



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110818795 B

(45)授权公告日 2020.04.24

(21)申请号 202010024565.9

C12N 15/13(2006.01)

(22)申请日 2020.01.10

C12N 15/867(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12N 15/861(2006.01)

申请公布号 CN 110818795 A

C12N 15/864(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

(43)申请公布日 2020.02.21

A61K 39/395(2006.01)

(73)专利权人 上海复宏汉霖生物技术股份有限公司

A61K 45/06(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

地址 201210 上海市浦东新区中国(上海)

自由贸易试验区张衡路1999号7幢
303,304室

(56)对比文件

WO 2019/129221 A1,2019.07.04,说明书第
8-14、20-26、71、87、171-172、196段.

(72)发明人 杨明 许文峰 姜伟东 薛杰

CN 108137691 A,2018.06.08,全文.

CN 108290946 A,2018.07.17,全文.

(74)专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司 11006

CN 108368176 A,2018.08.03,全文.

代理人 黄韧敏

审查员 冷千里

(51)Int.Cl.

权利要求书1页 说明书72页

C07K 16/28(2006.01)

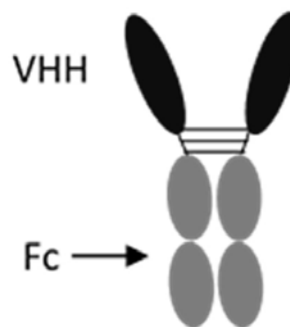
序列表75页 附图15页

(54)发明名称

抗TIGIT抗体和使用方法

(57)摘要

本发明涉及与“具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)”结合的抗TIGIT抗体,这些抗体包括对TIGIT和一种或多种另外的抗原具有结合特异性的多特异性抗TIGIT抗体;以及其使用方法。在某些实施例中,这些抗TIGIT抗体包含与TIGIT结合的单结构域抗体。



1. 一种与TIGIT结合的抗体,该抗体是单结构域抗体,其中该单结构域抗体以 1×10^{-8} M或更小的KD结合TIGIT,其中所述单结构域抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含:

重链可变区CDR1,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 94所示;重链可变区CDR2,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 95所示;和重链可变区CDR3,其氨基酸序列如SEQ ID NO: 96所示。

2. 如权利要求1所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,其中:

所述重链可变区序列如SEQ ID NO: 97所示。

3. 如权利要求1所述的抗体,其中该单结构域抗体包含人源化框架。

4. 如权利要求1所述的抗体,其中该抗体包含人抗体IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的抗体,其中该抗体缀合至治疗剂或标记。

6. 一种核酸,该核酸编码如权利要求1至4中任一项所述的抗体。

7. 一种载体,该载体包含如权利要求6所述的核酸。

8. 一种宿主细胞,该宿主细胞包含如权利要求6所述的核酸或如权利要求7所述的载体。

9. 一种制备如权利要求1至4中任一项所述的抗体的方法,该方法包括在如权利要求8所述的宿主细胞中表达该抗体并从该宿主细胞中分离该抗体。

10. 一种药物组合物,该药物组合物包含a) 如权利要求1至4中任一项所述的抗体,和b) 药学上可接受的载剂。

11. 一种如权利要求1至4中任一项所述的抗体或如权利要求6所述的核酸或如权利要求10所述的药物组合物在制备减轻受试者的肿瘤负荷的药物中的用途,其中所述肿瘤为结肠癌。

抗TIGIT抗体和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及与具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)结合的抗体,这些抗体包括对TIGIT和一种或多种另外的抗原具有结合特异性的多特异性抗TIGIT抗体;以及其使用方法。

背景技术

[0002] 具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)是由免疫细胞(例如活化的T细胞和自然杀伤细胞(NK细胞))表达的免疫检查点受体,并介导免疫抑制。TIGIT的配体包括PVR(CD155),其已在树突状细胞(DC)、巨噬细胞以及许多人类癌细胞中鉴定出,并已显示与TIGIT结合后可下调T细胞活化和细胞因子分泌。TIGIT/PVR相互作用的抑制可以介导免疫细胞有效的抗肿瘤活性。考虑到TIGIT在免疫检查点调节中的重要作用,在本领域中仍然需要开发用于调节TIGIT介导的免疫细胞调节以用于免疫疗法和癌症治疗的治疗性分子和方法。

发明内容

[0003] 本公开提供了以高亲和力特异性结合TIGIT的分离的单克隆抗体,其包括结合TIGIT和一种或多种另外的靶标的多特异性抗体。在某些实施例中,抗TIGIT抗体包含与TIGIT结合的单结构域抗体。本公开进一步提供了制备抗体、免疫缀合物和包含这些抗体的药物组合物的方法,以及使用抗体、免疫缀合物和包含这些抗体的药物组合物例如用于治疗疾病和病症(例如癌症)的方法。本发明部分地基于发现与TIGIT结合的单结构域抗TIGIT抗体,这些抗体可以增加免疫细胞中的免疫应答并提供改善的抗肿瘤功效。

[0004] 在某些实施例中,抗TIGIT抗体包含与TIGIT结合的单结构域抗体。在某些实施例中,单结构域抗体以约 1×10^{-7} M或更小的KD结合TIGIT。在某些实施例中,单结构域抗体以约 1×10^{-8} M或更小的KD结合TIGIT。在某些实施例中,单结构域抗体以约 5×10^{-9} M或更小的KD结合TIGIT。在某些实施例中,单结构域抗体以约 2×10^{-9} M或更小的KD结合TIGIT。

[0005] 在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 94所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 95所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 96所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 98所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 99所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 100所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 102所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 103所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 104所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结

[0006] 在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:a) 重链可变区CDR1,该重链可变区CDR1包含SEQ ID NO: 94、98、102、106、110、114、118、122、126、130、134、138、142、146、150、154、158、162、166、170、174、178、182、186和190中任何一个的氨基酸序列,或其具有多达约3个氨基酸取代的变体;b) 重链可变区CDR2,该重链可变区CDR2包含SEQ ID NO: 95、99、103、107、111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175、179、183、187和191中任何一个的氨基酸序列,或其具有多达约3个氨基酸取代的变体;以及c) 重链可变区CDR3,该重链可变区CDR3包含SEQ ID NO: 96、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188和192中任何一个的氨基酸序列,或其具有多达约3个氨基酸取代的变体。

[0007] 在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含CDR1结构域、CDR2结构域和CDR3结构域,其中该CDR1结构域、CDR2结构域和CDR3结构域分别含有包含在参考重链可变区中的CDR1结构域、CDR2结构域和CDR3结构域,该参考重链可变区包含选自SEQ ID NO: 97、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189和193组成的组的氨基酸序列。

[0008] 在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 94所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 95所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 96所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 98所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 99所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 100所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 102所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 103所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 104所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 106所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 107所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 108所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 110所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 111所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 112所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 114所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 115所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 116所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 118所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 119所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 120所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 122所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 123所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 124所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 126所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 127所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 128所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 130所

酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 190所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 191所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 192所示序列的氨基酸。

[0009] 在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含与选自由SEQ ID NO: 97、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189和193组成的组的氨基酸序列具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。

[0010] 在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 97所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 101所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 105所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 109所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 113所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 117所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 121所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 125所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 129所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 133所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 137所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 141所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 145所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 149所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 153所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 157所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 161所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 165所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 169所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 173所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 177所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 181所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 185所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 189所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 193所示的氨基酸序列。

[0011] 在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 1所示序

CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 59所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 61所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 62所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 63所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 65所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 66所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 67所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 69所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 70所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 71所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 73所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 74所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 75所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 77所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 78所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 79所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 81所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 82所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 83所示序列的氨基酸。

[0013] 在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含与选自由SEQ ID NO: 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80和84组成的组的氨基酸序列具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含选自由SEQ ID NO: 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80和84组成的组的氨基酸序列。

[0014] 在某些实施例中,单结构域抗体包含人源化框架。

[0015] 在某些实施例中,抗TIGIT抗体包含Fc区。在某些实施例中,Fc区包含人Fc区。在某些实施例中,Fc区包含选自下组的Fc区,该组由以下组成:IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的Fc区。在某些实施例中,Fc区包含选自下组的Fc区,该组由以下组成:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的Fc区。在某些实施例中,Fc区包含IgG1 Fc区。在某些实施例中,IgG1 Fc区包含一种或多种增强抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的突变。在某些实施例中,IgG1 Fc区包含L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L的突变。在某些实施例中,IgG1 Fc区包含S239D、A330L和I332E的突变。在某些实施例中,抗TIGIT抗体包含SEQ ID NO: 194所示的氨基酸序列。

[0016] 在某些实施例中,重链可变区通过接头连接至Fc区。在某些实施例中,接头是肽接头。在某些实施例中,肽接头包含约4至约30个氨基酸。在某些实施例中,肽接头包含约4至约15个氨基酸。在某些实施例中,肽接头包含选自由SEQ ID NO: 195-220组成的组的氨基酸序列。

[0017] 在某些实施例中,该抗TIGIT抗体包含多特异性抗体,例如双特异性抗体,全长免疫球蛋白,单链Fv(scFv)片段,Fab片段,Fab'片段,F(ab')₂,Fv片段,二硫键稳定的Fv片段(dsFv),(dsFv)₂,VHH,Fv-Fc融合物,scFv-Fc融合物,scFv-Fv融合物,双抗体,三抗体,四抗

体或任何它们的组合。

[0018] 在某些实施例中,抗TIGIT抗体包含多特异性抗体(例如双特异性抗体),其包含特异性结合第二抗原的第二抗体部分。在某些实施例中,第二抗原是肿瘤相关抗原。在某些实施例中,肿瘤相关抗原选自下组,该组由以下组成:Her-2,EGFR,PD-L1,c-Met,B细胞成熟抗原(BCMA),碳酸酐酶IX(CA1X),癌胚抗原(CEA),CD5,CD7,CD10,CD19,CD20,CD22,CD30,CD33,CD34,CD38,CD41,CD44,CD49f,CD56,CD74,CD123,CD133,CD138,CD276(B7H3),上皮糖蛋白(EGP2),滋养层细胞表面抗原2(TROP-2),上皮糖蛋白-40(EGP-40),上皮细胞粘附分子(EpCAM),受体酪氨酸蛋白激酶erb-B2、3、4,叶酸结合蛋白(FBP),胎儿乙酰胆碱受体(AChR),叶酸受体-a,神经节苷脂G2(GD2),神经节苷脂G3(GD3),人端粒酶逆转录酶(hTERT),激酶插入结构域受体(KDR),Lewis A(CA 1.9.9),Lewis Y(LeY),磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3),L1细胞粘附分子(L1CAM),粘蛋白16(Muc-16),粘蛋白1(Muc-1),NG2D配体,癌胚抗原(h5T4),前列腺干细胞抗原(PSCA),前列腺特异性膜抗原(PSMA),肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72),密封蛋白18.2(CLDN18.2),血管内皮生长因子R2(VEGF-R2),肾母细胞瘤蛋白(WT-1),1型酪氨酸蛋白激酶跨膜受体(ROR1)及其任何组合。

[0019] 在某些实施例中,第二抗原是免疫检查点调节剂。在某些实施例中,免疫检查点调节剂选自以下组成的组:PD1、CTLA4、LAG-3、2B4、BTLA及其任何组合。

[0020] 在某些实施例中,抗TIGIT抗体缀合至治疗剂或标记。在某些实施例中,标记选自下组,该组由以下组成:放射性同位素、荧光染料和酶。

[0021] 本公开进一步提供了与治疗剂连接的、包含本文公开的任何抗体的免疫缀合物。在某些实施例中,治疗剂是细胞毒素。在某些实施例中,治疗剂是放射性同位素。

[0022] 本公开进一步提供了药物组合物。在某些实施例中,药物组合物包含a) 本文公开的抗体或免疫缀合物,和b) 药学上可接受的载剂。

[0023] 本公开进一步提供了编码本文公开的任何抗体的核酸。本公开进一步提供了包含本文公开的任何核酸的载体。本公开进一步提供了包含本文公开的核酸或载体的宿主细胞。

[0024] 本公开进一步提供了用于制备本文公开的抗体的方法。在某些实施例中,该方法包括在本文公开的宿主细胞中表达抗体,并从宿主细胞分离抗体。

[0025] 本公开进一步提供了减轻受试者的肿瘤负荷的方法。在某些实施例中,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗体、免疫缀合物或药物组合物。

[0026] 在某些实施例中,该方法减少肿瘤细胞的数量。在某些实施例中,该方法减小肿瘤大小。在某些实施例中,该方法根除受试者的肿瘤。在某些实施例中,肿瘤选自以下组成的组:间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜肿瘤、成胶质细胞瘤、食道癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃肿瘤、胆管癌、头颈癌、血液癌及其组合。

[0027] 本公开进一步提供了治疗 and/或预防受试者的赘生物的方法。在某些实施例中,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗体、免疫缀合物或药物组合物。

[0028] 本公开进一步提供了延长患有赘生物的受试者的存活期的方法。在某些实施例中,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗体、免疫缀合物或药物组合物。在某些实施例中,赘生物选自以下组成的组:间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜肿瘤、成胶质细胞瘤、食道癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃肿瘤、胆管癌、头颈

癌、血液癌及其组合。

[0029] 本公开进一步提供了本文公开的用作药物的任何抗体。本公开进一步提供了本文公开的用于治疗癌症的任何抗体。本公开进一步提供了本文公开的用作药物的药物组合物。本公开进一步提供了本文公开的用于治疗癌症的药物组合物。在某些实施例中，癌症选自自由以下组成的组：间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜肿瘤、成胶质细胞瘤、食道癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃肿瘤、胆管癌、头颈癌、血液癌及其组合。

[0030] 本公开进一步提供了试剂盒，其包含本文公开的抗体、免疫缀合物、药物组合物、核酸、载体或宿主细胞。在某些实施例中，试剂盒包含用于治疗 and/或预防赘生物的书面说明书。

附图说明

[0031] 图1A-1C描绘了通过流式细胞术测定确定的代表性VHH二价抗体与人TIGIT的全细胞结合。图1A显示了与一种参考抗人TIGIT抗体(参考Ab1)相比的一种测定。图1B显示了使用其他VHH抗体的不同测定。Y轴表示AlexaFlour 488的平均荧光强度。X轴表示以纳摩尔计的抗体浓度。2B7、1G1、1C12、3G6、2B10、3G7、3G10、13H11和15A5是抗人TIGIT的VHH克隆。使用Prism的非线性回归方法获得EC50值，并且在表中以纳摩尔表示这些值。图1C是TIGIT VHH二价抗体的结构示意图。

[0032] 图2A-2B描绘了代表性二价抗体在阻断TIGIT活性中的功效，该活性由萤光素酶报告基因测定确定。在代表性抗TIGIT二价抗体和低浓度葡萄球菌肠毒素存在下，将人TIGIT和NFAT报告基因稳定转染的Jurkat细胞与PVR(CD155)稳定转染的Raji细胞共培养。Y轴以相对发光单位表示NFAT萤光素酶活性。X轴表示以纳摩尔计的抗体浓度。参考Ab1是参考抗h-TIGIT抗体。2B7、1G1、1C12、3G6、2B10、3G7和3F10是抗h-TIGIT的代表性克隆。使用Prism的非线性回归方法获得EC50值，并且在表中以纳摩尔表示这些值。

[0033] 图3A和3B描绘了通过流式细胞术测定确定的人源化1C12和1G1克隆与人TIGIT的全细胞结合。1C12人源化形式的代表性结果如图3A所示。1C12嵌合抗体是具有1C12克隆的Llama VHH序列以及人IgG1的CH2和CH3结构域的抗体，1C12(F-EREF)、1C12(F-EREW)和1C12(F-GLEW)是1C12克隆的人源化形式，差异为框架2中的突变。1G1人源化形式的代表性结果如图3B所示。1G1嵌合抗体是具有1G1克隆的Llama VHH序列以及人IgG1的CH2和CH3结构域的抗体。1G1(F-G-ERES)、1G1(F-A-ERES)、1G1(F-A-EREW)和1G1(F-A-GLEW)是框架2中具有不同突变的人源化1G1克隆的四种不同形式。Y轴是AlexaFlour 488的平均荧光强度值。X轴是以纳摩尔计的抗体浓度的值。

[0034] 图4A和4B描述了人源化的1C12和1G1克隆在阻断TIGIT活性中的功效，该活性由萤光素酶报告基因测定确定。TIGIT阻断萤光素酶报告基因测定中1C12人源化形式的代表性结果如图4A所示。与参考抗h-TIGIT抗体参考Ab1相比，所有克隆更有效。1G1人源化形式的代表性结果如图4B所示。Y轴代表NFAT萤光素酶活性(RLU, 相对发光单位)。X轴表示以纳摩尔计的抗体浓度。

[0035] 图5描绘了针对代表性克隆的来自阻断ELISA的IC50值(以纳摩尔计)和来自全细胞结合的EC50值(以纳摩尔计)之间的相关性。克隆名称在图中进行了标记。使用GraphPad

Prism分析相关性。

[0036] 图6A和6B描绘了针对代表性克隆测试的热稳定性。将VHH抗体样品从25加热到70°C持续60分钟。使用ELISA或全细胞结合检查加热的样品与人TIGIT的结合。图6A显示了在ELISA测定中代表性克隆的加热样品与h-TIGIT ECD的结合,其中在图例中标记了克隆名称。Y轴代表由ELISA测定法获得的OD450。X轴代表处理温度。图6B显示了代表性克隆的加热样品与通过流式细胞术确定的在Jurkat细胞中稳定表达的h-TIGIT的结合。Y轴代表与h-TIGIT结合的百分比。X轴代表处理温度。

[0037] 图7A-7C描绘了通过使用ForteBio的Octet结合测定法确定的2A3-Fc与人TIGIT结合的表位。将带有his标签的人TIGIT ECD(200 nM)的重组蛋白加载到传感器上。通过注射三种不同浓度的2A3-Fc检测结合。通过第二次注射图7A中所示的2A3-Fc未检测到额外的结合,但是通过注射三种不同浓度的参考Ab2,一种参考抗TIGIT抗体(如图7B中所示),或参考Ab1(如图7C中所示),检测到强结合。结果表明,与参考Ab2和参考Ab1相比,2A3克隆具有不同的结合表位。

[0038] 图8A-8C描绘了通过ELISA测定法确定的2A3-Fc对人-、食蟹猴-和小鼠-TIGIT的交叉结合活性。图8A显示了2A3-Fc与重组人TIGIT ECD的结合。参考Ab2是一种抗人TIGIT参考抗体。2A3-Fc和参考Ab2都以相似的亲和力与h-TIGIT结合。抗PDL1不与h-TIGIT结合。图8B显示了2A3-Fc与重组cyno-TIGIT的结合。2A3-Fc和参考Ab2都以相似的亲和力与cyno-TIGIT结合。抗PDL1不与cyno-TIGIT结合。图8C显示了2A3-Fc与重组小鼠TIGIT的结合。2A3-Fc和参考Ab2均未与小鼠TIGIT结合,但是抗小鼠TIGIT参考抗体(博奇公司(Biolegend) # 142101)与小鼠TIGIT以高亲和力结合。Y轴代表OD450,X轴代表以 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 计的抗体浓度。

[0039] 图9描绘了在全细胞结合测定和人TIGIT阻断报告基因测定中代表性克隆2A3-Fc和热点校正形式的2A3-LT-Fc的效力的比较。Y轴在上图中代表平均荧光强度,在下图中代表以相对发光单位计的NFAT萤光素酶报告基因活性。X轴表示以纳摩尔计的抗体浓度。热点校正形式2A3-LT-Fc具有与亲本克隆2A3-Fc相似的效力。

[0040] 图10A和10B描绘了热点校正形式2A3-LT-Fc与参考抗-h-TIGIT抗体参考Ab2的亲合力的比较。图10A显示了在全细胞结合中热点校正形式2A3-LT-Fc与参考Ab2的效力的比较。Y轴代表通过使用CytoFlex的流式细胞术测定法确定的AlexaFlour 488的平均荧光强度。X轴表示以纳摩尔计的抗体浓度。显示的数据是来自三个不同实验的代表性结果。2A3-LT-Fc与h-TIGIT的亲和力比与参考Ab2的亲和力略高。图10B显示了在TIGIT阻断NFAT报告基因测定中,热点校正形式2A3-LT-Fc与参考Ab2的效力的比较。Y轴代表以相对发光单位计的NFAT萤光素酶报告基因活性。X轴表示以纳摩尔计的抗体浓度。2A3-LT-Fc具有与参考Ab2相似的效力。

[0041] 图11描绘了使用Octet结合测定法确定的2A3-LT-Fc野生型(wt)和Fc突变(DLE和VLPLL)分别与人Fc γ RIIIA、人Fc γ RIIB和小鼠Fc γ RIV的结合。传感器加载有Fc γ RIIIA、人Fc γ RIIB和小鼠Fc γ RIV的ECD重组蛋白,使用ForteBio检测到5种不同浓度的2A3-LT-Fc wt、DLE或VLPLL突变体的缔合和解离。Y轴表示缔合、解离和Rmax。X轴表示以秒计的时间。与野生型相比,DLE和VLPLL突变体均具有增强的与人Fc γ RIIIA的结合亲和力,DLE突变体也具有增强的与人Fc γ RIIB的结合亲和力,但是VLPLL突变体降低了与人Fc γ RIIB的结合亲和力。所有形式都具有与小鼠Fc γ RIV相似的亲和力。

[0042] 图12A和12B分别描绘了TIGIT mAb 2A3-LT-Fc wt、DLE突变体对阻断TIGIT活性和人Fc γ RIIIA介导的活性的影响。图12A描绘了使用NFAT萤光素酶报告基因测定法确定的TIGIT mAb 2A3-LT-Fc wt、DLE突变体对阻断TIGIT活性的影响。将经人TIGIT和NFAT报告基因稳定转染的Jurkat细胞与经PVR稳定转染的Raji细胞共培养。加入2A3-LT-Fc wt和突变体并培养5小时。通过萤光素酶活性来测量TCR介导的活性。Y轴以相对发光单位表示NFAT萤光素酶活性。X轴表示以纳摩尔计的抗体浓度。图12B描述了TIGIT mAb 2A3-LT-Fc wt、DLE突变体对人Fc γ RIIIA介导的活性的影响,该活性由Fc γ RIIIA介导的NFAT萤光素酶报告基因活性确定。在不同浓度的2A3-LT-Fc wt、DLE突变体存在下,将人Fc γ RIIIA和NFAT稳定转染的Jurkat细胞与人TIGIT稳定转染的293T细胞共培养5小时。测量萤光素酶活性,并在Y轴上以相对发光单位表示。X轴表示以纳摩尔计的抗体浓度。

[0043] 图13A-13C描绘了对抗TIGIT抗体的体内有效性分析。使用了人TIGIT敲入C57BL/6小鼠和MC38鼠结肠癌模型。在治疗前一周给小鼠接种了MC38肿瘤细胞。当平均肿瘤大小达到约51 mm³时治疗开始,在腹膜内一周两次给药,持续2.5周。2A3-LT-Fc抗体每次6mg/kg或参考Ab2每次11mg/kg(与2A3-LT-Fc抗体在mole/kg上等同)。图13A描绘了用空白对照,2A3-Fc-wt,有DLE突变的2A3-Fc和参考Ab 2给药的长有肿瘤的小鼠的肿瘤生长曲线。单个肿瘤体积的结果显示在图13B中。图13C显示了在研究中各实验组的体重变化并不显著。

具体实施方式

[0044] 本公开提供了以高亲和力特异性结合TIGIT的分离的单克隆抗体,其包括结合TIGIT和一种或多种另外的靶标的多特异性抗体。在某些实施例中,抗TIGIT抗体包含与TIGIT结合的单结构域抗体。本公开进一步提供了制备抗体、免疫缀合物和包含这些抗体的药物组合物的方法,以及使用抗体、免疫缀合物和包含这些抗体的药物组合物例如用于治疗疾病和病症(例如癌症)的方法。本发明部分地基于发现与TIGIT结合的单结构域抗TIGIT抗体,这些抗体可以增加免疫细胞中的免疫应答并提供改善的抗肿瘤功效。

[0045] 为了清楚起见而不是作为限制,目前公开的主题的具体实施方式分为以下小节:

[0046] 1. 定义;

[0047] 2. 抗体;

[0048] 3. 使用方法;

[0049] 4. 药物配制品;以及

[0050] 5. 制品。

[0051] 1. 定义

[0052] 本文中术语“抗体”以最广泛的含义使用,并且涵盖多种抗体结构,这些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)、单结构域抗体和抗体片段,只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。

[0053] “抗体片段”是指包含完整的全长抗体的抗原结合部分的分子,该完整的全长抗体结合与完整的抗体结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、双抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如,scFv)、由抗体片段形成的多特异性抗体、单结构域抗体、VHH纳米抗体、结构域抗体、二价结构域抗体或与抗原结合的抗体的任何其他片段。“VHH”是指从骆驼科动物中分离的单结构域抗体。在某些实施例中,VHH包含骆驼重

链抗体的重链可变区。在某些实施例中，VHH的大小不超过25kDa。在某些实施例中，VHH的大小不超过20kDa。在某些实施例中，VHH的大小不超过15kDa。

[0054] “全长抗体”是指包含两条重链和两条轻链的抗体。轻链和重链的可变区对抗原结合负责。重链和轻链的可变区可以分别称为“VH”和“VL”。两条链中的可变区通常包含三个高度可变的环，称为互补决定区(CDR)(包括LC-CDR1、LC-CDR2和LC-CDR3的轻链(LC)CDR,包括HC-CDR1、HC-CDR2和HC-CDR3的重链(HC)CDR)。本文公开的抗体和抗原结合片段的CDR边界可以通过公知的惯例来定义或鉴定,例如,Kabat、Chothia或Al-Lazikani的惯例(Al-Lazikani 1997; Chothia 1985; Chothia 1987; Chothia 1989; Kabat 1987; Kabat 1991)。重链或轻链的三个CDR被插入称为框架区(FR)的侧翼区段之间,它们比CDR更为保守,并形成了支持高变环的支架。重链和轻链的恒定区不参与抗原结合,但是表现出多种效应子功能。根据抗体重链恒定区的氨基酸序列将抗体分类。抗体的五种主要类别或同种型是IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,分别以存在 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重链为特征。几种主要抗体类别分为亚类,例如IgG1(γ 1重链)、IgG2(γ 2重链)、IgG3(γ 3重链)、IgG4(γ 4重链)、IgA1(α 1重链)或IgA2(α 2重链)。

[0055] 与参考抗体“交叉竞争结合的抗体”是指在竞争测定中阻断参考抗体与其抗原的结合达50%以上的抗体,相反,在竞争测定中参考抗体阻断抗体与其抗原的结合达50%以上。在Antibodies [抗体], Harlow和Lane(冷泉港出版社,冷泉港,纽约(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY))中描述了示例性竞争测定法。

[0056] “Fv”是最小抗体片段,其含有完整抗原识别位点和抗原结合位点。该片段由紧密非共价缔合的一个重链可变区和一个轻链可变区的二聚体组成。从这两个结构域的折叠中发出六个高变环(重链和轻链各自中的3个环),该高变环贡献用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体与抗原结合特异性。然而,甚至单个可变结构域(或仅包含三个对抗原有特异性的CDR的半个Fv)可以识别并结合抗原,虽然有时以比完整结合位点更低的亲和力进行。

[0057] “单链Fv”(也缩写为“sFv”或“scFv”)是包含连接成单个多肽链的V_H和V_L抗体结构域的抗体片段。在一些实施例中,scFv多肽进一步包含在V_H和V_L结构域之间的一种多肽接头,该多肽接头使得scFv形成所希望的用于抗原结合的结构。关于scFv的综述,参见Plückthun的The Pharmacology of Monoclonal Antibodies [单克隆抗体的药理学], 第113卷, Rosenburg和Moore编辑 Springer-Verlag [施普林格出版社], 纽约, 第269-315页(1994)。

[0058] 出于本文的目的,“受体人框架”或“人框架”是包含源自人免疫球蛋白框架或人共有框架的轻链可变结构域(VL)框架或重链可变结构域(VH)框架的氨基酸序列的框架。“源自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可以包含其相同的氨基酸序列,或者可以包含氨基酸序列变化。在某些实施例中,氨基酸变化的数目是10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、或2个或更少。在某些实施例中,VL受体人框架与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列在序列方面是相同的。

[0059] “亲和力”是指分子(例如,抗体)的单个结合部位与其结合配偶体(例如,抗原)之间非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明,如本文所用,“结合亲和力”是指内部结合亲和力,其反映出结合对(例如,抗体与抗原)的成员之间1:1相互作用。分子X对其配偶体Y

的亲合力通常可以由解离常数(KD)表示。亲合力可以通过本领域已知的常规方法(包括本文所述的那些)测量。下面描述了用于测量结合亲和力的具体说明性和示例性实施例。

[0060] “亲合力成熟的”抗体是指与不具有这种改变的亲本抗体相比,在一个或多个CDR或高变区(HVR)中具有一个或多个改变的抗体,该改变提供了抗体对抗原的改善的亲合力。

[0061] 如本文所用,“具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体”或“TIGIT”是指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物(例如灵长类动物(例如人和食蟹猴)))的任何天然TIGIT多肽、或其任何片段,并且可以任选地包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个、至多六个、至多七个、至多八个、至多九个或至多十个氨基酸取代、添加和/或缺失。该术语涵盖全长未处理的TIGIT以及由于在细胞中进行处理而产生的任何形式的TIGIT。该术语还涵盖TIGIT的天然存在的变体,例如剪接变体或等位基因变体。本公开的抗TIGIT抗体靶向的人TIGIT氨基酸序列的非限制性实例如下:

[0062] 1 MRWCLLLIWA QGLRQAPLAS GMMTGTIETT GNISAKEGGS IILQCHLSST TAQVTQVNWE

[0063] 61 QQDQLLAICN ADLGWHISPS FKDRVAPGPG LGLTLQSLTV NDTGEYFCIY HTYPDGTYYTG

[0064] 121 RIFLEVLESS VAEHGARFQI PLLGAMAATL VVICTAVIVV VALTRKKKAL RIHSVEGDLR

[0065] 181 RKSAGQEEWS PSAPSPPGSC VQAEAAPAGL CGEQRGEDCA ELHDYFNVLS YRSLGNCSFF

[0066] 241 TETG [SEQ ID NO: 221]。

[0067] 术语“TIGIT的ECD”是指TIGIT的细胞外结构域。例如,SEQ ID NO: 221所示的示例性TIGIT蛋白的ECD包含以下氨基酸序列:

[0068] MRWCLLLIWA QGLRQAPLAS GMMTGTIETT GNISAKEGGS IILQCHLSST TAQVTQVNWE

[0069] QQDQLLAICN ADLGWHISPS FKDRVAPGPG LGLTLQSLTV NDTGEYFCIY HTYPDGTYYTG

[0070] RIFLEVLESS VAEHGARF [SEQ ID NO: 222]。

[0071] 术语“抗TIGIT抗体”和“结合TIGIT的抗体”是指能够以足够的亲合力结合TIGIT的抗体,使得该抗体可用作靶向TIGIT的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施例中,与无关的、非TIGIT蛋白的抗TIGIT抗体的结合程度小于该抗体与TIGIT结合的约10%,例如通过BIAcore®表面等离子体共振测定法所测量的。在某些实施例中,与TIGIT结合的抗体具有以下解离常数(KD)<约1 μ M,<约100 nM,<约10 nM,<约1 nM,<约0.1 nM,<约0.01 nM或<约0.001 nM(例如 10^{-8} M或更小,例如 10^{-8} M至 10^{-12} M,例如 10^{-9} M至 10^{-10} M)。在某些实施例中,抗TIGIT抗体结合来自不同物种的TIGIT中保守的TIGIT表位。在某些实施例中,抗TIGIT抗体结合在蛋白质的ECD中的TIGIT上的表位。

[0072] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分源自不同来源或物种。在某些实施例中,本文公开的嵌合抗体包含骆驼科动物重链可变区和人Fc区。

[0073] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”是指重链和/或轻链的可变区内的非连续抗原结合位点。这些特定区已经描述于:Kabat等人, J. Biol. Chem. [生物化学杂志], 252:6609-6616 (1977);Kabat等人, 美国卫生与公共服务部,“Sequences of proteins of immunological interest [具有免疫学意义的蛋白质序列]”(1991); Chothia等人, J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 196:901-917 (1987); Al-Lazikani B.等人, J. Mol. Biol. [分子生物学杂志], 273: 927-948 (1997); MacCallum 等人, J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 262:732-745 (1996); Abhinandan和Martin, Mol. Immunol.

[分子免疫学], 45: 3832-3839 (2008); Lefranc M.P.等人, Dev. Comp.Immunol.[发展与比较免疫学], 27: 55-77 (2003); 以及Honegger和Plückthun, J. Mol. Biol.[分子生物学杂志], 309:657-670 (2001),其中定义包括当彼此比较时氨基酸残基的重叠或子集。然而,应用任一特定定义来指代抗体或移植的抗体或其变体的CDR旨在落入如本文定义和使用的术语的范围内。涵盖如上述每篇参考文献定义的CDR的氨基酸残基列于下表1中作为比较。CDR预测算法和接口是本领域已知的,包括例如Abhinandan和Martin,Mol. Immunol.[分子免疫学], 45: 3832-3839 (2008); Ehrenmann F.等人, Nucleic Acids Res.[核酸研究], 38: D301-D307 (2010); 和Adolf-Bryfogle J.等人, Nucleic Acids Res.[核酸研究], 43: D432-D438 (2015)。在本段中引用的参考文献的内容通过引用以其整体并入本文,以用于本申请中并且可能包含在本文的一项或多项权利要求中。

[0074] 表1:CDR定义

	Kabat1	Chothia2	MacCallum3	IMGT4	AHo5
VHCDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
VHCDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
VHCDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137
VLCDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
VLCDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
VLCDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137

[0076] ¹残基编号遵循Kabat等人的命名法(同上)。

[0077] ²残基编号遵循Chothia等人的命名法(同上)。

[0078] ³残基编号遵循MacCallum等人的命名法(同上)。

[0079] ⁴残基编号遵循Lefranc等人的命名法(同上)。

[0080] ⁵残基编号遵循Honegger和Plückthun的命名法(同上)。

[0081] 表述“如Kabat中的可变结构域残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”及其变体是指用于上文Kabat等人的抗体汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这个编号系统,实际直链氨基酸序列可以含有对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入的更少的或另外的氨基酸。例如,重链可变结构域可以包含在H2的残基52之后的单个氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)以及在重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。可以通过在抗体序列与“标准”Kabat编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。

[0082] 在某些实施例中,涵盖单结构域抗体(例如,本文公开的单结构域抗TIGIT抗体)的CDR的氨基酸残基是根据上文Lefranc等人的IMGT命名法定义的。在某些实施例中,涵盖全长抗体的CDR的氨基酸残基是根据上文Kabat等人的Kabat命名法定义的。在某些实施例中,免疫球蛋白重链例如Fc区中的残基编号是如上文Kabat等人所述的EU索引的编号。“如Kabat所述的EU索引”是指人IgG1 EU抗体的残基编号。

[0083] “框架”或“FR”是指除了本文定义的CDR残基以外的那些可变结构域残基。

[0084] “人源化”抗体是指包含来自非人CDR/HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施例中，人源化抗体将包括基本上至少一个、并且典型地两个可变结构域的全部，其中HVR/CDR的全部或基本上全部对应于非人类抗体的那些，并且FR的全部或基本上全部对应于人类抗体的那些。人源化抗体可任选地包含源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经人源化的抗体

[0085] “人抗体”是具有氨基酸序列的抗体，该氨基酸序列对应于由人产生的抗体的氨基酸序列和/或已经使用本文公开的任何用于制备人抗体的技术制备。人抗体的此定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术(包括噬菌体展示文库)产生人抗体。Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志], 227: 381 (1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志], 222:581 (1991)。也可用于制备人单克隆抗体的是在Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* [单克隆抗体和癌症疗法], Alan R. Liss, 第77页 (1985); Boerner等人, *J. Immunol.* [免疫学杂志], 147(1):86-95 (1991)中描述的方法。另请参见van Dijk和van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* [药理学新见], 5: 368-74 (2001)。人抗体可以通过将抗原施用至已被修饰以响应抗原攻击而产生这种抗体但其内源基因座已失效的转基因动物(例如已免疫的xenomice)来制备(参见,例如,有关XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584)。关于通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体,还参见例如Li等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 103:3557-3562 (2006)。

[0086] 将“关于本文鉴定的多肽和抗体序列的氨基酸序列同一性百分比(%)”或“同源性”定义为在对齐序列(考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分)后,候选序列中与所比较多肽中的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,可以用本领域技术中的多种方式来实现比对,例如使用公众可得的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign (DNASTAR)或MUSCLE软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括需要在被比较序列的全长范围实现最大比对的任何算法。然而,出于本文的目的,使用序列比较计算机程序MUSCLE生成氨基酸序列同一性%值(Edgar, R.C., *Nucleic Acids Research* [核酸研究] 32(5):1792-1797, 2004; Edgar, R.C., *BMC Bioinformatics* [BMC生物信息学] 5(1):113, 2004)。

[0087] “同源的”是指两个多肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性或序列同一性。当两个比较序列中两个的一个位置被相同的碱基或氨基酸单体亚基占据时,例如,如果两个DNA分子中的每一个的一个位置被腺嘌呤占据,则该分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分比是两个序列共享的匹配或同源位置数除以比较的位置数乘以100的函数。例如,如果两个序列中10个位置中的6个是匹配或同源的,那么两个序列是60%同源的。举例来说,DNA序列ATTGCC和TATGGC具有50%的同源性。通常,当两个序列比对以给出最大同源性时进行比较。

[0088] 术语“恒定结构域”是指免疫球蛋白分子的一部分,其相对于免疫球蛋白的另一部分,即可变结构域,具有更保守的氨基酸序列,其包含抗原结合位点。恒定结构域包含重链的C_H1、C_H2和C_H3结构域(统称为C_H)和轻链的C_L结构域。

[0089] 任何哺乳动物物种的抗体(例如免疫球蛋白)的“轻链”都可以根据其恒定结构域

的氨基酸序列指定为两种明显不同的类型之一,分别称为kappa(“κ”)和lambda(“λ”)。

[0090] “CH1结构域”(也称为“H1”结构域的“C1”)通常从约氨基酸118至约氨基酸215(EU编号系统)。

[0091] “铰链区”通常定义为IgG中对应于人IgG1的Glu216至Pro230的区域(Burton, *Molec. Immunol.* [分子免疫学] 22:161-206 (1985))。其他IgG同种型的铰链区可以通过将第一个和最后一个形成重链间S-S键的半胱氨酸残基置于相同位置而与IgG1序列比对。

[0092] 人IgG Fc区(也称为“C2”结构域)的“CH2结构域”通常从约氨基酸231至约氨基酸340。CH2结构域是独特的,因为其不与另一个结构域紧密配对。而是,两个N连接的支链碳水化合物链插入完整天然IgG分子的两个CH2结构域之间。据推测,碳水化合物可以提供结构域-结构域配对的替代物并有助于稳定CH2结构域。Burton, *Molec Immunol.* [分子免疫学], 22:161-206 (1985)。

[0093] “CH3结构域”(也称为“C2”结构域)包含CH2结构域与Fc区的C末端之间的残基(即,从约氨基酸残基341到抗体序列的C末端),通常在IgG的氨基酸残基446或447处)。

[0094] 本文中的术语“Fc区”或“片段可结晶区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区域,包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可以变化,但是通常将人IgG重链的Fc区定义为从Cys226位置处的氨基酸残基或从Pro230延伸至其羧基末端。可以例如抗体的生产或纯化期间或通过对编码抗体重链的核酸进行重组工程化来去除Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)。因此,完整抗体的组合物可以包括去除了所有K447残基的抗体群体,没有去除K447残基的抗体群体以及具有带有和不带有K447残基的抗体混合物的抗体群体。用于本文所述抗体的合适天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。

[0095] “Fc受体”或“FcR”描述结合抗体的Fc区的受体。优选的FcR是天然人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体(γ受体)并包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类的受体的FcR,包括等位基因变体和这些受体的剪接形式,FcγRII受体包括FcγRIIA(“活化受体”)和FcγRIIB(“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,主要区别在于其胞质结构域。活化受体FcγRIIA在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制性受体FcγRIIB在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。(参见M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* [免疫学年度评论] 15:203-234 (1997)。FcR综述于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* [免疫学年度评论], 9: 457-92 (1991); Capel等人, *Immunomethods* [免疫方法] 4: 25-34 (1994); 和de Haas等人, *J. Lab. Clin. Med.* [实验与临床医学杂志] 126: 330-41 (1995)。本文的术语“FcR”涵盖其他FcR,包括将来鉴定的FcR。

[0096] 如本文所用,术语“表位”是指抗体或抗原结合部分所结合的抗原上的特定原子或氨基酸基团。如果两个抗体或抗原结合部分对抗原具有竞争性结合,则它们可以结合抗原内的相同表位。

[0097] 如本文所用,术语“特异性结合”、“特异性识别”和“对……有特异性”是指可测量和可再现的相互作用,例如靶标与抗体或抗体部分之间的结合,其决定了在异质分子(包括生物分子)群体存在时靶标的存在。例如,特异性识别靶标(可以是表位)的抗体或抗体部分是与该靶标结合的抗体或抗体部分,其亲和力、亲合力、就绪性和/或持续时间长于与其他

靶标的结合。在一些实施例中,抗体与不相关靶标的结合程度小于例如通过放射免疫测定法(RIA)测量的抗体与靶标的结合程度的约10%。在一些实施例中,特异性结合靶标的抗体的解离常数(K_D) $\leq 10^{-5}$ 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。在一些实施例中,抗体特异性结合对从不同物种的蛋白中为保守的蛋白的表位。在一些实施例中,特异性结合可以包括但不要求排他结合。抗体或抗原结合结构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。这类方法包括但不限于蛋白质印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-、EIA-、BIAcore™-检验和肽扫描。

[0098] “分离的”抗体(或构建体)是已经从其生产环境的组分(例如天然或重组)中鉴定、分离和/或回收的抗体。在某些实施例中,分离的多肽在其生产环境中没有或基本上没有与所有其他组分缔合。

[0099] 编码本文所述的构建体、抗体或其抗原结合片段的“分离的”核酸分子是与在其生产环境中从通常与其相关联的至少一种污染物核酸分子中鉴定并分离的核酸分子。在某些实施例中,分离的核酸没有或基本没有与生产环境有关的所有组分缔合。编码本文所述的多肽和抗体的分离的核酸分子的形式不同于天然存在的形式或背景。因此,分离的核酸分子不同于编码天然存在于细胞中的本文所述的多肽和抗体的核酸。分离的核酸包括通常包含核酸分子的细胞中所含的该核酸分子,但是该核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置。

[0100] 术语“控制序列”是指在特定宿主生物体中表达可操作地连接的编码序列所必需的DNA序列。例如,适用于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵子序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

[0101] 当核酸与另一核酸序列处于功能关系时,该核酸是“可操作地连接的”。例如,如果将前序列或分泌性前导序列的DNA表达为参与多肽分泌的前蛋白,则该前序列或分泌性前导序列的DNA可操作地连接至该多肽的DNA;如果启动子或增强子影响编码序列的转录,则该启动子或增强子可操作地连接至该序列;或者如果核糖体结合位点被定位成使得有助于翻译,则该核糖体结合侧可操作地连接至编码序列。通常,“可操作地连接”意指所连接的DNA序列是连续的,并且在分泌性前导序列的情形下是连续的并处于阅读框中。然而,增强子不必是连续的。通过在方便的限制位点处连接来实现连接。如果不存在此类位点,则根据常规实践使用合成的寡核苷酸衔接子或连接子。

[0102] 如本文所用,术语“载体”是指能够繁殖与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体,以及掺入已引入其的宿主细胞基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0103] 如本文所用,术语“转染的”或“转化的”或“转导的”是指将外源核酸转移或引到宿主细胞中的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是使用外源核酸转染、转化或转导的细胞,该细胞包括原代目标细胞及其子代。

[0104] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,是指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞和从其衍生的后代,而与传代次数无关。后代的核酸含量可能与亲代细胞不完全相同,并且可能含有突变。具有与在原始转化细胞中筛选或选择的功能或生物学活性相同的功能或生物学活性的突变后代包括在本文中。

[0105] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文可互换使用,是指哺乳动物,包括但不限于人、牛、马、猫、犬、啮齿动物或灵长类动物。在一些实施例中,受试者是人。

[0106] 药剂的“有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效达到所需治疗或预防结果的量。该特定剂量可以根据以下各项中的一种或多种来改变:所选择的具体药剂、随后的给药方案(无论它是否与其他化合物组合)、施用时间、成像的组织、以及其中携带它的物理递送系统。

[0107] 本申请的物质/分子、激动剂或拮抗剂的“治疗有效量”可以根据例如疾病状态、年龄、性别和个体体重以及该物质/分子、激动剂或拮抗剂在个体中引发希望的应答的能力等因素而变化。治疗有效量也是该物质/分子、激动剂或拮抗剂的任何毒性或有害作用均被治疗有益作用所抵消的量。治疗有效量可以一次或多次施用来递送。

[0108] “预防有效量”是指以剂量计并且持续所需的时间段以实现所希望的预防结果的有效量。典型地,但非必需的,因为预防的剂量是在疾病之前或早期在受试者体内使用的,所以这种预防有效量将小于治疗有效量。

[0109] 如本文所用,“治疗(treatment或treating)”是用于获得有益的或所希望的结果(包括临床结果)的方法。出于本申请的目的,有益的或所希望的临床结果包括但不限于以下中的一种或多种:缓解由疾病引起的一种或多种症状、减少疾病的程度、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)、预防或延迟疾病的重现、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他药物的剂量、延迟疾病的进展、增加或改善生活质量、增加体重增长和/或延长存活。“治疗”还涵盖减少癌症的病理后果(像例如,肿瘤体积)。本申请的方法考虑了这些治疗方面中的任何一个或多个。“治疗”并不一定意味着所治疗的疾病将得到治愈。

[0110] 应当理解,本文所述的申请的实施例包括“由……组成”和/或“基本上由……组成”。

[0111] 如本文所用,术语“约(about)”或“大约(approximately)”意指由本领域普通技术人员确定的特定值在可接受的误差范围之内,这将部分地取决于该值是怎样测定或确定的,即,受到测量系统的限制。在某些实施例中,“约”可以意指根据本领域的实践在3个或大于3个标准差之内。在某些实施例中,“约”可以表示给定值的至多20%(例如,至多10%、至多5%或至多1%)的范围。在某些实施例中,特别是对于生物学系统和方法,该术语可以意指在某一值的数量级内,例如在5倍内或在2倍内。

[0112] 如本文所用,术语“调节”是指正向或负向变化。示例性调节包括约1%、约2%、约5%、约10%、约25%、约50%、约75%或约100%的变化。

[0113] 如本文所用,术语“增加”是指正向地改变至少约5%。改变可以为约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%、约100%或更多。

[0114] 如本文所用,术语“减少”是指负向地变化至少约5%。改变可以为约5%、约10%、约25%、约30%、约50%、约75%或甚至约100%。

[0115] 本文使用的术语“约X-Y”具有与“约X至约Y”相同的含义。

[0116] 当在本文和附带的权利要求中使用,单数形式“一个/种(a)”、“或(or)”和“这些/该(the)”包括复数指代物,除非上下文明确地指示其他的情况。

[0117] “效应子功能”是指归因于抗体的Fc区的那些生物学活性,其随抗体同种型不同而

变化。抗体效应子功能的实例包括：C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调和B细胞活化。

[0118] “免疫缀合物”是指缀合至一个或多个异源分子(包括但不限于细胞毒性剂)的抗体。

[0119] 术语“药物配制品”是指这样的制剂,其处于允许包含其中的活性成分的生物学活性有效的形式,并且不含对配制品所施用的受试者具有不可接受的毒性的其他组分。

[0120] 如本文所用,“药学上可接受的载剂”是指药物配制品中除活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载剂包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0121] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的结构域,其参与抗体与抗原的结合。在某些实施例中,天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个CDR。(参见,例如Kindt等人 Kuby Immunology [库比免疫学], 第61版, W. H. 弗里曼公司(W.H.Freeman and Co.), 第91页(2007)。)单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用VH或VL结构域从结合抗原的抗体中分离结合特定抗原的抗体,以分别筛选互补的VL或VH结构域的文库。参见,例如Portolano等人, J. Immunol. [免疫学杂志] 150:880-887 (1993); Clarkson等人, Nature [自然] 352:624-628 (1991)。

[0122] 2. 抗体

[0123] 在某些实施例中,本发明部分基于发现与TIGIT结合的单结构域抗体,其可用于抗肿瘤治疗中,其中所述抗体选择性抑制TIGIT受体并诱导免疫细胞(例如,T细胞)的有益免疫应答。因此,本公开提供了抗TIGIT抗体。在某些实施例中,本文公开的抗TIGIT抗体是抑制TIGIT受体功能的拮抗剂抗体。在某些实施例中,抗TIGIT抗体阻断TIGIT受体和配体之间的相互作用。在某些实施例中,抗TIGIT抗体阻断来自TIGIT受体的免疫抑制信号。在某些实施例中,抗TIGIT抗体包含单结构域抗体,例如骆驼科动物抗体或VHH抗体。在某些实施例中,由于抗TIGIT抗体与IgG、Fab和/或scFv形式的传统抗体相比尺寸较小,因此其具有改善的组织浸润能力。

[0124] 在某些实施例中,本公开的抗体可以是或包含单克隆抗体(包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体)。在某些实施例中,本文公开的抗体包含人源化抗体。在某些实施例中,抗体包含受体人框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0125] 在某些实施例中,本公开的抗体可以是抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或F(ab')₂片段。在某些实施例中,抗体是全长抗体,例如完整的IgG₁抗体、或本文定义的其他抗体类型或同种型。在某些实施例中,本公开的抗体可以单独或组合地掺入任何(如本申请中所述的(例如,本文详述的第2.1-2.11节))特征。

[0126] 本公开的抗体可用于例如诊断或治疗赘生物或癌症。在某些实施例中,使用本公开的抗体可以抑制其生长的瘤形成和癌症包括通常对免疫疗法有响应的瘤形成和癌症。在某些实施例中,瘤形成和癌症包括乳腺癌(例如,乳腺细胞癌)、卵巢癌(例如,卵巢细胞癌)和肾细胞癌(RCC)。可以使用本公开的方法治疗的其他癌症的实例包括黑素瘤(例如,转移性恶性黑素瘤),前列腺癌,结肠癌,肺癌,骨癌,胰腺癌,皮肤癌,脑瘤,慢性或急性白血病(包括急性髓细胞性白血病,慢性粒细胞性白血病,急性淋巴细胞性白血病,慢性淋巴细胞

性白血病),淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤,淋巴细胞性淋巴瘤,原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤,T细胞淋巴瘤),鼻咽癌,头或颈癌,皮肤癌或眼内恶性黑色素瘤,子宫癌,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,食道癌,小肠癌,内分泌系统癌,甲状腺癌,甲状旁腺癌,乳腺旁癌(cancer of the adbreast gland),软组织肉瘤,尿道癌,阴茎癌,儿童实体瘤,膀胱癌,肾癌或输尿管癌,乳腺骨盆癌,中枢神经系统(CNS)赘生物,肿瘤血管生成,脊柱肿瘤,脑干神经胶质瘤,垂体腺瘤,卡波西氏肉瘤,表皮样癌,鳞状细胞癌,环境诱导的癌症,包括由石棉(例如间皮瘤)诱导的癌症以及上述癌症的组合。

[0127] 2.1 示例性抗TIGIT抗体

[0128] 本公开提供了结合TIGIT蛋白的分离的抗体。在某些实施例中,本公开的抗TIGIT抗体结合TIGIT的ECD。在某些实施例中,抗TIGIT抗体与包含SEQ ID NO: 222所示氨基酸序列的TIGIT的ECD结合。在某些实施例中,抗TIGIT抗体结合与本文所述的抗TIGIT抗体(例如2A3)相同的表位。

[0129] 在某些实施例中,本文公开的抗TIGIT抗体可以用作TIGIT受体的拮抗剂。在某些实施例中,抗TIGIT抗体可以使TIGIT受体的活性降低至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约99%或约99.9%。在某些实施例中,抗TIGIT抗体可以阻断TIGIT受体的下游免疫抑制信号传导。在某些实施例中,抗TIGIT抗体增加免疫细胞(例如T细胞和/或NK细胞)的免疫应答和/或抗肿瘤作用。在某些实施例中,使用抗TIGIT抗体的治疗在受试者中表现出抗肿瘤功效,从而减少肿瘤生长和/或延长受试者的存活期。在某些实施例中,包含单结构域抗体(例如,VHH)的抗TIGIT抗体与全长抗体相比具有较小的分子尺寸,这是因为与全长抗体的Fab结构域相比,单结构域抗体的尺寸较小,这样与全长抗体相比,可以导致(例如在肿瘤部位)优异的组织浸润。在某些实施例中,与使用全长抗TIGIT抗体(例如参考Ab1和参考Ab 2)的治疗相比,使用抗TIGIT抗体的治疗表现出更优异的抗肿瘤功效。参考Ab1具有与在U.S. 2016/0176963 A1中公开的BMS22G2相同的氨基酸序列,参考Ab2具有与Tiragolumab相同的氨基酸序列,其序列在U.S. 2017/0088613 A1中公开

[0130] 在某些实施例中,抗TIGIT抗体包含与TIGIT结合的单结构域抗体。在某些实施例中,单结构域抗体包含VHH。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区(VH)。在某些实施例中,单结构域抗体连接至Fc区。在某些实施例中,单结构域抗体不连接至Fc区。

[0131] 在某些实施例中,单结构域抗体以约 1×10^{-7} M或更小的KD结合TIGIT。在某些实施例中,单结构域抗体以约 1×10^{-8} M或更小的KD结合TIGIT。在某些实施例中,单结构域抗体以约 5×10^{-9} M或更小的KD结合TIGIT。在某些实施例中,单结构域抗体以约 1×10^{-9} M或更小的KD结合TIGIT。在某些实施例中,单结构域抗体以约 1×10^{-9} M至约 1×10^{-7} M之间的KD与TIGIT结合。在某些实施例中,单结构域抗体以约 1×10^{-9} M至约 1×10^{-8} M之间的KD与TIGIT结合。在某些实施例中,单结构域抗体以约 2×10^{-9} M至约 1×10^{-8} M之间的KD与TIGIT结合。在某些实施例中,单结构域抗体以约 2×10^{-9} M至约 5×10^{-8} M之间的KD与TIGIT结合。在某些实施例中,单结构域抗体以约 1×10^{-9} M至约 5×10^{-9} M之间的KD与TIGIT结合。

[0132] 在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 94所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 95所示序列的氨基酸;和重链可变

列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 184所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 186所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 187所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 188所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 190所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 191所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 192所示序列的氨基酸。

[0133] 在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:a) 重链可变区CDR1,该重链可变区CDR1包含SEQ ID NO: 94、98、102、106、110、114、118、122、126、130、134、138、142、146、150、154、158、162、166、170、174、178、182、186和190中任何一个的氨基酸序列,或其具有多达约3个氨基酸取代的变体;b) 重链可变区CDR2,该重链可变区CDR2包含SEQ ID NO: 95、99、103、107、111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175、179、183、187和191中任何一个的氨基酸序列,或其具有多达约3个氨基酸取代的变体;以及c) 重链可变区CDR3,该重链可变区CDR3包含SEQ ID NO: 96、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188和192中任何一个的氨基酸序列,或其具有多达约3个氨基酸取代的变体。

[0134] 在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含CDR1结构域、CDR2结构域和CDR3结构域,其中该CDR1结构域、CDR2结构域和CDR3结构域分别含有包含在参考重链可变区中的CDR1结构域、CDR2结构域和CDR3结构域,该参考重链可变区包含选自自由SEQ ID NO: 97、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189和193组成的组的氨基酸序列。

[0135] 在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 94所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 95所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 96所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 98所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 99所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 100所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 102所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 103所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 104所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 106所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 107所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 108所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 110所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 111所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 112所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 114所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 115所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 116所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 118所

酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 178所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 179所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 180所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 182所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 183所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 184所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 186所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 187所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 188所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 190所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 191所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 192所示序列的氨基酸。

[0136] 在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含与选自由SEQ ID NO: 97、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189和193组成的组的氨基酸序列具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含选自由SEQ ID NO: 97、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189和193组成的组的氨基酸序列。

[0137] 在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 97所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 101所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 105所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 109所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 113所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 117所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 121所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 125所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 129所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 133所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 137所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 141所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 145所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 149所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 153所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 157所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 161所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 165所示的氨基酸

序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 169所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 173所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 177所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 181所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 185所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 189所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 193所示的氨基酸序列。

[0138] 在某些实施例中,重链可变区中包含的任何氨基酸序列可包含至多约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9或约10个氨基酸取代、缺失和/或添加。在某些实施例中,氨基酸取代是保守取代。

[0139] 在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 1所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 2所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 3所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 5所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 6所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 7所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 9所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 10所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 11所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 13所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 14所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 15所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 17所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 18所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 19所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 21所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 22所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 23所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 25所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 26所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 27所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 29所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有

NO: 74所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 75所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 77所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 78所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 79所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体与参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该参考抗TIGIT单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 81所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 82所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 83所示序列的氨基酸。

[0140] 在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 1所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 2所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 3所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 5所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 6所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 7所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 9所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 10所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 11所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 13所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 14所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 15所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 17所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 18所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 19所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 21所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 22所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 23所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 25所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 26所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 27所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 29所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 30所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 31所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 33所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 34所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 35所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 37所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 38所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 39所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体

包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 41所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 42所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 43所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 45所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 46所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 47所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 49所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 50所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 51所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 53所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 54所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 55所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 57所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 58所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 59所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 61所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 62所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 63所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 65所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 66所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 67所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 69所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 70所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 71所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 73所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 74所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 75所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 77所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 78所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 79所示序列的氨基酸。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 81所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 82所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 83所示序列的氨基酸。

[0141] 在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含与选自由SEQ ID NO: 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80和84组成的组的氨基酸序列具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%序列同一性的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含选自由SEQ ID NO: 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80和84组成的组的氨基酸序列。

[0142] 在某些实施例中,重链可变区中包含的任何氨基酸序列可包含至多约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9或约10个氨基酸取代、缺失和/或添加。在某些实施例中,氨基酸取代是保守取代。

[0143] 在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 8所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 12所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 20所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 24所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 28所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 32所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 36所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 40所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 44所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 48所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 52所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 56所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 60所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 64所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 68所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 72所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 76所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 80所示的氨基酸序列。在某些实施例中,单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 84所示的氨基酸序列。

[0144] 在某些实施例中,单结构域抗体包含人源化框架。在某些实施例中,人源化框架包含选自由SEQ ID NO: 85-93组成的组的重链可变区序列的框架序列。在某些实施例中,人源化框架包含选自由SEQ ID NO: 85-93组成的组的重链可变区序列的FR2序列。

[0145] 在某些实施例中,抗TIGIT抗体不包含Fc区。在某些实施例中,抗TIGIT抗体包含Fc区。在某些实施例中,Fc区包含人Fc区。在某些实施例中,Fc区包含选自下组的Fc区,该组由以下组成: IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的Fc区。在某些实施例中,Fc区包含选自下组的Fc区,该组由以下组成: IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的Fc区。在某些实施例中,Fc区包含IgG1 Fc区。在某些实施例中,IgG1 Fc区包含一种或多种增强抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的突变。在某些实施例中,IgG1 Fc区包含L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L的突变。在某些实施例中,IgG1 Fc区包含S239D、A330L和I332E的突变。在某些实施例中,抗TIGIT抗体包含SEQ ID NO: 194所示的氨基酸序列。

[0146] 在某些实施例中,重链可变区通过接头连接至Fc区。在某些实施例中,接头是肽接头。在某些实施例中,肽接头包含约4至约30个氨基酸。在某些实施例中,肽接头包含约4至约15个氨基酸。在某些实施例中,肽接头包含选自由SEQ ID NO: 195-220组成的组的氨基酸序列。

[0147] 在某些实施例中,该抗TIGIT抗体包含多特异性抗体,例如双特异性抗体,全长免疫球蛋白,单链Fv(scFv)片段,Fab片段,Fab'片段,F(ab')₂,Fv片段,二硫键稳定的Fv片段(dsFv),(dsFv)₂,VHH,Fv-Fc融合物,scFv-Fc融合物,scFv-Fv融合物,双抗体,三抗体,四抗体或任何它们的组合。在某些实施例中,抗体包含多特异性抗体(例如双特异性抗体),其包含特异性结合第二抗原的第二抗体部分。

[0148] 在某些实施例中,第二抗原是肿瘤相关抗原。在某些实施例中,肿瘤相关抗原选自下组,该组由以下组成:Her-2,EGFR,PD-L1,c-Met,B细胞成熟抗原(BCMA),碳酸酐酶IX(CA1X),癌胚抗原(CEA),CD5,CD7,CD10,CD19,CD20,CD22,CD30,CD33,CD34,CD38,CD41,CD44,CD49f,CD56,CD74,CD123,CD133,CD138,CD276(B7H3),上皮糖蛋白(EGP2),滋养层细胞表面抗原2(TROP-2),上皮糖蛋白-40(EGP-40),上皮细胞粘附分子(EpCAM),受体酪氨酸蛋白激酶erb-B2、3、4,叶酸结合蛋白(FBP),胎儿乙酰胆碱受体(AChR),叶酸受体-a,神经节苷脂G2(GD2),神经节苷脂G3(GD3),人端粒酶逆转录酶(hTERT),激酶插入结构域受体(KDR),Lewis A(CA 1.9.9),Lewis Y(LeY),磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3),L1细胞粘附分子(L1CAM),粘蛋白16(Muc-16),粘蛋白1(Muc-1),NG2D配体,癌胚抗原(h5T4),前列腺干细胞抗原(PSCA),前列腺特异性膜抗原(PSMA),肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72),密封蛋白18.2(CLDN18.2),血管内皮生长因子R2(VEGF-R2),肾母细胞瘤蛋白(WT-1),1型酪氨酸蛋白激酶跨膜受体(ROR1)及其任何组合。

[0149] 在某些实施例中,第二抗原是免疫检查点调节剂。在某些实施例中,免疫检查点调节剂选自自由以下组成的组:PD1,CTLA4,LAG-3,2B4,BTLA及其任何组合。

[0150] 在某些实施例中,抗TIGIT抗体缀合至治疗剂或标记。在某些实施例中,标记选自下组,该组由以下组成:放射性同位素、荧光染料和酶。

[0151] 2.2 抗体亲和力

[0152] 在某些实施例中,本文公开的抗体或多特异性抗体的抗原结合部分对其靶抗原具有高结合亲和力。在某些实施例中,抗体或抗原结合部分以约 1×10^{-7} M或更小的KD结合靶标。在某些实施例中,抗体或抗原结合部分以约 1×10^{-8} M或更小的KD结合靶标。在某些实施例中,抗体或抗原结合部分以约 5×10^{-9} M或更小的KD结合靶标。在某些实施例中,抗体或抗原结合部分以约 1×10^{-9} M或更小的KD结合靶标。在某些实施例中,抗体或抗原结合部分以约 1×10^{-9} M至约 1×10^{-7} M之间的KD结合靶标。在某些实施例中,抗体或抗原结合部分以KD结合至靶标在约 1×10^{-9} M和约 1×10^{-8} M之间的抗体。在某些实施例中,抗体或抗原结合部分以约 2×10^{-9} M和约 1×10^{-8} M之间的KD结合靶标。在某些实施例中,抗体或抗原结合部分以约 2×10^{-9} M至约 5×10^{-8} M之间的KD结合靶标。在某些实施例中,抗体或抗原结合部分以约 1×10^{-9} M至约 5×10^{-9} M之间的KD结合靶标。

[0153] 抗体或抗原结合部分的KD可以通过本领域已知的方法确定。这类方法包括但不限于蛋白质印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-、EIA-、Octet- BIACORE®-检验和肽扫描。

[0154] 在某些实施例中,可以使用BIACORE®表面等离子体共振测定法测量KD。例如但不

限于,在固定的抗原CMS芯片上以约10个响应单位(RU)在25°C下使用BIAcore®-2000或BIAcore® 3000(Biacore公司,皮斯卡塔韦(Piscataway),新泽西州(NJ))进行测定。在某些实施例中,根据供应商说明书,将羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CMS,Biacore公司)用N-乙基-N'-(3-二甲基氨丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)进行活化。将抗原用pH 4.8的10 mM乙酸钠稀释至5 µg/ml(大约0.2 µM),之后以5 µl/分钟的流速注入,以实现偶联蛋白质的大约10个响应单位(RU)。在注入抗原之后,将1 M乙醇胺注入以封闭未反应的基团。对于动力学测量,在25°C,将在具有0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20™)表面活性剂(PBST)的PBS中的Fab的双倍的连续稀释物(0.78 nM至500 nM)以大约25 µl/min的流速注入。缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})是使用简单的一对一朗缪尔结合模型(BIAcore® 评估软件版本3.2)通过同时拟合缔合与解离传感图来计算。可以将平衡解离常数(KD)计算为比率 k_{off}/k_{on} 。参见例如,Chen等人,J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 293:865-881 (1999)。如果通过以上表面等离子体共振测定法的缔合速率(on-rate)超过 $10^6 M^{-1} s^{-1}$,则缔合速率可以通过使用荧光淬灭技术来确定,该技术在增加的抗原浓度(如光谱仪例如截流配置的分光光度计(阿维夫仪器)或具有搅拌吸收池的8000系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic公司)测量的)的存在下,在25°C测量PBS(pH 7.2)中的20 nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发 = 295 nm;发射 = 340 nm,16 nm带通)的增加或减少。

[0155] 2.3 抗体片段

[0156] 在某些实施例中,本公开的抗体包含抗原结合片段或抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段,以及以下描述的其他片段。有关某些抗体片段的综述,请参见Hudson等人,Nat. Med. [自然医学] 9: 129-134 (2003)。关于scFv片段的综述,参见例如,Pluckthtin, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies [单克隆抗体的药理学],第113卷,Rosenburg和Moore编辑,(施普林格出版社(Springer-Verlag), 纽约),第269-315页 (1994); 还参见WO 93/16185;以及美国专利号5,571,894和5,587,458。关于包含补救受体结合表位残基并具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab)₂片段的讨论,请参见美国专利号5,869,046。

[0157] 在某些实施例中,本公开的抗体可以是双抗体。双抗体是具有两个可以是二价或双特异性的抗原结合位点的抗体片段。参见例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat. Med. [自然医学] 9:129-134 (2003);和Hollinger等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 90: 6444-6448 (1993)。三抗体和四抗体还被描述于Hudson等人,Nat. Med. [自然医学] 9:129-134 (2003)中。

[0158] 在某些实施例中,本公开的抗体可包含单结构域抗体。单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施例中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis公司, 沃尔瑟姆(Waltham), 马萨诸塞州(MA);参见例如,美国专利号6,248,516 B1)。在某些实施例中,单结构域抗体是骆驼科动物单结构域抗体。在某些实施例中,单结构域抗体是VHH。在某些实施例中,单结构域抗体是人源化的。

[0159] 抗体片段可以通过多种技术制备,这些技术包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)的生产,如本文所述。

[0160] 2.4嵌合抗体和人源化抗体

[0161] 在某些实施例中,本公开的包括多特异性抗体的抗原结合部分的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于,例如,美国专利号4,816,567;和Morrison等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊], 81:6851-6855 (1984)中。在某些实施例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,源自小鼠的可变区)和人恒定区。在某些实施例中,嵌合抗体是其中类别或亚类已经从亲本抗体的类别或亚类改变的“类别转换”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0162] 在某些实施例中,本公开的包括多特异性抗体的抗原结合部分的抗体可以是人源化抗体。通常,将非人抗体进行人源化以减少对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR,例如CDR,(或其部分)衍生自非人抗体,而FR(或其任何部分)源自人抗体序列。人源化抗体还可以任选地包含人恒定区的至少一部分。在某些实施例中,人源化抗体中的某些FR残基被来自非人抗体(例如,源自HVR残基的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0163] 人源化抗体及其制备方法描述于例如Almagro和Fransson, Front.Biosci.[生物科学前沿] 13:1619-1633 (2008)中,并在例如Riechmann等人, Nature [自然] 332:323-329 (1988)中进一步描述;Queen等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 86:10029-10033 (1989);美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人, Methods [方法] 36:25-34 (2005)(描述了SDR (a-CDR)移植);Padlan, Mol. Immunol.[分子免疫学] 28:489-498 (1991)(描述“重修表面”);Dall'Acqua等人, Methods [方法] 36:43-60 (2005)(描述了“FR改组”);和Osborn等人, Methods [方法] 36:61-68 (2005)和Klimka等人, Br. J. Cancer [英国癌症杂志], 83:252-260 (2000)(描述了FR改组的“指导选择”方法)。

[0164] 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(参见,例如,Sims等人 J. Immunol.[免疫学杂志] 151:2296 (1993));源自轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列的框架区(参见,例如,Carter等人 Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊], 89:4285 (1992);和Presta等人 J. Immunol.[免疫学杂志], 151:2623 (1993));人类成熟的(体细胞突变的)构架区或人种系框架区(参见,例如Almagro和Fransson, Front.Biosci.[生物科学前沿] 13:1619-1633 (2008));以及筛选FR文库得到的框架区(参见,例如Baca等人, J. Biol. Chem.[生物化学杂志] 272:10678-10684 (1997)和Rosok等人, J. Biol. Chem.[生物化学杂志] 271:22611-22618 (1996))。

[0165] 2.5 人抗体

[0166] 在某些实施例中,本公开的抗体可以是人抗体(例如,人结构域抗体或人DAb)。人抗体可以使用本领域中已知的不同技术产生。人抗体一般在van Dijk和van de Winkel, Curr.Opin. Pharmacol.[药理学新见]5: 368-74 (2001), Lonberg, Curr.Opin. Immunol.[免疫学新见] 20:450-459 (2008), 和Chen, Mol. Immunol.[分子免疫学] 47(4):912-21 (2010)中描述。能够产生完全人单结构域抗体(或DAb)的转基因小鼠或大鼠是本领域已知的。参见例如US20090307787A1、美国专利号8,754,287、US20150289489A1、US20100122358A1、和WO 2004049794。

[0167] 可以通过向转基因动物施用免疫原来制备人抗体(例如人DAb),该转基因动物已被修饰以响应抗原攻击而产生完整的人抗体或具有人可变区的完整抗体。这样的动物通常含有全部或部分的人免疫球蛋白基因座,它们取代了内源性免疫球蛋白基因座,或者存在于染色体外或随机整合到动物的染色体中。在这种转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被灭活。对于从转基因动物中获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg, Nat. Biotech. [自然生物技术] 23:1117-1125 (2005)。还参见例如描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述HuMab®技术的美国专利号5,770,429;描述K-M MOUSE®技术的美国专利号7,041,870,和描述VelociMouse®技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900)。来自这类动物产生的完整抗体的人可变区可以(例如通过与不同的人恒定区结合)被进一步修饰。

[0168] 人抗体(例如人DAb)也可以通过基于杂交瘤的方法来制备。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠人异源骨髓瘤细胞系(参见,例如,Kozbor J. Immunol. [免疫学杂志], 133: 3001 (1984); Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications [单克隆抗体生产技术和应用], 第51-63页马塞尔德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.), 纽约, 1987);和Boerner等人, J. Immunol. [免疫学杂志], 147: 86 (1991))。Li等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊], 103: 3557-3562 (2006)中还描述了通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体。另外的方法包括例如在美国专利号7,189,826(描述从杂交瘤细胞系生产单克隆人IgM抗体)和Ni, Xiandai Mianyixue [现代免疫学], 26 (4):265-268 (2006) (描述人-人杂交瘤)中描述的那些方法。人杂交瘤技术(Trioma技术)也描述于Vollmers和Brandlein, Histology and Histopathology [组织学和组织病理学], 20 (3):927-937 (2005)和Vollmers和Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology [实验和临床药理学的方法和发现], 27 (3):185-91 (2005)中。

[0169] 人抗体(例如人DAb)也可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来产生。然后可以将此类可变结构域序列与所需的人恒定域结合。从抗体库中选择人抗体的技术描述如下。

[0170] 2.6 文库衍生的抗体

[0171] 可以通过在组合文库中筛选具有所需活性或多种活性的抗体来分离抗体部分。例如,本领域已知多种用于产生噬菌体展示文库并筛选此类文库中具有所需结合特性的抗体的方法。这类方法在例如Hoogenboom等人 Methods in Molecular Biology [分子生物学方法] 178:1-37(O'Brien等人编辑,哈门那出版社(Human Press),托托瓦(Totowa),新泽西州(NJ),2001)中描述,并且在以下文献中进一步描述:McCafferty等人, Nature [自然] 348:552-554; Clackson等人, Nature [自然] 352: 624-628 (1991); Marks等人, J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 222: 581-597 (1992); Marks和Bradbury, Methods in Molecular Biology [分子生物学方法] 248:161-175(Lo编辑,哈门那出版社(Human Press),托托瓦(Totowa),新泽西州(NJ),2003);Sidhu等人, J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 338 (2): 299-310 (2004); Lee等人, J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 340 (5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 101 (34): 12467-12472 (2004); 和Lee等人, J. Immunol. Methods [免疫学方法杂

志] 284(1-2): 119-132(2004)。已经描述了用于构建单结构域抗体文库的方法,例如,参见美国专利号7371849。

[0172] 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基因库,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以按照Winter等人, Ann.Rev. Immunol. [免疫学年度评论], 12: 433-455 (1994)中的描述筛选抗原结合噬菌体。噬菌体通常将抗体片段展示为scFv片段或Fab片段。来自免疫源的文库无需构建杂交瘤即可提供针对免疫原的高亲和力抗体。可替代地,可以如Griffiths等人, EMBO J [欧洲分子生物学学会杂志], 12: 725-734 (1993)所述在无需任何免疫的情况下克隆天然文库(例如从人中获得)以提供针对广泛范围的非自身以及自身抗原的抗体的单一来源。最后,如Hoogenboom和Winter, J. Mol. Biol. [分子生物学杂志], 227: 381-388 (1992)所述,还可以通过从干细胞克隆未重排的V基因片段,并使用包含随机序列的PCR引物来编码高度可变的CDR3区并在体外完成重排,来合成天然文库。描述人抗体噬菌体文库的专利出版物包括:美国专利号5,750,373和美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0173] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段在本文中被认为是人抗体或人抗体片段。

2.7 抗体变体

[0174] 当前公开的主题还提供了公开的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能需要改善该抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。可以通过将适当的修饰引入编码抗体的核苷酸序列中或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。这样的修饰包括但不限于抗体的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以得到最终的构建体,条件是最终的(即经过修饰的)抗体具有所需的特性(例如抗原结合)。

[0175] 2.7.1 取代、插入和缺失变体

[0176] 在某些实施例中,提供了具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。取代诱变的目标位点包括HVR(或CDR)和FR。保守取代示于表2中“优选取代”标题之下。表2中在“示例性取代”的标题下提供了更实质的变化,并且如下文参考氨基酸侧链类别进一步描述的。氨基酸取代可以引入目的抗体中,并针对所希望的活性(例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性、或改善的ADCC或CDC)筛选产物。

[0177] 表2. 氨基酸取代

[0178]

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

[0179] 氨基酸可以根据常见的侧链特性进行分组：(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) 芳香族的：Trp、Tyr、Phe。在某些实施例中，非保守取代将需要将这些类别中的一个的成员交换为另一个类别。

[0180] 在某些实施例中，取代变体的一种类型涉及取代亲本抗体（例如，人源化或人抗体）的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步研究的所得变体将相对于亲本抗体在某些生物学特性（例如，增加的亲和力、降低的免疫原性）上具有修饰（例如，改善）和/或将基本上保留了亲本抗体的某些生物学特性。示例性取代变体是亲和力成熟的抗体，该抗体可以方便地生成，例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术（例如本文披露的那些）。简而言之，对一个或多个HVR（或CDR）残基进行突变，并且将变体抗体在噬菌体上展示并针对特定生物学活性（例如结合亲和力）进行筛选。

[0181] 可以在HVR（或CDR）中进行改变（例如，取代），例如以改善抗体亲和力。此类改变可以在HVR（或CDR）“热点”（即由在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子编码的残基）中进行（参见例如，Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* [分子生物学方法] 207:179-196 (2008)）和/或SDR（a-CDR）中进行，测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建和从二级

文库中重新选择而进行的亲和力成熟已经描述于例如, Hoogenboom等人 *Methods in Molecular Biology* [分子生物学方法] 178:1-37 (O'Brien等人编辑, 哈门那出版社 (Human Press), 托托瓦(Totowa), 新泽西州(NJ), (2001))中。在亲和力成熟的某些实施例中, 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, 将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后产生二级文库。然后筛选文库以鉴别具有所希望的亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR(或CDR)定向方法, 其中使若干HVR(或CDR)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别抗原结合中涉及的HVR(或CDR)残基。特别是CDR-H3和CDR-L3经常成为靶标。

[0182] 在某些实施例中, 取代、插入或缺失可在一个或多个HVR(或CDR)内发生, 只要这样的改变基本上不降低抗体结合抗原的能力。例如, 可以在HVR(或CDR)中进行基本上不降低结合亲和力的保守改变(例如, 如本文提供的保守取代)。此类改变可能在HVR(或CDR)“热点”或CDR之外。在以上提供的变体VHH序列的某些实施例中, 每个HVR(或CDR)是未改变的, 或包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0183] 如Cunningham和Wells (1989) *Science* [科学], 244:1081-1085所述, 用于鉴定可以靶向诱变的抗体的残基或区域的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”。在这种方法中, 鉴定目标残基的残基或残基组(例如, 带电荷的残基, 例如Arg、Asp、His、Lys和Glu), 并用中性或带负电荷的氨基酸(例如, 丙氨酸或聚丙氨酸)取代, 以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在氨基酸位置引入另外的取代, 证明对初始取代的功能敏感性。可替代地或另外地, 抗原-抗体复合物的晶体结构用于鉴定抗体和抗原之间的接触点。这样的接触残基和邻近残基可以被靶向或消除作为取代候选。可以筛选变体以确定它们是否包含所需的属性。

[0184] 氨基酸序列插入包括氨基末端和/或羧基末端融合, 长度在一个残基至含有一百个或更多残基的多肽的范围内, 以及单一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。抗体分子的其他插入变体包括与抗体的N-或C-末端与增加抗体的血清半衰期的酶(例如, 对于ADEPT)或多肽融合。

2.7.2 糖基化变体

[0185] 在某些实施例中, 改变抗体部分以增加或减少构建体糖基化的程度。向抗体中添加或缺失糖基化位点可通过改变氨基酸序列以产生或去除一个或多个糖基化位点而方便地实现。

[0186] 当抗体部分包含Fc区(例如, scFv-Fc)时, 与其相连的碳水化合物可以发生改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分支的双触角寡糖, 其通常通过N-键连接至Fc区 C_H2 结构域的Asn297。参见, 例如Wright等人 *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡糖可以包括多种碳水化合物, 例如, 甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸, 以及在双触角寡糖结构的“茎”中附着于GlcNAc的岩藻糖。在某些实施例中, 可以对抗体部分中的寡糖进行修饰, 以产生具有某些改善的特性的抗体变体。

[0187] 在某些实施例中, 抗体部分具有碳水化合物结构, 该碳水化合物结构缺少(直接或间接)附接至Fc区的岩藻糖。例如, 此类抗体中的岩藻糖含量可以为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。岩藻糖的量是通过计算Asn297糖链中岩藻糖的平均量来确定的, 相对于通过MALDI-TOF质谱测量的与Asn 297附接的所有糖结构(例如, 复合、杂合和高甘露糖结构)

的总和,如WO 2008/077546中所述。Asn297是指位于Fc区中约297位的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可位于位置297上游或下游约 ± 3 个氨基酸,即在位置294和300之间。这类岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见例如,美国专利公开号US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621(协和发酵工业株式会社(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺陷型”抗体变体有关的出版物实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人 J. Mol. Biol.[分子生物学杂志] 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki等人 Biotech. Bioeng.[生物技术和生物工程]87: 614 (2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化作用缺陷型的Lec13 CHO细胞(Ripka等人 Arch. Biochem. Biophys. [生物化学与生物物理学集刊] 249:533-545 (1986); 美国专利申请号US 2003/0157108 A1, Presta, L; 和WO 2004/056312 A1, Adams等人),以及敲除细胞系,例如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8,敲除CHO细胞(参见例如,Yamane-Ohnuki等人 Biotech. Bioeng.[生物技术和生物工程]87: 614 (2004); Kanda, Y.等人, Biotechnol. Bioeng.[生物技术和生物工程], 94 (4):680-688 (2006); 和WO2003/085107)。

[0188] 在某些实施例中,抗体部分具有二等分的寡糖,例如其中附着于抗体的Fc区的双触角寡糖被GlcNAc二等分。此类抗体变体可以具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);和US 2005/0123546(Umana等人)中。还提供了在寡糖上具有至少一个连接至Fc区的半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可以具有改善的ADCC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087 (Patel等人); WO 1998/58964 (Raju, S.); 和WO 1999/22764 (Raju, S.)中。

[0189] 2.7.3 Fc区变体

[0190] 在某些实施例中,可将一个或多个氨基酸修饰引入抗体部分的Fc区(例如scFv-Fc)内,从而生成Fc区变体。Fc区变体可包含一个人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),该序列包含在一个或多个氨基酸位置处的氨基酸修饰(例如,取代)。

[0191] 在某些实施例中,具有一些(但非全部)效应子功能的Fc片段,此类功能使该片段成为适合应用的理想候选物,在所述应用中,抗体部分在体内的半衰期很重要,但某些效应子功能(例如,补体和ADCC)是非必要或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定确认ADCC和/或ADCC活性的降低/消耗。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定确保抗体没有Fc γ R结合能力(因此可能缺乏ADCC活性),但可以保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch和Kinet,在Annu. Rev. Immunol.[免疫学年度评论]9:457-492 (1991)的第464页的表2中。在美国专利号5,500,362中描述了用于评估感兴趣的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例(例如,参见Hellstrom, I.等人,Proc. Nat'l Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊],83:7059-7063 (1986))以及Hellstrom, I等人,Proc. Nat'l Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊],82:1499-1502 (1985);5,821,337(参见

Bruggemann, M.等人, J. Exp. Med. [实验医学杂志], 166:1351-1361 (1987)。可替代地, 可以采用非放射性测定方法(例如, 参见用于流式细胞术的ACTI™ 非放射性细胞毒性测定(细胞技术公司(CellTechnology, Inc.) 山景城(Mountain View), 加利福尼亚州; 以及CytoTox 96® 非放射性细胞毒性测定(普洛麦格公司(Promega), 麦迪逊, 威斯康星州)。用于此类测定的有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地, 可以在体内评估目的分子的ADCC活性, 例如在动物模型中, 如Clynes等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 95:652-656 (1998)中披露的。还可以进行C1q结合测定确认抗体不能结合C1q, 并且因此缺乏CDC活性。例如, 参见在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(参见例如, Gazzano-Santoro等人, J. Immunol. Methods [免疫学方法杂志] 202:163 (1996); Cragg, M.S.等人, Blood [血液] 101:1045-1052 (2003); 以及Cragg, M.S.和M.J. Glennie, Blood [血液] 103:2738-2743 (2004))。也可以使用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定(例如, 参见:Petkova, S.B.等人, Int'l Immunol. [国际免疫学] 18(12):1759-1769 (2006))。

[0192] 具有降低的效应子功能的抗体包括(美国专利号6,737,056), 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抗体。此类Fc突变体包括具有氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个的取代的Fc突变体, 包括具有残基265和297被丙氨酸取代的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0193] 本文描述了与FcR结合提高或降低的某些抗体变体。(参见, 例如美国专利号6,737,056;WO 2004/056312, 以及Shields等人, J. Biol. Chem. [生物化学杂志] 9(2):6591-6604 (2001)。

[0194] 在某些实施例中, Fc片段是IgG1 Fc片段。在某些实施例中, IgG1 Fc片段包含L234A突变和/或L235A突变。在某些实施例中, Fc片段是IgG2或IgG4 Fc片段。在某些实施例中, Fc片段是包含S228P、F234A和/或L235A突变的IgG4 Fc片段。

[0195] 在某些实施例中, 抗体部分包含具有一个或多个氨基酸取代的Fc区, 这些取代(例如, Fc区内的位置298、333和/或334处的取代(残基的EU编号))改善ADCC。

[0196] 在某些实施例中, Fc区内发生改变, 导致C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)发生改变(即, 提高或降低), 例如, 如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人, J. Immunol. [免疫学杂志], 164:4178-4184 (2000) 中所描述。

[0197] 在某些实施例中, 抗体部分(例如, scFv-Fc)变体包含变体Fc区, 该变体Fc区包含一个或多个改变半衰期和/或改变与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的氨基酸取代。具有延长的半衰期和与新生儿Fc受体(FcRn)的改善的结合的抗体, 其负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人, J. Immunol. [免疫学杂志] 117:587 (1976)和Kim等人, J. Immunol. [免疫学杂志] 24:249 (1994)), 如US2005/0014934A1中所描述(Hinton等人)。那些抗体包含具有一个或多个氨基酸取代的Fc区, 其中这些取代改变了Fc区与FcRn的结合。此类Fc变体包括在一个或多个Fc区残基上具有取代(例如Fc区残基434的取代)的那些变体(美国专利号7,371,826)。

[0198] 还参见Duncan和Winter, Nature [自然] 322:738-40 (1988); 美国专利号5,648,260; 美国专利号5,624,821; 以及关于Fc区变体的其他实例的WO 94/29351。

[0199] 2.7.4 半胱氨酸工程化抗体变体

[0200] 在某些实施例中,可能需要产生半胱氨酸工程化抗体部分,例如“thioMAb”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在某些实施例中,取代的残基出现在抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基团由此位于抗体的可及位点,并可用于将抗体与其他部分,例如药物部分或接头-药物部分偶联,以产生免疫偶联物,如本文进一步所述。在某些实施例中,以下任何一个或多个残基可以被半胱氨酸取代:重链的A118(EU编号);以及重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸工程化抗体部分可以如例如美国专利号7,521,541中所述产生。

[0201] 2.8 抗体衍生物

[0202] 在某些实施例中,本文所述的抗体部分可以被进一步修饰以包含本领域已知且容易获得的其他非蛋白质部分。适用于抗体衍生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,羧甲基纤维素,葡聚糖,聚乙烯醇,聚乙烯吡咯烷酮,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(正乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇,丙二醇均聚物,环氧丙烷/环氧乙烷共聚物,聚氧乙烯化多元醇(例如甘油),聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于在水中的稳定性而在制造中可能具有优势。该聚合物可以具有任何分子量,并且可以是支链或非支链的。连接至抗体的聚合物的数量可以变化,并且如果连接的聚合物多于一种,则它们可以是相同或不同的分子。一般而言,用于衍生化的聚合物的数量和/或类型可以基于以下考虑因素来确定,这些因素包括但不限于待改善抗体的特定性质或功能,是否将抗体衍生物用于确定的诊断条件等。

[0203] 在某些实施例中,抗体部分可以被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。如本文可互换使用的,“生物活性的”或“具有生物学活性的”是指在体内显示出执行特定功能的生物学活性。例如,它可能意味着与特定生物分子(例如蛋白质、DNA等)结合,然后促进或抑制这种生物分子的活性。在某些实施例中,生物活性蛋白或其片段包括:作为活性药物物质施用给患者的蛋白和多肽;用于预防或治疗疾病或病症、以及用于诊断目的的蛋白和多肽(例如诊断测试或体外测定中使用的酶);以及为预防疾病而施用给患者的蛋白质和多肽(例如疫苗)。

[0204] 2.9 抗体的生产方法

[0205] 可以使用本领域中任何可用的或已知的技术来产生本文公开的抗体。例如但不限于,可以使用重组方法和组合物产生抗体,例如,如美国专利号4,816,567中所述。产生抗体的详细程序在以下实例中描述。

[0206] 本公开的主题还提供了编码本文公开的抗体的分离的核酸。例如,分离的核酸可以编码包含抗体的VL的氨基酸序列和/或包含抗体的VH的氨基酸序列,例如抗体的轻链和/或重链。

[0207] 在某些实施例中,核酸可以存在于一种或多种载体(例如表达载体)中。如本文所用,术语“载体”是指能够转运与其连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指可以将另外的DNA区段连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中可以将另外的DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们被引入至其中的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体以及附加型哺乳动物载体)。

其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)在引入到宿主细胞后被整合到宿主细胞的基因组中,并且从而随着宿主基因组一起复制。此外,某些载体表达载体能够指导它们可操作地连接的基因的表达。一般而言,用于重组DNA技术中的表达载体常常为质粒(载体)形式。但是,所公开的主题旨在包括具有等效功能的其他形式的表达载体,例如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0208] 可以在单个多顺反子表达盒、单个载体的多个表达盒或多个载体中构建本文公开的抗体的不同部分。产生多顺反子表达盒的元件的实例包括但不限于多种病毒和非病毒内部核糖体进入位点(IRES,例如,FGF-1 IRES,FGF-2 IRES,VEGF IRES,IGF-II IRES,NF-kB IRES,RUNX1 IRES,p53 IRES,甲型肝炎IRES,丙型肝炎IRES,瘟病毒IRES,口蹄疫病毒IRES,小核糖核酸病毒IRES,脊髓灰质炎病毒IRES和脑心肌炎病毒IRES)和可裂解的接头(例如2A肽,例如P2A、T2A、E2A和F2A肽)。逆转录病毒载体和合适的包装线的组合也是合适的,其中衣壳蛋白将具有感染人细胞的功能。已知多种产生两性病毒的细胞系,包括但不限于PA12(Miller等人(1985) Mol. Cell. Biol. [分子细胞生物学] 5:431-437); PA317(Miller等人(1986) Mol. Cell. Biol. [分子细胞生物学] 6:2895-2902); 和CRIP(Danos等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 85:6460-6464)。非两性性颗粒也是合适的,例如用VSVG、RD114或GALV包膜和本领域中任何其他已知的假型颗粒。

[0209] 在某些实施例中,可以将编码本公开的抗体的核酸和/或包括该核酸的一种或多种载体引入宿主细胞。在某些实施例中,可以通过本领域已知的任何方法将核酸引入细胞中,这些方法包括但不限于转染,电穿孔,显微注射,用含有核酸序列的病毒或噬菌体载体感染,细胞融合,染色体介导的基因转移,微细胞介导的基因转移,原生质球融合等。在某些实施例中,宿主细胞可以包括,例如,已经用以下载体转化的宿主细胞:该载体包含编码包含单结构域抗体和/或单结构域抗体的VH的氨基酸序列的核酸。在某些实施例中,宿主细胞可以包括例如已经用以下转化的宿主细胞:(1) 一种载体,其包含编码包含该抗体的VL的氨基酸序列和包含该抗体的VH的氨基酸序列的核酸,或(2) 第一载体,其包含编码该抗体的VL的氨基酸序列的核酸,和第二载体,其包含编码该抗体的VH的氨基酸序列的核酸。在某些实施例中,宿主细胞是真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,YO、NS0、Sp20细胞)。

[0210] 在某些实施例中,制备本文公开的抗体的方法可以包括在适合于抗体表达的条件下培养其中已经引入了编码抗体的核酸的宿主细胞,以及任选地从宿主细胞和/或宿主细胞培养基中回收抗体。在某些实施例中,通过色谱技术从宿主细胞回收抗体。

[0211] 为了重组产生本公开的抗体,可以分离编码如上所述的抗体的核酸,并将其插入一种或多种载体中,以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合编码抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序此类核酸。用于克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中产生抗体,特别是在不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如,美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(还参见Charlton, Methods in Molecular Biology [分子生物学方法], 第248卷(B.K.C.Lo, 编辑, 哈门那出版社(Human Press), 托托瓦(Totowa), 新泽西州(NJ), 2003), 第245-254页,描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达)表达后,可以从细菌细胞糊中分离出可溶级

分的抗体,并可以进一步纯化。

[0212] 除原核生物外,真核微生物(例如丝状真菌或酵母菌)也是适合抗体编码载体的克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已被“人源化”的真菌和酵母菌株,从而产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见Gemgross, *Nat. Biotech.* [自然生物技术] 22:1409-1414 (2004), 和Li等人, *Nat. Biotech.* [自然生物技术] 24:210-215 (2006)。用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也可以源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定出许多杆状病毒株,它们可以与昆虫细胞结合使用,特别是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。在某些实施例中,植物细胞培养物可以用作宿主细胞。参见例如美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述了在转基因植物中生产抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0213] 在某些实施例中,脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如但不限于,适于悬浮生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的非限制性实例是由SY40(COS-7)转化的猴肾CV1系;人胚胎肾系(293或293细胞,如例如在Graham等人, *J Gen Viral.* [普通病毒学杂志] 36:59 (1977)中描述);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4细胞,例如在Mather, *Biol. Reprod.* [生殖生物学] 23:243-251 (1980)中描述);猴肾细胞(CV 1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK;水牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep 02);小鼠乳房肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,例如在Mather等人, *Annals N. Y. Acad. Sci.* [纽约科学院年刊] 383:44-68 (1982)中描述);MRC 5细胞;和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFK CHO细胞(Urlaub等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 77:42 I6 (1980));和骨髓瘤细胞系(例如YO、NSO和Sp2/0)。对于某些适合抗体产生的哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如,Yazaki和Wu, *Methods in Molecular Biology* [分子生物学方法], 第248卷(B.K.C.Lo编辑,哈门那出版社(Human Press), 托托瓦(Totowa), 新泽西州(NJ)), 第255-268页(2003)。

[0214] 在某些实施例中,用于制备双特异性和/或多特异性抗体的技术包括但不限于重组表达具有相同特异性的两个免疫球蛋白重链轻链对,其中一个或两个重链或轻链融合至具有不同特异性的抗原结合部分(例如,单结构域抗体,例如VHH),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(参见Milstei n和Cuello, *Nature* [自然] 305: 537 (1983)), PCT专利申请号W0 93/08829和Traunecker等人, *EMBO J* [欧洲分子生物学学会杂志] 10: 3655 (1991))和“杵臼结构”工程化(参见例如,美国专利号5,731,168)。双特异性抗体也可以通过工程化静电转向效应来制备,以制备抗体Fc-异二聚体分子(W0 2009/089004A 1);交联两个或更多个抗体或片段(参见例如,美国专利号4,676,980和Brennan等人, *Science* [科学], 229: 81 (1985));使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见例如, Kostelny等人, *J Immunol.* [免疫学杂志], 148(5): 1547-1553 (1992));使用“双抗体”技术制备双特异性抗体片段(参见例如,Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊], 90:6444-6448 (1993));和使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如, Gruber等人, *J. Immunol.* [免疫学杂志], 152:5368 (1994));并如例如在Tutt等人 *J Immunol.* [免疫学杂志] 147: 60 (1991)中所述制备三特异性抗体。

[0215] 本公开的双特异性和多特异性分子也可以使用化学技术(参见,例如,Kranz

(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊]78:5807)、“多瘤”技术(参见,例如,美国专利4,474,893)或重组DNA技术制备。还可以使用本领域已知的和本文所述的方法,通过缀合组成型结合特异性,例如第一表位和第二表位结合特异性,来制备当前公开的主题的双特异性和多特异性分子。例如,但不限于,双特异性和多特异性分子的每种结合特异性可以通过重组融合蛋白技术一起产生,或者可以分开产生,然后彼此缀合。当结合特异性是蛋白质或肽时,可以使用多种偶联剂或交联剂进行共价结合。交联剂的非限制性实例包括蛋白A,碳二亚胺,N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA),N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)(参见例如Karpovsky (1984) J. Exp. Med.[实验医学杂志]160:1686; Liu (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊]82:8648)。其他方法包括由Paulus(Behring Ins.Mitt.[贝林研究所通报](1985)第78期,118-132; Brennan (1985) Science [科学]229:81-83), Glennie (1987) J Immunol.[免疫学杂志]139:2367-2375)描述的那些方法。当结合特异性是抗体(例如,两种人源化抗体)时,它们可以通过两条重链的C末端铰链区的巯基键合来缀合。在某些实施例中,在缀合之前,铰链区可以被修饰为包含奇数个(例如一个)巯基残基。

[0216] 在某些实施例中,双特异性抗体的两种结合特异性可以在同一载体中编码,并在同一宿主细胞中表达和组装。当双特异性和多特异性分子是MAB x MAB, MAB x Fab, Fab x F(ab')₂或配体x Fab融合蛋白时,此方法特别有用。在某些实施例中,本公开的双特异性抗体可以是单链分子,例如单链双特异性抗体,包含一个单链抗体和结合决定簇的单链双特异性分子或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性和多特异性分子也可以是单链分子或可以包含至少两个单链分子。制备双特异性分子和多特异性分子的方法描述于例如美国专利号5,260,203;美国专利号5,455,030;美国专利号4,881,175;美国专利号5,132,405;美国专利号5,091,513;美国专利号5,476,786;美国专利号5,013,653;美国专利号5,258,498;以及美国专利号5,482,858中。本文还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点(例如,表位结合位点)的工程化抗体,包括“章鱼抗体”(参见例如US 2006/0025576A1)。

[0217] 在某些实施例中,动物系统可以用于产生本公开的抗体。用于制备杂交瘤的一种动物系统是鼠系统。

[0218] 在小鼠中杂交瘤的产生是非常完善建立的程序。用于分离用于融合的经免疫的脾细胞的免疫方案和技术在本领域中是已知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的(参见例如Harlow和Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual[抗体实验室手册], 纽约州冷泉港冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York))。

[0219] 2.10 测定

[0220] 本文提供的本公开的抗体可以通过本领域已知的和本文提供的多种测定法对其物理/化学性质和/或生物学活性进行鉴定、筛选或表征。

[0221] 在某些实施例中,可以通过已知方法(例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或蛋白质印迹测定)来测试本公开的抗体的抗原结合活性。这些测定中的每一种通常通过采用特异性针对感兴趣的复合物的经标记的试剂(例如,抗体)来检测特别感兴趣

的蛋白-抗体复合物的存在。例如,可以使用例如识别并特异性结合抗体的酶联抗体或抗体片段来检测抗体。可替代地,可以使用多种其他免疫测定中的任何一种来检测抗体。例如,可以将该抗体进行放射性标记并且在放射性免疫测定(RIA)中使用(参见例如,Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays [放射性免疫测定的原则], Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques [关于放射性配体测定技术的第七次培训课程], The Endocrine Society [内分泌学会], 1986年3月, 将其通过引用并入本文)。可以通过这样的手段,如使用盖革(Geiger)计数器或闪烁计数器或通过放射自显影来对放射性同位素进行检测。

[0222] 在某些实施例中,竞争测定法可用于鉴定与本公开的抗体(例如1C12、2A3或1G1)竞争与TIGIT结合的抗体。在某些实施例中,这样的竞争性抗体结合由1C12、2A3或1G1结合的共同表位(例如,线性或构象表位)。Morris (1996) “Epitope Mapping Protocols [表位定位方案],” Methods in Molecular Biology [分子生物学方法], 第66卷(哈门那出版社(Human Press), 托托瓦(Totowa), 新泽西州(NJ))中提供了定位抗体所结合的表位的详细示例性方法。

[0223] 在竞争测定的非限制性实例中,可以在包含与TIGIT结合的第一标记抗体(例如1C12、2A3或1G1)和第二未标记抗体的溶液中孵育固定的TIGIT,测试所述第二未标记抗体与第一抗体竞争与TIGIT结合的能力。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定的TIGIT在包含第一标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中孵育。在允许第一抗体与TIGIT结合的条件下孵育后,去除过量的未结合抗体,并测量与固定的TIGIT相关的标记物的量。如果在测试样品中相比于对照样品的与固定的TIGIT相关的标记的量大大减少,则表明第二抗体正在与第一抗体竞争与TIGIT的结合。参见Harlow和Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual [抗体实验室手册] 第14章纽约州冷泉港冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0224] 本公开提供了用于鉴定具有生物学活性的其抗TIGIT抗体的测定法。生物学活性可以包括例如激活免疫细胞或免疫激活报告基因(例如NFAT报告基因)。还提供了在体内和/或体外具有这种生物学活性的抗体。

[0225] 2.11 免疫缀合物

[0226] 本公开的主题还提供了免疫缀合物,其包含与一种或多种检测探针和/或细胞毒性剂(例如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如,蛋白毒素,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素、或其片段))或放射性同位素缀合的本文公开的抗体。例如,所公开的主题的抗体或抗原结合部分可以功能性地连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或其他方式)至一个或多个其他结合分子(例如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物)。

[0227] 在某些实施例中,免疫缀合物是抗体药物缀合物(ADC),其中抗体缀合至一种或多种药物,包括但不限于美登木素生物碱(参见美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235);奥瑞他汀(auristatin),例如单甲基奥瑞他汀药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483和5,780,588,以及7,498,298);尾海兔素(dolastatin);卡里奇霉素(calicheamicin)或其衍生物(参见美国专利号5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001和5,877,296;Hinman等人, Cancer Res. [癌症研究] 53:3336-3342 (1993);和Lode等人, Cancer Res. [癌症研究] 58:2925-

2928 (1998)); 蒽环霉素, 如道诺霉素 (daunomycin) 或阿霉素 (doxorubicin) (参见Kratz等人, *Current Med Chem.* [现代药物化学] 13:477-523 (2006); Jeffrey等人, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* [生物有机化学与医药化学通讯] 16:358-362 (2006); Torgov等人, *Bioconj.Chem.* [生物共轭化学] 16:717-721 (2005); Nagy等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 97:829-834 (2000); Dubowchik等人, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* [生物有机化学与医药化学通讯] 12:1529-1532 (2002); King等人, *J Med. Chem.* [医药化学杂志] 45:4336-4343 (2002); 和美国专利号6,630,579); 甲氨蝶呤; 长春地辛; 紫杉烷, 例如多西他赛、紫杉醇、拉罗他赛、替塞他赛和奥他赛; 单端孢霉烯 (trichothecenes); 和CC1065。

[0228] 在某些实施例中, 免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的本文所述的抗体, 所述酶活性毒素或其片段包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链 (来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴藴根毒蛋白A链、 α -帚曲毒蛋白、油桐蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆 (*Phytolaca americana*) 蛋白 (PAPI, PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制剂、多花白树毒蛋白、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酿霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin) 和单端孢菌素 (trichothecenes)。

[0229] 在某些实施例中, 免疫缀合物包含与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的本文所述的抗体。多种放射性同位素可用于生产放射性缀合物。非限制性实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和 Lu 的放射性同位素。当将放射性缀合物用于检测时, 它可以包括用于闪烁显像研究的放射性原子, 例如 ^{99m}Tc 或 ^{112}In , 或用于核磁共振 (NMR) 成像 (也称为磁共振成像, MRI) 的自旋标记, 例如碘123、碘131、铟11、氟19、碳13、氮15、氧17、钆、锰或铁。

[0230] 可以使用多种双功能蛋白偶联剂 (例如, N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二巯基) 丙酸酯 (SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (SMCC)、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物 (如二甲基己二亚氨酸酯 HCl)、活性酯 (如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类 (如戊二醛)、双叠氮化合物 (如双(对叠氮苯甲酰基) 己二胺)、双重氮衍生物 (如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯 (如甲代亚苯基 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物 (如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)) 制备抗体和细胞毒性剂的缀合物。例如, 可以如 Vitetta 等人, *Science* [科学], 238: 1098 (1987) 描述的制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳4-标记的1-异硫氰酸基苄基-3-甲基二亚乙基三胺-五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见 W094/11026。接头可以是促进细胞中细胞毒性药物释放的“可切割接头”。例如, 可以使用酸不稳定性接头、肽酶敏感性接头、光不稳定性接头、二甲基接头或含二硫化物的接头 (Chari 等人, *Cancer Res.* [癌症研究] 52:127-131 (1992); 美国专利号5,208,020)。

[0231] 本文的免疫缀合物或ADC明确涵盖但不限于用交联剂制备的此类缀合物, 包括但不限于可商购的 BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC、和磺基-SMPB、和 SVSB (琥珀酰亚胺基-(4-乙炔基砵) 苯甲酸酯) (例如, 来自美国伊利诺伊州罗克福德的皮尔

斯生物技术公司(Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A))。

[0232] 3. 使用方法

[0233] 本公开的主题进一步提供了使用公开的抗体(例如抗TIGIT抗体)的方法。在某些实施例中,这些方法涉及当前公开的抗体的治疗用途。在某些实施例中,这些方法涉及当前公开的抗体的诊断用途。

[0234] 3.1 治疗方法

[0235] 本公开提供了本文公开的任何抗体(例如,抗TIGIT抗体)用于治疗疾病和病症或用于增强免疫应答的方法和用途。在某些实施例中,可以将抗体和/或包含本文公开的抗体的药物组合物施用于受试者(例如哺乳动物(例如人))以治疗疾病和病症或增加免疫应答。在某些实施例中,这些疾病和病症涉及免疫检查点抑制和/或异常的TIGIT活性。在某些实施例中,可以通过本文公开的抗体治疗的疾病和病症包括但不限于瘤形成(例如癌症)。

[0236] 在某些实施例中,本公开提供了本文所述的抗TIGIT抗体(或其片段),用于制造药物。在某些实施例中,本公开提供了本文所述的抗TIGIT抗体(或其片段),用于制造用于治疗癌症的药物。在某些实施例中,本公开提供了本文所述的抗TIGIT抗体(或其片段),用于治疗受试者的癌症。在某些实施例中,本公开提供了包含本文提供的抗TIGIT抗体(或其片段)的药物组合物,用于治疗受试者的癌症。在某些实施例中,癌症可以是血液癌(例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤)、卵巢癌、乳腺癌、膀胱癌、脑癌、结肠癌、肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、胶质母细胞瘤、喉癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、腺癌、神经胶质瘤、软组织肉瘤和多种癌(包括前列腺癌和小细胞肺癌)。合适的癌还包括肿瘤学领域中的任何已知癌,包括但不限于星形细胞瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、少突神经胶质瘤、室管膜细胞瘤、成神经管细胞瘤、原始神经外胚层肿瘤(PNET)、软骨肉瘤、骨原发性肉瘤、胰腺导管腺癌、小细胞和大细胞肺腺癌、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、鳞状细胞癌、支气管肺泡癌、上皮腺癌、和其肝转移瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、肝癌、胆管癌、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、基底细胞癌、汗腺瘤、乳头状癌、皮脂腺癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、肾母细胞瘤、睾丸瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、乳腺肿瘤(如导管腺癌和小叶腺癌)、子宫颈鳞状上皮和腺癌、子宫上皮癌和卵巢上皮性癌、前列腺腺癌、膀胱移行性鳞状细胞癌、B和T细胞淋巴瘤(结节性和弥散性)、浆细胞瘤、急性和慢性白血病、恶性黑色素瘤、软组织肉瘤和平滑肌肉瘤。

[0237] 在某些实施例中,癌症可以是黑素瘤、NSCLC、头颈癌、尿路上皮癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌、TNBC)、胃癌、胆管癌、经典型霍奇金淋巴瘤(cHL)、非霍奇金淋巴瘤原发性纵隔B-细胞淋巴瘤(NHL PMBCL)、间皮瘤、卵巢癌、肺癌(例如,小细胞肺癌)、食管癌、鼻咽癌(NPC)、胆道癌、结肠直肠癌、宫颈癌或甲状腺癌。

[0238] 在某些实施例中,待治疗的受试者是哺乳动物(例如,人,非人灵长类、大鼠、小鼠、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫等)。在某些实施例中,受试者是人。在某些实施例中,受试者疑似患有癌症或有患癌症的风险、或被诊断患有具有异常TIGIT表达或活性的癌症或任何其他疾病。

[0239] 表现出异常的TIGIT活性的许多癌症或任何其他疾病的诊断方法以及这些疾病的临床描述是本领域已知的。此类方法包括但不限于例如免疫组织化学、PCR、荧光原位杂交(FISH)。关于异常TIGIT活性或表达的诊断方法的其他细节描述于例如Gupta等人,(2009) *Mod Pathol*. [现代病理学] 22(1): 128-133; Lopez-Rios等人 (2013) *J Clin Pathol*. [临床病理学杂志] 66(5): 381-385; Ellison等人 (2013) *J Clin Pathol* [临床病理学杂志] 66(2): 79-89; And 以及Guha 等人 (2013) *PLoS ONE* [公共科学图书馆·综合] 8(6): e67782中。

[0240] 可以通过任何合适的途径施用,包括例如静脉内、肌内或皮下。在一些实施例中,本文提供的抗TIGIT抗体(或其片段)和/或组合物与第二、第三或第四药剂(包括例如抗肿瘤药、生长抑制剂,细胞毒性剂或化学治疗剂)组合施用,以治疗涉及异常TIGIT活性的疾病或失调。这类药剂包括例如多西他赛、吉非替尼、FOLFIRI(伊立替康、5-氟尿嘧啶和亚叶酸)、伊立替康、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗(抗VEGF抗体)、FOLFOX-4、输注氟尿嘧啶、亚叶酸和奥沙利铂、阿法替尼、吉西他滨、卡培他滨、培美曲塞、替万替尼、依维莫司、CpG-ODN、雷帕霉素、来那度胺、维罗非尼、内皮抑素、拉帕替尼、PX-866、Imprime PGG和伊洛替尼。在一些实施例中,将抗TIGIT抗体(或其片段)缀合至另外的药剂。

[0241] 在某些实施例中,本文提供的抗TIGIT抗体(或其片段)和/或组合物与一种或多种其他疗法(例如放射疗法、手术、化学疗法、和/或靶向疗法)组合施用。在某些实施例中,本文提供的抗TIGIT抗体(或其片段)和/或组合物与放射疗法组合施用。在某些实施例中,本文提供的抗TIGIT抗体(或其片段)和/或组合物与放射疗法的组合用于治疗本文公开的赘生物或癌症。

[0242] 取决于待治疗的适应症和本领域技术人员熟悉的与给药相关的因素,本文提供的抗TIGIT抗体或其片段将以在最小化毒性和副作用的同时有效治疗该适应症的剂量施用。对于癌症的治疗,典型的剂量可以是例如在0.001至1000 μg 的范围内;然而,低于或高于该示例性范围的剂量在本发明的范围内。日剂量可以是总体重的约0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约100 mg/kg ,总体重的约0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或总体重的约1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至约100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。如上提到的,可以通过定期评估治疗的患者来监测治疗或预防功效。对于经若干天或更长时间的重复施用,取决于病症,重复进行治疗直至发生所希望的疾病症状抑制。然而,其他剂量方案可能是有用的并且在本发明的范围内。所希望的剂量可通过单次推注施用组合物、通过多次推注施用组合物、或通过连续输注施用组合物来递送。

[0243] 包含抗TIGIT抗体或其片段的药物组合物可以每天一次、两次、三次或四次施用。组合物也可以以低于每日施用的频率进行施用,例如,每周六次、每周五次、每周四次、每周三次、每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次或每六个月一次。组合物也可以例如在植入物中以缓释配制品施用,该植入物逐渐释放该组合物以在一段时间内使用,并且允许该组合物以较低频率施用,例如每月一次、每2-6个月一次、每年一次、或甚至单次施用。缓释装置(例如圆粒剂型(pellet)、纳米颗粒、微粒、纳米球、微球等)可以通过注射进行施用。

[0244] 抗体(或其片段)可以以单次日剂量施用,或者总日剂量可以以每日两次、三次或四次的分剂量施用。组合物也可以以低于每日施用的频率进行施用,例如,每周六次、每周五次、每周四次、每周三次、每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每月一次、每两

个月一次、每三个月一次或每六个月一次。抗体(或其片段)也可以例如在植入物中以缓释配制品施用,该植入物逐渐释放该组合物以在一段时间内使用,并且允许该组合物以较低频率施用,例如每月一次、每2-6个月一次、每年一次、或甚至单次施用。缓释装置(例如圆粒剂型(pellet)、纳米颗粒、微粒、纳米球、微球等)可以通过注射或手术植入各种位置进行施用。

[0245] 可以通过例如但不限于肿瘤消退、肿瘤重量或尺寸缩小、进展时间、存活持续时间、无进展存活、总体反应率、应答持续时间、生活质量、蛋白质表达和/或活性来评估癌症治疗。可以采用确定疗法功效的方法,包括例如通过放射成像测量反应。

[0246] 在某些实施例中,将治疗功效测量为肿瘤生长抑制百分比(% TGI),使用等式 $100 - (T/C \times 100)$ 进行计算,其中T是治疗的肿瘤的平均相对肿瘤体积,并且C是未治疗的肿瘤的平均相对肿瘤体积。在某些实施例中,%TGI是约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、或多于95%。

[0247] 3.2 诊断和成像方法

[0248] 经标记的抗TIGIT抗体、其片段,以及其衍生物和类似物可用于诊断目的,以检测、诊断或监测与TIGIT的表达、异常表达和/或活性相关的疾病和/或障碍。例如,本文提供的抗TIGIT抗体(或其片段)可以用于原位、体内、离体和体外诊断测定或成像测定。用于检测TIGIT多肽表达的方法,包括(a)使用本发明的一种或多种抗体测定多肽在个体的细胞(例如组织)或体液中的表达,和(b)比较该基因表达水平和标准基因表达水平,其中与标准表达水平相比,测定的基因表达水平的增加或减少指示异常表达。

[0249] 本文提供的另外的实施例包括在动物(例如哺乳动物,如人)中诊断与TIGIT的表达或异常表达相关的疾病或障碍的方法。这些方法包含在哺乳动物中检测TIGIT分子。在某些实施例中,诊断包括:(a)向哺乳动物施用有效量的经标记的抗PD-1抗体(或其片段);(b)在施用后等待一段时间间隔,以允许经标记的抗TIGIT抗体(或其片段)优先浓缩在受试者的表达TIGIT分子的部位(并且将未结合的经标记的分子清除至背景水平);(c)确定背景水平;和(d)检测受试者中经标记的分子,使得检测到高于背景水平的经标记的分子指示受试者患有与TIGIT表达或异常表达相关的特定疾病或障碍。背景水平可以通过不同方法确定,这些方法包括将所检测到的标记的分子的量与先前针对一个具体系统确定的标准值进行对比。

[0250] 本文提供的抗TIGIT抗体(或其片段)可以用于使用本领域技术人员已知的经典免疫组织学方法来测定生物样品中蛋白质水平(例如,参见Jalkanen等人, J. Cell. Biol. [细胞生物学杂志] 101:976-985 (1985);Jalkanen等人, J. Cell. Biol. [细胞生物学杂志] 105:3087-3096 (1987))。有用于检测蛋白质基因表达的其他基于抗体的方法包括免疫测定,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)。合适的抗体测定标记是本领域中已知的并且包括酶标记(例如葡萄糖氧化酶);放射性同位素,例如碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟($^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、以及锝(^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、铈(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru ;鲁米诺;以及荧光标记(例如荧光素及罗丹明及生物素)。

[0251] 本领域已知的技术可以应用于本文提供的经标记的抗体(或其片段)。此类技术包

包括但不限于使用双功能缀合剂(参见例如,美国专利号5,756,065;5,714,631;5,696,239;5,652,361;5,505,931;5,489,425;5,435,990;5,428,139;5,342,604;5,274,119;4,994,560;和5,808,003)。

[0252] 可替代地,或另外地,可以测量细胞中编码TIGIT多肽的核酸或mRNA的水平,例如经由使用对应于编码EGFR的核酸或其互补序列的基于核酸的探针的荧光原位杂交;(FISH;参见1998年10月公布的WO 98/45479),DNA印迹法、RNA印迹法或聚合酶链反应(PCR)技术,例如实时定量PCR(RT-PCR)。还可以通过测量生物流体(例如血清)中的脱落抗原来研究TIGIT过表达,例如使用基于抗体的测定(还参见,例如,1990年6月12日发布的美国专利号4,933,294;1991年4月18日发布的WO 91/05264;1995年3月28日发布的美国专利号5,401,638;以及Sias等人, J. Immunol. Methods [免疫方法杂志] 132:73-80 (1990))。除了上述测定之外,本领域技术人员可获得各种体内和离体测定。例如,可以将哺乳动物体内的细胞暴露于抗体,该抗体任选地用可检测标记(例如放射性同位素)进行标记,并且可以例如通过外部扫描放射性或者通过分析取自先前暴露于该抗体的哺乳动物的样品(例如,活体标本检查或其他生物样品)来评估抗体与细胞的结合。

[0253] 4. 药物配制品

[0254] 本公开的主题还提供了包含一种或多种本文公开的抗体以及药学上可接受的载剂的药物配制品。在某些实施例中,药物组合物可以包含当前公开的主题的多种(例如,两种或更多种)抗体和/或其抗原结合部分的组合。在某些实施例中,本公开的药物组合物可以包含一种或多种抗TIGIT抗体。

[0255] 在某些实施例中,所公开的药物配制品可以通过将具有所需纯度的抗体与一种或多种任选的药学上可接受的载剂(Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明顿药物科学], 第16版, Osol, A.编辑 (1980))组合以冻干配制品或水溶液的形式来制备。例如但不限于,冻干抗体配制品在美国专利号6,267,958中描述。在某些实施例中,水性抗体配制品可以包括在美国专利号6,171,586和WO2006/044908中描述的那些,后者的配制品包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。在某些实施例中,抗体可以具有大于约80%,大于约90%,大于约91%,大于约92%,大于约93%,大于约94%,大于95%,大于约96%,大于约97%,大于约98%,大于约99%,大于约99.1%,大于约99.2%,大于约99.3%,大于约99.4%,大于约99.5%,大于约99.6%,大于约99.7%,大于约99.8%或大于约99.9%的纯度。

[0256] 药学上可接受的载剂通常在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲液(例如磷酸盐、柠檬酸盐、以及其他有机酸);包括抗坏血酸和甲硫氨酸的抗氧化剂;防腐剂(例如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化六甲铵;氯化苄烷铵、氯化苄乙铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;烷基对羟苯甲酸酯(例如甲基或丙基对羟苯甲酸酯);邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸;单糖、二糖、以及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐的计数离子,例如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白络合物);和/或非离子型表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。本文中的示例性药学上可接受的载剂还包括间质药物分散剂,例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,例如rHuPH20 (HYLENEX®),

Baxter International公司)。在美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中描述了某些示例性的sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20。在某些实施例中,sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(例如软骨素酶)组合。

[0257] 载剂可以适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(例如,通过注射或输注)。根据施用途径,可以将活性化合物(即抗TIGIT抗体)包被在一种材料中,以保护该化合物免受酸和其他可使化合物失活的自然条件的影响。

[0258] 本公开的药物组合物也可以组合治疗,即与其他药剂组合施用。在某些实施例中,本文所公开的药物组合物还可以包含一种或多种活性成分,这对于所治疗的特定适应症是必需的,例如,具有互补活性且不会产生互相不利影响的那些。在某些实施例中,药物配制品可包含用于治疗由第一治疗剂治疗的相同疾病的第二活性成分。此类活性成分合适地以对于预期目的有效的量组合存在。例如但不限于,本公开的配制品还可以包含一种或多种活性成分,这对于所治疗的特定适应症是必要的,优选地是那些具有互补活性且不会产生互相不利影响的活性成分。例如,可能期望进一步提供可用于治疗相同疾病的第二治疗剂。此类活性成分合适地以对于预期目的有效的量组合存在。

[0259] 本公开的组合物可以通过本领域已知的多种方法施用。施用途径和/或方式取决于所需结果。这些活性化合物可以用保护该化合物以便避免快速释放的载剂来制备,例如一种受控释放配制品,包括植入物、经皮贴片以及微囊化递送系统。可以使用生物可降解、生物相容的聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、以及聚乳酸。制备这类配制品的许多方法由例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems [缓释和控释药物递送系统], J.R.Robinson,编辑,马塞尔德克尔公司,纽约,1978描述。在某些实施例中,药物组合物是在美国食品和药物管理局(U.S. Food and Drug Administration)的优质生产规范(Good Manufacturing Practice(GMP))条件下生产的。

[0260] 也可以制备含有所公开的抗体的缓释制剂。持续释放制剂的适合的实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质处于成型制品的形式(例如薄膜或微胶囊)。在某些实施例中,可以将活性成分包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如分别在胶体药物递送系统中(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或在粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。此类技术披露于Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明顿药物科学],第16版,Osol, A.编辑(1980)中。

[0261] 为了通过某些施用途径施用本公开的抗体,可能有必要用防止其失活的材料包被该化合物或与该化合物共同施用。例如,可以在合适的载剂(例如脂质体)或稀释剂中将化合物施用给受试者。药学上可接受的稀释剂包括盐水和缓冲水溶液。脂质体包括水包油包水型CGF乳剂以及常规脂质体(Strejan等人(1984) J Neuroimmunol.[神经免疫学杂志] 7:27)。

[0262] 药学上可接受的载剂包括无菌水溶液或分散液以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。使用此类介质和试剂用于药物活性的物质是本领域中已知的。

[0263] 除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相容,否则可考虑将其用于本公开的药物组合物中。还可以将补充性活性化合物掺入组合物中。

[0264] 治疗组合物通常必须是无菌的、基本等渗的,并且在生产和储存条件下是稳定的。

该组合物可以配制为一种溶液、微乳液、脂质体,或适合于高药物浓度的其他有序结构。该载剂可以是含有以下物质的溶剂或分散介质:例如,水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇等),以及其适合的混合物。恰当的流动性可以(例如)通过使用包衣(如卵磷脂)来维持,在分散体的情况下通过维持所需的颗粒大小来维持,以及通过使用表面活性剂来维持。在许多情况下,在组合物中包括等张剂,例如糖、多元醇(如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化钠将为优选的。可以通过在该组合物中包括例如单硬脂酸盐以及明胶的一种延迟吸收的药剂来实现这些可注射组合物的延长的吸收。

[0265] 无菌注射溶液可通过将所需量的一种或多种公开的抗体根据需要与合适的溶剂与上面列举的一种或多种成分的组合掺入,然后进行灭菌微滤(例如通过无菌滤膜过滤)来制备。通常,分散液通过以下方式制备:

[0266] 将活性化合物掺入无菌媒介物中,该无菌媒介物含有基础分散介质和来自以上列举的那些的其他所需成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),所述方法从其先前的无菌过滤溶液中产生活性成分和任何其他所希望的成分的粉末。

[0267] 还可以用本领域已知的医学装置来施用治疗性组合物。

[0268] 例如,本发明的治疗组合物可以与无针皮下注射装置一起施用,例如在美国专利号5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824或4,596,556中公开的装置。可用于本公开的植入物和模块的实例包括:美国专利号4,487,603,其公开了一种用于以受控的速率分配药物的植入式微输液泵;美国专利号4,486,194,其公开了一种用于通过皮肤施用药物的治疗装置;美国专利号4,447,233,其公开了一种用于以精确的输注速率输送药物的药物输注泵;美国专利号4,447,224,其公开了一种用于连续药物输送的可变流量可植入输注设备;美国专利号4,439,196,其公开了一种具有多室隔室的渗透药物递送系统;以及美国专利号4,475,196,其公开了一种渗透药物输送系统。已知许多其他此类植入物、递送系统和模块。

[0269] 对于治疗组合物,本公开的配制品包括适于口服、经鼻、局部(包括经颊和经舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外施用的那些配制品。这些配制品可以方便地以单位剂量形式存在并且可以通过药学领域众所周知的任何方法制备。可以与载剂材料组合以产生单一剂型的抗体的量根据所治疗的受试者和特定的施用方式而变化。可以与载剂材料结合以产生单一剂型的抗体的量通常是产生治疗效果的组合物的量。通常,以百分数计,这个量的范围是从约0.01%至约99%的活性成分,从约0.1%至约70%,或从约1%至约30%。

[0270] 用于局部或经皮施用本公开的组合物的剂型包括散剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、溶液、贴剂和吸入剂。可以将活性化合物在无菌条件下与药学上可接受的载剂和可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0271] 短语“肠胃外施用”和“经肠胃外施用”是指除了肠施用和局部施用之外的、通常通过注射的施用模式,并且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外以及胸骨内注射和输注。

[0272] 这些药物组合物还可以含有辅助剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂、和分散剂。预防存在微生物可以通过上述灭菌程序,以及通过包含不同抗细菌和抗真菌剂,例如对羟苯甲

酸酯(paraben)、氯代丁醇、苯酚山梨酸等来确保。可能还希望将等渗剂,例如糖、氯化钠等包括于这些组合中。此外,通过包括延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶可以引起可注射药物形式的延长吸收。

[0273] 在某些实施例中,当将本公开的抗体作为药物施用给人和动物时,它们可以单独或与药学上可接受的载剂组合的作为药物组合物给予,所述药物组合物包含例如约0.01%至约99.5%(或约0.1%至90%)的本文所述的抗体。

[0274] 5. 制品

[0275] 当前公开的主题还提供一种制品,该制品包含可用于治疗、预防和/或诊断上述疾病的材料。

[0276] 在某些实施例中,制品包括容器以及在容器上或与容器相关联的标签或包装插入物。合适的容器的非限制性实例包括瓶、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可以由多种材料(例如玻璃或塑料)形成。容器可以容纳(本身或与另一种组合物组合)有效治疗、预防和/或诊断病症的组合物,并且可具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。

[0277] 在某些实施例中,组合物中的至少一种活性剂是当前公开的主题的抗体。标签或包装插入物可指示该组合物用于治疗所选病症。

[0278] 在某些实施例中,该制品可以包括(a)第一容器,该第一容器中装有组合物,其中该组合物包含本发明的抗体;以及(b)第二容器,其中装有组合物,其中该组合物包含其他细胞毒性或治疗剂。在某些实施例中,所述制品可以进一步包含包装插入物,其指示所述组合物可以用于治疗特定病症。

[0279] 可替代地或另外地,制品可以进一步包括另外的容器,例如第二或第三容器,其包括药学上可接受的缓冲剂,例如但不限于注射用抑菌水(BWFI),磷酸盐缓冲盐水,林格氏溶液和右旋糖溶液。该制品可以包括从商业和用户角度所希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0280] 典型实施例

[0281] 实施例1.一种与TIGIT结合的抗体,该抗体包含单结构域抗体,该单结构域抗体以 1×10^{-7} M或更小的KD结合TIGIT。

[0282] 实施例2.如实施例1所述的抗体,其中该单结构域抗体以 1×10^{-8} M或更小的KD结合TIGIT。

[0283] 实施例3.如实施例1或2所述的抗体,其中该单结构域抗体以 5×10^{-9} M或更小的KD结合TIGIT。

[0284] 实施例4.如实施例1至3中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体以 2×10^{-9} M或更小的KD结合TIGIT。

[0285] 实施例5.如实施例1至4中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含VHH。

[0286] 实施例6.如实施例1至5中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体或VHH包含重链可变区(VH)。

[0287] 实施例7.如实施例1至6中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体与包含重链可变区的参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该重链可变区包含:

[0288] a.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 94所示序列的氨基酸;重链可变区

CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 95所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 96所示序列的氨基酸,

[0289] b.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 98所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 99所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 100所示序列的氨基酸,

[0290] c.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 102所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 103所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 104所示序列的氨基酸,

[0291] d.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 106所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 107所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 108所示序列的氨基酸,

[0292] e.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 110所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 111所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 112所示序列的氨基酸,

[0293] f.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 114所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 115所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 116所示序列的氨基酸,

[0294] g.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 118所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 119所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 120所示序列的氨基酸,

[0295] h.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 122所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 123所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 124所示序列的氨基酸,

[0296] i.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 126所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 127所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 128所示序列的氨基酸,

[0297] j.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 130所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 131所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 132所示序列的氨基酸,

[0298] k.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 134所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 135所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 136所示序列的氨基酸,

[0299] l.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 138所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 139所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 140所示序列的氨基酸,

[0300] m.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 142所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 143所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 144所示序列的氨基酸,

[0301] n.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 146所示序列的氨基酸;重链可变区

CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 147所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 148所示序列的氨基酸,

[0302] i.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 150所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 151所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 152所示序列的氨基酸,

[0303] o.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 154所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 155所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 156所示序列的氨基酸,

[0304] p.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 158所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 159所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 160所示序列的氨基酸,

[0305] q.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 162所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 163所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 164所示序列的氨基酸,

[0306] r.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 166所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 167所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 168所示序列的氨基酸,

[0307] s.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 170所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 171所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 172所示序列的氨基酸,

[0308] t.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 174所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 175所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 176所示序列的氨基酸,

[0309] u.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 178所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 179所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 180所示序列的氨基酸,

[0310] v.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 182所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 183所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 184所示序列的氨基酸,

[0311] w.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 186所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 187所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 188所示序列的氨基酸,或

[0312] x.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 190所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 191所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 192所示序列的氨基酸。

[0313] 实施例8.如实施例1至7中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:

[0314] a.重链可变区CDR1,该重链可变区CDR1包含SEQ ID NO: 94、98、102、106、110、114、118、122、126、130、134、138、142、146、150、154、158、162、166、170、174、178、182、186和

190中任何一个的氨基酸序列,或其具有多达约3个氨基酸取代的变体;

[0315] b.重链可变区CDR2,该重链可变区CDR2包含SEQ ID NO: 95、99、103、107、111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175、179、183、187和191中任何一个的氨基酸序列,或其具有多达约3个氨基酸取代的变体;以及

[0316] c.重链可变区CDR3,该重链可变区CDR3包含SEQ ID NO: 96、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188和192中任何一个的氨基酸序列,或其具有多达约3个氨基酸取代的变体。

[0317] 实施例9.如实施例1至8中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含CDR1结构域、CDR2结构域和CDR3结构域,其中该CDR1结构域、CDR2结构域和CDR3结构域分别含有包含在参考重链可变区中的CDR1结构域、CDR2结构域和CDR3结构域,该参考重链可变区包含选自由SEQ ID NO: 97、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189和193组成的组的氨基酸序列。

[0318] 实施例10.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 94所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 95所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 96所示序列的氨基酸。

[0319] 实施例11.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 98所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 99所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 100所示序列的氨基酸。

[0320] 实施例12.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 102所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 103所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 104所示序列的氨基酸。

[0321] 实施例13.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 106所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 107所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 108所示序列的氨基酸。

[0322] 实施例14.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 110所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 111所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 112所示序列的氨基酸。

[0323] 实施例15.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 114所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 115所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 116所示序列的氨基酸。

[0324] 实施例16.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 118所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具

有SEQ ID NO: 119所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 120所示序列的氨基酸。

[0325] 实施例17.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 122所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 123所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 124所示序列的氨基酸。

[0326] 实施例18.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 126所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 127所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 128所示序列的氨基酸。

[0327] 实施例19.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 130所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 131所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 132所示序列的氨基酸。

[0328] 实施例20.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 134所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 135所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 136所示序列的氨基酸。

[0329] 实施例21.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 138所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 139所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 140所示序列的氨基酸。

[0330] 实施例22.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 142所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 143所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 144所示序列的氨基酸。

[0331] 实施例23.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 146所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 147所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 148所示序列的氨基酸。

[0332] 实施例24.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 150所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 151所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 152所示序列的氨基酸。

[0333] 实施例25.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 154所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 155所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 156所示序列的氨基酸。

[0334] 实施例26.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可

变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 158所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 159所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 160所示序列的氨基酸。

[0335] 实施例27.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 162所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 163所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 164所示序列的氨基酸。

[0336] 实施例28.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 166所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 167所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 168所示序列的氨基酸。

[0337] 实施例29.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 170所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 171所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 172所示序列的氨基酸。

[0338] 实施例30.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 174所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 175所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 176所示序列的氨基酸。

[0339] 实施例31.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 178所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 179所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 180所示序列的氨基酸。

[0340] 实施例32.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 182所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 183所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 184所示序列的氨基酸。

[0341] 实施例33.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 186所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 187所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 188所示序列的氨基酸。

[0342] 实施例34.如实施例1至9中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含:重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 190所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 191所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 192所示序列的氨基酸。

[0343] 实施例35.如实施例1至34中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含与选自SEQ ID NO: 97、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189和193组成的组的氨基酸序列具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。

- [0344] 实施例36.如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 97所示的氨基酸序列。
- [0345] 实施例37.如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 101所示的氨基酸序列。
- [0346] 实施例38.如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 105所示的氨基酸序列。
- [0347] 实施例39. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 109所示的氨基酸序列。
- [0348] 实施例40. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 113所示的氨基酸序列。
- [0349] 实施例41. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 117所示的氨基酸序列。
- [0350] 实施例42. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 121所示的氨基酸序列。
- [0351] 实施例43. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 125所示的氨基酸序列。
- [0352] 实施例44. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 129所示的氨基酸序列。
- [0353] 实施例45. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 133所示的氨基酸序列。
- [0354] 实施例46. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 137所示的氨基酸序列。
- [0355] 实施例47. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 141所示的氨基酸序列。
- [0356] 实施例48. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 145所示的氨基酸序列。
- [0357] 实施例49. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 149所示的氨基酸序列。
- [0358] 实施例50. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 153所示的氨基酸序列。
- [0359] 实施例51. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 157所示的氨基酸序列。
- [0360] 实施例52. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 161所示的氨基酸序列。
- [0361] 实施例53. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 165所示的氨基酸序列。
- [0362] 实施例54. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 169所示的氨基酸序列。
- [0363] 实施例55. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链

可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 173所示的氨基酸序列。

[0364] 实施例56. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 177所示的氨基酸序列。

[0365] 实施例57. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 181所示的氨基酸序列。

[0366] 实施例58. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 185所示的氨基酸序列。

[0367] 实施例59. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 189所示的氨基酸序列。

[0368] 实施例60. 如实施例1至35中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO: 193所示的氨基酸序列。

[0369] 实施例61. 如实施例1至60中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体与包含重链可变区的参考抗TIGIT单结构域抗体交叉竞争与TIGIT结合,该重链可变区包含:

[0370] 1.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 1所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 2所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 3所示序列的氨基酸,

[0371] 2.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 5所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 6所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 7所示序列的氨基酸,

[0372] 3.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 9所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 10所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 11所示序列的氨基酸,

[0373] 4.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 13所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 14所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 15所示序列的氨基酸,

[0374] 5.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 17所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 18所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 19所示序列的氨基酸,

[0375] 6.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 21所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 22所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 23所示序列的氨基酸,

[0376] 7.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 25所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 26所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 27所示序列的氨基酸,

[0377] 8.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 29所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 30所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 31所示序列的氨基酸,

[0378] 9.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 33所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 34所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ

ID NO: 35所示序列的氨基酸,

[0379] 10.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 37所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 38所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 39所示序列的氨基酸,

[0380] 11.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 41所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 42所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 43所示序列的氨基酸,

[0381] 12.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 45所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 46所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 47所示序列的氨基酸,

[0382] 13.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 49所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 50所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 51所示序列的氨基酸,

[0383] 14.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 53所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 54所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 55所示序列的氨基酸,

[0384] 15.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 57所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 58所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 59所示序列的氨基酸,

[0385] 16.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 61所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 62所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 63所示序列的氨基酸,

[0386] 17.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 65所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 66所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 67所示序列的氨基酸,

[0387] 18.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 69所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 70所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 71所示序列的氨基酸,

[0388] 19.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 73所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 74所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 75所示序列的氨基酸,

[0389] 20.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 77所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 78所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 79所示序列的氨基酸,或

[0390] 21.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 81所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 82所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 83所示序列的氨基酸。

[0391] 实施例62. 如实施例1至61中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含:

[0392] 1.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 1所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 2所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 3所示序列的氨基酸,

[0393] 2.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 5所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 6所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 7所示序列的氨基酸,

[0394] 3.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 9所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 10所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 11所示序列的氨基酸,

[0395] 4.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 13所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 14所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 15所示序列的氨基酸,

[0396] 5.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 17所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 18所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 19所示序列的氨基酸,

[0397] 6.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 21所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 22所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 23所示序列的氨基酸,

[0398] 7.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 25所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 26所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 27所示序列的氨基酸,

[0399] 8.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 29所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 30所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 31所示序列的氨基酸,

[0400] 9.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 33所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 34所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 35所示序列的氨基酸,

[0401] 10.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 37所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 38所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 39所示序列的氨基酸,

[0402] 11.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 41所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 42所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 43所示序列的氨基酸,

[0403] 12.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 45所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 46所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 47所示序列的氨基酸,

[0404] 13.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 49所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 50所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 51所示序列的氨基酸,

[0405] 14.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 53所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 54所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 55所示序列的氨基酸,

[0406] 15.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 57所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 58所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 59所示序列的氨基酸,

[0407] 16.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 61所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 62所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 63所示序列的氨基酸,

[0408] 17.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 65所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 66所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 67所示序列的氨基酸,

[0409] 18.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 69所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 70所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 71所示序列的氨基酸,

[0410] 19.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 73所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 74所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 75所示序列的氨基酸,

[0411] 20.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 77所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 78所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 79所示序列的氨基酸,或

[0412] 21.重链可变区CDR1,其包含具有SEQ ID NO: 81所示序列的氨基酸;重链可变区CDR2,其包含具有SEQ ID NO: 82所示序列的氨基酸;和重链可变区CDR3,其包含具有SEQ ID NO: 83所示序列的氨基酸。

[0413] 实施例63. 如实施例1至62中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含重链可变区,该重链可变区包含与选自由SEQ ID NO: 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80和84组成的组的氨基酸序列具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。

[0414] 实施例64. 如实施例1至63中任一项所述的抗体,其中该单结构域抗体包含人源化框架。

[0415] 实施例65. 如实施例1至64中任一项所述的抗体,其中该抗体包含Fc区。

[0416] 实施例66. 如实施例1至65中任一项所述的抗体,其中该Fc区包含人Fc区。

[0417] 实施例67. 如实施例1至66中任一项所述的抗体,其中该Fc区包含选自下组的Fc区,该组由以下组成: IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的Fc区。

[0418] 实施例68. 如实施例1至67中任一项所述的抗体,其中该Fc区包含选自下组的Fc区,该组由以下组成: IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的Fc区。

[0419] 实施例69. 如实施例1至68中任一项所述的抗体,其中该Fc区包含IgG1 Fc区。

[0420] 实施例70. 如实施例69所述的抗体,其中该IgG1 Fc区包含一种或多种增强抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的突变。

- [0421] 实施例71. 如实施例70所述的抗体,其中该IgG1 Fc区包含L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L的突变。
- [0422] 实施例72. 如实施例70所述的抗体,其中该IgG1 Fc区包含S239D、A330L和I332E的突变。
- [0423] 实施例73. 如实施例1至72中任一项所述的抗体,其中该重链可变区通过接头连接至Fc区。
- [0424] 实施例74. 如实施例73所述的抗体,其中该接头是肽接头。
- [0425] 实施例75. 如实施例74所述的抗体,其中该肽接头包含约4至约30个氨基酸。
- [0426] 实施例76. 如实施例74或75所述的抗体,其中该肽接头包含选自由SEQ ID NO: 195-220组成的组的氨基酸序列。
- [0427] 实施例77. 如实施例1至76中任一项所述的抗体,其中该抗体包含多特异性抗体,例如双特异性抗体,全长免疫球蛋白,单链Fv(scFv)片段,Fab片段,Fab'片段,F(ab')₂,Fv片段,二硫键稳定的Fv片段(dsFv),(dsFv)₂,VHH,Fv-Fc融合物,scFv-Fc融合物,scFv-Fv融合物,双抗体,三抗体,四抗体或任何它们的组合。
- [0428] 实施例78. 如实施例1至77中任一项所述的抗体,其中该抗体包含多特异性抗体,例如双特异性抗体,其包含特异性结合第二抗原的第二抗体部分。
- [0429] 实施例79. 如实施例78所述的抗体,其中该第二抗原是肿瘤相关抗原。
- [0430] 实施例80. 如实施例79所述的抗体,其中该肿瘤相关抗原选自由以下组成的组: Her-2,EGFR,PDL1,c-Met,B细胞成熟抗原(BCMA),碳酸酐酶IX(CA1X),癌胚抗原(CEA),CD5,CD7,CD10,CD19,CD20,CD22,CD30,CD33,CD34,CD38,CD41,CD44,CD49f,CD56,CD74,CD123,CD133,CD138,CD276(B7H3),上皮糖蛋白(EGP2),滋养层细胞表面抗原2(TROP-2),上皮糖蛋白-40(EGP-40),上皮细胞粘附分子(EpCAM),受体酪氨酸蛋白激酶erb-B2、3、4,叶酸结合蛋白(FBP),胎儿乙酰胆碱受体(AChR),叶酸受体-a,神经节苷脂G2(GD2),神经节苷脂G3(GD3),人端粒酶逆转录酶(hTERT),激酶插入结构域受体(KDR),Lewis A(CA 1.9.9),Lewis Y(LeY),磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3),L1细胞粘附分子(L1CAM),粘蛋白16(Muc-16),粘蛋白1(Muc-1),NG2D配体,癌胚抗原(h5T4),前列腺干细胞抗原(PSCA),前列腺特异性膜抗原(PSMA),肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72),密封蛋白18.2(CLDN18.2),血管内皮生长因子R2(VEGF-R2),肾母细胞瘤蛋白(WT-1),1型酪氨酸蛋白激酶跨膜受体(ROR1)及其任何组合。
- [0431] 实施例81. 如实施例80所述的抗体,其中该第二抗原是免疫检查点调节剂。
- [0432] 实施例82. 如实施例81所述的抗体,其中该免疫检查点调节剂选自由以下组成的组:PD1,CTLA4,LAG-3,2B4,BTLA及其任何组合。
- [0433] 实施例83. 如实施例1至82中任一项所述的抗体,其中该抗体缀合至治疗剂或标记。
- [0434] 实施例84. 如实施例83所述的抗体,其中该标记选自由以下组成的组:放射性同位素、荧光染料和酶。
- [0435] 实施例85. 一种免疫缀合物,该免疫缀合物包含与治疗剂连接的如实施例1至84中任一项所述的抗体。
- [0436] 实施例86. 如实施例85所述的免疫缀合物,其中该治疗剂是细胞毒素。
- [0437] 实施例87. 如实施例85所述的免疫缀合物,其中该治疗剂是放射性同位素。

- [0438] 实施例88.一种药物组合物,该药物组合物包含a) 如实施例1至84中任一项所述的抗体或如实施例85至87中任一项所述的免疫缀合物,和b) 药学上可接受的载剂。
- [0439] 实施例89.一种核酸,该核酸编码如实施例1至84中任一项所述的抗体。
- [0440] 实施例90.一种载体,该载体包含如实施例89所述的核酸。
- [0441] 实施例91.一种宿主细胞,该宿主细胞包含如实施例89所述的核酸或如实施例90所述的载体。
- [0442] 实施例92.一种制备如实施例1至84中任一项所述的抗体的方法,该方法包括在如实施例91所述的宿主细胞中表达该抗体并从该宿主细胞中分离该抗体。
- [0443] 实施例93.一种减轻受试者的肿瘤负荷的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施例1至84中任一项所述的抗体、如实施例85至87中任一项所述的免疫缀合物或如实施例88所述的药物组合物。
- [0444] 实施例94.如实施例93所述的方法,其中该方法减少肿瘤细胞的数量。
- [0445] 实施例95.如实施例93或94所述的方法,其中该方法减小肿瘤大小。
- [0446] 实施例96.如实施例93至95中任一项所述的方法,其中该方法根除该受试者的肿瘤。
- [0447] 实施例97.如实施例93至95中任一项所述的方法,其中该肿瘤选自自由以下组成的组:间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜肿瘤、成胶质细胞瘤、食道癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃肿瘤、胆管癌、头颈癌、血液癌及其组合。
- [0448] 实施例98.一种治疗和/或预防赘生物的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如实施例1至84中任一项所述的抗体、如实施例85至87中任一项所述的免疫缀合物或如实施例88所述的药物组合物。
- [0449] 实施例99.一种延长患有赘生物的受试者的存活期的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如实施例1至84中任一项所述的抗体、如实施例85至87中任一项所述的免疫缀合物或如实施例88所述的药物组合物。
- [0450] 实施例100.如实施例98或99所述的方法,其中该赘生物选自自由以下组成的组:间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜肿瘤、成胶质细胞瘤、食道癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃肿瘤、胆管癌、头颈癌、血液癌及其组合。
- [0451] 实施例101.如实施例1至84中任一项所述的抗体,其用作药物。
- [0452] 实施例102.如实施例1至84中任一项所述的抗体,其用于治疗癌症。
- [0453] 实施例103.如实施例88所述的药物组合物,其用作药物。
- [0454] 实施例104.如实施例88所述的药物组合物,其用于治疗癌症。
- [0455] 实施例105.如实施例102所述的抗体或如实施例104所述的药物组合物,其中该癌症选自自由以下组成的组:间皮瘤、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胸膜肿瘤、成胶质细胞瘤、食道癌、胃癌、滑膜肉瘤、胸腺癌、子宫内膜癌、胃肿瘤、胆管癌、头颈癌、血液癌及其组合。
- [0456] 实施例106.一种试剂盒,该试剂盒包含如实施例1至84中任一项所述的抗体、如实施例85至87中任一项所述的免疫缀合物、如实施例88所述的药物组合物、如实施例89所述的核酸、如实施例90所述的载体、或如实施例91所述的宿主细胞。
- [0457] 实施例107.如实施例106所述的试剂盒,该试剂盒进一步包含用于治疗 and/或预防

赘生物的书面的说明书。

[0458] 以下实例仅是对当前公开的主题的说明,不应以任何方式视为限制。

[0459] 实例

[0460] 实例1.免疫、抗人TIGIT VHH抗体的产生和苗头抗体的发现

[0461] 重组人TIGIT细胞外结构域(ECD)蛋白的抗原购自Arco Bio公司。根据本领域已知的方案,使用美洲驼进行TIGIT的免疫。通过ELISA测定法测定血清抗体的效价。在3轮免疫后,观察到高滴度(1:100,000)。然后收集全血,并分离PBMC。然后从PBMC中分离RNA。

[0462] 在本领域已知的方案下,通过PCR扩增VHH抗体基因,通过DNA琼脂糖凝胶纯化,构建到噬菌体载体pADL-23c(抗体设计实验室(Antibody Design Labs))中,并转化至TG1电感受态细胞(来自Lucigen)。转化的TG1细胞在Y2T培养基中培养。通过添加辅助噬菌体并共培养过夜,可生产出具有目标VHH的噬菌体。通过离心收集培养上清液中的噬菌体,并使用包被生物素化的h-TIGIT或cyno-TIGIT ECD的链霉亲和素偶联的Dynabeads进行h-TIGIT(h-TIGIT)或食蟹猴-TIGIT(cyno-TIGIT)抗原的结合剂淘选。经过三轮淘选后,洗脱了h-TIGIT或cyno-TIGIT的结合物,将其用于感染SS320细胞。挑选SS320细胞的集落并在Y2T培养基中培养,并添加IPTG以分泌VHH抗体。使用h-TIGIT ECD包被的板通过ELISA分析筛选具有VHH抗体的上清液。选择阳性h-TIGIT结合剂进行测序。选择了具有不同序列的29个克隆。还通过ELISA检查了VHH抗体对cyno-TIGIT的结合能力。序列表(SEQ ID NO: 1-84)中显示了前21种结合剂及其CDR和VH。

[0463] 还使用阻断ELISA测定法确定了VHH抗体克隆对阻断脊髓灰质炎病毒受体(PVR,又名CD155)与TIGIT结合的影响。进一步选择了对PVR结合h-TIGIT有90%以上抑制作用的9个克隆(克隆名称:2B7、1G1、1C12、3G6、2B10、3G7、3F10、13H11和15A5)。

[0464] 实例2 - TIGIT VHH抗体的表征和选择

[0465] 通过添加图1C中所示的人恒定重链2(CH2)和恒定重链3(CH3)结构域,构建从实例1中鉴定出的抗体克隆,以制备二价抗体。所构建的二价VHH抗体在ExpiCHO细胞中表达,并收集上清液中的蛋白质并通过蛋白质A纯化。

[0466] 通过流式细胞术测定证实了二价克隆与人TIGIT转染的Jurkat细胞的结合亲和力。建立稳定表达人TIGIT和NFAT报告基因的Jurkat细胞。具体地,通过电穿孔用人TIGIT表达载体转染Jurkat细胞,并在细胞培养期间用1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 嘌呤霉素来选择稳定表达人TIGIT的细胞。将具有代表性的抗体克隆在不同浓度下与h-TIGIT稳定表达Jurkat细胞($0.2 \times 10^6/\text{ml}$) 在96孔板中以100 μl /孔的FACS缓冲液(含1.5% FBS的PBS)中孵育30分钟。洗涤后,加入AlexaFluor 488偶联的抗人IgG Fc二抗(Alexa Fluor® 488 AffiniPure山羊抗人IgG, Fc γ 片段特异性,杰克逊实验室(Jackson labs), 1:500稀释),并孵育30分钟。洗涤后,使用CytoFlex(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter))通过门控活细胞群体来测量平均荧光强度。使用GraphPad Prism计算结合亲和力。代表性的结果示于图1A和1B中。与参考Ab1(US 2016/0176963 A1中公开的参考抗人TIGIT抗体,根据所公开序列合成)相比,所有测试的抗体均对表达人TIGIT的细胞表现出高结合亲和力。

[0467] 此外,使用电穿孔用NFAT报告基因转染稳定表达人TIGIT的Jurkat细胞。通过在培养基中的300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 潮霉素选择表达NFAT报告基因的细胞。此外,用人PVR稳定转染Raji细胞,并在培养基中用潮霉素以125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 选择转染的细胞。然后通过葡萄球菌肠毒素

(SEE, 0.01 ng/ml)的存在下共孵育表达人PVR的Raji细胞和表达人TIGIT和NFAT报告基因的Jurkat细胞持续5小时,测定抗体对PVR介导的抑制TCR诱导的NFAT报告基因活性的影响。加入具有底物(普洛麦格公司(Promega))的Bright-Glo萤光素酶测定缓冲液,并使用读板器通过化学发光活性来测定萤光素酶活性。使用GraphPad Prims的非线性回归方法计算抗体阻断TIGIT活性的能力。代表性结果如图2所示。与参考Ab1相比,除3F10外的所有测试克隆均显示出相似的TIGIT阻断作用。

[0468] 实例3-抗TIGIT抗体的人源化

[0469] 选择两个代表性克隆1G1和1C12对其框架进行人源化。简而言之,使用两个克隆的序列进行Igb1ast来搜索人种系基因的数据库。选择理想的种系序列,并对框架序列进行突变以将框架序列从美洲驼的改变为人的。对于1C12克隆,使用人种系IGHV-3-30*10,并制成了三种形式的人源化1C12(1C12-EREF、1C12-EREW和1C12-GLEW)。对于1G1,使用了人种系IGHV-3-30*01,并制作了六种形式的人源化1G1(1G1-F-G-ERES、1G1-F-A-ERES、1G1-F-A-EREW、1G1-F-A-GLEW、1G1-F-A-GREL和1G1-F-A-GRES)。将构建体克隆到表达载体中,通过ExpiCHO的瞬时转染产生抗体蛋白,并通过蛋白A进行纯化。

[0470] 人源化二价抗体与人TIGIT的结合亲和力通过与在Jurkat细胞上稳定表达的h-TIGIT的全细胞结合来确定。简而言之,将抗体与h-TIGIT转染的Jurkat细胞(100 μ l的 0.2×10^6 /孔)在FACS缓冲液中孵育30分钟。将细胞洗涤一次,然后与抗人IgG Fc AlexaFluor488(1:500)一起孵育。通过CytoFlex确定平均荧光强度,并使用GraphPad Prism 8.0进行非线性回归,计算抗体与h-TIGIT的结合亲和力,如图3A所示。与嵌合亲本克隆相比,对于所有三个形式的1C12克隆都观察到了相似的结合亲和力。对于1G1克隆,与嵌合克隆相比,两个人源化形式F-G-ERES和F-A-ERES对h-TIGIT表现出相似的亲和力,而两个形式(F-A-EREW和F-A-GLEW)对h-TIGIT失去结合亲和力,如图3B所示。

[0471] 使用先前描述的方法确定人源化抗体在阻断PVR介导的对TCR介导的NFAT报告基因活性的抑制作用中的活性。简而言之,在PVR转染的Raji细胞和低浓度的葡萄球菌肠毒素(SEE, 0.01 ng/ml)存在下,将人TIGIT和NFAT报告基因转染的Jurkat细胞与不同浓度的抗体孵育5小时。添加具有底物(普洛麦格公司(Promega))的Bright-Glo萤光素酶测定缓冲液,并测量萤光素酶活性。代表性结果显示在图4A和4B。与嵌合亲本克隆和参考抗h-TIGIT抗体参考Ab1相比,1C12克隆的所有人源化形式在阻断TIGIT方面具有相似的效力。除了两个形式1G1-(F-A-EREW)和1G1-(F-A-GLEW)失去了阻断作用以外,1G1的所有人源化形式在阻断TIGIT方面均具有与嵌合亲本克隆相似的效力。

[0472] 实例4 - 亲和力成熟、选择和修改

[0473] 对1G1-F-A-ERES克隆进行亲和力成熟。设计用于使每个CDR区的氨基酸单突变的引物。使用组装PCR制备突变文库,并将其克隆到噬菌体载体中。通过转化TG1细胞和克隆的DNA测序来测量文库质量。使用辅助噬菌体进行噬菌体生产,并使用涂有生物素化的h-TIGIT ECD或cyno-TIGIT ECD的链霉亲和素偶联的Dynabeads进行噬菌体淘选。经过两轮淘选后,洗脱淘选产物用于感染SS320细胞,挑取菌落并在具有IPTG的Y2T培养基中培养。通过ELISA测定法检查上清液中的VHH抗体。选择针对h-和cyno-TIGIT的阳性克隆与h-和cyno-TIGIT稳定表达的细胞进行全细胞结合。还对选定的克隆进行了PVR阻断ELISA和人TIGIT阻断NFAT报告基因检测。使用GraphPad Prism计算EC50或IC50值。序列表(SEQ ID NO: 94-

177)中显示了前25种结合剂及其CDR和VHH。

[0474] 使用GraphPad Prism将EC50/IC50在全细胞结合和阻断ELISA分析中的相关性作图,代表性数据如图5所示。鉴定出2A3具有最高的亲和力和效力。

[0475] 通过在25至70°C的温度下热处理60分钟测试12个代表性克隆的热稳定性,然后使用ELISA和全细胞结合流式细胞术检测处理后的样品与人TIGIT的结合,其结果如图6A和6B所示。与其他克隆相比,克隆2A3具有更高的热稳定性。

[0476] 使用人IgG1 CH2和CH3结构域构建了二价2A3抗体(2A3-Fc)。抗体在ExpiCHO细胞中表达,并通过蛋白A柱进行纯化。与抗TIGIT参考抗体参考Ab1和参考Ab2(与Tiragolumab具有相同氨基酸序列的参考抗人TIGIT抗体,根据在U.S. 2017/0088613 A1中公开的Tiragolumab序列合成)相比,使用Octet结合试验研究了与人TIGIT结合的2A3-Fc表位。如图7A-7C所示,与参考Ab1和参考Ab2相比,2A3克隆结合至不同的表位。

[0477] 2A3-Fc对人、食蟹猴和小鼠TIGIT的物种间结合活性通过ELISA测定法测定,其结果示于图8A-8C中。2A3-Fc与人、食蟹猴结合,但不与小鼠TIGIT结合。

[0478] 对2A3的CDR区域的分析确定了两个热点,即CDR2中的蛋氨酸和CDR3中的天冬氨酸,然后是丝氨酸。将蛋氨酸突变为亮氨酸和异亮氨酸,将天冬氨酸突变为苏氨酸和谷氨酸。修饰的抗体(2A3 ML,2A3 MI,2A3 ML_DT(又名 2A3LT)和2A3 ML_DE)的CDR和VHH在序列表中显示(SEQ ID NO: 178-193)。在全细胞结合和NFAT萤光素酶报告基因检测中测试了修饰的形式,与亲本2A3克隆相比,所有这些修饰的抗体都表现出相似的特性。图9显示了2A3-LT-Fc(2A3 ML DT)的代表性数据,其中M变为L,并且D变为T(2A3 ML DT),其中与亲本2A3-Fc相比,在全细胞结合测定中观察到相似的人TIGIT结合亲和力,在NFAT报告基因测定中观察到了相似的效力。

[0479] 将2A3-Fc的亲和力和效力与参考抗TIGIT抗体参考Ab2进行了比较。2A3-Fc表现出比参考Ab2显著得高的亲和力。在全细胞结合测定中,2A3-Fc的EC50值为 0.32 ± 0.06 nM,而参考Ab2(n = 3)为 0.61 ± 10.13 nM(图10A)。与参考Ab2相比,2A3-Fc在NFAT萤光素酶报告基因检测中也显示出类似的阻断TIGIT的功效。2A3-Fc的EC50值为 0.48 ± 10.18 nM,而参考Ab2(n = 3)为 0.72 ± 0.42 nM(图10B)。

[0480] 实例5 - Fc工程化

[0481] 抗TIGIT抗体增强免疫功能和抗肿瘤活性的作用机制不仅涉及对TIGIT的阻断作用,而且还涉及抗原呈递细胞(APC)与有效T细胞(CD8 + T细胞)之间的结合作用,通过APC上的Fc γ RIIIA结合抗体Fc区,以及有效T细胞上VHH结构域与TIGIT的结合。为了利用这种机制,制得了两种不同的Fc增强形式,一种具有DLE突变(S239D、A330L和I332E),一种具有VPVLL突变(L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L)。Fc突变体与人Fc γ RIIIA和Fc γ RIIB的结合通过使用Fc γ RIIIA和Fc γ RIIB的ECD的重组蛋白的Octet结合测定来检查,其结果如图11所示。DLE和VPVLL突变体均具有增强的对人Fc γ RIIIA的结合亲和力。DLE突变体还具有增强的与人Fc γ RIIB的结合亲和力,而VPVLL突变体具有降低的对人Fc γ RIIB的结合亲和力。

[0482] 还检查了Fc突变体的TIGIT阻断活性,其中DLE突变体显示出降低的TIGIT阻断功能,如图12A所示。

[0483] 此外,当抗体可变区与其特异性抗原结合时,其Fc区可以交联Fc γ RIIIA并触发下

游信号传导。使用这种作用方式,使用人Fc γ RIIIA和NFAT报告基因转染的Jurkat细胞和过表达TIGIT的293T细胞检查了Fc突变体对Fc γ RIIIA介导的活性的影响。在该测定系统中,如图12B所示,与野生型Fc形式相比,DLE突变体显著增加了人Fc γ RIIIA介导的NFAT报告基因活性。

[0484] 表3对应图12A的检测数据

[0485]

EC50 (nM)	2A3 LT-Fc	DLE
Exp 1	0.58	0.67
Exp 2	0.687	0.92
Exp 3	0.45	1.32
平均数	0.57	0.97
SD	0.12	0.3279

[0486] 表4对应图12B的检测数据

[0487]

EC50 (nM)	2A3 LT-Fc	DLE
Exp 1	0.226	0.027
Exp 2	0.175	0.0295
Exp 3	0.144	0.018
Exp 4	0.18	0.02
平均数	0.18	0.024
SD	0.03	0.005

[0488] 实例6 -体内有效性研究

[0489] 利用人TIGIT敲入的C57BL/6小鼠和MC38鼠结肠癌模型,2A3-LT-Fc wt,2A3-LT-Fc-DLE的有效性得到了评估并与参考Ab2比较。在治疗前一周给小鼠接种了MC38肿瘤细胞。当平均肿瘤大小达到约51 mm³时治疗开始,在腹膜内一周两次给药,持续2.5周。2A3-LT-Fc抗体每次6mg/kg或参考Ab2每次11mg/kg(与2A3-LT-Fc抗体在mole/kg上等同)。治疗后16天,多只对照组的小鼠中肿瘤大小达到上限(2000 mm³)。因此治疗后16天成为分析的数据终点。在对照组中,平均肿瘤体积在治疗后16天为1548.76 \pm 191 mm³(平均值 \pm 标准误差)。与对照组相比,使用2A3-LT-Fc wt,2A3-LT-Fc-DLE的治疗显著减小了肿瘤生长,造成依次为38%和50%的TGI(肿瘤抑制)及依次为985.05 \pm 123 mm³和802.20 \pm 126 mm³的肿瘤体积(与空白对照相比通过曼-惠特尼(Mann-Whitney)检验P值依次为0.037和0.007)。使用参考抗体的治疗也减小了肿瘤生长,但由此抗体造成的减小与对照组相比在统计上并不显著,其TGI为26%,肿瘤体积为1156.16 \pm 195 mm³(图13A,表5)。单个肿瘤体积的结果显示在

图13B中。这些结果表明2A3-LT-Fc和2A3-LT-Fc-DLE都比参考Ab2更有效。在研究中各实验组的体重变化并不显著(图13C),表明治疗得到了良好的耐受。

[0490] 表5. MC38同基因人TIGIT小鼠模型第16天的平均肿瘤体积

组	处理	N	肿瘤体积 (mm ³) ^a	P ^b	% TGI (16 天)
1	媒介物	8	1548.76±191		
[0491] 2	2A3-LT-Fc-wt 6 mg/kg	8	985.05±123	0.037	38
3	2A3-LT-Fc-DLE 6 mg/kg	8	802.20±126	0.007	50
4	参考 Ab 2, 11 mg/kg	8	1156.16±195	0.234	26

[0492] ^a平均值±标准误差

[0493] ^b在治疗后16天通过曼-惠特尼(Mann-Whitney)检验与空白对照相比

[0494] 除了所描绘和要求保护的各种实施例之外,所公开的主题还针对具有本文所公开和要求保护的特征的其他组合的其他实施例。这样,本文所呈现的特定特征可以在所公开的主题的范围内以其他方式彼此组合,使得所公开的主题包括本文所公开的特征的任何合适的组合。出于展示和说明的目的已经提出了所公开主题的具体实施例的以上说明。以上说明并不旨在是穷尽的或将所公开主题限制于所公开的那些实施例。

[0495] 对于本领域技术人员将显而易见的是,在不脱离所公开主题的精神或范围的情况下,可以对所公开主题的组成和方法进行多种修改和变化。因此,预期的是所公开主题包括在所附权利要求书及其等同物范围内的修改和变化。

[0496] 本文引用了多种出版物、专利和专利申请,其内容通过引用以其整体并入本文。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 上海复宏汉霖生物技术股份有限公司
- [0003] <120> 抗TIGIT抗体和使用方法
- [0004] <130> SH1903-20P122745
- [0005] <160> 222
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 8
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> Artificial Sequence
- [0011] <220>
- [0012] <223> 4A11 CDR1
- [0013] <400> 1
- [0014] Gly Arg Pro Phe Ser Asn Tyr Thr
- [0015] 1 5
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 7
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> Artificial Sequence
- [0020] <220>
- [0021] <223> 4A11 CDR2
- [0022] <400> 2
- [0023] Ala Trp Pro Ser Pro Ser Thr
- [0024] 1 5
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 18
- [0027] <212> PRT
- [0028] <213> Artificial Sequence
- [0029] <220>
- [0030] <223> 4A11 CDR3
- [0031] <400> 3
- [0032] Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Leu Thr Gln Ser Trp Leu Asn Ala Ala Leu
- [0033] 1 5 10 15
- [0034] Asp Tyr
- [0035] <210> 4
- [0036] <211> 124
- [0037] <212> PRT
- [0038] <213> Artificial Sequence

[0039] <220>
 [0040] <223> 4A11 VHH
 [0041] <400> 4
 [0042] Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Glu Ala Gln Pro Gly Gly
 [0043] 1 5 10 15
 [0044] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Asn Tyr
 [0045] 20 25 30
 [0046] Thr Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 [0047] 35 40 45
 [0048] Gly Leu Ala Trp Pro Ser Pro Ser Thr Tyr Val Val Asp Ser Val Lys
 [0049] 50 55 60
 [0050] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu
 [0051] 65 70 75 80
 [0052] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 [0053] 85 90 95
 [0054] Ala Asp Tyr Lys Ser Leu Thr Gln Ser Trp Leu Asn Ala Ala Leu Asp
 [0055] 100 105 110
 [0056] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0057] 115 120
 [0058] <210> 5
 [0059] <211> 8
 [0060] <212> PRT
 [0061] <213> Artificial Sequence
 [0062] <220>
 [0063] <223> 4B5 CDR1
 [0064] <400> 5
 [0065] Pro Arg Thr Phe Ser Thr Phe His
 [0066] 1 5
 [0067] <210> 6
 [0068] <211> 8
 [0069] <212> PRT
 [0070] <213> Artificial Sequence
 [0071] <220>
 [0072] <223> 4B5 CDR2
 [0073] <400> 6
 [0074] Phe Asn Trp Ser Gly Gly Arg Thr
 [0075] 1 5
 [0076] <210> 7
 [0077] <211> 26

[0078] <212> PRT
 [0079] <213> Artificial Sequence
 [0080] <220>
 [0081] <223> 4B5 CDR3
 [0082] <400> 7
 [0083] Ala Ala Ala Arg Asp Arg Gly Leu His Asp Gly Thr Thr Ser Asp Ser
 [0084] 1 5 10 15
 [0085] Tyr Leu Glu Gly Ser His Glu Tyr Glu Tyr
 [0086] 20 25
 [0087] <210> 8
 [0088] <211> 133
 [0089] <212> PRT
 [0090] <213> Artificial Sequence
 [0091] <220>
 [0092] <223> 4B5 VHH
 [0093] <400> 8
 [0094] Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Ser Val Leu Ala Gly Gly
 [0095] 1 5 10 15
 [0096] Ser Leu Arg Leu Arg Cys Ala Gly Thr Pro Arg Thr Phe Ser Thr Phe
 [0097] 20 25 30
 [0098] His Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 [0099] 35 40 45
 [0100] Ala Ala Phe Asn Trp Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0101] 50 55 60
 [0102] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Gly Lys Asn Met Val Tyr
 [0103] 65 70 75 80
 [0104] Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys
 [0105] 85 90 95
 [0106] Ala Ala Ala Arg Asp Arg Gly Leu His Asp Gly Thr Thr Ser Asp Ser
 [0107] 100 105 110
 [0108] Tyr Leu Glu Gly Ser His Glu Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 [0109] 115 120 125
 [0110] Val Thr Val Ser Ser
 [0111] 130
 [0112] <210> 9
 [0113] <211> 8
 [0114] <212> PRT
 [0115] <213> Artificial Sequence
 [0116] <220>

[0117] <223> 4C5 CDR1
 [0118] <400> 9
 [0119] Gly Arg Ser Val Ser Thr Tyr Phe
 [0120] 1 5
 [0121] <210> 10
 [0122] <211> 8
 [0123] <212> PRT
 [0124] <213> Artificial Sequence
 [0125] <220>
 [0126] <223> 4C5 CDR2
 [0127] <400> 10
 [0128] Ile Asp Arg Gly Ser Thr Val Thr
 [0129] 1 5
 [0130] <210> 11
 [0131] <211> 17
 [0132] <212> PRT
 [0133] <213> Artificial Sequence
 [0134] <220>
 [0135] <223> 4C5 CDR3
 [0136] <400> 11
 [0137] Ala Ala Lys Ala Ile Thr Arg Asn Phe Ile Ala Thr Asn Asp Tyr Asp
 [0138] 1 5 10 15
 [0139] Tyr
 [0140] <210> 12
 [0141] <211> 124
 [0142] <212> PRT
 [0143] <213> Artificial Sequence
 [0144] <220>
 [0145] <223> 4C5 VHH
 [0146] <400> 12
 [0147] Gln Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 [0148] 1 5 10 15
 [0149] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Arg Ser Val Ser Thr Tyr
 [0150] 20 25 30
 [0151] Phe Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 [0152] 35 40 45
 [0153] Ala Ala Ile Asp Arg Gly Ser Thr Val Thr Arg Tyr Asp Asp Ser Val
 [0154] 50 55 60
 [0155] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Val Tyr

[0156]	65	70	75	80
[0157]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0158]		85	90	95
[0159]	Ala Ala Lys Ala Ile Thr Arg Asn Phe Ile Ala Thr Asn Asp Tyr Asp			
[0160]		100	105	110
[0161]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser			
[0162]		115	120	
[0163]	<210> 13			
[0164]	<211> 8			
[0165]	<212> PRT			
[0166]	<213> Artificial Sequence			
[0167]	<220>			
[0168]	<223> 4D5 CDR1			
[0169]	<400> 13			
[0170]	Gly Arg Ala Phe Asn Glu Tyr Ala			
[0171]	1	5		
[0172]	<210> 14			
[0173]	<211> 8			
[0174]	<212> PRT			
[0175]	<213> Artificial Sequence			
[0176]	<220>			
[0177]	<223> 4D5 CDR2			
[0178]	<400> 14			
[0179]	Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr			
[0180]	1	5		
[0181]	<210> 15			
[0182]	<211> 18			
[0183]	<212> PRT			
[0184]	<213> Artificial Sequence			
[0185]	<220>			
[0186]	<223> 4D5 CDR3			
[0187]	<400> 15			
[0188]	Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr			
[0189]	1	5	10	15
[0190]	Asp Tyr			
[0191]	<210> 16			
[0192]	<211> 125			
[0193]	<212> PRT			
[0194]	<213> Artificial Sequence			

[0195] <220>
 [0196] <223> 4D5 VHH
 [0197] <400> 16
 [0198] Val Asp Ser Gly Gly Gly Ala Val Lys Ala Gly Asp Ser Leu Arg Leu
 [0199] 1 5 10 15
 [0200] Val Cys Ser Ala Pro Gly Arg Thr His Gly Arg Ala Phe Asn Glu Tyr
 [0201] 20 25 30
 [0202] Ala Met Ala Trp Phe Arg Gln Gly Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [0203] 35 40 45
 [0204] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Ala Ser Val
 [0205] 50 55 60
 [0206] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Ser Ala Ala Phe
 [0207] 65 70 75 80
 [0208] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0209] 85 90 95
 [0210] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [0211] 100 105 110
 [0212] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0213] 115 120 125
 [0214] <210> 17
 [0215] <211> 8
 [0216] <212> PRT
 [0217] <213> Artificial Sequence
 [0218] <220>
 [0219] <223> 4D11 CDR1
 [0220] <400> 17
 [0221] Gly Ser Ile Ser Ser Ile Asn Ala
 [0222] 1 5
 [0223] <210> 18
 [0224] <211> 7
 [0225] <212> PRT
 [0226] <213> Artificial Sequence
 [0227] <220>
 [0228] <223> 4D11 CDR2
 [0229] <400> 18
 [0230] Ile Thr Asn Ser Gly Ser Thr
 [0231] 1 5
 [0232] <210> 19
 [0233] <211> 10

[0234] <212> PRT
 [0235] <213> Artificial Sequence
 [0236] <220>
 [0237] <223> 4D11 CDR3
 [0238] <400> 19
 [0239] Thr Ala Arg Arg Ser Thr Trp Tyr Ile Ser
 [0240] 1 5 10
 [0241] <210> 20
 [0242] <211> 116
 [0243] <212> PRT
 [0244] <213> Artificial Sequence
 [0245] <220>
 [0246] <223> 4D11 VHH
 [0247] <400> 20
 [0248] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0249] 1 5 10 15
 [0250] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Ser Ser Ile Asn
 [0251] 20 25 30
 [0252] Ala Met Gly Trp Tyr Arg Leu Ala Pro Gly Lys His Arg Glu Phe Val
 [0253] 35 40 45
 [0254] Ala Asp Ile Thr Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Ala Ser Val Lys
 [0255] 50 55 60
 [0256] Gly Arg Phe Asn Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Val Tyr Leu
 [0257] 65 70 75 80
 [0258] Gln Met Asn Ser Leu Lys Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 [0259] 85 90 95
 [0260] Ala Arg Arg Ser Thr Trp Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Thr Gln Val
 [0261] 100 105 110
 [0262] Thr Val Ser Ser
 [0263] 115
 [0264] <210> 21
 [0265] <211> 8
 [0266] <212> PRT
 [0267] <213> Artificial Sequence
 [0268] <220>
 [0269] <223> 4E5 CDR1
 [0270] <400> 21
 [0271] Gly Leu Thr Ser Ser Asp Ile Ala
 [0272] 1 5

[0273] <210> 22
 [0274] <211> 8
 [0275] <212> PRT
 [0276] <213> Artificial Sequence
 [0277] <220>
 [0278] <223> 4E5 CDR2
 [0279] <400> 22
 [0280] Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr
 [0281] 1 5
 [0282] <210> 23
 [0283] <211> 18
 [0284] <212> PRT
 [0285] <213> Artificial Sequence
 [0286] <220>
 [0287] <223> 4E5 CDR3
 [0288] <400> 23
 [0289] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [0290] 1 5 10 15
 [0291] Asp Tyr
 [0292] <210> 24
 [0293] <211> 125
 [0294] <212> PRT
 [0295] <213> Artificial Sequence
 [0296] <220>
 [0297] <223> 4E5 VHH
 [0298] <400> 24
 [0299] Gln Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Val Val Glu Val Gly Ala
 [0300] 1 5 10 15
 [0301] Ser Leu Thr Leu Ser Cys Glu Thr Ser Gly Leu Thr Ser Ser Asp Ile
 [0302] 20 25 30
 [0303] Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Gly Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [0304] 35 40 45
 [0305] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Ala Ser Val
 [0306] 50 55 60
 [0307] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Ser Ala Ala Phe
 [0308] 65 70 75 80
 [0309] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0310] 85 90 95
 [0311] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr

[0312]	100	105	110
[0313]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser		
[0314]	115	120	125
[0315]	<210> 25		
[0316]	<211> 8		
[0317]	<212> PRT		
[0318]	<213> Artificial Sequence		
[0319]	<220>		
[0320]	<223> 4H6 CDR1		
[0321]	<400> 25		
[0322]	Gly Thr Ile Phe Arg Leu Asn Arg		
[0323]	1	5	
[0324]	<210> 26		
[0325]	<211> 8		
[0326]	<212> PRT		
[0327]	<213> Artificial Sequence		
[0328]	<220>		
[0329]	<223> 4H6 CDR2		
[0330]	<400> 26		
[0331]	Thr Ile Trp Ser Gly Arg Arg Thr		
[0332]	1	5	
[0333]	<210> 27		
[0334]	<211> 14		
[0335]	<212> PRT		
[0336]	<213> Artificial Sequence		
[0337]	<220>		
[0338]	<223> 4H6 CDR3		
[0339]	<400> 27		
[0340]	Asn Tyr Arg Arg Ile Thr Pro Trp Glu Ala Ser Gly Asn Tyr		
[0341]	1	5	10
[0342]	<210> 28		
[0343]	<211> 121		
[0344]	<212> PRT		
[0345]	<213> Artificial Sequence		
[0346]	<220>		
[0347]	<223> 4H6 VHH		
[0348]	<400> 28		
[0349]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Thr Ala Gly Ala		
[0350]	1	5	10 15

[0351] Ser Leu Ile Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Thr Ile Phe Arg Leu Asn
 [0352] 20 25 30
 [0353] Arg Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Arg Val
 [0354] 35 40 45
 [0355] Ala Ala Thr Ile Trp Ser Gly Arg Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 [0356] 50 55 60
 [0357] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Asn Ala Lys Lys Thr Val Tyr
 [0358] 65 70 75 80
 [0359] Leu Arg Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0360] 85 90 95
 [0361] Asn Tyr Arg Arg Ile Thr Pro Trp Glu Ala Ser Gly Asn Tyr Trp Gly
 [0362] 100 105 110
 [0363] Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0364] 115 120
 [0365] <210> 29
 [0366] <211> 8
 [0367] <212> PRT
 [0368] <213> Artificial Sequence
 [0369] <220>
 [0370] <223> 4H9 CDR1
 [0371] <400> 29
 [0372] Gly Pro Ile Ala Arg Ser Arg Ser
 [0373] 1 5
 [0374] <210> 30
 [0375] <211> 10
 [0376] <212> PRT
 [0377] <213> Artificial Sequence
 [0378] <220>
 [0379] <223> 4H9 CDR2
 [0380] <400> 30
 [0381] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr
 [0382] 1 5 10
 [0383] <210> 31
 [0384] <211> 18
 [0385] <212> PRT
 [0386] <213> Artificial Sequence
 [0387] <220>
 [0388] <223> 4H9 CDR3
 [0389] <400> 31

[0390] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [0391] 1 5 10 15
 [0392] Asp Tyr
 [0393] <210> 32
 [0394] <211> 127
 [0395] <212> PRT
 [0396] <213> Artificial Sequence
 [0397] <220>
 [0398] <223> 4H9 VHH
 [0399] <400> 32
 [0400] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ala Val Gln Ala Gly Gly
 [0401] 1 5 10 15
 [0402] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Pro Ile Ala Arg Ser Arg
 [0403] 20 25 30
 [0404] Ser Thr Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Gly Pro Gly Lys Glu Arg Glu
 [0405] 35 40 45
 [0406] Ser Val Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Ala
 [0407] 50 55 60
 [0408] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Ser Ala
 [0409] 65 70 75 80
 [0410] Ala Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0411] 85 90 95
 [0412] Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln
 [0413] 100 105 110
 [0414] Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0415] 115 120 125
 [0416] <210> 33
 [0417] <211> 8
 [0418] <212> PRT
 [0419] <213> Artificial Sequence
 [0420] <220>
 [0421] <223> 10H5 CDR1
 [0422] <400> 33
 [0423] Glu Thr Thr Phe Lys Ser Met Ala
 [0424] 1 5
 [0425] <210> 34
 [0426] <211> 8
 [0427] <212> PRT
 [0428] <213> Artificial Sequence

[0429] <220>
 [0430] <223> ETTFKSMA
 [0431] <400> 34
 [0432] Thr Asn Tyr Asn Gly Gly Arg Thr
 [0433] 1 5
 [0434] <210> 35
 [0435] <211> 17
 [0436] <212> PRT
 [0437] <213> Artificial Sequence
 [0438] <220>
 [0439] <223> 10H5 CDR3
 [0440] <400> 35
 [0441] Ala Ala Lys Ala Thr Glu Gly Thr Thr Phe Pro Ser Arg Thr Tyr Glu
 [0442] 1 5 10 15
 [0443] Phe
 [0444] <210> 36
 [0445] <211> 124
 [0446] <212> PRT
 [0447] <213> Artificial Sequence
 [0448] <220>
 [0449] <223> 10H5 VHH
 [0450] <400> 36
 [0451] Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ala Cys Thr
 [0452] 1 5 10 15
 [0453] Ala Ser Asp Pro Pro Phe Ala Asn Tyr Glu Thr Thr Phe Lys Ser Met
 [0454] 20 25 30
 [0455] Ala Met Gly Trp Val Arg His Ile Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
 [0456] 35 40 45
 [0457] Ala Ala Thr Asn Tyr Asn Gly Gly Arg Thr Trp Tyr Ser Asn Ser Ala
 [0458] 50 55 60
 [0459] Lys Ala Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0460] 65 70 75 80
 [0461] Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0462] 85 90 95
 [0463] Ala Ala Lys Ala Thr Glu Gly Thr Thr Phe Pro Ser Arg Thr Tyr Glu
 [0464] 100 105 110
 [0465] Phe Trp Gly Gln Gly Ile Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0466] 115 120
 [0467] <210> 37

[0468] <211> 8
 [0469] <212> PRT
 [0470] <213> Artificial Sequence
 [0471] <220>
 [0472] <223> 12H7 CDR1
 [0473] <400> 37
 [0474] Gly Asn Phe Leu Ser Val Ser Asp
 [0475] 1 5
 [0476] <210> 38
 [0477] <211> 7
 [0478] <212> PRT
 [0479] <213> Artificial Sequence
 [0480] <220>
 [0481] <223> 12H7 CDR2
 [0482] <400> 38
 [0483] Val Thr Glu His Gly Arg Thr
 [0484] 1 5
 [0485] <210> 39
 [0486] <211> 20
 [0487] <212> PRT
 [0488] <213> Artificial Sequence
 [0489] <220>
 [0490] <223> 12H7 CDR3
 [0491] <400> 39
 [0492] Lys Ala Ser Asp Val Phe Thr Asp Ala Gly Ala His Glu Ala Val Leu
 [0493] 1 5 10 15
 [0494] Ile Arg Asp Tyr
 [0495] 20
 [0496] <210> 40
 [0497] <211> 126
 [0498] <212> PRT
 [0499] <213> Artificial Sequence
 [0500] <220>
 [0501] <223> 12H7 VHH
 [0502] <400> 40
 [0503] Gln Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 [0504] 1 5 10 15
 [0505] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Asn Phe Leu Ser Val Ser
 [0506] 20 25 30

[0507] Asp Met Ser Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Met Glu Arg Asp Val Val
 [0508] 35 40 45
 [0509] Ala Thr Val Thr Glu His Gly Arg Thr Thr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
 [0510] 50 55 60
 [0511] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu His Thr Thr Tyr Leu
 [0512] 65 70 75 80
 [0513] Glu Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Lys
 [0514] 85 90 95
 [0515] Ala Ser Asp Val Phe Thr Asp Ala Gly Ala His Glu Ala Val Leu Ile
 [0516] 100 105 110
 [0517] Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0518] 115 120 125
 [0519] <210> 41
 [0520] <211> 8
 [0521] <212> PRT
 [0522] <213> Artificial Sequence
 [0523] <220>
 [0524] <223> 13H11 CDR1
 [0525] <400> 41
 [0526] Gly Leu Thr Phe Ser Met Tyr Ala
 [0527] 1 5
 [0528] <210> 42
 [0529] <211> 8
 [0530] <212> PRT
 [0531] <213> Artificial Sequence
 [0532] <220>
 [0533] <223> 13H11 CDR2
 [0534] <400> 42
 [0535] Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr
 [0536] 1 5
 [0537] <210> 43
 [0538] <211> 18
 [0539] <212> PRT
 [0540] <213> Artificial Sequence
 [0541] <220>
 [0542] <223> 13H11 CDR3
 [0543] <400> 43
 [0544] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [0545] 1 5 10 15

[0546] Asp Tyr
 [0547] <210> 44
 [0548] <211> 125
 [0549] <212> PRT
 [0550] <213> Artificial Sequence
 [0551] <220>
 [0552] <223> 13H11 VHH
 [0553] <400> 44
 [0554] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 [0555] 1 5 10 15
 [0556] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Met Tyr
 [0557] 20 25 30
 [0558] Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Gly Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [0559] 35 40 45
 [0560] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Ala Ser Val
 [0561] 50 55 60
 [0562] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Ser Ala Ala Phe
 [0563] 65 70 75 80
 [0564] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0565] 85 90 95
 [0566] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [0567] 100 105 110
 [0568] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0569] 115 120 125
 [0570] <210> 45
 [0571] <211> 8
 [0572] <212> PRT
 [0573] <213> Artificial Sequence
 [0574] <220>
 [0575] <223> 15A5 CDR1
 [0576] <400> 45
 [0577] Glu Arg Thr Phe Ser Ser Phe Ala
 [0578] 1 5
 [0579] <210> 46
 [0580] <211> 8
 [0581] <212> PRT
 [0582] <213> Artificial Sequence
 [0583] <220>
 [0584] <223> 15A5 CDR2

[0585] <400> 46
 [0586] Ile Asp Pro Ser Gly Arg Tyr Ile
 [0587] 1 5
 [0588] <210> 47
 [0589] <211> 18
 [0590] <212> PRT
 [0591] <213> Artificial Sequence
 [0592] <220>
 [0593] <223> 15A5 CDR3
 [0594] <400> 47
 [0595] Ala Ala Arg Ile Arg Gly Glu Gly Tyr Tyr Thr Arg Ser Ser Phe Tyr
 [0596] 1 5 10 15
 [0597] His Tyr
 [0598] <210> 48
 [0599] <211> 125
 [0600] <212> PRT
 [0601] <213> Artificial Sequence
 [0602] <220>
 [0603] <223> 15A5 VHH
 [0604] <400> 48
 [0605] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 [0606] 1 5 10 15
 [0607] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Thr Phe Ser Ser Phe
 [0608] 20 25 30
 [0609] Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Val Val
 [0610] 35 40 45
 [0611] Ala Ala Ile Asp Pro Ser Gly Arg Tyr Ile Tyr Tyr Lys Asp Ser Val
 [0612] 50 55 60
 [0613] Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr
 [0614] 65 70 75 80
 [0615] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys
 [0616] 85 90 95
 [0617] Ala Ala Arg Ile Arg Gly Glu Gly Tyr Tyr Thr Arg Ser Ser Phe Tyr
 [0618] 100 105 110
 [0619] His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0620] 115 120 125
 [0621] <210> 49
 [0622] <211> 8
 [0623] <212> PRT

[0624] <213> Artificial Sequence
 [0625] <220>
 [0626] <223> 2B7 CDR1
 [0627] <400> 49
 [0628] Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Pro
 [0629] 1 5
 [0630] <210> 50
 [0631] <211> 8
 [0632] <212> PRT
 [0633] <213> Artificial Sequence
 [0634] <220>
 [0635] <223> 2B7 CDR2
 [0636] <400> 50
 [0637] Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr
 [0638] 1 5
 [0639] <210> 51
 [0640] <211> 18
 [0641] <212> PRT
 [0642] <213> Artificial Sequence
 [0643] <220>
 [0644] <223> 2B7 CDR3
 [0645] <400> 51
 [0646] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [0647] 1 5 10 15
 [0648] Asp Tyr
 [0649] <210> 52
 [0650] <211> 125
 [0651] <212> PRT
 [0652] <213> Artificial Sequence
 [0653] <220>
 [0654] <223> 2B7 VHH
 [0655] <400> 52
 [0656] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 [0657] 1 5 10 15
 [0658] Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0659] 20 25 30
 [0660] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Gly Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [0661] 35 40 45
 [0662] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Ala Ser Val

[0663] 50 55 60
 [0664] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Ser Ala Ala Phe
 [0665] 65 70 75 80
 [0666] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0667] 85 90 95
 [0668] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [0669] 100 105 110
 [0670] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0671] 115 120 125
 [0672] <210> 53
 [0673] <211> 8
 [0674] <212> PRT
 [0675] <213> Artificial Sequence
 [0676] <220>
 [0677] <223> 2B10 CDR1
 [0678] <400> 53
 [0679] Ser Arg Ile Phe Arg Arg Tyr Ala
 [0680] 1 5
 [0681] <210> 54
 [0682] <211> 8
 [0683] <212> PRT
 [0684] <213> Artificial Sequence
 [0685] <220>
 [0686] <223> 2B10 CDR2
 [0687] <400> 54
 [0688] Ile Thr Trp Ser Gly Ala Ser Thr
 [0689] 1 5
 [0690] <210> 55
 [0691] <211> 17
 [0692] <212> PRT
 [0693] <213> Artificial Sequence
 [0694] <220>
 [0695] <223> 2B10 CDR3
 [0696] <400> 55
 [0697] Ala Ala Asp Pro Trp Gly Ser Val Ile Val Gly Thr Ala Glu Tyr Glu
 [0698] 1 5 10 15
 [0699] Tyr
 [0700] <210> 56
 [0701] <211> 124

[0702] <212> PRT
 [0703] <213> Artificial Sequence
 [0704] <220>
 [0705] <223> 2B10 VHH
 [0706] <400> 56
 [0707] Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp
 [0708] 1 5 10 15
 [0709] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Arg Ile Phe Arg Arg Tyr
 [0710] 20 25 30
 [0711] Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 [0712] 35 40 45
 [0713] Ala Ala Ile Thr Trp Ser Gly Ala Ser Thr Thr Tyr Thr Asp Ser Val
 [0714] 50 55 60
 [0715] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Glu Asn Thr Thr Tyr
 [0716] 65 70 75 80
 [0717] Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0718] 85 90 95
 [0719] Ala Ala Asp Pro Trp Gly Ser Val Ile Val Gly Thr Ala Glu Tyr Glu
 [0720] 100 105 110
 [0721] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0722] 115 120
 [0723] <210> 57
 [0724] <211> 8
 [0725] <212> PRT
 [0726] <213> Artificial Sequence
 [0727] <220>
 [0728] <223> 3F10 CDR1
 [0729] <400> 57
 [0730] Glu His Thr Phe Ser Asn Phe Pro
 [0731] 1 5
 [0732] <210> 58
 [0733] <211> 8
 [0734] <212> PRT
 [0735] <213> Artificial Sequence
 [0736] <220>
 [0737] <223> 3F10 CDR2
 [0738] <400> 58
 [0739] Ile Asp Ser Ser Gly Arg Leu Thr
 [0740] 1 5

[0741] <210> 59
 [0742] <211> 18
 [0743] <212> PRT
 [0744] <213> Artificial Sequence
 [0745] <220>
 [0746] <223> 3F10 CDR3
 [0747] <400> 59
 [0748] Ala Ala Arg Thr Gly Gly Val Gly Tyr Tyr Ser Arg Ser Ser Phe Tyr
 [0749] 1 5 10 15
 [0750] Asn Tyr
 [0751] <210> 60
 [0752] <211> 125
 [0753] <212> PRT
 [0754] <213> Artificial Sequence
 [0755] <220>
 [0756] <223> 3F10 VHH
 [0757] <400> 60
 [0758] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 [0759] 1 5 10 15
 [0760] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Ser Glu His Thr Phe Ser Asn Phe
 [0761] 20 25 30
 [0762] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asn Val Val
 [0763] 35 40 45
 [0764] Ala Ala Ile Asp Ser Ser Gly Arg Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0765] 50 55 60
 [0766] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr
 [0767] 65 70 75 80
 [0768] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys
 [0769] 85 90 95
 [0770] Ala Ala Arg Thr Gly Gly Val Gly Tyr Tyr Ser Arg Ser Ser Phe Tyr
 [0771] 100 105 110
 [0772] Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0773] 115 120 125
 [0774] <210> 61
 [0775] <211> 8
 [0776] <212> PRT
 [0777] <213> Artificial Sequence
 [0778] <220>
 [0779] <223> 3G6 CDR1

[0780] <400> 61
 [0781] Gly Ser Ile Phe Gly Ile Ser Val
 [0782] 1 5
 [0783] <210> 62
 [0784] <211> 7
 [0785] <212> PRT
 [0786] <213> Artificial Sequence
 [0787] <220>
 [0788] <223> 3G6 CDR2
 [0789] <400> 62
 [0790] Leu Thr Arg Ala Gly Leu Thr
 [0791] 1 5
 [0792] <210> 63
 [0793] <211> 15
 [0794] <212> PRT
 [0795] <213> Artificial Sequence
 [0796] <220>
 [0797] <223> 3G6 CDR3
 [0798] <400> 63
 [0799] His Ala Asn Ile Met Glu Ser Ala Ala Ser Thr Phe Gly Arg Tyr
 [0800] 1 5 10 15
 [0801] <210> 64
 [0802] <211> 121
 [0803] <212> PRT
 [0804] <213> Artificial Sequence
 [0805] <220>
 [0806] <223> 3G6 VHH
 [0807] <400> 64
 [0808] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 [0809] 1 5 10 15
 [0810] Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Gly Ile Ser
 [0811] 20 25 30
 [0812] Val Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gln Arg Asp Leu Val
 [0813] 35 40 45
 [0814] Ala Thr Leu Thr Arg Ala Gly Leu Thr Thr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 [0815] 50 55 60
 [0816] Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 [0817] 65 70 75 80
 [0818] Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His

[0819]		85	90	95
[0820]	Ala Asn Ile Met Glu Ser Ala Ala Ser Thr Phe Gly Arg Tyr Trp Gly			
[0821]		100	105	110
[0822]	Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser			
[0823]		115	120	
[0824]	<210> 65			
[0825]	<211> 8			
[0826]	<212> PRT			
[0827]	<213> Artificial Sequence			
[0828]	<220>			
[0829]	<223> 3G7 CDR1			
[0830]	<400> 65			
[0831]	Gly Arg Thr Leu Ser Thr Tyr Thr			
[0832]	1	5		
[0833]	<210> 66			
[0834]	<211> 7			
[0835]	<212> PRT			
[0836]	<213> Artificial Sequence			
[0837]	<220>			
[0838]	<223> 3G7 CDR2			
[0839]	<400> 66			
[0840]	Ala Trp Pro Ser Pro Ser Thr			
[0841]	1	5		
[0842]	<210> 67			
[0843]	<211> 18			
[0844]	<212> PRT			
[0845]	<213> Artificial Sequence			
[0846]	<220>			
[0847]	<223> 3G7 CDR3			
[0848]	<400> 67			
[0849]	Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Leu Thr Gln Ser Trp Leu Asn Ala Ala Leu			
[0850]	1	5	10	15
[0851]	Asp Tyr			
[0852]	<210> 68			
[0853]	<211> 124			
[0854]	<212> PRT			
[0855]	<213> Artificial Sequence			
[0856]	<220>			
[0857]	<223> 3G7 VHH			

[0858] <400> 68
 [0859] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 [0860] 1 5 10 15
 [0861] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser Thr Tyr
 [0862] 20 25 30
 [0863] Thr Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 [0864] 35 40 45
 [0865] Gly Leu Ala Trp Pro Ser Pro Ser Thr Tyr Val Val Asp Ser Val Lys
 [0866] 50 55 60
 [0867] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ile Tyr Leu
 [0868] 65 70 75 80
 [0869] Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 [0870] 85 90 95
 [0871] Ala Asp Tyr Lys Ser Leu Thr Gln Ser Trp Leu Asn Ala Ala Leu Asp
 [0872] 100 105 110
 [0873] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0874] 115 120
 [0875] <210> 69
 [0876] <211> 8
 [0877] <212> PRT
 [0878] <213> Artificial Sequence
 [0879] <220>
 [0880] <223> 3H7 CDR1
 [0881] <400> 69
 [0882] Gly Ser Ile Leu Ser Ala Gly Val
 [0883] 1 5
 [0884] <210> 70
 [0885] <211> 8
 [0886] <212> PRT
 [0887] <213> Artificial Sequence
 [0888] <220>
 [0889] <223> 3H7 CDR2
 [0890] <400> 70
 [0891] Ile Ala Leu Asp Gly Ser Thr Gly
 [0892] 1 5
 [0893] <210> 71
 [0894] <211> 15
 [0895] <212> PRT
 [0896] <213> Artificial Sequence

[0897] <220>
 [0898] <223> 3H7 CDR3
 [0899] <400> 71
 [0900] Asn Ala Asn Ile Arg Thr Asp Met Arg Ser Ala Pro Phe Asp His
 [0901] 1 5 10 15
 [0902] <210> 72
 [0903] <211> 122
 [0904] <212> PRT
 [0905] <213> Artificial Sequence
 [0906] <220>
 [0907] <223> 3H7 VHH
 [0908] <400> 72
 [0909] Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 [0910] 1 5 10 15
 [0911] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Leu Ser Ala Gly
 [0912] 20 25 30
 [0913] Val Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
 [0914] 35 40 45
 [0915] Ala Ser Ile Ala Leu Asp Gly Ser Thr Gly Tyr Tyr Ile Asp Ser Val
 [0916] 50 55 60
 [0917] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Val Tyr
 [0918] 65 70 75 80
 [0919] Leu Asp Met Arg Ser Leu Glu Pro Ala Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
 [0920] 85 90 95
 [0921] Asn Ala Asn Ile Arg Thr Asp Met Arg Ser Ala Pro Phe Asp His Trp
 [0922] 100 105 110
 [0923] Gly His Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0924] 115 120
 [0925] <210> 73
 [0926] <211> 8
 [0927] <212> PRT
 [0928] <213> Artificial Sequence
 [0929] <220>
 [0930] <223> 4C6 CDR1
 [0931] <400> 73
 [0932] Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr Pro
 [0933] 1 5
 [0934] <210> 74
 [0935] <211> 8

[0936] <212> PRT
 [0937] <213> Artificial Sequence
 [0938] <220>
 [0939] <223> 4C6 CDR2
 [0940] <400> 74
 [0941] Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr
 [0942] 1 5
 [0943] <210> 75
 [0944] <211> 16
 [0945] <212> PRT
 [0946] <213> Artificial Sequence
 [0947] <220>
 [0948] <223> 4C6 CDR3
 [0949] <400> 75
 [0950] Ala Val Asp Pro Thr Gly Trp Gly Thr Ile Glu Ala Asp Phe Arg Ser
 [0951] 1 5 10 15
 [0952] <210> 76
 [0953] <211> 123
 [0954] <212> PRT
 [0955] <213> Artificial Sequence
 [0956] <220>
 [0957] <223> 4C6 VHH
 [0958] <400> 76
 [0959] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 [0960] 1 5 10 15
 [0961] Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0962] 20 25 30
 [0963] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Gly Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [0964] 35 40 45
 [0965] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Ala Ser Val
 [0966] 50 55 60
 [0967] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Ser Ala Ala Phe
 [0968] 65 70 75 80
 [0969] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Arg Cys
 [0970] 85 90 95
 [0971] Ala Val Asp Pro Thr Gly Trp Gly Thr Ile Glu Ala Asp Phe Arg Ser
 [0972] 100 105 110
 [0973] Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0974] 115 120

[0975] <210> 77
 [0976] <211> 8
 [0977] <212> PRT
 [0978] <213> Artificial Sequence
 [0979] <220>
 [0980] <223> 1C12 CDR1
 [0981] <400> 77
 [0982] Ser Arg Ile Phe Ser Arg Tyr Gly
 [0983] 1 5
 [0984] <210> 78
 [0985] <211> 8
 [0986] <212> PRT
 [0987] <213> Artificial Sequence
 [0988] <220>
 [0989] <223> 1C12 CDR2
 [0990] <400> 78
 [0991] Ile Ser Trp Asn Gly Ala Ser Thr
 [0992] 1 5
 [0993] <210> 79
 [0994] <211> 17
 [0995] <212> PRT
 [0996] <213> Artificial Sequence
 [0997] <220>
 [0998] <223> 1C12 CDR3
 [0999] <400> 79
 [1000] Ala Ala Asp Pro Trp Gly Ala Val Lys Leu Gly Thr Ala Glu Tyr Glu
 [1001] 1 5 10 15
 [1002] Tyr
 [1003] <210> 80
 [1004] <211> 124
 [1005] <212> PRT
 [1006] <213> Artificial Sequence
 [1007] <220>
 [1008] <223> 1C12 VHH
 [1009] <400> 80
 [1010] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Asp
 [1011] 1 5 10 15
 [1012] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Arg Ile Phe Ser Arg Tyr
 [1013] 20 25 30

[1014] Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 [1015] 35 40 45
 [1016] Ala Ala Ile Ser Trp Asn Gly Ala Ser Thr Thr Tyr Thr Asp Ser Val
 [1017] 50 55 60
 [1018] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Glu Asn Thr Thr Tyr
 [1019] 65 70 75 80
 [1020] Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1021] 85 90 95
 [1022] Ala Ala Asp Pro Trp Gly Ala Val Lys Leu Gly Thr Ala Glu Tyr Glu
 [1023] 100 105 110
 [1024] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [1025] 115 120
 [1026] <210> 81
 [1027] <211> 8
 [1028] <212> PRT
 [1029] <213> Artificial Sequence
 [1030] <220>
 [1031] <223> 1G1 CDR1
 [1032] <400> 81
 [1033] Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr Pro
 [1034] 1 5
 [1035] <210> 82
 [1036] <211> 8
 [1037] <212> PRT
 [1038] <213> Artificial Sequence
 [1039] <220>
 [1040] <223> 1G1 CDR2
 [1041] <400> 82
 [1042] Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr
 [1043] 1 5
 [1044] <210> 83
 [1045] <211> 18
 [1046] <212> PRT
 [1047] <213> Artificial Sequence
 [1048] <220>
 [1049] <223> 1G1 CDR3
 [1050] <400> 83
 [1051] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1052] 1 5 10 15

[1053] Asp Tyr
 [1054] <210> 84
 [1055] <211> 125
 [1056] <212> PRT
 [1057] <213> Artificial Sequence
 [1058] <220>
 [1059] <223> 1G1 VHH
 [1060] <400> 84
 [1061] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 [1062] 1 5 10 15
 [1063] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr
 [1064] 20 25 30
 [1065] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Gly Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1066] 35 40 45
 [1067] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Ala Ser Val
 [1068] 50 55 60
 [1069] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Ser Ala Ala Phe
 [1070] 65 70 75 80
 [1071] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1072] 85 90 95
 [1073] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1074] 100 105 110
 [1075] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1076] 115 120 125
 [1077] <210> 85
 [1078] <211> 125
 [1079] <212> PRT
 [1080] <213> Artificial Sequence
 [1081] <220>
 [1082] <223> 1G1-F-G-ERES VHH
 [1083] <400> 85
 [1084] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1085] 1 5 10 15
 [1086] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr
 [1087] 20 25 30
 [1088] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Gly Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1089] 35 40 45
 [1090] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1091] 50 55 60

[1131]	1	5	10	15
[1132]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr			
[1133]	20	25	30	
[1134]	Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val			
[1135]	35	40	45	
[1136]	Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
[1137]	50	55	60	
[1138]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[1139]	65	70	75	80
[1140]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1141]	85	90	95	
[1142]	Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr			
[1143]	100	105	110	
[1144]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[1145]	115	120	125	
[1146]	<210> 88			
[1147]	<211> 125			
[1148]	<212> PRT			
[1149]	<213> Artificial Sequence			
[1150]	<220>			
[1151]	<223> 1G1-F-A-GLEW VHH			
[1152]	<400> 88			
[1153]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
[1154]	1	5	10	15
[1155]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr			
[1156]	20	25	30	
[1157]	Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[1158]	35	40	45	
[1159]	Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
[1160]	50	55	60	
[1161]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[1162]	65	70	75	80
[1163]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1164]	85	90	95	
[1165]	Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr			
[1166]	100	105	110	
[1167]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[1168]	115	120	125	
[1169]	<210> 89			

[1170] <211> 125
 [1171] <212> PRT
 [1172] <213> Artificial Sequence
 [1173] <220>
 [1174] <223> 1G1-F-A-GREL VHH
 [1175] <400> 89
 [1176] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1177] 1 5 10 15
 [1178] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr
 [1179] 20 25 30
 [1180] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 [1181] 35 40 45
 [1182] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1183] 50 55 60
 [1184] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1185] 65 70 75 80
 [1186] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1187] 85 90 95
 [1188] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1189] 100 105 110
 [1190] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1191] 115 120 125
 [1192] <210> 90
 [1193] <211> 125
 [1194] <212> PRT
 [1195] <213> Artificial Sequence
 [1196] <220>
 [1197] <223> 1G1-F-A-GRES VHH
 [1198] <400> 90
 [1199] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1200] 1 5 10 15
 [1201] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr
 [1202] 20 25 30
 [1203] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Ser Val
 [1204] 35 40 45
 [1205] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1206] 50 55 60
 [1207] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1208] 65 70 75 80

[1209]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1210]	85 90 95
[1211]	Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
[1212]	100 105 110
[1213]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1214]	115 120 125
[1215]	<210> 91
[1216]	<211> 124
[1217]	<212> PRT
[1218]	<213> Artificial Sequence
[1219]	<220>
[1220]	<223> 1C12-EREF VHH
[1221]	<400> 91
[1222]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
[1223]	1 5 10 15
[1224]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Arg Ile Phe Ser Arg Tyr
[1225]	20 25 30
[1226]	Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
[1227]	35 40 45
[1228]	Ala Ala Ile Ser Trp Asn Gly Ala Ser Thr Thr Tyr Thr Asp Ser Val
[1229]	50 55 60
[1230]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1231]	65 70 75 80
[1232]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1233]	85 90 95
[1234]	Ala Ala Asp Pro Trp Gly Ala Val Lys Leu Gly Thr Ala Glu Tyr Glu
[1235]	100 105 110
[1236]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[1237]	115 120
[1238]	<210> 92
[1239]	<211> 124
[1240]	<212> PRT
[1241]	<213> Artificial Sequence
[1242]	<220>
[1243]	<223> 1C12-EREW VHH
[1244]	<400> 92
[1245]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
[1246]	1 5 10 15
[1247]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ser Arg Ile Phe Ser Arg Tyr

[1248]		20		25		30												
[1249]	Gly	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Trp	Val		
[1250]			35					40					45					
[1251]	Ala	Ala	Ile	Ser	Trp	Asn	Gly	Ala	Ser	Thr	Thr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val		
[1252]			50					55					60					
[1253]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		
[1254]	65					70					75					80		
[1255]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
[1256]				85						90				95				
[1257]	Ala	Ala	Asp	Pro	Trp	Gly	Ala	Val	Lys	Leu	Gly	Thr	Ala	Glu	Tyr	Glu		
[1258]				100					105					110				
[1259]	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
[1260]			115					120										
[1261]	<210>	93																
[1262]	<211>	124																
[1263]	<212>	PRT																
[1264]	<213>	Artificial Sequence																
[1265]	<220>																	
[1266]	<223>	1C12_GLEW VHH																
[1267]	<400>	93																
[1268]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg		
[1269]	1			5						10				15				
[1270]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Arg	Ile	Phe	Ser	Arg	Tyr		
[1271]				20						25				30				
[1272]	Gly	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
[1273]			35							40				45				
[1274]	Ala	Ala	Ile	Ser	Trp	Asn	Gly	Ala	Ser	Thr	Thr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val		
[1275]			50							55				60				
[1276]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		
[1277]	65					70					75					80		
[1278]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
[1279]				85						90				95				
[1280]	Ala	Ala	Asp	Pro	Trp	Gly	Ala	Val	Lys	Leu	Gly	Thr	Ala	Glu	Tyr	Glu		
[1281]				100						105				110				
[1282]	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
[1283]			115					120										
[1284]	<210>	94																
[1285]	<211>	8																
[1286]	<212>	PRT																

[1287] <213> Artificial Sequence
 [1288] <220>
 [1289] <223> 2A3 CDR1
 [1290] <400> 94
 [1291] Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr Pro
 [1292] 1 5
 [1293] <210> 95
 [1294] <211> 8
 [1295] <212> PRT
 [1296] <213> Artificial Sequence
 [1297] <220>
 [1298] <223> 2A3 CDR2
 [1299] <400> 95
 [1300] Ile Ser Ser Asp Met Arg Phe Thr
 [1301] 1 5
 [1302] <210> 96
 [1303] <211> 18
 [1304] <212> PRT
 [1305] <213> Artificial Sequence
 [1306] <220>
 [1307] <223> 2A3 CDR3
 [1308] <400> 96
 [1309] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Val Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1310] 1 5 10 15
 [1311] Asp Tyr
 [1312] <210> 97
 [1313] <211> 125
 [1314] <212> PRT
 [1315] <213> Artificial Sequence
 [1316] <220>
 [1317] <223> 2A3 VHH
 [1318] <400> 97
 [1319] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1320] 1 5 10 15
 [1321] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr
 [1322] 20 25 30
 [1323] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1324] 35 40 45
 [1325] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Met Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[1365] <212> PRT
 [1366] <213> Artificial Sequence
 [1367] <220>
 [1368] <223> 1A8 VHH
 [1369] <400> 101
 [1370] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1371] 1 5 10 15
 [1372] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr
 [1373] 20 25 30
 [1374] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1375] 35 40 45
 [1376] Ala Ala Ile Ser Ser Arg Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1377] 50 55 60
 [1378] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1379] 65 70 75 80
 [1380] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1381] 85 90 95
 [1382] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1383] 100 105 110
 [1384] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1385] 115 120 125
 [1386] <210> 102
 [1387] <211> 8
 [1388] <212> PRT
 [1389] <213> Artificial Sequence
 [1390] <220>
 [1391] <223> 1D11 CDR1
 [1392] <400> 102
 [1393] Gly Pro Ser Phe Ser Ser Ser Pro
 [1394] 1 5
 [1395] <210> 103
 [1396] <211> 8
 [1397] <212> PRT
 [1398] <213> Artificial Sequence
 [1399] <220>
 [1400] <223> 1D11 CDR2
 [1401] <400> 103
 [1402] Ile Ser Ser Met Gly Arg Phe Thr
 [1403] 1 5

[1404] <210> 104
 [1405] <211> 18
 [1406] <212> PRT
 [1407] <213> Artificial Sequence
 [1408] <220>
 [1409] <223> 1D11 CDR3
 [1410] <400> 104
 [1411] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1412] 1 5 10 15
 [1413] Asp Tyr
 [1414] <210> 105
 [1415] <211> 125
 [1416] <212> PRT
 [1417] <213> Artificial Sequence
 [1418] <220>
 [1419] <223> 1D11 VHH
 [1420] <400> 105
 [1421] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1422] 1 5 10 15
 [1423] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Ser
 [1424] 20 25 30
 [1425] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1426] 35 40 45
 [1427] Ala Ala Ile Ser Ser Met Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1428] 50 55 60
 [1429] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1430] 65 70 75 80
 [1431] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1432] 85 90 95
 [1433] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1434] 100 105 110
 [1435] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1436] 115 120 125
 [1437] <210> 106
 [1438] <211> 8
 [1439] <212> PRT
 [1440] <213> Artificial Sequence
 [1441] <220>
 [1442] <223> 5E8 CDR1

[1443] <400> 106
 [1444] Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr Pro
 [1445] 1 5
 [1446] <210> 107
 [1447] <211> 8
 [1448] <212> PRT
 [1449] <213> Artificial Sequence
 [1450] <220>
 [1451] <223> 5E8 CDR2
 [1452] <400> 107
 [1453] Gln Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr
 [1454] 1 5
 [1455] <210> 108
 [1456] <211> 18
 [1457] <212> PRT
 [1458] <213> Artificial Sequence
 [1459] <220>
 [1460] <223> 5E8 CDR3
 [1461] <400> 108
 [1462] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1463] 1 5 10 15
 [1464] Asp Tyr
 [1465] <210> 109
 [1466] <211> 125
 [1467] <212> PRT
 [1468] <213> Artificial Sequence
 [1469] <220>
 [1470] <223> 5E8 VHH
 [1471] <400> 109
 [1472] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1473] 1 5 10 15
 [1474] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr
 [1475] 20 25 30
 [1476] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1477] 35 40 45
 [1478] Ala Ala Gln Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1479] 50 55 60
 [1480] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1481] 65 70 75 80

[1482] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1483] 85 90 95
 [1484] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1485] 100 105 110
 [1486] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1487] 115 120 125
 [1488] <210> 110
 [1489] <211> 8
 [1490] <212> PRT
 [1491] <213> Artificial Sequence
 [1492] <220>
 [1493] <223> 2A5 CDR1
 [1494] <400> 110
 [1495] Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr Pro
 [1496] 1 5
 [1497] <210> 111
 [1498] <211> 8
 [1499] <212> PRT
 [1500] <213> Artificial Sequence
 [1501] <220>
 [1502] <223> 2A5 CDR2
 [1503] <400> 111
 [1504] Ile Ser Ser Val Gly Arg Phe Thr
 [1505] 1 5
 [1506] <210> 112
 [1507] <211> 18
 [1508] <212> PRT
 [1509] <213> Artificial Sequence
 [1510] <220>
 [1511] <223> 2A5 CDR3
 [1512] <400> 112
 [1513] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Trp Gln Trp Tyr
 [1514] 1 5 10 15
 [1515] Asp Tyr
 [1516] <210> 113
 [1517] <211> 125
 [1518] <212> PRT
 [1519] <213> Artificial Sequence
 [1520] <220>

[1521] <223> 2A5 VHH
 [1522] <400> 113
 [1523] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1524] 1 5 10 15
 [1525] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr
 [1526] 20 25 30
 [1527] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1528] 35 40 45
 [1529] Ala Ala Ile Ser Ser Val Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1530] 50 55 60
 [1531] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1532] 65 70 75 80
 [1533] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1534] 85 90 95
 [1535] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Trp Gln Trp Tyr
 [1536] 100 105 110
 [1537] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1538] 115 120 125
 [1539] <210> 114
 [1540] <211> 8
 [1541] <212> PRT
 [1542] <213> Artificial Sequence
 [1543] <220>
 [1544] <223> 5G10 CDR1
 [1545] <400> 114
 [1546] Gly Pro Arg Phe Ser Ser Tyr Pro
 [1547] 1 5
 [1548] <210> 115
 [1549] <211> 8
 [1550] <212> PRT
 [1551] <213> Artificial Sequence
 [1552] <220>
 [1553] <223> 5G10 CDR2
 [1554] <400> 115
 [1555] Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr
 [1556] 1 5
 [1557] <210> 116
 [1558] <211> 18
 [1559] <212> PRT

[1560] <213> Artificial Sequence
 [1561] <220>
 [1562] <223> 5G10 CDR3
 [1563] <400> 116
 [1564] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1565] 1 5 10 15
 [1566] Asp Gly
 [1567] <210> 117
 [1568] <211> 125
 [1569] <212> PRT
 [1570] <213> Artificial Sequence
 [1571] <220>
 [1572] <223> 5G10 VHH
 [1573] <400> 117
 [1574] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1575] 1 5 10 15
 [1576] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Arg Phe Ser Ser Tyr
 [1577] 20 25 30
 [1578] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1579] 35 40 45
 [1580] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1581] 50 55 60
 [1582] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1583] 65 70 75 80
 [1584] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1585] 85 90 95
 [1586] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1587] 100 105 110
 [1588] Asp Gly Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1589] 115 120 125
 [1590] <210> 118
 [1591] <211> 8
 [1592] <212> PRT
 [1593] <213> Artificial Sequence
 [1594] <220>
 [1595] <223> 2A6 CDR1
 [1596] <400> 118
 [1597] Gly Pro Ser Phe Ser Leu Tyr Pro
 [1598] 1 5

[1599] <210> 119
 [1600] <211> 8
 [1601] <212> PRT
 [1602] <213> Artificial Sequence
 [1603] <220>
 [1604] <223> 2A6 CDR2
 [1605] <400> 119
 [1606] Ile Ser Ser Asp Arg Arg Phe Thr
 [1607] 1 5
 [1608] <210> 120
 [1609] <211> 18
 [1610] <212> PRT
 [1611] <213> Artificial Sequence
 [1612] <220>
 [1613] <223> 2A6 CDR3
 [1614] <400> 120
 [1615] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1616] 1 5 10 15
 [1617] Asp Tyr
 [1618] <210> 121
 [1619] <211> 125
 [1620] <212> PRT
 [1621] <213> Artificial Sequence
 [1622] <220>
 [1623] <223> 2A6 VHH
 [1624] <400> 121
 [1625] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1626] 1 5 10 15
 [1627] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Leu Tyr
 [1628] 20 25 30
 [1629] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1630] 35 40 45
 [1631] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Arg Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1632] 50 55 60
 [1633] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1634] 65 70 75 80
 [1635] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1636] 85 90 95
 [1637] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr

[1638]	100	105	110
[1639]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1640]	115	120	125
[1641]	<210> 122		
[1642]	<211> 8		
[1643]	<212> PRT		
[1644]	<213> Artificial Sequence		
[1645]	<220>		
[1646]	<223> 1G1-1C12 CDR1		
[1647]	<400> 122		
[1648]	Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr Pro		
[1649]	1	5	
[1650]	<210> 123		
[1651]	<211> 8		
[1652]	<212> PRT		
[1653]	<213> Artificial Sequence		
[1654]	<220>		
[1655]	<223> 1G1-1C12 CDR2		
[1656]	<400> 123		
[1657]	Ile Ser Ser Asp Leu Arg Phe Thr		
[1658]	1	5	
[1659]	<210> 124		
[1660]	<211> 18		
[1661]	<212> PRT		
[1662]	<213> Artificial Sequence		
[1663]	<220>		
[1664]	<223> 1G1-1C12 CDR3		
[1665]	<400> 124		
[1666]	Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Lys Gln Trp Tyr		
[1667]	1	5	10 15
[1668]	Asp Tyr		
[1669]	<210> 125		
[1670]	<211> 125		
[1671]	<212> PRT		
[1672]	<213> Artificial Sequence		
[1673]	<220>		
[1674]	<223> 1C12 VHH		
[1675]	<400> 125		
[1676]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		

[1677]	1	5	10	15
[1678]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr			
[1679]	20	25	30	
[1680]	Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val			
[1681]	35	40	45	
[1682]	Ala Ala Ile Ser Ser Asp Leu Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
[1683]	50	55	60	
[1684]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[1685]	65	70	75	80
[1686]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1687]	85	90	95	
[1688]	Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Lys Gln Trp Tyr			
[1689]	100	105	110	
[1690]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[1691]	115	120	125	
[1692]	<210> 126			
[1693]	<211> 8			
[1694]	<212> PRT			
[1695]	<213> Artificial Sequence			
[1696]	<220>			
[1697]	<223> 5B5 CDR1			
[1698]	<400> 126			
[1699]	Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr Pro			
[1700]	1	5		
[1701]	<210> 127			
[1702]	<211> 8			
[1703]	<212> PRT			
[1704]	<213> Artificial Sequence			
[1705]	<220>			
[1706]	<223> 5B5 CDR2			
[1707]	<400> 127			
[1708]	Ile Ser Ser Asp Thr Arg Phe Thr			
[1709]	1	5		
[1710]	<210> 128			
[1711]	<211> 18			
[1712]	<212> PRT			
[1713]	<213> Artificial Sequence			
[1714]	<220>			
[1715]	<223> 5B5 CDR3			

[1716] <400> 128
 [1717] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1718] 1 5 10 15
 [1719] Asp Arg
 [1720] <210> 129
 [1721] <211> 125
 [1722] <212> PRT
 [1723] <213> Artificial Sequence
 [1724] <220>
 [1725] <223> 5B5 VHH
 [1726] <400> 129
 [1727] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1728] 1 5 10 15
 [1729] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr
 [1730] 20 25 30
 [1731] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1732] 35 40 45
 [1733] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Thr Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1734] 50 55 60
 [1735] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1736] 65 70 75 80
 [1737] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1738] 85 90 95
 [1739] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1740] 100 105 110
 [1741] Asp Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1742] 115 120 125
 [1743] <210> 130
 [1744] <211> 8
 [1745] <212> PRT
 [1746] <213> Artificial Sequence
 [1747] <220>
 [1748] <223> 6F12 CDR1
 [1749] <400> 130
 [1750] Gly Pro Ser Phe Thr Ser Tyr Pro
 [1751] 1 5
 [1752] <210> 131
 [1753] <211> 8
 [1754] <212> PRT

[1755] <213> Artificial Sequence
 [1756] <220>
 [1757] <223> 6F12 CDR2
 [1758] <400> 131
 [1759] Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Lys
 [1760] 1 5
 [1761] <210> 132
 [1762] <211> 18
 [1763] <212> PRT
 [1764] <213> Artificial Sequence
 [1765] <220>
 [1766] <223> 6F12 CDR3
 [1767] <400> 132
 [1768] Ala Ala Glu Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1769] 1 5 10 15
 [1770] Asp Tyr
 [1771] <210> 133
 [1772] <211> 125
 [1773] <212> PRT
 [1774] <213> Artificial Sequence
 [1775] <220>
 [1776] <223> 6F12 VHH
 [1777] <400> 133
 [1778] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1779] 1 5 10 15
 [1780] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Thr Ser Tyr
 [1781] 20 25 30
 [1782] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1783] 35 40 45
 [1784] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1785] 50 55 60
 [1786] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1787] 65 70 75 80
 [1788] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1789] 85 90 95
 [1790] Ala Ala Glu Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1791] 100 105 110
 [1792] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1793] 115 120 125

[1794] <210> 134
 [1795] <211> 8
 [1796] <212> PRT
 [1797] <213> Artificial Sequence
 [1798] <220>
 [1799] <223> 1C7 CDR1
 [1800] <400> 134
 [1801] Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr Pro
 [1802] 1 5
 [1803] <210> 135
 [1804] <211> 8
 [1805] <212> PRT
 [1806] <213> Artificial Sequence
 [1807] <220>
 [1808] <223> 1C7 CDR2
 [1809] <400> 135
 [1810] Ile Ser Ser Arg Gly Arg Phe Thr
 [1811] 1 5
 [1812] <210> 136
 [1813] <211> 18
 [1814] <212> PRT
 [1815] <213> Artificial Sequence
 [1816] <220>
 [1817] <223> 1C7 CDR3
 [1818] <400> 136
 [1819] Ala Ala Arg Gly Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1820] 1 5 10 15
 [1821] Asp Tyr
 [1822] <210> 137
 [1823] <211> 125
 [1824] <212> PRT
 [1825] <213> Artificial Sequence
 [1826] <220>
 [1827] <223> 1C7 VHH
 [1828] <400> 137
 [1829] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1830] 1 5 10 15
 [1831] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Tyr
 [1832] 20 25 30

[1833]	Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
[1834]	35 40 45
[1835]	Ala Ala Ile Ser Ser Arg Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1836]	50 55 60
[1837]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1838]	65 70 75 80
[1839]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1840]	85 90 95
[1841]	Ala Ala Arg Gly Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
[1842]	100 105 110
[1843]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1844]	115 120 125
[1845]	<210> 138
[1846]	<211> 8
[1847]	<212> PRT
[1848]	<213> Artificial Sequence
[1849]	<220>
[1850]	<223> 6E9 CDR1
[1851]	<400> 138
[1852]	Gly Pro Ser Arg Ser Ser Tyr Pro
[1853]	1 5
[1854]	<210> 139
[1855]	<211> 8
[1856]	<212> PRT
[1857]	<213> Artificial Sequence
[1858]	<220>
[1859]	<223> 6E9 CDR2
[1860]	<400> 139
[1861]	Ile Ser Ser Asp Gly Lys Phe Thr
[1862]	1 5
[1863]	<210> 140
[1864]	<211> 18
[1865]	<212> PRT
[1866]	<213> Artificial Sequence
[1867]	<220>
[1868]	<223> 6E9 CDR3
[1869]	<400> 140
[1870]	Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Asn Trp Tyr
[1871]	1 5 10 15

[1872] Asp Tyr
 [1873] <210> 141
 [1874] <211> 125
 [1875] <212> PRT
 [1876] <213> Artificial Sequence
 [1877] <220>
 [1878] <223> 6E9 VHH
 [1879] <400> 141
 [1880] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1881] 1 5 10 15
 [1882] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Arg Ser Ser Tyr
 [1883] 20 25 30
 [1884] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1885] 35 40 45
 [1886] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Lys Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1887] 50 55 60
 [1888] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1889] 65 70 75 80
 [1890] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1891] 85 90 95
 [1892] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Asn Trp Tyr
 [1893] 100 105 110
 [1894] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1895] 115 120 125
 [1896] <210> 142
 [1897] <211> 8
 [1898] <212> PRT
 [1899] <213> Artificial Sequence
 [1900] <220>
 [1901] <223> 1A10 CDR1
 [1902] <400> 142
 [1903] Gly Asn Ser Phe Ser Ser Tyr Pro
 [1904] 1 5
 [1905] <210> 143
 [1906] <211> 8
 [1907] <212> PRT
 [1908] <213> Artificial Sequence
 [1909] <220>
 [1910] <223> 1A10 CDR2

[1911] <400> 143
 [1912] Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Ser
 [1913] 1 5
 [1914] <210> 144
 [1915] <211> 18
 [1916] <212> PRT
 [1917] <213> Artificial Sequence
 [1918] <220>
 [1919] <223> 1A10 CDR3
 [1920] <400> 144
 [1921] Ala Cys Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1922] 1 5 10 15
 [1923] Asp Tyr
 [1924] <210> 145
 [1925] <211> 125
 [1926] <212> PRT
 [1927] <213> Artificial Sequence
 [1928] <220>
 [1929] <223> 1A10 VHH
 [1930] <400> 145
 [1931] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1932] 1 5 10 15
 [1933] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn Ser Phe Ser Ser Tyr
 [1934] 20 25 30
 [1935] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1936] 35 40 45
 [1937] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1938] 50 55 60
 [1939] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1940] 65 70 75 80
 [1941] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1942] 85 90 95
 [1943] Ala Cys Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [1944] 100 105 110
 [1945] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1946] 115 120 125
 [1947] <210> 146
 [1948] <211> 8
 [1949] <212> PRT

[1950] <213> Artificial Sequence
 [1951] <220>
 [1952] <223> 6B11 CDR1
 [1953] <400> 146
 [1954] Gly Pro Ser Phe Pro Ser Tyr Pro
 [1955] 1 5
 [1956] <210> 147
 [1957] <211> 8
 [1958] <212> PRT
 [1959] <213> Artificial Sequence
 [1960] <220>
 [1961] <223> 6B11 CDR2
 [1962] <400> 147
 [1963] Ile Ser Ser Arg Gly Arg Phe Thr
 [1964] 1 5
 [1965] <210> 148
 [1966] <211> 18
 [1967] <212> PRT
 [1968] <213> Artificial Sequence
 [1969] <220>
 [1970] <223> 6B11 CDR3
 [1971] <400> 148
 [1972] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Leu Gln Trp Tyr
 [1973] 1 5 10 15
 [1974] Asp Tyr
 [1975] <210> 149
 [1976] <211> 125
 [1977] <212> PRT
 [1978] <213> Artificial Sequence
 [1979] <220>
 [1980] <223> 6B11 VHH
 [1981] <400> 149
 [1982] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [1983] 1 5 10 15
 [1984] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Pro Ser Tyr
 [1985] 20 25 30
 [1986] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [1987] 35 40 45
 [1988] Ala Ala Ile Ser Ser Arg Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[1989]	50	55	60
[1990]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1991]	65	70	75 80
[1992]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1993]		85	90 95
[1994]	Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Leu Gln Trp Tyr		
[1995]		100	105 110
[1996]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1997]		115	120 125
[1998]	<210>	150	
[1999]	<211>	8	
[2000]	<212>	PRT	
[2001]	<213>	Artificial Sequence	
[2002]	<220>		
[2003]	<223>	6D8 CDR1	
[2004]	<400>	150	
[2005]	Gly Pro Ser Phe Ser Ser Lys Pro		
[2006]	1	5	
[2007]	<210>	151	
[2008]	<211>	8	
[2009]	<212>	PRT	
[2010]	<213>	Artificial Sequence	
[2011]	<220>		
[2012]	<223>	6D8 CDR2	
[2013]	<400>	151	
[2014]	Arg Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr		
[2015]	1	5	
[2016]	<210>	152	
[2017]	<211>	18	
[2018]	<212>	PRT	
[2019]	<213>	Artificial Sequence	
[2020]	<220>		
[2021]	<223>	6D8 CDR3	
[2022]	<400>	152	
[2023]	Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Arg Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr		
[2024]	1	5	10 15
[2025]	Asp Tyr		
[2026]	<210>	153	
[2027]	<211>	125	

[2028] <212> PRT
 [2029] <213> Artificial Sequence
 [2030] <220>
 [2031] <223> 6D8 VHH
 [2032] <400> 153
 [2033] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [2034] 1 5 10 15
 [2035] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Lys
 [2036] 20 25 30
 [2037] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [2038] 35 40 45
 [2039] Ala Ala Arg Ser Ser Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [2040] 50 55 60
 [2041] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [2042] 65 70 75 80
 [2043] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2044] 85 90 95
 [2045] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Arg Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2046] 100 105 110
 [2047] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [2048] 115 120 125
 [2049] <210> 154
 [2050] <211> 8
 [2051] <212> PRT
 [2052] <213> Artificial Sequence
 [2053] <220>
 [2054] <223> 6D12 CDR1
 [2055] <400> 154
 [2056] Gly Pro Ser Phe Ser Thr Tyr Pro
 [2057] 1 5
 [2058] <210> 155
 [2059] <211> 8
 [2060] <212> PRT
 [2061] <213> Artificial Sequence
 [2062] <220>
 [2063] <223> 6D12 CDR2
 [2064] <400> 155
 [2065] Ile Ser Ser Asp Gly Val Phe Thr
 [2066] 1 5

[2067] <210> 156
 [2068] <211> 18
 [2069] <212> PRT
 [2070] <213> Artificial Sequence
 [2071] <220>
 [2072] <223> 6D12 CDR3
 [2073] <400> 156
 [2074] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Glu Gln Trp Tyr
 [2075] 1 5 10 15
 [2076] Asp Tyr
 [2077] <210> 157
 [2078] <211> 125
 [2079] <212> PRT
 [2080] <213> Artificial Sequence
 [2081] <220>
 [2082] <223> 6D12 VHH
 [2083] <400> 157
 [2084] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [2085] 1 5 10 15
 [2086] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Thr Tyr
 [2087] 20 25 30
 [2088] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [2089] 35 40 45
 [2090] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Val Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [2091] 50 55 60
 [2092] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [2093] 65 70 75 80
 [2094] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2095] 85 90 95
 [2096] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Glu Gln Trp Tyr
 [2097] 100 105 110
 [2098] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [2099] 115 120 125
 [2100] <210> 158
 [2101] <211> 8
 [2102] <212> PRT
 [2103] <213> Artificial Sequence
 [2104] <220>
 [2105] <223> 2C5 CDR1

[2145] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2146] 85 90 95
 [2147] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2148] 100 105 110
 [2149] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [2150] 115 120 125
 [2151] <210> 162
 [2152] <211> 8
 [2153] <212> PRT
 [2154] <213> Artificial Sequence
 [2155] <220>
 [2156] <223> 7F6 CDR1
 [2157] <400> 162
 [2158] Gly Pro Met Phe Ser Ser Tyr Pro
 [2159] 1 5
 [2160] <210> 163
 [2161] <211> 8
 [2162] <212> PRT
 [2163] <213> Artificial Sequence
 [2164] <220>
 [2165] <223> 7F6 CDR2
 [2166] <400> 163
 [2167] Ile Ser Ser Asp Pro Arg Phe Thr
 [2168] 1 5
 [2169] <210> 164
 [2170] <211> 18
 [2171] <212> PRT
 [2172] <213> Artificial Sequence
 [2173] <220>
 [2174] <223> 7F6 CDR3
 [2175] <400> 164
 [2176] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2177] 1 5 10 15
 [2178] Asp Tyr
 [2179] <210> 165
 [2180] <211> 125
 [2181] <212> PRT
 [2182] <213> Artificial Sequence
 [2183] <220>

[2184] <223> 7F6 VHH
 [2185] <400> 165
 [2186] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [2187] 1 5 10 15
 [2188] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Met Phe Ser Ser Tyr
 [2189] 20 25 30
 [2190] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [2191] 35 40 45
 [2192] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Pro Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [2193] 50 55 60
 [2194] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [2195] 65 70 75 80
 [2196] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2197] 85 90 95
 [2198] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2199] 100 105 110
 [2200] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [2201] 115 120 125
 [2202] <210> 166
 [2203] <211> 8
 [2204] <212> PRT
 [2205] <213> Artificial Sequence
 [2206] <220>
 [2207] <223> 2D5 CDR1
 [2208] <400> 166
 [2209] Gly Pro Ser Phe Ser Ser Ser Pro
 [2210] 1 5
 [2211] <210> 167
 [2212] <211> 8
 [2213] <212> PRT
 [2214] <213> Artificial Sequence
 [2215] <220>
 [2216] <223> 2D5 CDR2
 [2217] <400> 167
 [2218] Ile Ser Trp Asp Gly Arg Phe Thr
 [2219] 1 5
 [2220] <210> 168
 [2221] <211> 18
 [2222] <212> PRT

[2223] <213> Artificial Sequence
 [2224] <220>
 [2225] <223> 2D5 CDR3
 [2226] <400> 168
 [2227] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2228] 1 5 10 15
 [2229] Val Tyr
 [2230] <210> 169
 [2231] <211> 125
 [2232] <212> PRT
 [2233] <213> Artificial Sequence
 [2234] <220>
 [2235] <223> 2D5 VHH
 [2236] <400> 169
 [2237] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [2238] 1 5 10 15
 [2239] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Ser Ser Ser
 [2240] 20 25 30
 [2241] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [2242] 35 40 45
 [2243] Ala Ala Ile Ser Trp Asp Gly Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [2244] 50 55 60
 [2245] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [2246] 65 70 75 80
 [2247] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2248] 85 90 95
 [2249] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2250] 100 105 110
 [2251] Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [2252] 115 120 125
 [2253] <210> 170
 [2254] <211> 8
 [2255] <212> PRT
 [2256] <213> Artificial Sequence
 [2257] <220>
 [2258] <223> 7B11 CDR1
 [2259] <400> 170
 [2260] Gly Pro Ser Phe Leu Ile Tyr Pro
 [2261] 1 5

[2262] <210> 171
 [2263] <211> 8
 [2264] <212> PRT
 [2265] <213> Artificial Sequence
 [2266] <220>
 [2267] <223> 7B11 CDR2
 [2268] <400> 171
 [2269] Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Trp
 [2270] 1 5
 [2271] <210> 172
 [2272] <211> 18
 [2273] <212> PRT
 [2274] <213> Artificial Sequence
 [2275] <220>
 [2276] <223> 7B11 CDR3
 [2277] <400> 172
 [2278] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Val Gln Trp Tyr
 [2279] 1 5 10 15
 [2280] Asp Tyr
 [2281] <210> 173
 [2282] <211> 125
 [2283] <212> PRT
 [2284] <213> Artificial Sequence
 [2285] <220>
 [2286] <223> 7B11 VHH
 [2287] <400> 173
 [2288] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [2289] 1 5 10 15
 [2290] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Leu Ile Tyr
 [2291] 20 25 30
 [2292] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [2293] 35 40 45
 [2294] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Trp Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [2295] 50 55 60
 [2296] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [2297] 65 70 75 80
 [2298] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2299] 85 90 95
 [2300] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Val Gln Trp Tyr

[2301]	100	105	110
[2302]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[2303]	115	120	125
[2304]	<210> 174		
[2305]	<211> 8		
[2306]	<212> PRT		
[2307]	<213> Artificial Sequence		
[2308]	<220>		
[2309]	<223> 7D12 CDR1		
[2310]	<400> 174		
[2311]	Gly Pro Ser Phe Leu Ser Tyr Pro		
[2312]	1	5	
[2313]	<210> 175		
[2314]	<211> 8		
[2315]	<212> PRT		
[2316]	<213> Artificial Sequence		
[2317]	<220>		
[2318]	<223> 7D12 CDR2		
[2319]	<400> 175		
[2320]	Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Ser		
[2321]	1	5	
[2322]	<210> 176		
[2323]	<211> 18		
[2324]	<212> PRT		
[2325]	<213> Artificial Sequence		
[2326]	<220>		
[2327]	<223> 7D12 CDR3		
[2328]	<400> 176		
[2329]	Ala Ala Arg Asp Trp Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr		
[2330]	1	5	10 15
[2331]	Asp Tyr		
[2332]	<210> 177		
[2333]	<211> 125		
[2334]	<212> PRT		
[2335]	<213> Artificial Sequence		
[2336]	<220>		
[2337]	<223> 7D12 VHH		
[2338]	<400> 177		
[2339]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg		

[2340] 1 5 10 15
 [2341] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Ser Phe Leu Ser Tyr
 [2342] 20 25 30
 [2343] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [2344] 35 40 45
 [2345] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Gly Arg Phe Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [2346] 50 55 60
 [2347] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [2348] 65 70 75 80
 [2349] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2350] 85 90 95
 [2351] Ala Ala Arg Asp Trp Gly Ser Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2352] 100 105 110
 [2353] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [2354] 115 120 125
 [2355] <210> 178
 [2356] <211> 8
 [2357] <212> PRT
 [2358] <213> Artificial Sequence
 [2359] <220>
 [2360] <223> 2A3 ML CDR1
 [2361] <400> 178
 [2362] Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr Pro
 [2363] 1 5
 [2364] <210> 179
 [2365] <211> 8
 [2366] <212> PRT
 [2367] <213> Artificial Sequence
 [2368] <220>
 [2369] <223> 2A3 ML CDR2
 [2370] <400> 179
 [2371] Ile Ser Ser Asp Leu Arg Phe Thr
 [2372] 1 5
 [2373] <210> 180
 [2374] <211> 18
 [2375] <212> PRT
 [2376] <213> Artificial Sequence
 [2377] <220>
 [2378] <223> 2A3 ML CDR3

[2379] <400> 180
 [2380] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Val Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2381] 1 5 10 15
 [2382] Asp Tyr
 [2383] <210> 181
 [2384] <211> 125
 [2385] <212> PRT
 [2386] <213> Artificial Sequence
 [2387] <220>
 [2388] <223> 2A3 ML VHH
 [2389] <400> 181
 [2390] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [2391] 1 5 10 15
 [2392] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr
 [2393] 20 25 30
 [2394] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [2395] 35 40 45
 [2396] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Leu Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [2397] 50 55 60
 [2398] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [2399] 65 70 75 80
 [2400] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2401] 85 90 95
 [2402] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Val Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2403] 100 105 110
 [2404] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [2405] 115 120 125
 [2406] <210> 182
 [2407] <211> 8
 [2408] <212> PRT
 [2409] <213> Artificial Sequence
 [2410] <220>
 [2411] <223> 2A3 MI CDR1
 [2412] <400> 182
 [2413] Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr Pro
 [2414] 1 5
 [2415] <210> 183
 [2416] <211> 8
 [2417] <212> PRT

[2418] <213> Artificial Sequence
 [2419] <220>
 [2420] <223> 2A3 MI CDR2
 [2421] <400> 183
 [2422] Ile Ser Ser Asp Ile Arg Phe Thr
 [2423] 1 5
 [2424] <210> 184
 [2425] <211> 18
 [2426] <212> PRT
 [2427] <213> Artificial Sequence
 [2428] <220>
 [2429] <223> 2A3 MI CDR3
 [2430] <400> 184
 [2431] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Val Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2432] 1 5 10 15
 [2433] Asp Tyr
 [2434] <210> 185
 [2435] <211> 125
 [2436] <212> PRT
 [2437] <213> Artificial Sequence
 [2438] <220>
 [2439] <223> 2A3 MI VHH
 [2440] <400> 185
 [2441] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [2442] 1 5 10 15
 [2443] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr
 [2444] 20 25 30
 [2445] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [2446] 35 40 45
 [2447] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Ile Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [2448] 50 55 60
 [2449] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [2450] 65 70 75 80
 [2451] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2452] 85 90 95
 [2453] Ala Ala Arg Asp Ser Gly Val Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2454] 100 105 110
 [2455] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [2456] 115 120 125

[2457] <210> 186
 [2458] <211> 8
 [2459] <212> PRT
 [2460] <213> Artificial Sequence
 [2461] <220>
 [2462] <223> 2A3 ML DT CDR1
 [2463] <400> 186
 [2464] Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr Pro
 [2465] 1 5
 [2466] <210> 187
 [2467] <211> 8
 [2468] <212> PRT
 [2469] <213> Artificial Sequence
 [2470] <220>
 [2471] <223> 2A3 ML DT CDR2
 [2472] <400> 187
 [2473] Ile Ser Ser Asp Leu Arg Phe Thr
 [2474] 1 5
 [2475] <210> 188
 [2476] <211> 18
 [2477] <212> PRT
 [2478] <213> Artificial Sequence
 [2479] <220>
 [2480] <223> 2A3 ML DT CDR3
 [2481] <400> 188
 [2482] Ala Ala Arg Thr Ser Gly Val Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2483] 1 5 10 15
 [2484] Asp Tyr
 [2485] <210> 189
 [2486] <211> 125
 [2487] <212> PRT
 [2488] <213> Artificial Sequence
 [2489] <220>
 [2490] <223> 2A3 ML DT VHH
 [2491] <400> 189
 [2492] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [2493] 1 5 10 15
 [2494] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr
 [2495] 20 25 30

[2496] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [2497] 35 40 45
 [2498] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Leu Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [2499] 50 55 60
 [2500] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [2501] 65 70 75 80
 [2502] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2503] 85 90 95
 [2504] Ala Ala Arg Thr Ser Gly Val Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2505] 100 105 110
 [2506] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [2507] 115 120 125
 [2508] <210> 190
 [2509] <211> 8
 [2510] <212> PRT
 [2511] <213> Artificial Sequence
 [2512] <220>
 [2513] <223> 2A3 ML DE CDR1
 [2514] <400> 190
 [2515] Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr Pro
 [2516] 1 5
 [2517] <210> 191
 [2518] <211> 8
 [2519] <212> PRT
 [2520] <213> Artificial Sequence
 [2521] <220>
 [2522] <223> 2A3 ML DE CDR2
 [2523] <400> 191
 [2524] Ile Ser Ser Asp Leu Arg Phe Thr
 [2525] 1 5
 [2526] <210> 192
 [2527] <211> 18
 [2528] <212> PRT
 [2529] <213> Artificial Sequence
 [2530] <220>
 [2531] <223> 2A3 ML DE CDR3
 [2532] <400> 192
 [2533] Ala Ala Arg Glu Ser Gly Val Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2534] 1 5 10 15

[2535] Asp Tyr
 [2536] <210> 193
 [2537] <211> 125
 [2538] <212> PRT
 [2539] <213> Artificial Sequence
 [2540] <220>
 [2541] <223> 2A3 ML DE VHH
 [2542] <400> 193
 [2543] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [2544] 1 5 10 15
 [2545] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr
 [2546] 20 25 30
 [2547] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [2548] 35 40 45
 [2549] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Leu Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [2550] 50 55 60
 [2551] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [2552] 65 70 75 80
 [2553] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [2554] 85 90 95
 [2555] Ala Ala Arg Glu Ser Gly Val Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
 [2556] 100 105 110
 [2557] Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [2558] 115 120 125
 [2559] <210> 194
 [2560] <211> 357
 [2561] <212> PRT
 [2562] <213> Artificial Sequence
 [2563] <220>
 [2564] <223> 2A3 LT Fc
 [2565] <400> 194
 [2566] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [2567] 1 5 10 15
 [2568] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr
 [2569] 20 25 30
 [2570] Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ser Val
 [2571] 35 40 45
 [2572] Ala Ala Ile Ser Ser Asp Leu Arg Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [2573] 50 55 60

[2574]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[2575]	65 70 75 80
[2576]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2577]	85 90 95
[2578]	Ala Ala Arg Thr Ser Gly Val Gly Tyr Tyr Ser Arg Ala Gln Trp Tyr
[2579]	100 105 110
[2580]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys
[2581]	115 120 125
[2582]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
[2583]	130 135 140
[2584]	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
[2585]	145 150 155 160
[2586]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
[2587]	165 170 175
[2588]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
[2589]	180 185 190
[2590]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
[2591]	195 200 205
[2592]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
[2593]	210 215 220
[2594]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
[2595]	225 230 235 240
[2596]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
[2597]	245 250 255
[2598]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
[2599]	260 265 270
[2600]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
[2601]	275 280 285
[2602]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
[2603]	290 295 300
[2604]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
[2605]	305 310 315 320
[2606]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
[2607]	325 330 335
[2608]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
[2609]	340 345 350
[2610]	Leu Ser Pro Gly Lys
[2611]	355
[2612]	<210> 195

- [2613] <211> 12
[2614] <212> PRT
[2615] <213> Artificial Sequence
[2616] <220>
[2617] <223> 示例性接头
[2618] <400> 195
[2619] Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
[2620] 1 5 10
[2621] <210> 196
[2622] <211> 15
[2623] <212> PRT
[2624] <213> Artificial Sequence
[2625] <220>
[2626] <223> 示例性接头
[2627] <400> 196
[2628] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
[2629] 1 5 10 15
[2630] <210> 197
[2631] <211> 5
[2632] <212> PRT
[2633] <213> Artificial Sequence
[2634] <220>
[2635] <223> 示例性接头
[2636] <400> 197
[2637] Gly Gly Gly Ser Gly
[2638] 1 5
[2639] <210> 198
[2640] <211> 10
[2641] <212> PRT
[2642] <213> Artificial Sequence
[2643] <220>
[2644] <223> 示例性接头
[2645] <400> 198
[2646] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[2647] 1 5 10
[2648] <210> 199
[2649] <211> 8
[2650] <212> PRT
[2651] <213> Artificial Sequence

- [2652] <220>
[2653] <223> 示例性接头
[2654] <400> 199
[2655] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
[2656] 1 5
[2657] <210> 200
[2658] <211> 12
[2659] <212> PRT
[2660] <213> Artificial Sequence
[2661] <220>
[2662] <223> 示例性接头
[2663] <400> 200
[2664] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
[2665] 1 5 10
[2666] <210> 201
[2667] <211> 6
[2668] <212> PRT
[2669] <213> Artificial Sequence
[2670] <220>
[2671] <223> 示例性接头
[2672] <400> 201
[2673] Gly Ser Gly Gly Ser Gly
[2674] 1 5
[2675] <210> 202
[2676] <211> 9
[2677] <212> PRT
[2678] <213> Artificial Sequence
[2679] <220>
[2680] <223> 示例性接头
[2681] <400> 202
[2682] Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
[2683] 1 5
[2684] <210> 203
[2685] <211> 7
[2686] <212> PRT
[2687] <213> Artificial Sequence
[2688] <220>
[2689] <223> 示例性接头
[2690] <400> 203

- [2730] <210> 208
[2731] <211> 7
[2732] <212> PRT
[2733] <213> Artificial Sequence
[2734] <220>
[2735] <223> 示例性接头
[2736] <400> 208
[2737] Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
[2738] 1 5
[2739] <210> 209
[2740] <211> 7
[2741] <212> PRT
[2742] <213> Artificial Sequence
[2743] <220>
[2744] <223> 示例性接头
[2745] <400> 209
[2746] Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala
[2747] 1 5
[2748] <210> 210
[2749] <211> 12
[2750] <212> PRT
[2751] <213> Artificial Sequence
[2752] <220>
[2753] <223> 示例性接头
[2754] <400> 210
[2755] Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
[2756] 1 5 10
[2757] <210> 211
[2758] <211> 10
[2759] <212> PRT
[2760] <213> Artificial Sequence
[2761] <220>
[2762] <223> 示例性接头
[2763] <400> 211
[2764] Gly Arg Pro Gly Ser Gly Arg Pro Gly Ser
[2765] 1 5 10
[2766] <210> 212
[2767] <211> 20
[2768] <212> PRT

- [2769] <213> Artificial Sequence
 [2770] <220>
 [2771] <223> 示例性接头
 [2772] <400> 212
 [2773] Gly Arg Pro Gly Ser Gly Arg Pro Gly Ser Gly Arg Pro Gly Ser Gly
 [2774] 1 5 10 15
 [2775] Arg Pro Gly Ser
 [2776] 20
 [2777] <210> 213
 [2778] <211> 10
 [2779] <212> PRT
 [2780] <213> Artificial Sequence
 [2781] <220>
 [2782] <223> 示例性接头
 [2783] <400> 213
 [2784] Gly Arg Gly Gly Ser Gly Arg Gly Gly Ser
 [2785] 1 5 10
 [2786] <210> 214
 [2787] <211> 20
 [2788] <212> PRT
 [2789] <213> Artificial Sequence
 [2790] <220>
 [2791] <223> 示例性接头
 [2792] <400> 214
 [2793] Gly Arg Gly Gly Ser Gly Arg Gly Gly Ser Gly Arg Gly Gly Ser Gly
 [2794] 1 5 10 15
 [2795] Arg Gly Gly Ser
 [2796] 20
 [2797] <210> 215
 [2798] <211> 10
 [2799] <212> PRT
 [2800] <213> Artificial Sequence
 [2801] <220>
 [2802] <223> 示例性接头
 [2803] <400> 215
 [2804] Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser
 [2805] 1 5 10
 [2806] <210> 216
 [2807] <211> 20

- [2808] <212> PRT
[2809] <213> Artificial Sequence
[2810] <220>
[2811] <223> 示例性接头
[2812] <400> 216
[2813] Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
[2814] 1 5 10 15
[2815] Lys Pro Gly Ser
[2816] 20
[2817] <210> 217
[2818] <211> 10
[2819] <212> PRT
[2820] <213> Artificial Sequence
[2821] <220>
[2822] <223> 示例性接头
[2823] <400> 217
[2824] Gly Glu Pro Gly Ser Gly Glu Pro Gly Ser
[2825] 1 5 10
[2826] <210> 218
[2827] <211> 20
[2828] <212> PRT
[2829] <213> Artificial Sequence
[2830] <220>
[2831] <223> 示例性接头
[2832] <400> 218
[2833] Gly Glu Gly Gly Ser Gly Glu Gly Gly Ser Gly Glu Gly Gly Ser Gly
[2834] 1 5 10 15
[2835] Glu Gly Gly Ser
[2836] 20
[2837] <210> 219
[2838] <211> 10
[2839] <212> PRT
[2840] <213> Artificial Sequence
[2841] <220>
[2842] <223> 示例性接头
[2843] <400> 219
[2844] Gly Asp Pro Gly Ser Gly Asp Pro Gly Ser
[2845] 1 5 10
[2846] <210> 220

[2847] <211> 20
 [2848] <212> PRT
 [2849] <213> Artificial Sequence
 [2850] <220>
 [2851] <223> 示例性接头
 [2852] <400> 220
 [2853] Gly Asp Pro Gly Ser Gly Asp Pro Gly Ser Gly Asp Pro Gly Ser Gly
 [2854] 1 5 10 15
 [2855] Asp Pro Gly Ser
 [2856] 20
 [2857] <210> 221
 [2858] <211> 244
 [2859] <212> PRT
 [2860] <213> Homo sapiens
 [2861] <220>
 [2862] <221> 人TIGIT多肽
 [2863] <222> (1) .. (244)
 [2864] <400> 221
 [2865] Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala
 [2866] 1 5 10 15
 [2867] Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn
 [2868] 20 25 30
 [2869] Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser
 [2870] 35 40 45
 [2871] Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln
 [2872] 50 55 60
 [2873] Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser
 [2874] 65 70 75 80
 [2875] Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln
 [2876] 85 90 95
 [2877] Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr
 [2878] 100 105 110
 [2879] Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu
 [2880] 115 120 125
 [2881] Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly
 [2882] 130 135 140
 [2883] Ala Met Ala Ala Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val
 [2884] 145 150 155 160
 [2885] Val Ala Leu Thr Arg Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu

[2886]		165		170		175
[2887]	Gly Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser					
[2888]		180		185		190
[2889]	Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala					
[2890]		195		200		205
[2891]	Gly Leu Cys Gly Glu Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu Leu His Asp					
[2892]		210		215		220
[2893]	Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys Ser Phe Phe					
[2894]		225		230		235
[2895]	Thr Glu Thr Gly					
[2896]	<210>	222				
[2897]	<211>	138				
[2898]	<212>	PRT				
[2899]	<213>	Homo sapiens				
[2900]	<220>					
[2901]	<221>	人TIGIT多肽的ECD				
[2902]	<222>	(1) .. (138)				
[2903]	<400>	222				
[2904]	Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala					
[2905]		1		5		10
[2906]	Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn					
[2907]		20		25		30
[2908]	Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser					
[2909]		35		40		45
[2910]	Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln					
[2911]		50		55		60
[2912]	Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser					
[2913]		65		70		75
[2914]	Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln					
[2915]		85		90		95
[2916]	Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr					
[2917]		100		105		110
[2918]	Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu					
[2919]		115		120		125
[2920]	Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe					
[2921]		130		135		

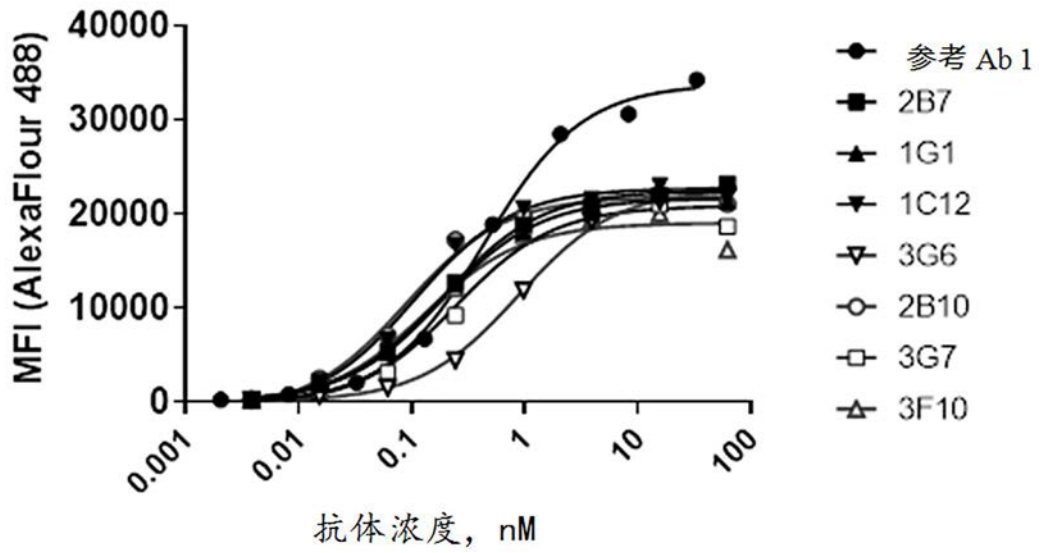


图1A

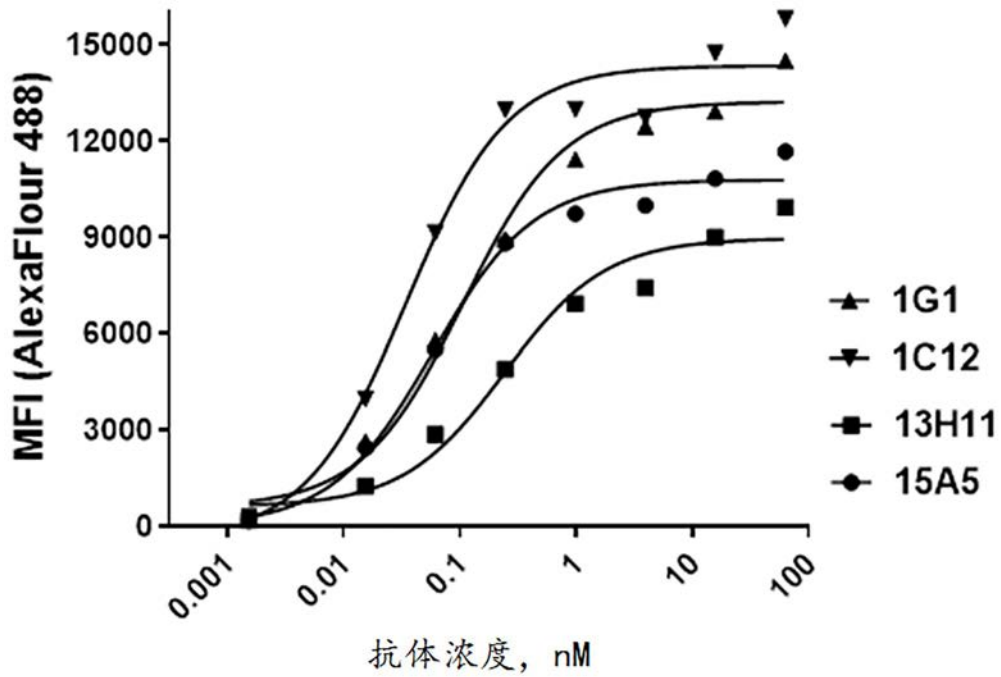


图1B

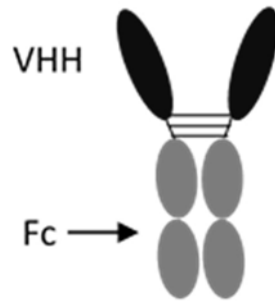


图1C

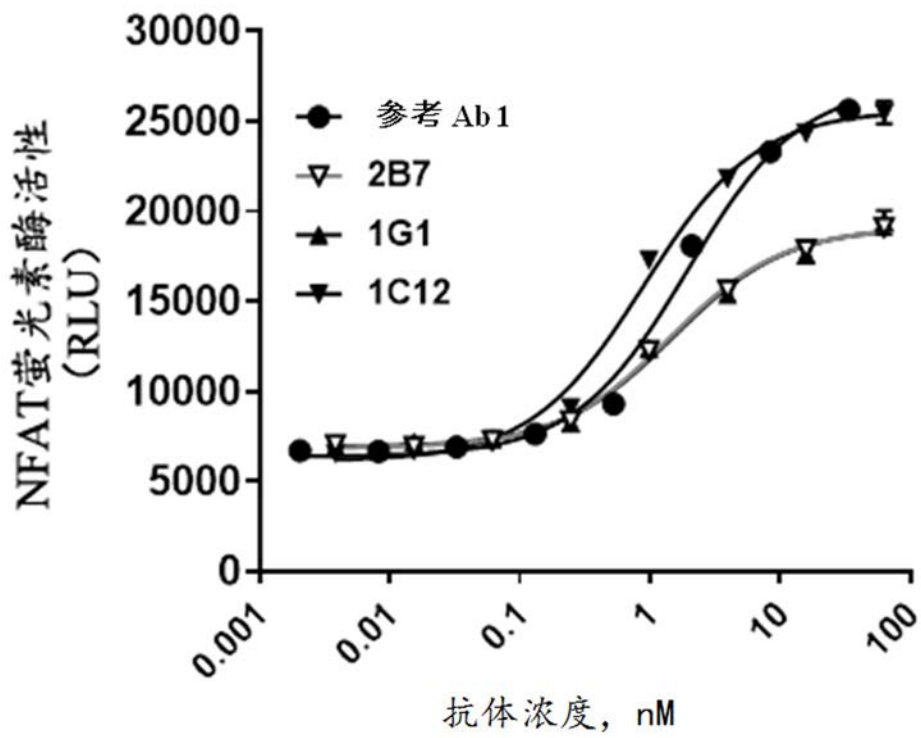


图2A

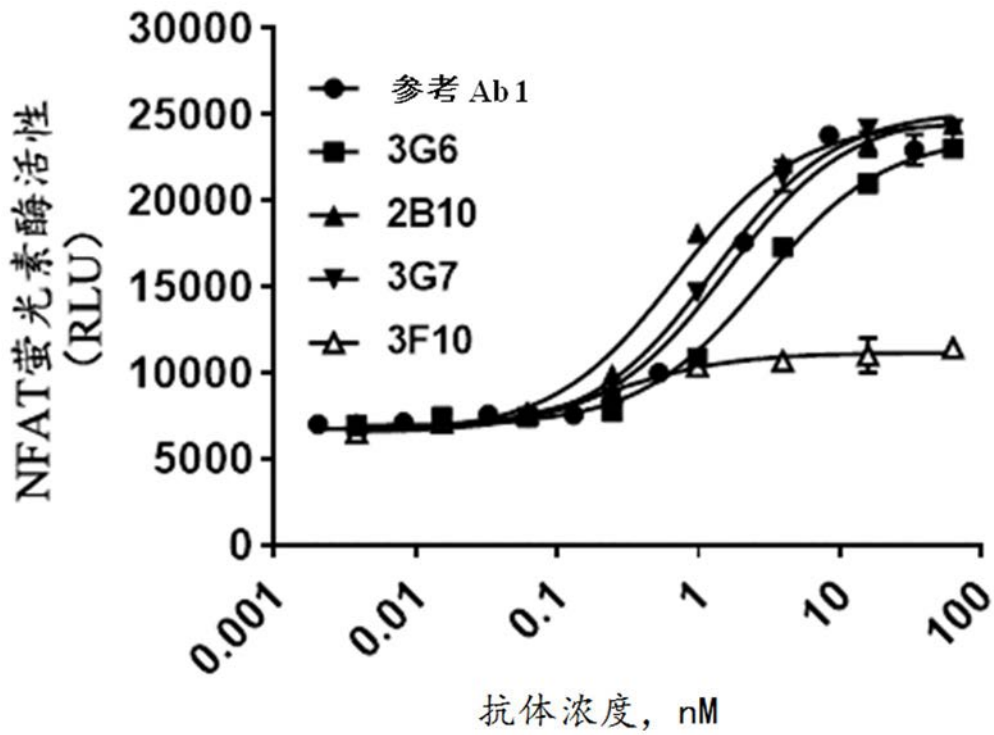


图2B

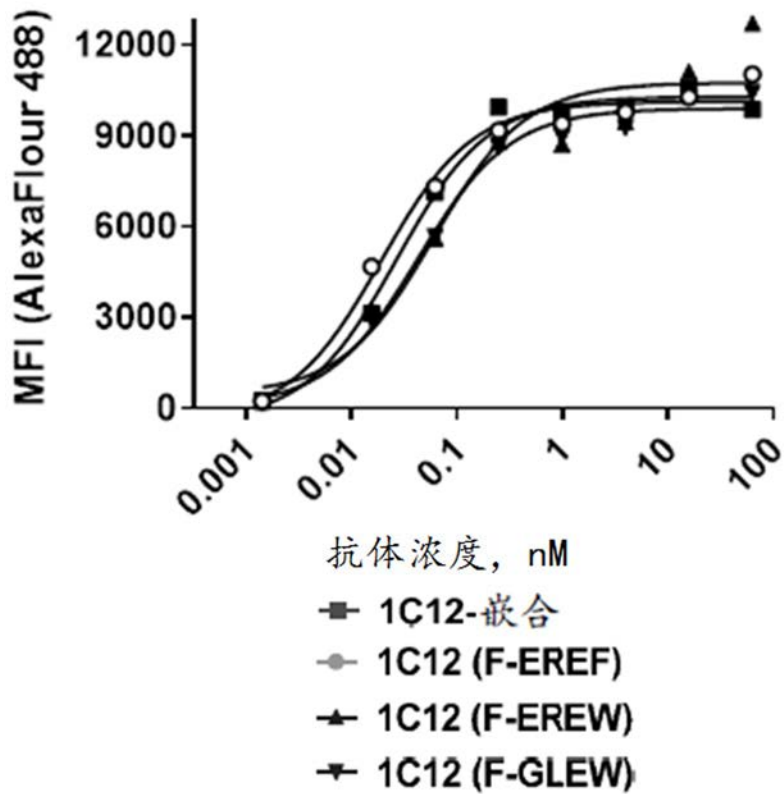


图3A

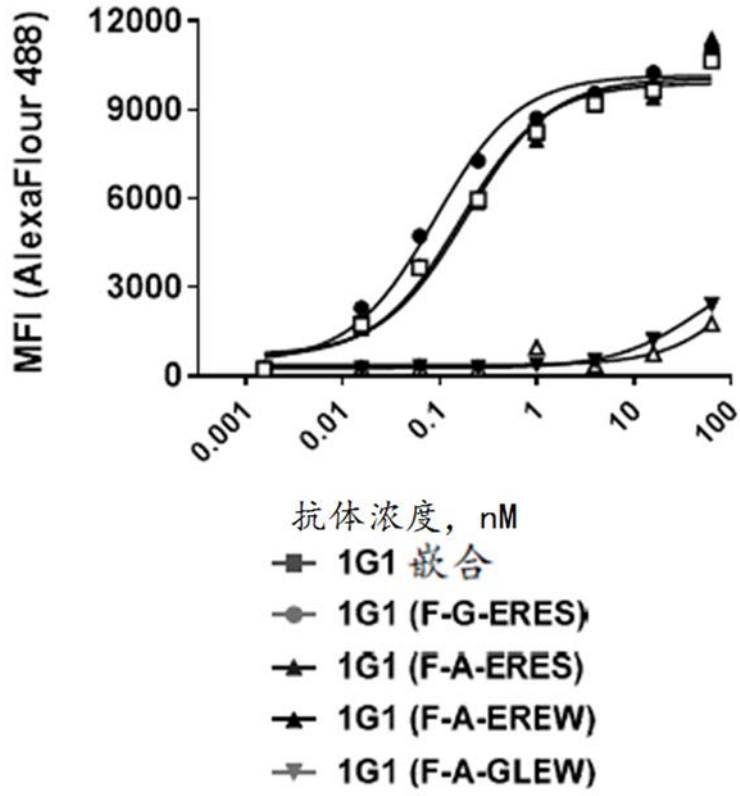


图3B

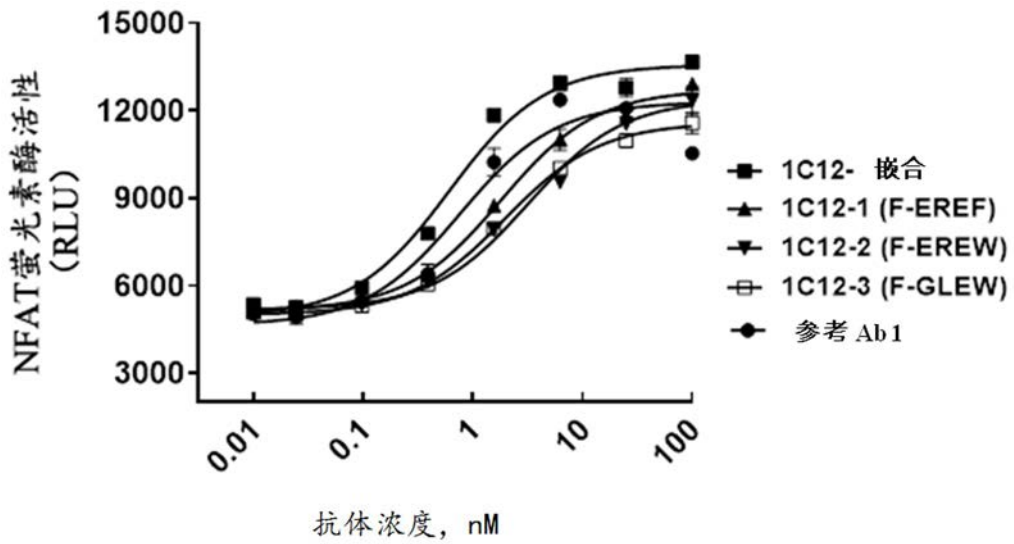


图4A

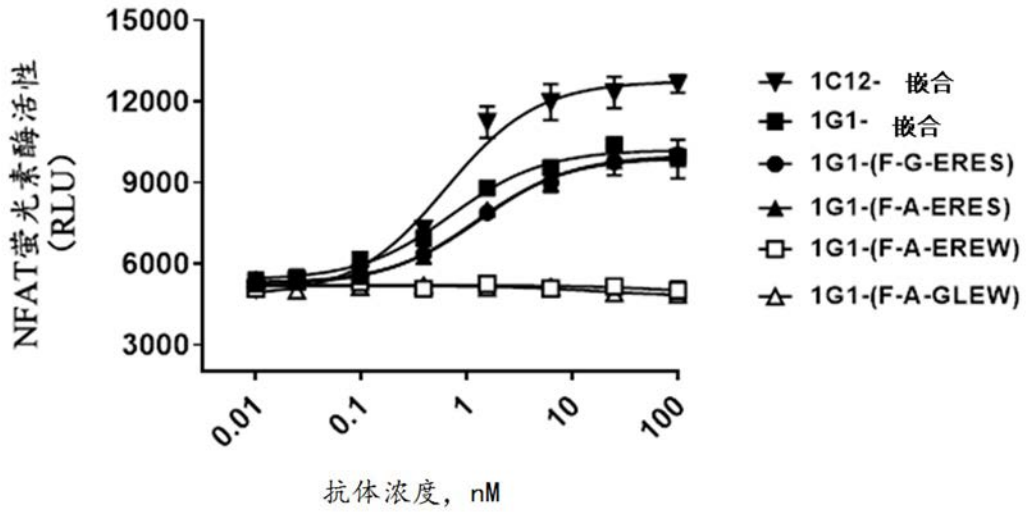


图4B

全细胞结合和阻断ELISA的相关性

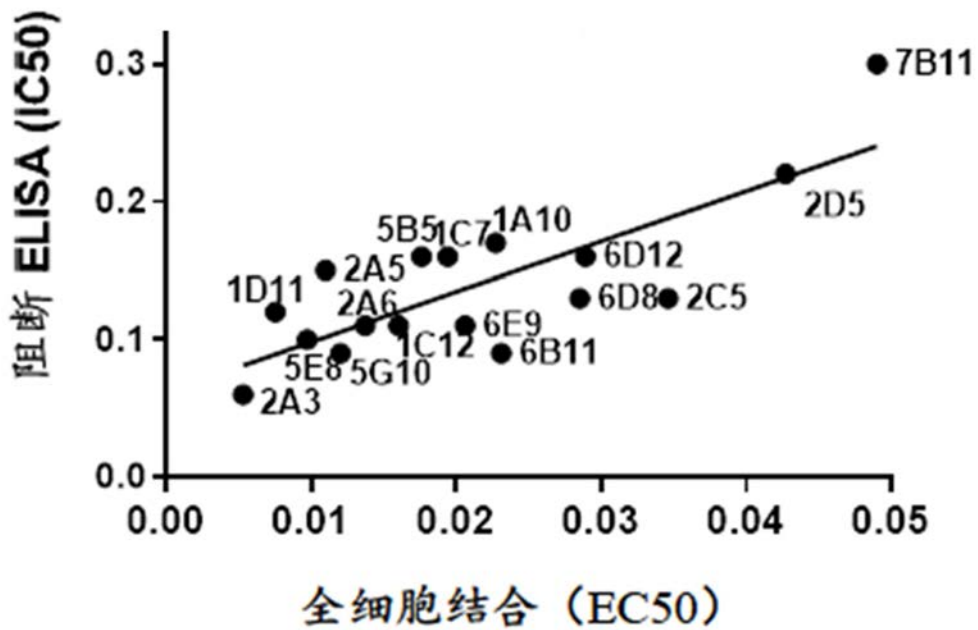


图5

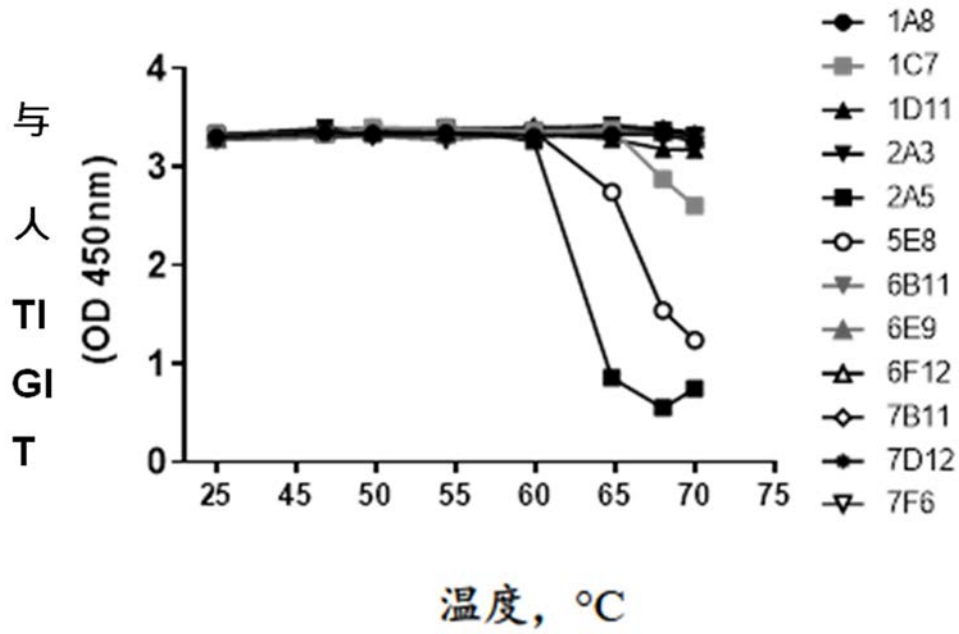


图6A

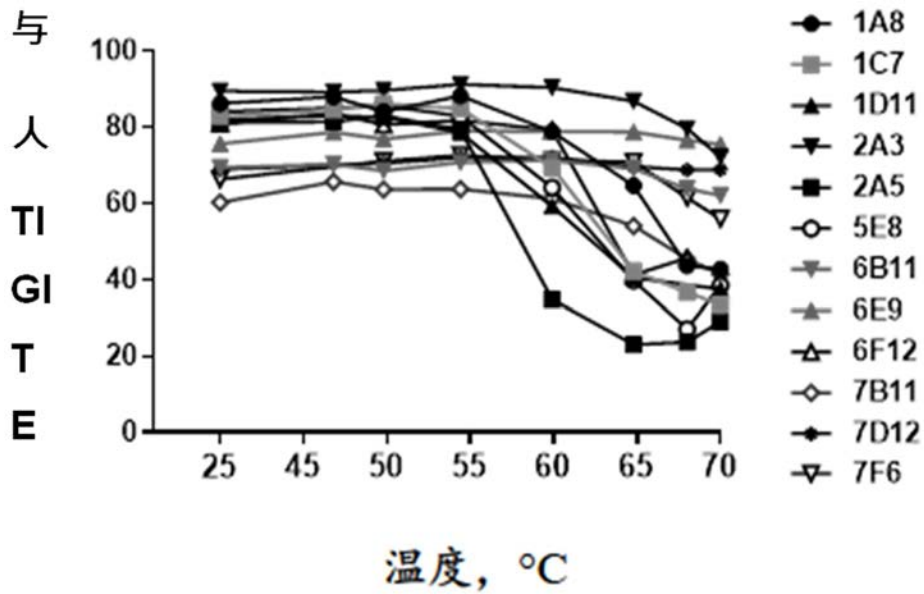


图6B

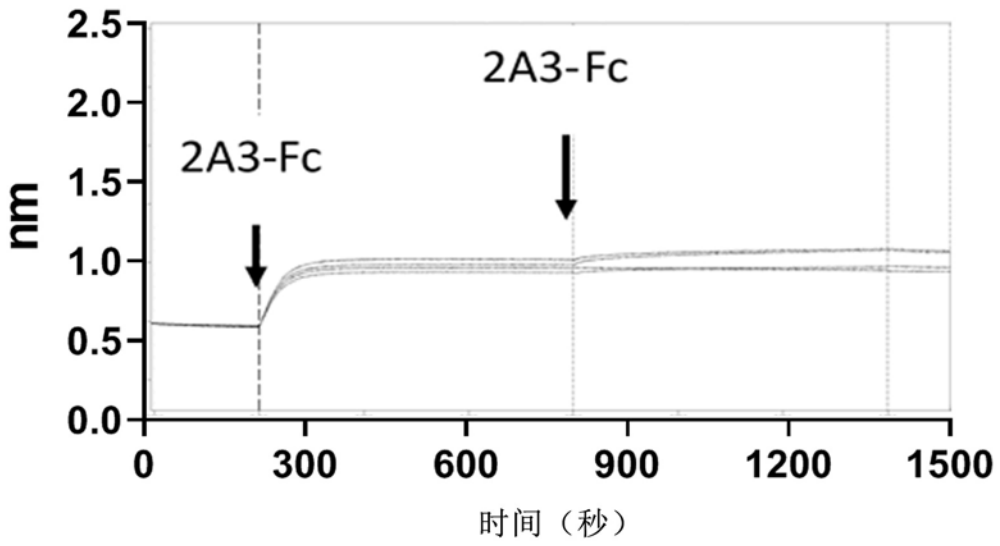


图7A

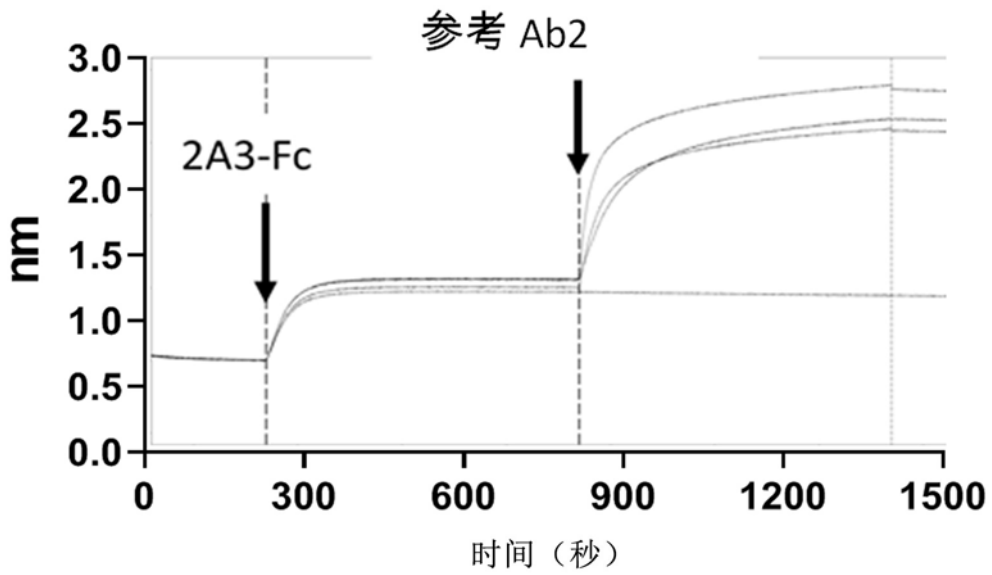


图7B

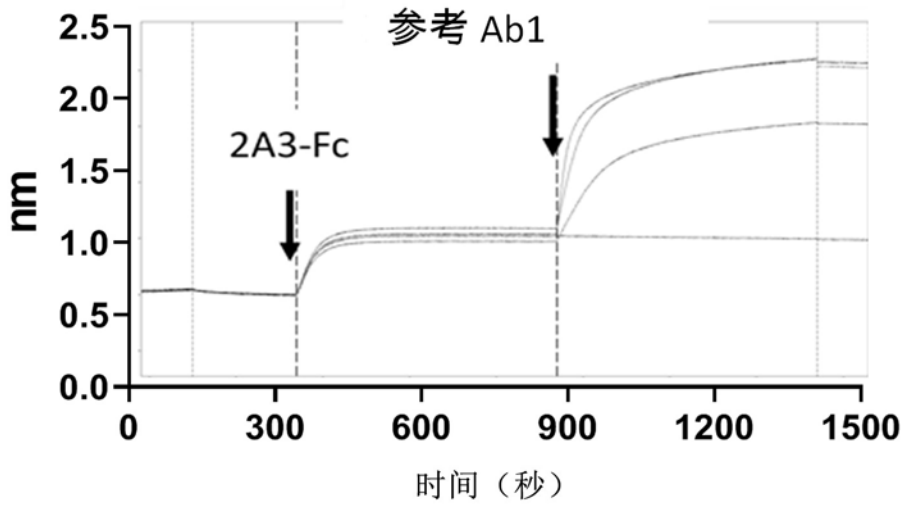


图7C

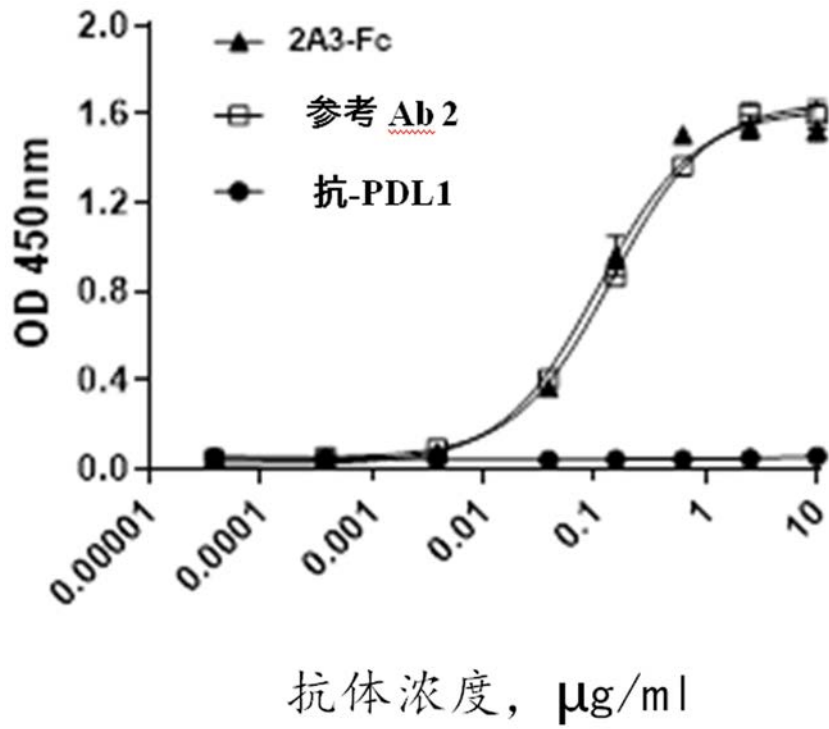


图8A

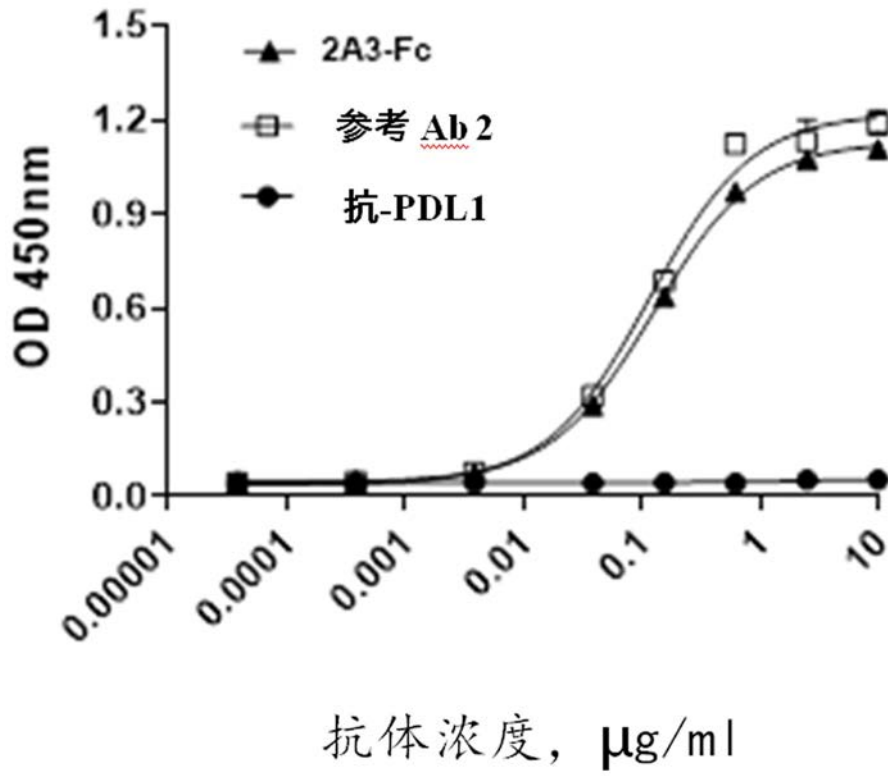


图8B

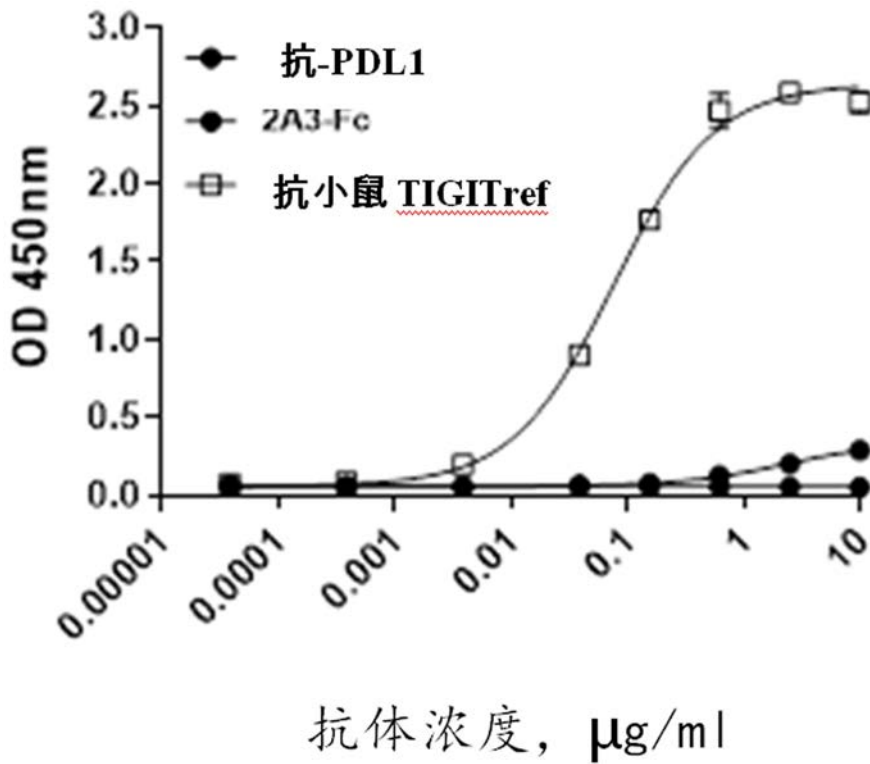


图8C

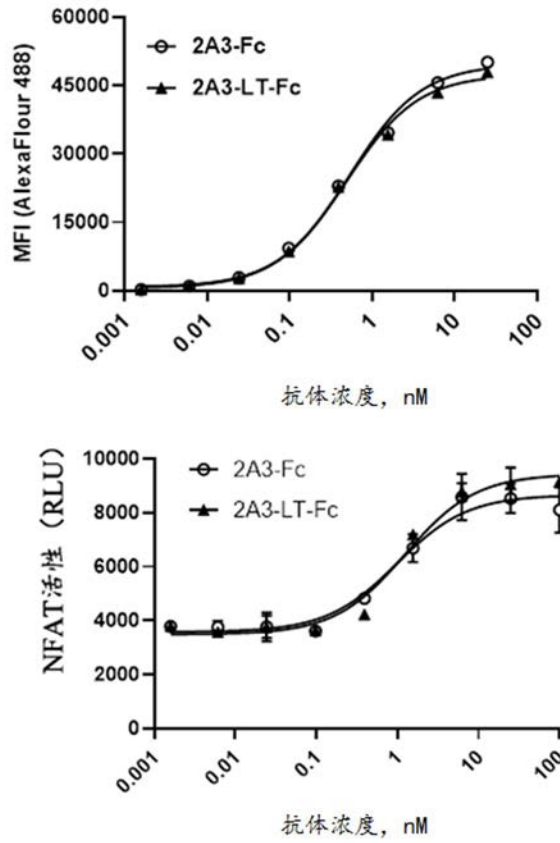


图9

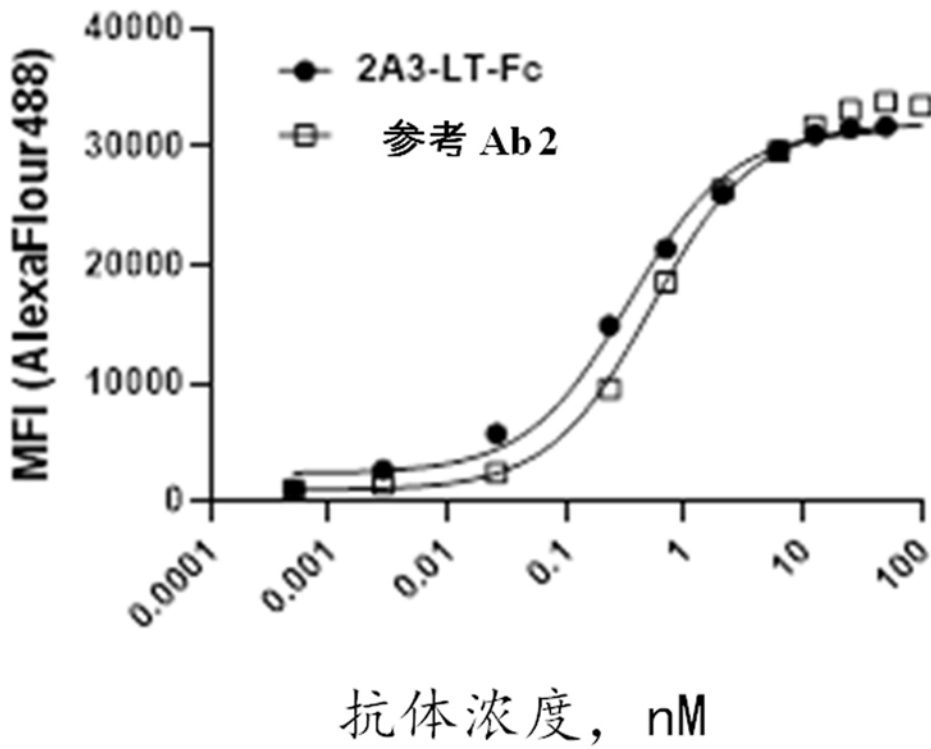


图10A

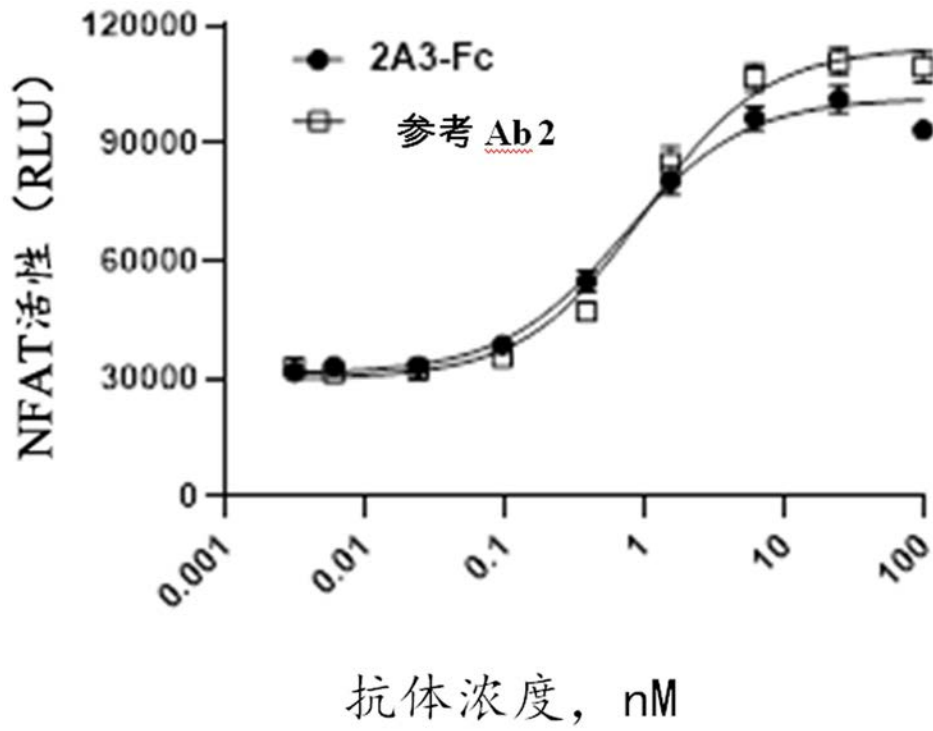


图10B

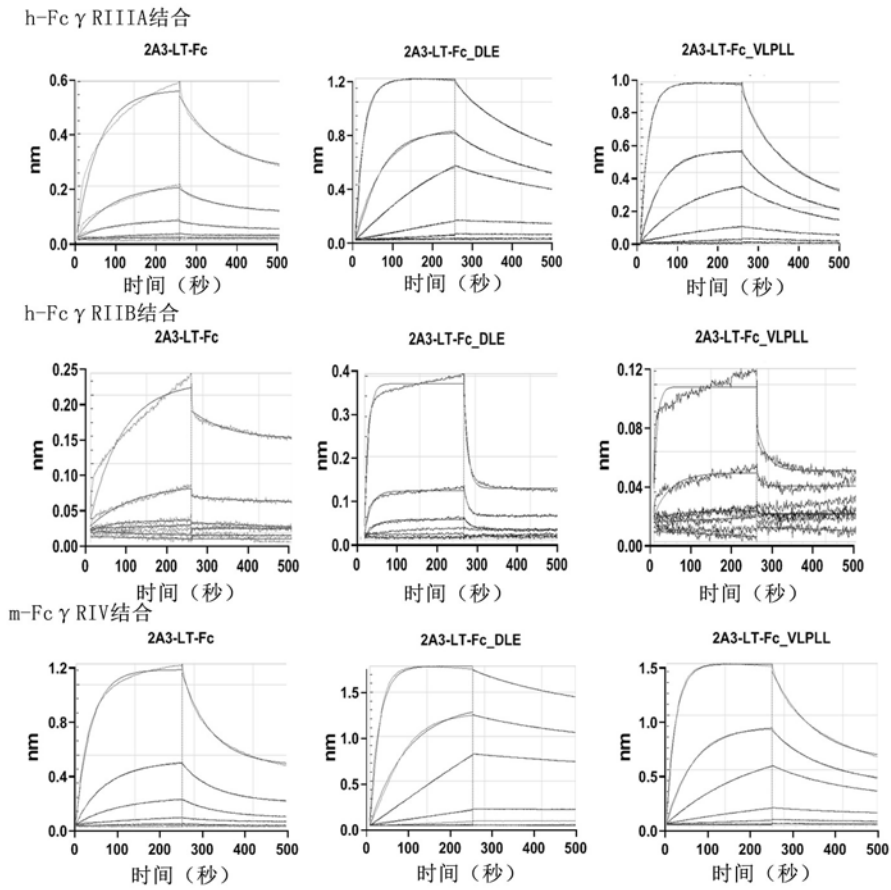


图11

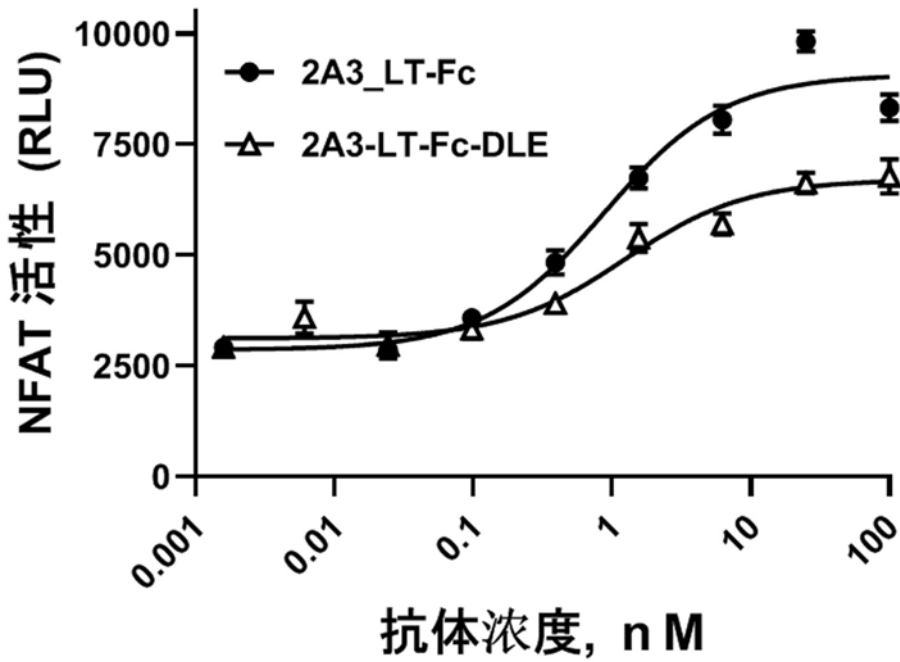


图12A

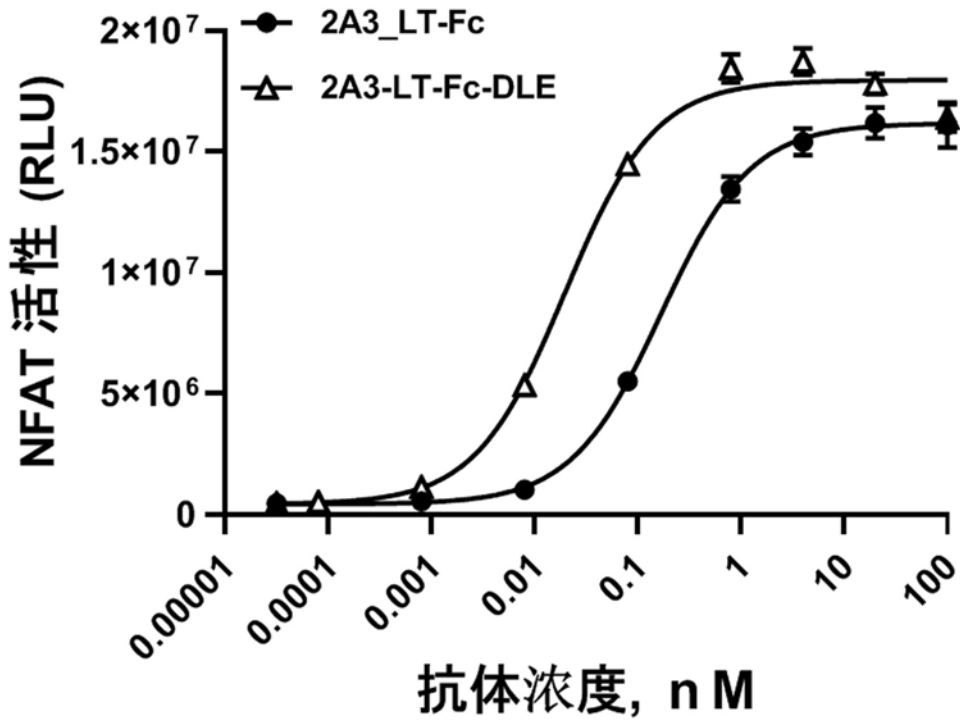


图12B

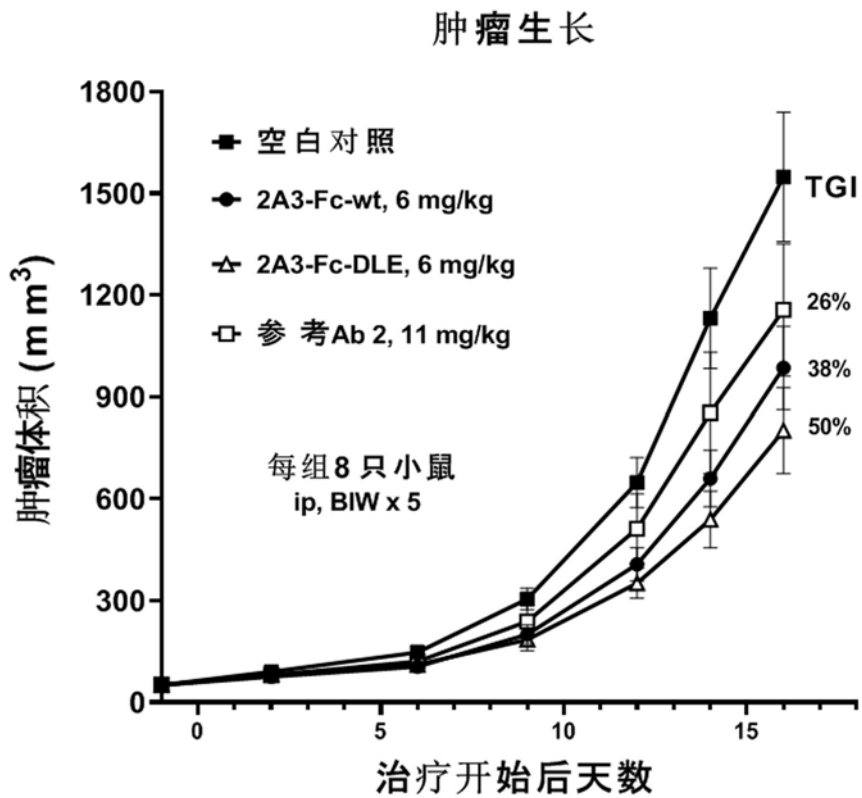


图13A

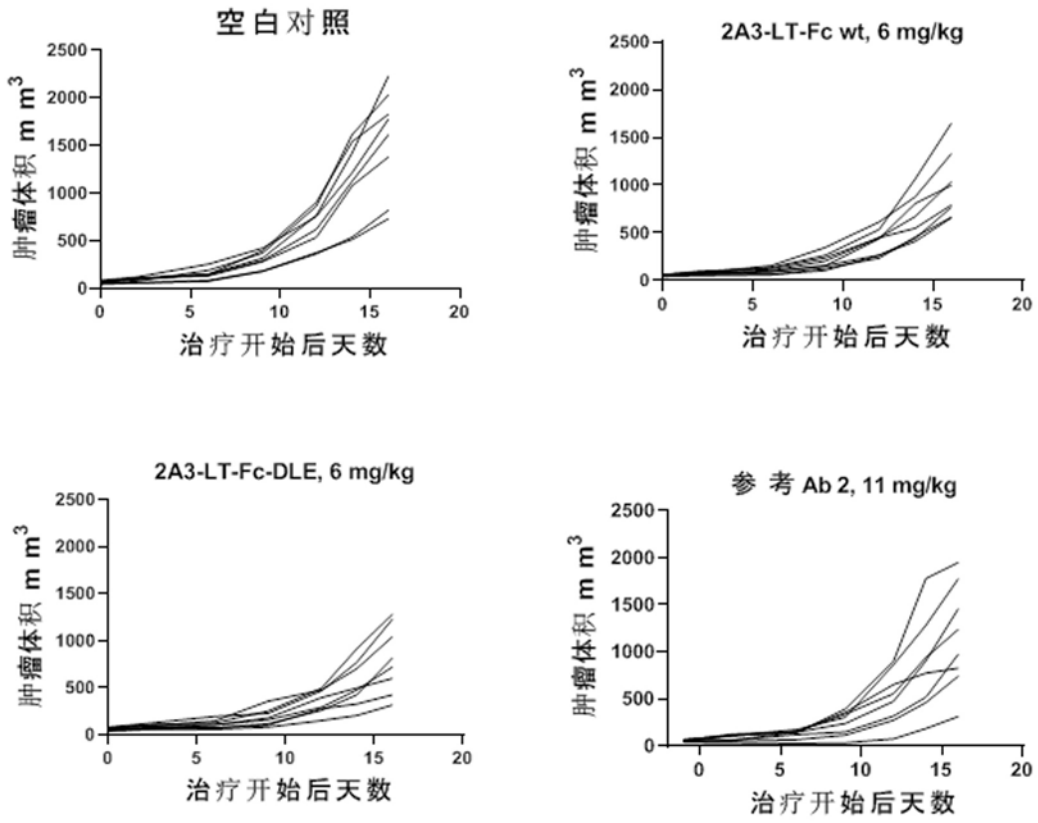


图13B

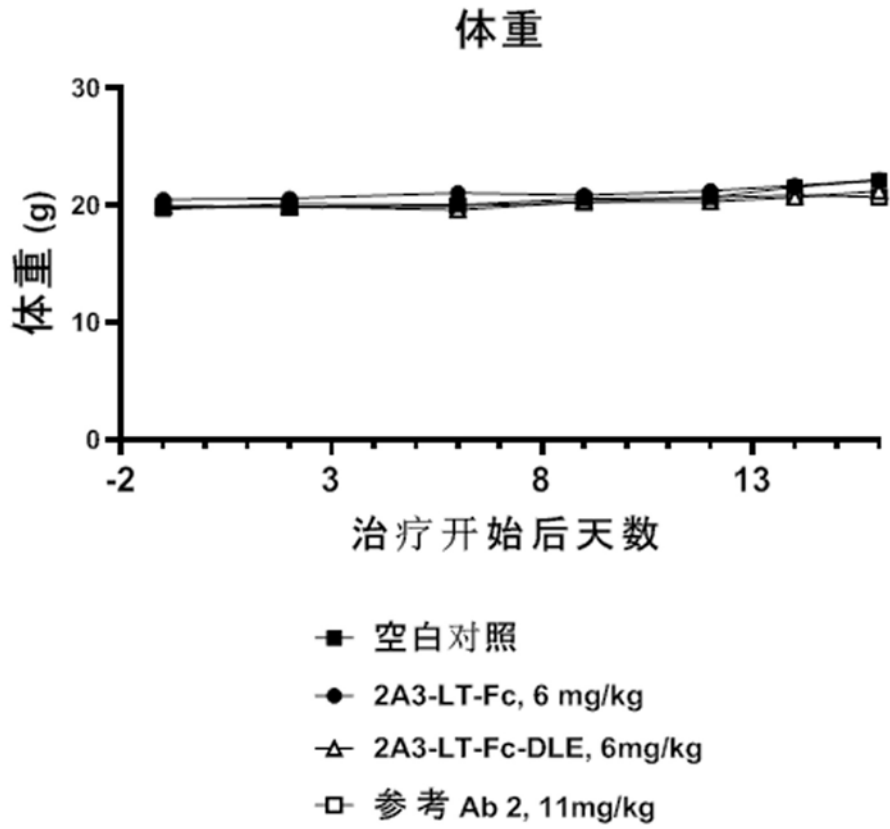


图13C