抗 TIGIT 单克隆抗体的制备及生物活性评价

张　娜[1,2]，朱中松[1,2]，刘　忠[3]，张贵民[3]，赵丽丽[1,2]*

（1. 鲁南新时代生物技术有限公司，山东临沂 273400；2. 哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室，山东临沂 273400；
3. 鲁南制药集团股份有限公司，山东临沂 276000）

摘要：抗 T 细胞免疫球蛋白和免疫受体酪氨酸抑制性基序结构域（TIGIT）单克隆抗体在治疗恶性肿瘤方面潜力巨大，但目前疗效仍有所欠缺。该研究通过构建小鼠噬菌体抗体库成功筛选到 11 株单克隆抗体，并对其中 2 株高结合力的阻断型抗体（SY15-84 和 SY15-P2-001）进行人源化改造，采用小鼠实体瘤模型评价其药效。结果显示，改造后的抗体 SY15-84-3 和 SY15-P2-001-3 具有更高的亲和力和结合力；在体外生物活性试验中显示出显著的激活能力，可高效阻断 TIGIT-CD155 的抑制轴并重新激活 CD226-CD155 信号通路。上述 2 株人源化改造抗体具有显著的抑瘤效果，相对抑瘤率分别为 88.19％和 93.50％。该研究为抗 TIGIT 抗体药物的开发提供了数据支持。

关键词：抗 TIGIT 单克隆抗体；噬菌体抗体库；人源化抗体；抗肿瘤活性

中图分类号：R979.1^{+}9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)01-0065-09

引用：张　娜, 朱中松, 刘　忠, 等. 抗TIGIT单克隆抗体的制备及生物活性评价[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(1): 65-73. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.01.006

Preparation and Biological Activity Evaluation of Anti-TIGIT Monoclonal Antibody

ZHANG Na[1,2], ZHU Zhongsong[1,2], LIU Zhong[3], ZHANG Guimin[3], ZHAO Lili[1,2]*

(*1. Lunan New Time Bio-tech Co., Ltd., Linyi 273400; 2. State Engineering Lab. of High Expression of Mammalian Cells, Linyi 273400; 3. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000*)

ABSTRACT: Anti-T cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domain (TIGIT) monoclonal antibodies hold great potential for the treatment of malignant tumors, although their efficacy still needs to be improved. In this study, a mouse phage antibody library was constructed, and 11 monoclonal antibodies were screened successfully. Two high-affinity blocking antibodies (SY15-84 and SY15-P2-001) were subjected to humanization modification, and their pharmacodynamic activities were evaluated using a mouse solid tumor model. The results revealed that the humanized antibodies, SY15-84-3 and SY15-P2-001-3, had higher affinity and binding capacity compared with the parental antibodies, as well as robust bioactivity *in vitro*. They could efficiently disrupt the TIGIT-CD155 inhibitory axis, and reactivate the CD226-CD155 signaling pathway. Both antibodies demonstrated significant anti-tumor effects, with relative tumor inhibition rates of 88.19％ and 93.50％, respectively. This study provides data support for the development of anti-TIGIT drugs.

Key Words: anti-TIGIT monoclonal antibody; phage antibody library; humanized antibody; antitumor activity

近年来，免疫检查点靶向疗法在肿瘤治疗领域取得了重大进展。例如，靶向 PD-1/PD-L1 或细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4（cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4，CTLA-4）的药物在临床应用中取得了显著疗效，但并非所有患者都能获益[1]。克

收稿日期：2025-04-17

基金项目：山东省重点研发计划（泰山产业领军人才工程）项目（tscx202306088）

作者简介：张　娜，高级工程师，硕士研究生，专业方向：抗体药物研究与开发。

通信作者：赵丽丽，博士，高级研究员，从事蛋白药物研究与开发。

服其治疗局限性的机制之一是开发针对肿瘤微环境相关的其他免疫检查点。T 细胞免疫球蛋白和免疫受体酪氨酸抑制性基序结构域（T cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domain，TIGIT）是近年来潜力巨大的新型免疫检查点。该蛋白属于免疫球蛋白超家族成员，其胞外域可高亲和力地结合 CD155，并通过胞内免疫受体酪氨酸抑制基序结构域（immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domain，ITIM）传递抑制性信号[2-3]。与 CTLA-4 竞争性抑制 CD28-CD80/86 相互作用的机制类似，TIGIT 可通过“劫持”CD155，阻断共刺激受体 CD226 的活化，从而抑制 T 细胞功能[4-5]。

TIGIT 在多种实体瘤如肺癌、肝癌、胃癌，以及血液恶性肿瘤中表达上调并预示着预后不良。在小鼠肿瘤模型中，TIGIT 单抗可减缓或抑制肿瘤生长，临床上与其他免疫抑制剂联用可提高患者的治疗响应率[6-7]。近期，罗氏制药公布了替瑞利尤单抗（tiragolumab）联合阿替利珠单抗（PD-L1 抑制剂）和贝伐珠单抗（VEGF 抑制剂）在不可切除肝细胞癌研究中的临床数据，显示三联疗法可显著提高客观缓解率、延长生存期，并且未显著增加严重不良反应[8]。因此，特异性 TIGIT 抗体有望突破现有肿瘤免疫治疗的困境，为恶性肿瘤患者带来福音。

目前尚无抗 TIGIT 单克隆抗体药物上市，主要原因可能与 TIGIT 通路双重调控机制的复杂性、配体 CD155 在肿瘤细胞的表达动态性及肿瘤微环境的异质性等因素有关。因此，抗 TIGIT 抗体的设计要求很高，需要综合考虑多种功能机制。为开发高亲和力、能高效阻断 TIGIT/CD155 信号通路的新型抗 TIGIT 单克隆抗体，本研究通过优化载体 pComzx、精简试验步骤，以及结合试验与 AI 的协同设计，构建噬菌体抗体库，从中高效筛选抗 TIGIT 鼠源单克隆抗体，并进行人源化改造，从而探究人源化单克隆抗体的生物学活性，以期为后续临床研究提供参考。

1　仪器与试药

PowerPac Basic 型核酸电泳仪、T100 型 PCR 仪均购于美国 Bio-Rad 公司；Amersham Imager 600 型凝胶成像系统、Biacore T200 型生物分子相互作用分析仪均购于美国 GE 公司；FACSCanto Ⅱ型流式细胞仪（美国 BD 公司）；Neo2 型酶标仪（美国 BioTek 公司）；ZR-3 型双通道注射乳化器（保定发格仪器仪表制造有限公司）；CKX41SF 型倒置荧光显微镜（日本奥林巴斯公司）；371 型二氧化碳细胞培养箱、NanoDrop One 型微量紫外分光光度计均购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司；AKTA pure04 型蛋白纯化仪（美国 Cytiva 公司）。

人源 -TIGIT-mFc 蛋白、生物素（biotin）标记的人源 -TIGIT-mFc 蛋白、人源 -TIGIT-his 蛋白和人源 -CD155-mFc 蛋白均购自美国 ACRO Biosystems 公司；完全弗氏佐剂（批号 SLBR1681L）和弗氏不完全佐剂（批号 SLCB3267）、聚乙二醇 8000 均购自德国 Sigma-Aldrich 公司；RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒均购自日本 TaKaRa 生物技术有限公司；脱脂奶粉购自京天成生物技术（北京）有限公司；磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）和 3,3',5,5'- 四甲基联苯胺（tetramethylbenzidine，TMB）显色液、氨苄西林、卡那霉素和亲和素（avidin）均购自北京索莱宝生物技术有限公司；吐温 -20（德国 Merck 公司）；限制性内切酶 *Sfi* Ⅰ（美国 NEB 公司）；0.45 μm 无菌滤膜（德国 Sartorius 公司）；ExpiCHO 表达培养基（批号 2186702）、CHO 转染试剂盒（批号 2474280）、补料培养基（ExpiCHO Enhancer，批号 2572593；ExpiCHO Feed，批号 2474816）和胰蛋白酶（批号 25200072）均购自美国 Gibco 公司；VCSM13 辅助噬菌体（RlpVHHs，货号 P007）；含表面活性剂的生物化学缓冲液 HBS-EP^{+}10X（批号 32590）、Protein A 预装色谱柱（MabSelect SuRe^{TM} LX）均购自美国 Cytiva 公司；羊抗鼠 -IgG-Fc-HRP 二抗（美国 Southern Biotech 公司，批号 16713-S761H）；pCDNA3.4 质粒（美国 Invitrogen 公司，货号 A14697）；藻红蛋白（phycoerythrin，PE）标记的抗人源 -IgG-Fc 二抗（英国 Abcam 公司，批号 98596）；阴性对照抗体（hu-IgG）、萤光素酶试剂（bright-lite luciferase assay substrate，批号 7E472E0）均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；pComzx 载体由本实验室保存；盐酸（西陇科学股份有限公司）；甘氨酸（国药集团化学试剂有限公司）；其他化学试剂均为分析纯。

大肠埃希菌 SS320（美国 Lucigen 公司，批号 MC1061F）；ExpiCHOS 细胞（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；hu-TIGIT-CHO 稳转细胞株、cyno-TIGIT-CHO 稳转细胞株、CD155-CHO-K1-APC 细胞系和 TIGIT/CD226/NFAT-Luc-Jurkat

细胞系由哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室构建保存；小鼠结直肠癌细胞（CT26.WT 细胞）由江苏集萃药康生物科技股份有限公司提供。

替瑞利尤单抗对照抗体类似物具有人 IgG1/κ 恒定区，根据专利（WO 2015009856）中提供的抗体氨基酸序列制备。

BALB/c 小鼠 5 只，雌性，6 ～ 8 周龄，体质量 18 ～ 20 g，无特定病原体（SPF）级，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物生产许可证号为 SCXK（京）2016-0006，实验动物质量合格证编号为 11400700348951。BALB/c-hPD1/hTIGIT 人源化小鼠，30 只，雌性，体质量 19.2 ～ 24.6 g，7 ～ 8 周龄，购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司，试验动物生产许可证号为 SCXK（苏）2018-0008，质量合格证编号为 3207272011001282。动物伦理许可编号 GPTAP20200804-1。

2 方法与结果

2.1 动物免疫

使用人源 -TIGIT-mFc 抗原蛋白免疫 BALB/c 小鼠（雌性，6 ～ 8 周龄，n=5）。首次免疫：抗原蛋白与完全弗氏佐剂按体积比 1 ∶ 1 混合并充分乳化，皮下多点免疫，剂量为每只 100 μg。第 2、3 次免疫：抗原与不完全弗氏剂按体积比 1 ∶ 1 混合并充分乳化，皮下多点注射免疫，剂量为每只 50 μg。每次免疫间隔 14 d，第 3 次免疫结束 7 d 后，尾静脉取血检测抗体效价。

2.2 免疫小鼠滴度测定

用人源 -TIGIT-his 抗原蛋白（2 μg/mL，每孔 100 μL）包被 96 孔酶标板，4 ℃过夜；用 PBST（含 0.02%吐温 -20 的 PBS，现配现用，下同）清洗 1 次，再用 5%脱脂奶粉于 25 ℃封闭 2 h，PBST 洗涤 3 次。取 5 只小鼠血清，用 PBS 稀释（初始孔 1 ∶ 500，然后 3 倍稀释），作为一抗；各取 100 μL 加至包被好的 96 孔酶标板中，空白组加 PBS 100 μL，于 25 ℃孵育 1 h。用 PBST 洗涤 3 次，每孔加入羊抗鼠 -IgG-Fc-HRP 二抗（用 PBS 以体积比 1 ∶ 10 000 稀释）100 μL，于 25 ℃孵育 1 h。用 PBST 洗板 3 次，每孔加 TMB 50 μL 显色 10 min，再加 2 mol/L 盐酸 50 μL 终止反应。置酶标仪中读取 450 nm 处的光密度（OD_{450}）值，采用 Graphpad Prism 8.0 软件分析数据。结果如图 1 所示，小鼠抗体滴度均高达 100 万，其中 3# 小鼠免疫效价较佳。

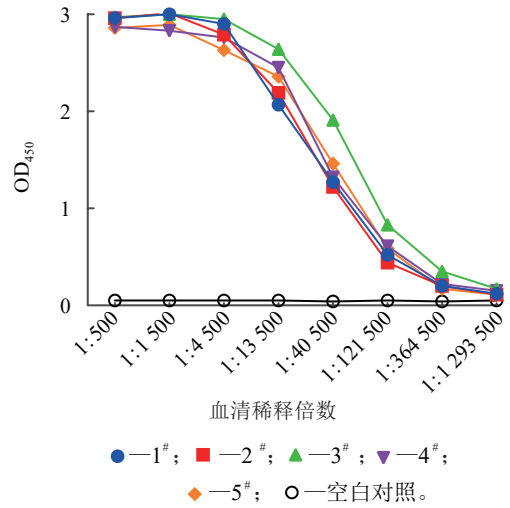


图 1 免疫小鼠滴度检测结果

Fig.1 Titer Detection Results of Immunized Mice

2.3 噬菌体抗体库的构建

取免疫效价较高的 3# 小鼠脾脏，研磨制成脾细胞悬液，按 RNA 提取试剂盒说明书提取脾脏细胞的总 RNA，按逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA，利用小鼠抗体基因的特异性引物扩增出抗体的轻链可变区和重链可变区及重链恒定区 1（C_H1）基因[9]。扩增的基因经酶切（*Sfi* Ⅰ）后连接到噬菌体 pComzx 载体上，电转至大肠埃希菌 SS320 感受态细胞中。将电转后的大肠埃希菌接种至含有氨苄西林（100 μg/mL）的 2YT 培养基 200 mL 中，于 37 ℃、220 r/min 条件培养。待大肠埃希菌的生长至 OD_{600} 值为 0.4 ～ 0.6 时，添加辅助噬菌体 VCSM13 并同时添加卡那霉素（50 μg/mL），于 16 ℃培养过夜。次日，参照专利[10]，利用聚乙二醇 8000 和氯化钠提取噬菌体，获得噬菌体抗体库，命名为 SY15，分装保存于 - 80 ℃备用。测定库容量为 1.1×10^9 pfu/mL，噬菌体库空载占比为 3.66%（标准为 <10%），终止子占比为 1.8%（标准为 <20%），抗体表达正确率为 94.54%（标准为 >70%）。可见所得噬菌体库质量较高，可用于下一步抗体筛选。

2.4 噬菌体抗体库的筛选

将生物素（biotin）标记的人源 -TIGIT-mFc 蛋白与亲和素（avidin）偶联的磁珠孵育，可得结合 TIGIT-

mFc-biotin 抗原的磁珠；将其与上述构建的噬菌体库于 25 ℃孵育 2 h，用 PBST 洗涤去除非特异性吸附的噬菌体，加入胰蛋白酶（20 mg/mL）50 μL，混匀后反应 20 min，洗脱得到特异性结合的抗体展示噬菌体。用洗脱下来的噬菌体侵染对数生长期的 SS320 菌体，再加入 VCSM13 辅助噬菌体，于 37 ℃、220 r/min 条件培养 1 h，离心（4 500×*g*）15 min，弃去上清，将沉淀置换到 2YT 培养基（含 100 μg/mL 氨苄西林、50 μg/mL 卡那霉素）100 mL 中，再于 37 ℃、220 r/min 条件培养 16 h。然后，参照“**2.3**”项下方法获得一轮富集的噬菌体。所得噬菌体继续用于下一轮筛选[10]，共进行 3 轮筛选，即完成单克隆初筛。挑选部分单克隆，利用 ELISA 法检测其与人和猴的 TIGIT 抗原多点结合情况，获得了多株能特异性结合人和猴 TIGIT 蛋白的单克隆抗体。通过测序和亲和动力学试验分析，共得 11 株阳性单克隆抗体，分别命名为 SY15-4、SY15-20、SY15-25、SY15-39、SY15-47、SY15-61、SY15-84、SY15-96，以及 SY15-P2-001、SY15-P2-003、SY15-P5-001（SY15 为抗体库名称，P 和数字为克隆编号）。

2.5　嵌合抗体构建、表达与纯化

将获得的 11 个鼠源抗体的重链与轻链可变区基因分别与人 IgG1 的重链恒定区及 κ 轻链恒定区基因连接[11]，分别克隆入 pCDNA3.4 质粒中，获得嵌合抗体表达质粒，并进行质粒鉴定。

以 ExpiCHO 表达培养基培养 ExpiCHOS 细胞，按 CHO 细胞转染试剂盒说明书转染 ExpiCHOS 细胞。具体方法如下：将上述嵌合抗体表达质粒与转染试剂混合后加至 ExpiCHOS 细胞 25 mL 中，充分混匀，于 37 ℃培养 18 ～ 22 h。添加补料培养基并降温至 32 ℃继续培养。转染后 D5 第 2 次添加补料培养基，继续培养 10 ～ 12 d，取培养基上清用于抗体纯化。

Protein A 亲和色谱法纯化抗体：制备 Protein A 亲和色谱柱（HiTrap™ 5 mL）；采用 PBS 平衡色谱柱；取培养基上清，离心（4 500×*g*）10 min，用 0.45 μm 滤膜过滤后上样；用 PBS 洗至 OD_{280} 值接近于 0；用甘氨酸 - 盐酸缓冲液（50 mmol/L，pH 3.5）洗脱，收集峰值区的洗脱液，用 2 mol/L 的 Tris 溶液调至 pH 6.0，得嵌合抗体。按文献[12]的优化方法，采用尺寸排阻高效液相色谱（SEC-HPLC）法鉴定抗体纯度，按文献[13]提供的方法，测定抗体浓度，并将抗体分装冻存备用。获得的嵌合抗体分别命名为 chiSY15-4、chiSY15-20、chiSY15-25、chiSY15-39、chiSY15-47、chiSY15-61、chiSY15-84、chiSY15-96，以及 chiSY15-P2-001、chiSY15-P2-003、chiSY15-P5-001。

SEC-HPLC 检测结果如表 1 所示，可见上述嵌合抗体的纯度均大于 95%。

表 1　嵌合抗体的 SEC-HPLC 检测结果

Tab.1　The SEC-HPLC Results of Chimeric Antibodies

序号	样品名称	高分子聚合物峰面积 /%	单体峰面积 /%
1	chiSY15-4	1.2	98.8
2	chiSY15-20	2.5	97.5
3	chiSY15-25	—	100.0
4	chiSY15-39	4.9	95.1
5	chiSY15-47	—	100.0
6	chiSY15-61	1.9	98.1
7	chiSY15-84	—	100.0
8	chiSY15-96	—	100.0
9	chiSY15-P2-001	—	100.0
10	chiSY15-P2-003	—	100.0
11	chiSY15-P5-001	—	100.0

2.6　嵌合抗体与 hu-TIGIT-CHO 和 cyno-TIGIT-CHO 细胞结合活性的检测

取对数生长期的 hu-TIGIT-CHO 和 cyno-TIGIT-CHO 细胞，分别以每孔 2×10^5 个细胞加至 96 孔板中，离心（300×*g*）5 min，沉淀用 PBS 清洗 2 遍；分别用 PBS 梯度稀释单抗、阳性对照抗体（tiragolumab 类似物）以及阴性对照抗体（hu-IgG），使其浓度为 66.67、22.22、7.41、2.47、0.82、0.27、0.09、0.03 nmol/L，各取 100 μL，分别加至对应孔中，混匀后于 4 ℃孵育 30 min；用 PBS 清洗细胞 2 次，加入 PBS 稀释 PE 标记的抗人源 -IgG-Fc 二抗至 1 μL/mL，每孔 100 μL，混匀后于 4 ℃孵育 30 min；用 PBS 清洗 2 遍，再用 PBS 200 μL 悬浮细胞，采用流式细胞仪检测，Graphpad Prism 8.0 软件分析数据。抗体对 hu-TIGIT-CHO 和 cyno-TIGIT-CHO 交叉结合的 EC_{50} 值如表 2 所示。可见候选抗体 chiSY15-84、

chiSY15-96、chiSY15-P2-001 和 chiSY15-P5-001 结合 hu-TIGIT-CHO 的活性明显优于阳性对照抗体。候选抗体对 cyno-TIGIT-CHO 细胞的结合结果显示，抗体 chiSY15-20、chiSY15-47、chiSY15-61、chiSY15-84、chiSY15-P2-001、chiSY15-P2-003 与猴 TIGIT-CHO 细胞的交叉结合力明显强于阳性对照抗体。综合以上抗体对 hu-TIGIT-CHO 和 cyno-TIGIT-CHO 细胞的 EC_{50} 值，选取表现较优的 chiSY15-84 和 chiSY15-P2-001 抗体，做进一步评价。

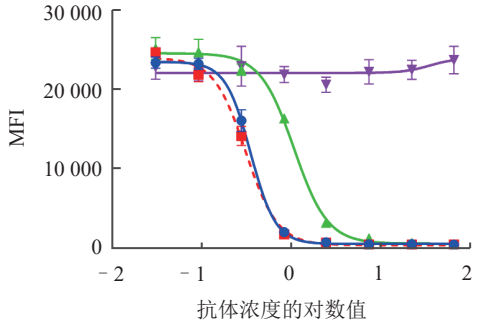
表 2 候选抗体与 hu/cyno-TIGIT-CHO 结合的 EC_{50} 值

Tab.2 The EC_{50} Values of Candidate Antibodies for Binding to Hu/ cyno-TIGIT-CHO

抗体名称	EC_{50}/(nmol·L^{-1})	
	hu-TIGIT-CHO	cyno-TIGIT-CHO
chiSY15-4	1.209	1.717
chiSY15-20	0.647	0.728
chiSY15-25	1.157	1.617
chiSY15-47	0.790	1.045
chiSY15-39	0.701	28.327
chiSY15-61	0.731	1.043
chiSY15-84	0.313	0.957
chiSY15-96	0.406	99.667
chiSY15-P2-001	0.310	1.005
chiSY15-P2-003	0.605	0.984
chiSY15-P5-001	0.522	1.593
tiragolumab 类似物	0.921	1.608
hu-IgG	—	—

2.7 嵌合抗体细胞水平阻断活性检测

取对数生长期的 hu-TIGIT-CHO 细胞，调整细胞密度至每 1 mL 含 2×10^6 个，每孔 100 μL 加入 96 孔板中，离心 (300×*g*) 5 min，弃去上清，每孔加入浓度为 2 μg/mL 的 CD155-mFc 蛋白 50 μL，混匀，于 4 ℃孵育 30 min 后，离心 (300×*g*) 5 min，弃去上清，剩余物中分别加入用 PBS (pH 7.4) 梯度稀释至浓度为 66.67、22.22、7.41、2.47、0.82、0.27、0.09、0.03 nmol/L 的候选抗体、阳性对照抗体 tiragolumab 类似物和阴性对照 hu-IgG，各 50 μL，混匀后于 4 ℃孵育 30 min；离心 (300×*g*) 5min，弃去上清，每孔剩余物用 PBS 200 μL 洗板，重复 2 次，加入 PE 标记的抗人源 -IgG-Fc 流式抗体（用 PBS 以 1 ∶ 500 稀释），每孔 200 μL，混匀，于 4 ℃孵育 30 min；离心 (300×*g*) 5min，弃去上清，剩余物用 PBS 清洗 2 次，每孔加入 PBS 200 μL 重悬细胞。采用流式细胞仪检测，收集平均荧光强度 (mean fluorescence intensity，MFI)，用 GraphPad Prism 8.0 软件分析数据。结果如图 2 所示，chiSY15-84 (IC_{50} 值 0.31 nmol/L) 和 chiSY15-P2-001 (IC_{50} 值 0.35 nmol/L) 阻断 CD155 结合 hu-TIGIT-CHO 的能力显著优于阳性对照抗体 (IC_{50} 值 1.07 nmol/L)。综合以上评价结果选取单克隆抗体 SY15-84 和 SY15-P2-001 进行人源化改造。



■—chiSY15-84；●—chiSY15-P2-001；▲—tiragolumab 类似物；▼—hu-IgG。

图 2 抗体阻断 CD155 蛋白与 hu-TIGIT-CHO 细胞的曲线图谱 (n=3)

Fig.2 Dose Response Curves of Antibody Blocking CD155 Protein Binding to hu-TIGIT-CHO Cells (n=3)

2.8 抗体人源化改造

为了降低鼠源抗体在人体内的免疫原性，对 SY15-84 和 SY15-P2-001 分子的可变区进行人源化改造[14]。小鼠源抗体的人源化改造通过互补决定区（complementarity determining region，CDR）移植法，将 SY15-84 和 SY15-P2-001 的重链和轻链可变区序列与 NCBI 网站的人免疫球蛋白基因数据库 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) 进行比对。选择与 SY15-84 和 SY15-P2-001 同源度和表达量较高，同时被其他已成药药物使用过的人源基因 *IGVH* 和 *IGVK* 作为人源化改造的框架。使用 Discovery Studio 2018 软件，采用同源建模方法建模，对包埋残基、与 CDR 区有直接相互作用的残基，以及对 V_H 和 V_L 构象有重要影响的残基进行回复突变。选取最优的结构模型，分别对 SY15-84 和 SY15-P2-001 抗体

的轻重链可变区进行人源化改造，各设计 3 条人源化序列（人源化程度依次增加），其中人源化后的重链可变区分别为 huV_{H1}、huV_{H2} 和 huV_{H3}，人源化后的轻链可变区分别为 huV_{L1}、huV_{L2} 和 huV_{L3}，并以此命名得到抗体。例如，抗体 SY15-84 的可变区经人源化重组后，得到的抗体可命名为 SY15-84-huV_{H1}+huV_{L1}，其他以此类推（表 3）。设计好的抗体轻重链可变区分别与轻重链恒定区组合、合成，然后照“**2.5**”项下方法构建、表达与纯化。

2.9　人源化抗体的亲和力动力学评价

使用生物分子相互作用分析仪，利用表面等离子体共振（surface plasmon resonance，SPR）技术，测定 SY15-84 和 SY15-P2-001 人源化前后抗体的亲和力。

用经 0.22 μm 滤膜过滤的超纯水将 10×HBS-EP$^+$ 缓冲液稀释为 1×。用 1×HBS-EP$^+$ 缓冲液将 TIGIT 单克隆抗体稀释至 6 μg/mL，作为配体；再用 1×HBS-EP$^+$ 缓冲液稀释 TIGIT-his 蛋白，分别制备浓度为 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5、0.781 25 nmo/L 的抗原蛋白溶液作为分析物，并用 1×HBS-EP$^+$ 缓冲液为对照；吸取适量甘氨酸盐酸溶液（含 10 mmol/L 甘氨酸，pH 1.5）作为再生液。分别将配体、分析物、再生液、1×HBS-EP$^+$ 缓冲液放置到样品托盘上，设置程序为：配体流速 10 μL/min，20 s；分析物 30 μL/min，结合时间 100 s，解离时间 600 s；再生液 30 μL/min，30 s。试验中采集并保存 SPR 信号，采用 Biacore T200 Evaluation Software Version 3.1 分析软件进行数据处理，获得结合常数（K_{on}）和解离常数（K_{off}），再计算得抗体的亲和力常数（K_D）。检测结果如表 4 所示，人源化抗体 SY15-84 抗体和 SY15-P2-001 的亲和力均有所提高，且均优于对照抗体（K_D=1.30×10^{-9}）。分别选取人源化程度较高的 SY15-84-3（K_D=2.69×10^{-10}）和 SY15-P2-001-3（K_D=3.33×10^{-10}）抗体进行下一步研究。

表 4　2 种抗体人源化前后的亲和力

Tab.4　Binding Affinities of Antibodies before and after Humanization

抗体	抗原	K_D/(mol·L^{-1})	K_{on}/(L·mol^{-1}·s^{-1})	K_{off}/(s^{-1})
chiSY15-84	TIGIT-his	6.80×10^{-10}	3.93×10^5	2.68×10^{-4}
SY15-84-1	TIGIT-his	1.15×10^{-10}	8.86×10^5	1.02×10^{-4}
SY15-84-2	TIGIT-his	2.84×10^{-10}	6.73×10^5	1.91×10^{-4}
SY15-84-3	TIGIT-his	2.69×10^{-10}	7.60×10^5	2.04×10^{-4}
chiSY15-P2-001	TIGIT-his	4.76×10^{-10}	7.08×10^5	3.37×10^{-4}
SY15-P2-001-1	TIGIT-his	8.12×10^{-10}	3.68×10^5	2.99×10^{-4}
SY15-P2-001-2	TIGIT-his	4.27×10^{-10}	9.95×10^5	4.25×10^{-4}
SY15-P2-001-3	TIGIT-his	3.33×10^{-10}	6.19×10^5	2.06×10^{-4}
对照抗体（tiragolumab 类似物）	TIGIT-his	1.30×10^{-9}	1.18×10^5	1.53×10^{-4}

2.10　人源化抗体细胞水平人猴交叉结合活性评价

照“**2.6**”项下方法检测人源化抗体与 hu-TIGIT-CHO 和 cyno-TIGIT-CHO 的交叉结合活性。结果如图 3 和表 5 所示，人源化抗体 SY15-84-3 和 SY15-P2-001-3 与 hu-TIGIT-CHO 和 cyno-TIGIT-CHO 的结合活性均优于对照抗体，且 SY15-P2-001-3 的结合力强于 SY15-84-3。

2.11　人源化抗体体外功能活性评价

本研究建立了一种双信号报告系统，通过定量

表 5　抗体与 hu-TIGIT-CHO 或 cyno-TIGIT-CHO 的 EC_{50} 值

Tab.5　EC_{50} Values of Antibodies for Binding to Hu-TIGIT-CHO or Cyno-TIGIT-CHO

抗体	EC_{50}/(nmol·L^{-1})	
	hu-TIGIT-CHO	cyno-TIGIT-CHO
SY15-84-3	0.15	0.47
SY15-P2-001-3	0.09	0.64
对照抗体（tiragolumab 类似物）	0.78	1.37

表 3　人源化抗体的名称及组成

Tab.3　Names and Compositions of the Humanized Antibodies

人源化抗体名称	人源化抗体组成	人源化抗体	人源化抗体组成
SY15-84-1	SY15-84-huV_{H1}-H_C+huV_{L1}-L_C	SY15-P2-001-1	SY15-P2-001-1-huV_{H1}-H_C+huV_{L1}-L_C
SY15-84-2	SY15-84-huV_{H2}-H_C+huV_{L2}-L_C	SY15-P2-001-2	SY15-P2-001-2-huV_{H2}-H_C+huV_{L2}-L_C
SY15-84-3	SY15-84-huV_{H3}-H_C+huV_{L3}-L_C	SY15-P2-001-3	SY15-P2-001-3-huV_{H1}-H_C+huV_{L3}-L_C

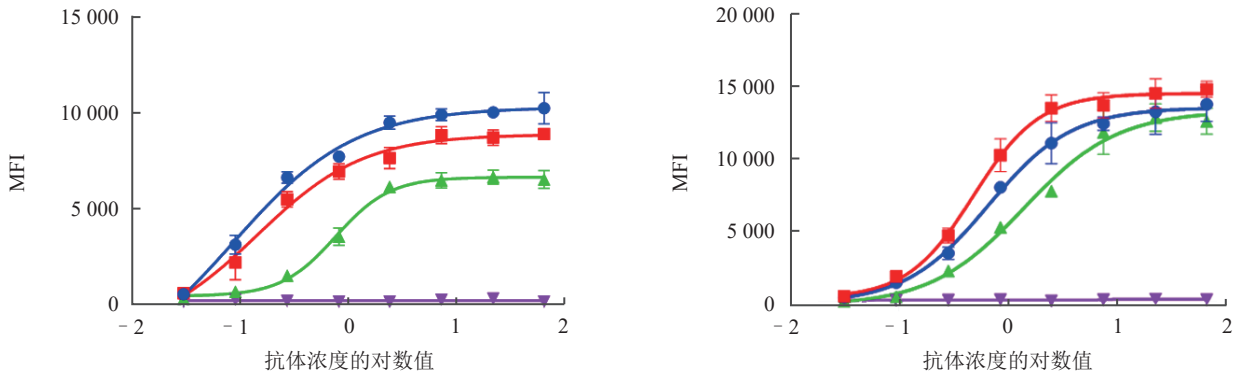


图 3　人源化抗体与 hu-TIGIT-CHO 细胞（A）或 cyno-TIGIT-CHO 细胞（B）的结合曲线（*n*=3）

Fig.3　Binding Curves of Humanized Antibodies Binding to Hu-TIGIT-CHO (A) or Cyno-TIGIT-CHO (B) (*n*=3)

检测 TIGIT-CD155 通路阻断后 CD226 共刺激信号的激活强度，验证 TIGIT 抗体对 CD226-CD155 轴的功能影响。CD155 与 TIGIT 的高亲和力结合会抑制 Jurkat/NFAT 报告基因 /TIGIT/CD226 细胞的激活。抗 TIGIT 单克隆抗体存在时，会阻断 CD155 与 TIGIT 的相互作用，减弱其对 Jurkat/ NFAT 报告基因 /TIGIT/CD226 细胞激活的抑制作用，导致萤光素酶信号增强，且增强程度与抗 TIGIT 单克隆抗体浓度呈正相关。

首先分别培养 CD155-CHO-K1 APC 细胞和 TIGIT/CD226/NFAT-LUC-Jurkat 细胞。将 2 种细胞分别以每孔 7×10^4 个和每孔 1×10^5 个接种至 96 孔细胞培养板中，混合共培养；然后，取 200 nmol/L 的 SY15-84-3 和 SY15-P2-001-3 抗体、阳性对照抗体（tiragolumab 类似物），5 倍稀释（共得到 12 个浓度）；稀释后的抗体各取 100 μL，加至 96 孔细胞培养板中，混合均匀，于 37 ℃培养 18 h。然后，取出 96 孔细胞培养板，每孔加入 50 μL 萤光素酶试剂，反应 5 ～ 10 min，采用多功能酶标仪检测，采用 GraphPad Prism 8.0 软件，以非线性回归法分析数据，并对萤光素酶信号进行归一化处理，计算各抗体的 EC_{50} 值。结果如图 4 所示，抗 TIGIT 人源化抗体能剂量依赖性地解除 TIGIT 抑制，从而恢复报告基因介导的荧光信号，并且 SY15-84-3（EC_{50} 值 0.08 nmol/L）和 SY15-P2-001-3（EC_{50} 值 0.12 nmol/L）阻断 TIGIT 的抑制并重建 CD226 通路激活荧光信号的能力显著强于阳性对照抗体（EC_{50} 值 0.28 nmol/L）。

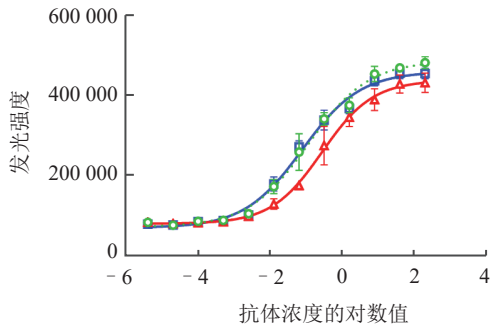


图 4　人源化抗体对 TIGIT/CD226/NFAT-LUC-Jurkat 细胞的激活活性曲线（*n*=3）

Fig.4　Activation Curves of Humanized Antibody for Activating on TIGIT/CD226/NFAT-LUC-Jurkat Cell (*n*=3)

2.12　人源化抗体在小鼠体内抑瘤作用研究

取 7 ～ 8 周龄的 BALB/c-hPD1/hTIGIT 雌性人源化小鼠 30 只，收集对数生长期的结直肠癌 CT26.WT 细胞，接种于小鼠右后肢，接种量为每只 5×10^5 个细胞，接种体积为 100 μL。接种后 D8、平均肿瘤体积约达到 50 mm^3 时，根据肿瘤体积挑取 24 只，随机分成 4 组，每组 6 只。分组当天定义为 D0，分别于 D0、D3、D6、D10、D14、D16、D18 腹腔注射 PBS 和质量浓度为 1 mg/mL 的 SY15-84-3、SY15-P2-001-3、tiragulomab 类似物（分别记作 G1、G2、G3 和 G4 组），每次给药剂量为 10 mg/kg，注射体积为 400 μL。

用电子游标卡尺于D0、D2、D5、D9、D12、D16、D18、D20时测量肿瘤的最大直径（*D*）和最小直径（*d*），按式①计算肿瘤体积（*V*），同时称量小鼠体质量，并按式②、③计算各给药组的相对肿瘤抑制率（tumor growth inhibition of tumor volume，TGI_{tv}），结果如图5A所示。

$$V=[D\times d^2]/2 \quad ①$$

$$RTV_n=\frac{V_{nt}}{V_{n0}} \quad ②$$

$$TGI_{tv}=\left(1-\frac{mean\ RTV_{treat}}{mean\ RTV_{G1}}\right)\times 100\% \quad ③$$

式中：V_{nt}为编号为*n*的小鼠在第*t*天的肿瘤体积；V_{n0}为编号为*n*的小鼠在D0的肿瘤体积；TGI_{tv}为编号为*n*的小鼠在第*t*天的肿瘤相对体积（relative tumor volume，RVT）；*mean* RTV_{treat}为给药组RTV平均值；*mean* RTV_{G1}为G1组RTV平均值。

结果显示，分组给药后D20，与G1组相比，G2和G3组能明显抑制肿瘤的生长，TGI_{tv}分别为88.19％和93.50％；G4组（tiragulomab类似物）的TGI_{tv}为65.59％。试验过程中，各组小鼠健康状态良好，无死亡情况。所有小鼠在给药期间的活动和进食状态良好，未发现明显不良反应，体质量均有一定程度增加（图5B）。综上所述，人源化抗体SY15-84-3和SY15-P2-001-3均显示出良好的抗肿瘤效果，抑瘤效果优于tiragulomab类似物，对肿瘤的生长抑制作用具有统计学差异（$P<0.05$）。

3　总结与讨论

TIGIT是一种通过多种机制抑制T淋巴细胞的免疫检查点，抑制TIGIT不仅可增强$CD8^+$ T细胞的细胞毒性，还可增强自然杀伤细胞的抗肿瘤免疫[15]。目前，已有多款抗TIGIT抗体药物进入临床研究，但有关其肿瘤抑制的作用机制尚未完全阐明。本研究中使用的对照抗体tiragolumab类似物基于公开序列构建，可能无法完全代表原研产品的质量与功能。因此，本研究的比较结果仅为TIGIT机制探讨提供参考。这一局限性提示后续研究需采用经严格验证的对照体系或原研产品，以深化机制解析并为临床转化提供更可靠依据。

本研究构建的噬菌体库通过严格的建库设计，结合AI优化，质量高、库容量大（1.1×10^{-9} pfu/mL）。利用该库成功获得了11个鼠源抗TIGIT单克隆抗体，并构建、表达了对应的嵌合抗体，利用流式细胞术评价了各抗体与TIGIT的结合活性和对TIGIT/CD155信号通路的阻断能力，最终选择出具有高结合活性的阻断型抗体SY15-84和SY15-P2-001，进行后续的人源化改造。人源化单克隆抗体SY15-84-3和SY15-P2-001-3与TIGIT的亲和力高，且均与表达于CHO细胞表面的人和猴TIGIT交叉结合活性良好。此外，体外功能活性研究显示，所构建

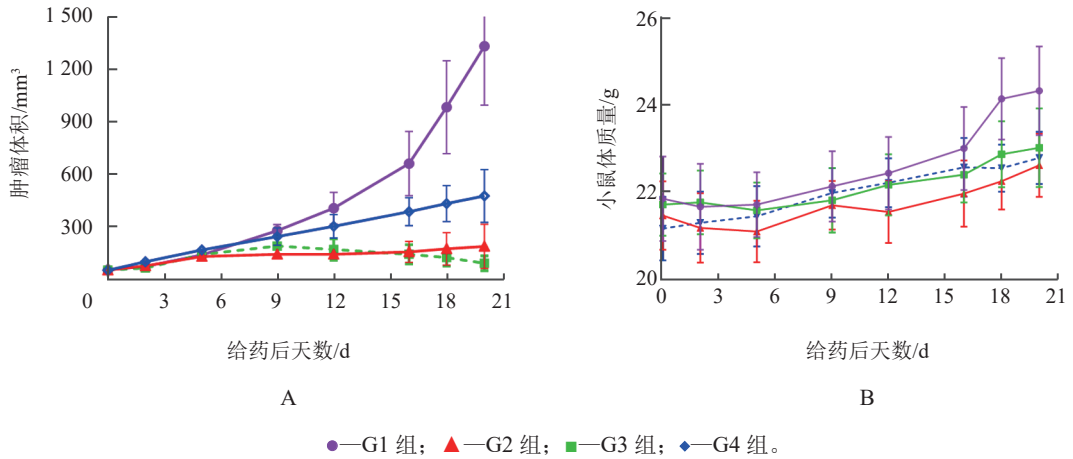


图5　人源化抗体对CT26.WT接种移植肿瘤模型小鼠的抑瘤作用（A）及小鼠的体质量变化（B）（*n*=6）

Fig.5　Tumor Suppressive Effect of Humanized Antibodies in CT26.WT Inoculated Transplanted Tumor Model (A) and Mean Body Weight Changes of Mice (B) (*n*=6)

的人源化抗体可打破免疫耐受，激活免疫细胞，且呈现剂量依赖性，证明了抗体的有效性。在人源化小鼠体内结直肠癌实体瘤模型中，SY15-84-3 和 SY15-P2-001-3 的肿瘤生长抑制率 TGI_{tv} 分别高达 88.19%和 93.50%，证明其具有显著的抗肿瘤效果。本研究结果验证了抗 TIGIT 抗体可通过结合 TIGIT 阻断 TIGIT/CD155 信号通路，从而抑制肿瘤生长的作用机制，为抗体药物的进一步开发提供了有价值的参考。

然而抗 TIGIT 抗体单药抑制肿瘤的疗效欠佳，而其与 PD-1/PD-L1、CTLA-4 及 VEGF 等其他免疫抑制分子，或与手术、化疗、放疗联合使用，发挥协同抗肿瘤作用可能是提高疗效的可行策略[1,6,8,16-18]，后续研究将对此进一步评估。抗 TIGIT 抗体的疗效不仅依赖于对 TIGIT-CD155 通路的阻断，Fcγ 受体的参与在重塑肿瘤免疫微环境中也起到关键作用[18]。未来可考虑对 Fc 端实施精准工程化修饰，从而进一步增强抗肿瘤效果。此外，尽管 TIGIT 在多种恶性肿瘤细胞中的表达上调，但它同时也广泛表达于免疫细胞，抗 TIGIT 抗体靶向肿瘤细胞时可能会非特异性攻击正常免疫细胞，引发不良反应，导致临床应用受限[19-20]。未来可嵌入生物标志物策略，结合临床相关性分析，通过精准筛选人群达到规避脱靶效应的目的，从而提升临床安全性。

参考文献：

[1] ANDREWS L P, YANO H, VIGNALI D A A, *et al*. Inhibitory receptors and ligands beyond PD-1, PD-L1 and CTLA-4: breakthroughs or backups [J]. *Nature Immunol*, 2019, **20**(11): 1425-1434.

[2] WORBOYS J D, VOWELL K N, HARE R K, *et al*. TIGIT can inhibit T cell activation via ligation-induced nanoclusters, independent of CD226 co-stimulation [J]. *Nat Commun*, 2023, **14**: 5016.

[3] 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.

[4] KHAN M, AROOJ S, WANG H. NK cell-based immune checkpoint inhibition [J]. *Front Immunol*, 2020, **11**: 167.

[5] YEO J, KO M, LEE D H, *et al*. TIGIT/CD226 axis regulates anti-tumor immunity [J]. *Pharmaceuticals* (Basel), 2021, **14**(3): 200.

[6] CHU X J, TIAN W T, WANG Z Q, *et al*. Co-inhibition of TIGIT and PD-1/PD-L1 in cancer immunotherapy: mechanisms and clinical trials [J]. *Mol Cancer*, 2023, **22**(1): 93.

[7] WU L, MAO L, LIU J F, *et al*. Blockade of TIGIT/CD155 signaling reverses T-cell exhaustion and enhances antitumor capability [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, **7**: 1700-1713.

[8] FINN R S, RYOO B, HSU C, *et al*. Tiragolumab in combination with atezolizumab and bevacizumab in patients with unresectable, locally advanced or metastatic hepatocellular carcinoma (MORPHEUS-Liver): a randomized, open-label, phase 1b-2 study [J]. *Lancet Oncol*, 2025, **26**: 214-226.

[9] ORUM H, ANDERSEN P S, OSTER A, *et al*. Efficient method for constructing comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**(19): 4491-4498.

[10] Bird Rock Bio Inc. Antibodies that bind human cannabinoid 1 (CB1) receptor: IL, 248006B [P]. 2024-05-01.

[11] KHADEMI F, MOHAMMADI P, MOSTAFAEI A. The construction and characterization of 1F5 chimeric anti-CD20 monoclonal antibodies: an efficient splicing by overlap extension-polymerase chain reaction technique [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2021, **20**(2): 205-220.

[12] 武 刚, 于传飞, 俞晓娟, 等. 重组抗前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶9单克隆抗体质控方法的建立[J]. 中国生物制品杂志, 2023, **36**(12): 1483-1490.

[13] 赵丽丽, 赵文鹏, 许永亮, 等. 抗SIRPα单克隆抗体的制备及其体外活性[J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(3): 366-373.

[14] CHEN L, LU J S, WANG R, *et al*. Humanization and characterization of a murine monoclonal neutralizing antibody against human adenovirus 7 [J]. *Virology*, 2023, **583**: 36-44.

[15] GE Z H, PEPPELENBOSCH M P, SPRENGERS D, *et al*. TIGIT, the next step towards successful combination immune checkpoint therapy in cancer [J]. *Front Immunol*, 2021, **12**: 699895.

[16] HARJUNPÄÄ H, GUILLEREY C. TIGIT as an emerging immune checkpoint [J]. *Clin Exp Immunol*, 2020, **200**(2): 108-119.

（下转第 96 页）

zidovudine – lamivudine tablets［J］. *Acta Chim Slov*, 2015, **62**(2): 437-444.

［9］ KATOCH S, CHAUHAN S S, KUMAR V. A review on genetic algorithm: past, present, and future［J］. *Multimed Tools Appl*, 2021, **80**(5): 8091-8126.

［10］ LI X K, LI Z Y, YANG Z Y, *et al*. A hybrid variable selection and modeling strategy for the determination of target compounds in different spectral datasets［J］. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2022, **275**: 121123.

［11］ 徐惠敏, 郝经文, 陈乃富, 等. 傅里叶变换中红外光谱结合偏最小二乘法快速测定蕨菜总多糖含量[J]. 天然产物研究与开发, 2022, **34**(11): 1857-1864.

［12］ 蒋　薇, 汤　亮, 薛博文, 等. 基于连续小波变换的烤烟叶片总氮和烟碱含量高光谱监测预测研究[J]. 中国烟草学报, 2023, **29**(4): 33-43.

［13］ 第五鹏瑶, 卞希慧, 王姿方, 等. 光谱预处理方法选择研究［J］. 光谱学与光谱分析, 2019, **39**: 2800-2806.

［14］ 孙嘉豪, 张　伟, 施鉴芩, 等. 光谱数据预处理策略选择及应用[J]. 计量学报, 2023, **44**(8): 1284-1292.

（上接第 73 页）

［17］ ROUSSEAU A, PARISI C, BARLESI F. Anti-TIGIT therapies for solid tumors: a systematic review［J］. *ESMO Open*, 2023, **8**(2): 101184.

［18］ GUAN X N, HU R Z, CHOI Y, *et al*. Anti-TIGIT antibody improves PD-L1 blockade through myeloid and T_{reg} cells［J］. *Nature*, 2024, **627**(8004): 646-655.

［19］ ZHANG Y Y, HE J J, LIU Y L, *et al*. Unlocking the potential of TIGIT in enhancing therapeutic strategies for acute myeloid leukemia through combined azacitidine therapy［J］. *NPJ Precis Onc*, 2025, **9**: 142.

［20］ KABUT J, GORZELAK-MAGIERA A, GISTEREK-GROCHOLSKA I. New therapeutic targets TIGIT, LAG-3 and TIM-3 in the treatment of advanced, non-small-cell lung cancer［J］. *Int J Mol Sci*, 2025, **26**(9): 4096.