Fc 变异体根据构成其的氨基酸修饰来定义。因此，举例来说，S228P 或 228P 是相对于亲本 Fc 多肽在位置 228 处具有脯氨酸取代的 Fc 变异体，其中编号是根据 EU 索引。WT 氨基酸可以不指明，在此情况下前述变异体称为 228P。

“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
25 VHH 序列的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基，从而实现“人源化”。本披露中亦称为“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他修饰，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
30 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异源蛋白成分，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”于其他
“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
35 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。本披露的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。此外, 为避免免疫原性下降所引起的活性下降, 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。

- 5 “亲和力成熟”的抗体, 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和力相比于其各自的亲本抗体有所增加。亲和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): 889896; KS Johnson 及 RE Hawkins, “Affinity maturation of antibodies using phage display”, Oxford University Press 1996。

- 通常, 本披露的抗体将以如于 Biacore 或 KinExA 或 Fortibio 测定中测量的优选 10^{-7} 至 10^{-10} 摩尔/升 (M)、更优选 10^{-8} 至 10^{-10} 摩尔/升、甚至更优选 10^{-9} 至 10^{-10} 或更低的解离常数(KD), 和/或以至少 10^{-7} M、优选至少 10^{-8} M、更优选至少 10^{-9} M, 更优选至少 10^{-10} M 的缔合常数 (KA) 结合所要结合的抗原 (即 PVRIG)。任何大于 10^{-4} M 的 KD 值一般都视为指示非特异性结合。抗体对抗原或表位的特异性结合可以以已知的任何适合方式来测定, 包括例如本披露所述的表面等离子体共振术 (SPR) 测定、Scatchard 测定和/或竞争性结合测定 (例如放射免疫测定 (RIA)、酶免疫测定 (EIA) 及夹心式竞争性测定。

- “表位”或可互换使用的“抗原决定簇”指抗体所结合的抗原上的任何部分。抗原决定簇通常包含化学活性表面基团, 例如氨基酸或糖侧链, 并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如, 表位通常以独特的空间构象包括至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续或非连续的氨基酸, 其可以是“线性”表位或“构象”表位。在线性表位中, 蛋白质与相互作用分子 (例如抗体) 之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中, 相互作用的位置位于彼此分开的氨基酸残基。可使用本领域中熟知的许多表位定位技术鉴别给定抗原的表位 (例如 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第 66 卷, G.E.Morris, Ed. (1996), US4708871)。
- 30 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 (高通量筛选方法如参见 WO03/48731)。因此, 可使用本领域技术人员已知的常规技术, 获得与本披露的抗体分子竞争结合 PVRIG 上的相同表位的抗体及其抗原结合片段。

- 35 “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。通常, 当使用重组人 PVRIG、TIGIT 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 (K_D) 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”在本文中可以与 “特异性结合的抗体” 互换使用。

“结合亲和力”在本文中用作两个分子 (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, 用于描述单价相互作用 (固有活性)。两个分子之间的结合亲和力可通过确定解离常数 (K_D) 来量化。可通过使用例如表面等离子共振 (SPR) 方法 (Biacore) 测量复合物形成和解离的动力学来确定 K_D 。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})。 K_D 通过方程 $K_D = k_d/k_a$ 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 (参见 Caceci 等人, 1984, Byte 9: 340-362; Wong&Lohman, 1993, PNAS 90: 5428-5432)。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、以及本文其它地方例举的其它测定。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 K_D 值与非目的相互作用 (例如已知不结合 PVRIG 的对照抗体) 的 K_D 值进行评价。在一些实施方案中, 本披露的抗 PVRIG 抗体能够与其靶结合的亲和力比它与另一种非 PVRIG 分子结合的亲和力大至少 2 倍、10 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍、1,000 倍或 10,000 倍, 这里不属于限制性定义。

“保守修饰”适用于氨基酸和核苷酸序列。对于特定的核苷酸序列, 保守修饰是指编码相同或基本相同的氨基酸序列的那些核酸的相互置换, 或在核苷酸不编码氨基酸序列的情况下, 是指基本上相同的核苷酸序列。对于氨基酸序列, 保守修饰是指具有类似特征 (例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等) 的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸, 使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓, 一般而言, 多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性 (参见例如 Watson 等 (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页, (第 4 版))。

“氨基酸突变”包括氨基酸取代、缺失、插入、修饰及其任意组合, 以实现最终构建体, 使得最终构建体拥有期望的特性, 例如增强的稳定性、提高的活性。氨基酸序列缺失和插入包括在氨基端和/或羧基端的缺失和插入。优选的氨基酸突变是氨基酸取代。为了改变例如抗 PVRIG 抗体的结合特性, 可以将非保守性的氨基酸取代, 即将一个氨基酸用具有不同结构和/或化学特性的另一种氨基酸替换。优选的氨基酸取代包括用亲水性氨基酸替换疏水性氨基酸。氨基酸取代包括由非天然存在的氨基酸或由 20 种标准氨基酸的天然存在的氨基酸衍生物 (例如 4-羟脯氨酸、3-甲基组氨酸、鸟氨酸、高丝氨酸、5-羟赖氨酸) 替换。可以使用本领域中

公知的遗传或化学方法生成氨基酸突变，包括定点诱变、PCR、基因合成、化学修饰等方法。氨基酸突变可以发生在抗体的 CDR 区、FR 区或 Fc 区。

本披露工程化的抗体或抗原结合片段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 CHO 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。

“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地场合。例如，“任选包含 1-3 个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述抗体（例如抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体）或其生理学上/药学可接受的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，其中其他组分的示例是：例如生理学/药学可接受的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

“药学可接受的载体”或“药学可接受的赋形剂”包括当与活性成分组合时，允许该成分保留生物学活性并且不与受试者的免疫系统反应的任何材料。例子包括但不限于任何标准药物载体，例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳剂如油/水乳剂、和各种类型的润湿剂。在一些实施例中，用于肠胃外施用的稀释剂是磷酸盐缓冲盐水（PBS）或生理（0.9%）盐水。包含此类载体的组合物通过众所周知的常规方法配制（参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, A.Gennaro, 编辑, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; 以及 R Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第 20 版 Mack Publishing, 2000）。

“缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而调节 pH 变化的缓冲剂。将 pH 控制在适当范围中的缓冲剂的例子包括醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸、草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、枸橼酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。

“组氨酸缓冲剂”是包含组氨酸的缓冲剂。组氨酸缓冲剂的实例包括组氨酸-盐酸组氨酸，组氨酸-醋酸组氨酸，组氨酸-磷酸组氨酸，组氨酸-硫酸组氨酸等缓冲剂，优选组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂。组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂可由组氨酸与盐酸配制而成，或者由组氨酸与盐酸组氨酸配制而成。

“醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂。醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸-醋酸钠盐、组氨酸-醋酸组氨酸、醋酸-醋酸钾、醋酸-醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。优选的醋酸盐缓冲剂是醋酸-醋酸钠盐。

“枸橼酸盐缓冲剂”是包括枸橼酸根离子的缓冲剂。枸橼酸盐缓冲剂的实例包括枸橼酸-枸橼酸钠、枸橼酸-枸橼酸钾、枸橼酸-枸橼酸钙、枸橼酸-枸橼酸镁等。优选的枸橼酸盐缓冲剂是枸橼酸-枸橼酸钠。

5 “琥珀酸盐缓冲剂”是包括琥珀酸根离子的缓冲剂。琥珀酸盐缓冲剂的实例包括琥珀酸-琥珀酸钠盐、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙盐等。优选的琥珀酸盐缓冲剂是琥珀酸-琥珀酸钠盐。示例性的，所述的琥珀酸-琥珀酸钠可由琥珀酸与氢氧化钠配制而成，或由琥珀酸与琥珀酸钠盐配制而成。

10 “磷酸盐缓冲剂”是包括磷酸根离子的缓冲剂。磷酸盐缓冲剂的实例包括磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾、磷酸氢二钠-枸橼酸等。优选的磷酸盐缓冲剂是磷酸氢二钠-磷酸二氢钠。

“冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或液体或溶液制剂经冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。

本披露所述的药物组合物能够达到一种稳定的效果：其中的抗体（例如抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体）在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性
15 和/或生物学活性的药物组合物。优选地，药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质稳定性的分析技术，可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。

稳定的制剂包括在下述情况下没有观察到统计学显著变化的制剂：在冷藏温
20 度（2-8°C）保存至少 3 个月、优选 6 个月、更优选 1 年，甚至更优选地多达 2 年。

另外，稳定的液体制剂也包括这样的液体制剂：其在包括 25°C 的温度保存包括 1 个月、3 个月或 6 个月在内的时段后表现出期望的特征。稳定性的典型的例子：
25 通过 SEC-HPLC 测得，通常不超过约 10%、优选不超过约 5%的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体发生聚集或降解。通过视觉分析，制剂是淡黄色近无色澄明液体或者无色澄明液体，或澄清至稍微乳白色。所述制剂的浓度、pH 和重量克分子渗透压浓度具有不超过±10%变化。通常观察到不超过约 10%、优选不超过约 5%的减少。通常形成不超过约 10%、优选不超过约 5%的聚集。

在一些实施方案中，本披露的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体制剂在 40°C 高温条件下放置一个月，SEC 单体%大于或等于 95%（例如大于 95%、大于 96%、
30 大于 97%、大于 98%或大于 99%）和/或 CE-SDS（NR）%大于或等于 95%（例如大于 95%、大于 96%、大于 97%、大于 98%或大于 99%）。

如果在目检颜色和/或澄清度后，或者通过 UV 光散射、尺寸排阻色谱法（SEC）和动态光散射（DLS）测得，抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性，那么所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体在药物制剂中“保
35 留它的物理稳定性”。蛋白构象的变化可以通过荧光光谱法（其确定蛋白三级结构）和通过 FTIR 光谱法（其确定蛋白二级结构）来评价。

如果抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体没有显示出显著的化学改变，那么所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体在药物制剂中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式的蛋白，可以评估化学稳定性。经常改变蛋白化学结构的降解过程包括水解或截短（通过诸如尺寸排阻色谱法和 CE-SDS 等方法来评价）、氧化（通过诸如与质谱法或 MALDI/TOF/MS 结合的肽谱法等方法来评价）、脱酰胺作用（通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价）和异构化（通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等来评价）。

如果抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体在给定时间的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内，那么所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体在药物制剂中“保留它的生物活性”。

“施用”、“给予”和“处理”，当其应用于动物、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。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、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。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当其应用于人、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，例如包含本披露的任一种的药物组合物，所述受试者具有一种或多种疾病症状，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，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。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。尽管本披露的实施方案（例如治疗方法或药盒）在缓解每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。本披露的受试者可以是动物或人类受试者。

本披露的药物组合物可通过任何合适的手段施用，包括肠胃外、肺内和鼻内，并且如果需要局部治疗，则病灶内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何适当的途径，例如，通过注射，诸如静脉内或皮下注射。本文考虑多种给药时间方案，包括但不限于，单次或在多个时间点多次施用，推注施用和脉冲输注。在一些实施方案中，本披露的药物组合物通过静脉内施用。

本披露的药物组合物将以符合良好医疗实践的方式配制、给药和施用。在此背景下考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个体受试者的临床状况、病症的起因、试剂的递送部位、施用方法、施用时间安排以及医学从业者已知的其他因素。任选地，药物组合物还可以与用于预防或治疗所述病症的一种或更多种其它试剂一起配制。此类其它试剂的有效量取决于药物组合物中存在的抗原结合分子的量、病症或治疗的类型以及其它因素。可以与本文所述相同的剂量和施用路径使用，或以本文所述剂量的约 1 至 99% 使用，或以任何剂量使用，并通过经验/临床确定为合适的任何途径使用。

在以上说明书中提出了本披露一种或多种实施方式的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本披露，但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书，本披露的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中，除非上下文中有清楚的另外指明，单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语都具有本披露所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本披露的优选实施方式。这些实施例不应以任何方式理解为限制本披露的范围，本披露的范围由权利要求书限定。

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。

实施例 - 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体制备与检测

PCT/CN2021/080470（申请日：2021.3.13；优先权专利申请号：CN202010174835.4）通过援引完整收入本披露。

实施例 1. PVRIG 蛋白质序列及制备

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) 为购买自 Acrobiosystems 公司的纯化商业蛋白试剂，其序列见表 1。

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：

5 TPEVWVQVQMEATELSSFTVHCGFLGPGSISLVTVSWGGPDGAGGTKLAVLHP
ELGTRQWAPARQARWETQSSISLALED SGASSPFANTTFCCKFASFPEGSWESCG
SLPPSSDPGLSAPPTVPILRADHHHHHHH (SEQ ID NO: 1)

在 HEK293 细胞中通过常规方法进行瞬时转染表达重组蛋白，收集上清并通过 Ni-NTA 进行纯化。经检测，获得 cyno-PVRIG-his。

10

实施例 2. 抗人 PVRIG 单域抗体的产生

抗人 PVRIG 单克隆单域抗体通过免疫骆驼产生。免疫抗原为带 his 标签的人 PVRIG 重组蛋白 (h-PVRIG-his)。用弗氏佐剂 (Sigma, Lot No.: F5881/F5506) 乳化：首次用弗氏完全佐剂 (CFA) CFA，其余加强免疫用弗氏不完全佐剂 (IFA)。

15 免疫注射时间为第 0，14，28，42 天。于第 56 天采血进行血检，用 ELISA 方法检测骆驼血清，确定骆驼血清中的抗体滴度。

取 200mL 骆驼外周血，分离其中的 PBMC，用 Trizol 提取细胞中的 RNA，并反转录成 cDNA。用 PCR 的方法扩增单域抗体可变区的基因，克隆到噬菌体载体中，从而建立抗人 PVRIG 单域抗体的噬菌体文库。

20 将噬菌体文库用 BSA 稀释封闭，与磁珠 Dynabeads (M-280, invitrogen) 共孵育，收集负筛孵育后的噬菌体。用生物素标记的带有 his 标签的人 PVRIG 包被封闭 Dynabeads，将负筛后收集的噬菌体悬液与所述 Dynabeads 孵育，用胰酶洗脱噬菌体。经过 3 轮筛选，挑选第 3 轮筛选获得的 400 个克隆进行测序，其中 5 株单域抗体的重链序列如表 2 所示，不同编码规则的 CDR 如表 3 所示。

25 表 2. 抗 PVRIG 抗体重链可变区 (HCVR) 序列

抗体编号	重链可变区氨基酸序列		序列编号
20	HCVR	DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASRYTSRTDC MGWFRQAPGKEHEGVAHIDSDGIPRYVDSVKGR FTISQDHAKNTLYLQMNSLKPEDSATYYCVVGF KFDDDYCAPNDWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 2
30	HCVR	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCEASGYSSGDC MGWFRRAPGKERDEGVATIDNAGRIKYADSVKG RFTISHGNGKYILYLQMNSLKPEDTDMYYCAAG WTFGGNCSPADWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 3
38	HCVR	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASPSTYGPSD MAWFRQAPGKQREGVATISAAGRLTYTDSVRG RFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAMYYCAA	SEQ ID NO: 4

		DFAGGSSLFADYKYWGQGTQVTVSS	
39	HCVR	QVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCAASRYTSRTDC MGWFRQAPGKEREGVAHIDSDGIPRYVESVKGR FTISQDHAKNTLYLQMNSLKPEDSATYYCVVGF KFGDYCAPNDWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 5
151	HCVR	HVQLVESGGGVSQAGGSLRLSCVASASGFTYRP YCMAWFRQAPGKEREAAGIDIFGGTTYADSVK GRFTASRDNAGFSLFLQMNDLKPEDTAMYYCAA GDSPDGRCPPLGQGLNYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 6

表 3. 抗 PVRIG 抗体的重链互补决定区 (CDR) 序列

抗体编号	CDR	Kabat 编码规则	Chothia 编码规则	IMGT 编码规则	AbM 编码规则
20	HCDR1	TDCMG (SEQ ID NO: 7)	RYTSRTD (SEQ ID NO: 22)	RYTSRTDC (SEQ ID NO: 37)	RYTSRTDCMG (SEQ ID NO: 52)
	HCDR2	HIDSDGIPRYV DSVKG (SEQ ID NO: 8)	DSDGI (SEQ ID NO: 23)	IDSDGIP (SEQ ID NO: 38)	HIDSDGIPR (SEQ ID NO: 53)
	HCDR3	GFKFDDDYCA PND (SEQ ID NO: 9)	GFKFDDDYCA PND (SEQ ID NO: 24)	VVGFKFDDDYCA PND (SEQ ID NO: 39)	GFKFDDDYCAP ND (SEQ ID NO: 54)
30	HCDR1	GDCMG (SEQ ID NO: 10)	GYSYSGD (SEQ ID NO: 25)	GYSYSGDC (SEQ ID NO: 40)	GYSYSGDCMG (SEQ ID NO: 55)
	HCDR2	TIDNAGRIKYA DSVKG (SEQ ID NO: 11)	DNAGR (SEQ ID NO: 26)	IDNAGRI (SEQ ID NO: 41)	TIDNAGRIK (SEQ ID NO: 56)
	HCDR3	GWTFGGNCSP AD (SEQ ID NO: 12)	GWTFGGNCSP AD (SEQ ID NO: 27)	AAGWTFGGNCSP AD (SEQ ID NO: 42)	GWTFGGNCSP AD (SEQ ID NO: 57)
38	HCDR1	PSDMA (SEQ ID NO: 13)	PSTYGPS (SEQ ID NO: 28)	PSTYGPSD (SEQ ID NO: 43)	PSTYGPSDMA (SEQ ID NO: 58)
	HCDR2	TISAAGRLTY TDSVRG (SEQ ID NO: 14)	SAAGRL (SEQ ID NO: 29)	ISAAGRLT (SEQ ID NO: 44)	TISAAGRLTY (SEQ ID NO: 59)
	HCDR3	DFAGGSSLFAD YKY (SEQ ID NO: 15)	DFAGGSSLFAD YKY (SEQ ID NO: 30)	AADFAGGSSLFAD YKY (SEQ ID NO: 45)	DFAGGSSLFAD YKY (SEQ ID NO: 60)
39	HCDR1	TDCMG (SEQ ID NO: 16)	RYTSRTD (SEQ ID NO: 31)	RYTSRTDC (SEQ ID NO: 46)	RYTSRTDCMG (SEQ ID NO: 61)

	HCDR2	HIDSDGIPRYVESVKG (SEQ ID NO: 17)	DSDGI (SEQ ID NO: 32)	IDSDGIP (SEQ ID NO: 47)	HIDSDGIPR (SEQ ID NO: 62)
	HCDR3	GFKFGDYCAPND (SEQ ID NO: 18)	GFKFGDYCAPND (SEQ ID NO: 33)	VVGFKFGDYCAPND (SEQ ID NO: 48)	GFKFGDYCAPND (SEQ ID NO: 63)
151	HCDR1	YRPYCMA (SEQ ID NO: 19)	ASGFTYRPY (SEQ ID NO: 34)	ASGFTYRPYC (SEQ ID NO: 49)	ASGFTYRPYCMA (SEQ ID NO: 64)
	HCDR2	GIDIFGGTTYADSVKG (SEQ ID NO: 20)	DIFGG (SEQ ID NO: 35)	IDIFGGT (SEQ ID NO: 50)	GIDIFGGTT (SEQ ID NO: 65)
	HCDR3	GDSPDGRCPPLGQGLNY (SEQ ID NO: 21)	GDSPDGRCPPLGQGLNY (SEQ ID NO: 36)	AAGDSPDGRCPPLGQGLNY (SEQ ID NO: 51)	GDSPDGRCPPLGQGLNY (SEQ ID NO: 66)

实施例 3. 全长抗 PVRIG 抗体的制备

- 将实施例 2 中 5 个抗体的重链可变区与人 IgG4 重链 Fc 区域连接, 构造形成全长抗 PVRIG 抗体。其中重链 Fc 区域包括铰链(hinge)区, 并带有 S228P, F234A, L235A, K447A 突变 (Eu 命名系统)。WO2016134333A1 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, 能与人 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 个抗体和阳性抗体的全长序列如表 4 所示。

表 4. 全人源抗 PVRIG 抗体的重轻链全长序列

抗体编号	重/轻链全长氨基酸序列	序列编号
20	HC DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASRYTSRTDCMGWFRQAPGK EHEGVAHIDSDGIPRYVDSVKGRFTISQDHAKNTLYLQMNSLKPE DSATYYCVVGFKFDDDYCAPNDWGQGTQVTVSSESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGA	SEQ ID NO: 67
30	HC HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCEASGYSYSGDCMGWFRRAPGK ERDEGVATIDNAGRIKYADSVKGRFTISHGNGKYILYLQMNSLKPE EDTDMYYCAAGWTFGGNCSPADWGQGTQVTVSSESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK	SEQ ID NO: 68

		<u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF</u> <u>LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGA</u>	
38	HC	<u>QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASPSTYGPSDMAWFRQAPGK</u> <u>QREGVATISAAGRLTYTDSVRGRFTISRDNANTMYLQMNSLK</u> <u>PEDTAMYYCAADFAGGSSLFADYKYWGQGTQVTVSSESKYGPP</u> <u>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP</u> <u>EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL</u> <u>NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT</u> <u>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF</u> <u>FLYRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGA</u>	SEQ ID NO: 69
39	HC	<u>QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASRYTSRTDCMGWFRQAPGK</u> <u>EREGVAHIDSDGIPRYVESVKGRFTISQDHAKNTLYLQMNSLKPE</u> <u>DSATYYCVVGFKFGDYCAPNDWGQGTQVTVSSESKYGPPCPPCP</u> <u>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF</u> <u>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK</u> <u>EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ</u> <u>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY</u> <u>SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGA</u>	SEQ ID NO: 70
151	HC	<u>HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAP</u> <u>GKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTASRDNAGFSLFLQMNDLK</u> <u>PEDTAMYYCAAGDSPDGRCPPLGQGLNYWGQGTQVTVSSESKY</u> <u>GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQ</u> <u>EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ</u> <u>DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE</u> <u>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD</u> <u>DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS</u> <u>LGA</u>	SEQ ID NO: 71
Tab5	HC	<u>EVQLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTFGTSSMNWVRQAPGK</u> <u>GLEWVAVISFDGTEIHYADSVKGRFTISRDNASKSTVFLQMNSLRP</u> <u>DDTALYYCAKSGSNIYFYSMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP</u> <u>LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA</u> <u>VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVES</u> <u>KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</u> <u>VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP</u> <u>PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV</u> <u>LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS</u> <u>LSLGA</u>	SEQ ID NO: 72
	LC	<u>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAGQSISGWLAWFQQKPGKAPN</u> <u>LLIYETSTLESGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQYY</u> <u>SYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN</u> <u>FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS</u> <u>KADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC</u>	SEQ ID NO: 73

(注：下划线为重链的 Fc 结构域)

- 合成编码上述序列的基因序列，用 BamHI 和 XhoI 消化后，通过 BamHI / XhoI 酶切位点插入到 pcDNA3.1 表达载体（Life Technologies Cat. No. V790-20）中。将
- 5 表达载体和转染试剂 PEI（Polysciences, Inc. Cat. No. 23966）以 1:2 的比例转染 HEK293 细胞（Life Technologies Cat. No. 11625019），并置于 CO₂ 孵育箱中孵育 4-5 天。表达的抗体通过离心回收后，按常规方法进行抗体纯化，经检测，获得目的抗体。

实施例 4. 抗 PVRIG 抗体与 PVRIG 重组蛋白的结合实验

ELISA 实验被用来检测抗 PVRIG 抗体的结合特性。用直接包被带 his 标签的 PVRIG 重组蛋白，抗体加入后，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。

人、食蟹猴或小鼠 PVRIG 蛋白包被 96 孔酶标板，按 1 $\mu\text{g/mL}$ 浓度每孔 100 μL ，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗液洗三遍，每孔 250 μL 。每次洗涤震荡 10 秒以保证充分清洗。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 250 μL 。每次洗涤震荡 10 秒以保证充分清洗。每孔加 100 μL 用稀释液稀释好的抗 PVRIG 待测抗体。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。洗液洗三遍，每孔 250 μL 。每孔加入 100 μL HRP 标记的抗人 IgG 二抗（Sigma，A8667）。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。洗液洗三遍，每孔 250 μL 。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 M μ LtiSkanFc 酶标仪读取 450nm OD 值，计算抗 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 5. 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)	鼠 PVRIG-Fc ELISA EC ₅₀ (nM)
20	0.40	0.14	无结合
30	0.26	0.16	无结合
38	0.26	0.40	无结合
39	0.27	0.16	无结合
151	2.15	2.43	无结合
Tab5	2.86	无结合	无结合
IgG4	无结合	无结合	无结合

实施例 5. 抗 PVRIG 抗体与表达 PVRIG 的细胞结合实验

用流式细胞仪（FACS）来检测抗 PVRIG 抗体的结合特性。构建过表达人或食蟹猴 PVRIG 的细胞株，抗体加入后，通过加入二抗检测抗体与抗原结合的活性。

将带有人或食蟹猴 PVRIG 基因序列的表达质粒在 HEK293 细胞中进行转染，并用抗生素筛选和无限稀释法获得过表达稳定转染单克隆细胞株。在 96 孔板中每孔接种 2×10^5 个过表达细胞。300g 离心 5 分钟，去除上清，加入 100 μL 待测抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。离心去除上清，用 200 μL 洗液（PBS+2% FBS）洗涤 3 次，加入 100 μL 1:500 稀释的用 Alexa Fluor 488 标记的抗人 IgG 二抗（Invitrogen，A-11013），4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。离心去除上清，用 200 μL 洗液（PBS+2% FBS）洗涤 3 次。用 100 μL 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 6. 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)
20	N.A.	N.A.
30	N.A.	0.02
38	0.24	0.34
39	0.004	6.97
151	0.01	2.23
Tab5	2.13	无结合
IgG4	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。)

实施例 6. 抗 PVRIG 抗体阻断 PVRIG 和 PVRL2 结合实验

本实验中，通过体外阻断实验，检测所筛选出来的抗 PVRIG 抗体阻断人 PVRIG 和其配体人 PVRL2 的结合能力。具体方法是将带小鼠 IgG2a Fc 标签的人 PVRIG 重组蛋白 (h-PVRIG-mIgG2a Fc) 包被到 96 孔酶标板上，加入抗 PVRIG 抗体充分结合占据表位后，再加入带 his 标签的 PVRL2 (PV2-H52E2, AcroBiosystem)，通过检测 his 标签，来计算 PVRIG 与 PVRL2 的结合量，计算抗 PVRIG 抗体对 PVRIG 活性位点阻断的 IC₅₀ 值。

h-PVRIG-mIgG2a Fc 蛋白包被 96 孔酶标板，按 1μg/mL 浓度每孔 100 μL，4℃ 孵育过夜。洗液洗三遍，每孔 250μL。每次洗涤震荡 10 秒以保证充分清洗。加入 300μL/孔封闭液室温孵育 1 小时。洗液洗三遍，每孔 250 μL。每次洗涤震荡 10 秒以保证充分清洗。每孔加 50 μL 稀释好的抗 PVRIG 待测抗体和 50 μL 带 his 标签的配体 PVRL2，37℃孵育 1 小时。洗液洗三遍，每孔 250 μL。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 250 μL。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。

结果显示，所有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)
20	1.18
30	1.11
38	0.93

39	0.76
151	0.37
Tab5	1.16
IgG4	无阻断

实施例 7. 抗 PVRIG 抗体与 PVRIG 的亲合力测定

将 Protein A 生物传感器(Fortebio, #18-5010)浸泡在 200 μ L 的 KB 缓冲剂(PBS, pH 7.4, 0.02% tween-20, 0.1% BSA) 中 60 秒, 进行湿润处理。然后, 用 KB 缓冲剂将抗 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 缓冲剂中 100 秒, 以洗脱多余的抗体。将带有 his 标签的人 PVRIG 用 KB 缓冲剂以 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。将传感器置于 KB 缓冲剂中解离 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 8 所示。

结果显示, 所有检测抗体均具有与人 PVRIG 的高亲合力。

表 8. 抗 PVRIG 抗体与人 PVRIG 的亲合力

抗体编号	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
20	3.43E+05	8.07E-05	2.36E-10
30	2.84E+05	2.05E-04	7.23E-10
38	1.32E+05	2.87E-04	2.17E-09
39	2.42E+05	1.69E-04	6.96E-10
151	2.61E+05	5.22E-05	2.00E-10
Tab5	7.37E+05	1.61E-05	2.19E-10

实施例 8. 抗 PVRIG 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 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。加入 1E5 个 293F-OS8-PVRL2 细胞, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 小时。离心去除上清, 加入 Luciferase 缓冲剂 (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。实验结果如图 1 和表 9 所示。

结果显示,所有检测抗体均有较强的激活 Jurkat 细胞中 Luciferase 的能力,活性是阳性抗体的 3.7-18.5 倍,证明这些抗体可以结合 PVRIG 并阻断 PVRL2 与 PVRIG 的结合。

表 9. 抗 PVRIG 抗体报告基因细胞活性实验结果

抗体株编号	PVRIG 报告基因细胞活性实验 EC ₅₀ (nM)
20	0.04
30	0.06
38	0.20
39	0.06
151	0.04
Tab5	0.74
IgG4	无结合

5

实施例 9. 抗 PVRIG 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。

- 10 将培养的 NK92 细胞系(人恶性非霍奇金淋巴瘤患者的 NK 细胞)用洗液(包括 RPMI 1640, 5% FBS, 10 ng/mL IL-2)洗涤两次,并重悬至 2×10^6 个/mL 的密度。在 96 孔板中每孔加入 50 μ L (总计 1×10^5 个) NK92 细胞。加入 50 μ L 20 nM 或 100 nM 待测抗体, 37°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
- 15 细胞与 K562 细胞个数的比例为 10:1。37°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,裂解孔中所有细胞,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), 150 μ L 只包括 K562 细胞的样品(对照组三),进行同样的操作。
- 20

根据如下公式,计算杀伤活性:

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

- 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。
- 25

实验结果如图 2 和表 10 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 10. 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)	
	20 nM 抗体	100 nM 抗体
20	35±2	33±2
30	36±5	39±5
38	29±2	27±2
39	32±3	30±3
151	35±3	33±2
Tab5	32±2	32±3
IgG4	22±1	22±2

实施例 10. 抗 PVRIG 抗体的混合淋巴细胞反应 (MLR) 实验

PVRIG 在 T 细胞上表达, 而 PVRL2 在树突状细胞(DC 细胞)中表达。抗 PVRIG 抗体可以通过阻断 PVRL2 与 PVRIG 的结合, 解除树突状细胞对 T 细胞的抑制作用, 活化 T 细胞。

混合淋巴细胞反应, 是指两个无关个体、功能正常的淋巴细胞在体外混合培养时, 由于主要组织相容性抗原不同, 可相互刺激对方的 T 细胞发生增殖。从第一个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) 的终浓度添加细胞因子, 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 µg/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 1×10⁵ 个 CD3⁺T 细胞和 2×10⁴ 个 DC 细胞。加入待测抗体, 37℃孵育 120h, 取上清, 用 ELISA 试剂盒 (R&D, DY202) 检测上清中的 IFN γ 含量。实验结果如图 3 和表 11 所示。

结果表明, 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, 本公开的抗体较之阳性对照 Tab5 的效果更优。

表11. 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±标准差)		
	4 nM 抗体	20 nM 抗体	100 nM 抗体
30	1675±101	1911±347	1576±288
38	1388±232	2024±491	2126±465
151	1498±175	2224±162	1798±373
Tab5	912±173	1425±330	2349±148
IgG4	984±335	814±112	1309±437

实施例11. 抗PVRIG抗体的人源化改造

在所获得的骆驼单域抗体 20、抗体 30、抗体 38、抗体 39 和抗体 151 的 VH

- 典型结构的基础上，将重链可变区序列与抗体 GermLine 数据库比较，获得同源性高的人种系模板。将骆驼单域抗体的框架区替换为人种系模板的重链框架区，CDR（根据 Kabat 编号系统）保留，再与人源 IgG 的 Fc 区域（带有 S228P，F234A，L235A，K447A 突变的 IgG4 Fc）重组。以骆驼单域抗体的三维结构为基础，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表 12-16 所示。

表 12. 抗体 20 的人种系模板和人源化抗体序列

抗体编号	重链可变区氨基酸序列		序列编号
模板 IGHV3-7*01	HCV R	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCAR	SEQ ID NO: 74
20H1	HCV R	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST DCMGWFRQAPGKGLEGV AHIDSDGIPRYVD SVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCVVGFKFDEEDYCAPNDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 75
20H2	HCV R	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSRT DCMGWFRQAPGKGLEGV AHIDSDGIPRYVD SVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCVVGFKFDEEDYCAPNDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 76
20H3	HCV R	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFST DCMGWFRQAPGKGLEGV AHIDSDGIPRYVD SVKGRFTISQDHAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCVVGFKFDEEDYCAPNDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 77
20H4	HCV R	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTSRT DCMGWFRQAPGKGLEGV AHIDSDGIPRYVD SVKGRFTISQDHAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCVVGFKFDEEDYCAPNDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 78
20H5	HCV R	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTSRT DCMGWFRQAPGKEHEGV AHIDSDGIPRYVD SVKGRFTISQDHAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCVVGFKFDEEDYCAPNDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 79

- 10 根据表 12，抗体 20H1-20H5 包含如 TDCMG (SEQ ID NO: 7) 所示的 CDR1，如 HIDSDGIPRYVDSVKG (SEQ ID NO: 8) 所示的 CDR2，和如 GFKFDEEDYCAPND (SEQ ID NO: 150) 所示的 CDR3。

表 13. 抗体 30 的人种系模板和人源化抗体序列

抗体编号	重链可变区氨基酸序列		序列编号
模板 IGHV3-7*01	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVK GRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	SEQ ID NO: 74
30H1	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGDC MGWFRQAPGKGLEGVATIDNAGRIKYADSVKGR	SEQ ID NO: 80

		FTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCSPADWGQGTQVTVSS	
30H2	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGDCMGWFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRIKYADSVKG RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCSPADWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 81
30H3	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYSGDCMGWFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRIKYADSVKG RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCSPADWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 82
30H4	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGDCMGWFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRIKYADSVKG RFTISHGNAKYILYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCSPADWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 83
30H5	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSYSGDCMGWFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRIKYADSVKG RFTISHGNAKYILYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWTFGGQCSPADWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 84

根据表 13, 抗体 30H1-30H5 包含如 GDCMG (SEQ ID NO: 10) 所示的 CDR1, 如 TIDNAGRIKYADSVKG (SEQ ID NO: 11) 所示的 CDR2, 如 GWTFGGQCSPAD (SEQ ID NO: 151) 所示的 CDR3。

表 14. 抗体 38 的人种系模板和人源化抗体序列

抗体编号	重链可变区氨基酸序列		序列编号
模板 IGHV3-3 0 *02	HCVR	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	SEQ ID NO: 85
38H2	HCVR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSPSDMAWFRQAPGKGLEGVATISAAGRITYTDSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFAAGSSLFADYKYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 86
38H4	HCVR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASPFTYGPSDMAWFRQAPGKGLEGVATISAAGRITYTDSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFAGGSSLFADYKYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 87
38H7	HCVR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASPSTYGPSDMAWFRQAPGKQREGVATISAAGRITYTDSVRGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFAGGSSLFADYKYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 88
38H8	HCVR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASPSTYGPSDMAWFRQAPGKGLEGVATISAAGRITYTDSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFAGGSSLFADYKYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 89
38H9	HCVR	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASPSTYGPSDMAWFRQAPGKGLEGVATISAAGRITYTDSVRGRFTISRDN SKNTMYLQMNSLRAEDTAVYYCAADFAGGSSLFADYKYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 90

5

表 15. 抗体 39 的人种系模板和人源化抗体序列

抗体编号	重链可变区氨基酸序列		序列编号
模板 IGHV3-7 *01	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKG RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	SEQ ID NO: 74

39H1	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTDCM GWFRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVESVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKF GDYCAPNDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 91
39H2	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSRTDCM GWFRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVESVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKF GDYCAPNDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 92
39H3	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTDC MGWFRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVESVKGR FTISQDHAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGF KFGDYCAPNDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 93
39H4	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTSRTDC MGWFRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVESVKGR FTISQDHAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGF KFGDYCAPNDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 94
39H5	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTSRTDC MGWFRQAPGKEREGVAHIDSDGIPRYVESVKGR FTISQDHAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGF KFGDYCAPNDWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 95

表 16. 抗体 151 的人种系模板和人源化抗体序列

抗体编号	重链可变区氨基酸序列		序列编号
模板 IGHV3-7 *01	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	SEQ ID NO: 74
151H2	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTYRPYC MAWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGTTYADSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGD SPDGRCPLGQGLNYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 96
151H4	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPY CMAWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGTTYADSVKG RFTISRDNAGNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAG DSPDGRCPLGQGLNYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 97
151H7	HCVR	HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPY CMAWFRQAPGKEREAAGIDIFGGTTYADSVKG RFTASRDNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAG DSPDGRCPLGQGLNYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 98
151H8	HCVR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPY CMAWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGTTYADSVKG RFTISRDNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAG DSPDGRCPLGQGLNYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 99
151H9	HCVR	HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPY CMAWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGTTYADSVKG RFTASRDNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAG DSPDGRCPLGQGLNYWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO: 100

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PVRIG抗体。其中重链Fc区域包括铰链(hinge)区，并带有S228P, F234A, L235A, K447A突变。

5 >人IgG4重链Fc区域 (S228P/F234A/L235A/K447A)

ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV

NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLGA (SEQ ID NO: 101)

>人IgG4重链Fc区域 (S228P/K447A)

5 ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLKG (SEQ ID NO: 153)

10 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12. 人源化抗PVRIG抗体与表达PVRIG的细胞结合实验

依照实施例 5 的方法，用流式细胞仪检测人源化抗 PVRIG 抗体与人或食蟹猴 PVRIG 的结合。实验结果如表 17 所示。

15 表 17. 人源化抗 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)
20H1	0.019	0.658
20H2	0.006	0.338
20H3	0.006	1.500
20H4	0.008	0.591
20H5	0.005	0.007
30H1	0.024	0.374
30H2	0.003	0.005
30H3	0.004	0.003
38H2	0.088	0.137
38H4	0.062	0.095
38H7	0.040	0.049
38H8	0.065	N.T.
38H9	0.068	N.T.
39H1	0.004	0.251
39H2	0.006	0.019
39H3	0.005	0.348
39H4	0.005	0.006
39H5	0.006	0.208
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
IgG4	无结合	无结合

(注: N.T., not tested, 未测试。)

实施例 13. 人源化抗 PVRIG 抗体与 PVRIG 的亲合力测定

依照实施例 7 的方法，检测人源化抗 PVRIG 抗体与人 PVRIG 的亲合力。结果如表 18 所示。表中列出的所有抗体均具有与人 PVRIG 的高亲合力。

表 18. 人源化抗 PVRIG 抗体与人 PVRIG 的亲合力

抗体编号	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (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
39H1	2.64E+05	8.65E-04	3.28E-09
39H2	1.80E+05	1.24E-04	6.92E-10
39H4	1.89E+05	9.11E-05	4.82E-10
151H7	1.57E+05	1.88E-04	1.20E-09

5

实施例 14. 人源化抗 PVRIG 抗体报告基因细胞活性实验

依照实施例 8 的方法，检测人源化抗 PVRIG 抗体在报告基因细胞中的活性。实验结果如图 4A-图 4B 和表 19 所示。表中列出的抗体均具有激活 Jurkat 细胞的能力。

10

表 19. 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)
20H5	0.042
30H2	0.176
30H3	0.078
39H1	0.191
39H2	0.074
39H4	0.094
151H4	3.549
151H7	0.038
151H8	0.058
Tab5	1.380
IgG4	无激活

实施例 15. 人源化抗 PVRIG 抗体的活化 NK 细胞杀伤能力实验

依照实施例 9 的方法，检测人源化抗 PVRIG 抗体对 NK 细胞的活化能力。实验结果如图 5A-图 5B 和表 20-表 21 所示。结果显示，本公开人源化抗 PVRIG 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。

15

表 20. 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
20	9.6±0.5	10.1±0.5	10.2±0.6
20H5	9.2±0.7	9.9±0.6	13.3±0.5
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 21. 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
39	21.3±1.4	22.7±1.1	22.8±1.6
39H1	13.7±0.7	17.7±0.9	21.2±1.1
39H2	15.3±0.5	18.7±1.0	19.7±0.9
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
IgG4	11.2±0.4	11.7±2.1	9.2±0.6
PBS	6.6±1.1		

实施例 16. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的制备

- 5 为探索不同构造的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体对抗体功能的影响，将抗 PVRIG 单域抗体 151 通过 GGGGSGGGGS (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 双特异性抗体，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
- 10 其与 151 形成的双特异性抗体序列如下表 22 所示。抗 TIGIT 抗体序列信息如表 23-24 所示。此处全文引入 WO2019062832A1 中的 TIGIT 抗体。

表 22. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的第一、第二多肽链序列

抗体编号	重/轻链全长氨基酸序列		序列编号
1708 (抗 TIGIT 抗体)	第一多肽链	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWV RQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTST STVYMESSLRSED TAVYYCAREGAYGYFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLGK	SEQ ID NO: 102
	第二多肽链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKP GKSPKLLIYNARTLAEGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPED FATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 103
1708-151-1	第一多肽链	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASASGFTYRPYCMAWF RQAPGKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTASRDNAGFSL	SEQ ID

(抗体 151 连 接到 1708 重 链 N 端)		FLQMNDLKPEDTAMYYCAAGDSPDGRCPLGQGLNYWG QGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGS KYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDATVYYCAR EGAYGYYFDYWGGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK	NO: 104
	第二多 肽链	与 1708 的轻链相同	SEQ ID NO: 103
1708-1 51-2 (151 连接到 1708 重 链 C 端)	第一多 肽链	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVR QAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTS TVYMESSLRSEDATVYYCAREGAYGYYFDYWGGQTLTV VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGK TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLGLKGGGGSGGGGSHVQLVESGGGSVQAGGSLRL SCVASASGFTYRPYCMAWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGTT YADSVKGRFTASRDNAGFSLFLQMNDLKPEDTAMYYCAA GDSPDGRCPLGQGLNYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 105
	第二多 肽链	与 1708 的轻链相同	SEQ ID NO: 103
1708-1 51-3 (151 连接到 1708 轻 链 N 端)	第一多 肽链	与 1708 的重链相同	SEQ ID NO: 102
	第二多 肽链	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASASGFTYRPYCMAWF RQAPGKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGRFTASRDNAGFSL FLQMNDLKPEDTAMYYCAAGDSPDGRCPLGQGLNYWG QGTQVTVSSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASENIYSYLAWEYQQKPGKSPKLLIYNARTLAEGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCYHSGSPLPFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 106
1708-1 51-4 (151 连接到 1708 轻	第一多 肽链	与 1708 的重链相同	SEQ ID NO: 102
	第二多	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWEYQQKPG	SEQ

链 C 端)	肽链	KSPKLLIYNARTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGECGGGGSGGGGSHVQLVESGGGSGVQAGGSLR LSCVASASGFTYRPYCMAWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGT TYADSVKGRFTASRDNAGFSLFLQMNDLKPEDTAMYYCA AGDSPDGRCPPLGQGLNYWGQGTQVTVSS	ID NO: 107
-----------	----	---	------------------

表23. 抗TIGIT抗体重链及轻链CDR区序列 (Kabat编号规则)

抗体	重链		轻链	
1707	HCDR1	DYHMY (SEQ ID NO: 115)	LCDR1	KASQDVGTSA (SEQ ID NO: 118)
	HCDR2	YISKGGISTYYPDTVKG (SEQ ID NO: 116)	LCDR2	WASARHT (SEQ ID NO: 119)
	HCDR3	QSSYDFAMDY (SEQ ID NO: 117)	LCDR3	QQYSSYPLT (SEQ ID NO: 120)
1708	HCDR1	NYWMH (SEQ ID NO: 121)	LCDR1	RASENIYSYLA (SEQ ID NO: 124)
	HCDR2	RIDPDSTGSKYNEKFKT (SEQ ID NO: 122)	LCDR2	NARTLAE (SEQ ID NO: 125)
	HCDR3	EGAYGYFFDY (SEQ ID NO: 123)	LCDR3	QYHSGSPLP (SEQ ID NO: 126)
1709	HCDR1	DYYMH (SEQ ID NO: 127)	LCDR1	KASQNVVTAVA (SEQ ID NO: 130)
	HCDR2	LVYPYNDNTGYNRKFKG (SEQ ID NO: 128)	LCDR2	SASNRYT (SEQ ID NO: 131)
	HCDR3	GGPSNWNFFDY (SEQ ID NO: 129)	LCDR3	QQYTLYPLT (SEQ ID NO: 132)
1710	HCDR1	NYYMH (SEQ ID NO: 133)	LCDR1	RTSENIFTYLA (SEQ ID NO: 136)
	HCDR2	RIDPTSGATKYNDNFKG (SEQ ID NO: 134)	LCDR2	NAKTFAE (SEQ ID NO: 137)
	HCDR3	EGGFGYFFDY (SEQ ID NO: 135)	LCDR3	QHHYGIPLP (SEQ ID NO: 138)
1711	HCDR1	NYWIG (SEQ ID NO: 139)	LCDR1	KSSQSLLYSRNQMNLY A (SEQ ID NO: 142)
	HCDR2	DIYPPGAYTNYNEKFKD (SEQ ID NO: 140)	LCDR2	WTSTRES (SEQ ID NO: 143)
	HCDR3	GDYYDSSGRAMDY (SEQ ID NO: 141)	LCDR3	QQYYSYPYT (SEQ ID NO: 144)

表24. 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 WMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYY CAREGAYGYFFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 145)
1708-VH2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLE

	WMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY CAREGAYGYFFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 146)
1708-VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLE WIGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC AREGAYGYFFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 147)
1708-VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYN ARTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGG TKVEIK (SEQ ID NO: 148)
1708-VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKSPKLLIYN ARTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGG TKVEIK (SEQ ID NO: 149)

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 双特异性抗体。双特异性抗体的表达量和纯度如表 25 所示。将纳米抗体偶联到普通单克隆抗体上，无论是重、轻链的 N 端还是 C 端，均显示了良好的表达量和纯度。

表 25. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的表达量和纯度

抗体编号	表达量 (mg/L)	SEC 纯度 (%)
1708-151-1	140	97.6
1708-151-2	108	95.7
1708-151-3	160	94.7
1708-151-4	158	96.2

实施例 17. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体与 PVRIG 和 TIGIT 的结合以及对相应配体的阻断实验

1. 不同构型的双特异性抗体与人 PVRIG 的结合及对配体 PVRL2 的阻断
依照实施例 4、实施例 5 和实施例 6 的方法，进行实验，结果如表 26 所示。结果表明，不同构型的双特异性抗体，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。

表 26. 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)
1708-151-1	1.864	0.05	0.757
1708-151-2	2.391	0.21	0.824
1708-151-3	1.579	0.06	0.712
1708-151-4	1.671	0.49	0.743
Tab5	1.857	3.15	0.797
IgG4	无结合	无结合	无阻断

2. 不同构型的双特异性抗体与人 TIGIT 的结合及对配体 PVR 的阻断
依照实施例 4、实施例 5 和实施例 6 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 27 所示。结果表明, 不同构型的双特异性抗体和抗 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。抗 PVRIG 抗体 151 的连接方式对于抗 TIGIT 抗体与 TIGIT 的结合基本无影响。

5 表 27. 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)
1708-151-1	0.101	1.51	0.96
1708-151-2	0.090	1.27	1.04
1708-151-3	0.069	1.92	0.62
1708-151-4	0.054	1.00	0.69
1708	0.055	0.74	0.87
IgG4	无结合	无结合	无阻断

综合表 26-27 的数据, 我们发现抗 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 和 TIGIT 的结合和配体的阻断, 并且都显示了良好的表达量、纯度。

10 实施例 18. 人源化抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的制备

将不同的人源化抗 PVRIG 抗体 (20H5, 30H2, 39H2, 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, 序列如表 28 所示。

表 28. 人源化抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的第一和第二多肽链全长序列

抗体编号	第一和第二多肽链全长氨基酸序列		序列编号
1708-20H5	第一多肽链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTSRTDCM GWFRQAPGKEHEGVAHIDSDGIPRYVDSVKGRFT ISQDHAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCCVVGFKFD EDYCAPNDWGQGTMTVTSSGGGSGGGGSEVQ LVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMH WVRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRV TMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAREGAY GYYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSL GK	SEQ ID NO: 108
	第二多肽链	与 1708 的轻链相同	SEQ ID NO: 103

1708-30H2	第一多肽链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGDCM GWFRQAPGKGLDEGVATIDNAGRIKYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGWT FGGQCSPADWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSEVQ LVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMH WVRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRV TMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAREGAY GYYFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL GK	SEQ ID NO: 109
	第二多肽链	与 1708 的轻链相同	SEQ ID NO: 103
1708-39H2	第一多肽链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSRTDCM GWFRQAPGKGLEGVAHIDSDGIPRYVESVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVVGFKFG DYCAPNDWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSEVQL VQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMHW VRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNEKFKTRVT MTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAREGAYG YYFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL GK	SEQ ID NO: 110
	第二多肽链	与 1708 的轻链相同	SEQ ID NO: 103
1708-15H 7	第一多肽链	HVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPY CMAWFRQAPGKEREAVAGIDIFGGTTYADSVKGR FTASRDNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDS PDGRCPLGQGLNYWGQGTMTVTVSSGGGGSGG GGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT NYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNE KFKTRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYC AREGAYGYYFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF	SEQ ID NO: 111

		YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK	
	第二多肽链	与 1708 的轻链相同	SEQ ID NO: 103
1708-151H8	第一多肽链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASASGFTYRPY CMAWFRQAPGKGLEAVAGIDIFGGTTYADSVKGR FTISRDNAGFSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGDS PDGRCPPLGQGLNYWGQGTMTVSSGGGSGG GGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNE KFKTRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYC AREGAYGYYFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK	SEQ ID NO: 112
	第二多肽链	与 1708 的轻链相同	SEQ ID NO: 103

按常规方法进行抗体的瞬时转染、表达和纯化，经鉴定，得到目的双抗。

实施例 19. 人源化抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体与 PVRIG 和 TIGIT 的结合以及对相应配体的阻断

- 5 依照实施例 4、5、6 的方法，检测人源化抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体对人和食蟹猴 PVRIG 的结合，对人 PVRIG 的配体阻断。结果如表 29 和图 6A-6E 所示。结果表明，各个人源化双特异性抗体，均可以结合人 PVRIG，阻断 PVRIG 结合 PVRL2。1708-151H8 对食蟹猴 PVRIG 结合较弱。

表 29. 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)	与食蟹猴 PVRIG 重 组蛋白结 合 EC ₅₀ (nM)	与食蟹猴 PVRIG 过 表达细胞 结合 EC ₅₀ (nM)	阻断人 PVRIG 与 人 PVRL2 结合 IC ₅₀ (nM)
1708-20H5	2.466	0.075	0.144	0.070	0.628
1708-30H2	0.320	0.056	0.184	3.540	0.552
1708-39H2	1.805	0.079	0.133	0.293	0.619
1708-151H7	0.679	0.043	9.442	11.470	0.598
1708-151H8	0.390	0.094	N.A.	N.A.	0.654
1708	无结合	无结合	无结合	无结合	未测试
Tab5	1.407	0.789	无结合	无结合	0.964
IgG4	无结合	无结合	无结合	无结合	无阻断

与实施例 4、5、6 类似地，检测人源化抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体对人和食蟹猴 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 30 和图 7A-图 7E 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 30. 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)	与食蟹猴 TIGIT 重组蛋白结合 EC ₅₀ (nM)	与食蟹猴 TIGIT 过表达细胞结合 EC ₅₀ (nM)	阻断人 TIGIT 与人 PVR 结合 IC ₅₀ (nM)
1708-20H5	0.145	0.010	0.112	0.009	1.018
1708-30H2	0.153	0.010	0.114	0.009	1.014
1708-39H2	0.135	0.005	0.105	0.005	0.812
1708-151H7	0.160	0.012	0.119	0.012	0.773
1708-151H8	0.184	0.006	0.135	0.011	1.087
1708	0.133	0.0027	0.104	0.003	0.779
Tab5	无结合	无结合	无结合	无结合	未测试
IgG4	无结合	无结合	无结合	无结合	无阻断

利用 Biacore 检测人源化双特异性抗体与人 PVRIG, 食蟹猴 PVRIG, 和人 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)，食蟹猴 PVRIG 抗原 (SEQ ID NO: 1)，或人 TIGIT 抗原 (AcroBiosystem, TIT-H52H3)。利用 Biacore 仪器 (Biacore X100, GE) 实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。实验得到的数据用 BiacoreX100 evaluation software2.0 GE 软件以 (1:1) Binding 模型进行拟合，得出亲合力数值，见表 31。

表 31. 人源化双特异性抗体与人 PVRIG, 食蟹猴 PVRIG, 和人 TIGIT 的亲合力

抗体编号	抗原	kon (1/Ms)	koff (1/s)	KD (M)
1708-20H5	人 PVRIG	1.67E+07	1.30E-04	7.82E-12
1708-30H2		1.29E+07	9.12E-03	7.06E-10
1708-39H2		7.90E+06	2.76E-04	3.49E-11
1708-151H7		6.06E+06	7.57E-04	1.25E-10
1708-20H5	人 TIGIT	1.97E+06	1.50E-04	7.63E-11
1708-30H2		3.08E+06	1.58E-04	5.12E-11
1708-39H2		1.39E+06	1.13E-04	8.08E-11
1708-151H7		1.40E+06	1.16E-04	8.28E-11
1708-20H5	食蟹猴 PVRIG	2.56E+07	1.81E-01	7.05E-09
1708-30H2		1.82E+07	5.81E-01	3.19E-08
1708-39H2		8.48E+07	2.52E+00	2.97E-08

实施例 20. 人源化抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的混合淋巴细胞反应 (MLR) 实验

依照实施例 10 的方法，检测人源化抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体对 T 细胞的活化能力。实验结果如图 8 和表 32 所示。结果显示，人源化抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 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32. 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
IgG4	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
Keytruda	未测试	444 $\pm$ 111

实施例 21. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体在人黑色素瘤 A375 混合人 PBMC 的小鼠皮下移植瘤模型中的抗肿瘤作用评估

为进一步探究双特异性抗体亚型在动物药效中的作用，除了上述 IgG4 亚型的双特异性抗体，我们也合成了相应的 IgG1 亚型的抗体，用于动物药效试验。在该实验中用到的其他之前未描述的抗体序列如表 33。

表 33. IgG1 型人源化抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的第一和第二多肽链全长序列

抗体编号	第一和第二多肽链全长氨基酸序列		序列编号
1708-IgG1 (与 1708 相同，只是重链恒定区亚型换为 IgG1)	HC	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNY WMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPDSTGSKYNE KFKTRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDNAVY YCAREGAYGYYFDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 113
	LC	与 1708 的轻链相同	SEQ ID NO: 103
1708-151-IgG1 (与 1708 相同，只是重链恒定区亚型换为 IgG1)	第一多肽链	HVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASASGFTYR PYCMAWFRQAPGKEREAAGIDIFGGTTYADS VKGRFTASRDNAGFSLFLQMNDLKPEDTAMY	SEQ ID NO: 114

1708-151 相同，只是重链恒定区亚型换为IgG1)	肽链	YCAAGDSPDGRCPPLGQGLNYWGQGTQVTVS SGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGR IDPDSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYYCAREGAYGYYFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	
	第二多肽链	与 1708 的轻链相同	SEQ ID NO: 103

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。

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 Mitomycin 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 Mitomycin C 处理后的 A375 细胞共培养。共培养 6 天后，收取 PBMC，同时收取新鲜消化下来的 A375 细胞。每只老鼠接种：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 34，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。

表 34. 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	Q2D	i.p.
3	1708-IgG1	7	30	Q2D	i.p.
4	151-IgG4 + 1708-IgG1	7	16.1	Q2D	i.p.
			30	Q2D	i.p.

5	1708-151 IgG1	7	35.8	Q2D	i.p.
6	1708-151 IgG4	7	35.8	Q2D	i.p.

(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 35-36 和图 9A-图 9 B。

表 35. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体对小鼠体重的影响

组别	第 0 天平均体重 (g) (平均值±标准差)	第 26 天平均体重 (g) (平均值±标准差)	体重变化率 (%) (平均值±标准差)
1	20.5±0.42	23.60±0.64	15.21±2.88
2	20.43±0.4	23.77±0.74	16.54±2.57
3	20.65±0.48	23.85±0.45	15.71±2.08
4	20.69±0.51	22.81±0.78	10.14±1.45
5	20.65±0.56	23.54±1.14	13.77±3.26
6	20.65±0.48	23.8±0.76	15.28±2.58

表 36. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体在小鼠人源 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	629.64±163.74	67.10	32.90	<0.001×××
6	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 单药组没有明显差异。抗 TIGIT 抗体 1708-IgG1 单药组，抗 PVRIG 抗体 151 与抗 TIGIT 抗体 1708-IgG1 联用组，1708-151-IgG1 双抗组，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 9B）。

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 37，分组给药当天为第 0 天。

表 37. 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	Q2D	i.p.
3	1708-151H7 IgG4	7	12	Q2D	i.p.

(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)。)

5 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 38-39 和图 10A-图 10B。

表 38. 抗 P RIG/TIGIT 双特异性抗体对小鼠体重的影响

组别	第 0 天平均体重 (g) (平均值±标准差)	第 28 天平均体重 (g) (平均值±标准差)	体重变化率 (%) (平均值±标准差)
1	21.51±0.53	25.38±0.32	18.38±3.27
2	21.57±0.55	24.82±0.46	15.34±2.18
3	21.63±0.47	24.87±0.36	15.15±1.38

表 39. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体在小鼠人源 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， $\times P < 0.05$ ， $\times\times P < 0.01$ ， $\times\times\times P < 0.001$ 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 IgG4 与 1708-151H7 IgG4 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 10A 和图 10B)。

15 制备例-抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体制剂

制剂制备与检测过程中使用的设备、抗体及方法如下:

1. SEC 分子排阻色谱法:

根据凝胶孔隙的孔径大小与高分子样品分子的线团尺寸间的相对关系，而对溶质进行分离的分析方法。

SEC% (SEC单体含量百分比) = A单体/A总*100% (A单体为样品中主峰单体的峰面积, A总为所有峰面积之和)。

SEC测定用仪器：安捷伦 HPLC 1260；柱子：waters, XBridge BEH200Å SEC (7.8×300 mm 3.5μm)。

25 **2. NR-CE (也称 CE-SDS (NR)) 毛细管凝胶电泳:**

将凝胶移到毛细管中作为支持介质进行的一种电泳，并在一定的电压下根据样品分子量的大小进行分离的方法。

非还原CE纯度百分比=A主峰/A总*100% (A主峰为样品中主峰的峰面积, A

总为所有峰面积之和。) CE测定用仪器: Beckman毛细管电泳仪 型号plus800。

3. iCIEF 成像毛细管等点聚焦电泳:

根据蛋白质等电点pI的不同进行分离的技术。

iCIEF中性峰含量百分比=中性峰面积/总面积*100% (总面积为酸性峰、中性峰和碱性峰面积之和)。

iCIEF测定用仪器: simple protein, 型号muarice。

4. 渗透压测定:

冰点法测定渗透压, 以冰点下降值与溶液的摩尔浓度成正比例关系为基础, 采用高灵敏度感温元件, 测定溶液结冰点, 通过电量转化为渗透压。

渗透压测定用仪器: 罗泽 Loser, 型号 OM815。

5. 蛋白浓度测定:

以下制备例所采用的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体为 1708-30H2。双特异性抗体的浓度采用蛋白浓度计。

蛋白浓度测定仪器: 紫外可见分光光度计, 型号: Nano Drop oneC, 光程为 1mm。

制备例 1. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体制剂缓冲体系及 pH 值的筛选

采用下列缓冲体系, 制备蛋白浓度约为 50mg/mL 的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体 (1708-30H2) 制剂, 其中缓冲体系如下:

- 1) 10mM 醋酸-醋酸钠盐 (简称 AA), pH 5.0
- 2) 10mM AA, pH5.5
- 3) 10mM 琥珀酸-琥珀酸钠盐 (简称 SA), pH6.0
- 4) 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 (简称 His-HCl), pH5.5
- 5) 10mM His-HCl, pH6.0
- 6) 10mM His-HCl, pH6.5
- 7) 10mM 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠盐 (简称 PB), pH8.0
- 8) 10mM 氨基丁三醇-盐酸盐 (简称 Tris-HCl), pH8.0
- 9) 10mM Tris-HCl, pH8.5;

对制备完成的制剂进行无菌过滤, 灌装, 加塞, 轧盖。制剂样品在 40°C 高温条件下强制降解, 以外观、SEC、CE-SDS (NR) 和 iCIEF 为评价指标, 考察制剂稳定性。

实验结果见表 40。结果显示, 制剂样品在 40°C 高温条件下放置一个月后:

- 外观方面, SA 缓冲体系组制剂出现大量颗粒, 差于其他缓冲体系组制剂;
- 纯度方面, 缓冲体系 pH≥8.0 的制剂样品, SEC 单体和 CE-SDS (NR) 下降较多, 下降范围分别为 3.3%至 5.6%和 7.1%至 14.9%。另外, 缓冲体系 pH=5.0 或 pH≥8.0 的制剂样品, 其 iCIEF 中性峰纯度下降超过 30%。

表 40. 抗 PVRIG/TIGIT 抗体制剂的缓冲体系及 pH 值筛选实验结果

缓冲体系编号	放置条件	外观	SEC%		CE-SDS (NR) %	iCIEF%	
			聚体	单体		酸性峰	中性峰
1	0h	澄明	1.8	98.1	98.1	32.5	54.4
	40℃M1	颗粒	2.8	95.7	93.7	38.6	23.3
2	0h	澄明	1.7	98.2	98.0	33.1	53.4
	40℃M1	颗粒	2.3	96.0	93.1	40.1	28.9
3	0h	澄清，略有乳光	1.7	98.1	98.0	33.2	53.0
	40℃M1	大量颗粒	3.1	95.6	94.8	42.1	34.1
4	0h	澄清，略有乳光	1.7	98.1	97.8	32.1	53.8
	40℃M1	颗粒	2.4	96.1	94.2	37.4	28.8
5	0h	澄清，略有乳光	1.6	98.3	97.9	31.8	54.0
	40℃M1	颗粒	2.3	96.5	95.3	41.4	33.7
6	0h	澄清，略有乳光	1.7	98.2	97.9	32.0	53.4
	40℃M1	颗粒	2.4	96.6	95.4	46.5	33.6
7	0h	澄清，略有乳光	1.5	98.4	97.5	33.7	53.0
	40℃M1	颗粒	4.6	94.3	82.6	75.9	12.6
8	0h	澄清，略有乳光	1.1	98.8	97.5	32.9	53.0
	40℃M1	颗粒	3.4	95.5	90.4	64.8	19.7
9	0h	澄清，略有乳光	1.0	98.9	97.5	33.2	52.7
	40℃M1	颗粒	5.5	93.3	89.3	72.8	15.0

注：M 表示月，40℃M1 表示 40℃恒温放置 1 个月

制备例 2. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体制剂蛋白浓度的筛选

5 采用 10mM His-HCl pH 6.0 缓冲体系，制备蛋白浓度分别为低浓度 50mg/mL 和高浓度 100mg/mL 的制剂。制备完成的制剂无菌过滤，灌装，加塞，轧盖。样品在 40℃ 高温条件下强制降解，以 SEC、CE-SDS (NR) 和 iCIEF 为评价指标，考察制剂稳定性。

实验结果见表 41，实验结果表明：制剂样品在 40℃ 高温条件下放置 1 个月后，
10 不同浓度制剂组纯度方面，高蛋白浓度制剂的 SEC、CE-SDS (NR) 和 iCIEF 值相对略低。

表 41. 不同蛋白浓度制剂的稳定性实验结果

蛋白浓度	条件	SEC%		CE-SDS (NR) %	iCIEF%	
		聚体	单体		酸性峰	中性峰
50 mg/mL	D0	1.6	98.3	97.9	31.8	54.0
	40℃M1	2.3	96.5	95.3	41.4	33.7
100 mg/mL	D0	1.6	98.3	97.9	31.8	54.0
	40℃M1	2.9	95.8	94.2	41.7	32.9

制备例 3. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体制剂中表面活性剂种类和浓度的筛

15 选

采用 10mM His-HCl pH6.5 的缓冲体系，制备含 50mg/mL 抗体，80mg/mL 蔗糖，以及不同浓度的表面活性剂的抗 PVRIG/TIGIT 抗体（1708-30H2）制剂，具体表面活性剂种类和浓度如下：

- 5
- 1) 0.2mg/mL 聚山梨酯 80;
2) 0.4mg/mL 聚山梨酯 80;
3) 0.6mg/mL 聚山梨酯 80;
4) 0.4mg/mL 聚山梨酯 20;
5) 0.4mg/mL 泊洛沙姆 188;

10

制备完成的制剂无菌过滤，灌装，加塞，轧盖。样品在 40℃ 高温条件下强制降解，以外观、SEC、CE-SDS（NR）和 iCIEF 为评价指标，考察制剂稳定性。

实验结果见表 42。实验结果表明，各实验组制剂均具备良好的稳定性。

表 42. 不同表面活性剂制剂的稳定性实验结果

表面活性剂编号	条件	外观	SEC%		CE-SDS (NR)%	iCIEF%	
			聚体	单体		酸性峰	中性峰
1	D0	澄清透明	0.7	99.3	98.3	28.9	56.8
	40℃M1	澄清透明	2.6	97.2	96.0	49.2	31.9
2	D0	澄清透明	0.6	99.4	98.1	29.4	56.2
	40℃M1	澄清透明	2.9	96.9	95.1	49.2	32.5
3	D0	澄清透明	0.6	99.4	98.3	29.4	56.5
	40℃M1	澄清透明	3.2	96.6	95.0	50.7	33.1
4	D0	澄清透明	0.5	99.5	98.1	30.5	56.6
	40℃M1	澄清透明	1.6	98.3	96.3	46.3	33.7
5	D0	澄清透明	0.6	99.4	98.2	29.1	56.6
	40℃M1	澄清透明	1.9	98.0	95.7	47.7	32.4

制备例 4. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体制剂糖浓度的筛选

15

采用 10mM His-HCl pH5.5 的缓冲体系，制备含 50mg/mL 抗体，0.4mg/mL 聚山梨酯 80 以及不同浓度的蔗糖的抗 PVRIG/TIGIT 抗体（1708-30H2）制剂，具体蔗糖浓度如下：

- 20
- 1) 75mg/mL 蔗糖;
2) 80mg/mL 蔗糖;
制备完成的制剂，测定其渗透压。

实验结果见表 43。结果表明，蔗糖浓度在 75mg/mL - 80mg/mL 时渗透压均在等渗范围内（280-320mOsm）。

表 43.不同蔗糖浓度的制剂的渗透压实验结果

蔗糖编号	蔗糖浓度（mg/mL）	制剂渗透压值（mOsm）
1	75	290
2	80	300

制备例 5. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体在不同缓冲体系中的稳定性实验

使用下列缓冲体系, 制备含 50mg/mL 抗体, 80mg/mL 蔗糖, 0.4mg/mL 聚山梨酯 80 的抗 PVRIG/TIGIT 抗体 (1708-30H2) 制剂, 其中缓冲体系如下:

1) 10mM AA pH5.5

5 2) 10mM His-HCl pH5.5

制备完成的制剂无菌过滤, 灌装, 加塞, 轧盖。样品在 40°C 高温条件下强制降解, 以外观、SEC、CE-SDS (NR) 和 iCIEF 为评价指标, 考察制剂稳定性。

实验结果见表 44, 结果显示, 制剂样品在 40°C 高温条件下放置 1 个月后, 以 His-HCl 和 AA 为缓冲体系的制剂的外观、SEC、CE-SDS (NR) 无显著差异, 但
10 iCIEF 值显示 His-HCl 缓冲体系组的中性峰纯度高于 AA。

表 44. 不同缓冲体系制剂的稳定性实验结果

缓冲体系 编号	条件	外观	SEC%		CE-SDS (NR) %	iCIEF%	
			聚体	单体		酸性峰	中性峰
1	D0	澄清透明	0.4	99.6	98.2	31.6	55.5
	40°C M1	澄清透明	2.6	97.1	95.3	47.8	23.3
2	D0	澄清透明	0.6	99.4	98.2	29.0	56.8
	40°C M1	澄清透明	2.9	96.8	95.3	42.9	27.3

制备例 6. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体制剂在不同 pH 值下的稳定性

使用下列缓冲体系, 制备含 50mg/mL 抗体, 80mg/mL 蔗糖, 0.4mg/mL 聚山梨酯 80 的抗 PVRIG/TIGIT 抗体制剂 (1708-30H2), 缓冲体系如下:

1) 10mM His-HCl pH5.5

2) 10mM His-HCl pH6.0

3) 10mM His-HCl pH6.5

制备完成的制剂无菌过滤, 灌装, 加塞, 轧盖。样品在 40°C 高温条件下强制
20 降解, 以外观、SEC、CE-SDS (NR) 和 iCIEF 为评价指标, 考察制剂稳定性。

实验结果见表 45。实验结果表明, His-HCl 缓冲剂的 pH 在 5.5 至 6.5 之间时, 各组制剂均具有良好的稳定性。

表 45. 不同 pH 的缓冲体系制剂稳定性实验结果

缓冲体系 编号	条件	外观	SEC%		CE-SDS (NR) %	iCIEF%	
			聚体	单体		酸性峰	中性峰
1	D0	澄清透明	0.6	99.4	98.2	29.0	56.8
	40°C M1	澄清透明	2.9	96.8	95.3	42.9	27.3
2	D0	澄清透明	0.6	99.4	98.2	29.8	56.4
	40°C M1	澄清透明	2.8	97.0	95.5	45.8	31.5
3	D0	澄清透明	0.6	99.4	98.1	29.4	56.2
	40°C M1	澄清透明	2.9	96.9	95.1	49.2	32.5

制备例 7. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体制剂的稳定性实验

采用 10mM His-HCl pH6.0 的缓冲体系，制备含 50mg/mL 抗体，0.4mg/mL 聚山梨酯 80，80mg/mL 蔗糖的抗 PVRIG/TIGIT 抗体（1708-30H2）制剂。制备完成的制剂无菌过滤，灌装，加塞，轧盖。样品放置在 25℃ 及 2 至 8℃ 条件下 6 个月，以外观、SEC、CE-SDS（NR）和 iCIEF 为评价指标，考察制剂稳定性。

5 实验结果见表 46。结果表明，优选制剂具备良好的稳定性。

表 46. 制剂稳定性实验结果

条件	外观	SEC%		CE-SDS (NR) %	iCIEF%	
		聚体	单体		酸性峰	中性峰
D0	澄清透明	0.6	99.4	98.2	29.8	56.4
25℃M6	澄清透明	2.2	97.6	97.0	42.3	39.6
2 至 8℃M6	澄清透明	0.8	99.1	97.3	30.0	56.5

制备例 8. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体制剂的 pH 漂移实验

采用 10mM His-HCl pH6.0 的缓冲体系，分别制备 3 批含 50mg/mL 抗体，
10 0.4mg/mL 聚山梨酯 80，80mg/mL 蔗糖的抗 PVRIG/TIGIT 抗体(1708-30H2)制剂。
测定 3 批制剂成品的 pH 值，与缓冲液 pH 值对比，考察 pH 漂移情况。

实验结果见表 47。结果表明，制剂 pH 漂移没有统计学上的显著变化。

表 47.制剂 pH 测定的实验结果

批次号	制剂 pH 值	pH 漂移值
1	6.07	0.07
2	6.07	0.07
3	6.07	0.07

15 **制备例 9. 抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体制剂中不同表面活性剂的稳定性实验**

采用 10mM His-HCl pH6.0 的缓冲体系，制备含 50mg/mL 抗体，80mg/mL 蔗糖，以及不同种类的表面活性剂的抗 PVRIG/TIGIT 抗体（1708-30H2）制剂，具体表面活性剂种类和浓度如下：

- 20 1) 0.4mg/mL 聚山梨酯 80；
 2) 0.4mg/mL 聚山梨酯 20；
 3) 0.4mg/mL 泊洛沙姆 188；

制备完成的制剂无菌过滤，灌装，加塞，轧盖。样品放置在 2 至 8℃ 条件下 12 个月，以外观、SEC、和 iCIEF 为评价指标，考察制剂稳定性。

25 实验结果见表 48。结果表明，上述制剂具备良好的稳定性。

表 48. 不同表面活性剂对制剂稳定性影响的实验结果

表面活性剂编号	条件	外观	SEC%		iCIEF%	
			聚体	单体	酸性峰	中性峰
1	D0	澄清透明	0.3	99.7	18.4	54.5

	2 至 8℃M12	澄清透明	0.6	99.2	18.9	53.3
2	D0	澄清透明	0.3	99.7	18.1	54.6
	2 至 8℃M12	澄清透明	0.6	99.2	18.9	53.4
3	D0	澄清透明	0.3	99.7	18.3	54.5
	2 至 8℃M12	澄清透明	0.5	99.3	18.9	53.5

权利要求书

1. 一种药物组合物，包含抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体和缓冲剂，其中：
所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结
5 构域和特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域；
所述缓冲剂为组氨酸缓冲剂或醋酸盐缓冲剂；
优选地，所述组氨酸缓冲剂为组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂，或
优选地，所述醋酸盐缓冲剂为醋酸-醋酸钠盐缓冲剂。
- 10 2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中所述药物组合物的 pH 为 5.0 至 6.5；
优选地，所述药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.5；
更优选地，所述药物组合物的 pH 为 6.0 ± 0.2 。
- 15 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合物，其中所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 1mg/mL 至 150mg/mL；
优选地，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 1mg/mL 至 100mg/mL；
更优选地，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体的浓度为 $50\text{mg/mL} \pm 5\text{mg/mL}$ 。
- 20 4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含表面活性剂；
优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯或泊洛沙姆；
更优选地，所述表面活性剂为聚山梨酯 80。
- 25 5. 根据权利要求 4 所述的药物组合物，其中所述表面活性剂的浓度为 0.05mg/mL 至 1.0mg/mL；
优选地，所述表面活性剂的浓度为 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL；
更优选地，所述表面活性剂的浓度为 $0.4\text{mg/mL} \pm 0.1\text{mg/mL}$ 。
- 30 6. 根据权利要求 1 至 5 任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含渗透压调节剂；
优选地，所述渗透压调节剂选自由蔗糖、海藻糖、山梨糖醇、精氨酸、甘氨酸和氯化钠组成的组中的一种或更多种；
更优选地，所述渗透压调节剂为蔗糖。
- 35 7. 根据权利要求 6 所述的药物组合物，其中所述渗透压调节剂的浓度为 70mg/mL 至 100mg/mL；

优选地，所述渗透压调节剂的浓度为 70mg/mL 至 90mg/mL；

更优选地，所述渗透压调节剂的浓度为 80mg/mL $\pm$ 5 mg/mL。

8. 根据权利要求 1 至 7 任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲剂的浓度为
5 5mM 至 100mM；

优选地，所述缓冲剂的浓度为 10mM 至 30mM；

更优选地，所述缓冲剂的浓度为 10mM $\pm$ 5 mM。

9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的药物组合物，其中：
10 所述特异性结合 PVRIG 的第一抗原结合结构域包含至少一个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 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别包含 SEQ ID NO: 3、80-84 任一所示序列中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列；

- 优选地，所述免疫球蛋白单一可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kabat
15 编号系统定义，其中，CDR1 包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列，CDR2 包含 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列，和 CDR3 包含 SEQ ID NO: 151 的氨基酸序列；

更优选地，所述免疫球蛋白单一可变结构域包含 SEQ ID NO: 81 的氨基酸序列。

- 20 10. 根据权利要求 1 至 9 任一项所述的药物组合物，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 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 121 的氨基酸序列、HCDR2 包含 SEQ ID NO: 122 的氨基酸序列和 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 123 的氨基酸序列，和

- 25 所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 124 的氨基酸序列、LCDR2 包含 SEQ ID NO: 125 的氨基酸序列和 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 126 的氨基酸序列；

优选地，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 145 的氨基酸序列，和所述 VL 包含 SEQ ID NO: 149 的氨基酸序列；

- 30 更优选地，所述特异性结合 TIGIT 的第二抗原结合结构域包含重链和轻链，所述重链包含 SEQ ID NO: 102 的氨基酸序列，所述轻链包含 SEQ ID NO: 103 的氨基酸序列；

- 最优选地，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含第一多肽链和第二多肽链，其中：所述第一多肽链包含 SEQ ID NO: 109 的氨基酸序列，所述第二多肽链包含
35 SEQ ID NO: 103 的氨基酸序列。

11. 根据权利要求 1 至 10 任一项所述的药物组合物，其包含如下组分：

- (a) 1mg/mL 至 100mg/mL 的所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，
(b) 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80，
(c) 70mg/mL 至 90mg/mL 的蔗糖，和
(d) 10mM 至 30mM 的组氨酸缓冲剂，所述药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.5；
5 优选地，所述药物组合物包含如下组分：
(a) 50mg/mL 至 100mg/mL 的所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，
(b) 0.2mg/mL 至 0.6mg/mL 的聚山梨酯 80，
(c) 75mg/mL 至 80mg/mL 的蔗糖，和
(d) 10mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 5.5 至 6.5；
10 更优选地，所述药物组合物包含如下组分：
(a) 50mg/mL $\pm$ 5 mg/mL 的抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体，所述抗 PVRIG/TIGIT 双特异性抗体包含 SEQ ID NO: 109 所示氨基酸序列的第一多肽链和包含 SEQ ID NO: 103 所示氨基酸序列的第二多肽链，
(b) 0.4mg/mL $\pm$ 0.1mg/mL 的聚山梨酯 80，
15 (c) 80mg/mL $\pm$ 5mg/mL 的蔗糖，和
(d) 10mM $\pm$ 5mM 的组氨酸-盐酸组氨酸缓冲剂；所述药物组合物的 pH 为 6.0 $\pm$ 0.2。
12. 一种冻干制剂，所述冻干制剂复溶后可形成权利要求 1 至 11 任一项所述的
20 的药物组合物。
13. 一种制备冻干制剂的方法，其中包括将权利要求 1 至 11 中任一项所述的药物组合物进行冷冻干燥的步骤。
- 25 14. 一种冻干制剂，所述制剂通过权利要求 13 所述的方法获得的。
15. 根据权利要求 1 至 11 任一项所述的药物组合物，其为静脉注射制剂、皮下注射制剂、腹腔注射制剂或肌肉注射制剂；优选为静脉注射制剂。
- 30 16. 一种治疗疾病的方法，所述方法包括：
向受试者施用治疗有效量的权利要求 1 至 11、15 中任一项所述的药物组合物、
权利要求 12 或 14 所述的冻干制剂；
优选地，所述疾病为增殖性疾病、感染或脓毒症；
更优选地，所述增殖性疾病为肿瘤；
35 最优选地，所述肿瘤选自以下的任一项：肺癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈癌、食管癌、胃癌、结直肠癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、肝癌、黑色素瘤、肾癌、鳞状细胞癌和血液系统癌症。

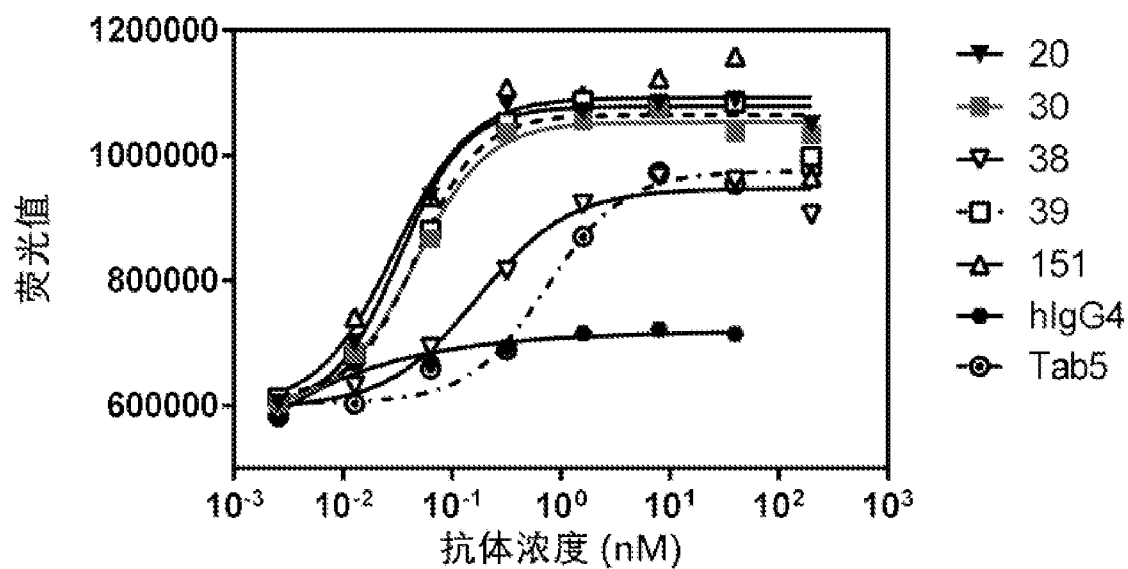


图 1

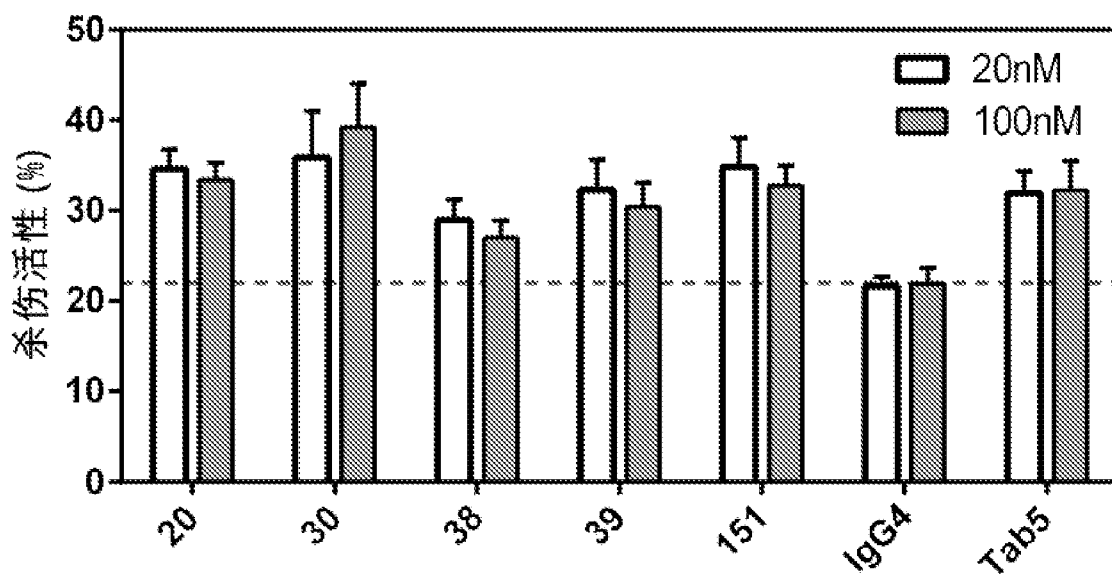


图 2

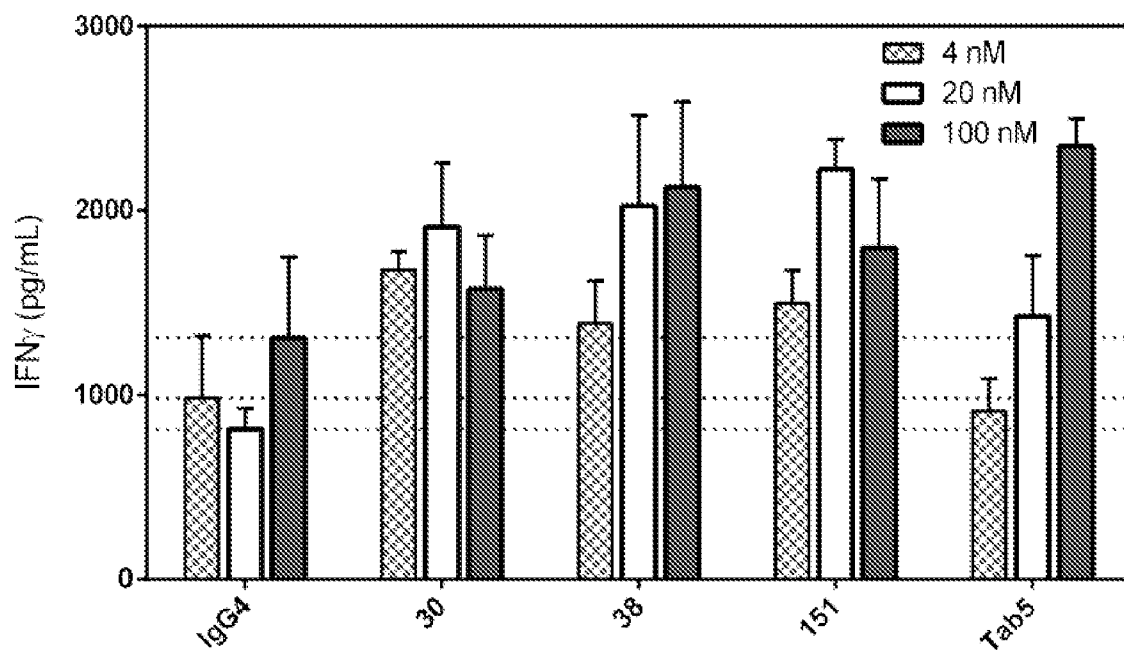


图 3

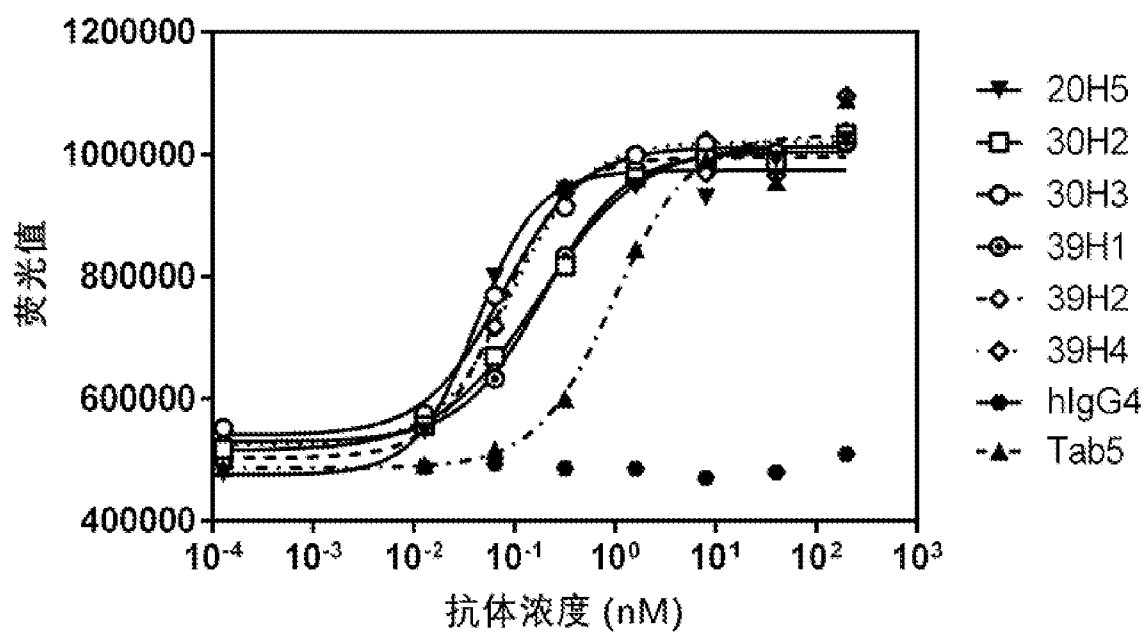


图 4A

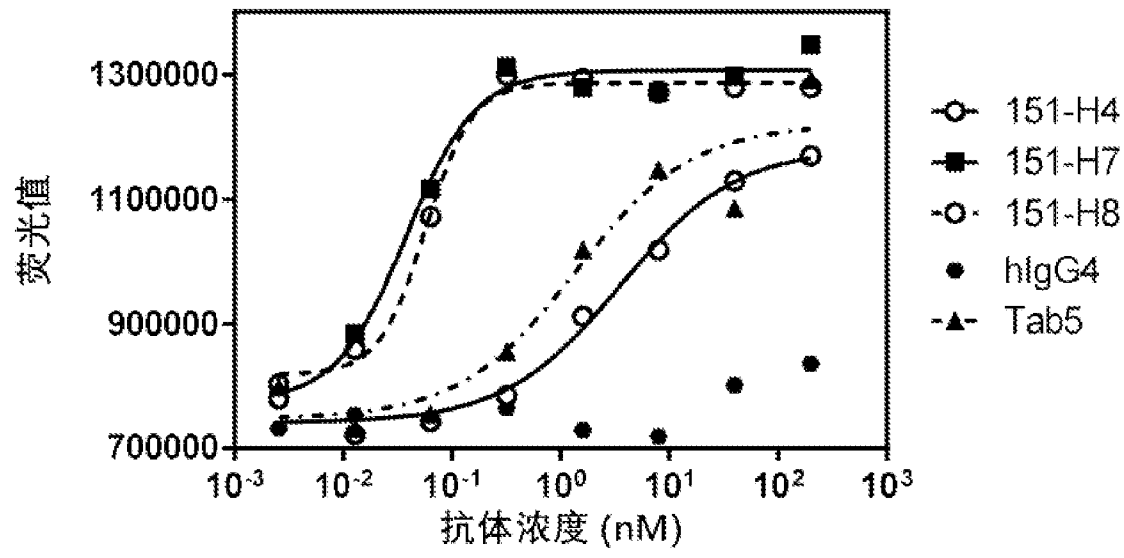


图 4B

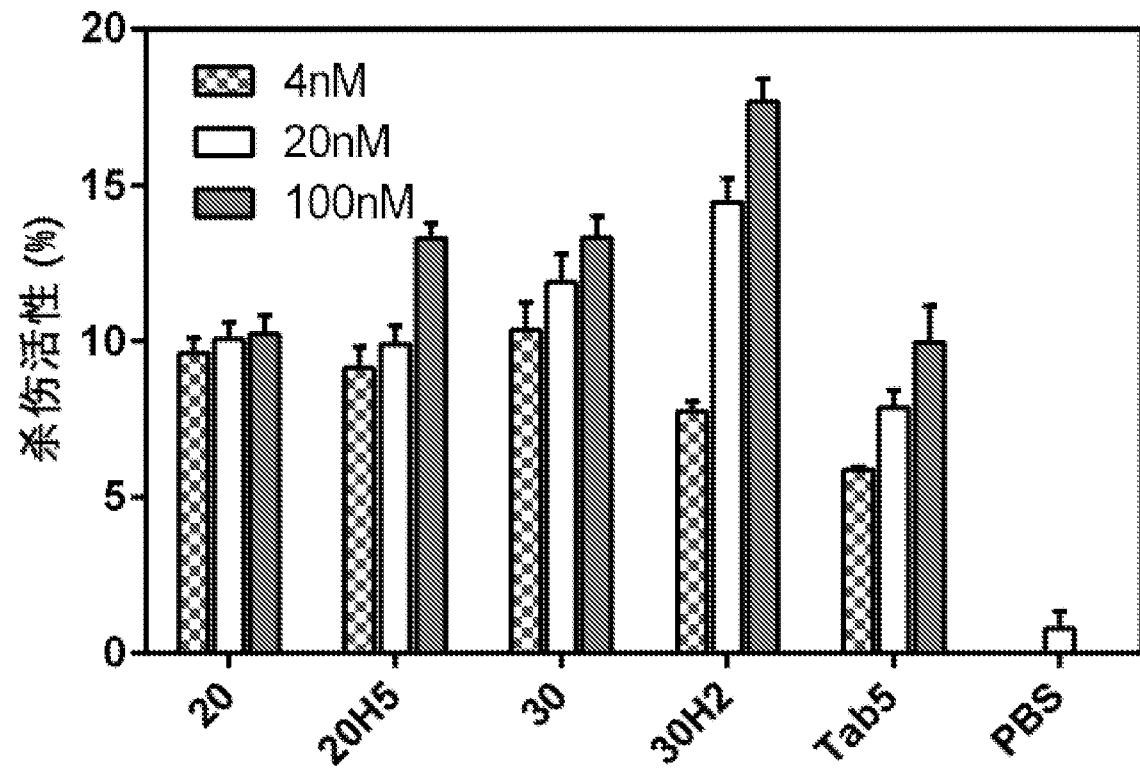


图 5A

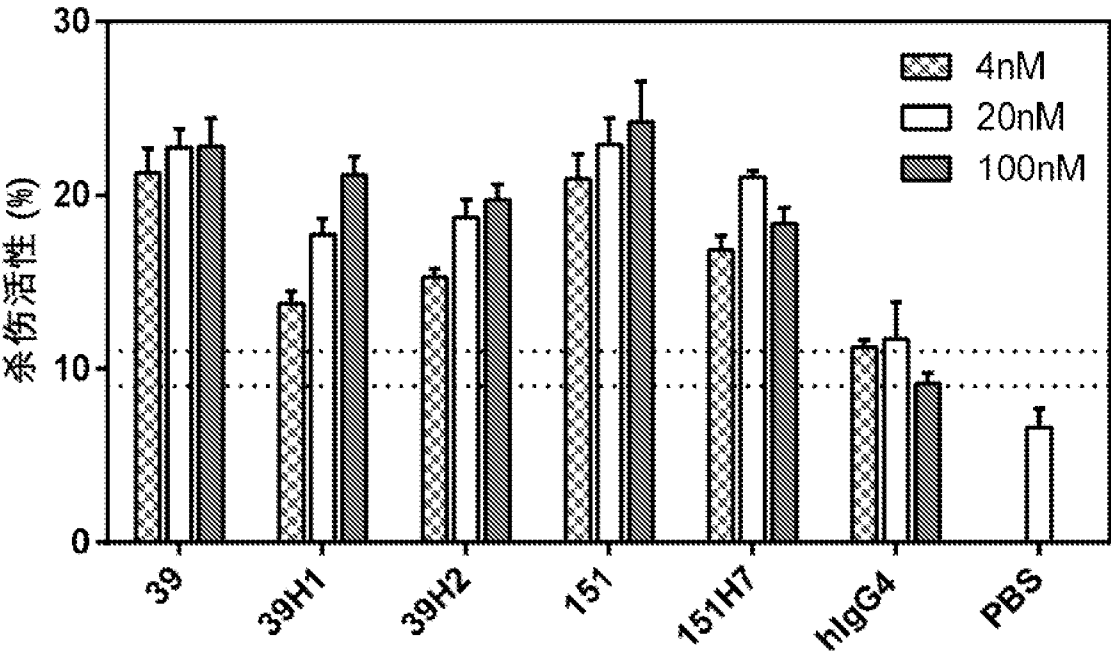


图 5B

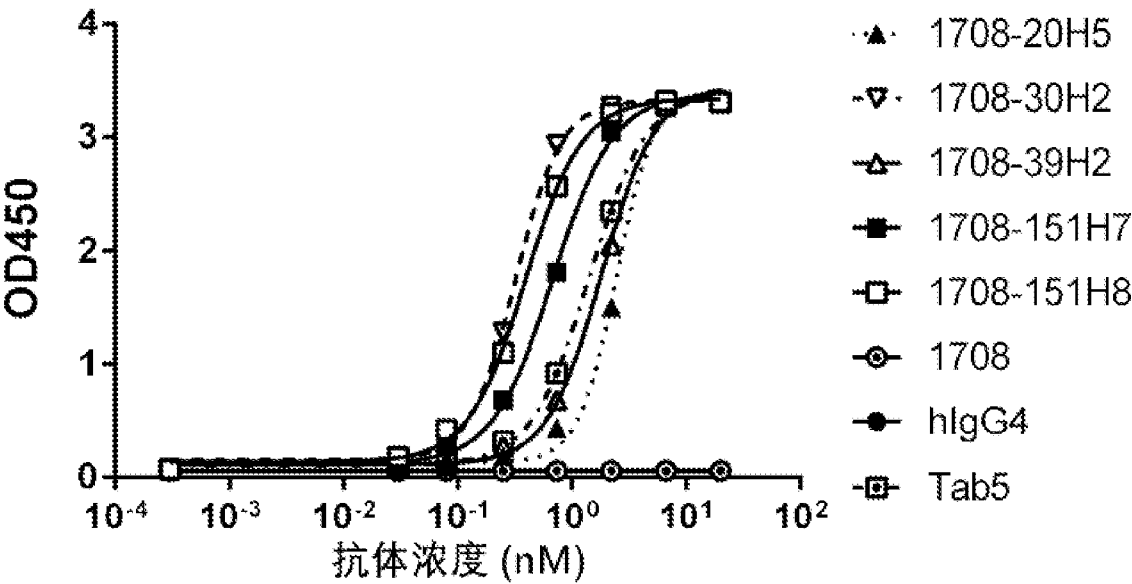


图 6A

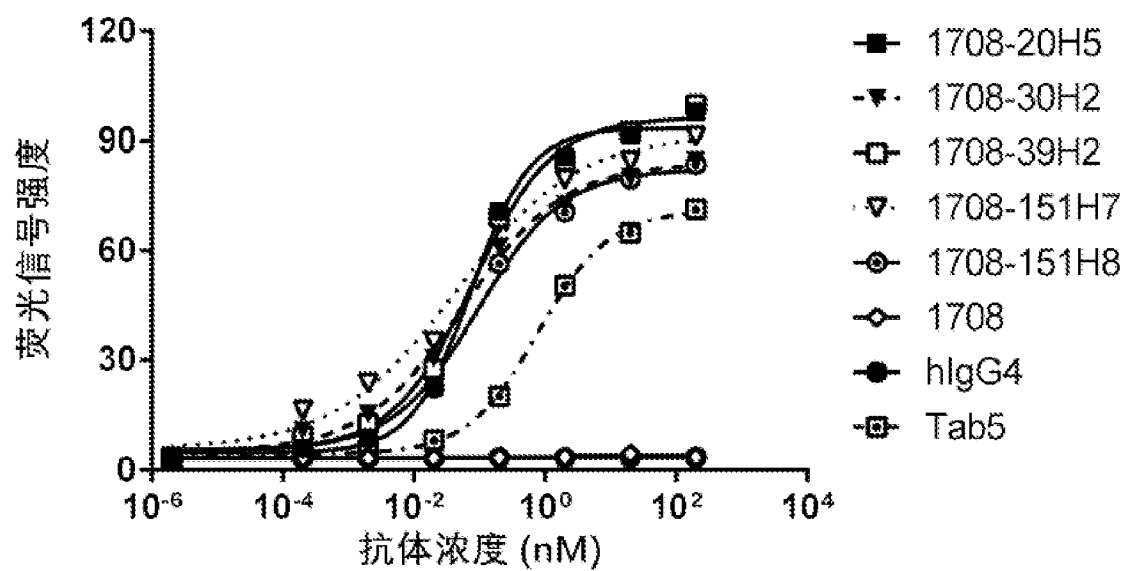


图 6B

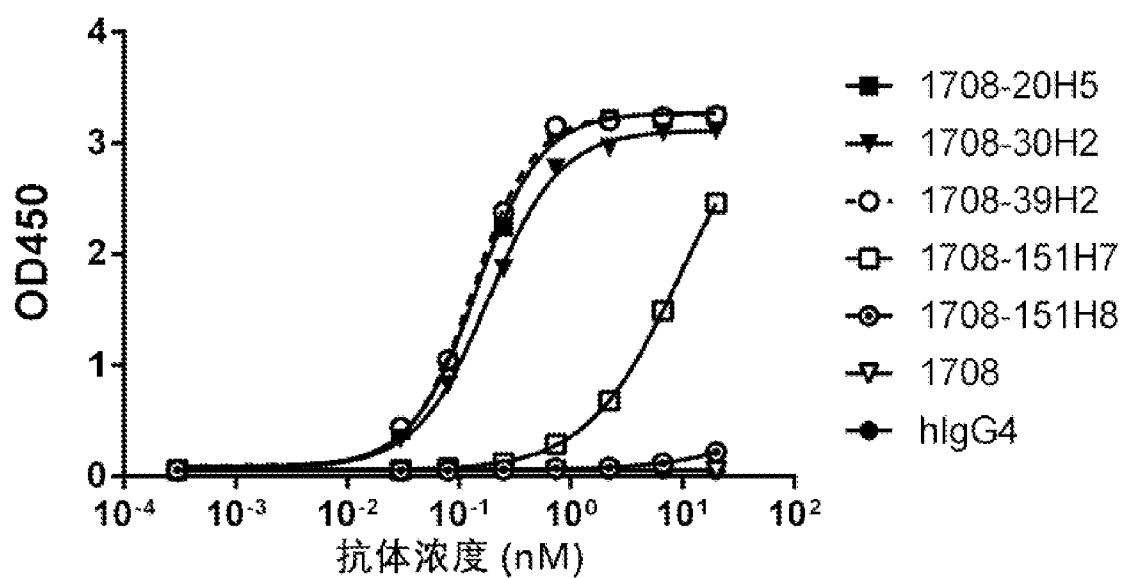


图 6C

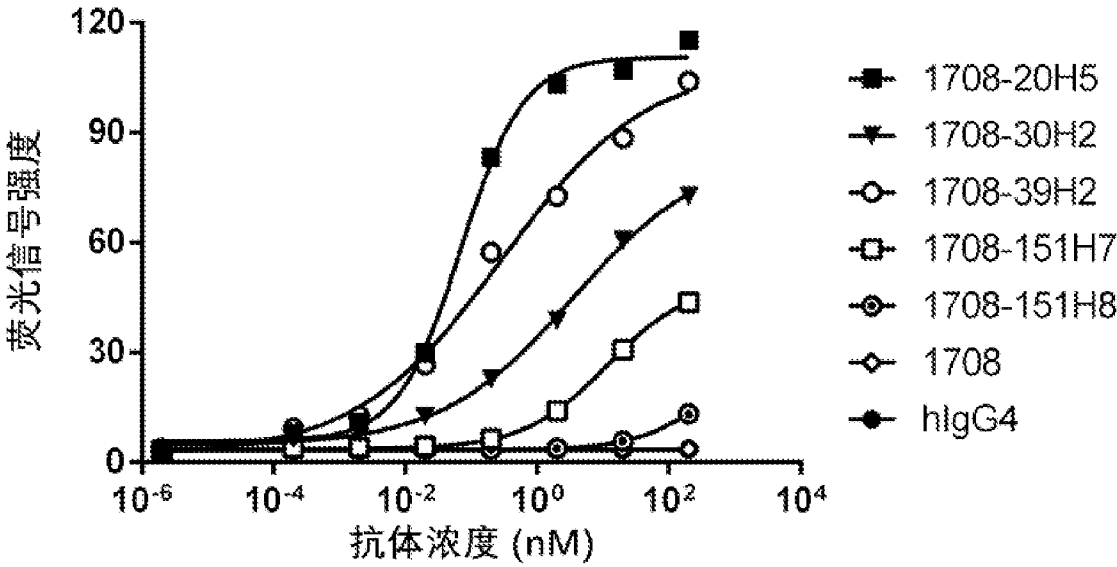


图 6D

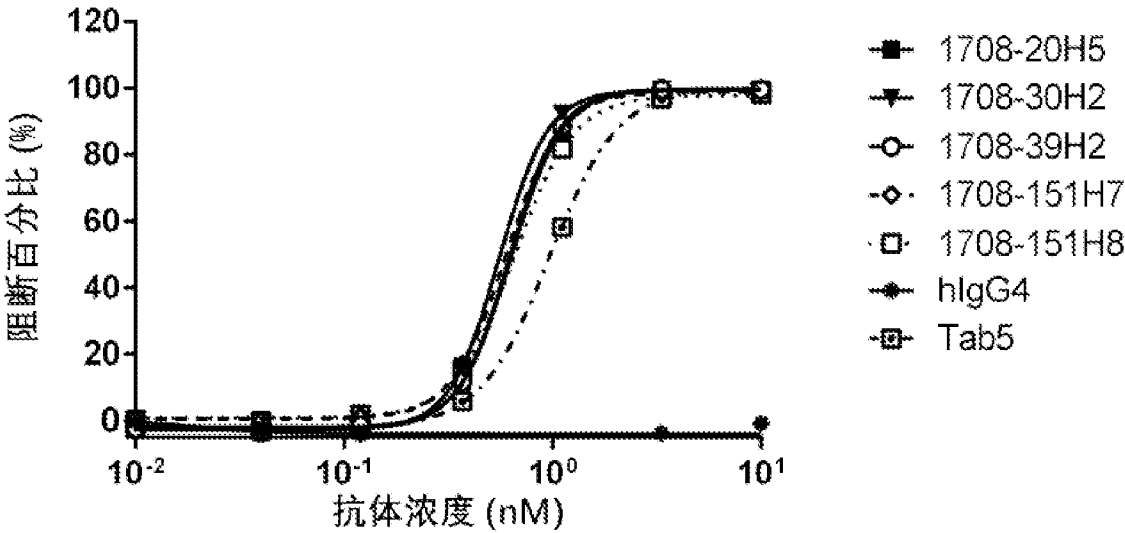


图 6E

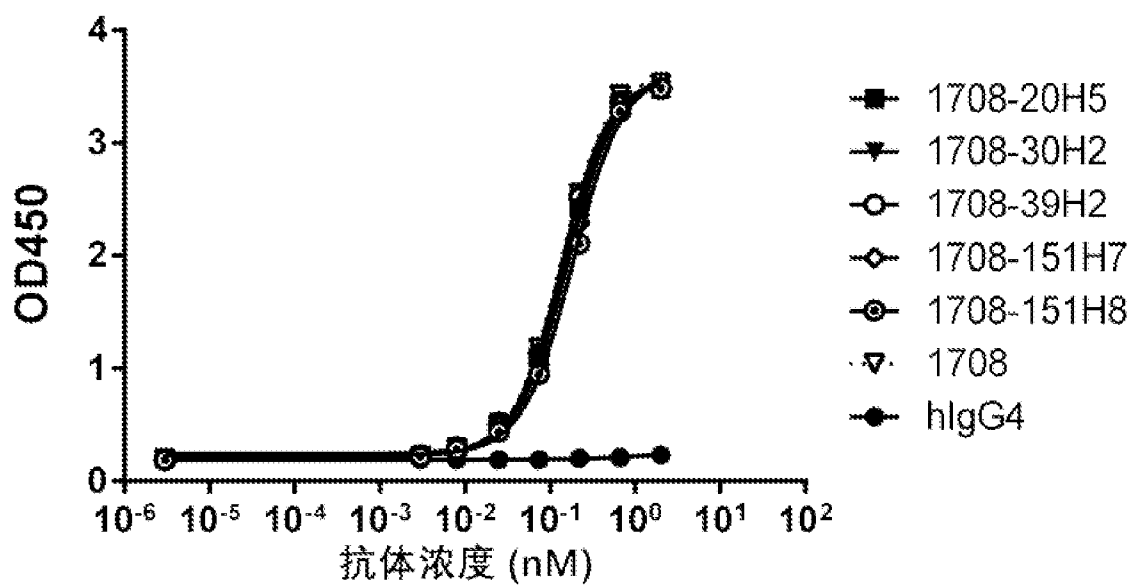


图 7A

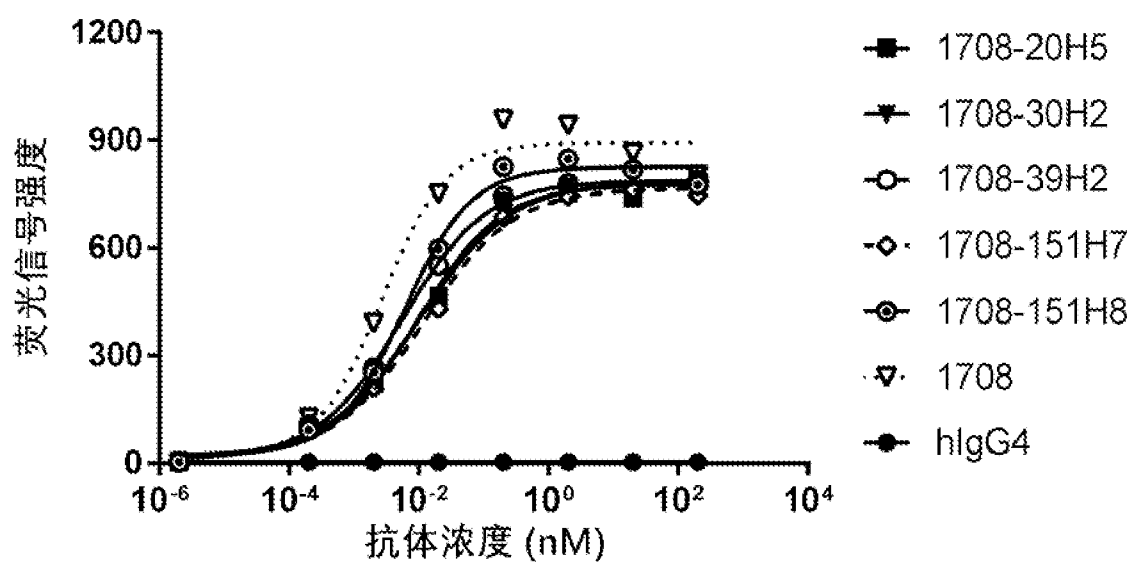


图 7B

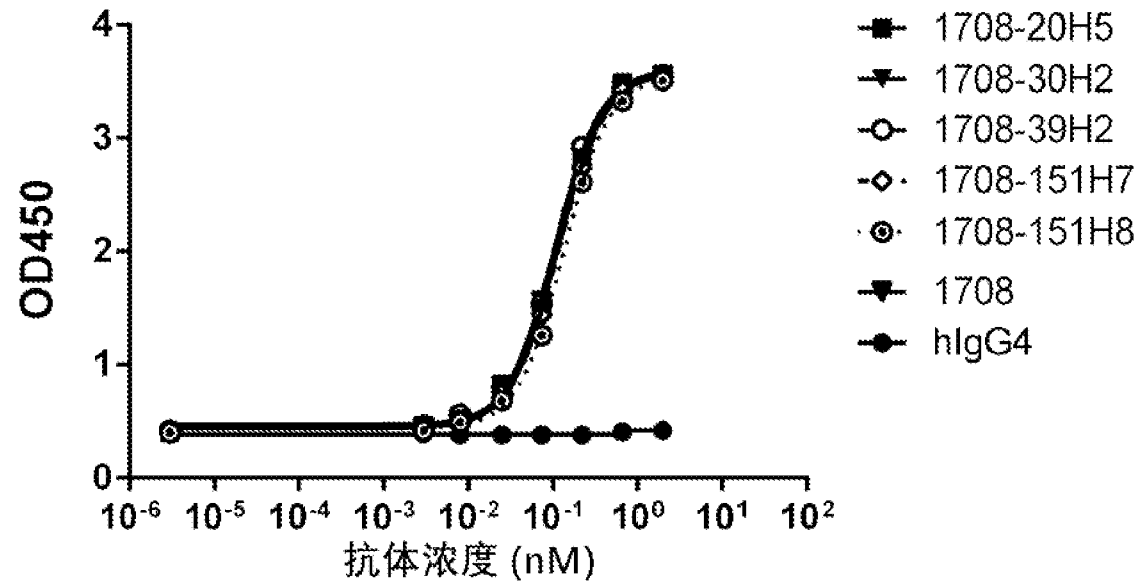


图 7C

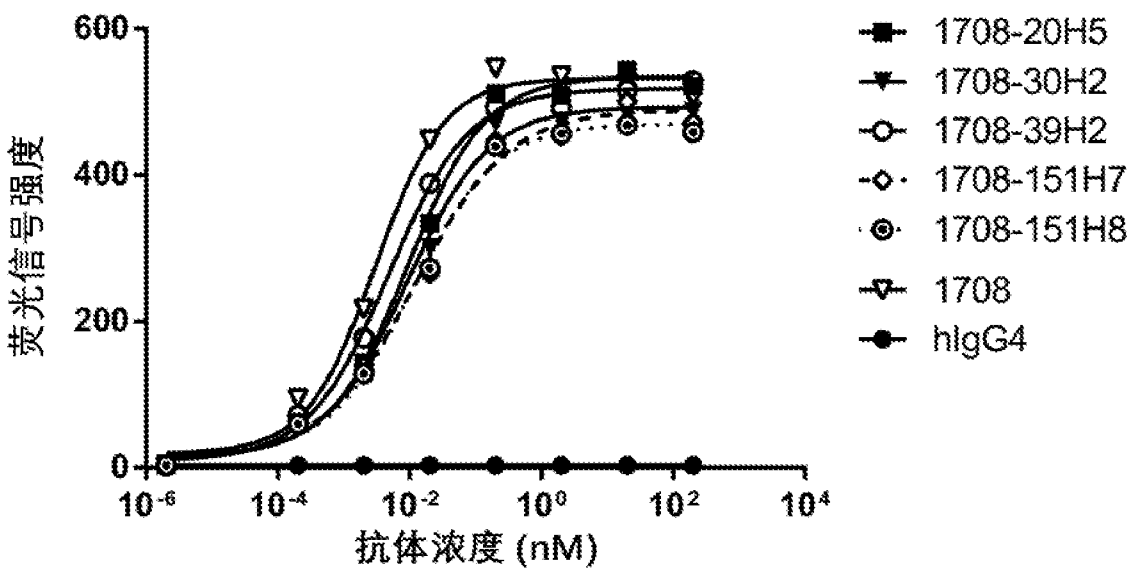


图 7D

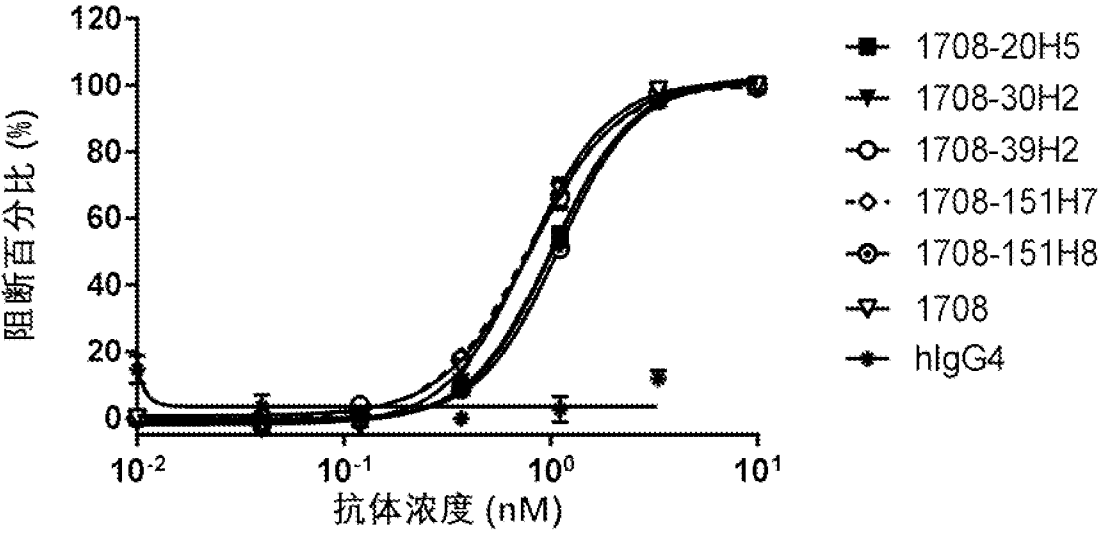


图 7E

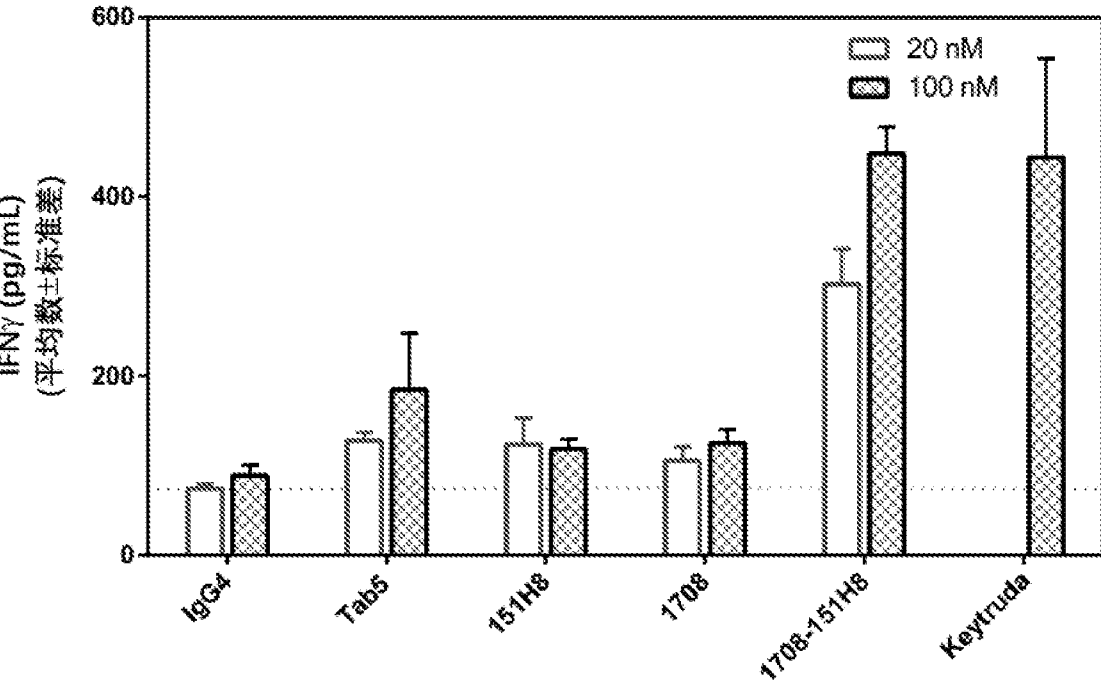


图 8

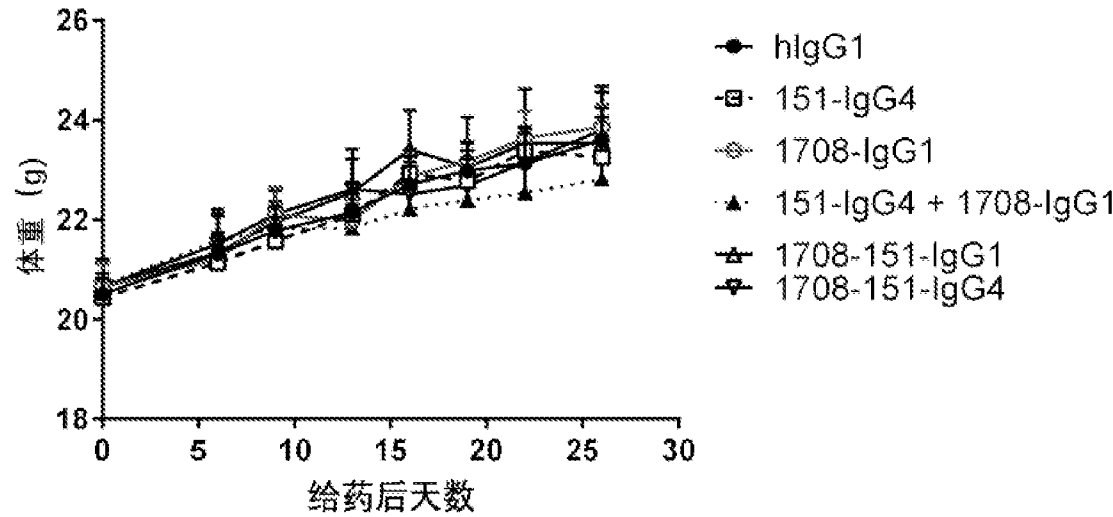


图 9A

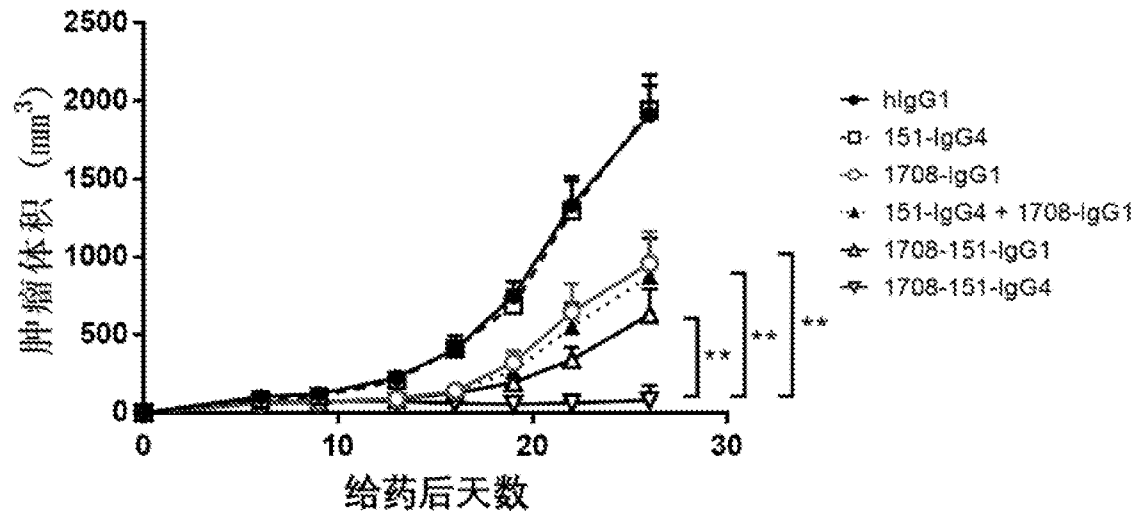


图 9B

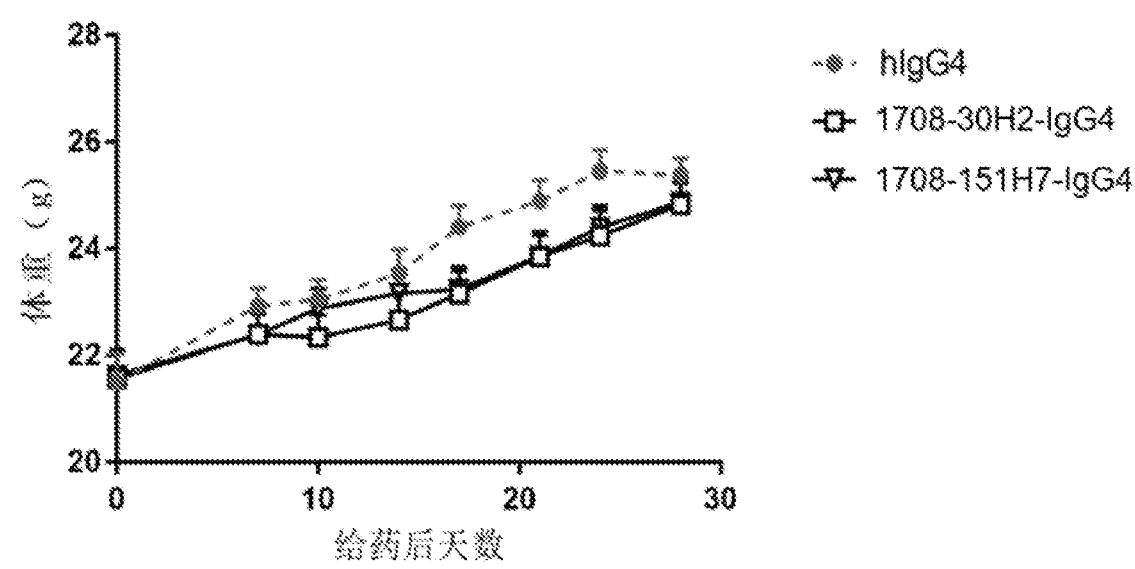


图 10A

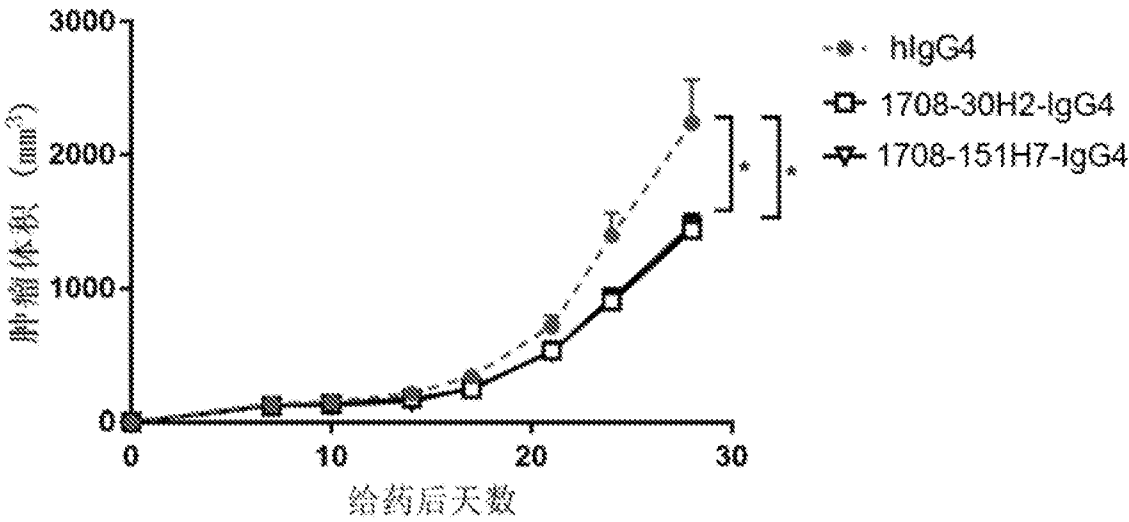


图 10B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/118942

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

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPABS, CNTXT, ENTXTC, DWPI, VEN, CNKI, 万方, WANFANG, ISI WEB OF SCIENCES, PUBMED, GenBank, STN: 申请人, 发明人, PVRIG, TIGIT, 双特异性抗体, CD112R, 组氨酸, 醋酸盐, 聚山梨酯, 泊洛沙姆, 蔗糖, 海藻糖, 山梨糖醇, 精氨酸, 甘氨酸, 氯化钠, bispecific antibody, acetic acid-sodium acetate buffer, histidine-hydrochloric acid buffer, sucrose, polysorbate, cancer, SEQ ID NOs: 1-149

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PY	WO 2021180205 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 16 September 2021 (2021-09-16) claims 1-18	1-16
Y	CN 111744007 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 09 October 2020 (2020-10-09) claims 1-16	1-16
Y	CN 113039202 A (COMPUGEN LTD.) 25 June 2021 (2021-06-25) claims 1-62, and description, paragraph [1053]	1-8, 10-16
Y	CN 111744013 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 09 October 2020 (2020-10-09) claims 1-4	10
A	WO 2018017864 A2 (ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.) 25 January 2018 (2018-01-25) entire document	1-16



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

13 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/CN2022/118942

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 111356476 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 30 June 2020 (2020-06-30) entire document	1-16
A	CN 112274637 A (COMPUGEN LTD.) 29 January 2021 (2021-01-29) entire document	1-16
A	CN 112739717 A (GENSUN BIOPHARMA INC.) 30 April 2021 (2021-04-30) entire document	1-16
A	US 2020231698 A1 (HOFFMANN-LA ROCHE INC.) 23 July 2020 (2020-07-23) entire document	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/118942

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/CN2022/118942

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.: **16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 16 relates to a method for treating diseases, belonging to a method for the treatment of diseases. Claim 16 does not comply with PCT Rule 39.1(iv). The present report relates to conducting a search 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/CN2022/118942

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	TW	202144417	A	01 December 2021
				CA	3170025	A1	16 September 2021
CN	111744007	A	09 October 2020	None			
CN	113039202	A	25 June 2021	IL	279053	A	31 January 2021
				AU	2019276578	A1	14 January 2021
				BR	112020024249	A2	02 March 2021
				US	2019382477	A1	19 December 2019
				KR	20210016448	A	15 February 2021
				CL	2020003127	A1	29 October 2021
				SG	11202011461 T	A	30 December 2020
				EP	3802605	A1	14 April 2021
				JP	2021525087	A	24 September 2021
				CO	2020016619	A2	18 January 2021
				CA	3101019	A1	05 December 2019
				WO	2019232484	A1	05 December 2019
CN	111744013	A	09 October 2020	None			
WO	2018017864	A2	25 January 2018	None			
CN	111356476	A	30 June 2020	RU	2020118313	A3	24 January 2022
				AU	2018391217	A1	09 July 2020
				JP	2021506922	A	22 February 2021
				KR	20200104314	A	03 September 2020
				EP	3714901	A1	30 September 2020
				WO	2019120269	A1	27 June 2019
				CA	3085656	A1	27 June 2019
				BR	112020011664	A2	17 November 2020
				US	2022031842	A1	03 February 2022
				TW	201927337	A	16 July 2019
CN	112274637	A	29 January 2021	None			
CN	112739717	A	30 April 2021	JP	2021532170	A	25 November 2021
				US	2020002417	A1	02 January 2020
				WO	2020006516	A1	02 January 2020
				CA	3105101	A1	02 January 2020
				US	2021009696	A1	14 January 2021
				US	2021246214	A1	12 August 2021
				JP	2021529557	A	04 November 2021
				KR	20210028222	A	11 March 2021
				US	2020277388	A1	03 September 2020
				JP	2021529556	A	04 November 2021
				US	2020002426	A1	02 January 2020
				WO	2020006511	A1	02 January 2020
				WO	2020006509	A1	02 January 2020
				EP	3814381	A1	05 May 2021
				AU	2019293047	A1	28 January 2021
				BR	112020026862	A2	20 April 2021
				US	2020181272	A1	11 June 2020
				US	2020002439	A1	02 January 2020
				CN	112638401	A	09 April 2021
				EP	3813880	A1	05 May 2021
				EP	3813864	A1	05 May 2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/118942

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				CN	113056285	A	29 June 2021
US	2020231698	A1	23 July 2020	EP	3658183	A1	03 June 2020
				AU	2018308930	A1	06 February 2020
				KR	20200036889	A	07 April 2020
				CA	3069073	A1	31 January 2019
				WO	2019020745	A1	31 January 2019
				JP	2020528419	A	24 September 2020
				IL	271416	A	30 January 2020
				CN	110869050	A	06 March 2020
				TW	201909914	A	16 March 2019
				BR	112020000566	A2	21 July 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/118942

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

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

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))

WPABS, CNTXT, ENTXTC, DWPI, VEN, CNKI, 万方, ISI WEB OF SCIENCES, PUBMED, GenBank, STN: 申请人, 发明人, PVRIG, TIGIT, 双特异性抗体, CD112R, 组氨酸, 醋酸盐, 聚山梨酯, 泊洛沙姆, 蔗糖, 海藻糖, 山梨糖醇, 精氨酸, 甘氨酸, 氯化钠, bispecific antibody, acetic acid-sodium acetate buffer, histidine-hydrochloric acid buffer, sucrose, polysorbate, cancer, SEQ ID NOs: 1-149

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
PY	W0 2021180205 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2021年9月16日 (2021 - 09 - 16) 权利要求1-18	1-16
Y	CN 111744007 A (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2020年10月9日 (2020 - 10 - 09) 权利要求1-16	1-16
Y	CN 113039202 A (康姆普根有限公司) 2021年6月25日 (2021 - 06 - 25) 权利要求1-62, 说明书第[1053]段	1-8, 10-16
Y	CN 111744013 A (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2020年10月9日 (2020 - 10 - 09) 权利要求1-4	10
A	W0 2018017864 A2 (ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.) 2018年1月25日 (2018 - 01 - 25) 全文	1-16
A	CN 111356476 A (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2020年6月30日 (2020 - 06 - 30) 全文	1-16

☒ 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13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

授权官员

陈莹

电话号码 86-(010)-53961975

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	CN 112274637 A (康姆普根有限公司) 2021年1月29日 (2021 - 01 - 29) 全文	1-16
A	CN 112739717 A (璟尚生物制药公司) 2021年4月30日 (2021 - 04 - 30) 全文	1-16
A	US 2020231698 A1 (HOFFMANN-LA ROCHE INC.) 2020年7月23日 (2020 - 07 - 23) 全文	1-16

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： 16
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16涉及一种治疗疾病的方法，属于疾病的治疗方法，不符合R39.1(iv)的规定，本报告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/CN2022/118942

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	TW	202144417	A	2021年12月1日
				CA	3170025	A1	2021年9月16日
CN	111744007	A	2020年10月9日	无			
CN	113039202	A	2021年6月25日	IL	279053	A	2021年1月31日
				AU	2019276578	A1	2021年1月14日
				BR	112020024249	A2	2021年3月2日
				US	2019382477	A1	2019年12月19日
				KR	20210016448	A	2021年2月15日
				CL	2020003127	A1	2021年10月29日
				SG	11202011461T	A	2020年12月30日
				EP	3802605	A1	2021年4月14日
				JP	2021525087	A	2021年9月24日
				CO	2020016619	A2	2021年1月18日
				CA	3101019	A1	2019年12月5日
				WO	2019232484	A1	2019年12月5日
CN	111744013	A	2020年10月9日	无			
WO	2018017864	A2	2018年1月25日	无			
CN	111356476	A	2020年6月30日	RU	2020118313	A3	2022年1月24日
				AU	2018391217	A1	2020年7月9日
				JP	2021506922	A	2021年2月22日
				KR	20200104314	A	2020年9月3日
				EP	3714901	A1	2020年9月30日
				WO	2019120269	A1	2019年6月27日
				CA	3085656	A1	2019年6月27日
				BR	112020011664	A2	2020年11月17日
				US	2022031842	A1	2022年2月3日
				TW	201927337	A	2019年7月16日
CN	112274637	A	2021年1月29日	无			
CN	112739717	A	2021年4月30日	JP	2021532170	A	2021年11月25日
				US	2020002417	A1	2020年1月2日
				WO	2020006516	A1	2020年1月2日
				CA	3105101	A1	2020年1月2日
				US	2021009696	A1	2021年1月14日
				US	2021246214	A1	2021年8月12日
				JP	2021529557	A	2021年11月4日
				KR	20210028222	A	2021年3月11日
				US	2020277388	A1	2020年9月3日
				JP	2021529556	A	2021年11月4日
				US	2020002426	A1	2020年1月2日
				WO	2020006511	A1	2020年1月2日
				WO	2020006509	A1	2020年1月2日
				EP	3814381	A1	2021年5月5日
				AU	2019293047	A1	2021年1月28日
				BR	112020026862	A2	2021年4月20日
				US	2020181272	A1	2020年6月11日
				US	2020002439	A1	2020年1月2日
				CN	112638401	A	2021年4月9日
				EP	3813880	A1	2021年5月5日
				EP	3813864	A1	2021年5月5日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/118942

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利	公布日 (年/月/日)
						CN 113056285 A	2021年6月29日
US 2020231698 A1				2020年7月23日		EP 3658183 A1	2020年6月3日
						AU 2018308930 A1	2020年2月6日
						KR 20200036889 A	2020年4月7日
						CA 3069073 A1	2019年1月31日
						WO 2019020745 A1	2019年1月31日
						JP 2020528419 A	2020年9月24日
						IL 271416 A	2020年1月30日
						CN 110869050 A	2020年3月6日
						TW 201909914 A	2019年3月16日
						BR 112020000566 A2	2020年7月21日