



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117050184 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 14

(21) 申请号 202311022709.7

(22) 申请日 2018.12.28

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2017/119506 2017.12.28 CN

PCT/CN2018/097159 2018.07.26 CN

(62) 分案原申请数据

201880088792.9 2018.12.28

(71) 申请人 南京传奇生物科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区龙眠大道568号南京生命科技小镇6号楼

(72) 发明人 张望 武术 杨帅 潘琦 周传初

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038

专利代理人 杨琴

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

权利要求书5页 说明书117页

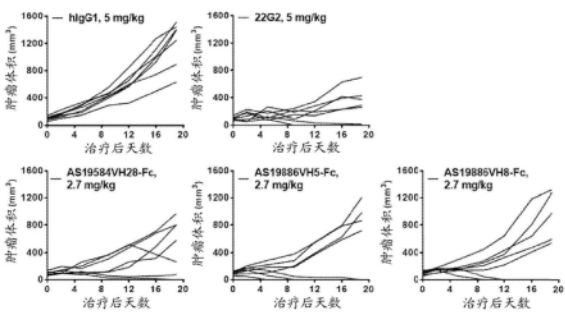
序列表(电子公布) 附图26页

(54) 发明名称

针对TIGIT的单域抗体和其变体

(57) 摘要

提供了包含特异性识别TIGIT的单域抗体(sdAb)部分的构建体。也提供了制备和使用这些构建体的方法。



1. 一种分离的抗TIGIT构建体,所述分离的抗TIGIT构建体包含特异性识别TIGIT的单域抗体(sdAb)部分(“抗TIGIT的sdAb部分”),其中所述抗TIGIT的sdAb部分包含:氨基酸序列如SEQ ID NOs:39、63、37、38、40-42任一项所示的CDR1,氨基酸序列如SEQ ID NOs:109、107、108、110-112任一项所示的CDR2,和氨基酸序列如SEQ ID NOs:179、177、178、180-182任一项所示的CDR3。

2. 如权利要求1所述的分离的抗TIGIT构建体,其中所述抗TIGIT的sdAb部分包含以下中的任一项:

(1) 氨基酸序列如SEQ ID NO:39或63所示的CDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO:109所示的CDR2,和氨基酸序列如SEQ ID NO:179所示的CDR3;

(2) 氨基酸序列如SEQ ID NO:37所示的CDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO:107所示的CDR2,和氨基酸序列如SEQ ID NO:177所示的CDR3;

(3) 氨基酸序列如SEQ ID NO:38所示的CDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO:108所示的CDR2,和氨基酸序列如SEQ ID NO:178所示的CDR3;

(4) 氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示的CDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO:110所示的CDR2,和氨基酸序列如SEQ ID NO:180所示的CDR3;

(5) 氨基酸序列如SEQ ID NO:41所示的CDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO:111所示的CDR2,和氨基酸序列如SEQ ID NO:181所示的CDR3;或

(6) 氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示的CDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO:112所示的CDR2,和氨基酸序列如SEQ ID NO:182所示的CDR3。

3. 如权利要求1或2所述的分离的抗TIGIT构建体,其中所述抗TIGIT的sdAb包含V_HH域,所述V_HH域包含SEQ ID NOs:256、280、282-284、286、287、254、255、257-259中的任一项的氨基酸序列。

4. 如权利要求1或2所述的分离的抗TIGIT构建体,其中所述抗TIGIT的sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。

5. 如权利要求1或2所述的分离的抗TIGIT构建体,其中所述分离的抗TIGIT构建体是sdAb-Fc融合蛋白;

优选地,所述sdAb-Fc融合蛋白是单体或二聚的;

优选地,所述Fc片段是人类IgG1(hIgG1)Fc、无效应子(惰性)hIgG1 Fc或hIgG4 Fc;

优选地,所述sdAb-Fc融合蛋白包含SEQ ID NOs:291、315、317-319、321、322、289、290和292-294中的任一项的氨基酸序列。

6. 如权利要求1或2所述的分离的抗TIGIT构建体,其中所述分离的抗TIGIT构建体还包含特异性识别第二表位的第二抗体部分;

优选地,所述第二抗体部分是全长抗体、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、单链Fv(scFv)、scFv-scFv、微抗体、双抗体或sdAb;

优选地,所述抗TIGIT构建体是多特异性的;

优选地,所述抗TIGIT的sdAb部分和所述第二抗体部分任选地通过肽接头来连接;

优选地,所述肽接头包含SEQ ID NOs:324和370-378中的任一项的氨基酸序列。

7. 如权利要求6所述的分离的抗TIGIT构建体,其中所述第二抗体部分是由两条重链和两条轻链组成的全长抗体;

优选地,所述重链的Fc片段可以是IgG1Fc、无效应子的IgG1 Fc、IgG2 Fc或IgG4 Fc;

优选地,所述的分离的抗TIGIT构建体包含如下任何一种结构:

(i) 其中所述抗TIGIT的sdAb部分的N末端与所述全长抗体的至少一条重链的C末端融合;

(ii) 其中所述抗TIGIT的sdAb部分的C末端与所述全长抗体的至少一条重链的N末端融合;

(iii) 其中所述抗TIGIT的sdAb部分的N末端与所述全长抗体的至少一条轻链的C末端融合;

(iv) 其中所述抗TIGIT的sdAb部分的C末端与所述全长抗体的至少一条轻链的N末端融合;

(v) 所述的分离的抗TIGIT构建体包含四个抗TIGIT的sdAb部分,其中每个抗TIGIT的sdAb部分的C末端与所述全长抗体的每一条链的N末端融合;或

(vi) 所述的分离的抗TIGIT构建体包含四个抗TIGIT的sdAb部分,其中四个抗TIGIT的sdAb部分中的每两个抗TIGIT sdAb部分融合在一起,并进一步与所述全长抗体的每一条重链的N末端融合。

8. 如权利要求7所述的分离的抗TIGIT构建体,其中所述全长抗体特异性识别PD-1 (“抗PD-1全长抗体”);

优选地,所述抗PD-1全长抗体包括以下中的任一项:

(1) (i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:385所示的重链可变域(VH)的三个重链互补决定区(HC-CDR),和氨基酸序列如SEQ ID NO:386所示的轻链可变域(VL)的三个轻链互补决定区(LC-CDR);或,(ii) 氨基酸序列如SEQ ID NO:385所示的重链可变域(VH),和氨基酸序列如SEQ ID NO:386所示的轻链可变域(VL);

(2) (i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:387所示的重链可变域(VH)的三个重链互补决定区(HC-CDR),和氨基酸序列如SEQ ID NO:388所示的轻链可变域(VL)的三个轻链互补决定区(LC-CDR);或,(ii) 氨基酸序列如SEQ ID NO:387所示的重链可变域(VH),和氨基酸序列如SEQ ID NO:388所示的轻链可变域(VL);或

(3) (i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:406所示的重链可变域(VH)的三个重链互补决定区(HC-CDR),和氨基酸序列如SEQ ID NO:407所示的轻链可变域(VL)的三个轻链互补决定区(LC-CDR);或,(ii) 氨基酸序列如SEQ ID NO:406所示的重链可变域(VH),和氨基酸序列如SEQ ID NO:407所示的轻链可变域(VL)。

9. 如权利要求8所述的分离的抗TIGIT构建体,其中:

(i) 所述抗PD-1全长抗体包括氨基酸序列如SEQ ID NO:390所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:391所示的轻链,其中所述抗PD-1全长抗体的所述重链中的至少一者与所述抗TIGIT的sdAb部分融合;或

(ii) 所述抗PD-1全长抗体包括氨基酸序列如SEQ ID NO:390所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:391所示的轻链,其中所述抗PD-1全长抗体的所述轻链中的至少一者与所述抗TIGIT的sdAb部分融合。

10. 如权利要求7所述的分离的抗TIGIT构建体,其中所述全长抗体特异性识别PD-L1 (“抗PD-L1全长抗体”);

优选地,所述抗PD-L1全长抗体包括以下中的任一项:

(1) 氨基酸序列如SEQ ID NO:349所示的重链互补决定区(HC-CDR)1、氨基酸序列如SEQ ID NO:350所示的HC-CDR2、氨基酸序列如SEQ ID NO:351所示的HC-CDR3、氨基酸序列如SEQ ID NO:352所示的轻链互补决定区(LC-CDR)1、氨基酸序列如SEQ ID NO:353所示的LC-CDR2和氨基酸序列如SEQ ID NO:354所示的LC-CDR3;

(2) 氨基酸序列如SEQ ID NO:339所示的VH,和氨基酸序列如SEQ ID NO:340所示的VL;

(3) 氨基酸序列如SEQ ID NO:323或327所示的重链,和氨基酸序列如SEQ ID NO:328所示的轻链;

(4) 氨基酸序列如SEQ ID NO:329所示的重链,和氨基酸序列如SEQ ID NO:330所示的轻链;

(5) (i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:379所示的VH的三个HC-CDR,和氨基酸序列如SEQ ID NO:380所示的VL的三个LC-CDR;或, (ii) 氨基酸序列如SEQ ID NO:379所示的VH,和氨基酸序列如SEQ ID NO:380所示的VL;

(6) (i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:383所示的VH的三个HC-CDR,和氨基酸序列如SEQ ID NO:384所示的VL的三个LC-CDR;或, (ii) 氨基酸序列如SEQ ID NO:383所示的VH,和氨基酸序列如SEQ ID NO:384所示的VL;

(7) (i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:381所示的VH的三个HC-CDR,和氨基酸序列如SEQ ID NO:382所示的VL的三个LC-CDR;或, (ii) 氨基酸序列如SEQ ID NO:381所示的VH,和氨基酸序列如SEQ ID NO:382所示的VL;

(8) 氨基酸序列如SEQ ID NO:331所示的重链,和氨基酸序列如SEQ ID NO:332所示的轻链;或

(9) 氨基酸序列如SEQ ID NO:333所示的重链,和氨基酸序列如SEQ ID NO:334所示的轻链。

11. 如权利要求10所述的分离的抗TIGIT构建体,其中:

(1) 所述抗PD-L1全长抗体包括氨基酸序列如SEQ ID NO:327所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:328所示的轻链,其中所述抗PD-L1全长抗体的所述重链中的至少一者与所述抗TIGIT的sdAb部分融合;

(2) 所述抗PD-L1全长抗体包括氨基酸序列如SEQ ID NO:323所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:328所示的轻链,其中所述抗PD-L1全长抗体的所述重链中的至少一者与所抗TIGIT的sdAb部分融合;

(3) 所述抗PD-L1全长抗体包括氨基酸序列如SEQ ID NO:329所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:330所示的轻链,其中所述抗PD-L1全长抗体的所述重链中的至少一者与所述抗TIGIT的sdAb部分融合;

(4) 所述抗PD-L1全长抗体包括氨基酸序列如SEQ ID NO:323所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:328所示的轻链,其中所述抗PD-L1全长抗体的所述轻链中的至少一者与所述抗TIGIT的sdAb部分融合;

(5) 所述抗PD-L1全长抗体包括氨基酸序列如SEQ ID NO:329所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:330所示的轻链,其中所述抗PD-L1全长抗体的所述轻链中的至少一者与所述抗TIGIT的sdAb部分融合;

(6) 所述抗PD-L1全长抗体包括氨基酸序列如SEQ ID NO:331所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:332所示的轻链,其中所述抗PD-L1全长抗体的所述重链中的至少一者与所述抗TIGIT的sdAb部分融合;或

(7) 所述抗PD-L1全长抗体包括氨基酸序列如SEQ ID NO:333所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:334所示的轻链,其中所述抗PD-L1全长抗体的所述重链中的至少一者与所述抗TIGIT的sdAb部分融合。

12. 如权利要求6所述的分离的抗TIGIT构建体,包含如下任何一种结构:

(a) 所述的分离的抗TIGIT构建体由四条多肽链组成,所述多肽链具有如下从N末端至C末端的结构: (i) V_L-C_L , (ii) V_H-C_H1 -任选的肽接头-第一个抗TIGIT的sdAb部分- C_H2-C_H3 , (iii) V_H-C_H1 -任选的肽接头-第二个抗TIGIT的sdAb部分- C_H2-C_H3 , 和 (iv) V_L-C_L ; 其中多肽链 (i) 的 V_L-C_L 和多肽链 (ii) 的 V_H-C_H1 形成特异性识别第二表位的第二抗体部分, 并且多肽链 (iv) 的 V_L-C_L 和多肽链 (iii) 的 V_H-C_H1 形成特异性识别第三表位的第三抗体部分;

(b) 所述的分离的抗TIGIT构建体由二条多肽链组成,所述多肽链具有如下从N末端至C末端的结构: (i) 第一个特异性识别第二表位的scFv-任选的肽接头-第一个抗TIGIT的sdAb部分- C_H2-C_H3 , 和 (ii) 第二个特异性识别第三表位的scFv-任选的肽接头-第二个抗TIGIT的sdAb部分- C_H2-C_H3 ;

(c) 所述的分离的抗TIGIT构建体由四条多肽链组成,所述多肽链具有如下从N末端至C末端的结构: (i) V_L-C_L -任选的肽接头-第一个抗TIGIT的sdAb部分- C_L , (ii) V_H-C_H1 -任选的肽接头-第二个抗TIGIT的sdAb部分- $C_H1-C_H2-C_H3$, (iii) V_H-C_H1 -任选的肽接头-第三个抗TIGIT的sdAb部分- $C_H1-C_H2-C_H3$, 和 (iv) V_L-C_L -任选的肽接头-第四个抗TIGIT的sdAb部分- C_L ; 其中多肽链 (i) 的 V_L-C_L 和多肽链 (ii) 的 V_H-C_H1 形成特异性识别第二表位的第二抗体部分, 并且多肽链 (iv) 的 V_L-C_L 和多肽链 (iii) 的 V_H-C_H1 形成特异性识别第三表位的第三抗体部分; 或

(d) 所述的分离的抗TIGIT构建体由四条多肽链组成,所述多肽链具有如下从N末端至C末端的结构: (i) 第一个抗TIGIT的sdAb部分- C_L , (ii) 第一个特异性识别第二表位的scFv-任选的肽接头-第二个抗TIGIT的sdAb部分- $C_H1-C_H2-C_H3$, (iii) 第二个特异性识别第三表位的scFv-任选的肽接头-第三个抗TIGIT的sdAb部分- $C_H1-C_H2-C_H3$, 和 (iv) 第四个抗TIGIT的sdAb部分- C_L 。

13. 一种分离的抗TIGIT构建体,所述分离的抗TIGIT构建体包含抗TIGIT的sdAb部分,其中所述抗TIGIT的sdAb部分包含SEQ ID NOs:256、280、282-284、286、287、254、255、257-259中的任一项的CDR1、CDR2和CDR3。

14. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1-13中任一项所述的分离的抗TIGIT构建体,和任选地药学上可接受的载体。

15. 如权利要求1-13中任一项所述的分离的抗TIGIT构建体或如权利要求14所述的药物组合物在制作用于治疗具有TIGIT相关疾病的个体的药物中的应用;

优选地,所述TIGIT相关疾病是癌症;

优选地,所述癌症是实体肿瘤;优选地,所述癌症是结肠癌;

优选地,所述TIGIT相关疾病是病原体感染;

优选地,所述TIGIT相关疾病是免疫相关疾病;

优选地,所述药物以有效量向所述个体施用;

优选地,所述药物用于全身施用或局部施用;

优选地,所述个体是人类。

16. 权利要求15所述应用,其中,所述药物与另外的疗法组合使用;

优选地,所述另外的疗法是手术、放射、化学疗法、免疫疗法、激素疗法或其组合;

优选地,所述另外的疗法是免疫疗法;

优选地,所述免疫疗法包括向所述个体施用有效量的包含免疫调节剂的第二药物组合物;

优选地,所述免疫调节剂是免疫检查点抑制剂;

优选地,所述免疫检查点抑制剂是特异性识别PD-1或PD-L1的抗体。

17. 一种分离的核酸,所述分离的核酸编码如权利要求1-13中任一项所述的分离的抗TIGIT构建体。

18. 一种载体,所述载体包含如权利要求17所述的分离的核酸。

19. 一种分离的宿主细胞,所述分离的宿主细胞包含如权利要求17所述的分离的核酸或如权利要求18所述的载体。

针对TIGIT的单域抗体和其变体

[0001] 本申请是申请号为201880088792.9、申请日为2018年12月28日、发明名称为“针对TIGIT的单域抗体和其变体”的发明申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及包含特异性识别TIGIT的单域抗体(sdAb)部分的构建体,以及其制备和使用方法。

[0003] 背景技术/发明背景

[0004] 具有Ig和ITIM域的T细胞免疫受体(TIGIT,也称为Vstm3或WUCAM)是属于CD28家族的免疫受体。这种26KDa蛋白含有细胞外IgV域,I型跨膜区,细胞内免疫球蛋白尾酪氨酸(ITT)样基序,以及细胞质中基于C末端免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)基序。在原生T细胞和NK细胞中,TIGIT在细胞表面几乎检测不到,但在T细胞和NK细胞活化时上调。在肿瘤微环境中,TIGIT在调节性T细胞(Treg)、耗竭的T细胞和NK细胞上被高度检测到。TIGIT具有多种配体,包括CD155(nec1-5或脊髓灰质炎病毒受体(PVR))、CD112(连接蛋白-2或脊髓灰质炎病毒受体相关2(PVRL2))和CD113(连接蛋白-3或PVRL3)。TIGIT可以高亲和力结合至CD155(PVR),而以较低的亲和力结合至CD112和CD113。最近的报道也表明TIGIT顺式地与CD226(PTA1或DNAM-1)相互作用。

[0005] TIGIT经由几种机制发挥其抑制性免疫检查点功能。首先,在与其主要配体CD155(PVR)结合后,随后TIGIT在其ITIM域中的磷酸化转导抑制信号,从而经由NF- κ B途径来下调T细胞和NK细胞中的IFN- γ 表达。其次,由于TIGIT以比CD226更高的亲和力与PVR相互作用,因此它与CD226竞争并减弱由CD226转导的刺激信号。第三,PVR与树突细胞上的TIGIT结合可导致IL-10表达的上调和IL-12表达的下调,因此损害树突细胞的抗肿瘤免疫应答。最后,最近的研究表明,TIGIT可以直接顺式地与CD226结合,以便抑制CD226二聚化,所述二聚化是T细胞活化所必需的。因此,TIGIT在感染和癌症的免疫应答中充当重要的负调节因子,并且已经提出阻断TIGIT信号传导作为增强用于癌症治疗的T细胞和NK细胞免疫的方法。

[0006] 程序性细胞死亡受体1(PD-1)是另一种抑制性免疫检查点分子,对T细胞功能具有重要的负调节作用。当PD-1与调节T细胞受体(TCR)信号传导的程序性细胞死亡配体1(PD-L1)和/或程序性细胞死亡配体2(PD-L2)结合时,PD-1信号传导可以减弱T细胞应答。使用靶向PD-1或PD-L1的抗体来阻断PD-1/PD-L1轴已经证明可促进肿瘤特异性T细胞免疫,对癌症患者具有显著的临床益处。然而,由于PD-1/PD-L1阻断后的抗性 or 复发,仍然存在巨大的未满足的临床需求。

[0007] 本文所提及的所有出版物、专利、专利申请和公开专利申请的公开内容特此通过引用整体并入本文。

发明内容

[0008] 本发明涉及抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分(下文称为“抗TIGIT sdAb”),例如抗TIGIT sdAb,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其包含与人类免疫球蛋白G

(IgG)的结晶片段(Fc)片段融合的抗TIGIT sdAb,以及多特异性(例如双特异性)抗原结合蛋白,其包含例如与其它sdAb融合或与全长四链抗体融合的抗TIGIT sdAb;以及其制备和使用方法。

[0009] 本申请的一个方面提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,其中所述sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,其中所述sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代在CDR1和/或CDR2中,其中CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。

[0010] 在根据上述任一种分离的抗TIGIT构建体的一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分包括以下任何一种:

[0011] (1) 包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:176的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0012] (2) 包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:177的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0013] (3) 包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:178的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0014] (4) 包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:179的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0015] (5) 包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:180的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0016] (6) 包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:181的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0017] (7) 包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:182的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0018] (8) 包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:194的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0019] (9) 包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:196的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0020] (10) 包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:197的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0021] (11) 包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:198的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0022] (12) 包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:129的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:199的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0023] (13) 包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:133的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:203的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0024] (14) 包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:205的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0025] (15) 包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:136的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:206的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0026] (16) 包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:137的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:207的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;

[0027] (17) 包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:209的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;或

[0028] (18) 包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:140的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:210的氨基酸序列的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。

[0029] 在根据上述任一种分离的抗TIGIT构建体的一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分包含V_H域,所述V_H域包含以下任一者的氨基酸序列:a-1) 37位的氨基酸残基选自以下组成的组:F、Y、V、L、A、H、S、I、W、C、N、G、D、T和P(例如F、Y、L、I或V,例如F或Y,或例如F);a-2) 44位的氨基酸残基选自以下组成的组:E、Q、G、D、A、K、R、L、P、S、V、H、T、N、W、M和I(例如A、G、E、D、Q、R、S或L,或例如G、E或Q);a-3) 45位的氨基酸残基选自以下组成的组:L、R、P、H、F、G、Q、S、E、T、Y、C、I、D和V(例如L、C或R,或例如L或R);a-4) 103位的氨基酸残基选自以下组成的组:W、R、G、S、K、A、M、Y、I、F、T、N、V、Q、P、E和C(例如W、G或R,或例如W);和a-5) 108位的氨基酸残基选自以下组成的组:Q、L、R、P、E、K、S、T、M、A和H(例如Q);或b-1) 37位的氨基酸残基选自以下组成的组:F、Y、L、I和V(例如F或Y,或例如F);b-2) 44位的氨基酸残基选自以下组成的组:E和Q;b-3) 45位的氨基酸残基选自以下组成的组:R和L(例如R);b-4) 103位的氨基酸残基选自以下组成的组:W、R、G和S(例如W);和b-5) 108位的氨基酸残基选自以下组成的组:Q和L(例如Q);或c-1) 37位的氨基酸残基选自以下组成的组:F、Y、L、I和V(例如F或Y,或例如F);c-2) 44位的氨基酸残基选自以下组成的组:A、G、E、D、Q、R、S和L(例如G、E或Q);c-3) 45位的氨基酸残基选自以下组成的组:L、R和C(例如L或R);c-4) 103位的氨基酸残基选自以下组成的组:P、R和S(例如R或S);和c-5) 108位的氨基酸残基选自以下组成的组:Q和L(例如Q);其中氨基酸位置是根据Kabat编号。在一些实施方案中,当108位为Q时,108位可以任选地人源化为L。

[0030] 在根据如上所述的分离的抗TIGIT构建体中的任一者的一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分包含V_H域,所述V_H域包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列,或其与SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者具有至少约80%(例如至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一者)序列同一性的变体。在一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分包含V_H域,所述V_H域包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列,或其在V_H域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代在SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR,例如CDR1和/或CDR2和/或CDR3中。在一些实施方案中,氨基酸取代在SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的FR,例如FR1和/或FR2和/或FR3和/或FR4中。在一些实施方案中,氨基酸取代在CDR和FR中。在一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分包含V_H域,所述V_H域包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。

[0031] 在根据上述任一种分离的抗TIGIT构建体的一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分与TIGIT之间结合的K_d为约10⁻⁵M至约10⁻¹²M(例如约10⁻⁵M至约10⁻¹²M,约10⁻⁷M至约

10^{-12}M ,或约 10^{-8}M 至约 10^{-12}M 。

[0032] 在根据上述任一种分离的抗TIGIT构建体的一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。

[0033] 在根据上述任一种分离的抗TIGIT构建体的一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体是sdAb-Fc融合蛋白。在一些实施方案中,sdAb-Fc融合蛋白是单体的。在一些实施方案中,sdAb-Fc融合蛋白是二聚体的。在一些实施方案中,Fc片段是人类IgG1 (hIgG1)Fc、无效应子(effectorless) (惰性)hIgG1 Fc或hIgG4Fc。在一些实施方案中,Fc片段包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分和Fc片段任选地通过肽接头来连接,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头。在一些实施方案中,sdAb-Fc融合蛋白包含SEQ ID NO:288-294、306、308-311、315、317-319、321-322和365-367中的任一者的氨基酸序列。

[0034] 在根据上述任一种分离的抗TIGIT构建体的一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体还包含特异性识别第二表位的第二抗体部分。在一些实施方案中,第二抗体部分是全长抗体、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、单链Fv(scFv)、scFv-scFv、微抗体、双抗体(diabody)或sdAb。在一些实施方案中,抗TIGIT构建体是单特异性的。在一些实施方案中,抗TIGIT构建体是多特异性的(例如双特异性的)。在一些实施方案中,第二表位不来自TIGIT。在一些实施方案中,第二表位来自TIGIT但不同于由抗TIGIT sdAb部分特异性识别的表位。在一些实施方案中,第二表位与抗TIGIT sdAb部分特异性识别的表位相同。在一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分和第二抗体部分任选地通过肽接头来连接,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头。在一些实施方案中,第二抗体部分是sdAb。在一些实施方案中,第二抗体部分是Fab。在一些实施方案中,第二抗体部分是scFv。在一些实施方案中,第二抗体部分是由两条重链和两条轻链组成的全长抗体。在一些实施方案中,重链的Fc片段是IgG1Fc、无效应子的IgG1 Fc、IgG2 Fc或IgG4 Fc。在一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分的N末端与全长抗体的重链中的至少一者的C末端融合。在一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分的C末端与全长抗体的重链中的至少一者的N末端融合。在一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分的N末端与全长抗体的轻链中的至少一者的C末端融合。在一些实施方案中,特异性识别TIGIT的sdAb部分的C末端与全长抗体的轻链中的至少一者的N末端融合。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体包含四个相同的如上所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分,每个抗TIGIT sdAb部分的C末端经由任选的肽接头与全长抗体的每个链的N末端融合。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体包含四个相同的如上所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分,两个抗TIGIT sdAb部分经由任选的肽接头彼此融合,另外两个抗TIGIT sdAb部分经由任选的肽接头彼此融合,并且每个抗TIGIT sdAb部分融合多肽的C末端经由任选的肽接头与全长抗体的每条重链的N末端融合。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体由四条多肽链组成,所述多肽链具有如下从N末端至C末端的结构:(1) V_L-C_L ; (2) 抗TIGIT sdAb- $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (3) 抗TIGIT sdAb- $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; 和(4) V_L-C_L ,其中多肽链(1)和(2)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第一拷贝的抗原结合位点,多肽链(3)和(4)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第二拷贝的抗原结合位点,并且每个抗TIGIT sdAb特异性结合TIGIT的拷贝。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体由四条多肽链组成,所述多肽链具有如下从N末端至C

末端的结构: (1) V_L-C_L ; (2) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ -抗TIGIT sdAb; (3) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ -抗TIGIT sdAb;和(4) V_L-C_L ,其中多肽链(1)和(2)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第一拷贝的抗原结合位点,多肽链(3)和(4)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第二拷贝的抗原结合位点,并且每个抗TIGIT sdAb特异性结合TIGIT的拷贝。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体由四条多肽链组成,所述多肽链具有如下从N末端至C末端的结构: (1) 抗TIGIT sdAb- V_L-C_L ; (2) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (3) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$;和(4) 抗TIGIT sdAb- V_L-C_L ,其中多肽链(1)和(2)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第一拷贝的抗原结合位点,多肽链(3)和(4)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第二拷贝的抗原结合位点,并且每个抗TIGIT sdAb特异性结合TIGIT的拷贝。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体由四条多肽链组成,所述多肽链具有如下从N末端至C末端的结构: (1) V_L-C_L -抗TIGIT sdAb; (2) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (3) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$;和(4) V_L-C_L -抗TIGIT sdAb,其中多肽链(1)和(2)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第一拷贝的抗原结合位点,多肽链(3)和(4)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第二拷贝的抗原结合位点,并且每个抗TIGIT sdAb特异性结合TIGIT的拷贝。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体由四条多肽链组成,所述多肽链具有如下从N末端至C末端的结构: (1) 抗TIGIT sdAb- V_L-C_L ; (2) 抗TIGIT sdAb- $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (3) 抗TIGIT sdAb- $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$;和(4) 抗TIGIT sdAb- V_L-C_L ,其中多肽链(1)和(2)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第一拷贝的抗原结合位点,多肽链(3)和(4)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第二拷贝的抗原结合位点,并且每个抗TIGIT sdAb特异性结合TIGIT的拷贝。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体由四条多肽链组成,所述多肽链具有如下从N末端至C末端的结构: (1) V_L-C_L ; (2) 抗TIGIT sdAb-抗TIGIT sdAb- $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (3) 抗TIGIT sdAb-抗TIGIT sdAb- $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$;和(4) V_L-C_L ,其中多肽链(1)和(2)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第一拷贝的抗原结合位点,多肽链(3)和(4)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第二拷贝的抗原结合位点,并且每个抗TIGIT sdAb特异性结合TIGIT的拷贝。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体由两条多肽链组成,每条链具有如下从N末端至C末端的结构: V_L-V_H -抗TIGIT sdAb- C_H2-C_H3 ,其中每个多肽链的 V_H 和 V_L 形成scFv域,其特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的拷贝,并且每个抗TIGIT sdAb特异性结合TIGIT的拷贝。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体由四条多肽链组成,所述多肽链具有如下从N末端至C末端的结构: (1) V_L-C_L -抗TIGIT sdAb- C_L ; (2) V_H-C_H1 -抗TIGIT sdAb- $C_H1-C_H2-C_H3$; (3) V_H-C_H1 -抗TIGIT sdAb- $C_H1-C_H2-C_H3$;和(4) V_L-C_L -抗TIGIT sdAb- C_L ,其中多肽链(1)和(2)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第一拷贝的抗原结合位点,多肽链(3)和(4)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第二拷贝的抗原结合位点,并且每个抗TIGIT sdAb特异性结合TIGIT的拷贝。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体由

四条多肽链组成,其具有如下从N末端至C末端的结构:(1)抗TIGIT sdAb-C_L; (2) V_L-V_H-抗TIGIT sdAb-C_H1-C_H2-C_H3; (3) V_L-V_H-抗TIGIT sdAb-C_H1-C_H2-C_H3;和(4)抗TIGIT sdAb-C_L,其中多肽链(2)和(3)的V_H和V_L各自形成特异性结合第二表位(例如PD-1、PD-L1)的拷贝的scFv,并且每个抗TIGIT sdAb特异性结合TIGIT的拷贝。在一些实施方案中,全长抗体(或包含V_H和V_L的抗原结合部分)特异性识别PD-1。在一些实施方案中,抗PD-1全长抗体(或包含V_H和V_L的抗原结合部分)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:385的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:386的V_L。在一些实施方案中,抗PD-1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:325的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:326的轻链。在一些实施方案中,抗PD-1全长抗体(或包含V_H和V_L的抗原结合部分)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:387的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:388的V_L。在一些实施方案中,抗PD-1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:390的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:391的轻链。在一些实施方案中,抗PD-1全长抗体(或包含V_H和V_L的抗原结合部分)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:406的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:407的V_L。在一些实施方案中,全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:390的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:391的轻链,其中全长抗体的重链中的至少一者与如上所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分融合,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:394或396。在一些实施方案中,全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:390的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:391的轻链,其中全长抗体的轻链中的至少一者与如上所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分融合,并且其中轻链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:399或401。在一些实施方案中,全长抗体(或包含V_H和V_L的抗原结合部分)特异性识别PD-L1。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或包含V_H和V_L的抗原结合部分)包含1) V_H,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2) V_L,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或包含V_H和V_L的抗原结合部分)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的V_L。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:323或327的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328的轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:329的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:330的轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或包含V_H和V_L的抗原结合部分)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:379的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:380的V_L。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或包含V_H和V_L的抗原结合部分)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:383的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:384的V_L。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或包含V_H和V_L的抗原结合部分)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:381的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:382的V_L。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:331的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:332的轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:333的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:334的轻链。在一些实施方案中,全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:327的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328的轻链,其中全长抗体的重链中的至少一者与如上所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分融合,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:343。在一些实施方案中,全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:323的重链和包含氨

氨基酸序列SEQ ID NO:328的轻链,其中全长抗体的重链中的至少一者与如上所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分融合,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:357或359。在一些实施方案中,全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:329的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:330的轻链,其中全长抗体的重链中的至少一者与如上所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分融合,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:341或402。在一些实施方案中,全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:323的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328的轻链,其中全长抗体的轻链中的至少一者与如上所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分融合,并且其中轻链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:362或364。在一些实施方案中,全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:329的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:330的轻链,其中全长抗体的轻链中的至少一者与如上所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分融合,并且其中轻链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:405。在一些实施方案中,全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:331的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:332的轻链,其中全长抗体的重链中的至少一者与如上所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分融合,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:347。在一些实施方案中,全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:333的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:334的轻链,其中全长抗体的重链中的至少一者与如上所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分融合,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:345。

[0035] 在根据上述任一种分离的抗TIGIT构建体的一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体还包含生物活性蛋白质或其片段。

[0036] 此外提供了一种分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,其中所述sdAb部分包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR1、CDR2和CDR3。

[0037] 此外提供了一种分离的抗TIGIT构建体(例如,抗TIGIT sdAb、抗TIGIT sdAb-Fc融合体、PD-1×TIGIT BABP或PD-L1×TIGIT BABP),其与上述分离的抗TIGIT构建体中的任何一种竞争性地特异性结合TIGIT。

[0038] 此外提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含任何一种上述分离的抗TIGIT构建体和任选地药学上可接受的载体。

[0039] 本申请的另一方面提供了治疗具有TIGIT相关疾病(例如癌症或免疫相关疾病)的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的任何一种上述药物组合物。在一些实施方案中,TIGIT相关疾病是癌症。在一些实施方案中,癌症是实体肿瘤,例如结肠癌。在一些实施方案中,TIGIT相关疾病是免疫相关疾病。在一些实施方案中,免疫相关疾病与T细胞功能障碍病症相关。在一些实施方案中,T细胞功能障碍病症的特征在于T细胞耗竭。在一些实施方案中,免疫相关疾病选自以下组成的组:未解决的急性感染、慢性感染和肿瘤免疫。在一些实施方案中,TIGIT相关疾病是病原性感染。在一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用另外的疗法(例如,癌症疗法),例如手术、放射、化学疗法、免疫疗法、激素疗法或其组合。在一些实施方案中,另外的疗法是免疫疗法。在一些实施方案中,免疫疗法包括向所述个体施用有效量的第二药物组合物,其包含免疫调节剂,例如免疫检查点抑制剂(例如,特异性识别PD-1或PD-L1的抗体)。在一些实施方案中,全身(例如静脉内(i.v.)或腹膜内(i.p.))施用药物组合物。在一些实施方案中,局部(例如肿瘤内)施用药物组合物。

在一些实施方案中,个体是人类。

[0040] 此外提供了一种分离的核酸,所述核酸编码上述任一种分离的抗TIGIT构建体。在一些实施方案中,分离的核酸包含SEQ ID NO:246-252中的任一者的核酸序列。

[0041] 此外提供了一种载体,所述载体包含上述任一种分离的核酸。

[0042] 此外提供了一种分离的宿主细胞,所述宿主细胞包含上述分离的核酸或载体中的任一者。

[0043] 此外提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含上述分离的抗TIGIT构建体、分离的核酸、载体或分离的宿主细胞中的任一者。

[0044] 本申请的另一方面提供了产生上述任一种分离的抗TIGIT构建体的方法,所述方法包括在有效表达所编码的抗TIGIT构建体的条件下,培养包含上述分离的核酸或载体中的任一者的宿主细胞,或培养任何一种上述的分离的宿主细胞;以及从所述宿主细胞中获得所表达的抗TIGIT构建体。在一些实施方案中,所述方法还包括产生包含上述分离的核酸或载体中的任一者的宿主细胞。

附图说明

[0045] 图1描绘了免疫前血清和最终加强后的免疫后血清的免疫应答评估。

[0046] 图2描绘了最终加强后常规抗体(IgG1)和重链抗体(IgG2和IgG3)的免疫应答评估。从免疫前血清中分离的相应免疫球蛋白片段用作阴性对照。

[0047] 图3描绘了非人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白在Promega TIGIT/CD155阻断报告基因测定中的功能。22G2用作阳性抗TIGIT对照。

[0048] 图4A-4C描绘了单独或与小鼠PD-1阻断抗体RMP1-14组合的非人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白(AS19584-Fc)在CT26同系肿瘤模型中的体内功效。10A7用作抗TIGIT抗体的阳性对照。图4A显示了每个治疗组中的平均肿瘤体积。图4B显示了每种治疗下肿瘤浸润的CD8⁺或CD4⁺ T淋巴细胞的百分比。图4C显示了每只动物的蜘蛛图。

[0049] 图5A-5B描绘了单独或与抗PD-1抗体RMP1-14组合的非人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白(AS19584-Fc)在CT26同系肿瘤模型中的体内功效。图5A显示了每个治疗组中的平均肿瘤体积。图5B显示了在不同治疗下每只动物在对数标度下的肿瘤体积的蜘蛛图。

[0050] 图6A-6B描绘了单独或与抗PD-1抗体RMP1-14组合的非人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白(AS19584-Fc)在MC38同系肿瘤模型中的体内功效。图6A显示了每个治疗组中的平均肿瘤体积。图6B显示了在不同治疗下每只动物在对数标度下的肿瘤体积的蜘蛛图。

[0051] 图7描绘了使用Promega TIGIT/CD155阻断报告基因测定,人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白(AS19584VH28-Fc、AS19886VH5-Fc、AS19886VH8-Fc)与其未人源化的亲本抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白(AS19584-Fc、AS19886-Fc)相比的体外功能活性。22G2用作阳性抗TIGIT抗体对照。

[0052] 图8描绘了使用IL-2释放测定,人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白(AS19584VH28-Fc、AS19886VH5-Fc、AS19886VH8-Fc)与其未人源化的亲本抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白(AS19584-Fc、AS19886-Fc)相比的体外功能活性。22G2用作阳性抗TIGIT抗体对照。

[0053] 图9描绘了人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白AS19584VH28-Fc的体内药代动力学曲线。22G2用作阳性抗TIGIT抗体对照。

[0054] 图10A-10B描绘了人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白在携带MC38肿瘤模型的TIGIT人源化小鼠中的体内功效。图10A显示了每个治疗组中的平均肿瘤体积。图10B显示了每只动物的肿瘤体积的蜘蛛图。22G2用作阳性抗TIGIT抗体对照。hIgG1用作阴性对照。

[0055] 图11描绘了使用基于细胞的PD-L1功能测定,概念验证(POC)PD-L1×TIGIT双特异性抗原结合蛋白(BABP)和其亲本抗PD-L1抗体元件的体外功能。Tecentriq生物仿制药(具有IgG1 Fc或惰性IgG1 Fc)用作阳性抗PD-L1抗体对照。h53C1(具有IgG1 Fc或惰性IgG1 Fc)是内部开发的抗PD-L1抗体。

[0056] 图12描绘了使用混合淋巴细胞反应(MLR),POC PD-L1×TIGIT BABP和相应亲本元件(抗PD-L1抗体和抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白)的体外功能。Tecentriq生物仿制药(具有IgG1 Fc或惰性IgG1 Fc)用作阳性抗PD-L1抗体对照。22G2用作阳性抗TIGIT抗体对照。hIgG1用作阴性对照。

[0057] 图13描绘了使用Promega TIGIT/CD155阻断报告基因测定,POC PD-L1×TIGIT BABP和相应亲本元件(抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白)的体外功能。22G2用作阳性抗TIGIT抗体对照。

[0058] 图14描绘了使用针对TIGIT靶向的IL-2释放测定,POC PD-L1×TIGIT BABP和相应亲本元件(抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白)的体外功能。22G2用作阳性抗TIGIT抗体对照。

[0059] 图15描绘了使用PD-L1/TIGIT双功能报告基因测定,POC PD-L1×TIGIT BABP BTP-5、其相应亲本元件(h53C1和AS19584-Fc融合蛋白)和其组合的体外功能。

[0060] 图16A-16B描绘了在携带MC38-hPD-L1肿瘤的C57BL/6人类PD-1KI小鼠中POC PD-L1×TIGIT BABP BTP-5与其亲本元件(h53C1和AS19584-Fc)和其组合疗法相比的体内功效。图16A显示了每个治疗组中的平均肿瘤体积。图16B显示了每只动物的肿瘤体积的蜘蛛图。IgG1用作阴性对照。

[0061] 图17描绘了示例性BABP的示意性结构,其包含具有两条相同重链和两条相同轻链的单特异性全长抗体,和两个相同抗TIGIT sdAb,其中每个抗TIGIT sdAb的C末端经由任选的肽接头与一条重链的N末端融合。两个抗TIGIT sdAb特异性结合第一表位(TIGIT)。全长抗体具有两个特异性结合第二表位的抗原结合位点。例如,BABP可以由四条多肽链组成,其具有如下从N末端至C末端的结构:(1) V_L-C_L ; (2) $V_HH-V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (3) $V_HH-V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; 和(4) V_L-C_L ,其中多肽链(1)和(2)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第一拷贝的抗原结合位点,多肽链(3)和(4)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第二拷贝的抗原结合位点,并且每个 V_HH 特异性结合第一表位(TIGIT)的拷贝。在替代形式中,可以省略每个抗TIGIT sdAb,或者用彼此融合的两个相同或不同的抗TIGIT sdAb代替。单特异性全长抗体可以用双特异性全长抗体代替,以进一步扩展结合特异性。

[0062] 图18描绘了示例性BABP的示意性结构,其包含具有两条相同重链和两条相同轻链的单特异性全长抗体,和两个相同抗TIGIT sdAb,其中每个抗TIGIT sdAb的N末端经由任选的肽接头与一条重链的C末端融合。两个抗TIGIT sdAb特异性结合第一表位(TIGIT)。全长抗体具有两个特异性结合第二表位的抗原结合位点。例如,BABP可以由四条多肽链组成,其具有如下从N末端至C末端的结构:(1) V_L-C_L ; (2) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3-V_HH$; (3) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3-V_HH$; 和(4) V_L-C_L ,其中多肽链(1)和(2)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第一拷贝的抗原结合位点,多肽链(3)和(4)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第二拷贝的抗原结合位点,

并且每个 V_H 特异性结合第一表位 (TIGIT) 的拷贝。在替代形式中, 可以省略每个抗TIGIT sdAb, 或者用彼此融合的两个相同或不同的抗TIGIT sdAb代替。单特异性全长抗体可以用双特异性全长抗体代替, 以进一步扩展结合特异性。

[0063] 图19描绘了示例性BABP的示意性结构, 其包含具有两条相同重链和两条相同轻链的单特异性全长抗体, 和两个相同抗TIGIT sdAb, 其中每个抗TIGIT sdAb的C末端经由任选的肽接头与一条轻链的N末端融合。两个抗TIGIT sdAb特异性结合第一表位 (TIGIT)。全长抗体具有两个特异性结合第二表位的抗原结合位点。例如, BABP可以由四条多肽链组成, 其具有如下从N末端至C末端的结构: (1) $V_HH-V_L-C_L$; (2) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (3) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; 和 (4) $V_HH-V_L-C_L$, 其中多肽链 (1) 和 (2) 的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第一拷贝的抗原结合位点, 多肽链 (3) 和 (4) 的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第二拷贝的抗原结合位点, 并且每个 V_H 特异性结合第一表位 (TIGIT) 的拷贝。在替代形式中, 可以省略每个抗TIGIT sdAb, 或者用彼此融合的两个相同或不同的抗TIGIT sdAb代替。单特异性全长抗体可以用双特异性全长抗体代替, 以进一步扩展结合特异性。

[0064] 图20描绘了示例性BABP的示意性结构, 其包含具有两条相同重链和两条相同轻链的单特异性全长抗体, 和两个相同抗TIGIT sdAb, 其中每个抗TIGIT sdAb的N末端经由任选的肽接头与一条轻链的C末端融合。两个抗TIGIT sdAb特异性结合第一表位。全长抗体具有两个特异性结合第二表位的抗原结合位点。例如, BABP可以由四条多肽链组成, 其具有如下从N末端至C末端的结构: (1) $V_L-C_L-V_HH$; (2) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (3) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; 和 (4) $V_L-C_L-V_HH$, 其中多肽链 (1) 和 (2) 的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第一拷贝的抗原结合位点, 多肽链 (3) 和 (4) 的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第二拷贝的抗原结合位点, 并且每个 V_H 特异性结合第一表位 (TIGIT) 的拷贝。在替代形式中, 可以省略每个抗TIGIT sdAb, 或者用彼此融合的两个相同或不同的抗TIGIT sdAb代替。单特异性全长抗体可以用双特异性全长抗体代替, 以进一步扩展结合特异性。

[0065] 图21描绘了示例性BABP的示意性结构, 其包含具有两条相同重链和两条相同轻链的单特异性全长抗体, 和四个相同抗TIGIT sdAb, 其中每个抗TIGIT sdAb的C末端经由任选的肽接头与单特异性全长抗体的重链或轻链的N末端融合。每个抗TIGIT sdAb特异性结合至第一表位 (TIGIT)。全长抗体具有两个抗原结合位点, 每个抗原结合位点特异性结合第二表位。例如, BABP可以由四条多肽链组成, 其具有如下从N末端至C末端的结构: (1) $V_HH-V_L-C_L$; (2) $V_HH-V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (3) $V_HH-V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; 和 (4) $V_HH-V_L-C_L$, 其中多肽链 (1) 和 (2) 的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第一拷贝的抗原结合位点, 多肽链 (3) 和 (4) 的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第二拷贝的抗原结合位点, 并且每个 V_H 特异性结合第一表位 (TIGIT) 的拷贝。在替代形式中, 可以省略每个抗TIGIT sdAb, 或者用彼此融合的两个相同或不同的抗TIGIT sdAb代替。单特异性全长抗体可以用双特异性全长抗体代替, 以进一步扩展结合特异性。

[0066] 图22描绘了示例性BABP的示意性结构, 其包含具有两条相同重链和两条相同轻链的单特异性全长抗体, 和四个相同抗TIGIT sdAb, 其中与每条重链的N末端融合的是两个相同抗TIGIT sdAb, 两个抗TIGIT sdAb经由任选的肽接头彼此融合, 并且两个抗TIGIT sdAb经由任选的肽接头与每条重链的N末端融合。每个抗TIGIT sdAb特异性结合第一表位 (TIGIT)。全长抗体具有两个抗原结合位点, 每个抗原结合位点特异性结合第二表位。例如,

BABP可以由四条多肽链组成,其具有如下从N末端至C末端的结构:(1) V_L-C_L ; (2) $V_HH-V_HH-V_HH-C_H1-C_H2-C_H3$; (3) $V_HH-V_HH-V_HH-C_H1-C_H2-C_H3$;和(4) V_L-C_L ,其中多肽链(1)和(2)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第一拷贝的抗原结合位点,多肽链(3)和(4)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第二拷贝的抗原结合位点,并且每个 V_HH 特异性结合第一表位(TIGIT)的拷贝。在替代形式中,可以省略每个抗TIGIT sdAb,或者用彼此融合的两个相同或不同的抗TIGIT sdAb代替。单特异性全长抗体可以用双特异性全长抗体代替,以进一步扩展结合特异性。

[0067] 图23描绘了示例性BABP的示意性结构,其包含两个相同抗原结合(Fab)片段,两个相同抗TIGIT sdAb和Fc区,其中每个抗TIGIT sdAb的N末端经由任选的肽接头与Fab片段的 C_H1 区的C末端融合,并且每个抗TIGIT sdAb的C末端与Fc区的 C_H2 区的N末端融合。每个抗TIGIT sdAb特异性结合第一表位(TIGIT)。每个Fab片段特异性结合第二表位。例如,BABP可以由四条多肽链组成,其具有如下从N末端至C末端的结构:(1) V_L-C_L ; (2) $V_H-C_H1-V_HH-C_H2-C_H3$; (3) $V_H-C_H1-V_HH-C_H2-C_H3$;和(4) V_L-C_L ,其中多肽链(1)和(2)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第一拷贝的抗原结合位点,多肽链(3)和(4)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第二拷贝的抗原结合位点,并且每个 V_HH 特异性结合第一表位(TIGIT)的拷贝。在替代形式中,可以省略每个抗TIGIT sdAb,或者用彼此融合的两个相同或不同的抗TIGIT sdAb代替。在替代形式中,为了扩展特异性,两个Fab片段可以特异性结合不同的表位,和/或 V_HH 片段可以特异性结合不同的表位。

[0068] 图24描绘了示例性BABP的示意性结构,其包含两个相同单链可变片段(scFv)、两个相同抗TIGIT sdAb和Fc区,其中每个抗TIGIT sdAb的N末端经由任选的肽接头与scFv的C末端融合,并且每个抗TIGIT sdAb的C末端与Fc区的N末端融合。每个抗TIGIT sdAb特异性结合第一表位(TIGIT)。每个scFv特异性结合第二表位。例如,BABP可以由两条多肽链组成,每条链具有如下从N末端至C末端的结构: $V_L-V_HH-V_HH-C_H2-C_H3$,其中每条多肽链的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的拷贝的scFv域,并且每个 V_HH 特异性结合第一表位(TIGIT)的拷贝。在替代形式中,scFv域可以从N末端至C末端包含: V_HH-V_L 。在替代形式中,可以省略每个抗TIGIT sdAb,或者用彼此融合的两个相同或不同的抗TIGIT sdAb代替。另外,为了扩展特异性,两个scFv可以特异性结合不同的表位,和/或 V_HH 片段可以特异性结合不同的表位。

[0069] 图25描绘了示例性BABP的示意性结构,其包含:两个相同Fab片段;两个相同Fab样片段,每个Fab样片段包含两个 V_HH 片段;和Fc区。在每个Fab样片段中, V_H 和 V_L 区各自被抗TIGIT sdAb代替。每个Fab样片段特异性结合第一表位(TIGIT)。每个Fab片段特异性结合第二表位。例如,BABP可以由四条多肽链组成,其具有如下从N末端至C末端的结构:(1) $V_L-C_L-V_HH-C_L$; (2) $V_H-C_H1-V_HH-C_H1-C_H2-C_H3$; (3) $V_H-C_H1-V_HH-C_H1-C_H2-C_H3$;和(4) $V_L-C_L-V_HH-C_L$,其中多肽链(1)和(2)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第一拷贝的抗原结合位点,多肽链(3)和(4)的 V_H 和 V_L 形成特异性结合第二表位的第二拷贝的抗原结合位点,并且每个 V_HH 特异性结合第一表位(TIGIT)的拷贝。在替代形式中,为了扩展特异性,两个Fab片段可以特异性结合不同的表位,和/或Fab样片段可以特异性结合不同的表位(例如,来自TIGIT的不同表位)。

[0070] 图26描绘了示例性BABP的示意性结构,其包含:两个相同scFv;两个相同Fab样片段,每个Fab样片段包含两个 V_HH 片段;和Fc区。在每个Fab样片段中, V_H 和 V_L 区各自被抗TIGIT sdAb代替。每个Fab样片段特异性结合第一表位(TIGIT)。每个scFv特异性结合第二表位。例如,BABP可以由四条多肽链组成,其具有如下从N末端至C末端的结构:(1) V_HH-C_L ; (2) V_L-V_HH -

$V_HH-C_H1-C_H2-C_H3$; (3) $V_L-V_H-V_HH-C_H1-C_H2-C_H3$; 和 (4) V_HH-C_L , 其中多肽链 (2) 和 (3) 的 V_H 和 V_L 各自形成特异性结合第二表位的拷贝的 scFv, 并且每个 V_HH 特异性结合第一表位 (TIGIT) 的拷贝。在替代形式中, scFv 的 C 末端可以与包含 V_HH-C_L 的 Fab 样片段中的链的 N 末端融合; 和/或 scFv 域可以从 N 末端至 C 末端包含: V_H-V_L 。另外, 为了扩展特异性, 两个 scFv 可以特异性结合不同的表位, 和/或 V_HH 片段可以特异性结合不同的表位 (例如, 来自 TIGIT 的不同表位)。

[0071] 图27A-27C描绘了PD-1/TIGIT和PD-L1/TIGIT双功能报告基因测定, 以通过同时靶向PD-L1/PD-1途径和CD155/TIGIT途径来评估BABP的体外协同作用。测试BTP-11和BTP-13并与阻断PD-1或TIGIT的单一疗法进行比较 (图27A)。测试BTP-15、BTP-17、BTP-21和BTP-22, 并与阻断PD-L1或TIGIT的单一疗法进行比较 (图27B和图27C)。

[0072] 图28A和28B分别描绘了通过FACS检测的BTP-21、替拉戈单抗 (Tiragolumab)、阿特珠单抗 (Atezolizumab)、度伐单抗 (Durvalumab)、h53C1和AS19584VH28与原代CD8和CD4 T 细胞的结合。

[0073] 图29描绘了BTP-21、阿特珠单抗、度伐单抗和h53C1在诱导由3个健康个体的原代人类PBMC离体释放IFN- γ 的能力。

[0074] 图30描绘了在携带CT26肿瘤的Balb/c人PD-1KI小鼠中PD-1 $\times$ TIGIT BABP BTP-11与其亲本元件 (PD1-BM-min和AS19584VH28) 和其组合相比的体内功效。数据显示在蜘蛛图中。TF指示无肿瘤小鼠。

[0075] 图31描绘了在携带过表达人类PD-L1的MC38肿瘤 (MC38-hPDL1) 的C57BL/6人类PD-1/PD-L1双重KI小鼠中PD-L1 $\times$ TIGIT BABP BTP-21与阿特珠单抗、其亲本元件 (h53C1和AS19584VH28) 和其组合相比的体内功效。数据显示在蜘蛛图中。TF指示无肿瘤小鼠。

具体实施方式

[0076] 本发明提供了特异性识别TIGIT的新型sdAb (下文也称为“抗TIGIT sdAb”) 和其抗体变体 (例如, 包含抗TIGIT sdAb的较大蛋白质或多肽, 例如抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白, 与全长抗体、Fab或scFv融合的抗TIGIT sdAb, 或包含抗TIGIT sdAb的多特异性抗原结合蛋白 (MABP, 例如双特异性抗原结合蛋白 (BABP))), 其用于治疗TIGIT相关疾病 (例如癌症) 的用途和其制备方法。

[0077] sdAb与常规4链抗体的不同在于具有单个单体抗体可变域, 例如重链可变域 (V_HH), 其可以在没有轻链帮助的情况下对抗原展现出高亲和力。已知骆驼科动物 V_HH 为分子量约15kDa的最小功能性抗原结合片段。

[0078] 因此, 本申请的一个方面提供了分离的抗TIGIT构建体, 其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分。分离的抗TIGIT构建体可以是例如抗TIGIT sdAb (例如天然或人源化), 包含融合在一起的本文所述的多个抗TIGIT sdAb的多肽, 包含与Fc片段 (例如, 人类IgG1 Fc、无效应子 (惰性) IgG1 Fc、hIgG2 Fc或IgG4 Fc) 融合的本文所述的抗TIGIT sdAb的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白, 或包含与全长抗体 (例如抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体) 或包含重链可变域 (V_H) 和轻链可变域 (V_L) 的抗原结合片段融合的本文所述的抗TIGIT sdAb的MABP。抗TIGIT构建体可以是单特异性或多特异性 (例如双特异性), 单价或多价 (例如二价)。

[0079] 也提供了包含本文所述的抗TIGIT构建体的组合物 (例如药物组合物)、试剂盒和制品, 其制备方法, 以及使用本文所述的抗TIGIT构建体治疗TIGIT相关疾病 (例如癌症) 的

方法。

[0080] I. 定义

[0081] 如本文所用,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是用于获得有益或期望结果(包括临床结果)的方法。出于本发明的目的,有益或期望的临床结果包括但不限于以下一种或多种:缓解由疾病引起的一种或多种症状,减轻疾病的程度,稳定疾病(例如,预防或延迟疾病的恶化),预防或延迟疾病的传播(例如,转移),预防或延迟疾病的复发,延迟或减缓疾病的进展,改善疾病状态,提供疾病的缓解(部分或全部),减少治疗疾病所需的一种或多种其它药物的剂量,延迟疾病的进展,提高生活质量和/或延长生存期。“治疗”也涵盖减少癌症的病理后果。本发明的方法考虑这些治疗方面中的任何一种或多种。

[0082] 本文所用的术语“有效量”是指足以治疗特定病症、疾患或疾病例如改善、缓和、减轻和/或延迟其一种或多种症状的药剂或药剂组合的量。关于癌症,有效量包括足以引起肿瘤缩小和/或降低肿瘤生长速率(例如抑制肿瘤生长)或预防或延迟其它不需要的细胞增殖的量。在一些实施方案中,有效量是足以延迟发展的量。在一些实施方案中,有效量是足以预防或延迟复发的量。有效量可以在一次或多次施用中施用。有效量的药物或组合物可以:(i)减少癌细胞的数量;(ii)减小肿瘤大小;(iii)在一定程度上抑制、推迟、减缓并优选阻止癌细胞浸润到外周器官中;(iv)抑制(即,在一定程度上减缓并且优选阻止)肿瘤转移;(v)抑制肿瘤生长;(vi)预防或延迟肿瘤的发生和/或复发;和/或(vii)在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。

[0083] 如本文所用,“个体”或“受试者”是指哺乳动物,包括但不限于人类、牛科动物、马科动物、猫科动物、犬科动物、啮齿动物或灵长类动物。在一些实施方案中,个体是人类。

[0084] 术语“抗体”、“抗原结合部分”或“抗体部分”是以其最广泛意义使用并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、全长抗体和其抗原结合片段,只要其展现所需抗原结合活性即可。

[0085] 术语“仅有重链的抗体”或“HCAb”是指功能性抗体,其包含重链,但缺少通常在4链抗体中发现的轻链。已知骆驼科动物(例如骆驼、美洲驼或羊驼)产生HCAb。

[0086] 术语“单域抗体”或“sdAb”是指具有三个互补决定区(CDR)的单一抗原结合多肽。单独sdAb能够在不与相应含CDR多肽配对的情况下结合至抗原。在一些情况下,单域抗体是由骆驼科HCAb工程化,并且其重链可变域在本文中称为“V_H”(重链抗体重链的可变域)。骆驼科动物sdAb是已知最小的抗原结合抗体片段之一(参见例如Hamers-Casterman等, Nature 363:446-8(1993);Greenberg等, Nature 374:168-73(1995);Hassanzadeh-Ghassabeh等, Nanomedicine(Lond), 8:1013-26(2013))。基本V_H具有从N末端至C末端的以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1至FR4分别是指框架区1至4,并且其中CDR1至CDR3是指互补决定区1至3。

[0087] “分离”抗体(或构建体)是已经从其产生环境的组分中鉴定、分离和/或回收的抗体(例如天然或重组)。优选地,分离的多肽不与来自其产生环境的所有其它组分缔合。其产生环境的污染物组分(例如由重组转染细胞产生的污染物组分)是通常将干扰抗体的研究、诊断性或治疗性用途的物质,并且可包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选实施方案中,多肽将被纯化至:(1)如通过例如劳立法(Lowry method)所测定大于95重量%的抗体,并且在一些实施方案中大于99重量%;(2)足以通过使用旋杯式测序仪获得N末端或

内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或者(3)通过使用考马斯蓝(Coomassie Blue)或优选地银染色法在非还原或还原条件下进行SDS-PAGE被纯化至均质。分离的抗体(或构建体)包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一种组分将不存在。然而,分离的多肽、抗体或构建体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0088] 抗体的“可变区”或“可变域”是指抗体重链或轻链的氨基末端域。重链和轻链的可变域可分别称为“ V_H ”和“ V_L ”。这些结构域通常是抗体的最易变部分(相对于相同类别的其它抗体)并且包含抗原结合位点。来自骆驼科物种的仅有重链的抗体具有单条重链可变区,其被称为“ V_HH ”。因此 V_HH 是一种特殊类型的 V_H 。

[0089] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“完全抗体”可互换使用,是指呈大致上完整形式的抗体,与抗体片段相反。具体地说,全长4链抗体包括具有重链和轻链(包括Fc区)的抗体。全长仅重链抗体包括重链可变域(例如 V_HH)和Fc区。恒定域可为天然序列恒定域(例如人类天然序列恒定域)或其氨基酸序列变体。在一些情况下,完整抗体可具有一种或多种效应功能。

[0090] “抗体片段”或“抗原结合片段”包括完整抗体的一部分,优选地所述完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和Fv片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利第5,641,870号,实施例2;Zapata等,Protein Eng. 8(10): 1057-1062(1995));单链抗体(scFv)分子;单域抗体(例如 V_HH)和由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,和残余“Fc”片段,所述名称反映了容易结晶的能力。Fab片段由整条L链连同H链的可变域(V_H)和一条重链的第一恒定域(C_H1)组成。每个Fab片段关于抗原结合是单价的,即,它具有单一抗原结合位点。抗体经木瓜蛋白酶处理产生单个大 $F(ab')_2$ 片段,所述片段大致对应于具有不同抗原结合活性的两个二硫键连接的Fab片段并且仍然能够交联抗原。Fab'片段因在 C_H1 结构域的羧基末端处具有少量额外残基(包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸)而不同于Fab片段。Fab'-SH是恒定域的半胱氨酸残基带有自由巯基的Fab'在本文中的名称。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初以其间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对形式产生。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0091] 术语“恒定域”是指免疫球蛋白分子中相对于免疫球蛋白的其它部分,即含有抗原结合位点的可变域,具有更保守的氨基酸序列的部分。恒定域含有重链的 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 域(统称为 C_H)和轻链的 C_L1 (或 C_L)域。

[0092] 来自任何哺乳动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可基于其恒定域的氨基酸序列指定为两种明显不同类型(称为 κ 和 λ)中的一者。

[0093] “Fv”是含有完全抗原识别和结合位点的最小抗体片段。这个片段由处于紧密、非共价缔合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。由这两个结构域的折叠产生六个高变环(由H链和L链各自产生3个环),所述高变环促成用于抗原结合的氨基酸残基并且赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即便单个可变域(或仅包含三个对抗原具有特异性的CDR的半个Fv)具有识别和结合抗原的能力,但与整个结合位点相比,仍处于较低的亲和力下。

[0094] “单链Fv”(也缩写为“sFv”或“scFv”)是包含连接到单一多肽链中的 V_H 和 V_L 抗体结构域的抗体片段。优选地,scFv多肽还包含 V_H 与 V_L 结构域之间的多肽接头,所述多肽接头能

够使scFv形成用于抗原结合的所需结构。关于scFv的综述,参见Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag, New York,第269-315页(1994)。

[0095] 如本文所用的术语“高变区”、“HVR”或“HV”是指抗体可变域中序列高度可变和/或形成结构确定环的区域。通常,单域抗体包含三个HVR(或CDR):HVR1(或CDR1)、HVR2(或CDR2)和HVR3(或CDR3)。在所述三个HVR中,HVR3(或CDR3)显示最大多样性,并且被认为在赋予抗体的优良特异性方面发挥独特作用。参见例如Hamers-Casterman等,Nature 363:446-448(1993);Sheriff等,Nature Struct.Biol.3:733-736(1996)。

[0096] 术语“互补决定区”或“CDR”用于指由Kabat系统定义的高变区。参见Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)。

[0097] 多个HVR描述在使用中并且涵盖在本文中。Kabat互补决定区(CDR)是基于序列可变性并且是最常用的(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。Chothia替代地指结构环的位置(Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM HVR表示Kabat HVR与Chothia结构环之间的折衷,并且通过Oxford Molecular的AbM抗体建模软件来使用。“接触”HVR是基于可用复合物晶体结构的分析。来自这些HVR中的每个的残基在以下表1中指出。

[0098] 表1.HVR描述。

[0099]	环	Kabat	AbM	Chothia	接触	
	L1	L24- L34	L24- L34	L26- L32	L30- L36	
	L2	L50- L56	L50- L56	L50- L52	L46- L55	
	L3	L89-	L89-	L91-	L89-	
	环	Kabat	AbM	Chothia	接触	
[0100]	H1	L97	L97	L96	L96	
		H31- H35B	H26- H35B	H26- H32	H30- H35B	
		(Kabat 编号)				
		H1	H31- H35	H26- H35	H26- H32	H30- H35
	(Chothia 编号)					
	H2		H50- H65	H50- H58	H53- H55	H47- H58
			H3	H95- H102	H95- H102	H96- H101

[0101] HVR可包括如下的“延长HVR”:在 V_L 中,24-36或24-34(L1),46-56或50-56(L2),以及89-97或89-96(L3),并且在 V_H 中,26-35(H1),50-65或49-65(H2),以及93-102、94-102或95-102(H3)。对于这些定义中的每一个,可变域残基是根据Kabat等(同上)来编号。

[0102] 单域抗体(例如 V_H H)的氨基酸残基是根据Kabat等(“Sequence of proteins of immunological interest”, US Public Health Service, NIH Bethesda, Md., 出版号91)给出的 V_H 域的一般编号进行编号,如在Riechmann和Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000年6月23日;240(1-2):185-195的文章中应用于来自骆驼科动物的 V_H H域。根据这种编号, V_H H的FR1包含1-30位的氨基酸残基, V_H H的CDR1包含31-35位的氨基酸残基, V_H H的FR2包含36-49位的氨基酸, V_H H的CDR2包含50-65位的氨基酸残基, V_H H的FR3包含66-94位的氨基酸残基, V_H H的CDR3包含95-102位的氨基酸残基,并且 V_H H的FR4包含103-113位的氨基酸残基。在这方面,应该注意,如 V_H 域和 V_H H域的技术众所周知,每个CDR中氨基酸残基的总数可以变化,并且可以不对应于由Kabat编号指示的氨基酸残基的总数(即,根据Kabat编号的一个或多个位置可能不在实际序列中被占据,或者实际序列可能包含比Kabat编号允许的数量更多的氨基酸残基)。

[0103] 表述“如Kabat中的可变域残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”和其变型是指用于Kabat等(同上)中的抗体编译的重链可变域或轻链可变域的编号系统。使用该编号系统,实际线性氨基酸序列可能含有较少或额外的对应于可变域的FR或HVR的缩短或对其进行的插入的氨基酸。例如,重链可变域可包括H2的残基52之后的单个氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)和重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。可通过在抗体序列的同源区处与“标准”Kabat编号序列比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。

[0104] 除非本文另有说明,否则免疫球蛋白重链中残基的编号是如Kabat等,同上中的EU索引的编号。“如Kabat中的EU索引”是指人类IgG1 EU抗体的残基编号。

[0105] “框架”或“FR”残基是除了如本文所定义的HVR残基以外的那些可变域残基。

[0106] 如本文所用,术语“特异性结合”、“特异性识别”或“特异性针对”是指可测量和可再现的相互作用,例如靶标与抗原结合蛋白(例如sdAb)的结合,所述结合在存在包括生物分子在内的分子的异质群体的情况下确定靶标存在。例如,特异性结合靶标(其可以是表位)的抗原结合蛋白(例如sdAb)是与结合其它靶标相比,以更大亲和力、亲合力、更容易和/或以更长持续时间结合该靶标的抗原结合蛋白(例如sdAb)。在一些实施方案中,抗原结合蛋白(例如sdAb)与不相关靶标的结合程度是抗原结合蛋白(例如sdAb)与靶标的结合的约10%以下,如例如通过放射免疫测定(RIA)所测量。在一些实施方案中,特异性结合靶标的抗原结合蛋白(例如sdAb)具有 $\leq 10^{-5}M$ 、 $\leq 10^{-6}M$ 、 $\leq 10^{-7}M$ 、 $\leq 10^{-8}M$ 、 $\leq 10^{-9}M$ 、 $\leq 10^{-10}M$ 、 $\leq 10^{-11}M$ 或 $\leq 10^{-12}M$ 的解离常数(K_d)。在一些实施方案中,抗原结合蛋白特异性地结合在来自不同物种的蛋白质中保守的蛋白质上的表位。在一些实施方案中,特异性结合可包括但不需要排他性结合。抗体或抗原结合域的结合特异性可以通过本领域已知的方法经实验方式测定。这类方法包括但不限于蛋白质印迹法(Western blots)、ELISA测试、RIA测试、ECL测试、IRMA测试、EIA测试、BIAcore测试和肽扫描。

[0107] 术语“特异性”是指抗原结合蛋白(例如sdAb)针对抗原的特定表位的选择性识别。例如,天然抗体是单特异性的。如本文所用的术语“多特异性”表示抗原结合蛋白具有多表位特异性(即,能够特异性结合一个生物分子上的两个、三个或更多个不同的表位或能够特异性结合两个、三个或更多个不同的生物分子上的表位)。如本文所用的“双特异性”表示抗原结合蛋白具有两种不同的抗原结合特异性。除非另有说明,否则所列出的双特异性抗体

结合的抗原的顺序是任意的。也就是说,例如,术语“抗TIGIT/PD-L1”、“抗PD-L1/TIGIT”、“TIGIT×PD-L1”、“PD-L1×TIGIT”、“PD-L1/TIGIT”、“TIGIT/PD-L1”、“PD-L1-TIGIT”和“TIGIT-PD-L1”可互换使用,指特异性结合TIGIT和PD-L1的双特异性抗体。如本文所用的术语“单特异性”表示具有一个或多个结合位点的抗原结合蛋白(例如sdAb),每个结合位点结合相同抗原的相同表位。

[0108] 如本文所用的术语“价”表示抗原结合蛋白中存在特定数目的结合位点。例如天然抗体或全长抗体具有两个结合位点并且是二价的。因此,术语“三价”、“四价”、“五价”和“六价”分别表示抗原结合蛋白中存在两个结合位点、三个结合位点、四个结合位点、五个结合位点和六个结合位点。

[0109] 本文中的术语“Fc区”或“片段可结晶区域”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区,其包括天然序列Fc区和变体Fc区。虽然免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能不同,但人类IgG重链Fc区通常限定为从在位置Cys226处的氨基酸残基或从Pro230至其羧基末端的延伸段。Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可例如在抗体产生或纯化期间或通过对编码抗体的重链的核酸进行重组工程化来去除。因此,完整抗体的组合物可包括所有的K447残基去除的抗体群体、K447残基未去除的抗体群体、以及具有拥有和没有K447残基的抗体的混合物的抗体群体。适用于本文描述的抗体的天然序列Fc区包括人类IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。

[0110] “结合亲和力”总体上是指一个分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。结合亲和力可以由 K_d 、 K_{off} 、 K_{on} 或 K_a 表示。如本文所用,术语“ K_{off} ”意指抗体(或抗原结合域)从抗体/抗原复合物中解离的解离速率常数,如从动力学选择设置所确定,以 s^{-1} 为单位表示。如本文所用,术语“ K_{on} ”意指抗体(或抗原结合域)与抗原结合形成抗体/抗原复合物的缔合速率常数,以 $M^{-1}s^{-1}$ 为单位表示。如本文所用,术语平衡解离常数“ K_D ”或“ K_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离常数,并且描述占据存在于平衡的抗体分子溶液中的所有抗体结合域的一半所需的抗原浓度,并且等于 K_{off}/K_{on} ,以M为单位表示。 K_d 的测量预先假定所有结合剂都在溶液中。在抗体与细胞壁系连的情况下,例如在酵母表达系统中,相应平衡速率常数表示为EC50,这给出了 K_d 的良好近似值。亲和常数 K_a 是解离常数 K_d 的倒数,以 M^{-1} 为单位表示。解离常数(K_D 或 K_d)用作显示抗体对抗原的亲合力的指标。例如,通过使用标记有多种标记剂的抗体的Scatchard方法,以及通过使用BiacoreX(由Amersham Biosciences制造),其是非处方测量试剂盒或类似试剂盒,根据用户手册和试剂盒附带的实验操作方法,可以易于进行分析。可以使用这些方法导出的 K_D 值以M(摩尔)为单位表示。特异性结合靶标的抗体或其抗原结合片段可具有例如 $\leq 10^{-5}M$ 、 $\leq 10^{-6}M$ 、 $\leq 10^{-7}M$ 、 $\leq 10^{-8}M$ 、 $\leq 10^{-9}M$ 、 $\leq 10^{-10}M$ 、 $\leq 10^{-11}M$ 或 $\leq 10^{-12}M$ 的解离常数(K_d)。

[0111] 半数最大抑制浓度(IC_{50})是物质(例如抗体)抑制特定生物或生物化学功能的有效性的量度。它表明需要多少特定药物或其它物质(抑制剂,例如抗体)来抑制特定的生物过程(例如,TIGIT与CD155,或过程的组分即酶、细胞、细胞受体或微生物之间的结合)达一半。所述值通常表示为摩尔浓度。对于激动剂药物或其它物质(例如抗体), IC_{50} 与“ EC_{50} ”相当。 EC_{50} 也表示在体内获得最大作用的50%所需的血浆浓度。如本文所用,“ IC_{50} ”用于指示在体

外中和50%的抗原生物活性(例如TIGIT生物活性)所需的抗体(例如抗TIGIT sdAb)的有效浓度。 IC_{50} 或 EC_{50} 可以通过生物测定来测量,例如通过FACS分析(竞争结合测定)配体结合的抑制、基于细胞的细胞因子释放测定或扩增的发光邻近均相测定(AlphaLISA)。

[0112] 相对于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同源性”定义为,在比对序列并且引入空位(如果需要的话)以获得最大序列同一性百分比之后,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分,候选序列中与特定肽或多肽序列中氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。出于确定氨基酸序列同一性百分比的目的所进行的比对可以本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用公众可获得的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定测量比对的适当参数,包括对所比较序列的全长获得最大比对所需的任何算法。

[0113] 编码构建体、抗体或其抗原结合片段的“分离的”核酸分子是经鉴定并且与至少一种污染物核酸分子分开的核酸分子,所述核酸分子在其产生的环境中通常与所述污染物核酸分子缔合。优选地,分离的核酸不与产生环境相关联的所有组分缔合。编码本文所述多肽和抗体的分离的核酸分子呈其在自然界中存在的形式或状态以外的形式。因此分离的核酸分子区别于天然存在于细胞中的编码本文所述的多肽和抗体的核酸。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中所含的核酸分子,但核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。

[0114] 应理解,本文中描述的本发明的实施方案包括“由实施方案组成”和/或“基本上由实施方案组成”。

[0115] 本文中对“约”某一值或参数的提及包括(以及描述)针对所述值或参数本身的变化。例如,关于“约X”的描述包括“X”的描述。

[0116] 如本文所用,提及“并非”某一值或参数通常表示并描述“不同于”某一值或参数。例如,所述方法不用于治疗X型癌症,意味着所述方法用于治疗不同于X的类型的癌症。

[0117] 本文使用的术语“约X-Y”具有与“约X至约Y”相同的含义。

[0118] 除非上下文另有明确规定,否则在本文和所附权利要求中使用的单数形式“一”、“或”和“所述”包括多个指示物。

[0119] II. 抗TIGIT构建体

[0120] (I) 抗TIGIT单域抗体部分

[0121] 本文所述的分离的抗TIGIT构建体包含特异性识别TIGIT的单域抗体(sdAb)部分(或“抗TIGIT sdAb”)。在一些实施方案中,分离的抗TIGIT构建体是抗TIGIT sdAb。

[0122] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,所述部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的 K_d 为约 $10^{-5}M$ 至约 $10^{-12}M$ (例如约 $10^{-7}M$ 至约 $10^{-12}M$,或约 $10^{-8}M$ 至约 $10^{-12}M$)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源

化的或完全人源化的。

[0123] 在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包括包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列的CDR3,并且氨基酸取代在CDR1和/或CDR2中。因此,在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,所述部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的 K_d 为约 10^{-5} M至约 10^{-12} M(例如约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,或约 10^{-8} M至约 10^{-12} M)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。

[0124] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,所述部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。

[0125] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,所述部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。

[0126] 本文提到的CDR序列在序列表中提供。CDR可以以各种成对组合进行组合以产生许多抗TIGIT sdAb部分。

[0127] 例如,在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:36的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:106的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:176的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:36的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:106的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:176的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:36的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:106的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:176的CDR3。

[0128] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:107的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)

氨基酸取代的变体；和包含氨基酸序列SEQ ID NO:177的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:107的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:177的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:107的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:177的CDR3。

[0129] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:108的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:178的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:108的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:178的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:108的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:178的CDR3。

[0130] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:109的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:179的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:109的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:179的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:109的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:179的CDR3。

[0131] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:110的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:180的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:110的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:180的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID

NO:40的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:110的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:180的CDR3。

[0132] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:111的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:181的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:111的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:181的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:111的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:181的CDR3。

[0133] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:112的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:182的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:112的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:182的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:112的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:182的CDR3。

[0134] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:54的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:124的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:194的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:54的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:124的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:194的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:54的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:124的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:194的CDR3。

[0135] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:56的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:126的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:196的CDR3,或其包含至多约3个(例如约

1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:56的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:126的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:196的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:56的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:126的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:196的CDR3。

[0136] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:127的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:197的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:127的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:197的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:127的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:197的CDR3。

[0137] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:58的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:128的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:198的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:58的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:128的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:198的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:58的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:128的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:198的CDR3。

[0138] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:59的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:129的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:199的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:59的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:129的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:199的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:59的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:129的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:199的

CDR3。

[0139] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO: 63的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:133的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:203的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:63的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:133的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:203的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:63的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:133的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:203的CDR3。

[0140] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO: 65的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:135的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:205的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:65的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:135的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:205的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:65的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:135的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:205的CDR3。

[0141] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO: 66的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:136的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:206的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:66的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:136的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:206的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:66的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:136的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:206的CDR3。

[0142] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO: 67的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:137的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:207的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部

分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:67的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:137的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:207的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:67的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:137的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:207的CDR3。

[0143] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:139的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:209的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:139的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:209的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:139的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:209的CDR3。

[0144] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的CDR1,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;包含氨基酸序列SEQ ID NO:140的CDR2,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:210的CDR3,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:140的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:210的CDR3;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:70的CDR1;包含氨基酸序列SEQ ID NO:140的CDR2;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:210的CDR3。

[0145] 抗TIGIT sdAb部分可以在一个或多个FR序列中包含一个或多个“标志残基”。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含V_H域,其包含以下任一者的氨基酸序列:a-1) 37位的氨基酸残基选自由以下组成的组:F、Y、V、L、A、H、S、I、W、C、N、G、D、T和P(例如F、Y、L、I或V,例如F或Y,或者例如F);a-2) 44位的氨基酸残基选自由以下组成的组:E、Q、G、D、A、K、R、L、P、S、V、H、T、N、W、M和I(例如A、G、E、D、Q、R、S或L,或例如G、E或Q);a-3) 45位的氨基酸残基选自由以下组成的组:L、R、P、H、F、G、Q、S、E、T、Y、C、I、D和V(例如L、C或R,或例如L或R);a-4) 103位的氨基酸残基选自由以下组成的组:W、R、G、S、K、A、M、Y、I、F、T、N、V、Q、P、E和C(例如W、G或R,或例如W);和a-5) 108位的氨基酸残基选自由以下组成的组:Q、L、R、P、E、K、S、T、M、A和H(例如Q);或b-1) 37位的氨基酸残基选自由以下组成的组:F、Y、L、I和V(例如F或Y,或例如F);b-2) 44位的氨基酸残基选自由以下组成的组:E和Q;b-3) 45位的氨基酸残基选自由以下组成的组:R和L(例如R);b-4) 103位的氨基酸残基选自由以下组成的组:W、R、G和S(例如W);

和b-5) 108位的氨基酸残基选自由以下组成的组:Q和L(例如Q);或c-1) 37位的氨基酸残基选自由以下组成的组:F、Y、L、I和V(例如F或Y,或例如F);c-2) 44位的氨基酸残基选自由以下组成的组:A、G、E、D、Q、R、S和L(例如G、E或Q);c-3) 45位的氨基酸残基选自由以下组成的组:L、R和C(例如L或R);c-4) 103位的氨基酸残基选自由以下组成的组:P、R和S(例如R或S);和c-5) 108位的氨基酸残基选自由以下组成的组:Q和L(例如Q);其中氨基酸位置是根据Kabat编号。应注意,根据Kabat编号的氨基酸位置37、44、45、103和108处的这些“标志残基”适用于天然V_HH序列的抗TIGIT sdAb部分,并且可以在人源化期间被取代。例如,根据Kabat编号在氨基酸108位处的Q可以任选地人源化为L。其它人源化取代对于本领域技术人员来说是显而易见的。例如,可以通过比较天然存在的V_HH的FR序列与一个或多个密切相关的人类V_H的相应FR序列,然后使用本领域已知(也如本文所述)的方法将一个或多个这些潜在有用的人源化取代引入所述V_HH中来确定潜在有用的人源化取代。可以测试所得的人源化V_HH序列的TIGIT结合亲和力、稳定性、容易性和表达水平和/或其它所需性质。可能的残基取代也可以来自抗体V_H域,其中V_H/V_L界面包含一个或多个高度带电的氨基酸残基。本文所述的抗TIGIT sdAb部分可以是部分或完全人源化的。优选地,所得的人源化抗TIGIT sdAb以如本文所述的K_d、K_{on}和K_{off}结合至TIGIT。

[0146] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的V_HH域,或其与SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者具有至少约80%(例如至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一者)序列同一性的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分,其包含V_HH域,所述域包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列,或其V_HH域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的V_HH域或其变体的抗TIGIT sdAb部分在SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR,例如CDR1和/或CDR2和/或CDR3中包含氨基酸取代。在一些实施方案中,包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的V_HH域或其变体的抗TIGIT sdAb部分包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR1、CDR2和CDR3,并且氨基酸取代在SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的FR,例如FR1和/或FR2和/或FR3和/或FR4中。在一些实施方案中,包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的V_HH域或其变体的抗TIGIT sdAb部分在CDR和FR中包含氨基酸取代。在一些实施方案中,提供包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的V_HH域的抗TIGIT sdAb部分。在一些实施方案中,提供包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR1、CDR2和CDR3的抗TIGIT sdAb部分。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的K_d为约10⁻⁵M至约10⁻¹²M(例如约10⁻⁷M至约10⁻¹²M,或约10⁻⁸M至约10⁻¹²M)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。

[0147] 在一些实施方案中,提供了抗TIGIT sdAb部分(下文称为“竞争性抗TIGIT sdAb部

分”或“竞争性抗TIGIT sdAb”)或包含抗TIGIT sdAb部分的抗TIGIT构建体(下文称为“竞争性抗TIGIT构建体”),其与本文所述的任何一种抗TIGIT sdAb部分竞争性地特异性结合TIGIT。在一些实施方案中,可以使用ELISA测定来确定竞争性结合。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分(或包含抗TIGIT sdAb部分的抗TIGIT构建体),其与包含SEQ ID NO: 253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的抗TIGIT sdAb部分竞争性地特异性结合至TIGIT。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb部分(或包含抗TIGIT sdAb部分的抗TIGIT构建体),其与抗TIGIT sdAb部分竞争性地特异性结合至TIGIT,所述抗TIGIT sdAb部分包括包含SEQ ID NO: 36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO: 106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO: 176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,竞争性抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的 K_d 为约 10^{-5} M至约 10^{-12} M(例如约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,或约 10^{-8} M至约 10^{-12} M)。在一些实施方案中,竞争性抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。

[0148] 单域抗体

[0149] 示例性sdAb包括但不限于来自仅重链抗体的重链可变域(例如,骆驼科的 V_H (重链抗体的重链的可变域)或软骨鱼中的 V_{NAR} (鲨鱼新抗原受体的可变域)),天然缺乏轻链的结合分子,源自常规4链抗体的单域(例如 V_H 或 V_L),人源化仅重链抗体,表达人类重链节段的转基因小鼠或大鼠产生的人类单域抗体,以及不同于源自抗体的那些的工程化结构域和单域支架。sdAb可以源自任何物种,包括但不限于小鼠、大鼠、人类、骆驼、美洲驼、七鳃鳗、鱼、鲨鱼、山羊、兔和牛。本文涵盖的sdAb还包括来自骆驼科和鲨鱼以外的物种的天然存在的sdAb分子。

[0150] 在一些实施方案中,sdAb源自天然存在的单域抗原结合分子,其被称为缺乏轻链的重链抗体(在本文中也称为“仅重链抗体”或“HCAb”)。这些单域分子公开于例如WO 94/04678和Hamers-Casterman, C.等(1993)Nature 363:446-448中。为清楚起见,源自天然缺乏轻链的重链分子的可变域在本文中称为 V_H ,以将其与四链免疫球蛋白的常规 V_H 区分开。这样的 V_H 分子可以源自骆驼科物种例如骆驼、美洲驼、骆马、单峰骆驼、羊驼和原驼中产生的抗体。除了骆驼科之外的其它物种可以产生天然缺乏轻链的重链分子,并且这样的 V_H 在本申请的范围之内。

[0151] 在一些实施方案中,sdAb源自在软骨鱼中发现的免疫球蛋白的可变区。例如,sdAb可以源自在鲨鱼血清中发现的称为新型抗原受体(NAR)的免疫球蛋白同种型。产生源自NAR可变区的单域分子(“IgNAR”)的方法描述于WO 03/014161和Streltsov (2005)Protein Sci. 14:2901-2909中。

[0152] 在一些实施方案中,sdAb是重组、CDR移植、人源化、骆驼化、去免疫和/或体外产生的(例如,通过噬菌体展示来选择)。在一些实施方案中,框架区的氨基酸序列可以通过框架区中特定氨基酸残基的“骆驼化”来改变。骆驼化是指将来自常规4链抗体的(天然存在的) V_H 域的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基用在重链抗体的 V_H 域中的相应位置出现的一个或多个氨基酸残基来代替或取代。这可以以对于本领域技术人员来说显而易见的本身已知的方式进行,例如基于本文的进一步描述。这些“骆驼化”取代优选插入在形成和/或存

在于 V_H - V_L 界面的氨基酸位置,和/或如本文所定义的所谓的骆驼科标志残基(参见例如W0 94/04678,Davies和Riechmann FEBS Letters 339:285-290,1994;Davies和Riechmann Protein Engineering 9(6):531-537,1996;Riechmann J.Mol.Biol.259:957-969,1996;以及Riechmann和Muyldermans J.Immunol.Meth.231:25-38,1999)。

[0153] 在一些实施方案中,sdAb是由表达人类重链区段的转基因小鼠或大鼠产生的人类sdAb。参见例如US20090307787A1,美国专利第8,754,287号,US20150289489A1,US20100122358A1和W02004049794。在一些实施方案中,sdAb是亲和力成熟的。

[0154] 在一些实施方案中,针对特定抗原或靶标的天然存在的 V_H H域可以从骆驼科动物 V_H H序列的(原生或免疫)文库获得。这些方法可以包括或不包括使用所述抗原或靶标或其至少一部分、片段、抗原决定簇或表位使用本身已知的一种或多种筛选技术来筛选这样的文库。这样的文库和技术例如描述于W0 99/37681、W0 01/90190、W0 03/025020和W0 03/035694中。或者,可以使用源自(原生或免疫) V_H H文库的改进的合成或半合成文库,例如通过例如随机诱变和/或CDR改组的技术从(原生或免疫) V_H H文库获得的 V_H H文库,如例如在W0 00/43507中描述。

[0155] 在一些实施方案中,sdAb由常规的4链抗体产生。参见例如EP 0 368 684;Ward等(Nature 1989年10月12日;341(6242):544-6);Holt等,Trends Biotechnol.,2003,21(11):484-490;W0 06/030220;和W0 06/003388。

[0156] 由于sdAb的独特性质,使用 V_H H域作为单一抗原结合蛋白或作为抗原结合域(即作为较大蛋白质或多肽的一部分)提供了许多优于常规 V_H 和 V_L 、scFv和常规抗体片段(例如Fab或(Fab')₂)的显著优势:1)仅需要单个结构域以高亲和力结合抗原,因此不需要具有第二结构域,也不需要确保这两个结构域以适当空间构象和构型存在(例如,在折叠期间不需要配对重链和轻链,不需要使用专门设计的接头,例如对于scFv);2) V_H H域和其它sdAb可以从单个基因表达并且不需要翻译后折叠或修饰;3) V_H H域和其它sdAb可以容易地设计成多价和/或多特异性形式(例如本申请中描述的那些);4) V_H H域和其它sdAb是高度可溶的并且不具有聚集的倾向(关于由Ward等,Nature.1989年10月12日;341(6242):544-6描述的小鼠衍生的“dAb”);5) V_H H域和其它sdAb对于热、pH、蛋白酶和其它变性剂或条件具有高度稳定性;6) V_H H域和其它sdAb容易且相对廉价地制备(即使在大规模生产中),例如使用微生物发酵,不需要使用哺乳动物表达系统(为生产例如常规抗体片段所需);7)与常规的4链抗体和其抗原结合片段相比, V_H H域和其它sdAb相对较小(约15kDa,或比常规IgG小10倍),因此具有(较)高组织穿透能力,例如用于实体肿瘤和其它致密组织;以及8) V_H H域和其它sdAb可以展现出所谓的“空腔结合特性”(由于它们与常规 V_H 域相比延伸的CDR3环),因此可以接近常规4链抗体和其抗原结合片段无法接近的靶标和表位,例如,已显示 V_H H域和其它sdAb可以抑制酶(参见例如W01997049805;Transue等,Proteins.1998年9月1日;32(4):515-22;Lauwereys等,EMBO J.1998年7月1日;17(13):3512-20)。

[0157] TIGIT

[0158] TIGIT属于CD28家族。具有26kDa的蛋白质由细胞外IgV域,I型跨膜区域,细胞内免疫球蛋白尾酪氨酸(ITT)样基序和细胞质中基于C末端免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)基序组成。在原生T细胞和NK细胞中,TIGIT在细胞表面几乎检测不到,但在T细胞和NK细胞活化时上调。

[0159] 术语“具有Ig和ITIM域的T细胞免疫受体”、“TIGIT”、“TIGIT抗原”、“TIGIT表位”、“Vstm3”和“WUCAM”可互换使用,并且包括人类TIGIT的变体、同功异型物、物种同源物,以及具有至少一个与TIGIT共有的表位的类似物。

[0160] 人类TIGIT的氨基酸序列在Genbank登录号NP_776160中公开。氨基酸区1-21是信号肽;22-141是细胞外结构域;142-162是跨膜结构域;并且163-244是细胞质结构域。已经报道了通过mRNA的可选剪接具有170个氨基酸的氨基酸序列的变体。人类TIGIT mRNA的核苷酸序列公开于NM_173799。已经报道了在173位具有A至G转换的核苷酸序列的变体。

[0161] 特定的人类TIGIT序列在氨基酸序列方面通常与Genbank登录号NP_776160的人类TIGIT至少90%相同,并且含有与其它物种(例如鼠类)的TIGIT氨基酸序列相比将氨基酸序列鉴定为人类的氨基酸残基。在一些实施方案中,人类TIGIT在氨基酸序列方面可以与Genbank登录号NP_776160的人类TIGIT至少约95%、96%、97%、98%或99%相同。在一些实施方案中,人类TIGIT序列将显示与Genbank登录号NP_776160的人类TIGIT相比不超过10个氨基酸差异。在一些实施方案中,人类TIGIT可以显示与Genbank登录号NP_776160的人类TIGIT相比不超过5、4、3、2或1个氨基酸差异。可以如本文所述确定同一性百分比。在一些实施方案中,人类TIGIT序列可以与Genbank登录号NP_776160的人类TIGIT不同,例如,通过具有保守突变或在非保守区中的突变,并且TIGIT具有与Genbank登录号NP_776160的人类TIGIT基本上相同的生物学功能。例如,人类TIGIT的生物学功能是在TIGIT的细胞外域中具有表位,其特异性地由本公开的抗TIGIT构建体结合或者人类TIGIT的生物学功能是T细胞活性的调节。在一些实施方案中,本文所述的抗TIGIT sdAb部分特异性识别与Genbank登录号NP_776160的人类TIGIT具有100%氨基酸序列同一性的TIGIT多肽。在一些实施方案中,本文所述的抗TIGIT sdAb部分特异性地识别包含SEQ ID NO:368的氨基酸序列的TIGIT多肽。

[0162] 在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分可以与来自除人类之外的物种的TIGIT或在结构上与人类TIGIT相关的其它蛋白质(例如,人类TIGIT同源物)交叉反应。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分对人类TIGIT是完全特异性的,并且不展现出物种或其它类型的交叉反应性。

[0163] 在一些实施方案中,本文所述的抗TIGIT sdAb部分特异性识别TIGIT的细胞外域(ECD)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分特异性识别TIGIT ECD的N末端部分。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分特异性识别TIGIT ECD的C末端部分。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分特异性识别TIGIT ECD的中间部分。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分特异性识别的TIGIT的ECD在氨基酸序列方面与Genbank登录号NP_776160的人类TIGIT的ECD具有至少约95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分特异性识别的TIGIT的ECD在氨基酸序列方面与Genbank登录号NP_776160的人类TIGIT的ECD具有100%同一性。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分特异性地识别包含SEQ ID NO:369的氨基酸序列的TIGIT多肽。

[0164] 抗体亲和力

[0165] 抗体或抗原结合域的结合特异性可以通过本领域已知的方法通过实验确定。此类方法包括但不限于蛋白质印迹法、ELISA测试、RIA测试、ECL测试、IRMA测试、EIA测试、BIAcore测试和肽扫描。

[0166] 在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的 K_d 为约 10^{-5} M至约 10^{-6} M,约 10^{-6} M至约 10^{-7} M,约 10^{-7} M至约 10^{-8} M,约 10^{-8} M至约 10^{-9} M,约 10^{-9} M至约 10^{-10} M,约 10^{-10} M至约 10^{-11} M,约 10^{-11} M至约 10^{-12} M,约 10^{-5} M至约 10^{-12} M,约 10^{-6} M至约 10^{-12} M,约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,约 10^{-8} M至约 10^{-12} M,约 10^{-9} M至约 10^{-12} M,约 10^{-10} M至约 10^{-12} M,约 10^{-5} M至约 10^{-11} M,约 10^{-7} M至约 10^{-11} M,约 10^{-8} M至约 10^{-11} M,约 10^{-9} M至约 10^{-11} M,约 10^{-5} M至约 10^{-10} M,约 10^{-7} M至约 10^{-10} M,约 10^{-8} M至约 10^{-10} M,约 10^{-5} M至约 10^{-9} M,约 10^{-7} M至约 10^{-9} M,约 10^{-5} M至约 10^{-8} M,或约 10^{-6} M至约 10^{-8} M。

[0167] 在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间结合的 K_{on} 为约 $10^2 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $10^4 M^{-1} s^{-1}$,约 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $10^6 M^{-1} s^{-1}$,约 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $10^7 M^{-1} s^{-1}$,约 $10^2 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $10^7 M^{-1} s^{-1}$,约 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $10^7 M^{-1} s^{-1}$,约 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $10^7 M^{-1} s^{-1}$,约 $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $10^7 M^{-1} s^{-1}$,约 $10^3 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $10^6 M^{-1} s^{-1}$,或约 $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 。

[0168] 在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的 K_{off} 为约 $1 s^{-1}$ 至约 $10^{-2} s^{-1}$,约 $10^{-2} s^{-1}$ 至约 $10^{-4} s^{-1}$,约 $10^{-4} s^{-1}$ 至约 $10^{-5} s^{-1}$,约 $10^{-5} s^{-1}$ 至约 $10^{-6} s^{-1}$,约 $1 s^{-1}$ 至约 $10^{-6} s^{-1}$,约 $10^{-2} s^{-1}$ 至约 $10^{-6} s^{-1}$,约 $10^{-3} s^{-1}$ 至约 $10^{-6} s^{-1}$,约 $10^{-4} s^{-1}$ 至约 $10^{-6} s^{-1}$,约 $10^{-2} s^{-1}$ 至约 $10^{-5} s^{-1}$,或约 $10^{-3} s^{-1}$ 至约 $10^{-5} s^{-1}$ 。

[0169] 在一些实施方案中,在扩增的发光邻近均相测定(AlphaLISA)中,抗TIGIT sdAb部分的 EC_{50} 小于10nM。在一些实施方案中,通过FACS分析(竞争结合测定)或基于细胞的细胞因子释放测定,在配体结合的抑制中,抗TIGIT sdAb部分的 EC_{50} 小于500nM。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的 EC_{50} 小于1nM(例如约0.001nM至约0.01nM,约0.01nM至约0.1nM,约0.1nM至约1nM等),约1nM至约10nM,约10nM至约50nM,约50nM至约100nM,约100nM至约200nM,约200nM至约300nM,约300nM至约400nM,或约400nM至约500nM。

[0170] 嵌合或人源化抗体

[0171] 在一些实施方案中,本文提供的抗TIGIT sdAb部分是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如美国专利第4,816,567号;和Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。在一个实例中,嵌合抗体包含非人类可变区(例如,源自骆驼科物种,例如美洲驼的可变区)和人类恒定区。在另一个实例中,嵌合抗体是“类别转换”抗体,其中类别或亚类与亲本抗体的类别或亚类相比已经改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0172] 在一些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,非人类抗体被人源化以降低对人类的免疫原性,同时保留亲本非人类抗体的特异性和亲和力。一般来说,人源化抗体包含一个或多个可变域,其中HVR例如CDR(或其部分)来源于非人类抗体,并且FR(或其部分)来源于人类抗体序列。人源化抗体任选地也将包含至少一部分人类恒定区。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人类抗体(例如HVR残基所来源的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0173] 人源化抗体和其制备方法在例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中进行了综述。可用于人源化的人类框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区;源自轻链或重链可变区的特定亚组的人类抗体的共有序列的框架区;人类成熟(体细胞突变)框架区或人类种系框架区;以及筛选FR文库得到的框架区。

[0174] 在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb被修饰,例如人源化,而不降低结构域对抗原的天然亲和力,同时降低其对异源物种的免疫原性。例如,可以确定美洲驼抗体的抗体可变域(V_H)的氨基酸残基,并且例如在框架区中的一个或多个骆驼科氨基酸被其在人类共有

序列中发现的人类对应物代替,所述多肽不失去其典型特征,即人源化不会显著影响所得多肽的抗原结合能力。骆驼科动物单域抗体的人源化需要在单一多肽链中引入和诱变有限量的氨基酸。这与scFv、Fab'、(Fab')₂和IgG的人源化形成对比,其需要在两条链,即轻链和重链中引入氨基酸变化以及两条链的组装的保存。

[0175] 包含V_HH域的sdAb可以人源化以具有人类样序列。在一些实施方案中,本文使用的V_HH域的FR区包含与人类VH框架区至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或95%以上中的任一者的氨基酸序列同源性。一类示例性的人源化V_HH域的特征在于V_HH在位置45处带有选自以下组成的组的氨基酸:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺,例如L45和位置103处的色氨酸,根据Kabat编号。因此,属于该类的多肽显示出与人类VH框架区的高氨基酸序列同源性,并且所述多肽可以直接施用于人类而不期望由此产生不需要的免疫应答,并且没有进一步人源化的负担。

[0176] 另一类示例性的人源化骆驼科动物单域抗体已在WO 03/035694中描述,并且含有通常在人类源或来自其它物种的常规抗体中发现的疏水性FR2残基,但通过103位上的带电精氨酸残基补偿这种亲水性损失,该残基代替双链抗体的V_H中存在的保守色氨酸残基。因此,属于这两类的肽显示出与人类V_H框架区的高氨基酸序列同源性,并且所述肽可以直接施用于人类而不期望由此产生不需要的免疫应答,并且没有进一步人源化的负担。

[0177] 人类结构域抗体

[0178] 在一些实施方案中,本文提供的抗TIGIT sdAb部分是人类抗体(称为人类结构域抗体,或人类DAb)。可以使用本领域已知的各种技术产生人类抗体。人类抗体一般描述于Chen, Mol. Immunol. 47(4):912-21(2010)中。能够产生完全人类单域抗体(或DAb)的转基因小鼠或大鼠是本领域已知的。参见例如US20090307787A1,美国专利第8,754,287号,US20150289489A1,US20100122358A1和WO2004049794。

[0179] 可以通过向转基因动物施用免疫原来制备人类抗体(例如人类DAb),转基因动物已经被修饰以响应于抗原性攻击产生完整的人类抗体或具有人类可变区的完整抗体。这样的动物通常含有全部或部分的人类免疫球蛋白基因座,其代替内源免疫球蛋白基因座,或者其存在于染色体外或随机整合到动物的染色体中。在这样的转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座通常已经失活。关于从转基因动物获得人类抗体的方法的综述,参见Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125(2005)。可以进一步修饰来自这些动物产生的完整抗体的人类可变区,例如通过与不同的人类恒定区组合进行。

[0180] 也可以通过基于杂交瘤的方法制备人类抗体(例如人类DAb)。用于产生人类单克隆抗体的人类骨髓瘤和小鼠-人类异源骨髓瘤(heteromyeloma)细胞系是本领域中已知的。

[0181] 也可以通过分离选自人类源噬菌体展示文库的Fv克隆可变域序列来产生人类抗体(例如人类DAb)。然后,可将这样的可变域序列与期望的人类恒定域组合。下文描述了从抗体文库中选择人类抗体的技术。

[0182] 获得针对特定抗原或靶标的V_HH序列的一种技术涉及适当地免疫能够表达重链抗体的转基因哺乳动物(即,以便产生针对所述抗原或靶标的免疫应答和/或重链抗体),从所述转基因哺乳动物中获得合适的生物样品,所述样品含有V_HH序列(编码所述V_HH序列的核酸序列)(例如血液样品、血清样品或B细胞样品),然后从所述样品开始,使用本身已知的任何

合适的技术(例如本文所述的任何方法或杂交瘤技术),产生针对所述抗原或靶标的 V_H 序列。例如,为此目的,可以使用描述于W0 02/085945、W0 04/049794和W0 06/008548以及Janssens等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.2006年10月10日;103(41):15130-5中的表达重链抗体的小鼠以及其它方法和技术。例如,表达这种重链抗体的小鼠可以表达具有任何合适(单个)可变域的重链抗体,例如来自天然来源的(单个)可变域(例如人类(单个)可变域、骆驼科(单个)可变域或鲨鱼(单个)可变域),以及例如合成或半合成(单个)可变域。

[0183] 源自文库的抗体

[0184] 可以通过对组合文库筛选具有期望的一种或多种活性的抗体来分离本申请的抗体。例如,本领域中已知用于产生噬菌体展示文库并对此类文库筛选具有期望的结合特性的抗体的多种方法。已经描述了构建单域抗体文库的方法,例如,参见美国专利第7371849号。

[0185] 在某些噬菌体展示方法中,通过聚合酶链反应(PCR)分别克隆 V_H 和 V_L 基因的组库,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以对其筛选抗原结合噬菌体,如Winter等,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)中所描述。可以通过PCR类似地克隆 V_H 基因的组库,在噬菌体文库中随机重组,并筛选抗原结合噬菌体。噬菌体通常展示作为scFv片段或作为Fab片段的抗体片段。来自免疫来源的文库提供对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。或者,可以在没有任何免疫化的情况下(例如,从人类)克隆天然组库以提供针对广泛范围的非自身抗原以及自身抗原的抗体的单一来源,如由Griffiths等,EMBO J,12:725-734(1993)所描述。最后,也可以通过从干细胞克隆未重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物来合成制备天然文库,以编码高度可变的CDR3区并在体外实现重排,如由Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)所描述。

[0186] 从人类抗体文库分离的抗体或抗体片段被视为本文中的人类抗体或人类抗体片段。

[0187] 生物活性

[0188] 本文所述的抗TIGIT sdAb部分的生物活性可以通过测量其半数最大有效浓度(EC_{50})来确定,其是抗体结合其靶标或抑制特定生物或生物化学功能(例如抑制TIGIT与其主要配体CD155之间的结合)的有效性的量度。例如,此处 EC_{50} 可用于指示在细胞表面结合50%TIGIT或在体外中和50%TIGIT生物活性所需的抗TIGIT sdAb的有效浓度。 EC_{50} 也代表在体内获得最大作用的50%所需的血浆浓度。 EC_{50} 可以通过本领域已知的测定来测量,例如,生物测定例如FACS结合分析,通过FACS分析配体结合的抑制(竞争结合测定),基于细胞的细胞因子释放测定,或扩增的发光邻近同源测定(AlphaLISA)。

[0189] 例如,可以使用流式细胞术研究配体结合的阻断(也参见实施例2)。表达人类TIGIT的CHO细胞可以从贴壁培养瓶中解离,并与用于测试的不同浓度的抗TIGIT sdAb,和恒定浓度的经标记的CD155蛋白(例如生物素标记的人类CD155-Fc蛋白)混合。可使用抗TIGIT抗体阳性对照,例如22G2(参见US2016/0176963中的SEQ ID NO:7和9)。将混合物在室温下平衡30分钟,用FACS缓冲液(含有1%BSA的PBS)洗涤三次。然后,加入恒定浓度的特异性识别经标记CD155蛋白的抗体(例如PE/Cy5抗生物素蛋白链菌素第二抗体),并在室温下温育15分钟。用FACS缓冲液洗涤细胞并通过流式细胞术分析。可以使用Prism(GraphPad Software, San Diego, CA)使用非线性回归分析数据以计算 EC_{50} 。竞争测定的结果可以证明

抗TIGIT sdAb抑制经标记的CD155与TIGIT之间相互作用的能力。

[0190] 也可以通过TIGIT/CD155阻断报告基因测定或IL-2释放测定来测试抗TIGIT sdAb部分的生物活性(也参见实施例2)。在与其主要配体CD155结合后,随后TIGIT在其ITIM域中的磷酸化转导抑制信号以下调T细胞中的IL-2表达。例如,可将TIGIT效应细胞接种过夜,然后与包含抗TIGIT sdAb的抗TIGIT构建体的连续稀释液一起温育,接着以合适的E:T比率加入CD155 aAPC/CHO-K1细胞。在37℃、5%CO₂下诱导6小时后,可以加入Bio-GloTM荧光素酶测定试剂并测定发光。结果可以证明抗TIGIT sdAb抑制CD155与TIGIT之间相互作用的能力。

[0191] 在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分阻断或拮抗由TIGIT受体转导的信号。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分可以结合TIGIT上的表位,从而抑制TIGIT与CD155相互作用。在一些实施方案中,在抗体结合位点与TIGIT配体结合位点的比率大于1:1并且抗体浓度大于10⁻⁸M的条件下,抗TIGIT sdAb部分可以将TIGIT与CD155的结合降低至少约5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%、99%或99.9%中的任一者。

[0192] (II) 包含抗TIGIT sdAb部分的构建体

[0193] 包含抗TIGIT sdAb部分的抗TIGIT构建体可以具有任何可能的形式。

[0194] 在一些实施方案中,包含抗TIGIT sdAb部分的抗TIGIT构建体可以进一步包含另外的多肽序列,例如一个或多个抗体部分(或抗原结合部分),或免疫球蛋白的Fc片段。这些另外的多肽序列可以或不改变或以其它方式影响抗TIGIT sdAb的(生物学)性质,并且可以或不向本文所述的抗TIGIT sdAb添加其它功能。在一些实施方案中,另外的多肽序列赋予本发明的抗TIGIT sdAb一种或多种所需的性质或功能。

[0195] 在一些实施方案中,另外的多肽序列可包含特异性识别第二表位的第二抗体部分或第二抗原结合部分(例如sdAb、scFv、Fab、全长抗体)。在一些实施方案中,第二表位来自TIGIT。在一些实施方案中,第二表位不来自TIGIT。在一些实施方案中,第二抗体部分(或第二抗原结合部分)特异性识别TIGIT上与本文所述的抗TIGIT sdAb相同的表位。在一些实施方案中,第二抗体部分(或第二抗原结合部分)特异性识别TIGIT上与本文所述的抗TIGIT sdAb不同的表位。在一些实施方案中,抗TIGIT构建体包含经由任选的接头(例如肽接头)连接在一起的两个或更多个本文所述的抗TIGIT-sdAb部分。连接在一起的两个或更多个抗TIGIT-sdAb部分可以相同或不同。

[0196] 在一些实施方案中,额外的多肽序列可以增加抗体构建体的半衰期、溶解度或吸收,降低免疫原性或毒性,消除或减弱不期望的副作用,和/或与本文所述的抗TIGIT sdAb本身相比,赋予本发明的抗TIGIT构建体以其它有利性质和/或减少其不希望的性质。这些另外的多肽序列的一些非限制性实例是血清蛋白,例如人类血清白蛋白(HSA;参见例如WO 00/27435)或半抗原分子(例如被循环抗体识别的半抗原,参见例如WO 98/22141)。显示将免疫球蛋白(例如V_H域)的片段与血清白蛋白或其片段连接可以增加抗体半衰期(参见例如WO 00/27435和WO 01/077137)。因此,在一些实施方案中,本发明的抗TIGIT构建体可包含任选地经由合适的接头(例如肽接头)与血清白蛋白(或与其合适片段)连接的本文所述的抗TIGIT sdAb部分。在一些实施方案中,本文所述的抗TIGIT sdAb部分可以与至少包含血清白蛋白域III的血清白蛋白片段连接(参见PCT/EP2007/002817)。抗TIGIT sdAb-HSA融合蛋白可以具有任何形式,例如(sdAb)_n-HSA(n是至少1的整数)、sdAb-HSA-sdAb等。

[0197] 抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白

[0198] 在一些实施方案中,本文所述的抗TIGIT sdAb部分可以任选地经由接头序列与一个或多个(优选人类) C_H2 和/或 C_H3 域(例如Fc片段)连接,以增加其体内半衰期。

[0199] 因此,在一些实施方案中,抗TIGIT构建体是抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其包含与免疫球蛋白例如IgA、IgD、IgE、IgG和IgM的Fc片段融合的本文所述的抗TIGIT sdAb部分。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白包含IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的任一种)的Fc片段。在一些实施方案中,Fc片段是人类Fc,例如人类IgG1(hIgG1)Fc、hIgG2Fc或hIgG4 Fc。在一些实施方案中,Fc片段是无效应子的,具有减少的、最小化的或消除的抗体效应功能,例如ADCC、CDC和/或ADCP(抗体依赖性细胞吞噬作用)。例如,在一些实施方案中,无效应子Fc包含 C_H2 区中的N297A或DANA突变(D265A+N297A)。在一些实施方案中,无效应子的Fc包含K322A和L234A/L235A(LALA)突变。在一些实施方案中,Fc片段是无效应子的(惰性)IgG1 Fc,例如无效应子的hIgG1 Fc。在一些实施方案中,Fc片段包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白是单体的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白是二聚的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分和Fc片段任选地通过肽接头连接。在一些实施方案中,肽接头是人类IgG1铰链(SEQ ID NO:370)。在一些实施方案中,肽接头是突变人类IgG1铰链(SEQ ID NO:371)。在一些实施方案中,肽接头是人类IgG4铰链(SEQ ID NO:324)。在一些实施方案中,肽接头是hIgG2铰链。在一些实施方案中,肽接头包含SEQ ID NO:372-378中的任一者,例如SEQ ID NO:372或373的氨基酸序列。

[0200] 因此,例如,在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,其中所述抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,并且其中所述抗TIGIT sdAb部分经由任选的接头与免疫球蛋白的Fc片段融合。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,其中所述sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列;或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,并且其中所述抗TIGIT sdAb部分经由任选的接头与免疫球蛋白的Fc片段融合。在一些实施方案中,氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,其中所述sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-

207、209-210中的任一者的氨基酸序列,并且其中抗TIGIT sdAb部分经由任选的接头与免疫球蛋白的Fc片段融合。在一些实施方案中,Fc片段是人类IgG1 Fc、人类无效应子IgG1 Fc、hIgG2 Fc或人类IgG4 Fc。在一些实施方案中,Fc片段包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白是单体的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白是二聚的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分和Fc片段任选地通过肽接头连接。在一些实施方案中,肽接头包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的 K_d 为约 10^{-5} M至约 10^{-12} M(例如约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,或约 10^{-8} M至约 10^{-12} M)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。

[0201] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,其中所述sdAb部分包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的 V_H 域,或其与SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者具有至少约80% (例如至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一者) 序列同一性的变体,并且其中抗TIGIT sdAb部分经由任选的接头与免疫球蛋白的Fc片段融合。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,其中所述sdAb部分包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的 V_H 域,或其在 V_H 域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者) 氨基酸取代的变体,并且其中抗TIGIT sdAb部分经由任选的接头与免疫球蛋白的Fc片段融合。在一些实施方案中, V_H 域中的氨基酸取代在SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR,例如CDR1和/或CDR2和/或CDR3中。在一些实施方案中, V_H 域中的氨基酸取代在SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的FR,例如FR1和/或FR2和/或FR3和/或FR4中。在一些实施方案中,氨基酸取代在SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR和FR中。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,其中所述sdAb部分包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的 V_H 域,并且其中抗TIGIT sdAb部分经由任选的接头与免疫球蛋白的Fc片段融合。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,其中所述sdAb部分包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR1、CDR2和CDR3,并且其中所述抗TIGIT sdAb部分经由任选的接头与免疫球蛋白的Fc片段融合。在一些实施方案中,Fc片段是人类IgG1 Fc、无效应子的人类IgG1 Fc、hIgG2 Fc或人类IgG4 Fc。在一些实施方案中,Fc片段包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白是单体的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白是二聚的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分和Fc片段任选地通过肽接头连接。在一些实施方案中,肽接头包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的 K_d 为约 10^{-5} M至约 10^{-12} M(例如约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,或约 10^{-8} M至约 10^{-12} M)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。

[0202] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其包含SEQ ID NO:288-294、

306、308-311、315、317-319、321-322和365-367中的任一者的氨基酸序列。

[0203] 在一些实施方案中,也提供了抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白(下文称为“竞争性抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白”),其与抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白、抗TIGIT sdAb或包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的抗TIGIT构建体中的任一者竞争性地特异性结合至TIGIT。可以使用ELISA测定来确定竞争性结合。例如,在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其与包含SEQ ID NO:288-294、306、308-311、315、317-319、321-322和365-367中的任一者的氨基酸序列的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白竞争性地特异性结合至TIGIT。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其与包含抗TIGIT sdAb的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白竞争性地特异性结合至TIGIT,所述抗TIGIT sdAb包括包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,提供抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,其与抗TIGIT sdAb(或包含抗TIGIT sdAb的抗TIGIT构建体)竞争性地特异性结合至TIGIT,所述抗TIGIT sdAb包括包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列的CDR1;包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列的CDR2;和包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列的CDR3。在一些实施方案中,竞争性抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的Fc片段包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,竞争性抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白与TIGIT之间的结合的 K_d 为约 10^{-5} M至约 10^{-12} M(例如约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,或约 10^{-8} M至约 10^{-12} M)。在一些实施方案中,竞争性抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。

[0204] 多价和/或多特异性抗体

[0205] 在一些实施方案中,抗TIGIT构建体包含与一种或多种其它抗体部分或抗原结合部分(例如特异性识别另一表位的抗体部分)融合的本文所述的抗TIGIT sdAb部分。一种或多种其它抗体部分可以具有任何抗体或抗体片段形式,例如全长抗体、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、scFv、scFv-scFv、微抗体,双抗体或sdAb。在一些实施方案中,一种或多种抗体部分(或抗原结合部分)包含重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)。抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌(E.coli)或噬菌体)产生,如本文所述。

[0206] 制备多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达,以及“孔中旋钮(knob-into-hole)”工程化;使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体;使用“双抗体”技术制备双特异性抗体片段;以及使用单链Fv(sFv)二聚体;以及如例如Tutt等,J.Immunol.147:60(1991)中所述制备三特异性抗体;以及产生包含串联单域抗体的多肽。本文还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化抗体,包括“章鱼抗体(Octopus antibody)”(参见例如US2006/0025576A1)。

[0207] 肽接头

[0208] 在一些实施方案中,抗TIGIT构建体内的抗TIGIT sdAb和其它一个或多个抗体部分(例如全长抗体、sdAb或包含 V_H 和 V_L 的抗原结合部分)可以任选地通过肽接头连接。抗TIGIT构建体中使用的肽接头的长度、挠性程度和/或其它性质可能对性质具有一些影响,

所述性质包括但不限于对于一种或多种特定抗原或表位的亲和力、特异性或亲合力。例如，可以选择较长的肽接头以确保两个相邻的结构域不在空间上相互干扰。在一些实施方案中，肽接头包含挠性残基（例如甘氨酸和丝氨酸），使得相邻的结构域相对于彼此自由移动。例如，甘氨酸-丝氨酸双联体可以是合适的肽接头。

[0209] 肽接头可以具有任何合适的长度。在一些实施方案中，肽接头的长度是至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100个或100个以上氨基酸中的任一者。在一些实施方案中，肽接头的长度不超过约100、75、50、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5个或5个以下氨基酸中的任一者。在一些实施方案中，肽接头的长度是约1个氨基酸至约10个氨基酸，约1个氨基酸至约20个氨基酸，约1个氨基酸至约30个氨基酸，约5个氨基酸至约15个氨基酸，约10个氨基酸至约25个氨基酸，约5个氨基酸至约30个氨基酸，约10个氨基酸至约30个氨基酸长，约30个氨基酸至约50个氨基酸，约50个氨基酸至约100个氨基酸，或约1个氨基酸至约100个氨基酸中的任一者。

[0210] 肽接头可具有天然存在的序列或非天然存在的序列。例如，源自仅重链抗体的铰链区的序列可用作接头。参见例如W01996/34103。在一些实施方案中，肽接头是人类IgG1铰链（SEQ ID NO:370）。在一些实施方案中，肽接头是突变人类IgG1铰链（SEQ ID NO:371）。在一些实施方案中，肽接头是人类IgG4铰链（SEQ ID NO:324）。在一些实施方案中，肽接头是人类IgG2铰链。在一些实施方案中，肽接头是柔性接头。示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物 $(G)_n$ （SEQ ID NO:374），甘氨酸-丝氨酸聚合物（包括例如 $(GS)_n$ （SEQ ID NO:375）、 $(GSGS)_n$ （SEQ ID NO:376）、 $(GGGS)_n$ （SEQ ID NO:377）和 $(GGGS)_n$ （SEQ ID NO:378），其中n是至少1的整数），甘氨酸-丙氨酸聚合物，丙氨酸-丝氨酸聚合物，以及在本领域中已知的其它柔性接头。在一些实施方案中，肽接头包含SEQ ID NO:372（GGGSGGGG）或373（GGGSGGGSGGGG）的氨基酸序列。

[0211] 在一些实施方案中，包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分和一种或多种其它抗体部分（例如全长抗体，sdAb或包含 V_H 和 V_L 的抗原结合部分）的抗TIGIT构建体是单特异性的。在一些实施方案中，包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分和一种或多种其它抗体部分（例如全长抗体，sdAb或包含 V_H 和 V_L 的抗原结合部分）的抗TIGIT构建体是多特异性的（例如双特异性的）。多特异性分子是对至少两个不同表位具有结合特异性的分子（例如，对两个表位具有结合特异性的双特异性抗体）。也涵盖了具有超过两种价态和/或特异性的多特异性分子。例如，可以制备三特异性抗体。Tutt等，J. Immunol. 147:60 (1991)。应理解，本领域技术人员可选择本文所述的各个多特异性分子的适当特征以彼此组合从而形成本发明的多特异性抗TIGIT分子。

[0212] 在一些实施方案中，抗TIGIT构建体是多价的但单特异性的，即抗TIGIT构建体包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分和至少第二抗体部分（例如全长抗体，sdAb或包含 V_H 和 V_L 的抗原结合部分），其特异性识别与本文所述的抗TIGIT sdAb部分相同的TIGIT表位。在一些实施方案中，特异性识别与本文所述的抗TIGIT sdAb部分相同的TIGIT表位的一个或多个抗体部分可包含与抗TIGIT sdAb部分相同的CDR和/或相同的 V_H 氨基酸序列。例如，抗TIGIT构建体可包含两个或更多个本文所述的抗TIGIT sdAb部分，其中两个或更多个抗TIGIT sdAb部分相同，并且任选地通过肽接头连接。在一些实施方案中，所述肽接头包含

SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列。

[0213] 在一些实施方案中,抗TIGIT构建体是多价和多特异性的,即,抗TIGIT构建体包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分和至少第二抗体部分(例如全长抗体,sdAb或包含V_H和V_L的抗原结合部分),其特异性识别除TIGIT外的第二抗原,或由本文所述的抗TIGIT sdAb部分识别的不同TIGIT表位。在一些实施方案中,第二抗体部分是sdAb。在一些实施方案中,第二抗体部分特异性识别人类血清白蛋白(HSA)。在一些实施方案中,本文所述的抗TIGIT sdAb部分与第二抗体部分的N末端和/或C末端融合。在一些实施方案中,抗TIGIT构建体是三价和双特异性的。在一些实施方案中,抗TIGIT构建体包含本文所述的两个抗TIGIT sdAb部分和第二抗体部分(例如抗HSA sdAb),其中第二抗体部分介于两个抗TIGIT sdAb部分之间。在一些实施方案中,抗体部分任选地通过肽接头连接。在一些实施方案中,肽接头包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列。

[0214] 与本文所述的单个抗TIGIT sdAb部分相比,包含两个或更多个抗TIGIT sdAb部分的单特异性或多特异性抗TIGIT构建体可具有增加的亲合力。

[0215] 包含与全长抗体融合的抗TIGIT sdAb部分的双特异性抗体

[0216] 在一些实施方案中,抗TIGIT构建体包含与第二抗体部分融合的本文所述的抗TIGIT sdAb部分,其中第二抗体部分是由两条重链和两条轻链组成的全长抗体(例如抗PD-1或抗PD-L1全长抗体)。全长抗体的Fc片段可以是例如IgG1Fc、无效应子IgG1 Fc、IgG2 Fc或IgG4 Fc。在一些实施方案中,Fc片段包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,全长抗体是刺激性免疫检查点分子的活化剂。在一些实施方案中,全长抗体是免疫检查点抑制剂,例如PD-1或PD-L1的抑制剂。

[0217] 包含针对TIGIT和PD-1的双特异性的构建体将在下文称为“抗TIGIT/PD-1抗体”、“抗TIGIT/PD-1构建体”、“PD-1×TIGIT抗体”或“PD-1×TIGIT BABP”。包含针对TIGIT和PD-L1的双特异性的构建体将在下文称为“抗TIGIT/PD-L1抗体”、“抗TIGIT/PD-L1构建体”、“PD-L1×TIGIT抗体”或“PD-L1×TIGIT BABP”。

[0218] 与TIGIT类似,PD-1和PD-L1是抑制性免疫检查点分子。

[0219] PD-1是调节T细胞活化和耐受性的B7/CD28家族共刺激分子的一部分,因此拮抗性抗PD-1抗体可以用于克服耐受性。PD-1已被定义为B7-4的受体。B7-4在与免疫细胞上的抑制性受体结合后可以抑制免疫细胞的活化。PD-1/PD-L1途径的参与导致T细胞效应功能、细胞因子分泌和增殖的抑制。(Turnis等,OncoImmunology 1(7):1172-1174,2012)。高水平的PD-1与耗尽或慢性刺激的T细胞相关。此外,增加的PD-1表达与癌症患者的存活率降低相关。用于下调PD-1、B7-4以及免疫细胞中B7-4和PD-1抑制信号之间的相互作用的试剂可以导致免疫应答的增强。可以应用于本申请的示例性抗PD-1抗体包括但不限于派姆单抗(pembrolizumab)(例如**Keytruda®**)、PD1-BM-min和纳武单抗(nivolumab)(例如**Opdivo®**)。

[0220] PD-L1(程序性细胞死亡-配体1)也称为分化簇274(CD274)或B7同源物1(B7-H1)。在特定事件(例如妊娠、组织异体移植、自身免疫疾病和其它疾病状态例如肝炎和癌症)期间,PD-L1充当PD-1在抑制免疫系统中起主要作用的配体。PD-1受体/PD-L1配体复合物的形成传递抑制信号,其降低淋巴结处CD8⁺ T细胞的增殖。可以应用于本申请的示例性抗PD-L1抗体包括但不限于阿特珠单抗(例如**Tecentriq®**),度伐单抗(例如MEDI4736、IMFINZI™),阿维单抗(avelumab)(例如**Bavencio®**)和h53C1(人源化53C1)。在一些实施方案中,h53C1抗

PD-L1抗体包含1) V_H , 其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1, 包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2, 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3, 和2) V_L , 其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1, 包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2, 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中, h53C1抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的 V_L 。在一些实施方案中, h53C1抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:323或327的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328的轻链。在一些实施方案中, h53C1抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:329的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:330的轻链。

[0221] 在一些实施方案中, 提供分离的抗TIGIT构建体, 其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-1全长抗体, 其中抗TIGIT sdAb部分包含: CDR1, 所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列, 或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体; CDR2, 所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列, 或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体; 和CDR3, 所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列, 或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中, 提供分离的抗TIGIT构建体, 其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-1全长抗体, 其中抗TIGIT sdAb部分包含: CDR1, 所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列; CDR2, 所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列; 和CDR3, 所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列; 或所述CDR的在CDR区域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中, 氨基酸取代是在CDR1和/或CDR2中。在一些实施方案中, 提供分离的抗TIGIT构建体, 其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-1全长抗体, 其中sdAb包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的 V_H 域, 或其与SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者具有至少约80% (例如至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一者) 序列同一性的变体。在一些实施方案中, 提供分离的抗TIGIT构建体, 其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-1全长抗体, 其中sdAb包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的 V_H 域, 或其在 V_H 域中包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中, 氨基酸取代在SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR, 例如CDR1和/或CDR2和/或CDR3中。在一些实施方案中, 氨基酸取代在SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的FR, 例如FR1和/或FR2和/或FR3和/或FR4中。在一些实施方案中, 氨基酸取代在SEQ ID NO:253-259、

271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR和FR中。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-1全长抗体,其中sdAb包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的V_H域。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-1全长抗体,其中sdAb部分包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包含V_H,所述V_H包含氨基酸序列SEQ ID NO:385的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,所述V_L包含氨基酸序列SEQ ID NO:386的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:385的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:386的V_L。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:325的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:326的轻链。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包含V_H,所述V_H包含氨基酸序列SEQ ID NO:387的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,所述V_L包含氨基酸序列SEQ ID NO:388的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:387的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:388的V_L。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包含V_H,所述V_H包含氨基酸序列SEQ ID NO:406的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,所述V_L包含氨基酸序列SEQ ID NO:407的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:406的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:407的V_L。在一些实施方案中,全长抗体的Fc片段是hIgG1 Fc、无效应子的hIgG1 Fc、hIgG2 Fc或hIgG4 Fc。在一些实施方案中,全长抗体的Fc片段包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的N末端与全长抗体的重链中的至少一者的C末端融合。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的C末端与全长抗体的重链中的至少一者的N末端融合。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的N末端与全长抗体的轻链中的至少一者的C末端融合。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的C末端与全长抗体的轻链中的至少一者的N末端融合。在一些实施方案中,抗TIGIT构建体包含四个本文所述的抗TIGIT sdAb部分,并且抗TIGIT sdAb部分的C末端与全长抗体的重链和轻链的N末端融合(如图21所例示)。在一些实施方案中,抗TIGIT构建体包含四个本文所述的抗TIGIT sdAb部分,其中两个抗TIGIT sdAb部分经由第一任选的接头融合在一起,并且另外两个抗TIGIT sdAb部分经由第二任选的接头融合在一起,其中每组两个抗TIGIT sdAb融合体的C末端经由第三和第四任选的接头与全长抗体的每条重链的N末端融合(如图22所例示)。在一些实施方案中,四个抗TIGIT sdAb部分是相同的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分和全长抗体任选地通过肽接头连接。在一些实施方案中,肽接头包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的K_d为约10⁻⁵M至约10⁻¹²M(例如约10⁻⁷M至约10⁻¹²M,或约10⁻⁸M至约10⁻¹²M)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。

[0222] 在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-1全长抗体的重链中的至少一者的N末端融合,其中抗PD-1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:390的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:391或395的轻链,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:394(在下文指示为“BTP-11”)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗

PD-1全长抗体的两条重链的N末端融合。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的N末端与抗PD-1全长抗体的重链中的至少一者的C末端融合,其中抗PD-1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:390的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:391或397的轻链,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:396(在下文指示为“BTP-12”)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-1全长抗体的两条重链的N末端融合。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-1全长抗体的轻链中的至少一者的N末端融合,其中抗PD-1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:390或398的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:391的轻链,并且其中轻链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:399(在下文指示为“BTP-13”)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-1全长抗体的两条轻链的N末端融合。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的N末端与抗PD-1全长抗体的轻链中的至少一者的C末端融合,其中抗PD-1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:390或400的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:391的轻链,并且其中轻链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:401(在下文指示为“BTP-14”)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的N末端与抗PD-1全长抗体的两条轻链的C末端融合。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包括包含SEQ ID NO:394和396中的任一者的氨基酸序列的重链融合多肽的两个相同拷贝,和包含SEQ ID NO:391、395或397中的任一者的氨基酸序列的轻链的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT构建体具有如图17和图18所示的结构。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包括包含SEQ ID NO:390、398或400中的任一者的氨基酸序列的重链的两个相同拷贝,和包含SEQ ID NO:399或401的氨基酸序列的轻链融合多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT构建体具有如图19和图20所示的结构。

[0223] 因此,在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;并且其中抗PD-L1全长抗体包含 V_H ,所述 V_H 包含氨基酸序列SEQ ID NO:381的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,所述 V_L 包含氨基酸序列SEQ ID NO:382的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。

[0224] 在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列;并且其中抗PD-L1全长抗体包含 V_H ,所述 V_H 包含氨基酸序列SEQ ID NO:381的HC-CDR1、HC-

CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,所述 V_L 包含氨基酸序列SEQ ID NO:382的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中sdAb包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的 V_H 域,或其与SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者具有至少约80% (例如至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一者) 序列同一性的变体;并且其中抗PD-L1全长抗体包含 V_H ,所述 V_H 包含氨基酸序列SEQ ID NO:381的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,所述 V_L 包含氨基酸序列SEQ ID NO:382的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中sdAb包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的 V_H 域;并且其中抗PD-L1全长抗体包含 V_H ,所述 V_H 包含氨基酸序列SEQ ID NO:381的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,所述 V_L 包含氨基酸序列SEQ ID NO:382的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中sdAb部分包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR1、CDR2和CDR3;并且其中抗PD-L1全长抗体包含 V_H ,所述 V_H 包含氨基酸序列SEQ ID NO:381的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,所述 V_L 包含氨基酸序列SEQ ID NO:382的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,全长抗体的Fc片段包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:331的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:332的轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:333的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:334的轻链。

[0225] 在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的重链中的至少一者的N末端融合,其中抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:331的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:332或348的轻链,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:347 (在下文指示为“BTP-7”)。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的重链中的至少一者的N末端融合,其中抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:333的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:334或346的轻链,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:345 (在下文指示为“BTP-6”)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的两条重链的N末端融合。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包括包含SEQ ID NO:345或347的氨基酸序列的重链融合多肽的两个相同拷贝,和包含SEQ ID NO:332、334、346和348中的任一者的氨基酸序列的轻链的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT构建体具有如图17所示的结构。

[0226] 在根据本文所述的抗TIGIT/抗PD-L1构建体中的任一者的一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包含1) V_H ,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2) V_L ,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。

[0227] 在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的重链中的至少一者的N末端融合,其中抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:329的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:330或342的轻链,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:341(在下文指示为“BTP-4”)。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的重链中的至少一者的N末端融合,其中抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:327的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328或344的轻链,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:343(在下文指示为“BTP-5”)。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的重链中的至少一者的N末端融合,其中抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:323的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328或358的轻链,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:357(在下文指示为“BTP-15”)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的两条重链的N末端融合。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的N末端与抗PD-L1全长抗体的重链中的至少一者的C末端融合,其中抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:323的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328或360的轻链,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:359(在下文指示为“BTP-16”)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的N末端与抗PD-L1全长抗体的两条重链的C末端融合。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的轻链中的至少一者的N末端融合,其中抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:323或361的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328的轻链,并且其中轻链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:362(在下文指示为“BTP-17”)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的两条轻链的N末端融合。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的N末端与抗PD-L1全长抗体的轻链中的至少一者的C末端融合,其中抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:323或363的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328的轻链,并且其中轻链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:364(在下文指示为“BTP-18”)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的N末端与抗PD-L1全长抗体的两条轻链的C末端融合。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的重链中的至少一者的N末端融合,其中抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:329的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:330或403的轻链,并且其中重链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:402(在下文指示为“BTP-21”)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的两条重链的N末端融合。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的轻链中的至少一者的N末端融合,其中抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:329或404的重链,和包含氨基酸序列SEQ ID

NO:330的轻链,并且其中轻链融合多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:405(在下文指示为“BTP-22”)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分的C末端与抗PD-L1全长抗体的两条轻链的N末端融合。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包括包含SEQ ID NO:341、343、357、359和402中的任一者的氨基酸序列的重链融合多肽的两个相同拷贝,和包含SEQ ID NO:328、330、342、344、358、360和403中的任一者的氨基酸序列的轻链的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT构建体具有如图17和图18中所示的结构。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包括包含SEQ ID NO:323、329、361、363和404中的任一者的氨基酸序列的重链的两个相同拷贝,和包含SEQ ID NO:362、364和405中的任一者的氨基酸序列的轻链融合多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT构建体具有如图19和图20中所示的结构。

[0228] 在根据本文所述的抗TIGIT/抗PD-L1构建体中的任一者的一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包含V_H,所述V_H包含氨基酸序列SEQ ID NO:379的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,所述V_L包含氨基酸序列SEQ ID NO:380的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中sdAb包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的V_H域;并且其中抗PD-L1全长抗体包含V_H,所述V_H包含氨基酸序列SEQ ID NO:379的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,所述V_L包含氨基酸序列SEQ ID NO:380的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中sdAb部分包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR1、CDR2和CDR3;并且其中抗PD-L1全长抗体包含V_H,所述V_H包含氨基酸序列SEQ ID NO:379的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,所述V_L包含氨基酸序列SEQ ID NO:380的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。

[0229] 在根据本文所述的抗TIGIT/抗PD-L1构建体中的任一者的一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包含V_H,所述V_H包含氨基酸序列SEQ ID NO:383的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,所述V_L包含氨基酸序列SEQ ID NO:384的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中sdAb包括包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列的V_H域;并且其中抗PD-L1全长抗体包含V_H,所述V_H包含氨基酸序列SEQ ID NO:383的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,所述V_L包含氨基酸序列SEQ ID NO:384的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,提供分离的抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分和抗PD-L1全长抗体,其中sdAb部分包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR1、CDR2和CDR3;并且其中抗PD-L1全长抗体包含V_H,所述V_H包含氨基酸序列SEQ ID NO:383的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,所述V_L包含氨基酸序列SEQ ID NO:384的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。

[0230] 在一些实施方案中,也提供了抗TIGIT构建体,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分(下文称为“竞争性抗TIGIT构建体”),其与本文所述的任何一种抗TIGIT构建体竞争性地特异性结合至TIGIT(例如抗TIGIT sdAb部分,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的多特异性或单特异性抗TIGIT构建体,例如本文描述的PD-1×TIGIT BABP或PD-L1×TIGIT BABP)。

[0231] 抗TIGIT多特异性抗原结合蛋白(MABP)

[0232] 本申请通常提供抗TIGIT构建体,其包含与全长抗体或包含 V_H 和 V_L 的抗原结合片段融合的本文所述的抗TIGIT sdAb部分,其中抗TIGIT构建体是多特异性的(下文称为“多特异性抗TIGIT构建体”或“抗TIGIT多特异性抗原结合蛋白(MABP)”)。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP是双特异性的(下文称为“双特异性抗TIGIT构建体”或“抗TIGIT双特异性抗原结合蛋白(BABP)”)。抗TIGIT sdAb部分特异性结合TIGIT,其不同于由全长抗体或包含 V_H 和 V_L 的抗原结合片段识别的靶标,从而赋予扩展的靶向能力。由于sdAb的小尺寸,在一些实施方案中,与全长抗体或抗原结合片段组分相比,本文所述的抗TIGIT MABP(或BABP)可具有相似的分子量和药代动力学性质。例如,可以通过以下方式设计抗TIGIT MABP:将一种或多种抗TIGIT sdAb部分与单克隆抗体融合,单克隆抗体具有经证实的临床功效和安全性,以提供增加的临床益处和期望的药代动力学性质,而不妨碍多特异性构建体的可表达性。在一些实施方案中,通过任选的肽接头将本文所述的一种或多种抗TIGIT sdAb部分与全长抗体或抗原结合片段融合。可采用本文所述的抗TIGIT MABP(或BABP)来靶向除TIGIT之外的多种疾病相关表位或抗原组合,例如TIGIT与免疫检查点分子、细胞表面抗原(例如肿瘤抗原)或促炎分子的组合,从而提供可用于治疗多种疾病和疾患,例如癌症、炎症和自身免疫疾病的药剂。抗TIGIT MABP可以具有任何形式,例如PCT/CN2017/093644中公开的那些,所述文献通过引用整体并入本文。

[0233] 因此,例如,在一些实施方案中,提供抗TIGIT构建体(例如,MABP或BABP),所述构建体包含:(a)第一抗原结合部分,其包含抗TIGIT sdAb部分,所述抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b)包含 V_H 和 V_L 的第二抗原结合部分,其中 V_H 和 V_L 一起形成特异性结合第二表位(例如,PD-1、PD-L1)的抗原结合位点,其中第一抗原结合部分与第二抗原结合部分彼此融合。在一些实施方案中,提供抗TIGIT构建体(例如,MABP或BABP),所述构建体包含:(a)第一抗原结合部分,其包含抗TIGIT sdAb部分,所述抗TIGIT sdAb部分包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR1、CDR2和CDR3,和(b)包含 V_H 和 V_L 的第二抗原结合部分,其中 V_H 和 V_L 一起形成特异性结合第二表位(例如,PD-1、PD-L1)的抗原结合位点,其中第一抗原结合部分与第二抗原结合部分彼此融合。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的 K_d 为约 10^{-5} M至约 10^{-12} M(例如约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,或约 10^{-8} M至约 10^{-12} M)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,第二表位是免疫检查点分子(例如PD-1、PD-L1)。在一些实施方案中,第二表位是促炎分子。在一些实施方案中,第二表位是细胞表面抗原(例如肿瘤抗原,或免疫效应细胞上的细胞表面抗原)。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包括包含 V_H 的重链和包含 V_L 的轻链。在一些实施方案中,第一抗原结合部分在重链的N末端、轻链的N末端、Fc区的N末端、重链的C末端或轻链的C末端与第二抗原结合部分融合。在一些实施方

案中,第二抗原结合部分包含Fab或scFv。在一些实施方案中,第一抗原结合部分在Fab或scFv的C末端与第二抗原结合部分融合。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含全长4链抗体。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含抗PD-1全长抗体。在一些实施方案中,抗PD-1全长抗体(或Fab、scFv)包含 V_H ,其包含SEQ ID NO:385的氨基酸序列的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,其包含SEQ ID NO:386的氨基酸序列的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-1全长抗体(或Fab、scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:385的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:386的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:325的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:326的轻链。在一些实施方案中,抗PD-1全长抗体(或Fab、scFv)包含 V_H ,其包含SEQ ID NO:387的氨基酸序列的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,其包含SEQ ID NO:388的氨基酸序列的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-1全长抗体(或Fab、scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:387的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:388的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-1全长抗体(或Fab、scFv)包含 V_H ,其包含SEQ ID NO:406的氨基酸序列的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,其包含SEQ ID NO:407的氨基酸序列的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-1全长抗体(或Fab、scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:406的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:407的 V_L 。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含抗PD-L1全长抗体(或Fab、scFv)。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或Fab、scFv)包含 V_H ,所述 V_H 包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,所述 V_L 包含SEQ ID NO:382的氨基酸序列的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或Fab、scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:381的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:382的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:331的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:332的轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:333的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:334的轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或Fab、scFv)包含 V_H ,所述 V_H 包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,所述 V_L 包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或Fab、scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:379的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:380的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或Fab、scFv)包含 V_H ,所述 V_H 包含SEQ ID NO:383的氨基酸序列的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,所述 V_L 包含SEQ ID NO:384的氨基酸序列的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或Fab、scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:383的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:384的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或Fab、scFv)包含1) V_H ,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2) V_L ,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或Fab、scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:323或327的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328的轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:329的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:330的轻链。在一些实施方案中,第一抗原结合部分与第二

抗原结合部分化学融合。在一些实施方案中,第一抗原结合部分经由肽接头与第二抗原结合部分融合。在一些实施方案中,肽接头长度不超过约30个(例如不超过约25、20或15个中的任一者)氨基酸。在一些实施方案中,肽接头包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗原结合片段包含Fc区,例如IgG1 Fc、无效应子的IgG1 Fc、IgG2 Fc或IgG4 Fc。在一些实施方案中,第二抗原结合片段包括包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列的Fc区。

[0234] 在一些实施方案中,抗TIGIT构建体(例如,MABP或BABP)包含可以特异性结合至少两个不同表位的至少两个抗原结合部分。至少两个抗原结合部分中的一些可以是相同的,只要MABP具有两个不同表位的结合位点即可。抗TIGIT MABP(或BABP)可以是对称的或不对称的。例如,抗TIGIT MABP(或BABP)可以包括包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分的一至八个拷贝,和包含 V_H 和 V_L 的第二抗原结合部分的一个或两个拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含两个不同的抗原结合部分,每个抗原结合部分包含 V_H 域和 V_L 域,它们一起形成不同的抗原结合位点。例如,第二抗原结合部分可以是双特异性抗体。在一些实施方案中,第二抗原结合部分是单特异性全长抗体或其抗原结合片段,例如Fab或scFv。

[0235] 在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含1、2、3、4、5、6、7、8个或8个以上不同的抗原结合部分中的任一者,每个抗原结合部分包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分。在一些实施方案中,两个相同的抗TIGIT sdAb部分彼此融合,其进一步与第二抗原结合部分融合。在一些实施方案中,两个不同的抗TIGIT sdAb部分彼此融合,其进一步与第二抗原结合部分融合。

[0236] 抗TIGIT构建体(例如MABP)可具有针对TIGIT和/或第二表位(例如PD-1、PD-L1)的任何合适数目的价数,以及任何合适数目的特异性。在一些实施方案中,MABP(或BABP)是针对TIGIT的二价、三价、四价、五价、六价或更高价。在一些实施方案中,MABP(或BABP)是针对第二表位(例如PD-1、PD-L1)的二价、三价、四价、五价、六价或更高价。在一些实施方案中,MABP是双特异性的(例如, $PD-1 \times TIGIT$ BABP、 $PD-L1 \times TIGIT$ BABP)。示例性BABP描绘于图17-26中。在一些实施方案中,MABP是三特异性的。在一些实施方案中,MABP是四特异性的。在一些实施方案中,MABP具有超过四种特异性。

[0237] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT BABP,其包含:(a)第一抗原结合部分的一个或多个拷贝(例如2个),其包含抗TIGIT sdAb部分,所述抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b)包含 V_H 和 V_L 的第二抗原结合部分的单一拷贝,其中 V_H 和 V_L 一起形成特异性结合第二表位(例如,PD-1、PD-L1)的抗原结合位点,其中第一抗原结合部分的每个拷贝与第二抗原结合部分融合。

[0238] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP,其包含:(a)多个(例如2、3、4、5、6、7、8个或8个以上)相同或不同的抗TIGIT sdAb部分,所述抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1

包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b)多个(例如2、3、4、5、6个或6个以上)包含 V_H 和 V_L 的第二抗原结合部分,其中 V_H 和 V_L 一起形成特异性结合第二表位(例如,PD-1、PD-L1)的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb部分彼此融合,和/或与第二抗原结合部分融合。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb包含 V_H H域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,一个或多个抗TIGIT sdAb部分各自进一步与另一个相同或不同的抗TIGIT sdAb部分融合。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含抗PD-1全长抗体(或Fab、scFv)。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体(或Fab、scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:323或327的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328的轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1全长抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:329的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:330的轻链。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分经由肽接头彼此融合。在一些实施方案中,第一抗原结合部分经由肽接头与第二抗原结合部分融合。在一些实施方案中,肽接头包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,第二抗原结合片段包含Fc区,例如IgG1 Fc、无效应子的IgG1 Fc、IgG2 Fc或IgG4 Fc。在一些实施方案中,第二抗原结合片段包括包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列的Fc区。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的 K_d 为约 10^{-5} M至约 10^{-12} M(例如约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,或约 10^{-8} M至约 10^{-12} M)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。

[0239] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一抗原结合部分的单一拷贝,其包含抗TIGIT sdAb部分,所述抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b)各自包含 V_H 和 V_L 的第二抗原结合部分的两个拷贝,其中 V_H 和 V_L 一起形成特异性结合第二表位(例如,PD-1、PD-L1)的抗原结合位点,其中第一抗原结合部分与第二抗原结合部分的两个拷贝中的一者融合。

[0240] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一抗原结合部

分的两个拷贝,其各自包含抗TIGIT sdAb部分,所述抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,(b)各自包含 V_H 和 V_L 的第二抗原结合部分的两个拷贝,其中 V_H 和 V_L 一起形成特异性结合第二表位(例如,PD-1、PD-L1)的抗原结合位点,其中第一抗原结合部分的一个拷贝与第二抗原结合部分的每个拷贝融合(如图17-20、图23和图24所例示)。在一些实施方案中,一个或多个抗TIGIT sdAb各自进一步与另一种相同或不同的抗TIGIT sdAb部分融合。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含 V_H 域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。

[0241] a) 融合多肽

[0242] 抗TIGIT MABP(或BABP)的包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分与包含 V_H 和 V_L 的第二抗原结合部分彼此融合(即,共价连接)。因此,本申请的抗TIGIT MABP(或BABP)包含一个或多个融合多肽。每个融合多肽可包括包含本文所述的抗TIGIT sdAb的第一抗原结合部分和来自第二抗原结合部分的多肽。

[0243] 包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分和包含 V_H 和 V_L 的第二抗原结合部分可以通过单个化学键(例如肽键)直接连接或经由肽接头连接。包含抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分可以在第二抗原结合部分的任何一个(包括每个)多肽的N末端或C末端融合,或者可以在第二抗原结合部分的任何一个(包括每个)多肽的内部位置融合,例如在第二抗原结合部分的重链Fc区的N末端。融合多肽可以重组或化学方式获得。在一些实施方案中,包含抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分的C末端经由化学键(例如肽键)或肽接头与第二抗原结合部分的任何(包括每个)多肽的N末端融合。在一些实施方案中,包含抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分的N末端经由化学键(例如肽键)或肽接头与第二抗原结合部分的任何(包括每个)多肽的C末端融合。在一些实施方案中,包含抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分经由化学键与第二抗原结合部分融合,所述化学键不是涉及氨基酸主链化学基团的肽键。

[0244] 在一些实施方案中,第二抗原结合部分包括包含 V_H 和 V_L 的单链抗体片段。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含scFv。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含在N末端至C末端方向包含以下各者的融合多肽:包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分,任选的肽接头, V_H 域和 V_L 域。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含在N末端至C末端方向包含以下各者的融合多肽:包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分,任选的肽接头, V_L 域和 V_H 域。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含在

N末端至C末端方向包含以下各者的融合多肽： V_H 域， V_L 域，任选的肽接头，和包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分。在一些实施方案中，抗TIGIT MABP(或BABP)包含在N末端至C末端方向包含以下各者的融合多肽： V_L 域， V_H 域，任选的肽接头，和包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分。

[0245] 在一些实施方案中，第二抗原结合部分包括包含 V_H 域的重链和包含 V_L 域的轻链。在一些实施方案中，重链还包含一个或多个重链恒定域，例如 C_H1 、 C_H2 、 C_H3 和 C_H4 ，和/或抗体铰链区(HR)。在一些实施方案中，轻链还包含轻链恒定域(C_L)，例如 λC_L 域或 κC_L 域。在一些实施方案中，包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分的N末端与重链的C末端融合。在一些实施方案中，包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分的C末端与重链的N末端融合。在一些实施方案中，包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分的N末端与轻链的C末端融合。在一些实施方案中，包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分的C末端与轻链的N末端融合。在一些实施方案中，抗TIGIT MABP(或BABP)包含从N末端至C末端包含以下各者的第一多肽：重链，任选的肽接头，和包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分；和包含轻链的第二多肽。在一些实施方案中，抗TIGIT MABP(或BABP)包含从N末端至C末端包含以下各者的第一多肽：包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分，任选的肽接头，和重链；和包含轻链的第二多肽。在一些实施方案中，抗TIGIT MABP(或BABP)包含从N末端至C末端包含以下各者的第一多肽：轻链，任选的肽接头，和包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分；和包含重链的第二多肽。在一些实施方案中，抗TIGIT MABP(或BABP)包含从N末端至C末端包含以下各者的第一多肽：包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分，任选的肽接头，和轻链；和包含重链的第二多肽。在一些实施方案中，抗TIGIT MABP(或BABP)包含两个相同的第一多肽和两个相同的本文所述的第二多肽。

[0246] 在一些实施方案中，第二抗原结合部分包含由两条重链和两条轻链组成的全长抗体(例如，抗PD-1或抗PD-L1全长抗体)。在一些实施方案中，全长抗体是由两条相同重链和两条相同轻链组成的全长单克隆抗体。在一些实施方案中，抗TIGIT MABP(或BABP)包含两个相同的第一多肽，每个多肽从N末端至C末端包含：重链，任选的肽接头，和包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分；和两个相同的第二多肽，每个第二多肽包含轻链(参见例如图18)。在一些实施方案中，抗TIGIT MABP(或BABP)包含两个相同的第一多肽，每个第一多肽从N末端至C末端包含：包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分，任选的肽接头，和重链；和两个相同的第二多肽，每个第二多肽包含轻链(参见例如图17)。在一些实施方案中，抗TIGIT MABP(或BABP)包含两个相同的第一多肽，每个第一多肽从N末端至C末端包含：轻链，任选的肽接头，和包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分；和两个相同的第二多肽，每个第二多肽包含重链(参见例如图20)。在一些实施方案中，抗TIGIT MABP(或BABP)包含两个相同的第一多肽，每个第一多肽从N末端至C末端包含：包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的第一抗原结合部分，任选的肽接头，和轻链；以及两个相同的包含重链的第二多肽(参见例如图19)。

[0247] 在一些实施方案中，抗TIGIT MABP(或BABP)包含：(a) 由第一和第二重链以及第一和第二轻链组成的全长抗体，其中全长抗体特异性识别第一表位(例如PD-1、PD-L1)；(b) 本文所述的第一抗TIGIT sdAb部分，其特异性识别第二表位；(c) 本文所述的第二抗TIGIT

sdAb部分,其特异性识别第三表位;(d)本文所述的第三抗TIGIT sdAb部分,其特异性识别第四表位;以及(e)本文所述的第四抗TIGIT sdAb部分,其特异性识别第五表位;其中第一抗TIGIT sdAb部分的C末端与第一轻链的N末端融合,其中第二抗TIGIT sdAb部分的C末端与第二轻链的N末端融合,其中第三抗TIGIT sdAb部分的C末端与第一重链的N末端融合,并且其中第四抗TIGIT sdAb部分的C末端与第二重链的N末端融合。在一些实施方案中,四个抗TIGIT sdAb部分是不同的。在一些实施方案中,四个抗TIGIT sdAb部分是相同的。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含两个相同的第一多肽,每个第一多肽从N末端至C末端包含:第三或第四抗TIGIT sdAb部分,任选的肽接头,和重链;以及两个相同的第二多肽,每个第二多肽包含第一或第二抗TIGIT sdAb部分,任选的肽接头和轻链。参见例如图21。

[0248] 在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含:(a)由两条重链和两条轻链组成的全长抗体,其中全长抗体特异性识别第一表位(例如PD-1、PD-L1);(b)本文所述的第一抗TIGIT sdAb部分,其特异性识别第二表位;(c)本文所述的第二抗TIGIT sdAb部分,其特异性识别第三表位;(d)本文所述的第三抗TIGIT sdAb部分,其特异性识别第四表位;以及(e)本文所述的第四抗TIGIT sdAb部分,其特异性识别第五表位;其中第一抗TIGIT sdAb部分的C末端与第二抗TIGIT sdAb部分的N末端融合,并且第二抗TIGIT sdAb部分的C末端与一条重链的N末端融合,并且其中第三抗TIGIT sdAb部分的C末端与第四抗TIGIT sdAb部分的N末端融合,并且第四抗TIGIT sdAb部分的C末端与另一条重链的N末端融合。在一些实施方案中,四个抗TIGIT sdAb部分是不同的。在一些实施方案中,四个抗TIGIT sdAb部分是相同的。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含两个相同的第一多肽,每个第一多肽从N末端至C末端包含:第一或第三抗TIGIT sdAb部分,任选的肽接头,第二或第四抗TIGIT sdAb部分,任选的肽接头和重链;以及两个相同的第二多肽,每个第二多肽包含轻链。参见例如图22。

[0249] 在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含:(a)由两条重链和两条轻链组成的全长抗体,其中全长抗体特异性识别第一表位(例如PD-1、PD-L1);(b)本文所述的第一抗TIGIT sdAb部分,其特异性识别第二表位;以及(c)本文所述的第二抗TIGIT sdAb部分,其特异性识别第三表位,其中第一或第二抗TIGIT sdAb部分的N末端与重链的C_H1区的C末端融合,并且第一或第二抗TIGIT sdAb部分的C末端与重链的C_H2区的N末端融合。在一些实施方案中,两个抗TIGIT sdAb部分是相同的。在一些实施方案中,两个抗TIGIT sdAb部分是不同的。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含两个相同的第一多肽,每个第一多肽从N末端至C末端包含:V_H-C_H1-任选的肽接头-抗TIGIT sdAb部分-C_H2-C_H3;以及两个相同的第二多肽,每个第二多肽包含轻链。参见例如图23。

[0250] 在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含:(a)特异性识别第一表位(例如PD-1、PD-L1)的第一scFv;(b)特异性识别第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第二scFv;(c)Fc区;(d)本文所述的第一抗TIGIT sdAb部分,其特异性识别第三表位;以及(d)本文所述的第二抗TIGIT sdAb部分,其特异性识别第四表位,其中每个抗TIGIT sdAb部分的N末端与scFv的C末端融合并且抗TIGIT sdAb部分的C末端与Fc区的N末端融合。在一些实施方案中,两个抗TIGIT sdAb部分是相同的。在一些实施方案中,两个抗TIGIT sdAb部分是不同的。在一些实施方案中,两个scFv是相同的。在一些实施方案中,两个scFv是不同的。在一些实施方案

中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含两个相同的多肽,每个多肽从N末端至C末端包含:scFv-任选的肽接头-抗TIGIT sdAb部分-CH₂-CH₃,例如V_H-V_L-任选的肽接头-抗TIGIT sdAb部分-CH₂-CH₃,或V_L-V_H-任选的肽接头-抗TIGIT sdAb部分-CH₂-CH₃。参见例如图24。

[0251] 在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含:(a)特异性识别第一表位(例如PD-1、PD-L1)的第一Fab;(b)特异性识别第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第二Fab;(c)Fc区;(d)第一Fab样结构域,其包含本文所述的特异性识别第三表位的第一抗TIGIT sdAb部分,和本文所述的特异性识别第四表位的第二抗TIGIT sdAb部分;(e)第二Fab样结构域,其包含本文所述的特异性识别第五表位的第三抗TIGIT sdAb部分,和本文所述的特异性识别第六表位的第四抗TIGIT sdAb部分,其中每个Fab样结构域的N末端与Fab的C末端融合,并且Fab样结构域的两个C末端之一与Fc区的N末端融合。在一些实施方案中,四个抗TIGIT sdAb部分是相同的。在一些实施方案中,四个抗TIGIT sdAb部分是不同的。在一些实施方案中,两个Fab是相同的。在一些实施方案中,两个Fab是不同的。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含两个相同的第一多肽,每个第一多肽从N末端至C末端包含:V_H-C_H1-任选的肽接头-抗TIGIT sdAb部分-C_H1-C_H2-C_H3;以及两个相同的第二多肽,每个第二多肽从N末端至C末端包含:V_L-C_L-任选的肽接头-抗TIGIT sdAb部分-C_L。参见例如图25。

[0252] 在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含:(a)特异性识别第一表位(例如PD-1、PD-L1)的第一scFv;(b)特异性识别第二表位(例如PD-1、PD-L1)的第二scFv;(c)Fc区;(d)第一Fab样结构域,其包含本文所述的特异性识别第三表位的第一抗TIGIT sdAb部分,和本文所述的特异性识别第四表位的第二抗TIGIT sdAb部分;(e)第二Fab样结构域,其包含本文所述的特异性识别第五表位的第三抗TIGIT sdAb部分,和本文所述的特异性识别第六表位的第四抗TIGIT sdAb部分,其中每个Fab样结构域的两个N末端之一与scFv的C末端融合,并且Fab样结构域的两个C末端之一与Fc区的N末端融合。在一些实施方案中,四个抗TIGIT sdAb部分是相同的。在一些实施方案中,四个抗TIGIT sdAb部分是不同的。在一些实施方案中,两个scFv是相同的。在一些实施方案中,两个scFv是不同的。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(或BABP)包含两个相同的第一多肽,每个第一多肽从N末端至C末端包含:scFv-任选的肽接头-抗TIGIT sdAb部分-C_H1-C_H2-C_H3;以及两个相同的第二多肽,每个第二多肽从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb部分-C_L。在一些实施方案中,scFv从N末端至C末端包含:V_H-V_L或V_L-V_H。参见例如图26。

[0253] 本文所述的抗TIGIT MABP(或BABP)可包含位于第一抗原结合部分与第二抗原结合部分之间的一个或多个肽接头。在一些实施方案中,第二抗原结合部分和第一抗原结合部分的重链多肽之间的肽接头与第二抗原结合部分和第一抗原结合部分的轻链多肽之间的肽接头相同。在一些实施方案中,第二抗原结合部分和第一抗原结合部分的重链多肽之间的肽接头不同于第二抗原结合部分和第一抗原结合部分的轻链多肽之间的肽接头。在一些实施方案中,第一抗原结合部分和第二抗原结合部分彼此直接融合,其间没有设置肽接头。两个或更多个抗TIGIT sdAb部分之间的肽接头可以与抗TIGIT sdAb部分和第二抗原结合部分之间的肽接头相同或不同。上文“肽接头”部分中描述的任何肽接头可用于本文所述的任何抗TIGIT MABP(或BABP)中。

[0254] b) 包含V_H和V_L的第二抗原结合部分

[0255] 抗TIGIT MABP(例如BABP)包含至少一个包含V_H和V_L的第二抗原结合部分。这样的

抗原结合部分可以是由两条重链和两条轻链组成的全长常规抗体,或由其衍生的抗原结合片段。

[0256] 在一些实施方案中,第二抗原结合部分是抗原结合片段,其包括包含V_H域的重链和包含V_L域的轻链。本文涵盖的示例性抗原结合片段包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0257] 在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含Fc区,例如人类Fc区。在一些实施方案中,Fc区源自IgG分子,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类中的任何一种。在一些实施方案中,Fc区能够介导抗体效应功能,例如ADCC和/或CDC。例如,具有野生型Fc序列的亚类IgG1、IgG2和IgG3的抗体通常显示包括C1q和C3结合的补体活化,而IgG4不活化补体系统并且不结合C1q和/或C3。在一些实施方案中,Fc区包含降低Fc区与Fc受体的结合亲和力的修饰。在一些实施方案中,Fc区是IgG1 Fc。在一些实施方案中,IgG1 Fc包含233-236位的一个或多个突变,例如L234A和/或L235A。在一些实施方案中,Fc区是无效应子的IgG1 Fc。在一些实施方案中,Fc区是IgG4 Fc。在一些实施方案中,IgG4 Fc包含位置327、330和/或331的突变。参见例如Armour KL等,Eur J. Immunol. 1999;29:2613;和Shields RL等,J. Biol. Chem. 2001;276:6591。在一些实施方案中,Fc区包含P329G突变。在一些实施方案中,Fc区包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列。

[0258] 在一些实施方案中,Fc区包含促进两条不相同重链的异二聚化的修饰。这些修饰的Fc区对于具有不对称设计的本文所述的抗TIGIT MABP(例如BABP)可能是特别受关注的。在一些实施方案中,所述修饰是孔中旋钮修饰,其包含重链或重链融合多肽中的一者中的旋钮修饰和两个重链或重链融合多肽中的另一者中的孔修饰。在一个实施方案中,Fc区包含CH3域中两条重链之间界面内的修饰,其中i) 在一条重链的CH3域中,氨基酸残基被具有较大侧链体积的氨基酸残基取代,从而在一条重链的CH3域的界面内产生突起(“旋钮”),其可定位在另一条重链的CH3域中的界面内的空腔(“孔”)中,并且ii) 在另一条重链的CH3域中,氨基酸残基被具有较小侧链体积的氨基酸残基代替,从而在第二CH3域的界面内产生空腔(“孔”),其中第一个CH3域中的界面内的突起(“旋钮”)是可定位的。例如,在US2011/0287009、US2007/0178552、WO 96/027011、WO 98/050431和Zhu等,1997,Protein Science 6:781-788中描述了孔中旋钮修饰的实例。本文也涵盖了促进异二聚化的对Fc区的其它修饰。例如,可以将静电转向效应设计到Fc区中以提供Fc-异二聚体分子(参见例如US4676980和Brennan等,Science,229:81(1985))。

[0259] 在一些实施方案中,Fc区包含抑制Fab臂交换的修饰。例如,IgG4 Fc中的S228P突变阻止Fab臂交换。

[0260] 在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含κ轻链恒定区。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含λ轻链恒定区。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含重链恒定区。

[0261] 在一些实施方案中,第二抗原结合部分是由两条重链和两条轻链组成的全长抗体。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含由两条重链和两条轻链组成的单克隆抗体(在本文中也称为“4链抗体”)。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含由两条重链和两条轻链组成的多特异性(例如双特异性)全长抗体。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含人类IgG1亚类、无效应子的hIgG1亚类或具有突变L234A和L235A的人类IgG1亚类的全

长抗体。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含人类IgG2亚类的全长抗体。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含人类IgG3亚类的全长抗体。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含人类IgG4亚类的全长抗体或具有额外突变S228P的人类IgG4亚类的全长抗体。在一些实施方案中,全长抗体的Fc区包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列。

[0262] 本领域已知的任何全长4链抗体或由其衍生的抗原结合片段可以用作抗TIGIT MABP(例如BABP)的第二抗原结合部分。具有经证实的临床功效、安全性和药代动力学特征的抗体或抗体片段是特别令人关注的。在一些实施方案中,对本领域已知的抗体或抗体片段进一步工程化,例如人源化或诱变以选择具有合适亲和力的变体,然后与第一抗原结合部分融合以提供抗TIGIT MABP(例如BABP)。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含本领域已知的单克隆抗体或抗体片段的 V_H 和 V_L 域,以及修饰的重链恒定区和/或轻链恒定区。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含本领域已知的单克隆抗体和修饰的Fc区,例如具有S228P突变的IgG4 Fc,或无效应子的IgG1 Fc。在一些实施方案中,第二抗原结合部分包含人类、人源化或嵌合全长抗体或抗体片段。

[0263] 在一些实施方案中,第二抗原结合部分是抗PD-1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)。在一些实施方案中,抗PD-1抗体是派姆单抗(例如,Keytruda®),PD1-BM-min或纳武单抗(例如,Opdivo®)。在一些实施方案中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包含 V_H ,其包含SEQ ID NO:385的氨基酸序列的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,其包含SEQ ID NO:386的氨基酸序列的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:385的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:386的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:325的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:326的轻链。在一些实施方案中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包含 V_H ,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:387的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:388的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:387的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:388的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包含 V_H ,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:406的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:407的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:406的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:407的 V_L 。在一些实施方案中,第二抗原结合部分是抗PD-L1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体是阿特珠单抗(例如,Tecentriq®),度伐单抗(例如,MEDI4736、IMFINZI™),阿维单抗(例如,Bavencio®)或人源化53C1(h53C1)。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包含 V_H ,所述 V_H 包含氨基酸序列SEQ ID NO:381的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,所述 V_L 包含氨基酸序列SEQ ID NO:382的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:381的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:382的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:331的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:332的

轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:333的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:334的轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包含 V_H ,所述 V_H 包含氨基酸序列SEQ ID NO:379的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,所述 V_L 包含氨基酸序列SEQ ID NO:380的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:379的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:380的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包含 V_H ,所述 V_H 包含氨基酸序列SEQ ID NO:383的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,所述 V_L 包含氨基酸序列SEQ ID NO:384的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:383的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:384的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包含1) V_H ,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2) V_L ,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体或其抗原结合片段(例如Fab或scFv)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:323或327的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328的轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:329的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:330的轻链。

[0264] c) 示例性抗TIGIT MABP和BABP

[0265] 在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(例如BABP)包含(a)第一抗原结合部分,其包含本文所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分,和(b)第二抗原结合部分,其包含 V_H 和 V_L ,其中 V_H 和 V_L 一起形成特异性结合PD-1的抗原结合位点,其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分彼此融合(下文称为“PD-1×TIGIT BABP”或“TIGIT×PD-1BABP”)。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(例如BABP)包含(a)第一抗原结合部分,其包含本文所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分,和(b)第二抗原结合部分,其包含 V_H 和 V_L ,其中 V_H 和 V_L 一起形成特异性结合PD-L1的抗原结合位点,其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分彼此融合(下文称为“PD-L1×TIGIT BABP”或“TIGIT×PD-L1 BABP”)。

[0266] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一抗原结合部分,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,所述sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b)第二抗原结合部分,其包含由两条重链和两条轻链组成的全长抗体(例如派姆单抗、PD1-BM-min或纳武单抗),其中全长抗体特异性结合PD-1;并且其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分彼此融合。在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一抗原结合部分,其包含特异性

识别TIGIT的sdAb部分,所述sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b)第二抗原结合部分,其包含由两条重链和两条轻链组成的全长抗体,其中全长抗体特异性结合PD-1;其中全长抗体包含V_H,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:385的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:386的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3;并且其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分彼此融合。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:385的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:386的V_L。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:325的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:326的轻链。在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一抗原结合部分,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,所述sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b)第二抗原结合部分,其包含由两条重链和两条轻链组成的全长抗体,其中全长抗体特异性结合PD-1;其中全长抗体包含V_H,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:387的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:388的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3;并且其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分彼此融合。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:387的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:388的V_L。在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一抗原结合部分,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,所述sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b)第二抗原结合部分,其包含由两条重链和两条轻链组成的全长抗体,其中全长抗体特异性结合PD-1;其中全长抗体包含V_H,所述V_H包含氨基酸序列SEQ ID NO:406的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,所述V_L包含氨基酸序列SEQ ID NO:407的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3;并且其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分彼此融合。在一些实施方案中,抗PD-1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:406的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:407的V_L。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸

序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含V_HH域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,第一抗原结合部分与第二抗原结合部分在两条重链中的一条或每条的N末端、两条轻链中的一条或每条的N末端、Fc区的N末端、两条重链中的一条或每条的C末端、或两条轻链中的一条或每条的C末端融合。在一些实施方案中,第一抗原结合部分与第二抗原结合部分化学融合。在一些实施方案中,第一抗原结合部分经由肽键或肽接头与第二抗原结合部分融合。在一些实施方案中,肽接头长度不超过约30个(例如不超过约25、20或15个中的任一者)氨基酸。在一些实施方案中,肽接头包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,全长抗体的Fc区可以是例如IgG1 Fc、无效应子的IgG1 Fc、IgG2Fc或IgG4 Fc。在一些实施方案中,Fc区包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的K_d为约10⁻⁵M至约10⁻¹²M(例如约10⁻⁷M至约10⁻¹²M,或约10⁻⁸M至约10⁻¹²M)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。

[0267] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a) 第一抗原结合部分,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,所述sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b) 第二抗原结合部分,其包含由两条重链和两条轻链组成的全长抗体(例如阿特殊单抗、度伐单抗、阿维单抗或h53C1),其中全长抗体特异性结合PD-L1;并且其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分彼此融合。在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a) 第一抗原结合部分,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,所述sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b) 第二抗原结合部分,其包含由两条重链和两条轻链组成的全长抗体,其中全长抗体特异性结合PD-L1;其中全长抗体包含V_H,所述V_H包含氨基酸序列SEQ ID NO:381的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和V_L,所述V_L包含氨基酸序列SEQ ID NO:382的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3;并且其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分彼此融合。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:381

的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:382的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:331的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:332的轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:333的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:334的轻链。在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一抗原结合部分,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,所述sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b)第二抗原结合部分,其包含由两条重链和两条轻链组成的全长抗体,其中全长抗体特异性结合PD-L1;其中全长抗体包含 V_H ,其包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,其包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3;并且其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分彼此融合。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:379的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:380的 V_L 。在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一抗原结合部分,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,所述部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b)第二抗原结合部分,其包含由两条重链和两条轻链组成的全长抗体,其中全长抗体特异性结合PD-L1;其中全长抗体包含 V_H ,其包含SEQ ID NO:383的氨基酸序列的HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3,和 V_L ,其包含SEQ ID NO:384的氨基酸序列的LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3;并且其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分彼此融合。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:383的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:384的 V_L 。在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一抗原结合部分,其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分,所述sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体,和(b)第二抗原结合部分,其包含由两条重链和两条轻链组成的全长抗体,其中全长抗体特异性结合PD-L1;其中全长抗体包含1) V_H ,其包括包含SEQ ID NO:349的氨基酸序列的HC-CDR1、包含SEQ ID NO:350的氨基酸序列的HC-CDR2和包含SEQ ID NO:351的氨基酸序列的HC-CDR3,和2) V_L ,其包括包含SEQ ID NO:352的氨基酸序

列的LC-CDR1、包含SEQ ID NO:353的氨基酸序列的LC-CDR2和包含SEQ ID NO:354的氨基酸序列的LC-CDR3;并且其中第一抗原结合部分和第二抗原结合部分彼此融合。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的 V_L 。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:323或327的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:328的轻链。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:329的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:330的轻链。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含 V_H H域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的CDR1、CDR2和CDR3。在一些实施方案中,第一抗原结合部分与第二抗原结合部分在两条重链中的一条或每条的N末端、两条轻链中的一条或每条的N末端、Fc区的N末端、两条重链中的一条或每条的C末端、或两条轻链中的一条或每条的C末端融合。在一些实施方案中,第一抗原结合部分与第二抗原结合部分化学融合。在一些实施方案中,第一抗原结合部分经由肽键或肽接头与第二抗原结合部分融合。在一些实施方案中,肽接头长度不超过约30个(例如不超过约25、20或15个中的任一者)氨基酸。在一些实施方案中,肽接头包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,全长抗体的Fc区可以是例如IgG1 Fc、无效应子的IgG1Fc、IgG2 Fc或IgG4 Fc。在一些实施方案中,Fc区包含SEQ ID NO:355、356和389中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的 K_d 为约 10^{-5} M至约 10^{-12} M(例如约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,或约 10^{-8} M至约 10^{-12} M)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。

[0268] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT BABP,其包含:(a) 第一多肽,其从N末端至C末端包含: V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 -抗TIGIT sdAb部分;和(b) 第二多肽,其从N末端至C末端包含: V_L - C_L ,其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合PD-1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含 V_H H域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 和 V_L 域源自派姆单抗、PD1-BM-min或纳

武单抗。在一些实施方案中, V_H 包含 SEQ ID NO:385 的氨基酸序列并且 V_L 包含 SEQ ID NO:386 的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含 SEQ ID NO:387 的氨基酸序列并且 V_L 包含 SEQ ID NO:388 的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含 SEQ ID NO:406 的氨基酸序列并且 V_L 包含 SEQ ID NO:407 的氨基酸序列。在一些实施方案中, C_H3 和抗 TIGIT sdAb 部分任选地经由肽接头, 例如包含 SEQ ID NO:324 和 370-378 中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自 IgG4 Fc, 例如 SEQ ID NO:389。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自 IgG1 Fc, 例如 SEQ ID NO:356。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自无效应子 IgG1 Fc, 例如 SEQ ID NO:355。在一些实施方案中, 抗 TIGIT BABP 包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中, 抗 TIGIT sdAb 部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中, 抗 TIGIT BABP 包含 (a) 包含 SEQ ID NO:396 的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝, 和 (b) 包含 SEQ ID NO:397 的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中, PD-1 $\times$ TIGIT BABP 具有如图 18 所示的结构。

[0269] 在一些实施方案中, 提供抗 TIGIT BABP, 其包含: (a) 第一多肽, 其从 N 末端至 C 末端包含: V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 -抗 TIGIT sdAb 部分; 和 (b) 第二多肽, 其从 N 末端至 C 末端包含: V_L - C_L , 其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合 PD-1 的抗原结合位点, 并且其中抗 TIGIT sdAb 部分包含 CDR1, 所述 CDR1 包含 SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70 中的任一者的氨基酸序列, 或其包含至多约 3 个 (例如约 1 个、2 个或 3 个中的任一者) 氨基酸取代的变体; CDR2, 所述 CDR2 包含 SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140 中的任一者的氨基酸序列, 或其包含至多约 3 个 (例如约 1 个、2 个或 3 个中的任一者) 氨基酸取代的变体; 和 CDR3, 所述 CDR3 包含 SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210 中的任一者的氨基酸序列, 或其包含至多约 3 个 (例如约 1 个、2 个或 3 个中的任一者) 氨基酸取代的变体。在一些实施方案中, 抗 TIGIT sdAb 包含: CDR1, 所述 CDR1 包含 SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70 中的任一者的氨基酸序列; CDR2, 所述 CDR2 包含 SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140 中的任一者的氨基酸序列; 和 CDR3, 所述 CDR3 包含 SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210 中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中, 抗 TIGIT sdAb 部分包含 V_H 域, 其包含 SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287 中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 和 V_L 域源自阿特殊单抗、度伐单抗、阿维单抗或 h53C1。在一些实施方案中, h53C1 抗 PD-L1 抗体包含 1) V_H , 其包括包含氨基酸序列 SEQ ID NO:349 的 HC-CDR1, 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:350 的 HC-CDR2, 和包含氨基酸序列 SEQ ID NO:351 的 HC-CDR3, 和 2) V_L , 其包括包含氨基酸序列 SEQ ID NO:352 的 LC-CDR1, 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:353 的 LC-CDR2, 和包含氨基酸序列 SEQ ID NO:354 的 LC-CDR3。在一些实施方案中, h53C1 抗 PD-L1 抗体包括包含氨基酸序列 SEQ ID NO:339 的 V_H 和包含氨基酸序列 SEQ ID NO:340 的 V_L 。在一些实施方案中, V_H 包含 SEQ ID NO:381 的氨基酸序列并且 V_L 包含 SEQ ID NO:382 的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含 SEQ ID NO:379 的氨基酸序列并且 V_L 包含 SEQ ID NO:380 的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含 SEQ ID NO:383 的氨基酸序列并且 V_L 包含 SEQ ID NO:384 的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含 SEQ ID NO:339 的氨基酸序列并且 V_L 包含 SEQ ID NO:340 的氨基酸序列。在一些实施方案中, C_H3 和抗 TIGIT sdAb 部分任选地经由肽接头, 例如包含 SEQ ID NO:324 和 370-378 中的任一者的氨基酸序列

的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2和C_H3域源自IgG4 Fc, 例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中, C_H2和C_H3域源自IgG1 Fc, 例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中, C_H2和C_H3域源自无效应子IgG1 Fc, 例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中, 抗TIGIT BABP包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中, 抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中, 抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:359的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝, 和(b)包含SEQ ID NO:360的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中, PD-L1×TIGIT BABP具有如图18所示的结构。

[0270] 在一些实施方案中, 提供抗TIGIT BABP, 其包含: (a) 第一多肽, 其从N末端至C末端包含: 抗TIGIT sdAb部分-V_H-C_H1-C_H2-C_H3; 和(b) 第二多肽, 其从N末端至C末端包含: V_L-C_L, 其中V_H和V_L形成特异性结合PD-1的抗原结合位点, 并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1, 所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列, 或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体; CDR2, 所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列, 或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体; 和CDR3, 所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列, 或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中, 抗TIGIT sdAb部分包含: CDR1, 所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列; CDR2, 所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列; 和CDR3, 所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中, 抗TIGIT sdAb部分包含V_HH域, 其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H和V_L域源自派姆单抗、PD1-BM-min或纳武单抗。在一些实施方案中, V_H包含SEQ ID NO:385的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:386的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H包含SEQ ID NO:387的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:388的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H包含SEQ ID NO:406的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:407的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H和抗TIGIT sdAb部分任选地经由肽接头, 例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2和C_H3域源自IgG4 Fc, 例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中, C_H2和C_H3域源自IgG1 Fc, 例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中, C_H2和C_H3域源自无效应子IgG1 Fc, 例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中, 抗TIGIT BABP包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中, 抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中, 抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:394的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝, 和(b)包含SEQ ID NO:395的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中, PD-1×TIGIT BABP具有如图17所示的结构。

[0271] 在一些实施方案中, 提供抗TIGIT BABP, 其包含: (a) 第一多肽, 其从N末端至C末端包含: 抗TIGIT sdAb部分-V_H-C_H1-C_H2-C_H3; 和(b) 第二多肽, 其从N末端至C末端包含: V_L-C_L, 其中V_H和V_L形成特异性结合PD-L1的抗原结合位点, 并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,

所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含V_HH域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H和V_L域源自阿特殊单抗、度伐单抗、阿维单抗或h53C1。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包含1) V_H,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2) V_L,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的V_L。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:382的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:383的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:384的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:339的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H和抗TIGIT sdAb部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:345的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝,和(b)包含SEQ ID NO:346的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:347的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝,和(b)包含SEQ ID NO:348的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:341的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝,和(b)包含SEQ ID NO:342的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:343的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝,和(b)包含SEQ ID NO:344的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:357的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝,和(b)包含SEQ ID NO:358的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:402的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝,和(b)包含SEQ ID NO:403的氨基酸

序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,PD-L1×TIGIT BABP具有如图17所示的结构。

[0272] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT BABP,其包含:(a)第一多肽,其从N末端至C末端包含: V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ;和(b)第二多肽,其从N末端至C末端包含: V_L - C_L -抗TIGIT sdAb部分,其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合PD-1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含 V_H H域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 和 V_L 域源自派姆单抗、PD1-BM-min或纳武单抗。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:385的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:386的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:387的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:388的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:406的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:407的氨基酸序列。在一些实施方案中, C_L 和抗TIGIT sdAb部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:400的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝,和(b)包含SEQ ID NO:401的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,PD-1×TIGIT BABP具有如图20所示的结构。

[0273] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT BABP,其包含:(a)第一多肽,其从N末端至C末端包含: V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ;和(b)第二多肽,其从N末端至C末端包含: V_L - C_L -抗TIGIT sdAb部分,其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合PD-L1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方

案中,抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含V_H域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H和V_L域源自阿特殊单抗、度伐单抗、阿维单抗或h53C1。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包含1) V_H,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2) V_L,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的V_L。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:382的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:383的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:384的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:339的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列。在一些实施方案中,C_L和抗TIGIT sdAb部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:363的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝,和(b)包含SEQ ID NO:364的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,PD-L1×TIGIT BABP具有如图20所示的结构。

[0274] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT BABP,其包含:(a) 第一多肽,其从N末端至C末端包含:V_H-C_H1-C_H2-C_H3;和(b) 第二多肽,其从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb部分-V_L-C_L,其中V_H和V_L形成特异性结合PD-1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含V_H域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-

287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 和 V_L 域源自派姆单抗、PD1-BM-min或纳武单抗。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:385的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:386的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:387的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:388的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:406的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:407的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_L 和抗TIGIT sdAb部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:398的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝,和(b)包含SEQ ID NO:399的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,PD-1 $\times$ TIGIT BABP具有如图19所示的结构。

[0275] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT BABP,其包含:(a)第一多肽,其从N末端至C末端包含: V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ;和(b)第二多肽,其从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb部分- V_L - C_L ,其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合PD-L1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含 V_H 域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 和 V_L 域源自阿特殊单抗、度伐单抗、阿维单抗或h53C1。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包含1) V_H ,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2) V_L ,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的 V_L 。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:382的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:383的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:384的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:339的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_L 和抗TIGIT

sdAb部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:361的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝,和(b)包含SEQ ID NO:362的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含(a)包含SEQ ID NO:404的氨基酸序列的第一多肽的两个相同拷贝,和(b)包含SEQ ID NO:405的氨基酸序列的第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,PD-L1×TIGIT BABP具有如图19所示的结构。

[0276] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一多肽,其从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb1部分- V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ;和(b)第二多肽,其从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb2部分- V_L - C_L ,其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合PD-1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含 V_H 域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是相同的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是不同的。在一些实施方案中, V_H 和 V_L 域源自派姆单抗、PD1-BM-min或纳武单抗。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:385的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:386的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:387的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:388的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:406的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:407的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_L 和抗TIGIT sdAb2部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, V_H 和抗TIGIT sdAb1部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(例如BABP)包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相

同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,PD-1×TIGIT MABP(例如BABP)具有如图21所示的结构。

[0277] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一多肽,其从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb1部分- V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ;和(b)第二多肽,其从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb2部分- V_L - C_L ,其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合PD-L1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含 V_H 域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是相同的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是不同的。在一些实施方案中, V_H 和 V_L 域源自阿特殊单抗、度伐单抗、阿维单抗或h53C1。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包含1) V_H ,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2) V_L ,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的 V_L 。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:382的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:383的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:384的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:339的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_L 和抗TIGIT sdAb2部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, V_H 和抗TIGIT sdAb1部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(例如BABP)包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,PD-L1×TIGIT

MABP (例如BABP) 具有如图21所示的结构。

[0278] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP (例如BABP),其包含:(a) 第一多肽,其从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb1部分-抗TIGIT sdAb2部分- V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ;和(b) 第二多肽,其从N末端至C末端包含: V_L - C_L ,其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合PD-1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO: 36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO: 106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO: 176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO: 36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO: 106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO: 176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含 V_H 域,其包含SEQ ID NO: 253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是相同的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是不同的。在一些实施方案中, V_H 和 V_L 域源自派姆单抗、PD1-BM-min或纳武单抗。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO: 385的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO: 386的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO: 387的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO: 388的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO: 406的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO: 407的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分与抗TIGIT sdAb2部分,和/或 V_H 与抗TIGIT sdAb2部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO: 324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO: 389。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO: 356。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO: 355。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP (例如BABP) 包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,PD-1×TIGIT MABP (例如BABP) 具有如图22所示的结构。

[0279] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP (例如BABP),其包含:(a) 第一多肽,其从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb1部分-抗TIGIT sdAb2部分- V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ;和(b) 第二多肽,其从N末端至C末端包含: V_L - C_L ,其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合PD-L1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO: 36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO: 106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO: 176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个

(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含V_H域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是相同的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是不同的。在一些实施方案中,V_H和V_L域源自阿特殊单抗、度伐单抗、阿维单抗或h53C1。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包含1)V_H,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2)V_L,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的V_L。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:382的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:383的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:384的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:339的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分与抗TIGIT sdAb2部分,和/或V_H与抗TIGIT sdAb2部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(例如BABP)包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,PD-L1×TIGIT MABP(例如BABP)具有如图22所示的结构。

[0280] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT BABP,其包含:(a) 第一多肽,其从N末端至C末端包含:V_H-C_H1-抗TIGIT sdAb部分-C_H2-C_H3;和(b) 第二多肽,其从N末端至C末端包含:V_L-C_L,其中V_H和V_L形成特异性结合PD-1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-

182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含V_HH域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H和V_L域源自派姆单抗、PD1-BM-min或纳武单抗。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:385的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:386的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:387的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:388的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:406的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:407的氨基酸序列。在一些实施方案中,C_H1和抗TIGIT sdAb部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,PD-1×TIGIT BABP具有如图23所示的结构。

[0281] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT BABP,其包含:(a) 第一多肽,其从N末端至C末端包含:V_H-C_H1-抗TIGIT sdAb部分-C_H2-C_H3;和(b) 第二多肽,其从N末端至C末端包含:V_L-C_L,其中V_H和V_L形成特异性结合PD-L1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含V_HH域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H和V_L域源自阿特殊单抗、度伐单抗、阿维单抗或h53C1。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包含1) V_H,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2) V_L,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的V_L。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:382的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:383的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:384的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:339的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列。在一些实施方案中,C_H1和抗TIGIT

sdAb部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,PD-L1×TIGIT BABP具有如图23所示的结构。

[0282] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT BABP,其包含多肽,所述多肽从N末端至C末端包含: V_L - V_H -抗TIGIT sdAb部分- C_H2 - C_H3 ,其中 V_L 和 V_H 一起形成特异性结合PD-1的scFv,并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT BABP,其包含多肽,所述多肽从N末端至C末端包含: V_H - V_L -抗TIGIT sdAb部分- C_H2 - C_H3 ,其中 V_L 和 V_H 一起形成特异性结合PD-1的scFv,并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含: V_H H域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv(或形成scFv的 V_L 和 V_H)源自派姆单抗、PD1-BM-min或纳武单抗。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:385的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:386的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:387的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:388的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:406的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:407的氨基酸序列。在一些实施方案中,形成scFv的 V_H 与 V_L ,和/或scFv与抗TIGIT sdAb部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含两个相同的多肽拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源

化的。在一些实施方案中,PD-1×TIGIT BABP具有如图24所示的结构。

[0283] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT BABP,其包含多肽,所述多肽从N末端至C末端包含: V_L - V_H -抗TIGIT sdAb部分- C_H2 - C_H3 ,其中 V_L 和 V_H 一起形成特异性结合PD-L1的scFv,并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT BABP,其包含多肽,所述多肽从N末端至C末端包含: V_H - V_L -抗TIGIT sdAb部分- C_H2 - C_H3 ,其中 V_L 和 V_H 一起形成特异性结合PD-L1的scFv,并且其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含 V_H 域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,scFv(或形成scFv的 V_L 和 V_H)源自阿特珠单抗、度伐单抗、阿维单抗或h53C1。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包含1) V_H ,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2) V_L ,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的 V_H 和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的 V_L 。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:382的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:383的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:384的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:339的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列。在一些实施方案中,形成scFv的 V_H 与 V_L ,和/或scFv与抗TIGIT sdAb部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT BABP包含两个相同的多肽拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、

嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,PD-L1×TIGIT BABP具有如图24所示的结构。

[0284] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一多肽,其从N末端至C末端包含: V_H - C_H1 -抗TIGIT sdAb1部分- C_H1 - C_H2 - C_H3 ;和(b)第二多肽,其从N末端至C末端包含: V_L - C_L -抗TIGIT sdAb2部分- C_L ,其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合PD-1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含 V_H 域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是相同的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是不同的。在一些实施方案中, V_H 和 V_L 域源自派姆单抗、PD1-BM-min或纳武单抗。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:385的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:386的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:387的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:388的氨基酸序列。在一些实施方案中, V_H 包含SEQ ID NO:406的氨基酸序列并且 V_L 包含SEQ ID NO:407的氨基酸序列。在一些实施方案中, C_H1 与抗TIGIT sdAb1部分,和/或 C_L 与抗TIGIT sdAb2部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中, C_H2 和 C_H3 域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(例如BABP)包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,PD-1×TIGIT MABP(例如BABP)具有如图25所示的结构。

[0285] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一多肽,其从N末端至C末端包含: V_H - C_H1 -抗TIGIT sdAb1部分- C_H1 - C_H2 - C_H3 ;和(b)第二多肽,其从N末端至C末端包含: V_L - C_L -抗TIGIT sdAb2部分- C_L ,其中 V_H 和 V_L 形成特异性结合PD-L1的抗原结合位点,并且其中抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID

NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含V_HH域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是相同的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是不同的。在一些实施方案中,V_H和V_L域源自阿特殊单抗、度伐单抗、阿维单抗或h53C1。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包含1)V_H,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2)V_L,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的V_L。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:382的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:383的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:384的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:339的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列。在一些实施方案中,C_H1与抗TIGIT sdAb1部分,和/或C_L与抗TIGIT sdAb2部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(例如BABP)包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,PD-L1×TIGIT MABP(例如BABP)具有如图25所示的结构。

[0286] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a) 第一多肽,其从N末端至C末端包含:V_L-V_H-抗TIGIT sdAb1部分-C_H2-C_H3;和(b) 第二多肽,其从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb2部分-C_L,其中V_L和V_H形成特异性结合PD-1的scFv,并且其中抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a) 第一多肽,其从N末端至C末端包含:V_H-V_L-抗TIGIT sdAb1部分-C_H2-C_H3;和(b)

第二多肽,其从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb2部分-C_L,其中V_L和V_H形成特异性结合PD-1的scFv,并且其中抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含V_HH域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是相同的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是不同的。在一些实施方案中,V_H和V_L域(或scFv)源自派姆单抗、PD1-BM-min或纳武单抗。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:385的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:386的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:387的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:388的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:406的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:407的氨基酸序列。在一些实施方案中,形成scFv的V_H与V_L和/或scFv与抗TIGIT sdAb1部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(例如BABP)包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,PD-1×TIGIT MABP(例如BABP)具有如图26所示的结构。

[0287] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一多肽,其从N末端至C末端包含:V_L-V_H-抗TIGIT sdAb1部分-C_H2-C_H3;和(b)第二多肽,其从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb2部分-C_L,其中V_L和V_H形成特异性结合PD-L1的scFv,并且其中抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,提供抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含:(a)第一多肽,其从N末端至C末端包含:V_H-V_L-抗TIGIT sdAb1部分-C_H2-C_H3;和(b)第二多肽,其从N末端至C末端包含:抗TIGIT sdAb2部分-C_L,其中V_L和V_H形成特异性结合PD-

L1的scFv,并且其中抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含:CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分各自包含V_H域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是相同的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb1部分和抗TIGIT sdAb2部分是不同的。在一些实施方案中,V_H和V_L域(或scFv)源自阿特珠单抗、度伐单抗、阿维单抗或h53C1。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包含1)V_H,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:349的HC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:350的HC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:351的HC-CDR3,和2)V_L,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:352的LC-CDR1,包含氨基酸序列SEQ ID NO:353的LC-CDR2,和包含氨基酸序列SEQ ID NO:354的LC-CDR3。在一些实施方案中,h53C1抗PD-L1抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:339的V_H和包含氨基酸序列SEQ ID NO:340的V_L。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:381的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:382的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:379的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:380的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:383的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:384的氨基酸序列。在一些实施方案中,V_H包含SEQ ID NO:339的氨基酸序列并且V_L包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列。在一些实施方案中,形成scFv的V_H与V_L,和/或scFv与抗TIGIT sdAb1部分任选地经由肽接头,例如包含SEQ ID NO:324和370-378中的任一者的氨基酸序列的肽接头彼此融合。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG4 Fc,例如SEQ ID NO:389。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:356。在一些实施方案中,C_H2和C_H3域源自无效应子IgG1 Fc,例如SEQ ID NO:355。在一些实施方案中,抗TIGIT MABP(例如BABP)包含第一多肽的两个相同拷贝和第二多肽的两个相同拷贝。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,PD-L1×TIGIT MABP(例如BABP)具有如图26所示的结构。

[0288] 在一些实施方案中,也提供了抗TIGIT MABP(例如BABP),其包含特异性识别TIGIT的sdAb部分(下文称为“竞争性抗TIGIT构建体”、“竞争性抗TIGIT MABP”或“竞争性抗TIGIT BABP”),其与本文所述的任何一种抗TIGIT构建体竞争性地特异性结合TIGIT(例如抗TIGIT sdAb部分、抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白、多特异性(例如双特异性)或单特异性抗TIGIT构建体,其包含本文描述的抗TIGIT sdAb部分,例如本文所述的抗TIGIT/PD-1构建体(例如,MABP或BABP)或抗TIGIT/PD-L1构建体(例如,MABP或BABP))。

[0289] (III) 抗TIGIT构建体抗体变体

[0290] 在一些实施方案中,涵盖了本文提供的抗TIGIT构建体(例如,抗TIGIT sdAb部分、抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白、抗TIGIT MABP/BABP)的氨基酸序列变体。例如,可能需要改善抗体的结合亲和力和/或其它生物特性。抗体的氨基酸序列变体可通过将适当修饰引入编码所述抗体的核苷酸序列中或通过肽合成来制备。这样的修饰包括例如抗体的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可对缺失、插入和取代进行任何组合以获得最终构建体,其限制条件为最终构建体具有所需特性,例如抗原结合。

[0291] a) 取代、插入、缺失和变体

[0292] 在一些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。用于取代诱变的目标位点包括HVR(或CDR)和FR。保守性取代显示于表2中的标题“优选取代”下。更实质性变化提供于表2中的标题“示例性取代”下,并且如以下关于氨基酸侧链类别进一步所述。氨基酸取代可引入目标抗体和经筛选所需活性(例如,保留的/改善的抗原结合、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC)的产物中。

[0293] 表2. 氨基酸取代

[0294]

原始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu;Asn	Glu
Cys (C)	Ser;Ala	Ser
Gln (Q)	Asn;Glu	Asn
Glu (E)	Asp;Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val;Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;正亮氨酸	Leu

[0295] 可根据共同侧链性质将氨基酸分组:1) 疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile; 2) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;3) 酸性:Asp、Glu;4) 碱性:His、Lys、Arg;5) 影响链取向的残基:Gly、Pro;和6) 芳香性:Trp、Tyr、Phe。

[0296] 非保守性取代将需要将这些类别中一个类别的成员更换成另一类别。

[0297] 一种类型的取代变体涉及取代亲本抗体(例如,人源化抗体或人类抗体)的一个或多个高变区残基。一般来说,选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体将在某些生物特性方面具有改变(例如改善)(例如亲和力增加、免疫原性降低)和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物特性。一个示例性取代变体是亲和力成熟抗体,其可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(例如本文描述的那些技术)便利地产生。简言之,使一个或多个HVR残基突变,并且使变体抗体在噬菌体上展示并筛选特定生物活性(例如结合亲和力)。

[0298] 可在HVR中进行改变(例如取代)以例如改善抗体亲和力。可在HVR“热点”(即由在体细胞成熟过程期间以高频率经受突变的密码子编码的残基)(参见例如Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008))和/或SDR(a-CDR)中进行此类改变,并测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建并从二级文库中重新选择的亲和力成熟已经例如在Hoogenboom等, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等编, Human Press, Totowa, NJ, (2001))中描述。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)中的任一种将多样性引入选用于成熟的可变基因中。然后产生二级文库。然后筛选文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一方法涉及HVR定向方法,其中使若干HVR残基(例如一次4-6个残基)随机化。可例如使用丙氨酸扫描诱变或模型化来特异性地鉴定抗原结合中涉及的HVR残基。特别是,经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0299] 在一些实施方案中,取代、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内,只要这样的改变基本上不降低抗体结合抗原的能力即可。例如,可在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如如本文所提供的保守性取代)。这样的改变可处于HVR“热点”或CDR以外。在以上提供的变体 V_H 序列的一些实施方案中,各HVR未被改变或含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0300] 一种可用于鉴定抗体中可以作为诱变靶位的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如由Cunningham和Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所描述。在这种方法中,鉴定某一残基或一组目标残基(例如带电荷残基,例如Arg、Asp、His、Lys和Glu)并用中性或带负电荷氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)代替以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始取代显示功能敏感性的氨基酸位置上引入其它取代。或者或另外,抗原-抗体复合物的晶体结构用来鉴定抗体与抗原之间的接触点。此类接触残基和相邻残基可作为取代的候选物而被靶向或消除。可筛选变体以确定其是否含有所需特性。

[0301] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的范围内的氨基末端和/或羧基末端融合,以及具有单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N末端或C末端与增加抗体的血清半衰期的酶(例如用于ADEPT)或多肽的融合。

[0302] b) 糖基化变体

[0303] 在一些实施方案中,改变本文提供的抗TIGIT构建体以提高或降低构建体糖基化的程度。对抗体添加糖基化位点或使抗体缺失糖基化位点可通过改变氨基酸序列以使得产生或除去一个或多个糖基化位点来便利地实现。

[0304] 当抗TIGIT构建体包含Fc区(例如,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白、PD-1×TIGIT MABP或PD-L1×TIGIT MABP)时,可以改变与其连接的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然

抗体通常包含一般通过N-键连接到Fc区的C_H2域的Asn297的分枝双触角(biantennary)寡糖。参见例如Wright等, TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可包括各种碳水化合物, 例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸, 以及连接到双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中, 可对本申请的抗TIGIT构建体中的寡糖进行修饰以产生具有某些改善特性的抗体变体。

[0305] 在一些实施方案中, 提供具有缺乏(直接或间接)连接到Fc区上的岩藻糖的碳水化合物结构的抗TIGIT构建体抗体变体。例如, 这样的抗体中的岩藻糖量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。如通过MALDI-TOF质谱法所测量, 通过相对于连接到Asn297的所有糖结构(例如复合、杂合和高甘露糖结构)的总和计算Asn297上的糖链内岩藻糖的平均量来测定岩藻糖的量, 如例如WO 2008/077546中所述。Asn297是指位于Fc区中大致位置297(Fc区残基的EU编号)上的天冬酰胺残基; 然而, Asn297也可由于抗体中的微小序列变化而位于位置297的上游或下游约±3个氨基酸处, 即在位置294与300之间。这样的岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公开号US 2003/0157108(Presta, L.); US2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。涉及“脱岩藻糖基化的”或“岩藻糖缺乏的”抗体变体的出版物的实例包括: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US2003/0115614; US 2002/0164328; US2004/0093621; US2004/0132140; US2004/0110704; US 2004/0110282; US2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki等, J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004); Yamane-Ohnuki等, Biotech.Bioeng.87:614(2004)。

[0306] 进一步提供具有二等分寡糖的抗TIGIT构建体变体, 例如其中连接到抗体的Fc区的双触角寡糖是由GlcNAc二等分。这样的抗体变体可具有降低的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。这样的抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等); 美国专利第6,602,684号(Umana等); 和US 2005/0123546(Umana等)。也提供了在连接到Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这样的抗体变体可具有改善的CDC功能。这样的抗体变体描述于例如WO 1997/30087(Patel等); WO 1998/58964(Raju, S.); 和WO 1999/22764(Raju, S.)。

[0307] c)Fc区变体

[0308] 在一些实施方案中, 可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的抗TIGIT构建体(例如, 抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白、PD-1×TIGIT MABP或PD-L1×TIGIT MABP)的Fc区, 从而产生Fc区变体。Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置包含氨基酸修饰(例如取代)的人类Fc区序列(例如, 人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。

[0309] 在一些实施方案中, 本申请涵盖具有一些但并非所有效应功能的抗TIGIT构建体(例如, 抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白、PD-1×TIGIT MABP或PD-L1×TIGIT MABP)变体, 这使得它成为其中抗TIGIT构建体的体内半衰期很重要但某些效应功能(例如补体和ADCC)是不必要或有害的应用的理想候选物。可进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的降低/减少。例如, 可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏FcγR结合(因此有可能缺乏ADCC活性), 但保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达FcγRIII, 而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。在Ravetch和Kinet, Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页上的表2中汇总了造血细胞上的FcR表达。

用于评估目标分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于美国专利第5,500,362号中(参见例如Hellstrom,I.等Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。或者,可采用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA);以及CytoTox96®非放射性细胞毒性测定(Promega,Madison,WI)。用于这些测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。或者或另外,可以在体内评估目标分子的ADCC活性,例如在动物模型中,例如公开于Clynes等Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中的动物模型中。也可进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q并且因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体活化,可以进行CDC测定。也可以使用本领域中已知的方法来进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定(参见例如Petkova,S.B.等,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0310] 具有降低的效应功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个的取代的那些(美国专利第6,737,056号)。这样的Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两处或更多处具有取代的Fc突变体,包括残基265和297取代成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利第7,332,581号)。

[0311] 与FcR的结合改善或削弱的某些抗体变体已有描述。(参见例如美国专利第6,737,056号;WO 2004/056312和Shields等,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001))。

[0312] 在一些实施方案中,抗TIGIT构建体变体包含具有一个或多个改善的ADCC的氨基酸取代(例如在Fc区的位置298、333和/或334(残基的EU编号)处的取代)的Fc区。

[0313] 在一些实施方案中,对Fc区做出改变,其导致改变的(即,改善的或降低的)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如,如描述于美国专利第6,194,551号、WO 99/51642和Idusogie等,J.Immunol.164:4178-4184(2000)中。

[0314] 在一些实施方案中,提供了抗TIGIT构建体(例如,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白、PD-1×TIGIT MABP或PD-L1×TIGIT MABP)变体,其包括包含一个或多个氨基酸取代的变体Fc区,所述取代增加半衰期和/或改善与新生儿Fc受体(FcRn)的结合。具有延长的半衰期和改善的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体描述于US2005/0014934A1(Hinton等)中,所述新生儿Fc受体(FcRn)负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等,J.Immunol.24:249(1994))。那些抗体包含其中具有改善Fc区与FcRn的结合的一个或多个取代的Fc区。这样的Fc变体包括在Fc区残基的一个或多个处具有取代的Fc变体,例如Fc区残基434的取代(美国专利第7,371,826号)。

[0315] 关于Fc区变体的其它实例,也参见Duncan和Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利第5,648,260号;美国专利第5,624,821号;和WO 94/29351。

[0316] 涵盖包含本文所述的任何Fc变体的抗TIGIT构建体(例如sdAb-Fc融合蛋白,与全长抗体融合的抗TIGIT sdAb,或本文所述的抗TIGIT MABP/BABP)或其组合。

[0317] d) 半胱氨酸工程化抗体变体

[0318] 在一些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸工程化抗TIGIT构建体,例如“thioMAB”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定实施方案中,取代的

残基存在于抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基团由此定位在抗体的可及位点处并且可用于使抗体结合至其它部分(例如药物部分或接头-药物部分)以产生如本文进一步所述的免疫结合物。在一些实施方案中,以下残基中的任何一个或多个可以被半胱氨酸取代:重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。可如例如美国专利第7,521,541号中所述来生成半胱氨酸工程化抗TIGIT构建体。

[0319] e) 抗体衍生物

[0320] 在一些实施方案中,可以进一步修饰本文中提供的抗TIGIT构建体以包含本领域已知并易于获得的额外非蛋白质部分。适于使抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、右旋糖酐、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、和右旋糖酐或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性可具有制造优势。所述聚合物可具有任何分子量,并且可为分支或未分支的。连接到抗体上的聚合物数目可以变化,并且如果连接超过一个聚合物,则它们可以是相同或不同的分子。一般来说,用于衍生化的聚合物的数量和/或类型可基于包括但不限于有待改善的抗体的具体特性或功能、抗体衍生物是否在限定条件下用于疗法等考虑因素来确定。

[0321] 在一些实施方案中,提供抗TIGIT构建体与可通过暴露于辐射而选择性加热的非蛋白质部分的结合物。在一些实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。辐射可具有任何波长,并且包括但不限于不损害普通细胞但会将非蛋白质部分加热至杀伤邻近于抗体-非蛋白质部分的细胞的温度的波长。

[0322] 在一些实施方案中,本文提供的抗TIGIT构建体(例如抗TIGIT sdAb、抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白、抗TIGIT/PD-1双特异性抗体、抗TIGIT/PD-L1双特异性抗体或抗TIGIT MABP(例如BABP))可以进一步修饰以包含一种或多种生物活性蛋白、多肽或其片段。如本文中可互换使用的“生物活性”或“生物学活性”是指在体内显示生物活性以实现特定功能。例如,它可以指与特定生物分子(例如蛋白质、DNA等)的组合,然后促进或抑制这种生物分子的活性。在一些实施方案中,生物活性蛋白质或其片段包括作为用于预防或治疗疾病或疾病的活性药物物质施用于患者的蛋白质和多肽,以及用于诊断目的的蛋白质和多肽,例如用于诊断测试或体外测定的酶,以及施用于患者以预防疾病的蛋白质和多肽例如疫苗。在一些实施方案中,生物活性蛋白质或其片段具有免疫刺激/免疫调节、膜转运或酶活性。在一些实施方案中,生物活性蛋白质、多肽或其片段是酶、激素、生长因子、细胞因子或其混合物。在一些实施方案中,生物学活性蛋白质、多肽或片段可以特异性识别靶标肽(例如抗原或其它蛋白质)。

[0323] 在一些实施方案中,可包含在本文所述的抗TIGIT构建体内的生物活性蛋白质或其片段是蛋白质结合蛋白质。在一些实施方案中,可以包含在本文所述的抗TIGIT构建体内的生物活性蛋白质或其片段是抗体模拟物,它们是包含令人联想到抗体的抗原结合域的小型工程化蛋白质(Geering和Fussenegger, Trends Biotechnol., 33(2):65-79, 2015)。这些分子源自现有人类支架蛋白并包含单一多肽。可包含在本文所述的抗TIGIT构建体内的示

例性抗体模拟物可以是但不限于：设计的锚蛋白重复蛋白 (DARPin；包含3-5个完全合成的锚蛋白重复序列，其侧接有N末端和C末端Cap域)、亲合力多聚体 (avimer；一种高亲和力蛋白质，其包含多个A结构域，每个结构域对靶标具有低亲和力)，或Anticalin(基于脂质运载蛋白的支架，具有四个可接近的环，每个环的序列可以是随机的)。在一些实施方案中，可包含在本文所述的抗TIGIT构建体内的生物活性蛋白或其片段是狢狢重复蛋白(例如， β -连环蛋白、 α -内输蛋白、斑珠蛋白、腺瘤性结肠息肉病蛋白 (APC))，其包含狢狢重复单元(长度约40个残基的特征性重复氨基酸序列)。每个狢狢重复序列由一对形成发夹结构的 α 螺旋组成。重复序列的多个拷贝形成所谓的 α 螺线管结构。狢狢重复蛋白能够结合不同类型的肽，依赖于肽骨架的恒定结合方式，而不需要特定的保守侧链或与肽的游离N末端或C末端的相互作用。通过残基识别肽残基的可能性，结合重复蛋白的内在模块性，使得狢狢重复蛋白成为用于设计用于肽结合的通用支架的有希望的候选物。

[0324] 在一些实施方案中，可包含在本文所述的抗TIGIT构建体内的生物学活性蛋白质或其片段是配体，例如与特定细胞受体相互作用的淋巴因子和细胞因子。淋巴因子是低分子量蛋白质，当抗原或凝集素刺激T细胞生长时，T细胞分泌这些蛋白质。

[0325] III. 药物组合物

[0326] 本申请还提供了包含任何一种抗TIGIT构建体的药物组合物，所述抗TIGIT构建体包含如本文所述的特异性识别TIGIT的sdAb(例如抗TIGIT sdAb、抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白、抗TIGIT/PD-1双特异性抗体(例如，PD-1 $\times$ TIGIT BABP)，或抗TIGIT/PD-L1双特异性抗体(例如，PD-L1 $\times$ TIGIT BABP))，以及任选地药学上可接受的载体。通过混合具有期望纯度的本文所述的抗TIGIT构建体与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol, A. 编(1980))以冻干制剂或水溶液形式制备药物组合物。

[0327] 药物组合物优选是稳定的，其中包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的抗TIGIT构建体在储存时基本上保持其物理和化学稳定性和完整性。可在选定温度下持续选定时期测量稳定性。为了快速筛选，可以将制剂在40℃下保持2周至1个月，此时测量稳定性。当制剂在2-8℃下储存时，通常制剂应在30℃或40℃下稳定至少1个月，和/或在2-8℃下稳定至少2年。当制剂在30℃下储存时，制剂通常应在30℃下稳定至少2年，和/或在40℃下稳定至少6个月。例如，储存期间的聚集程度可用作蛋白质稳定性的指标。在一些实施方案中，本文所述的抗TIGIT构建体的稳定制剂可包含少于约10% (优选少于约5%) 的作为制剂中聚集体存在的抗TIGIT构建体。

[0328] 可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒，并且包括缓冲剂，抗氧化剂，包括抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E、偏亚硫酸氢钠；防腐剂，等渗剂(例如氯化钠)，稳定剂，金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物)；螯合剂例如EDTA和/或非离子表面活性剂。

[0329] 生理上可接受的载体的实例包括缓冲剂，例如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六甲双铵、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯酚、丁醇或苄醇、对羟基苯甲酸烷酯(例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯)、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇以及间甲酚)；低分子量(小于约10个残基)多肽；蛋白质，例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，例如聚乙烯基

吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖以及其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐相对离子,例如钠离子;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,例如TWEENTM、聚乙二醇(PEG),和PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0330] 缓冲剂用于将pH控制在优化治疗效果的范围,特别是在稳定性取决于pH的情况下。缓冲剂优选以约50mM至约250mM范围的浓度存在。适用于本申请的缓冲剂包括有机酸和无机酸和其盐。例如,柠檬酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、草酸盐、乳酸盐、乙酸盐。另外,缓冲剂可包括组氨酸和三甲胺盐,例如Tris。

[0331] 添加防腐剂以阻止微生物生长,并且通常以0.2%-1.0%(w/v)的范围存在。添加防腐剂可以例如促进多用途(多剂量)制剂的生产。适用于本申请的防腐剂包括十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵(例如氯化物、溴化物、碘化物),苄索氯铵;硫柳汞,苯酚,丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇,3-戊醇和间甲酚。

[0332] 存在有时称为“稳定剂”的张力剂以调节或维持组合物中液体的张力。当与大的带电生物分子如蛋白质和抗体一起使用时,它们通常被称为“稳定剂”,因为它们可以与氨基酸侧链的带电基团相互作用,从而减少分子间和分子内相互作用的可能性。考虑到其它成分的相对量,张力剂可以以0.1重量%至25重量%、优选1重量%至5重量%的任何量存在。优选的张力剂包括多元糖醇,优选三元或更高级糖醇,例如甘油、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。

[0333] 另外的赋形剂包括可以作为以下一者或多者的试剂:(1)填充剂,(2)溶解度增强剂,(3)稳定剂和(4)防止变性或粘附到容器壁上的试剂。这些赋形剂包括:多元糖醇(上面列举);氨基酸,例如丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等;有机糖或糖醇,例如蔗糖、乳糖、乳糖醇、海藻糖、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、肌醇糖、肌醇、半乳糖、半乳糖醇、甘油、环醇(例如肌醇)、聚乙二醇;含硫还原剂,例如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙醇酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量蛋白质,例如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其它免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯基吡咯烷酮;单糖(例如,木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖);二糖(例如,乳糖、麦芽糖、蔗糖);三糖如棉子糖;以及多糖如糊精或葡聚糖。

[0334] 存在非离子表面活性剂或清洁剂(也称为“润湿剂”)以帮助溶解治疗剂以及保护治疗性蛋白免于搅动诱导的聚集,从而也允许制剂暴露于剪切表面应力而不会引起活性治疗蛋白质或抗体的变性。非离子表面活性剂的存在量为约0.05mg/ml至约1.0mg/ml,优选约0.07mg/ml至约0.2mg/ml。

[0335] 合适的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、40、60、65、80等),泊洛沙姆(184、188等), PLURONIC[®]多元醇, TRITON[®], 聚氧乙烯脱水山梨糖醇单醚(TWEEN[®]-20、TWEEN[®]-80等),聚桂醇(lauromacrogol)400,聚乙二醇40硬脂酸酯,聚氧乙烯氢化蓖麻油10、50和60,甘油单硬脂酸酯,蔗糖脂肪酸酯,甲基纤维素和羧甲基纤维素。可以使用的阴离子清洁剂包括月桂基硫酸钠、二辛基磺基琥珀酸钠和二辛基磺酸钠。阳离子清洁剂包括苯扎氯铵或苄索氯铵。

[0336] 为了使药物组合物用于体内施用,它们必须是无菌的。可通过无菌过滤膜过滤使

药物组合物无菌。通常将本文中的药物组合物放到具有无菌进入端口的容器中,例如具有通过皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。

[0337] 施用途径根据已知和可接受的方法,例如通过单次或多次推注或以合适的方式长时间输注,例如通过皮下、静脉内、腹膜内、肌肉内、动脉内、病灶内或关节内途径来注射或输注,局部施用,吸入或通过持续释放或延长释放方式。在一些实施方案中,局部(例如肿瘤内)施用药物组合物。

[0338] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有拮抗剂的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述半透性基质呈成形制品的形式,例如膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯,水凝胶(例如,聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯),或聚(乙烯醇)),聚交酯(美国专利第3,773,919号),L-谷氨酸与L-谷氨酸乙酯的共聚物,不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯,可降解的乳酸-乙醇酸共聚物,例如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0339] 本文中的药物组合物也可含有所治疗的特定适应症所需要的一种以上活性化合物,优选是具有互补活性并且不会对彼此有不利影响的化合物。或者或另外,组合物可包含细胞毒性剂,化学治疗剂,细胞因子,免疫抑制剂或生长抑制剂。这样的分子适合于以对于预定目的有效的量组合存在。

[0340] 活性成分也可截留在例如通过凝聚技术或通过界面聚合作用制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中、胶状药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中或粗乳液中。这些技术公开在Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版中。

[0341] 在一些实施方案中,药物组合物包含在一次性小瓶中,例如一次性密封小瓶。在一些实施方案中,药物组合物包含在多用途小瓶中。在一些实施方案中,药物组合物散装容纳在容器中。在一些实施方案中,药物组合物是冷冻保存的。

[0342] IV. 治疗TIGIT相关疾病的方法

[0343] 包含如本文所述的特异性识别TIGIT的sdAb部分的抗TIGIT构建体(例如抗TIGIT sdAb,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,抗TIGIT/PD-1双特异性抗体(例如PD-1×TIGIT BABP)或抗TIGIT/PD-L1双特异性抗体(例如PD-L1×TIGIT BABP)),及其组合物(例如药物组合物)可用于多种应用,例如诊断、分子测定和疗法。

[0344] 本发明的一个方面提供了治疗有需要的个体中的TIGIT相关疾病或疾患的方法,所述方法包括向个体施用有效量的包含本文所述的抗TIGIT构建体的药物组合物。在一些实施方案中,TIGIT相关疾病是癌症。在一些实施方案中,TIGIT相关疾病是病原性感染,例如病毒感染。在一些实施方案中,TIGIT相关疾病是免疫相关疾病。在一些实施方案中,免疫相关疾病与T细胞功能障碍病症相关。在一些实施方案中,T细胞功能障碍病症的特征在于T细胞耗竭。在一些实施方案中,免疫相关疾病选自以下组成的组:未解决的急性感染、慢性感染和肿瘤免疫。在一些实施方案中,本文所述的抗TIGIT构建体可用于增加、增强或刺激有需要的受试者中的免疫应答或功能。在一些实施方案中,TIGIT相关疾病(例如,癌症、免疫相关疾病)对PD-1或PD-L1阻断具有部分抗性(例如,对抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗具有部分抗性)。

[0345] 本发明部分涵盖了抗TIGIT蛋白构建体(例如抗TIGIT sdAb,抗TIGIT sdAb-Fc融

合蛋白,抗TIGIT/PD-1双特异性抗体(例如PD-1×TIGIT BABP),或抗TIGIT/PD-L1双特异性抗体(例如PD-L1×TIGIT BABP)),编码其的核酸分子或载体,包含编码其的核酸分子或载体的宿主细胞,其可以单独或以任何方式与另一种疗法组合施用,并且在至少一些方面中,与药学上可接受的载体或赋形剂一起施用。在一些实施方案中,在施用抗TIGIT构建体之前,它们可以与本领域众所周知的合适的药物载体和赋形剂组合。根据本公开内容制备的组合物可用于治疗或延迟癌症的恶化,或者增加、增强或刺激有需要的受试者的免疫应答或功能。

[0346] 在一些实施方案中,提供了治疗TIGIT相关疾病(例如,癌症、免疫相关疾病,例如与T细胞功能障碍相关的疾病)的方法,所述方法包括向个体施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含分离的抗TIGIT构建体,所述构建体包含特异性识别TIGIT的sdAb部分(例如抗TIGIT sdAb,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,抗TIGIT/PD-1双特异性抗体(例如PD-1×TIGIT BABP),或抗TIGIT/PD-L1双特异性抗体(例如PD-L1×TIGIT BABP)),其中抗TIGIT sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;以及任选地药学上可接受的载体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的 K_d 为约 10^{-5} M至约 10^{-12} M(例如约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,或约 10^{-8} M至约 10^{-12} M)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含 V_H 域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,TIGIT相关疾病是癌症。在一些实施方案中,癌症是实体肿瘤(例如结肠癌)。在一些实施方案中,TIGIT相关疾病是免疫相关疾病。在一些实施方案中,免疫相关疾病与T细胞功能障碍病症相关。在一些实施方案中,T细胞功能障碍病症的特征在于T细胞耗竭。在一些实施方案中,免疫相关疾病选自以下组成的组:未解决的急性感染、慢性感染和肿瘤免疫。在一些实施方案中,TIGIT相关疾病(例如,癌症、免疫相关疾病)对PD-1或PD-L1阻断具有部分抗性(例如,对抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗具有部分抗性)。在一些实施方案中,所述方法还包括向个体施用另外的疗法(例如,癌症疗法,例如手术、放射、化学疗法、免疫疗法、激素疗法或其组合)。在一些实施方案中,另外的疗法是免疫疗法,例如通过向个体施用有效量的包含免疫调节剂的第二药物组合物。在一些实施方案中,免疫调节剂是免疫检查点抑制剂,例如抗PD-1或抗PD-L1抗体。在一些实施方案中,全身(例如静脉内或腹膜内)施用药物组合物。在一些实施方案中,局部(例如肿瘤内)施用药物组合物。在一些实施方案中,个体是人类。在一些实施方案中,治疗癌症的方法具有以下一种或多种生物活性:(1)杀伤癌细胞(包括旁观者杀伤);(2)抑制癌细胞的增殖;(3)在肿瘤中诱导免疫应答;(4)减小肿瘤大小;(5)缓解具有癌症的个体的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移;(7)延长生存期;(8)延长癌症进展时间;(9)预防、抑制或降低癌症复发的可能性。在一些实施方案中,由本文所述的药物组合物介导的杀伤癌细胞的方法可以实现至少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或

95%以上中的任一者的肿瘤细胞死亡率。在一些实施方案中,由本文所述的药物组合物介导的杀伤癌细胞的方法可以实现至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或95%以上中的任一者的旁观者肿瘤细胞(例如,未被编码抗TIGIT构建体的溶瘤VV感染)死亡率。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物介导的减小肿瘤大小的方法可以减少至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)的肿瘤大小。在一些实施方案中,本文所述的药物组合物介导的抑制肿瘤转移的方法可以抑制至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一者)的转移。在一些实施方案中,由本文所述的药物组合物介导的延长个体(例如人类)存活的方法可以使个体的存活延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月中的任一者。在一些实施方案中,由本文所述的药物组合物介导的延长癌症进展时间的方法可以使癌症进展时间延长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周中的任一者。在一些实施方案中,治疗免疫相关疾病的方法可以增加、增强或刺激受试者中的免疫应答或功能。在一些实施方案中,通过活化效应细胞(例如,T细胞,例如CD8⁺和/或CD4⁺ T细胞),扩增(增加)效应细胞群,和/或杀伤靶细胞(例如,靶肿瘤细胞)来增加、增强和/或刺激受试者中的免疫应答或功能。在一些实施方案中,相对于施用包含本文所述的抗TIGIT构建体的药物组合物之前,个体中的CD4和/或CD8 T细胞增加或增强引发、活化、增殖、细胞因子释放和/或细胞溶解活性。在一些实施方案中,相对于施用包含本文所述的抗TIGIT构建体的药物组合物之前,CD4和/或CD8 T细胞的数量升高。在一些实施方案中,相对于施用包含本文所述的抗TIGIT构建体的药物组合物之前,活化的CD4和/或CD8 T细胞的数量升高。在一些实施方案中,活化的CD4和/或CD8 T细胞的特征在于相对于在施用包含本文所述抗TIGIT构建体的药物组合物之前,产生 γ -IFN⁺的CD4和/或CD8 T细胞和/或增强的细胞溶解活性。在一些实施方案中,CD4和/或CD8 T细胞展现出选自由IFN- γ 、TNF- α 和白介素组成的组的细胞因子的释放增加。在本发明方法的一些实施方案中,CD4和/或CD8 T细胞是效应记忆T细胞。在一些实施方案中,CD4和/或CD8效应记忆T细胞的特征在于产生 γ -IFN⁺的CD4和/或CD8 T细胞和/或增强的细胞溶解活性。在一些实施方案中,CD4和/或CD8效应记忆T细胞的特征在于具有CD44^高CD62L^低的表达。在一些实施方案中,癌症具有升高的T细胞浸润水平。

[0347] 本文描述的方法适用于治疗多种癌症,包括实体癌症和液体癌症。所述方法适用于所有阶段的癌症,包括早期癌症、非转移性癌症、原发性癌症、晚期癌症、局部晚期癌症、转移性癌症或缓解期癌症。本文描述的方法可以用作第一疗法、第二疗法、第三疗法或与本领域已知的其它类型的癌症疗法的组合疗法,例如化学疗法、手术、激素疗法、放射、基因疗法、免疫疗法(例如T细胞疗法或施用免疫调节剂)、骨髓移植、干细胞移植、靶向疗法、冷冻疗法、超声疗法、光动力疗法、射频消融等,在辅助环境或新辅助环境中(即,所述方法可以在初步/确定疗法之前进行)。在一些实施方案中,所述方法用于治疗先前已经治疗的个体。在一些实施方案中,癌症对于先前疗法是难以治愈的。在一些实施方案中,所述方法用于治疗先前未接受过治疗的个体。在一些实施方案中,癌症对PD-1或PD-L1阻断具有部分抗性(例如,对抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗具有部分抗性)。

[0348] 在一些实施方案中,所述方法适用于治疗具有异常TIGIT表达、活性和/或信号传导的癌症,作为非限制性实例,所述癌症包括非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肾细胞癌、结肠直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、间皮瘤、黑素瘤、头颈癌、甲状腺癌、肉

瘤、前列腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤(MM))、蕈样真菌病、梅克尔细胞癌(merkel cell cancer)和恶性血液病。

[0349] 因此,在一些实施方案中,提供了治疗免疫疗法应答性实体肿瘤(例如癌瘤或腺癌,例如具有异常TIGIT表达、活性和/或信号传导的癌症)的方法,所述方法包括向个体施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包含分离的抗TIGIT构建体,所述构建体包含特异性识别TIGIT的sdAb部分(例如抗TIGIT sdAb,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,抗TIGIT/PD-1双特异性抗体(例如PD-1×TIGIT BABP),或抗TIGIT/PD-L1双特异性抗体(例如PD-L1×TIGIT BABP)),其中所述sdAb部分包含CDR1,所述CDR1包含SEQ ID NO:36-42、54、56-59、63、65-67、69-70中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;CDR2,所述CDR2包含SEQ ID NO:106-112、124、126-129、133、135-137、139-140中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;和CDR3,所述CDR3包含SEQ ID NO:176-182、194、196-199、203、205-207、209-210中的任一者的氨基酸序列,或其包含至多约3个(例如约1个、2个或3个中的任一者)氨基酸取代的变体;以及任选地药学上可接受的载体。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分与TIGIT之间的结合的 K_d 为约 10^{-5} M至约 10^{-12} M(例如约 10^{-7} M至约 10^{-12} M,或约 10^{-8} M至约 10^{-12} M)。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分是骆驼科的、嵌合的、人类的、部分人源化的或完全人源化的。在一些实施方案中,抗TIGIT sdAb部分包含 V_H 域,其包含SEQ ID NO:253-259、271、273-276、280、282-284、286-287中的任一者的氨基酸序列。在一些实施方案中,癌症是实体肿瘤(例如结肠癌)。在一些实施方案中,全身(例如静脉内或腹膜内)施用药物组合物。在一些实施方案中,局部(例如肿瘤内)施用药物组合物。在一些实施方案中,所述方法还包括向个体施用另外的癌症疗法(例如手术、放射、化学疗法、免疫疗法、激素疗法或其组合)。在一些实施方案中,另外的疗法包括向个体施用有效量的第二药物组合物,其包含免疫调节剂,例如抗PD-1或抗PD-L1抗体。在一些实施方案中,个体是人类。在一些实施方案中,免疫疗法应答性实体肿瘤对PD-1或PD-L1阻断具有部分抗性(例如,对抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗具有部分抗性)。

[0350] 在一些实施方案中,所述方法适用于治疗具有异常PD-1或PD-L1/PD-L2表达、活性和/或信号传导的癌症,作为非限制性实例,所述癌症包括血液癌症和/或实体肿瘤。可以使用本发明的抗体抑制其生长的一些癌症包括通常对免疫疗法有反应的癌症。用于治疗的其他癌症的非限制性实例包括黑素瘤(例如转移性恶性黑素瘤)、肾癌(例如透明细胞癌)、前列腺癌(例如激素难治性前列腺癌)、乳腺癌、结肠癌和肺癌(例如非小细胞肺癌)。另外,本发明包括其生长可以使用本发明的抗体抑制的难治性或复发性恶性肿瘤。可以使用本发明的抗体治疗的其它癌症的实例包括骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门区域癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病(Hodgkin's Disease)、非霍奇氏金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病包括急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、儿童实体肿瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)赘瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症(包

括由石棉诱发的癌症)以及所述癌症的组合。本发明也可用于治疗转移性癌症,尤其是表达PD-L1的转移性癌症(Iwai等(2005) *Int. Immunol.* 17:133-144)。在一些实施方案中,具有异常PD-1或PD-L1/PD-L2表达、活性和/或信号传导的癌症对PD-1或PD-L1阻断具有部分抗性(例如,对抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体治疗具有部分抗性)。

[0351] 在一些实施方案中,本文所述的方法适用于治疗结肠直肠癌,例如腺癌,胃肠道类癌瘤,胃肠道间质瘤,平滑肌肉瘤,黑素瘤或鳞状细胞癌。

[0352] 本申请的药物组合物的剂量和所需药物浓度可根据设想的特定用途而变化。确定施用的适当剂量或途径完全在本领域普通技术人员的范围内。动物实验为人类疗法的有效剂量的确定提供可靠的指导。有效剂量的物种间类推可以遵循Mordenti, J. 和Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi等编, Pergamon Press, New York 1989, 第42-46页制定的原则来进行。

[0353] 当体内施用包含本文所述的抗TIGIT sdAb部分的抗TIGIT构建体(例如抗TIGIT sdAb, 抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白, 抗TIGIT/PD-1双特异性抗体(例如PD-1×TIGIT BABP)或抗TIGIT/PD-L1双特异性抗体(例如PD-L1×TIGIT BABP))时, 正常剂量可以从每天约10ng/kg至约100mg/kg哺乳动物体重或更大量变化, 优选约1mg/kg/天至10mg/kg/天, 例如约1-3mg/kg/天, 约2-4mg/kg/天, 约3-5mg/kg/天, 约4-6mg/kg/天, 约5-7mg/kg/天, 约6-8mg/kg/天, 约6-6.5mg/kg/天, 约6.5-7mg/kg/天, 约7-9mg/kg/天, 或约8-10mg/kg/天, 这取决于施用途。在本申请的范围内, 不同的制剂对于不同的治疗和不同的病症是有效的, 并且意图治疗特定器官或组织的施用可能需要不同于对另一种器官或组织的递送方式的递送。此外, 剂量可通过一个或多个单独的施用来施用, 或通过连续输注来施用。对于若干天或更长时间内的重复施用, 根据疾患, 持续进行治疗, 直至实现所需的疾病症状抑制为止。然而, 其它剂量方案可以是有用的。这种疗法的进展容易地通过常规技术和测定来监测。

[0354] 在一些实施方案中, 药物组合物是单次施用(例如推注)。在一些实施方案中, 药物组合物被施用多次(例如2、3、4、5、6或更多次中的任一者)。如果是多次施用, 则可以通过相同或不同的途径进行, 并且可以在同一部位或替代部位进行。药物组合物可以每周施用两次, 每周施用3次, 每周施用4次, 每周施用5次, 每日施用, 不中断地每日施用, 每周施用一次, 不中断地每周施用, 每2周施用一次, 每3周施用一次, 每月施用一次, 每2个月一次, 每3个月一次, 每4个月一次, 每5个月一次, 每6个月一次, 每7个月一次, 每8个月一次, 每9个月一次, 每10个月一次, 每11个月一次, 或每年一次。施用间隔可以是约24小时至48小时, 2天至3天, 3天至5天, 5天至1周, 1周至2周, 2周至1个月, 1个月至2个月, 2个月至3个月, 3个月至6个月, 或6个月至一年中的任一者。间隔也可以是不规则的(例如在肿瘤进展后)。在一些实施方案中, 给药方案没有中断。在一些实施方案中, 每4天施用组合物达4次。通过监测患者的疾病迹象并相应地调整治疗, 医学领域的技术人员可以容易地确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0355] 将本申请的药物组合物(包括但不限于复原和液体制剂)施用于需要用本文所述的抗TIGIT构建体(例如抗TIGIT sdAb, 抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白, 抗TIGIT/PD-1双特异性抗体(例如PD-1×TIGIT BABP), 或抗TIGIT/PD-L1双特异性抗体(例如PD-L1×TIGIT BABP))治疗的个体, 优选人类, 根据已知方法, 例如静脉内推注施用, 或在一段时间内连续

输注,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、静脉内(i.v.)、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径。通过将本文所述的冻干的抗TIGIT构建体溶解在稀释剂中以使蛋白质分散在各处,可以制备复原制剂。用于本申请的示例性药学上可接受的(对于人类施用是安全且无毒的)稀释剂包括但不限于无菌水,抑菌性注射用水(BWFI),pH缓冲溶液(例如磷酸盐-缓冲盐水),无菌盐水溶液,林格氏溶液或右旋糖溶液,或盐和/或缓冲剂的水溶液。

[0356] 在一些实施方案中,药物组合物通过皮下(即在皮肤下)施用来施用于个体。出于这些目的,可以使用注射器来注射药物组合物。然而,可以使用其它用于施用药物组合物的装置,例如注射装置;注射笔;自动注射器装置,无针装置;和皮下贴片递送系统。在一些实施方案中,将药物组合物静脉内施用于个体。在一些实施方案中,通过输注(例如静脉内输注)将药物组合物施用于个体。

[0357] V. 制备方法

[0358] 本文所述的抗TIGIT构建体(例如抗TIGIT sdAb,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,抗TIGIT/PD-1双特异性抗体(例如PD-1×TIGIT BABP)或抗TIGIT/PD-L1双特异性抗体(例如PD-L1×TIGIT BABP))可以使用本领域已知或如本文所述的任何方法制备。也参见实施例1、2、4和6。在一些实施方案中,提供了产生抗TIGIT构建体的方法,所述方法包括:(a)在有效表达所编码的抗TIGIT构建体的条件下培养包含编码本文所述的抗TIGIT构建体的分离核酸或载体的宿主细胞;以及(b)从所述宿主细胞中获得所表达的抗TIGIT构建体。在一些实施方案中,步骤(a)的方法还包括产生包含编码本文所述的抗TIGIT构建体的分离核酸或载体的宿主细胞。

[0359] 已经描述了制备sdAb的方法。参见例如Els Pardon等,Nature Protocol,2014;9(3):674。sdAb(例如V_HH)可以使用本领域已知的方法获得,例如通过对骆驼科物种(例如骆驼或美洲驼)进行免疫并从中获得杂交瘤,或通过使用本领域中已知的分子生物学技术克隆单域抗体文库,并且随后使用未选择的文库的单个克隆通过ELISA来选择或通过使用噬菌体展示。

[0360] 为了重组产生sdAb,将编码单域抗体的核酸分离并插入可复制的载体中以进一步克隆(DNA扩增)或用于表达。编码单域抗体的DNA容易分离并且使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合至编码抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)来测序。有很多载体可供使用。载体的选择部分取决于要使用的宿主细胞。通常,优选的宿主细胞来源于原核或真核(通常是哺乳动物)。在一些实施方案中,编码本文所述抗TIGIT构建体的分离核酸包含SEQ ID NO:246-252中的任一者的核酸序列。

[0361] 1. 在原核细胞中重组生产

[0362] a) 载体构建

[0363] 编码本申请的抗体的多核酸序列可使用标准重组技术获得。可以从产生抗体的细胞例如杂交瘤细胞中分离和测序所需的多核酸序列。或者,可以使用核苷酸合成仪或PCR技术合成多核苷酸。一旦获得,就将编码多肽的序列插入能够在原核宿主中复制和表达异源多核苷酸的重组载体中。本领域可获得和已知的许多载体可用于本发明的目的。适当载体的选择主要取决于待插入载体中的核酸的大小和待用载体转化的特定宿主细胞。每个载体含有不同组分,这取决于其功能(异源多核苷酸的扩增或表达,或两者)和与其所在的特定宿主细胞的相容性。载体组分通常包括但不限于:复制起点、选择标志基因、启动子、核糖

体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入物和转录终止序列。

[0364] 通常,含有复制子和控制序列的质粒载体与这些宿主一起使用,所述复制子和控制序列源自与宿主细胞相容的物种。载体通常携带复制位点以及能够提供在转化的细胞中进行表型选择的标志序列。

[0365] 另外,含有与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体可以作为转化载体与这些宿主一起使用。例如,噬菌体例如GEM™-11可用于制备重组载体,所述载体可用于转化感受态宿主细胞,例如大肠杆菌LE392。

[0366] 本申请的表达载体可包含两个以上的启动子-顺反子对,其编码每种多肽组分。启动子是位于调节其表达的顺反子上游(5')的非翻译调节序列。原核启动子通常分为两类,诱导型和组成型。诱导型启动子是一种这样的启动子,其响应于培养条件的变化,例如营养素的存​​在与否或温度的变化,启动在其控制下的顺反子的转录水平的增加。

[0367] 许多由多种潜在宿主细胞识别的启动子是众所周知的。通过经由限制酶消化从源DNA中除去启动子并将分离的启动子序列插入本申请的载体中,可以将选择的启动子与编码轻链或重链的顺反子DNA可操作地连接。天然启动子序列和许多异源启动子都可用于指导目标基因的扩增和/或表达。在一些实施方案中,利用异源启动子,因为与天然目标多肽启动子相比,它们通常允许所表达的目标基因的更多转录和更高产量。

[0368] 适用于原核宿主的启动子包括PhoA启动子,-半乳糖酶和乳糖启动子系统,色氨酸(trp)启动子系统和杂合启动子例如tac或trc启动子。然而,在细菌中起作用的其它启动子(例如其它已知的细菌或噬菌体启动子)也是合适的。其核酸序列已经公布,从而使本领域技术人员可操作地使用接头或衔接子将它们连接到编码靶标轻链和重链的顺反子(Siebenlist等(1980)Cell 20:269)以提供任何所需的限制性位点。

[0369] 在一个方面,重组载体内的每个顺反子包含分泌信号序列组分,其指导所表达的多肽跨膜转运。一般来说,信号序列可以是载体的组分,或者其可以是插入载体中的目标多肽DNA的一部分。出于本发明目的选择的信号序列应该是宿主细胞识别和处理(即被信号肽酶切割)的信号序列。对于不能识别和处理异源多肽原生的信号序列的原核宿主细胞,信号序列被原核信号序列取代,所述原核信号序列选自例如由以下组成的组:碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或热稳定肠毒素II(STII)前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA和MBP。在本申请的一些实施方案中,在表达系统的两个顺反子中使用的信号序列是STII信号序列或其变体。

[0370] 在一些实施方案中,根据本申请的抗TIGIT构建体的产生可以发生在宿主细胞的细胞质中,因此不需要在每个顺反子内存在分泌信号序列。在一些实施方案中,多肽组分,例如编码任选地与第一抗原结合部分融合的第二抗原结合部分的V_H域的多肽,和编码任选地与第一抗原结合部分融合的第二抗原结合部分的V_L域的多肽在细胞质内表达、折叠和组装以形成功能性抗体。某些宿主菌株(例如,大肠杆菌trxB⁻菌株)提供有利于二硫键形成的细胞质条件,从而允许所表达的蛋白质亚基的正确折叠和组装。Proba和Pluckthun Gene, 159:203(1995)。

[0371] 本发明提供了一种表达系统,在所述表达系统中可以调节所表达的多肽组分的定量比,以使本申请的抗体的分泌和适当组装的产量最大化。这种调节至少部分地通过同时调节多肽组分的翻译强度来实现。在Simmons等的美国专利第5,840,523号中公开了一种调节翻译强度的技术。它利用顺反子内的翻译起始区(TIR)的变体。对于给定的TIR,可以产生

具有一系列翻译强度的一系列氨基酸或核酸序列变体,从而提供方便的手段,藉以调整这种因子以获得特定链的所需表达水平。TIR变体可以通过常规诱变技术产生,其导致密码子变化,从而可以改变氨基酸序列,但核酸序列中的沉默变化是优选的。TIR的改变可包括例如Shine-Dalgarno序列的数量或间隔的改变,以及信号序列的改变。产生突变信号序列的一种方法是在编码序列开始时产生“密码子库”,其不改变信号序列的氨基酸序列(即,变化是沉默的)。这可以通过改变每个密码子的第三个核苷酸位置来实现;另外,一些氨基酸(例如亮氨酸、丝氨酸和精氨酸)具有多个第一和第二位置,从而可能增加制造库的复杂性。

[0372] 优选地,产生具有针对其中每个顺反子的TIR强度范围的载体集合。这种有限集合提供了在各种TIR强度组合下各链表达水平以及所需蛋白质产物的产率的比较。TIR强度可以通过定量报告基因的表达水平来确定,如Simmons等的美国专利第5,840,523号中所详细描述。基于翻译强度比较,选择期望的个别TIR以在本申请的表达载体构建体中组合。

[0373] b) 原核宿主细胞

[0374] 适用于表达本申请的抗体的原核宿主细胞包括古细菌(Archaeobacteria)和真细菌(Eubacteria),例如革兰氏阴性(Gram-negative)或革兰氏阳性(Gram-positive)生物。有用细菌的实例包括埃希氏菌属(*Escherichia*) (例如大肠杆菌)、芽孢杆菌属(*Bacilli*) (例如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*))、肠杆菌(*Enterobacteria*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种(例如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*))、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、变形杆菌(*Proteus*)、志贺氏菌(*Shigella*)、根瘤菌(*Rhizobia*)、透明颤菌(*Vitreoscilla*)或副球菌(*Paracoccus*)。在一些实施方案中,使用革兰氏阴性细胞。在一些实施方案中,大肠杆菌细胞用作本发明的宿主。大肠杆菌菌株的实例包括菌株W3110及其衍生物,包括具有基因型W3110 *AphuA* (*AtonA*) *ptr3* *lac Iq* *lacL8AompT A* (*nmpc-fepE*) *degP41* *kan^R*的菌株33D3(美国专利第5,639,635号)。其它菌株及其衍生物,例如大肠杆菌294(ATCC 31,446)、大肠杆菌B、大肠杆菌1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌RV308(ATCC 31,608)也是合适的。这些实施例是说明性的而非限制性的。考虑到复制子在细菌细胞中的可复制性,通常需要选择适当的细菌。例如,当众所周知的质粒例如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410用于提供复制子时,大肠杆菌、沙雷氏菌或沙门氏菌属物种可适合用作宿主。

[0375] 通常,宿主细胞应分泌最少量的蛋白水解酶,并且可以理想地将另外的蛋白酶抑制剂掺入细胞培养物中。

[0376] c) 蛋白质生产

[0377] 宿主细胞用上述表达载体转化,并在被调节为适合诱导启动子、筛选转化子或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中培养。转化意味着将DNA引入原核宿主中,使得DNA可以作为染色体外元件或通过染色体整合体来复制。取决于所用的宿主细胞,使用适合于这类细胞的标准技术进行转化。使用氯化钙的钙处理通常用于含有大量细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法使用聚乙二醇/DMSO。使用的另一种技术是电穿孔。

[0378] 宿主细胞用上述表达载体转化,并在被调节为适合诱导启动子、筛选转化子或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中培养。转化意味着将DNA引入原核宿主中,使得DNA可以作为染色体外元件或通过染色体整合体来复制。取决于所用的宿主细胞,使用适合于这类细胞的标准技术进行转化。使用氯化钙的钙处理通常用于含有大量细胞壁屏障的细

菌细胞。另一种转化方法使用聚乙二醇/DMSO。使用的另一种技术是电穿孔。

[0379] 用于产生本申请的抗体的原核细胞在本领域已知并适于培养所选择的宿主细胞的培养基中生长。合适的培养基的实例包括luria肉汤 (LB) 加必需的营养补充剂。在一些实施方案中,培养基也含有基于表达载体的构建来选择的选择剂,以选择性地允许含有表达载体的原核细胞的生长。例如,将氨苄青霉素添加到培养基中以便表达氨苄青霉素抗性基因的细胞生长。

[0380] 除了碳、氮和无机磷酸盐源之外的任何必要的补充物也可以以适当浓度包括在内,所述补充物单独或作为与另一种补充物或培养基的混合物(例如复合氮源)引入。任选地,培养基可含有一种或多种选自由谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙酸盐、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇组成的群的还原剂。原核宿主细胞在合适的温度下培养。例如,对于大肠杆菌生长,优选的温度范围是约20℃至约39℃,更优选约25℃至约37℃,甚至更优选在约30℃。培养基的pH可以是约5至约9的任何pH,主要取决于宿主生物。对于大肠杆菌,pH优选为约6.8至约7.4,并且更优选为约7.0。

[0381] 如果在本申请的表达载体中使用诱导型启动子,则在适于活化启动子的条件下诱导蛋白质表达。在本申请的一个方面中,PhoA启动子用于控制多肽的转录。因此,转化的宿主细胞在用于诱导的磷酸盐限制培养基中培养。优选地,磷酸盐限制培养基是C.R.A.P培养基。根据所用的载体构建体,可以使用多种其它诱导物,如本领域已知的。

[0382] 本申请的表达的抗TIGIT构建体被分泌到宿主细胞的周质中并从宿主细胞的周质中回收。蛋白质回收通常涉及破坏微生物,通常通过例如渗透压休克、超声处理或裂解的方式破坏微生物。一旦细胞被破坏,可通过离心或过滤除去细胞碎片或全细胞。蛋白质可以进一步纯化,例如,通过亲和树脂色谱法。或者,可将蛋白质转运到培养基中并在其中分离。可以从培养物中除去细胞,并且过滤培养上清液并浓缩,以进一步纯化所产生的蛋白质。经表达的多肽可以使用通常已知的方法进一步分离和鉴定,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和蛋白质印迹测定。

[0383] 或者,通过发酵过程大量进行蛋白质生产。各种大规模补料分批发酵程序可用于生产重组蛋白。大规模发酵具有至少1000升容量,优选约1,000至100,000升容量。这些发酵罐使用搅拌器叶轮来分配氧气和营养物质,尤其是葡萄糖(优选的碳/能源)。小规模发酵通常是指发酵罐中的发酵,其体积容量不超过约100升,并且可以在约1升至约100升的范围内。

[0384] 在发酵过程中,蛋白质表达的诱导通常在细胞已经在合适条件下生长至所需密度(例如OD₅₅₀为约180-220)后开始,在所述阶段细胞处于早期稳定期。根据所用的载体构建体,可以使用多种诱导物,如本领域已知和如上所述。细胞可以在诱导前生长更短的时间。细胞通常诱导约12-50小时,但可以使用更长或更短的诱导时间。

[0385] 为了提高本申请的抗体的产量和质量,可以改变各种发酵条件。例如,为了改善所分泌多肽的正确组装和折叠,过表达分子伴侣蛋白例如Dsb蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD和/或DsbG)或FkpA(具有伴侣蛋白活性的肽基脯氨酰顺式,反式-异构酶)的其它载体可用于共转化宿主原核细胞。已证明伴侣蛋白促进细菌宿主细胞中产生的异源蛋白质的正确折叠和溶解性。

[0386] 为了使表达的异源蛋白质(特别是蛋白水解敏感的蛋白质)的蛋白水解最小化,某

些缺乏蛋白水解酶的宿主菌株可用于本发明。例如,可以修饰宿主细胞株以在编码已知细菌蛋白酶的基因中实现基因突变,例如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其组合。

[0387] 缺乏蛋白水解酶并用过表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株可用作编码本申请抗体的表达系统中的宿主细胞。

[0388] d) 蛋白质纯化

[0389] 进一步纯化本文产生的抗TIGIT构建体以获得基本上同质的制剂用于进一步的测定和用途。可以使用本领域已知的标准蛋白质纯化方法。以下程序是合适的纯化程序的示例:在免疫亲和或离子交换柱上分级,乙醇沉淀,反相HPLC,在二氧化硅上或在阳离子交换树脂如DEAE上的色谱法,色谱聚焦,SDS-PAGE,硫酸铵沉淀,以及使用例如Sephadex G-75的凝胶过滤。

[0390] 在一些实施方案中,固定在固相上的蛋白A用于包含本申请Fc区的抗体的免疫亲和纯化。蛋白A是来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的411(D细胞壁蛋白,其与抗体的Fc区以高亲和力结合。Lindmark等(1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13。固定有蛋白A的固相优选为包含玻璃或二氧化硅表面的柱,更优选为受控孔径玻璃柱或硅胶柱。在一些应用中,柱已经涂覆有试剂,例如甘油,以试图防止污染物的非特异性粘附。然后洗涤固相以除去非特异性结合至固相的污染物。最后,通过洗脱从固相中回收目标抗体。

[0391] 2. 在真核细胞中重组生产

[0392] 对于真核表达,载体组分通常包括但不限于以下一种或多种:信号序列、复制起点、一种或多种标志基因,以及增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0393] a) 信号序列组分

[0394] 用于真核宿主的载体也可以是插入物,其编码信号序列或在成熟蛋白质或多肽的N末端具有特异性切割位点的其它多肽。选择的异源信号序列优选是被宿主细胞识别和处理(即被信号肽酶切割)的信号序列。在哺乳动物细胞表达中,可获得哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列,例如单纯疱疹gD信号。

[0395] 将所述前体区的DNA以读码框连接到编码本申请抗体的DNA上。

[0396] b) 复制起点

[0397] 通常,哺乳动物表达载体不需要复制起点组分(通常使用SV40起点仅因为它含有早期启动子)。

[0398] c) 选择基因组分

[0399] 表达和克隆载体可含有选择基因,也称为可选择标志物。典型的选择基因编码的蛋白质(a)赋予对抗生素或其它毒素例如氨苄青霉素、新霉素、氨甲蝶呤或四环素的抗性,(b)补充营养缺陷型缺陷,或(c)提供复杂培养基无法获得的关键营养素,例如编码用于芽孢杆菌D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0400] 选择方案的一个实例利用药物来阻止宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞产生赋予抗药性的蛋白质,从而在选择方案中存活。这种显性选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0401] 适用于哺乳动物细胞的可选择标志物的另一个实例是能够鉴定能够摄取编码本申请抗体的核酸的细胞的那些可选择标志物,例如DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白-I和-II、优

选灵长类动物金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0402] 例如,首先通过在含有氨甲蝶呤(Mtx)(DHFR的竞争性拮抗剂)的培养基中培养所有转化体来鉴定用DHFR选择基因转化的细胞。当采用野生型DHFR时,适当的宿主细胞是DHFR活性缺失的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系(例如ATCC CRL-9096)。

[0403] 或者,用编码多肽的DNA序列、野生型DHFR蛋白和另一种可选择标志物如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)转化或共转化的宿主细胞(特别是含有内源DHFR的野生型宿主)可以通过在含有针对可选择标志物的选择剂的培养基中进行细胞生长来选择,所述选择剂例如氨基糖苷类抗生素,例如卡那霉素、新霉素或G418。

[0404] d) 启动子组分

[0405] 表达和克隆载体通常含有由宿主生物识别并且可操作地连接至编码所需多肽序列的核酸的启动子。事实上所有的真核基因均具有富含AT的区,所述区位于转录起始位点的上游大约25至30个碱基处。在许多基因的转录开始的上游70至80个碱基处发现的另一个序列是CNCAAT区,其中N可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的3'端的是AATAAA序列,其可以是用于将poly A尾添加到编码序列的3'端的信号。所有这些序列可以插入到真核表达载体中。

[0406] 适用于原核宿主的其它启动子包括phoA启动子、-内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶启动子、色氨酸(trp)启动子系统和杂合启动子如tac启动子。然而,其它已知的细菌启动子也是合适的。用于细菌系统中的启动子也可含有可操作地连接于编码抗体的DNA的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。

[0407] 来自哺乳动物宿主细胞中的载体的多肽转录例如通过以下各者来控制:从例如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(例如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、B型肝炎病毒且最优选猿猴病毒40(SV40)的病毒的基因组获得的启动子,异源哺乳动物启动子(例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子),热休克启动子,条件是这些启动子与宿主细胞系统相容。

[0408] SV40病毒的早期和晚期启动子可方便地作为SV40限制性片段获得,所述片段也含有SV40病毒复制起点。人类巨细胞病毒的立即早期启动子可方便地作为HindIII E限制性片段获得。使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达DNA的系统在美国专利第4,419,446号中公开。这种系统的改进在美国专利第4,601,978号中描述。关于在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子控制下的小鼠细胞中人类干扰素cDNA的表达,也参见Reyes等, Nature 297:598-601(1982)。或者,劳斯肉瘤病毒长末端重复序列可以用作启动子。

[0409] e) 增强子元件组分

[0410] 通过将增强子序列插入载体中,通常可以提高高等真核生物对编码本申请抗体的DNA的转录。现在已知许多来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的增强子序列。然而,通常,人们将使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括复制起点(100-270bp)的后侧上的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点的后侧上的多瘤增强子和腺病毒增强子。增强子可在多肽编码序列的5'或3'位剪接到载体中,但优选位于启动子的5'位点。

[0411] f) 转录终止组分

[0412] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人类或来自其它多细胞生物的

有核细胞)中的表达载体也将含有终止转录和稳定mRNA所必需的序列。这样的序列通常可从真核或病毒DNA或cDNA的5'和偶尔3'非翻译区中获得。这些区域含有转录为多肽编码mRNA的非翻译部分中的聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种可用的转录终止组分是牛生长激素聚腺苷酸化区。参见W094/11026和在其中公开的表达载体。

[0413] g) 宿主细胞的选择和转化

[0414] 用于在本文载体中克隆或表达DNA的合适宿主细胞包括本文所述的高等真核细胞,包括脊椎动物宿主细胞。脊椎动物细胞在培养物(组织培养物)中的繁殖已成为常规程序。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651);人类胚肾细胞系(亚克隆以便在悬浮培养中生长的293或293细胞, Graham等, J. Gen Virol. 36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980));小鼠塞特利氏细胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人类宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);水牛鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);人类肺细胞(W138, ATCC CCL75);人类肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TR1细胞(Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞;以及人类肝细胞瘤细胞系(Hep G2)。

[0415] 宿主细胞被用于产生抗体的上述表达或克隆载体转化并且在经适当改良以诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中培养。

[0416] h) 培养宿主细胞

[0417] 用于产生本发明的抗体的宿主细胞可在多种培养基中培养。例如Ham's F10 (Sigma)、最低必需培养基((Minimal Essential Medium/MEM), (Sigma))、RPMI-1640 (Sigma)和杜氏改良依格氏培养基((Dulbecco's Modified Eagle's Medium/DMEM), Sigma)的市售培养基适用于培养宿主细胞。必要时培养基都可补充有激素和/或其它生长因子(例如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(例如氯化钠、钙、镁、和磷酸盐)、缓冲剂(例如HEPES)、核苷酸(例如腺苷和胸苷)、抗生素(例如GENTAMYCINTM药物)、痕量元素(定义为通常在微摩尔浓度范围内的最终浓度存在的无机化合物)以及葡萄糖或等效能量源。也可以以本领域技术人员已知的适当浓度包括任何其它必需的补充剂。培养条件,例如温度、pH等,是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些,并且对于本领域普通技术人员来说是显而易见的。

[0418] i) 蛋白质纯化

[0419] 当使用重组技术时,抗体可在细胞内在周质空间中产生,或直接分泌到培养基中。如果抗体在细胞内产生,则作为第一个步骤,例如通过离心或超滤去除微粒状碎片(宿主细胞或裂解的片段)。Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992)描述了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的程序。简言之,在约30分钟内在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)存在下解冻细胞糊状物。可以通过离心除去细胞碎片。当抗体被分泌至培养基中时,通常首先使用市售蛋白质浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)浓缩来自这些表达系统的上清液。可在任何前述步骤中纳入蛋白酶抑制剂如PMSF以抑制蛋白水解并且可纳入抗生素以防止外来污染物的生长。

[0420] 由细胞制备的蛋白质组合物可以使用例如羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析和亲和色谱法来纯化,亲和色谱法是优选的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适合性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于含有1、2或4条重链的人类免疫球蛋白的抗体。蛋白G被推荐用于所有小鼠同种型和人类3个同种型。亲和配体所附接的基质最通常是琼脂糖,但也可用其它基质。机械稳定的基质,例如受控孔径玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯基)苯,允许比使用琼脂糖可实现的更快的流动速率和更短的处理时间。在抗体包含C_H3结构域的情况下,Bakerbond ABXTM树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)适用于纯化。根据待回收的抗体,其它蛋白质纯化技术例如离子交换柱上的分级、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅色谱法、肝素SEPHAROSE™色谱法、阴离子或阳离子交换树脂(例如聚天冬氨酸柱)色谱法、色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀也是可用的。

[0421] 在任何初步纯化步骤之后,可以使包含目标抗体和污染物的混合物经受使用pH在约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液的低pH疏水相互作用色谱法,所述色谱法优选在低盐浓度(例如,约0-0.25M盐)下进行。

[0422] 3. 多克隆抗体

[0423] 通常通过多次皮下(s.c.)或腹膜内(i.p.)注射相关抗原和佐剂在动物中产生多克隆抗体。使用双功能性或衍生化药剂将相关抗原结合到在待免疫的物种中具免疫原性的蛋白质(例如,钥孔虫血蓝蛋白(KLH)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、或大豆胰蛋白酶抑制剂)可能是有用的,所述双功能性或衍生化药剂例如马来酰亚胺苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基结合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl₂或R¹N=C=NR,其中R和R¹独立地是低级烷基。可采用的佐剂的实例包括弗氏完全佐剂和MPL-TDM佐剂(单磷酸脂质A、合成海藻糖二霉菌酸酯(trehalose dicorynomycolate))。免疫方案可由本领域技术人员选择而无需过多的实验。

[0424] 通过将例如100μg或5μg的蛋白质或结合物(分别针对兔或小鼠)与3个体积的弗氏完全佐剂组合并且在多个部位处皮内注射溶液来针对抗原、免疫原性结合物或衍生物对动物进行免疫。一个月后,通过在多个部位皮下注射,用1/5至1/10的初始量的于弗氏完全佐剂中的肽或结合物对动物加强免疫。七至十四天后,对动物进行放血,测定血清的抗体滴度。对动物加强免疫,直至滴度达到稳定为止。结合物也可在重组细胞培养物中制成蛋白质融合体。另外,聚集剂(例如明矾)适于增强免疫应答。也参见实施例1的骆驼中的免疫接种。

[0425] 4. 单克隆抗体

[0426] 单克隆抗体从基本上均质的抗体的群体获得,即构成所述群体的个体抗体是相同的,除了可能以微量存在的天然存在的突变和/或翻译后修饰(例如,异构化、酰胺化)之外。因此,修饰语“单克隆”指示如并非分散抗体的混合物的抗体的特征。例如,单克隆抗体可使用最初由Kohler等,Nature 256:495(1975)描述的杂交瘤方法制备,或者可通过重组DNA方法(美国专利第4,816,567号)制备。在杂交瘤方法中,使小鼠或其它适当的宿主动物(例如仓鼠或美洲驼)如上文所述那样免疫以得到产生或能够产生将特异性结合用于免疫的蛋白质的抗体的淋巴细胞。或者,可以体外免疫淋巴细胞。然后使用合适的融合剂(例如聚乙二醇)使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103页(Academic Press, 1986))。也参见实施例1的骆驼中的免疫接种。

[0427] 免疫剂通常包括抗原蛋白或其融合变体。一般来说,如果需要人类来源的细胞,则使用外周血淋巴细胞(“PBL”),或者如果需要非人类哺乳动物来源的细胞,则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用合适的融合剂(例如聚乙二醇)使淋巴细胞与永生化细胞系融合以形成杂交瘤细胞。Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), 第59-103页。

[0428] 永生化细胞系通常是经过转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物、牛和人类来源的骨髓瘤细胞。通常,采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。接种由此制备的杂交瘤细胞,并且使其在优选地含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质的合适培养基中生长。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺少酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT培养基),它们是防止HGPRT缺陷细胞生长的物质。

[0429] 优选的永生化骨髓瘤细胞是有效地融合、支持通过产生所选抗体的细胞稳定高水平地产生抗体并且对培养基(例如HAT培养基)敏感的那些骨髓瘤细胞。在这些中,优选的是鼠类骨髓瘤系,例如源自MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤(可从Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA获得)的那些细胞系以及SP-2细胞(及其衍生物,例如X63-Ag8-653)(可从American Type Culture Collection, Manassas, Va. USA获得)。

[0430] 测定杂交瘤细胞生长所处的培养基中针对抗原的单克隆抗体的产生。优选地,通过免疫沉淀或通过体外结合测定(例如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来确定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0431] 可以测定培养杂交瘤细胞的培养基中是否存在针对所需抗原的单克隆抗体。优选地,通过免疫沉淀或通过体外结合测定(例如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来确定单克隆抗体的结合亲和力和特异性。这些技术和测定是本领域中已知的。例如,结合亲和力可以通过Munson等, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)的Scatchard分析来测定。

[0432] 在鉴定出产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞之后,可通过有限稀释程序对克隆进行亚克隆并且通过标准方法使其生长(Goding, 同上)。用于该目的的合适的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,杂交瘤细胞可作为肿瘤在哺乳动物中体内生长。

[0433] 由亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规免疫球蛋白纯化程序(例如蛋白A-琼脂糖、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法)从培养基、腹水或血清适当地分离。

[0434] 单克隆抗体也可以通过重组DNA方法制备。编码单克隆抗体的DNA容易分离并且使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合至编码鼠类抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)来测序。杂交瘤细胞充当这种DNA的优选来源。一旦分离,就可将DNA置于表达载体中,然后将其转染到宿主细胞(例如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞)中,所述细胞不另外产生免疫球蛋白,以便在这些重组宿主细胞中合成单克隆抗体。

[0435] 在另一个实施方案中,抗体可以从使用McCafferty等, *Nature*, 348:552-554 (1990)中所描述的技术生成的抗体噬菌体文库分离。Clackson等, *Nature*, 352:624-628

(1991)和Marks等, *J.Mol.Biol.*, 222:581-597 (1991) 分别描述了使用噬菌体文库的鼠类抗体和人类抗体的分离。随后的出版物描述通过链改组 (Marks等, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)), 以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略 (Waterhouse等, *Nucl.Acids.Res.* 21:2265-2266 (1993)) 生成高亲和性 (nM范围) 的人类抗体。因此, 这些技术为用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行备选方案。

[0436] DNA也可以被修饰, 例如, 通过用人类重链和轻链恒定域的编码序列代替同源鼠类序列 (美国专利第4,816,567号; Morrison等, *Proc.Natl Acad.Sci.USA*, 81:6851 (1984)), 或通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分共价连接至免疫球蛋白编码序列。通常, 这样的非免疫球蛋白多肽取代抗体的恒定域, 或者它们取代抗体的一个抗原组合位点的可变域以产生嵌合二价抗体, 所述嵌合二价抗体包括具有针对抗原的特异性的一个抗原组合位点和具有针对不同抗原的特异性的另一个抗原组合位点。

[0437] 本文所述的单克隆抗体可以是单价的, 其制备是本领域众所周知的。例如, 一种方法涉及免疫球蛋白轻链和修饰重链的重组表达。重链通常在Fc区中的任何点处截短, 以便防止重链交联。或者, 相关的半胱氨酸残基可使用另一种氨基酸残基取代或缺失以便防止交联。体外方法也适于制备单价抗体。消化抗体以产生其片段 (特别是Fab片段) 可使用本领域已知的常规技术来实现。

[0438] 嵌合或杂合抗体也可使用合成蛋白质化学中已知的方法 (包括涉及交联剂的那些方法) 在体外制备。例如, 免疫毒素可使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建。适用于该目的的试剂的实例包括亚氨基硫醇酯和4-巯基丁酰亚胺酸甲酯。

[0439] 关于单克隆sdAb生产, 也参见实施例1。

[0440] 5. 人源化抗体

[0441] 非人类 (例如鼠类) 抗体的人源化形式是包含源自非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段 (例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其它抗原结合亚序列)。人源化抗体包括其中来自接受者的CDR的残基被来自例如小鼠、大鼠、兔、骆驼科或美洲驼的非人类物种 (供体抗体) 的CDR的具有所需特异性、亲和力和能力的残基代替的人类免疫球蛋白 (受者抗体)。在一些情况下, 人类免疫球蛋白的FR框架残基被对应的非人类残基代替。人源化抗体也可包含既不存在于受者抗体中也不存在于输入CDR或框架序列中的残基。通常, 人源化抗体可以包含至少一个并且通常两个可变域的基本上全部, 其中全部或基本上全部的CDR区对应于非人类免疫球蛋白的那些CDR区并且全部或基本上全部的Fv区是人类免疫球蛋白共有序列的那些FR区。在一些实施方案中, 人源化抗体包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) (通常人类免疫球蛋白的恒定区) 的至少一部分。参见例如Jones等, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature* 332:323-329 (1988); 和Presta, *Curr.Op.Struct.Biol.* 2:593-596 (1992)。

[0442] 用于人源化非人类抗体的方法是本领域众所周知的。通常, 人源化抗体具有从非人类来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基经常被称为“输入”残基, 所述输入残基通常取自“输入”可变域。人源化可以基本上按照Winter和合作者的方法 (Jones等, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, *Science* 239:1534-1536 (1988)), 或者通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人类抗体的对应序列来进行。因此, 这些“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利第4,816,567

号),其中基本上小于完整的人类可变域被来自非人类物种的对应序列取代。实际上,人源化抗体通常是人类抗体,其中一些CDR残基和可能一些FR残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。

[0443] 用于制备人源化抗体的人类可变域轻链和重链两者的选择对于降低抗原性是非常重要的。根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知的人类可变域序列的整个文库筛选啮齿动物抗体的可变域的序列。然后接受最接近于啮齿动物的序列的人类序列作为人源化抗体的人类框架(FR)。Sims等,J.Immunol.,151:2296(1993);Chothia等,J.Mol.Biol.,196:901(1987)。另一种方法使用源自特定亚组的轻链或重链的全部人类抗体的共有序列的特定框架。相同的框架可用于若干不同的人源化抗体。

[0444] 此外重要的是,抗体被人源化成保留对抗原的高亲和力和其它有利的生物特性。为实现这一目标,根据优选方法,使用亲本序列和人源化序列的三维模型通过亲本序列和各种概念上人源化的产物的分析方法制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得并且本领域技术人员熟悉的。可获得计算机程序,其说明和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构。检查这些显示允许对残基在候选免疫球蛋白序列的功能方面的可能的作用进行分析,即,对影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基进行分析。以这种方式,可以从接受者和输入序列中选择并组合FR残基,从而实现所需的抗体特征,例如增加的对靶抗原的亲和力。通常,CDR残基直接并且最基本地参与影响抗原结合。

[0445] 在一些实施方案中,sdAb被修饰,例如人源化,而不降低所述结构域对抗原的天然亲和力,同时降低其对异源物种的免疫原性。例如,可以确定美洲驼抗体的抗体可变域(V_H)的氨基酸残基,并且例如在框架区中的一个或多个骆驼科氨基酸被其在人类共有序列中发现的人类对应物代替,所述多肽不失去其典型特征,即人源化不会显著影响所得多肽的抗原结合能力。骆驼科sdAb的人源化需要在单一多肽链中引入和诱变有限量的氨基酸。这与scFv、Fab'、(Fab')₂和IgG的人源化形成对比,其需要在两条链即轻链和重链中引入氨基酸变化以及两条链的组装的保存。

[0446] 6. 人类抗体

[0447] 作为人源化的替代方案,可产生人类抗体。例如,现在可能在内源性免疫球蛋白产生不存在下在免疫之后能够产生人类抗体的全谱的转基因动物(例如小鼠)。例如,已经描述了在嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合子缺失导致完全抑制内源性抗体产生。在这种种系突变体小鼠中转移人类种系免疫球蛋白基因阵列将在抗原攻击之后引起人类抗体的产生。

[0448] 或者,噬菌体展示技术可用于从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因谱在体外产生人类抗体和抗体片段。McCafferty等,Nature 348:552-553(1990);Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.227:381(1991)。根据该技术,将抗体V结构域基因同框克隆到丝状噬菌体(例如M13或fd)的主要或次要外壳蛋白基因中,并且在噬菌体颗粒的表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,所以基于抗体的功能特性进行选择也引起选择编码展现出这些特性的抗体的基因。因此,噬菌体模拟B细胞的一些特性。噬菌体展示可以以多种形式进行。V基因区段的几个来源可用于噬菌体展示。Clackson等,Nature 352:624-628(1991)从源自免疫小鼠的脾脏的V基因的小型随机组合文库分离多种不同阵列的抗噁唑酮抗体。可构建来自未免疫人类供体的V基因谱,并且可

基本上遵循由以下所述的技术分离针对多种不同阵列的抗原(包括自体抗原)的抗体: Marks等, *J.Mol.Biol.* 222:581-597(1991), 或Griffith等, *EMBO J.* 12:725-734(1993)。也参见美国专利第5,565,332号和第5,573,905号。

[0449] Cole等和Boerner等的技术也可用于制备人类单克隆抗体(Cole等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R.Liss, 第77页(1985)和Boerner等, *J.Immunol.*, 147(1):86-95(1991))。相似地,人类抗体可通过将人类免疫球蛋白基因座引入到转基因动物(例如,其中内源性免疫球蛋白基因部分地或完全地失活的小鼠)中来制备。在攻击之后,观察到人类抗体产生,这在所有方面(包括基因重排、组装和抗体谱)中与在人类中看到的非常相似。这种方法描述在例如美国专利第5,545,807号;第5,545,806号;第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;第5,661,016号;以及Marks等, *Bio/Technology* 10:779-783(1992);Lonberg等, *Nature* 368:856-859(1994);Morrison, *Nature* 368:812-813(1994);Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14:845-851(1996);Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996);Lonberg和Huszar, *Intern.Rev.Immunol.* 13:65-93(1995)。例如,在一些实施方案中,可以通过对人类HCAb小鼠进行免疫接种来产生人类抗体(例如人类DAb)。例如,HCAb(例如,sdAb-Fc融合蛋白)可以通过对转基因小鼠进行免疫接种来产生,其中已经消除了内源性鼠类抗体表达并且已经引入了人类转基因。HCAb小鼠在US8,883,150、US8,921,524、US8,921,522、US8,507,748、US8,502,014、US2014/0356908、US2014/0033335、US2014/0037616、US2014/0356908、US2013/0344057、US2013/0323235、US2011/0118444和US2009/0307787中公开,所有这些文献关于仅重链抗体和其在转基因小鼠中的产生的公开内容通过引用并入本文。对HCAb小鼠免疫接种并将得到的初免脾细胞与鼠类骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤。然后通过用人类序列取代鼠类CH2和CH3区,可以使得到的HCAb完全是人类的。

[0450] 最后,人类抗体也可以通过体外活化的B细胞(参见美国专利5,567,610和5,229,275)或通过使用本领域已知的各种技术产生,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom和Winter, *J.Mol.Biol.*, 227:381(1991);Marks等, *J.Mol.Biol.*, 222:581(1991))。

[0451] VI. 制品和试剂盒

[0452] 也提供了试剂盒和制品,其包含任何分离的抗TIGIT构建体(例如抗TIGIT sdAb, 抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白,PD-1×TIGIT双特异性构建体(例如BABP),PD-L1×TIGIT双特异性构建体(例如BABP)),编码其的分离核酸或载体,或分离的宿主细胞,其包含编码本文所述的抗TIGIT构建体的分离的核酸或载体。在一些实施方案中,提供了试剂盒,其包含本文所述的任何一种药物组合物,并且优选提供其使用说明。

[0453] 本申请的试剂盒处于合适的包装中。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶、罐、柔性包装(例如,密封的Mylar或塑料袋)等。试剂盒可任选地提供额外的组分,例如缓冲液和解释性信息。因此,本申请也提供了制品,其包括小瓶(例如密封小瓶)、瓶、罐、柔性包装等。

[0454] 制品可包含容器和容器上或与容器相关的标签或包装说明书。合适的容器包括瓶、小瓶、注射器等。容器可由多种材料(例如玻璃或塑料)形成。通常,容器保存对治疗本文所述的疾病或病症(例如癌症)有效的组合物并且可具有无菌进入端口(例如,容器可以是具有可经皮下注射用注射针刺破的塞子的静脉输液袋或小瓶)。标记或包装插页指示组合物用于治疗个体的特定疾患。标记或包装插页将还包括用于向个体施用组合物的说明书。

标签可以指示复原和/或使用的说明。容纳药物组合物的容器可以是多次使用的小瓶,其允许复原制剂的重复施用(例如2-6次施用)。包装插页是指习惯上包括于治疗产品的商业包装中的说明书,所述说明书含有关于适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或关于这些治疗产品使用的警告的信息。另外,制品可以进一步包括第二容器,其包含药学上可接受的缓冲液,例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。它还可以包括从商业和使用者观点来看期望的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0455] 试剂盒或制品可包括多个单位剂量的药物组合物和使用说明书,其包装量足以在药房,例如医院药房和配药药房中存储和使用。

[0456] 实施例

[0457] 以下实施例仅意图例示本发明,并且因此不应视为以任何方式限制本发明。提供以下实施例和详细描述是用于说明而非用于限制。

[0458] 实施例1:抗TIGIT sdAb的产生

[0459] 免疫接种

[0460] 在所有当前动物福利法规下,用重组TIGIT-Fc(Acrobiosystems)蛋白对骆驼进行免疫接种。为了免疫接种,将抗原配制成具有CFA(完全弗氏佐剂;初次免疫)或IFA(不完全弗氏佐剂;加强免疫)的乳液。在颈部皮下施用抗原。每只动物接受乳液(在CFA乳液中含有100 μ g的TIGIT-Fc)的5次注射,并且随后以2周的间隔进行TIGIT-Fc的IFA乳液的4次注射。在免疫接种期间的不同时间点,从动物收集10ml血液样品并制备血清。在使用固定化TIGIT-His蛋白的基于ELISA的实验中使用血清样品验证抗原特异性体液免疫应答的诱导(图1和图2),显示足够的应答引发,包括重链免疫球蛋白(HCAb)。最后一次免疫接种后5天,收集300ml血样。使用Ficoll-Paque梯度(Amersham Biosciences)从300ml血液样品中分离作为骆驼HCAb遗传来源的外周血淋巴细胞(PBL),产生 1×10^9 个PBL。

[0461] 文库构建

[0462] 从PBL提取的RNA用作RT-PCR的起始材料以扩增sdAb编码基因片段。将这些片段克隆到内部噬菌粒载体中。在与sdAb编码序列同框的情况下,所述载体编码C末端His-Tag。文库大小为约 6×10^8 。根据标准方案制备文库噬菌体,并在4 $^{\circ}$ C过滤灭菌后储存以供进一步使用。

[0463] 选择和高通量筛选

[0464] 使用固体淘选以及基于细胞的淘选,用上述文库进行选择。对这些两种情况仅进行了单轮选择。针对富集因子(相对于对照的在洗脱液中存在的噬菌体的数量)、多样性和TIGIT阳性克隆的百分比(ELISA)来分析每个选择输出物。基于这些参数,选取最佳选择用于进一步分析。为此,将每个选择的输出物作为汇集物来重新克隆到可溶性表达载体中以进行高通量筛选。在与sdAb编码序列同框的情况下,所述载体编码C末端His-Tag。挑取菌落并在96孔深孔板(1ml体积)中生长,并通过加入IPTG和0.1% Triton诱导上清液中的sdAb表达。

[0465] 分析上清液结合TIGIT蛋白(通过ELISA)和表达TIGIT的CHO-K1稳定细胞系(通过FACS)的能力。对阳性结合物进行测序并且选择独特的克隆用于进一步表征。

[0466] 独特的克隆在2XYT培养基中生长,并通过IPTG诱导上清液中的sdAb表达。分析独

特结合物的上清液抑制CD155与TIGIT之间相互作用的能力。为此,首先将表达TIGIT的稳定CHO细胞与含sdAb的上清液一起温育,然后与CD155-Fc (Acrobiosystems) 一起温育,接着与荧光团标记的抗人类Fc的第二抗体一起温育。与没有抗TIGIT sdAb阻断的样品相比,平均荧光强度(MFI)的变化代表CD155/TIGIT结合的阻断。

[0467] 选择所有潜在的抑制剂用于在BIAcore T200仪器上通过表面等离子体激元共振 (SPR) 来进行 K_D 分析。解离相用于计算每个个别sdAb的 k_{off} 值。

[0468] 实施例2:抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的制备和体外评估

[0469] sdAb-Fc融合蛋白的产生

[0470] 通过将抗TIGIT sdAb与人类IgG1 Fc区融合来产生抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白构建体。制备构建体的maxiprep用于CHO-K1细胞瞬时表达和纯化。表达的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白通过色谱法经由含有蛋白A琼脂糖树脂的柱来纯化。通过SEC-HPLC测定蛋白质纯度。通过Bristol-Myers Squibb产生的抗TIGIT抗体22G2,根据公布专利中的序列(参见US2016/0176963,SEQ ID NO:7和9)在人类IgG1主链中产生。阻断鼠类TIGIT的仓鼠抗体,10A7,根据在公布专利中报告的序列(参见US2015/0216970,SEQ ID NO:13和15)在人类IgG1主链中产生。

[0471] 通过表面等离子体激元共振 (SPR) 进行靶蛋白结合和跨物种反应测试

[0472] 利用BIAcore T200仪器通过SPR测定每种抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的亲合常数(K_D)。简言之,人类、食蟹猴或小鼠TIGIT-His蛋白(Acrobiosystems)以不高于100RU的密度与CM5传感器芯片进行胺偶联。以不少于5种不同浓度注射抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白。几种示例性抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的动力学资料总结于表3中。

[0473] 表3.非人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白对TIGIT的亲合力测定

	靶标	构建体	动力学参数		
			k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
[0474]	人类 TIGIT-His	AS19584-Fc	7.9E+05	4.3E-04	5.4E-10
		AS19886-Fc	1.0E+06	1.9E-03	1.9E-09
		AS20160-Fc	6.8E+05	1.9E-03	2.7E-09
		22G2	1.4E+06	2.7E-04	1.9E-10
[0474]	食蟹猴 TIGIT-His	AS19584-Fc	2.7E+05	1.4E-02	5.1E-08
		AS19886-Fc	1.9E+05	1.6E-02	8.2E-08
		AS20160-Fc	1.3E+05	2.5E-02	2.0E-07
		22G2	2.0E+06	6.8E-03	3.4E-09
[0474]	小鼠 TIGIT-His	AS19584-Fc	1.4E+06	7.2E-04	5.0E-10
		AS19886-Fc	/	/	/
		AS20160-Fc	/	/	/
		22G2	/	/	/

[0475] 通过FACS分析CHO-TIGIT细胞结合和配体结合的抑制

[0476] 为了确定细胞结合 EC_{50} ,收获表达人类、食蟹猴或鼠类TIGIT的CHO-K1细胞,并用梯度浓度的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白温育,接着用荧光团标记的抗人类Fc的第二抗体温育。对于阻断测定,将固定浓度的生物素化的CD155-Fc蛋白(Acrobiosystems)加入到温育中,并用荧光团标记的抗生物素链霉素检测CD155-Fc与CHO/人类TIGIT细胞的结合。用流式细胞术分析样品。表4总结了抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的结合和阻断能力的 EC_{50} 。抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白对CHO细胞上表达的人类TIGIT具有与阳性对照22G2相似或更好的结合能

力,而AS19584-Fc、AS19886-Fc和AS20160-Fc对22G2表现出优异的配体阻断能力。另外,发现AS19584-Fc以与在CHO细胞上表达的人类TIGIT结合的相似EC50来结合在CHO细胞上表达的小鼠TIGIT。检测到小鼠TIGIT交叉结合对照10A7,具有0.709nM的CHO/小鼠TIGIT结合EC₅₀,与AS19584-Fc相似。

[0477] 表4.非人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白对TIGIT的结合和阻断配体结合的数据

EC50 (nM)	结合测定			阻断测定
	人类	食蟹猴	小鼠	人类
AS19584-Fc	0.571	3.851	0.806	1.085
AS19852-Fc	0.383	>100	/	/
AS19858-Fc	0.223	>100	/	/
AS19886-Fc	0.340	1.172	/	0.643
AS19887-Fc	0.497	>100	/	/
AS19888-Fc	1.004	>100	/	/
AS20160-Fc	0.876	14.48	/	1.177
22G2	1.140	0.604	/	2.699
10A7	4.057	>100	0.709	5.273

[0479] CT26是一种鼠类结肠癌细胞系,具有高表达的鼠类CD155(数据未显示)。因为AS19584-Fc与鼠类TIGIT交叉反应,为了评估其阻断TIGIT与其主要配体CD155相互作用的能力,CT26细胞在梯度浓度的AS19584-Fc融合蛋白存在下与鼠类TIGIT-Fc一起温育。通过用针对人类Fc的荧光染料结合的第二抗体染色并通过FACS检测来评估鼠类TIGIT-Fc与CT26细胞的结合。阻断的EC50对于AS19584-Fc为77.90nM,并且对于鼠类TIGIT阻断剂10A7为71.33nM。因此,AS19584-Fc和10A7具有相当的阻断TIGIT配体CD155的能力。

[0480] TIGIT/CD155阻断报告基因测定

[0481] 根据测定试剂盒(Promega,目录号CS198811)的手册,使用Promega TIGIT/CD155阻断报告基因测定试剂盒(Promega,目录号CS198811)进行TIGIT/CD155阻断报告基因测定。简言之,将解冻和使用的TIGIT效应细胞接种过夜,然后与抗TIGIT抗体或抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的连续稀释液一起温育,接着在合适的E:T比率下加入CD155 aAPC/CHO-K1细胞。在37℃、5%CO₂下诱导6小时后,加入Bio-GloTM荧光素酶测定试剂并测定发光。使用GraphPad Prism 6软件进行四参数逻辑曲线分析。数据曲线显示在图3中并总结在表5中。AS19584-Fc、AS19886-Fc和AS20160-Fc具有与22G2相当或优异的阻断功能。

[0482] 表5.TIGIT/CD155阻断报告基因测定

构建体	EC50 (nM)	信号跨度
AS19584-Fc	1.470	111.5
AS19886-Fc	3.044	101.5
AS20160-Fc	5.464	88.8
22G2	7.922	107.9

[0484] 实施例3:抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白在同系肿瘤模型中的体内功效

[0485] 在CT26同系肿瘤模型中比较10A7和AS19584-Fc的功效研究

[0486] 由于AS19584-Fc融合蛋白和10A7具有非常接近的细胞结合和小鼠TIGIT的阻断EC50(参见表4),进行了在相同摩尔剂量下比较不同分子形式的两种抗体的研究。将表达鼠

类CD155的CT26肿瘤细胞培养,悬浮于不含镁和钙的HBSS^{-/-}中,并在6-8周龄时的雌性Balb/c小鼠的侧腹皮下注射 5×10^5 个细胞。使用卡尺测量肿瘤体积并用公式(长 $\times$ 宽 $\times$ 宽)/2计算。当平均肿瘤体积达到90-100mm³时,将小鼠随机分组以开始治疗。测试物品每4天经由腹膜内给药一次。在整个研究中测量体重。在给药后第18天处死动物并收获肿瘤组织,用胶原酶IV/DNA酶I消化以制备单细胞悬浮液用于表面标志物CD3/CD4/CD8的染色和流式细胞术分析。

[0487] CT26肿瘤模型对于PD-1阻断是部分抵抗的。如图4A和4C所示,大鼠抗鼠类PD-1抗体RMP1-14(Bioxcell)在5mg/kg下对于CT26肿瘤生长具有有限的抑制。AS19584-Fc和10A7在单独或与RMP1-14组合的情况下,均以相同摩尔剂量(分别为10mg/kg和18.8mg/kg)显著延迟肿瘤进展。值得注意的是,AS19584-Fc在给药后一周内表现出更快的反应,并且在测试的摩尔剂量下最终比10A7更均匀的反应。在关于肿瘤学不同靶标的其它研究中也观察到所述现象(数据未显示)。这可能与sdAb-Fc融合蛋白相比于全长单克隆抗体的较小分子量相关(分别为~80kDa对150kDa)。在小鼠PK研究中,与抗TIGIT全长抗体相比,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白具有约1.5~2倍更大的在稳态下的表观分布体积(Vss)和更低血浆峰浓度(Cmax)(图9;未显示额外数据)。差异与抗体是否与小鼠TIGIT交叉反应无关。所述观察结果表明,sdAb-Fc融合蛋白由于其小尺寸而可能比全长抗体具有更快和更强的组织(包括肿瘤)穿透,并且更快的药物功效也可能与这种独特的性质相关。如用流式细胞术所评估,用AS19584-Fc治疗增强了CD8⁺和CD4⁺T细胞瘤内浸润,而其与RMP1-14的组合进一步增强了这种过滤(图4B)。

[0488] 在CT26同系肿瘤模型中测试PD-1/TIGIT双重阻断的功效研究

[0489] 将CT26肿瘤细胞培养,悬浮于不含镁和钙的HBSS^{-/-}中,并在6-8周龄的雌性Balb/c小鼠的侧腹皮下注射 5×10^5 个细胞。使用卡尺测量肿瘤体积并用公式(长 $\times$ 宽 $\times$ 宽)/2计算。当平均肿瘤体积达到90-100mm³时,将小鼠随机分组以开始治疗。测试物品每4天经由腹膜内给药一次。在整个研究中测量体重。

[0490] CT26肿瘤模型对于PD-1阻断是部分抵抗的。如图5A和图5B所示,大鼠抗鼠类PD-1抗体RMP1-14(Bioxcell)在5mg/kg下适度但显著地抑制CT26肿瘤生长。AS19584-Fc融合蛋白在与RMP1-14相同摩尔剂量下显示出显著的肿瘤抑制。相同摩尔剂量(分别为5mg/kg和2.67mg/kg)的RMP1-14和AS19584-Fc的组合显示出显著改善的功效,在8只小鼠中的6只中观察到肿瘤完全消退。

[0491] 在MC38同系肿瘤模型中测试PD-1/TIGIT双重阻断的功效研究

[0492] 将MC38肿瘤细胞培养,悬浮于不含镁和钙的HBSS^{-/-}中,并在6-8周龄的雌性C57BL/6小鼠的侧腹皮下注射 1×10^6 个细胞。使用卡尺测量肿瘤体积并用公式(长 $\times$ 宽 $\times$ 宽)/2计算。当平均肿瘤体积达到90-100mm³时,将小鼠随机分组以开始治疗。测试物品每4天经由腹膜内给药一次。在整个研究中测量体重。

[0493] MC38肿瘤模型对PD-1阻断敏感。如图6A和图6B所示,RMP1-14在3mg/kg下显著延迟MC38肿瘤生长。AS19584-Fc融合蛋白以剂量依赖性方式抑制肿瘤生长。相同摩尔剂量(分别为3mg/kg和1.6mg/kg)的RMP1-14和AS19584-Fc的组合显示同时靶向PD-1和TIGIT的协同作用,导致功效显著提高并且在7只小鼠中的5只中完全消退。RMP1-14和高剂量AS19584-Fc(分别为3mg/kg和10mg/kg)的组合完全消除了所有动物中的肿瘤植入(7只中的7只)。

[0494] 实施例4:抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的人源化、产生和表征

[0495] 抗TIGIT sdAb的人源化

[0496] 将sdAb AS19584和AS19886的蛋白质序列与具有最高同源性程度的5个最接近的人类种系序列进行比对。选择最佳人类种系序列作为人类受体。制作同源性模型。根据模型分析数据,将对于抗原结合或抗体支架形成而言是潜在关键的残基予以保留,而选择其余残基以转化为人类对应物。最初生成4-6个序列优化变体的组(阶段1)。分析这些变体的许多参数,并将获得的结果用于设计第二组sdAb(阶段2)。人源化sdAb在其名称中用“VH”表示。

[0497] 人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的产生

[0498] 在人源化变体中,根据亲和力和小规模生产水平选择AS19584VH28、AS19886VH5和AS19886VH8用于生产和表征。通过将人源化抗TIGIT sdAb与人类IgG1 Fc区融合产生人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白构建体。制备构建体的maxiprep用于HEK293细胞瞬时表达和纯化。表达的人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白通过色谱法经由含有蛋白A琼脂糖树脂的柱纯化。通过SEC-HPLC测定蛋白质纯度。表达结果总结在表6中。

[0499] 表6.人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的表达

	构建体	瞬时表达(mg/L)	纯度(%)	内毒素水平 (EU/mg)
[0500]	AS19584VH28-Fc	212.0	98.83	0.1
	AS19886VH5-Fc	76.8	98.36	0.1
	AS19886VH8-Fc	70.0	96.47	0.2

[0501] 稳定性分析

[0502] 使用动态光散射(DLS)检测在加热期间较大蛋白质聚集体的形成。使用DYNAPRO[®]NANOSTAR[®]读板器(Wyatt,Santa Barbara,California),对1.5mg/ml的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白样品,进行从25℃至75℃的温度匀升,温度间隔为约0.75℃。将20μl每种样品加入到WYATT[®]一次性比色皿中,接着用10μl矿物油(Sigma 8410)覆盖样品以防止蒸发。对每个抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白样品平均三次测量(5次采集/每次测量)。在具有所选温度间隔的实验持续时间内,热扫描速率计算为1.5℃/min。测量每个样品,同时连续升高温度直至目标温度达到75℃(约40分钟)。在DYNAMICS[™] 7.6.0.48软件(Wyatt,Santa Barbara,California)中用起始分析方法分析聚集温度($T_{聚集}$)。各种样品的测量的聚集起始温度($T_{聚集}$)显示在表7中。

[0503] 酸性稳定性评估如下。每种抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白样品以10mg/ml在具有不同pH:3.6、3.3、3.0和2.7的50mM柠檬酸钠缓冲液中制备,在pH 7.2的磷酸钠缓冲液中制备一个对照。在R.T.下的酸性条件下暴露1小时后,通过磷酸钠缓冲液将样品中和至pH 7.2。然后用SDS-PAGE检测每个样品的纯度分析和SPR活性。各种酸性条件下的活性浓度百分比总结在表7中。

[0504] 如下测试冷冻-解冻稳定性。在含有4%蔗糖、50mM组氨酸和50mM精氨酸的缓冲液(pH 6.0)中,将浓度>50mg/ml的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白样品完全冷冻-解冻5个循环。通过SEC-HPLC评估所有样品的完整全单体分子的级分,并使用制造商提供的CHROMELEON[™]软件来记录和分析数据。冷冻-解冻循环后每种抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的回收率如表7所

示。

[0505] 表7中的数据证明,所有测试的人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白在热、酸性和冷冻-解冻稳定性测试中是稳定的。

[0506] 表7.人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的稳定性分析

[0507]	构建体	热稳定性	酸稳定性				冷冻-解冻稳定性
		T_{m} (°C)	活性浓度(%)				回收率 (%)
			对照	pH 3.6	pH 3.3	pH 3.0	pH 2.7
	AS19584VH28-Fc	66.0	100	99.9	100	100	100
	AS19886VH5-Fc	60.2	100	99.9	100	100	100
	AS19886VH8-Fc	66.0	100	100.4	100.3	99.7	99

[0508] 疏水性分析

[0509] 通过疏水相互作用色谱法(HIC)测试人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的疏水性。在TSKgel®Butyl-NPR HPLC柱上分析每个样品,所述柱具有递增量的含有(NH₄)₂SO₄的Tris缓冲液(pH 7.0)作为流动相,流速为1ml/min。保留时间用于比较每个样品的疏水性。如表8中所示,所有人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白在疏水性方面是合格的。

[0510] 表8.人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的疏水性分析

[0511]	构建体	保留时间(分钟)
	AS19584VH28-Fc	21.6
	AS19886VH5-Fc	18.7
	AS19886VH8-Fc	18.7

[0512] 溶解度分析

[0513] 为了评估溶解度,使用交叉相互作用色谱(CIC)柱测量纯化的人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白。从合并的小鼠血清中纯化的鼠类多克隆抗体购自Sigma-Aldrich(I5381)。将鼠类多克隆抗体以约30mg/ml与树脂基质偶联。将PBS缓冲液中纯化的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白分别注射到鼠类IgG结合柱和对照柱,浓度范围为0.05至0.20mg/mL。保留时间用于计算表9中报告的保留因子k'值: $k' = (V_r - V_o) / V_o = (T_r - T_m) / T_m$ 。V_r表示蛋白质偶联柱上样品的洗脱体积,V_o表示来自对照柱的洗脱体积,T_r表示蛋白质偶联柱上的保留时间,并且T_m表示对照柱上的保留时间。许多样品在同一柱上运行两次。k'值>0.6的蛋白质通常明显不易溶解。根据表9,所有人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白样品展现出优异的溶解性。

[0514] 表9.人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的溶解度分析

[0515]	构建体	K'
	AS19584VH28-Fc	0.041
	AS19886VH5-Fc	-0.037
	AS19886VH8-Fc	0.030

[0516] 通过表面等离子体激元共振(SPR)进行靶蛋白结合和跨物种反应测试

[0517] 利用BIAcore T200仪器通过SPR测定每种抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的亲合常数

(K_D)。简言之,人类、食蟹猴或小鼠TIGIT-His (Acrobiosystems)以不高于100RU的密度与CM5传感器芯片进行胺偶联。以不少于5种不同浓度注射抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白。动力学资料总结于表10中。

[0518] 表10. 针对TIGIT的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的亲和力测定

靶标	构建体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
人类 TIGIT-His	AS19584VH28-Fc	7.3E+05	2.1E-04	2.9E-10
	AS19886VH5-Fc	5.5E+05	1.6E-03	2.9E-09
	AS19886VH8-Fc	7.3E+05	1.7E-03	2.4E-09
	AS19584-Fc	9.5E+05	3.4E-04	3.5E-10
	AS19886-Fc	8.8E+05	2.3E-03	2.6E-09
	22G2	1.4E+06	1.6E-04	1.2E-10
食蟹猴 TIGIT-His	AS19584VH28-Fc	3.4E+05	1.2E-02	3.4E-08
	AS19886VH5-Fc	9.5E+04	2.7E-02	2.8E-07
	AS19886VH8-Fc	1.4E+05	2.3E-02	1.6E-07
	AS19584-Fc	4.6E+05	1.7E-02	3.8E-08
	AS19886-Fc	1.4E+05	1.1E-02	7.6E-08
	22G2	1.3E+06	5.6E-03	4.1E-09
小鼠 TIGIT-His	AS19584VH28-Fc	6.2E+05	4.9E-04	7.8E-10
	AS19886VH5-Fc	/	/	/
	AS19886VH8-Fc	/	/	/
	AS19584-Fc	8.8E+05	4.9E-04	5.5E-10
	AS19886-Fc	/	/	/
	22G2	/	/	/

[0520] 通过FACS分析CHO-TIGIT细胞结合和配体结合的抑制

[0521] 使用与实施例2中所述相同方法测定抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白与CHO-K1细胞上表达的TIGIT结合并阻断CD155配体结合的能力。表11总结了抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的结合和阻断能力的EC50。所有人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白与其亲本抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白具有相当的结合和阻断能力。

[0522] 表11. 抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白对TIGIT的结合和阻断数据

构建体	结合测定 EC50 (nM)		阻断测定 EC50 (nM)
	人类	食蟹猴	人类
AS19584VH28-Fc	0.432	1.017	1.651
AS19886VH5-Fc	0.657	2.062	2.818
AS19886VH8-Fc	0.676	2.277	2.486
AS19584-Fc	0.391	0.664	1.700
AS19886-Fc	0.541	1.354	2.377
22G2	0.494	1.120	1.944

[0524] TIGIT/CD155阻断报告基因测定和IL-2释放测定

[0525] TIGIT/CD155阻断报告基因测定:所述研究根据实施例2中描述的方法进行。22G2充当阳性对照。数据曲线显示在图7中并总结在表12中。结果表明人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白在配体阻断方面具有与其亲本克隆相当的功能。

[0526] IL-2释放测定:将由GenScript开发的表达CD155的靶细胞在96孔板中接种过夜,然后与抗TIGIT抗体或抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的连续稀释液一起温育,接着以适当的E:

T比率加入内部开发的TIGIT效应细胞。在37℃、5%CO₂下诱导24小时后,通过人类IL-2HTRF测定试剂盒测量细胞培养上清液中白细胞介素2(IL-2)的浓度。使用GraphPad Prism 6软件进行四参数逻辑曲线分析。数据曲线显示在图8中并总结在表12中。22G2充当阳性对照。结果表明人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白在效应T细胞中诱导IL-2释放方面具有与其亲本克隆相当的功能。

[0527] 表12.抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的功能测定

[0528]	构建体	报告基因测定 EC50 (nM)	IL-2 释放测定 EC50 (nM)
	AS19584VH28-Fc	2.12	0.818
	AS19886VH5-Fc	3.54	3.150
	AS19886VH8-Fc	3.27	5.850
	AS19584-Fc	2.20	1.025
	AS19886-Fc	3.16	2.644
	22G2	3.04	3.072

[0529] 实施例5:人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的体内研究

[0530] 人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的药代动力学研究

[0531] 8周龄的C57BL/6小鼠接受单次静脉内推注22G2或AS19584VH28-Fc融合蛋白,剂量为3mg/kg。在不同时间点,收获外周血样品以制备血浆,并使用夹心ELISA测定测试抗体的浓度。WinNonlin用于通过非区室分析来模拟每种测试抗体的药代动力学特征(模型201)。数据总结在表13中并且药代动力学曲线显示在图9中。这项研究和其它几项研究(现在显示的数据)的结果表明,与单克隆抗体相比,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白具有更短的半衰期、更高的清除率但在稳态下分布的表现体积更大。

[0532] 表13.单克隆抗TIGIT抗体和人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的药代动力学特征

[0533]	参数	单位	22G2	AS19584VH28-Fc
	t _{1/2} (终末半衰期)	h	267.031±8.071	207.153±14.739
	CL	ml/h/kg	0.262±0.005	0.459±0.064
	C _{max}	μg/ml	55.973±6.805	51.344±7.644
	V _{ss}	ml/kg	102.086±3.562	138.449±6.166
	MRT	h	389.45±6.564	304.32±33.505
	AUC _{0-t}	h*μg/ml	9535.171±260.896	5910.564±673.563
	AUC _{0-∞}	h*μg/ml	11449.56±207.903	6616.818±941.466

[0534] 人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白在带有MC38肿瘤的TIGIT人源化小鼠中的功效

[0535] 将MC38肿瘤细胞培养,悬浮于无镁和钙的HBSS^{-/-}中,并且在6-8周龄的具有人类TIGIT敲入(KI)的雌性C57BL/6小鼠(BiocytoGen)的侧腹皮下注射1×10⁶个细胞。使用卡尺测量肿瘤体积并用公式(长×宽×宽)/2计算。当平均肿瘤体积达到90-100mm³时,将小鼠随机分组以开始治疗。测试物品每4天通过腹膜内给药一次。在整个研究中测量体重。

[0536] 如图10A和图10B所示,包括3种人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白和阳性对照22G2的所有测试抗体显著抑制MC38肿瘤的生长,证明了人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的体内功效。本研究中22G2对人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的优越功效,与体外研究结果不一致,很可能是由于与常规全长抗体相比,抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的半衰期较短(也参

见图9和表13),以及由于在这种情况下采用的低测试剂量。

[0537] 实施例6:靶向PD-1/PD-L1和TIGIT的概念验证(POC)双特异性分子的产生和体外表征

[0538] PD-1×TIGIT和PD-L1×TIGIT POC双特异性抗原结合蛋白(BABP)的构建和表达

[0539] 可以用与以下各者融合的抗TIGIT sdAb构建BABP:全长抗体,或者从在C末端处具有Fc区的全长抗体衍生的scFv或Fab区,例如抗PD-1抗体,例如, **Keytruda**[®] (派姆单抗), PD1-BM-min、**Opdivo**[®] (纳武单抗) 或抗PD-L1抗体,例如 **Tecentriq**[®] (阿特珠单抗), **IMFINZI**[™] (度伐单抗), **Bavencio**[®] (阿维单抗) 或人源化53C1 (h53C1)。抗TIGIT sdAb可以经由接头(例如9-氨基酸Gly/Ser接头(9GS接头)、人类IgG1 (hIgG1) 铰链,或突变的hIgG1铰链),或在没有接头的情况下与全长抗体(或来自在C末端处具有Fc区的全长抗体的scFv或Fab区)连接。BABP可以具有图17-26中举例说明的任何构型。例如,抗TIGIT sdAb可以经由N末端或C末端与至少一条重链、至少一条轻链,或重链和轻链融合(参见图17-20)。

[0540] 该实施例描述了用于概念验证(POC)的PD-L1×TIGIT BABP的构建和表达。经由突变的人类IgG1 (hIgG1) 铰链将抗TIGIT sdAb AS19584与抗PD-L1抗体h53C1 (BTP-4和BTP-5) 或**Tecentriq**生物仿制药 (BTP-6和BTP-7) 的重链的N末端融合。野生型人类IgG1 Fc用于BTP-5和BTP-7,而无效应子的人类IgG1 (惰性hIgG1) Fc用于BTP-4和BTP-6。所有POC PD-L1×TIGIT BABP构建体具有图17所示的结构。POC BABP构建体在Expi293F细胞中瞬时表达,并且蛋白质用蛋白A亲和柱纯化。用SEC-HPLC测定蛋白质纯度。结果总结在表14中。

[0541] 表14. POC PD-L1×TIGIT BABP的表达

[0542]

构建体	产量 (mg/L)	纯度 (%)	内毒素水平 (EU/mg)
BTP-4	98.4	97.09	0.1
BTP-5	114.1	99.52	0.1
BTP-6	269.8	95.27	0.1
BTP-7	318.6	95.15	0.1

[0543] BABP的亲合力测定

[0544] 为了比较POC PD-L1×TIGIT BABP与其亲本元件 (抗PD-L1 Ab和抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白), 将**Tecentriq**[®]的Fc区改变为野生型人类IgG1 (hIgG1) Fc作为对照, 并且产生具有野生型hIgG1 Fc或无效应子的人类IgG1 (惰性hIgG1) Fc的h53C1和AS19584-Fc融合蛋白作为对照。人类和小鼠TIGIT-His和人类PD-L1购自Acrobiosystems。如实施例2中所述测试POC PD-L1×TIGIT BABP的亲合力, 并且数据显示在表15中。与其亲本元件单克隆抗体和具有相应同种型的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白相比, PD-L1×TIGIT BABP与靶蛋白具有相当或略微降低的亲合力。

[0545] 表15. POC PD-L1×TIGIT BABP的亲合力测定

[0546]	亲和力(K _D , M)	人类 PD-L1	人类 TIGIT	小鼠 TIGIT
	BTP-4 (h53C1 惰性 IgG1)	5.1E-10	4.1E-10	5.6E-10
	BTP-5 (h53C1 IgG1)	4.9E-10	4.1E-10	5.9E-10
	BTP-6 (Tecentriq 生物仿制药惰性 IgG1)	3.4E-10	3.6E-10	5.4E-10
	BTP-7 (Tecentriq 生物仿制药 IgG1)	3.4E-10	4.1E-10	5.6E-10
	h53C1 (IgG1)	5.0E-10	/	/
	h53C1 (惰性 IgG1)	4.1E-10	/	/
	Tecentriq 生物仿制药(IgG1)	3.1E-10	/	/
	Tecentriq 生物仿制药(惰性 IgG1)	2.8E-10	/	/
	AS19584-Fc (IgG1)	/	4.0E-10	5.7E-10
	AS19584-Fc (惰性 IgG1)	/	4.9E-10	7.1E-10

[0547] 通过FACS分析CHO-TIGIT或CHO-PD-L1细胞结合和配体结合的抑制

[0548] 如实施例2中所述评估POC PD-L1×TIGIT BABP结合至在CHO细胞上表达的TIGIT和阻断CD155与CHO-TIGIT细胞结合的能力。如实施例2中所述,也类似地评估结合至在CHO细胞上表达的PD-L1和阻断PD-1与CHO-PD-L1细胞结合的能力。22G2用作阳性抗TIGIT Ab对照。结果总结在表16中。与其亲本元件单克隆抗体(抗PD-L1 Ab)和具有相应同种型的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白相比,PD-L1×TIGIT BABP具有相当或略微降低的靶细胞结合和配体阻断能力。

[0549] 表16.POC PD-L1×TIGIT BABP的结合和阻断数据

[0550]	EC50 (nM)	PD-L1		TIGIT	
		结合	阻断	结合	阻断
	BTP-4 (h53C1 惰性 IgG1)	0.627	0.469	1.008	0.913
	BTP-5 (h53C1 IgG1)	0.636	0.468	0.829	1.013
	BTP-6 (Tecentriq 生物仿制药惰性 IgG1)	2.957	2.275	3.729	6.166
	BTP-7 (Tecentriq 生物仿制药 IgG1)	1.692	1.285	1.427	2.473
	h53C1 (IgG1)	0.466	0.432	/	/
	h53C1 (惰性 IgG1)	0.451	0.339	/	/
	Tecentriq 生物仿制药(IgG1)	1.292	0.872	/	/
	Tecentriq 生物仿制药(惰性 IgG1)	1.288	0.873	/	/
	AS19584-Fc (IgG1)	/	/	0.713	0.884
	AS19584-Fc (惰性 IgG1)	/	/	1.036	1.415
	22G2 (IgG1)	/	/	2.455	1.113

[0551] POC PD-L1×TIGIT BABP的体外功能测定

[0552] 基于PD-L1细胞的测定:将PD-L1靶细胞(GS-C2/PD-L1,GenScript,目录号M00613)接种过夜,然后与测试样品的连续稀释液一起温育,接着以合适的E:T比率加入PD-1效应细胞(GS-J2/PD-1,GenScript,目录号M00612)。在37℃、5%CO₂诱导6小时后,加入One-GloTM荧光素酶测定试剂并测定发光。使用GraphPad Prism 6软件进行四参数逻辑曲线分析。结果示于图11中。

[0553] 混合淋巴细胞反应 (MLR) :从人类外周血单核细胞 (PBMC) 分离树突细胞 (DC) 和CD4⁺ T细胞。在FACS测定中分析DC的共刺激分子和MHC II类的表达 (其表面标志物CD1a、CD83、CD86和HLA-DR的表达数据被验证,数据未显示)。将合适比率的CD4⁺ T细胞和DC接种到96孔板的孔中,并用测试抗体处理。将测定板在37℃/5%CO₂培养箱中温育72小时,并使用人类IL2 HTRF试剂盒 (Cisbio,目录号64IL2PEB) 测量由细胞释放的IL-2。结果示于图12中。

[0554] 根据实施例2和实施例4中描述的方法分别进行TIGIT/CD155阻断报告基因分析和IL-2释放分析。结果分别示于图13和图14中。

[0555] 所有上述基于体外细胞的功能测定的结果总结于表17中。与其亲本元件单克隆抗体 (抗PD-L1 Ab) 和具有相应同种型的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白相比,POC PD-L1×TIGIT BABP显示出相当或略微降低的体外功能。

[0556] 表17.POC PD-L1×TIGIT BABP的体外功能测定

	EC50 (nM)	PD-L1	MLR	TIGIT	
				报告基因测定	IL-2 释放
[0557]	BTP-4 (h53C1 惰性 IgG1)	1.792	0.924	4.00	1.562
	BTP-5 (h53C1IgG1)	1.968	1.045	3.99	2.403
	BTP-6 (Tecentriq 生物仿制药惰性 IgG1)	3.202	1.753	4.37	6.428
	BTP-7 (Tecentriq 生物仿制药 IgG1)	1.812	1.534	3.76	4.083
	h53C1 (IgG1)	1.871	0.270	/	/
	h53C1 (惰性 IgG1)	1.810	0.499	/	/
	Tecentriq 生物仿制药(IgG1)	2.060	1.942	/	/
	Tecentriq 生物仿制药(惰性 IgG1)	1.534	1.590	/	/
	AS19584 (IgG1)	/	>100	2.44	1.992
	AS19584 (惰性 IgG1)	/	>100	3.40	1.820
	22G2 (IgG1)	/	>100	6.01	2.263

[0558] 基于PD-L1/TIGIT细胞的双功能报告基因测定:将PD-L1/CD155靶细胞 (表达PD-L1和CD155的细胞) 接种过夜,然后用测试抗体的连续稀释液温育,接着以合适的E:T比率加入PD-1/TIGIT效应细胞 (表达PD-1和TIGIT的细胞)。在37℃、5%CO₂诱导6小时后,加入One-GloTM荧光素酶测定试剂并测定发光以代表效应细胞活化。

[0559] 如图15所示,通过阻断PD-L1,h53C1能够在T细胞中诱导IL-2表达。低剂量与高剂量之间的效果差异极小。单独的TIGIT阻断剂AS19584-Fc (IgG1或惰性IgG1) 在测定条件下不能活化T细胞。相比之下,与其亲本元件单克隆抗体 (抗PD-L1 Ab) 和具有相应同种型的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白相比,POC PD-L1×TIGIT BABP (BTP-4和BTP-5) 表现出通过在效应细胞中诱导IL-2表达而增强T细胞功能的优异能力。POC PD-L1×TIGIT BABP的效果与相应组合 (h53C1+AS19584-Fc,具有IgG1或惰性IgG1 Fc片段) 的效果相当。

[0560] 实施例7:靶向PD-L1和TIGIT的POC PD-L1×TIGIT BABP的体内功效

[0561] 带有MC38-hPD-L1肿瘤模型的C57BL/6人类PD-1敲入 (KI) 小鼠的功效研究

[0562] 敲除MC38肿瘤细胞中的小鼠PD-L1基因,并通过慢病毒转导来稳定表达人类PD-L1。对所产生的MC38-hPD-L1细胞进行培养,悬浮在无镁和钙的HBSS^{-/-}中,并在6-8周龄雌性

C57BL/6人类PD-1KI小鼠(BiocytoGen)的侧腹皮下注射 1×10^6 个细胞,其中鼠类PD-1基因的细胞外域已被人类对应物取代。使用卡尺测量肿瘤体积并用公式(长 $\times$ 宽 $\times$ 宽)/2计算。当平均肿瘤体积达到90-100mm³时,将小鼠随机分组以开始治疗。测试物品每周经由腹膜内给药三次。在整个研究中测量体重。

[0563] 如图16A和图16B所示,通过分别阻断PD-L1和TIGIT,h53C1和AS19584-Fc(具有野生型IgG1)均适度延迟MC38-hPD-L1肿瘤生长,没有统计学意义。h53C1和AS19584-Fc的组合疗法没有改善单一疗法的功效,部分动物无反应。然而,接受BTP-5的动物的肿瘤生长持续延迟,表明POC PD-L1 $\times$ TIGIT BABP具有比任何单一疗法和体内组合疗法更好的治疗功效。

[0564] 实施例8:PD-1 $\times$ TIGIT和PD-L1 $\times$ TIGIT BABP的产生

[0565] PD-1 $\times$ TIGIT和PD-L1 $\times$ TIGIT BABP的构建

[0566] 该实施例描述了PD-L1 $\times$ TIGIT和PD-1 $\times$ TIGIT BABP的构建。

[0567] 经由突变的人类IgG1(hIgG1)铰链作为接头,将人源化抗TIGIT sdAb AS19584VH28与抗PD-L1单克隆Ab h53C1的重链N末端、重链C末端、轻链N末端或轻链C末端融合,以分别产生PD-L1 $\times$ TIGIT BABP BTP-15、BTP-16、BTP-17和BTP-18。h53C1的重链包含野生型人类IgG1 Fc区。BTP-15、BTP-16、BTP-17和BTP-18分别具有图17、图18、图19和图20中所示的示例性结构。

[0568] 经由突变的人类IgG1(hIgG1)铰链作为接头,人源化抗TIGIT sdAb AS19584VH28与抗PD-1抗体的重链N末端、重链C末端、轻链N末端或轻链C末端融合,以产生PD-1 $\times$ TIGIT BABP。抗PD-1抗体的重链包含人类IgG4 Fc区。PD-1 $\times$ TIGIT BABP具有图17-20所示的示例性结构。

[0569] 实施例9:PD-1 $\times$ TIGIT和PD-L1 $\times$ TIGIT BABP的产生和表征

[0570] PD-1 $\times$ TIGIT和PD-L1 $\times$ TIGIT BABP的构建

[0571] 该实施例描述了PD-L1 $\times$ TIGIT和PD-1 $\times$ TIGIT BABP的构建。

[0572] 经由突变的人类IgG1(hIgG1)铰链作为接头,将人源化抗TIGIT sdAb AS19584VH28与抗PD-1单克隆Ab PD1-BM-min的重链N末端、重链C末端、轻链N末端或轻链C末端融合,以分别产生PD-1 $\times$ TIGIT BABP BTP-11、BTP-12、BTP-13和BTP-14。PD1-BM-min的重链包含人类IgG4 Fc区。BTP-11、BTP-12、BTP-13和BTP-14分别具有图17、图18、图19和图20中所示的示例性结构。

[0573] 经由突变的人类IgG1(hIgG1)铰链作为接头,将人源化抗TIGIT sdAb AS19584VH28与抗PD-L1单克隆Ab h53C1的重链N末端、重链C末端、轻链N末端或轻链C末端融合,以分别产生PD-L1 $\times$ TIGIT BABP BTP-15、BTP-16、BTP-17和BTP-18。h53C1的重链包含野生型人类IgG1 Fc区。BTP-15、BTP-16、BTP-17和BTP-18分别具有图17、图18、图19和图20中所示的示例性结构。

[0574] 经由突变的人类IgG1(hIgG1)铰链作为接头,将人源化抗TIGIT sdAb AS19584VH28与抗PD-L1单克隆Ab h53C1的重链N末端或轻链N末端融合,以分别产生PD-L1 $\times$ TIGIT BABP BTP-21和BTP-22。h53C1的重链包含惰性人类IgG1 Fc区。BTP-21和BTP-22分别具有图17和图19中所示的示例性结构。

[0575] BABP的亲合力测定

[0576] 如前所述评估BABP对人类PD-1、PD-L1、人类TIGIT和小鼠TIGIT的亲合力。结果总

结在表18中。简言之,为了比较PD-1×TIGIT BABP与其亲本元件(抗PD-1Ab和抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白),产生具有野生型人类IgG4 Fc的PD1-BM-min和AS19584VH28-Fc融合蛋白作为对照。为了比较PD-L1×TIGIT BABP与其亲本元件(抗PD-L1 Ab和抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白),产生具有无效应子的人类IgG1(惰性hIgG1)Fc的h53C1和AS19584VH28-Fc融合蛋白作为对照。人类和小鼠TIGIT-His以及人类PD-1和PD-L1购自Acrobiosystems。如实施例2中所述测试PD-1xTIGIT BABP和PD-L1×TIGIT BABP的亲和力,并且数据显示在表18中。与它们各自的亲本元件单克隆抗体和具有相应同种型的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白相比,PD-1×TIGIT BABP和PD-L1×TIGIT BABP都具有与靶蛋白相当或仅略微降低的亲和力。

[0577] 表18.PD-1×TIGIT BABP和PD-L1×TIGIT BABP的亲和力测定

[0578]

实验	亲和力(K _D , M)	人类 PD-1	人类 TIGIT	小鼠 TIGIT
#1 PD-1/TIGIT (IgG4)	BTP-11 (IgG4)	4.0E-09	2.8E-10	5.0E-10
	BTP-13 (IgG4)	4.2E-10	2.6E-10	6.2E-10
	PD1-BM-min (IgG4)	1.2E-09	/	/
	AS19584VH28 (IgG4)	/	6.8E-10	1.1E-09
	亲和力(K _D , M)	人类 PD-L1	人类 TIGIT	小鼠 TIGIT
#2 PD-L1/TIGIT (IgG1)	BTP-15 (IgG1)	5.4E-10	2.5E-10	7.5E-10
	BTP-17 (IgG1)	6.5E-10	2.6E-10	8.1E-10
	h53C1 (IgG1)	3.5E-10	/	/
	AS19584VH28 (IgG1)	/	2.9E-10	1.0E-09
#3 PD-L1/TIGIT (惰性 IgG1)	BTP-21 (惰性 IgG1)	5.0E-10	3.0E-10	7.9E-10
	BTP-22 (惰性 IgG1)	7.9E-10	3.1E-10	7.7E-10
	h53C1 (惰性 IgG1)	4.4E-10	/	/
	AS19584VH28 (惰性 IgG1)	/	3.6E-10	1.1E-09

[0579] 通过FACS分析CHO-TIGIT、CHO-PD-1或CHO-PD-L1细胞结合和配体结合的抑制

[0580] PD-1×TIGIT BABP和PD-L1×TIGIT BABP与CHO细胞上表达的PD-1、PD-L1或TIGIT结合的能力及其阻断PD-1与CHO-PD-L1结合、PD-L1与CHO-PD-1细胞的结合或CD155与CHO-TIGIT细胞的结合的能力如实施例2中所述评估。22G2 (IgG1) 是抗TIGIT单克隆抗体,并根据公布的序列来表达。替拉戈单抗(临床试验中的抗TIGIT单克隆抗体)、度伐单抗和阿特珠单抗(都作为市售的抗PD-L1抗体)根据其公布的序列来表达并用作另外的对照。结果总结在表19中。与其亲本元件单克隆抗体(抗PD-1Ab、PD-1-BM min)和具有相应同种型的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白相比,PD-1×TIGIT BABP具有相当或仅略微降低的靶细胞结合和配体阻断能力。与其亲本元件单克隆抗体(抗PD-L1 Ab、h53C1)和具有相应同种型的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白相比,PD-L1×TIGIT BABP具有相当或仅略微降低的靶细胞结合和配体阻断能力。

[0581] 表19.PD-1×TIGIT BABP和PD-L1×TIGIT BABP的结合和阻断数据

实验	EC50 (nM)	PD-1		TIGIT		
		结合	阻断	结合	阻断	
[0582] #1 PD-1/TIGIT (IgG4)	BTP-11 (IgG4)	6.308	8.681	1.405	0.9255	
	BTP-13 (IgG4)	1.921	2.211	1.354	1.111	
	PD1-BM-min (IgG4)	1.715	1.508	/	/	
	AS19584VH28 (IgG4)	/	/	2.398	0.8913	
	EC50 (nM)	PD-L1		TIGIT		
		结合	阻断	结合	阻断	
[0583] #2 PD-L1/TIGIT (IgG1)	BTP-15 (IgG1)	3.530	1.834	1.792	0.2166	
	BTP-17 (IgG1)	3.564	2.352	0.8443	0.6238	
	h53C1 (IgG1)	1.248	0.6361	/	/	
	AS19584VH28 (IgG1)	/	/	0.8914	0.3353	
	#3 PD-L1/TIGIT (惰性 IgG1)	BTP-21 (惰性 IgG1)	3.357	3.662	3.096	3.139
		BTP-22 (惰性 IgG1)	4.856	5.910	4.590	4.471
		h53C1 (惰性 IgG1)	2.006	1.967	/	/
		AS19584VH28 (惰性 IgG1)	/	/	5.762	4.779
		阿特殊单抗	2.940	3.355	/	/
		度伐单抗	0.7440	0.8597	/	/
		22G2 (IgG1)	/	/	1.600	2.307
	替拉戈单抗	/	/	2.236	2.421	

[0584] 体外功能测定

[0585] PD-1×TIGIT BABP和PD-L1×TIGIT BABP的体外功能通过基于PD-1细胞的测定、基于PD-L1细胞的测定、基于TIGIT细胞的报告基因测定和用于TIGIT的IL-2释放测定进行分析,类似地如实施例2、4和6中所述。22G2 (IgG1) 是抗TIGIT单克隆抗体,并根据公布的序列来表达。替拉戈单抗(临床试验中的抗TIGIT单克隆抗体)、度伐单抗和阿特殊单抗(均作为市售的抗PD-L1抗体)根据其公布的序列来表达并用作另外的对照。结果总结在表20中。与其亲本元件单克隆抗体(分别为PD1-BM-min和h53C1)和具有相应同种型的抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白相比,PD-1×TIGIT BABP和PD-L1×TIGIT BABP显示出相当或仅略微降低的体外功能。与商业抗TIGIT抗体替拉戈单抗相比,PD-L1×TIGIT BABP BTP-21和BTP-22甚至展现出更好的TIGIT阻断功能。

[0586] 表20. PD-1×TIGIT BABP和PD-L1×TIGIT BABP的体外功能测定

实验	EC50 (nM)	PD-1	TIGIT		
			报告基因测定	IL-2 释放	
#1 PD-1/TIGIT (IgG4)	BTP-11 (IgG4)	8.514	7.814	0.778	
	BTP-13 (IgG4)	2.326	4.027	0.565	
	PD1-BM-min (IgG4)	1.209	/	/	
	AS19584VH28 (IgG4)	/	4.058	0.737	
	派姆单抗(抗 PD-1)	1.596	/	/	
[0587]	EC50 (nM)	PD-L1	TIGIT		
			报告基因测定	IL-2 释放	
	#2 PD-L1/TIGIT (IgG1)	BTP-15 (IgG1)	8.106	21.65	2.450
		BTP-17 (IgG1)	3.836	2.611	0.509
		h53C1 (IgG1) (抗 PD-L1)	4.017	/	/
		AS19584VH28 (IgG1)	/	3.123	0.223
	#3 PD-L1/TIGIT (惰性 IgG1)	BTP-21 (惰性 IgG1)	5.042	5.913	未测试
		BTP-22 (惰性 IgG1)	5.826	5.353	
		h53C1 (惰性 IgG1)	6.875	/	
	[0588]	AS19584VH28 (惰性 IgG1)	/	5.420	
		阿特殊单抗(抗 PD-L1)	5.146	/	
度伐单抗(抗 PD-L1)		5.499	/		
22G2 (IgG1) (抗 TIGIT)		/	4.648		
替拉戈单抗(抗 TIGIT)		/	11.36		

[0589] PD-L1/TIGIT双功能报告基因测定:为了评估PD-1×TIGIT BABP或PD-L1×TIGIT BABP通过同时靶向PD-L1/PD-1途径和CD155/TIGIT途径而以协同方式活化T细胞的能力,如实施例6所述,进行PD-L1/TIGIT双功能报告基因测定。简言之,将PD-L1/CD155靶细胞(表达PD-L1和CD155的细胞)接种过夜,然后与测试抗体的连续稀释液一起温育,接着在合适的E:T比率下加入PD-1/TIGIT效应细胞(表达PD-1和TIGIT的细胞)。在37℃、5%CO₂下诱导6小时后,加入One-GloTM荧光素酶测定试剂并确定发光代表效应细胞活化。22G2 (IgG1) 是抗TIGIT单克隆抗体,并根据公布的序列来表达。替拉戈单抗(临床试验中的抗TIGIT单克隆抗体)、派姆单抗(市售的抗PD-1单克隆抗体;缩写为Pembro)、度伐单抗和阿特珠单抗/Tecentriq[®](均为市售的抗PD-L1抗体),根据其公布的序列来表达并用作另外的对照。从图27A-27C可以看出,使用抗PD-1、抗PD-L1或抗TIGIT Ab的单一疗法不能同时有效地阻断PD-L1/PD-1和CD155/TIGIT途径以触发效应细胞活化。BTP-11、BTP-13(如图27A所示)、BTP-15、BTP-17(如图27B所示)、BTP-21和BTP-22(如图27C和表21所示)通过阻断PD-L1/PD-1和/或CD155/TIGIT途径而在报告细胞中协同触发信号,与任何测试的单一疗法相比,显示出显著增加的最大信号。与派姆单抗(抗PD-1)和22G2(抗TIGIT)组合疗法相比,BTP-11和BTP-13甚至展现出优异的效应细胞活化功能(图27A)。与替拉戈单抗+阿特珠单抗或替拉戈单抗+度伐单抗组合疗法相比,BTP-21和BTP-22BABP显示出相当或甚至更好(BTP-22)的同时PD-L1/PD-1和CD155/TIGIT阻断活性(图27C)。

[0590] 表21.用于PD-L1×TIGIT BABP的PD-L1/TIGIT双功能报告基因测定

[0591]		信号的上平台	EC50 (nM)
	BTP-21	11524	12.88
	BTP-22	10263	5.47
	h53C1惰性IgG1 (抗PD-L1)	2660	2.76
	阿特殊单抗 (抗PD-L1 Ab)	3527	2.36
	度伐单抗 (抗PD-L1 Ab)	3109	2.66
	AS19584VH28-Fc惰性IgG1	1608	10.57
	替拉戈单抗 (抗TIGIT)	983	3.61
	替拉戈单抗+阿特殊单抗	13636	7.99
	替拉戈单抗+度伐单抗	12851	9.68

[0592] 原代T细胞结合:为了评估PD-L1×TIGIT BABP与原代细胞结合的能力,用CD8⁺ T细胞分离试剂盒 (Miltenyi, 目录号130-096-495) 或CD4⁺ T细胞分离试剂盒 (Miltenyi, 目录号130-096-533) 从PBMC (HemaCare) 分离人类原代T细胞。用T细胞活化/扩增试剂盒 (Miltenyi, 目录号130-092-919) 活化并扩增分离的T细胞。如实施例2中所述进行FACS分析,以分别测定PD-L1×TIGIT BABP与活化的CD8⁺和CD4⁺ T细胞的结合。如图28A和图28B所示,BTP-21已显示出对原代CD8和CD4 T细胞的有效结合能力,其与基准抗体或亲本抗体相当。

[0593] PBMC IFN- γ 释放测定:在存在梯度浓度的测试物品的情况下,在37℃下,在具有5%CO₂的培养箱中,在补充有10%FBS的RPMI 1640培养基中,将来自健康供体的新鲜解冻的人类PBMC (HemaCare) 与PD-L1靶细胞 (GS-C2/PD-L1, GenScript, 目录号M00613) 以3:1的比率共培养72小时。然后将细胞快速离心,并且收集上清液以使用人类IFN- γ HTRF试剂盒 (Cisbio, 目录号62HIFNGPEH) 和PHERAstarPlus机器 (BMG Labtech) 进行IFN- γ 浓度测定。所述研究由3名不同的供体进行。结果表明BTP-21具有与基准抗体和亲本抗体相当的EC50,而其在BTP-21中的细胞因子释放诱导的最大潜力始终高于其它PD-L1抗体 (图29)。

[0594] PD-1×TIGIT BABP的体内功效研究

[0595] 在具有人类PD-1KI的Balb/c小鼠中建立的同系CT26结肠癌模型 (表达鼠类CD155) 中评估BTP-11的体内抗肿瘤活性。如实施例3中构建该CT26肿瘤模型。当肿瘤大小达到约100mm³时,动物开始接受治疗。测试物品每4天经由腹膜内给药一次。在整个研究中测量体重。肿瘤体积小于10mm³的动物被认为是无肿瘤的 (TF)。

[0596] 如图30所示,CT26肿瘤模型对抗TIGIT单阻断 (参见AS19584VH28 IgG4) 具有部分抗性,仅导致8只小鼠中的1只无肿瘤。单独的抗PD-1抗体 (PD1-BM-min) 以10mg/kg适度抑制PD-1KI小鼠中的CT26肿瘤生长,导致8只小鼠中的3只无肿瘤。BTP-11在相同摩尔剂量 (12.33mg/kg) 下显示出导致肿瘤消退的优异效果,导致8只小鼠中的5只无肿瘤。该效果甚至优于使用相同摩尔剂量 (分别为10mg/kg和5.33mg/kg) 的PD1-BM-min和AS19584VH28 IgG4的联合治疗,其仅导致8只小鼠中的1只无肿瘤。

[0597] PD-L1×TIGIT BABP的体内功效研究

[0598] 为了评估BTP-21的体内抗肿瘤活性,将过表达人类PD-L1的鼠类MC38结肠癌细胞 (MC38-hPDL1) 植入C57BL/6人类PD-1/PD-L1双重KI小鼠中,类似地如实施例3中所述。根据

公布的序列来表达阿特殊单抗(市售的抗PD-L1抗体)并用作另外的对照。当肿瘤大小达到 100mm^3 时,将动物随机分组进行治疗。测试物品在第0天、第4天、第6天和第8天经由腹膜内给药。在整个研究中测量体重。

[0599] 从图31中可以看出,阿特殊单抗和h53C1(惰性IgG1)单阻断均能够以 5mg/kg 抑制MC38-hPD-L1肿瘤生长,分别在治疗后第30天导致8只小鼠中的4只和8只小鼠中的3只无肿瘤。使用 2.67mg/kg 的AS19584VH28惰性IgG1的单阻断导致8只小鼠中的4只无肿瘤。BTP-21和组合疗法(h53C1(惰性IgG1)和AS19584VH28惰性IgG1)显示出较高的无肿瘤小鼠率(分别为8只中的6只和7只中的6只)。此外值得注意的是,BTP-21和组合疗法比所测试的任何单一疗法都更早发生无肿瘤状态。BTP-21或组合疗法治疗组中最早的应答者在治疗后第10至15天达到无肿瘤状态,而单一疗法组在任何小鼠达到无肿瘤状态之前需要20至25天。此外,与较高剂量(6.17mg/kg)施用BTP-21或相同摩尔剂量(5mg/kg h53C1+ 2.67mg/kg AS19584VH28惰性IgG1)的组合疗法相比,BTP-21即使在较低剂量(2.06mg/kg)下也展现出类似的优异治疗效果(图31)。

[0600] 上述研究表明,与在带有人源化靶标的小鼠肿瘤模型中靶向两种途径中的任一种的单一疗法相比,本文所述的BABP通过同时阻断PD-L1/PD-1和CD155/TIGIT途径而显示出优异的抗肿瘤活性。

血清滴定测定

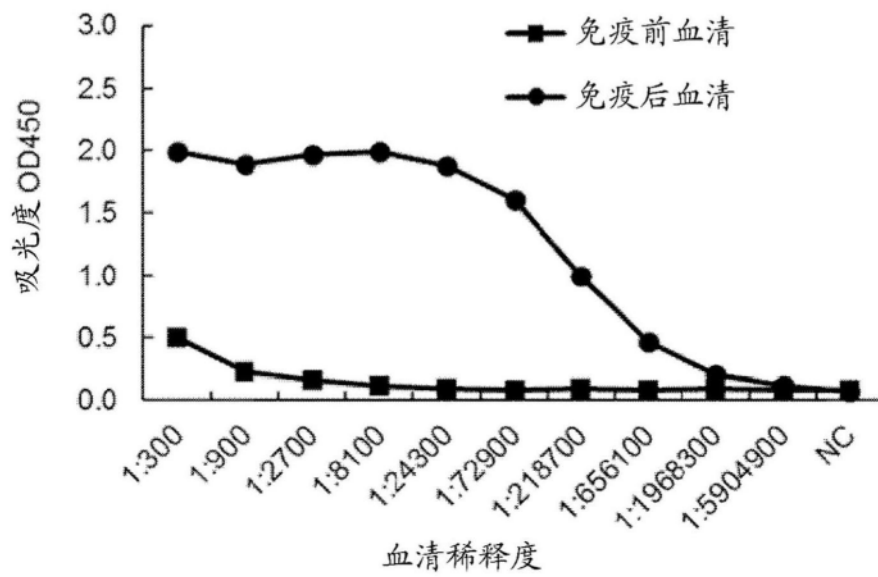


图1

纯化的IgG免疫反应试验

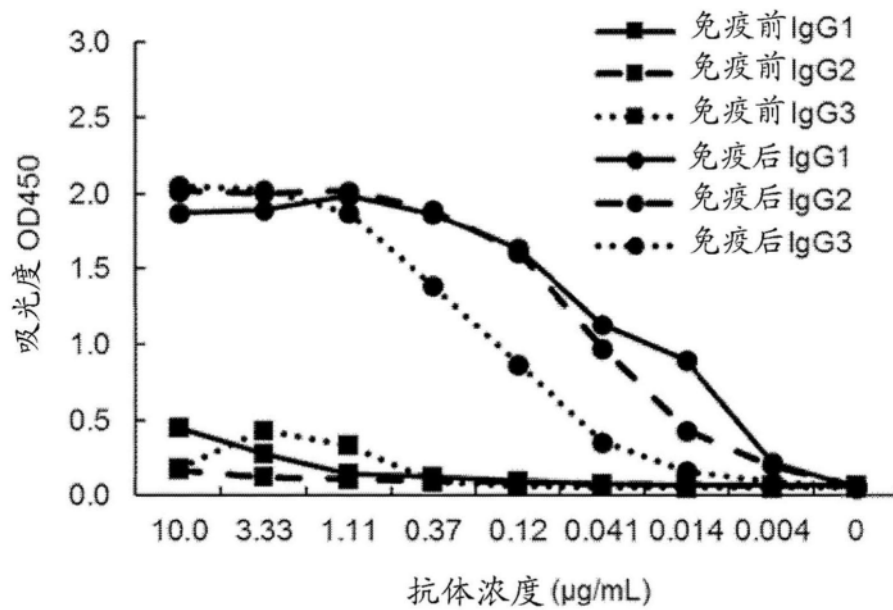


图2

非人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白和22G2的
TIGIT/CD155阻断报告基因测定

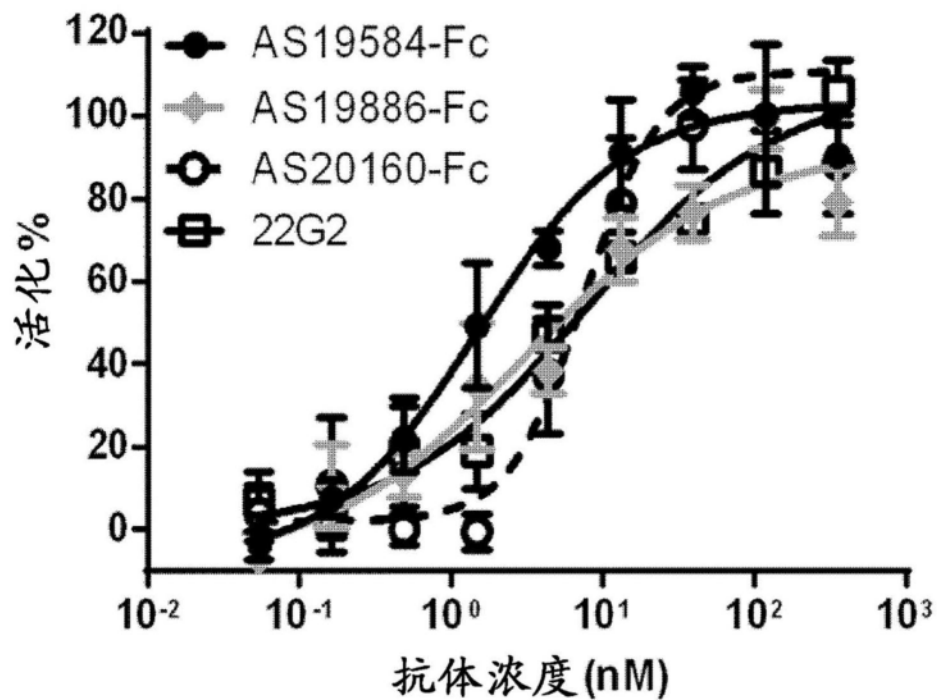


图3

非人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白和10A7在CT26
同系肿瘤模型中的功效

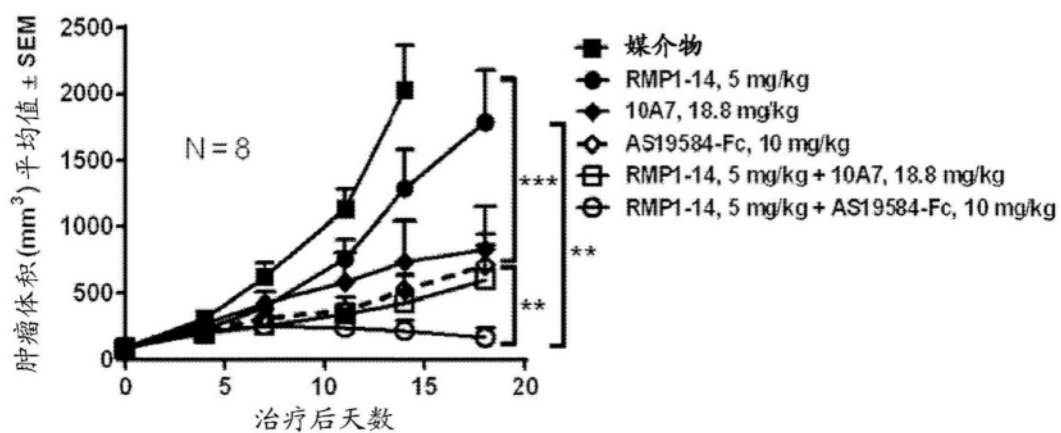


图4A

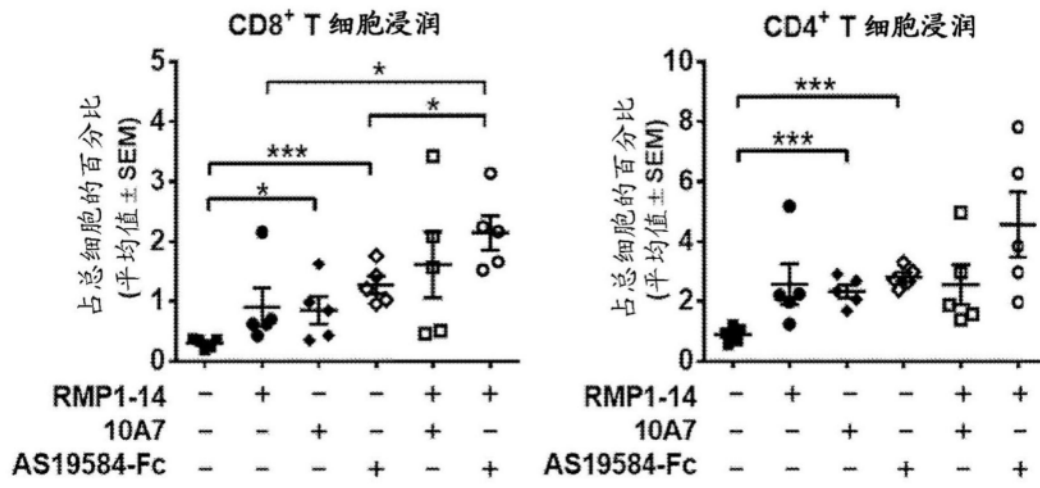


图4B

非人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白和10A7在CT26同系肿瘤模型中的功效

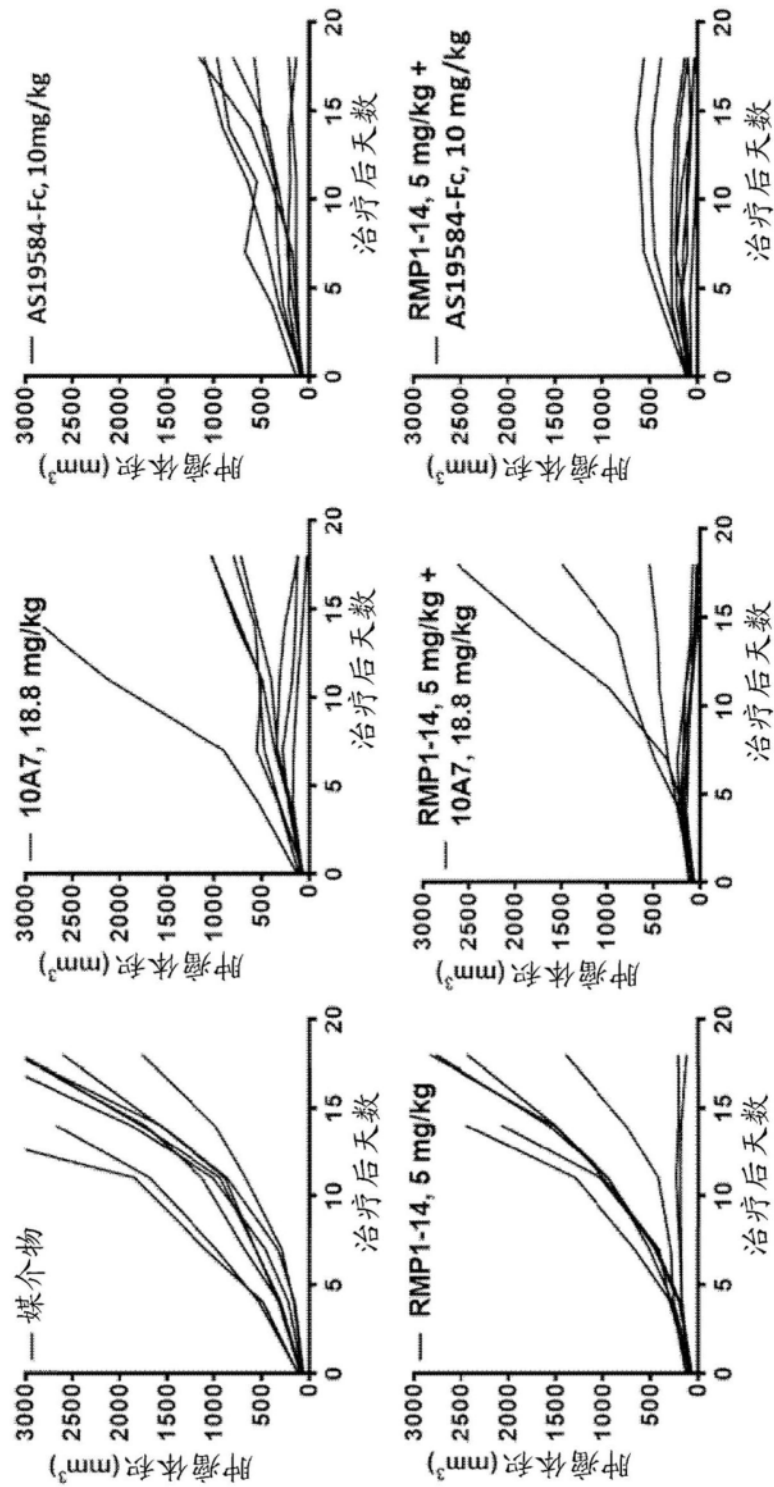


图4C

非人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白在CT26同系肿瘤
模型中的功效

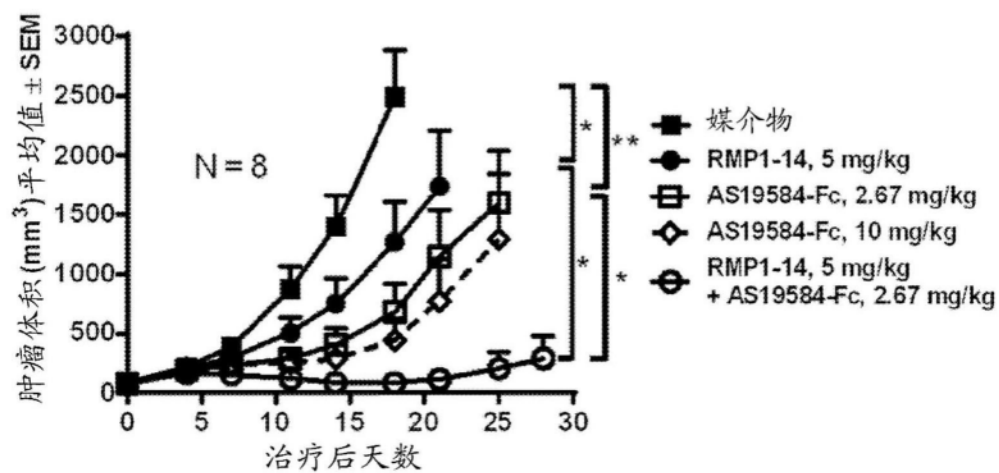


图5A

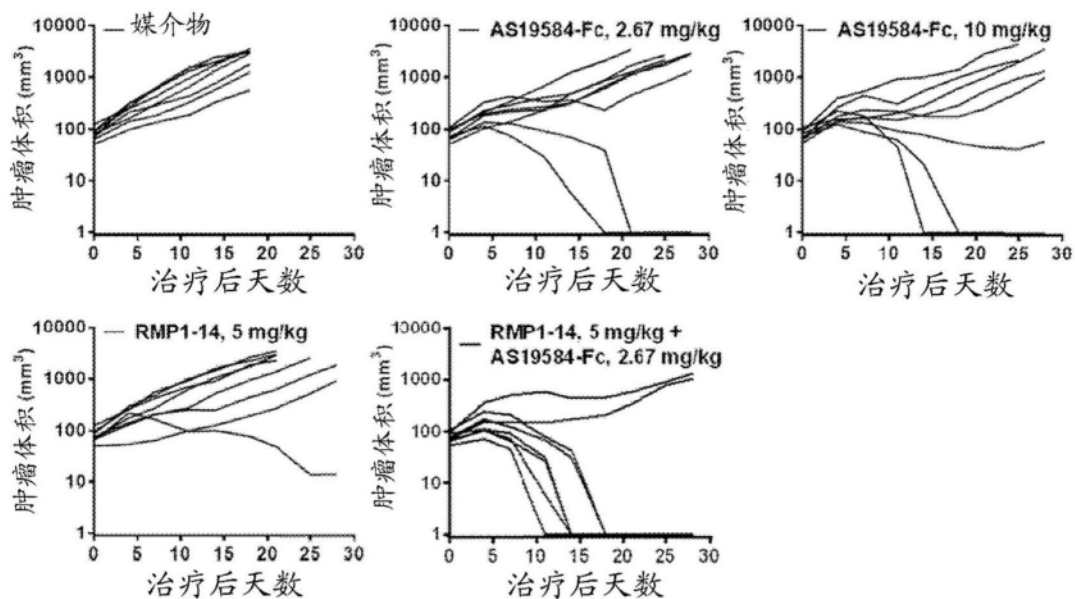


图5B

非人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白在MC38同系肿瘤模型中的功效

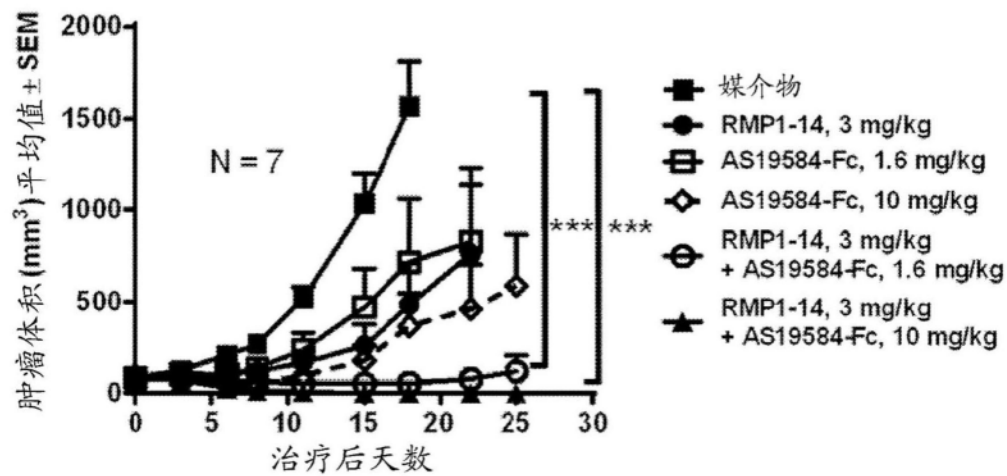


图6A

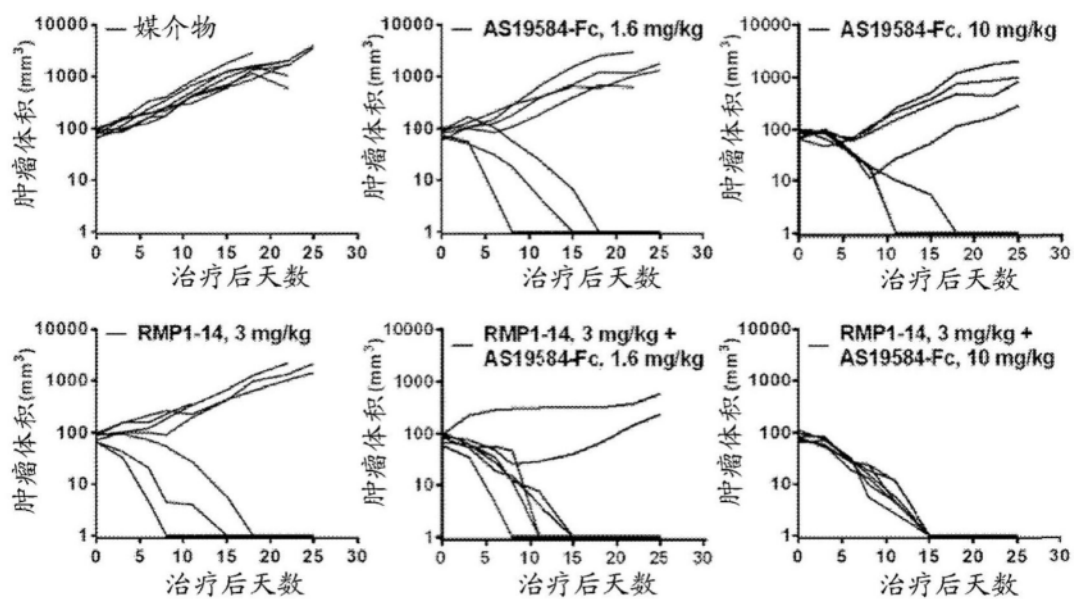


图6B

抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白的TIGIT/CD155阻断报告基因测定

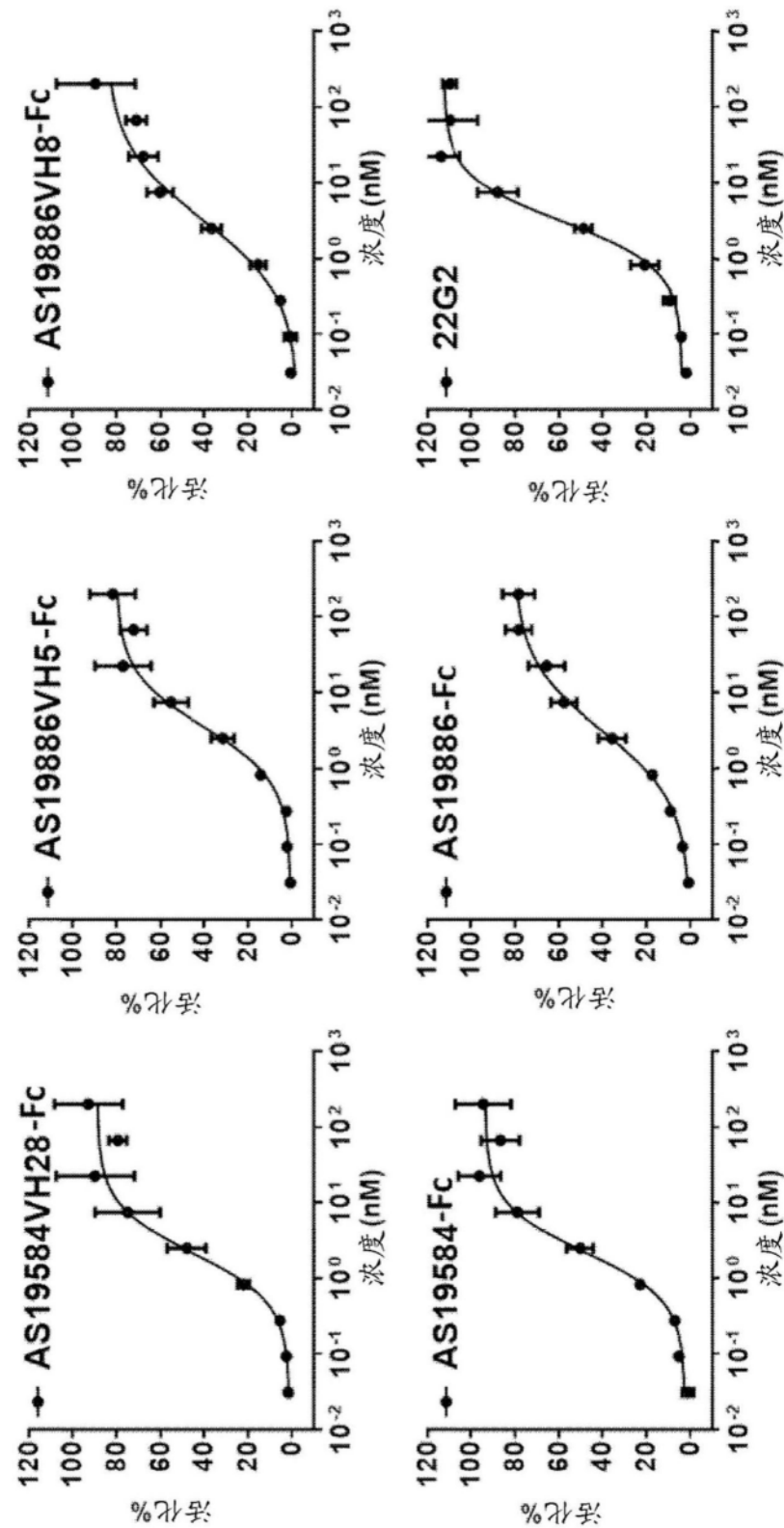


图7

抗TIGITsdAb-Fc融合蛋白的IL-2释放测定

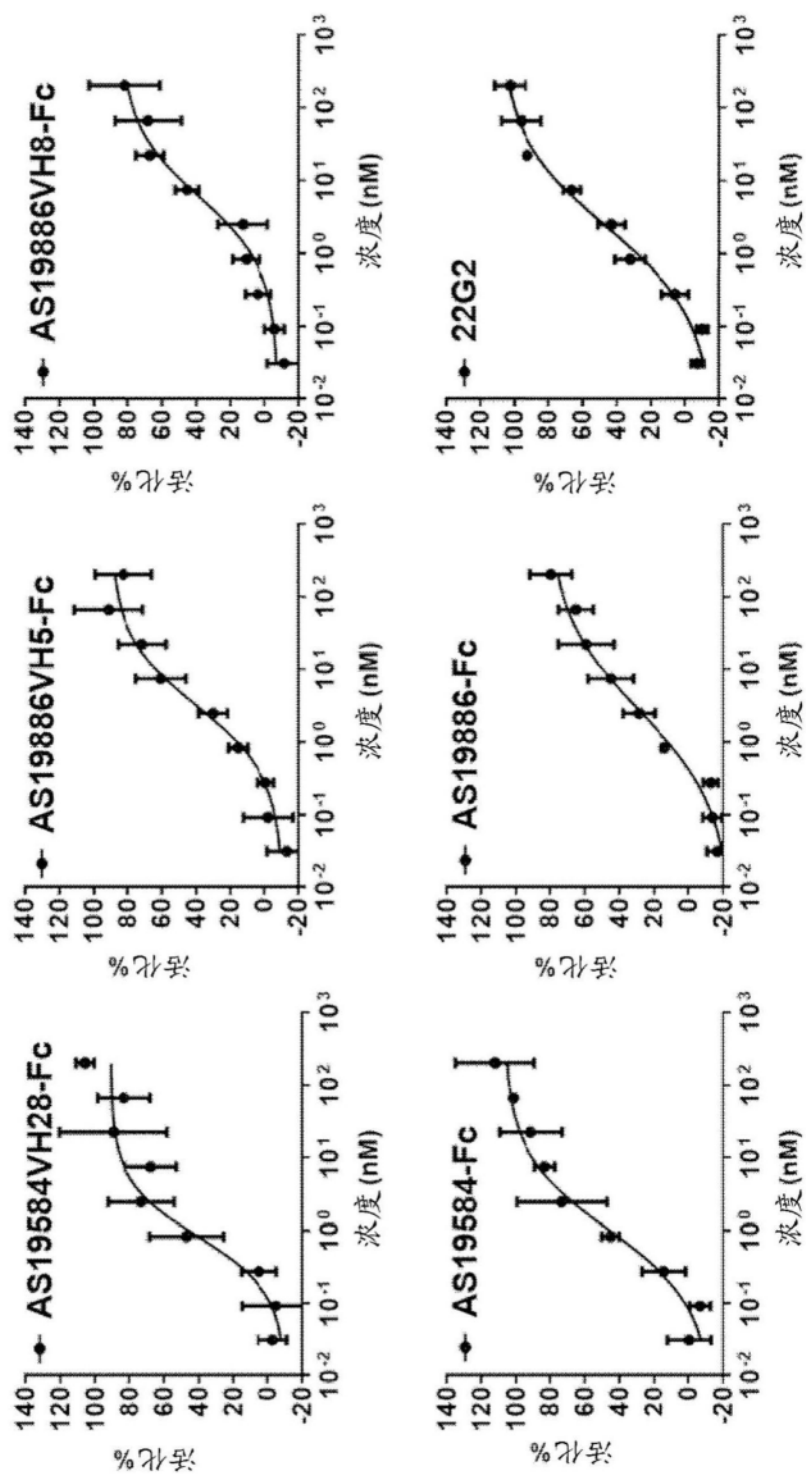


图8

人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白与抗TIGIT全长抗体22G2的药代动力学曲线

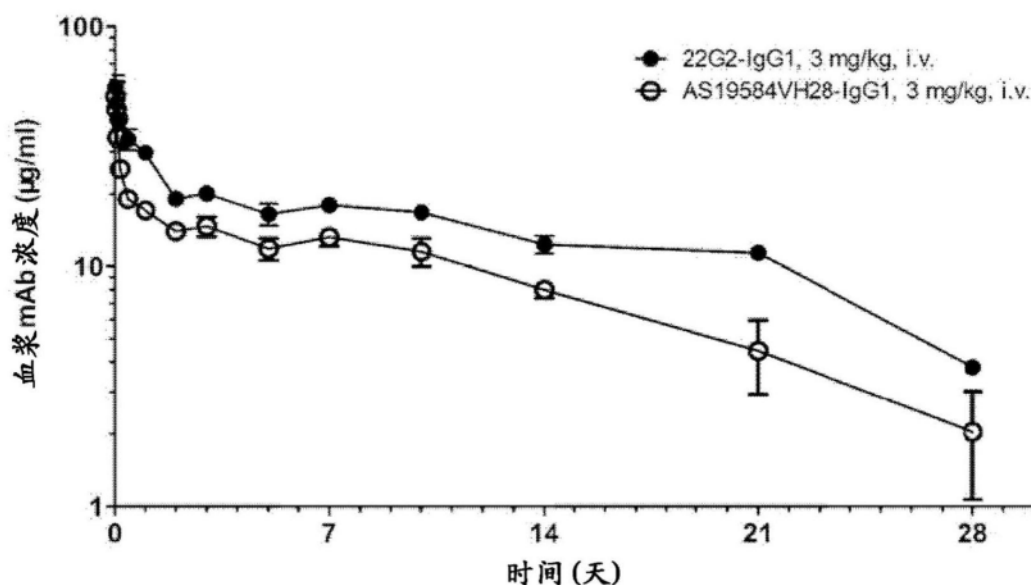


图9

人源化抗TIGIT sdAb-Fc融合蛋白在带有MC38肿瘤的人类TIGIT KI小鼠中的功效

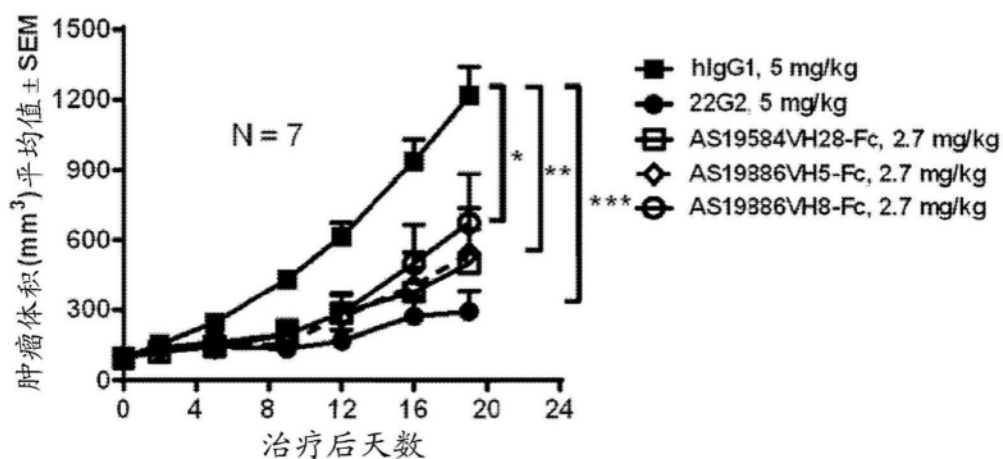


图10A

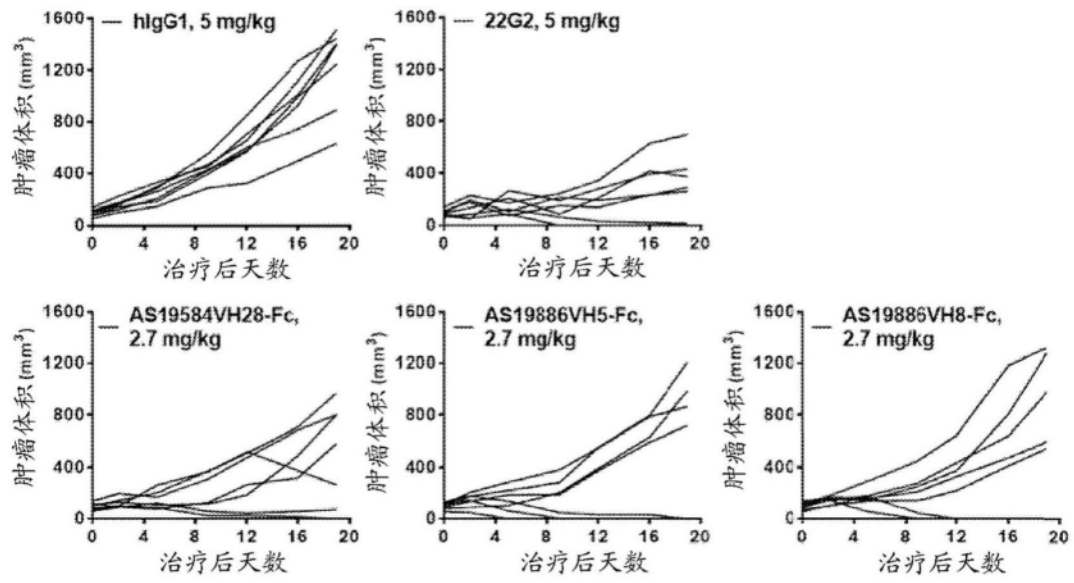


图10B

POCPD-L1xTIGITBAP的PD-L1 功能测定

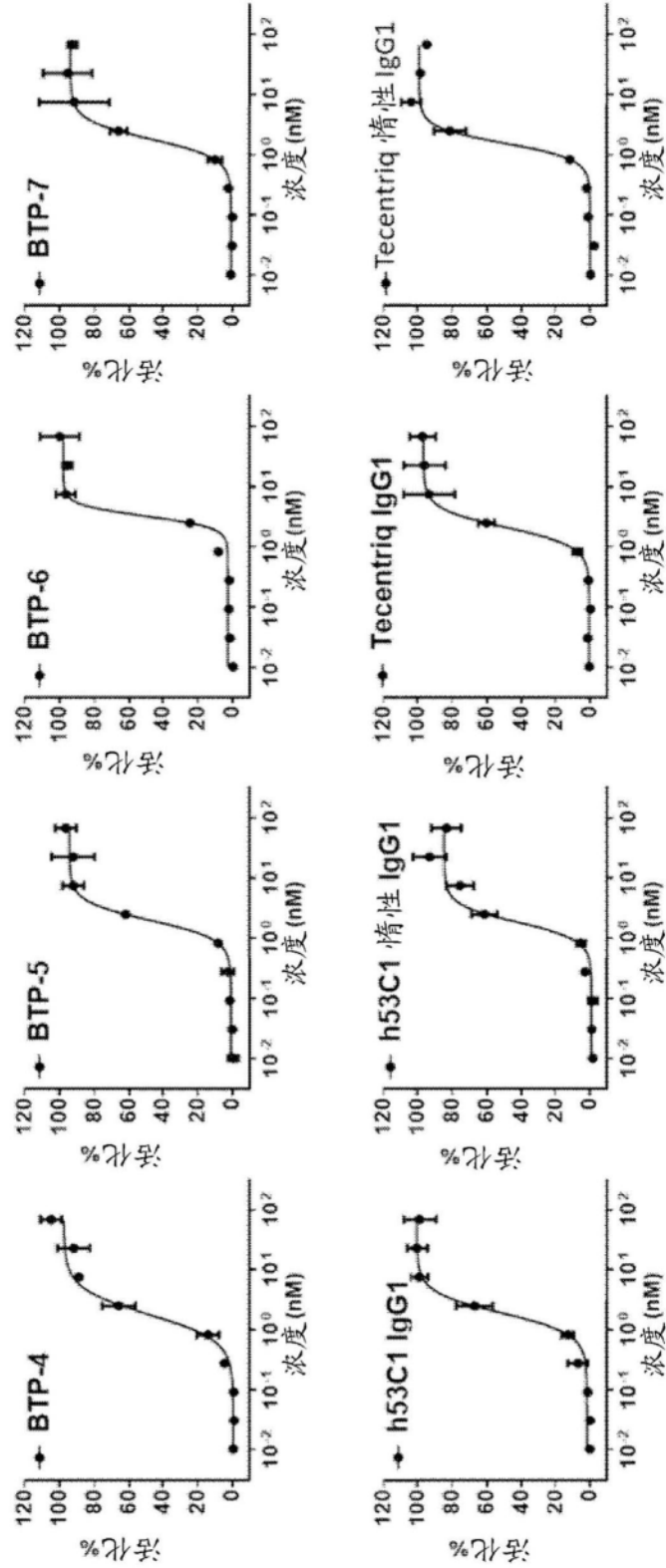


图11

POC PD-L1×TIGIT BABP的MLR测定

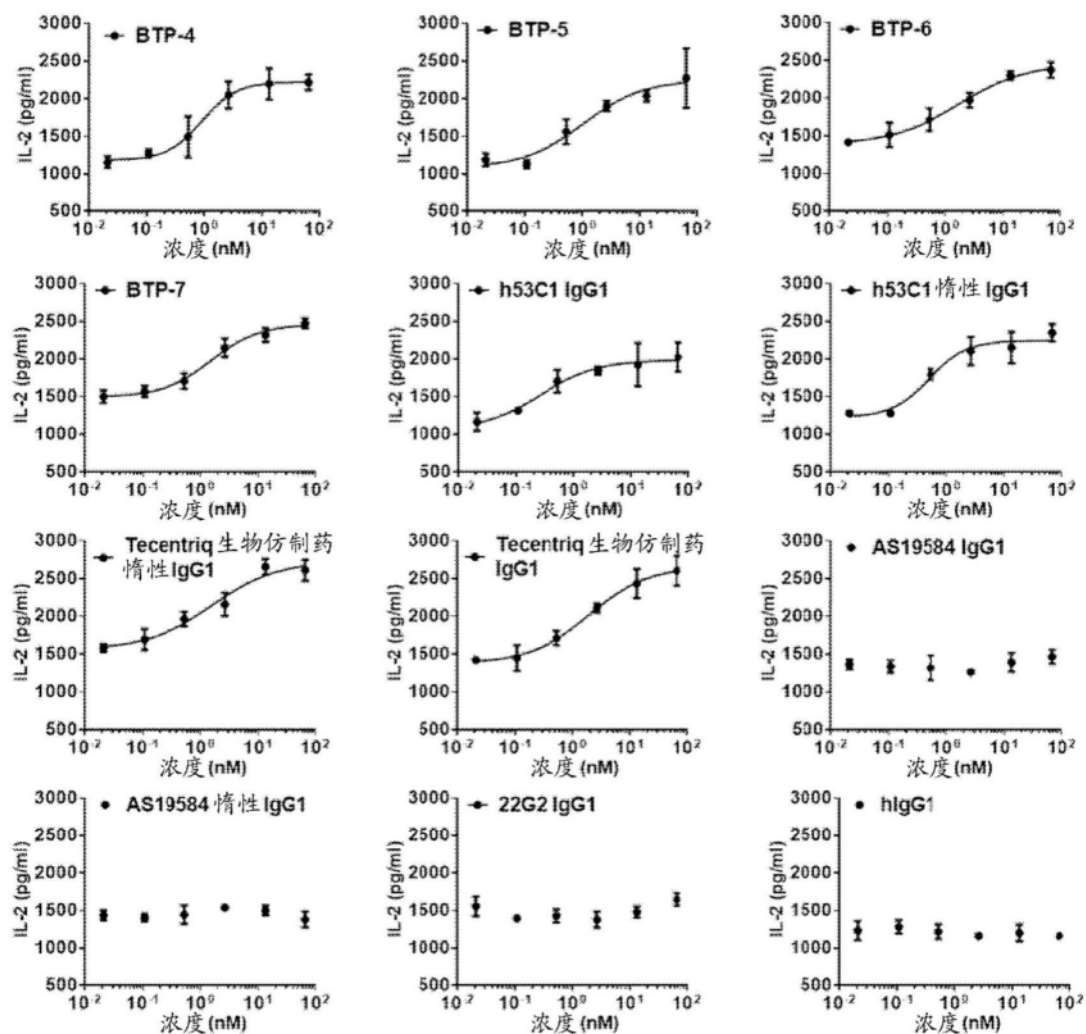


图12

POCPD-L1×TIGIT BABP的TIGIT/CD155阻断报告基因测定

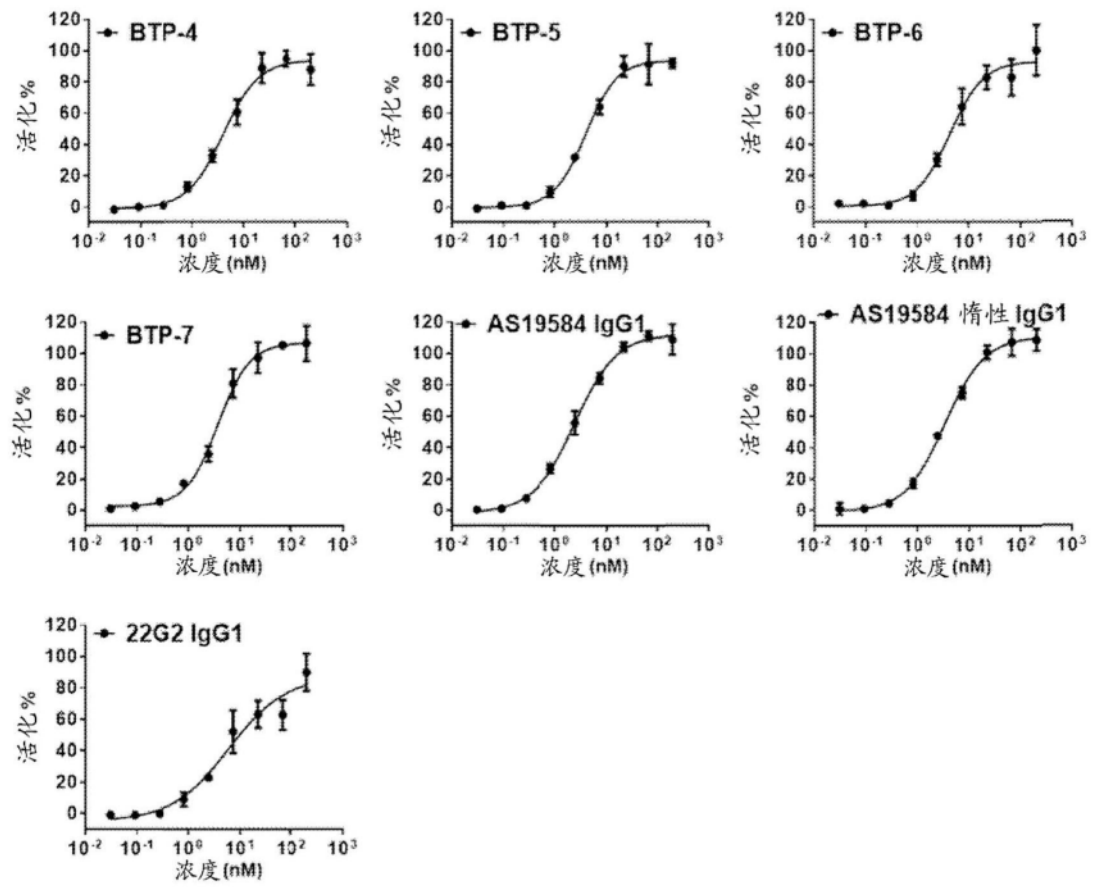


图13

POC PD-L1×TIGIT BABP的IL-2释放测定

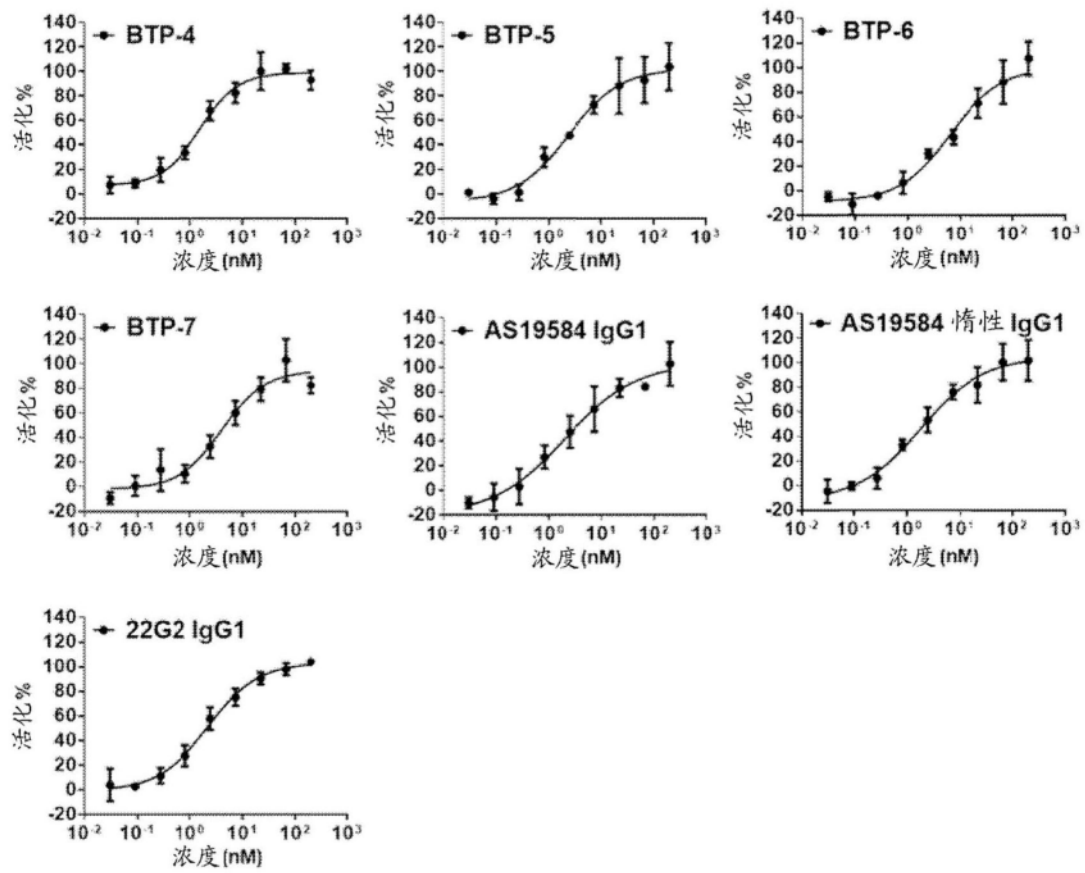


图14

POC PD-L1×TIGIT BABP的PD-L1/TIGIT双功能报告基因测定

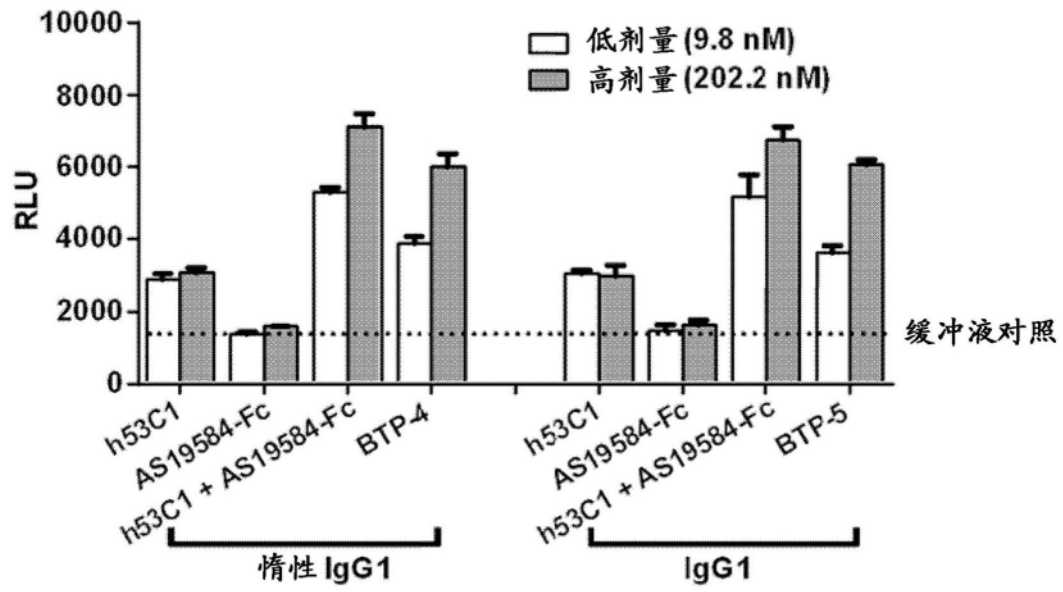


图15

POCSMAB在带有MC38-hPD-L1肿瘤的C57BL/6 人类PD-1 KI小鼠中的功效

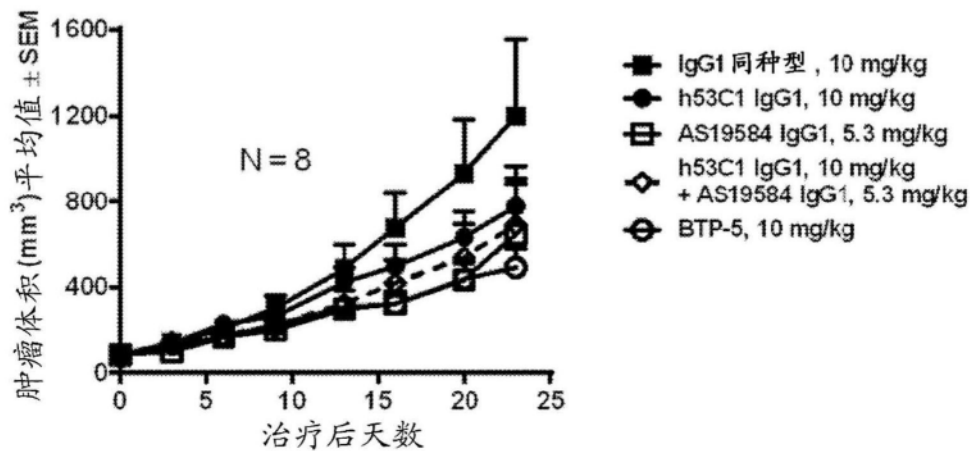


图 16A

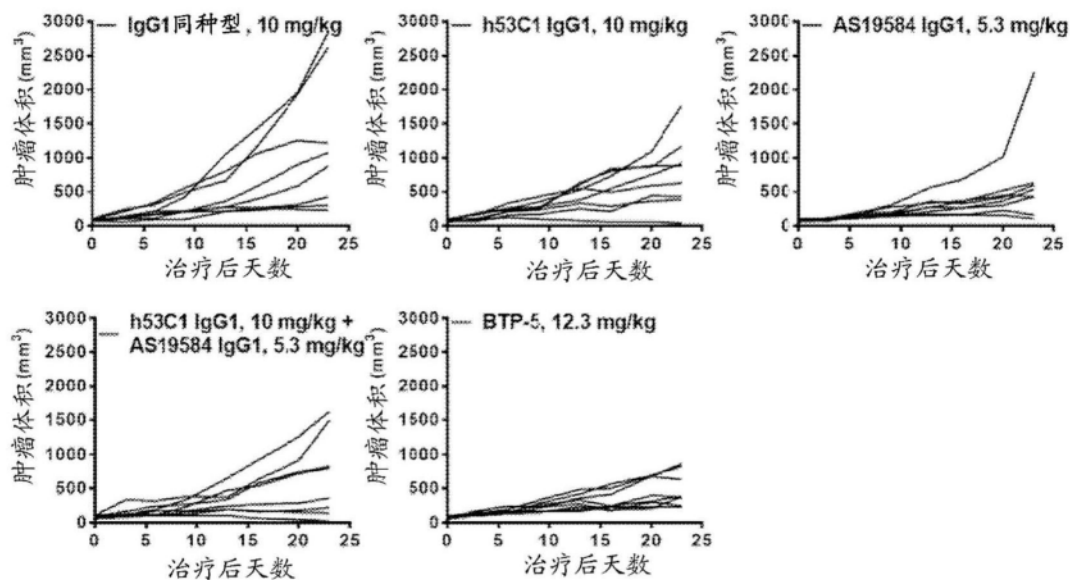


图 16B

图16

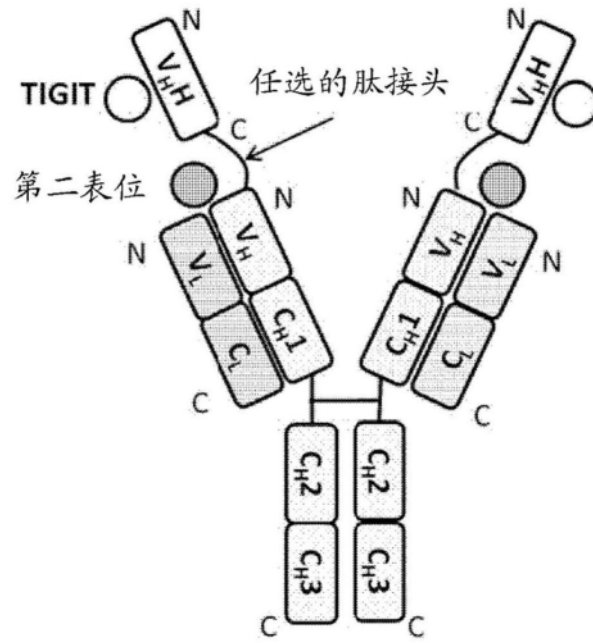


图17

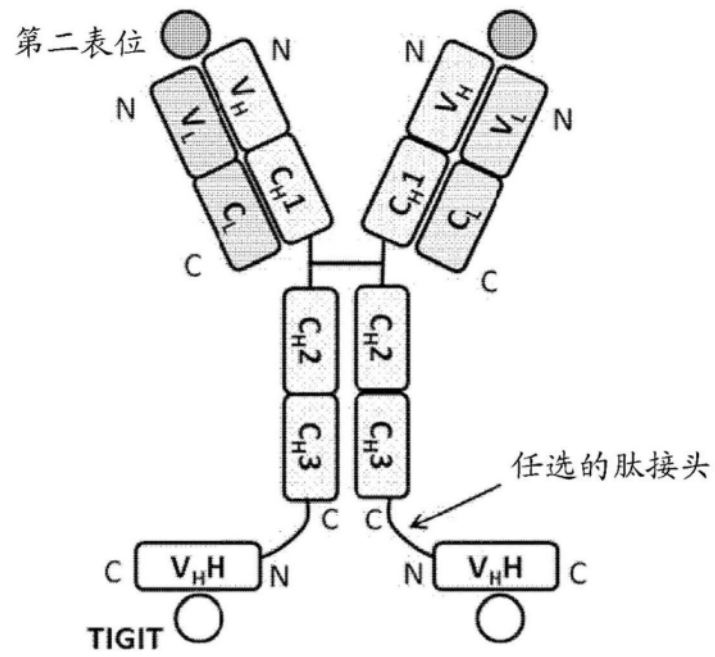


图18

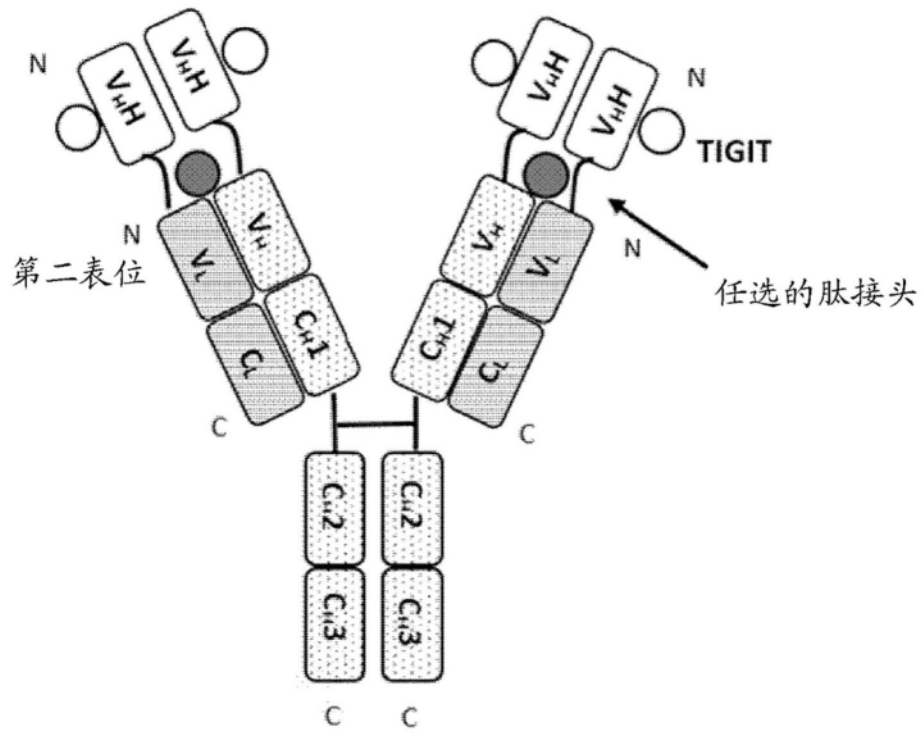


图21

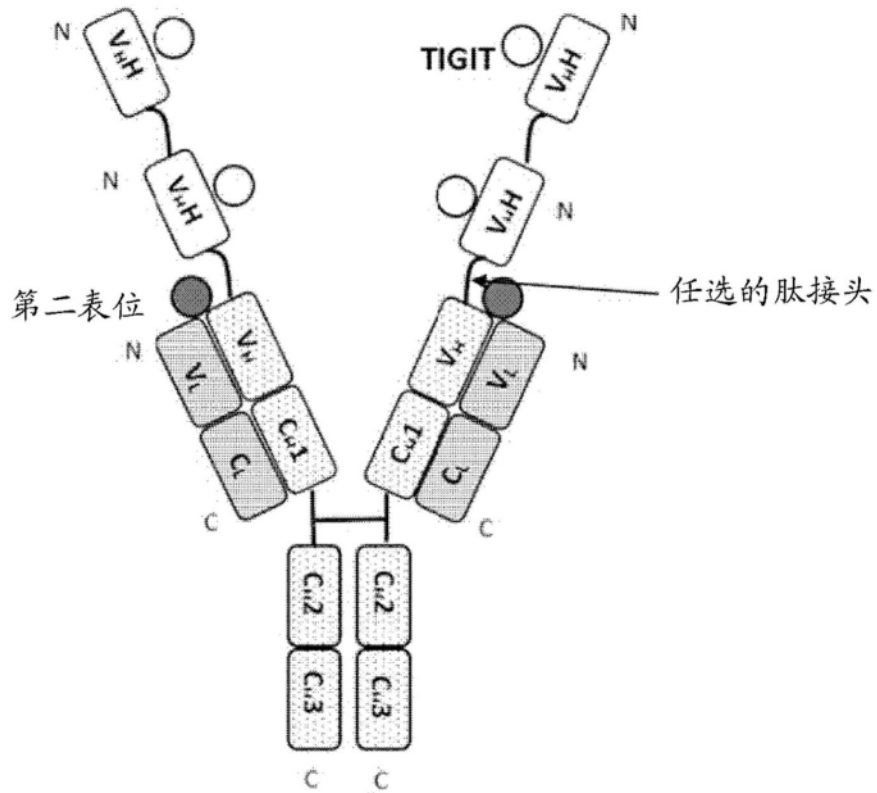


图22

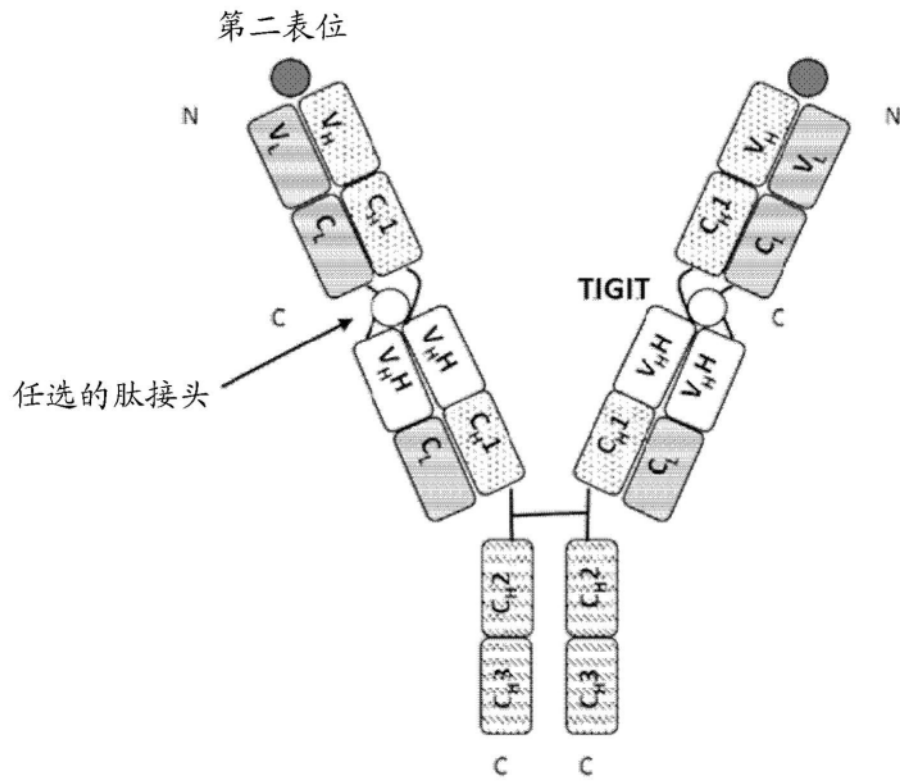


图25

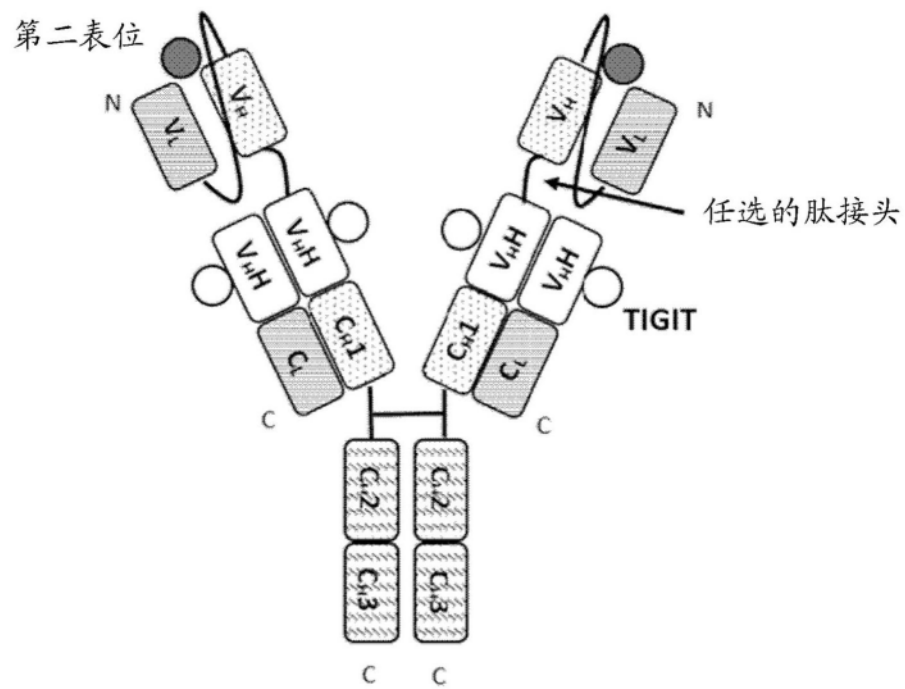


图26

PD-1/TIGIT、PD-L1/TIGIT双功能报告基因测定

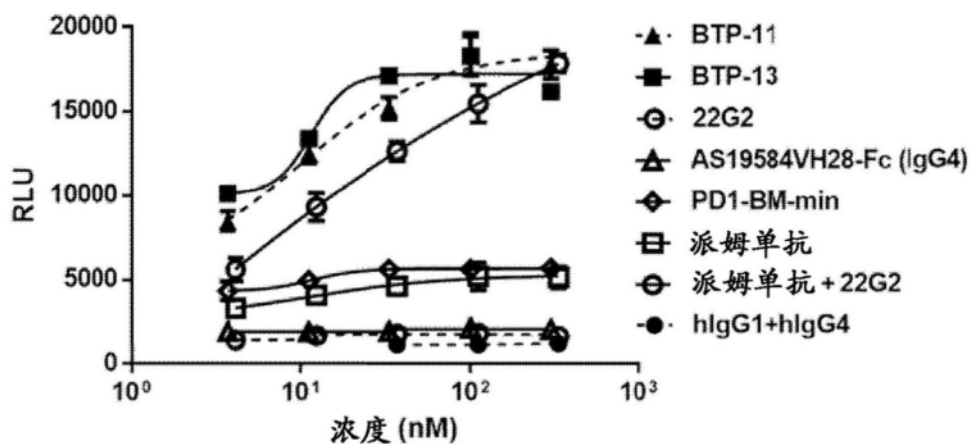


图 27A

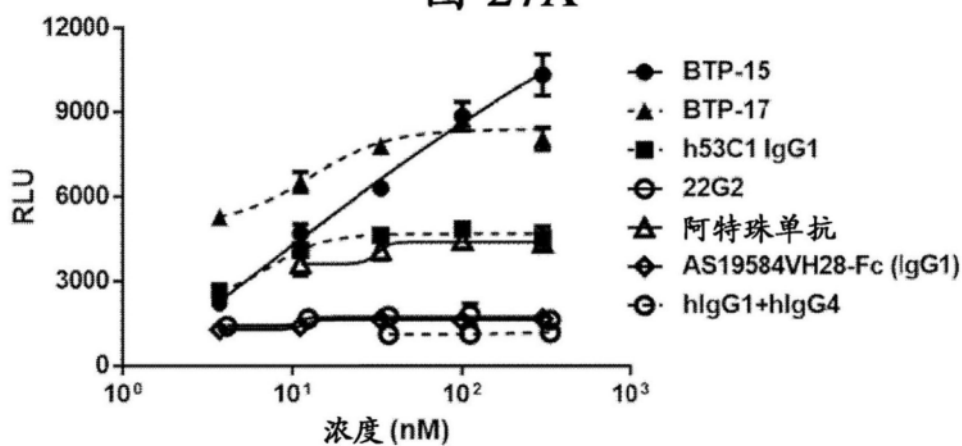


图 27B

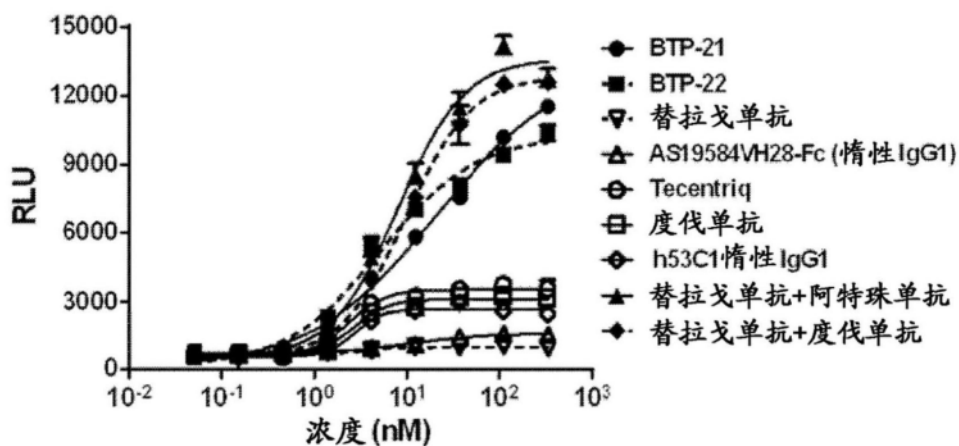


图 27C

图27

原代T细胞结合测定

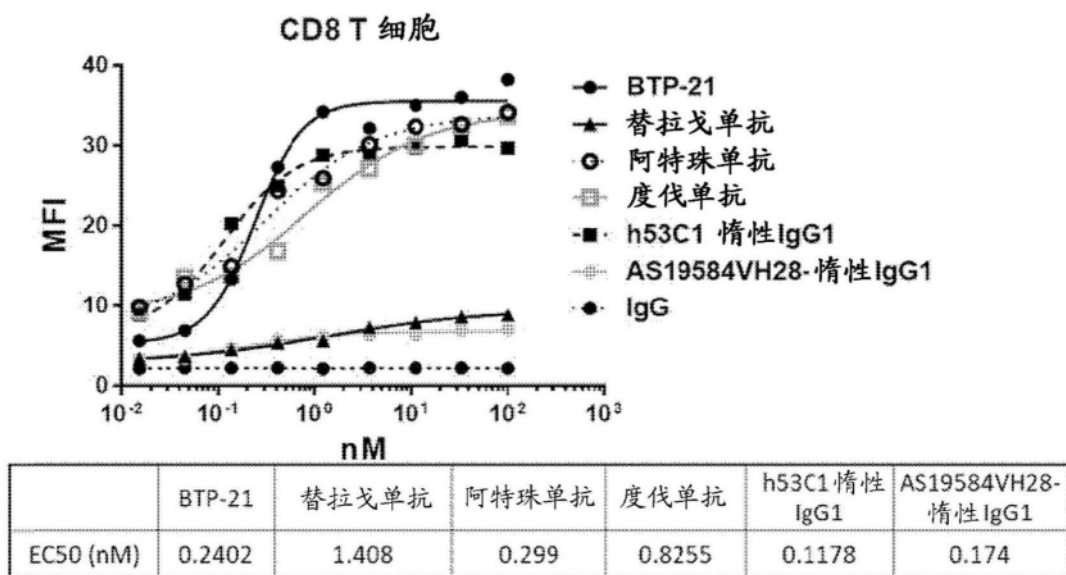


图 28A

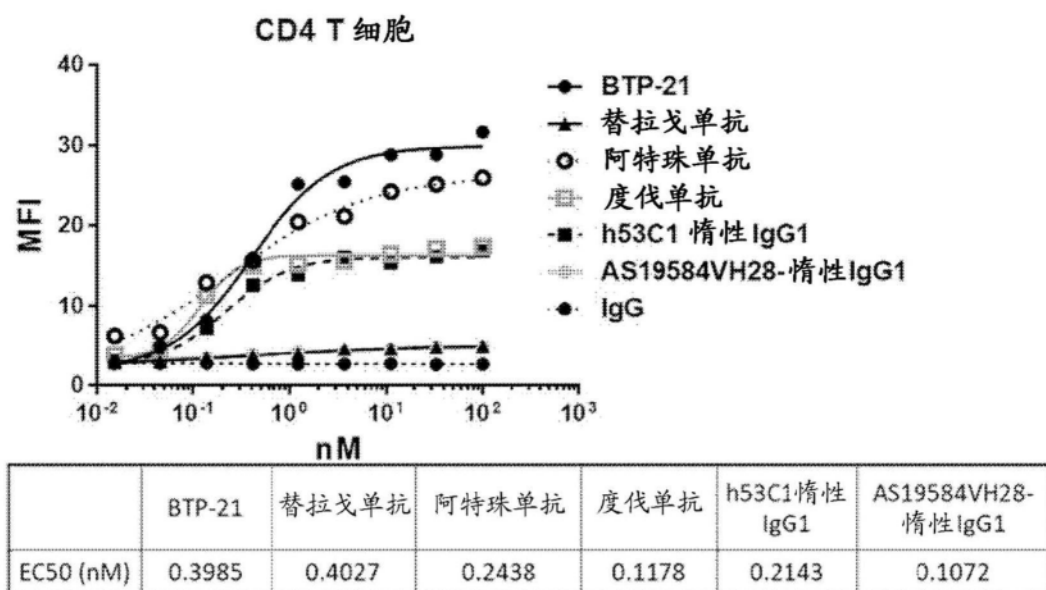


图 28B

图28

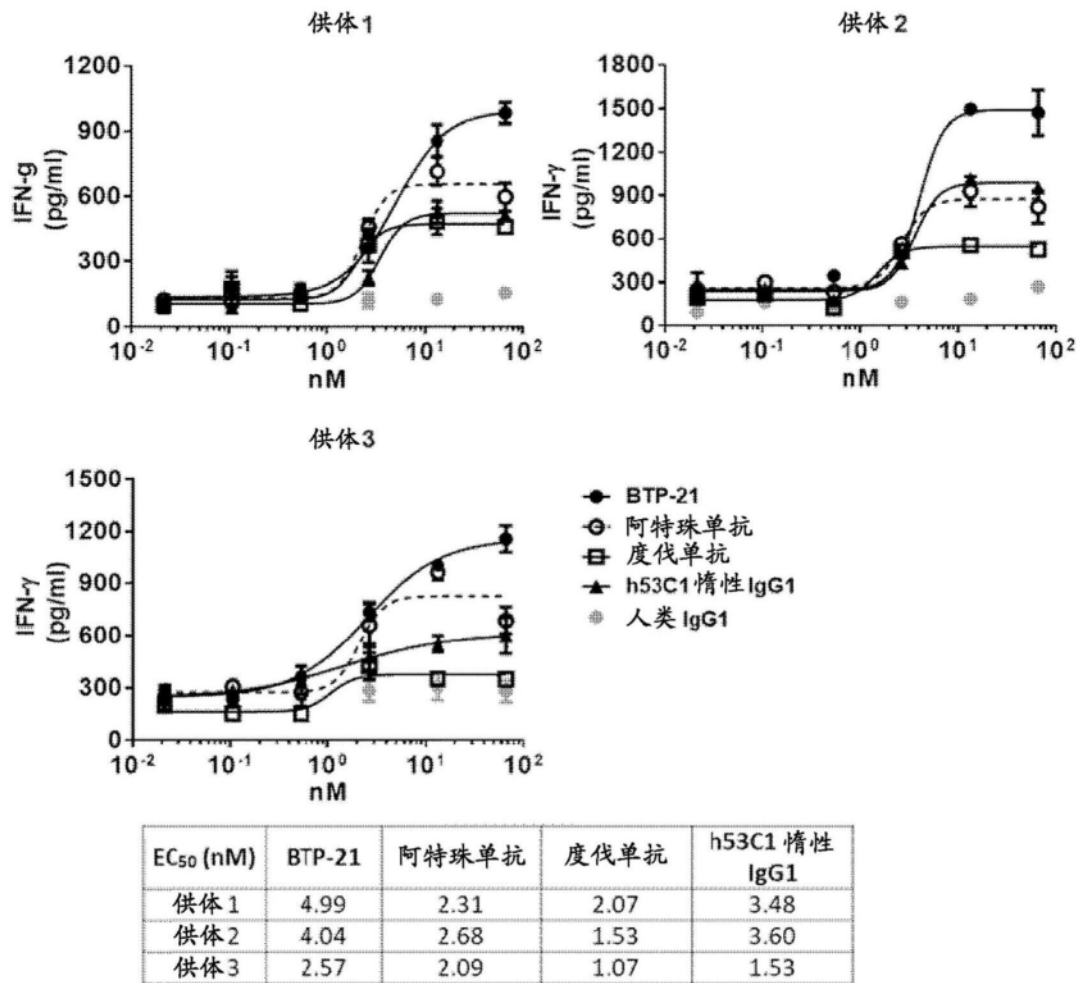
PBMC IFN- γ 释放测定

图29

BTP-11在带有CT26肿瘤的Balb/c人类PD-1 KI小鼠中的功效

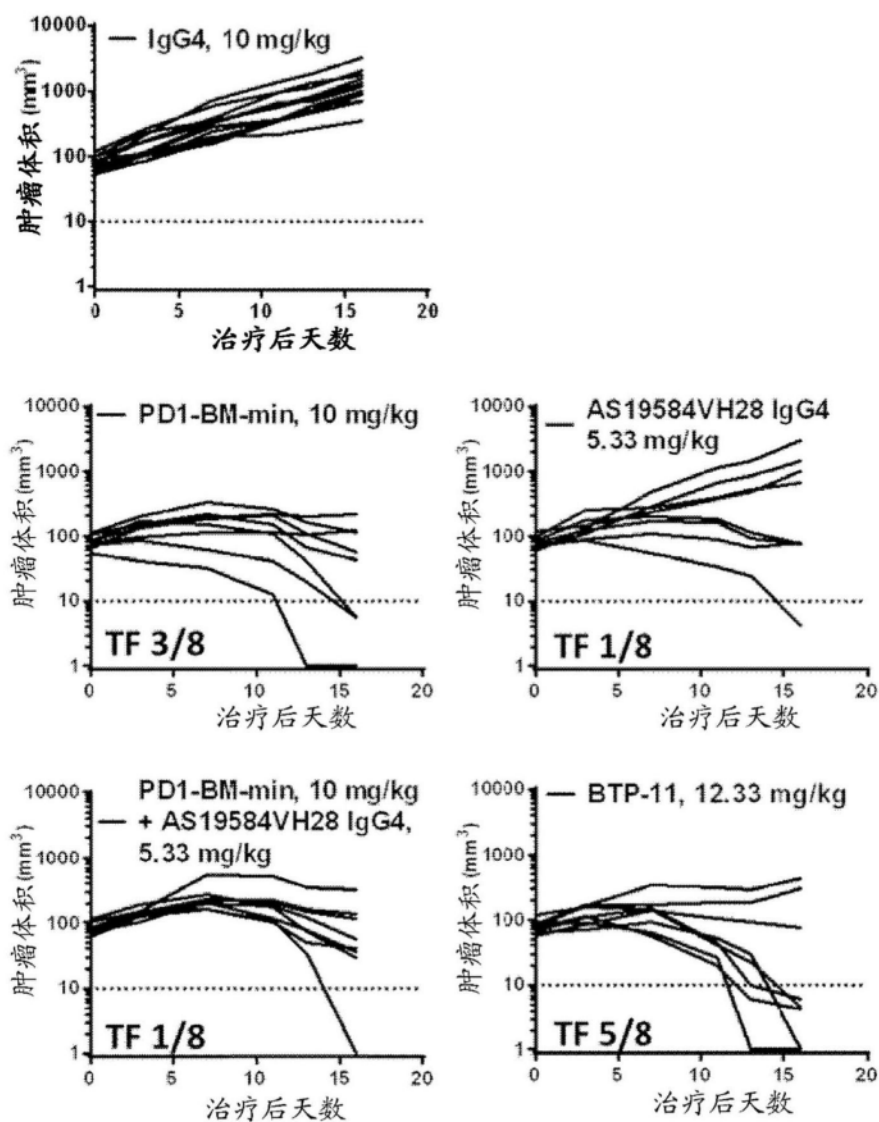


图30

BTP-21在带有MC38-hPDL1肿瘤的C57BL/6人类PD-1/PD-L1双重KI小鼠中的功效

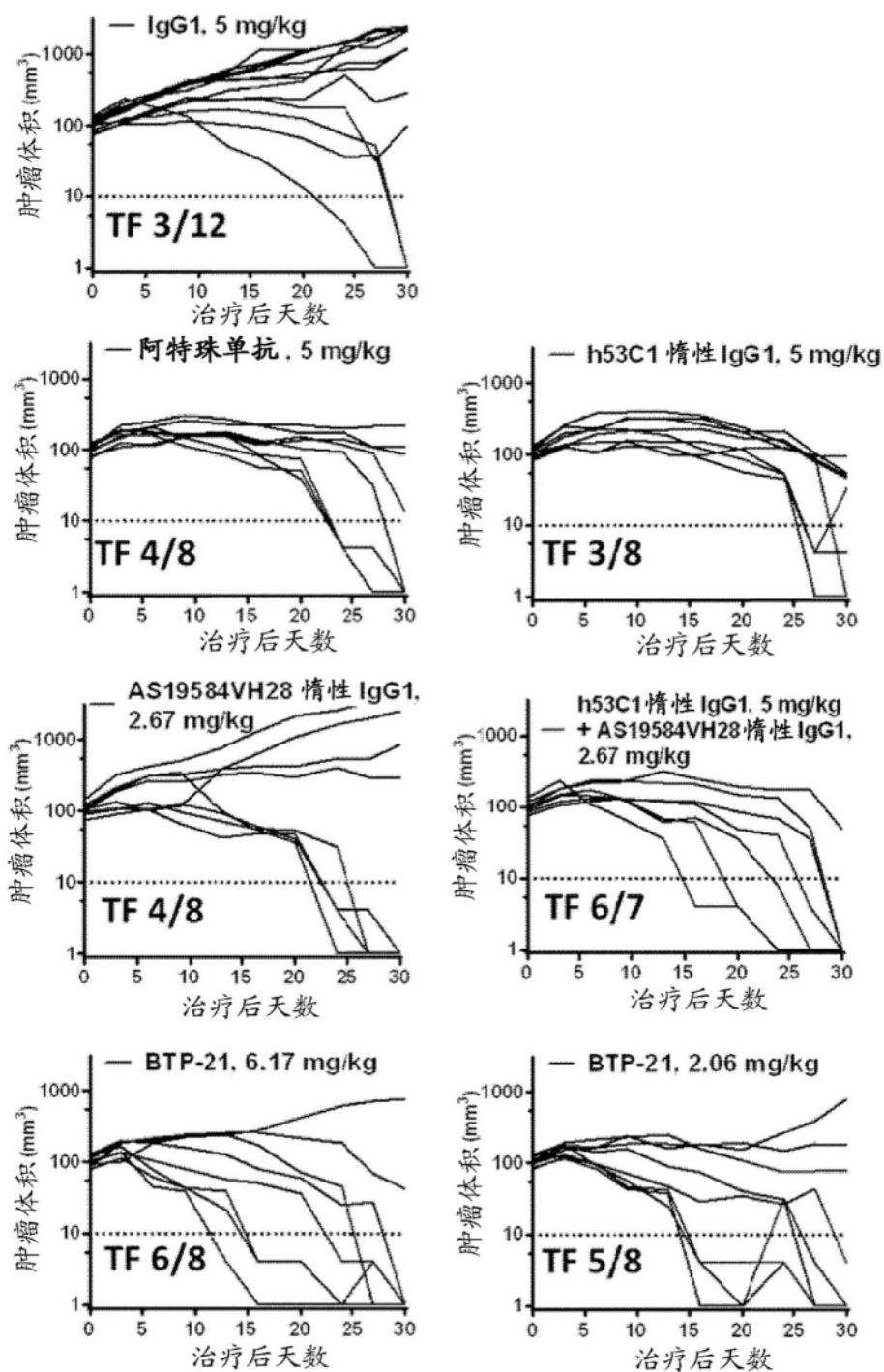


图31