

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7317272号  
(P7317272)

(45)発行日 令和5年7月31日(2023.7.31)

(24)登録日 令和5年7月21日(2023.7.21)

|                         |               |       |
|-------------------------|---------------|-------|
| (51)国際特許分類              | F I           |       |
| C 0 7 K 16/28 (2006.01) | C 0 7 K 16/28 |       |
| C 1 2 N 15/13 (2006.01) | C 1 2 N 15/13 | Z N A |
| C 1 2 N 15/63 (2006.01) | C 1 2 N 15/63 | Z     |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01)  | C 1 2 N 1/15  |       |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01)  | C 1 2 N 1/19  |       |
| 請求項の数 21 (全48頁) 最終頁に続く  |               |       |

|                   |                             |          |                                   |
|-------------------|-----------------------------|----------|-----------------------------------|
| (21)出願番号          | 特願2020-517291(P2020-517291) | (73)特許権者 | 510166892                         |
| (86)(22)出願日       | 平成30年9月28日(2018.9.28)       |          | ジェンス ヘンルイ メディシンカンパニ               |
| (65)公表番号          | 特表2020-537509(P2020-537509  |          | ー リミテッド                           |
|                   | A)                          |          | J I A N G S U H E N G R U I M E D |
| (43)公表日           | 令和2年12月24日(2020.12.24)      |          | I C I N E C O . , L T D .         |
| (86)国際出願番号        | PCT/CN2018/108246           |          | 中華人民共和国 ジェンス 2 2 2 0 0 2          |
| (87)国際公開番号        | WO2019/062832               |          | リエンユンガン エコノミック・アンド                |
| (87)国際公開日         | 平成31年4月4日(2019.4.4)         |          | ・テクノロジー・ディベロップメント                 |
| 審査請求日             | 令和3年9月6日(2021.9.6)          |          | ・ゾーン クンルンジャン ロード ナン               |
| (31)優先権主張番号       | 201710908565.3              |          | パー7                               |
| (32)優先日           | 平成29年9月29日(2017.9.29)       | (73)特許権者 | 508209602                         |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 中国(CN)                      |          | シャンハイ ヘンルイ ファーマスーティ               |
|                   |                             |          | カル カンパニー リミテッド                    |
|                   |                             |          | S H A N G H A I H E N G R U I P H |
|                   |                             |          | A R M A C E U T I C A L C O . , L |
|                   |                             |          | 最終頁に続く                            |

(54)【発明の名称】 T I G I T抗体、その抗原結合断片及びその医療用途 本願は、2019年9月29日に  
出願された出願番号CN201710908565.3に基づいたものであり、その優先

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、該モノクローナル抗体または抗原結合断片は、ヒトTIGITに特異的に結合し、該モノクローナル抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、ここで、

(i)該重鎖可変領域は、配列番号15、16及び17のアミノ酸配列に示されるHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、及び該軽鎖可変領域は、配列番号18、19及び20のアミノ酸配列に示されるLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む；または、

(ii)該重鎖可変領域は、配列番号21、22及び23のアミノ酸配列で示されるHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、及び該軽鎖可変領域は、配列番号24、25及び26のアミノ酸配列に示されるLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む；または、

(iii)該重鎖可変領域は、配列番号27、28及び29のアミノ酸配列に示されるHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、及び該軽鎖可変領域は、配列番号30、31及び32のアミノ酸配列に示されるLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む；または、

(iv)該重鎖可変領域は、配列番号33、34及び35のアミノ酸配列に示されるHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、及び該軽鎖可変領域は、配列番号36、37及び38のアミノ酸配列に示されるLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む；または、

(v)該重鎖可変領域は、配列番号39、40及び41のアミノ酸配列に示されるHCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、及び該軽鎖可変領域は、配列番号42、43及び44のアミノ酸配列に示されるLCDR1、LCDR2及びLCDR3を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合

断片。

【請求項 2】

該モノクローナル抗体が、組換え抗体である、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

該モノクローナル抗体が、マウス抗体、キメラ抗体及びヒト化抗体からなる群から選択される組換え抗体である、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

ヒト化抗体の軽鎖及び重鎖可変領域上の軽鎖及び重鎖FR領域配列は、それぞれ、ヒト生殖系列の軽鎖及び重鎖に由来する、請求項 3 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 5】

該ヒト化抗体は、

xvi) 配列番号 45 または 50 の重鎖可変領域及び配列番号 46、47、48 及び 49 のいずれか 1 つの軽鎖可変領域；

xvii) 配列番号 51、54 及び 55 のいずれか 1 つの重鎖可変領域及び配列番号 52 または 53 の軽鎖可変領域；

xviii) 配列番号 56、61、62 及び 63 のいずれか 1 つの重鎖可変領域及び配列番号 57、58、59 及び 60 のいずれか 1 つの軽鎖可変領域；

xix) 配列番号 64、67、68、69 及び 70 のいずれか 1 つの重鎖可変領域及び配列番号 65 または 66 の軽鎖可変領域；または、

20

xx) 配列番号 71、75、76 及び 77 のいずれか 1 つの重鎖可変領域及び配列番号 72、73 及び 74 のいずれか 1 つの軽鎖可変領域

からなる群から選択されるいずれか 1 つを含む、請求項 4 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

該抗体は全長抗体であり、ヒト抗体定常領域をさらに含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

該抗体は全長抗体であり、配列番号 78 に示されるヒト抗体重鎖定常領域及び配列番号 79 に示されるヒト軽鎖定常領域を含む、請求項 6 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 8】

該抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、単鎖抗体 (scFv)、二量体化 V 領域 (二重特異性抗体)、ジスルフィド安定化 V 領域 (dsFv) 及び CDR を含むペプチドからなる群から選択される、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

治療有効量の、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、1 つまたは複数の薬学的に許容される担体、希釈剤、緩衝液または賦形剤とを含む、医薬組成物。

40

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の核酸分子を含む、組換えベクター。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の組換えベクターで形質転換された宿主細胞であって、該宿主細胞が原核細胞及び真核細胞からなる群から選択される、宿主細胞。

【請求項 13】

該宿主細胞が真核細胞である、請求項 12 に記載の宿主細胞。

50

## 【請求項 14】

該宿主細胞が哺乳動物細胞である、請求項 12 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 15】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を産生するための方法であって、請求項 12 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞を培養し、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を形成及び蓄積し、そして培養物から該モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を回収することを含む、方法。

## 【請求項 16】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用するステップを含む、ヒトTIGITを検出または測定するための方法。 10

## 【請求項 17】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む、ヒトTIGITを検出または測定するための薬剤。

## 【請求項 18】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、請求項 9 に記載の医薬組成物、または請求項 10 に記載の単離された核酸分子の、ヒトTIGIT関連疾患を治療するための薬剤の調製における使用。

## 【請求項 19】

該疾患がT細胞機能不全疾患である、請求項 18 の記載の使用。 20

## 【請求項 20】

該疾患が腫瘍、癌、免疫疾患または感染症である、請求項 18 の記載の使用。

## 【請求項 21】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または請求項 9 に記載の医薬組成物、または請求項 10 に記載の単離された核酸分子の、CD155陽性、PVR陽性の腫瘍、癌または感染症を治療するための薬剤の調製における使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【本発明の分野】

## 【0001】

本開示は、TIGIT抗体及びその抗原結合断片に関する。さらに本開示は、TIGIT抗体のCDR領域を含むキメラ抗体及びヒト化抗体にも関し、TIGIT抗体及びその抗原結合断片を含む医薬組成物、ならびにTIGIT関連疾患の診断及び治療薬としてのそれらの使用に関する。 30

## 【本発明の背景】

## 【0002】

近年、免疫細胞共抑制受容体に対する免疫チェックポイント療法は腫瘍免疫療法において大きな進歩を遂げ、新しい共抑制受容体を発見及び検証することは世界的な競争のホットスポットとなっている。T細胞は免疫応答の主要なメディエーターであり、T細胞の活性化はTCRシグナル伝達と共刺激シグナルに依存している。共刺激シグナルはT細胞活性化のためのシグナルを制限し、その機能不全は自己免疫疾患の発症に関与している (Immunol Rev、2012、248:122-139; Autoimmun Rev、2013、12:1171-1176)。TIGIT (T細胞免疫グロブリンとITIMドメイン) は、NK細胞とT細胞の表面にある新たに発見された共抑制シグナル分子であり、T細胞、NK細胞及び樹状細胞 (DC) の調節と密接に関連している。 40

## 【0003】

TIGIT遺伝子はヒト染色体16にあり、244アミノ酸からなるI型膜貫通タンパク質をコードしている。ヒトTIGIT分子の細胞外ドメインの長さは141アミノ酸で、免疫グロブリンV様ドメインがある。膜貫通領域は23アミノ酸を持っている。細胞質領域はより短く、80アミノ酸からなり、PDZ結合ドメインとITIMモチーフがある。TIGIT分子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、その構造は比較的保守的であり、その相同的な分子は様々な哺乳類に見られる。ヒトTIGIT分子は、サル、イヌ及びマウスTIGI 50

T分子に対してそれぞれ88%、67%及び58%の相同性を持っている (Nat Immunol、2009、10(1):48-57)。

【0004】

TIGIT分子は主にT細胞とNK細胞の表面に発現している (Nat Immunol、2009、10:48-57)。TIGITはナイーブT細胞と休止記憶T細胞の両方で発現が低く、in vitro活性化後に増加される (J Immunol、2012、188:3869-3875)。TIGITは、NK細胞の表面でより高いレベルで発現される (Proc Natl Acad Sci USA、2009、106(42):17858-17863)。TIGITは免疫療法の潜在的な新しいターゲットである。既存の研究では、TIGITを特異的に遮断するモノクローナル抗体が動物モデルでは有意な抗腫瘍効果を示すことが示されている (Martinet and Smyth 2015)。TIGIT抗体とPD-1抗体の組み合わせは、HIV及び黒色腫に対するCD8 T細胞の殺傷機能を促進することができ、CD226を遮断することでそのような効果はない (Chew、Fujitaら、2016)。現在、国内外でTIGITを阻害するモノクローナル抗体の製剤はないため、特異性の高いTIGITモノクローナル抗体の開発が必要である。

10

【0005】

現在、TIGIT抗体及びその関連出願は、WO2009126688、WO2014089113、WO2015009856、WO2015143343、WO2015174439、WO2017053748、WO2017030823、WO2016106302、US20160176963、US20130251720などの特許出願で報告されている。しかし、これまで臨床に適用できるTIGIT抗体はなく、臨床応用により適した新しいTIGIT抗体を開発する必要が依然としてある。

20

【本発明の概要】

【0006】

本開示は、TIGITの細胞外領域のアミノ酸配列または三次元構造に特異的に結合するモノクローナル抗体または抗原結合断片 (TIGIT結合分子とも呼ばれる) を提供する。

【0007】

一態様では、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が提供され、該モノクローナル抗体または抗原結合断片が、ヒトTIGITに特異的に結合し、該モノクローナル抗体が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、ここで、

(i) 該重鎖可変領域は、配列番号15、16及び17のアミノ酸配列に示されるようなLCDR1、LCDR2及びLCDR3、またはそれぞれ配列番号15、16及び17に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の差があるHCDR変異体を含み、該軽鎖可変領域は、配列番号18、19及び20のアミノ酸配列に示されるようなLCDR1、LCDR2及びLCDR3、またはそれぞれ配列番号18、19及び20に示されるようなLCDR1、LCDR2及びLCDR3と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の差があるLCDR変異体を含む；または、

30

(ii) 該重鎖可変領域は、配列番号21～23のアミノ酸配列で示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3、またはそれぞれ配列番号21～23に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の差があるHCDR変異体を含み、該軽鎖可変領域は、配列番号24～26のアミノ酸配列に示されるようなLCDR1、LCDR2及びLCDR3、またはそれぞれ配列番号24～26に示されるようなLCDR1、LCDR2及びLCDR3と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の差があるLCDR変異体を含む；または、

40

(iii) 該重鎖可変領域は、配列番号27～29のアミノ酸配列に示されるようなLCDR1、LCDR2及びLCDR3、またはそれぞれ配列番号27～29に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の差があるHCDR変異体を含み、該軽鎖可変領域は、配列番号30～32のアミノ酸配列に示されるようなLCDR1、LCDR2及びLCDR3、またはそれぞれ配列番号30～32に示されるようなLCDR1、LCDR2及びLCDR3と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の差があるLCDR変異体を含む；または、

(iv) 該重鎖可変領域は、配列番号33～35のアミノ酸配列に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3、またはそれぞれ配列番号33～35に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の差があるHCDR変異体を含み、該軽鎖可変領

50

域は、配列番号36～38のアミノ酸配列に示されるようなLCDR1、LCDR2及びLCDR3、またはそれぞれ配列番号36～38に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の差があるLCDR変異体を含む；または、

(v)該重鎖可変領域は、配列番号39～41のアミノ酸配列に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3、またはそれぞれ配列番号39～41に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の差があるHCDR変異体を含み、該軽鎖可変領域は、配列番号42～44のアミノ酸配列に示されるようなLCDR1、LCDR2及びLCDR3、またはそれぞれ配列番号42～44に示されるようなLCDR1、LCDR2及びLCDR3と3つ、2つ、または1つのアミノ酸の差があるLCDR変異体を含む。

【0008】

いくつかの実施形態では、3つ、2つまたは1つのアミノ酸の差を有するモノクローナル抗体または抗原結合断片CDR（3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含む）の変異体は、親和性成熟法によって得られる。

【0009】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体または抗原結合断片は、 $10^{-8}$  M未満、 $10^{-9}$  M未満、 $10^{-10}$  M未満、または $10^{-11}$  M未満の親和性（KD）でTIGITに結合する。

【0010】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体または抗原結合断片は、ヒトTIGITに特異的に結合し、該モノクローナル抗体が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、ここで、  
 (vi)該重鎖可変領域は、配列番号15～17に示されたようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3領域を含み、該軽鎖可変領域は、配列番号18～20に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3領域を含む；または

(vii)該重鎖可変領域は、配列番号21～23に示されたようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3領域を含み、該軽鎖可変領域は、配列番号24～26に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3領域を含む；または

(viii)該重鎖可変領域は、配列番号27～29に示されたようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3領域を含み、該軽鎖可変領域は、配列番号30～32に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3領域を含む；または

(ix)該重鎖可変領域は、配列番号33～35に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3領域を含み、該軽鎖可変領域は、配列番号36～38に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3領域を含む；または

(x)該重鎖可変領域は、配列番号39～41に示されるようなHCDR1、HCDR2及びHCDR3領域を含み、該軽鎖可変領域は、配列番号42～44に示されるようなLCDR1、LCDR2及びLCDR3領域を含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、該モノクローナル抗体は組換え抗体であり、好ましくは、マウス抗体、キメラ抗体及びヒト化抗体からなる群から選択される組換え抗体である。

【0012】

いくつかの実施形態では、該ヒト化抗体の軽鎖及び重鎖可変領域上の軽鎖及び重鎖FR領域配列は、それぞれ、ヒト生殖系列の軽鎖及び重鎖またはそれらの変異配列に由来する。

【0013】

いくつかの実施形態では、該ヒト化抗体は、ヒト化抗体は、配列番号45、51、56、64または71に示されるような重鎖可変領域、またはそれらの変異体を含み、該変異体が、配列番号45、51、56、64または71に示されるような重鎖可変領域に1～10のアミノ酸変異を有する、

【0014】

いくつかの実施形態では、該変異体は、配列番号45、51、56、64または71に示されるような重鎖可変領域のFR領域に1～10のアミノ酸逆突然変異を有する。好ましくは、該逆突然変異が以下からなる群から選択される：

配列番号45に示されるような重鎖可変領域上のN84S、S85R及びそれらの任意の組み合わせ

10

20

30

40

50

せ；または、

配列番号51に示されるような重鎖可変領域上のM48I、R72V、V79A及びそれらの任意の組み合わせ；または、

配列番号56に示されるような重鎖可変領域上のY27F、M48I、R72V、V79A、S84N及びそれらの任意の組み合わせ；または、

配列番号64に示されるような重鎖可変領域上のR38K、R67K、R72V、T74K、M48I、V68A、M70L、V79A及びそれらの任意の組み合わせ；または、

配列番号71に示されるような重鎖可変領域上のG27Y、M48I、L83F、A97T及びそれらの任意の組み合わせ。

【0015】

いくつかの実施形態では、該ヒト化抗体は、以下からなる群から選択される重鎖可変領域を含む：

(vi) 配列番号45または50に示されるような重鎖可変領域；

(vii) 配列番号51及び54から55のいずれか1つに示されるような重鎖可変領域；

(viii) 配列番号56、61、62及び63のいずれか1つに示されるような重鎖可変領域；

(ix) 配列番号64、67、68、69及び70のいずれか1つに示されるような重鎖可変領域；そして

(x) 配列番号71、75、76及び77のいずれか1つに示されるような重鎖可変領域。

【0016】

いくつかの実施形態では、該ヒト化抗体は、配列番号46、52、57、65または72に示されるような軽鎖可変領域、またはその変異体を含む。該逆突然変異が、配列番号46、52、57、65または72に示されるような軽鎖可変領域に1～10のアミノ酸変化を含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、該変異体は、配列番号46、52、57、65または72に示されるような軽鎖可変領域のFR領域に1～10のアミノ酸逆突然変異を有する。好ましくは、該逆突然変異が、以下からなる群から選択される：

配列番号46の軽鎖可変領域上のS60D、T85D、A43S、S63T及びそれらの任意の組み合わせのアミノ酸逆突然変異；または、

配列番号52の軽鎖可変領域上のA43Sのアミノ酸逆突然変異；または、

配列番号57の軽鎖可変領域上のQ3V、A43S、S60D、Y87F及びそれらの任意の組み合わせのアミノ酸逆突然変異；または、

配列番号65の軽鎖可変領域上のA43S、I48V及びそれらの任意の組み合わせのアミノ酸逆突然変異；または、

配列番号72の軽鎖可変領域上のN22S、P49S及びそれらの任意の組み合わせのアミノ酸逆突然変異。

【0018】

いくつかの実施形態では、該ヒト化抗体は、以下からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む：

xi) 配列番号46、47、48及び49のいずれか1つに示されるような軽鎖可変領域；または

xii) 配列番号52または53に示されるような軽鎖可変領域；

xiii) 配列番号57、58、59及び60のいずれか1つに示されるような軽鎖可変領域；

xiv) 配列番号65または66に示されるような軽鎖可変領域；そして

xv) 配列番号72、73及び74のいずれか1つに示されるような軽鎖可変領域。

【0019】

いくつかの実施形態では、該ヒト化抗体は、以下からなる群から選択されるいずれか1つを含む：

xvi) 配列番号45または50の重鎖可変領域及び配列番号46、47、48及び49のいずれか1つの軽鎖可変領域；

xvii) 配列番号51、54及び55のいずれか1つの重鎖可変領域及び配列番号52または53の軽鎖可変領域；

10

20

30

40

50

xviii) 配列番号56、61、62及び63のいずれか1つの重鎖可変領域及び配列番号57、58、59及び60のいずれか1つの軽鎖可変領域;

xix) 配列番号64、67、68、69及び70のいずれか1つの重鎖可変領域及び配列番号65または66の軽鎖可変領域;または、

xx) 配列番号71、75、76及び77のいずれか1つの重鎖可変領域及び配列番号72、73及び74のいずれか1つの軽鎖可変領域。

【0020】

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片のいくつかの実施形態では、該抗体は完全長抗体であり、ヒト抗体定常領域をさらに含む。該重鎖定常領域は、好ましくはヒトIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4抗体定常領域である。より好ましくは、該全長抗体は、配列番号78に示されるようなヒト抗体重鎖定常領域及び配列番号79に示されるようなヒト軽鎖定常領域を含む。

10

【0021】

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片のいくつかの実施形態では、該抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、単鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(二重特異性抗体)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)及びCDRを含むペプチドからなる群から選択される。

【0022】

いくつかの実施形態では、該モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、ヒトTIGITへの結合について上記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片と競合する。

【0023】

別の態様では、本開示は、治療有効量の上記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、1つまたは複数の薬学的に許容される担体、希釈剤、緩衝液または賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。該医薬組成物の投与単位に含まれる該モノクローナル抗体またはその抗原結合断片の量は、好ましくは0.1~2000 mg、より好ましくは0.1~1000 mgである。

20

【0024】

別の態様では、本開示は、上記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子を提供する。

【0025】

別の態様では、本開示は、上記核酸分子を含む組換えベクターを提供する。

30

【0026】

別の態様では、本開示は、上記組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。該宿主細胞が、原核細胞及び真核細胞からなる群から選択され、好ましくは真核細胞であり、より好ましくは哺乳動物細胞である。

【0027】

別の態様では、本開示は、上記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を産生するための方法を提供する。該方法が、上記宿主細胞を培養液に培養し、上記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を形成及び蓄積し、そして該培養液から該モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を回収することを含む。

【0028】

別の態様では、本開示は、ヒトTIGITを検出または測定するための方法を提供する。該方法が、上記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用するステップを含む。

40

【0029】

別の態様では、本開示は、ヒトTIGITを検出または測定するための薬剤を提供する。該薬剤が、上記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0030】

別の態様では、本開示は、ヒトTIGIT関連疾患を治療するための薬剤を提供する。該薬剤が、上記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含むか、上記医薬組成物を含むか、または上記核酸分子を含む。該疾患が、好ましくはT細胞機能障害である。該T細胞機能障害が、T細胞枯渇を特徴とし、そのような障害はNK細胞の増強及びT細胞の活性化に

50

より治療または遅延または緩和され、それにより生物の免疫活性が増強される。より好ましくは、該疾患は、腫瘍、癌、免疫疾患または感染症である。これらのうち、癌は、好ましくは、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、中皮腫、黒色腫、頭頸部癌、甲状腺癌、肉腫、前立腺癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、リンパ腫、骨髄腫、菌状息肉腫、メルケル細胞癌、副腎皮質癌、肝臓肝細胞癌、膵管腺癌、褐色細胞腫及び神経節神経腫、子宮内膜がん、卵巣漿液性嚢胞腺がんからなる群から選択される。これらのうち、骨髄腫は、好ましくは、多発性骨髄腫（MM）である。該免疫疾患は、好ましくは、関節炎、炎症性腸疾患、乾癬からなる群から選択される。該感染症は、好ましくは、慢性ウイルス感染症である。別の態様では、ヒトTIGIT関連疾患、好ましくはT細胞機能障害、より好ましくは腫瘍、癌または感染状態、最も好ましくはCD155陽性またはPVR陽性の腫瘍、癌、または免疫疾患または感染状態を治療するために、本開示は、ヒトTIGIT関連疾患を治療する方法を提供する。該方法が、薬学的有効量の上記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片、またはそれを含む医薬組成物、または上記核酸分子を被験者に投与することを含む。

10

#### 【0031】

別の態様では、本開示は、ヒトTIGIT関連疾患を治療するための薬剤の調製のための、上記モノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片、またはそれを含む医薬組成物、または上記核酸分子の使用を提供する。該疾患は、好ましくは、T細胞機能障害であり、より好ましくは、腫瘍、癌または感染症であり、最も好ましくは、CD155陽性またはPVR陽性の腫瘍、癌、免疫疾患または感染状態である。

20

#### 【0032】

別の態様では、本開示は、疾患を治療する方法を提供する。該方法が、上記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片の薬学的有効量、またはそれを含む医薬組成物、または上記単離された核酸分子を被験者に投与することを含む。該疾患が、好ましくはT細胞機能不全疾患であり、より好ましくは腫瘍、癌または感染症であり、最も好ましくはCD155陽性またはPVR陽性の腫瘍、癌または感染症である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0033】

【図1】ELISAアッセイによるTIGIT抗体のヒトTIGITタンパク質への結合の検出

【図2】ELISAアッセイによるTIGIT抗体のサルTIGITタンパク質への結合の検出

30

【図3】TIGIT抗体のヒトTIGITを過剰発現するCHO細胞への結合の検出

【図4】TIGIT抗体のヒトPBMCへの結合親和性の検出

【図5A】ch1708及びそのヒト化抗体のCD155へのヒトTIGITの結合の遮断に対する効果の検出

【図5B】ヒトTIGIT抗体のCD155への結合を遮断する効果の検出

【図6】TIGIT抗原がCD155を過剰発現するCHO細胞への結合を遮断するTIGIT抗体の効果の検出

【図7】CD155がTIGITを過剰発現するCHO細胞への結合を遮断するTIGIT抗体の効果の検出

【図8】TIGIT抗原がCD112を過剰発現するCHO細胞への結合を遮断するTIGIT抗体の効果の検出

40

【図9】TIGITを過剰発現するCHO細胞へのTIGIT抗体の内部移行（内部移行は1時間テストされた）

【図10A】TIGIT抗体がナチュラルキラー細胞（NK）の殺傷効果を促進することを示すアッセイ

【図10B】TIGIT抗体がナチュラルキラー細胞（NK）の殺傷効果を促進することを示すアッセイ

【図11】TIGIT抗体がPBMC-Tリンパ球を活性化することを示すアッセイ

【図12】ラットにおけるヒト化TIGIT抗体のIn vivo薬物動態アッセイ

【本発明の詳細な説明】

50

## 【 0 0 3 4 】

## 1. 用語

本開示をより容易に理解するために、特定の技術用語及び科学用語が以下で具体的に定義される。本明細書で明示的に定義されていない限り、本明細書で使用される他の全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。

## 【 0 0 3 5 】

本開示で使用されるアミノ酸の3文字コード及び1文字コードは、J. biol. chem, 243, p3558 (1968) に記載されているとおりである。

## 【 0 0 3 6 】

本明細書で使用する場合、「抗体」とは、2つの同一の重鎖と2つの同一の軽鎖の間のジスルフィド結合によって一緒に接続された4-ペプチド鎖構造である免疫グロブリンを指す。異なる免疫グロブリン重鎖定常領域は、異なるアミノ酸組成と順位を示すため、異なる抗原性を示す。従って、免疫グロブリンは、重鎖 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、及び $\epsilon$ をそれぞれ有する、5つのタイプ、または免疫グロブリンアイソタイプ、即ちIgM、IgD、IgG、IgA、及びIgEに分類することができる。ヒンジ領域のアミノ酸組成と重鎖ジスルフィド結合の数と位置に応じて、同じタイプのIgはさらに異なるサブタイプに分類できる。例えば、IgGはIgG1、IgG2、IgG3、IgG4に分類できる。軽鎖は、異なる定常領域に基づいて または鎖に分けることができる。5種類のIgのそれぞれに、 または鎖がある。

## 【 0 0 3 7 】

本開示では、本明細書で言及される抗体軽鎖は、さらにヒトまたはマウスの、鎖またはその変異体を含む軽鎖定常領域を含む。

## 【 0 0 3 8 】

本開示では、本明細書で言及される抗体重鎖は、さらにヒトまたはマウスIgG1、IgG 2、IgG 3、IgG 4またはそれらの変異体を含む重鎖定常領域を含む。

## 【 0 0 3 9 】

抗体の重鎖と軽鎖のN末端に隣接する約110のアミノ酸配列は、可変領域(Fv領域)として知られ、非常に可変的である。C末端に近い残りのアミノ酸配列は、定常領域として知られ、比較的安定である。可変領域には、3つの超可変領域(HVR)と4つの比較的保守的なフレームワーク領域(FR)が含まれる。抗体の特異性を決定する3つの超可変領域は、相補性決定領域(CDR)とも呼ばれる。各軽鎖可変領域(LCVR)と各重鎖可変領域(HCVR)は、3つのCDR領域と4つのFR領域で構成され、アミノ末端からカルボキシル末端への順序は、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4である。軽鎖の3つのCDR領域はLCDR1、LCDR2及びLCDR3を指し、重鎖の3つのCDR領域はHCDR1、HCDR2及びHCDR3を指す。本明細書の抗体または抗原結合断片のLCVR及びHCVR領域におけるCDRアミノ酸残基の数及び位置は、既知のKabat付番基準(LCDR1-3、HCDR1-3)に準拠する。

## 【 0 0 4 0 】

本開示の抗体には、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、好ましくはヒト化抗体が含まれる。

## 【 0 0 4 1 】

本開示における「マウス抗体」という用語は、当分野の知識及び技術に従って調製された抗ヒトTIGITモノクローナル抗体を指す。調製中、被験者にTIGIT抗原を注射し、その後、所望の配列または機能的特徴を有する抗体を発現する融合細胞を単離する。本開示の好ましい実施形態では、マウスTIGIT抗体またはその抗原結合断片は、マウス、鎖またはその変異体の軽鎖定常領域をさらに含むか、またはマウスIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、またはその変異体の重鎖定常領域をさらに含む。

## 【 0 0 4 2 】

「キメラ抗体」という用語は、マウス抗体の可変領域をヒト抗体の定常領域と融合させることによる抗体であり、マウス抗体誘導性免疫応答を緩和することができる。キメラ抗

10

20

30

40

50

体を確立するために、特定のマウスモノクローナル抗体を分泌する融合細胞を確立することができ、可変領域遺伝子がマウス融合細胞からクローニングされる。次に、ヒト抗体の所望の定常領域遺伝子をクローニングし、マウスの可変領域遺伝子と連結し、続いて発現ベクターに挿入できるキメラ遺伝子を形成することができる。最後に、キメラ抗体分子は真核生物系または原核生物系で発現される。本開示の好ましい実施形態では、TIGITキメラ抗体の軽鎖は、さらにヒト、鎖またはその変異体由来する軽鎖定常領域を含む。TIGITキメラ抗体の重鎖はさらに、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはその変異体由来する重鎖定常領域を含み、好ましくはヒトIgG1、IgG2またはIgG4由来する重鎖定常領域を含み、またはアミノ酸変異（YTE変異または逆突然変異、S228Pなど）を有するIgG1、IgG2、IgG4の変異体を含む。

10

## 【0043】

CDR移植抗体を含む用語「ヒト化抗体」は、マウスCDR配列をヒト抗体可変領域フレームワークに移植することにより生成される抗体、即ち、異なるタイプのヒト生殖系列抗体フレームワーク配列で産生される抗体を指す。そ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または公開された参考文献をカバーする公共のDNAデータベースから得られる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の生殖系列DNA配列は、「VBase」ヒト生殖系列配列データベース ([www.mrccep.ac.uk/vbase](http://www.mrccep.ac.uk/vbase)で利用可能)、ならびにKabat、EAら、1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版に見出すことができる。免疫原性の低下によって引き起こされる活性の低下を回避するために、ヒト抗体の可変領域のフレームワーク配列を最小限の逆変異または復帰変異にかけて、活性を維持することができる。本開示のヒト化抗体はまた、CDR親和性成熟がファージディスプレイによって行われるヒト化抗体を含む。本開示の好ましい実施形態では、ヒト化TIGIT抗体のマウスCDR配列は、配列番号15~44からなる群から選択される。ヒト抗体可変領域フレームワークが設計及び選択される。ここで、重鎖可変領域上のFR領域配列、ヒト生殖系列重鎖配列は、(IGHV3-7\*01及びhjh2)、(IGHV1-46\*01及びhjh4.1)、(IGHV1-69\*02及びhjh4.1)の組み合わせからなる群から選択され、ヒト生殖細胞系軽鎖配列は、(IGKV1-39\*02及びhjk2.1)、(IGKV1-39\*01及びhjk4.1)及び(IGKV4-1\*01及びhjk4.1)の組み合わせからなる群から選択される。免疫原性の低下によって引き起こされる活性の低下を回避するために、ヒト抗体可変領域を最小限の逆変異（逆突然変異、即ち、ヒト抗体由来するFR領域のアミノ酸残基は、元の抗体に対応するアミノ酸残基で置き換えられる）に供し、活性を維持することができる。

20

30

## 【0044】

CDRのグラフトは、結果として生じるTIGIT抗体またはその抗原結合断片の、抗原と接触するフレームワーク残基のために、抗原に対する親和性の低下をもたらし得る。このような相互作用は、高度な体細胞変異の結果である可能性がある。従って、ドナーフレームワークのアミノ酸をヒト化抗体フレームワークに移入する必要があるかもしれない。抗原結合に関与する非ヒトTIGIT抗体またはその抗原結合断片由来するアミノ酸残基は、マウスモノクローナル抗体可変領域の配列及び構造をチェックすることにより同定することができる。生殖系列のアミノ酸残基とは異なるドナーCDRフレームワークのアミノ酸残基は、関連していると見なすことができる。最も密接に関連する生殖系列を決定することができない場合、その配列は、サブタイプ間で共有される共通の配列または高い類似率を有するマウス配列の共通の配列と比較することができる。まれなフレームワーク残基は、結合に重要な役割を果たす体細胞中の高度な突然変異の結果であると考えられている。

40

## 【0045】

「3つ、2つ、または1つのアミノ酸の差を有する変異体」などの表現において、該「アミノ酸の差」は、変異体タンパク質またはポリペプチドにおけるアミノ酸変化または変異の存在を指し、元のタンパク質またはポリペプチドと比較した場合、元のタンパク質またはポリペプチドで発生した1つまたは複数のアミノ酸の挿入、削除、または置換を含む。

## 【0046】

本明細書で使用される場合、「抗原結合断片」または「機能的断片」は、抗原（例えば

50

、TIGIT)への結合能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。完全長抗体の断片を用いて抗原との結合機能を達成できることが示されている。「抗原結合断片」という用語の結合断片の例として以下が含まれる：(i) Fab断片、VL、VH、CL及びCH1ドメインで構成される一価の断片、(ii) F(ab')<sub>2</sub>断片、ヒンジ領域のジスルフィド結合によって連結された2つのFab断片を含む2価の断片、(iii) VHドメインとCH1ドメインで構成されるFd断片、(iv) 片腕抗体のVH及びVLドメインからなるFv断片、(v) VHドメインで構成される単ドメインまたはdAb断片(Wardら、(1989) Nature341:544-546)、(vi) 個別の相補性決定領域(CDR)、(vii) 合成リンカーによって任意にリンクされた2つ以上の個別のCDRの組み合わせ。さらに、Fv断片のVLドメインとVHドメインは2つの別々の遺伝子によってコードされているが、組換え法を用いて合成リンカーでリンクすることができ、これにより、VLドメインとVHドメインをペアにして形成された一価分子の単一のタンパク質鎖を生成する(単鎖Fv(scFv)と呼ばれ、Birdら、(1988) Science: 242 423-426; Hustonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA85:5879-5883を参照)。該単鎖抗体はまた、抗体の「抗原結合断片」という用語に含まれることが意図されている。このような抗体断片は、当該分野で公知の従来技術を用いて得られ、無傷の抗体と同じ方法を用いて機能的断片についてスクリーニングされる。抗原結合部分は、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または化学的破壊によって生成することができる。抗体は、異なるアイソタイプ、例えば、IgG(例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4サブタイプ)、IgA1、IgA2、IgD、IgEまたはIgM抗体の形態であり得る。

【0047】

本開示における抗原結合断片は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、単鎖抗体(scFv)、二量体化V領域(二重特異性抗体)、ジスルフィド安定化V領域(dsFv)及びCDR含有ペプチドを含む。

【0048】

Fabは、IgG抗体分子をパイン(H鎖の224位のアミノ酸残基を切断する)で処理することにより得られる抗体断片である。Fab断片は、分子量が約50,000であり、抗原結合活性を有し、H鎖のN末端側の約半分とL鎖全体がジスルフィド結合を介して結合している。

【0049】

本開示のFabは、ヒトTIGITを特異的に認識し、細胞外領域のアミノ酸配列またはその三次元構造に結合する本発明のモノクローナル抗体をパインで処理することにより作製することができる。また、抗体のFabをコードするDNAを原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入し、原核生物または真核生物に導入してFabを発現させることにより、Fabを作製することができる。

【0050】

F(ab')<sub>2</sub>は、約100,000の分子量を有し、抗原結合活性を有し、ヒンジ位置で結合されている2つのFab領域を含む抗体断片であり、IgGのヒンジ領域にある2つのジスルフィド結合の下流部分をペプシンで消化することで得られる。

【0051】

本開示のF(ab')<sub>2</sub>は、ヒトTIGITを特異的に認識し、細胞外領域のアミノ酸配列またはその三次元構造にペプシンで結合する本開示のモノクローナル抗体を処理することによって産生され得る。また、F(ab')<sub>2</sub>は、チオエーテル結合またはジスルフィド結合を介して、下記のFab'を結合することによって製作することができる。

【0052】

Fab'は、約500,000の分子量を有し、抗原結合活性を有する抗体断片であり、上記のF(ab')<sub>2</sub>のヒンジ領域でジスルフィド結合を切断することにより得られる。本開示のFab'は、TIGITを特異的に認識し、細胞外領域のアミノ酸配列またはその三次元構造に結合する本発明のF(ab')<sub>2</sub>を、以下のような還元剤(例えば、ジチオトレイトール)で処理することによって製作することができる。

【0053】

また、該Fab'は、抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物発現ベクターまたは真核

10

20

30

40

50

生物発現ベクターに挿入し、ベクターを原核生物または真核生物に導入してFab'を発現させることによって製作することができる。

【0054】

「単鎖抗体」、「単鎖Fv」または「scFv」という用語は、リンカーによって接続された抗体重鎖可変ドメイン（または領域；VH）及び抗体軽鎖可変ドメイン（または領域；VL）を含む分子を指す。そのようなscFv分子は、NH<sub>2</sub>-VL-リンカー-VH-COOHまたはNH<sub>2</sub>-VH-リンカー-VL-COOHの一般構造を有する。従来技術における適切なリンカーは、例えば、1～4回の反復を有する変異体を用いる、反復GGGGSアミノ酸配列またはその変異体からなる（Holligerら、(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448）。本開示に使用できるその他のリンカーとして、Alfthanら、(1995), Protein Eng. 8:725-731, Choiら、(2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106, Huら、(1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanovら、(1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 及び Rooversら、(2001), Cancer Immunolに記載されたものである。

10

【0055】

本開示のscFvは、以下のステップによって製作できる。ヒトTIGITを特異的に認識し、細胞外領域のアミノ酸配列またはその三次元構造に結合する本開示のモノクローナル抗体のVH及びVLをコードするcDNAを得て、scFvをコードするDNAを構築し、DNAを原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入し、発現ベクターを原核生物または真核生物に導入して該scFvを発現させる。

【0056】

二重特異性抗体は、scFvが二量体化された抗体断片であり、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。該二価の抗原結合活性において、2つの抗原は同じであっても異なってもよい。

20

【0057】

本開示の二重特異性抗体は、以下のステップによって製作できる。ヒトTIGITを特異的に認識し、細胞外領域のアミノ酸配列またはその三次元構造に結合する、本開示のモノクローナル抗体のVH及びVLをコードするcDNAを得て、リンカーペプチドの長さが8以下のアミノ酸残基になるようにscFvをコードするDNAを構築し、DNAを原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入し、次いで発現ベクターを原核生物または真核生物に導入して該二重特異性抗体を発現させる。

30

【0058】

dsFvは、VHとVLのそれぞれの1つのアミノ酸残基をシステイン残基で置換し、2つのシステイン残基間のジスルフィド結合を介して置換ポリペプチドを接続することによって得られる。システイン残基で置換されるアミノ酸残基は、既知の方法に従って抗体の三次元構造予測に基づいて選択することができる（Protein Engineering, 7, 697 (1994)）。

【0059】

本開示のdsFvは、以下のステップによって製作できる。ヒトTIGITを特異的に認識し、細胞外領域のアミノ酸配列またはその三次元構造に結合する本開示のモノクローナル抗体のVH及びVLをコードするcDNAを得て、dsFvをコードするDNAを構築し、DNAを原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入し、発現ベクターを原核生物または真核生物に導入して該dsFvを発現させる。

40

【0060】

CDR含有ペプチドは、VH及びVLのCDRの1つまたは複数の領域によって構築される。いくつかのCDRを含むペプチドは、直接または適切なペプチドリンカーを介して結合することができる。

【0061】

本開示のCDR含有ペプチドは、以下のステップによって製作できる。ヒトTIGITを特異的に認識し、細胞外領域のアミノ酸配列またはその三次元構造に結合する、本開示のモノクローナル抗体のVH及びVLのCDRをコードするDNAを構築し、DNAを原核生物発現ベクターまたは真核生物発現ベクターに挿入し、次いで発現ベクターを原核生物または真核生

50

物に導入してペプチドを発現させる。該CDR含有ペプチドは、Fmoc法やtBoc法などの化学合成法でも製作できる。

【0062】

本明細書で使用される「抗体フレームワーク」という用語は、この可変ドメインの抗原結合ループ(CDR)の足場として機能する、VLまたはVHのいずれかの可変ドメインの一部を指す。本質的には、該CDRのない可変ドメインである。

【0063】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、免疫グロブリンまたは抗体が特異的に結合する抗原上の部位(例えば、TIGIT分子上の特定の部位)を指す。エピトープは、典型的には、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個の連続した、または非連続的なアミノ酸を、独特の三次構造で含む。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, ed. G. E. Morris (1996)を参照。

【0064】

「特異的に結合する」、「選択的に結合する」、「選択的に結合する」または「特異的に結合する」という用語は、抗原上の所定のエピトープへの抗体の結合を指す。典型的には、該抗体は、約 $10^{-7}$  M未満、例えば、約 $10^{-8}$  M未満、 $10^{-9}$  M、または $10^{-10}$  M未満の親和性(KD)で結合する。

【0065】

「KD」または「Kd」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用についての解離平衡定数を指す。典型的には、本開示の抗体は、約 $10^{-7}$  M未満、例えば約 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、または $10^{-10}$  M、またはそれ以下の解離平衡定数(KD)でTIGITに結合する。例えば、BIACORE装置で表面プラズモン共鳴(SPR)技術を用いて測定される。

【0066】

「競合」という用語が、同じエピトープに対して競合する抗原結合タンパク質(例えば、中和抗原結合タンパク質または中和抗体)の文脈で使用される場合、抗原結合タンパク質間で競合が起こることを意味する。これは以下のアッセイによって測定される: 該アッセイにおいて、試験される抗原結合タンパク質(例えば、抗体またはその免疫学的に機能的な断片)は、参照抗原結合タンパク質(例えば、リガンドまたは参照抗体)と一般的な抗原(例えば、TIGIT抗原またはその断片)との特異的結合を防止または阻害(例えば、低減)する。抗原結合タンパク質が他のタンパク質と競合するかどうかを判断するために、数多くの種類の競合結合アッセイが利用できる。例えば、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ら、1983, Methods in Enzymology 9: 242-253)を参照)、固相直接ピオチン-アビジンEIA(Kirklandら、1986, J. Immunol. 137: 3614-3619を参照)、固相直接標識アッセイ、固相直接標識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)、I-125ラベルを用いた固相直接ラベリングRIA(Morelら、1988, Molec. Immunol. 25: 7-15を参照)、固相直接ピオチン-アビジンEIA(Cheungら、1990, Virology 176: 546-552を参照)及び直接ラベリングRIA(Moldenhauerら、1990, Scand. J. Immunol. 32: 77-82を参照)。典型的には、アッセイは、試験される非標識抗原結合タンパク質及び標識参照抗原結合タンパク質の両方に結合することができる精製された抗原(固体表面または細胞表面のいずれか)の使用を含む。競合阻害は、試験される抗原結合タンパク質の存在下で、固体表面または細胞に結合した標識の量を測定することによって測定される。通常、試験される抗原結合タンパク質は過剰に存在する。競合アッセイ(抗原結合タンパク質と競合)によって識別される抗原結合タンパク質には、次のものが含まれる: 参照抗原結合タンパク質と同じエピトープに結合する抗原結合タンパク質;そして、参照抗原結合タンパク質が結合するエピトープに十分に近いエピトープに結合する抗原結合タンパク質。ここで、2つのエピトープは、空間的に互いに干渉して結合を妨害する。競合的結合を測定する方法に関する他の詳細は、本明細書の実施例に提供されている。典型的には、

10

20

30

40

50

競合する抗原結合タンパク質が過剰に存在する場合、それは少なくとも40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%または75%またはそれ以上の参照抗原結合タンパク質と共通抗原との間の特異的結合を阻害する。場合によっては、結合は少なくとも80～85%、85～90%、90～95%、95～97%または97%、またはそれ以上が阻害される。

【0067】

本明細書で使用される「核酸分子」という用語は、DNA分子及びRNA分子を指す。核酸分子は一本鎖または二本鎖であってもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に置かれると「作動可能に連結」される。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、それが配列の転写に影響を与える場合、コード配列に機能的に

10

【0068】

「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。一実施形態では、ベクターは「プラスミド」であり、これは、追加のDNAセグメントが連結され得る環状二本鎖DNAループを指す。別の実施形態では、ベクターはウイルスベクターであり、他のDNAセグメントがウイルスゲノムに連結され得る。本明細書に開示されるベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製することができる（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター）、または、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれてもよく、それにより、宿主ゲノム（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）とともに複製される。

20

【0069】

抗体及び抗原結合断片を生成及び精製するための方法は、当技術分野で周知であり、例えば、抗体、A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第5-8、15章に見出すことができる。例えば、マウスをヒトTIGITまたはその断片で免疫化することができ、次いで、得られた抗体を、当技術分野で周知の従来の方法を使用することにより、再生し、精製し、アミノ酸配列について配列決定することができる。抗原結合断片はまた、従来の方法によって調製され得る。本開示の抗体または抗原結合断片は、非ヒト抗体に由来するCDR上に1つまたは複数のヒトフレームワーク領域を含むように設計されている。ヒトフレームワークの生殖系列配列は、ヒト抗体可変生殖系列遺伝子データベースとMOEソフトウェアを、ImMunoGeneTics (IMGT) のウェブサイト<http://imgt.cines.fr>またはThe Immunoglobulin Facts Book、2001、ISBN 012441351から整列することで取得できる。

30

【0070】

「宿主細胞」という用語は、発現ベクターが導入されている細胞を指す。宿主細胞は、細菌、微生物、植物または動物の細胞を含んでもよい。形質転換されやすい細菌には、腸内細菌科のメンバーが含まれ、例えば、大腸菌やサルモネラ株など; *Bacillus subtilis* のような *Bacillaceae*; 肺炎球菌; 連鎖球菌とインフルエンザ菌。適切な微生物には、*Saccharomyces cerevisiae* 及び *Pichia pastoris* が含まれる。適切な動物宿主細胞株には、CHO（チャイニーズハムスター卵巣細胞株）、HEK細胞（非限定的な例として、HEK293細胞）及びNSO細胞が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0071】

本開示の操作された抗体または抗原結合断片は、公知の方法を用いて調製及び精製され得る。例えば、重鎖及び軽鎖をコードするcDNA配列をクローニングし、GS発現ベクターに操作することができる。次に、組換え免疫グロブリン発現ベクターをCHO細胞に安定的に遺伝子導入することができる。当技術分野で周知のより推奨される方法として、哺乳動物発現系は、典型的にはFc領域の高度に保存されたN末端部位での抗体のグリコシル化をもたらす。安定したクローンは、ヒトTIGITに特異的に結合する抗体の発現を確認できる。陽性クローンは、抗体産生のためにバイオリクター内の無血清培地で拡大できる。抗体が分泌された培養液は、常法により精製することができる。例えば、調整済み緩衝液で平衡化したプロテインAまたはGセファロースFFカラムで精製を行うことができる。カラム

50

を洗浄して非特異的結合成分を除去した後、結合した抗体をpH勾配で溶出し、抗体画分をSDS-PAGEで検出して回収する。抗体は、一般的な技術を用いて濾過及び濃縮することができる。可溶性混合物とポリマーは、サイズ排除やイオン交換などの一般的な手法で除去できる。次に、得られた生成物を直ちに、例えば-70℃で凍結するか、または凍結乾燥してもよい。

#### 【0072】

「投与する」または「治療」は、動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官、または体液に適用される場合、外因性の医薬品、治療剤、診断剤、または組成物を動物、ヒト、被験者、細胞、組織、臓器、または体液と接触させることを指す。「投与する」または「治療」は、例えば、治療法、薬物動態学、診断法、研究法及び実験法を指すことができる。細胞の処理は、試薬を細胞と接触させること、ならびに試薬を流体と接触させることを含み、該流体は細胞と接触している。「投与すること」または「治療」はまた、例えば、細胞、薬剤、診断薬、結合組成物、または別の細胞によるin vitro及びex vivoの治療を意味する。「治療」は、ヒト、獣医、または研究対象に適用される場合、研究及び診断への応用のための治療的処置、予防的または予防的手段を指す。

10

#### 【0073】

「治療する」とは、本開示の結合化合物のいずれかを含む組成物などの治療薬を、その治療薬が既知の治療活性を有する1つまたは複数の疾患症状を有する患者の内部または外部に投与することを意味する。典型的には、薬剤は、臨床的に測定可能な程度でそのような症状の退行を誘導するかまたは進行を阻害することにより、治療される患者または集団における1つ以上の疾患症状を緩和するのに有効な量で投与される。特定の疾患の症状を緩和するのに有効な治療薬の量（「治療的有効量」とも呼ばれる）は、患者の病状、年齢及び体重、ならびに患者において所望の反応を誘発する薬物の能力などの要因によって変動する可能性がある。疾患の症状が緩和されたかどうかは、その症状の重症度または進行状況を評価するために医師または他の熟練した医療提供者が通常使用する臨床測定によって評価できる。本開示の実施形態（例えば、治療方法または製品）は、全ての患者の標的疾患症状を緩和するのに効果的ではないかもしれないが、当該技術分野で既知の任意の統計的試験（例えば、Student's t検定、chi-square検定、Mann及びWhitneyによるU-検定、Kruskal-Wallis検定（H-検定）、Jonckheere-Terpstra-検定及びWilcoxon-検定）により測定されるように、統計的に有意な数の患者における標的疾患症状を軽減するはずである。

20

30

#### 【0074】

「保存的改変」または「保存的置換」とは、タンパク質中のアミノ酸の、類似の特徴（例えば、電荷、側鎖サイズ、疎水性/親水性、骨格構造及び剛性など）を有する他のアミノ酸による置換を指し、タンパク質の生物活性を変えずに、頻繁に変更を加えることができる。当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換は、生物学的活性を実質的に変化させないことを認識する（Watsonら、(1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224、第4版を参照）。さらに、構造的または機能的に類似したアミノ酸による置換は、生物活性を妨害する可能性が低くなる。

40

#### 【0075】

「有効量」は、疾病の症状または徴候を改善または予防するのに十分な量を包含する。有効量はまた、診断を可能にするかまたは容易にするのに十分な量を意味する。特定の患者または獣医学的对象の有効量は、治療される状態、患者の全体的な健康状態、投与経路及び投与量、ならびに副作用の重症度などの要因に応じて変動する可能性がある。有効量は、重大な副作用または毒性作用を回避する最大用量または投薬プロトコルであり得る。

#### 【0076】

「外因性」とは、状況に応じ生物、細胞、または人体の外部で製作される物質を指す。「内因性」とは、状況に応じ細胞、生物、または人体の中で産生される物質を指す。

#### 【0077】

50

「相同性」は、2つのポリヌクレオチド配列間または2つのポリペプチド配列間の配列類似性を指す。比較された2つの配列の両方の位置が同じ塩基またはアミノ酸モノマーサブユニットで占められている場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれの位置がアデニンで占められている場合、分子はその位置で相同である。2つの配列間の相同性の割合は、2つの配列で共有される一致または相同な位置の数を、比較する位置の数で割って100倍した関数である。例えば、2つの配列の10個の位置のうち6個が一致しているか、配列が最適に整列している場合に相同である場合、2つの配列の相同性は60%である。2つの配列の100箇所のうち95箇所が一致または相同である場合、2つの配列の相同性は95%である。一般に、比較は2つの配列を整列させて相同性を最大にするときに実行される。

【0078】

本明細書で使用する場合、「細胞」、「細胞株」及び「細胞培養」という表現は互換的に使用される。そのような名称は全て子孫を含む。従って、「形質転換体」及び「形質転換細胞」という用語は、継代の数に関係なく、一次対象細胞及びそれらに由来する培養物を含む。また、故意または不注意による突然変異のために、全ての子孫がDNAの内容が正確に同一であるとは限らないことも理解されたい。最初に形質転換された細胞でスクリーニングされたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異子孫が含まれる。明確な指定が意図されている場合、文脈から明確に理解される。

【0079】

本明細書で 사용되는場合、「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」は、例えば、米国特許第4,683,195号に記載されるように、核酸、RNA及び/またはDNAの特定部分の微量が増幅される手順または技術を指す。一般に、オリゴヌクレオチドプライマーを設計できるように、関心領域の末端または関心領域を超える配列情報を入手できる必要がある。これらのプライマーは、増幅されるテンプレートの反対側の鎖と配列が同一または類似している。2つのプライマーの5'末端ヌクレオチドは、増幅される材料の末端と一致している。PCRを用いて、特定のRNA配列、全ゲノムDNAからの特定のDNA配列及び全細胞RNA、バクテリオファージまたはプラスミド配列などから転写されたcDNAを増幅できる。Mullisら、(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)を参照。本開示で使用されるPCR試験は、核酸試験サンプルを増幅するためのポリメラーゼ反応法の1つの例であると考えられるが、これだけではない。該方法は、既知の核酸配列をプライマー及び核酸ポリメラーゼとして使用して、核酸の特定の部分を増幅または生成することを含む。

【0080】

「任意の」または「任意に」とは、その後のイベントまたは状況が発生する可能性があることを意味するが、必ずしも発生するわけではない。説明には、イベントまたは状況が発生する場合と発生しない場合が含まれる。例えば、「場合により1~3個の抗体重鎖可変領域を含む」とは、特定の配列を有する抗体重鎖可変領域が存在し得るが、存在する必要はないことを意味する。

【0081】

「医薬組成物」は、本開示による1つ以上の化合物またはその生理学的/薬学的に許容される塩またはプロドラッグ、ならびに生理学的/薬学的に許容される担体及び賦形剤などの他の化学成分を含む混合物を指す。医薬組成物は、生物への投与を促進し、有効成分の吸収を促進し、それにより生物学的効果を発揮することを目的とする。

【0082】

また、本開示は、TIGITに関連する疾患の治療剤を含み、本剤は、本開示のモノクローナル抗体またはその抗体断片を有効成分として含む。

【0083】

TIGITに関連している限り、TIGIT関連疾患には制限はない。例えば、本開示の分子によって誘発される治療反応は、それをヒトTIGITに結合させ、その結果、T細胞機能障害疾患を抑制または阻害することによって産生できる。該T細胞機能障害疾患が、好ましくは悪性腫瘍、癌または感染症、好ましくは免疫療法チェックポイントを標的とした免疫療法

10

20

30

40

50

薬を使用して臨床試験で臨床反応が観察された腫瘍または癌、最も好ましくはCD155陽性の腫瘍、癌、または感染性疾患である。

【0084】

さらに、本開示は、TIGITの免疫検出または免疫測定法、TIGITの免疫検出またはイムノアッセイ用薬剤、TIGITを発現する細胞の免疫検出またはイムノアッセイ、ヒトTIGITを特異的に認識し、細胞外領域のアミノ酸配列またはその立体構造に結合する本開示のモノクローナル抗体または抗体断片を有効成分として含む、TIGIT関連疾患を診断するための診断薬に関する。

【0085】

本開示では、TIGITの量を検出または測定するための方法は、当技術分野で知られている任意の方法であってよい。例えば、それは免疫検出またはイムノアッセイを含む。

10

【0086】

免疫検出またはイムノアッセイは、標識された抗原または抗体を使用することにより、抗体または抗原の量を検出または測定するための方法である。免疫検出またはイムノアッセイの例には、放射性物質標識免疫学的抗体法（RIA）、酵素イムノアッセイ（EIAまたはELISA）、蛍光イムノアッセイ（FIA）、発光イムノアッセイ、Western Blotting、物理化学的アッセイなどが含まれる。

【0087】

TIGITに関連する上記の疾患は、本開示のモノクローナル抗体または抗体断片を用いてTIGITを発現する細胞を検出または測定することにより診断され得る。

20

【0088】

ポリペプチドを発現する細胞を検出するために、既知のイムノアッセイを使用することができ、好ましくは、免疫沈降、蛍光細胞染色、免疫組織化学染色などが使用される。また、FMAT8100HTSシステム（Applied Biosystem）を用いた蛍光抗体染色法なども利用できる。

【0089】

本開示において、TIGITを検出または測定するために使用される生体試料は、TIGITを発現する細胞を含む可能性がある限り、特に限定されない。例えば、組織細胞、血液、血漿、血清、涙液、尿、糞、組織液または培養液を使用することができる。

【0090】

本開示のモノクローナル抗体またはその抗体断片を含む診断薬は、所望の診断方法に応じて、抗原抗体反応を実施するための薬剤または反応を検出するための薬剤をさらに含む得る。抗原抗体反応を行うための薬剤としては、緩衝液、塩などが挙げられる。反応検出剤としては、例えば、モノクローナル抗体を認識する標識二次抗体、その抗体断片またはそれを含むコンジュゲート、標識に対応する基質など、免疫検出法または免疫測定法で通常用いられる薬剤が挙げられる。

30

【0091】

本開示の実施形態で提供されるTIGITモノクローナル抗体または抗原結合断片は、TIGITに対する高い特異性及びTIGITに対する高い親和性を有する。ヒト化抗体は免疫原性を大幅に低下させ、マウス抗体の特異性、高い親和性、優れたin vitro及びin vivo活性は完全に維持される。

40

【0092】

本開示の実施形態で提供されるTIGITモノクローナル抗体または抗原結合断片は、ラットにおいて良好な代謝動態特性を有し、長い半減期を示し、高い生物学的利用能を有する。

【0093】

本開示の実施形態で提供されるTIGITヒト化抗体分子は、良好な長期安定性を有し、明らかな異常な化学修飾はなく、高濃度での明らかな凝集はなく、また、高純度及び熱安定性を有する。

【0094】

本開示の実施形態で提供されるTIGITモノクローナル抗体または抗原結合フラグメント

50

は、NK細胞及びT細胞の活性を増強することに対して良好な効果を有する。

実施例及び試験例

【0095】

以下の実施例は、本開示をさらに説明するために提供されるものであるが、本開示の範囲を限定する意図のものではない。特定の条件が具体的に示されていない実験方法は、通常、従来条件に従って(Molecular Cloning, Laboratory Manual of antibody technology, Cold Spring Harbor Laboratoryを参照。)、または材料または製品の製造元が推奨する条件に従って行われる。出所が明示されていない試薬は市販の試薬である。

実施例1 TIGIT抗原及び抗体の調製

【0096】

1.1タンパク質の設計と発現

本開示のTIGITの鋳型としてヒトTIGITタンパク質(Uniprot No.: Q495A1)を用い、本開示の検出に用いた抗原及びタンパク質のアミノ酸配列を設計した。または、異なるタグをTIGITタンパク質に融合させ、それぞれpHrベクター(自社製)またはpXC-17.4ベクター(LONZA)にクローン化し、293細胞で一過性に発現させるか、精製のためにCHO細胞で安定発現させ、抗原と本開示において検出に使用されるタンパク質が得られた。以下のTIGIT抗原は、特に明記しない限り、全てヒトTIGITを指す。

TIGIT細胞外ドメインとマウスIgG2aFcフラグメントからなる融合タンパク質：免疫と検出のためのTIGIT-mFc

MEFGLSWLFLVAILKGVQCMMMTGTIETTGNISA**AEK**GG**SIL**QCHLSSTTAQVTQ  
VNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPG**PGLGLTLQSLTV**NDTGEYFCI  
YHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGAR**FQIPEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGP**  
**SVFIFPPKIKDVL**MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW**FVNNVEVHTAQ**TQTHREDY  
NSTLRVVSALPIQH**QDWM**SGKEFKCKV**NNKDL**PAPIERTISK**PKGSVRAPQVYVLP**  
**P**EEEMTKK**QVTL**TCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS  
KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK\*

SEQ ID NO: 1

注：下線付き部分はシグナルペプチドを示し、斜体部分はmFcを示す。

TIGIT細胞外ドメインとヒトIgG1 Fcフラグメントからなる融合タンパク質：検出用TIGIT-Fc

MEFGLSWLFLVAILKGVQCMMMTGTIETTGNISA**AEK**GG**SIL**QCHLSSTTAQVTQ  
VNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPG**PGLGLTLQSLTV**NDTGEYFCI  
YHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGAR**FQIPEPKSSDKTHTC**PPCPAPELLGGPS  
**VFLFPPKPKD**TL**MISRTPEV**TCVVVDV**SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE**  
**QYNSTYRVVSVLTVLHQD**WLNGKEYKCKV**SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL**  
**PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK**TPPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRW**QOGNVFSCSV**MHEALHNHYT**QKSLSLSPGK**\*

SEQ ID NO: 2

注：下線付き部分はシグナルペプチドを示し、斜体部分はFcを示す。

全長TIGIT：TIGITを過剰発現する細胞株の構築(検出用)

MRWCLLLIWAQGLRQAPLASGMMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQV  
TQVNWEQQDQLLAICNADLGWHPSPFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYF  
CIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPLLGAMAATLVVICTAVIVVVA  
LTRKKKALRIHSVEGDLRRKSAGQEEWSPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQRGED  
CAELHDYFNVLSYRSLGNCSEFFTETG

SEQ ID NO: 3

シグナルペプチド(単一の下線付き部分)+細胞外ドメイン+膜貫通ドメイン(二重下線付き部分)+細胞内ドメイン(斜体部分)

10

cynoTIGIT細胞外ドメインとマウスIgG2aFcフラグメントからなる融合タンパク質:cynoTIGIT-mFc(検出用)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCMMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSTMAQVT  
QVNWEQHDHSLLAIRNAELGWHIYPAFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTMNDTGEYF  
CTYHTYPDGTGRIFLEVLESSVAEHSARFQIPEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLG  
GPSVTFHPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQTTHR  
EDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYV  
LPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYF  
MYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK\*

20

SEQ ID NO: 4

注:下線付き部分はシグナルペプチドを示し、斜体部分はmFcを示す。

【0097】

1.2 TIGIT関連組換えタンパク質の精製、融合細胞抗体及び組換え抗体の精製

(1) 融合細胞上清の分離、精製/プロテインG親和性クロマトグラフィー:

プロテインG親和性クロマトグラフィーは、マウス融合細胞上清の精製のために選択した。培養した融合細胞を遠心分離し、上清を得、1M Tris-HCl (pH8.0~8.5) 10~15% (上清量)を加えてpHを調整した。プロテインGカラムを3~5カラム容量の6M塩酸グアニジンで洗浄し、次に3~5カラム容量の純水で洗浄した。カラムを、3~5カラム容量の平衡化緩衝液、例えば、1xPBS (pH7.4) 緩衝液システムで平衡化した。細胞上清をロードし、流速を制御することにより約1分以上の保持時間で低流速で結合した。UV吸収がベースラインに戻るまで、3~5カラム容量の1xPBS (pH7.4)でカラムを洗浄した。0.1 M酢酸/酢酸ナトリウム (pH3.0) 緩衝液でサンプルを溶出し、UV検出に従って溶出ピークを収集した。一時的な保管のため、溶出生成物のpHを1 M Tris-HCl (pH8.0)でpH5~6にすばやく調整した。溶出生成物については、当業者に周知の方法によって溶液の交換を行うことができる。例えば、限外濾過チューブで限外濾過を行い、溶液が所望の緩衝液系と交換した。またはSuperdex 200などの高分解能分子排除カラムを用いて、溶出産物から凝集体を除去することによりサンプルの純度を向上させた。

30

40

(2) プロテインA親和性クロマトグラフィーによるFcタグ融合タンパク質または抗体の抽出:

Fc融合タンパク質または抗体を発現する細胞培養上清を最初に高速で遠心分離して上清を収集した。プロテインAカラムを3~5カラム容量の6M塩酸グアニジンで洗浄し、次に3~5カラム容量の純水で洗浄した。3~5カラム容量の平衡化緩衝液、例えば、1xPBS (pH7.4) 緩衝液システムでカラムを平衡化した。細胞上清をロードし、流速を制御することにより約1分以上の保持時間で低流速で結合した。UV吸収がベースラインに戻るまで、3~5カラム容量の1xPBS (pH7.4)でカラムを洗浄した。サンプルは0.1 M酢酸/酢酸ナ

50

トリウム (pH3.0 ~ 3.5) 緩衝液で溶出され、UV検出に従って溶出ピークを収集した。一時的な保管のために、溶出生成物のpHを1 M Tris-HCl (pH8.0) でpH5 ~ 6にすばやく調整した。溶出生成物については、当業者に周知の方法によって溶液の交換を行うことができる。例えば、限外濾過チューブで限外濾過を行い、溶液が所望の緩衝液系と交換した。または、Superdex 200などの高分解能分子排除カラムで溶出産物から凝集体を除去することにより、サンプルの純度が向上させた。

## 実施例2 抗ヒトTIGIT融合細胞モノクローナル抗体の調製

【0098】

### 2.1 免疫

実験用SJMホウライマウス (メス、6-8週齢、Beijing Weitong Lihua Experimental Animal Technology Co., Ltd.、動物生産許可番号: SCXK (Beijing) 2012-0001) を免疫し、抗ヒトTIGITモノクローナル抗体を作製した。摂食環境: SPFレベル。マウスは、購入後1週間、12/12時間の明/暗サイクル、温度20 ~ 25 °C、湿度40 ~ 60%で実験室環境に保管した。環境に順応したマウスを以下のプロトコルに従って免疫した。免疫用の抗原は、mFc (配列番号1) を含むヒトTIGIT細胞外ドメインであった。

免疫プロトコル: 免疫は、TiterMax(登録商標)ゴールドアジュバント (Sigma カタログ番号T2684) とThermoImject(登録商標)Alum (Thermo カタログ番号77161) アジュバントを交互に使用して行った。抗原とアジュバントの比率 (TiterMax(登録商標)Goldアジュバント) は1:1で、抗原とアジュバントの比率 (ThermoImject(登録商標)Alum) は3:1、50 µg/マウス/時間 (初回免疫)、25 µg/マウス/回 (追加免疫)。抗原を乳化し、0、14、28、42及び56日目に接種した。0日目に、50 µg/マウスの乳化抗原を腹腔内 (IP) 注射した。14日目に、25 µg/マウスをいくつかの部位 (一般的には背中6 ~ 8部位) に皮下 (皮下) 注射した。28日目と42日目に、背中と腹部の腫れ具合に応じて、抗原を背中に注射するか、腹腔内に注射した。21、35、49及び63日目に採血し、マウスの血清抗体価をELISAで測定した。4回目または5回目の免疫後、プラトーに達する傾向のある血清抗体価が高いマウスを脾細胞融合のために選択した。脾細胞融合の3日前に追加免疫を行い、生理食塩水中に調製した50 µg/マウスの抗原を腹腔内注射した (IP)。

【0099】

### 2.2 脾細胞の融合

融合細胞は、脾臓リンパ球と骨髓腫Sp2/0細胞 (ATCC(登録商標)CRL-8287<sup>TM</sup>) を最適化されたPEG媒介融合手順で融合することにより得られた。融合した融合細胞を0.5 ~ 1 × 10<sup>6</sup>/mlの密度で完全培地 (20% FBS、1 × HAT、1 × OPIを含むDMEM培地) に再懸濁し、100 µl/ウェルでの96ウェルプレートに播種した。37 °C、5% CO<sub>2</sub>で3 ~ 4日間インキュベートした後、HAT完全培地に100 µl/ウェルを補充し、針状クローンが形成されるまでさらに3 ~ 4日間培養した。上澄みを除去し、200 µl/ウェルのHT完全培地 (20% FBS、1 × HT及び1 × OPIを含むRPMI-1640培地) を加え、37 °C、5% CO<sub>2</sub>で3日間培養し、次にELISAにより検出を行った。

【0100】

### 2.3 融合細胞のスクリーニング

融合細胞の培養上清を、融合細胞の増殖密度に従って結合ELISAで検出した。結合ELISAによって細胞が陽性であると検出された上清を、細胞結合アッセイ及び細胞ブロッキングアッセイに供した。細胞が結合アッセイとブロッキングアッセイの両方で陽性であることが検出されたウェルを適時に拡大し、凍結保存し、単一の細胞クローンが得られるまでサブクローンを2 ~ 3回処理した。

サブクローニングされた各細胞をまたTIGIT結合ELISA、HTRFブロッキングアッセイ、細胞結合アッセイ及び細胞ブロッキングアッセイに供した。融合細胞クローンは上記の実験により得えた。さらに無血清細胞培養により抗体を調製し、試験例で使用するために精製例に従って精製した。

【0101】

### 2.4 陽性融合細胞クローンの配列決定

陽性融合細胞クローンを以下のように配列決定した。対数増殖期の融合細胞を回収し、製造元の指示に従ってTrizol (Invitrogen、カタログ番号15596-018) でRNAを抽出し、PrimeScript™逆転写酵素キット (Takara、カタログ番号2680A) で逆転写を行った。逆転写により得られたcDNAを、マウスIg-プライマーセット (Novagen、TB326 Rev. B 0503) を用いたPCRにより増幅し、配列決定した。得られたDNA配列から、陽性クローンm17に対応する抗体の可変領域のアミノ酸配列は以下のとおりであった。

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFIFSDYHMYWVRQTPEKRLEWVAYISK  
GGISTYYPDTPVKGRFTISRDNAKHTLYLQMSRLKSEDAMYYCARQSSYDFAM  
DYWGRGTSVTVSS

10

SEQ ID NO: 5

DIVMTQSHKFMSTSVGVRVSITCKASQDVGTSVAWYQKPGQSPKLLIYWASA  
RHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQYSSYPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 6

QVQLQQPGAELVKPGSSVKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQGPGRGLEWIGRI  
DPDSTGSKYNEKFKTKASLTVDTVSGTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREGAYGY  
YFDYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO: 7

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQKQKSPQLLVYNARTL  
AESVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYCYHSGSPLPFGAGTKLALK

20

SEQ ID NO: 8

EVQLQQSGPVLVKPGPSVKISCKASGFTFTDYYMHWVKQSLGKSLEWIGLVYP  
YNDNTGYNRKFKGKATLTVDTSSSTAYIELNSLTSEDSAVYYCARGGPSNWNYP  
DYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO: 9

DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITCKASQNVVTAVAWYQKPGQSPKLLIYSASNR  
YTGVPDRFTGSGSGTDFTLTINNVQSEDLADYFCQYTYLYPLTFGAGTKLELK

30

SEQ ID NO: 10

QVQLQQPGAELVKFGASVKLSCKASGYTFTNYMHWVKQRPGRGLEWIGRID  
PTSGATKYNDNFKGKATLTVDKPSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREGGFGYYF  
DYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO: 11

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIPTYLAWYQKQKSPQLLVYNAKTFA  
EGVPSRFSGSGSGTQFSLKISSLQPEDFGIYYCQHGYGIPLPFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 12

40

QVQLQQSGTELVRPGTSVKMSCKASGYTFTNYWIGWAKQRPBGHGLEWIGDIYP  
GGAYTNYNEKFKDKATLTADKSSSTAYMQFSSLTSEDSAIYYCTRGDYDSSGR  
AMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO: 13

50

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVSMSCKSSQSLLYSRNQMNLYLAWYQQKPGQSPKLLI  
 YWTSTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISVKAEDLAVYYCQQYYSYPYTFGGGT  
 KLEIK

SEQ ID NO: 14

各抗体の軽鎖及び重鎖におけるCDR配列を表1に示した。

(表1) 各重鎖及び軽鎖のCDR配列

| 抗体    | 重鎖    |                                    | 軽鎖    |  |
|-------|-------|------------------------------------|-------|--|
| m1707 | HCDR1 | DYHMY<br>SEQ ID NO: 15             | LCDR1 | KASQDVGTSVA<br>SEQ ID NO: 18           |
|       | HCDR2 | YISKGGISTYYPDTVKG<br>SEQ ID NO: 16 | LCDR2 | WASARHT<br>SEQ ID NO: 19               |
|       | HCDR3 | QSSYDFAMDY<br>SEQ ID NO: 17        | LCDR3 | QQYSSYPLT<br>SEQ ID NO: 20             |
| m1708 | HCDR1 | NYWMH<br>SEQ ID NO: 21             | LCDR1 | RASENIYSYLA<br>SEQ ID NO: 24           |
|       | HCDR2 | RIDPDSTGSKYNEKFKT<br>SEQ ID NO: 22 | LCDR2 | NARTLAE<br>SEQ ID NO: 25               |
|       | HCDR3 | EGAYGYFDY<br>SEQ ID NO: 23         | LCDR3 | QYHSGSPLP<br>SEQ ID NO: 26             |
| m1709 | HCDR1 | DYYMH<br>SEQ ID NO: 27             | LCDR1 | KASQNVVTAVA<br>SEQ ID NO: 30           |
|       | HCDR2 | LVYPYNDNTGYNRKFKG<br>SEQ ID NO: 28 | LCDR2 | SASNRYT<br>SEQ ID NO: 31               |
|       | HCDR3 | GGPSNWNFYFDY<br>SEQ ID NO: 29      | LCDR3 | QQYTLYPLT<br>SEQ ID NO: 32             |
| m1710 | HCDR1 | NYMH<br>SEQ ID NO: 33              | LCDR1 | RTSENIPTYLA<br>SEQ ID NO: 36           |
|       | HCDR2 | RIDPTSGATKYNDNFKG<br>SEQ ID NO: 34 | LCDR2 | NAKTFAE<br>SEQ ID NO: 37               |
|       | HCDR3 | EGGFGYFDY<br>SEQ ID NO: 35         | LCDR3 | QHHYGIPLP<br>SEQ ID NO: 38             |
| m1711 | HCDR1 | NYWIG<br>SEQ ID NO: 39             | LCDR1 | KSSQSLLYSRNQMN<br>YLA<br>SEQ ID NO: 42 |
|       | HCDR2 | DIYPPGAYTNYNEKFKD<br>SEQ ID NO: 40 | LCDR2 | WTSTRES<br>SEQ ID NO: 43               |
|       | HCDR3 | GDYYDSSGRAMDY<br>SEQ ID NO: 41     | LCDR3 | QQYYSYPYT<br>SEQ ID NO: 44             |

10

20

30

40

50

実施例 3 : マウス抗ヒトTIGIT抗体のヒト化

【 0 1 0 2 】

MOEソフトウェアを用いてIMGTヒト抗体重鎖及び軽鎖可変領域生殖細胞系遺伝子データベースに整列することにより、マウス抗体と高い同一性を持つ重鎖及び軽鎖可変領域生殖細胞系遺伝子をテンプレートとして選択した。マウス抗体のCDRを、対応するヒト由来のテンプレートに別々に移植して、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順序で可変領域配列を形成した。必要に応じて、バックボーン配列の主要なアミノ酸をマウス抗体に対応するアミノ酸に戻し、突然変異させ、元の親和性を確保し、ヒト化抗TIGITモノクローナル抗体を取得した。CRD領域のアミノ酸残基は、Kabatナンバリングシステムによって決定し、注釈付けした。

10

【 0 1 0 3 】

マウス抗体の軽鎖及び重鎖可変領域をヒト抗体の軽鎖及び重鎖定常領域に連結してキメラ抗体を形成した。m1707抗体に対応するキメラ抗体はch1707と呼ばれた。他の抗体に関しては、同様の方法で命名した。

【 0 1 0 4 】

3.1融合細胞クローンm1707のヒト化

(1) m1707のヒト化のためのフレームの選択

マウス抗体m1707の場合、ヒト化軽鎖テンプレートはIGKV1-39 \* 02及びhjk2.1で、ヒト化重鎖テンプレートはIGHV3-7\*01及びhjh2であった。ヒト化後、ヒト化抗体h1707が得られた。ヒト化可変領域の配列は以下のとおりであった：

20

h1707 VH-CDR グラフト

*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDYHMYWVRQAPGKGLEWVAYISKG  
GISTYYPDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQSSYDFAMDYW  
GRGTLVTVSS*

SEQ ID NO: 45

h1707 VL-CDR グラフト

*DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVGTSVAWYQQKPKAPKLLIYWASARH  
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK*

30

SEQ ID NO: 46

注：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順に、斜体部分はFR配列を示し、下線付き部分はCDR配列を示す。

(2) h1707の逆突然変異は次のように設計された。

| h1707-VL |                        | h1707-VH |            |
|----------|------------------------|----------|------------|
| h1707-L1 | Grafted                | h1707-H1 | Grafted    |
| h1707-L2 | S60D, T85D             | h1707-H2 | N84S, S85R |
| h1707-L3 | S60D, T85D, A43S       |          |            |
| h1707-L4 | S60D, T85D, A43S, S63T |          |            |

40

注：例えば、S60Dは、アミノ酸配列の自然な配列番号付けに従って、60番のSがDに逆変異したことを示す。「移植された」とは、マウス抗体CDRがヒト生殖系列FR領域配列に移

50

植されたことを意味する。

(3) ヒト化h1707配列の組み合わせは次のとおりであった。

|          |          |          |
|----------|----------|----------|
|          | h1707-H1 | h1707-H2 |
| h1707-L1 | h1707-01 | h1707-02 |
| h1707-L2 | h1707-03 | h1707-04 |
| h1707-L3 | h1707-05 | h1707-06 |
| h1707-L4 | h1707-07 | h1707-08 |

10

注：この表は、様々な変異体を組み合わせて取得した配列を示している。例えば、h1707-04は、ヒト化抗体h1707-04が4つの復帰変異、即ち、軽鎖L2と重鎖H2を含むことを示す。他は同様なルールに従う。

(4) ヒト化h1707の特定の配列は次のとおりであった。

20

30

40

50

> h1707-L1 (h1707 VL-CDR グラフトと同様)

DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWASARH  
TGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 46

> h1707-L2

DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWASARH  
TGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 47

> h1707-L3

DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKSPKLLIYWASARH  
TGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 48

> h1707-L4

DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKSPKLLIYWASARH  
TGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 49

> h1707-H1 (h1707 VH-CDR グラフトと同様)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS<sup>1</sup>DYHMYWVRQAPGKGLEWVAYISKG  
GISTYYPD<sup>2</sup>TVKGRFTISRDN<sup>3</sup>AKNSLYLQ<sup>4</sup>MNSLRAEDTAVYYCARQSSYDFAMDYW  
GRGTLVTVSS

SEQ ID NO: 45

> h1707-H2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS<sup>1</sup>DYHMYWVRQAPGKGLEWVAYISKG  
GISTYYPD<sup>2</sup>TVKGRFTISRDN<sup>3</sup>AKNSLYLQ<sup>4</sup>MSRLRAEDTAVYYCARQSSYDFAMDYW  
GRGTLVTVSS

SEQ ID NO: 50

## 【 0 1 0 5 】

### 3.2 融合細胞クローンm1708のヒト化

#### (1) m1708のヒト化のためのフレームの選択

マウス抗体m1708の場合、ヒト化軽鎖テンプレートはIGKV1-39\*01及びhjk4.1で、ヒト化重鎖テンプレートはIGHV1-46\*01及びhjh4.1であった。ヒト化後、ヒト化抗体h1708が得られた。ヒト化可変領域の配列は以下のとおりであった：

h1708VH-CDRグラフト

10

20

30

40

50

*EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP  
DSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYME~~LS~~SLRSED~~TA~~VYYCAREGAYGYYFDY  
WGQGTLVTVSS*

SEQ ID NO: 51

h1708VL-CDR グラフト

*DIQMTQSPSSLSASVGVDRVTITCRASENIYSYLA~~WY~~QKPKGKAPKLLIYNARTLAE  
GVPSRFSGSGSGTDFLT~~IS~~SLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGTKVEIK*

10

SEQ ID NO: 52

注：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順に、斜体部分はFR配列を示し、下線付き部分はCDR配列を示す。

(2) h1708の逆突然変異は次のように設計された。

| h1708-VL |         | h1708-VH |                  |
|----------|---------|----------|------------------|
| h1708-L1 | Grafted | h1708-H1 | Grafted          |
| h1708-L2 | A43S    | h1708-H2 | R72V             |
|          |         | h1708-H3 | M48I, R72V, V79A |

20

注：例えば、A43Sは、アミノ酸配列の自然な配列番号に従って、43番のAがSに逆変異されたことを示す。「移植された」とは、マウス抗体のCDRがヒト生殖系列FR領域配列に移植されたことを意味する。

(3) ヒト化h1708配列の組み合わせは次のとおりであった。

30

|          | h1708-H1 | h1708-H2 | h1708-H3 |
|----------|----------|----------|----------|
| h1708-L1 | h1708-01 | h1708-02 | h1708-03 |
| h1708-L2 | h1708-04 | h1708-05 | h1708-06 |

(4) ヒト化h1708の特定の配列は次のとおりである。

40

50

> h1708-L1 (h1708 VL-CDR グラフトと同様)

*DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNARTLAE  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGGTKVEIK*

SEQ ID NO: 52

> h1708-L2

*DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKSPKLLIYNARTLAE  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYHSGSPLPFGGGGTKVEIK*

10

SEQ ID NO: 53

> h1708-H1 (h1708 VL-CDR グラフトと同様)

*EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP  
DSTGSKYNEKFKTRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGAYGYFDY  
WGQGLVTVSS*

SEQ ID NO: 51

> h1708-H2

*EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFNYWMHWVRQAPGQGLEWMGRIDP  
DSTGSKYNEKFKTRVTMTVDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREGAYGYFDY  
WGQGLVTVSS*

20

SEQ ID NO: 54

> h1708-H3

*EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFNYWMHWVRQAPGQGLEWIGRIDP  
STGSKYNEKFKTRVTMTVDTSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCAREGAYGYFDYW  
GQGLVTVSS*

30

SEQ ID NO: 55

#### 【 0 1 0 6 】

#### 3.3 融合細胞クローンm1709のヒト化

(1) m1709のヒト化のためのフレームの選択

マウス抗体m1709の場合、ヒト化軽鎖テンプレートはIGKV1-39\*01及びhjk4.1で、ヒト化重鎖テンプレートはIGHV1-46\*01及びhjh4.1であった。ヒト化後、ヒト化抗体h1709が得られた。ヒト化可変領域の配列は以下のとおりであった：

h1709VH-CDR グラフト

*EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGLVYP  
YNDNTGYNRKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGGPSNWNFY  
DYWGQGLVTVSS*

40

SEQ ID NO: 56

h1709VL-CDR グラフト

*DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVVTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRY  
TGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYTLYPLTFGGGTKVEIK*

SEQ ID NO: 57

50

注：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順に、斜体部分はFR配列を示し、下線付き部分はCDR配列を示す。

(2) h1709の逆突然変異は次のように設計された。

| h1709-VL |                       | h1709-VH |                              |
|----------|-----------------------|----------|------------------------------|
| h1709-L1 | 移植された                 | h1709-H1 | 移植された                        |
| h1709-L2 | S60D                  | h1709-H2 | R72V, S84N                   |
| h1709-L3 | A43S, S60D, Y87F      | h1709-H3 | R72V, V79A, S84N             |
| h1709-L4 | Q3V, A43S, S60D, Y87F | h1709-H4 | Y27F, M48I, R72V, V79A, S84N |

10

注：例えば、S60Dは、アミノ酸配列の自然な配列番号付けに従って、60番のSがDに逆変異したことを示す。「移植された」とは、マウス抗体のCDRがヒト生殖系列FR領域配列に移植されたことを意味する。

20

(3) ヒト化h1709配列の組み合わせは次のとおりであった。

|          | h1709-H1 | h1709-H2 | h1709-H3 | h1709-H4 |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| h1709-L1 | h1709-01 | h1709-02 | h1709-03 | h1709-04 |
| h1709-L2 | h1709-05 | h1709-06 | h1709-07 | h1709-08 |
| h1709-L3 | h1709-09 | h1709-10 | h1709-11 | h1709-12 |
| h1709-L4 | h1709-13 | h1709-14 | h1709-15 | h1709-16 |

30

注：この表は、様々なバリエーションを組み合わせで取得した配列を示している。例えば、h1709-06は、ヒト化抗体h1709-06が3つの復帰変異、即ち、軽鎖L2と重鎖H2を含むことを示す。他は同様なルールに従う。

(4) ヒト化h1709の特定の配列は以下のとおりであった。

40

50

> h1709-L1 (h1709 VL-CDR グラフトと同様)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVVTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRY  
TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYTLYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 57

> h1709-L2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVVTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRY  
TGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYTLYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 58

> h1709L3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVVTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRY  
TGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYFCQQYTLYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 59

> h1709-L4

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVVTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRY  
TGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYFCQQYTLYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 60

> h1709.H1 (h1709 VH-CDR グラフトと同様)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGLVYP  
YNDNTGYNRKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARGGPSNWNYF  
DYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 56

> h1709-H2

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGLVYP  
YNDNTGYNRKFKGRVTMTVDTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARGGPSNWNYF  
DYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 61

> h1709-H3

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGLVYP  
YNDNTGYNRKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCARGGPSNWNYF  
DYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 62

> h1709-H4

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFDYYMHWVRQAPGQGLEWIGLVYPY  
NDNTGYNRKFKGRVTMTVDTSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCARGGPSNWNYFD  
YWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 63

## 3.4 融合細胞クローンm1710のヒト化

## (1) m1710のヒト化のためのフレームの選択

マウス抗体m1710の場合、ヒト化軽鎖テンプレートはIGKV1-39\*01及びhjk4.1で、ヒト化重鎖テンプレートはIGHV1-46\*01及びhjh4.1であった。ヒト化後、ヒト化抗体h1710が得られた。ヒト化可変領域の配列は以下のとおりであった：

h1710VH-CDR グラフト

*EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMHWRQAPGQGLEWMGRIDPT  
SGATKYNDNFKGRVTMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCAREGGFGYYFDYW  
GQGTTVTVSS*

SEQ ID NO: 64

h1710VL-CDR グラフト

*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRITSENIPTYLAWYQOKPGKAPKLLIYNAKTFAE  
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHHYGIPLPFGQGTKLEIK*

SEQ ID NO: 65

注：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順に、斜体部分はFR配列を示し、下線付き部分はCDR配列を示す。

## (2) h1710の逆突然変異は次のように設計された。

| h1710-VL |            | h1710-VH |  |
|----------|------------|----------|--|
| h1710-L1 | 移植された      | h1710-H1 | 移植された  |
| h1710-L2 | A43S, I48V | h1710-H2 | R72V, T74K                                     |
|          |            | h1710-H3 | R72V, T74K, M70L, V79A                         |
|          |            | h1710-H4 | R72V, T74K, M48I, V68A, M70L, V79A             |
|          |            | h1710-H5 | R38K, R67K, R72V, T74K, M48I, V68A, M70L, V79A |

注：例えば、A43Sは、アミノ酸配列の自然な配列番号に従って、43番のAがSに逆変異されたことを示す。「移植された」とは、マウス抗体のCDRがヒト生殖系列FR領域配列に移植されたことを意味する。

## (3) ヒト化h1710配列の組み合わせは次のとおりであった。

|          |          |          |          |          |          |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|          | h1710-H1 | h1710-H2 | h1710-H3 | h1710-H4 | h1710-H5 |
| h1710-L1 | h1710-01 | h1710-02 | h1710-03 | h1710-04 | h1710-05 |
| h1710-L2 | h1710-06 | h1710-07 | h1710-08 | h1710-09 | h1710-10 |

注：この表は、様々な変異体を組み合わせて取得した配列を示している。例えば、h1710-07は、ヒト化抗体h1710-07が4つの復帰変異、即ち、軽鎖L2と重鎖H2を含むことを示

している。他は同様なルールに従う。

(4) ヒト化h1710の特定の配列は次のとおりであった。

> h1710-L1 (h1710 VL-CDR グラフトと同様)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRTSENIFTYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTFAE  
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHGYGIPLPFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 65

> h1710-L2

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRTSENIFTYLAWYQQKPGKSPKLLVYNAKTFAE  
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHGYGIPLPFGQGTKLEIK

10

SEQ ID NO: 66

> h1710-H1 (h1710 VH-CDR グラフトと同様)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPT  
SGATKYNDNFKGRVTMTRDTSSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREGGFGYYFDYW  
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 64

> h1710-H2

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPT  
SGATKYNDNFKGRVTMTVDKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREGGFGYYFDY  
WGQGTTVTVSS

20

SEQ ID NO: 67

> h1710-H3

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPT  
SGATKYNDNFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGGFGYYFDYW  
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 68

> h1710-H4

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYYMHWVRQAPGQGLEWIGRIDPTS  
GATKYNDNFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGGFGYYFDYWG  
QGTTVTVSS

30

SEQ ID NO: 69

> h1710-H5

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYYMHWVKQAPGQGLEWIGRIDPTS  
GATKYNDNFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREGGFGYYFDYWG  
QGTTVTVSS

40

SEQ ID NO: 70

## 【 0 1 0 8 】

### 3.5融合細胞クローンm1711のヒト化

(1) m1711のヒト化のためのフレームの選択

マウス抗体m1711の場合、ヒト化軽鎖テンプレートはIGKV4-1\*01及びhjk4.1で、ヒト化重鎖テンプレートはIGHV1-69\*02及びhjh4.1であった。ヒト化後、ヒト化抗体h1711が得られた。ヒト化可変領域の配列は以下のとおりであった：

50

h1711VH-CDR グラフト

*EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSNYWIGWVRQAPGQGLEWMGDIYPG  
GAYTNYNEKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDYDSSGRAM  
DYWGQGTLVTV*

SEQ ID NO: 71

h1711VL-CDR グラフト

*DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQMNLYLAWYQQKPGQPPLLIY  
WTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGGGTKV  
EIK*

SEQ ID NO: 72

注：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順に、斜体部分はFR配列を示し、下線付き部分はCDR配列を示す。

(2) h1711の逆突然変異は次のように設計された。

| h1711-VL |            | h1711-VH |                        |
|----------|------------|----------|------------------------|
| h1711-L1 | 移植された      | h1711-H1 | 移植された                  |
| h1711-L2 | P49S       | h1711-H2 | M48I,                  |
| h1711-L3 | N22S, P49S | h1711-H3 | G27Y, M48I,            |
|          |            | h1711-H4 | G27Y, M48I, L83F, A97T |

注：例えば、P49Sは、アミノ酸配列の自然な配列番号に従って、49番のPがSに逆変異したことを示す。「移植された」とは、マウス抗体のCDRがヒト生殖系列FR領域配列に移植されたことを意味する。

(3) ヒト化h1711配列の組み合わせは次のとおりである。

|          | h1711-H1 | h1711-H2 | h1711-H3 | h1711-H4 |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| h1711-L1 | h1711-01 | h1711-02 | h1711-03 | h1711-04 |
| h1711-L2 | h1711-05 | h1711-06 | h1711-07 | h1711-08 |
| h1711-L3 | h1711-09 | h1711-10 | h1711-11 | h1711-12 |

注：この表は、様々な変異体トを組み合わせで取得した配列を示している。例えば、h1711-06は、ヒト化抗体h1711-06が軽鎖L2と重鎖H2からなる復帰変異を含むことを示す。他は同様なルールに従う。

(4) ヒト化h1711の特定の配列は以下のとおりであった。

> h1711-L1 (h1711 VL-CDR グラフトと同様)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQMNYLAWYQQKPGQPPKLLIY  
WTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSSYPYTFGGGTKV  
EIK

SEQ ID NO: 72

> h1711-L2

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQMNYLAWYQQKPGQSPKLLIY  
WTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSSYPYTFGGGTKV  
EIK

10

SEQ ID NO: 73

> h1711-L3

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSRNQMNYLAWYQQKPGQSPKLLIY  
WTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSSYPYTFGGGTKV  
EIK

SEQ ID NO: 74

20

> h1711-H1 (h1711 VH-CDR グラフトと同様)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYWIGWVRQAPGQGLEWMGDIYPG  
GAYTNYNEKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDYDSSGRAM  
DYWGQGLVTV  
SS

SEQ ID NO: 71

>h1711-H2

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPPG  
AYTNYNEKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDYDSSGRAMD  
YWGQGLVTVSS

30

SEQ ID NO: 75

>h1711-H3

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPPG  
AYTNYNEKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDYDSSGRAMD  
YWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 76

40

> h1711-H4

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPPG  
AYTNYNEKFKDRVTITADKSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCTRGDYDSSGRAMD  
YWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 77

全長重鎖配列は、上記の重鎖可変領域のそれぞれを、配列番号78に示す重鎖定常領域配

50

列 (IgG4、S228P変異を有する) で組換え発現させることにより得られた。上記の軽鎖可変領域のそれぞれは、配列番号79に記載の軽鎖定常領域配列 (kappa鎖) で組換え発現され、最終的な完全長軽鎖配列を形成する。上記の重鎖及び軽鎖可変領域はまた、当技術分野で周知の他のIgGファミリー重鎖及び軽鎖定常領域または変異IgGファミリー定常領域と組み換えて、無傷の抗体重鎖及び軽鎖配列を形成することができる。例示的な定常領域配列を以下に示す：

S228P変異のあるIgG4重鎖定常領域：

S228P 変異のある IgG4 重鎖定常領域：

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP  
PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT  
QKSLSLSLGK

10

SEQ ID NO: 78

軽鎖定常領域：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

SEQ ID NO: 79

上記の軽鎖及び重鎖は、当技術分野における従来の技術によって、本開示の代替のヒト化定常領域または機能的に修飾されたヒト化定常領域とともに組換え発現された。

22G2-H3Qは陽性対照抗体として使用され、そのVH及びVL配列はUS20160176963A1 (それぞれUS20160176963A1の配列番号8及び9) に由来し、それぞれ、配列番号78および配列番号79の重鎖および軽鎖定常領域に連結されて、無傷の完全長抗体を形成した。22G2-H3QのVHとVLの特定の配列を以下に示す。

30

22G2-H3Q VH

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGIYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIY  
YSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYYVSGNY  
YNVDYYFFGVDVWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 80

22G2-H3Q VL

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR  
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLFTFGPGTKVDIK

40

SEQ ID NO: 81

本開示の結合活性は、以下の生化学的試験で実証された。

試験例1：ELISAアッセイによるヒトTIGITタンパク質へのTIGIT抗体の結合

【0109】

ELISAアッセイにより抗TIGIT抗体の結合能力を抗体とヒトTIGITタンパク質を用いて

50

検出した。ELISAプレートにコーティングされた抗FcまたはmFc抗体に結合することにより、FcまたはmFcタグが付いたTIGIT融合タンパク質を96ウェルマイクロタイタープレートに固定化した。抗体添加後のシグナル強度を用いて、TIGITに対する抗体の結合活性を測定した。10A7 hlgG4（その軽鎖及び重鎖可変領域配列は、US20130251720A1に開示されている配列番号21及び22に由来し、上記の軽鎖及び重鎖可変領域は、それぞれ本開示の配列番号79及び78の軽鎖及び重鎖定常領域に連結され、全長抗体を形成する）を陽性対照分子として使用し、ヒトIgG4抗体（hlgG4）を陰性対照として使用したが、これはTIGITに結合することができなかった。実験手順は具体的に次のように記載する。

ヤギ抗ヒトFc抗体（Jackson Immuno Research、カタログ番号109-005-008）またはヤギ抗マウスFc抗体（Sigma、カタログ番号M3534-1ML）をPBS、pH7.4（Shanghai BasalMedia、カタログ番号B320）で希釈し、2 µg/mlの濃度にし、96ウェルマイクロタイタープレート（Corning、カタログ番号CLS3590-100EA）に50 µl/ウェルの容量で加え、37 °Cのインキュベーターに2時間放置した。液体を廃棄した後、PBSで希釈した5%スキムミルク（BDスキムミルク、カタログ番号232100）ブロッキング溶液を200 µl/ウェルで添加し、ブロッキングのため37 °Cで3時間または4 °Cで終夜（16～18時間）した。ブロッキングが終了した後、ブロッキング溶液を廃棄し、プレートをPBST緩衝液（0.05% tween-20を含むPBS、pH7.4）、TIGIT-Fc融合タンパク質（自社製）またはTIGIT-mFc融合タンパク質（自社製）で5回洗浄した。サンプル希釈液（1% BSAを含むPBS、pH7.4）で0.5 µg/mlの濃度に希釈し、50 µl/ウェルで加え、37 °Cのインキュベーターに1時間または4 °Cで終夜放置した。インキュベーション後、反応液をプレートから取り除き、プレートをPBSTで5回洗浄し、サンプル希釈液で様々な濃度に希釈した試験対象の抗体（融合細胞の精製抗体またはヒト化抗体）を50 µl/ウェルで入れ、37 °Cで1時間インキュベーターに放置した。インキュベーション後、プレートをPBST、HRP標識ヤギ抗マウス二次抗体（Jackson Immuno Research、カタログ番号115-035-003）またはヤギ抗ヒト二次抗体（Jackson Immuno Research、カタログ番号109-035-003）サンプル希釈液で希釈し、50 µl/ウェルで加え、37 °Cで1時間インキュベーターに放置した。プレートをPBSTで5回洗浄し、TMB発色基質（KPL、カタログ番号52-00-03）を50 µl/ウェルで加え、室温で5～10分間インキュベートし、50 µl/ウェルの1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して反応を停止させた。波長450 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー（Thermo Scientific Multiskan, MK3）で読み取った。データをGraphPad Prism 5で分析し、EC50値はヒトTIGITタンパク質へのTIGIT抗体の結合として算出した。その結果を図1に示す。

試験例2：ELISAアッセイによるカニクイザルTIGITタンパク質へのTIGIT抗体の結合  
【0110】

ELISAアッセイにより抗体とカニクイザルTIGITタンパク質を用いてサルタンパク質に対する抗TIGIT抗体の交差結合能力を検出した。FcまたはmFcタグが付いたカニクイザルTIGIT融合タンパク質を、ELISAプレートにコーティングされた抗FcまたはmFc抗体に結合させることにより、96ウェルマイクロタイタープレートに固定した。抗体添加後のシグナル強度を用いて、カニクイザルTIGITに対する抗体の結合活性を測定した。実験手順は具体的に次のように記載する。

ヤギ抗ヒトFc抗体（Jackson Immuno Research、カタログ番号109-005-008）またはヤギ抗マウスFc抗体（Sigma、カタログ番号M3534-1ML）をPBS、pH7.4（Shanghai BasalMedia、カタログ番号B320）を2 µg/mlの濃度に調整し、96ウェルマイクロタイタープレート（Corning、カタログ番号CLS3590-100EA）に50 µl/ウェルの容量で加え、プレートを37 °Cのインキュベーターに2時間放置した。液体を廃棄した後、PBSで希釈した5%スキムミルク（BDスキムミルク、カタログ番号232100）ブロッキング溶液を200 µl/ウェルで添加し、ブロッキングのため37 °Cで3時間または4 °Cで終夜（16～18時間）インキュベーターに放置した。ブロッキングが完了した後、ブロッキング溶液を廃棄し、プレートをPBST緩衝液（0.05% tween-20、pH7.4を含むPBS）、カニクイザルTIGIT-Fc融合タンパク質（自社製）またはカニクイザルTIGIT-mFcで5回洗浄した。サンプル希釈液（1% BSAを含むPBS、pH7.4）で0.5 µg/mlの濃度に希釈された融合タンパク質（自社

製)を50 µl/ウェルで添加し、プレートに37 °Cのインキュベーターに1時間、または4時間で終夜放置した。インキュベーション後、反応液をプレートから取り除き、プレートをPBSTで5回洗浄し、サンプル希釈液で様々な濃度に希釈した試験対象の抗体(融合細胞の精製抗体またはヒト化抗体)を50 µl/ウェル、そしてプレートを37 °Cのインキュベーターに1時間置いた。インキュベーション後、プレートをPBST、HRP標識ヤギ抗マウス二次抗体(Jackson Immuno Research、カタログ番号115-035-003)またはヤギ抗ヒト二次抗体(Jackson Immuno Research、カタログ番号109-035-003)サンプル希釈液で希釈し、50 µl/ウェルで加え、37 °Cで1時間インキュベートした。プレートをPBSTで5回洗浄し、TMB発色基質(KPL、カタログ番号52-00-03)を50 µl/ウェル加え、室温で5~10分間インキュベートし、50 µl/ウェルの1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して反応を停止させた。波長450 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Thermo Scientific Multiskan、MK3)で読み取った。データをGraphPad Prism 5で分析し、EC<sub>50</sub>値をカニクイザルTIGITタンパク質へのTIGIT抗体の結合として算出した。その結果を図2に示す。

10

試験例3: 結合アッセイによるヒトTIGITを過剰発現するCHO細胞へのTIGIT抗体の結合【0111】

抗体及び結合アッセイによりTIGITタンパク質を過剰発現するCHO細胞を用いて抗TIGIT抗体の結合能力を検出した。TIGIT全長プラスミドを電穿孔によりCHO細胞に形質転換し、2週間圧力でスクリーニングし、TIGITの発現レベルを調べた。TIGITを過剰発現する細胞を96ウェルプレートの底に固定した。抗体添加後のシグナル強度を用いて、TIGITを過剰発現しているCHO細胞への抗体の結合活性を測定した。実験手順は具体的に次のように記載する。

20

細胞を5x10<sup>5</sup>/mlの密度で播種し、100 µl/ウェルを96ウェルプレートで終夜培養した。上清を捨て、プレートをPBSで3回洗浄した後、細胞免疫固定液(Beyotime、カタログ番号P0098)100 µl/ウェルを加え、室温で30分固定した。プレートをPBSで4回洗浄した。液体を捨てた後、PBSで希釈した5%スキムミルク(BDスキムミルク、カタログ番号232100)のブロッキング溶液を200 µl/ウェルで加え、37 °Cで3時間インキュベートしてブロッキングした。ブロッキングが完了した後、ブロッキング溶液を廃棄し、プレートをPBST緩衝液(0.05% tween-20を含むPBS、pH7.4)で5回洗浄し、試験対象の抗体(融合細胞の精製抗体またはヒト化抗体)をサンプル希釈液で希釈した。様々な濃度の溶液を50 µl/ウェルで加え、37 °Cのインキュベーターに1時間放置した。インキュベーション後、プレートをPBST、HRP標識ヤギ抗マウス二次抗体(Jackson Immuno Research、カタログ番号115-035-003)またはヤギ抗ヒト二次抗体(Jackson Immuno Research、カタログ番号109-035-003)をサンプル希釈液で希釈し、50 µl/ウェルで加え、37 °Cで1時間インキュベートした。プレートをPBSTで5回洗浄し、TMB発色基質(KPL、カタログ番号52-00-03)50 µl/ウェルを加え、室温で5~15分間インキュベートし、1Mウェルを50 µl/ウェルH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して反応を停止させた。波長450 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Thermo Scientific Multiskan、MK3)で読み取った。データをGraphPad Prism 5で分析し、EC<sub>50</sub>値は、TIGITタンパク質を過剰発現するCHO細胞へのTIGIT抗体の結合として算出した。その結果を図3と次の表に示す。

30

| 抗体                    | H1707-02 | H1711-04 | H1709-10 | H1708-04 | H1710-01 | 10A7-IgG4 | hIgG4  |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|--------|
| EC <sub>50</sub> (nM) | 0.08717  | 0.05868  | 0.05684  | 0.08480  | 0.07686  | 0.1090    | >10000 |

40

試験例4: 結合アッセイによるTIGIT抗体のヒトPBMCへの結合

【0112】

結合アッセイによりインビトロで活性化された抗体及びヒトPBMCを用いて抗TIGIT抗体の結合活性を検出した。ヒトPBMCは、スーパー抗原S. aureusエンテロトキシンB(SEB)の刺激によって活性化された。抗体添加後の蛍光シグナル強度を用いて、活性化ヒトPBMCへの抗体の結合活性を測定した。実験手順は具体的に次のように記載する。

50

PBMCは、Ficoll-Hypaque密度勾配遠心分離 (Stem Cell Technologies) により新鮮な血液から得られ、10% (v/v) FBS及び500 ng/mlスーパー抗原黄色ブドウ球菌エンテロトキシンB (SEB) が補充されたRPMI 1640培養培地で37℃、5%CO<sub>2</sub>で4日間培養された。

活性化されたPBMC細胞を5 × 10<sup>6</sup>/ml、100 µl/ウェルの密度で96ウェル丸底プレート (Corning、カタログ番号32915001) に播種し、遠心分離機 (ベックマンコールター、Allegra X-15R遠心分離機) で1500 rpmで5分間遠心分離した。その上清を廃棄した。細胞を200 µlのPBSで再懸濁し、遠心分離し、上清を再び廃棄した。勾配サンプル希釈溶液 (1% BSAを含むPBS、pH7.4) で希釈した試験対象の抗体を100 µl/ウェルに加えて細胞を再懸濁し、4℃で1時間インキュベートした。インキュベーション後、サンプルを1500 rpmで5分間遠心分離し、上清を廃棄し、細胞をサンプル希釈液で2回洗浄し、PEヤギ抗ヒトIgG (Jackson ImmunoResearch、109-115-098) を100 µl加えて再懸濁し、4℃で1時間インキュベートした。インキュベーション後、サンプルを1500 rpmで5分間遠心分離し、上清を廃棄し、細胞をサンプル希釈液で2回洗浄し、最後に200 µl/ウェルのサンプル希釈液で再懸濁した。蛍光シグナルの強度をフローサイトメーター (BD FACS Canto II) で測定した。データをGraphPad Prism 5で分析した。EC50値をヒトPBMCへのTIGIT抗体の結合として算出した。その結果を図4に示す。

10

試験例 5 : Biacoreアッセイ

【 0 1 1 3 】

ヒト及びサル(T)のTIGITに対して試験されるヒト化抗TIGIT抗体の親和性は、Biacore、GE機器を用いて測定した。

20

プロテインAバイオセンサーチップ (カタログ番号29127556、GE) を用いた親和性キャプチャーにより、または、Human Anti-Capture Kit (カタログ番号28-9538-28、GE) の取扱説明書に従って、ヒト抗捕捉抗体をバイオセンサーチップ (カタログ番号28-9538-28、GE) に共有結合させた。それにより、試験される抗体のある量が親和性で捕捉された。次に、ヒトとサル(T)のTIGIT抗原の一連の濃度勾配をチップの表面に流した。ヒトTIGITはSinobiological Co., Ltd. (カタログ番号10917-H08-H、Sino.Biol) から入手可能であり、サルTIGITは実施例1及び実施例2に記載されている発現及び精製から得られた。反応シグナルが検出された。Biacore装置 (Biacore T200、GE) を用いてリアルタイムで結合及び解離曲線を得た。サイクルの解離が完了した後、バイオセンサーチップを洗浄し、Human anti-Capture Kitで提供される再生溶液またはグリシン塩酸再生溶液、pH1.5 (カタログ番号BR-1003-54、GE) で再生した。実験に用いたアミノカップリングキットはGE (カタログ番号BR-1000-50、GE) から購入し、緩衝液はHBS-EP+10 × 緩衝液 (カタログ番号BR-1006-69、GE) であり、D.I.水で1 × (pH7.4) に希釈した。

30

BIAevaluationバージョン4.1、GEソフトウェアを用いてデータを(1:1) Langmuirモデルに適合させ、表2~4に示すように親和性値を得た。

(表2) huTIGITタンパク質に対する試験される分子の反応親和性

| 固定相      | 固定化方法       | 移動相     | 結合定数 (1/Ms) | 解離定数 (1/s) | 親和性 (M)  |
|----------|-------------|---------|-------------|------------|----------|
| 22G2-H3Q | プロテイン A の捕捉 | huTIGIT | 5.35E5      | 3.79E-4    | 7.09E-10 |
| h1707-02 |             |         | 1.74E6      | 1.88E-4    | 1.08E-10 |
| h1711-04 |             |         | 1.83E6      | 4.36E-4    | 2.38E-10 |
| h1709-10 |             |         | 2.49E6      | 2.59E-4    | 1.04E-10 |
| h1708-04 |             |         | 1.75E6      | 1.83E-4    | 1.04E-10 |
| h1710-01 |             |         | 1.63E6      | 2.40E-4    | 1.47E-10 |

40

(表3) cynoTIGITタンパク質に対する試験される分子の反応親和性

50

| 固定相      | 固定化方法         | 移動相               | 結合定数<br>(1/Ms) | 解離定数<br>(1/s) | 親和性<br>(M) |
|----------|---------------|-------------------|----------------|---------------|------------|
| 22G2-H3Q | Fc 親和性の<br>捕捉 | cynoTIGIT-<br>mFc | 2.44E6         | 4.04E-4       | 1.66E-10   |
| h1711-04 |               |                   | 2.46E6         | 3.17E-4       | 1.29E-10   |
| h1709-10 |               |                   | 1.39E6         | 4.15E-4       | 3.00E-10   |
| h1708-04 |               |                   | 1.24E6         | 3.52E-4       | 2.85E-10   |
| h1710-01 |               |                   | 1.15E6         | 3.71E-4       | 3.22E-10   |

(表4) ch1711とTIGITタンパク質に対するそのヒト化抗体の反応親和性

10

| 抗体       | Biacore(TIGIT-His) |          |          | 抗体       | Biacore(TIGIT-His) |          |          |
|----------|--------------------|----------|----------|----------|--------------------|----------|----------|
|          | ka<br>(1/Ms)       | kd (1/s) | KD (M)   |          | ka<br>(1/Ms)       | kd (1/s) | KD (M)   |
| ch1711   | 1.83E6             | 4.55E-4  | 2.49E-10 | h1711-07 | 1.51E6             | 7.32E-4  | 4.85E-10 |
| h1711-01 | 1.40E6             | 2.09E-3  | 1.49E-9  | h1711-08 | 2.13E6             | 4.41E-4  | 2.07E-10 |
| h1711-02 | 1.38E6             | 1.71E-3  | 1.24E-9  | h1711-09 | 1.55E6             | 1.85E-3  | 1.19E-9  |
| h1711-03 | 1.30E6             | 7.23E-4  | 5.56E-10 | h1711-10 | 1.47E6             | 1.52E-3  | 1.03E-9  |
| h1711-04 | 2.10E6             | 4.42E-4  | 2.10E-10 | h1711-11 | 1.72E6             | 8.52E-4  | 4.94E-10 |
| h1711-05 | 1.52E6             | 1.86E-3  | 1.22E-9  | h1711-12 | 2.10E6             | 4.31E-4  | 2.05E-10 |
| h1711-06 | 1.46E6             | 1.52E-3  | 1.05E-9  |          |                    |          |          |

20

試験例6：TIGIT抗体はTIGIT抗原のCD155タンパク質への結合をブロックアッセイにより遮断する

【0114】

抗体がCD155タンパク質へのTIGITの結合を遮断するHTRFアッセイにより抗TIGIT抗体の遮断能力を測定した。ドナーと受容体のペアであるPab Anti-Human IgG-Tb (Cisbio、カタログ番号61HFCTAA)とStreptavidin-XL665 (Cisbio、カタログ番号610SAXLA)は、TIGIT-Fcとビオチン化CD155 (R&D、カタログ番号2530-CD-050/CF)に結合する。あるいは、Pab Anti-mouse-IgG-XL665 (Cisbio、カタログ番号61PAMXLA)及びStreptavidin-Tb (Cisbio、カタログ番号610SATLA)はTIGIT-mFc及びビオチン化CD155 (R&D、カタログ番号2530-CD-050/CF)に結合する。融合細胞の精製抗体またはヒト化抗体を添加した後のシグナルの強度を用いて、CD155へのTIGITの結合を遮断する抗体の活性を測定した。実験手順は具体的に次のように記載する。

30

希釈溶液(1%BSAを含むPBS、pH7.4)で希釈した様々な濃度の試験抗体(融合細胞精製抗体またはヒト化抗体)を、384ウェルの実験用プレート(Corning、カタログ番号3706)に10µl/ウェルで添加し、1000rpmで1分間遠心分離し、サンプル希釈液で濃度2µg/mlに希釈したTIGIT-FcまたはTIGIT-mFcを2.5µl/ウェルで添加し、1000rpmで1分間遠心分離した後、ビオチン-CD155 4µg/mlに希釈したものを2.5µl/ウェルで加えた。プレートを1000rpmで1分間遠心分離した後、室温で10分間ブレインキュベートした。その後、Pab Anti-Human IgG-Tb (Cisbio、カタログ番号61HFCTAA)をサンプル希釈液で3.2µg/mlに希釈し、0.08µg/ml Streptavidin-XL665 (Cisbio、カタログ番号610SAXLA)を2.5µl/ウェルで加え、またはサンプル希釈液で3.2µg/mlおよび0.08µg/mlストレプトアビジン-Tb (Cisbio、カタログ番号610SATLA)に希釈されたPab Anti-mouse-IgG-XL665 (Cisbio、カタログ番号61PAMXLA)を2.5µl/ウェルで添加した。プレートを室温で1時間放置し、PHEARstar FSプレートリーダー(BMG LABTECH)を用いて665nm及び620nmで発光値を検出した。データをGraphPad Prism

40

50

5で分析した。CD155タンパク質へのヒトTIGITの結合に対するTIGIT抗体の阻害活性を算出した。その結果を図5A及び5Bに示す。

試験例7：TIGIT抗体は、ブロッキングアッセイによりCD155を過剰発現するCHO細胞へのTIGIT抗原の結合を遮断する

【0115】

抗体がCD155を過剰発現するCHO細胞へのTIGITの結合を遮断するELISAアッセイにより抗TIGIT抗体の遮断能力を検出した。全長CD155プラスミドをエレクトロポレーションによりCHO細胞に形質転換し、2週間かけて圧力でスクリーニングし、CD155の発現レベルを調べた。CD155を過剰発現する細胞を96ウェルプレートの底に固定し、TIGITを様々な濃度に希釈した抗TIGIT抗体とプレインキュベートし、プレートに加えた。二次抗体の添加後の信号強度を用いて、CD155を過剰発現するCHO細胞へのTIGITの結合を遮断する抗体の能力を測定した。実験手順は具体的に次のように記載する。

CD155-CHO細胞を $5 \times 10^5$ /mlの密度で播種し、100  $\mu$ l/ウェルを96ウェルプレートで終夜培養した。上清を廃棄し、プレートをPBSで3回洗浄した後、細胞免疫固定液（Beyotime、カタログ番号P0098）を100  $\mu$ l/ウェルで加え、室温で30分固定した。プレートをPBSで4回洗浄した。液体を廃棄した後、PBSで希釈した5%スキムミルク（BDスキムミルク、カタログ番号232100）のブロッキング溶液を200  $\mu$ l/ウェルで加え、37  $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートしてブロッキングした。ブロッキングが完了した後、ブロッキング溶液を廃棄し、プレートをPBST緩衝液（0.05% tween-20、pH7.4を含むPBS）で5回洗浄した後、抗原抗体の事前混合溶液を50  $\mu$ l/ウェルで添加した。37  $^{\circ}$ Cのインキュベーターで1時間インキュベートした。ここで、ヒトTIGIT-hFc（自社製）またはヒトTIGIT-mFc（自社製）をサンプル希釈液（1% BSAを含むPBS、pH7.4）で希釈した。0.2  $\mu$ g/mlの最終濃度まで、試験される抗体の勾配濃度と混合し、1時間プレインキュベートした。インキュベーション後、反応液をプレートから取り除き、PBST、HRP標識ヤギ抗ヒト二次抗体（Jackson Immuno Research、カタログ番号109-035-003）またはヤギ抗マウス二次抗体（Jackson Immuno Research、カタログ番号115-035-003）を50  $\mu$ l/ウェルで加え、37  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。プレートをPBSTで5回洗浄し、TMB発色基質（KPL、カタログ番号52-00-03）を50  $\mu$ l/ウェルで加え、室温で5～15分間インキュベートし、1M  $H_2SO_4$ を50  $\mu$ l/ウェルで反応を停止させる。波長450 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー（Thermo Scientific Multiskan、MK3）で読み取った。データをGraphPad Prism 5で分析した。CD155を過剰発現するCHO細胞への抗原の結合を遮断することに対するTIGIT抗体の効果を算出した。その結果を図6に示す。

試験例8：TIGIT抗体は、ブロッキングアッセイにより、TIGITを過剰発現しているCHO細胞へのCD155タンパク質の結合を遮断する

【0116】

抗体がTIGITを過剰発現するCHO細胞へのCD155の結合を遮断するFACSアッセイにより抗TIGIT抗体の遮断能力を検出した。全長TIGITプラスミドをエレクトロポレーションによりCHO細胞に遺伝子導入し、2週間かけて圧力でスクリーニングし、TIGITの発現レベルを調べた。TIGITを過剰発現している細胞を様々な濃度の抗TIGIT抗体とプレインキュベートし、その後、蛍光標識されたCD155-Fcを加えてインキュベーションした。シグナル強度を用いてTIGITを過剰発現するCHO細胞へのCD155の結合を遮断する抗体の能力を測定した。実験手順は具体的に次のように記載する。

まず、CD155-Fc（Sino Biological、カタログ番号10109-H02H）をCFTM633蛍光色素（Sigma Aldrich、カタログ番号MX633S100）で標識した。CD155-FcをPBSに0.5～1 mg/mlの濃度で溶解し、9倍のサンプル量の10  $\times$  Mix-n-Stain反応緩衝液を添加して、完全に混合した。CFTM633蛍光色素を加え、暗所、室温で30分間インキュベートした。蛍光標識の手順は完了した。

TIGIT-CHO細胞を $5 \times 10^6$ /ml、100  $\mu$ l/ウェルの密度で96ウェル丸底プレート（Corning、カタログ番号32915001）に播種し、遠心分離機で1500 rpmで5分間遠心分離し

た（ベックマンコールター、アレグラX-15R遠心分離機）、上清を廃棄した。細胞を200 μlのPBSに再懸濁し、再び遠心分離し、上清を廃棄した。細胞は、サンプル希釈溶液（1%BSAを含むPBS、pH7.4）で段階希釈された100 μl/ウェルのテスト対象の抗体溶液を加えて再懸濁し、4℃で1時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を1500 rpmで5分間遠心分離し、上清を廃棄し、細胞をサンプル希釈液で2回洗浄した。次に、2 μg/ml CFTM633 蛍光標識CD155-Fc溶液100 μlを加えて細胞を再懸濁し、4℃で1時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を1500 rpmで5分間遠心分離し、上清を捨て、細胞をサンプル希釈液で2回洗浄し、最後に細胞を200 μl/ウェルのサンプル希釈液で再懸濁した。蛍光シグナルの強度をフローサイトメーター（BD FACS Canto II）で測定した。データをGraphPad Prism 5で分析した。CD155のTIGIT-CHO細胞への結合を遮断する際のTIGIT抗体の能力を算出した。その結果を図7と次の表に示す。

10

| 抗体       | H1707-02 | H1711-04 | H1709-10 | H1708-04 | H1710-01 | 10A7-IgG4 | hIgG4  |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|--------|
| IC50(nM) | 0.4824   | 0.5698   | 0.4269   | 0.4992   | 0.4675   | 0.6783    | >10000 |

本試験例では、h1707-02、h1708-04、h1709-10、h1710-01及びh1711-04抗体は全て、TIGITを過剰発現しているCHO細胞へのCD155の結合を遮断できた。  
 試験例9：TIGIT抗体は、ブロッキングアッセイにより、CD112を過剰発現しているCHO細胞へのTIGIT抗原の結合を遮断する

20

【0117】

抗体がCD112を過剰発現するCHO細胞へのTIGITの結合を遮断するFACSアッセイにより抗TIGIT抗体の遮断能力を検出した。全長CD112プラスミドをエレクトロポレーションによってCHO細胞に形質転換し、2週間かけて圧力でスクリーニングし、CD112の発現レベルを調べた。TIGIT-mFcタンパク質を様々な濃度の希釈抗TIGIT抗体とプレインキュベートし、CD112を過剰発現するCHO細胞をインキュベーションのために添加した。PEラベルで標識された抗体は、TIGITシグナルの強度を検出するために追加した。これは、CD112を過剰発現するCHO細胞へのTIGITの結合を遮断する抗体の能力を測定するために使用した。実験手順は具体的に次のように記載する。

ヒト化抗体サンプルを1%BSAで希釈し、20 μg/mLの濃度から9つの濃度ポイントを開始した。一方、TIGIT-mFcは2 μg/mLに希釈した。抗原を様々な濃度の抗体と1：1（体積比）の比率で混合し、37℃で30分間プレインキュベートした。CD112-CHO細胞を収集し、PBSで1回洗浄し、0.5\*10<sup>6</sup>/testで分注した。細胞を抗原抗体混合物150 μlで再懸濁し、4℃で60分間インキュベートし、1%BSAで3回洗浄した。細胞を100 μlのPE-ヤギ抗マウスIgG（Biolegend、405307）希釈溶液に再懸濁し、4℃で40分間インキュベートし、1%BSAで3回洗浄し、200 μlの1%BSAで再懸濁した。各サンプルの平均蛍光強度（MFI）をフローサイトメーターBD FACSCanto IIで読み取った。データをGraphPad Prism 5で分析した。CD112-CHO細胞への抗原の結合の遮断に対するTIGIT抗体の効果を算出した。その結果を図8に示す。

30

試験例10：TIGITを過剰発現するCHO細胞でのTIGIT抗体の結合内在化アッセイ

40

【0118】

細胞表面の抗原に結合した際のTIGIT抗体の内部移行を調べるために、完全長TIGITを過剰発現するCHO細胞でFACSアッセイを行い、TIGIT抗体の内部移行を試験した。実験手順は具体的に次のように記載する。

TIGIT-CHO細胞を2x10<sup>6</sup>/ml、100 μl/ウェルの密度で96ウェル丸底プレート（Corning、カタログ番号32915001）に播種し、遠心分離機（ベックマンコールター、Allegra X-15R遠心分離機）で1500 rpmで5分間遠心分離した。上清を廃棄した。細胞を200 μlの1%BSAに再懸濁し、遠心分離し、再び上清を廃棄した。ヒト化抗体サンプルを1%BSAで4 μg/mLの濃度に希釈し、100 μl/ウェルで細胞に添加して細胞を再懸濁した。再懸濁した細胞を氷上で1時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を1500 rp

50

mで5分間遠心分離し、上清を捨て、細胞を1%BSAで3回洗浄し、10%FBS-DMEM/F-12培養液で再懸濁し、2つの部分に分けた。1つはインキュベーター内で37℃で1時間インキュベートし（内在化グループ）、もう1つは氷上で1時間インキュベートした（結合親和性グループ）。インキュベーション後、細胞を1%BSAで1回洗浄した後、氷上で1%BSAで希釈したPE-抗Fc抗体（Jackson、109-115-098）と1時間インキュベートした。細胞を1%BSAで3回洗浄し、1%BSAに再懸濁した。各サンプルのMFIをフローサイトメーターBD FACSCanto IIで読み取った。抗体の内在化率は次式により算出した。注：「ブランク」とは、1%BSAで希釈したPE-抗Fc抗体のみで、抗TIGIT抗体なしで、氷上で1時間インキュベートし、3回洗浄して再懸濁した後、MFIが読み取られたことを意味する。その結果を図9に示す。

10

内在化率% = (結合親和性グループ-内在化グループ) \* 100 / (結合親和性グループ-空白グループ)

試験例11：ナチュラルキラー細胞（NK）の細胞殺傷アッセイ

【0119】

NK細胞殺傷機能に対するTIGIT抗体の効果を研究するために、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を収集して精製し、ナチュラルキラー細胞（NK）を抽出し、ヒト結腸直腸癌細胞株WiDrと4時間共培養し、乳酸脱水素酵素（LDH）の分泌レベルを検出した。実験手順は具体的に次のように記載する。

ヒト結腸直腸癌細胞株WiDrは、10%（v/v）ウシ胎児血清（FBS）を添加したMEM培地で37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。PBMCは、Ficoll-Hypaque密度勾配遠心分離（Stem Cell Technologies）により新鮮な血液から得た。ヒト初代NK細胞は、新しく分離されたPBMC（Miltenyi、カタログ番号130-092-657）から抽出し、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で、10%（v/v）FBSを添加したRPMI 1640培地の中で培養した。

20

ヒト初代NK細胞を6ウェル細胞培養プレートに約2x10<sup>6</sup>/mlの細胞密度で播種し、100 U/mLのヒトIL-2を添加して終夜インキュベートした。細胞をフェノールレッドを含まないRPMI 1640培地で洗浄し、再懸濁し、細胞密度約3x10<sup>5</sup>/ウェルで96ウェルU底プレートに播種した。一方、連続希釈抗体サンプル（PBSで希釈）または同量のホモIgG（ブランクコントロールとして）を追加した。37℃、5%CO<sub>2</sub>で1時間インキュベートした後、標的細胞WiDrをヒト初代NK細胞と1：1の比率で、37℃、5%CO<sub>2</sub>で4時間共培養した。胞培養上清を回収した。細胞培養上清に分泌されたLDHのレベルは、製造元の指示に従ってCytoTox96（登録商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Promega、カタログ番号G1780）を用いて測定した。特定の細胞溶解の割合は、次の式：溶解率= 100 × (ER-SR1-SR2) / (MR-SR1) で測定した。ここで、ER、SR（1&2）及びMRは実験的な自然発生（「1」）標的細胞については「2」、ヒト初代NK細胞については「2」）及び最大LDH放出を示す。自然放出は、培地のみで培養された標的細胞またはヒト初代NK細胞によるLDHの放出で、最大放出は、全ての標的細胞が溶解緩衝液によって溶解されたときに測定されたLDHであった。結果を図10Aまたは図10Bと次の表に示す。ヒト化TIGIT候補抗体h1707-02、h1708-04、h1710-01及びその他の抗体は、ヒト初代NK細胞による標的細胞の殺傷を様々な程度に高め、薬物濃度依存的な効果を示す。

30

|           | h1707-02 | h1708-04 | 22G2-H3Q |
|-----------|----------|----------|----------|
| IC50 (nM) | 0.9      | 1.29     | 5.78     |

40

|           | h1710-01 | 22G2-H3Q |
|-----------|----------|----------|
| IC50 (nM) | 0.38     | 2.23     |

試験例12：PBMC-Tリンパ球活性化の実験

【0120】

50

ヒト一次Tリンパ球機能に対するTIGIT抗体の影響を調べるために、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を収集して精製した。分泌されたサイトカインIFN $\gamma$  のレベルは、5日間ツベルクリン (TB) をin vitroで刺激した後に測定した。実験手順は具体的に次のように記載する。

Ficoll-Hypaque密度勾配遠心分離 (Stem Cell Technologies) により新鮮な血液からPBMCを得て、10% (v/v) FBSが補充されたRPMI 1640培地で37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ で培養した。

新たに精製されたPBMCの密度は、RPMI 1640培地で $2 \times 10^6$ /mlに調整した。25 $\mu$ lのツベルクリンを20 mLの細胞懸濁液に加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ で5日間培養した。5日目に、CD155 (組換えCD155/PVRタンパク質、R&D、2530-CD-050/CF) を96ウェル細胞培養プレートに0.25 $\mu$ g/ウェルに加え、4 $^{\circ}$ Cで終夜コーティングした。6日目に、上記の培養細胞を収集し、遠心分離し、PBSで1回洗浄し、新鮮なRPMI 1640培地に再懸濁して密度を $1 \times 10^6$ /mlに調整した。細胞を、CD155コーティングした96ウェル細胞培養プレートに、ウェルあたり90 $\mu$ lで播種した。連続希釈抗体サンプル (PBSで希釈) または等量のアイソタイプIgG (ブランクコントロールとして) をウェルあたり10 $\mu$ l添加した。細胞培養プレートをインキュベーター内で37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ で3日間インキュベートした。細胞培養プレートを取り出し、4000rpmで10分間遠心分離した。細胞培養上清を回収し、IFN $\gamma$  のレベルをELISA法 (ヒトIFN $\gamma$  検出キット、NEOBioscience、EHC 102g.96) で製造元の指示に従って測定した。その結果を図11に示す。TIGITヒト化候補抗体h1708-04、h1710-01及びその他の抗体は、活性化された初代Tリンパ球から分泌されるサイトカインIFN $\gamma$  のレベルを様々な程度に増加させ、薬物濃度依存的な効果を示した。

試験例 1 3 : ラットにおけるヒト化TIGIT抗体の薬物動態学的評価

【 0 1 2 1 】

体重180~240gのSD雄ラットは、Sippr-BK実験動物株式会社から購入した。給餌期間中、餌と水を自由に摂取させなかった。実験室環境への適応は3日以上で、12/12時間の明/暗サイクル調整、温度16~26 $^{\circ}$ C、相対湿度40~70%であった。実験開始の1日前に、SDラットに付番号し、ランダムに群分けし、各群に3匹のラットとした。実験当日、5つの群に、それぞれ試験薬h1707-02、h1708-04、h1710-01、h1711-04及びh1709-10を静脈内または皮下に注射した。22G2-H3Qを3 mg/kgの用量で陽性対照として使用した。全ての群において、注入量は5 ml/kgであった。

静脈内注射の場合、血液サンプルは、投与後5分、8時間、1日、2日、4日、7日、10日、14日、21日及び28日の時点で採取した。皮下注射の場合、血液サンプルは、投与後1時間、4時間、8時間、1日、2日、4日、8日、11日、14日、21日、及び28日の前の時点で採取した。各動物について、抗凝固剤の非存在下で全血0.2 mlを採取した。血液サンプルを4 $^{\circ}$ Cで30分間放置し、1000 gで15分間遠心分離し、上澄みをEPチューブに取り出し、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

抗体の血清濃度をELISA法 (実施例3及び試験例1を参照) により測定し、試験薬物の薬物動態パラメーターをWinnolinソフトウェアで計算した。主な薬物動態の結果を図12に示す。

該検出から、ラットにおける抗TIGIT抗体h1707-02、h1708-04、h1710-01、h1709-10及びh1711-04の暴露量は、SDラットに上記の抗体3 mg/kgを静脈内投与した後も同様であったことが分かった。皮下投与後の生物学的利用率は高く、ほぼ100%であった。各抗体の消失半減期は22G2-H3Q抗体のそれよりも長かった。

試験例 1 4 : UNITテストによるヒト化TIGIT抗体の熱安定性の検出

【 0 1 2 2 】

異なる緩衝系の熱安定性を比較した。異なるpHに対応する例示的な緩衝液系は、10mM PBS (pH7.4)、15mM His (pH6.0) 及び10mM酢酸 (pH5.2) であった。試料をそれぞれ対応する緩衝液に溶解し、濃度を約50mg/mlに制御した。検出はUNITにより実施した。検出のため、気泡を避けて、9 $\mu$ lのサンプルを機器内に装備されたサンプルスロットにピペットで移した。サンプルスロットをしっかりと固定し、機器に配置した。実行パラ

メータは次のように設定した。インキュベーション0s; レート0.3 /分; プレートホールド5s; 終了温度95 。 h1707-02、h1708-04、h1710-01、h1709-10、h1711-04及びその他の抗体は、いくつかの試験系で良好な熱安定性を示した。

(表5) 抗体の熱安定性

| タンパク質    | 緩衝液               | Tagg<br>(°C) | Tonset(°C) | Tm1(°C) | Tm2(°C) |
|----------|-------------------|--------------|------------|---------|---------|
| h1707-02 | PBS<br>(pH7.4)    | 69.0         | 61.0       | 70.49   |         |
| h1711-04 | 10mM<br>酢酸緩<br>衝液 | 74.3         | 54.3       | 69.7    | 80.7    |
| h1709-10 | (pH5.2)           | 74.5         | 59.6       | 69.4    |         |
| h1708-04 |                   | 71.5         | 60.4       | 69.4    | 78.3    |
| h1710-01 |                   | 76.8         | 57.2       | 67.7    | 77.6    |

試験例15: SEC-HPLCでサンプル純度のモニタリングによる特定濃度でのサイクル安定性の調査

【0123】

抗体を80 で5回の凍結融解サイクルを行った後、4 で保管し、40 で28日間保管した後、抗体の安定性を、10mM PBS (pH7.4)、15mM His (pH6.0)、10mM酢酸 (pH5.2) 中の約50mg/mlの濃度など、様々な例示的な条件下で比較した。抗体の純度は、Xbridge protein BEH SEC 200A (Waters) HPLCカラムで検出した。H1707-02、h1708-04、h1709-10、h1710-01、h1711-04などは全て良好な安定性を示し、SEC純度は40 で1か月間加速した後でも大幅に変化しなかった。

10

20

30

40

50

| 抗体       | 緩衝液                       | 初期純度   | -80°Cで<br>5回凍結融解 | 4°Cで<br>28日間 | 40°Cで<br>28日間 |
|----------|---------------------------|--------|------------------|--------------|---------------|
| H1707-02 | PBS 緩衝液<br>(pH7.4)        | 98.16% | 98.39%           | 97.82%       | 94.91%        |
| H1711-04 |                           | 98.00% |                  |              | 96.79%        |
| H1709-10 |                           | 97.20% |                  |              | 96.03%        |
| H1708-04 |                           | 98.68% | 98.76%           | 98.70%       | 97.68%        |
| H1710-01 |                           | 98.73% |                  | 98.73%       | 97.96%        |
| H1707-02 | 10mM 酢酸<br>緩衝液<br>(pH5.2) | 99.37% | 99.78%           | 99.34%       | 98.42%        |
| H1711-04 |                           | 98.00% |                  |              | 97.58%        |
| H1709-10 |                           | 97.29% |                  |              | 96.73%        |
| H1708-04 |                           | 98.61% | 98.40%           | 98.71%       | 97.80%        |
| H1710-01 |                           | 98.77% |                  | 98.77%       | 98.63%        |
| H1707-02 | His 緩衝液<br>(pH6.0)        | 99.73% | 99.73%           | 99.61%       | 98.64%        |
| H1711-04 |                           | 98.31% |                  |              | 97.64%        |
| H1709-10 |                           | 97.89% |                  |              | 96.68%        |
| H1708-04 |                           | 98.95% | 99.10%           | 99.09%       | 98.06%        |
| H1710-01 |                           | 98.93% |                  | 98.93%       | 98.79%        |

10

20

30

#### 試験例 16 : 抗体の化学的安定性

##### 【0124】

h1707-02、h1708-04、h1709-10、h1710-01、h1711-04などの抗体分子の化学的安定性を調べた。

試験する抗体500 µgを500 µlのPBS pH7.4に溶解し、40 °Cの水浴でインキュベートした。酵素消化実験のために、サンプルをそれぞれ0日目、14日目、28日目に採取した。様々な時点で採取した100 µgのサンプルを100 µlの0.2 M His-HCl、8 M Gua-HCl pH 6.0に溶解し、3 µlの0.1g/mL DTTを添加し、50 °Cの水浴で1分間インキュベートした後、0.02 M His-HCl pH6.0で2回限外濾過した。3 µlの0.25 mg/mLトリプシンを加え、酵素消化のために37 °Cの水浴で終夜インキュベートした。LC-MS分析は、Agilent 6530 Q-TOFを用いて行った。その結果、40 °Cで1か月加速した後、h1707-02、h1708-04、h1709-10、h1710-01及びh1711-04は、水の損失、酸化、脱アミドなどの不安定な変化を示さなかった。分子が良好な化学的安定性を有することが示唆された。

40

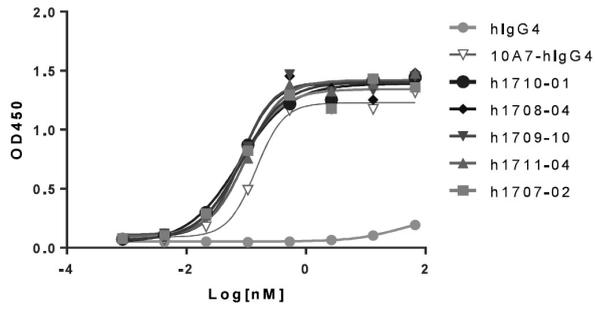
##### 【0125】

添付図面及び実施例を用いて上述の発明を詳細に説明した。しかし、説明及び例は、本開示の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に引用された全ての特許及び科学文献の開示は、その全体が参照により明示的に組み込まれている。

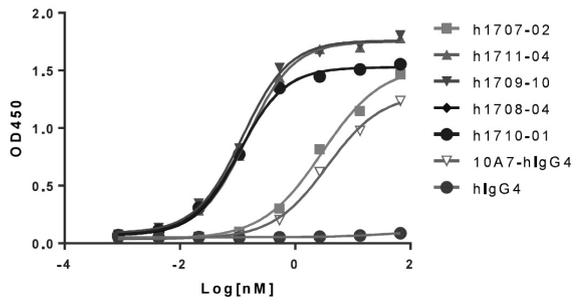
50

【 図面 】

【 図 1 】

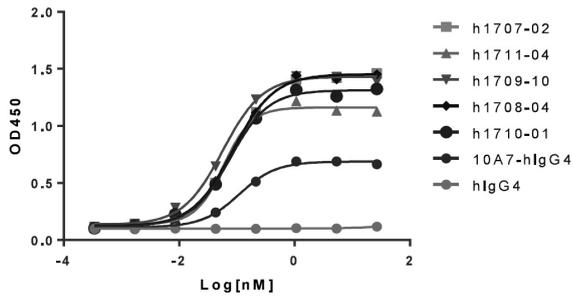


【 図 2 】

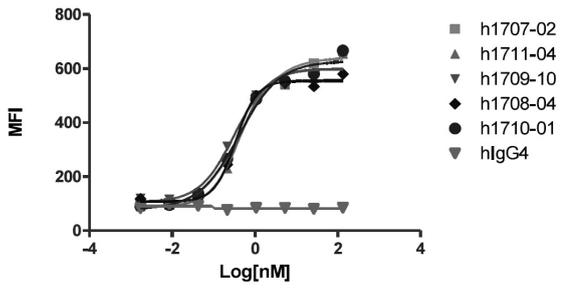


10

【 図 3 】

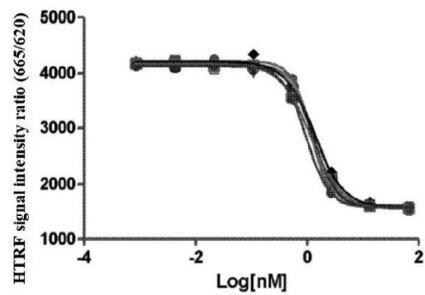


【 図 4 】

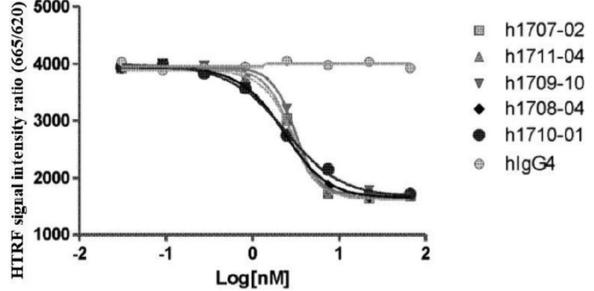


20

【 図 5 A 】



【 図 5 B 】

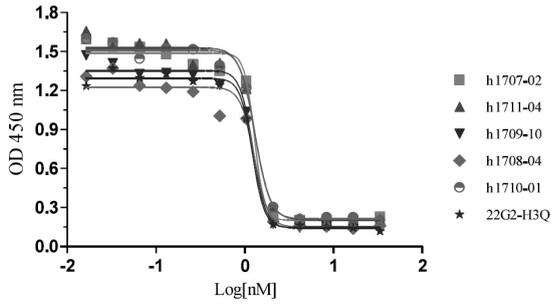


30

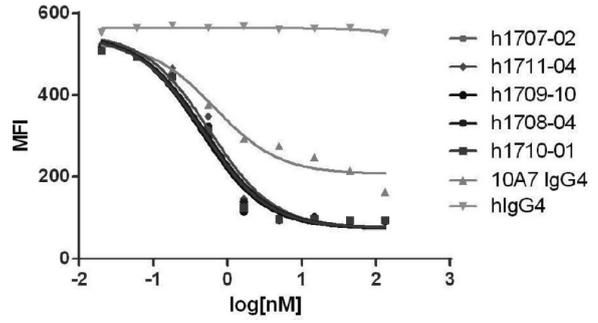
40

50

【 6 】

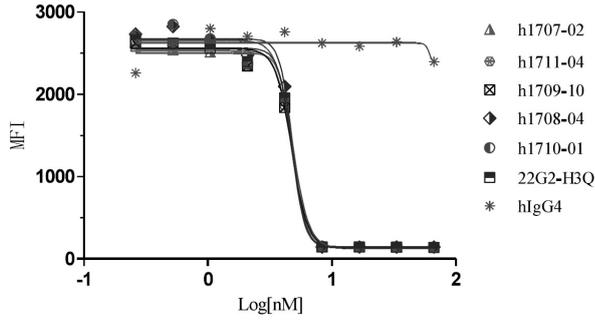


【 7 】

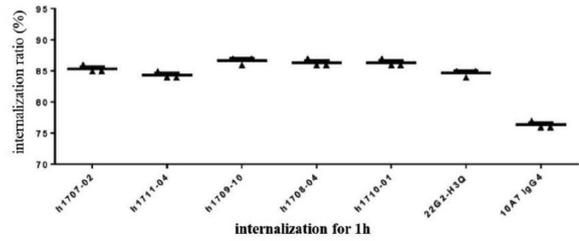


10

【 8 】

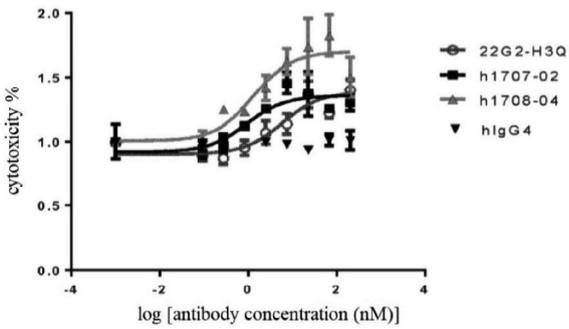


【 9 】

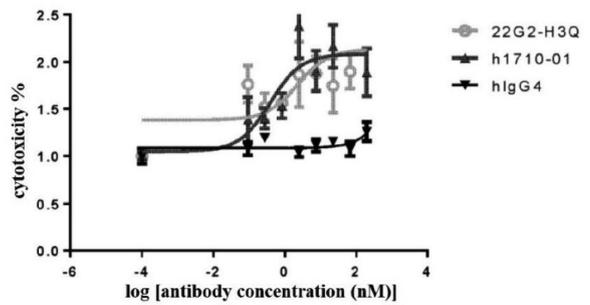


20

【 10 A 】



【 10 B 】

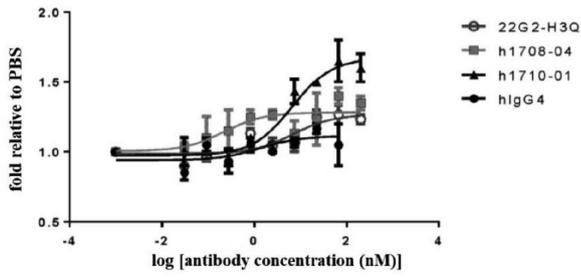


30

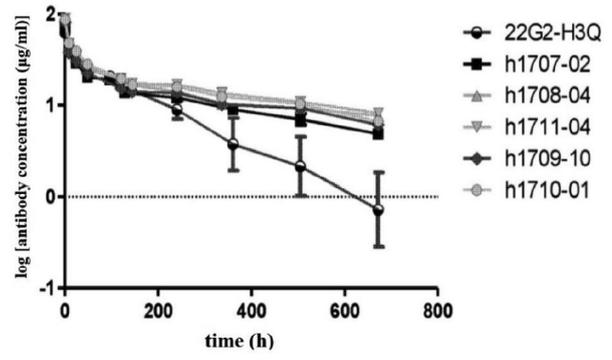
40

50

【 1 1 】



【 1 2 】



10

【 配列表 】

[0007317272000001.app](#)

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)  
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)  
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)  
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)  
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)

## F I

C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 N 5/10  
 C 1 2 P 21/08  
 A 6 1 K 39/395 U  
 A 6 1 P 37/02  
 A 6 1 P 35/00  
 A 6 1 P 31/00  
 G 0 1 N 33/53 N

(54)【発明の名称】 権を主張する。その開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

T D .

中華人民共和国 シャンハイ、ミンシン・ディストリクト、ウェンジン・ロード No. 279

(74)代理人 110003007

弁理士法人謝国際特許商標事務所

(72)発明者 フー、ヤユエン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No. 279

(72)発明者 サオ、ジョアシアオ

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No. 279

(72)発明者 フ、チーユエ

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No. 279

(72)発明者 タオ、ウェイカン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン・ディストリクト ウェンジン・ロード No. 279

審査官 小田 浩代

(56)参考文献

国際公開第2017/037707 (WO, A1)  
 国際公開第2016/106302 (WO, A1)  
 国際公開第2016/028656 (WO, A1)  
 国際公開第2017/059095 (WO, A1)  
 国際公開第2017/152088 (WO, A1)  
 米国特許出願公開第2016/0176963 (US, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 U n i P r o t / G e n e S e q  
 P u b M e d