

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-532836
(P2024-532836A)

(43)公表日 令和6年9月10日(2024.9.10)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 C 0 8 6
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全73頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-509425(P2024-509425)		(71)出願人	519063026	
(86)(22)出願日	令和4年8月22日(2022.8.22)			中山康方生物医▲薬▼有限公司	
(85)翻訳文提出日	令和6年4月8日(2024.4.8)			AKESO BIOPHARMA, IN	
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/113882			C.	
(87)国際公開番号	WO2023/020625			中国▲広▼▲東▼省中山市火炬▲開▼▲	
(87)国際公開日	令和5年2月23日(2023.2.23)			發▼区神▲農▼路6号	
(31)優先権主張番号	202110961038.5			6 Shennong Road, Tor	
(32)優先日	令和3年8月20日(2021.8.20)			ch Development Zone	
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)			Zhongshan, Guangdon	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		(74)代理人	100099759	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(			弁理士 青木 篤	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		(74)代理人	100123582	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR			弁理士 三橋 真二	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		(74)代理人	100117019	
		最終頁に続く	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 抗T I G I T抗体及びT G F－β Rを含む融合タンパク質、並びにその医薬組成物及び使用

(57)【要約】

抗T I G I T抗体及びT G F－β Rを含む融合タンパク質、並びにその医薬組成物及び使用。具体的には、T I G I Tを標的とする第1タンパク質機能領域；及びT G F－β結合活性を有する第2タンパク質機能領域；を含む融合タンパク質であって、前記第1タンパク質機能領域が、抗T I G I T抗体又はその抗原結合性断片であり；前記抗T I G I T抗体の重鎖可変領域が、配列番号3～5のアミノ酸配列をそれぞれ有するH C D R 1～H C D R 3を含み、軽鎖可変領域が、配列番号8～10のアミノ酸配列をそれぞれ有するL C D R 1～L C D R 3を含む；融合タンパク質が開示される。融合タンパク質は、T I G I Tの阻害及びT G F－β濃度の減少を同時に可能にし、抗腫瘍薬の調製に対して優れた潜在能力を有する。

【選択図】図7

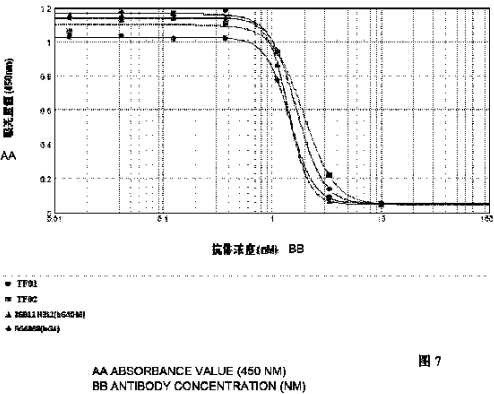


图7

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ＴＩＧＩＴを標的とする第１タンパク質機能領域；及び
ＴＧＦ－β結合活性を有する第２タンパク質機能領域；
を含む融合タンパク質であって、
前記第１タンパク質機能領域が、抗ＴＩＧＩＴ抗体又はその抗原結合性断片であり；
前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の重鎖可変領域が、配列番号３～５のアミノ酸配列をそれぞれ有するＨＣＤＲ１～ＨＣＤＲ３を含み、軽鎖可変領域が、配列番号８～１０のアミノ酸配列をそれぞれ有するＬＣＤＲ１～ＬＣＤＲ３を含む；
融合タンパク質。

10

【請求項 2】

前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の重鎖可変領域が、配列番号１、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、及び配列番号１７から選択されるアミノ酸配列を含み；
前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の軽鎖可変領域が、配列番号６、配列番号１９、配列番号２１、配列番号２３、及び配列番号２５から選択されるアミノ酸配列を含む；
請求項１に記載の融合タンパク質。

【請求項 3】

請求項１又は２のいずれか１項に記載の融合タンパク質であって、
前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の重鎖可変領域が、配列番号１のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号６のアミノ酸配列を含む；
前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の重鎖可変領域が、配列番号１１のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号１９のアミノ酸配列を含む；
前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の重鎖可変領域が、配列番号１７のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号１９のアミノ酸配列を含む；
前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の重鎖可変領域が、配列番号１３のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号２１のアミノ酸配列を含む；
前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の重鎖可変領域が、配列番号１３のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号２３のアミノ酸配列を含む；
前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の重鎖可変領域が、配列番号１５のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号２１のアミノ酸配列を含む；
前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の重鎖可変領域が、配列番号１５のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号２３のアミノ酸配列を含む；
前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の重鎖可変領域が、配列番号１１のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号２５のアミノ酸配列を含む；又は、
前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の重鎖可変領域が、配列番号１７のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号２５のアミノ酸配列を含む；
融合タンパク質。

20

30

【請求項 4】

前記抗ＴＩＧＩＴ抗体又はその抗原結合性断片が、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、Ｆ（ａｂ'）₂、Ｆｄ、Ｆｖ、ｄＡｂ、相補性決定領域断片、単鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、及びダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）から選択される、請求項１～３のいずれか１項に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 5】

前記抗ＴＩＧＩＴ抗体が、マウス以外の種に由来する、例えばヒト抗体に由来する非ＣＤＲ領域を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の重鎖定常領域が、Ｉｇガンマー１鎖Ｃ領域（ＮＣＢＩアクセッション番号Ｐ０１８５７等）又はＩｇガンマー４鎖Ｃ領域（ＮＣＢＩアクセッション番号Ｐ０１８６１．１等）であり、前記抗ＴＩＧＩＴ抗体の軽鎖定常領域が、Ｉｇカップ鎖Ｃ領域（ＮＣＢＩアクセッション番号Ｐ０１８３４等）である、請求項１～５のいずれか１

50

項に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

リガンド C D 1 5 5 - h F c - ビオチンに対する結合能が対照抗体 R G 6 0 5 8 (h G 4) よりも高い、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

前記融合タンパク質が、T I G I T - m F c に対し、0 . 0 8 n M 未満又は 0 . 1 0 n M 未満の E C 5 0 で結合し；好ましくは前記 E C 5 0 が間接 E L I S A によって測定される；請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

前記融合タンパク質が、T G F - β 1、T G F - β 2、又は T G F - β 3 に対し、0 . 3 n M 未満、0 . 4 n M 未満、0 . 5 n M 未満、又は 0 . 6 n M 未満の E C 5 0 で結合し、好ましくは前記 E C 5 0 が間接 E L I S A によって測定される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

前記抗 T I G I T 抗体が、China Center for Type Culture Collection (CCTCC) において CCTCC 番号 C 2 0 2 0 2 0 8 で寄託されているハイブリドーマ細胞株 L T 0 1 9 によって製造される抗体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

前記抗 T I G I T 抗体の重鎖定常領域が、E U 番号方式に基づき、次の変異の組み合わせ：

L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A ；

L 2 3 4 A 及び G 2 3 7 A ；

L 2 3 5 A 及び G 2 3 7 A ；又は、

L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び G 2 3 7 A ；

の 1 つを有する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 12】

前記第 2 タンパク質機能領域が、T G F - β 受容体、その細胞外領域、又は T G F - β 受容体機能を有する T G F - β 受容体細胞外領域の短縮断片であり；

好ましくは、前記 T G F - β 受容体が、T G F - β R I、T G F - β R I I、もしくは T G F - β R I I I であるか、T G F - β R I、T G F - β R I I、もしくは T G F - β R I I I の細胞外領域であるか、又は T G F - β R I、T G F - β R I I、もしくは T G F - β R I I I の細胞外領域の短縮断片であり；

好ましくは、前記第 2 タンパク質機能領域が、配列番号 3 3 ~ 3 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む；

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

前記抗 T I G I T 抗体の重鎖が配列番号 2 7 又は配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含み、軽鎖が配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

前記第 1 タンパク質機能領域と前記第 2 タンパク質機能領域とが直接又はリンカー断片を介して連結している、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 15】

前記リンカー断片が (G G G G S) n 又は (G G G G S) n G であり、n が正の整数であり、好ましくは n が 1、2、3、4、5、又は 6 である、請求項 1 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

前記第 1 タンパク質機能領域及び前記第 2 タンパク質機能領域の数が、それぞれ独立に 1 個、2 個、又はそれよりも多い個数である、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の融

10

20

30

40

50

合タンパク質。

【請求項 17】

前記 TGF- β 受容体又はその細胞外断片が、前記抗 TIGIT 抗体の重鎖の C 末端に連結している、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 18】

TIGIT を標的とする第 1 タンパク質機能領域；及び
TGF- β 結合活性を有する第 2 タンパク質機能領域；
を含む融合タンパク質であって、
前記第 1 タンパク質機能領域の数が 1 個であり、前記第 2 タンパク質機能領域の数が 2 個であり；
前記第 1 タンパク質機能領域が、抗 TIGIT 抗体又はその抗原結合性断片であり、前記第 2 タンパク質機能領域が、TGF- β 受容体、その細胞外領域、又は TGF- β 受容体機能を有する TGF- β 受容体細胞外領域の短縮断片であり；
前記抗 TIGIT 抗体の重鎖が、配列番号 27 又は配列番号 31 のアミノ酸配列を含み、軽鎖が配列番号 29 のアミノ酸配列を含み；
前記第 2 タンパク質機能領域が、配列番号 33 のアミノ酸配列を含み；
前記第 2 タンパク質機能領域が、前記抗 TIGIT 抗体の重鎖の C 末端にリンカー断片を介して連結しており；
好ましくは、前記リンカー断片が配列番号 44 のアミノ酸配列を含む；

10

融合タンパク質。

20

【請求項 19】

請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質をコードする、単離核酸分子。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の単離核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 21】

請求項 19 に記載の単離核酸分子又は請求項 20 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 22】

融合タンパク質部分及び結合物部分 (conjugated moiety) を含む複合体であって、前記融合タンパク質部分が請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質であり、前記結合物部分が検出可能な標識であり、好ましくは前記結合物部分が放射性同位体、蛍光物質、発光物質、着色物質、又は酵素である、複合体。

30

【請求項 23】

試料中の TIGIT 及び／又は TGF- β の存在又は濃度を検出するためのキットの調製における、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質又は請求項 22 に記載の複合体の使用。

【請求項 24】

請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質又は請求項 22 に記載の複合体を含む医薬組成物であって、前記医薬組成物が任意に、薬理学的に許容される担体及び／又は賦形剤をさらに含む、医薬組成物。

【請求項 25】

1 つ又は複数の抗腫瘍化学療法薬をさらに含む、請求項 24 に記載の医薬組成物であって、好ましくは、前記抗腫瘍化学療法薬がチロシンキナーゼ阻害剤であり、より好ましくは、前記抗腫瘍化学療法薬がアンロチニブもしくはその薬理学的に許容される塩（塩酸塩等）、又はレンバチニブもしくはその薬理学的に許容される塩（メシル酸塩等）である、医薬組成物。

40

【請求項 26】

前記医薬組成物の単位用量が、前記融合タンパク質の質量ベースで 100mg～1500mg、200mg～1000mg、200mg～800mg、300mg～600mg、400mg～500mg、又は 450mg である、請求項 24 又は 25 に記載の医薬組成物。

50

【請求項 27】

別個のパッケージ内の第1製品及び第2製品を含む組合せ製品であって、

前記第1製品が、請求項1～18のいずれか1項に記載の融合タンパク質、請求項22に記載の複合体、又は請求項24～26のいずれか1項に記載の医薬組成物を含み；

前記第2製品が、1つ又は複数の抗腫瘍化学療法薬を含み、好ましくは、前記抗腫瘍化学療法薬が、チロシンキナーゼ阻害剤であり、より好ましくは、前記抗腫瘍化学療法薬が、アンロチニブもしくはその薬理学的に許容される塩（塩酸塩等）、又はレンパチニブもしくはその薬理学的に許容される塩（メシル酸塩等）であり；

好ましくは、前記第1製品及び前記第2製品が、独立に、1つ又は複数の薬理学的に許容される副原料をさらに含み；

好ましくは、前記組合せ製品がさらに添付文書を含む；

組合せ製品。

10

【請求項 28】

前記第1製品の単位用量が、前記融合タンパク質の質量ベースで100mg～1500mg、200mg～1000mg、200mg～800mg、300mg～600mg、400mg～500mg、又は450mgである、請求項27に記載の組合せ製品。

【請求項 29】

前記第2製品の単位用量が、活性成分の質量ベースで0.1mg～100mg、0.5mg～50mg、1mg～20mg、2mg～15mg、4mg～12mg又は8mg～12mgである、請求項27又は28に記載の組合せ製品。

20

【請求項 30】

腫瘍の治療及び／又は予防のための薬剤の調製における、請求項1～18のいずれか1項に記載の融合タンパク質又は請求項22に記載の複合体の使用であって、

好ましくは、前記腫瘍が、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、乳がん、卵巣がん、大腸がん、黒色腫、膵臓がん、子宮頸がん、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、形質細胞腫、腎細胞がん、前立腺がん、及び膵管腺がんの1つ又は複数から選択され；

好ましくは、前記非小細胞肺癌が進行性非小細胞肺癌である；

使用。

【請求項 31】

腫瘍の治療及び／又は予防における使用のための、請求項1～18のいずれか1項に記載の融合タンパク質又は請求項22に記載の複合体であって、

好ましくは、前記腫瘍が、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、乳がん、卵巣がん、大腸がん、黒色腫、膵臓がん、子宮頸がん、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、形質細胞腫、腎細胞がん、前立腺がん、及び膵管腺がんの1つ又は複数から選択され；

好ましくは、前記非小細胞肺癌が進行性非小細胞肺癌である；

融合タンパク質又は複合体。

30

【請求項 32】

腫瘍を治療及び／又は予防するための方法であって、請求項1～18のいずれか1項に記載の融合タンパク質又は請求項22に記載の複合体の有効量を、前記治療及び／又は予防を必要とする対象に投与する工程を含み；

好ましくは、前記腫瘍が、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、乳がん、卵巣がん、大腸がん、黒色腫、膵臓がん、子宮頸がん、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、形質細胞腫、腎細胞がん、前立腺がん、及び膵管腺がんの1つ又は複数から選択され；

好ましくは、前記非小細胞肺癌が進行性非小細胞肺癌である；

方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は生物医学の分野に属し、抗TIGIT抗体及びTGF- β Rを含む融合タンパク質、並びにその医薬組成物及び使用に関する。

【背景技術】

【0002】

TIGIT (T細胞Ig及びITIMドメイン; WUCAM、Vstm3、又はVSIG9としても知られる) は、ポリオウイルス受容体 (PVR) / ネクチンファミリーのメンバーである。TIGITは、細胞外免疫グロブリン可変領域 (IgV) ドメイン、I型膜貫通ドメイン、並びに、古典的な免疫受容体チロシン依存性抑制モチーフ (ITIM) 及び免疫グロブリンテールチロシン (ITT) モチーフを有する細胞内ドメインからなる。TIGITは、リンパ球において、特に、エフェクター及び制御CD4+ T細胞 (Treg細胞)、濾胞ヘルパーCD4+ T細胞、エフェクターCD8+ T細胞や、ナチュラルキラー (NK) 細胞において、特に高度に発現している (Yu X, Harden K, Gonzalez LC, et al., The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells.[J]. Nature immunology, 2009, 10(1):48)。

10

【0003】

CD155 (PVR、Nect5、又はTage4としても知られる)、CD112 (PVRL2 / ネクチン2としても知られる)、及びCD113 (PVRL3としても知られる) は、TIGITが結合するリガンドであり (Martinet L, Smyth M J., Balancing natural killer cell activation through paired receptors.[J]. Nature Reviews Immunology, 2015, 15(4):243-254)、これらのうちCD155はTIGITに対する高親和性のリガンドである。NK細胞では、TIGITがリガンドCD155及びCD112へ結合すると、CD155及びCD112高発現細胞に対するNK細胞の殺傷効果が阻害される (Stanitsky N, Simic H, Arapovic J, et al., The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity.[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(42):17858-17863)。CD8+ T細胞の殺傷効果は、PD-1及びTIGITが同時にブロックされた場合に増強されることが報告されている (Johnston R J, Comps-Agrar L, Hackney J, et al., The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8+ T cell effector function.[J]. Cancer cell, 2014, 26(6):923-937)。近年の研究では、NK細胞の免疫チェックポイントとしてのTIGITが、腫瘍増殖過程においてNK細胞の消耗をもたらしていることが明らかになっている。また、抗TIGITモノクローナル抗体によってNK細胞の消耗を逆転させることが可能であり、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、乳がん、卵巣がん、大腸がん、黒色腫、膵臓がん、子宮頸がん、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、及び形質細胞腫などの各種腫瘍の免疫療法にそれら抗体を利用できることが示されている (Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al., Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity.[J]. Nature immunology, 2018, 19(7):723-732)。

20

30

40

【0004】

さらに、TIGITブロッカーは単独で、又はそれをPD-1ブロッカー及びCD96ブロッカーと組み合わせることで、野生型及びCD155-/-マウスモデルのB16メラノーマの増殖を有意に減少させることが報告された (Li X-Y, Das I, Lepletier A, et al., CD155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms. J Clin Invest, 2018, 128:2613-25)。CD112Rブロッカーは単独で、又はそれにTIGITブロッカー及び／又はPD-1ブロッカーを組み合わせることで、卵巣がん、子宮内膜がん、及び肺腫瘍におけるTILのサイトカイン産生能を高めることができた (Whelan S, Ophir E, Kotturi MF, et al., PVRL2 and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8+ T-cell function

50

. Cancer Immunol Res, 2019, 7:257-68)。

【0005】

トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) スーパーファミリーは機能的に多様なサイトカインのクラスであり、さらにTGF- β 、アクチビン、インヒビン、増殖分化因子 (GDF)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、Nodal、Lefty、及び抗Mullerianホルモンなどのサブファミリーに分けられる (表A)。TGF- β サブファミリーには3種のタンパク質、TGF- β 1、TGF- β 2、及びTGF- β 3がそれぞれ知られており、中でもTGF- β 1が最も高発現のサブタイプである。TGF- β 1、TGF- β 2、及びTGF- β 3が受容体に結合すると、Smad及び非Smadシグナル伝達経路を介して多様な生物学的応答が媒介される。その例として、上皮間葉移行 (EMT)、組織線維化促進 (pro-tissue fibrosis)、血管新生促進 (pro-angiogenesis)、腫瘍促進性免疫回避、並びに、がん阻害及び促進二重作用 (cancer inhibition and promotion dual action) が挙げられる (J Massague. TGF β in Cancer.[J]. Cell, 2008, 134(2):215-230)。

10

【0006】

TGF- β 受容体 (TGF- β R) は、ヒトの正常及び腫瘍細胞表面上に広範に分布し、3種の受容体スーパーファミリーを含む。これらのうち、古典的なTGF- β 受容体ファミリーI型はALK1~7を含み、TGF- β RI (T β RIとも呼ばれる) はALK5としても知られており；古典的なTGF- β 受容体ファミリーII型はTGF- β RII (T β RIIとも記される)、ActRII、ActRIIB、AMHRII、及びBMPRIIを含み；TGF- β 受容体スーパーファミリーIII型はベータグリカン (TGF- β RIIIとしても知られる) 及びエンドグリンを含み；TGF- β RI、TGF- β RII、及びTGF- β RIIIはそれぞれ、TGF- β 1、TGF- β 2、及びTGF- β 3に結合することができる (Pawlak John B, Blobe Gerard C, TGF- β superfamily co-receptors in cancer. DevDyn, 2021)。TGF- β ファミリー及び受容体を表Aに示す (Carl-Henrik Heldin1 and Aristidis Moustakas. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016に基づく総説による要約)。TGF- β RI及びTGF- β RIIは、セリン／スレオニンタンパク質キナーゼ受容体である。TGF- β RIIは、TGF- β シグナル伝達経路におけるシグナル伝達の鍵となる分子として、高い親和性でTGF- β に結合して、TGF- β RI二量体とヘテロ四量体受容体を形成することができ、その後、自己リン酸化によってリン酸化されてTGF- β RIを活性化する。活性化されたTGF- β RIは、下流のSmad経路関連タンパク質をリン酸化し、下流標的遺伝子の転写と翻訳を調節し、さらに、疾患と関連した生物学的応答を引き起こす。TGF- β RI及びTGF- β RIIと比較して、TGF- β RIIIはTGF- β に対する親和性が弱く、また、細胞内セグメントを有しない。そのため、下流シグナル伝達経路へと接続されない。TGF- β RIIIの機能は、TGF- β を捕捉し、TGF- β RIIに対して提示することである。他のTGF- β 受容体もTGF- β に結合することができる (Sang Xiaohong et al., Advances in researches on small molecule inhibitors targeting TGF- β and receptors.[J]. Journal of Pharmacy, 2019(9))。

20

30

40

50

【表 1-1】

表A：TGF-βファミリー及び受容体

タンパク質名	遺伝子名	他の名称	受容体	
TGF-β ₁	TGFβ ₁	CIF-A（軟骨誘導因子-A）、分化阻害因子	ActRL1/ALK-1； TβRI/ALK-5	TβRII
TGF-β ₂	TGFβ ₂	G-TsF（神経膠芽腫由来T細胞抑制性因子）、BSC-1GI（BSC-1細胞増殖阻害因子）、ポリエルギン、CIF-B（軟骨誘導因子-B）		
TGF-β ₃	TGFβ ₃			
インヒビンα	INH A	インヒビンA	ActRIB/ALK-4	ActRIIB； ActRII
インヒビンβA	INH B A	FRP（卵巣刺激ホルモン放出タンパク質）、EDF（赤芽球分化誘導因子）、XTC-MIF（Xenopus XTC細胞中胚葉誘導因子）	ActRIB/ALK-4；ActRIC/ALK-7	
インヒビンβB	INH B B	インヒビンB及びアクチビンB又はAB、a、b XTC-MIF		
インヒビンβC	INH B C	アクチビンCc		
インヒビンβE	INH B E	アクチビンEc		
Nodal	NODAL	BMP-16	ActRIB/ALK-4	ActRIIB； ActRII
ミオスタチン	MSTN	GDF-8	TβRI/ALK-5；ActRIB/ALK-4	ActRIIB
BMP-2	BMP2		BMPRIA/ALK-3；BMPRIB/ALK-6	BMPRII； ActRIIB； ActRII
BMP-3	BMP3	オステオゲニン		
BMP-4	BMP4	BMP-2B	BMPRIA/ALK-3；BMPRIB/ALK-6	BMPRII； ActRIIB； ActRII
BMP-5	BMP5		BMPRIB/ALK-6；BMPRIA/ALK-3；ActRIA/ALK-2	BMPRII； ActRIIB； ActRII
BMP-6	BMP6	Vgr1（Vg1関連タンパク質）	BMPRIB/ALK-6；BMPRIA/ALK-3；ActRIA/ALK-2	BMPRII； ActRIIB； ActRII
BMP-7	BMP7	OP-1（骨形成タンパク質-1）	BMPRIB/ALK-6；BMPRIA/ALK-3；ActRIA/ALK-2	BMPRII； ActRIIB； ActRII
BMP-8A	BMP8A	OP-2	BMPRIB/ALK-6；BMPRIA/ALK-3；ActRIA/ALK-2	BMPRII； ActRIIB； ActRII

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

BMP-8B	BMP8B	OP-3	BMPRII/ALK-6; BMPRIA/ALK-3; ActRIA/ALK-2	BMPRII; ActRIIB; ActRII
BMP-9	GDF2	GDF-2	BMPRII/ALK-6; ActRLI/ALK-1	BMPRII; ActRIIB; ActRII
BMP-10	BMP10		BMPRII/ALK-6; ActRLI/ALK-1	BMPRII; ActRIIB; ActRII
GDF-1	GDF1		ActRII/ALK-4; ActRIC/ALK-7	ActRIIB; ActRII
GDF-3	GDF3	Vgr2	ActRII/ALK-4; ActRIC/ALK-7	ActRIIB; ActRII
GDF-5	GDF5	CDMP-1 (軟骨由来形態形成タンパク質-1)、BMP-14	BMPRII/ALK-6; BMPRIA/ALK-3	BMPRII; ActRIIB; ActRII
GDF-6	GDF6	CDMP-2、BMP-13	BMPRII/ALK-6; BMPRIA/ALK-3	BMPRII; ActRIIB; ActRII
GDF-7	GDF7	CDMP-3、BMP-12	BMPRII/ALK-6; BMPRIA/ALK-3	BMPRII; ActRIIB; ActRII
GDF-9	GDF9	GDF-9A	TβRI/ALK-5; ActRII/ALK-4; ActRIC/ALK-7	ActRIIB
GDF-9B	BMP15	BMP-15	BMPRII/ALK-6	
GDF-10	GDF10	BMP-3b	ActRII/ALK-4; ActRIC/ALK-4	ActRII
GDF-11	GDF11	BMP-11	TβRI/ALK-5; ActRII/ALK-4	ActRIIB; ActRII
GDF-15	GDF15	胎盤TGF-β、胎盤BMP (PLAB)、PDF (前立腺由来因子)、NAG-1 (非ステロイド性抗炎症薬活性化遺伝子-1)、MIC-1 (マクロファージ阻害性サイトカイン-1)	BMPRIA/ALK-3	ActRIIB
MIS (ミュー管抑制物質)	AMH	AMH (抗ミュー管ホルモン)	ActRIA/ALK-2;	AMHRII
LeftyA	LEFTY2	EBAF (子宮内膜出血関連因子)、TGF-β4、Stra3		
LeftyB	LEFTY1			

【0007】

腫瘍の進行中には、腫瘍細胞、間葉線維芽細胞、及び他の細胞が、多量のTGF-βを腫瘍微小環境 (TME) 中に分泌し、免疫抑制を媒介する。TGF-βは、ナイーブT細胞が、抗腫瘍活性を媒介するTh1へと分化するのを阻害し、TGF-βRII欠失T細胞は増強されたTh1応答を有する (Eduard, Battle, Joan, et al., Transforming Growth Factor-β Signaling in Immunity and Cancer.[J]. Immunity, 2019)。腫瘍殺傷活性を有するエフェクターT細胞のグランザイムA、グランザイムB、パーフォリン、γ-インターフェロン (IFN-γ)、及びFasLは、TGF-βの活性下で発現量が減少し、その結果、腫瘍細胞の免疫回避が生ずる。Tregは、腫瘍微小環境

(TME)による腫瘍免疫抑制を媒介する鍵となる細胞であり、腫瘍殺傷活性を有するエフェクターT細胞の機能を阻害することができる。腫瘍細胞によって産生されたTGF- β は、多量のTregをTME中に生じさせ、腫瘍抗原に対する寛容性を高め、腫瘍免疫回避の生成を促進する(Chen Dan, Ran Yan. Advance in researches on the regulation and control of tumor cells and tumor-associated immune cells by TGF- β . [J]. Modern Medicine & Health, 2020, 36(09):1354-1358)。現在臨床試験中の、TGF- β 分子を標的とする、研究中の抗体医薬は、黒色腫、腎細胞がん、乳がん、子宮頸がん、進行性非小細胞肺がん、前立腺がん、膵管腺がん、進行性固形腫瘍、及び転移性固形腫瘍を適応症とする。

【0008】

Fc受容体は、特定の免疫細胞の表面上で発現する免疫グロブリンファミリーに属し、抗体Fc領域を認識して免疫応答を媒介する。Fab領域が抗原を認識すると、抗体のFc領域が免疫細胞(キラー細胞など)上のFc受容体に結合して、その免疫細胞の応答機能、例えば食作用やADCCなどを開始させる。

【0009】

Fc受容体が認識する抗体の種類、及び発現細胞の種類により、Fc受容体は主にFc γ R、Fc α R、及びFc ϵ Rの3種に分類される。Fc γ Rはさらに、Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)、Fc γ RIII(CD16)、及びFcRn(新生児Fc受容体)の4つのサブタイプに分類することができる。これらのうち、Fc γ RI、Fc γ RII、及びFc γ RIIIは、ADCC効果と密接に関連している。Fc γ RIIIはADCCを媒介する最も優勢な分子であり、異なる細胞型において、高度に相同な2つのサブタイプ、Fc γ RIIIa及びFc γ RIIIbがある。Fc γ RIIIa集団には、高親和性のFc γ RIIIa__V158、及び低親和性のFc γ RIIIa__F158という、一塩基多型(SNP)の部位で区別される2つのサブタイプが存在する。Fc γ RIはIgGのFc領域に対して高い親和性を有し、ADCCプロセスに関与する。Fc γ RIIはFc γ RIIa、Fc γ RIIb、及びFc γ RIIc(それぞれCD32a、CD32b、及びCD32cとも称される)という3つのサブタイプを含み、これらのうちFc γ RIIaはADCC活性を有する。Fc γ RIIaについては、一塩基変異により、Fc γ RIIa__H131及びFc γ RIIa__R131という2つのサブタイプがヒトに存在する。Fc γ RIIbは抑制性受容体であり、近傍のITAM経路を阻害する典型的な抑制性Fc γ Rである。例えば、BCRへの免疫複合体の結合後、Fc断片は同じ細胞上のFc γ RIIbへ結合し、B細胞活性化を負に調節し、抗体及びサイトカインの分泌を減少させる(Hogarth PM, Pietersz GA., 2012, NATURE R E VIEWS DRUG DISCOVERY, 11(4):311-331)。

【0010】

現在、TIGIT及びTGF- β シグナル伝達経路の両者を阻害する薬物の開発が必要とされている。

【発明の概要】

【0011】

本願発明者らは鋭意研究を重ね、創造的な努力を行うことによって、抗TIGIT抗体及びTGF- β Rを含む融合タンパク質を作製し、驚くべきことに、この融合タンパク質が、TIGIT及びTGF- β に効果的に同時に結合可能であり、抗腫瘍薬の調製におけるポテンシャルを有することを見出した。本発明を以下に詳細に説明する。

【0012】

本発明の一態様は、
TIGITを標的とする第1タンパク質機能領域；及び
TGF- β 結合活性を有する第2タンパク質機能領域；
を含む融合タンパク質であって、
前記第1タンパク質機能領域が、抗TIGIT抗体又はその抗原結合性断片であり；
前記抗TIGIT抗体の重鎖可変領域が、配列番号3～5のアミノ酸配列をそれぞれ有

10

20

30

40

50

するHCDR1～HCDR3を含み、軽鎖可変領域が、配列番号8～10のアミノ酸配列をそれぞれ有するLCDR1～LCDR3を含む；

融合タンパク質に関する。

【0013】

本発明のいくつかの実施形態では、

前記抗TIGIT抗体の重鎖可変領域が、配列番号1、配列番号11、配列番号13、配列番号15、及び配列番号17から選択されるアミノ酸配列を含み；

前記抗TIGIT抗体の軽鎖可変領域が、配列番号6、配列番号19、配列番号21、配列番号23、及び配列番号25から選択されるアミノ酸配列を含む；

融合タンパク質が提供される。

10

【0014】

本発明のいくつかの実施形態では、

前記抗TIGIT抗体の重鎖可変領域が、配列番号1のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号6のアミノ酸配列を含む；

前記抗TIGIT抗体の重鎖可変領域が、配列番号11のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号19のアミノ酸配列を含む；

前記抗TIGIT抗体の重鎖可変領域が、配列番号17のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号19のアミノ酸配列を含む；

前記抗TIGIT抗体の重鎖可変領域が、配列番号13のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号21のアミノ酸配列を含む；

20

前記抗TIGIT抗体の重鎖可変領域が、配列番号13のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号23のアミノ酸配列を含む；

前記抗TIGIT抗体の重鎖可変領域が、配列番号15のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号21のアミノ酸配列を含む；

前記抗TIGIT抗体の重鎖可変領域が、配列番号15のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号23のアミノ酸配列を含む；

前記抗TIGIT抗体の重鎖可変領域が、配列番号11のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号25のアミノ酸配列を含む；又は、

前記抗TIGIT抗体の重鎖可変領域が、配列番号17のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が、配列番号25のアミノ酸配列を含む；

30

融合タンパク質が提供される。

【0015】

本発明のいくつかの実施形態では、前記抗TIGIT抗体又はその抗原結合性断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、相補性決定領域断片、単鎖抗体(single chain antibody)、ヒト化抗体、キメラ抗体、及びダイアボディ(diabody)から選択される、融合タンパク質が提供される。

【0016】

本発明のいくつかの実施形態では、前記抗TIGIT抗体が、マウス以外の種に由来する、例えばヒト抗体に由来する非CDR領域を含む、融合タンパク質が提供される。

【0017】

40

本発明のいくつかの実施形態では、前記抗TIGIT抗体の重鎖定常領域が、Igガンマー1鎖C領域(NCBIアクセッション番号P01857等)又はIgガンマー4鎖C領域(NCBIアクセッション番号P01861.1等)であり、軽鎖定常領域が、Igカッパ鎖C領域(NCBIアクセッション番号P01834等)である、融合タンパク質が提供される。

【0018】

本発明のいくつかの実施形態では、リガンドCD155-hFc-ビオチンに対する結合能が対照抗体RG6058(hG4)よりも高い融合タンパク質が提供される。

【0019】

本発明のいくつかの実施形態では、前記融合タンパク質が、TIGIT-mFcに対し

50

、0.08 nM未満又は0.10 nM未満のEC₅₀で結合し、好ましくは前記EC₅₀が間接ELISAによって測定される、融合タンパク質が提供される。

【0020】

本発明のいくつかの実施形態では、前記融合タンパク質が、TGF-β1、TGF-β2、及び／又はTGF-β3に対し、0.3 nM未満、0.4 nM未満、0.5 nM未満、又は0.6 nM未満のEC₅₀で結合し、好ましくは前記EC₅₀が間接ELISAによって測定される、融合タンパク質が提供される。

【0021】

本発明のいくつかの実施形態では、前記抗TIGIT抗体が、China Center for Type Culture Collection (CCTCC)においてCCTCC番号C2020208で寄託されているハイブリドーマ細胞株LT019によって製造される抗体である、融合タンパク質が提供される。

【0022】

本発明のいくつかの実施形態では、前記抗TIGIT抗体の重鎖定常領域が、EU番号方式に基づき、次の変異の組み合わせ：

L234A及びL235A；

L234A及びG237A；

L235A及びG237A；又は、

L234A、L235A、及びG237A；

の1つを有する、融合タンパク質が提供される。

【0023】

本発明のいくつかの実施形態では、

前記第2タンパク質機能領域が、TGF-β受容体、その細胞外領域、又はTGF-β受容体機能を有するTGF-β受容体細胞外領域の短縮断片であり；

好ましくは、前記TGF-β受容体が、TGF-βRI、TGF-βRII、もしくはTGF-βRIIIであるか、TGF-βRI、TGF-βRII、もしくはTGF-βRIIIの細胞外領域であるか、又はTGF-βRI、TGF-βRII、もしくはTGF-βRIIIの細胞外領域の短縮断片 (a truncated fragment) であり；

好ましくは、前記第2タンパク質機能領域が、配列番号33～39のいずれか1つのアミノ酸配列を含む；

融合タンパク質が提供される。

【0024】

本発明のいくつかの実施形態では、前記抗TIGIT抗体の重鎖が配列番号27又は配列番号31のアミノ酸配列を含み、軽鎖が配列番号29のアミノ酸配列を含む、融合タンパク質が提供される。

【0025】

本発明のいくつかの実施形態では、前記第1タンパク質機能領域と前記第2タンパク質機能領域とが直接又はリンカー断片を介して連結している、融合タンパク質が提供される。

【0026】

本発明のいくつかの実施形態では、前記リンカー断片が(GGGGS)_n又は(GGGGS)_nGであり、_nが正の整数であり、好ましくは_nが1、2、3、4、5、又は6である、融合タンパク質が提供される。

【0027】

本発明のいくつかの実施形態では、前記第1タンパク質機能領域及び前記第2タンパク質機能領域の数が、それぞれ独立に1個、2個、又はそれよりも多い個数である、融合タンパク質が提供される。

【0028】

本発明のいくつかの実施形態では、前記TGF-β受容体又はその細胞外断片が、前記

抗 T I G I T 抗体の重鎖の C 末端に連結している、融合タンパク質が提供される。

【0029】

本発明は、

T I G I T を標的とする第 1 タンパク質機能領域；及び

T G F - β 結合活性を有する第 2 タンパク質機能領域；

を含む融合タンパク質であって、

前記第 1 タンパク質機能領域の数が 1 個であり、前記第 2 タンパク質機能領域の数が 2 個であり；

前記第 1 タンパク質機能領域が、抗 T I G I T 抗体又はその抗原結合性断片であり、前記第 2 タンパク質機能領域が、T G F - β 受容体、その細胞外領域、又は T G F - β 受容体機能を有する T G F - β 受容体細胞外領域の短縮断片であり；

前記抗 T I G I T 抗体の重鎖が配列番号 27 又は配列番号 31 のアミノ酸配列を含み、軽鎖が配列番号 29 のアミノ酸配列を含み；

前記第 2 タンパク質機能領域が、配列番号 33 のアミノ酸配列を含み；

前記第 2 タンパク質機能領域が、前記抗 T I G I T 抗体の重鎖の C 末端にリンカー断片を介して連結しており；

好ましくは、前記リンカー断片が配列番号 44 のアミノ酸配列を含む；

融合タンパク質に関する。

【0030】

本発明のいくつかの実施形態では、前記融合タンパク質は腫瘍の治療及び／又は予防のために使用され、

好ましくは、前記腫瘍は、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、乳がん、卵巣がん、大腸がん、黒色腫、膵臓がん、子宮頸がん、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、B 細胞リンパ腫、形質細胞腫、腎細胞がん、前立腺がん、及び膵管腺がんの 1 つ又は複数から選択され；

好ましくは、前記非小細胞肺癌は進行性非小細胞肺癌である。

【0031】

広義には、本発明の融合タンパク質を抗体と称してよい。

【0032】

本発明の他の一態様は、本発明のいずれかの実施形態の融合タンパク質をコードする、単離核酸分子に関する。

【0033】

本発明のさらなる他の一態様は、本発明の単離核酸分子を含むベクターに関する。

【0034】

本発明のさらなる他の一態様は、本発明の単離核酸分子又は本発明のベクターを含む、宿主細胞に関する。

【0035】

本発明のさらなる他の一態様は、融合タンパク質部分及び結合物部分 (conjugated moiety) を含む複合体であって、前記融合タンパク質部分が本発明のいずれかの実施形態の融合タンパク質であり、前記結合物部分が検出可能な標識であり、好ましくは前記結合物部分が放射性同位体、蛍光物質、発光物質、着色物質、又は酵素である、複合体に関する。

【0036】

本発明のいくつかの実施形態では、前記複合体は腫瘍の治療及び／又は予防のために使用され、

好ましくは、前記腫瘍は、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、乳がん、卵巣がん、大腸がん、黒色腫、膵臓がん、子宮頸がん、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、B 細胞リンパ腫、形質細胞腫、腎細胞がん、前立腺がん、及び膵管腺がんの 1 つ又は複数から選択され；

好ましくは、前記非小細胞肺癌は進行性非小細胞肺癌である。

【0037】

本発明のさらなる他の一態様は、試料中のTIGIT及び／又はTGF- β の存在又は濃度を検出するためのキットの調製（preparation）における、本発明の融合タンパク質又は本発明の複合体の使用に関する。

【0038】

本発明のさらなる他の一態様は、本発明のいずれかの実施形態の融合タンパク質又は本発明の複合体を含む医薬組成物であって、前記医薬組成物が任意に、薬理学的に許容される担体及び／又は賦形剤をさらに含む、医薬組成物に関する。

【0039】

本発明のいくつかの実施形態では、前記医薬組成物は1つ又は複数の抗腫瘍化学療法薬をさらに含み、好ましくは、前記抗腫瘍化学療法薬はチロシンキナーゼ阻害剤であり、より好ましくは、前記抗腫瘍化学療法薬はアンロチニブもしくはその薬理学的に許容される塩（塩酸塩等）、又はレンバチニブもしくはその薬理学的に許容される塩（メシル酸塩等）である。

10

【0040】

本発明のいくつかの実施形態では、前記医薬組成物の単位用量が、前記融合タンパク質の質量ベースで100mg～1500mg、200mg～1000mg、200mg～800mg、300mg～600mg、400mg～500mg、又は450mgである、医薬組成物が提供される。

【0041】

20

本発明のいくつかの実施形態では、前記医薬組成物は注射剤である。

【0042】

本発明のさらなる他の一態様は、

別個のパッケージ内の第1製品及び第2製品を含む組合せ製品であって、

前記第1製品が、本発明のいずれかの実施形態の融合タンパク質、本発明の複合体、又は本発明のいずれかの実施形態の医薬組成物を含み；

前記第2製品が、1つ又は複数の抗腫瘍化学療法薬を含み、好ましくは、前記抗腫瘍化学療法薬がチロシンキナーゼ阻害剤であり、より好ましくは、前記抗腫瘍化学療法薬がアンロチニブもしくはその薬理学的に許容される塩（塩酸塩等）、又はレンバチニブもしくはその薬理学的に許容される塩（メシル酸塩等）であり；

30

好ましくは、前記第1製品及び前記第2製品が、独立に、1つ又は複数の薬理学的に許容される副原料（auxiliary materials）をさらに含み；

好ましくは、前記組合せ製品がさらに添付文書を含む；
組合せ製品に関する。

【0043】

本発明のいくつかの実施形態では、前記第1製品の単位用量が、前記融合タンパク質の質量ベースで100mg～1500mg、200mg～1000mg、200mg～800mg、300mg～600mg、400mg～500mg、又は450mgである、組合せ製品が提供される。

【0044】

40

本発明のいくつかの実施形態では、前記第2製品の単位用量が、活性成分の質量ベースで0.1mg～100mg、0.5mg～50mg、1mg～20mg、2mg～15mg、4mg～12mg又は8mg～12mgである、組合せ製品が提供される。

【0045】

本発明のいくつかの実施形態では、前記第1製品及び前記第2製品が独立に注射剤である、治療用組合せ（therapeutic combination）が提供される。

【0046】

本発明のさらなる他の一態様は、腫瘍の治療及び／又は予防のための薬剤の調製における、本発明のいずれかの実施形態の融合タンパク質又は本発明の複合体の使用であって、好ましくは、前記腫瘍が、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、乳がん、卵巣がん、大腸が

50

ん、黒色腫、膵臓がん、子宮頸がん、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、形質細胞腫、腎細胞がん、前立腺がん、及び膵管腺がんの1つ又は複数から選択され；

好ましくは、前記非小細胞肺がんが進行性非小細胞肺がんである；
使用に関する。

【0047】

本発明のさらなる他の一態様は、腫瘍を治療及び／又は予防するための方法であって、本発明のいずれかの実施形態の融合タンパク質又は本発明の複合体の有効量を、前記治療及び／又は予防を必要とする対象に投与する工程を含み；

好ましくは、前記腫瘍が、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、乳がん、卵巣がん、大腸がん、黒色腫、膵臓がん、子宮頸がん、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、形質細胞腫、腎細胞がん、前立腺がん、及び膵管腺がんの1つ又は複数から選択され；

好ましくは、前記非小細胞肺がんが進行性非小細胞肺がんである；
方法に関する。

【0048】

本発明のいくつかの実施形態では、本発明のいずれかの実施形態の医薬組成物の有効量を、外科的治療の前もしくは後、及び／又は放射線治療の前もしくは後に、その投与を必要とする対象に投与する工程を含む方法が提供される。

【0049】

本発明のいくつかの実施形態では、

本発明の融合タンパク質の単位用量が、体重1kgあたり0.1～100mg、好ましくは1～10mgであり、又は、前記融合タンパク質の単位用量が、各対象において10～1000mg、好ましくは50～500mg、100～400mg、150～300mg、150～250mg、もしくは200mgであり；

好ましくは前記用量が3日、4日、5日、6日、10日、1週間、2週間、又は3週間ごとに1回投与され；

好ましくは投与経路が点滴静注又は静脈注射である；
方法が提供される。

【0050】

軽鎖及び重鎖の可変領域が抗原の結合を決定する。各鎖の可変領域は相補性決定領域（CDR）と呼ばれる3つの超可変領域を含んでおり、重鎖（H）のCDRはHCDR1、HCDR2、及びHCDR3を、軽鎖（L）のCDRはLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む。本発明において、CDRはIMGT番号付けシステムによって定義される（Ehrenmann F, Kaas Q, and Lefranc M P., IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF.[J]. Nucleic acids research, 2009; 38(suppl_1):D301-D307を参照）。

【0051】

以下のモノクローナル抗体のCDRのアミノ酸配列は、当業者に周知の技術的手段によって、例えばIMGT定義に従って、分析される。結果は以下の通りである：

マウスTIGITモノクローナル抗体のHCDR及びLCDR

HCDR1：GHSFTSDYA（配列番号3）

HCDR2：ISYSDST（配列番号4）

HCDR3：ARLDYGNYGGA MDY（配列番号5）

LCDR1：QHVSTA（配列番号8）

LCDR2：SAS（配列番号9）

LCDR3：QQHYITPWT（配列番号10）

【0052】

ヒト化TIGITモノクローナル抗体の3個のHCDRと3個のLCDRは、マウスT

10

20

30

40

50

I G I Tモノクローナル抗体のものと同一である。

【0053】

本発明において、他に定義されない限り、本明細書内で使用される科学及び技術用語は、当業者が一般的に理解する意味を有する。また、本明細書で使用される細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、及び免疫学の実験室操作は、対応する分野で広く使用されるルーチン手順である。一方、本発明の理解を促すために、関連のある語の定義及び説明を以下に提供する。

【0054】

本明細書で使用されるE C 5 0という語は、最大効果の5 0 %に対する濃度、すなわち、最大効果の5 0 %を引き起こしうる濃度のことを指す。

【0055】

本明細書で使用される「抗体」という語は、一般に2対のポリペプチド鎖からなる（それぞれの対が1本の「軽」（L）鎖と1本の「重」（H）鎖を有する）免疫グロブリン分子のことを指す。抗体軽鎖はκ及びλ軽鎖へと分類される。重鎖はμ、δ、γ、α、又はεへと分類される。抗体のアイソタイプはI g M、I g D、I g G、I g A、及びI g Eとして定義される。軽鎖及び重鎖において、可変領域と定常領域は、約12以上のアミノ酸の「J」領域によって連結しており、重鎖はさらに、約3以上のアミノ酸の「D」領域を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（V H）及び重鎖定常領域（C H）からなる。重鎖定常領域は、3つのドメイン（C H 1、C H 2、及びC H 3）からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（V L）及び軽鎖定常領域（C L）からなる。軽鎖定常領域は1つのドメイン、C Lからなる。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの宿主組織又は因子への結合を、例えば免疫系の各種細胞（エフェクター細胞など）の、古典的な補体系の第1成分（C 1 q）への結合を、媒介することができる。V H及びV L領域は、超可変領域（相補性決定領域（C D R）と呼ばれる）にさらに細かく分けることができ、超可変領域間にはフレームワーク領域（F R）と呼ばれる保存的な領域が分布している。各V H及びV Lは、アミノ末端からカルボキシル末端に向けて次の順番で並んだ、3つのC D Rと4つのF Rからなる：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、及びF R 4。各重鎖／軽鎖ペアの可変領域（V H及びV L）は、抗原結合部位を形成する。領域又はドメインに対するアミノ酸の割り当ては、Bethesda M.d., Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, (1987 and 1991))もしくはChothia & Lesk J. Mol. Biol., 1987; 196:901-917; Chothia et al., Nature, 1989; 342:878-883、又は、I M G T番号付けシステムの定義（Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P., IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF.[J]. Nucleic acids research, 2009; 38(suppl_1):D301-D307における定義を参照）に基づいて行われる。

【0056】

「抗体」という語は、抗体を製造するためのいかなる特定の方法によっても限定されない。例えば、抗体には、組み換え抗体、モノクローナル抗体、及びポリクローナル抗体が含まれる。抗体は、I g G（例えばサブタイプI g G 1、I g G 2、I g G 3、もしくはI g G 4）、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、又はI g Mなどの、各種アイソタイプの抗体であってよい。

【0057】

本明細書で使用される「m A b」又は「モノクローナル抗体」という語は、高度に相同な抗体分子のグループに由来する、すなわち、自然に生じうる天然の変異を例外として同一の抗体分子のグループに由来する、抗体又は抗体の断片のことを指す。モノクローナル抗体は、ある抗原上の単一のエピトープに対して高度に特異的である。モノクローナル抗体と異なり、ポリクローナル抗体は、通常、ある抗原上の異なるエピトープを一般に認識する少なくとも2つ以上の異なる抗体を含む。モノクローナル抗体は一般に、Kohler et al. (Kohler G, Milstein C., Continuous cultures of fused cells secreting

10

20

30

40

50

antibody of predefined specificity.[J]. Nature, 1975; 256(5517):495) によって最初に報告されたハイブリドーマ技術を用いて取得することができるが、組み換え DNA 技術を用いても取得することができる (米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号明細書などを参照)。

【0058】

本明細書で使用される「ヒト化抗体」という語は、ヒト免疫グロブリン (レセプター抗体) の CDR の全体又は部分を非ヒト抗体 (ドナー抗体) の CDR で置き換えた場合に得られる抗体又は抗体断片のことを指し、ドナー抗体は、期待される特異性、親和性、又は反応性を有する非ヒト (例えばマウス、ラット、もしくはウサギ) 抗体であってよい。さらに、レセプター抗体のフレームワーク領域 (FR) におけるいくつかのアミノ酸残基も、対応する非ヒト抗体のアミノ酸残基又は他の抗体のアミノ酸残基に置換し、抗体の性能をさらに改善又は最適化することができる。ヒト化抗体のさらなる詳細については、例えば Jones et al., Nature, 1986; 321:522-525、Reichmann et al., Nature, 1988; 332:323-329、Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 1992; 2:593-596、及び Clark, Immunol. Today, 2000; 21:397-402 を参照のこと。いくつかのケースでは、抗体の抗原結合性断片はダイアボディであり、V_H 及び V_L ドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現する。しかし、使用されるリンカーは短いため、同一鎖上の 2 つのドメインのペアリングは起こりえない。そのため、ドメインは他の鎖上の相補ドメインとペアリングすることとなり、2 個の抗原結合部位が生成する (例えば Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993; 90:6444-6448 及び Poljak R.J. et al., Structure, 1994; 2:1121-1123 を参照)。

【0059】

本明細書に記載する融合タンパク質は、DNA 組み換えによって 2 個の遺伝子を同時発現させたタンパク質産物である。抗体及び抗原結合性断片を製造及び精製するための方法は当該分野で周知であり、例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press の第 5 ～ 8 章及び 15 章に記載されている。

【0060】

本明細書で使用される「単鎖可変領域断片 (ScFv)」という語は、抗体重鎖可変領域 (V_H) 及び抗体軽鎖可変領域 (V_L) がリンカーによって連結した分子のことを指す。V_L 及び V_H ドメインはペアを成し、それらドメインが単一ポリペプチド鎖を生成することを可能にするリンカーによって一価の分子が形成される (例えば、Bird et al., Science, 1988; 242:423-426 及び Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988; 85:5879-5883 を参照)。このような s c F v 分子は次の一般構造を有してよい: NH₂ - V_L - リンカー断片 - V_H - COOH、又は NH₂ - V_H - リンカー断片 - V_L - COOH。従来技術の適切なリンカーは、GGGGS アミノ酸配列の反復、又はそのバリエーションからなる。例えば、(GGGGS)₄ のアミノ酸配列を有するリンカーを用いてもよく、そのバリエーションを用いてもよい (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993; 90:6444-6448)。本発明において使用できる他のリンカーが、Alfthan et al., Protein Eng., 1995; 8:725-731、Choi et al., Eur. J. Immunol., 2001; 31:94-106、Hu et al., Cancer Res., 1996; 56:3055-3061、Kipriyanov et al., J. Mol. Biol., 1999; 293:41-56、及び Roovers et al., Cancer Immunology, Immunotherapy, 2001, 50(1):51-59 に記載されている。

【0061】

本明細書で使用される「単離される」という語は、天然状態から人為手段によって取得されることを指す。特定の「単離される」物質又は成分が天然に存在する場合に、その天然環境において変化が生ずることであってもよく、天然環境から単離されることであってもよく、その両者であってもよい。例えば、単離されていない特定のポリヌクレオチド又はポリペプチドが特定の動物生体中に天然に存在し、このような天然状態から高純度の同一のポリヌクレオチド又はポリペプチドが単離された場合、それを単離ポリヌクレオチド又はポリペプチドと呼ぶ。「単離される」という語は、前記物質の活性に影響を及ぼさな

い、人工もしくは合成物質、又は他の不純物の存在を除外するものではない。

【0062】

本明細書で使用される「ベクター」という語は、ポリヌクレオチドを挿入することができる核酸ビヒクルのことを指す。ベクターが、挿入されたポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質の発現を可能にする場合、そのベクターは、発現ベクターと呼ばれる。ベクターは、ベクターによって運ばれる遺伝物質エレメントが宿主細胞で発現できるように、形質転換、形質導入、又はトランスフェクションによって宿主細胞に導入することができる。ベクターは当業者に周知であり、例として、プラスミド；ファージミド；コスミド；酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、又はP1由来人工染色体（PAC）などの人工染色体；λファージ又はM13ファージなどのファージ；及び、動物ウイルス；などが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターとして使用しうる動物ウイルスとしては、レトロウイルス（レンチウイルスなど）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、及びパポバウイルス（例えばSV40）などが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターは、発現を調節するための各種エレメントを含んでいてよく、それらの例として、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択エレメント、及びレポーター遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、ベクターは、複製開始部位を含んでいてもよい。

10

【0063】

本明細書で使用される「宿主細胞」という語は、そこにベクターを導入できる細胞のことを指し、例として、E. coliもしくはBacillus subtilisなどの原核細胞；酵母細胞もしくはAspergillusなどの真菌細胞；S2 Drosophila細胞もしくはSf9などの昆虫細胞；又は、線維芽細胞、CHO細胞、GS細胞、COS細胞、NSO細胞、HeLa細胞、BHK細胞、HEK293細胞、もしくはヒト細胞などの動物細胞；が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0064】

本発明において、「ADCP」という語は、抗体依存性細胞食作用のことを指す。細胞表面抗原に結合する抗体のFc断片は、マクロファージなどの食作用活性細胞のFc受容体に結合し、その結果、食細胞による、抗体が結合した細胞に対する食作用が媒介される。

30

【0065】

本発明において、「ADCC」という語は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害のことを指す。抗体のFab断片がウイルス感染細胞又は腫瘍細胞のエピトープに結合し、その抗体のFc断片がキラー細胞（NK細胞及びマクロファージなど）表面上のFc受容体（FcR）に結合して、キラー細胞による標的細胞の直接殺傷を媒介する。

【0066】

本発明において、「CDC」という語は、補体依存性細胞傷害のことを指す。抗体が、細胞膜表面上の対応する抗原に特異的に結合すると、複合体が形成され、補体系が活性化される。その後、MACが標的細胞表面上に形成され、続いて標的細胞の溶解が起こる結果となる。補体は各種細菌及び他の病原性生物の溶解を引き起こす場合があり、病原性生物の感染に対する重要な防御メカニズムである。

40

【0067】

本明細書で使用される「特異的に結合する」という語は、2つの分子間の非無作為的な結合反応、例えば抗体とその標的となる抗原との間の反応などのことを指す。いくつかの実施形態において、ある抗原に特異的に結合する抗体（又は、ある抗原に対して特異的な抗体）とは、抗体が約 10^{-5} M未満、例えば約 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、又は 10^{-10} M未満の親和性（ K_D ）で抗原に結合することを意味する。

【0068】

本明細書で使用される「 K_D 」という語は、特異的抗体－抗原相互作用の解離平衡定数のことを指し、抗体と抗原との間の結合親和性を説明するために使用される。解離平衡定

50

数が小さいことは、抗体－抗原結合が強く、抗体と抗原との間の親和性が高いことを表す。一般に、抗体は、約 10^{-5} M未満、例えば約 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、又は 10^{-10} M未満の解離平衡定数 (K_D) で抗原 (T I G I Tタンパク質など) に結合する。 K_D は、例えばF o r t e b i oシステムの使用など、当業者に公知の方法を用いて決定することができる。

【0069】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という語と「m A b」という語は同一の意味を有し、互換的に用いることができる。「ポリクローナル抗体」という語と「p A b」という語は同一の意味を有し、互換的に用いることができる。また、本明細書において、アミノ酸は通常、当該分野で公知の1文字又は3文字略号を使用して表される。例えば、アラニンはA又はA l aで表すことができる。

10

【0070】

本明細書で使用される「薬理学的に許容される副原料」という語は、対象及び活性成分に薬理学的及び／又は生理学的に適合した、当該分野で周知の担体及び／又は賦形剤 (例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995を参照) のことを指し、例として、p H調整剤、界面活性剤、アジュバント、イオン強度増強剤が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、p H調整剤の限定されない例として、リン酸緩衝液が挙げられ、界面活性剤の限定されない例として、陽イオン、陰イオン、又は非イオン界面活性剤、例えばT w e e n - 8 0が挙げられ、イオン強度増強剤の限定されない例として、塩化ナトリウムが挙げられる。

20

【0071】

本明細書で使用される「有効量」という語は、所望の効果を得るのに、又は少なくとも部分的に得るのに、十分な量のことを指す。例えば、疾患 (腫瘍など) に対する予防的有效量とは、その疾患 (腫瘍など) の発症を予防、抑止、又は遅延するのに十分な量のことを指し、治療有効量とは、その疾患に罹患している患者において、疾患又はその合併症を治癒又は少なくとも部分的に抑止するのに十分な量のことを指す。そのような有効量を決定することは、疑いもなく当業者の能力の範囲内である。例えば、治療目的における有効量は、治療しようとする疾患の重症度；患者自身の免疫系の全体的な状態；年齢、体重、及び性別などの患者の一般的な条件；投与経路；並びに同時に行われる他の治療；などによって決まる。

30

【0072】

本発明において、「第1」 (例えば、第1タンパク質機能領域又は第1製品) 及び「第2」 (例えば、第2タンパク質機能領域又は第2製品) という語は、特に断りのない限り、表現上の区別又は明瞭性のために用いられ、典型的な順序の意味は有しない。

【0073】

本発明の有益な効果

本発明は以下の技術的效果 (1) ~ (9) のいずれか1つ以上を達成する。

(1) 本発明の融合タンパク質 (例えばT F 0 1又はT F 0 2) が、T I G I Tの阻害及びT G F - β 濃度の減少を同時に可能にする。

40

(2) 本発明の融合タンパク質 (例えばT F 0 1又はT F 0 2) が、T I G I Tに極めて特異的に結合することができ、T I G I TのC D 1 5 5への結合を極めて効果的にブロックすることができ、生物におけるT I G I Tの免疫抑制を特異的に緩和することができる。

(3) 本発明の融合タンパク質 (例えばT F 0 1又はT F 0 2) が、T G F - β に極めて特異的に結合することができ、T G F - β のT G F - β 受容体への結合を極めて効果的にブロックすることができ、生物におけるT G F - β による免疫抑制を特異的に緩和し、免疫応答を活性化することができる。

(4) 本発明の融合タンパク質が抗腫瘍薬の調製に対して高いポテンシャルを有する。

(5) 本発明の融合タンパク質の第1タンパク質機能領域及び第2タンパク質機能領域が

50

相乗効果を有し、その効果が、いずれかのタンパク質機能領域を単独で使した融合タンパク質と比べて優れている。

(6) 本発明の融合タンパク質、特にTF01が、Fc受容体FcγRI、FcγRIIb、FcγRIIIa__H131、及び／もしくはFcγRIIIa__R131、FcγRIIIa__V158、及び／もしくはFcγRIIIa__F158に対する結合活性を完全に取り除いたものであり、且つ、ADCC活性又はADCP活性を取り除いたものである。

(7) 本発明の融合タンパク質、特にTF01が、補体C1qに対する結合活性を完全に取り除いたものであり、且つ、CDC活性を完全に取り除いたものである。

(8) 本発明の融合タンパク質、特にTF01及びTF02の両者が、TIGITによって誘導された免疫細胞の免疫抑制を効果的にブロックすることができ、且つ、細胞のIL-2分泌を誘導することができる。

(9) 本発明の融合タンパク質、特にTF01が、TGF-βによって誘導された免疫細胞の免疫抑制を効果的にブロックすることができ、且つ、細胞のINF-γ分泌を誘導することができる。

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1】図1は、TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、及びRG6058(hG4)の、抗原TIGIT-mFcへの結合活性の分析である。

【図2】図2は、TF01、TF02、及びTGF-βRII-mFcの、TGF-β1への結合活性の分析である。

【図3】図3は、TF01、TF02、及びTGF-βRII-mFcの、TGF-β2への結合活性の分析である。

【図4】図4は、TF01、TF02、及びTGF-βRII-mFcの、TGF-β3への結合活性の分析である。

【図5】図5は、ヒトTGF-β1への結合に関してTGF-βRII-His-ビオチンと競合する、抗TIGIT抗体とTGF-βRの融合タンパク質の活性の分析である。

【図6】図6は、ヒトTGF-β3への結合に関してTGF-βRII-His-ビオチンと競合する、抗TIGIT抗体とTGF-βRの融合タンパク質の活性の分析である。

【図7】図7は、ヒトTIGIT-mFcへの結合に関してヒトCD155-hFc-ビオチンと競合する、抗TIGIT抗体とTGF-βRの融合タンパク質の活性の分析である。

【図8】図8は、抗TIGIT抗体とTGF-βRの融合タンパク質の、293T-TIGIT膜表面上のTIGITへの結合活性の分析である。

【図9】図9は、細胞膜表面上の抗原TIGITへの結合に関してCD155と競合する、TF01の分析である。

【図10】図10は、細胞膜表面上の抗原TIGITへの結合に関してCD112と競合する、TF01の分析である。

【図11】図11は、FcγRIに対する、TF01の親和性定数の分析である。

【図12】図12は、FcγRIに対する、26B12H2L2(hG1WT)の親和性定数の分析である。

【図13】図13は、FcγRIIIa__V158に対する、TF01の親和性定数の分析である。

【図14】図14は、FcγRIIIa__V158に対する、26B12H2L2(hG1WT)の親和性定数の分析である。

【図15】図15は、FcγRIIIa__F158に対する、TF01の親和性定数の分析である。

【図16】図16は、FcγRIIIa__F158に対する、26B12H2L2(hG1WT)の親和性定数の分析である。

【図17】図17は、FcγRIIIa__H131に対する、TF01の親和性定数の分析

10

20

30

40

50

である。

【図18】図18は、FcγRIIa__H131に対する、26B12H2L2 (hG1WT) の親和性定数の分析である。

【図19】図19は、FcγRIIa__R131に対する、TF01の親和性定数の分析である。

【図20】図20は、FcγRIIa__R131に対する、26B12H2L2 (hG1WT) の親和性定数の分析である。

【図21】図21は、FcγRIIbに対する、TF01の親和性定数の分析である。

【図22】図22は、FcγRIIbに対する、26B12H2L2 (hG1WT) の親和性定数の分析である。

10

【図23】図23は、C1qに対する、TF01の親和性定数の分析である。

【図24】図24は、C1qに対する、26B12H2L2 (hG1WT) の親和性定数の分析である。

【図25】図25は、RG6058 (hG1WT)、RG6058 (hG4WT)、26B12H2L2 (hG1WT)、及びTF01の、ADCP効果の分析である。

【図26】図26は、Jurkat-TIGIT及びTHP-1細胞同時培養系でのIL-2分泌に対するCD112阻害への、抗TIGIT抗体とTGF-βRの融合タンパク質のブロッキング活性の評価である。

【図27】図27は、Jurkat-TIGIT及びTHP-1細胞同時培養系でのIL-2分泌に対するCD155阻害への、抗TIGIT抗体とTGF-βRの融合タンパク質のブロッキング活性の評価である。

20

【図28】図28は、Jurkat-TIGIT及びHT1080-aCD3scFv細胞同時培養系でのIL-2分泌の促進における、抗TIGIT抗体とTGF-βRの融合タンパク質の生物活性の評価である。

【図29】図29は、CMV抗原へのPBMC二次免疫応答の過程における、IFN-γ分泌に対するTGF-β1阻害への、抗TIGIT抗体とTGF-βRの融合タンパク質のブロッキング活性の評価である。

【図30】図30は、Scid BeigeマウスモデルにおけるMDA-MB-231異種移植腫瘍の治療に対する、抗TIGIT抗体とTGF-βRの融合タンパク質の有効性を示す。結果は平均±標準誤差で示し、2元配置分散分析（ボンフェローニ検定）を行った。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、及び $***p < 0.001$ ；アイソタイプ対照との比較。

30

【図31】図31は、MDA-MB-231異種移植腫瘍を有するScid Beigeマウスモデルの体重に対する、抗TIGIT抗体とTGF-βRの融合タンパク質の効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0075】

寄託された生物材料：

ハイブリドーマ細胞株LT019 (TIGIT-26B12) を、China Center for Type Culture Collection (CCTCC) に、CCTCC番号C2020208のもと、2020年10月23日付けで寄託した。寄託機関のアドレスは、郵便番号430072 中華人民共和国 武漢 武漢大学である。

40

【0076】

本発明は、次の配列1～48に関する。

1. 26B12VHのアミノ酸配列

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGHSFTSDYAWNWI
RQFPGNRLIEWMGYISYSDSTNYNPSLKSRI
SITRDTSKNQFFLQMNSVTTEDTATYYCARLDYGN
YGGAMDYWGQGTSVTVSS (配列番号1)

2. 26B12VHのヌクレオチド配列

50

G A G G T G C A G C T G C A G G A G T C T G G A C C T G G C C T G G T G A A A
C C C T C T C A G T C T C T G T C C C T C A C C T G C A C T G T C A C T G G C C
A C T C A T T C A C C A G T G A T T A T G C C T G G A A C T G G A T C C G G C A
G T T T C C A G G A A A C A G A C T G G A G T G G A T G G G C T A C A T A A G C
T A C A G T G A T A G C A C T A A C T A C A A C C C A T C T C T C A A A A G T C
G A A T C T C T A T C A C T C G A G A C A C A T C C A A G A A C C A G T T C T T
C T T G C A G A T G A A T T C T G T G A C T A C T G A G G A C A C A G C C A C A
T A T T A C T G T G C A A G A T T G G A C T A T G G T A A C T A C G G T G G G G
C T A T G G A C T A C T G G G G T C A A G G G A C C T C A G T C A C C G T C T C
C T C A (配列番号2)

10

3. HCDR1:

GHSFTSDYA (配列番号3)

4. HCDR2:

ISYSDST (配列番号4)

5. HCDR3:

ARLDYGNYGGAAMDY (配列番号5)

6. 26B12VLのアミノ酸配列

D I V L T Q S H E F M S T S L R D R V S I T C K S S Q H V S T A V A W Y Q Q K
P G Q S P K L L I Y S A S Y R Y T G V P D R F T G S G S G T D F T F T I S S V K
A E D L A V Y Y C Q Q H Y I T P W T F G G G T K L E I K (配列番号6)

20

7. 26B12VLのヌクレオチド配列

G A T A T T G T G C T A A C T C A G T C T C A C G A A T T C A T G T C C A C C
T C A T T A C G A G A C A G G G T C A G C A T C A C C T G C A A A T C C A G T C
A A C A T G T G A G T A C T G C T G T A G C C T G G T A T C A A C A G A A A C C
A G G A C A A T C T C C T A A A C T A C T G A T T T A C T C G G C A T C C T A C
C G G T A C A C T G G A G T C C C T G A T C G C T T C A C T G G C A G T G G A T
C T G G G A C G G A T T T C A C T T T C A C C A T C A G C A G T G T G A A G G C
T G A A G A C C T G G C A G T T T A T T A C T G T C A G C A A C A T T A T A T T
A C T C C G T G G A C G T T C G G T G G A G G C A C C A A G C T G G A A A T A A
A A (配列番号7)

30

8. LCDR1:

QHVSSTA (配列番号8)

9. LCDR2:

SAS (配列番号9)

10. LCDR3:

QQHYITPWT (配列番号10)

11. 26B12H1VHのアミノ酸配列

D V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S G H S F T S D Y A W N W I R
Q F P G K G L E W I G Y I S Y S D S T N Y N P S L K S R I T I S R D T S K N Q F
F L Q L N S V T A A D T A T Y Y C A R L D Y G N Y G G A M D Y W G Q G T S V T V
S S (配列番号11)

40

12. 26B12H1VHのヌクレオチド配列

G A T G T G C A G C T G C A G G A G A G C G G C C C G G A C T G G T G A A G
C C T T C C C A G A C C C T G T C T C T G A C C T G T A C A G T G T C T G G C C
A C A G C T T C A C A T C C G A C T A C G C C T G G A A C T G G A T C A G G C A
G T T T C C A G G C A A G G G C C T G G A G T G G A T C G G C T A C A T C T C T
T A T A G C G A C T C C A C C A A C T A T A A T C C C T C T C T G A A G A G C C
G G A T C A C C A T C A G C A G A G A T A C A T C C A A G A A C C A G T T C T T
T C T G C A G C T G A A C A G C G T G A C A G C C G C C G A C A C C G C C A C A
T A C T A T T G C G C C C G G C T G G A C T A C G G C A A T T A T G G C G G A G

50

CCATGGATTACTGGGGGCCAGGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCC (配列番号12)

13. 26B12H2VHのアミノ酸配列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGHSFTSDYAWSWIR
QPPGKGLEWIGYISYSDSTNYPNPSLKSRVTISRDTSKNQF
SLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGNYGGAAMDYWGQGTSVTVSS (配列番号13)

14. 26B12H2VHのヌクレオチド配列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGCCCCAGGACTGGTGAAAG
CCAAGCCAGACCCCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCTGGGCC
ACTCTTTTACAAGCGACTACGCCTGGTCTTGGATCAGGCA
GCCCCCTGGCAAGGGGACTGGAGTGGATCGGGCTACATCTCC
TATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTC
GGGTGACCATCTCTAGAGATACAAGCAAGAACCAAGTTCTC
CCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAGCCGTG
TACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAG
CCATGGATTACTGGGGGCCAGGGGCACCAAGCGTGACAGTGTC
TAGC (配列番号14)

15. 26B12H3VHのアミノ酸配列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGHSFTSDYAWSWIR
QPPGKGLEWIGYISYSDSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQF
SLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGNYGGAAMDYWGQGTSVTVSS (配列番号15)

16. 26B12H3VHのヌクレオチド配列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGCCCCAGGACTGGTGAAAG
CCAAGCCAGACCCCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCTGGGCC
ACTCTTTTACAAGCGACTACGCCTGGTCTTGGATCAGACA
GCCCCCTGGCAAGGGGACTGGAGTGGATCGGGCTACATCTCC
TATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTA
GAGTGACCATCTCTGTGGATACAAGCAAGAACCAAGTTCTC
CCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAGCCGTG
TACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAG
CCATGGATTACTGGGGGCCAGGGGCACCAAGCGTGACAGTGTC
TAGC (配列番号16)

17. 26B12H4VHのアミノ酸配列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGHSFTSDYAWNWI
RQFPKGLEWMGYISYSDSTNYPNPSLKSRITISRDTSKNQF
FLQLNSVTAADTATYYCARLDYGNYGGAAMDYWGQGTSVTVSS (配列番号17)

18. 26B12H4VHのヌクレオチド配列

GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGGCCCCGGGACTGGTGAAAG
CCTTCCCAGACCCCTGTCTCTGACCTGTACAGTGTCCTGGGCC
ACAGCTTTCACATCCGACTACGCCTGGAACTGGATCAGGCA
GTTTCCAGGCAAGGGGCCTGGAGTGGATGGGGCTACATCTCT
TATAGCGACTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCC
GGATCACCATCAGCAGAGATACATCCAAGAACCAAGTTCTT
TCTGCAGCTGAACAGCGTGACAGCCGCGACACCGCCACA
TACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAG
CCATGGATTACTGGGGGCCAGGGGCACCTCCGTGACAGTGAG
CTCC (配列番号18)

10

20

30

40

50

19. 26B12L1VLのアミノ酸配列

DIQMTQSPKSLSTSVGDRVITICRSSSQHVSTAVAWYQQK
PGKSPKLLIYSASYRYSGVDPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQ
PEDFATYYCQQHYITPWTFGGGGTKLEIK (配列番号19)

20. 26B12L1VLのヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTAAGTCCCTGTCTACA
AGCGTGGGCGATCGGGTGACCATCACATGTAGAAAGCTCCC
AGCACGTGTCTACCGCAGTGGCATGGTACCAGCAGAAAGCC
AGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCGCCCTCTTAC
AGGTATTCCGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCT
CTGGCACCGATTTTCACCTTTACAATCTCTAGCGTGACGCC
AGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTACATC
ACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACAAAGCTGGAGATCA
AG (配列番号20)

10

21. 26B12L2VLのアミノ酸配列

DIQMTQSPSSLASVSGDRVITICRSSSQHVSTALAWYQQK
PGKSPKLLIYSASSRYSGVDPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQ
PEDFATYYCQQHYITPWTFGGGGTKLEIK (配列番号21)

22. 26B12L2VLのヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTAGCTCCCTGTCTGCC
AGCGTGGGCGATAGGGTGACCATCACATGTAGATCTAGCC
AGCACGTGTCTACAGCCCTGGCATGGTACCAGCAGAAAGCC
AGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCCCTCCTCT
AGGTATTCTGGAGTGCCAGACCGGTTTTCCGGCTCTGGCA
GCGGCACCGATTTTCACCTTTACAATCAGCTCCCTGCAGCC
AGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATATC
ACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCA
AG (配列番号22)

20

23. 26B12L3VLのアミノ酸配列

DIQMTQSPSSLASVSGDRVITICRASQHVSTALAWYQQK
PGKAPKLLIYSASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQHYITPWTFGGGGTKLEIK (配列番号23)

30

24. 26B12L3VLのヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTAGCTCCCTGAGCGCC
TCCGTGGGCGATAGGGTGACCATCACATGTAGAGCCTCTC
AGCACGTGAGCACAGCCCTGGCATGGTACCAGCAGAAAGCC
AGGCAAGGCCCCCTAAGCTGCTGATCTATAGCGCCTCTAGC
CTGCAGTCCGGAGTGCCATCTCGGTTCTCTGGCAGCGGCT
CCGGAACCGACTTTACCCCTGACAATCTCCTCTCTGCAGCC
AGAGGATTTTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTACATC
ACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCA
AG (配列番号24)

40

25. 26B12L4VLのアミノ酸配列

DIQMTQSPKSMSTSVGDRVITICRSSSQHVSTAVAWYQQK
PGKSPKLLIYSASYRYSGVDPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQ
PEDFATYYCQQHYITPWTFGGGGTKLEIK (配列番号25)

26. 26B12L4VLのヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTAAGTCCATGTCTACA
AGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACATGTAGAAAGCTCCC
AGCACGTGTCTACCGCAGTGGCATGGTACCAGCAGAAAGCC

50

27. 26B12H2L2 (hG4DM) の重鎖のアミノ酸配列

28. 26B12H2L2 (hG4DM) の重鎖のヌクレオチド配列

GATGTGCGAGCTTGCAGGAGTCTCTGGGCCCCAGGGAAGCTGGTGAAGC
CCAAGCCAGACCCCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGGCC
ACTCTTTTACAAAGCGACTACGCCCTGGTCTTGGGATCAGGGCA
GCCCCCTTGGCAAGGGGACTTGGAGTGGATTCGGGCTACATCTCC
TATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTC
GGGTGACCATCTCTAGAGATACAAGCAAGAAACCAGTTCTC
CCTGAAGCTGAGCTCCCGTGACCGCAGCAGACACAGCCCGTG
TACTATTGCGGCCCGGCTGGGACTACGGGCAATTATGGCGGGAG
CCATGGATTACTTGGGGGCCAGGGGCACCCAGCGTGACAGTGTCT
TAGCGCCTTCCACAAAGGGGGCCCTCGGGTCTTCCCCCTGGCG
CCCTGCTTCCAGGAGCACCTTCCGAGAGGCACAGCCGCCCTGG
GCTGCTTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTTGACGGT
GTCGTGGAACCTCAGGCGGCCCTGACCAAGCGGGCGTACACACC
TTCCCCGGCTGTCTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCTCCCTCA
GCAGCGTGGTGACCGGTGCCCTTCCAGCAGCTTGGGGCACGAA
GACCTACACCTTGCAACGTAGATCACAAAGCCCAAGCAACACC
AAGGTGGACAAGAGAGGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCAT
GCCCAACCATGCCCAAGCACCTGAGGCGCGCTGGGGGGACCATC
AGTCTTCTCTGTTCCCCCCAAAAACCCCAAGGACACTCTCATG
ATCTCCCCGGACCCCTGAGGCTCACGTGCGTGGTGGTGGACG
TGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTTCCAGTTTCAACTGGGTACGT
GGATGGCGTGAGGTTGCATAATGCCCAAGACAAAGCCCGCGG
GAGGAGCAGTTTCAACAGCACGTACCGTGTGTGGTCAAGCGTCC
TCACCGTCTCTGCACCAAGGACTGGGCTGAACGGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTTCCAAACAAAGGCCCTCCCGTCTCTCCATC
GAGAAAAACCATCTTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGC
CACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCAAGGAGGAGATGAC
CAAGAAACCAGGTTCAGCCTTGACCTGCTTGGTCAAAGGCCCTC
TACCCCAAGCGACATCGCCCGTGAGGTGGGAGAGAGCAATGGGC
AGCCGGGAGAAACAACCTACAAAGACCAACGCCCTCCCCGTGCTGGA

CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCCTCTACAGCAGGCTAACCCTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGACACAACCACTACACACAGAA
GAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT (配列番号28)

29. 26B12H2L2 (hG4DM) の軽鎖のアミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQHVSTALAWYQQK
PGKSPKLLIYSASSRYSQVPRFSQSGSGTDFFTISSSLQ
PEDFATYYCQQHYITPWFQGGGTGLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (配列番号29)

10

30. 26B12H2L2 (hG4DM) の軽鎖のヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTAGCTCCCTGTCTGCC
AGCGTGGGCGATAGGGTGACCATCACATGTAGATCTAGCC
AGCACGTGTCTACAGCCCTGGCATGGTACCAGCAGAAGCC
AGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCTCTCTCT
AGGTATTCTGGAGTGCCAGACCGGTTTTTCCGGCTCTGGCA
GCGGCACCGATTTTACCTTTACAATCAGCTCCCTGCAGCC
AGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATATC
ACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCA
AGCGTACGGTGGCAGCCCCATCTGTCTTTCATTTTTTCCCC
TAGTGACGAGCAGCTGAAATCCGGAACAGCCTCTGTGGTC
TGTCTGCTGAACAATTTCTACCTTCGCGAAGCCAAGGTGC
AGTGGAAAGTCGATAACGCTCTGCAGAGTGGCAATTTCACA
GGAGAGCGTGACTGAACAGGACTCCAAGGATTCTACCTAT
AGTCTGAGCTCCACTCTGACCTGTCCAAGCAGATTACG
AAAAGCACAAAGTGATGCCTGTGAGGTCAACCACCCAGGG
GCTGAGTTCTCCAGTCAACCAAAATCCTTCAACAGAGGCGAA
TGT (配列番号30)

20

31. 26B12H2L2 (hG1DM) の重鎖のアミノ酸配列

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIR
QPPGKGLEWIGYISYSDSTNYPNPSLKSRVTISRDTSKNQF
SLKLSSTVTAADTAVYYCARLDYGNVGGAMDYWGQGTSVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAA
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNH
YTQKSLSLSPGK (配列番号31)

30

40

32. 26B12H2L2 (hG1DM) の重鎖のヌクレオチド配列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGCCCAGGACTGGTGAAAG
CCAAGCCAGACCTGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGGCC
ACTCTTTTACAAGCGACTACGCCCTGGTCTTGGATCAGGCA
GCCCCCTGGCAAGGGAGTGGAGTGGATCGGGCTACATCTCC
TATTCTGACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTC
GGGTGACCATCTCTAGAGATACAAGCAAGAACCAGTTCTC
CCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAGCCGTG

50

T A C T A T T G C G C C C G G C T G G A C T A C G G C A A T T A T G G C G G A G
C C A T G G A T T A C T G G G G C C A G G G C A C C A G C G T G A C A G T G T C
T A G C G C C T C T A C C A A G G G G C C C A G C G T G T T T C C T C T C G C C
C C C T C C T C C A A A A G C A C C A G C G G A G G A A C C G C T G C T C T C G
G A T G T C T G G T G A A G G A C T A C T T C C C T G A A C C C G T C A C C G T
G A G C T G G A A T A G C G G C G C T C T G A C A A G C G G A G T C C A T A C A
T T C C C T G C T G T G C T G C A A A G C A G C G G A C T C T A T T C C C T G T
C C A G C G T C G T C A C A G T G C C C A G C A G C A G C C T G G G C A C C C A
G A C C T A C A T C T G T A A C G T C A A C C A C A A G C C C T C C A A C A C C
A A G G T G G A C A A G A A A G T G G A G C C C A A A T C C T G C G A C A A G A
C A C A C A C C T G T C C C C C C T G T C C T G C T C C C G A A G C T G C T G G
A G G C C C T A G C G T C T T C C T C T T T C C T C C C A A A C C C A A G G A C
A C C C T C A T G A T C A G C A G A A C C C C T G A A G T C A C C T G T G T C G
T C G T G G A T G T C A G C C A T G A G G A C C C C G A G G T G A A A T T C A A
C T G G T A T G T C G A T G G C G T C G A G G T G C A C A A C G C C A A A A C C
A A G C C C A G G G A G G A A C A G T A C A A C T C C A C C T A C A G G G T G G
T G T C C G T G C T G A C A G T C C T C C A C C A G G A C T G G C T G A A C G G
C A A G G A G T A C A A G T G C A A G G T G T C C A A C A A G G C T C T C C C T
G C C C C C A T T G A G A A G A C C A T C A G C A A G G C C A A A G G C C A A C
C C A G G G A G C C C C A G G T C T A T A C A C T G C C T C C C T C C A G G G A
C G A A C T C A C C A A G A A C C A G G T G T C C C T G A C C T G C C T G G T C
A A G G G C T T T T A T C C C A G C G A C A T C G C C G T C G A G T G G G A G T
C C A A C G G A C A G C C C G A G A A T A A C T A C A A G A C C A C C C C T C C
T G T C C T C G A C T C C G A C G G C T C C T T C T T C C T G T A C A G C A A G
C T G A C C G T G G A C A A A A G C A G G T G G C A G C A G G G A A A C G T G T
T C T C C T G C A G C G T G A T G C A C G A A G C C C T C C A C A A C C A C T A
C A C C C A G A A A A G C C T G T C C C T G A G C C C C G G C A A A (配列番号 3
2)

33. TGF- β RII細胞外領域の短縮断片のアミノ酸配列

I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D
N Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H
D P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E
C N D N I I F S E E Y N T S N P D (配列番号 33)

34. TGF- β RIのアミノ酸配列：(下線部は細胞外領域の配列)

M E A A V A A P R P R L L L L V L A A A A A A A A A L L P G A T A L Q C F C H
L C T K D N F T C V T D G L C F V S V T E T T D K V I H N S M C I A E I D L I P
R D R P F V C A P S S K T G S V T T T Y C C N Q D H C N K I E L P T T V K S S P
G L G P V E L A A V I A G P V C F V C I S L M L M V Y I C H N R T V I H H R V P
N E E D P S L D R P F I S E G T T L K D L I Y D M T T S G S G S G L P L L V Q R
T I A R T I V L Q E S I G K G R F G E V W R G K W R G E E V A V K I F S S R E E
R S W F R E A E I Y Q T V M L R H E N I L G F I A A D N K D N G T W T Q L W L V
S D Y H E H G S L F D Y L N R Y T V T V E G M I K L A L S T A S G L A H L H M E
I V G T Q G K P A I A H R D L K S K N I L V K K N G T C C I A D L G L A V R H D
S A T D T I D I A P N H R V G T K R Y M A P E V L D D S I N M K H F E S F K R A
D I Y A M G L V F W E I A R R C S I G G I H E D Y Q L P Y Y D L V P S D P S V E
E M R K V V C E Q K L R P N I P N R W Q S C E A L R V M A K I M R E C W Y A N G
A A R L T A L R I K K T L S Q L S Q Q E G I K M (配列番号 34)

35. TGF- β RI細胞外領域のアミノ酸配列

L Q C F C H L C T K D N F T C V T D G L C F V S V T E T T D K V I H N S M C I
A E I D L I P R D R P F V C A P S S K T G S V T T T Y C C N Q D H C N K I E L P

TTVKSSPGLGPVEL (配列番号35)

36. TGF- β RIIのアミノ酸配列: (下線部は細胞外領域の配列)

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVT
DNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEK
PQEVCAVWRKNDENITLETVCCHDPKLPYHDFILEDAAASP
KCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
LLLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKLS
TWETGKTRKLMFSEHCAIILED RSDISSTCANNINHNT
ELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIF
PYEEYASWKTEKDI FSDINLKHENILQFLTAEERKTEL GK
QYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSSLARGIA
HLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFG
LSLRLDPTLSVDDLANSGQVGTARYMAPEVLES RMNLE NV
ESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPPFGSKVR
EHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSFNLNHQGIQMCETLTE
CWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEEKIPE
DGS LNTTK (配列番号36)

37. TGF- β RII細胞外領域のアミノ酸配列

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTC
DNQKSCMSNCSITSICEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVC
HDPKLPYHDFILEDAAASP KCIMKEKKKPGETFFMCSSS
DECNDNIIFSEEYNTSNPD LLLVIFQ (配列番号37)

38. TGF- β RIIIのアミノ酸配列: (下線部は細胞外領域の配列)

MTSHYVIAIAIFALMSSCLATAGPEPGALCELSPVSA SHPV
QALMESFTVL SGCASRGTTGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQL
QREVTLHLNPISSVHIHHKSVVFL LNSPHPLVWHLKTERL
ATGVSRLFLVSEGSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEH
LLNWARKEYGAVTSFTELK IARNIYIKVGEDQVFPPKCN I
GKNFLSLNYLA EYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHIIELIT
PNSNPYSAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILKCKKSV
NWVIKSFDVKGSLKIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDD
IPSTQGNLVK WALDNGYSPITSYTMAPVANRFHLRLENN A
EEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALPALQNPPIRGGE GQNG
GLPFPFPDISRRVWNEEGEDGLPRPKDPVIPSIQLFPGLR
EPEEVQGSVDIALSVKCDNEKMIVAVEKDSFQASGYSGMD
VTLLDPTCKAKMNGTHFVLESPLNGCGTRPRWSALDGVVY
YNSIVIQVPALGDSSGWPDGYEDLES GDNGFP GDMDEGDA
SLFTRPEIVVFNC SLQQVRNPSSSFQE QPHGNITFNMELYN
TDLFLVPSQGVFSVPENGHVYVEVSVTKAEQELGF A IQTC
FISPYSNPDRMSHYTIIENICPKDES VKFYSPKRVHFPI P
QADMDKKRFSFVFKPVFN TSLFLQCELT LCTKMEKH P QK
LPKCVPPDEACTSLDASI IWAMMQNKKTF TKPLAVI HHEA
ESKEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDTLTVMGIAFAAFVIGA
LLTGALWYIYSHTGETAGRQQVPTSP PAS ENS SA AHSIGS
TQSTPCSSSSSTA (配列番号38)

39. TGF- β RIII細胞外領域のアミノ酸配列

GPEPGALCELSPVSA SHPVQALMESFTVL SGCASRGTTG
LPQEVHVLNLRTAGQGPGQLQREVTLHLNPISSVHIHHKS
VVFL LNSPHPLVWHLKTERLATGVSRLFLVSEGSVVQFSS
ANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARKEYGAVTSFTELKI

10

20

30

40

50

ARNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFLSLNLYLAEY LQPKAAE
GCVMS SQPQNEEVHIIELITPNSNPYSAFQVDITIDIRPS
QEDLEVVKNLILILKCKKSVNWVIKSF DVKGS LKI IAPNS
IGFGKESERSMTMTKSI RDDIPSTQGNLVK WALDNGYSPI
TSYTMAPVANRFHLRLENNAEEMGDEEVHTIPPELRILLD
PGALPALQNPPIRGGEQGNGGLPFPFPDISRRVWNEEGED
GLPRPKDPVIPSIQLFPGLREPEEVQGSVDIALSVKCDNE
KMI VAVEKDSFQASGYSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLE
SPLNGCGTRPRWSALDGVVY YNSIVIQVPALGDS SSGWPDG
YEDLES GDNGFPGDMDEGDASL FTRPEIVVFNC SLQQVRN
PSSFQEQPHGNITFNME LYNTDLFLVPSQGVFSVPENGHV
YVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSNPDRMSHYTIIENI
CPKDES VKFYSPKRVHFP I PQADM DKKRFSFVF KPVFNTS
LLFLQCELT LCTKMEKH P QKLPKCVPPDEACTSLDASIIW
AMMQNKKTFTKPLAVI HHEAESKEKGP S MKEPNPISPPIF
HGLDTLTV (配列番号39)

10

40. チラゴルマブの重鎖のアミノ酸配列

EVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSAAWNWI
RQSPSRGLEWLGKTY YRFKWYSDYAVSVKGRITINPDTSK
NQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTRESTT TYDLLAGPFDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSSKSTSGGTAA LGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTS G VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP S
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCP
APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号40)

20

41. チラゴルマブの軽鎖のアミノ酸配列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQT VLYSSNNKKYL
AWYQQKPGQP PNL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL
TISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAP
SVFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC (配列番号41)

30

42. RG6058 (hG4) の重鎖可変領域のアミノ酸配列

EVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSAAWNWI
RQSPSRGLEWLGKTY YRFKWYSDYAVSVKGRITINPDTSK
NQFSLQLNSVTPEDTAVFYCTRESTT TYDLLAGPFDYWGQG
TLVTVSS (配列番号42)

40

43. RG6058 (hG4) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQT VLYSSNNKKYL
AWYQQKPGQP PNL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL
TISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPFTFGPGTKVEIK (配列番号43)

44. リンカー断片のアミノ酸配列

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG (配列番号44)

45. 抗HEL & TGFβ 抗体の重鎖のアミノ酸配列

EVQLEQSGAE LMKPGASVKISCKATGYTFTTYWIEWIKQ

50

R P G H S L E W I G E I L P G S D S T Y Y N E K V K G K V T F T A D A S S N T A
Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R G D G F Y V Y W G Q G T T L T V S S A S T
K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S
G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C
N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E A A G G P S V F L F
P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E
V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V
S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V
S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S
F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L
S L G G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G I P P H V Q K S V N N D M I V T
D N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N Q K S C M S N C S I T S I C E K
P Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D P K L P Y H D F I L E D A A S P
K C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C N D N I I F S E E Y N T S N P D
(配列番号 45)

10

46. 抗HEL & TGFβ抗体の軽鎖のアミノ酸配列

D I E L T Q S P A T L S V T P G D S V S L S C R A S Q S I S N N L H W Y Q Q K
S H E S P R L L I K Y T S Q S M S G I P S R F S G S G S G T D F T L S I N S V E
T E D F G V Y F C Q Q S G S W P R T F G G G T K L D I K R T V A A P S V F I F P
P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S
Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q
G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 46)

20

47. RG6058 (G1DM)の重鎖のアミノ酸配列

E V Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L T C A I S G D S V S S N S A A W N W I
R Q S P S R G L E W L G K T Y Y R F K W Y S D Y A V S V K G R I T I N P D T S K
N Q F S L Q L N S V T P E D T A V F Y C T R E S T T Y D L L A G P F D Y W G Q G
T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F
P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S
S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P
A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T
L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N
Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E
A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (配列番号 47)

30

48. RG6058 (G1DM)の軽鎖のアミノ酸配列

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q T V L Y S S N N K K Y L
A W Y Q Q K P G Q P P N L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L
T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P F T F G P G T K V E I K R T V A A P
S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A
L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A
C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 48)

40

【0077】

詳細な説明

本発明の実施形態を、実施例を参照しながら以下に説明するが、当業者は、以下の実施例が本発明の単なる例証であり、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではないと理解するであろう。実施例中、指定された条件のない実験手順については、従来の条件又は製造業者によって推奨される条件に従って行われる。使用される試薬又は機器について、製造業者の指定のないものは、全て市販の従来の製品である。

【0078】

50

BALB/cマウスはGuangdong Medical Laboratory Animal Centerより購入した。

【0079】

C57マウスはLaboratory Animal Center of Guangzhou University of Chinese Medicineより購入した。

【0080】

MDA-MB-231細胞及びU87-MG細胞はATCCより購入した。

【0081】

陽性対照抗体であるチラゴルマブは、WHO. Proposed INN: List 117. WHO Drug Information, 31(2): p104, 2017に記載される抗体に由来し、配列番号40～41のアミノ酸配列とそれぞれ同一の、重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を含む。 10

【0082】

本発明において、チラゴルマブとRG6058 (hG1WT) は同一の抗体である。

【0083】

陽性対照抗体RG6058 (hG4) は、中国特許出願公開第CN108290946 (A) 号明細書に記載の抗体に由来する配列を含み、配列番号42～43のアミノ酸配列とそれぞれ同一の、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。

【0084】

陽性対照抗体RG6058 (hG1DM) を、Akeso Biopharma社の研究室において、ロット番号20180816にて調製した。その重鎖のアミノ酸配列を配列番号47に示し、軽鎖の配列番号を配列番号48に示す。 20

【0085】

本発明の実施例におけるアイソタイプ対照抗体であるヒト抗鶏卵リゾチームIgG (抗HEL、又はヒトIgG; hIgGと略記) の可変領域配列は、Acierno et al. "Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies" (Acierno et al., J Mol Biol., 2007; 374(1):130-46) に由来する。実施例で使用されたhIgG1DM及びhIgG4WTは、hG1DM及びhG4WT定常領域配列をそれぞれ有する、抗HELを有したアイソタイプ対照抗体であり、Akeso Biopharma社の研究室において調製されたものである。 30

【0086】

kサブタイプの抗HEL抗体 (ヒトhG4DM) の重鎖のC末端にTGFβRIIを融合することにより、抗HEL & TGFβ抗体を構築した。調製はAkeso Biopharma社の研究室で行った。その重鎖のアミノ酸配列を配列番号45に示し、軽鎖のアミノ酸配列を配列番号46に示す。

【0087】

TIGIT-mFcタンパク質 (ロット番号20171110)、TGF-βRII-mFc (ロット番号20200528)、CD155-hFc-ビオチン (ロット番号20170721)、CD155-mFc (ロット番号20190726)、及びCD112-mFc (ロット番号20190726) は、全て、公知の配列に従い、Akeso Biopharma社によって製造された。mFcはマウスIgGのFcタンパク質断片を表し、hFcはヒトIgGのFcタンパク質断片を表す。 40

【0088】

TGF-β1タンパク質は、Sino Biological社より、カタログ番号LC13DE3108にて購入した。

【0089】

TGF-β2タンパク質は、PeproTech社より、カタログ番号0420345E0620にて購入した。

【0090】

TGF-β3タンパク質は、PeproTech社より、カタログ番号0713410 50

A 0 2 1 9 にて購入した。

【0091】

本発明の以下の実施例において、使用した細胞株 2 9 3 T-T I G I T は、A k e s o B i o p h a r m a 社によって構築された。細胞株 2 9 3 T-T I G I T は、第 3 世代レンチウイルス系（例えば、A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L., J Virol., 1998. 72(11):8463-8471を参照）を用いて、H E K 2 9 3 T 細胞（武漢大学）のウイルス感染により調製された。ここで使用されたレンチウイルス発現ベクターは、p l e n t i 6 . 3 / V 5 - T I G I T F L - B S D であった（T I G I T は Genebank ID: NP_776160. 2 であり；ベクター p l e n t i 6 . 3 / V 5 T O P O は Invitrogen 社よりカタログ番号 K 5 3 1 5 2 0 にて購入した）。

10

【0092】

本発明の以下の実施例において、使用した細胞株 C H O - K 1 - T I G I T は、A k e s o B i o p h a r m a 社によって構築された。細胞株 C H O - K 1 - T I G I T は、第 3 世代レンチウイルス系（例えば、A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L., J Virol., 1998. 72(11):8463-8471を参照）を用いて、C H O - K 1 細胞（Cell Resource Center, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences）のウイルス感染により調製された。ここで使用されたレンチウイルス発現ベクターは、p l e n t i 6 . 3 / V 5 - T I G I T F L - B S D であった（T I G I T は Genebank ID: NP_776160. 2 であり、ベクター p l e n t i 6 . 3 / V 5 T O P O は Invitrogen 社よりカタログ番号 K 5 3 1 5 2 0 にて購入した）。

20

【0093】

本発明の以下の実施例において、使用した細胞株 J u r k a t - T I G I T は、A k e s o B i o p h a r m a 社によって構築された。細胞株 J u r k a t - T I G I T は、第 3 世代レンチウイルス系（例えば、A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L., J Virol., 1998. 72(11):8463-8471を参照）を用いて、J u r k a t 細胞（Cell Center, Chinese Academy of Sciences）のウイルス感染により調製された。ここで使用されたレンチウイルス発現ベクターは、p l e n t i 6 . 3 / V 5 - T I G I T F L - B S D であった（T I G I T は Genebank ID: NP_776160. 2 であり；ベクター p l e n t i 6 . 3 / V 5 T O P O は Invitrogen 社よりカタログ番号 K 5 3 1 5 2 0 にて購入した）。

30

【0094】

本発明の以下の実施例において、使用した細胞株 H T 1 0 8 0 - a C D 3 s c F v は、A k e s o B i o p h a r m a 社によって構築された。細胞株 H T 1 0 8 0 - a C D 3 s c F v は、第 3 世代レンチウイルス系（例えば、A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L., J Virol., 1998. 72(11):8463-8471を参照）を用いて、H T - 1 0 8 0 細胞（Cell Resource Center, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences）のウイルス感染により調製された。ここで使用されたレンチウイルス発現ベクターは、p C D H - a C D 3 s c F v - P u r o であった（抗 C D 3 s c F v の配列は抗ヒト C D 3 M u s m u s c u l u s O K T 3 ハイブリドーマ抗体から得た；ベクター p C D H - C M V - M C S - E F 1 - P u r o は Y o u b i o 社よりカタログ番号 V T 1 4 8 0

40

50

にて購入した)。

【0095】

実施例1：抗TIGIT抗体の調製

1. ハイブリドーマ細胞株LT019の調製

抗TIGIT抗体の調製に用いた抗原は、ヒトTIGIT-mFcであった(TIGITはGenBank ID: NP_776160.2であった)。免疫されたマウスの脾細胞をマウスのミエローマ細胞と融合し、ハイブリドーマ細胞を調製した。ヒトTIGIT-hFcを抗原として、間接ELISAによってハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、TIGITに特異的に結合する抗体を分泌することができるハイブリドーマ細胞を得た。スクリーニングによって得られたハイブリドーマ細胞に対して限界希釈法を行い、安定ハイブリドーマ細胞株を得た。上記ハイブリドーマ細胞株をハイブリドーマ細胞株LT019と名付け、この細胞株から分泌されるモノクローナル抗体を26B12と名付けた。

10

【0096】

ハイブリドーマ細胞株LT019(TIGIT-26B12としても知られる)を、China Center for Type Culture Collection(CCTCC)に、CCTCC番号C2020208のもと、2020年10月23日付けで寄託した。寄託機関のアドレスは、郵便番号430072 中華人民共和国 武漢 武漢大学である。

【0097】

2. 抗TIGIT抗体26B12の調製

上記で調製した細胞株LT019を、化学的に定義された培地(CD培地、1%ペニシリン-ストレプトマイシン含有)を用いて37℃/5%CO₂で培養した。7日後、細胞培養上清を回収し、高速遠心分離、及び精密濾過膜による真空濾過を行い、HiTrap protein A HP カラムを用いた精製によって抗体26B12を得た。

20

【0098】

実施例2：抗TIGIT抗体26B12の配列分析

細胞／細菌全RNA抽出キット(Tiagen社、カタログ番号DP430)の使用説明書に記載の方法に従い、実施例1で培養した細胞株LT019からmRNAを抽出した。

30

【0099】

Invitrogen SuperScript(登録商標) III First-Strand Synthesis System for RT-PCRの使用説明書に従ってcDNAを合成し、PCRによって増幅した。

【0100】

pEASY-T1 Cloning Kit(Transgen社、CT101)の使用説明書に従い、PCR増幅産物から直接TAクローニングを行った。

【0101】

TAクローニング産物を直接シーケンシングした。シーケンシングの結果は以下の通りである。

40

【0102】

重鎖可変領域のヌクレオチド配列を、363bpの長さで配列番号2に示す。コードされるアミノ酸配列を、121アミノ酸の長さで配列番号1に示す。重鎖HCDR1、HCDR2、及びHCDR3の配列を、配列番号3、4、及び5にそれぞれ示す。

【0103】

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列を、321bpの長さで配列番号7に示す。コードされるアミノ酸配列を、107アミノ酸の長さで配列番号6に示す。軽鎖LCDR1、LCDR2、及びLCDR3の配列を、配列番号8、9、及び10にそれぞれ示す。

【0104】

実施例3：抗ヒトTIGITヒト化抗体及び変異抗体の設計及び調製

50

1. 抗ヒトTIGITヒト化抗体26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4、及び26B12H4L4の軽鎖及び重鎖の設計

ヒトTIGITタンパク質の三次元結晶構造、及び実施例2で得られた抗体26B12の配列に基づき、抗体26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4、及び26B12H4L4（NCBIデータベースからの抗体定常領域配列：重鎖定常領域はIgガンマー1鎖C領域、アクセッション番号P01857であり；軽鎖定常領域はIgカップ鎖C領域、アクセッション番号P01834である）の可変領域配列を設計した。

【0105】

設計された可変領域配列を以下の表1に示す。

【表2】

表1：抗ヒトTIGITヒト化抗体の可変領域配列

名称	重鎖可変領域のアミノ酸配列の配列番号	重鎖可変領域のヌクレオチド配列の配列番号	軽鎖可変領域のアミノ酸配列の配列番号	軽鎖可変領域のヌクレオチド配列の配列番号
26B12H1L1	11	12	19	20
26B12H4L1	17	18	19	20
26B12H2L2	13	14	21	22
26B12H2L3	13	14	23	24
26B12H3L2	15	16	21	22
26B12H3L3	15	16	23	24
26B12H1L4	11	12	25	26
26B12H4L4	17	18	25	26

【0106】

上記8種抗体26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4、及び26B12H4L4に関して、重鎖可変領域のヌクレオチド配列の長さは363bpであり、コードされるアミノ酸配列の長さは121aaであり；軽鎖可変領域のヌクレオチド配列の長さは321bpであり、コードされるアミノ酸配列の長さは107aaであった。

【0107】

また、上記8種抗体は同一のHC DR1～HC DR3及びLC DR1～LC DR3を有していた。HC DR1、HC DR2、及びHC DR3の配列を配列番号3、4、及び5にそれぞれ示し、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3の配列を配列番号8、9、及び10にそれぞれ示す。

【0108】

2. ヒト化抗体26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4、及び26B12H4L4の調製

重鎖定常領域は全てIgガンマー1鎖C領域、アクセッション番号P01857であり、軽鎖定常領域は全てIgカップ鎖C領域、アクセッション番号P01834であった。

【0109】

26B12H1L1の重鎖cDNA及び軽鎖cDNA、26B12H4L1の重鎖cDNA及び軽鎖cDNA、26B12H2L2の重鎖cDNA及び軽鎖cDNA、26B12H3L2の重鎖cDNA及び軽鎖cDNA、26B12H2L3の重鎖cDNA及び軽鎖cDNA、26B12H3L3の重鎖cDNA及び軽鎖cDNA、26B12H1L4の重鎖cDNA及び軽鎖cDNA、26B12H2L4の重鎖cDNA及び軽鎖cDNA、及び26B12H4L4の重鎖cDNA及び軽鎖cDNAを、別々にpUC57sim

p l e (G e n S c r i p t 社により提供) ベクターにクローニングし、
p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 H 1、p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 L 1
;
p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 H 4、p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 L 1
;
p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 H 2、p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 L 2
;
p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 H 3、p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 L 2
;
p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 H 2、p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 L 3 10
;
p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 H 3、p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 L 3
;
p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 H 1、p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 L 4
; 及び
p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 H 4、p U C 5 7 s i m p l e - 2 6 B 1 2 L 4
;

を得た。

【0110】

Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition)に記載の標準的な技術を参照し、E c o R I 及び H i n d I I I 消化によって合成された重鎖及び軽鎖全長遺伝子を、制限酵素 E c o R I 及び H i n d I I I による消化によって発現ベクター p c D N A 3 . 1 にサブクローニングし、発現プラスミド p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 H 1、p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 L 1、p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 H 4、p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 H 2、p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 L 2、p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 H 3、p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 L 3、及び p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 L 4 を得て、組換え発現プラスミドの重鎖／軽鎖遺伝子をさらにシーケンシングした。その後、対応する軽鎖及び重鎖組換えプラスミド (p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 H 1 / p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 L 1、p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 H 4 / p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 L 1、p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 H 2 / p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 L 2、p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 H 3 / p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 L 2、p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 H 2 / p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 L 3、p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 H 3 / p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 L 3、p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 H 1 / p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 L 4、及び p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 H 4 / p c D N A 3 . 1 - 2 6 B 1 2 L 4) を含む、設計した遺伝子の組み合わせを、別々に 2 9 3 F 細胞にコトランスフェクトし、培養物を回収及び精製した。配列を確認した後、エンドトキシンフリーの発現プラスミドを調製し、抗体発現のために H E K 2 9 3 細胞に対して一過性トランスフェクションを行った。培養 7 日後に細胞培養物を回収し、P r o t e i n A カラム上で親和性精製を行い、ヒト化抗体を得た。

【0111】

ヒト化抗体 2 6 B 1 2 H 2 L 2 を、本明細書において 2 6 B 1 2 H 2 L 2 (h G 1 W T) とも呼ぶ。

【0112】

3. ヒト化抗体 2 6 B 1 2 H 2 L 2 (h G 1 D M) 及び 2 6 B 1 2 H 2 L 2 (h G 4 D M) の設計

発明者は、2 6 B 1 2 H 2 L 2 の重鎖定常領域において、2 3 4 位にロイシンからアラニンへの点変異 (L 2 3 4 A) を (E U 番号付けシステムによる; 以下同様)、また、2 3 5 位にロイシンからアラニンへの点変異 (L 2 3 5 A) を導入することにより、変異定常領域を有するヒト化抗体 2 6 B 1 2 H 2 L 2 (h G 1 D M) を得た。2 6 B 1 2 H 2 L 2 (h G 1 D M) の重鎖 2 6 B 1 2 H 2 (h G 1 D M) のアミノ酸配列を配列番号 3 1 に

示し、軽鎖のアミノ酸配列を配列番号 29 に示す。

【0113】

発明者は、Ig ガンマー 4 鎖 C 領域（アクセッション：P01861.1）を重鎖定常領域として用い、26B12H2L2 の重鎖定常領域において、234 位にロイシンからアラニンへの点変異（L234A）を、また、235 位にロイシンからアラニンへの点変異（L235A）を導入し、一方で抗体可変領域を一定とすることにより、変異定常領域を有するヒト化抗体 26B12H2L2（hG4DM）を得た。26B12H2L2（hG4DM）の重鎖 26B12H2（hG4DM）のアミノ酸配列を配列番号 27 に示し、軽鎖のアミノ酸配列を配列番号 29 に示す。

【0114】

ヒト化抗体 26B12H2L2（hG1DM）及び 26B12H2L2（hG4DM）は、上記工程 2 に記載の方法によって調製した。

【0115】

実施例 4：抗 TIGIT 抗体と TGF-βR の融合タンパク質の配列設計及び調製

1. 配列設計

抗 TIGIT 抗体と TGF-βR の融合タンパク質の構成を、次の表 2 に示す。

【表 3】

表 2：抗 TIGIT 抗体と TGF-βR の融合タンパク質の重鎖及び軽鎖の構成

融合タンパク質名	IgG 部分の重鎖	リンカー断片	TGF-βRII 細胞外領域の短縮断片	軽鎖
TF01	配列番号 27	配列番号 44	配列番号 33	配列番号 29
TF02	配列番号 31	配列番号 44	配列番号 33	配列番号 29

【0116】

TGF-β 受容体部分は 2 個のペプチド鎖を有し、それぞれが IgG 部分の重鎖 C 末端にリンカー断片を介して連結する。

【0117】

2. 抗体の発現及び精製

TF01 及び TF02 の重鎖 cDNA 配列及び軽鎖 cDNA 配列を、ベクター pUC57simple（Genscript 社により提供）に別々にクローニングし、プラスミド pUC57simple-TF01H 及び pUC57simple-TF02H、又は、pUC57simple-TF01L 及び pUC57simple-TF02L をそれぞれ得た。

【0118】

プラスミド pUC57simple-TF01H/pUC57simple-TF01L、及び pUC57simple-TF02H/pUC57simple-TF02L をそれぞれ消化（HindIII 及び EcoRI）し、電気泳動で単離した重鎖及び軽鎖を別々にベクター pcDNA3.1 にサブクローニングし、組換えプラスミドを抽出して 293F 細胞にコトランスフェクトした。細胞培養 7 日後に培養物を高速遠心分離で分離し、上清を濃縮して、HiTrap MabSelect SuRe カラム上にロードした。タンパク質を溶出緩衝液を用いてワンステップで溶出した。標的試料を単離し、緩衝液を PBS へと交換した。その結果、抗 TIGIT 抗体と TGF-βR の融合タンパク質、TF01 及び TF02 が調製された。

【0119】

実施例 5：TF01 及び TF02 の、抗原又は TGF-β への結合活性の ELISA 分析

1. TF01、TF02、26B12H2L2（hG4DM）、及び RG6058（hG4）の、抗原 TIGIT-mFc への結合活性の間接 ELISA 分析

【0120】

方法は次の通りである。

マイクロプレートに2 μg/mLのヤギ抗マウスIgG Fc (Jackson社、カタログ番号115-005-071)でコートし、4℃で一晩インキュベートした。その後、マイクロプレートをPBSTで1回洗浄し、ブロッキング溶液として1%BSAを含むPBS溶液を用いて37℃で2時間ブロッキングした。ブロッキング後、マイクロプレートをPBSTで3回洗浄した。その後、1 μg/mLのTIGIT-mFcを加え、マイクロプレートを37℃で30分間インキュベートし、次いでPBSTで3回洗浄した。PBST溶液で段階希釈した抗体(抗体の希釈勾配を表3に示す)を加えた。試験抗体を含むマイクロプレートを37℃で30分間インキュベートし、その後、PBSTで3回洗浄した。洗浄後、1:5000の割合で希釈したHRP標識ヤギ抗ヒトIgG(H+L)(Jackson社、カタログ番号109-035-098)の二次抗体ワーキング溶液を加え、次いでマイクロプレートを37℃で30分間インキュベートした。インキュベート後、プレートをPBSTで4回洗浄した。次いで、TMB(Neogen、308177)を暗所で加えて5分間発色させた後、停止溶液を加えて発色反応を停止させた。マイクロプレートを直ちにマイクロプレートリーダーに入れ、マイクロプレート中の各ウェルのOD値を450nmで読み取った。SoftMax Pro 6.2.1により、データの分析と加工を行った。

【0121】

結果を表3及び図1に示す。

【表4】

表3: TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、及びRG6058(hG4)の、TIGIT-mFcへの結合のELISA分析

T I G I T-mFc (1 μg/mL)、50 μL/ウェル								
抗体希釈勾配 (nM)	T F 0 1		T F 0 2		2 6 B 1 2 H 2 L 2 (h G 4 D M)		R G 6 0 5 8 (h G 4)	
	初期抗体濃度 (μg/mL)							
	0.399		0.399		0.325		0.332	
2.240	2.965	2.902	2.950	2.911	2.952	2.999	3.032	3.017
0.747	2.921	2.862	2.861	2.819	2.972	2.993	3.018	3.040
0.249	2.625	2.473	2.374	2.350	2.703	2.650	2.691	2.739
0.083	1.808	1.669	1.475	1.438	2.054	2.117	1.898	2.015
0.028	0.889	0.818	0.700	0.685	1.134	1.158	0.992	1.081
0.009	0.404	0.362	0.305	0.307	0.529	0.546	0.460	0.505
0.0031	0.210	0.178	0.165	0.167	0.252	0.265	0.223	0.261
0	0.109	0.102	0.097	0.105	0.098	0.117	0.113	0.131
二次抗体	ヤギ抗ヒト I g G (H+L)、H R P (1 : 5 0 0 0)							
E C ₅₀ (nM)	0.067		0.091		0.046		0.055	

【0122】

図より、TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、及びRG6058(hG4)が、用量依存的に、抗原TIGIT-mFcに効果的に結合できたことが分かる。全用量に対するEC₅₀値を表3に示す。結合した抗体の吸光度の定量分析に基づき、カーブフィッティングによって得られた結果によれば、TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、及びRG6058(hG4)(対照)の結合効率EC₅₀値は、それぞれ0.067 nM、0.091 nM、0.046 nM、及び0.055 nMであった。

【0123】

上記実験結果は、TF01、TF02、26B12H2L2(hG4DM)、及びRG6058(hG4)が、TIGIT-mFcに効果的に結合する活性を有していたことを

示している。

【0124】

2. T F 0 1、T F 0 2、及びT G F - β R I I - m F c の、T G F - β 1、T G F - β 2、及びT G F - β 3に対するの結合活性の間接E L I S A分析

【0125】

方法は次の通りである。

3枚のマイクロプレートに、それぞれ1 μ g / m L、2 μ g / m L、及び1 μ g / m Lの、T G F - β 1、T G F - β 2、及びT G F - β 3でコートし、4℃で一晩インキュベートした。その後、抗原でコートされたマイクロプレートをP B S Tで1回洗浄し、ブロッキング溶液として1% B S Aを含むP B S溶液を用いて37℃で2時間ブロッキングした。ブロッキング後、マイクロプレートをP B S Tで3回洗浄した。その後、P B S T溶液で段階希釈した抗体、及びT G F - β R I I - m F cを加えた。試験抗体及びT G F - β R I I - m F cを含むマイクロプレートを、37℃で30分間インキュベートし、その後、P B S Tで3回洗浄した。洗浄後、1 : 5 0 0 0の割合で希釈したH R P 標識ヤギ抗ヒトI g G (H + L) (J a c k s o n 社、カタログ番号1 0 9 - 0 3 5 - 0 9 8) 及びH R P 標識ヤギ抗マウスI g G F c (J a c k s o n 社、カタログ番号1 1 5 - 0 3 5 - 0 7 1) の二次抗体ワーキング溶液を加え、次いでマイクロプレートを37℃で30分間インキュベートした。インキュベート後、プレートをP B S Tで4回洗浄した。次いで、T M B (N e o g e n、3 0 8 1 7 7) を暗所で加えて5分間発色させた後、停止溶液を加えて発色反応を停止させた。マイクロプレートを直ちにマイクロプレートリーダーに入れ、マイクロプレート中の各ウェルのOD値を450 nmで読み取った。S o f t M a x P r o 6 . 2 . 1により、データの分析と加工を行った。

【0126】

結果を、表4、5、及び6、並びに図2、3、及び4に示す。

【表5】

表4 : T F 0 1、T F 0 2、及びT G F - β R I I - m F c の、T G F - β 1への結合のE L I S A分析

抗体希釈勾配 (μ g / m L)	T G F - β 1 (1 μ g / m L)、5 0 μ L / ウェル					
	T F 0 1		T F 0 2		T G F - β R I I - m F c	
1.000	2.885	2.823	2.786	2.819	1.896	2.007
0.333	2.811	2.771	2.695	2.769	1.949	1.909
0.111	2.515	2.432	2.379	2.411	1.787	1.721
0.037	1.525	1.352	1.358	1.304	1.136	1.044
0.012	0.663	0.611	0.612	0.548	0.673	0.602
0.004	0.233	0.206	0.206	0.190	0.240	0.206
0.001	0.113	0.100	0.103	0.092	0.119	0.099
0.000	0.063	0.056	0.057	0.060	0.053	0.224
二次抗体	ヤギ抗ヒトI g G (H + L)、H R P (1 : 5 0 0 0)、5 0 μ L / ウェル			ヤギ抗マウスI g G m F C、H R P (1 : 5 0 0 0)、5 0 μ L / ウェル		
E C ₅₀ (nM)	0.207		0.224		0.356	

10

20

30

40

50

【表 6】

表 5：TF01、TF02、及びTGF-βRII-mFcの、TGF-β2への結合のELISA分析

抗体希釈勾配 (nM)	TGF-β2 (2 μg/mL)					
	TF01		TF02		TGF-βRII-mFc	
初期タンパク質濃度 (μg/mL)	2.001		2.000		0.971	
11.23 nM	2.874	2.896	2.821	2.812	1.462	1.436
1:3	2.782	2.769	2.764	2.716	1.336	1.322
1:9	2.411	2.353	2.224	2.186	0.908	0.925
1:27	1.507	1.353	1.197	1.199	0.432	0.462
1:81	0.707	0.430	0.548	0.554	0.253	0.211
1:243	0.364	0.350	0.314	0.316	0.202	0.158
1:729	0.237	0.243	0.231	0.243	0.184	0.152
0	0.164	0.171	0.181	0.191	0.176	0.160
二次抗体	ヤギ抗ヒトIgG (H+L) -HRP (1:5000)				ヤギ抗マウスIgG Fc-HRP (1:5000)	
EC ₅₀ (nM)	0.477		0.594		1.029	

【表 7】

表 6：TF01、TF02、及びTGF-βRII-mFcの、TGF-β3への結合のELISA分析

抗体希釈勾配 (nM)	TGF-β3 (1 μg/mL)					
	TF01		TF02		TGF-βRII-mFc	
初期タンパク質濃度 (μg/mL)	2.001		2.000		0.971	
11.23 nM	3.065	3.042	3.009	3.035	1.663	1.765
1:3	3.058	3.048	3.048	3.054	1.667	1.649
1:9	2.957	2.976	2.931	2.944	1.411	1.447
1:27	2.382	2.409	2.269	2.213	0.912	0.934
1:81	0.993	0.980	0.964	0.913	0.338	0.340
1:243	0.263	0.278	0.270	0.252	0.113	0.114
1:729	0.120	0.118	0.116	0.115	0.071	0.074
0	0.057	0.055	0.054	0.055	0.056	0.059
二次抗体	ヤギ抗ヒトIgG (H+L) -HRP (1:5000)				ヤギ抗マウスIgG Fc-HRP (1:5000)	
EC ₅₀ (nM)	0.215		0.234		0.402	

【0127】

結合した抗体の吸光度の定量分析に基づき、カーブフィッティングによって得られた結果によれば、TF01のTGF-β1、TGF-β2、及びTGF-β3への結合効率EC₅₀値は、それぞれ0.207 nM、0.477 nM、及び0.215 nMであり、TF02のTGF-β1、TGF-β2、及びTGF-β3への結合効率EC₅₀値は、それぞれ0.224 nM、0.594 nM、及び0.234 nMであり、TGF-βR2-mFc（陽性対照）のTGF-β1、TGF-β2、及びTGF-β3への結合効率EC₅₀値は、それぞれ0.356 nM、1.029 nM、及び0.402 nMであった。

【0128】

結果は、TF01及びTF02が、TGF-β1、TGF-β2、及びTGF-β3に、用量依存的に、効果的に結合する活性を有することを示す。結果はさらに、TF01、TF02、及びTGF-βRII-mFcのそれぞれが、TGF-β1、TGF-β2、

及び TGF-β 3 にそれぞれ効果的に結合でき、また、TF01 及び TF02 は、TGF-β 1、TGF-β 2、及び TGF-β 3 への結合能が TGF-β RII-mFc よりも高いことを示す。

【0129】

実施例 6：ヒト TGF-β 1 及び TGF-β 3 への結合に関して TGF-β RII-His-ビオチンと競合する、TF01 及び TF02 の活性の ELISA 分析

実験工程：2 枚のマイクロプレートを、2 μg/mL の TGF-β 1 及び TGF-β 3 でそれぞれコートし、4℃で一晩インキュベートした。インキュベート後、抗原でコートされたマイクロプレートを PBST で 1 回リンスし、ブロッキング溶液として 1% BSA を含む PBS 溶液を用いて 2 時間ブロッキングした。ブロッキング後、マイクロプレートを PBST で 3 回洗浄した。PBST 溶液で段階希釈した抗体、及び TGF-β RII-mFc をマイクロプレートに加えた。TGF-β 1 のマイクロプレートについては、室温で 60 分間インキュベート後、プレートを PBST で 3 回洗浄し、次いで 0.01 μg/mL の TGF-β RII-His-ビオチンを加えて室温で 10 分間インキュベートした。TGF-β 3 のマイクロプレートについては、37℃で 30 分間インキュベート後、プレートを PBST で 3 回洗浄し、次いで 0.01 μg/mL の TGF-β RII-His-ビオチンを加えて 37℃で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、プレートを PBST で 3 回洗浄した。洗浄後、1:4000 の割合で希釈した SA-HRP ワーキング溶液を加え、マイクロプレートを 37℃で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、プレートを PBST で 4 回洗浄した。次いで、TMB (Neogen、308177) を暗所で加えて 4 分間発色させた後、停止溶液を加えて発色反応を停止させた。マイクロプレートを直ちにマイクロプレートリーダーに入れ、マイクロプレート中の各ウェルの OD 値を 450 nm で読み取った。SoftMax Pro 6.2.1 により、データの分析と加工を行った。

【0130】

TGF-β 1 及び TGF-β 3 への結合に関して TGF-β RII-His-ビオチンと競合する抗体の結果を表 7 及び 8、並びに図 5 及び 6 に示す。吸光度 vs. 抗体濃度の曲線をフィッティングし、TGF-β 1 及び TGF-β 3 への結合に関して TGF-β RII-His-ビオチンと競合する抗体の EC50 値を算出した。結果を以下の表 7 及び 8 に示す。

【表 8】

表 7：TGF-β 1 への結合に関して TGF-β RII-His-ビオチンと競合する、TF01 及び TF02 の活性の分析

抗体希釈勾配 (nM)、100 μL/ウェル	TGF-β 1 (2 μg/mL)、50 μL/ウェル					
	TF01		TF02		TGF-β RII-mFc	
初期タンパク質濃度 (μg/mL)	10.000		9.998		4.851	
56.134	0.252	0.281	0.256	0.279	0.294	0.317
28.067	0.275	0.270	0.222	0.266	0.305	0.311
14.034	0.324	0.317	0.316	0.350	0.396	0.361
7.017	0.714	0.815	0.961	1.032	0.933	0.828
3.508	1.267	1.296	1.385	1.508	1.435	1.360
1.754	1.491	1.497	1.590	1.618	1.601	1.576
0.877	1.561	1.573	1.524	1.595	1.609	1.543
0	1.629	1.561	1.570	1.545	1.609	1.603
TGF-β R2-His-ビオチン、0.01 μg/mL、50 μL/ウェル						
二次抗体：SA-HRP (1:4000)、50 μL/ウェル						
EC50 (nM)	5.759		7.469		6.475	

10

20

30

40

50

【表 9】

表 8：TGF-β 3 への結合に関して TGF-β RII-His-ビオチンと競合する、TF01 及び TF02 の活性の分析

抗体希釈勾配、 50 μL/ウェル	TGF-β 3 (2 μg/mL)、50 μL/ウェル					
	TF01		TF02		TGF-β RII-mFc	
初期タンパク質濃度 (μg/mL)	10.000		9.998		4.851	
56.134	0.232	0.213	0.210	0.220	0.181	0.197
28.067	0.249	0.233	0.233	0.299	0.198	0.218
14.034	0.307	0.293	0.299	0.279	0.255	0.277
7.017	0.364	0.378	0.486	0.456	0.372	0.335
3.508	0.897	0.892	0.973	0.937	0.813	0.601
1.754	1.294	1.344	1.327	1.323	1.272	1.040
0.877	1.427	1.466	1.436	1.466	1.476	1.311
0	1.511	1.500	1.535	1.508	1.575	1.453
TGF-β RII-His-ビオチン、0.01 μg/mL、50 μL/ウェル						
二次抗体	SA-HRP (1:4000)					
EC ₅₀ (nM)	3.569		3.879		2.808	

【0131】

結合した抗体の吸光度の定量分析に基づき、カーブフィッティングによって得られた結果によれば、TGF-β 1 への結合に関して TGF-β RII-His-ビオチンと競合する、TF01、TF02、及び TGF-β RII-mFc の結合効率 EC₅₀ 値は、それぞれ 5.579 nM、7.469 nM、及び 6.475 nM であり、TGF-β 3 への結合に関して TGF-β RII-His-ビオチンと競合する、TF01、TF02、及び TGF-β RII-mFc の結合効率 EC₅₀ 値は、それぞれ 3.569 nM、3.879 nM、及び 2.808 nM であった。

【0132】

結果は、TF01 及び TF02 が、TGF-β 1 及び TGF-β 3 に、用量依存的に、効果的に結合できることを示す。また、TF01 は、TGF-β 1 に対する結合能が TGF-β RII-His-ビオチンよりも高い。TF01 は、TGF-β 1 への結合に関して TGF-β RII-His-ビオチンと競合する能力が TGF-β RII-mFc よりも高かった。

【0133】

実施例 7：ヒト TIGIT-mFc への結合に関して CD155-hFc-ビオチンと競合する、TF01 及び TF02 の活性の ELISA 分析

マイクロプレートに 2 μg/mL のヒト TIGIT-mFc (TIGIT GenBank ID: NP_776160.2) をコートし、4℃で一晩インキュベートした。インキュベート後、マイクロプレートを、1% BSA を含む PBS 溶液で 37℃にて 2 時間ブロッキングした。ブロッキング後、プレートを 3 回洗浄し、乾燥した。抗体を、20.18 nM (最終濃度 10.09 nM) を開始濃度として、希釈プレート上で、1:3 の勾配率にて 7 種の濃度に段階希釈し、また、ブランク対照を設定した。その後、4 μg/mL (最終濃度 2 μg/mL) のヒト CD155-hFc-ビオチン溶液を等量加え、系をよく混合した。その後、混合物を室温で 20 分間インキュベートした。その後、コートしたマイクロプレートに反応後の混合物を加え、マイクロプレートを 37℃で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、プレートを PBST で 3 回洗浄し、乾燥した。SA-HRP (KPL、14-30-00) ワーキング溶液を加え、プレートを 37℃で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、プレートを 4 回洗浄し、乾燥した。次いで、TMB (Neogen、308177) を暗所で加えて 5 分間発色させた後、停止溶液

を加えて発色反応を停止させた。マイクロプレートを直ちにマイクロプレートリーダーに入れ、マイクロプレート中の各ウェルのOD値を450nmで読み取った。SoftMax Pro 6.2.1により、データの分析と加工を行った。

【0134】

結果を図7に示す。全用量に対するOD値を表9に示す。結合した抗体の吸光度 (absorbance intensity) の定量分析に基づき、カーブフィッティングによって抗体の結合効率EC₅₀値を得た (表9)。

【表10】

表9：TIGIT-mFcへの結合に関してCD155-hFc-ビオチンと競合するTF01、TF02、26B12H2L2 (hG4DM)、及びRG6058 (hG4) の活性の分析

抗体希釈 (nM)	TIGIT-mFc (2μg/mL)、50μL/ウェル							
	TF01		TF02		26B12H2L2 (hG4DM)		RG6058 (hG4)	
初期最終抗体濃度 (μg/mL)	1.797		1.797		1.463		1.496	
10.090	0.055	0.051	0.052	0.049	0.049	0.046	0.047	0.052
3.363	0.085	0.086	0.221	0.212	0.066	0.065	0.151	0.127
1.121	0.786	0.765	0.923	0.949	0.865	0.874	0.913	0.974
0.374	0.982	1.059	1.099	1.106	1.148	1.117	1.170	1.199
0.125	0.993	1.042	1.148	1.180	1.123	1.150	1.153	1.169
0.042	1.028	1.051	1.118	1.144	1.174	1.141	1.203	1.144
0.0138	1.080	0.979	1.036	1.083	1.155	1.165	1.137	1.139
0	1.001	1.039	1.011	1.058	1.095	1.130	1.182	1.126
一次抗体	CD155-hFc-ビオチン (2μg/mL)、50μL/ウェル							
二次抗体	SA-HRP (1:4000)							
EC ₅₀ (nM)	1.463		1.963		1.423		1.675	

【0135】

TIGIT-mFcが、そのリガンドCD155-hFc-ビオチンへ結合するのをブロックするための、TF01、TF02、26B12H2L2 (hG4DM)、及びRG6058 (hG4) (対照) のEC₅₀値は、それぞれ、1.463nM、1.963nM、1.423nM、及び1.675nMであった。

【0136】

結果は、抗原であるヒトCD155-hFc-ビオチンがその受容体であるヒトTIGIT-mFcに結合するのを、TF01、TF02、26B12H2L2 (hG4DM)、及びRG6058 (hG4) (対照) が用量依存的に、効果的にブロックできることを示す。TF01は、TIGIT-mFcがそのリガンドCD155-hFc-ビオチンへ結合するのをブロックする能力が、対照抗体RG6058 (hG4) よりも高かった。

【0137】

実施例8：293T-TIGIT膜表面上のTIGITへの、TF01の結合活性のFACS分析

対数増殖期の293T-TIGIT細胞を採取し、透明なV底96ウェルプレートに3×10⁵細胞/ウェルで移した。350gの1%PBSAを加え、混合物を5分間遠心分離して、上清を除去した。1%PBSAで希釈した抗体100μL (それぞれ、100nM、33.33nM、11.11nM、3.7nM、1.23nM、0.41nM、0.041nM、0.0041nM、及び0.00041nMの最終濃度) を、それぞれ加えた。系を穏やかに均一に混合し、混合物を氷上で1時間インキュベートした。その後、350gの1%PBSAを加え、混合物を5分間遠心分離して、上清を除去した。350倍希釈したFITC標識ヤギ抗ヒトIgG二次抗体 (Jackson社、カタログ番号10

9-095-098)を加え、再懸濁して均一に混合し、混合物を暗所にて氷上で0.5時間インキュベートした。350gの1%PBSAを加え、混合物を5分間遠心分離して、上清を除去した。そして、400μLのPBSAを加えて細胞沈殿物を再懸濁し、得られた混合物をFACS Calibur分析のためのフローチューブ(flow tube)に移した。

【0138】

実験結果を表10及び図8に示す。TF01及びRG6058(hG4)(対照抗体)は、どちらも293T-TIGIT膜表面上のTIGITに特異的に結合することができた。

【表11】

表10：293T-TIGIT細胞表面上のTIGITへの、TF01及びRG6058(hG4)の結合活性のFACS分析

抗体希釈勾配 (nM)	TF01	RG6058 (hG4)
0.00041	8.83	9.07
0.0041	10.00	10.30
0.041	18.50	19.50
0.41	97.40	106.00
1.23	244.00	251.00
3.7	497.00	508.00
11.1	596.00	629.00
33.3	604.00	630.00
100	589.00	630.00
EC ₅₀ (nM)	1.540	1.612
R2	0.9981	0.9981

【0139】

293T-TIGIT細胞に結合するTF01及びRG6058(hG4)のEC₅₀値は、同一実験条件下で、それぞれ1.540nM及び1.612nMであった。

【0140】

結果は、TF01が、293T-TIGIT膜表面上のTIGITに対して用量依存的に、効果的に結合する活性を有し、対照抗体RG6058(hG4)よりも高い結合能を有することを示した。

【0141】

実施例9：細胞膜表面上の抗原TIGITへの結合に関してCD155又はCD112と競合するTF01の、競合フローサイトメトリーによる分析

293T-TIGIT細胞を従来法で消化し、各ウェルが300,000細胞となるようにいくつかの試料に分割して、その後、遠心分離と洗浄を行った。次いで、勾配希釈された対応する抗体を各ウェルに100μL加え、混合物を氷上で30分間インキュベートした。その後、100μLのCD155/CD112-mFc(Akeso Biopharma社による調製；ロット番号20190726/20190726)を各ウェルに加え、系を良く混合して、最終濃度10nM/30nMにした。その後、混合物を氷上で1時間インキュベートした。次いで、350gの1%PBSAを加え、混合物を5分間遠心分離して、上清を除去した。1:300の割合で希釈したAPCヤギ抗マウスIgG抗体(Biolegend社、カタログ番号405308)を各ウェルに100μL加え、1%PBSAをブランク試料に100μL加えて、系をよく混合した。その後、混合物を暗所にて氷上で30分間インキュベートし、次いで遠心分離、洗浄、及び再懸濁を行った後、フローサイトメトリーチューブに移して試験を行った。

【0142】

結果を図9及び10に示し、EC₅₀値を表11に示す。蛍光定量分析及びカーブフィ

ッティングにより、抗原への結合に関して競合するTF01のEC₅₀値は、それぞれ1.2720 nM及び0.7445 nMと算出された。

【表12】

表11：293T-TIGIT表面抗原への結合に関して競合するTF01の蛍光強度のFACS分析

抗体希釈勾配 (nM)	CD155		CD112	
	TF01	チラゴルマブ	TF01	チラゴルマブ
0.00041	1499.0	1725.0	350.0	421.0
0.0041	1449.0	1739.0	339.0	418.0
0.041	1432.0	1754.0	359.0	382.0
0.41	1220.0	1469.0	267.0	314.0
1.23	802.0	956.0	125.0	168.0
3.7	113.0	95.8	42.7	88.1
11.1	25.9	30.4	33.1	40.6
33.3	25.5	30.0	33.1	38.2
100	25.0	31.1	32.5	38.3
EC ₅₀ (nM)	1.2720	1.2760	0.7445	0.8370
R ²	0.9958	0.9957	0.9985	0.9962

10

【0143】

結果は、293T-TIGIT宿主細胞表面上のTIGITへのCD155及び／又はCD112の結合を、TF01抗体が用量依存的に、効果的にブロックできることを示す。

20

【0144】

実施例10：Fc受容体FcγRIに対する、TF01の親和性の分析

Fc受容体FcγRI（CD64としても知られる）は、IgG抗体のFc断片に結合することができ、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）に関与している。Fc受容体への治療抗体の結合能は、抗体の安全性と有効性に影響を与えると思われる。実験において、FcγRIに対するTF01の親和性定数をFortebio Octetシステムを用いて測定し、抗体のADCC活性を評価した。

30

【0145】

FcγRIに対する対応する抗体の親和性定数をFortebio Octetシステムによって測定する方法を、以下に簡単に記載する。試料希釈緩衝液は、PBS中の0.02% Tween-20及び0.1% BSA（pH7.4）であった。1 μg/mLのFcγRI溶液（Sinobio社より購入）をHIS1Kセンサーに加え、センサー表面上にFcγRIを50秒間固定した。FcγRIへの抗体の結合及び解離定数の両者を、3.12～50 nM（2倍段階希釈）の抗体濃度の緩衝液中で測定した。試料プレートの振とう速度は1000 rpmであり、温度は30℃であり、頻度（frequency）は5.0 Hzであった。データを1：1モデルでフィッティング及び分析することにより、親和性定数を得た。

40

【0146】

TF01に対するFcγRIの親和性定数に関する結果を表12及び図11～12に示す。

【表13】

表12：FcγRIへのTF01の結合に関する動態パラメータ

抗体	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	SE (kon)	K _{dis} (1/s)	SE (kdis)	R _{max} (nM)
TF01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26B12H2L2 (hG1WT)	6.51E-09	5.58E+05	2.90E+03	3.64E-03	1.54E-05	0.30-0.37

50

N/Aは、抗体が結合しなかったか、又は、抗原に対するシグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【0147】

結果は、26B12H2L2(hG1WT)がFcγRIに 6.51×10^{-9} Mの親和性定数で結合できたこと、そして、TF01についてはFcγRIに結合しなかった、又は結合シグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【0148】

結果は、FcγRIに対するTF01の結合活性が効果的に排除されたことを示す。

【0149】

実施例11：Fc受容体FcγRIIIa及びそのサブタイプに対する、TF01の親和性の分析

(1) TF01に対する、FcγRIIIa__V158の親和性定数の分析

Fc受容体FcγRIIIa__V158(CD16a__V158としても知られる)は、IgG抗体のFc断片に結合することができ、ADCC効果を媒介する。実験において、FcγRIIIa__V158に対するTF01の親和性定数をFortebio Octetシステムを用いて測定し、抗体のADCC活性を評価した。

【0150】

対応する抗体の親和性定数をFortebio Octetシステムによって測定する方法を、以下に簡単に記載する。試料希釈緩衝液は、PBS中の0.02% Tween-20及び0.1% BSA(pH7.4)であった。5μg/mLのFcγRIIIa__V158を、HIS1Kセンサー上に60秒間固定した。センサーを緩衝液中で60秒間平衡化し、センサー上の固定化FcγRIIIa__V158の、31.25~500nM(2倍段階希釈)の濃度の抗体に対する結合を60秒間測定した。緩衝液中で抗体を60秒間解離させた。試料プレートの振とう速度は1000rpmであり、温度は30℃であり、頻度は5.0Hzであった。データを1:1モデルでフィッティング及び分析することにより、親和性定数を得た。

【0151】

TF01に対するFcγRIIIa__V158の親和性定数に関する結果を、表13及び図13~14に示す。

【表14】

表13：FcγRIIIa__V158へのTF01の結合に関する動態パラメータ

抗体	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	SE (kon)	K _{dis} (1/s)	SE (kdis)	R _{max} (nM)
TF01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26B12H2L2 (hG1WT)	5.54E-08	4.02E+05	1.68E+04	2.23E-02	3.84E-04	0.18-0.39

N/Aは、抗体が結合しなかったか、又は、抗原に対するシグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【0152】

結果は、26B12H2L2(hG1WT)がFcγRIIIa__V158に 5.54×10^{-8} Mの親和性定数で結合できたこと、そして、TF01についてはFcγRIIIa__V158に結合しなかった、又は結合シグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【0153】

結果は、FcγRIIIa__V158に対するTF01の結合活性が効果的に排除されたことを示す。

【0154】

(2) TF01に対する、FcγRIIIa__F158の親和性定数の分析

Fc受容体FcγRIIIa__F158(CD16a__F158としても知られる)は、IgG抗体のFc断片に結合することができ、ADCC効果を媒介する。実験において、FcγRIIIa__F158に対するTF01の親和性定数をFortebio Octetシステムを用いて測定し、抗体のADCC活性を評価した。

【0155】

FcγRIIIa__F158に対するTF01の親和性定数をFortebio Octetシステムによって測定する方法を、以下に簡単に記載する。試料希釈緩衝液は、PBS中の0.02% Tween-20及び0.1% BSA(pH7.4)であった。5μg/mLのFcγRIIIa__V158を、HIS1Kセンサー上に120秒間固定した。センサーを緩衝液中で60秒間平衡化し、センサー上の固定化FcγRIIIa__V158の、31.25~500nM(2倍段階希釈)の濃度の抗体に対する結合を60秒間測定した。緩衝液中で抗体を60秒間解離させた。試料プレートの振とう速度は1000rpmであり、温度は30℃であり、頻度は5.0Hzであった。データを1:1モデルでフィッティング及び分析することにより、親和性定数を得た。

【0156】

TF01に対するFcγRIIIa__F158の親和性定数に関する結果を、表14及び図15~16に示す。

【表15】

表14: FcγRIIIa__F158へのTF01の結合に関する動態パラメータ

抗体	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	SE (kon)	K _{dis} (1/s)	SE (kdis)	R _{max} (nM)
TF01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26B12H2L2 (hG1WT)	9.97E-08	4.03E+05	2.28E+04	4.02E-02	7.95E-04	0.00-0.16

N/Aは、抗体が結合しなかったか、又は、抗原に対するシグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【0157】

結果は、26B12H2L2(hG1WT)がFcFcγRIIIa__F158に9.97E-08Mの親和性定数で結合できたこと、そして、TF01についてはFcFcγRIIIa__F158に結合しなかった、又は結合シグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【0158】

結果は、FcγRIIIa__F158に対するTF01の結合活性が効果的に排除されたことを示す。

【0159】

実施例12: Fc受容体FcγRIIIa及びそのサブタイプに対する、TF01の親和性の分析

(1) TF01に対する、FcγRIIIa__H131の親和性定数の分析

Fc受容体FcγRIIIa__H131(CD32a__H131としても知られる)は、IgG抗体のFc断片に結合することができ、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)に関与している。Fc受容体への治療抗体の結合能は、抗体の安全性と有効性に影響を与えられる。実験において、FcγRIIIa__H131に対するTF01の親和性定数をFortebio Octetシステムを用いて測定し、Fc受容体に対する試験抗体の結合能を評価した。

【0160】

FcγRIIIa__H131に対するTF01の親和性定数をFortebio Octetシステムによって測定する方法を、以下に簡単に記載する。試料希釈緩衝液は、PBS中の0.02% Tween-20及び0.1% BSA(pH7.4)であった。5μg/mLのFcγRIIIa__H131を、NTAセンサー上に約1.0nmの固定高で

固定した。センサーを緩衝液中で60秒間平衡化し、センサー上の固定化FcγRIIa__H131の、12.5～200nM（2倍段階希釈）の濃度の抗体に対する結合を60秒間測定した。緩衝液中で抗体を60秒間解離させた。試料プレートの振とう速度は1000rpmであり、温度は30℃であり、頻度は5.0Hzであった。データを1:1モデルでフィッティング及び分析することにより、親和性定数を得た。

【0161】

TF01に対するFcγRIIa__H131の親和性定数に関する結果を、表15及び図17～18に示す。

【表16】

表15：FcγRIIa__H131へのTF01の結合に関する動態パラメータ

試料ID	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	SE (kon)	K _{dis} (1/s)	SE (kdis)	R _{max} (nM)
TF01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26B12H2L2 (hG1WT)	3.90E-08	4.81E+05	1.60E+04	1.88E-02	2.82E-04	0.50-1.01

10

N/Aは、抗体が結合しなかったか、又は、抗原に対するシグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【0162】

結果は、26B12H2L2（hG1WT）がFcγRIIa__H131に3.90E-08Mの親和性定数で結合できたこと、そして、TF01についてはFcγRIIa__H131に結合しなかった、又は結合シグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

20

【0163】

結果は、FcγRIIa__H131に対するTF01の結合活性が効果的に排除されたことを示す。

【0164】

（2）TF01に対する、FcγRIIa__R131の親和性定数の分析

Fc受容体FcγRIIa__R131（CD32a__R131としても知られる）は、IgG抗体のFc断片に結合することができ、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）に関与している。Fc受容体への治療抗体の結合能は、抗体の安全性と有効性に影響を与えらると思われる。実験において、FcγRIIa__R131に対するTF01の親和性定数をFortebio Octetシステムを用いて測定し、Fc受容体に対する試験抗体の結合能を評価した。

30

【0165】

FcγRIIa__R131に対するTF01の親和性定数をFortebio Octetシステムによって測定する方法を、以下に簡単に記載する。試料希釈緩衝液は、PBS中の0.02% Tween-20及び0.1% BSA（pH7.4）であった。5μg/mLのFcγRIIa__R131を、NTAセンサー上に約1.0nmの固定高で固定した。センサーを緩衝液中で60秒間平衡化し、センサー上の固定化FcγRIIa__R131の、12.5～200nM（2倍段階希釈）の濃度の抗体に対する結合を60秒間測定した。抗体を緩衝液中で60秒間解離させた。試料プレートの振とう速度は1000rpmであり、温度は30℃であり、頻度は5.0Hzであった。データを1:1モデルでフィッティング及び分析することにより、親和性定数を得た。

40

【0166】

TF01に対するFcγRIIa__R131の親和性定数に関する結果を、表16及び図19～20に示す。

50

【表 1 7】

表 1 6 : F c γ R I I a __ R 1 3 1 への T F 0 1 の結合に関する動態パラメータ

抗体	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	SE (kon)	K _{dis} (1/s)	SE (kdis)	R _{max} (nM)
T F 0 1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2 6 B 1 2 H 2 L 2 (h G 1 W T)	3.22E-08	5.11E+05	1.38E+04	1.65E-02	2.14E-04	1.08-1.55

N / A は、抗体が結合しなかったか、又は、抗原に対するシグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【 0 1 6 7 】

結果は、2 6 B 1 2 H 2 L 2 (h G 1 W T) が F c γ R I I a __ H 1 3 1 に 3 . 2 2 E - 0 8 M の親和性定数で結合できたこと、そして、T F 0 1 については F c γ R I I a __ R 1 3 1 に結合しなかった、又は結合シグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【 0 1 6 8 】

結果は、F c γ R I I a __ R 1 3 1 に対する T F 0 1 の結合活性が効果的に排除されたことを示す。

【 0 1 6 9 】

実施例 1 3 : T F 0 1 に対する、F c γ R I I b の親和性定数の分析

F c 受容体 F c γ R I I b (C D 3 2 b としても知られる) は、I g G 抗体の F c 断片に結合することができる。実験において、F c γ R I I b に対する試験抗体の親和性定数を F o r t e b i o O c t e t システムを用いて測定し、F c 受容体に対する T F 0 1 の結合能を評価した。

【 0 1 7 0 】

F c γ R I I b に対する T F 0 1 の親和性定数を F o r t e b i o O c t e t システムによって測定する方法を、以下に簡単に記載する。試料希釈緩衝液は、P B S 中の 0 . 0 2 % T w e e n - 2 0 及び 0 . 1 % B S A (p H 7 . 4) であった。5 μ g / m L の F c γ R I I b を、N T A センサー上に約 1 . 0 n m の固定高で固定した。センサーを緩衝液中で 6 0 秒間平衡化し、センサー上の固定化 h F C G R 2 B - h i s の、1 2 . 5 ~ 2 0 0 n M (2 倍段階希釈) の濃度の抗体に対する結合を 6 0 秒間測定した。抗体を緩衝液中で 6 0 秒間解離させた。試料プレートの振とう速度は 1 0 0 0 r p m であり、温度は 3 0 ° C であり、頻度は 5 . 0 H z であった。データを 1 : 1 モデルでフィッティング及び分析することにより、親和性定数を得た。

【 0 1 7 1 】

T F 0 1 に対する F c γ R I I b の親和性定数に関する結果を、表 1 7 及び図 2 1 ~ 2 2 に示す。

【表 1 8】

表 1 7 : F c γ R I I b への T F 0 1 の結合に関する動態パラメータ

抗体	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	SE (kon)	K _{dis} (1/s)	SE (kdis)	R _{max} (nM)
T F 0 1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2 6 B 1 2 H 2 L 2 (h G 1 W T)	4.12E-08	3.42E+05	9.61E+03	1.41E-02	2.04E-04	0.50-0.78

N / A は、抗体が結合しなかったか、又は、抗原に対するシグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【 0 1 7 2 】

結果は、2 6 B 1 2 H 2 L 2 (h G 1 W T) が F c γ R I I b に 4 . 1 2 E - 0 8 M の親和性定数で結合できたこと、そして、T F 0 1 については F c γ R I I b に結合しな

った、又は結合シグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【0173】

結果は、FcγRIIbに対するTF01の結合活性が効果的に排除されたことを示す。

【0174】

実施例14：C1qに対する、TF01の親和性の分析

血清補体C1qは、IgG抗体のFc断片に結合することができ、CDC効果を媒介する。C1qに対する治療抗体の結合能は、抗体の安全性と有効性に影響を与えると思われる。実験において、C1qに対するTF01の親和性定数をFortebio Octetシステムを用いて測定し、抗体のCDC活性を評価した。

【0175】

C1qに対する抗体の親和性定数をFortebio Octetシステムによって測定する方法を、以下に簡単に記載する。試料希釈緩衝液は、PBS中の0.02% Tween-20及び0.1% BSA (pH7.4)であった。50 µg/mLの抗体を、FAB2Gセンサー上に約2.0 nmの固定高で固定した。センサーを緩衝液中で60秒間平衡化し、センサー上の固定化抗体の、0.625~10 nM (2倍段階希釈)の濃度の抗原C1qに対する結合を60秒間測定した。抗原-抗体を緩衝液中で60秒間解離させた。試料プレートの振とう速度は1000 rpmであり、温度は30℃であり、頻度は5.0 Hzであった。データを1:1モデルでフィッティング及び分析することにより、親和性定数を得た。データ取得ソフトウェアはFortebio Data Acquisition 7.0であり、データ分析ソフトウェアはFortebio Data Analysis 7.0であった。

【0176】

C1qに対するTF01の親和性定数に関する結果を、表18及び図23~24に示す。

【表19】

表18：C1qへのTF01の結合に関する動態パラメータ

抗体	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	SE (kon)	K _{dis} (1/s)	SE (kdis)	R _{max} (nM)
TF01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26B12H2L2 (hG1WT)	1.28E-09	2.40E+06	4.79E+04	3.05E-03	7.33E-05	0.53-0.63

N/Aは、抗体が結合しなかったか、又は、抗原に対するシグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【0177】

結果は、26B12H2L2 (hG1WT)がC1qに1.28E-09 Mの親和性定数で結合できたこと、そして、TF01についてはC1qに結合しなかった、又は結合シグナルが極めて弱かったため、結果の分析が行われず、対応するデータが得られなかったことを示す。

【0178】

結果は、C1qに対するTF01の結合活性が効果的に排除されたことを示す。

【0179】

実施例15：CHO-K1-TIGITに対する、TF01の抗体依存性細胞食作用活性

抗体依存性細胞食作用 (ADCP) 活性を検出するため、エフェクター細胞としてマウスマクロファージを用い、標的細胞としてTIGITを過剰発現する細胞株を用いた。細胞に媒介されるADCP効果を試験した。

【0180】

凍結保存したマウス骨髓由来マクロファージ (MBMM) (C57マウス由来) を取り

出し、DMEM+10% FBS+100 ng/mL M-CSF（マクロファージコロニー刺激因子、PeproTech社、カタログ番号315-02）を加えて、混合物を1200×gで5分間遠心分離した。細胞を回収し、DMEM+10% FBS+100 ng/mL M-CSF培地を加え、細胞を一晩融解させた。

【0181】

標的細胞（CHO-K1-TIGIT）を回収し、170×gで5分間遠心分離し、PBSで1回洗浄した。トリパンブルーを加えて計数を行った。5（6）-カルボキシフルオレセイン N-スクシンイミジルエステル（CFSE、Biolegend社、カタログ番号423801）をPBSで2.5 μMに希釈し、細胞を再懸濁した（染色密度：10,000,000細胞/mL）。適量の細胞を細胞インキュベーター内で20分間インキュベートした。6 mLのDMEM完全培地（10% FBSを含む）を加えて染色を停止させた。混合物を170×gで5分間遠心分離して、上清を除去した。1 mLのDMEM完全培地を加え、細胞をインキュベーター中で10分間インキュベートした。抗体を、DMEM完全培地で所望の濃度まで希釈し、アイソタイプ対照抗体を設計した。標的細胞（150,000細胞/ウェル）を96ウェルV底プレートに加えた後、抗体（100 μL）を加え、系をよく混合した。混合物を氷上で40分間インキュベートし、170×gで5分間遠心分離し、2回洗浄した。マクロファージ（MBMM）を回収し、750×gで5分間遠心分離して、上清を除去した。細胞を計数し、DMEM完全培地に再懸濁して、マクロファージの濃度を調整した（50,000細胞/100 μL）。その後、標的細胞を含む96ウェルV底プレートに前記細胞を加え、再懸濁及び混合を行った。混合物をインキュベーター中で37℃にて2時間インキュベートした。室温の100 μLの1% PBSSAを各ウェルに加えた。混合物を750×gで5分間遠心分離して、上清を除去した。細胞を200 μLのPBSSAで1回洗浄した。APC抗マウス/ヒトCD11b抗体（Biolegend社、カタログ番号101212）（PBSSAで500倍希釈）を、対応する試料に100 μL/ウェルで加え、系をよく混合した。その後、混合物を氷上で40分間インキュベートした。各ウェルに100 μLの1% PBSSAを加えた。混合物を750×gで5分間遠心分離して、上清を除去した。細胞を、各ウェルにつき200 μLのPBSSAで1回洗浄した。各ウェルに200 μLの1% PBSSAを加えて再懸濁し、試験を行った。系内のマクロファージはAPC陽性であり、食作用に関与するマクロファージはAPC及びCFSE二重陽性であった。食作用率を、APC陽性細胞の数に対する二重陽性細胞の数の割合として決定し、それによりADCP活性を評価した。各群のADCP活性をP%で表し、それを次の式で算出した。

【数1】

$$P\% = \frac{\text{食作用に関与するマクロファージの数}}{\text{マクロファージの総数}} \times 100\%$$

【0182】

結果を図25に示す。

【0183】

結果は、同一濃度においてRG6058（hG1WT）、RG6058（hG4）、及び26B12H2L2（hG1WT）がADCP効果を有すること、そして、同一濃度においてTF01の食作用率がアイソタイプ対照抗体群と同程度であることを示し、TF01がADCP効果を有しないことが示された。

【0184】

結果は、TF01によって導入されたアミノ酸変異がADCP効果を効果的に排除できたことを示す。

【0185】

実施例16：同時培養系でのIL-2分泌に対するCD112/CD155阻害への、抗TIGIT抗体とTGF-βRの融合タンパク質のブロッキング活性の評価

1. Jurkat-TIGIT及びTHP-1細胞同時培養系でのIL-2分泌に対するCD112阻害への、抗TIGIT抗体とTGF- β Rの融合タンパク質のブロッキング活性の評価

96ウェルプレート(Corning社、モデル番号3599)を、2 μ g/mLの抗ヒトCD3抗体(Akeso Biopharma社による調製;ロット番号20170830)で、37℃にて2時間コートした。その後、コーティング溶液を除去し、予冷したPBS(300 μ L)でプレートを1回洗浄した。Jurkat-TIGIT細胞(Akeso Biopharma社による構築)を計数し、96ウェルプレートに50,000細胞/ウェルにて加えた。抗体を実験設計に従って加え、プレートを37℃で30分間インキュベートした。CD112-hFc(Akeso Biopharma社による調製;ロット番号20180209)を実験設計に従って加えた。THP-1細胞(Chinese Academy of Sciencesから購入、カタログ番号3131C0001000700057)を計数し、96ウェルプレートに50,000細胞/ウェルにて加えた。プレートをインキュベーター内で48時間インキュベートした。培養上清を回収し、IL-2 ELISAキット(Dakewe社、カタログ番号1110202)を用いてIL-2含量を試験した。

【0186】

結果を図26に示す。結果は、CD112がIL-2分泌に対して有意な阻害効果を示すことを示す。抗体26B12H2L2(hG4DM)、TF01、TF02、RG6058(hG1DM)、及びRG6058(hG4)は、系内のIL-2分泌に対するCD112阻害を効果的にブロックすることができ、TF01及びTF02は、陽性対照抗体RG6058(hG1DM)及びRG6058(hG4)よりも強い活性を有していた。

【0187】

2. Jurkat-TIGIT及びTHP-1細胞同時培養系でのIL-2分泌に対するCD155阻害への、抗TIGIT抗体とTGF- β Rの融合タンパク質のブロッキング活性の評価

96ウェルプレート(Corning社、モデル番号3599)を、2 μ g/mLの抗ヒトCD3抗体(Akeso Biopharma社による調製;ロット番号20170830)で、37℃にて2時間コートした。その後、コーティング溶液を除去し、予冷したPBS(300 μ L)でプレートを1回洗浄した。Jurkat-TIGIT細胞(Akeso Biopharma社による構築)を計数し、96ウェルプレートに50,000細胞/ウェルにて加えた。実験デザインに従って抗体を加え、プレートを37℃で30分間インキュベートした。CD155-hFc(Akeso Biopharma社による調製;ロット番号20180209)を実験設計に従って加えた。THP-1細胞(Chinese Academy of Sciencesから購入、カタログ番号3131C0001000700057)を計数し、96ウェルプレートに50,000細胞/ウェルにて加えた。プレートをインキュベーター内で48時間インキュベートした。培養上清を回収し、IL-2 ELISAキット(Dakewe社、カタログ番号1110202)を用いてIL-2含量を試験した。

【0188】

結果を図27に示す。結果は、CD155がIL-2分泌に対して有意な阻害効果を示すことを示す。抗体TF01及びRG6058(hG1DM)は、系内のIL-2分泌に対するCD155阻害を効果的にブロックすることができ、同程度の活性を有していた。

【0189】

実施例17: Jurkat-TIGIT及びHT1080-aCD3scFv細胞同時培養系でのIL-2分泌の促進における、抗TIGIT抗体とTGF- β Rの融合タンパク質の生物活性の評価

対数増殖期のJurkat-TIGIT及びHT1080-aCD3scFv細胞(A

10

20

30

40

50

keso Biopharma社による構築)を採取及び計数し、各ウェルが50,000個のJurkat-TIGIT細胞、及び各ウェルが10,000個のHT1080-aCD3scFv細胞となるようにした。希釈した抗体(抗体勾配:3nM、30nM、300nM)を加えた。可溶性抗ヒトCD28抗体(3 μ g/mL)(R&D社、カタログ番号MAB342-500)を加えた。混合物をインキュベーターで48時間インキュベートした。培養上清を回収し、IL-2 ELISAキット(Dakewe社、カタログ番号1110202)を用いてIL-2含量を試験した。

【0190】

結果を図28に示す。

【0191】

結果は、抗体TF01、TF02、及びRG6058(hG4)が、Jurkat-TIGIT及びHT1080-scFv細胞同時培養系でのIL-2分泌を効果的に促進でき、同程度の活性を有することを示す。

【0192】

実施例18:CMV抗原へのPBMC二次免疫応答の過程における、IFN- γ 分泌に対するTGF- β 1阻害への、抗TIGIT抗体とTGF- β Rの融合タンパク質のブロッキング活性の評価

PBMC(健常ドナー由来)を融解し、完全培地(RPMI1640+10% FBS)上に播種して、インキュベーター中で一晚インキュベートした。翌日、細胞を採取及び計数して細胞生存率を決定し、丸底96ウェルプレート(Corning社、カタログ番号3799)上に200,000細胞/ウェルで播種した。一方、勾配希釈した抗体、CMV(最終濃度0.02 μ g/mL、Mabtech社、カタログ番号3619-1)、及びTGF- β 1(最終濃度3ng/mL、Genscript社、カタログ番号Z03411)を実験設計に従って加え、最終容量200 μ Lとした。(TGF- β 1及び抗体は37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした。)混合物をインキュベーター内で4日間インキュベートした。4日後、細胞培養上清を回収し、IFN- γ ELISAキット(Dakewe社、カタログ番号1110002)を用いてIFN- γ 含量を試験した。

【0193】

結果を図29に示す。結果は、CMV抗原が、PBMC二次免疫応答によるIFN- γ の分泌を引き起こすことができ、系内のIFN- γ 分泌に対してTGF- β 1が有意な阻害効果を有することを示す。抗体TF01、抗HEL&TGF β 、及び抗HEL&TGF β +26B12H2L2(hG1DM)の併用により、系内のIFN- γ 分泌に対するTGF- β 1阻害を効果的にブロックすることができ、この効果は26B12H2L2(hG1DM)を単独で用いた場合には達成されなかった。TF01のブロッキング活性は、対照抗体抗HEL&TGF β のものよりも優れており、抗HEL&TGF β +26B12H2L2(hG1DM)と同程度であった。

【0194】

実施例19:マウス腫瘍細胞皮下異種移植モデルにおける、抗TIGIT抗体とTGF- β Rの融合タンパク質の薬力学的評価

抗TIGIT抗体とTGF- β Rの融合タンパク質の抗腫瘍活性をin vivoで測定するため、まず、MDA-MB-231細胞(ATCCより購入)を、6.71~9.57週齢の雌のScid Beigeマウス(Beijing Vital River Laboratory Animal Technology社から購入)の乳房脂肪体に皮下接種した。接種の17日後、マウスを腫瘍容積によりランダムに8個体ずつの3群に分けた。各マウスにヒト末梢血単核球(hPBMC)を腹腔内注射し、投与を行って、グループ分けの日をD0と定義した。投与経路は腹腔内注射であり、週1回の注射を6週間行った。hPBMCの腹腔内注射をグループ分けの8日後に行った。モデリングと具体的なレジメンを表19に示す。投与後、各群の腫瘍の長さ及び幅を測定し、腫瘍容積を算出した。

10

20

30

40

50

【表 2 0】

表 1 9：Scid BeigeマウスモデルにおけるMDA-MB-2 3 1 異種移植腫瘍の治療に対する、抗TIGIT抗体とTGF-β Rの融合タンパク質の投与計画

グループ分け	動物数	接種	レジメン
アイソタイプ対 照、 3 0 m g / k g	8	MDA-MB-2 3 1、 2×10^6 細胞/Scid Beigeマウス、乳房脂肪体に皮下接種；細胞接種 1 7 日後にグループ分け、 2.5×10^{12} 個のhP BMC (2.5×10^6 million hP BMCs)を腹腔内注射した；グループ分け 8 日後に3, 0 0 0, 0 0 0 個のhP BMCを腹腔内注射した。	抗HEL (hIgG4) (Akeso Biopharma社による調製、ロット番号2 0 1 9 0 9 1 0)、3 0 m g / k g；週 1 回、6 週間の腹腔内注射
TF01 3. 6 m g / k g	8		TF01 (Akeso Biopharma社による調製、ロット番号A130Y20210301)、3. 6 m g / k g；週 1 回、6 週間の腹腔内注射
TF01 3 6 m g / k g	8		TF01 (Akeso Biopharma社による調製、ロット番号A130Y20210301)、3 6 m g / k g；週 1 回、6 週間の腹腔内注射

【0 1 9 5】

結果を図 3 0 に示す。結果は、アイソタイプ対照抗体と比べ、抗TIGIT抗体とTGF-β Rの融合タンパク質TF01が、マウスにおける腫瘍の成長を効果的に阻害できたことを示す。

【0 1 9 6】

また、図 3 1 に示すように、担がんマウスは試験薬剤TF01に対して耐性が高く、各群の担がんマウスの体重への影響は無かった。

【0 1 9 7】

本発明の具体的な実施形態を詳細に記載したが、当業者は、開示されたあらゆる教示に従い、それらの詳細に対して各種改変及び置換を行いうることを理解するであろう。これらの変更は全て本発明の保護範囲内に含まれる。本発明の完全な範囲が、添付の請求の範囲及びその任意の等価物によって提供される。

【図面】

【図 1】

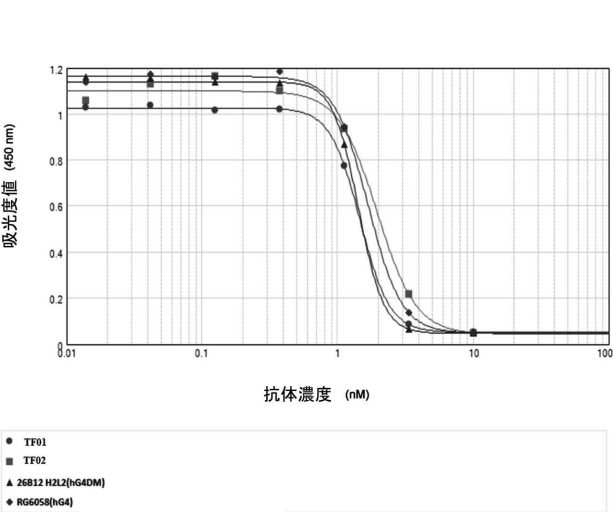


FIG. 1

【図 2】

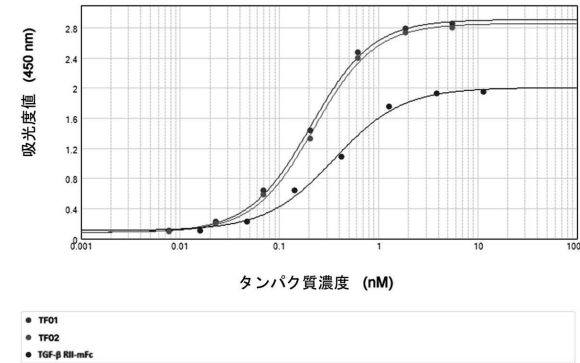


FIG. 2

10

20

30

40

50

【図 3】

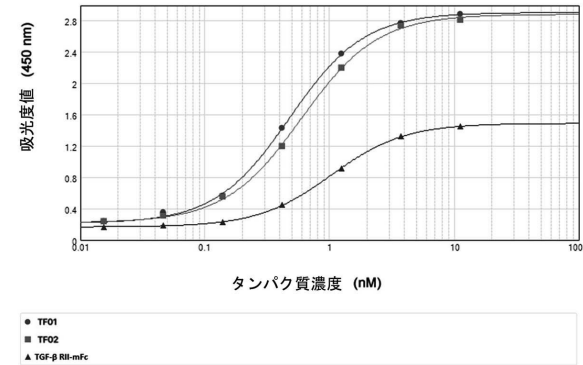


FIG. 3

【図 4】

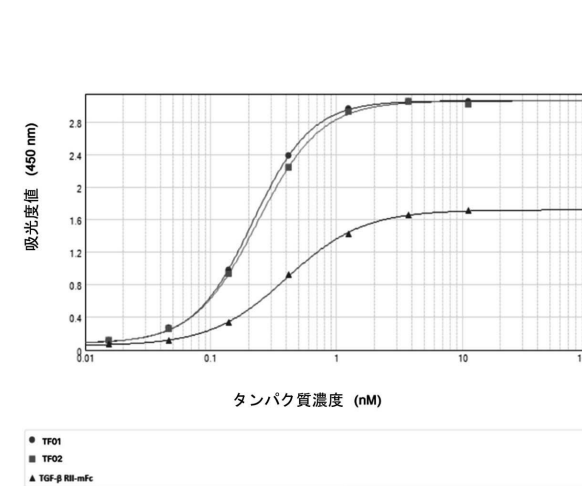


FIG. 4

【図 5】

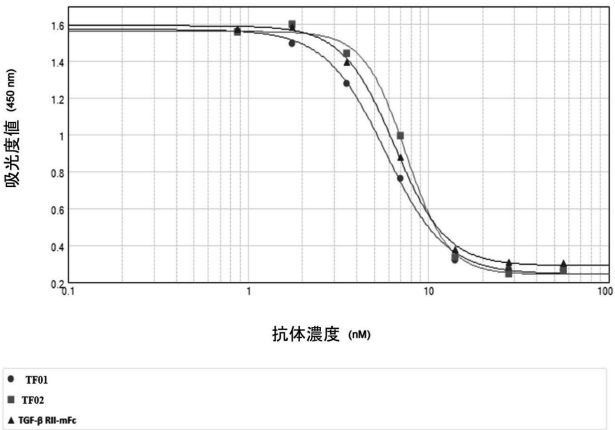


FIG. 5

【図 6】

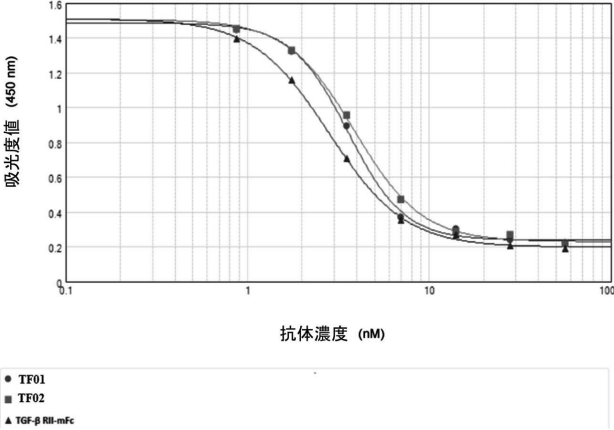


FIG. 6

10

20

30

40

50

【図 7】

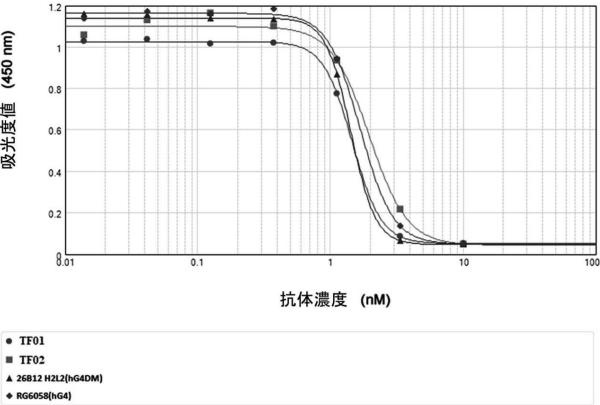


FIG. 7

【図 8】

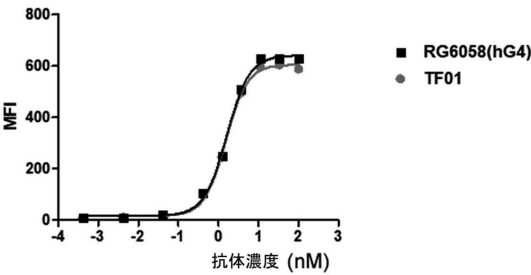


FIG. 8

10

【図 9】

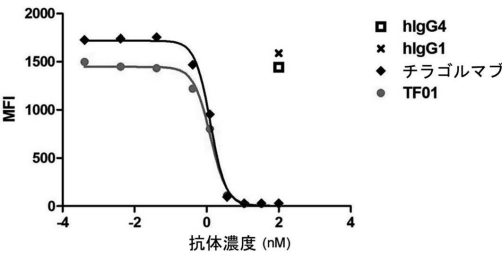


FIG. 9

【図 10】

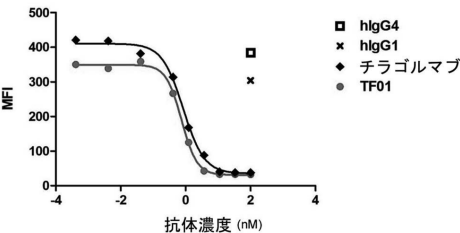


FIG. 10

20

30

40

50

【 図 1 1 】

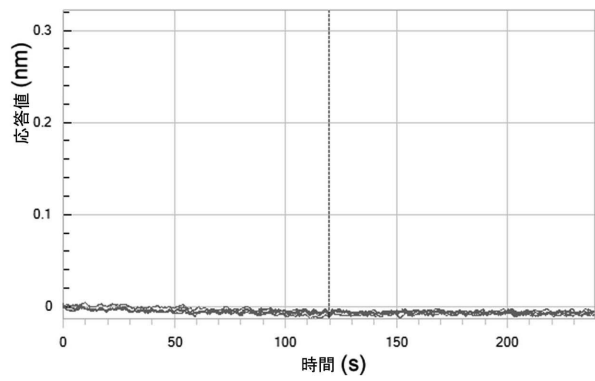


FIG. 11

【 図 1 2 】

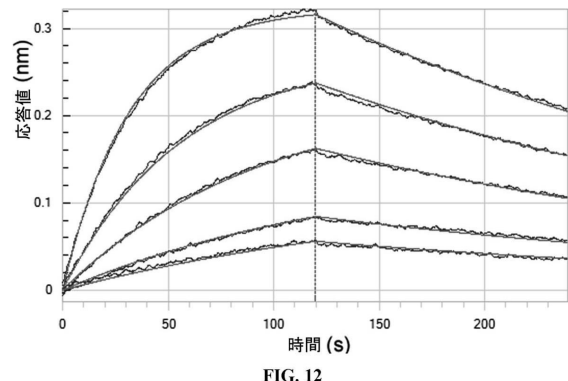


FIG. 12

【 図 1 3 】

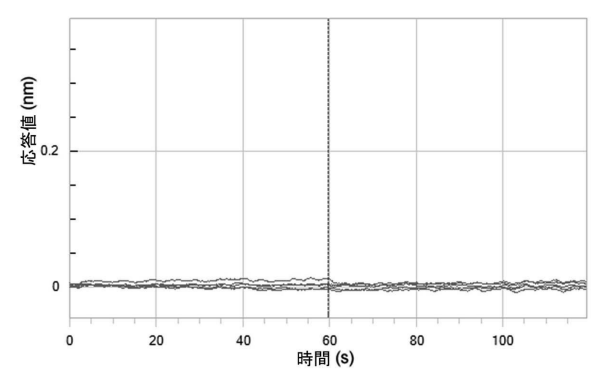


FIG. 13

【 図 1 4 】

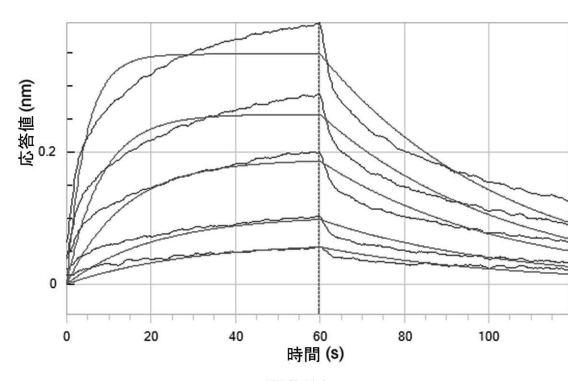


FIG. 14

10

20

30

40

50

【 図 1 5 】

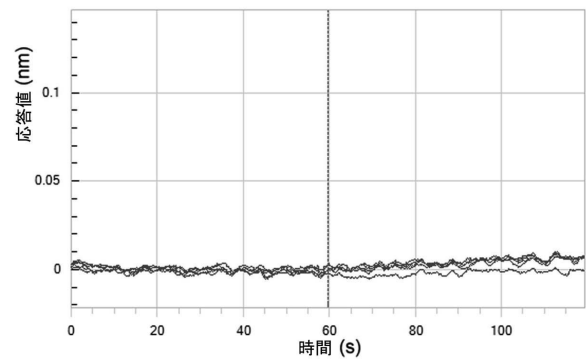


FIG. 15

【 図 1 6 】

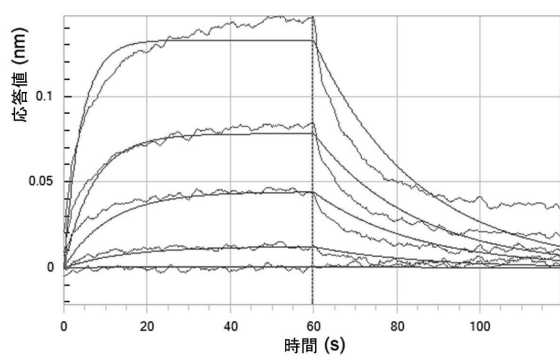


FIG. 16

【 図 1 7 】

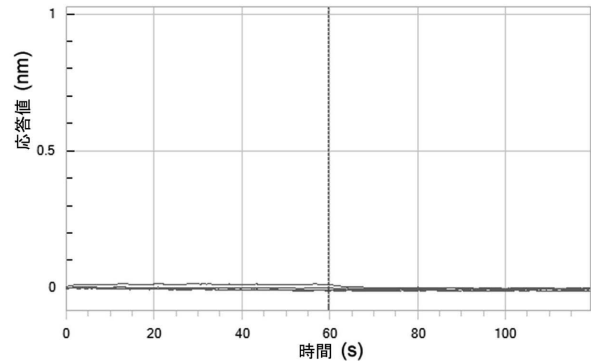


FIG. 17

【 図 1 8 】

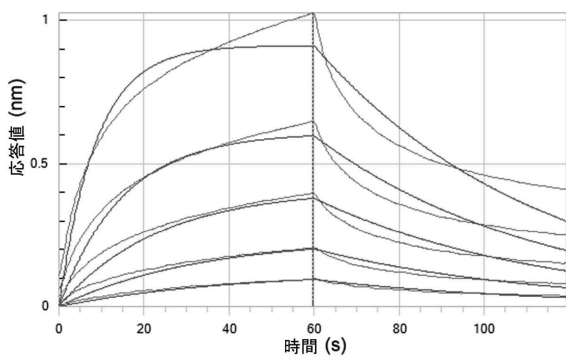


FIG. 18

10

20

30

40

50

【図 1 9】

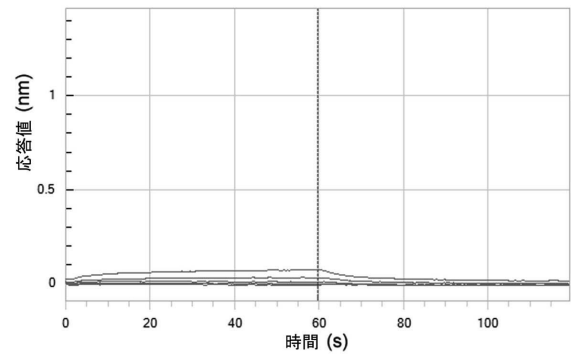


FIG. 19

【図 2 0】

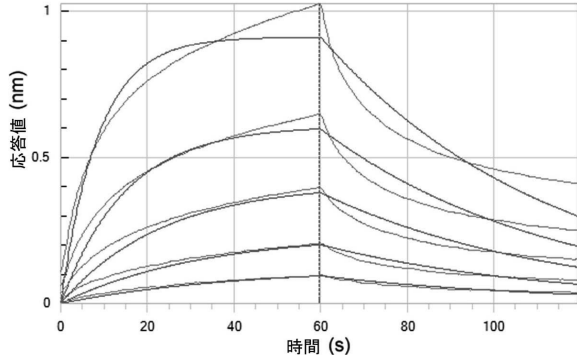


FIG. 20

10

【図 2 1】

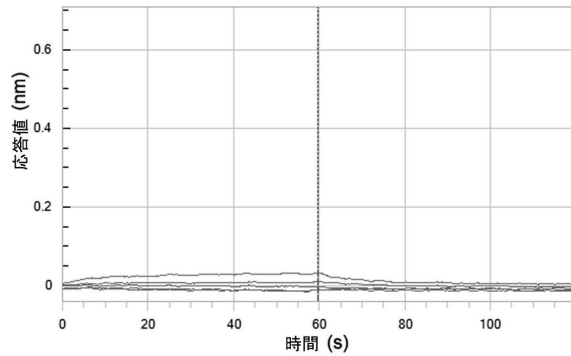


FIG. 21

【図 2 2】

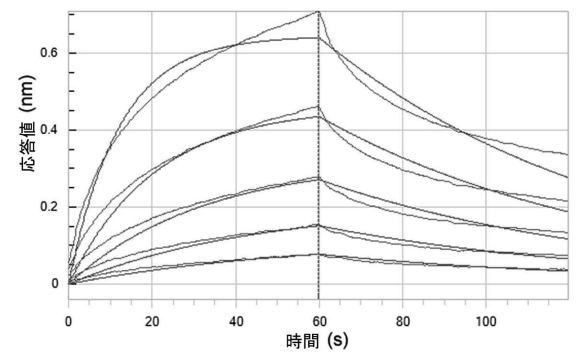


FIG. 22

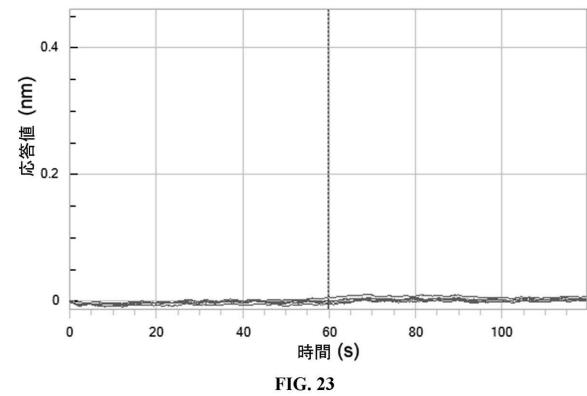
20

30

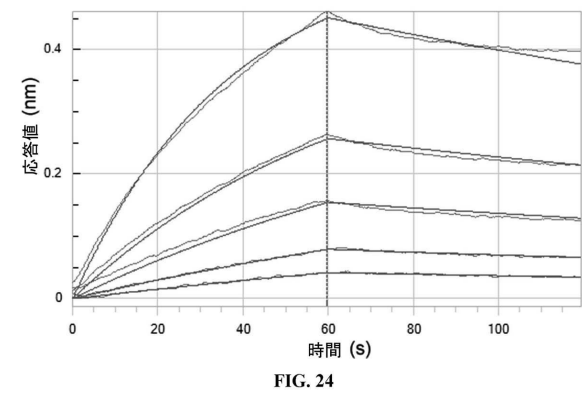
40

50

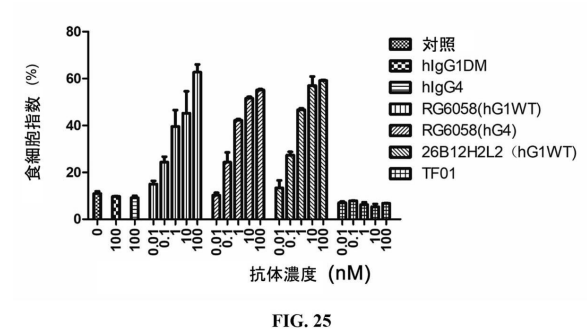
【図 2 3】



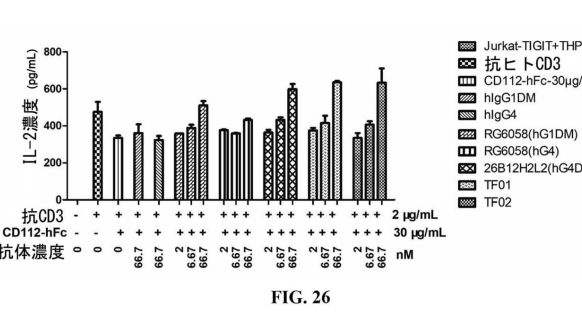
【図 2 4】



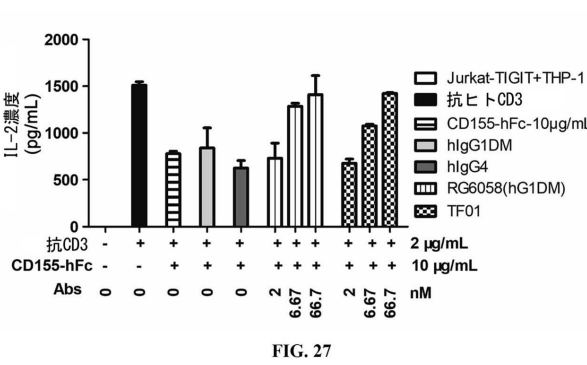
【図 2 5】



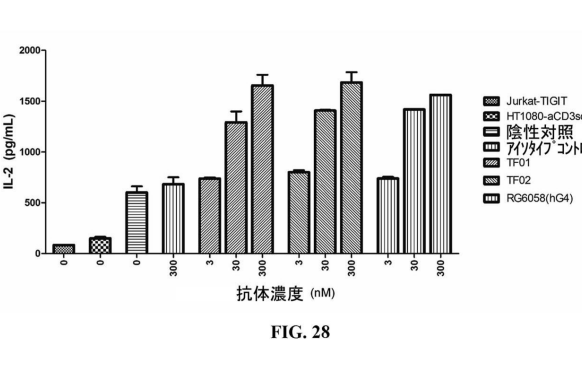
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

20

30

40

50

【図 2 9】

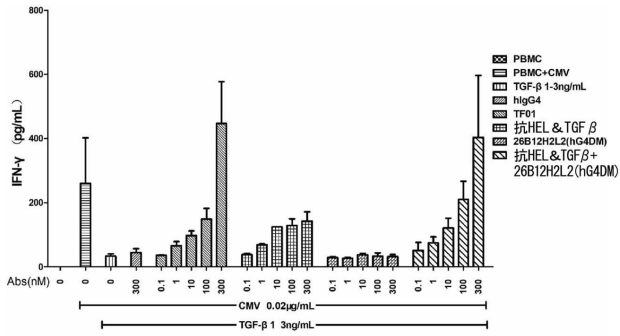


FIG. 29

【図 3 0】

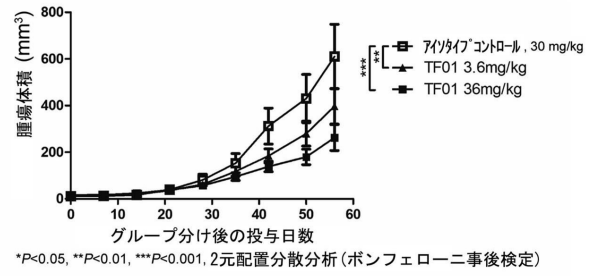


FIG. 30

【図 3 1】

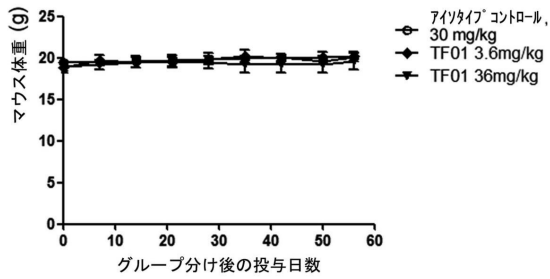


FIG. 31

【配列表】

2024532836000001.xml

10

20

30

40

50

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/113882

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 19/00(2006.01)i; C07K 14/71(2006.01)i; C07K 14/495(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, VEN, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, WANFANG DATABASE, baidu 学术, BAIDU SCHOLAR, PUBMED, ELSEVIER, SPRINGER, ISI web of knowledge, sciencedirect, NCBI, Genbank, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: TIGIT, T cell Ig and ITIM domain, WUCAM, Vstm3, VSIG9, It019, tigit-26b12, CCTTCC NO: C2020208, TGF-β, 转化生长因子-β, transforming growth factor-β, 中山康方生物医药有限公司, akeso biopharma, 发明人, SEQ ID NOs: 1-39		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 108883164 A (JN BIOSCIENCES LLC et al.) 23 November 2018 (2018-11-23) entire document	1-32
A	CN 108290946 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 17 July 2018 (2018-07-17) entire document	1-32
A	US 2018/0251548 A1 (COMPASS THERAPEUTICS LLC) 06 September 2018 (2018-09-06) entire document	1-32
A	CN 110050000 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 23 July 2019 (2019-07-23) entire document	1-32
A	WO 2021/101796 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.) 27 May 2021 (2021-05-27) entire document	1-32
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 September 2022		Date of mailing of the international search report 28 September 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

International application No.

PCT/CN2022/113882

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021/093760 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 20 May 2021 (2021-05-20) entire document	1-32
A	LAN, Yan et al. "Enhanced Preclinical Antitumor Activity of M7824, a Bifunctional Fusion Protein Simultaneously Targeting PD-L1 and TGF-β" <i>Science Translational Medicine</i> , Vol. 10, 17 January 2018 (2018-01-17), eaa5488, pp. 1-15	1-32
PA	CN 114181310 A (AKESO BIOPHARMA CO., LTD.) 15 March 2022 (2022-03-15) entire document	1-32
PA	CN 114478769 A (AKESO BIOPHARMA CO., LTD.) 13 May 2022 (2022-05-13) entire document	1-32
PA	CN 114106182 A (AKESO BIOPHARMA CO., LTD.) 01 March 2022 (2022-03-01) entire document	1-32

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/113882	
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:			10
			20
			30
			40
			50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/113882
Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☒ Claims Nos.: 32 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: [1] Claim 32 relates to a method for treating and/or preventing tumors, and relates to the subject matter as defined in PCT Rule 39.1 that does not warrant a search conducted by the international searching authority: (iv) methods for the treatment of a human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods. An international search was formed on the basis of a use of the fusion protein or conjugate in the preparation of a drug for treating and/or preventing the tumors.	10
2.	☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3.	☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	20
		30
		40
		50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/113882

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108883164	A	23 November 2018	US	2020297844	A1	24 September 2020
				EP	3423089	A1	09 January 2019
				AU	2017228474	A1	30 August 2018
				TW	201734043	A	01 October 2017
				US	2017281764	A1	05 October 2017
				MX	2018010485	A	10 January 2019
				KR	20220024837	A	03 March 2022
				UY	37141	A	29 September 2017
				JP	2019513817	A	30 May 2019
				UA	125898	C2	06 July 2022
				SG	11201806992V	A	27 September 2018
				IL	261188	A	31 October 2018
				WO	2017152088	A1	08 September 2017
				BR	112018067458	A2	02 January 2019
				CA	3014934	A1	08 September 2017
				PH	12018501778	A1	15 May 2019
				KR	20180119653	A	02 November 2018
				MY	191649	A	05 July 2022
CN	108290946	A	17 July 2018	WO	2017053748	A2	30 March 2017
				NZ	739750	A	29 November 2019
				CL	2018000744	A1	06 July 2018
				AU	2019246814	A1	31 October 2019
				BR	112018005862	A2	16 October 2018
				UA	124573	C2	13 October 2021
				CN	113956358	A	21 January 2022
				CA	2994858	A1	30 March 2017
				AU	2016325610	A1	01 March 2018
				MX	2018003633	A	01 August 2018
				EP	3353210	A2	01 August 2018
				CL	2020000938	A1	14 August 2020
				JP	2020074778	A	21 May 2020
				CR	20180225	A	09 July 2018
				KR	20180053742	A	23 May 2018
				US	2021253693	A1	19 August 2021
				KR	20220104289	A	26 July 2022
				JP	2018532397	A	08 November 2018
				MA	42925	A	01 August 2018
				RU	2018114523	A3	25 October 2019
				ZA	201800941	B	29 May 2019
				AU	2021250946	A1	11 November 2021
				SG	10202007764T	A	29 September 2020
				US	2017088613	A1	30 March 2017
				PH	12018500608	A1	01 October 2018
				CN	113912724	A	11 January 2022
				IL	257636	A	30 April 2018
				CO	2018004090	A2	30 November 2018
				PE	20181046	A1	03 July 2018
				US	2018186875	A1	05 July 2018
				US	2021032328	A1	04 February 2021
				JP	2021166524	A	21 October 2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/113882

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				HK	1258058	A1	01 November 2019
				KR	20200087283	A	20 July 2020
				US	2022064286	A1	03 March 2022
				RU	2020120073	A	03 July 2020
				US	2019119376	A1	25 April 2019
				TW	201718644	A	01 June 2017
US	2018/0251548	A1	06 September 2018	JP	2018531914	A	01 November 2018
				WO	2017048824	A1	23 March 2017
				EP	3349792	A1	25 July 2018
				CA	2998589	A1	23 March 2017
				AU	2016322934	A1	12 April 2018
CN	110050000	A	23 July 2019	TW	201900674	A	01 January 2019
				KR	20200004801	A	14 January 2020
				EP	3623389	A1	18 March 2020
				MX	2019013023	A	18 December 2019
				JP	2020519289	A	02 July 2020
				WO	2018205985	A1	15 November 2018
				AU	2018264455	A1	14 November 2019
				BR	112019023184	A2	19 May 2020
				CA	3061791	A1	29 October 2019
WO	2021/101796	A1	27 May 2021	US	2020157180	A1	21 May 2020
				None			
				TW	202128763	A	01 August 2021
				None			
				None			
				WO	2022089392	A1	05 May 2022
				None			
				None			
				None			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/113882
A. 主题的分类 C07K 19/00(2006.01)i; C07K 14/71(2006.01)i; C07K 14/495(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K A61K A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, VEN, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, baidu学术, PUBMED, ELSEVIER, SPRINGER, ISI web of knowledge, sciencedirect, NCBI, Genbank, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统: TIGIT, T cell Ig and ITIM domain, WUCAM, Vstm3, VSIG9, lt019, tigit-26b12, CCTCC NO: C2020208, TGF-β, 转化生长因子-β, transforming growth factor-β, 中山康方生物医药有限公司, akeso biopharma, 发明人, SEQ ID NOs:1-39		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 108883164 A (JN生物科学有限责任公司 等) 2018年11月23日 (2018 - 11 - 23) 全文	1-32
A	CN 108290946 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2018年7月17日 (2018 - 07 - 17) 全文	1-32
A	US 2018/0251548 A1 (COMPASS THERAPEUTICS LLC) 2018年9月6日 (2018 - 09 - 06) 全文	1-32
A	CN 110050000 A (江苏恒瑞医药股份有限公司 等) 2019年7月23日 (2019 - 07 - 23) 全文	1-32
A	WO 2021/101796 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.) 2021年5月27日 (2021 - 05 - 27) 全文	1-32
A	WO 2021/093760 A1 (江苏恒瑞医药福分有限公司 等) 2021年5月20日 (2021 - 05 - 20) 全文	1-32
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2022年9月19日		国际检索报告邮寄日期 2022年9月28日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 郝佳 电话号码 86-(10)-53961967

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/113882
G. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	LAN, Y. 等. "Enhanced preclinical antitumor activity of M7824, a bifunctional fusion protein simultaneously targeting PD-L1 and TGF- β " SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, 第10卷, 2018年1月17日 (2018 - 01 - 17), eaan5488, 第1-15页	1-32
PA	CN 114181310 A (中山康方生物医药有限公司) 2022年3月15日 (2022 - 03 - 15) 全文	1-32
PA	CN 114478769 A (中山康方生物医药有限公司) 2022年5月13日 (2022 - 05 - 13) 全文	1-32
PA	CN 114106182 A (中山康方生物医药有限公司) 2022年3月1日 (2022 - 03 - 01) 全文	1-32

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/113882
第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)	
1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的: a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的: ☒ 附件C/ST. 25文本文件形式 ☐ 纸件或图形文件形式 b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的: c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的: ☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a)) ☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段) 2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。 3. 补充意见:		

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/113882
第II栏	某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)	
根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:		
1.	☒ 权利要求: 32 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即: [1] 权利要求32涉及一种治疗和/或预防肿瘤的方法, 涉及PCT细则39.1定义的不要求国际检索单位检索的主题: (iv) 处置人体或动物体的外科手术方法或治疗方法, 以及诊断方法。国际检索基于所述融合蛋白或偶联物在制备用于治疗 and/或预防肿瘤的药物中的用途作出。	10
2.	☐ 权利要求: 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:	
3.	☐ 权利要求: 因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。	20
		30
		40
		50

国际检索报告 关于同族专利的信息						国际申请号 PCT/CN2022/113882	
检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	108883164	A	2018年11月23日	US	2020297844	A1	2020年9月24日
				EP	3423089	A1	2019年1月9日
				AU	2017228474	A1	2018年8月30日
				TW	201734043	A	2017年10月1日
				US	2017281764	A1	2017年10月5日
				MX	2018010485	A	2019年1月10日
				KR	20220024837	A	2022年3月3日
				UY	37141	A	2017年9月29日
				JP	2019513817	A	2019年5月30日
				UA	125898	C2	2022年7月6日
				SG	11201806992V	A	2018年9月27日
				IL	261188	A	2018年10月31日
				WO	2017152088	A1	2017年9月8日
				BR	112018067458	A2	2019年1月2日
				CA	3014934	A1	2017年9月8日
				PH	12018501778	A1	2019年5月15日
				KR	20180119653	A	2018年11月2日
				MY	191649	A	2022年7月5日
CN	108290946	A	2018年7月17日	WO	2017053748	A2	2017年3月30日
				NZ	739750	A	2019年11月29日
				CL	2018000744	A1	2018年7月6日
				AU	2019246814	A1	2019年10月31日
				BR	112018005862	A2	2018年10月16日
				UA	124573	C2	2021年10月13日
				CN	113956358	A	2022年1月21日
				CA	2994858	A1	2017年3月30日
				AU	2016325610	A1	2018年3月1日
				MX	2018003633	A	2018年8月1日
				EP	3353210	A2	2018年8月1日
				CL	2020000938	A1	2020年8月14日
				JP	2020074778	A	2020年5月21日
				CR	20180225	A	2018年7月9日
				KR	20180053742	A	2018年5月23日
				US	2021253693	A1	2021年8月19日
				KR	20220104289	A	2022年7月26日
				JP	2018532397	A	2018年11月8日
				MA	42925	A	2018年8月1日
				RU	2018114523	A3	2019年10月25日
				ZA	201800941	B	2019年5月29日
				AU	2021250946	A1	2021年11月11日
				SG	10202007764T	A	2020年9月29日
				US	2017088613	A1	2017年3月30日
				PH	12018500608	A1	2018年10月1日
				CN	113912724	A	2022年1月11日
				IL	257636	A	2018年4月30日
				CO	2018004090	A2	2018年11月30日
				PE	20181046	A1	2018年7月3日
				US	2018186875	A1	2018年7月5日
				US	2021032328	A1	2021年2月4日
				JP	2021166524	A	2021年10月21日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2022/113882			
检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				HK	1258058	A1	2019年11月1日
				KR	20200087283	A	2020年7月20日
				US	2022064286	A1	2022年3月3日
				RU	2020120073	A	2020年7月3日
				US	2019119376	A1	2019年4月25日
				TW	201718644	A	2017年6月1日
US	2018/0251548	A1	2018年9月6日	JP	2018531914	A	2018年11月1日
				WO	2017048824	A1	2017年3月23日
				EP	3349792	A1	2018年7月25日
				CA	2998589	A1	2017年3月23日
				AU	2016322934	A1	2018年4月12日
CN	110050000	A	2019年7月23日	TW	201900674	A	2019年1月1日
				KR	20200004801	A	2020年1月14日
				EP	3623389	A1	2020年3月18日
				MX	2019013023	A	2019年12月18日
				JP	2020519289	A	2020年7月2日
				WO	2018205985	A1	2018年11月15日
				AU	2018264455	A1	2019年11月14日
				BR	112019023184	A2	2020年5月19日
				CA	3061791	A1	2019年10月29日
				US	2020157180	A1	2020年5月21日
WO	2021/101796	A1	2021年5月27日	无			
WO	2021/093760	A1	2021年5月20日	TW	202128763	A	2021年8月1日
CN	114181310	A	2022年3月15日	无			
CN	114478769	A	2022年5月13日	WO	2022089392	A1	2022年5月5日
CN	114106182	A	2022年3月1日	无			

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 0 7 K 16/30 (2006.01)
 C 0 7 K 14/715 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 37/04 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 38/17 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4709 (2006.01)
 A 6 1 K 31/47 (2006.01)

C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 15/13
 C 0 7 K 16/30
 C 0 7 K 14/715
 A 6 1 P 43/00 1 2 1
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 37/04
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 39/395 U
 A 6 1 K 38/17
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 31/4709
 A 6 1 K 31/47

4 H 0 4 5

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
 M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
 ,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
 H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ワン チョンミン

中華人民共和国, カントン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ ディベロップメント ゾーン,
 シェンノン ロード 6

(72)発明者 チャン ポン

中華人民共和国, カントン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ ディベロップメント ゾーン,
 シェンノン ロード 6

(72)発明者 リー パイヨン

中華人民共和国, カントン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ ディベロップメント ゾーン,
 シェンノン ロード 6

(72)発明者 シア ユイ

中華人民共和国, カントン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ ディベロップメント ゾーン,
 シェンノン ロード 6

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA44

4C076 AA95 CC07 CC27 CC41 EE59

4C084 AA02 AA07 AA19 BA41 BA44 CA53 DC50 MA02 NA05 NA13
 ZB021 ZB091 ZB261 ZB262 ZC202 ZC7514C085 AA14 AA16 BB11 BB31 BB41 BB43 CC02 CC05 CC31 DD62
 DD63 EE01 EE03 GG064C086 AA01 BC28 GA07 GA13 GA14 MA02 MA04 NA05 ZB02 ZB09
 ZB26 ZC754H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 FA72
 FA74