

· 研究论文 ·

抗 TIGIT 单克隆抗体的制备及体外生物学活性的初步研究

吴振华[#], 李娜[#], 陈娟, 蒋美珠, 陈瑶, 梅小芬, 王海彬^{*}

(浙江博锐生物制药有限公司, 浙江台州 318000)

摘要: T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白 (TIGIT) 通过多种机制抑制固有和适应性免疫, 是肿瘤免疫治疗的新靶点。本研究利用重组人源 TIGIT 胞外区蛋白免疫 BALB/c 小鼠 (本研究中的小鼠按照国际实验动物护理和使用准则进行使用, 并经委托单位京天成生物技术 (北京) 有限公司实验动物伦理委员会批准), 分离并提取小鼠脾淋巴细胞常规融合, 成功筛选得到抗 TIGIT 单克隆抗体 c7D3, 并初步研究了其生物学活性。结果表明, 抗体 c7D3 能高亲和地结合 TIGIT, 并能有效阻断 TIGIT 与配体的结合。细胞功能实验证实, c7D3 能激活 T 细胞, 在 TIGIT/CD155 报告基因实验中促进荧光素酶表达, 提高人外周血单个核细胞分泌细胞因子的能力。本研究表明, 抗体 c7D3 具有高亲和力和良好的生物学活性, 有望开发成为新的肿瘤免疫治疗的抗体药物。

关键词: TIGIT; 杂交瘤; 单克隆抗体; 嵌合抗体; 生物学活性

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)11-3310-06

Preparation of anti-human TIGIT monoclonal antibody and preliminary study of its biological activity

WU Zhen-hua[#], LI Na[#], CHEN Juan, JIANG Mei-zhu, CHEN Yao, MEI Xiao-fen, WANG Hai-bin^{*}

(BioRay Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318000, China)

Abstract: T cell immune receptor with Ig and ITIM domains (TIGIT), a promising new target in cancer immunotherapy, plays a critical role in limiting adaptive and innate immunity against tumors. The extracellular domain of human TIGIT was used to immunize BALB/c mice, and a new anti-human TIGIT chimeric antibody (c7D3) was developed. The mice in this study were used in accordance with the international guidelines for the care and use of laboratory animals, and the animal study was approved by the Institutional Animal Ethics Committee of AbMax Biotechnology. The biological activity of c7D3 was studied. The results showed that c7D3 exhibited high affinity for TIGIT and effectively inhibited the interaction between TIGIT and its ligands. Cell-based assays indicated that c7D3 induced strong luciferase signaling in TIGIT/CD155 signaling reporter assay and enhanced cytokine secretion in a T cell stimulation assay. The data showed that c7D3 has high binding affinity and excellent blocking bioactivity, supporting the further advancement for therapeutic application.

Key words: TIGIT; hybridoma; monoclonal antibody; chimeric antibody; bioactivity

近年来, 肿瘤免疫治疗彻底改变了晚期恶性肿瘤的临床治疗方式, 成为继手术、放疗和化疗后又一重要手段^[1,2]。以程序性死亡受体 1/程序性死亡配体 1 (PD-1/PD-L1)、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白-4 (CTLA-4) 等

免疫检查点抑制剂为代表的免疫疗法可以阻断免疫抑制信号, 从而促进 T 细胞的激活和对肿瘤的免疫应答^[3]。但是, 目前免疫疗法存在响应率不高和耐药性的问题, 表明存在其他免疫耐受机制帮助肿瘤逃脱免疫监控^[4,5]。

T 细胞免疫球蛋白和 ITIM 结构域蛋白 (TIGIT) 是一种免疫共抑制受体, 属免疫球蛋白超家族成员, 主要

收稿日期: 2022-01-26; 修回日期: 2022-03-25.

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-576-89007929, E-mail: haibin.wang@bioraypharm.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0121

表达于效应 T 细胞、记忆 T 细胞、调节 T 细胞 (Treg)、自然杀伤 (NK) 细胞中^[6,7]。TIGIT 目前已知的配体有 CD155 和 CD112, 其主要在树突状细胞 (DC)、巨噬细胞、T 细胞等免疫细胞表面表达, 此外, 在很多肿瘤细胞上也有高表达^[8,9]。TIGIT 信号通路在肿瘤细胞逃脱免疫监视中发挥了重要作用。TIGIT 与 CD155 或 CD112 的结合可减弱 DC 细胞的抗原呈递功能, 或直接向 T 细胞和 NK 细胞内部传递抑制性信号^[10]。当 TIGIT 在 Treg 上表达时, TIGIT 信号通路增强 Treg 的抑制功能, 从而抑制多种免疫细胞的活性^[11,12]。研究表明, 阻断 TIGIT 信号通路可增强效应 T 细胞和 NK 细胞活性, 促进免疫细胞表达干扰素- γ (IFN- γ)^[13,14]。在小鼠肿瘤模型中靶向 TIGIT 单抗可减缓或抑制肿瘤的生长, 临床上抗 TIGIT 单抗与其他免疫检查点抑制剂的联用可提高患者的响应率, 并降低疾病风险^[15-17]。因此, 特异性的抗 TIGIT 单抗可增强抗肿瘤免疫应答, 是实现肿瘤免疫治疗的有效策略。

为开发新型高功效的 TIGIT 抗体, 本研究利用重组人胞外区 TIGIT 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 筛选得到一株特异性抗 TIGIT 单克隆抗体, 并初步研究了其生物学活性, 为后续进一步的开发奠定了基础。

材料与方 法

细胞系 293T 细胞来源于美国典型培养物保藏中心 (ATCC); 表达 TIGIT 的慢病毒上清来源于赛业生物科技有限公司; CHO-S 细胞来源于 Thermo Fisher 公司; TIGIT 效应细胞、CD155 aAPC/CHO-K1 细胞来源于金斯瑞生物科技股份有限公司; 人外周血单个核细胞 (PBMC) 来源于澳赛尔斯生物技术有限公司 (Allcells)。

主要材料和试剂 BALB/c 小鼠, 4 周龄, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号: SYXK (京) 2017-0033; 胎牛血清 (FBS)、磷酸缓冲盐溶液 (PBS)、DMEM 培养基购自 Gibco 公司; Hybri-Max HAT 培养基补充物 (HAT)、弗氏完全和不完全佐剂购自 Sigma 公司; PEG2000 购自 Roche 公司, CD155、TIGIT 蛋白、生物素标记 TIGIT 蛋白购自北京百普赛斯生物科技股份有限公司 (Acrobiosystems); BSA 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; TMB 购自湖州英创生物科技有限公司; HRP 标记的山羊抗人 IgG、FITC 标记的山羊抗人 IgG、HRP 标记的链霉亲和素购自 Abcam 公司; 对照抗体 22G2、IgG1 购自泰州市百英生物科技有限公司; 镍柱购自 Solarbio 公司; 抗 PD-L1 抗体为本公司保存; 白细胞介素 2 (IL-2) 和 IFN- γ 检测试剂盒购自 Invitrogen 公司。

动物免疫及细胞融合 委托京天成生物技术 (北京) 有限公司开展, 以制备的 100 μg 胞外区 TIGIT 蛋白 (氨基酸 Met22~Pro141) 为免疫原, 加弗氏完全佐剂乳化后, 背部多点皮下注射免疫 BALB/c 小鼠, 并分离成功免疫的小鼠脾脏淋巴细胞, 按 1:1 比例与对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合, 用含 15% FBS、1 \times HAT 的 DMEM 选择性培养基培养杂交瘤细胞。动物实验符合国际实验动物护理和使用准则, 并经京天成生物技术 (北京) 有限公司实验动物伦理委员会批准。

细胞株的筛选及抗体纯化 通过结合和竞争 ELISA 实验筛选杂交瘤上清液, 将筛选出的阳性杂交瘤用有限稀释法克隆化培养, 经多次克隆化培养后, 挑选出稳定的杂交瘤细胞株。小鼠腹腔注射杂交瘤细胞制备腹水, 腹水经饱和硫酸铵沉淀和亲和层析纯化制备鼠抗人 TIGIT 单克隆抗体。

轻重链可变区测序及抗体表达 按照常规方法对筛选到的阳性杂交瘤细胞株进行 RNA 提取并逆转为 cDNA, 并对抗体基因序列进行序列确定, 得到 7D3 的重链可变区和轻链可变区序列。将 7D3 的重链、轻链可变区分别和人源抗体重链 IgG1 恒定区、人源抗体轻链 kappa 恒定区连接, 克隆到载体 pBRex-3 中并转染至 CHO-S 细胞, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的摇床上培养约 7 天后收集上清液, 用 protein A 纯化, 得到嵌合抗体 c7D3。将纯化后的抗体通过 SDS-PAGE 凝胶电泳和 SEC-HPLC 法检测。

ELISA 检测抗体与人 TIGIT 的结合活性 将人 TIGIT 以 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度稀释到 PBS 中, 每孔 100 μL 包被微孔板 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。弃包被液, PBST 洗板后, 用 5% BSA-PBST 封闭液 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h; 洗板后, 每孔加入起始浓度 133.33 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、4 倍梯度稀释的抗 TIGIT 抗体 100 μL , 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。反应完毕洗板, 每孔加入 1:10 000 稀释 HRP 标记的山羊抗人 IgG 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。洗板后加入 TMB 溶液, 室温避光反应 10 min 后, 加入 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2SO_4 终止反应。置于酶标仪上 450 nm 波长检测吸光度, 并用 GraphPad Prism 7 软件进行四参数曲线拟合, 计算半数有效浓度 (EC_{50}) 值。

293T-TIGIT 细胞株构建 取表达 TIGIT 的慢病毒上清感染 293T 细胞, 48 h 后, 进行加压筛选。2 周后, 流式细胞术检测 TIGIT 的表达。

流式细胞术检测抗体与细胞膜表达的 TIGIT 结合活性 收集对数期生长的 293T-TIGIT 细胞, 以 2% BSA-PBS 离心洗涤细胞 2 次, 计数后, 每管 1×10^5 个分装, 加入起始浓度 13.3 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、5 倍梯度稀释的 c7D3 抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。洗涤细胞 2 次后, 加入 1:100 稀

释的FITC标记的山羊抗人IgG, 4 °C避光反应30 min。洗涤细胞2次后, 用流式细胞仪检测。

竞争ELISA法检测抗体对TIGIT与CD155结合的抑制 将CD155以PBS稀释至 $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔100 μL 加入酶标板中4 °C包被过夜。PBST洗板后加入2% BSA-PBST封闭液, 37 °C封闭1.5 h。将起始浓度 $133.33 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗体进行4倍稀释, 与 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 生物素标记的TIGIT每孔各50 μL 加入板上, 37 °C孵育1 h。洗板后每孔加入1:1 000稀释的HRP标记的链霉亲和素100 μL , 37 °C反应1 h。洗板后, 每孔加入TMB溶液100 μL , 室温避光反应30 min后, 以 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 终止反应, 酶标仪检测450 nm波长吸光度, 并用GraphPad Prism 7软件进行四参数曲线拟合, 计算半数抑制浓度(IC_{50})值。

竞争ELISA法检测抗体对TIGIT与CD112结合的抑制 将CD112以PBS稀释至 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔100 μL 加入酶标板中4 °C包被过夜。PBST洗板后加入2% BSA-PBST封闭液, 37 °C封闭1.5 h。将起始浓度 $133.33 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的抗体进行4倍稀释, 与 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 生物素标记的TIGIT每孔各50 μL 加入板上, 37 °C孵育1 h。洗板后每孔加入1:1 000稀释的HRP标记的链霉亲和素100 μL , 37 °C反应1 h。洗板后, 每孔加入TMB溶液100 μL , 室温避光反应30 min后, 以 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ 终止反应, 酶标仪检测450 nm波长吸光度, 并用GraphPad Prism 7软件进行四参数曲线拟合, 计算 IC_{50} 值。

抗体抑制TIGIT/CD155报告基因活性 将CD155 aAPC/CHO-K1细胞接种到96孔细胞培养板, 培养箱中孵育16~20 h, 然后加入TIGIT效应细胞和c7D3抗体, 培养板置于培养箱中孵育约6 h, 加入荧光素酶底物, 酶标仪上读取化学发光值。依据相对化学发光信号值(RLU)和最终检测浓度的对应关系, 用GraphPad Prism 7软件进行四参数曲线拟合建立相应的量效曲线图。

抗体激活PBMC细胞释放细胞因子 将CD155

以PBS稀释至 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度, 每孔100 μL 加至细胞培养板中4 °C包被过夜; 弃上清, 每孔加入 1×10^5 个PBMC细胞、 $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 金黄色葡萄球菌肠毒素B (SEB), 及梯度稀释的抗体c7D3或等量的同型IgG1空白对照抗体或c7D3抗体与PD-L1抗体的组合, 置于37 °C、5% CO_2 培养箱孵育4天。收集细胞培养上清, ELISA检测IL-2和IFN- γ 的浓度。

统计学分析 实验数据均采用GraphPad Prism 7处理, 表示为 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 。两组间的差异性比较采用Student's *t*检验分析。

结果

1 单抗制备

以重组人TIGIT蛋白胞外区为免疫原免疫小鼠, 采用细胞融合方式构建并获得杂交瘤细胞, ELISA检测筛选出10个阳性杂交瘤克隆(图1A)。竞争ELISA法检测这10个杂交瘤细胞株阻断TIGIT与CD155结合的抑制率, 筛选出抑制率最强的单克隆细胞株7D3(图1B)。制备并纯化鼠抗人单克隆抗体7D3, 将对应杂交瘤细胞株进行轻重链可变区测序, 并与人源抗体重链IgG1恒定区、人源抗体轻链kappa恒定区连接, 表达并纯化嵌合抗体c7D3。SDS-PAGE电泳检测, 表明c7D3抗体纯度>95%(图2A), 通过SEC-HPLC测定抗体纯度为97.1%(图2B)。

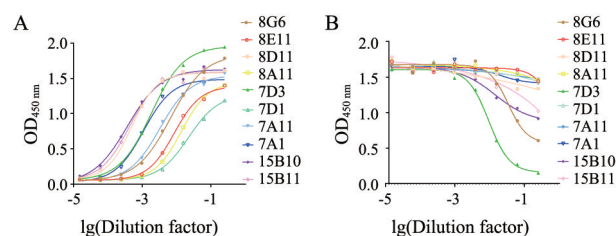


Figure 1 The binding activity of hybridoma supernatants to TIGIT (A) and the blocking activity towards TIGIT/CD155 interaction (B) were determined by ELISA. TIGIT: T cell immune receptor with Ig and ITIM domains

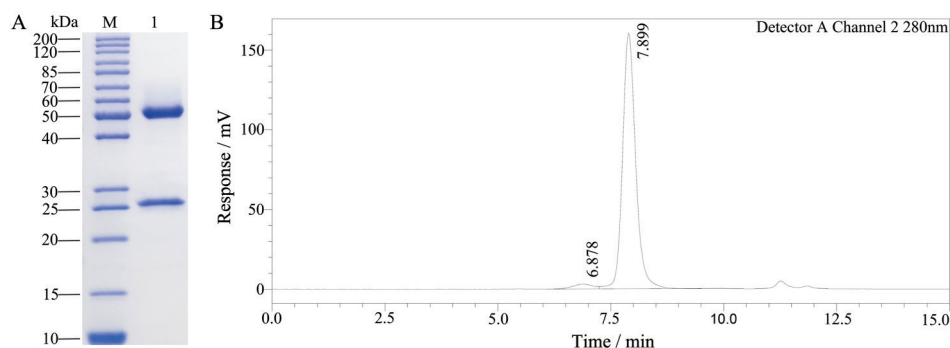


Figure 2 Purity analysis of antibody c7D3 by SDS-PAGE (A) and SEC-HPLC (B). M: Protein marker (kDa); Lane 1: c7D3 under reducing condition

2 抗体与 TIGIT 的结合活性

通过慢病毒转染构建表达 TIGIT 的 293T 细胞株, 以抗体 22G2 检测细胞株表达, 流式检测结果见图 3A, 与 293T 细胞相比, 293T-TIGIT 细胞表达 TIGIT 的阳性细胞达到 90% 以上, 表明 293T-TIGIT 细胞可以稳定表达 TIGIT。

采用 ELISA 和流式细胞术的方法检测单克隆抗体 c7D3 与 TIGIT 的结合活性。包被 TIGIT 蛋白, 检测不同浓度的 c7D3 与 TIGIT 的结合, 结果见图 3B, c7D3 与 TIGIT 结合的 EC_{50} 值为 $0.104 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对照抗体 22G2 与 TIGIT 结合的 EC_{50} 值为 $0.491 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 表明 c7D3 与 TIGIT 具有较高的结合活性, 且其结合活性强于 22G2。以构建好的 293T-TIGIT 细胞株, 检测单克隆抗体 c7D3 与膜表达 TIGIT 的结合, 如图 3C 所示, 表明 c7D3 能特异地结合膜表达的 TIGIT。

3 抗体竞争抑制结合活性检测

分别包被 CD155 和 CD112 蛋白, 采用竞争 ELISA 法检测单克隆抗体 c7D3 对 TIGIT 与 CD155、CD112 结

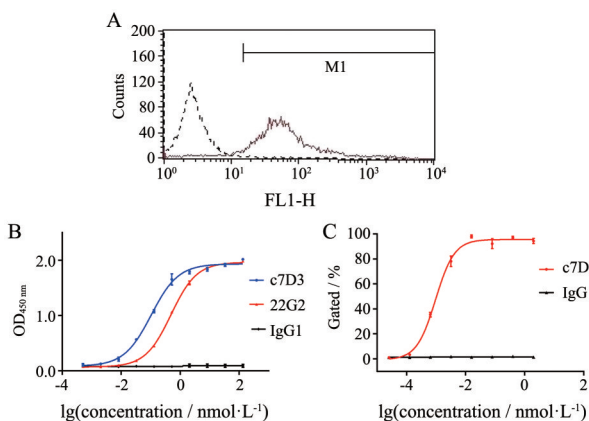


Figure 3 The binding activities of c7D3. A: Analysis of TIGIT expression in 293T-TIGIT cell line by flow cytometry; B: Binding to recombinant TIGIT was analyzed by ELISA; C: Binding to 293T-TIGIT cell line was analyzed by flow cytometry. $n = 3$, mean \pm SEM

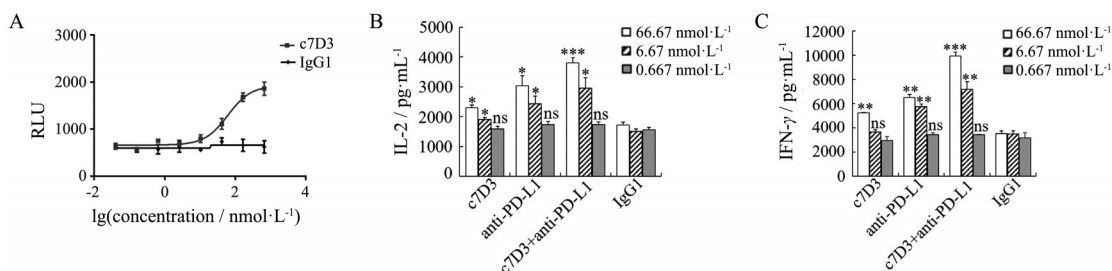


Figure 5 Functional assay of c7D3. A: The effect of c7D3 in a TIGIT/CD155 signaling reporter assay. Data represent a representative experiment; B: The effect of c7D3 and/or anti-PD-L1 mAb on IL-2 production; C: The effect of c7D3 and/or anti-PD-L1 mAb on IFN- γ production. PD-L1: Programmed cell death ligand 1; mAb: Monoclonal antibody; IL-2: Interleukin 2; IFN- γ : Interferon gamma. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs respective isotype control group (IgG1). ns: No significance

合的阻断作用, 结果见图 4A、B, 在抗体阻断 TIGIT 与 CD155 结合实验中, c7D3 和 22G2 的 IC_{50} 分别为 3.338 和 $8.869 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 抗体阻断 TIGIT 与 CD112 结合实验中, c7D3 和 22G2 的 IC_{50} 分别为 18.90 和 $43.39 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果表明, c7D3 抗体能有效阻断 TIGIT/CD155 和 TIGIT/CD112 的结合, 且与对照抗体 22G2 相比, 阻断作用更强。

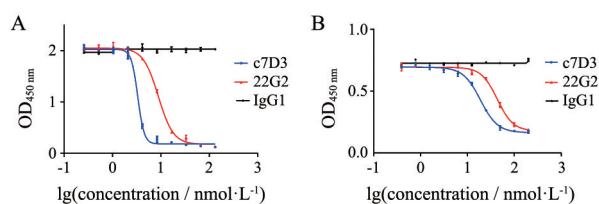


Figure 4 The blocking activities of c7D3 towards TIGIT/CD155 interaction (A) and TIGIT/CD112 interaction (B) were determined by competition inhibition ELISA. $n = 3$, mean \pm SEM

4 TIGIT/CD155 报告基因法测定抗体生物学活性

TIGIT/CD155 报告基因法以表达人源 TIGIT 和萤光素酶报告基因的 Jurkat T 细胞为效应细胞, 以表达人源 CD155 及 T 细胞受体 (TCR) 激活蛋白的 CHO-K1 细胞为抗原呈递细胞。当两种细胞共培养时, TIGIT 与其配体 CD155 相互作用, 抑制 *IL2* 启动子调控的萤光素酶表达, 因此, 在实验体系中引入抗 TIGIT 阻断性抗体后, 可与效应细胞表达的 TIGIT 相结合, 阻断 TIGIT 与 CD155 的相互作用, 解除抑制信号, 并激活 TCR 信号途径和 *IL2* 启动子, 促进萤光素酶的表达, 并催化底物产生化学发光信号。TIGIT/CD155 报告基因实验结果见图 5A, 与 IgG1 对照抗体相比, c7D3 诱导了化学发光信号值的增加, 表明 c7D3 能有效抑制 TIGIT 与其配体的结合, 并激活 T 细胞活化信号通路。

5 抗体激活 PBMC 细胞释放细胞因子

96 孔培养板上包被 CD155, 加入 SEB 体外刺激 PBMC 分泌细胞因子, 通过检测 IL-2 和 IFN- γ 水平评价抗体对人原代 T 淋巴细胞功能的影响。结果如图 5B、C

所示,与IgG1对照抗体相比,c7D3能促进PBMC分泌细胞因子IL-2和IFN- γ ,并且和抗PD-L1抗体联合用药效果优于两者各自单独用药效果,表明c7D3能解除TIGIT对T细胞活化的抑制,促进T细胞激活,而且c7D3与抗PD-L1抗体可能具有协同的促T细胞激活作用。

讨论

以PD-(L)1免疫检查点抑制剂为代表的免疫疗法在多种不同肿瘤中具有良好的治疗效果,但由于其他免疫检查点的参与或肿瘤本身的异质性,临床上只有部分患者获益^[18]。TIGIT是一种免疫检查点蛋白,其在效应T细胞、NK细胞和Treg细胞中表达,通过多种机制抑制T细胞和NK细胞的功能,导致NK细胞耗竭^[19,20]。作为肿瘤治疗的新一代免疫检查点,TIGIT和其他检查点共同参与肿瘤的免疫逃逸,靶向TIGIT单抗或与PD-(L)1抑制剂联合用药成为新的治疗方向^[21-23]。

目前全球尚无抗TIGIT抗体获批上市,但已有十余款靶向TIGIT新药项目推进到临床试验阶段^[24,25]。在临床研究中,抗TIGIT单抗多与抗PD-(L)1抗体以联合治疗方案用于各类实体瘤及血液系统肿瘤。罗氏制药的tiragolumab联合抗PD-L1抗体在转移性非小细胞肺癌及其他各类实体瘤的组合疗法中展现出良好的潜力,被FDA认定为“突破性疗法”^[26];默克公司的vibostolimab为人鼠嵌合单克隆抗体,与pembrolizumab的联合治疗在晚期非小细胞肺癌患者中显示出良好的抗肿瘤活性和耐受性^[27];百济神州生物科技有限公司的ociperlimab联合替雷利珠单抗治疗晚期非小细胞肺癌已处于III期临床试验^[28]。现有临床结果表明,抗TIGIT单抗联合PD-(L)1抑制剂是一种很有前景的肿瘤联合免疫治疗方法。

本研究以人TIGIT胞外区蛋白为免疫原免疫小鼠,通过常规细胞融合成功制备了一种新的抗TIGIT抗体c7D3。初步探讨c7D3生物学活性,表明c7D3与TIGIT有较高亲和力及优良的阻断活性,且细胞水平上具有良好生物功能活性,证实抗体c7D3具有进一步开发成为肿瘤免疫治疗的候选分子的潜力。在下一步研究中,本课题组将对c7D3分子进行人源化改造,对药效学、成药性等方面分析优化,进一步明确其成药可能,为抗TIGIT抗体开发及肿瘤免疫治疗提供新的药物途径,为更好的肿瘤治疗效果提供新的联合用药方案。

作者贡献:吴振华和李娜为本文共同第一作者。吴振华

完成了论文的修改,设计并指导了所有实验;李娜完成了论文撰写及抗体的生物学活性评价;陈娟完成了杂交瘤细胞上清的检测及细胞株构建;蒋美珠、陈瑶、梅小芬完成了结合和竞争方法开发;王海彬完成了论文的审阅。

利益冲突:所有作者声明均不存在利益冲突。

References

- [1] Shao RG. Monoclonal antibody-based cancer immunotherapy [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 1110-1118.
- [2] Kyi C, Postow MA. Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy [J]. FEBS Lett, 2014, 588: 368-376.
- [3] Zarour HM. Reversing T-cell dysfunction and exhaustion in cancer [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22: 1856-1864.
- [4] Tray N, Weber JS, Adams S. Predictive biomarkers for checkpoint immunotherapy: current status and challenges for clinical application [J]. Cancer Immunol Res, 2018, 6: 1122-1128.
- [5] Lesokhin AM, Bal S, Badros AZ. Lessons learned from checkpoint blockade targeting PD-1 in multiple myeloma [J]. Cancer Immunol Res, 2019, 7: 1224-1229.
- [6] Boles KS, Vermi W, Facchetti F, et al. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC [J]. Eur J Immunol, 2009, 39: 695-703.
- [7] Manieri NA, Chiang EY, Grogan JL. TIGIT: a key inhibitor of the cancer immunity cycle [J]. Trends Immunol, 2017, 38: 20-28.
- [8] Harjunpää H, Guillerey C. TIGIT as an emerging immune checkpoint [J]. Clin Exp Immunol, 2020, 200: 108-119.
- [9] Stamm H, Wellbrock J, Fiedler W. Interaction of PVR/PVRL2 with TIGIT/DNAM-1 as a novel immune checkpoint axis and therapeutic target in cancer [J]. Mamm Genome, 2018, 29: 694-702.
- [10] Yu X, Harden K, Gonzalez LC, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells [J]. Nat Immunol, 2009, 10: 48-57.
- [11] Joller N, Hafler JP, Brynedal B, et al. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions [J]. J Immunol, 2011, 186: 1338-1342.
- [12] Ester L, Margarita DV, Vijay K, et al. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function [J]. J Immunol, 2012, 188: 3869-3875.
- [13] Liu S, Zhang H, Li M, et al. Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells [J]. Cell Death Differ, 2013, 20: 456-464.
- [14] Zhang Q, Bi JC, Zheng XD, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity [J]. Nat Immunol, 2018, 19: 723-732.
- [15] Guillerey C, Harjunpää H, Carrié N, et al. TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8⁺ T cell immunity against multiple myeloma [J]. Blood, 2018, 132: 1689-1694.

- [16] Fourcade J, Sun ZJ, Chauvin JM, et al. CD226 opposes TIGIT to disrupt Tregs in melanoma [J]. *JCI Insight*, 2018, 3: e121157.
- [17] Wu L, Mao L, Liu JF, et al. Blockade of TIGIT/CD155 signaling reverses T-cell exhaustion and enhances antitumor capability [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7: 1700-1713.
- [18] Yeo J, Ko M, Lee DH, et al. TIGIT/CD226 axis regulates anti-tumor immunity [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14: 200.
- [19] Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 17858-17863.
- [20] He W, Zhang H, Han F, et al. CD155/TIGIT signaling regulates CD8⁺ T-cell metabolism and promotes tumor progression in human gastric cancer [J]. *Cancer Res*, 2017, 77: 6375-6388.
- [21] Chauvin JM, Zarour HM. TIGIT in cancer immunotherapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8: e000957.
- [22] Martinez M, Kim S, Jean NS, et al. Addition of anti-TIM3 or anti-TIGIT antibodies to anti-PD1 blockade augments human T cell adoptive cell transfer [J]. *Oncoimmunology*, 2021, 10: 1873607.
- [23] Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade J, et al. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8⁺ T cells in melanoma patients [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125: 2046-2058.
- [24] Fu ZH, Liu HC, Wang L, et al. A reporter gene assay for determining the biological activity of therapeutic antibodies targeting TIGIT [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 3925-3934.
- [25] Ge ZH, Peppelenbsch MP, Sprengers D, et al. TIGIT, the next step towards successful combination immune checkpoint therapy in cancer [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 699895.
- [26] Rodriguez-Abreu D, Johnson ML, Hussein MA, et al. Primary analysis of a randomized, double-blind, phase II study of the anti-TIGIT antibody tiragolumab (tira) plus atezolizumab (atezo) versus placebo plus atezo as first-line (1L) treatment in patients with PD-L1-selected NSCLC (CITYSCAPE) [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38: 9503.
- [27] Niu J, Maurice D, Lee DH, et al. First-in-human phase 1 study of the anti-TIGIT antibody vibostolimab as monotherapy or with pembrolizumab for advanced solid tumors, including non-small-cell lung cancer [J]. *Ann Oncol*, 2022, 33: 169-180.
- [28] Chen X, Xue L, Ding X, et al. An Fc-competent anti-human TIGIT blocking antibody ociperlimab (BGBA1217) elicits strong immune responses and potent anti-tumor efficacy in pre-clinical models [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 828319.