



(21) 申请号 202310283485.9  
(22) 申请日 2023.03.21  
(71) 申请人 上海赛金生物医药有限公司  
地址 201203 上海市浦东新区张江高科技  
园区春晓路300号  
(72) 发明人 陈羿 蔡则玲 何巧巧 王雅玲  
方国波  
(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
司 31100  
专利代理师 杨昀  
(51) Int. Cl.  
C07K 19/00 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01)  
C12N 15/85 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 38/20 (2006.01)  
A61K 47/68 (2017.01)  
A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 35/02 (2006.01)  
A61P 31/00 (2006.01)  
A61P 33/00 (2006.01)  
A61P 37/02 (2006.01)

权利要求书3页 说明书24页  
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

抗PD-1/抗TIGIT双特异性抗体与IL-2的融合蛋白及应用

(57) 摘要

本文提供了抗PD-1/抗TIGIT双特异性抗体与IL-2的融合蛋白及应用。具体而言,本文提供了一种融合蛋白,其包含融合的(I)第一多肽和(II)第二多肽,其,所述第一多肽包含抗TIGIT且抗PD-1的抗TIGIT/抗PD-1双特异性抗体(BsAb)或其抗原结合部分,其中所述BsAb或其抗原结合部分包含(A)TIGIT结合域和(B)PD-1结合域;所述第二多肽包含白介素-2(IL-2)或其具有促淋巴细胞生长活性的变体。还提供了融合蛋白编码序列、载体和细胞、相关产品及其应用(例如用于癌症诊断、预防和/或治疗)。

1. 一种融合蛋白,其包含:

(I) 第一多肽,其包含抗TIGIT且抗PD-1的抗TIGIT/抗PD-1双特异性抗体(BsAb)或其抗原结合部分,其中,上述双特异性抗体或其抗原结合部分包含:

(A) TIGIT结合域,其包含选自下组的重链互补决定区(VH CDR)1~3和/或轻链互补决定区(VL CDR)1~3:

(i) 选自下组的VH CDR1:SEQ ID NO:11或19;

(ii) 选自下组的VH CDR2:SEQ ID NO:12或20;

(iii) 选自下组的VH CDR3:SEQ ID NO:13或21;

(iv) 选自下组的VL CDR1:SEQ ID NO:15或23;

(v) 选自下组的VL CDR2:SEQ ID NO:16或24;

(vi) 选自下组的VL CDR3:SEQ ID NO:17或25;以及

(B) PD-1结合域;以及

(II) 第二多肽,其包含白介素-2(IL-2)或其具有促淋巴细胞生长活性的变体,其中,所述第二多肽与所述第一多肽融合。

2. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,

(A) 所述TIGIT结合域包含选自下组的VH CDR1~3的组合:SEQ ID NO:11、12和13;或SEQ ID NO:19、20和21;和/或,

所述TIGIT结合域包含选自下组的VL CDR1~3的组合:SEQ ID NO:15、16和17;或SEQ ID NO:23、24和25

(例如,所述TIGIT结合域包含选自下组的VH CDR1~3和VL CDR1~3的组合:SEQ ID NO:11、12和13与SEQ ID NO:15、16和17的组合;

或SEQ ID NO:19、20和21与SEQ ID NO:23、24和25的组合);

和/或

(B) 所述PD-1结合域包含抗PD-1抗体的抗原结合域,

例如,所述PD-1结合域包含抗PD-1抗体的抗原结合域;

例如,所述PD-1结合域包含选自派姆单抗或纳武单抗的VL CDR、VH CDR、VH和/或VL,或与前述序列具有至少80%(例如85%、90%、95%、98%)序列同一性且具有PD-1结合活性的片段或其组合;和/或

例如,所述PD-1结合域包含选自SEQ ID NO:1、2、3或4的一种或多种PD-1结合片段或与前述序列具有至少80%(例如85%、90%、95%、98%)序列同一性且具有PD-1结合活性的片段或其组合。

3. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述TIGIT结合域包含选自下组的重链可变区(VH)或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列:SEQ IDNO:10或18;和/或

所述TIGIT结合域包含选自下组的轻链可变区(VL)或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:14或22,

(例如,所述TIGIT结合域包含选自下组的重链可变区(VH)和轻链可变区的组合:SEQ ID NO:10或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列和SEQ ID NO:14或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的组合;

或SEQ ID NO:18或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列和SEQ IDNO:22或与其

具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的组合)。

4. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述TIGIT结合域包含选自下组的一种或多种TIGIT结合片段:SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8所示的片段,或与前述序列具有至少90%(例如95%)序列同一性且具有TIGIT结合活性的片段。

5. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述TIGIT结合域和/或PD-1结合域为选自以下组成的组的抗体片段:Fab片段;由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)<sub>2</sub>片段;包含通过铰链区的二硫桥键连接的两个Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;dAb片段;分离的CDR;和IscFv;和/或

所述双特异性抗体的形式选自下组:1)由抗原结合区域(Fab)组装起来的融合蛋白; (2)对称型BsAb; (3)非对称型BsAb;和/或

所述双特异性抗体为多价抗体,例如2价、3价、4价、5价、6价或更高价抗体;和/或

所述融合蛋白具有杵臼(KIH)构型(例如所述双特异性抗体具有包含如下片段的KIH构型:包含选自SEQ ID NO:1、2、5或6的重链以及选自SEQ ID NO:3、4、7或8的轻链的抗原结合域,或它们的任意组合)或具有在重链C端链接scFv片段的IgG-scFv构型;和/或

所述双特异性抗体为同源二聚体或多聚体,或异源二聚体或多聚体。

6. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述第二多肽具有选自下组的一个或多个特征:

(a) 所述第二多肽还包含信号肽;

(b) 所述IL-2为野生型IL-2或其功能性片段,例如来源于人、灵长类动物、啮齿类动物;

(c) 与野生型IL-2相比,所述IL-2变体与IL-2R $\beta$ 亚基的结合亲和力增强和/或所述IL-2变体与IL-2R $\alpha$ 亚基的结合亲和力降低;

(d) 与野生型IL-2相比,所述IL-2变体的促淋巴细胞生长活性不变或增强;

例如,所述IL-2变体包含选自下组的一个或多个突变:R38L、F42A、L80F、R81D、L85V、I86V、I92F,例如包含突变组合:R38L和F42A,其中所述突变的位置根据EU编号方式。

7. 如权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述第一多肽和第二多肽直接连接或通过接头连接,例如所述接头是甘氨酸接头,如Gn,或甘氨酸/丝氨酸接头,如(GS)<sub>n</sub>、(GG)<sub>n</sub>、(GGGS)<sub>n</sub>、(GGGG)<sub>n</sub>或(GGGGS)<sub>n</sub>的氨基酸序列,其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的整数;和/或

所述第二多肽连接于第一多肽中抗体重链的N端和/或C端,例如位于PD-1结合域抗体重链的C端;和/或

所述融合蛋白包含:SEQ ID NO:1、3、5和7所示的序列;或SEQ ID NO:2、4、6和8所示的序列;或与前述序列具有至少80%(例如85%、90%、95%)序列同一性且具有相同或相似活性的片段的组合。

8. 核酸分子或其组合,其编码如权利要求1-7中任一项所述的融合蛋白。

9. 一种载体或细胞,其包含如权利要求1-7中任一项所述的融合蛋白和/或如权利要求8所述的核酸分子或其组合,例如所述细胞为嵌合抗原受体(CAR)细胞。

10. 一种产品,其包含如权利要求1-7中任一项所述的融合蛋白或其片段、如权利要求8所述的核酸分子或其组合、如权利要求9所述的载体或细胞,

例如,所述产品选自:药物组合物、试剂盒、药盒;和/或,

例如,所述产品用于:所述双特异性抗体的生产、包含所述双特异性抗体的衍生物(例

如CAR细胞)的生产、疾病治疗和/或疾病检测。

11. 如权利要求1-7中任一项所述的融合蛋白、如权利要求8所述的核酸分子或其组合、如权利要求9所述的载体或细胞或如权利要求10所述产品的应用,其用于制备TIGIT和/或PD-1过表达相关疾病的预防和/或治疗的药物,

例如,所述TIGIT和/或PD-1过表达相关疾病选自:

癌症(如腺癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、肉瘤;来自肾上腺、胆囊、骨、骨髓、脑、乳腺、胆管、胃肠道、心脏、肾脏、肝脏、肺、肌肉、卵巢、胰腺、甲状旁腺、阴茎、前列腺、皮肤、唾液腺、脾脏、睾丸、胸腺、甲状腺或子宫的肿瘤组织;中枢神经系统的肿瘤,如胶质细胞多样性瘤、或星细胞瘤;眼部肿瘤(例如基底细胞癌、鳞状细胞癌或黑色素瘤)、内分泌腺肿瘤、神经内分泌系统肿瘤、胃肠道胰腺内分泌系统肿瘤,生殖系统肿瘤或头颈部肿瘤);

感染或感染性疾病,例如;HIV、病毒感染性肝炎、HTLV-1病毒感染、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒感染、寄生虫感染(泡球蚴,日本血吸虫,疟原虫);

免疫缺陷性疾病,例如:1型糖尿病、多发性硬化症、类风湿性关节炎、乳糜泻、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、皮肤狼疮、特发性关节炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎或系统性硬化病、移植物抗宿主病、银屑病、斑秃、特应性皮炎、HCV诱导的血管炎、舍格伦综合征、天疱疮、强直性脊柱炎、白塞病、韦格纳肉芽肿病、自身免疫性肝炎、硬化性胆管炎、古-斯综合征和巨噬细胞激活综合征、自身免疫性甲状腺炎、自身免疫性葡萄膜炎、再生障碍性贫血。

## 抗PD-1/抗TIGIT双特异性抗体与IL-2的融合蛋白及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术和医学领域。具体而言,本发明涉及抗体-细胞间素融合蛋白,具体为包含能特异性结合PD-1和TIGIT的双特异性抗体和白介素-2(IL-2)或其各类变异体的融合蛋白。另外,本申请涉及编码这类融合蛋白的多核苷酸、表达这类融合蛋白的载体和宿主细胞。本申请还涉及产生、制备这类融合蛋白的方法,以及用于治疗疾病的药物成分和治疗方法。

### 背景技术

[0002] 白细胞介素-2(IL-2)一种由抗原刺激诱导的T细胞生长因子,可以激活和促进T细胞的增值与分化,维持多种免疫细胞如B细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞的生长和繁殖。因而IL-2在治疗肿瘤和免疫缺陷性疾病中有重要作用,是FDA批准的首批用于癌症的免疫治疗药物之一。近年来,虽然野生型IL-2应用于癌症的治疗取得了令人瞩目的成果,然而其在体内半衰期短,还可能引起发热、呕吐、腹泻、头晕和低血压等副作用,促使人们将研究焦点转向于特异性更强、治疗效果更好的新型突变IL-2蛋白。

[0003] IL-2通过与细胞膜上的IL-2受体(IL-2R)结合来发挥生物活性。IL-2R受体是一个复合体,由 $\alpha$ 链(55kd), $\beta$ 链(75kd)和 $\gamma$ 链(64kd)组成。只有在3条链同时存在时,IL-2才能与IL-2R以高亲和力结合( $K_d \approx 10^{-11}M$ )。只有 $\beta$ 和 $\gamma$ 链的表达而失去 $\alpha$ 链的细胞,能够进行信号转导,但只能以中度亲和力与IL-2结合( $K_d \approx 10^{-9}M$ )。只表达 $\alpha$ 链的细胞以低亲和力与IL-2结合( $K_d \approx 10^{-8}M$ ),且无法进行细胞的信号转导。 $\gamma$ 亚基不单独与IL-2结合。高亲和力的IL-2R主要存在于活化的T、B淋巴细胞及NK细胞中,大部分静止状态的NK细胞和巨噬细胞表达中等亲和力IL-2R,而低亲和力的IL-2R表达在静止状态的T细胞中(GAFFEN S L等,Cytokine, 2004, 28(3):109-123)。

[0004] 研究发现,IL-2蛋白的突变可以增强对IL-2R $\beta$ 的亲和力,该种新型IL-2突变蛋白相对于野生型IL-2可以更好的诱导细胞毒性T细胞的增值,减少Treg细胞的扩增,从而提高抗肿瘤效果(Levin等,Nature 484:529(2012))。

[0005] 含Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(T cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains,TIGIT,也称WUCAM、Vstm3或VSIG9),是一种主要表达在NK细胞、T细胞、Treg细胞等免疫细胞表面的检查点分子,其在细胞质尾部具有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM),是典型的抑制性受体蛋白(Yu等,Nat. Immunol. 10:48-57, 2009)。

[0006] TIGIT可通过多种机制抑制机体的免疫反应。通过靶向T细胞抗原受体(TCR)的信号通路分子,TIGIT直接阻断初始T细胞(Tn)活化、增殖和效应功能的获得,并且能够抑制CD4+T细胞的细胞增殖和炎症细胞因子的产生(Fourcade J等,JCI Insight, 2018, 3(14): e121157)。TIGIT可以通过调节树突细胞的细胞因子产生来间接抑制T细胞(Yu等, Nat. Immunol. 10:48-57, 2009)。TIGIT还可增强Tregs稳定性及其对产生IFN- $\gamma$ 的T细胞增殖的抑制功能(Fourcade J等,JCI Insight, 2018, 3(14): e121157)。在肿瘤环境中,TIGIT

高表达于肿瘤浸润或迁移相关的NK细胞与效应T细胞表面,CD155在肿瘤细胞表面高表达,肿瘤细胞通过CD155/TIGIT的结合直接作用于NK细胞和效应T细胞,抑制其活性(Li等, J. Biol. Chem. 289:17647-17657, 2014)。对于增强免疫应答以及预防和/或治疗肿瘤、感染或感染性疾病,TIGIT是极具潜力的免疫治疗新靶点。靶向TIGIT的CD155阻断型抗体,特别是抗人TIGIT抗体,能释放免疫效应细胞的肿瘤杀伤活性,有望取得良好的抗肿瘤疗效。

[0007] 通过PD-1抗体进行的免疫检查点抑制是目前最广泛使用的癌症免疫疗法之一,但这种传统疗法的治疗有效性不足,人群缺乏响应,还存在耐药性甚至严重的不良反应。目前上市在售的免疫检查点抗体药物大多为单克隆抗体,仅针对一个特异性的靶点。然而,单克隆抗体治疗可能产生耐药性或无应答,并且很多疾病受到不同的信号通路、不同的细胞因子和受体的调节机制的影响,单一靶点的免疫疗法可能有效性较低。

[0008] TIGIT对于增强免疫应答以及预防和/或治疗肿瘤、感染或感染性疾病是极具潜力的免疫治疗新靶点,然而单药治疗疗效尚有局限性,尚需开发有效的联合疗法。

[0009] 双特异性抗体(Bispecific antibody, BsAb)是一类基因工程抗体,通常是指可特异性结合两种抗原或者同一种抗原的两种不同表位的抗体。目前,BsAb已成为抗体工程领域的热点,在自身免疫性疾病、肿瘤以及其他疾病的治疗中具有广阔的应用前景。

[0010] 本领域中仍然迫切需要研究开发出能够同时作用于TIGIT和PD-1且具有改善IL-2功能的高效双抗药物。

## 发明内容

[0011] 本发明正是提供了一种融合蛋白,其既包含能够同时特异性靶向PD-1及TIGIT两种靶点的双特异性抗体部分,也包含IL-2或其变体部分。通过体内、外实验验证了其高效的生物学活性,相比于联合用药,包含双特异性抗体的融合蛋白在疗效及成本上都具有较大的优势,具有显著的临床意义和广阔的市场空间。

[0012] 在本发明的一些方面中,提供了一种融合蛋白,其包含:

[0013] (I) 第一多肽,其包含抗TIGIT且抗PD-1的抗TIGIT/抗PD-1双特异性抗体(BsAb)或其抗原结合部分,其中,上述双特异性抗体或其抗原结合部分包含:

[0014] (A) TIGIT结合域,和

[0015] (B) PD-1结合域;以及

[0016] (II) 第二多肽,其包含白介素-2(IL-2)或其具有促淋巴细胞生长活性的变体,其中,所述第二多肽与所述第一多肽融合。

[0017] 在一些实施方式中,抗TIGIT/抗PD-1双特异性抗体中的TIGIT结合域采用了本文所公开抗TIGIT单克隆抗体(例如P03489、P03479)或其功能性片段(抗原结合片段,例如可参见表2和表3)。

[0018] 在本发明的一些方面中,提供了一种核酸分子或其组合,其编码本发明的融合蛋白。

[0019] 在本发明的一些方面中,提供了一种载体或细胞,其包含本发明的融合蛋白或其片段和/或核酸分子或其组合,例如所述细胞为嵌合抗原受体(CAR)细胞。

[0020] 在本发明的一些方面中,提供了一种产品,其包含本发明所述的融合蛋白或其片段、核酸分子或其组合、载体或细胞。产品可选自:药物组合物、试剂盒、药盒。或者,产品可

用于:所述融合蛋白的生产、包含所述融合蛋白的衍生物(例如CAR细胞)的生产、疾病治疗和/或疾病检测。

[0021] 在本发明的一些方面中,提供了如本文所述的融合蛋白或其片段、核酸分子或其组合、载体或细胞或产品的应用,其用于制备TIGIT和/或PD-1过表达相关疾病(例如癌症、感染性疾病)的预防和/或治疗的药物。

[0022] 本领域的技术人员可对前述的技术方案和技术特征进行任意组合而不脱离本发明的发明构思和保护范围。本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

## 附图说明

[0023] 下面结合附图对本发明作进一步说明,其中这些显示仅为了图示说明本发明的实施方案,而不是为了局限本发明的范围。

[0024] 图1:本申请示例性TIGIT/PD-1BsAb-IL-2变异体融合蛋白结构示意图。

[0025] 图2:显示了抗人TIGIT单克隆抗体与膜TIGIT结合的流式细胞技术分析研究。

[0026] 图2A:嵌合抗体7103-07和其人源化抗体P03479与膜TIGIT的结合;

[0027] 图2B:抗人TIGIT人源化抗体P03489与膜TIGIT的结合。

[0028] 图3:显示了抗人TIGIT单克隆抗体和CD155与重组人TIGIT的竞争结合的ELISA研究。

[0029] 图4:显示了抗人TIGIT单克隆抗体对PHA激活的PBMC产生IFN  $\gamma$  的促进作用。

[0030] 图5:显示了抗人TIGIT人源化单克隆抗体在小鼠体内抑制小鼠肿瘤生长的作用:

[0031] 图5A:各组每只小鼠的肿瘤体积与时间的关系;

[0032] 图5B:试验结束时(D17)各组每个小鼠的肿瘤重量。

[0033] 图6:SDS-PAGE方法鉴定制备的TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)融合蛋白:

[0034] 图6A:TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)融合蛋白KD5301A的非还原胶和还原胶的分析;

[0035] 图6B:TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)融合蛋白KD5301B的非还原胶和还原胶的分析。

[0036] 图7:TIGIT/PD-1BsAb-IL-2体外与抗原双结合的夹心ELISA研究。

[0037] 图8:TIGIT/PD-1BsAb-IL-2体外刺激淋巴细胞CTLL-2生长的研究。

[0038] 以上图中,\*表示 $p < 0.05$ ,\*\*表示 $p < 0.01$ 。

## 具体实施方式

[0039] 本发明提供了一种抗PD-1/抗TIGIT BsAb-IL-2突变体的抗体-细胞间素融合蛋白,该融合蛋白包含TIGIT和PD-1的双特异性抗体和突变型IL-2分子。与野生型IL-2分子相比,所述突变白介素-2分子可以增强对IL-2R $\beta$ 的亲合力或者减弱对IL-2R $\beta$ 的亲合力,同时降低对IL-2R $\alpha$ 的亲合力。另一方面,该PD-1/TIGIT双特异性抗体-IL-2融合蛋白能延缓IL-2的半衰期,比IL-2单独应用的生物活性更好。其抗体部分带引融合的IL-2靶向到肿瘤微环境中,对其中的TIGIT和PD-1高表达的衰竭的T淋巴细胞和NK细胞刺激,激活它们的抗肿瘤功能。另外,PD-1/TIGIT BsAb-IL-2变异体优先激活TIGIT和PD-1高表达的淋巴细胞,对其

它淋巴细胞的激活作用不强,从而减少了IL-2引发的副作用。该PD-1/TIGIT双特异性抗体还可以释放免疫效应细胞的肿瘤杀伤活性,协同杀伤肿瘤细胞,取得更强的抑制肿瘤的效果。

[0040] 由此,本公开提供了可用于预防和/或治疗TIGIT和PD-1表达或过表达相关的疾病,例如肿瘤、感染或感染性疾病。本公开的双特异性抗体还能够减少或消除表达TIGIT和/或PD-1的细胞(例如Treg细胞)或其活性。

[0041] 本公开还提供了一种增强免疫应答,预防和/或治疗肿瘤、感染或感染性疾病的方法,其包括向受试者施用包含治疗有效量的本文所述双特异性抗体或其衍生物(例如嵌合抗原受体药物)的药物组合物。

[0042] 本文中提供的所有数值范围旨在清楚地包括落在范围端点之间的所有数值及它们之间的数值范围。可对本发明提到的特征或实施例提到的特征进行组合。本说明书所揭示的所有特征可与任何组合物形式并用,说明书中所揭示的各个特征,可以任何可提供相同、均等或相似目的的替代性特征取代。因此除有特别说明,所揭示的特征仅为均等或相似特征的一般性例子。

[0043] 如本文所用,“含有”、“具有”或“包括”包括了“包含”、“主要由……构成”、“基本上由……构成”、和“由……构成”;“主要由……构成”、“基本上由……构成”和“由……构成”属于“含有”、“具有”或“包括”的下位概念。

#### [0044] 单克隆抗体及其制备

[0045] 本文所用的术语“单克隆抗体(单抗)”指从一类基本均一的群体获得的抗体,即该群体中包含的单个抗体是相同的,除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体高特异性地针对单个抗原位点。而且,与常规多克隆抗体制剂(通常是具有针对不同决定簇的不同抗体)不同,各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体的好处还在于它们是通过杂交瘤培养来合成的,不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性,是从基本均一的抗体群中获得的,这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

[0046] 如本文所用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150,000道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH),其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0047] 如本文所用,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈 $\beta$ -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分 $\beta$ 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ.No.91-3242,卷I,647-669页(1991))。恒定区不直接参

与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0048] 如本文所用,术语“靶分子”指能够被抗体或其靶向结构域特异性结合的分子。在本文中,靶分子可位于表面表达或高表达TIGIT、PD-1或两者的细胞上,优选靶分子暴露于靶细胞外部或在其上富集。在一些实施方式中,靶分子表达于癌细胞、被感染细胞。在一些实施方式中,靶分子为TIGIT、PD-1或两者。

[0049] 如本文所用,术语“序列同一性”或“同一性%”是指在比对序列并且(必要时)引入空位以获得的最大序列相同性百分比之后,候选序列与参考序列中相同残基(例如氨基酸或核酸)的百分比。例如,如本文所用,“至少70%的序列同一性”是指候选序列与参考序列间的序列同一性达到70%以上,如75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%或其中任意数值点的同一性。

[0050] 本公开提供了特异性结合人TIGIT的单克隆抗体,优选人源化抗体。在本公开中,如果没有特别说明,“m”表示鼠源部分,“h”表示人源部分。在一些实施方式中,所述抗体包括重链可变区(VH),所述重链可变区包括3个互补决定区(CDR),所述抗体包括轻链可变区(VL),所述轻链可变区包括3个CDR。

[0051] 在一些实施方式中,抗TIGIT单克隆抗体包含选自下组的重链互补决定区(VH CDR)1~3和/或轻链互补决定区(VL CDR)1~3的抗体:(i)选自下组的VH CDR1:SEQ ID NO:11或19;(ii)选自下组的VH CDR2:SEQ ID NO:12或20;(iii)选自下组的VH CDR3:SEQ ID NO:13或21;(iv)选自下组的VL CDR1:SEQ ID NO:15或23;(v)选自下组的VL CDR2:SEQ ID NO:16或24;(vi)选自下组的VL CDR3:SEQ ID NO:17或25。

[0052] 在一些实施方式中,抗TIGIT单克隆抗体包含选自下组的VH CDR1~3的组合:SEQ ID NO:11、12和13;或SEQ ID NO:19、20和21;和/或,包含选自下组的VL CDR1~3的组合:SEQ ID NO:15、16和17;或SEQ ID NO:23、24和25。

[0053] 在一些实施方式中,抗TIGIT单克隆抗体包含选自下组的VH CDR1~3和VL CDR1~3的组合:SEQ ID NO:11、12和13与SEQ ID NO:15、16和17的组合;或SEQ ID NO:19、20和21与SEQ ID NO:23、24和25的组合)。

[0054] 在一些实施方式中,抗TIGIT单克隆抗体包含包含选自下组的重链可变区(VH)或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:10或18。在一些实施方式中,抗TIGIT单克隆抗体包含选自下组的轻链可变区(VL)或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:14或22。

[0055] 在一些实施方式中,抗TIGIT单克隆抗体包含选自下组的重链可变区(VH)和轻链可变区的组合:SEQ ID NO:10或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列和SEQ ID NO:14或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的组合;或SEQ ID NO:18或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列和SEQ ID NO:22或与其具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的组合。

[0056] 本文所提供的抗TIGIT单克隆抗体是具有高亲和力、高特异性且效果更优的新型TIGIT单克隆抗体。本文的抗体及其功能性片段能够有效阻断TIGIT与其配体CD155的结合,增强免疫细胞的细胞因子释放,提高免疫细胞活性、增强免疫应答,用于预防和/或治疗肿瘤、感染或感染性疾病。本公开的抗TIGIT抗体还能够减少或消除表达TIGIT的细胞(例如

Treg细胞)或其活性。本文抗TIGIT单克隆抗体及其片段的效果甚至于优于罗氏的三期临床药物替瑞利尤单抗(Tiragolumab),由此在其基础上进行进一步开发能够获得更适于临床应用的产品。

[0057] 本申请中可采用各种抗PD-1单克隆抗体。在一些实施方式中,示例性的抗PD-1单克隆抗体包含选自派姆单抗或纳武单抗的VL CDR、VH CDR、VH和/或VL,或与前述序列具有至少80%(例如85%、90%、95%、98%)序列同一性且具有PD-1结合活性的片段或其组合。

[0058] 双特异性抗体

[0059] 本文所用的术语“双特异性”指抗体同时具有与2种不同配体特异性相互作用的能力。

[0060] 在获得了本文所述的高亲和力、高特异性高效抗TIGIT单克隆抗体及其抗原结合片段之后(例如如前部分所述),可采用已知的双特异性抗体构建方法和构型将其与抗PD-1抗体或其抗原结合片段组合来构建本文的双特异性抗体。

[0061] 术语抗体的“抗原结合域”、“抗原结合部分”可互换使用,指的是如本文所用抗体的一个或多个部分,所述部分对TIGIT或PD-1具有特异性的结合亲和力。完整抗体的部分已被证明能够进行抗体的抗原结合功能。抗原结合部分的实例包括但不限于:(i)Fab部分,即单价部分,包括VL、VH、CL和CH1结构域;(ii)F(ab')<sub>2</sub>部分,即二价部分,包括铰链区通过二硫桥彼此连接的两个Fab部分;(iii)Fd部分,包括VH和CH1结构域;(iv)Fv部分,包括抗体单臂的FL和VH结构域;(v)dAb部分,由VH结构域组成或由VH、CH1、CH2、DH3或VH、CH2、CH3(dAb,或单域抗体,仅包含也已经显示出特异性结合至靶表位的VL结构域)组成。

[0062] 在一些实施方式中,TIGIT结合域和/或PD-1结合域为选自以下组成的组的抗体片段:Fab片段;由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)<sub>2</sub>片段;包含通过铰链区的二硫桥键连接的两个Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;dAb片段;分离的CDR;和scFv。

[0063] 尽管Fv部分的两个结构域(即VL和VH)分别由不同基因编码,但可利用合成接头(例如,多聚-G<sub>4</sub>S氨基酸序列(GGGGS)<sub>n</sub>,n=1~10中的任意整数)和重组方法使其彼此连接,使得有可能将它们制备成一条蛋白链,其中VL和VH结构域组合以形成单价分子(称为单链Fv(ScFv))。术语抗体的“抗原结合部分”也包含这种单链抗体。

[0064] 单链抗体的其他形式例如“双抗体”同样包括于此。双抗体是二价、双特异性抗体,其中VH和VL结构域表达于单个多肽链上,但是使用的接头太短而不能将两个结构域组合在同一条链上,从而迫使所述结构域与不同链的互补结构域配对,以形成两个抗原结合位点。免疫球蛋白恒定区指的是重链或轻链恒定区。人IgG重链和轻链恒定区氨基酸序列在本领域是已知的。

[0065] 在一些实施方式中,本文的双特异性抗体可不含Fc段(非IgG样结构)。此类双特异性抗体具有生产简便、产量高、成本低等优点。例如,本文的双特异性抗体可由两个单链抗体ScFv通过短肽链连接形成、由两个交叉的单链抗体ScFv组成的抗体二聚体(diabody)。可对此类结构的双特异性抗体进行进一步改造以提高其稳定性,例如在其肽链的C端引入半胱氨酸在VH-VL间形成二硫键。

[0066] 在一些实施方式中,本文的双特异性抗体包含Fc段,即为类IgG样结构双特异性抗体。此类双特异性抗体保留了Fc片段的相应功能,且具有较高稳定性。此类双特异性抗体可

包括但不限于:杵臼结构((Knob-into-hole,KIH)、scFv2-Fc、Triomabs、双可变结构域免疫球蛋白(Dual-Variable Domain Immunoglobulin,DVD-Ig)等。

[0067] 在一些实施方式中,本文的双特异性抗体采用了杵臼结构,将抗TIGIT抗体和抗PD-1抗体两种抗体其中一个的重链CH3区中引入突变(例如S354C和T366W突变),通过将体积较小氨基酸替换为体积较大的氨基酸,形成Knob结构,再在另一个抗体重链CH3区中引入突变,通过将体积较大氨基酸替换为体积较小的氨基酸,形成臼(Holes)结构,再利用杵臼结构的结构互补特性,实现两种抗体的正确组装。

[0068] 在一些实施方式中,本文的双特异性抗体具有杵臼结构的构型(可参见图1),其Fc可以经工程改造加上CrossMab。具体而言,示例性的构型1双特异性抗体具有如下结构特征:

[0069] ——在其中一条重链的恒定区域引入突变S354C和T366W(EU编号方式),形成knob重链;

[0070] ——在另一条重链的恒定区域引入突变Y349C、T366S、L368A和Y407V(EU编号方式),形成hole重链;

[0071] ——使knob重链和hole重链形成异源二聚体,由此形成抗TIGIT/抗PD-1BsAbs。

[0072] 在一些实施方式中,本文的双特异性抗体具有IgG-scFv结构(或scFv2-IgG)的构型。具体而言,示例性的IgG-scFv构型双特异性抗体具有如下结构特征:

[0073] ——在抗PD-1或TIGIT抗体的两条重链的C端均连接抗TIGIT或PD-1抗体的scFv片段;

[0074] ——重链和scFv之间、scFv的VH和VL之间分别由n个G<sub>4</sub>S(即GGGS重复,n大于3)的柔性肽连接;

[0075] ——这些重链分别与抗TIGIT抗体轻链或PD-1抗体轻链形成同源二聚体双特异性抗体。

[0076] 此外,为了降低抗体介导的ADCC和CDC活性,可使抗体的二条重链CH1区域的2个氨基酸L234/L235(EU编号方式)被氨基酸Ala取代(LALA变异体),以消除抗体的ADCC/CDC功能。

[0077] 本文的双特异性抗体可用常规手段来鉴定。比如,双特异性抗体的结合特异性可用流式细胞术、免疫沉淀、体外结合试验(如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))、生物膜层光学干涉技术分析(BLI)来测定。

[0078] 本文的双特异性抗体可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超声处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0079] 融合蛋白(多肽)

[0080] 如本文中使用的,术语“融合蛋白(多肽)”指包含抗PD-1/抗TIGIT双特异性抗体多肽和IL-2多肽的融合多肽分子,其中融合蛋白的组件通过肽键直接或通过接头彼此连接。为清楚起见,融合蛋白的抗体构件的各个肽链可以是非共价连接的,例如通过二硫键。“融合”意指各组分直接地或经由一种或多种肽接头通过肽键连接。如本文所用,术语“元件”或

“构件”是指构成融合蛋白中一部分的氨基酸序列。术语“单元”或“单体”是指元件构成功能的基本片段。

[0081] “天然IL-2”，也称作“野生型IL-2” (wtIL-2)，意指天然存在的IL-2，其与“经修饰IL-2”，也称为“突变IL-2” (mutIL-2) 相反，后者相对于天然存在IL-2存在突变或修饰，例如为了改变天然IL-2的一项或多项特性，诸如稳定性、活性等。经修饰IL-2分子可以例如包含氨基酸序列中的修饰，例如氨基酸替代、删除或插入。如背景部分中所述，IL-2的结构和功能在本领域中已有一定的研究和了解。本申请中可采用本领域中已知的IL-2多肽，也可采用其天然变体和片段(例如剪接变体或等位基因变体)，以及具有IL-2活性的非天然变体。

[0082] 本文所用的野生型人IL-2多肽是本领域中已知的。例如，野生型人IL-2多肽可包含登录号为UniProtKB-P60568的氨基酸序列，或如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列(人IL-2)，或可为与这些蛋白质具有相同或类似活性的同源序列(例如可通过本领域已知的数据库或比对软件获得同源序列)或其功能性/活性片段。

[0083] 在一些实施方式中，突变IL-2分子在结合IL-2R $\alpha$ 亚基的IL-2区域与结合IL-2R $\beta$ 亚基的IL-2区域不同。在IL-2的这2个区域引入氨基酸突变，可以改变IL-2与IL-2R $\alpha$ 亚基结合和与IL-2R $\beta$ 亚基结合的亲和力。例如，IL-2突变体(L80F、R81D、L85V、I86V、I92F)与IL-2R $\beta$ 亚基结合的亲和力增强(Levin等.(2012)Nature 484,529-533)，IL-2突变体(F42A)与IL-2R $\alpha$ 亚基结合的亲和力减弱。可人工合成IL-2突变体基因(L80F、R81D、L85V、I86V、I92F)，然后用基因点突变方法在此基因序列中引入氨基酸突变(F42A)，构建成编码结合IL-2R $\alpha$ 亚基结合亲和力减弱并IL-2R $\beta$ 亚基结合亲和力增强的IL-2mut基因。在一些实施方式中，IL-2突变体包含R38L和F42A突变。

[0084] 本文的突变IL-2多肽可选自：(a) 在前述野生型IL-2氨基酸序列的两段具有一个或多个额外氨基酸残基的多肽；或(b) 在野生型IL-2序列内经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有野生型IL-2活性的由(a)衍生的蛋白质或多肽。例如，本文的突变IL-2多肽可包含前述的减弱IL-2R $\alpha$ 亚基结合亲和力和/或增强IL-2R $\beta$ 亚基结合亲和力的突变。

[0085] 本公开融合蛋白中的多肽元件和多肽元件优选由人基因或其同源基因或家族基因编码或经过人源化。本公开中蛋白质或多肽的变异形式包括(但并不限于)：一个或多个(通常为1~50个，较佳地1~30个，更佳地1~20个，最佳地1~10个，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代，以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内，较佳地为10个以内，更佳地为5个以内)氨基酸。例如，在本领域中，用性能相近或相似的氨基酸进行取代时，通常不会改变蛋白质或多肽的功能。又比如，在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质或多肽的功能，例如融合蛋白可包括或不包括起始的甲硫氨酸残基而仍然具有其所需的病毒感染防治活性。

[0086] 多肽的变异形式包括：同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与其蛋白编码序列杂交的序列所编码的蛋白。根据重组生产方案所用的宿主，本发明的蛋白质或多肽可以是糖基化的，或可以是非糖基化的。

[0087] 在本发明的融合蛋白中，各组分(TIGIT结合域、PD-1结合域和IL-2或其变体分子)彼此遗传融合。融合蛋白可设计为使其组分直接彼此融合或经由接头序列间接融合。可依照本领域中公知的方法测定接头的组成和长度，并可以测试功效。还包含另外的序列以纳入切割位点来分开融合蛋白的各个组分(若期望的话)，例如内肽酶识别序列。

[0088] 本文融合蛋白中各多肽元件或元件中的肽单元可通过接头连接。在本申请中优选采用柔性接头,以使得多肽元件或肽单元之间可存在相互作用。可用于本申请融合蛋白中的接头可包含2~300个氨基酸残基,例如5~100个、10~50个、15~3个氨基酸残基。示例性的接头可为甘氨酸接头,如(G)<sub>n</sub>或甘氨酸/丝氨酸接头,如(GS)<sub>n</sub>、(GGS)<sub>n</sub>、(GGGS)<sub>n</sub>、(GGGGS)<sub>n</sub>或(GGGGGS)<sub>n</sub>的氨基酸序列,其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的整数。

[0089] 可将IL-2或其变体连接于双特异性多肽的C端、N端或中间。在一些实施方式中,IL-2连接于PD-1重链的C端。

[0090] 本文的融合蛋白还可包含信号肽,诸如具有引导融合蛋白分泌、定位和/或输送功能的氨基酸序列,其长度通常为5-50个氨基酸。在一些实施方式中,信号肽可选自例如:tPA2信号肽、TFF2信号肽、IL-2信号肽、bPRL信号肽CD33蛋白信号肽等。

[0091] 本文的融合蛋白还可包含标记物,例如用于纯化、检测、定位的标记物,如选自荧光标记物、非放射性核素标记物、生物素类标记物、磷酸化修饰标记、肽标签。

[0092] 编码分子、含该分子的表达载体及宿主细胞

[0093] 本文还提供了编码所述的融合蛋白或其片段的核酸分子。这些核酸分子的序列可以用常规技术,比如利用PCR扩增或基因组文库筛选等方法获得。此外,还可将轻链和重链的编码序列融合在一起,形成单链抗体。本文还公开了含有上述核酸分子的表达载体,例如为pcDNA3.4、pcDNA3.1等;本文还公开了被上述表达载体转化的宿主细胞,其可为例如CHO细胞、COS细胞等。

[0094] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0095] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。

[0096] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码所述的本文的融合蛋白(或其片段,或其衍生物)的核酸序列。然后可将该序列引入本领域中已知的各种现有的分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本文蛋白序列中。

[0097] 本文还涉及包含上述的编码序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞,例如CHO细胞、COS细胞等。通常用哺乳动物细胞系来作为表达真核细胞衍生多肽的宿主细胞。哺乳动物细胞在培养物中的繁殖是本领域熟知的。见《组织培养》,Academic Press,Kruse and Patterson编辑(1973),该文纳入本文作为参考。较佳的哺乳动物细胞是许多可购得的无限增殖细胞系。这些无限增殖细胞系包括但不限于,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、Vero细胞、HeLa海拉细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(如Hep G2)和其它许多细胞系。它们为蛋白质分子提供了翻译后修饰,包括正确的折叠、正确的二硫键形成以及正确位点的糖基化。

[0098] 用表达载体转化宿主细胞的方法有很多种,所用的转化程序取决于待转化的宿主。将异源多核苷酸导入哺乳动物细胞中的方法是本领域所知的,其包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、Polybrene(1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物)介导转染、原生质体融合、电穿孔、脂质体介导转染以及将DNA直接显微注射到胞核中。在本文中,较佳的方

法是电穿孔法或脂质体介导法等。例如可采用Invitrogen公司的脂质体法试剂盒来转染诸如COS、CHO细胞等宿主细胞。

[0099] 在适合本文融合蛋白表达的条件下,培养转化所得的宿主细胞。然后用常规的免疫球蛋白纯化步骤,如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析等本领域技术人员熟知的常规分离纯化手段纯化得到本文的抗体。

[0100] 偶联物、嵌合抗原受体及表达嵌合抗原受体的免疫细胞

[0101] 本申请中还提供了包含本文融合蛋白的偶联物、嵌合抗原受体,以及表达所述嵌合抗原受体的免疫细胞。由于本申请融合蛋白或其功能性片段对TIGIT以及PD-1的特异性,所述偶联物、嵌合抗原受体,以及表达所述嵌合抗原受体的免疫细胞可起到靶向作用于表达或过表达TIGIT和/或PD-1的细胞或组织,并优选产生加合或协同效应。并且,由于本申请的融合蛋白本身具有生物活性(例如具有免疫调节活性),通过其偶联物、嵌合抗原受体及表达嵌合抗原受体的免疫细胞中的抗体或抗原结合片段部分也可发挥相应的作用。

[0102] 在一些实施方式中,抗体偶联物可包含:本文所述的融合蛋白或其功能性片段;偶联部分,例如药物、毒素、细胞因子、放射性核素或酶;以及可选的,接头。在一些实施方式中,所述偶联通过酶促偶联、化学偶联、融合等方式实现。接头可以是促进偶联部分在细胞中的释放的“可切割接头”,例如酸不稳定接头、肽酶敏感性接头、光不稳定接头、二甲基接头,和含二硫化物的接头。

[0103] 在一些实施方式中,与抗体或融合蛋白连接的偶联部分可为例如生物活性剂,其可为增强和/或调节所希望的生物学作用的任何合成的、重组产生的或天然发生的物质。在一些实施方式中,所述生物活性剂可提供的作用包括但不限于:调节、刺激、和/或抑制生长信号;调节、刺激、和/或抑制抗凋亡信号;调节、刺激、和/或抑制凋亡或坏死信号;调节、刺激、和/或抑制ADCC级联;调节、刺激、和/或抑制CDC级联等。例如,其可为化疗剂、毒素、细胞因子、同位素、酶类等。

[0104] 本申请中还提供了嵌合抗原受体(CAR),其包含胞外结构域和胞内结构域,其中,所述胞外结构域包含本申请的融合蛋白或其功能性片段。在一些实施方式中,本申请的CAR还包含连接胞外结构域和胞内结构域的跨膜结构域,例如CD28的跨膜部分。本申请的CAR可为第一代、第二代、第三代或第四代CAR。

[0105] 在一些实施方式中,本申请CAR中的抗体或其抗原结合片段为scFv或VH sdAb,或由其组成。在一些实施方式中,CAR的胞内结构域包括模拟或近似通过天然抗原受体的信号、通过此类受体联合共刺激受体的信号,和/或通过单独共刺激受体的信号的那些。

[0106] 在一些实施方式中,胞内结构域包括一个或多个共刺激结构域和活化结构域,例如选自下组的一种或多种:ITAM结构域、CD3 $\zeta$ 、CD28、4-1BB、OX40、CD27、ICOS或其组合,例如(CD28+CD3 $\zeta$ )、(CD28+CD27+CD3 $\zeta$ )、(CD28+OX40+CD3 $\zeta$ )、(CD28+4-1BB+CD3 $\zeta$ )、(CD28+CD27+OX40+CD3 $\zeta$ )、(CD28+4-1BB+CD27+CD3 $\zeta$ )、(CD28+4-1BB+OX40+CD3 $\zeta$ )、(4-1BB+CD3 $\zeta$ )、(4-1BB+OX40+CD3 $\zeta$ )、(4-1BB+CD27+CD3 $\zeta$ )、(CD27+CD3 $\zeta$ )、(CD27+OX40+CD3 $\zeta$ )、(CD28 $\Delta$ +CD3 $\zeta$ )、(CD28 $\Delta$ +CD27+CD3 $\zeta$ )、(CD28 $\Delta$ +OX40+CD3 $\zeta$ )、(CD28 $\Delta$ +4-1BB+CD3 $\zeta$ )、(CD28 $\Delta$ +4-1BB+OX40+CD3 $\zeta$ )、(CD28 $\Delta$ +CD27+OX40+CD3 $\zeta$ )、(CD28 $\Delta$ +4-1BB+CD27+CD3 $\zeta$ )、(4-1BB+ICOS+CD3 $\zeta$ )、(CD28+ICOS+CD3 $\zeta$ )、(ICOS+CD3 $\zeta$ )。

[0107] 在一些实施方式中, CAR的胞外结构域还包含铰链区, 例如所述铰链区源自IgG的铰链或CD8 $\alpha$ /CD28胞外区, 如选自: IgG4 Fc  $\Delta$  EQ、IgG4 Fc  $\Delta$  Q、(t-12AA+t-20AA)、mKate、phiLov、dsRed、Venus、eGFP、CH3 HA、(CD8 $\alpha$ +t-20AA)、双重t-20AA、(t-20AA+CD8 $\alpha$ )、(CD8 $\alpha$ +亮氨酸拉链Basep1)、(CD8 $\alpha$ +亮氨酸拉链Acid1)、2D3、CD8 $\alpha$ 或IgG4 Fc。

[0108] 本申请中还提供了一种经转化的免疫细胞, 其表达本申请的嵌合抗原受体, 例如所述免疫细胞选自T细胞, 如 $\alpha\beta$ T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或NK T细胞或从多能细胞衍生的T细胞。免疫细胞可来自待接受治疗的个体或来自其他来源。可将经转化(可任选的扩增)的免疫细胞给予待治疗个体, 例如用于过继疗法。

[0109] 此外, 本申请中还包括了用于转化免疫细胞的CAR构建体、表达载体、制备方法及其应用。

#### [0110] 药物组合物

[0111] 本文还提供了一种药物组合物, 该组合物含有药学上有效量的本文融合蛋白或其免疫偶联物以及药学上可接受的载体。

[0112] 本文所用的术语“药学上可接受的”是指当分子本体和组合物适当地给予动物或人时, 它们不会产生不利的、过敏的或其它不良反应。本文所用的“药学上可接受的载体”应当与本文的活性物质相容, 即能与其共混而不会在通常情况下大幅度降低药物组合物的效果。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。在《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Pub.Co., N.J. 1991年)中可找到关于药学上可接受的载体的充分讨论。

[0113] 这类载体包括(但并不限于): 盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、佐剂、及其组合。另外, 这些载体中还可能存在辅助性的物质, 如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。

[0114] 本文的组合物可通过口服以及静脉内、肌内或皮下等途径给药; 优选的是口服或静脉内注射给药。本文的药物组合物可根据需要制成各种剂型, 并可由医师根据患者种类、年龄、体重和大致疾病状况、给药方式等因素确定对病人有益的剂量进行施用。

[0115] 使用药物组合物时, 是将安全有效量的抗体或免疫偶联物施用于哺乳动物, 其中该安全有效量通常约0.1微克-5毫克/千克体重, 而且在大多数情况下不超过约3毫克/千克体重, 较佳地该剂量是约1-10微克/千克体重-约1毫克/千克体重。当然, 具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素, 这些都是熟练医师技能范围内的。

[0116] 如本文所用, 术语“单位剂型”是指为了服用方便, 将本公开的组合物制备成单次服用所需的剂型, 包括但不限于各种固体剂(如片剂)、液体剂、胶囊剂、缓释剂。

[0117] 在本公开的另一优选实施方式中, 所述组合物为单位剂型或多剂型, 且其中活性物质的含量为0.01~2000mg/剂, 优选0.1~1500mg/剂, 更优选1~1000mg/剂。在本公开的另一个优选例中, 每天施用1~6剂本公开的组合物, 优选施用1~3剂; 最优选的, 每天服用的剂量为1剂。

[0118] 本文的融合蛋白或免疫偶联物可有效阻断TIGIT与其配体CD155的结合, 也可有效阻断PD-1与PD-L1配体的结合, 增强免疫细胞的细胞因子释放, 提高免疫细胞活性、增强免疫应答, 用于预防和/或治疗肿瘤、感染或感染性疾病。本文的活性物质可用于治疗多种类型的肿瘤, 所述的肿瘤比如(包括但不限于): 腺癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、肉瘤; 来自肾上腺、胆囊、骨、骨髓、脑、乳腺、胆管、胃肠道、心脏、肾脏、肝脏、肺、肌肉、卵巢、胰腺、甲状旁

腺、阴茎、前列腺、皮肤、唾液腺、脾脏、睾丸、胸腺、甲状腺或子宫的肿瘤组织；中枢神经系统的肿瘤，如胶质细胞多样性瘤、或星细胞瘤；眼部肿瘤（例如基底细胞癌、鳞状细胞癌或黑色素瘤）、内分泌腺肿瘤、神经内分泌系统肿瘤、胃肠道胰腺内分泌系统肿瘤，生殖系统肿瘤或头颈部肿瘤。

#### [0119] 检测试剂盒

[0120] 本文还提供了一种检测TIGIT和/或PD-1的试剂盒，它含有本文所述的融合蛋白或其活性片段、免疫偶联物。可采用本文的试剂盒来检测生物样品中是否存在TIGIT或PD-1或同时存在两者或其含量，该检测方法包括步骤：(a) 将样品与本文试剂盒中的融合蛋白或其免疫偶联物接触；(b) 检测是否形成特异性的抗原-抗体复合物（例如TIGIT抗原-抗体复合物、PD-1抗原-抗体复合物和/或TIGIT/PD-1抗原-抗体双重复合物），其中形成复合物就表示样品中存在TIGIT和/或PD-1或定量检测所形成的抗原-抗体复合物的量以反映样品中TIGIT和/或PD-1的含量。特别优选的是，采用本文的试剂盒检测TIGIT和PD-1同时存在的情况。被测样品可为经过预处理或未经过预处理，例如可经过提取、纯化或浓缩等。

[0121] 所述试剂盒含有容器以及位于容器内的本文的融合蛋白、或者带有所述抗体的检测板，以及使用说明书。该试剂盒中还可含有检测所需的其它试剂，例如缓冲液、指示剂等。本领域技术人员可根据具体需要对试剂盒的内容物进行调整。

#### [0122] 实施例

[0123] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。本领域技术人员可对本发明做出适当的修改、变动，这些修改和变动都在本发明的范围之内。

[0124] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法，可采用本领域中的常规方法，例如参考《分子克隆实验指南》（第三版，纽约，冷泉港实验室出版社，New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）或按照供应商所建议的条件。DNA的测序方法为本领域常规的方法，也可由商业公司提供测试。

[0125] 除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0126] 实施例1. 抗TIGIT单克隆抗体及其编码序列的获得、性能测定以及抗TIGIT抗体-IL-2融合蛋白基因的构建

#### [0127] 1.1 抗TIGIT单克隆抗体及其编码序列的获得

[0128] 抗TIGIT抗体为本申请人发明的多个抗TIGIT人源化单克隆抗体，抗体的制备方法以及氨基酸序列见中国发明专利申请（CN202111105544.0，“靶向TIGIT的单克隆抗体”，申请日2021年9月22日）。

[0129] 具体而言，按常规方法，用重组人TIGIT（His标签，Sino Biological, 10917-H08H Accession#NP 776160.2.Met1-Phe138，下同）腹腔和皮下注射免疫Balb/c小鼠（6~8周龄，体重18g左右，雌性，购自计划生育科学研究所实验动物经营部）后获取经免疫小鼠的脾细胞。将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞（购自中国科学院细胞库，货号为TCM18）融合，并在融合后以TIGIT-Fc（Human TIGIT（Fc Tag）:Sino Biological, 10917-H02H）通过ELISA筛选阳性克

隆,筛选出多株克隆,其中编号7103-01和7103-07的克隆均具有IgG1重链和Kappa轻链。

[0130] 培养所得细胞株,并扩增细胞。离心后收集上清,并用Protein-A亲和层析柱从上清中纯化融合蛋白,跑胶分析,每个泳道分别上样2 $\mu$ g还原和非还原样品。电压150V,1小时。结果显示:非还原的抗体的分子量在150KD左右,还原抗体的分子量分别在50KD和25KD左右,符合抗体的分子量特性。

[0131] 通过ELISA检测所得单克隆抗体与重组人TIGIT抗原 (Human TIGIT (His), Sino Biological, 10917-H08H) 的结合,结果显示7103-01和7103-07单抗与TIGIT抗原的结合亲和力 $EC_{50}$ 分别为:0.0647nM和0.075nM。

[0132] 提取杂交瘤细胞的总RNA进行反转录。以所得cDNA作为模板,参考von Boehmer, L. 等, Sequencing and cloning of antigen-specific antibodies from mouse memory B cells. Nat Protoc, 2016. 11 (10): p. 1908-1923., 扩增出杂交瘤抗体的VH和VL基因,并测序得到TIGIT鼠单克隆抗体VH和VL序列。

[0133] 在进行抗体人源化之前,我们先构建重组人鼠嵌合抗体表达质粒,将杂交瘤抗体的V区构建到嵌合抗体表达载体 (pcDNA3.1) 上,即将V区序列连接到恒定区为人IgG1或者人 $\lambda/\kappa$ 的表达载体上,在HEK293F细胞里瞬时表达并纯化人鼠嵌合抗体。纯化产物的SDS-PAGE分析结果显示:非还原的抗体的分子量在150KDa左右,还原抗体的分子量分别在55kDa和25KDa,符合抗体的分子量特性。

[0134] 根据编号7103-01 (VL:SEQ ID NO:26;VH:SEQ ID NO:27) 和7103-07 (VL:SEQ ID NO:28;VH:SEQ ID NO:29) 的鼠源母本抗体序列,设计人源化抗体序列。具体步骤如下:首先使用Discovery Studio和Schrödinger Antibody Modeling,采用同源建模方法构建可变区的三维分子模型。接下来,通过比对数据库已有抗体结构,分别对母本抗体可变区及CDR进行结构模拟。同时,选择分别与鼠源母本抗体VH和VL具有高度同源性的cDNA衍生的人种系 (Germline) 序列进行比对。重链VH选择同源度最高的IGHV1为人源化设计模板,设计序列。轻链VL选择IGKV1为人源化设计模板,设计序列。获得具有如下重链和轻链序列组合的人源化抗TIGIT单克隆抗体:

[0135] 表1. 人源化抗体不同轻重链的组合方式以及对应编号

人源化抗体来源	人源化抗体轻重链组合方式	抗体编号
7103-01	huVH4VL1	P03489
7103-07	huVH2VL1	P03479

[0137] 表2. P03489重链和轻链序列

描述	SEQ ID NO	序列

[0139]	P03489 7103-01 huVH4	全长序列	10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYNIYWVRQA PGQGLEWMGGVNPSTNGNTNFNENFQGRVTMTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCTRGNYYGYEFAYWGQGTTVTVSS
		CDR1	11	SYNIY
		CDR2	12	GVNPSNGNTNFNENFQG
		CDR3	13	GNYYGYEFAY
[0140]	P03489 7103-01 huVL1	全长序列	14	DIQMTQSPSSMSASVGDRTITCKASQHVSTAVAWYQQKPG KAPKLLIYSPSYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFFTISSVQPEDIA TYQCQQHYSTPWFVGGGKLEIK
		CDR1	15	KASQHVSTAVA
		CDR2	16	SPSYRYT
		CDR3	17	QQHYSTPWT

表3.P03479重链和轻链序列

描述		SEQ ID NO	序列	
[0141]	P03479 7103-07 huVH2	全长序列	18	EVQVVESGGGLVKGPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQA PGKGLEWVAEISSGGSHTFYADTVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARKTLDYYALDYWGQGTTVTVSS
		CDR1	19	TYAMS
		CDR2	20	EISSGGSHTFYADTVKG
		CDR3	21	KTLDYYALDY
[0142]	P03479 7103-07 huVL1	全长序列	22	DVQITQSPSYLSASVGDRTINCRASKSISKYLAWYQQKPG KAPKLLIYSGSRLQSGIPSRFSGSGYGTDFLTISLQPEDFAT YYCQQHNEYPWTFVGGGKLEIK
		CDR1	23	RASKSISKYLA
		CDR2	24	SGSRLQS
		CDR3	25	QQHNEYPWT

[0142] 根据上述人源化设计结果,将序列构建到pcDNA3.4载体上,经PCR、酶切、连接、转化、鉴定、测序、比对、抽提后得到质粒。根据人源化设计后的表达组合,运用ExpiCHO-S表达系统(Thermo Fisher,A29133),将上述质粒按照要求进行在ExpiCHO-S细胞中为期7天的表达,并在表达第6天,通过HPLC测出表达量。最后经Protein A亲和层析一步纯化,得到抗体蛋白。

[0143] 为了确定人源化TIGIT单克隆抗体是否可以结合重组人TIGIT蛋白,进行ELISA测试。结果显示:抗人TIGIT人源化单克隆抗体P03489和P03479能够分别以0.5nM和0.09nM的EC<sub>50</sub>结合人TIGIT蛋白,显著优于阳性对照替瑞利尤单抗0.5nM的EC<sub>50</sub>,证明了本申请单抗优异的TIGIT结合性能。

[0144] 1.2生物膜层光学干涉技术(BLI)研究抗体与TIGIT的结合活性

[0145] 用GATOR(ProbeLife)检测仪器以及HFC(LOT#2007065Tray 2),Human antibody Capture探针来检测小鼠嵌合TIGIT单克隆抗体(7103-01(hFc)和7103-07(hFc))和人源化TIGIT单克隆抗体(P03489和P03479)与重组人TIGIT结合的解离常数(Kd)。将单克隆抗体在结合缓冲液(Q buffer[PBS(10mM PH7.4)+0.02% Tween 20+0.2% BSA]中稀释至30nM。将重组人TIGIT蛋白在Qbuffer中2倍梯度稀释至不同浓度,在40nM到10nM的范围内变化。通过将抗体捕获传感器置于上述连续稀释的抗原溶液中来开始进行动力学关联测定。

[0146] 表4显示BLI检测结果。7103-01的人源化抗体#P03489与TIGIT结合亲和力Kd与其母本人鼠嵌合抗体7103-01(hFc)的Kd相当,分别为1.19x10<sup>-9</sup>M和1.73x10<sup>-9</sup>M。7103-07的人

源化抗体#P03479与TIGIT结合亲和力要弱于其母本人鼠嵌合抗体7103-07(hFc)与TIGIT的结合亲和力,但其Kd也分别达到 $8.43 \times 10^{-9}$ M和 $2.96 \times 10^{-9}$ M。实验结果显示所有抗体在Global拟合模式下的相关系数 $R^2$ 都大于0.95,符合系统适应性要求,结果可靠。

[0147] 表4.TIGIT mAb与重组人TIGIT结合的结合动力学常数总结表

TIGIT mAbs	样品 ID	TIGIT-His				
		$K_d$ (M)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$R^2$	$R_{max}$ (nm)
[0148] 7103-01(hFc)	7103-01(hFc)	1.73E-09	5.49E+05	9.51E-04	0.992	0.293
7103-01-huVH4VL1	P03489	1.19E-09	4.89E+05	5.84E-04	0.993	0.289
7103-07(hFc)	7103-07(hFc)	2.96E-09	5.73E+05	1.69E-03	0.985	0.311
7103-07-huVH2VL1	P03479	8.43E-09	5.87E+05	4.95E-03	0.992	0.252

[0149] 1.3流式细胞术方法(flow cytometry)研究人鼠嵌合和人源化单克隆抗体与细胞膜上TIGIT蛋白的结合

[0150] 稳定表达全长人TIGIT的CHO-K(CHO-K-TIGIT)细胞株构建如下:采用含有全长人TIGIT cDNA(NM\_173799.2)的质粒(购自Sino Biological)把cDNA克隆到含有大鼠谷氨酰胺合成酶基因的哺乳细胞表达载体pcDNA3.1(Invitrogen),然后用电转染(Bio-Rad, Gene Pulser Xcell)方法把上述构建好的质粒转染进CHO-K细胞,转染的细胞在OptiCHO培养基(Invitrogen)中培养24-48个小时后,把培养基换成筛选培养基。筛选培养基含有OptiCHO, 5 $\mu$ g/ml重组人胰岛素和10 $\mu$ M氨基亚砷蛋氨酸(MSX)。细胞培养在37 $^{\circ}$ C, 8% CO<sub>2</sub>的培养箱里。3个星期后,用抗TIGIT抗体对筛选培养的细胞进行流式分选(FACS),得到表达在细胞膜上的人TIGIT的CHO-K单克隆细胞株。

[0151] TIGIT抗体与细胞膜TIGIT结合的流式细胞仪研究方法简述如下:首先配制FACS缓冲液,即1 $\times$ PBS+0.5%BSA溶液。取所需数量的CHO-K-TIGIT细胞,一个样品所需的细胞量约为 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个,用FACS buffer将TIGIT mAbs(7103-01(hFc)、7103-07(hFc)、P03479和P03489)和替瑞利尤单抗(Tiragolumab, 罗氏,已进入三期临床实验;用作阳性对照样品)以一定的比例稀释后重悬细胞,体积约为100 $\mu$ L,4 $^{\circ}$ C冰箱孵育30min,用FACS缓冲液将细胞洗涤一次后,用FACS缓冲液稀释的FITC-抗人IgG(Abcam:6854)将细胞重悬后置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育30min,最后,FACS缓冲液洗涤细胞后,用200 $\mu$ L的FACS缓冲液重悬细胞,上机检测。

[0152] 图2显示流式细胞研究结果。如图2A所示,TIGIT人源化单克隆抗体P03479和CHO-TIGIT结合较好,结合CHO-TIGIT细胞膜的EC<sub>50</sub>为0.144 $\mu$ g/mL(0.963nM),对比母本(7103-07(hFc))的EC<sub>50</sub> 0.201 $\mu$ g/mL(1.347nM)和替瑞利尤单抗的EC<sub>50</sub> 0.574 $\mu$ g/mL(3.844nM),P03479的亲和力更高。如图2B所示,TIGIT人源化单克隆抗体P03489和CHO-TIGIT结合较好,结合CHO-TIGIT细胞膜的EC<sub>50</sub>为0.114 $\mu$ g/mL(0.761nM),亲和力高于替瑞利尤单抗的EC<sub>50</sub>0.202 $\mu$ g/mL(1.536nM)。

[0153] 1.4人鼠嵌合和人源化TIGIT单克隆抗体对重组人TIGIT-CD155结合的抑制

[0154] 为了确定人鼠嵌合和人源化的TIGIT单克隆抗体是否可以抑制CD155与TIGIT的结

合,用ELISA方法进行体外测试。将替瑞利尤单抗(Tiragolumab)用作阳性对照。用pH=9.6的NaHCO<sub>3</sub>溶液稀释抗原TIGIT(Human TIGIT(His),Sino Biological,10917-H08H)至1μg/mL,每孔50μL加入到96孔酶标板中,4°C冰箱过夜。次日,PBS洗涤两遍之后,用3%的BSA封闭,每孔100μL,37°C孵育1.5h,用PBST洗涤4次。梯度稀释的TIGIT单克隆抗体和CD155-mFC(6μg/mL)(Human CD155(Fc Tag):Sino Biological,10109-H02H)等体积混匀后加入封闭洗涤后的酶标板中,37°C孵育2h,继续用PBST洗涤4次后,加入一定比例稀释的二抗HRP抗mFC(Jackson Immuno Research,115-035-164),37°C孵育1.5h,最后PBST洗涤4次后,加入TMB显色液,37°C孵育10-15min后,酶标仪读数(波长450nm和655nm)。

[0155] 图3显示了ELISA的研究结果。如图所示,TIGIT单克隆抗体均能特异性阻断TIGIT与CD155的结合。人源化mAb P03479的抑制活性IC<sub>50</sub>为0.107μg/mL(0.714nM),阻断能力与人鼠嵌合单克隆抗体(7103-07(hFc))的IC<sub>50</sub>值0.154μg/mL(1.033nM)相当或更优,且明显优于替瑞利尤单抗IC<sub>50</sub>值0.378μg/mL(2.534nM)。

[0156] 1.5人源化TIGIT单克隆抗体体外增强人PBMC的INF γ产生

[0157] T淋巴细胞激活后,淋巴细胞分泌细胞因子INF γ。为了测试TIGIT单克隆抗体作为T细胞活化的阳性调节剂功能,我们进行了以下实验,说明人源化的TIGIT单克隆抗体对TIGIT信号阻断导致对PBMC细胞INF γ产生的增强作用。方法简述如下:复苏冷冻的人外周血单核细胞PBMC,调整细胞密度至5×10<sup>6</sup>个/mL,用RPMI 1640+10%FBS培养基分别稀释待测的TIGIT抗体至浓度为20μg/mL,PHA浓度6μg/mL,分别加50μL的PHA稀释液和50μL的抗体稀释液至96孔板中,最后加100μL的细胞悬液至96孔板中,轻轻混匀后至37°C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养4天。4天后吸取上清100μL检测INF γ的含量。

[0158] 图4显示了检测结果。如图所示,人源化TIGIT单克隆抗体P03479和P03489对PHA激活的PBMC释放INF γ具有促进作用。加入人源化TIGIT抗体P03479和P03489的INF γ释放量比空白(不加入人源化TIGIT单克隆抗体)的INF γ释放量分别高出81%和36%,且效果均优于替瑞利尤单抗(仅16%)。

[0159] 1.6人源化TIGIT单克隆抗体体内抑制小鼠肿瘤生长的功能研究

[0160] 由于本发明的抗体都不结合小鼠TIGIT,因此我们用人TIGIT基因敲入小鼠(C57BL/6)研究抗体的体内抗肿瘤效果。人TIGIT基因敲入小鼠饲养在SPF级别环境里。在本实施例中小鼠肿瘤模型为结肠癌MC38。方法简述如下:小鼠结肠癌MC38肿瘤细胞来自上海南方模式生物科技股份有限公司。24只7~9周龄的人TIGIT基因敲入C57/B6小鼠分成3组(4雄4雌/组),用皮下接种的方法在小鼠腋下注射MC38细胞1×10<sup>6</sup>个/只。在接种的当天(D0),通过腹腔注射的方式分别给予各组小鼠PBS(对照组)、重组人IgG1 10mg/kg(对照组)和TIGIT人源化抗体P03479 10mg/kg。每周给药2次,共4次。每次给药时测量瘤体积(即长径×短径<sup>2</sup>/2),称小鼠重量。在D17结束试验。引颈脱臼处死小鼠,取瘤称重。

[0161] 研究结果见图5。图5A显示各组每个小鼠的肿瘤体积与时间的关系,图5B显示在试验结束时(D17)各组每个小鼠的肿瘤重量。实验结果表明,TIGIT人源化抗体P03479能有效抑制小鼠肿瘤的生长(图5A和5B),在实验结束时(D17),P03479组小鼠肿瘤的平均重量显著小于hIgG1组(p<0.05)。

[0162] 实施例2.抗PD-1/抗TIGIT双特异性抗体-IL-2融合蛋白(BsAb-IL-2)的制备

[0163] 2.1.抗体修饰

[0164] 为了降低抗体介导的ADCC和CDC活性,在抗体的二条重链CH1区域的2个氨基酸L234/L235(EU编号方式)被氨基酸Ala取代(LALA变异体),消除抗体的ADCC/CDC功能。

[0165] 抗TIGIT/抗PD-1双特异性抗体以“杵臼”(knob-in-hole,简称KIH)(Merchant et al(1998)Nat Biotech 16,677-681)形式构建,即在其中1条重链恒定区域引入突变S354C和T366W(EU编号方式)(knob重链),在另一条重链恒定区域引入突变Y349C、T366S、L368A和Y407V(EU编号方式)(hole重链),knob重链和hole重链形成异源二聚体,由此形成抗TIGIT/抗PD-1BsAbs-IL-2融合蛋白。

[0166] 为了避免2个抗体的重链和轻链错配对,对其中1个抗体的重链和轻链进行改造,即把此抗体重链的CH1序列与此抗体轻链的恒定 $\lambda$ 域置换,使重链可变域融合到人源抗体轻链恒定 $\lambda$ 域,抗体轻链可变域融合到人源IgG1的CH1序列(crossmab)。

[0167] 上述基因均用人工合成的方法获得。

[0168] 2.2.野生型IL-2和突变型IL-2

[0169] 野生型人IL-2(WT)全长基因(含信号肽序列,SEQ ID NO:9)由人工合成。结合IL-2R $\alpha$ 亚基的IL-2区域与结合IL-2R $\beta$ 亚基的IL-2区域不同,在IL-2的这2个区域引入氨基酸突变,可以改变IL-2与IL-2R $\alpha$ 亚基结合和与IL-2R $\beta$ 亚基结合的亲和力。IL-2突变体(L80F、R81D、L85V、I86V、I92F)与IL-2R $\beta$ 亚基结合的亲和力增强(Levin等,(2012)Nature 484, 529-533),IL-2突变体(R38L)与IL-2R $\beta$ 亚基结合的亲和力减弱(Chappel等,(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.88,9036-9040),IL-2突变体(F42A)与IL-2R $\alpha$ 亚基结合的亲和力减弱。

[0170] IL-2mut的特征在于以下突变:

[0171] a)F42A——减弱IL-2/IL-2R $\alpha$ 相互作用;

[0172] b)L80F、R81D、L85V、I86V、I92F——增强IL-2/IL-2R $\beta$ 相互作用;

[0173] c)R38L——减弱IL-2/IL-2R $\beta$ 相互作用。

[0174] 2.3.抗TIGIT/PD-1双特异性抗体-IL-2(R38L、F42A)融合蛋白的表达和纯化

[0175] 用重叠延伸PCR方法将IL-2基因(R38L、F42A)(简称RLFA)通过连接肽(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>连接到PD-1抗体(本实施例中的PD-1抗体是pembrolizumab)重链的C末端,构建PD-1抗体HC-IL-2基因,其重链可以是VH-CH1-hinge-CH2-CH3-linker-IL-2结构(knob)(SEQ ID NO:1),或者是VH-CL-hinge-CH2-CH3-linker-IL-2的crossmab结构(knob)(SEQ ID NO:2)。其余抗体重链和轻链用人工合成获得。

[0176] TIGIT/PD-1双特异性抗体-IL-2融合蛋白的重链和轻链序列编号见表5

	TIGIT/PD-1 BsAb-IL-2	PD-1 抗体重链 -IL-2(R38L、F42A)	PD-1 抗体轻链	TIGIT 抗体重链	TIGIT 抗体轻链
[0177]	KD5301A	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7
	KD5301B	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8

[0178] 把每个BsAb-IL-2(RLFA)的重链和轻链编码DNA克隆到表达载体pcDNA3.4(ThermoFisher)中以产生4种独立载体,然后提取重组质粒。将4个质粒共转染293F细胞,转染试剂为sinofection(SinoBiological)。细胞培养7天后,将培养液通过高速离心,从上清中经Protein A亲和层析柱纯化获得TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)。

[0179] 将纯化后的样品分别加入还原型蛋白电泳上样缓冲液和非还原型蛋白电泳上样

缓冲液,煮沸后进行SDS-PAGE电泳检测。

[0180] 实验结果与分析

[0181] KD5201A和KD5201B的电泳图如图6A和6B所示。KD5301A的2个重链(HC-IL-2和HC)的理论分子量分别为65.7kDa和49.0kDa,如箭头所示(图6A);2个轻链的理论分子量相差不大,分别为23.4kDa和23.7kDa,如箭头所示(图6A)。KD5301B的2个重链(HC-IL-2和HC)的理论分子量分别为67.0kDa和48.8kDa,如箭头所示(图6B);2个轻链的理论分子量相差883Da,在SDS-PAGE胶上可见2条带,如箭头所示(图6B)。

[0182] 2.4SEC-HPLC分析

[0183] 使用Acquity UPLC(沃特斯(Waters))系统进行分析,并且将蛋白BEH SEC、200A、1.7 $\mu$ m、4.6mm $\times$ 150mm、10K-450K(沃特斯)用作SEC柱。使用由PBS(pH7.4(天惠华))组成的流动相,在环境温度下均匀地进行SEC分离。流速为0.25mL min<sup>-1</sup>。通过计算在280nm下由紫外线(UV)检测器检测到的峰面积来定量BiSpAb单体、聚集物和片段的相对量。

[0184] 结果显示

[0185] BsAbs-IL2融合蛋白的出峰时间早于正常IgG的出峰时间,表明融合蛋白的分子量稍微大于正常IgG的分子量,与SDS-PAGE结果一致。

[0186] 2.5RPC-HPLC分析

[0187] 采用RPC-HPLC法,对所得抗体-IL-2融合蛋白进行分析

[0188] 实验结果与分析

[0189] IL-2蛋白具有强疏水性,与抗体融合后的融合蛋白变为较强的疏水性蛋白。RPC-HPLC结果显示BsAbs-IL2融合蛋白的出峰时间晚于不含IL-2的BsAbs的出峰时间,表明BsAbs-IL2融合蛋白的疏水性变强,与预期的结果一致。

[0190] 实施例3.TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)与抗原以及IL-2R结合的ELISA研究

[0191] 用ELISA方法检测BsAb-IL-2(RLFA)与其抗原TIGIT和PD-1的体外结合活性。方法简述如下:用50 $\mu$ l含1 $\mu$ L/mL重组人TIGIT-His或PD-1-His或IL-2R $\alpha$ 亚基或IL-2R $\beta$ 亚基的NaHCO<sub>3</sub>(pH9.6)缓冲液在4 $^{\circ}$ C下包板过夜。次日,PBS洗涤两遍之后,用3%的BSA封闭,每孔100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C孵育1.5h,用PBST洗涤4次。用结合溶液(TBST含1%的BSA)梯度稀释BsAb-IL-2(RLFA),加入封闭洗涤后的酶标板中(每孔50 $\mu$ l),37 $^{\circ}$ C孵育2h。用PBST洗涤4次,然后加入一定比例稀释的二抗碱性磷酸酶标记的抗hFc(Jackson Immuno Research),37 $^{\circ}$ C孵育1.5h,最后PBST洗涤4次后,加入PNPP显色液,37 $^{\circ}$ C孵育10-15min后,酶标仪读数(波长405nm和490nm)。

[0192] 结果显示TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)能特异性结合TIGIT或PD-1,与IL-2R $\alpha$ 亚基或IL-2R $\beta$ 亚基的结合活性很弱。上述结果表明双特异性抗体与IL-2变体的融合不影响双特异性抗体对其抗原的结合,且IL-2变体具有所需的低IL-2R $\alpha$ 亚基或IL-2R $\beta$ 亚基结合活性。

[0193] 实施例4.TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)与抗原以及IL-2R结合动力学研究

[0194] 用生物膜层光学干涉技术(BLI)检测双特异性抗体与TIGIT、PD-1、IL-2R $\alpha$ 亚基和IL-2R $\beta$ 亚基蛋白结合的动力学参数。BLI检测仪器是GATOR(ProbeLife),用Human antibody Capture探针捕获双抗,抗原分别是Histidine标签的重组人TNFR2和PD-1。方法简述如下:将纯化获得的BsAb-IL-2(RLFA)在结合缓冲液(Q buffer[PBS(10mM PH7.4)+0.02% Tween 20+0.2% BSA]中稀释至30nM,用Human antibody Capture探针捕获BsAb-IL-2。将重组人

TIGIT或PD-1或IL-2R $\alpha$ 亚基或IL-2R $\beta$ 亚基蛋白分别在Q buffer中2倍梯度稀释至不同浓度,在1nM到100nM的范围内变化。将已捕获BsAb-IL-2(RLFA)的传感器置于上述连续稀释的抗原溶液中来开始进行动力学关联测定。

[0195] 实验结果与分析

[0196] 结果显示BsAb-IL-2(RLFA)能高亲和力其抗原TIGIT和PD-1,但与IL-2R $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基的亲和力很弱,远弱于野生型IL-2与IL-2R $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基的亲和力。这些结果与预期的结果一致。

[0197] 实施例5. TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)与抗原双结合的夹心ELISA研究

[0198] 用夹心ELISA方法检测TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)是否能与TIGIT和PD-1同时结合。为了制备用于分析双特异性抗体结合的ELISA板,将板在4 $^{\circ}$ C下用50 $\mu$ l含1 $\mu$ L/mL重组人TIGIT-His的NaHCO<sub>3</sub>(pH9.6)包板过夜。次日,PBS洗涤两遍之后,用3%的BSA封闭,每孔100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C孵育1.5h,用PBST洗涤4次。用结合溶液(TBST含1%的BSA)梯度稀释TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA),加入封闭洗涤后的酶标板中(每孔50 $\mu$ l),37 $^{\circ}$ C孵育2h。用PBST洗涤4次后每孔加入稀释在结合溶液的重组人PD-1-mFc(小鼠IgG1 Fc),37 $^{\circ}$ C孵育2h。用PBST洗涤4次,加入一定比例稀释的碱性磷酸酶标记的抗鼠IgG1 Fc抗体,37 $^{\circ}$ C孵育1.5h,最后PBST洗涤4次后,加入PNPP显色液,37 $^{\circ}$ C孵育10-15min后,酶标仪读数(波长405nm和490nm)。

[0199] 实验结果与分析

[0200] 夹心ELISA结果显示(图7),2种TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)融合蛋白KD5301A和KD5301B均能同时特异性结合TIGIT和PD-1。

[0201] 实施例6. TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)与抗原双结合的夹心BLI研究

[0202] 用生物膜层光学干涉技术(BLI)检测TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)是否能与TIGIT和PD-1同时结合。BLI检测仪器是GATOR(ProbeLife),方法简述如下:用抗小鼠IgG1 Fc的抗体探针捕获重组人PD-1-mFc,将TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)(100nM)稀释在结合缓冲液(Q buffer [PBS(10mM PH7.4)+0.02% Tween 20+0.2% BSA]中,与探针孵育,已捕获PD-1-mFc的传感器与双抗结合,然后将稀释在结合缓冲液中的重组TIGIT-His与探针孵育,由传感器探测TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)与TIGIT的结合。

[0203] 结果显示TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)能同时特异性结合TIGIT和PD-1。

[0204] 实施例7. 流式细胞术(flow cytometry)研究TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)与细胞膜上TIGIT和PD-1蛋白的结合

[0205] 用人TIGIT和PD-1全长cDNA构建膜上表达的稳定细胞株。把需要表达的上述抗原的cDNA插入到哺乳细胞表达载体pcDNA3.1(ThermoFisher),用电转染的方法把表达质粒转染进Jurkat细胞,在含G418培养基里培养2周,然后用流式分选仪器分选TIGIT或PD-1高表达的单细胞株。单细胞株在96-well板里培养,扩增T25方瓶培养,然后用流式检测膜蛋白的表达,选择出高表达的稳定Jurkat细胞株。

[0206] TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)与细胞膜TIGIT或PD-1结合的流式细胞仪研究方法简述如下:首先配制FACS缓冲液,即1 $\times$ PBS+0.5%BSA溶液。取所需数量上述构建的细胞,一个样品所需的细胞量约为 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个,用FACS buffer将需要检测的双抗抗体以一定的比例稀释后与细胞混匀,体积约为100 $\mu$ L,4 $^{\circ}$ C冰箱孵育30min,用FACS缓冲液将细胞洗涤一次后,用FACS缓冲液稀释的FITC-抗人IgG(Abcam:6854)将细胞重悬后置于4 $^{\circ}$ C冰箱

孵育30min,最后,FACS缓冲液洗涤细胞后,用200 $\mu$ L的FACS缓冲液重悬细胞,上机检测。

[0207] 实验结果显示,TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)能高亲和力的与细胞膜上的TIGIT和PD-1特异性结合。

[0208] 实施例8.TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)体外结合细胞膜上IL-2R $\alpha$ 亚基和IL-2R $\beta$ 亚基的亲合力检测

[0209] 采用流式细胞术检测TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)与细胞膜上IL-2R $\alpha$ 亚基和IL-2R $\beta$ 亚基的结合亲和力。

[0210] 首先我们分别共转染人IL-2R $\alpha$ 、IL-2R $\beta$ 和IL-2R $\gamma$ 表达质粒(Sinobio)在293F细胞中,瞬时表达以下IL-2R复合物:IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (三聚体)、IL-2R $\alpha\gamma$ (二聚体)和IL-2R $\beta\gamma$ (二聚体)。分别用抗IL-2R $\alpha$ 、IL-2R $\beta$ 和IL-2R $\gamma$ 的抗体检测和确认相应IL-2R亚基在细胞膜上的表达。

[0211] 然后我们用流式细胞术检测TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)分别与上述3种表达IL-2R复合物( $\alpha\beta\gamma$ 、 $\alpha\gamma$ 和 $\beta\gamma$ )的293F细胞结合的活性。检测方法如实施例1.3所述。

[0212] 结果显示,TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)与IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 、IL-2R $\alpha\gamma$ 和IL-2R $\beta\gamma$ 的结合活性都非常低。

[0213] 实施例9.TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)对重组人TIGIT与CD155或PD-1与PD-L1结合的抑制作用

[0214] 用ELISA方法检测TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)对重组人TIGIT与CD155或PD-1与PD-L1结合的抑制活性。用的NaHCO<sub>3</sub>缓冲液(pH 9.6)稀释抗原TIGIT或PD-1(Sino Biological)至1 $\mu$ g/mL,每孔50 $\mu$ L加入到96孔酶标板中,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。次日,PBS洗涤两遍之后,用3%的BSA封闭,每孔100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C孵育1.5h,用PBST洗涤4次。梯度稀释的TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)和固定浓度的生物素标记的重组人CD155或PD-L1(Sino Biological,下同)等体积混匀后加入封闭洗涤后的酶标板中,37 $^{\circ}$ C孵育2h,继续用PBST洗涤4次后,加入一定比例稀释的碱性磷酸酶标记的链霉亲和素,37 $^{\circ}$ C孵育1.5h,最后PBST洗涤4次后,加入PNPP显色液,37 $^{\circ}$ C孵育10-15min后,酶标仪读数(波长405nm和490nm)。

[0215] 实验结果显示,TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)能有效抑制TIGIT与CD155以及PD-1与PD-L1的结合。

[0216] 实施例10.TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)对重组人CD155或PD-L1与细胞膜上TIGIT或PD-1结合的抑制作用

[0217] 用流式细胞术研究TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)对重组人CD155或PD-L1与细胞膜上TIGIT或PD-1结合的抑制功能。研究方法简述如下:首先配制FACS缓冲液,即1 $\times$ PBS+0.5%BSA溶液。取所需数量的表达膜TIGIT或PD-1的Jurkat细胞(实施例7所述),一个样品所需的细胞量约为 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个,用含有生物素标记的CD155或PD-L1的FACS溶液梯度稀释需要检测的TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA),与细胞混匀,体积约为100 $\mu$ L,4 $^{\circ}$ C冰箱孵育30min,用FACS缓冲液将细胞洗涤一次后,用FACS缓冲液稀释的PE标记的链霉亲和素(Abcam:6854)将细胞重悬后置于4 $^{\circ}$ C冰箱孵育30min,最后,FACS缓冲液洗涤细胞后,用200 $\mu$ L的FACS缓冲液重悬细胞,上机检测。

[0218] 实验结果显示,TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)能有效抑制CD155或PD-L1与细胞膜上TIGIT或PD-1结合。

[0219] 实施例11.TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)体外刺激CTLL-2细胞增殖的功能研究

[0220] IL-2是淋巴细胞生长的重要生长因子之一,能刺激多种淋巴细胞的增殖,其中包括小鼠T淋巴细胞CTLL-2。将CTLL-2(中国食品药品检定院)培养在RPMI1640培养基中(Gibco,含10%FBS(胎牛血清,Gibco)和重组人(rh)IL-2(北京双鹭药业))。在实验的前一天,在96-孔细胞培养板里每孔加入 $1 \times 10^4$ 个细胞,含0.2mL培养基(10% FBS,不含rhIL-2),然后每孔加入系列稀释的待检测的TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA),培养二天后,用CCK-8细胞生长检测试剂盒检测细胞生长状况。用野生型重组人IL-2(rhIL-2(WT), SinoBiological,中国)和TIGIT抗体(P03479)与IL-2(WT)的融合蛋白(mAb-IL-2(WT))做对照样品。

[0221] 实验结果显示(图8),KD5301B刺激CTLL-2细胞生长的活性 $EC_{50}$ 为1.7nM,而rhIL-2(WT)和mAb-IL-2(WT)刺激CTLL-2细胞生长的活性 $EC_{50}$ 分别为0.07nM和0.08nM,刺激细胞生长的活性远强于KD5301B,说明KD5301的变异体IL-2与IL-2R的结合活性很弱,使其刺激淋巴细胞生长的功能活性也弱。

[0222] 实施例12.TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)体外对淋巴细胞CD4+和CD8+生长的影响研究

[0223] 分别从人TIGIT基因和PD-1基因敲入小鼠以及野生型小鼠的外周血或脾脏中分离出CD4+和CD8+T淋巴细胞,在体外和TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)共培养3天,然后检测基因敲入小鼠里的TIGIT阳性和阴性、PD-1阳性和阴性的CD4+和CD8+淋巴细胞数量,以及野生型小鼠里的CD4+和CD8+淋巴细胞数量。用重组人IL-2(WT)作对照。

[0224] 实验结果显示,与rhIL-2(WT)相比,TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)优先刺激TIGIT阳性和PD-1阳性的CD4+和CD8+淋巴细胞增殖,而rhIL-2(WT)刺激所有的CD4+和CD8+淋巴细胞增殖。

[0225] 实施例13.TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)体外激活NK细胞的研究

[0226] 用FACS技术从NK92细胞群中分选出高表达和低表达TIGIT的NK92细胞,然后与TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)共培养24小时,检测NK92细胞CD107的表达。CD107是NK92细胞激活的标志物,在NK92细胞处于非激活状态时,CD107不表达或低表达。激活后,NK92细胞显著增加CD107的表达。用重组人IL-2(WT)作对照。

[0227] 实验结果显示,与rhIL-2(WT)相比,TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)优先刺激TIGIT高表达的NK92的CD107表达,而rhIL-2(WT)对高表达和低表达TIGIT的NK92细胞的激活没有区别。

[0228] 实施例14.体外增强人PBMC的INF  $\gamma$  产生

[0229] T淋巴细胞激活后,淋巴细胞分泌细胞因子INF  $\gamma$ 。为了测试TIGIT/PD-1BsAb-IL-2是否能增强激活的T细胞的活性,我们进行了以下实验。方法简述如下:复苏冷冻的人外周血单核细胞PBMC,调整细胞密度至 $5 \times 10^6$ 个/mL,在含PHA(0.3-3 $\mu$ g/mL)的培养基中培养2天,激活淋巴细胞。用PBS清洗PHA刺激的PBMC,然后与含有TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)的培养基培养4天,然后检测上清中INF  $\gamma$ 的含量。用重组IL-2(RLFA)、TIGIT/PD-1BsAb和重组IL-2(RLFA)加上TIGIT/PD-1BsAb作为对照。重组IL-2(RLFA)和TIGIT/BsAbs制备方法可参考本发明中的抗体-IL2融合蛋白的制备方法。

[0230] 实验结果显示,与重组IL-2(RLFA)或TIGIT/BsAbs单独作用相比,或二者联合作用

相比, TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA) 具有更强的激活T细胞IFN  $\gamma$  表达的活性, 即更强的激活T细胞功能活性的能力。

[0231] 实施例15. TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA) 体内对淋巴细胞CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>生长的影响研究

[0232] 我们用人TIGIT基因敲入小鼠、人PD-1基因敲入小鼠和人TIGIT/PD-1双基因敲入小鼠研究本发明的TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA) 在体内对T淋巴细胞CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>生长的刺激作用。

[0233] 8~10周龄各基因敲入C57BL/6小鼠(百奥赛图)按体重随机分组, 每组6只(雌雄各半), 分别从尾静脉注射不同剂量本发明的TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)、IgG1-IL-2(RLFA)、PBS(对照组)。4天后从眼睛处取血, 加入荧光标记的抗小鼠CD4或CD8抗体以及抗人TIGIT和PD-1抗体, 孵育1小时后, 用PBS清洗细胞3次, 然后用流式细胞仪检测各样品的荧光强度, 计算总CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞以及NK细胞在血液中的含量, 以及TIGIT+CD4<sup>+</sup>、TIGIT+CD8<sup>+</sup>、PD-1+CD4<sup>+</sup>、PD-1+CD8<sup>+</sup>和TIGIT+NK细胞在血液中的含量。

[0234] 实验结果显示, 与IgG1-IL-2(RLFA) 相比, TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA) 优先刺激TIGIT和PD-1阳性的淋巴细胞增殖。

[0235] 实施例16. 体内抑制肿瘤生长的研究

[0236] 我们用人TIGIT/PD-1双基因敲入小鼠研究本发明的TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA) 抑制同源肿瘤生长的功能。

[0237] 在8~10只C57BL/6小鼠(百奥赛图, 雌雄各半)皮下接种小鼠结肠癌细胞MC38, 约7天后按肿瘤大小随机分组(8只/组, 雌雄各半), 分别从尾静脉注射不同剂量的TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA)、IgG1-IL-2(RLFA)、TIGIT/PD-1BsAb或PBS, 每周2次, 共给药4次。每周2次量瘤体积(长 $\times$ 宽<sup>2</sup>/2)。在PBS组小鼠的平均肿瘤体积大于2000mm<sup>3</sup>时结束实验, 取脾、瘤称重。

[0238] 实验结果显示, TIGIT/PD-1BsAb-IL-2(RLFA) 抑制肿瘤生长的能力强于IgG1-IL-2(RLFA) 和TIGIT/PD-1BsAb抑制肿瘤生长的能力。

[0239] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0240] 附: 序列信息

[0241] SEQ ID NO:1:PD-1抗体(pembrolizumab)重链-linker-IL-2(R38L,F42A), 重链含有LALA变异以及S354C和T366W变异(knob重链1)

[0242] QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG

[0243] GTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT

[0244] TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

[0245] QSSGLYLSVSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG

[0246] PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST

[0247] YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKN

[0248] QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF

- [0249] SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMI
- [0250] LNGINNYKNPKLTLMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI
- [0251] SNINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
- [0252] SEQ ID NO:2:PD-1抗体 (pembrolizumab) 重链-linker-IL-2 (R38L、F42A) ,重链可  
变域融合到人源抗体轻链恒定λ域和含有LALA变异以及S354C和T366W变异的人源IgG1铰链  
域-CH2-CH3 (knob重链2)
- [0253] QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNG
- [0254] GTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT
- [0255] TVTVSSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
- [0256] TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAP
- [0257] EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
- [0258] EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR
- [0259] EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
- [0260] QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEH
- [0261] LLLDLQMILNGINNYKNPKLTLMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNF
- [0262] HLRPRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
- [0263] SEQ ID NO:3:PD-1抗体 (pembrolizumab) 轻链
- [0264] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLES
- [0265] GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
- [0266] PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLT
- [0267] LSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0268] SEQ ID NO:4:PD-1抗体 (pembrolizumab) 轻链,轻链可变域融合人源IgG1的CH1
- [0269] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLES
- [0270] GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVF
- [0271] PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
- [0272] SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC
- [0273] SEQ ID NO:5:TIGIT抗体 (P03489) 重链可变域 (SEQ ID NO:84) 融合到含有LALA变  
异以及Y349C、T366S、L368A和Y407V变异的IgG1 Fc (hole重链1)
- [0274] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFISYNIYWVRQAPGQGLEWMGGVNPSNGN
- [0275] TNFNENFQGRVTMTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTRGNYYGYEFAYWGQTTTVTVSSASTKGPS  
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN  
VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP  
PSR  
EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL  
HNHYTQKSLSLSPGK
- [0276] SEQ ID NO:6:TIGIT抗体 (P03479) 重链可变域 (SEQ ID NO:88) 融合到含有LALA变  
异以及Y349C、T366S、L368A和Y407V变异的IgG1 Fc (hole重链2)
- [0277] EVQVVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVAEISSGGSHTFYADTVKGRFT  
ISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARKTLDYALDYWGQTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD  
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0278] SEQ ID NO:7:TIGIT抗体 (P03489) 轻链

[0279] DIQMTQSPSSMSASVGDRTITCKASQHVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSPSYRYTGVPSRFSGSGSGT  
DFTFTISSVQPEDIATYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0280] SEQ ID NO:8:TIGIT抗体 (P03479) 轻链

[0281] DVQITQSPSYLSASVGDRTINCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSRLQSGIPSRFSGSGYGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0282] SEQ ID NO:9:野生型IL-2 (WT)

[0283] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV  
LNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[0284] SEQ ID NO:10 ~ SEQ ID NO:17:P03489的VH、VHCDR1-3、VL和VLCDR1-3序列

[0285] 参见表2

[0286] SEQ ID NO:18 ~ SEQ ID NO:25:P03479的VH、VHCDR1-3、VL和VLCDR1-3序列

[0287] 参见表3

[0288] SEQ ID NO:26:鼠源单抗7103-01的VL

[0289] DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQHVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSPSYRYTGVDPDRFTGSGSGT  
DFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK

[0290] SEQ ID NO:27:鼠源单抗7103-01的VH

[0291] QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFISYNIYWVKRPGQGLEWIGGVNPSNGNTNFNENFKSKAT  
LTVDKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCTRGNYYGYEFAYWGQGLVTVSA

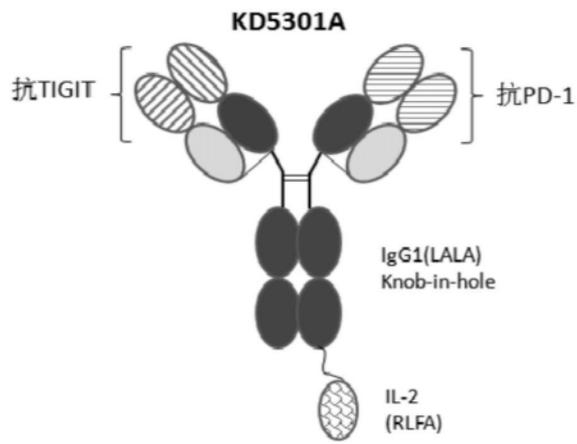
[0292] SEQ ID NO:28:鼠源单抗7103-07的VL

[0293] DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSRLQSGIPSKFSGSGYGT  
DFTLTISLQPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIK

[0294] SEQ ID NO:29:鼠源单抗7103-07的VH

[0295] EVQVVESGGGLVKPGGTLKLSAASGFTFSTYAMSWVRQSPEQRLEWVAEISSGGSHTFYSDTVTGRF  
TISRDNANTLYLEMNSLRSEDTAMYYCARKTLDYYALDYWGQGTSVTVSS。

A



B

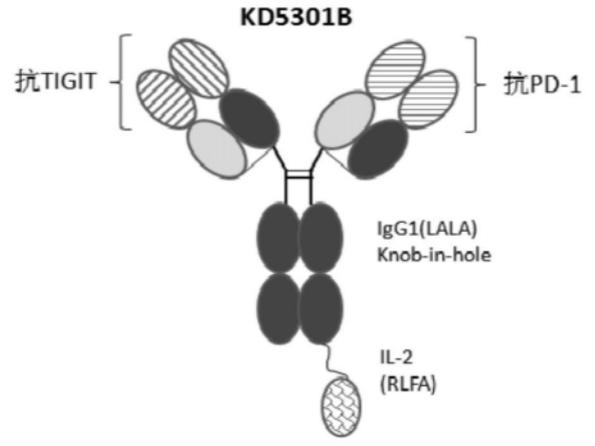
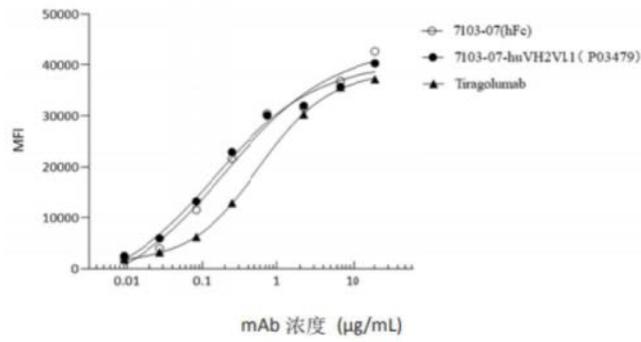


图1

A



B

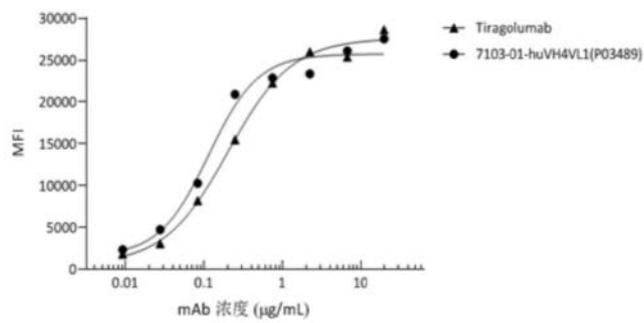


图2

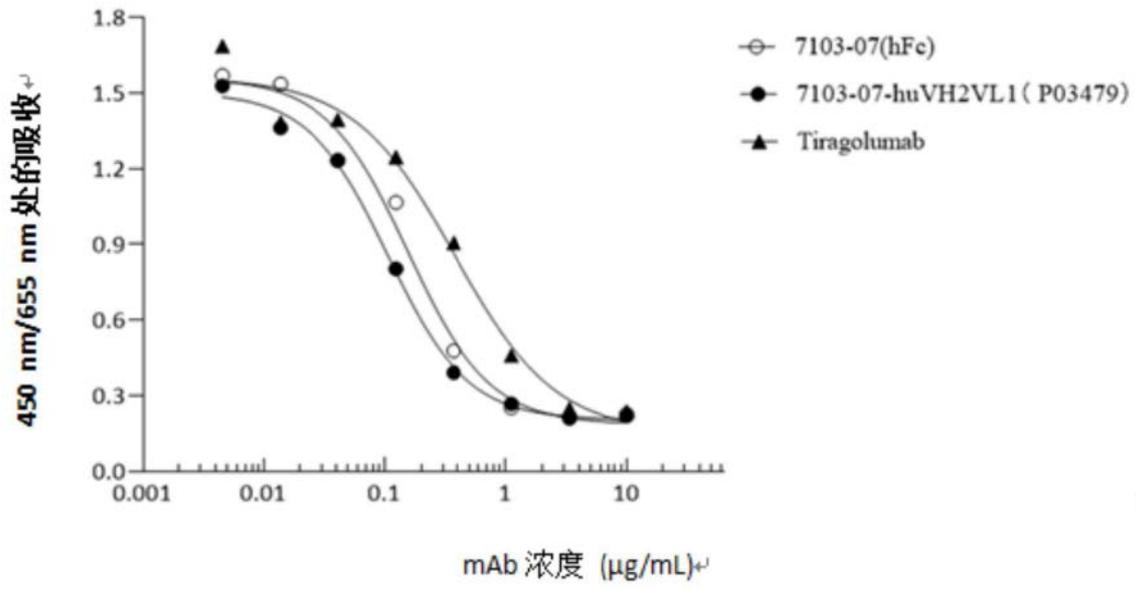


图3

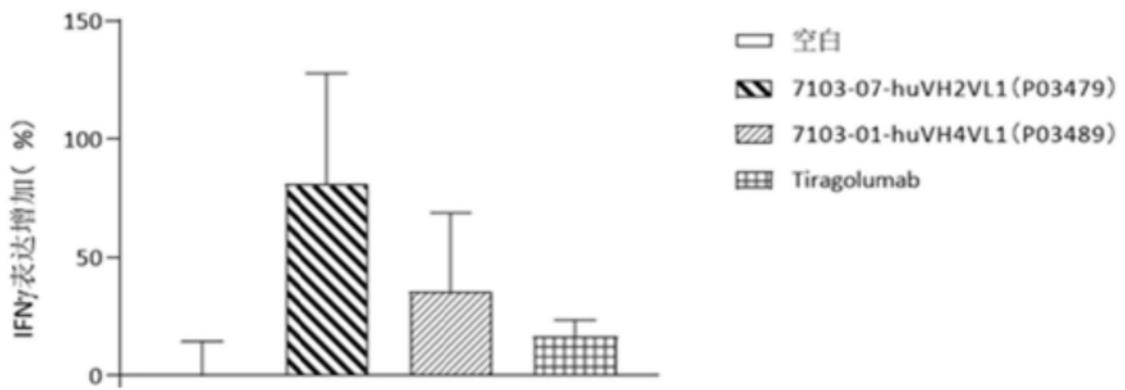
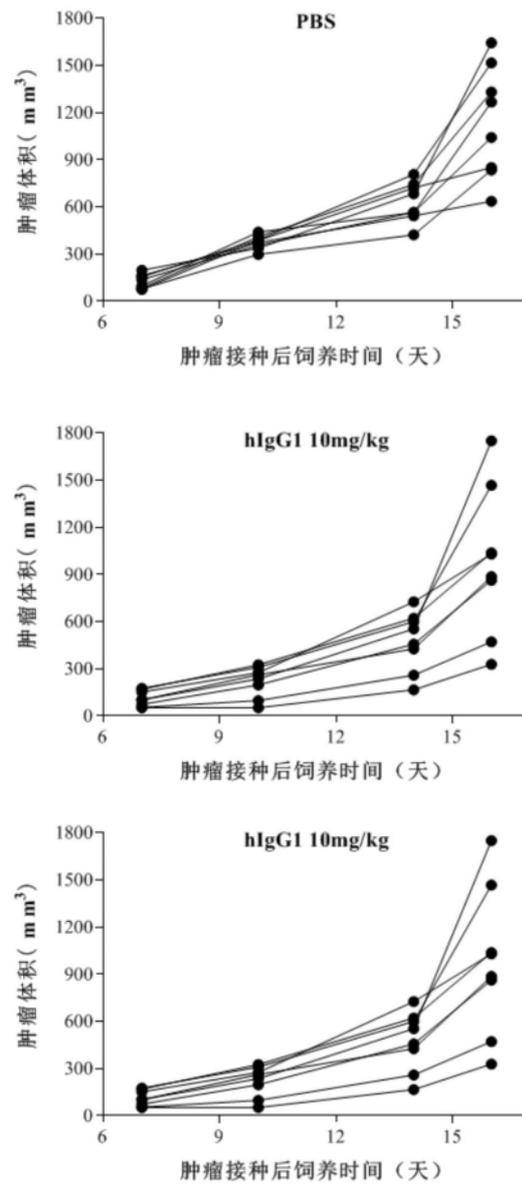


图4

**A**



**B**

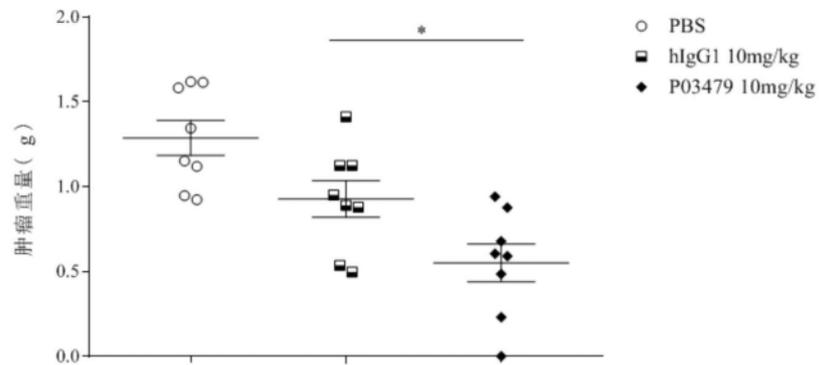


图5

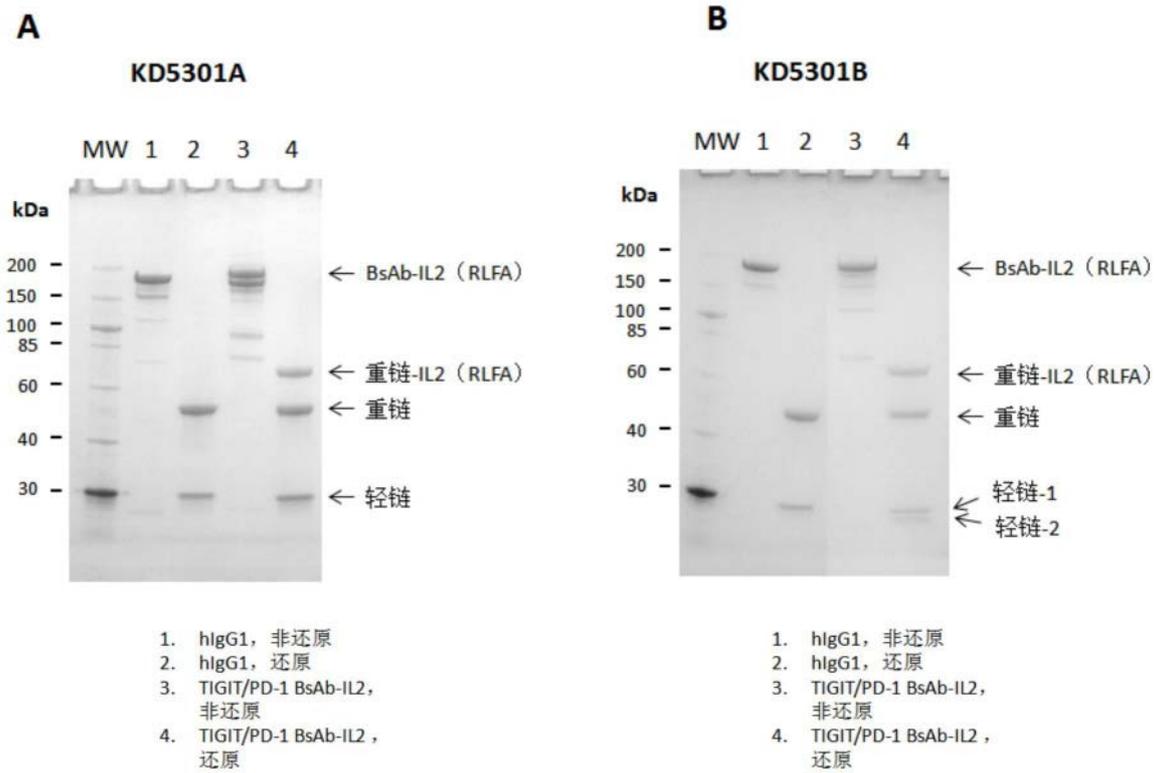


图6

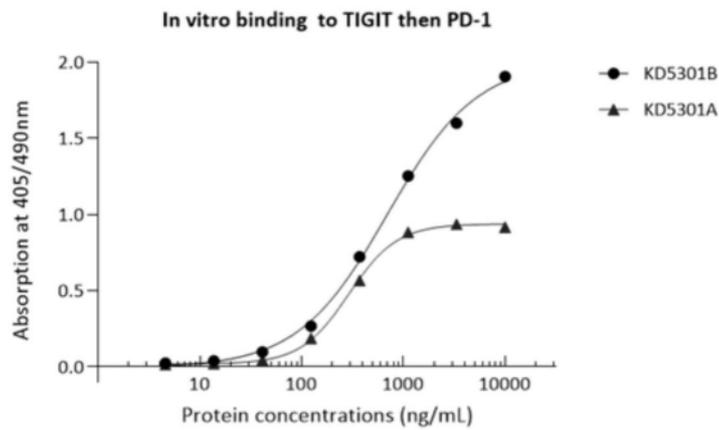


图7

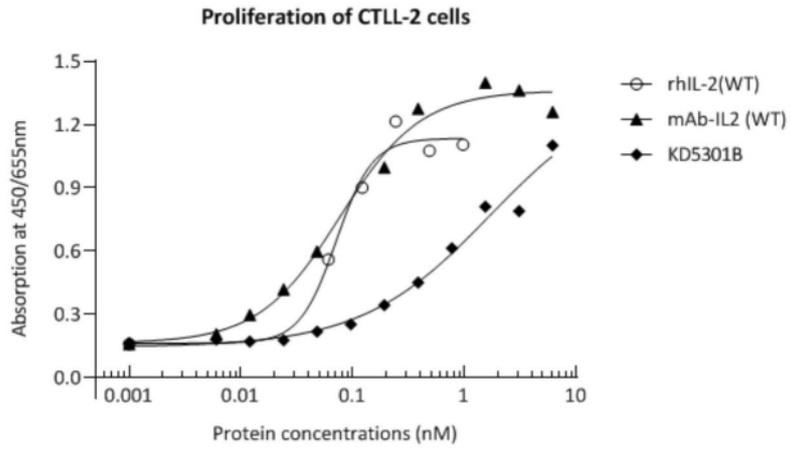


图8