



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111051347 B

(45) 授权公告日 2021.12.21

(21) 申请号 201880058441.3
 (22) 申请日 2018.09.28
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111051347 A
 (43) 申请公布日 2020.04.21
 (66) 本国优先权数据
 201710908565.3 2017.09.29 CN
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.03.09
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/CN2018/108246 2018.09.28
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/062832 ZH 2019.04.04
 (73) 专利权人 江苏恒瑞医药股份有限公司
 地址 222047 江苏省连云港市经济技术开
 发区昆仑山路7号
 专利权人 上海恒瑞医药有限公司
 (72) 发明人 付雅媛 曹卓晓 胡齐悦 陶维康
 (74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限
 公司 11314
 代理人 程伟

(56) 对比文件
 CN 107148430 A,2017.09.08
 CN 103073644 A,2013.05.01
 WO 2017037707 A1,2017.03.09
 WO 2017059095 A1,2017.04.06
 CN 107207594 A,2017.09.26
 CN 107148430 A,2017.09.08
 CN 103073644 A,2013.05.01
 WO 2017037707 A1,2017.03.09
 WO 2017059095 A1,2017.04.06
 CN 107207594 A,2017.09.26
 LOZANO,E 等.The TIGIT/CD226 Axis
 Regulates Human T Cell Function.《THE
 JOURNAL OF IMMUNOLOGY》.2012,第188卷(第8
 期),摘要、第3870页左栏第4段,第3871页左栏第
 1段-第3872页左栏第1段,第3874页左栏第1段-
 右栏倒数第1段,图2和图3.
 LOZANO,E 等.The TIGIT/CD226 Axis
 Regulates Human T Cell Function.《THE
 JOURNAL OF IMMUNOLOGY》.2012,第188卷(第8
 期),摘要、第3870页左栏第4段,第3871页左栏第
 1段-第3872页左栏第1段,第3874页左栏第1段-
 右栏倒数第1段,图2和图3.
 审查员 彭海航

(51) Int.Cl.
 C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书2页 说明书38页 附图5页

(54) 发明名称
 TIGIT抗体、其抗原结合片段及医药用途

(57) 摘要
 一种TIGIT抗体、其抗原结合片段及医药用
 途。进一步地,还涉及包含所述TIGIT抗体CDR区
 的鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体,以及包含
 TIGIT抗体及其抗原结合片段的药物组合物,以
 及其作为药物的用途。特别地,还涉及一种人源
 化的TIGIT抗体在制备用于治疗TIGIT相关的疾
 病或病症的药物中的用途。

CN 111051347 B

1. 一种单克隆抗体或其抗原结合片段,所述单克隆抗体或抗原结合片段特异性结合人TIGIT,所述单克隆抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中:

所述重链可变区包含分别如SEQ ID NO:21、22和23氨基酸序列所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含分别如SEQ ID NO:24、25和26氨基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

2. 如权利要求1所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体选自鼠源抗体、嵌合抗体和人源化抗体。

3. 如权利要求2所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述的人源化抗体轻链和重链可变区上的轻链和重链FR区序列分别来源于人种系轻链和重链。

4. 如权利要求3所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗体包含选自SEQ ID NO:51、54和55中任一个所示的重链可变区。

5. 如权利要求3所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗体包含SEQ ID NO:52或53所示的轻链可变区。

6. 如权利要求3所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗体包含选自SEQ ID NO:51、54和55中任一个所示的重链可变区和选自SEQ ID NO:52和53中任一个所示的轻链可变区。

7. 如权利要求1至6任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为全长抗体,进一步包括人抗体恒定区。

8. 如权利要求7所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为全长抗体,包含SEQ ID NO:78所示的人抗体重链恒定区和SEQ ID NO:79所示的人轻链恒定区。

9. 权利要求1至6任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、单链抗体、双抗体、dsFv和包含CDR的肽。

10. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其特征在于与权利要求1至9任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段竞争结合人TIGIT。

11. 一种药物组合物,其含有治疗有效量的根据权利要求1至10任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

12. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求1至10任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

13. 一种重组载体,其包含权利要求12所述的核酸分子。

14. 一种用根据权利要求13所述的重组载体转化的宿主细胞,所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞。

15. 一种用根据权利要求13所述的重组载体转化的宿主细胞,所述宿主细胞为真核细胞。

16. 一种用根据权利要求13所述的重组载体转化的宿主细胞,所述宿主细胞为哺乳动物细胞。

17. 用于生产权利要求1至10任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括将权利要求14至16任一项所述的宿主细胞在培养物中进行培养以形成并积累权利要求1至10任一项的单克隆抗体或其抗原结合片段,以及从培养物回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段。

18. 用于检测或测定人TIGIT的试剂,所述试剂包含权利要求1至10任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段。

19. 如权利要求1至10任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段、如权利要求11所述的药物组合物或如权利要求12所述的核酸分子在制备用于治疗与人TIGIT相关的疾病的药物中的用途,其中所述疾病是肿瘤、癌症、免疫性疾病或感染性病症。

TIGIT抗体、其抗原结合片段及医药用途

[0001] 本申请是基于,并且要求以下文件的优先权,中国申请号为201710908565.3,申请日为2017年9月29日,该申请的公开内容都通过引用并入到了本申请当中。

技术领域

[0002] 本公开涉及TIGIT抗体及其抗原结合片段,进一步地,本公开还涉及包含所述TIGIT抗体CDR区的嵌合抗体、人源化抗体,本公开还涉及包含所述TIGIT抗体及其抗原结合片段的药物组合物,以及其作为TIGIT相关疾病诊断剂和治疗药物的用途。

背景技术

[0003] 近年来,针对于免疫细胞共抑制受体的免疫卡控点治疗在肿瘤免疫治疗中取得了巨大进展,发现和验证新的共抑制性受体成为一个全球竞争性的热点。T细胞是免疫反应的关键介导者,T细胞的活化依赖TCR信号和共刺激信号。共刺激信号则是T细胞活化的限制信号,其功能失调参与自身免疫疾病的发生(Immunol Rev,2012,248:122-139;Autoimmun Rev,2013,12:1171-1176)。TIGIT(T cell immunoglobulin and ITIM domain)是新发现的位于NK细胞和T细胞表面的共抑制信号分子,与T细胞、NK细胞及树突状细胞DC等的功能调节密切相关。

[0004] TIGIT基因位于人类第16号染色体,编码由244个氨基酸组成的I型跨膜蛋白。人TIGIT分子胞膜外区长141个氨基酸,有1个免疫球蛋白V样结构域;跨膜区23个氨基酸;胞质区较短,有80个氨基酸,具有1个PDZ结合结构域和1个ITIM模体。TIGIT分子属于免疫球蛋白超家族IgSF的一员,其结构较为保守,多种哺乳动物中都发现了其同源分子,人类TIGIT分子与猴、狗和小鼠的TIGIT分子分别具有88%、67%和58%的同源性(Nat Immunol,2009,10(1):48-57)。

[0005] TIGIT分子主要表达于T细胞和NK细胞表面(Nat Immunol,2009,10:48-57)。Naïve T细胞和静息记忆T细胞均低表达TIGIT,体外活化后表达上调(J Immunol,2012,188:3869-3875)。NK细胞表面TIGIT则有较高水平的表达(Proc Natl Acad Sci USA,2009,106(42):17858-17863)。TIGIT是极具潜力的免疫治疗新靶点。已有研究表明特异性地阻断TIGIT的单克隆抗体,在动物模型中显示了显著的抗肿瘤效果(Martinet and Smyth 2015)。TIGIT抗体和PD-1抗体联用,能够促进CD8T细胞对HIV和黑色素瘤的杀伤功能,这一效应随着对CD226的阻断而消失(Chew,Fujita et al.2016)。目前国内外还没有阻断TIGIT的单克隆抗体药物上市,因此亟须开展高效特异性TIGIT单克隆抗体的研发。

[0006] 目前,已有W02009126688、W02014089113、W02015009856、W02015143343、W02015174439、W02017053748、W02017030823、W02016106302、US20160176963、US20130251720等专利报道了TIGIT的抗体及相关应用。但目前为止,尚无TIGIT抗体应用于临床,仍需开发新的,更适于临床应用的TIGIT抗体。

发明内容

[0007] 本公开提供与TIGIT的胞外区的氨基酸序列或三维结构特异性结合的单克隆抗体或抗原结合片段(也可称TIGIT结合分子)。

[0008] 一方面,提供一种单克隆抗体或其抗原结合片段,所述单克隆抗体或抗原结合片段特异性结合人TIGIT,所述单克隆抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0009] (i) 重链可变区包含选自如SEQ ID NO:15、16和17氨基酸序列所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3或与SEQ ID NO:15、16和17所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3分别具有3,2或1个氨基酸差异的HCDR变体,轻链可变区包含选自如SEQ ID NO:18、19和20氨基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3或与SEQ ID NO:18、19和20所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3分别具有3,2或1个氨基酸差异的LCDR变体;或

[0010] (ii) 重链可变区包含选自如SEQ ID NO:21-23氨基酸序列所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3或与SEQ ID NO:21-23所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3分别具有3,2或1个氨基酸差异的HCDR变体,轻链可变区包含选自如SEQ ID NO:24-26氨基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3或与SEQ ID NO:24-26所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3分别具有3,2或1个氨基酸差异的LCDR变体;或

[0011] (iii) 重链可变区包含选自如SEQ ID NO:27-29氨基酸序列所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3或与SEQ ID NO:27-29所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3分别具有3,2或1个氨基酸差异的HCDR变体,轻链可变区包含选自如SEQ ID NO:30-32氨基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3或与SEQ ID NO:30-32所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3分别具有3,2或1个氨基酸差异的LCDR变体;或

[0012] (iv) 重链可变区包含选自如SEQ ID NO:33-35氨基酸序列所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3或与SEQ ID NO:33-35所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3分别具有3,2或1个氨基酸差异的HCDR变体,轻链可变区包含选自如SEQ ID NO:36-38氨基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3或与SEQ ID NO:36-38所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3分别具有3,2或1个氨基酸差异的LCDR变体;或

[0013] (v) 重链可变区包含选自如SEQ ID NO:39-41氨基酸序列所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3或与SEQ ID NO:39-41所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3分别具有3,2或1个氨基酸差异的HCDR变体,轻链可变区包含选自如SEQ ID NO:42-44氨基酸序列所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3或与SEQ ID NO:42-44所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3分别具有3,2或1个氨基酸差异的LCDR变体。

[0014] 在一些实施方式中,所述单克隆抗体或抗原结合片段的CDR(包括3个重链CDR和3个轻链CDR)具有3,2或1个氨基酸差异的CDR变体是经亲和力成熟方法筛选获得的具有3,2或1个氨基酸差异的CDR变体。

[0015] 在一些实施方式中,所述单克隆抗体或抗原结合片段与TIGIT的亲和力(KD)小于 10^{-8} M、小于 10^{-9} M、小于 10^{-10} M或小于 10^{-11} M。

[0016] 在一些实施方式中,所述单克隆抗体或抗原结合片段特异性结合人TIGIT,所述单克隆抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0017] (vi) 重链可变区包含如SEQ ID NO:15-17所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,轻链可变区包含如SEQ ID NO:18-20所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;或

[0018] (vii) 重链可变区包含如SEQ ID NO:21-23所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,轻链可变区包含如SEQ ID NO:24-26所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;或

[0019] (viii) 重链可变区包含如SEQ ID NO:27-29所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,轻链可变区包含如SEQ ID NO:30-32所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;或

[0020] (ix) 重链可变区包含如SEQ ID NO:33-35所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,轻链可变区包含如SEQ ID NO:36-38所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区;或

[0021] (x) 重链可变区包含如SEQ ID NO:39-41所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3区,轻链可变区包含如SEQ ID NO:42-44所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3区。

[0022] 在一些实施方式中,其中所述单克隆抗体是重组抗体,优选选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体的重组抗体。

[0023] 在一些实施方式中,其中所述的人源化抗体轻链和重链可变区上的轻链和重链FR区序列分别来源于人种系轻链和重链或其突变序列。

[0024] 在一些实施方式中,其中所述的人源化抗体含有SEQ ID NO:45、51、56、64或71所示的重链可变区或其变体;所述变体是在SEQ ID NO:45、51、56、64或71所示的重链可变区序列上具有1-10个氨基酸变化。

[0025] 在一些实施方式中,所述变体是在SEQ ID NO:45、51、56、64或71所示的重链可变区的FR区位置上具有1-10个氨基酸的回复突变;优选的,所述回复突变选自:

[0026] 在SEQ ID NO:45所示的重链可变区上的N84S、S85R和其任意组合的氨基酸回复突变;

[0027] 或在SEQ ID NO:51所示的重链可变区上的M48I、R72V、V79A和其任意组合的氨基酸回复突变;

[0028] 或在SEQ ID NO:56所示的重链可变区上的Y27F、M48I、R72V、V79A、S84N和其任意组合的氨基酸回复突变;

[0029] 或在SEQ ID NO:64所示的重链可变区上的R38K、R67K、R72V、T74K、M48I、V68A、M70L、V79A和其任意组合的氨基酸回复突变;

[0030] 或在SEQ ID NO:71所示的重链可变区上的G27Y、M48I、L83F、A97T和其任意组合的氨基酸回复突变。

[0031] 在一些实施方式中,其中所述人源化抗体包含选自:(vi) SEQ ID NO:45或50所示的重链可变区;

[0032] (vii) SEQ ID NO:51、54至55中任一个所示的重链可变区;

[0033] (viii) SEQ ID NO:56、61、62和63中任一个所示的重链可变区;

[0034] (ix) SEQ ID NO:64、67、68、69和70中任一个所示的重链可变区;和

[0035] (x) SEQ ID NO:71、75、76和77中任一个所示的重链可变区。

[0036] 在一些实施方式中,其中所述的人源化抗体含有SEQ ID NO:46、52、57、65或72所示的轻链可变区或其变体;所述回复突变是在SEQ ID NO:46、52、57、65或72所示的轻链可变区上具有1-10个氨基酸变化的序列。

[0037] 在一些实施方式中,其中所述变体是在SEQ ID NO:46、52、57、65或72所示的轻链可变区的FR区位置上具有1-10个氨基酸的回复突变;优选的,所述回复突变选自:

[0038] 在SEQ ID NO:46所示的轻链可变区上的S60D、T85D、A43S、S63T和其任意组合的氨

基酸回复突变；

[0039] 或在SEQ ID NO:52所示的轻链可变区上的A43S的氨基酸回复突变；

[0040] 或在SEQ ID NO:57所示的轻链可变区上的Q3V、A43S、S60D、Y87F和其任意组合的氨基酸回复突变；

[0041] 或在SEQ ID NO:65所示的轻链可变区上的A43S、I48V和其任意组合的氨基酸回复突变；

[0042] 或在SEQ ID NO:72所示的轻链可变区上的N22S、P49S和其任意组合的氨基酸回复突变。

[0043] 在一些实施方式中,其中所述人源化抗体包含选自:

[0044] xi) SEQ ID NO:46、47、48和49中任一个所示的轻链可变区；

[0045] xii) SEQ ID NO:52或53所示的轻链可变区；

[0046] xiii) SEQ ID NO:57、58、59和60中任一个所示的轻链可变区；

[0047] xiv) SEQ ID NO:65或66所示的轻链可变区；或

[0048] xv) SEQ ID NO:72、73和74中任一个所示的轻链可变区。

[0049] 在一些实施方式中,其中所述人源化抗体包含选自:

[0050] xvi) SEQ ID NO:45或50所示的重链可变区和SEQ ID NO:46、47、48和49中任一个所示的轻链可变区；

[0051] xvii) SEQ ID NO:51、54和55中任一个所示的重链可变区和SEQ ID NO:52或53所示的轻链可变区；

[0052] xviii) SEQ ID NO:56、61、62和63中任一个所示的重链可变区和SEQ ID NO:57、58、59和60中任一个所示的轻链可变区；

[0053] xix) SEQ ID NO:64、67、68、69和70中任一个所示的重链可变区和SEQ ID NO:65或66所示的轻链可变区；或

[0054] xx) SEQ ID NO:71、75、76和77中任一个所示的重链可变区和SEQ ID NO:72、73和74中任一个所示的轻链可变区。

[0055] 在一些实施方式中,单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为全长抗体,进一步包括人抗体恒定区,其中重链恒定区优选人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4抗体重链恒定区,更优选包含SEQ ID NO:78所示的人抗体重链恒定区和SEQ ID NO:79所示的人轻链恒定区。

[0056] 在一些实施方式中,单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是选自Fab、Fab'、F(ab')₂、单链抗体(scFv)、二聚化的V区(双抗体)、二硫键稳定化的V区(dsFv)和包含CDR的肽的抗原结合片段。

[0057] 在一些实施方式中,单克隆抗体或其抗原结合片段,其与前述的单克隆抗体或其抗原结合片段竞争结合人TIGIT。

[0058] 另一方面,本公开提供一种药物组合物,其含有治疗有效量的根据上述单克隆抗体或其抗原结合片段,以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。药物组合物单位剂量中含单克隆抗体或其抗原结合片段的量优选为0.1-2000mg,更优选为0.1-1000mg。

[0059] 另一方面,本公开提供一种分离的核酸分子,其编码上述单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0060] 另一方面,本公开提供一种重组载体,其包含上述核酸分子。

[0061] 另一方面,本公开提供一种用根据上述的重组载体转化的宿主细胞,所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞,优选为真核细胞,更优选哺乳动物细胞。

[0062] 另一方面,本公开提供用于生产上述单克隆抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括将上述宿主细胞在培养物中进行培养以形成并积累上述单克隆抗体或其抗原结合片段,以及从培养物回收所述单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0063] 另一方面,本公开提供用于检测或测定人TIGIT的方法,所述方法包括使用上述单克隆抗体或其抗原结合片段的步骤。

[0064] 另一方面,本公开提供用于检测或测定人TIGIT的试剂,所述试剂包含上述单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0065] 另一方面,本公开提供用于治疗与人TIGIT相关的疾病的试剂,所述治疗剂包含上述单克隆抗体或其抗原结合片段,或包含上述药物组合物,或包含上述的核酸分子,所述疾病优选是T细胞功能障碍性病症,T细胞功能障碍体现在T细胞耗尽,是通过增强NK细胞和激活T细胞,增强机体免疫活性实现对疾病的治疗或延迟或缓解,更优选是肿瘤、癌症、免疫性疾病或感染性病症。其中癌症优选非小细胞肺癌,小细胞肺癌,肾细胞癌,结直肠癌,卵巢癌,乳腺癌,胰腺癌,胃癌,膀胱癌,食道癌,间皮瘤,黑素瘤,头和颈癌,甲状腺癌,肉瘤,前列腺癌,成胶质细胞瘤,宫颈癌,胸腺癌,白血病,淋巴瘤,骨髓瘤,蕈样肉芽肿、梅克尔细胞癌、肾上腺皮质癌、肝脏肝细胞癌、胰管腺癌、嗜铬细胞瘤和神经节细胞瘤、子宫内膜癌和卵巢浆液性囊腺癌。其中骨髓瘤优选多发性骨髓瘤(MM)。免疫性疾病优选关节炎、炎性肠病、银屑病。感染性疾病优选慢性病毒感染。另一方面,本公开提供治疗与人TIGIT相关的疾病的方法,所述方法包括向受试者施用药物有效量的上述单克隆抗体或其抗原结合片段,或包含上述的药物组合物,或上述的核酸分子,以治疗人TIGIT相关的疾病,所述疾病优选是T细胞功能障碍性病症,更优选是肿瘤、癌症或感染性病症,最优选CD155阳性或PVR阳性的肿瘤、癌症、或免疫性疾病或感染性病症。

[0066] 另一方面,本公开提供上述单克隆抗体或其抗原结合片段,或包含上述的药物组合物,或上述核酸分子在制备与人TIGIT相关的疾病的治疗剂中的应用,所述疾病优选是T细胞功能障碍性病症,更优选是肿瘤、癌症或感染性病症,最优选CD155阳性或PVR阳性的肿瘤、癌症、免疫性疾病或感染性病症。

[0067] 另一方面,本公开提供一种治疗疾病的方法,所述方法包括向受试者施用药物有效量的上述单克隆抗体或其抗原结合片段,或包含上述药物组合物,或上述分离的核酸分子,所述疾病优选是T细胞功能障碍性病症,更优选是肿瘤、癌症或感染性病症,最优选CD155阳性或PVR阳性的肿瘤、癌症或感染性病症。

附图说明

[0068] 图1:TIGIT抗体结合人TIGIT蛋白的ELISA检测。

[0069] 图2:TIGIT抗体结合猴TIGIT蛋白的ELISA检测。

[0070] 图3:TIGIT抗体与过表达人TIGIT的CHO细胞的结合检测。

[0071] 图4:TIGIT抗体与人PBMC的结合亲和力检测。

[0072] 图5A:ch1708及其人源化抗体对人TIGIT与CD155结合的阻断作用检测;

- [0073] 图5B:TIGIT人源化抗体对人TIGIT与CD155结合的阻断作用检测。
- [0074] 图6:TIGIT抗体对TIGIT抗原与过表达CD155的CHO细胞结合的阻断实验。
- [0075] 图7:TIGIT抗体对CD155与过表达TIGIT的CHO细胞结合的阻断实验。
- [0076] 图8:TIGIT抗体对TIGIT抗原与过表达CD112的CHO细胞结合的阻断实验。
- [0077] 图9:TIGIT抗体在TIGIT过表达的CHO细胞中的结合内吞实验,其中内吞1小时。
- [0078] 图10A:TIGIT抗体促进自然杀伤细胞(NK)的细胞杀伤实验;图10B:TIGIT抗体促进自然杀伤细胞(NK)的细胞杀伤实验。
- [0079] 图11:TIGIT抗体对PBMC-T淋巴细胞激活实验。
- [0080] 图12:TIGIT人源化抗体在大鼠体内的药代动力学检测。
- [0081] 术语
- [0082] 为了更容易理解本公开,以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义,本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。
- [0083] 本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。
- [0084] 本公开所述的“抗体”指免疫球蛋白,是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同,故其抗原性也不同。据此,可将免疫球蛋白分为五类,或称为免疫球蛋白的同种型,即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE,其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类Ig根据其较链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别,又可分为不同的亚类,如IgG可分为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类Ig中每类Ig都可以有 κ 链或 λ 链。
- [0085] 在本公开中,本公开所述的抗体轻链可进一步包含轻链恒定区,所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的 κ 、 λ 链或其变体。
- [0086] 在本公开中,本公开所述的抗体重链可进一步包含重链恒定区,所述的重链恒定区包含人源或鼠源的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体。
- [0087] 抗体重链和轻链靠近N端的约110个氨基酸的序列变化很大,为可变区(Fv区);靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定,为恒定区。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的骨架区(FR)。3个高变区决定抗体的特异性,又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDR区和4个FR区组成,从氨基端到羧基端依次排列的顺序为:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。轻链的3个CDR区指LCDR1、LCDR2、和LCDR3;重链的3个CDR区指HCDR1、HCDR2和HCDR3。本公开所述的抗体或抗原结合片段的LCVR区和HCVR区的CDR氨基酸残基在数量和位置符合已知的Kabat编号规则(LCDR1-3,HCDR1-3)。
- [0088] 本公开的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体,优选人源化抗体。
- [0089] 术语“鼠源抗体”在本公开中为根据本领域知识和技能制备的对人TIGIT的单克隆抗体。制备时用TIGIT抗原注射试验对象,然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本公开一个优选的实施方案中,所述的鼠源TIGIT抗体或其抗原结合片段,可进一步包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区,或进一步包含鼠源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体的重链恒定区。

[0090] 术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”,是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体,可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体,要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤,然后从鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因,再根据需要克隆人抗体的恒定区基因,将鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中,最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。在本公开一个优选的实施方案中,所述的TIGIT嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区。所述的TIGIT嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体的重链恒定区,优选包含人源IgG1、IgG2或IgG4重链恒定区,或者使用氨基酸突变(如YTE突变或回复突变、S228P)的IgG1、IgG2或IgG4变体。

[0091] 术语“人源化抗体(humanized antibody)”,包括CDR移植抗体(CDR-grafted antibody),是指将鼠的CDR序列移植到人的抗体可变区框架,即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分,从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开的参考文献获得。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(在因特网www.mrccepe.com.ac.uk/vbase可获得),以及在Kabat,E.A.等人,1991Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版中找到。为避免免疫原性下降的同时,引起的活性下降,可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变,以保持活性。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对CDR进行亲和力成熟后的人源化抗体。在本公开一个优选的实施方案中,所述的TIGIT人源化抗体中鼠的CDR序列选自SEQ ID NO:15-44;人的抗体可变区框架经过设计选择,其中所述抗体重链可变区上的重链FR区序列,人种系重链选自:(IGHV3-7*01和hjh2),(IGHV1-46*01和hjh4.1)和(IGHV1-69*02和hjh4.1)的组合序列,和人种系轻链选自:(IGKV1-39*02和hjk2.1),(IGKV1-39*01和hjk4.1)和(IGKV4-1*01和hjk4.1)的组合序列。为避免免疫原性下降的同时,引起的活性下降,可对所述的人抗体可变区可进行最少反向突变(回复突变,即将人抗体来源的FR区氨基酸残基突变成原始来源抗体对应位置的氨基酸残基),以保持活性。

[0092] CDR的移植可由于与抗原接触的构架残基而导致产生的TIGIT抗体或其抗原结合片段对抗原的亲和力减弱。此类相互作用可以是体细胞高度突变的结果。因此,可能仍然需要将此类供体构架氨基酸移植至人源化抗体的构架。来自非人TIGIT抗体或其抗原结合片段的参与抗原结合的氨基酸残基可通过检查鼠单克隆抗体可变区序列和结构来鉴定。CDR供体构架中与种系不同的各残基可被认为是相关的。如果不能确定最接近的种系,那么可将序列与亚型共有序列或具有高相似性百分数的鼠序列的共有序列相比较。稀有构架残基被认为可能是体细胞高度突变的结果,从而在结合中起着重要作用。

[0093] 在类似“具有3,2或1个氨基酸差异的变体”中“氨基酸差异”是指相较于原蛋白质或多肽,变体蛋白质或多肽存在氨基酸的改变或突变,包括在原蛋白质或多肽的基础上发生1个或数个氨基酸的插入、缺失或替换。

[0094] 术语抗体的“抗原结合片段”或“功能片段”是指抗体的保持特异性结合抗原(例如,TIGIT)的能力的一个或多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来实现抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合片段”中包含的结合片段的实例包括(i)Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,包含通过铰链区上的二硫桥连接的两

个Fab片段的二价片段,(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体的单臂的VH和VL结构域组成的Fv片段;(v)单结构域或dAb片段(Ward等人,(1989)Nature341:544-546),其由VH结构域组成;和(vi)分离的互补决定区(CDR)或(vii)可任选地通过合成的接头连接的两个或更多个分离的CDR的组合。此外,虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码,但可使用重组方法,通过合成的接头连接它们,从而使得其能够产生为其中VL和VH区配对形成单价分子的单个蛋白质链(称为单链Fv(scFv);参见,例如,Bird等人(1988)Science242:423-426;和Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci USA85:5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段,并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组DNA技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。抗体可以是不同同种型的抗体,例如,IgG(例如,IgG1,IgG2,IgG3或IgG4亚型),IgA1,IgA2,IgD,IgE或IgM抗体。

[0095] 本公开的抗原结合片段包括Fab、F(ab')₂、Fab'、单链抗体(scFv)、二聚化的V区(双抗体)、二硫键稳定化的V区(dsFv)、包含CDR的肽等。

[0096] Fab是通过用蛋白酶木瓜蛋白酶(切割H链的224位的氨基酸残基)处理IgG抗体分子所获得的片段中的具有约50,000的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段,其中H链N端侧的约一半和整个L链通过二硫键结合在一起。

[0097] 本公开的Fab可以通过用木瓜蛋白酶处理本公开的特异性识别人TIGIT并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体来生产。此外,可以通过将编码所述抗体的Fab的DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达Fab来生产所述Fab。

[0098] F(ab')₂是通过用酶胃蛋白酶消化IgG铰链区中两个二硫键的下方部分而获得的分子量为约100,000并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个Fab区的抗体片段。

[0099] 本公开的F(ab')₂可以通过用胃蛋白酶处理本公开的特异性识别人TIGIT并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体来生产。此外,可以通过用硫醚键或二硫键连接下面描述的Fab'来生产所述F(ab')₂。

[0100] Fab'是通过切割上述F(ab')₂的铰链区的二硫键而获得的分子量为约50,000并具有抗原结合活性的抗体片段。本公开的Fab'可以通过用还原剂例如二硫苏糖醇处理本公开的特异性识别TIGIT并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的F(ab')₂来生产。

[0101] 此外,可以通过将编码抗体的Fab'片段的DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达Fab'来生产所述Fab'。

[0102] 术语“单链抗体”、“单链Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域(或区域;VH)和抗体轻链可变结构域(或区域;VL)的分子。此类scFv分子可具有一般结构:NH₂-VL-接头-VH-COOH或NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成,例如使用1-4个重复的变体(Holliger等人(1993),Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448)。可用于本公开的其他接头由Alfthan等人(1995),Protein Eng.8:725-731,Choi等人(2001),Eur.J.Immunol.31:94-106,Hu等人(1996),Cancer Res.56:3055-3061,Kipriyanov等人(1999),J.Mol.Biol.293:41-56和Roovers等人(2001),Cancer Immunol.描述。

[0103] 本公开的scFv可以通过以下步骤来生产:获得本公开的特异性识别人TIGIT并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的编码cDNA,构建编码scFv的DNA,将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中,然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达scFv。

[0104] 双抗体是其中scFv被二聚体化的抗体片段,是具有二价抗原结合活性的抗体片段。在二价抗原结合活性中,两个抗原可以是相同或不同的。

[0105] 本公开的双抗体可以通过以下步骤来生产:获得本公开的特异性识别人TIGIT并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的编码cDNA,构建编码scFv的DNA以使肽接头的氨基酸序列长度为8个残基或更少,将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中,然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达双抗体。

[0106] dsFv是通过将其中每个VH和VL中的一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代的多肽经由半胱氨酸残基之间的二硫键相连而获得的。可以按照已知方法(Protein Engineering,7,697(1994))基于抗体的三维结构预测来选择被半胱氨酸残基取代的氨基酸残基。

[0107] 本公开的dsFv可以通过以下步骤来生产:获得本公开的特异性识别人TIGIT并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的编码cDNA,构建编码dsFv的DNA,将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中,然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达dsFv。

[0108] 包含CDR的肽是通过包含VH或VL的CDR中的一个或多个区域而构成的。包含多个CDR的肽可以被直接相连或经由适合的肽接头相连。

[0109] 本公开的包含CDR的肽可以通过以下步骤来生产:构建本公开的特异性识别人TIGIT并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的CDR的编码DNA,将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中,然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达所述肽。也可以通过化学合成方法例如Fmoc方法或tBoc方法来生产所述包含CDR的肽。

[0110] 本文中使用的术语“抗体框架”,是指可变结构域VL或VH的一部分,其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。从本质上讲,其是不具有CDR的可变结构域。

[0111] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位(例如,TIGIT分子上的特定部位)。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。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,GEMorris,Ed.(1996)。

[0112] 术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常,抗体以大约小于 10^{-8} M,例如大约小于 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或更小的亲和力(KD)结合。

[0113] 术语“KD”或“Kd”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常,本公开的抗体以小于大约 10^{-7} M,例如小于大约 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或更小的解离平衡常数(KD)结合TIGIT,例如,如使用表面等离子体共振(SPR)技术在BIACORE仪中测定的。

[0114] 当术语“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和

抗体)的情况中时,意指在抗原结合蛋白之间竞争,其通过以下测定法来测定:在所述测定法中,待检测的抗原结合蛋白(例如抗体或其免疫学功能片段)防止或抑制(例如降低)参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原(例如TIGIT抗原或其片段)的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争,这些测定例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如Stahli等,1983,Methods in Enzymology 9:242-253);固相直接生物素-亲和素EIA(参见例如Kirkland等,1986,J. Immunol. 137:3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见例如Harlow和Lane,1988,Antibodies, A Laboratory Manual (抗体,实验室手册),Cold Spring Harbor Press);用I-125标记物的固相直接标记RIA(参见例如Morel等,1988,Molec. Immunol. 25:7-15);固相直接生物素-亲和素EIA(参见例如Cheung,等,1990,Virology 176:546-552);和直接标记的RIA(Moldenhauer等,1990,Scand. J. Immunol. 32:77-82)。通常所述测定法涉及使用能与带有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白结合的纯化抗原(所述抗原在固态表面或细胞表面)。在待测抗原结合蛋白存在下,测量结合于固态表面或细胞的标记的量,来测量竞争性抑制。通常,待测抗原结合蛋白是过量存在的。由竞争性测定(竞争抗原结合蛋白)鉴定的抗原结合蛋白包括:结合与参考抗原结合蛋白同一表位的抗原结合蛋白;和结合充分接近参考抗原结合蛋白的结合表位的邻近表位的抗原结合蛋白,所述两个表位在空间上互相妨碍发生结合。在本文实施例中提供关于用于测定竞争性结合的方法的其它详细资料。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时,其将抑制(例如降低)至少40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或75%或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下,结合被抑制至少80-85%、85-90%、90-95%、95-97%或97%或更多。

[0115] 本文中使用的术语“核酸分子”是指DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时,核酸是“有效连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

[0116] 术语“载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中,载体是“质粒”,其是指可将另外的DNA区段连接至其中的环状双链DNA环。在另一个实施方案中,载体是病毒载体,其中可将另外的DNA区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组,从而随宿主基因组一起复制(例如,非附加型哺乳动物载体)。

[0117] 现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法,如冷泉港的抗体实验技术指南,5-8章和15章。例如,鼠可以用人TIGIT或其片段免疫,所得到的抗体能被复性、纯化,并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或多个人源FR区。人FR种系序列可以通过比对IMGT人类抗体可变区种系基因数据库和MOE软件,从ImMunoGeneTics(IMGT)的网站<http://imgt.cines.fr>得到,或者从免疫球蛋白杂志,2001 ISBN 012441351上获得。

[0118] 术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微

生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科 (enterobacteriaceae) 的成员,例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或沙门氏菌 (*Salmonella*) 的菌株;芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 例如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*);肺炎球菌 (*Pneumococcus*);链球菌 (*Streptococcus*) 和流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括CHO (中国仓鼠卵巢细胞系) 和NS0细胞。

[0119] 本公开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GS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。作为一种更推荐的现有技术,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端位点。通过表达与人TIGIT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。比如,用含调整过的缓冲液的A或G Sepharose FF柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用pH梯度法洗脱结合的抗体,用SDS-PAGE检测抗体片段,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°C,或者冻干。

[0120] “给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“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。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断应用。

[0121] “治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂,例如包含本公开的任一种结合化合物的组合物,所述患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,在受治疗患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有测量的程度。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,例如患者的疾病状态、年龄和体重,以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法,可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解每个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患者中应当减轻目标疾病症状。

[0122] “保守修饰”或“保守置换或取代”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))。另外,结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。

[0123] “有效量”包含足以改善或预防医学疾病的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化：例如，待治疗的病症、患者的总体健康情况、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。

[0124] “外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。“内源性”指根据情况在细胞、生物或人体内产生的物质。

[0125] “同源性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个DNA分子的每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。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100$ 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的10个位置有6个匹配或同源，那么两个序列为60%同源；如果两个序列中的100个位置有95个匹配或同源，那么两个序列为95%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。

[0126] 本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括后代。因此，单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物，而不考虑转移数目。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在DNA含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意旨不同名称的情况下，其由上下文清楚可见。

[0127] 本文使用的“聚合酶链式反应”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA和/或DNA如在例如美国专利号4,683,195中所述扩增的程序或技术。一般来说，需要获得来自目标区域末端或之外的序列信息，使得可以设计寡核苷酸引物；这些引物在序列方面与待扩增模板的对应链相同或相似。2个引物的5'末端核苷酸可以与待扩增材料的末端一致。PCR可用于扩增特定的RNA序列、来自总基因组DNA的特定DNA序列和由总细胞RNA转录的cDNA、噬菌体或质粒序列等。一般参见Mullis等(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich编辑, (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的PCR被视为用于扩增核酸测试样品的核酸聚合酶反应法的一个实例，但不是唯一的实例，所述方法包括使用作为引物的已知核酸和核酸聚合酶，以扩增或产生核酸的特定部分。

[0128] “任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。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。

[0129] “药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。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。

[0130] 此外，本公开包括用于治疗与TIGIT相关的疾病的药剂，所述药剂包含本公开的单克隆抗体或其抗体片段作为活性成分。

[0131] 对与TIGIT相关的疾病没有限制，只要它是与TIGIT相关的疾病即可，例如利用本公开的分子诱导的治疗反应可通过结合人类TIGIT然后阻遏或抑制T细胞功能障碍性病症，优选是恶性肿瘤、癌症或感染性病症，优选在靶向免疫治疗检查点的免疫治疗药物的临床

试验中观察到的有临床应答的肿瘤或癌症类型,最优选CD155阳性的肿瘤、癌症或感染性疾病。

[0132] 此外,本公开涉及用于免疫检测或测定TIGIT的方法、用于免疫检测或测定TIGIT的试剂、用于免疫检测或测定表达TIGIT的细胞的方法和用于诊断与TIGIT相关的疾病的诊断剂,其包含本公开的特异性识别TIGIT并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体或抗体片段作为活性成分。

[0133] 在本公开中,用于检测或测定TIGIT的量的方法可以是任何已知方法。例如,它包括免疫检测或测定方法。

[0134] 免疫检测或测定方法是使用标记的抗原或抗体检测或测定抗体量或抗原量的方法。免疫检测或测定方法的实例包括放射性物质标记的免疫抗体方法(RIA)、酶免疫测定法(EIA或ELISA)、荧光免疫测定法(FIA)、发光免疫测定法、蛋白质免疫印迹法、物理化学方法等。

[0135] 上述与TIGIT相关的疾病可以通过用本公开的单克隆抗体或抗体片段检测或测定表达TIGIT的细胞来诊断。

[0136] 为了检测表达多肽的细胞,可以使用已知的免疫检测方法,并优选使用免疫沉淀法、荧光细胞染色法、免疫组织染色法等。此外,可以使用利用FMAT8100HTS系统(Applied Biosystem)的荧光抗体染色法等。

[0137] 在本公开中,对用于检测或测定TIGIT的活体样品没有特别限制,只要它具有包含表达TIGIT的细胞的可能性即可,例如组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便、组织液或培养液。

[0138] 根据所需的诊断方法,含有本公开的单克隆抗体或其抗体片段的诊断剂还可以含有用于执行抗原-抗体反应的试剂或用于检测反应的试剂。用于执行抗原-抗体反应的试剂包括缓冲剂、盐等。用于检测的试剂包括通常用于免疫检测或测定方法的试剂,例如识别所述单克隆抗体、其抗体片段或其结合物的标记的第二抗体和与所述标记对应的底物等。

[0139] 本公开实施例提供的TIGIT单克隆抗体或抗原结合片段对TIGIT具有很高的特异性、以及与TIGIT的高亲和力,其中人源化抗体的免疫原性大大降低,同时完全保留了鼠源抗体的特异性,较高的亲和力和优异的体内活性。

[0140] 本公开实施例提供的TIGIT单克隆抗体或抗原结合片段具有良好的大鼠上的代谢动力学特性,显示出很长的半衰期,很高的生物利用度。

[0141] 本公开实施例提供的TIGIT人源化抗体分子具有良好的长期稳定性,无明显异常化学修饰,高浓度下无明显聚集,有较高的纯度和热稳定性。

[0142] 本公开实施例提供的TIGIT单克隆抗体或抗原结合片段具有良好的增强NK细胞和T细胞活性的效果。

具体实施方式

[0143] 实施例与测试例

[0144] 以下结合实施例进一步描述本公开,但这些实施例并非限制着本公开的范围。本公开实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,如冷泉港的抗体技术实验手册,分子克隆手册;或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂,

为市场购买的常规试剂。

[0145] 实施例1、TIGIT抗原抗体的制备

[0146] 1.1蛋白设计及表达

[0147] 以人TIGIT蛋白 (Uniprot号:Q495A1) 作为本公开TIGIT的模板,设计本公开涉及的抗原及检测用蛋白的氨基酸序列,可选的在TIGIT蛋白基础上融合不同的标签,分别克隆到pHr载体上(自产)或pXC-17.4载体上(LONZA)上,在293细胞瞬转表达或CHO细胞稳定表达纯化,获得编码本公开抗原及检测用蛋白。以下TIGIT抗原未特殊说明的均指人TIGIT。

[0148] TIGIT胞外区与小鼠IgG2aFc段的融合蛋白:TIGIT-mFc,用于免疫和检测

MEFGLSWLFLVAILKGVQCMMMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQ
VNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCI
YHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGP
SVFIFPPKIKDVLMI^{*SLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW*}FVNNVEVHTAQ^{*TQTHRE*}EDY
[0149] *NSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL*PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP
*PEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDG*SYFMYS
*KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK**

SEQ ID NO: 1

[0150] 注释:划横线部分为信号肽,斜体部分为mFc。

[0151] TIGIT胞外区与人IgG1 Fc段的融合蛋白:TIGIT-Fc,用于检测

MEFGLSWLFLVAILKGVQCMMMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQ
VNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCI
YHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPS
[0152] *VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE*
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
*KLIVDKSRWQQGNV^{*FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**}*

[0153]

SEQ ID NO: 2

[0154] 注释:划横线部分为信号肽,斜体部分为Fc。

[0155] 全长TIGIT:用于构建TIGIT过表达细胞株,用于检测

MRWCLLLIWAQGLRQAPLASGMMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQV
TQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYF
CIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPLLGAMAATLVVICTAVIVVVA
[0156] *LTRKKKALRIHSVEGDLRRKSAGQEEWSPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEORGED*
CAELHDYFNVLSYRSLGNCSFFTETG

SEQ ID NO: 3

[0157] 信号肽(单下划线)+胞外区+跨膜区(双下划线)+胞内区(斜体部分)

[0158] cynoTIGIT胞外区与小鼠IgG2aFc段的融合蛋白:cynoTIGIT-mFc,用于检测

MEFGLSWLFLVAILKGVQCMMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSTMAQVT
 QVNWEQHDHSLLAIRNAELGWHIYPAFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTMNDTGEYF
 CTYHTYPDGTGRIFLEVLESSVAEHSARFQIPEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLG
 [0159] *GPSVFIFPPKIKDVL*MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHR
 EDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYV
 LPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYF
 MYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*

SEQ ID NO: 4

[0160] 注释:划横线部分为信号肽,斜体部分为mFc。

[0161] 1.2TIGIT相关重组蛋白的纯化,以及杂交瘤抗体、重组抗体的纯化

[0162] (1) 杂交瘤上清分离纯化/ProteinG亲和层析:

[0163] 对于小鼠杂交瘤上清纯化首选ProteinG进行亲和层析,将培养所得杂交瘤离心取上清,根据上清体积加入10-15%体积的1M Tris-HCl (pH8.0-8.5) 调节上清pH。ProteinG柱利用6M盐酸胍洗3-5倍柱体积,然后利用纯水清洗3-5倍柱体积;利用如1×PBS (pH7.4) 缓冲体系作为平衡缓冲液对层析柱平衡3-5倍柱体积;细胞上清利用低流速上样结合,控制流速使保留时间约1min或更长时间;利用1×PBS (pH7.4) 洗涤层析柱3-5倍柱体积至紫外吸收回落至基线;利用0.1M醋酸/醋酸钠 (pH3.0) 缓冲液进行样品洗脱,根据紫外检测收集洗脱峰,洗脱产物利用1M Tris-HCl (pH8.0) 快速调节pH至5-6暂存。对于洗脱产物可以利用本领域技术人员熟知的方法进行溶液置换,如利用超滤管进行超滤浓缩及溶液置换至所需的缓冲体系,或者利用分子排阻如G-25脱盐替换成所需的缓冲体系,或者利用如Superdex 200等高分辨率分子排阻柱去除洗脱产物中的聚体成分以提高样品纯度。

[0164] (2) Protein A亲和层析提取带Fc标签的融合蛋白或者抗体:

[0165] 首先将表达Fc融合蛋白或者抗体的细胞培养上清进行高速离心收取上清。ProteinA亲和柱利用6M盐酸胍洗3-5倍柱体积,然后利用纯水清洗3-5倍柱体积。利用如1×PBS (pH7.4) 缓冲体系作为平衡缓冲液对层析柱平衡3-5倍柱体积。细胞上清利用低流速上样结合,控制流速使保留时间约1min或更长时间,结合完毕后利用1×PBS (pH7.4) 洗涤层析柱3-5倍柱体积至紫外吸收回落至基线。利用0.1M醋酸/醋酸钠 (pH3.0-3.5) 缓冲液进行样品洗脱,根据紫外检测收集洗脱峰,洗脱产物利用1M Tris-HCl (pH8.0) 快速调节pH至5-6暂存。对于洗脱产物可以利用本领域技术人员熟知的方法进行溶液置换,如利用超滤管进行超滤浓缩及溶液置换至所需的缓冲体系,或者利用分子排阻如G-25脱盐替换成所需的缓冲体系,或者利用如Superdex 200等高分辨率分子排阻柱去除洗脱产物中的聚体成分以提高样品纯度。

[0166] 实施例2、抗人TIGIT杂交瘤单克隆抗体的制备

[0167] 2.1免疫

[0168] 抗人TIGIT单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用SJL白小鼠,雌性,6-8周龄(北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001)。饲养环境:SPF级。小鼠购进后,实验室环境饲养1周,12/12小时光/暗周期调节,温度20-25℃;湿度40-60%。将已适应环境的小鼠按以下方案免疫。免疫抗原为带mFc的人TIGIT胞外区(SEQ ID

NO:1)。

[0169] 免疫方案:用TiterMax®Gold Adjuvant (Sigma Cat No.T2684) 与ThermoImject® Alum (Thermo Cat No.77161) 佐剂交叉免疫。抗原与佐剂 (TiterMax®Gold Adjuvant) 比例为1:1, 抗原与佐剂 (Thermo Imject® Alum) 比例为3:1, 50µg/只/次 (首次免疫), 25µg/只/次 (加强免疫)。抗原乳化后进行接种, 时间为第0、14、28、42、56天。第0天腹膜内 (IP) 注射50µg/只的乳化后抗原。第14天皮下 (sc) 多点 (一般背部6-8点) 注射25µg/只。第28, 42天根据背部结块和腹部肿胀情况, 选择背部或腹膜内注射抗原。于第21, 35, 49, 63天取血, 用ELISA方法确定小鼠血清中的抗体滴度。在第4-5次免疫以后, 选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前3天加强免疫, 腹膜内 (IP) 注射50µg/只的生理盐水配制的抗原溶液。

[0170] 2.2脾细胞融合

[0171] 采用优化的PEG介导的融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞Sp2/0细胞 (ATCC® CRL-8287™) 进行融合得到杂交瘤细胞。融合好的杂交瘤细胞以 $0.5-1 \times 10^6$ /ml的密度用完全培养基 (含20%FBS、1×HAT、1×OPI的DMEM培养基) 重悬, 100µl/孔种于96孔板中, 37°C, 5%CO₂孵育3-4天后, 补充HAT完全培养基100µl/孔, 继续培养3-4天至形成针尖般克隆。去除上清, 加入200µl/well的HT完全培养基 (含20%FBS、1×HT和1×OPI的RPMI-1640培养基), 37°C, 5%CO₂培养3天后进行ELISA检测。

[0172] 2.3杂交瘤细胞筛选

[0173] 根据杂交瘤细胞生长密度, 用结合ELISA方法进行杂交瘤培养上清检测。并将结合ELISA检测的阳性孔细胞上清进行细胞结合实验和细胞阻断实验。结合和阻断均为阳性的孔细胞及时进行扩增冻存保种和二到三次亚克隆直至获得单细胞克隆。

[0174] 每次亚克隆细胞也均需进行TIGIT结合ELISA、HTRF阻断实验、细胞结合实验和细胞阻断实验检测。通过以上实验筛选得到杂交瘤克隆, 用无血清细胞培养法进一步制备抗体, 按纯化实例纯化抗体, 供在检测例中使用。

[0175] 2.4杂交瘤阳性克隆序列测定

[0176] 从阳性杂交瘤中克隆序列过程如下。收集对数生长期杂交瘤细胞, 用Trizol (Invitrogen, CatNo.15596-018) 按照试剂盒说明书步骤提取RNA, 用PrimeScript™ Reverse Transcriptase试剂盒反转录 (Takara, Cat No.2680A)。将反转录得到的cDNA采用小鼠Ig-Primer Set (Novagen, TB326 Rev.B 0503) 进行PCR扩增后测序。从得到的DNA序列获得所筛选到的阳性克隆m17对应的抗体可变区氨基酸序列如下所示:

[0177] m1707-HCVR

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFIFSDYHMYWVRQTPEKRLEWVAYISK
GGISTYYPD TVKGRFTISRDN AKHTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARQSSYDFAM

[0178] DYWGRGTSVTVSS

SEQ ID NO: 5

[0179] m1707-LCVR

- [0180] DIVMTQSHKFMSTSVGVRVSITCKASQDVGTSVAWYQQKPGQSPKLLIYWASA
RHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO: 6
- [0181] m1708-HCVR
QVQLQQPGAELVKPGSSVKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQGPGRGLEWIGRI
- [0182] DPDSTGSKYNEKFKTKASLTVDTVSGTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREGAYGY
YFDYWGQGTTTLTVSS
SEQ ID NO: 7
- [0183] m1708-LCVR
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQGKSPQLLVYNARTL
- [0184] AESVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQYHSGSPLPFGAGTKLALK
SEQ ID NO: 8
- [0185] m1709-HCVR
EVQLQQSGPVLVKPGPSVKISCKASGFTFTDYMHVWKQSLGKSLEWIGLVYP
- [0186] YNDNTGYNRKFKGKATLTVDTSSSTAYIELNSLTSEDSAVYYCARGGPSNWNYP
DYWGQGTTTLTVSS
SEQ ID NO: 9
- [0187] m1709-LCVR
DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITCKASQNVVTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNR
- [0188] YTGVPDRFTGSGSGTDFTLTINNVSQSEDLADYFCQQYTLYPLTFGAGTKLELK
SEQ ID NO: 10
- [0189] m1710-HCVR
QVQLQQPGAELVKFGASVKLSCKASGYTFTNYMHVWKQRPGRGLEWIGRID
- [0190] PTSGATKYNDNFKFKGKATLTVDKPSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREGGFGYYF
DYWGQGTTTLTVSS
SEQ ID NO: 11
- [0191] m1710-LCVR
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRSENIFTYLAWYQQKQGKSPQLLVYNAKTF
- [0192] EGVPSRFSGSGSGTQFSLKISSLQPEDFGIYYCQHGYGIPLPFGAGTKLELK
SEQ ID NO: 12
- [0193] m1711-HCVR
QVQLQQSGTELVRPGTSVKMSCKASGYTFTNYWIGWAKQRPGHGLEWIGDIYP
- [0194] GGAYTNYNEKFKDKATLTADKSSSTAYMQFSSLTSEDSAIYYCTRGDYYDSSGR
AMDYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO: 13
- [0195] m1711-LCVR

[0196] DIVMSQSPSSLAVSVGEKVSMSCKSSQSLLYSRNQMNYLAWYQQKPGQSPKLLI
 YWTSTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPYTFGGGT
 KLEIK

SEQ ID NO: 14

[0197] 其中各抗体轻重链中CDR序列如表1所示。

[0198] 表1各重链及轻链CDR区序列

抗体	重链		轻链	
[0199] m1707	HCDR1	DYHMY SEQ ID NO: 15	LCDR1	KASQDVGTSVA SEQ ID NO: 18
	HCDR2	YISKGGISTYYPDTVKG SEQ ID NO: 16	LCDR2	WASARHT SEQ ID NO: 19
	HCDR3	QSSYDFAMDY	LCDR3	QQYSSYPLT

[0200]

		SEQ ID NO: 17		SEQ ID NO: 20
m1708	HCDR1	NYWMH SEQ ID NO: 21	LCDR1	RASENIYSYLA SEQ ID NO: 24
	HCDR2	RIDPDSTGSKYNEKFKT SEQ ID NO: 22	LCDR2	NARTLAE SEQ ID NO: 25
	HCDR3	EGAYGYFDY SEQ ID NO: 23	LCDR3	QYHSGSPLP SEQ ID NO: 26
m1709	HCDR1	DYYMH SEQ ID NO: 27	LCDR1	KASQNVVTAVA SEQ ID NO: 30
	HCDR2	LVYPYNDNTGYNRKFKG SEQ ID NO: 28	LCDR2	SASNRYT SEQ ID NO: 31
	HCDR3	GGPSNWNFYFDY SEQ ID NO: 29	LCDR3	QQYTLYPLT SEQ ID NO: 32
m1710	HCDR1	NYVMH SEQ ID NO: 33	LCDR1	RTSENIPTYLA SEQ ID NO: 36
	HCDR2	RIDPTSGATKYNDNFKG SEQ ID NO: 34	LCDR2	NAKTFAE SEQ ID NO: 37
	HCDR3	EGGFGYFDY SEQ ID NO: 35	LCDR3	QHGYGIPLP SEQ ID NO: 38
m1711	HCDR1	NYWIG SEQ ID NO: 39	LCDR1	KSSQSLLYSRNQMN YLA SEQ ID NO: 42
	HCDR2	DIYPPGAYTNYNEKFKD SEQ ID NO: 40	LCDR2	WTSTRES SEQ ID NO: 43
	HCDR3	GDYYDSSGRAMDY SEQ ID NO: 41	LCDR3	QQYYSYPYT SEQ ID NO: 44

[0201] 实施例3、鼠源抗人TIGIT抗体的人源化

[0202] 通过比对IMGT人类抗体重轻链可变区种系基因数据库和MOE软件,分别挑选与鼠源抗体同源性高的重链和轻链可变区种系基因作为模板,将鼠源抗体的CDR分别移植到相应的人源模板中,形成次序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的可变区序列。根据需要,将骨架序列中关键氨基酸回复突变为鼠源抗体对应的氨基酸,以保证原有的亲和力,即得到人源化抗TIGIT单克隆抗体。其中CDR区氨基酸残基的确定由Kabat编号系统确定并注释。

[0203] 上述鼠源抗体的轻重链可变区与人源抗体的轻重链恒定区连接后形成嵌合抗体,m1707抗体对应的嵌合抗体命名为ch1707,其他抗体类推。

[0204] 3.1杂交瘤克隆m1707的人源化

[0205] (1)m1707人源化构架选择

[0206] 鼠源抗体m1707的人源化轻链模板为IGKV1-39*02和hjk2.1,人源化重链模板为IGHV3-7*01和hjh2,经人源化后得到人源化抗体h1707,人源化可变区序列如下:

[0207] h1707 VH-CDR graft
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDYHMYWVRQAPGKGLEWVAYISKG
 [0208] *GISTYYPDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQSSYDFAMDYW*
GRGTLVTVSS

SEQ ID NO: 45

[0209] h1707VL-CDR graft
DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVGTSVAWYQOKPGKAPKLLIYWASARH
 [0210] *TGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK*

SEQ ID NO: 46

[0211] 注：顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为FR序列，下划线为CDR序列。

[0212] (2) h1707回复突变设计如下表：

h1707-VL		h1707-VH	
h1707-L1	Grafted	h1707-H1	Grafted
[0213] h1707-L2	S60D, T85D	h1707-H2	N84S, S85R
h1707-L3	S60D, T85D, A43S		
h1707-L4	S60D, T85D, A43S, S63T		

[0214] 注：如S60D表示依照氨基酸序列自然顺序编号，将60位S突变回D。Grafted代表鼠抗体CDR植入人种系FR区序列。

[0215] (3) h1707人源化序列组合如下表：

	h1707-H1	h1707-H2
[0216] h1707-L1	h1707-01	h1707-02
h1707-L2	h1707-03	h1707-04
h1707-L3	h1707-05	h1707-06
[0217] h1707-L4	h1707-07	h1707-08

[0218] 注：该表表示各种突变组合所得的序列。如h1707-04表示，在人源化的抗体h1707-04上有轻链L2、重链H2的四个回复突变。其它类推。

[0219] (4) h1707人源化具体序列如下：

[0220] >h1707-L1 (同h1707 VL-CDR graft)

- [0221] DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWASARH
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK
 SEQ ID NO: 46
- [0222] >h1707-L2
DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWASARH
- [0223] TGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK
 SEQ ID NO: 47
- [0224] >h1707-L3
DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKSPKLLIYWASARH
- [0225] TGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK
 SEQ ID NO: 48
- [0226] >h1707-L4
DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKSPKLLIYWASARH
- [0227] TGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK
 SEQ ID NO: 49
- [0228] >h1707-H1 (同h1707 VH-CDR graft)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYHMYWVRQAPGKGLEWVA YISKG
- [0229] GISTYYPD TVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYC ARQSSYDFAMDYW
GRGTLVTVSS
 SEQ ID NO: 45
- [0230] >h1707-H2
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYHMYWVRQAPGKGLEWVA YISKG
- [0231] GISTYYPD TVKGRFTISRDN AKNSLYLQMSRLRAEDTAVYYC ARQSSYDFAMDYW
GRGTLVTVSS
 SEQ ID NO: 50
- [0232] 3.2杂交瘤克隆m1708的人源化
- [0233] (1)m1708人源化构架选择
- [0234] 鼠源抗体m1708的人源化轻链模板为IGKV1-39*01和hjk4.1,人源化重链模板为IGHV1-46*01和hjh4.1,经人源化后得到人源化抗体h1708,人源化可变区序列如下:
- [0235] h1708VH-CDR graft
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP
- [0236] DSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGAYGYYFDY
WGQGTLVTVSS
 SEQ ID NO: 51
- [0237] h1708VL-CDR graft
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNARTLAE
- [0238] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIK
 SEQ ID NO: 52

[0239] 注：顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为FR序列，下划线为CDR序列。

[0240] (2) h1708回复突变设计如下表：

h1708-VL		h1708-VH	
h1708-L1	Grafted	h1708-H1	Grafted
h1708-L2	A43S	h1708-H2	R72V
		h1708-H3	M48I, R72V, V79A

[0242] 注：如A43S表示依照氨基酸序列自然顺序编号，将43位A突变回S。Grafted代表鼠抗体CDR植入人种系FR区序列。

[0243] (3) h1708人源化序列组合如下表：

	h1708-H1	h1708-H2	h1708-H3
h1708-L1	h1708-01	h1708-02	h1708-03
h1708-L2	h1708-04	h1708-05	h1708-06

[0245] 注：该表表示各种突变组合所得的序列。如h1708-05表示，在人源化的抗体h1708-05上有轻链L2、重链H2的两个回复突变。其它类推。

[0246] (4) h1708人源化具体序列如下：

[0247] >h1708-L1 (同h1708 VL-CDR graft)

*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC*RASENIYSYLA*WYQQKPGKAPKLLIYNARTLAE*

[0248] *GVPSRFSGSGSGTDFLT*TISSLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 52

[0249] >h1708-L2

*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC*RASENIYSYLA*WYQQKPGKSPKLLIYNARTLAE*

[0250] *GVPSRFSGSGSGTDFLT*TISSLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 53

[0251] >h1708-H1 (同h1708 VH-CDR graft)

*EVQLVQSGAEVKKPGASVKV*SCKASGYFTNYWMH*WVRQAPGQGLEWMGRIDP*

[0252] *DSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYME*SSLRSEDTAVYYCAREGAYGYYFDY

WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 51

[0253] >h1708-H2

*EVQLVQSGAEVKKPGASVKV*SCKASGYFTNYWMH*WVRQAPGQGLEWMGRIDP*

[0254] *DSTGSKYNEKFKTRVTM*TVDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGAYGYYFDY

WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 54

[0255] >h1708-H3

[0256] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPD
STGSKYNEKFKTRVTMTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGAYGYYFDYW
 GQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 55

[0257] 3.3杂交瘤克隆m1709的人源化

[0258] (1) m1709人源化构架选择

[0259] 鼠源抗体m1709的人源化轻链模板为IGKV1-39*01和hjk4.1,人源化重链模板为IGHV1-46*01和hjh4.1,经人源化后得到人源化抗体h1709,人源化可变区序列如下:

[0260] h1709VH-CDR graft
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGLVYP
YNDNTGYNRKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGGSPSNWNYF
 DYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 56

[0262] h1709VL-CDR graft

[0263] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVVTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASNRY
TGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYTLYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 57

[0264] 注:顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,序列中斜体为FR序列,下划线为CDR序列。

[0265] (2) h1709回复突变设计如下表:

h1709-VL		h1709-VH	
h1709-L1	Grafted	h1709-H1	Grafted
h1709-L2	S60D	h1709-H2	R72V, S84N
h1709-L3	A43S, S60D, Y87F	h1709-H3	R72V, V79A, S84N
h1709-L4	Q3V, A43S, S60D, Y87F	h1709-H4	Y27F, M48I, R72V, V79A, S84N

[0267] 注:如S60D表示依照氨基酸序列自然顺序编号,将60位S突变回A.Grafted代表鼠抗体CDR植入人种系FR区序列。

[0268] (3) h1709人源化序列组合如下表:

	h1709-H1	h1709-H2	h1709-H3	h1709-H4
h1709-L1	h1709-01	h1709-02	h1709-03	h1709-04
h1709-L2	h1709-05	h1709-06	h1709-07	h1709-08
h1709-L3	h1709-09	h1709-10	h1709-11	h1709-12
h1709-L4	h1709-13	h1709-14	h1709-15	h1709-16

[0270] 注：该表表示各种突变组合所得的序列。如h1709-06表示，在人源化的抗体h1709-06上有轻链L2、重链H2的三个回复突变。其它类推。

[0271] (4) h1709人源化具体序列如下：

[0272] >h1709-L1 (同h1709 VL-CDR graft)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVVTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASNRY

[0273] TGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYTLYPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO: 57

[0274] >h1709-L2

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVVTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASNRY

[0275] TGVDPDRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYTLYPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO: 58

[0276] >h1709L3

[0277] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVVTAVAWYQQKPKGKSPKLLIYSASNRY

TGVDPDRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYFCQQYTLYPLTFGGGKVEIK

[0278]

SEQ ID NO: 59

[0279] >h1709-L4

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVVTAVAWYQQKPKGKSPKLLIYSASNRYT

[0280] GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYFCQQYTLYPLTFGGGKVEIK

SEQ ID NO: 60

[0281] >h1709.H1 (同h1709 VH-CDR graft)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMHWRQAPGQGLEWMGLVYP

YNDNTGYNRKFKGRVTMTRDTSSTVYMEISSLRSEDVAVYYCARGGSPSNWNYF

[0282]

DYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 56

[0283] >h1709-H2

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMHWRQAPGQGLEWMGLVYP

YNDNTGYNRKFKGRVTMTVDTSSTVYMEISSLRSEDVAVYYCARGGSPSNWNYF

[0284]

DYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 61

[0285] >h1709-H3

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMHWRQAPGQGLEWMGLVYP

YNDNTGYNRKFKGRVTMTVDTSSTAYMEISSLRSEDVAVYYCARGGSPSNWNYF

[0286]

DYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 62

[0287] >h1709-H4

[0288] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWIGLVYPY
NDNTGYNRKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELNSLRSEDTAVYYCARGGSPSNWNYFD
YWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 63

[0289] 3.4杂交瘤克隆m1710的人源化

[0290] (1) m1710人源化构架选择

[0291] 鼠源抗体m1710的人源化轻链模板为IGKV1-39*01和hjk4.1,人源化重链模板为IGHV1-46*01和hjh4.1,经人源化后得到人源化抗体h1710,人源化可变区序列如下:

[0292] h1710VH-CDR graft

[0293] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPT
SGATKYNDNFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGGFGYYFDYW
GQGTTVTVSS

[0294]

SEQ ID NO: 64

[0295] h1710VL-CDR graft

[0296] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIFTYLAWYQQKPKAPKLLIYNAKTFAE
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGIPLPFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 65

[0297] 注:顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,序列中斜体为FR序列,下划线为CDR序列。

[0298] (2) h1710回复突变设计如下表:

h1710-VL		h1710-VH	
h1710-L1	Grafted	h1710-H1	Grafted
h1710-L2	A43S, I48V	h1710-H2	R72V, T74K
[0299]		h1710-H3	R72V, T74K, M70L, V79A
		h1710-H4	R72V, T74K, M48I, V68A, M70L, V79A
		h1710-H5	R38K, R67K, R72V, T74K, M48I, V68A, M70L, V79A

[0300] 注:如A43S表示依照氨基酸序列自然顺序编号,将43位A突变回S.Grafted代表鼠抗体CDR植入人种系FR区序列。

[0301] (3) h1710人源化序列组合如下表:

[0302]		h1710-H1	h1710-H2	h1710-H3	h1710-H4	h1710-H5
	h1710-L1	h1710-01	h1710-02	h1710-03	h1710-04	h1710-05
	h1710-L2	h1710-06	h1710-07	h1710-08	h1710-09	h1710-10

[0303] 注：该表表示各种突变组合所得的序列。如h1710-07表示，在人源化的抗体h1710-07上有轻链L2、重链H2的四个回复突变。其它类推。

[0304] (4) h1710人源化具体序列如下：

[0305] >h1710-L1 (同h1710 VL-CDR graft)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRTSENIFTYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTFAE

[0306] GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHHYGIPLPFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 65

[0307] >h1710-L2

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRTSENIFTYLAWYQQKPGKSPKLLVYNAKTFAE

[0308] GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHHYGIPLPFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 66

[0309] >h1710-H1 (同h1710 VH-CDR graft)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPT

[0310] SGATKYNDNFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGGFGYYFDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 64

[0311] >h1710-H2

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPT

[0312] SGATKYNDNFKGRVTMTVDKSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGGFGYYFDY
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 67

[0313] >h1710-H3

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPT

[0314] SGATKYNDNFKGRVTLTVDKSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCAREGGFGYYFDY
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 68

[0315] >h1710-H4

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPTS

[0316] GATKYNDNFKGRATLTVDKSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCAREGGFGYYFDY
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 69

[0317] >h1710-H5

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMHWVKQAPGQGLEWIGRIDPTS

[0318] GATKYNDNFKGKATLTVDKSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCAREGGFGYYFDY
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 70

[0319] 3.5杂交瘤克隆m1711的人源化

[0320] (1) m1711人源化构架选择

[0321] 鼠源抗体m1711的人源化轻链模板为IGKV4-1*01和hjk4.1,人源化重链模板为IGHV1-69*02和hjh4.1,经人源化后得到人源化抗体h1711,人源化可变区序列如下:

[0322] h1711VH-CDR graft

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYWIGWVRQAPGQGLEWMGDIYPG

[0323]

GAYTNYNEKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDYDSSGRAM
DYWGQGLVTV

[0324]

SEQ ID NO: 71

[0325] h1711VL-CDR graft

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQMNLYLAWYQQKPGQPPKLLIY

[0326]

WTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGTKV
EIK

SEQ ID NO: 72

[0327] 注:顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,序列中斜体为FR序列,下划线为CDR序列。

[0328] (2) h1711回复突变设计如下表:

h1711-VL		h1711-VH	
h1711-L1	Grafted	h1711-H1	Grafted
h1711-L2	P49S	h1711-H2	M48I,
h1711-L3	N22S, P49S	h1711-H3	G27Y, M48I,
		h1711-H4	G27Y, M48I, L83F, A97T

[0330] 注:如P49S表示依照氨基酸序列自然顺序编号,将49位P突变回S.Grafted代表鼠抗体CDR植入人种系FR区序列。

[0331] (3) h1711人源化序列组合如下表:

[0332]

	h1711-H1	h1711-H2	h1711-H3	h1711-H4
h1711-L1	h1711-01	h1711-02	h1711-03	h1711-04
h1711-L2	h1711-05	h1711-06	h1711-07	h1711-08
h1711-L3	h1711-09	h1711-10	h1711-11	h1711-12

[0333] 注:该表表示各种突变组合所得的序列。如h1711-06表示,在人源化的抗体h1711-06上由轻链L2、重链H2组合成的回复突变抗体。其它类推。

[0334] (4) h1711人源化具体序列如下:

[0335] >h1711-L1(同h1711 VL-CDR graft)

[0336] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQMNYLAWYQQKPGQPPLLIY
WTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGTKV
 EIK

SEQ ID NO: 72

[0337] >h1711-L2

[0338] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQMNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGTKV
 EIK

SEQ ID NO: 73

[0339] >h1711-L3

[0340] DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSRNQMNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGTKV
 EIK

SEQ ID NO: 74

[0341] >h1711-H1 (同h1711 VH-CDR graft)

[0342] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSNYWIGWVRQAPGQGLEWMGDIYPG
GAYTNYNEKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDYDSSGRAM
DYWGQGLVTVSS
 SS

SEQ ID NO: 71

[0343] >h1711-H2

[0344] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPPG
AYTNYNEKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDYDSSGRAMD
YWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 75

[0345] >h1711-H3

[0346] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPPG
AYTNYNEKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDYDSSGRAMD
YWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 76

[0347] >h1711-H4

[0348] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPPG
AYTNYNEKFKDRVTITADKSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCTRGDYDSSGRAMD
YWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 77

[0349] 以上各重链可变区可与如SEQ ID NO:78所示的重链恒定区序列(IgG4,带S228P突变)重组表达得到最终的完整重链序列。上述各轻链可变区与如SEQ ID NO:79所示的轻链

恒定区序列(kappa链)重组表达得到最终的完整重轻链序列。上述重轻链可变区也可与其他本领域内公知的IgG家族的重轻链恒定区或突变的IgG家族恒定区重组,形成完整的抗体重轻链序列。示例性的恒定区序列如下所示:

[0350] IgG4重链恒定区,带S228P突变:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVD

[0351]

GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKLSLSLGK

SEQ ID NO: 78

[0352] 轻链恒定区:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

[0353]

C

SEQ ID NO: 79

[0354] 采用所属领域的常规技术手段,将以上轻链、重链与本公开技术方案可选的人源化恒定区,及经过功能性修饰的人源化恒定区,重组并表达。

[0355] 阳性对照抗体为22G2-H3Q,VH和VL序列来自US20160176963A1(分别为US20160176963A1的SEQ ID NO:8和9),分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示的重链恒定区和轻链恒定区形成完整全长抗体。22G2-H3Q的VH和VL具体序列如下:

[0356] 22G2-H3Q VH

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGIYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIY
YSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDYYVSGNY

[0357]

YNVDYYFFGVDVWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 80

[0358] 22G2-H3Q VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR

[0359]

ATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLFTFGPGTKVDIK

SEQ ID NO: 81

[0360] 以下用生化测试方法验证本公开的结合活性

[0361] 测试例1:TIGIT抗体结合人TIGIT蛋白的ELISA实验

[0362] 抗TIGIT抗体的结合力通过抗体与人TIGIT蛋白的ELISA实验来检测。用带Fc或mFc标签的TIGIT融合蛋白通过与包被在酶标板中的抗Fc或mFc抗体结合从而固定到96孔酶标板中,抗体加入后信号的强弱被用于判断抗体和TIGIT的结合活性,阳性对照分子为10A7hIgG4(其中10A7IgG4的轻重链可变区序列来自US20130251720A1的SEQ ID NO:21和22,与上述轻重链可变区连接形成全长抗体的轻重链恒定区分别为本申请的SEQ ID NO:79

和78),阴性对照为与TIGIT不结合的人IgG4抗体(hIgG4),具体实验方法如下:

[0363] 用pH7.4的PBS(上海源培,Cat No.B320)缓冲液将羊抗人Fc抗体(Jackson Immuno Research,Cat No.109-005-008)或羊抗鼠Fc抗体(Sigma,Cat No.M3534-1ML)稀释至2 μ g/ml浓度,以50 μ l/孔的体积加入96孔酶标板(Corning,Cat No.CLS3590-100EA)中,于37 $^{\circ}$ C孵育箱中放置2小时。弃去液体后,加入用PBS稀释的5%脱脂牛奶(BD skim milk,Cat No.232100)封闭液200 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育3小时或4 $^{\circ}$ C放置过夜(16-18小时)进行封闭。封闭结束后,弃去封闭液,并用PBST缓冲液(pH7.4PBS含0.05% tween-20)洗板5次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液(pH7.4PBS含1%BSA)稀释至0.5 μ g/ml的TIGIT-Fc融合蛋白(内部生产)或TIGIT-mFc融合蛋白(内部生产),置37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育1小时或4 $^{\circ}$ C放置过夜。孵育结束后,弃去酶标板中的反应液,用PBST洗板5次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体(杂交瘤纯化抗体或人源化抗体),放于37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育1小时。孵育结束后用PBST洗板5次,加入50 μ l/孔用样品稀释液稀释的HRP标记的羊抗鼠二抗(Jackson Immuno Research,Cat No.115-035-003)或羊抗人二抗(Jackson Immuno Research,Cat No.109-035-003),37 $^{\circ}$ C孵育1小时。用PBST洗板5次后,加入50 μ l/孔TMB显色底物(KPL,Cat No.52-00-03),于室温孵育5-10min,加入50 μ l/孔1M H₂SO₄终止反应,用酶标仪(Thermo scientific Multiskan,MK3)在波长450nm处读取吸收值,用GraphPad Prism 5分析数据,计算TIGIT抗体对人TIGIT蛋白的结合EC₅₀值。结果见图1。

[0364] 测试例2:TIGIT抗体结合食蟹猴TIGIT蛋白的ELISA实验

[0365] 抗TIGIT抗体的猴交叉结合力通过抗体与食蟹猴(cynomolgus)TIGIT蛋白的ELISA实验来检测。用带Fc或mFc标签的食蟹猴TIGIT融合蛋白通过与包被在酶标板中的抗Fc或mFc抗体结合从而固定到96孔酶标板中,抗体加入后信号的强弱被用于判断抗体和食蟹猴TIGIT的结合活性,具体实验方法如下:

[0366] 用pH7.4的PBS(上海源培,Cat No.B320)缓冲液将羊抗人Fc抗体(Jackson Immuno Research,Cat No.109-005-008)或羊抗鼠Fc抗体(Sigma,Cat No.M3534-1ML)稀释至2 μ g/ml浓度,以50 μ l/孔的体积加入96孔酶标板(Corning,Cat No.CLS3590-100EA)中,于37 $^{\circ}$ C孵育箱中放置2小时。弃去液体后,加入用PBS稀释的5%脱脂牛奶(BD skim milk,Cat No.232100)封闭液200 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育3小时或4 $^{\circ}$ C放置过夜(16-18小时)进行封闭。封闭结束后,弃去封闭液,并用PBST缓冲液(pH7.4 PBS含0.05% tween-20)洗板5次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液(pH7.4 PBS含1%BSA)稀释至0.5 μ g/ml的食蟹猴TIGIT-Fc融合蛋白(内部生产)或食蟹猴TIGIT-mFc融合蛋白(内部生产),置37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育1小时或4 $^{\circ}$ C放置过夜。孵育结束后,弃去酶标板中的反应液,用PBST洗板5次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体(杂交瘤纯化抗体或人源化抗体),放于37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育1小时。孵育结束后用PBST洗板5次,加入50 μ l/孔用样品稀释液稀释的HRP标记的羊抗鼠二抗(Jackson Immuno Research,Cat No.115-035-003)或羊抗人二抗(Jackson Immuno Research,Cat No.109-035-003),37 $^{\circ}$ C孵育1小时。用PBST洗板5次后,加入50 μ l/孔TMB显色底物(KPL,Cat No.52-00-03),于室温孵育5-10min,加入50 μ l/孔1M H₂SO₄终止反应,用酶标仪(Thermo scientific Multiskan MK3)在波长450nm处读取吸收值,用GraphPad Prism 5分析数据,计算TIGIT抗体对猴TIGIT的结合EC₅₀值。结果见图2。

[0367] 测试例3:TIGIT抗体与人TIGIT过表达CHO细胞的结合实验

[0368] 抗TIGIT抗体的结合力通过抗体与过表达TIGIT蛋白的CHO细胞的结合实验来检测。通过电转染的方法将TIGIT全长质粒转进CHO细胞中加压筛选两周后,检测TIGIT的表达量。将过表达细胞固定于96孔板底后,抗体加入后信号的强弱被用于判断抗体和TIGIT过表达CHO细胞的结合活性,具体实验方法如下:

[0369] 将细胞以 5×10^5 /ml密度,100 μ l/孔接种于96孔板中过夜培养。弃上清,用PBS洗三遍后,加入100 μ l/孔的细胞免疫固定液(Beyotime,Cat No.P0098)室温固定半小时,PBS洗四遍。弃去液体后,加入用PBS稀释的5%脱脂牛奶(BD skim milk,Cat No.232100)封闭液200 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育3小时进行封闭。封闭结束后,弃去封闭液,并用PBST缓冲液(pH7.4PBS含0.05% tween-20)洗板5次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体(杂交瘤纯化抗体或人源化抗体),放于37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育1小时。孵育结束后用PBST洗板5次,加入50 μ l/孔用样品稀释液稀释的HRP标记的羊抗鼠二抗(Jackson Immuno Research,Cat No.115-035-003)或羊抗人二抗(Jackson Immuno Research,Cat No.109-035-003),37 $^{\circ}$ C孵育1小时。用PBST洗板5次后,加入50 μ l/孔TMB显色底物(KPL,Cat No.52-00-03),于室温孵育5-15min,加入50 μ l/孔1M H₂SO₄终止反应,用酶标仪(Thermo scientific Multiskan MK3)在波长450nm处读取吸收值,用GraphPad Prism5分析数据,计算TIGIT抗体对TIGIT过表达CHO细胞的结合EC₅₀值。结果见图3及下表。

抗体	H1707	H1711	H1709	H1708	H1710	10A7-IgG4	hIgG4
	-02	-04	-10	-04	-01		
[0370] EC ₅₀ (nM)	0.08717	0.05868	0.05684	0.08480	0.07686	0.1090	>10000

[0371] 测试例4:TIGIT抗体与人PBMC的结合实验

[0372] 抗TIGIT抗体的结合力通过抗体与体外激活的人PBMC的结合实验来检测。通过超抗原金黄色葡萄球菌肠毒素B(SEB)刺激的方法使人PBMC活化,抗体加入后荧光信号的强弱被用于判断抗体和活化的人PBMC的结合活性,具体实验方法如下:

[0373] 新鲜血液利用Ficoll-Hypaque密度梯度离心(Stem Cell Technologies)得到PBMC,于RPMI 1640培养基中培养,该培养基中添加10%(v/v)FBS,同时加入超抗原金黄色葡萄球菌肠毒素B(SEB)500ng/ml,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培养4天。

[0374] 激活后的PBMC细胞以 5×10^6 /ml密度,100 μ l/孔接种于96孔圆底板(Corning,Cat No.32915001)中,离心机(Beckman Coulter,Allegra X-15R Centrifuge)1500rpm离心5分钟,弃上清;用200 μ l PBS重悬细胞,离心,弃上清,重复一遍。加入100 μ l/孔已用样品稀释液(pH7.4PBS含1%BSA)梯度稀释的待测抗体溶液重悬细胞,4 $^{\circ}$ C孵育1小时。孵育结束后,1500rpm离心5分钟,弃上清,用样品稀释液洗两遍细胞后,加入PE-山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch,109-115-098)稀释液100 μ l重悬细胞,4 $^{\circ}$ C孵育1小时。孵育结束后,1500rpm离心5分钟,弃上清,用样品稀释液洗两遍细胞,最后用200 μ l/孔样品稀释液重悬细胞,在流式细胞仪(BD FACS Canto II)上检测荧光信号强弱,用GraphPad Prism 5分析数据,计算TIGIT抗体对人PBMC细胞结合的EC₅₀值。结果见图4。

[0375] 测试例5:Biacore测定

[0376] 用Biacore,GE仪器测定待测人源化抗TIGIT抗体与人、猴TIGIT的亲合力。

[0377] 用Protein A生物传感芯片(Cat.#29127556,GE)亲和捕获或按照人抗捕获试剂盒

(Cat.#28-9538-28,GE)说明书中的方法将人抗捕获抗体共价偶联于生物传感芯片(Cat.#28-9538-28,GE)上,从而亲和捕获一定量的待测抗体,然后于芯片表面流经一系列浓度梯度下的人、猴TIGIT抗原,人源TIGIT可选自义翘神州生物公司(Cat.10917-H08-H,Sino.Biol),猴TIGIT由实施例1及实施例2表达纯化而得,利用Biacore仪器(Biacore T200,GE)实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。在每个循环解离完成后,用人抗捕获试剂盒里配置的再生溶液或pH1.5的甘氨酸-盐酸再生溶液(Cat.#BR-1003-54,GE)将生物芯片洗净再生。实验中用到的氨基偶联试剂盒购自GE公司(Cat.#BR-1000-50,GE),缓冲液为HBS-EP+10×缓冲溶液(Cat.#BR-1006-69,GE)用D.I.Water稀释至1×(pH 7.4)。

[0378] 实验得到的数据用BIAevaluation version 4.1,GE软件以(1:1)Langmuir模型进行拟合,得出亲和力数值,结果见表2-4。

[0379] 表2、待测分子与huTIGIT蛋白的反应亲和力

	固定相	固定化方式	流动相	结合常数 (1/Ms)	解离常数 (1/s)	亲和力 (M)
[0380]	22G2-H3Q	Protein A 捕获	huTIGIT	5.35E5	3.79E-4	7.09E-10
	h1707-02			1.74E6	1.88E-4	1.08E-10
	h1711-04			1.83E6	4.36E-4	2.38E-10
[0381]	h1709-10			2.49E6	2.59E-4	1.04E-10
	h1708-04			1.75E6	1.83E-4	1.04E-10
	h1710-01			1.63E6	2.40E-4	1.47E-10

[0382] 表3、待测分子与cynoTIGIT蛋白的反应亲和力

	固定相	固定化方式	流动相	结合常数 (1/Ms)	解离常数 (1/s)	亲和力 (M)
[0383]	22G2-H3Q	Fc 亲和捕获	cynoTIGIT-mFc	2.44E6	4.04E-4	1.66E-10
	h1711-04			2.46E6	3.17E-4	1.29E-10
	h1709-10			1.39E6	4.15E-4	3.00E-10
	h1708-04			1.24E6	3.52E-4	2.85E-10
	h1710-01			1.15E6	3.71E-4	3.22E-10

[0384] 表4、ch1711及其人源化抗体与TIGIT蛋白的反应亲和力

抗体	Biacore (TIGIT-His)			抗体	Biacore (TIGIT-His)		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
[0385] ch1711	1.83E6	4.55E-4	2.49E-10	h1711-07	1.51E6	7.32E-4	4.85E-10
h1711-01	1.40E6	2.09E-3	1.49E-9	h1711-08	2.13E6	4.41E-4	2.07E-10
h1711-02	1.38E6	1.71E-3	1.24E-9	h1711-09	1.55E6	1.85E-3	1.19E-9
h1711-03	1.30E6	7.23E-4	5.56E-10	h1711-10	1.47E6	1.52E-3	1.03E-9
h1711-04	2.10E6	4.42E-4	2.10E-10	h1711-11	1.72E6	8.52E-4	4.94E-10
h1711-05	1.52E6	1.86E-3	1.22E-9	h1711-12	2.10E6	4.31E-4	2.05E-10
h1711-06	1.46E6	1.52E-3	1.05E-9				

[0386] 测试例6:TIGIT抗体对TIGIT抗原与CD155蛋白结合的阻断试验

[0387] 抗TIGIT抗体的阻断能力通过抗体阻断TIGIT与CD155蛋白结合的HTRF实验来检测。用Pab Anti-Human IgG-Tb(Cisbio,Cat No.61HFCTAA)和Streptavidin-XL665(Cisbio,Cat No.610SAXLA)这对供体和受体与TIGIT-Fc和biotinylated CD155(R&D,Cat No.2530-CD-050/CF)结合,或者Pab Anti-mouse-IgG-XL665(Cisbio,Cat No.61PAMXLA)和Streptavidin-Tb(Cisbio,Cat No.610SATLA)与TIGIT-mFc和biotinylated CD155(R&D,Cat No.2530-CD-050/CF)结合,杂交瘤纯化抗体或人源化抗体加入后信号的强弱被用于判断抗体阻断TIGIT与CD155的活性,具体实验方法如下:

[0388] 将稀释液(pH7.4PBS含1%BSA)稀释的不同浓度待测抗体(杂交瘤纯化抗体或人源化抗体)10 μ l/孔加入384孔实验板(Corning,CatNo.3706),1000rpm离心1min后加入2.5 μ l/孔用样品稀释液稀释至2 μ g/ml的TIGIT-Fc或TIGIT-mFc,1000rpm离心1min后加入2.5 μ l/孔稀释至4 μ g/ml的biotin-CD155,1000rpm离心1min后室温预孵育10min,然后加入2.5 μ l/孔的样品稀释液稀释至3.2 μ g/ml的Pab Anti-Human IgG-Tb(Cisbio,Cat No.61HFCTAA)和2.5 μ l/孔的0.08 μ g/ml的Streptavidin-XL665(Cisbio,Cat No.610SAXLA),或者2.5 μ l/孔的样品稀释液稀释至3.2 μ g/ml的Pab Anti-mouse-IgG-XL665(Cisbio,Cat No.61PAMXLA)和2.5 μ l/孔的0.08 μ g/ml的Streptavidin-Tb(Cisbio,Cat No.610SATLA),室温放置1小时,用PHEARstar FS酶标仪(BMG LABTECH)检测665nm与620nm的发射光值,用GraphPad Prism 5分析数据,计算TIGIT抗体对人TIGIT与CD155蛋白的抑制活性。结果见图5A和图5B。

[0389] 测试例7:TIGIT抗体对TIGIT抗原与过表达CD155的CHO细胞结合的阻断实验

[0390] 抗TIGIT抗体的阻断能力通过抗体阻断TIGIT与过表达CD155的CHO细胞结合的ELISA实验来检测。通过电转染的方法将CD155全长质粒转染进CHO细胞中加压筛选两周后,检测CD155的表达量。将过表达细胞固定于96孔板底后,TIGIT与稀释好的不同浓度抗TIGIT抗体预孵育后加入孔板,加入二抗后通过信号的强弱被用于判断抗体阻断TIGIT与过表达CD155的CHO细胞结合的能力,具体实验方法如下:

[0391] CD155-CHO细胞以5 \times 10⁵/ml密度,100 μ l/孔接种于96孔板中过夜培养。弃上清,用PBS洗三遍后,加入100 μ l/孔细胞免疫固定液(Beyotime,Cat No.P0098)室温固定半小时,PBS洗四遍。弃去液体后,加入用PBS稀释的5%脱脂牛奶(BD skim milk,Cat No.232100)封闭液200 μ l/孔,37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育3小时进行封闭。封闭结束后,弃去封闭液,并用PBST缓冲液(pH7.4PBS含0.05% tween-20)洗板5次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液

(pH7.4PBS含1%BSA)稀释的已预混合孵育1小时的终浓度为0.2 μ g/ml的human TIGIT-hFc (内部生产)或human TIGIT-mFc (内部生产)与梯度浓度的待测抗体的抗原抗体混合液,置37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育1小时。孵育结束后,弃去酶标板中的反应液,用PBST洗板5次后,加入50 μ l/孔用样品稀释液稀释的HRP标记的羊抗人二抗(Jackson Immuno Research,Cat No.109-035-003)或羊抗鼠二抗(Jackson Immuno Research,Cat No.115-035-003),37 $^{\circ}$ C孵育1小时。用PBST洗板5次后,加入50 μ l/孔TMB显色底物(KPL,Cat No.52-00-03),于室温孵育5-15分钟,加入50 μ l/孔1M H₂S₀₄溶液终止反应,用酶标仪(Thermo scientific Multiskan, MK3)在波长450nm处读取吸收值,用GraphPad Prism 5分析数据,计算TIGIT抗体对抗原与过表达CD155的CHO细胞结合的阻断作用。结果见图6。

[0392] 测试例8:TIGIT抗体对CD155蛋白与过表达TIGIT的CHO细胞结合的阻断实验

[0393] 抗TIGIT抗体的阻断能力通过抗体阻断CD155与TIGIT过表达CHO细胞结合的FACS实验来检测。通过电转染的方法将TIGIT全长质粒转染进CHO细胞中加压筛选两周后,检测TIGIT的表达量。将过表达细胞与不同浓度的抗TIGIT抗体预孵育后,再加入荧光标记的CD155-Fc进行孵育,通过信号的强弱用于判断抗体阻断CD155与过表达TIGIT的CHO细胞结合的能力,具体实验方法如下:

[0394] 先将CD155-Fc(Sino Biological,Cat No.10109-H02H)标记CFTM633(Sigma Aldrich,Cat No.MX633S100)的荧光染料。将CD155-Fc用PBS溶解至浓度为0.5-1mg/ml,加入9倍样品体积的10 \times Mix-n-Stain Reaction Buffer,混匀;然后加入CFTM633荧光染料,避光室温孵育30分钟后,荧光标记完成。

[0395] TIGIT-CHO细胞以5 \times 10⁶/ml密度,100 μ l/孔接种于96孔圆底板(Corning,Cat No.32915001)中,离心机(Beckman Coulter,Allegra X-15R Centrifuge)1500rpm离心5分钟,弃上清;用200 μ l PBS重悬细胞,离心,弃上清,重复一遍。加入100 μ l/孔已用样品稀释液(pH7.4PBS含1%BSA)梯度稀释的待测抗体溶液重悬细胞,4 $^{\circ}$ C孵育1小时。孵育结束后,1500rpm离心5分钟,弃上清,用样品稀释液洗两遍细胞后,加入100 μ l 2 μ g/ml的CFTM633荧光标记的CD155-Fc溶液重悬细胞,4 $^{\circ}$ C孵育1小时。孵育结束后,1500rpm离心5分钟,弃上清,用样品稀释液洗两遍细胞,最后用200 μ l/孔样品稀释液重悬细胞,在流式细胞仪(BD FACS Canto II)上检测荧光信号强弱,用GraphPad Prism 5分析数据,计算TIGIT抗体对CD155与TIGIT-CHO细胞结合的阻断能力。结果见图7及下表。

抗体	H1707-02	H1711-04	H1709-10	H1708-04	H1710-01	10A7-IgG4	hIgG4
[0396] IC50 (nM)	0.4824	0.5698	0.4269	0.4992	0.4675	0.6783	>10000

[0397] 本测试例中h1707-02、h1708-04、h1709-10、h1710-01、h1711-04抗体均能够很好的阻断CD155与TIGIT过表达的CHO细胞的结合。

[0398] 测试例9:TIGIT抗体对TIGIT抗原与过表达CD112的CHO细胞结合的阻断实验

[0399] 抗TIGIT抗体的阻断能力通过抗体阻断TIGIT与CD112过表达CHO细胞结合的FACS实验来检测。通过电转染的方法将CD112全长质粒转染进CHO细胞中加压筛选两周后,检测CD112的表达量。将TIGIT-mFc蛋白与稀释好的不同浓度抗TIGIT抗体预孵育后加入CD112过表达的CHO细胞中进行孵育,加入PE label的抗体检测TIGIT信号的强弱被用于判断抗体阻

断TIGIT与过表达CD112的CHO细胞结合的能力,具体实验方法如下:

[0400] 1%BSA稀释人源化抗体样品,从20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 起始浓度两倍稀释九个浓度点,同时稀释TIGIT-mFc至2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,将抗原和不同浓度的抗体按1:1体积比混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵育30分钟;收集CD112-CHOs细胞,PBS洗涤一次,按 $0.5 \times 10^6/\text{test}$ 分配;用150 μl 的抗原抗体混合液重悬细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育60分钟,1%BSA洗涤3次;PE-山羊抗小鼠IgG (Biolegend,405307) 稀释液100 μl 重悬细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育40分钟,1%BSA洗涤3次,用200 μl 1%BSA重悬细胞,在流式细胞仪BD FACSCanto II上读取各样品MFI(平均荧光强度),GraphPad Prism 5分析数据,判断TIGIT抗体对抗原与CD112-CHO细胞结合的阻断作用。结果见图8。

[0401] 测试例10:TIGIT抗体在TIGIT过表达CHO细胞的结合内吞实验

[0402] 为了研究TIGIT抗体与细胞表面抗原结合后发生内吞的能力,用过表达全长TIGIT的CHO细胞进行TIGIT抗体的内吞能力的FACS实验。具体实验方法如下:

[0403] TIGIT-CHO细胞以 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 密度,100 μl /孔接种于96孔圆底板(Corning,Cat No.32915001)中,离心机(Beckman Coulter,Allegra X-15R Centrifuge)1500rpm离心5分钟,弃上清;用200 μl 1%BSA重悬细胞,离心,弃上清,重复一遍。1%BSA稀释人源化抗体样品至4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度,100 μl /孔加入细胞中重悬细胞,冰上孵育1小时。孵育结束后,1500rpm离心5分钟,弃上清,用1%BSA洗三遍细胞后,用10%FBS-DMEM/F-12培养基重悬细胞并将细胞分为两部分,一部分放到37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育1小时(内吞组,Internalization group),另一部分继续在冰上孵育1小时(结合亲和力组,Binding affinity group)。孵育结束后,用1%BSA洗一遍细胞后加入用1%BSA稀释的PE-anti-Fc抗体(Jackson,109-115-098)冰上孵育一小时后,1%BSA洗涤3次,用1%BSA重悬细胞,在流式细胞仪BD FACSCanto II上读取各样品MFI,按照如下计算公式计算抗体的内吞率。注:Black是不加抗TIGIT抗体孵育,只加用1%BSA稀释的PE-抗Fc抗体冰上孵育一小时后洗涤3次重悬读取MFI。结果见图9。

[0404] 内吞比率(Internalization Ratio) % = (结合亲和力组-内吞组) * 100 / (结合亲和力组-空白组)

[0405] 测试例11:自然杀伤细胞(NK)的细胞杀伤实验

[0406] 为了研究TIGIT抗体对NK细胞杀伤功能的影响,收集和纯化人外周血单核细胞(PBMC),提取自然杀伤细胞(NK),与人大肠癌细胞WiDr共培养4h,检测乳酸脱氢酶(LDH)的分泌水平。具体实验过程如下:

[0407] 人大肠癌细胞系WiDr于MEM培养基中培养,该培养基中添加10% (v/v) 胎牛血清(FBS),37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂条件下培养。新鲜血液利用Ficoll-Hypaque密度梯度离心(Stem Cell Technologies)得到PBMC,人原代NK细胞从新鲜分离的PBMC中提取(Miltenyi,CAT#130-092-657),于RPMI 1640培养基中培养,该培养基中添加10% (v/v) FBS,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂条件下培养。

[0408] 人原代NK细胞接种至6孔细胞培养板,细胞密度约为 $2 \times 10^6/\text{ml}$,加入100U/mL人IL-2过夜培养后,利用无酚红RPMI 1640培养基洗涤,重悬,并接种至96孔U底板中,细胞密度约为 $3 \times 10^5/\text{孔}$,同时加入梯度稀释的抗体样品(用PBS稀释)或等量的同型IgG作为空白对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂培养箱孵育1h后,靶标细胞WiDr以1:1比例与人原代NK细胞共培养,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂培养箱培养4h后,收集细胞培养上清。采用CytoTox96®Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega,CAT#G1780)说明书方法检测细胞培养上清内LDH分泌水平。

特异性细胞溶解的百分比以下式决定： $\% \text{溶解} = 100 \times (\text{ER} - \text{SR1} - \text{SR2}) / (\text{MR} - \text{SR1})$ ，其中ER、SR (1&2) 及MR分别代表实验、自发 (1为靶标细胞, 2为人原代NK细胞) 及最大LDH释放。自发释放系由单独培养于培养基中的靶标细胞或人原代NK细胞所释放的LDH，最大释放系利用裂解液裂解所有靶标细胞时所测定的LDH。结果如图10A或图10B以及下表所示，TIGIT人源化候选抗体h1707-02、h1708-04、h1710-01等抗体均能够不同程度增强人原代NK细胞对靶细胞的杀伤，并且有药物浓度剂量效应。

		h1707-02	h1708-04	22G2-H3Q
[0409]	IC50 (nM)	0.9	1.29	5.78

		h1710-01	22G2-H3Q
[0410]	IC50 (nM)	0.38	2.23

[0411] 测试例12: PBMC-T淋巴细胞激活实验

[0412] 为了研究TIGIT抗体对人原代T淋巴细胞功能的影响，收集和纯化人外周血单核细胞 (PBMC)，采用结核菌素 (TB) 体外刺激5天后，检测细胞因子IFN γ 分泌水平。具体实验过程如下：

[0413] 新鲜血液利用Ficoll-Hypaque密度梯度离心 (Stem Cell Technologies) 得到PBMC，于RPMI 1640培养基中培养，该培养基中添加10% (v/v) FBS，37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培养。

[0414] 新鲜分离纯化的PBMC以RPMI 1640培养基调整密度为 2×10^6 /ml，20mL细胞悬液中加入25 μ l结核菌素，37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱培养5天。第5天，在96孔细胞培养板中加入CD155 (重组CD155/PVR Protein, R&D, 2530-CD-050/CF)，每孔0.25 μ g，4 $^{\circ}$ C包被过夜。第6天，收集上述培养的细胞离心，用PBS洗一次，重悬至新鲜的RPMI 1640培养基中，调整密度为 1×10^6 /ml，接种至CD155包被的96孔细胞培养板，每孔90 μ l。同时加入梯度稀释的抗体样品 (用PBS稀释) 或等量的同型IgG作为空白对照，每孔10 μ l。细胞培养板置于37 $^{\circ}$ C，5%CO₂培养箱孵育3天。取出细胞培养板，离心 (4000rpm, 10min) 收集细胞培养上清，采用ELISA的方法 (人IFN- γ 检测试剂盒，欣博盛，EHC102g.96) 检测IFN- γ 的水平。具体操作参考试剂说明书。结果如图11所示，TIGIT人源化候选抗体h1708-04，h1710-01等抗体能够不同程度增强激活的原代T淋巴细胞分泌细胞因子IFN- γ ，并且有药物浓度剂量效应。

[0415] 测试例13: 人源化TIGIT抗体大鼠药代动力学评价

[0416] SD雄性大鼠，体重180-240g，购自西普尔-必凯实验动物有限公司。饲养期间自由摄取饲料和水，实验室环境适应性饲养不小于3天，12/12小时光/暗周期调节，温度16-26 $^{\circ}$ C，相对湿度40-70%。实验开始前一天，对SD大鼠进行编号，随机分组，每组3只。实验当天，五组大鼠分别静脉注射或皮下注射受试药物h1707-02、h1708-04、h1710-01、h1711-04和h1709-10，22G2-H3Q为阳性对照，给药剂量为3mg/kg；注射体积均为5ml/kg。

[0417] 静脉注射给药方式于给药前及给药后5min, 8h, 1d, 2d, 4d, 7d, 10d, 14d, 21d, 28d各时间点采血。皮下注射给药方式于给药前及给药后1h, 4h, 8h, 1d, 2d, 4d, 8d, 11d, 14d, 21d, 28d各时间点采血。每只动物取全血0.2ml，不加抗凝剂，取血后在4 $^{\circ}$ C放置30min，1000g离心15min，取上清置于EP管中，-80 $^{\circ}$ C保存。

[0418] 采用ELISA方法(见实施例3测试例1)检测血清中的抗体浓度,采用Winnolin软件计算受试药物的药动力学参数。所得部分主要药动力学结果见图12。

[0419] 经检测,SD大鼠静脉注射给予3mg/kg抗TIGIT抗体h1707-02,h1708-04,h1710-01,h1709-10,h1711-04后,在大鼠体内的暴露量相近;皮下给药生物利用度高,接近100%;各抗体的消除半衰期均较长,优于22G2-H3Q抗体。

[0420] 测试例14:利用UNIT检测人源化TIGIT抗体的热稳定性

[0421] 比较了不同的缓冲体系下的热稳定性情况,不同pH对应的示例性缓冲体系如10mM PBS (pH7.4),15mM His (pH6.0),10mM Acetate acid (pH5.2)。将样品置换到对应缓冲液中,控制样品浓度在50mg/ml左右,利用UNIT进行检测。检测时,用移液枪吸取9 μ l样品,加入仪器配置的样品槽中,注意不能有气泡,用夹套将样品槽加紧放入仪器中,设置参数运行:Start Temp 20 $^{\circ}$ C;Incubation 0s;Rate 0.3 $^{\circ}$ C/min;Plate Hold 5s;End Temp 95 $^{\circ}$ C。在几个测试体系中h1707-02,h1708-04,h1710-01,h1709-10,h1711-04等抗体均表现了良好的热稳定性。

[0422] 表5抗体热稳定性监测表

蛋白	缓冲液	Tagg ($^{\circ}$ C)	Tonset($^{\circ}$ C)	Tm1($^{\circ}$ C)	Tm2($^{\circ}$ C)
h1707-02	PBS (pH7.4)	69.0	61.0	70.49	
h1711-04	10mM 醋 酸缓冲液 (pH5.2)	74.3	54.3	69.7	80.7
h1709-10		74.5	59.6	69.4	
h1708-04		71.5	60.4	69.4	78.3
h1710-01		76.8	57.2	67.7	77.6

[0424] 测试例15、通过SEC-HPLC监测样品纯度考察一定浓度条件下周期稳定性

[0425] 示例性的条件比如将样品浓度控制在约50mg/ml,在10mM PBS (pH7.4),15mM His (pH6.0),10mM Acetate acid (pH5.2)等体系中比较不同抗体在-80 $^{\circ}$ C反复冻融5次及4 $^{\circ}$ C和40 $^{\circ}$ C保存28天的稳定性情况。利用Xbridge protein BEH SEC 200A(Waters)HPLC柱子检测抗体纯度,h1707-02,h1708-04,h1709-10,h1710-01,h1711-04等均表现了良好的稳定性,一个月40 $^{\circ}$ C加速SEC纯度无明显变化。

抗体	缓冲液	初始纯度	-80℃ 冻融五次	4℃ 28 天	40℃ 28 天
H1707-02	PBS 缓冲液(pH7.4)	98.16%	98.39%	97.82%	94.91%
H1711-04		98.00%			96.79%
H1709-10		97.20%			96.03%
H1708-04		98.68%	98.76%	98.70%	97.68%
H1710-01		98.73%		98.73%	97.96%
H1707-02	10mM 醋酸缓冲液(pH5.2)	99.37%	99.78%	99.34%	98.42%
H1711-04		98.00%			97.58%
H1709-10		97.29%			96.73%
H1708-04		98.61%	98.40%	98.71%	97.80%
H1710-01		98.77%		98.77%	98.63%
H1707-02	His 缓冲液(pH6.0)	99.73%	99.73%	99.61%	98.64%
H1711-04		98.31%			97.64%
H1709-10		97.89%			96.68%
H1708-04		98.95%	99.10%	99.09%	98.06%
H1710-01		98.93%		98.93%	98.79%

[0427] 测试例16、抗体的化学稳定性

[0428] 对h1707-02、h1708-04、h1709-10、h1710-01、h1711-04等抗体分子进行化学稳定性检测。

[0429] 取500μg待测抗体溶于500μl pH 7.4的PBS中,40℃水浴;分别于0、14、28天取样,用于酶解实验。将100μg不同时间点取样的样品溶于100μl 0.2M His-HCl,8M Gua-HCl,pH 6.0溶液中,加3μl 0.1g/mL DTT,50℃水浴1小时,后用0.02M His-HCl,pH 6.0的溶液超滤两次,加入3μL 0.25mg/mL的trypsin,37℃水浴酶解过夜。Agilent 6530 Q-TOF进行LC-MS检测分析,结果显示h1707-02、h1708-04、h1709-10、h1710-01、h1711-04在40度条件加速一个月均未发现明显的失水、氧化、脱酰胺等不稳定的变化,提示分子良好的化学稳定性。

[0430] 虽然为了清楚的理解,已经借助于附图和实例详细描述了上述发明,但是描述和实例不应当解释为限制本公开的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚结合。

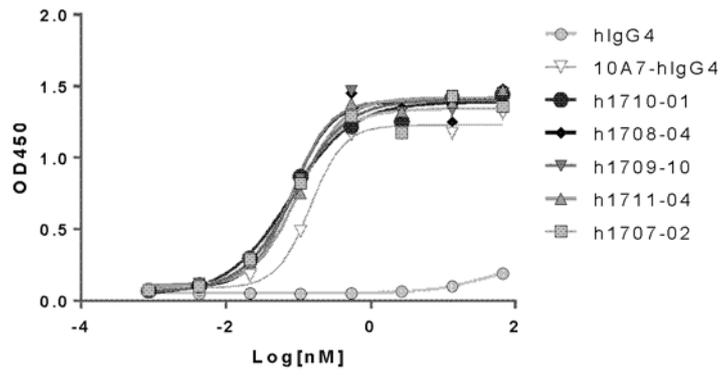


图1

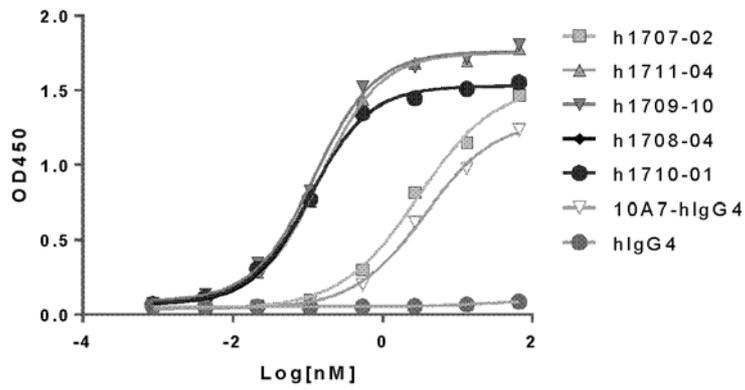


图2

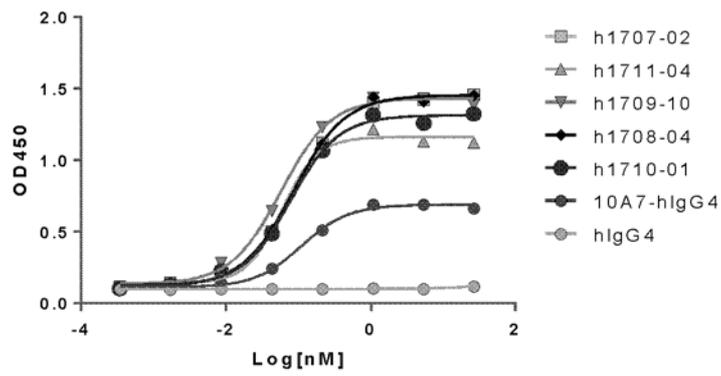


图3

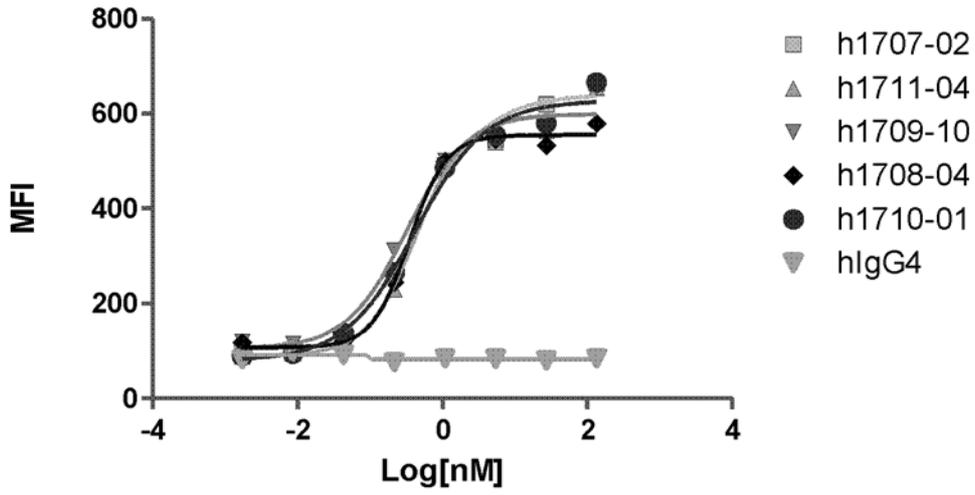


图4

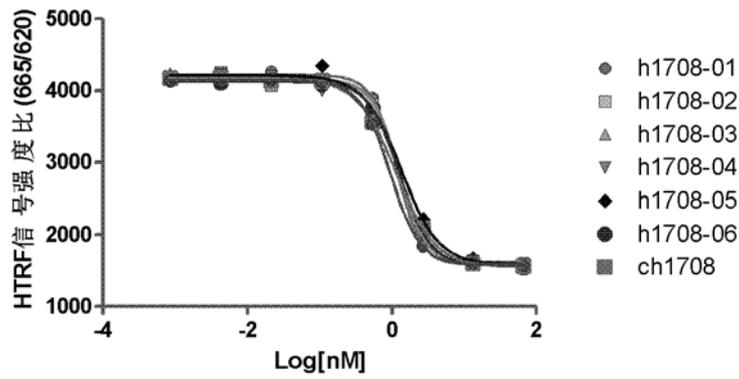


图5A

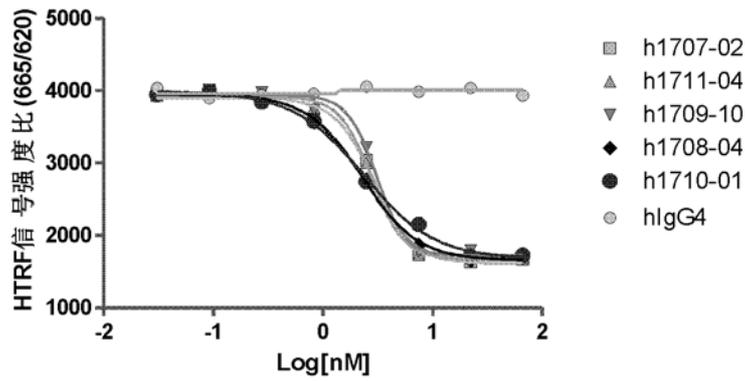


图5B

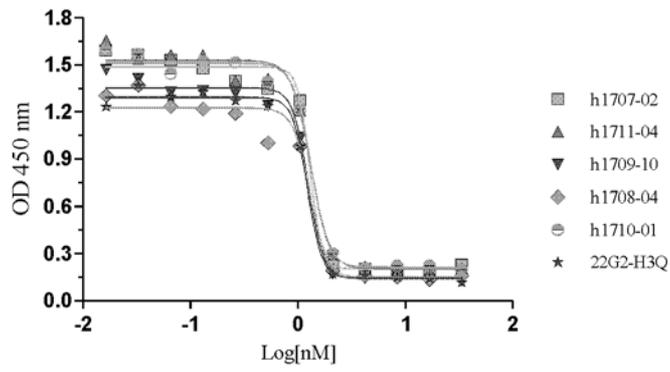


图6

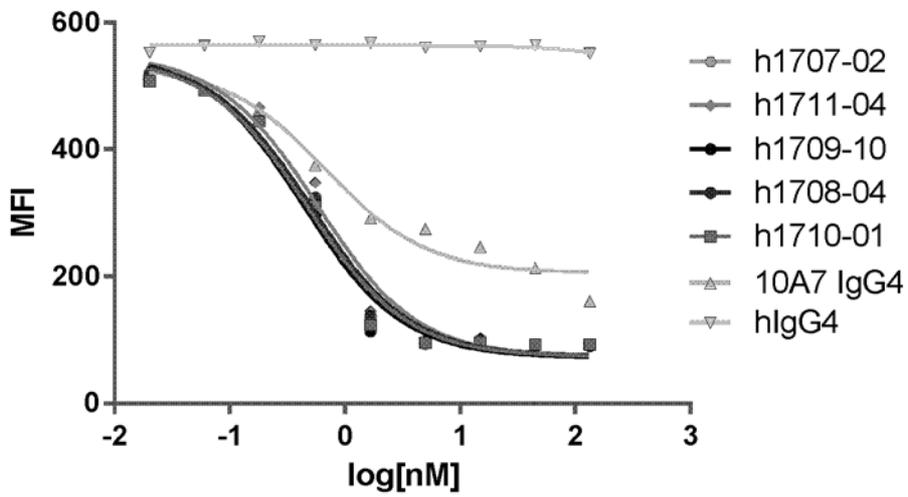


图7

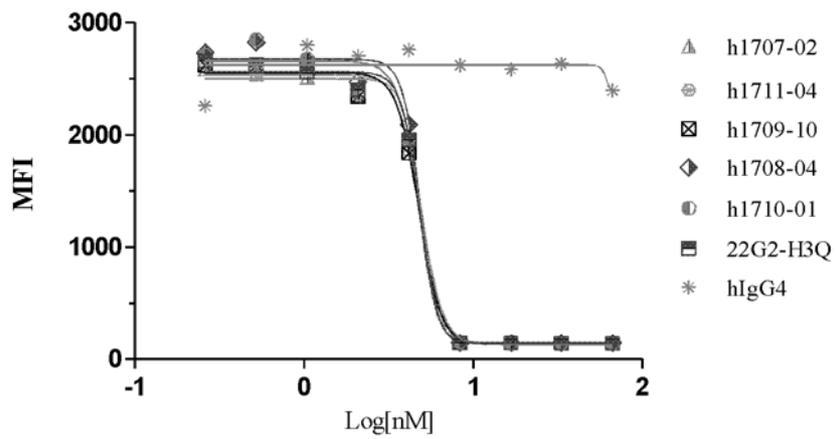


图8

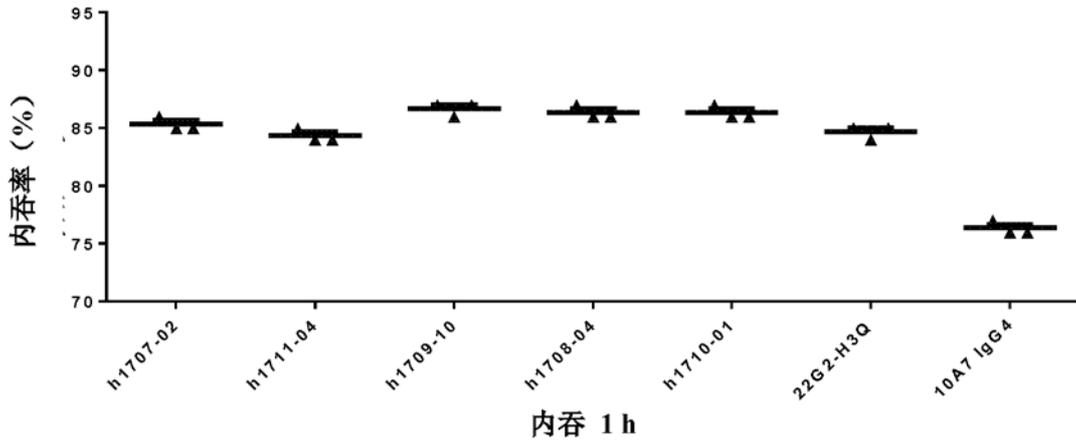


图9

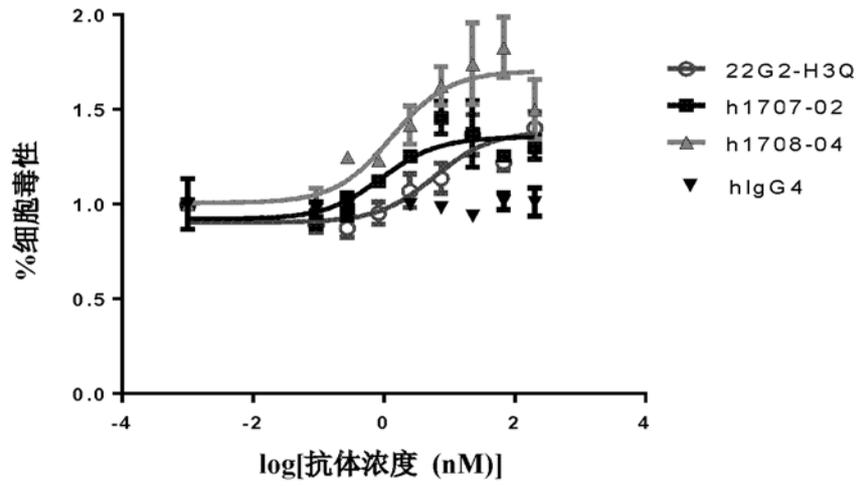


图10A

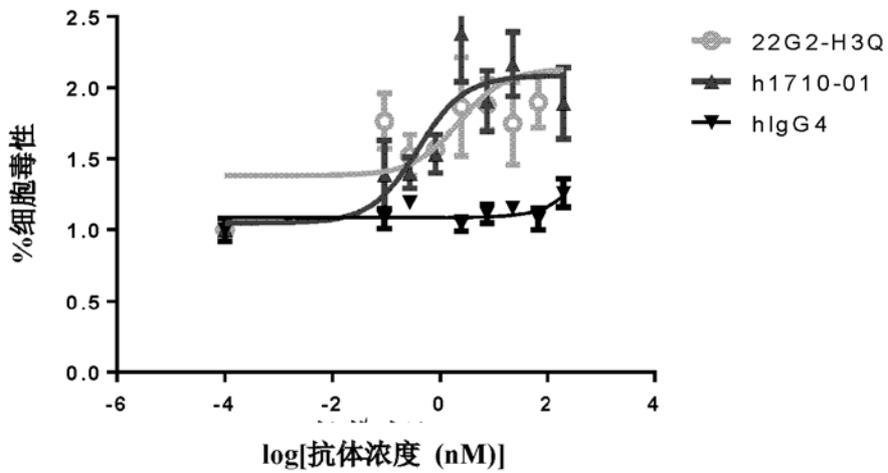


图10B

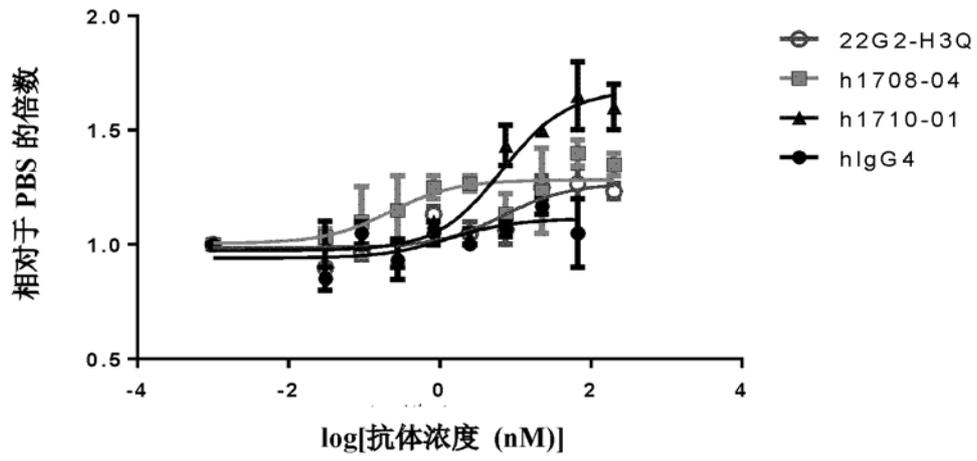


图11

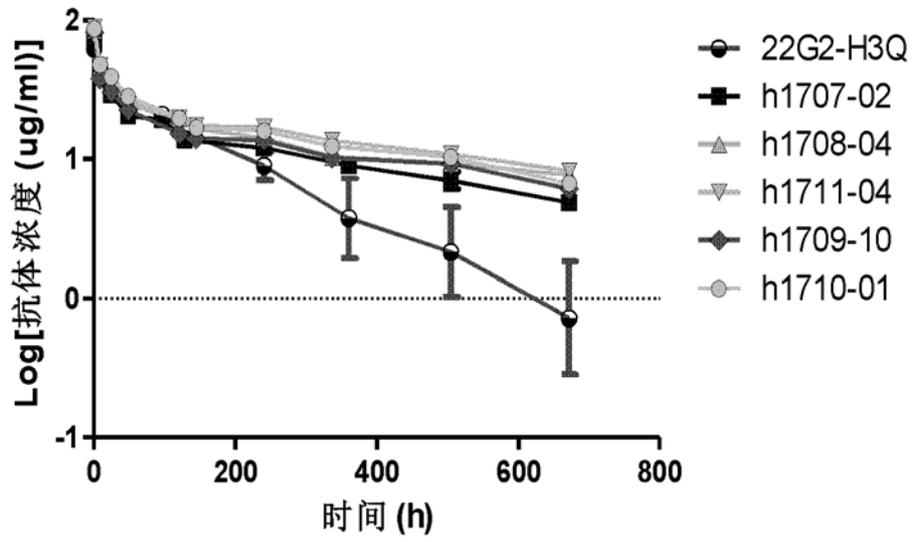


图12