



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116925222 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 24

(21) 申请号 202210343374.8

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.04.02

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

(72) 发明人 翟天航 戴爽 黄威峰 曾竣玮
约翰·布考斯基 凯文·舒茨
梅根·黑默莱恩

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

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书4页 说明书22页
序列表22页 附图11页

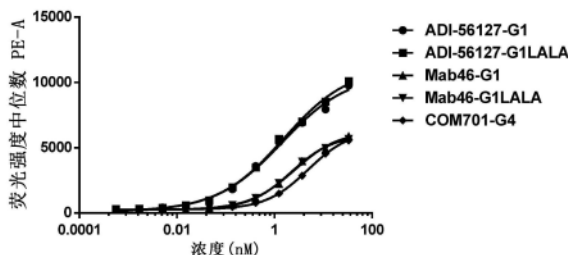
(54) 发明名称

抗PVRIG抗体、其药物组合物及用途

(57) 摘要

本发明属于生物医药领域,涉及一种抗PVRIG抗体。具体地,本发明涉及抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1至HCDR3,所述轻链可变区包含LCDR1至LCDR3,其中:所述抗体的重链可变区,HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示、HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示和HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示,并且所述抗体的轻链可变区,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示、LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示和LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示。本发明的抗体与PVRIG具有较高的亲和力,甚至与抗TIGIT单抗和/或抗PD-1抗体具有协同作用,具有良好的抗肿瘤应用前景。

激活人T细胞结合试验



1. 抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,

所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1至HCDR3,所述轻链可变区包含LCDR1至LCDR3,其中:

所述抗体的重链可变区,

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示、HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示和HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示,

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示、HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示和HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示、HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示和HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示,或者

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示、HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示和HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示;

并且

所述抗体的轻链可变区,

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示、LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示和LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示、LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示和LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示,

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示、LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示和LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示,或者

LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:30所示、LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:31所示和LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:32所示。

2. 根据权利要求1所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示;

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示;

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示;

或者

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:30所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:31所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:32所示。

3. 根据权利要求1至2中任一权利要求所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO: 7;

并且

所述轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8。

4. 根据权利要求1至3中任一权利要求所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示;

或者

重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

5. 根据权利要求1至4中任一权利要求所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体的重链恒定区为Ig gamma-1chain Cregion(例如NCBI ACCESSION:P01857)或Ig gamma-4chain Cregion(例如NCBIACCESSION:P01861.1);轻链恒定区为Ig kappa chain C region(例如NCBIACCESSION:P01834);

优选地,所述抗体的重链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35所示,所述抗体的轻链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:36所示。

6. 根据权利要求1至5中任一权利要求所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,按照EU编号系统,所述抗体的重链恒定区包含L234A突变和L235A突变。

7. 根据权利要求1至6中任一权利要求所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗PVRIG抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。

8. 根据权利要求1至7中任一权利要求所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中,所述的抗体包括非-CDR区,且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种,例如来自人抗体。

9. 根据权利要求1至8中任一权利要求所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体与CHO细胞表面过表达的人PVRIG蛋白的结合的EC₅₀小于3nM、小于2.9nM或小于2.8nM;优选地,所述EC₅₀通过流式细胞术检测法测得。

10. 分离的核酸分子,其编码权利要求1至9中任一权利要求所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段。

11. 一种重组载体,其包含权利要求10所述的分离的核酸分子。

12. 一种宿主细胞,其包含权利要求10所述的分离的核酸分子,或者权利要求11所述的重组载体。

13. 偶联物,其包括抗体以及偶联部分,其中,所述抗体为权利要求1至9中任一权利要求所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,所述偶联部分为可检测的标记;优选地,所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、有色物质或酶。

14. 试剂盒,其包括权利要求1至9中任一权利要求所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,或者包括权利要求13所述的偶联物;

优选地,所述试剂盒还包括第二抗体,其特异性识别所述抗体;任选地,所述第二抗体还包括可检测的标记,例如放射性同位素、荧光物质、有色物质或酶。

15. 一种药物组合物,其包含权利要求1至9中任一权利要求所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段或者权利要求13所述的偶联物;可选地,所述药物组合物还包括一种或多种药学上可接受的辅料。

16. 根据权利要求15所述的药物组合物,其还包含一种或多种抗TIGIT抗体;

优选地,所述药物组合物还包含一种或多种抗PD-1抗体或者一种或多种抗PD-L1抗体。

17. 根据权利要求15至16中任一权利要求所述的药物组合物,其中,

抗PVRIG抗体或其抗原结合片段与抗TIGIT抗体的摩尔比为(1:5) - (5:1);

和/或

抗PVRIG抗体或其抗原结合片段与抗PD-1抗体或者抗PD-L1抗体的摩尔比为(1:5) - (5:1)。

18. 根据权利要求16至17中任一权利要求所述的药物组合物,其中,所述的抗TIGIT抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1至HCDR3,所述轻链可变区包含LCDR1至LCDR3,其中:

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:44所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:45所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:46所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:47所示;

优选地,所述的抗TIGIT抗体,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:41所示。

19. 根据权利要求16至18中任一权利要求所述的药物组合物,其中,所述的抗PD-1抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1至HCDR3,所述轻链可变区包含LCDR1至LCDR3,其中:

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:51所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:52所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:53所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:54所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:55所示;

优选地,所述的抗PD-1抗体,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:48所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:49所示。

20. 一种组合产品,其包含独立包装的第一产品和第二产品,其中,

所述第一产品包含其包含权利要求1至9中任一权利要求所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段或者权利要求13所述的偶联物;

所述第二产品包含至少一种抗TIGIT抗体;

优选地,所述组合产品还包括第三产品,所述第三产品包含至少一种抗PD-1抗体或者至少一种抗PD-L1抗体;

优选地,所述第一产品、所述第二产品和第三产品还独立地包含一种或多种药学上可接受的辅料;

优选地,所述组合产品还包含产品说明书。

21. 根据权利要求20所述的组合产品,其中,

抗PVRIG抗体或其抗原结合片段与抗TIGIT抗体的摩尔比为(1:5) - (5:1);

和/或

抗PVRIG抗体或其抗原结合片段与抗PD-1抗体或者抗PD-L1抗体的摩尔比为(1:5) - (5:1)。

22. 根据权利要求20至21中任一权利要求所述的组合产品,其中,所述的抗TIGIT抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1至HCDR3,所述轻链可变区包含LCDR1至LCDR3,其中:

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:44所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:45所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:46所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:47所示;

优选地,所述的抗TIGIT抗体,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:41所示。

23. 根据权利要求20至22中任一权利要求所述的组合产品,其中,所述的抗PD-1抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1至HCDR3,所述轻链可变区包含LCDR1至LCDR3,其中:

HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:51所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:52所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:53所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:54所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:55所示;

优选地,所述的抗PD-1抗体,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:48所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:49所示。

24. 权利要求1至9中任一权利要求所述的抗体或其抗原结合片段或者权利要求13所述的偶联物在制备治疗或预防肿瘤的药物中的用途;

优选地,所述肿瘤选自结肠癌、黑色素瘤、肺癌、肾癌、子宫内膜癌、乳腺癌、皮肤癌、卵巢癌、胃癌、头颈癌、肝癌、脑瘤、尿路上皮癌、骨肿瘤、胆管癌、卵巢癌、直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B淋巴细胞瘤、浆细胞瘤、前列腺癌和睾丸癌中的一种或多种;

优选地,所述肺癌为非小细胞肺癌或小细胞肺癌。

抗PVRIG抗体、其药物组合物及用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及一种抗PVRIG抗体、其药物组合物及用途。

背景技术

[0002] 脊髓灰质炎病毒受体相关免疫球蛋白结构域 (poliovirus receptor related immunoglobulin domain-containing protein, PVRIG, 又称CD112R) 属于PVR家族成员,其胞外区具有一个IgV结构域,胞内区含有一个ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) 结构域,是一种表达在自然杀伤(NK)细胞和T细胞上的新型免疫抑制受体。

[0003] PVRL2 (poliovirus receptor-related 2, CD112, Nectin-2) 是一种粘附分子,参与细胞-细胞连接,并在多种癌症中过度表达。PVRL2目前被鉴定为PVRIG唯一的配体,可以高亲和力与PVRIG结合,抑制T和NK细胞免疫激活。PVRL2也是共激活受体DNAM-1 (DNAM-1, CD226) 的配体,并且与另一个抑制性受体—具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体 (TIGIT) 存在弱性结合。因此,与同一家族成员TIGIT发挥免疫抑制的作用机制类似,PVRIG也可以通过与CD226竞争性结合其配体PVRL2而阻断CD226传递的激活信号,来发挥免疫抑制的作用。

[0004] 在肺癌、肾癌、子宫内膜癌、乳腺癌、皮肤癌及其肿瘤微环境中,PVRIG或其配体PVRL2均高表达,且PVRIG在前列腺癌患者的NK细胞上也高表达 (Whelan S, et al. Cancer Immunol Res. 2019; 7 (2) : 257-268.)。此外,PVRIG与耗竭性CD8+T细胞标志TIGIT和PD-1分子呈共表达,提示了PVRIG的表达有着一定的肿瘤特异性,并且可能与肿瘤内的TIL的激活/耗竭状态有关 (Whelan S, et al. Cancer Immunol Res. 2019; 7 (2) : 257-268.)。WO2021180205A1报道了抗PVRIG抗体能够用于肺癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、胃癌、子宫内膜癌、头颈癌等的防治。

[0005] 在临床前小鼠肿瘤模型中的研究表明,PVRIG缺失或阻断可以恢复T/NK细胞活性,促进抗肿瘤免疫反应。从Pmel-1 TCR-CD112R-缺陷小鼠分离的CD8+T细胞表现出增强的脱颗粒和细胞因子分泌效应。与野生型小鼠中相比,CD112R缺陷小鼠中MC38肿瘤的生长减缓,CD8+TILs表现出增强的免疫效应和炎症/细胞毒性相关基因上调的转录组特征。文献同时报道,PVRIG抗体或PVRIG基因敲除小鼠与PD-L1抗体在MC38及CT26小鼠肿瘤模型中联用比PD-L1抗体单药具有更好的治疗效果 (Murter B, et al. Cancer Immunology Research, 2019.)。Feng Xu等人证明用抗体阻断PVRIG与CD112的相互作用可增强NK细胞对肿瘤细胞的细胞毒性,此外与TIGIT阻断单抗联用可进一步增强Trastuzumab介导的NK细胞对乳腺癌细胞的杀伤效果 (Xu F, et al. Cancer Immunology Immunotherapy Cii, 2017.)。在基因敲除小鼠模型中,PVRIG抗体可减少TIGIT^{-/-}小鼠肿瘤的生长,并且PVRIG与TIGIT的双敲除小鼠中的肿瘤生长控制,与单敲除小鼠相比也有进一步提高 (RJ Sullivan, et al, ASCO-SITC Clinical Immuno-Oncology Symposium, 2020)。

[0006] 临床前数据表明,PVRIG抗体能有效刺激某些癌症的抗肿瘤免疫反应,并发现其和

PD-1/L1和TIGIT抗体具有一定的协同作用,能够增强T/NK细胞的功能,提高抗肿瘤反应,减缓肿瘤的生长。以PVRIG作为治疗靶点,有望提高现有抗体药物(如抗TIGIT和抗PD-1/L1抗体)的治疗效果,呈现出不同于其他药物靶点和临床中组合疗法的优势。Compugen公司开发的COM701是全球首个获批临床的PVRIG抗体,目前正在进行与TIGIT单抗(COM902)联用I期研究,并与BMS达成合作进行COM701+BMS-986207+nivolumab三联I期试验。除此之外, Surface Oncology授权给GSK的GSK4381562以及国内君实生物的JS009已于2021年年底前递交了临床申请,Amgen公司也布局了PVRIG单抗,目前处于临床前阶段。

[0007] 因此,本领域存在开发新的高亲合力、高选择性、高生物活性的抗PVRIG抗体需求,用于疾病尤其是癌症的治疗。

发明内容

[0008] 本发明人经过深入的研究和创造性的劳动,得到了新的抗PVRIG抗体。本发明人惊奇地发现,本发明的抗PVRIG抗体具有良好的亲和力和生物活性,具有抗肿瘤的潜力。由此提供了下述发明:

[0009] 本发明的一个方面涉及一种抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,

[0010] 所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1至HCDR3,所述轻链可变区包含LCDR1至LCDR3,其中:

[0011] 所述抗体的重链可变区,

[0012] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示、HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示和HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示,

[0013] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示、HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示和HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,

[0014] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示、HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示和HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示,或者

[0015] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示、HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示和HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示;

[0016] 并且

[0017] 所述抗体的轻链可变区,

[0018] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示、LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示和LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,

[0019] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示、LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示和LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示,

[0020] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示、LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示和LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示,或者

[0021] LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:30所示、LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:31所示和LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:32所示。

[0022] 在本发明的一些实施方式中,所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,

[0023] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,

LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示；

[0024] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:20所示；

[0025] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:21所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:23所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:25所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示；

[0026] 或者

[0027] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:27所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:29所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:30所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:31所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:32所示。

[0028] 轻链和重链的可变区决定抗原的结合；每条链的可变区均含有三个高变区，称互补决定区(CDR) (重链(H)的CDR包含HCDR1、HCDR2、HCDR3,轻链(L)的CDR包含LCDR1、LCDR2、LCDR3。在本发明的一些实施方式中,所述的双特异性抗体,其HCDR1-HCDR3以及LCDR1-LCDR3参照美国专利公开US20210380669A1或者文献Lu.et al (Deamidation and isomerization liability analysis of 131clinical-stage antibodies,MABS,2019,VOL.11,NO.1,45-57,DOI:10.1080/19420862.2018.1548233)进行定义或者编号。

[0029] 在本发明的一些实施方式中,所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7；

[0030] 并且

[0031] 所述轻链可变区的氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8。

[0032] 在本发明的一些实施方式中,所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,

[0033] 重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示；

[0034] 重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示；

[0035] 重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示；

[0036] 或者

[0037] 重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0038] 在本发明的一些实施方式中,所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体的重链恒定区为Ig gamma-1chain C region(例如NCBI ACCESSION:P01857)或Ig gamma-4chain C region(例如NCBI ACCESSION:P01861.1)；轻链恒定区为Ig kappa chain C region(例如NCBI ACCESSION:P01834)；

[0039] 优选地,所述抗体的重链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35所示,所述抗体的轻链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:36所示。

[0040] 在本发明的一些实施方式中,所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,按照

EU编号系统,所述抗体的重链恒定区包含L234A突变和L235A突变(简称为LALA)。本发明中,如果没有特别说明,位点之前的字母表示突变前的氨基酸,位点之后的字母表示突变后的氨基酸。

[0041] 在本发明的一些实施方式中,所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗PVRIG抗体或其抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、互补决定区片段、单链抗体、人源化抗体、嵌合抗体或双抗体。

[0042] 在本发明的一些实施方式中,所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段,其中,

[0043] 所述的抗体包括非-CDR区,且所述非-CDR区来自不是鼠类的物种,例如来自人抗体。

[0044] 在本发明的一些实施方式中,所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体与CHO细胞表面过表达的人PVRIG蛋白的结合的EC₅₀小于3nM、小于2.9nM或小于2.8nM;优选地,所述EC₅₀通过流式细胞术检测法测得。

[0045] 本发明的另一方面涉及一种分离的核酸分子,其编码本发明中任一项所述的抗TIGIT抗体或其抗原结合片段。

[0046] 本发明的再一方面涉及一种重组载体,其包含本发明的分离的核酸分子。

[0047] 本发明的再一方面涉及一种宿主细胞,其包含本发明的分离的核酸分子,或者本发明的重组载体。

[0048] 本发明的再一方面涉及一种偶联物,其包括抗体以及偶联部分,其中,所述抗体为本发明中任一项所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,所述偶联部分为可检测的标记;优选地,所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、有色物质或酶。

[0049] 本发明的再一方面涉及一种试剂盒,其包括本发明中任一项所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段,或者包括本发明的偶联物;

[0050] 优选地,所述试剂盒还包括第二抗体,其特异性识别所述抗体;任选地,所述第二抗体还包括可检测的标记,例如放射性同位素、荧光物质、有色物质或酶。

[0051] 本发明的再一方面涉及一种药物组合物,其包含本发明中任一项所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物;可选地,所述药物组合物还包括一种或多种药学上可接受的辅料。

[0052] 在本发明的一些实施方式中,所述的药物组合物,其还包含一种或多种抗TIGIT抗体;

[0053] 优选地,所述药物组合物还包含一种或多种抗PD-1抗体或者一种或多种抗PD-L1抗体。

[0054] 在本发明的一些实施方式中,所述的药物组合物,其中,

[0055] 抗PVRIG抗体或其抗原结合片段与抗TIGIT抗体的摩尔比为(1:5) - (5:1),例如1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1;

[0056] 和/或

[0057] 抗PVRIG抗体或其抗原结合片段与抗PD-1抗体或者抗PD-L1抗体的摩尔比为(1:5) - (5:1),例如1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1。

[0058] 在本发明的一个或多个实施方式中,所述的药物组合物,其中,所述的抗TIGIT抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1至HCDR3,所述轻链可变区

包含LCDR1至LCDR3,其中:

[0059] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:44所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:45所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:46所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:47所示;

[0060] 优选地,所述的抗TIGIT抗体,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:41所示。

[0061] 在本发明的一个或多个实施方式中,所述的药物组合物,其中,所述的抗PD-1抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1至HCDR3,所述轻链可变区包含LCDR1至LCDR3,其中:

[0062] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:51所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:52所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:53所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:54所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:55所示;

[0063] 优选地,所述的抗PD-1抗体,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:48所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:49所示。

[0064] 在本发明的一个或多个实施方式中,所述的药物组合物,其中,所述药物组合物的单位剂量,按照其中的所述抗PVRIG抗体或其抗原结合片段的质量计算,为100mg-1000mg、200mg-800mg、200mg-500mg、300mg-600mg、400mg-500mg或者450mg。

[0065] 在本发明的一些实施方式中,所述的药物组合物,其活性成分由抗PVRIG抗体或其抗原结合片段组成。

[0066] 在本发明的一些实施方式中,所述的药物组合物,其活性成分由抗PVRIG抗体或其抗原结合片段和抗TIGIT抗体组成。

[0067] 在本发明的一些实施方式中,所述的药物组合物,其活性成分由抗PVRIG抗体或其抗原结合片段、抗TIGIT抗体和抗PD-1抗体组成。

[0068] 本发明的再一方面涉及一种组合产品,其包含独立包装的第一产品和第二产品,其中,

[0069] 所述第一产品包含其包含本发明中任一项所述的抗PVRIG抗体或其抗原结合片段或者本发明的偶联物;

[0070] 所述第二产品包含至少一种抗TIGIT抗体;

[0071] 优选地,所述组合产品还包括第三产品,所述第三产品包含至少一种抗PD-1抗体或者至少一种抗PD-L1抗体;

[0072] 优选地,所述第一产品、所述第二产品和第三产品还独立地包含一种或多种药学上可接受的辅料;

[0073] 优选地,所述组合产品还包含产品说明书。

[0074] 在本发明的一些实施方式中,所述的组合产品,其中,

[0075] 抗PVRIG抗体或其抗原结合片段与抗TIGIT抗体的摩尔比为(1:5)-(5:1),例如1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1;

[0076] 和/或

[0077] 抗PVRIG抗体或其抗原结合片段与抗PD-1抗体或者抗PD-L1抗体的摩尔比为(1:5)-(5:1),例如1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1。

[0078] 在本发明的一些实施方式中,所述的组合产品,其中,所述的抗TIGIT抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1至HCDR3,所述轻链可变区包含LCDR1至LCDR3,其中:

[0079] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:43所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:44所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:45所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:46所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:47所示;

[0080] 优选地,所述的抗TIGIT抗体,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:41所示。

[0081] 在本发明的一些实施方式中,所述的组合产品,其中,所述的抗PD-1抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含HCDR1至HCDR3,所述轻链可变区包含LCDR1至LCDR3,其中:

[0082] HCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示,HCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:51所示,HCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:52所示,LCDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:53所示,LCDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:54所示和LCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:55所示;

[0083] 优选地,所述的抗PD-1抗体,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:48所示,并且轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:49所示。

[0084] 本发明再一方面涉及本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的偶联物或者本发明中任一项所述的药物组合物在制备治疗或预防肿瘤的药物中的用途;

[0085] 优选地,所述肿瘤选自结肠癌、黑色素瘤、肺癌、肾癌、子宫内膜癌、乳腺癌、皮肤癌、卵巢癌、胃癌、头颈癌、肝癌、脑瘤、尿路上皮癌、骨肿瘤、胆管癌、卵巢癌、直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B淋巴细胞瘤、浆细胞癌、前列腺癌和睾丸癌中的一种或多种;

[0086] 优选地,所述肺癌为非小细胞肺癌或小细胞肺癌。

[0087] 根据本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的偶联物或者本发明中任一项所述的药物组合物,其用于治疗或预防肿瘤;

[0088] 优选地,所述肿瘤选自结肠癌、黑色素瘤、肺癌、肾癌、子宫内膜癌、乳腺癌、皮肤癌、卵巢癌、胃癌、头颈癌、肝癌、脑瘤、尿路上皮癌、骨肿瘤、胆管癌、卵巢癌、直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B淋巴细胞瘤、浆细胞癌、前列腺癌和睾丸癌中的一种或多种;

[0089] 优选地,所述肺癌为非小细胞肺癌或小细胞肺癌。

[0090] 本发明的再一方面涉及一种治疗或预防肿瘤的方法,包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的偶联物或者本发明中任一项所述的药物组合物的步骤;

[0091] 优选地,所述肿瘤选自结肠癌、黑色素瘤、肺癌、肾癌、子宫内膜癌、乳腺癌、皮肤癌、卵巢癌、胃癌、头颈癌、肝癌、脑瘤、尿路上皮癌、骨肿瘤、胆管癌、卵巢癌、直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B淋巴细胞瘤、浆细胞癌、前列腺癌和睾丸癌中的一种或多种;

[0092] 优选地,所述肺癌为非小细胞肺癌或小细胞肺癌。

[0093] 在本发明的一个或多个实施方式中,所述的方法,其中,

[0094] 抗PVRIG抗体的单次给药剂量为每千克体重0.1-100mg,优选1-10mg(例如1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg或10mg);或者,抗PVRIG抗体的单次给药剂量为每位受试者10-1000mg(例如大约100mg、大约150mg、大约200mg、大约250mg、大约300mg、大约350mg、大约400mg、大约450mg、大约500mg、大约600mg、大约700mg、大约800mg、大约900mg或大约1000mg),优选50-500mg、100-400mg、150-300mg、150-250mg或200mg;

[0095] 优选地,每3天、4天、5天、6天、10天、1周、2周或3周给药一次;

[0096] 优选地,给药方式为静脉滴注或静脉注射。

[0097] 在一些方案中,抗PVRIG抗体的施用治疗以2周(14天)或3周(21天)为一个周期,优选在每个周期第一天(D1)静脉给予抗PVRIG抗体。例如,所述抗PVRIG抗体以每两周一次(q2w)或者每三周一次(q3w)的频率施用。

[0098] 在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时,为了更好地理解本发明,下面提供相关术语的定义和解释。

[0099] 如本文中所使用的,当提及PVRIG(NCBI GenBank ID:NP_076975.2)的氨基酸序列时,其包括PVRIG蛋白的全长或者细胞外片段;还包括PVRIG的融合蛋白,例如与小鼠或人IgG的Fc蛋白片段(mFc或hFc)进行融合的片段。然而,本领域技术人员理解,在PVRIG蛋白的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“PVRIG蛋白”或“PVRIG”应包括所有此类序列,包括所示的序列以及其天然或人工的变体。并且,当描述PVRIG蛋白的序列片段时,其不仅包括的序列片段,还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

[0100] 如本文中所使用的,当提及TIGIT(NCBI GenBank ID:NP_776160.2)的氨基酸序列时,其包括TIGIT蛋白的全长或功能片段;还包括TIGIT的融合蛋白,例如与小鼠或人IgG的Fc蛋白片段(mFc或hFc)进行融合的片段。然而,本领域技术人员理解,在TIGIT蛋白的氨基酸序列中,可天然产生或人工引入突变或变异(包括但不限于置换,缺失和/或添加),而不影响其生物学功能。因此,在本发明中,术语“TIGIT蛋白”或“TIGIT”应包括所有此类序列,包括所示的序列以及其天然或人工的变体。并且,当描述TIGIT蛋白的序列片段时,其不仅包括的序列片段,还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

[0101] 如本文中所使用的,术语 EC_{50} 是指半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect),是指能引起50%最大效应的浓度。

[0102] 如本文中所使用的,术语“抗体”是指通常由两对多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由3个结构域(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)的结合。 V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)),其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 V_H

和 V_L 由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗原结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda M.d. (1987 and 1991)), 或Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 1987; 196: 901-917; Chothia 等人 Nature 1989; 342: 878-883 或者IMGT编号系统定义, 见Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." Nucleic acids research 2009; 38(suppl_1): D301-D307. 的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如, 其包括, 特别地, 重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体, 例如, IgG (例如, IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

[0103] 如本文中所使用的, 术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽, 其保持特异性结合全长抗体所结合的共同抗原的能力, 和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合, 其也被称为“抗原结合部分”。通常参见, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第2版, Raven Press, N.Y. (1989)), 其以其全文通过引用合并入本文, 用于所有目的。可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下, 抗原结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如, scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody) 和这样的多肽, 其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

[0104] 如本文中所使用的, 术语“Fd片段”意指由 V_H 和 C_H1 结构域组成的抗体片段; 术语“Fv片段”意指由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的抗体片段; 术语“dAb片段”意指由 V_H 结构域组成的抗体片段(Ward等人, Nature 341: 544-546 (1989)); 术语“Fab片段”意指由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成的抗体片段; 术语“F(ab')₂片段”意指包含通过较链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的抗体片段。

[0105] 在一些情况下, 抗体的抗原结合片段是单链抗体(例如, scFv), 其中 V_L 和 V_H 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见, 例如, Bird等人, Science 242: 423-426 (1988) 和Huston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988))。此类scFv分子可具有一般结构: NH_2-V_L -接头- V_H-COOH 或 NH_2-V_H -接头- V_L-COOH 。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成。例如, 可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄的接头, 但也可使用其变体(Holliger等人(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由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。

[0106] 在一些情况下, 抗体的抗原结合片段是双抗体, 即, 双价抗体, 其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达, 但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对, 从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见, 例如, Holliger P. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993), 和Poljak R.J. 等人,

Structure 2:1121-1123(1994))。

[0107] 在另一些情况下,抗体的抗原结合片段是“双特异性抗体”,指由第一抗体(片段)和第二抗体(片段)或抗体类似物通过偶联臂所形成的偶联物,偶联的方式包括但不限于化学反应、基因融合和酶促。抗体的抗原结合片段可以是“多特异性抗体”包括例如:三特异性抗体和四特异性抗体,前者是具有三种不同抗原结合特异性的抗体,而后者是具有四种不同抗原结合特异性的抗体。例如,经设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin),与IgG抗体,scFv-Fc抗体片段相连或其组合,如CN104341529A。抗IL-17a的fynomer与抗IL-6R抗体结合,如W02015141862A1。

[0108] 可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如,重组DNA技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体(例如本发明提供的单克隆抗体ADI-56127、ADI-56204、ADI-56249和ADI-56145)获得抗体的抗原结合片段(例如,上述抗体片段),并且以与用于完整抗体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

[0109] 如本文中所使用的,术语“单抗”和“单克隆抗体”是指,来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段,也即除可能自发出现的自然突变外,一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的,其通常包含至少2种或更多种的不同抗体,这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用Kohler等首次报道的杂交瘤技术获得(Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. nature, 1975; 256 (5517): 495),但也可采用重组DNA技术获得(如参见U.S. Patent 4,816,567)。

[0110] 如本文中所使用的,术语“人源化抗体”是指,人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部或部分CDR区被一非人源抗体(供体抗体)的CDR区替换后得到的抗体或抗体片段,其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源(例如,小鼠、大鼠或兔)抗体。此外,受体抗体的构架区(FR)的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换,或被其他抗体的氨基酸残基替换,以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容,可参见例如, Jones et al., Nature 1986; 321: 522-525; Reichmann et al., Nature 1988; 332: 323-329; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 1992; 2: 593-596; 和 Clark M. Antibody humanization: a case of the ‘Emperor’s new clothes’? [J]. Immunol. Today, 2000; 21 (8): 397-402。

[0111] 如本文中所使用的,术语“分离的”或“被分离的”指的是,从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分,那么可能是其所处的天然环境发生了改变,或从天然环境下分离出该物质,或二者情况均有发生。例如,某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽,而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质,也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

[0112] 如本文中所使用的,术语“载体(vector)”是指,可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时,载体称为表达载体。载体可以通过转化,转导或者转染导入宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的,包括但不限于:质粒;噬菌粒;柯斯质粒;人工染色

体,例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC);噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于,逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件,包括但不限于,启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外,载体还可含有复制起始位点。

[0113] 如本文中所使用的,术语“宿主细胞”是指,可用于导入载体的细胞,其包括但不限于,如大肠杆菌或枯草杆菌等的原核细胞,如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞,如S2果蝇细胞或Sf9等的昆虫细胞,或者如纤维原细胞,CHO细胞,COS细胞,NSO细胞,HeLa细胞,GS细胞,BHK细胞,HEK 293细胞或人细胞等的动物细胞。

[0114] 如本文中所使用的,术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用;术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用;术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中,氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如,丙氨酸可用A或Ala表示。

[0115] 如本文中所使用的,术语“药学上可接受的辅料”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂,其是本领域公知的(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995),并且包括但不限于:pH调节剂,表面活性剂,佐剂,离子强度增强剂。例如,pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液;表面活性剂包括但不限于阳离子,阴离子或者非离子型表面活性剂,例如Tween-80;离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

[0116] 如本文中所使用的,术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如,预防疾病(例如肿瘤)有效量是指,足以预防,阻止,或延迟疾病(例如肿瘤)的发生的量;治疗疾病有效量是指,足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。

[0117] 如本文中所使用的,术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”可互换使用,并且当提及术语“杂交瘤”和“杂交瘤细胞株”时,其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。

[0118] 在本发明中,如果没有特别说明,所述“第一”(例如第一产品)、“第二”(例如第二产品)和“第三”(例如第三产品)是为了指代上的区分或表述上的清楚,并不具有典型的次序上的含义。

[0119] 发明的有益效果

[0120] 本发明实现了如下的(1)至(4)项中所述技术效果中的一项或多项:

[0121] (1) 本发明的抗体能够与PVRIG结合,亲和力较高。

[0122] (2) 本发明的抗体与抗TIGIT抗体或者抗PD-1抗体或者抗PD-L1抗体之间很可能具有协同作用。

[0123] (3) 本发明的抗体能够有效地治疗和/或预防肿瘤,例如结肠癌、黑色素瘤、肺癌、肾癌、子宫内膜癌、乳腺癌、皮肤癌、卵巢癌、胃癌、头颈癌、肝癌、脑瘤、尿路上皮癌、骨肿瘤、胆管癌、卵巢癌、直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B淋巴细胞瘤、浆细胞瘤、前列腺癌和睾丸癌等。

[0124] (4) 本发明的抗体具有较低的毒副作用。

附图说明

- [0125] 图1A至1B:抗PVRIG抗体与CHO细胞上过表达的人PVRIG的结合曲线图。
- [0126] 图2A至2B:抗PVRIG抗体与CHO细胞上过表达的食蟹猴PVRIG的结合曲线图。
- [0127] 图3A至3B:抗PVRIG抗体与CHO细胞上过表达的小鼠PVRIG的结合曲线图。
- [0128] 图4A至4B:抗PVRIG抗体阻断人PVRIG与CHO细胞上过表达的人CD112结合的曲线图。
- [0129] 图5A至5B:抗PVRIG抗体阻断小鼠CD112与小鼠PVRIG蛋白结合的曲线图。
- [0130] 图6:抗PVRIG抗体与激活的人原代T细胞上PVRIG的结合曲线图。
- [0131] 图7:抗PVRIG抗体与抗TIGIT抗体联合阻断PVRIG/CD112、TIGIT/CD155信号通路的曲线图。
- [0132] 图8:抗PVRIG抗体与抗TIGIT及抗PD-L1抗体联合阻断PVRIG/CD112、TIGIT/CD155和PD-1/PD-L1信号通路的曲线图。
- [0133] 图9A至9C:抗PVRIG抗体依次介导过表达人PVRIG、过表达食蟹猴PVRIG、过表达小鼠PVRIG CHO细胞ADCC试验结果。
- [0134] 图10:抗PVRIG抗体在野生型小鼠CT-26肿瘤模型的药效图。
- [0135] 图11:抗PVRIG抗体在混合接种A375和人PBMC的NDG小鼠模型的药效图。
- [0136] 图12:抗PVRIG抗体联合抗TIGIT抗体在混合接种A375和人PBMC的NDG小鼠模型的药效图。
- [0137] 图13:抗PVRIG抗体联合抗TIGIT及抗PD-1抗体在混合接种A375和人PBMC的NDG小鼠模型的药效图。
- [0138] 图14:抗PVRIG抗体在小鼠体内半衰期曲线。

具体实施方式

[0139] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0140] 抗体Atezolizumab (ATE):抗PD-L1单抗,商品名Tecentriq,罗氏Roche。

[0141] 由HEK293细胞表达并纯化实施例中使用的下述对照抗体:

[0142] COM701是由HEK293细胞表达的来自Compugen公司的抗人PVRIG抗体,其轻链可变区序列和重链可变区序列与美国专利US10227408B2中的SEQ ID NO:1372、SEQ ID NO:1380一致;

[0143] Mab46是由HEK293细胞表达的来自Surface Oncology公司的抗人PVRIG抗体,其轻链可变区和重链可变区序列与美国专利公开US20200040081A1中的SEQ ID NO:912、SEQ ID NO:918一致。

[0144] Tiragolumab由HEK293细胞表达的来自Genentech公司的抗人TIGIT抗体,其轻链和重链序列来源于WHO Drug Information, Vol.31, No.2, 2017, Proposed INN:List 117, CAS号:1918185-84-8。

[0145] 实施例1:抗体的序列设计、表达和纯化

[0146] 1. 抗体的序列设计

[0147] 基于酵母抗体展示文库(Adimab),按照现有的方法(参见专利申请W02009036379、W02010105256和W02012009568)进行扩增和优化。通过筛选获得的酵母细胞在30℃下震荡诱导48小时以分泌表达目标抗PVRIG抗体(全长IgG)。诱导结束之后,1300rpm离心10分钟去除酵母细胞,收获上清液。使用Protein A对上清液中的抗PVRIG抗体进行纯化,pH2.0醋酸溶液洗脱,收获抗PVRIG抗体。其中获得抗PVRIG抗体ADI-56127、ADI-56204、ADI-56249和ADI-56145。同时,将抗体ADI-56127、ADI-56204、ADI-56249和ADI-56145分别使用木瓜蛋白酶酶切并用KappaSelect(GE生命医疗集团)进行纯化获得相应抗体Fab片段。

[0148] 4个抗体ADI-56127、ADI-56204、ADI-56249和ADI-56145的可变区序列信息如下。

[0149] ADI-56127的重链可变区:

[0150] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTESVDAISWVRQAPGQGLEWMGDIIPFFDT-DYAQKFQGRV
TITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGGTSWTHFFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)

[0151] ADI-56127的轻链可变区:

[0152] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS
GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)

[0153] ADI-56204的重链可变区:

[0154] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTHYGIYWRQAPGQGLEWMGHIYAYSGD TDYAQKLQGRV
TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGSPYEHFNWFDWPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:3)

[0155] ADI-56204的轻链可变区:

[0156] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASDDISDYLWYQQKPKAPKLLIYDASSLHTGVPSRFSGSGSG
TDFTFTISSLPEDIATYYCQQYGNLPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:4)

[0157] ADI-56249的重链可变区:

[0158] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTFAISWVRQAPGQGLEWMGDIIPIFG-SNYAQKFQGRV
TITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGPLEGKVSPFDIWGQGT MVTVSS (SEQ ID NO:5)

[0159] ADI-56249的轻链可变区:

[0160] DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHSTGYNLWDWYLQKPGQSPQLLIYVGSTRASGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQERQFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:6)

[0161] ADI-56145的重链可变区:

[0162] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWVGWISSYDASTKYSQELQGRV
TMTTDTSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCARGSPIYEHFNWFDWPWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:7)

[0163] ADI-56145的轻链可变区:

[0164] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDSSNRATGIPARFSGSGSG
TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQLSHHPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)

[0165] 上面各抗体的CDR如下:

[0166] (1)ADI-56127

[0167] HCDR1:GTESVDAIS (SEQ ID NO:9)

[0168] HCDR2:DIIPFFD TDYAQKFQG (SEQ ID NO:10)

[0169] HCDR3:AREGGTSWTHFFDL (SEQ ID NO:11)

[0170] LCDR1:RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:12)

- [0171] LCDR2:GASSRAT (SEQ ID NO:13)
 [0172] LCDR3:QQYGSSPIT (SEQ ID NO:14)
 [0173] (2)ADI-56204
 [0174] HCDR1:YTFTHYGIY (SEQ ID NO:15)
 [0175] HCDR2:HIYAYSGD TDY A Q K L Q G (SEQ ID NO:16)
 [0176] HCDR3:ARGSPYEHFNWFDP (SEQ ID NO:17)
 [0177] LCDR1:QASDDISDYLN (SEQ ID NO:18)
 [0178] LCDR2:DASSLHT (SEQ ID NO:19)
 [0179] LCDR3:QQYG N L P I T (SEQ ID NO:20)
 [0180] (3)ADI-56249
 [0181] HCDR1:GTFSTFAIS (SEQ ID NO:21)
 [0182] HCDR2:DIIPIFG-SNYA Q K F Q G (SEQ ID NO:22)
 [0183] HCDR3:ARGPLEGKVSPFDI (SEQ ID NO:23)
 [0184] LCDR1:RSSQSL LHSTGYN Y L D (SEQ ID NO:24)
 [0185] LCDR2:VGSTRAS (SEQ ID NO:25)
 [0186] LCDR3:MQERQFPIT (SEQ ID NO:26)
 [0187] (4)ADI-56145
 [0188] HCDR1:YTFTSYGIS (SEQ ID NO:27)
 [0189] HCDR2:WISSYDASTKYSQELQG (SEQ ID NO:28)
 [0190] HCDR3:ARGSPIYEHFNWFDP (SEQ ID NO:29)
 [0191] LCDR1:RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:30)
 [0192] LCDR2:DSSNRAT (SEQ ID NO:31)
 [0193] LCDR3:QQLSHHPLT (SEQ ID NO:32)

[0194] 1.2抗体及其变体的表达与纯化

[0195] 对于抗体ADI-56127、ADI-56204和对照抗体Mab46,均分别将其重链可变区(VH)重组到野生型人IgG1重链恒定区(氨基酸序列如SEQ ID NO:33所示)。此外,对于抗体ADI-56127、ADI-56204、ADI-56249、ADI-56145和对照抗体Mab46,均分别将其重链可变区(VH)重组到经L234A、L235A改造的重链恒定区(氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示)中,构成完整的“VH-CH1-CH2-CH3”抗体重链。对于对照抗体COM701,将其重链可变区重组到人IgG4重链恒定区(氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示)中。此外,将上述抗体的轻链可变区(VL)均重组到人kappa轻链恒定区(氨基酸序列如SEQ ID NO:36所示)。经由HEK293表达系统瞬时表达纯化。具体操作如下:使用化学转染的方法将带有抗体重链和轻链的pcDNA3.1载体转入HEK293细胞中,在37℃,8%CO₂条件下,培养7天。收集细胞液,13000rpm离心20分钟。取上清液,Protein A纯化上清液,SEC检测抗体纯度,同时控制内毒素含量。制得的抗体分别命名为ADI-56127-G1、ADI-56127-G1LALA、ADI-56204-G1、ADI-56204-G1LALA、ADI-56249-G1LALA、ADI-56145-G1LALA、Mab46-G1、Mab46-G1LALA和COM701-G4。

[0196] 野生型人IgG1重链恒定区:

[0197] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC

VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:33)

[0198] 经L234A、L235A改造的重链恒定区:

[0199] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:34) 人IgG4重链恒定区:

[0200] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:35)

[0201] 人kappa轻链恒定区:

[0202] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:36)

[0203] 实施例2:抗体亲和力检测

[0204] 采用生物膜层光学干涉技术 (ForteBio) 测定实施例1获得的抗体及其变体或Fab
片段与人、食蟹猴、小鼠PVRIG的结合解离常数 (K_D)。ForteBio亲和力测定按照现有方法
(Este, P等人 High throughput solution-based measurement of antibody-antigen
affinity and epitope binning. *Mabs*, 2013.5 (2) :p.270-8) 进行。所述人、食蟹猴、小鼠
PVRIG的胞外段氨基酸序列分别如SEQ ID NOs:37-39所示。

[0205] 人PVRIG胞外段氨基酸序列:

[0206] TPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTVSWGGPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARW
ETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGLPSSDPGLSAPPTPAPILRAD (SEQ ID NO:37)

[0207] 食蟹猴PVRIG胞外段氨基酸序列:

[0208] TPEVWVQVQMEATELSSFTVHCGFLGPGSISLVTVSWGGPDGAGGTKLAVLHPELGTRQWAPARQARW
ETQSSISLALEDGSGASSPFANTTFCCKFASFPEGSWESCGSLPSSDPGLSAPPTPVPILRAD (SEQ ID NO:38)

[0209] 小鼠PVRIG胞外段氨基酸序列:

[0210] SPEVWVQVQMEATNLSSFSVHCGVLGYSLISLVTVSCEGFVDAGRTKLAVLHPEFGTQQWAPARQAHW
ETPNVSVTLTMGQSKARSSLANTTFCCEFVTFPHGSRVACRDLHRSDPGLSAPTPALNLQAD (SEQ ID NO:39)

[0211] 测量完整抗体(即,通过Adimab原始获得的全长IgG)与人的PVRIG-his蛋白的单价
亲和力:传感器在分析缓冲液中线下平衡20分钟,然后线上检测120s建立基线,加载完整的
PVRIG抗体至AHQ传感器至厚度1nm进行亲和力检测。将已加载抗体的传感器于100nM
PVRIG-his抗原中作用至平台期,然后将传感器转移到分析缓冲液中至少2分钟用于解离速
率测量。使用1:1结合模型进行动力学分析。

[0212] 测量候选抗体Fab片段(即全长IgG经木瓜蛋白酶处理后得到的Fab片段)与人、食
蟹猴、小鼠PVRIG-Fc蛋白的单价亲和力:传感器在分析缓冲液中线下平衡20分钟,然后线上

检测120s建立基线,加载PVRIG-Fc抗原至AHQ传感器至厚度1nm进行亲和力检测。将已加载抗原的传感器于100nM Fab液中作用至平台期,然后将传感器转移到分析缓冲液中至少2分钟用于解离速率测量。使用1:1结合模型进行动力学分析。

[0213] 测量完整抗体与食蟹猴、小鼠PVRIG-Fc蛋白的双价亲和力:传感器在分析缓冲液中线下平衡20分钟,然后线上检测120s建立基线,加载完整的PVRIG抗体至AHQ传感器至厚度1nm进行亲和力检测。将已加载抗体的传感器于高浓度无关完整抗体液中继续加载10分钟,饱和封闭AHQ传感器上Fc结合位点,将封闭完成的传感器于100nM PVRIG-Fc抗原中作用至平台期,然后将传感器转移到分析缓冲液中至少2分钟用于解离速率测量。使用1:1结合模型进行动力学分析。

[0214] 在如上测定方法中,候选分子及其变体分子的 K_D 值如下表1所示。

[0215] 表1:抗PVRIG候选分子及其变体分子的 K_D 值

[0216] 抗体编号	抗体 IgG 与人 PVRIG 蛋白结合单价亲和力	抗体 Fab 与人 PVRIG-Fc 蛋白单价亲和力	抗体 IgG 与食蟹猴 PVRIG-Fc 蛋白双价亲和力	抗体 Fab 与食蟹猴 PVRIG-Fc 蛋白单价亲和力	抗体 IgG 与小鼠 PVRIG-Fc 蛋白双价亲和力	抗体 Fab 与小鼠 PVRIG-Fc 蛋白单价亲和力	
	ADI-56127	3.64E-10	6.10E-11	1.81E-10	1.28E-10	1.66E-09	1.14E-07
[0217]	ADI-56204	4.25E-10	3.83E-10	1.97E-10	1.48E-08	N.B.	NA
	ADI-56249	8.72E-10	2.63E-10	2.44E-10	2.12E-08	2.62E-09	NA
	ADI-56145	2.04E-09	7.58E-10	6.23E-10	1.57E-07	N.B.	NA

[0218] 注:“N.B.”:no binding(无结合);“NA”:not available(未检测)。

[0219] 由表1结果可见:

[0220] ADI-56127和ADI-56249与小鼠PVRIG有交叉结合活性。

[0221] 实施例3:抗PVRIG抗体与过表达人/食蟹猴/小鼠PVRIG CHO细胞的结合活性及阻断活性

[0222] 3.1基于流式细胞术检测法检测抗PVRIG抗体及其变体与过表达在CHO细胞上人/食蟹猴/小鼠PVRIG的结合活性。

[0223] 具体地,通过转染克隆到MCS的人PVRIG、食蟹猴PVRIG、小鼠PVRIG cDNA的pCHO1.0载体(购自Invitrogen)加压筛选产生过表达人PVRIG的CHO细胞(CHO-huPVRIG细胞),过表达食蟹猴PVRIG的CHO细胞(CHO-cynoPVRIG细胞)以及过表达小鼠PVRIG的CHO细胞(CHO-muPVRIG细胞)。将扩大培养过的表达细胞调整至合适细胞密度加入96孔流式板,离心后加入梯度稀释的待测样品,4℃孵育30分钟。PBS清洗两次,加入对应稀释至合适浓度的荧光二抗,4℃孵育30分钟,PBS清洗两次。加入PBS重悬细胞,在CytoFlex流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。采用Graphpad软件作图分析获得 EC_{50} 数值。结果如表2、图1A至图1B、图2A至图2B以及图3A至图3B所示。

[0224] 3.2基于流式细胞术检测法检测抗PVRIG抗体及其变体,阻断人PVRIG与过表达在CHO细胞上人CD112结合的活性。

[0225] 具体地,通过转染克隆到MCS的人CD112 cDNA的pCHO1.0载体(购自Invitrogen)加压筛选产生过表达人CD112的CHO细胞(CHO-huCD112细胞)。将扩大培养的CHO-huCD112细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/mL,100 μ L/孔加入96孔流式板,离心备用。用PBS梯度稀释纯化的单克隆抗体,将稀释好的样品60 μ L/孔加入空白96孔流式板中,然后60 μ L/孔加入1 μ g/mL的带有Mouse IgG2a Fc Tag的人PVRIG蛋白,混匀后4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。将上述孵育完毕的样品100 μ L/孔加入含有CHO-huCD112细胞的96孔流式板中,4 $^{\circ}$ C共孵育30分钟,PBS清洗两次。100 μ L/孔加入用PBS稀释100倍的APC羊抗鼠IgG抗体,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。100 μ L/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。结果如表2、图4A至图4B所示。

[0226] 3.3基于ELISA检测法检测抗PVRIG抗体及其变体,阻断小鼠PVRIG蛋白与小鼠CD112蛋白结合的活性。

[0227] 具体地,用1 \times 包被缓冲液稀释mouse CD112-his蛋白至终浓度为1 μ g/mL,100 μ L/孔加入酶标板中,覆膜,4 $^{\circ}$ C静置包被过夜。弃去酶标板中包被液,用1 \times PBST清洗3次,200 μ L/孔加入5%BSA/PBS室温封闭2小时。封闭期间,取待测样品用1%BSA/PBS梯度稀释,终体积为60 μ L/孔。取生物素标记的Mouse PVRIG huFc蛋白用1%BSA/PBS稀释至2 μ g/mL,60 μ L/孔加入上述样品孔中,混匀后室温孵育1小时。弃去酶标板中封闭液,100 μ L/孔加上上述样品混合液,室温孵育2小时。弃去上述共孵育样品,用1 \times PBST清洗3次,100 μ L/孔加入1%BSA/PBS稀释的SA-HRP,室温孵育1小时。弃去SA-HRP稀释液,1 \times PBST清洗3次,100 μ L/孔加入ELISA显色液室温反应1-3分钟,50 μ L/孔加入ELISA终止液,读取450nm处吸光度数值。采用Graphpad软件作图获得浓度-吸光度值的结合曲线图,结果如表2、图5A至图5B所示。

[0228] 表2:抗PVRIG候选分子及其变体分子过表达细胞结合阻断活性汇总表

[0229]	抗体	过表达人 PVRIG CHO 细胞	过表达食 蟹猴 PVRIG	过表达小 鼠 PVRIG CHO 细胞	基于过表 达人 CD112	基于小鼠 CD112 蛋 白小鼠
--------	----	-------------------------	---------------------	---------------------------	---------------------	------------------------

	结合 EC50 (nM)	CHO 细胞 结合 EC50 (nM)	结合 EC50 (nM)	CHO 细胞 人 PVRIG 结合阻断 IC50 (nM)	PVRIG 结 合阻断 IC50 (nM)
ADI-56249-G1LALA	1.297	0.3959	W.B.	2.072	3.224
ADI-56145-G1LALA	2.285	37.61	NA	1.363	NA
ADI-56204-G1	2.734	2.363	N.B.	1	NA
ADI-56204-G1LALA	2.503	1.967	N.B.	0.9906	NA
ADI-56127-G1	2.514	1.955	6.469	1.229	1.568
ADI-56127-G1LALA	2.443	1.978	5.375	1.359	1.776
Mab46-G1	2.999	8.18	3.877	1.153	2.834
Mab46-G1LALA	3.804	22.04	6.266	1.032	2.863
COM701-G4	6.417	3.582	N.B.	1.097	NA

[0231] 注：“N.B.”:no binding(无结合)；“NA”:not available(未检测)。

[0232] 由表2、图1A至图1B、图2A至图2B以及图3A至图3B可以得出如下结论：

[0233] (1) ADI-56249-G1LALA、ADI-56145-G1LALA、ADI-56204-G1、ADI-56204-G1LALA、ADI-56127-G1、ADI-56127-G1LALA与CHO细胞表面过表达的人PVRIG蛋白的结合活性优于对照分子Mab46-G1、Mab46-G1LALA和COM701-G4；

[0234] (2) ADI-56249-G1LALA、ADI-56204-G1、ADI-56204-G1LALA、ADI-56127-G1、ADI-56127-G1LALA与CHO细胞表面过表达的食蟹猴PVRIG蛋白的结合活性优于对照分子Mab46-G1、Mab46-G1LALA和COM701-G4；

[0235] (3) ADI-56127-G1、ADI-56127-G1LALA与CHO细胞表面过表达的小鼠PVRIG蛋白有明显结合，结合活性与对照分子Mab46-G1、Mab46-G1LALA相当。

[0236] 由表2和图4A至图4B、图5A至图5B可以得出如下结论：

[0237] (1) ADI-56145-G1LALA、ADI-56204-G1、ADI-56204-G1LALA、ADI-56127-G1、ADI-56127-G1LALA阻断人PVRIG与CHO细胞表面过表达的人CD112蛋白结合的活性与对照分子Mab46-G1、Mab46-G1LALA和COM701-G4相当；

[0238] (2) 部分与CHO细胞表面过表达的小鼠PVRIG蛋白有结合的抗PVRIG抗体分子(ADI-56127-G1和ADI-56127-G1LALA)能够明显阻断小鼠PVRIG与小鼠CD112蛋白的结合，且阻断活性优于对照分子Mab46-G1、Mab46-G1LALA。

[0239] 实施例4:抗PVRIG抗体与原代T细胞表面PVRIG结合

[0240] 基于流式细胞术检测法检测发明抗PVRIG抗体与激活T细胞表面的PVRIG结合活性。

[0241] 具体地，将人PBMC按照STEMCELL公司提供的试验方案(stemcell, 货号:#17951C)进行分选获得human total T细胞。用X-VIVO15培养基(购自Lonza, 货号:04-418Q)调整T细胞浓度至 1.0×10^6 cells/mL, 加入1 μ L IL-2储备液(100万IU), 同时1:1 (bead-to-cell) 加

入CD3/CD28 Dynabeads (购自gibco, 货号:11132D), 于37°C, 5%CO₂培养箱内培养48小时。将活化后的T细胞调整至合适细胞密度加入96孔流式板, 离心后加入梯度稀释的待测样品, 4°C孵育30分钟。PBS清洗两次, 加入对应稀释至合适浓度的荧光二抗, 4°C孵育30分钟, PBS清洗两次。加入PBS重悬细胞, 在CytoFlex流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。

[0242] 结果如图6所示。结果表明, 本发明抗PVRIG抗体ADI-56127-G1、ADI-56127-G1LALA能够结合激活T细胞表面的PVRIG分子, 且结合活性优于对照分子Mab46-G1、Mab46-G1LALA、COM701-G4。

[0243] 实施例5: 荧光素酶报告基因系统检测抗PVRIG抗体与抗TIGIT抗体联合阻断效应

[0244] 为检测抗PVRIG抗体与抗TIGIT抗体在细胞水平的联合阻断活性, 本实施例构建了如下荧光素酶报告基因系统, 简单描述为, 利用慢病毒转染细胞, 构建了过表达人CD155、人CD112和OKT-3scFv的CHO-K1细胞株(CHO-K1-CD155-CD112), 构建了过表达人TIGIT、人PVRIG和NF-AT luciferase报告基因的Jurkat细胞株(Jurkat-TIGIT-PVRIG-luc), 后续利用这一报告基因系统开展相关试验。

[0245] 具体地, 消化获取CHO-K1-CD155-CD112功能细胞, 调整细胞密度, 100μL/孔加入96孔白底板中, 贴壁培养过夜。第二天, 制备Jurkat-TIGIT-PVRIG-luc效应细胞悬液, 将待测样品用反应培养基梯度稀释。取出白底板, 吸去培养上清, 将上述稀释好的样品40μL/孔加入白底板, 同时40μL/孔加入Jurkat-TIGIT-PVRIG-luc效应细胞悬液, 于37°C, 5%CO₂培养箱培养6h。培养完成后80μL/孔加入Bio-GloTM reagent, 并使用多功能酶标仪读取荧光信号值。

[0246] 结果如图7所示。结果表明, 本发明抗PVRIG抗体ADI-56127-G1LALA、ADI-56145-G1LALA、ADI-56204-G1LALA、ADI-56249-G1LALA分别按照摩尔比1:1联合抗TIGIT抗体Tiragolumab均能够解除CD112介导的PVRIG下游抑制信号通路, 以及CD155介导的TIGIT下游抑制信号通路, 更大程度增强报告基因荧光素酶表达, 且活性和对照分子COM701-G4相当。

[0247] 实施例6: 荧光素酶报告基因系统检测抗PVRIG抗体与抗TIGIT及抗PD-L1抗体联合阻断效应

[0248] 为检测抗PVRIG抗体与抗TIGIT及抗PD-L1抗体在细胞水平的联合阻断活性, 本实施例构建了如下荧光素酶报告基因系统, 简略描述为, 在实施例5的基础上, 慢病毒感染CHO-K1-CD155-CD112以过表达PD-L1获得CHO-K1-CD155-CD112-PD-L1功能细胞, 慢病毒感染Jurkat-TIGIT-PVRIG-luc以过表达PD-1, 获得Jurkat-TIGIT-PVRIG-PD-1-luc效应细胞悬液, 后续利用这一报告基因系统开展相关试验。

[0249] 具体地, 消化获取CHO-K1-CD155-CD112-PD-L1功能细胞, 调整细胞密度, 100μL/孔加入96孔白底板中, 贴壁培养过夜。第二天, 制备Jurkat-TIGIT-PVRIG-PD-1-luc效应细胞悬液, 将待测样品用反应培养基梯度稀释。取出白底板, 吸去培养上清, 将上述稀释好的样品40μL/孔加入白底板, 同时40μL/孔加入Jurkat-TIGIT-PVRIG-PD-1-luc效应细胞悬液, 置于37°C, 5%CO₂培养箱培养6小时。培养完成后80μL/孔加入Bio-GloTM reagent, 使用多功能酶标仪读取荧光信号值。

[0250] 结果如图8所示。结果表明, 本发明抗PVRIG抗体ADI-56127-G1LALA、ADI-56145-G1LALA、ADI-56204-G1LALA、ADI-56249-G1LALA分别按照1:1:1的摩尔比与抗TIGIT抗体

Tiragolumab及抗PD-L1抗体Atezolizumab (ATE) 联合均能够通过分别阻断PVRIG/CD112、TIGIT/CD155和PD-1/PD-L1介导的下游抑制信号,进一步增强报告基因荧光素酶表达,且活性和对照分子COM701-G4相当。

[0251] 实施例7:抗PVRIG抗体体外ADCC活性检测

[0252] 基于荧光素酶报告基因系统,检测发明抗PVRIG抗体体外ADCC活性。

[0253] 具体地,扩大培养Jurkat-NFAT-Luciferase-CD16 ADCC效应细胞(购自Promega),用含10%low IgG FBS的1640培养基重悬细胞至 4×10^6 细胞/mL。用含10%low IgG FBS的1640培养基重悬CHO-huPVRIG细胞,CHO-cynoPVRIG细胞,CHO-muPVRIG细胞稀释至 1.6×10^6 细胞/mL。将上述3种细胞悬液分别与Jurkat-NF-AT-Luciferase-CD16细胞1:1混合均匀,50 μ L/孔加入无菌96孔白底板内,加入含10%low IgG FBS的1640培养基梯度稀释的待检测抗体样品。37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂共孵育6小时。培养完成,取出细胞,室温平衡5分钟,100 μ L/孔加入Bio-Glo TM reagent,使用多功能酶标仪读取荧光信号值。

[0254] 结果如图9A至图9C所示。结果表明,本发明抗PVRIG抗体ADI-56204-G1、ADI-56127-G1在荧光素酶报告基因系统中可以体外介导对CHO-huPVRIG细胞、CHO-cynoPVRIG细胞、CHO-muPVRIG细胞的ADCC活性,且ADI-56204-G1介导对CHO-huPVRIG细胞、CHO-cynoPVRIG细胞的ADCC活性强于对照分子Mab46-G1。而ADI-56127-G1介导对CHO-huPVRIG细胞、CHO-cynoPVRIG细胞、CHO-muPVRIG细胞的ADCC活性与对照分子Mab46-G1相当。

[0255] 实施例8:抗PVRIG抗体在野生型Balb/c小鼠体内药效学研究本实验采用在野生型Balb/c小鼠体内接种CT-26小鼠结肠癌细胞(购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司)测定本发明抗PVRIG抗体的抗肿瘤作用。

[0256] 具体地,首先制备CT-26细胞悬液,在小鼠右腹沟皮下注射0.1mL约 5×10^5 细胞建立CT-26荷瘤小鼠模型。待平均肿瘤体积长至约100mm³时进行分组,腹腔注射给予不同剂量、相同给药体积的PBS或抗体进行治疗,每组6只小鼠。监测各组小鼠瘤体积和体重变化,监测频率均为2-3天/次,连续监测2到3周,给药剂量和方式如表3。

[0257] 表3:抗PVRIG抗体肿瘤抑制活性试验方案

组别	给药剂量	给药频率/次数
PBS	N/A	Q3d \times 4
ADI-56127-G1	10mg/kg	Q3d \times 4
ADI-56127-G1LALA	10mg/kg	Q3d \times 4

[0259] 结果如图10所示。结果表明,本发明抗PVRIG抗体ADI-56127-G1能够显著抑制小鼠CT26肿瘤的生长。

[0260] 实施例9:抗PVRIG抗体在NDG小鼠混合接种A375和人PBMC体内药效学研究

[0261] 本实验在B-NDG小鼠混合接种A375(购自Addexbio,C0020004,一种人恶性黑色素瘤细胞),人PBMC细胞(上海妙顺,A10S033014/PB100C)的模型(A375 huPBMC模型)中测定本发明的抗PVRIG抗体的抗肿瘤作用。其中,通过将人的免疫细胞(PBMC)接种至免疫缺陷小鼠中,产生局部重组人类免疫系统的人源化肿瘤小鼠模型。

[0262] 具体地,首先A375细胞与人PBMC 1:1等体积混合成0.1mL细胞悬液,在小鼠右腹沟以皮下注射的方式建立A375 huPBMC模型。待平均肿瘤体积长至30-50mm³左右时进行分组,腹腔注射给予不同剂量、相同给药体积的PBS或抗体治疗,每组6只小鼠。监测各组小鼠瘤体

积和体重变化,监测频率均为2-3天/次,连续监测2到3周,给药剂量和方式如表4。

[0263] 表4:抗PVRIG抗体A375 PBMC模型给药方案

组别	给药剂量	给药频率/次数
PBS	N/A	Q2-3d×8
ADI-56127-G1	10mg/kg	Q2-3d×8
Mab46-G1	10mg/kg	Q2-3d×8
COM701-G4	10mg/kg	Q2-3d×8

[0265] 结果如图11所示。结果表明,本发明的抗PVRIG抗体ADI-56127-G1可以显著抑制小鼠A375肿瘤的生长,且抗肿瘤活性优于对照分子Mab46-G1和COM701-G4。

[0266] 实施例10:抗PVRIG抗体联合抗TIGIT抗体在NDG小鼠混合接种A375和人PBMC体内药效学研究

[0267] 本实验采用皮下混合接种的方式建立A375,人PBMC荷瘤小鼠模型(建模步骤与实施例9相同),待平均肿瘤体积长至60mm³左右时进行分组,腹腔注射给予不同剂量、相同给药体积的PBS或抗体治疗,每组6只小鼠。监测各组小鼠瘤体积和体重变化,监测频率均为2-3天/次,连续监测2到3周,给药剂量和方式如表5。

[0268] 表5:抗PVRIG抗体与抗TIGIT抗体A375模型给药方案

组别	给药剂量	给药频率/次数
阴性对照	N/A	Q2d×6
ADI-56127-G1	10 mg/kg	Q2d×6
Anti-TIGIT-mAb	10 mg/kg	Q2d×6
ADI-56127-G1+Anti-TIGIT-mAb	10 mg/kg+10 mg/kg	Q2d×6

[0271] 结果如图12所示。结果表明,联合施用本发明的抗PVRIG抗体ADI-56127-G1与抗TIGIT单抗相较于两单药治疗具有更显著的抑瘤作用。

[0272] 本实施例中用到的抗TIGIT单抗的序列如下:

[0273] 抗TIGIT抗体VH氨基酸序列:

[0274] QLQLQESGPGLVKPAETLSLCTVSGGSISSYDHYWTWIRQPPGKGLEWIGTVYYSGSTFHNPSLKSRTVTPVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARVGPVSHPPFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:40)

[0275] 抗TIGIT抗体VL氨基酸序列:

[0276] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:41)

[0277] 上述抗TIGIT抗体的CDR如下:

[0278] HCDR1:GSISSYDHYWT (SEQ ID NO:42)

[0279] HCDR2:TVYYSGSTFHNPSLKS (SEQ ID NO:43)

[0280] HCDR3:ARVGPVSHPPFDY (SEQ ID NO:44)

[0281] LCDR1:RASQSISSYLN(SEQ ID NO:45)

[0282] LCDR2:AASSLQS(SEQ ID NO:46)

[0283] LCDR3:QQSYSTPIT(SEQ ID NO:47)

[0284] 本实施例中用到的抗TIGIT单抗重链恒定区采用野生型人IgG1重链恒定区(SEQ ID NO:33)。

[0285] 本实施例中用到的抗TIGIT单抗轻链恒定区采用人kappa轻链恒定区(SEQ ID NO:36)。

[0286] 实施例11:抗PVRIG抗体联合抗PD-1及抗TIGIT抗体在NDG小鼠混合接种A375和人PBMC体内药效学研究

[0287] 本实验首先采用皮下混合接种的方式建立A375,人PBMC荷瘤小鼠模型(建模步骤与实施例9相同),待平均肿瘤体积长至200mm³左右时进行分组,腹腔注射给予不同剂量、相同给药体积的PBS或抗体治疗,每组6只小鼠。监测各组小鼠瘤体积和体重变化,监测频率均为2-3天/次,连续监测2到3周,给药剂量和方式如表6。

[0288] 表6:抗PVRIG抗体与抗PD-1及抗TIGIT抗体A375模型给药方案

组别	给药剂量	给药频率/次数
PBS	N/A	Q2d × 5
ADI-56127-G1+Anti-TIGIT-mAb	10 mg/kg+10 mg/kg	Q2d × 5
Anti-PD-1-mAb	5 mg/kg	Q2d × 5
Anti-PD-1-mAb+Anti-TIGIT-mAb	5 mg/kg+10 mg/kg	Q2d × 5
Anti-PD-1-mAb+ADI-56127-G1	5 mg/kg+10 mg/kg	Q2d × 5
ADI-56127-G1+Anti-PD-1-mAb+Anti-TIGIT-mAb	5 mg/kg+10 mg/kg+10 mg/kg	Q2d × 5

[0290] 结果如图13所示,结果表明联合施用本发明的抗PVRIG抗体ADI-56127-G1、抗TIGIT单抗和抗PD-1抗体能够有效地抑制肿瘤生长,且对A375的肿瘤抑制活性明显优于其它给药组。

[0291] 本实施例中用到的抗TIGIT单抗的序列与实施例10一致。

[0292] 本实施例中用到的抗PD-1单抗的序列如下:

[0293] 抗PD-1抗体VH氨基酸序列

[0294] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYYIYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNGGTNFNEKFKPRVTMTVDSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTVRDFRFDKGFYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:48)

[0295] 抗PD-1抗体VL氨基酸序列

[0296] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGLNYPVHWYQRKPGQAPRLLIYLGSYLDSGVPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQSWELPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:49)

[0297] 上述抗PD-1抗体的6个CDR如下:

[0298] HCDR1:YTFTEYYIY (SEQ ID NO:50)

[0299] HCDR2:GINPSNGGTNFNEKFKP (SEQ ID NO:51)

[0300] HCDR3:TVRDFRFDKGFY (SEQ ID NO:52)

[0301] LCDR1:RASKSVSTSGLNYPVH (SEQ ID NO:53)

[0302] LCDR2:LGSYLD (SEQ ID NO:54)

[0303] LCDR3:QQSWELPLT (SEQ ID NO:55)

[0304] 本实施例中用到的抗PD-1单抗重链恒定区采用经L234A、L235A改造的IgG1重链恒定区 (SEQ ID NO:34)

[0305] 本实施例中用到的抗PD-1单抗轻链恒定区采用人kappa轻链恒定区 (SEQ ID NO:36)

[0306] 实施例12:抗PVRIG抗体与小鼠体内半衰期研究

[0307] 采用尾静脉单次注射法,检测本发明抗PVRIG抗体ADI-56127-G1在小鼠体内半衰期。

[0308] 具体地,实验用Balb/c小鼠,雌雄各3只,12/12小时光/暗调节,温度 $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度40%-70%,自由进水饮食。实验当天对Balb/c小鼠单次尾静脉注射单克隆抗体分子,注射剂量为10mg/kg。取血时间点:给药后5分钟、0.5小时、2小时、6小时、24小时、48小时、96小时、168小时、336小时、504小时于小鼠眼眶采血。全血样品 $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$ 放置30分钟,12000rpm离心5分钟收集血清,所得血清再于 $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$,12000rpm离心5分钟, -80°C 保存,ELISA检测血清中单克隆抗体分子含量。

[0309] 结果如图14所示。结果表明,本发明抗PVRIG抗体ADI-56127-G1单次注射在小鼠体内半衰期为160小时。

[0310] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

<220>

<223> ADI-56204的轻链可变区

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ADI-56249的重链可变区

<400> 5

```

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

```


Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Pro Ile Tyr Glu His Phe Asn Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ADI-56145的轻链可变区

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ser Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Ser His His Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCDR1

<400> 9

Gly Thr Glu Ser Val Asp Ala Ile Ser
1 5

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCDR2

<400> 10

Asp Ile Ile Pro Phe Phe Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly

1 5 10 15

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCDR3

<400> 11

Ala Arg Glu Gly Gly Thr Ser Trp Thr His Phe Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR1

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR2

<400> 13

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR3

<400> 14

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Thr

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCDR1

<400> 15

Tyr Thr Phe Thr His Tyr Gly Ile Tyr

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCDR2

<400> 16

His Ile Tyr Ala Tyr Ser Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCDR3

<400> 17

Ala Arg Gly Ser Pro Thr Tyr Glu His Phe Asn Trp Phe Asp Pro

1 5 10 15

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR1

<400> 18

Gln Ala Ser Asp Asp Ile Ser Asp Tyr Leu Asn

1	5	10	
<210> 19			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> LCDR2			
<400> 19			
Asp Ala Ser Ser Leu His Thr			
1	5		
<210> 20			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> LCDR3			
<400> 20			
Gln Gln Tyr Gly Asn Leu Pro Ile Thr			
1	5		
<210> 21			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> HCDR1			
<400> 21			
Gly Thr Phe Ser Thr Phe Ala Ile Ser			
1	5		
<210> 22			
<211> 16			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> HCDR2			
<400> 22			
Asp Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly			
1	5	10	15
<210> 23			
<211> 14			

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> HCDR3
 <400> 23
 Ala Arg Gly Pro Leu Glu Gly Lys Val Ser Pro Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> LCDR1
 <400> 24
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Thr Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15
 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> LCDR2
 <400> 25
 Val Gly Ser Thr Arg Ala Ser
 1 5
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> LCDR3
 <400> 26
 Met Gln Glu Arg Gln Phe Pro Ile Thr
 1 5
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> HCDR1

<400> 27

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCDR2

<400> 28

Trp Ile Ser Ser Tyr Asp Ala Ser Thr Lys Tyr Ser Gln Glu Leu Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCDR3

<400> 29

Ala Arg Gly Ser Pro Ile Tyr Glu His Phe Asn Trp Phe Asp Pro

1 5 10 15

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR1

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR2

<400> 31

Asp Ser Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR3

<400> 32

Gln Gln Leu Ser His His Pro Leu Thr

1 5

<210> 33

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 野生型人IgG1重链恒定区

<400> 33

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

	165		170		175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu					
	180		185		190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn					
	195		200		205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly					
	210		215		220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu					
225		230		235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr					
	245		250		255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn					
	260		265		270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe					
	275		280		285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn					
	290		295		300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr					
305		310		315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
	325				

<210> 34

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 经L234A、L235A改造的重链恒定区

<400> 34

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

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

<210> 35

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人IgG4 重链恒定区

<400> 35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1	5	10	15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr			
65	70	75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
	100	105	110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
	115	120	125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
	130	135	140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
145	150	155	160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe			
	165	170	175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
	180	185	190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu			
	195	200	205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
	210	215	220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys			
225	230	235	240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
	245	250	255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
	260	265	270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
	275	280	285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
	290	295	300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
305	310	315	320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly

325

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人kappa轻链恒定区

<400> 36

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 37

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 人PVRIG胞外段氨基酸序列

<400> 37

Thr Pro Glu Val Trp Val Gln Val Arg Met Glu Ala Thr Glu Leu Ser

1 5 10 15

Ser Phe Thr Ile Arg Cys Gly Phe Leu Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu

20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Gly Gly Pro Asn Gly Ala Gly Gly Thr Thr Leu

35 40 45

Ala Val Leu His Pro Glu Arg Gly Ile Arg Gln Trp Ala Pro Ala Arg

50 55 60

Gln Ala Arg Trp Glu Thr Gln Ser Ser Ile Ser Leu Ile Leu Glu Gly

Cys Ala Arg Val Gly Pro Asp Val Ser His Pro Pro Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 抗TIGIT抗体VL氨基酸序列

<400> 41

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCDR1

<400> 42

Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Asp His Tyr Trp Thr
 1 5 10

<210> 43

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCDR2

<400> 43

Thr Val Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Phe His Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCDR3

<400> 44

Ala Arg Val Gly Pro Asp Val Ser His Pro Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR1

<400> 45

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR2

<400> 46

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR3

<400> 47

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ile Thr

<223> LCDR1

<400> 53

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Leu Asn Tyr Val His

1 5 10 15

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR2

<400> 54

Leu Gly Ser Tyr Leu Asp Ser

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LCDR3

<400> 55

Gln Gln Ser Trp Glu Leu Pro Leu Thr

1 5

过表达人PVRIG CHO细胞结合

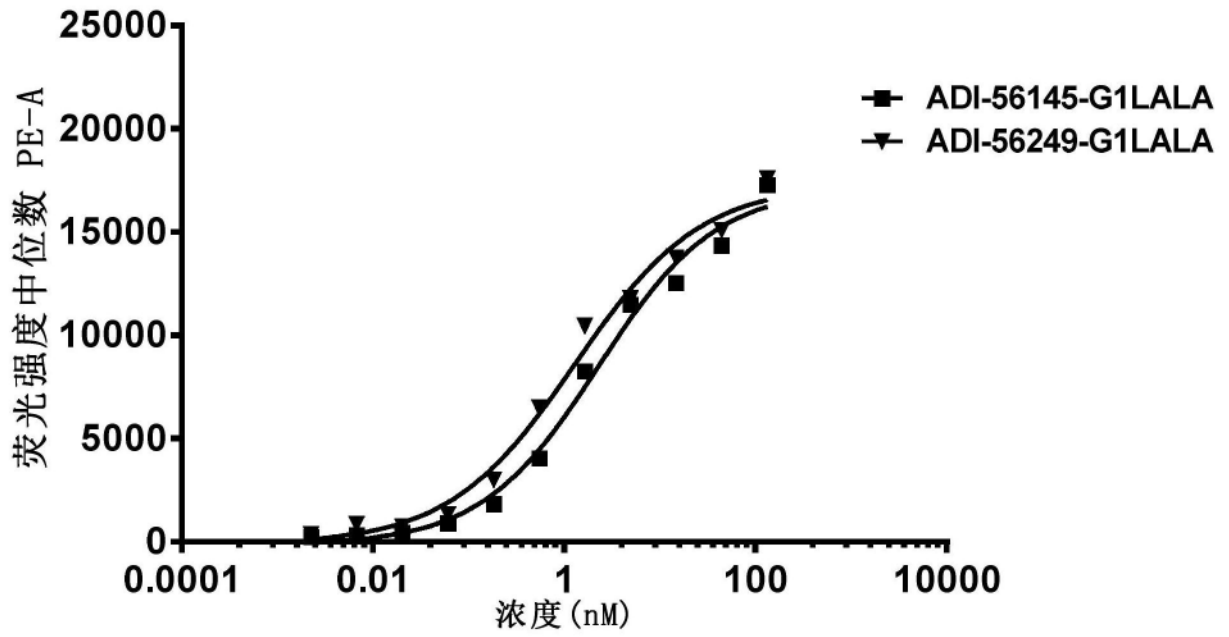


图1A

过表达人PVRIG CHO细胞结合

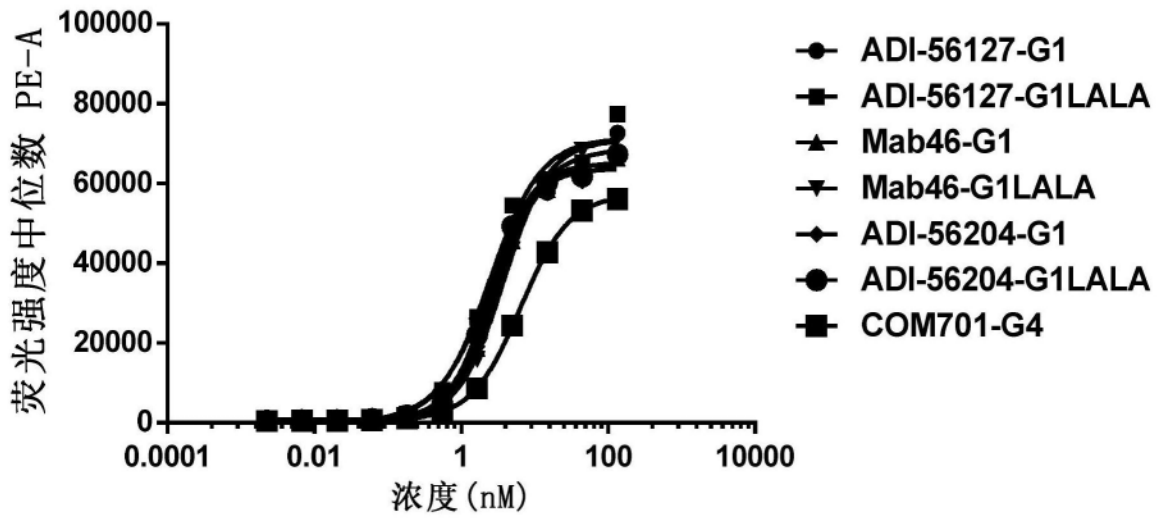


图1B

过表达食蟹猴PVRIG CHO细胞结合

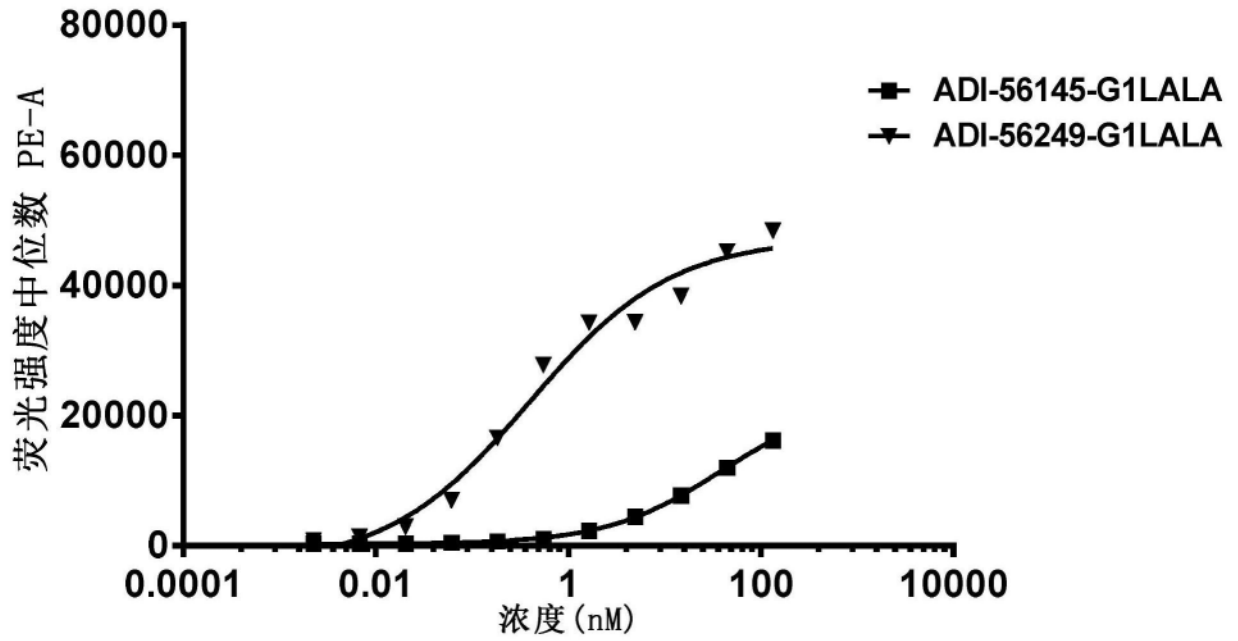


图2A

过表达食蟹猴PVRIG CHO细胞结合

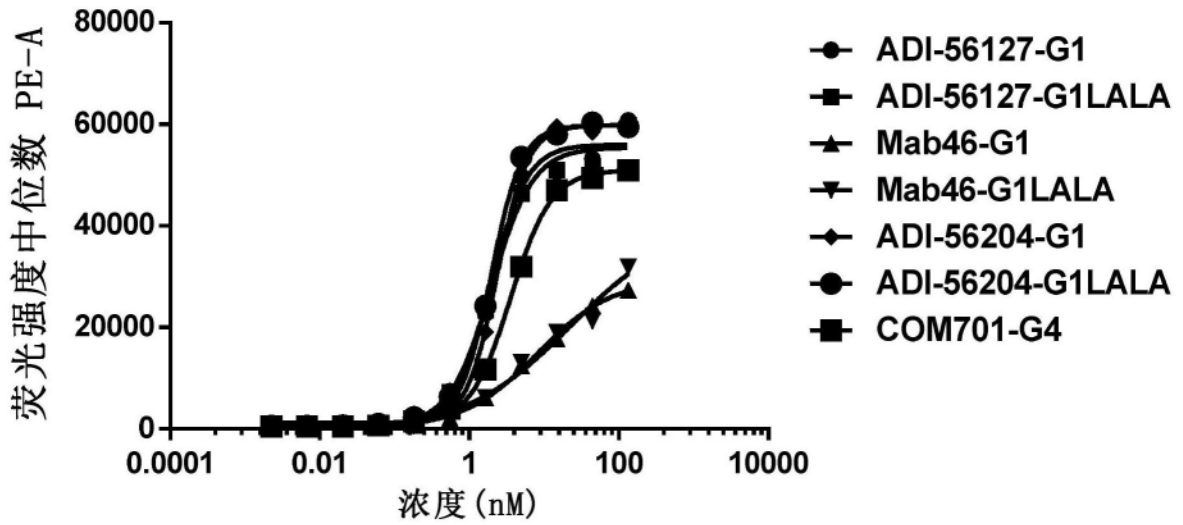


图2B

过表达小鼠PVRIG CHO细胞结合

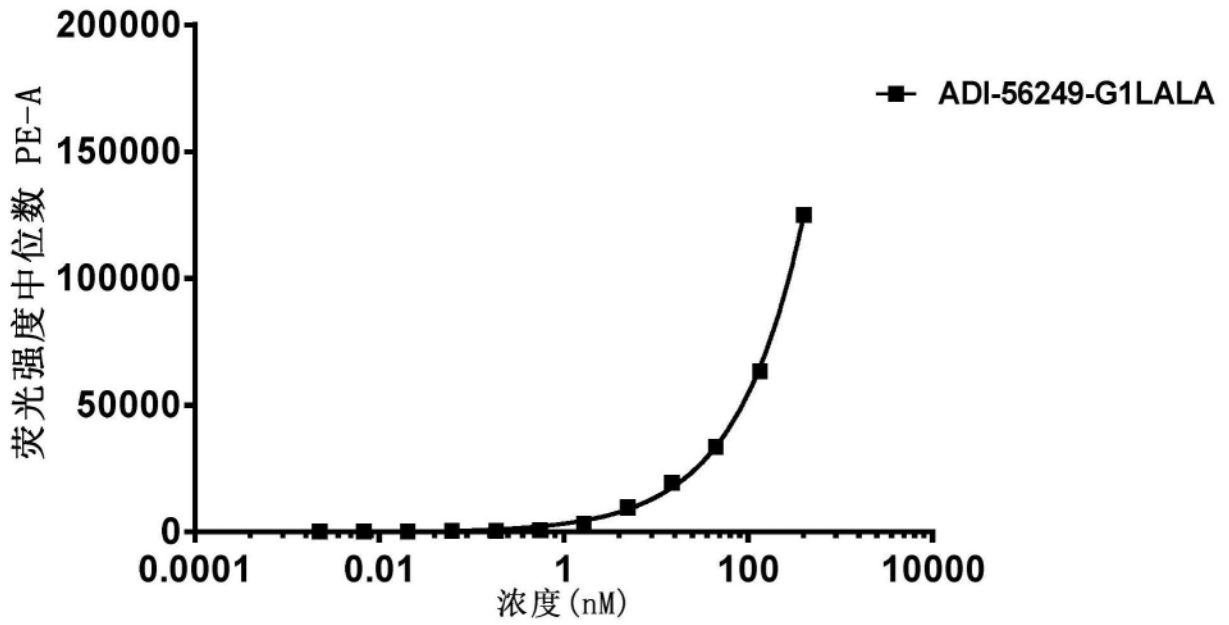


图3A

过表达小鼠PVRIG CHO细胞结合

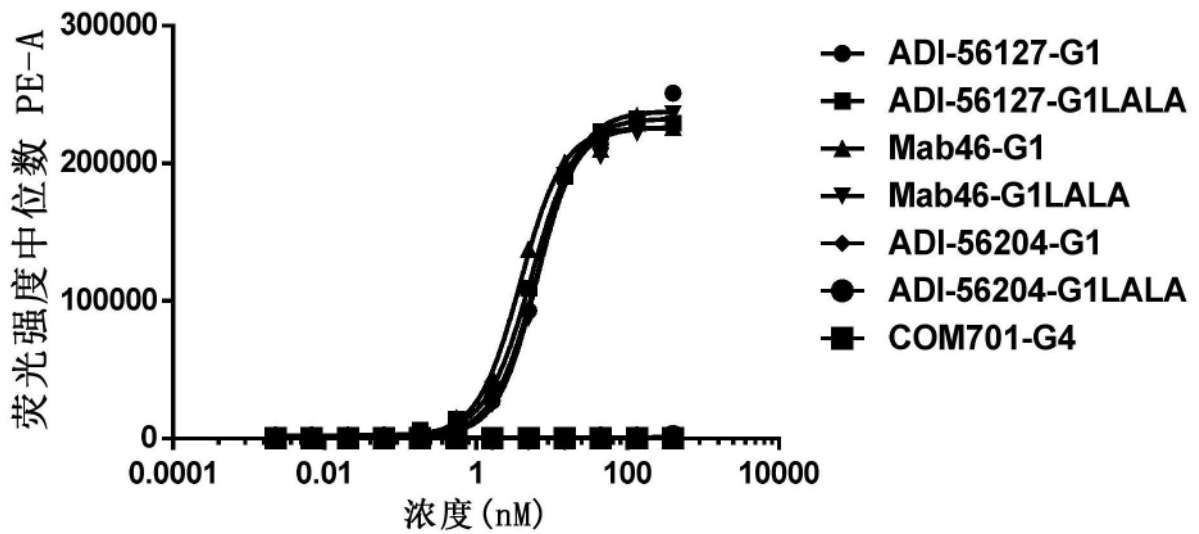


图3B

基于过表达人CD112 CHO细胞PVRIG结合阻断试验

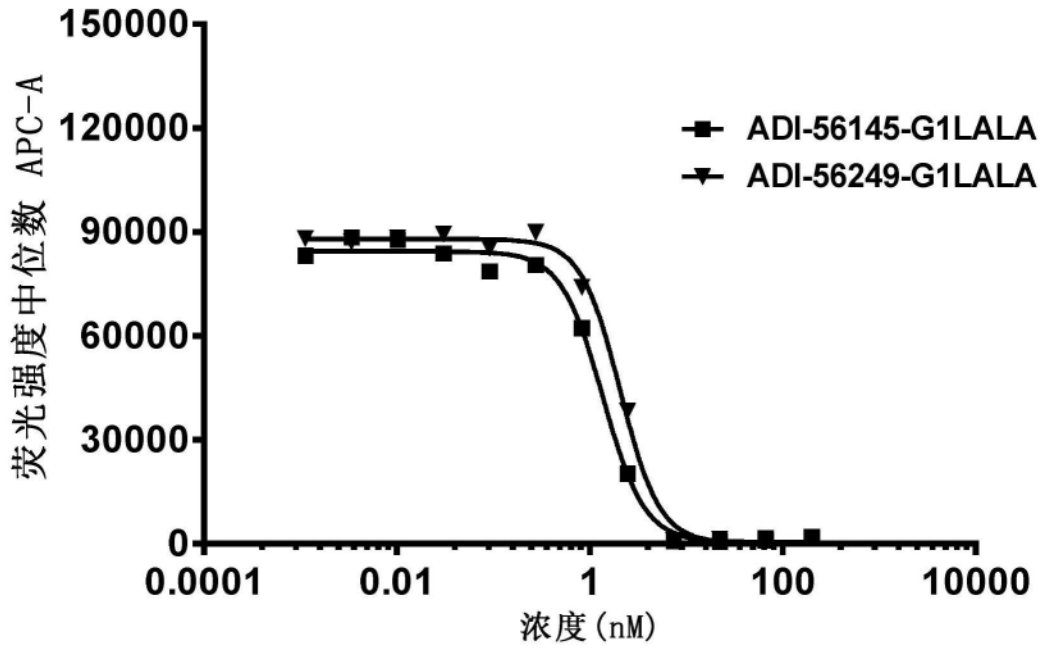


图4A

基于过表达人CD112 CHO细胞PVRIG结合阻断试验

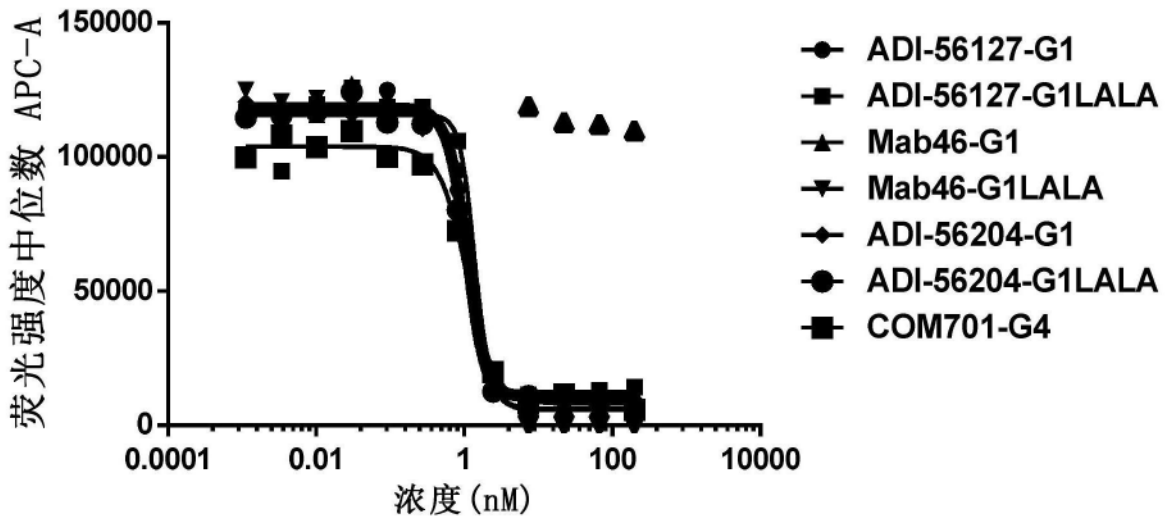


图4B

小鼠CD112与小鼠PVRIG蛋白结合阻断试验

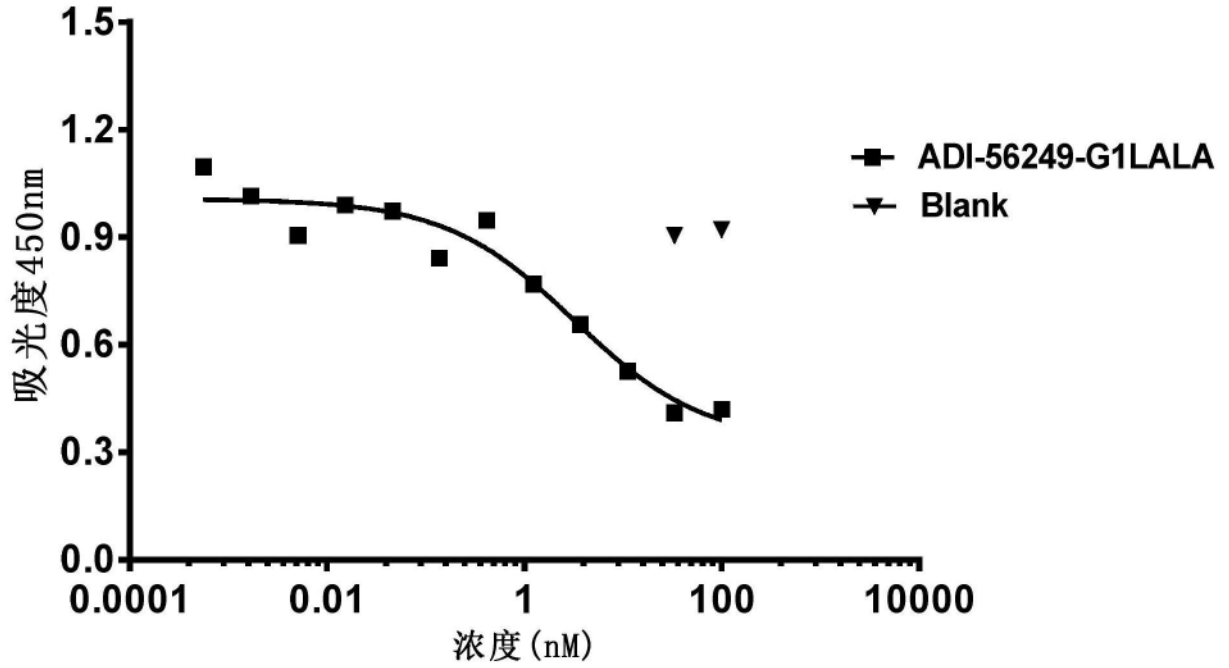


图5A

小鼠CD112与小鼠PVRIG蛋白结合阻断试验

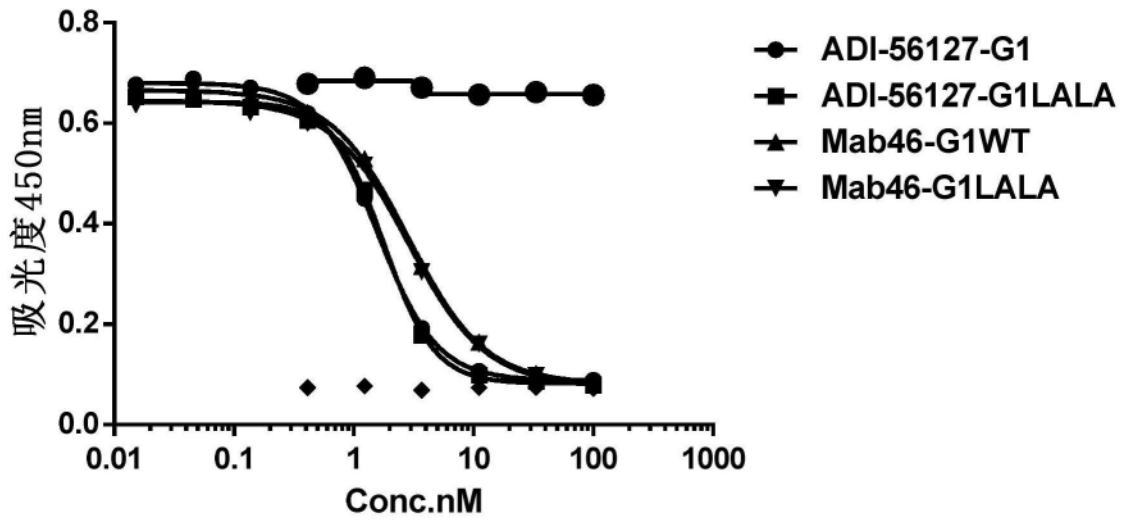


图5B

激活人T细胞结合试验

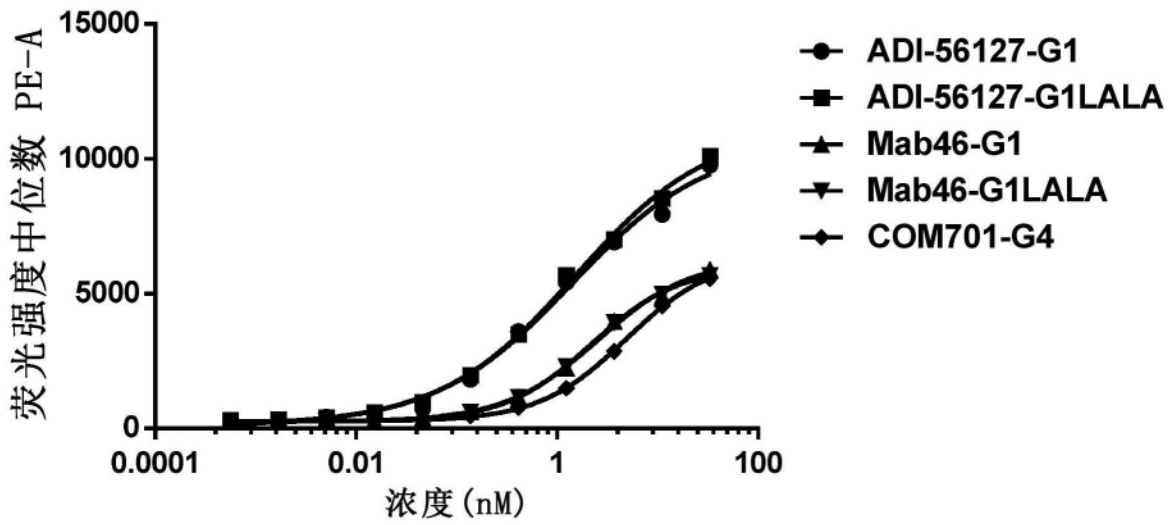


图6

Jurkat-TIGIT-PVRIG+CHOK1-CD155-CD112

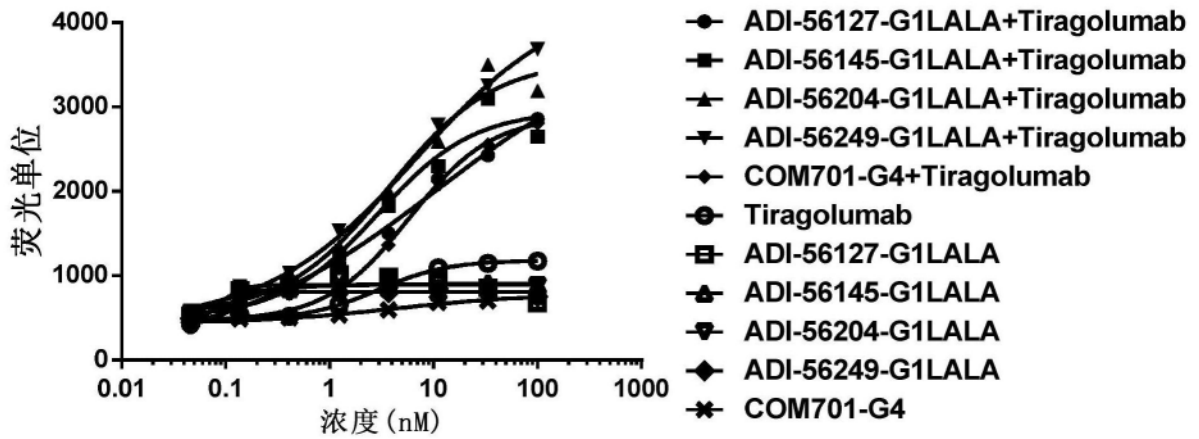


图7

Jurkat-TIGIT-PVRIG-PD1+CHOK1-CD155-CD112-PDL1

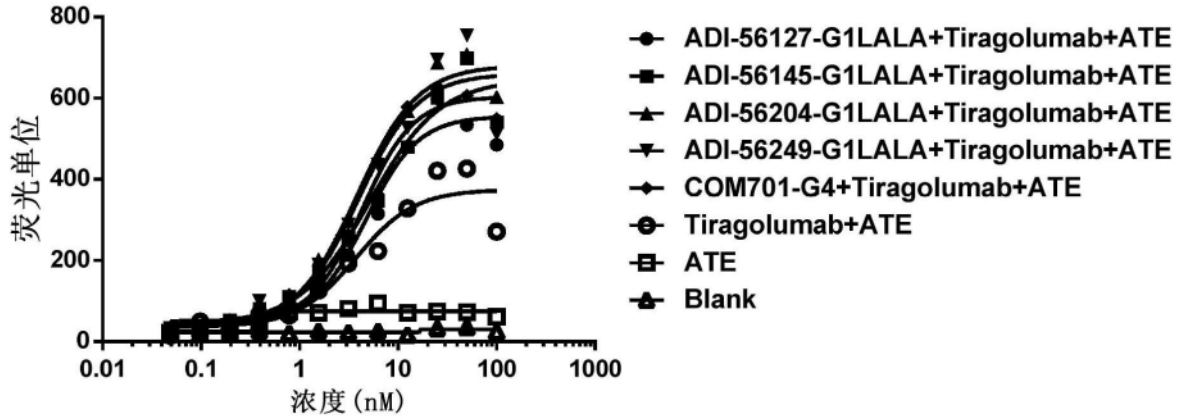


图8

基于过表达人PVRIG CHO细胞的ADCC活性试验

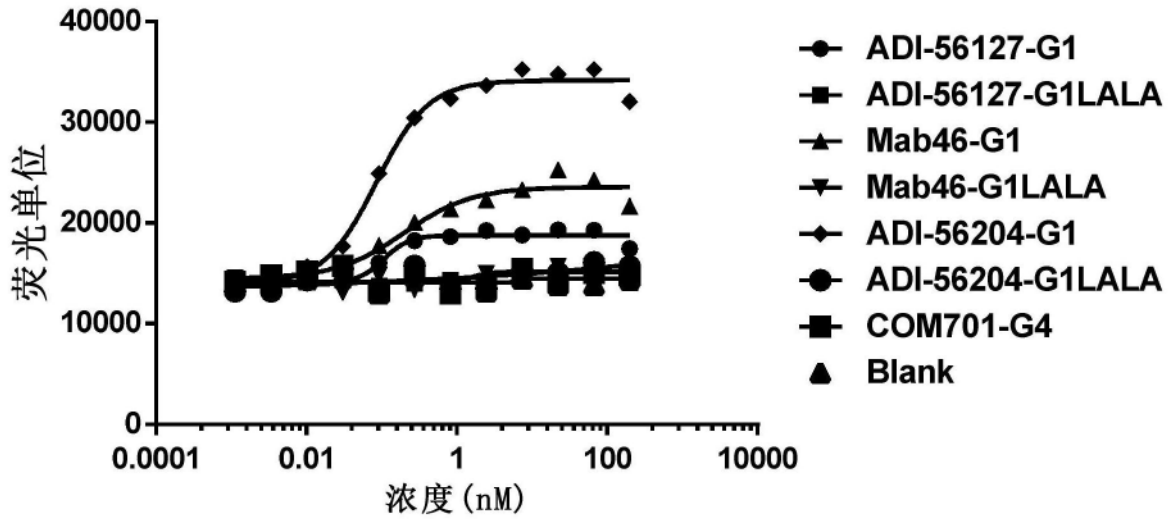


图9A

基于过表达食蟹猴PVRIG CHO细胞的ADCC活性试验

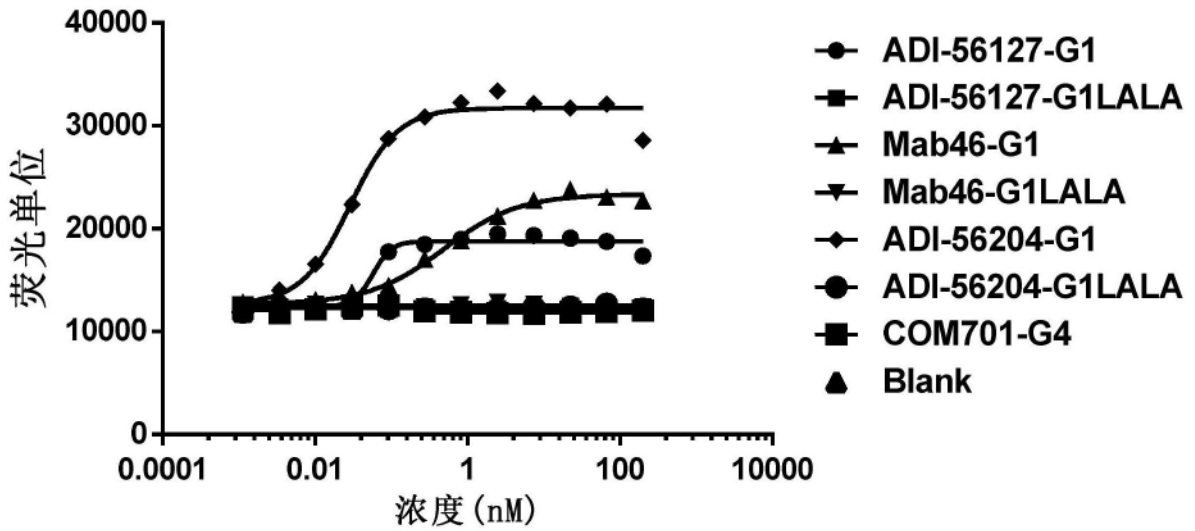


图9B

基于过表达小鼠PVRIG CHO细胞的ADCC活性试验

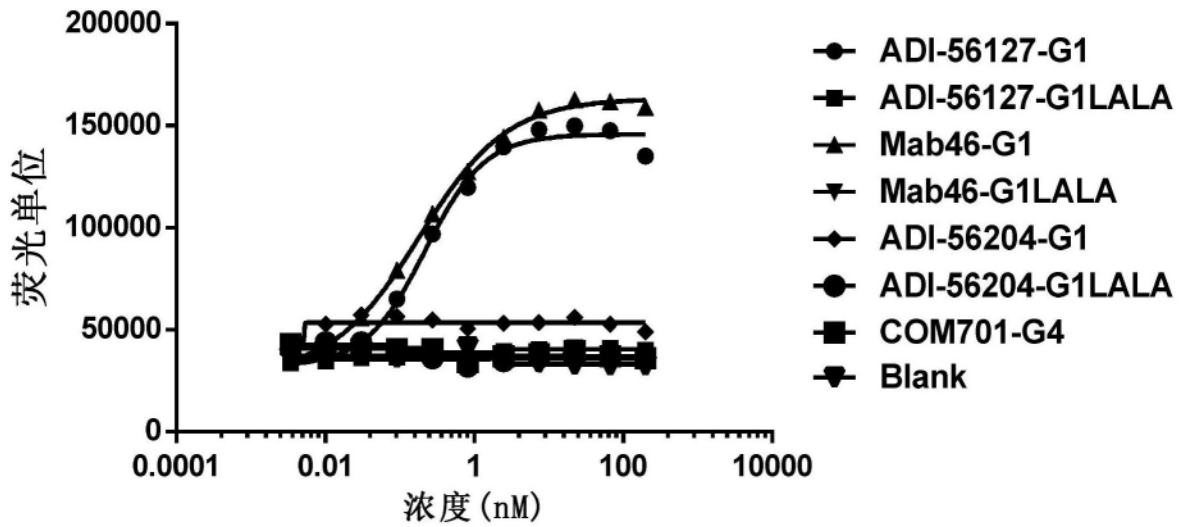


图9C

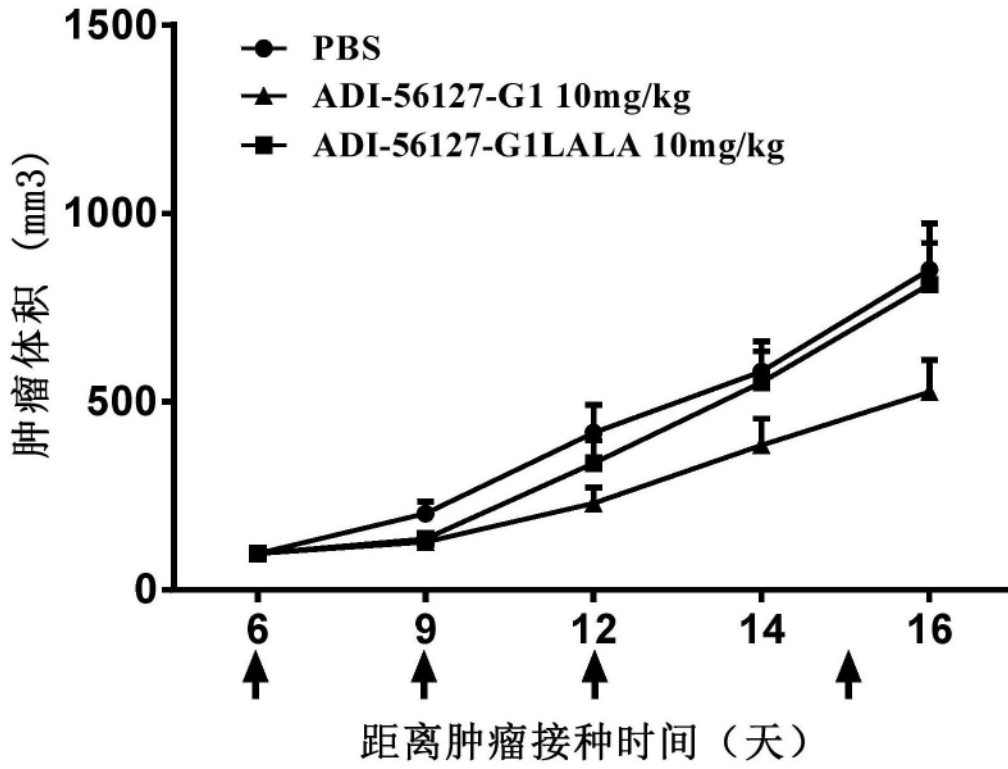


图10

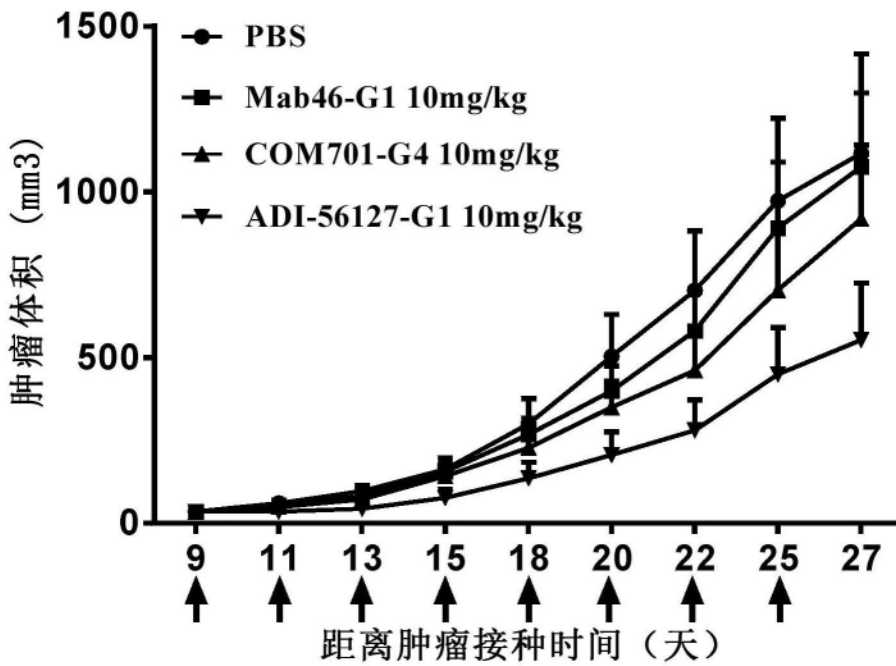


图11

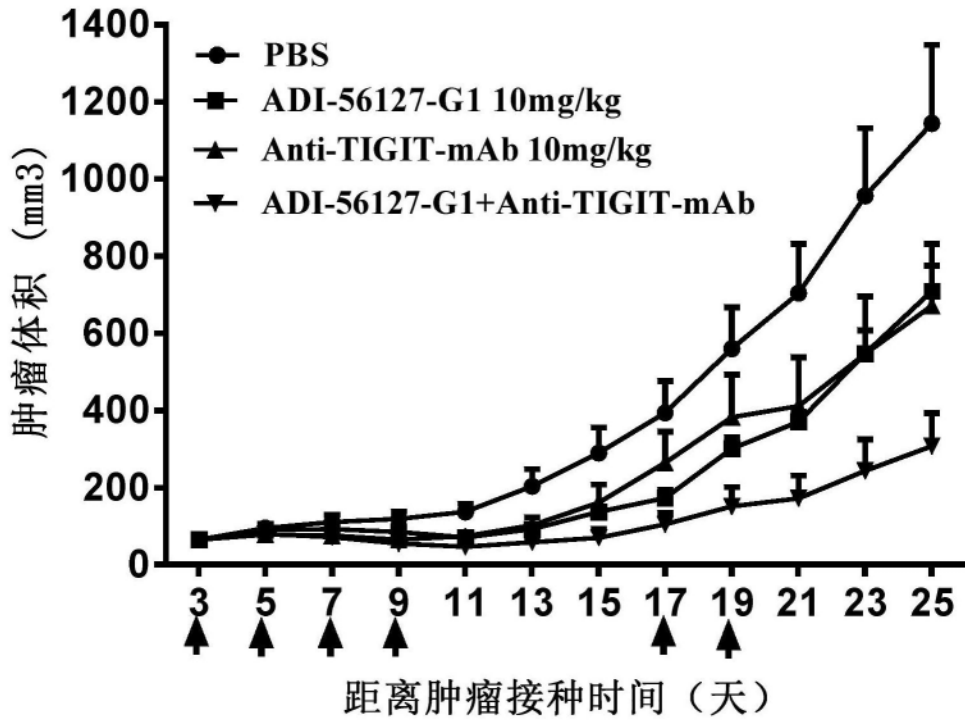


图12

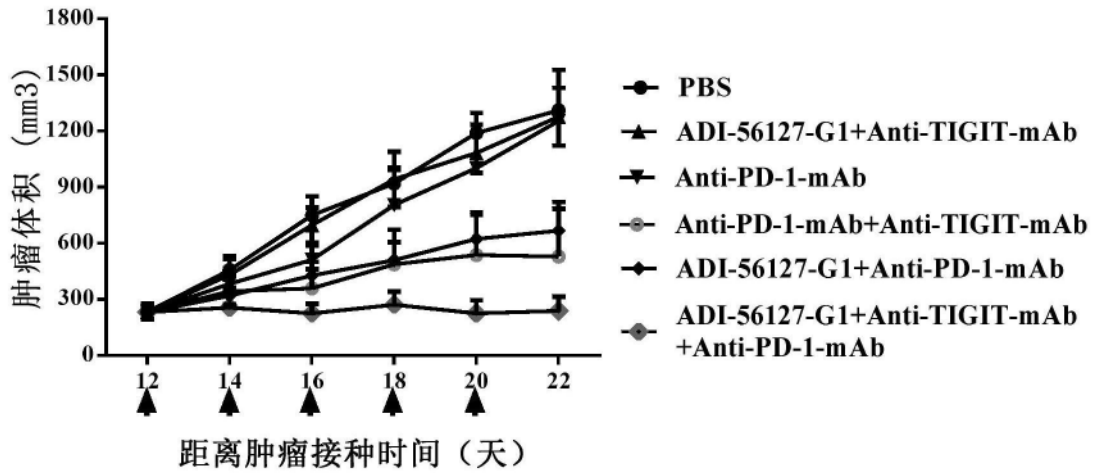


图13

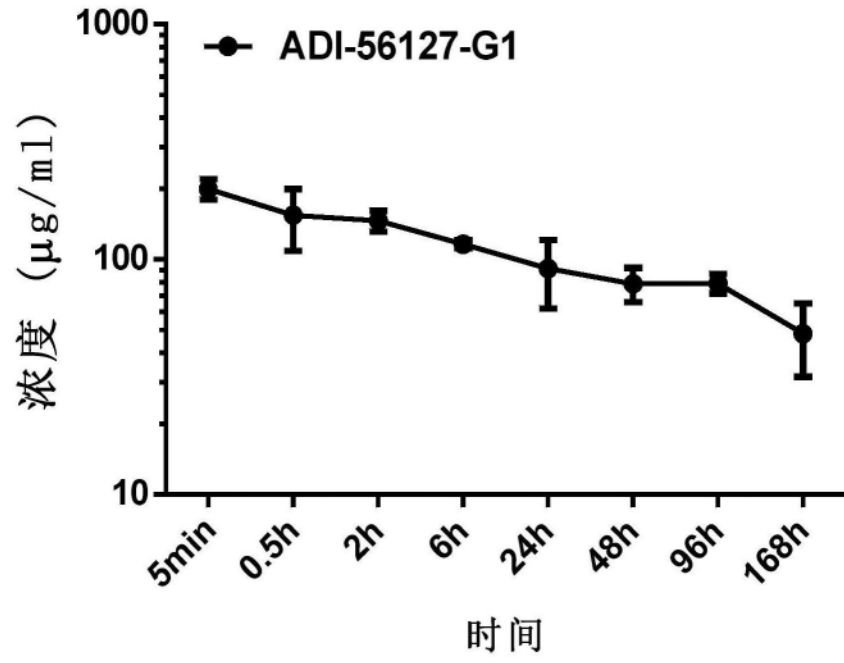


图14