



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107207594 A

(43)申请公布日 2017.09.26

(21)申请号 201580070988.1

D.F.阿杜雷尔 I.查克拉博尔蒂

(22)申请日 2015.12.22

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(30)优先权数据

62/096267 2014.12.23 US

代理人 黄登高 罗文峰

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.06.22

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/067332 2015.12.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/106302 EN 2016.06.30

(71)申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 M.F.毛雷尔 陈正辉 提摩西

B.德沃瓦 M.斯里尼瓦桑

S.H.朱利恩 P.O.谢泼德

权利要求书3页 说明书71页

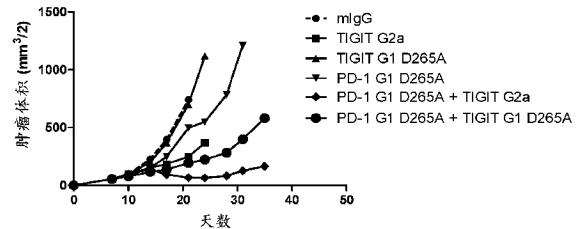
序列表40页 附图8页

(54)发明名称

针对TIGIT的抗体

(57)摘要

本发明提供结合人TIGIT (含Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体)的抗体或其抗原结合片段，以及这些抗体或片段在治疗应用中，例如在治疗癌症或慢性病毒感染中的用途。这样的治疗方法包括与其它免疫调节受体相互作用，例如PD-1/PD-L1相互作用的抑制剂的组合疗法。本发明进一步提供编码所述抗体的重链和/或轻链可变区的多核苷酸，包含编码所述抗体的重链和/或轻链可变区的多核苷酸的表达载体，包含所述载体的细胞，和通过自细胞表达所述抗体或片段来制备它们的方法。



1. 分离的抗体或其抗原结合片段,其与一种或多种选自14B2、13E6、6F9、11G11、10C9、16F6、11C9、27A9、10D7、20G6、24E8、24G1、27F1、15A6、4E4、13D1、9B11、10B8、22G2、19H2、8C8、17G4、25E7、26D8和16A8的抗体竞争结合人TIGIT (含Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体)。

2. 权利要求1的分离的抗体或片段,其中在交叉阻断测定法中所述竞争包括当以与所选抗体大致相等的摩尔浓度使用时,在竞争ELISA中减少所选抗体与人TIGIT (SEQ ID NO: 1)的结合至少20%的能力。

3. 分离的抗体或其抗原结合片段,其在以下表位结合TIGIT (含Ig和ITIM结构域的人T细胞免疫受体):

a. 包含huTIGIT (SEQ ID NO: 1)的残基E60、I109、L65、N70、F107、T117、I68、H76和N58的一个或多个的表位(抗体22G2);

b. 包含残基G74、N70、H76、L65、L73、Q56、I68、H111和P114的一个或多个的表位(抗体11G11);或

c. 包含残基H76、G74、L65、N58、I68、Q139、G135、L73、F107、N70、E60、H134、A132和I109的一个或多个的表位(抗体15A6)。

4. 权利要求3的分离的抗体或片段,其在包含残基L65、I68、N70和H76的一个或多个的表位结合TIGIT。

5. 权利要求3的分离的抗体或片段,其在以下表位结合TIGIT:

a. 包含序列NWEQQDQLLAICNADLGWH (SEQ ID NO: 38) 和/或FCIYHTYPDGT (SEQ ID NO: 39) 的表位(抗体22G2);

b. 包含序列QVNWEQQDQLLAICNADLGWH (SEQ ID NO: 40) 和/或HTYP (SEQ ID NO: 41) 的表位(抗体11G11);或

c. 包含序列NWEQQDQLLAICNADLGWH (SEQ ID NO: 38) 、FCI和/或AEHGARFQ (SEQ ID NO: 43) 的表位(抗体15A6)。

6. 权利要求5的分离的抗体或片段,其在包含序列LLAICNADLGWH (SEQ ID NO: 44) 的表位结合TIGIT。

7. 分离的抗体或其抗原结合片段,其结合TIGIT (含Ig和ITIM结构域的人T细胞免疫受体),其中抗体重链可变结构域源自人V区种系序列V4-39、V4-61或V1-69。

8. 权利要求7的分离的抗体或片段,其中抗体重链和轻链可变结构域源自人重链和轻链V区种系序列组合V4-39/VA27、V4-61/VL6、V4-39/VL6或V1-69/VL15。

9. 前述权利要求中任一项的分离的抗体或片段,其中所述抗体或片段显著抑制人TIGIT与人PVR/CD155的结合。

10. 权利要求1-8中任一项的分离的抗体或片段,其中所述抗体以2 nM或更小的K_D结合人TIGIT,如通过BIACORE® SPR分析所测量的。

11. 权利要求1-8中任一项的分离的抗体或片段,其中所述抗体结合人和食蟹猴TIGIT二者。

12. 前述权利要求中任一项的分离的抗体或片段,其中所述抗体不是美国专利申请公开号2009/0258013中的mAb 10A7或1F4。

13. 权利要求12的分离的抗体或片段,其中所述抗体或片段不结合在huTIGIT上与美

国专利申请公开号2009/0258013的mAb 10A7或1F4相同的表位,和不与美国专利申请公开号2009/0258013的mAb 10A7或1F4竞争结合TIGIT。

14. 分离的抗体或其抗原结合片段,其结合基本上由以下组成的TIGIT (含Ig和ITIM结构域的人T细胞免疫受体) :

a) 重链可变结构域,包含:

- i) CDRH1,包含序列SEQ ID NO.:14、20、26或32;
- ii) CDRH2,包含序列SEQ ID NO.:15、21、27或33; 和
- iii) CDRH3,包含序列SEQ ID NO.:16、22、28或34;
和
- b) 轻链可变结构域,包含:
- i) CDRL1,包含序列SEQ ID NO.:17、23、29或35;
- ii) CDRL2,包含序列SEQ ID NO.:18、24、30或36; 和
- iii) CDRL3,包含序列SEQ ID NO.:19、25、31或37。

15. 权利要求14的分离的抗体或片段,其包含一个或多个重链和一个或多个轻链,其中:

a) 重链包含与序列SEQ ID NO: 2、3、4、5、7、8、10或12具有至少80%序列同一性的重链可变区; 和

a) 轻链包含与序列SEQ ID NO: 6、9、11或13具有至少80%序列同一性的轻链可变区。

16. 权利要求14的分离的抗体或片段,其包含重链和轻链可变结构域,所述重链和轻链可变结构域包含选自以下的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3序列:

- i) SEQ ID NO: 14 - 19;
- ii) SEQ ID NO: 20 - 25;
- iii) SEQ ID NO: 26 - 31; 和
- iv) SEQ ID NO: 32 - 37。

17. 前述权利要求中任一项的分离的抗体,其中所述抗体是人IgG1抗体或其具有增加的效应子功能的变体。

18. 权利要求11-16中任一项的分离的抗体,其中所述抗体是具有减少或消除的效应子功能的人IgG1 Fc变体。

19. 权利要求18的分离的抗体或片段,其包含以下突变:按EU编号的L234A、L235E、G237A、A330S和P331S (SEQ ID NO: 48)。

20. 编码前述权利要求中任一项的抗体或片段的重链和/或轻链可变区的核酸。

21. 包含权利要求20的核酸的表达载体。

22. 用权利要求21的表达载体转化的宿主细胞。

23. 产生抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段的方法,包括在允许产生所述抗体或片段的条件下培养权利要求22的宿主细胞,和自细胞纯化所述抗体。

24. 在有需要的受试者中增强抗原-特异性T细胞反应的方法,包括使T细胞与权利要求1-19中任一项的抗体或片段接触,使得抗原-特异性T细胞反应得到增强。

25. 权利要求24的方法,其中所述受试者具有肿瘤或慢性病毒感染,并且针对所述肿瘤或病毒感染的免疫反应得到增强。

26. 减少或耗尽有需要的受试者的肿瘤中的调节T细胞的方法,包括给予有效量的权利要求1-17中任一项的抗体或片段,使得肿瘤中的调节T细胞的数量减少。

27. 治疗癌症的方法,包括给予有需要的受试者治疗有效量的权利要求1-19中任一项的抗体或片段。

28. 权利要求27的方法,其中所述癌症选自:膀胱癌、乳腺癌、子宫/宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、食管癌、胃肠癌、胰腺癌、结肠直肠癌、结肠癌、肾癌、头颈癌、肺癌、胃癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统的肿瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤和病毒相关的癌症。

29. 权利要求27的方法,其中所述癌症是转移性癌症、难治性癌症或复发性癌症。

30. 权利要求24-29中任一项的方法,还包括给予一种或多种选自抗-PD-1抗体、抗-
LAG-3抗体、抗-CTLA-4抗体或抗-PD-L1抗体的另外的治疗剂。

31. 权利要求30的方法,其中所述另外的治疗剂是抗-PD-1抗体。

32. 权利要求30的方法,其中所述另外的治疗剂是抗-PD-L1抗体。

33. 双特异性抗体,其包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,其中:

a) 所述第一抗原结合结构域来自权利要求1-16中任一项的抗-huTIGIT抗体;和

b) 所述第二抗原结合结构域来自选自抗-PD-1抗体、抗-
LAG-3抗体、抗-CTLA-4抗体和
抗-PD-L1抗体的抗体。

34. 权利要求33的双特异性抗体,其中所述第二结合结构域来自抗-PD-1抗体。

35. 权利要求33的双特异性抗体,其中所述第二结合结构域来自抗-PD-L1抗体。

36. 检测样品中TIGIT存在的方法,包括在允许所述抗体或其抗原结合片段和TIGIT之间形成复合物的条件下使样品与权利要求1-16中任一项的抗体或其抗原结合片段接触,和检测所述复合物的形成。

37. 治疗癌症的方法,包括在且仅在肿瘤包含以下一项或多项时,给予具有肿瘤的受试者拮抗剂抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段:

a) 高水平的侵润TIGIT⁺ T细胞和/或NK细胞;

b) 在肿瘤细胞或肿瘤侵润骨髓细胞上的PVR和/或Nectin-2表达升高;和

c) 具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 感染。

38. 治疗癌症的方法,包括在且仅在肿瘤包含以下一项或多项时,给予具有肿瘤的受试者拮抗剂权利要求1-19中任一项的抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段:

a) 高水平的侵润TIGIT⁺ T细胞和/或NK细胞;

b) 在肿瘤细胞或肿瘤侵润骨髓细胞上PVR和/或Nectin-2表达升高;和

c) 具核梭杆菌感染。

针对TIGIT的抗体

[0001] 背景

TIGIT (含Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体) 是一种共-抑制性受体蛋白, 亦称为WUCAM、Vstm3或Vsigt9。TIGIT在对T细胞上特异性表达的蛋白的基因组研究中被发现, 和具有免疫球蛋白可变结构域、跨膜结构域和免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM), 和包含PVR蛋白家族的标记序列元件。其已知与脊髓灰质炎病毒受体 (PVR; CD155) 和与nectin2 (CD112) 相互作用。参见例如Stengel et al. (2012) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 19:5399; WO 2006/124667; WO 2009/126688。尽管PVR可与共活化受体DNAM-1 (CD226) 相互作用以增强肿瘤杀伤, 但高亲和力TIGIT/PVR相互作用会抑制这样的杀伤, 可用于阻止也表达PVR的正常(自身)细胞的杀伤。Stanietsky et al. (2009) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 106:17858。这种抑制性相互作用的优势可能在抑制抗-自身免疫反应中是重要的, 但在肿瘤情况下其抑制肿瘤根除。同前。

[0002] TIGIT通过促进成熟免疫调节性树突细胞的产生来抑制T细胞活化。Yu et al. (2009) *Nat. Immunol.* 10:48。TIGIT和其它这样的共-抑制性分子 (例如, CTLA-4、PD-1、Lag3和BTLA) 可在肿瘤细胞逃脱免疫监视中起作用。实验表明, PVR/CD155在黑素瘤细胞上 (Inozume et al. (2014) *J. Invest. Dermatol.* 134:S121 – Abstract 693) 和在各种其它肿瘤上过表达。可能的是, TIGIT/PVR相互作用可通过抑制T和NK细胞的抗-肿瘤反应, 保护这样的肿瘤细胞免于免疫介导的根除。Stanietsky et al. (2009) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 106:17858和Lozano et al. (2012) *J. Immunol.* 188:3869。其它实验已鉴定了调节T细胞 (T_{regs}) 的TIGIT⁺亚组, 其选择性抑制Th1和Th17反应 (Joller et al. (2014) *Immunity* 40:569), 表明抗-TIGIT抗体可增强抗-肿瘤免疫反应的备选机制。

[0003] 类似于其它共-抑制性受体例如CTLA-4、PD-1和BTLA, TIGIT可起“关闭”免疫反应的作用。同前。靶向CTLA-4 (ipilimumab) 和PD-1 (nivolumab、pembrolizumab) 的抗体已被批准用于治疗人癌症, 证实了这种治疗途径。结合人TIGIT的抗体也可用于治疗癌症。参见例如WO 2006/124667。在小鼠模型中, PD-L1和TIGIT二者的抗体阻断导致协同提高CD8⁺ T细胞介导的肿瘤排斥。Grogan et al. (2014) *J. Immunol.* 192(1) Suppl. 203.15; Johnston et al. (2014) *Cancer Cell* 26:1-15。在黑素瘤的动物模型中得到类似结果。Inozume et al. (2014) *J. Invest. Dermatol.* 134:S121 – Abstract 693。一些实验表明, 仅在与TIGIT竞争结合PVR/CD155的共活化受体DNAM-1/CD226的存在下, TIGIT阻断有效增强抗-肿瘤CD8⁺ T细胞反应。Johnston et al. (2014) *Cancer Cell* 26:1-15。

[0004] 最近的实验证实了肿瘤内细菌表达的Fap2蛋白可通过结合TIGIT来抑制NK细胞介导的肿瘤杀伤 (Gur et al. (2015) *Immunity* 42:344), 表明清除这样的细菌, 阻断TIGIT与Fap2的相互作用, 或总体上阻断TIGIT的活性, 可用于治疗癌症, 例如, 结肠直肠癌。Hampton (2015) *JAMA* 313:1305。

[0005] 对治疗癌症和慢性病毒感染的改进方法, 和用于所述方法的药物例如治疗性单克隆抗体, 存在需要。用于这样的改进的治疗方法的药物可包含特异性结合TIGIT和逆转或部分逆转TIGIT-介导的抗-肿瘤或抗-病毒免疫反应的抑制的抗体或抗体片段。

[0006] 发明简述

本发明提供用于癌症和慢性病毒感染的改进的药物和治疗方法,其包含结合huTIGIT的抗体或其抗原-结合片段。本文提供了分离的抗体,例如单克隆抗体,特别是人单克隆抗体,其特异性结合huTIGIT和具有需要的功能性质,例如特异性结合huTIGIT、结合猴TIGIT(例如,食蟹猴TIGIT)的高亲和力,阻断TIGIT与PVR和/或Nectin-2的结合的能力,阻断TIGIT与DNAM的相互作用的能力,或这些性质的任何组合。

[0007] 本发明进一步提供治疗癌症的改进方法和用于所述方法的治疗性抗体,包括其中TIGIT-介导的信号传导抑制抗-肿瘤免疫反应的癌症、其中TIGIT与共活化受体DNAM-1/CD226相互作用抑制抗-肿瘤免疫反应的肿瘤、其中表达TIGIT的调节T细胞抑制抗-肿瘤免疫反应的肿瘤,或其中TIGIT否则会抑制抗-肿瘤免疫反应的肿瘤。本发明还提供用于治疗其中TIGIT抑制抗-病毒免疫反应的慢性病毒感染的方法和治疗性抗体。

[0008] 在另一个方面,本发明涉及与具有本文公开的重链和轻链可变结构域序列的抗体竞争结合huTIGIT和/或交叉阻断具有本文公开的重链和轻链可变结构域序列的抗体与huTIGIT结合的抗体。

[0009] 在某些实施方案中,本发明的抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段增强抗-肿瘤免疫反应,例如,抗原-特异性T细胞反应。在其它实施方案中,本发明的抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段阻断TIGIT介导的抑制性信号传导,允许PVR/DNAM共刺激NK细胞,以增加NK-介导的抗-肿瘤反应杀伤。在又一实施方案中,本发明的抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段减少否则会抑制抗-肿瘤免疫反应的肿瘤内的调节T细胞群。在又一实施方案中,形式为IgG1的本发明的抗-TIGIT抗体减少CD8⁺耗尽的T细胞和T_{regs},允许流入新的未耗尽CD8⁺ T细胞。在其它实施方案中,本发明的抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段通过一种或多种上述机制起作用,因为这些机制不必然互相排斥。

[0010] 在某些实施方案中,本发明的抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段不结合活化Fc_γ受体(Fc_γR),例如,在依赖于提高TIGIT-表达细胞的抗-肿瘤活性的实施方案中。在备选的实施方案中,本发明的抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段结合一种或多种活化Fc_γR,例如,在依赖于杀伤TIGIT-表达细胞,例如耗尽CD8⁺ T细胞或T_{regs}的实施方案中。

[0011] 本发明还提供分离的单克隆抗体(15A6)或其抗原结合片段,其特异性结合huTIGIT和包含重链CDRH1、CDRH2和CDRH3序列(分别包含SEQ ID NO: 14、15和16)和/或轻链CDRL1、CDRL2和CDRL3序列(分别包含SEQ ID NO: 17、18和19)。

[0012] 本发明还提供分离的单克隆抗体(22G2)或其抗原结合片段,其特异性结合huTIGIT和包含重链CDRH1、CDRH2和CDRH3序列(分别包含SEQ ID NO: 20、21和22)和/或轻链CDRL1、CDRL2和CDRL3序列(分别包含SEQ ID NO: 23、24和25)。

[0013] 本发明还提供分离的单克隆抗体(11G11)或其抗原结合片段,其特异性结合huTIGIT和包含重链CDRH1、CDRH2和CDRH3序列(分别包含SEQ ID NO: 26、27和28)和/或轻链CDRL1、CDRL2和CDRL3序列(分别包含SEQ ID NO: 29、30和31)。

[0014] 本发明还进一步提供分离的单克隆抗体(10D7)或其抗原结合片段,其特异性结合huTIGIT和包含重链CDRH1、CDRH2和CDRH3序列(分别包含SEQ ID NO: 32、33和34)和/或轻链CDRL1、CDRL2和CDRL3序列(分别包含SEQ ID NO: 35、36和37)。

[0015] 本发明还提供分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其特异性结合huTIGIT和包

含以SEQ ID NO: 2 (或3、4、5)和6; SEQ ID NO: 7 (或8)和9; SEQ ID NO: 10和11; 和SEQ ID NO: 12和13公开的可变重链和可变轻链序列。

[0016] 本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其结合huTIGIT和包含重链和轻链可变区,其中重链可变区包含与选自SEQ ID NO: 2、3、4、5、7、8、10和12的氨基酸序列具有至少90%、95%或99%同一性的氨基酸序列。

[0017] 本发明还提供分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其结合huTIGIT和包含重链和轻链可变区,其中轻链可变区包含与选自SEQ ID NO: 6、9、11和13的氨基酸序列具有至少90%、95%或99%同一性的氨基酸序列。

[0018] 在某些实施方案中,本发明的分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,(a) 结合在 huTIGIT上与15A6、22G2、11G11和/或10D7相同的表位,和/或 (b) 抑制15A6、22G2、11G11和/或10D7与huTIGIT的结合,如通过例如FACS或ELISA所测量的。

[0019] 在某些实施方案中,本发明的抗-huTIGIT抗体或其抗原结合片段结合包含 huTIGIT (SEQ ID NO: 1) 的残基E60、I109、L65、N70、F107、T117、I68、H76和N58的一个或多个或由其组成的表位(抗体22G2)、包含残基G74、N70、H76、L65、L73、Q56、I68、H111和P114的一个或多个或由其组成的表位(抗体11G11),或包含残基H76、G74、L65、N58、I68、Q139、G135、L73、F107、N70、E60、H134、A132和I109的一个或多个或由其组成的表位(抗体15A6)。

[0020] 或者,本发明的抗-huTIGIT抗体或其抗原结合片段结合包含选自 NWEQQDQLLAICNADLGWH (SEQ ID NO: 38) 和FCIYHTYPDGT (SEQ ID NO: 39) (抗体22G2), 或选自QVNWEQQDQLLAICNADLGWH (SEQ ID NO: 40) 和HTYP (SEQ ID NO: 41) (抗体 11G11), 或选自NWEQQDQLLAICNADLGWH (SEQ ID NO: 38)、FCI和AEHGARFQ (SEQ ID NO: 43) (抗体15A6) 的一个或多个序列或由其组成的表位。

[0021] 在还进一步的实施方案中,本发明的抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段结合 huTIGIT (SEQ ID NO: 1) 上的包含残基L65、I68、N70和H76的一个或多个或由其组成的核心表位;和/或包含LLAICNADLGWH (SEQ ID NO: 44) 或由其组成的表位。

[0022] 在一些实施方案中,本发明的抗-huTIGIT抗体或其抗原结合片段还结合食蟹猴 TIGIT。

[0023] 在各个实施方案中,本发明的抗-TIGIT抗体或其抗原-结合片段是人IgG1、IgG2、 IgG3或IgG4抗体,或其变体。在某些实施方案中,包括但不限于阻断“耗尽的”肿瘤-特异性T 细胞中的TIGIT信号传导或阻断允许DNAM-1/PVR-介导的共刺激的NK细胞上的抑制性信号的方法,或阻断TIGIT与DNAM-1/CD226相互作用以减少DNAM-1同源二聚化的方法,抗-TIGIT 抗体或其抗原-结合片段包含无效或几乎无效的Fc。这样的Fc区包括例如,人IgG2或IgG4, 或人IgG1的无效变体,具有一个或多个以下突变:L234A, L235E, G237A, A330S和P331S (EU编号),包括包含所有5个所列突变的IgG1.1f (SEQ ID NO: 48)。

[0024] 在备选的实施方案中,包括但不限于耗尽TIGIT⁺调节T细胞的方法,抗-TIGIT抗体 或其抗原-结合片段包含优先结合活化Fc γ R (Fc γ RI、Fc γ RIIa或Fc γ RIIIa)的Fc,例如 人IgG1,或相对于野生型IgG1 Fc,与活化Fc γ R的结合增强的序列变体。在涉及使用IgG1形式的本发明的抗-TIGIT抗体以驱动T_{regS}的减少的实施方案中,肿瘤内注射可任选地用于将效果定位于肿瘤微环境,使由在周围组织中的活性引起的潜在副作用最小化。

[0025] 在某些实施方案中,本发明的抗-TIGIT抗体的CDR区中的甲硫氨酸残基(例如,SEQ

ID NO: 34,10D7的CDRH3中的M115)或其抗原-结合片段被不经历氧化的氨基酸残基置换。

[0026] 在某些实施方案中,竞争结合、交叉阻断或结合与15A6、22G2、11G11或10D7或其抗原-结合片段相同的表位的抗-huTIGIT抗体是人或人源化抗体。

[0027] 在一些实施方案中,本发明的抗-huTIGIT抗体不是美国专利申请公开号2009/0258013中描述的抗体,或不结合与美国专利申请公开号2009/0258013中描述的抗体相同的表位,例如,它们不结合与抗-huTIGIT mAb 10A7或1F4相同的表位。亦参见Johnston *et al.* (2014) *Cancer Cell* 26:1; Yu *et al.* (2009) *Nat. Immunol.* 10:48。

[0028] 在其它实施方案中,抗-huTIGIT抗体包含源自与本文公开的抗体相同的人V结构域种系序列的可变结构域,包括重链V结构域V4-39、V4-61或V1-69。在更具体的实施方案中,抗-huTIGIT抗体包含源自与本文公开的抗体相同的人重链和轻链V结构域种系序列的重链和轻链可变结构域,例如V4-39/VA27 (15A6)、V4-61/VL6 (22G2)、V4-39/VL6 (11G11)和V1-69/VL15 (10D7)。

[0029] 在各种实施方案中,本发明的抗-huTIGIT抗体以小于10nM、5nM、2nM、1nM、300pM或100pM的K_D结合huTIGIT。在其它实施方案中,本发明的抗-huTIGIT抗体以2nM-100pM的K_D结合huTIGIT。

[0030] 在其它实施方案中,本发明的抗-huTIGIT抗体基本上由抗体15A6、22G2、11G11和10D7的CDR的某种组合组成,或包含抗体15A6、22G2、11G11和10D7的CDR的某种组合,例如CDRH1 (SEQ ID NO: 14, 20, 26和32); CDRH2 (SEQ ID NO: 15, 21, 27和33); CDRH3 (SEQ ID NO: 16, 22, 28和34); CDRL1 (SEQ ID NO: 17, 23, 29和35); CDRL2 (SEQ ID NO: 18, 24, 30和36); 和CDRL3 (SEQ ID NO: 19, 25, 31和37)。在其它实施方案中,抗体基本上由抗体15A6、22G2、11G11和10D7的CDR序列的单独的特定组合组成,或包含抗体15A6、22G2、11G11和10D7的CDR序列的单独的特定组合。

[0031] 在进一步的实施方案中,本发明的抗-huTIGIT抗体基本上由抗体15A6 (SEQ ID NO: 2-5和6), 22G2 (SEQ ID NO: 7-8和9), 11G11 (SEQ ID NO: 10和11)和10D7 (SEQ ID NO: 12和13)的重链和/或轻链可变结构域,或与这些公开的序列共有至少80%, 85%, 90%和95%序列同一性的序列组成,或包含所述序列。

[0032] 在还进一步的实施方案中,本发明的抗-huTIGIT抗体基本上由包含抗体15A6 (SEQ ID NO: 2-5和6), 22G2 (SEQ ID NO: 7-8和9), 11G11 (SEQ ID NO: 10和11)和10D7 (SEQ ID NO: 12和13)的可变结构域序列的重链和/或轻链,或与这些公开的序列共有至少80%, 85%, 90%和95%序列同一性的序列组成,或包含所述序列。

[0033] 在其它实施方案中,本发明的抗体的抗原结合结构域以双特异性分子存在,其还包含特异性结合不同的免疫调节受体,包括但不限于PD-1、CTLA-4或LAG3的抗原结合结构域。

[0034] 本发明还提供编码本发明的抗-huTIGIT抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链可变区的核酸,包含所述核酸分子的表达载体,用所述表达载体转化的细胞,和通过表达用表达载体转化的细胞和回收抗体的而产生抗体方法。

[0035] 本发明还提供包含与试剂例如可检测标记或细胞毒性剂连接的本文所述的抗-huTIGIT抗体的免疫缀合物。

[0036] 本发明还提供包含本发明的抗-huTIGIT抗体或其抗原结合片段和载体的药物组

合物。本文还提供了包含抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段和使用说明书的药剂盒。

[0037] 在另一个方面，本发明提供增强抗原-特异性T细胞反应的方法，包括使T细胞与本发明的抗-huTIGIT抗体或其抗原结合片段接触，使得抗原-特异性T细胞反应得到增强，例如，通过减少否则会抑制抗-肿瘤反应的抑制性信号。在一些实施方案中，抗原-特异性T细胞是肿瘤-抗原特异性效应T细胞，例如CD8⁺ T细胞，和所述增强，例如通过阻断TIGIT-介导的抑制性作用，导致抗-肿瘤活性增加。本发明的抗-huTIGIT抗体或其抗原-结合片段还可减少NK细胞中的抑制性信号，因此增加它们的抗-肿瘤活性。不意欲受理论的限制，本发明的抗-huTIGIT抗体通过阻断TIGIT与PVR的结合，从而减少或消除否则会传递至细胞的抑制性信号，来增加效应T细胞或NK细胞功能。或者，或另外，本发明的抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段可抑制TIGIT和DNAM-1/CD226之间的相互作用，其否则会减少DNAM-1-介导的免疫活化。

[0038] 本发明还提供增加T细胞中的IL-2和/或IFN- γ 产生，和/或T细胞的增殖的方法，包括使T细胞与有效量的抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段接触。

[0039] 在另一个方面，本发明提供减少或耗尽有需要的受试者的肿瘤中的T_{regs}的方法，包括给予有效量的本发明的抗-huTIGIT抗体，其中所述抗体具有效应子功能或增强的效应子功能，以减少肿瘤中的T_{regs}的数量。

[0040] 本发明提供在受试者中增强免疫反应的方法，包括给予受试者有效量的本发明的抗-huTIGIT抗体或其抗原结合片段，使得受试者的免疫反应得到增强。在某些实施方案中，受试者具有肿瘤，和针对肿瘤的免疫反应得到增强。在另一个实施方案中，受试者具有病毒感染，和抗-病毒免疫反应得到增强。

[0041] 本发明还提供了在受试者中抑制肿瘤生长的方法，包括给予受试者本发明的抗-huTIGIT抗体或其抗原结合片段，使得肿瘤生长得到抑制。

[0042] 本发明还提供了治疗癌症的方法，例如通过免疫疗法，包括给予有需要的受试者治疗有效量的本发明的抗-huTIGIT抗体或其抗原结合片段，例如，作为药物组合物，从而治疗癌症。在某些实施方案中，癌症是膀胱癌、乳腺癌、子宫/宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、食管癌、胃肠癌、胰腺癌、结肠直肠癌、结肠癌、肾癌、头颈癌、肺癌、胃癌、生殖细胞癌、骨癌、肝癌、甲状腺癌、皮肤癌、中枢神经系统的肿瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤和病毒相关的癌症。在某些实施方案中，癌症是转移性癌症、难治性癌症或复发性癌症。

[0043] 在某些实施方案中，本文所述的调节免疫功能的方法和治疗方法包括给予本发明的抗-huTIGIT抗体与一种或多种另外的治疗剂的组合或作为含一种或多种另外的治疗剂的双特异性试剂给予，所述另外的治疗剂例如抗-PD-1抗体、抗-PD-L1抗体、抗-LAG3抗体、抗-GITR抗体、抗-OX40抗体、抗-CD73抗体、抗-CD40抗体、抗-CD137 mAb、抗-CD27 mAb、抗-CSF-1R抗体和/或抗-CTLA-4抗体、TLR激动剂或IDO或TGF β 的小分子拮抗剂。在特定的实施方案中，抗-huTIGIT疗法与抗-PD-1和/或抗-PD-L1疗法，例如，用结合人PD-1的抗体或其抗原结合片段或结合人PD-L1的抗体或其抗原结合片段的治疗组合。

[0044] 在一些实施方案中，筛选来自患者的样品，例如，活检样品中T细胞或NK细胞上的DNAM-1表达，以选择最可能对抗-TIGIT疗法有响应的患者，其中T细胞上存在DNAM-1表明在抗-TIGIT疗法，例如，用本发明的抗-huTIGIT抗体或片段治疗时患者将具有有益的抗-肿瘤反应，和DNAM-1的不存在鉴定不太可能自抗-TIGIT疗法获益的患者。在其它实施方案中，筛

选来自患者的样品中肿瘤细胞或肿瘤侵润骨髓细胞上的PVR和/或Nectin-2表达,以选择最可能对抗-TIGIT疗法有响应的患者,其中存在PVR和/或Nectin-2表明在抗-TIGIT疗法,例如,用本发明的抗-huTIGIT抗体或片段治疗时患者将具有有益抗-肿瘤反应,和PVR和/或Nectin-2/CD112的不存在鉴定不太可能自抗-TIGIT疗法获益的患者。在各个实施方案中,TIGIT、DNAM、PVR和/或Nectin-2的细胞-表面表达通过FACS、IHC或LC-MS确定。在另一个方面,本发明提供治疗有需要的受试者的方法,包括如本文所述确定TIGIT、DNAM、PVR和/或Nectin-2的细胞-表面表达,和优先或排他地给予最可能获得治疗益处的那些受试者本发明的抗-TIGIT抗体。

[0045] 在一个实施方案中,在考虑用本发明的抗-TIGIT抗体治疗的受试者中测量可溶性PVR和/或可溶性Nectin-2 (sPVR、sNectin-2) 的水平,和只有显示可溶性PVR和/或Nectin-2升高的受试者用所述抗体治疗。在一些实施方案中,在血清中通过ELISA或LC-MS检测sPVR和/或sNectin-2。

[0046] 本发明还提供在样品中、在样品内的细胞上(例如,FACS)或在细胞或组织的特定位置(例如,IHC)检测TIGIT的存在方法,或基于在细胞表面上TIGIT的存在或不存在来分选细胞的方法(例如,FACS),包括在允许在抗体或其抗原结合片段和TIGIT之间形成复合物的条件下使样品与本发明的抗-huTIGIT抗体或其抗原结合片段接触,和检测复合物的形成。在一些实施方案中,用于检测的抗-TIGIT抗体与可检测标记缀合。

[0047] 根据以下详细描述和实施例(其不应视为限制性的),本公开内容的其它特征和优点将是明显的。

[0048] 附图简述

图1显示“框并(binning)”实验的示意图,其中配对测试了本发明的各种抗-huTIGIT抗体阻断其它抗体与huTIGIT的结合的能力。结果表明抗体落入有限数量的类别或或“框”中。见实施例3。

[0049] 图2A、2B和2C显示huTIGIT序列变体分别与抗体22G2、11G11和15A6结合的酵母展示数据。在成熟huTIGIT中的各个氨基酸残基的残基编号沿横坐标提供。残基编号比SEQ ID NO: 1的编号小21,因为该序列表包括未包括在图中的信号肽。如实施例4所述的,展示huTIGIT的序列变体的酵母基于它们不能结合各自的抗体(22G2, 11G11, 15A6)而选择。因此,沿huTIGIT序列的对于抗体结合是关键的位置以高频率出现(即,在纵坐标上升起的条柱/线),因为它们在未-结合酵母克隆库中的过度表现。在各残基处变体(非野生型)残基出现的频率在纵坐标上提供(对数标度),每个残基一个条柱(线)。将频率数据标准化至在未选择的文库(即尚未基于不能结合本发明的抗-huTIGIT抗体进行选择的文库)中在各位置处变体残基出现的频率。参见实施例4。

[0050] 图3显示抗-TIGIT mAb 22G2对溶胞的作用,表示为表达人PVR的细胞被人NK细胞特异性溶胞的百分比。参见实施例5。对于各抗体,左条柱是野生型P815细胞和右条柱是表达人PVR的P815细胞。

[0051] 图4A显示健康人供体血液用抗原肽的混合物(CETF = 来自CMV、EBV、流感和破伤风的肽)处理诱导CD8⁺ T细胞上PD-1和TIGIT的上调。“No Stim”样品未用CEFT处理,而“Stim”样品用CEFT处理。图4B显示抗-TIGIT mAb和/或抗-PD-1 mAb对来自用CETF刺激的4份健康人供体血液样品的IFN γ 表达的作用。参见实施例6。

[0052] 图5A和5B显示在小鼠模型中抗-TIGIT抗体单独或与其它免疫调节疗法组合对肿瘤生长的作用。图5A显示用以下抗体处理的小鼠的CT26小鼠结肠癌模型的肿瘤体积(立方毫米),其通过肿瘤宽度的平方乘以长度的一半来计算:具有效应子功能激活的鼠IgG2a Fc结构域的抗-小鼠TIGIT抗体("TIGIT G2a")、具有效应子功能缺陷的IgG1 D265A Fc结构域的抗-小鼠TIGIT抗体("TIGIT G1 D265A")、具有效应子功能缺陷的IgG1 D265A Fc结构域的抗-小鼠PD-1抗体("PD-1 G1 D265A")、其组合,或对照IgG1抗体。图5B显示抗-TIGIT单一疗法以及与抗-PD-1和抗-CTLA-4抗体的组合疗法的作用。提供肿瘤体积以及实验结束时各组10只小鼠中无肿瘤(TF)小鼠的数量。每条线代表一只小鼠。mIgG1同种型对照未得到无肿瘤小鼠,作为单一疗法的抗-TIGIT也是如此。抗-PD-1作为单一疗法得到一只无肿瘤小鼠,当与抗-TIGIT组合时得到五只。抗-CTLA-4作为单一疗法得到三只无肿瘤小鼠,和当与抗-TIGIT组合时得到六只。参见实施例7。

[0053] 图6A和6B显示癌症组织中PVR表达升高。图6A显示各肿瘤类型中的PVR mRNA表达,如在The Cancer Genome Atlas (TCGA)数据集中检测的。提供肾上腺皮质癌(ACC)、不染色肾细胞癌(KICH)、肝脏肝细胞癌(LIHC)、结肠和直肠腺癌(COAD、READ)、胰管腺癌(PAAD)、嗜铬细胞瘤和神经节细胞瘤(PCPG)、乳头状肾癌(KIRP)、肺腺癌(LUAD)、头颈鳞状细胞癌(HNSC)、甲状腺腺癌(PRAD)、子宫内膜癌(UCEC)、宫颈癌(CESC)、皮肤黑素瘤(SKCM)、间皮瘤(MESO)、尿道上皮膀胱癌(BLCA)、透明细胞肾癌(KIRC)、肺鳞状细胞癌(LUSC)、子宫癌肉瘤(UCS)、肉瘤(SARC)、卵巢浆液性囊腺癌(OV)、乳头状甲状腺癌(THCA)、多形性成胶质细胞瘤(GBM)、乳腺癌(BRCA)、轻度胶质瘤(LGG)和弥漫性大B-细胞淋巴瘤(DLBC)的数据。此处公开的结果整体上或部分基于TCGA Research Network产生的数据。图6B显示与正常结肠上皮组织相比,结肠腺癌组织中的人PVR,腺癌样品中较深色区域指示PVR表达升高。参见实施例9。

[0054] 图7显示形式为IgG1f (SEQ ID NO: 45)或IgG1.1f (SEQ ID NO: 48)的抗-TIGIT mAb 22G2的Fc γ 受体结合,表示为理论最大受体结合值(R_{max})的百分比。对于两个不同批次的IgG1.1f抗体(按所示以10 μ M和1 μ m使用),提供6种不同的Fc γ 受体的数据。在各条柱群中,按左到右的顺序提供Fc γ 受体的数据:hCD64 (Fc γ RI); hCD32a-H131 (Fc γ RIIA-H131); hCD32a-R131 (Fc γ RIIA-R131); hCD32b (Fc γ RIIB); hCD16a-V158 (Fc γ RIIIA-V158); 和hCD16b-NA2 (Fc γ RIIIB-NA2,其中NA2表示为同种异型变体)。尽管Fc γ 受体对以相同的条柱表示,但根据提供它们的顺序,它们的身份是清楚的。对于与食蟹猴Fc γ 受体CD64、CD32a、CD32b和CD16(未显示)的结合,观察到相同的降低。

[0055] 详细描述

本发明公开了分离的抗体,特别是单克隆抗体,例如,人单克隆抗体,其特异性结合人TIGIT ("huTIGIT")和阻断与PVR/CD155结合,从而减少或消除否则会在TIGIT-表达细胞中发生的免疫抑制性信号。本发明还提供分离的抗体,特别是单克隆抗体,例如,人或人源化单克隆抗体,其特异性结合人TIGIT和阻断否则会阻止DNAM-1同源二聚化和因此阻止DNAM-1介导的共刺激的人TIGIT与DNAM-1/CD226的相互作用。提供各种人抗-huTIGIT单克隆抗体的序列。在某些实施方案中,本文描述的抗体源自特定的重链和轻链种系序列和/或包含特定的结构特征例如包含特定的氨基酸序列的CDR区。

[0056] 本文还提供了制备这样的抗体的方法,包含这样的抗体或其抗原-结合片段的免

疫缀合物和双特异性分子,和经配制以包含所述抗体或片段的药物组合物。本文还提供了使用单独或与其它免疫刺激剂(例如,抗体)和/或癌症或抗-感染疗法组合的所述抗体增强免疫反应的方法。因此,本文描述的抗-huTIGIT抗体可在各种治疗性应用中用于治疗,包括例如,抑制肿瘤生长和治疗慢性病毒感染。

[0057] 定义

为了本说明书可以更易于理解,首先定义某些术语。其它定义在整个详细描述中阐明。

[0058] TIGIT称为“含Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体”,其为免疫球蛋白的PVR(脊髓灰质炎病毒受体)家族的成员,其结合PVR/CD155和Nectin-2/CD112。TIGIT亦称为TIGIT、WUCAM、Vstm3和Vsigt9。除非另外指明,或自上下文清楚的是,本文提及TIGIT是指人TIGIT(“huTIGIT”),和抗-TIGIT抗体是指抗-人TIGIT抗体。人TIGIT还称为GENE ID NO: 201633和MIM (Mendelian Inheritance in Man): 612859。包括21个氨基酸信号序列的人TIGIT(NP_776160.2)的序列以SEQ ID NO: 1提供。除非另外指明,或自上下文清楚的是,TIGIT的“抑制”是指阻断PVR结合和信号传导。本发明的抗-TIGIT抗体可通过抑制TIGIT信号传导、阻断TIGIT/DNAM-1相互作用和/或其它机制,例如指导调节T细胞的减少来起作用。

[0059] PVR(脊髓灰质炎病毒受体)与TIGIT相互作用以产生免疫抑制性信号。PVR亦称为PVS; HVED; CD155; NECL5; TAGE4; Necl-5。除非另外指明,或自上下文清楚的是,本文提及PVR/CD155是指人PVR(“huPVR”)。人PVR还称为GENE ID NO: 5817和MIM: 173850。存在四种已知的人PVR转录物变体: α (NP_006496.4)、 β (NP_001129240.1)、 γ (NP_001129241.1)和 δ (NP_001129242.2),其序列以SEQ ID NO: 50 - 53提供。除非另外指明,提及PVR或人PVR涉及 α 转录物多肽。

[0060] 除非另外指明或自上下文清楚的是,本文使用的术语“抗体”可包括整个抗体和其任何抗原结合片段(即,“抗原-结合部分”)或单一链。在一个实施方案中,“抗体”是指包含通过二硫键互相连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,或其抗原结合片段。各重链包含重链可变区(本文简称为V_H)和重链恒定区。在某些天然存在的IgG、IgD和IgA抗体中,重链恒定区包含三个结构域,CH1、CH2和CH3。在某些天然存在的抗体中,各轻链包含轻链可变区(本文简称为V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域,CL。V_H和V_L区可进一步细分为超变性的区域,称为互补决定区(CDR),其与称为框架区(FR)的较保守的区域交替。各V_H和V_L包含三个CDR和四个框架区(FR),从氨基端至羧基端按以下顺序排列:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(Clq)结合。

[0061] 抗体通常以高亲和力特异性结合它们的相关抗原,反映为10⁻⁷-10⁻¹¹ M或更小的离解常数(K_D)。大于约10⁻⁶ M的任何K_D一般视为指示非特异性结合。如本文使用的,“特异性结合”抗原的抗体是指以高亲和力结合抗原和基本上相同的抗原的抗体,其意思是具有10⁻⁷ M或更小、优选地10⁻⁸ M或更小、甚至更优选地5 x 10⁻⁹ M或更小和最优选地10⁻⁸ M-10⁻¹⁰ M或更小的K_D,但不以高亲和力结合不相关的抗原。如果抗原显示与给定的抗原高程度的序列同一性,例如,如果抗原显示与给定的抗原的序列至少80%、至少90%、优选地至少95%、更优选地至少97%或甚至更优选地至少99%序列同一性,则所述抗原与给定的抗原“基本上相同”。例如,特异性结合人TIGIT的抗体也可能与来自某些非人灵长类物种(例如,食蟹猴)的

TIGIT交叉反应,但可能与来自其它物种的TIGIT,或与并非TIGIT的抗原不交叉反应。

[0062] 抗体可显示N-和/或C-末端氨基酸残基的修饰。例如,本发明的抗体可自编码例如重链上C-末端赖氨酸残基的构建体产生,但这样的C-末端赖氨酸可在出售或给予的治疗性抗体中部分地或全部地缺失。或者,抗体可自明确不编码C-末端赖氨酸残基的构建体产生,即使这样的赖氨酸存在于治疗性抗体所来源的亲本抗体中。在另一个实例中,本发明的抗体中的N-末端谷氨酰胺或谷氨酸残基可在出售或给予的治疗性抗体中部分地或完全转化为焦谷氨酸。抗体链的N-末端存在的任何形式的谷氨酰胺或谷氨酸,包括焦谷氨酸,包括在本文使用的术语“谷氨酰胺”内。因此,本文提供的具有N-末端谷氨酰胺或谷氨酸残基的抗体链序列包括不考虑焦谷氨酸形成水平的抗体链。

[0063] 除非另外指明,免疫球蛋白可来自任何通常已知的同种型,包括但不限于IgA、分泌性IgA、IgG和IgM。IgG同种型在某些物种中分为亚类:在人中IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,和在小鼠中IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3。免疫球蛋白,例如,人IgG1,以若干同种异型存在,其在至多几个氨基酸上彼此不同。除非另外指明,“抗体”可包括例如,单克隆和多克隆抗体;嵌合和人源化抗体;人和非-人抗体;全合成抗体;和单链抗体。

[0064] 本文使用的术语抗体的“抗原-结合部分”或“抗原结合片段”是指抗体的一个或多个片段,其保留特异性结合抗原(例如,人TIGIT)的能力。术语抗体的“抗原-结合部分/片段”内包括的结合片段的实例包括(i) Fab片段 - 由V_L, V_H, CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')2片段 - 包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由V_H和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段,和(v) 由V_H结构域组成的dAb片段(Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546)。分离的互补决定区(CDR)或通过合成接头连接的两个或更多个分离的CDR的组合,如果能够结合抗原,则可包含抗体的抗原结合结构域。

[0065] 单链抗体构建体也包括在本发明中。尽管Fv片段的两个结构域V_L和V_H,由单独的基因编码,但它们可使用重组方法通过合成接头连接,使它们能够作为单一蛋白链制备,其中V_L和V_H区配对以形成称为单链Fv(scFv)的单价分子;参见例如,Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426;和Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。这样的单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原-结合部分/片段”内。这些和其它可能的构建体描述于Chan & Carter (2010) *Nat. Rev. Immunol.* 10:301。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的常规技术获得,和以与完整抗体相同的方式筛选片段的功效。抗原-结合部分/片段可通过重组DNA技术,或通过酶或化学裂解完整免疫球蛋白产生。

[0066] 除非另外指明,词语“片段”当涉及抗体而使用时,例如在权利要求中,是指抗体的抗原结合片段,使得“抗体或片段”与“抗体或其抗原结合片段”具有相同的含义。

[0067] “双特异性”或“双功能抗体”是具有两个不同的重链/轻链对的人工杂合抗体,产生两个抗原结合位点,具有对不同的抗原的特异性。双特异性抗体可通过各种方法产生,包括杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。参见例如,Songsivilai & Lachmann (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79:315; Kostelny *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1547。

[0068] 本文使用的术语“单克隆抗体”是指显示对特定表位的单一结合特异性和亲和力的抗体,或其中所有抗体显示对特定表位的单一结合特异性和亲和力的抗体组合物。通常,这样的单克隆抗体源自单一细胞或编码抗体的核酸,和在没有有意引入任何序列改变的情

况下传代。因此，术语“人单克隆抗体”是指具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和任选的恒定区的单克隆抗体。在一个实施方案中，人单克隆抗体通过杂交瘤产生，例如通过融合获自转基因或转染色体非人动物（例如，具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因小鼠）的B细胞至永生细胞而获得。

[0069] 本文使用的术语“重组人抗体”，包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体，例如(a)自人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体的动物（例如，小鼠）或从中制备的杂交瘤分离的抗体，(b)自经转化以表达抗体的宿主细胞，例如，转染瘤分离的抗体，(c)自重组的组合人抗体文库分离的抗体，和(d)通过涉及人免疫球蛋白基因序列剪接至其它DNA序列的任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体包含可变区和恒定区，其利用由种系基因编码的特定的人种系免疫球蛋白序列，但包括例如在抗体成熟期间发生的后续重排和突变。如本领域已知的（参见例如，Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23 (9) :1117-1125），可变区包含抗原结合结构域，其由各种基因编码，所述基因经重排以形成对外源抗原特异性的抗体。除了重排之外，可变区可进一步通过多个单氨基酸变化被修饰（称为体细胞突变或超突变）以增加抗体对外源抗原的亲和力。恒定区将在对抗原的进一步反应中变化（即，同种型变换）。因此，在对抗原的反应中重排和体细胞突变的编码轻链和重链免疫球蛋白多肽的核酸序列可与原始种系序列不同，而是基本上相同或类似（即，具有至少80%同一性）。

[0070] “人”抗体(HuMAb)是指具有可变区的抗体，其中框架区和CDR区二者均源自人种系免疫球蛋白序列。此外，如果抗体包含恒定区，则恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可包括并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变）。然而，本文使用的术语“人抗体”不意欲包括其中源自另一哺乳动物物种例如小鼠的种系的CDR序列已被移植到人框架序列的抗体。术语“人”抗体和“完全人”抗体同义使用。

[0071] “人源化”抗体是指其中非人抗体，例如小鼠抗体的CDR结构域外的一些、大部分或所有的氨基酸被源自人免疫球蛋白的相应的氨基酸置换的抗体。在人源化形式的抗体的一个实施方案中，CDR结构域外的一些、大部分或所有的氨基酸被来自人免疫球蛋白的氨基酸置换，而一个或多个CDR区内的一些、大部分或所有的氨基酸未改变。氨基酸的小的添加、缺失、插入、置换或修饰是允许的，只要它们不废除抗体结合特定抗原的能力。“人源化”抗体保留类似于原始抗体的抗原特异性。

[0072] “嵌合抗体”是指其中可变区源自一个物种和恒定区源自另一个物种的抗体，例如其中可变区源自小鼠抗体和恒定区源自人抗体的抗体。“杂合”抗体是指具有不同类型的重链和轻链的抗体，例如小鼠（亲本）重链和人源化轻链，或反之亦然。

[0073] 如本文使用的，“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类型（例如，IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgM，IgA1，IgA2，IgD和IgE抗体）。

[0074] “同种异型”是指在特定的同种型组内天然存在的变体，所述变体在一个或几个氨基酸上不同。参见例如，Jefferis et al. (2009) *mAbs* 1:1。

[0075] 短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异性的抗体”在本文可与术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。

[0076] 本文使用的“分离的抗体”是指基本上不含具有不同的抗原特异性的其它抗体的

抗体(例如,特异性结合TIGIT的分离的抗体基本上不含特异性结合并非TIGIT抗原的抗体)。然而,特异性结合人TIGIT的表位的分离的抗体可具有与来自不同物种的其它TIGIT蛋白的交叉反应性。

[0077] 如本文使用的,“抑制PVR与TIGIT结合”的抗体是指在本领域公认的方法中,例如,在基于FACS的细胞-结合测定法中,以约1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、例如约0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小、约0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小或约0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或更小的EC50抑制人PVR与人TIGIT结合的抗体。

[0078] 源自抗体Fc区与某些Fc受体的相互作用的“效应子功能”,包括但不必然限于C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合、Fc γ R-介导的效应子功能例如ADCC和抗体依赖性细胞-介导的吞噬(ADCP),和细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)的减量调节。这样的效应子功能通常需要Fc区与抗原结合结构域(例如,抗体可变结构域)组合。

[0079] “Fc受体”或“FcR”是结合免疫球蛋白的Fc区的受体。结合IgG抗体的FcR包含Fc γ R家族的受体,包括这些受体的等位基因变体和可选剪接形式。Fc γ R家族由三种活化受体(在小鼠中Fc γ RI、Fc γ RIII和Fc γ RIV;在人中Fc γ RIA、Fc γ RIIA和Fc γ RIIIA)和一种抑制受体(Fc γ RIIb或等同于Fc γ RIIB)组成。人Fc γ R的各种性质概述于表1。大多数先天效应细胞类型共表达一种或多种活化Fc γ R和抑制Fc γ RIIb,而天然杀伤(NK)细胞选择性表达一种活化Fc受体(在小鼠中Fc γ RIII和在人中Fc γ RIIIA),但在小鼠和人中不表达抑制Fc γ RIIb。人IgG1结合大多数人Fc受体,在其结合的活化Fc受体的类型的方面被认为等同于鼠IgG2a。

[0080] 表1

人Fc γ R的性质

Fc γ	等位基因变体	对人 IgG 的亲和力	同种型偏好	细胞分布
Fc γ RI	未描述	高($K_D \sim 10 \text{ nM}$)	IgG1>3>2	单核细胞、巨噬细胞、活化的中性粒细胞、树突细胞?
Fc γ RIIA	H131	低至中等	IgG1>3>4	中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性细胞、树突细胞、血小板
	R131	低	IgG1>3>2	
Fc γ RIIIA	V158	中等	IgG1>3>4>2	NK 细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、嗜酸性细胞、树突细胞?
	F158	低	IgG1>3>4>2	
Fc γ RIIb	I232	低	IgG1>3>2	B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、肥大细胞
	T232	低	IgG1>3>2	

“Fc区”(片段可结晶区)或“Fc结构域”或“Fc”是指抗体的重链的C-末端区,其介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括与位于免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)上

的Fc受体结合或与经典补体系统的第一组分(C1q)结合。因此,Fc区包含抗体的恒定区,不包括第一恒定区免疫球蛋白结构域(例如,CH1或CL)。在IgG、IgA和IgD抗体同种型中,Fc区包含抗体的两条重链的每一条的CH₂和CH₃恒定结构域;IgM和IgE Fc区包含在每条多肽链中的三个重链恒定结构域(CH₁结构域2-4)。对于IgG,Fc区包含免疫球蛋白结构域C γ 2和C γ 3和在C γ 1和C γ 2之间的铰链。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能不同,但人IgG重链Fc区通常定义为从位置C226或P230的氨基酸残基(或这两个氨基酸之间的氨基酸)延伸至重链的羧基-末端,其中编号根据EU索引,如Kabat. Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, MD; 亦参见美国专利申请公开号2008/0248028的图3c-3f。人IgG Fc区的CH₂结构域从约氨基酸231延伸至约氨基酸340,而CH₃结构域位于Fc区中CH₂结构域的C-末端侧,即,其从IgG的约氨基酸341延伸至约氨基酸447(包括C-末端赖氨酸)。如本文所用的,Fc区可以是天然序列Fc,包括任何同种异型变体,或变体Fc(例如,非-天然存在的Fc)。Fc还可以指隔离的这一区域,或在包含Fc的蛋白多肽的情况下,例如“包含Fc区的结合蛋白”,还称为“Fc融合蛋白”(例如,抗体或免疫粘合素)。

[0081] 除非另外指明,或自上下文清楚的是,抗体的Fc区的氨基酸残基编号根据EU编号协定,除了当明确提及序列表中的序列的残基时,其中字母编号必然是连续的。例如,关于Fc区中氨基酸置换的影响的文献资料通常使用EU编号,其允许通过相同的数字提及抗体的Fc区中任何给定的残基,不管它所连接的可变结构域的长度如何。在少见的情况下,可能需要参考经引用以证实所提及的准确的Fc残基的文件。

[0082] “天然序列Fc区”或“天然序列Fc”包含与自然中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区;天然序列人IgG2 Fc区;天然序列人IgG3 Fc区;和天然序列人IgG4 Fc区以及其天然存在的变体。天然序列Fc包括Fc的各种同种异型。参见例如,Jefferis *et al.* (2009) *mAbs* 1:1。

[0083] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原(例如,TIGIT)上免疫球蛋白或抗体特异性结合的位点。蛋白抗原内的表位可自连续氨基酸(通常为线性表位)或通过蛋白的三级折叠而并置的非连续氨基酸(通常为构象表位)形成。自连续氨基酸形成的表位通常但不总是在暴露于变性溶剂时得到保持,而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位通常包括呈独特的空间构象的至少3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14或15个氨基酸。

[0084] 术语“表位作图”是指参与抗体-抗原识别的抗原上的分子决定簇的鉴定过程。确定给定抗体结合的表位的方法是本领域众所周知的,和包括例如,免疫印迹和免疫沉淀测定,其中测试重叠或连续的肽(例如,来自TIGIT)与给定抗体(例如,抗-TIGIT抗体)的反应性;x-射线结晶照相术;2-维核磁共振;酵母展示(参见本文的实施例4);和HDX-MS(参见例如,*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996))。

[0085] 涉及两种或更多种抗体的术语“结合相同的表位”意指抗体结合相同区段的氨基酸残基,如通过给定的方法确定的。确定抗体是否与本文所述的抗体结合“TIGIT上相同的表位”的技术包括例如,表位作图方法,例如抗原:抗体复合物的晶体的x-射线分析,其提供表位的原子解析,和氢/氘交换质谱(HDX-MS)。其它方法监测抗体与抗原片段(例如,蛋白水

解片段)或与抗原的突变变体的结合,其中由于抗原序列内氨基酸残基的修饰导致的结合丧失通常被视为表位组分的指示,例如丙氨酸扫描诱变(Cunningham & Wells (1985) *Science* 244:1081)或突变靶序列变体的酵母展示(参见本文的实施例4)。此外,用于表位作图的计算机组合方法也可使用。这些方法依赖于目的抗体从组合噬菌体展示肽文库亲和分离特定的短肽的能力。预期具有相同或密切相关的VH和VL或相同的CDR序列的抗体结合相同的表位。

[0086] “与另一种抗体竞争结合靶标”的抗体是指抑制(部分地或完全)其它抗体与靶标的结合的抗体。两种抗体是否彼此竞争结合靶标,即一种抗体是否抑制其它抗体与靶标的结合或其程度,可使用已知的竞争实验来确定。在某些实施方案中,抗体与另一抗体竞争结合靶标,和抑制这种结合达至少10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%或100%。抑制或竞争的水平可以不同,这取决于哪种抗体是“阻断抗体”(即,首次与靶标孵育的冷抗体)。竞争测定法可按所述进行,例如Ed Harlow和David Lane, Cold Spring Harb. Protoc.; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277或Ed Harlow和David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999的“Using Antibodies”的第11章。竞争抗体结合相同的表位、重叠表位或临近表位(例如,如通过空间位阻所证明的)。

[0087] 其它竞争结合测定法包括:固相直接或间接放射免疫测定法(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定法(EIA)、夹心竞争测定法(参见Stahli et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242);固相直接生物素-亲和素EIA(参见Kirkland et al. (1986) *J. Immunol.* 137:3614);固相直接标记测定法、固相直接标记夹心测定法(参见Harlow和Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel et al. (1988) *Mol. Immunol.* 25 (1):7);固相直接生物素-亲和素EIA(Cheung et al. (1990) *Virology* 176:546);和直接标记RIA(Moldenhauer et al. (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77)。

[0088] 如本文所用的,术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异地结合”是指结合预定抗原而非其它抗原上的表位的抗体。通常,抗体(i)当在BIACORE® 2000表面等离子体共振仪器上使用预定的抗原,例如重组人TIGIT作为分析物和抗体作为配体,通过例如,表面等离子体共振(SPR)技术,或通过抗体与抗原阳性细胞结合的Scatchard分析测定时,以大约小于 10^{-7} M、例如大约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或甚至更低的平衡离解常数(KD)结合;和(ii)以其对于结合并非预定抗原或密切相关的抗原的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)的亲和力至少2倍的亲和力结合预定抗原。因此,“特异性结合人TIGIT”的抗体是指以 10^{-7} M或更小、例如大约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或甚至更低的KD结合可溶性或细胞结合的人TIGIT的抗体。“与食蟹猴TIGIT交叉反应”的抗体是指以 10^{-7} M或更小、例如大约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或甚至更低的KD结合食蟹猴TIGIT的抗体。

[0089] 如本文所用的,术语“ k_{assoc} ”或“ k_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率常数,而如本文所用的,术语“ k_{dis} ”或“ k_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的离解速率常数。如本文所用的,术语“KD”是指平衡离解常数,其获自 k_d 与 k_a 的比率(即 k_d/k_a)和表示为摩尔浓度(M)。抗体的KD值可使用本领域充分确立的方法确定。确定抗体的KD的优选方法包括生物层干涉(BLI)分析,优选地使用ForteBio Octet RED装置;表面等离子体共振,优选地使用生物传

感器系统例如BIACORE[®] 表面等离子体共振系统(参见例如实施例2) ;或流式细胞术和Scatchard分析。

[0090] 如本文所用的,对于IgG抗体的术语“高亲和力”是指对靶抗原具有 10^{-8} M或更小、更优选地 10^{-9} M或更小和甚至更优选地 10^{-10} M或更小的K_D的抗体。然而,对于其它抗体同种型,“高亲和力”结合可改变。例如,对于IgM同种型,“高亲和力”结合是指具有 10^{-7} M或更小、更优选地 10^{-8} M或更小的K_D的抗体。

[0091] 在使用抗体或其抗原结合片段的体外或体内测定法的情况下,术语“EC50”是指引起反应的抗体或其抗原-结合片段的浓度,所述反应是最大反应的50%,即,最大反应和基线之间的一半。

[0092] 术语“结合固定的TIGIT”是指本文所述的抗体结合TIGIT,例如在细胞表面上表达或连接至固体支持物的TIGIT的能力。

[0093] 如本文所用的,术语“交叉反应”是指本文所述的抗体结合来自不同物种的TIGIT的能力。例如,本文所述的结合人TIGIT的抗体还可结合来自其它物种的TIGIT (例如,食蟹猴TIGIT)。如本文所用的,交叉反应性可通过检测在结合测定法(例如,SPR、ELISA)中与纯化抗原的特定反应性,或与生理表达TIGIT的细胞的结合或以其它方式与生理表达TIGIT的细胞功能相互作用来测量。测定交叉反应性的方法包括本文所述的标准结合测定法,例如通过使用BIACORE[®] 2000 SPR仪器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)的BIACORE[®] 表面等离子体共振(SPR)分析,或流式细胞术技术。

[0094] 本文使用的术语“天然存在的”,在应用于对象时,是指对象可在自然中发现的事实。例如,可自天然来源分离和未在实验室中人工有意修饰的生物体(包括病毒)中存在的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0095] “多肽”是指包含至少两个连续连接的氨基酸残基的链,链的长度没有上限。蛋白中的一个或多个氨基酸残基可包含修饰,例如但不限于,糖基化、磷酸化或二硫键。”蛋白”可包含一个或多个多肽。

[0096] 如本文所用的,术语“核酸分子”意欲包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,和可以是cDNA。

[0097] 还提供了对本文提供的抗体序列的“保守序列修饰”,即没有废除由核苷酸序列编码或包含氨基酸序列的抗体与抗原的结合的核苷酸和氨基酸序列修饰。例如,修饰可通过本领域已知的标准技术引入,例如定点诱变和PCR-介导的诱变。保守序列修饰包括保守氨基酸置换,其中氨基酸残基被替换为具有类似侧链的氨基酸残基。具有类似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、β分支的侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,抗-TIGIT抗体中的预测的非必需氨基酸残基优选地被来自相同的侧链家族的另一氨基酸残基替换。鉴定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守置换的方法是本领域众所周知的。参见例如,Brumme11 *et al.*, *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12 (10):879-884 (1999); 和Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417

(1997))。

[0098] 或者,在另一个实施方案中,突变可沿所有或部分的抗-TIGIT抗体编码序列随机引入,例如通过饱和诱变,和可筛选得到的修饰的抗-TIGIT抗体的改进结合活性。

[0099] 对于核酸,术语“基本同源性”表示两个核酸或其指定的序列,当最佳比对和比较时,至少约80%的核苷酸、通常至少约90%-95%和更优选地至少约98%-99.5%的核苷酸是相同的,具有适当核苷酸插入或缺失。或者,当区段在选择性杂交条件下杂交至互补链时存在基本同源性。

[0100] 对于多肽,术语“基本同源性”表示两个多肽或其指定的序列,当最佳比对和比较时,至少约80%的氨基酸、通常至少约90%-95%和更优选地至少约98%-99.5%的氨基酸是相同的,具有适当氨基酸插入或缺失。

[0101] 两个序列之间的百分比同一性是当序列最佳比对时,所述序列共有的相同位置的数量的函数(即,%同源性=相同位置数/位置总数×100),根据空位数和各空位的长度来确定最佳比对,它们需要引入以最佳比对两个序列。两个序列之间的序列比较和百分比同一性的确定可使用数学算法实现,如下文的非限制性实例中所述的。

[0102] 两个核苷酸序列之间的百分比同一性可使用GCG软件包中的GAP程序确定,使用NWSgapdna.CMP矩阵和40、50、60、70或80的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性还可使用并入ALIGN程序(版本2.0)的E. Meyers和W. Miller的算法确定(CABIOS, 4:11-17 (1989)),使用PAM120权重残基表,空位长度罚分12和空位罚分4。此外,两个氨基酸序列之间的百分比同一性可使用并入GCG软件包中的GAP程序的Needleman和Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970))算法确定,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,和空位权重16、14、12、10、8、6或4,和长度权重1、2、3、4、5或6。

[0103] 本文所述的核酸和蛋白序列可进一步用作“询问序列”以进行对公众数据库的检索,以例如鉴定相关的序列。这样的检索可使用Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(版本2.0)进行.BLAST核苷酸检索可用NBLAST程序进行,评分=100,字长=12,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列.BLAST蛋白检索可用XBLAST程序进行,评分=50,字长=3,以获得与本文所述的蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得有空位的比对用于比较目的,使用Gapped BLAST,如Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402中所述。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可使用各程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0104] 核酸可以完整细胞、细胞裂解物或部分纯化或基本纯化形式存在。当通过标准技术,包括碱/SDS处理、CsCl分带、柱色谱、琼脂糖凝胶电泳和本领域众所周知的其它技术,从其它细胞组分或其它杂质,例如,其它细胞核酸(例如,染色体的其它部分)或蛋白中纯化时,核酸是“分离的”或“基本上纯的”。参见F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

[0105] 如本文所用的,术语“载体”意指能够运输它所连接的另一核酸的核酸分子。一个类型的载体是“质粒”,其是指环状双链DNA环,其中可连接另外的DNA区段。另一类型的载体是病毒载体,其中另外的DNA区段可连接至病毒基因组中。某些载体能够在它们所引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体,和游离哺乳动物载体)。其它载体

(例如非游离哺乳动物载体)当引入宿主细胞时可整合至宿主细胞的基因组,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与它们可操作连接的基因的表达。这样的载体在本文称为“重组表达载体”(或简称“表达载体”)。一般而言,用于重组DNA技术的表达载体通常为质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常使用的载体形式。然而,还包括其它形式的表达载体,例如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒),它们起同等的功能。

[0106] 如本文所用的,术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)意指包含并非天然存在于细胞中的核酸的细胞,和可以是其中引入了重组表达载体的细胞。应理解,这样的术语不仅意指特定的主题细胞,而且意指所述细胞的后代。因为某些修饰可在后续传代中由于突变或环境影响而发生,这样的后代实际上可能与亲代细胞不同,但仍包括在本文使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0107] “免疫反应”是指针对外源因素在脊椎动物内的生物学反应,所述反应保护生物体对抗这些因素和由它们引起的疾病。免疫反应通过免疫系统的细胞(例如,T淋巴细胞、B淋巴细胞、天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜酸性细胞、肥大细胞、树突细胞或中性粒细胞)和由任何这些细胞或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用介导,其导致选择性靶向、结合、损坏、破坏和/或从脊椎动物体消除侵入的病原体、被病原体感染的细胞或组织、癌性或其它异常细胞,或者在自身免疫或病理性炎症的情况下,正常的人细胞或组织。免疫反应包括例如,活化或抑制T细胞,例如,效应T细胞或Th细胞,例如CD8⁺或CD4⁺T细胞,或抑制或消耗T_{reg}细胞。“T效应”(“Teff”)细胞是指具有溶胞活性的T细胞(例如,CD4⁺和CD8⁺ T细胞)以及T辅助(Th)细胞,其分泌细胞因子和活化和指导其它免疫细胞,但不包括调节T细胞(T_{reg}细胞)。

[0108] 如本文所用的,术语“T细胞-介导的反应”是指由T细胞,包括效应T细胞(例如,CD8⁺细胞)和辅助T细胞(例如,CD4⁺细胞)介导的反应。T细胞介导的反应包括例如,T细胞的细胞毒性和增殖。

[0109] 如本文所用的,术语“细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应”是指由细胞毒性T细胞引起的免疫反应。CTL反应主要通过CD8⁺ T细胞介导。

[0110] “免疫调节剂(immunomodulator)”或“免疫调节剂(immunoregulator)”是指试剂,例如,信号传导途径的组分,其可参与调节、调控或改变免疫反应。“调节”、“调控”或“改变”免疫反应是指免疫系统的细胞或这样的细胞(例如,效应T细胞)的活性的任何改变。这样的调节包括刺激或抑制免疫系统,其可表现为各种细胞类型的数量的增加或减少,这些细胞的活性的增加或减少,或可在免疫系统内发生的任何其它变化。已经鉴定了抑制性和刺激性免疫调节剂二者,其中的一些可在肿瘤微环境中具有增强的功能。在优选的实施方案中,免疫调节剂位于T细胞表面上。“免疫调节靶标”是被物质、试剂、部分、化合物或分子靶向结合,和其活性通过物质、试剂、部分、化合物或分子的结合而改变的免疫调节剂。免疫调节靶标包括例如,细胞表面上的受体(“免疫调节受体”)和受体配体(“免疫调节配体”)。

[0111] “免疫疗法”是指通过包括诱导、提高、抑制或以其它方式改变免疫反应的方法,治疗患有疾病、或有风险感染疾病或患有疾病复发的受试者。

[0112] “免疫刺激疗法”或“免疫刺激性疗法”是指导致增加(诱导或提高)受试者的免疫反应的疗法,以例如,治疗癌症。

[0113] “增强内源免疫反应”意指增加受试者的已有免疫反应的功效或效力。功效和效力的这种增加可例如通过克服抑制内源宿主免疫反应的机制或通过刺激增强内源宿主免疫反应的机制实现。

[0114] 如本文所用的，术语“连接”是指两个或更多个分子的缔合。连接可以是共价或非-共价的。连接也可以是遗传的(即，重组融合的)。这样的连接可使用各种公认的技术实现，例如化学缀合和重组蛋白产生。

[0115] 如本文所用的，“给予”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统的任何一种，将包含治疗剂的组合物物理引入受试者。对于本文所述的抗体，优选的给予途径包括静脉内、腹膜内、肌内、皮下、脊柱或其它胃肠外给予途径，例如通过注射或输注。本文使用的短语“胃肠外给予”意指并非肠内和局部给予的给予方式，通常通过注射，和包括但不限于静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眼内、心内、皮内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注，以及体内电穿孔。或者，本文所述的抗体可经过非胃肠外途径给予，例如局部、表皮或粘膜给予途径，例如鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。给予还可进行例如一次、多次和/或经一个或多个长期的时期。

[0116] 如本文所用的，术语“抑制”或“阻断”(例如，涉及抑制/阻断细胞上PVR与TIGIT的结合)可互换使用，和包括部分和完全抑制/阻断二者达例如至少约50%，60%，70%，80%，90%，95%，99%或100%。

[0117] 如本文所用的，“癌症”是指一组广义的疾病，特征为体内异常细胞的不受控制的生长。不受调节的细胞分化可导致形成恶性肿瘤或细胞，其侵袭临近组织和可通过淋巴系统或血流转移至身体的远端部分。

[0118] “血液恶性肿瘤”包括淋巴瘤、白血病、骨髓瘤或淋巴恶性肿瘤，以及脾和和淋巴结的癌症。实例性的淋巴瘤包括B细胞淋巴瘤和T细胞淋巴瘤二者。B-细胞淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤和大多数非-霍奇金淋巴瘤。B细胞淋巴瘤的非限制性实例包括弥漫性大B-细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、粘膜相关的淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴细胞淋巴瘤(与慢性淋巴细胞白血病重叠)、套细胞淋巴瘤(MCL)、Burkitt淋巴瘤、纵隔大B细胞淋巴瘤、Waldenström巨球蛋白血症、结节边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、血管内大B-细胞淋巴瘤、原发性弥漫性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病。T细胞淋巴瘤的非限制性实例包括结节外T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、恶性大细胞淋巴瘤和血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤。血液恶性肿瘤还包括白血病，例如但不限于继发性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病和急性成淋巴细胞性白血病。血液恶性肿瘤还包括骨髓瘤，例如但不限于，多发性骨髓瘤和郁积性多发性骨髓瘤。其它血液和/或B细胞-或T-细胞-相关的癌症包括在术语血液恶性肿瘤范围内。

[0119] 如本文所用的，术语“治疗”是指在受试者上或给予受试者活性剂时进行的任何类型的干预或过程，其目的是逆转、缓解、改善、抑制或减慢或阻止症状、并发症、病况或与疾病有关的生物化学指标的进展、发生、严重性或复发。预防是指给予未患有疾病的受试者以预防疾病发生或将影响最小化(如果发生的话)。

[0120] 术语“有效剂量”定义为足以实现或至少部分实现所需效果的量。药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是任何量的药物，其当单独或与另一治疗剂组合使用

时,促进疾病消退,通过以下证明:疾病症状的严重性降低,无疾病症状期的频率和持续时间增加,或阻止由于疾病痛苦导致的损害或失能。药物的“预防有效量”或“预防有效剂量”是药物的量,其当单独或与另一治疗剂组合给予有风险发生疾病或患有疾病复发的受试者时,抑制疾病的发生或复发。治疗剂或预防剂促进疾病消退或抑制疾病的发生或复发的能力可使用技术人员已知的各种方法评价,例如在临床试验期间在人受试者中,在预测在人中的功效的动物模型系统中,或通过在体外测定中测定所述试剂的活性。

[0121] 例如,抗癌剂是在受试者中减慢癌症进展或促进癌症消退的药物。在优选的实施方案中,治疗有效量的药物促进癌症消退至消除癌症的点。“促进癌症消退”意指单独或与抗-肿瘤剂组合给予有效量的药物,导致肿瘤生长或大小减少,肿瘤坏死,至少一种疾病症状的严重性降低,无疾病症状期的频率和持续时间增加,阻止由于疾病痛苦导致的损害或失能,或以其它方式改善患者的疾病症状。药理学有效性是指药物促进患者的癌症消退的能力。生理学安全性是指给予药物引起的在细胞、器官和/或生物体水平上可接受的低水平的毒性,或其它不良生理学效果(副作用)。

[0122] 例如,对于治疗肿瘤,相对于未治疗的受试者,药物的治疗有效量或剂量优选地抑制细胞生长或肿瘤生长达至少约20%,更优选地至少约40%,甚至更优选地至少约60%,和还更优选地至少约80%。在最优选地实施方案中,药物的治疗有效量或剂量完全抑制细胞生长或肿瘤生长,即,优选地抑制细胞生长或肿瘤生长达100%。化合物抑制肿瘤生长的能力可使用下文描述的测定法评价。肿瘤生长的抑制可能不紧接治疗后发生,和可能仅在一段时间后或在重复给予后发生。或者,组合物的这种性质可通过检查化合物抑制细胞生长的能力来评价,这样的抑制可通过技术人员已知的测定法体外测量。在本文所述的其它优选的实施方案中,可观察到肿瘤消退,和可持续至少约20天、更优选地至少约40天或甚至更优选地至少约60天的时间。

[0123] 除非另外指明或自上下文清楚的是,如本文所用的“组合”疗法意欲包括以配合的方式给予两种或更多种治疗剂,和包括但不限于同时给药。具体而言,组合疗法包括共给予(例如,给予共制剂或同时给予单独的治疗性组合物)和连续或序贯给予,条件是一种治疗剂的给予在一定程度上以另一治疗剂的给予为条件。例如,一种治疗剂可仅在已给予不同的治疗剂并允许作用规定的一段时间后给予。参见例如,Kohrt *et al.* (2011) *Blood* 117:2423。

[0124] 术语“患者”和“受试者”是指接受预防性或治疗性治疗的任何人或非-人动物。例如,本文所述的方法和组合物可用于治疗具有癌症的受试者。术语“非-人动物”包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,例如非-人灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0125] 本文所述的各个方面在以下子部分中更详细地描述。

[0126] I. 抗-TIGIT抗体

本申请公开了具有所需性质的全人抗-huTIGIT抗体,用作治疗疾病例如癌症的治疗剂。这些性质包括以下一项或多项:以高亲和力结合人TIGIT的能力、结合食蟹猴TIGIT的能力、阻断PVR结合(因此阻断信号传导)的能力,和可能减少抗体的化学稳定性的序列责任(sequence liabilities)的缺失。

[0127] 本文通过序列公开的抗-TIGIT抗体结合人TIGIT上的特定表位,如实施例4所述确

定的和图2A - 2C所示的。确定表位的三种特异性抗体在人TIGIT的类似区域结合,但不同之处在于接触的特定氨基酸残基。抗体共有以高亲和力结合人TIGIT的性质和具有阻断PVR结合的能力。因此,结合相同或密切相关的表位的其它抗体可能会共有这些需要的性质,和可通过竞争实验发现。

[0128] 此外,抗体22G2以与结合人TIGIT基本上相同的亲和力结合食蟹猴TIGIT,当为支持使用抗体作为人治疗剂的监管批准而需要进行毒性研究时,这是方便的。结合与15A6和22G2相同或类似的表位的其它抗-TIGIT抗体可能共有结合食蟹猴TIGIT的这一有利性质。结合类似的表位的抗体可通过进行竞争实验或通过直接确定其表位而发现。

[0129] 与本文公开的抗-huTIGIT抗体竞争的抗-TIGIT抗体

与本发明的抗体竞争结合huTIGIT的抗-huTIGIT抗体,例如15A6和22G2,可使用类似于本文描述的免疫方案(实施例1)产生。与本文描述的抗-huTIGIT抗体竞争结合的抗体也可通过用人TIGIT或包含其细胞外结构域(SEQ ID NO: 1; NP_776160.2的残基22-141)的构建体免疫小鼠,或通过用包含本文公开的抗-huTIGIT抗体所结合的表位(例如,15A6, 22G2和11G11)的人TIGIT的片段免疫产生。可通过本领域众所周知的方法,例如在ELISA中阻断与TIGIT的细胞外结构域和免疫球蛋白Fc结构域的融合蛋白的结合,或阻断结合在其表面上表达huTIGIT的细胞的能力,例如,通过FACS,筛选得到的抗体阻断15A6或22G2与人TIGIT结合的能力。在各个实施方案中,在加入15A6或22G2之前、同时或之后,将试验抗体与TIGIT-Fc融合蛋白(或与在其表面上表达huTIGIT的细胞)接触。例如,可进行“框并”实验(实施例3)以确定抗体是否落入与抗体15A6或22G2相同的“框”中,在所述实验中抗体15A6或22G2被称为“参比”抗体,和测试的抗体被称为“试验”抗体。减少15A6和/或22G2与TIGIT(作为Fc融合物或在细胞上)的结合的抗体,特别是以粗略的化学计量浓度,可能在相同、重叠或临近表位结合,和因此可共有15A6和22G2的需要的功能性质。

[0130] 竞争抗体还可使用本领域已知的其它方法鉴定。例如,可使用标准ELISA测定法或竞争ELISA测定法,其中重组人TIGIT蛋白构建体固定在板上,加入各种浓度的未标记试验抗体,将板洗涤,加入标记的参比抗体,洗涤和测量结合的标记的量。如果增加浓度的未标记试验抗体抑制标记的参比抗体的结合,则试验抗体被认为抑制参比抗体与板上的靶标的结合,或被认为与参比抗体竞争结合。另外或备选地,BIACORE® SPR分析可用于评价抗体竞争的能力。试验抗体抑制本文所述的抗-huTIGIT抗体与TIGIT的结合的能力证实了试验抗体可与参比抗体竞争结合TIGIT。

[0131] 因此,本文提供了抑制本文所述的抗-huTIGIT抗体与细胞(例如,活化的T细胞)上的TIGIT结合达至少10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的抗-TIGIT抗体,和/或其与细胞(例如,活化的T细胞)上的TIGIT的结合被抑制达至少10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%,例如,通过ELISA或FACS测定的,例如通过使用以下段落中描述的测定法。

[0132] 确定试验抗体是否阻断参比抗体的结合(即,与参比抗体“竞争”)的实例性的竞争实验可如下进行:活化的人T细胞如下制备:外周血单核细胞(PBMC)自人全血使用Ficoll梯度分离和用10μg/mL植物凝集素(PHA-L)(USBio1#P3370-30)和200IU/mL重组IL-2(Peprotech#200-02)活化3天。活化的T细胞重悬于FACS缓冲液(含5%胎牛血清的PBS)和以

10⁵个细胞/样品孔接种在96孔板。未缀合的试验抗体以范围0–50 μg/mL的浓度(自最高浓度50 μg/mL开始,三倍滴定)加入板中。不相关的IgG可用作试验抗体的同种型对照,和以相同的浓度(自最高浓度50 μg/mL开始,三倍滴定)加入。用50μg/mL未标记的参比抗体预孵育的样品可作为完全阻断的阳性对照(100%抑制)包括在内,和在初始孵育中没有抗体的样品可用作阴性对照(无竞争;0%抑制)。孵育30分钟后,无需洗涤,将标记的,例如,生物素化的参比抗体以每孔2μg/mL的浓度加入。样品孵育另外30分钟。未结合的抗体通过用FACS缓冲液洗涤细胞而除去。细胞-结合的标记参比抗体用检测标记的试剂(例如,用于检测生物素的PE缀合的链霉抗生物素(Invitrogen, catalog#S21388))检出。在FACS Calibur Flow Cytometer (BD, San Jose) 上获得样品和用Flowjo软件(Tree Star, Inc, Ashland, OR)分析。结果可表示为%抑制(即,从100%减去各浓度的标记的量除以没有阻断抗体时获得的标记的量)。

[0133] 通常,然后反向进行相同的实验,即,试验抗体是参比抗体和参比抗体是试验抗体。在某些实施方案中,抗体至少部分地(例如,至少10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%或90%)或完全(100%)阻断其它抗体与靶标,例如,人TIGIT或其片段的结合,和不管当一种或其它抗体是试验抗体时抑制是否发生。当抗体以两种方式,即,在其中试验抗体首先加入的竞争实验中和在其中参比抗体首先加入的竞争实验中彼此竞争时,试验和参比抗体彼此“交叉阻断”与靶标的结合。

[0134] 当以粗略相等的浓度存在时,例如在如实施例3中描述的竞争实验中,如果它们抑制15A6和/或22G2与人TIGIT的结合达至少10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%或100%,抗-huTIGIT抗体被认为与本文公开的抗-huTIGIT抗体竞争。除非另外指明,当以与选择的抗体粗略相等的摩尔浓度使用时,如果其减少选择的抗体与人TIGIT的结合达至少20%,抗体将被认为与选自本发明的抗-huTIGIT抗体的抗体竞争,如在竞争ELISA实验中测量的,如前述两个段落中概述的。

[0135] 结合相同的表位的抗-TIGIT抗体

结合与本文公开的抗体相同或类似的表位的抗-huTIGIT抗体可使用类似于本文描述的免疫方案(实施例1)产生。可筛选得到的抗体与人TIGIT的高亲和力结合(实施例2)。然后可在酵母展示测定法中研究选择的抗体,其中huTIGIT的序列变体呈现在酵母细胞表面上(实施例4)以测定抗体结合的准确表位。

[0136] 可通过本领域已知的任何方法进行表位确定。本文公开的表位通过酵母展示确定,如实施例4中所述和图2A–2C所示的。在各个实施方案中,抗-huTIGIT抗体被认为与本文公开的抗-huTIGIT mAb,例如,15A6和/或22G2结合相同的表位,如果它们与15A6或22G2所接触的huTIGIT的至少一个区域内的一个或多个相同的残基接触的话;如果它们与15A6或22G2所接触的huTIGIT的至少一个区域内的大部分残基接触的话;如果它们与15A6或22G2所接触的huTIGIT的每个区域内的大部分残基接触的话;如果它们与15A6或22G2所接触的huTIGIT的整个长度的大部分接触点接触的话;如果它们与15A6或22G2所接触的人TIGIT的所有不同的区域接触的话;如果它们与15A6或22G2所接触的人TIGIT的任何一个区域的所有相同的残基接触的话;或如果它们与15A6或22G2所接触的所有区域的所有残基接触的话。表位“区”是沿抗体15A6或22G2所接触的一级序列的残基簇,例如,以SEQ ID NO: 38 – 44提供。

[0137] 确定与本文所述的抗体结合“TIGIT上相同的表位”的抗体的技术包括抗原:抗体复合物的晶体的x-射线分析,其提供表位的原子解析。其它方法监测抗体与抗原片段或抗原的突变变体的结合,其中由于抗原序列内氨基酸残基的修饰导致的结合丧失被认为是表位组分的指示。方法还可依赖于目的抗体自组合噬菌体展示肽文库或自蛋白酶消化的靶蛋白亲和分离特定短肽(天然三维形式或变性形式)的能力。然后所述肽被视为定义对应于用于筛选肽文库的抗体的表位的引导。对于表位作图,还已开发计算算法,其已显示对构象不连续表位作图。

[0138] 表位或包含表位的区域还可通过筛选与跨越TIGIT的一系列重叠肽的结合来鉴定。或者,Jespers *et al.* (1994) *Biotechnology* 12:899的方法可用于指导具有与本文所述的抗-TIGIT抗体相同的表位和因此具有类似性质的抗体的选择。使用噬菌体展示,首先抗-TIGIT抗体的重链与(优选地,人)轻链库配对以选择TIGIT-结合抗体,然后新的轻链与(优选地,人)重链库配对以选择具有与本文所述的抗-huTIGIT抗体相同的表位或表位区的(优选地,人) TIGIT-结合抗体。或者,本文所述的抗体的变体可通过编码抗体的重链和轻链的cDNA的诱变来获得。

[0139] 丙氨酸扫描诱变,如Cunningham & Wells (1989) *Science* 244: 1081所述,或TIGIT的氨基酸残基的点诱变的一些其它形式(例如实施例4提供的酵母展示方法),也可用于确定抗-TIGIT抗体的功能表位。

[0140] 特异性抗体所结合的表位或表位区(“表位区”是一个包含表位或与表位重叠的区域)也可通过评价抗体与包含TIGIT片段的肽的结合来确定。一系列包含序列TIGIT(例如,人TIGIT)的重叠肽可被合成和例如,在直接ELISA、竞争ELISA(其中评价肽阻止抗体与结合至微量滴定板的孔的TIGIT结合的能力)中或在芯片上筛选结合。这样的肽筛选方法可能不能检测一些不连续的功能表位,即包括沿TIGIT多肽链的一级序列不是连续的氨基酸残基的功能表位。

[0141] 表位也可通过基于MS的蛋白指纹,例如氢/氘交换质谱(HDX-MS)和蛋白的快速光化学氧化(FPOP)来鉴定。HDX-MS可进行,例如,进一步描述于Wei *et al.* (2014) *Drug Discovery Today* 19:95,该方法通过引用明确地结合到本文中。FPOP可按所述进行,例如,Hambley & Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2057,该方法通过引用明确地结合到本文中。

[0142] 抗-TIGIT抗体结合的表位还可通过结构方法确定,例如X-射线晶体结构测定(例如,WO2005/044853)、分子建模和核磁共振(NMR)光谱,包括当游离时和当以复合物与目的抗体结合时TIGIT的不稳定酰胺氢的H-D交换速率的NMR测定(Zinn-Justin *et al.* (1992) *Biochemistry* 31:11335; Zinn-Justin *et al.* (1993) *Biochemistry* 32:6884)。

[0143] 关于X-射线结晶照相术,结晶可使用本领域任何已知的方法进行(例如,Giege *et al.* (1994) *Acta Crystallogr. D50:339*; McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189: 1),包括微批量(例如,Chayen (1997) *Structure* 5:1269)、悬滴蒸汽扩散(例如,McPherson (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300)、接晶种和透析。合乎需要的是,使用具有至少约1 mg/mL和优选地约10 mg/mL-约20 mg/mL的浓度的蛋白制备物。结晶可在包含聚乙二醇1000-20,000 (PEG; 平均分子量范围约1000-约20,000 Da)、优选地约5000-约7000 Da、更优选地约6000 Da,范围约10%-约30% (w/v) 的浓度的沉淀剂溶液中最佳进行。还合乎

需要的是,包括蛋白稳定剂,例如,范围约0.5%–约20%的浓度的甘油。合适的盐,例如氯化钠、氯化锂或柠檬酸钠,也可能在沉淀剂溶液中是合乎需要的,优选地浓度范围为约1 mM–约1000 mM。沉淀剂优选地被缓冲至pH约3.0–约5.0,优选地约4.0。可用于沉淀剂溶液的具体的缓冲液可改变,并且是本领域众所周知的(Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York)。可用的缓冲液的实例包括但不限于,HEPES、Tris、MES和乙酸盐。晶体可在宽范围的温度下生长,包括2°C, 4°C, 8°C和26°C。

[0144] 抗体:抗原晶体可使用众所周知的X-射线衍射技术进行研究,和可使用计算机软件例如X-PLOR (Yale University, 1992, 由Molecular Simulations, Inc.发布;参见例如Blundell & Johnson (1985) *Meth. Enzymol.* 114 & 115, H. W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; U.S. Patent Application Publication No. 2004/0014194) 和BUSTER (Bricogne (1993) *Acta Cryst.* D49:37–60; Bricogne (1997) *Meth. Enzymol.* 276A:361–423, Carter & Sweet, eds.; Roversi et al. (2000) *Acta Cryst.* D56: 1313–1323) 精修,其公开内容通过引用以其整体结合到本文中。

[0145] 以高亲和力结合的抗-TIGIT抗体

在一些实施方案中,本发明的抗-huTIGIT抗体以高亲和力结合huTIGIT,如同本文公开的抗-huTIGIT抗体,增加其作为有效的治疗剂的可能性。在各种实施方案中本发明的抗-huTIGIT抗体以小于10nM, 5nM, 2nM, 1nM, 300pM, 100pM或60 pM的K_D结合huTIGIT。在其它实施方案中,本发明的抗-huTIGIT抗体以2nM–60pM的K_D结合huTIGIT。评价抗体与huTIGIT的结合能力的标准测定法包括ELISA、RIA、蛋白质印迹、生物层干涉测量(BLI)和BIACORE® SPR分析(参见实施例2)。

[0146] 抗-TIGIT抗体序列变体

本文公开的抗体序列的一些可变性可耐受和仍保持需要的抗体性质。CDR区使用Kabat系统描述(Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。因此,本发明进一步提供包含CDR序列的抗-huTIGIT抗体,所述CDR序列与本文公开的抗体(例如,15A6, 22G2和11G11)的CDR序列具有至少70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%同一性。本发明还提供包含重链和/或轻链可变结构域序列的抗-huTIGIT抗体,所述可变结构域序列与本文公开的抗体(例如,15A6, 22G2和11G11)的重链和/或轻链可变结构域序列具有至少70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%或99%同一性。

[0147] 源自相同的种系的抗-TIGIT抗体

鉴于抗原-结合特异性主要由CDR决定,与本文公开的抗体(例如,15A6, 22G2和11G11)共有CDR序列的抗体可能共有其需要的性质。此外,本文公开的选择的抗体(15A6, 22G2和11G11)结合沿huTIGIT的一级序列的类似区域,和一些重链和轻链源自相同的种系序列。因此,组合(“混合和匹配”)来自抗体15A6, 22G2和11G11的CDR区的抗体也可预期结合huTIGIT和保留其需要的性质。具有等同于或优于本文公开的特异性抗体的结合亲和力、生物学活性和/或其它性质的“混合和匹配”的抗体可选择用于本发明的方法。

[0148] 在某些实施方案中,本发明的抗-huTIGIT抗体包含源自特定的人种系重链免疫球

蛋白基因的重链可变区和/或来自特定的人种系轻链免疫球蛋白基因的轻链可变区。抗体15A6具有源自人种系V4-39, D6-19和JH4b的重链, 和源自种系VA27和JK2的轻链。抗体22G2具有源自人种系V4-61, D3-10和JH6b的重链, 和源自种系VL6和JK3的轻链。抗体11G11具有源自人种系V4-39, D3-10和JH4b的重链, 和源自种系VL6和JK2的轻链。抗体10D7具有源自人种系V1-69, D6-13和JH6b的重链, 和源自种系VL15和JK5的轻链。结合人TIGIT和源自一些或全部这些种系序列的其它抗体可能在序列上密切相关, 特别是源自相同的V-区基因的那些, 和因此预期共有相同的所需性质。

[0149] 如本文所用的, 如果抗体的可变区获自使用人种系免疫球蛋白基因的系统, 人抗体包含“源自”特定的种系序列的重链或轻链可变区, 和抗体序列与该种系足够相关, 因为它比任何其它种系更可能源自该给定的种系。这样的系统包括用目的抗原免疫带有人免疫球蛋白基因的转基因小鼠, 或用目的抗原筛选在噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库。抗体序列从中“来源”的人种系免疫球蛋白序列可通过比较人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列和选择与人抗体的序列在序列上最接近的(即, 最大的%同一性)人种系免疫球蛋白序列来鉴定。由于例如, 天然存在的体细胞突变或有意引入定点突变, “源自”特定的人种系免疫球蛋白序列的人抗体可包含与该种系序列相比的氨基酸差异。然而, 选择的人抗体通常在氨基酸序列上与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列(例如, V区)具有至少90%同一性, 和当与其它物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如, 鼠种系序列)相比, 包含鉴定人抗体为人的氨基酸残基。在某些情况下, 与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列(例如, V区)相比, 人抗体可具有至少95%或甚至至少96%, 97%, 98%或99%氨基酸序列同一性。通常, 源自特定人种系序列的人抗体将显示与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列(例如, V区)不超过10个氨基酸差异。在某些情况下, 人抗体可显示与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列(例如, V区)不超过5个, 或甚至不超过4、3、2或1个氨基酸差异。

[0150] II. 工程改造和修饰的抗体

VH和VL区

还提供了工程改造和修饰的抗体, 其可使用具有一个或多个本文公开的V_H和/或V_L序列的抗体作为起始材料制备, 以工程改造修饰的抗体, 所述修饰的抗体可具有与起始抗体不同的性质。抗体可通过修饰一个或两个可变区(即, V_H和/或V_L)内, 例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个框架区内的一个或多个残基进行工程改造。另外或备选地, 抗体可通过修饰恒定区内的残基进行工程改造, 例如以改变抗体的效应子功能。

[0151] 可进行的一个类型的可变区工程改造是CDR移植。这样的移植特别用于人源化非人抗-TIGIT抗体, 其与本文公开的抗-huTIGIT抗体竞争结合, 和/或结合与本文公开的抗-huTIGIT抗体相同的表位。抗体主要通过位于6个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。为此原因, 在单个抗体之间CDR内的氨基酸序列比CDR外的序列更具有变化。因为CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用, 可通过构建包括移植到来自具有不同性质的不同抗体的框架序列上的来自特定参比抗体的CDR序列的表达载体, 表达模拟特定参比抗体的性质的重组抗体(参见例如, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; Winter的美国专利号5,225,539和

Queen *et al.* 的美国专利号5,530,101; 5,585,089; 5,693,762和6,180,370)。

[0152] 这样的框架序列可获自包括种系抗体基因序列的公开的DNA数据库或出版的参考文献。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可见于“VBase”人种系序列数据库,以及Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; 和Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836;其各自的内容通过引用明确结合到本文中。

[0153] 用于本文描述的抗体的优选框架序列是结构上类似于本文描述的抗体使用的框架序列的那些序列。V_H CDR1, 2和3序列和V_L CDR1, 2和3序列,可移植到框架区上,所述框架区具有与框架序列所来源的种系免疫球蛋白基因中存在的序列相同的序列,或CDR序列可移植到框架区上,所述框架区包含与种系序列相比至多20个,优选地保守的氨基酸置换。例如,已发现在某些情况下,使框架区内的残基突变以保持或增强抗体的抗原结合能力是有利的(参见例如,Queen *et al.* 的美国专利号5,530,101; 5,585,089; 5,693,762和6,180,370)。

[0154] 本文所述的工程改造的抗体包括其中已对V_H和/或V_L内的框架残基进行修饰,例如,以改进抗体的性质的那些。通常,进行这样的框架修饰以减少抗体的免疫原性。例如,一种方法是“回突变”一个或多个框架残基至相应的种系序列。更特别地,经历体细胞突变的抗体可包含不同于抗体所来源的种系序列的框架残基。这样的残基可通过比较抗体框架序列与抗体所来源的种系序列进行鉴定。为了使框架区序列回到它们的种系结构,体细胞突变可通过例如定点诱变或PCR-介导的诱变,“回突变”至种系序列。这样的“回突变的”抗体也意欲包括在内。

[0155] 另一类型的框架修饰包括突变框架区内,或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基,以除去T细胞表位,从而减少抗体可能的免疫原性。这种方法也被称为“去免疫”和更详细地描述于Carr *et al.* 的美国专利申请号20030153043。

[0156] 另一类型的可变区修饰是突变CDR区内的氨基酸残基,以改进目的抗体的一种或多种结合性质(例如,亲和力)。可进行定点诱变或PCR-介导的诱变以引入突变和对抗体结合的作用,或其它目的功能性质。优选地,引入保守修饰。突变可以是氨基酸添加、缺失,或优选地置换。此外,通常CDR区内不超过1个、2个、3个、4个或5个残基被改变。

[0157] 抗体的CDR的甲硫氨酸残基可被氧化,导致可能的化学降解,因此降低抗体的效力。因此,还提供了重链和/或轻链CDR中的一个或多个甲硫氨酸残基被不经历氧化降解的氨基酸残基置换的抗-TIGIT抗体。

[0158] 类似地,脱酰胺化位点可自抗-TIGIT抗体除去,特别是在CDR中。

[0159] 抗原结合结构域内的可能的糖基化位点优选地被消除,以防止糖基化,其可干扰抗原结合。参见例如,美国专利号5,714,350。

[0160] 靶向抗原结合

在各个实施方案中，本发明的抗体经修饰以在其中抗原结合是有害的组织和环境中选择性阻断抗原结合，但在其是有益的情况下允许抗原结合。在一个实施方案中，产生阻断肽“掩蔽”，其特异性结合抗体的抗原结合表面和干扰抗原结合，所述掩蔽通过肽酶可裂解接头连接至抗体的每个结合臂。参见例如，CytomX的美国专利号8,518,404。这样的构建体可用于治疗癌症，其中与非肿瘤组织相比在肿瘤微环境中蛋白酶水平极大增加。在肿瘤微环境中选择性裂解可裂解接头允许离解掩蔽/阻断肽，使得能够在肿瘤中选择性抗原结合，而非在其中抗原结合可能导致不需要的副作用的外周组织中。

[0161] 或者，在相关的实施方案中，开发了包含两个抗原结合结构域的二价结合化合物（“掩蔽配体”），其结合（二价）抗体的两个抗原结合表面和干扰抗原结合，其中两个结合结构域掩蔽通过可裂解接头彼此连接（而非抗体），例如通过肽酶可裂解。参见例如，Tegopharm Corp的国际专利申请公开号WO 2010/077643。掩蔽配体可包含或源自抗体意欲结合的抗原，或可独立地产生。这样的掩蔽配体可用于治疗癌症，其中与非肿瘤组织相比在肿瘤微环境中蛋白酶水平极大增加。在肿瘤微环境中选择性裂解可裂解接头允许彼此离解两个结合结构域，减少对抗体的抗原-结合表面的亲合力。产生的掩蔽配体与抗体的离解使得能够在肿瘤中选择性地抗原结合，而非在其中抗原结合可能导致不需要的副作用的外周组织中。

[0162] Fcs和修饰的Fcs

除了自抗原结合结构域与抗原的结合产生的治疗性抗体的活性之外（例如，在拮抗剂抗体的情况下相关配体或受体蛋白的阻断，或在激动剂抗体的情况下引起的信号传导），抗体的Fc部分还通常以复合物方式与免疫系统相互作用以引发任何量的生物效应。效应子功能，例如免疫球蛋白的Fc区负责需要重要的抗体功能，例如抗原-依赖性细胞的细胞毒性（ADCC）、补体依赖性细胞毒性（CDC）和抗体-依赖性细胞-介导的吞噬（ADCP），导致杀伤靶细胞，虽然通过不同的机制。重链恒定区存在5个主要类型或同种型（IgA，IgG，IgD，IgE，IgM），各自具有特征性的效应子功能。这些同种型可进一步细分为亚型，例如IgG分为4个亚型，称为IgG1，IgG2，IgG3和IgG4。IgG分子与对IgG类型的抗体特异性的三类Fc γ 受体（Fc γ R）相互作用，即Fc γ RI，Fc γ RII和Fc γ RIII。IgG与Fc γ R受体的结合的重要序列已报道位于CH2和CH3结构域中。抗体的血清半寿期受抗体结合新生Fc受体（FcRn）的能力影响。

[0163] 本发明的抗体可包含本发明的可变结构域与包含不同的Fc区的恒定结构域的组合，所述Fc区基于对于预期用途的抗体的生物学活性（如果有的话）进行选择。Salfeld (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:1369。人IgG，例如，可分类为4个亚类，IgG1，IgG2，IgG3和IgG4，和其各自包含具有结合一种或多种Fc γ 受体（活化受体Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA、Fc γ RIIC (CD32)；Fc γ RIIA和Fc γ RIIB (CD16) 和抑制受体Fc γ RIIB）和补体的第一组分（C1q）的独特特征的Fc区。人IgG1和IgG3结合所有Fc γ 受体；IgG2结合Fc γ RIIA_{H131}，和具有对Fc γ RIIA_{R131} Fc γ RIIA_{V158}较低的亲和力；IgG4结合Fc γ RI，Fc γ RIIA，Fc γ RIIB，Fc γ RIIC和Fc γ RIIA_{V158}；和抑制性受体Fc γ RIIB具有与所有其它Fc γ 受体相比，对IgG1，IgG2和IgG3更低的亲和力。Bruhns *et al.* (2009) *Blood* 113:3716。研究表明Fc γ RI不结合IgG2，和Fc γ RIIB不结合IgG2或IgG4。同上。一般而言，关于ADCC活性，人IgG1 \geq IgG3 \gg IgG4 \geq IgG2。因此，可选择例如IgG1恒定结构域，而非IgG2或IgG4，用于药物，其中ADCC是需要的；如果活化表达Fc γ RIIA的NK细胞、单核细胞或巨噬细胞，可选择IgG3；和如

果抗体用于使过敏患者脱敏,可选择IgG4。如果所需抗体缺少所有的效应子功能,也可选择IgG4。

[0164] 本文所述的抗-TIGIT可变区可连接(例如,共价连接或融合)至Fc,例如,IgG1, IgG2, IgG3或IgG4 Fc,其可具有任何同种异型或异同种异型,例如,对于IgG1: G1m, G1m1 (a), G1m2 (x), G1m3 (f), G1m17 (z); 对于IgG2: G2m, G2m23 (n); 对于IgG3: G3m, G3m21 (g1), G3m28 (g5), G3m11 (b0), G3m5 (b1), G3m13 (b3), G3m14 (b4), G3m10 (b5), G3m15 (s), G3m16 (t), G3m6 (c3), G3m24 (c5), G3m26 (u), G3m27 (v)。参见例如,Jeffery et al. (2009) *mAbs* 1:1)。同种异型的选择可受潜在的免疫原性顾虑的影响,例如,以使抗-药物抗体的形成最小化。

[0165] 在某些实施方案中,本文所述的抗-TIGIT可变区连接至结合一个或多个活化Fc受体(Fc γ RI/CD64, Fc γ RIIa/CD32或Fc γ RIIIa/CD16)的Fc,和从而刺激ADCC和可导致T细胞耗尽。在某些实施方案中,本文所述的抗-TIGIT可变区连接至人IgG1或IgG3 Fc,即,抗体具有IgG1或IgG3同种型。在某些实施方案中,抗-TIGIT抗体是耗尽抗体,特别是,它们在肿瘤微环境中耗尽T_{reg}细胞,而非T_{eff}细胞(从而增强抗-肿瘤活性),但不显著耗尽肿瘤微环境外,例如,在外周中的T_{reg}和T_{eff}细胞。在某些实施方案中,抗-TIGIT抗体具有天然存在的或非-天然存在的同种型(例如,包括突变),其刺激肿瘤位点的T_{reg}细胞耗尽或消除和同时活化T_{eff}细胞。在某些实施方案中,抗-TIGIT抗体导致肿瘤位点的T_{eff}与T_{reg}比率升高,这表明有效的抗-肿瘤活性,优选地没有显著耗尽肿瘤微环境外,例如,在外周中的T_{reg}和T_{eff}细胞。

[0166] 在其它实施方案中,抗-TIGIT抗体阻断T_{regs}的免疫抑制性活性。在某些实施方案中,抗-TIGIT抗体具有Fc,且FcR结合减少或消除,例如对活化FcR的结合减少。

[0167] 本文描述的抗-TIGIT可变区可连接至非-天然存在的Fc区,例如,无效应或大部分无效应Fc(例如,人IgG2或IgG4),或者,具有与一种或多种活化Fc受体(Fc γ RI, Fc γ RIIa或Fc γ RIIIa)的结合增强的Fc,例如以增强肿瘤环境中的T_{reg}耗尽。

[0168] 本文所述的可变区可连接至包含一种或多种修饰的Fc,通常以改变抗体的一种或多种功能性质,例如血清半寿期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原-依赖性细胞的细胞毒性。此外,本文所述的抗体可经化学修饰(例如,一个或多个化学部分可连接至抗体)或其可经修饰以改变其糖基化,以改变抗体的一种或多种功能性质。每个这些实施方案在下文更详细地描述。Fc区的残基编号根据Kabat的EU索引。本文公开的序列变体参照残基号提供,后面是代替天然存在的氨基酸而置换的氨基酸,任选地前面是该位置处天然存在的残基。在给定的位置可能存在多个氨基酸的情况下,例如,如果在天然存在的同种型之间序列不同,或如果在该位置多个突变可被置换,它们通过斜线分开(例如,“X/Y/Z”)。

[0169] 例如,可在Fc区进行修饰以产生Fc变体,相对于亲本Fc,其具有(a) 增加或降低的抗体-依赖性细胞-介导的细胞毒性(ADCC), (b) 增加或降低的补体介导的细胞毒性(CDC), (c) 增加或降低的对C1q的亲和力和/或(d) 增加或降低的对Fc受体的亲和力。这样的Fc区变体通常包含在Fc区的至少一个氨基酸修饰。认为组合氨基酸修饰是特别需要的。例如,变体Fc区可在其中,例如,在其中鉴定的特定Fc区位置包括2、3、4、5个等的置换。本文公开了实例性的Fc序列变体,和还提供在美国专利号5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; 6,194,551; 7,317,091; 8,101,720; PCT专利公开W0 00/42072; WO 01/58957; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/

063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925和WO 06/020114。

[0170] 减少效应子功能

ADCC活性可通过修饰Fc区而减少。在某些实施方案中,影响与Fc受体结合的位点可被除去,优选地并非补救受体结合位点的位点。在其它实施方案中,Fc区可经修饰以除去ADCC位点。ADCC位点是本领域已知的,关于IgG1的ADCC位点,参见例如, Sarmay *et al.* (1992) *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9。在一个实施方案中,人IgG1的G236R和L328R变体有效地消除Fc γ R结合。Horton *et al.* (2011) *J. Immunol.* 186:4223和Chu *et al.* (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926。在其它实施方案中,与Fc γ Rs结合降低的Fc包含氨基酸置换L234A, L235E和G237A。Gross *et al.* (2001) *Immunity* 15:289。

[0171] CDC活性也可通过修饰Fc区而减少。IgG1位置D270, K322, P329和P331的突变,特别是丙氨酸突变D270A, K322A, P329A和P331A,显著减少相应的抗体结合C1q和激活补体的能力。Idusogie *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:4178; WO 99/51642。IgG1的位置331的修饰(例如,P331S)已表明减少补体结合。Tao *et al.* (1993) *J. Exp. Med.* 178:661和Canfield & Morrison (1991) *J. Exp. Med.* 173:1483。在另一个实例中,氨基酸位置231-239内的一个或多个氨基酸残基被改变从而减少抗体固定补体的能力。WO 94/29351。

[0172] 在一些实施方案中,补体固定减少的Fc具有氨基酸置换A330S和P331S。Gross *et al.* (2001) *Immunity* 15:289。

[0173] 对于其中效应子功能被完全避免的应用,例如,当抗原结合单独足以产生需要的治疗益处,和效应子功能仅导致(或增加风险)不需要的副作用时,可使用IgG4抗体,或可设计缺少Fc区或其大部分的抗体或片段,或Fc可经突变以完全消除糖基化(例如,N297A)。或者,已经产生人IgG2(C_H1结构域和铰链区)和人IgG4(C_H2和C_H3结构域)的杂合构建体,其避免效应子功能,缺少结合Fc γ Rs(如同IgG2)的能力和不能活化补体(如同IgG4)。Rother *et al.* (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:1256。亦参见Mueller *et al.* (1997) *Mol. Immunol.* 34:441; Labrijn *et al.* (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:479(总体上论述了Fc修饰以减少效应子功能)。

[0174] 在其它实施方案中,Fc区通过替换至少一个氨基酸残基为不同的氨基酸残基来改变,以减少抗体的整体效应子功能。例如,选自氨基酸残基234, 235, 236, 237, 297, 318, 320和322的一个或多个氨基酸可替换为不同的氨基酸残基,使得抗体对效应配体亲和力降低,但保留亲本抗体的抗原-结合能力。亲和力改变的效应配体可以是例如,Fc受体(残基234, 235, 236, 237, 297)或补体的C1组分(残基297, 318, 320, 322)。Winter *et al.*的美国专利号5,624,821和5,648,260。

[0175] 一个早期的专利申请提议在IgG Fc区的修饰以降低对Fc γ RI的结合,来减少ADCC(234A; 235E; 236A; G237A)或阻断对补体组分C1q的结合以消除CDC(E318A或V/K320A和K322A/Q)。WO 88/007089。亦参见Duncan & Winter (1988) *Nature* 332:563; Chappel *et al.* (1991) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 88:9036; 和Sondermann *et al.* (2000) *Nature* 406:267(论述了这些突变对Fc γ RIII结合的影响)。

[0176] 减少效应子功能的Fc修饰还包括位置234, 235, 236, 237, 267, 269, 325和328的置换、插入和缺失,例如234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L和328R。Fc变体可包含236R/328R。减少FcyR和补体相互作用的其它修饰包括置换297A, 234A, 235A,

237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331 S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P 和 234V。这些和其它修饰论述于 Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20: 685–691。通过突变在位置 233 – 236 和 327 – 331 的一个或多个的 IgG 残基, 例如 IgG1 中的 E233P, L234V, L235A, 任选地 G236 Δ, A327G, A330S 和 P331S; IgG4 中的 E233P, F234V, L235A, 任选地 G236 Δ; 和 IgG2 中的 A330S 和 P331S, 可减少效应子功能 (ADCC 和 补体活化二者), 同时保持新生 FcR 结合 (保持半寿期)。参见 Armour *et al.* (1999) *Eur. J. Immunol.* 29: 2613; WO 99/58572。减少效应子功能的其它突变包括 IgG1 的 L234A 和 L235A (Alegre *et al.* (1994) *Transplantation* 57:1537); IgG2 的 V234A 和 G237A (Cole *et al.* (1997) *J. Immunol.* 159:3613; 亦参见美国专利号 5,834,597); 和 IgG4 的 S228P 和 L235E (Reddy *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:1925)。人 IgG1 中减少效应子功能的另一突变组合包括 L234F, L235E 和 P331S。Oganesyan *et al.* (2008) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 64:700。总体上参见 Labrijn *et al.* (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20: 479。发现在 Fc (IgG1) 融合蛋白 (abatacept) 的情况下降低效应子功能的另外的突变是 C226S, C229S 和 P238S (EU 残基编号)。Davis *et al.* (2007) *J. Immunol.* 34:2204。

[0177] 具有减少的 ADCC 和/或 CDC 的其它 Fc 变体公开于 Glaesner *et al.* (2010) *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26:287 (IgG4 中的 F234A 和 L235A 以减少 ADCC 和 ADCP); Hutchins *et al.* (1995) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 92:11980 (IgG4 中的 F234A, G237A 和 E318A); An *et al.* (2009) *MAbs* 1:572 和美国专利申请公开号 2007/0148167 (IgG2 中的 H268Q, V309L, A330S 和 P331S); McEarchern *et al.* (2007) *Blood* 109:1185 (IgG1 中的 C226S, C229S, E233P, L234V, L235A); Vafa *et al.* (2014) *Methods* 65: 114 (IgG2 中的 V234V, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S)。

[0178] 在某些实施方案中, 选择基本上没有效应子功能的 Fc, 即, 对 Fc γ R 的结合减少和 补体固定减少。实例性的无效应的 Fc, 例如, IgG1 Fc, 包含以下 5 个突变: L234A, L235E, G237A, A330S 和 P331S。Gross *et al.* (2001) *Immunity* 15:289。这 5 个置换可与 N297A 组合以同样消除糖基化。

[0179] 提高效应子功能

或者, ADCC 活性可通过修饰 Fc 区而增加。关于 ADCC 活性, 人 IgG1 \geq IgG3 \gg IgG4 \geq IgG2, 因此可选择 IgG1 恒定结构域, 而非 IgG2 或 IgG4, 用于药物, 其中 ADCC 是需要的。或者, 通过修饰以下位置的一个或多个氨基酸, Fc 区可经修饰以增加抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 和/或增加对 Fc γ 受体的亲和力: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 或 439。See WO 2012/142515; 亦参见 WO 00/42072。实例性的置换包括 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D 和 332E。实例性的变体包括 239D-332E, 236A-332E, 236A-239D-332E, 268F-324T, 267E-268F, 267E-324T 和 267E-268F-324T。例如, 包含 G236A 变体的人 IgG1 Fcs, 其可任选地与 I332E 组合, 已表明增加 Fc γ RIIIA / Fc γ

RIIB结合亲和力比率大约15倍。Richards *et al.* (2008) *Mol. Cancer Therap.* 7:2517; Moore *et al.* (2010) *mAbs* 2:181。提高FcγR和补体相互作用的其它修饰包括但不限于置換298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I和396L。这些和其它修饰论述于Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685–691。特别是,通过IgG1的位置E333的变化,例如, E333A,ADCC和CDC二者可增强。Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591。在IgG1中使用P247I和A339D/Q突变以增强效应子功能公开于WO 2006/020114, 和D280H, K290S ± S298D/V公开于WO 2004/074455。已经表明人IgG1中K326A/W和E333A/S变体,和IgG2中的E333S,增加效应子功能。Idusogie *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:2571。

[0180] 特别是,人IgG1上对Fc γ R1, Fc γ RII, Fc γ RIII和FcRn的结合位点已经作图,和已经描述了具有改进的结合的变体。Shields *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591–6604。位置256, 290, 298, 333, 334和339的特定突变表明改进对Fc γ RIII的结合,包括组合突变体T256A-S298A, S298A-E333A, S298A-K224A和S298A-E333A-K334A (具有增强的Fc γ RIIIa结合和ADCC活性)。已经鉴定对Fc γ RIIIa结合强力增强的其它IgG1变体,包括具有S239D-I332E和S239D-I332E-A330L突变的变体,其显示对Fc γ RIIIa的亲和力最大增加,Fc γ RIIb结合降低,和在食蟹猴中强的细胞毒性活性。Lazar *et al.* (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 103:4005; Awan *et al.* (2010) *Blood* 115:1204; Desjarlais & Lazar (2011) *Exp. Cell Res.* 317:1278。引入三重突变至抗体例如阿仑单抗(CD52-特异性的)、曲妥单抗(HER2/neu-特异性的)、利妥昔单抗(CD20-特异性的)和西妥昔单抗(EGFR-特异性的)转化为体外极大增强的ADCC活性,和S239D-I332E变体显示在猴中增强的耗尽B细胞的能力。Lazar *et al.* (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 103:4005。此外,已经鉴定了包含L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I和P396L突变的IgG1突变体,其在表达人Fc γ RIIIa的转基因小鼠中在B细胞恶性肿瘤和乳腺癌模型中显示增强的对Fc γ RIIIa的结合和同时增强的ADCC活性。Stavenhagen *et al.* (2007) *Cancer Res.* 67:8882; 美国专利号8,652,466; Nordstrom *et al.* (2011) *Breast Cancer Res.* 13:R123。

[0181] 不同的IgG同种型还显示不同的CDC活性(IgG3>IgG1>>IgG2≈IgG4)。Dangl *et al.* (1988) *EMBO J.* 7:1989。对于其中需要增强的CDC的应用,引入增加对C1q结合的突变也是可能的。募集补体(CDC)的能力可通过IgG2中K326和/或E333的突变,例如K326W(其减少ADCC活性)和E333S增强,以增加对C1q,补体级联中的第一组分的结合。Idusogie *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:2571。引入S267E / H268F / S324T (单独或以任何组合)至人IgG1增强C1q结合。Moore *et al.* (2010) *mAbs* 2:181。Natsume *et al.* (2008) *Cancer Res.* 68:3863 (其中的图1)的IgG1/IgG3杂合同种型抗体“113F”的Fc区也提供增强的CDC。亦参见Michaelsen *et al.* (2009) *Scand. J. Immunol.* 70:553和Redpath *et al.* (1998) *Immunology* 93:595。

[0182] 可增加或降低效应子功能的另外的突变公开于Dall'Acqua *et al.* (2006) *J. Immunol.* 177:1129。亦参见Carter (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6:343; Presta (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:460。

[0183] 尽管与本发明的拮抗剂抗-TIGIT mAb没有必然关联,但增强对抑制性受体

FcyRIIb的亲和力的Fc变体可增强凋亡诱导或辅助活性。Li & Ravetch (2011) *Science* 333:1030; Li & Ravetch (2012) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 109:10966; 美国专利申请公开号2014/0010812。这样的变体可提供具有与FcyRIIb⁺细胞,包括例如B细胞和单核细胞有关的免疫调节活性的抗体。在一个实施方案中,相对于一种或多种活化受体,Fc变体提供选择性增强的对FcyRIIb的亲和力。改变对FcyRIIb结合的修饰包括选自234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328和332的位置(根据EU索引)的一种或多种修饰。提高FcyRIIb亲和力的实例性的置换包括但不限于234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y和332E。实例性的置换包括 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W和328Y。提高对FcyRIIb结合的其它Fc变体包括235Y-267E, 236D-267E, 239D-268D, 239D-267E, 267E-268D, 267E-268E和267E-328F。特别是,人IgG1的S267E, G236D, S239D, L328F和I332E变体,包括S267E-L328F双重变体在特异性提高对抑制性FcyRIIb受体的亲和力中具有特别的价值。Chu *et al.* (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926; 美国专利申请公开号2006/024298; WO 2012/087928。对Fc γ RIIb增强的特异性(与Fc γ RIIa^{R131}不同)可通过加入P238D置换和其它突变(Mimoto *et al.* (2013) *Protein. Eng. Des. & Selection* 26:589; WO 2012/115241),以及V262E和V264E (Yu *et al.* (2013) *J. Am. Chem. Soc.* 135:9723和WO 2014/184545)而获得。

[0184] 半寿期延长

在某些实施方案中,抗体经修饰以增加其生物半寿期。各种方法是可能的。例如,这可通过增加Fc区对FcRn的结合亲和力进行。在一个实施方案中,在CH1或CL区内改变抗体以包含获自IgG的Fc区的CH2结构域的两个环的补救受体结合表位,如描述于Presta *et al.* 的美国专利号5,869,046和6,121,022。增加对FcRn结合和/或改进药代动力学性质的其它实例性的Fc变体包括位置259, 308和434的置换,包括例如259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y和434M。增加Fc对FcRn的结合的其它变体包括:250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton *et al.*, 2004, *J. Biol. Chem.* 279 (8): 6213-6216, Hinton *et al.* 2006 *Journal of Immunology* 176:346-356), 256A, 272A, 305A, 307A, 311A, 312A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (9):6591-6604), 252F, 252Y, 252W, 254T, 256Q, 256E, 256D, 433R, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H (Dall' Acqua *et al.* *Journal of Immunology*, 2002, 169:5171-5180, Dall' Acqua *et al.*, 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281:23514-23524)。参见美国专利号8,367,805。

[0185] IgG Fc中某些保守残基(I253, H310, Q311, H433, N434)的修饰,例如N434A变体(Yeung *et al.* (2009) *J. Immunol.* 182:7663)已经提议作为增加FcRn亲和力,从而增加循环中抗体的半寿期的一种方式。WO 98/023289。包含M428L和N434S的组合Fc变体已经表明增加FcRn结合和增加血清半寿期至多5倍。Zalevsky *et al.* (2010) *Nat. Biotechnol.* 28:157。包含T307A, E380A和N434A修饰的组合Fc变体也延长IgG1抗体的半寿期。Petkova *et al.* (2006) *Int. Immunol.* 18:1759。此外,包含M252Y-M428L, M428L-N434H, M428L-N434F, M428L-N434Y, M428L-N434A, M428L-N434M和M428L-N434S变体的组合Fc变体也已表明延长半寿期。WO 2009/086320。

[0186] 此外,包含M252Y, S254T和T256E的组合Fc变体增加半寿期接近4倍。Dall' Acqua *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281:23514。提供增加的FcRn亲和力但降低的pH依赖性的相关的IgG1修饰(M252Y-S254T- T256E- H433K- N434F)已用于产生IgG1构建体(“MST-HN Abdeg”),用作竞争物以阻止其它抗体与FcRn的结合,导致其它抗体(内源IgG (例如,在自身免疫情况下)或其它外源(治疗性) mAb)的清除率增加。Vaccaro *et al.* (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1283; WO 2006/130834。

[0187] 增加FcRn结合的其它修饰描述于Yeung *et al.* (2010) *J. Immunol.* 182:7663-7671; 6,277,375; 6,821,505; WO 97/34631; WO 2002/060919。

[0188] 在某些实施方案中,杂合IgG同种型可用于增加FcRn结合,和潜在地增加半寿期。例如,IgG1/IgG3杂合变体可通过在两种同种型不同的位置处,置换CH2和/或CH3区中的IgG1位置为来自IgG3的氨基酸构建。因此,可构建杂合变体IgG抗体,其包含一个或多个置换,例如,274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R和436F。在本文描述的其它实施方案中,IgG1/IgG2杂合变体可通过在两种同种型不同的位置处,置换CH2和/或CH3区中的IgG2位置为来自IgG1的氨基酸构建。因此,可构建杂合变体IgG抗体,其包含一个或多个置换,例如,一个或多个以下氨基酸置换:233E, 234L, 235L, -236G (涉及在位置236插入甘氨酸) 和327A。参见美国专利号8,629,113。已产生IgG1/IgG2/IgG4杂合序列,其据称增加血清半寿期和改进表达。美国专利号7,867,491 (其中的序列号18)。

[0189] 本发明的抗体的血清半寿期也可通过聚乙二醇化而增加。抗体可经聚乙二醇化,以例如增加抗体的生物学(例如,血清)半寿期。为了将抗体聚乙二醇化,抗体或其片段通常与聚乙二醇(PEG)试剂,例如PEG的活性酯或醛衍生物在其中一个或多个PEG基团与抗体或抗体片段连接的条件下反应。优选地,聚乙二醇化通过与活性PEG分子(或类似的活性水-可溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应进行。如本文所用的,术语“聚乙二醇”意欲包括用于衍生其它蛋白的任何形式的PEG,例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中,待聚乙二醇化的抗体是未糖基化抗体。用于聚乙二醇化蛋白的方法是本领域已知的,可应用于本文描述的抗体。参见例如Nishimura *et al.*的EP 0154316和Ishikawa *et al.*的EP 0401384。

[0190] 或者,在一些情况下,可能需要降低本发明的抗体的半寿期,而不是增加。人IgG1的Fc中的修饰例如I253A (Hornick *et al.* (2000) *J. Nucl. Med.* 41:355) 和H435A/R, I253A或H310A (Kim *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 29:2819) 可降低FcRn结合,从而降低半寿期(增加清除率),其在其中快速清除是优选的情况,例如医学成像下使用。亦参见Kenanova *et al.* (2005) *Cancer Res.* 65:622。增强清除率的其它方式包括将本发明的抗原结合结构域格式化为缺少结合FcRn的能力的抗体片段,例如Fab片段。这样的修饰可将抗体的循环半寿期从数周减少至大约数小时。如果需要的话,抗体片段的选择性聚乙二醇化然后可用于细微调节(增加)抗体片段的半寿期。Chapman *et al.* (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:780。抗体片段还可与人血清白蛋白融合,例如在融合蛋白构建体中,以增加半寿期。Yeh *et al.* (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 89:1904。或者,双特异性抗体可用本发明的第一抗原结合结构域和结合人血清白蛋白(HSA)的第二抗原结合结构域构建。参见国际专利申请公布WO 2009/127691和其中引用的专利文献。或者,专门的多肽序列可

加入抗体片段以增加半寿期,例如,“XTEN”多肽序列。Schellenberger *et al.* (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:1186; 国际专利申请公布WO 2010/091122。

[0191] 另外的Fc变体

当使用IgG4恒定结构域时,通常优选包括置换S228P,其模拟IgG1中的铰链序列,从而使IgG4分子稳定,例如,在治疗的患者中减少治疗性抗体和内源IgG4之间的Fab-臂交换。Labrijn *et al.* (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:767; Reddy *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:1925。

[0192] IgG1构建体的铰链中的潜在的蛋白酶裂解位点可通过D221G和K222S修饰而消除,增加了抗体的稳定性。WO 2014/043344。

[0193] Fc变体对其配体(Fc受体)的亲和力和结合性质可通过本领域已知的各种体外测定法(基于生物化学或免疫学的测定法)测定,包括但不限于平衡方法(例如,酶联免疫吸附测定法(ELISA)或放射免疫测定法(RIA))或动力学(例如,BIACORE® SPR分析),和其它方法,例如间接结合测定法、竞争性抑制测定法、荧光共振能量转移(FRET)、凝胶电泳和色谱(例如,凝胶过滤)。这些和其它方法可使用检查的一个或多个组分上的标记和/或使用各种检测方法,包括但不限于发色、荧光、发光或同位素标记。结合亲和力和动力学的详细描述可见于Paul, W. E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999),其聚焦于抗体-免疫原相互作用。

[0194] 在仍其它的实施方案中,抗体的糖基化经修饰以增加或降低效应子功能。例如,可制备未糖基化的抗体,其通过突变位置297的保守的天冬酰胺残基(例如,N297A),因此废除补体和Fc γ RI结合,缺少所有的效应子功能。Bolt *et al.* (1993) *Eur. J. Immunol.* 23: 403。亦参见Tao & Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595 (使用IgG1中的N297Q以消除位置297的糖基化)。

[0195] 尽管未糖基化抗体通常缺少效应子功能,但可引入突变以恢复该功能。未糖基化抗体,例如,自N297A/C/D/或H突变产生或在不将蛋白糖基化的系统(例如大肠杆菌)中产生的那些,可进一步突变以恢复Fc γ R结合,例如,S298G和/或T299A/G/或H (WO 2009/079242),或E382V和M428I (Jung *et al.* (2010) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 107: 604)。

[0196] 另外,具有增强的ADCC的抗体可通过改变糖基化制备。例如基于改进的对Fc γ RIIIa的结合,从重链Asn297-连接的寡糖除去岩藻糖已经表明增强ADCC。Shields *et al.* (2002) *JBC* 277:26733; Niwa *et al.* (2005) *J. Immunol. Methods* 306: 151; Cardarelli *et al.* (2009) *Clin. Cancer Res.* 15:3376 (MDX-1401); Cardarelli *et al.* (2010) *Cancer Immunol. Immunotherap.* 59:257 (MDX-1342)。这样的低岩藻糖抗体可,例如,在缺少岩藻糖基转移酶(FUT8)的敲除中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中(Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614),或在产生无岩藻糖化抗体的其它细胞中产生。参见例如,Zhang *et al.* (2011) *mAbs* 3:289和Li *et al.* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210 (均描述了在糖工程改造的巴斯德毕赤酵母中的抗体产生);Mossner *et al.* (2010) *Blood* 115:4393; Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733; Shinkawa *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278:3466; EP 1176195B1。ADCC还可按PCT公开号WO 03/035835中所述增强,其公开了使用变体CHO细胞系,Lec13,其将岩藻糖连接至

Asn(297)-连接的糖的能力降低,也导致在宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖化。亦参见Shields, R.L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740。或者,在抗体产生期间岩藻糖类似物可加入培养基,以抑制掺入岩藻糖至抗体上的糖。WO 2009/135181。

[0197] 增加抗体-连接的寡糖的二等分GlcNac结构也增强ADCC。Umana et al的PCT公开号WO 99/54342描述了细胞系经工程改造以表达糖蛋白-修饰的糖基转移酶(例如,β(1,4)-N-乙酰基葡萄糖胺基转移酶III (GnTIII)),使得工程改造细胞系上表达的抗体显示增加的二等分GlcNac结构,导致抗体的ADCC活性增加(亦参见Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180)。

[0198] 已开发了另外的糖基化变体,其缺乏半乳糖、唾液酸、岩藻糖和木糖残基(所谓的GNGN糖型),其显示增强的ADCC和ADCP但降低的CDC,以及缺乏唾液酸、岩藻糖和木糖(所谓的G1/G2糖型)的其它变体,其显示增强的ADCC、ADCP和CDC。美国专利申请公开号2013/0149300。具有这些糖基化模式的抗体任选地在遗传修饰的*N. benthamiana*植物中产生,其中内源木糖基和岩藻糖基转移酶基因已被敲除。

[0199] 糖工程改造还可用于通过改变Fc区的Asn297连接的糖链的α2,6唾液酸含量,修饰IgG构建体的抗-炎性质,其中增加比例的α2,6唾液酸化形式导致增强的抗-炎效果。参见Nimmerjahn et al. (2008) *Ann. Rev. Immunol.* 26:513。相反,在其中不需要抗-炎性质的情况下可使用降低的比例具有α2,6唾液酸化糖的抗体。修饰抗体的α2,6唾液酸化含量的方法,例如通过选择性纯化α2,6唾液酸化形式或通过酶修饰,在美国专利申请公开号2008/0206246中提供。在其它实施方案中,Fc区的氨基酸序列可经修饰以模拟α2,6唾液酸化的作用,例如通过包含F241A修饰。WO 2013/095966。

[0200] III. 抗体物理性质

本文所述的抗体可在轻链或重链可变区中包含一个或多个糖基化位点。这样的糖基化位点可导致抗体的免疫原性增加或由于改变的抗原结合导致的抗体pK改变(Marshall et al. (1972) *Ann. Rev. Biochem.* 41:673-702; Gala和Morrison (2004) *J. Immunol.* 172:5489-94; Wallick et al. (1988) *J. Exp. Med.* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al. (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura et al. (2000) *Mol. Immunol.* 37:697-706)。已知糖基化发生在包含N-X-S/T序列的基序中。在一些情况下,优选具有不包含可变区糖基化的抗-TIGIT抗体。这可通过选择在可变区中不包含糖基化基序的抗体或通过将糖基化区内的残基突变实现。

[0201] 在某些实施方案中,本文所述的抗体不包含天冬酰胺异构位点。天冬酰胺的脱酰胺可发生在N-G或D-G序列上,导致产生异天冬氨酸残基,这将扭结(kink)引入至多肽链和降低其稳定性(异天冬氨酸作用)。

[0202] 各抗体具有独特的等电点(pI),其通常落入6-9.5的pH范围。IgG1抗体的pI通常落入7-9.5的pH范围和IgG4抗体的pI通常落入6-8的pH范围。推测pI在正常范围外的抗体可在体内条件下具有一定的解折叠和不稳定性。因此,优选具有包含落入正常范围的pI值的抗-TIGIT抗体。这可通过选择pI在正常范围内的抗体或通过突变带电荷的表面残基实现。

[0203] 各抗体具有特有的解链温度,较高的解链温度指示较大的体内整体稳定性(Krishnamurthy R和Manning M C (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71)。通常,优选T_{M1}(初始解折叠温度)大于60°C,优选地大于65°C,甚至更优选地大于70°C。抗体的熔点

可使用差异扫描量热法(Chen et al. (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando et al. (1999) *Immunol Lett.* 68:47-52)或圆二色性(Murray et al. (2002) *J. Chromatogr. Sci.* 40:343-9)测量。

[0204] 在优选的实施方案中,选择不快速降解的抗体。抗体的降解可使用毛细管电泳(CE)和MALDI-MS (Alexander A J和Hughes D E (1995) *Anal Chem.* 67:3626-32)测量。

[0205] 在另一优选的实施方案中,选择具有最小聚集作用的抗体,聚集作用可导致触发不需要的免疫反应和/或改变或不利的药代动力学性质。一般而言,具有25%或更小、优选地20%或更小、甚至更优选地15%或更小、甚至更优选地10%或更小和甚至更优选地5%或更小的聚集的抗体是可接受的。聚集可通过数种技术测量,包括大小排阻柱(SEC)、高效液相色谱(HPLC)和光散射。

[0206] IV. 核酸分子

本文描述的另一方面涉及编码本文所述的抗体的核酸分子。核酸可以全细胞、细胞裂解物或部分纯化或基本纯化形式提供。当自其它细胞组分或其它杂质,例如,其它细胞核酸(例如,其它染色体DNA,例如,与分离的DNA天然连接的染色体DNA)或蛋白中通过标准技术,包括碱/SDS处理、CsCl分带、柱色谱、限制性酶、琼脂糖凝胶电泳和本领域众所周知的其它技术纯化时,核酸是“分离的”或“基本上纯的”。参见F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本文所述的核酸可以是例如DNA或RNA,和可以或可以不包含内含子序列。在某些实施方案中,核酸是cDNA分子。

[0207] 本文所述的核酸可使用标准分子生物学技术获得。对于杂交瘤表达的抗体(例如,自带有人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤,如下文进一步描述的),编码由杂交瘤制备的抗体的轻链和重链的cDNA可通过标准PCR扩增或cDNA克隆技术获得。对于获自免疫球蛋白基因文库的抗体(例如,使用噬菌体展示技术),编码抗体的核酸可自文库回收。

[0208] 一旦获得编码VH和VL区段的DNA片段,这些DNA片段可通过标准重组DNA技术进一步操作,例如以将可变区基因转化为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,编码VL或VH的DNA片段可操作连接至编码另一蛋白,例如抗体恒定区或柔性接头的另一DNA片段。在此情况下使用的术语“可操作连接”意指两个DNA片段经连接,使得由两个DNA片段编码的氨基酸序列仍符合读框。

[0209] 编码VH区的分离的DNA可通过可操作连接编码VH的DNA与编码重链恒定区(铰链,CH1, CH2和/或CH3)的另一DNA分子,转化为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如,Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)和包含这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增获得。重链恒定区可以是IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM或IgD恒定区,例如IgG1区。对于Fab片段重链基因,编码VH的DNA可操作连接至仅编码重链CH1恒定区的另一DNA分子。

[0210] 编码VL区的分离DNA可通过可操作连接编码VL的DNA至编码轻链恒定区CL的另一DNA分子转化为全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如,Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of*

Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 和包含这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增获得。轻链恒定区可以是κ或λ恒定区。

[0211] 为了产生scFv基因,编码VH和VL的DNA片段可操作连接至编码柔性接头,例如,编码氨基酸序列(Gly₄-Ser)₃的另一片段,使得VH和VL序列可作为相邻的单链蛋白表达,其中VL和VH区通过柔性接头连接(参见例如,Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554)。

[0212] V. 抗体产生

本发明的各种抗体,例如,与本文公开的抗-人TIGIT抗体竞争或结合相同的表位的那些,可使用各种已知的技术产生,例如Kohler和Milstein, *Nature* 256: 495 (1975) 描述的标准体细胞杂交技术。尽管体细胞杂交程序是优选的,但原则上,也可使用产生单克隆抗体的其它技术,例如,B淋巴细胞的病毒或致癌转化,使用人抗体基因文库的噬菌体展示技术。

[0213] 制备杂交瘤的优选的动物系统是鼠系统。小鼠中杂交瘤产生是充分建立的程序。免疫方案和分离免疫的脾细胞用于融合的技术是本领域已知的。融合配对细胞(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。

[0214] 本文所述的嵌合或人源化抗体可基于按上所述制备的鼠单克隆抗体的序列制备。编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA可使用标准分子生物学技术获自目的鼠杂交瘤和经工程改造以包含非-鼠(例如,人)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,鼠可变区可使用本领域已知的方法连接至人恒定区(参见例如,Cabilly *et al.*的美国专利号4,816,567)。为了产生人源化抗体,鼠CDR区可使用本领域已知的方法插入人框架(参见例如,Winter的美国专利号5,225,539和Queen *et al.*的美国专利号 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762和6,180,370)。

[0215] 在一个实施方案中,本文所述的抗体是人单克隆抗体。这样的针对TIGIT的人单克隆抗体可使用带有人免疫系统的一部分而非小鼠系统的转基因或转染色体小鼠制备。这些转基因和转染色体小鼠包括本文分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,和在本文中统称为“人Ig小鼠”。

[0216] HuMAb小鼠® (Medarex, Inc.) 包含人免疫球蛋白基因微基因座,其编码未重排的人重链(μ和γ)和κ轻链免疫球蛋白序列,以及灭活内源μ和κ链基因座的靶向突变(参见例如,Lonberg, *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859)。因此,小鼠显示降低的小鼠IgM或κ表达,和在对免疫的反应中,引入的人重链和轻链转基因经历类型转换和体细胞突变以产生高亲和力人IgGκ单克隆(Lonberg, N. *et al.* (1994), 同上; 综述于Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. 和Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, 和Harding, F. 和Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546)。HuMab小鼠的制备和用途,和所述小鼠带有的基因组修饰,进一步描述于Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailion *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.*

(1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; 和 Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, 所有的内容通过引用以其整体明确结合到本文中。还参见 Lonberg 和 Kay 的美国专利号 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 和 5,770,429; Surani et al. 的美国专利号 5,545,807; Lonberg 和 Kay 的 PCT 公开号 WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 和 WO 99/45962; 和 Korman et al. 的 PCT 公开号 WO 01/14424。

[0217] 在某些实施方案中, 本文所述的抗体使用在转基因和转染色体上带有人免疫球蛋白序列的小鼠产生, 例如带有人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠。这样的小鼠, 在本文称为“KM 小鼠”, 详细描述于 Ishida et al. 的 PCT 公开号 WO 02/43478。

[0218] 还另外地, 表达人免疫球蛋白基因的可选的转基因动物系统是本领域可获得的, 和可用于产生本文描述的抗-TIGIT 抗体。例如, 可使用称为 Xeno 小鼠 (Abgenix, Inc.) 的可选的转基因系统; 这样的小鼠描述于例如 Kucherlapati et al. 的美国专利号 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6, 150,584 和 6,162,963。

[0219] 此外, 表达人免疫球蛋白基因的可选的转染色体动物系统是本领域可获得的, 和可用于产生本文描述的抗-TIGIT 抗体。例如, 可使用称为“TC 小鼠”的带有人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠; 这样的小鼠描述于 Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727。此外, 带有人重链和轻链转染色体的牛已经在本领域中描述 (Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) 和可用于产生本文所述的抗-TIGIT 抗体。

[0220] 本领域描述的用于产生人抗体, 例如, 人抗-TIGIT 抗体的另外的小鼠系统包括 (i) VelocImmune® 小鼠 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), 其中内源小鼠重链和轻链可变区已通过同源重组被替换为人重链和轻链可变区, 其可操作连接至内源小鼠恒定区, 使得在小鼠中产生嵌合抗体 (人 V/ 小鼠 C), 然后随后使用标准重组 DNA 技术转化为全人抗体; 和 (ii) MeMo® 小鼠 (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), 其中小鼠包含未重排的人重链可变区, 但包含单一重排的人共同轻链可变区。这样的小鼠, 和其用于产生抗体的应用, 描述于例如 WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 和 US 2012/0073004。

[0221] 本文描述的人单克隆抗体还可使用用于筛选人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示方法制备。在本领域中确立了这样的用于分离人抗体的噬菌体展示方法。参见例如: Ladner et al. 的美国专利号 5,223,409; 5,403,484; 和 5,571,698; Dower et al. 的美国专利号 5,427,908 和 5,580,717; McCafferty et al. 的美国专利号 5,969,108 和 6,172,197; 和 Griffiths et al. 的美国专利号 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 和 6,593,081。

[0222] 本文所述的人单克隆抗体还可使用 SCID 小鼠制备, 人免疫细胞已在其中重构, 使得在免疫时可产生人抗体反应。这样的小鼠描述于例如 Wilson et al. 的美国专利号 5,476,996 和 5,698,767。

[0223] 免疫

为了产生对人TIGIT的全人抗体,包含人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体小鼠(例如,HCo12, HCo7或KM小鼠)可用TIGIT抗原和/或表达TIGIT的细胞的纯化或富集制备物免疫,如对于其它抗原所述,例如Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474) : 856-859; Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851和WO 98/24884。或者,小鼠可用编码人TIGIT的DNA免疫。优选地,在首次输注时小鼠是6-16周龄。例如,重组TIGIT抗原的纯化或富集制备物(5-50 μ g)可用于腹膜内免疫HuMAb小鼠。在使用TIGIT抗原的纯化或富集制备物进行免疫不产生抗体的情况下,小鼠还可用表达TIGIT的细胞免疫,例如,细胞系,以促进免疫反应。实例性的细胞系包括过表达TIGIT的稳定CHO和Raji细胞系。

[0224] 用各种抗原的积累经验表明,当腹膜内(IP)或皮下(SC)用Ribi佐剂中的抗原初始免疫,接着每隔一周用Ribi佐剂中的抗原IP/SC免疫(最多共10次)时,HuMAb转基因小鼠响应最好。在免疫方案期间监测免疫反应,其中血浆样品通过后眼眶采血获得。血浆可通过ELISA和FACS(如下文所述)筛选,和具有足够效价的抗-TIGIT人免疫球蛋白的小鼠可用于融合。处死和取出脾脏和淋巴结之前3天,小鼠可用抗原静脉内加强免疫。预期各免疫可需要进行2-3次融合。对各抗原通常免疫6-24只小鼠。通常,使用HCo7, HCo12和KM品系。此外,HCo7和HCo12转基因二者可一起繁育成具有两种不同的人重链转基因的单一小鼠(HCo7/HCo12)。

[0225] 产生TIGIT的单克隆抗体的杂交瘤的产生

为了生成产生本文所述的单克隆抗体的杂交瘤,来自免疫小鼠的脾细胞和/或淋巴结细胞可经分离和融合至合适的永生细胞系,例如小鼠骨髓瘤细胞系。可筛选得到的杂交瘤中抗原-特异性抗体的产生。例如,来自免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液可用50% PEG融合至Sp2/0非分泌小鼠骨髓瘤细胞(ATCC, CRL 1581)。细胞以大约 2×10^5 个在平底微量滴定板中铺板,接着在包含10%胎牛血清、18% "653"条件培养基、5% origin (IGEN)、4 mM L-谷氨酰胺、1 mM丙酮酸钠、5mM HEPES、0.055 mM 2-巯基乙醇、50单位/ml青霉素、50 mg/ml链霉素、50 mg/ml庆大霉素和1X HAT (Sigma)的选择性培养基中两周孵育。大约2周后,细胞在其中HAT替换为HT的培养基中培养。然后通过ELISA筛选各个孔中的人单克隆IgM和IgG抗体。一旦广泛的杂交瘤生长发生,可通常在10-14天后观察培养基。分泌杂交瘤的抗体可重新铺板,再次筛选,如果对于人IgG仍然是阳性,则可将单克隆抗体通过有限稀释亚克隆至少2次。然后可将稳定的亚克隆体外培养,以在组织培养基中产生少量的抗体用于表征。

[0226] 为了纯化单克隆抗体,选择的杂交瘤可在2升旋转烧瓶中生长用于单克隆抗体纯化。上清液可过滤和浓缩,然后用蛋白A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.)进行亲和色谱。洗脱的IgG可通过凝胶电泳和高效液相色谱检查,以确保纯度。缓冲液溶液可交换成PBS,和浓度可通过OD280使用1.43消光系数确定。可等分单克隆抗体并在-80°C贮存。

[0227] VI. 抗体制备**产生TIGIT的单克隆抗体的转染瘤的产生**

本发明的抗体,包括两种提供序列的特异性抗体和另外的相关抗-TIGIT抗体,可在宿主细胞转染瘤中使用例如重组DNA技术和基因转染方法的组合产生,如本领域众所周知的(Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202)。

[0228] 例如,为了表达抗体或其抗体片段,编码部分或全长轻链和重链的DNA可通过标准分子生物学技术获得(例如,PCR扩增或cDNA克隆,使用表达目的抗体的杂交瘤)和DNA可插入表达载体,使得基因可操作连接至转录和翻译控制序列。在该背景下,术语“可操作连接”意指抗体基因连接至载体,使得载体内的转录和翻译控制序列发挥它们预期的调节抗体基因的转录和翻译的功能。表达载体和表达控制序列经选择以与使用的表达宿主细胞相容。抗体轻链基因和抗体重链基因可插入单独的载体或两个基因插入相同的表达载体。抗体基因通过标准方法插入表达载体(例如,连接抗体基因片段和载体上的互补限制性位点,或如果不存在限制性位点,则平端连接)。本文所述的抗体的轻链和重链可变区可通过将它们插入已经编码所需要的同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体,使得在载体内V_H区段可操作连接至C_H区段和在载体内V_L区段可操作连接至载体内的C_L区段,用于产生任何抗体同种型的全长抗体基因。另外或备选地,重组表达载体可编码信号肽,其促进自宿主细胞分泌抗体链。可将抗体链基因克隆至载体,使得信号肽符合读框地连接至抗体链基因的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异质信号肽(即,来自非-免疫球蛋白的信号肽)。

[0229] 除了抗体链基因外,重组表达载体还可带有控制抗体链基因在宿主细胞中表达的调节序列。术语“调节序列”意欲包括启动子、增强子和控制抗体链基因的转录或翻译的其它表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。这样的调节序列描述于例如Goeddel (*Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))。本领域技术人员应理解,表达载体的设计,包括调节序列的选择,可依赖于例如待转化的宿主细胞的选择、需要的蛋白表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调节序列包括在哺乳动物细胞中指导高水平蛋白表达的病毒元件,例如源自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如,腺病毒主要晚期启动子(AdMLP)和多瘤的启动子和/或增强子。或者,可使用非病毒调节序列,例如泛素启动子或β-珠蛋白启动子。还进一步,调节元件包含来自不同来源的序列,例如SRα启动子系统,其包含来自SV40早期启动子和人T细胞白血病病毒1型的长末端重复序列的序列(Takebe, Y. et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472)。

[0230] 除了抗体链基因和调节序列外,重组表达载体还可带有另外的序列,例如调节载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制起点)和可选择性标记基因。可选择性标记基因促进载体所引入的宿主细胞的选择(参见例如,Axel et al.的美国专利号4,399,216, 4,634,665和5,179,017)。例如,通常可选择性标记基因赋予载体所引入的宿主细胞抗药性,例如G418、潮霉素或甲氨蝶呤。优选的可选择性标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(在dhfr-宿主细胞中用于甲氨蝶呤选择/扩增)和neo基因(用于G418选择)。

[0231] 对于轻链和重链的表达,编码重链和轻链的表达载体通过标准技术转染至宿主细胞。术语“转染”的各种形式意欲包括通常用于引入外源DNA至原核或真核宿主细胞的各种技术,例如,电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。尽管理论上在原核或真核宿主细胞中表达本文所述的抗体是可能的,但在真核细胞、最优选地哺乳动物宿主细胞中表达抗体是最优选的,因为这样的真核细胞和特别是哺乳动物细胞,比原核细胞更可能装配和分泌适当折叠的和免疫活性的抗体。已报道抗体基因的原核表达对于产生高收率的活性抗体是无效的(Boss, M. A. 和Wood, C. R. (1985) *Immunoology Today* 6:12-13)。本发明的抗体也可在酵母巴斯德毕赤酵母的糖工程改造的菌株中产生.Li et al. (2006) *Nat.*

Biotechnol. 24:210。

[0232] 用于表达本文所述的重组抗体的优选的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞) (包括dhfr- CHO细胞, 描述于Urlaub和Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 用于DHFR可选择性标记, 例如, 描述于R. J. Kaufman和P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。特别是, 对于用于NS0骨髓瘤细胞, 另一优选的表达系统是公开于WO 87/04462, WO 89/01036和EP 338, 841的GS基因表达系统。当编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时, 抗体通过培养宿主细胞足以允许抗体在宿主细胞中表达、或更优选地分泌抗体至宿主细胞生长的培养基的一段时间产生。抗体可自培养基使用标准蛋白纯化方法回收。

[0233] 由于通常观察到的翻译后修饰, 本发明的抗体多肽链的N-和C-末端可不同于预期的序列。例如, C-末端赖氨酸残基通常自抗体重链丢失。Dick et al. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132。N-末端谷氨酰胺残基, 和更少程度上为谷氨酸残基, 通常在治疗性抗体的轻链和重链中转化为焦谷氨酸残基。Dick et al. (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97: 544; Liu et al. (2011) *JBC* 28611211; Liu et al. (2011) *J. Biol. Chem.* 286: 11211。

[0234] 本发明的各种激动剂抗-huTIGIT抗体的氨基酸序列在序列表中提供, 其概述于表5。因为上述原因, 对于重链或重链恒定结构域, C-末端赖氨酸不包括在序列表的任何序列中。然而, 在备选的实施方案中, 本发明的抗-huTIGIT抗体的各重链, 和/或编码这样的抗体或其重链或轻链的遗传构建体, 在重链的C-末端包括这种另外的赖氨酸残基。

[0235] VII. 测定法

可通过例如标准ELISA测试本文所述的抗体与TIGIT的结合。简言之, 微量滴定板用在PBS中1-2 μ g/ml的纯化的TIGIT包被, 然后用在PBS中的5%牛血清白蛋白封闭。稀释的抗体(例如, 来自TIGIT免疫小鼠的稀释的血浆)加入各孔, 和在37°C孵育1-2小时。将板用PBS/Tween洗涤和然后用例如, 对于人抗体或另外具有人重链恒定区的抗体的第二试剂, 与辣根过氧化酶(HRP)缀合的山羊-抗-人IgG Fc-特异性多克隆试剂在37°C孵育1小时。洗涤后, 将板用ABTS底物(Moss Inc, 产品: ABTS-1000)显色和通过分光光度计在OD 415-495分析。然后通过流式细胞术进一步筛选来自免疫小鼠的血清中与表达人TIGIT的细胞系, 但不与不表达TIGIT的对照细胞系的结合。简言之, 抗-TIGIT抗体的结合通过用1:20稀释的抗-TIGIT抗体孵育表达TIGIT的CHO细胞评价。洗涤细胞和用PE-标记的抗-人IgG Ab检测结合。使用FACScan流式细胞仪(Becton Dickinson, San Jose, CA)进行流式细胞术分析。优选地, 产生最高效价的小鼠用于融合。如果小鼠抗-huTIGIT抗体被检出, 可使用抗-小鼠检测抗体进行类似的实验。

[0236] 上述ELISA测定法可用于筛选与TIGIT免疫原显示阳性反应性的抗体, 因此, 筛选产生所述抗体的杂交瘤。产生优选地以高亲和力结合TIGIT的抗体的杂交瘤然后可被亚克隆和进一步表征。来自各杂交瘤的一个克隆, 其保留亲本细胞的反应性(通过ELISA), 然后可选择用于制备细胞库和用于抗体纯化。

[0237] 为了纯化抗-TIGIT抗体, 选择的杂交瘤可在2升旋转烧瓶中生长用于单克隆抗体纯化。上清液可经过滤和浓缩, 然后用蛋白A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) 进行亲和色谱。洗脱的IgG可通过凝胶电泳和高效液相色谱检查以确保纯度。缓冲液溶液可交

换成PBS，和可通过OD₂₈₀使用1.43消光系数测定浓度。可等分单克隆抗体并在-80°C贮存。

[0238] 为了确定选择的抗-TIGIT单克隆抗体是否结合独特的表位，各抗体可使用市售可得的试剂(Pierce, Rockford, IL)被生物素化。生物素化的MAb结合可用链霉亲和素标记的探针检测。使用未标记的单克隆抗体和生物素化的单克隆抗体的竞争研究可使用TIGIT包被的-ELISA板进行，如上所述。

[0239] 为了确定纯化抗体的同种型，同种型ELISA可使用对特定同种型的抗体特异性的试剂进行。例如，为了确定人单克隆抗体的同种型，微量滴定板的各孔可用1 μg/ml的抗-人免疫球蛋白在4°C包被过夜。在用1% BSA封闭后，将板与1 μg /ml或更少的试验单克隆抗体或纯化的同种型对照在环境温度下反应1-2小时。然后将各孔与人IgG1或人IgM-特异性碱性磷酸酶缀合的探针反应。将板显色和分析，如上所述。

[0240] 为了测试单克隆抗体与表达TIGIT的活细胞的结合，可使用流式细胞术，如实施例中所述。简言之，表达膜结合TIGIT的细胞系(在标准生长条件下生长)与各种浓度的单克隆抗体在包含0.1% BSA的PBS中在4°C混合1小时。洗涤后，将细胞与藻红蛋白(PE)-标记的抗-IgG抗体在与第一抗体染色相同的条件下反应。样品可通过FACScan仪器使用光和侧散射性质分析，以门控单细胞，和测定标记的抗体的结合。除了或代替流式细胞术测定法，可使用备选的使用荧光显微镜的测定法。细胞可完全按上所述染色，和通过荧光显微镜检查。该方法允许单个细胞的可视化，但根据抗原密度可具有降低的敏感性。

[0241] 可通过蛋白质印迹进一步测试抗-TIGIT抗体与TIGIT抗原的反应性。简言之，可制备来自表达TIGIT的细胞的细胞提取物，对其进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后，将分离的抗原转移至硝酸纤维素膜上，用20%小鼠血清封闭，和用测试的单克隆抗体探查。IgG结合可使用抗-IgG碱性磷酸酶检测，和用BCIP/NBT底物片剂显色(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)。

[0242] 用于分析各种抗-TIGIT抗体的结合亲和力、交叉反应性和结合动力学的方法包括本领域已知的标准测定法，例如，生物层干涉测定(BLI)分析和BIACORE®表面等离子体共振(SPR)分析，使用BIACORE® 2000 SPR仪器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)。

[0243] 在一个实施方案中，抗体特异性结合人TIGIT的细胞外区域。抗体可特异性结合TIGIT的细胞外结构域内的特定结构域(例如，功能结构域)。在特定的实施方案中，抗体特异性结合PVR结合的TIGIT上的位点。在某些实施方案中，抗体特异性结合人TIGIT的细胞外区域和食蟹猴TIGIT的细胞外区域。优选地，抗体以高亲和力结合人TIGIT。

[0244] VIII. 双特异性分子

本文所述的抗体可用于形成双特异性分子。抗-TIGIT抗体或其抗原-结合片段可衍生或连接至另一功能分子，例如，另一肽或蛋白(例如，受体的另一抗体或配体)以产生双特异性分子，其结合至少2个不同的结合位点或靶分子。本文所述的抗体事实上可衍生或连接至超过1个其它功能分子以产生多特异性分子，其结合超过2个不同的结合位点和/或靶分子；这样的多特异性分子也旨在包括在本文使用的术语“双特异性分子”的范围内。为了产生本文所述的双特异性分子，本文所述的抗体可功能连接(例如，通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其它方式)至一个或多个其它结合分子，例如另一抗体、抗体片段、肽或结合模拟物，使得产生双特异性分子。

[0245] 因此，本文提供了至少包含一个对TIGIT的第一结合特异性(binding

specificity) 和对第二靶表位的第二结合特异性的双特异性分子。在本文所述的其中双特异性分子是多特异性的其中一个实施方案中,分子可进一步包括第三结合特异性。

[0246] 在一个实施方案中,本文所述的双特异性分子包含至少一种抗体或其抗体片段,包括例如,Fab、Fab'、F(ab')2、Fv或单链Fv作为结合特异性。抗体也可以是轻链或重链二聚体,或其任何最小片段,例如Fv或单链构建体,描述于Ladner *et al*美国专利号4,946,778,其内容通过引用明确结合到本文中。

[0247] 尽管优选人单克隆抗体,但可用于本文所述的双特异性分子的其它抗体是鼠、嵌合和人源化单克隆抗体。

[0248] 本文所述的双特异性分子可使用本领域已知的方法通过缀合组分结合特异性制备。例如,双特异性分子的各结合特异性可单独产生,然后彼此缀合。当结合特异性是蛋白或肽时,可使用各种偶联或交联剂用于共价缀合。交联剂的实例包括蛋白A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻-亚苯基二马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)(参见例如,Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648)。其它方法包括描述于Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83),和Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375)中的那些。优选的缀合剂是SATA和磺基-SMCC,二者可获自Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)。

[0249] 当结合特异性是抗体时,它们可通过两条重链的C-末端铰链区的巯基键合缀合。在特别优选的实施方案中,铰链区经修饰以包含奇数的巯基残基,优选地一个,然后缀合。

[0250] 或者,两个结合特异性可在相同的载体中编码和在相同的宿主细胞中表达和装配。当双特异性分子是mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')2或配体x Fab融合蛋白时,这种方法特别有用。本文所述的双特异性分子可以是包含一个单链抗体和结合决定簇的单链分子,或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可包含至少两个单链分子。制备双特异性分子的方法描述于例如美国专利号5,260,203; 美国专利号5,455,030; 美国专利号4,881,175; 美国专利号5,132,405; 美国专利号5,091,513; 美国专利号5,476,786; 美国专利号5,013,653; 美国专利号5,258,498; 和美国专利号5,482,858。

[0251] 双特异性分子与其特异性靶标的结合可使用本领域公认的方法证实,例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、FACS分析、生物测定法(例如,生长抑制)或蛋白质印迹测定法。这些测定法的每一种通常通过使用对目的复合物特异性的标记试剂(例如,抗体),检测特别感兴趣的蛋白-抗体复合物的存在。

[0252] IX. 组合物

还提供了组合物,例如,药物组合物,包含本文所述的抗-TIGIT抗体或其抗原-结合片段,其与药学上可接受的载体一起配制。这样的组合物可包括本文所述的一种抗体或(例如,两种或更多种不同的)抗体的组合,或免疫缀合物或双特异性分子。例如,本文所述的药物组合物可包含抗体的组合(或免疫缀合物或双特异性),其结合靶标抗原上的不同的表位或具有互补的活性。

[0253] 在某些实施方案中,组合物包含浓度为至少1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 50

mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml或1-300 mg/ml或100-300 mg/ml的抗-TIGIT抗体。

[0254] 本文所述的药物组合物还可在组合疗法中给予,即,与其它试剂组合。例如,组合疗法可包括本文所述的抗-TIGIT抗体与至少一种其它抗-癌症和/或T-细胞刺激(例如,活化)剂组合。可用于组合疗法的治疗剂的实例更详细描述于下文中本文所述的抗体的用途的章节。

[0255] 在一些实施方案中,本文公开的治疗性组合物可包括用于治疗癌症的其它化合物、药物和/或试剂。这样的化合物、药物和/或试剂可包括,例如化学治疗药物、小分子药物或刺激对给定的癌症的免疫反应的抗体。在一些情况下,治疗性组合物可包括,例如抗-CTLA-4抗体、抗-PD-1抗体、抗-PD-L1抗体、抗-CD40抗体、抗-OX40(亦称为CD134, TNFRSF4, ACT35和/或TXGP1L)抗体、抗-LAG-3抗体、抗-CD73抗体、抗-CD137抗体、抗-CD27抗体、抗-CSF-1R抗体、TLR激动剂或IDO或TGF β 的小分子拮抗剂的一种或多种。

[0256] 如本文所用的,“药学上可接受的载体”包括生理学上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣料、抗细菌和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。优选地,载体适合于静脉内、肌内、皮下、胃肠外、脊柱或表皮给药(例如,通过注射或输注)。根据给药途径,活性化合物,即抗体、免疫缀合物或双特异性分子,可被材料包被,以保护化合物免于酸和可灭活化合物的其它天然条件的作用。

[0257] 本文所述的药用化合物可包括一种或多种药学上可接受的盐。”药学上可接受的盐”是指保留母体化合物的需要的生物学活性和不产生任何不需要的毒性作用的盐(参见例如,Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19)。这样的盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括源自无毒无机酸的那些,例如盐酸盐、硝酸盐、磷酸盐、硫酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、亚磷酸盐等,以及来自无毒有机酸的那些,例如脂肪族单-和二羧酸、苯基取代的烷酸、羟基烷酸、芳族酸、脂肪族和芳族磺酸等。碱加成盐包括源自碱土金属的那些,例如钠、钾、镁、钙等,以及来自无毒有机胺的那些,例如N,N'-二苯基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等。

[0258] 本文所述的药物组合物还可包括药学上可接受的抗-氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水可溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢纳、偏亚硫酸氢纳、亚硫酸钠等;(2)油-可溶性抗氧化剂,例如棕榈酸抗坏血酸酯、丁羟基茴香醚(BHA)、丁羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0259] 可用于本文所述的药物组合物的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)和其合适的混合物,植物油,例如橄榄油,和可注射有机酯,例如油酸乙酯。可例如通过使用包衣材料,例如卵磷脂,在分散剂的情况下通过保持需要的粒径,和通过使用表面活性剂,保持合适的流动性。

[0260] 这些组合物还可包含辅助剂,例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。防止存在微生物可通过上述灭菌程序和通过包含各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等确保。组合物中还可需要包括等张剂,例如糖、氯化钠等。此外,可注射药用形式的长期吸收可通过包含延迟吸收的试剂实现,例如单硬脂酸铝和明胶。

[0261] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液,和用于临时制备无菌可注射溶液

或分散液的无菌粉剂。这样的介质和试剂对药用活性物质的应用是本领域已知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容，考虑其在本文所述的药物组合物中的应用。补充的活性化合物也可掺入组合物中。

[0262] 治疗性组合物通常在制造和贮存条件下必须是无菌的和稳定的。组合物可作为溶液、微乳液、脂质体或适合于高药物浓度的其它有序结构配制。载体可以是溶剂或分散介质，包含例如，水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和其合适的混合物。可例如通过使用包衣料例如卵磷脂，在分散液的情况下通过维持需要的粒径和通过使用表面活性剂，保持适当的流动性。在许多情况下，优选组合物包括等张剂，例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨醇，或氯化钠。可注射组合物的长期吸收可通过在组合物中包括延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸盐和明胶实现。

[0263] 无菌注射溶液可通过将需要量的活性化合物掺入含一种上述成分或其组合(按需要)的合适的溶剂中，接着无菌微过滤制备。通常，分散液通过将活性化合物掺入包含基础分散介质和需要的上述其它成分的无菌溶媒制备。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉剂的情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干)，其得到活性成分加来自其之前的无菌过滤溶液的任何另外需要的成分的粉末。

[0264] 可与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据治疗的受试者和具体的给药方式而不同。可与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的组合物的量。通常，以百分比来计算，该量范围为约0.01%-约99%的活性成分，优选地约0.1%-约70%，最优选地约1%-约30%的活性成分，其与药学上可接受的载体组合。

[0265] 给药方案经调整以提供最佳需要的反应(例如，治疗反应)。例如，可给予单次推注，可随时间给予若干分开的剂量，或根据治疗情况的紧急指示，剂量可按比率减少或增加。配制容易给予和剂量均匀的剂量单位形式的胃肠外组合物是特别有利的。本文所用的剂量单位形式是指适合作为单位剂量用于治疗的受试者的物理离散单位；每个单位包含预定量的活性化合物，其经计算以与需要的药用载体结合产生需要的治疗效果。本文所述的剂量单位形式的规格由以下规定并直接取决于它们：(a)活性化合物的独特特征和要实现的特定治疗效果，和(b)本领域配制这样的活性化合物以处理个体敏感性的固有限制。

[0266] 对于给予抗体，剂量范围为约0.0001-100 mg/kg和更通常0.01-5 mg/kg的宿主体重。例如，剂量可以是0.3 mg/kg体重、1 mg/kg体重、3 mg/kg体重、5 mg/kg体重或10 mg/kg体重或1-10 mg/kg的范围内。实例性的治疗方案需要给予每周一次、每2周一次、每3周一次、每4周一次、每月一次、每3个月一次或每3-6个月一次。在优选的实施方案中，本发明的抗-TIGIT抗体每两周给予。对于本文所述的抗-TIGIT抗体，其它优选的剂量方案包括经静脉内给予1 mg/kg，3 mg/kg或5 mg/kg体重，其中抗体使用以下给药方案之一给予：(i) 每4周，持续6个剂量，然后每3个月；(ii) 每3周；(iii) 3 mg/kg体重一次，接着每3周1 mg/kg体重。

[0267] 在一些方法中，两种或更多种具有不同的结合特异性的单克隆抗体同时给予，在该情况下给予的各抗体的剂量落入指示的范围内。治疗性抗体通常多次给予。单次剂量之间的间隔可以是例如，每周、每月、每3个月或每年。间隔也可以是无规律的，如通过测量患者的靶抗原的抗体的血液水平所指示的。在一些方法中，剂量经调整以实现约1-1000 µg/ml的血浆抗体浓度和在一些方法中约25-300 µg/ml。

[0268] 抗体可作为持续释放制剂给予,在此情况下,需要较少频率给予。剂量和频率根据患者中抗体的半寿期而不同。通常,人抗体显示最长的半寿期,接着是人源化抗体、嵌合抗体和非人抗体。给予的剂量和频率可根据治疗是预防性的还是治疗性的而不同。在预防性应用中,相对低的剂量以相对不频繁的间隔给予一段长期的时间。一些患者在他们的余下生命中持续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要以相对短的间隔的相对高的剂量,直到疾病进展被减少或终止,和优选地直到患者显示疾病症状的部分或完全改善。此后,患者可任选地给予预防性方案,尽管在许多免疫肿瘤适应症中继续治疗不是需要的。

[0269] 本文所述的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可改变,以获得有效地对特定患者、组合物和给药方式实现需要的治疗反应,而对患者没有毒性的活性成分的量。选择的剂量水平取决于各种药代动力学因素,包括本文所述使用的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、给药途径、给药次数、使用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与使用的特定组合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料,治疗的患者的年龄、性别、体重、条件、一般健康和在先病史,和医学领域众所周知的其它因素。

[0270] 本文所述的抗-TIGIT抗体的“治疗有效剂量”优选地导致疾病症状的严重性降低、无疾病症状期的频率和持续时间增加或阻止由于疾病痛苦导致的损伤或失能。在癌症的情况下,治疗有效剂量优选地阻止与癌症有关的身体症状的进一步恶化。癌症的症状是本领域众所周知的和包括例如,不寻常的胎块特征,胎块外观的变化包括不对称、边界、颜色和/或直径,新染色的皮肤区域,异常的胎块,指甲下区域变暗,乳房结块,乳头改变,乳房囊肿,乳房痛,死亡,失重,虚弱,过度疲劳,难以进食,失去食欲,慢性咳嗽,气喘恶化,咳血,尿血,便血,恶心,呕吐,肝转移,肺转移,骨转移,腹胀,胃气胀,腹膜腔积液,阴道出血,便秘,腹胀,结肠穿孔,急性腹膜炎(感染、发烧、疼痛),疼痛,呕血,重汗,发烧,高血压,贫血,腹泻,黄疸,晕眩,寒战,肌肉抽搐,结肠转移,肺转移,膀胱转移,肝转移,骨转移,肾转移,和胰腺转移,吞咽困难等。治疗功效可在首次给予本发明的抗-huTIGIT mAb后直接观察到,或其可仅在一段时间和/或一系列剂量后观察到。这样的延迟功效可仅在数月治疗,至多6、9或12个月后观察到。鉴于一些免疫肿瘤试剂显示的延迟功效,不过早判定本发明的抗-huTIGIT mAb缺乏治疗功效是重要的。

[0271] 治疗有效剂量可阻止或延迟癌症发生,例如当疾病的早期或初步迹象存在时可能是需要的。用于诊断癌症的实验室检验包括化学(包括测量TIGIT水平)、血液学、血清学和放射学。因此,监测任何前述症状的任何临床或生物化学测定法可用于确定特定治疗是否是治疗癌症的治疗有效剂量。本领域普通技术人员将能够基于例如受试者尺寸、受试者症状严重性和特定的组合物或选择的给药途径等因素,确定这样的量。

[0272] 本文所述的组合物可通过一种或多种给药途径使用本领域已知的各种方法的一种或多种给予。技术人员将理解,给药途径和/或方式根据需要的结果而改变。本文所述的抗体的优选的给药途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其它胃肠外给予途径,例如通过注射或输注。本文使用的词语“胃肠外给予”意指并非肠内和局部给予的给予方式,通常通过注射,和包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0273] 或者,本文所述的抗体可通过非胃肠外途径给予,例如局部、表皮或粘膜给予途

径,例如,鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。

[0274] 活性化合物可用保护化合物免于快速释放的载体制备,例如控制释放制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊封递送系统。可使用生物可降解的、生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这样的制剂的许多方法是取得专利的,或本领域技术人员通常已知的。参见例如,*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0275] 治疗性组合物可用本领域已知的医学装置给予。例如,在优选的实施方案中,本文所述的治疗性组合物可用无针头皮下注射装置,例如公开于美国专利号 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; 或 4,596,556 的装置给予。用于本文所述的抗-TIGIT 抗体的众所周知的植入物和模块的实例包括:美国专利号 4,487,603, 其公开了可植入微输注泵,用于以受控速率分配药物;美国专利号 4,486,194, 其公开了用于通过皮肤给予药物的治疗装置;美国专利号 4,447,233, 其公开了药物输注泵,用于以准确的输注速率递送药物;美国专利号 4,447,224, 其公开了可变流量可植入输注装置,用于持续药物递送;美国专利号 4,439,196, 其公开了渗透药物递送系统,具有多个室的区间;和美国专利号 4,475,196, 其公开了渗透药物递送系统。这些专利通过引用结合到本文中。许多其它这样的植入物、递送系统和模块是本领域技术人员已知的。

[0276] 在某些实施方案中,可配制本文所述的抗-TIGIT 抗体以确保合适的体内分布。例如,血-脑屏障 (BBB) 排除了许多高亲水性化合物。为了确保本文所述的治疗性化合物穿过 BBB (如果需要),它们可配制例如,在脂质体中。对于制备脂质体的方法,参见例如,美国专利 4,522,811; 5,374,548; 和 5,399,331。脂质体可包含选择性运输至特定细胞或器官,从而增强靶向药物递送的一个或多个部分 (参见例如, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685)。实例性的靶向部分包括叶酸或生物素 (参见例如, Low et al. 的美国专利 5,416,016); 甘露糖苷 (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); 抗体 (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); 表面活性剂蛋白A受体 (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 268:C134); p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); 亦参见 K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *ImmunoMethods* 4:273。

[0277] X. 用途和方法

本文所述的抗体、抗体组合物和方法具有许多体外和体内功用,包括例如通过阻断 TIGIT 信号传导增强免疫反应或检测 TIGIT。在优选的实施方案中,本文所述的抗体是人或人源化抗体。例如,本文所述的抗-TIGIT 抗体可给予体外或离体培养的细胞,或人受试者,例如,体内,以增强各种疾病的免疫性。因此,本文提供了改变受试者的免疫反应的方法,包括给予受试者本文所述的抗体或其抗原-结合片段,使得受试者中的免疫反应被增强、刺激或上调。

[0278] 优选的受试者包括其中需要免疫反应增强的人患者。方法特别适合于治疗具有可通过增强免疫反应 (例如, T-细胞介导的免疫反应) 治疗的病症的人患者。在特定的实施方案中,方法特别适合于体内治疗癌症。为了实现免疫性的抗原-特异性增强,本文所述的抗-

TIGIT抗体可与目的抗原一起给予,或抗原可已经存在于待治疗的受试者中(例如,带肿瘤或带病毒的受试者)。当TIGIT的抗体与另一试剂一起给予时,两者可分开或同时给予。

[0279] 还包括用于检测样品中人TIGIT抗原的存在的方法,或测量人TIGIT抗原的量的方法,包括使样品和对照样品与特异性结合人TIGIT的人单克隆抗体或其抗原结合片段在允许在抗体或其片段和人TIGIT之间形成复合物的条件下接触。然后检测复合物的形成,其中样品与对照样品相比,复合物形成的差异指示样品中存在人TIGIT抗原。此外,本文所述的抗-TIGIT抗体可用于通过免疫亲和纯化纯化人TIGIT。

[0280] 鉴于本文所述的抗-TIGIT抗体阻断T细胞反应,例如抗原-特异性T细胞反应的抑制或共抑制的能力,本文提供了使用本文所述的抗体刺激、增强或上调抗原-特异性T细胞反应,例如,抗-肿瘤T细胞反应的体外和体内方法。在某些实施方案中,还提供CD3刺激(例如,通过与表达膜CD3的细胞共孵育),所述刺激可与用抗-TIGIT抗体治疗同时、之前或之后提供。例如,本文提供了提高抗原-特异性T细胞反应的方法,包括使所述T细胞与本文所述的抗-TIGIT抗体和任选地与CD3接触,使得抗原-特异性T细胞反应得到增强,例如,通过除去TIGIT-介导的抑制效果。抗原-特异性T细胞反应的任何合适的指示剂可用于测量抗原-特异性T细胞反应。这样的合适的指示剂的非限制性实例包括在存在抗体的情况下增加T细胞增殖和/或在存在抗体的情况下增加细胞因子产生。在优选的实施方案中,抗原-特异性T细胞产生的白介素-2和/或干扰素- γ 得到增强。

[0281] 进一步包括在受试者中提高免疫反应(例如,抗原-特异性T细胞反应)的方法,包括给予受试者本文所述的抗-TIGIT抗体,使得受试者的免疫反应(例如,抗原-特异性T细胞反应)得到增强。在优选的实施方案中,受试者是带肿瘤的受试者,和针对肿瘤的免疫反应得到增强。肿瘤可以是实体肿瘤或液体肿瘤,例如,血液恶性肿瘤。在某些实施方案中,肿瘤是免疫原性肿瘤。在某些实施方案中,肿瘤是非免疫原性的。在某些实施方案中,肿瘤是PD-L1阳性的。在某些实施方案中,肿瘤是PD-L1阴性的。受试者也可以是带病毒的受试者,和针对病毒的免疫反应得到增强。

[0282] 还提供了在受试者中抑制肿瘤细胞的生长的方法,包括给予受试者本文所述的抗-TIGIT抗体,使得受试者的肿瘤生长得到抑制。还提供了在受试者中治疗慢性病毒感染的方法,包括给予受试者本文所述的抗-TIGIT抗体,使得受试者的慢性病毒感染得到治疗。

[0283] 本文还包括用于自具有肿瘤例如,癌性肿瘤的受试者的肿瘤微环境耗尽T_{reg}细胞的方法,包括给予受试者治疗有效量的本文所述的抗-TIGIT抗体,其包含刺激肿瘤微环境中T_{reg}细胞的耗尽的Fc。Fc可例如是具有效应子功能或增强的效应子功能的Fc,例如结合一种或多种活化Fc受体或与一种或多种活化Fc受体的结合增强的Fc。在优选的实施方案中,T_{reg}耗尽发生而没有显著耗尽或抑制肿瘤微环境中的T_{eff},和没有显著耗尽或抑制肿瘤微环境外的T_{eff}细胞和T_{reg}细胞。在某些实施方案中,例如,在肿瘤微环境中,受试者在T_{reg}细胞上比在T_{eff}细胞上具有更高水平的TIGIT。在某些实施方案中,抗-TIGIT抗体可耗尽肿瘤中的T_{reg}和/或肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中的T_{reg}。例如在CT26肿瘤模型中,格式化为小鼠IgG2a的抗-小鼠TIGIT抗体(其显示效应子功能)部分地耗尽T_{reg}和CD8⁺ T细胞二者,但不耗尽CD4⁺ T细胞。格式化为小鼠IgG1 D265A的无效对应物抗-TIGIT抗体不耗尽T细胞。当考虑是否使用具有效应子功能或无效抗-TIGIT抗体时,必须考虑可增强抗-肿瘤免疫反应的

T_{regs}的耗尽和消除实际杀死肿瘤细胞所需要的一些细胞的CD8⁺ T细胞的耗尽之间的权衡。尽管耗尽T_{reg}s可预期增强抗-肿瘤活性,但最近的研究表明,连接TIGIT与TIGIT⁺ T_{regs}促进T_{reg}细胞-介导的T_{eff}细胞增殖抑制(Joller *et al.* (2014) *Immunity* 40:569),表明TIGIT信号传导的阻断(例如,使用本发明的拮抗剂抗-TIGIT抗体)也可能增强抗-肿瘤活性。因此,可能最有效的是,使用缺少效应子功能的拮抗剂抗-TIGIT抗体,其i) 阻断T_{regs}中的TIGIT信号传导,从而减少它们的免疫抑制活性,ii) 通过阻断TIGIT的抑制性效果,同时避免它们的效应子功能介导的耗尽,活化抗-肿瘤CD8⁺ T细胞,和iii) 通过允许DNAM结合否则会结合TIGIT的PVR(和通过减少直接TIGIT-DNAM相互作用),增强DNAM-介导的活化(Johnston *et al.* (2014) *CancerCell* 26:923)。

[0284] 在某些实施方案中,给予受试者抗-TIGIT抗体作为辅助疗法。相对于当前的护理标准,用抗-TIGIT抗体治疗具有癌症的受试者可导致长期持久反应;长期存活至少1, 2, 3, 4, 5, 10或更多年,无复发存活至少1, 2, 3, 4, 5,或10或更多年。在某些实施方案中,用抗-TIGIT抗体治疗具有癌症的受试者阻止癌症复发或延迟癌症复发达例如,1, 2, 3, 4, 5,或10或更多年。抗-TIGIT治疗可用作一线或二线治疗。

[0285] 本文所述的这些和其它方法在下文更详细地描述。

[0286] 癌症

通过抗-TIGIT抗体阻断通过TIGIT的PVR/Nectin-2信号传导可增强患者中对癌症细胞的免疫反应。本文提供了治疗具有癌症的受试者的方法,包括给予受试者本文所述的抗-TIGIT抗体,使得受试者被治疗,例如,使得癌性肿瘤的生长被抑制或减少,和/或肿瘤消退。抗-TIGIT抗体可单独用于抑制癌症肿瘤的生长。或者,抗-TIGIT抗体可与另一试剂,例如,其它免疫原性剂、标准癌症治疗或其它抗体组合使用,如下文所述。还提供了与PD-1的抑制剂,例如抗-PD-1或抗-PD-L1抗体的组合。

[0287] 因此,本文提供了例如,通过抑制受试者的肿瘤细胞生长治疗癌症的方法,包括给予受试者治疗有效量的本文所述的抗-TIGIT抗体,例如,15A6, 22G2, 11G11或10D7或其抗原-结合片段。抗体可以是人抗-TIGIT抗体(例如本文所述的任何人抗-huTIGIT抗体)或其可以是嵌合或人源化非-人抗-huTIGIT抗体,例如,嵌合或人源化抗-TIGIT抗体与至少一种本文所述的抗-TIGIT抗体竞争结合,或结合与至少一种本文所述的抗-TIGIT抗体相同的表位。

[0288] 其生长可使用本发明的抗体抑制的癌症包括通常对免疫疗法有响应的癌症。治疗的癌症的非限制性实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非NSCLC、胶质瘤、胃肠癌、肾癌(例如,透明细胞癌)、卵巢癌、肝癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌(例如,肾细胞癌(RCC))、前列腺癌(例如,激素难治性前列腺腺癌)、甲状腺癌、成神经细胞瘤、胰腺癌、成胶质细胞瘤(多形性成胶质细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌和头颈癌(或癌瘤)、胃癌、生殖细胞肿瘤、儿科肉瘤、鼻腔鼻窦天然杀伤(sinonasal natural killer)、黑素瘤(例如,转移性恶性黑素瘤,例如皮肤或眼内恶性黑素瘤)、骨癌、皮肤癌、子宫癌、肛门区的癌症、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状旁腺的癌症、肾上腺的癌症、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童的实体肿瘤、输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统的肿瘤(CNS)、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、

鳞状细胞癌、T-细胞淋巴瘤、环境诱导的癌症包括石棉诱导的癌症，病毒相关的癌症（例如，人乳头瘤病毒 (HPV) - 相关肿瘤）和源自两种主要的血液细胞谱系，即骨髓细胞系（其产生粒细胞、红细胞、血小板、巨噬细胞和肥大细胞）或淋巴细胞系（其产生B、T、NK和浆细胞）的任一种的血液系统恶性肿瘤，例如所有类型的白血病、淋巴瘤和骨髓瘤，例如，急性的、慢性的淋巴细胞性和/或骨髓性白血病，例如急性白血病 (ALL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 和慢性骨髓性白血病 (CML)，未分化的AML (M0)、成髓细胞白血病 (M1)、成髓细胞白血病 (M2；具有细胞成熟)、前髓细胞白血病 (M3或M3变体 [M3V])、骨髓单核细胞白血病 (M4或M4变体，含嗜酸性细胞 [M4E])、单核细胞白血病 (M5)、红细胞白血病 (M6)、成巨核细胞白血病 (M7)、分离的粒细胞肉瘤和绿色瘤；淋巴瘤，例如霍奇金淋巴瘤 (HL)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、B-细胞淋巴瘤、T-细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、单核细胞样B-细胞淋巴瘤、粘膜相关的淋巴组织 (MALT) 淋巴瘤、恶性（例如，Ki 1+）大细胞淋巴瘤、成年T-细胞淋巴瘤/白血病、套细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞T-细胞淋巴瘤、中心血管淋巴瘤、肠内T-细胞淋巴瘤、原发性纵隔B-细胞淋巴瘤、前体T-成淋巴细胞性淋巴瘤、T-成淋巴细胞性淋巴瘤/白血病 (T-Lbly/T-ALL)、外周T-细胞淋巴瘤、成淋巴细胞性淋巴瘤、移植后淋巴增殖性疾病、真性组织细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、成淋巴细胞性淋巴瘤 (LBL)、淋巴谱系的造血肿瘤、急性成淋巴细胞性白血病、弥漫性大B-细胞淋巴瘤、Burkitt淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性组织细胞淋巴瘤 (DHL)、免疫母细胞大细胞淋巴瘤、前体B-成淋巴细胞性淋巴瘤、皮肤T-细胞淋巴瘤 (CTLC)（亦称为蕈样肉芽肿病或Sezary综合征）和淋巴浆细胞样淋巴瘤 (LPL) 伴有Waldenstrom巨球蛋白血症；骨髓瘤，例如IgG骨髓瘤、轻链骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、郁积性骨髓瘤（亦称为无痛骨髓瘤）、单生浆细胞瘤和多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、毛细胞淋巴瘤；骨髓谱系的造血肿瘤、间充质来源的肿瘤，包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤；精原细胞瘤、畸胎癌、中枢和外周神经肿瘤，包括星形细胞瘤、神经鞘瘤；间充质来源的肿瘤，包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤；和其他肿瘤，包括黑素瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡性癌和畸胎癌、淋巴谱系的造血肿瘤例如T-细胞和B-细胞肿瘤，包括但不限于T-细胞疾病，例如T-前淋巴细胞性白血病 (T-PLL)，包括小细胞和脑形细胞类型；大颗粒状淋巴细胞白血病 (LGL)，优选地具有T-细胞类型；和T-NHL肝脾淋巴瘤；外周/后-胸腺T细胞淋巴瘤（多形和成免疫细胞亚型）；血管中心（鼻）T-细胞淋巴瘤；头颈癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌；急性骨髓性淋巴瘤，以及所述癌症的任何组合。本文所述的方法还可用于治疗转移性癌症、难治性癌症（例如，对之前的免疫疗法，例如，用阻断性CTLA-4或PD-1抗体治疗的癌症）和复发性癌症。

[0289] 抗-TIGIT抗体可作为单一疗法给予，或仅作为免疫刺激疗法给予，或在癌症疫苗策略中其可与免疫原性剂，例如癌症细胞、纯化的肿瘤抗原（包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子）或用编码免疫刺激性细胞因子的基因转染细胞组合（He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28）。可使用的肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑素瘤抗原的肽，例如肽gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶，或经转染以表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞。

[0290] 已设计了对肿瘤进行疫苗接种的许多实验策略（参见 Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000,

ASCO Educational Book Spring: 414–428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730–738; 亦参见Restifo, N. 和Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023–3043 in DeVita et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition)。在这些策略之一中, 使用自体或同种异体的肿瘤细胞制备疫苗。当肿瘤细胞被转导以表达GM-CSF时, 这些细胞疫苗已表明最有效。GM-CSF已表明是对于肿瘤疫苗接种的抗原呈递的有效激活物(Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3539–43)。

[0291] 在各种肿瘤中基因表达和大规模基因表达模式的研究已产生了所谓的肿瘤特异性抗原的定义(Rosenberg, S A (1999) *Immunity* 10: 281–7)。在许多情况下, 这些肿瘤特异性抗原是肿瘤和肿瘤产生的细胞中表达的分化抗原, 例如黑素细胞抗原gp100、MAGE抗原和Trp-2。更重要的是, 许多这些抗原可表明是宿主中发现的肿瘤特异性T细胞的靶标。TIGIT抑制可与肿瘤中表达的一系列重组蛋白和/或肽结合使用, 以产生对这些蛋白的免疫反应。这些蛋白正常被免疫系统视为自身抗原和因此耐受它们。肿瘤抗原可包括蛋白端粒酶, 其是合成染色体的端粒所需要的和其在超过85%的人癌症中和在仅有有限数量的体组织中表达(Kim et al. (1994) *Science* 266: 2011–2013)。因为体细胞突变改变蛋白序列或在两个不相关序列之间产生融合蛋白(即, Philadelphia染色体中的bcr-abl)或来自B细胞肿瘤的个体基因型, 肿瘤抗原也可以是癌症细胞中表达的“新-抗原”。

[0292] 其它肿瘤疫苗可包括来自涉及人癌症的病毒, 例如人乳头瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV和HCV)和卡波西疱疹肉瘤病毒(KHSV)的蛋白。可与TIGIT抑制结合使用的另一形式的肿瘤特异性抗原是自肿瘤组织本身分离的纯化的热休克蛋白(HSP)。这些热休克蛋白包含来自肿瘤细胞的蛋白片段, 和这些HSP在递送抗原呈递细胞以引发肿瘤免疫时高度有效(Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585–1588; Tamura et al. (1997) *Science* 278:117–120)。

[0293] 树突细胞(DC)是可用于引发抗原-特异性反应的有效的抗原呈递细胞。DC可离体产生和加载各种蛋白和肽抗原以及肿瘤细胞提取物(Nestle et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328–332)。DC还可通过遗传方式被转导以也表达这些肿瘤抗原。为免疫目的, DC已直接与肿瘤细胞融合(Kugler et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332–336)。作为接种方法, DC免疫可有效地与TIGIT阻断组合, 以活化(释放)更有效的抗-肿瘤反应。

[0294] TIGIT抑制还可与标准癌症治疗(例如, 手术、放射和化学疗法)组合。TIGIT抑制可有效地与化学治疗方案组合。在这些情况下, 减少给予的化学治疗剂的剂量是可能的(Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301–5304)。这样的组合的实例是抗-TIGIT抗体与达卡巴非组合来治疗黑素瘤。这样的组合的另一实例是抗-TIGIT抗体与白介素-2(IL-2)组合来治疗黑素瘤。组合使用TIGIT抑制和化学疗法的科学原理是细胞死亡, 其是大多数化学治疗化合物的细胞毒性作用的结果, 可导致抗原呈递途径中肿瘤抗原的水平增加。可通过细胞死亡导致与TIGIT抑制协同的其它组合疗法是放射、手术和激素剥夺。这些方案各自在宿主中产生肿瘤抗原的来源。血管发生抑制剂也可与TIGIT抑制组合。血管发生的抑制导致肿瘤细胞死亡, 其可提供肿瘤抗原进入宿主抗原呈递途径。

[0295] 本文所述的抗-TIGIT抗体还可与使表达Fc α 或Fc γ 受体的效应细胞靶向肿瘤细胞的双特异性抗体组合使用(参见例如, 美国专利号5,922,845和5,837,243)。双特异性抗体

可用于靶向两种单独的抗原。例如抗-Fc受体/抗肿瘤抗原(例如,Her-2/neu)双特异性抗体已用于使巨噬细胞靶向肿瘤位点。这种靶向可更有效地活化肿瘤特异性反应。这些反应的T细胞分支可通过抑制TIGIT而增强。或者,抗原可通过使用结合肿瘤抗原和树突细胞特异性细胞表面标记的双特异性抗体,直接递送至DC。

[0296] 肿瘤通过各种机制逃避宿主免疫监督。许多这些机制可通过失活由肿瘤表达的免疫抑制性蛋白克服。这些特别包括TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037–1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198–200) 和Fas配体(Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363–1365)。这些实体各自的抗体可用于与抗-TIGIT抗体组合以抵消免疫抑制剂的作用和有助于宿主的肿瘤免疫反应。

[0297] 活化宿主免疫反应的其它抗体可与抗-TIGIT抗体组合使用。这些包括树突细胞表面上的分子,其活化DC功能和抗原呈递。抗-CD40抗体能够有效地替代T细胞辅助活性(Ridge *et al.* (1998) *Nature* 393: 474–478)和可与抗-TIGIT抗体组合使用。T细胞共刺激性分子例如OX-40 (Weinberg *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160–2169)、CD137/4-1BB (Melero *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 682–685 (1997) 和ICOS (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397: 262–266)的活化抗体也可提供增加的T细胞活化水平。PD-1或PD-L1或CTLA-4 (例如,美国专利号5,811,097)的抑制剂也可与抗-TIGIT抗体组合使用。

[0298] 骨髓移植目前用于治疗造血来源的各种肿瘤。尽管移植物抗宿主病是这种治疗的结果,但治疗益处可获自移植物抗肿瘤反应。TIGIT抑制可用于增加供体移植的肿瘤特异性T细胞的功效。

[0299] 还存在若干实验治疗方案,包括离体活化和扩增抗原特异性T细胞和继承性转移这些细胞至受体,以刺激针对肿瘤的抗原-特异性T细胞(Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546–51)。这些方法也可用于活化对感染性病原例如CMV的T细胞反应。在抗-TIGIT抗体的存在下离体活化可增加继承性转移的T细胞的频率和活性。

[0300] 慢性病毒感染

在另一个方面,本文所述的发明提供了在受试者中治疗感染性疾病的方法,包括给予受试者抗-TIGIT抗体或其抗原-结合片段,使得受试者的感染性疾病被治疗。

[0301] 类似于上文所述的其对于肿瘤的应用,抗体-介导的TIGIT抑制可单独使用,或作为辅助剂与疫苗组合使用,以增强对病原体、毒素和自身抗原的免疫反应。这种治疗性方法可特别用于的病原体的实例包括但不限于,HIV、肝炎(A, B, & C)、流感、疱疹、贾第虫、疟疾、利什曼原虫、金黄色葡萄球菌、绿脓假单胞菌。TIGIT抑制可特别用于由病原例如HIV确立的感染,其在感染期间提供改变的抗原。这些新的表位在抗-人TIGIT抗体给予时作为外来物识别,因此引起强的T细胞反应。

[0302] 导致通过本文所述的方法可治疗的感染的病原性病毒的一些实例包括HIV、肝炎(A, B, 或C)、疱疹病毒(例如,VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, 和CMV, EB病毒)、腺病毒、流感病毒、黄病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV病毒、登革热病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病毒、JC病毒和虫媒病毒脑炎病毒。

[0303] 引起可通过本文所述方法治疗的感染的病原性细菌的一些实例包括衣原体、立克次氏体细菌、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、脑膜炎球菌和淋球菌、克雷伯菌、变形

杆菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团菌、白喉、沙门氏菌、杆菌、霍乱、破伤风、肉毒杆菌中毒、炭疽、瘟疫、钩端螺旋体病和莱姆病细菌。

[0304] 引起可通过本文所述方法治疗的感染的病原性真菌的一些实例包括假丝酵母(白色假丝酵母、克鲁斯假丝酵母、光滑假丝酵母、热带假丝酵母等)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、曲霉菌(烟曲霉、黑曲霉等)、毛霉菌属(*mucor, absidia, rhizopus*)、申克孢子丝菌(*Sporothrix schenkii*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)和*Histoplasma capsulatum*。

[0305] 引起可通过本文所述方法治疗的感染的病原性寄生虫的一些实例包括溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、结肠小袋虫(*Balantidium coli*)、*Naegleria fowleri*、棘阿米巴(*Acanthamoeba sp.*)、*Giardia lamblia*、隐孢子虫(*Cryptosporidium sp.*)、卡氏肺囊虫(*Pneumocystis carinii*)、*Plasmodium vivax*、果氏巴贝虫(*Babesia microti*)、布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、*Nippostrongylus brasiliensis*。

[0306] 在所有上述方法中,TIGIT抑制可与其它形式的免疫疗法例如细胞因子治疗(例如,干扰素、GM-CSF, G-CSF, IL-2)或双特异性抗体疗法组合,其提供增强的肿瘤抗原呈递(参见例如,Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123)。

[0307] 疫苗辅助剂

本文所述的抗-TIGIT抗体可通过共给与抗-TIGIT抗体与目的抗原(例如,疫苗),用于增强抗原-特异性免疫反应。因此,本文提供了提高对目的抗原的免疫反应的方法,包括给予受试者:(i)抗原;和(ii)抗-TIGIT抗体或其抗原-结合片段,使得在受试者中对抗原的免疫反应得到增强。抗原可以是例如,肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原或来自病原体的抗原。这样的抗原的非限制性实例包括上文论述的那些,例如上文论述的肿瘤抗原(或肿瘤疫苗),或来自上述病毒、细菌或其它病原体的抗原。

[0308] 在某些实施方案中,代替抗-TIGIT抗体或除了抗-TIGIT抗体之外,包含抗-TIGIT抗体所结合的表位的肽或融合蛋白用作疫苗。

[0309] 体内和体外给予本文所述的抗体组合物(例如,人单克隆抗体、多特异性和双特异性分子和免疫缀合物)的合适途径是本领域众所周知的和可由普通技术人员选择。例如,抗体组合物可通过注射给予(例如,静脉内或皮下)。使用的分子的合适剂量取决于受试者的年龄和体重和抗体组合物的浓度和/或制剂。

[0310] 如之前所述,本文所述的抗-TIGIT抗体可与一种或其它多种治疗剂,例如,细胞毒性剂、放射毒性剂或免疫抑制剂共给予。抗体可与试剂连接(作为免疫复合物)或可与试剂分开给予。在后一情况下(分开给予),抗体可在试剂之前、之后或同时给予,或可与其它已知的疗法,例如,抗-癌症疗法,例如,放射共给予。这样的治疗剂特别包括,抗-肿瘤剂,例如多柔比星(阿霉素)、顺铂、硫酸博来霉素、亚硝脲氮芥、苯丁酸氮芥、达卡巴嗪和环磷酰胺羟基脲,其本身仅在对患者为毒性或亚毒性的水平上有效。顺铂以100 mg/ml剂量静脉内给予,每四周一次,和阿霉素以60-75 mg/ml剂量静脉内给予,每21天一次。与化学治疗剂共给

予本文所述的抗-TIGIT抗体或其抗原结合片段,提供两种抗-癌症剂,其通过不同的机制起作用,产生对人肿瘤细胞的细胞毒性作用。这样的共给予可解决由于发生耐药性或肿瘤细胞的抗原性改变引起的问题,抗原性改变可赋予它们与抗体无反应。

[0311] 本文所述的范围内还包括包含本文所述的抗体组合物(例如,人抗体、双特异性或多特异性分子或免疫缀合物)和使用说明书的药剂盒。药剂盒可进一步包含至少一种另外的试剂,或本文所述的一种或多种另外的人抗体(例如,具有互补活性的人抗体,其结合不同于第一种人抗体的TIGIT抗原表位)。药剂盒通常包括标记,指示药剂盒内容物的预期用途。术语标记包括提供在药剂盒上或随药剂盒提供,或以其它方式连同药剂盒一起的任何书面或记录的材料。

[0312] **组合疗法**

除了上文提供的组合疗法,本文所述的抗-TIGIT抗体还可用于组合疗法,例如,用于治疗下文所述的癌症。

[0313] 本发明提供组合疗法的方法,其中抗-TIGIT抗体与一种或多种另外的试剂,例如有效刺激免疫反应从而进一步增强、刺激或上调受试者的免疫反应的抗体共给予。如实施例7中所示,和图5A和5B中所示,给予小鼠拮抗剂抗-TIGIT抗体和拮抗剂抗-PD-1抗体具有增强的抑制肿瘤生长的效果。

[0314] 通常,本文所述的抗-TIGIT抗体可与以下组合:(i) 共刺激受体的激动剂,和/或(ii) T细胞上抑制性信号的拮抗剂,其任一导致放大抗原-特异性T细胞反应(免疫检查点调节剂)。大多数共刺激和共抑制性分子是免疫球蛋白超家族(IgSF)的成员,和本文所述的抗-TIGIT抗体可与靶向IgSF家族的成员以增加免疫反应的试剂给予。结合共刺激或共-抑制性受体的膜结合配体的一个重要的家族是B7家族,其包括B7-1, B7-2, B7-H1(PD-L1), B7-DC(PD-L2), B7-H2(ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5(VISTA), 和B7-H6。结合共刺激或共-抑制性受体的膜结合配体的另一个家族是TNF家族的分子,其结合相关的TNF受体家族成员,包括CD40和CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137/4-1BB, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, 淋巴细胞毒素 α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, 淋巴细胞毒素 α 1B2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR(参见例如,Tansey (2009) *Drug Discovery Today* 00:1)。

[0315] T细胞活化还受可溶性细胞因子调节。因此,抗-TIGIT抗体可与以下组合使用:(i) 抑制T细胞活化的IgSF家族或B7家族或TNF家族的蛋白的拮抗剂(或抑制剂或阻断剂),或抑制T细胞活化的细胞因子(例如,IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF或其它免疫抑制性细胞因子)的拮抗剂,和/或(ii) IgSF家族、B7家族或TNF家族的刺激性受体或刺激T细胞活化的细胞因子的激动剂,用于刺激免疫反应,例如,用于治疗增殖性疾病,例如癌症。

[0316] 在一个方面,T细胞反应可通过本发明的抗-TIGIT mAb和以下一种或多种的组合刺激:(i) 抑制T细胞活化的蛋白的拮抗剂(例如,免疫检查点抑制剂),例如CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, Galectin-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectin-1, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, CD96(WO 2015/024060; Bernhardt et al. (2014) *Nat. Immunol.* 15:406)和TIM-4,和(ii) 刺激T细胞

活化的蛋白的激动剂,例如B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, CD40, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3和CD28H。

[0317] 调节上述蛋白之一和可与激动剂抗-TIGIT抗体(例如,本文描述的那些)组合用于治疗癌症的实例性的试剂包括:YERVOY®/ipilimumab或tremelimumab(对CTLA-4), galiximab(对B7.1), OPDIVO®/nivolumab/BMS-936558(对PD-1), pidilizumab/CT-011(对PD-1), KEYTRUDA®/pembrolizumab/MK-3475(对PD-1), AMP224(对B7-DC/PD-L2), BMS-936559(对B7-H1), MPDL3280A(对B7-H1), MEDI-570(对ICOS), AMG557(对B7H2), MGA271(对B7H3 - WO 11/109400), IMP321(对LAG-3), urelumab/BMS-663513和PF-05082566(对CD137/4-1BB), CDX-1127(对CD27), MEDI-6383和MEDI-6469(对OX40), RG-7888(对OX40L - WO 06/029879), Atacicept(对TACI), CP-870893(对CD40), lucatumumab(对CD40), dacetuzumab(对CD40), 和muromonab-CD3(对CD3)。

[0318] 可与拮抗剂抗-TIGIT抗体组合用于治疗癌症的其它分子包括NK细胞上的抑制性受体的拮抗剂或NK细胞上的活化受体的激动剂。例如,拮抗剂抗-TIGT抗体可与KIR的拮抗剂(例如,lirilumab)组合。

[0319] 用于组合疗法的其它试剂包括抑制或耗尽巨噬细胞或单核细胞的试剂,包括但不限于CSF-1R拮抗剂,例如CSF-1R拮抗剂抗体,包括RG7155(W011/70024, W011/107553, W011/131407, W013/87699, W013/119716, W013/132044)或FPA-008(W011/140249; W013169264; W014/036357)。

[0320] 通常,本文所述的拮抗剂抗-TIGIT抗体可与一种或多种以下试剂一起使用:连接阳性共刺激受体的激动剂、通过抑制性受体削弱信号传导的阻断剂,和系统增加抗-肿瘤T细胞的频率的一种或多种试剂,在肿瘤微环境内克服不同免疫抑制途径的试剂(例如,阻断抑制性受体接合(例如,PD-L1/PD-1相互作用),耗尽或抑制T_{regS}(例如,使用抗-CD25单克隆抗体(例如,daclizumab)或通过离体抗-CD25珠耗尽),抑制代谢酶例如IDO,或逆转/阻止细胞无效能或耗竭)和触发先天免疫活化和/或肿瘤位点的炎症的试剂。

[0321] 本文提供了刺激受试者的免疫反应的方法,包括给予受试者拮抗剂抗-TIGIT分子,例如,抗体,和一种或多种另外的免疫刺激抗体,例如PD-1拮抗剂,例如,拮抗剂抗体,PD-L1拮抗剂,例如,拮抗剂抗体,CTLA-4拮抗剂,例如,拮抗剂抗体和/或LAG3拮抗剂,例如,拮抗剂抗体,使得在受试者中的免疫反应得到刺激,例如以抑制肿瘤生长或刺激抗-病毒反应。在一个实施方案中,给予受试者拮抗剂抗-TIGIT抗体和拮抗剂抗-PD-1抗体。在一个实施方案中,给予受试者拮抗剂抗-TIGIT抗体和拮抗剂抗-PD-L1抗体。在一个实施方案中,给予受试者拮抗剂抗-TIGIT抗体和拮抗剂抗-CTLA-4抗体。在一个实施方案中,至少一种另外的免疫刺激抗体(例如,抗-PD-1, 抗-PD-L1, 抗-CTLA-4和/或抗-LAG3)是人抗体。或者,至少一种另外的免疫刺激抗体可以是例如,嵌合或人源化抗体,例如,自小鼠抗-PD-1、抗-PD-L1、抗-CTLA-4和/或抗-LAG3抗体制备。

[0322] 本文提供了治疗过度增殖性疾病(例如,癌症)的方法,包括给予受试者拮抗剂抗-TIGIT抗体和拮抗剂PD-1抗体。TIGIT和PD-1在黑素瘤中共表达(Chauvin *et al.* (2015) *J. Clin. Invest.* 125:2046),和还在来自非小细胞肺癌(NSCLC)和肾细胞癌(RCC)患者的CD8⁺ TILS上以相对高水平共表达。参见表2(显示对于来自数个患者的样品,作为总CD3⁺ CD8⁺ TILS的百分比的TIGIT⁺ / PD-1⁺细胞的百分比)。

[0323] 表2

癌症中TIGIT+ / PD-1+ TILS的百分比

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

在某些实施方案中,抗-TIGIT抗体以亚治疗剂量给予,抗-PD-1抗体以亚治疗剂量给予,或二者均以亚治疗剂量给予。本文还提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病有关的不良事件的方法,包括给予受试者抗-TIGIT抗体和亚治疗剂量的抗-PD-1抗体。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,抗-PD-1抗体是人序列单克隆抗体和抗-TIGIT抗体是人序列单克隆抗体,例如包含本文公开的抗体的CDR或可变区的抗体。

[0324] 在一个实施方案中,仅具有显示高表达的PVR和/或Nectin-2和高表达PD-L1的肿瘤的受试者被选择用本发明的抗-TIGIT抗体和PD-1拮抗剂组合治疗。在另一个实施方案中,具有显示高表达的PVR和/或Nectin-2但低表达PD-L1的肿瘤的受试者被选择用本发明的抗-TIGIT抗体单一疗法,或用并非PD-1拮抗剂的另一治疗剂的组合疗法。

[0325] 在其它实施方案中,本发明提供组合疗法,其中在用PD-1/PD-L1拮抗剂治疗后给予本发明的抗-TIGIT抗体。在一个实施方案中,仅在用PD-1/PD-L1拮抗剂治疗失败,导致不完全的治疗反应,或存在肿瘤复发或再发(本文称为“PD-1失败”)后,给予抗-TIGIT抗体。在进一步的实施方案中,筛选这样的PD-1失败中的肿瘤的PVR和/或Nectin-2表达,和仅具有高水平表达的那些用抗-TIGIT抗体治疗。

[0326] 用于本文所述方法的合适PD-1拮抗剂包括但不限于,配体、抗体(例如,单克隆抗体和双特异性抗体)和多价试剂。在一个实施方案中,PD-1拮抗剂是融合蛋白,例如,Fc融合蛋白,例如AMP-244。在一个实施方案中,PD-1拮抗剂是抗-PD-1或抗-PD-L1抗体。

[0327] 实例性的抗-PD-1抗体是OPDIVO®/nivolumab (BMS-936558) 或包含WO2006/121168中描述的抗体17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4和4A11之一的CDR或可变区的抗体。在某些实施方案中,抗-PD-1抗体是WO2012/145493中描述的MK-3475 (KEYTRUDA®/pembrolizumab/旧称1ambrrolizumab); WO 2012/145493中描述的AMP-514/MEDI-0680; 和CT-011 (pidilizumab; 之前的CT-AcTibody或BAT, 参见例如,Rosenblatt *et al.* (2011) *J. Immunotherapy* 34:409)。另外已知的PD-1抗体和其它PD-1抑制剂包括 WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, 美国专利号7,635,757和8,217,149, 和美国专利申请号 2009/0317368中描

述的那些。还可使用W02013/173223中公开的任何抗-PD-1抗体。与这些抗体之一竞争结合,和/或结合与这些抗体之一相同的PD-1表位的抗-PD-1抗体也可用于组合治疗。

[0328] 本文提供了治疗过度增殖性疾病(例如,癌症)的方法,包括给予受试者拮抗剂抗-TIGIT抗体和拮抗剂PD-L1抗体。在某些实施方案中,抗-TIGIT抗体以亚治疗剂量给予,抗-PD-L1抗体以亚治疗剂量给予,或二者均以亚治疗剂量给予。本文提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病相关的不良事件的方法,包括给予受试者抗-TIGIT抗体和亚治疗剂量的抗-PD-L1抗体。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,抗-PD-L1抗体是人序列单克隆抗体和抗-TIGIT抗体是人序列单克隆抗体,例如包含本文公开的抗体的CDR或可变区的抗体。

[0329] 在一个实施方案中,抗-PD-L1抗体是BMS-936559(在WO 2007/005874和美国专利号7,943,743中称为12A4),MSB0010718C(WO2013/79174),或包含公开于PCT公开号WO 07/005874和美国专利号7,943,743的3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7和13G4的CDR或可变区的抗体。在某些实施方案中,抗-PD-L1抗体是MEDI4736(亦称为抗-B7-H1)或MPDL3280A(亦称为RG7446)。还可使用公开于W02013/173223,W02011/066389, W02012/145493, 美国专利号 7,635,757和8,217,149和美国公开号2009/145493的任何抗-PD-L1抗体。与任何这些抗体竞争和/或结合与任何这些抗体相同的表位的抗-PD-L1抗体也可用于组合治疗。

[0330] 在又一实施方案中,本发明的激动剂抗-huCD40抗体与PD-1/PD-L1信号传导的拮抗剂,例如PD-1拮抗剂或PD-L1拮抗剂组合,并与第三种免疫治疗剂组合。在一个实施方案中第三种免疫治疗剂是GITR拮抗剂或OX-40拮抗剂,例如本文公开的抗-GITR或抗-OX40抗体。

[0331] 在另一个方面,免疫肿瘤剂是GITR激动剂,例如激动性GITR抗体。合适的GITR抗体包括例如,BMS-986153, BMS-986156, TRX-518(WO 06/105021, WO 09/009116)和MK-4166(WO 11/028683)。

[0332] 在另一个方面,免疫肿瘤剂是IDO拮抗剂。合适的IDO拮抗剂包括例如, INCB-024360(WO 2006/122150, WO 07/75598, WO 08/36653, WO 08/36642), indoximod或NLG-919(WO 09/73620, WO 09/1156652, WO 11/56652, WO 12/142237)。

[0333] 本文提供了治疗过度增殖性疾病(例如,癌症)的方法,包括给予受试者本文所述的抗-TIGIT抗体和CTLA-4拮抗剂抗体。在某些实施方案中,抗-TIGIT抗体以亚治疗剂量给予,抗-CTLA-4抗体以亚治疗剂量给予,或二者均以亚治疗剂量给予。本文提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病有关的不良事件的方法,包括给予受试者抗-TIGIT抗体和亚治疗剂量的抗-CTLA-4抗体。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,抗-CTLA-4抗体是选自以下的抗体: YERVOY®(ipilimumab或抗体10D1,描述于PCT公开号WO 01/14424), tremelimumab(旧称ticilimumab, CP-675,206)和描述于以下公开的抗-CTLA-4抗体: WO 98/42752; WO 00/37504; 美国专利号6,207,156; Hurwitz *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071; Camacho *et al.* (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Abstract No. 2505(抗体CP-675206); 和Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304。还可使用W02013/173223中公开的任何抗-CTLA-4抗体。

[0334] 本文提供了治疗过度增殖性疾病(例如,癌症)的方法,包括给予受试者抗-TIGIT抗体和抗-LAG-3抗体。在进一步的实施方案中抗-TIGIT抗体以亚治疗剂量给予,抗-LAG-3抗体以亚治疗剂量给予,或二者均以亚治疗剂量给予。本文提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病有关的不良事件的方法,包括给予受试者抗-TIGIT抗体和亚治疗剂量的抗-LAG-3抗体。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,抗-LAG-3抗体是人序列单克隆抗体和抗-TIGIT抗体是人序列单克隆抗体,例如包含本文公开的抗体的CDR或可变区的抗体。抗-LAG3抗体的实例包括包含描述于美国专利申请号 US2011/0150892和 WO2014/008218的抗体25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2或17E5的CDR或可变区的抗体。在一个实施方案中,抗-LAG-3抗体是BMS-986016。可使用的本领域公认的其它抗-LAG-3抗体包括描述于US 2011/007023的IMP731。也可使用IMP-321。与任何这些抗体竞争和/或结合与任何这些抗体相同的表位的抗-LAG-3抗体也可用于组合治疗。

[0335] 给予本文所述的抗-TIGIT抗体和针对一种或多种第二靶抗原例如LAG-3和/或CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1的拮抗剂,例如,拮抗剂抗体,可增强对患者的癌细胞的免疫反应。其生长可使用本公开内容的抗体抑制的癌症包括通常对免疫疗法有响应的癌症。用本公开内容的组合疗法治疗的癌症的代表性实例包括上文特别列出的在用抗-TIGIT抗体的单一疗法中论述的那些癌症。

[0336] 在某些实施方案中,本文所述的治疗性抗体的组合可作为在药学上可接受的载体中的单一组合物同时给予,或作为以抗体分别在药学上可接受的载体中的分开的组合物同时给予。在另一个实施方案中,治疗性抗体的组合可序贯给予。例如,抗-CTLA-4抗体和抗-TIGIT抗体可序贯给予,例如首先给予抗-CTLA-4抗体,其次给予抗-TIGIT抗体,或首先给予抗-TIGIT抗体,其次给予抗-CTLA-4抗体。另外或备选地,抗-PD-1抗体和抗-TIGIT抗体可序贯给予,例如首先给予抗-PD-1抗体,其次给予抗-TIGIT抗体,或首次给予抗-TIGIT抗体,其次给予抗-PD-1抗体。另外或备选地,抗-PD-L1抗体和抗-TIGIT抗体可序贯给予,例如首先给予抗-PD-L1抗体,其次给予抗-TIGIT抗体,或首先给予抗-TIGIT抗体,其次给予抗-PD-L1抗体。另外或备选地,抗-LAG-3抗体和抗-TIGIT抗体可序贯给予,例如首先给予抗-LAG-3抗体,其次给予抗-TIGIT抗体,或首先给予抗-TIGIT抗体,其次给予抗-LAG-3抗体。

[0337] 此外,如果超过一个剂量的组合疗法序贯给予,序贯给予的顺序可在每个给予时间点逆转或保持相同的顺序,序贯给予可与同时给予组合,或其任何组合。例如首次给予组合抗-CTLA-4抗体和抗-TIGIT抗体可以是同时的,第二次给予可以序贯的,其中首先给予抗-CTLA-4抗体和其次给予抗-TIGIT抗体,和第三次给予可以是序贯的,其中首先给予抗-TIGIT抗体和其次给予抗-CTLA-4抗体等等。另外或备选地,首次给予组合抗-PD-1抗体和抗-TIGIT抗体可以是同时的,第二次给予可以是序贯的,其中首先给予抗-PD-1抗体和其次给予抗-TIGIT抗体,和第三次给予可以是序贯的,其中首先给予抗-TIGIT抗体和其次给予抗-PD-1抗体等等。另外或备选地,首次给予组合抗-PD-L1抗体和抗-TIGIT抗体可以是同时的,第二次给予可以是序贯的,其中首先给予抗-PD-L1抗体和其次给予抗-TIGIT抗体,和第三次给予可以是序贯的,其中首先给予抗-TIGIT抗体和其次给予抗-PD-L1抗体等等。另外或备选地,首次给予组合抗-LAG-3抗体和抗-TIGIT抗体可以是同时的,第二次给予可以是序贯的,其中首先给予抗-LAG-3抗体和其次给予抗-TIGIT抗体,和第三次给予可以是序贯的,其中首先给予抗-TIGIT抗体和其次给予抗-LAG-3抗体等等。另一代表性的给药方案可

包括首次给予是序贯的,其中首先给予抗-TIGIT和其次给予抗-CTLA-4抗体(和/或抗-PD-1抗体和/或抗-PD-L1抗体和/或抗-LAG-3抗体),和后续的给予可以是同时的。

[0338] 任选地,抗-TIGIT作为单独的免疫治疗剂,或抗-TIGIT抗体和一种或多种另外的免疫治疗性抗体(例如,抗-CTLA-4和/或抗-PD-1和/或抗-PD-L1和/或抗-LAG-3阻断)的组合可进一步与免疫原性剂,例如癌细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子)、细胞和用编码免疫刺激细胞因子的基因转染的细胞(He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28)组合。可使用的肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑素瘤抗原的肽,例如肽gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶,或经转染以表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞(下文进一步论述)。TIGIT抑制剂和一种或多种另外的抗体(例如,CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断)还可进一步与标准癌症治疗组合。例如,TIGIT抑制剂和一种或多种另外的抗体(例如,CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断)可有效地与化学治疗方案组合。在这些情况下,有可能减少与本公开内容的组合给予的其它化学治疗剂剂量(Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304)。这样的组合的实例是抗-TIGIT激动剂抗体与或不与另外的抗体(例如抗-CTLA-4抗体和/或抗-PD-1抗体和/或抗-PD-L1抗体和/或抗-LAG-3抗体)的组合进一步与达卡巴非组合以治疗黑素瘤。另一实例是抗-TIGIT抗体与或不与抗-CTLA-4抗体和/或抗-PD-1抗体和/或抗-PD-L1抗体和/或LAG-3抗体的组合进一步与白介素-2(IL-2)组合以治疗黑素瘤。组合使用TIGIT抑制和CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断以及化学疗法的科学原理是细胞死亡,其是大多数化学治疗化合物的细胞毒性作用的结果,可导致抗原呈递途径中肿瘤抗原的水平增加。可导致通过细胞死亡的含或不含CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断的组合TIGIT抑制的协同性的其它组合疗法包括放射、手术或激素剥夺。这些方案各自在宿主中产生肿瘤抗原的来源。血管发生抑制剂还可与组合的TIGIT抑制和CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断组合。血管发生的抑制导致肿瘤细胞死亡,其可以是提供给宿主抗原呈递途径的肿瘤抗原的来源。

[0339] 抗-TIGIT拮抗剂抗体作为单独的免疫治疗剂,或TIGIT拮抗剂和CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断抗体的组合还可用于与使表达Fc α 或Fc γ 受体的效应细胞靶向肿瘤细胞的双特异性抗体组合(参见例如,美国专利号5,922,845和5,837,243)。双特异性抗体可用于靶向两种独立的抗原。这些反应的T细胞分支将通过使用组合的TIGIT抑制和CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断而增强。

[0340] 在另一个实例中,抗-TIGIT拮抗剂抗体作为单独的免疫治疗剂或抗-TIGIT抗体和另外的免疫刺激剂例如,抗-CTLA-4抗体和/或抗-PD-1抗体和/或抗-PD-L1抗体和/或LAG-3剂例如抗体的组合,可用于与抗-肿瘤抗体,例如RITUXAN[®](利妥昔单抗), HERCEPTIN[®](曲妥单抗), BEXXAR[®](tositumomab), ZEVALIN[®](ibritumomab), CAMPATH[®](阿仑单抗), LYMPHOCIDE[®](eprtuzumab), AVASTIN[®](bevacizumab), 和TARCEVA[®](erlotinib)等组合。例如,并不希望受理论的束缚,用抗-癌症抗体或与毒素缀合的抗-癌症抗体治疗可导致癌细胞死亡(例如,肿瘤细胞),其可加强免疫刺激剂例如,TIGIT, CTLA-4, PD-1, PD-L1或LAG-3剂例如抗体介导的免疫反应。在实例性的实施方案中,过度增殖性疾病(例如,癌症肿瘤)的治疗可包括抗癌剂,例如抗体,与抗-TIGIT和任选地另外的免疫刺激剂,例如,抗-CTLA-4和/或抗-PD-1和/或抗-PD-L1和/或抗-LAG-3剂例如抗体组合,同时或序贯或其

任何组合,其可加强宿主的抗-肿瘤免疫反应。

[0341] 肿瘤通过各种机制逃脱宿主免疫监督。许多这些机制可通过失活肿瘤表达的和是免疫抑制性的蛋白而克服。这些特别包括TGF- β (Kehrl *et al.* (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037–1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198–200) 和Fas配体(Hahne *et al.* (1996) *Science* 274: 1363–1365)。这些实体各自的抗体可进一步与抗-TIGIT抗体,含或不含另外的免疫刺激剂,例如,抗-CTLA-4和/或抗-PD-1和/或抗-PD-L1和/或抗-LAG-3剂例如抗体组合,以抵消免疫抑制剂的作用和有助于宿主的抗-肿瘤免疫反应。

[0342] 可用于活化宿主免疫反应的其它试剂,例如抗体,可进一步与抗-TIGIT抗体,含或不含另外的免疫刺激剂,例如抗-CTLA-4和/或抗-PD-1和/或抗-PD-L1和/或抗-LAG-3抗体组合使用。这些包括树突细胞表面上的分子,其活化DC功能和抗原呈递。抗-CD40抗体(Ridge *et al.*, 同上)可与抗-TIGIT抗体和任选地另外的免疫刺激剂,例如,抗-CTLA-4和/或抗-PD-1和/或抗-PD-L1和/或抗-LAG-3剂例如抗体组合使用。T细胞共刺激分子OX-40 (Weinberg *et al.* (2000) *Immunol* 164:2160–2169), CD137/4-1BB (Meleiro *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3:682–685 (1997) 和ICOS (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397:262–266) 的其它活化抗体也可提供增加的T细胞活化的水平。

[0343] 如上所述,骨髓移植目前用于治疗造血来源的各种肿瘤。抗-TIGIT免疫疗法单独或与CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断组合可用于增加供体移植的肿瘤特异性T细胞的效力。

[0344] 几种实验治疗方案包括离体活化和扩增抗原特异性T细胞和继承性转移这些细胞至受体,以针对肿瘤的抗原-特异性T细胞(Greenberg & Ridde11, 同上)。这些方法还可用于活化对感染性病原例如CMV的T细胞反应。在存在抗-TIGIT,含或不含另外的免疫刺激疗法,例如,抗-CTLA-4和/或抗-PD-1和/或抗-PD-L1和/或抗-LAG-3抗体时离体活化可预期增加继承性转移的T细胞的频率和活性。

[0345] 本文提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病(例如,癌症)有关的不良事件的方法,包括给予受试者抗-TIGIT抗体,含或不含亚治疗剂量的抗-CTLA-4和/或抗-PD-1和/或抗-PD-L1和/或抗-LAG-3剂,例如抗体。例如,本文所述的方法提供通过给予患者不可吸收的类固醇,减少免疫刺激治疗性抗体-诱导的结肠炎或腹泻的发生率的方法。如本文所用的,“不可吸收的类固醇”是糖皮质激素,其显示广泛的首过代谢,使得在肝中代谢后,类固醇的生物利用率低,即,小于约20%。在本文所述的一个实施方案中,不可吸收的类固醇是布地奈德。布地奈德是一种局部起作用的糖皮质激素,在口服给予后其广泛代谢,主要在肝中。ENTOCORT EC[®] (Astra-Zeneca) 是一种pH-和时间-依赖性的布地奈德口服制剂,其经开发以优化药物递送至回肠和通过整个结肠。ENTOCORT EC[®] 在美国获得批准用于治疗轻度至中度的克罗恩病,涉及回肠和/或上行结肠。ENTOCORT EC[®] 治疗克罗恩病的常用口服剂量是6–9 mg/天。ENTOCORT EC[®] 在肠中释放,然后被吸收和保留在肠粘膜中。一旦其通过肠粘膜靶组织,ENTOCORT EC[®] 被肝中的细胞色素P450系统广泛代谢成代谢物,具有可忽略的糖皮质激素活性。因此,生物利用率低(约10%)。与具有较不广泛的首过代谢的其它糖皮质激素相比,布地奈德的低生物利用率导致改进的治疗率。布地奈德导致比系统作用的糖皮质激素更少的副作用,包括更少的下丘脑-脑垂体抑制。然而,长期给予ENTOCORT EC[®] 可导致

系统糖皮质激素作用,例如肾上腺功能亢进和肾上腺抑制。参见PDR 58th ed. 2004; 608-610。

[0346] 在还进一步的实施方案中,TIGIT抑制含或不含CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断(即,免疫刺激治疗性抗体抗-TIGIT和任选地抗-CTLA-4和/或抗-PD-1和/或抗-PD-L1和/或抗-LAG-3抗体)与不可吸收的类固醇组合,可进一步与水杨酸酯组合。水杨酸酯包括5-ASA试剂,例如:sulfasalazine (AZULFIDINE[®], Pharmacia & UpJohn); olsalazine (DIPENTUM[®], Pharmacia & UpJohn); balsalazide (COLAZAL[®], Salix Pharmaceuticals, Inc.); 和mesalamine (ASACOL[®], Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA[®], Shire US; CANASA[®], Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA[®], Solvay)。

[0347] 根据本文所述的方法,水杨酸酯与抗-TIGIT含或不含抗-CTLA-4和/或抗-PD-1和/或抗-PD-L1和/或LAG-3抗体和不可吸收的类固醇组合给予可包括水杨酸酯和不可吸收的类固醇的任何重叠或序贯给予,以减少由免疫刺激抗体诱导的结肠炎的发生率。因此,例如,减少由本文所述的免疫刺激抗体诱导的结肠炎的发生率的方法包括同时或序贯给予水杨酸酯和不可吸收的类固醇(例如,在不可吸收的类固醇后6小时给予水杨酸酯),或其任何组合。此外,水杨酸酯和不可吸收的类固醇可通过相同的途径给予(例如,都经口给予)或通过不同的途径给予(例如,水杨酸酯经口给予和不可吸收的类固醇直肠给予),其可不同于用于给予抗-TIGIT和抗-CTLA-4和/或抗-PD-1和/或抗-PD-L1和/或抗-LAG-3抗体的途径。

[0348] 本文所述的抗-TIGIT抗体和组合抗体疗法还可与为它们针对治疗的适应症(例如,癌症)的特定用处而选择的其它众所周知的疗法组合使用。本文所述的抗-TIGIT抗体的组合可与已知的药学上可接受的试剂序贯使用。

[0349] 例如,本文所述的抗-TIGIT抗体和组合抗体疗法可与另外的治疗组合使用(例如,同时或分开),例如放射、化学疗法(例如,使用喜树碱(CPT-11)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、顺铂、多柔比星、依立替康、紫杉醇、吉西他滨、顺铂、紫杉醇、卡铂-紫杉醇(Taxol),多柔比星、5-fu或喜树碱+ apo2l/TRAIL (a 6X combo)),一种或多种蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米或MG132),一种或多种Bcl-2抑制剂(例如,BH3I-2' (bc1-x1抑制剂),吲哚胺双加氧酶-1(IDO1)抑制剂(例如,INCB24360),AT-101 (R-(--)-棉酚衍生物),ABT-263 (小分子),GX-15-070 (obatoclax)或MCL-1 (骨髓白血病细胞分化蛋白-1)拮抗剂,iAP (细胞凋亡蛋白的抑制剂)拮抗剂(例如,smac7, smac4, 小分子smac模拟物, 合成的smac肽(参见Fulda et al., Nat Med 2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308)或AEG-35156 (GEM-640)), HDAC (组蛋白脱乙酰基酶)抑制剂,抗-CD20抗体(例如,利妥昔单抗),血管发生抑制剂(例如,贝伐单抗),靶向VEGF和VEGFR的抗-血管发生剂(例如,AVASTIN[®]),合成的三萜类(参见Hyer et al., Cancer Research 2005;65:4799-808),c-FLIP (细胞FLICE-抑制蛋白)调节剂(例如,PPAR γ (过氧化物酶体增殖子-活化受体 γ)的天然和合成配体,5809354或5569100),激酶抑制剂(例如,Sorafenib),曲妥单抗,西妥昔单抗,Temsirolimus, mTOR抑制剂例如雷帕霉素和temsirolimus,Bortezomib, JAK2抑制剂,HSP90抑制剂,PI3K-AKT抑制剂,Lenalidomide,GSK3 β 抑制剂,IAP抑制剂和/或遗传毒性药物。

[0350] 本文所述的抗-TIGIT抗体和组合抗体疗法可进一步与一种或多种抗-增殖细胞毒

性剂组合使用。可用作抗-增殖细胞毒性剂的化合物的类型包括但不限于以下：

烷基化剂(包括但不限于,氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸酯、硝基脲和三嗪) :Uracil mustard、氮芥、环磷酰胺(CYTOXANTM) fosfamide、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、曲他胺、三亚乙基硫代磷酸胺、白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、链佐星、达卡巴韦和替莫唑胺。

[0351] 抗代谢物(包括但不限于叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂) :甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、磷酸氟达拉滨、Pentostatine和吉西他滨。

[0352] 与拮抗剂抗-TIGIT抗体组合的合适的抗-增殖剂包括但不限于,紫杉烷类, 紫杉醇(紫杉醇作为TAXOL™市售可得), 多西他赛, discodermolide (DDM), dictyostatin (DCT), Peloruside A, epothilones, epothilone A, epothilone B, epothilone C, epothilone D, epothilone E, epothilone F, furanoepothilone D, desoxyepothilone B1, [17]-脱氢脱氧epothilone B, [18]脱氢脱氧epothilones B, C12,13-环丙基-epothilone A, C6-C8桥接epothilone A, 反式-9,10-脱氢epothilone D, 顺式-9,10-脱氢epothilone D, 16-脱甲基epothilone B, epothilone B10, discoderomolide, patupilone (EP0-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (Discodermolide), TZT-1027 (sobidotin), ILX-651 (tasidotin hydrochloride), Halichondrin B, 甲磺酸艾日布林(E-7389), Hemiasterlin (HTI-286), E-7974, Cyptophycins, LY-355703, Maytansinoid免疫缀合物(DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (ispinesib), SB-743921, MK-0731, STA-5312, eleutherobin, 17 β -乙酰氨基-2-乙氨基-6-氨基-B-同型-雌-1,3,5(10)-三烯-3-醇, cyclostreptin, isolaulimalide, laulimalide, 4-表-7-脱羟基-14,16-二去甲基-(+)-discodermolides和cryptothilone 1,以及本领域已知的其它微管稳定剂。

[0353] 在结合用本文所述的抗-TIGIT抗体治疗或其之前需要使异常增殖细胞休眠的情况下,激素和类固醇(包括合成的类似物),例如17a-炔雌醇、己烯雌酚、睾酮、泼尼松、氟甲睾酮、Dromostanolone propionate、睾内酯、Megestrol acetate, 甲泼尼龙, 甲基-睾酮, 泼尼松龙, 曲安西龙, 氯烯雌醚, 羟孕酮, 氨鲁米特, 雌莫司汀, Medroxyprogesterone acetate, 亮丙瑞林, 氟他胺, 托瑞米芬, ZOLADEX™也可给予患者。当使用本文所述的方法或组合物时,在临床条件下用于调节肿瘤生长或转移的其它试剂,例如抗模拟物,也可按需要给予。

[0354] 用于安全和有效给予化学治疗剂的方法是本领域技术人员已知的。此外,它们的给予描述于标准文献中。例如,许多化学治疗剂的给予描述于Physicians' Desk Reference (PDR), 例如,1996年版本(Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); 其公开内容通过引用结合到本文中。

[0355] 化学治疗剂和/或放射疗法可根据本领域众所周知的治疗方案给予。本领域技术人员应理解,化学治疗剂和/或放射疗法的给予可根据治疗的疾病和化学治疗剂和/或放射疗法对疾病的已知效果而改变。此外,根据熟练临床医师的知识,治疗方案(例如,给予的剂量和次数)可根据给予的治疗剂对患者的观察到的效果和根据疾病对给予的治疗剂的观察到的反应而改变。

[0356] 患者选择

在本发明的各种实施方案中，在用本发明的抗-TIGIT抗体治疗之前，测试患者以确定他们是否可能对抗-TIGIT疗法有响应，和仅显示与治疗反应有关的特征的那些患者被治疗。可测量与TIGIT途径有关的蛋白的表达，包括TIGIT， DNAM， PVR， Nectin-2， 可溶性PVR (sPVR) 和可溶性Nectin-2 (sNectin-2) 或其组合。PVR和Nectin-2 mRNA均在大多数人肿瘤中高表达。参见实施例9和图6A。在一个实施方案中，sPVR和/或sNectin-2在人血清中检测，例如通过ELISA，其中升高的sPVR和/或sNectin-2水平指示具有癌症的受试者可能对用本发明的抗-TIGIT抗体的治疗有响应。

[0357] 在一些实施方案中，筛选来自患者的样品中T细胞上DNAM-1的表达，以选择最可能对抗-TIGIT疗法有响应的患者，其中T细胞或NK细胞上DNAM-1的存在表明在抗-TIGIT疗法时，例如，用本发明的抗-huTIGIT抗体或片段治疗，患者将具有有益的抗-肿瘤反应；和在T细胞或NK细胞上缺少DNAM-1鉴定较不可能获益于抗-TIGIT疗法的患者。在其它实施方案中，筛选来自患者的样品中肿瘤细胞或肿瘤-侵润骨髓细胞上PVR和/或Nectin-2/CD112的表达，以选择最可能对抗-TIGIT疗法有响应的患者，其中肿瘤细胞或肿瘤-侵润骨髓细胞上PVR和/或Nectin-2/CD112的存在表明在抗-TIGIT疗法时，例如，用本发明的抗-huTIGIT抗体或片段治疗，患者将具有有益的抗-肿瘤反应；和在肿瘤细胞或肿瘤-侵润骨髓细胞上缺少PVR和/或Nectin-2/CD112鉴定较不可能获益于抗-TIGIT疗法的患者。

[0358] 在一个实施方案中，在考虑用于本发明的抗-TIGIT抗体治疗的受试者中，测量可溶性PVR和/或Nectin-2的水平，和仅显示升高的可溶性PVR和/或Nectin-2的受试者用抗体治疗。例如，高可溶性PVR和/或Nectin-2可用作患者选择生物标记物。

[0359] 如果肿瘤细胞表达升高水平的PVR和/或Nectin-2，以及如果这样的肿瘤具有高水平的侵润TIGIT⁺ CD8⁺ T细胞，则肿瘤类型，和个体受试者中的肿瘤最可能对用本发明的抗-TIGIT抗体有响应。

[0360] 本公开内容在以下实施例中进一步说明，其不应解释为进一步限制。本申请中引用的所有附图和所有参考文献、Genbank序列、专利和公开的专利申请的内容通过引用明确结合到本文中。特别是，PCT公开号W0 09/045957， W0 09/073533， W0 09/073546， WO 09/054863和PCT/US2013/072918和美国专利申请号2011/0150892的公开内容通过引用明确结合到本文中。

实施例

[0361] 实施例1

抗-huTIGIT抗体的产生

人抗-huTIGIT单克隆抗体使用表达人抗体基因的转基因小鼠，如下产生。

[0362] 抗原

huTIGIT可溶性重组蛋白用作免疫的抗原。可溶性融合蛋白具有40.7 kD的MW和包含huTIGIT的细胞外部分，在其C-末端与小鼠IgG2a Fc连接。这种融合蛋白在本文被称为“huTIGIT-muFc融合蛋白”。融合蛋白通过标准重组DNA方法发生，和在转染的CHO细胞中表达，所述细胞分泌可溶性融合蛋白至培养上清液。用于转染的CHO宿主细胞获自Invitrogen (Cat #11619-012)。分泌的可溶性融合蛋白经纯化用作免疫原。包括信号序列的全长人TIGIT的序列提供在SEQ ID NO: 1。

[0363] 转基因小鼠

人TIGIT的全人单克隆抗体使用来自CHD**; CKD2**; CMD++; JKD++; KCo5 (9272) +⁺; SC20+基因型的小鼠(下文称为KM[®]小鼠)制备。各个转基因名称在括号中,接着随机整合转基因的品系号。符号++和+表示纯合子或半合子;然而因为小鼠使用基于PCR的测定法常规筛选,所述测定法不允许我们对随机整合的人Ig转基因区分杂合性和纯合性,因此+标记可给予对于这些元件实际上是纯合的小鼠。在此品系中,内源小鼠κ轻链基因已被纯合子地破坏,如Chen et al. (1993) *EMBO J.* 12:811–820中所述,和内源小鼠重链基因已被纯合子地破坏,如WO 2001/09187的实施例1中所述。此外,该小鼠品系带有人κ轻链转基因,KCo5,如Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845–851中所述;带有大部分人κ轻链基因座的酵母人工染色体(YAC),如WO 2000/026373中所述。

[0364] 小鼠的免疫

为了产生人TIGIT的全人单克隆抗体,KM小鼠用纯化的huTIGIT-muFc融合蛋白免疫。通用免疫方案描述于Lonberg, N. et al (1994) *Nature* 368 (6474) : 856–859; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845–851和WO 98/24884。在首次输注抗原时小鼠大约4月龄。纯化的重组huTIGIT-muFc抗原制备物(自表达融合蛋白的转染的哺乳动物细胞纯化的10 μg)或用人TIGIT转染的300–19细胞用于腹膜内和皮下免疫小鼠。免疫原与RIBI佐剂(Sigma Cat#M6536)1:1混合。

[0365] 小鼠以5–7天间隔免疫5次。首次和第二次免疫用重组蛋白进行。第三次免疫用细胞,第四次免疫用蛋白和第五次免疫用细胞进行。最后一次免疫后一周,将小鼠放血以评价抗原特异性效价。免疫反应通过后眼眶采血监测。通过FACS分析使用转染的300–19细胞筛选血浆,和对抗-人TIGIT人IgG具有最高效价的小鼠用于融合。通过在处死和取出脾脏前静脉内(IV)和腹膜内(IP)注射可溶性抗原(2天)和转染的细胞(3天),小鼠接受最后一次加强免疫。

[0366] 产生人TIGIT的人单克隆抗体的杂交瘤的产生

自高效价KM小鼠分离的小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤融合配对细胞用基于电场的电融合,使用Cyto Pulse大室细胞融合电穿孔仪(Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD)融合。来自免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液与等量的P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580)非分泌小鼠骨髓瘤细胞融合(融合号:2541)。产生的细胞以2.0 x 10⁴个细胞/孔在包含高葡萄糖(Cellegro #10-013-CM)和10%胎牛血清(Hyclone #SH30071.03)并补充有β-巯基乙醇(1000X, Gibco #21985-023)、7 mM HEPES (Cellegro 25-060-C1)、另外的2 mM L-谷氨酰胺(Cellegro 25-005-C1)、HAT (50X, Sigma #H-0262)、5%杂交瘤克隆因子(BioVeris #210001)、10% P388DI (ATCC #CRL TIB-63)条件培养基和青霉素-链霉素(100x, Cellegro #30-002-C1)的选择性DMEM培养基中置于平底微量滴定板中。约7天后,包含HAT的一些培养基被包含HT (Cellegro #25-047-C1)的培养基替换。

[0367] 10–12天后,使用均质HTRF测定法,筛选各个孔中人IgG/人κ轻链抗体的存在。在该测定法中,来自96孔融合板的上清液与铕-穴状化合物标记的山羊抗-人IgG (Fc片段特异性的)、生物素化的山羊抗-人κ轻链(Bethyl #A80-115B)、链霉亲和素-XLent混合,和孵育1小时。然后将板在RUBYstar读出仪中读数。

[0368] 来自对人IgG/人κ轻链或人IgG/人λ轻链抗体阳性的孔的杂交瘤细胞然后通过

FACS使用用人TIGIT转染的300-19细胞和300-19未转染细胞作为对照进行筛选。将FACS阳性亲本系转移至24孔板。几天后，来自各孔的细胞上清液通过FACS再次筛选以证实IgG对人TIGIT的特异性。

[0369] 杂交瘤通过连续稀释克隆和通过FACS再筛选。选择36种抗体用于扩增和纯化。随后选择4种抗体(15A6, 22G2, 11G11, 10D7)用于测序和进一步分析。

[0370] 实施例2

抗-huTIGIT抗体与可溶性人TIGIT的结合

抗-huTIGIT抗体与可溶性人TIGIT的结合通过BIACORE[®]表面等离子体共振(SPR)分析测定。抗-huTIGIT抗体在人κ包被的芯片上捕获(~5KRUs; Southernbiotech cat#2060-01)和重组人TIGIT(rhTIGIT/Fc)以浓度500 nM, 250 nM, 125 nM, 62 nM和31 nM流过芯片。mAb/体积的捕获浓度为2-40 μg/mL (5 μL, 10 μL/min)。抗原结合时间为5分钟, 15 μL/min, 抗原离解时间为6分钟, 和用50 mM HCl/50 mM NaOH (各自12 μL, 100 μL/min)进行再生。结果显示在表3中。

[0371] 表3 抗-huTIGIT mAbs与人TIGIT的结合

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

10C9	1.52	29.4	194
8C8	0.582	33.1	568

抗体14B2, 19H2和26D8的结合太弱而不能可靠地测量。

[0372] 表3显示的初步结合常数测定用于帮助选择抗-huTIGIT抗体以进一步研究。亚克隆和纯化的抗体15A6和22G2的结合常数然后使用全效价曲线测定, 分别为1.5 nM和90 pM。

[0373] 进行另外的SPR实验, 比较具有修饰的框架残基和改变的人IgG1恒定区的15A6和22G2抗体。人IgG1f序列提供在SEQ ID NO: 45, 同种异型变体提供在SEQ ID NO: 46 (其在R97K, E239D和M241L不同于SEQ ID NO: 45)。人IgG1.3提供在SEQ ID NO: 47 (其在L117A, L118E和G120A, 对应于EU编号的L234A, L235E和G237A, 不同于SEQ ID NO: 45)。另一无效的人IgG1恒定区, 人IgG1.1f提供在SEQ ID NO: 48 (其在L117A, L118E, G120A, A213S和P214S, 对应于EU编号的L234A, L235E, G237A, A330S和P331S, 不同于SEQ ID NO: 45)。图7显示在IgG1.1f构建体中Fc γ 受体结合的显著降低。使用这样的“惰性”Fc区是可取的, 因为TIGIT在CD8 $^{+}$ TILs上高表达, 和具有效应子功能的抗-TIGIT抗体可能耗尽根除肿瘤恰好需要的抗-肿瘤CD8 $^{+}$ TILs和/或NK细胞。

[0374] 比较具有框架变体A72S和/或N112T的15A6和具有框架变体H3Q的22G2抗体与它们的未修饰形式的SPR实验, 证实了框架变化和同种型均没有显著影响与人TIGIT的结合。结果在表4中提供。

[0375] 表4

选择的抗-huTIGIT mAb与人TIGIT的结合

抗体	序列变体	同种型	k_a ($M^{-1}s^{-1}$) ($\times 10^6$)	k_d (s^{-1}) ($\times 10^{-3}$)	K_D (nM)
15A6	-	IgG1f	1.0	1.5	1.5
15A6	-	IgG1.1f	1.1	1.6	1.5
15A6	A72S	IgG1.1f	1.1	1.7	1.5
15A6	N112T	IgG1.1f	1.1	1.9	1.7
15A6	A72S & N112T	IgG1.1f	1.0	2.0	2.0
22G2	-	IgG1f	1.9	0.17	0.09
22G2	-	IgG1.1f	2.0	0.13	0.07
22G2	H3Q	IgG1	1.9	0.30	0.16
22G2	H3Q	IgG1.1f	2.0	0.16	0.08

另外的SPR实验发现, mAb 22G2以0.06 nM的 K_D 结合人TIGIT和以0.09 nM的 K_D 结合食蟹猴TIGIT。

[0376] 序列表中的氨基酸残基编号比文献中的编号低117, 这是由于使用了EU编号和序列表中缺少IgG序列的可变结构域。人抗体的遗传构建体中存在的C-末端赖氨酸(K)残基通常自市售产生的抗体中缺失, 例如本发明的治疗性抗体。Dick *et al.* (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132。因此, 该赖氨酸未包括在任何SEQ ID NO: 45-48中, 但在一个实施方案中, 本发明的抗-huTIGIT抗体在重链的C-末端包括该另外的赖氨酸残基。在一些实施方案中本发明的抗体为包含具有C-末端赖氨酸的重链和缺少C-末端赖氨酸的重链的混合物的制备物, 例如, 由于非预期的C-末端剪切。在一些实施方案中本发明的抗-huTIGIT抗体包含一个或多个重链和一个或多个轻链, 例如两个重链和两个轻链。

[0377] 实施例3**抗-TIGIT抗体框并至多个组**

进行抗体框并实验以确定哪些抗-人TIGIT抗体与哪些其它抗体竞争结合huTIGIT,因此结合类似的表位。研究了抗体14B2, 13E6, 6F9, 11G11, 10C9, 16F6, 11C9, 27A9, 10D7, 20G6, 24E8, 24G1, 27F1, 15A6, 4E4, 13D1, 9B11, 10B8, 22G2, 19H2, 8C8, 17G4, 25E7, 26D8和16A8。

[0378] 抗-huTIGIT抗体之间的配对竞争如下测定,其中第一抗体结合至传感器芯片的表面,第二抗体与TIGIT多肽构建体在混合物中预孵育,和预孵育的混合物流过传感器芯片以确定第二抗体干扰TIGIT多肽构建体与在芯片表面上的第一抗体结合的程度。简言之,第一抗-huTIGIT抗体固定在传感器芯片CM5芯片 (Series S, GE Healthcare CAT# BR-1005-30) 表面上,流动池2, 流动池3 & 流动池4 (5000 RU) 和流动池1用作阴性对照。第二抗体稀释至起始浓度120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2X)。第二抗体的一系列稀释通过用缓冲液1:3稀释抗体浓度进行,得到7个不同浓度和对照样品0.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以获得滴定曲线。各抗体浓度系列分成两半。第一半浓度系列中,在各孔中40 nM (2X) 将TIGIT抗原 (rhTIGIT/Fc) 加入以制备终浓度系列 (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -0.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和20 nM的终抗原浓度。在第二半浓度系列中,替换抗原,加入缓冲液使抗体稀释至相同的浓度,和该一半作为空白处理。将第二抗-TIGIT抗体和rhTIGIT/Fc的复合物孵育2小时。将40 μL 复合物以30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速注射到抗体(第一)包被的表面。使用BIACORE[®] T200表面等离子体共振仪器和运行缓冲液是HBE-EP, GE Healthcare CAT# BR-1001-88, 过滤脱气, 0.01M HEPES, pH7.4, 0.15 NaCl, 3mM EDTA, 0.005% Surfactant P20。表面用25 mM NaOH (Order code: BR-1003-58, GE Healthcare) 以100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 再生5秒。使用Microsoft Excel分析数据,其中第二抗体的浓度系列针对相应的反应单元作图,以获得滴定曲线。

[0379] 结果表明试验抗体框并至四个组。见图1。框1的抗体(14B2, 13E6, 6F9, 11G11, 10C9, 16F6, 11C9, 27A9, 10D7, 20G6, 24E8, 24G1, 27F1, 15A6, 4E4, 13D1, 9B11, 10B8)阻断框1内的其它抗体以及22G2, 19H2, 8C8和17G4的结合。框2的抗体(25E7, 26D8, 16A8)阻断框2内的其它抗体以及22G2, 19H2和8C8的结合。抗体22G2, 19H2和8C8 (框3) 阻断框3内的其它抗体,以及框1和2二者中的抗体的结合,但不阻断17G4 (框4) 的结合。抗体17G4阻断框1内的抗体的结合,但不阻断任何其它抗体的结合。

[0380] 实施例4**通过酵母展示表位作图**

选择的本发明的抗-huTIGIT抗体(克隆22G2, 11G11和15A6)的表位通过在酵母上展示随机诱变的huTIGIT细胞外区域变体和基于它们不能结合特定的抗体来分选这些酵母确定。选择的不能结合的酵母细胞被扩增和基于它们不能结合本发明的特定抗体进行另外轮的选择。参见例如,Chao et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 342:539。对得到的酵母,确定huTIGIT变体的序列和分析各残基对抗体结合的影响。本发明的抗体的结合表位作为huTIGIT序列内的基因座确定,其中单个氨基酸突变破坏与本发明的抗-huTIGIT抗体的结合。

[0381] 简言之,易错PCR用于克隆人TIGIT-编码DNA至构建体,允许表达huTIGIT变体,作为融合蛋白的氨基-末端部分,其还包含c-myc标签序列和酵母细胞壁蛋白Agα1p。这样的构

建体,当在酵母(酿酒酵母)中表达时,在酵母细胞表面上展示变体huTIGIT多肽,其通过Aga1p多肽锚定至细胞表面。c-myc标签可任选地用作在给定的酵母细胞上展示huTIGIT-融合蛋白的阳性对照。酵母细胞通过FACS分选,和作为正确折叠的huTIGIT-融合蛋白表达(通过对对照小鼠抗-huTIGIT抗体的结合测定,其通过别藻蓝蛋白(APC)-标记的山羊抗-小鼠IgG第二抗体检出)而不结合本发明的抗体(通过用藻红蛋白(PE)标记的山羊抗-人IgG作为第二抗体检测来测定)的那些被合并,扩增和用于后续轮的选择。确定来自在若干轮选择后仍保留的酵母构建体的huTIGIT序列。没有抗-huTIGIT抗体选择的对照实验证实了在沿huTIGIT序列的各位点上良好的突变体覆盖度,和提供了基线以将用选择的文库获得的结果标准化。

[0382] 对huTIGIT突变体分子的各抗体选择群进行数百万的高质量序列读出。发现残基60结构上耐受突变,但该位置的突变体不结合抗体22G2,表明E60参与表位。类似地,残基I109, L65, N70, F107, T117, I68, H76和N58也发现是抗体22G2的表位的重要的残基。22G2的表位残基簇集至包含残基58 - 76 (NWEQQDQLLAICNADLGWH; SEQ ID NO: 38) 和残基107 - 117 (FCIYHTYPDGT; SEQ ID NO: 39) 的一级序列区。参见图2A。该表位与TIGIT/PVR结合界面重叠,如通过X-射线晶体结构所测量的。Stengel *et al.* (2012) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 109:5399。

[0383] 用抗体11G11的类似的实验显示残基G74, N70, H76, L65, L73, Q56, I68, H111和P114的重要的接触点。11G11的表位残基簇集至包含残基56 - 76 (QVNWEQQDQLLAICNADLGWH; SEQ ID NO: 40) 和残基111 - 114 (HTYP; SEQ ID NO: 41) 的一级序列区,其它可能的接触在残基120 - 139 (GRIFLEVLESSVAEHGARFQ; SEQ ID NO: 42)。参见图2B。

[0384] 用抗体15A6的类似的实验显示残基H76, G74, L65, N58, I68, Q139, G135, L73, F107, N70, E60, H134, A132和I109的重要的接触点。15A6的表位残基簇集至包含残基58 - 76 (NWEQQDQLLAICNADLGWH; SEQ ID NO: 38) 和残基107 - 109 (FCI) 的一级序列区,其它可能的接触在残基132 - 139 (AEHGARFQ; SEQ ID NO: 43)。参见图2C。

[0385] 所有三个表位包括残基L65, I68, N70和H76,表明这些残基和该区域,即残基65 - 76 (LLAICNADLGWH; SEQ ID NO: 44) 或仅考虑15A6和22G2的58 - 76,代表了本发明的抗-huTIGIT抗体的结合的重要的区域(“核心表位”)。

[0386] 对huTIGIT与人PVR/CD155的结合的类似的实验显示残基Q56, N58, I68, N70, L73, G74, W75, H76, H111, T112, Y113, P114, D115和G116的重要的接触点,该接触主要落入抗体22G2, 11G11和15A6所结合的表位区。

[0387] 实施例5

通过用抗-TIGIT抗体处理的NK细胞增强PVR⁺细胞的溶胞

评价了抗-人TIGIT抗体22G2对体外NK-细胞介导的PVR⁺细胞溶胞的作用。在存在抗-huTIGIT mAb 22G2-IgG1, 22G2-IgG1.1或同种型对照的情况下,野生型和工程改造以表达人PVR的P815细胞(小鼠肥大细胞瘤细胞系)暴露于人NK细胞。

[0388] 简言之,人NK细胞,效应子,自全血分离和用IL-2孵育过夜。NK细胞用靶细胞, P815/PVR或P815[wt],以E:T细胞比10:1或20:1铺板。抗体以终浓度5μg/mL加入至各孔。将板孵育2-4小时,和评价细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH),死细胞或濒死细胞的一种产物,的

释放。

[0389] 结果在图3中提供。百分比(%)特异性溶胞计算为[(试验信号-平均自发溶胞)/(平均最大溶胞-平均自发溶胞)] \times 100。使用抗-TIGIT抗体22G2的TIGIT阻断减少NK细胞上的抑制性信号传导,导致表达PVR的靶细胞的溶胞以DNAM-1特异性方式增加。

[0390] 实施例6

通过抗-TIGIT抗体的CD8⁺ T细胞的活化

进行实验以确定抗-人TIGIT抗体,单独和与抗-人PD-1抗体组合对用抗原肽刺激的人T细胞的作用。初步观察到,PD-1⁺/TIGIT⁺ CD8⁺ T细胞在来自暴露于抗原肽混合物(来自CMV、EBV、流感和破伤风)的健康人供体的血液中比来自未暴露的血液更普遍。参见图4A。IFN γ产生在用CEFT处理的血液中测量。参见图4B。尽管与单一疗法一样无效,抗-TIGIT mAb 22G2增强抗-PD-1刺激IFN γ自暴露于抗原肽混合物的人T细胞产生的能力。亦参见Chauvin *et al.* (2015) *J. Clin. Invest.* 125:2046,其中抗-人TIGIT抗体10D7对人肿瘤特异性CD8⁺ T细胞的作用在来自暴露于NY-ESO-1肽的黑素瘤患者(同时给予或不给予抗-huPD-1抗体)的外周血单核细胞(PBMC)中测定。

[0391] 实施例7

鼠CT26肿瘤模型中抗-TIGIT抗体的抗-肿瘤活性

在同基因CT26结肠腺癌模型中测试抗-小鼠TIGIT抗体单独和与抗-小鼠PD-1抗体组合的抗-肿瘤活性。这些实验中使用的抗-muTIGIT抗体是本发明的抗-huTIGIT抗体的小鼠代替物。

[0392] 简言之,抗-muTIGIT mAb(克隆4B1)用鼠IgG2a或鼠IgG1 D265A(具有减少的效应子功能)Fc区制备,以及抗-muPD-1(克隆4H2)用鼠IgG1 D265A Fc区制备。将这些抗体和其组合以及小鼠IgG1同种型对照给予小鼠以确定在同基因CT26结肠腺癌模型中的抗-肿瘤活性。用于研究的IgG1对照抗体是具有小鼠IgG1同种型的重组人抗-白喉毒素抗体。

[0393] 在第0天,向15只BALB/c小鼠/组(总共90只小鼠)皮下注射 1×10^6 个CT26肿瘤细胞。在移植后第7天开始治疗。测量肿瘤,随机分到治疗组,以具有相当的平均肿瘤体积(45-50 mm³),然后用设计的抗体(200 μg/剂量)腹膜内(IP)处理,和在第10和14天再次进行。各实验还包括200 μg/剂量的对照IgG1抗体,因此对照IgG1实验本身包括400 μg/剂量。肿瘤体积每周两次测量。

[0394] 结果表示在图5A中,其提供了各实验的平均肿瘤体积作为时间的函数。减少的效应子功能形式的抗-TIGIT抗体(G1 D265A)未影响肿瘤生长和未除去任何肿瘤小鼠,而IgG2a减少肿瘤生长和导致15只小鼠中的3只在第35天无肿瘤。IgG2a抗-TIGIT抗体与抗-PD-1抗体的组合高度有效地减少肿瘤生长和导致15只小鼠中的10只无肿瘤,而抗-TIGIT G1 D265A与抗-PD-1的组合略微无效地减少肿瘤生长和导致15只小鼠中的7只无肿瘤。无论如何,IgG2a和IgG1 D265A抗-TIGIT抗体二者增强抗-PD-1抗体的活性,它们单独导致15只小鼠中的仅2只无肿瘤。

[0395] 进行类似实验以比较作为单一疗法的抗-TIGIT与抗-TIGIT/抗-PD-1和抗-TIGIT/抗-CTLA-4组合疗法。使抗-TIGIT和抗-PD-1抗体的形式为Fc-惰性小鼠IgG1-D265A同种型,和抗-CTLA-4作为小鼠IgG2b。在第0天向雌性BALB/c小鼠移植 1×10^6 个肿瘤细胞,和抗体以10 mg/kg在第10、14和17天经IP给予。结果提供在图5B。加入抗-TIGIT至用抗-PD-1和抗-

CTLA-4的治疗显著增强肿瘤生长抑制(TGI),从组合疗法曲线上来看是明显的,对于抗-TIGIT/抗-PD-1为56% TGI,和对于抗-TIGIT/抗-CTLA-4为49% TGI,相比之下,对于用抗-TIGIT、抗-PD-1和抗-CTLA-4的单一疗法分别为7%、18%和13% TGI。组合疗法还增加在实验结束时的无肿瘤小鼠数,对于与抗-PD-1的组合从1/10增加至5/10,和对于与抗-CTLA-4的组合从3/10增加至6/10。

[0396] 实施例8

抗-huTIGIT抗体15A6, 22G2, 11G11和10D7的其它性质

进行各种其它体外测定法以确定选择的本发明的抗体的性质。发现抗-huTIGIT mAbs 15A6, 22G2, 11G11和10D7结合表达huTIGIT的Jurkat细胞。Jurkat/hTIGIT细胞的生物测定法证实抗体15A6, 11G11和10D7全都以大致等同的效力阻断PVR信号传导,和抗体22G2的效力更佳,为约2倍($IC_{50} = 0.21\text{nM}$)。显示抗体15A6和22G2,当在CHO细胞上表达时,以基本上与人TIGIT相同的亲和力结合来自食蟹猴的TIGIT,而11G11和10D7并非如此。例如,抗体22G2 IgG1.1f分别以0.09 nM和0.07 nM的 K_D 结合人和猴TIGIT,和还分别具有0.55 nM和0.28-0.58 nM的结合CD8⁺ T细胞的EC50,但不结合大鼠或小鼠TIGIT。然而,用原代细胞的后续实验证实了在该背景下15A6不充分结合食蟹猴TIGIT。抗体22G2和15A6染色人淋巴细胞,但直至10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度不染色22种其它人组织(大脑、小脑、心、肝、肺、肾、脾、扁桃体、胸腺、结肠、小肠、胃、胰腺、皮肤、骨骼肌、肾上腺、甲状腺、外周神经、前列腺、胎盘、睾丸和子宫)。当以10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 孵育20小时,抗体22G2不增加来自8个供体的人全血的75种不同的细胞因子和趋化因子的表达(包括GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-13, IL-2, IFN γ , IP-10),表明低风险的细胞因子释放综合征。

[0397] 在单独的实验中,抗-TIGIT mAb 22G2 IgG1.1f,对于阻断TIGIT-mFc与分别过表达人PVR和人Nectin-2的P815细胞结合,当各自以其EC90浓度(分别14.1 nM和12.8 nM)存在时,显示15.4 nM和5.72 nM的 IC_{50} 。

[0398] 发现抗体22G2 IgG1.1f具有在重链的N310上的单N-糖基化位点,具有对CHO中产生的单克隆抗体典型的聚糖特征。

[0399] 这些结果表明,在本发明的方法中,抗体22G2具有理想的性质用于治疗用途,因为其当存在于细胞表面上时结合TIGIT,其抑制PVR和Nectin-2信号传导,其不结合外来的人组织或诱导不需要的细胞因子或趋化因子释放,和其结合食蟹猴TIGIT,这有助于进行毒理学研究用于支持监管批准的研究。

[0400] 实施例9

基于TIGIT, DNAM, PVR和Nectin-2的表达选择患者

与TIGIT途径相关的蛋白的表达水平(TIGIT, PVR/CD155, Nectin-2/CD112, DNAM/CD226)可用于指导用本发明的抗-TIGIT抗体的治疗。可溶性形式的PVR和Nectin-2 (sPVR 和 sNectin-2) 可在血清中检出,例如,通过ELISA或其它常规方式。TIGIT, PVR, Nectin-2 和 DNAM可在细胞表面上检出,例如肿瘤细胞、CD8⁺ T细胞、调节T细胞、NK细胞或肿瘤侵润骨髓细胞,例如,通过免疫组织化学(IHC)、流式细胞术(FACS)或质谱方法,包括液相色谱质谱(LC-MS)。

[0401] 不意欲受理论的限制,用本发明的抗-TIGIT抗体治疗基于在相互作用细胞上阻断TIGIT与其配体,例如PVR或Nectin-2的结合,和/或在所述细胞上阻止TIGIT与DNAM相互作

用。因此,最可能响应这样的治疗的肿瘤或肿瘤类型是其中TIGIT活性对肿瘤进展是重要的那些,使得阻断这样的TIGIT活性将增强肿瘤根除。特别是,高水平的TIGIT⁺ TILs,例如TIGIT⁺ CD8⁺ T细胞、TIGIT⁺ T_{regs}或TIGIT⁺ NK细胞,将表明肿瘤可能响应拮抗剂抗-TIGIT治疗。这些TIGIT⁺ TILs上的DNAM表达进一步表明,肿瘤可响应抗-TIGIT治疗。类似地,在肿瘤细胞本身上或在肿瘤侵润骨髓细胞上表达高水平的TIGIT配体PVR和/或Nectin-2的肿瘤也将是用本发明的抗-TIGIT抗体治疗的良好候选者。

[0402] 筛选TIGIT途径的蛋白的表达水平可以治疗适应症选择水平或以个体患者水平(“患者分层”)进行。例如,表达水平可在来自具有许多不同癌症的每一种的许多患者的组织样品中测定,以确定哪种类型的癌症显示表明特定类型的癌症可适合于用拮抗剂本发明的-TIGIT mAb治疗的蛋白表达模式。一旦对于统计学足够数量的样品做出这样的确定,抗-TIGIT疗法可被推荐用于患有预期对抗-TIGIT疗法响应的癌症类型的任何个体患者。或者,可取而代之地测试来自个体患者的样品,以帮助指导对该患者特定的治疗决定。

[0403] 因为对于TIGIT途径蛋白表达测试的相关细胞是在肿瘤和周围微环境中的那些细胞,这样的筛选可能需要获得肿瘤样品,例如,通过活检或切除。

[0404] 因此,本发明还提供通过测量在侵润CD8⁺ T细胞、T_{regs}或NK细胞中的TIGIT水平,和/或通过测量在肿瘤细胞或肿瘤侵润骨髓细胞中PVR和/或Nectin-2的表达,鉴定作为用本发明的拮抗剂抗-TIGIT抗体治疗的良好候选者的肿瘤类型或具体肿瘤的方法。

[0405] 在一个实例中,抗-TIGIT疗法用于代替、结合或补充用PD-1或PD-L1抑制剂的治疗。显示高PVR/Nectin-2表达和低PD-L1表达的肿瘤可用作为单一疗法的抗-TIGIT抗体,或抗-TIGIT抗体与另一种并非PD-1/PD-L1拮抗剂的免疫肿瘤学试剂的组合治疗(如果对于这样的试剂存在生物学原理的话)。本发明的抗-TIGIT抗体可在显示高PVR/Nectin-2表达和还显示高PD-L1表达的肿瘤中基本上与抗-PD-1/PD-L1抗体同时给予。或者,本发明的抗-TIGIT抗体可在抗-PD-1/PD-L1疗法后给予难治性患者、复发性患者或具有任何其它不完全或不令人满意的反应的患者,如果他们的肿瘤显示升高的PVR和/或Nectin-2表达的话。

[0406] 在鉴定可能适合于用本发明的拮抗剂抗-TIGIT抗体治疗的肿瘤类型的实验中,使用TCGA数据集对各种人癌症测定人PVR mRNA的表达。结果显示在图6A。结果以递减顺序提供,具有最高水平的PVR mRNA,因此最可能适合于用本发明的抗-TIGIT抗体治疗的肿瘤在最上面。

[0407] 与结肠上皮对照样品相比,在结肠腺癌样品中PVR还以高得多的水平通过IHC检出。参见图6B。进一步的IHC实验显示,在100%的肝细胞癌症样品(10/10)、90%的结肠直肠癌样品(9/10)和44%的卵巢癌样品(4/9)中PVR表达升高。这些结果表明,具有这些癌症,特别是肝细胞和结肠直肠癌的患者,是用本发明的拮抗剂抗-TIGIT抗体治疗的良好候选者。

[0408] 本发明还提供治疗方法,例如,治疗结肠直肠癌的方法,包括测定肿瘤内细菌具核梭杆菌的存在或不存在,其存在表明肿瘤可能是用本发明的抗-TIGIT抗体治疗的良好候选者。这样的治疗方法还任选地包括给予具有肿瘤内细菌具核梭杆菌的受试者抗生素,例如,甲硝哒唑、哌拉西林/tazobactum、ticarcillin/clavulanate、amoxicillin/sulbactum、氨苄西林/sulbactum、ertupenem、imipenem、meropenem、氯林肯霉素或cefoxitin。

[0409] 表5

序列表概述

SEQ ID NO.	描述
1	人TIGIT多肽 (NP_776160.2)
2	15A6 VH结构域
3	15A6 VH结构域A72S
4	15A6 VH结构域N112T
5	15A6 VH结构域A72S N112T
6	15A6 VL结构域
7	22G2 VH结构域
8	22G2 VH结构域 H3Q
9	22G2 VL结构域
10	11G11 VH结构域
11	11G11 VL结构域
12	10D7 VH结构域
13	10D7 VL结构域
14	15A6 CDRH1
15	15A6 CDRH2
16	15A6 CDRH3
17	15A6 CDRL1
18	15A6 CDRL2
19	15A6 CDRL3
20	22G2 CDRH1
21	22G2 CDRH2
22	22G2 CDRH3
23	22G2 CDRL1
24	22G2 CDRL2
25	22G2 CDRL3
26	11G11 CDRH1
27	11G11 CDRH2
28	11G11 CDRH3
29	11G11 CDRL1
30	11G11 CDRL2
31	11G11 CDRL3
32	10D7 CDRH1
33	10D7 CDRH2
34	10D7 CDRH3
35	10D7 CDRL1
36	10D7 CDRL2
37	10D7 CDRL3
38	22G2/15A6表位 - huTIGIT残基58 - 76

39	22G2表位 - huTIGIT残基107 - 117
40	11G11表位 - huTIGIT残基56 - 76
41	11G11表位 - huTIGIT残基111 - 114
42	11G11表位 - huTIGIT残基120 - 139
43	15A6表位 - huTIGIT残基132 - 139
44	22G2/11G11/15A6核心表位 - huTIGIT残基65 - 76
45	IgG1f恒定结构域(人)
46	IgG1恒定结构域, 同种异型变体(人)
47	IgG1.3恒定结构域(人)
48	IgG1.1f恒定结构域(人)
49	K 恒定结构域(人)
50	PVR/CD155前体 α (人) NP_006496.4
51	PVR/CD155前体 β (人) NP_001129240.1
52	PVR/CD155前体 γ (人) NP_001129241.1
53	PVR/CD155前体 δ (人) NP_001129242.2

关于抗体序列,序列表提供了重链和轻链的成熟可变区的序列,即序列不包括信号肽。
[0410] 等同方案:

本领域技术人员将认识到,或使用不超过常规实验能够确定本文公开的特定实施方案的许多等同方案。这样的等同方案意欲包括在随附权利要求书中。

序列表

<110> 百时美施贵宝公司

<120> 针对 TIGIT 的抗体

<130> 12437-W0-PCT

<150> 62/096, 267

<151> 2014-12-23

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 244

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

[0001] Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala
1 5 10 15

Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn
20 25 30

Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser
35 40 45

Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln
50 55 60

Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser
65 70 75 80

Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln
85 90 95

Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr
 100 105 110

Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu
 115 120 125

Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly
 130 135 140

Ala Met Ala Ala Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val
 145 150 155 160

Val Ala Leu Thr Arg Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu
 165 170 175

Gly Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser
 [0002] 180 185 190

Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala
 195 200 205

Gly Leu Cys Gly Glu Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu Leu His Asp
 210 215 220

Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys Ser Phe Phe
 225 230 235 240

Thr Glu Thr Gly

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5				10				15			

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
								25					30		

Arg	Tyr	Phe	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
						35			40			45			

Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
						50			55			60			

[0003]	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ala	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
					65				70			75		80		

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
						85				90				95	

Cys	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Trp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Asn
						100			105			110			

Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
					115

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人序列，具有 A72S 修饰

<400> 3

Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1															

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser

Arg	Tyr	Phe	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu

Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser

Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe

[0004]

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr

Cys	Ala	Ser	Ser	Ser	Ala	Trp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Asn

Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人序列，具有 N112Q 修饰

<400> 4

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Arg Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ala Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 [0005] 85 90 95

Cys Ala Ser Ser Ser Ala Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人序列，具有 A72S 和 N112T 修饰

<400> 5

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Arg Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

[0006] Cys Ala Ser Ser Ser Ala Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 6

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

[0007] <210> 7
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 7

Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
 20 25 30

Ile Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr
 100 105 110

Tyr Phe Phe Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 115 120 125

Ser Ser
 130

<210> 8

[0008] <211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人序列，具有 H3Q 修饰

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
 20 25 30

Ile Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr
 100 105 110

Tyr Phe Phe Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 115 120 125

Ser Ser
 130

[0009] <210> 9
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 9

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 10
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 [0010] 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Ser His Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Asn Ile Phe Tyr Ser Gly His Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Gln Gly Leu Leu Trp Phe Gly Gly Leu Ser Pro Tyr Tyr
 100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 11

<211> 106

<212> PRT

<213> 人

<400> 11

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

[0011]

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12

<211> I28

<212> PRT

<213> 人

<400> 12

Gln Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ile Phe Arg Asn Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Phe Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

[0012]

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Ala Ala Ala Gly Thr Thr Arg Tyr Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile
 [0013] 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

Ser Ser Arg Tyr Phe Trp Gly
 1 5

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 15

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

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

Ser Ser Ala Trp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

[0014]

<400> 17

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 19

Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Tyr Thr
1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

Ser Gly Ile Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

[0015] <213> 人

<400> 21

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

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<400> 22

Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr Tyr Phe Phe
1 5 10 15

Gly Val Asp Val
20

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

[0016]

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 25

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Phe Thr

1 5 10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 26

Ser Ser Ser His Tyr Trp Gly

1 5

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 27

Asn Ile Phe Tyr Ser Gly His Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1

5

10

15

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 28

Gln Gly Leu Leu Trp Phe Gly Gly Leu Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1

5

10

15

[0017]

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1

5

10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 30

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1

5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 31

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr

1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 32

Asn Tyr Ala Ile Ser

1 5

[0018]

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 33

Gly Ile Ile Pro Phe Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> 人

<400> 34

Gly Gly Ala Ala Ala Gly Thr Thr Arg Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 1 5 10 15

Met Asp Val

<210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 35

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

[0019] <210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 36

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 37

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile Thr
 1 5

<210> 38
 <211> 19
 <212> PRT

<213> 人

<400> 38

Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu
 1 5 10 15

Gly Trp His

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 39

Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
 1 5 10

[0020]

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> 人

<400> 40

Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala
 1 5 10 15

Asp Leu Gly Trp His

20

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> 人

<400> 41

His Thr Tyr Pro

1

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<400> 42

Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His Gly

1

5

10

15

Ala Arg Phe Gln

20

<210> 43

<211> 8

[0021] <212> PRT

<213> 人

<400> 43

Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln

1

5

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 44

Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His

1

5

10

<210> 45

<211> 329

<212> PRT

<213> 人

<400> 45

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

[0022] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

[0023] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 46

<211> 329

<212> PRT

<213> 人

<400> 46

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[0024] 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

[0025] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 47
<211> 329
<212> PRT
<213> 人

<400> 47

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

[0026]

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Ile Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130	135	140
-----	-----	-----

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	145	150	155	160
---	-----	-----	-----	-----

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	165	170	175
---	-----	-----	-----

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	180	185	190
---	-----	-----	-----

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	195	200	205
---	-----	-----	-----

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	210	215	220
---	-----	-----	-----

[0027]

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	225	230	235	240
---	-----	-----	-----	-----

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	245	250	255
---	-----	-----	-----

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	260	265	270
---	-----	-----	-----

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	275	280	285
---	-----	-----	-----

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	290	295	300
---	-----	-----	-----

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
---	--	--

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

325

<210> 48

<211> 329

<212> PRT

<213> 人

<400> 48

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

[0028]

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

[0029] Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<400> 49

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 [0030] 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 50

<211> 417

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(20)

<400> 50

Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu
1 5 10 15

Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln
20 25 30

[0031] Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro
35 40 45

Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu
50 55 60

Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln
65 70 75 80

Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly
100 105 110

Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe
115 120 125

Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys
 130 135 140

Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro
 145 150 155 160

Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln
 165 170 175

Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val
 180 185 190

Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu
 195 200 205

[0032] Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu
 210 215 220

His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val
 225 230 235 240

Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr
 245 250 255

Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro
 260 265 270

Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro
 275 280 285

Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys
 290 295 300

Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala
 305 310 315 320

Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu
 325 330 335

His Ser Gly Met Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile
 340 345 350

Leu Val Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser
 355 360 365

Lys Cys Ser Arg Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser
 370 375 380

[0033] Thr Glu His Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala
 385 390 395 400

Val Ser Arg Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr
 405 410 415

Arg

<210> 51

<211> 372

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(27)

<400> 51

Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln
 20 25 30

Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro
 35 40 45

Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu
 50 55 60

Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln
 65 70 75 80

[0034] Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly
 100 105 110

Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe
 115 120 125

Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys
 130 135 140

Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro
 145 150 155 160

Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln
 165 170 175

Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val		
180	185	190
Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu		
195	200	205
Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu		
210	215	220
His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val		
225	230	235
Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr		
245	250	255
[0035] Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro		
260	265	270
Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro		
275	280	285
Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys		
290	295	300
Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala		
305	310	315
Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu		
325	330	335
His Ser Gly Thr Glu His Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser		
340	345	350

Tyr Ser Ala Val Ser Arg Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr
 355 360 365

Glu Gly Thr Arg
 370

<210> 52
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> 信号
 <222> (1)..(27)
 <400> 52

[0036] Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln
 20 25 30

Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro
 35 40 45

Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu
 50 55 60

Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln
 65 70 75 80

Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly
 100 105 110

Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe
 115 120 125

Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys
 130 135 140

Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro
 145 150 155 160

Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln
 165 170 175

[0037] Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val
 180 185 190

Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu
 210 215 220

His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val
 225 230 235 240

Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr
 245 250 255

Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro
 260 265 270

Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro
 275 280 285

Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys
 290 295 300

Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala
 305 310 315 320

Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Gly Thr Glu His Ala Ser
 325 330 335

Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala Val Ser Arg Glu Asn
 340 345 350

Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr Arg
 [0038] 355 360

<210> 53

<211> 392

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> 信号

<222> (1), , (27)

<400> 53

Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln
 20 25 30

Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro

35	40	45
Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu		
50	55	60
Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln		
65	70	75
Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala		
85	90	95
Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly		
100	105	110
Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe		
115	120	125
Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys		
130	135	140
Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro		
[0039] 145	150	155
Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln		
165	170	175
Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val		
180	185	190
Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu		
195	200	205
Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu		
210	215	220
His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val		
225	230	235
Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr		
245	250	255
Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro		
260	265	270

Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro
275 280 285

Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys
290 295 300

Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala
305 310 315 320

Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu
325 330 335

[0040]

His Ser Gly Met Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile
340 345 350

Leu Val Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser
355 360 365

Lys Cys Ser Arg Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser
370 375 380

Glu His His Gln Ser Cys Arg Asn
385 390

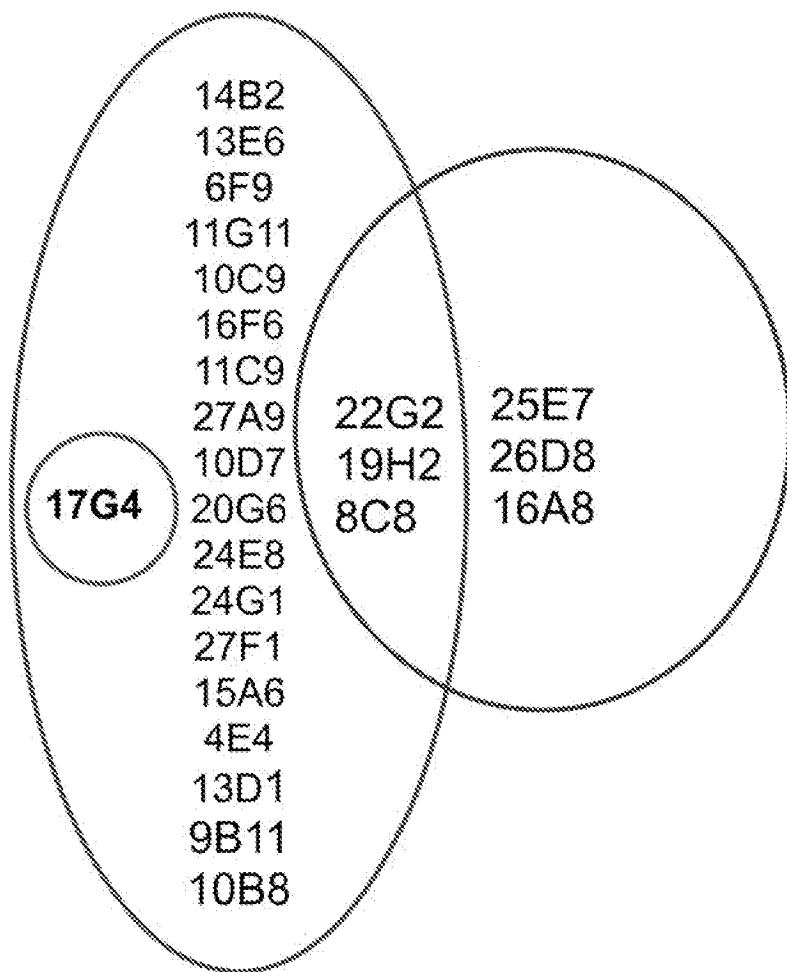


图 1

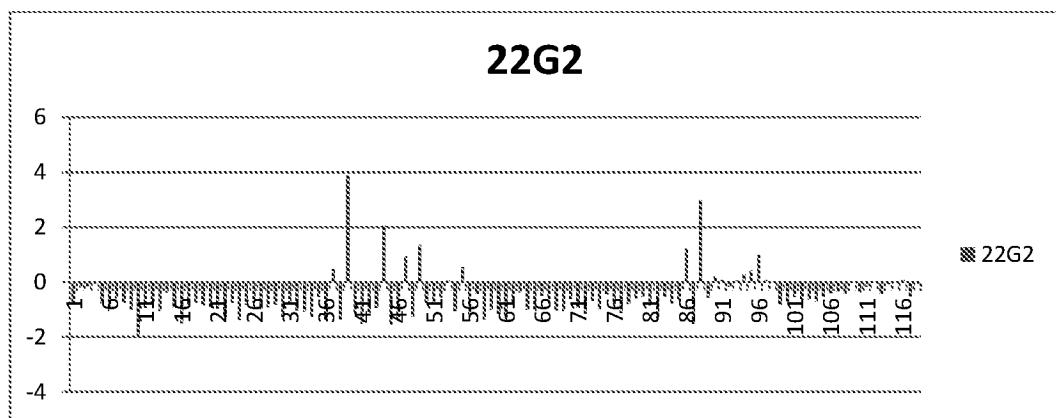


图 2A

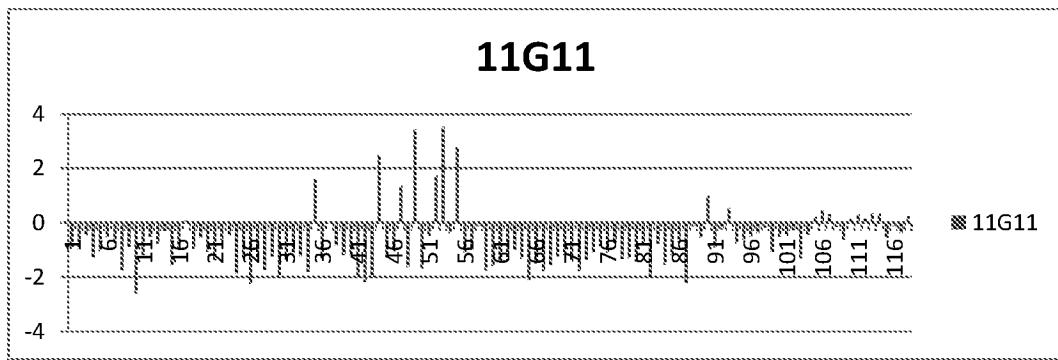


图 2B

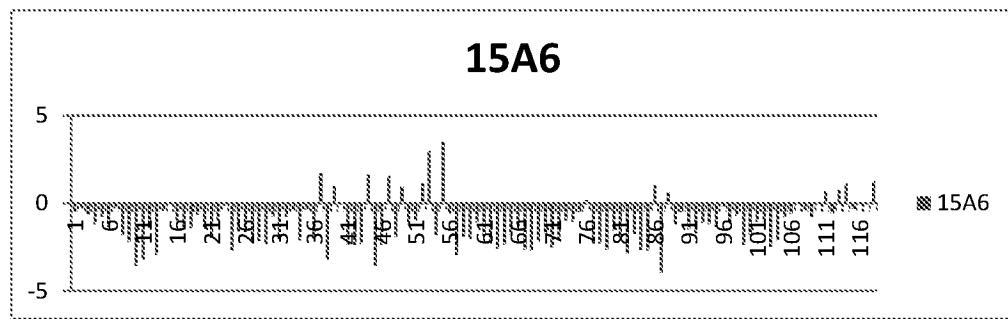


图 2C

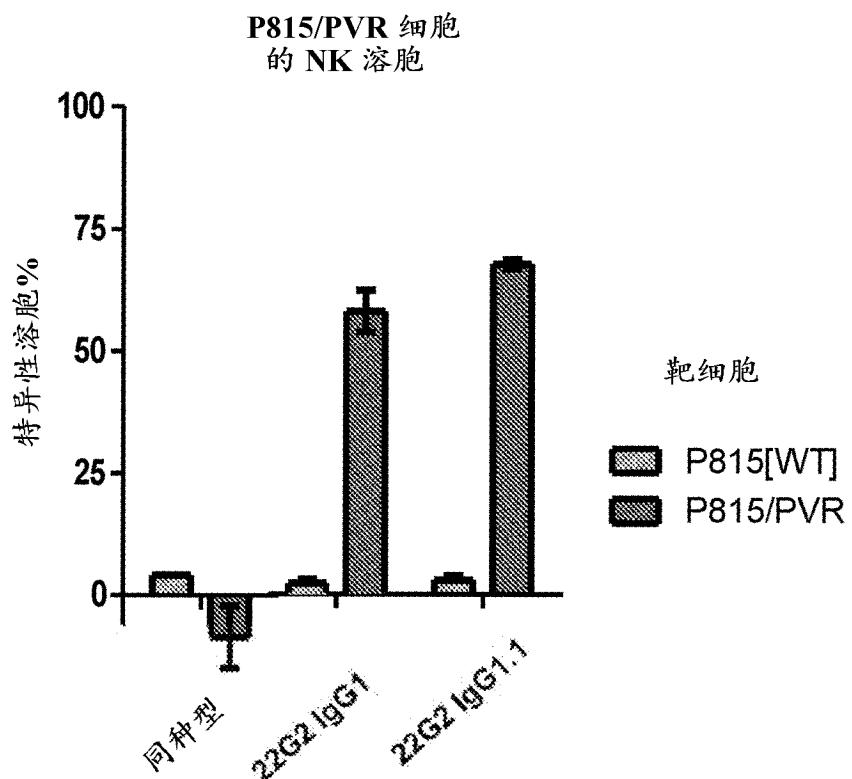


图 3

**CD8+ T 细胞上
TIGIT 和 PD1 的上调**

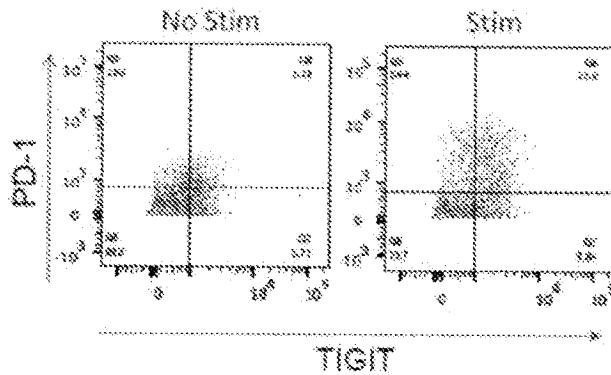


图 4A

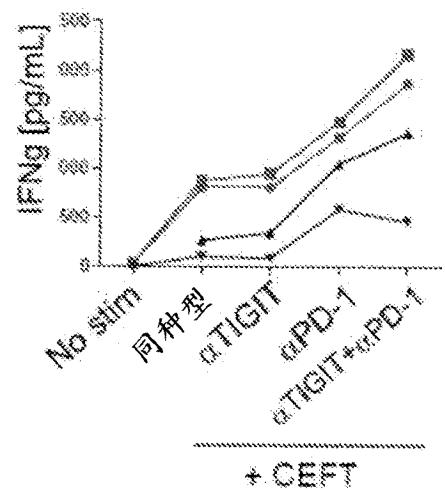


图 4B

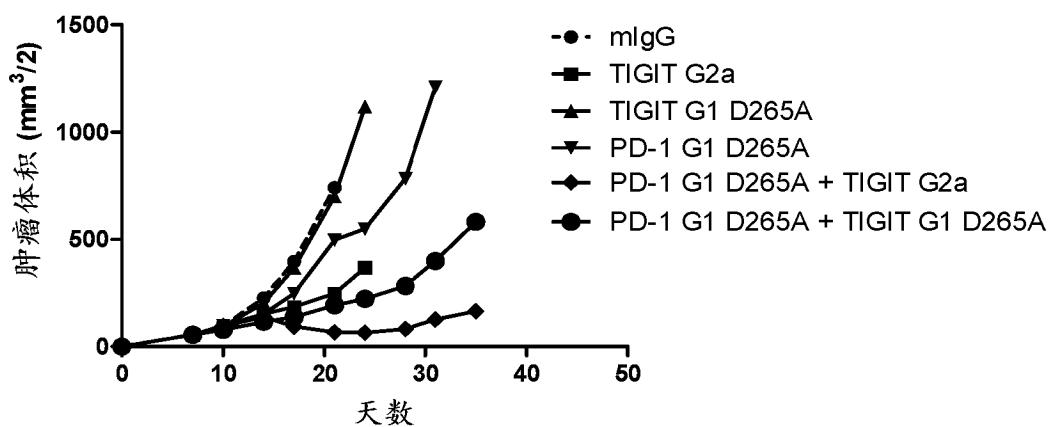


图 5A

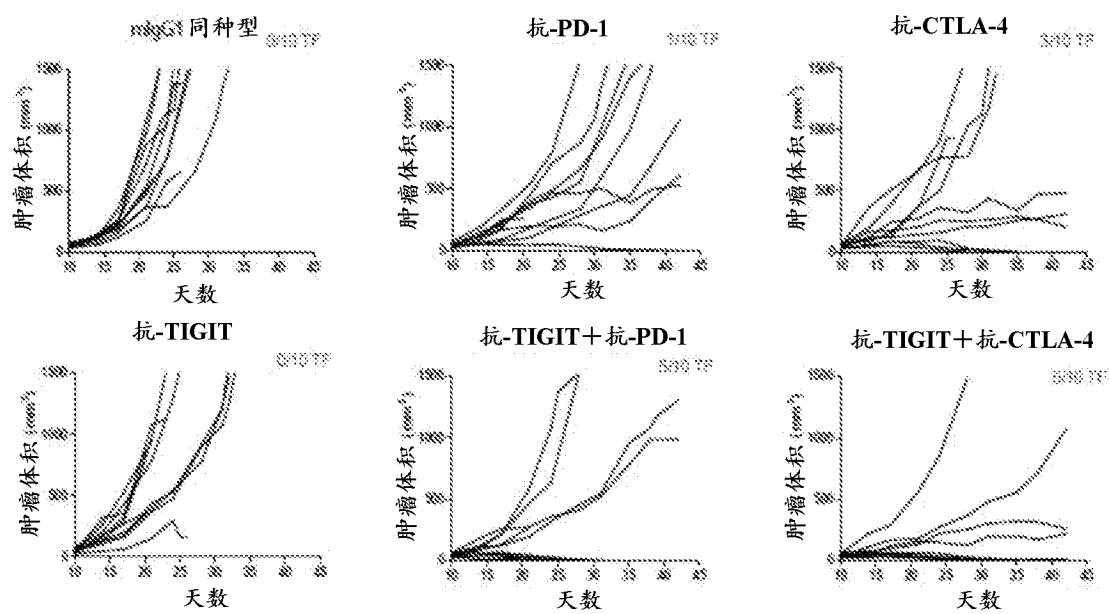


图 5B

TCGA RNAseq 数据中 PVR 的表达

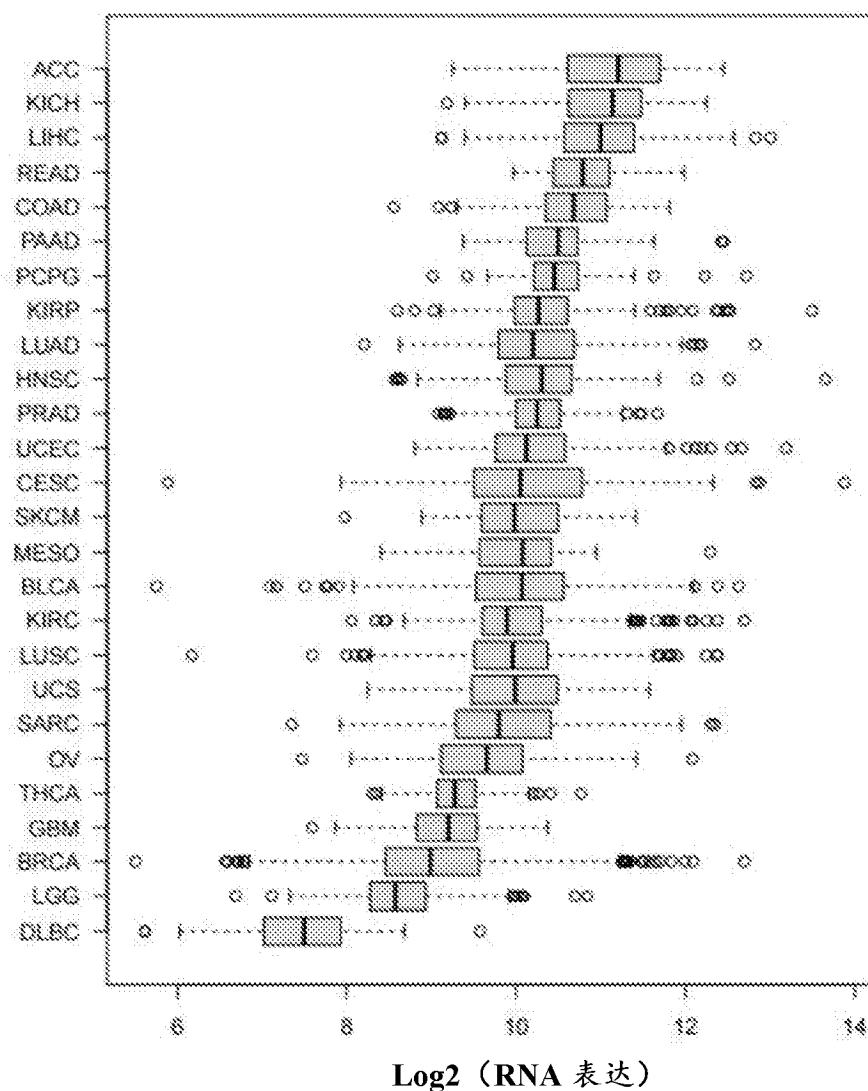
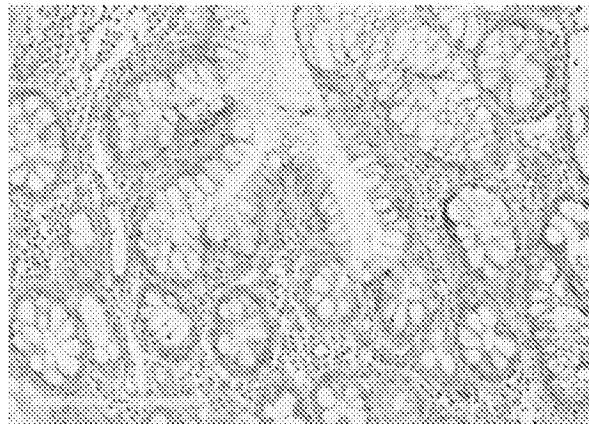
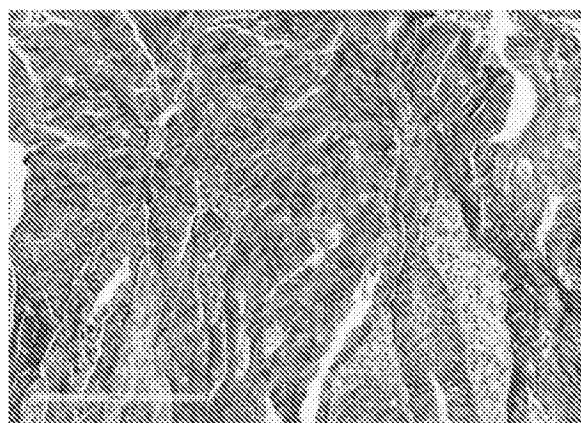


图 6A



结肠上皮组织



结肠腺癌

图 6B

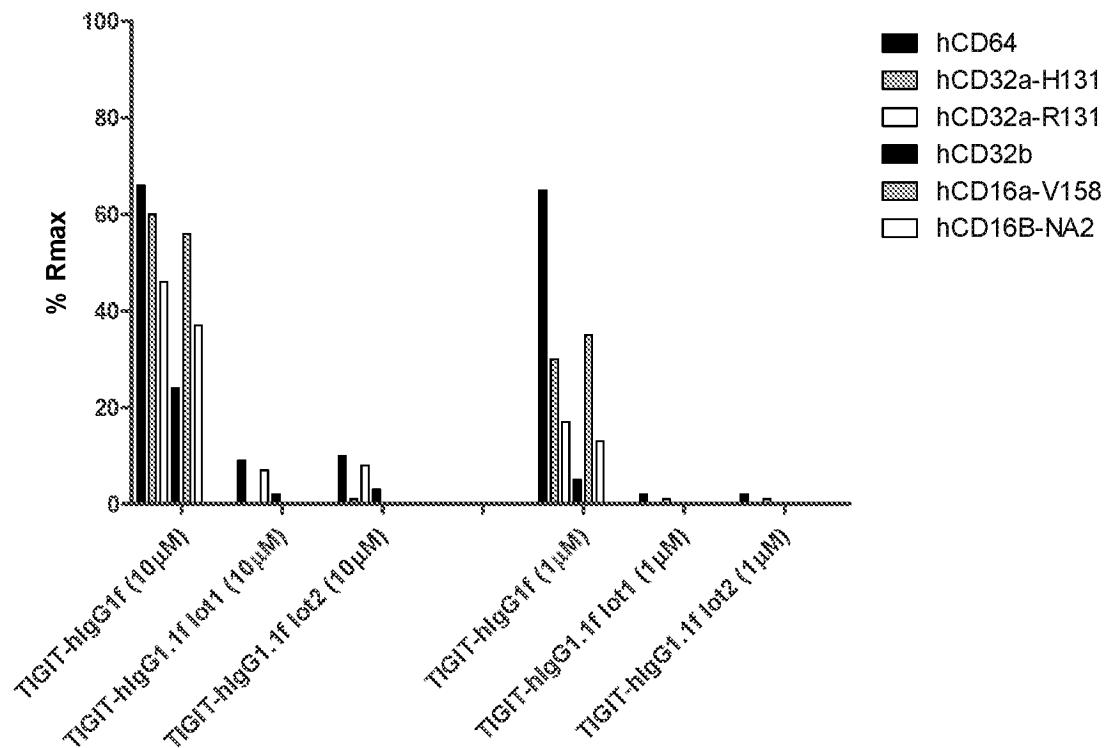


图 7