



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I888366 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：109103414

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 16 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

(30)優先權：2013/07/16 美國 61/846,941

2013/08/13 美國 61/865,582

2014/03/10 美國 61/950,754

2014/04/29 美國 61/985,884

2014/05/12 美國 61/992,109

(71)申請人：美商建南德克公司(美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：葛洛甘 珍 GROGAN, JANE (AU)；強斯頓 羅伯特 J JOHNSTON, ROBERT J.

(US)；艾賓 布萊恩 IRVING, BRYAN (US)；駭克尼 傑森 HACKNEY, JASON

(US)；余 辛 YU, XIN (US)；伊頓 丹 EATON, DAN (US)；波里斯 克莉絲汀

BOWLES, KRISTIN (CA)；康 艾格 蕾蒂西亞 COMPS-AGRAR, LAETITIA (FR)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN 101213297A

審查人員：吳祖漢

申請專利範圍項數：71 項 圖式數：37 共 249 頁

(54)名稱

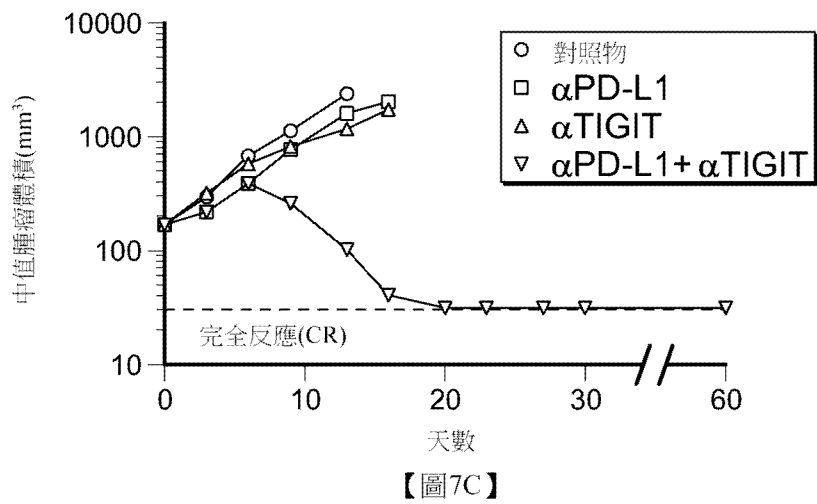
利用 PD-1 軸結合拮抗劑及 TIGIT 抑制劑治療癌症之方法

(57)摘要

本發明描述組合療法，其包含 PD-1 軸結合拮抗劑及降低或抑制 TIGIT 表現及/或活性之藥劑，及其使用方法，包括治療需要增強免疫原性之病狀，諸如提高腫瘤免疫原性以用於治療癌症或慢性感染之方法。

The present invention describes combination treatment comprising a PD-1 axis binding antagonist and an agent that decreases or inhibits TIGIT expression and/or activity and methods for use thereof, including methods of treating conditions where enhanced immunogenicity is desired such as increasing tumor immunogenicity for the treatment of cancer or chronic infection.

指定代表圖：





I888366

【發明摘要】

【中文發明名稱】

利用PD-1軸結合拮抗劑及TIGIT抑制劑治療癌症之方法

【英文發明名稱】

METHODS OF TREATING CANCER USING PD-1 AXIS

BINDING ANTAGONISTS AND TIGIT INHIBITORS

【中文】

本發明描述組合療法，其包含PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑，及其使用方法，包括治療需要增強免疫原性之病狀，諸如提高腫瘤免疫原性以用於治療癌症或慢性感染之方法。

【英文】

The present invention describes combination treatment comprising a PD-1 axis binding antagonist and an agent that decreases or inhibits TIGIT expression and/or activity and methods for use thereof, including methods of treating conditions where enhanced immunogenicity is desired such as increasing tumor immunogenicity for the treatment of cancer or chronic infection.

【指定代表圖】

圖7C

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

利用PD-1軸結合拮抗劑及TIGIT抑制劑治療癌症之方法

【英文發明名稱】

METHODS OF TREATING CANCER USING PD-1 AXIS
BINDING ANTAGONISTS AND TIGIT INHIBITORS

【技術領域】

本發明描述組合療法，其包含PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑，及其使用方法。

【先前技術】

向T細胞提供兩種不同信號為廣泛接受的抗原呈現細胞(APC)對休眠T淋巴細胞之淋巴細胞活化的模型。Lafferty等人, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53: 27-42 (1975)。此模型進一步提供自體與非自體及免疫耐受性之辨別。Bretscher等人, Science 169: 1042-1049 (1970)；Bretscher, P.A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999)；Jenkins等人, J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987)。在識別主要組織相容複合物(MHC)之情形下呈現之外來抗原胜肽後，主要信號或抗原特異性信號經由T細胞受體(TCR)轉導。第二或共刺激信號藉由表現於抗原呈現細胞(APC)上之共刺激分子傳遞至T細胞，且誘使T細胞促進純系擴增、細胞因子分泌及效應功能。Lenschow等人, Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996)。在不存在共刺激之情況下，T細胞可變得對抗原刺激具有抗性，引起對外來或內源抗原之耐受性反應。

在兩信號模型中，T細胞接收陽性共刺激及陰性共抑制信號。對該等陽性及陰性信號之調節對最大化宿主之保護性免疫反應至關重要，同時保持免疫耐受性且防止自體免疫。陰性信號似乎為誘導T細胞耐受性所需要的，而陽性信號促進T細胞活化。

向曝露於抗原之T細胞提供共刺激及共抑制信號，且共刺激信號與共抑制信號之間的相互作用為控制免疫反應量級所必需的。此外，提供至T細胞之信號隨感染或免疫誘發消除、劣化或持續而變化，且此等變化強烈影響回應T細胞且使免疫反應再成形。

共刺激機制具有治療利益，因為已證實操縱共刺激信號可提供促進或終止基於細胞之免疫反應的手段。最近，已發現T細胞功能不全或能力缺失與抑制受體(程式化死亡1多肽(PD-1))之經誘導及持久表現同時發生。作為結果，治療靶向PD-1及其他經由與PD-1之相互作用而信號傳導之分子(諸如程式化死亡配位體1 (PD-L1)及程式化死亡配位體2 (PD-L2))受到強烈關注。

PD-L1在多種癌症中過表現且常常與不良預後相關(Okazaki T等人, Intern. Immun. 2007 19(7):813)(Thompson RH等人, Cancer Res 2006, 66(7):3381)。有趣的是，與正常組織中之T淋巴細胞及周邊血液T淋巴細胞形成對比，大部分腫瘤浸潤性T淋巴細胞主要表現PD-1，表明腫瘤反應性T細胞上之PD-1之上調可促使抗腫瘤免疫反應減弱(Blood 2009 114(8):1537)。此可歸因於使用由表現PD-L1之腫瘤細胞與表現PD-1之T細胞相互作用介導之PD-L1信號傳導，引起T細胞活化減弱及逃避免疫監視(Sharpe等人, Nat Rev 2002)(Keir ME等人, 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677)。因此，抑制PD-L1/PD-1相互作用可促進CD8+ T細胞介導之腫瘤殺死。

已提議將抑制PD-1軸經由其直接配位體(例如PD-L1、PD-L2)進行之信號傳導作為增強用於治療癌症(例如腫瘤免疫性)之T細胞免疫性之手段。此外，已藉由抑制PD-L1與結合搭配物B7-1之結合觀測到T細胞免疫

性之類似增強。此外，與抑制藉由在腫瘤細胞中失調之其他信號傳導路徑進行之PD-1信號傳導組合可進一步增強治療功效。仍需要用於治療、穩定、預防及/或延緩各種癌症之發展的此類最佳療法。

本文中揭示之所有參考文獻、公開案及專利申請案均以全文引用的方式併入本文中。

【發明內容】

本發明描述組合療法，其包含PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。

本文中提供用於治療個體中之癌症或延緩其進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。

本文中亦提供用於減少或抑制個體中癌症復發或癌症進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。

本文中亦提供用於治療個體中之免疫相關疾病或延緩其進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。

本文中亦提供用於降低或抑制個體中免疫相關疾病之進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。

在一些實施例中，免疫相關疾病與T細胞功能異常病症相關。在一些實施例中，T細胞功能異常病症係由對抗原刺激之反應降低表徵。在一些實施例中，T細胞功能異常病症係由T細胞能力缺失或分泌細胞激素、增

殖或執行溶細胞活性之能力降低來表徵。在一些實施例中，T細胞功能異常病症係由T細胞耗竭表徵。在一些實施例中，T細胞為CD4+及CD8+ T細胞。在一些實施例中，免疫相關疾病係選自由以下組成之群：起因不明的急性感染、慢性感染及腫瘤免疫性。

本文中亦提供增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其係藉由投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。

本文中亦提供治療個體中之癌症或延緩其進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

本文中亦提供用於減少或抑制個體中癌症復發或癌症進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

本文中亦提供用於治療個體中之免疫相關疾病或延緩其進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

本文中亦提供用於降低或抑制個體中免疫相關疾病之進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

在一些實施例中，免疫相關疾病與T細胞功能異常病症相關。在一些實施例中，T細胞功能異常病症係由對抗原刺激之反應降低表徵。在一些實施例中，T細胞功能異常病症係由T細胞能力缺失或分泌細胞激素、增殖或執行溶細胞活性之能力降低來表徵。在一些實施例中，T細胞功能異常病症係由T細胞耗竭表徵。在一些實施例中，T細胞為CD4+及CD8+T細

胞。在一些實施例中，免疫相關疾病係選自由以下組成之群：起因不明的急性感染、慢性感染及腫瘤免疫性。

本文中亦提供增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其藉由投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

在一些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑能夠增加及/或刺激CD226表現及/或活性。

在一些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑係選自抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑、TIGIT表現及/或活性之拮抗劑、PVR表現及/或活性之拮抗劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞信號傳導的藥劑。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑為小分子抑制劑，抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。

在一些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。

在一些實施例中，PVR表現及/或活性之拮抗劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制

性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

本發明亦描述組合治療，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑。

本文中提供增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其係藉由投與個體有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑。

在一些實施例中，該一或多種額外免疫共抑制性受體係選自由以下組成之群：PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA及VISTA。在一些實施例中，該一或多種額外免疫共抑制性受體係選自PD-1、CTLA-4、LAG3及TIM3之群。

本發明亦描述組合治療，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑。

本文中提供增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其係藉由投與個體有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑。

在一些實施例中，一或多種額外免疫共刺激性受體係選自由以下組成之群：CD226、OX-40、CD28、CD27、CD137、HVEM及GITR。在一些實施例中，一或多種額外免疫共刺激性受體係選自CD226、OX-40、CD27、CD137、HVEM及GITR之群。在一些實施例中，一或多種額外免疫共刺激性受體係選自由OX-40及CD27組成之群。

在一些實施例中，以上方法中之任一種進一步包含投與至少一種化學治療劑。

在一些實施例中，以上方法中之任一種中之個體患有癌症。在一些實施例中，以上方法中之任一種中之個體為人類。

在一些實施例中，與投與組合之前相比，個體中之CD4及/或CD8 T細胞具有增加或增強之激活、活化、增殖、細胞因子釋放及/或溶細胞活性。

在一些實施例中，與投與組合之前相比，CD4及/或CD8 T細胞數目升高。在一些實施例中，與投與組合之前相比，活化之CD4及/或CD8 T細胞數目升高。在一些實施例中，活化之CD4及/或CD8 T細胞係由產生 γ -IFN⁺之CD4及/或CD8 T細胞及/或與投與組合之前相比溶細胞活性增強來表徵。在一些實施例中，CD4及/或CD8 T細胞呈現選自由以下組成之群之細胞激素的增加之釋放：IFN- γ 、TNF- α 及介白素。

在一些實施例中，CD4及/或CD8 T細胞為效應子記憶T細胞。在一些實施例中，CD4及/或CD8效應子記憶T細胞係由產生 γ -IFN⁺之CD4及/或CD8 T細胞及/或增強之溶細胞活性表徵。在一些實施例中，CD4及/或CD8效應子記憶T細胞係由具有CD44^高 CD62L^低之表現表徵。

在一些實施例中，以上方法中之任一種中之癌症均具有升高之T細胞浸潤水準。

在一些實施例中，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係選自由以下組成之群：TIGIT表現及/或活性之拮抗劑、PVR表現及/或活性之拮抗劑及抑制由結合於PVR之TIGIT介導之相互作用及/或細胞內信號傳導的藥劑。

在一些實施例中，**TIGIT**表現及/或活性之拮抗劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，**PVR**表現及/或活性之拮抗劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制由結合於**PVR**之**TIGIT**介導之細胞內信號傳導的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，**TIGIT**表現及/或活性之拮抗劑為抗**TIGIT**抗體或其抗原結合片段。

在一些實施例中，抗**TIGIT**抗體或其抗原結合片段包括至少一個包含選自以下之胺基酸序列的HVR：胺基酸序列**KSSQSLYYSGVKENLLA** (SEQ ID NO:1)、**ASIRFT** (SEQ ID NO:2)、**QQGINNPLT** (SEQ ID NO:3)、**GFTFSSFTMH** (SEQ ID NO:4)、**FIRSGSGIVFYADAVRG** (SEQ ID NO:5)及**RPLGHNTFDS** (SEQ ID NO:6)或**RSSQSLVNSYGNTFLS** (SEQ ID NO:7)、**GISNRFS** (SEQ ID NO:8)、**LQGTHQPPT** (SEQ ID NO:9)、**GYSFTGHLMN** (SEQ ID NO:10)、**LIIPYNGGTSYNQKFKG** (SEQ ID NO:11)及**GLRGFYAMDY** (SEQ ID NO:12)。

在一些實施例中，抗**TIGIT**抗體或其抗原結合片段包括輕鏈，其包含**DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPG**
QSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQ
QGINNPLTFGDGTKLEIKR (SEQ ID NO:13)或**DVVLTQTPLSLSVSF**

GDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNRFSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYCYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK
(SEQ ID NO:14)中闡述之胺基酸序列。

在一些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段包括重鏈，其包含
EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEW
VAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDNANKNLLFLQMNDLKSEDTAMY
YCARRPLGHNTFDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15)或EVQLQQSG
PELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYN
GGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCRGLRG
FYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:16)中闡述之胺基酸序列。

在一些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段包括輕鏈，其包含
DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPG
QSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQ
QGINNPLTFGDGTKLEIKR (SEQ ID NO:13)或DVVLTQTPLSLSVSFG
DQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNRFSGVPD
RFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYCYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK
(SEQ ID NO:14) 中 闡 述 之 胺 基 酸 序 列 ， 且 抗 體 重 鏈 包 含
EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEW
VAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDNANKNLLFLQMNDLKSEDTAMY
YCARRPLGHNTFDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15)或EVQLQQSG
PELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYN
GGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCRGLRG
FYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:16)中闡述之胺基酸序列。

在一些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段，其中抗體係選自人類化抗體、嵌合抗體、雙特異性抗體、異結合抗體及免疫毒素。

在一些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段包含至少一個與KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO:1)、ASIRFT (SEQ ID NO:2)、QQGINNPLT (SEQ ID NO:3)、GFTFSSFTMH (SEQ ID NO:4)、FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO:5) 及 RPLGHNTFDS (SEQ ID NO:6) 或 RSSQSLVNSYGNTFLS (SEQ ID NO:7)、GISNRFS (SEQ ID NO:8)、LQGTHQPPT (SEQ ID NO:9)、GYSFTGHLMN (SEQ ID NO:10)、LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:11) 及 GLRGFYAMDY (SEQ ID NO:12) 中之任一者中闡述之HVR至少90%一致的HVR。

在一些實施例中，抗TIGIT抗體或其片段包含輕鏈及/或重鏈，該輕鏈及/或重鏈分別包含與DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDGTKLEIKR (SEQ ID NO:13) 或 DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYCYCLQGT HQPPTFGPGTKLEV K (SEQ ID NO:14) 或 EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDNANKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15) 或 EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCRGLRGFYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:16) 中闡述之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。

在一些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑係選自由以下組成之群：PD-1結合拮抗劑、PD-L1結合拮抗劑及PD-L2結合拮抗劑。

在一些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑為PD-1結合拮抗劑。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑抑制PD-1與其配位體結合搭配物之結合。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑抑制PD-1與PD-L1之結合。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑抑制PD-1與PD-L2之結合。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑抑制PD-1與PD-L1及PD-L2之結合。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為抗體。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為MDX-1106 (尼沃單抗(nivolumab))。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為Merck 3475 (拉立珠單抗(lambrolizumab))。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為CT-011 (皮立珠單抗(pidilizumab))。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為AMP-224。

在一些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑為PD-L1結合拮抗劑。在一些實施例中，PD-L1結合拮抗劑抑制PD-L1與PD-1之結合。在一些實施例中，PD-L1結合拮抗劑抑制PD-L1與B7-1之結合。在一些實施例中，PD-L1結合拮抗劑抑制PD-L1與PD-1及B7-1之結合。在一些實施例中，PD-L1結合拮抗劑為抗體。

在一些實施例中，PD-L1結合拮抗劑係選自由以下組成之群：YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105及MEDI 4736。

在一些實施例中，抗PD-L1抗體包含重鏈，其包含GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:17)之HVR-H1序列、AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:18)之HVR-H2序列及RHWPGGFDY (SEQ ID NO:19)之HVR-H3序列；及輕鏈，其包含RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:20)之HVR-L1序列、

SASFLYS (SEQ ID NO:21) 之 HVR-L2 序列及 QQYLYHPAT (SEQ ID NO:22) 之 HVR-L3 序列。

在一些實施例中，抗 PD-L1 抗體包含重鏈可變區，其包含 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLE WVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:23) 之胺基酸序列，及輕鏈可變區，其包含 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDV STAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:24) 之胺基酸序列。

在一些實施例中，PD-1 軸結合拮抗劑為 PD-L2 結合拮抗劑。在一些實施例中，PD-L2 結合拮抗劑為抗體。在一些實施例中，PD-L2 結合拮抗劑為免疫黏附素。

在一些實施例中，所治療之癌症係選自由以下組成之群：非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、間皮瘤、黑素瘤、頭頸癌、甲狀腺癌、內瘤、前列腺癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈樣真菌病、梅克爾細胞癌及其他血液科惡性疾病。

在一些實施例中，持續投與降低或抑制 TIGIT 表現及/或活性之藥劑。在一些實施例中，間歇投與降低或抑制 TIGIT 表現及/或活性之藥劑。在一些實施例中，降低或抑制 TIGIT 表現及/或活性之藥劑係在 PD-1 軸結合拮抗劑之前投與。在一些實施例中，降低或抑制 TIGIT 表現及/或活性之藥劑係與 PD-1 軸結合拮抗劑同時投與。在一些實施例中，降低或抑制

TIGIT表現及/或活性之藥劑係在PD-1軸結合拮抗劑之後投與。

本文中亦提供套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑之組合治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。

本文中亦提供套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑以及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。

本文中亦提供套組，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。

本文中亦提供套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑之組合以增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。

本文中亦提供套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑以及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。

本文中亦提供套組，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。

本文中亦提供套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑與調節CD226表現及/或活性之藥劑之組合治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。

本文中亦提供套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑以及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。

本文中亦提供套組，其包含調節CD226表現及/或活性之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用調節CD226表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。

本文中亦提供套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑與調節CD226表現及/或活性之藥劑之組合以增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。

本文中亦提供套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑以及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。

本文中亦提供套組，其包含調節CD226表現及/或活性之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用調節CD226表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。

在一些實施例中，包含PD-1軸結合拮抗劑之套組為抗PD-L1抗體。在一些實施例中，包含PD-1軸結合拮抗劑之套組為抗PD-1抗體。在一些實施例中，包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的套組係選自由以

下組成之群：TIGIT表現及/或活性之拮抗劑、PVR表現及/或活性之拮抗劑及抑制由結合於PVR之TIGIT介導之相互作用及/或細胞內信號傳導的藥劑。在一些實施例中，包含TIGIT表現及/或活性之拮抗劑的套組為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。

在一些實施例中，套組包含調節CD226表現及/或活性之藥劑，其能夠增加及/或刺激CD226表現及/或活性。在一些實施例中，包含調節CD226表現及/或活性之藥劑的套組係選自抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑、TIGIT表現及/或活性之拮抗劑、PVR表現及/或活性之拮抗劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑。在一些實施例中，包含抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用之藥劑及/或TIGIT表現及/或活性之拮抗劑的套組為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。

在某些態樣中，本發明提供治療個體中之癌症或延緩其進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。在其他態樣中，本發明提供有效量之PD-1軸結合拮抗劑之用途，其係用於製造用以治療個體中之癌症或延緩其進程之藥劑，其中PD-1軸結合劑係與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的用途，其係用於製造用以治療個體中之癌症或延緩其進程的藥劑，其中降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係與PD-1軸結合拮抗劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於治療癌症或延緩其進程之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於治療癌症或延

緩其進程之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合。

在某些態樣中，本發明提供用於降低或抑制個體中癌症復發或癌症進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。在其他態樣中，本發明提供有效量之PD-1軸結合拮抗劑之用途，其係用於製造用以降低或抑制個體中癌症復發或癌症進程之藥劑，其中PD-1軸結合劑係與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的用途，其係用於製造用以降低或抑制個體中癌症復發或癌症進程的藥劑，其中降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係與PD-1軸結合拮抗劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於降低或抑制癌症復發或癌症進程之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於降低或抑制癌症復發或癌症進程之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合。

在其他態樣中，本發明提供治療個體中之免疫相關疾病之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。在其他態樣中，本發明提供有效量之PD-1軸結合拮抗劑之用途，其係用於製造用以治療個體中之免疫相關疾病或延緩其進程之藥劑，其中PD-1軸結合劑係與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的用途，其係用於製造用以治療個體中之免疫相關疾病或延緩其進程的藥劑，其中降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係與PD-1軸結

合拮抗劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於治療免疫相關疾病或延緩其進程之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於治療免疫相關疾病或延緩其進程之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合。

在其他態樣中，本發明提供一種組合，其包含有效量之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。

在其他態樣中，本發明提供降低或抑制個體中之免疫相關疾病之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。在其他態樣中，本發明提供有效量之PD-1軸結合拮抗劑之用途，其係用於製造用以降低或抑制個體中之免疫相關疾病之進程的藥劑，其中PD-1軸結合劑係與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的用途，其係用於製造用以降低或抑制個體中之免疫相關疾病之進程的藥劑，其中降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係與PD-1軸結合拮抗劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於降低或抑制免疫相關疾病之進程的PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於降低或抑制免疫相關疾病之進程的降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合。

在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，免疫相關疾病與T細胞功能異常病症相關。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，免疫相關疾病為病毒感染。在可與前述實施例中之任一者組合之

某些實施例中，病毒感染為慢性病毒感染。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，T細胞功能異常病症係由對抗原刺激之反應降低表徵。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，T細胞功能異常病症係由T細胞能力缺失或分泌細胞激素、增殖或執行溶細胞活性之能力降低表徵。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，T細胞功能異常病症係由T細胞耗竭表徵。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，T細胞為CD4+及CD8+ T細胞。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，免疫相關疾病係選自由以下組成之群：起因不明的急性感染、慢性感染及腫瘤免疫性。

在其他態樣中，本發明提供提高、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。在其他態樣中，本發明提供有效量之PD-1軸結合拮抗劑之用途，其係用於製造用以增強或刺激個體中之免疫反應或功能之藥劑，其中PD-1軸結合劑係與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的用途，其係用於製造用以增強或刺激個體中之免疫反應或功能的藥劑，其中降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係與PD-1軸結合拮抗劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於增強或刺激免疫反應或功能之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於增強或刺激免疫反應或功能之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合。在其他態樣中，本發明提供一種組合，其包含有效量之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/

或活性之藥劑。

在其他態樣中，本發明提供治療個體中之癌症或延緩其進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。在其他態樣中，本發明提供有效量之PD-1軸結合拮抗劑之用途，其係用於製造用以治療個體中之癌症或延緩其進程之藥劑，其中PD-1軸結合劑係與調節CD226表現及/或活性之藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供有效量之調節CD226表現及/或活性之藥劑的用途，其係用於製造用以治療個體中之癌症或延緩其進程的藥劑，其中調節CD226表現及/或活性之藥劑係與PD-1軸結合拮抗劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於治療癌症或延緩其進程之PD-1軸結合拮抗劑與調節CD226表現及/或活性之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於治療癌症或延緩其進程之調節CD226表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合。

在某些態樣中，本發明提供用於降低或抑制個體中癌症復發或癌症進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。在其他態樣中，本發明提供有效量之PD-1軸結合拮抗劑之用途，其係用於製造用以降低或抑制個體中癌症復發或癌症進程之藥劑，其中PD-1軸結合劑係與調節CD226表現及/或活性之藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供有效量之調節CD226表現及/或活性之藥劑的用途，其係用於製造用以降低或抑制個體中癌症復發或癌症進程的藥劑，其中調節CD226表現及/或活性之藥劑係與PD-1軸結合拮抗劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於降低或抑制癌症復發或癌症進程之PD-1軸結合拮抗劑與調節CD226表現及/或活性之藥劑

的組合。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於降低或抑制癌症復發或癌症進程之調節CD226表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合。

在其他態樣中，本發明提供治療個體中之免疫相關疾病或延緩其進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。在其他態樣中，本發明提供有效量之PD-1軸結合拮抗劑之用途，其係用於製造用以治療個體中之免疫相關疾病或延緩其進程之藥劑，其中PD-1軸結合劑係與調節CD226表現及/或活性之藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供有效量之調節CD226表現及/或活性之藥劑的用途，其係用於製造用以治療個體中之免疫相關疾病或延緩其進程的藥劑，其中調節CD226表現及/或活性之藥劑係與PD-1軸結合拮抗劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於治療免疫相關疾病或延緩其進程之PD-1軸結合拮抗劑與調節CD226表現及/或活性之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於治療免疫相關疾病或延緩其進程之調節CD226表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合。

在其他態樣中，本發明提供一種組合，其包含有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

在其他態樣中，本發明提供降低或抑制個體中免疫相關疾病之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。在其他態樣中，本發明提供有效量之PD-1軸結合拮抗劑之用途，其係用於製造用以降低或抑制個體中免疫相關疾病之進程的藥劑，其中PD-1軸結合劑係與調節CD226表現及/或活性之藥劑組合使用。

在其他態樣中，本發明提供有效量之調節CD226表現及/或活性之藥劑的用途，其係用於製造用以降低或抑制個體中免疫相關疾病之進程的藥劑，其中調節CD226表現及/或活性之藥劑係與PD-1軸結合拮抗劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於降低或抑制免疫相關疾病之進程之PD-1軸結合拮抗劑與調節CD226表現及/或活性之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於降低或抑制免疫相關疾病之進程之調節CD226表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合。

在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，免疫相關疾病與T細胞功能異常病症相關。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，免疫相關疾病為病毒感染。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，病毒感染為慢性病毒感染。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，T細胞功能異常病症係由對抗原刺激之反應降低表徵。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，T細胞功能異常病症係由T細胞能力缺失或分泌細胞激素、增殖或執行溶細胞活性之能力降低表徵。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，T細胞功能異常病症係由T細胞耗竭表徵。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，T細胞為CD4+及CD8+ T細胞。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，免疫相關疾病係選自由以下組成之群：起因不明的急性感染、慢性感染及腫瘤免疫性。

在其他態樣中，本發明提供提高、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。在其他態樣中，本發明提供有效量之PD-1軸結合

拮抗劑之用途，其係用於製造用以增強或刺激個體中之免疫反應或功能之藥劑，其中PD-1軸結合劑係與調節CD226表現及/或活性之藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供有效量之調節CD226表現及/或活性之藥劑的用途，其係用於製造用以增強或刺激個體中之免疫反應或功能的藥劑，其中調節CD226表現及/或活性之藥劑係與PD-1軸結合拮抗劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於增強或刺激免疫反應或功能之PD-1軸結合拮抗劑與調節CD226表現及/或活性之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於增強或刺激免疫反應或功能之調節CD226表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合。在其他態樣中，本發明提供一種組合，其包含有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑為增加及/或刺激CD226表現及/或活性之藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑為增加及/或刺激CD226與PVR之相互作用的藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑為增加及/或刺激由結合於PVR之CD226介導之細胞內信號傳導的藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑係選自由以下組成之群：抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑、TIGIT表現及/或活性之拮抗劑、PVR表現及/或活性之拮抗劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL2之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL3之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳

導的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVRL2之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVRL3之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑及其組合。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑為抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸或抑制性多肽。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑為選自由以下組成之群的抑制性核酸；反義多核苷酸、干擾RNA、催化RNA及RNA-DNA嵌合體。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，反義多核苷酸靶向TIGIT。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，干擾RNA靶向TIGIT。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，催化RNA靶向TIGIT。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，RNA-DNA嵌合體靶向TIGIT。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑為TIGIT表現及/或活性之拮抗劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為選自由以下組成之群的抑制性核酸；反義

多核苷酸、干擾RNA、催化RNA及RNA-DNA嵌合體。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PVR表現及/或活性之拮抗劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例之中任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例之中任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL2之相互作用的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例之中任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL3之相互作用的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導的細胞內信號傳導的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例之中任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL2之相互作用的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例之中任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL3之相互作用的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在其他態樣中，本發明提供提高、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其包含投與個體有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性的

藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體的藥劑。在其他態樣中，本發明提供有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的用途，其係用於製造用以增強或刺激個體中之免疫反應或功能的藥劑，其中降低或抑制TIGIT表現及/或活性的藥劑係與降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體的藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供有效量之降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑的用途，其係用於製造用以增強或刺激個體中之免疫反應或功能的藥劑，其中降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑係與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於增強或刺激免疫反應或功能之降低或抑制TIGIT表現及/或活性的藥劑與降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於增強或刺激免疫反應或功能之降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體的藥劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供一種組合，其包含有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，該一或多種額外免疫共抑制性受體係選自由以下組成之群：PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA、VISTA、B7H4及CD96。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，該一或多種額外免疫共抑制性受體係選自由以下組成之群：PD-1、CTLA-4、LAG3及TIM3。

在其他態樣中，本發明提供提高、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其包含投與個體有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性的藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體的藥劑。在其他態樣

中，本發明提供有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的用途，其係用於製造用以增強或刺激個體中之免疫反應或功能的藥劑，其中降低或抑制TIGIT表現及/或活性的藥劑係與增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體的藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供有效量之增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑的用途，其係用於製造用以增強或刺激個體中之免疫反應或功能的藥劑，其中增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑係與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑組合使用。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於增強或刺激免疫反應或功能之降低或抑制TIGIT表現及/或活性的藥劑與增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供醫藥組合物，其包含用於增強或刺激免疫反應或功能之增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體的藥劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。在其他態樣中，本發明提供一種組合，其包含有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，該一或多種額外免疫共刺激性受體係選自由以下組成之群：CD226、OX-40、CD28、CD27、CD137、HVEM、GITR、MICA、ICOS、NKG2D及2B4。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，該一或多種額外免疫共刺激性受體係選自由以下組成之群：CD226、OX-40、CD27、CD137、HVEM及GITR。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，該一或多種額外免疫共刺激性受體係選自由以下組成之群：OX-40及CD27。

在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，該方法進一步

包含投與至少一種化學治療劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，個體患有癌症。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，個體為人類。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，與投與組合之前相比，個體中之CD4及/或CD8 T細胞具有提高或增強之激活、活化、增殖、細胞活素釋放及/或溶細胞活性。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，與投與組合之前相比，CD4及/或CD8 T細胞之數目升高。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，與投與組合之前相比，活性CD4及/或CD8 T細胞之數目升高。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，與投與組合之前相比，活性CD4及/或CD8 T細胞係由產生 γ -IFN⁺之CD4及/或CD8 T細胞及/或增強之溶細胞活性表徵。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，CD4及/或CD8 T細胞呈現增加之選自由以下組成之群的細胞激素之釋放：IFN- γ 、TNF- α 及介白素。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，CD4及/或CD8 T細胞為效應子記憶T細胞。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，CD4及/或CD8效應子記憶T細胞係由產生 γ -IFN⁺之CD4及/或CD8 T細胞及/或增強之溶細胞活性表徵。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，CD4及/或CD8效應子記憶T細胞係由具有CD44^高 CD62L^低之表現表徵。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，癌症具有升高之T細胞浸潤水準。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係選自由以下組成之群：TIGIT表現及/或活性之拮抗劑、PVR表現及/或活性之拮抗劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL2之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與

PVRL3之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVRL2之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVRL3之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑及其組合。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PVR表現及/或活性之拮抗劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例之中任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例之中任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL2之相互作用的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例之中任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL3之相互作用的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導的細胞內信號傳導的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於PVRL2之TIGIT介導的細胞內信號傳導的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片

段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於PVRL3之TIGIT介導的細胞內信號傳導的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為選自由以下組成之群的抑制性核酸：反義多核苷酸、干擾RNA、催化RNA及RNA-DNA嵌合體。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，反義多核苷酸靶向TIGIT。

在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，干擾RNA靶向TIGIT。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，催化RNA靶向TIGIT。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，RNA-DNA嵌合體靶向TIGIT。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段包含至少一個包含選自以下胺基酸序列之胺基酸序列的HVR：

(1) KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO:1)、ASIRFT (SEQ ID NO:2)、QQGINNPLT (SEQ ID NO:3)、GFTFSSFTMH (SEQ ID NO:4)、FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO:5)及RPLGHNTFDS (SEQ ID NO:6)；或(2) RSSQSLVNSYGNTFLS (SEQ ID NO:7)、GISNRFS (SEQ ID NO:8)、LQGTHQPPT (SEQ ID NO:9)、GYSFTGHLMN (SEQ ID NO:10)、LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:11) 及 GLRGFYAMDY (SEQ ID NO:12)。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段，其中抗體輕鏈包含

DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKP
GQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFC
QQGINNPLTFGDGTKLEIKR (SEQ ID NO:13) 或 DVVLTQTPLSLSV
SFGDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYYCLQGTHQPPTFGPGTK
LEVK (SEQ ID NO:14)中闡述之胺基酸序列。在可與前述實施例中之任
一者組合之某些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段，其中抗體重
鏈包含EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPG
KGLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDNANKNLLFLQMNDLKSE
DTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15) 或
EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLE
WIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAV
YFCSRGLRGFYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:16)中闡述之胺基
酸序列。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗TIGIT抗
體或其抗原結合片段，其中抗體輕鏈包含DIVMTQSPSSLAVSPGEK
VTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQSPKLLIYYASIRFTGV
PDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDGTKLE
IKR (SEQ ID NO:13) 或 DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVN
SYGNTFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLK
ISTIKPEDLGMYYYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO:14)中闡
述之胺基酸序列，且抗體重鏈包含EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEA
SGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTIS
RDNANKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQGTLVT

VSS (SEQ ID NO:15)或EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKAS**GYSFTG**
HLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSS
 STAYMELLSLTSDDSAVYFCSR**GLRGFYAMDYWGQG**TSVTVSS

(SEQ ID NO: 16)中闡述之胺基酸序列。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段，其中抗體係選自由以下組成之群：人類化抗體、嵌合抗體、雙特異性抗體、異結合抗體及免疫毒素。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段包含至少一個與以下中之任一者中闡述之HVR至少90%一致的HVR：(1) KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO:1)、ASIRFT (SEQ ID NO:2)、QQGINNPLT (SEQ ID NO:3)、GFTFSSFTMH (SEQ ID NO:4)、FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO:5)及RPLGHNTFDS (SEQ ID NO:6)；或(2) RSSQSLVNSYGN TFLS (SEQ ID NO:7)、GISNRFS (SEQ ID NO:8)、LQGTHQPPT (SEQ ID NO:9)、GYSFTGHLMN (SEQ ID NO:10)、LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:11)及GLRGFYAMDY (SEQ ID NO:12)。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗TIGIT抗體或其片段包含輕鏈，其包含與DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQ QKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQ YFCQQGINNPLTFGDGTKLEIKR (SEQ ID NO:13)或DVVLTQTPLSL SVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGN TFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYCYCLQGTHQPPTFGPG TKLEVK (SEQ ID NO:14)中闡述之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列；及/或重鏈，其包含與EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEAS**GFTF**

SSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDN
KNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQGT LVTVSS
 (SEQ ID NO:15)或**EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLM**
NWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY
MELLSLTSDDSAVYFCRGLRGFYAMDYWGQGT SVTVSS (SEQ ID
 NO:16)中闡述之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。在可與前述實
 施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑係選自由以下
 組成之群：PD-1結合拮抗劑、PD-L1結合拮抗劑及PD-L2結合拮抗劑。在
 可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑為
 PD-1結合拮抗劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，
 PD-1結合拮抗劑抑制PD-1與配位體結合搭配物之結合。在可與前述實施
 例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1結合拮抗劑抑制PD-1與PD-L1
 之結合。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1結合
 拮抗劑抑制PD-1與PD-L2之結合。在可與前述實施例中之任一者組合之某
 些實施例中，PD-1結合拮抗劑抑制PD-1與PD-L1及PD-L2之結合。在可
 與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1結合拮抗劑為抗
 體。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1結合拮抗
 劑為MDX-1106。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，
 PD-1結合拮抗劑為MK-3475。在可與前述實施例中之任一者組合之某些
 實施例中，PD-1結合拮抗劑為CT-011。在可與前述實施例中之任一者組
 合之某些實施例中，PD-1結合拮抗劑為AMP-224。在可與前述實施例中
 之任一者組合之某些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑為PD-L1結合拮抗劑。
 在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1結合拮抗劑抑

制PD-L1與PD-1之結合。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-L1結合拮抗劑抑制PD-L1與B7-1之結合。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-L1結合拮抗劑抑制PD-L1與PD-1及B7-1之結合。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-L1結合拮抗劑為抗PD-L1抗體。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-L1結合拮抗劑係選自由以下組成之群：YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105及MEDI4736。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗PD-L1抗體包含重鏈，其包含GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:17)之HVR-H1序列、AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:18)之HVR-H2序列及RHWPGGFDY (SEQ ID NO:19)之HVR-H3序列；及輕鏈，其包含RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:20)之HVR-L1序列、SASFLYS (SEQ ID NO:21)之HVR-L2序列及QQYLYHPAT (SEQ ID NO:22)之HVR-L3序列。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗PD-L1抗體包含重鏈可變區，其包含EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:23)或EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTK (SEQ ID NO:40)之胺基酸序列，及輕鏈可變區，其包含DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:24)之胺基酸序列。在可與前述實施例中之

任一者組合之某些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑為PD-L2結合拮抗劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-L2結合拮抗劑為抗體。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-L2結合拮抗劑為免疫黏附素。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，癌症係選自由以下組成之群：非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、間皮瘤、黑素瘤、頭頸癌、甲狀腺癌、內瘤、前列腺癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、黴菌病、梅克爾細胞癌及其他血液科惡性疾病。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，持續投與可降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，間歇性投與可降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係在PD-1軸結合拮抗劑之前投與。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係與PD-1軸結合拮抗劑同時投與。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係在PD-1軸結合拮抗劑之後投與。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑係在調節CD226表現及/或活性之藥劑之前投與。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑係與調節CD226表現及/或活性之藥劑同時投與。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑係在調節CD226表現及/或活性之藥劑之後投與。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係在降低或抑制一或多

種額外免疫共抑制性受體之藥劑之前投與。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係與降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑同時投與。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係在降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑之後投與。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係在增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑之前投與。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係與增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑同時投與。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係在增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑之後投與。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑之組合治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑以及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合治療個體中之癌

症或延緩其進程的說明。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑之組合增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑以及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑與調節CD226表現及/或活性之藥劑之組合治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑以及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含調節CD226表現及/或活性之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用調節CD226表現及

/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑與調節CD226表現及/或活性之藥劑之組合增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑以及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含調節CD226表現及/或活性之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用調節CD226表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。

在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑為抗PD-L1抗體。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗PD-L1抗體係選自由以下組成之群：YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105及MEDI4736。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗PD-L1抗體包含重鏈，其包含GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:17)之HVR-H1序列、AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:18)之HVR-H2序列及RHWPGGFDY (SEQ ID NO:19)之HVR-H3序列；及輕鏈，其包含RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:20)之HVR-L1序列、SASFLYS (SEQ ID NO:21)之HVR-L2序列及QQYLYHPAT (SEQ ID

NO:22)之HVR-L3序列。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗PD-L1抗體包含重鏈可變區，其包含EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:23) 或 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTK (SEQ ID NO:40) 之胺基酸序列，及輕鏈可變區，其包含DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:24) 之胺基酸序列。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑為抗PD-1抗體。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗PD-1抗體為MDX-1106、MK-3475或CT-011。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑為AMP-224。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑為PD-L2結合拮抗劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-L2結合拮抗劑為抗體。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，PD-L2結合拮抗劑為免疫黏附素。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑的組合治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。在其他態樣中，本

發明提供一種套組，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑以及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑的組合增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑以及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，該一或多種額外免疫共抑制性受體係選自由以下組成之群：PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA、VISTA、B7H4及CD96。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，該一

或多種額外免疫共抑制性受體係選自由以下組成之群：PD-1、CTLA-4、LAG3及TIM3。

在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑的組合治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑以及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑的組合增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑以及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。在其他態樣中，本發明提供一種套組，其包含增加或活化一或多種額外免疫共刺激

性受體之藥劑及藥品說明書，該藥品說明書包含關於使用增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，該一或多種額外免疫共刺激性受體係選自由以下組成之群：CD226、OX-40、CD28、CD27、CD137、HVEM、GITR、MICA、ICOS、NKG2D及2B4。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，該一或多種額外免疫共刺激性受體係選自由以下組成之群：CD226、OX-40、CD27、CD137、HVEM及GITR。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，該一或多種額外免疫共刺激性受體係選自由以下組成之群：OX-40及CD27。

在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，個體為人類。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑係選自由以下組成之群：TIGIT表現及/或活性之拮抗劑、PVR表現及/或活性之拮抗劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL2之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL3之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVRL2之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑及抑制及/或阻斷由結合於PVRL3之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑為增加及/或刺激CD226表現及/或活性之藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，調節CD226表現

及/或活性之藥劑為增加及/或刺激CD226與PVR之相互作用的藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑為增加及/或刺激由結合於PVR之CD226介導之細胞內信號傳導的藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑係選自由以下組成之群：抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑、TIGIT表現及/或活性之拮抗劑、PVR表現及/或活性之拮抗劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL2之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL3之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVRL2之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑以及抑制及/或阻斷由結合於PVRL3之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑為抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸或抑制性多肽。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段包含至少一個包含選自以下胺基酸序列之胺基酸序列的HVR：(1) KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO:1)、ASIRFT (SEQ ID NO:2)、QQGINNPLT (SEQ ID NO:3)、GFTFSSFTMH (SEQ ID NO:4)、FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO:5) 及 RPLGHNTFDS (SEQ ID

NO:6)；或(2) RSSQSLVNSYGN TFLS (SEQ ID NO:7)、GISNRFS (SEQ ID NO:8)、LQGTHQPPT (SEQ ID NO:9)、GYSFTGHLMN (SEQ ID NO:10)、LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:11)及GLRGFYAMDY (SEQ ID NO:12)。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗 TIGIT 抗體或其抗原結合片段，其中抗體輕鏈包含 DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCK**SSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDGTKLEIKR** (SEQ ID NO:13)或DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGN TFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYCY**CLQGTHQPPTFGPGTKLEVK** (SEQ ID NO:14)中闡述之胺基酸序列。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段，其中抗體重鏈包含 EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEAS**GFTFSSFTMHWVRQSPGKGL EWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDNANKNLLFLQMNDLKSEDTA MYYCARRPLGHNTFDSWGQGTTLVTVSS** (SEQ ID NO:15)或EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKAS**GYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLII PYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCSRG LRGFYAMDYWGQGTSTVTVSS** (SEQ ID NO:16)中闡述之胺基酸序列。在可與前述實施例中之任一者組合之某些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段，其中抗體輕鏈包含DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCK**SSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDGTKLEIKR** (SEQ ID NO:13) 或 DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGN TFL

SWYLHKPGQSPQLLIFGISNRFSQVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPED
 LGMYYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO:14)中闡述之胺基
 酸序列，且抗體重鏈包含EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFT
 FSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDN
 AKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQGTLVTVSS
 (SEQ ID NO:15)或EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSTGHLM
 NWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY
 MELLSTLSDDSAVYFCRGLRGFYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID
 NO: 16)中闡述之胺基酸序列。

【圖式簡單說明】

圖1展示TIGIT在耗竭之CD8⁺及CD4⁺ T細胞上大量表現。圖1A描繪富含MACS之C57BL6/J脾CD8⁺ T細胞，其經培養板結合之抗CD3及抗CD28活體外刺激24-48小時。表示TIGIT表現之流動式細胞測量術直方圖(紅色)與同型染色(灰色)有關。亦展示TIGIT MFI之定量。***，P<0.001。資料表示2次獨立實驗；n=3。在圖1B-1C中，C57BL6/J小鼠受阿姆斯壯病毒株(Armstrong strain)LCMV感染，且在感染之後第7天分析脾細胞。資料表示2次獨立實驗；n=5。圖1B展示表示未經處理(CD44^低CD62L^高)及效應子記憶(CD44^高CD62L^低)CD4⁺及CD8⁺ T細胞之TIGIT表現之流動式細胞測量術直方圖。亦展示TIGIT MFI之定量。***，P<0.001。圖1C展示表示PD-1^高及PD-1^低效應子記憶CD8⁺ T細胞之TIGIT表現之流動式細胞測量術直方圖。亦展示TIGIT MFI之定量。***，P<0.001。圖1D展示C57BL6/J小鼠中CD4⁺ T細胞暫時耗盡且受純系13菌株LCMV感染。在感染之後第42天分析脾細胞。表示未經處理(CD44^低

CD62L^高)、中樞記憶(CD44^高 CD62L^高)及效應子記憶(CD44^高 CD62L^低)CD8⁺ T細胞之TIGIT表現之流動式細胞測量術直方圖。亦展示TIGIT MFI之定量。***, P<0.001。資料表示2次獨立實驗；n=5。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖2展示TIGIT^{loxP/loxP}小鼠之設計。使用標準技術藉由loxP部位側接TIGIT之外顯子1。

圖3展示TIGIT缺失型CD8⁺及CD4⁺ T細胞正常地對急性病毒感染作出反應。TIGIT^{fl/fl} CD4^{cre} (CKO)及TIGIT^{fl/fl}同窩幼畜(WT)受阿姆斯特壯菌株LCMV感染。在感染之後第7天分析脾細胞。資料表示兩次獨立實驗；n=5。**圖3A**展示在活性(CD44^{high})細胞圈選情況下，CD8⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。活性CD8⁺ T細胞之定量呈全部CD8⁺ T細胞之百分比形式。**圖3B**展示在IFN γ 生產細胞圈選情況下，在刺激活體外之後，CD8⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。IFN γ 生產細胞之定量呈全部CD8⁺ T細胞之百分比形式。**圖3C**展示在活性(CD44^{high})細胞圈選情況下，CD4⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。活性CD4⁺ T細胞之定量呈全部CD4⁺ T細胞之百分比形式。**圖3D**展示在IFN γ 生產細胞圈選情況下，在活體外刺激之後，CD4⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。IFN γ 生產細胞之定量呈全部CD4⁺ T細胞之百分比形式。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖4展示TIGIT及PD-1活體內協同調節耗竭之T細胞之效應功能。在**圖4A-4E**中，TIGIT^{fl/fl} CD4-cre-(WT)及TIGIT^{fl/fl} CD4-cre+ (CKO)小鼠中CD4⁺ T細胞暫時耗竭且受純系13菌株LCMV感染。在感染之後第42天分析脾細胞及肝病毒效價。資料表示2次獨立實驗，且每個組中n=6-9。**圖4A**描繪在活性細胞(CD44^{high} CD62L^{low})圈選情況下，CD8⁺ T細胞上閘控之

代表性FACS曲線。活性細胞之定量呈全部CD8⁺ T細胞之百分比形式。圖4B描繪在IFN γ +細胞圈選情況下，在活體外刺激之後，CD8⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。IFN γ 生產細胞之定量呈CD8⁺ T細胞之百分比形式。圖4C描繪在活性細胞(CD44^高 CD62L^低)圈選情況下，CD4⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。活性細胞之定量呈全部CD4⁺ T細胞之百分比形式。圖4D描繪在IFN γ +細胞圈選情況下，在活體外刺激之後，CD4⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。IFN γ 生產細胞之定量呈CD4⁺ T細胞之百分比形式。圖4E描繪肝LCMV效價之定量。***，P<0.0001。在圖4F-4H中，C57BL6/J小鼠中CD4⁺ T細胞暫時耗盡且受純系13菌株LCMV感染。在感染之後第28天開始，小鼠用同型匹配對照物、抗PD-L1、抗TIGIT或抗PD-L1+抗TIGIT抗體處理。在感染之後第42天分析脾細胞及肝病毒效價。資料表示2次獨立實驗；n=10。圖4F描繪在活性細胞(CD44^高 CD62L^低)圈選情況下，CD8⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。活性細胞之定量呈全部CD8⁺ T細胞之百分比形式。***，P<0.0001。圖4G描繪在IFN γ +細胞圈選情況下，在活體外刺激之後，活性CD8⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。IFN γ 生產細胞之定量呈活性CD8⁺ T細胞之百分比形式。*，P=0.0352。**，P=0.0047。圖4H描繪肝LCMV效價之定量。*，P=0.0106。**，P=0.0047。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖5展示在慢性病毒感染期間，TIGIT/PD-L1共阻斷可促進CD4⁺ T細胞效應功能。C57BL6/J小鼠中之CD4⁺ T細胞耗竭且受純系13菌株LCMV感染。在感染之後第28天開始，小鼠用同型匹配對照物、抗PD-L1、抗TIGIT或抗PD-L1+抗TIGIT抗體處理。在感染之後第42天分析脾細胞及肝病毒效價。資料表示2次獨立實驗；n=10。圖5A描繪在活性細胞

(CD44^高 CD62L^低)圈選情況下，CD4⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。活性CD4⁺ T細胞之定量呈全部CD4⁺ T細胞之百分比形式。**圖5B**描繪在IFN γ 生產細胞圈選情況下，在活體外刺激之後，CD4⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。IFN γ 生產細胞之定量呈全部CD4⁺ T細胞之百分比形式。*，P=0.019。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖6展示TIGIT表現在人類乳癌中升高且與CD8及抑制性共受體之表現相關。分析由癌症基因阿特拉斯網路(Cancer Gene Atlas Network)產生之乳癌基因表現微陣列資料。基因表現資料經正規化且表示為相對比率(log2)。**圖6A**描繪正常及所有乳房腫瘤樣品(左側)及乳房腫瘤次型(右側)中之TIGIT表現。***，P=6 $\times 10^{-12}$ 。展示盒須圖(Box and whisker plots)。**圖6B**描繪TIGIT與CD3 ϵ 表現之相關性。R²=0.61。**圖6C**描繪TIGIT與CD8 α (左側，R²=0.80)或CD4 (右側，R²=0.42)之相關性。**圖6D**描繪TIGIT與PD-1 (左側，R²=0.87)、LAG3 (中間，R²=0.80)及CTLA4 (右側，R²=0.76)之相關性。

圖7展示TIGIT及PD-1抑制抗腫瘤T細胞反應。在**圖7A-7B**中，BALB/C小鼠經CT26結腸直腸癌細胞接種。在接種之後第14天，當腫瘤尺寸達到約200 mm³時分析脾細胞及腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。資料表示一次實驗；n=6。**圖7A**描繪表示脾及腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞之TIGIT表現之流動式細胞測量術直方圖。亦展示TIGIT MFI之定量。**，P=0.0023。**圖7B**描繪表示脾及腫瘤浸潤CD4⁺ T細胞之TIGIT表現之流動式細胞測量術直方圖。亦展示TIGIT MFI之定量。***，P=0.0002。在**圖7C-7E**中，BALB/C小鼠經CT26結腸直腸癌細胞接種。當腫瘤尺寸達到約200 mm³時，小鼠用同型對照物、抗PD-L1、抗TIGIT或抗PD-L1+抗TIGIT抗體處

理三週。資料表示兩次獨立實驗； $n=10-20$ (圖7C-7D)或7-10 (圖7E)。圖7C描繪隨時間推移之中值CT26腫瘤體積。圖7D描繪小鼠存活率。圖7E展示在初始接種之後約60天，接受抗TIGIT+抗PD-L1之完全緩解(CR)之小鼠以及未經處理之BALB/c小鼠在其左胸側經CT26細胞接種且在其乳房脂肪墊中經EMT6乳癌細胞接種。展示CR小鼠(紫色及綠色)及未經處理之小鼠(黑色及橙色)腫瘤中CT26(正方形)及EMT6(三角形)之中值(左側)及個別(右側)腫瘤體積。圖7F展示小鼠經CT26腫瘤接種且如圖7C中進行處理。藉由流動式細胞測量術分析腫瘤浸潤及腫瘤引流淋巴結駐留T細胞。在IFN γ 生產細胞圈選情況下，在活體外刺激之後CD8+ TIL之代表性FACS曲線。產生IFN γ 之CD8+ TIL之定量呈全部CD8+ TIL之百分比形式。***， $P=0.0003$ 。資料表示兩次獨立實驗； $n=5$ 。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖8展示CT26腫瘤浸潤淋巴細胞TIGIT表現與Tim-3表現相關。BALB/C小鼠經CT26結腸直腸癌細胞接種。在接種之後約第14天，當腫瘤尺寸達到約200 mm³時分析脾細胞及腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。資料表示一次實驗； $n=6$ 。圖8A描繪脾及腫瘤浸潤CD8+ T細胞之TIGIT表現之代表性直方圖。TIGIT MFI之定量。**， $P=0.0026$ 。圖8B描繪脾及腫瘤浸潤CD4+ T細胞之TIGIT表現之代表性直方圖。TIGIT MFI之定量。***， $P<0.0001$ 。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖9展示MC38腫瘤浸潤淋巴細胞TIGIT表現與PD-1及Tim-3表現相關。C57BL6/J小鼠經MC38結腸直腸癌細胞接種。在接種之後約第14天，當腫瘤尺寸達到約200 mm³時分析脾細胞及腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。資料表示一次實驗； $n=5$ 。圖9A描繪脾及腫瘤浸潤CD8+ T細胞之TIGIT表

現之代表性直方圖。TIGIT MFI之定量。***， $P<0.0001$ 。圖9B描繪脾及腫瘤浸潤CD4⁺ T細胞之TIGIT表現之代表性直方圖。TIGIT MFI之定量。*， $P=0.0136$ 。**， $P=0.0029$ 。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖10展示經抗PD-L1及/或抗TIGIT處理之小鼠中之CT26腫瘤生長。未經處理之BALB/c小鼠用CT26腫瘤細胞接種且用抗PD-L1及/或抗TIGIT或同型匹配對照抗體處理，如圖4D-4F中所描述。展示每一個處理組中個別小鼠中隨時間推移之腫瘤體積。資料表示兩次獨立實驗。

圖11展示CD4⁺ TIL及腫瘤引流淋巴結T細胞之流動式細胞測量術分析。BALB/C小鼠經CT26結腸直腸癌細胞接種。當腫瘤尺寸達到約200 mm³時，小鼠用同型對照物、抗PD-L1、抗TIGIT或抗PD-L1+抗TIGIT抗體處理7天。收集腫瘤及腫瘤引流淋巴結。資料表示2次獨立實驗；n=5。在IFN γ 生產細胞圈選情況下，在活體外刺激之後，腫瘤引流淋巴結CD8⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。IFN γ ⁺細胞之定量呈全部CD8⁺ T細胞之百分比形式。***， $P<0.001$ 。CD8⁺ T細胞之定量呈全部TIL之百分比形式。**， $P=0.0065$ 。活性(CD44^高 CD62L^低)CD8⁺ T細胞之定量呈全部CD8⁺ TIL之百分比形式。*， $P=0.012$ 。CD8⁺ T細胞之定量呈全部腫瘤引流淋巴結細胞之百分比形式。活性CD8⁺ T細胞之定量呈腫瘤引流淋巴結中全部CD8⁺ T細胞之百分比形式。*， $P<0.05$ 。圖11C描繪CD4⁺ T細胞之定量呈全部TIL之百分比形式。*， $P=0.016$ 。圖11D描繪活性CD4⁺ T細胞之定量呈全部CD4⁺ TIL之百分比形式。圖11E描繪CD4⁺ T細胞之定量呈全部腫瘤引流淋巴結細胞之百分比形式。圖11F描繪活性CD4⁺ T細胞之定量呈腫瘤引流淋巴結中全部CD4⁺ T細胞之百分比形式。圖11A描繪在活體外刺激之後，IFN γ ⁺細胞之定量呈CD4⁺ TIL之百分比形式。圖11B描繪在活體外

刺激之後， $\text{IFN}\gamma^+$ 細胞之定量呈腫瘤引流淋巴結中 CD4^+ T細胞之百分比形式。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖12展示 CD8^+ TIL之另一種流動式細胞測量術分析。如圖4中所描述，BALB/C小鼠用CT26結腸直腸癌細胞接種且用同型對照物、抗PD-L1、抗TIGIT或抗PD-L1+抗TIGIT抗體處理。在處理之後第7天收集腫瘤且藉由流動式細胞測量術分析。資料表示2次獨立實驗； $n=5$ 。圖12A描繪 $\text{TNF}\alpha^+$ 細胞之定量呈全部 CD8^+ TIL之百分比形式。 $**$ ， $P<0.01$ 。圖12B描繪 CD8^+ TIL之定量呈全部TIL之百分比形式。 $**$ ， $P<0.01$ 。圖12C描繪活性($\text{CD44}^{\text{高}} \text{CD62L}^{\text{低}}$) CD8^+ TIL之定量呈全部 CD8^+ TIL之百分比形式。 $*$ ， $P<0.05$ 。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖13展示腫瘤引流淋巴結駐留 CD8^+ T細胞之流動式細胞測量術分析。如圖4中所描述，BALB/C小鼠用CT26結腸直腸癌細胞接種且用同型對照物、抗PD-L1、抗TIGIT或抗PD-L1+抗TIGIT抗體處理。在處理之後第7天收集腫瘤引流淋巴結且藉由流動式細胞測量術分析。資料表示2次獨立實驗； $n=5$ 。圖13A描繪在 $\text{IFN}\gamma$ 生產細胞圈選情況下，在活體外刺激之後，腫瘤引流淋巴結駐留 CD8^+ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。 $\text{IFN}\gamma^+$ 細胞之定量呈全部 CD8^+ T細胞之百分比形式。 $***$ ， $P<0.001$ 。圖13B描繪 CD8^+ T細胞之定量呈腫瘤引流淋巴結中全部細胞之百分比形式。圖13C描繪活性($\text{CD44}^{\text{高}} \text{CD62L}^{\text{低}}$) CD8^+ T細胞之定量呈全部 CD8^+ T細胞之百分比形式。 $*$ ， $P<0.05$ 。誤差條描繪平均值之標準誤差。圖13D描繪 $\text{TNF}\alpha$ 生產細胞之定量呈全部腫瘤引流淋巴結 CD8^+ T細胞之百分比形式。

圖14展示腫瘤浸潤 CD8^+ T細胞之 CD226 及 TIGIT 之共表現。C57BL6/J小鼠用MC38結腸直腸癌細胞接種。在接種之後約第14天，當腫

瘤尺寸達到約200 mm³時分析脾細胞及腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。脾B細胞(灰色)、脾CD8⁺ T細胞(藍色)及TIGIT⁺腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞(紅色)之CD226表現之代表性直方圖。資料表示2次獨立實驗；n=5。

圖15展示轉染細胞上CD226及TIGIT共免疫沈澱(co-IP)。COS7細胞與表現質體或對照質體(pRK)一起共轉染，該等表現質體含有TIGIT-HA(5 ng)或CD226-Flag(10 ng)標記之蛋白質之cDNA。在轉染後，細胞經洗滌及離心且使細胞集結粒溶解。預先清洗且離心所得上清液，且接著等分至兩個管中且使用標準程序與抗HA或抗旗標一起免疫沈澱。免疫沈澱蛋白質經歷SDS-PAGE及西方墨點法。藉由抗Flag-HRP或抗HA-HRP探測西方墨點。

圖16展示初級CD8⁺ T細胞中之TIGIT及CD226相互作用。富含MACS之脾C57BL6/J CD8⁺ T細胞用培養板結合之抗CD3及抗CD28抗體及重組型IL-2刺激48小時且溶解。細胞溶解物與抗TIGIT一起免疫沈澱且藉由抗CD226探測。泳道：分子量階梯(1)，輸入端(2)，共免疫沈澱流(3)及共免疫沈澱物。箭頭指示CD226之預期分子量。

圖17展示藉由TR-FRET檢測TIGIT/CD226相互作用。**圖17A**描繪Flag-ST-CD226均二聚體之HA-TIGIT分解。表現恆定量之Flag-ST-CD226及增加濃度之HA-TIGIT之COS-7細胞上量測之Flag-ST-CD226之間的FRET比率。**圖17B**描繪在PBS(白色條)或抗TIGIT抗體(黑色條)之15分鐘培育後記錄之Flag-ST-CD226之間的FRET比率。**圖17C**描繪Flag-ST-CD226與HA-TIGIT之相關性。Flag-ST-CD226與HA-TIGIT之間的FRET強度超過旗標-ST-CD226表現，如藉由同一批次之經轉染之COS-7細胞上之抗Flag ELISA量測。**圖17D**描繪在PBS(白色條)或抗TIGIT抗體(黑色

條)之15分鐘培育之後，Flag-ST-CD226與HA-TIGIT之間的FRET變化。A及C中之資料表示4次獨立實驗，其各自一式三份地進行。B及D中之資料表示2次獨立實驗，其各自一式三份地進行。

圖18展示Flag-ST-CD226及HA-TIGIT之細胞表面表現。表現指定標記構造之完整COS-7細胞上之抗Flag及抗HA ELISA。資料表示3次獨立實驗，其各自一式三份地進行。

圖19展示CD226阻斷可逆轉由TIGIT/PD-L1共阻斷誘導之增強之抗病毒T細胞反應。在**圖19A-19D**中，C57BL6/J小鼠中CD4⁺ T細胞暫時耗盡且受純系13菌株LCMV感染。在感染之後第28天開始，小鼠用同型匹配對照物、抗CD226、抗PD-L1+抗TIGIT或抗PD-L1+抗TIGIT+抗CD226抗體處理。在感染之後第42天分析脾細胞及肝病毒效價。**圖19A**描繪CD8⁺ T細胞之定量呈脾細胞之百分比形式。**圖19B**描繪活性CD8⁺ T細胞之定量呈全部CD8⁺ T細胞之百分比形式。***， $P < 0.001$ 。**圖19C**描繪IFN γ 生產細胞之定量呈活性CD8⁺ T細胞之百分比形式。***， $P < 0.001$ 。**圖19D**描繪肝LCMV效價之定量。***， $P < 0.001$ 。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖20展示TIGIT表現在人類癌症中升高且與CD8及PD-1強相關。如實例11中所描述進行人類癌症之基因表現分析。散佈圖展示每個基因計數資料，藉由程式庫尺寸正規化。盒須圖展示TIGIT與CD3e之差異穩定表現比率。**圖20A**描繪LUSC(灰色)及正常肺(黑色)中TIGIT與CD3e RNA表現之相關性。 $\rho = 0.86$ 。亦展示TIGIT/CD3e表現比率之定量。LUSC比率增量=372%。***， $P = 1.46 \times 10^{-46}$ 。**圖20B**描繪COAD(灰色)及正常結腸(黑色)中TIGIT與CD3e RNA表現之相關性。 $\rho = 0.83$ 。亦展示TIGIT/CD3e表現比率之定量。COAD比率增量=116%。***， $P = 3.66 \times 10^{-6}$ 。**圖20C**

描繪UCEC(灰色)及正常子宮內膜(黑色)中TIGIT與CD3e RNA表現之相關性。 $\rho=0.87$ 。亦展示TIGIT/CD3e表現比率之定量。UCEC比率增量=419%。***, $P=7.41 \times 10^{-5}$ 。圖20D描繪BRCA(灰色)及正常乳房(黑色)中TIGIT與CD3e RNA表現之相關性。 $\rho=0.82$ 。亦展示TIGIT/CD3e表現比率之定量。BRCA比率增量=313%。***, $P=4.6 \times 10^{-44}$ 。圖20E描繪腎臟腎透明細胞癌(灰色)及正常腎臟(黑色)中TIGIT及CD3e RNA表現之相關性。 $\rho=0.94$ 。亦展示TIGIT/CD3e表現比率之定量。圖20F描繪肺鱗狀細胞癌(灰色)及正常肺(黑色)中TIGIT與CD8A(左側)或TIGIT與CD4(右側)之相關性。 ρ 分別為0.77及0.48。圖20G描繪肺鱗狀細胞癌(灰色)及正常肺(黑色)中TIGIT與PD-1 (Pdc1)之相關性。 $\rho=0.82$ 。圖20H描繪肺鱗狀細胞癌(紅色)及正常肺(黑色)中TIGIT與CD226之相關性。 $\rho=0.64$ 。

圖21展示肺鱗狀細胞癌(LUSC)中T細胞相關之基因表現之分析。如實例11中所描述分析LUSC及正常組織樣品中之基因表現且產生與LUSC樣品中基因特徵最佳相關之基因的熱圖。在用於定中心及按比例縮放表現資料之歐氏距離矩陣(Euclidean distance matrix)上，使用離差平方和法(Ward linkage)、使用階層式集群技術使基因及樣品集群。

圖22展示TIGIT及PD-1由人類及鼠腫瘤浸潤淋巴細胞協調表現。圖22A-22C展示來自新鮮切除之人類NSCLC腫瘤、腫瘤匹配周邊血液及正常供體周邊血液之淋巴細胞之分析。資料表示兩個獨立分析之腫瘤。圖22A描繪表示在TIGIT⁺細胞圈選情況下，周邊及腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞之TIGIT表現之代表性FACS曲線。圖22B描繪表示在TIGIT⁺細胞圈選情況下，周邊及腫瘤浸潤CD4⁺ T細胞之TIGIT表現之代表性FACS曲線。圖22C描繪表示PD-1^高(紅色)及PD-1^低(藍色)NSCLC-浸潤CD8⁺(左側)及

CD4⁺(右側)T細胞之TIGIT表現之流動式細胞測量術直方圖。在圖**22D-22G**中，BALB/C小鼠經同基因型CT26結腸直腸癌細胞接種。在接種之後第14天，當腫瘤尺寸達到約200 mm³時分析脾細胞及腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。資料表示兩次獨立實驗；n=5-6。圖**22D**描繪在TIGIT⁺細胞圈選情況下，腫瘤浸潤CD8⁺T細胞之TIGIT表現之代表性FACS曲線。圖**22E**描繪在TIGIT⁺細胞圈選情況下，腫瘤浸潤CD4⁺T細胞之TIGIT表現之代表性FACS曲線。TIGIT⁺ T細胞之出現頻率之定量呈所有T細胞之百分比形式。*，P=0.0134。***，P<0.0001。圖**22F**描繪表示PD-1^高及PD-1^低腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞及脾CD8⁺ T細胞之TIGIT表現之流動式細胞測量術直方圖。亦展示TIGIT MFI之定量。**，P=0.0023。圖**22G**描繪表示PD-1^高及PD-1^低腫瘤浸潤CD4⁺T細胞及脾CD4⁺ T細胞之TIGIT表現之流動式細胞測量術直方圖。亦展示TIGIT MFI之定量。***，P=0.0002。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖**23**展示人類腫瘤浸潤T細胞之TIGIT表現之表徵。圖**23A-23B**描繪FACS曲線，其展示在TIGIT⁺細胞圈選情況下，NSCLC腫瘤浸潤CD8⁺及CD4⁺ T細胞(圖**23A**)及供體匹配PBMC CD8⁺及CD4⁺ T細胞(圖**23B**)之TIGIT表現。圖**23C-23D**描繪FACS曲線，其展示在TIGIT⁺細胞圈選情況下，CRC腫瘤浸潤CD8⁺及CD4⁺ T細胞(圖**23C**)及供體匹配PBMC CD8⁺及CD4⁺ T細胞(圖**23D**)之TIGIT表現。

圖**24**展示TIGIT:CD226相互作用並非由PVR TIGIT:CD226驅動且藉由TR-FRET偵測到TIGIT Q56R:CD226相互作用，且Flag-ST-CD226與HA-TIGIT或HA-TIGIT Q56R之間的FRET比率表明WT及Q56R TIGIT以相同功效結合CD226。資料表示一式三份地進行的三次獨立實驗。

圖25展示攜帶MC38腫瘤之小鼠中TIGIT/PD-L1抗體共阻斷之功效。在**圖25A-25C**中，如上所述產生攜帶MC38腫瘤之小鼠且用針對PD-L1(紅色)、TIGIT(藍色)、TIGIT及PD-L1(紫色)之阻斷抗體或同型匹配對照抗體(黑色)處理三週。N=10 (對照物、單獨抗PD-L1、單獨抗TIGIT)或20 (抗TIGIT+抗PD-L1)。**圖25A**描繪隨時間推移之中值(左側)及個別(右側)MC38腫瘤體積。**圖25B**描繪抗體處理之後第14天時的MC38腫瘤體積。***，P=0.0005。**，P=0.0093。*，P=0.0433。**圖25C**描繪隨時間推移之小鼠存活率。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖26展示鼠腫瘤浸潤T細胞之TIGIT表現之進一步表徵。**圖26A**描繪藉由MACS使脾C57BL6/J CD8⁺ T細胞富集且與經板塗之抗CD3及抗CD28促效劑抗體一起培養。隨時間推移之TIGIT(紅色)及同型匹配對照物(實心灰色)染色之代表性直方圖。TIGIT MFI之定量。***，P<0.001。受刺激之細胞誘導性表現PD-1且組成性表現CD226(資料未圖示)。資料表示2次獨立實驗；n=5。在**圖26B-26E**中，野生型C57BL6/J小鼠經同基因型MC38結腸直腸癌細胞皮下接種。腫瘤在無介入下生長直至其尺寸達到150-200 mm³。資料表示2次獨立實驗；n=5。**圖26B**描繪在TIGIT⁺細胞圈選情況下，腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞之代表性FACS曲線。TIGIT⁺細胞之出現頻率之定量呈所有腫瘤浸潤或脾CD8⁺ T細胞之百分比形式。***，P<0.0001。**圖26C**描繪在TIGIT⁺細胞圈選情況下，腫瘤浸潤CD4⁺ T細胞之代表性FACS曲線。TIGIT⁺細胞之出現頻率之定量呈所有腫瘤浸潤或脾CD4⁺ T細胞之百分比形式。***，P<0.0001。**圖26D**描繪PD-1^高及PD-1^低腫瘤浸潤CD8⁺T細胞(分別為紅色及藍色)以及脾CD8⁺ T細胞(灰色)之TIGIT表現之代表性直方圖。TIGIT MFI之定量。***，P<0.0001。**圖26E**

描繪表示PD-1^高及PD-1^低腫瘤浸潤CD4⁺ T細胞以及脾CD4⁺ T細胞之TIGIT表現之代表性直方圖。TIGIT MFI之定量。*，P=0.0136。**，P=0.0029。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖27展示腫瘤浸潤CD8⁺及CD4⁺ T細胞維持高CD226表現量。如本文所描述，野生型BALB/c小鼠經CT26腫瘤細胞接種。在腫瘤尺寸生長至約150-200 mm³之後，藉由流動式細胞測量術分析腫瘤及脾。**圖27A**描繪CD226⁺ CD8⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞及非T細胞之定量，分別呈所有CD8⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞及非T細胞之百分比形式。**圖27B**描繪腫瘤及脾中CD226表現之代表性直方圖。資料表示2次獨立實驗；n=5。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖28展示CD8⁺ T細胞反應之TIGIT抑制係取決於CD226。BALB/C小鼠在其右胸側經CT26結腸直腸癌細胞皮下接種。當腫瘤尺寸達到約200 mm³時，小鼠用同型對照物(黑色)、抗CD226(橙色)、抗PD-L1 (紅色)、抗TIGIT+抗PD-L1(紫色)或抗TIGIT+抗PD-L1+抗CD226(綠色)抗體處理三週。資料表示一次實驗；n=10 (A-B)或5 (C-F)。**圖28A**描繪隨時間推移之中值(左側)及個別(右側)CT26腫瘤體積。**圖28B**描繪隨時間推移之小鼠存活率。在**圖28C-28F**中，在處理之後第7天，藉由流動式細胞測量術評估腫瘤浸潤淋巴細胞及腫瘤引流淋巴結駐留淋巴細胞。**圖28C**描繪在活體外刺激之後，產生IFN γ 之CD8⁺ TIL之定量，其呈全部CD8⁺ TIL之百分比形式。**，P<0.01。**圖28D**描繪在活體外刺激之後，產生IFN γ 之細胞之定量，其呈全部CD8⁺ T細胞之百分比形式。*，P<0.05。**圖28E**描繪CD8⁺ TIL之定量呈全部TIL之百分比形式。**，P<0.01。**圖28F**描繪CD8⁺ T細胞之定量呈所有腫瘤引流淋巴結駐留淋巴細胞之百分比形式。誤差條描繪

平均值之標準誤差。

圖29展示TIGIT藉由直接破壞CD226均二聚作用來削弱CD226功能。**圖29A**描繪CD8⁺ T細胞由TIGIT^{fl/fl} CD4^{cre} (CKO)及TIGIT^{fl/fl} CD4^{wt} (WT)同窩幼畜進行MACS富集且在如所指定之抗CD226或同型匹配對照抗體存在下受刺激。³H-胸苷攝取展示為與抗CD3+PVR-Fc一起培養之細胞對與單獨抗CD3一起培養之細胞之比率。**, P=0.0061。***, P<0.0001。資料表示2次獨立實驗; n=5。**圖29B**描繪野生型C57BL6/J CD8⁺ T細胞經MACS富集且在如所指示之抗TIGIT、抗CD226及/或同型匹配對照抗體存在下受刺激。³H-胸苷攝取展示為與抗CD3+PVR-Fc一起培養之細胞對與單獨抗CD3一起培養之細胞的比率。***, 在配對t測試中P<0.001。**圖29C**描繪初級人類CD8⁺ T細胞由血液進行MACS富集且在存在或不存在人類重組型PVR-Fc情況下由次最佳含量之培養板結合之抗CD3刺激。如所指示添加抗TIGIT抗體或同型匹配對照抗體。³H-胸苷攝取之定量。**, P分別為0.0071及0.0014。**圖29D**描繪藉由如所指示增加受體及供體FLAG-ST-CD226之濃度來暫時轉染CHO細胞。FRET強度之定量與供體排放有關。資料表示三次獨立實驗; n=3。在**圖29E-29F**中, 如所指示, CHO細胞藉由FLAG-ST-CD226及增加濃度之HA-TIGIT暫時轉染。資料表示兩次或兩次以上獨立實驗; n=4。資料針對最大信號正規化。**圖29E**描繪CD226:CD226 FRET比率(FRET比率1)之定量。**圖29F**描繪TIGIT:CD226 FRET比率(FRET比率2)之定量。**圖29G**描繪對抗FLAG或抗HA免疫沈澱物進行之抗FLAG(左側)及抗HA(右側)免疫墨點, 抗HA免疫沈澱物係由經空pRK向量或Flag-CD226與HA-TIGIT之組合轉染之COS-7細胞製備。資料表示兩次獨立實驗。**圖29H**描繪在與PBS(白色)或

抗TIGIT抗體(紅色)一起培育之後，TIGIT:CD226 FRET比率之定量。***， $P < 0.001$ 。資料表示4次獨立實驗； $n=3$ 。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖30展示初級人類T細胞由血液進行MACS富集且受抗CD3及抗CD28刺激。對TIGIT⁺及TIGIT⁻細胞進行分類、使其休止、再刺激及藉由指定抗體針對FRET進行標記。資料表示兩次獨立實驗。***， $P < 0.001$ 。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖31展示在慢性病毒感染期間，TIGIT及PD-1共阻斷未恢復耗竭之CD4⁺ T細胞之效應功能。圖31A描繪CD8⁺ T細胞之定量呈所有脾細胞之百分比形式。圖31B描繪gp33 pentamer⁺細胞之定量呈所有脾CD8⁺ T細胞之百分比形式。**， $P = 0.0040$ 。圖31C描繪在IFN γ ⁺細胞圈選情況下，在活體外刺激之後，gp33 pentamer⁺ CD8⁺ T細胞上閘控之代表性FACS曲線。產生IFN γ 之細胞之定量呈所有gp33 pentamer⁺ CD8⁺ T細胞之百分比形式。*， $P = 0.0319$ 。**， $P = 0.0030$ 。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖32展示TIGIT/PD-L1共阻斷功效取決於CD8⁺ T細胞。在圖32A-32B中，如圖7中所描述，野生型BALB/c小鼠經CT26腫瘤接種。當腫瘤尺寸達到100-150 mm³時，小鼠中CD8⁺ T細胞暫時耗竭且用抗TIGIT+抗PD-L1處理。資料表示一次實驗； $n=10$ /組。圖32A描繪隨時間推移之中值(左側)及個別(右側)CT26腫瘤體積。圖32B描繪在開始處理之後第17天，CT26腫瘤體積之定量。***， $P=0.0004$ 。在圖32C中，野生型BALB/c小鼠經CT26腫瘤接種且用抗TIGIT+抗PD-L1處理，且接著用CT26腫瘤再次攻擊，其中在再次攻擊時，CD8⁺ T細胞暫時耗竭。資料表示兩次獨立實驗； $n=5$ 。圖32C描繪隨時間推移之中值(左側)及個別(右

側)CT26腫瘤體積。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖33展示腫瘤細胞上之PVR表現並非TIGIT/PD-L1共阻斷功效所必需。如所描述，野生型BALB/c小鼠經野生型或PVR缺失型(PVR.KO)腫瘤接種。當腫瘤尺寸達到150-200 mm³時，小鼠用抗TIGIT+抗PD-L1或同型匹配對照抗體處理。資料表示一次實驗；n=10/組。**圖33**描繪隨時間推移之中值(左側)及個別(右側)CT26腫瘤體積。

圖34展示攜帶EMT6腫瘤之小鼠中TIGIT/PD-L1抗體共阻斷之功效。如上所述產生攜帶EMT6腫瘤之小鼠且用針對PD-L1(紅色)、TIGIT(藍色)、TIGIT及PD-L1(紫色)之阻斷抗體或同型匹配對照抗體(黑色)處理三週。N=10 (對照物、單獨抗PD-L1、單獨抗TIGIT)或20 (抗TIGIT+抗PD-L1)。**圖34**描繪隨時間推移中值(左側)及個別(右側)EMT6腫瘤體積。

圖35展示TIGIT調節腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞效應功能。BALB/C小鼠在其右胸側經CT26結腸直腸癌細胞皮下接種且用抗PD-L1、抗TIGIT或抗PD-L1+抗TIGIT處理，如圖7中所描述。在開始處理之後第7天，藉由流動式細胞測量術分析腫瘤引流淋巴結(dLN)駐留及腫瘤浸潤T細胞。資料表示兩次獨立實驗；n=5。**圖35A**描繪IFN γ /TNF α 雙生產dLN駐留CD8⁺及CD4⁺ T細胞之定量分別呈全部dLN駐留CD8⁺及CD4⁺ T細胞之百分比形式。亦展示未受刺激之T細胞之雙細胞因子產生。**，P分別為0.002、0.003及0.001。**圖35B**描繪IFN γ /TNF α 雙生產腫瘤浸潤CD8⁺及CD4⁺ T細胞之定量分別呈全部腫瘤浸潤CD8⁺及CD4⁺ T細胞之百分比形式。亦展示未受刺激之T細胞之雙細胞因子產生。***，P<0.0001。誤差條描繪平均值之標準誤差。

圖36展示來自經切除之人類NSCLC腫瘤、腫瘤匹配周邊血液及正常

供體周邊血液之淋巴細胞之分析。由三個獨立所需之樣品集合收集資料。

圖36A描繪TIGIT⁺細胞之定量呈所有CD8⁺ T細胞之百分比形式。^{*}，
P<0.05。**圖36B**描繪TIGIT⁺細胞之定量呈所有CD4⁺ T細胞之百分比形式。

圖37展示人類腫瘤中TIGIT表現之表徵。**圖37A**描繪NSCLC腫瘤駐留淋巴細胞(紅色，CD45⁺ FSC^低)、骨髓細胞(藍色，CD45⁺ FSC^高)及與亞型匹配同型染色(灰色)有關的非造血細胞(綠色，CD45⁻)之TIGIT表現之代表性流動式細胞測量術直方圖。**圖37B**描繪PD-1^高及PD-1^低 NSCLC腫瘤浸潤CD8⁺及CD4⁺ T細胞之閘控策略。

【實施方式】

相關申請案之交叉引用

本申請案主張2013年7月16日申請之美國臨時申請案第61/846,941號、2013年8月13日申請之美國臨時申請案第61/865,582號、2014年3月10日申請之美國臨時申請案第61/950,754號、2014年4月29日申請之美國臨時申請案第61/985,884號及2014年5月12日申請之美國臨時申請案第61/992,109號之優先權，其均以全文引用的方式併入本文中。

以ASCII文本文件形式提交序列表

以下以ASCII文本文件形式提交之內容以全文引用的方式併入本文中：序列表(文件名稱：146392025944SEQLISTING.TXT，記錄日期：2014年7月15日，大小：17 KB)之電腦可讀形式(CRF)。

I. 一般技術

本文中描述或參考之技術及程序通常可由熟習此項技術者使用習知方法良好理解及共同使用，諸如描述於以下文獻中之廣泛使用之方法：

Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第3版 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. ; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel等人編, (2003)) ; *Methods in Enzymology*系列(Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames 及 G.R. Taylor 編 (1995)) ; Harlow及Lane編 (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*及*Animal Cell Culture* (R.I. Freshney編 (1987)) ; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait 編, 1984) ; *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis編, 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney編, 1987) ; *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather 及 P.E. Roberts, 1998) Plenum Press ; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths及D.G. Newell 編 , 1993-8) J. Wiley and Sons ; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir及C.C. Blackwell編) ; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller 及 M.P. Calos 編 , 1987) ; *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis等人編, 1994) ; *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan等人編, 1991) ; *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999) ; *Immunobiology* (C.A. Janeway 及 P. Travers, 1997) ; *Antibodies* (P. Finch, 1997) ; *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty編, IRL Press, 1988-1989) ; *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd 及 C. Dean 編 , Oxford University Press, 2000) ; *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow及D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; *The Antibodies* (M.

Zanetti 及 J. D. Capra 編, Harwood Academic Publishers, 1995) ; 及 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita等人編, J.B. Lippincott Company, 1993)。

II. 定義

術語「*PD-1* 軸結合拮抗劑」為抑制*PD-1*軸結合搭配物與其結合搭配物中之一或多者之相互作用，以便移除由*PD-1*信號傳導軸上之信號傳導引起之T細胞功能不全的分子，其結果為恢復或增強T細胞功能(例如增殖、細胞因子產生、目標細胞殺死)。如本文所使用，*PD-1*軸結合拮抗劑包括*PD-1*結合拮抗劑、*PD-L1*結合拮抗劑及*PD-L2*結合拮抗劑。

術語「*PD-1* 結合拮抗劑」為降低、阻斷、抑制、消除或干擾由*PD-1*與其結合搭配物中之一或多者(諸如*PD-L1*、*PD-L2*)之相互作用引起的信號轉導的分子。在一些實施例中，*PD-1*結合拮抗劑為抑制*PD-1*與其結合搭配物之結合的分子。在特定態樣中，*PD-1*結合拮抗劑抑制*PD-1*與*PD-L1*及/或*PD-L2*之結合。舉例而言，*PD-1*結合拮抗劑包括抗*PD-1*抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽及其他降低、阻斷、抑制、消除或干擾由*PD-1*與*PD-L1*及/或*PD-L2*之相互作用引起之信號轉導的分子。在一個實施例中，*PD-1*結合拮抗劑降低由或經由表現於T淋巴細胞上之細胞表面蛋白質介導之陰性共刺激信號，以便降低功能異常T細胞之功能異常水準(例如增強對抗原識別之效應子反應)，該等T淋巴細胞經由*PD-1*介導信號傳導。在一些實施例中，*PD-1*結合拮抗劑為抗*PD-1*抗體。在特定態樣中，*PD-1*結合拮抗劑為本文中所描述之MDX-1106。在另一特定態樣中，*PD-1*結合拮抗劑為本文中所描述之Merck 3745。在另一特定態樣中，*PD-1*結合拮抗劑為本文中所描述之CT-011。在另一特定態樣中，*PD-*

1結合拮抗劑為本文中所描述之AMP-224。

術語「*PD-L1*結合拮抗劑」為降低、阻斷、抑制、消除或干擾由PD-L1與其結合搭配物中之任一或多者(諸如PD-1、B7-1)之相互作用引起的信號轉導的分子。在一些實施例中，PD-L1結合拮抗劑為抑制PD-L1與其結合搭配物之結合的分子。在特定態樣中，PD-L1結合拮抗劑抑制PD-L1與PD-1及/或B7-1之結合。在一些實施例中，PD-L1結合拮抗劑包括抗PD-L1抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽及其他降低、阻斷、抑制、消除或干擾由PD-L1與其結合搭配物中之一或多者(諸如PD-1、B7-1)之相互作用引起的信號轉導的分子。在一個實施例中，PD-L1結合拮抗劑降低由或經由表現於T淋巴細胞上之細胞表面蛋白質介導之陰性共刺激信號，以便降低功能異常T細胞之功能異常水準(例如增強對抗原識別之效應子反應)，該等T淋巴細胞經由PD-L1介導信號傳導。在一些實施例中，PD-L1結合拮抗劑為抗PD-L1抗體。在特定態樣中，抗PD-L1抗體為本文中所描述之YW243.55.S70。在另一特定態樣中，抗PD-L1抗體為本文中所描述之MDX-1105。在另一特定態樣中，抗PD-L1抗體為本文中所描述之MPDL3280A。在另一特定態樣中，抗PD-L1抗體為本文中所描述之MEDI 4736。

術語「*PD-L2*結合拮抗劑」為降低、阻斷、抑制、消除或干擾由PD-L2與其結合搭配物中之任一或多者(諸如PD-1)之相互作用引起的信號轉導的分子。在一些實施例中，PD-L2結合拮抗劑為抑制PD-L2與其結合搭配物之結合的分子。在特定態樣中，PD-L2結合拮抗劑抑制PD-L2與PD-1之結合。在一些實施例中，PD-L2結合拮抗劑包括抗PD-L2抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽及其他降低、阻斷、抑制、消除

或干擾由PD-L2與其結合搭配物中之任一或多者(諸如PD-1)之相互作用引起的信號轉導的分子。在一個實施例中，PD-L2結合拮抗劑降低由或經由表現於T淋巴細胞上之細胞表面蛋白質介導之陰性共刺激信號，以便降低功能異常T細胞之功能異常水準(例如增強對抗原識別之效應子反應)，該等T淋巴細胞經由PD-L2介導信號傳導。在一些實施例中，PD-L2結合拮抗劑為免疫黏附素。

術語「*適體*」係指能夠結合於目標分子之核酸分子，諸如多肽。舉例而言，本發明之適體可特異性結合於TIGIT多肽，或結合於調節TIGIT之表現的信號傳導途徑中之分子。適體之產生及治療用途已在此項技術中明確。參見例如美國專利第5,475,096號，及Macugen[®] (Eyetechnology, New York)用於治療年齡相關之黃斑變性之治療功效。

術語「*拮抗劑*」係以最廣泛含義使用，且包括任何部分或完全阻斷、抑制或中和本文中所揭示之原生多肽之生物活性的分子。以類似方式，術語「*促效劑*」係以最廣泛含義使用且包括任何模擬本文中所揭示之原生多肽之生物活性的分子。合適的促效劑或拮抗劑分子特定地包括原生多肽、胜肽、反義寡核苷酸、小型有機分子之促效劑或拮抗劑抗體或抗體片段、片段或胺基酸序列變異體等。用於鑑別多肽之促效劑或拮抗劑之方法可包含使多肽與候選促效劑或拮抗劑分子接觸且量測通常與多肽相關之一或多種生物活性之可偵測變化。

術語「*TIGIT拮抗劑*」與「*TIGIT*活性或*TIGIT*表現之拮抗劑」可互換使用且係指干擾(藉由降低TIGIT編碼核酸之轉錄或轉變或藉由抑制或阻斷TIGIT多肽活性或其兩者)TIGIT之正常功能的化合物。TIGIT拮抗劑之實例包含(但不限於)反義多核苷酸、干擾RNA、催化RNA、RNA-DNA

嵌合體、TIGIT特異性適體、抗TIGIT抗體、抗TIGIT抗體之TIGIT結合片段、TIGIT結合小分子、TIGIT結合肽及其他特異性結合TIGIT之多肽(包括(但不限於)一或多種TIGIT配位體之TIGIT結合片段，視情況與一或多種額外結構域融合)，使得TIGIT拮抗劑與TIGIT之間的相互作用引起TIGIT活性或表現之降低或停止。一般熟習此項技術者將理解，在一些情況下，TIGIT拮抗劑可拮抗一種TIGIT活性而不影響另一種TIGIT活性。舉例而言，用於本文中之某些方法中之所需TIGIT拮抗劑為TIGIT拮抗劑，其回應於PVR相互作用、PVRL3相互作用或PVRL2相互作用中之一者而拮抗TIGIT活性，且例如不影響或最低限度地影響任何其他TIGIT相互作用。

術語「*PVR*拮抗劑」與「*PVR*活性或*PVR*表現之拮抗劑」可互換使用且係指干擾(藉由降低PVR編碼核酸之轉錄或轉變或藉由抑制或阻斷PVR多肽活性或其兩者)PVR之正常功能之化合物。PVR拮抗劑之實例包含(但不限於)反義多核苷酸、干擾RNA、催化RNA、RNA-DNA嵌合體、PVR特異性適體、抗PVR抗體、抗PVR抗體之PVR結合片段、PVR結合小分子、PVR結合肽及其他特異性結合PVR之多肽(包括(但不限於)一或多種PVR配位體之PVR結合片段，視情況與一或多種額外結構域融合)，使得PVR拮抗劑與PVR之間的相互作用引起PVR活性或表現之降低或停止。一般熟習此項技術者將理解，在一些情況下，PVR拮抗劑可拮抗一種PVR活性而不影響另一種PVR活性。舉例而言，用於本文中之某些方法中之所需PVR拮抗劑為PVR拮抗劑，其回應於TIGIT相互作用而拮抗PVR活性且不影響PVR-CD96及/或PVR-CD226相互作用。

術語「*功能不全*」在免疫功能不全之情形下係指對抗原刺激之免疫

反應降低之狀態。該術語包括其中可發生抗原識別之耗竭及/或能力缺失之共同成分，但隨後的免疫反應對控制感染或腫瘤生長無效。

如本文所使用，術語「*功能異常*」亦包括對抗原識別具有抗性或不起反應，具體言之，將抗原識別轉譯成下游T細胞效應功能(諸如增殖、細胞活素產生(例如IL-2)及/或目標細胞殺死)之能力減弱。

術語「*能力缺失*」係指由經由T細胞受體之信號傳遞不完全或不充分而引起之對抗原刺激不起反應之狀態(例如在不存在ras活化之情況下細胞內Ca⁺²升高)。在不存在共刺激之情況下，T細胞能力缺失亦可由抗原刺激引起，引起細胞變成即使在共刺激情形下仍對後續抗原活化具有抗性。無反應狀態常常可由存在介白素-2解決。能力缺失T細胞不進行純系擴增及/或獲得效應功能。

術語「*耗竭*」係指T細胞耗竭，如在多種慢性感染及癌症期間發生之由持續TCR信號傳導引起之T細胞功能不全之狀態。其與能力缺失之區別在於其並非由信號傳導不完全或不足引起，而係由持續信號傳導引起。其由不良效應子功能、抑制性受體之持續表現及與功能性效應子或記憶T細胞不同之轉錄狀態定義。耗竭可阻止感染及腫瘤之最佳控制。耗竭可由外源性陰性調節路徑(例如免疫調節細胞激素)以及細胞內源性陰性調節(共刺激)路徑(PD-1、B7-H3、B7-H4等)引起。

「*增強T細胞功能*」意謂誘發、引起或刺激T細胞具有持續或擴增之生物功能，或更新或再活化耗竭或惰性T細胞。增強T細胞功能之實例包括：增加CD8⁺ T細胞之γ干擾素之分泌、增加增殖、在介入之前增加與該等水準相關之抗原反應(例如病毒、病原體或腫瘤清除率)。在一個實施例中，增強水準為至少50%，或者60%、70%、80%、90%、100%、

120%、150%、200%。量測此增強作用之方式為一般熟習此項技術者已知。

「*T*細胞功能異常病症」為由對抗原刺激之反應降低表徵之*T*細胞病症或病狀。在特定實施例中，*T*細胞功能異常病症為與經由PD-1之信號傳導不當增加特定相關之病症。在另一個實施例中，*T*細胞功能異常病症為其中*T*細胞能力缺失或分泌細胞激素、增殖或進行溶細胞活性之能力降低之病症。在特定態樣中，反應降低可引起對表現免疫原之病原體或腫瘤之控制無效。由*T*細胞功能不全表徵之*T*細胞功能異常病症之實例包括起因不明的急性感染、慢性感染及腫瘤免疫性。

「腫瘤免疫性」係指其中腫瘤躲避免疫識別及清除之過程。因此，作為治療概念，腫瘤免疫性在該躲避作用減弱且腫瘤由免疫系統識別及攻擊時被「治療」。腫瘤識別之實例包括腫瘤結合、腫瘤縮小及腫瘤清除。

「免疫原性」係指特定物質引起免疫反應之能力。在由免疫反應進行之腫瘤細胞之清除中，腫瘤為免疫原性且增強腫瘤免疫原性輔助物。增強腫瘤免疫原性之實例包括(但不限於)用PD-1軸結合拮抗劑(例如抗PD-L1抗體)及TIGIT抑制劑(例如抗TIGIT抗體)處理。

「持續反應」係指在停止處理之後，對降低腫瘤生長之持續作用。舉例而言，與投藥階段開始時之尺寸相比，腫瘤尺寸可保持相同或較小。在一些實施例中，持續反應之持續時間長度至少與處理持續時間相同、為處理持續時間之1.5倍、2.0倍、2.5倍或3.0倍。

術語「抗體」包括單株抗體(包括具有免疫球蛋白Fc區之全長抗體)、具有多表位特異性之抗體組合物、多特異性抗體(例如雙特異性抗體、雙功能抗體及單鏈分子)以及抗體片段(例如Fab、F(ab')₂及Fv)。在本文中，

術語「免疫球蛋白」(Ig)可與「抗體」互換使用。

基本四鏈抗體單位為雜四聚醣蛋白，其由兩條相同之輕(L)鏈及兩條相同之重(H)鏈構成。IgM抗體由5個基本雜四聚體單位以及稱為J鏈之另一多肽組成，且含有10個抗原結合位點，而IgA抗體包含2-5個可與J鏈組合聚合形成多價裝配體(*assemblage*)之基本四鏈單位。在IgG之情況下，4鏈單元一般為約150,000道爾頓。各L鏈經由一個共價雙硫鍵與H鏈鏈聯，而視H鏈同型而定，兩條H鏈經由一或多個雙硫鍵彼此鏈聯。各H及L鏈亦具有規則間隔之鏈內二硫橋。各H鏈在N端具有可變域(V_H)，繼之以各 α 及 γ 鏈之三個恆定域(C_H)以及 μ 及 ϵ 同型之4個 C_H 域。各L鏈在N末端具有可變域(V_L)，繼之以位於其另一端之恆定域。 V_L 與 V_H 對準且 C_L 與重鏈之第一恆定域(C_{H1})對準。咸信，特定胺基酸殘基在輕鏈與重鏈可變域之間形成界面。 V_H 與 V_L 配對一起形成單一抗原結合位點。關於不同類別之抗體之結構及特性，參見例如*Basic and Clinical Immunology*, 第8版, Daniel P. Sties, Abba I. Terr 及 Tristram G. Parslow (編), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 第71頁及第6章。來自任何脊椎動物物種之L鏈可基於其恆定域之胺基酸序列而歸為兩種顯著不同類型(稱為 κ 及 λ)中之一種。視免疫球蛋白之重鏈(CH)之恆定域之胺基酸序列而定，其可歸為不同類別或同型。存在5種類別之免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，其分別具有指定為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 之重鏈。基於CH序列及功能之相對較小差異， γ 及 α 類別進一步分成亞類，例如人類表現以下亞類：IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。

抗體之「可變區」或「可變域」係指抗體之重鏈或輕鏈之胺基端結構域。重鏈及輕鏈之可變結構域可分別稱為「 VH 」及「 VL 」。此等域一般

為抗體之最可變部分(相對於同一類別之其他抗體)且含有抗原結合位點。

術語「可變」係指抗體之可變域之某些區段的序列廣泛不同。V域介導抗原結合且定義特定抗體對其特定抗原之特異性。然而，可變性並非均勻分佈於整個可變域中。相反，其集中於輕鏈可變域與重鏈可變域中稱為高變區(HVR)之三個區段中。可變域之更高保守部分稱作構架區(FR)。原生重鏈及輕鏈之可變域各自包含四個主要採用 β 摺疊構型之FR區，該等FR區由三個HVR連接，該等HVR形成連接 β 摺疊結構之環，且在一些情況下形成 β 摺疊結構之一部分。各鏈中之HVR與另一鏈中之HVR藉由FR區緊密結合在一起，促使形成抗體之抗原結合位點(參見Kabat等人，*Sequences of Immunological Interest*，第五版，National Institute of Health, Bethesda, MD (1991))。雖然恆定域並不直接參與抗體與抗原之結合，但展現各種效應功能，諸如使抗體參與抗體依賴性細胞毒性。

如本文所用之術語「單株抗體」係指自實質上均質之抗體群體所獲得之抗體，亦即，構成該群體之個別抗體除可微量存在之可能的天然存在之突變及/或轉譯後修飾(例如異構化、醯胺化)外相同。單株抗體針對單一抗原位點具高度特異性。與通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑相反，各單株抗體針對抗原上之單一決定子。除其特異性以外，單株抗體之有利之處在於其藉由融合瘤培養合成，不受其他免疫球蛋白污染。修飾語「單株」指示抗體係自實質上均質之抗體群體獲得之特徵，且不應理解為需要藉由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，根據本發明使用之單株抗體可由多種技術製得，包括例如融合瘤方法(例如Kohler及Milstein., *Nature*, 256:495-97 (1975)；Hongo等人, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995)、Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*,

(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版1988) ; Hammerling等人, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、重組型DNA方法(參見例如美國專利第4,816,567號)、噬菌體呈現技術(參見例如Clackson等人, *Nature*, 352: 624-628 (1991) ; Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992) ; Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004) ; Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004) ; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004) ; 及 Lee等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)) , 及用於在具有部分或全部人類免疫球蛋白基因座或編碼人類免疫球蛋白序列之基因的動物中產生人類或類人類抗體的技術(參見例如WO 1998/24893 ; WO 1996/34096 ; WO 1996/33735 ; WO 1991/10741 ; Jakobovits等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993) ; Jakobovits等人, *Nature* 362: 255-258 (1993) ; Bruggemann等人, *Year in Immunol.* 7:33 (1993) ; 美國專利第5,545,807號 ; 美國專利第5,545,806號 ; 美國專利第5,569,825號 ; 美國專利第5,625,126號 ; 美國專利第5,633,425號 ; 及美國專利第5,661,016號 ; Marks等人, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) ; Lonberg等人, *Nature* 368: 856-859 (1994) ; Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994) ; Fishwild 等人, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996) ; Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) ; 及 Lonberg 及 Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)) 。

術語「裸抗體」係指未與細胞毒素部分或放射性標記結合之抗體。

術語「全長抗體」、「完整抗體」或「完全抗體」可互換使用以指與抗體片段完全不同的呈實質上完整形式之抗體。特定言之，完全抗體包括

具有包括Fc區之重鏈及輕鏈之抗體。恆定域可為天然序列恆定域(例如人類天然序列恆定域)或其胺基酸序列變異體。在一些情況下，完整抗體可具有一或多種效應功能。

「抗體片段」包含完整抗體之一部分，較佳完整抗體之抗原結合區及/或可變區。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段；雙功能抗體；線抗體(參見美國專利5,641,870，實例2；Zapata等人, *Protein Eng.* **8(10)**: 1057-1062 [1995])；由抗體片段形成之單鏈抗體分子及多特异性抗體。抗體之木瓜蛋白酶消化產生稱為「Fab」片段之兩個相同抗原結合片段及殘餘「Fc」片段，該名稱反映容易地結晶之能力。Fab片段由完整L鏈以及H鏈可變區域(V_H)及一條重鏈之第一恆定域(C_{H1})組成。各Fab片段對於抗原結合而言為單價的，亦即其具有單一抗原結合位點。用胃蛋白酶處理抗體產生單一大F(ab')₂片段，其大致對應於具有不同抗原結合活性之兩個雙硫鍵鍵聯之Fab片段且仍能夠交聯抗原。Fab'片段與Fab片段之不同之處在於在包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸的C_{H1}域之羧基末端具有少量其他殘基。Fab'-SH在本文中指代恆定域之半胱胺酸殘基帶有游離硫醇基之Fab'。F(ab')₂抗體片段最初製造為其間具有鉸鏈半胱胺酸之Fab'片段對。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

Fc片段包含由二硫鍵固持在一起之兩個H鏈之羧基端部分。抗體之效應功能由Fc區中之序列決定，該區亦由某些類型細胞上所發現之Fc受體(FcR)識別。

「Fv」為含有完整抗原識別及結合位點之最小抗體片段。此片段由一個重鏈可變區域與一個輕鏈可變區域緊密非共價締合之二聚體組成。此等兩個域摺疊產生六個高變環(H鏈及L鏈各3個環)，其提供用於抗原結合

之胺基酸殘基，且賦予抗體抗原結合特異性。然而，甚至單一可變域(或僅包含三個對抗原具特異性之HVR的一半Fv)亦具有識別並結合抗原之能力，但親和力低於整個結合位點。

「單鏈Fv」亦簡稱為「sFv」或「scFv」，其為包含連接至單一多肽鏈中之V_H及V_L抗體結構域的抗體片段。sFv多肽較佳在V_H與V_L域之間進一步包含使sFv能夠形成抗原結合所需結構之多肽連接子。關於sFv之綜述，參見Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷，Rosenburg及Moore編，Springer-Verlag, New York, 第269-315頁(1994)。

本發明抗體之「功能片段」包含完整抗體之一部分，一般包括完整抗體之抗原結合區或可變區或保留FcR結合能力或具有改良之FcR結合能力之抗體的Fc區。抗體片段之實例包括線性抗體、單鏈抗體分子及由抗體片段形成之多特異性抗體。

術語「雙功能抗體」係指藉由在V_H與V_L域之間用短連接子(約5-10個殘基)構築sFv片段(參見先前段落)以致實現V域之鏈間配對而非鏈內配對，藉此產生二價片段(亦即具有兩個抗原結合位點之片段)所製備之小抗體片段。雙特異性微型雙功能抗體為兩個「交叉」sFv片段之異源二聚體，其中兩個抗體之V_H域及V_L域存在於不同多肽鏈上。雙功能抗體更詳細地描述於例如EP 404,097；WO 93/11161；Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6444-6448 (1993)中。

本文之單株抗體特定包括「嵌合」抗體(免疫球蛋白)，其中重鏈及/或輕鏈的一部分與衍生自特定物種或屬於特定抗體類別或亞類之抗體中的相應序列相同或同源，而該(該等)鏈之其餘部分與衍生自另一物種或屬於

另一抗體類別或亞類之抗體中的相應序列相同或同源；以及該等抗體之片段，只要其展現出所要的生物活性即可(美國專利第4,816,567號；Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:6851-6855 (1984))。本文之相關嵌合抗體包括PRIMATIZED[®]抗體，其中抗體之抗原結合區係衍生自藉由例如用相關抗原使獼猴免疫所產生之抗體。如本文所使用，「人類化抗體」係作為「嵌合抗體」之子集使用。

非人類(例如鼠)抗體之「人類化」形式為含有最少之源自非人類免疫球蛋白之序列的嵌合抗體。在一個實施例中，人類化抗體為人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中來自接受者之HVR(下文定義)的殘基經來自具有所要特異性、親和力及/或能力之非人類物種(供體抗體)(諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物)之HVR的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白的構架(「FR」)殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含受體抗體或供者抗體中未見之殘基。可進行此等修飾以進一步改進抗體效能，諸如結合親和力。通常，人類化抗體將包含實質上至少一個且典型地，兩個可變結構域之全部，其中所有或大體上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白序列之高變環，且所有或大體上所有FR區域為人類免疫球蛋白序列之FR區域，但FR區域可包括一或多個改良抗體效能(諸如結合親和力、異構化、免疫原性等)之個別FR殘基替代。FR中此等胺基酸取代之數目典型地在H鏈中不超過6個且在L鏈中不超過3個。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，典型地，人類免疫球蛋白之至少一部分。關於其他細節，參見例如Jones等人, *Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988)；及Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。亦參見例如Vaswani及Hamilton,

Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998) ; Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995) ; Hurle 及 Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994) ; 及美國專利第6,982,321號及第7,087,409號。

「人類抗體」為具有對應於人類所產生之抗體之胺基酸序列的胺基酸序列的抗體及/或已使用如本文所揭示之用於製造人類抗體之技術中之任一種製成的抗體。人類抗體之此定義尤其排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。可使用此項技術中已知之各種技術(包括噬菌體呈現文庫)來產生人類抗體。Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991) ; Marks 等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991) 。 Cole 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77頁 (1985) ; Boerner 等人, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)中所述之方法亦可用於製備人類單株抗體。亦參見 van Dijk 及 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5:368-74 (2001)。人類抗體可藉由將抗原投與已經修飾以回應於抗原攻擊產生該等抗體但內源性基因座已不能使用之轉殖基因動物(例如經免疫之異種小鼠(xenomice))來製備(關於XENOMOUSE™技術, 參見例如美國專利第6,075,181號及第6,150,584號)。關於經由人類B細胞融合瘤技術產生之人類抗體, 亦參見例如Li等人, *PNAS USA*, **103**:3557-3562 (2006)。

當在本文中使用时, 術語「高變區」、「HVR」或「HV」係指抗體可變域中序列具有高變性及/或形成結構上界定之環的區域。通常, 抗體包含六個HVR; 三個位於V_H中(H1, H2、H3), 且三個位於V_L中(L1、L2, L3)。在原生抗體中, H3及L3在六個HVR中顯示最具多樣性, 且咸信尤其H3在賦予抗體以精細特異性方面起到獨特作用。參見例如Xu等人,

Immunity **13**:37-45 (2000) ; Johnson 及 Wu, *Methods in Molecular Biology* **248**:1-25 (Lo編, Human Press, Totowa, NJ, 2003)。實際上，僅由重鏈組成之天然存在之駱駝抗體在不存在輕鏈之情況下亦具功能性及穩定性。參見例如Hamers-Casterman等人, *Nature* **363**:446-448 (1993) ; Sheriff等人, *Nature Struct. Biol.* **3**:733-736 (1996)。

本文中使用並涵蓋許多HVR敘述。Kabat互補決定區(CDR)係基於序列可變性且使用最常見 (Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia另外指出結構環之位置(Chothia及Lesk *J. Mol. Biol.* **196**:901-917(1987))。AbM HVR表示 Kabat HVR與Chothia結構環之間的折中，且由Oxford Molecular之AbM 抗體模型化軟體使用。「接觸」HVR係基於可用複合晶體結構之分析。此等HVR中之每一者之殘基註解如下。

環	Kabat	AbM	Chothia	接觸
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat編號)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia編號)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

HVR可包含如下「擴展HVR」：VL中之24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2)及89-97或89-96 (L3)及VH中之26-35 (H1)、50-65或49-65

(H2)及93-102、94-102或95-102 (H3)。可變域殘基係根據Kabat等人(同上文)關於該等定義中之每一者所述編號。

表述「如Kabat中之可變功能域殘基編號」或「如Kabat中之胺基酸位置編號」及其變體係指Kabat等人,同上文中用於抗體之編譯之重鏈可變結構域或輕鏈可變結構域之編號系統。使用該編號系統,實際的線性胺基酸序列可含有更少或其他胺基酸,相當於簡化或插入可變域之FR或HVR。舉例而言,重鏈可變結構域可包括在H2之殘基52之後之單一胺基酸插入(根據Kabat之殘基52a)及在重鏈FR殘基82之後之插入殘基(例如根據Kabat之殘基82a、82b及82c等)。可藉由將抗體序列與「標準」Kabat編號序列之同源區相比對,來測定指定抗體中殘基之Kabat編號。

「構架」或「FR」殘基為除如本文所定義之HVR殘基以外的彼等可變域殘基。

「人類共同構架」或「受體人類構架」為表示人類免疫球蛋白V_L或V_H構架序列之選擇中最常存在之胺基酸殘基的構架。通常,人類免疫球蛋白V_L或V_H序列係選自可變域序列之亞群。通常,序列之亞群為如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中之亞群。對於V_L, 實例包括該亞群可為如Kabat等人, 同上文中之亞群κI、κII、κIII或κIV。此外,對於V_H, 亞群可為如Kabat等人, 同上文中之亞群I、亞群II或亞群III。或者,人類共同構架可來源於諸如當人類構架殘基係基於與供體構架之同源性藉由比對供體構架序列與許多各種人類構架序列而選擇時具有特定殘基之以上亞群。「來源於」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之受體人類構架可包含其相同胺基酸序列或其可含有預先存

在之胺基酸序列變化。在一些實施例中，預先存在之胺基酸變化之數目為10個或更少、9個或更少、8個或更少、7個或更少、6個或更少、5個或更少、4個或更少、3個或更少或2個或更少。

「*V_H*亞群III共同構架」包含由Kabat等人, 同上文之可變重亞群III中之胺基酸序列獲得的共同序列。在一個實施例中，*V_H*亞群III共同構架胺基酸序列包含以下序列中之每一者之至少一部分或全部：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (HC-FR1)(SEQ ID NO:25)、WVRQAPGKGLEWV (HC-FR2)、(SEQ ID NO:26)、RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (HC-FR3, SEQ ID NO:27)、WGQGTLLVTVSA (HC-FR4), (SEQ ID NO:28)。

「*V_L*κI共同構架」包含由Kabat等人, 同上文之可變輕κ亞群I中之胺基酸序列獲得的共同序列。在一個實施例中，*V_H*亞群I共同構架胺基酸序列包含以下序列中之每一者之至少一部分或全部：DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (LC-FR1) (SEQ ID NO:29)、WYQQKPGKAPKLLIY (LC-FR2) (SEQ ID NO:30)、GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (LC-FR3)(SEQ ID NO:31)、FGQGTKVEIKR (LC-FR4)(SEQ ID NO:32)。

指定位置(例如，Fc區域之指定位置)之「胺基酸修飾」係指指定殘基之取代或缺失或至少一個胺基酸殘基鄰接指定殘基插入。插入「鄰接」指定殘基意謂其一個至兩個殘基內之插入。插入可在指定殘基之N端或C端。本文中之較佳胺基酸修飾為取代。

「親和力成熟」抗體為在其一或多個HVR中具有一或多處可使得抗體對抗原之親和力改良之變化的抗體(與不具有彼等變化之親本抗體相

比)。在一個實施例中，親和力成熟抗體對標靶抗原具有奈莫耳(nanomolar)或甚至皮莫耳(picomolar)親和力。藉由此項技術中已知的程序產生親和力成熟抗體。舉例而言，Marks等人, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)描述藉由V_H域及V_L域改組進行親和力成熟。HVR及/或構架殘基之隨機突變誘發由例如Barbas等人, *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994)；Schier等人, *Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton等人 *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)；及Hawkins等人, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)描述。

如本文所用之術語「特異性結合」或「具有特異性」係指諸如目標與抗體之間的結合之可量測且可重現之相互作用，其在包括生物分子之分子之異質群體存在下確定目標之存在。舉例而言，特異性結合目標(可為抗原決定基)之抗體為與結合其他目標相比以較大親和力(affinity、avidity)、更容易及/或以更長持續時間結合此目標之抗體。在一個實施例中，如例如放射性免疫檢定(RIA)所量測，抗體與無關目標結合之水準為抗體與該目標之結合之約10%以下。在某些實施例中，特異性結合目標之抗體的解離常數(K_d)≤1 μM、≤100 nM、≤10 nM、≤1 nM或≤0.1 nM。在某些實施例中，抗體特異性結合在來自不同物種之蛋白質中為保守的蛋白質上之抗原決定基。在另一個實施例中，特異性結合可包括(但不必需)排他性結合。

如本文所使用，術語「免疫黏附素」表示類抗體分子，其將異源蛋白質(「黏附素」)之結合特異性與免疫球蛋白恆定域之效應功能組合。在結構上，免疫黏附素包含具有所需結合特異性之胺基酸序列(其並非抗體

之抗原識別及結合位點，亦即為「異源」的)與免疫球蛋白恆定域序列的融合物。免疫黏附素分子之黏附素部分通常為至少包含受體或配體之結合位點的毗連胺基酸序列。免疫黏附素中之免疫球蛋白恆定域序列可自任何免疫球蛋白獲得，諸如IgG-1、IgG-2(包括IgG2A及IgG2B)、IgG-3或IgG-4亞型、IgA(包括IgA-1及IgA-2)、IgE、IgD或IgM。Ig融合體較佳包括用本文所述之多肽或抗體域替代Ig分子內之至少一個可變區。在尤佳實施例中，免疫球蛋白融合物包括IgG1分子之鉸鏈區、CH2及CH3區或鉸鏈區、CH1、CH2及CH3區。對於產生免疫球蛋白融合，亦參見1995年6月27日頒佈之美國專利第5,428,130號。舉例而言，適合作為適用於本文中之組合療法之第二藥劑的免疫黏附素包含PD-L1或PD-L2之胞外或PD-1結合部分或PD-1之胞外或PD-L1或PD-L2結合部分的多肽，其與免疫球蛋白序列之恆定域融合，分別諸如PD-L1 ECD-Fc、PD-L2 ECD-Fc及PD-1 ECD-Fc。Ig Fc與細胞表面受體之ECD之免疫黏附素組合有時稱為可溶受體。

「融合蛋白質」及「融合多肽」係指具有兩個共價接合在一起的部分之多肽，其中該等部分中之每一者為具有不同特性之多肽。特性可為生物特性，諸如活體外或活體內活性。特性亦可單一化學或物理性質，諸如結合於目標分子、反應之催化等。兩個部分可藉由單一肽鍵直接接合或經由肽連接子接合，但彼此在閱讀框架中。

如本文所描述，「PD-1寡肽」、「PD-L1寡肽」或「PD-L2寡肽」為分別結合(較佳特異性)於PD-1、PD-L1或PD-L2陰性共刺激多肽之寡肽，分別包括受體、配位體或信號傳導成分。該等寡肽可使用已知寡肽合成方法以化學方式合成或可使用重組技術製備及純化。該等寡肽之長度通常至少

為約5個胺基酸，或者長度可為至少約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100個胺基酸或更大。該等寡肽可使用熟知技術鑑別。在此方面，應指出，用於篩選能夠特異性結合於多肽目標之寡肽之寡肽文庫的技術在此項技術中已熟知(參見例如美國專利第5,556,762號、第5,750,373號、第4,708,871號、第4,833,092號、第5,223,409號、第5,403,484號、第5,571,689號、第5,663,143號；PCT公開案第WO 84/03506號及第WO84/03564號；Geysen等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**:3998-4002 (1984)；Geysen等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**:178-182 (1985)；Geysen等人, *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986)；Geysen等人, *J. Immunol. Meth.*, **102**:259-274 (1987)；Schoofs等人, *J. Immunol.*, **140**:611-616 (1988), Cwirla, S. E.等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:6378 (1990)；Lowman, H.B.等人 *Biochemistry*, **30**:10832 (1991)；Clackson, T.等人 *Nature*, **352**: 624 (1991)；Marks, J. D.等人, *J. Mol. Biol.*, **222**:581 (1991)；Kang, A.S.等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:8363 (1991)，及Smith, G. P., *Current Opin. Biotechnol.*, **2**:668 (1991))。

「阻斷」抗體或「拮抗劑」抗體為抑制或降低其所結合之抗原之生

物活性的抗體。在一些實施例中，阻斷抗體或拮抗劑抗體實質上或完全抑制抗原之生物活性。本發明之抗PD-L1抗體阻斷經由PD-1之信號傳導，以便使T細胞自功能異常狀態恢復對抗原刺激之功能反應(例如增殖、細胞因子產生、目標細胞殺死)。

「促效劑」或「活化」抗體為增強或引發其所結合之抗原之信號傳導的抗體。在一些實施例中，在無天然配位體存在下，促效抗體引起或活化信號傳導。

本文中之術語「Fc區」用於定義免疫球蛋白重鏈之C端區，包括天然序列Fc區及變異體Fc區。儘管免疫球蛋白重鏈之Fc區之邊界可變化，但人類IgG重鏈Fc區通常定義為自位置Cys226處之胺基酸殘基或自Pro230至其羧基端的一段。Fc區之C端離胺酸(根據EU編號系統之殘基447)例如可在抗體產生或純化期間或藉由重組工程改造編碼抗體重鏈之核酸而移除。因此，完整抗體之組合物可包含移除所有K447殘基之抗體群、未移除K447殘基之抗體群及具有有無K447殘基之抗體混合物的抗體群。適用於本發明抗體之天然序列Fc區包括人類IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3及IgG4。

「Fc受體」或「FcR」描述結合於抗體之Fc區的受體。較佳FcR為原生序列人類FcR。此外，較佳FcR為結合IgG抗體之受體(γ 受體)且包括Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII亞類之受體，包括對偶基因變體及此等受體之交替剪接形式，Fc γ RII受體包括Fc γ RIIA(「活化受體」)及Fc γ RIIB(「抑制受體」)，其具有主要在細胞質結構域方面不同的類似胺基酸序列。活性受體Fc γ RIIA在其細胞質域含有基於免疫受體酪胺酸之激活模體(ITAM)。抑制受體Fc γ RIIB在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之抑制主結構

(ITIM) (參見M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* **15**:203-234 (1997))。FcR 論述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 457-92 (1991)；Capel等人, *Immunomethods* **4**: 25-34 (1994)；及de Haas等人, *J. Lab. Clin. Med.* **126**: 330-41 (1995)中。其他FcR，包括將來鑑別之FcR，涵蓋於本文中之術語「FcR」中。

術語「Fc受體」或「FcR」亦包括新生受體FcRn，其負責將母體IgG轉移至胎兒。Guyer等人, *J. Immunol.* **117**: 587 (1976)及Kim等人, *J. Immunol.* **24**: 249 (1994)。已知量測與FcRn之結合的方法(參見例如Ghetie及Ward, *Immunol. Today* **18**: (12): 592-8 (1997)；Ghetie等人, *Nature Biotechnology* **15** (7): 637-40 (1997)；Hinton等人, *J. Biol. Chem.* **279** (8): 6213-6 (2004)；WO 2004/92219 (Hinton等人))。可例如在表現人類FcRn之轉殖基因小鼠或經轉染人類細胞株中，或在投與具有變異Fc區之多肽的靈長類動物中，檢定活體內與FcRn之結合及人類FcRn高親和力結合多肽之血清半衰期。WO 2004/42072(Presta)描述與FcR之結合提高或降低之抗體變異體。亦參見例如Shields等人, *J. Biol. Chem.* **9**(2): 6591-6604 (2001)。

如本文中所用，短語「大體上減少」或「大體上不同」係表示兩個數值之間的差異水準足夠大(通常，一個數值與一種分子相關而另一數值與參考/對比分子相關)，以致熟習該項技術者認為兩數值之間的差異在藉由該等數值(例如Kd值)所量測之生物學特徵之範圍內具有統計顯著性。該兩個數值之間的差異作為參考/對比分子之數值的函數例如大於約10%、大於約20%、大於約30%、大於約40%及/或大於約50%。

如本文所用之術語「實質上類似」或「實質上相同」表示兩個數值

(例如與本發明抗體相關之一個數值及與參考/比較抗體相關之另一數值)之間的相似水準足夠高，使得熟習此項技術者將認為兩個值之間的差異在由該等值(例如Kd值)所量度之生物特徵的情形下具有極小或不具有生物及/或統計顯著性。該兩個值之間的差異作為參考/比較值之函數為例如小於約50%、小於約40%、小於約30%、小於約20%及/或小於約10%。

如本文所用之「載劑」包括在所採用之劑量及濃度下，對暴露於其中之細胞或哺乳動物無毒之醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑。通常，生理學上可接受之載劑為pH緩衝水溶液。生理學上可接受之載劑之實例包括緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖醇，諸如甘露糖醇或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；及/或非離子界面活性劑，諸如TWEEN™、聚乙二醇(PEG)及PLURONICS™。

「包裝插頁」係指通常包括於藥劑之商業包裝中之說明書，其含有關於使用該等藥劑之適應症、用法、劑量、投藥、禁忌、與所包裝產品組合之其他藥劑及/或注意事項等資訊。

如本文所使用，術語「處理」係指經設計以改變所治療之個體或細胞在臨床病理學之病程期間的天然病程的臨床介入。所需處理作用包括降低疾病發展速率、改善或減輕疾病病況及緩解或改良預後。舉例而言，若一或多種與癌症相關之症狀減輕或消除，包括(但不限於)降低(或破壞)癌細胞之增殖、減少由疾病引起之症狀、提高疾病患者之生活品質、降低治

療疾病所需之其他藥物的劑量、延緩疾病進程及/或延長個體存活時間，則成功「治療」個體。

如本文所使用，「延緩疾病進程」意謂延緩、阻礙、減緩、阻滯、穩定及/或延遲疾病(諸如癌症)之發展。視疾病史及/或所治療之個體而定，此延遲可具有變化之時間長度。如熟習此項技術者所明瞭，充分或顯著之延緩實際上可涵蓋預防，其中該個體並不發展該疾病。舉例而言，晚期癌症(諸如轉移之發展)可得到延遲。

如本文所使用，「*降低或抑制癌症復發*」意謂降低或抑制腫瘤或癌症復發或腫瘤或癌症進程。

如本文所使用，「癌症」及「癌性」係指或描述哺乳動物中之生理病狀，其典型地由不受控細胞生長表徵。此定義中包括良性及惡性癌症以及休眠腫瘤或微轉移。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。該等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌、肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺部腺癌及肺部鱗狀癌)、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(包括胃腸癌)、胰臟癌、膠質母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝腫瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌瘤、唾液腺癌瘤、腎癌、肝癌、前列腺癌、陰門癌、甲狀腺癌、肝癌及各種類型頭頸癌，以及B細胞淋巴瘤(包括低度/濾泡性非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma；NHL)；小淋巴細胞性(SL)NHL；中度/濾泡性NHL；中度彌漫性NHL；高度免疫胚細胞性NHL；高度淋巴母細胞性NHL；高度小不裂解細胞性NHL；巨大腫塊性NHL；套細胞淋巴瘤；AIDS相關淋巴瘤；及瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia)；慢性淋巴球性白血病(CLL)；急性淋巴母細胞性白

血病(ALL)；毛細胞白血病；慢性骨髓母細胞性白血病；及移植後淋巴組織增生病症(PTLD)，以及與母斑病、水腫(諸如與腦腫瘤相關之水腫)及梅格斯氏症候群(Meigs' syndrome)相關之異常血管增生。

如本文所使用，「轉移」意謂癌症自其原發位點擴散至身體中其他部位。癌細胞可離開原發腫瘤，滲透至淋巴及血管中，經由血流循環且在體內其他位置處之正常組織內的遠位中心生長(轉移)。轉移可為局部或遠位的。視自原發腫瘤離開、穿過血流且停留在遠端位點之腫瘤細胞而定，轉移為連續過程。在新的部位，細胞建立血液供應且可生長以形成危及生命的塊狀物。腫瘤細胞內之刺激性及抑制性分子均調節此性質，且遠端部位中腫瘤細胞與宿主細胞之間的相互作用亦顯著。

「有效量」至少為實現可測量的改進或預防特定病症所需之最小濃度。本文中之有效量可根據諸如患者之疾病病況、年齡、性別及體重以及抗體引起個體中所需反應之能力之因素而變化。有效量亦為其中處理之任何毒性或有害作用不超過治療有益作用之量。對於預防性用途而言，有利或所需結果包括諸如消除或減小風險、減輕嚴重水準或延遲疾病發作之結果，該發作包括疾病之生物化學、組織及/或行為症狀，在疾病發展期間呈現之其併發症及中間病理學表型。對於治療用途，有益或所需結果包括諸如降低由疾病引起之一或多種症狀、提高疾病患者之生活品質、降低治療疾病所需之其他藥物的劑量、增強另一種藥物之作用(諸如經由靶向)、延緩疾病進程及/或延長存活時間之臨床結果。在癌症或腫瘤情況下，有效量之藥物可具有以下作用：降低癌細胞數目；降低腫瘤尺寸；抑制(亦即在一定水準上減緩或理想地停止)癌細胞浸潤至周邊器官中；抑制(亦即在一定水準上減緩或理想地停止)腫瘤轉移；在一定水準上抑制腫瘤生

長；及/或在一定水準上緩解與病症相關之一或多種症狀。有效量可以一或多種投藥投與。出於本發明之目的，有效量之藥物、化合物或醫藥組合物為足以直接或間接實現預防性或治療性處理之量。如在臨床背景中所瞭解，藥物、化合物或醫藥組合物之有效劑量可與或不與另一藥物、化合物或醫藥組合物結合達成。因此，在投與一或多種治療劑之情形下可考慮「有效劑量」，且若與一或多種其他藥劑聯合，所需結果可達成或已達成，則可視為單一藥劑係以有效量給出。

如本文所使用，「結合」係指除一種處理形式以外亦投與另一種處理形式。因此，「結合」係指在向個體投與一種處理形式之前、在投與一種處理形式期間或在投與一種處理形式之後投與另一種處理形式。

如本文所使用，「個體」意謂哺乳動物，包括(但不限於)人類或非人類哺乳動物，諸如牛、馬、犬、羊或貓。個體較佳為人類。本文中患者亦為個體。

如本文所使用，「完全反應」或「CR」係指所有目標病灶消失；「部分反應」或「PR」係指目標病灶之最長直徑之總和(SLD)降低至少30%，以基線SLD作為參考；及「穩定疾病」或「SD」係指目標病灶既未充分收縮至滿足PR要求，亦未充分增加至滿足PD要求，以處理開始時之最小SLD作為參考。

如本文所使用，「進行性疾病」或「PD」係指目標病灶之SLD增加至少20%，以自處理開始時所記錄之最小SLD或存在一或多個新的病灶作為參考。

如本文所使用，「無進展存活期」(PFS)係指處理期間及處理後之時間長度，其間所治療之疾病(例如癌症)未惡化。無進展存活期可包括患者

經歷完全反應或部分反應之時間量，以及患者經歷穩定疾病之時間量。

如本文所使用，「整體反應率」(ORR)係指完全反應(CR)率與部分反應(PR)率之總和。

如本文所使用，「整體存活率」係指組中可能在特定持續時間之後存活之個體之百分比。

「化學治療劑」為適用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括烷基化劑，諸如噻替派(thiotepa)及環磷醯胺(CYTOXAN®)；烷基磺酸酯，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；乙烯亞胺及甲基三聚氰胺，包括六甲蜜胺(altretamine)、曲他胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三甲密胺(trimethylolomelamine)；乙醯精寧(acetogenins)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))； δ -9-四氫大麻酚(屈大麻酚(dronabinol)、MARINOL®)； β -拉帕酮(beta-lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼(colchicines)；樺木酸(betulinic acid)；喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物拓朴替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康(irinotecan)、CAMPTOSAR®)、乙醯基喜樹鹼、東莨菪素(scopolectin)及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚蟲素(苔蘚蟲素)；培美曲塞(pemetrexed)；海洋抑素(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；替尼泊苷(teniposide)；念珠藻環肽(cryptophycins)(特定言之，念珠藻環肽1及念珠

藻環肽8)；海兔毒素(dolastatin)；倍癌黴素(duocarmycin)(包括合成類似物 KW-2189 及 CB1-TM1)；艾榴塞洛素(eleutherobin)；盤克斯塔汀(pancratistatin)；TLK-286；CDP323，一種口服 α -4整合素抑制劑；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海綿抑素(spongistatin)；氮芥(nitrogen mustards)，諸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺、雌氮芥(estramustine)、異環磷醯胺、雙氯乙基甲胺、氮芥氧化物氫化物、美法侖(melphalan)、新氮芥(novembichin)、膽固醇對苯乙酸氮芥(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶芥(uracil mustard)；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗有絲分裂劑，諸如烯二炔抗有絲分裂劑(例如卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 γ II及卡奇黴素 Ω II (參見例如Nicolaou等人, *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))；達米辛(dynemicin)，包括達米辛A；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新抑癌蛋白發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomysins)、放射菌素、安麴黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸、博來黴素(bleomycins)、放線菌素C、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、放線菌素D、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、小紅莓(doxorubicin)(包括ADRIAMYCIN®、N-嗎啉基-小紅莓、氰基-N-嗎啉基-小紅莓、2-吡咯啉基-小紅莓、鹽酸小紅莓脂質體注射液(DOXIL®)及去氧小紅莓(deoxydoxorubicin))、表柔比星(epirubicin)、依索比星

(esorubicin)、艾達黴素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycins)(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈脲佐菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤(methotrexate)、吉西他濱(gemcitabine)(GEMZAR®)、喃氟啶(tegafur)(UFTORAL®)、卡培他濱(capecitabine)(XELODA®)、埃坡黴素(epothilone)及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤(methotrexate)、蝶羅呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤、硫米嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)及伊馬替尼(imatinib)(2-苯基胺基嘧啶衍生物)以及其他c-Kit抑制劑；抗腎上腺劑，諸如胺格魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如亞葉酸；乙醯葡醛酯；醛磷醯胺糖苷；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝斯布西(bestrabucil)；比山群(bisantrene)；艾達曲克(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醌(diaziquone)；艾弗鳥胺酸(elfornithine)；依利乙胺；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；脛基尿素；

蘑菇多醣(lentinan)；氯尼達明(lonidainine)；類美登素(maytansinoids)，
 諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocins)；丙脒脒
 (mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫比達摩(mopidanmol)；二胺
 硝吡啶(nitraerine)；噴司他汀(pentostatin)；凡那明(phenamet)；吡柔比
 星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼
 (procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；
 雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；螺旋鍺；細
 交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢
 黴烯(trichothecenes)(尤其T-2毒素，弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素
 A(roridin A)及胺癸叮(anguidine))；尿烷(urethan)；長春地辛
 (vindesine)(ELDISINE®、FILDESIN®)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露
 氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇
 (mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖
 苷(arabinoside)(「Ara-C」)；噻替派(thiotepa)；類紫杉醇(taxoids)，例
 如太平洋紫杉醇(paclitaxel)(TAXOL®)、太平洋紫杉醇之經白蛋白工程改
 造之奈米粒子調配物(ABRAXANE™)及多西他賽
 (doxetaxel)(TAXOTERE®)；苯丁酸氮芥(chloranbucil)；6-硫代鳥嘌呤
 (6-thioguanine)；巯基嘌呤；甲胺嘌呤；鉑類似物，諸如順鉑(cisplatin)
 及卡鉑(carboplatin)；長春鹼(vinblastine)(VELBAN®)；鉑；依託泊苷
 (etoposide)(VP-16)；異環磷醯胺(ifosfamide)；米托蒽醌
 (mitoxantrone)；長春新鹼(vincristine)(ONCOVIN®)；奧沙利鉑
 (oxaliplatin)；亮克沃林(leucovorin)；長春瑞賓(vinorelbine)
 (NAVELBINE®)；米托蒽醌(novantrone)；依達曲沙(edatrexate)；柔紅

黴素(daunomycin)；胺基喋呤(aminopterin)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視黃素，諸如視黃酸(retinoic acid)；以上任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物；以及以上兩者或兩者以上之組合，諸如CHOP，其為環磷醯胺、小紅莓、長春新鹼及潑尼龍之組合療法之縮寫，及FOLFOX，其為奧沙利鉑(ELOXATIN™)與5-FU及亮克沃林之組合之治療方案。

該定義中亦包括具有調節、減少、阻斷或抑制可促進癌生長之激素之效應之作用的抗激素劑，該等抗激素劑通常為系統性或全身性治療之形式。其可為激素本身。實例包括抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括(例如)他莫西芬(包括NOLVADEX®他莫西芬)、雷諾昔芬(raloxifene)(EVISTA®)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫西芬(4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬(trioxifene)、雷諾昔芬鹽酸鹽(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及托瑞米芬(toremifene)(FARESTON®)；抗孕酮；雌激素受體下調劑(ERD)；雌激素受體拮抗劑，諸如氟維司群(FASLODEX®)；用以抑制或制止卵巢功能之藥劑，例如黃體生成激素釋放激素(LHRH)促效劑，諸如乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)(LUPRON®及ELIGARD®)、乙酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、乙酸布舍瑞林(buserelin acetate)及曲特瑞林(tripterelin)；抗雄激素，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)及比卡魯胺(bicalutamide)；及抑制酶芳香酶(其調控腎上腺中雌激素之產生)之芳香酶抑制劑，諸如4(5)-咪唑、胺魯米特(aminoglutethimide)、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)(MEGASE®)、依西美坦(exemestane)(AROMASIN®)、弗米斯坦(formestane)、法屈唑(fadrozole)、伏羅唑(vorozole)

(RIVISOR®)、來曲唑(letrozole)(FEMARA®)及安美達錠(anastrozole)(ARIMIDEX®)。此外，該化學治療劑定義包括：雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)(例如 BONEFOS® 或 OSTAC®)、依替膦酸鹽(etidronate)(DIDROCAL®)、NE-58095、唑來膦酸/唑來膦酸鹽(zoledronic acid/zoledronate)(ZOMETA®)、阿侖膦酸鹽(alendronate)(FOSAMAX®)、帕米膦酸鹽(pamidronate)(AREDIA®)、替魯膦酸鹽(tiludronate)(SKELID®)或利塞膦酸鹽(risedronate)(ACTONEL®)；以及曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，尤其抑制異常細胞增殖所牽涉之信號轉導路徑中基因之表現的彼等反義寡核苷酸，諸如PKC- α 、Raf、H-Ras及表皮生長因子受體(EGF-R)；疫苗，諸如THERATOPE®疫苗及基因治療疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗；拓撲異構酶1抑制劑(例如LURTOTECAN®)；抗雌激素，諸如氟維司群；Kit抑制劑，諸如伊馬替尼或EXEL-0862(酪胺酸激酶抑制劑)；EGFR抑制劑，諸如埃羅替尼或西妥昔單抗；抗VEGF抑制劑，諸如貝伐單抗；瑞諾替康(arinotecan)；rmRH(例如ABARELIX®)；拉帕替尼及拉帕替尼對甲苯磺酸鹽(lapatinib ditosylate)(ErbB-2與EGFR雙重酪胺酸激酶小分子抑制劑，亦稱為GW572016)；17AAG(作為熱休克蛋白(Hsp)90毒劑之格爾德黴素(geldanamycin)衍生物)；及上述化學治療劑中之任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

如本文所使用，術語「細胞激素」通常係指由一個細胞群體釋放之蛋白質，其作用於作為細胞間介體之另一細胞或對產生蛋白質之細胞具有自分泌作用。該等細胞激素之實例包括淋巴因子、單核球激素；介白素

(「IL」)，諸如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17A-F、IL-18至IL-29(諸如IL-23)、IL-31，包括PROLEUKIN[®]rIL-2；腫瘤壞死因子，諸如TNF- α 或TNF- β ，TGF- β 1-3；及其他多肽因子，包括白血病抑制因子(「LIF」)，睫狀神經營養因子(「CNTF」)、類CNTF細胞激素(「CLC」)、心營養素(「CT」)及套組配位體(「KL」)。

如本文所使用，術語「趨化細胞素」係指具有選擇性誘發白細胞之趨化及活化之能力的可溶因子(例如細胞激素)。其亦引起血管生成、發炎、傷口癒合及腫瘤形成過程。實例趨化因子包括IL-8，一種鼠角質細胞化學引誘劑(KC)之人類同源物。

除非上下文另外明確指示，否則如本文中及所附申請專利範圍中所使用，單數形式「一」及「該」包括複數個指示物。

本文中，對「約」一個值或參數之參考包括(及描述)針對該值或參數本身之變化。舉例而言，涉及「約X」之描述包括「X」之描述。

如本文所用之片語「醫藥學上可接受之鹽」係指本發明化合物之醫藥學上可接受之有機鹽或無機鹽。例示性鹽包括(但不限於)硫酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸磷酸鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、柳酸鹽、酸檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、丹寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、丁二酸鹽、順丁烯二酸鹽、龍膽酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡糖酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、葡糖二酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲烷磺酸鹽「甲磺酸鹽」、乙烷磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽、雙羥萘酸鹽(亦即1,1'-亞甲基-雙-(2-羥基-3-萘甲酸鹽))鹽、鹼金屬(例如鈉及鉀)鹽、鹼土金屬(例如鎂)鹽及銨鹽。

醫藥學上可接受之鹽可涉及包涵另一分子，諸如乙酸根離子、丁二酸根離子或其他相對離子。相對離子可為使母體化合物上之電荷穩定之任何有機或無機部分。此外，醫藥學上可接受之鹽可於其結構中具有一個以上帶電原子。多個帶電原子為醫藥學上可接受之鹽之一部分的情況可具有多個相對離子。因此，醫藥學上可接受之鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個相對離子。

若本發明之化合物為鹼，則所需醫藥學上可接受之鹽可由此項技術中可用之任何合適方法製備，例如用無機酸處理游離鹼，該無機酸為諸如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、甲烷磺酸、磷酸及其類似酸；或用有機酸處理游離鹼，該有機酸為諸如乙酸、順丁烯二酸、丁二酸、扁桃酸、反丁烯二酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水楊酸、諸如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸之呷喃糖酸、諸如檸檬酸或酒石酸之 α -羥基酸、諸如天冬胺酸或麩胺酸之胺基酸、諸如苯甲酸或肉桂酸之芳族酸、諸如對甲苯磺酸或乙烷磺酸之磺酸或其類似酸。

若本發明化合物為酸，則所需醫藥學上可接受之鹽可由任何合適方法製備，例如用無機鹼或有機鹼處理游離酸，該無機鹼或有機鹼為諸如胺(第一胺、第二胺或第三胺)、鹼金屬氫氧化物或鹼土金屬氫氧化物或其類似鹼。合適鹽之說明性實例包括(但不限於)：來源於以下之有機鹽：諸如甘胺酸及精胺酸之胺基酸、氨、第一胺、第二胺及第三胺及諸如呷啉、嗎啉及呷嗪之環胺；及來源於以下之無機鹽：鈉、鈣、鉀、鎂、錳、鐵、銅、鋅、鋁及鋰。

片語「醫藥學上可接受」表示物質或組合物須與構成調配物之其他成份及/或用其治療之哺乳動物化學上及/或毒理學上相容。

應理解，本文中所描述之本發明之態樣及變化包括「組成」態樣及變化及/或「主要由態樣及變化組成」。

III. 方法

在一態樣中，本文中提供治療或延緩個體中之癌症之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。

在另一態樣中，本文中提供降低或抑制個體中癌症復發或癌症進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。如本文所揭示，癌症復發及/或癌症進程包括(但不限於)癌症轉移。

在另一態樣中，本文中提供治療或延緩個體中免疫相關疾病之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。

在另一態樣中，本文中提供降低或抑制個體中免疫相關疾病之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。

在一些實施例中，免疫相關疾病與T細胞功能異常病症相關。在一些實施例中，免疫相關疾病為病毒感染。在某些實施例中，病毒感染為慢性病毒感染。在一些實施例中，T細胞功能異常病症係由對抗原刺激之反應降低表徵。在一些實施例中，T細胞功能異常病症係由T細胞能力缺失或分泌細胞激素、增殖或執行溶細胞活性之能力降低來表徵。在一些實施例中，T細胞功能異常病症係由T細胞耗竭表徵。在一些實施例中，T細胞為CD4+及CD8+ T細胞。在一些實施例中，T細胞功能異常病症包括起因不

明的急性感染、慢性感染及腫瘤免疫性。

在另一態樣中，本文中提供增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。

在另一態樣中，本文中提供治療或延緩個體中之癌症或延緩其進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

在另一態樣中，本文中提供用於降低或抑制個體中癌症復發或癌症進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

在另一態樣中，本文中提供用於治療個體中之免疫相關疾病或延緩其進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

在另一態樣中，本文中提供降低或抑制個體中之免疫相關疾病之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

在一些實施例中，免疫相關疾病與T細胞功能異常病症相關。在一些實施例中，免疫相關疾病為病毒感染。在某些實施例中，病毒感染為慢性病毒感染。在一些實施例中，T細胞功能異常病症係由對抗原刺激之反應降低表徵。在一些實施例中，T細胞功能異常病症係由T細胞能力缺失或分泌細胞激素、增殖或執行溶細胞活性之能力降低來表徵。在一些實施例中，T細胞功能異常病症係由T細胞耗竭表徵。在一些實施例中，T細胞為CD4+及CD8+ T細胞。在一些實施例中，免疫相關疾病係選自由以下組成

之群：起因不明的急性感染、慢性感染及腫瘤免疫性。

在另一態樣中，本文中提供增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其藉由投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

在一些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑能夠增加及/或刺激CD226表現及/或活性；增加及/或刺激CD226與PVR、PVRL2及/或PVRL3之相互作用；及增加及/或刺激由結合於PVR、PVRL2及/或PVRL3之CD226介導之細胞內信號傳導。如本文所使用，能夠增加及/或刺激CD226表現及/或活性之藥劑包括(但不限於)增加及/或刺激CD226表現及/或活性之藥劑。如本文所使用，能夠增加及/或刺激CD226與PVR、PVRL2及/或PVRL3之相互作用的藥劑包括(但不限於)增加及/或刺激CD226與PVR、PVRL2及/或PVRL3之相互作用的藥劑。如本文所使用，能夠增加及/或刺激由結合於PVR、PVRL2及/或PVRL3之CD226介導之細胞內信號傳導的藥劑包括(但不限於)增加及/或刺激由結合於PVR、PVRL2及/或PVRL3之CD226介導之細胞內信號傳導的藥劑。

在一些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑係選自抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑、TIGIT表現及/或活性之拮抗劑、PVR表現及/或活性之拮抗劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL2之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL3之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVRL2之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVRL3之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑及其組合。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑為小分子抑制劑，抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑為選自反義多核苷酸、干擾RNA、催化RNA及RNA-DNA嵌合體之抑制性核酸。

在一些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為選自反義多核苷酸、干擾RNA、催化RNA及RNA-DNA嵌合體之抑制性核酸。

在一些實施例中，PVR表現及/或活性之拮抗劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，PVR表現及/或活性之拮抗劑係選自小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑係選自小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL2之相互作用的藥劑係選自小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL3之相互作用的藥劑係選自小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於PVRL2之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於PVRL3之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在另一態樣中，本文中提供提高、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其藉由投與個體有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之表現及/或活性的藥劑。在一些實施例中，該一或多種額外免疫共抑制性受體係選自PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA VISTA、B7H4及CD96。在一些實施例中，該一或多種其他免疫共抑制性受體係選自PD-1、CTLA-4、LAG3及TIM3。

在另一態樣中，本文中提供提高、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其藉由投與個體有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之

藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之表現及/或活性的藥劑。在一些實施例中，該一或多種額外免疫共刺激性受體係選自CD226、OX-40、CD28、CD27、CD137、HVEM、GITR、MICA、ICOS、NKG2D及2B4。在一些實施例中，該一或多種額外免疫共刺激性受體係選自CD226、OX-40、CD28、CD27、CD137、HVEM及GITR。在一些實施例中，該一或多種額外免疫共刺激性受體係選自OX-40及CD27。

本發明之方法可用於治療需要增強免疫原性之病狀，諸如增加腫瘤免疫原性以用於治療癌症或T細胞功能異常病症。

可治療多種癌症，或可延緩其進程。

在一些實施例中，個體患有非小細胞肺癌。非小細胞肺癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有小細胞肺癌。小細胞肺癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有腎細胞癌。腎細胞癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有結腸直腸癌。結腸直腸癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有卵巢癌。卵巢癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有乳癌。乳癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有胰臟癌。胰臟癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有胃癌。胃癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有膀胱癌。膀胱癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有食道癌。食道癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有間皮瘤。間皮瘤可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有黑素瘤。黑素瘤可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有頭頸癌。頭頸癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有甲狀腺癌。甲狀腺癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有內瘤。內瘤可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體

患有前列腺癌。前列腺癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有神經膠母細胞瘤。神經膠母細胞瘤可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有子宮頸癌。子宮頸癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有胸腺癌。胸腺癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有白血病。白血病可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有淋巴瘤。淋巴瘤可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有骨髓瘤。骨髓瘤可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有蕈樣真菌病。蕈樣真菌病可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有梅克爾細胞癌。梅克爾細胞癌可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體患有血液科惡性疾病。血液科惡性疾病可處於早期或晚期。在一些實施例中，個體為人類。

在本發明之方法之一些實施例中，與投與組合之前相比，個體中之CD4及/或CD8 T細胞具有提高或增強之激活、活化、增殖、細胞激素釋放及/或溶細胞活性。

在本發明之方法之一些實施例中，與投與組合之前相比，CD4及/或CD8 T細胞之數目增加。在本發明之方法之一些實施例中，與投與組合之前相比，活性CD4及/或CD8 T細胞之數目增加。

在本發明之方法之一些實施例中，活性CD4及/或CD8 T細胞係由與投與組合之前相比，產生 γ -IFN⁺之CD4及/或CD8 T細胞及/或增強之溶細胞活性表徵。

在本發明之方法之一些實施例中，CD4及/或CD8 T細胞呈現增加之選自由以下組成之群之細胞激素的釋放：IFN- γ 、TNF- α 及介白素。

在本發明之方法之一些實施例中，CD4及/或CD8 T細胞為效應子記憶T細胞。在本發明之方法之一些實施例中，CD4及/或CD8效應子記憶T

細胞係由產生 γ -IFN⁺之CD4及/或CD8 T細胞及/或增強之溶細胞活性表徵。在本發明之方法之一些實施例中，CD4及/或CD8效應子記憶T細胞係由具有CD44^高CD62L^低之表現表徵。

在本發明之方法之一些實施例中，癌症具有升高之T細胞浸潤水準。

在一些實施例中，本發明之方法可進一步包含投與額外療法。額外療法可為放射療法、手術、化學療法、基因療法、DNA療法、病毒療法、RNA療法、免疫療法、骨髓移植、奈米療法、單株抗體療法或前述各者之組合。額外療法可呈佐劑或新輔助療法形式。在一些實施例中，額外療法為投與副作用限制劑(例如意欲減少治療(諸如抗噁心劑等)之副作用之出現及/或強度的藥劑)。在一些實施例中，額外療法為放射療法。在一些實施例中，額外療法為手術。在一些實施例中，額外療法可為上文描述之化學治療劑中之一或多者。

任一種如下描述之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑均可用於本發明之方法中。

在一些實施例中，本文中所描述之目標中之任一者(例如PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA、VISTA、B7H4、CD96、B7-1、TIGIT、CD226、OX-40、CD28、CD27、CD137、HVEM、GITR、MICA、ICOS、NKG2D、2B4等)為人類蛋白質。

PD-1軸結合拮抗劑

本文中提供治療或延緩個體中之癌症之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。本文中亦提供降低或抑制個體中癌症復發或癌症進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或

活性之藥劑的組合。本文中亦提供治療或延緩個體中免疫相關疾病之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。本文中亦提供降低或抑制個體中免疫相關疾病之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。本文中亦提供增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。

舉例而言，PD-1軸結合拮抗劑包括PD-1結合拮抗劑、PD-L1結合拮抗劑及PD-L2結合拮抗劑。

在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為抑制PD-1與其配位體結合搭配物之結合的分子。在特定態樣中，PD-1配位體結合搭配物為PD-L1及/或PD-L2。在另一個實施例中，PD-L1結合拮抗劑為抑制PD-L1與其結合搭配物之結合的分子。在特定態樣中，PD-L1結合搭配物為PD-1及/或B7-1。在另一個實施例中，PD-L2結合拮抗劑為抑制PD-L2與其結合搭配物之結合的分子。在特定態樣中，PD-L2結合搭配物為PD-1。拮抗劑可為抗體、其抗原結合片段、免疫黏附素、融合蛋白質或寡肽。

在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑係選自MDX-1106(尼沃單抗)、Merck 3745(拉立珠單抗)、CT-011 (皮立珠單抗)及AMP-224。在一些實施例中，PD-L1結合拮抗劑係選自YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105及MEDI 4736。在一些實施例中，PD-L2結合拮抗劑為AMP-224。在一些實施例中，PD-1結合拮抗劑為AMP-224、MDX-1105，亦稱為BMS-936559，其為WO2007/005874中描述之抗PD-L1抗體。抗體YW243.55.S70 (SEQ ID NO:20)為WO 2010/077634 A1中描述之抗PD-

L1。MDX-1106，亦稱為MDX-1106-04、ONO-4538、BMS-936558或尼沃單抗，為WO2006/121168中描述之抗PD-1抗體。Merck 3745，亦稱為MK 3475、MK-3475、SCH-900475或拉立珠單抗，為WO2009/114335中描述之抗PD-1抗體。CT-011，亦稱為hBAT、hBAT-1或皮立珠單抗，為WO2009/101611中描述之抗PD-1抗體。AMP-224，亦稱為B7-DCIg，為WO2010/027827及WO2011/066342中描述之PD-L2-Fc融合可溶受體。

適用於本發明之方法之抗PD-L1抗體之實例及製造其之方法描述於PCT專利申請案WO 2010/077634 A1中，其以引用的方式併入本文中。

在一些實施例中，PD-1軸結合拮抗劑為抗PD-L1抗體。在一些實施例中，抗PD-L1抗體能夠抑制PD-L1與PD-1之間及/或PD-L1與B7-1之間的結合。在一些實施例中，抗PD-L1抗體為單株抗體。在一些實施例中，抗PD-L1抗體為選自由以下組成之群的抗體片段：Fab、Fab'-SH、Fv、scFv及(Fab')₂片段。在一些實施例中，抗PD-L1抗體為人類化抗體。在一些實施例中，抗PD-L1抗體為人類抗體。

適用於本發明之抗PD-L1抗體，包括含有該等抗體之組合物，諸如WO 2010/077634 A1中所描述，可在具有或不具有任何額外療法(例如化學療法)之情況下與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑組合使用，以治療癌症或免疫相關疾病(例如T細胞功能異常病症、病毒感染、慢性病毒感染等)。

在一個實施例中，抗PD-L1抗體含有重鏈可變區多肽，其包含HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3序列，其中：

(a) HVR-H1序列為GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO: 33)；

(b) HVR-H2序列為AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:34)；

(c) HVR-H3序列為RHWPGGFDY (SEQ ID NO:19)；

此外其中：X₁為D或G；X₂為S或L；X₃為T或S。

在一個特定態樣中，X₁為D；X₂為S且X₃為T。在另一態樣中，多肽進一步包含在根據式：(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)之HVR之間並列的可變區重鏈構架序列。在另一態樣中，構架序列係來源於人類共同構架序列。在另一態樣中，構架序列為VH子組III共同構架。在另一態樣中，至少一個構架序列為以下：

HC-FR1為EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:25)

HC-FR2為WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:26)

HC-FR3為RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:27)

HC-FR4為WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:28).

在另一態樣中，重鏈多肽進一步與包含HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3之可變區輕鏈組合，其中：

(a) HVR-L1序列為RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:35)；

(b) HVR-L2序列為SASX₉LX₁₀S, (SEQ ID NO:36)；

(c) HVR-L3序列為QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO:37)；

此外其中：X₄為D或V；X₅為V或I；X₆為S或N；X₇為A或F；X₈為V或L；X₉為F或T；X₁₀為Y或A；X₁₁為Y、G、F或S；X₁₂為L、Y、F或W；X₁₃為Y、N、A、T、G、F或I；X₁₄為H、V、P、T或I；X₁₅為A、W、R、P或T。

在另一態樣中，X₄為D；X₅為V；X₆為S；X₇為A；X₈為V；X₉為F；X₁₀為Y；X₁₁為Y；X₁₂為L；X₁₃為Y；X₁₄為H；X₁₅為A。在另一態樣

中，輕鏈進一步包含在根據式：(LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)之HVR之間並列的可變區輕鏈構架序列。在另一態樣中，構架序列來源於人類共同構架序列。在另一態樣中，構架序列為VLkI共同構架。在另一態樣中，至少一個構架序列為以下：

LC-FR1為DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:29)

LC-FR2為WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:30)

LC-FR3 為 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:31)

LC-FR4為FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:32).

在另一個實施例中，提供經分離之抗PD-L1抗體或抗原結合片段，其包含重鏈及輕鏈可變區序列，其中：

(a) 重鏈包含HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3，此外其中：

(i) HVR-H1序列為GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:33)

(ii) HVR-H2序列為AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:34)

(iii) HVR-H3序列為RHWPGGFDY，及 (SEQ ID NO:19)

(b) 輕鏈包含HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3，此外其中：

(i) HVR-L1序列為RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:35)

(ii) HVR-L2序列為SASX₉LX₁₀S；及 (SEQ ID NO:36)

(iii) HVR-L3序列為QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T； (SEQ ID NO:37)

此外其中：X₁為D或G；X₂為S或L；X₃為T或S；X₄為D或V；X₅為V或I；X₆為S或N；X₇為A或F；X₈為V或L；X₉為F或T；X₁₀為Y或A；X₁₁為Y、G、F或S；X₁₂為L、Y、F或W；X₁₃為Y、N、A、T、G、F或I；X₁₄為H、V、P、T或I；X₁₅為A、W、R、P或T。

在特定態樣中，X₁為D；X₂為S且X₃為T。在另一個態樣中，X₄為D；X₅為V；X₆為S；X₇為A；X₈為V；X₉為F；X₁₀為Y；X₁₁為Y；X₁₂為L；X₁₃為Y；X₁₄為H；X₁₅為A。在另一個態樣中，X₁為D；X₂為S且X₃為T，X₄為D；X₅為V；X₆為S；X₇為A；X₈為V；X₉為F；X₁₀為Y；X₁₁為Y；X₁₂為L；X₁₃為Y；X₁₄為H且X₁₅為A。

在另一態樣中，重鏈可變區包含一或多個在HVR之間並列的構架序列，如：(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)，且輕鏈可變區包含一或多個在HVR之間並列的構架序列，如：(LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)。在另一態樣中，構架序列來源於人類共同構架序列。在另一態樣中，重鏈構架序列來源於Kabat子組I、II或III序列。在另一態樣中，重鏈構架序列為VH子組III共同構架。在另一態樣中，一或多個重鏈構架序列為以下：

- HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:25)
- HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:26)
- HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(SEQ ID NO:27)
- HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:28).

在另一態樣中，輕鏈構架序列來源於Kabat κI、II、III或IV子組序列。在另一態樣中，輕鏈構架序列為VLκI共同構架。在另一態樣中，一或多個輕鏈構架序列為以下：

- LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:29)
- LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:30)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:31)

LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:32).

在另一特定態樣中，抗體進一步包含人類或鼠類恆定區。在另一態樣中，人類恆定區係選自由以下組成之群：IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4。在另一特定態樣中，人類恆定區為IgG1。在另一態樣中，鼠類恆定區係選自由以下組成之群：IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。在另一態樣中，鼠類恆定區為IgG2A。在另一特定態樣中，抗體具有降低的或最小效應功能。在另一特定態樣中，最小效應功能由「效應子較少Fc突變」或非糖基化引起。在另一個實施例中，效應子較少Fc突變為恆定區中之N297A或D265A/N297A取代。

在另一實施例中，提供抗PD-L1抗體，其包含重鏈及輕鏈可變區序列，其中：

(a) 重鏈進一步包含HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3序列，其分別與GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:17)、AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:18)及RHWPGGFDY (SEQ ID NO:19)具有至少85%序列一致性，或

(b) 輕鏈進一步包含HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3序列，其分別與RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:20)、SASFLYS (SEQ ID NO:21)及QQYLYHPAT (SEQ ID NO:22)具有至少85%序列一致性。

(c) 在特定態樣中，序列一致性為86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在另一態樣中，重鏈可變區包含一或多個在HVR之間並列的

構架序列，如：(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)，且輕鏈可變區包含一或多個在HVR之間並列的構架序列，如：(LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)。在另一態樣中，構架序列係來源於人類共同構架序列。在另一態樣中，重鏈構架序列來源於Kabat子組I、II或III序列。在另一態樣中，重鏈構架序列為VH子組III共同構架。在另一態樣中，一或多個重鏈構架序列為以下：

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:25)

HC-FR2 WVRQAPGKGGLEWV (SEQ ID NO:26)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:27)

HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:28)。

在另一態樣中，輕鏈構架序列來源於Kabat κ I、II、III或IV子組序列。在另一態樣中，輕鏈構架序列為VL κ I共同構架。在另一態樣中，一或多個輕鏈構架序列為以下：

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:29)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:30)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:31)

LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:32)。

在另一特定態樣中，抗體進一步包含人類或鼠類恆定區。在另一態樣中，人類恆定區係選自由以下組成之群：IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4。在另一特定態樣中，人類恆定區為IgG1。在另一態樣中，鼠類恆

定區係選自由以下組成之群：IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。在另一態樣中，鼠類恆定區為IgG2A。在另一特定態樣中，抗體具有降低的或最小效應功能。在另一特定態樣中，最小效應功能由「效應子較少Fc突變」或非糖基化引起。在另一個實施例中，效應子較少Fc突變為恆定區中之N297A或D265A/N297A取代。

在另一實施例中，提供經分離之抗PD-L1抗體，其包含重鏈及輕鏈可變區序列，其中：

(a) 重鏈序列與重鏈序列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSA (SEQ ID NO:23)或EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTK (SEQ ID NO:40)具有至少85%序列一致性，或

(b) 輕鏈序列與輕鏈序列：DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWAYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTSSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:24)具有至少85%序列一致性。

在特定態樣中，序列一致性為86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在另一態樣中，重鏈可變區包含一或多個在HVR之間並列的構架序列，如：(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)，且輕鏈可變區包含一或多個在HVR之間並列的構架序列，如：

(LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)。在另一態樣中，構架序列係來源於人類共同構架序列。在另一態樣中，重鏈構架序列來源於Kabat子組I、II或III序列。在另一態樣中，重鏈構架序列為VH子組III共同構架。在另一態樣中，一或多個重鏈構架序列為以下：

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:25)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:26)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:27)

HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:28).

在另一態樣中，輕鏈構架序列來源於Kabat κ I、II、III或IV子組序列。在另一態樣中，輕鏈構架序列為VL κ I共同構架。在另一態樣中，一或多個輕鏈構架序列為以下：

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:29)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:30)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:31)

LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:32).

在另一特定態樣中，抗體進一步包含人類或鼠類恆定區。在另一態樣中，人類恆定區係選自由以下組成之群：IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4。在另一特定態樣中，人類恆定區為IgG1。在另一態樣中，鼠類恆定區係選自由以下組成之群：IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。在另一態樣中，鼠類恆定區為IgG2A。在另一特定態樣中，抗體具有降低的或最小

效應功能。在另一特定態樣中，最小效應子功能由原核細胞中之產生作用引起。在另一特定態樣中，最小效應功能由「效應子較少Fc突變」或非糖基化引起。在另一個實施例中，效應子較少Fc突變為恆定區中之N297A或D265A/N297A取代。

在另一實施例中，本發明提供組合物，其包含上述抗PD-L1抗體中之任一者與至少一種醫藥學上可接受之載劑的組合。

在另一實施例中，提供經分離之核酸，其編碼抗PD-L1抗體之輕鏈或重鏈可變區序列，其中：

(a) 重鏈進一步包含HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3序列，其分別與GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:17)、AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:18)及RHWPGGFDY (SEQ ID NO:19)具有至少85%序列一致性，及

(b) 輕鏈進一步包含HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3序列，其分別與RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:20)、SASFLYS (SEQ ID NO:21)及QQYLYHPAT (SEQ ID NO:22)具有至少85%序列一致性。

在特定態樣中，序列一致性為86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在另一態樣中，重鏈可變區包含一或多個在HVR之間並列的構架序列，如：(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)，且輕鏈可變區包含一或多個在HVR之間並列的構架序列，如：(LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)。在另一態樣中，構架序列係來源於人類共同構架序列。在另一態樣中，重鏈構架序列來源於Kabat子組I、II或III序列。在另一態樣中，重

鏈構架序列為VH子組III共同構架。在另一態樣中，一或多個重鏈構架序列為以下：

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:25)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:26)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:27)

HC-FR4 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:28)。

在另一態樣中，輕鏈構架序列來源於Kabat κ I、II、III或IV子組序列。在另一態樣中，輕鏈構架序列為VL κ I共同構架。在另一態樣中，一或多個輕鏈構架序列為以下：

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:29)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:30)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:31)

LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:32)。

在另一特定態樣中，抗體進一步包含人類或鼠類恆定區。在另一態樣中，人類恆定區係選自由以下組成之群：IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4。在另一特定態樣中，人類恆定區為IgG1。在另一態樣中，鼠類恆定區係選自由以下組成之群：IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。在另一態樣中，鼠類恆定區為IgG2A。在另一特定態樣中，抗體具有降低的或最小效應功能。在另一特定態樣中，最小效應子功能由原核細胞中之產生作用引起。在另一特定態樣中，最小效應功能由「效應子較少Fc突變」或非糖基化引起。在另一態樣中，效應子較少Fc突變為恆定區中之N297A或

D265A/N297A取代。

在另一態樣中，核酸進一步包含適用於編碼上述抗PD-L1抗體中之任一者之核酸之表現的載體。在另一特定態樣中，載體進一步包含適用於核酸之表現的宿主細胞。在另一特定態樣中，宿主細胞為真核細胞或原核細胞。在另一特定態樣中，真核細胞為哺乳動物細胞，諸如中國倉鼠卵巢(CHO)。

抗PD-L1抗體或其抗原結合片段可使用此項技術中已知之方法(例如藉由包含培養含有核酸之宿主細胞的方法，該核酸編碼上述抗PD-L1抗體或抗原結合片段中之任一者)在適合於產生該抗體或斷片及回收抗體或片段之條件下以適用於表現之形式製備。

在另一實施例中，本發明提供包含如本文中提供之抗PD-L1抗體或其抗原結合片段及至少一種醫藥學上可接受之載劑的組合物。

降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑

本文中提供治療或延緩個體中之癌症之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。本文中亦提供降低或抑制個體中癌症復發或癌症進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。本文中亦提供治療或延緩個體中免疫相關疾病之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。本文中亦提供降低或抑制個體中免疫相關疾病之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。本文中亦提供增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結

合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合。本文中亦提供提高、增強或刺激個體中免疫反應或功能之方法，其包含投與個體有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑。本文中亦提供提高、增強或刺激個體中免疫反應或功能之方法，其包含投與個體有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑。舉例而言，降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑包括TIGIT表現及/或活性之拮抗劑、PVR表現及/或活性之拮抗劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL2之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL3之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVRL2之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVRL3之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑及其組合。

在一些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑包括小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，PVR表現及/或活性之拮抗劑包括小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑包括小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL2之相互作用的藥劑包括小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL3之相互作用的藥劑包括小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑包括小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於PVRL2之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑包括小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於PVRL3之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑包括小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為選自反義多核苷酸、干擾RNA、催化RNA及RNA-DNA嵌合體之抑制性核酸。

在一些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。

適用於本發明之抗TIGIT抗體，包括含有該等抗體之組合物，諸如WO 2009/126688中所描述，可與PD-1軸結合拮抗劑組合使用。

抗TIGIT抗體

本發明提供抗TIGIT抗體。例示性抗體包括多株抗體、單株抗體、人類化抗體、雙特異性抗體及異結合抗體。一般熟習此項技術者將理解，本發明亦提供針對其他多肽之抗體(亦即抗PVR抗體)且本文中特定針對抗TIGIT抗體之創造、產生、變體、使用或其他態樣之方法的描述中之任一

者亦將適用於對其他非TIGIT多肽具有特異性之抗體。

多株抗體

抗TIGIT抗體可包含多株抗體。製備多株抗體之方法為熟習此項技術者所已知。可於哺乳動物中產生多株抗體，例如藉由一或多次注射免疫劑及視需要，佐劑。通常藉由多次皮下或腹膜內注射將免疫劑及/或佐劑注射於哺乳動物中。免疫劑可包括TIGIT多肽或其融合蛋白質。使免疫劑接合至已知在經免疫之哺乳動物中具有免疫原性的蛋白質可為適用的。該等免疫原性蛋白質之實例包括(但不限於)匙孔螺血氰蛋白、血清白蛋白、牛類甲狀腺球蛋白及大豆胰蛋白酶抑制劑。可使用之佐劑之實例包括傅氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)及MPL-TDM佐劑(單磷醯基脂質A、合成繭蜜糖二黴菌酸酯(trehalose dicorynomycolate))。熟習此項技術者可在無過度實驗之情況下選擇免疫方案。

單株抗體

或者，抗TIGIT抗體可為單株抗體。單株抗體可使用融合瘤方法製備，諸如由Kohler及Milstein, **Nature**, **256**:495 (1975)所描述之方法。在融合瘤方法中，小鼠、倉鼠或其他合適宿主動物典型地用免疫劑免疫以產生淋巴細胞，其產生或能夠產生將特異性結合於免疫劑之抗體。或者，淋巴細胞可在活體外免疫。

免疫劑將典型地包括TIGIT多肽或其融合蛋白質。通常，若需要人類來源之細胞，則使用周邊血液淋巴細胞(「PBL」)；或若需要非人類哺乳動物來源，則使用脾細胞或淋巴結細胞。接著，使用諸如聚乙二醇之合適融合劑將該等淋巴細胞與永生化細胞株融合以形成融合瘤細胞[Goding, **Monoclonal Antibodies: Principles and Practice**, Academic Press,

(1986) 第59-103頁]。永生化細胞株通常為經轉形之哺乳動物細胞，尤其嚙齒動物、牛及人類起源之骨髓瘤細胞。通常使用大鼠或小鼠骨髓瘤細胞株。可將該等融合瘤細胞培養於合適培養基中，該培養基較佳含有一或多種抑制未融合永生化細胞之生長或存活的物質。舉例而言，若親本細胞缺乏酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT)，則融合瘤之培養基通常應包括次黃嘌呤、胺基蝶呤及胸苷(「HAT培養基」)，該等物質阻止HGPRT缺失細胞之生長。

較佳永生化細胞株為有效融合、支持所選抗體產生細胞穩定高水準表現抗體且對諸如HAT培養基之培養基敏感的細胞株。更佳永生化細胞株為鼠類骨髓瘤系，例如，其可獲自索爾克研究所細胞分發中心(Salk Institute Cell Distribution Center)(San Diego, California)及美國菌種保存中心(American Type Culture Collection)(Manassas, Virginia)。亦描述人類骨髓瘤及小鼠-人類雜交骨髓瘤細胞株用於製備人類單株抗體[Kozbor, **J. Immunol.**, **133**:3001 (1984)；Brodeur等人, **Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications**, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) 第51-63頁]。

接著可分析其中培養融合瘤細胞之培養基中針對該多肽之單株抗體之存在。較佳藉由免疫沈澱或藉由活體外結合分析法(諸如放射免疫分析(RIA)或酶聯免疫吸附分析法(ELISA))測定由融合瘤細胞產生之單株抗體的結合特異性。該等技術及分析法為此項技術中已知的。單株抗體之結合親和力可例如藉由Scatchard analysis of Munson and Pollard, **Anal. Biochem.**, **107**:220 (1980)測定。

在識別出所需融合瘤細胞之後，可藉由限制稀釋程序來次選殖該等

純系且藉由標準方法使之生長[Goding，同上文]。適用於此目的之培養基包括，例如杜貝科改良之伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)及RPMI-1640培養基。或者，可使融合瘤細胞在哺乳動物中以腹水形式活體內生長。

由次純系分泌之單株抗體可藉由諸如蛋白A-瓊脂糖凝膠、羥基磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析之習知免疫球蛋白純化程序自培養基或腹水流體中分離或純化。

單株抗體亦可藉由重組型DNA方法製得，諸如美國專利第4,816,567號中描述之方法。本發明之編碼單株抗體之DNA可使用習知程序容易地分離及定序(例如藉由使用能夠特異性結合於編碼鼠類抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)。本發明之融合瘤細胞充當該種DNA之較佳來源。一經分離，即可將DNA置放於表現載體中，接著將表現載體轉染至不以其他方式產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中，以在重組型宿主細胞中獲得單株抗體之合成。DNA亦可例如藉由用人類重鏈及輕鏈恆定域之編碼序列替代同源鼠類序列(美國專利第4,816,567號；Morrison等人,同上文)，或藉由將非免疫球蛋白多肽之所有或一部分編碼序列與免疫球蛋白編碼序列共價接合來修飾。該種非免疫球蛋白多肽可替代本發明抗體之恆定域，或可替代本發明抗體之一個抗原結合位點的可變域以產生嵌合二價抗體。

抗體可為單價抗體。用於製備單價抗體之方法已在此項技術中熟知。舉例而言，一種方法涉及免疫球蛋白輕鏈及經修飾之重鏈之重組型表現。通常在Fc區中之任一點截短重鏈以防止重鏈交聯。或者，以另一胺基酸殘基取代相關半胱胺酸殘基或使其缺失以防止交聯。

活體外方法亦適於製備單價抗體。消化抗體以產生其片段(尤其Fab片段)可使用此項技術中已知之常規技術來實現。

人類及人類化抗體

本發明之抗TAT抗體可進一步包含人類化抗體或人類抗體。非人類(例如鼠類)抗體之人類化形式為含有源自非人類免疫球蛋白之極少序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段(諸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗體之其他抗原結合子序列)。人類化抗體包括人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中該接受者之互補決定區(CDR)之殘基已經具有所需特異性、親和力及能力之非人類物種(諸如小鼠、大鼠或兔)抗體(供者抗體)之CDR的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv構架殘基係經相應非人類殘基置換。人類化抗體亦可包含既不存在於接受者抗體中亦不存在於輸入CDR或構架序列中之殘基。通常，人類化抗體將包含實質上所有之至少一個且通常兩個可變域，其中所有或實質上所有CDR區對應於非人類免疫球蛋白之彼等CDR區且所有或實質上所有FR區為人類免疫球蛋白共同序列之彼等FR區。人類化抗體最佳亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)(通常為人類免疫球蛋白之恆定區)的至少一部分[Jones等人, **Nature**, **321**:522-525 (1986)；Riechmann等人, **Nature**, **332**:323-329 (1988)；及Presta, **Curr. Op. Struct. Biol.**, **2**:593-596 (1992)]。

用於使非人類抗體人類化之方法為此項技術中所熟知。通常，人類化抗體具有一或多個自非人類來源引入其中之胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘基通常稱為「輸入」殘基，其通常取自「輸入」可變域。人類化可基本上根據Winter及合作者之方法[Jones等人, **Nature**, **321**:522-525 (1986)；Riechmann等人, **Nature**, **332**:323-327 (1988)；Verhoeyen等人,

Science, **239**:1534-1536 (1988)]，藉由用啮齒動物CDR或CDR序列取代人類抗體之相應序列來執行。因此，該等「人類化」抗體為嵌合抗體(美國專利第4,816,567號)，其中實質上小於完整人類可變域經來自非人類物種之相應序列取代。實際上，人類化抗體通常為一些CDR殘基及可能之一些FR殘基經來自啮齒動物抗體之類似位點之殘基取代的人類抗體。

人類抗體亦可使用此項技術中已知的不同技術產生，包括噬菌體呈現文庫[Hoogenboom及Winter, **J. Mol. Biol.**, **227**:381 (1991)；Marks等人, **J. Mol. Biol.**, **222**:581 (1991)]。Cole等人及Boerner等人之技術亦可用於製備人類單株抗體[Cole等人, **Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy**, Alan R. Liss, 第77頁 (1985)及Boerner等人, **J. Immunol.**, **147**(1):86-95 (1991)]。類似地，亦可藉由將人類免疫球蛋白基因座引入轉殖基因動物中來製備人類抗體，該轉殖基因動物例如內源性免疫球蛋白基因已部分或完全失活之小鼠。激發後，觀察人類抗體產生，其在各方面均密切地類似於人類中所見，包括基因重排、組裝及抗體譜系。此方法描述於例如美國專利第5,545,807號；第5,545,806號；第5,569,825號；第5,625,126號；第5,633,425號；第5,661,016號，及以下科學公開案中：Marks等人, **Bio/Technology** **10**, 779-783 (1992)；Lonberg等人, **Nature** **368** 856-859 (1994)；Morrison, **Nature** **368**, 812-13 (1994)；Fishwild等人, **Nature Biotechnology** **14**, 845-51 (1996)；Neuberger, **Nature Biotechnology** **14**, 826 (1996)；Lonberg及Huszar, **Intern. Rev. Immunol.** **13** 65-93 (1995)。

抗體亦可使用如上文所描述之已知選擇及/或突變誘發方法進行親和力成熟。較佳親和力成熟抗體之親和力比用於製備成熟抗體之起始抗體

(通常為鼠類、人類化或人類)高五倍，更佳10倍，甚至更佳20或30倍。

雙特異性抗體

雙特異性抗體為對至少兩種不同抗原具有結合特異性之單株抗體，較佳為人類或人化抗體。在本發明之情況下，結合特異性中之一者係針對TIGIT，另一者係針對任何其他抗原，且較佳針對細胞表面蛋白質或受體或受體子單元。

用於製備雙特異性抗體之方法係此項技術中已知的。傳統上，雙特異性抗體之重組型產生基於基於兩個免疫球蛋白重鏈/輕鏈對之共表現，其中該兩個重鏈具有不同特異性[Milstein and Cuello, **Nature**, **305**:537-539 (1983)]。由於免疫球蛋白重鏈及輕鏈隨機分配，所以此等融合瘤(四重融合瘤(quadromas))產生十個不同抗體分子之潛在混合物，其中僅一個抗體分子具有正確之雙特異性結構。正確分子之純化通常藉由親和層析步驟實現。類似程序揭示於1993年5月13日公開之WO 93/08829及Traunecker等人, **EMBO J.**, **10**:3655-3659 (1991)中。

具有所需結合特異性(抗體-抗原結合位點)之抗體可變域可與免疫球蛋白恆定域序列融合。該融合較佳係與免疫球蛋白重鏈恆定域，包含至少部分鉸鏈區、CH2區及CH3區。較佳為在至少一種融合中存在含有輕鏈結合所必需之位點之第一重鏈恆定區(CH1)。將編碼免疫球蛋白重鏈(若需要，免疫球蛋白輕鏈)融合之DNA嵌入獨立表現載體中，且共轉染入適當宿主機體中。欲知雙特異性抗體製備詳情，參見例如，Suresh等人, **Methods in Enzymology**, **121**:210 (1986)。

根據WO 96/27011中描述之另一種方法，抗體分子對之間的界面可經工程改造以最大化自重組型細胞培養物回收之雜二聚體之百分比。較佳

界面包含抗體恆定域之CH3區之至少一部分。在此方法中，使第一抗體分子界面之一或多條小胺基酸側鏈經較大側鏈(例如，酪胺酸或色胺酸)置換。尺寸與大側鏈相同或類似之互補「腔」藉由將大胺基酸側鏈置換為更小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)而形成於第二抗體分子界面上。此提供使異源二聚體之產率增加超過其他不合需要之最終產物(諸如同源二聚體)的機制。

可製備全長抗體或抗體片段形式之雙特異性抗體(例如F(ab')₂雙特異性抗體)。文獻中已描述由抗體片段產生雙特異性抗體之技術。舉例而言，可使用化學接合製備雙特異性抗體。Brennan等人, **Science**, 229: 81 (1985)描述一種蛋白水解裂解完整抗體產生F(ab')₂片段之程序。在二硫醇錯合劑亞砷酸鈉存在下還原此等片段以穩定鄰近二硫醇且防止分子間二硫鍵形成。接著將所產生之Fab'片段轉化為硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。接著藉由用巯基乙胺還原將一種Fab'-TNB衍生物再轉化為Fab'-硫醇，且將其與等莫耳量之另一Fab'-TNB衍生物混合以形成雙特異性抗體。所產生之雙特異性抗體可用作用於選擇性固定酶之試劑。

可自大腸桿菌中直接回收Fab'片段且使該等片段化學偶合形成雙特異性抗體。Shalaby等人, **J. Exp. Med.** 175:217-225 (1992)描述完全人類化之雙特異性抗體F(ab')₂分子之產生。各Fab'片段分開自大腸桿菌中分泌且經受活體外定向化學偶合以形成雙特異性抗體。由此形成之雙特異性抗體能夠結合過度表現ErbB2受體之細胞及正常人類T細胞，而且激發人類細胞毒素淋巴細胞對人類乳房腫瘤目標之溶胞活性。

亦已描述多種直接由重組細胞培養物製備及分離雙特異性抗體片段之技術。舉例而言，已使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體。Kostelny等

人, *J. Immunol.*, 148 (5):1547-1553 (1992)。藉由基因融合將來自Fos及Jun蛋白質之白胺酸拉鏈肽連接至兩種不同抗體之Fab'部分。在鉸鏈區還原抗體同源二聚體以形成單體, 且接著使其再氧化以形成抗體異源二聚體。此方法亦可用於產生抗體同源二聚體。Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)所述之「微型雙功能抗體」技術為製備雙特異性抗體片段提供了替代機制。該等片段包含經連接子連接至輕鏈可變域(V_L)之重鏈可變域(V_H), 該連接子過短而使相同鏈上之兩個結構域之間無法配對。因此, 迫使一個片段之V_H及V_L域與另一片段之互補V_L及V_H域配對, 藉此形成兩個抗原結合位點。亦已報導另一種藉由使用單鏈Fv(sFv)二聚體來製備雙特異性抗體片段之策略。參見Gruber等人, *J. Immunol.* 152:5368 (1994)。

涵蓋具有兩價以上之抗體。作為一個非限制性實例, 可製備三特異性抗體。參見例如Tutt等人, *J. Immunol.* 147:60 (1991)。

在本文中, 例示性雙特異性抗體可結合於既定TIGIT多肽上的兩個不同抗原決定基。或者, 抗TIGIT多肽臂可與結合於白細胞上之觸發分子(諸如T細胞受體分子(例如CD2、CD3、CD28或B7))或針對IgG之Fc受體(FcγR, 諸如FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32)及FcγRIII (CD16))組合以便使細胞防禦機制集中於表現特定TIGIT多肽之細胞。雙特異性抗體亦可用於使細胞毒性劑定位至表現特定TIGIT多肽之細胞。此等抗體具有TIGIT結合臂及結合細胞毒性劑或放射性核種螯合劑(諸如EOTUBE、DPTA、DOTA或TETA)之臂。另一種相關雙特異性抗體結合TIGIT多肽且進一步結合組織因子(TF)。

異結合抗體

異結合抗體亦屬於本發明之範疇內。異結合抗體由兩個共價接合抗體構成。舉例而言，已提出該等抗體使免疫系統細胞靶向非所需之細胞[美國專利第4,676,980號]，且用於治療HIV感染[WO 91/00360；WO 92/200373；EP 03089]。預期該等抗體可在活體外使用合成蛋白質化學中已知之方法(包括涉及交聯劑之方法)製備。舉例而言，可使用二硫基交換反應或藉由形成硫醚鍵來構築免疫毒素。適於此目的之試劑之實例包括亞胺基硫醇鹽及甲基-4-巯基丁醯亞胺酯及例如美國專利第4,676,980號中所揭示之試劑。

效應子功能工程改造

可能需要關於效應子功能修飾本發明之抗體，以便增強例如抗體治療癌症之效用。舉例而言，可將半胱胺酸殘基引入Fc區，藉此允許此區域中形成鏈間雙硫鍵。由此產生之同源二聚抗體可具有改良之內化能力及/或增加之補體介導之細胞殺滅及抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。參見Caron等人, **J. Exp Med.**, **176**: 1191-1195 (1992)及Shopes, **J. Immunol.**, **148**: 2918-2922 (1992)。具有增強之抗腫瘤活性之均二聚抗體亦可使用異雙功能性交聯劑製備，如Wolff等人 **Cancer Research**, **53**: 2560-2565 (1993)中所描述。或者，抗體可經工程改造而具有雙Fc區且由此可具有增強之補體溶解及ADCC能力。參見Stevenson等人, **Anti-Cancer Drug Design**, **3**: 219-230 (1989)。

在一些具體實例中，產生抗TIGIT抗體，其為倉鼠抗小鼠抗體。兩種抗體10A7及1F4亦特異性結合於人類TIGIT。使用標準技術測定10A7抗體之輕鏈及重鏈之胺基酸序列。此抗體之輕鏈序列為：
DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPG

QSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQ
QGINNPLTFGDGTKLEIKR (SEQ ID NO:13)且此抗體之重鏈序列為：
EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEW
VAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDNANKNLLFLQMNDLKSEDTAMY
YCARRPLGHNTFDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15)，其中各鏈之互
補決定區(CDR)由粗體字表示。因此，10A7輕鏈之CDR1具有序列
KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO:1)，10A7輕鏈之CDR2具有序列
ASIRFT(SEQ ID NO:2)且10A7輕鏈之CDR3具有序列QQGINNPLT (SEQ
ID NO:3)。10A7重鏈之CDR1具有序列GFTFSSFTMH (SEQ ID NO:4)，
10A7重鏈之CDR2具有序列FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO:5)且
10A7重鏈之CDR3具有序列RPLGHNTFDS (SEQ ID NO:6)。

亦測定1F4抗體之輕鏈及重鏈之胺基酸序列。此抗體之輕鏈序列為：
DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQS
PQLLIFGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYCYCLQGT
HQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO:14)且此抗體之重鏈序列為：
EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLE
WIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVY
FCRGLRGRFYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:16)，其中各鏈之互
補決定區(CDR)由粗體字表示。因此，1F4輕鏈之CDR1具有序列
RSSQSLVNSYGNTFLS (SEQ ID NO:7)，1F4輕鏈之CDR2具有序列
GISNRFS (SEQ ID NO:8)且1F4輕鏈之CDR3具有序列LQGTHQPPT
(SEQ ID NO:9)。1F4重鏈之CDR1具有序列GYSFTGHLMN (SEQ ID
NO:10)，1F4重鏈之CDR2具有序列LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID

NO:11)且1F4重鏈之CDR3具有序列GLRGFYAMDY (SEQ ID NO:12)。

編碼1F4輕鏈之核苷酸序列測定為GATGTTGTGTTGACTCAAACCTCCACTCTCCCTGTCTGTCAGCTTTGGAGATCAAGTTTCTATCTCTTG CAGGTCTAGTCAGAGTCTTGTAACAGTTATGGGAACACCTTTTTG TCTTGGTACCTGCACAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCT TTGGGATTTCCAACAGATTTTCTGGGGTGCCAGACAGGTTTCAGTGG CAGTGGTTCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCACAATAAA GCCTGAGGACTTGGGAATGTATTACTGCTTACAAGGTACGCATCAG CCTCCACGTTTCGGTCCTGGGACCAAGCTGGAGGTGAAA (SEQ ID NO:38)且編碼1F4重鏈之核苷酸序列測定為GAGGTCCAGCTGCAACA GTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAACTTCAATGAAGATATCC TGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCCATCTTATGAACTGGGT GAAGCAGAGCCATGGAAAGAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTATT CCTTACAATGGTGGTACAAGCTATAACCAGAAGTTCAAGGGCAAG GCCACATTGACTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAGC TCCTCAGTCTGACTTCTGATGACTCTGCAGTCTATTTCTGTTCAAGA GGCCTTAGGGGCTTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT CAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:39)。

在一些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段包含至少一個包含選自以下中闡述之胺基酸序列之胺基酸序列的HVR：(1) KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO:1)、ASIRFT (SEQ ID NO:2)、QQGINNPLT (SEQ ID NO:3)、GFTFSSFTMH (SEQ ID NO:4)、FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO:5)及RPLGHNTFDS (SEQ ID

NO:6)，或(2) RSSQSLVNSYGN TFLS (SEQ ID NO:7)、GISNRFS (SEQ ID NO:8)、LQGTHQPPT (SEQ ID NO:9)、GYSFTGHLMN (SEQ ID NO:10)、LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:11)及GLRGFYAMDY (SEQ ID NO:12)。

在一些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段，其中抗體輕鏈包含DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDGTKLEIKR (SEQ ID NO:13)或DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGN TFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMY YCLQGTHQPPTFGPGTKLEV K (SEQ ID NO:14)中闡述之胺基酸序列。

在一些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段，其中抗體重鏈包含EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDN AKNLLFLQMNDLKSEDTAMY YCARRPLGHNTFDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15)或EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFC SRGLRG FYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:16)中闡述之胺基酸序列。

在一些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段，其中抗體輕鏈包含DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDGTKLEIKR (SEQ ID NO:13)或DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGN TFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNRFSGVPD

RFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYCYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK
(SEQ ID NO:14) 中闡述之胺基酸序列且抗體重鏈包含
EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEW
VAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDNANKNLLFLQMNDLKSEDTAMY
YCARRPLGHNTFDSWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO:15)或EVQLQQSGP
ELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNG
GTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVYFCSRGLRGFY
AMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO:16)中闡述之胺基酸序列。

在一些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段，其中抗體係選自人類化抗體、嵌合抗體、雙特異性抗體、異結合抗體及免疫毒素。

在一些實施例中，抗TIGIT抗體或其抗原結合片段包含至少一個與以下中之任一者中闡述之HVR至少90%一致的HVR：(1) KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO:1)、ASIRFT (SEQ ID NO:2)、QQGINNPLT (SEQ ID NO:3)、GFTFSSFTMH (SEQ ID NO:4)、FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO:5)及RPLGHNTFDS (SEQ ID NO:6)，或(2) RSSQSLVNSYGNTFLS (SEQ ID NO:7)、GISNRFS (SEQ ID NO:8)、LQGTHQPPT (SEQ ID NO:9)、GYSFTGHLMN (SEQ ID NO:10)、LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:11)及GLRGFYAMDY (SEQ ID NO:12)。

在一些實施例中，抗TIGIT抗體或其片段包含輕鏈及/或重鏈，該輕鏈及/或重鏈分別包含與DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDGTKLEIKR (SEQ ID NO:13)或

DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQS
PQLLIFGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYCYCLQGT
HQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO:14)或EVQLVESGGGLTQPGKSLKL
SCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRF
TISRDNANKNLLFLQMNDLKSEDTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO:15)或EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFT
GHLMNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSS
STAYMELLSLTSDDSAVYFCRGLRGFYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ
ID NO:16)中闡述之胺基酸序列至少90%一致的胺基酸序列。

調節CD226表現及/或活性之藥劑

本文中提供治療或延緩個體中之癌症或延緩其進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。本文中亦提供用於降低或抑制個體中癌症復發或癌症進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。本文中亦提供用於治療個體中之免疫相關疾病或延緩其進程之方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。本文中亦提供降低或抑制個體中之免疫相關疾病之進程的方法，其包含投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。本文中亦提供增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其藉由投與個體有效量之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑。

舉例而言，調節CD226表現及/或活性之藥劑為能夠增加及/或刺激CD226表現及/或活性、增加及/或刺激CD226與PVR、PVRL2及/或

PVRL3之相互作用及增加及/或刺激由結合於PVR、PVRL2及/或PVRL3之CD226介導之細胞內信號傳導的藥劑。在一些實施例中，能夠增加及/或刺激CD226表現及/或活性之藥劑為增加及/或刺激CD226表現及/或活性之藥劑。在一些實施例中，能夠增加及/或刺激CD226與PVR、PVRL2及/或PVRL3之相互作用的藥劑為增加及/或刺激CD226與PVR、PVRL2及/或PVRL3之相互作用的藥劑。在一些實施例中，能夠增加及/或刺激由結合於PVR、PVRL2及/或PVRL3之CD226介導之細胞內信號傳導的藥劑為增加及/或刺激由結合於PVR、PVRL2及/或PVRL3之CD226介導之細胞內信號傳導的藥劑。

在一些實施例中，調節CD226表現及/或活性之藥劑係選自抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑、TIGIT表現及/或活性之拮抗劑、PVR表現及/或活性之拮抗劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVR之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL2之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷TIGIT與PVRL3之相互作用的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVRL2之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑、抑制及/或阻斷由結合於PVRL3之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑及其組合。在一些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑係選自小分子抑制劑，抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，抑制及/或阻斷CD226與TIGIT之相互作用的藥劑為選自反義多核苷酸、干擾RNA、催化RNA及RNA-DNA嵌合體之抑制性核酸。

在一些實施例中，**TIGIT**表現及/或活性之拮抗劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，**TIGIT**表現及/或活性之拮抗劑為抗**TIGIT**抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，**TIGIT**表現及/或活性之拮抗劑為選自反義多核苷酸、干擾RNA、催化RNA及RNA-DNA嵌合體之抑制性核酸。在一些實施例中，**PVR**表現及/或活性之拮抗劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，抑制及/或阻斷**TIGIT**與**PVR**之相互作用的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，抑制及/或阻斷**TIGIT**與**PVRL2**之相互作用的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，抑制及/或阻斷**TIGIT**與**PVRL3**之相互作用的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於**PVR**之**TIGIT**介導之細胞內信號傳導的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於**PVRL2**之**TIGIT**介導之細胞內信號傳導的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，抑制及/或阻斷由結合於**PVRL3**之**TIGIT**介導之細胞內信號傳導的藥劑為小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。

在一些實施例中，**TIGIT**表現及/或活性之拮抗劑包括小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在

一些實施例中，PVR表現及/或活性之拮抗劑包括小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，抑制由結合於PVR之TIGIT介導之細胞內信號傳導的藥劑係選自由以下組成之群：小分子抑制劑、抑制性抗體或其抗原結合片段、適體、抑制性核酸及抑制性多肽。在一些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為抗TIGIT抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，TIGIT表現及/或活性之拮抗劑為選自反義多核苷酸、干擾RNA、催化RNA及RNA-DNA嵌合體之抑制性核酸。

免疫調節抗體療法之T細胞目標之組合

除TCR之特異性抗原識別以外，T細胞活化係經由共刺激受體提供之陽性與陰性信號之平衡調節。此等表面蛋白質典型地為TNF受體或B7超家族之部件。活化共刺激受體包括CD226、CD28、OX40、GITR、CD137、CD27、HVEM、MICA、ICOS、NKG2D及2B4。抑制性共刺激受體包括CTLA-4、PD-1、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、B7H4及CD96。針對活化共刺激分子之促效抗體及針對陰性共刺激分子之阻斷抗體可增強T細胞刺激以促進腫瘤破壞。

本文中提供增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，其係藉由投與個體有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑。在一些實施例中，該一或多種額外免疫共抑制性受體係選自PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA、VISTA、B7H4及CD96。在一些實施例中，該一或多種額外免疫共抑制性受體係選自PD-1、CTLA-4、LAG3及TIM3之群。

本文中亦提供增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能的方法，

其係藉由投與個體有效量之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑。在一些實施例中，該一或多種額外免疫共刺激性受體係選自CD226、OX-40、CD28、CD27、CD137、HVEM、GITR、MICA、ICOS、NKG2D及2B4。在一些實施例中，該一或多種額外免疫共刺激性受體係選自CD226、OX-40、CD27、CD137、HVEM及GITR。在一些實施例中，該一或多種額外免疫共刺激性受體係選自OX-40及CD27。

IV 套組

在另一態樣中，提供包含PD-1軸結合拮抗劑及藥品說明書之套組，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合以治療個體中之癌症或延緩其進程或增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。套組中可包括本文中所描述之PD-1軸結合拮抗劑及/或降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑以及藥品說明書的套組，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑以治療個體中之癌症或延緩其進程或增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。套組中可包括本文中所描述之PD-1軸結合拮抗劑及/或降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及藥品說明書的套組，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合以治療個體中之癌症或延緩其進程或增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。套組中可包括本文中所描

述之PD-1軸結合拮抗劑及/或降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含PD-1軸結合拮抗劑及藥品說明書之套組，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑與調節CD226表現及/或活性之藥劑的組合以治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。套組中可包括本文中所描述之PD-1軸結合拮抗劑及/或調節CD226表現及/或活性之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑以及藥品說明書的套組，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑以治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。套組中可包括本文中所描述之PD-1軸結合拮抗劑及/或調節CD226表現及/或活性之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含調節CD226表現及/或活性之藥劑及藥品說明書的套組，該藥品說明書包含關於使用調節CD226表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合以治療個體中之癌症或延緩其進程的說明。套組中可包括本文中所描述之PD-1軸結合拮抗劑及/或調節CD226表現及/或活性之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含PD-1軸結合拮抗劑及藥品說明書之套組，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑與調節CD226表現及/或活性之藥劑之組合以增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。套組中可包括本文中所描述之PD-1軸結合拮抗劑及/或調節CD226表現及/或活性之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或

活性之藥劑以及藥品說明書的套組，該藥品說明書包含關於使用PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。套組中可包括本文中所描述之PD-1軸結合拮抗劑及/或調節CD226表現及/或活性之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含調節CD226表現及/或活性之藥劑及藥品說明書的套組，該藥品說明書包含關於使用調節CD226表現及/或活性之藥劑與PD-1軸結合拮抗劑之組合增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。套組中可包括本文中所描述之PD-1軸結合拮抗劑及/或調節CD226表現及/或活性之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及藥品說明書的套組，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑的組合以治療個體中之癌症或延緩其進程或增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。套組中可包括本文中所描述之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及/或降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑以及藥品說明書的套組，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑以治療個體中之癌症或延緩其進程或增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。套組中可包括本文中所描述之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及/或降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受

體之藥劑及藥品說明書的套組，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合以治療個體中之癌症或延緩其進程或增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。套組中可包括本文中所描述之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及/或降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及藥品說明書的套組，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑與增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑的組合以治療個體中之癌症或延緩其進程或增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。套組中可包括本文中所描述之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及/或增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑以及藥品說明書的套組，該藥品說明書包含關於使用降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑以治療個體中之癌症或延緩其進程或增強患有癌症之個體之免疫功能的說明。套組中可包括本文中所描述之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及/或增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑中的任一者。

在另一態樣中，提供包含增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑及藥品說明書的套組，該藥品說明書包含關於使用增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑與降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑的組合以治療個體中之癌症或延緩其進程或增強患有癌症之個體之免

疫功能的說明。套組中可包括本文中所描述之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及/或增加或活化一或多種額外免疫共刺激性受體之藥劑中的任一者。

在一些實施例中，套組包含容器，該容器含有本文中所描述之PD-1軸結合拮抗劑及降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑中的一或多者。在一些實施例中，套組包含容器，該容器含有本文中所描述之PD-1軸結合拮抗劑及調節CD226表現及/或活性之藥劑中的一或多者。在一些實施例中，套組包含容器，該容器含有本文中所描述之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之所述及降低或抑制一或多種額外免疫共抑制性受體之藥劑中的一或多者。在一些實施例中，套組包含容器，該容器含有本文中所描述之降低或抑制TIGIT表現及/或活性之藥劑及增加或活化一或多種額外免疫共刺激受體之藥劑中的一或多者。合適容器包括，例如瓶子、小瓶(例如雙腔室小瓶)、注射器(諸如單腔室注射器或雙腔室注射器)及試管。容器可由多種材料(諸如玻璃或塑膠)形成。在一些實施例中，套組可包含標記(例如在容器上或與容器關聯)或藥品說明書。標記或藥品說明書可指示其中所含化合物可適用於或意欲用於治療個體中之癌症或延緩其進程或增強患有癌症之個體之免疫功能。套組可進一步包含自商業及使用者觀點出發而所需的材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

實例

可參考以下實例進一步理解本發明，其係以說明方式提供且不意謂造成限制。

實例1：TIGIT大量表現於耗竭之CD8⁺及CD4⁺ T細胞上且與PD-1表現相關

為了確認CD8⁺ T細胞在活體外刺激之後可勝任於表現TIGIT，用板結合之抗CD3及抗CD28活體外刺激富含MACS之C57BL6/J脾CD8⁺ T細胞24-48小時。使用流動式細胞測量術量測TIGIT表現。與CD4⁺ T細胞之TIGIT表現(Yu, X.等人, The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature immunology* **10**, 48-57 (2009))一致，鼠類CD8⁺ T細胞在活體外刺激之48小時內表現TIGIT(圖1A)。

為了評估活體內活性CD8⁺ T細胞之TIGIT表現，用阿姆斯特壯病毒株淋巴球性脈絡叢腦膜炎病毒(LCMV)感染C57BL6/J小鼠，且在感染之後第7天分析脾細胞。簡言之，對於急性感染，用 2×10^6 個牙菌斑形成單位(PFU)阿姆斯特壯菌株LCMV靜脈內感染小鼠。使用流動式細胞測量術量測原生(CD44^低 CD62L^高)及效應子記憶(CD44^高 CD62L^低)CD8⁺及CD4⁺ T細胞之TIGIT表現。在LCMV T細胞反應之峰處，CD4⁺效應子記憶T細胞(T_{EM})之子集及幾乎所有CD8⁺ T_{EM}細胞強表現TIGIT(圖1B)。使用流動式細胞測量術量測PD-1^高及PD-1^低效應子記憶CD8⁺ T細胞之TIGIT表現。有趣的是，TIGIT表現幾乎完全與PD-1表現相關(圖1C)。

因為PD-1與T細胞耗竭相關，因此在慢性刺激T細胞上檢驗TIGIT表現。簡言之，對於慢性感染，C57BL6/J小鼠用 2×10^6 個PFU純系13病毒株LCMV靜脈內感染，且分別在感染之前第3天及感染之後第4天用500 µg及250 µg耗竭抗CD4抗體(純系GK1.5)處理。在指定情況下，在感染後第28天至第42天，經純系13菌株LCMV感染之小鼠每週接受200 µg同型對照抗體、200 µg抗PD-L1抗體及/或500 µg抗TIGIT抗體之腹膜內注射3次。在感染之後第42天分析脾細胞。使用流動式細胞測量術量測原生(CD44^低

CD62L^高)、中央記憶(CD44^高 CD62L^高)及效應子記憶(CD44^高 CD62L^低)CD8⁺ T細胞之TIGIT表現。實際上，在經純系13病毒株LCMV慢性感染之小鼠中，TIGIT主要在PD-1^高 T細胞而非原生細胞、PD-1^低 T_{EM}細胞或中央記憶T細胞上大量表現(圖1D)。

實例2：TIGIT缺失型小鼠中TIGIT在T細胞耗竭中之作用

為了表徵TIGIT在T細胞耗竭中之作用，產生T細胞中TIGIT條件性缺失之小鼠(TIGIT^{fl/fl} CD4-cre⁺ (CKO)，圖2)。簡言之，藉由標準技術在C57BL/6J背景下產生CD4^{cre}小鼠及TIGIT^{loxP/loxP}小鼠且雜交。品質測試ES細胞株(Art B6/3.6(基因背景：C57BL/6 NTac))在含有白血病抑制因子及胎牛血清之ES細胞培養基中於包含小鼠胚胎纖維母細胞之有絲分裂非活性給料層上生長。根據Taconic Artemis標準操作程序藉由線性化DNA靶向載體將細胞電穿孔。使用G418及更昔洛韋(Gancyclovir)選擇作為用於同源重組純系之富集的機制。在轉染之後第8天分離具有不同形態之抗性ES細胞集落(ES純系)且在初次篩檢中藉由南方墨點法(Southern Blotting)及/或PCR分析。在廣泛分子驗證之後，將同源重組型ES細胞純系擴增且在液氮中冷凍。藉由flpE重組酶移除neo卡匣，隨後顯微注射至B1/6雌性白化病人供體中。產生嵌合後代且藉由PCR針對生殖系傳遞篩檢尾部。在TIGIT^{loxP/loxP} CD4^{cre}小鼠中在96%功效下自T細胞消除TIGIT表現。

T細胞缺乏TIGIT之小鼠對急性阿姆斯特壯菌株LCMV感染起CD4⁺及CD8⁺ T細胞反應，其與野生型小鼠類似(圖3)。

為了評估慢性感染情況中之作用，使TIGIT^{fl/fl} CD4-cre(WT)及TIGIT^{fl/fl} CD4-cre⁺ (CKO)小鼠之CD4⁺ T細胞暫時耗竭且用純系13病毒株

LCMV感染。在感染之後第42天分析脾細胞及肝病毒效價。在用純系13菌株LCMV慢性感染之後，與來自野生型小鼠($TIGIT^{fl/fl}$ $CD4\text{-cre}^-$ (WT))之T細胞相比，顯著較多的來自 $TIGIT^{fl/fl}$ $CD4\text{-cre}^+$ (CKO) 小鼠之 $CD8^+$ 及 $CD4^+$ T細胞可勝任於產生干擾素 γ (IFN γ)(增加82%-86%， $P<0.01$ ，圖4A至圖4D)。此外，病毒負載在慢性感染 $TIGIT^{fl/fl}$ $CD4\text{-cre}^+$ (CKO) 小鼠中顯著降低(降低68%， $P<0.0001$ ，圖4E)。

此等結果表明在慢性免疫反應期間，諸如在慢性病毒感染期間，TIGIT在調節T細胞活性及反應中起重要作用，且TIGIT可調節慢性刺激或耗竭之 $CD8^+$ 及 $CD4^+$ T細胞之效應子功能，尤其為產生效應子細胞激素(諸如IFN γ 及TNF α)之勝任力。

實例3：TIGIT及PD-1活體內協同調節耗竭之T細胞之效應子功能

因為TIGIT表現與PD-1表現緊密相關，尤其在 $CD8^+$ T細胞中在急性及慢性病毒感染期間(圖1)，與藉由僅阻斷任一種共受體所獲得之結果相比，阻斷TIGIT與PD-1之組合可更大水準地恢復T細胞效應子功能。

為了測試此假設，C57BL6/J小鼠僅 $CD4^+$ T細胞耗竭且用純系13菌株LCMV感染。對於慢性感染，小鼠用 2×10^6 個PFU純系13病毒株LCMV靜脈內感染，且分別在感染之前第3天及感染之後第4天用500 μg 及250 μg 耗竭抗CD4抗體(純系GK1.5)處理。在指定情況下，在感染後第28天至第42天，經純系13菌株LCMV感染之小鼠每週接受200 μg 同型對照抗體、200 μg 抗PD-L1抗體及/或500 μg 抗TIGIT抗體之腹膜內注射3次。處理在感染後第28天開始，因為在慢性病毒感染之此模型中，T細胞反應在此時間點時基本上耗竭(Wherry 等人，Molecular Signature of $CD8^+$ T cell Exhaustion During Chronic Viral Infection, Immunity. 2007

Oct;27(4):670-84)。在感染之後第42天分析脾細胞及肝病毒效價。

在此等小鼠中，與匹配同型對照抗體相比，抗PD-L1處理引起更穩固的CD8⁺ T細胞活化(增加88%， $P<0.0001$ ，圖4F)，如先前所報導(Barber, D.L.等人 Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682-687 (2006))。抗TIGIT處理本身或其與抗PD-L1之組合對CD8⁺ T細胞活化並無顯著作用(圖4F)。類似地，單獨的PD-1阻斷適當地提高CD8⁺ T細胞細胞激素勝任水準，而單獨TIGIT阻斷無作用(圖4G)。然而，在經抗TIGIT及抗PD-L1處理之小鼠中，產生IFN γ 之CD8⁺ T細胞之出現頻率顯著增加，且與在經單獨抗PD-L1處理之小鼠中所發現相比達到顯著較大水準(圖4G，增加93%， $P=0.0050$)。在CD4⁺ T細胞下觀測到類似作用(圖5)。亦如圖31中所示，與經單獨的抗PD-L1處理之小鼠相比，TIGIT/PD-L1共阻斷顯著增強CD8⁺ T細胞效應子功能而非CD4⁺ T細胞效應子功能。亦觀測對LCMV gp33抗原特異性T細胞中對T細胞擴增及效應子功能之類似作用(圖31)。此等結果表明PD-1及TIGIT之間對耗竭CD8⁺ T細胞之強協同作用，且指示TIGIT特異性調節CD8⁺ T細胞之細胞激素勝任水準及效應子功能。

與此等結果一致，LCMV病毒負載在經單獨的抗PD-L1處理之小鼠中適當降低，在經單獨的抗TIGIT處理之小鼠中未降低，且在經抗TIGIT及抗PD-L1處理之小鼠中實質上降低(在抗PD-L1處理下病毒效價降低68%， $P=0.0004$ ，在抗TIGIT+抗PD-L1處理下病毒效價降低92%， $P<0.0001$ ，圖4H)。此等資料表明PD-1與TIGIT之抑制性作用之間的強協同作用，且表明與PD-1不同，TIGIT並非效應子T細胞活化之廣泛抑制劑，實情為其在限制T細胞之細胞激素勝任及效應子功能中具有有限作用。

實例4：TIGIT表現在人類乳癌中升高且與CD8及抑制性共受體之表現相關

T細胞耗竭亦為癌症之主要免疫特性，其中多個腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)表現大量抑制性共受體且缺乏產生效應子細胞激素之能力(Wherry, E.J. T cell exhaustion. *Nature immunology* **12**, 492-499 (2011) ; Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D.及Sotomayor, E.M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual review of immunology* **25**, 267-296 (2007))。

為了確定TIGIT是否抑制TIL效應子功能，分析由Cancer Genome Atlas Network(CGAN)產生之乳癌基因表現微陣列資料(Network, C.G.A. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61-70 (2012))。

TIGIT表現在乳房腫瘤中整體顯著升高(與正常樣品相比增加135%， $P=6\times 10^{-12}$ ，圖6A)且跨越乳癌之4種主要分子次型(圖6A)(Perou, C.M.等人 Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752 (2000) ; Sorlie, T.等人 Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10869-10874 (2001))。TIGIT之表現與CD3 ϵ 之表現高度相關，與其由TIL之表現一致($R^2=0.61$ ，圖6B)。有趣的是，TIGIT表現與CD8 α 而非CD4高度相關，或僅與CD4中度相關，表明TIGIT可能主要調節CD8 $^+$ TIL功能(CD8 α ， $R^2=0.80$ ，CD4， $R^2=0.42$ ，圖6C)。

鑒於在慢性病毒感染期間TIGIT與PD-1之共表現，亦評估乳癌中PD-

1 及其他抑制性共受體與TIGIT之相關性。TIGIT與PD-1、CTLA4及LAG3之間的相關性極強(PD-1, $R^2=0.87$, CTLA4, $R^2=0.76$, LAG3, $R^2=0.80$, 圖6D)。總體而言, 此等資料表明TIGIT由TIL, 尤其CD8⁺ T細胞表現, 且可抑制其功能。

實例5：TIGIT及PD-1抑制抗腫瘤T細胞反應

為了在小鼠中藉由TIL較好表徵TIGIT, BALB/C小鼠用CT26結腸直腸癌細胞接種。簡言之, BALB/c小鼠用懸浮於基質膠(BD Biosciences)中之 1×10^5 個CT26結腸癌細胞皮下接種至右側胸側腹中。在兩週之後, 藉由每週腹膜內注射3次持續3週將攜帶約200 mm³腫瘤之小鼠隨機分配成接受35 mg/kg同型對照抗體、抗PD-L1抗體及/或抗TIGIT抗體之處理組。藉由測徑規每週量測腫瘤2次。對腫瘤變成潰瘍/壞死或生長超過2000 mm³之動物進行安樂死。在接種之後第14天, 當腫瘤尺寸達到約200 mm³時分析脾細胞及腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。

與人類腫瘤中之TIGIT表現(圖6)一致, CD8⁺及CD4⁺ CT26 TIL均表現大量TIGIT (圖7A-7B)。此外, 根據慢性病毒感染研究, TIL TIGIT表現與其他抑制性共受體(包括PD-1 (圖7A-7B)及Tim-3 (圖8))之表現緊密相關。在MC38結腸癌腫瘤中發現類似的TIGIT表現模式(圖9)。

為了測試在抗腫瘤免疫反應情形下TIGIT表現之生理相關性, 具有已產生之CT26腫瘤(尺寸為約200 mm³)之BALB/C小鼠用200 μg同型對照物、200 μg抗PD-L1、500 μg抗TIGIT或200 μg抗PD-L1+500 μg抗TIGIT抗體處理三週。

單獨的抗TIGIT或抗PD-L1處理僅稍微減緩CT26腫瘤生長, 其兩者均引起中值存活率之適度3天增加(圖7C-7D)。然而, 抗PD-L1與抗TIGIT

之組合療法顯著降低腫瘤生長(至第16天，中值腫瘤體積降低75%， $P<0.0001$ ，**圖7C**及**圖10**)。此外，70%接受抗TIGIT及抗PD-L1之小鼠經歷完全及持久的腫瘤緩解且在研究期間存活，甚至在不存在其他抗體治療之情況下(**圖7C-7D**)。亦在經針對TIGIT及PD-1之阻斷抗體之組合處理之攜帶腫瘤之小鼠中觀測到此等作用。

為了測試此等存活小鼠對CT26腫瘤細胞之免疫性，在初始接種之後約60天，接受抗TIGIT+抗PD-L1之完全緩解(CR)小鼠以及原生BALB/c小鼠再用CT26細胞在其左(先前未接種)側胸側腹中接種。亦將含 1×10^5 個EMT6乳癌細胞之基質膠接種之此等小鼠之第四乳房脂肪墊中。每週量測腫瘤2次。對腫瘤變成潰瘍/壞死或全部腫瘤負荷超過2000 mm^3 之動物進行安樂死。

如**圖7E**中所示，兩種腫瘤在原生對照小鼠中容易地生長，但僅EMT6腫瘤在先前清除CT26腫瘤之小鼠中生長。此等結果表明在腫瘤形成期間，TIGIT與PD-1之共阻斷產生針對CT26腫瘤細胞之特異性免疫性狀態。

為了確定TIGIT/PD-L1共阻斷之功效是否由 CD8^+ T細胞介導，在開始抗TIGIT及抗PDL1處理時使用耗竭抗體使攜帶CT26腫瘤之小鼠經歷 CD8^+ T細胞剝離。在處理開始時，當 CD8^+ T細胞耗竭時，經抗TIGIT及抗PD-L1抗體處理之小鼠無法抵抗CT26腫瘤(在處理17天之後平均腫瘤體積增加1532%， $P=0.0004$ ，**圖32A-32B**)。此外， CD8^+ T細胞耗竭減弱先前經處理之CR小鼠控制再接種CT26腫瘤之能力(**圖32C**)。綜合而言，此等結果表明抗TIGIT及抗PD-L1經由 CD8^+ T細胞起作用以引起有效的一級及二級抗腫瘤免疫反應。

為了確定腫瘤細胞之PVR表現是否為TIGIT/PD-L1共阻斷功效所必需，野生型BALB/c小鼠用野生型CT26腫瘤(其表現PVR)或PVR缺失型CT26腫瘤接種。簡言之，野生型CT26腫瘤細胞經降低PVR之表現的核酸暫時轉染。在轉染之後約兩週，藉由流動式細胞測量術及qPCR基於PVR表現之損失對CT26細胞進行次選殖。當腫瘤尺寸達到150-200 mm³時，小鼠用抗TIGIT及抗PD-L1或同型匹配對照抗體處理。與經對照抗體處理之腫瘤接種小鼠相比，經抗TIGIT及抗PD-L1抗體處理之小鼠能夠抵抗野生型及PVR缺失型腫瘤(圖33)。此等結果表明抗TIGIT及抗PD-L1獨立於表現PVR之腫瘤起作用。

亦測試及確認TIGIT/PD-L1共阻斷在MC38腫瘤模型中之功效。如前所述，野生型C57BL6/J小鼠用同基因型MC38結腸直腸癌細胞皮下接種且用TIGIT與PD-L1阻斷抗體之組合處理已產生之腫瘤。與CT26模型不同，用單獨抗PD-L1處理在一些小鼠中足以誘發完全反應(圖25)。然而，如在CT26模型中，用抗TIGIT及抗PD-L1處理攜帶MC38腫瘤之小鼠可在大部分小鼠中協同逆轉腫瘤生長及引起腫瘤清除(圖26)。亦在經同基因型EMT6乳癌細胞接種之小鼠中觀測到此等作用(圖34)。

此等結果表明TIGIT及PD-1之共阻斷可引起持續的及抗原特異性抗腫瘤免疫反應。此等結果亦表明在經治療性處理之小鼠中，調適性抗腫瘤反應完全發揮功能且再活化。

為了評估TIGIT及PD-1對腫瘤浸潤淋巴細胞本身之功能作用，如前所述，小鼠用CT26腫瘤細胞接種且用抗TIGIT及/或抗PD-L1處理。在治療開始之後第7天，收集腫瘤及腫瘤引流淋巴結以用於藉由流動式細胞測量術分析。

腫瘤浸潤及腫瘤引流淋巴結駐留CD4⁺ T細胞產生極少IFN γ ，且未在TIGIT/PD-1阻斷後產生更多(圖11)。然而，來自經抗TIGIT及抗PD-L1處理之小鼠而非經單獨抗TIGIT或抗PD-L1處理之小鼠的腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞顯著更勝任於在活體外刺激後產生IFN γ (與對照物相比增加174%， $P=0.0001$ ，圖13D)。關於TNF α 之CD8⁺ TIL產生觀測到類似結果(圖12)。

有趣的是，經單獨的抗TIGIT或抗PD-L1或其兩者處理之小鼠均具有增加之腫瘤引流淋巴結駐留CD8⁺ T細胞之細胞激素勝任水準(增加75%-113%， $P<0.001$ ，圖13)，表明淋巴結駐留CD8⁺ T細胞與其腫瘤浸潤對應物相比處於較小的抑制水準下。腫瘤浸潤及腫瘤引流淋巴結駐留CD8⁺ T細胞及CD4⁺ T細胞之累積及表型活化未改變且分別由單一抗體處理及雙抗體及雙抗體處理稍微增強(圖12-13)。腫瘤及腫瘤引流淋巴結中之IFN γ /TNF α 雙重產生CD8⁺ T細胞之出現頻率遵循類似模式(圖35A-35B)。

因此，儘管單獨的TIGIT或PD-L1阻斷足以增強腫瘤引流淋巴結中之CD8⁺ T細胞效應子功能，但需要兩種受體之阻斷以恢復腫瘤自身內耗竭之CD8⁺ T細胞之功能，與腫瘤微環境為高度免疫抑制之觀點一致。

實例6：腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞上TIGIT與CD226共表現

TIGIT與共刺激受體CD226就結合於脊髓灰白質炎病毒受體(PVR)進行競爭(Yu, X. 等人 The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature immunology* **10**, 48-57 (2009))。鑒於CD226不足可增強慢性病毒感染期間之T細胞耗竭(Cella, M.等人 Loss of DNAM-1 contributes to CD8⁺ T-cell exhaustion in chronic HIV-1 infection. *European Journal of Immunology* **40**(4), 949-954 (2010)；Welch, M. 等

人CD8 T cell defect of TNA-a and IL-2 in DNAM-1 deficient mice delays clearance in vivo of a persistent virus infection. *Virology* 429(2) 163-170 (2012)), 可能TIGIT可藉由干擾CD226活性而部分抑制T細胞反應。

為了評估CD226與TIGIT之間是否存在抑制T細胞反應之關係，測定腫瘤浸潤CD8+ T細胞上TIGIT及CD226之表現。

如圖14中所示，C57BL6/J小鼠用MC38結腸直腸癌細胞接種。在接種之後約第14天，當腫瘤尺寸達到約200 mm³時藉由FAC分析來分析脾細胞及腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。脾B細胞(灰色)、脾CD8+ T細胞(藍色)及TIGIT+腫瘤浸潤CD8+ T細胞(紅色)之CD226表現之代表性直方圖。資料表示兩次獨立實驗；n=5。圖14說明脾CD8+ T細胞高度表現CD226且此外，腫瘤浸潤TIGIT+ CD8+ T細胞亦高度表現CD226。資料表明TIGIT及CD226協同表現於鼠類腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞上，且可調節各自對CD8⁺ T細胞之功能。此觀測結果與活性CD4⁺ T細胞及NK細胞類似，其亦共表現TIGIT及CD226。

實例7：轉染細胞上TIGIT及CD226之共免疫沈澱

為了確定TIGIT是否在細胞表面與CD226相互作用，細胞用人類TIGIT及人類CD226共轉染且經歷免疫沈澱。簡言之，15 cm板中之COS 7細胞用針對TIGIT-HA (5 ng)或CD226-Flag (10 ng)標記蛋白質之含有cDNA之表現質體或對照質體(pRK)共轉染。在轉染之後23小時，細胞用PBS洗滌且收集於4 ml冰冷的PBS中且在300xg下離心5分鐘且細胞粒在4℃下再懸浮於2 ml溶解緩衝液中。細胞在每15分鐘渦旋下溶解超過50分鐘，且接著在4℃下在10,00xg下離心15分鐘。所得上清液用160 µl CL6B

瓊脂糖研磨漿藉由在4℃下旋轉30分鐘來預先清洗，且在3000xg下離心2分鐘。將上清液等分至兩個試管中且使用標準程序與抗HA或抗flag一起免疫沈澱。免疫沈澱蛋白質經歷SDS-PAGE及西方墨點法。藉由抗Flag-HRP或抗HA-HRP探測西方墨點。

如圖15中所示，抗TIGIT下調CD226且抗CD226下調TIGIT，表明TIGIT及CD226在細胞表面實體接觸。

實例8：初級CD8+ T細胞中TIGIT及CD226相互作用

除了證明CD226及TIGIT在轉染細胞中相互作用之能力以外，亦評估CD226及TIGIT在初級CD8+ T細胞中之相互作用。簡言之，富含MACS之脾C57BL6/J CD8+ T細胞用培養板結合之抗CD3及抗CD28抗體及重組型IL-2刺激48小時且溶解。細胞溶解物與抗TIGIT一起免疫沈澱且藉由抗CD226探測。圖16說明TIGIT及CD226在活性初級CD8+細胞中相互作用，因為其兩者均可在共免疫沈澱物中偵測到。此資料表明CD226及TIGIT亦在初級細胞上彼此相互作用。

實例9：使用TR-FRET(時差式螢光共振能量轉移)之轉染細胞上TIGIT/CD226相互作用

為了評估TIGIT及CD226之間是否存在任何分子相互作用，使用TR-FRET方法。FRET (螢光共振能量轉移)係基於兩個螢光團(供體及受體)在緊密靠近時彼此之間的能量轉移。可藉由使各搭配物與螢光標記偶合及藉由偵測能量轉移位準來評估生物分子之間的分子相互作用。當兩個實體彼此足夠接近時，能量來源引起之供體之激勵引起能量朝向受體轉移，其又發射既定波長之特定螢光。由於此等光譜特性，可在無需自非結合搭配物實體分離的情況下偵測供體-受體複合物。FRET之時差式(TR)量測之組合

允許信號清除背景螢光。此係典型地藉由在系統激勵與螢光量測之間引入時間延遲以允許信號清除所有非特定短活性發射而實現。

使用TR-FRET，本文中吾人證實TIGIT及CD226在相同細胞中表現時引起FRET，表明此等兩種分子之分子相互作用。簡言之，使用脂染胺2000(Life Technologies)，用SNAP標記(ST)CD226及HA-TIGIT轉染COS-7細胞，且在白色96孔板(Costar)中以每孔100,000個細胞接種。24小時後，在37°C，5% CO₂下，細胞用在DMEM 10% FCS中稀釋之100 nM供體結合苯甲基-鳥嘌呤SNAP-Lumi-4Tb (Cisbio)及1 μM供體結合苯甲基-鳥嘌呤SNAP-A647 (New England Biolabs)標記1小時。在PBS中洗滌三次之後，在343 nm下雷射激勵後，在60 μs延遲之後，使用Safire2板讀取器(Tecan)在665 nm下記錄FRET信號400 μs。當測試抗TIGIT抗體時，亦在15分鐘培育之後記錄FRET信號。接著將FRET比率計算為FRET強度除以620 nm下之供體發射。FRET強度為：(來自經SNAP-供體及受體標記之細胞之665 nm下之信號)-(來自相同批次之僅經SNAP-供體標記之轉染細胞之665 nm下之信號)。

如圖17中所示，TIGIT能夠直接破壞CD226均二聚體及引起其分解。如圖17A中所示，藉由HA-TIGIT之濃度增加來觀測Flag-ST-CD226均二聚體之分解，如由表現恆定量之Flag-ST-CD226之COS-7細胞上量測之Flag-ST-CD226之間的FRET比率降低及HA-TIGIT之濃度增加說明。然而，如圖17B中所示，當將抗TIGIT抗體添加至細胞培養物中時，此阻斷TIGIT及CD226締合之能力。此係由Flag-ST-CD226均二聚體強度FRET強度之降低不足說明。此表明CD226與TIGIT締合成複合物，但抗TIGIT抗體可破壞此等相互作用(圖17A及17B)。

使用TR-FRET，亦證明TIGIT與CD226締合之能力且展示於圖17C及17D中。簡言之，在使用1 μ M供體結合苯甲基-鳥嘌呤SNAP-A647進行SNAP-tag標記(參見上文)之後，細胞在PBS中洗滌三次且與在磷酸鹽緩衝生理食鹽水+0.2%BSA中稀釋之2 nM抗HA供體結合Lumi-4Tb (Cisbio)一起在室溫下培育2小時。接著記錄FRET信號。在此情況下，FRET強度為：(來自經SNAP受體及抗HA供體標記之細胞之665 nm下之信號)-(來自經SNAP受體及抗HA供體標記之mock轉染細胞之665 nm下之信號)。

如圖17C中所示，觀測到Flag-ST-CD226與HA-TIGIT之締合，如由在表現恆定量之Flag-ST-CD226之COS-7細胞上量測之Flag-ST-CD226及HA-TIGIT之間的FRET強度增加及HA-TIGIT之濃度增加說明。當添加抗TIGIT抗體時，Flag-ST-CD226與HA-TIGIT之間的FRET強度降低，如圖17D中所示，表明TIGIT與CD226之相互作用可由抗TIGIT阻斷抗體阻斷。

為了確認FRET實驗中Flag-ST-CD226及HA-TIGIT之細胞表面表現，進行表現指定標記構造之完整COS-7上之抗旗標及抗HA ELISA。簡言之，COS7與4%多聚甲醛一起固定，洗滌兩次，且在磷酸鹽緩衝生理食鹽水+1%胎牛血清(FCS)中阻斷。接著細胞與抗HA單株抗體(純系3F10，Roche applied science)或抗Flag-M2單株抗體(Sigma)一起培育，其均與辣根過氧化酶結合。在洗滌之後，細胞與SuperSignal ELISA受質(Pierce)一起培育且用Safire2板讀取器(Tecan)偵測化學螢光。藉由減去在mock轉染細胞上記錄之信號來計算特異性信號。如圖18中所說明，在ELISA分析法中證實CD226及TIGIT之細胞表面表現。

為了證實TIGIT:CD226相互作用並非由PVR結合驅動，如Stengel等

人, (2012) *PNAS* 109(14):5399-5904中所描述產生Flag-ST-CD226及HA-TIGIT(WT)或HA-TIGIT Q56R且如所描述測定FRET比率。如圖24中所示, WT TIGIT及Q56R TIGIT以相同功效結合CD226。

此資料不僅表明CD226及TIGIT締合成複合物, 而且抗TIGIT抗體可破壞此等相互作用且TIGIT:CD226相互作用並非由PVR結合驅動。資料支持TIGIT在限制CD226介導之T細胞活化中之作用且干擾CD226活性可能為TIGIT抑制T細胞反應及活性之重要作用機制。

實例10：CD226阻斷可活體內逆轉TIGIT/PD-L1阻斷之效應子

為了測試CD226與TIGIT相互作用之生理相關性, 小鼠用純系13 LCMV慢性感染且接著在不存在或存在抗CD226阻斷抗體之情況下用抗TIGIT+抗PD-L1處理。簡言之, C57BL6/J小鼠中僅CD4⁺ T細胞耗竭且受純系13菌株LCMV感染。對於慢性感染, 小鼠用 2×10^6 個PFU純系13病毒株LCMV靜脈內感染, 且分別在感染之前第3天及感染之後第4天用500 μ g及250 μ g耗竭抗CD4抗體(純系GK1.5)處理。在指定時, 自感染後第28天至第42天, 受純系13菌株LCMV感染之小鼠每週3次接受200 μ g同型對照抗體、500 μ g抗CD226抗體、200 μ g抗PD-L1抗體+500 μ g抗TIGIT抗體或500 μ g抗CD226抗體+200 μ g抗PD-L1抗體+500 μ g抗TIGIT抗體之腹膜內注射。處理在感染後第28天開始, 因為在慢性病毒感染之此模型中, T細胞反應在此時間點時基本上耗竭(Wherry等人, *Molecular Signature of CD8⁺ T cell Exhaustion During Chronic Viral Infection*, *Immunity*. 2007 Oct;27(4):670-84)。在感染之後第42天分析脾細胞及肝病毒效價。

在此等小鼠中, 單獨的抗CD226處理對CD8⁺ T細胞出現頻率、活化或細胞激素勝任水準具有有限作用(圖19A-19C)。然而, 抗CD226處理顯

著逆轉在經抗PD-L1+抗TIGIT處理之小鼠中發現的CD8⁺ T cell活化及IFN γ 產生之增加(分別降低59%及58%，P<0.001，**圖19B-19D**)。

與此等結果一致，經抗CD226+抗PD-L1+抗TIGIT處理之小鼠中的LCMV病毒負載顯著高於經單獨的抗PD-L1+抗-TIGIT處理之小鼠(增加272%，P<0.001，**圖19D**)。

此資料表明TIGIT限制慢性T細胞反應之主要機制為干擾CD226介導之共刺激。資料鑑別TIGIT在與CD226相互作用及破壞CD226，引起CD8⁺ T細胞中關鍵共刺激信號之降低或損失的先前未知作用。資料表明干擾CD226介導之T細胞共刺激可為TIGIT限制慢性T細胞反應(諸如在癌症或慢性病毒感染期間)之主要機制。資料亦定義抗TIGIT抗體之基本參數，該等抗體意欲藉由干擾TIGIT與CD226相互作用之能力及/或TIGIT破壞CD226二聚化之能力來恢復慢性刺激或耗竭之CD8⁺或CD4⁺ T細胞之效應子功能。

材料及方法

小鼠。 C57BL/6J 及 BALB/c 小鼠係購自 Jackson Laboratory and Charles River Laboratories。CD4^{cre}小鼠及TIGIT^{loxP/loxP}小鼠係藉由標準技術在C57BL/6J背景上產生及雜交。在TIGIT^{loxP/loxP} CD4^{cre}小鼠中自T細胞在96%功效下消除TIGIT表現。

流動式細胞測量術。 藉由溫和機械破壞來製備脾、淋巴結及腫瘤之單一細胞懸浮液。藉由針對CD4、CD8、CD44、CD62L、PD-1 (eBiosciences)及CD226 (Biolegend)之市售抗體進行表面染色。TIGIT抗體係如先前所描述在Genentech產生(Yu, X.等人 The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of

mature immunoregulatory dendritic cells. *Nature immunology* **10**, 48-57 (2009)), 且根據製造商說明(Molecular Probes)結合於Alexa Fluor 647。

對於細胞內細胞激素染色(ICS)，細胞用20 ng/mL Phorbol 12-豆蔻酸鹽 13- 乙酸鹽(PMA，Sigma)及1 μ M伊屋諾黴素(Ionomycin)(δ)在3 μ g/mL佈雷菲爾德菌素A (Brefeldin A)(eBiosciences)存在下刺激4小時。在刺激之後，如所描述對細胞進行表面標記染色且根據製造商說明與eBioscience's FoxP3固定緩衝液集合一起固定及滲透。固定細胞用針對IFN γ 及TNF α 之抗體(eBiosciences)染色。

阻斷抗體。如先前所描述產生阻斷抗TIGIT IgG2a單株抗體(純系10A7，針對小鼠及人類TIGIT反應)且在鼠IgG2a主結構上選殖。藉由用PD-1-Fc融合蛋白質使Pd11^{-/-}小鼠免疫來產生阻斷抗PD-L1 IgG2a單株抗體(純系25A1)且選殖至鼠IgG2a主結構上。藉由上述消除與Fc γ 受體結合之突變來修飾純系25A1。藉由倉鼠之重組型鼠CD226之免疫接種來產生阻斷抗CD226 IgG2a單株抗體(純系37F6)且選殖至鼠IgG2a主結構上。此等抗體亦用於本文中所描述之其他實例中描述之測試中。

病毒感染。對於急性感染，小鼠用 2×10^6 個牙菌斑形成單位(PFU)阿姆斯特壯菌株LCMV靜脈內感染。對於慢性感染，小鼠用 2×10^6 個PFU純系13病毒株LCMV靜脈內感染，且分別在感染之前第3天及感染之後第4天用500 μ g及250 μ g耗竭抗CD4抗體(純系GK1.5)處理。在指定情況下，在感染後第28天至第42天，經純系13菌株LCMV感染之小鼠每週接受200 μ g同型對照抗體、200 μ g抗PD-L1抗體及/或500 μ g抗TIGIT抗體之腹膜內注射3次。

病毒效價分析法。MC57細胞之單層與1%甲基纖維素之覆層一起培

養且用來自LCMV感染小鼠之經連續稀釋之肝勻漿感染。在感染之後72小時，細胞與4%多聚甲醛一起固定且與0.5% Triton-X一起滲透。病毒斑用抗LCMV NP(純系VL-4)及HRP結合抗大鼠IgG染色且藉由鄰苯二胺(OPD, Sigma)觀測。

生物資訊. 乳癌基因表現資料微陣列資料係自Cancer Gene Atlas Network(Network, T.C.G.A. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* **489**, 519-525 (2012))獲得。微陣列資料之處理及正規化係使用R程式化語言(<http://r-project.org>)及Bioconductor's limma封裝(<http://bioconductor.org>)進行。如先前所描述²²，使用正常+指數背景校正方法預先處理來自各通道之微陣列強度值。接著如先前所描述²³，使用分位正規化來正規化校正強度值。藉由自各陣列之測試通道減去參考通道來計算正規化記錄比率資料。如先前所描述²⁴，使用非特異性過濾器進一步過濾資料，移除未映射至已知基因的探針，且將資料集減少至每個基因一個探針。對於不同的表現分析，如先前所描述，藉由limma封裝計算適度t-統計(Smyth, G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* **3**, Article3 (2004))。為了評估相關性，使用皮爾森相關係數(Pearson's correlation coefficients)。

CT26結腸癌瘤. BALB/c小鼠用懸浮於基質膠(BD Biosciences)中之 1×10^5 個CT26結腸癌瘤細胞皮下接種至右側胸側腹中。在兩週之後，藉由每週腹膜內注射3次持續3週將攜帶約200 mm³腫瘤之小鼠隨機分配成接受35 mg/kg同型對照抗體、抗PD-L1抗體及/或抗TIGIT抗體之處理組。藉由

測徑規每週量測腫瘤2次。對腫瘤變成潰瘍/壞死或生長超過2000 mm³之動物進行安樂死。

EMT6乳癌. BALB/c小鼠在第四乳房脂肪墊中用含 1×10^5 個同基因型EMT6乳癌細胞之基質膠(BD Biosciences)皮下接種，在兩週之後，藉由每週腹膜內注射3次持續3週將攜帶約150-200 mm³腫瘤之小鼠隨機分配成接受35 mg/kg同型對照抗體、抗PD-L1抗體及/或抗TIGIT抗體之處理組。藉由測徑規每週量測腫瘤2次，且使用經修改之橢球公式計算腫瘤體積： $\frac{1}{2} \times (\text{長度} \times \text{寬度}^2)$ 。腫瘤收縮至32 mm³或更小之動物視為發生完全反應(CR)。腫瘤生長至大於2000 mm³之動物視為發生進程且進行安樂死。在進程或完全反應之前腫瘤變成潰瘍之動物進行安樂死且自研究移除。

CT26再攻擊. 當指定時，如上文所描述預先經CT26結腸癌細胞接種之BALB/c小鼠用CT26細胞再接種至左(先前未接種)側胸側腹中。亦將含 1×10^5 個EMT6乳癌細胞之基質膠接種之此等小鼠之第四乳房脂肪墊中。每週量測腫瘤2次。對腫瘤變成潰瘍/壞死或全部腫瘤負荷超過2000 mm³之動物進行安樂死。

統計. 使用非配對(在指定時配對)2尾史都登氏t試驗法(Student's t-tests)進行統計測試。誤差條描繪平均值之標準誤差。

動物研究監管. 所有動物研究均由機構動物護理及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee)批准。

實例11：TIGIT表現在人類癌症中升高且與CD8及PD-1之表現及CD8+ T細胞浸潤相關

材料及方法

生物資訊. RNA定序資料之處理及分析係使用R程式化語言

(<http://www.r-project.org>) 以及來自 Bioconductor 項目之若干套件 (<http://www.bioconductor.org>) 進行。癌症及匹配正常樣品之 RNA 定序資料係自 5 種不同適應症之 TCGA 獲得：乳癌 (Network, C.G.A. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature 490, 61-70 (2012))、結腸腺癌 (Network, T.C.G.A. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature 487, 330-337 (2012))、腎透明細胞癌 (Network, C.G.A. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. Nature 499, 43-49 (2013))、肺鱗狀細胞癌 (Network, T.C.G.A. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. Nature 489, 519-525 (2012)) 及子宮內膜癌 (Network, T.C.G.A. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. Nature 497, 67-73 (2012))。

使用 HTSeqGenie Bioconductor 套件處理原始 RNA-seq 讀數。簡言之，使用 GSNAP 算法 (Wu, T.D. 及 Nacu, S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. Bioinformatics (Oxford, England) 26, 873-881 (2010)) 將讀數與人類基因組 (NCBI 構築 37) 比對。對屬於外顯子之獨特比對讀數對進行計數以產生個別基因之基因表現量之評估。吾人使用來自 edgeR 套件 (Robinson, M.D., McCarthy, D.J. 及 Smyth, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics (Oxford, England) 26, 139-140 (2010)) 之文庫尺寸評估來校正不同樣品之各別定序深度。

為了得出 T 細胞特異性基因特徵，吾人手動處理由 IRIS 項目鑑別之 T

細胞基因，移除與細胞循環過程相關之基因、其他組織中高度表現之基因以及已知共活化及共抑制性受體。此產生對T細胞具有特異性的15基因特徵。為了計算肺鱗狀細胞癌資料中之T細胞基因表現簽名評分，吾人首先使用來自limma Bioconductor套件之voom功能對原始計數資料進行差異穩定轉換。接著計算來自15基因T細胞特徵之定中心及按比例縮放差異穩定資料之第一特徵向量。此方法產生相對T細胞豐度之穩固每樣品評估。接著再次使用limma套件，針對各基因擬合包括T細胞特徵分數之線性模型。接著藉由基因與線性模型中T細胞特徵之相關性將基因分級，僅選擇與T細胞特徵正相關之基因。對於觀察T細胞相關基因作為熱圖，將差異穩定資料定中心及按比例縮放成單元差異，允許具有不同平均表現量之基因之比較。

為了確定TIGIT之表現與其他基因之間的相關性，使用來自edgeR Bioconductor 套件 (Robinson, M.D., McCarthy, D.J. 及 Smyth, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics (Oxford, England) 26, 139-140 (2010))之方法將RNA定序計數資料正規化以考慮文庫尺寸之不同。接著基於正規化計數計算斯皮爾曼等級相關係數 (Spearman's rank correlation coefficient)。認為 $p > 0.75$ 表示強相關， $\rho \leq 0.75$ 但 > 0.5 表示中等相關，且 $\rho \leq 0.5$ 但 > 0.25 表示弱相關。

對於各適應症之TIGIT/CD3 ϵ 比率之計算，首先計算各RNA定序資料集之差異穩定資料。接著計算TIGIT及CD3 ϵ 之差異穩定資料之log2比率。為了計算腫瘤與正常樣品之間的差異，使用標準R功能進行標準線性模型分析。接受 < 0.01 之p值作為腫瘤與正常樣品之間顯著差異之證據。

為了鑑別與腫瘤浸潤T細胞相關之基因，使用基於基因特徵之方法審核來自Cancer Genome Atlas(TCGA)肺鱗狀細胞癌(LUSC)集合之基因表現資料(Network, T.C.G.A. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. Nature 489, 519-525 (2012))。使用由免疫反應電子雜交項目(Immune Response In Silico project)(Abbas, A.R.等人 Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data. Genes and immunity 6, 319-331 (2005))定義之免疫細胞特異性基因集合及上述方法，研究高度特異性15基因特徵。檢驗與T細胞特徵相關度最高之基因，吾人鑑別先前與腫瘤中之T細胞功能不全相關的若干共抑制性受體，特定言之，PD-1(圖21)。在LUSC中，TIGIT與CD3 ϵ 之表現高度相關，其中斯皮爾曼等級相關係數 ρ 為0.82(圖20A)。實際上，TIGIT及CD3 ϵ 表現亦在多個其他TCGA腫瘤基因表現數據集中高度相關，包括結腸腺癌(COAD)、子宮內膜癌(UCEC)、乳癌(BRCA)及腎臟透明細胞癌(KIRC)，其中 ρ 在0.83至0.94範圍內(圖20B-20E)。此外，TIGIT之表現在多個腫瘤樣品中相對於CD3 ϵ 之表現升高，與匹配正常組織相比，LUSC、COAC、UCEC及BRCA腫瘤樣品中之TIGIT/CD3 ϵ 比率增加(增加116%-419%，圖20A-20D)。KIRC樣品中TIGIT與CD3 ϵ 表現之之未改變，KIRC樣品中TIGIT及CD3 ϵ 之表現與正常組織樣品相比高得多(圖20E)。此等資料表明在多種固態腫瘤中，TIGIT表現由腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)上調。

先前已描述TIGIT作為CD4+ T細胞激活之抑制劑，在CD8+ T細胞中功能未知。然而，LUSC樣品中之TIGIT表現與CD8A高度相關且與CD4僅弱相關(ρ 分別為0.77及0.48，圖20F)。TIGIT之表現亦與其互補共刺激受

體CD226之表現以及PD-1 (腫瘤中T細胞抑制及其他慢性免疫反應期間之關鍵介體)之表現相關(p 分別為0.64及0.82, 圖20G-20H)。儘管此等基因之一些非淋巴細胞來源存在於腫瘤中, 但此等資料強烈表明腫瘤浸潤T細胞, 特定言之, 「耗竭」CD8⁺ T細胞表現大量TIGIT。

實例12: TIGIT及PD-1由人類及鼠類腫瘤浸潤淋巴細胞協同表現

材料及方法

人類腫瘤及PBMC樣品. 匹配全血及新鮮的以手術方式切除之腫瘤組織係自Conversant Biosciences或Foundation Bio獲得。所有標本係在書面知情同意書下獲得且使用經哈特福德醫院機構審查委員會(Hartford Hospital Institutional Review Board; IRB)批准之協定(NSCLC患者1, 描繪於圖22中)或西方IRB(NSCLC患者2及CRC患者1, 描繪於圖23及圖37中)收集。正常成年全血係自健康志願者獲得。PBMC係藉由菲科爾梯度離心(Ficoll gradient centrifugation)自全血純化。將腫瘤組織切割成小片, 且與膠原蛋白酶及DNase (Roche)一起培育, 且使用gentleMACS Disassociator (Miltenyi)分離。

流動式細胞測量術. 藉由溫和機械破壞來製備小鼠脾、淋巴結及腫瘤之單一細胞懸浮液。藉由針對CD4、CD8、CD44、CD62L、PD-1 (eBiosciences)及CD226 (Biolegend)之市售抗體進行表面染色。在Genentech產生TIGIT抗體且根據製造商說明(Molecular Probes)結合於Alexa Fluor 647。

對於細胞內細胞激素染色(ICS), 細胞用20 ng/mL Phorbol 12-豆蔻酸鹽13-乙酸鹽(PMA, Sigma)及1 μ M伊屋諾黴素(Ionomycin)(δ)在3 μ g/mL佈雷菲爾德菌素A(Brefeldin A)(eBiosciences)存在下刺激4小時。

在刺激之後，如所描述對細胞進行表面標記染色且根據製造商說明與 eBioscience's FoxP3 固定緩衝液集合一起固定及滲透。固定細胞用針對 IFN γ 及 TNF α 之抗體(eBiosciences)染色。

如上文所描述製備人類腫瘤及 PBMC 樣品。用活力染料(Molecular Probes)、市售針對 CD45 (eBiosciences)、CD3、CD4、CD8、PD-1 (BD Biosciences) 之抗體及如上文所描述製備之抗 TIGIT 抗體進行表面染色。

用 LSR-II 或 LSR-Fortessa 儀器(BD Biosciences)獲得所有樣品且使用 FlowJo 軟體(Treestar)分析。

為了確認 TIGIT 之腫瘤浸潤 T 細胞之上調，評估人類非小細胞肺癌腫瘤浸潤 T 細胞、匹配周邊 T 細胞及正常供體周邊 T 細胞上之 TIGIT 蛋白質表現。細胞表面 TIGIT 係由 NSCLC 浸潤 CD8⁺ 及 CD4⁺ T 細胞之亞群表現(分別為 51% 及 39%，**圖 22A-22B**)。**圖 36** 進一步表明細胞表面 TIGIT 係由大百分比之 NSCLC 浸潤 CD8⁺ 及 CD4⁺ T 細胞表現(分別為 58% 及 28% TIGIT⁺，**圖 36A-36B**)。有趣的是，與來自健康供體之細胞相比，來自 NSCLC 腫瘤供體之周邊 CD8⁺ 及 CD4⁺ T 細胞亦表現較大量之 TIGIT (**圖 22A-22B** 及 **圖 36A-36B**)。在匹配 NSCLC 及 PBMC 樣品之第二集合以及匹配結腸直腸癌 (CRC) 及 PBMC 樣品之集合下獲得類似結果(**圖 23** 及 **圖 37**)。幾乎所有表現大量 TIGIT 之腫瘤浸潤 T 細胞共表現 PD-1，與圖 1 中描述之 TIGIT 與 PD-1 表現之間的相關性一致(**圖 22C**)。

為了將吾人之人類結果擴展至臨床前癌症模型，分別在野生型 BALB/c 小鼠及 C57BL/6/J 小鼠中藉由 T 細胞浸潤皮下 CT26 及 MC38 結腸直腸腫瘤表徵 TIGIT 表現。在接種後兩週，當 CT26 及 MC38 腫瘤產生且生長至 150-200 mm³ 尺寸時，TIGIT 由約 50% 腫瘤浸潤 CD8⁺ T 細胞及 25% 腫瘤

浸潤CD4⁺ T細胞表現，表現量與活體外刺激之初級CD8⁺ T細胞類似(圖22D-22E及圖26)。在CD8⁺及CD4⁺鼠類TIL中，CD226組成性表現，且TIGIT及PD-1表現再次緊密相關(圖22F-22G)。

此等結果證實TIGIT由腫瘤浸潤T細胞高度表現，且TIGIT之表現與其他共抑制性受體，最值得注意的是PD-1之表現並行出現。

實例13：CD8⁺ T細胞反應之TIGIT抑制係取決於CD226

與PD-1或CTLA-4不同，不存在T細胞抑制性信號級聯由*cis*中之TIGIT起始之直接生物化學證據。然而，共抑制性受體亦可藉由限制互補共刺激受體之活性(諸如藉由CTLA-4之CD28信號傳導之抑制)發揮功能。以確認TIGIT為腫瘤浸潤及抗病毒CD8⁺ T細胞之負調節劑，探尋TIGIT是否經由T細胞之互補共刺激受體CD226間接誘導T細胞耗竭，CD226係由周邊及腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞高度表現(圖27)。

攜帶150-200 mm³ CT26腫瘤之野生型BALB/c小鼠在存在或不存在阻斷抗CD226抗體之情況下用抗PD-L1與抗TIGIT抗體之組合或用單獨抗CD226處理。與對照小鼠相比，用單獨抗CD226處理可稍微加速腫瘤生長，引起中值存活期減少2天(單獨抗CD226對比對照物， $P=0.0118$ ，圖28A-28B)。驚人的是，向經抗TIGIT及抗PD-L1共阻斷處理之小鼠添加抗CD226阻斷抗體可極大地增強腫瘤生長且充分逆轉TIGIT/PD-L1共阻斷對腫瘤消退及存活之功效(圖28A-28B)。在經抗TIGIT、抗PD-L1及/或抗CD226處理之慢性感染小鼠中觀測到對LCMV效價之類似作用(圖19D)。此等資料表明CD226對抗腫瘤及其他慢性T細胞反應作出貢獻，且TIGIT至少部分地T藉由CD226之抑制兒抑制此等反應。

為了更充分地理解TIGIT及CD226活性如何影響抗腫瘤T細胞反應，

測試單獨CD226及其與TIGIT之組合如何影響T細胞活化、腫瘤浸潤及效應子功能。分析來自經如上所述處理之攜帶CT26腫瘤之小鼠的腫瘤及腫瘤引流淋巴結7天。如前所述，PD-L1及TIGIT之共阻斷增強腫瘤浸潤及腫瘤引流淋巴結駐留CD8⁺ T細胞之IFN γ 產生(分別增加130%及99%， $P<0.001$ ，圖28C-28D)。單獨CD226之阻斷未對腫瘤浸潤及腫瘤引流淋巴結駐留CD8⁺ T細胞之IFN γ 產生起作用，表明CD226共刺激之作用已經侷限於耗竭之T細胞中(圖28C-28E)。然而，在經組合抗TIGIT及抗PD-L1處理之小鼠中，CD226阻斷損害腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞之出現頻率及效應子功能(降低57%， $P=0.0015$ ，圖28D)。抗CD226處理對駐留於腫瘤引流淋巴結中之CD8⁺ T細胞並無此類作用，而單獨的抗PD-L1可增強CD8⁺ T細胞效應子功能，表明PD-L1阻斷即使在不存在CD226之情況下亦足以增強CD8⁺ T細胞效應子功能。CD226阻斷亦引起腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞之出現頻率降低(降低53%， $P=0.0044$ ，圖28E-28F)。綜合而言，此等資料表明CD226起作用以支持腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞之聚集及效應子功能，且TIGIT抵消腫瘤浸潤CD8⁺ T細胞之效應子功能。

實例14：TIGIT藉由直接阻礙CD226均二聚而削弱CD226功能

為了測試TIGIT是否可拮抗*cis*中之CD226活性，測試TIGIT對活體外CD226共刺激之作用。與野生型同來源CD8⁺ T細胞相比，經次最佳量之抗CD3刺激之TIGIT缺失型CD8⁺ T細胞更穩定地對PVR共刺激起反應，且此增強之反應係取決於CD226 (增殖增加46%， $P=0.0061$ ，圖29A)。與此等資料一致，與在同型匹配對照抗體存在下相比，經次最佳抗CD3及PVR刺激之野生型CD8⁺ T細胞在抗TIGIT抗體存在下更穩定地增殖，且此作用亦係取決於CD226 (增殖增加105%， $P=0.0010$ ，圖29B)。

為了測試TIGIT與初級人類CD8⁺ T細胞之相關性，將來自健康供體血液之CD8⁺ T細胞純化且用次最佳量之板結合之抗CD3及重組型人類PVR-Fc融合蛋白質刺激。在同型匹配對照抗體存在下，PVR共刺激適度地增強型T細胞刺激及增殖。此外，添加阻斷抗TIGIT抗體顯著增強PVR共刺激之作用，與TIGIT對初級鼠類CD8⁺ T細胞之作用一致(增殖增加69%， $P=0.0071$ ，圖29C)。此等資料表明CD226功能之TIGIT抑制對初級鼠類及人類CD8⁺ T細胞之細胞內源性作用。

使用TR-FRET (時差式螢光共振能量轉移)確定TIGIT減弱CD226活性之分子機制。首先，藉由非滲透性供體及受體螢光團表現及標記人類ST-CD226。此等細胞產生強FRET信號，證實CD226均二聚之能力(圖29D)。為了監測細胞表面上CD226與TIGIT相互作用，在不存在或存在分別用SNAP-tag受質及抗HA抗體標記之人類HA-TIGIT下表現ST-CD226。驚人的是，增加含量之TIGIT之共表現(由ELISA監測)減弱CD226/CD226 FRET信號，表明TIGIT可破壞CD226均二聚(圖29E)。實際上，受體CD226及供體TIGIT亦產生顯著FRET信號，表明此等兩種蛋白質之間的直接相互作用(圖29F)。藉由共免疫沈澱進一步證實此相互作用(圖29G)。此等資料表明TIGIT與CD226在細胞表面直接相互作用，且此相互作用可削弱CD226均二聚。

為了測試TIGIT抗體阻斷對TIGIT-CD226相互作用之作用，再次共表現人類ST-CD226及HA-TIGIT，此次係在存在或不存在針對人類TIGIT之阻斷抗體情況下進行。向細胞培養物中添加抗TIGIT可顯著降低TIGIT及CD226締合之能力(圖29H)。此等資料表明抗TIGIT處理可限制TIGIT與CD226之相互作用，且與CD226活性之抑制為TIGIT加強CD8⁺ T細胞耗

竭之關鍵作用機制之觀點一致。此亦與抗TIGIT抗體增強CD226共刺激之能力一致。

接著，確認內源TIGIT與CD226相互作用之能力(圖30)。用抗CD3及抗CD28抗體活體外刺激初級人類T細胞，基於TIGIT表現分類，休眠，再刺激且用針對內源TIGIT及CD226之抗體標記，該等抗體結合於與TR-FRET相容之螢光團。經供體結合抗TIGIT及受體結合抗CD226抗體標記之表現TIGIT之T細胞產生強FRET信號(圖30)。相反，在不表現TIGIT或經供體結合抗TIGIT及受體結合抗HVEM抗體標記之T細胞上僅偵測到可忽略的FRET信號(圖30)，證實偵測到的內源TIGIT與CD226之間相互作用之特異性。

此等結果表明內源TIGIT及CD226可在細胞表面直接相互作用，且此相互作用削弱CD226均二聚。鑒於CD226作為活體內T細胞反應之共刺激劑之作用，且不希望受理論約束，咸信CD226之抑制可為慢性病毒感染及癌症期間TIGIT加強CD8⁺ T細胞耗竭之關鍵作用機制。

材料及方法

經轉染之細胞株之時差式螢光共振能量轉移。 使用脂染胺2000 (Life Technologies)，用N端SNAP標記(ST)CD226及N端HA-TIGIT轉染CHO細胞，且在白色96孔板(Costar)中以每孔100,000個細胞接種。24小時後，將細胞標記以量測SNAP供體/SNAP受體之間或SNAP受體/抗HA供體之間的TR-FRET。1) SNAP供體/SNAP受體標記：細胞與在DMEM 10% FCS中稀釋之100 nM供體結合苯甲基鳥嘌呤SNAP-Lumi-4Tb (Cisbio)及1 μM受體結合苯甲基-鳥嘌呤SNAP-A647 (New England Biolabs)一起在37 °C，5% CO₂下培育1小時。接著細胞在PBS中洗滌三次，隨後讀取FRET

信號。2) SNAP受體/抗HA供體：細胞與在DMEM 10% FCS中稀釋之1 μ M受體結合苯甲基-鳥嘌呤SNAP-A647一起在37°C，5% CO₂下培育1小時。在PBS中洗滌三次之後，細胞與2 nM抗HA Lumi-4Tb (Cisbio)一起在PBS+0.2% BSA中在室溫下培育2小時。接著在343 nm下雷射激勵後之60 μ s延遲之後，使用Safire2板讀取器(Tecan)在665 nm下記錄FRET信號400 μ s。當最終在10 μ g/ml下測試抗TIGIT時，亦在15分鐘培育之後記錄FRET信號。對於Flag-ST-CD226/Flag-ST-CD226相互作用，FRET比率計算為FRET強度除以620 nm下之供體發射，其與CD226表現成比例。FRET強度為：(來自經SNAP-供體及受體標記之細胞之665 nm下之信號)-(來自相同批次之僅經SNAP-供體標記之轉染細胞之665 nm下之信號)。對於Flag-ST-CD226/HA-TIGIT相互作用，FRET比率表示FRET強度除以Flag-ST-CD226表現，如由抗Flag ELISA量測。在此情況下，FRET強度 = (來自經SNAP受體及抗HA供體標記之細胞之665 nm下之信號) - (來自經SNAP受體及抗HA供體標記之mock轉染之細胞之665 nm下之信號)。

人類T細胞之時差式螢光共振能量轉移。人類抗TIGIT (Genentech純系1F4)、抗CD226 (Santa Cruz Biotechnology)及抗HVEM (eBioscience)抗體為與TR-FRET (Cisbio)相容之結合螢光團。初級人類T細胞為自血液富含MACS，用板結合之抗CD3及抗CD28活體外刺激72小時。接著將TIGIT表現及非表現T細胞(均表現CD226)分類，在不刺激72小時下休眠，且再刺激48小時。接著各群用Tris-KREBS緩衝液(20 mM Tris pH 7.4、118 mM NaCl、5.6 mM 葡萄糖、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgSO₄、4.7 mM KCl、1.8 mM CaCl₂)洗滌一次且在以下條件下一式三份地培養：1) 抗TIGIT Ab-Lumi4-Tb (5 μ g/ml)，2) 抗TIGIT Ab-Lumi4-

Tb (5 $\mu\text{g/ml}$)+抗HVEM-d2 (10 $\mu\text{g/ml}$)，3) 抗TIGIT Ab-Lumi4-Tb (5 $\mu\text{g/ml}$)+抗CD226 (10 $\mu\text{g/ml}$)，4)抗-TIGIT Ab-Lumi4-Tb (5 $\mu\text{g/ml}$)+抗CD226 (10 $\mu\text{g/ml}$)+冷的抗TIGIT Ab (純系1F4) (50 $\mu\text{g/ml}$)。最佳化指定濃度以確保最高FRET信號。細胞在旋轉器上在室溫下培育2小時且接著在Tris-KREBS緩衝液中洗滌3次。接著T細胞在白色96孔板(Costar)中以400,000個細胞/孔接種且在343 nm下雷射激勵後之60 μs 延遲之後，使用PHERAstar板讀取器(BMG Labtech)在665 nm下記錄TR-FRET 400 μs 。FRET強度表示為來自經Ab-Lumi4-Tb+Ab-d2標記之細胞之665 nm下之信號減去來自相同批次之經單獨Ab-Lumi4-Tb標記之細胞之665 nm下之信號。非特異性FRET信號由與Lumi4Tb+d2+其餘為冷的Ab一起培育之T細胞提供。

共免疫沈澱. 簡言之，15 cm板中之COS 7細胞用針對TIGIT-HA (5 ng)或CD226-Flag (10 ng)標記蛋白質之含有cDNA之表現質體或對照質體(pRK)共轉染。在轉染之後23小時，細胞用PBS洗滌且收集於4 ml冰冷的PBS中且在300xg下離心5分鐘且細胞粒在4°C下再懸浮於2 ml溶解緩衝液中。細胞在每15分鐘渦旋下溶解超過50分鐘，且接著在4°C下在10,00xg下離心15分鐘。所得上清液用160 μl CL6B瓊脂糖研磨漿藉由在4°C下旋轉30分鐘來預先清洗，且在3000xg下離心2分鐘。將上清液等分至兩個試管中且與抗HA或抗flag一起使用標準程序進行免疫沈澱。免疫沈澱蛋白質經歷SDS-PAGE及西方墨點法。藉由抗Flag-HRP或抗HA-HRP探測西方墨點。

本文中引用之所有專利、專利申請案、文獻及論文均以全文引用的方式併入本文中。

【序列表】

<110> 美商建南德克公司(Genentech, Inc.)
葛洛甘, 珍(GROGAN, Jane)
強斯頓, 羅伯特 J.(JOHNSTON, Robert J.)
艾賓, 布萊恩(IRVING, Bryan)
駭克尼, 傑森(HACKNEY, Jason)
余, 辛(YU, Xin)
伊頓, 丹(EATON, Dan)
波里斯, 克莉絲汀(BOWLES, Kristin)
康-艾格, 蕾蒂西亞(COMPS-AGRAR, Laetitia)

<120> 利用PD-1軸結合拮抗劑及TIGIT抑制劑治療癌症之方法

<130> 14639-2025944

<140> Not yet Assigned
<141> Concurrently Herewith

<150> US 61/846,941
<151> 2013-07-16

<150> US 61/865,582
<151> 2013-08-13

<150> US 61/950,754
<151> 2014-03-10

<150> US 61/985,884
<151> 2014-04-29

<150> US 61/992,109
<151> 2014-05-12

<160> 40

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 1
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Tyr Ser Gly Val Lys Glu Asn Leu Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 2
Ala Ser Ile Arg Phe Thr
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 3
Gln Gln Gly Ile Asn Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 4
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Thr Met His
1 5 10

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 5
Phe Ile Arg Ser Gly Ser Gly Ile Val Phe Tyr Ala Asp Ala Val Arg
1 5 10 15
Gly

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 6
Arg Pro Leu Gly His Asn Thr Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 7
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser
1 5 10 15

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 8
Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 9

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Pro Thr
1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 10

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His Leu Met Asn
1 5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 11

Leu Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 12

Gly Leu Arg Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 13
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 13
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Tyr Ser
20 25 30
Gly Val Lys Glu Asn Leu Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ile Arg Phe Thr Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Met Gly Gln Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95
Gly Ile Asn Asn Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys Arg

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 14
Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Ser Phe Gly
1 5 10 15
Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Asn Ser
20 25 30
Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Phe Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95
Thr His Gln Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys

100105110

<210> 15
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Thr Gln Pro Gly Lys
151015
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
202530
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
354045
Ala Phe Ile Arg Ser Gly Ser Gly Ile Val Phe Tyr Ala Asp Ala Val
505560
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe
65707580
Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
859095
Ala Arg Arg Pro Leu Gly His Asn Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
100105110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 16
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
151015
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His
202530
Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
354045
Gly Leu Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
505560
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65707580
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

I888366

				85						90						95			
Ser	Arg	Gly	Leu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly				
			100						105						110				
Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser													
			115																

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 17
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 18
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 18
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 19
Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 20
<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 20
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 21
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 22
Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
1 5

<210> 23
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 24
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 25
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 26
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 27
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 27
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 28
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 29
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 30
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 31
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 31
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 32
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> VARIANT
<222> 6
<223> Xaa = Asp或Gly

<400> 33
Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 34
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa = Ser或Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> 10
<223> Xaa = Thr或Ser

<400> 34
Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Asp或Val

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Val或Ile

<220>

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa = Ser或Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa = Ala或Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa = Val或Leu

<400> 35

Arg	Ala	Ser	Gln	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Xaa	Xaa	Ala
1			5						10	

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa = Phe或Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Tyr或Ala

<400> 36
Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa = Tyr, Gly, Phe,或Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa = Leu, Tyr, Phe或Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> 5
<223> Xaa = Tyr, Asn, Ala, Thr, Gly, Phe或Ile

<220>
<221> VARIANT
<222> 6
<223> Xaa = His, Val, Pro, Thr或Ile

<220>
<221> VARIANT
<222> 8
<223> Xaa = Ala, Trp, Arg, Pro或Thr

<400> 37
Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5

<210> 38
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 38
gatgttgtgt tgactcaaac tccactctcc ctgtctgtca gctttggaga tcaagtttct 60
atctcttgca ggtctagtca gaggcttgta aacagttatg ggaacacctt tttgtcttgg 120
tacctgcaca agcctggcca gtctccacag ctctcatctt ttgggatttc caacagattt 180
tctgggggtgc cagacagggt cagtggcagt ggltcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcacaataa agcctgagga cttgggaatg tattactgct tacaaggtag gcatcagcct 300
cccacgttcg gtcctgggac caagctggag gtgaaa 336

<210> 39
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 39
gaggtcacgc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggaacttc aatgaagata 60
tcctgcaagg cttctgggta ctcatcact ggccatctta tgaactgggt gaagcagagc 120
catggaaaga accttgagtg gattggactt attattcctt acaatggtgg tacaagctat 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240
atggagctcc tcagctcgac ttctgatgac tctgcagtct attctgttc aagaggcctt 300
aggggcttct atgctatgga ctactgggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca 357

<210> 40
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 40
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種有效量之抗PD-1拮抗劑抗體的用途，其係用於製備用於以下之藥劑：

- (a) 治療個體中之癌症或延緩其進程；
- (b) 降低或抑制個體中之癌症復發或癌症進程；
- (c) 治療個體中之免疫相關疾病或延緩其進程；
- (d) 降低或抑制個體中之免疫相關疾病之進程；或
- (e) 增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能，

該藥劑係與抗TIGIT拮抗劑抗體組合，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體抑制或阻斷CD226與TIGIT之相互作用。

【請求項2】

一種有效量之抗TIGIT拮抗劑抗體的用途，其係用於製備用於以下之藥劑：

- (a) 治療個體中之癌症或延緩其進程；
- (b) 降低或抑制個體中之癌症復發或癌症進程；
- (c) 治療個體中之免疫相關疾病或延緩其進程；
- (d) 降低或抑制個體中之免疫相關疾病之進程；或
- (e) 增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能，

該藥劑係與有效量之抗PD-1拮抗劑抗體組合，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體抑制或阻斷CD226與TIGIT之相互作用。

【請求項3】

一種有效量之抗PD-1拮抗劑抗體及抗TIGIT拮抗劑抗體的用途，其

係用於製備用於以下之藥劑：

- (a) 治療個體中之癌症或延緩其進程；
- (b) 降低或抑制個體中之癌症復發或癌症進程；
- (c) 治療個體中之免疫相關疾病或延緩其進程；
- (d) 降低或抑制個體中之免疫相關疾病之進程；或
- (e) 增加、增強或刺激個體中之免疫反應或功能；

其中該抗TIGIT拮抗劑抗體抑制或阻斷CD226與TIGIT之相互作用。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該免疫相關疾病係由T細胞功能異常表徵。

【請求項5】

如請求項4之用途，其中該T細胞功能異常係由對抗原刺激之反應降低表徵。

【請求項6】

如請求項4之用途，其中該T細胞功能異常係由T細胞能力缺失(anergy)或分泌細胞激素、增殖或執行溶細胞活性之能力降低表徵。

【請求項7】

如請求項4之用途，其中該T細胞功能異常係由T細胞耗竭表徵。

【請求項8】

如請求4之用途，其中該T細胞功能異常包含功能異常之CD4+ 及CD8+ T細胞。

【請求項9】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該免疫相關疾病係選自由以下

組成之群：起因不明的急性感染、慢性感染及腫瘤免疫性。

【請求項10】

如請求項中1至3中任一項之用途，其中該藥劑係進一步與至少一種化學治療劑組合使用。

【請求項11】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該個體患有癌症。

【請求項12】

如請求項11之用途，其中該個體處於緩解。

【請求項13】

如請求項4之用途，其中該免疫相關疾病係由CD4+及CD8+ T細胞之激活(priming)、活化、增殖、細胞激素釋放或溶細胞活性表徵。

【請求項14】

如請求項13之用途，其中與投與該組合之前相比，該抗PD-1拮抗劑抗體及該抗TIGIT拮抗劑抗體之組合增加CD4+或CD8+ T細胞之數目。

【請求項15】

如請求項13之用途，其中與投與該組合之前相比，該抗PD-1拮抗劑抗體及該抗TIGIT拮抗劑抗體之組合增加活化之CD4+及CD8+ T細胞之數目。

【請求項16】

如請求項13之用途，其中與投與該組合之前相比，該等活化之CD4+及CD8+ T細胞係由增強之 γ -IFN⁺產生或增強之溶細胞活性表徵。

【請求項17】

如請求項13之用途，其中與投與該組合之前相比，該抗PD-1拮抗劑

抗體及該抗TIGIT拮抗劑抗體之組合增加自該等CD4+及CD8+ T細胞釋放選自由以下組成之群之細胞激素：IFN- γ 、TNF- α 及介白素。

【請求項18】

如請求項13之用途，其中該等CD4+及CD8+ T細胞為效應子記憶T細胞。

【請求項19】

如請求項18之用途，其中該等CD4+及CD8+效應子記憶T細胞係由 γ -IFN⁺之產生或增強之溶細胞活性表徵。

【請求項20】

如請求項18之用途，其中該等CD4+及CD8+效應子記憶T細胞係由具有CD44^高 CD62L^低表現表徵。

【請求項21】

如請求項11之用途，其中該癌症包含浸潤T細胞。

【請求項22】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體包含6個包含HVR，該等HVR包含選自以下組成之群之胺基酸序列：

(1) KSSQSLYYSGVKENLLA (SEQ ID NO:1)、ASIRFT (SEQ ID NO:2)、QQGINNPLT (SEQ ID NO:3)、GFTFSSFTMH (SEQ ID NO:4)、FIRSGSGIVFYADAVRG (SEQ ID NO:5)及RPLGHNTFDS (SEQ ID NO:6)；及

(2) RSSQSLVNSYGNTFLS (SEQ ID NO:7)、GISNRFS (SEQ ID NO:8)、LQGTHQPPT (SEQ ID NO:9)、GYSFTGHLMN (SEQ ID NO:10)、LIIPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:11)及GLRGFYAMDY

(SEQ ID NO:12)。

【請求項23】

如請求項22之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體包含輕鏈，該輕鏈包含

DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTCK

SSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGS

GSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFCQQGINNPLTFGDGTKLEIKR (SEQ ID NO:13) 或 **DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSSQSLVNSYGNTFLS**

WYLHKPGQSPQLLIFGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDL

GMYCYCLQGTHQPPTFGPGTKLEVK (SEQ ID NO:14)中闡述之胺基酸序列。

【請求項24】

如請求項22之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體包含重鏈，該重鏈包含

EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEA

SGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTIS

RDNAKNLLFLQMNDLKSEDTAMYVCARRPLGHNTFDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:15) 或 **EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSTGHL**

MNWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELL

SLTSDDSAVYFCRGLRGFYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:16)中闡述之胺基酸序列。

【請求項25】

如請求項22之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體包含輕鏈及重鏈，該輕鏈包含

DIVMTQSPSSLAVSPGEKVTMTC

KSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFT

GSGSGTDYTLTITSVQAEDMGQYFC**QQGINNPLTF**GDGTKLEIKR
(SEQ ID NO:13)或DVVLTQTPLSLSVSFGDQVSISCRSS**QSLVNSYGN**
TFLSWYLHKPGQSPQLLIFGISNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISTIK
PEDLGMYCY**LQGTHQPPT**FGPGTKLEVK (SEQ ID NO:14)中闡述之
胺基酸序列，且該重鏈包含EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEAS
GFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISR
DNAKNLLFLQMNDLKSEDTAMYCYCARR**PLGHNTFDSWGQGTLVTVSS**
(SEQ ID NO:15)或EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKAS**GYSFTGHLM**
NWVKQSHGKNLEWIGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY
MELLSLTSDDSAVYFCSRGLRGFYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID
NO:16)中闡述之胺基酸序列。

【請求項26】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體係選自由
以下組成之群：人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、雙特異性抗體及異結
合抗體。

【請求項27】

如請求項26之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體為IgG抗體。

【請求項28】

如請求項27之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體為IgG1、IgG2、
IgG2A、IgG2B、IgG3或IgG4亞類。

【請求項29】

如請求項28之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體為IgG1抗體。

【請求項30】

如請求項28之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體為IgG4抗體。

【請求項31】

如請求項26之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體為單株抗體。

【請求項32】

如請求項31之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體為單株人類抗體。

【請求項33】

如請求項31之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體為單株人類化抗體。

【請求項34】

如請求項32之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體為單株人類IgG1抗體。

【請求項35】

如請求項32之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體為單株人類IgG4抗體。

【請求項36】

如請求項33之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體為單株人類化IgG1抗體。

【請求項37】

如請求項33之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體為單株人類化IgG4抗體。

【請求項38】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體具有修飾之效應子功能。

【請求項39】

如請求項38之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體具有降低的或最小的效應子功能。

【請求項40】

如請求項39之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體在恆定區中包含N297A或D265A/N297A取代。

【請求項41】

如請求項38之用途，其中該修飾之效應子功能造成改良之內化能力、增加之補體介導之細胞殺滅或增加之抗體依賴性細胞毒性。

【請求項42】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體抑制以下之結合：

- (a) PD-1與其PD-1配位體結合搭配物；
- (b) PD-1與PD-L1；或
- (c) PD-1與PD-L1及PD-L2兩者。

【請求項43】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為尼沃單抗(nivolumab)(MDX-1106)。

【請求項44】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為拉立珠單抗(lambrolizumab)(MK-3475)。

【請求項45】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為IgG抗體。

【請求項46】

如請求項45之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為IgG1、IgG2、IgG2A、IgG2B、IgG3或IgG4抗體。

【請求項47】

如請求項45之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為IgG1抗體。

【請求項48】

如請求項46之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為IgG4抗體。

【請求項49】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為單株抗體。

【請求項50】

如請求項49之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為單株人類抗體。

【請求項51】

如請求項49之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為單株人類化抗體。

【請求項52】

如請求項50之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為單株人類IgG1抗體。

【請求項53】

如請求項50之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為單株人類IgG4抗體。

【請求項54】

如請求項51之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為單株人類化IgG1抗體。

【請求項55】

如請求項51之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體為單株人類化IgG4抗體。

【請求項56】

如請求項45之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體具有修飾之效應子功能。

【請求項57】

如請求項56之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體具有降低的或最小效應子功能。

【請求項58】

如請求項57之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體在恆定區中包含N297A或D265A/N297A取代。

【請求項59】

如請求項56之用途，其中該修飾之效應子功能造成改良之內化能力、增加之補體介導之細胞殺滅或增加之抗體依賴性細胞毒性。

【請求項60】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該癌症係選自由以下組成之群：非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳腺癌、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、間皮瘤、黑素瘤、頭頸癌、甲狀腺癌、內瘤(sarcoma)、前列腺癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈樣真菌病、梅克爾細胞癌(Merkel cell cancer)及血液科惡性疾病。

【請求項61】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該癌症係選自由以下組成之群：非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肝細胞癌、腎細胞癌、頭頸癌、結腸直腸癌、乳癌、食道癌、胃癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、膀胱癌、黑素瘤、淋巴瘤及梅克爾細胞癌(Merkel cell cancer)。

【請求項62】

如請求項60之用途，其中該癌症為黑素瘤。

【請求項63】

如請求項60之用途，其中該癌症為非小細胞肺癌。

【請求項64】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該癌症為固態腫瘤。

【請求項65】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該癌症為血液科惡性疾病。

【請求項66】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體及該抗TIGIT拮抗劑抗體之組合係經調配用於持續性投與。

【請求項67】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該抗PD-1拮抗劑抗體及該抗TIGIT拮抗劑抗體之組合係經調配用於間歇性投與。

【請求項68】

如請求項1或2之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體係在該PD-1拮抗劑抗體之前投與。

【請求項69】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體係與該

PD-1拮抗劑抗體同時投與。

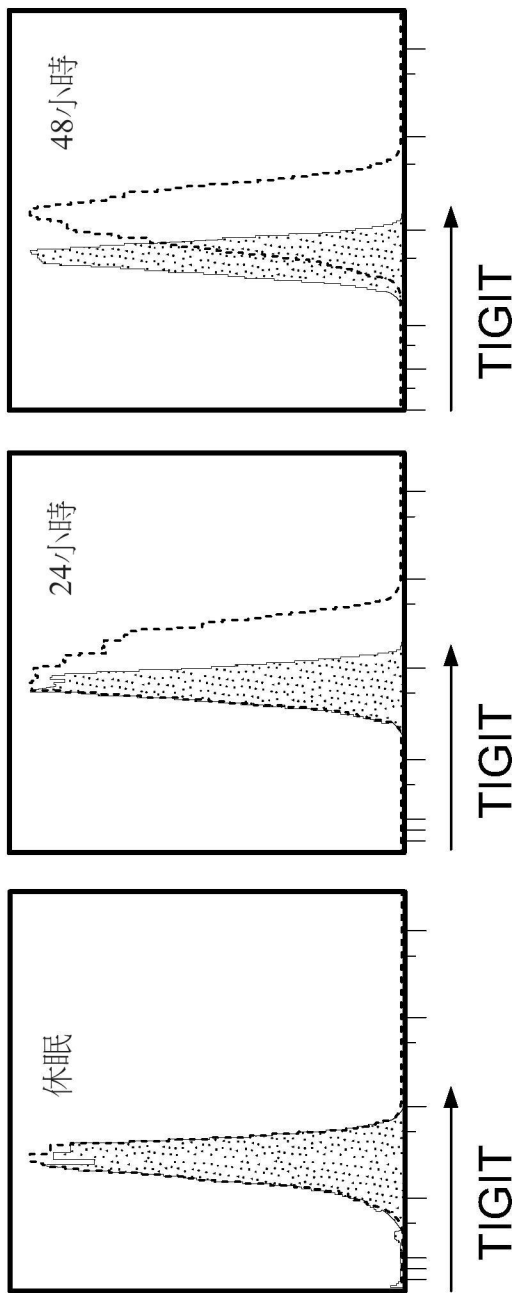
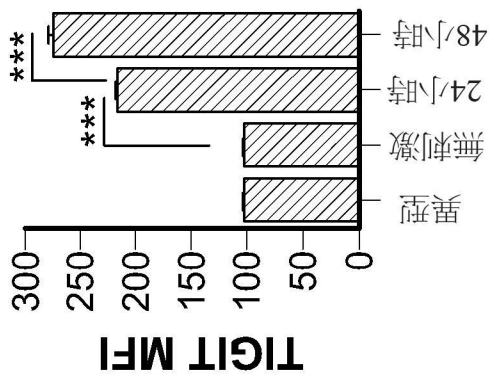
【請求項70】

如請求項1或2之用途，其中該抗TIGIT拮抗劑抗體係在該PD-1拮抗劑抗體之後投與。

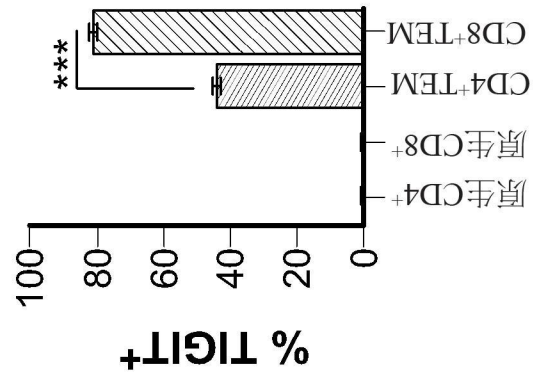
【請求項71】

如請求項1至3中任一項之用途，其中該個體為人類。

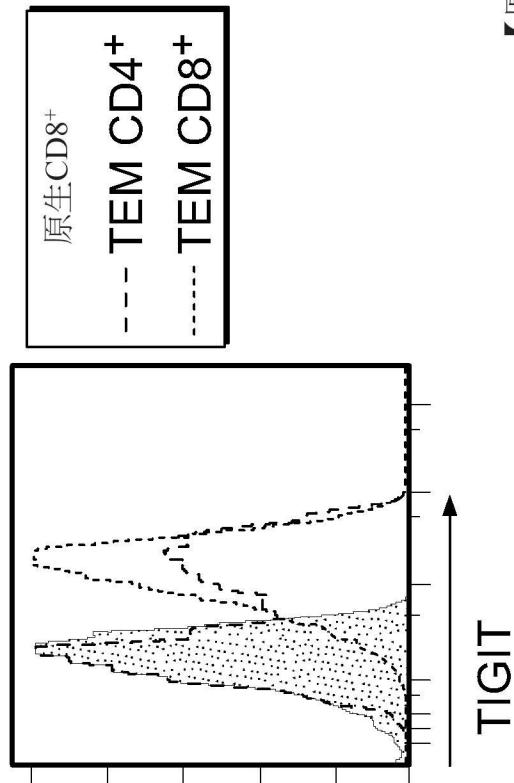
【發明圖式】

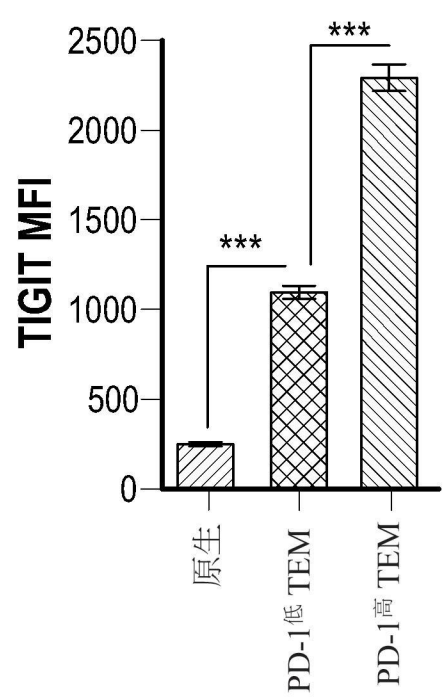
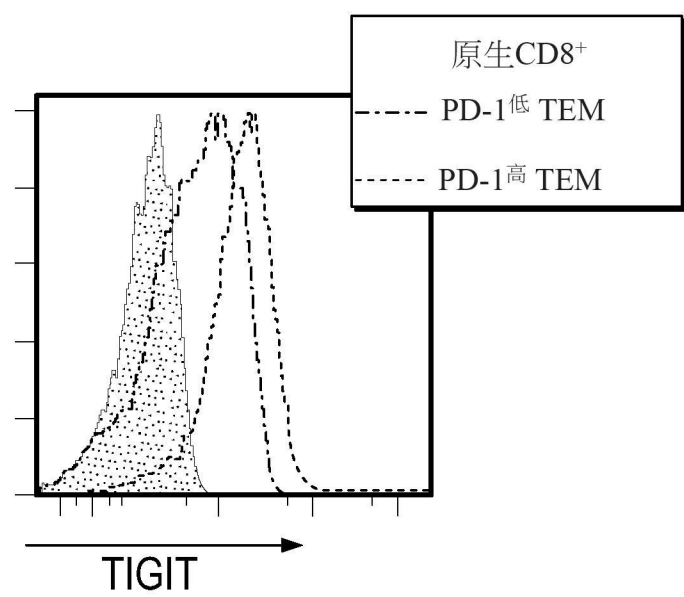


【圖1A】

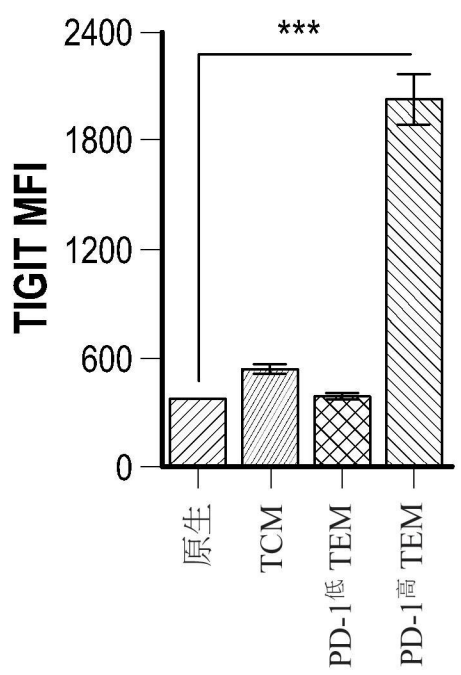
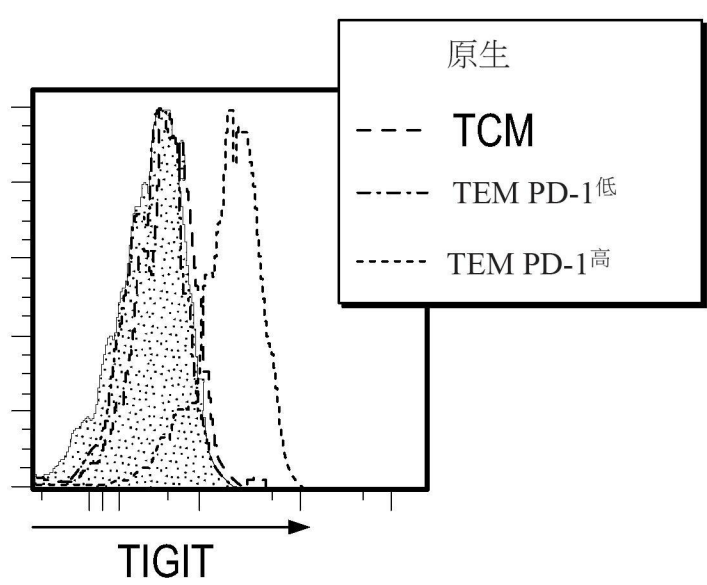


【圖1B】

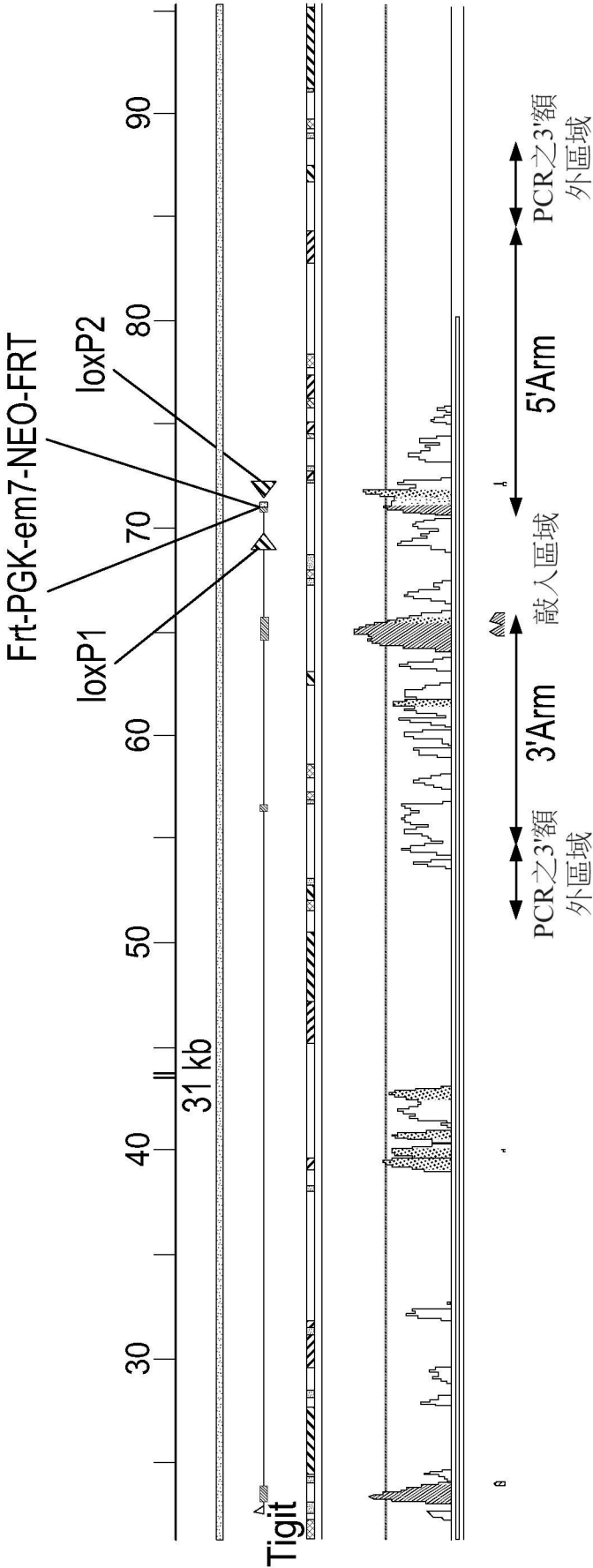




【圖1C】



【圖1D】



總長度同源臂=6030 bp
5'同源臂=2405 bp
敲入區域含有外顯子1 = 937 bp
3'同源臂=3175 bp
選擇標記=Frt-PGK-em7-NEO-FRT

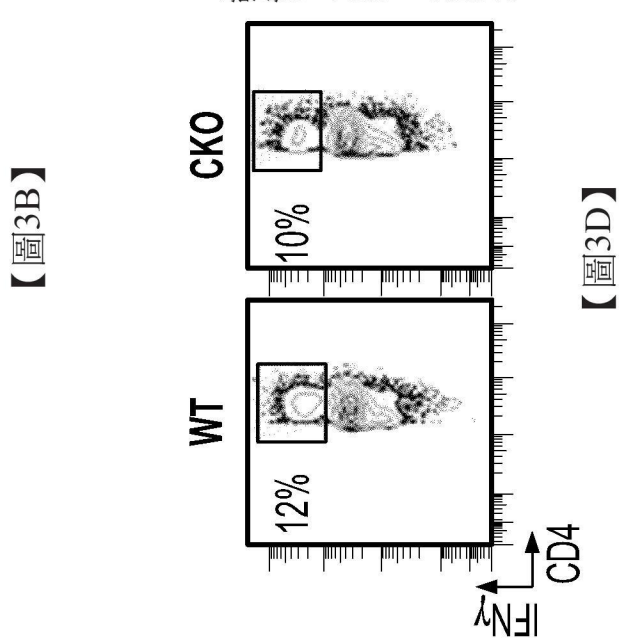
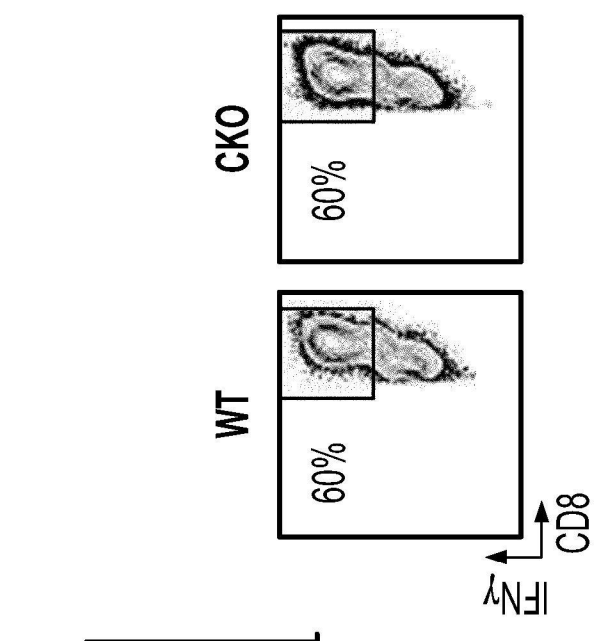
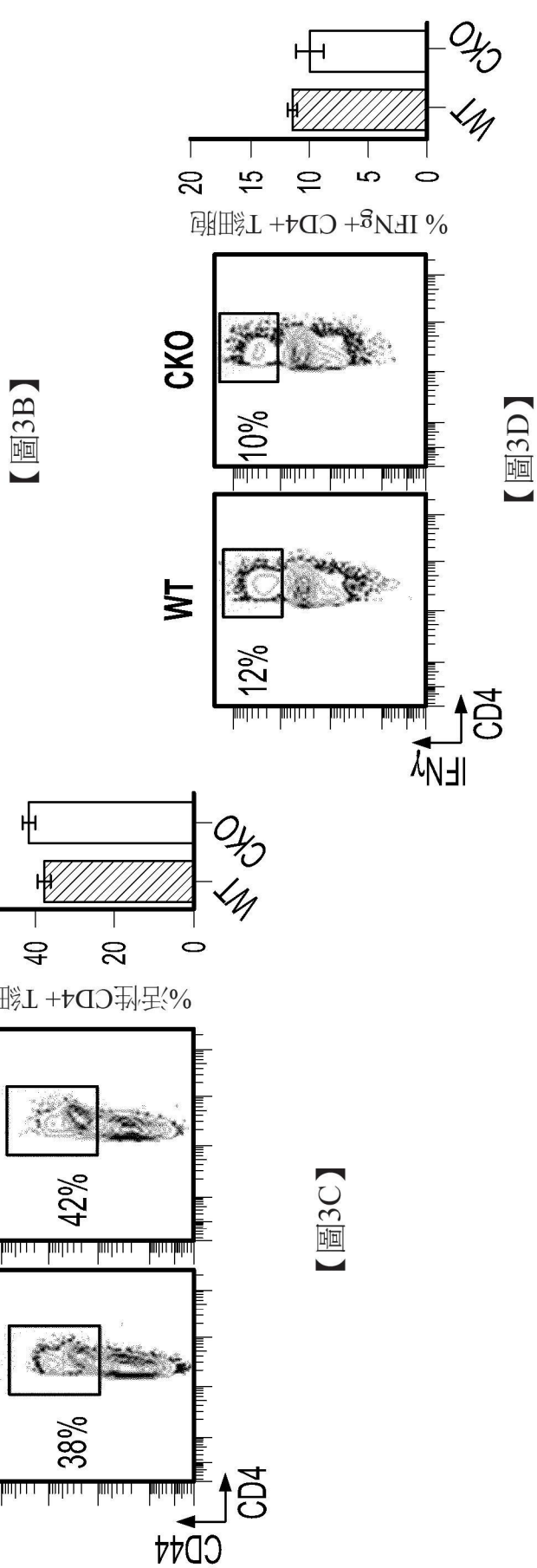
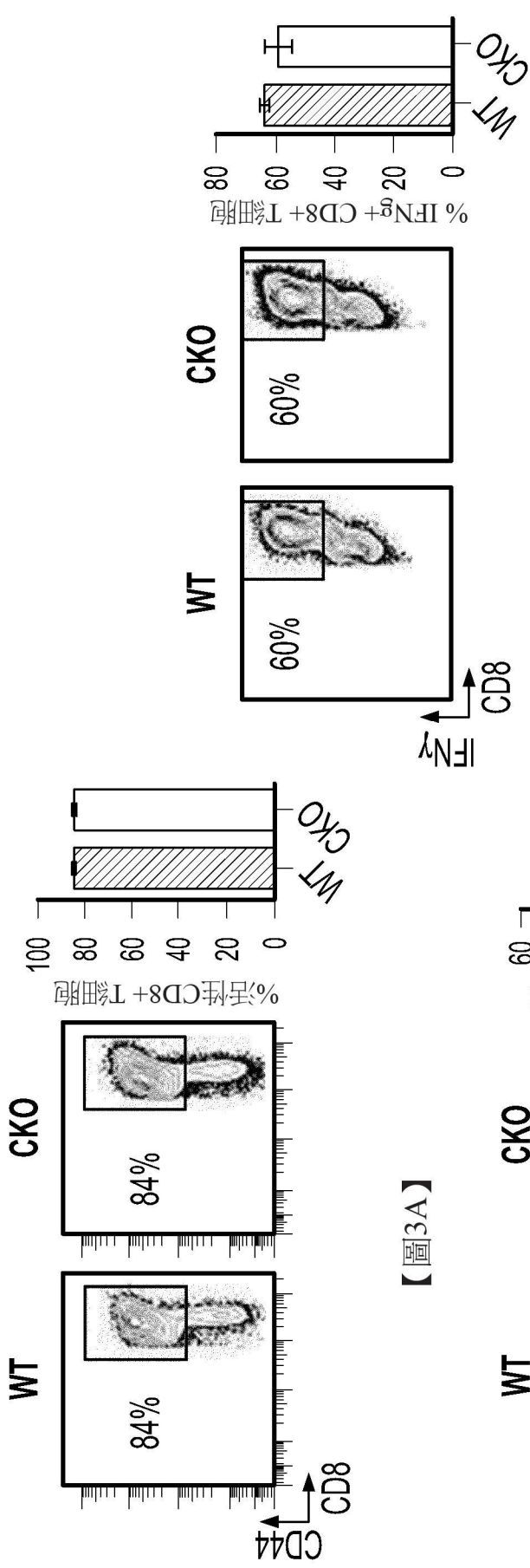
對照載體

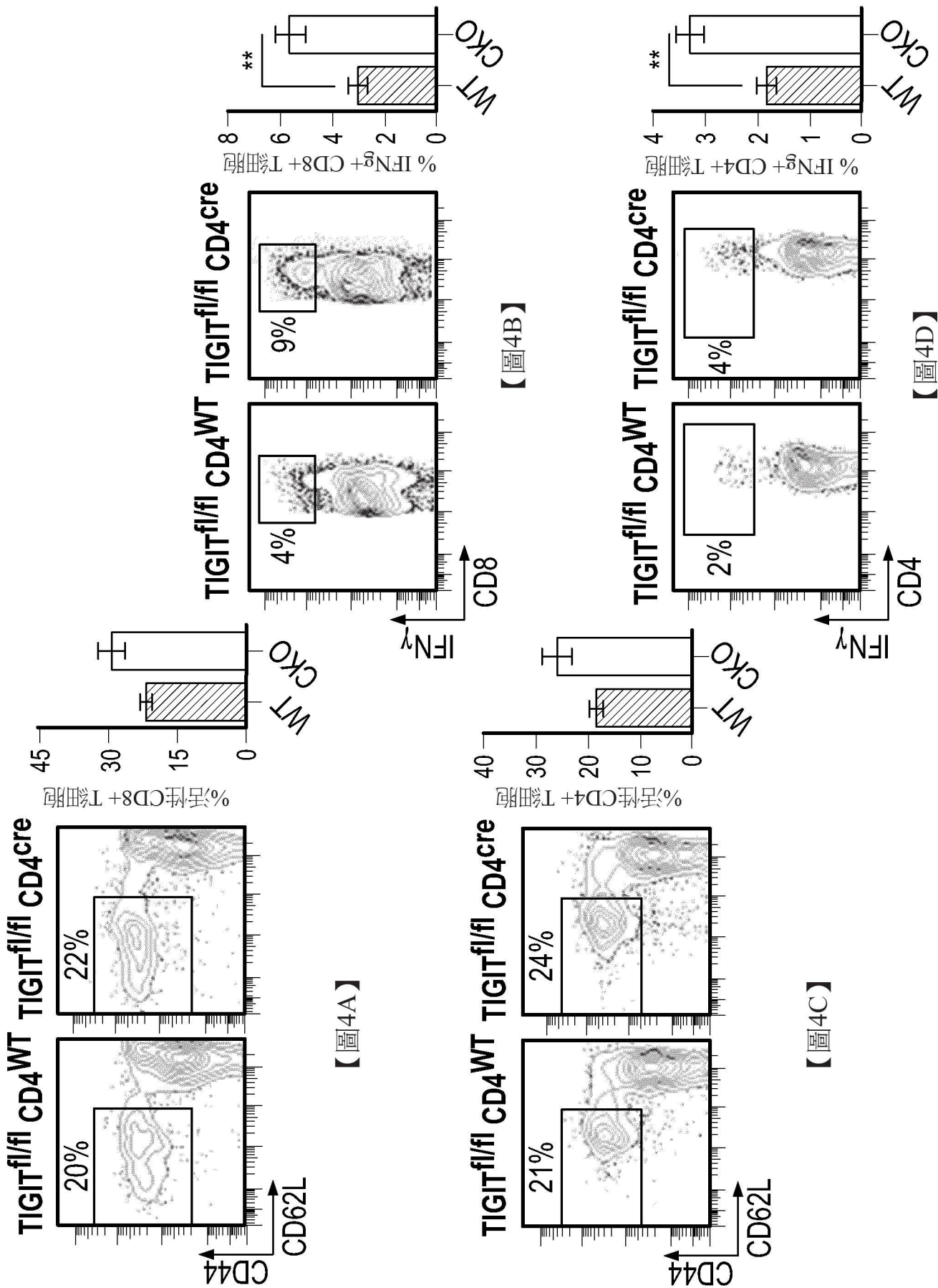
藉由PCR篩檢，接著定序
5'額外染色體區域=556 bp
3'額外染色體區域=284 bp

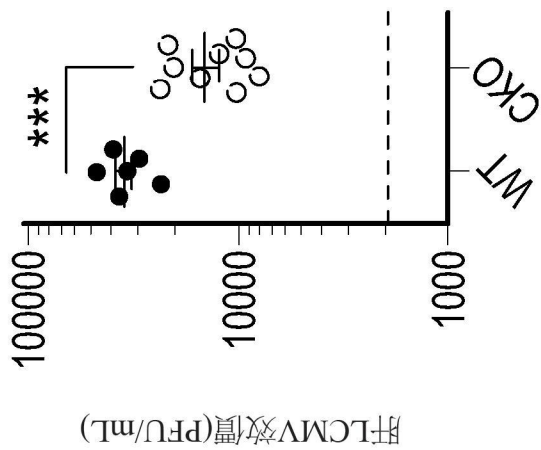
註釋

- LINE
- Exon
- LTR
- UTR
- SNE
- CNS
- 其他
- RNA

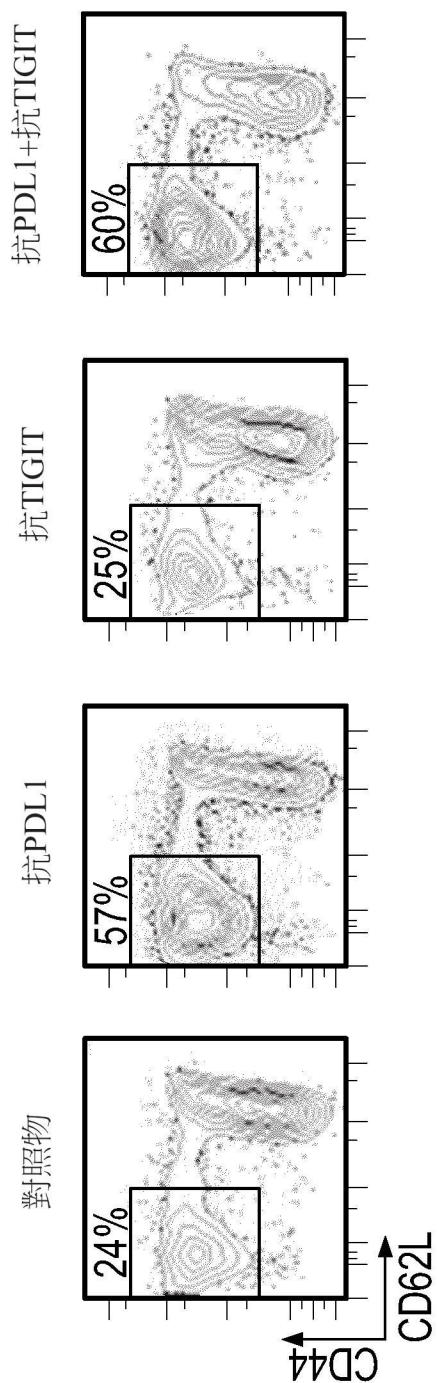
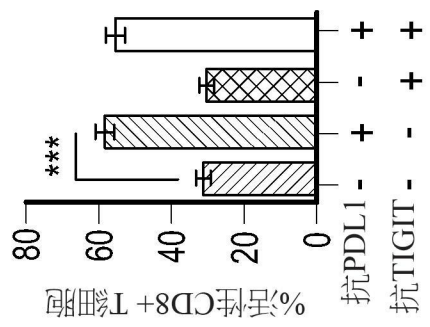
【圖2】



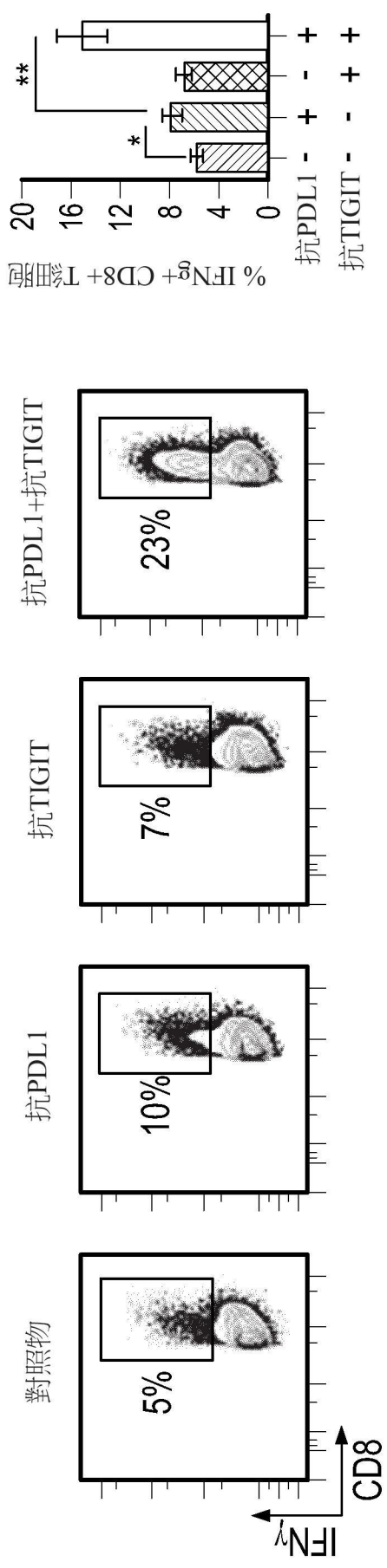




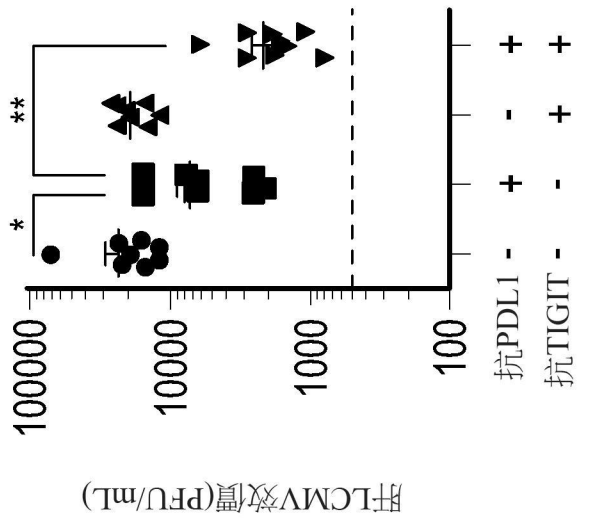
【圖4E】



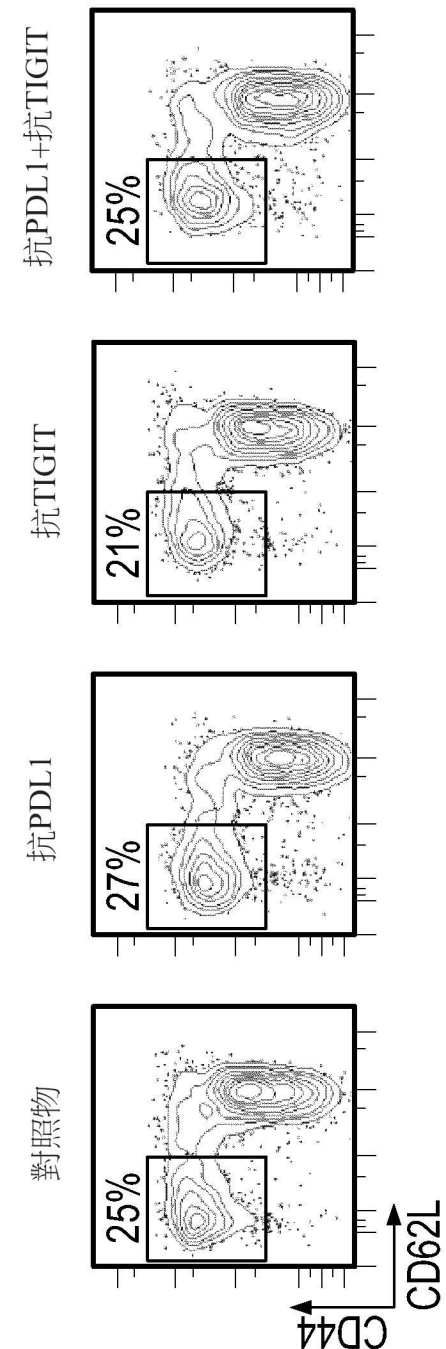
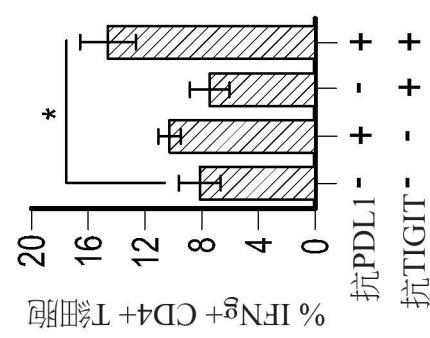
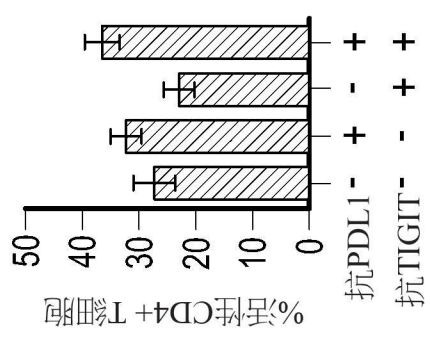
【圖4F】



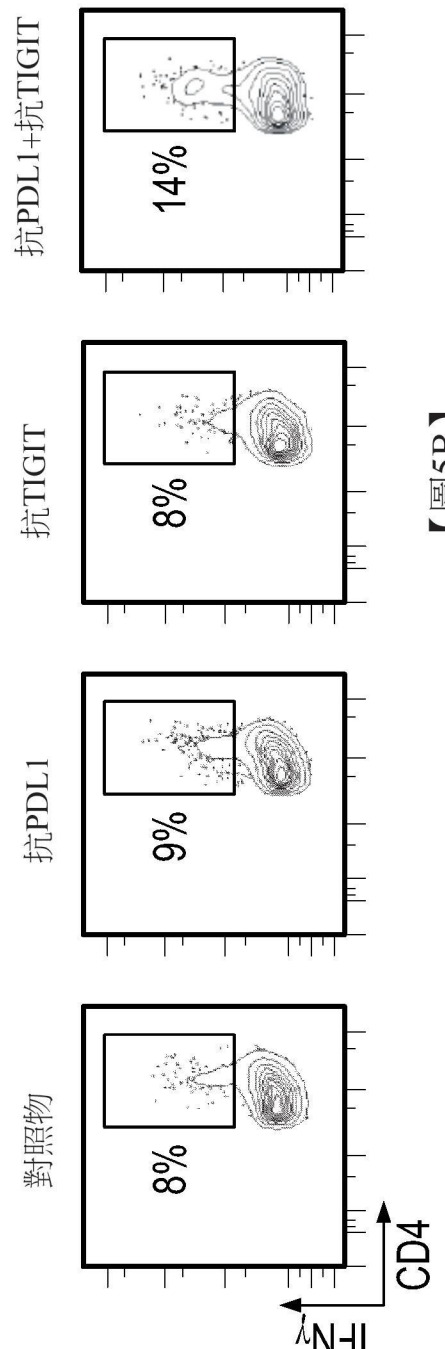
【圖4G】



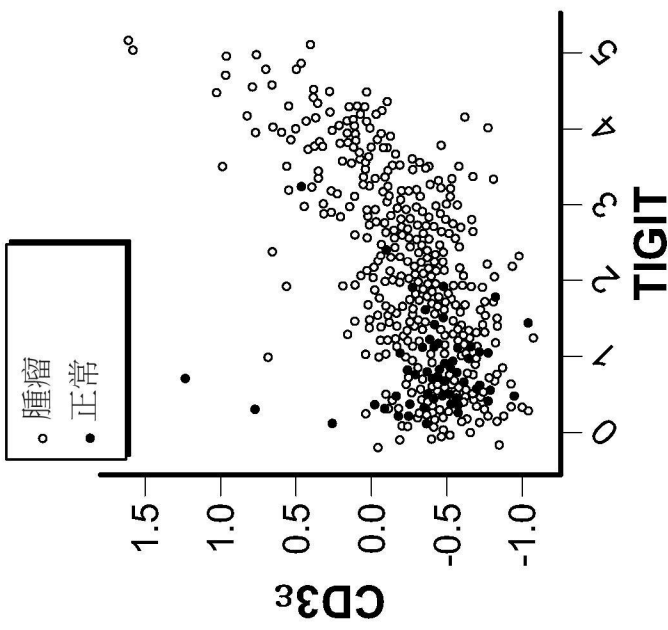
【圖4H】



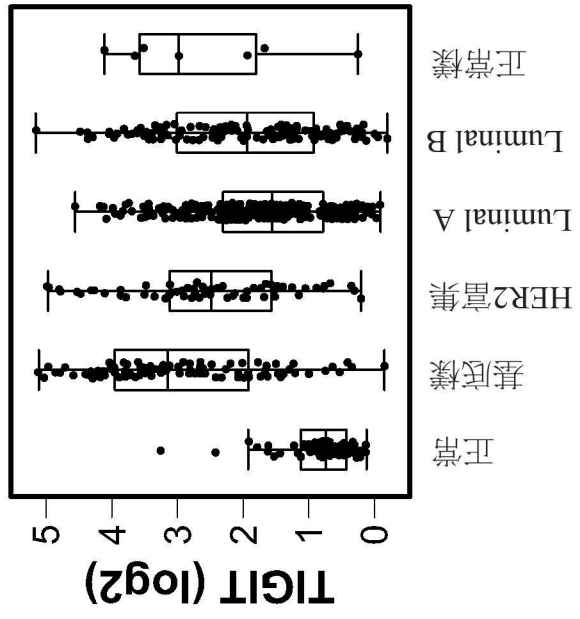
【圖5A】



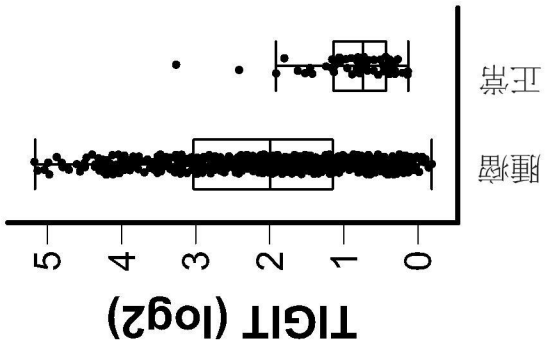
【圖5B】

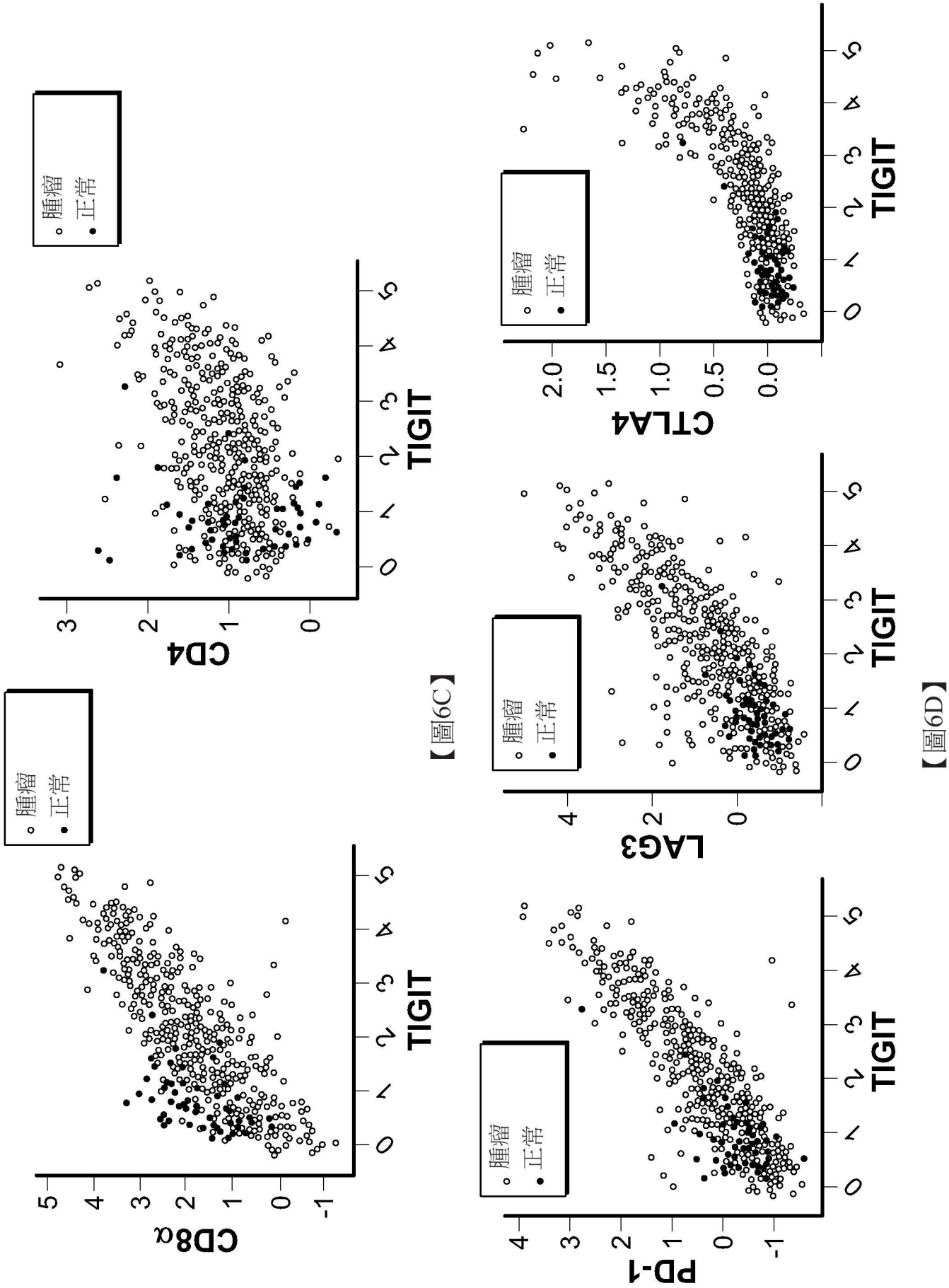


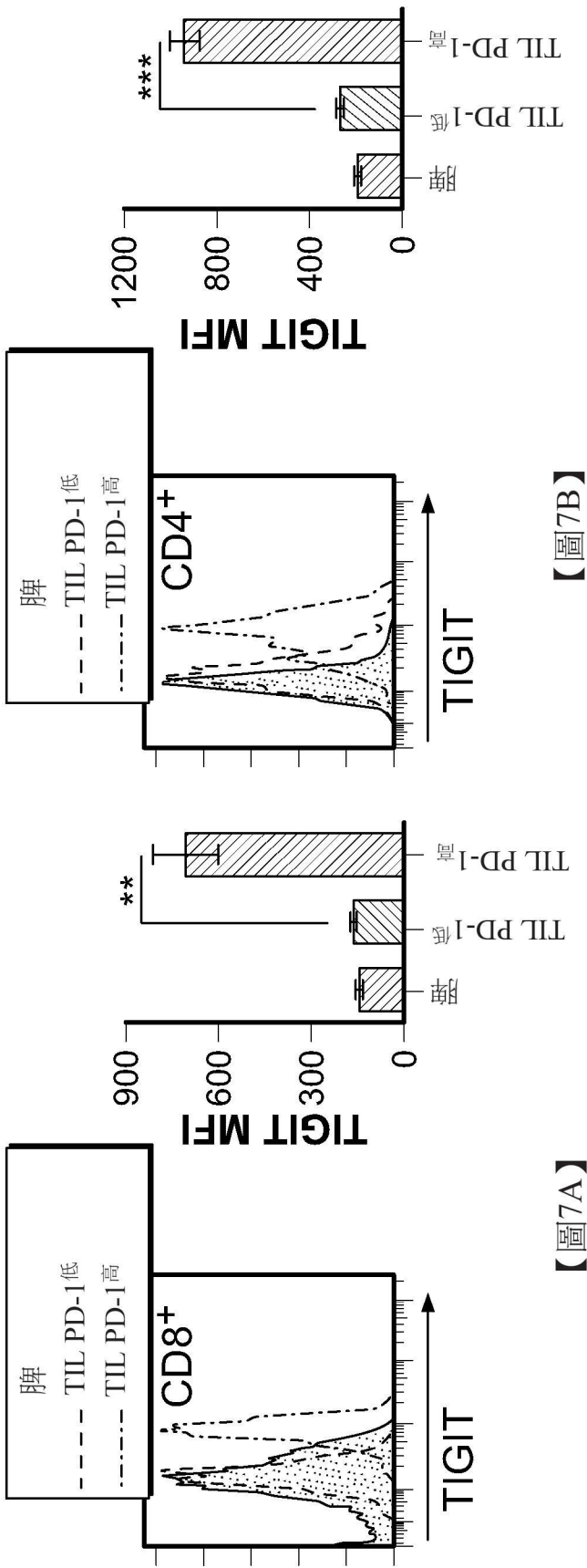
【圖6B】



【圖6A】

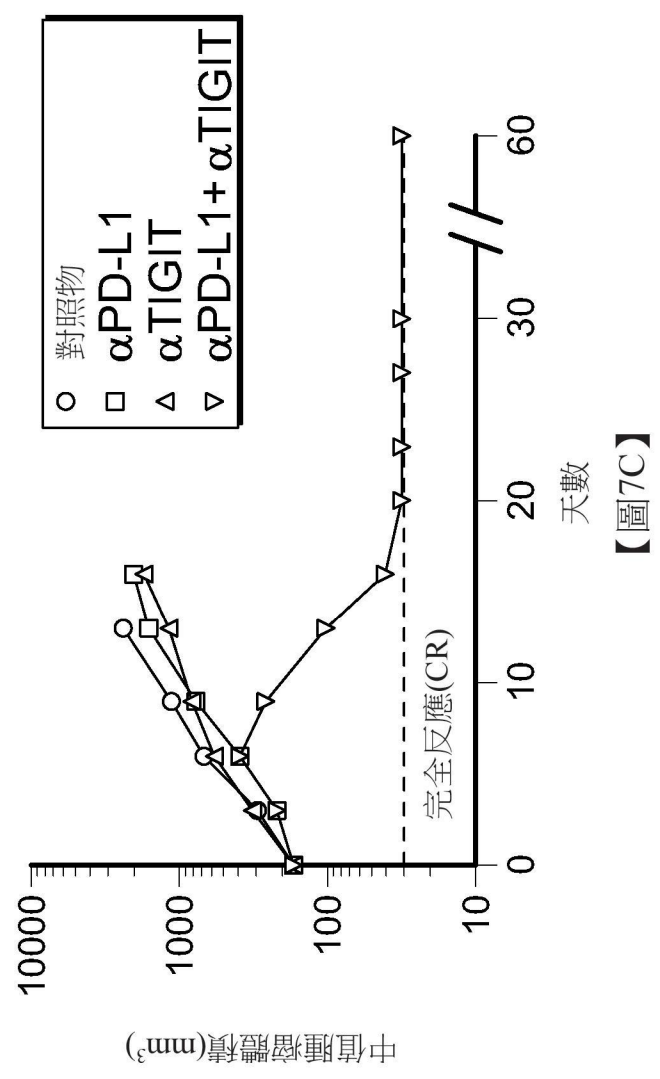




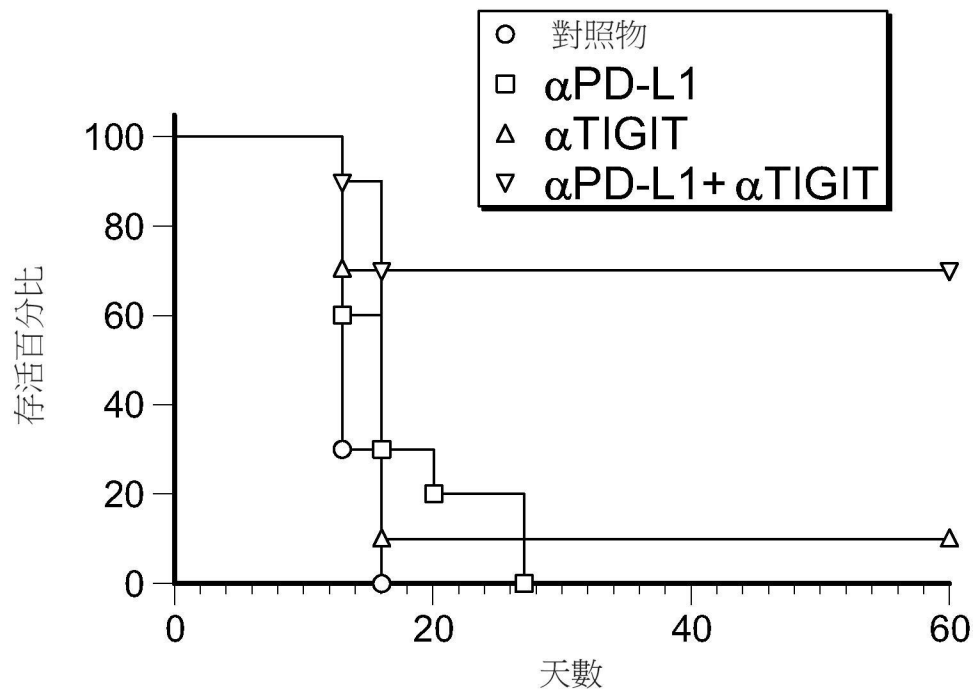


【圖7A】

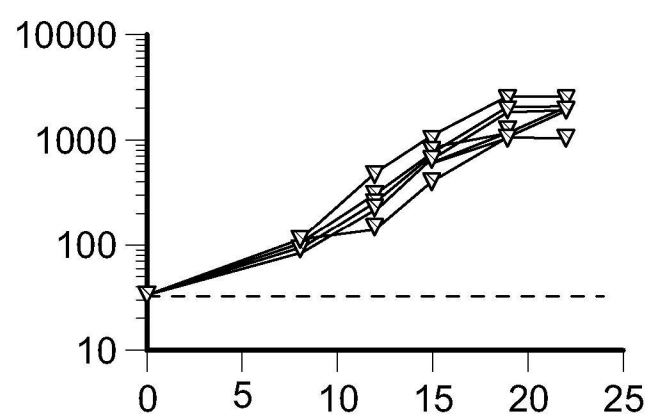
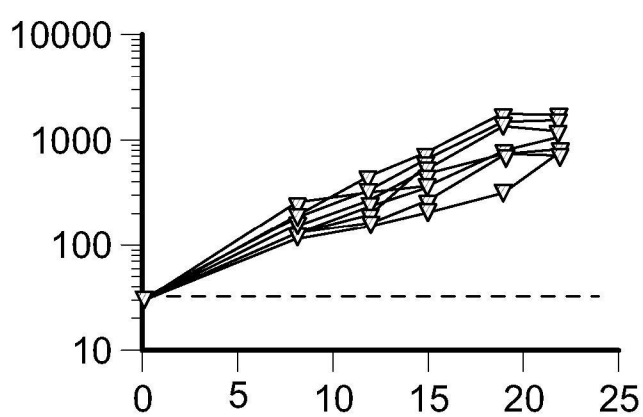
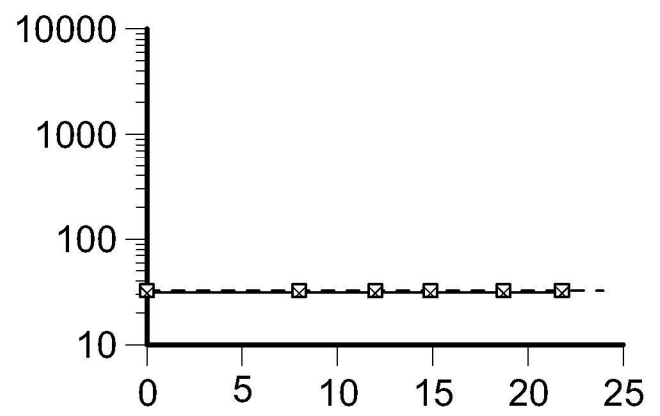
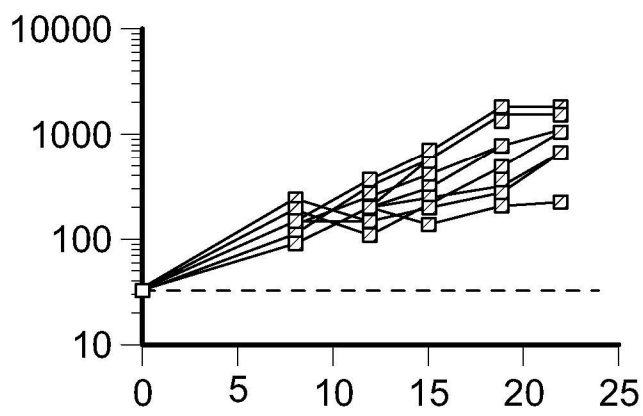
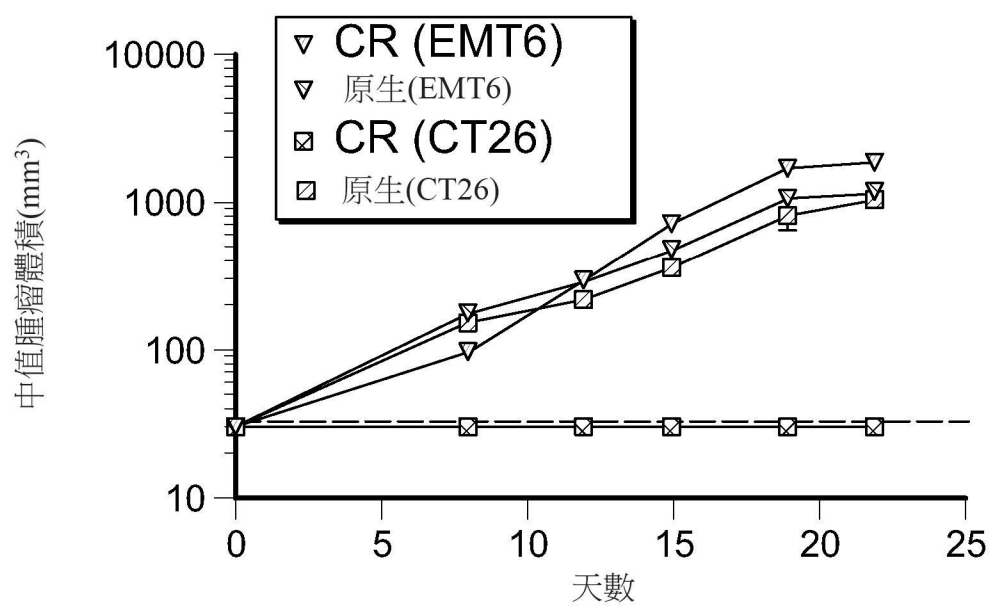
【圖7B】



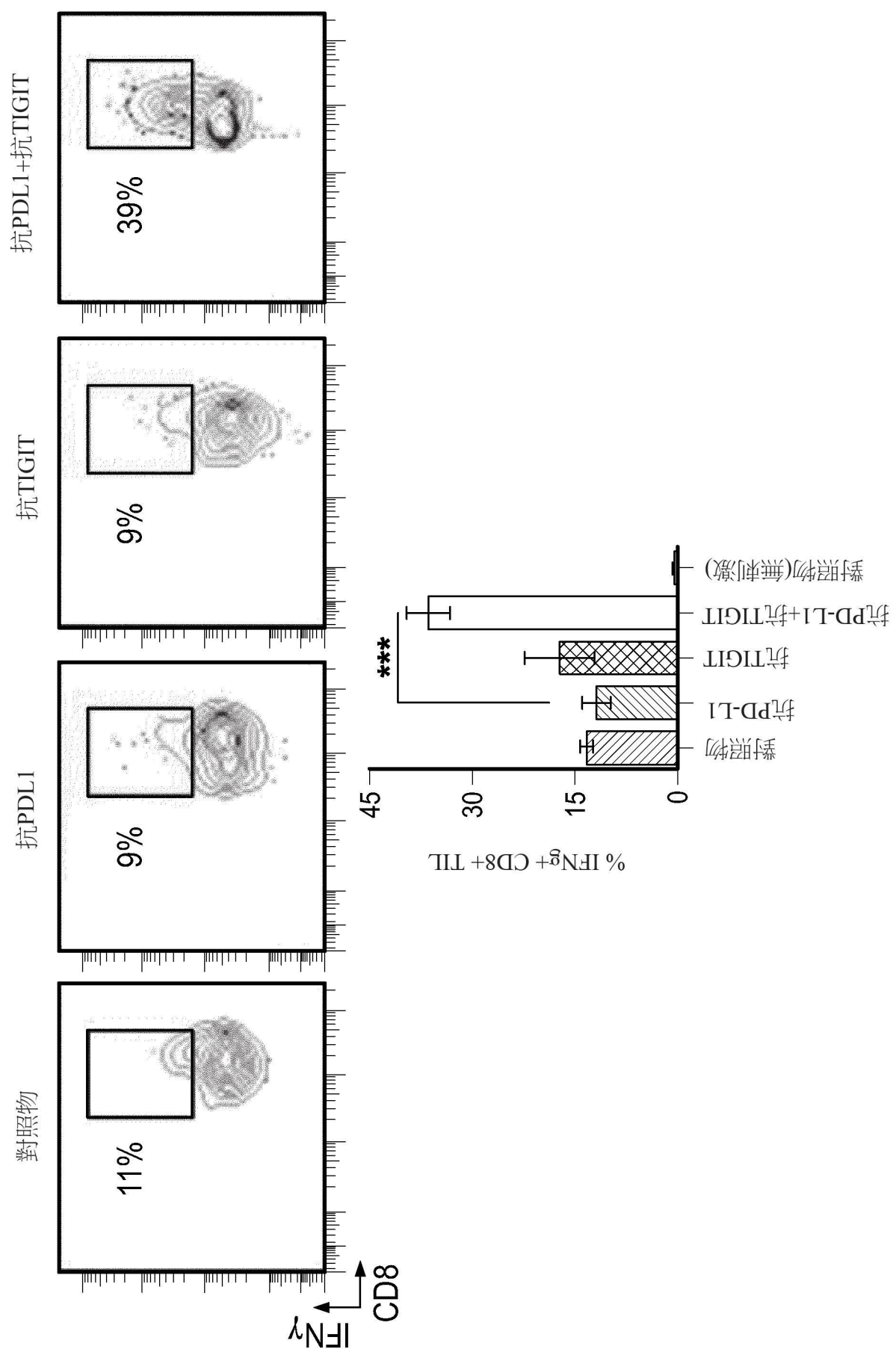
【圖7C】



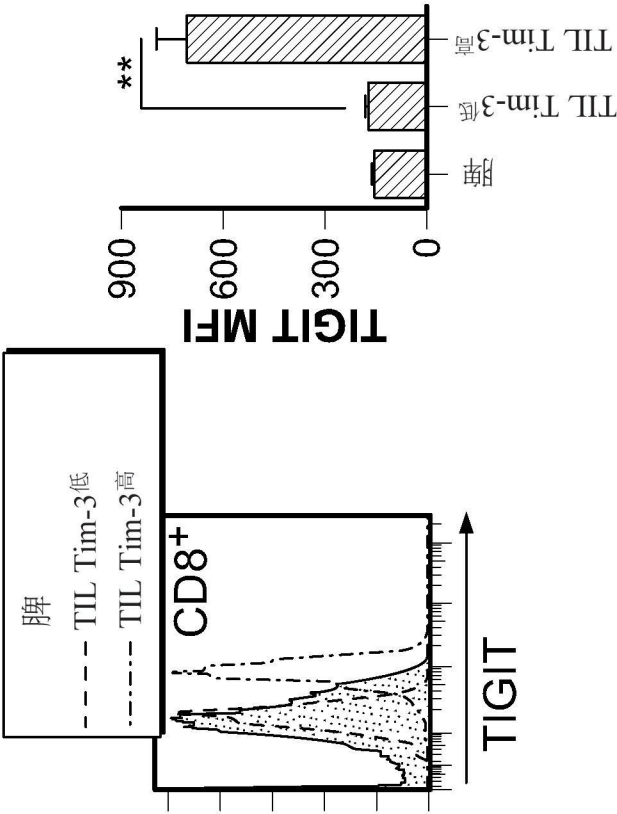
【圖7D】



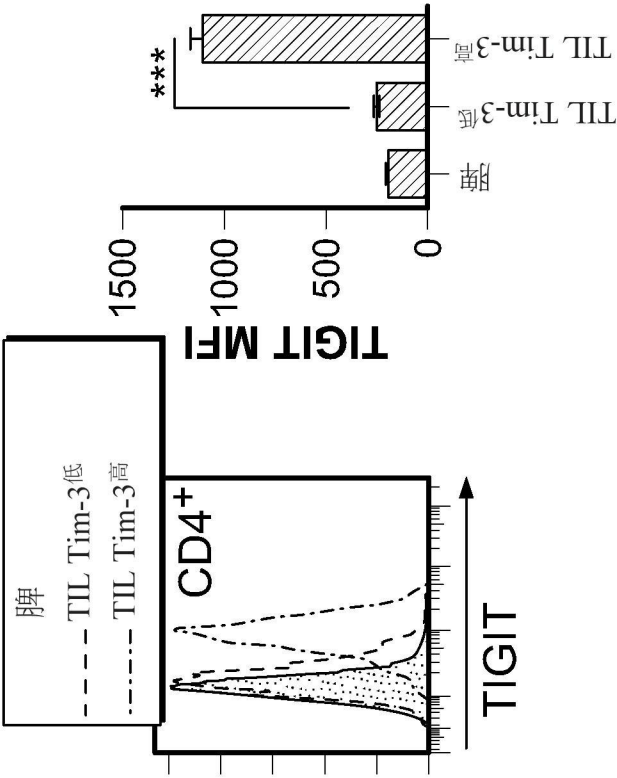
【圖7E】



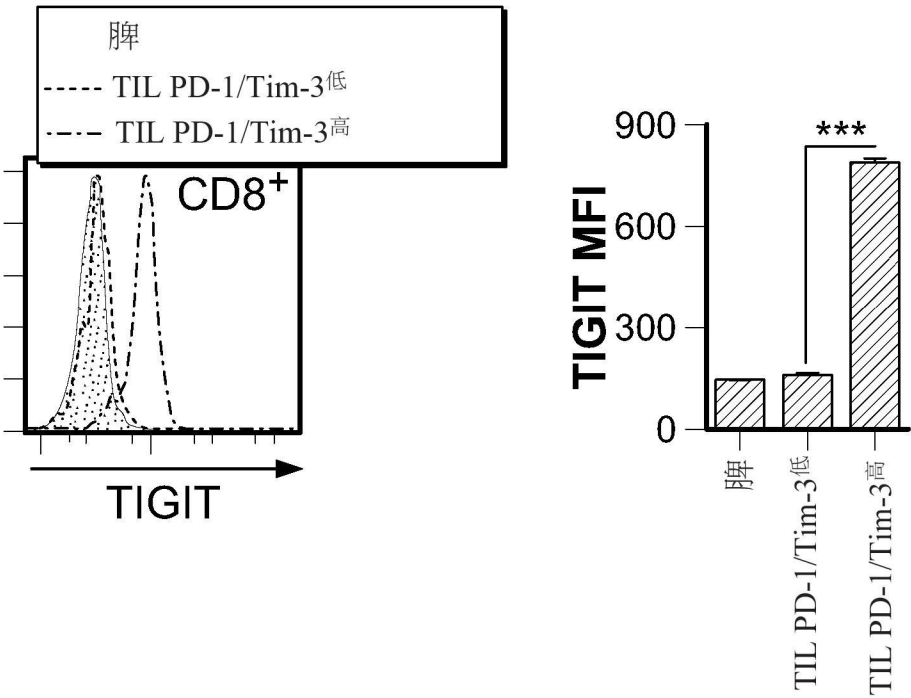
【圖7F】



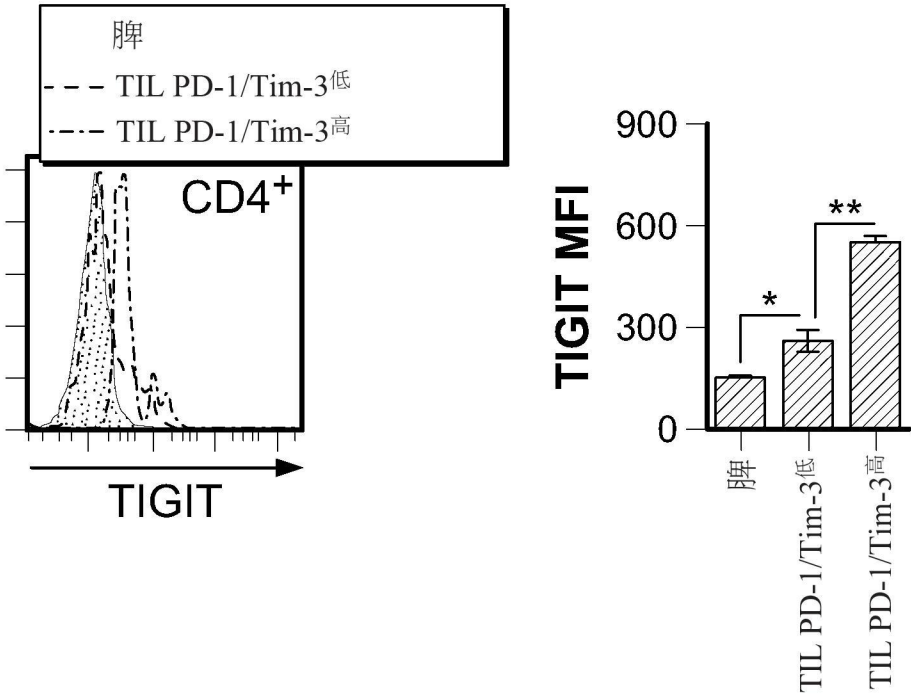
【圖8A】



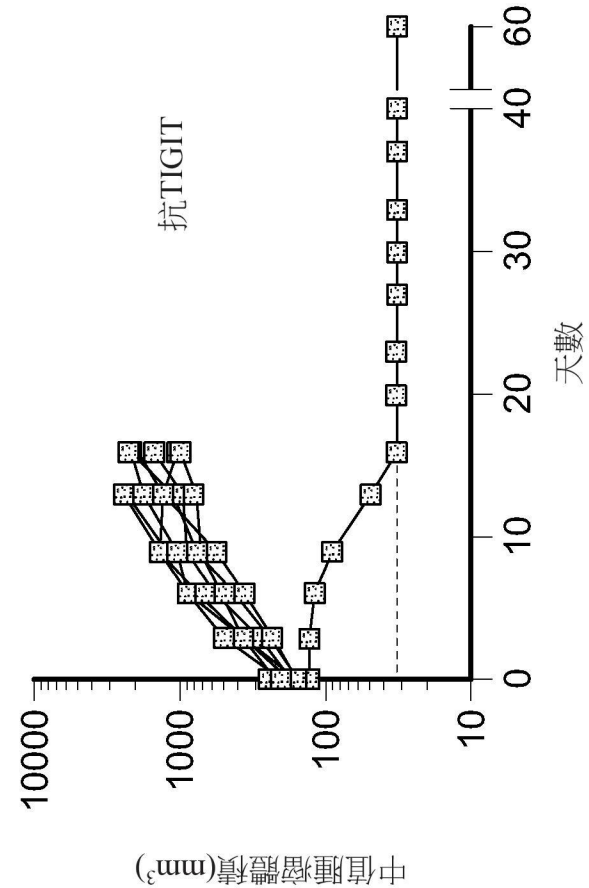
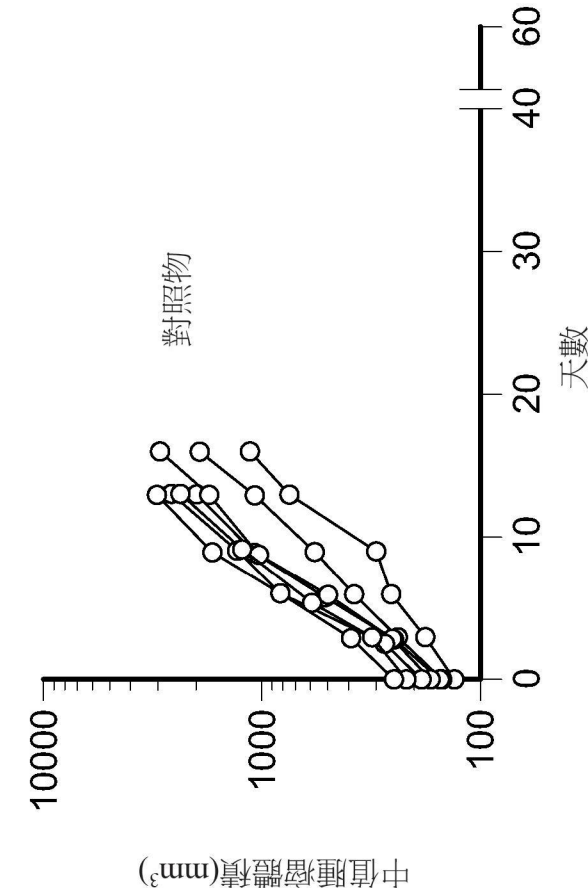
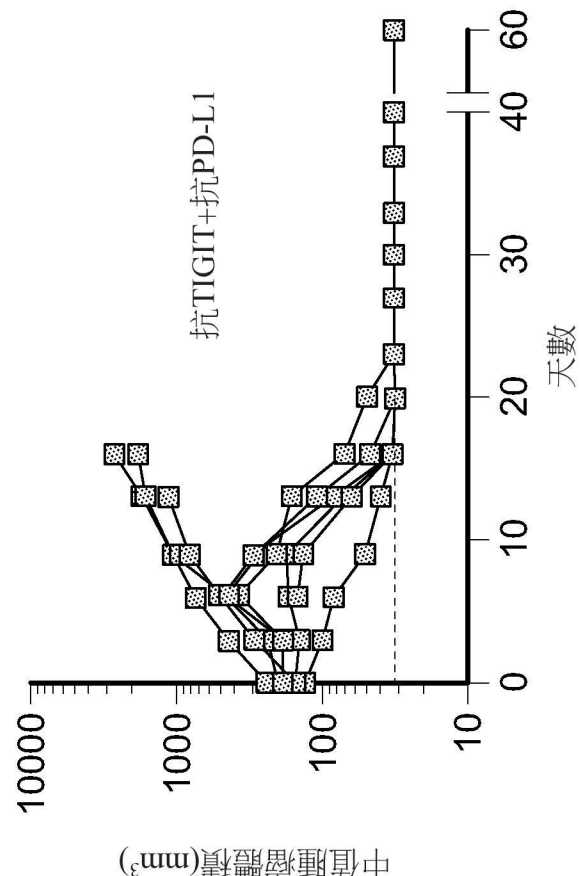
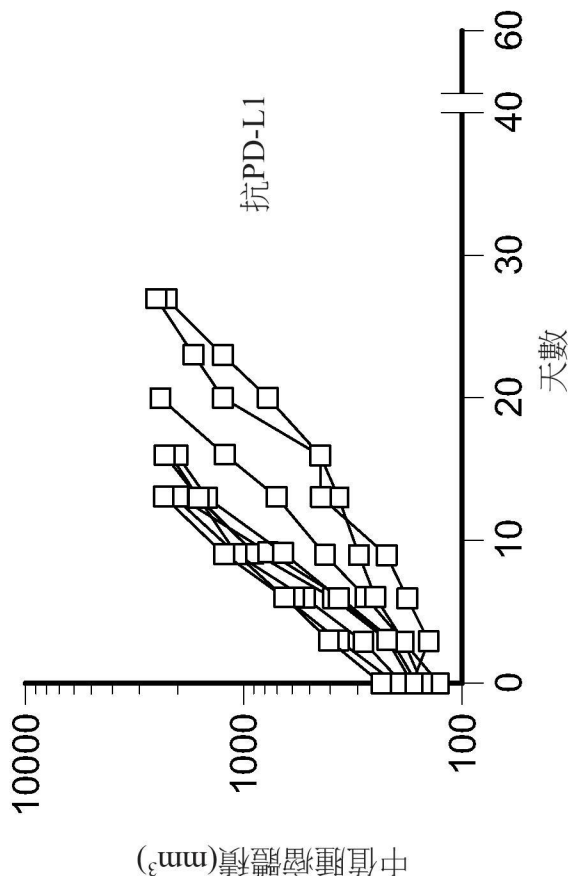
【圖8B】



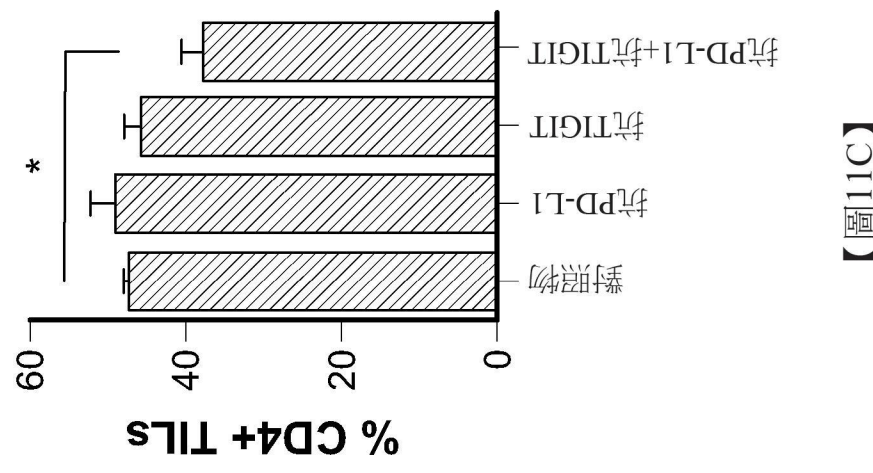
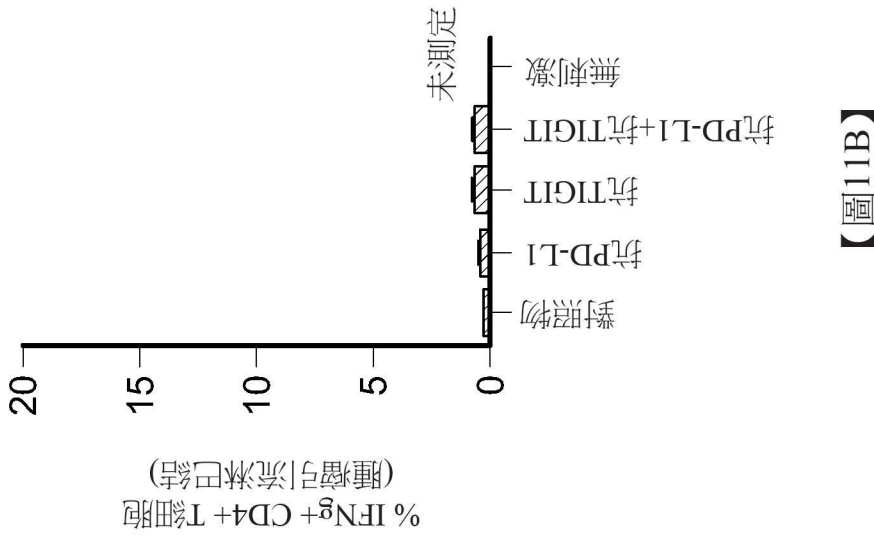
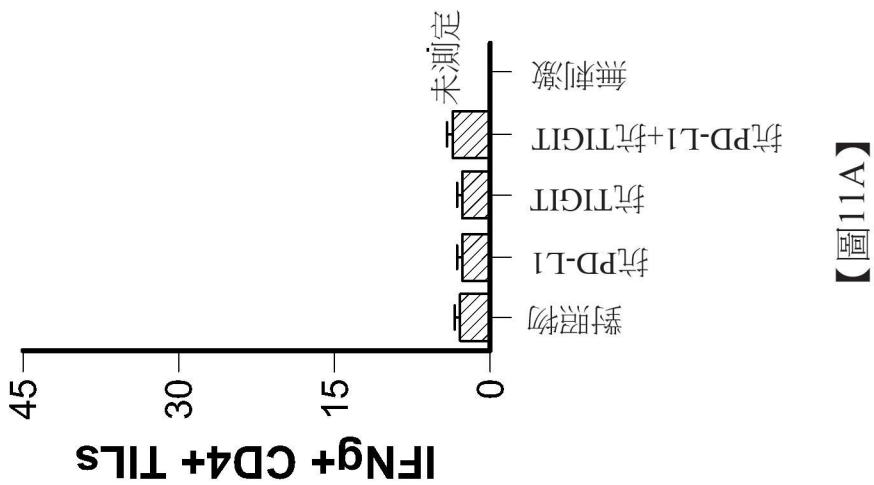
【圖9A】

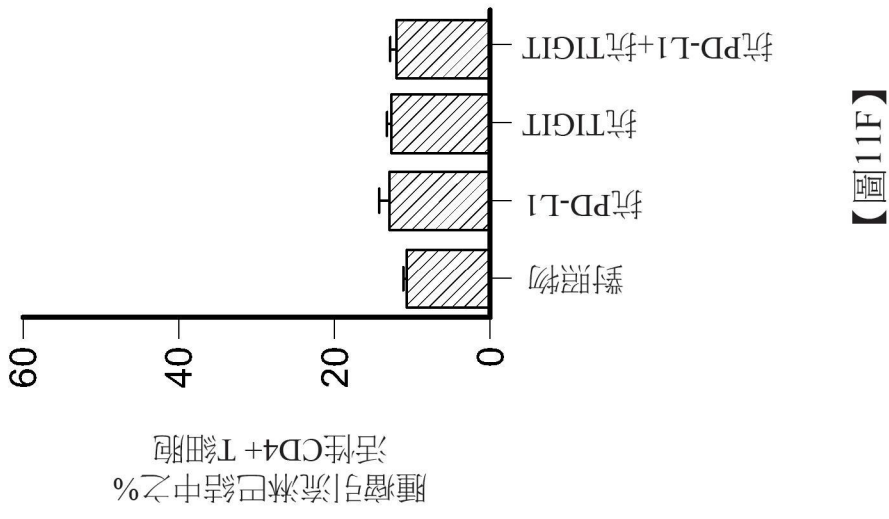
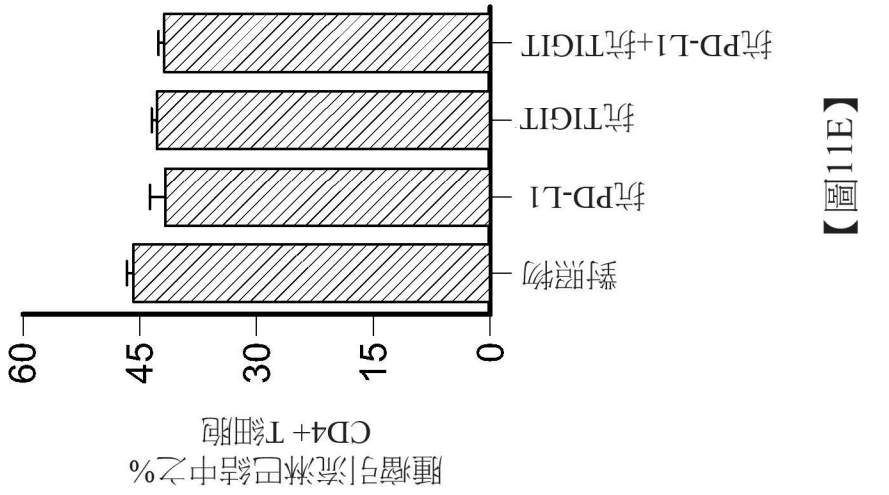
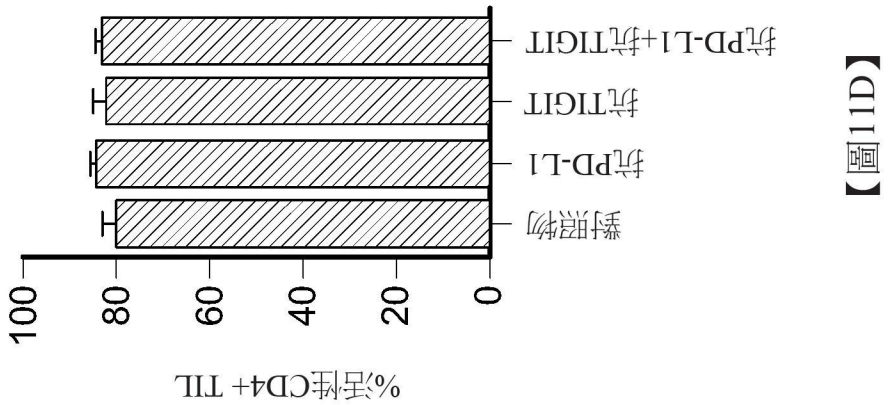


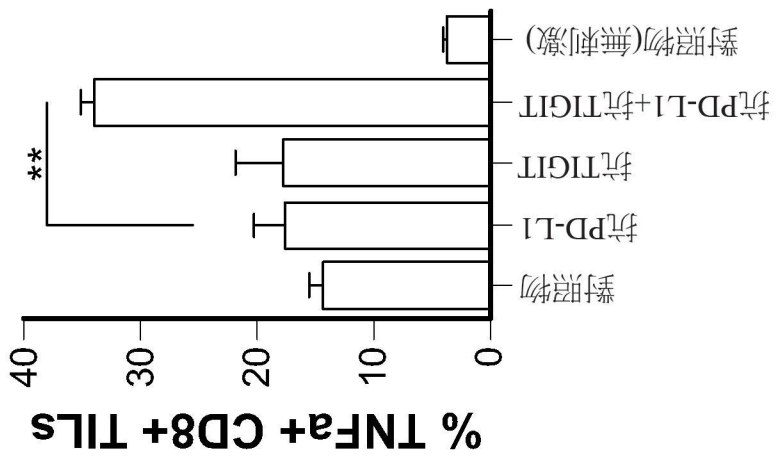
【圖9B】



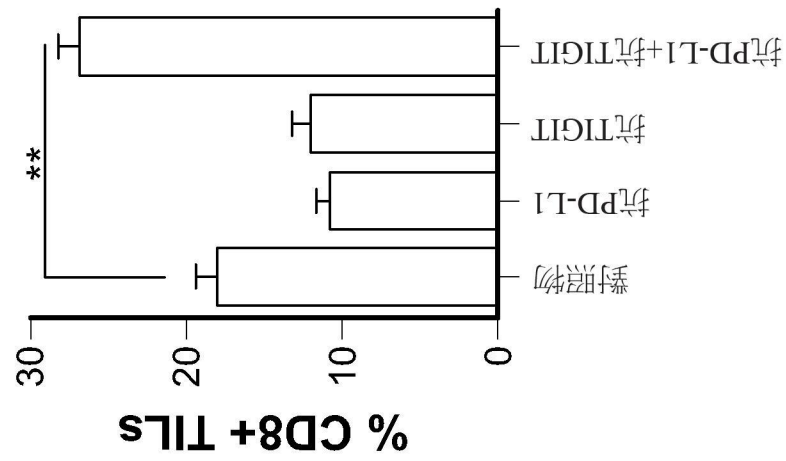
【圖10】



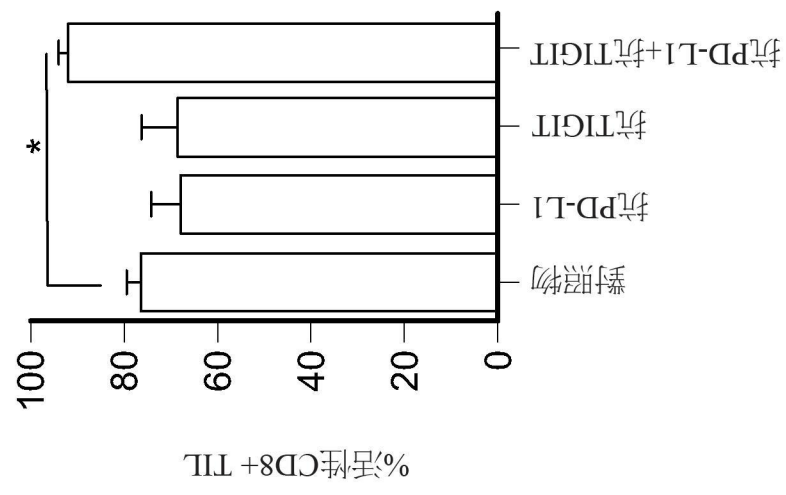




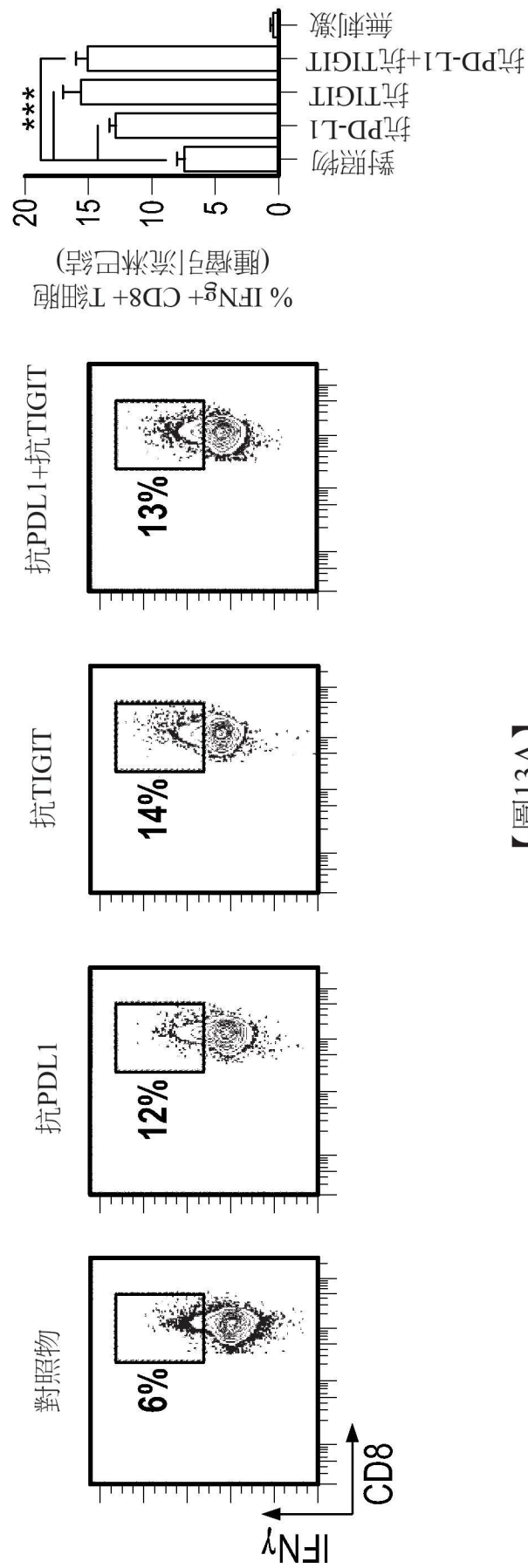
【圖12A】



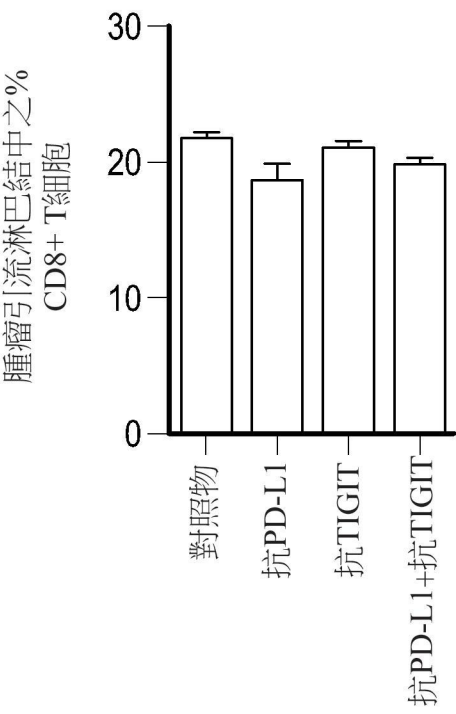
【圖12B】



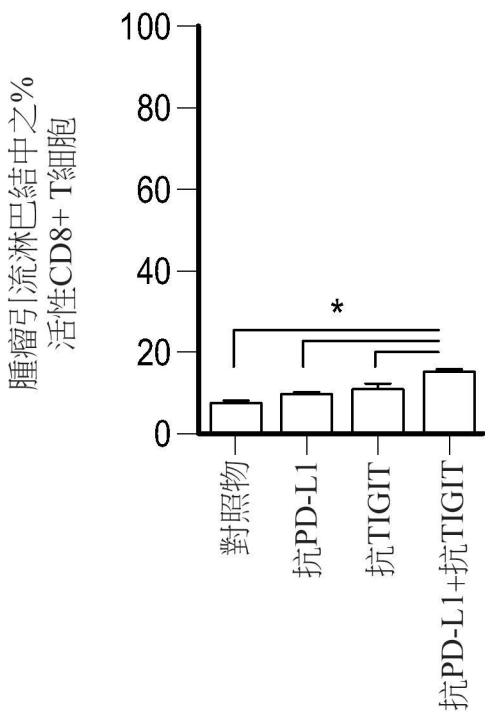
【圖12C】



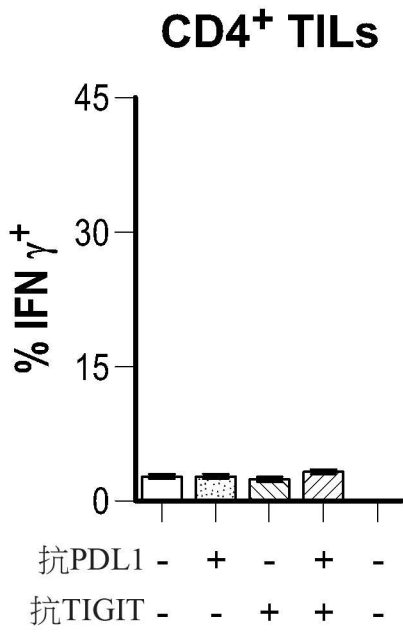
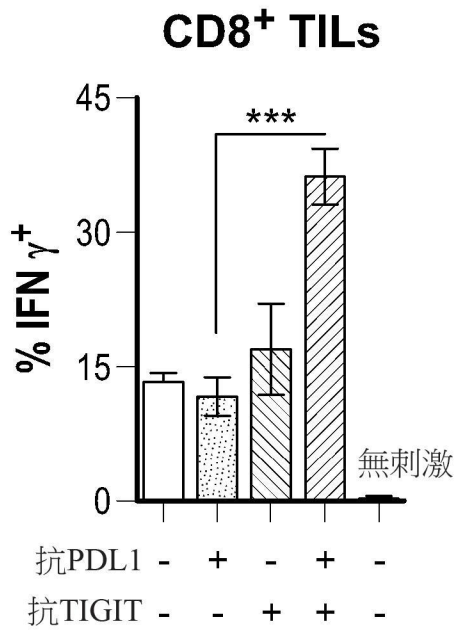
【圖13A】



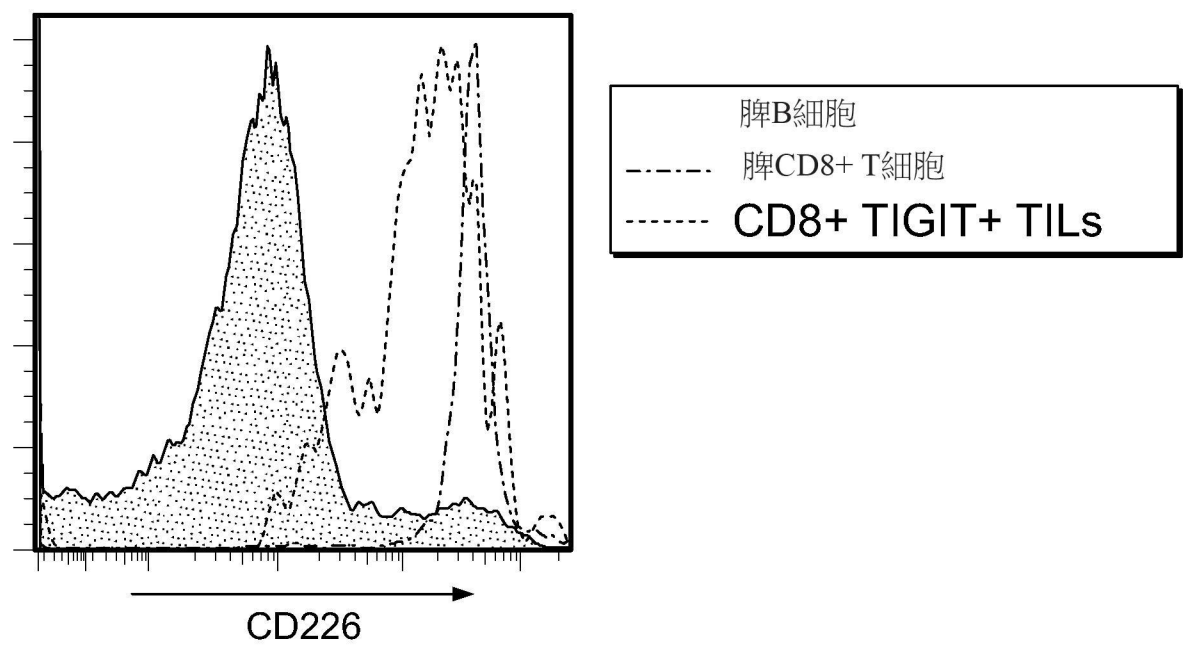
【圖13B】



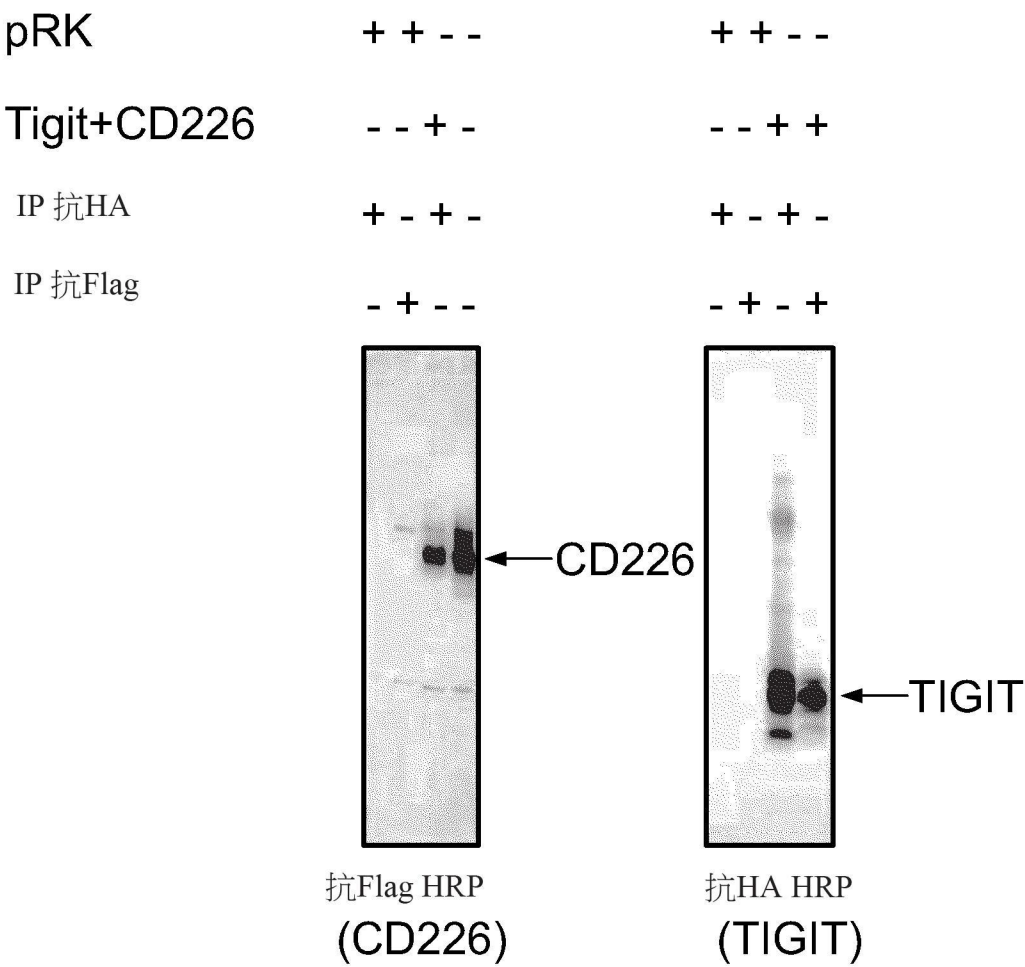
【圖13C】



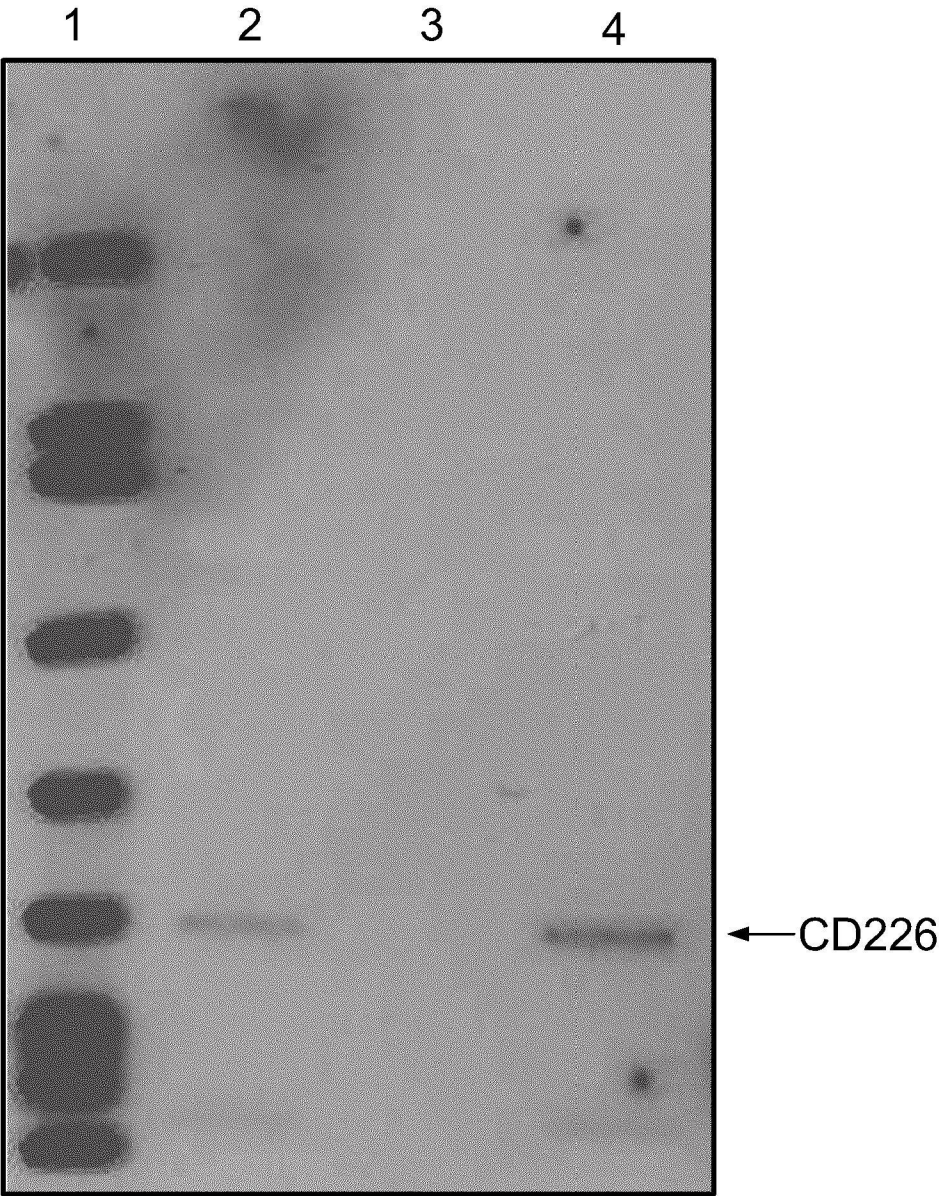
【圖13D】



【圖14】

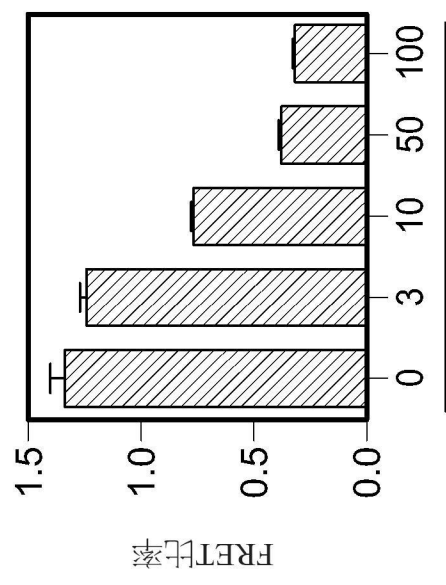


【圖15】



【圖16】

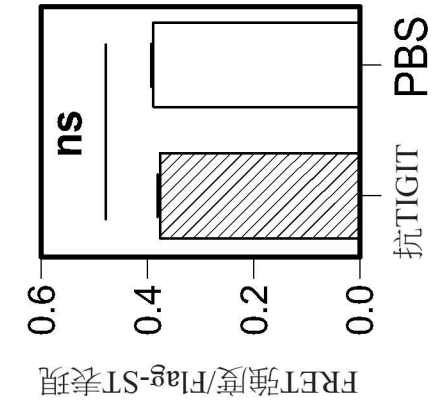
FRET ST-CD226 / ST-CD226



5 ng Flag-ST-CD226 + HA-TIGIT (ng)

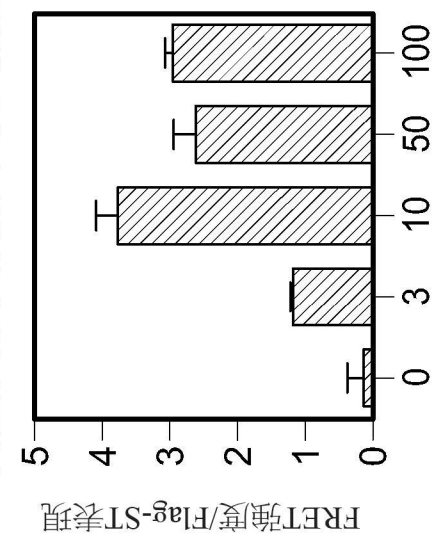
【圖17A】

FRET ST-CD226 / ST-CD226



Flag-ST-CD226 HA-TIGIT
【圖17B】

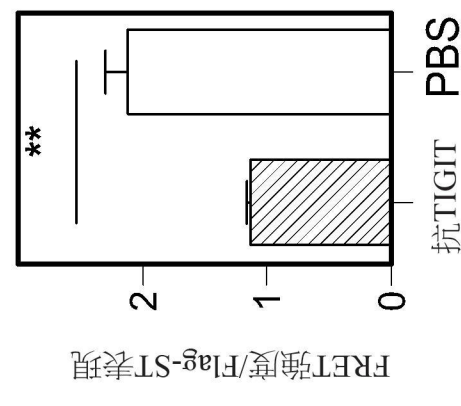
FRET HA-TIGIT / ST-CD226



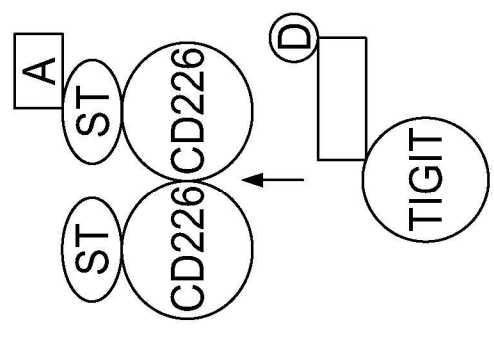
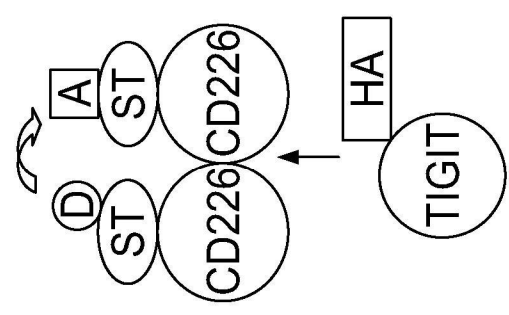
5 ng Flag-ST-CD226 + HA-TIGIT (ng)

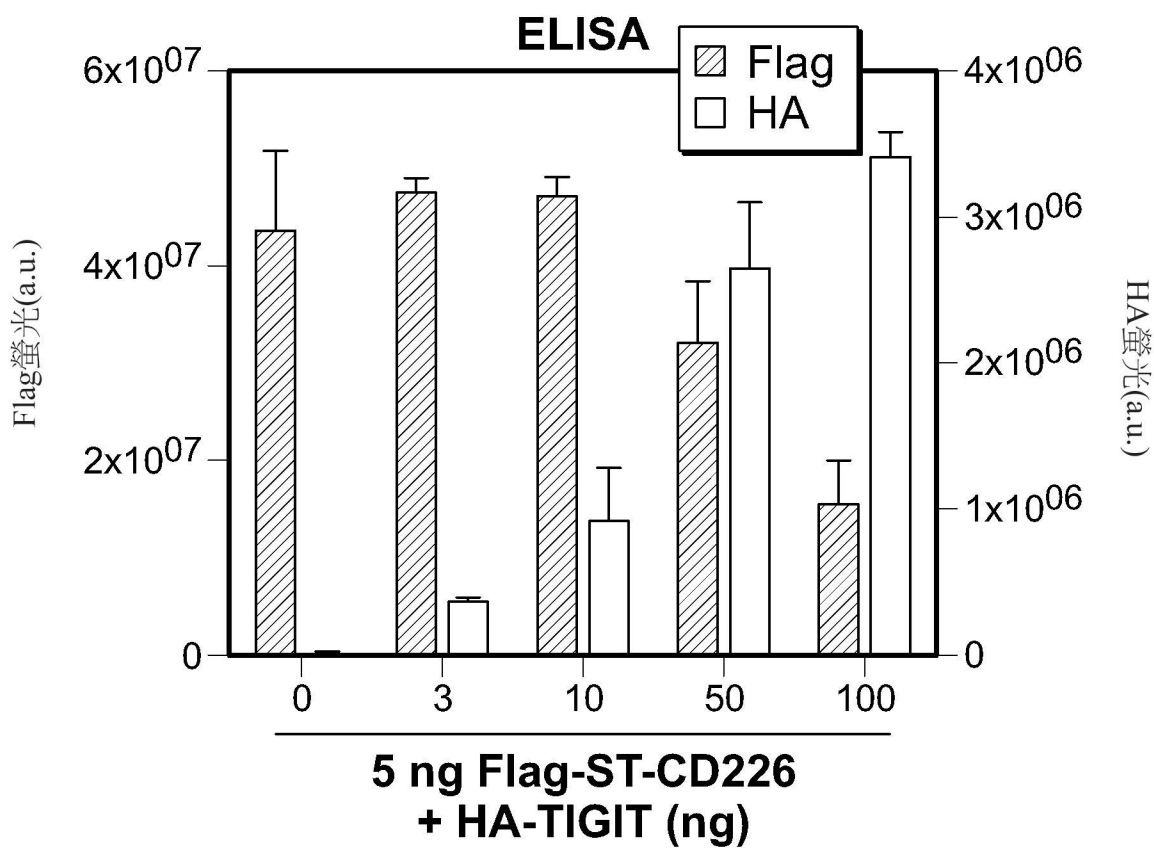
【圖17C】

FRET ST-CD226 / HA-TIGIT

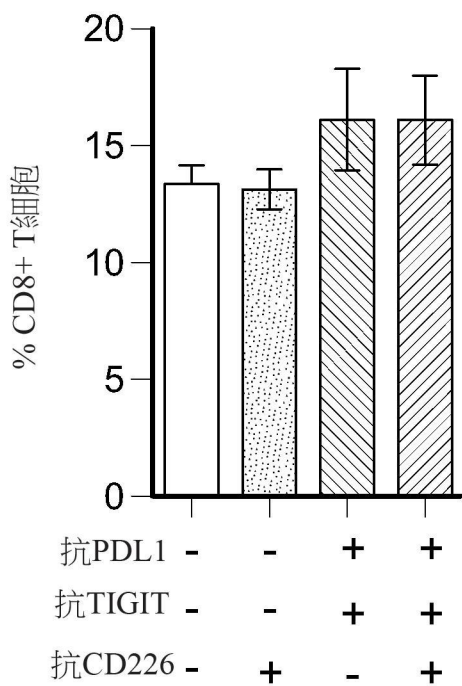


【圖17D】

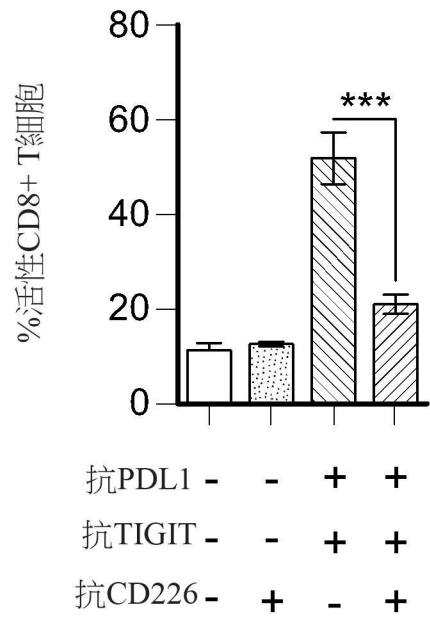




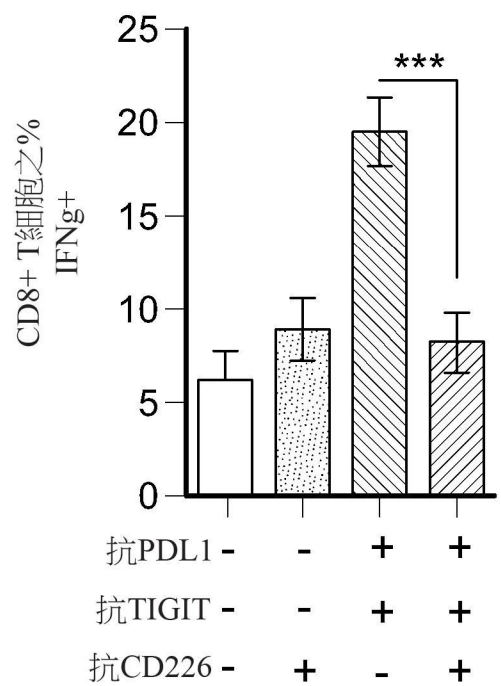
【圖18】



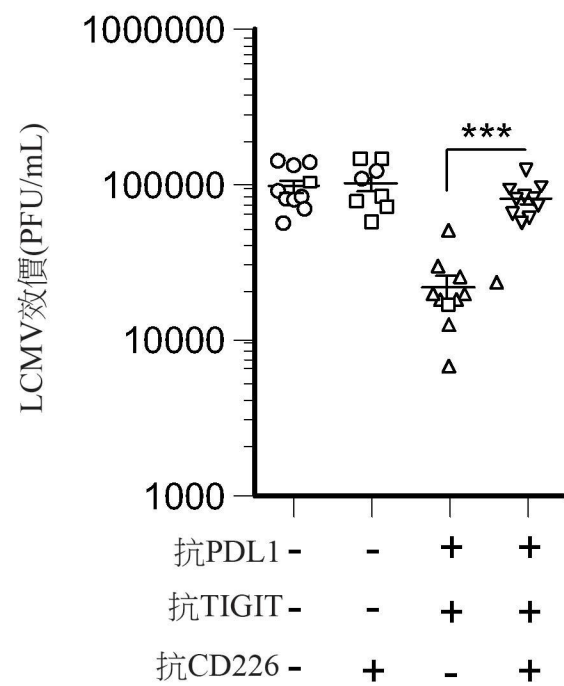
【圖19A】



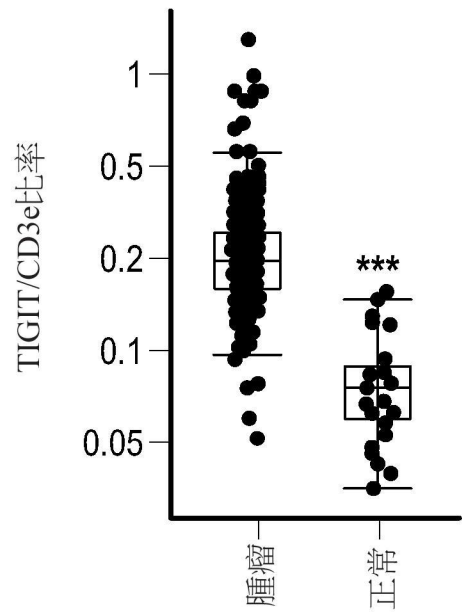
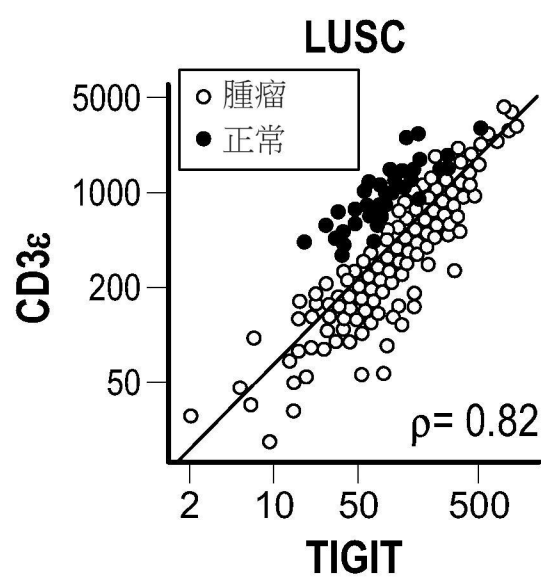
【圖19B】



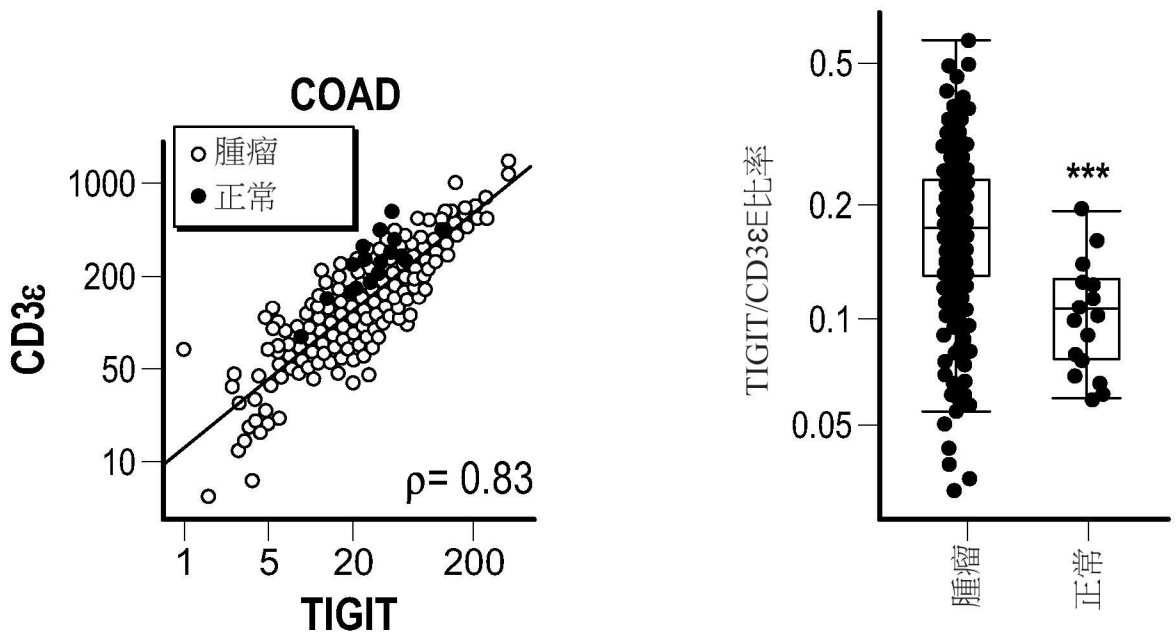
【圖19C】



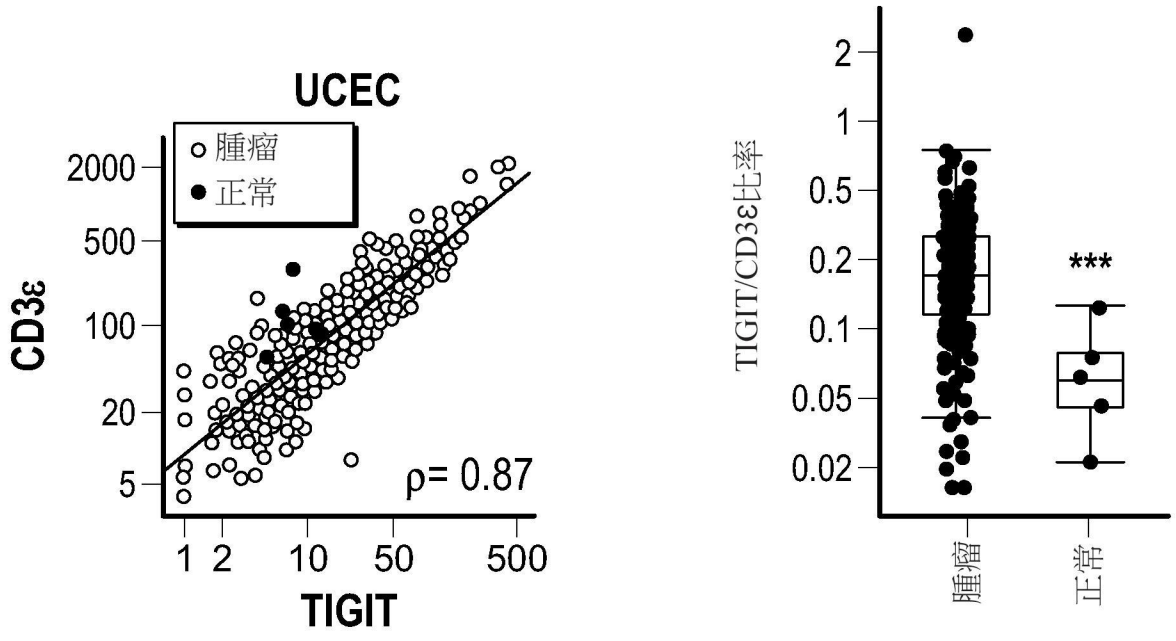
【圖19D】



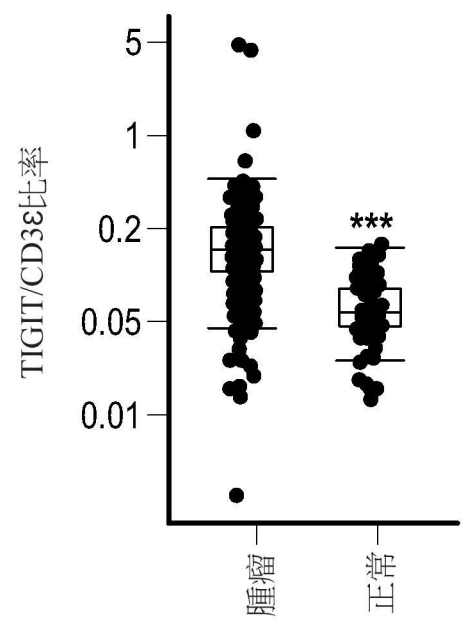
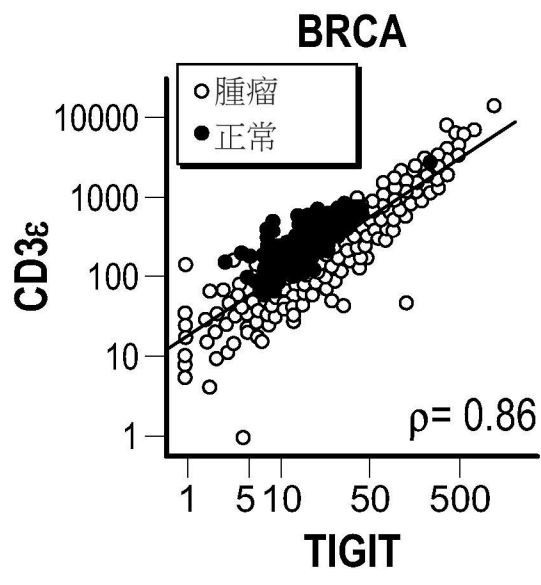
【圖20A】



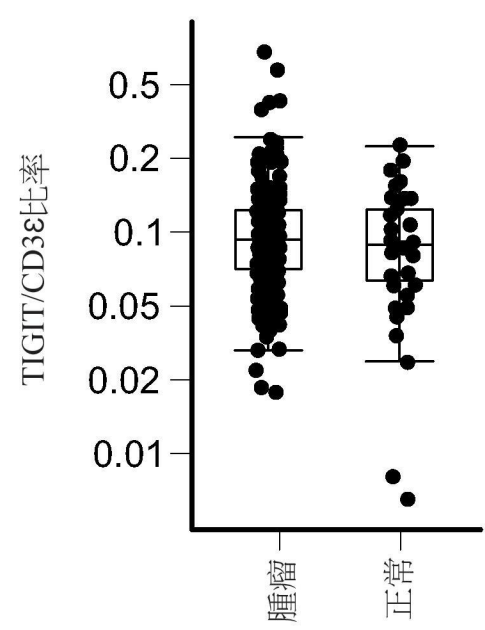
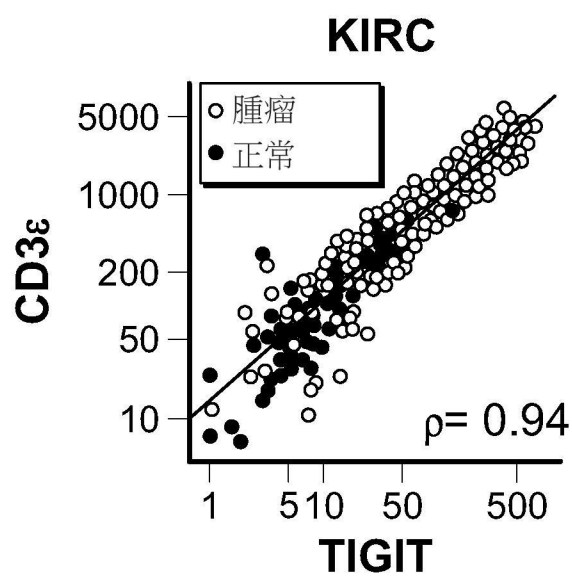
【圖20B】



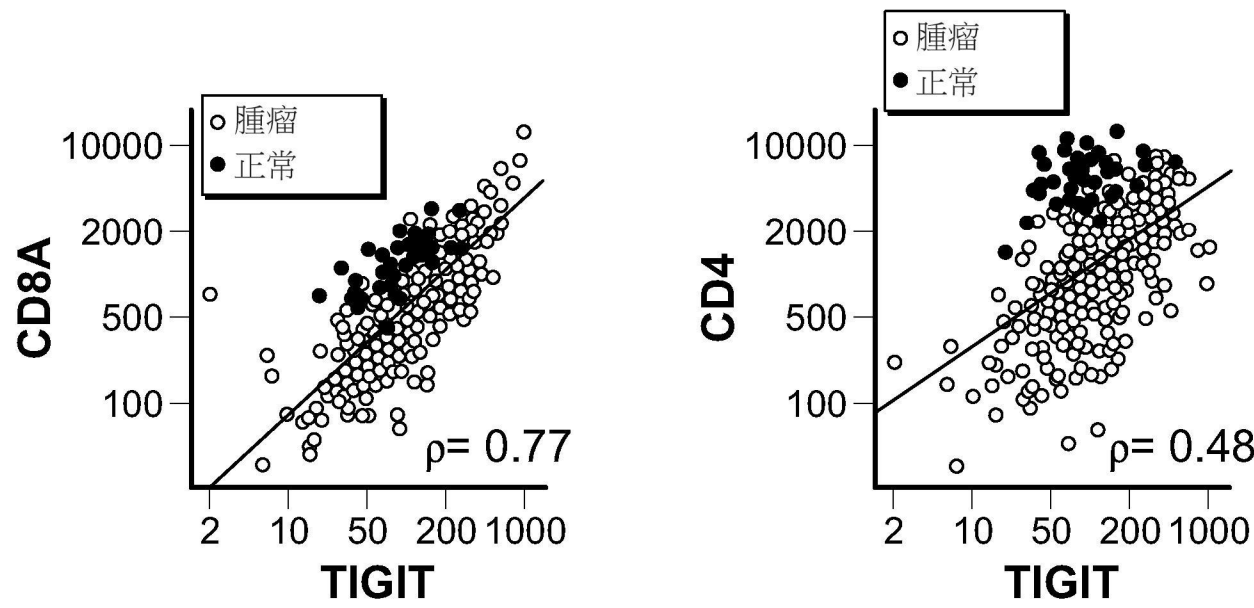
【圖20C】



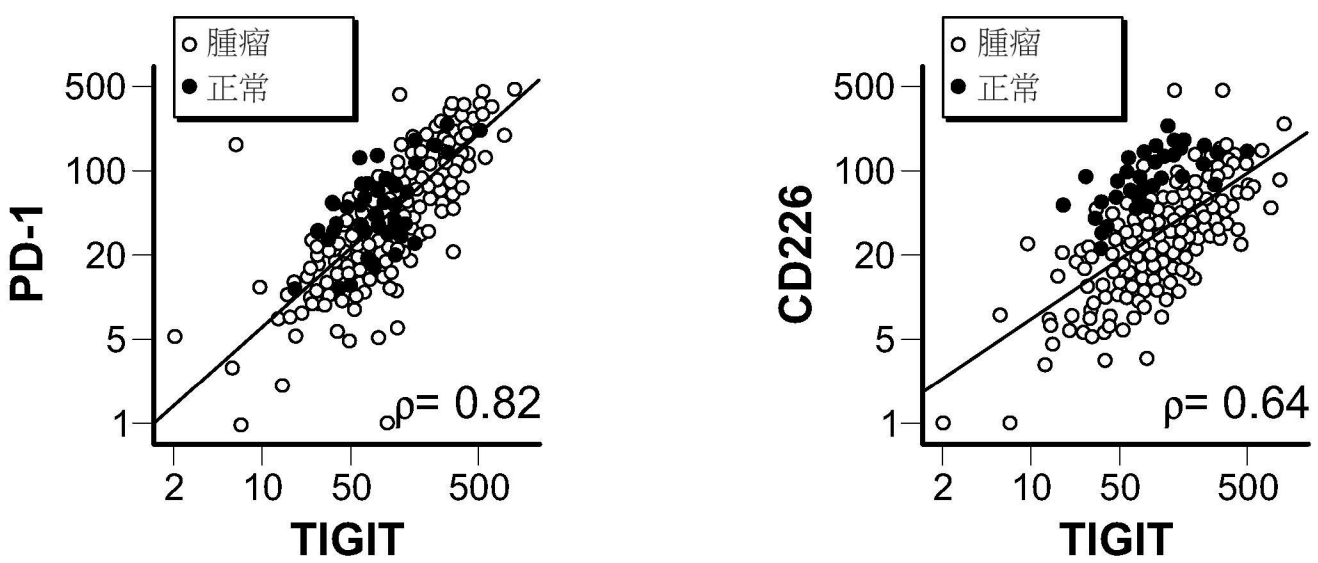
【圖20D】



【圖20E】

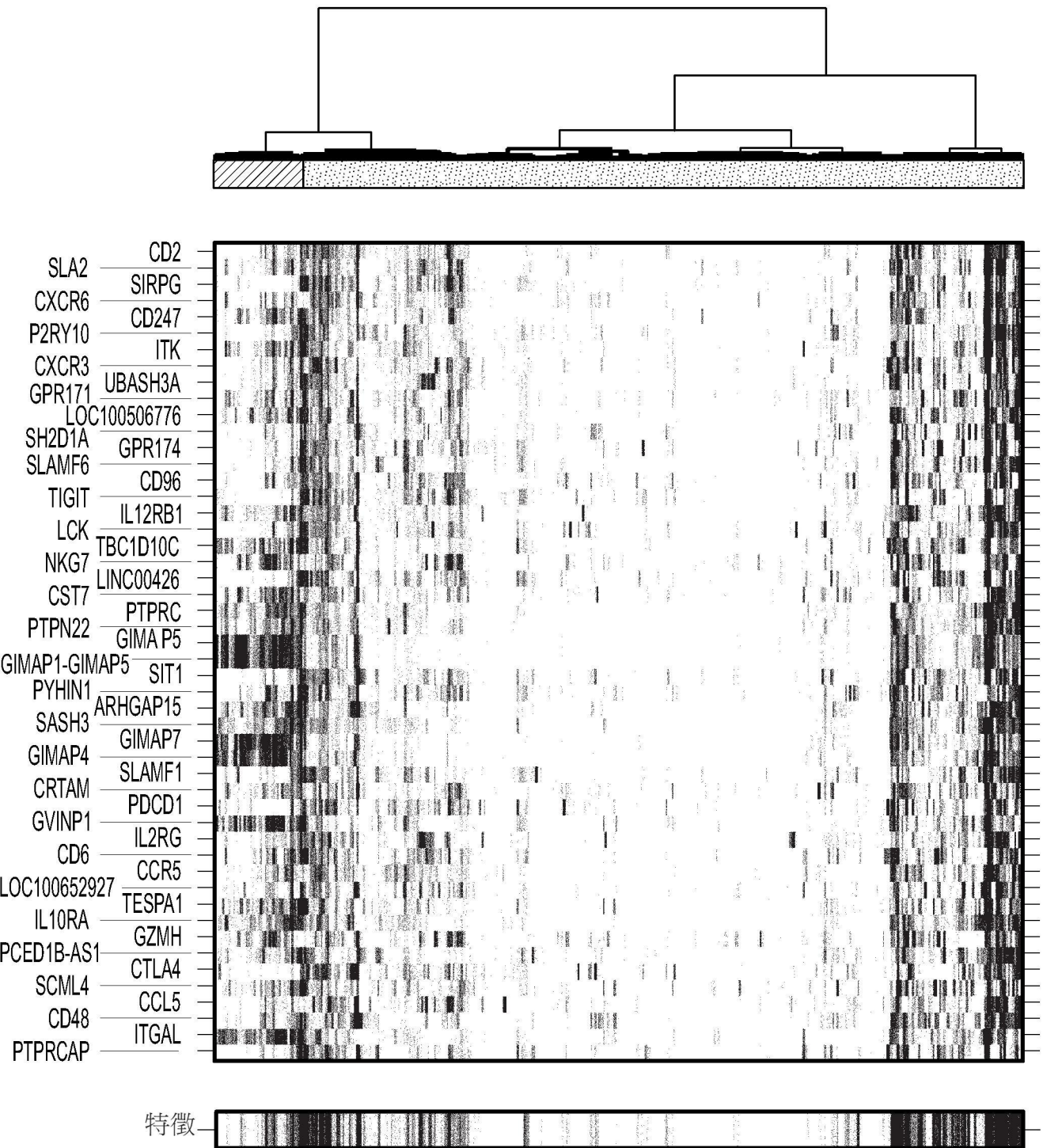


【圖20F】

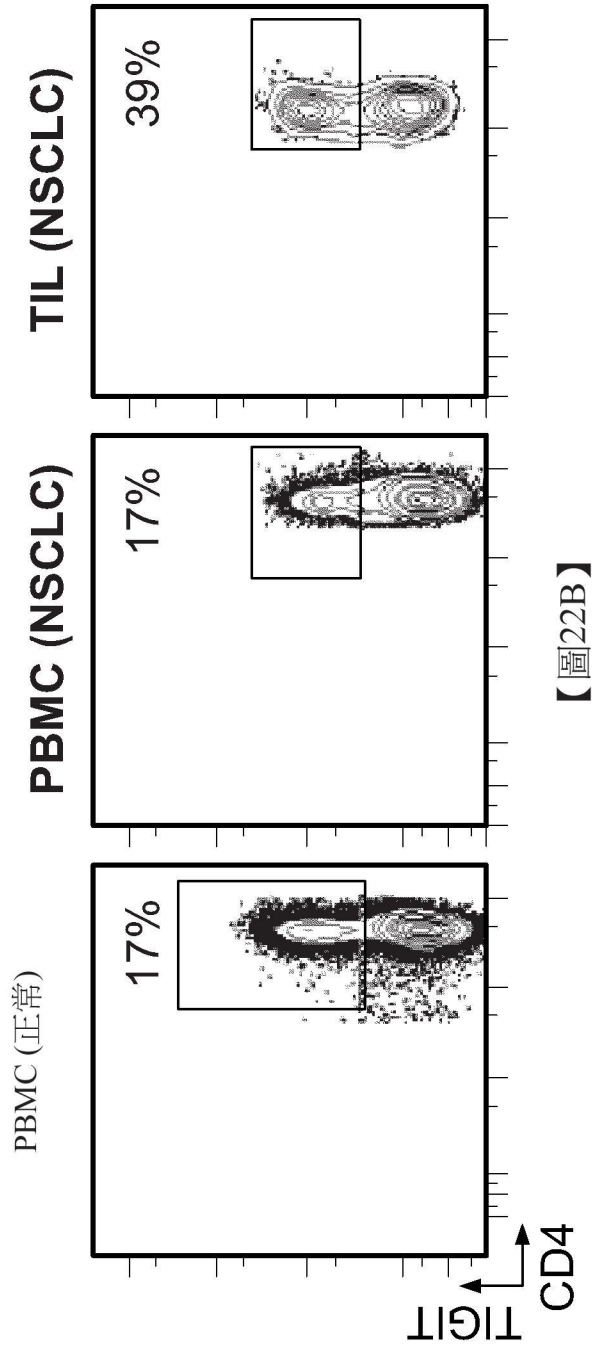
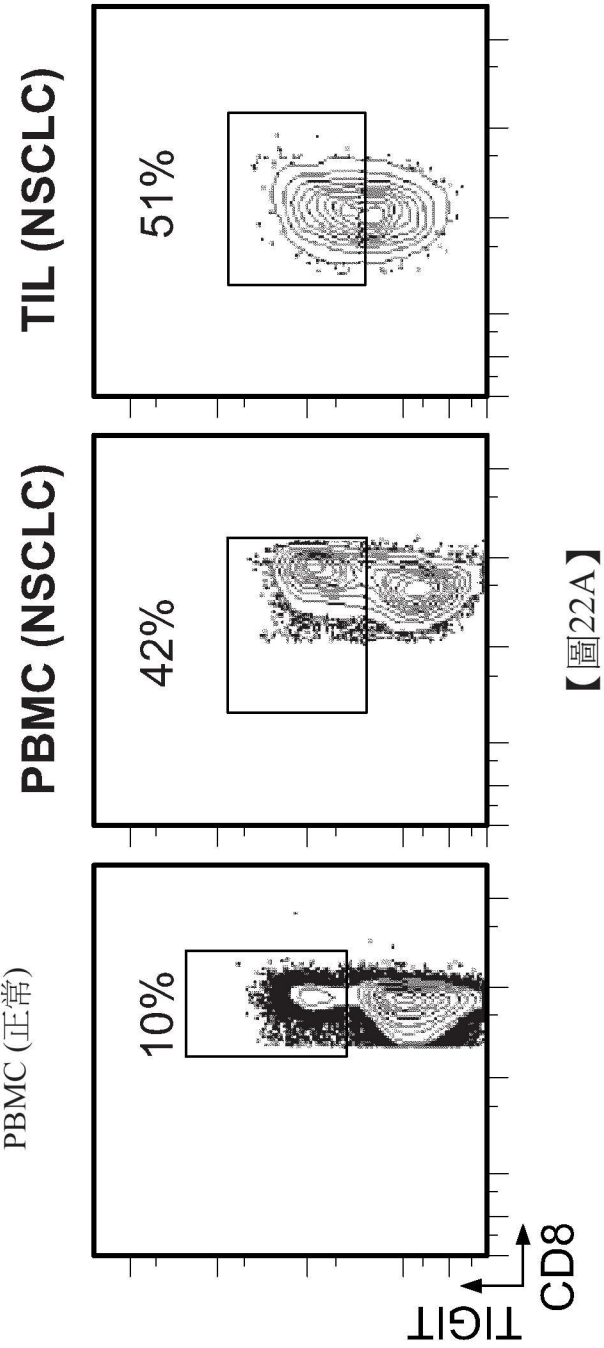


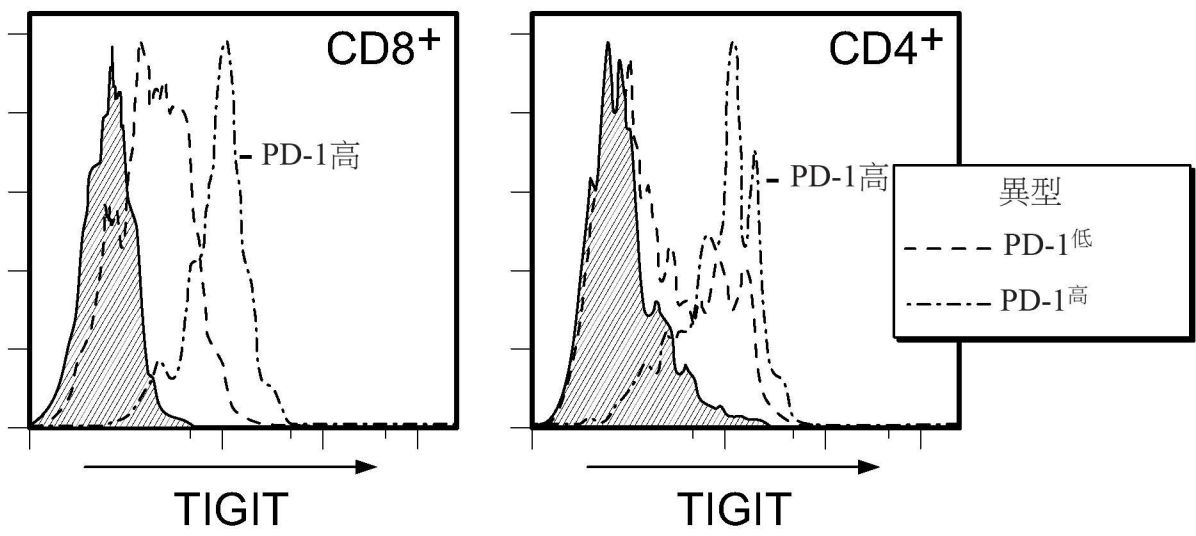
【圖20G】

【圖20H】

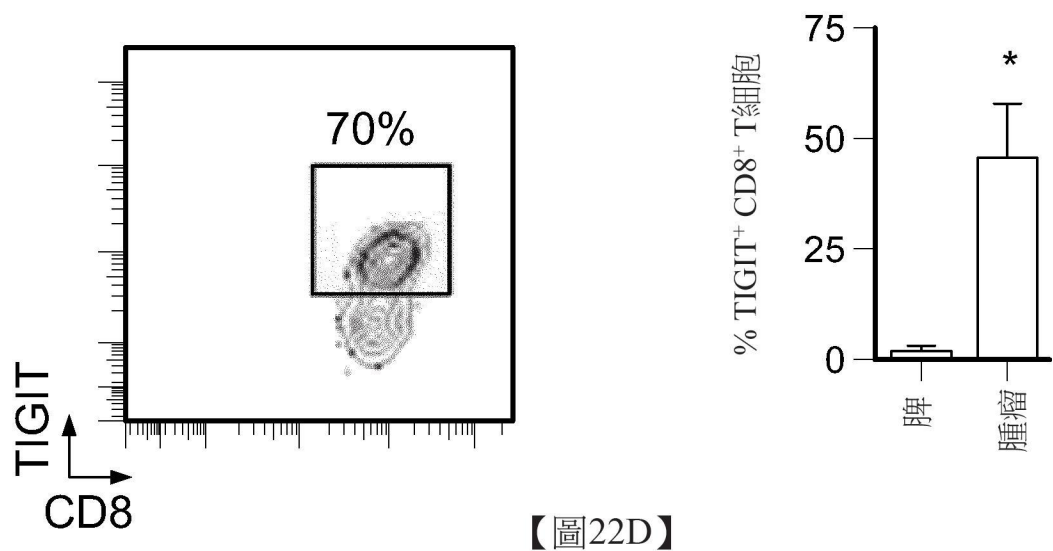


【圖21】





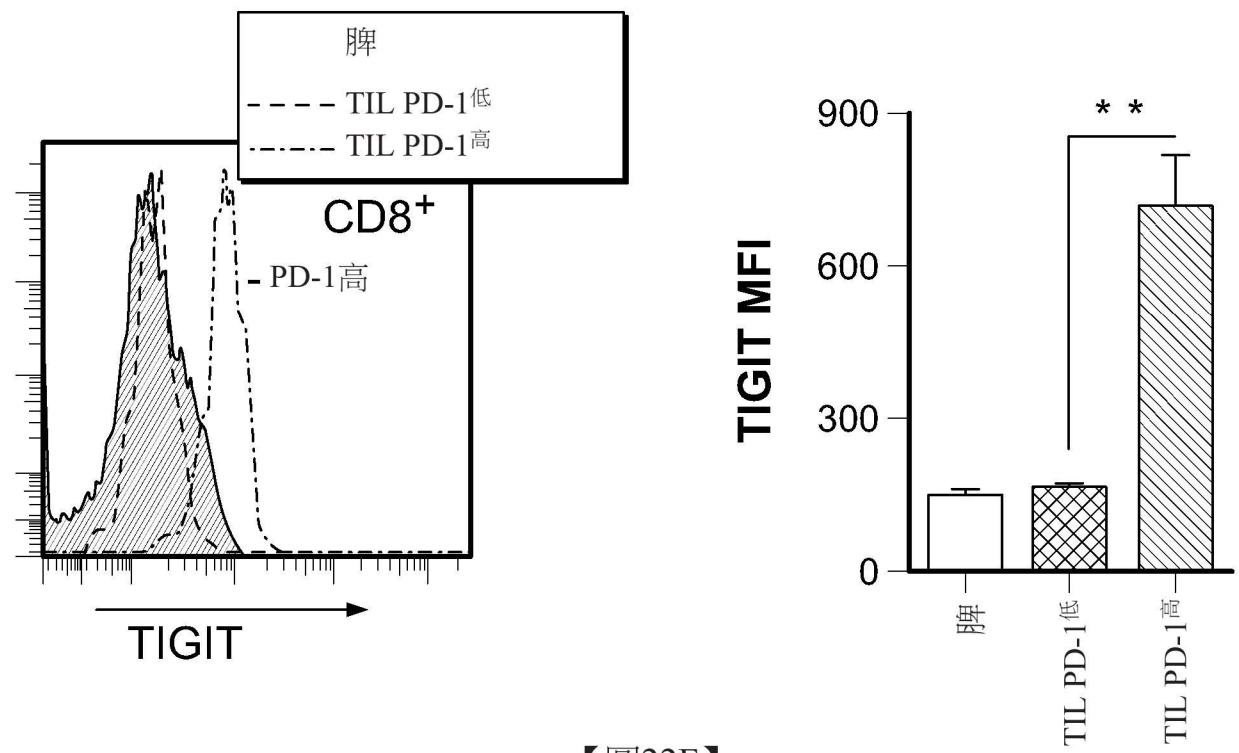
【圖22C】



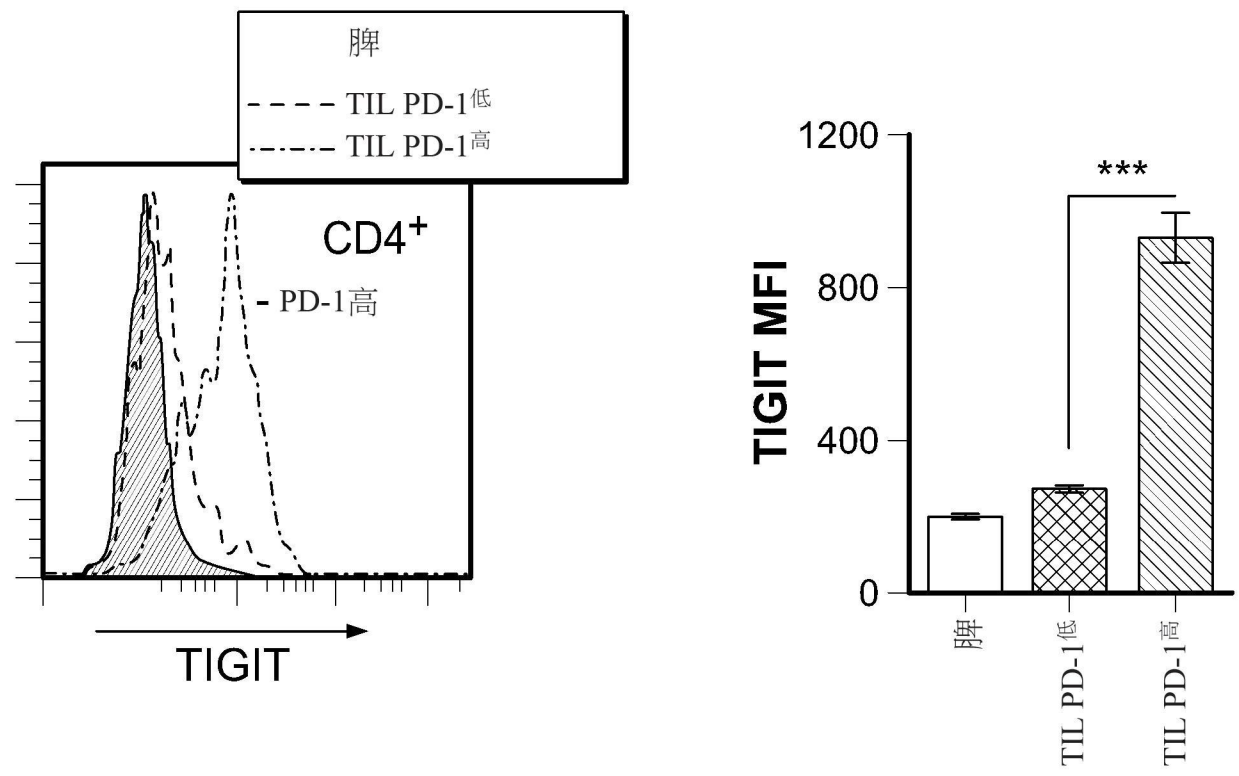
【圖22D】



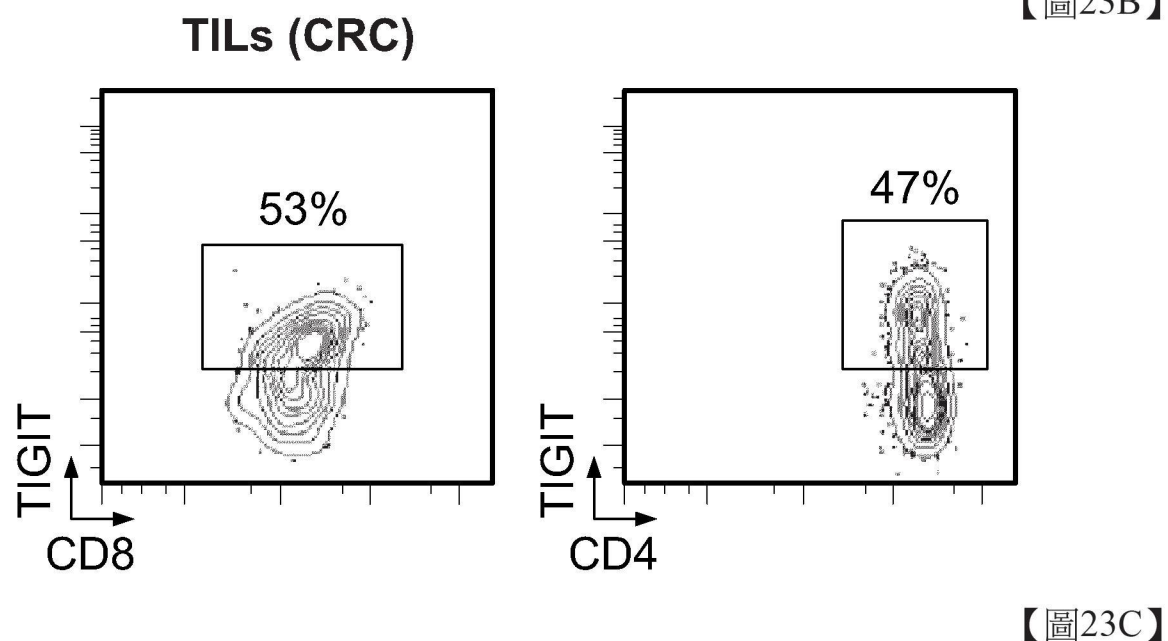
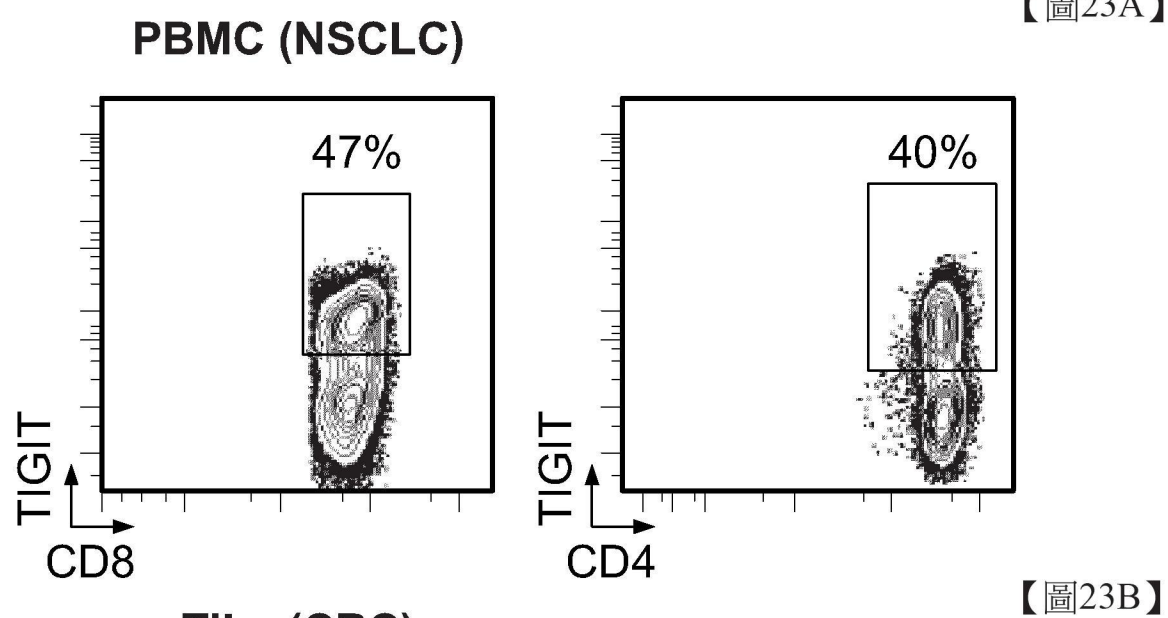
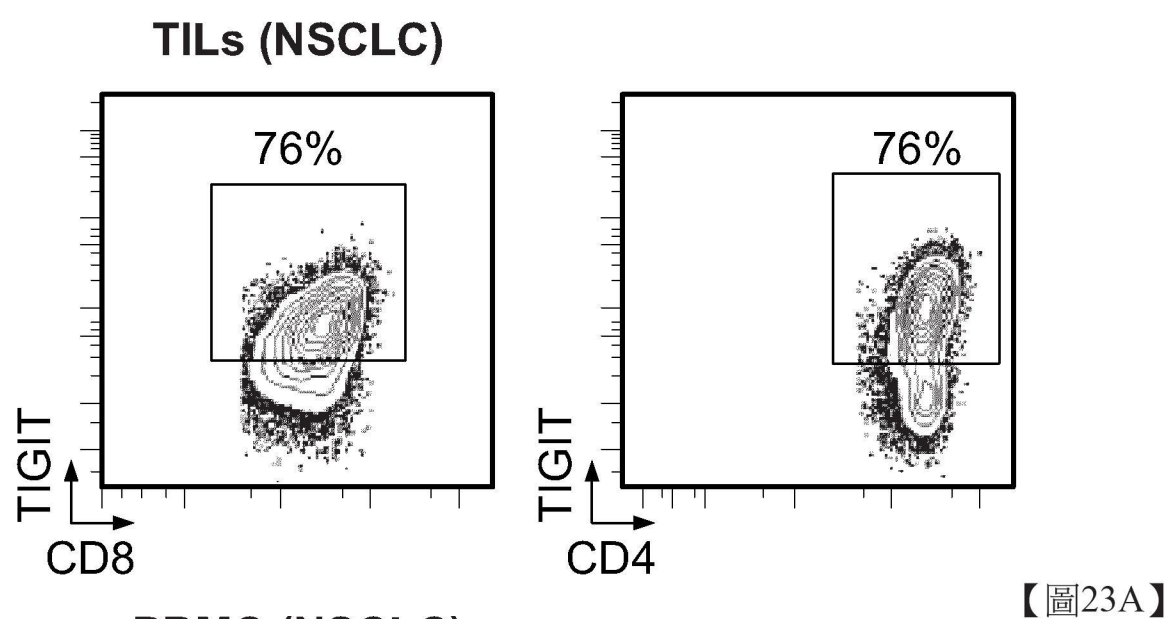
【圖22E】

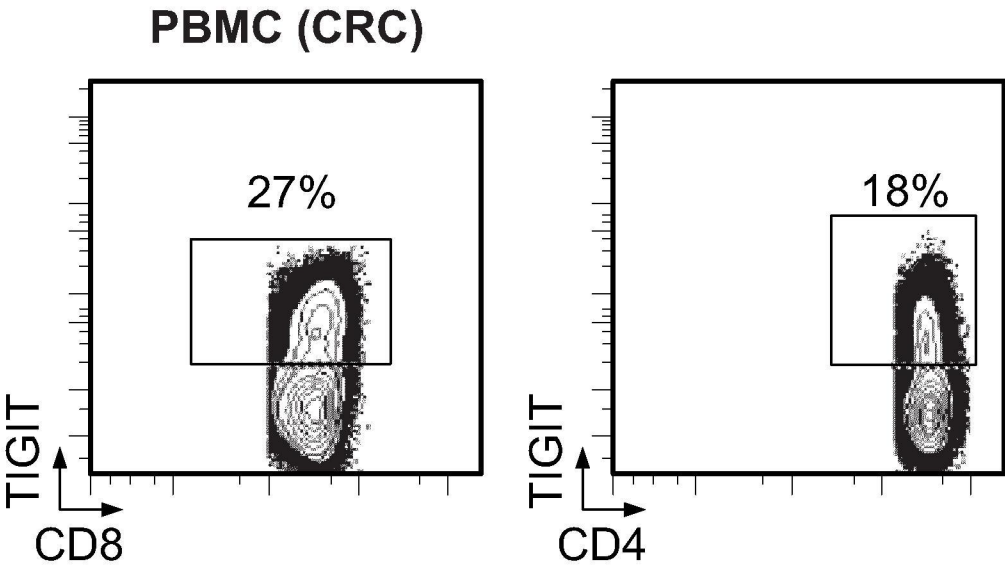


【圖22F】

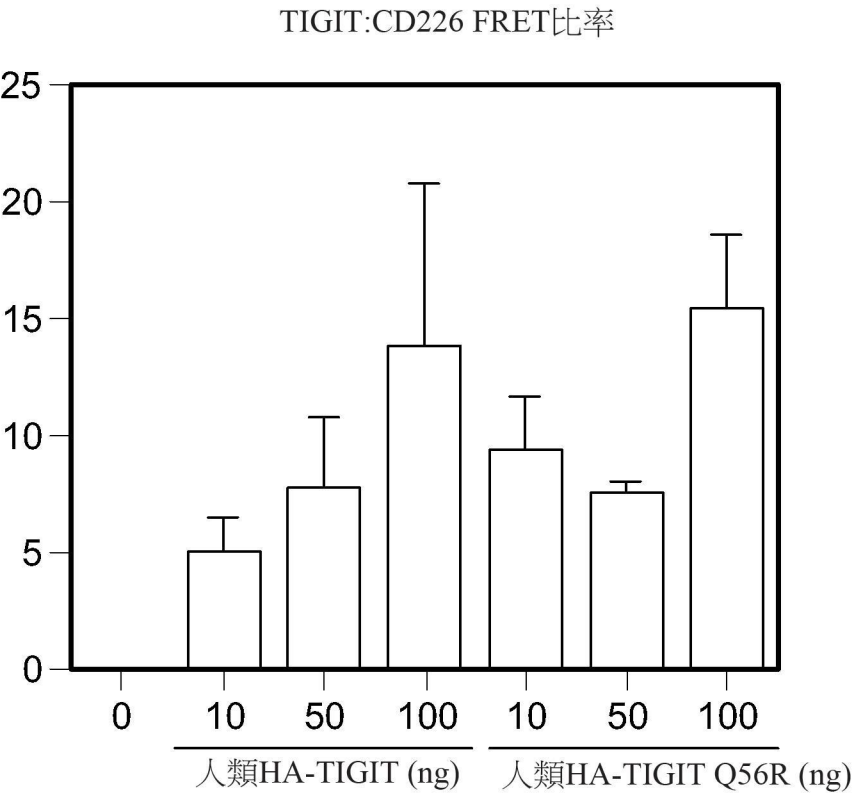


【圖22G】

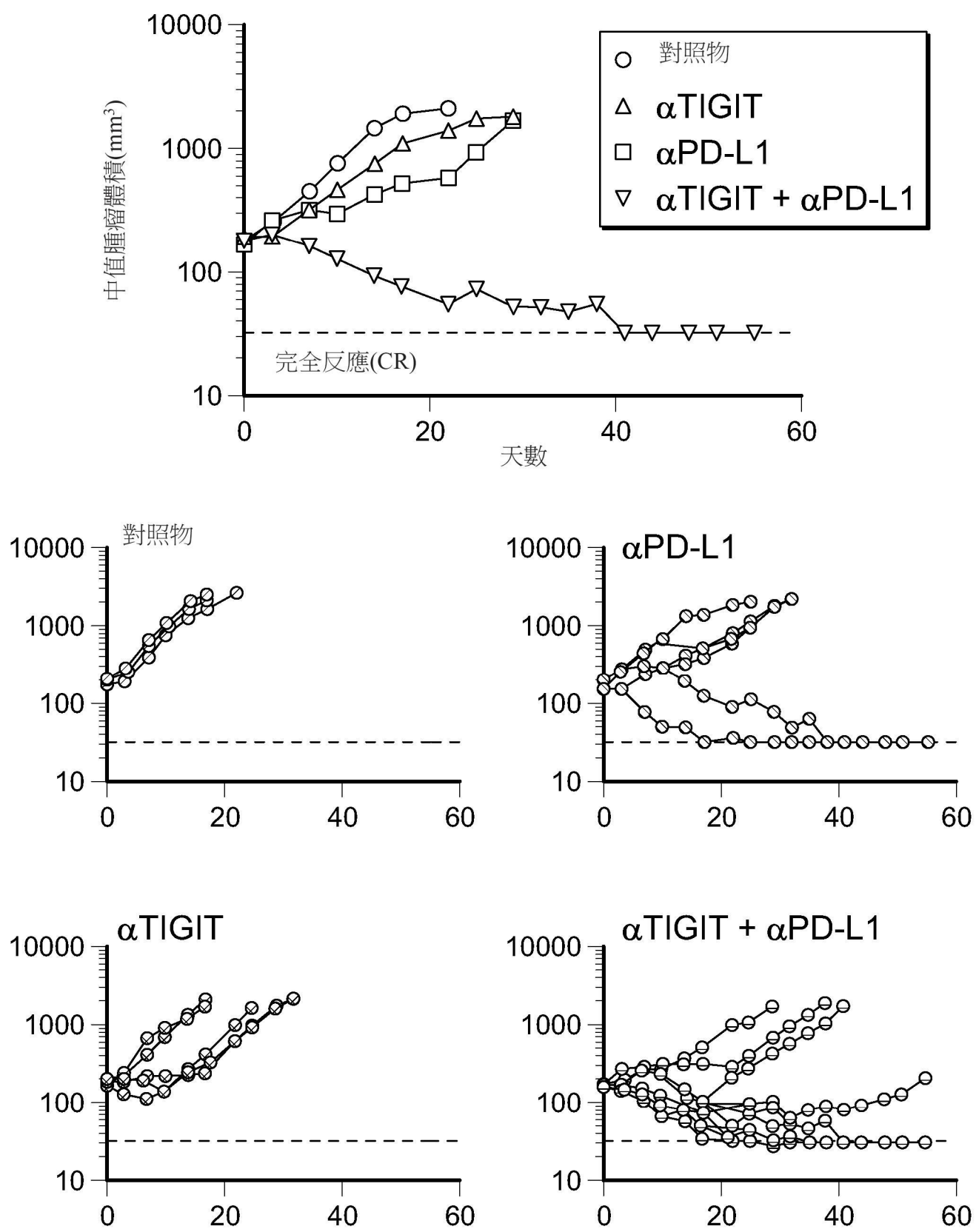




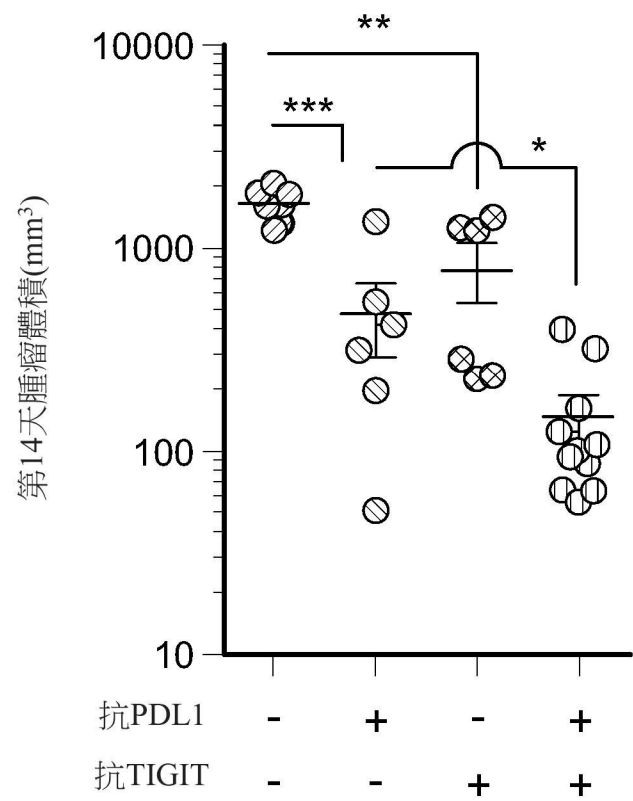
【圖23D】



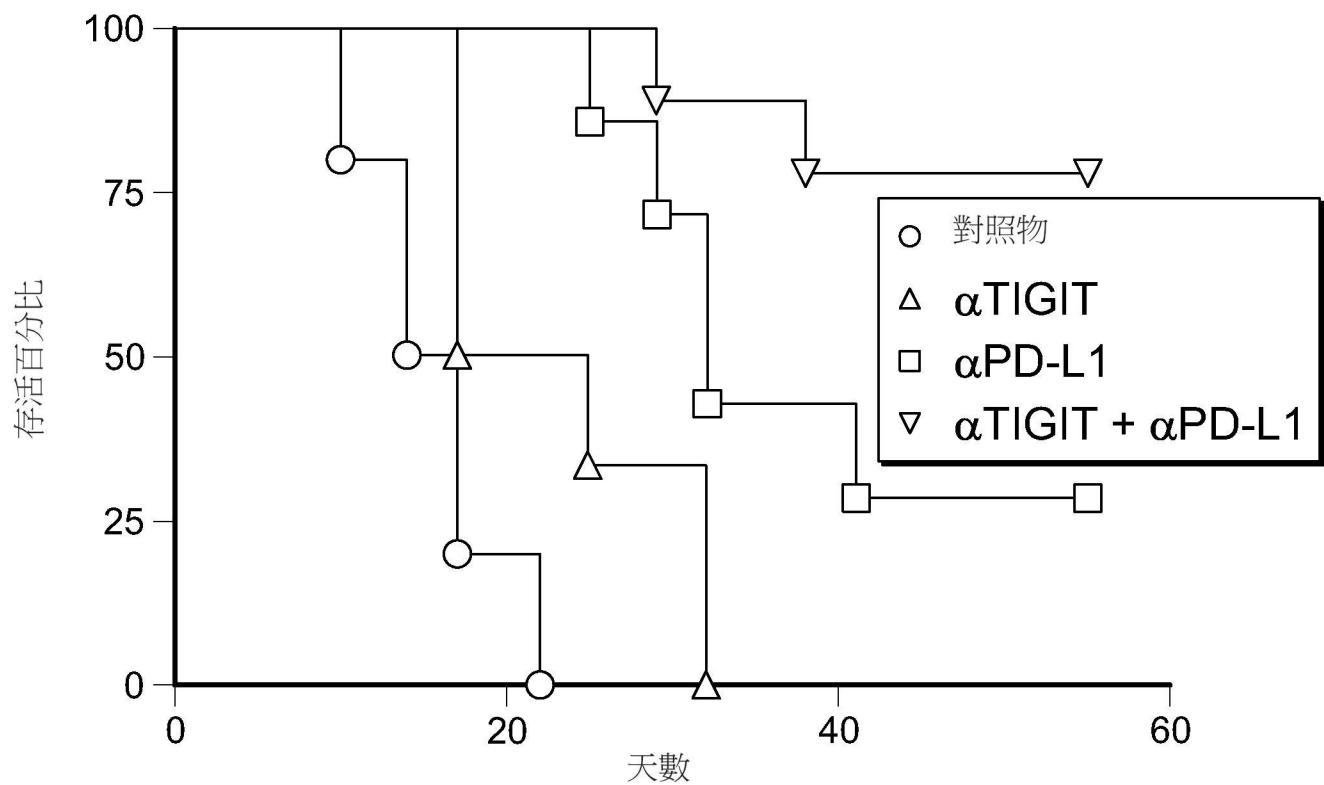
【圖24】



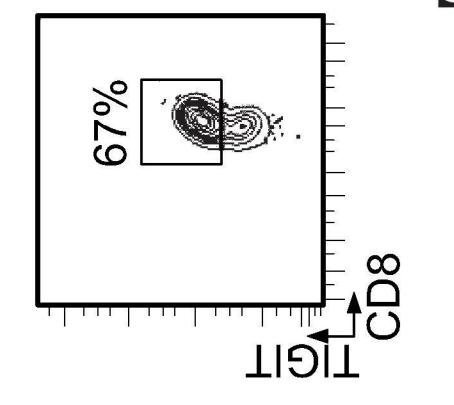
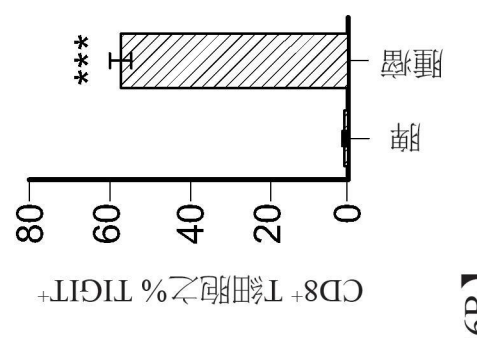
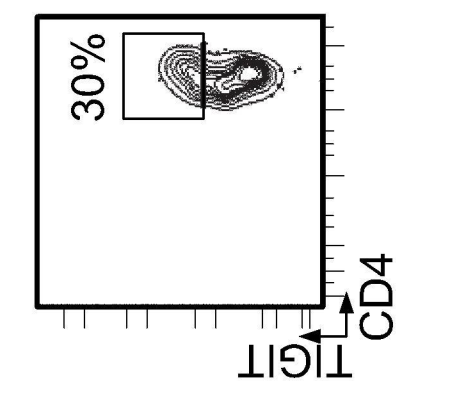
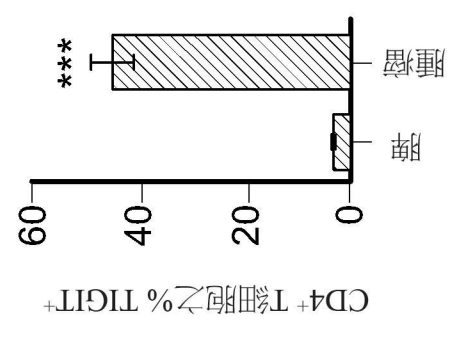
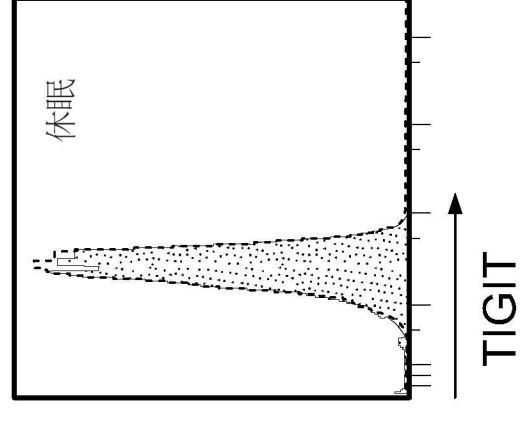
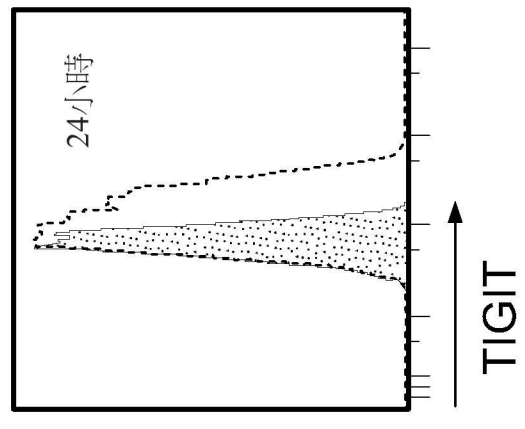
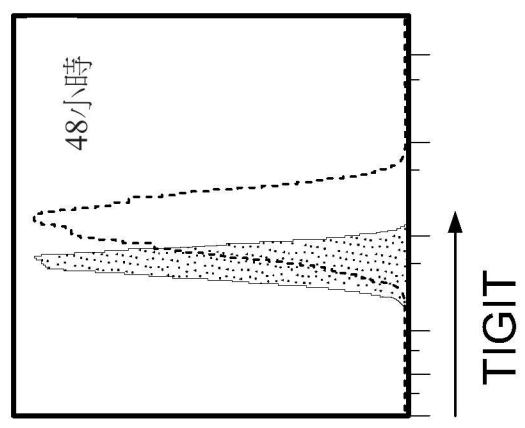
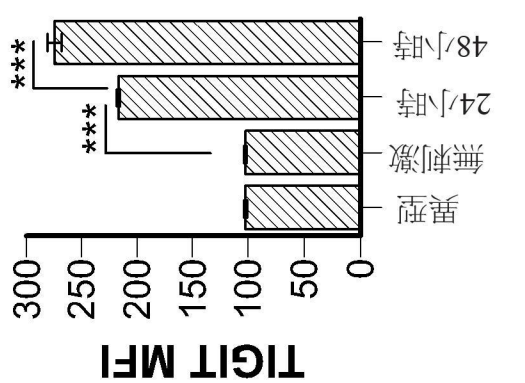
【圖25A】



【圖25B】



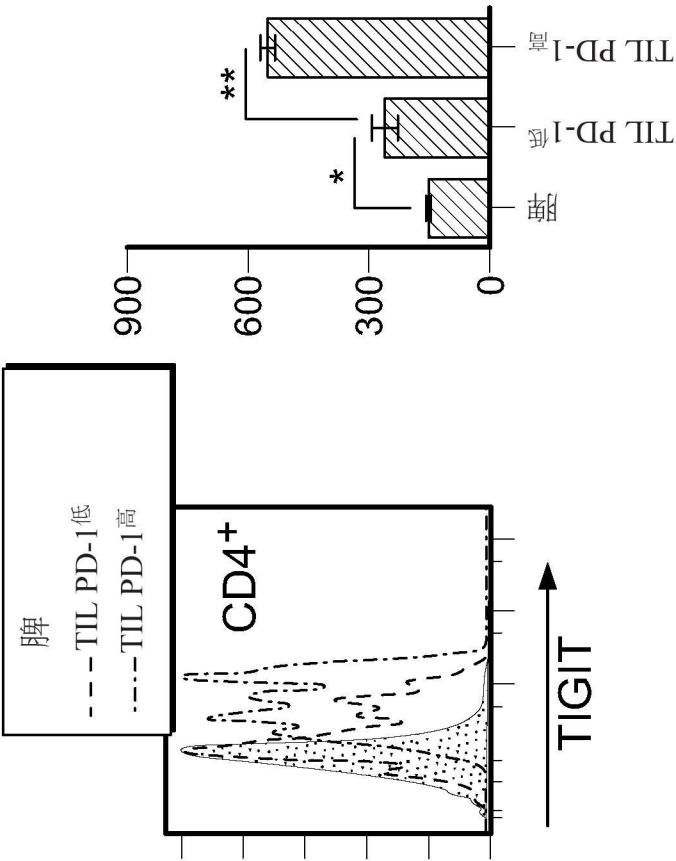
【圖25C】



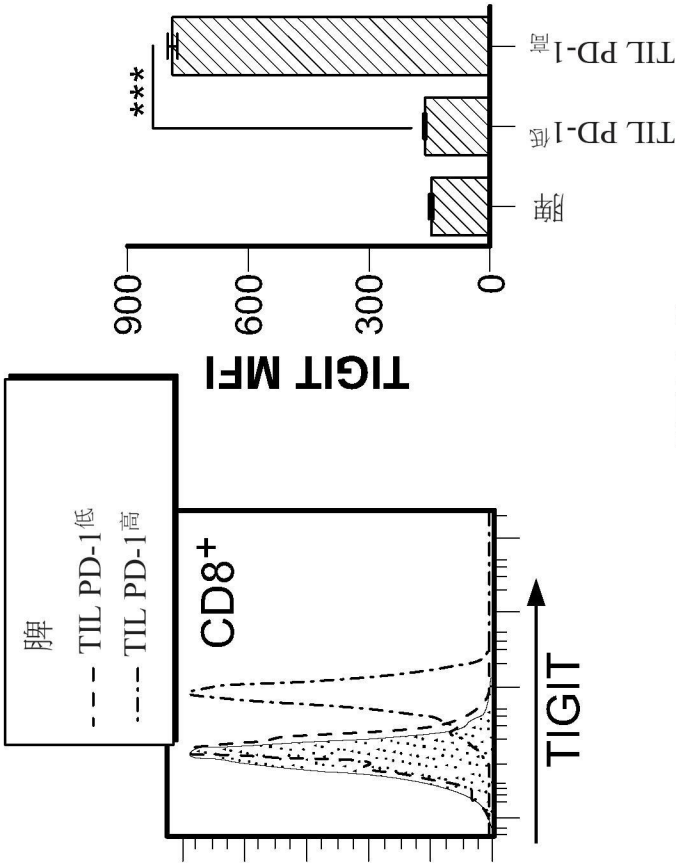
【圖26C】

【圖26B】

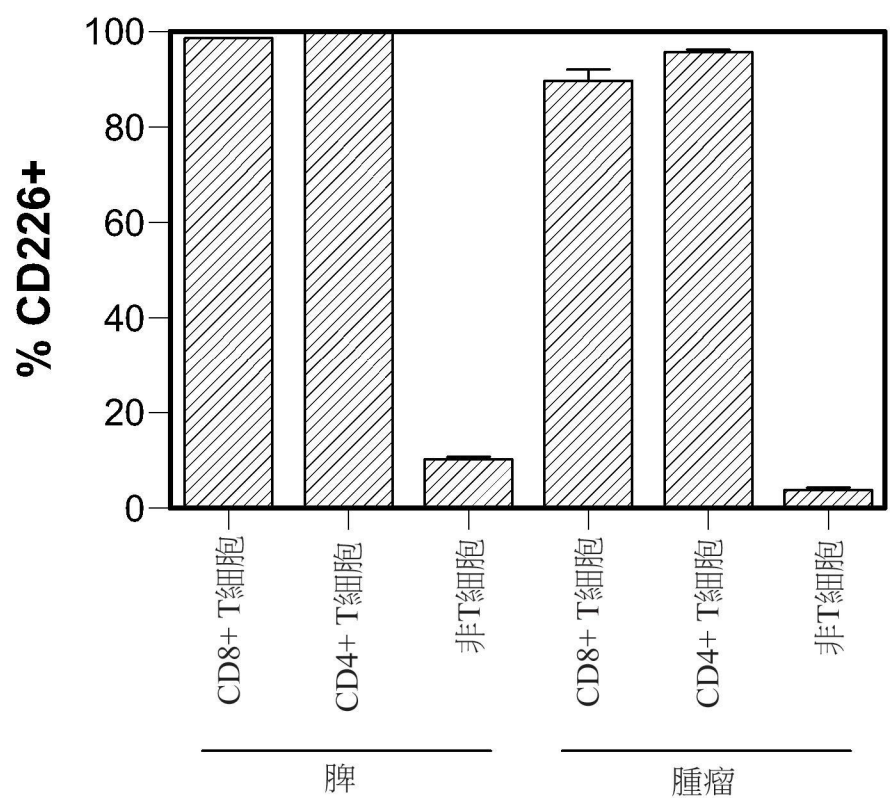
【圖26A】



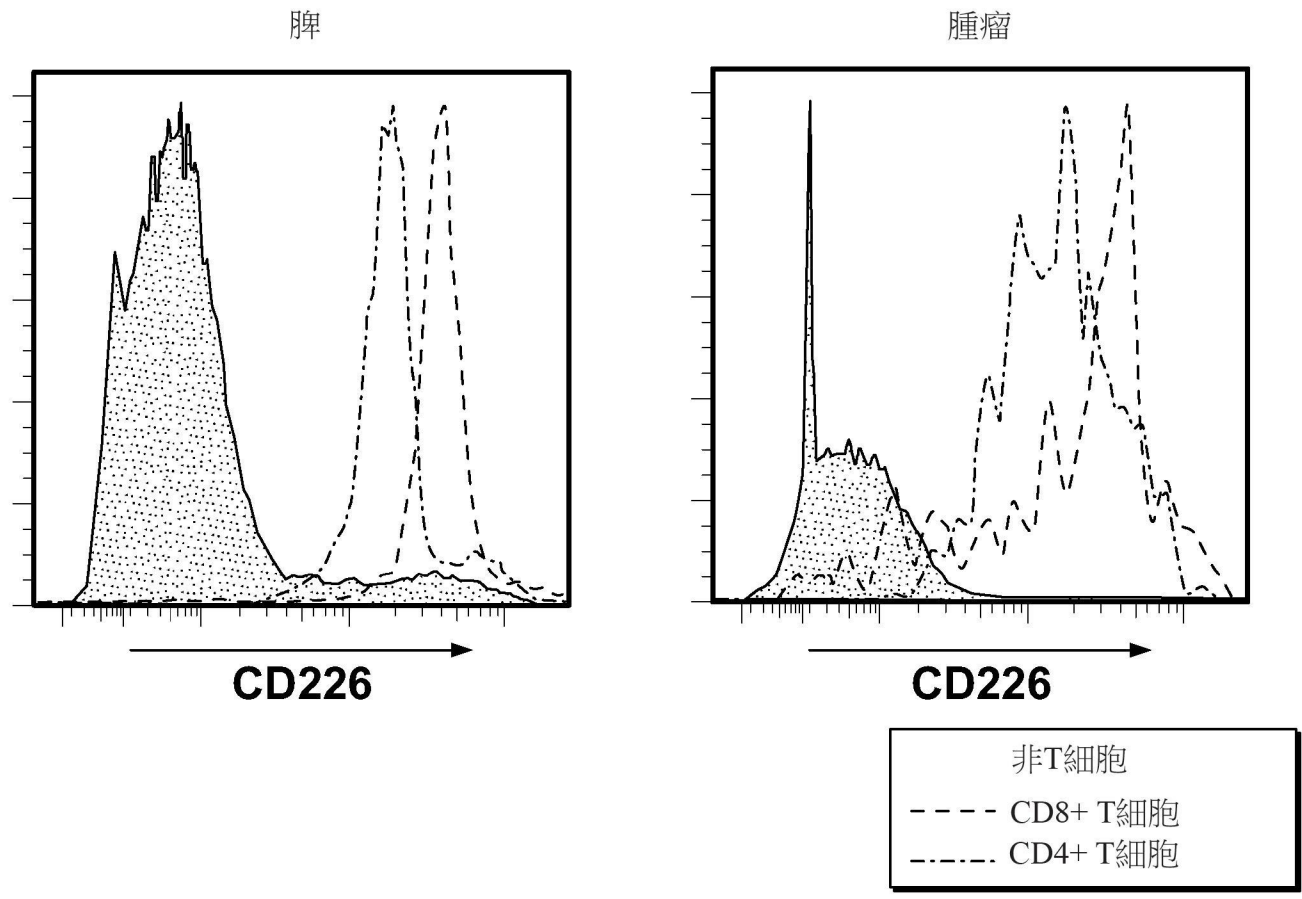
【圖26E】



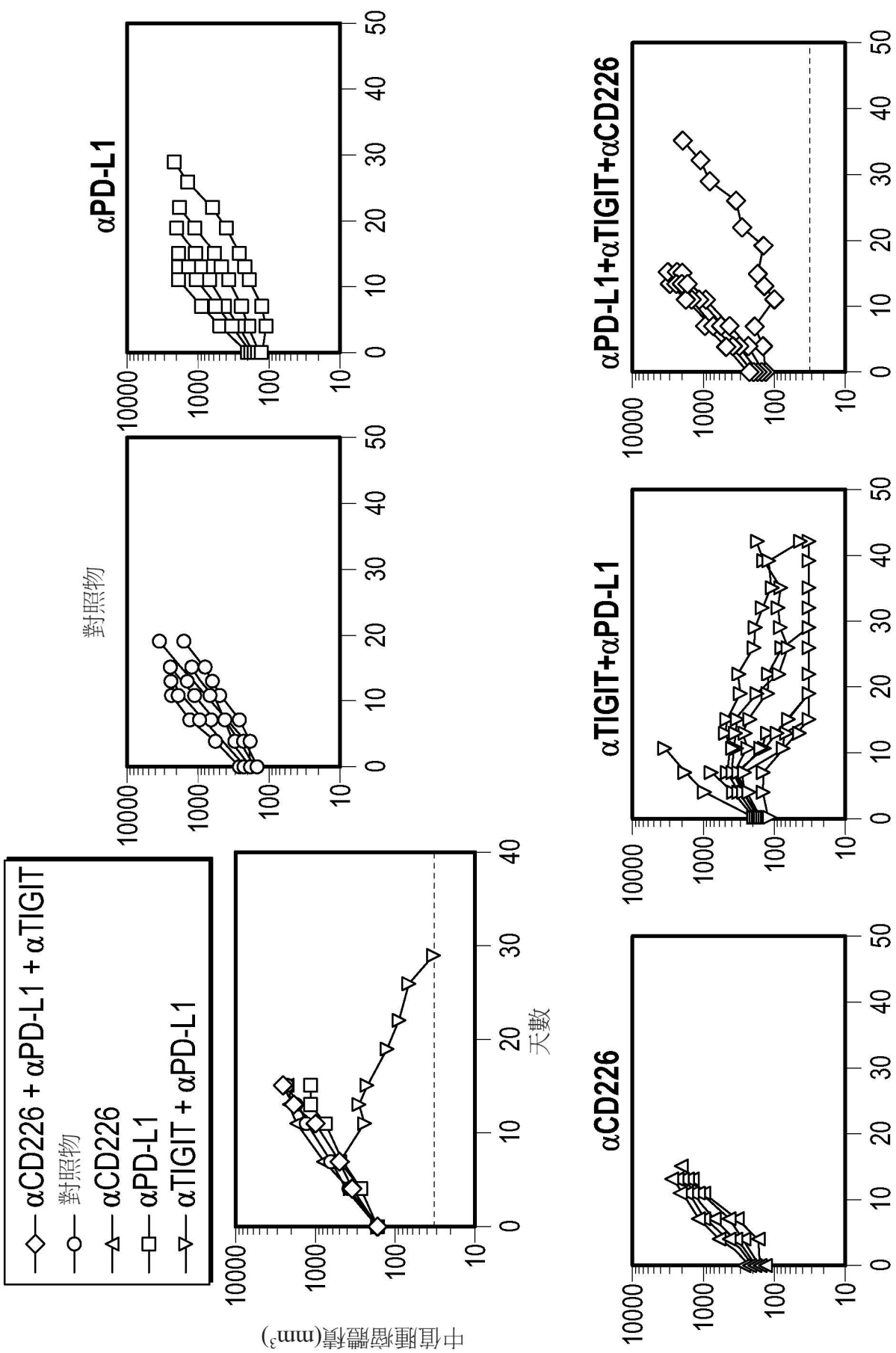
【圖26D】



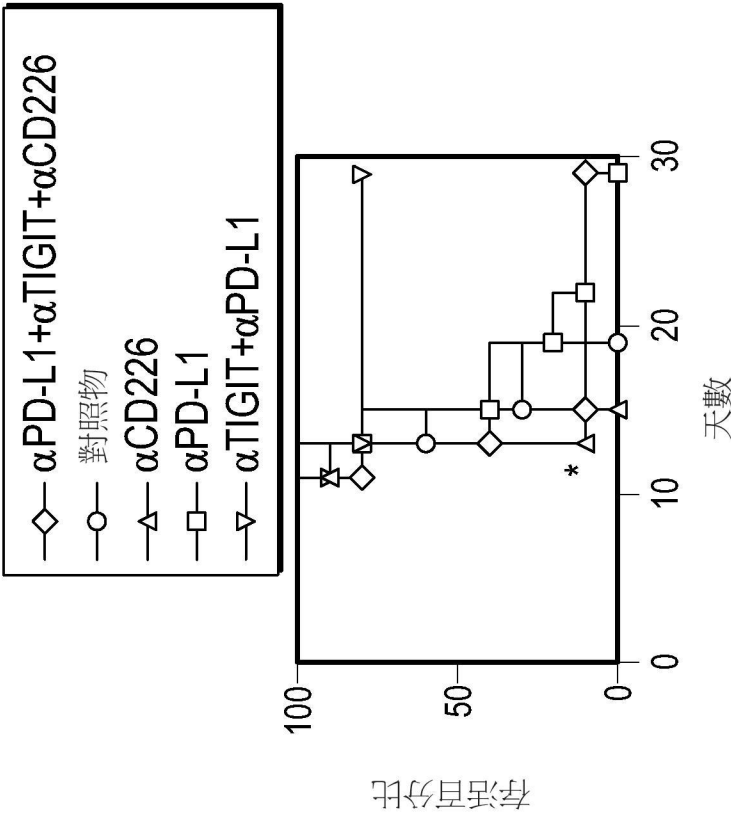
【圖27A】



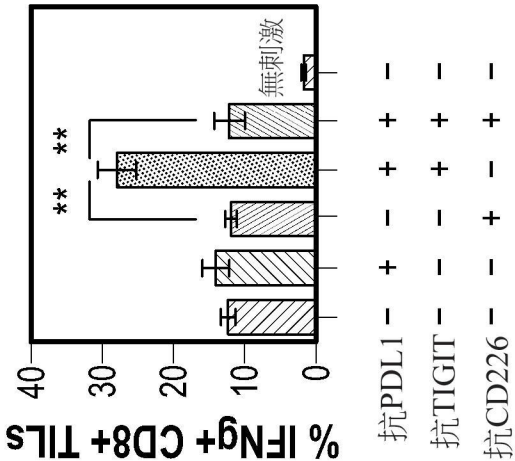
【圖27B】



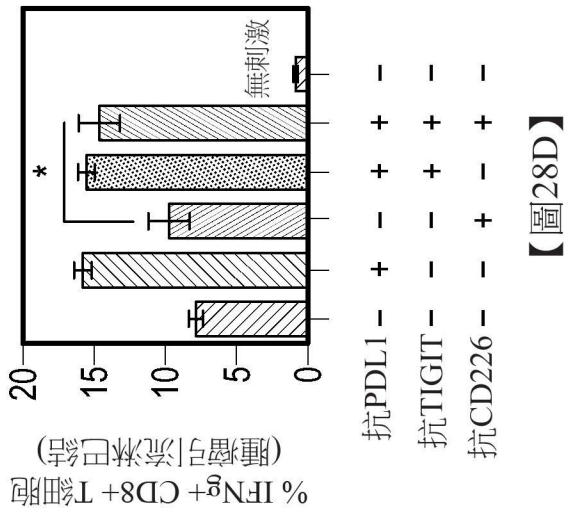
【圖28A】



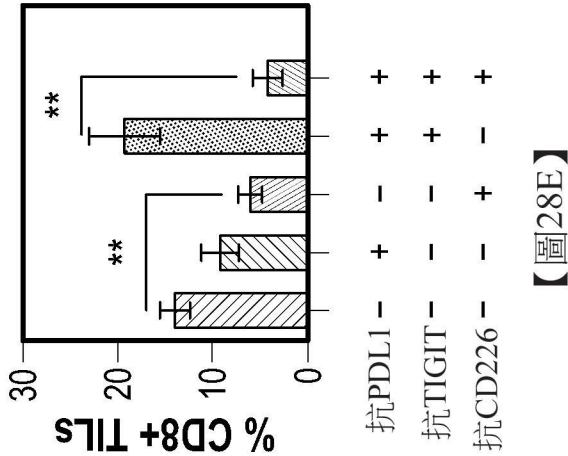
【圖28C】



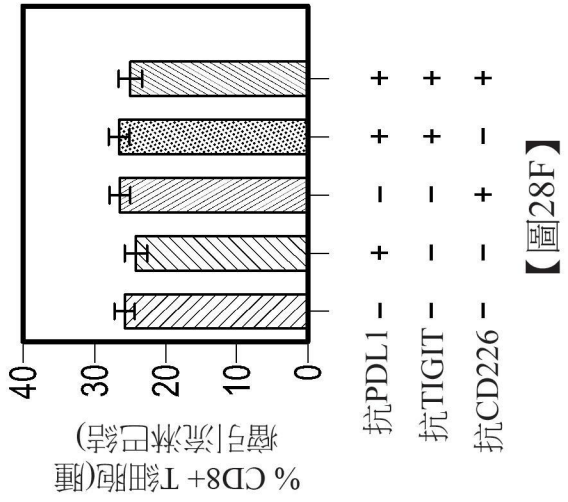
【圖28B】



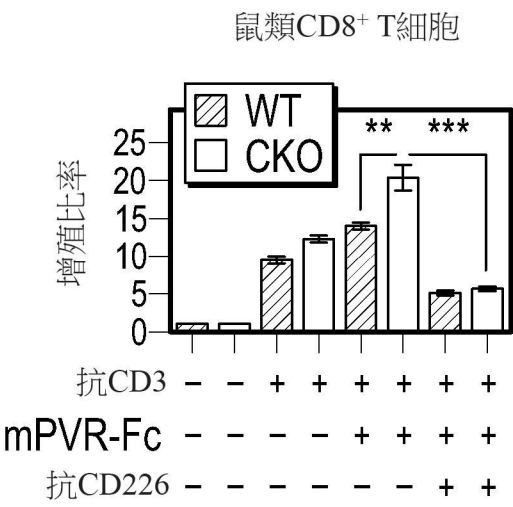
【圖28D】



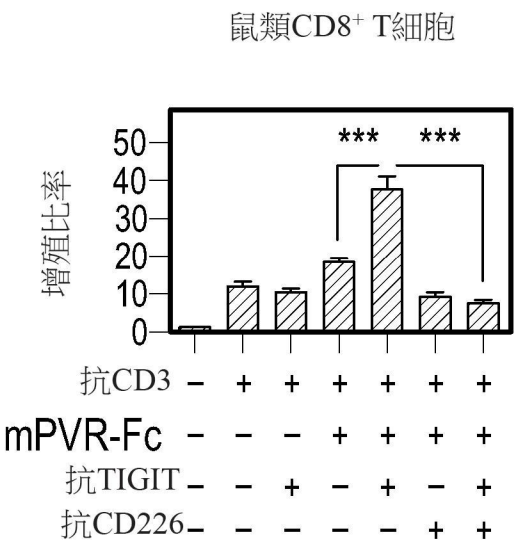
【圖28E】



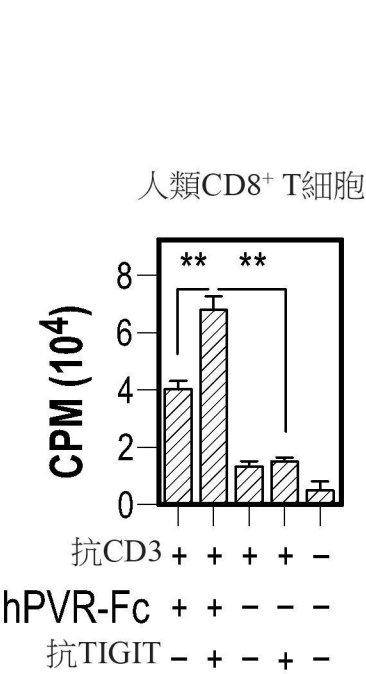
【圖28F】



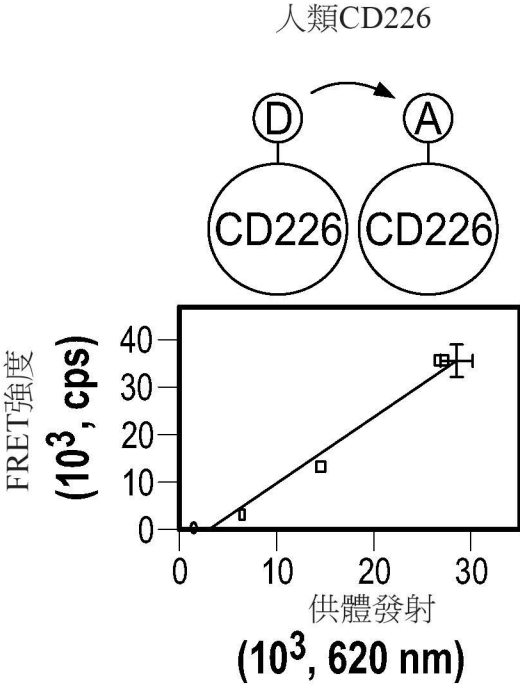
【圖29A】



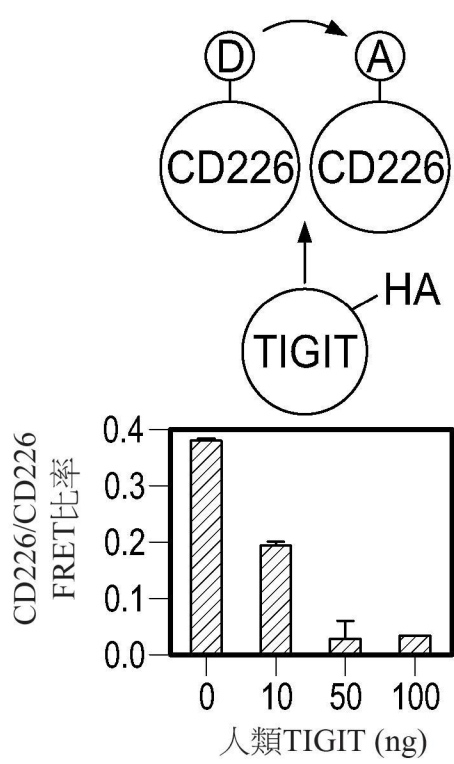
【圖29B】



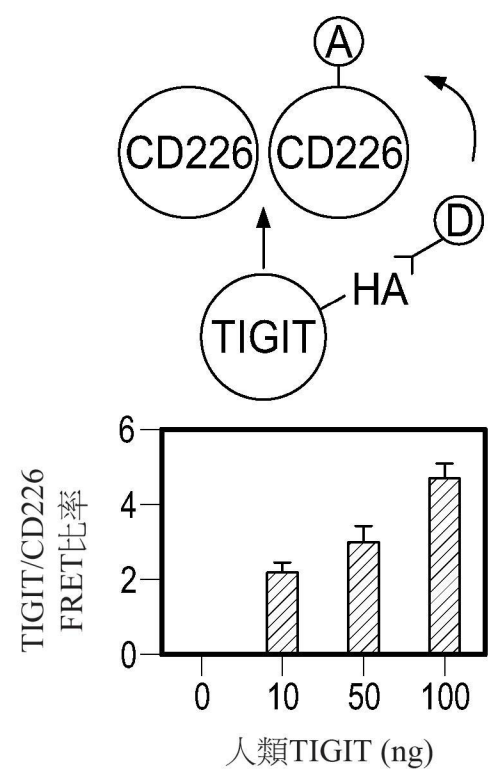
【圖29C】



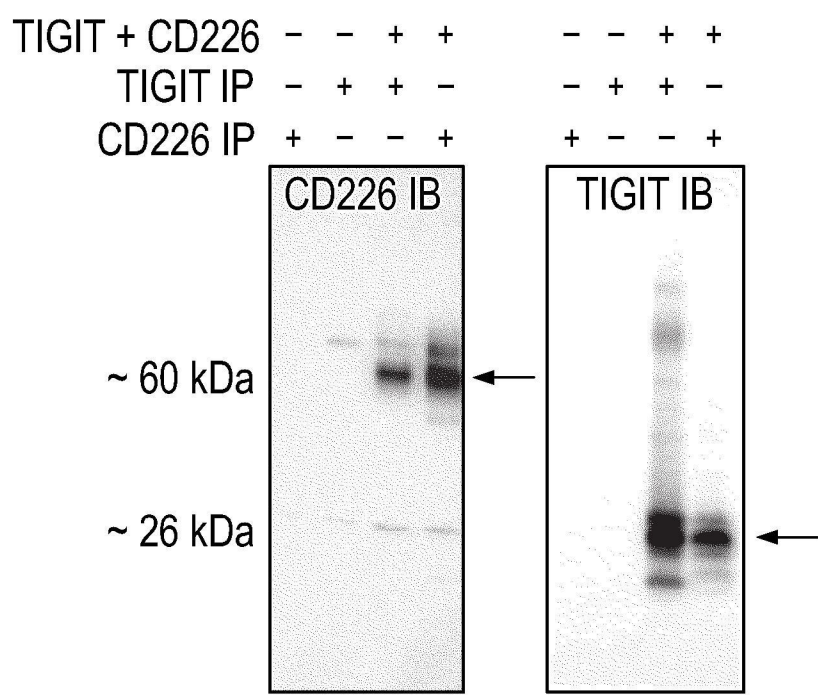
【圖29D】



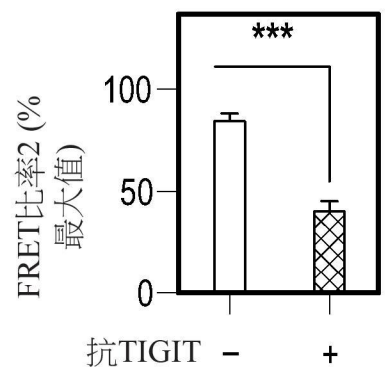
【圖29E】



【圖29F】

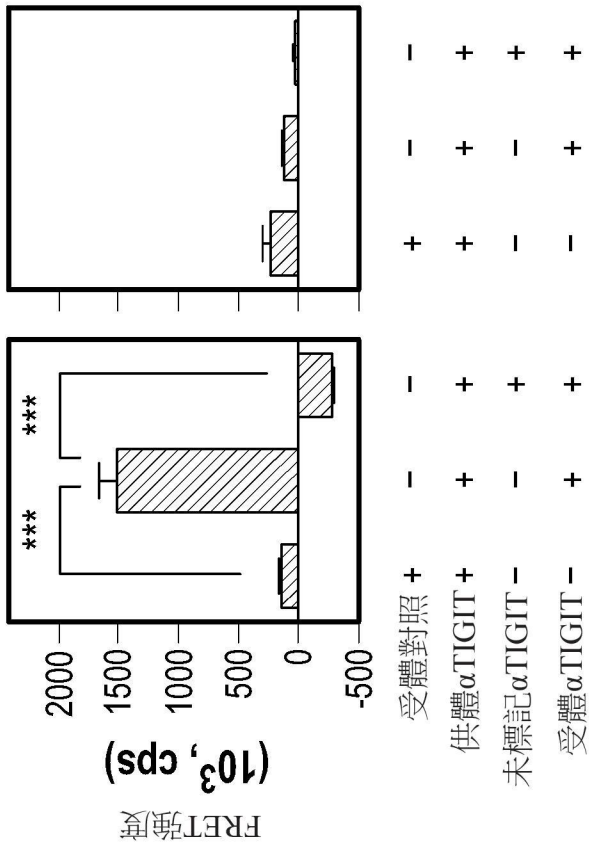


【圖29G】

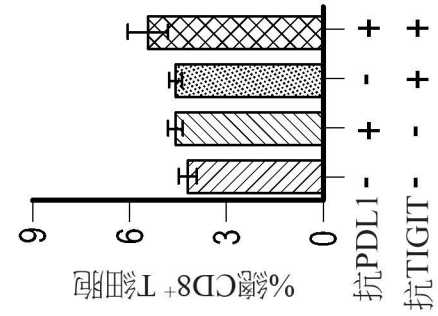


【圖29H】

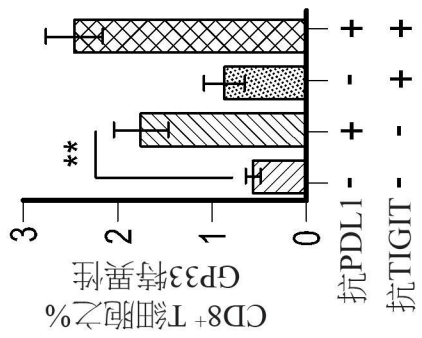
CD226+ TIGIT+ CD226+ TIGIT-



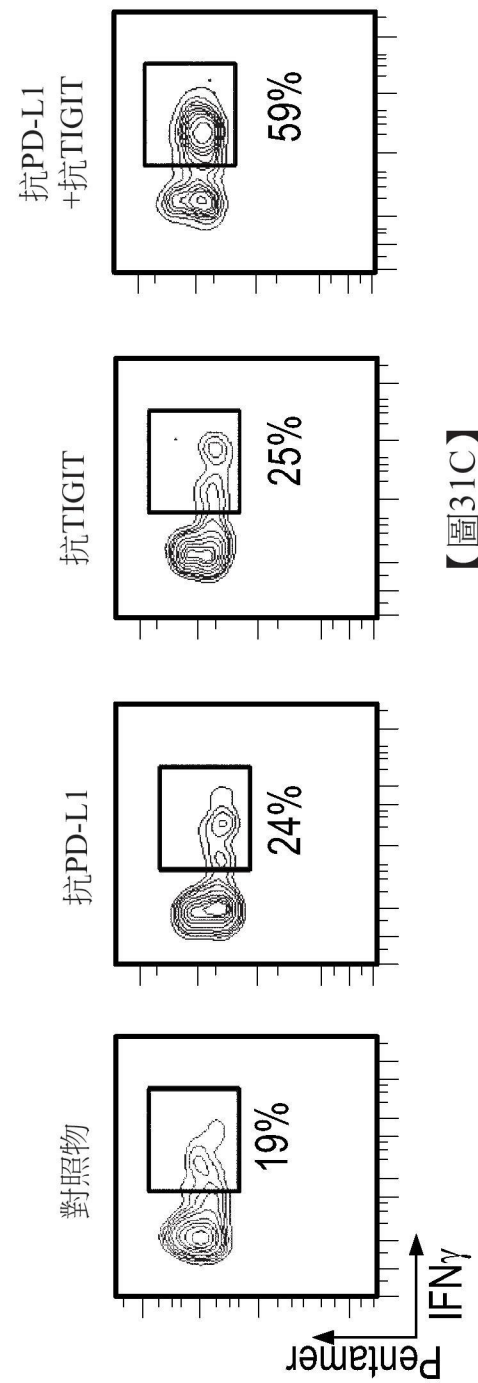
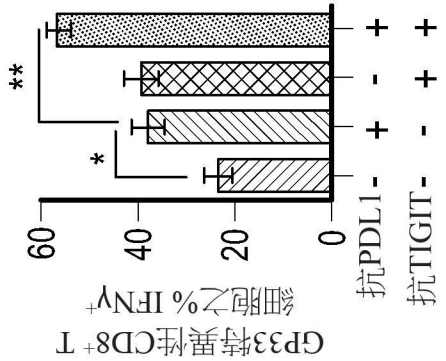
【圖30】



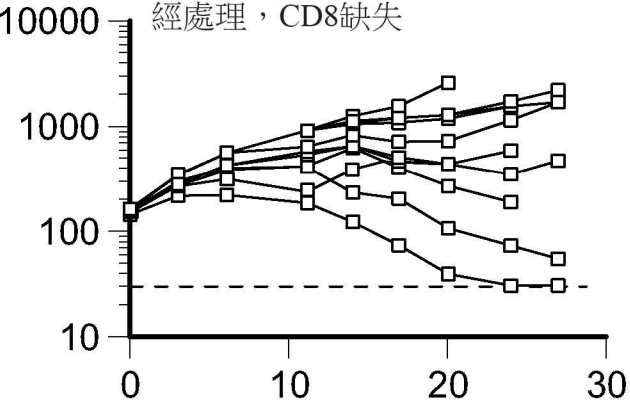
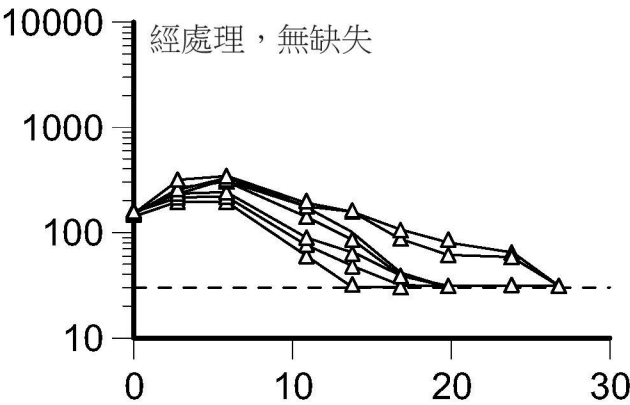
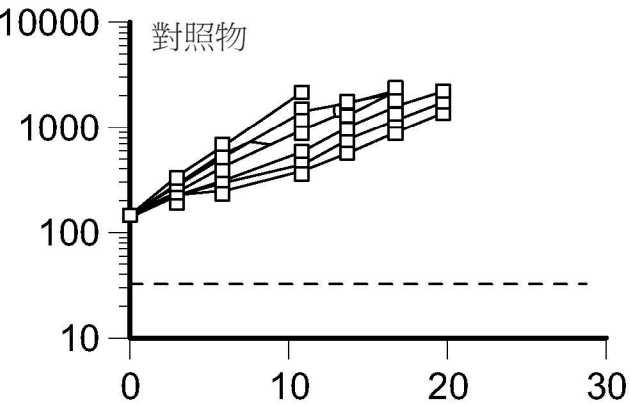
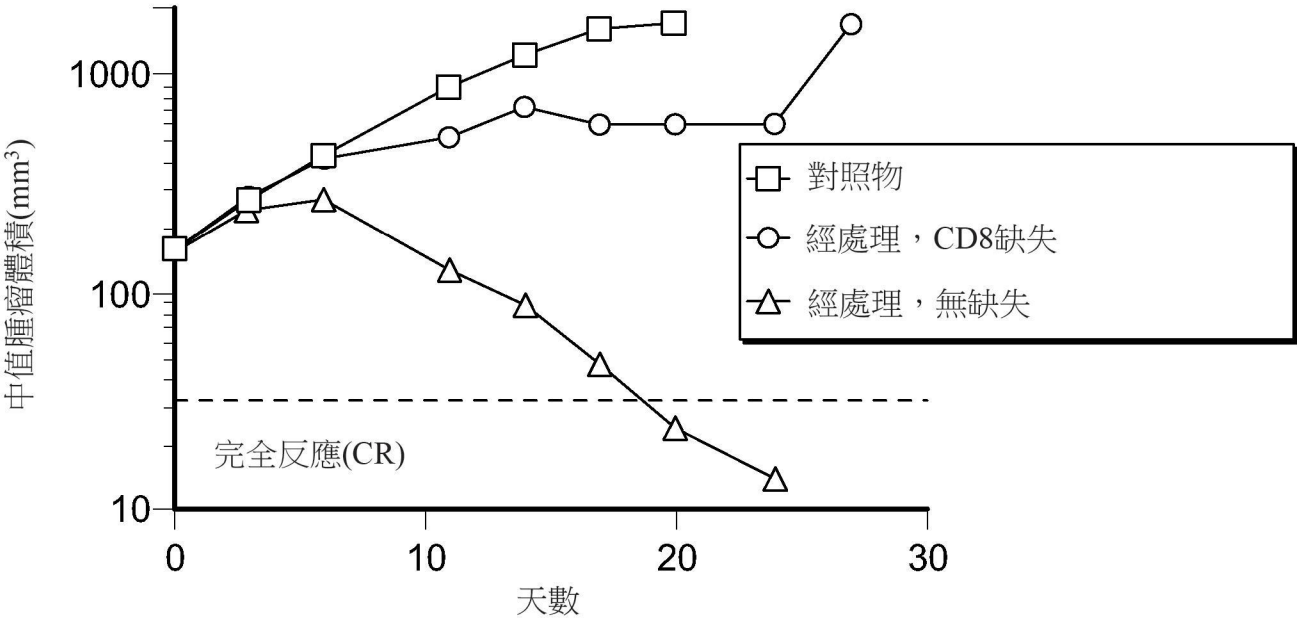
【圖31A】



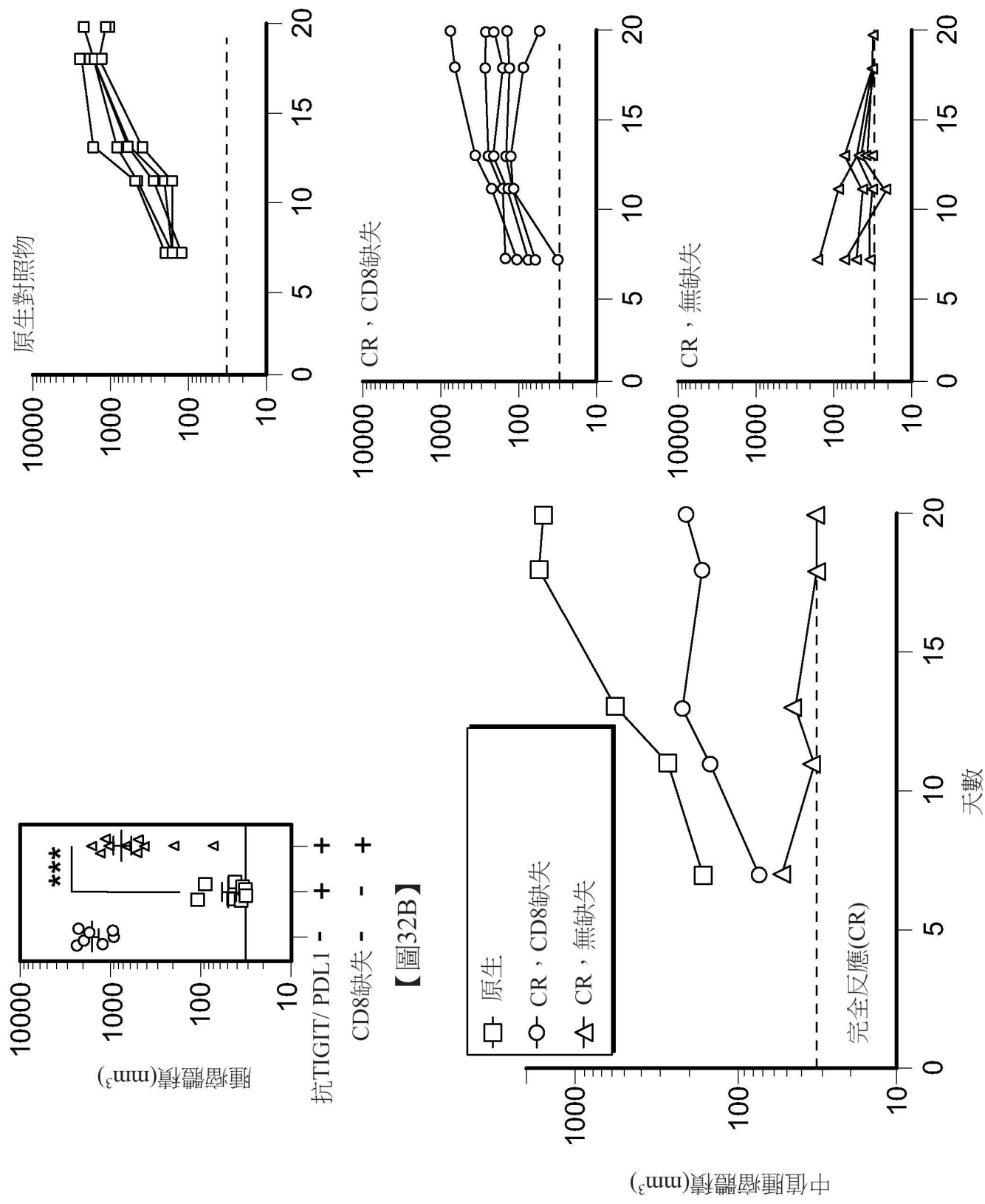
【圖31B】



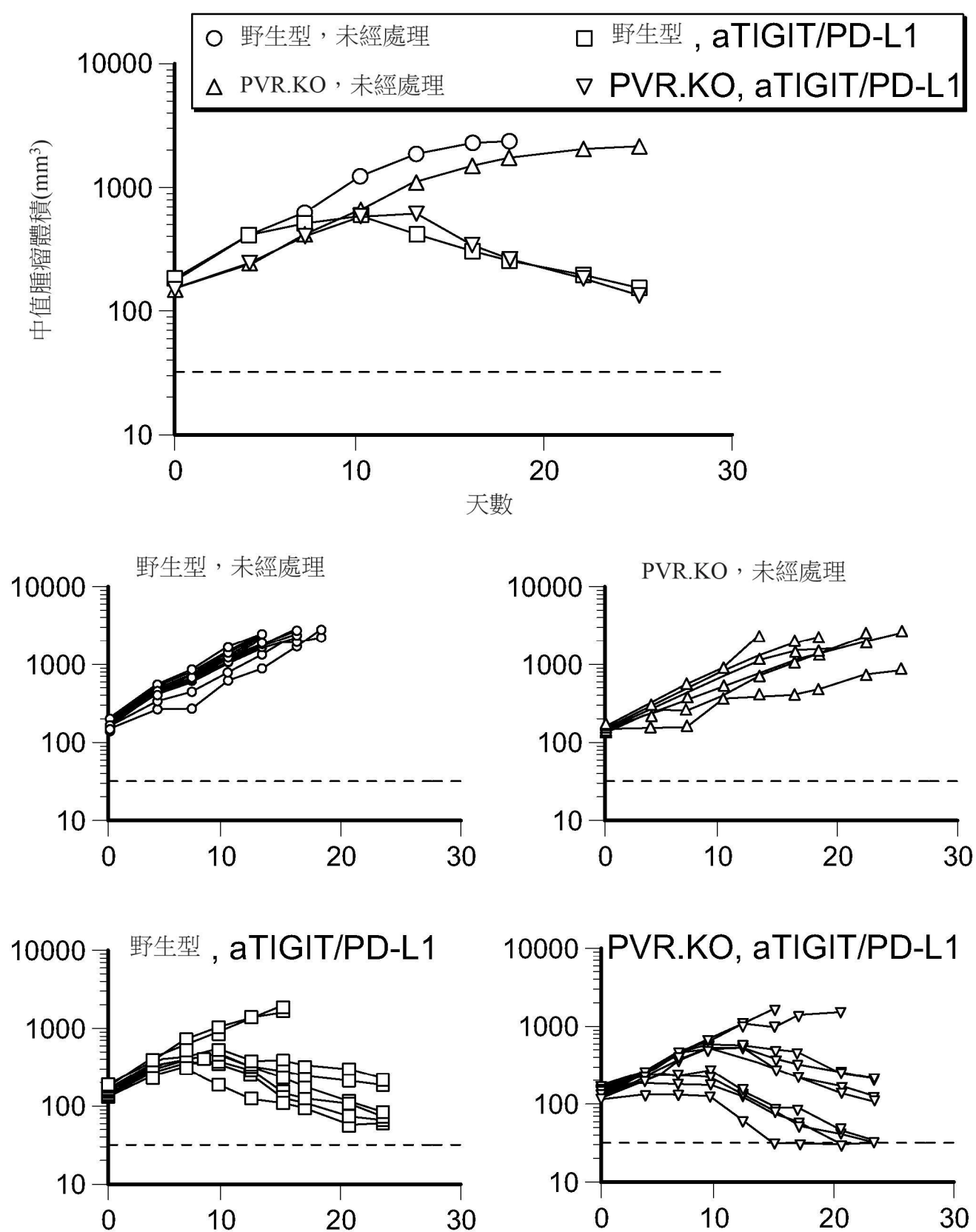
【圖31C】



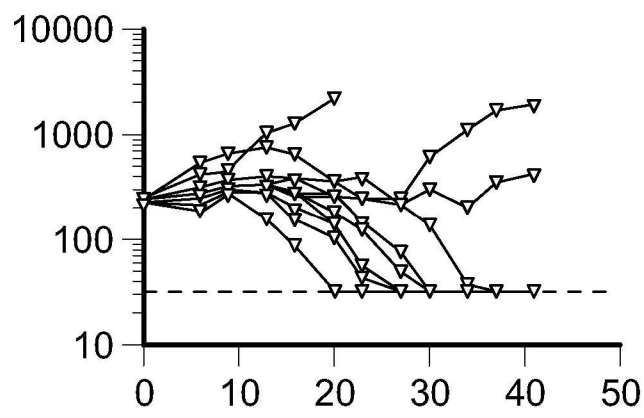
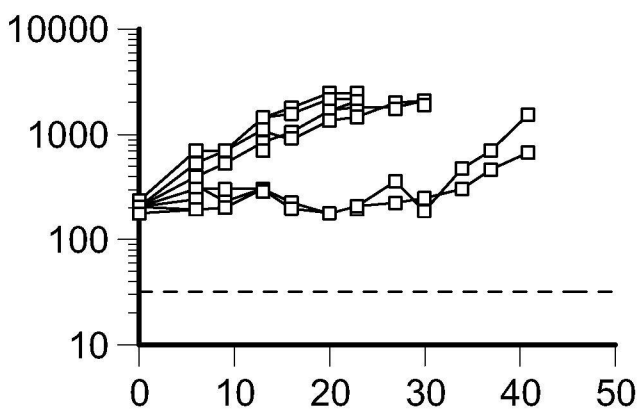
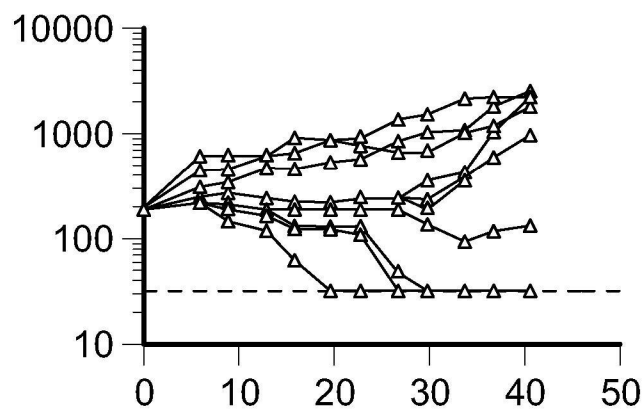
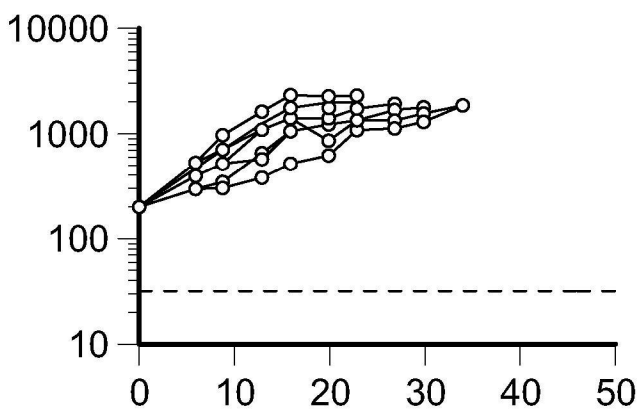
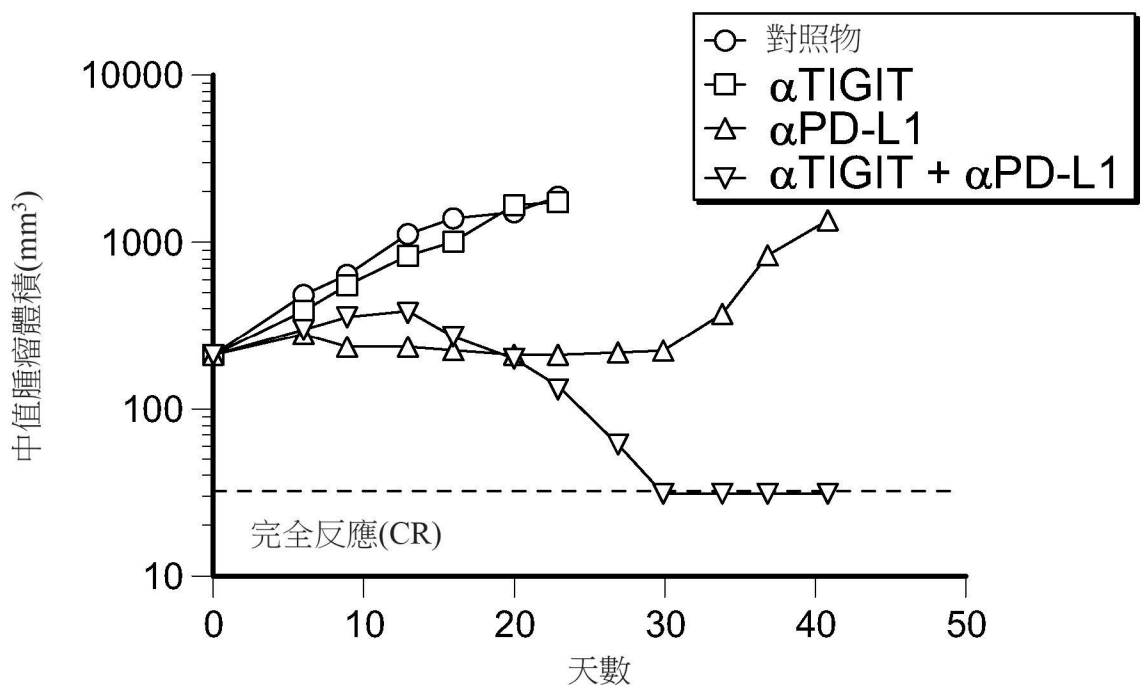
【圖32A】



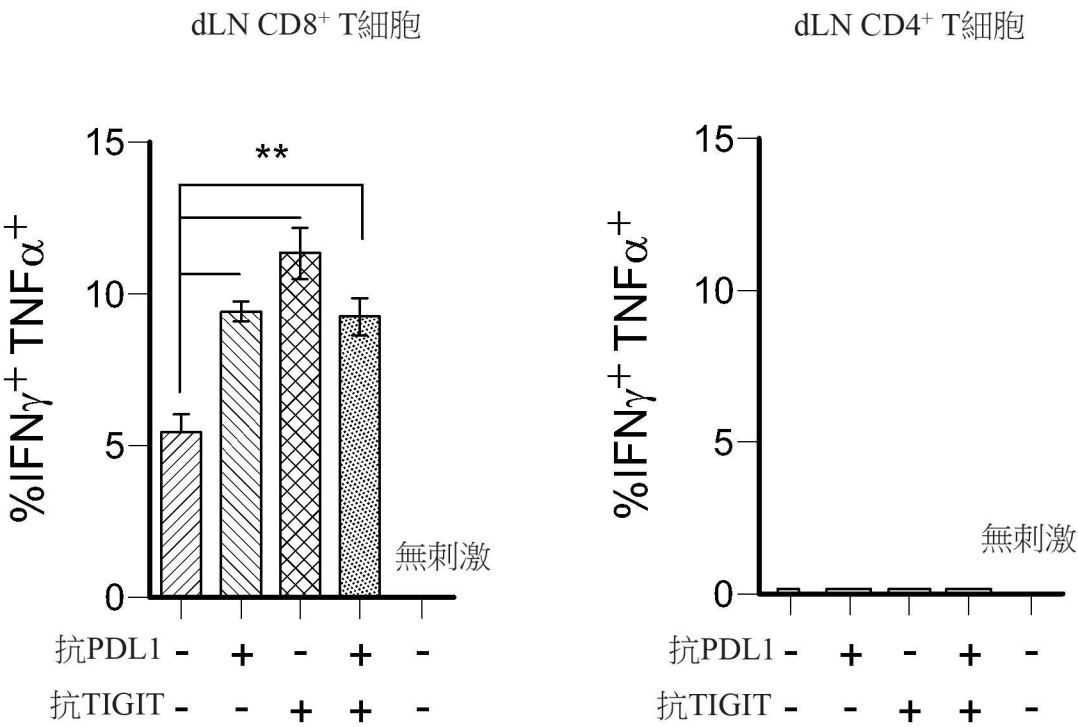
【圖32C】



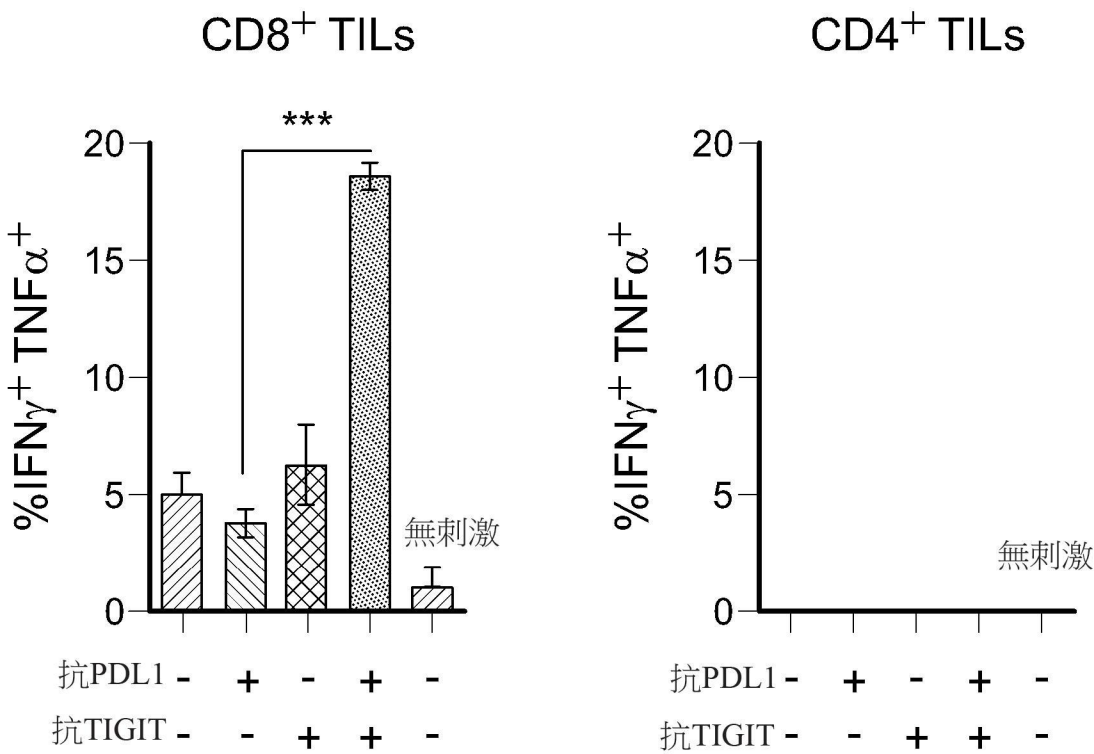
【圖33】



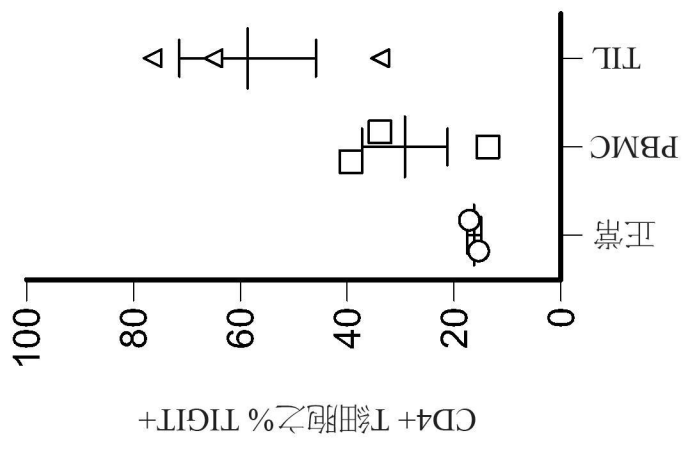
【圖34】



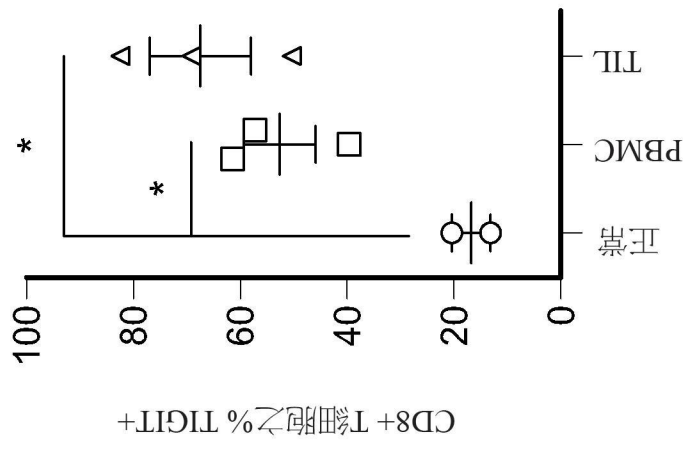
【圖35A】



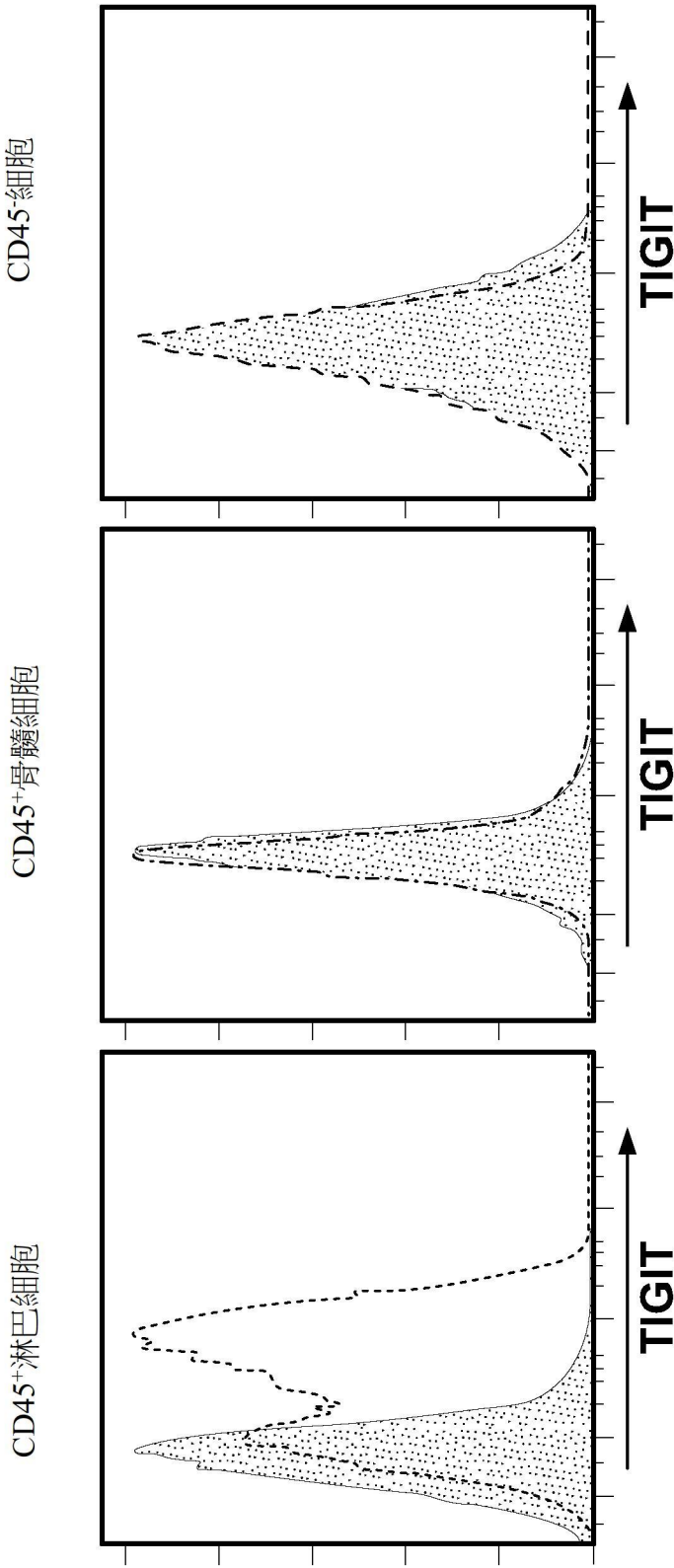
【圖35B】



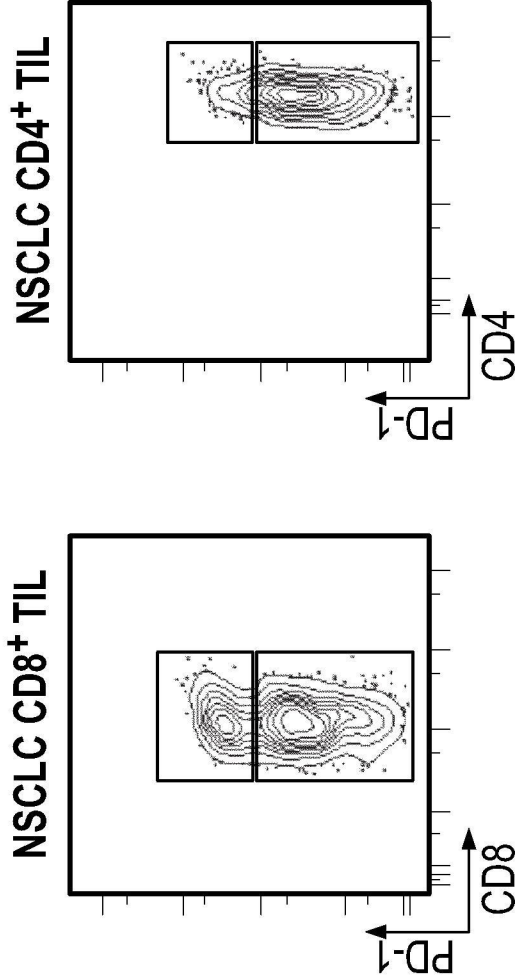
【圖36B】



【圖36A】



【圖37A】



【圖37B】