

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-35138

(P2018-35138A)

(43) 公開日 平成30年3月8日(2018.3.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K</b> 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 N</b> 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N</b> 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
<b>C 1 2 N</b> 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
<b>C 1 2 N</b> 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 38 O L (全 98 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-138861 (P2017-138861)	(71) 出願人	391015708
(22) 出願日	平成29年7月18日 (2017.7.18)		ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン
(62) 分割の表示	特願2016-564332 (P2016-564332)		パニー
原出願日	平成27年12月22日 (2015.12.22)		B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B
(31) 優先権主張番号	62/096, 267		B C O M P A N Y
(32) 優先日	平成26年12月23日 (2014.12.23)		アメリカ合衆国08543ニュージャージー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		州 プリンストン、ルート206アンド
			・プロビンス・ライン・ロード
		(74) 代理人	100100158
			弁理士 鮫島 睦
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(74) 代理人	100156111
			弁理士 山中 伸一郎
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 T I G I Tに対する抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ヒトT I G I T ( I g および I T I M ドメインを有するT細胞免疫受容体) と結合する抗体、又はその抗原結合断片、並びに、癌又は慢性ウイルス感染の治療においてなど、治療適用におけるこれらの抗体又は断片の使用の提供。

【解決手段】ヒトT I G I T との結合について、特定の群から選択される1種又は複数の抗体と競合する、単離された抗体又はその抗原結合断片。治療方法は、P D - 1 / P D - L 1 相互作用などのその他の免疫調節性受容体相互作用の阻害剤との併用療法を含む。さらに、抗体の重鎖及び/又は軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、抗体の重鎖及び/又は軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、ベクターを含む細胞及び細胞から抗体又は断片を発現させることによってそれを作製する方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト T I G I T ( I g および I T I M ドメインを有する T 細胞免疫受容体 ) との結合について、 1 4 B 2 、 1 3 E 6 、 6 F 9 、 1 1 G 1 1 、 1 0 C 9 、 1 6 F 6 、 1 1 C 9 、 2 7 A 9 、 1 0 D 7 、 2 0 G 6 、 2 4 E 8 、 2 4 G 1 、 2 7 F 1 、 1 5 A 6 、 4 E 4 、 1 3 D 1 、 9 B 1 1 、 1 0 B 8 、 2 2 G 2 、 1 9 H 2 、 8 C 8 、 1 7 G 4 、 2 5 E 7 、 2 6 D 8 および 1 6 A 8 からなる群から選択される 1 種または複数の抗体と競合する、単離された抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 2】

交差遮断アッセイにおける競合が競合 E L I S A において選択された抗体のヒト T I G I T ( 配列番号 1 ) との結合を、選択された抗体とおよそ等モル濃度で使用した場合に少なくとも 2 0 % 低減する能力を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体または断片。

## 【請求項 3】

a . h u T I G I T ( 配列番号 1 ) の残基 E 6 0 、 I 1 0 9 、 L 6 5 、 N 7 0 、 F 1 0 7 、 T 1 1 7 、 I 6 8 、 H 7 6 および N 5 8 ( 抗体 2 2 G 2 ) のうち 1 個もしくは複数を含むエピトープ、

b . 残基 G 7 4 、 N 7 0 、 H 7 6 、 L 6 5 、 L 7 3 、 Q 5 6 、 I 6 8 、 H 1 1 1 および P 1 1 4 ( 抗体 1 1 G 1 1 ) のうち 1 個もしくは複数を含むエピトープ、または

c . 残基 H 7 6 、 G 7 4 、 L 6 5 、 N 5 8 、 I 6 8 、 Q 1 3 9 、 G 1 3 5 、 L 7 3 、 F 1 0 7 、 N 7 0 、 E 6 0 、 H 1 3 4 、 A 1 3 2 および I 1 0 9 ( 抗体 1 5 A 6 ) のうち 1 個もしくは複数を含むエピトープ

で、 T I G I T ( I g および I T I M ドメインを有するヒト T 細胞免疫受容体 ) と結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 4】

残基 L 6 5 、 I 6 8 、 N 7 0 および H 7 6 のうち 1 個もしくは複数を含むエピトープで T I G I T と結合する、請求項 3 に記載の単離された抗体または断片。

## 【請求項 5】

a . 配列 N W E Q Q D Q L L A I C N A D L G W H ( 配列番号 3 8 ) および / または F C I Y H T Y P D G T ( 配列番号 3 9 ) ( 抗体 2 2 G 2 ) を含むエピトープ、

b . 配列 Q V N W E Q Q D Q L L A I C N A D L G W H ( 配列番号 4 0 ) および / または H T Y P ( 配列番号 4 1 ) ( 抗体 1 1 G 1 1 ) を含むエピトープ、または

c . 配列 N W E Q Q D Q L L A I C N A D L G W H ( 配列番号 3 8 ) 、 F C I および / または A E H G A R F Q ( 配列番号 4 3 ) ( 抗体 1 5 A 6 ) を含むエピトープ

で T I G I T と結合する、請求項 3 に記載の単離された抗体または断片。

## 【請求項 6】

配列 L L A I C N A D L G W H ( 配列番号 4 4 ) を含むエピトープで T I G I T と結合する、請求項 5 に記載の単離された抗体または断片。

## 【請求項 7】

抗体重鎖可変ドメインがヒト V 領域生殖系列配列 V 4 - 3 9 、 V 4 - 6 1 または V 1 - 6 9 に由来する、 T I G I T ( I g および I T I M ドメインを有するヒト T 細胞免疫受容体 ) と結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 8】

抗体重鎖および軽鎖可変ドメインがヒト重鎖および軽鎖の V 領域の生殖系列配列の組合せ V 4 - 3 9 / V A 2 7 、 V 4 - 6 1 / V L 6 、 V 4 - 3 9 / V L 6 または V 1 - 6 9 / V L 1 5 に由来する、請求項 7 に記載の単離された抗体または断片。

## 【請求項 9】

ヒト T I G I T のヒト P V R / C D 1 5 5 との結合を実質的に阻害する、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体または断片。

## 【請求項 10】

B I A C O R E ( 登録商標 ) S P R 分析によって測定される場合、抗体がヒト T I G I T

10

20

30

40

50

と 2 n M 以下の  $K_D$  で結合する、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体または断片。

【請求項 1 1】

抗体がヒトおよびカニクイザル T I G I T の両方と結合する、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体または断片。

【請求項 1 2】

抗体が米国特許出願第 2 0 0 9 / 0 2 5 8 0 1 3 号の m A b 1 0 A 7 または 1 F 4 ではない、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の単離された抗体または断片。

【請求項 1 3】

米国特許出願第 2 0 0 9 / 0 2 5 8 0 1 3 号の m A b 1 0 A 7 または 1 F 4 と同一の h u T I G I T 上のエピトープと結合せず、さらに、T I G I T との結合について米国特許出願第 2 0 0 9 / 0 2 5 8 0 1 3 号の m A b 1 0 A 7 または 1 F 4 と競合しない、請求項 1 2 に記載の単離された抗体または断片。

10

【請求項 1 4】

i) 配列番号 1 4、2 0、2 6 または 3 2 の配列を含む C D R H 1、

i) 配列番号 1 5、2 1、2 7 または 3 3 の配列を含む C D R H 2 および

i) 配列番号 1 6、2 2、2 8 または 3 4 の配列を含む C D R H 3

を含む a) 重鎖可変ドメインと、

i) 配列番号 1 7、2 3、2 9 または 3 5 の配列を含む C D R L 1、

i) 配列番号 1 8、2 4、3 0 または 3 6 の配列を含む C D R L 2 および

i) 配列番号 1 9、2 5、3 1 または 3 7 の配列を含む C D R L 3

20

を含む b) 軽鎖可変ドメインと

から本質的になる、T I G I T (I g および I T I M ドメインを有するヒト T 細胞免疫受容体) と結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 5】

1 種または複数の重鎖および 1 種または複数の軽鎖を含み、ここで、

a) 重鎖が配列番号 2、3、4、5、7、8、1 0 または 1 2 の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する重鎖可変領域を含み、

a) 軽鎖が配列番号 6、9、1 1 または 1 3 の配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む、請求項 1 4 に記載の単離された抗体または断片。

30

【請求項 1 6】

i) 配列番号 1 4 ~ 1 9、

ii) 配列番号 2 0 ~ 2 5、

iii) 配列番号 2 6 ~ 3 1 および

iv) 配列番号 3 2 ~ 3 7

からなる群から選択される C D R H 1、C D R H 2、C D R H 3、C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 配列を含む重鎖および軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 4 に記載の単離された抗体または断片。

【請求項 1 7】

エフェクター機能が増大したヒト I g G 1 抗体またはその変異体である、請求項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

40

【請求項 1 8】

エフェクター機能が低減または排除されたヒト I g G 1 F c 変異体である、請求項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 1 9】

E U 番号付けによる以下の突然変異：L 2 3 4 A、L 2 3 5 E、G 2 3 7 A、A 3 3 0 S および P 3 3 1 S (配列番号 4 8) を含む、請求項 1 8 に記載の単離された抗体または断片。

【請求項 2 0】

請求項 1 から 1 9 のいずれかに記載の抗体または断片の重鎖および / または軽鎖可変領

50

域をコードする核酸。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 2 3】

抗体または断片の産生を可能にする条件下で請求項 2 2 に記載の宿主細胞を培養することと、細胞から抗体を精製することを含む、抗 T I G I T 抗体またはその抗原結合断片を産生する方法。

【請求項 2 4】

それを必要とする対象において抗原特異的 T 細胞応答を増強する方法であって、抗原特異的 T 細胞応答が増強されるように、T 細胞を、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の抗体または断片と接触させることを含む、方法。

【請求項 2 5】

対象が腫瘍または慢性ウイルス感染を有し、腫瘍またはウイルス感染に対する免疫応答が増強される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

それを必要とする対象の腫瘍において調節 T 細胞を低減または枯渇させる方法であって、腫瘍における T 調節細胞の数が低減するように、有効量の請求項 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の抗体または断片を投与することを含む、方法。

【請求項 2 7】

癌を治療する方法であって、それを必要とする対象に、治療上有効な量の請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の抗体または断片を投与することを含む、方法。

【請求項 2 8】

癌が膀胱癌、乳癌、子宮 / 子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、食道癌、胃腸癌、膵臓癌、結腸直腸癌、結腸癌、腎臓癌、頭頸部癌、肺癌、胃癌、生殖細胞癌、骨癌、肝臓癌、甲状腺癌、皮膚癌、中枢神経系の新生物、リンパ腫、白血病、骨髓腫、肉腫およびウイルス関連癌からなる群から選択される、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

癌が転移性癌、難治性癌または再発性癌である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

抗 P D - 1 抗体、抗 L A G - 3 抗体、抗 C T L A - 4 抗体または抗 P D - L 1 抗体からなる群から選択される 1 種または複数のさらなる治療薬を投与することをさらに含む、請求項 2 4 から 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

さらなる治療薬が抗 P D - 1 抗体である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

さらなる治療薬が抗 P D - L 1 抗体である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

第 1 の抗原結合ドメインと、第 2 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、

a) 第 1 の抗原結合ドメインが請求項 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の抗 h u T I G I T 抗体に由来し、

b) 第 2 の抗原結合ドメインが抗 P D - 1 抗体、抗 L A G - 3 抗体、抗 C T L A - 4 抗体および抗 P D - L 1 抗体からなる群から選択される抗体に由来する、二重特異性抗体。

【請求項 3 4】

第 2 の結合ドメインが抗 P D - 1 抗体に由来する、請求項 3 3 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3 5】

第 2 の結合ドメインが抗 P D - L 1 抗体に由来する、請求項 3 3 に記載の二重特異性抗

10

20

30

40

50

体。

【請求項 36】

サンプル中の T I G I T の存在を検出する方法であって、抗体またはその抗原結合断片と T I G I T との複合体の形成を可能にする条件下で、サンプルを、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片と接触させることと、複合体の形成を検出することを含む、方法。

【請求項 37】

腫瘍が以下：

a) 高レベルの浸潤 T I G I T<sup>+</sup> T 細胞および / または N K 細胞、

b) 腫瘍細胞または腫瘍浸潤骨髓系細胞での P V R および / またはネクチン - 2 の発現の上昇および

c) フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*) 感染

のうち 1 つまたは複数を含む場合かつその場合にのみ、アンタゴニスト抗 T I G I T 抗体またはその抗原結合断片を、腫瘍を有する対象に投与することを含む、癌を治療する方法。

【請求項 38】

腫瘍が以下：

a) 高レベルの浸潤 T I G I T<sup>+</sup> T 細胞および / または N K 細胞、

b) 腫瘍細胞または腫瘍浸潤骨髓系細胞での P V R および / またはネクチン - 2 の発現の上昇、および

c) フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*) 感染

のうち 1 つまたは複数を含む場合かつその場合にのみ、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載のアンタゴニスト抗 T I G I T 抗体またはその抗原結合断片を、腫瘍を有する対象に投与することを含む、癌を治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

T I G I T (I g および I T I M ドメインを有する T 細胞免疫受容体) は、W U C A M、V s t m 3 または V s i g 9 としても知られる共抑制受容体タンパク質である。T I G I T は、T 細胞上に特異的に発現されるタンパク質のゲノム検索において発見され、免疫グロブリン可変ドメイン、膜貫通ドメインおよび免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ (I T I M) を有し、P V R タンパク質ファミリーのシグネチャー配列要素を含有する。ポリオウイルス受容体 (P V R C D 1 5 5) と、およびネクチン 2 (C D 1 1 2) と相互作用するとわかっている。例えば、Stengel et al. (2012) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 19:5399; W O 2 0 0 6 / 1 2 4 6 6 7; W O 2 0 0 9 / 1 2 6 6 8 8 を参照のこと。P V R は、同時活性化受容体 D N A M - 1 (C D 2 2 6) と相互作用して腫瘍死滅を増強し得るが、高親和性 T I G I T / P V R 相互作用は、このような死滅を阻害し、同様に P V R を発現する正常 (自己) 細胞死滅を防ぐよう作用し得る。Stanietzsky et al. (2009) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 106:17858。この阻害性相互作用の優位は、抗自己免疫反応の抑制において重要であり得るが、腫瘍に関連しては、腫瘍根絶を抑制する。同著。

【背景技術】

【0002】

T I G I T は、成熟した免疫制御性樹状細胞の生成を促進することによって T 細胞活性化を抑制する。Yu et al. (2009) Nat. Immunol. 10:48。T I G I T およびその他のこのような共抑制分子 (例えば、C T L A - 4、P D - 1、L a g 3 および B T L A) は、腫瘍細胞による免疫監視の回避において役割を果たし得る。実験によって、P V R / C D 1 5 5 は、黒色腫細胞 (Inozume et al. (2014) J. Invest. Dermatol. 134:S121 - Abstract 693) および種々のその他の腫瘍で過剰発現されると示されている。T I G I T / P V R 相互作用は、T および N K 細胞の抗腫瘍反応を阻害することによって免疫媒介性根絶からこのような腫瘍細胞を遮蔽し得る可能性がある。Stanietzsky et al. (2009) Proc. Nat'l

10

20

30

40

50

Acad. Sci. (USA) 106:17858およびLozano et al. (2012) J. Immunol. 188:3869。その他の実験によって、 $T_h1$ および $T_h17$ 反応を選択的に抑制する調節T細胞( $T_{reg}$ )の $TIGIT^+$ サブセットが同定され(Joller et al. (2014) Immunity 40:569)、これは、抗 $TIGIT$ 抗体が抗腫瘍免疫応答を増強し得る代替機序を示唆する。

【0003】

$TIGIT$ は、 $CTLA-4$ 、 $PD-1$ および $BTLA$ などのその他の共抑制反応と同様に免疫応答を「止める」よう作用し得る。同著。この治療的アプローチを検証する、 $CTLA-4$ (イピリムマブ)および $PD-1$ (ニボルマブ、ペンブロリズマブ)を標的とする抗体が、ヒト癌の治療のために承認されている。ヒト $TIGIT$ と結合する抗体もまた、癌の治療に使用してもよい。例えば、WO2006/124667を参照のこと。マウスモデルでは、 $PD-L1$ および $TIGIT$ 両方の抗体遮断は、 $CD8^+$ T細胞媒介性腫瘍拒絶の相乗的増強につながる。Grogan et al. (2014) J. Immunol. 192(1) Suppl. 203.15; Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26:1-15。黒色腫の動物モデルにおいて同様の結果が得られている。Inozume et al. (2014) J. Invest. Dermatol. 134:S121 - Abstract 693。いくつかの実験によって、 $TIGIT$ 遮断は、 $PVR/CD155$ との結合について $TIGIT$ と競合する同時活性化受容体 $DNAM-1/CD226$ の存在下でのみ、抗腫瘍 $CD8^+$ T細胞反応を増強するのに有効であることが示唆されている。Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26:1-15。

10

【0004】

最近の実験によって、 $Fap2$ タンパク質を発現する腫瘍内細菌が、 $TIGIT$ との結合によってNK細胞媒介性腫瘍死滅を阻害し得ると実証されており(Gur et al. (2015) Immunity 42:344)、これは、このような細菌を排除すること、 $TIGIT$ の $Fap2$ との相互作用を遮断することまたは $TIGIT$ の活性を遮断することは、全般的に、癌、例えば、結腸直腸癌の治療において有用であり得ることを示唆する。Hampton (2015) JAMA 313:1305。

20

【0005】

癌および慢性ウイルス感染を治療する改善された方法ならびに方法において使用するための治療用モノクローナル抗体などの医薬に対する必要性が存在する。このような改善された治療方法において使用するための医薬は、 $TIGIT$ と特異的に結合し、抗腫瘍もしくは抗ウイルス性免疫応答の $TIGIT$ 媒介性抑制を逆転させるかもしくは部分的に逆転させる抗体または抗体断片を含み得る。

30

【発明の概要】

【0006】

本発明は、 $huTIGIT$ と結合する抗体またはその抗原結合断片を含む、癌および慢性ウイルス感染の治療の改善された医薬および方法を提供する。 $huTIGIT$ と特異的に結合し、 $huTIGIT$ との高親和性の特異的な結合、サル $TIGIT$ (例えば、カニクイザル $TIGIT$ )との結合、 $TIGIT$ の $PVR$ および/またはネクチン-2との結合を遮断する能力、 $TIGIT$ の $DNAM$ との相互作用を遮断する能力またはこれらの特性の任意の組合せなどの望ましい機能的特性を有する、モノクローナル抗体、特に、ヒトモノクローナル抗体などの単離された抗体が、本明細書において提供される。

40

【0007】

本発明は、 $TIGIT$ 媒介性シグナル伝達が抗腫瘍免疫応答を抑制する癌、同時活性化受容体 $DNAM-1/CD226$ との $TIGIT$ 相互作用が抗腫瘍免疫応答を抑制する腫瘍、 $TIGIT$ 発現性調節T細胞が抗腫瘍免疫応答を抑制する腫瘍または $TIGIT$ が、そうでなければ抗腫瘍免疫応答を阻害する腫瘍を含めた、癌を治療する改善された方法および方法において使用するための治療用抗体をさらに提供する。本発明はまた、 $TIGIT$ が抗ウイルス性免疫応答を抑制する慢性ウイルス感染の治療において使用するための方法および治療用抗体を提供する。

【0008】

別の態様では、本発明は、 $huTIGIT$ との結合について本明細書に開示される重鎖

50

および軽鎖可変ドメイン配列を有する抗体と競合し、および／またはh u T I G I Tとの結合から本明細書に開示される重鎖および軽鎖可変ドメインを有する抗体を交差遮断する抗体に関する。

【0009】

特定の実施形態では、本発明の抗T I G I T抗体またはその抗原結合断片は、抗腫瘍免疫応答、例えば、抗原特異的T細胞応答を増強する。その他の実施形態では、本発明の抗T I G I T抗体またはその抗原結合断片は、T I G I T媒介性阻害シグナル伝達を遮断し、NK細胞のP V R / D N A M同時刺激を可能にして、NK媒介性抗腫瘍免疫応答死滅を増大する。さらに別の実施形態では、本発明の抗T I G I T抗体またはその抗原結合断片は、そうでなければ抗腫瘍免疫応答を抑制するであろう、腫瘍内調節性T細胞の集団を枯渇させる。さらに別の実施形態では、I g G 1としてフォーマットされた本発明の抗T I G I T抗体は、C D 8 <sup>+</sup> 疲弊T細胞およびT<sub>r e g</sub>を枯渇させ、新鮮な疲弊していないC D 8 <sup>+</sup> T細胞の流入を可能にする。その他の実施形態では、本発明の抗T I G I T抗体またはその抗原結合断片は、機序は必ずしも相互排他的ではないので、上記で言及した機序の1種または複数によって作用する。

10

【0010】

特定の実施形態では、本発明の抗T I G I T抗体またはその抗原結合断片は、例えば、T I G I T発現細胞の抗腫瘍活性を増強することに頼る実施形態において、活性化F c 受容体(F c R)と結合しない。代替実施形態では、本発明の抗T I G I T抗体またはその抗原結合断片は、例えば、疲弊C D 8 <sup>+</sup> T細胞またはT<sub>r e g</sub>などのT I G I T発現細胞の死滅に頼る実施形態において、1種または複数の活性化F c Rと結合する。

20

【0011】

本発明はまた、h u T I G I Tと特異的に結合し、それぞれ、配列番号14、15および16を含む重鎖C D R H 1、C D R H 2およびC D R H 3配列ならびに／またはそれぞれ、配列番号17、18および19を含む軽鎖C D R L 1、C D R L 2およびC D R L 3配列を含む、単離されたモノクローナル抗体(15A6)またはその抗原結合断片を提供する。

【0012】

本発明はまた、h u T I G I Tと特異的に結合し、それぞれ、配列番号20、21および22を含む重鎖C D R H 1、C D R H 2およびC D R H 3配列ならびに／またはそれぞれ、配列番号23、24および25を含む軽鎖C D R L 1、C D R L 2およびC D R L 3配列を含む単離されたモノクローナル抗体(22G2)またはその抗原結合断片を提供する。

30

【0013】

本発明は、h u T I G I Tと特異的に結合し、それぞれ、配列番号26、27および28を含む重鎖C D R H 1、C D R H 2およびC D R H 3ならびに／またはそれぞれ、配列番号29、30および31を含む軽鎖C D R L 1、C D R L 2およびC D R L 3配列を含む、単離されたモノクローナル抗体(11G11)またはその抗原結合断片をさらに提供する。

【0014】

本発明は、h u T I G I Tと特異的に結合し、それぞれ、配列番号32、33および34を含む重鎖C D R H 1、C D R H 2およびC D R H 3配列ならびに／またはそれぞれ、配列番号35、36および37を含む軽鎖C D R L 1、C D R L 2およびC D R L 3を含む、単離されたモノクローナル抗体(10D7)またはその抗原結合断片をなおさらに提供する。

40

【0015】

本発明はまた、h u T I G I Tと特異的に結合し、配列番号2(または3、4、5)および6、配列番号7(または8)および9、配列番号10および11ならびに配列番号12および13に開示される重鎖可変鎖および軽鎖可変鎖配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片も提供する。

50

## 【0016】

本発明は、h u T I G I Tと結合し、重鎖および軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供し、ここで、重鎖可変領域は、配列番号2、3、4、5、7、8、10および12からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、95%または99%同一であるアミノ酸配列を含む。

## 【0017】

本発明はまた、h u T I G I Tと結合し、重鎖および軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片も提供し、ここで、軽鎖可変領域は、配列番号6、9、11および13からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、95%または99%同一であるアミノ酸配列を含む。

10

## 【0018】

特定の実施形態では、本発明の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、(a)15A6、22G2、11G11および/または10D7と同一のh u T I G I T上のエピトープと結合し、ならびに/または(b)例えば、F A C SもしくはE L I S Aによって測定されるような、15A6、22G2、11G11および/または10D7のh u T I G I Tとの結合を阻害する。

## 【0019】

特定の実施形態では、本発明の抗h u T I G I T抗体またはその抗原結合断片は、h u T I G I T (配列番号1)の残基E60、I109、L65、N70、F107、T117、I68、H76およびN58(抗体22G2)のうち1個もしくは複数を含むか、もしくははからなるエピトープと、残基G74、N70、H76、L65、L73、Q56、I68、H111およびP114(抗体11G11)のうち1個もしくは複数を含むか、もしくははからなるエピトープで、または残基H76、G74、L65、N58、I68、Q139、G135、L73、F107、N70、E60、H134、A132およびI109(抗体15A6)のうち1個もしくは複数を含むか、もしくははからなるエピトープで結合する。

20

## 【0020】

あるいは、本発明の抗h u T I G I T抗体またはその抗原結合断片は、N W E Q Q D Q L L A I C N A D L G W H (配列番号38)およびF C I Y H T Y P D G T (配列番号39)(抗体22G2)からなる群から、またはQ V N W E Q Q D Q L L A I C N A D L G W H (配列番号40)およびH T Y P (配列番号41)(抗体11G11)からなる群から、またはN W E Q Q D Q L L A I C N A D L G W H (配列番号38)、F C IおよびA E H G A R F Q (配列番号43)(抗体15A6)からなる群から選択される1種または複数の配列を含むか、またははからなるエピトープで結合する。

30

## 【0021】

なおさらなる実施形態では、本発明の抗T I G I T抗体またはその抗原結合断片は、残基L65、I68、N70およびH76のうち1種または複数を含むかまたははからなるh u T I G I T (配列番号1)上のコアエピトープと、および/またはL L A I C N A D L G W H (配列番号44)を含むかもしくははからなるエピトープで結合する。

## 【0022】

いくつかの実施形態では、本発明の抗h u T I G I T抗体またはその抗原結合断片はまた、カニクイザルT I G I Tと結合する。

40

## 【0023】

種々の実施形態では、本発明の抗T I G I T抗体またはその抗原結合断片は、ヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4抗体またはその変異体である。それだけには限らないが、「疲弊した」腫瘍特異的T細胞においてT I G I Tシグナル伝達を遮断するかもしくはNK細胞に対する阻害シグナルを遮断してD N A M - 1 / P V R媒介性同時刺激を可能にする方法またはD N A M - 1 / C D 2 2 6とのT I G I T相互作用を遮断して、D N A M - 1ホモ二量体化を損なう方法を含めた特定の実施形態では、抗T I G I T抗体またはその抗原結合断片は、エフェクターレスまたはほとんどエフェクターレスのF cを

50



含む。このようなFc領域として、例えば、ヒトIgG2もしくはIgG4、または以下の突然変異：L234A、L235E、G237A、A330SおよびP331S(EU番号付け)のうち1つもしくは複数を有するヒトIgG1のエフェクターレス変異体、例えば、列挙された突然変異のうち5つすべてを含むIgG1.1f(配列番号48)が挙げられる。

#### 【0024】

それだけには限らないが、TIGIT<sup>+</sup>調節T細胞を枯渇させる方法を含めた代替実施形態では、抗TIGIT抗体またはその抗原結合断片は、ヒトIgG1などの活性化FcR(FcRI、FcRIIaまたはFcRIIIa)と選択的に結合するFcまたは野生型IgG1Fcに対して増強された、活性化FcRとの結合を有する配列変異体を含む。Tregの枯渇を駆動する本発明の抗TIGIT抗体のIgG1型の使用を含む実施形態では、腫瘍微小環境への効果を局在化して、末梢組織における活性によって引き起こされる副作用の可能性を最小にするために、腫瘍内注射を適宜使用してもよい。

10

#### 【0025】

特定の実施形態では、本発明の抗TIGIT抗体のCDR領域またはその抗原結合断片中のメチオニン残基(例えば、10D7のCDRH3中のM115、配列番号34)が、酸化を受けないアミノ酸残基と置換される。

#### 【0026】

特定の実施形態では、15A6、22G2、11G11または10D7と同一エピトープと結合について競合し、交差遮断するかまたは結合する抗huTIGIT抗体またはその抗原結合断片は、ヒトまたはヒト化抗体である。

20

#### 【0027】

いくつかの実施形態では、本発明の抗huTIGIT抗体は、米国特許出願公開第2009/0258013号に記載される抗体ではないか、またはそれと同一のエピトープと結合しない、例えば、それらは、抗huTIGIT mAb 10A7または1F4と同一のエピトープと結合しない。また、Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26:1; Yu et al. (2009) Nat. Immunol. 10:48も参照のこと。

#### 【0028】

その他の実施形態では、抗huTIGIT抗体は、重鎖VドメインV4-39、V4-61またはV1-69を含めた、本明細書に開示される抗体と同一のヒトVドメイン生殖系列配列に由来する可変ドメインを含む。より具体的な実施形態では、抗huTIGIT抗体は、V4-39/VA27(15A6)、V4-61/VL6(22G2)、V4-39/VL6(11G11)およびV1-69/VL15(10D7)などの本明細書に開示される抗体と同一のヒト重鎖および軽鎖Vドメイン生殖系列配列に由来する重鎖および軽鎖可変ドメインを含む。

30

#### 【0029】

種々の実施形態では、本発明の抗huTIGIT抗体は、10nM、5nM、2nM、1nM、300pMまたは100pM未満のK<sub>D</sub>でhuTIGITと結合する。その他の実施形態では、本発明の抗huTIGIT抗体は、2nMから100pMの間のK<sub>D</sub>でhuTIGITと結合する。

40

#### 【0030】

その他の実施形態では、本発明の抗huTIGIT抗体は、CDRH1(配列番号14、20、26および32)、CDRH2(配列番号15、21、27および33)、CDRH3(配列番号16、22、28および34)、CDRL1(配列番号17、23、29および35)、CDRL2(配列番号18、24、30および36)およびCDRL3(配列番号19、25、31および37)などの抗体15A6、22G2、11G11および10D7のCDRのいくつかの組合せから本質的になる、または含む。その他の実施形態では、抗体は、抗体15A6、22G2、11G11および10D7のCDR配列の別個の特定の組合せから本質的になる、または含む。

#### 【0031】

50

さらなる実施形態では、本発明の抗 h u T I G I T 抗体は、抗体 1 5 A 6 (配列番号 2 ~ 5 および 6)、2 2 G 2 (配列番号 7 ~ 8 および 9)、1 1 G 1 1 (配列番号 1 0 および 1 1) および 1 0 D 7 (配列番号 1 2 および 1 3) の重鎖および / もしくは軽鎖可変ドメインまたはこれらの開示された配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % および 9 5 % 配列同一性を共有する配列から本質的になるかまたは含む。

【 0 0 3 2 】

なおさらなる実施形態では、本発明の抗 h u T I G I T 抗体は、抗体 1 5 A 6 (配列番号 2 ~ 5 および 6)、2 2 G 2 (配列番号 7 ~ 8 および 9)、1 1 G 1 1 (配列番号 1 0 および 1 1) および 1 0 D 7 (配列番号 1 2 および 1 3) の可変ドメイン配列を含む重鎖および / もしくは軽鎖またはこれらの開示された配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % および 9 5 % 配列同一性を共有する配列から本質的になるかまたは含む。

10

【 0 0 3 3 】

その他の実施形態では、本発明の抗体の抗原結合ドメインは、それだけには限らないが、P D - 1、C T L A - 4 または L A G 3 を含む、異なる免疫調節性受容体と特異的に結合する抗原結合ドメインをさらに含む二重特異性分子中に存在する。

【 0 0 3 4 】

本発明は、本発明の抗 h u T I G I T 抗体またはその抗原結合断片の重鎖および / または軽鎖可変領域をコードする核酸、核酸分子を含む発現ベクター、発現ベクターで形質転換された細胞ならびに発現ベクターで形質転換された細胞を発現させることによって抗体を産生し、抗体を回収する方法をさらに提供する。

20

【 0 0 3 5 】

本発明はまた、検出可能な標識または細胞傷害性薬剤などの薬剤と連結している、本明細書に記載される抗 h u T I G I T 抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、本発明の抗 h u T I G I T 抗体またはその抗原結合断片と、担体とを含む医薬組成物を提供する。また、抗 T I G I T 抗体またはその抗原結合断片および使用のための説明書を含むキットが本明細書に提供される。

【 0 0 3 7 】

別の態様では、本発明は、例えば、そうでなければ抗腫瘍応答を弱めるであろう阻害シグナルの低減によって、抗原特異的 T 細胞応答が増強されるように、T 細胞を、本発明の抗 h u T I G I T 抗体またはその抗原結合断片と接触させることを含む、抗原特異的 T 細胞応答を増強する方法を提供する。いくつかの実施形態では、抗原特異的 T 細胞は、C D 8 <sup>+</sup> T 細胞などの腫瘍抗原特異的エフェクター T 細胞であり、例えば、T I G I T 媒介性阻害効果の遮断による増強は、抗腫瘍活性の増大をもたらす。本発明の抗 h u T I G I T 抗体またはその抗原結合断片はまた、N K 細胞において阻害シグナルを低減し、ひいては、その抗腫瘍活性を増大し得る。理論によって制限されるつもりはないが、本発明の抗 h u T I G I T 抗体は、T I G I T の P V R との結合を遮断し、ひいては、そうでなければ細胞に送達されるであろう阻害シグナルを低減または排除することによってエフェクター T 細胞または N K 細胞機能を増大する。あるいは、またはさらに、本発明の抗 T I G I T 抗体またはその抗原結合断片は、そうでなければ D N A M - 1 媒介性免疫活性化を低減するであろう、T I G I T と D N A M - 1 / C D 2 2 6 間の相互作用を阻害し得る。

30

40

【 0 0 3 8 】

本発明は、T 細胞を有効量の抗 T I G I T 抗体またはその抗原結合断片と接触させることを含む、T 細胞における I L - 2 および / もしくは I F N -  $\gamma$  産生ならびに / または T 細胞の増殖を増大する方法をさらに提供する。

【 0 0 3 9 】

別の態様では、本発明は、本発明の有効量の抗 h u T I G I T 抗体を投与することを含む、それを必要にする対象における腫瘍において T <sub>r e g</sub> を低減または枯渇させる方法であって、ここで、抗体は、腫瘍における T <sub>r e g</sub> 数を低減する、エフェクター機能または増強されたエフェクター機能を有する、方法を提供する。

50

## 【0040】

本発明は、対象における免疫応答が増強されるように、対象に本発明の有効量の抗h u T I G I T抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、対象において免疫応答を増強する方法を提供する。特定の実施形態では、対象は腫瘍を有し、腫瘍に対する免疫応答が増強される。別の実施形態では、対象は、ウイルス感染を有し、抗ウイルス性免疫応答が増強される。

## 【0041】

本発明はまた、腫瘍の成長が阻害されるように、対象に、本発明の抗h u T I G I T抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、対象において腫瘍の成長を阻害する方法を提供する。

10

## 【0042】

本発明は、それを必要とする対象に、例えば、医薬組成物として、治療上有効な量の本発明の抗h u T I G I T抗体またはその抗原結合断片を投与し、それによって、癌を治療することを含む、例えば、免疫療法によって癌を治療する方法をさらに提供する。特定の実施形態では、癌は、膀胱癌、乳癌、子宮/子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、食道癌、胃腸癌、膵臓癌、結腸直腸癌、結腸癌、腎臓癌、頭頸部癌、肺癌、胃癌、生殖細胞癌、骨癌、肝臓癌、甲状腺癌、皮膚癌、中枢神経系の新生物、リンパ腫、白血病、骨髄腫、肉腫およびウイルス関連癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌、難治性癌または再発性癌である。

20

## 【0043】

特定の実施形態では、免疫機能を調節する方法および本明細書に記載された治療の方法は、本発明の抗h u T I G I T抗体を、1種または複数のさらなる治療薬、例えば、抗P D - 1抗体、抗P D - L 1抗体、抗L A G 3抗体、抗G I T R抗体、抗O X 4 0抗体、抗C D 7 3抗体、抗C D 4 0抗体、抗C D 1 3 7 m A b、抗C D 2 7 m A b、抗C S F - 1 R抗体および/または抗C T L A - 4抗体、T L RアゴニストまたはI D OもしくはT G F の小分子アンタゴニストと組み合わせ、またはこれとともに二重特異性試薬として投与することを含む。特定の実施形態では、抗h u T I G I T治療は、抗P D - 1および/または抗P D - L 1治療、例えば、ヒトP D - 1と結合する抗体もしくはその抗原結合断片またはヒトP D - L 1と結合する抗体もしくはその抗原結合断片を用いる治療と組み合わせる。

30

## 【0044】

いくつかの実施形態では、患者から得たサンプル、例えば、バイオプシーを、抗T I G I T治療に対して応答する可能性が最も高い患者を選択するために、T細胞またはN K細胞でのD N A M - 1の発現についてスクリーニングし、ここで、T細胞でのD N A M - 1の存在は、患者が抗T I G I T治療、例えば、本発明の抗h u T I G I T抗体または断片を用いる治療の際に有益な抗腫瘍応答を有することを示唆し、D N A M - 1の不在は、抗T I G I T治療から恩恵を受ける可能性が低い患者を同定する。その他の実施形態では、抗T I G I T治療に対して応答する可能性が最も高い患者を選択するために、患者から得たサンプルを、腫瘍細胞または腫瘍浸潤骨髄系細胞でのP V Rおよび/またはネクチン - 2の発現についてスクリーニングし、ここで、P V Rおよび/またはネクチン - 2の存在は、患者が、抗T I G I T治療、例えば、本発明の抗h u T I G I T抗体または断片を用いる治療の際に有益な抗腫瘍応答を有することを示唆し、P V Rおよび/またはネクチン - 2 / C D 1 1 2の不在は、抗T I G I T治療から恩恵を受ける可能性が低い患者を同定する。種々の実施形態では、T I G I T、D N A M、P V Rおよび/またはネクチン - 2の細胞表面発現は、F A C S、I H CまたはL C - M Sによる。別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるようなT I G I T、D N A M、P V Rおよび/またはネクチン - 2の細胞表面発現を決定することおよび本発明の抗T I G I T抗体を、治療利益を提供する可能性が最も高いものへ選択的にまたは排他的に投与することを含む、それを必要とする対象の治療の方法を提供する。

40

## 【0045】

50

一実施形態では、本発明の抗 T I G I T 抗体を用いる治療について考慮されている対象において可溶性 P V R および / または可溶性ネクチン - 2 ( s P V R、s ネクチン - 2 ) のレベルを測定し、上昇した可溶性 P V R および / またはネクチン - 2 を示す対象のみを、抗体を用いて治療する。いくつかの実施形態では、s P V R および / または s ネクチン - 2 は、E L I S A または L C - M S によって血清中で検出される。

【 0 0 4 6 】

本発明はまた、抗体またはその抗原結合断と T I G I T との複合体の形成を可能にする条件下で、サンプルを本発明の抗 h u T I G I T 抗体またはその抗原結合断片と接触させることおよび複合体の形成を検出することを含む、サンプル内の、サンプル内の細胞での (例えば、F A C S)、または細胞もしくは組織中の特定の位置における (例えば、I H C ) T I G I T の存在を検出する方法、またはその表面での T I G I T の有無に基づいて細胞を選別する方法 (例えば、F A C S) も提供する。いくつかの実施形態では、検出のために使用される抗 T I G I T 抗体は、検出可能な標識とコンジュゲートされる。

10

【 0 0 4 7 】

本開示のその他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および実施例から明らかとなるが、これらは制限と解釈されてはならない。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 8 】

【図 1】図 1 は、本発明の種々の抗 h u T I G I T 抗体が、その他の抗体の h u T I G I T との結合を遮断する能力について対で試験される「ピンング」実験の模式図を示す。結果は、抗体が、制限された数のカテゴリーまたは「ピン」内に入ることを示す。実施例 3 を参照のこと。

20

【 0 0 4 9 】

【図 2 A】図 2 A は、h u T I G I T 配列変異体のそれぞれ、抗体 2 2 G 2、1 1 G 1 1 および 1 5 A 6 との結合についての酵母ディスプレイデータを示す。成熟 h u T I G I T 中の各アミノ酸残基の残基数が、横軸に沿って示されている。配列表は、図には含まれていないシグナルペプチドを含むので、残基数は、配列番号 1 の番号付けよりも 2 1 少ない。実施例 4 に詳述されるように、h u T I G I T の配列変異体をディスプレイする酵母は、それがそれぞれの抗体 (2 2 G 2、1 1 G 1 1、1 5 A 6) と結合できないことに基づいて選択した。したがって、抗体結合にとって重要である h u T I G I T 配列に沿う位置は、非結合酵母クローンのプールにおいてその過剰提示のために高頻度で (すなわち、縦軸を上回って上がるバー / 線として) 現れる。各残基で変異体 (非野生型) 残基が現れる頻度は、縦軸で (対数目盛りで) 表され、1 つのバー (線) または各残基を有する。頻度データは、選択されていないライブラリー、すなわち、本発明の抗 h u T I G I T 抗体と結合できないことに基づく選択に付されていなかったライブラリーにおいて各位置で変異体残基が現れる頻度に対して正規化されている。実施例 4 を参照のこと。

30

【 0 0 5 0 】

【図 2 B】図 2 B は、h u T I G I T 配列変異体のそれぞれ、抗体 2 2 G 2、1 1 G 1 1 および 1 5 A 6 との結合についての酵母ディスプレイデータを示す。成熟 h u T I G I T 中の各アミノ酸残基の残基数が、横軸に沿って示されている。配列表は、図には含まれていないシグナルペプチドを含むので、残基数は、配列番号 1 の番号付けよりも 2 1 少ない。実施例 4 に詳述されるように、h u T I G I T の配列変異体をディスプレイする酵母は、それがそれぞれの抗体 (2 2 G 2、1 1 G 1 1、1 5 A 6) と結合できないことに基づいて選択した。したがって、抗体結合にとって重要である h u T I G I T 配列に沿う位置は、非結合酵母クローンのプールにおいてその過剰提示のために高頻度で (すなわち、縦軸を上回って上がるバー / 線として) 現れる。各残基で変異体 (非野生型) 残基が現れる頻度は、縦軸で (対数目盛りで) 表され、1 つのバー (線) または各残基を有する。頻度データは、選択されていないライブラリー、すなわち、本発明の抗 h u T I G I T 抗体と結合できないことに基づく選択に付されていなかったライブラリーにおいて各位置で変異体残基が現れる頻度に対して正規化されている。実施例 4 を参照のこと。

40

50

## 【0051】

【図2C】図2Cは、h u T I G I T配列変異体のそれぞれ、抗体22G2、11G11および15A6との結合についての酵母ディスプレイデータを示す。成熟h u T I G I T中の各アミノ酸残基の残基数が、横軸に沿って示されている。配列表は、図には含まれていないシグナルペプチドを含むので、残基数は、配列番号1の番号付けよりも21少ない。実施例4に詳述されるように、h u T I G I Tの配列変異体をディスプレイする酵母は、それがそれぞれの抗体(22G2、11G11、15A6)と結合できないことに基づいて選択した。したがって、抗体結合にとって重要であるh u T I G I T配列に沿う位置は、非結合酵母クローンのプールにおいてその過剰提示のために高頻度で(すなわち、縦軸を上回って上がるバー/線として)現れる。各残基で変異体(非野生型)残基が現れる頻度は、縦軸で(対数目盛りで)表され、1つのバー(線)または各残基を有する。頻度データは、選択されていないライブラリー、すなわち、本発明の抗h u T I G I T抗体と結合できないことに基づく選択に付されていなかったライブラリーにおいて各位置で変異体残基が現れる頻度に対して正規化されている。実施例4を参照のこと。

10

## 【0052】

【図3】図3は、ヒトNK細胞による、ヒトPVRを発現する細胞の特異的溶解パーセントとして表される溶解に対する抗T I G I T m A b 22G2の効果を示す。実施例5を参照のこと。各抗体について、左のバーは野生型P815細胞であり、右のバーは、ヒトPVRを発現するP815細胞である。

20

## 【0053】

【図4A】図4Aは、抗原ペプチドのカクテル(C E T F = C M V、E B V、インフルエンザおよびテタヌス由来のペプチド)を用いる健常なヒトドナー血液の治療が、C D 8<sup>+</sup> T細胞でP D - 1およびT I G I Tの上方制御を誘導することを示す。「N o S t i m」サンプルは、C E F Tを用いて処理しなかったが、「S t i m」サンプルは、処理した。実施例6を参照のこと。

## 【0054】

【図4B】図4Bは、C E T Fを用いて刺激された4人の健常なヒトドナー血液サンプルからのI F N 発現に対する抗T I G I T m A bおよび/または抗P D - 1 m A bの効果を示す。実施例6を参照のこと。

## 【0055】

【図5A】図5Aは、マウスモデルにおける腫瘍成長に対する、単独での、またはその他の免疫調節性治療と組み合わせた抗T I G I T抗体の効果を示す。図5Aは、エフェクター機能が可能になったマウスI g G 2 a F cドメインを有する抗マウスT I G I Y抗体(「T I G I T G 2 a」)、エフェクター機能に欠陥があるI g G 1 D 2 6 5 A F cドメインを有する抗マウスT I G I T抗体(「T I G I T G 1 D 2 6 5 A」)、エフェクター機能に欠陥のあるI g G 1 D 2 6 5 A F cドメインを有する抗マウスP D - 1抗体(「P D - 1 G 1 D 2 6 5 A」)、それらの組合せまたは対照I g G 1抗体を用いて治療されたマウスについて、C T 2 6マウス結腸癌モデルにおける腫瘍の幅の二乗に長さの半分を乗じることによって算出された腫瘍量(立方ミリメートル)を示す。実施例7を参照のこと。

30

40

## 【0056】

【図5B】図5Bは、マウスモデルにおける腫瘍成長に対する、単独での、またはその他の免疫調節性治療と組み合わせた抗T I G I T抗体の効果を示す。図5Bは、抗T I G I T単剤治療ならびに抗P D - 1および抗C T L A - 4抗体との併用療法の効果を示す。腫瘍量は、実験の最後での10匹のマウスの各群中の腫瘍不含(T F)マウスの数とともに提供される。各線は、1匹のマウスを表す。m I g G 1アイソタイプ対照は、腫瘍不含マウスを与えず、単剤治療としての抗T I G I Tも同様であった。抗P D - 1は、単剤治療として、1匹の腫瘍不含マウスを与え、抗T I G I Tと組み合わせた場合には、5匹を与えた。抗C T L A - 4は、単剤治療として、3匹の腫瘍不含マウスを与え、抗T I G I Tと組み合わせた場合には、6匹を与えた。実施例7を参照のこと。

50

## 【 0 0 5 7 】

【図 6 A】図 6 A は、癌組織における上昇した P V R 発現を示す。図 6 A は、The Cancer Genome Atlas ( T C G A ) データセットにおいて検出されたような種々の腫瘍型における P V R m R N A 発現を示す。データは、副腎皮質癌腫 ( A C C )、嫌色素腎細胞癌 ( K I C H )、肝臓肝細胞癌腫 ( L I H C )、結腸および直腸腺癌 ( C O A D 、 R E A D )、膵管腺癌 ( P A A D )、褐色細胞腫 & 傍神経節腫 ( P C P G )、乳頭状腎臓癌腫 ( K I R P )、肺腺癌 ( L U A D )、頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C )、前立腺腺癌 ( P R A D )、子宮体子宮内膜癌 ( U C E C )、子宮頸癌 ( C E S C )、皮膚黒色腫 ( S K C M )、中皮腫 ( M E S O )、尿路上皮膀胱癌 ( B L C A )、明細胞腎臓癌腫 ( K I R C )、肺扁平上皮癌 ( L U S C )、子宮癌肉腫 ( U C S )、肉腫 ( S A R C )、卵巣漿液性嚢胞腺癌 ( O V )、乳頭状甲状腺癌腫 ( T H C A )、神経膠芽腫多形 ( G B M )、乳癌 ( B R C A )、ローグレード神経膠腫 ( L G G ) およびびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 ( D L B C ) について提供される。本明細書に開示される結果は、T C G A R e s e a r c h N e t w o r k によって作製されたデータに基づいて全体または部分である。

10

## 【 0 0 5 8 】

【図 6 B】図 6 B は、癌組織における上昇した P V R 発現を示す。図 6 B は、正常結腸上皮と比較した、結腸腺癌組織におけるヒト P V R を示し、腺癌サンプル中に、上昇した P V R 発現を示すより暗い領域を有する。実施例 9 を参照のこと。

## 【 0 0 5 9 】

【図 7】図 7 は、I g G 1 f (配列番号 4 5) または I g G 1 . 1 f (配列番号 4 8) としてフォーマットされた抗 T I G I T m A b 2 2 G 2 の、理論上の最大受容体結合値 ( R m a x ) のパーセンテージとして表される F c 受容体結合を示す。データは、6 種の異なる F c 受容体について、示されるように 1 0 μ M および 1 μ m で使用される I g G 1 . 1 f 抗体の 2 種の異なるロットについて示されている。バーの各クラスター内で、F c 受容体のデータは、左から右に h C D 6 4 ( F c R I ) ; h C D 3 2 a - H 1 3 1 ( F c R I I A - H 1 3 1 ) ; h C D 3 2 a - R 1 3 1 ( F c R I I A - R 1 3 1 ) ; h C D 3 2 b ( F c R I I B ) ; h C D 1 6 a - V 1 5 8 ( F c R I I I A - V 1 5 8 ) ; および h C D 1 6 b - N A 2 ( F c R I I I B - N A 2 、ここで、N A 2 はアロタイプ変異体と呼ぶ) の順に示されている。F c 受容体の対は、同一バーによって表されるが、その同一性は、それらが示されている順から明らかである。カニクイザル F c 受容体 C D 6 4 、 C D 3 2 a 、 C D 3 2 b および C D 1 6 との結合について同一の低下が観察された (示されていない)。

20

30

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 6 0 】

本発明は、ヒト T I G I T (「h u T I G I T」) と特異的に結合し、P V R / C D 1 5 5 との結合を遮断し、それによって、そうでなければ T I G I T 発現細胞において生じるであろう免疫抑制シグナルを低減または排除する、単離された抗体、特に、モノクローナル抗体、例えば、ヒトモノクローナル抗体を開示する。本発明はまた、ヒト T I G I T と特異的に結合し、そうでなければ D N A M - 1 ホモ二量体化、したがって、D N A M - 1 媒介性同時刺激を妨げるであろう、ヒト T I G I T の D N A M - 1 / C D 2 2 6 との相互作用を遮断する、単離された抗体、特に、モノクローナル抗体、例えば、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体を提供する。種々のヒト抗 h u T I G I T モノクローナル抗体の配列が提供される。特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、特に、重鎖および軽鎖生殖系列配列に由来し、および / または特定のアミノ酸配列を含む C D R 領域などの特定の構造的特徴を含む。

40

## 【 0 0 6 1 】

このような抗体、このような抗体またはその抗原結合断片を含むイムノコンジュゲートおよび二重特異性分子および抗体または断片を含有するよう製剤化された医薬組成物を作製する方法が、本明細書においてさらに提供される。また、抗体を、免疫応答増強のために、単独でまたはその他の免疫賦活剤 (例えば、抗体) および / または癌もしくは抗感染薬

50

治療と組み合わせて使用する方法も本明細書において提供される。したがって、本明細書に記載される抗h u T I G I T抗体は、例えば、腫瘍成長の阻害および慢性ウイルス性感染症の治療を含めた、さまざまな治療適用における治療において使用され得る。

#### 【0062】

##### 定義

本明細書において説明がより容易に理解され得るために、特定の用語をまず定義する。さらなる定義は詳細な説明を通じて示されている。

#### 【0063】

T I G I Tとは、「I gおよびI T I Mドメインを有するT細胞免疫受容体」、免疫グロブリンタンパク質のP V R (ポリオウイルス受容体)ファミリーのメンバーを指し、P V R / C D 1 5 5およびネクチン - 2 / C D 1 1 2と結合する。T I G I Tはまた、T I G I T、W U C A M、V s t m 3およびV s i g 9とも呼ばれる。特に断りのない限り、または文脈から明確ではない限り、本明細書においてT I G I Tへの言及は、ヒトT I G I T (「h u T I G I T」)を指し、抗T I G I T抗体とは、抗ヒトT I G I T抗体を指す。ヒトT I G I Tは、G E N E I D 番号：2 0 1 6 3 3およびM I M (ヒトにおけるメンデル遺伝)：6 1 2 8 5 9にさらに記載されている。2 1 個のアミノ酸のシグナル配列を含むヒトT I G I Tの配列(N P \_ 7 7 6 1 6 0 . 2 )が、配列番号1に提供されている。特に断りのない限り、または文脈から明確ではない限り、T I G I Tの「阻害」とは、P V R 結合およびシグナル伝達の遮断を指す。本発明の抗T I G I T抗体は、T I G I Tシグナル伝達の阻害、T I G I T / D N A M - 1相互作用の遮断および/または調節T細胞の枯渇の指示などのその他の機序によって作用し得る。

#### 【0064】

P V R (ポリオウイルス受容体)は、T I G I Tと相互作用して、免疫抑制シグナルを誘導する。P V Rはまた、P V S、H V E D、C D 1 5 5、N E C L 5、T A G E 4、N e c l - 5とも呼ばれる。特に断りのない限り、または文脈から明確でない限り、本明細書においてP V R / C D 1 5 5への言及は、ヒトP V R (「h u P V R」)を指す。ヒトP V Rは、G E N E I D 番号：5 8 1 7およびM I M：1 7 3 8 5 0にさらに記載されている。4種の既知ヒトP V R転写物変異体：(N P \_ 0 0 6 4 9 6 . 4)、(N P \_ 0 0 1 1 2 9 2 4 0 . 1)、(N P \_ 0 0 1 1 2 9 2 4 1 . 1)および(N P \_ 0 0 1 1 2 9 2 4 2 . 2)があり、それらの配列は、配列番号5 0 ~ 5 3に提供されている。特に断りのない限り、P V RまたはヒトP V Rへの言及は、転写物ポリペプチドと関連する。

#### 【0065】

特に断りのない限り、または文脈から明確でない限り、本明細書において用語「抗体」とは、全抗体および任意の抗原結合断片(すなわち「抗原結合部分」)またはその単一鎖を含み得る。「抗体」とは、一実施形態では、ジスルフィド結合によって相互接続している少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質またはその抗原結合断片を指す。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書において、V<sub>H</sub>と略される)および重鎖定常領域からなる。特定の天然に存在するI g G、I g DおよびI g A抗体では、重鎖定常領域は、3つのドメイン、C H 1、C H 2およびC H 3からなる。特定の天然に存在する抗体では、各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書において、V<sub>L</sub>と略される)および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C Lからなる。V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域は、相補性決定領域(C D R)と呼ばれ、フレームワーク領域(F R)と呼ばれるより保存されている領域と散在している超可変性の領域にさらに細分され得る。各V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>は、以下の順序：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4でアミノ末端からカルボキシ末端に配置される、3つのC D Rおよび4つのフレームワーク領域(F R)から構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの、宿主組織または因子、例えば、免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)および伝統的な補体系の第1の成分(C 1 q)との結合を媒介し得る。

#### 【0066】

抗体は、通常、そのコグネイト抗原と、 $10^{-7} \sim 10^{-1}$  M以下の解離定数( $K_D$ )によって反映される高親和性で特異的に結合する。約 $10^{-6}$  Mより大きい任意の $K_D$ は、一般に、非特異的結合を示すと考えられる。本明細書において、抗原と「特異的に結合する」抗体とは、抗原および実質的に同一の抗原と、 $10^{-7}$  M以下、好ましくは、 $10^{-8}$  M以下、さらにより好ましくは、 $5 \times 10^{-9}$  M以下、最も好ましくは、 $10^{-8}$  Mから $10^{-10}$  M以下の間の $K_D$ を有することを意味する高親和性で結合するが、無関係の抗原とは高親和性で結合しない抗体である。抗原は、所与の抗原に対して高度の配列同一性を示す場合には、例えば、所与の抗原の配列に対して、少なくとも80%、少なくとも90%、好ましくは、少なくとも95%、より好ましくは、少なくとも97%、またはさらにより好ましくは、少なくとも99%の配列同一性を示す場合に、所与の抗原と「実質的に同一」である。例として、ヒトTIGITと特異的に結合する抗体はまた、特定の非ヒト霊長類種(例えば、カニクイザル)に由来するTIGITと交差反応し得るが、その他の種に由来するTIGITと、またはTIGIT以外の抗原とは交差反応し得ない。

#### 【0067】

抗体は、Nおよび/またはC末端アミノ酸残基で修飾を示し得る。例えば、本発明の抗体は、例えば、重鎖でC末端リシン残基をコードするコンストラクトから産生され得るが、このようなC末端リシンは、販売または投与される治療用抗体では部分的にまたは完全に存在しないことがある。あるいは、抗体は、具体的に、C末端リシン残基をコードしないコンストラクトから産生され得るが、このようなリシンは、治療用抗体が導かれた親の抗体中には存在していた。別の例では、本発明の抗体中のN末端グルタミンまたはグルタミン酸残基は、販売され投与される治療用抗体では、ピログルタミン酸に部分的または完全に変換され得る。ピログルタミン酸を含めた、抗体鎖のN末端に存在するグルタミンまたはグルタミン酸の任意の形態は、本明細書において用語「グルタミン」内に包含される。したがって、N末端グルタミンまたはグルタミン酸残基を有する本明細書に提供される抗体鎖配列は、ピログルタミン酸形成のレベルに関わらず抗体鎖を包含する。

#### 【0068】

特に断りのない限り、免疫グロブリンは、それだけには限らないがIgA、分泌型IgA、IgGおよびIgMを含めた、よく知られているアイソタイプのいずれかに由来し得る。IgGアイソタイプは、特定の種ではサブクラスに分けられる：ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4ならびにマウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3。免疫グロブリン、例えば、ヒトIgG1は、多くても2、3個のアミノ酸で互いに異なるいくつかのアロタイプで存在する。特に断りのない限り、「抗体」は、例として、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、キメラおよびヒト化抗体、ヒトおよび非ヒト抗体、完全合成抗体および一本鎖抗体を含み得る。

#### 【0069】

本明細書において、用語、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」は、抗原(例えば、ヒトTIGIT)と特異的に結合する能力を保持する抗体の1種または複数の断片を指す。用語、抗体の「抗原結合部分/断片」内に包含される結合断片の例として、(i) Fab断片 -  $V_L$ 、 $V_H$ 、CLおよびCH1ドメインからなる一価の断片、(ii)  $F(ab')_2$ 断片 - ヒンジ領域でジスルフィド橋によって連結している2つのFab断片を含む二価の断片、(iii)  $V_H$ およびCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームの $V_L$ および $V_H$ ドメインからなるFv断片および(v)  $V_H$ ドメインからなるdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)が挙げられる。単離された相補性決定領域(CDR)または合成リンカーによって接続された2つ以上の単離されたCDRの組合せは、抗原と結合できる場合には抗体の抗原結合ドメインを含み得る。

#### 【0070】

一本鎖抗体コンストラクトもまた、本発明中に含まれる。Fv断片の2つのドメイン、 $V_L$ および $V_H$ は別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、 $V_L$ および $V_H$ 領域対が、一本鎖Fv(scFv)として知られる一価の分子を形成する単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによる組換え方法を使用して接続され得る

10

20

30

40

50



；例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426;およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)を参照のこと。このような一本鎖抗体はまた、用語、抗体の「抗原結合部分/断片」内に包含されるものとする。これらおよびその他の可能性あるコンストラクトは、Chan & Carter (2010) Nat. Rev. Immunol. 10:301に記載されている。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技術を使用して得られ、断片は、無傷の抗体と同様の方法で有用性についてスクリーニングされる。抗原結合部分/断片は、組換えDNA技術によって、または無傷の免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的切断によって生産され得る。

#### 【0071】

特に断りのない限り、語句「断片」は、特許請求の範囲などにおいて抗体に関連して使用される場合には、抗体の抗原結合断片を指し、その結果、「抗体または断片」は、「抗体またはその抗原結合断片」と同一の意味を有する。

#### 【0072】

「二重特異性」または「二機能性抗体」は、2つの異なる重鎖/軽鎖対を有し、異なる抗原に対して特異性を有する2つの抗原結合部位を生じさせる人工ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結を含めた種々の方法によって生産できる。例えば、Songsivilai & Lachmann (1990) Clin. Exp. Immunol. 79:315; Kostelny et al. (1992) J. Immunol. 148:1547を参照のこと。

#### 【0073】

本明細書において、用語「モノクローナル抗体」とは、特定のエピトープに対する単一結合特異性および親和性を示す抗体またはすべての抗体が特定のエピトープに対する単一結合特異性および親和性を示す抗体の組成物を指す。通常、このようなモノクローナル抗体は、抗体をコードする単一細胞または核酸に由来し、任意の配列変更を意図的に導入することなく増殖され得る。したがって、用語「ヒトモノクローナル抗体」とは、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および適宜定常領域を有するモノクローナル抗体を指す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、例えば、トランスジェニックまたは導入染色体非ヒト動物(例えば、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウス)から得られたB細胞を不死化された細胞と融合することによって得られたハイブリドーマによって産生される。

#### 【0074】

本明細書において、用語「組換えヒト抗体」は、組換え手段によって調製され、発現され、作製されるか、または単離されたすべてのヒト抗体、例えば、(a)ヒト免疫グロブリン遺伝子のトランスジェニックまたは導入染色体またはそれから調製されたハイブリドーマである動物(例えば、マウス)から単離された抗体、(b)抗体を発現するよう形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、(c)組換え、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体および(d)ヒト免疫グロブリン遺伝子配列のその他のDNA配列へのスプライシングを含む任意のその他の手段によって調製され、発現され、作製されるか、または単離された抗体を含む。このような組換えヒト抗体は、生殖系列遺伝子によってコードされる特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列を利用する可変および定常領域を含むが、その後の再編成および例えば、抗体成熟の間に起こる突然変異を含む。当技術分野で公知のように(例えば、Lonberg (2005) Nature Biotech. 23(9):1117-1125を参照のこと)、可変領域は、外来抗原に対して特異的な抗体を形成するよう再編成する種々の遺伝子によってコードされる抗原結合ドメインを含有する。可変領域は、再配列に加えて、外来抗原に対する抗体の親和性を増大するよう、複数の単一アミノ酸変更(体細胞突然変異または高頻度突然変異とも呼ばれる)によってさらに修飾され得る。定常領域は、抗原にさらに応じて変化する(すなわち、アイソタイプスイッチ)。したがって、抗原に応じた、軽鎖および重鎖免疫グロブリンポリペプチドをコードする再編成され、体細胞突然変異された核酸配列は、元の生殖系列配列と同一ではない場合があるが、代わりに、実質的に同一または同様となる(すなわち、少なくとも80%の同一性を有する)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 5 】

「ヒト」抗体(HuMAb)とは、フレームワークおよびCDR領域の両方が、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を指す。さらに、抗体が定常領域を含有する場合には、定常領域はまた、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボでの体細胞突然変異によって導入された突然変異)を含み得る。しかし、本明細書において、用語「ヒト抗体」はマウスなどの別の哺乳類種の生殖系列に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列にグラフトされている抗体を含むよう意図されない。用語「ヒト」抗体および「完全ヒト」抗体は、同義的に使用される。

10

## 【 0 0 7 6 】

「ヒト化」抗体とは、非ヒト抗体、例えば、マウス抗体のCDRドメインの外側のアミノ酸の一部、ほとんどまたはすべてが、ヒト免疫グロブリンに由来する対応するアミノ酸で置換されている抗体を指す。抗体のヒト化形態の一実施形態では、CDRドメインの外側のアミノ酸の一部、ほとんどまたはすべてが、ヒト免疫グロブリンに由来するアミノ酸で置換されているが、1つまたは複数のCDR領域内の一部、ほとんどまたはすべてのアミノ酸は変更されていない。アミノ酸の小さい付加、欠失、挿入または置換または修飾は、抗体の特定の抗原と結合する能力を抑制しない限り許容される。「ヒト化」抗体は、元の抗体のものと同様の抗原特異性を保持する。

20

## 【 0 0 7 7 】

「キメラ抗体」とは、可変領域がマウス抗体に由来し、定常領域がヒト抗体に由来する抗体などの、可変領域がある種に由来し、定常領域が別の種に由来する抗体を指す。「ハイブリッド」抗体とは、マウス(親)重鎖およびヒト化軽鎖またはその逆などの異なる種の重鎖および軽鎖を有する抗体を指す。

## 【 0 0 7 8 】

本明細書において、「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgDおよびIgE抗体)を指す。

## 【 0 0 7 9 】

「アロタイプ」とは、特定のアイソタイプ群内の天然に存在する変異体を指し、これらの変異体は、1個または2、3個のアミノ酸で異なっている。例えば、Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1を参照のこと。

30

## 【 0 0 8 0 】

語句「抗原を認識する抗体」および「抗原に対して特異的な抗体」は、本明細書において、用語「抗原と特異的に結合する抗体」と同義的に使用される。

## 【 0 0 8 1 】

本明細書において「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有するその他の抗体を実質的に含まない抗体を指す(例えば、TIGITと特異的に結合する単離された抗体は、TIGIT以外の抗原と特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。しかし、ヒトTIGITのエピトープと特異的に結合する単離された抗体は、異なる種に由来するその他のTIGITタンパク質と交差反応性を有し得る。

40

## 【 0 0 8 2 】

本明細書において、「PVRのTIGITとの結合を阻害する」抗体は、当技術分野で認識される方法において、例えば、FACSベースの細胞結合アッセイにおいて、約0.9 μg/mL以下、約0.85 μg/mL以下、約0.8 μg/mL以下、約0.75 μg/mL以下、約0.7 μg/mL以下、約0.65 μg/mL以下、約0.6 μg/mL以下、約0.55 μg/mL以下、約0.5 μg/mL以下、約0.45 μg/mL以下、約0.4 μg/mL以下、約0.35 μg/mL以下、約0.3 μg/mL以下、約0.25 μg/mL以下、約0.2 μg/mL以下、約0.15 μg/mL以下または約0.1 μg/mL以下などの約1 μg/mL以下のEC<sub>50</sub>で、ヒトPVRのヒトTIGITとの結合

50

を阻害する抗体を指す。

#### 【 0 0 8 3 】

抗体 F c 領域の特定の F c 受容体との相互作用に由来する「エフェクター機能」は、C 1 q 結合、補体依存性細胞傷害性(C D C)、F c 受容体結合、A D C C および抗体依存性細胞媒介性食作用(A D C P)などの F c R 媒介性エフェクター機能および細胞表面受容体(例えば、B 細胞受容体 ; B C R)の下方制御を含むが、必ずしもそれらに制限されない。このようなエフェクター機能は、一般に、抗原結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と組み合わせられる F c 領域を必要とする。

#### 【 0 0 8 4 】

「F c 受容体」または「F c R」は、免疫グロブリンの F c 領域と結合する受容体である。I g G 抗体と結合する F c R は、対立遺伝子変異体およびこれらの受容体の別法としてスプライシングされた形態を含めた F c R ファミリーの受容体を含む。F c R ファミリーは、3 種の活性化(マウスでは F c R I、F c R I I I および F c R I V ; ヒトでは F c R I A、F c R I I A および F c R I I I A)および 1 種の阻害性(F c R I I b または同等に F c R I I B)受容体からなる。ヒト F c R の種々の特性は、表 1 に要約されている。先天性エフェクター細胞種の大部分は、1 種または複数の活性化 F c R および阻害性 F c R I I b を同時に発現するが、ナチュラルキラー(N K)細胞は、1 種の活性化 F c 受容体(マウスでは F c R I I I およびヒトでは F c R I I I A)を選択的に発現するが、マウスおよびヒトにおいて阻害性 F c R I I b を発現しない。ヒト I g G 1 は、ほとんどのヒト F c 受容体と結合し、結合する活性化 F c 受容体の種類に関してマウス I g G 2 a と同等と考えられる。

#### 【 0 0 8 5 】

#### 【表 1】

表1

ヒト Fc γ R の特性

Fc γ	対立遺伝子変異体	ヒト IgG に対する親和性	アイソタイプ優先度	細胞分布
Fc γ RI	記載なし	高い(K <sub>D</sub> 約10nM)	IgG1=3>4>>2	単球、マクロファージ、活性化された好中球、樹状細胞?
Fc γ RIIA	H131	低い〜中程度	IgG1>3>2>4	好中球、単球、マクロファージ、好酸球、樹状細胞、血小板
	R131	低い	IgG1>3>4>2	
Fc γ RIIIA	V158	中程度	IgG1=3>>4>2	NK細胞、単球、マクロファージ、肥満細胞、好酸球、樹状細胞?
	F158	低い	IgG1=3>>4>2	
Fc γ RIIB	I232	低い	IgG1=3=4>2	B細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、肥満細胞
	T232	低い	IgG1=3=4>2	

#### 【 0 0 8 6 】

「F c 領域」(結晶化可能断片(fragment crystallizable)領域)または「F c ドメイン」または「F c」とは、免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)上に位置する F c 受容体とのまたは伝統的な補体系の第 1 の成分(C 1 q)との結合を含めた、免疫グロブリンの宿主組織または因子との結合を媒介する抗体の重鎖の C 末端領域を指す。したがって、F c 領域は、第 1 の定常領域免疫グロブリンドメイン(例えば、C H 1 または C L)を含まない抗体の定常領域を含む。I g G、I g A および I g D 抗体アイソタイプでは、F c 領域は、抗体の 2 つの重鎖の各々中に C H 2 および C H 3 定常ドメインを含む ; I g M および I g E F c 領域は、各ポリペプチド鎖中に 3 つの重鎖定常ドメイン(C H ドメイン 2 ~ 4)を含む。I g G については、F c 領域は、免疫グロブリンドメイン C 2 および C 3 ならびに C 1 および C 2 の間にヒンジを含む。免疫グロブリン重鎖の F c 領

域の境界は変わり得るが、ヒト I g G 重鎖 F c 領域は、普通、位置 C 2 2 6 または P 2 3 0 のアミノ酸残基(またはこれら 2 個のアミノ酸の間のアミノ酸)から重鎖のカルボキシ末端に伸びるよう規定され、ここで、番号付けは、K a b a t におけるような E U 指数に従う、Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD ; 米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 2 4 8 0 2 8 号の図 3 c ~ 3 f も参照のこと。ヒト I g G F c 領域の C<sub>H</sub>2 ドメインは、約アミノ酸 2 3 1 ~ 約アミノ酸 3 4 0 に広がるが、C<sub>H</sub>3 ドメインは、F c 領域中の C<sub>H</sub>2 ドメインの C 末端側に位置する、すなわち、I g G の約アミノ酸 3 4 1 ~ 約アミノ酸 4 4 7 (C 末端リシンを含む)に広がる。本明細書において、F c 領域は、任意のアロタイプ変異体または変異体 F c (例えば、天然に存在しない F c)を含めた天然配列 F c であり得る。F c はまた、単離において、または「F c 融合タンパク質」(例えば、抗体またはイムノアドヘシン)とも呼ばれる、「F c 領域を含む結合タンパク質」などの F c を含むタンパク質ポリペプチドに関連して、この領域を指し得る。

10

20

30

40

50

#### 【0087】

特に断りのない限り、または文脈から明確ではない限り、抗体の F c 領域におけるアミノ酸残基番号付けは、番号付けが必ずしも連続していない、配列表中の配列中の残基を具体的に指す場合を除いて、E U 番号付けの慣習に従う。例えば、F c 領域におけるアミノ酸置換の効果に関する文献参照は、通常、E U 番号付けを使用し、これによって、結合される可変ドメインの長さに関わらず、同一番号によって抗体の F c 領域中の任意の所与の残基の参照が可能になる。稀な場合には、正確な F c 残基が参照されていることを確認するために、参照されている文書を参照することが必要な場合もある。

#### 【0088】

「天然配列 F c 領域」または「天然配列 F c」は、自然界において見られる F c 領域のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む。天然配列ヒト F c 領域は、天然配列ヒト I g G 1 F c 領域、天然配列ヒト I g G 2 F c 領域、天然配列ヒト I g G 3 F c 領域および天然配列ヒト I g G 4 F c 領域ならびにそれらの天然に存在する変異体を含む。天然配列 F c は、F c の種々のアロタイプを含む。例えば、Jefferis et al. (2009) m Abs 1:1を参照のこと。

#### 【0089】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」とは、免疫グロブリンまたは抗体が特異的に結合する抗原(例えば、T I G I T)上の部位を指す。タンパク質抗原内のエピトープは、連続アミノ酸(普通、直鎖エピトープ)またはタンパク質の三次元フォールディングによって並置された非連続アミノ酸(普通、コンホメーションエピトープ)の両方から形成され得る。連続アミノ酸から形成されるエピトープは、通常、必ずではないが、変性溶媒に対する曝露の際に保持されるが、三次元フォールディングから形成されるエピトープは、通常、変性溶媒を用いる処理の際に失われる。エピトープは、通常、独特の空間コンホメーション中に少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 または 15 個のアミノ酸を含む。

#### 【0090】

用語「エピトープマッピング」とは、抗体抗原認識に関与する抗原上の分子決定基の同定のプロセスを指す。所与の抗体によって結合されるエピトープを決定する方法は、当技術分野で周知であり、例えば、由来する(例えば、T I G I T に由来する)重複ペプチドまたは連続ペプチドが、所与の抗体(例えば、抗 T I G I T 抗体)との反応性について試験される、免疫プロット法および免疫沈降アッセイ；X 線結晶学；2 次元核磁気共鳴；酵母ディスプレイ(本明細書中、実施例 4 を参照のこと)；および H D X - M S (例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)を参照のこと)が挙げられる。

#### 【0091】

2 種以上の抗体に関して、用語「同一エピトープと結合する」は、所与の方法によって決定されるように、抗体がアミノ酸残基の同一セグメントと結合することを意味する。本

明細書に記載される抗体を用いて、抗体が「T I G I T上の同一エピトープ」と結合するか否かを調べる技術として、例えば、エピトープの原子分解を提供する抗原：抗体複合体の結晶のX線分析および水素/重水素交換質量分析(HDX-MS)などのエピトープマッピング方法が挙げられる。アラニンスキャニング突然変異誘発(Cunningham & Wells (1985) Science 244:1081)または突然変異体標的配列変異体の酵母ディスプレイ(本明細書中、実施例4を参照のこと)などのその他の方法は、抗体の抗原断片(例えば、タンパク質分解断片)との、または抗原の突然変異された変動との結合をモニタリングし、これでは、抗原配列内のアミノ酸残基の修飾による結合の喪失が、エピトープ成分の指標と考えられることが多い。さらに、エピトープマッピングのための計算コンビナトリアル法を使用してもよい。これらの方法は、対象の抗体の、コンビナトリアルファージディスプレイペプチドライブラリーから特異的な短いペプチドを親和性単離する能力に依存する。同一または密接に関連するVHおよびVLまたは同一のCDR配列を有する抗体は、同一エピトープと結合すると予想される。

10

#### 【0092】

「標的との結合について別の抗体と競合する」抗体とは、その他の抗体の標的との結合を阻害する(部分的にまたは完全に)抗体を指す。2種の抗体が、標的との結合について互いに競合するか否か、すなわち、ある抗体が、その他の抗体の標的との結合を阻害するか否か、およびどの程度阻害するかは、公知の競合実験を使用して調べてもよい。特定の実施形態では、抗体は、別の抗体の標的との結合と、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%競合する、阻害する。阻害または競合のレベルは、どの抗体が「ブロッキング抗体」であるか(すなわち、標的とともに最初にインキュベートされるコールド抗体)に応じて異なり得る。競合アッセイは、例えば、Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb. Protoc.; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277またはChapter 11 of “Using Antibodies” by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999に記載されるように実施できる。競合抗体は、同一エピトープと、重複エピトープとまたは隣接するエピトープ(例えば、立体障害によって証明されるような)と結合する。

20

#### 【0093】

その他の競合結合アッセイとして、固相直接または間接ラジオイムノアッセイ(RIA)、固相直接または間接酵素イムノアッセイ(EIA)、サンドイッチ競合アッセイ(Stahli et al. (1983) Methods in Enzymology 9:242を参照のこと); 固相直接ビオチン-アビジンEIA(Kirkland et al. (1986) J. Immunol. 137:3614を参照のこと); 固相直接標識化アッセイ、固相直接標識化サンドイッチアッセイ(Harlow and Lane (1988), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Pressを参照のこと); I-125標識を使用する固相直接標識RIA(Morel et al. (1988) Mol. Immunol. 25(1):7を参照のこと); 固相直接ビオチン-アビジンEIA(Cheung et al. (1990) Virology 176:546); および直接標識化RIA(Moldenhauer et al. (1990) Scand. J. Immunol. 32:77)が挙げられる。

30

#### 【0094】

本明細書において、用語「特異的結合」、「選択的結合」、「選択的に結合する」および「特異的に結合する」とは、所定の抗原上のエピトープとの、その他の抗原とではない抗体結合を指す。通常、抗体は、(i)例えば、分析物として所定の抗原、例えば、組換えヒトTIGITおよびリガンドとして抗体を使用したBIACORE(登録商標)2000表面プラズモン共鳴機器における表面プラズモン共鳴(SPR)技術または抗体の抗原陽性細胞との結合のスク্যাッチャード解析法によって決定される場合に、およそ $10^{-7}$  M未満、例えば、およそ $10^{-8}$  M未満、 $10^{-9}$  Mまたは $10^{-10}$  Mまたはさらにそれより小さい平衡解離定数( $K_D$ )で結合し、(ii)所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原(例えば、BSA、カゼイン)との結合に対するその親和性よりも、少なくとも2倍大きい親和性で所定の抗原と結合する。したがって、「ヒトTIGITと特異的に結合する」抗体とは、 $10^{-7}$  M以下、例えば、およそ $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  Mまたは1

40

50

$10^{-10}$  M 未満またはさらにそれより小さい  $K_D$  で、可溶性または細胞結合型ヒト TIGIT と結合する抗体を指す。「カニクイザル TIGIT と交差反応する」抗体とは、 $10^{-7}$  M 以下、例えば、およそ  $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M または  $10^{-10}$  M 未満またはさらにそれより低い  $K_D$  でカニクイザル TIGIT と結合する抗体を指す。

#### 【0095】

本明細書において、用語「 $k_{assoc}$ 」または「 $k_a$ 」とは、特定の抗体抗原相互作用の会合速度定数を指すのに対し、本明細書において、用語「 $k_{diss}$ 」または「 $k_d$ 」は、特定の抗体抗原相互作用の解離速度定数を指す、用語「 $K_D$ 」は、本明細書において、平衡解離定数を指し、これは  $k_a$  に対する  $k_d$  の割合(すなわち、 $k_d / k_a$ )から得られ、モル濃度(M)として表される。抗体の  $K_D$  値は、当技術分野で十分に確立された方法を使用して決定できる。抗体の  $K_D$  を決定する好ましい方法として、好ましくは、Fortebio Octet RED 装置を使用するバイオレイヤー干渉法(BLI)分析、好ましくは、BIAcore (登録商標)表面プラズモン共鳴システムなどのバイオセンサーシステムを使用する表面プラズモン共鳴(例えば、実施例2を参照のこと)またはフローサイトメトリーおよびスキャッチャード解析法が挙げられる。

10

#### 【0096】

本明細書において、用語、IgG 抗体の「高親和性」とは、標的抗原に対して  $10^{-8}$  M 以下、より好ましくは、 $10^{-9}$  M 以下、さらにより好ましくは、 $10^{-10}$  M 以下の  $K_D$  を有する抗体を指す。しかし、「高親和性」結合は、その他の抗体アイソタイプについては変わり得る。例えば、IgM アイソタイプの「高親和性」結合は、 $10^{-7}$  M 以下、より好ましくは、 $10^{-8}$  M 以下の  $K_D$  を有する抗体を指す。

20

#### 【0097】

用語、抗体またはその抗原結合断片を使用するインビトロまたはインビボアッセイに関連して「 $EC_{50}$ 」とは、最大応答の 50%、すなわち、最大応答とベースラインの間の中間である応答を誘導する抗体またはその抗原結合断片の濃度を指す。

#### 【0098】

用語「固定化された TIGIT と結合する」とは、本明細書に記載された抗体の、例えば、細胞の表面に発現されたか、または固相支持体と結合している TIGIT と結合する能力を指す。

#### 【0099】

用語、本明細書において「交差反応する」とは、本明細書に記載された抗体の、異なる種に由来する TIGIT と結合する能力を指す。例えば、ヒト TIGIT と結合する本明細書に記載される抗体はまた、別の種に由来する TIGIT (例えば、カニクイザル TIGIT) と結合し得る。本明細書において、交差反応性は、結合アッセイ(例えば、SPR、ELISA)において精製抗原との特異的反応性または TIGIT を生理学的に発現する細胞との結合もしくはそうでなければ、それとの機能的相互作用を検出することによって測定してもよい。交差反応性を調べるための方法として、例えば、BIAcore (登録商標) 2000 SPR 機器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)を使用する BIAcore (登録商標)表面プラズモン共鳴(SPR)分析またはフローサイトメトリー技術による、本明細書に記載されるような標準結合アッセイが挙げられる。

30

40

#### 【0100】

用語、本明細書において対象に適用されるような「天然に存在する」とは、対象が自然界において見出され得るという事実を指す。例えば、実験室において人によって意図的に修飾されていない、自然界における供給源から単離され得る生物(ウイルスを含む)中に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列が天然に存在する。

#### 【0101】

「ポリペプチド」とは、少なくとも2個の連続して連結しているアミノ酸残基を含む鎖を指し、鎖の長さには上限はない。タンパク質中の1個または複数のアミノ酸残基は、それだけには限らないが、グリコシル化、リン酸化またはジスルフィド結合などの修飾を含有し得る。「タンパク質」は、1つまたは複数のポリペプチドを含み得る。

50

## 【0102】

用語「核酸分子」とは、本明細書において、DNA分子およびRNA分子を含むものとする。核酸分子は、一本鎖であっても、二本鎖であってもよく、cDNAであり得る。

## 【0103】

本明細書において提供される抗体配列への「保存的配列修飾」、すなわち、すなわち、ヌクレオチド配列によってコードされるか、またはアミノ酸配列を含有する抗体の、抗原との結合を抑制しないヌクレオチドおよびアミノ酸配列修飾も提供される。例えば、修飾は、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介突然変異誘発などの当技術分野で公知の標準技術によって導入され得る。保存的配列修飾として、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基と置換される保存的アミノ酸置換が挙げられる。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で規定されている。これらのファミリーとして、塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、

10

分枝側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸が挙げられる。したがって、抗TIGIT抗体中の予想される非必須アミノ酸残基は、同一側鎖ファミリーに由来する別のアミノ酸残基と置換されることが好ましい。抗原結合を排除しないヌクレオチドおよびアミノ酸保存的置換を同定する方法は、当技術分野で周知である。例えば、Brummel et al., Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. Protein Eng. 12(10):879-884 (1999);およびBurks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417 (1997))を参照のこと。

20

## 【0104】

あるいは、別の実施形態では、突然変異は、飽和突然変異誘発などによって抗TIGIT抗体コード配列のすべてかまたは一部に沿って無作為に導入され得、得られた修飾された抗TIGIT抗体は、改善された結合活性についてスクリーニングされ得る。

## 【0105】

核酸については、用語「実質的な相同性」は、2種の核酸またはその指定された配列は、最適にアラインされ、比較される場合に、ヌクレオチドの少なくとも約80%、普通、少なくとも約90%~95%、より好ましくは、ヌクレオチドの少なくとも約98%~99.5%において適当なヌクレオチド挿入または欠失を用いて同一であることを示す。あるいは、セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下で、鎖の相補体とハイブリダイズする場合に、実質的な相同性が存在する。

30

## 【0106】

ポリペプチドについては、用語「実質的な相同性」は、2種のポリペプチドまたはその指定された配列が、最適にアラインされ、比較される場合に、アミノ酸の少なくとも約80%、普通、少なくとも約90%~95%、より好ましくは、アミノ酸の少なくとも約98%~99.5%において適当なアミノ酸挿入または欠失を用いて同一であることを示す。

40

## 【0107】

2種の配列間の同一性パーセントは、配列が最適にアラインされる場合に配列によって共有される同一位置の数の関数であり(すなわち、相同性% = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100)、最適アラインメントは、2種の配列の最適アラインメントのために導入される必要があるギャップの数、各ギャップの長さを考慮して決定される。2種の配列間の配列の比較および同一性パーセントの決定は、以下の限定されない例に記載されるように、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。

## 【0108】

2種のヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムを使用して、NW S g a p d n a . C M Pマトリックスおよび40、5

50

0、60、70または80のギャップ加重および1、2、3、4、5または6の長さ加重を使用して決定できる。2種のヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一性パーセントはまた、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているE. MeyersおよびW. Millerのアルゴリズム(CABIOS, 4:11-17 (1989))を使用し、PAM120加重残基表、12のギャップ長ペナルティーおよび4のギャップペナルティーを使用して決定できる。さらに、2種のアミノ酸配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラム中に組み込まれたNeedlemanおよびWunsch(J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970))アルゴリズムを使用し、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれかおよび16、14、12、10、8、6または4のギャップ加重および1、2、3、4、5または6の長さ加重を使用して決定できる。

10

#### 【0109】

本明細書に記載される核酸およびタンパク質配列は、例えば、関連配列を同定するための公開データベースに対する検索を実施するための「クエリー配列」としてさらに使用され得る。このような検索は、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム(バージョン2.0)を使用して実施され得る。本明細書に記載された核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得るために、NBLAST検索を、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて実施できる。本明細書に記載されたタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得るために、BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長(wordlength)=3を用いて実施できる。比較目的でギャップ付きアラインメントを得るために、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載されるようなギャップ付きBLASTを利用できる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合には、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータ(例えば、XBLASTおよびNBLAST)を使用できる。

20

#### 【0110】

核酸は、全細胞中に、細胞溶解物中に、または部分精製されたかもしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンド形成、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当技術分野で周知のその他のものを含めた標準技術によって、その他の細胞成分またはその他の夾雑物、例えば、その他の細胞性核酸(例えば、染色体のその他の部分)またはタンパク質から精製された場合に「単離される」かまたは「実質的に純粋にされる」。F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照のこと。

30

#### 【0111】

本明細書において、用語「ベクター」は、それに連結している別の核酸を輸送可能な核酸分子を指すものとする。ある種のベクターは、「プラスミド」であり、これは、さらなるDNAセグメントがライゲーションされ得る環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターは、ウイルスベクターであり、これでは、さらなるDNAセグメントがウイルスゲノム中にライゲーションされ得る。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製可能である(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター)。その他のベクター(例えば、非エピソード哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それによって、宿主ゲノムとともに複製され得る。さらに、特定のベクターは、作動可能に連結されている遺伝子の発現を指示可能である。このようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」(または単に「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。プラスミドは、ベクターの最もよく使用される形態であるので、本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、同義的に使用され得る。しかし、同等の機能を果たす、ウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)などのその他の形態の発現ベクターもまた含まれる。

40

50



## 【0112】

用語「組換え宿主細胞」(または単に「宿主細胞」)は、本明細書において、細胞中に天然に存在しない核酸を含み、組換え発現ベクターが導入されている細胞であり得る細胞を指すものとする。このような用語は、特定の対象細胞を指すだけではなく、このような細胞の後代も指すということは理解されなければならない。特定の修飾は、突然変異または環境的影響のいずれかによって後世において起こり得るので、このような後代は実際、親の細胞と同一ではない場合もあるが、本明細書において、用語「宿主細胞」の範囲内に依然として含まれる。

## 【0113】

「免疫応答」とは、外来作用物質に対する脊椎動物内の生物学的応答を指し、この応答が、これらの作用物質およびそれらによって引き起こされる疾患から生物を保護する。免疫応答は、免疫系の細胞(例えば、Tリンパ球、Bリンパ球、ナチュラルキラー(NK)細胞、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、樹状細胞または好中球)およびこれらの細胞のいずれかまたは肝臓によって産生される可溶性高分子(抗体、サイトカインおよび補体を含む)の作用によって媒介され、これは、進入する病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、癌性もしくはその他の異常な細胞、または自己免疫もしくは病的炎症の場合には、正常なヒト細胞もしくは組織との選択的標的化、結合、損傷、破壊および/またはそれらの脊椎動物の身体からの排除をもたらす。免疫反応は、例えば、T細胞、例えば、CD8<sup>+</sup>もしくはCD4<sup>+</sup>T細胞などのエフェクターT細胞もしくはTh細胞の活性化もしくは阻害またはT<sub>reg</sub>細胞の阻害もしくは枯渇を含む。「TEフェクター」(「T<sub>eff</sub>」)細胞とは、サイトカインを分泌し、その他の免疫細胞を活性化し、指示する、細胞溶解活性を有するT細胞(例えば、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞)ならびにTヘルパー(Th)細胞を指すが、調節T細胞(T<sub>reg</sub>細胞)を含まない。

10

20

## 【0114】

本明細書において、用語「T細胞媒介性応答」とは、エフェクターT細胞(例えば、CD8<sup>+</sup>細胞)およびヘルパーT細胞(例えば、CD4<sup>+</sup>細胞)を含めたT細胞によって媒介される応答を指す。T細胞媒介性応答は、例えば、T細胞細胞傷害性および増殖を含む。

## 【0115】

本明細書において、用語「細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答」とは、細胞傷害性T細胞によって誘導される免疫応答を指す。CTL応答は、CD8<sup>+</sup>T細胞によって主に媒介される。

30

## 【0116】

「免疫調節物質(immunomodulator)」または「免疫制御物質(immunoregulator)」とは、免疫応答の調節、制御または修飾に関与し得る作用物質、例えば、シグナル伝達経路の成分を指す。免疫応答の「調節」、「制御」または「修飾」とは、免疫系の細胞における、またはこのような細胞(例えば、エフェクターT細胞)の活性における任意の変更を指す。このような調節は、免疫系の刺激または抑制を含み、種々の細胞型の数の増大もしくは減少、これらの細胞の活性の増大もしくは減少または免疫系内で起こり得る任意のその他の変化によって示され得る。阻害的および刺激的免疫調節物質の両方とも同定されており、その一部は、腫瘍微小環境において増強された機能を有し得る。好ましい実施形態では、免疫調節物質は、T細胞の表面に位置する。「免疫調節性標的」または「免疫制御性標的」は、物質、作用物質、部分、化合物または分子による結合に対して標的化される免疫調節物質であり、その活性は、物質、作用物質、部分、化合物または分子の結合によって変更される。免疫調節性標的は、例えば、細胞の表面の受容体(「免疫調節性受容体」)および受容体リガンド(「免疫調節性リガンド」)を含む。

40

## 【0117】

「免疫療法」とは、免疫応答を誘導、増強、抑制またはそうでなければ修飾することを含む方法によって、疾患の再発に苦しむまたは、それを起こすまたは患う危険にある対象の治療を指す。

## 【0118】

50

「免疫賦活性(immunostimulating)療法」または「免疫賦活性(immunostimulatory)療法」とは、例えば、癌を治療するための、対象における免疫応答の増大(誘導または増強)をもたらす療法を指す。

【0119】

「内因性免疫応答を増強する」とは、対象における既存の免疫応答の有効性または効力を増大することを意味する。この有効性および効力の増大は、例えば、内因性宿主免疫応答を抑制する機序を克服することによって、または内因性宿主免疫応答を増強する機序を刺激することによって達成され得る。

【0120】

本明細書において、用語「連結している」とは、2つ以上の分子の会合を指す。連結は、共有結合である場合も、非共有結合である場合もある。連結はまた、遺伝的であり(すなわち、組換えによって融合され)得る。このような連結は、化学的コンジュゲーションおよび組換えタンパク質生産などのさまざまな当技術分野において認識される技術を使用して達成され得る。

【0121】

本明細書において、「投与すること」は、当業者に公知の種々の方法および送達システムのいずれかを使用して、治療薬を含む組成物の対象への物理的導入を指す。本明細書に記載される抗体の好ましい投与経路は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、脊髄または例えば、注射もしくは注入によるその他の非経口投与経路を含む。本明細書において、語句「非経口投与」とは、経腸および局所投与以外の、普通、注射による投与様式を意味し、制限するものではないが、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、リンパ内、病巣内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および注入ならびにインビボエレクトロポレーションを含む。あるいは、本明細書に記載される抗体は、局所、上皮または粘膜投与経路などの非経口ではない経路によって、例えば、鼻腔内に、経口的に、経腔的に、直腸性に、舌下にまたは局所的に投与され得る。投与することは、例えば、1回、複数回および/または1回もしくは複数回の長期間にわたって実施され得る。

【0122】

本明細書において、用語「阻害する」または「遮断する」(例えば、細胞上でのPVRのTIGITとの結合の阻害/遮断を指す)は、同義的に使用され、例えば、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%または100%の部分的および完全阻害/遮断の両方を包含する。

【0123】

本明細書において、「癌」は、身体中での異常な細胞の制御されない成長を特徴とする疾患の広い群を指す。未制御細胞分裂は、隣接する組織へ浸潤し、リンパ系または血流によって身体の遠隔部位へ転移し得る悪性腫瘍または細胞の形成をもたらし得る。

【0124】

「血液悪性腫瘍」は、リンパ腫、白血病、骨髄腫またはリンパ系悪性腫瘍ならびに脾臓およびリンパ節の癌を含む。例示的リンパ腫として、B細胞リンパ腫およびT細胞リンパ腫の両方が挙げられる。B細胞リンパ腫は、ホジキンリンパ腫およびほとんどの非ホジキンリンパ腫の両方を含む。B細胞リンパ腫の限定されない例として、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、小細胞リンパ性リンパ腫(慢性リンパ性白血病と重複する)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、バーキットリンパ腫、縦隔大細胞型B細胞リンパ腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、結節性辺縁帯B細胞リンパ腫、脾臓辺縁帯リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症が挙げられる。T細胞リンパ腫の限定されない例として、節外性T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫および血管免疫芽球形T細胞リンパ腫が挙げられる。血液悪性腫瘍としてまた、それだけには限らないが、続発性白血病、慢性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病および急性リンパ性白血病などの白血病も挙げられる。血液悪性腫瘍として、さらにそれだけには限らな

いが、多発性骨髄腫およびくすり型多発性骨髄腫などの骨髄腫も挙げられる。その他の血液系および／またはB細胞もしくはT細胞関連癌が、用語血液悪性腫瘍によって包含される。

#### 【0125】

用語「治療する」、「治療すること」および「治療」とは、本明細書において、症状の進行、発生、重症度もしくは再発、合併症、疾病と関連している状態または生化学的兆候を逆転させ、軽減し、寛解し、阻害し、または減速することを目的とした、対象で実施される任意の種類の介入もしくはプロセスまたは対象へ活性薬剤を投与することを指す。予防とは、疾患が発生するのを防ぐため、またはそれが起こる場合にはその効果を最小化するための、疾患を有していない対象への投与を指す。

10

#### 【0126】

用語「有効用量」または「有効投与量」は、所望の効果を達成または少なくとも部分的に達成するのに十分な量と定義される。薬物または治療薬の「治療上有効な量」または「治療上有効な投与量」は、単独で、または別の治療薬と組み合わせて使用される場合に、疾患症状の重症度の低減、疾患症状のない期間の頻度および期間の増大または疾患苦痛による機能障害もしくは能力障害の防止によって証明される疾患退縮を促進する薬物の任意の量である。薬物の「予防的有効量」または「予防的有効投与量」は、単独で、または別の治療薬と組み合わせて、疾患が発生するか、または疾患の再発を患うリスクにある対象に投与される場合に、疾患の発生または再発を阻害する薬物の量である。治療薬または予防薬の疾患退縮を促進する能力または疾患の発生もしくは再発を阻害する能力は、臨床試験の際にヒト対象において、ヒトにおける有効性を予測する動物モデル系において、インビトロアッセイにおいて薬剤の活性をアッセイすることによってなど、当業者に公知の種々の方法を使用して評価できる。

20

#### 【0127】

例として、抗癌剤は、対象において、癌進行を減速するか、または癌退縮を促進する薬物である。好ましい実施形態では、治療上有効な量の薬物は、癌を排除するところまで癌退縮を促進する。「癌退縮を促進すること」とは、有効量の薬物を、単独でまたは抗新生物剤と組み合わせて投与することが、患者において、腫瘍成長または大きさの低減、腫瘍の壊死、少なくとも1種の疾患症状の重症度の低下、疾患症状のない期間の頻度および期間の増大、疾患苦痛による機能障害もしくは能力障害の防止またはそうでなければ疾患症状の寛解をもたらすことを意味する。薬理学的有効性とは、薬物の患者において癌退縮を促進する能力を指す。生理学的安全性とは、薬物の投与に起因する、容認できるほど低レベルの毒性または細胞、臓器および／または生物レベルでのその他の有害な生理学的効果(有害効果)を指す。

30

#### 【0128】

腫瘍の治療の例として、薬物の治療上有効な量または投与量は、未治療の対象と比較して、好ましくは、細胞成長または腫瘍成長を少なくとも約20%、より好ましくは、少なくとも約40%、一層より好ましくは、少なくとも約60%、さらにより好ましくは、少なくとも約80%阻害する。最も好ましい実施形態では、薬物の治療上有効な量または投与量は、細胞成長または腫瘍成長を完全に阻害し、すなわち好ましくは、細胞成長または腫瘍成長を100%阻害する。化合物の腫瘍成長を阻害する能力は、以下に記載されるアッセイを使用して評価できる。腫瘍成長の阻害は、治療後即時でない場合もあり、一定時間後または反復投与後にのみ起こる場合もある。あるいは、この組成物の特性は、化合物の細胞成長を阻害する能力を調べることによって評価でき、このような阻害は、当業者に公知のアッセイによってインビトロで測定され得る。本明細書に記載されるその他の好ましい実施形態では、腫瘍退縮が観察され得、少なくとも約20日、より好ましくは、少なくとも約40日または一層より好ましくは、少なくとも約60日の期間継続し得る。

40

#### 【0129】

「併用」療法とは、本明細書において、文脈から別に明確ではない限り、協調した様式での2種以上の治療薬の投与を包含することを意味し、それだけには限らないが、同時投

50

薬を含む。具体的には、併用療法は、同時投与(例えば、合剤の投与または別個の治療用組成物の同時投与)および連続または逐次投与の両方を包含する、ただし、一方の治療薬の投与は、もう一方の治療薬の投与に対していくつかの方法で条件付けられる。例えば、一方の治療薬は、異なる治療薬が投与され、規定の期間作用させた後にのみ投与され得る。例えば、Kohrt et al. (2011) Blood 117:2423を参照のこと。

#### 【0130】

用語「患者」および「対象」とは、予防的または治療的処置のいずれかを受ける任意のヒトまたは非ヒト動物を指す。例えば、本明細書に記載される方法および組成物は、癌を有する対象を治療するために使用され得る。用語「非ヒト動物」は、すべての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリなどの哺乳動物および非哺乳動物、両生類、爬虫類などを含む。

10

#### 【0131】

本明細書に記載される種々の態様は、以下のサブセクションにおいてさらに詳細に記載される。

#### 【0132】

##### I. 抗TIGIT抗体

本願は、癌などの疾患の治療において治療薬として使用するための所望の特性を有する、完全ヒト抗huTIGIT抗体を開示する。これらの特性として、ヒトTIGITと高親和性で結合する能力、カニクイザルTIGITと結合する能力、PVR結合(したがって、シグナル伝達)を遮断する能力および抗体の化学安定性を低減し得る配列傾向がないこと、のうち1種または複数が挙げられる。

20

#### 【0133】

配列によって本明細書に開示される抗TIGIT抗体は、実施例4に記載され、図2A~2Cにおいて示されるように決定されるヒトTIGIT上の特異的エピトープと結合する。エピトープが決定された3種の特異的抗体は、ヒトTIGITの同様の領域で結合するが、どの特異的アミノ酸残基が接触されるかが異なる。抗体は、高親和性でのヒトTIGITとの結合の特性を共有し、PVR結合を遮断する能力を有する。したがって、同一または密接に関連するエピトープと結合するその他の抗体は、これらの望ましい特性を共有する可能性が高く、競合実験によって発見され得る。

30

#### 【0134】

さらに、抗体22G2は、ヒトTIGITと結合するのと実質的に同一の親和性でカニクイザルTIGITと結合し、これは、ヒト治療薬として抗体を使用するために規制当局の承認を支持する毒性研究を実施するために必要である場合には好都合である。15A6および22G2と同一または同様のエピトープと結合するその他の抗TIGIT抗体は、cyno TIGITとの結合のこの有利な特性を共有する可能性が高い。同様のエピトープとの抗体結合は、競合実験を行うことによって、またはそのエピトープを直接的に調べることによって発見され得る。

#### 【0135】

本明細書において開示される抗huTIGIT抗体と競合する抗TIGIT抗体

15A6および22G2などのhuTIGITとの結合について本発明の抗体と競合する抗huTIGIT抗体は、本明細書に記載されるもの(実施例1)と同様の免疫処置プロトコルを使用して作製され得る。本明細書に記載される抗huTIGIT抗体との結合について競合する抗体はまた、ヒトTIGITもしくはその細胞外ドメイン(配列番号1の残基22~141; NP\_776160.2)を含むコンストラクトを用いてマウスを免疫処置することによって、または本明細書において開示される抗huTIGIT抗体(例えば、15A6、22G2および11G11)によって結合されるエピトープを含有するヒトTIGITの断片を用いて免疫処置することによって作製され得る。得られた抗体は、当技術分野で周知の方法、例えば、ELISAにおけるTIGITの細胞外ドメインおよび免疫グロブリンFcドメインの融合タンパク質との結合の遮断、または例えば、FACSによる、その表面上にhuTIGITを発現する細胞と結合する能力の遮断によって

40

50

、15A6または22G2のヒトTIGITとの結合を遮断する能力についてスクリーニングされ得る。種々の実施形態では、試験抗体は、15A6または22G2の添加に先立って、それと同時に、またはその後に、TIGIT-Fc融合タンパク質と(またはその表面上にhUTIGITを発現する細胞と)接触される。例えば、「ビニング」実験を実施して、抗体が抗体15A6または22G2と同一「ビン」内に入るか否かを調べてもよく(実施例3)、この実験では、抗体15A6または22G2は、「参照」抗体と呼ばれ、試験されるべき抗体は、「試験」抗体と呼ばれる。15A6および/または22G2のTIGIT(Fc融合物としてかまたは細胞上のいずれか)との結合を、特に、およそ化学量論濃度で低減する抗体は、同一の、重複する、または隣接するエピトープと結合する可能性が高く、したがって、15A6および22G2の望ましい機能的特性を共有し得る。

10

#### 【0136】

競合抗体はまた、当技術分野で公知のその他の方法を使用しても同定できる。例えば、標準ELISAアッセイまたは競合的ELISAアッセイを使用でき、これでは、組換えヒトTIGITタンパク質コンストラクトを、プレート上に固定化し、種々の濃度の非標識試験抗体を添加し、プレートを洗浄し、標識された参照抗体を添加し、洗浄し、結合している標識の量を測定する。増大する濃度の非標識試験抗体が、標識された参照抗体の結合を阻害する場合には、試験抗体は、参照抗体のプレート上の標的との結合を阻害するといわれるか、または参照抗体の結合と競合するといわれる。さらに、またはあるいは、BIACORE(登録商標)SPR分析を実施して、抗体の競合する能力を評価してもよい。試験抗体の、本明細書に記載される抗hUTIGIT抗体のTIGITとの結合を阻害する能力は、試験抗体がTIGITとの結合について参照抗体と競合し得ることを実証する。

20

#### 【0137】

したがって、例えば、以下の段落に記載されるアッセイを使用することなどによってELISAまたはFACSによって測定される場合、本明細書に記載される抗hUTIGIT抗体の、細胞、例えば、活性化されたT細胞上のTIGITとの結合を、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%阻害する、および/または細胞、例えば、活性化されたT細胞上のTIGITとのその結合が、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%阻害される抗TIGIT抗体が、本明細書において提供される。

30

#### 【0138】

試験抗体が、参照抗体の結合を遮断する(すなわち「競合する」)か否かを調べるための例示的競合実験は、以下の通りに実施され得る：活性化ヒトT細胞を以下の通りに調製する：ヒト全血からフィコール勾配を使用して末梢血単核細胞(PBMCs)を単離し、10 $\mu$ g/mLフィトヘマグルチニン(PHA-L)(USBiol番号P3370-30)および200IU/mL組換えIL-2(Peprotech番号200-02)を用いて3日間活性化する。活性化T細胞をFACSバッファー(5%ウシ胎児血清を有するPBS)に再懸濁し、96ウェルプレートにおいてサンプルウェルあたり10<sup>5</sup>個細胞で播種する。プレートにコンジュゲートしていない試験抗体を、0~50 $\mu$ g/mLの範囲の濃度で(50 $\mu$ g/mLの最高濃度から出発する3倍滴定)添加する。無関係のIgGを試験抗体のアイソタイプ対照として使用し、同一濃度で(50 $\mu$ g/mLの最高濃度から出発する3倍滴定)添加してもよい。50 $\mu$ g/mLの非標識参照抗体とともにブレインキュベートしたサンプルを、競合遮断の陽性対照(100%阻害)として含めてもよく、一次インキュベーションにおいて抗体を伴わないサンプルを、陰性対照(競合なし; 0%阻害)として使用してもよい。30分インキュベートした後、洗浄せずに、標識された、例えば、ビオチン化された参照抗体を、ウェルあたり2 $\mu$ g/mLの濃度で添加する。サンプルをさらに30分間インキュベートする。FACSバッファーを用いて細胞を洗浄することによ

40

50

て結合していない抗体を除去する。細胞が結合している標識された参照抗体を、標識、例えば、ビオチンを検出するための、PEがコンジュゲートしているストレプトアビジン(Invitrogen、カタログ番号S21388)を検出する薬剤を用いて検出する。サンプルをFACS Caliburフローサイトメーター(BD, San Jose)で獲得し、FlowJoソフトウェア(Tree Star, Inc, Ashland, OR)を用いて分析する。結果は、阻害%として(すなわち、100%から各濃度の標識の量を差し引き、遮断抗体を伴わずに得られた標識の量で除して)表され得る。

#### 【0139】

通常、次いで、同一実験を、逆で実施する、すなわち、試験抗体は、参照抗体であり、参照抗体は、試験抗体である。特定の実施形態では、抗体は、他の抗体の、標的、例えば、ヒトTIGITまたはその断片との結合を少なくとも部分的に(例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%)または完全に(100%)遮断し、一方またはもう一方の抗体が試験抗体である場合に阻害が起こるか否かに関わらない。試験および参照抗体は、抗体が互いに双方向に、すなわち、試験抗体が最初に添加される競合実験において、および参照抗体が最初に添加される競合実験において競合する場合には、互いの標的との結合を「交差遮断」する。

#### 【0140】

抗huTIGIT抗体は、例えば、実施例3に記載されるもののような競合実験において、およそ等濃度で存在する場合に、15A6および/または22G2のヒトTIGITとの結合を、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%阻害する場合に、本明細書に開示される抗huTIGIT抗体と競合すると考えられる。別に示されない限り、抗体は、先行する2段落において概説されるような競合ELISA実験において測定される場合、選択された抗体とともにおよそ等モル濃度で使用した場合に、選択された抗体のヒトTIGITとの結合を少なくとも20%低減する場合に、本発明の抗huTIGIT抗体からなる群から選択される抗体と競合すると考えられる。

#### 【0141】

同一エピトープと結合する抗TIGIT抗体

本明細書に開示される抗体と同一または同様のエピトープと結合する抗huTIGIT抗体は、本明細書に記載されるもの(実施例1)と同様の免疫処置プロトコルを使用して作製され得る。得られた抗体は、ヒトTIGITとの高親和性結合についてスクリーニングされ得る(実施例2)。選択された抗体は、次いで、抗体によって結合される正確なエピトープを調べるために、huTIGITの配列変異体が酵母細胞の表面上に提示される酵母ディスプレイアッセイにおいて研究され得る(実施例4)。

#### 【0142】

エピトープ決定は、当技術分野で公知の任意の方法によって行われ得る。本明細書に開示されるエピトープは、実施例4に記載され、図2A~2Cで示される酵母ディスプレイによって決定した。種々の実施形態では、抗huTIGIT抗体は、15A6もしくは22G2によって接触されるhuTIGITの少なくとも1つの領域内の1個または複数の同一残基と接触する場合に；15A6もしくは22G2によって接触されるhuTIGITの少なくとも1つの領域内の大部分の残基と接触する場合に；15A6もしくは22G2によって接触されるhuTIGITの各領域内の大部分の残基と接触する場合に；15A6もしくは22G2によって接触されるhuTIGITの全長に沿う接触の大部分と接触する場合に；15A6もしくは22G2によって接触されるヒトTIGITの別個の領域のすべて内で接触する場合に；15A6もしくは22G2によって接触されるヒトTIGIT上の任意の1つの領域で同一残基のすべてと接触する場合に；または15A6または22G2によって接触されるすべての領域ですべての残基と接触する場合に本明細書に開示される抗huTIGIT mAb、例えば、15A6および/または22G2と同一エピトープと結合すると考えられる。エピトープ「領域」は、例えば、配列番号38~44で提供されるような、抗体15A6または22G2によって接触される一次配列に沿っ

た残基のクラスターである。

【0143】

本明細書に記載される抗体を用いて「T I G I T上の同一エピトープ」と結合する抗体を調べる技術として、抗原：抗体複合体の結晶のX線解析が挙げられ、これは、エピトープの原子分解を提供する。その他の方法は、抗体の抗原断片または抗原の突然変異された変動との結合をモニタリングし、これでは、抗原配列内のアミノ酸残基の修飾による結合の喪失は、エピトープ成分を示すと考えられる。方法はまた、対象の抗体の、コンビナトリアルファージディスプレイペプチドライブラリーから、または標的タンパク質のプロテアーゼ消化物から特異的な短いペプチド(天然の三次元形態または変性された形態のいずれか)を親和性単離する能力に頼る場合もある。そこで、ペプチドは、ペプチドライブラリーをスクリーニングするために使用される抗体に対応するエピトープの定義のためのリードと見なされる。エピトープマッピングのために、コンホメーション的に不連続なエピトープをマッピングするために示されてきた計算アルゴリズムも開発された。

10

【0144】

エピトープまたはエピトープを含む領域はまた、T I G I Tに広がる一連の重複するペプチドとの結合についてスクリーニングすることによって同定できる。あるいは、Jesper *et al.* (1994) *Biotechnology* 12:899の方法を使用して、同一エピトープを有する、したがって、本明細書に記載される抗T I G I T抗体に対して同様の特性を有する抗体の選択を導いてもよい。ファージディスプレイを使用して、まず、抗T I G I T抗体の重鎖を、(好ましくは、ヒト)軽鎖のレパートリーと対形成して、T I G I T結合性抗体を選択し、次いで、新規軽鎖を(好ましくは、ヒト)重鎖のレパートリーと対形成して、本明細書に記載される抗h u T I G I T抗体と同一エピトープまたはエピトープ領域を有する(好ましくは、ヒト)T I G I T結合性抗体を選択する。抗体の重鎖および軽鎖をコードするc D N Aの突然変異誘発によって、本明細書に記載される抗体の別法としての変異体を得ることができる。

20

【0145】

Cunningham & Wells (1989) *Science* 244: 1081によって記載されるようなアラニンスキャン突然変異誘発またはT I G I T中のアミノ酸残基の点突然変異誘発のいくつかのその他の形態(実施例4で提供される酵母ディスプレイ法など)を使用して、抗T I G I T抗体の機能的エピトープを調べてもよい。

30

【0146】

特異的抗体によって結合されたエピトープまたはエピトープ領域(「エピトープ領域」は、エピトープを含むか、またはエピトープと重複する領域である)はまた、抗体の、T I G I Tの断片を含むペプチドとの結合を評価することによって決定してもよい。T I G I T(例えば、ヒトT I G I T)の配列を包含する一連の重複するペプチドは、合成し、例えば、直接E L I S A、競合的E L I S A法(ペプチドが、抗体の、マイクロタイタープレートウェルと結合しているT I G I Tとの結合を防ぐその能力について評価される)において、またはチップ上で結合についてスクリーニングしてもよい。このようなペプチドスクリーニング方法は、いくつかの不連続な機能的なエピトープ、すなわち、T I G I Tポリペプチド鎖の一次配列に沿って連続していないアミノ酸残基を含む機能的エピトープを検出可能でない場合もある。

40

【0147】

エピトープはまた、水素/重水素交換質量分析(H D X - M S)およびタンパク質の迅速光化学酸化(Fast Photochemical Oxidation of Proteins)(F P O P)などのM Sベースのタンパク質フットプリント法によって同定してもよい。H D X - M Sは、Wei *et al.* (2014) *Drug Discovery Today* 19:95でさらに記載されるように実施でき、その方法は、参照によって本明細書に具体的に組み込まれる。F P O Pは、例えば、Hambley & Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2057に記載されるように実施でき、その方法は、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

【0148】

50

抗 T I G I T 抗体によって結合されるエピトープはまた、X 線結晶構造決定(例えば、W O 2 0 0 5 / 0 4 4 8 5 3)、分子モデリングおよび遊離している場合および対象の抗体との複合体中に結合されている場合には、T I G I T 中の不安定なアミド水素の H - D 交換速度の N M R 決定を含めた核磁気共鳴(N M R)分光法などの構造的な方法によって決定してもよい(Zinn-Justin et al. (1992) Biochemistry 31:11335; Zinn-Justin et al. (1993) Biochemistry 32:6884)。

#### 【 0 1 4 9 】

X 線結晶学に関して、結晶化は、マイクロバッチ(例えば、Chayen (1997) Structure 5:1269)、懸滴蒸気拡散(例えば、McPherson (1976) J. Biol. Chem. 251:6300)、シーディングおよび透析を含めた当技術分野で公知の方法のいずれかを使用して達成され得る(例えば、Giege et al. (1994) Acta Crystallogr. D50:339; McPherson (1990) Eur. J. Biochem. 189:1)。少なくとも約 1 m g / m L、好ましくは、約 1 0 m g / m L ~ 約 2 0 m g / m L の濃度を有するタンパク質調製物を使用することが望ましい。結晶化は、約 1 0 % ~ 約 3 0 % (w / v) の範囲の濃度を有する、ポリエチレングリコール 1 0 0 0 ~ 2 0 , 0 0 0 (P E G ; 約 1 0 0 0 ~ 約 2 0 , 0 0 0 D a の範囲の平均分子量)、好ましくは、約 5 0 0 0 ~ 約 7 0 0 0 D a、より好ましくは、約 6 0 0 0 D a を含有する沈殿剤溶液中で最良に達成され得る。タンパク質分解防止剤、例えば、グリセロールを約 0 . 5 % ~ 約 2 0 % の範囲の濃度で含むことが望ましいものであり得る。塩化ナトリウム、塩化リチウムまたはクエン酸ナトリウムなどの適した塩はまた、好ましくは、約 1 m M ~ 約 1 0 0 0 m M の範囲の濃度の沈殿剤溶液中にあることが望ましいものであり得る。沈殿剤は、好ましくは、約 3 . 0 ~ 約 5 . 0、好ましくは、約 4 . 0 の p H に緩衝される。沈殿剤溶液において有用な特定のバッファーは変わり得て、当技術分野で周知である(Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York)。有用なバッファーの例として、それだけには限らないが、H E P E S、T r i s、M E S および酢酸が挙げられる。結晶は 2、4、8 および 2 6 を含めたさまざまな温度で成長させてもよい。

#### 【 0 1 5 0 】

抗体：抗原結晶は、周知の X 線回折技術を使用して研究され得、X - P L O R (Yale University、1992、Molecular Simulations、Inc.によって配布された;例えば、Blundell & Johnson (1985) Meth. Enzymol. 114 & 115, H. W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; 米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 0 1 4 1 9 4 号を参照のこと)および B U S T E R (Bricogne (1993) Acta Cryst. D49:37-60; Bricogne (1997) Meth. Enzymol. 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi et al. (2000) Acta Cryst. D56:1313-1323)などのコンピュータソフトウェアを使用して洗練され得て、それらの開示内容は、その全文が参照によって本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 1 5 1 】

高親和性で結合する抗 T I G I T 抗体

いくつかの実施形態では、本発明の抗 h u T I G I T 抗体は、本明細書に開示される抗 h u T I G I T 抗体のように、h u T I G I T と高親和性で結合し、有効な治療薬である可能性を高める。種々の実施形態では、本発明の抗 h u T I G I T 抗体は、h u T I G I T と 1 0 n M、5 n M、2 n M、1 n M、3 0 0 p M、1 0 0 p M または 6 0 p M 未満の  $K_D$  で結合する。その他の実施形態では、本発明の抗 h u T I G I T 抗体は、2 n M から 6 0 p M の間の  $K_D$  で h u T I G I T と結合する。抗体の、h u T I G I T に向けた結合能力を評価するための標準アッセイとして、E L I S A、R I A、ウエスタンブロット、バイオレイヤー干渉法(B L I)および B I A C O R E (登録商標) S P R 分析(実施例 2 を参照のこと)が挙げられる。

#### 【 0 1 5 2 】

抗 T I G I T 抗体配列変異体

本明細書に開示される抗体配列のいくつかの変異性は、許容され、抗体の望ましい特性を依然として維持し得る。C D R 領域は、カバットシステム(Kabat, E. A., et al. (199



1) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)を使用して描写される。したがって、本発明は、本明細書において開示される抗体(例えば、15A6、22G2および11G11)のCDR配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるCDR配列を含む抗h u T I G I T抗体をさらに提供する。本発明はまた、本明細書において開示される抗体(例えば、15A6、22G2および11G11)の重鎖および/または軽鎖可変ドメイン配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である重鎖および/または軽鎖可変ドメイン配列を含む抗h u T I G I T抗体も提供する。

10

#### 【0153】

同一生殖系列に由来する抗T I G I T抗体

抗原結合特異性は、主にCDRによって決定されることを考えると、本明細書において開示される抗体(例えば、15A6、22G2および11G11)とCDR配列を共有する抗体は、その望ましい特性を共有する可能性が高い。さらに、本明細書において開示される選択された抗体(15A6、22G2および11G11)は、h u T I G I Tの一次配列に沿って同様の領域と結合し、一部の重鎖および軽鎖は、同一の生殖系列配列に由来する。したがって、15A6、22G2および11G11を有する抗体に由来するCDR領域を組み合わせる(混合するおよび対応させる)抗体もまた、h u T I G I Tと結合し、その望ましい特性を保持すると予測され得る。本明細書において開示される特定の抗体と同等またはそれより優れた、結合親和性、生理活性 および/またはその他の特性を有する「混合および対応させた」抗体が、本発明の方法において使用するために選択され得る。

20

#### 【0154】

特定の実施形態では、本発明の抗h u T I G I T抗体は、特定のヒト生殖系列重鎖免疫グロブリン遺伝子に由来する重鎖可変領域および/または特定のヒト生殖系列軽鎖免疫グロブリン遺伝子に由来する軽鎖可変領域を含む。抗体15A6は、ヒト生殖系列V4-39、D6-19およびJH4bに由来する重鎖ならびに生殖系列VA27およびJK2に由来する軽鎖を有する。抗体22G2は、ヒト生殖系列V4-61、D3-10およびJH6bに由来する重鎖ならびに生殖系列VL6およびJK3に由来する軽鎖を有する。抗体11G11は、ヒト生殖系列V4-39、D3-10およびJH4bに由来する重鎖ならびに生殖系列VL6およびJK2に由来する軽鎖を有する。抗体10D7は、ヒト生殖系列V1-69、D6-13およびJH6bに由来する重鎖ならびに生殖系列VL15およびJK5に由来する軽鎖を有する。ヒトT I G I Tと結合し、これらの生殖系列配列の一部またはすべてに由来するその他の抗体は、配列、特に、同一V領域遺伝子に由来するものにおいて密接に関連している可能性が高く、したがって、同一の望ましい特性を共有すると予測される。

30

#### 【0155】

抗体の可変領域が、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られ、抗体配列が、所与の生殖系列に由来する可能性が任意のその他のものよりも高い生殖系列と十分に関連している場合には、本明細書において、ヒト抗体は、特定の生殖系列配列に「由来する」重鎖または軽鎖可変領域を含む。このような系は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保持するトランスジェニックマウスを、対象の抗原を用いて免疫処置することまたは対象の抗原を用いてファージ上にディスプレイされたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることを含む。抗体の配列が「由来する」ヒト生殖系列免疫グロブリン配列(単数または複数)は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較することおよびヒト抗体の配列に対して配列が最も近い(すなわち、最大同一性パーセント)ヒト生殖系列免疫グロブリン配列を選択することによって同定できる。特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列に「由来する」ヒト抗体は、生殖系列配列と比較した場合に、例えば、天然に存在する体細胞突然変異または部位特異的突然変異の意図的な誘導によるアミノ酸の相違を含有し得る。しかし、選択されたヒト抗体は、通常、

40

50

ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子(例えば、V領域)によってコードされるアミノ酸配列に対してアミノ酸配列において少なくとも90%同一であり、その他の種の生殖系列免疫グロブリンアミノ酸配列(例えば、マウス生殖系列配列)と比較した場合に、ヒト抗体をヒトであると同定するアミノ酸残基を含有する。特定の場合には、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子(例えば、V領域)によってコードされるアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列において少なくとも95%、またはさらに少なくとも96%、97%、98%または99%同一であり得る。通常、特定のヒト生殖系列配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子(例えば、V領域)によってコードされるアミノ酸配列から10個以下のアミノ酸の相違を示す。特定の場合には、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子(例えば、V領域)によってコードされるアミノ酸配列から5個以下、またはさらに4、3、2もしくは1個以下のアミノ酸の相違を示し得る。

10

#### 【0156】

### II. 遺伝子操作された、および修飾された抗体

#### V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域

修飾された抗体を遺伝子操作するために、出発材料として本明細書において開示されるV<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>配列のうち1種または複数を有する抗体を使用して調製され得る、遺伝子操作された、および修飾された抗体もまた提供され、この修飾された抗体は、出発抗体から変更された特性を有し得る。抗体は、一方または両方の可変領域(すなわち、V<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>)内の、例えば、1つまたは複数のCDR領域内の、および/または1つまたは複数のフレームワーク領域内の1個または複数の残基を修飾することによって、遺伝子操作され得る。さらに、またはあるいは、抗体は、例えば、抗体のエフェクター機能(単数または複数)を変更するために、定常領域(単数または複数)内の残基を修飾することによって遺伝子操作され得る。

20

#### 【0157】

実施され得る1種の可変領域遺伝子操作として、CDRグラフトニングがある。このようなグラフトニングは、本明細書において開示される抗h u T I G I T抗体と結合について競合し、および/または本明細書において開示される抗h u T I G I T抗体と同一エпитープと結合する非ヒト抗T I G I T抗体をヒト化において特に役立つ。抗体は、主に6つの重鎖および軽鎖相補性決定領域(CDR)中に位置するアミノ酸残基を介して標的抗原と相互作用する。このため、CDR内のアミノ酸配列は、CDRの外側の配列よりも個々の抗体間でより多様である。CDR配列は、ほとんどの抗体抗原相互作用に参与しているので、異なる特性を有する異なる抗体に由来するフレームワーク配列上にグラフトされた特定の参照抗体に由来するCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって、特定の参照抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現させることが可能である(例えば、Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; Winterの米国特許第5,225,539号およびQueen et alの米国特許第5,530,101号; 同5,585,089号; 同5,693,762号および同6,180,370号を参照のこと)。

30

#### 【0158】

このようなフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公開DNAデータベースまたは公開参考文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子の生殖系列DNA配列は、「V B a s e」ヒト生殖系列配列データベースに、ならびにKabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V<sub>H</sub> Sequences Reveals about Fifty Groups of V<sub>H</sub> Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V<sub>H</sub> Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836に見い出すことができ、それらの各々の内容は、参照により本明細書

40

50

に明確に組み込まれる。

【0159】

本明細書において記載される抗体において使用するための好ましいフレームワーク配列は、本明細書に記載される抗体によって使用されるフレームワーク配列と構造的に同様であるものである。V<sub>H</sub> CDR 1、2 および 3 配列ならびに V<sub>L</sub> CDR 1、2 および 3 配列は、フレームワーク配列が由来する生殖系列免疫グロブリン遺伝子において見られるものと同一配列を有するフレームワーク領域上にグラフトされ得るか、または CDR 配列は、生殖系列配列と比較した場合に最大 20 個の好ましくは保存的なアミノ酸置換を含有するフレームワーク領域上にグラフトされ得る。例えば、特定の場合には、抗体の抗原結合能力を維持または増強するために、フレームワーク領域内の残基を突然変異させることが有益であることがわかっている(例えば、Queen et al の米国特許第 5,530,101 号；同 5,585,089 号；同 5,693,762 号および同 6,180,370 号を参照のこと)。

10

【0160】

本明細書に記載された遺伝子操作された抗体は、例えば、抗体の特性を改善するために、V<sub>H</sub> および / または V<sub>L</sub> 内のフレームワーク残基に修飾が行われているものを含む。このようなフレームワーク修飾は、抗体の免疫原性を低下させるよう行われることが多い。例えば、1 つのアプローチとして、1 個または複数のフレームワーク残基を、対応する生殖系列配列に「復帰突然変異」することがある。より詳しくは、体細胞突然変異を起こしている抗体は、抗体が由来する生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含有し得る。このような残基は、抗体フレームワーク配列を、抗体が由来する生殖系列配列に対して比較することによって同定できる。フレームワーク領域配列をその生殖系列立体配置に戻すために、例えば、部位特異的突然変異誘発または PCR 媒介突然変異誘発によって、体細胞突然変異を生殖系列配列に「復帰突然変異する」ことができる。このような「復帰突然変異された」抗体も包含されるものとする。

20

【0161】

別の種類のフレームワーク修飾は、T 細胞エピトープを除去し、それによって、抗体の免疫原性の可能性を低減するために、フレームワーク領域内の、またはさらには 1 つもしくは複数の CDR 領域内の 1 個または複数の残基を突然変異することを含む。このアプローチはまた、「脱免疫化」と呼ばれ、Carr et al による米国特許公開第 20030153043 号にさらに詳細に記載されている。

30

【0162】

別の種類の可変領域修飾は、対象の抗体の 1 種または複数の結合特性(例えば、親和性)を改善するために CDR 領域内のアミノ酸残基を突然変異することである。部位特異的突然変異誘発または PCR 媒介突然変異誘発を実施して、抗体結合または対象のその他の機能的特性に対して突然変異(単数または複数)および効果を導入できる。保存的修飾が導入されることが好ましい。突然変異は、アミノ酸付加、欠失または好ましくは、置換であり得る。さらに、通常、CDR 領域内の 1、2、3、4 または 5 個以下の残基が変更される。

40

【0163】

抗体の CDR 中のメチオニン残基は、酸化され、その結果、化学的分解の可能性および結果としての抗体の効力の低減をもたらし得る。したがって、酸化分解を受けていないアミノ酸残基と置換された、重鎖および / または軽鎖 CDR 中の 1 個または複数のメチオニン残基を有する抗 TIGIT 抗体も提供される。

【0164】

同様に、抗 TIGIT 抗体から、特に、CDR 中の脱アミド化部位も除去され得る。

【0165】

抗原結合を干渉し得るグリコシル化を防ぐために、抗原結合ドメイン内の可能性あるグリコシル化部位が排除されることが好ましい。例えば、米国特許第 5,714,350 号を参照のこと。

50

## 【0166】

## 標的化される抗原結合

種々の実施形態では、本発明の抗体は、抗原結合が有害である組織および環境において抗原結合を選択的に遮断するが、有益である抗原結合を可能にするよう修飾される。一実施形態では、抗体の抗原結合表面と特異的に結合し、抗原結合を干渉する遮断ペプチド「マスク」が生じ、このマスクは、ペプチダーゼ切断可能リンカーによって抗体の結合アームの各々と連結している。例えば、CytomXの米国特許第8,518,404号を参照のこと。このようなコンストラクトは、非腫瘍組織と比較して、腫瘍微小環境においてプロテアーゼレベルが大幅に増大されている癌の治療にとって有用である。腫瘍微小環境における切断可能なリンカーの選択的切断によって、マスキング/遮断ペプチドの解離が可能となり、これが、抗原結合が不要な副作用を引き起こし得る末梢組織においてではなく腫瘍における抗原結合選択性を可能にする。

10

## 【0167】

あるいは、関連実施形態では、(二価)抗体の両方の抗原結合表面と結合し、抗原結合を干渉する、2つの抗原結合ドメインを含む二価結合化合物(「マスキングリガンド」)が開発され、これでは、2つの結合ドメインマスクは、切断可能なリンカー、例えば、ペプチダーゼによって切断可能なリンカーによって互いに(抗体ではなく)連結される。例えば、Tegopharm Corpの国際特許出願公開WO2010/077643を参照のこと。マスキングリガンドは、抗体が結合するよう意図される抗原を含み得るか、もしくはそれに由来し得るか、または独立に作製され得る。このようなマスキングリガンドは、非腫瘍組織と比較して、腫瘍微小環境においてプロテアーゼレベルが大幅に増大されている癌の治療にとって有用である。腫瘍微小環境における切断可能なリンカーの選択的切断によって、2つの結合ドメインの互いからの解離が可能となり、抗体の抗原結合表面の結合力を低下させる。結果として生じる、抗体からのマスキングリガンドの解離が、抗原結合が不要な副作用を引き起こし得る末梢組織においてではなく腫瘍における抗原結合選択性を可能にする。

20

## 【0168】

## Fcおよび修飾されたFc

抗原結合ドメインの抗原との結合(例えば、アンタゴニスト抗体の場合には、同族リガンドもしくは受容体タンパク質またはアゴニスト抗体の場合には、誘導されるシグナル伝達の遮断)に起因する治療用抗体の活性に加えて、抗体のFc部分は、複雑な方法で全体的に免疫系と相互作用して、任意の数の生物学的効果を誘発する。免疫グロブリンのFc領域などのエフェクター機能は、抗原依存性細胞性細胞傷害性(ADCC)、補体依存性細胞傷害性(CDC)および抗体依存性細胞媒介性食作用(ADCP)などの多数の重要な抗体機能に関与しており、異なる機序によってではあるが、標的細胞の死滅をもたらす。重鎖定常領域の5種の主要なクラスまたはアイソタイプ(IgA、IgG、IgD、IgE、IgM)があり、各々は、特徴的なエフェクター機能を有する。これらのアイソタイプは、サブクラスにさらに細分され得、例えば、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4として知られる4つのサブクラスに分けられる。IgG分子は、抗体のIgGクラスに対して特異的な3つのクラスのFc受容体(FcR)、すなわち、FcRI、FcRIIおよびFcRIIIと相互作用する。IgGのFcR受容体との結合にとって重要な配列は、CH2およびCH3ドメイン中に位置すると報告されている。抗体の血清半減期は、その抗体の新生児Fc受容体(FcRn)と結合する能力によって影響を受ける。

30

40

## 【0169】

本発明の抗体は、意図される使用のために抗体の生物活性(あるとすれば)に基づいて選択された、異なるFc領域を含む定常ドメインと組み合わせられた本発明の変換ドメインを含み得る。Salfeld (2007) Nat. Biotechnol. 25:1369。例えば、ヒトIgGは、4つのサブクラス、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4に分類され得、これらの各々は、1種または複数のFc受容体(活性化受容体FcRI(CD64)、FcRIIA

50

、F c R I I C (C D 3 2) ; F c R I I I A および F c R I I I B (C D 1 6) ならびに阻害性受容体 F c R I I B) との結合について、ならびに補体の第 1 の成分 (C 1 q) について独特のプロフィールを有する F c 領域を含む。ヒト I g G 1 および I g G 3 は、すべての F c 受容体と結合し ; I g G 2 は、F c R I I A<sub>H 1 3 1</sub> と結合し、F c R I I A<sub>R 1 3 1</sub> F c R I I I A<sub>V 1 5 8</sub> に対してより低い親和性を有し ; I g G 4 は、F c R I、F c R I I A、F c R I I B、F c R I I C および F c R I I I A<sub>V 1 5 8</sub> と結合し ; 阻害性受容体 F c R I I B は、I g G 1、I g G 2 および I g G 3 に対して、すべてのその他の F c 受容体よりも低い親和性を有する。Bruhns et al. (2009) Blood 113:3716。研究によって、F c R I は、I g G 2 と結合せず、F c R I I I B は、I g G 2 または I g G 4 と結合しないことが示された。同著。一般に、A D C C 活性に関して、ヒト I g G 1 I g G 3 >> I g G 4 I g G 2。結果として、例えば、A D C C が望まれる薬物における使用のためには、I g G 2 または I g G 4 ではなく、I g G 1 定常ドメインが選択され得 ; F c R I I I A 発現 N K 細胞、マクロファージの単球の活性化の場合には、I g G 3 が選択され得 ; アレルギー患者を脱感作するために抗体が使用されるべきである場合には I g G 4 が選択され得る。抗体がすべてのエフェクター機能を欠くことが望まれる場合にも、I g G 4 が選択され得る。

#### 【0170】

本明細書に記載される抗 T I G I T 可変領域は、F c、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 F c と連結され得 (例えば、共有結合によって連結されるか、または融合される)、これは、例えば、I g G 1 の任意のアロタイプまたはイソアロタイプ : G 1 m、G 1 m 1 (a)、G 1 m 2 (x)、G 1 m 3 (f)、G 1 m 1 7 (z) ; I g G 2 の任意のアロタイプまたはイソアロタイプ : G 2 m、G 2 m 2 3 (n) ; I g G 3 の任意のアロタイプまたはイソアロタイプ : G 3 m、G 3 m 2 1 (g 1)、G 3 m 2 8 (g 5)、G 3 m 1 1 (b 0)、G 3 m 5 (b 1)、G 3 m 1 3 (b 3)、G 3 m 1 4 (b 4)、G 3 m 1 0 (b 5)、G 3 m 1 5 (s)、G 3 m 1 6 (t)、G 3 m 6 (c 3)、G 3 m 2 4 (c 5)、G 3 m 2 6 (u)、G 3 m 2 7 (v) であり得る。例えば、Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1) を参照のこと。アロタイプの選択は、例えば、抗薬物抗体の形成を最小化するために、可能性ある免疫原性の懸念によって影響を受け得る。

#### 【0171】

特定の実施形態では、本明細書に記載される抗 T I G I T 可変領域は、1 種または複数の活性化 F c 受容体 (F c R I / C D 6 4、F c R I I a / C D 3 2 または F c R I I I a / C D 1 6) と結合する F c と連結され、それによって、A D C C を刺激し、T 細胞枯渇を引き起こし得る。特定の実施形態では、本明細書に記載される抗 T I G I T 可変領域は、ヒト I g G 1 または I g G 3 F c と連結され、すなわち、抗体は、I g G 1 または I g G 3 アイソタイプのものである。特定の実施形態では、抗 T I G I T 抗体は、枯渇性抗体であり、特に、それらは、腫瘍微小環境において、T<sub>r e g</sub> 細胞を枯渇させ、T<sub>e f f</sub> 細胞を枯渇させない (それによって、抗腫瘍活性を増強する) が、腫瘍微小環境の外側、例えば、末梢では、T<sub>r e g</sub> および T<sub>e f f</sub> 細胞を大幅には枯渇させない。特定の実施形態では、抗 T I G I T 抗体は、腫瘍部位での T<sub>r e g</sub> 細胞枯渇または排除および T<sub>e f f</sub> 細胞の同時活性化を刺激する、天然に存在するか、または天然に存在しない (例えば、突然変異 (単数または複数) を含む) のいずれかのアイソタイプのものである。特定の実施形態では、抗 T I G I T 抗体は、腫瘍部位での T<sub>e f f</sub> 対 T<sub>r e g</sub> 比の上昇をもたらし、これは、強力な抗腫瘍活性を示し、好ましくは、腫瘍微小環境の外側、例えば、末梢では、T<sub>r e g</sub> および T<sub>e f f</sub> 細胞を大幅に枯渇しない。

#### 【0172】

その他の実施形態では、抗 T I G I T 抗体は、T<sub>r e g</sub> の免疫抑制活性を遮断する。特定の実施形態では、抗 T I G I T 抗体は、F c R 結合が減少または排除された、例えば、活性化 F c R との結合が低減した F c を有する。

#### 【0173】

本明細書に記載される抗 T I G I T 可変領域は、例えば、腫瘍環境における T<sub>r e g</sub> 枯

10

20

30

40

50

渴を増強するために、天然に存在しないFc領域、例えば、エフェクターレスまたはほとんどエフェクターレスFc(例えば、ヒトIgG2またはIgG4)、あるいは、1種または複数の活性化Fc受容体(FcRI、FcRIIaまたはFcRIIIa)との結合が増強されたFcと連結され得る。

#### 【0174】

本明細書に記載される可変領域は、通常、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合および/または抗原依存性細胞性細胞傷害性などの、抗体の1種または複数の機能的特性を変更するために、1つまたは複数の修飾を含むFcと連結され得る。さらに、本明細書に記載される抗体は、化学的に修飾され得る(例えば、1種または複数の化学部分は、抗体と結合され得る)か、またはそのグリコシル化を変更するよう、抗体の1種または複数の機能的特性を変更するよう修飾され得る。これらの実施形態の各々は、以下に詳細に記載される。Fc領域中の残基の番号付けは、カバットのEU指数のものである。本明細書において開示される配列変異体は、残基番号と、それに続く、天然に存在するアミノ酸の代わりに置換されるアミノ酸に関連して、任意選択で、その位置の天然に存在する残基が先行して提供される。所与の位置に複数のアミノ酸が存在し得る場合、例えば、配列が天然に存在するアイソタイプ間で異なる場合、または複数の突然変異がその位置で置換され得る場合には、それらは/によって分けられる(例えば、「X/Y/Z」)。

#### 【0175】

例えば、親のFcに対して、(a)抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)が増大もしくは減少した、(b)補体媒介性細胞傷害性(CDC)が増大もしくは減少した、(c)C1qに対する親和性が増大もしくは減少した、および/または(d)Fc受容体に対する親和性が増大もしくは減少したFc変異体を作製するために、Fc領域中に修飾を行ってもよい。このようなFc領域変異体は、一般に、Fc領域中に少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。アミノ酸修飾を組み合わせることは、特に望ましいと考えられる。例えば、変異体Fc領域は、中に、本明細書において同定される特定のFc領域位置の2、3、4、5つなどの置換を含み得る。例示的Fc配列変異対は、本明細書において開示されており、また、米国特許第5,624,821号、同6,277,375号、同6,737,056号、同6,194,551号、同7,317,091号、同8,101,720号、PCT特許公開WO00/42072、WO01/58957、WO04/016750、WO04/029207、WO04/035752、WO04/074455、WO04/099249、WO04/063351、WO05/070963、WO05/040217、WO05/092925およびWO06/020114で提供されている。

#### 【0176】

エフェクター機能を低減すること

ADCC活性は、Fc領域を修飾することによって低減され得る。特定の実施形態では、Fc受容体との結合に影響を及ぼす部位、好ましくは、サルベージ受容体結合部位以外の部位が除去され得る。その他の実施形態では、Fc領域は、ADCC部位を除去するよう修飾され得る。ADCC部位は、当技術分野で公知である、例えば、IgG1中のADCC部位に関しては、Sarmay et al. (1992) Molec. Immunol. 29 (5): 633-9を参照のこと。一実施形態では、ヒトIgG1のG236RおよびL328R変異体は、FcR結合を効率的に排除する。Horton et al. (2011) J. Immunol. 186:4223およびChu et al. (2008) Mol. Immunol. 45:3926。その他の実施形態では、FcRとの結合が低減されているFcは、アミノ酸置換L234A、L235EおよびG237Aを含んでいた。Gross et al. (2001) Immunity 15:289。

#### 【0177】

CDC活性はまた、Fc領域を修飾することによって低減され得る。IgG1位置での突然変異、D270、K322、P329およびP331、具体的には、アラニン突然変異D270A、K322A、P329AおよびP331Aは、対応する抗体の、C1qと結合し、補体を活性化する能力を大幅に低減する。Idusogie et al. (2000) J. Immunol. 164:4178; WO99/51642。IgG1の位置331の修飾(例えば、P331S)

は、補体結合を低減すると示されている。Tao et al. (1993) J. Exp. Med. 178:661およびCanfield & Morrison (1991) J. Exp. Med. 173:1483。別の例では、アミノ酸位置 231 ~ 239 内の 1 個または複数のアミノ酸残基が変更され、それによって、抗体の補体を固定する能力を低減する。WO 94 / 29351。

#### 【0178】

いくつかの実施形態では、補体結合が低減した Fc は、アミノ酸置換 A330S および P331S を有する。Gross et al. (2001) Immunity 15:289。

#### 【0179】

エフェクター機能が完全に避けられるべき使用のために、例えば、所望の治療的利益を生じさせるのに抗原結合単独で十分である場合およびエフェクター機能が、望ましくない副作用につながる(そのリスクを増大する)だけである場合には、IgG4 抗体を使用してもよく、または Fc 領域もしくはそのかなりの部分を欠く抗体もしくは断片を考案することができ、または Fc を、グリコシル化を完全に排除するよう突然変異してもよい(例えば、N297A)。あるいは、エフェクター機能を欠き、Fc R と結合する能力を欠き(IgG2 のように)、補体を活性化することができない(IgG4 のように)、ヒト IgG2 のハイブリッドコンストラクト(C<sub>H</sub>1 ドメインおよびヒンジ領域)およびヒト IgG4 (C<sub>H</sub>2 および C<sub>H</sub>3 ドメイン)が作製されてきた。Rother et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25:1256。Mueller et al. (1997) Mol. Immunol. 34:441; Labriijn et al. (2008) Curr. Op. Immunol. 20:479(エフェクター機能を全般的に低減するための Fc 修飾を論じる)も参照のこと。

10

20

#### 【0180】

その他の実施形態では、Fc 領域は、抗体のすべてのエフェクター機能を低減するよう、少なくとも 1 個のアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基と置換することによって変更される。例えば、抗体が、エフェクターリガンドに対して低減した親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力は保持するよう、アミノ酸残基 234、235、236、237、297、318、320 および 322 から選択される 1 個または複数のアミノ酸が、異なるアミノ酸残基と置換され得る。それに対する親和性が変更されるエフェクターリガンドは、例えば、Fc 受容体(残基 234、235、236、237、297)または補体の C1 成分(残基 297、318、320、322)であり得る。両方とも Winter et al による米国特許第 5,624,821 号および同 5,648,260 号。

30

#### 【0181】

1 つの早期の特許出願は、Fc RI との結合を低減して、ADCC を低減するため(234A; 235E; 236A; G237A)または補体成分 C1q との結合を遮断して、CDC を排除するために(E318A または V/K320A および K322A/Q)、IgG Fc 領域中の修飾を提案した。WO 88 / 007089。Duncan & Winter (1988) Nature 332:563; Chappel et al. (1991) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 88:9036; および Sondermann et al. (2000) Nature 406:267(Fc RIII 結合に対するこれらの突然変異の効果を論じる)も参照のこと。

#### 【0182】

エフェクター機能を低減する Fc 修飾はまた、位置 234、235、236、237、267、269、325 および 328 での置換、挿入および欠失、例えば、234G、235G、236R、237K、267R、269R、325L および 328R を含む。Fc 変異体は、236R/328R を含み得る。FcγR および補体相互作用を低減するためのその他の修飾は、置換 297A、234A、235A、237A、318A、228P、236E、268Q、309L、330S、331S、220S、226S、229S、238S、233P および 234V を含む。これらおよびその他の修飾は、Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 20:685-691 に概説されている。IgG1 中、E233P、L234V、L235A、適宜、G236、A327G、A330S および P331S; IgG4 中、E233P、F234V、L235A、適宜、G236; および IgG2 中、A330S および P331S など、位置 233 ~ 236 および 327

40

50

～ 3 3 1 のうち 1 つまたは複数で I g G 残基を突然変異することによって、エフェクター機能 (A D C C および補体活性化の両方) は、新生児 F c R 結合を維持しながら (半減期を維持しながら) 低減され得る。Armour et al. (1999) Eur. J. Immunol. 29:2613 ; W O 9 9 / 5 8 5 7 2 を参照のこと。エフェクター機能を低減するその他の突然変異として、I g G 1 中の L 2 3 4 A および L 2 3 5 A (Alegre et al. (1994) Transplantation 57:153 7) ; I g G 2 中の V 2 3 4 A および G 2 3 7 A (Cole et al. (1997) J. Immunol. 159:36 13 ; 米国特許第 5 , 8 3 4 , 5 9 7 号も参照のこと) ; ならびに I g G 4 の S 2 2 8 P および L 2 3 5 E (Reddy et al. (2000) J. Immunol. 164:1925) が挙げられる。ヒト I g G 1 においてエフェクター機能を低減するための突然変異の別の組合せとして、L 2 3 4 F 、 L 2 3 5 E および P 3 3 1 S が挙げられる。Oganesyan et al. (2008) Acta Crystallogr . D. Biol. Crystallogr. 64:700。全般的に、Labriijn et al. (2008) Curr. Op. Immuno l. 20:479 を参照のこと。F c ( I g G 1 ) 融合タンパク質 (アバタセプト) に関連してエフ ェクター機能を減少させるとわかっているさらなる突然変異として、C 2 2 6 S 、 C 2 2 9 S および P 2 3 8 S ( E U 残基番号付け) がある。Davis et al. (2007) J. Immunol. 34 :2204。

10

#### 【 0 1 8 3 】

A D C C および / または C D C を低減させたその他の F c 変異体は、Glaesner et al. (2010) Diabetes Metab. Res. Rev. 26:287 ( I g G 4 において A D C C および A D C P を 減少させるための F 2 3 4 A および L 2 3 5 A ) ; Hutchins et al. (1995) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 92:11980 ( I g G 4 における F 2 3 4 A 、 G 2 3 7 A および E 3 1 8 A ) ; An et al. (2009) MAbs 1:572 および米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 1 4 8 1 6 7 号 ( I g G 2 における H 2 6 8 Q 、 V 3 0 9 L 、 A 3 3 0 S および P 3 3 1 S ) ; McEarchern et al. (2007) Blood 109:1185 ( I g G 1 における C 2 2 6 S 、 C 2 2 9 S 、 E 2 3 3 P 、 L 2 3 4 V 、 L 2 3 5 A ) ; Vafa et al. (2014) Methods 65:114 ( I g G 2 における V 2 3 4 V 、 G 2 3 7 A 、 P 2 3 8 S 、 H 2 6 8 A 、 V 3 0 9 L 、 A 3 3 0 S 、 P 3 3 1 S ) に開示されている。

20

#### 【 0 1 8 4 】

特定の実施形態では、本質的にエフェクター機能を有さない、すなわち、F c R との 結合が低減され、補体結合が低減された F c が、選択される。エフェクターレスである例 示的 F c 、例えば、I g G 1 F c は、以下の 5 つの突然変異を含む : L 2 3 4 A 、 L 2 3 5 E 、 G 2 3 7 A 、 A 3 3 0 S および P 3 3 1 S 。Gross et al. (2001) Immunity 15: 289。これらの 5 つの置換は、同様にグリコシル化を排除するための N 2 9 7 A と組み合 わされ得る。

30

#### 【 0 1 8 5 】

エフェクター機能を増強すること

あるいは、F c 領域を修飾することによって、A D C C 活性は増大され得る。A D C C 活性に関して、ヒト I g G 1 I g G 3 >> I g G 4 I g G 2 であり、そのため、A D C C が望まれる薬物における使用のためには、I g G 2 または I g G 4 ではなく、I g G 1 定常ドメインが選択され得る。あるいは、F c 領域は、以下の位置 : 2 3 4 、 2 3 5 、 2 3 6 、 2 3 8 、 2 3 9 、 2 4 0 、 2 4 1 、 2 4 3 、 2 4 4 、 2 4 5 、 2 4 7 、 2 4 8 、 2 4 9 、 2 5 2 、 2 5 4 、 2 5 5 、 2 5 6 、 2 5 8 、 2 6 2 、 2 6 3 、 2 6 4 、 2 6 5 、 2 6 7 、 2 6 8 、 2 6 9 、 2 7 0 、 2 7 2 、 2 7 6 、 2 7 8 、 2 8 0 、 2 8 3 、 2 8 5 、 2 8 6 、 2 8 9 、 2 9 0 、 2 9 2 、 2 9 3 、 2 9 4 、 2 9 5 、 2 9 6 、 2 9 8 、 2 9 9 、 3 0 1 、 3 0 3 、 3 0 5 、 3 0 7 、 3 0 9 、 3 1 2 、 3 1 3 、 3 1 5 、 3 2 0 、 3 2 2 、 3 2 4 、 3 2 5 、 3 2 6 、 3 2 7 、 3 2 9 、 3 3 0 、 3 3 1 、 3 3 2 、 3 3 3 、 3 3 4 、 3 3 5 、 3 3 7 、 3 3 8 、 3 4 0 、 3 6 0 、 3 7 3 、 3 7 6 、 3 7 8 、 3 8 2 、 3 8 8 、 3 8 9 、 3 9 8 、 4 1 4 、 4 1 6 、 4 1 9 、 4 3 0 、 4 3 3 、 4 3 4 、 4 3 5 、 4 3 6 、 4 3 7 、 4 3 8 または 4 3 9 で 1 個または複数のアミノ酸を修飾することによって、抗体依 存性細胞性細胞傷害性 (A D C C ) を増大するよう、および / または F c 受容体に対する 親和性を増大するよう修飾され得る。W O 2 0 1 2 / 1 4 2 5 1 5 を参照のこと ; W O 0

40

50



0 / 4 2 0 7 2 も参照のこと。例示的置換として、2 3 6 A、2 3 9 D、2 3 9 E、2 6 8 D、2 6 7 E、2 6 8 E、2 6 8 F、3 2 4 T、3 3 2 Dおよび3 3 2 Eが挙げられる。例示的変異体として、2 3 9 D - 3 3 2 E、2 3 6 A - 3 3 2 E、2 3 6 A - 2 3 9 D - 3 3 2 E、2 6 8 F - 3 2 4 T、2 6 7 E - 2 6 8 F、2 6 7 E - 3 2 4 Tおよび2 6 7 E - 2 6 8 F - 3 2 4 Tが挙げられる。例えば、任意選択で、I 3 3 2 Eと組み合わせられ得る、G 2 3 6 A変異体を含むヒトI g G 1 F cは、F c R I I A / F c R I I B結合親和性比をおよそ1.5倍増大するとわかった。Richards et al. (2008) Mol. Cancer Therap. 7:2517; Moore et al. (2010) mAbs 2:181。F c y Rおよび補体相互作用を増強するためのその他の修飾として、それだけには限らないが、置換2 9 8 A、3 3 3 A、3 3 4 A、3 2 6 A、2 4 7 I、3 3 9 D、3 3 9 Q、2 8 0 H、2 9 0 S、2 9 8 D、2 9 8 V、2 4 3 L、2 9 2 P、3 0 0 L、3 9 6 L、3 0 5 Iおよび3 9 6 Lが挙げられる。これらおよびその他の修飾は、Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 20: 685-691に概説されている。具体的には、A D C CおよびC D Cの両方は、I g G 1の位置E 3 3 3の変更、例えば、E 3 3 3 Aによって増強され得る。Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591。I g G 1においてエフェクター機能を増強するためのP 2 4 7 IおよびA 3 3 9 D / Q突然変異の使用は、WO 2 0 0 6 / 0 2 0 1 1 4に開示されており、D 2 8 0 H、K 2 9 0 S ± S 2 9 8 D / Vは、WO 2 0 0 4 / 0 7 4 4 5 5に開示されている。ヒトI g G 1におけるK 3 2 6 A / WおよびE 3 3 3 A / S変異体およびI g G 2におけるE 3 3 3 Sは、エフェクター機能を増大するとわかっている。Idusogie et al. (2001) J. Immunol. 166:2571。

10

20

#### 【0186】

具体的には、F c R 1、F c R I I、F c R I I IおよびF c R nに対するヒトI g G 1上の結合部位がマッピングされており、結合が改善された変異体が記載されている。Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604。組合せ突然変異体T 2 5 6 A - S 2 9 8 A、S 2 9 8 A - E 3 3 3 A、S 2 9 8 A - K 2 2 4 AおよびS 2 9 8 A - E 3 3 3 A - K 3 3 4 A (F c R I I I a結合およびA D C C活性が増強されている)を含めた、位置2 5 6、2 9 0、2 9 8、3 3 3、3 3 4および3 3 9での特定の突然変異は、F c R I I Iとの結合を改善すると示された。S 2 3 9 D - I 3 3 2 EおよびS 2 3 9 D - I 3 3 2 E - A 3 3 0 L突然変異を有する変異体を含めた、F c R I I I aとの結合が強力に増強されたその他のI g G 1変異体が同定されており、これは、F c R I I I aに対する親和性の最大の増大、F c R I I b結合の減少およびカニクイザルにおける強力な細胞傷害性活性を示した。Lazar et al. (2006) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 103:4005; Awan et al. (2010) Blood 115:1204; Desjarlais & Lazar (2011) Exp. Cell Res. 317:1278。アレムツズマブ(C D 5 2 特異的)、トラスツズマブ(H E R 2 / n e u 特異的)、リツキシマブ(C D 2 0 特異的)およびセツキシマブ(E G F R 特異的)などの抗体中への三重突然変異の導入は、インビトロで大きく増強されたA D C C活性に変換され、S 2 3 9 D - I 3 3 2 E変異体は、サルにおいてB細胞を枯渇させる増強された能力を示した。Lazar et al. (2006) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 103:4005。さらに、B細胞悪性腫瘍および乳癌のモデルにおいてヒトF c R I I I aを発現するトランスジェニックマウスにおいて、F c R I I I aとの増強された結合および同時に増強されたA D C C活性を示した、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、V 3 0 5 IおよびP 3 9 6 L突然変異を含有するI g G 1突然変異体が同定された。Stavenhagen et al. (2007) Cancer Res. 67:8882; 米国特許第8,652,466号; Nordstrom et al. (2011) Breast Cancer Res. 13:R123。

30

40

#### 【0187】

種々のI g Gアイソタイプはまた、差次的C D C活性を示す(I g G 3 > I g G 1 > > I g G 2 > I g G 4)。Dangl et al. (1988) EMBO J. 7:1989。増強されたC D Cが望まれる使用のためには、C 1 qとの結合を増大する突然変異を導入することも可能である。補体(C D C)を補充する能力は、C 1 q、補体カスケードの第1の成分との結合を増大するための、I g G 2におけるK 3 2 6および/またはE 3 3 3での突然変異、例えば、K

50

3 2 6 W (A D C C 活性を低減する)および E 3 3 3 S によって増強され得る。Idusogie et al. (2001) J. Immunol. 166:2571。ヒト I g G 1 への S 2 6 7 E / H 2 6 8 F / S 3 2 4 T (単独または任意の組合せの)導入は、C 1 q 結合を増強する。Moore et al. (2010) mAbs 2:181。Natsume et al. (2008) Cancer Res. 68:3863(その中の図 1)の I g G 1 / I g G 3 ハイブリッドアイソタイプ抗体の F c 領域「1 1 3 F」は、増強された C D C を与える。Michaelson et al. (2009) Scand. J. Immunol. 70:553およびRedpath et al. (1998) Immunology 93:595も参照のこと。

#### 【0188】

エフェクター機能を増大または減少し得るさらなる突然変異は、Dall'Acqua et al. (2006) J. Immunol. 177:1129に開示されている。Carter (2006) Nat. Rev. Immunol. 6:343;Presta (2008) Curr. Op. Immunol. 20:460も参照のこと。

#### 【0189】

本発明のアンタゴニスト抗 T I G I T m A b s と必ずしも関連しないが、阻害性受容体 F c y R I I b に対する親和性を増強する F c 変異体は、アポトーシス誘導またはアジュバント活性を増強し得る。Li & Ravetch (2011) Science 333:1030;Li & Ravetch (2012) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 109:10966; 米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 1 0 8 1 2 号。このような変異体は、例えば、B 細胞および単球を含めた F c y R I I b <sup>+</sup> 細胞と関連する免疫調節性活性を有する抗体を提供し得る。一実施形態では、F c 変異体は、1 種または複数の活性化受容体と相対的に、F c y R I I b に対する選択的に増強された親和性を提供する。F c y R I I b に対する結合を変更するための修飾として、E U 指数に従って、2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、2 3 9、2 6 6、2 6 7、2 6 8、3 2 5、3 2 6、3 2 7、3 2 8 および 3 3 2 からなる群から選択される位置での 1 つまたは複数の修飾が挙げられる。F c y R I I b 親和性を増強するための例示的置換として、それだけには限らないが、2 3 4 D、2 3 4 E、2 3 4 F、2 3 4 W、2 3 5 D、2 3 5 F、2 3 5 R、2 3 5 Y、2 3 6 D、2 3 6 N、2 3 7 D、2 3 7 N、2 3 9 D、2 3 9 E、2 6 6 M、2 6 7 D、2 6 7 E、2 6 8 D、2 6 8 E、3 2 7 D、3 2 7 E、3 2 8 F、3 2 8 W、3 2 8 Y および 3 3 2 E が挙げられる。例示的置換として、2 3 5 Y、2 3 6 D、2 3 9 D、2 6 6 M、2 6 7 E、2 6 8 D、2 6 8 E、3 2 8 F、3 2 8 W および 3 2 8 Y が挙げられる。F c y R I I b との結合を増強するためのその他の F c 変異体として、2 3 5 Y - 2 6 7 E、2 3 6 D - 2 6 7 E、2 3 9 D - 2 6 8 D、2 3 9 D - 2 6 7 E、2 6 7 E - 2 6 8 D、2 6 7 E - 2 6 8 E および 2 6 7 E - 3 2 8 F が挙げられる。具体的には、ヒト I g G 1 の S 2 6 7 E - L 3 2 8 F 二重変異体を含めた S 2 6 7 E、G 2 3 6 D、S 2 3 9 D、L 3 2 8 F および I 3 3 2 E 変異体は、具体的には、阻害性 F c y R I I b 受容体に対する親和性の増強において特に価値がある。Chu et al. (2008) Mol. Immunol. 45:3926; 米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 2 4 2 9 8 号; W O 2 0 1 2 / 0 8 7 9 2 8。F c R I I b に対する増強された特異性(F c R I I a <sup>R 1 3 1</sup> とは区別されるような)は、P 2 3 8 D 置換およびその他の突然変異(Mimoto et al. (2013) Protein. Eng. Des. & Selection 26:589; W O 2 0 1 2 / 1 1 5 2 4 1)ならびに V 2 6 2 E および V 2 6 4 E (Yu et al. (2013) J. Am. Chem. Soc. 135:9723および W O 2 0 1 4 / 1 8 4 5 4 5)を付加することによって得ることができる。

#### 【0190】

##### 半減期延長

特定の実施形態では、抗体は、その生物学的半減期を増大するよう修飾される。種々のアプローチが可能である。例えば、これは、F c 領域の F c R n に対する結合親和性を増大することによって行うことができる。一実施形態では、抗体は、Presta et al. によって米国特許第 5, 8 6 9, 0 4 6 号および同 6, 1 2 1, 0 2 2 号に記載されるように I g G の F c 領域の C H 2 ドメインの 2 つのループからとられるサルベージ受容体結合エピトープを含有するよう C H 1 または C L 領域内で変更される。F c R n との結合を増大し、および/または薬物動態特性を改善するその他の例示的 F c 変異体は、位置 2 5 9、3 0 8 および 4 3 4 での置換を含み、例えば、2 5 9 I、3 0 8 F、4 2 8 L、4 2 8 M、4 3 4

S、434H、434F、434Yおよび434Mが挙げられる。FcRnとのFc結合を増大するその他の変異体として、250E、250Q、428L、428F、250Q/428L(Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216、Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176:346-356)、256A、272A、305A、307A、311A、312A、378Q、380A、382A、434A(Shields et al, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604)、252F、252Y、252W、254T、256Q、256E、256D、433R、434F、434Y、252Y/254T/256E、433K/434F/436H(Dall'Acqua et al. Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et al., 2006, Journal of Biological Chemistry 281:23514-23524)が挙げられる。米国特許第8,367,805号を参照のこと。

10

#### 【0191】

N434A変異体(Yeung et al. (2009) J. Immunol. 182:7663)などの、IgG Fc中の特定の保存された残基(I253、H310、Q311、H433、N434)の修飾は、FcRn親和性を増大し、したがって、循環における抗体の半減期を増大する方法として提案されている。WO98/023289。M428LおよびN434Sを含む組合せFc変異体は、FcRn結合を増大し、血清半減期を最大5倍まで増大すると示されている。Zalevsky et al. (2010) Nat. Biotechnol. 28:157。T307A、E380AおよびN434A修飾を含む組合せFc変異体もまた、IgG1抗体の半減期を延長する。Petrova et al. (2006) Int. Immunol. 18:1759。さらに、M252Y-M428L、M428L-N434H、M428L-N434F、M428L-N434Y、M428L-N434A、M428L-N434MおよびM428L-N434S変異体を含む組合せFc変異体もまた、半減期を延長すると示されている。WO2009/086320。

20

#### 【0192】

さらに、M252Y、S254TおよびT256Eを含む組合せFc変異体は、半減期を4倍近く増大する。Dall'Acqua et al. (2006) J. Biol. Chem. 281:23514。増大したFcRn親和性を提供するが、pH依存が低下した関連IgG1修飾(M252Y-S254T-T256E-H433K-N434F)を使用して、その他の抗体のFcRnとの結合を防ぎ、その結果、そのその他の抗体、内因性IgG(例えば、自己免疫状況における)または別の外因性(治療用)mAbのいずれかのクリアランスの増大をもたらすための競合物質として使用するためのIgG1コンストラクト(「MST-HN Abdeg」)を作製した。Vaccaro et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23:1283; WO2006/130834。

30

#### 【0193】

FcRn結合を増大するためのその他の修飾は、Yeung et al. (2010) J. Immunol. 182:7663-7671; 第6,277,375号; 同6,821,505号; WO97/34631; WO2002/060919に記載されている。

#### 【0194】

特定の実施形態では、FcRn結合を増大し、半減期を潜在的に増大するためにハイブリッドIgGアイソタイプが使用され得る。例えば、IgG1/IgG3ハイブリッド変異体は、CH2および/またはCH3領域中のIgG1位置を、2種のアイソタイプが異なる位置でIgG3に由来するアミノ酸と置換することによって構築され得る。このようにして、1つまたは複数の置換、例えば、274Q、276K、300F、339T、356E、358M、384S、392N、397M、422I、435Rおよび436Fを含むハイブリッド変異体IgG抗体が、構築され得る。本明細書に記載されるその他の実施形態では、CH2および/またはCH3領域中のIgG2位置を、2種のアイソタイプが異なる位置でIgG1に由来するアミノ酸と置換することによって、IgG1/IgG2ハイブリッド変異体構築され得る。このようにして、1つまたは複数の置換、例えば、以下のアミノ酸置換: 233E、234L、235L、-236G(位置236でのグリシンの挿入を指す)および327Aのうち1つまたは複数を含むハイブリッド変異体

40

50

I g G 抗体が構築され得る。米国特許第 8,629,113 号を参照のこと。血清半減期に増大し、発現を改善するといわれている I g G 1 / I g G 2 / I g G 4 配列のハイブリッドが作製された。米国特許第 7,867,491 号(その中の配列番号 18)。

#### 【0195】

本発明の抗体の血清半減期はまた、ペグ化によって増大され得る。抗体を、例えば、抗体の生物学的(例えば、血清)半減期を増大するようペグ化してもよい。抗体をペグ化するために、通常、抗体またはその断片を、1つまたは複数の PEG 基が、抗体または抗体断片と結合するようになる条件下で、PEG の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール(PEG)試薬と反応させる。好ましくは、ペグ化は、反応性 PEG 分子(または類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応によって実施される。本明細書において、用語「ポリエチレングリコール」は、モノ(C1 ~ C10)アルコキシ - またはアリアルオキシ - ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール - マレイミドなどの、その他のタンパク質を誘導体化するために使用された PEG の任意の形態を包含するものとする。特定の実施形態では、ペグ化されるべき抗体は、非グリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化するための方法は、技術分野で公知であり、本明細書に記載される抗体に適用され得る。例えば、Nishimura et al. による EP 0 1 5 4 3 1 6 および Ishikawa et al. による EP 0 4 0 1 3 8 4 を参照のこと。

#### 【0196】

あるいは、いくつかの状況かでは、本発明の抗体の半減期を増大するのではなく、減少することが望ましい場合がある。ヒト I g G 1 の Fc における I 2 5 3 A (Hornick et al. (2000) J. Nucl. Med. 41:355) および H 4 3 5 A / R、I 2 5 3 A または H 3 1 0 A (Kim et al. (2000) Eur. J. Immunol. 29:2819) などの修飾は、医用画像のような迅速なクリアランスが好ましい状況において使用するために、FcRn 結合を減少させ、ひいては、半減期を減少(クリアランスを増大)させ得る。Kenanova et al. (2005) Cancer Res. 65:622 も参照のこと。クリアランスを増強するためのその他の手段として、本発明の抗原結合ドメインを、Fab 断片などの FcRn と結合する能力を欠く抗体断片としてフォーマットすることが挙げられる。このような修飾は、抗体の循環半減期を 2、3 週間から数時間に減少させ得る。次いで、抗体断片の選択的ペグ化を使用して、必要に応じて、抗体断片の半減期を微調整(増大)できる。Chapman et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:780。半減期を増大するために、抗体断片をまた、ヒト血清アルブミンと融合して、例えば、融合タンパク質コンストラクトにしてもよい。Yeh et al. (1992) Proc. Nat'l Acad. Sci. 89:1904。あるいは、ヒト血清アルブミン(HSA)と結合する、本発明の第 1 の抗原結合ドメインおよび第 2 の抗原結合ドメインを用いて、二重特異性抗体を構築してもよい。国際特許出願公開 WO 2 0 0 9 / 1 2 7 6 9 1 およびその中で引用される特許参考文献を参照のこと。あるいは、半減期を増大するために、特殊化ポリペプチド配列、例えば、「X T E N」ポリペプチド配列を抗体断片に添加することができる。Schellenberger et al. (2009) Nat. Biotechnol. 27:1186; 国際特許出願公開 WO 2 0 1 0 / 0 9 1 1 2 2。

#### 【0197】

さらなる Fc 変異体

I g G 4 定常ドメインを使用する場合には、普通、I g G 1 中のヒンジ配列を模倣し、それによって、例えば、治療されている患者において、治療用抗体と内因性 I g G 4 の間の Fab アーム交換を低減しながら、I g G 4 分子を安定化する置換 S 2 2 8 P を含むことが好ましい。Labrijn et al. (2009) Nat. Biotechnol. 27:767; Reddy et al. (2000) J. Immunol. 164:1925。

#### 【0198】

I g G 1 コンストラクトのヒンジ中の可能性あるプロテアーゼ切断部位を、D 2 2 1 G および K 2 2 2 S 修飾によって排除し、抗体の安定性を増大することができる。WO 2 0 1 4 / 0 4 3 3 4 4。

#### 【0199】

Fc 変異体のそのリガンド(Fc 受容体)に対する親和性および結合特性は、それだけに

は限らないが、平衡方法(例えば、酵素結合免疫吸着測定法(E L I S A)またはラジオイムノアッセイ(R I A))または速度論(例えば、B I A C O R E(登録商標)S P R分析)および間接結合アッセイ、競合阻害アッセイ、蛍光共鳴エネルギー移動(F R E T)、ゲル電気泳動およびクロマトグラフィー(例えば、ゲル濾過)などのその他の方法を含めた、当技術分野で公知の種々のインビトロアッセイ法(生化学または免疫学ベースのアッセイ)によって決定され得る。これらおよびその他の方法は、調べられている1種もしくは複数の成分上の標識を利用してもよく、および/またはそれだけには限らないが、クロマトグラフィー、蛍光、発光もしくは同位体標識を含めた種々の検出方法を使用してもよい。結合親和性および速度論の詳細な説明は、抗体免疫原相互作用に焦点を当てる、Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)に見出すことができる。

10

#### 【0200】

さらにその他の実施形態では、抗体のグリコシル化は、エフェクター機能を増大または低減するよう修飾される。例えば、位置297の保存されたアスパラギン残基を突然変異し(例えば、N297A)、ひいては、補体およびFc R I結合を消滅させることによって、すべてのエフェクター機能を欠く非グリコシル化抗体を作製できる。Bolt et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:403. Tao & Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595(IgG 1中のN297Qを使用して、位置297でのグリコシル化を排除する)も参照のこと。

#### 【0201】

非グリコシル化抗体は、一般に、エフェクター機能を欠くが、その機能を回復させるよう、突然変異を導入することができる。非グリコシル化抗体、例えば、N297A/C/D/またはH突然変異に起因するものか、またはタンパク質をグリコシル化しない系(例えば、大腸菌)において産生されたものを、Fc R結合を回復させるよう、さらに突然変異することができる、例えば、S298Gおよび/またはT299A/G/もしくはH(WO2009/079242)またはE382VおよびM428I(Jung et al. (2010) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 107:604)。

20

#### 【0202】

さらに、グリコシル化を変更することによって、ADCCが増強された抗体を製造できる。例えば、重鎖A s n 297が連結したオリゴ糖からのフコースの除去は、Fc R I I aとの改善された結合に基づいてADCCを増強すると示された。Shields et al. (2002) *JBC* 277:26733; Niwa et al. (2005) *J. Immunol. Methods* 306:151; Cardarelli et al. (2009) *Clin. Cancer Res.* 15:3376 (MDX-1401); Cardarelli et al. (2010) *Cancer Immunol. Immunotherap.* 59:257(MDX-1342)。このような低フコース抗体は、例えば、フコシルトランスフェラーゼ(F U T 8)を欠くノックアウトチャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞において(Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614)、または非フコシル化抗体を生成するその他の細胞において産生され得る。例えば、Zhang et al. (2011) *mAbs* 3:289およびLi et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210(両方とも、糖鎖操作されたピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)における抗体産生を説明する); Mossner et al. (2010) *Blood* 115:4393; Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733; Shinkawa et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:3466; EP1176195B1を参照のこと。ADCCはまた、フコースの、A s n (297)が連結した炭化水素と結合する能力が低下した変異体C H O細胞系統、L e c 13の使用を開示する、P C T公開WO03/035835に記載されるように増強され得、また、宿主細胞において発現された抗体の低フコシル化をもたらした。Shields, R.L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740も参照のこと。あるいは、フコース類似体を、フコースが抗体上の炭水化物中に組み込まれることを阻害するために抗体産生の際に培養培地に添加してもよい。WO2009/135181。

30

40

#### 【0203】

抗体が連結したオリゴ糖における二分G l c N a c構造の増大もまた、ADCCを増強する。Umana et al.によるP C T公開WO99/54342は、糖タンパク質修飾性グリ

50

コシルトランスフェラーゼ(例えば、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現するよう遺伝子操作された細胞系統を記載し、その結果、遺伝子操作された細胞系統において発現された抗体は、二分GlcNAc構造の増大を示し、これは、抗体のADCC活性の増大をもたらす(Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180も参照のこと)。

#### 【0204】

ADCCおよびADCPの増強を示すが、CDCを減少する、ガラクトース、シアル酸、フコースおよびキシロース残基(いわゆるGNGNグリコフォーム)を欠くさらなるグリコシル化変異体ならびにADCC、ADCPおよびCDCの増強を示す、シアル酸、フコースおよびキシロース(いわゆるG1/G2グリコフォーム)を欠くその他のものが開発されている。米国特許出願公開第2013/0149300号。これらのグリコシル化パターンを有する抗体は、任意選択で、内因性キシロシルおよびフコシルトランスフェラーゼ遺伝子がノックアウトされている、遺伝子修飾されたベンサミアナタバコ(N. benthamiana)植物において産生される。

#### 【0205】

糖鎖操作はまた、Fc領域のAsn297で結合している炭水化物鎖の2,6シアリル含量を変更することによって、IgGコンストラクトの抗炎症特性を修飾するために使用され得、これでは、2,6シアリル化形態の割合の増加が、抗炎症効果の増強をもたらす。Nimmerjahn et al. (2008) Ann. Rev. Immunol. 26:513を参照のこと。逆に、2,6シアリル化炭化水素を有する抗体の割合の減少は、抗炎症特性が望まれない場合には有用であり得る。例えば、2,6シアリル化形態の選択的精製によって、または酵素的修飾によって、抗体の2,6シアリル化含量を修飾する方法は、米国特許出願公開第2008/0206246号に提供されている。その他の実施形態では、Fc領域のアミノ酸配列は、例えば、F241A修飾を含めることによって、2,6シアリル化の効果を模倣するよう修飾され得る。WO2013/095966。

#### 【0206】

### III. 抗体物理的特性

本明細書に記載される抗体は、軽鎖または重鎖可変領域のいずれかに1つまたは複数のグリコシル化部位を含有し得る。このようなグリコシル化部位は、抗体の免疫原性の増大または変更された抗原結合による抗体のpKの変更をもたらし得る(Marshall et al. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41:673-702; Gala and Morrison (2004) J. Immunol. 172:5489-94; Wallick et al. (1988) J. Exp. Med. 168:1099-109; Spiro (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al. (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al. (2000) Mol. Immunol. 37:697-706)。グリコシル化は、N-X-S/T配列を含有するモチーフで起こると知られている。いくつかの場合には、可変領域グリコシル化を含有しない抗TIGIT抗体を有することが好ましい。これは、可変領域中にグリコシル化モチーフを含有しない抗体を選択することによってか、またはグリコシル化領域内の残基を突然変異させることによって達成され得る。

#### 【0207】

特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、アスパラギン異性部位を含有しない。アスパラギンの脱アミド化は、N-GまたはD-G配列で起こり得、その結果、ポリペプチド鎖中にねじれを導入し、その安定性を低減する(イソアスパラギン酸効果)イソアスパラギン酸残基を生成する。

#### 【0208】

各抗体は、独特の等電点(pI)を有し、これは、一般に、6から9.5の間のpH範囲に入る。IgG1抗体のpIは、通常、7~9.5のpH範囲内に入り、IgG4抗体のpIは、通常、6~8のpH範囲内に入る。正常範囲の外側のpIを有する抗体は、インビボ条件下で幾分かのアンフォールディングおよび不安定性を有し得るという推測がある。したがって、正常範囲内に入るpI値を含有する抗TIGIT抗体を有することが好ましい。これは、正常範囲のpIを有する抗体を選択することによってか、または電荷を有

する表面残基を突然変異させることによって達成され得る。

【0209】

各抗体は、特徴的な融解温度を有し、融解温度が高いほど、インビボで全体的な安定性が大きいことを示す(Krishnamurthy R and Manning M C (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71)。一般に、 $T_{m1}$  (最初のアンフォールディングの温度)は、60 超、好ましくは、65 超、さらにより好ましくは、70 超であることが好ましい。抗体の融点は、示差走査熱量測定(Chen et al (2003) Pharm Res 20:1952-60;Ghirlando et al. (1999) Immunol Lett. 68:47-52)または円偏光二色性(Murray et al. (2002) J. Chromatogr. Sci. 40:343-9)を使用して測定できる。

【0210】

好ましい実施形態では、迅速に分解しない抗体が選択される。抗体の分解は、キャピラリー電気泳動(CE)およびMALDI-MS(Alexander A J and Hughes D E (1995) Anal Chem. 67:3626-32)を使用して測定できる。

【0211】

別の好ましい実施形態では、最小の凝集効果を有する抗体が選択され、凝集効果は、不要な免疫応答および/または変更されたか、もしくは不都合な薬物動態特性の誘発につながり得る。一般に、抗体は、25%以下、好ましくは、20%以下、さらにより好ましくは、15%以下、さらにより好ましくは、10%以下およびさらにより好ましくは、5%以下の凝集を有しても許容される。凝集は、サイズ排除カラム(SEC)、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)および光散乱を含めた、いくつかの技術によって測定できる。

【0212】

IV. 核酸分子

本明細書に記載される別の態様は、本明細書に記載される抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンド形成、カラムクロマトグラフィー、制限酵素、アガロースゲル電気泳動および当技術分野で周知のその他のものを含めた標準技術によって、その他の細胞成分またはその他の夾雑物、例えば、その他の細胞性核酸(例えば、その他の染色体DNA、例えば、自然界では単離されたDNAと連結している染色体DNA)またはタンパク質から精製された場合に、全細胞中に、細胞溶解物中に、または部分精製されたかもしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、「単離される」かまたは「実質的に純粋にされる」。F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New Yorkを参照のこと。本明細書に記載される核酸は、例えば、DNAまたはRNAであり得、イントロン配列を含有する場合も、含有しない場合もある。特定の実施形態では、核酸は、cDNA分子である。

【0213】

本明細書に記載される核酸は、標準分子生物学技術を使用して得ることができる。ハイブリドーマ(例えば、以下にさらに記載されるようなヒト免疫グロブリン遺伝子を保持するトランスジェニックマウスから調製されたハイブリドーマ)によって発現される抗体については、ハイブリドーマによって作製された抗体の軽鎖および重鎖をコードするcDNAは、標準PCR増幅またはcDNAクローニング技術によって得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから(例えば、ファージディスプレイ技術を使用して)から得られる抗体については、抗体をコードする核酸は、ライブラリーから回収され得る。

【0214】

VHおよびVLセグメントをコードするDNA断片が得られると、例えば、可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子に、Fab断片遺伝子に、またはscFv遺伝子に変換するように、標準組換えDNA技術によってこれらのDNA断片をさらに操作できる。これらの操作では、VLまたはVHをコードするDNA断片は、抗体定常領域または可動性リンカーなどの別のタンパク質をコードする別のDNA断片と作動可能に連結している。この文脈において使用されるような、用語「作動可能に連結された」は、2種のDNA断片によってコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるよう、2種のDNA断片が接続さ

10

20

30

40

50

れることを意味するものとする。

【0215】

VH領域をコードする単離されたDNAは、VHをコードするDNAを、重鎖定常領域(ヒンジ、CH1、CH2および/またはCH3)をコードする別のDNA分子と作動可能に連結することによって、全長重鎖遺伝子に変換され得る。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野で公知であり(例えば、Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照のこと)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準PCR増幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgMまたはIgD定常領域、例えば、IgG1領域であり得る。Fab断片重鎖遺伝子については、VHをコードするDNAは、重鎖CH1定常領域のみをコードする別のDNA分子と作動可能に連結され得る。

10

【0216】

VL領域をコードする単離されたDNAは、VLをコードするDNAを、軽鎖定常領域、CLをコードする別のDNA分子と作動可能に連結することによって、全長軽鎖遺伝子(ならびにFab軽鎖遺伝子)に変換され得る。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野で公知であり(例えば、Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照のこと)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準PCR増幅によって得ることができる。軽鎖定常領域は、または定常領域であり得る。

20

【0217】

scFv遺伝子を作製するために、VHおよびVLをコードするDNA断片を、例えば、アミノ酸配列(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>をコードする可動性リンカーをコードする別の断片に作動可能に連結し、その結果、VHおよびVL配列が、可動性リンカーによって接続されたVLおよびVH領域を有する連続一本鎖タンパク質として発現され得る(例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554を参照のこと)。

【0218】

V. 抗体作製

30

本発明の種々の抗体、例えば、本明細書に開示される抗ヒトTIGIT抗体と同一エピトープと競合するものまたはそれと結合するものは、Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975)によって記載される標準体細胞ハイブリダイゼーション技術などの種々の公知の技術を使用して産生できる。体細胞ハイブリダイゼーション手順は好ましいが、原理上、モノクローナル抗体を産生するためのその他の技術、例えば、Bリンパ球のウイルス性または発癌性形質転換、ヒト抗体遺伝子のライブラリーを使用するファージディスプレイ技術も使用できる。

【0219】

ハイブリドーマを調製するための好ましい動物系として、マウス系がある。マウスにおけるハイブリドーマ産生は、極めて十分に確立された手順である。免疫処置プロトコールおよび技術および融合のために免疫処置された脾細胞を単離するための技術は、当技術分野で公知である。融合パートナー(例えば、マウス骨髄腫細胞)および融合手順も公知である。

40

【0220】

本明細書に記載されるキメラまたはヒト化抗体は、上記のように調製したマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて調製できる。標準分子生物学技術を使用して、重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAを、対象のマウスハイブリドーマから得、非マウス(例えば、ヒト)免疫グロブリン配列を含有するよう遺伝子操作できる。例えば、当技術分野で公知の方法を使用して、キメラ抗体を作製するために、マウス可変領域をヒト定常領域に連結できる(例えば、Cabilly et al.の米国特許第4,816,567号を参照のこと)

50



と)。ヒト化抗体を作製するために、当技術分野で公知の方法を使用して、ヒトフレームワーク中にマウスCDR領域を挿入できる(例えば、Winterの米国特許第5,225,539号およびQueen et al.の米国特許第5,530,101号;同5,585,089号;同5,693,762号および同6,180,370号を参照のこと)。

#### 【0221】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。このようなTIGITに対して向けられたヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の部分を保持する、トランスジェニックまたはトランスクロモソミック(transchromosomal)マウスを使用して作製できる。これらのトランスジェニックおよびトランスクロモソミック(transchromosomal)マウスは、本明細書において、それぞれHuMAbマウスおよびKMマウスと呼ばれるマウスを含み、本明細書において、まとめて「ヒトIgマウス」と呼ばれる。

10

#### 【0222】

HuMAbマウス(登録商標)(Medarex, Inc.)は、再編成されていないヒト重鎖( $\mu$ および $\delta$ )および軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座(miniloci)を、内因性 $\mu$ および $\delta$ 鎖遺伝子座を不活性化する標的化された突然変異とともに含有する(例えば、Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859を参照のこと)。したがって、マウスは、マウスIgMまたは $\delta$ の発現の低下を示し、免疫処置に応じて、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチおよび体細胞突然変異を受けて、高親和性ヒトIgGモノクローナルを生成する(Lonberg, N. et al. (1994)、前掲; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93およびHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546に概説されている)。HuMAbマウスの調製および使用ならびにこのようなマウスによって保持されるゲノム修飾は、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; およびFishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851にさらに記載されており、それらの開示内容は、その全文が参照により本明細書に組み込まれる。さらに、すべてLonbergおよびKayの米国特許第5,545,806号;同5,569,825号;同5,625,126号;同5,633,425号;同5,789,650号;同5,877,397号;同5,661,016号;同5,814,318号;同5,874,299号;および同5,770,429号; Surani et al.の米国特許第5,545,807号;すべてLonbergおよびKayのPCT公開番号WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884およびWO 99/45962ならびにKorman et al.のPCT公開番号WO 01/14424を参照のこと。

20

30

#### 【0223】

特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、導入遺伝子および導入染色体(transchromosome)上にヒト免疫グロブリン配列を保持するマウス、例えば、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入染色体を保持するマウスを使用して作製される。本明細書において「KMマウス」と呼ばれるこのようなマウスは、Ishida et al.のPCT公開WO 02/43478に詳細に記載されている。

40

#### 【0224】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替トランスジェニック動物系が、当技術分野で利用可能であり、本明細書に記載される抗TIGIT抗体を作製するために使用できる。例えば、Xenomouse(Abgenix, Inc.)と呼ばれる代替トランスジェニック系を使用でき、このようなマウスは、例えば、Kucherlapati et al.の米国特許第5,939,598号;同6,075,181号;同6,114,598号;同6,150,584号および同

50

6, 162, 963号に記載されている。

【0225】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替トランスクロモソミック(transchromosomal)動物系は、当技術分野で利用可能であり、本明細書に記載される抗TIGIT抗体を作製するために使用できる。例えば、「TCマウス」と呼ばれる、ヒト重鎖導入染色体(transchromosome)およびヒト軽鎖導入染色体(transchromosome)の両方を保持するマウスを使用でき、このようなマウスは、Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727に記載されている。さらに、ヒト重鎖および軽鎖導入染色体(transchromosome)を保持するウシが、当技術分野で記載されており(Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894)、本明細書に記載される抗TIGIT抗体を作製するために使用できる。

10

【0226】

ヒト抗体、例えば、ヒト抗TIGIT抗体を作製するための当技術分野において記載されるさらなるマウス系として、(i)内因性マウス重鎖および軽鎖可変領域が、相同組換えによって、内因性マウス定常領域に作動可能に連結された、ヒト重鎖および軽鎖可変領域と置換されており、その結果、マウスにおいてキメラ抗体(ヒトV/マウスC)が作製され、次いで、その後、標準組換えDNA技術を使用して完全ヒト抗体に変換される、VELOCI MMUNE(登録商標)マウス(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)ならびに(ii)マウスが再編成されていないヒト重鎖可変領域、しかし単一の再変性されたヒト共通軽鎖可変領域を含有するMeMo(登録商標)マウス(Merus Biopharmaceuticals, Inc.)が挙げられる。このようなマウスおよび抗体を作製するためのその使用は、例えば、WO2009/15777、US2010/0069614、WO2011/072204、WO2011/097603、WO2011/163311、WO2011/163314、WO2012/148873、US2012/0070861およびUS2012/0073004に記載されている。

20

【0227】

本明細書に記載されるヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を使用して調製できる。ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ法は、当技術分野で確立されている。例えば、Ladner et al.の米国特許第5,223,409号；同5,403,484号；および同5,571,698号；Dower et al.の米国特許第5,427,908号および同5,580,717号；McCafferty et al.の米国特許第5,969,108号および同6,172,197号；ならびにGriffiths et al.の米国特許第5,885,793号；同6,521,404号；同6,544,731号；同6,555,313号；同6,582,915号および同6,593,081号を参照のこと。

30

【0228】

本明細書に記載されるヒトモノクローナル抗体はまた、免疫処置の際にヒト抗体応答が生じ得るようヒト免疫細胞が再構成されているSCIDマウスを使用して調製できる。このようなマウスは、例えば、Wilson et al.の米国特許第5,476,996号および同5,698,767号に記載されている。

40

【0229】

免疫処置

ヒトTIGITに対する完全ヒト抗体を作製するために、例えば、Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856 - 859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851およびWO98/24884によって、その他の抗原について記載されるように、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含有するトランスジェニックまたはトランスクロモソマルマウス(例えば、HC012、HC07またはKMマウス)を、TIGIT抗原および/またはTIGITを発現する細胞の精製または濃縮された調製物を用いて免疫処置できる。あるいは、マウスをヒトTIGITをコードするDNAを用いて免疫処置できる。好ましくは、マウスは、第1の注入の際に6~16週齢とする。例えば、HuMAbマウスを腹

50

膜内に免疫処置するために、組換えT I G I T抗原の精製または濃縮された調製物(5 ~ 50  $\mu$ g)を使用できる。T I G I T抗原の精製または濃縮された調製物を使用する免疫処置が抗体をもたらさない事象では、T I G I Tを発現する細胞、例えば、細胞系統を用いてマウスを免疫処置して、免疫応答を促進することもできる。例示的細胞系統として、T I G I T過剰発現性安定C H OおよびR a j i細胞系統が挙げられる。

#### 【0230】

種々の抗原を用いる累積的経験は、H u M A bトランスジェニックマウスは、R i b i アジュバント中の抗原を用いる最初に腹膜内(I P)または皮下(S C)免疫処置と、それに続く、R i b i アジュバント中の抗原を用いる隔週でのI P / S C免疫処置(最大合計10)の際に最良に応答することを示した。免疫応答は、後眼窩出血によって得られている血漿サンプルを用いて、免疫処置プロトコルの過程にわたってモニタリングできる。血漿は、E L I S AおよびF A C Sによってスクリーニングでき(以下に記載されるように)、抗T I G I Tヒト免疫グロブリンの十分な力価を有するマウスを融合のために使用できる。マウスを、抗原を用いて静脈内に追加免疫し、3日後に、屠殺し、脾臓およびリンパ節を採取できる。各免疫処置のために2 ~ 3回の融合が実施されることが必要であり得ると予測される。各抗原について、6から24匹の間のマウスが、通常免疫処置される。普通、H C o 7、H C o 12およびK M系統が使用される。さらに、H C o 7およびH C o 12導入遺伝子は両方とも、2種の異なるヒト重鎖導入遺伝子を有する(H C o 7 / H C o 12)単一マウスと一緒に育種され得る。

#### 【0231】

T I G I Tに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

本明細書に記載されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するために、免疫処置されたマウスから脾細胞および/またはリンパ節細胞を単離し、マウス骨髓腫細胞系統などの適当な不死化細胞系統と融合できる。得られたハイブリドーマを抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングできる。例えば、50% P E Gを用いて、免疫処置マウス由来の脾臓リンパ球の単細胞懸濁液を、S p 2 / 0非分泌性マウス骨髓腫細胞(A T C C、C R L 1581)と融合できる。細胞を、およそ $2 \times 10^5$ で平底マイクロタイタープレートにプレーティングし、続いて、10%胎児クロン血清、18%「653」コンディショニング培地、5%オリゲン(origen)(I G E N)、4 mM L - グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム、5 mM H E P E S、0.055 mM 2 - メルカプトエタノール、50ユニット/mlペニシリン、50 mg / mlストレプトマイシン、50 mg / mlゲンタマイシンおよび1 X H A T(Sigma)を含有する選択培地で2週間インキュベートする。およそ2週間後、細胞をH A TがH Tと置換されている培地で培養できる。次いで、個々のウェルを、ヒトモノクローナルI g MおよびI g G抗体についてE L I S Aによってスクリーニングできる。広範なハイブリドーマ成長が起こると、10 ~ 14日後に普通に培地を観察できる。抗体を分泌するハイブリドーマを再プレーティングし、再度スクリーニングでき、ヒトI g Gについて依然として陽性である場合に、制限希釈によってモノクローナル抗体を少なくとも2回サブクロニングできる。次いで、安定なサブクローンをインビトロで培養して、特性決定のために組織培養培地において少量の抗体を作製できる。

#### 【0232】

モノクローナル抗体を精製するために、選択されたハイブリドーマを、モノクローナル抗体精製のために2リットルのスピナーフラスコ中で成長させることができる。プロテインA - セファロース(Pharmacia, Piscataway, N.J.)を用いるアフィニティークロマトグラフィーの前に、上清を濾過し、濃縮できる。溶出されたI g Gを、ゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィーによって調べ、純度を確実にすることができる。バッファー溶液は、P B Sに交換でき、1.43吸光係数を使用してO D 280によって濃度を決定できる。モノクローナル抗体をアリコートにし、- 80 で保存できる。

#### 【0233】

VI. 抗体製造

10

20

30

40

50

T I G I T に対するモノクローナル抗体を産生するトランスフェクトーマの作製

配列が提供される特異的抗体およびその他の関連抗 T I G I T 抗体の両方を含めた、本発明の抗体を、当技術分野で周知であるように、例えば、組換え D N A 技術および遺伝子トランスフェクション法の組合せを使用して宿主細胞トランスフェクトーマにおいて産生できる (Morrison, S. (1985) Science 229:1202)。

#### 【 0 2 3 4 】

例えば、抗体またはその抗体断片を発現させるために、部分または全長軽鎖および重鎖をコードする D N A を、標準分子生物学技術 (例えば、P C R 増幅または対象の抗体を発現するハイブリドーマを使用する c D N A クローニング) によって得ることができ、遺伝子が、転写および翻訳制御配列に作動可能に連結されるように、D N A を発現ベクター中に挿入することができる。これに関連して、用語「作動可能に連結された」は、ベクター内の転写および翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するというその意図される機能を果たすよう、抗体遺伝子がベクター中にライゲーションされることを意味するものとする。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合するよう選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別個のベクター中に挿入されてもよく、または両遺伝子は、同一発現ベクター中に挿入される。抗体遺伝子は、標準方法 (例えば、抗体遺伝子断片上の相補的制限部位およびベクターの連結または制限部位が存在しない場合には平滑末端連結) によって、発現ベクター (単数または複数) 中に挿入される。本明細書に記載される抗体の軽鎖および重鎖可変領域を使用し、V<sub>H</sub> セグメントがベクター内の C<sub>H</sub> セグメント (単数または複数) と作動可能に連結され、V<sub>L</sub> セグメントがベクター内の C<sub>L</sub> セグメントと作動可能に連結されるように、それらを所望のアイソタイプの重鎖定常および軽鎖定常領域をすでにコードする発現ベクター中に挿入することによって任意の抗体アイソタイプの全長抗体遺伝子を作製できる。さらに、またはあるいは、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードし得る。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが、抗体鎖遺伝子のアミノ末端とインフレーションで連結されるように、ベクター中にクローニングできる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド (すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド) であり得る。

#### 【 0 2 3 5 】

組換え発現ベクターは、抗体鎖遺伝子に加えて、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を保持し得る。用語「調節配列」とは、プロモーター、エンハンサーおよび抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するその他の発現制御エレメント (例えば、ポリアデニル化シグナル) を含むものとする。このような調節配列は、例えば、G o e d d e l (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)) に記載されている。調節配列の選択を含めた発現ベクターの設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に応じて変わり得る当業者には明らかである。哺乳動物宿主細胞発現のための好ましい調節配列として、サイトメガロウイルス (C M V)、サルウイルス 4 0 (S V 4 0)、アデノウイルス (例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター (A d M L P) およびポリオーマ由来のプロモーターおよび / またはエンハンサーなどの、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現を指示するウイルスエレメントが挙げられる。あるいは、ユビキチンプロモーターまたは - グロビンプロモーターなどの非ウイルス調節配列を使用してもよい。なおさらに、調節エレメントは、S V 4 0 初期プロモーター由来の配列およびヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の長い末端反復配列を含有する、S R プロモーター系などの異なる供給源に由来する配列からなる (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

#### 【 0 2 3 6 】

組換え発現ベクターは、抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列 (例えば、複製の起点) などのさらなる配列および選択マーカー遺伝子を保持し得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択

を促進する(例えば、すべてAxel et al.による米国特許第4,399,216号、同4,634,665号および同5,179,017号を参照のこと)。例えば、通常、選択マーカー遺伝子は、G418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を、ベクターが導入されている宿主細胞に付与する。好ましい選択マーカー遺伝子として、ジヒドロホレートレダクターゼ(DHFR)遺伝子(メトトレキサート選択/増幅とともに、dhfr-宿主細胞において使用するための)およびneo遺伝子(G418選択のための)が挙げられる。

#### 【0237】

軽鎖および重鎖の発現のために、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクター(単数または複数)を、標準技術によって宿主細胞にトランスフェクトする。用語「トランスフェクション」の種々の形態は、原核生物または真核生物宿主細胞への外因性DNAの導入のためによく使用されるさまざまな技術、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含するものとする。原核生物または真核生物宿主細胞のいずれかにおいて本明細書に記載される抗体を発現させることは理論上可能であるが、真核細胞、最も好ましくは、哺乳動物宿主細胞における抗体の発現が、最も好ましいが、これは、このような真核細胞、特に、哺乳動物細胞は、適切にフォールディングされ、免疫学的に活性な抗体を組み立て、分泌する可能性が原核細胞よりも高いからである。抗体遺伝子の原核生物発現は、活性な抗体の高効率の産生にとっては有効ではないと報告されている(Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13)。本発明の抗体はまた、酵母ピキア・パストリス(Pichia pastoris)の糖鎖操作された株においても産生できる。Li et al. (2006) Nat. Biotechnol. 24:210。

#### 【0238】

本明細書に記載される組換え抗体を発現させるための好ましい哺乳動物宿主細胞として、チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)(例えば、R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621に記載されるように、DHFR選択マーカーとともに使用される、Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されたdhfr-CHO細胞を含む)、NSO骨髓腫細胞、COS細胞およびSP2細胞が挙げられる。特に、NSO骨髓腫細胞とともに使用するためには、別の好ましい発現系として、WO87/04462、WO89/01036およびEP338,841に開示されるGS遺伝子発現系がある。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターは、哺乳動物宿主細胞中に導入され、抗体は、宿主細胞を、宿主細胞における抗体の発現、またはより好ましくは、宿主細胞が成長した培養培地への抗体の分泌を可能にするのに十分な期間培養することによって産生される。抗体は、標準タンパク質精製法を使用して培養培地から回収できる。

#### 【0239】

本発明の抗体ポリペプチド鎖のNおよびC末端は、よく観察される翻訳後修飾によって予測される配列とは異なることもある。例えば、C末端リシン残基は、抗体重鎖から失われていることが多い。Dick et al. (2008) Biotechnol. Bioeng. 100:1132。N末端グルタミン残基およびより少ない程度であるが、グルタミン酸残基は、治療用抗体の軽鎖および重鎖の両方でピログルタミン酸残基に変換されることが頻繁にある。Dick et al. (2007) Biotechnol. Bioeng. 97:544; Liu et al. (2011) JBC 286:11211; Liu et al. (2011) J. Biol. Chem. 286:11211。

#### 【0240】

本発明の種々のアゴニスト抗h u T I G I T抗体のアミノ酸配列は、表5にまとめられている配列表に提供されている。上記の理由のために、C末端リシンは、重鎖または重鎖定常ドメインの配列表中の配列のいずれにも含まれない。しかし、代替実施形態では、本発明の抗h u T I G I T抗体の各重鎖および/またはこのような抗体またはその重鎖もしくは軽鎖をコードする遺伝子コンストラクトは、このさらなるリシン残基を重鎖(単数または複数)のC末端に含む。

#### 【0241】

10

20

30

40

50

## VII. アッセイ

本明細書に記載される抗体は、T I G I Tとの結合について、例えば、標準E L I S Aによって試験できる。手短には、マイクロタイタープレートに精製されたT I G I Tを、P B S中1 ~ 2  $\mu\text{g} / \text{mL}$ で用いてコーティングし、次いで、P B S中5 %ウシ血清アルブミンを用いてブロッキングする。各ウェルに抗体の希釈物(例えば、T I G I T免疫処置マウスから得た血漿の希釈物)を添加し、37 で1 ~ 2時間インキュベートする。プレートをP B S / T w e e nを用いて洗浄し、次いで、例えば、ヒト抗体またはそうでなければヒト重鎖定常領域を有する抗体の二次試薬、西洋ワサビペルオキシダーゼ(H R P)とコンジュゲートしているヤギ抗ヒトI g G F c特異的ポリクローナル試薬とともに37 で1時間インキュベートする。洗浄した後、プレートをA B T S基質(Moss Inc、product:ABTS-1000)を用いて発色させ、O D 4 1 5 ~ 4 9 5で分光光度計によって分析する。次いで、免疫処置されたマウスから得た血清を、T I G I Tを発現しない対照細胞株ではなく、ヒトT I G I Tを発現する細胞株との結合についてフローサイトメトリーによってさらにスクリーニングする。手短には、抗T I G I T抗体の結合を、T I G I T発現性C H O細胞を1 : 20希釈の抗T I G I T抗体とともにインキュベートすることによって評価する。細胞を洗浄し、結合を、P E標識された抗ヒトI g G A bを用いて検出する。F A C S c a nフローサイトメトリー(Becton Dickinson, San Jose, CA)を使用してフローサイトメトリー分析を実施する。最高の力価を発生するマウスが、融合に使用されることが好ましい。マウス抗h u T I G I T抗体が検出されるべきである場合には、抗マウス検出抗体を使用して類似の実験を実施してもよい。

10

20

## 【0242】

上記のようなE L I S Aアッセイを使用して、抗体、ひいては、T I G I T免疫原と陽性の反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマについてスクリーニングできる。好ましくは、高親和性でT I G I Tと結合する抗体を産生するハイブリドーマを、サブクロニングし、さらに特性決定できる。細胞バンクを作製するために、抗体精製のために、親細胞の反応性を保持する(E L I S Aによって)各ハイブリドーマから1つのクローンを選択できる。

## 【0243】

抗T I G I T抗体を精製するために、モノクローナル抗体精製のために2リットルのスピナーフラスコ中で選択されたハイブリドーマを成長させることができる。プロテインA - セファロース(Pharmacia, Piscataway, NJ)を用いるアフィニティークロマトグラフィーの前に、上清を濾過し、濃縮できる。溶出されたI g Gを、ゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィーによって調べ、純度を確実にすることができる。バッファー溶液は、P B Sに交換でき、1.43吸光係数を使用してO D <sub>280</sub>によって濃度を決定できる。モノクローナル抗体をアリコートにし、- 80 で保存できる。

30

## 【0244】

選択された抗T I G I Tモノクローナル抗体が独特のエピトープと結合するか否かを調べるために、市販の試薬(Pierce, Rockford, IL)を使用して各抗体をビオチン化できる。ビオチン化M A b結合は、ストレプトアビジン標識されたプローブを用いて検出できる。上記のように、T I G I TコーティングされたE L I S Aプレートをを使用して、非標識モノクローナル抗体およびビオチン化モノクローナル抗体を使用する競合研究を実施できる。

40

## 【0245】

精製された抗体のアイソタイプを調べるために、特定のアイソタイプの抗体に対して特異的な試薬を使用してアイソタイプE L I S Aを実施できる。例えば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを調べるために、1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ の抗ヒト免疫グロブリンを用いてマイクロタイタープレートのウェルを、4で一晩コーティングできる。1 % B S Aを用いてブロッキングした後、プレートを、1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ 以下の試験モノクローナル抗体または精製されたアイソタイプ対照と周囲温度で1 ~ 2時間反応させる。次いで、ウェルをヒトI g G 1またはヒトI g M特異的アルカリホスファターゼがコンジュゲートしているブ

50

ローブのいずれかと反応させる。プレートを上記のように発色させ、分析する。

【0246】

モノクローナル抗体の、TIGITを発現する生存細胞との結合を調べるために、実施例に記載されるようにフローサイトメトリーを使用できる。手短には、膜結合性TIGITを発現する細胞株(標準成長条件下で成長させた)を、0.1% BSAを含有するPBS中、種々の濃度のモノクローナル抗体と4で1時間混合する。洗浄した後、細胞を、一次抗体染色と同一条件下でフィコエリトリン(PE)標識された抗IgG抗体と反応させる。サンプルを光および側方散乱特性を使用するFACSscan機器によって分析して、単細胞でゲート開閉し、標識された抗体の結合を調べる。フローサイトメトリーアッセイ(に加えて、または代わりに)、蛍光顕微鏡を使用する代替アッセイを使用してもよい。上記のように細胞を正確に染色し、蛍光顕微鏡によって調べることができる。この方法によって、個々の細胞の可視化が可能となるが、抗原の密度に応じて減少した感受性を有し得る。

10

【0247】

抗TIGIT抗体は、ウエスタンブロッティングによってTIGIT抗原との反応性についてさらに試験できる。手短には、TIGITを発現する細胞から細胞抽出物を調製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動に付すことができる。電気泳動後、分離された抗原をニトロセルロースメンブランにトランスファーし、20%マウス血清を用いてブロッキングし、試験されるべきモノクローナル抗体を用いてプロービングする。抗IgGアルカリホスファターゼを使用してIgG結合を検出し、BCIP/NBT基質錠剤を用いて発色させることができる(Sigma Chem.Co., St.Louis, MO)。

20

【0248】

種々の抗TIGIT抗体の結合親和性、交差反応性および結合速度論を解析する方法は、当技術分野で公知の標準アッセイ、例えば、バイオレイヤー干渉法(BLI)分析およびBIAcore(登録商標)2000SPR機器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)を使用するBIAcore(登録商標)表面プラズモン共鳴(SPR)分析を含む。

【0249】

一実施形態では、抗体は、ヒトTIGITの細胞外領域と特異的に結合する。抗体は、TIGITの細胞外ドメイン内の特定のドメイン(例えば、機能的ドメイン)と特異的に結合し得る。特定の実施形態では、抗体は、PVRが結合するTIGIT上の部位と特異的に結合する。特定の実施形態では、抗体は、ヒトTIGITの細胞外領域およびカニクイザルTIGITの細胞外領域と特異的に結合する。好ましくは、抗体は、高親和性でヒトTIGITと結合する。

30

【0250】

VIII. 二重特異性分子

本明細書に記載される抗体は、二重特異性分子の形成のために使用され得る。抗TIGIT抗体またはその抗原結合断片は、誘導体化されるか、または別の機能的分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質(例えば、別の抗体または受容体のリガンド)と連結されて、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子と結合する二重特異性分子を生成し得る。本明細書に記載される抗体は、実際、誘導体化されるか、2種以上のその他の機能的分子と連結されて、2種以上の異なる結合部位および/または標的分子と結合する多重特異性分子を生成し得る；このような多重特異性分子もまた、本明細書において、用語「二重特異性分子」に包含されるものとする。本明細書に記載される二重特異性分子を作製するために、本明細書に記載される抗体を、二重特異性分子が結果として生じるような別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合模倣物などの1種または複数のその他の結合分子と機能的に連結することができる(例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合による結合または別の方法で)。

40

【0251】

したがって、少なくとも1つのTIGITに対する第1の結合特異性および第2の標的エピトープに対する第2の結合特異性を含む二重特異性分子が本明細書において提供され

50

る。二重特異性分子が多重特異性である本明細書に記載される一実施形態では、分子は、第3の結合特異性をさらに含み得る。

【0252】

一実施形態では、本明細書に記載される二重特異性分子は、結合特異性として少なくとも1種の抗体または例えば、 $Fab$ 、 $Fab'$ 、 $F(ab')_2$ 、 $Fv$ もしくは一本鎖 $Fv$ を含めたその抗体断片を含む。参照によりその開示内容が明確に組み込まれるLadner et al. 米国特許第4,946,778号に記載されるように、抗体はまた、軽鎖または重鎖二量体または $Fv$ もしくは一本鎖コンストラクトなどのその任意の最小断片であり得る。

【0253】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいが、本明細書に記載される二重特異性分子において使用され得るその他の抗体として、マウス、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体がある。

【0254】

本明細書に記載される二重特異性分子は、当技術分野で公知の方法を使用して成分結合特異性をコンジュゲートすることによって調製できる。例えば、二重特異性分子の各結合特異性を、別個に作製し、次いで、互いにコンジュゲートできる。結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合には、共有結合コンジュゲーションのために種々のカップリングまたは架橋剤を使用できる。架橋剤の例として、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)およびスルホスクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)が挙げられる(例えば、Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, M A et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照のこと)。その他の方法として、Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83)およびGlennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375)に記載されるものが挙げられる。好ましいコンジュゲート剤として、SATAおよびスルホ-SMCCがあり、両方とも、Pierce Chemical Co.(Rockford, IL)から入手可能である。

【0255】

結合特異性が抗体である場合には、それらを、2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合によってコンジュゲートできる。特に好ましい実施形態では、ヒンジ領域は、コンジュゲーションに先立って奇数のスルフヒドリル残基、好ましくは、1を含有するよう修飾される。

【0256】

あるいは、両結合特異性は、同一ベクター中にコードされ、同一宿主細胞において発現され、アセンブルされ得る。この方法は、二重特異性分子が $mAb \times mAb$ 、 $mAb \times Fab$ 、 $Fab \times F(ab')_2$ またはリガンド $\times Fab$ 融合タンパク質である場合に特に有用である。本明細書に記載される二重特異性分子は、1つの一本鎖抗体および結合決定基を含む一本鎖分子または2つの結合決定基を含む一本鎖二重特異性分子であり得る。二重特異性分子は、少なくとも2つの一本鎖分子を含み得る。二重特異性分子を調製するための方法は、例えば、米国特許第5,260,203号; 同5,455,030号; 同4,881,175号; 同5,132,405号; 同5,091,513号; 同5,476,786号; 同5,013,653号; 同5,258,498号および同5,482,858号に記載されている。

【0257】

二重特異性分子の、その特異的標的との結合は、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、FACS分析、生物検定法(例えば、成長阻害)またはウエスタンブロットアッセイなどの当技術分野で認識される方法を使用して確認され得る。これらのアッセイは各々、一般に、対象の複合体に対して特異的な標識試薬(例えば、抗体)を使用することによって、特に対象とされるタンパク質-抗体複合体の存在を検出

10

20

30

40

50



する。

【0258】

IX. 組成物

医薬上許容される担体と一緒に製剤化された、本明細書に記載される抗TIGIT抗体またはその抗原結合断片(単数または複数)を含有する組成物、例えば、医薬組成物がさらに提供される。このような組成物は、(例えば、2種以上の異なる)本明細書に記載される抗体またはイムノコンジュゲートまたは二重特異性分子のうち1種または組合せを含み得る。例えば、本明細書に記載される医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープと結合するか、または補完的活性を有する抗体(またはイムノコンジュゲートまたは二重特異性)の組合せを含み得る。

10

【0259】

特定の実施形態では、組成物は、少なくとも1mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、50mg/ml、100mg/ml、150mg/ml、200mg/mlの濃度で、または1~300mg/mlもしくは100~300mg/mlで抗TIGIT抗体を含む。

【0260】

本明細書に記載される医薬組成物はまた、併用療法において、すなわち、その他の薬剤と組み合わせて投与できる。例えば、併用療法は、少なくとも1種のその他の抗癌剤および/またはT細胞刺激(例えば、活性化)剤と組み合わせた、本明細書に記載される抗TIGIT抗体を含み得る。併用療法において使用され得る治療薬の例は、本明細書に記載される抗体の使用に関する節において以下により詳細に記載される。

20

【0261】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示される治療用組成物は、癌の治療のために使用されるその他の化合物、薬物および/または薬剤を含み得る。このような化合物、薬物および/または薬剤として、例えば、所与の癌に対する免疫応答を刺激する化学療法薬、小分子薬または抗体が挙げられる。いくつかの場合には、治療用組成物は、例えば、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CD40抗体、抗OX40(CD134、TNFRSF4、ACT35および/またはTXGP1Lとしても知られる)抗体、抗LAG-3抗体、抗CD73抗体、抗CD137抗体、抗CD27抗体、抗CSF-1R抗体、TLRアゴニストまたはIDOもしくはTGFの小分子アンタゴニストのうち1種または複数を含み得る。

30

【0262】

本明細書において、「医薬上許容される担体」として、生理学的に適合する、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられる。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または上皮投与(例えば、注射または注入による)に適している。投与経路に応じて、化合物を、酸および化合物を不活性化し得るその他の天然条件作用から保護するために、材料において、活性化化合物、すなわち、抗体、免疫複合体または二重特異性分子をコーティングしてもよい。

【0263】

本明細書に記載される医薬化合物は、1種または複数の医薬上許容される塩を含み得る。「医薬上許容される塩」とは、親化合物の所望の生物活性を保持し、何らかの望ましくない毒物学的影響を付与しない塩を指す(例えば、Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照のこと)。このような塩の例として、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩として、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などといった非毒性無機酸に由来するものならびに脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などといった非毒性有機酸に由来するものが挙げられる。塩基付加塩として、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどといったアルカリ土類金属に由来するものならびにN,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロ

40

50

プロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどといった非毒性有機アミンに由来するものが挙げられる。

【0264】

本明細書に記載される医薬組成物はまた、医薬上許容される抗酸化物質を含み得る。医薬上許容される抗酸化物質の例として、(1)アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどといった水溶性抗酸化物質、(2)パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、 $\alpha$ -トコフェロールなどといった油溶性抗酸化物質および(3)クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などといった金属キレート化剤が挙げられる。

10

【0265】

本明細書に記載される医薬組成物において使用され得る、適した水性および非水性担体の例として、水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどといった)およびそれらの適した混合物、オリーブオイルなどの植物油およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散物の場合には必要な粒径の維持によって、また界面活性剤の使用によって維持できる。

【0266】

これらの組成物はまた、保存料、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントを含有し得る。微生物の存在の防止は、滅菌法手順、前掲によって、また種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などを含めることの両方によって確実にできる。糖、塩化ナトリウムなどといった等張剤を組成物中に含めることが望ましい場合もある。さらに、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延する薬剤を含めることによって、注射用医薬品形態の長期の吸収を引き起こすことができる。

20

【0267】

医薬上許容される担体として、滅菌水溶液または分散物および滅菌注射用溶液または分散物の即時調製のための滅菌散剤が挙げられる。医薬上活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で公知である。任意の従来の媒体または薬剤が、活性化化合物と不適合である場合を除いて、本明細書に記載される医薬組成物におけるその使用が考慮される。補足活性化化合物もまた、組成物中に組み込まれ得る。

30

【0268】

治療用組成物は、通常、製造および貯蔵の条件下で無菌で、安定でなくてはならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソームまたは高薬物濃度に適したその他の秩序構造として製剤化できる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど)およびそれらの適した混合物を含有する、溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散物の場合には必要な粒径の維持によって、また界面活性剤の使用によって維持できる。多くの場合、組成物中に、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールまたは塩化ナトリウムなどのポリアルコールを含めることが好ましいであろう。組成物中に吸収を遅延する薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを含めることによって、注射用組成物の長期吸収を引き起こすことができる。

40

【0269】

滅菌注射用溶液は、必要に応じて、上記で列挙された成分のうち1種または組合せとともに、適当な溶媒中に必要な量の活性化化合物を組み込むことと、それに続く、滅菌精密濾過によって調製できる。一般に、分散物は、基本分散媒および上記で列挙されたものから必要なその他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に活性化化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌散剤の場合には、調製の好ましい方法として、その前もって滅菌濾過された溶液から有効成分および任意のさらなる所望の成分の粉

50

末が得られる、真空乾燥およびフリーズドライ(凍結乾燥)がある。

【0270】

単一投与形を生産するための担体材料と組み合わせられ得る有効成分の量は、治療されている対象および特定の投与様式に応じて変わる。単一投与形を生産するための担体材料と組み合わせられ得る有効成分の量は、一般に、治療効果を生産する組成物の量となる。一般に、医薬上許容される担体との組合せにおいて、この量は、100パーセントのうち、有効成分の約0.01パーセント～約99パーセント、好ましくは、約0.1パーセント～約70パーセント、最も好ましくは、有効成分の約1パーセント～約30パーセントの範囲となる。

【0271】

投与計画は、最適の所望の応答(例えば、治療的応答)を提供するように調整される。例えば、単回ボラスを投与してもよく、いくつかの分割用量を経時的に投与してもよく、または治療状況の緊急事態によって示されるように、用量を比例的に低減または増大してもよい。投与の容易性および投与形の均一性のための投与単位形に非経口組成物を製剤化することは特に有利である。本明細書において、投与単位形とは、治療されている対象の単位投与量として適している物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要な医薬担体と関連して所望の治療効果を生産するよう算出された所定の量の活性化化合物を含有する。本明細書に記載される投与単位形の仕様は、(a)活性化化合物の独特の特徴および達成されるべき特定の治療効果ならびに(b)個体における感受性の治療のためのこのような活性化化合物の配合の技術分野に固有の制限によって決定され、それらに直接左右される。

【0272】

抗体の投与のために、投与量は、約0.0001～100mg/宿主体重1kg、より通常は、0.01～5mg/宿主体重1kgの範囲である。例えば、投与量は、0.3mg/体重1kg、1mg/体重1kg、3mg/体重1kg、5mg/体重1kgまたは10mg/体重1kgまたは1～10mg/kgの範囲内であり得る。例示的治療計画は、週に1回、2週に1回、3週に1回、4週に1回、月に1回、3～6ヶ月に1回の投与を必要とする。好ましい実施形態では、本発明の抗TIGIT抗体は、2週毎に投与される。本明細書に記載される抗TIGIT抗体のその他の好ましい投与計画として、静脈内投与による1mg/体重1kg、3mg/体重1kgまたは5mg/体重1kgが挙げられ、抗体は、以下の投与スケジュール：(i)6投与形に対して4週間毎、次いで、3ヶ月毎、(ii)3週間毎、(iii)3mg/体重1kgを1回と、それに続く1mg/体重1kgを3週間毎のうち1種を使用して与えられる。

【0273】

いくつかの方法では、異なる結合特異性を有する2種以上のモノクローナル抗体が同時に投与され、この場合には、投与される各抗体の投与量は、示される範囲内に入る。治療用抗体は、普通、複数の機会に投与される。単一投与量の間隔は、例えば、毎週、毎月、3ヶ月毎または毎年であり得る。間隔はまた、患者における標的抗原に対する抗体の血液レベルを測定することによって示されるように、不規則である場合もある。いくつかの方法において、投与量は、約1～1000μg/mL、いくつかの方法では、約25～300μg/mLの血漿抗体濃度を達成するように調整される。

【0274】

抗体は、持続放出製剤として投与でき、この場合には、あまり頻繁ではない投与が必要とされる。投与量および頻度は、患者における抗体の半減期に応じて変わる。一般に、ヒト抗体は、最長の半減期を示し、ヒト化抗体、キメラ抗体および非ヒト抗体が続く。投与の投与量および頻度は、治療が予防的であるか、治療的であるかに応じて変わり得る。予防的適用では、比較的少ない投与量が、比較的頻繁ではない間隔で長期間にわたって投与される。一部の患者は、生涯治療を受け続ける。治療的適用では、疾患の進行が低減または終結されるまで、好ましくは、患者が疾患の症状の部分的または完全寛解を示すまで、比較的短い間隔の比較的多い投与量が時には必要である。その後、患者は、任意選択で、予防的投与計画を投与されることがあるが、多くの免疫-腫瘍学適応症では、継続治療は

10

20

30

40

50

必要ではない。

【0275】

本明細書に記載される医薬組成物中の有効成分の実際の投与量レベルは、患者にとって毒性ではなく、特定の患者、組成物および投与様式について所望の治療応答を達成するのに有効である有効成分の量を得るよう変えてもよい。選択される投与量レベルは、使用される本明細書に記載される特定の組成物またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与の時間、使用されている特定の化合物の排出速度、治療期間、使用される特定の組成物と組み合わせて使用されるその他の薬物、化合物および/または材料、治療されている患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康および先の病歴および医薬の技術分野において周知の同様の因子を含めた種々の薬物動態因子に応じて変わる。

10

【0276】

本明細書に記載される抗TIGIT抗体の「治療上有効な投与量」は、好ましくは、疾患症状の重症度の低減、疾患症状のない期間の頻度および期間の増大または疾患苦痛による機能障害もしくは能力障害の防止をもたらす。癌に関連して、治療上有効な用量は、好ましくは、癌に関連する身体症状のさらなる増悪を防ぐ。癌の症状は、当技術分野で周知であり、例えば、普通ではない黒子の特徴、非対称、境界、色および/または直径を含めた黒子の外観の変化、新規に着色した皮膚領域、異常な黒子、爪の下で黒くなった領域、乳房のしこり、乳頭の変化、乳房嚢胞、乳房疼痛、死亡、体重減少、脱力感、過度の疲労、摂食障害、食欲の喪失、慢性の咳、息切れの悪化、喀血、血尿、血便、悪心、嘔吐、肝臓転移、肺転移、骨転移、腹部膨満、鼓腸、腹腔中の流体、膣出血、便秘、腹部膨隆、結腸の穿孔、急性腹膜炎(感染、発熱、疼痛)、疼痛、吐血、多量の発汗、発熱、高血圧症、貧血、下痢、黄疸、めまい、悪寒、筋痙攣、結腸転移、肺転移、膀胱転移、肝臓転移、骨転移、腎臓転移および脾臓転移、嚥下困難などが挙げられる。治療効力は、本発明の抗huTIGIT mAbの最初の投与の直後に観察可能であるか、または一定期間および/または一連の用量の後にのみ観察され得る。このような遅延された有効性は、数ヶ月の治療、最大6、9または12ヶ月後にのみ観察され得る。いくつかの免疫-腫瘍学薬剤によって示される遅延された有効性を考慮すると、本発明の抗huTIGIT mAbが、治療上の有効性を欠くと早期に決定しないことが重要である。

20

【0277】

疾患の早期または先行する徴候が存在する場合に望まれ得るような治療上有効な用量は、癌の発生を防ぐかまたは遅延し得る。癌の診断において使用される実験室試験は、化学(TIGITレベルの測定を含む)、血液学、血清学および放射線学を含む。したがって、前記のうちいずれかをモニタリングする任意の臨床または生化学アッセイを使用して、特定の治療が、癌を治療するための治療上有効な用量であるか否かを調べてもよい。当業者ならば、対象の大きさ、対象の症状の重症度および特定の組成物または選択された投与経路のような因子に基づいてこのような量を決定できるであろう。

30

【0278】

本明細書に記載される組成物は、当技術分野で公知の1種または複数の種々の方法を使用して、1種または複数の投与経路によって投与できる。当業者には明らかであろうが、投与経路および/または投与様式は、所望の結果に応じて変わる。本明細書に記載される抗体の好ましい投与経路として、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または例えば、注射もしくは注入によるその他の非経口投与経路が挙げられる。本明細書において、語句「非経口投与」とは、経腸および局所投与以外の、普通、注射による投与様式を意味し、制限するものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および注入が挙げられる。

40

【0279】

あるいは、本明細書に記載される抗体は、局所、上皮または粘膜投与経路、例えば、鼻腔内、経口、経膈、直腸性、舌下にまたは局所になど、非経口ではない経路によって投与できる。

50

## 【0280】

留置用剤、経皮パッチおよびマイクロカプセル化送達系を含めた徐放性製剤など、活性化合物を、化合物を迅速な放出から保護する担体を用いて調製できる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用できる。このような製剤を調製するための多数の方法が、特許権をとられているか、または一般的に、当業者に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照のこと。

## 【0281】

治療用組成物は、当技術分野で公知の医療装置を用いて投与できる。例えば、好ましい実施形態では、本明細書に記載される治療用組成物は、米国特許第5,399,163号；同5,383,851号；同5,312,335号；同5,064,413号；同4,941,880号；同4,790,824号；または同4,596,556号に開示される装置などの注射針無し皮下注射装置を用いて投与できる。本明細書に記載される抗TIGIT抗体とともに使用するための周知の留置用剤およびモジュールの例として、制御された速度で医薬を分配するための埋め込み可能な微量注入ポンプを開示する米国特許第4,487,603号が挙げられる。；皮膚を通して医薬を投与するための治療用装置を開示する同4,486,194号；正確な注入速度で医薬を送達するための医薬注入ポンプを開示する同4,447,233号；連続薬物送達のための可変流動埋め込み可能注入器具を開示する同4,447,224号；マルチチャンパーコンパートメントを有する浸透圧薬物送達システムを開示する同4,439,196号；および浸透圧薬物送達システムを開示する同4,475,196号が挙げられる。これらの特許は、参照により本明細書に組み込まれる。多数のその他のこのような留置用剤、送達系およびモジュールが、当業者に公知である。

## 【0282】

特定の実施形態では、本明細書に記載される抗TIGIT抗体は、インビボでの適切な分布を確実にするよう製剤化できる。例えば、血液脳関門(BBB)は、多数の高親水性化合物を排除する。本明細書に記載される治療用化合物が、BBBを通過することを確実にするために(必要に応じて)、それらを例えば、リポソーム中に製剤化できる。リポソームを作製する方法については、例えば、米国特許第4,522,811号；同5,374,548号；および同5,399,331号を参照のこと。リポソームは、特定の細胞または臓器中に選択的に輸送され、したがって、標的化された薬物送達を増強する1つまたは複数の部分を含み得る(例えば、V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照のこと)。例示的標的化部分として、葉酸またはビオチン(例えば、Low et al.の米国特許第5,416,016号を参照のこと)；マンノシド(Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038)；抗体(P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140；M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180)；界面活性剤プロテインA受容体(Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134)；p120(Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)が挙げられ、K. Keinänen；M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123；J.J. Killian；I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273も参照のこと。

## 【0283】

## X. 使用および方法

本明細書に記載される抗体、抗体組成物および方法は、例えば、TIGITシグナル伝達を遮断することによる免疫応答の増強またはTIGITの検出に絡む多数のインビトロおよびインビボ有用性を有する。好ましい実施形態では、本明細書に記載される抗体は、ヒトまたはヒト化抗体である。例えば、本明細書に記載される抗TIGIT抗体は、インビトロもしくはエキソビボで培養細胞に、または種々の疾患において免疫性を増強するために、例えば、インビボでヒト対象に投与できる。したがって、対象において免疫応答が増強され、刺激され、上方制御されるように、対象に、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、対象において免疫応答を修飾する方法が、本明

10

20

30

40

50

細書において提供される。

【0284】

好ましい対象として、免疫応答の増強が望ましいであろうヒト患者が挙げられる。方法は、免疫応答(例えば、T細胞媒介性免疫応答)を増大することによって治療され得る障害を有するヒト患者を治療するために特に適している。特定の実施形態では、方法は、インビボでの癌の治療のために特に適している。免疫性の抗原特異的増強を達成するために、本明細書に記載される抗TIGIT抗体を、対象の抗原と一緒に投与でき、または抗原が、治療されるべき対象においてすでに存在していてもよい(例えば、腫瘍を有するか、またはウイルスを有する対象)。TIGITに対する抗体を、別の薬剤と一緒に投与する場合には、2種は、別個に投与することも、同時に投与することもできる。

10

【0285】

また、サンプルおよび対照サンプルを、ヒトTIGITと特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、抗体または断片とヒトTIGITとの複合体の形成を可能にする条件下で接触させることを含む、サンプルにおけるヒトTIGIT抗原の存在を検出するか、またはヒトTIGIT抗原の量を測定するための方法も包含される。次いで、複合体の形成を検出し、これでは、対照サンプルと比較した、サンプル間の複合体形成の相違が、サンプルにおけるヒトTIGIT抗原の存在を示す。さらに、本明細書に記載される抗TIGIT抗体は、イムノアフィニティー精製によってヒトTIGITを精製するために使用できる。

【0286】

本明細書に記載される抗TIGIT抗体の、T細胞応答、例えば、抗原特異的T細胞応答の阻害または同時阻害を遮断する能力を考えると、抗原特異的T細胞応答、例えば、抗腫瘍T細胞応答を刺激、増強または上方制御するために、本明細書に記載される抗体を使用するインビトロおよびインビボ法が本明細書において提供される。特定の実施形態では、CD3刺激も提供され(例えば、膜CD3を発現する細胞との同時インキュベーションによって)、その刺激は、抗TIGIT抗体を用いる治療と同時に、その前に、またはその後提供され得る。例えば、抗原特異的T細胞応答が例えばTIGIT媒介性阻害効果の除去によって増強されるように、前記T細胞を、本明細書に記載される抗TIGIT抗体と、および任意選択で、CD3と接触させることを含む、抗原特異的T細胞応答を増強する方法が本明細書において提供される。抗原特異的T細胞応答の任意の適した指標を使用して、抗原特異的T細胞応答を測定できる。このような適した指標の限定されない例として、抗体の存在下でのT細胞増殖の増大および/または抗体の存在下でのサイトカイン生産の増大が挙げられる。好ましい実施形態では、インターロイキン-2および/または抗原特異的T細胞によるインターフェロン- $\gamma$ 生産が増強される。

20

30

【0287】

対象における免疫応答(例えば、抗原特異的T細胞応答)が増強されるように、本明細書に記載される抗TIGIT抗体を対象に投与することを含む、対象において免疫応答(例えば、抗原特異的T細胞応答)を増強する方法がさらに包含される。好ましい実施形態では、対象は、腫瘍を有する対象であり、腫瘍に対する免疫応答が増強される。腫瘍は、固形腫瘍または液体腫瘍、例えば、血液悪性腫瘍であり得る。特定の実施形態では、腫瘍は、免疫原性腫瘍である。特定の実施形態では、腫瘍は、非免疫原性である。特定の実施形態では、腫瘍は、PD-L1陽性である。特定の実施形態では、腫瘍は、PD-L1陰性である。対象はまた、ウイルスを有する対象であり得、ウイルスに対する免疫応答が増強される。

40

【0288】

対象において腫瘍の成長が阻害されるように、対象に、本明細書に記載される抗TIGIT抗体を投与することを含む、対象における腫瘍細胞の成長を阻害するための方法がさらに提供される。また、対象において慢性ウイルス感染が治療されるように、対象に、本明細書に記載される抗TIGIT抗体を投与することを含む、対象において慢性ウイルス感染を治療する方法も提供される。

50

## 【0289】

また、対象に、治療上有効な量の、腫瘍微小環境における  $T_{reg}$  細胞の枯渇を刺激するFcを含む本明細書に記載される抗TIGIT抗体を投与することを含む、腫瘍、例えば、癌性腫瘍を有する対象の腫瘍微小環境から  $T_{reg}$  細胞を枯渇させる方法も本明細書に包含される。Fcは、例えば、1種または複数の活性化Fc受容体との結合または増強された結合を有するなど、エフェクター機能または増強されたエフェクター機能を有するFcであり得る。好ましい実施形態では、 $T_{reg}$  枯渇は、腫瘍微小環境において  $T_{eff}$  の大幅な枯渇または阻害を伴わずに、また腫瘍微小環境の外側の  $T_{eff}$  細胞および  $T_{reg}$  細胞の大幅な枯渇または阻害を伴わずに起こる。特定の実施形態では、対象は、例えば、腫瘍微小環境において  $T_{eff}$  細胞よりも  $T_{reg}$  細胞でより高レベルのTIGITを有する。特定の実施形態では、抗TIGIT抗体は、腫瘍においてTregを、および/または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)において  $T_{reg}$  を枯渇させ得る。例えば、CT26腫瘍モデルでは、マウスIgG2a(エフェクター機能を示す)としてフォーマットされた抗マウスTIGIT抗体は、 $T_{reg}$  および  $CD8^+$  T細胞の両方を部分的に枯渇させたが、 $CD4^+$  T細胞は枯渇させなかった。マウスIgG1 D265Aとしてフォーマットされた、エフェクターレス対応物抗TIGIT抗体は、T細胞を枯渇させなかった。エフェクター機能を有するか、またはエフェクターレス抗TIGIT抗体を使用するか否かを考える場合には、抗腫瘍免疫応答を増強し得る  $T_{reg}$  の枯渇と、腫瘍細胞を実際に死滅させるのに必要とされる細胞の一部を排除する  $CD8^+$  T細胞の枯渇の間の二律背反に、十分な考慮がなされなければならない。 $T_{reg}$  の枯渇は、抗腫瘍活性を増強すると予測され得るが、最近の研究によって、 $TIGIT^+ T_{reg}$  でのTIGITの連結が、 $T_{eff}$  細胞増殖の  $T_{reg}$  細胞媒介性抑制を促進することが実証され(Joller et al. (2014) Immunity 40:569)、これは、TIGITシグナル伝達の遮断(例えば、本発明のアンタゴニスト抗TIGIT抗体を使用する)がまた、抗腫瘍活性を増強し得ることを示唆する。したがって、i)  $T_{reg}$  においてTIGITシグナル伝達を遮断し、したがって、その免疫抑制活性を低減し、ii) TIGITの阻害効果を遮断することによって抗腫瘍  $CD8^+$  T細胞を活性化し、同時に、エフェクター機能媒介性枯渇を避け、iii) DNAMが、そうでなければTIGITによって結合されたであろうPVRと結合することを可能にすることによって(また直接TIGIT-DNAM相互作用を低減することによって)、DNAM媒介性活性化を増強する(Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26:923)、エフェクター機能を欠くアンタゴニスト抗TIGIT抗体を使用することは、最も有効であり得る。

## 【0290】

特定の実施形態では、抗TIGIT抗体は、補助的療法として対象に与えられる。癌を有する対象の、抗TIGIT抗体を用いる治療は、現在の標準治療と比較して長期間耐久性のある応答、少なくとも1、2、3、4、5、10年またはそれ以上の長期間の生存、少なくとも1、2、3、4、5または10年またはそれ以上の再発のない生存につながり得る。特定の実施形態では、癌を有する対象の、抗TIGIT抗体を用いる治療は、癌の再発を防ぐか、または癌の再発を、例えば、1、2、3、4、5もしくは10年もしくはそれ以上遅延する。抗TIGIT治療は、第一次治療または第二次治療として使用できる。

## 【0291】

本明細書に記載されるこれらおよびその他の方法は、以下にさらに詳述される。

## 【0292】

癌

抗TIGIT抗体によるTIGITを介したPVR/ネクチン-2シグナル伝達の遮断は、患者における癌性細胞に対する免疫応答を増強し得る。対象が治療される、例えば、その結果、癌性腫瘍の成長が阻害もしくは低減される、および/または腫瘍が退縮するように、対象に、本明細書に記載される抗TIGIT抗体を投与することを含む、癌を有する対象を治療するための方法が、本明細書において提供される。抗TIGIT抗体は、癌

性腫瘍の成長を阻害するために単独で利用できる。あるいは、抗 T I G I T 抗体は、別の薬剤、例えば、以下に記載されるような、その他の免疫原、標準癌治療またはその他の抗体とともに利用できる。抗 P D - 1 または抗 P D - L 1 抗体などの P D - 1 の阻害剤との組合せも提供される。

#### 【 0 2 9 3 】

したがって、対象に、治療上有効な量の本明細書に記載される抗 T I G I T 抗体、例えば、1 5 A 6、2 2 G 2、1 1 G 1 1 または 1 0 D 7 またはその抗原結合断片を投与することを含む、例えば、対象において腫瘍細胞の成長を阻害することによって癌を治療する方法が、本明細書において提供される。抗体は、ヒト抗 T I G I T 抗体(本明細書に記載されるヒト抗 h u T I G I T 抗体のいずれかなど)であり得るか、またはキメラもしくは

10

#### 【 0 2 9 4 】

成長が本発明の抗体を使用して阻害され得る癌として、免疫療法に対して通常応答性の癌が挙げられる。治療のための癌の限定されない例として、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、扁平非小細胞肺癌(N S C L C)および N S C L C、神経膠腫、胃腸癌、腎癌(例えば、明細胞癌)、卵巣癌、肝臓癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌(例えば、腎細胞癌(R C C))、前立腺癌(例えば、ホルモン難治性前立腺癌)、甲状腺癌、神経芽細胞腫、脾臓癌、神経膠芽腫(神経膠芽腫多形)、子宮頸癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌腫および頭頸部癌(または癌腫)、胃癌(gastric cancer)、生殖細胞腫瘍、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、黒色腫(例えば、皮膚または眼球内悪性黒色腫などの転移性悪性黒色腫)、骨癌、皮膚癌、子宮癌、肛門領域の癌、精巣癌、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、食道の癌、小腸の癌、内分泌系の癌、上皮小体腺の癌、副腎の癌、柔組織の肉腫、尿道の癌、陰茎の癌、小児の固形腫瘍、尿管の癌、腎盂の癌腫、中枢神経系(C N S)の新生物、原発性 C N S リンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄の軸の腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮癌、T細胞リンパ腫、アスベストによって誘導されるものを含めた環境誘導性癌、ウイルス関連癌(例えば、ヒトパピローマウイルス(H P V)関連腫瘍)および 2 種の主要な血液細胞系統のいずれか、すなわち、骨髄系細胞株(顆粒球、赤血球、血小板、マクロファージおよび肥満細胞を産生する)またはリンパ球系細胞株(B、T、NK および形質細胞を産生する)に由来する血液悪性腫瘍、例えば、すべての種類の白血病、リンパ腫および骨髄腫、例えば、急性白血病(A L L)、急性骨髄性白血病(A M L)、慢性リンパ性白血病(C L L)および慢性骨髄性白血病(C M L)、未分化 A M L(M 0)、骨髄芽球性白血病(M 1)、骨髄芽球性白血病(M 2; 細胞成熟を伴う)、前骨髄球性白血病(M 3 または M 3 変異体 [ M 3 V ])、骨髄単球性白血病(M 4 または好酸球増加症を伴う M 4 変異体 [ M 4 E ])、単球性白血病(M 5)、赤白血病(M 6)、巨核芽球性白血病(M 7)、単離された顆粒球性肉腫および緑色腫などの急性、慢性、リンパ性および / または骨髄性白血病; ホジキンリンパ腫(H L)、非ホジキンリンパ腫(N H L)、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、単球様 B細胞リンパ腫、粘膜関連リンパ球系組織(M A L T)リンパ腫、未分化(例えば、K i 1 +)大細胞型リンパ腫、成人 T細胞リンパ腫 / 白血病、マントル細胞リンパ腫、血管免疫芽細胞性 T細胞リンパ腫、血管中心性リンパ腫、腸管 T細胞リンパ腫、原発性縦隔 B細胞リンパ腫、前駆体 Tリンパ芽球性リンパ腫、Tリンパ芽球性およびリンパ腫 / 白血病(T - L b 1 y / T - A L L)、末梢 T細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、移植後リンパ増殖性障害、真性組織球性リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫(L B L)、リンパ球系統の造血器腫瘍、急性リンパ性白血病、びまん性大細胞型 B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性組織球性リンパ腫(D H L)、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆体 Bリンパ芽球性リンパ腫、皮膚 T細胞リンパ腫(C T L C)(菌状息肉症またはセザリー症候群とも呼ばれる)およびワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症を伴うリンパ形質細胞性リンパ

20

30

40

50



腫 (L P L) などのリンパ腫 ; I g G 骨髄腫、軽鎖骨髄腫、非分泌性骨髄腫、くすぶり型骨髄腫 (低悪性度骨髄腫とも呼ばれる)、孤立性形質細胞腫および多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病 (C L L)、ヘアリー細胞リンパ腫などの骨髄腫 ; 骨髄系統の造血器腫瘍、線維肉腫および横紋筋肉腫 (rhabdomyosarcoma) を含めた間葉系起源の腫瘍 ; セミノーマ、奇形癌腫、星状細胞腫、シュワン腫を含めた中枢および末梢神経の腫瘍 ; 線維肉腫、横紋筋肉腫 (rhabdomyosarcoma) および骨肉腫を含めた間葉系起源の腫瘍 ; ならびに黒色腫、色素性乾皮症、ケラトアkantoma、セミノーマ、甲状腺濾胞性癌および奇形癌腫を含めたその他の腫瘍、リンパ球系統の造血器腫瘍、例えば、それだけには限らないが、小細胞および大脳様細胞型を含めた T 前リンパ球性白血病 (T - P L L) などの T 細胞障害を含めた T 細胞および B 細胞腫瘍 ; 好ましくは、T 細胞型の大顆粒リンパ球性白血病 (L G L) ; a / d T - N H L 肝脾リンパ腫 ; 末梢 / 成熟 T 細胞リンパ腫 (多形性および免疫芽球性亜種) ; 血管中心性 (鼻腔の) T 細胞リンパ腫 ; 頭頸部の癌、腎癌、直腸癌、甲状腺の癌 ; 急性骨髄系リンパ腫ならびに前記の癌の任意の組合せが挙げられる。本明細書に記載される方法はまた、転移性癌、難治性癌 (例えば、遮断性 C T L A - 4 または P D - 1 抗体を用いる、例えば、これまでの免疫療法に対して難治性の癌) および再発性癌の治療のために使用してもよい。

#### 【 0 2 9 5 】

抗 T I G I T 抗体は、単剤治療として、または唯一の免疫賦活性療法として投与でき、または癌ワクチン戦略において、癌性細胞、精製された腫瘍抗原 (組換えタンパク質、ペプチドおよび炭水化物分子を含む) もしくは免疫刺激性サイトカインをコードする遺伝子を用いてトランスフェクトされた細胞などの免疫原と組み合わせることができる (He et al. (2004) J. Immunol. 173:4919-28)。使用できる腫瘍ワクチンの限定されない例として、g p 1 0 0、M A G E 抗原、T r p - 2、M A R T 1 および / もしくはチロシナーゼのペプチドなどの黒色腫抗原のペプチドまたはサイトカイン G M - C S F を発現するようトランスフェクトされた腫瘍細胞が挙げられる。

#### 【 0 2 9 6 】

腫瘍に対するワクチン接種のための多数の実験戦略が考案されている (Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738 を参照のこと; DeVita et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition 中の Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 も参照のこと)。これらの戦略の 1 つでは、ワクチンは、自己または同種腫瘍細胞を使用して調製される。これらの細胞性ワクチンは、腫瘍細胞が G M - C S F を発現するよう形質導入される場合に最も有効であるとわかっている。G M - C S F は、腫瘍ワクチン接種のための抗原提示の強力なアクチベーターであるとわかっている (Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 3539-43)。

#### 【 0 2 9 7 】

種々の腫瘍における遺伝子発現および大規模遺伝子発現パターンの研究は、いわゆる腫瘍特異的抗原の定義につながった (Rosenberg, S A (1999) Immunity 10: 281-7)。多くの場合には、これらの腫瘍特異的抗原は、腫瘍において、また腫瘍が生じた細胞において発現される分化抗原、例えば、メラノサイト抗原 g p 1 0 0、M A G E 抗原および T r p - 2 である。より重要なことに、これらの抗原の多くは、宿主における腫瘍特異的 T 細胞の標的であると示され得る。これらのタンパク質に対する免疫応答を生じさせるために、T I G I T 阻害は、腫瘍において発現される組換えタンパク質および / またはペプチドの収集物とともに使用できる。これらのタンパク質は、正常には、自己抗原として免疫系によって見なされ、したがって、それらに対して寛容である。腫瘍抗原は、染色体のテロメアの合成に必要であり、ヒト癌の 8 5 % 超において、および限定された数の体細胞組織のみにおいて発現されるタンパク質テロメラーゼを含み得る (Kim et al. (1994) Science 266: 2011-2013)。腫瘍抗原はまた、タンパク質配列を変更するか、または 2 種の無関係の配

列間の融合タンパク質(すなわち、フィラデルフィア染色体中の  $bcr - abl$ )もしくは B 細胞腫瘍からのイディオタイプを作製する体細胞突然変異のために癌細胞において発現される「ネオ抗原」であり得る。

#### 【0298】

その他の腫瘍ワクチンは、ヒトパピローマウイルス(HPV)、肝炎ウイルス(HBV および HCV) およびカポジヘルペス肉腫ウイルス(KHSV)のようなヒト癌に関わるウイルスに由来するタンパク質を含み得る。TIGIT 阻害とともに使用できる腫瘍特異的抗原の別の形態として、腫瘍組織自体から単離された精製された熱ショックタンパク質(HSP)がある。これらの熱ショックタンパク質は、腫瘍細胞に由来するタンパク質の断片を含有し、これらの HSP は、腫瘍免疫を誘発するための抗原提示細胞への送達で高度に効率的である(Suot & Srivastava (1995) Science 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) Science 278:117-120)。

10

#### 【0299】

樹状細胞(DC)は、抗原特異的応答をブライムするために使用できる強力な抗原提示細胞である。DC は、エキソピボで生産され、種々のタンパク質およびペプチド抗原ならびに腫瘍細胞抽出物を搭載させることができる(Nestle et al. (1998) Nature Medicine 4: 328-332)。DC はまた、同様にこれらの腫瘍抗原を発現するよう遺伝的手段によって形質導入できる。DC はまた、免疫処置を目的として腫瘍細胞と直接融合されている(Kugler et al. (2000) Nature Medicine 6:332-336)。ワクチン化の方法として、より強力な抗腫瘍応答を活性化(制御を解く)よう、DC 免疫処置を、TIGIT 遮断と効率的に組み合わせることができる。

20

#### 【0300】

TIGIT 阻害はまた、標準癌治療(例えば、手術、放射線照射および化学療法)と組み合わせることができる。TIGIT 阻害は、化学療法治療計画と効率的に組み合わせることができる。これらの場合には、投与される化学療法試薬の用量を低減することが可能であり得る(Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304)。このような組合せの一例として、黒色腫の治療のためのデカルバジン(decarbazine)と組み合わせた抗TIGIT抗体がある。このような組合せの別の例として、黒色腫の治療のためのインターロイキン-2(IL-2)と組み合わせた抗TIGIT抗体がある。TIGIT 阻害および化学療法の組合せ使用の背後の科学的論拠は、ほとんどの化学療法薬化合物の細胞傷害性作用の結果である細胞死が、抗原提示経路における腫瘍抗原のレベルの増大をもたらすはずであるということである。細胞死による、TIGIT 阻害との相乗作用をもたらし得るその他の併用治療として、放射線照射、手術およびホルモン欠乏がある。これらのプロトコールの各々は、宿主において腫瘍抗原の供給源を作製する。血管新生阻害剤もまた、TIGIT 阻害と組み合わせることができる。血管新生の阻害は、腫瘍細胞死につながり、これが、腫瘍抗原を宿主抗原提示経路に供給し得る。

30

#### 【0301】

本明細書に記載される抗TIGIT抗体はまた、Fc またはFc 受容体を発現する、腫瘍細胞に対するエフェクター細胞を標的とする二重特異性抗体と組み合わせて使用できる(例えば、米国特許第5,922,845号および同5,837,243号を参照のこと)。2種の別個の抗原を標的とするよう二重特異性抗体を使用できる。例えば、抗Fc受容体/抗腫瘍抗原(例えば、Her-2/neu)二重特異性抗体が、腫瘍の部位に対するマクロファージを標的とするために使用されている。この標的化は、腫瘍特異的応答を効率的に活性化し得る。これらの応答のT細胞アームは、TIGITの阻害によって増強される。あるいは、抗原は、腫瘍抗原および樹状細胞特異的細胞表面マーカーと結合する二重特異性抗体の使用によってDCに直接送達され得る。

40

#### 【0302】

腫瘍は、多種多様な機序によって宿主免疫監視を回避する。これらの機序のうち多くは、腫瘍によって発現される免疫抑制タンパク質の不活性化によって克服され得る。これらは、中でも、TGF- (Kehrl et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050)、IL-

50

10 (Howard & O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200)およびF a s リガンド(H ahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365)を含む。これらの実体の各々に対する抗体は、免疫抑制剤の効果に対抗し、宿主による腫瘍免疫応答に有利に働くよう、抗T I G I T抗体と組み合わせて使用できる。

#### 【0303】

宿主免疫応答性を活性化するその他の抗体を、抗T I G I T抗体と組み合わせて使用できる。これらは、D C機能および抗原提示を活性化する樹状細胞の表面上の分子を含む。抗C D 4 0抗体は、効率的に、T細胞ヘルパー活性の代わりとなることができ(Ridge et al. (1998) Nature 393: 474-478)、抗T I G I T抗体とともに使用できる。O X - 4 0 (Weinberg et al. (2000) Immunol 164: 2160-2169)、C D 1 3 7 / 4 - 1 B B (Melero et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997)およびI C O S (Hutloff et al. (1999) Nature 397: 262-266)などのT細胞共刺激分子に対する抗体を活性化することはまた、T細胞活性化のレベルの増大を提供し得る。P D - 1もしくはP D - L 1またはC T L A - 4 (例えば、米国特許第5, 8 1 1, 0 9 7号)の阻害剤もまた、抗T I G I T抗体とともに使用してもよい。

#### 【0304】

造血起源の種々の腫瘍を治療するために、骨髄移植が現在使用されている。移植片対宿主病は、この治療の結果であるが、治療利益は、移植片対腫瘍応答から得られ得る。T I G I T阻害は、ドナーから移植された腫瘍特異的T細胞の有効性を増大できる。

#### 【0305】

抗原特異的T細胞のエキソピボ活性化および増大ならびに腫瘍に対する抗原特異的T細胞を刺激するための、これらの細胞のレシピエントへの養子移植を含む、いくつかの実験的治療プロトコルもある(Greenberg & Riddell (1999) Science 285: 546-51)。これらの方法はまた、C M Vなどの感染性因子に対するT細胞応答を活性化するために使用できる。抗T I G I T抗体の存在下でのエキソピボ活性化は、養子導入されたT細胞の頻度および活性を増大し得る。

#### 【0306】

##### 慢性ウイルス感染

別の態様では、本明細書に記載される本発明は、対象が感染性疾患について治療されるように、対象に抗T I G I T抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、対象において感染性疾患を治療する方法を提供する。

#### 【0307】

上記で論じられるような腫瘍へのその適用と同様に、病原体、毒素および自己抗原に対する免疫応答を増強するために、抗体媒介性T I G I T阻害を、単独で、またはアジュバントとして、ワクチンと組み合わせて使用できる。この治療的アプローチが特に有用であり得る病原体の例として、それだけには限らないが、H I V、肝炎(A、BおよびC)、インフルエンザ、ヘルペス、ジアルジア、マラリア、リーシュマニア、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)が挙げられる。T I G I T阻害は、感染の経過にわたって変更された抗原を示すH I Vなどの因子による確立された感染に対して特に有用である。これらの新規エピトープは、抗ヒトT I G I T抗体投与の時点で外来性として認識され、したがって、強力なT細胞応答を引き起こす。

#### 【0308】

本明細書に記載される方法によって治療可能な感染症を引き起こす病原性ウイルスのいくつかの例として、H I V、肝炎(A、BまたはC)、ヘルペスウイルス(例えば、V Z V、H S V - 1、H A V - 6、H S V - IIおよびC M V、エプスタイン・バーウイルス)、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、バルボウイルス、ワクシニアウイルス、H T L Vウイルス、デングウイルス、パピローマウイルス、軟属腫ウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、J Cウイルスおよびアルボウイルス脳炎ウイルスが挙げられ

る。

#### 【0309】

本明細書に記載される方法によって治療可能な感染症を引き起こす病原性細菌のいくつかの例として、クラミジア、リケッチア細菌、マイコバクテリア、ブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎球菌(pneumococci)、髄膜炎菌および淋菌、クレブシエラ、プロテウス、セラチア、シュドモナス、レジオネラ、ジフテリア、サルモネラ、バチルス、コレラ、テタヌス、ボツリヌス中毒、炭疽菌、ペスト、レプトスピラ症およびライム病細菌が挙げられる。

#### 【0310】

本明細書に記載される方法によって治療可能な感染症を引き起こす病原性真菌のいくつかの例として、カンジダ(*Candida*)(アルビカンズ(*albicans*)、クルゼイ(*krusei*)、グラブラータ(*glabrata*)、トロピカリス(*tropicalis*)など)、クリプトコッカス・ネオフォルマンス(*Cryptococcus neoformans*)、アスペルギルス(*Aspergillus*)(フミガツス(*fumigatus*)、ニガー(*niger*)など)、ケカビ目(*Mucorales*)の属(ケカビ属(*mucor*)、ユミケカビ属(*absidia*)、クモノスカビ属(*rhizopus*))、スポロトリックス・シェンキイ(*Sporothrix schenki*)、ブラストミセス・デルマチチジス(*Blastomyces dermatitidis*)、南アメリカ分芽菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、コクシジオイデス・イミチス(*Coccidioides immitis*)およびヒストプラズマ・カプスラーツム(*Histoplasma capsulatum*)が挙げられる。

#### 【0311】

本明細書に記載される方法によって治療可能な感染症を引き起こす病原性寄生生物のいくつかの例として、赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)、大腸バランチジウム(*Balantidium coli*)、フォーラーネグレリア(*Naegleria fowleri*)、アカントアメーバ属(*Acanthamoeba*)の種、ランブル鞭毛虫(*Giardia lamblia*)、クリプトスポリジウム属(*Cryptosporidium*)の種、ニューモシスチス・カリニ(*Pneumocystis carinii*)、三日熱マラリア原虫(*Plasmodium vivax*)、ネズミバベシア(*Babesia microti*)、トリパノソーマ・ブルセイ(*Trypanosoma brucei*)、トリパノソーマ・クルージ(*Trypanosoma cruzi*)、ドノバンリーシュマニア(*Leishmania donovani*)、トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*)、ブラジル鉤虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)が挙げられる。

#### 【0312】

上記の方法のすべてにおいて、T I G I T 阻害を、サイトカイン治療(例えば、インターフェロン、G M - C S F、G - C S F、I L - 2)または腫瘍抗原の提示の増強を提供する二重特異性抗体療法(例えば、Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123を参照)などのその他の形態の免疫療法と組み合わせることができる。

#### 【0313】

##### ワクチンアジュバント

抗T I G I T 抗体の、対象の抗原(例えば、ワクチン)との同時投与によって、本明細書に記載される抗T I G I T 抗体を使用して抗原特異的免疫応答を増強できる。したがって、対象における抗原に対する免疫応答が増強されるように、対象に、(i)抗原、(ii)抗T I G I T 抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、対象において抗原に対する免疫応答を増強する方法が、本明細書に提供される。抗原は、例えば、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原または病原体に由来する抗原であり得る。このような抗原の限定されない例として、上記で論じられた腫瘍抗原(または腫瘍ワクチン)または上記のウイルス、細菌もしくはその他の病原体に由来する抗原などの上記の節において論じられたものが挙げられる。

#### 【0314】

特定の実施形態では、抗T I G I T 抗体が結合するエピトープを含むペプチドまたは融合タンパク質が、抗T I G I T 抗体の代わりに、または抗T I G I T 抗体に加えて、ワクチンとして使用される。

#### 【0315】

10

20

30

40

50

インビボおよびインビトロで、本明細書に記載される、抗体組成物(例えば、ヒトモノクローナル抗体、多重特異性および二重特異性分子およびイムノコンジュゲート)を投与する適した経路は、当技術分野で周知であり、当業者ならば選択できる。例えば、抗体組成物は、注射(例えば、静脈内または皮下)によって投与できる。使用される分子の適した投与量は、対象の年齢および体重ならびに抗体組成物の濃度および/または製剤化に応じて変わる。

#### 【0316】

これまでに記載したように、本明細書に記載される抗TIGIT抗体は、1種またはその他の複数の治療薬、例えば、細胞傷害性薬剤、放射性毒性薬剤(radiotoxic agent)または免疫抑制剤と同時投与できる。抗体は、薬剤と連結できる(免疫複合体として)か、または薬剤と別個に投与できる。後者の場合には(別個の投与)、抗体を、薬剤の前に、後にもしくは同時に投与できるか、またはその他の既知療法、例えば、抗癌療法、例えば、放射線照射と同時投与できる。このような治療薬として、中でも、それ自体では、患者にとって毒性または準毒性であるレベルでのみ有効である、ドキシソルピシン(アドリアマイシン)、シスプラチンブレオマイシン硫酸塩、カルムスチン、クロラムブシル、ダカルバジンおよびシクロホスファミドヒドロキシ尿素などの抗腫瘍、抗新生物薬剤が挙げられる。シスプラチンは、100mg/mlの用量で4週間に1回、静脈内に投与され、アドリアマイシンは、60~75mg/mlの用量で21日に1回静脈内に投与される。抗TIGIT抗体またはその抗原結合断片の、化学療法薬との同時投与は、ヒト腫瘍細胞に細胞傷害性効果をもたらすよう異なる機序によって作動する2種の抗癌剤を提供する。このような同時投与は、薬物に対する抵抗性の発生または抗体と非反応性にする腫瘍細胞の抗原性の変化による問題を解決し得る。

10

20

#### 【0317】

また、本明細書に記載される範囲内に、本明細書に記載される抗体組成物(例えば、ヒト抗体、二重特異性もしくは多重特異性分子またはイムノコンジュゲート)および使用のための説明書を含むキットがある。キットは、少なくとも1種のさらなる試薬または1種もしくは複数のさらなる本明細書に記載されるヒト抗体(例えば、第1のヒト抗体とは別個のTIGIT抗原中のエピトープと結合する相補活性を有するヒト抗体)をさらに含有し得る。キットは、通常、キットの内容物の意図される使用を示す表示を含む。用語表示は、キット上にもしくはキットとともに供給された、またはそうでなければキットに添付されている任意の文書または記録材料を含む。

30

#### 【0318】

##### 併用療法

上記で提供された併用療法に加えて、本明細書に記載される抗TIGIT抗体はまた、例えば、以下に記載されるように癌を治療するための併用療法において使用できる。

#### 【0319】

本発明は、抗TIGIT抗体を、1種または複数のさらなる薬剤、例えば、免疫応答の刺激において有効である抗体と同時投与し、それによって、対象において免疫応答をさらに増強、刺激または上方制御する併用療法の方法を提供する。実施例7に示され、図5Aおよび5Bに示されるように、マウスへのアンタゴニスト抗TIGIT抗体およびアンタゴニスト抗PD-1抗体の投与は、腫瘍成長の阻害において増強された効果を有していた。

40

#### 【0320】

一般に、本明細書に記載される抗TIGIT抗体は、(i)共刺激性受容体のアゴニストおよび/または(ii)T細胞での阻害シグナルのアンタゴニストと組み合わせることができ、そのうちいずれかが、抗原特異的T細胞応答(免疫チェックポイント制御因子)の増幅をもたらす。共刺激および共抑制分子のほとんどは、免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)のメンバーであり、本明細書に記載される抗TIGIT抗体は、IgSFファミリーのメンバーを標的とし、免疫応答を増大する薬剤とともに投与してもよい。共刺激または共抑制受容体と結合する膜結合リガンドの1つの重要なファミリーとして、B7フ

50

ファミリーがあり、これは、B7-1、B7-2、B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H2(ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)およびB7-H6を含む。共刺激または共抑制受容体と結合する膜結合リガンドの別のファミリーとして、同族のTNF受容体ファミリーメンバーと結合する分子のTNFファミリーがあり、これは、CD40およびCD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137/4-1BB、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT $\alpha$ R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEG1/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、リンホトキシン $\beta$ /TNF、TNFR2、TNF $\alpha$ 、LT $\alpha$ R、リンホトキシン $\beta$ 1 $\beta$ 2、FAS、FASL、REL $\alpha$ T、DR6、TROY、NGFRを含む(例えば、Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1を参照のこと)。

10

### 【0321】

T細胞活性化はまた、可溶性サイトカインによって制御される。したがって、抗TIGIT抗体を、(i)T細胞活性化を阻害する、IgSFファミリーもしくはB7ファミリーもしくはTNFファミリーのタンパク質のアнтаゴニスト(または阻害剤もしくは遮断剤)またはT細胞活性化を阻害するサイトカイン(例えば、IL-6、IL-10、TGF- $\beta$ 、VEGFまたはその他の免疫抑制サイトカイン)のアンタゴニストおよび/または(ii)免疫応答を刺激するための、例えば、癌などの増殖性疾患を治療するためのIgSFファミリー、B7ファミリーもしくはTNFファミリーの、またはT細胞活性化を刺激するサイトカインの刺激性受容体のアゴニストと組み合わせて使用できる。

20

### 【0322】

一態様では、T細胞応答は、本発明の抗TIGITmAbと、(i)CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、ガレクチン9、CEACAM-1、BTLA、CD69、ガレクチン-1、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1、CD96(WO2015/024060; Bernhardt et al. (2014) Nat. Immunol. 15:406)およびTIM-4などのT細胞活性化を阻害するタンパク質(例えば、免疫チェックポイント阻害剤)のアンタゴニストならびに(ii)B7-1、B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、ICOS、CD40、ICOS-L、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、CD40、DR3およびCD28HなどのT細胞活性化を刺激するタンパク質のアゴニストのうち1種または複数の組合せによって刺激され得る。

30

### 【0323】

上記のタンパク質のうち1種を調節し、アゴニスト抗TIGIT抗体、例えば、癌を治療するために本明細書に記載されるものと組み合わせてもよい例示的薬剤として、YERVOY(登録商標)/イピリムマブまたはトレメリムマブ(CTLA-4に対する)、ガリキシマブ(B7.1に対する)、OPDIVO(登録商標)/ニボルマブ/BMS-936558(PD-1に対する)、ピディリズマブ/CT-011(PD-1に対する)、KEYTRUDA(登録商標)/ペンブロリズマブ/MK-3475(PD-1に対する)、AMP224(B7-DC/PD-L2に対する)、BMS-936559(B7-H1に対する)、MPDL3280A(B7-H1に対する)、MED1-570(ICOSに対する)、AMG557(B7H2に対する)、MGA271(B7H3に対する-WO11/109400)、IMP321(LAG-3に対する)、ウレルマブ(urelumab)/BMS-663513およびPF-05082566(CD137/4-1BBに対する)、CDX-1127(CD27に対する)、MED1-6383およびMED1-6469(OX40に対する)、RG-7888(OX40Lに対する-WO06/029879)、アタシセプト(TACIに対する)、CP-870893(CD40に対する)、ルカツムマブ(lucatumumab)(CD40に対する)、ダセツズマブ(CD40に対する)およびムロモナブCD3(CD3に対す

40

50

る)が挙げられる。

#### 【0324】

癌の治療のためにアンタゴニスト抗TIGIT抗体と組み合わせることができるその他の分子として、NK細胞上の阻害性受容体のアンタゴニストまたはNK細胞上の活性化受容体のアゴニストが挙げられる。例えば、アンタゴニスト抗TIGIT抗体を、KIRのアンタゴニスト(例えば、リリルマブ(lirilumab))と組み合わせることができる。

#### 【0325】

併用療法のためのさらにその他の薬剤として、マクロファージまたは単球を阻害または枯渇させる薬剤、それだけには限らないが、RG7155(WO11/70024、WO11/107553、WO11/131407、WO13/87699、WO13/119716、WO13/132044)またはFPA-008(WO11/140249、WO13169264、WO14/036357)を含めたCSF-1Rアンタゴニスト抗体などのCSF-1Rアンタゴニストが挙げられる。

10

#### 【0326】

一般に、本明細書に記載されるアンタゴニスト抗TIGIT抗体は、1種または複数の、陽性共刺激性受容体をライゲーションするアゴニスト剤、阻害性受容体によるシグナル伝達を減弱する遮断薬ならびに1種または複数の、抗腫瘍T細胞の頻度を全身性に増大する薬剤、腫瘍微小環境内のそれぞれの免疫抑制経路に克服する(例えば阻害性受容体の関与(例えば、PD-L1/PD-1相互作用)を遮断しTregを枯渇または阻害し(例えば、抗CD25モノクローナル抗体(例えば、ダクリズマブ)を使用して、またはエキソビポ抗CD25ビーズ枯渇によって)、IDOなどの代謝酵素を阻害するか、またはT細胞アネルギーもしくは消耗を逆転させる/防ぐ)薬剤および先天性免疫活性化および/または腫瘍部位での炎症の引き金を引く薬剤と一緒に使用できる。

20

#### 【0327】

例えば、腫瘍成長を阻害するよう、または抗ウイルス性応答を刺激するよう、対象において免疫応答が刺激されるように、対象に、アンタゴニスト抗TIGIT分子、例えば、抗体ならびにPD-1アンタゴニスト、例えば、アンタゴニスト抗体、PD-L1アンタゴニスト、例えば、アンタゴニスト抗体、CTLA-4アンタゴニスト、例えば、アンタゴニスト抗体および/またはLAG3アンタゴニスト、例えば、アンタゴニスト抗体などの1種または複数のさらなる免疫賦活性抗体を投与することを含む、対象において免疫応答を刺激するための方法が本明細書において提供される。一実施形態では、対象は、アンタゴニスト抗TIGIT抗体およびアンタゴニスト抗PD-1抗体を投与される。一実施形態では、対象は、アンタゴニスト抗TIGIT抗体およびアンタゴニスト抗PD-L1抗体を投与される。一実施形態では、対象は、アンタゴニスト抗TIGIT抗体およびアンタゴニスト抗CTLA-4抗体を投与される。一実施形態では、少なくとも1種のさらなる免疫賦活性抗体(例えば、抗PD-1、抗PD-L1、抗CTLA-4および/または抗LAG3)は、ヒト抗体である。あるいは、少なくとも1種のさらなる免疫賦活性抗体は、例えば、マウス抗PD-1、抗PD-L1、抗CTLA-4および/または抗LAG3抗体から調製された、例えば、キメラまたはヒト化抗体であり得る。

30

#### 【0328】

アンタゴニスト抗TIGIT抗体およびアンタゴニストPD-1抗体を対象に投与することを含む、過剰増殖性疾患(例えば、癌)を治療するための方法が本明細書において提供される。TIGITおよびPD-1は、黒色腫において同時発現され(Chauvin et al. (2015) J. Clin. Invest. 125:2046)、また、非小細胞肺癌(NSCLC)および腎細胞癌(RCC)患者に由来するCD8<sup>+</sup>TILSで比較的高レベルで同時発現される。表2を参照のこと(数人の患者から得たサンプルの総CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TILSのパーセンテージとしてのTIGIT<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>細胞のパーセンテージを示す)。

40

#### 【0329】

## 【表 2】

表 2

癌におけるTIGIT+/PD-1+TILSパーセンテージ

サンプル	%TIGIT+ / PD-1+
NSCLC-1	13
NSCLC-3	5.8
NSCLC-4	37.4
NSCLC-5	14.6
NSCLC-6	49.1
NSCLC-7	57.8
NSCLC-8	50.5
NSCLC-9	21
RCC-002	25.5
RCC-003	65.6
RCC-006	20.5

10

## 【0330】

特定の実施形態では、抗TIGIT抗体は、治療量以下の用量で投与され、抗PD-1抗体は、治療量以下の用量で投与され、または両方が、治療量以下の用量で投与される。また、抗TIGIT抗体および治療量以下の用量の抗PD-1抗体を、対象に投与することを含む、免疫賦活性薬剤を用いる過剰増殖性疾患の治療と関連する有害事象を変更するための方法が本明細書において提供される。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。特定の実施形態では、抗PD-1抗体は、ヒト配列モノクローナル抗体であり、抗TIGIT抗体は、本明細書において開示される抗体のCDRまたは可変領域を含む抗体などのヒト配列モノクローナル抗体である。

20

## 【0331】

一実施形態では、PVRおよび/またはネクチン-2の高発現および高発現PD-L1を示す腫瘍を有する対象のみが、本発明の抗TIGIT抗体およびPD-1アンタゴニストを用いる併用治療のために選択される。別の実施形態では、PVRおよび/またはネクチン-2の高発現を示すが、低発現PD-L1を示す腫瘍を有する対象は、本発明の抗TIGIT抗体を用いる単剤治療またはPD-1アンタゴニスト以外の別の治療薬を用いる併用療法のために選択される。

30

## 【0332】

その他の実施形態では、本発明は、本発明の抗TIGIT抗体が、PD-1/PD-L1アンタゴニストを用いる治療に続いて投与される併用療法を提供する。一実施形態では、抗TIGIT抗体は、PD-1/PD-L1アンタゴニストを用いる治療が失敗し、不完全な治療応答をもたらすか、または腫瘍の再発もしくは再燃があった(本明細書において「PD-1失敗」と呼ばれる)後にだけ投与される。さらなる実施形態では、このようなPD-1失敗における腫瘍は、PVRおよび/またはネクチン-2の発現についてスクリーニングされ、高レベル発現を有するもののみが抗TIGIT抗体を用いて治療される。

40

## 【0333】

本明細書に記載される方法において使用するための適したPD-1アンタゴニストとして、制限するものではないが、リガンド、抗体(例えば、モノクローナル抗体および二重特異性抗体)および多価薬剤が挙げられる。一実施形態では、PD-1アンタゴニストは、融合タンパク質、例えば、AMP-244などのFc融合タンパク質である。一実施形態では、PD-1アンタゴニストは、抗PD-1または抗PD-L1抗体である。

## 【0334】

例示的抗PD-1抗体として、OPDIVO(登録商標)/ニボルマブ(BMS-9365

50



58)またはWO2006/121168に記載される抗体17D8、2D3、4H1、5C4、7D3、5F4および4A11のうち1種のCDRもしくは可変領域を含む抗体がある。特定の実施形態では、抗PD-1抗体は、WO2012/145493に記載されるMK-3475(KEYTRUDA(登録商標)/ペンブロリズマブ/以前は、ランブロリズマブ); WO2012/145493に記載されるAMP-514/MEDI-0680; およびCT-011(ピディリズマブ; これまでは、CT-ActibodyまたはBAT; 例えば、Rosenblatt et al. (2011) J. Immunotherapy 34:409を参照のこと)である。さらに公知のPD-1抗体およびその他のPD-1阻害剤として、WO2009/014708、WO03/099196、WO2009/114335、WO2011/066389、WO2011/161699、WO2012/145493、米国特許第7,635,757号および同8,217,149号ならびに米国特許公開第2009/0317368号に記載されるものが挙げられる。WO2013/173223に開示される抗PD-1抗体のいずれかも使用してもよい。これらの抗体のうち1種と同様に、結合についてPD-1上の同一エピトープと競合する、および/またはPD-1上の同一エピトープと結合する抗PD-1抗体も、併用治療において使用してもよい。

10

20

30

40

50

#### 【0335】

アンタゴニスト抗TIGIT抗体およびアンタゴニストPD-L1抗体を対象に投与することを含む、過剰増殖性疾患(例えば、癌)を治療するための方法が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、抗TIGIT抗体は、治療量以下の用量で投与され、抗PD-L1抗体は、治療量以下の用量で投与され、または両方が、治療量以下の用量で投与される。抗TIGIT抗体および治療量以下の用量の抗PD-L1抗体を対象に投与することを含む、免疫賦活性薬剤を用いる過剰増殖性疾患の治療と関連する有害事象を変更するための方法が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、ヒト配列モノクローナル抗体であり、抗TIGIT抗体は、本明細書において開示される抗体のCDRまたは可変領域を含む抗体などのヒト配列モノクローナル抗体である。

#### 【0336】

一実施形態では、抗PD-L1抗体は、BMS-936559(WO2007/005874および米国特許第7,943,743号では12A4と呼ばれる)、MSB0010718C(WO2013/79174)またはPCT公開WO07/005874および米国特許第7,943,743号に記載される3G10、12A4、10A5、5F8、10H10、1B12、7H1、11E6、12B7および13G4のCDRもしくは可変領域を含む抗体である。特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、MEDI4736(また、抗B7-H1としても知られる)またはMPDL3280A(RG7446としても知られる)である。WO2013/173223、WO2011/066389、WO2012/145493、米国特許第7,635,757号および同8,217,149号および米国特許公開第2009/145493号において開示される抗PD-L1抗体のいずれも使用してもよい。これらの抗体のいずれかのものと同一エピトープと競合する、および/またはそれと結合する抗PD-L1抗体も、併用治療において使用してもよい。

#### 【0337】

なおさらなる実施形態では、本発明のアゴニスト抗huCD40抗体は、第3の免疫治療薬と組み合わせた、PD-1アンタゴニストまたはPD-L1アンタゴニストなどのPD-1/PD-L1シグナル伝達のアンタゴニストと組み合わせられる。一実施形態では、第3の免疫治療薬は、本明細書において開示される抗GITRもしくは抗OX40抗体などのGITRアンタゴニストまたはOX-40アンタゴニストである。

#### 【0338】

別の態様では、免疫-腫瘍学薬剤は、アゴニストGITR抗体などのGITRアゴニストである。適したGITR抗体として、例えば、BMS-986153、BMS-986156、TRX-518(WO06/105021、WO09/009116)およびMK-4166(WO11/028683)が挙げられる。

## 【0339】

別の態様では、免疫-腫瘍学薬剤は、IDOアンタゴニストである。適したIDOアンタゴニストとして、例えば、INCB-024360(WO2006/122150、WO07/75598、WO08/36653、WO08/36642)、インドキシモド(indoximod)またはNLG-919(WO09/73620、WO09/1156652、WO11/56652、WO12/142237)が挙げられる。

## 【0340】

本明細書に記載される抗TIGIT抗体およびCTLA-4アンタゴニスト抗体を対象に投与することを含む、過剰増殖性疾患(例えば、癌)を治療するための方法が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、抗TIGIT抗体は、治療量以下の用量で投与され、抗CTLA-4抗体は、治療量以下の用量で投与され、または両方が、治療量以下の用量で投与される。抗TIGIT抗体および治療量以下の用量の抗CTLA-4抗体を対象に投与することを含む、免疫賦活性薬剤を用いる過剰増殖性疾患の治療と関連する有害事象を変更するための方法が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、対象はヒトである。特定の実施形態では、抗CTLA-4抗体は、YERVOY(登録商標)(PCT公開WO01/14424に記載されるイピリムマブまたは抗体10D1)、トレメリムマブ(以前は、チシリムマブ、CP-675,206)および以下の刊行物: WO98/42752; WO00/37504; 米国特許第6,207,156; Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(17):10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145):Abstract No. 2505(antibody CP-675206); および Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304に記載される抗CTLA-4抗体からなる群から選択される抗体である。WO2013/173223に開示される抗CTLA-4抗体のいずれも、使用してよい。

## 【0341】

抗TIGIT抗体および抗LAG-3抗体を対象に投与することを含む、過剰増殖性疾患(例えば、癌)を治療するための方法が、本明細書において提供される。さらなる実施形態では、抗TIGIT抗体は、治療量以下の用量で投与され、抗LAG-3抗体は、治療量以下の用量で投与され、または両方が、治療量以下の用量で投与される。抗TIGIT抗体および治療量以下の用量の抗LAG-3抗体を対象に投与することを含む、免疫賦活性薬剤を用いる過剰増殖性疾患の治療と関連する有害事象を変更するための方法が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、対象はヒトである。特定の実施形態では、抗LAG-3抗体は、ヒト配列モノクローナル抗体であり、抗TIGIT抗体は、本明細書において開示される抗体のCDRもしくは可変領域を含む抗体などのヒト配列モノクローナル抗体である。抗LAG3抗体の例として、米国特許公開US2011/0150892およびWO2014/008218に記載されている、抗体25F7、26H10、25E3、8B7、11F2または17E5のCDRもしくは可変領域を含む抗体が挙げられる。一実施形態では、抗LAG-3抗体は、BMS-986016である。使用できる、その他の当技術分野で認識される抗LAG-3抗体として、US2011/007023に記載されるIMP731が挙げられる。IMP-321もまた使用してもよい。これらの抗体のいずれかのものと同一のエピトープと競合する、および/またはそれと結合する抗LAG-3抗体も、併用治療において使用してもよい。

## 【0342】

本明細書に記載される抗TIGIT抗体およびアンタゴニスト、例えば、アンタゴニスト抗体の、LAG-3および/またはCTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1などの1種または複数の第2の標的抗原への投与は、患者における癌性細胞に対する免疫応答を増強し得る。本開示の抗体を使用して成長が阻害され得る癌として、通常、免疫療法に応答性の癌が挙げられる。本開示の併用療法を用いる治療のための癌の代表例として、抗TIGIT抗体を用いる単剤治療の考察において上記で具体的に列挙された癌が挙げられる。

## 【0343】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、本明細書において論じられる治療用抗体の組合せを、医薬上許容される担体中の単一組成物として同時に、または医薬上許容される担体中の各抗体を有する別個の組成物として同時に投与できる。別の実施形態では、治療用抗体の組合せを別個に投与できる。例えば、抗CTLA-4抗体および抗TIGIT抗体を、抗CTLA-4抗体を最初に投与し、抗TIGIT抗体を2番目に、または抗TIGIT抗体を最初に投与し、抗CTLA-4抗体を2番目に投与するなど、逐次投与できる。さらに、またはあるいは、抗PD-1抗体および抗TIGIT抗体を、抗PD-1抗体を最初に投与し、抗TIGIT抗体を2番目に投与するか、または抗TIGIT抗体を最初に投与し、抗PD-1抗体を2番目に投与するなど、逐次投与できる。さらに、またはあるいは、抗PD-L1抗体および抗TIGIT抗体を、抗PD-L1抗体を最初に投与し、抗TIGIT抗体を2番目に投与するか、または抗TIGIT抗体を最初に投与し、抗PD-L1抗体を2番目に投与するなど逐次投与できる。さらに、またはあるいは、抗LAG-3抗体および抗TIGIT抗体を、抗LAG-3抗体を最初に投与し、抗TIGIT抗体を2番目に投与するか、または抗TIGIT抗体を最初に投与し、抗LAG-3抗体を2番目に投与するなど逐次投与できる。

10

20

30

40

50

#### 【0344】

さらに、2以上の用量の併用療法が逐次投与される場合には、逐次投与の順序は、各投与時点で逆転させることができ、同一順序で維持することができ、逐次投与は、同時投与またはその任意の組合せと組み合わせることができる。例えば、組合せ抗CTLA-4抗体および抗TIGIT抗体の第1の投与は、同時であり得、第2の投与は、抗CTLA-4抗体が第1および抗TIGIT抗体が第2で逐次であり得、第3の投与は、抗TIGIT抗体が第1および抗CTLA-4抗体が第2で逐次であり得る、など。さらにまたはあるいは、組合せ抗PD-1抗体および抗TIGIT抗体の第1の投与は、同時であり得、第2の投与は、抗PD-1抗体が第1および抗TIGIT抗体が第2で逐次であり得、第3の投与は、抗TIGIT抗体が第1で、抗PD-1抗体が第2で逐次であり得る、など。さらに、またはあるいは、組合せ抗PD-L1抗体および抗TIGIT抗体の第1の投与は、同時であり得、第2の投与は、抗PD-L1抗体が第1および抗TIGIT抗体が第2で逐次であり得、第3の投与は、抗TIGIT抗体が第1および抗PD-L1抗体が第2で逐次であり得るなど。さらに、またはあるいは、組合せ抗LAG-3抗体および抗TIGIT抗体の第1の投与は同時であり得、第2の投与は、抗LAG-3抗体が第1および抗TIGIT抗体が第2で逐次であり得、第3の投与は、抗TIGIT抗体が第1および抗LAG-3抗体が第2で逐次であり得る。別の代表的な投薬スキームは、抗TIGITが第1および抗CTLA-4抗体(および/または抗PD-1抗体および/または抗PD-L1抗体および/または抗LAG-3抗体)が第2で逐次である第1の投与を含み得、その後の投与は同時であってもよい。

#### 【0345】

適宜、唯一の免疫治療薬としての抗TIGITまたは抗TIGIT抗体および1種または複数のさらなる免疫治療用抗体(例えば、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3遮断)の組合せを、癌性細胞などの免疫原、精製された腫瘍抗原(組換えタンパク質、ペプチドおよび炭水化物分子を含む)、細胞および免疫刺激性サイトカイン(He et al. (2004) J. Immunol. 173:4919-28)をコードする遺伝子を用いてトランスフェクトされた細胞とさらに組み合わせることができる。使用できる腫瘍ワクチンの限定されない例として、gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1および/またはチロシナーゼのペプチドなどの黒色腫抗原のペプチドまたはサイトカインGM-CSFを発現するようトランスフェクトされた腫瘍細胞が挙げられる(以下にさらに論じられる)。TIGIT阻害剤および1種または複数のさらなる抗体(例えば、CTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3遮断)はまた、標準癌治療とさらに組み合わせることができる。例えば、TIGIT阻害剤および1種または複数のさらなる抗体(例えば、CTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3遮断)を、化学療法治療

計画と効率的に組み合わせることができる。これらの場合には、本開示の組合せとともに投与されるその他の化学療法試薬の用量を低減することが可能である(Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304)。このような組合せの例として、黒色腫の治療のためのデカルバジン(decarbazine)とさらに組み合わせた、抗CTLA-4抗体および/または抗PD-1抗体および/または抗PD-L1抗体および/または抗LAG-3抗体などのさらなる抗体を伴うか、または伴わない、抗TIGITアゴニスト抗体の組合せがある。別の例として、黒色腫の治療のためのインターロイキン-2(IL-2)とさらに組み合わせた、抗CTLA-4抗体および/または抗PD-1抗体および/または抗PD-L1抗体および/またはLAG-3抗体を伴うか、または伴わない、抗TIGIT抗体の組合せがある。TIGIT阻害およびCTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3遮断の、化学療法との組合せ使用の背後の科学的論拠は、ほとんどの化学療法薬化合物の細胞傷害性作用の結果である細胞死が、抗原提示経路における腫瘍抗原のレベルの増大をもたらすはずであるということである。細胞死によるCTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3遮断を伴うか、または伴わない、組み合わせられたTIGIT阻害との相乗作用をもたらし得るその他の併用療法として、放射線照射、手術またはホルモン欠乏がある。これらのプロトコルの各々は、宿主において腫瘍抗原の供給源を作製する。血管新生阻害剤もまた、組み合わせられたTIGIT阻害およびCTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3遮断と組み合わせることができる。血管新生の阻害は、腫瘍細胞死につながり、これが、宿主の抗原提示経路に供給される腫瘍抗原の供給源であり得る。

10

20

#### 【0346】

唯一の免疫治療薬としての抗TIGITアンタゴニスト抗体またはTIGITアンタゴニストおよびCTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3遮断抗体の組合せをまた、腫瘍細胞に対するFcまたはFc受容体発現性エフェクター細胞を標的とする二重特異性抗体と組み合わせ使用することができる(例えば、米国特許第5,922,845号および同5,837,243号)。2種の別個の抗原を標的とするよう二重特異性抗体を使用できる。これらの応答のT細胞アームは、組み合わせられたTIGIT阻害およびCTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3遮断の使用によって増強される。

30

#### 【0347】

別の実施例では、唯一の免疫治療薬としての抗TIGITアンタゴニスト抗体または抗TIGIT抗体およびさらなる免疫賦活性薬剤、例えば、抗CTLA-4抗体および/または抗PD-1抗体および/または抗PD-L1抗体および/またはLAG-3薬剤、例えば、抗体の組合せを、リツキサン(登録商標)(リツキシマブ)、ヘルセプチン(登録商標)(トラスツズマブ)、ペキサール(登録商標)(トシツモマブ)、ゼバリン(登録商標)(イブリツモマブ)、キャンパス(登録商標)(アレムツズマブ)、LYMPHOCIDE(登録商標)(エブルツズマブ(eprtezumab))、アバスチン(登録商標)(ベバシズマブ)およびTARCEVA(登録商標)(エルロチニブ)などの抗腫瘍、抗新生物抗体とともに使用できる。例として、理論に捉われようとは思わないが、抗癌抗体または毒素とコンジュゲートしている抗癌抗体を用いる治療は、癌細胞死(例えば、腫瘍細胞)につながり得、これは、免疫賦活性薬剤、例えば、TIGIT、CTLA-4、PD-1、PD-L1またはLAG-3薬剤、例えば、抗体によって免疫応答媒介性を増強する。例示的实施形態では、過剰増殖性疾患(例えば、癌腫瘍)の治療は、抗癌剤、例えば、抗体を、同時にまたは逐次またはそれらの任意の組合せで、抗TIGITおよび適宜、さらなる免疫賦活性薬剤、例えば、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3薬剤、例えば、抗体と組み合わせ含み得、これは、宿主による抗腫瘍免疫応答を増強し得る。

40

#### 【0348】

腫瘍は、多種多様な機序によって宿主免疫監視を回避する。これらの機序のうち多くは

50

、腫瘍によって発現され、免疫抑制であるタンパク質の不活性化によって克服され得る。これらは、中でも、TGF- (Kehrl et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050)、IL-10 (Howard & O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200)および Fas リガンド (Hahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365)を含む。これらの実体の各々に対する抗体は、免疫抑制剤の効果に対抗し、宿主による抗腫瘍免疫応答に有利に働くよう、さらなる免疫賦活性薬剤、例えば、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3薬剤、例えば、抗体を伴ってか、または伴わずに、抗TIGIT抗体とさらに組み合わせることができる。

#### 【0349】

宿主免疫応答性を活性化するために使用できるその他の薬剤、例えば、抗体を、さらなる免疫賦活性薬剤、例えば、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3抗体などを伴ってか、または伴わずに、抗TIGIT抗体と組み合わせるさらに使用できる。これらは、DC機能および抗原提示を活性化する樹状細胞の表面上の分子を含む。抗CD40抗体(Ridge et al., 前掲)は、抗TIGIT抗体および適宜、さらなる免疫賦活性薬剤、例えば、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3薬剤、例えば、抗体とともに使用できる。T細胞共刺激分子OX-40(Weinberg et al. (2000) Immunol 164:2160-2169)、CD137/4-1BB(Melero et al. (1997) Nature Medicine 3:682-685 (1997)およびICOS(Hutloff et al. (1999) Nature 397:262-266)に対するその他の活性化抗体はまた、T細胞活性化のレベルの増大を提供する。

10

20

#### 【0350】

上記で論じたように、骨髄移植は現在、造血起源の種々の腫瘍を治療するために現在使用されている。抗TIGIT免疫療法は、単独で、またはCTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3遮断と組み合わせて使用して、ドナーから移植された腫瘍特異的T細胞の有効性を増大することができる。

#### 【0351】

いくつかの実験治療プロトコールは、抗原特異的T細胞のエキソピボ活性化および拡大および腫瘍に対する抗原特異的T細胞のための、これらの細胞のレシピエントへの養子移植を含む(Greenberg & Riddell, 前掲)。これらの方法はまた、CMVなどの感染性病原体に対するT細胞応答を活性化するように使用できる。抗TIGITの存在下でのエキソピボ活性化は、さらなる免疫賦活性療法、例えば、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3抗体を伴ってか、または伴わずに、養子導入されたT細胞の頻度および活性を増大すると予測することができる。

30

#### 【0352】

抗TIGIT抗体を、治療量以下の用量の抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3薬剤、例えば、抗体を伴ってか、または伴わずに、対象に投与することを含む、免疫賦活性薬剤を用いる過剰増殖性疾患(例えば、癌)の治療と関連する有害事象を変更するための方法が、本明細書において提供される。例えば、本明細書に記載される方法は、患者に非吸収性ステロイドを投与することによって、免疫賦活性治療用抗体誘導性大腸炎または下痢の罹患率を低減する方法を提供する。本明細書において、「非吸収性ステロイド」は、広範な初回通過代謝を示し、その結果、肝臓における代謝後に、ステロイドのバイオアベイラビリティが低い、すなわち、約20%未満であるグルココルチコイドである。本明細書に記載される一実施形態では、非吸収性ステロイドは、ブデソニドである。ブデソニドは、経口投与後に広範に、主に肝臓によって代謝される局所活性糖質コルチコイドである。ENTOCORT EC(登録商標)(Astra-Zeneca)は、回腸および結腸全体への薬物送達を最適化するために開発されたブデソニドのpHおよび時間依存性経口製剤である。ENTOCORT EC(登録商標)は、回腸および/または上行結腸が関与する軽度から中程度のクローン病の治療のために米国において承認されている。クローン病の治療のためのENTOCORT EC(登録商標)の通常の経口投与量は、6~9mg/日である。ENTOCORT EC(登

40

50

録商標)は、腸管において放出され、その後、腸粘膜において吸収され、保持される。腸粘膜標的組織を通過すると、ENTOCORT EC(登録商標)は、肝臓においてシトクロムP450系によって、無視できるほどのグルココルチコイド活性を有する代謝産物に広範に代謝される。したがって、バイオアベイラビリティは低い(約10%)。ブデソニドの低いバイオアベイラビリティは、あまり広範ではない初回通過代謝を有するその他のグルココルチコイドと比較して改善された治療可能比をもたらす。ブデソニドは、全身活性化コルチコステロイドよりも少ない視床下部-下垂体抑制を含め、より少ない有害作用しかもたらさない。しかし、ENTOCORT EC(登録商標)の慢性投与は、全身性高コルチコイド症(hypercorticism)および副腎抑制などの全身グルココルチコイド作用をもたらし得る。PDR 58th ed. 2004; 608-610を参照のこと。

10

#### 【0353】

さらなる実施形態では、非吸収性ステロイドとともに、CTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3遮断(すなわち、免疫賦活性治療用抗体抗TIGITおよび適宜、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3抗体)を伴うか、または伴わないTIGIT阻害を、サリチル酸とさらに組み合わせることができる。サリチル酸として、例えば、スルファサラジン(AZULFIDINE(登録商標)、Pharmacia & UpJohn); オルサラジン(DIPENTUM(登録商標)、Pharmacia & UpJohn); バルサラジド(COLAZAL(登録商標)、Salix Pharmaceuticals, Inc.); およびメサラミン(ASACOL(登録商標)、Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA(登録商標)、Shire US; CANASA(登録商標)、Axcan Scandipharma, Inc.; ROWASA(登録商標)、Solvay)などの5-ASA薬剤が挙げられる。

20

#### 【0354】

本明細書に記載される方法に従って、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/またはLAG-3抗体および非吸収性ステロイドを伴うか、または伴わない、抗TIGITと組み合わせて投与されるサリチル酸として、免疫賦活性抗体によって誘発される大腸炎の発生率の低減を目的とした、サリチル酸および非吸収性ステロイドの任意の重複または逐次投与を挙げることができる。したがって、例えば、本明細書に記載される免疫賦活性抗体によって誘発される大腸炎の発生率を低減するための方法は、サリチル酸および非吸収性を同時にまたは逐次投与すること(例えば、サリチル酸は、非吸収性ステロイドの6時間後に投与される)、またはその任意の組合せを包含する。さらに、サリチル酸および非吸収性ステロイドを、同一経路によって(例えば、両方を経口投与する)、または異なる経路によって(例えば、サリチル酸を経口投与し、非吸収性ステロイドを直腸に投与する)投与でき、これは、抗TIGITおよび抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3抗体を投与するために使用される経路(単数または複数)とは異なり得る。

30

#### 【0355】

本明細書に記載される抗TIGIT抗体および組合せ抗体療法を、治療されている適応症(例えば、癌)に対するその特定の有用性について選択されるその他の周知の療法とともに使用してもよい。本明細書に記載される抗TIGIT抗体の組合せを、公知の医薬上許容される薬剤(単数または複数)と逐次使用してもよい。

40

#### 【0356】

例えば、本明細書に記載される抗TIGIT抗体および組合せ抗体療法は、放射線照射、化学療法(例えば、カンプトテシン(CPT-11)、5-フルオロウラシル(5-FU)、シスプラチン、ドキシソルピシン、イリノテカン、パクリタキセル、ゲムシタビン、シスプラチン、パクリタキセル、カルボプラチン-パクリタキセル(タキソール)、ドキシソルピシン、5-fuまたはカンプトテシン+ap021/TRAIL(6X combo)を使用する)、1種または複数のプロテアソーム阻害剤(例えば、ボルテゾミブまたはMG132)、1種または複数のBcl-2阻害剤(例えば、BH3I-2'(bcl-x1阻害剤)、インドールアミンジオキシゲナーゼ-1(IDO1)阻害剤(例えば、INCB2436

50

0)、A T - 1 0 1 (R - ( - ) - ゴシポール誘導体)、A B T - 2 6 3 (小分子)、G X - 1 5 - 0 7 0 (オパトクラックス(obatoclax))またはM C L - 1 (骨髄系白血病細胞分化タンパク質 - 1)アンタゴニスト)、i A P (アポトーシスタンパク質の阻害剤)アンタゴニスト(例えば、s m a c 7、s m a c 4、小分子s m a c ミメティック、合成s m a c ペプチド(Fulda et al., Nat Med 2002;8:808-15)、I S I S 2 3 7 2 2 (L Y 2 1 8 1 3 0 8)またはA E G - 3 5 1 5 6 (G E M - 6 4 0))、H D A C (ヒストンデアセチラーゼ)阻害剤、抗C D 2 0 抗体(例えば、リツキシマブ)、血管新生阻害剤(例えば、ベバシズマブ)、V E G F および V E G F R を標的化する抗血管新生剤(例えば、アバスチン(登録商標))、合成トリテルペノイド(Hyer et al., Cancer Research 2005;65:4799-808を参照のこと)、c - F L I P (細胞性F L I C E 阻害性タンパク質)モジュレーター(例えば、P P A R (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体)の天然および合成リガンド、5 8 0 9 3 5 4 または5 5 6 9 1 0 0)、キナーゼ阻害剤(例えば、ソラフェニブ)、トラスツズマブ、セツキシマブ、テムシロリムス、ラパマイシンおよびテムシロリムスなどのm T O R 阻害剤、ボルテゾミブ、J A K 2 阻害剤、H S P 9 0 阻害剤、P I 3 K - A K T 阻害剤、レナリドマイド(Lenalidomide)、G S K 3 阻害剤、I A P 阻害剤および/または遺伝毒性薬物などのさらなる治療と組み合わせて(例えば、同時または別個に)使用できる。

10

#### 【0357】

本明細書に記載される抗T I G I T 抗体および組合せ抗体療法は、1 種または複数の抗増殖性細胞傷害性薬剤と組み合わせてさらに使用できる。抗増殖性細胞傷害性薬剤として使用してもよい化合物のクラスとして、それだけには限らないが、以下が挙げられる：

20

#### 【0358】

アルキル化剤(制限するものではないが、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホネート、ニトロソ尿素およびトリアゼンを含む)：ウラシルマスタード、クロルメチン、シクロホスファミド(C Y T O X A N (商標))ホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ピボプロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジンおよびテモゾロミド。

#### 【0359】

代謝拮抗剤(制限するものではないが、葉酸アンタゴニスト、ピリミジン類似体、プリン類似体およびアデノシンデアミナーゼ阻害剤を含む)：メトトレキサート、5 - フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、6 - メルカププリン、6 - チオグアニン、フルダラビンホスフェート、ペントスタチンおよびゲムシタビン。

30

#### 【0360】

当技術分野で公知のその他のマイクロチューブリン分解防止剤に加えて、アンタゴニスト抗T I G I T 抗体、制限するものではないが、タキサン、パクリタキセル(パクリタキセルは、T A X O L <sup>TM</sup> として市販されている)、ドセタキセル、ディスコデルモリド(D D M)、ジクチオスタチン(D C T)、ペロルシド(Peloruside) A、エボチロン、エボチロンA、エボチロンB、エボチロンC、エボチロンD、エボチロンE、エボチロンF、フラノエボチロンD、デスオキシエボチロンB 1、[ 1 7 ] - デヒドロデスオキシエボチロンB、[ 1 8 ] デヒドロデスオキシエボチロンB、C 1 2, 1 3 - シクロプロピル - エボチロンA、C 6 - C 8 架橋エボチロンA、トランス - 9, 1 0 - デヒドロエボチロンD、シス - 9, 1 0 - デヒドロエボチロンD、1 6 - デスメチルエボチロンB、エボチロンB 1 0、ディスコデルモリド(discoderomolide)、パツピロン(patupilone)(E P O - 9 0 6)、K O S - 8 6 2、K O S - 1 5 8 4、Z K - E P O、A B J - 7 8 9、X A A 2 9 6 A (ディスコデルモリド(discoderomolide))、T Z T - 1 0 2 7 (ソブリドチン)、I L X - 6 5 1 (タシドチン塩酸塩(tasidotin hydrochloride))、ハリコンドリリンB、エリブリンメシル酸塩(Eribulin mesylate)(E - 7 3 8 9)、ヘミアステリン(H T I - 2 8 6)、E - 7 9 7 4、クリプトフィシン、L Y - 3 5 5 7 0 3、マイタンシノイドイムノコンジュゲート(D M - 1)、M K C - 1、A B T - 7 5 1、T 1 - 3 8 0 6 7、T - 9 0 0 6 0 7、S B - 7 1 5 9 9 2 (イスピネシブ(ispinesib))、S B - 7 4 3 9 2 1、M K - 0 7 3

40

50

1、STA-5312、エリテロピン、17-アセトキシ-2-エトキシ-6-オキソ-B-ホモ-エストラ-1,3,5(10)-トリエン-3-オール、シクロストレブチン、イソラウリマリド、ラウリマリド、4-エピ-7-デヒドロキシ-14,16-ジデメチル-(+)-ディスコデルモリドおよびクリプトチロン(cryptothilone)1と組み合わせるための適した抗増殖性薬剤。

#### 【0361】

本明細書に記載される抗TIGIT抗体を用いる治療とともに、またはそれに先立って異常に増殖性の細胞を静止状態にすることが望ましい場合には、17a-エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、プレドニゾン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、メゲストロールアセテート、メチルプレドニゾン、メチル-テストステロン、プレドニゾン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、メドロキシプロゲステロンアセテート、リユープロリド、フルタミド、トレミフェン、ZOLADEXTMなどのホルモンおよびステロイド(合成類似体を含む)も、患者に投与できる。本明細書に記載される方法または組成物を使用する場合には、鎮吐剤などの、臨床設定において腫瘍成長または転移の調節において使用されるその他の薬剤も、望まれるように投与できる。

10

#### 【0362】

化学療法薬の安全および有効な投与のための方法は、当業者に公知である。さらに、その投与は標準的な文献に記載される。例えば、多数の化学療法薬の投与は、その開示内容が、参照により本明細書に組み込まれる、Physicians' Desk Reference (PDR)、例えば、1996年版(Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA)に記載されている。

20

#### 【0363】

化学療法薬(単数または複数)および/または放射線療法を、当技術分野で周知の治療用プロトコールに従って投与できる。化学療法薬(単数または複数)および/または放射線療法の投与は、治療されている疾患およびその疾患に対する化学療法薬(単数または複数)および/または放射線療法の公知の効果に応じて変わり得るということは、当業者には明らかであろう。また、熟練した臨床医の知識に従って、患者に対する投与された治療薬の観察された効果を考慮して、また投与された治療薬に対する疾患の観察された応答を考慮して、治療プロトコール(例えば、投与の投与量および時間)を変えることができる。

30

#### 【0364】

##### 患者選択

本発明の種々の実施形態では、患者は、本発明の抗TIGIT抗体を用いて治療される前に、抗TIGIT療法に対して応答する可能性が高いか否かを調べるために試験され、治療的応答と関連する形質を示すもののみが治療される。TIGIT、DNAM、PVR、ネクチン-2、可溶性PVR(sPVR)および可溶性ネクチン-2(sネクチン-2)またはそれらの組合せを含めた、TIGIT経路と関連するタンパク質の発現を測定してもよい。PVRおよびネクチン-2 mRNAは両方とも、ヒト腫瘍の大部分において高度に発現される。実施例9および図6Aを参照のこと。一実施形態では、例えば、ELISAによって、ヒト血清においてsPVRおよび/またはsネクチン-2が検出され、これでは、sPVRおよび/またはsネクチン-2レベルの上昇が、本発明の抗TIGIT抗体を用いる治療に応答する可能性が高い癌を有する対象を示す。

40

#### 【0365】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT療法に対して応答する可能性が最も高い患者を選択するために、患者から得たサンプルが、T細胞でのDNAM-1の発現についてスクリーニングされ、これでは、T細胞またはNK細胞でのDNAM-1の存在が、患者が、抗TIGIT療法、例えば、本発明の抗hTIGIT抗体または断片を用いる治療の際に有益な抗腫瘍応答を有するであろうと示唆し、T細胞またはNK細胞にDNAM-1が存在しないことは、抗TIGIT療法から恩恵を受ける可能性が低い患者を示す。その他

50



の実施形態では、患者から得たサンプルは、抗 T I G I T 療法に対して応答する可能性が最も高い患者を選択するために、腫瘍細胞または腫瘍浸潤骨髓系細胞での P V R および / またはネクチン - 2 / C D 1 1 2 の発現についてスクリーニングされ、これでは、腫瘍細胞または腫瘍浸潤骨髓系細胞での P V R および / またはネクチン - 2 / C D 1 1 2 の存在は、患者が、抗 T I G I T 療法、例えば、本発明の抗 h u T I G I T 抗体または断片を用いる治療の際に有益な抗腫瘍応答を有するであろうと示唆し、腫瘍細胞または腫瘍浸潤骨髓系細胞に P V R および / またはネクチン - 2 / C D 1 1 2 が存在しないことは、抗 T I G I T 療法から恩恵を受ける可能性が低い患者を同定する。

#### 【 0 3 6 6 】

一実施形態では、可溶性 P V R および / またはネクチン - 2 のレベルは、本発明の抗 T I G I T 抗体を用いる治療について考慮されている患者において測定され、可溶性 P V R および / またはネクチン - 2 の上昇を示す患者のみが、抗体を用いて治療される。例えば、高可溶性 P V R および / またはネクチン - 2 を、患者選択バイオマーカーとして使用してもよい。

#### 【 0 3 6 7 】

腫瘍の種類および個々の対象における腫瘍は、腫瘍細胞が、上昇したレベルの P V R および / またはネクチン - 2 を発現する場合に、またこのような腫瘍が高レベルの浸潤 T I G I T + C D 8 + T 細胞を有する場合に、本発明の抗 T I G I T 抗体を用いる治療に対して応答する可能性が最も高い。

#### 【 0 3 6 8 】

以下の実施例によって本開示をさらに例示するが、これは、さらなる制限と解釈されてはならない。本願を通じて引用された、すべての図およびすべての参考文献の内容、G e n b a n k 配列、特許および公開特許出願は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。特に、P C T 公開 W O 0 9 / 0 4 5 9 5 7、W O 0 9 / 0 7 3 5 3 3、W O 0 9 / 0 7 3 5 4 6、W O 0 9 / 0 5 4 8 6 3 および P C T / U S 2 0 1 3 / 0 7 2 9 1 8 および米国特許公開第 2 0 1 1 / 0 1 5 0 8 9 2 号の開示内容は、参照により明確に組み込まれる。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 3 6 9 】

##### 実施例 1

##### 抗 h u T I G I T 抗体の作製

以下の通りに、ヒト抗体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを使用して、ヒト抗 h u T I G I T モノクローナル抗体を作製した。

#### 【 0 3 7 0 】

##### 抗原

h u T I G I T 可溶性組換えタンパク質を、免疫処置のための抗原として使用した。可溶性融合タンパク質は、40.7 k D の M W を有し、その C 末端でマウス I g G 2 a F c と連結している h u T I G I T の細胞外部分からなる。この融合タンパク質は、本明細書において、「h u T I G I T - m u F c 融合タンパク質」と呼ばれる。融合タンパク質は、標準組換え D N A 法によって作製し、トランスフェクトされた C H O 細胞において発現させた、トランスフェクトされた C H O 細胞は、可溶性融合タンパク質を培養上清中に分泌した。トランスフェクションに使用される C H O 宿主細胞は、Invitrogen(カタログ番号 1 1 6 1 9 - 0 1 2 ) から入手した。分泌された可溶性融合タンパク質を、免疫原として使用するために精製した。シグナル配列を含む全長ヒト T I G I T の配列は、配列番号 1 に提供されている。

#### 【 0 3 7 1 】

##### トランスジェニックマウス

ヒト T I G I T に対する完全ヒトモノクローナル抗体を、C H D \* \* ; C K D 2 \* \* ; C M D + + ; J K D + + ; K C o 5 ( 9 2 7 2 ) + ^ ; S C 2 0 + 遺伝型からマウスを使用して調製した(以下、K M (登録商標)マウスと呼ばれる)。個々の導入遺伝子指定は、括弧

10

20

30

40

50

内にあり。それに無作為に組み込まれた導入遺伝子の系統番号が続く。記号++および+は、同形接合性またはヘミ接合性を示すが、マウスは、無作為に組み込まれたヒトIg導入遺伝子について異型接合性および同型接合性間を区別することを可能にしないPCRベースのアッセイを使用して日常的にスクリーニングされるので、+指定は、これらの要素について実際に同形接合性であるマウスに与えられ得る。この株では、Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820に記載されるように、内因性マウス軽鎖遺伝子は、同型接合的に破壊されており、内因性マウス重鎖遺伝子は、WO2001/09187の実施例1に記載されるように同型接合的に破壊されている。さらに、このマウス株は、Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851に記載されるようなヒト軽鎖導入遺伝子、KC05、WO2000/026373に記載されるようなヒト軽鎖遺伝子座のほとんどを保持する酵母人工染色体(YAC)を保持する。

10

#### 【0372】

##### マウスの免疫処置

ヒトTIGITに対する完全ヒトモノクローナル抗体を作製するために、KMマウスを、精製されたhuTIGIT-muFc融合タンパク質を用いて免疫処置した。一般的な免疫処置スキームは、Lonberg, N. et al (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851およびWO98/24884に記載されている。マウスは、抗原の第1の注入の際に、およそ4ヶ月齢であった。精製された組換えhuTIGIT-muFc抗原調製物(融合タンパク質を発現するトランスフェクトされた哺乳動物細胞から精製された10μg)またはヒトTIGITを用いてトランスフェクトされた300-19細胞のいずれかを使用して、マウスを腹膜内および皮下に免疫処置した。免疫原は、RIBIアジュバント(Sigmaカタログ番号M6536)と1:1混合した。

20

#### 【0373】

マウスを5~7日の間隔で5回免疫処置した。組換えタンパク質を用いて第1および第2の免疫処置を実施した。第3の免疫処置は、細胞を用い、第4の免疫処置は、タンパク質を用い、第5の免疫処置は、細胞を用いた。最後の免疫処置の1週間後にマウスを出血させて、抗原特異的力価を評価した。免疫応答を、後眼窩出血によってモニタリングした。トランスフェクトされた300-19細胞を使用するFACS分析によって血漿をスクリーニングし、抗ヒトTIGITヒトIgGについて最高の力価を有するマウスを融合に使用した。マウスは、屠殺と脾臓採取前の2日前に可溶性抗原、および3日前にトランスフェクトされた細胞を静脈内(IV)および腹膜内(IP)注射することによって、最後のブーストを受けた。

30

#### 【0374】

##### ヒトTIGITに対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

高力価KMマウスから単離されたマウス脾細胞およびマウス骨髓腫融合パートナーを、Cyto Pulse大型チャンバー細胞融合エレクトロポレーター(Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD)を使用して電場ベースの電気融合を用いて融合した。免疫処置したマウスから得た脾臓リンパ球の単細胞懸濁液を、同数のP3X63Ag8.6.53(ATCC CRL 1580)非分泌性マウス骨髓腫細胞(融合数: 2541)と融合した。得られた細胞を、-メルカプトエタノール(1000X、Gibco番号21985-023)、7mM HEPES(Cellgro 25-060-CI)、追加の2mM L-グルタミン(Cellgro 25-005-CI)、HAT(50X、Sigma番号H-0262)、5%ハイブリドーマクローニング因子(BioVeris番号210001)、10% P388DI(ATCC番号CRL TIB-63)コンディショニング培地およびペニシリン-ストレプトマイシン(100x、Cellgro番号30-002-CI)を補給した、高グルコース(Cellgro番号10-013-CM)および10%ウシ胎児血清(Hyclone番号SH30071.03)を含有する選択DMEM培地において、平底マイクロタイタープレート中に $2.0 \times 10^4$ 個細胞/ウェルでプレーティングした。約7日後、HATを含有する培地の一部を、HT(Cellgro番号25-047-CI)を含有する培地と交換した。

40

50

## 【0375】

10～12日後、同種HTRFアッセイを使用して、個々のウェルを、ヒトIgG/ヒト軽鎖抗体の存在についてスクリーニングした。このアッセイにおいて、96ウェル融合プレートからの上清を、ユウロピウム-クリプテート標識されたヤギ抗ヒトIgG(Fc断片特異的)、ビオチン化ヤギ抗ヒト軽鎖(Bethyl番号A80-115B)、ストレプトアビジン-XLentと混合し、1時間インキュベートした。次いで、プレートをRUBystarリーダーで読み取った。

## 【0376】

ヒトIgG/ヒト軽鎖またはヒトIgG/ヒト軽鎖抗体について陽性のウェルから得たハイブリドーマ細胞を、次いで、ヒトTIGITを用いてトランスフェクトされた300-19細胞および対照としての300-19非トランスフェクト細胞を使用してFACSによってスクリーニングした。FACS陽性の親株を24ウェルプレートに移した。2、3日後、個々のウェルから得た細胞上清を、FACSによって再スクリーニングして、ヒトTIGITに対するIgG特異性を確認した。

10

## 【0377】

ハイブリドーマを段階希釈によってクローニングし、FACSによって再スクリーニングした。36抗体を拡大および精製のために選択した。4種の抗体(15A6、22G2、11G11、10D7)を、配列決定およびさらなる分析のために続いて選択した。

## 【0378】

## 実施例2

20

## 抗huTIGIT抗体の可溶性ヒトTIGITとの結合

抗huTIGIT抗体の可溶性ヒトTIGITとの結合をBIAcore(登録商標)表面プラズモン共鳴(SPR)分析によって調べた。抗huTIGIT抗体をヒトでコーティングされたチップ(約5KRU; Southernbiotechカタログ番号2060-01)上に捕獲し、組換えヒトTIGIT(rhTIGIT/Fc)を、500nM、250nM、125nM、62nMおよび31nMの濃度でチップ全体に流した。mAb/容量の捕獲濃度は、2～40μg/mL(10μL/分で5μL)であった。抗原会合時間は15μL/分で5分とし、抗原解離時間は、6分とし、50mM HCl/50mM NaOH(100μL/分で各12μL)を用いて再生を実施した。結果は、表3に示されている。

## 【0379】

30

## 【表 3】

表 3

抗huTIGIT mAbのヒトTIGITとの結合

抗体	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) ( $\times 10^5$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ ) ( $\times 10^{-3}$ )	$K_D$ (nM)
22G2	23.7	0.403	0.17
24E8	2.19	0.704	3.22
10B8	4.19	4.27	10.2
26F7	1.11	1.30	11.8
13D1	1.12	1.44	12.8
19H2	1.66	2.42	14.6
15A6	2.02	4.04	19.9
16F6	1.38	3.75	27.2
11G11	0.503	1.44	28.7
25E7	1.33	4.00	30.1
24G1	1.25	4.37	35.0
10D7	1.71	6.51	38.1
17G4	2.19	8.42	38.4
4E4	7.35	37.3	50.7
5F4	0.561	3.14	56.0
20G6	3.18	18.3	57.6
6F9	4.68	31.9	68.2
6F9	2.99	20.6	69.0
11C9	0.4	2.94	73.5
9B11	1.23	11.7	94.9
27F1	0.777	8.56	110
13E6	2.03	22.5	111
27F1	0.544	8.38	154
11G2	1.74	33.4	192
10C9	1.52	29.4	194
8C8	0.582	33.1	568

10

20

30

## 【0380】

抗体 14B2、19H2 および 26D8 の結合は、弱すぎて確実に測定されなかった。

## 【0381】

表 3 に示される先行する結合定数決定を使用して、さらなる研究のために抗 hu TIGIT 抗体を選択するのを補助した。次いで、サブクロニングされ、精製された抗体 15A6 および 22G2 の結合定数を、全滴定曲線を使用して、それぞれ、1.5 nM および 90 pM であると決定した。

40

## 【0382】

修飾されたフレームワーク残基および変更されたヒト IgG1 定常領域を有する 15A6 および 22G2 抗体を比較する、さらなる SPR 実験を実施した。ヒト IgG1 f 配列は、配列番号 45 で提供され、配列番号 46 で提供されアロタイプ変異体 (配列番号 45 と、R97K、E239D および M241L で異なる) を有する。ヒト IgG1.3 は、配列番号 47 で提供されている (配列番号 45 と、L117A、L118E および G120A で異なり、EU 番号付け下の L234A、L235E および G237A に対応する)。別のエフェクターレスヒト IgG1 定常領域、ヒト IgG1.1 f は、配列番号 48 で提供される (配列番号 45 と、L117A、L118E、G120A、A213S および P214S で異なり、EU 番号付け下の L234A、L235E、G237A、A330S

50

および P 3 3 1 S に対応する)。図 7 は、I g G 1 . 1 f コンストラクトにおける F c 受容体結合の劇的な低減を示す。T I G I T は、C D 8 + T I L で高度に発現され、エフェクター機能を有する抗 T I G I T 抗体が、腫瘍を根絶させるのに必要とされる極めて抗腫瘍性の C D 8 + T I L および / または N K 細胞を枯渇させ得るので、このような「不活性の」F c 領域の使用は、賢明であり得る。

#### 【 0 3 8 3 】

フレームワーク変異体 A 7 2 S および / または N 1 1 2 T を有する 1 5 A 6 およびフレームワーク変異体 H 3 Q を有する 2 2 G 2 抗体を、その修飾されていない形態と比較する S P R 実験によって、フレームワーク変更もアイソタイプも、ヒト T I G I T との結合に意味のある影響を及ぼさないということが実証された。結果は、表 4 に提供されている。

#### 【 0 3 8 4 】

##### 【表 4】

表 4

選択された抗 huTIGIT mAb のヒト TIGIT との結合

抗体	配列変異体	アイソタイプ	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) ( $\times 10^6$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ ) ( $\times 10^{-3}$ )	$K_D$ (nM)
15A6	-	IgG1f	1.0	1.5	1.5
15A6	-	IgG1.1f	1.1	1.6	1.5
15A6	A72S	IgG1.1f	1.1	1.7	1.5
15A6	N112T	IgG1.1f	1.1	1.9	1.7
15A6	A72S & N112T	IgG1.1f	1.0	2.0	2.0
22G2	-	IgG1f	1.9	0.17	0.09
22G2	-	IgG1.1f	2.0	0.13	0.07
22G2	H3Q	IgG1	1.9	0.30	0.16
22G2	H3Q	IgG1.1f	2.0	0.16	0.08

#### 【 0 3 8 5 】

さらなる S P R 実験によって、m A b 2 2 G 2 は、ヒト T I G I T と 0 . 0 6 n M の  $K_D$  で、カニクイザル T I G I T と、0 . 0 9 n M の  $K_D$  で結合することがわかった。

#### 【 0 3 8 6 】

配列表中のアミノ酸残基番号付けは、E U 番号付けの使用および配列表中の I g G 配列中に可変ドメインがないことのために、文献における番号付けよりも 1 1 7 小さい。ヒト抗体の遺伝子コンストラクト中に存在する C 末端リシン (K) 残基は、本発明の治療用抗体などの商業的に生産された抗体からは失われていることが多い。Dick et al. (2008) Bio technol. Bioeng. 100:1132。したがって、このリシンは、配列番号 4 5 ~ 4 8 のいずれにも含まれていないが、一実施形態では、本発明の抗 h u T I G I T 抗体は、このさらなるリシン残基を重鎖 (単数または複数) の C 末端に含む。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、例えば、意図されない C 末端クリッピングの結果として、C 末端リシンを有する重鎖および C 末端リシンを欠く重鎖の混合物を含む調製物中にある。いくつかの実施形態では、本発明の抗 h u T I G I T 抗体は、2 種の重鎖および 2 種の軽鎖など、1 種または複数の重鎖および 1 種または複数の軽鎖を含む。

#### 【 0 3 8 7 】

##### 実施例 3

抗 T I G I T 抗体は、複数の群へビニングする

どの抗ヒト T I G I T 抗体が、h u T I G I T との結合について、どのその他のものと競合し、したがって、同様のエピトープと結合するかを調べるために、抗体ビニング実験を実施した。抗体 1 4 B 2、1 3 E 6、6 F 9、1 1 G 1 1、1 0 C 9、1 6 F 6、1 1 C 9、2 7 A 9、1 0 D 7、2 0 G 6、2 4 E 8、2 4 G 1、2 7 F 1、1 5 A 6、4 E 4、1 3 D 1、9 B 1 1、1 0 B 8、2 2 G 2、1 9 H 2、8 C 8、1 7 G 4、2 5 E 7、2 6 D 8 および 1 6 A 8 を調べた。

## 【0388】

抗h u T I G I T抗体間の対競合は、以下のように決定し、これでは、第1の抗体は、センサーチップの表面と結合しており、第2の抗体は、混合物中でT I G I Tポリペプチドコンストラクトとともにプレインキュベートされており、プレインキュベートされた混合物をセンサーチップ上に流して、第2の抗体が、T I G I Tポリペプチドコンストラクトのチップ表面上の第1の抗体との結合を干渉する程度を調べる。手短には、第1の抗h u T I G I T抗体を、センサーチップC M 5チップ(Series S, GE Healthcareカタログ番号B R - 1 0 0 5 - 3 0)表面上に固定化し、フローセル2、フローセル3 & フローセル4(5 0 0 0 R U)およびフローセル1を陰性対照として使用した。第2の抗体を出発濃度で1 2 0  $\mu$ g / mL (2 X)に希釈した。第2の抗体の一連の希釈は、滴定曲線を得るために、7種の異なる濃度および(0.0  $\mu$ g / mL)の対照サンプルを求めてバッファーを用いて抗体の濃度を1 : 3希釈することによって行った。各抗体濃度シリーズを、2つの半量に分けた。濃度シリーズの第1の半量では、4 0 n M (2 X) T I G I T抗原(r h T I G I T / F c)を加えて、最終濃度シリーズ(6 0  $\mu$ g / mL ~ 0.0  $\mu$ g / mL)および各ウェルにおいて2 0 n Mの最終抗原濃度をとした。濃度のシリーズの第2の半量では、抗原の代わりに、同一濃度に希釈された抗体を有するようバッファーを加え、この半量をブランクとして処理した。第2の抗T I G I T抗体およびr h T I G I T / F cの複合体を2時間インキュベートした。4 0  $\mu$ Lの複合体を、抗体(第1)によってコーティングされた表面に3 0  $\mu$ L / 分の流速で注入した。B I A C O R E (登録商標) T 2 0 0 表面プラズモン共鳴機器を使用し、ランニングバッファーは、H B E - E P、GE Healthcareカタログ番号B R - 1 0 0 1 - 8 8、濾過され脱気された0.0 1 M H E P E S、p H 7.4、0.1 5 N a C l、3 m M E D T A、0.0 0 5 % 界面活性剤P 2 0とした。2 5 m M N a O H (注文コード: B R - 1 0 0 3 - 5 8、GE Healthcare)を、1 0 0  $\mu$ L / 分で5秒間用いて表面を再生した。マイクロソフトエクセルを使用してデータを分析し、これでは、第2の抗体の濃度シリーズを、対応する応答単位に対してプロットして、滴定曲線を得た。

## 【0389】

結果は、試験された抗体は、4つの群にビンニングすることを示す。図1を参照のこと。ビン1中の抗体(1 4 B 2、1 3 E 6、6 F 9、1 1 G 1 1、1 0 C 9、1 6 F 6、1 1 C 9、2 7 A 9、1 0 D 7、2 0 G 6、2 4 E 8、2 4 G 1、2 7 F 1、1 5 A 6、4 E 4、1 3 D 1、9 B 1 1、1 0 B 8)は、ビン1内のその他の抗体、ならびに2 2 G 2、1 9 H 2、8 C 8および1 7 G 4の結合を遮断する。ビン2中の抗体(2 5 E 7、2 6 D 8、1 6 A 8)は、ビン2中のその他の抗体ならびに2 2 G 2、1 9 H 2および8 C 8結合を遮断する。抗体2 2 G 2、1 9 H 2および8 C 8(ビン3)は、ビン3中のその他の抗体ならびにビン1およびビン2両方の中の抗体の結合を遮断するが、1 7 G 4(ビン4)を遮断しない。抗体1 7 G 4は、ビン1内の抗体の結合を遮断するが、その他の抗体はいずれも遮断しない。

## 【0390】

## 実施例 4

## 酵母ディスプレイによるエピトープマッピング

本発明の選択された抗h u T I G I T抗体(クローン2 2 G 2、1 1 G 1 1および1 5 A 6)のエピトープを、無作為に突然変異されたh u T I G I T細胞外領域変異体を酵母上にディスプレイし、これらの酵母を、それらが特定の抗体と結合できないことに基づいて選別することによって決定した。結合できなかった選択された酵母細胞を増幅し、それらが本発明の特定の抗体と結合できないことに基づく、さらなる選択ラウンドに付した。例えば、Chao et al. (2004) J. Mol. Biol. 342:539を参照のこと。得られた酵母についてh u T I G I T変異体の配列を決定し、抗体結合に対する各残基の効果について分析した。単一アミノ酸突然変異が本発明の抗h u T I G I T抗体との結合を破壊するh u T I G I T配列内の遺伝子座として、本発明の抗体の結合エピトープを決定した。

## 【0391】

手短には、エラーブローンPCRを使用して、ヒトTIGITをコードするDNAを、  
huTIGIT変異体の、c-mycタグ配列および酵母細胞壁タンパク質Ag 1pを  
さらに含む融合タンパク質のアミノ末端部分としての発現を可能にするコンストラクト中  
にクローニングした。このようなコンストラクトは、酵母(サッカロミセス・セレビシエ(  
Saccharomyces cerevisiae))中で発現されると、酵母細胞の表面に、Ag 1pポリペプ  
チドによって細胞表面に固定された変異体huTIGITポリペプチドをディスプレイす  
る。c-mycタグは、所与の酵母細胞でのhuTIGIT-融合タンパク質のディスプ  
レイの陽性対照として適宜使用できる。酵母細胞をFACSによって選別し、適切にフォ  
ールディングされたhuTIGIT-融合タンパク質として発現される(アロフィコシア  
ニン(APC)標識されたヤギ抗マウスIgGによって二次的に検出される、対照マウス抗  
huTIGIT抗体の結合によって決定されるように)が、本発明の抗体と結合しない(フィ  
コエリトリン(PE)標識されたヤギ抗ヒトIgGを用いる二次的な検出によって決定さ  
れるように)ものをプールし、増幅し、その後の選択ラウンドにおいて使用した。数回の  
選択ラウンド後に残存する酵母から得たコンストラクトについてhuTIGIT配列を決  
定した。抗huTIGIT抗体選択を行わない対照実験によって、huTIGIT配列に  
沿った各位置で良好な突然変異体カバー度を確認し、選択されたライブラリーを用いて得  
られた結果を正規化するためのベースラインを提供した。

10

#### 【0392】

huTIGIT突然変異体分子の各抗体によって選択された集団について、何百万もの  
高品質配列リードを実施した。残基60は、突然変異に対して構造的に寛容であるが、こ  
の位置での突然変異は、抗体22G2と結合しないことがわかり、これは、E60がエピ  
トープに關与していることを示した。同様に、残基I109、L65、N70、F107  
、T117、I68、H76およびN58もまた、抗体22G2のエピトープにおいて重  
要な残基であるとわかった。22G2のエピトープ残基は、残基58~76(NWEQQ  
DQLLAICNADLGWH; 配列番号38)および残基107~117(FCIYHT  
YPDGT; 配列番号39)を含む一次配列領域中に集まっている。図2Aを参照のこと  
。このエピトープは、X線結晶構造によって調べられるようにTIGIT/PVR結合界  
面と重複する。Stengel et al. (2012) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 109:5399。

20

#### 【0393】

抗体11G11を用いる類似実験によって、残基G74、N70、H76、L65、L  
73、Q56、I68、H111およびP114で重要な接触点が見された。11G11  
のエピトープ残基は、残基56~76(QVNWEQQDQLLAICNADLGWH;  
配列番号40)および残基111~114(HTYP; 配列番号41)を含む一次配列領域  
中に集まっており、残基120~139(GRIFLEVLESVAEHGARFQ;  
配列番号42)においてその他の可能性ある接触を有する。図2Bを参照のこと。

30

#### 【0394】

抗体15A6を用いる類似実験によって、残基H76、G74、L65、N58、I6  
8、Q139、G135、L73、F107、N70、E60、H134、A132およ  
びI109で重要な接触点が見された。15A6のエピトープ残基は、残基58~76(  
NWEQQDQLLAICNADLGWH; 配列番号38)および残基107~109(F  
CI)を含む一次配列領域中に集まっており、残基132~139(AEHGARFQ; 配  
列番号43)においてその他の可能性ある接触を有する。図2Cを参照のこと。

40

#### 【0395】

3種すべてのエピトープが、残基L65、I68、N70およびH76を含み、これは  
、これらの残基およびこの領域、すなわち、残基65~76(LLAICNADLGWH  
; 配列番号44)または15A6および22G2のみを考慮すれば58~76は、本発明  
の抗huTIGIT抗体の結合の重要な領域(「コアエピトープ」)に相当するということ  
を示唆する。

#### 【0396】

huTIGITのヒトPVR/CD155との結合に関する類似実験によって、残基Q

50

56、N58、I68、N70、L73、G74、W75、H76、H111、T112、Y113、P114、D115およびG116で重要な接触点が見られ、これらの接触は、抗体22G2、11G11および15A6によって結合されるエピトープ領域中に大部分は収まっている。

【0397】

#### 実施例 5

抗TIGIT抗体を用いて処理されたNK細胞によるPVR<sup>+</sup>細胞の溶解の増強

インビトロでのPVR<sup>+</sup>細胞のNK細胞媒介性溶解に対する抗ヒトTIGIT抗体22G2の効果を評価した。野生型およびヒトPVRを発現するよう遺伝子操作されたP815細胞(マウスマスト細胞腫細胞株)の両方を、抗huTIGIT mAb 22G2-IgG1、22G2-IgG1.1またはアイソタイプ対照の存在下でヒトNK細胞に曝露した。

10

【0398】

手短には、ヒトNK細胞、エフェクターを、全血から単離し、IL-2とともに一晚インキュベートした。NK細胞を、P815/PVRまたはP815[w.t.]いずれかの標的細胞とともに、10:1または20:1のE:T細胞比でプレATINGした。5μg/mLの最終濃度でウェルに抗体を添加した。プレートを2~4時間インキュベートし、細胞上清を、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の放出、死滅細胞または瀕死細胞の生成について評価した。

20

【0399】

結果は図3に示されている。特異的溶解パーセント(%)を、[(試験シグナル-平均自然溶解)/(平均最大溶解-平均自然溶解)]×100として算出した。抗TIGIT抗体22G2を使用するTIGIT遮断は、NK細胞での阻害シグナル伝達を低減し、これは、DNAM-1特異的に、PVRを発現する標的細胞の溶解の増大をもたらす。

【0400】

#### 実施例 6

抗TIGIT抗体によるCD8<sup>+</sup>T細胞の活性化

単独のおよび抗ヒトPD-1抗体と組み合わせた、抗ヒトTIGIT抗体の、抗原ペプチドを用いて刺激されたヒトT細胞に対する効果を調べるために実験を実施した。予備的問題として、PD-1<sup>+</sup>/TIGIT<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞が、抗原ペプチドのカクテル(CMV、EBV、インフルエンザおよびテタヌスから)に曝露された健常なヒトドナーから得た血液中に、曝露されていない血液よりも広がっていることが観察された。図4Aを参照のこと。CEF Tを用いて処理した血液において、IFN 産生が測定された。図4Bを参照のこと。抗TIGIT mAb 22G2は、単剤治療としては無効であるが、抗原ペプチドのカクテルに対して曝露されたヒトT細胞からのIFN 産生を刺激する抗PD-1の能力を増強した。抗ヒトTIGIT抗体10D7の、ヒト腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の効果が、抗huPD-1抗体の同時投与を伴うか、または伴わない、NY-ESO-1ペプチドに対して曝露された黒色腫患者からの末梢血単核細胞(PBMC)において決定されたChauvin et al. (2015) J. Clin. Invest. 125:2046も参照のこと。

30

【0401】

#### 実施例 7

マウスCT26腫瘍モデルにおける抗TIGIT抗体の抗腫瘍活性

抗マウスTIGIT抗体を、単独で、および抗マウスPD-1抗体と組み合わせて、同一遺伝子CT26結腸腺癌モデルにおいて抗腫瘍活性について試験した。これらの実験において使用される抗muTIGIT抗体は、本発明の抗huTIGIT抗体のマウスサロゲートである。

40

【0402】

手短には、抗muTIGIT mAb(クローン4B1)を、マウスIgG2aまたはマウスIgG1 D265A(エフェクター機能が低減した)Fc領域のいずれかを用いて、ならびに抗muPD-1(クローン4H2)を、マウスIgG1 D265A Fc領域を

50



用いて調製した。これらの抗体およびその組み合わせを、マウス I g G 1 アイソタイプ対照と一緒にマウスに投与し、同一遺伝子 C T 2 6 結腸腺癌モデルにおいて抗腫瘍活性について調べた。研究のために使用される I g G 1 対照抗体は、マウス I g G 1 アイソタイプを用いた組換えヒト抗ジフテリア毒素抗体である。

#### 【 0 4 0 3 】

0 日目に、群あたり 1 5 匹の B A L B / c マウス(合計で 9 0 匹のマウス)に、 $1 \times 10^6$  個の C T 2 6 腫瘍細胞を用いて皮下注射した。治療は、移植後 7 日目に開始した。腫瘍を測定し、同等の平均腫瘍量 ( $45 \sim 50 \text{ mm}^3$ ) を有するよう治療群に無作為化し、次いで、指定の抗体 ( $200 \mu\text{g}$  / 用量) を用いて腹膜内に (I P) 治療し、1 0 および 1 4 日目に再度治療した。各実験は、 $200 \mu\text{g}$  / 用量の対照 I g G 1 抗体も同様に含んでおり、したがって、対照 I g G 1 実験自体は、 $400 \mu\text{g}$  / 用量を含んでいた。腫瘍量は週に 2 回測定した。

#### 【 0 4 0 4 】

結果は、図 5 A に示されており、これは、時間の関数として各実験の平均腫瘍量を示す。抗 T I G I T 抗体 (G 1 D 2 6 5 A) のエフェクター機能低減版は、腫瘍成長に影響を及ぼさず、いずれのマウスの腫瘍も取り除かなかったが、I g G 2 a は腫瘍成長を低減し、その結果、1 5 匹のうち 3 匹の 3 5 日目に腫瘍がないマウスとなった。I g G 2 a 抗 T I G I T 抗体の、抗 P D - 1 抗体との組合せは、腫瘍成長の低減で高度に有効であり、1 5 匹のうち 1 0 匹の腫瘍のないマウスにつながったが、抗 T I G I T G 1 D 2 6 5 A の、抗 P D - 1 との組合せは、腫瘍成長の低減で幾分かあまり有効ではなく、その結果、1 5 匹のうち 7 匹の腫瘍のないマウスとなった。それにもかからず、I g G 2 a および I g G 1 D 2 6 5 A 抗 T I G I T 抗体は両方とも、抗 P D - 1 抗体の活性を増大し、これは、単独で、1 5 匹のうち 2 匹のみの腫瘍のないマウスをもたらした。

#### 【 0 4 0 5 】

同様の実験を実施して、単剤治療としての抗 T I G I T を、抗 T I G I T / 抗 P D - 1 および抗 T I G I T / 抗 C T L A - 4 併用療法と比較した。抗 T I G I T および抗 P D - 1 抗体の両方とも、F c 不活性マウス I g G 1 - D 2 6 5 A アイソタイプとして、抗 C T L A - 4 はマウス I g G 2 b としてフォーマットした。0 日目に、雌の B A L B / c マウスに、 $1 \times 10^6$  個の腫瘍細胞を用いて移植し、1 0、1 4 および 1 7 日目に抗体を  $10 \text{ mg} / \text{kg}$  で I P 投与した。結果は、図 5 B に提供されている。抗 P D - 1 および抗 C T L A - 4 を用いる治療への抗 T I G I T の添加は、併用療法曲線から明らかであるように腫瘍成長阻害 (T G I) を大幅に増強し、それぞれ、抗 T I G I T、抗 P D - 1 および抗 C T L A - 4 を用いる単剤治療の 7 %、1 8 % および 1 3 % T G I と比較して、抗 T I G I T / 抗 P D - 1 の 5 6 % T G I および抗 T I G I T / 抗 C T L A - 4 の 4 9 % T G I であった。併用療法はまた、実験の最後での腫瘍のないマウスの数を、抗 P D - 1 との組合せの 1 / 1 0 から 5 / 1 0 に、および抗 C T L A - 4 との組合せの 3 / 1 0 から 6 / 1 0 に増大した。

#### 【 0 4 0 6 】

##### 実施例 8

抗 h u T I G I T 抗体 1 5 A 6、2 2 G 2、1 1 G 1 1 および 1 0 D 7 のその他の特性

種々のその他のインビトロアッセイを実施して、本発明の選択された抗体の特性を調べた。抗 h u T I G I T m A b 1 5 A 6、2 2 G 2、1 1 G 1 1 および 1 0 D 7 は、h u T I G I T を発現するジャーカット細胞と結合するとわかった。ジャーカット / h T I G I T 細胞の生物検定法は、抗体 1 5 A 6、1 1 G 1 1 および 1 0 D 7 はすべて、P V R シグナル伝達を、およそ同等の有効性で遮断し、抗体 2 2 G 2 は、約 2 倍良好である ( $\text{IC}_{50} = 0.21 \text{ nM}$ ) と実証した。抗体 1 5 A 6 および 2 2 G 2 は、C H O 細胞上に発現された場合には、カニクイザル由来の T I G I T とヒト T I G I T と実質的に同一の親和性で結合すると示されるが、1 1 G 1 1 および 1 0 D 7 はそうではなかった。例えば、抗体 2 2 G 2 I g G 1.1 f は、ヒトおよびサル T I G I T と、それぞれ、 $0.09 \text{ nM}$  および  $0.07 \text{ nM}$  の  $K_D$  で結合し、また C D 8<sup>+</sup> T 細胞との結合についてそれぞれ、 $0.5$

5 nMおよび0.28 ~ 0.58 nMのEC<sub>50</sub>を有していたが、ラットまたはマウスTIGITと結合しなかった。しかし、初代細胞を用いるその後の実験は、15A6は、その関連ではcyno TIGITとは十分に結合しないことを実証した。抗体22G2および15A6は、ヒトリンパ球を染色したが、22種のその他のヒト組織は、10 μg/mlの濃度まで染色しなかった(大脳、小脳、心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓、扁桃腺、胸腺、結腸、小腸、胃、膵臓、皮膚、骨格筋、副腎、甲状腺、末梢神経、前立腺、胎盤、精巣および子宮)。抗体22G2は、10 μg/mlで20時間インキュベートした場合に、8人のドナーから得たヒト全血に由来する75種の異なるサイトカインおよびケモカイン(GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-13、IL-2、IFN、IP-10を含む)の発現を増大せず、サイトカイン放出症候群のリスクが低いことを示唆した。

10

#### 【0407】

別の実験では、抗TIGIT mAb 22G2 IgG1.1fは、それぞれ、ヒトPVRおよびヒトネクチン-2を過剰発現するP815細胞とのTIGIT-mFc結合の遮断について、各々がそのEC<sub>90</sub>濃度で存在する場合に(それぞれ、14.1 nMおよび12.8 nM)、15.4 nMおよび5.72 nMのIC<sub>50</sub>を示した。

#### 【0408】

抗体22G2 IgG1.1fは、重鎖上のN310に単一N-グリコシル化部位を有し、CHOにおいて産生されたモノクローナル抗体に常のグリカンプロファイルを有するとわかった。

#### 【0409】

これらの結果は、抗体22G2は、細胞の表面上に存在する場合にTIGITと結合する、PVRおよびネクチン-2シグナル伝達を阻害する、外来性ヒト組織と結合しないか、または不要なサイトカインもしくはケモカイン放出を誘導する、また、cyno TIGITと結合し、これは、規制当局の承認を支持する研究において使用するための毒性学研究を実施するのに役立つという点において、本発明の方法における治療的使用のための理想的な特性を有するということを示唆する。

20

#### 【0410】

##### 実施例9

TIGIT、DNAM、PVRおよびネクチン-2の発現に基づく患者選択

本発明の抗TIGIT抗体を用いる治療を導くために、TIGIT経路と関連するタンパク質(TIGIT、PVR/CD155、ネクチン-2/CD112、DNAM/CD226)の発現レベルを使用してもよい。PVRおよびネクチン-2の可溶性形態(sPVRおよびsネクチン-2)は、例えば、ELISAまたはその他の従来手段によって血清中で検出してもよい。TIGIT、PVR、ネクチン-2およびDNAMは、例えば、免疫組織化学(IHC)、フローサイトメトリー(FACS)または液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)を含めた質量分析法によって、腫瘍細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、調節T細胞、NK細胞または腫瘍浸潤骨髄系細胞などの細胞の表面上で検出してもよい。

30

#### 【0411】

理論によって制限されるものではないが、本発明の抗TIGIT抗体を用いる治療は、相互作用細胞でのそのリガンド、例えば、PVRまたはネクチン-2とのTIGIT結合の遮断および/または同細胞でのTIGITのDNAMとの相互作用の防止に基づく。したがって、このような治療に対して応答する可能性が最も高い腫瘍または腫瘍の種類は、TIGIT活性が、腫瘍進行にとって重要であり、その結果、このようなTIGIT活性の遮断が、腫瘍根絶を増強するものとなる。具体的には、TIGIT<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞、TIGIT<sup>+</sup>T<sub>reg</sub>またはTIGIT<sup>+</sup>NK細胞などの高レベルのTIGIT<sup>+</sup>TILは、アンタゴニスト抗TIGIT治療に対して応答する可能性が高い腫瘍を示唆する。これらのTIGIT<sup>+</sup>TILでのDNAM発現は、腫瘍は抗TIGIT治療に対して応答し得るということを示唆する。同様に、腫瘍細胞自体で、または腫瘍浸潤骨髄系細胞のいずれかで、高レベルのTIGITリガンドPVRおよび/またはネクチン-2を発現する腫瘍もまた、本発明の抗TIGIT抗体を用いる治療の良好な候補とな

40

50

る。

【0412】

TIGIT経路のタンパク質の発現レベルのスクリーニングは、治療適応症選択のレベルで実施しても、個々の患者レベルで実施してもよい(「患者層別化」)。例えば、どの種類の癌が、タンパク質発現パターンを示すかを調べるために、いくつかの異なる癌の各々を有する多数の患者から得た組織サンプルにおいて発現レベルを調べてもよく、これは、特定の種類の癌が、本発明のアンタゴニスト抗TIGITmAbを用いる治療を受け入れられることを示唆する。統計上適切な数のサンプルについてこのような決定がなされると、抗TIGIT療法に対して応答性であると予測される癌の種類を患っている任意の個々の患者に対して、抗TIGIT療法を推奨することができる。あるいは、個々の患者について具体的に治療決定を導くのに役立つよう、代わりにその患者から得たサンプルを試験してもよい。

10

【0413】

TIGIT経路タンパク質の発現について試験されるべき関連細胞は、腫瘍および周囲の微小環境中のものであるので、このようなスクリーニングは、例えば、生検または摘出によって腫瘍のサンプルを得る必要がある可能性が高い。

【0414】

したがって、本発明はまた、浸潤CD8<sup>+</sup>T細胞、T<sub>reg</sub>またはNK細胞においてTIGITのレベルを測定することによって、および/または腫瘍細胞または腫瘍浸潤骨髄系細胞においてPVRおよび/またはネクチン-2の発現を測定することによって、本発明のアンタゴニスト抗TIGIT抗体を用いる治療の良好な候補である腫瘍の種類または特定の腫瘍を同定するための方法を提供する。

20

【0415】

一実施例では、抗TIGIT療法は、PD-1またはPD-L1阻害剤を用いる治療の代わりに、と同時に、またはそれに対して補足的に使用される。高PVR/ネクチン-2発現および低PD-L1発現を示す腫瘍を、単剤治療としての抗TIGIT抗体を用いて、またはPD-1/PD-L1アンタゴニスト以外の別の免疫-腫瘍学薬剤について生物学的理論的根拠がある場合には、このような薬剤と組み合わせた抗TIGIT抗体を用いて治療してもよい。本発明の抗TIGIT抗体は、高PVR/ネクチン-2発現およびまた高PD-L1発現を示す腫瘍において、抗PD-1/PD-L1抗体と実質的に同時に投与してもよい。あるいは、難治性患者、再燃患者または任意のその他の不完全なまたは不満足な応答を有するものでは、その腫瘍が、PVRおよび/またはネクチン-2の発現の上昇を示す場合には、本発明の抗TIGIT抗体を抗PD-1/PD-L1療法の後に投与してもよい。

30

【0416】

本発明のアンタゴニスト抗TIGIT抗体を用いる治療を受け入れられる可能性が高い腫瘍の種類を同定するための実験では、TCGAデータセットを使用して種々のヒト癌についてヒトPVR mRNAの発現を調べた。結果は、図6Aに示されている。結果は、降順で示されており、最高レベルのPVR mRNAを有する、したがって、本発明の抗TIGIT抗体を用いる治療を受け入れられる可能性が最も高い腫瘍が最上部にある。

40

【0417】

PVRはまた、IHCによって、結腸上皮対照サンプルにおいてよりも結腸腺癌サンプルにおいてかなり高レベルで検出された。図6Bを参照のこと。さらなるIHC実験は、肝細胞癌サンプルの100%で(10/10)、結腸直腸癌サンプルの90%で(9/10)および卵巣癌サンプルの44%で(4/9)上昇したPVR発現を示した。これらの結果は、これらの癌、特に、肝細胞および結腸直腸癌を有する患者は、本発明のアンタゴニスト抗TIGIT抗体を用いる治療の良好な候補であろうということを示唆する。

【0418】

本発明はまた、腫瘍内細菌フソバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)の有無を調べることを含み、その存在が、腫瘍が、本発明の抗TIGIT抗体の治療の

50

良好な候補であり得ることを示唆する治療、例えば、結腸直腸癌の治療の方法を提供する。このような治療の方法はまた、適宜、抗生物質、例えば、メトロニダゾール、ピペラシリン/タゾバクタム、チカルシリン/クラブラン酸、アモキシシリン/スルバクタム、アンピシリン/スルバクタム、エルツペネム(ertupenem)、イミペネム、メロペネム、クリンダマイシンまたはセフォキシチンを、腫瘍内細菌フソバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)を有する対象に投与することを含む。

【 0 4 1 9 】

【表 5 - 1】

表 5

配列表の要約

配列番号	説明
1	ヒトTIGITポリペプチド(NP_776160.2)
2	15A6VH ドメイン
3	15A6VH ドメインA72S
4	15A6VH ドメインN112T
5	15A6VH ドメインA72S N112T
6	15A6 VL ドメイン
7	22G2VH ドメイン
8	22G2VH ドメインH3Q
9	22G2VL ドメイン
10	11G11VH ドメイン
11	11G11VL ドメイン)
12	10D7VH ドメイン
13	10D7VL ドメイン
14	15A6 CDRH1
15	15A6 CDRH2
16	15A6 CDRH3
17	15A6 CDRL1
18	15A6 CDRL2
19	15A6 CDRL3
20	22G2 CDRH1
21	22G2 CDRH2
22	22G2 CDRH3
23	22G2 CDRL1
24	22G2 CDRL2
25	22G2 CDRL3
26	11G11 CDRH1
27	11G11 CDRH2
28	11G11 CDRH3

10

20

30

40

【表 5 - 2】

29	11G11 CDRL1
30	11G11 CDRL2
31	11G11 CDRL3
32	10D7 CDRH1
33	10D7 CDRH2
34	10D7 CDRH3
35	10D7 CDRL1
36	10D7 CDRL2
37	10D7 CDRL3
38	22G2/15A6エピトープ-huTIGIT残基58～76
39	22G2エピトープ-huTIGIT残基107～117
40	11G11エピトープ-huTIGIT残基56～76
41	11G11エピトープ-huTIGIT残基111～114
42	11G11エピトープ-huTIGIT残基120～139
43	15A6エピトープ-huTIGIT残基132～139
44	22G2/11G11/15A6コアエピトープ-huTIGIT残基65～76
45	IgG1f定常ドメイン(ヒト)
46	IgG1定常ドメイン、アロタイプ変異体(ヒト)
47	IgG1.3定常ドメイン(ヒト)
48	IgG1.1f定常ドメイン(ヒト)
49	$\kappa$ 定常ドメイン(ヒト)
50	PVR/CD155前駆体 $\alpha$ (ヒト)NP_006496.4
51	PVR/CD155前駆体 $\beta$ (ヒト)NP_001129240.1
52	PVR/CD155前駆体 $\gamma$ (ヒト)NP_001129241.1
53	PVR/CD155前駆体 $\delta$ (ヒト)NP_001129242.2

10

20

## 【0420】

30

抗体配列に関して、配列表は、重鎖および軽鎖の成熟可変領域の配列、すなわち、シグナルペプチドを含まない配列を提供する。

## 【0421】

等価物：

当業者ならば、本明細書において開示される具体的な実施形態の多くの等価物を認識するであろうし、または単に慣例的な実験を使用すれば確かめることができる。このような等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されるものとする。

【 図 1 】

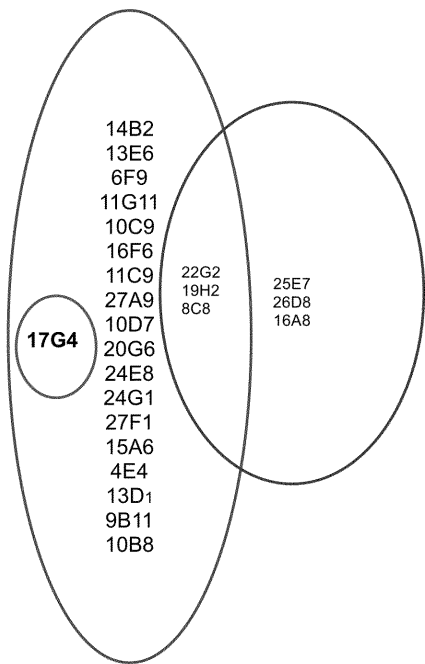


FIG. 1

【 図 2 A 】

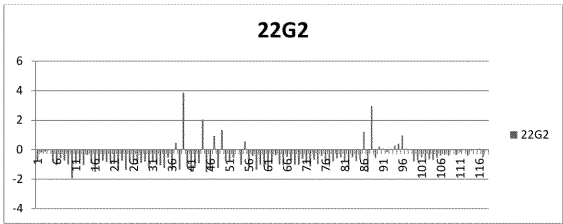


FIG. 2A

【 図 2 B 】

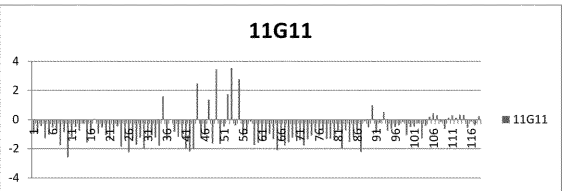


FIG. 2B

【 図 2 C 】

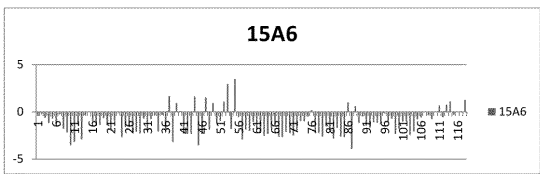


FIG. 2C

【 図 3 】

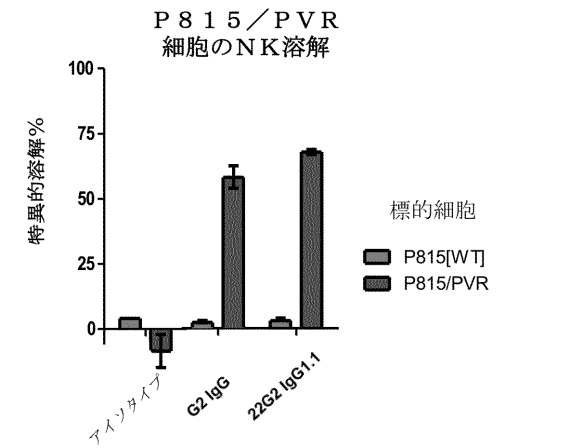
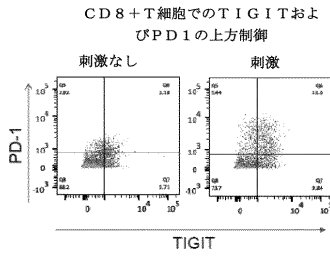


FIG. 3

【図 4 A】



【図 4 B】

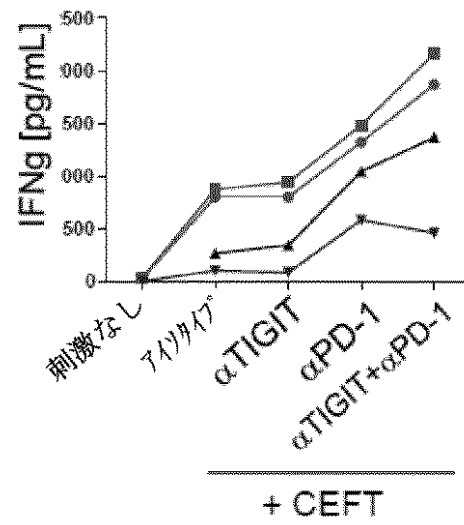


FIG. 4B

【図 5 A】

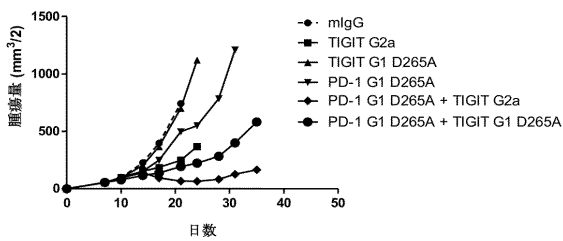


FIG. 5A

【図 5 B】

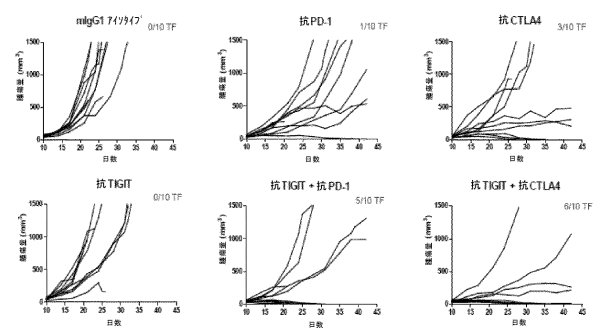


FIG. 5B

【図 6 A】

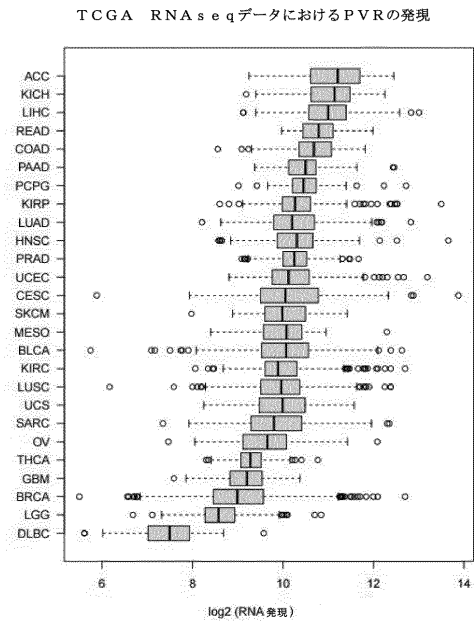
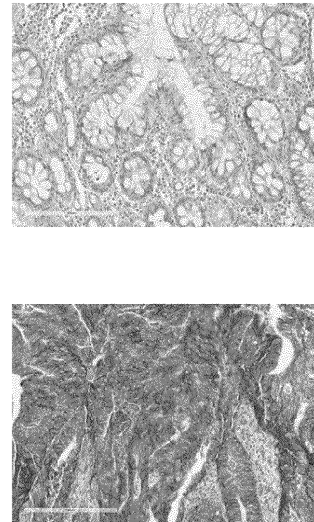


FIG. 6A

【図 6 B】



結腸上皮

結腸腺癌

FIG. 6B

【図 7】

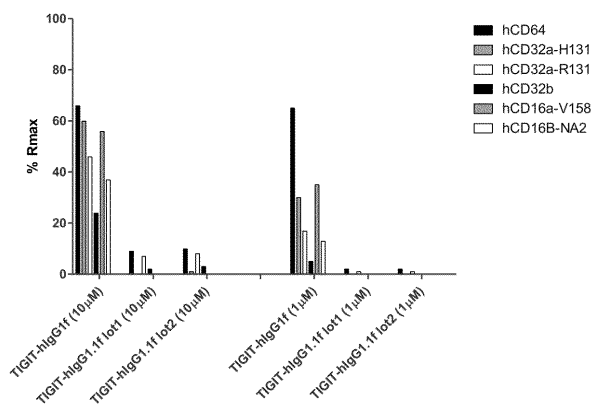


FIG. 7



【配列表】

2018035138000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	C 1 2 P 21/08	

- (72)発明者 マーク・エフ・モラー  
アメリカ合衆国 9 8 1 0 2 ワシントン州シアトル、イーストレイク・アベニュー・イースト 1 2 0  
1 番、プリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 セン・ホイ・ティモシー・チェン  
アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番、プリ  
ストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 ブリジット・デボー  
アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番、プリ  
ストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 モハン・スリニバサン  
アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番、プリ  
ストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 スーザン・エイチ・ジュリアン  
アメリカ合衆国 9 8 1 0 2 ワシントン州シアトル、イーストレイク・アベニュー・イースト 1 2 0  
1 番、プリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 ポール・オー・シェパード  
アメリカ合衆国 9 8 1 0 2 ワシントン州シアトル、イーストレイク・アベニュー・イースト 1 2 0  
1 番、プリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 ダニエル・エフ・アードゥレル  
アメリカ合衆国 9 8 1 0 2 ワシントン州シアトル、イーストレイク・アベニュー・イースト 1 2 0  
1 番、プリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内
- (72)発明者 インドラニ・チャクラボーティ  
アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番、プリ  
ストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44  
CA46  
4C084 AA19 NA05 ZB091 ZB261 ZB271 ZB331 ZC751  
4C085 AA13 AA14 BB36 BB42 DD62 EE01 EE03  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	针对TIGIT的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018035138A</a>	公开(公告)日	2018-03-08
申请号	JP2017138861	申请日	2017-07-18
[标]申请(专利权)人(译)	百时美施贵宝公司		
申请(专利权)人(译)	布里斯托尔 - 迈尔斯宝公司		
[标]发明人	マークエフモラー センホイティモシーチェン ブリジットデボー モハンスリニバサン スーザンエイチジュリアン ポールオーシェパード ダニエルエフアードゥレル インドラニチャクラボーティ		
发明人	マーク・エフ・モラー セン・ホイ・ティモシー・チェン ブリジット・デボー モハン・スリニバサン スーザン・エイチ・ジュリアン ポール・オー・シェパード ダニエル・エフ・アードゥレル インドラニ・チャクラボーティ		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C07K16/46 A61P37/04 A61P35/00 A61P31/12 A61K45/00 A61P43/00 A61K39/395 A61P35/02 A61P35/04 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 C07K16/2803 C07K2317/21 C07K2317/31 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2317/92 Y02A50/466		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C07K16/46 A61P37/04 A61P35/00 A61P31/12 A61K45/00 A61P43/00.121 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/02 A61P35/04 G01N33/53.D C12P21/08 C07K16/28 C12N15/09.ZZN.A C12N15/13		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/NA05 4C084/ZB091 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZB331 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB36 4C085/BB42 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	富田健二 山中真一郎		
优先权	62/096267 2014-12-23 US		
其他公开文献	JP6633032B2 JP2018035138A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

结合人TIGIT ( 具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体 ) 的抗体或其抗原结合片段，以及这些抗体或片段的抗体或片段在治疗应用中，例如用于治疗癌症或慢性病毒感染提供使用。 解决方案：分离的抗体或其抗原结合片段，其与选自特定组的一种或多种抗体竞争结合人TIGIT。治疗方法包括与其他免疫调节受体相互作用的抑制剂的组合疗法，例如PD-1 / PD-L1相互作用。此外，编码抗体的重链和/或轻链可变区的多核苷酸，包含编码抗体的重链和/或轻链可变区的多核苷酸的表达载体，抗体或片段从而产生它。 【选择图】无

(19) 日本国特許庁 (JP)		(12) 公開特許公報 (A)		(11) 特許出願公開番号	
				特開2018-35138	
				(P2018-35138A)	
				平成30年3月8日 (2018.3.8)	
				(43) 公開日	
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C O 7 K 16/28 (2006.01)		C O 7 K 16/28		Z N A 4 B O 6 4	
C 1 2 N 15/00 (2006.01)		C 1 2 N 15/00		A 4 B O 6 5	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		C 1 2 N 1/15		4 C O 8 4	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/19		4 C O 8 5	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21		4 H O 4 5	
		審査請求 未請求		請求項の数 38 O L (全 98 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号		特願2017-138861 (P2017-138861)		(71) 出願人	
(22) 出願日		平成29年7月18日 (2017.7.18)		391015708	
(62) 分割の表示		特願2016-564332 (P2016-564332) の分割		ブリストル・マイヤーズ スクイブ カンパニー	
原出願日		平成27年12月22日 (2015.12.22)		BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY	
(31) 優先権主張番号		62/096,267		アメリカ合衆国08543ニュージャージー	
(32) 優先日		平成26年12月23日 (2014.12.23)		州 プリンストン、ルート206アンド・プロビンス・ライン・ロード	
(33) 優先権主張国		米国 (US)		(74) 代理人	
				100100158	
				弁理士 坂島 睦	
				(74) 代理人	
				100122301	
				弁理士 斎田 憲史	
				(74) 代理人	
				100156111	
				弁理士 山中 伸一郎	
				最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 T I G I T に対する抗体					