

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7544937号
(P7544937)

(45)発行日 令和6年9月3日(2024.9.3)

(24)登録日 令和6年8月26日(2024.8.26)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28 Z N A
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
請求項の数 29 外国語出願 (全179頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2023-148427(P2023-148427)	(73)特許権者	518261261
(22)出願日	令和5年9月13日(2023.9.13)		ナンジン レジェンド バイオテック カ
(62)分割の表示	特願2020-536043(P2020-536043)の分割		ンパニー, リミテッド
原出願日	平成30年12月28日(2018.12.28)		NANJING LEGEND BIOT
(65)公開番号	特開2023-160982(P2023-160982 A)		ECH CO., LTD.
(43)公開日	令和5年11月2日(2023.11.2)		中華人民共和国, ジャンスー, ナンジン
審査請求日	令和5年9月13日(2023.9.13)		シティ, ジャンニン ディストリクト,
(31)優先権主張番号	PCT/CN2017/119506		ロンミャン アベニュー ナンバー568
(32)優先日	平成29年12月28日(2017.12.28)		, ビルディング オブ ナンジン ライフ
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		サイエンス タウン ナンバー6
(31)優先権主張番号	PCT/CN2018/097159		No. 6 Building of Na
(32)優先日	平成30年7月26日(2018.7.26)		njing Life Science
	最終頁に続く		Town, No. 568 Longmi
			an Avenue, Jiangning
			District, Nanjing c
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T I G I Tに対する単ドメイン抗体及びその変異体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

T I G I Tを特異的に認識する単ドメイン抗体 (s d A b) 部分 (抗 T I G I T s d A b 部分) を含む単離抗 T I G I T 構築物であって、前記抗 T I G I T s d A b 部分が、以下：

配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む C D R 1 ；配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列を含む C D R 2 ；及び配列番号 1 7 9 のアミノ酸配列を含む C D R 3

を含み、前記単離抗 T I G I T 構築物が抗体またはタンパク質である、単離抗 T I G I T 構築物。

【請求項2】

前記抗 T I G I T s d A b 部分が、以下：

(I) a - 1) 3 7 位のアミノ酸残基が、F、Y、V、L、A、H、S、I、W、C、N、G、D、T、及びPからなる群から選択され；

a - 2) 4 4 位のアミノ酸残基が、E、Q、G、D、A、K、R、L、P、S、V、H、T、N、W、M、及びIからなる群から選択され；

a - 3) 4 5 位のアミノ酸残基が、L、R、P、H、F、G、Q、S、E、T、Y、C、I、D、及びVからなる群から選択され；

a - 4) 1 0 3 位のアミノ酸残基が、W、R、G、S、K、A、M、Y、I、F、T、N、V、Q、P、E、及びCからなる群から選択され；及び

a - 5) 1 0 8 位のアミノ酸残基が、Q、L、R、P、E、K、S、T、M、A、及び

Hからなる群から選択され；または

(I I) b-1) 37位のアミノ酸残基が、F、Y、L、I、及びVからなる群から選択され；

b-2) 44位のアミノ酸残基が、E及びQからなる群から選択され；

b-3) 45位のアミノ酸残基が、R及びLからなる群から選択され；

b-4) 103位のアミノ酸残基が、W、R、G、及びSからなる群から選択され；及び

b-5) 108位のアミノ酸残基が、Q及びLからなる群から選択され；または

(I I I) c-1) 37位のアミノ酸残基が、F、Y、L、I、及びVからなる群から選択され；

c-2) 44位のアミノ酸残基が、A、G、E、D、Q、R、S、及びLからなる群から選択され；

c-3) 45位のアミノ酸残基が、L、R、及びCからなる群から選択され；

c-4) 103位のアミノ酸残基が、P、R、及びSからなる群から選択され；及び

c-5) 108位のアミノ酸残基が、Q及びLからなる群から選択され；

のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含み、

前記アミノ酸位置が、K a b a t 番号付けに従っており、108位がQである場合、108位が、Lに適宜ヒト化することができる、請求項1に記載の単離抗T I G I T構築物。

【請求項3】

前記抗T I G I T s d A b部分が、配列番号256、280、282～284、286、287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、または配列番号256、280、282～284、286、287のいずれか1つに対して少なくとも90%の配列同一性を有するその変異体を含む、請求項1または2に記載の単離抗T I G I T構築物。

【請求項4】

前記抗T I G I T s d A b部分が、ラクダ、または部分ヒト化である、請求項1～3のいずれか1項に記載の単離抗T I G I T構築物。

【請求項5】

前記単離抗T I G I T構築物が、抗T I G I T s d A b-F c融合タンパク質である、請求項1～4のいずれか1項に記載の単離抗T I G I T構築物。

【請求項6】

(i) 前記抗T I G I T s d A b-F c融合タンパク質が二量体である、および／または
(ii) 前記F cが、ヒトI g G 1 (h I g G 1) F c、エフェクターレス (不活性) h I g G 1 F c、もしくはh I g G 4 F cである、請求項5に記載の単離抗T I G I T構築物。

【請求項7】

前記抗T I G I T s d A b-F c融合タンパク質が、配列番号291、315、317～319、321、322のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項5または6に記載の単離抗T I G I T構築物。

【請求項8】

前記単離抗T I G I T構築物が、第2のエピトープを特異的に認識する第2の抗体部分をさらに含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の単離抗T I G I T構築物。

【請求項9】

前記第2の抗体部分が、完全長抗体、F a b、F a b'、(F a b')₂、F v、一本鎖F v (s c F v)、s c F v-s c F v、ミニボディ、ダイアボディ、またはs d A bである、請求項8に記載の単離抗T I G I T構築物。

【請求項10】

前記抗T I G I T s d A b部分、及び前記第2の抗体部分が、ペプチドリンカーによって適宜連結される、請求項8または9に記載の単離抗T I G I T構築物。

【請求項11】

前記ペプチドリンカーが、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項10に記載の単離抗T I G I T構築物。

10

20

30

40

50

【請求項 12】

前記第2の抗体部分が、2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体である、請求項8～11のいずれか1項に記載の単離抗TIGIT構築物。

【請求項 13】

前記重鎖のFc断片が、IgG1 Fc、エフェクターレスIgG1 Fc、IgG2 Fc、またはIgG4 Fcである、請求項12に記載の単離抗TIGIT構築物。

【請求項 14】

前記単離抗TIGIT構築物が、以下

(i) 前記抗TIGITs dAb部分のN末端が、前記完全長抗体の少なくとも1つの重鎖のC末端に融合される、

(ii) 前記抗TIGITs dAb部分のC末端が、前記完全長抗体の少なくとも1つの重鎖のN末端に融合される、

(iii) 前記抗TIGITs dAb部分のN末端が、前記完全長抗体の少なくとも1つの軽鎖のC末端に融合される、

(iv) 前記抗TIGITs dAb部分のC末端が、前記完全長抗体の少なくとも1つの軽鎖のN末端に融合される、

(v) 前記単離抗TIGIT構築物が4つの抗TIGITs dAb部分を含み、各々の抗TIGITs dAb部分のC末端が、前記完全長抗体の各々の鎖のN末端に融合される、および

(vi) 前記単離抗TIGIT構築物が4つの抗TIGITs dAb部分を含み、前記4つの抗TIGITs dAb部分のうちの2つがたがいに融合されており、前記完全長抗体の各々の重鎖のN末端にさらに融合される、

からなる群から選択される構成を含む、請求項12または13に記載の単離抗TIGIT構築物。

【請求項 15】

前記完全長抗体が、PD-1を特異的に認識する(抗PD-1完全長抗体)、請求項12～14のいずれか1項に記載の単離抗TIGIT構築物。

【請求項 16】

前記抗PD-1完全長抗体が、

(i) 配列番号385のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(V_H)、及び配列番号386のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(V_L)、

(ii) 配列番号387のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(V_H)、及び配列番号388のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(V_L)、または

(iii) 配列番号406のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(V_H)、及び配列番号407のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(V_L)

の重鎖相補性決定領域(HC-CDR)および軽鎖相補性決定領域(LC-CDR)を含む、請求項15に記載の単離抗TIGIT構築物。

【請求項 17】

前記抗PD-1完全長抗体が、配列番号390のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号391のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、

請求項15または16のいずれか1項に記載の単離抗TIGIT構築物。

【請求項 18】

前記完全長抗体が、PD-L1を特異的に認識する(抗PD-L1完全長抗体)、請求項12～14のいずれか1項に記載の単離抗TIGIT構築物。

【請求項 19】

前記抗PD-L1完全長抗体が、

(i) 配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3、配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3、

(i i) 配列番号 339 のアミノ酸配列を含む V_H 、及び配列番号 340 のアミノ酸配列を含む V_L 、

(i i i) 配列番号 323 もしくは 327 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 328 のアミノ酸配列を含む軽鎖、

(i v) 配列番号 329 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 330 のアミノ酸配列を含む軽鎖、

(v) 配列番号 379 のアミノ酸配列を含む V_H の $HC-CDR1\sim3$ 、及び配列番号 380 のアミノ酸配列を含む V_L の $LC-CDR1\sim3$ 、

(v i) 配列番号 383 のアミノ酸配列を含む V_H の $HC-CDR1\sim3$ 、及び配列番号 384 のアミノ酸配列を含む V_L の $LC-CDR1\sim3$ 、

(v i i) 配列番号 381 のアミノ酸配列を含む V_H の $HC-CDR1\sim3$ 、及び配列番号 382 のアミノ酸配列を含む V_L の $LC-CDR1\sim3$ 、

(v i i i) 配列番号 331 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 332 のアミノ酸配列を含む軽鎖、または

(i x) 配列番号 333 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 334 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、請求項 18 に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

【請求項 20】

前記抗 P D - L 1 完全長抗体が、配列番号 327 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 328 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、

請求項 18 または 19 に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

【請求項 21】

(a) 前記単離抗 T I G I T 構築物が N 末端から C 末端に 4 つのポリペプチド：(i) V_L-C_L 、(i i) V_H-C_H1 - 必要に応じてペプチドリンカー - 第 1 の抗 T I G I T s d A b 部分 - C_H2-C_H3 、(i i i) V_H-C_H1 - 必要に応じてペプチドリンカー - 第 2 の抗 T I G I T s d A b 部分 - C_H2-C_H3 、および (i v) V_L-C_L を含み、ポリペプチド (i) の V_L-C_L およびポリペプチド (i i) V_H-C_H1 が、第 2 のエピトープを特異的に認識する第 2 の抗体部分を形成し、ポリペプチド (i v) の V_L-C_L およびポリペプチド (i i i) V_H-C_H1 が、第 3 のエピトープを特異的に認識する第 3 の抗体部分を形成する、

(b) 前記単離抗 T I G I T 構築物が N 末端から C 末端に 2 つのポリペプチド：(i) 第 2 のエピトープを特異的に認識する第 1 の s c F v - 必要に応じてペプチドリンカー - 第 1 の抗 T I G I T s d A b 部分 - C_H2-C_H3 、および (i i) 第 3 のエピトープを特異的に認識する第 2 の s c F v - 必要に応じてペプチドリンカー - 第 2 の抗 T I G I T s d A b 部分 - C_H2-C_H3 を含む、

(c) 前記単離抗 T I G I T 構築物が N 末端から C 末端に 4 つのポリペプチド：(i) V_L-C_L - 必要に応じてペプチドリンカー - 第 1 の抗 T I G I T s d A b 部分 - C_L 、(i i) V_H-C_H1 - 必要に応じてペプチドリンカー - 第 2 の抗 T I G I T s d A b 部分 - $C_H1-C_H2-C_H3$ 、(i i i) V_H-C_H1 - 必要に応じてペプチドリンカー - 第 3 の抗 T I G I T s d A b 部分 - $C_H1-C_H2-C_H3$ 、および (i v) V_L-C_L - 必要に応じてペプチドリンカー - 第 4 の抗 T I G I T s d A b 部分 - C_L を含み、ポリペプチド (i) の V_L-C_L およびポリペプチド (i i) V_H-C_H1 が、第 2 のエピトープを特異的に認識する第 2 の抗体部分を形成し、ポリペプチド (i v) の V_L-C_L およびポリペプチド (i i i) の V_H-C_H1 が、第 3 のエピトープを特異的に認識する第 3 の抗体部分を形成する、ならびに

(d) 前記単離抗 T I G I T 構築物が N 末端から C 末端に 4 つのポリペプチド：(i) 第 1 の抗 T I G I T s d A b 部分 - C_L 、(i i) 第 2 のエピトープを特異的に認識する第 1 の s c F v - 必要に応じてペプチドリンカー - 第 2 の抗 T I G I T s d A b 部分 - $C_H1-C_H2-C_H3$ 、(i i i) 第 3 のエピトープを特異的に認識する第 2 の s c F v - 必要に応じてペプチドリンカー - 第 3 の抗 T I G I T s d A b 部分 - $C_H1-C_H2-C_H$

10

20

30

40

50

3、および (i v) 第4の抗 T I G I T s d A b 部分 - C_Lを含む、
からなる群から選択される構成を含む、請求項8～11のいずれか一項に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

【請求項22】

請求項1～21のいずれか1項に記載の単離抗 T I G I T 構築物、及び適宜、薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項23】

個体において T I G I T 関連疾患を治療するための医薬であって、前記 T I G I T 関連疾患の治療に有効な量の、請求項1～21のいずれか1項に記載の単離抗 T I G I T 構築物または請求項22に記載の医薬組成物を含む、医薬。

【請求項24】

前記 T I G I T 関連疾患が、がん、病原性感染または免疫関連疾患である、請求項23に記載の医薬。

【請求項25】

(i) 前記がんが、固形腫瘍であるか、
(i i) 前記病原性感染が、ウイルス感染であるか、または
(i i i) 前記免疫関連疾患が、T細胞機能不全障害と関連する、
請求項24に記載の医薬。

【請求項26】

(i) 前記固形腫瘍が、大腸がんであるか、または
(i i) 前記T細胞機能不全障害がT細胞消耗によって特徴付けられる、
請求項25に記載の医薬。

【請求項27】

請求項1～21のいずれか1項に記載の単離抗 T I G I T 構築物をコードする、単離核酸。

【請求項28】

請求項27に記載の単離核酸を含む、ベクター。

【請求項29】

請求項27に記載の単離核酸、または請求項28に記載のベクターを含む、単離宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2017年12月28日に出願された国際特許出願第PCT/CN2017/119506号、及び2018年7月26日に出願された国際特許出願第PCT/CN2018/097159号の利益を主張し、これらの出願は、それらの全体を参照することによって本明細書に組み込まれる。

【0002】

A S C I Iテキストファイルによる配列表の提出

A S C I Iテキストファイル上の以下の提出物の内容、すなわち、コンピューターで読取り可能な形態(CRF)の配列表(ファイル名: 761422000741 S E Q L I S T I N G . t x t、記録日: 2018年7月18日、サイズ: 392KB)は、その全体を参照することによって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

本発明は、T I G I Tを特異的に認識する単ドメイン抗体(s d A b)部分を含む構築物、及びこれらを作製し、使用方法に関する。

【0004】

I g及びI T I Mドメインを有するT細胞免疫受容体(T I G I T: V s t m3または

10

20

30

40

50

WUCAMとしても知られる)は、CD28ファミリーに属する免疫受容体である。この26KDaタンパク質は、細胞質中に細胞外IgVドメイン、I型膜貫通領域、細胞内免疫グロブリンテールチロシン(ITT)様モチーフ、及びC末端免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ(ITIM)モチーフを含有する。ナイーブT細胞及びNK細胞では、TIGITは、細胞表面上でほとんど検出できないが、T細胞及びNK細胞の活性化の際に上方調節される。腫瘍微小環境では、TIGITは、制御性T細胞(Treg)、疲弊状態のT細胞及びNK細胞上で高度に検出される。TIGITは、CD155(nectin-5またはポリオウイルス受容体(PVR))、CD112(ネクチン-2またはポリオウイルス受容体関連2(PVRL2))、及びCD113(ネクチン-3またはPVRL3)を含む、多数のリガンドを有する。TIGITは、CD155(PVR)に高親和性で結合することができる一方、CD112及びCD113に低親和性で結合することができる。最近の報告でも、TIGITが、シスでCD226(PTA1またはDNAM-1)と相互作用することも示唆している。

【0005】

TIGITは、いくつかの機序を介してその阻害免疫チェックポイント機能を発揮する。第1に、その主要リガンドCD155(PVR)に結合する際に、そのITIMドメインにおけるTIGITのその後のリン酸化は、阻害シグナルを変換して、NF-κB経路を介してT細胞及びNK細胞中のIFN-γ発現を下方調節する。第2に、TIGITが、CD226とよりもPVRと高親和性で相互作用する際に、TIGITは、CD226と競合し、CD226によって変換された刺激性シグナルを減衰させる。第3に、PVRが樹状細胞上でTIGITに結合することで、IL-10発現の上方調節及びIL-12発現の下方調節をもたらすため、樹状細胞の抗腫瘍免疫応答を損ない得る。最後に、TIGITが、シスでCD226に直接結合して、T細胞活性化に必要なCD226二量体化を阻害することができることが、最近の研究により示された。したがって、TIGITは、感染及びがんにおける免疫応答の重要な負の調節因子として作用し、TIGITシグナル伝達の遮断は、がん治療用のT細胞及びNK細胞免疫を強化するためのアプローチとして提案されている。

【0006】

プログラム細胞死受容体1(PD-1)は、T細胞機能上で重要な負の調節を有する別の阻害性免疫チェックポイント分子である。PD-1が、T細胞受容体(TCR)シグナル伝達を調節するプログラム細胞死リガンド1(PD-L1)及び／またはプログラム細胞死リガンド2(PD-L2)に結合する場合、T細胞応答は、PD-1シグナル伝達によって減衰させることができる。PD-1またはPD-L1のいずれかを標的化する抗体を用いたPD-1/PD-L1軸の遮断は、腫瘍特異的T細胞免疫を促進し、がん患者に大きな臨床的利益を有することが示されている。しかしながら、PD-1/PD-L1遮断の際の耐性または再発により、満たされていない巨大な臨床的ニーズがまだ存在する。

【0007】

本明細書に参照される全ての刊行物、特許、特許出願、及び公開特許出願の開示は、それらの全体を参照することによって本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、TIGIT(以下、「抗TIGIT sdAb」と呼ぶ)、例えば、抗TIGIT sdAb、ヒト免疫グロブリンG(IgG)の結晶性断片(Fc)断片に融合した抗TIGIT sdAbを含む抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、及び、例えば、他のsdAbsに融合したまたは完全長4本鎖抗体に融合した抗TIGIT sdAbを含む多重特異性(例えば、二重特異性)抗原結合タンパク質を特異的に認識するsdAb部分を含む抗TIGIT構築物、及びこれらを作製し、使用方法に関する。

【0009】

本出願の一態様は、TIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む単離抗TIGIT

10

20

30

40

50

T構築物であって、s d A b部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。いくつかの実施形態では、単離抗TIGIT構築物は、TIGITを特異的に認識するs d A b部分を含み、s d A b部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するs d A b部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、CDR1及び／またはCDR2中であり、CDR3は、配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するs d A b部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0010】

上述の単離抗TIGIT構築物のいずれか1つに記載のいくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するs d A b部分は、以下のいずれか1つを含む：

（1）配列番号36のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176のアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；

（2）配列番号37のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号107のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号177のアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；

（3）配列番号38のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号108のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号178のアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；

（4）配列番号39のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号109のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号179のアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域に

10

20

30

40

50

(16) 配列番号67のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号137のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号207のアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；

(17) 配列番号69のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号139のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号209のアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；または

(18) 配列番号70のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号140のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号210のアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体。

【0011】

上述の単離抗TIGIT構築物のいずれか1つに記載のいくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分は、以下のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む：a-1) 37位のアミノ酸残基は、F、Y、V、L、A、H、S、I、W、C、N、G、D、T、及びP（例えば、F、Y、L、I、またはV、例えば、FまたはY、または例えば、F）からなる群から選択され；a-2) 44位のアミノ酸残基は、E、Q、G、D、A、K、R、L、P、S、V、H、T、N、W、M、及びI（例えば、A、G、E、D、Q、R、S、またはL、または例えば、G、E、またはQ）からなる群から選択され；a-3) 45位のアミノ酸残基は、L、R、P、H、F、G、Q、S、E、T、Y、C、I、D、及びV（例えば、L、C、またはR、または例えば、LまたはR）からなる群から選択され；a-4) 103位のアミノ酸残基は、W、R、G、S、K、A、M、Y、I、F、T、N、V、Q、P、E、及びC（例えば、W、G、またはR、または例えば、W）からなる群から選択され；及びa-5) 108位のアミノ酸残基は、Q、L、R、P、E、K、S、T、M、A、及びH（例えば、Q）からなる群から選択され；またはb-1) 37位のアミノ酸残基は、F、Y、L、I、及びV（例えば、FまたはY、または例えば、F）からなる群から選択され；b-2) 44位のアミノ酸残基は、E及びQからなる群から選択され；b-3) 45位のアミノ酸残基は、R及びL（例えば、R）からなる群から選択され；b-4) 103位のアミノ酸残基は、W、R、G及びS（例えば、W）からなる群から選択され；及びb-5) 108位のアミノ酸残基は、Q及びL（例えば、Q）からなる群から選択され；またはc-1) 37位のアミノ酸残基は、F、Y、L、I、及びV（例えば、FまたはY、または例えば、F）からなる群から選択され；c-2) 44位のアミノ酸残基は、A、G、E、D、Q、R、S、及びL（例えば、G、E、またはQ）からなる群から選択され；c-3) 45位のアミノ酸残基は、L、R、及びC（例えば、LまたはR）からなる群から選択され；c-4) 103位のアミノ酸残基は、P、R、及びS（例えば、RまたはS）からなる群から選択され；及びc-5) 108位のアミノ酸残基は、Q及びL（例えば、Q）からなる群から選択され；アミノ酸位置は、Kabab番号付けに従っている。いくつかの実施形態では、108位は、108位がQである場合、Lに適宜ヒト化することができる。

【0012】

上述の単離抗TIGIT構築物のいずれか1つに記載のいくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、または配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つに対して少なくとも約80%（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のいずれか）の配列同一性を有するその変異体を含む。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、またはV_HHドメインにおいて最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのCDR1、及び／

10

20

30

40

50

またはCDR2、及び／またはCDR3などのCDR内である。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのFR1、及び／またはFR2、及び／またはFR3、及び／またはFR4などのFR内である。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、CDR及びFRの両方の内である。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。

【0013】

上述の単離抗TIGIT構築物のいずれか1つに記載のいくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分とTIGITの間の結合のK_dは、約10⁻⁵M～約10⁻¹²M（例えば、約10⁻⁵M～約10⁻¹²M、約10⁻⁷M～約10⁻¹²M、または約10⁻⁸M～約10⁻¹²M）である。

10

【0014】

上述の単離抗TIGIT構築物のいずれか1つに記載のいくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。

【0015】

上述の単離抗TIGIT構築物のいずれか1つに記載のいくつかの実施形態では、単離抗TIGIT構築物は、sdAb-Fc融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、sdAb-Fc融合タンパク質は、単量体である。いくつかの実施形態では、sdAb-Fc融合タンパク質は、二量体である。いくつかの実施形態では、Fc断片は、ヒトIgG1（hIgG1）Fc、エフェクターレス（不活性）hIgG1 Fc、またはhIgG4 Fcである。いくつかの実施形態では、Fc断片は、配列番号355、356、及び389のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及びFc断片は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーによって適宜連結される。いくつかの実施形態では、sdAb-Fc融合タンパク質は、配列番号288～294、306、308～311、315、317～319、321～322、及び365～367のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

20

30

【0016】

上述の単離抗TIGIT構築物のいずれか1つに記載のいくつかの実施形態では、単離抗TIGIT構築物は、第2のエピトープを特異的に認識する第2の抗体部分をさらに含む。いくつかの実施形態では、第2の抗体部分は、完全長抗体、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、一本鎖Fv（scFv）、scFv-scFv、ミニボディ、ダイアボディ、またはsdAbである。いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、単一特異性である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、多重特異性（例えば、二重特異性）である。いくつかの実施形態では、第2のエピトープは、TIGIT由来ではない。いくつかの実施形態では、第2のエピトープは、TIGIT由来であるが、抗TIGIT sdAb部分によって特異的に認識されるものとは異なる。いくつかの実施形態では、第2のエピトープは、抗TIGIT sdAb部分によって特異的に認識されるものと同じである。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分、及び第2の抗体部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーによって適宜連結される。いくつかの実施形態では、第2の抗体部分は、sdAbである。いくつかの実施形態では、第2の抗体部分は、Fabである。いくつかの実施形態では、第2の抗体部分は、scFvである。いくつかの実施形態では、第2の抗体部分は、2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体である。いくつかの実施形態では、重鎖のFc断片は、IgG1 Fc、エフェクターレスIgG1 Fc、IgG2 Fc、またはIgG4 Fcである。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分のN末端は、完全長抗体の少

40

50

なくとも1つの重鎖のC末端に融合される。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分のC末端は、完全長抗体の少なくとも1つの重鎖のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分のN末端は、完全長抗体の軽鎖の少なくとも1つのC末端に融合される。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分のC末端は、完全長抗体の軽鎖の少なくとも1つのN末端に融合される。いくつかの実施形態では、単離抗TIGIT構築物は、上述したように、TIGITを特異的に認識する4つの同一なsdAb部分を含み、抗TIGIT sdAb部分の各々のC末端は、適宜ペプチドリンカーを介して、完全長抗体の各鎖のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、単離抗TIGIT構築物は、上述のように、TIGITを特異的に認識する4つの同一なsdAbを含み、2つの抗TIGIT sdAb部分は、適宜ペプチドリンカーを介して互いに融合され、他の2つの抗TIGIT sdAb部分は、適宜ペプチドリンカーを介して互いに融合され、及び抗TIGIT sdAb部分融合ポリペプチドの各々のC末端は、適宜ペプチドリンカーを介して完全長抗体の各重鎖のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、単離抗TIGIT構築物は、以下のようなN末端からC末端までの構造を有する4つのポリペプチド鎖：(1) V_L-C_L ；(2) 抗TIGIT sdAb- $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ；(3) 抗TIGIT sdAb- $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ；及び(4) V_L-C_L からなり、ポリペプチド鎖(1)及び(2)の V_H 及び V_L は、第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）の第1のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖(3)及び(4)の V_H 及び V_L は、第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）の第2のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各抗TIGIT sdAbは、TIGITのコピーに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、単離抗TIGIT構築物は、以下のようなN末端からC末端までの構造を有する4つのポリペプチド鎖：(1) V_L-C_L ；(2) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ -抗TIGIT sdAb；(3) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ -抗TIGIT sdAb；及び(4) V_L-C_L からなり、ポリペプチド鎖(1)及び(2)の V_H 及び V_L は、第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）の第1のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖(3)及び(4)の V_H 及び V_L は、第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）の第2のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各抗TIGIT sdAbは、TIGITのコピーに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、単離抗TIGIT構築物は、以下のようなN末端からC末端までの構造を有する4つのポリペプチド鎖：(1) 抗TIGIT sdAb- V_L-C_L ；(2) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ；(3) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ；及び(4) 抗TIGIT sdAb- V_L-C_L からなり、ポリペプチド鎖(1)及び(2)の V_H 及び V_L は、第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）の第1のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖(3)及び(4)の V_H 及び V_L は、第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）の第2のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各抗TIGIT sdAbは、TIGITのコピーに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、単離抗TIGIT構築物は、以下のようなN末端からC末端までの構造を有する4つのポリペプチド鎖：(1) 抗TIGIT sdAb- V_L-C_L ；(2) 抗TIGIT sdAb- $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ；(3) 抗TIGIT sdAb- $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ；及び(4) 抗TIGIT sdAb- V_L-C

10

20

30

40

50

V_L からなり、ポリペプチド鎖 (1) 及び (2) の V_H 及び V_L は、第 2 のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1) の第 1 のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖 (3) 及び (4) の V_H 及び V_L は、第 2 のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1) の第 2 のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各抗 TIGIT s d A b は、TIGIT のコピーに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、単離抗 TIGIT 構築物は、以下のような N 末端から C 末端までの構造を有する 4 つのポリペプチド鎖：(1) V_L-C_L ；(2) 抗 TIGIT s d A b-抗 TIGIT s d A b- $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ；(3) 抗 TIGIT s d A b-抗 TIGIT s d A b- $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ；及び (4) V_L-C_L からなり、ポリペプチド鎖 (1) 及び (2) の V_H 及び V_L は、第 2 のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1) の第 1 のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖 (3) 及び (4) の V_H 及び V_L は、第 2 のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1) の第 2 のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各抗 TIGIT s d A b は、TIGIT のコピーに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、単離抗 TIGIT 構築物は、以下のような N 末端から C 末端までの構造を有する 4 つのポリペプチド鎖：(1) V_L-C_L ；(2) V_H-C_H1 -抗 TIGIT s d A b- C_H2-C_H3 ；(3) V_H-C_H1 -抗 TIGIT s d A b- C_H2-C_H3 ；及び (4) V_L-C_L からなり、ポリペプチド鎖 (1) 及び (2) の V_H 及び V_L は、第 2 のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1) の第 1 のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖 (3) 及び (4) の V_H 及び V_L は、第 2 のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1) の第 2 のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各抗 TIGIT s d A b は、TIGIT のコピーに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、単離抗 TIGIT 構築物は、以下のような N 末端から C 末端までの構造： V_L-V_H -抗 TIGIT s d A b- C_H2-C_H3 を各々が有する 2 つのポリペプチド鎖からなり、各ポリペプチド鎖の V_H 及び V_L は、第 2 のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1) のコピーに特異的に結合する s c F V ドメインを形成し、及び各抗 TIGIT s d A b は、TIGIT のコピーに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、単離抗 TIGIT 構築物は、以下のような N 末端から C 末端までの構造を有する 4 つのポリペプチド鎖からなり：(1) V_L-C_L -抗 TIGIT s d A b- C_L ；(2) V_H-C_H1 -抗 TIGIT s d A b- $C_H1-C_H2-C_H3$ ；(3) V_H-C_H1 -抗 TIGIT s d A b- $C_H1-C_H2-C_H3$ ；及び (4) V_L-C_L -抗 TIGIT s d A b- C_L 、ポリペプチド鎖 (1) 及び (2) の V_H 及び V_L は、第 2 のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1) の第 1 のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖 (3) 及び (4) の V_H 及び V_L は、第 2 のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1) の第 2 のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各抗 TIGIT s d A b は、TIGIT のコピーに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、単離抗 TIGIT 構築物は、以下のような N 末端から C 末端までの構造を有する 4 つのポリペプチド鎖：(1) 抗 TIGIT s d A b- C_L ；(2) V_L-V_H -抗 TIGIT s d A b- $C_H1-C_H2-C_H3$ ；(3) V

V_L-V_H -抗 TIGIT s d A b- $C_H1-C_H2-C_H3$ ；及び (4) 抗 TIGIT s d A b- C_L からなり、ポリペプチド鎖 (2) 及び (3) の V_H 及び V_L の各々は、第 2 のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1) のコピーに特異的に結合する s c F V を形成し、及び各抗 TIGIT s d A b は、TIGIT のコピーに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、完全長抗体 (または V_H 及び V_L を含む抗原結合部分) は、PD-1 を特異的に認識する。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 完全長抗体 (または V_H 及び V_L を含む抗原結合部分) は、配列番号 385 のアミノ酸配列を含む V_H 、及び配列番号 386 のアミノ酸配列を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 完全長抗体は、配列番号 325 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 326 のアミノ酸配

列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1完全長抗体（またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）は、配列番号387のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号388のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1完全長抗体は、配列番号390のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号391のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1完全長抗体（またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）は、配列番号406のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号407のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、配列番号390のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号391のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、完全長抗体の重鎖の少なくとも1つは、上述のように、TIGITを特異的に認識するsdAb部分に融合され、重鎖融合ポリペプチドは、配列番号394または396のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、配列番号390のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号391のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、完全長抗体の軽鎖の少なくとも1つは、上述のように、TIGITを特異的に認識するsdAb部分に融合され、軽鎖融合ポリペプチドは、配列番号399または401のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体（またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）は、PD-L1を特異的に認識する。いくつかの実施形態では、抗PD-L1完全長抗体（またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）は、1）配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含むV_H、及び2）配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1完全長抗体（またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）は、配列番号339のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号340のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号323または327のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号329のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号330のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1完全長抗体（またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）は、配列番号379のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号380のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1完全長抗体（またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）は、配列番号383のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号384のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1完全長抗体（またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）は、配列番号381のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号382のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号331のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号332のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号333のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、配列番号327のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、完全長抗体の重鎖の少なくとも1つは、上述のように、TIGITを特異的に認識するsdAb部分に融合され、重鎖融合ポリペプチドは、配列番号343のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、配列番号323のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、完全長抗体の重鎖の少なくとも1つは、上述のように、TIGITを特異的に認識するsdAb部分に融合され、重鎖融合ポリペプチドは、配列番号357または359のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、配列番号329のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号330のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、完全長抗体の重鎖の少なくとも1つは、上述のように、TIGITを特異的に認識するsdAb部分に融合され、重鎖融合ポリペプチドは、配列番号341または402のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、配列番号323のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、完全長抗体の軽鎖の少なくと

10

20

30

40

50

も1つは、上述のように、T I G I Tを特異的に認識するs d A b部分に融合され、軽鎖融合ポリペプチドは、配列番号362または364のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、配列番号329のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号330のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記完全長抗体の軽鎖の少なくとも1つは、上述のように、T I G I Tを特異的に認識するs d A b部分に融合され、軽鎖融合ポリペプチドは、配列番号405のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、配列番号331のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号332のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、完全長抗体の重鎖の少なくとも1つは、上述のように、T I G I Tを特異的に認識するs d A b部分に融合され、重鎖融合ポリペプチドは、配列番号347のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、配列番号333のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、完全長抗体の重鎖の少なくとも1つは、上述のように、T I G I Tを特異的に認識するs d A b部分に融合され、重鎖融合ポリペプチドは、配列番号345のアミノ酸配列を含む。

10

【0017】

上述の単離抗T I G I T構築物のいずれか1つに記載のいくつかの実施形態では、単離抗T I G I T構築物は、生物学的に活性なタンパク質またはその断片をさらに含む。

【0018】

T I G I Tを特異的に認識するs d A b部分を含む単離抗T I G I T構築物であって、s d A b部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む、単離抗T I G I T構築物をさらに提供する。

20

【0019】

上述の単離抗T I G I T構築物のいずれか1つと競合的にT I G I Tに特異的に結合する単離抗T I G I T構築物（例えば、抗T I G I T s d A b、抗T I G I T s d A b-Fc融合体、PD-1×T I G I T B A B P、またはPD-L1×T I G I T B A B P）をさらに提供する。

【0020】

上述の単離抗T I G I T構築物のいずれか1つ、及び適宜、薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物をさらに提供する。

【0021】

本出願の別の態様は、個体に有効量の上述の医薬組成物のいずれか1つを投与することを含む、T I G I T関連疾患（例えば、がん、または免疫関連疾患）を有する個体の治療方法を提供する。いくつかの実施形態では、T I G I T関連疾患は、がんである。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍、例えば、大腸がんである。いくつかの実施形態では、T I G I T関連疾患は、免疫関連疾患である。いくつかの実施形態では、免疫関連疾患は、T細胞機能不全障害と関連する。いくつかの実施形態では、T細胞機能不全障害は、T細胞消耗によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、免疫関連疾患は、未解明な急性感染、慢性感染、及び腫瘍免疫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、T I G I T関連疾患は、病原性感染である。いくつかの実施形態では、方法は、個体に追加の療法（例えば、がん療法）、例えば、外科外科手術、放射線、化学療法、免疫療法、ホルモン療法、またはそれらの組み合わせを投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、追加の療法は、免疫療法である。いくつかの実施形態では、免疫療法は、個体に、免疫調節薬を含む第2の医薬組成物、例えば、免疫チェックポイント阻害薬（例えば、PD-1またはPD-L1を特異的に認識する抗体）の有効量を投与することを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、全身に、例えば、静脈内（i.v.）または腹腔内（i.p.）に投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、局所的に、例えば、腫瘍内に投与される。いくつかの実施形態では、個体は、ヒトである。

30

40

【0022】

上述の単離抗T I G I T構築物のいずれか1つをコードする単離核酸をさらに提供する。いくつかの実施形態では、単離核酸は、配列番号246～252のいずれか1つの核酸配列

50

を含む。

【0023】

上述の単離核酸のいずれか1つを含むベクターをさらに提供する。

【0024】

上述の単離核酸またはベクターのいずれか1つを含む単離宿主細胞をさらに提供する。

【0025】

上述の単離抗TIGIT構築物、単離核酸、ベクター、または単離宿主細胞のいずれか1つを含むキットをさらに提供する。

【0026】

本出願の別の態様は、上述の単離核酸またはベクターのいずれか1つを含む宿主細胞を培養すること、またはコードされた抗TIGIT構築物の発現に効果的な条件下で上述の単離宿主細胞のいずれか1つを培養すること；及び発現された抗TIGIT構築物を前記宿主細胞から得ることを含む、上述の単離抗TIGIT構築物のいずれか1つの産生方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、上述の単離核酸またはベクターのいずれか1つを含む宿主細胞を産生することをさらに含む。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

TIGITを特異的に認識する単ドメイン抗体(s d A b)部分を含む単離抗TIGIT構築物であって、前記s d A b部分が、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体を含む、前記単離抗TIGIT構築物。

(項目2)

前記s d A b部分が、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体を含む、項目1に記載の単離抗TIGIT構築物。

(項目3)

前記s d A b部分が、以下：

(1) 配列番号36のアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106のアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176のアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(2) 配列番号37のアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号107のアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号177のアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(3) 配列番号38のアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号108のアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号178のアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(4) 配列番号39のアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号109のアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3

(16) 配列番号67のアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号137のアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号207のアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

50

(17) 配列番号69のアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号139のアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号209のアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；または

(18) 配列番号70のアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号140のアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号210のアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体

のいずれか1つを含む、項目1または2に記載の単離抗TIGIT構築物。

(項目4)

前記s d A b部分が、以下：

(1) 配列番号36のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(2) 配列番号37のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号107のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号177のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(3) 配列番号38のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号108のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号178のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(4) 配列番号39のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号109のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号179のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(5) 配列番号40のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号110のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号180のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(6) 配列番号41のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号111のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号181のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(7) 配列番号42のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号112のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号182のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(8) 配列番号54のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号124のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号194のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(9) 配列番号56のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号126のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号196のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(10) 配列番号57のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号127のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号197のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(11) 配列番号58のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号128のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号198のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(12) 配列番号59のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号129のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号199のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(13) 配列番号63のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号133のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号203のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

10

20

30

40

50

(14) 配列番号65のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号135のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号205のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(15) 配列番号66のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号136のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号206のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(16) 配列番号67のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号137のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号207のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；

(17) 配列番号69のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号139のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号209のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体；または

(18) 配列番号70のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号140のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号210のアミノ酸配列を含むCDR3；または前記CDR領域において最大で約3つのアミノ酸置換を含むその変異体

のいずれか1つを含む、項目1～3のいずれか1項に記載の単離抗TIGIT構築物。
(項目5)

前記s d A b部分が、以下：

a-1) 37位のアミノ酸残基が、F、Y、V、L、A、H、S、I、W、C、N、G、D、T、及びPからなる群から選択され；

a-2) 44位のアミノ酸残基が、E、Q、G、D、A、K、R、L、P、S、V、H、T、N、W、M、及びIからなる群から選択され；

a-3) 45位のアミノ酸残基が、L、R、P、H、F、G、Q、S、E、T、Y、C、I、D、及びVからなる群から選択され；

a-4) 103位のアミノ酸残基が、W、R、G、S、K、A、M、Y、I、F、T、N、V、Q、P、E、及びCからなる群から選択され；及び

a-5) 108位のアミノ酸残基が、Q、L、R、P、E、K、S、T、M、A、及びHからなる群から選択され；または

b-1) 37位のアミノ酸残基が、F、Y、L、I、及びVからなる群から選択され；

b-2) 44位のアミノ酸残基が、E及びQからなる群から選択され；

b-3) 45位のアミノ酸残基が、R及びLからなる群から選択され；

b-4) 103位のアミノ酸残基が、W、R、G、及びSからなる群から選択され；及び

b-5) 108位のアミノ酸残基が、Q及びLからなる群から選択され；または

c-1) 37位のアミノ酸残基が、F、Y、L、I、及びVからなる群から選択され；

c-2) 44位のアミノ酸残基が、A、G、E、D、Q、R、S、及びLからなる群から選択され；

c-3) 45位のアミノ酸残基が、L、R、及びCからなる群から選択され；

c-4) 103位のアミノ酸残基が、P、R、及びSからなる群から選択され；及び

c-5) 108位のアミノ酸残基が、Q及びLからなる群から選択され；

のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含み、

前記アミノ酸位置が、K a b a t番号付けに従っており、108位がQである場合、108位が、Lに適宜ヒト化することができる、項目1～4のいずれか1項に記載の単離抗TIGIT構築物。

(項目6)

前記s d A b部分が、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、または配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つに対して少なくとも約80%の配列同一性を有するその変異体を含む、項目1～5のいずれか1項に記載の単離抗TIGIT構築物。

(項目7)

前記 s d A b 部分が、配列番号 253～259、271、273～276、280、282～284、286～287 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む V_HH ドメイン、または前記 V_HH ドメインにおいて最大で約 3 つのアミノ酸置換を含むその変異体を含む、項目 6 に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 8)

前記 s d A b 部分と前記 T I G I T の間の結合の K_d が、約 10⁻⁵ M ～ 約 10⁻¹² M である、項目 1～7 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 9)

前記 s d A b 部分と前記 T I G I T の間の結合の K_d が、約 10⁻⁷ M ～ 約 10⁻¹² M である、項目 8 に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

10

(項目 10)

T I G I T を特異的に認識する前記 s d A b 部分が、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である、項目 1～9 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 11)

前記単離抗 T I G I T 構築物が、s d A b - F c 融合タンパク質である、項目 1～10 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 12)

前記 s d A b - F c 融合タンパク質が、単量体または二量体である、項目 11 に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

20

(項目 13)

前記 F c 断片が、ヒト I g G 1 (h I g G 1) F c、エフェクターレス (不活性) h I g G 1 F c、または h I g G 4 F c である、項目 11 または 12 に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 14)

前記 s d A b - F c 融合タンパク質が、配列番号 288～294、306、308～311、315、317～319、321～322、及び 365～367 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、項目 11～13 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 15)

前記単離抗 T I G I T 構築物が、第 2 のエピトープを特異的に認識する第 2 の抗体部分をさらに含む、項目 1～10 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

30

(項目 16)

前記第 2 の抗体部分が、完全長抗体、F a b、F a b'、(F a b')₂、F V、一本鎖 F V (s c F V)、s c F V - s c F V、ミニボディ、ダイアボディ、または s d A b である、項目 15 に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 17)

前記抗 T I G I T 構築物が、多重特異性である、項目 15 または 16 に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 18)

T I G I T を特異的に認識する前記 s d A b 部分、及び前記第 2 の抗体部分が、ペプチドリンカーによって適宜連結される、項目 15～17 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

40

(項目 19)

前記ペプチドリンカーが、配列番号 324 及び 370～378 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、項目 18 に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 20)

前記第 2 の抗体部分が、2 つの重鎖及び 2 つの軽鎖からなる完全長抗体である、項目 15～19 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 21)

前記重鎖の F c 断片が、I g G 1 F c、エフェクターレス I g G 1 F c、I g G 2

50

F c、またはI g G 4 F cであり得る、項目20に記載の単離抗T I G I T構築物。
(項目22)

T I G I Tを特異的に認識する前記s d A b部分のN末端が、前記完全長抗体の少なくとも1つの重鎖のC末端に融合される、項目20または21に記載の単離抗T I G I T構築物。

(項目23)

T I G I Tを特異的に認識する前記s d A b部分のC末端が、前記完全長抗体の少なくとも1つの重鎖のN末端に融合される、項目20または21に記載の単離抗T I G I T構築物。

(項目24)

T I G I Tを特異的に認識する前記s d A b部分のN末端が、前記完全長抗体の軽鎖の少なくとも1つのC末端に融合される、項目20または21に記載の単離抗T I G I T構築物。

(項目25)

T I G I Tを特異的に認識する前記s d A b部分のC末端が、前記完全長抗体の軽鎖の少なくとも1つのN末端に融合される、項目20または21に記載の単離抗T I G I T構築物。

(項目26)

前記完全長抗体が、P D - 1を特異的に認識する、項目20～25のいずれか1項に記載の単離抗T I G I T構築物。

(項目27)

前記完全長抗体が、配列番号385のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(V_H)、及び配列番号386のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(V_L)を含む、項目26に記載の単離抗T I G I T構築物。

(項目28)

前記完全長抗体が、配列番号387のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(V_H)、及び配列番号388のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(V_L)を含む、項目26に記載の単離抗T I G I T構築物。

(項目29)

前記完全長抗体が、配列番号406のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(V_H)、及び配列番号407のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(V_L)を含む、項目26に記載の単離抗T I G I T構築物。

(項目30)

前記完全長抗体が、配列番号390のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号391のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記完全長抗体の重鎖の少なくとも1つが、T I G I Tを特異的に認識する前記s d A b部分に融合され、前記重鎖融合ポリペプチドが、配列番号394または396のアミノ酸配列を含む、項目26または29のいずれか1項に記載の単離抗T I G I T構築物。

(項目31)

前記完全長抗体が、配列番号390のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号391のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記完全長抗体の軽鎖の少なくとも1つが、T I G I Tを特異的に認識する前記s d A b部分に融合され、前記軽鎖融合ポリペプチドが、配列番号399または401のアミノ酸配列を含む、項目26または29のいずれか1項に記載の単離抗T I G I T構築物。

(項目32)

前記完全長抗体が、P D - L 1を特異的に認識する、項目20～25のいずれか1項に記載の単離抗T I G I T構築物。

(項目33)

前記完全長抗体が、1) 配列番号349のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域(H C - C D R) 1、配列番号350のアミノ酸配列を含むH C - C D R 2、及び配列番号3

10

20

30

40

50

51のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含むV_H、及び2)配列番号352のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域(LC-CDR)1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含むV_Lを含む、項目32に記載の単離抗TIGIT構築物。

(項目34)

前記完全長抗体が、配列番号339のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号340のアミノ酸配列を含むV_Lを含む、項目33に記載の単離抗TIGIT構築物。

(項目35)

前記完全長抗体が、配列番号323または327のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、項目33または34に記載の単離抗TIGIT構築物。

10

(項目36)

前記完全長抗体が、配列番号329のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号330のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、項目33または34に記載の単離抗TIGIT構築物。

(項目37)

前記完全長抗体が、配列番号379のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号380のアミノ酸配列を含むV_Lを含む、項目32に記載の単離抗TIGIT構築物。

(項目38)

前記完全長抗体が、配列番号383のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号384のアミノ酸配列を含むV_Lを含む、項目32に記載の単離抗TIGIT構築物。

20

(項目39)

前記完全長抗体が、配列番号381のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号382のアミノ酸配列を含むV_Lを含む、項目32に記載の単離抗TIGIT構築物。

(項目40)

前記完全長抗体が、配列番号331のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号332のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、項目39に記載の単離抗TIGIT構築物。

(項目41)

前記完全長抗体が、配列番号333のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、項目39に記載の単離抗TIGIT構築物。

(項目42)

前記完全長抗体が、配列番号327のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記完全長抗体の重鎖の少なくとも1つが、TIGITを特異的に認識する前記s d A b部分に融合され、及び前記重鎖融合ポリペプチドが、配列番号343のアミノ酸配列を含む、項目32～36のいずれか1項に記載の単離抗TIGIT構築物。

30

(項目43)

前記完全長抗体が、配列番号323のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記完全長抗体の重鎖の少なくとも1つが、TIGITを特異的に認識する前記s d A b部分に融合され、及び前記重鎖融合ポリペプチドが、配列番号357または359のアミノ酸配列を含む、項目32～36のいずれか1項に記載の単離抗TIGIT構築物。

40

(項目44)

前記完全長抗体が、配列番号329のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号330のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記完全長抗体の重鎖の少なくとも1つが、TIGITを特異的に認識する前記s d A b部分に融合され、及び前記重鎖融合ポリペプチドが、配列番号341または402のアミノ酸配列を含む、項目32～36のいずれか1項に記載の単離抗TIGIT構築物。

(項目45)

前記完全長抗体が、配列番号323のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記完全長抗体の軽鎖の少なくとも1つが、TIGIT

50

を特異的に認識する前記 s d A b 部分に融合され、及び前記軽鎖融合ポリペプチドが、配列番号 3 6 2 または 3 6 4 のアミノ酸配列を含む、項目 3 2 ～ 3 6 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 4 6)

前記完全長抗体が、配列番号 3 2 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 3 3 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記完全長抗体の軽鎖の少なくとも 1 つが、T I G I T を特異的に認識する前記 s d A b 部分に融合され、及び前記軽鎖融合ポリペプチドが、配列番号 4 0 5 のアミノ酸配列を含む、項目 3 2 ～ 3 6 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 4 7)

前記完全長抗体が、配列番号 3 3 1 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 3 3 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記完全長抗体の重鎖の少なくとも 1 つが、T I G I T を特異的に認識する前記 s d A b 部分に融合され、及び前記重鎖融合ポリペプチドが、配列番号 3 4 7 のアミノ酸配列を含む、項目 3 2 及び 3 9 ～ 4 1 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 4 8)

前記完全長抗体が、配列番号 3 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 3 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記完全長抗体の重鎖の少なくとも 1 つが、T I G I T を特異的に認識する前記 s d A b 部分に融合され、及び前記重鎖融合ポリペプチドが、配列番号 3 4 5 のアミノ酸配列を含む、項目 3 2 及び 3 9 ～ 4 1 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 4 9)

T I G I T を特異的に認識する s d A b 部分を含む単離抗 T I G I T 構築物であって、前記 s d A b 部分が、配列番号 2 5 3 ～ 2 5 9、2 7 1、2 7 3 ～ 2 7 6、2 8 0、2 8 2 ～ 2 8 4、2 8 6 ～ 2 8 7 のいずれか 1 つの C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む、前記単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 5 0)

項目 1 ～ 4 9 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物と競合的に T I G I T に特異的に結合する、単離抗 T I G I T 構築物。

(項目 5 1)

項目 1 ～ 5 0 のいずれか 1 項に記載の単離抗 T I G I T 構築物、及び適宜、薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

(項目 5 2)

T I G I T 関連疾患を有する個体の治療方法であって、前記個体に有効量の項目 5 1 に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

(項目 5 3)

前記 T I G I T 関連疾患が、がんである、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記がんが、固形腫瘍である、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記がんが、大腸がんである、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記個体に追加の療法を投与することをさらに含む、項目 5 2 ～ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 7)

前記追加の療法が、外科手術、放射線、化学療法、免疫療法、ホルモン療法、またはそれらの組み合わせである、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記追加の療法が、免疫療法である、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

10

20

30

40

50

前記免疫療法が、前記個体に、免疫調節薬を含む第2の医薬組成物の有効量を投与することを含む、項目58に記載の方法。

(項目60)

前記免疫調節薬が、免疫チェックポイント阻害薬である、項目59に記載の方法。

(項目61)

前記免疫チェックポイント阻害薬が、PD-1またはPD-L1を特異的に認識する抗体である、項目60に記載の方法。

(項目62)

前記医薬組成物が、全身投与される、項目52～61のいずれか1項に記載の方法。

(項目63)

前記医薬組成物が、局所投与される、項目52～61のいずれか1項に記載の方法。

(項目64)

前記個体が、ヒトである、項目52～63のいずれか1項に記載の方法。

(項目65)

項目1～50のいずれか1項に記載の単離抗TIGIT構築物をコードする、単離核酸。

(項目66)

項目65に記載の単離核酸を含む、ベクター。

(項目67)

項目65に記載の単離核酸、または項目66に記載のベクターを含む、単離宿主細胞。

(項目68)

項目1～50のいずれか1項に記載の単離抗TIGIT構築物、項目65に記載の単離核酸、項目66に記載のベクター、または項目67に記載の単離宿主細胞を含む、キット。

(項目69)

抗TIGIT構築物の生成方法であって、

(a) コードされた抗TIGIT構築物を発現するのに有効な条件下で、項目65に記載の単離核酸、項目66に記載のベクター、または項目67に記載の単離宿主細胞を含む宿主細胞を培養すること；及び(b) 前記宿主細胞から、発現された抗TIGIT構築物を得ることを含む、前記方法。

(項目70)

工程(a)が、項目65に記載の単離核酸または項目66に記載のベクターを含む宿主細胞を生成することをさらに含む、項目69に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】免疫前血清及び免疫後血清の免疫応答評価を示す。

【図2】最終ブースト後の規則抗体(IgG1)及び重鎖抗体(IgG2及びIgG3)の免疫応答評価を示す。免疫前血清から単離された対応する免疫グロブリン断片は、陰性対照として使用した。

【図3】プロメガTIGIT/CD155遮断レポーターアッセイにおける非ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の機能を示す。22G2は、陽性抗TIGIT対照として使用した。

【図4-1】単体またはマウスPD-1遮断抗体RMP1-14と組み合わせた、CT26同系腫瘍モデルにおける非ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質(AS19584-Fc)のインビボ効力を示す。10A7は、抗TIGIT抗体の陽性対照として使用した。図4Aは、各処置群の平均腫瘍体積を示す。図4Bは、各処置下でCD8⁺またはCD4⁺Tリンパ球を浸潤する腫瘍のパーセントを示す。図4Cは、動物ごとのクモ状プロットを示す。

【図4-2】単体またはマウスPD-1遮断抗体RMP1-14と組み合わせた、CT26同系腫瘍モデルにおける非ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質(AS19584-Fc)のインビボ効力を示す。10A7は、抗TIGIT抗体の陽性対照として使用した。図4Aは、各処置群の平均腫瘍体積を示す。図4Bは、各処置下でCD8

10

20

30

40

50

+またはCD4⁺Tリンパ球を浸潤する腫瘍のパーセントを示す。図4Cは、動物ごとのクモ状プロットを示す。

【図5】単体または抗PD-1抗体RMP1-14と組み合わせた、CT26同系腫瘍モデルにおける非ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質(AS19584-Fc)のインビボ効力を示す。図5Aは、各処置群の平均腫瘍体積を示す。図5Bは、異なる処置下で動物ごとの対数スケールの腫瘍体積のクモ状プロットを示す。

【図6】単体または抗PD-1抗体RMP1-14と組み合わせた、MC38同系腫瘍モデルにおける非ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質(AS19584-Fc)のインビボ効力を示す。図6Aは、各処置群の平均腫瘍体積を示す。図6Bは、異なる処置下で動物ごとの対数スケールの腫瘍体積のクモ状プロットを示す。

【図7】非ヒト化親抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質(AS19584-Fc、AS19886-Fc)と比較した、プロメガTIGIT/CD155遮断レポーターアッセイを用いたヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質(AS19584VH28-Fc、AS19886VH5-Fc、AS19886VH8-Fc)のインビトロ機能活性を示す。22G2は、陽性抗TIGIT抗体対照として使用した。

【図8】非ヒト化親抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質(AS19584-Fc、AS19886-Fc)と比較した、IL-2放出アッセイを用いたヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質(AS19584VH28-Fc、AS19886VH5-Fc、AS19886VH8-Fc)のインビトロ機能活性を示す。22G2は、陽性抗TIGIT抗体対照として使用した。

【図9】ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質AS19584VH28-Fcのインビボ薬物動態曲線を示す。22G2は、陽性抗TIGIT抗体対照として使用した。

【図10】MC38腫瘍モデルを担持するTIGITヒト化マウスにおけるヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質のインビボ効力を示す。図10Aは、各処置群の平均腫瘍体積を示す。図10Bは、動物ごとの腫瘍体積のクモ状プロットを示す。22G2は、陽性抗TIGIT抗体対照として使用した。hIgG1は、陰性対照として使用した。

【図11】PD-L1の細胞ベース機能性アッセイを用いた、概念証明型(POC)PD-L1×TIGIT二重特異性抗原結合タンパク質(BABP)及びそれらの親抗PD-L1抗体エレメントのインビトロ機能を示す。テセントリクバイオシミラー(IgG1Fcまたは不活性IgG1Fcのいずれかを有する)は、陽性抗PD-L1抗体対照として使用した。h53C1(IgG1Fcまたは不活性IgG1Fcのいずれかを有する)は、社内開発された抗PD-L1抗体である。

【図12】混合リンパ球反応(MLR)を用いた、POC PD-L1×TIGIT BABP及び対応する親エレメント(抗PD-L1抗体及び抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質)のインビトロ機能を示す。テセントリクバイオシミラー(IgG1Fcまたは不活性IgG1Fcのいずれかを有する)は、陽性抗PD-L1抗体対照として使用した。22G2は、陽性抗TIGIT抗体対照として使用した。hIgG1は、陰性対照として使用した。

【図13】プロメガTIGIT/CD155遮断レポーターアッセイを用いた、POC PD-L1×TIGIT BABP及び対応する親エレメント(抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質)のインビトロ機能を示す。22G2は、陽性抗TIGIT抗体対照として使用した。

【図14】TIGITターゲティング用のIL-2放出アッセイを用いた、POC PD-L1×TIGIT BABP及び対応する親エレメント(抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質)のインビトロ機能を示す。22G2は、陽性抗TIGIT抗体対照として使用した。

【図15】PD-L1/TIGIT二機能性レポーターアッセイを用いた、POC PD-L1×TIGIT BABP BTP-5、その対応する親エレメント(h53C1及び

10

20

30

40

50

A S 1 9 5 8 4 - F c 融合タンパク質)、及びそれらの組み合わせのインビトロ機能を示す。

【図16】その親エレメント(h 5 3 C 1及びA S 1 9 5 8 4 - F c)及びそれらの併用療法と比較した、M C 3 8 - h P D - L 1腫瘍を担持するC 5 7 B L / 6ヒトP D - 1 K IマウスにおけるP O C P D - L 1 × T I G I T B A B P B T P - 5のインビボ効力を示す。図16Aは、各処置群の平均腫瘍体積を示す。図16Bは、動物ごとの腫瘍体積のクモ状プロットを示す。I g G 1は、陰性対照として使用した。

【図17】2つの同一の重鎖及び2つの同一の軽鎖、及び2つの同一の抗T I G I T s d A bを有する単一特異性完全長抗体を含み、各抗T I G I T s d A bのC末端が、適宜ペプチドリンカーを介して1つの重鎖のN末端に融合される、例示的なB A B Pの概略構造を示す。2つの抗T I G I T s d A bは、第1のエピトープ(T I G I T)に特異的に結合する。完全長抗体は、第2のエピトープに特異的に結合する2つの抗原結合部位を有する。例えば、B A B Pは、以下のようなN末端からC末端の構造を有する4つのポリペプチド鎖からなり得：(1) V_L-C_L；(2) V_HH-V_H-C_H1-C_H2-C_H3；(3) V_HH-V_H-C_H1-C_H2-C_H3；及び(4) V_L-C_L、ポリペプチド鎖(1)及び(2)のV_H及びV_Lは、第2のエピトープの第1のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖(3)及び(4)のV_H及びV_Lは、第2のエピトープの第2のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各V_HHは、第1のエピトープ(T I G I T)のコピーに特異的に結合する。代替フォーマットでは、各抗T I G I T s d A bは省略してもよく、または互いに融合した2つの同一または異なる抗T I G I T s d A bと置換してもよい。単一特異性完全長抗体は、二重特異性完全長抗体と置換して、結合特異性をさらに拡張してもよい。

【図18】2つの同一の重鎖及び2つの同一の軽鎖、及び2つの同一の抗T I G I T s d A bを有する単一特異性完全長抗体を含み、各抗T I G I T s d A bのN末端が、適宜ペプチドリンカーを介して1つの重鎖のC末端に融合される、例示的なB A B Pの概略構造を示す。2つの抗T I G I T s d A bは、第1のエピトープ(T I G I T)に特異的に結合する。完全長抗体は、第2のエピトープに特異的に結合する2つの抗原結合部位を有する。例えば、B A B Pは、以下のようなN末端からC末端の構造を有する4つのポリペプチド鎖からなり得：(1) V_L-C_L；(2) V_H-C_H1-C_H2-C_H3-V_HH；(3) V_H-C_H1-C_H2-C_H3-V_HH；及び(4) V_L-C_L、ポリペプチド鎖(1)及び(2)のV_H及びV_Lは、第2のエピトープの第1のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖(3)及び(4)のV_H及びV_Lは、第2のエピトープの第2のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各V_HHは、第1のエピトープ(T I G I T)のコピーに特異的に結合する。代替フォーマットでは、各抗T I G I T s d A bは省略してもよく、または互いに融合した2つの同一または異なる抗T I G I T s d A bと置換してもよい。単一特異性完全長抗体は、二重特異性完全長抗体と置換して、結合特異性をさらに拡張してもよい。

【図19】2つの同一の重鎖及び2つの同一の軽鎖、及び2つの同一の抗T I G I T s d A bを有する単一特異性完全長抗体を含み、各抗T I G I T s d A bのC末端が、適宜ペプチドリンカーを介して1つの重鎖のN末端に融合される、例示的なB A B Pの概略構造を示す。2つの抗T I G I T s d A bは、第1のエピトープ(T I G I T)に特異的に結合する。完全長抗体は、第2のエピトープに特異的に結合する2つの抗原結合部位を有する。例えば、B A B Pは、以下のようなN末端からC末端の構造を有する4つのポリペプチド鎖からなり得：(1) V_HH-V_L-C_L；(2) V_H-C_H1-C_H2-C_H3；(3) V_H-C_H1-C_H2-C_H3；及び(4) V_HH-V_L-C_L、ポリペプチド鎖(1)及び(2)のV_H及びV_Lは、第2のエピトープの第1のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖(3)及び(4)のV_H及びV_Lは、第2のエピトープの第2のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各V_HHは、第1のエピトープ(T I G I T)のコピーに特異的に結合する。代替フォーマットでは、各抗T I G I T s d A bは省略してもよく、または互いに融合した2つの同一または異

10

20

30

40

50

なる抗 T I G I T s d A b と置換してもよい。単一特異性完全長抗体は、二重特異性完全長抗体と置換して、結合特異性をさらに拡張してもよい。

【図 20】2つの同一の重鎖及び2つの同一の軽鎖、及び2つの同一の抗 T I G I T s d A b を有する単一特異性完全長抗体を含み、各抗 T I G I T s d A b の N 末端が、適宜ペプチドリンカーを介して1つの軽鎖の C 末端に融合される、例示的な B A B P の概略構造を示す。2つの抗 T I G I T s d A b は、第1のエピトープに特異的に結合する。完全長抗体は、第2のエピトープに特異的に結合する2つの抗原結合部位を有する。例えば、B A B P は、以下のような N 末端から C 末端の構造を有する4つのポリペプチド鎖からなり得：(1) $V_L - C_L - V_{HH}$ ；(2) $V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$ ；(3) $V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$ ；及び(4) $V_L - C_L - V_{HH}$ 、ポリペプチド鎖(1)及び(2)の V_H 及び V_L は、第2のエピトープの第1のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖(3)及び(4)の V_H 及び V_L は、第2のエピトープの第2のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各 V_{HH} は、第1のエピトープ (T I G I T) のコピーに特異的に結合する。代替フォーマットでは、各抗 T I G I T s d A b は省略してもよく、または互いに融合した2つの同一または異なる抗 T I G I T s d A b と置換してもよい。単一特異性完全長抗体は、二重特異性完全長抗体と置換して、結合特異性をさらに拡張してもよい。

【図 21】2つの同一の重鎖及び2つの同一の軽鎖、及び4つの同一の抗 T I G I T s d A b を有する単一特異性完全長抗体を含み、各抗 T I G I T s d A b の C 末端が、適宜ペプチドリンカーを介して単一特異性完全長抗体の重鎖または軽鎖の N 末端に融合される、例示的な B A B P の概略構造を示す。各抗 T I G I T s d A b は、第1のエピトープ (T I G I T) に特異的に結合する。完全長抗体は、各々が第2のエピトープに特異的に結合する2つの抗原結合部位を有する。例えば、B A B P は、以下のような N 末端から C 末端の構造を有する4つのポリペプチド鎖からなり得：(1) $V_{HH} - V_L - C_L$ ；(2) $V_{HH} - V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$ ；(3) $V_{HH} - V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$ ；及び(4) $V_{HH} - V_L - C_L$ 、ポリペプチド鎖(1)及び(2)の V_H 及び V_L は、第2のエピトープの第1のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖(3)及び(4)の V_H 及び V_L は、第2のエピトープの第2のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各 V_{HH} は、第1のエピトープ (T I G I T) のコピーに特異的に結合する。代替フォーマットでは、各抗 T I G I T s d A b は省略してもよく、または互いに融合した2つの同一または異なる抗 T I G I T s d A b と置換してもよい。単一特異性完全長抗体は、二重特異性完全長抗体と置換して、結合特異性をさらに拡張してもよい。

【図 22】2つの同一の重鎖及び2つの同一の軽鎖、及び4つの同一の抗 T I G I T s d A b を有する単一特異性完全長抗体を含み、2つの同一の抗 T I G I T s d A b が各重鎖の N 末端に融合しており、2つの抗 T I G I T s d A b は、適宜ペプチドリンカーを介して互いに融合され、及び2つの抗 T I G I T s d A b は、適宜ペプチドリンカーを介して各重鎖の N 末端に融合される、例示的な B A B P の概略構造を示す。各抗 T I G I T s d A b は、第1のエピトープ (T I G I T) に特異的に結合する。完全長抗体は、各々が第2のエピトープに特異的に結合する2つの抗原結合部位を有する。例えば、B A B P は、以下のような N 末端から C 末端の構造を有する4つのポリペプチド鎖からなり得：(1) $V_L - C_L$ ；(2) $V_{HH} - V_{HH} - V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$ ；(3) $V_{HH} - V_{HH} - V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$ ；及び(4) $V_L - C_L$ 、ポリペプチド鎖(1)及び(2)の V_H 及び V_L は、第2のエピトープの第1のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖(3)及び(4)の V_H 及び V_L は、第2のエピトープの第2のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各 V_{HH} は、第1のエピトープ (T I G I T) のコピーに特異的に結合する。代替フォーマットでは、各抗 T I G I T s d A b は省略してもよく、または互いに融合した2つの同一または異なる抗 T I G I T s d A b と置換してもよい。単一特異性完全長抗体は、二重特異性完全長抗体と置換して、結合特異性をさらに拡張してもよい。

【図23】2つの同一の抗原結合 (F a b) 断片、2つの同一の抗T I G I T s d A b、及びF c領域を含み、各抗T I G I T s d A bのN末端が、適宜ペプチドリンカーを介してF a b断片のC_H1領域のC末端に融合され、及び各抗T I G I T s d A bのC末端は、F c領域のC_H2領域のN末端に融合される、例示的なB A B Pの概略構造を示す。各抗T I G I T s d A bは、第1のエピトープ (T I G I T) に特異的に結合する。各F a b断片は、第2のエピトープに特異的に結合する。例えば、B A B Pは、以下のようなN末端からC末端の構造を有する4つのポリペプチド鎖からなり得：(1) V_L-C_L；(2) V_H-C_H1-V_HH-C_H2-C_H3；(3) V_H-C_H1-V_HH-C_H2-C_H3；及び(4) V_L-C_L、ポリペプチド鎖(1)及び(2)のV_H及びV_Lは、第2のエピトープの第1のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖(3)及び(4)のV_H及びV_Lは、第2のエピトープの第2のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各V_HHは、第1のエピトープ (T I G I T) のコピーに特異的に結合する。代替フォーマットでは、各抗T I G I T s d A bは省略してもよく、または互いに融合した2つの同一または異なる抗T I G I T s d A bと置換してもよい。代替フォーマットでは、特異性を拡張するため、2つのF a b断片は、異なるエピトープに特異的に結合することができ、及び／またはV_HH断片は、異なるエピトープに特異的に結合することができる。

10

【図24】2つの同一の一本鎖可変断片 (s c F v)、2つの同一の抗T I G I T s d A b、及びF c領域を含み、各抗T I G I T s d A bのN末端が、適宜ペプチドリンカーを介してs c F vのC末端に融合され、各抗T I G I T s d A bのC末端は、F c領域のN末端に融合される、例示的なB A B Pの概略構造を示す。各抗T I G I T s d A bは、第1のエピトープ (T I G I T) に特異的に結合する。各s c F vは、第2のエピトープに特異的に結合する。例えば、B A B Pは、各々が以下のようなN末端からC末端の構造を有する2つのポリペプチド鎖からなり得：V_L-V_H-V_HH-C_H2-C_H3、各ポリペプチド鎖のV_H及びV_Lは、第2のエピトープのコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各V_HHは、第1のエピトープ (T I G I T) のコピーに特異的に結合する。代替フォーマットでは、s c F vドメインは、N末端からC末端において、以下を含み得る：V_H-V_L。代替フォーマットでは、各抗T I G I T s d A bは省略してもよく、または互いに融合した2つの同一または異なる抗T I G I T s d A bと置換してもよい。さらに、特異性を拡張するため、2つのs c F vは、異なるエピトープに特異的に結合することができ、及び／またはV_HH断片は、異なるエピトープに特異的に結合することができる。

20

30

【図25】2つの同一のF a b断片、各々が2つのV_HH断片を含む2つの同一のF a b様断片、及びF c領域を含む、例示的なB A B Pの概略構造を示す。各F a b様断片では、V_H及びV_L領域は各々、抗T I G I T s d A bによって置換される。各F a b様断片は、第1のエピトープ (T I G I T) に特異的に結合する。各F a b断片は、第2のエピトープに特異的に結合する。例えば、B A B Pは、以下のようなN末端からC末端の構造を有する4つのポリペプチド鎖からなり得：(1) V_L-C_L-V_HH-C_L；(2) V_H-C_H1-V_HH-C_H1-C_H2-C_H3；(3) V_H-C_H1-V_HH-C_H1-C_H2-C_H3；及び(4) V_L-C_L-V_HH-C_L、ポリペプチド鎖(1)及び(2)のV_H及びV_Lは、第2のエピトープの第1のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、ポリペプチド鎖(3)及び(4)のV_H及びV_Lは、第2のエピトープの第2のコピーに特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び各V_HHは、第1のエピトープ (T I G I T) のコピーに特異的に結合する。代替フォーマットでは、特異性を拡張するため、2つのF a b断片は、異なるエピトープに特異的に結合することができ、及び／またはF a b様断片は、異なるエピトープ (例えば、T I G I Tから異なるエピトープ) に特異的に結合することができる。

40

【図26】2つの同一のs c F v、各々が2つのV_HH断片を含む2つの同一のF a b様断片、及びF c領域を含む、例示的なB A B Pの概略構造を示す。各F a b様断片では、V_H及びV_L領域は各々、抗T I G I T s d A bによって置換される。各F a b様断片は

50

、第1のエピトープ（T I G I T）に特異的に結合する。各s c F vは、第2のエピトープに特異的に結合する。例えば、B A B Pは、以下のようなN末端からC末端の構造を有する4つのポリペプチド鎖からなり得：（1）V_HH-C_L；（2）V_L-V_H-V_HH-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}；（3）V_L-V_H-V_HH-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}；及び（4）V_HH-C_L、ポリペプチド鎖（2）及び（3）のV_H及びV_Lは、各々、第2のエピトープのコピーに特異的に結合するs c F vを形成し、各V_HHは、第1のエピトープ（T I G I T）のコピーに特異的に結合する。代替フォーマットでは、s c F vのC末端は、V_HH-C_Lを含むF a b様断片における鎖のN末端に融合され得；及び／またはs c F vドメインは、N末端からC末端において、V_H-V_Lを含み得る。さらに、特異性を拡張するため、2つのs c F vは、異なるエピトープに特異的に結合することができ、及び／またはV_HH断片は、異なるエピトープ（例えば、T I G I Tから異なるエピトープ）に特異的に結合することができる。

10

【図27】PD-L1／PD-1経路及びCD155／T I G I T経路を同時に標的化することによってB A B Pのインビトロ相乗効果を評価するためのPD-1／T I G I T及びPD-L1／T I G I T二機能性レポーターアッセイを示す。BTP-11及びBTP-13を試験して、PD-1またはT I G I Tを遮断する単剤療法と比較した（図27A）。BTP-15、BTP-17、BTP-21及びBTP-22を試験して、PD-L1またはT I G I Tを遮断する単剤療法と比較した（図27B及び27C）。

【図28】FACSによって検出された、BTP-21、ティラゴルマブ（T i r a g o l u m a b）、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、h53C1及びAS19584VH28の、一次CD8及びCD4 T細胞へのそれぞれの結合を示す。

20

【図29】3人の健康な個体からの一次ヒトPBMCによるIFN-γ放出のエキスビボ誘導におけるBTP-21、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、及びh53C1の能力を示す。

【図30】その親エレメント（PD1-BM-min及びAS19584VH28）及びそれらの組み合わせと比較した、CT26腫瘍を担持するBalb／cヒトPD-1 K IマウスにおけるPD-1×T I G I T B A B P BTP-11のインビボ効力を示す。データをクモ状プロットで示す。TFは、無腫瘍マウスを示す。

【図31】アテゾリズマブ、その親エレメント（h53C1及びAS19584VH28）及びそれらの組み合わせと比較した、ヒトPD-L1を過剰発現するMC38腫瘍（MC38-hPDL1）を担持するC57BL／6ヒトPD-1／PD-L1ダブルK IマウスにおけるPD-L1×T I G I T B A B P BTP-21のインビボ効力を示す。データをクモ状プロットで示す。TFは、無腫瘍マウスを示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明は、T I G I Tを特異的に認識する新規のs d A b（以下、「抗T I G I T s d A b」とも呼ばれる）、及びその抗体変異体（例えば、抗T I G I T s d A b、例えば、抗T I G I T s d A b-F c融合タンパク質、完全長抗体に融合した抗T I G I T s d A b、F a b、またはs c F vを含む、より大きなタンパク質またはポリペプチド、または抗T I G I T s d A bを含む多重特異性抗原結合タンパク質（M A B P、例えば、二重特異性抗原結合タンパク質（B A B P））、及びT I G I T関連疾患（例えば、がん）を治療するためのそれらの使用、ならびにそれらの作製方法を提供する。

40

【0029】

s d A bは、単一単量体抗体可変ドメイン、例えば、重鎖可変ドメイン（V_HH）を有することにより、従来の4鎖抗体とは異なり、これは、軽鎖の助けを借りることなく抗原に対して高親和性を示すことができる。ラクダ科動物のV_HHは、およそ15 k Dの分子量を有する最小の機能的抗原結合断片として知られる。

【0030】

したがって、本出願の一態様は、T I G I Tを特異的に認識するs d A b部分を含む単離抗T I G I T構築物を提供する。単離抗T I G I T構築物は、例えば、抗T I G I T

50

s d A b（例えば、天然またはヒト化）、一緒に融合した本明細書に記載の複数の抗 T I G I T s d A b を含むポリペプチド、F c 断片（例えば、ヒト I g G 1 F c、エフェクターレス（不活性）I g G 1 F c、h I g G 2 F c、または I g G 4 F c）に融合した本明細書に記載の抗 T I G I T s d A b を含む抗 T I G I T s d A b - F c 融合タンパク質、または完全長抗体（例えば、抗 P D - 1 抗体、または抗 P D - L 1 抗体）もしくは重鎖可変ドメイン（V_H）及び軽鎖可変ドメイン（V_L）を含む抗原結合断片に融合した本明細書に記載の抗 T I G I T s d A b を含む M A B P であり得る。抗 T I G I T 構築物は、単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性）、一価または多価（例えば、二価）であり得る。

【0031】

組成物（例えば、医薬組成物）、本明細書に記載の抗 T I G I T 構築物を含むキット及び製造品、本明細書に記載の抗 T I G I T 構築物の作製方法、及本明細書に記載の抗 T I G I T 構築物を用いた T I G I T 関連疾患（例えば、がん）の治療方法も提供する。

【0032】

I. 定義

本明細書で使用する場合、「治療」または「治療すること」は、臨床結果を含む有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチである。本発明の目的では、有益なまたは所望の結果としては、以下：疾患から生じる1つ以上の症状を緩和すること、疾患範囲を縮小すること、疾患を安定化すること（例えば、疾患の悪化の予防または遅らせること）、疾患の拡散（例えば、転移）を予防または遅らせること、疾患の再発を予防または遅らせること、疾患の進行を遅延または遅らせること、疾患状態を改善すること、疾患の寛解（部分的なまたは完全な）を提供すること、疾患を治療するために必要な1つ以上の他の薬物適用の用量を低下させること、疾患の進行を遅らせること、生活の質を向上させること、及び／または生存を延長することの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。また、「治療」によって包含されるのは、がんの病理学的結果の縮小である。本発明の方法は、治療のこれらの態様のいずれか1つ以上を企図する。

【0033】

本明細書で使用される「有効量」という用語は、特異的な疾病、状態または疾患を治療する、例えば、その症状の1つ以上を改善、緩和、軽快、及び／または遅延させるのに十分な薬剤または薬剤の組み合わせの量を指す。がんを引き合いに出す場合、有効量は、腫瘍が退縮するか、及び／または腫瘍の増殖速度が低下するか（腫瘍増殖の抑制等）、または他の望ましくない細胞増殖が予防または遅延されるのに十分な量を含む。いくつかの実施形態では、有効量は、発症を遅延させるのに十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量は、再発を予防するかまたは遅延させるのに十分な量である。有効量は、1回または複数回の投与によって投与することができる。薬物または組成物の有効量は、（i）がん細胞の数を減少させる、（ii）腫瘍のサイズを低減させる、（iii）がん細胞が末梢器管に浸潤するのを阻害、遅延、ある程度まで緩徐化及び望ましくは停止させる、（iv）腫瘍の転移を阻害する（すなわち、ある程度まで緩徐化し、望ましくは停止させる）、（v）腫瘍の成長を阻害する、（vi）腫瘍の発現及び／または再発を予防または遅延させる、及び／または（vii）がんに伴う症状の1つ以上をある程度まで緩和することができる。

【0034】

本明細書で使用する場合、「個体」または「対象」は、ヒト、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、げっ歯類または霊長類を含むが、これらに限定されない哺乳動物を指す。いくつかの実施形態では、個体は、ヒトである。

【0035】

「抗体」、「抗原結合部分」、または「抗体部分」という用語は、それらの最も広い意味で用いられ、所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、完全長抗体及びその抗原結合断片を含むが、これらに限定されない種々の抗体構造を包含する。

10

20

30

40

50

【0036】

「重鎖のみ抗体」または「HCAb」という用語は、重鎖を含むが、4鎖抗体で通常見られる軽鎖が欠けている機能的抗体を指す。ラクダ科動物（例えば、ラクダ、ラマ、またはアルカバ）は、HCAbを産生することが知られている。

【0037】

「単ドメイン抗体」または「sdAb」という用語は、3つの相補性決定領域（CDR）を有する単一抗原結合ポリペプチドを指す。sdAbのみは、対応するCDR含有ポリペプチドと対合せずに抗原に結合することができる。場合によっては、単ドメイン抗体は、ラクダ科動物のHCAbから操作されており、それらの重鎖可変ドメインは、「V_HH」（重鎖抗体の重鎖の可変ドメイン）とも本明細書で呼ばれる。ラクダ科動物のsdAbは、公知の最小抗原結合抗体断片の1つである（例えば、Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-8 (1993); Greenberg et al., Nature 374:168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh et al., Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013) を参照されたい）。基本的なV_HHは、N末端からC末端において以下の構造：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4を有し、ここで、FR1~FR4は、フレームワーク領域1~4をそれぞれ指し、CDR1~CDR3は、相補性決定領域1~3を指す。

【0038】

「単離された」抗体（または構築物）は、その産生（例えば、天然または組み換え）環境の成分から同定され、単離され、及び／または回収されたものである。単離されたポリペプチドは、その産生環境からの他の全ての成分と関連しないのが好ましい。その産生環境の混入汚染成分、例えば、組み換えトランスフェクト細胞から生じるものは、典型的には、抗体の研究、診断、または治療への使用を妨げる物質であり、それらには、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性溶質または非タンパク質性溶質が含まれ得る。好ましい実施形態では、ポリペプチドは、（1）例えば、Lowry法で測定した場合に、抗体の95重量%を超えるまで、いくつかの実施形態では、99重量%を超えるまで、（2）スピニングカップシークエネーターを使用して、N末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、または（3）クマシーブルーまたは好ましくは銀染色を用いた非還元条件または還元条件下でのSDS-PAGEによって均一になるまで精製される。単離された抗体（または構築物）には、抗体の天然の環境の少なくとも1つの成分は存在しないことになるため、組み換え細胞内にインサイチュ抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチド、抗体、または構築物は、少なくとも1つの精製ステップにより調製されることになる。

【0039】

抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ、「V_H」及び「V_L」と呼ばれ得る。これらのドメインは、一般的に、（同じクラスの他の抗体に対して）抗体の最も可変な部分であり、抗原結合部位を含有している。ラクダ科の種に由来する重鎖のみ抗体は、「V_HH」と呼ばれる単一重鎖可変領域を有する。従って、V_HHは、特殊型のV_Hである。

【0040】

「完全長抗体」、「無傷抗体」、または「全抗体」という用語は、交換可能に使用され、抗体断片とは対照的に、その実質的に無傷な形態の抗体を指す。具体的には、完全長4鎖抗体は、Fc領域を含む重鎖及び軽鎖を伴うものを含む。完全長重鎖のみ抗体は、重鎖（例えば、V_HH）及びFc領域を含む。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列の定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列変異体であり得る。場合によっては、無傷抗体は、1つ以上のエフェクター機能を有し得る。

【0041】

「抗体断片」または「抗原結合断片」は、無傷抗体の一部、好ましくは、無傷抗体の抗

10

20

30

40

50

原結合及び／または可変領域を含む。抗体断片の例としては、F a b、F a b'、F (a b')₂ 及び F v 断片；ダイアボディ；線状抗体（米国特許第 5, 641, 870 号、実施例 2；Zapata et al., Protein Eng. 8 (10) : 1057-1062 (1995) を参照されたい）；抗体断片から形成される一本鎖抗体分子；単一ドメイン抗体（例えば、V_HH）、及び多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。抗体のパパイン消化は、「F a b」断片と呼ばれる 2 つの同一の抗原結合断片、ならびに残余「F c」断片（この名称は容易に結晶化する能力を反映している）を産生した。F a b 断片は、H 鎖の可変領域ドメイン（V_H）及び 1 つの重鎖の第 1 の定常ドメイン（C_H1）を伴う完全 L 鎖からなる。各 F a b 断片は、抗原結合に関して一価であり、すなわち、それは単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理は、単一大型 F (a b')₂ 断片を生じるが、これは、異なる抗原結合活性を有する 2 つのジスルフィド結合 F a b 断片におおよそ対応し、依然として抗原に架橋し得る。F a b' 断片は、抗体ヒンジ領域からの 1 つ以上のシステインを含めて C_H1 ドメインのカルボキシ末端に 2～3 の付加的残基を有することで F a b 断片と異なる。F a b'-SH は、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を有する F a b' に関する本明細書中での呼称である。F (a b')₂ 抗体断片は、元来、それらの間にヒンジシステインを有する F a b' 断片の対として産生された。抗体断片の他の化学的カップリングも既知である。

【0042】

「定常ドメイン」という用語は、抗原結合部位を含む、免疫グロブリンの他の部分である可変ドメインと比較して、より保存されたアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分子の部分（部分）を指す。定常ドメインは、重鎖の C_H1、C_H2、及び C_H3 ドメイン（総称して、C_H）、及び軽鎖の C_HL（または C_L）ドメインを含む。

【0043】

いかなる脊椎動物に由来する抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」も、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて明確に区別される、カップパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる 2 タイプの 1 つに割り当てられ得る。

【0044】

「F v」は、完全な抗原認識及び結合部位を含有する最小の抗体断片である。この断片は、強く、非共有的に会合した 1 つの重鎖及び 1 つの軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる。これら 2 つのドメインのフォールディングから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に抗原結合特異性を付与する 6 つの超可変ループ（各々 H 及び L 鎖からの 3 つのループ）を生じる。しかしながら、単一可変ドメイン（または抗原に特異的な 3 つの CDR のみを含む F v の半分）でさえ、完全結合部位より低い親和性ではあるが、抗原を認識し、結合する能力を有する。

【0045】

「一本鎖 F v」（「s F v」または「s c F v」とも略される）は、単一ポリペプチド鎖に連結される V_H 及び V_L 抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、s c F v ポリペプチドはさらに、V_H 及び V_L ドメイン間にポリペプチドリンカーを含み、これは、抗原結合のために望ましい構造を s c F v に形成させる。s c F v の概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) を参照されたい。

【0046】

「超可変領域」、「HVR」、または「HV」という用語は、本明細書で使用する場合、配列が超可変である、及び／または構造的に定義されたループを形成する、抗体可変ドメインの領域を指す。一般的に、単一ドメイン抗体は、3 つの HVR（または CDR）：HVR1（または CDR1）、HVR2（または CDR2）、及び HVR3（または CDR3）を含む。HVR3（または CDR3）は、3 つの HVR のうち最も高い多様性を示し、抗体に優れた特異性を付与するうえで特異な役割を果たすと考えられている。例えば

、Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993) 及びSheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996) を参照されたい。

【0047】

「相補性決定領域」または「CDR」という用語は、Kabatシステムで定義されるように、超可変領域を指すように使用される。Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) を参照されたい。

【0048】

多くのHVR描写が本明細書において使用され、包含される。Kabatの相補性決定領域（CDR）は、配列可変性に基づき、最も共通して使用される（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）。Chothiaは、代わりに、構造的ループの位置を指す（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。AbM HVRは、KabatのHVRとChothiaの構造的ループの間での妥協を表わし、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」HVRは、利用可能な複雑な結晶構造の分析に基づく。これらのHVRの各々からの残基を以下の表1に指摘する。

表1. HVRの描写。

【表1】

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

【0049】

HVRは以下の通りの「伸長HVR」： V_L 内に、24～36または24～34（L1）、46～56または50～56（L2）、及び89～97または89～96（L3）、ならびに、 V_H 内に、26～35（H1）、50～65または49～65（H2）、及び93～102、94～102、もしくは95～102（H3）を含み得る。可変ドメイン残基を、Kabat et al., supraに従って、これらの定義の各々について番号付けする。

【0050】

単ドメイン抗体（例えば、 V_HH ）のアミノ酸残基は、Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000 Jun. 23;240(1-2):185-195の論文においてラクダ科動物に由来する V_H ドメインに適用されるように、Kabat et al.（「Sequence of proteins of immunological interest」, US Public Health Services, NIH Bethesda, Md, Pub

lication No. 91) によって与えられたV_Hドメインに関する一般的な番号付けに従って番号付けされる。この番号付けに従うと、V_HHのFR1は、1位～30位のアミノ酸残基を含み、V_HHのCDR1は、31位～35位のアミノ酸残基を含み、V_HHのFR2は、36位～49位のアミノ酸残基を含み、V_HHのCDR2は、50位～65位のアミノ酸残基を含み、V_HHのFR3は、66位～94位のアミノ酸残基を含み、V_HHのCDR3は、95位～102位のアミノ酸残基を含み、V_HHのFR4は、103位～113位のアミノ酸残基を含む。これに関して、V_Hドメイン及びV_HHドメインに関して当該技術分野で既知のように、CDRそれぞれにおけるアミノ酸残基の総数は変わる可能性があり、Kabat番号付けで示されるアミノ酸残基の総数に対応していなくてもよい（すなわち、Kabat番号付けによる1つ以上の位置が実際の配列で占められていなくてもよく、または実際の配列が、Kabat番号付けで可能な数より多くのアミノ酸残基を含有していてもよい）ことに留意すべきである。

【0051】

「Kabatにおける可変ドメイン残基番号付け」または「Kabatにおけるアミノ酸位置番号付け」という表現、ならびにそのバリエーションは、Kabat et al., supraにおいて抗体の編集での重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインについて使用される番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを使用し、実際の直鎖アミノ酸配列は、可変ドメインのFRまたはHVRの短縮、またはその中への挿入に対応するより少ないまたは追加のアミノ酸を含み得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後の単一アミノ酸挿入（Kabatに従った残基52a）及び重鎖FR残基82の後の挿入残基（例えば、Kabatに従った残基82a、82b、及び82cなど）を含み得る。残基のKabat番号付けは、「標準的な」Kabat番号付け配列を伴う抗体の配列の相同性の領域でのアライメントにより所与の抗体について決定することができる。

【0052】

本明細書で別段の指定がない限り、免疫グロブリン重鎖における残基の番号付けは、Kabat et al., supraと同様のEUインデックスのものである。「Kabatと同様のEUインデックス」とは、ヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを指す。

【0053】

「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書で定義されるHVR残基以外の可変ドメイン残基である。

【0054】

本明細書で使用する場合、「特異的に結合する」、「特異的に認識する」、または「特異的である」という用語は、測定可能で再現性のある相互作用、例えば、標的と抗原結合タンパク質（例えば、sdAb）の間での結合を指し、それは、生物学的分子を含む分子の異種集団の存在において標的の存在を決定可能である。例えば、標的（エピトープであり得る）に特異的に結合する抗原結合タンパク質（例えば、sdAb）は、より大きな親和性、アビディティを伴い、より容易に、及び／またはそれが他の標的に結合するよりも大きな持続時間を伴いこの標的に結合する抗体である。いくつかの実施形態では、無関係な標的への抗原結合タンパク質（例えば、sdAb）の結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）により測定される通り、標的への抗原結合タンパク質（例えば、sdAb）の結合の約10%未満である。いくつかの実施形態では、標的に特異的に結合する抗原結合タンパク質（例えば、sdAb）は、 $\leq 10^{-5}$ M、 $\leq 10^{-6}$ M、 $\leq 10^{-7}$ M、 $\leq 10^{-8}$ M、 $\leq 10^{-9}$ M、 $\leq 10^{-10}$ M、 $\leq 10^{-11}$ M、または $\leq 10^{-12}$ Mの解離定数（K_d）を有する。いくつかの実施形態では、抗原結合タンパク質は、異なる種からのタンパク質間で保存されているタンパク質上のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、特異的結合は、排他的な結合を含み得るが、それを要求しない。抗体または抗原結合ドメインの結合特異性は、当該技術分野で公知の方法によって実験的に決定することができる。そのような方法は、ウェスタンブロット、ELISA、RIA、ECL、IRMA、EIA、BIACore試験、及びペプチドスキャンを含むが、これらに限定されるものではない。

【0055】

「特異性」という用語は、抗原の特定のエピトープに対する抗原結合タンパク質（例えば、s d A b）の選択的認識を指す。天然抗体は、例えば、単一特異性である。「多重特異性」という用語は、本明細書で使用する場合、抗原結合タンパク質が、ポリトロープ特異性を有する（すなわち、1つの生物学的分子上の2つ、3つ、またはそれ以上の異なるエピトープに特異的に結合することができる、または2つ、3つ、またはそれ以上の異なる生物学的分子上のエピトープに特異的に結合することができる）ことを指す。「二重特異性」は、本明細書で使用する場合、抗原結合タンパク質が2つの異なる抗原結合特異性を有することを指す。別段の指定がない限り、二重特異性抗体によって結合した抗原を表記した順番は任意である。すなわち、例えば、「抗T I G I T / P D - L 1」、「抗P D - L 1 / T I G I T」、「T I G I T × P D - L 1」、「P D - L 1 × T I G I T」、「P D - L 1 / T I G I T」、「T I G I T / P D - L 1」、「P D - L 1 - T I G I T」、及び「T I G I T - P D - L 1」という用語は、T I G I T及びP D - L 1の両方を特異的に認識する二重特異性抗体を指すように交換可能に使用され得る。「単一特異性」という用語は、本明細書で使用する場合、各々が同じ抗原の同じエピトープに結合する1つ以上の結合部位を有する抗原結合タンパク質（例えば、s d A b）を指す。

10

【0056】

「価」という用語は、本明細書で使用する場合、抗原結合タンパク質における特定の数の結合部位の存在を指す。例えば、天然抗体または完全長抗体は、2つの結合部位を有し、二価である。このように、「三価」、「四価」、「五価」、及び「六価」という用語は、抗原結合タンパク質における2つの結合部位、3つの結合部位、4つの結合部位、5つの結合部位、及び6つの結合部位の存在をそれぞれ指す。

20

【0057】

本明細書において「F c領域」または「断片結晶化可能領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域（天然配列F c領域及び変異体F c領域を含む）を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のF c領域の境界は変動し得るが、ヒトI g G重鎖F c領域は、通常、位置C y s 2 2 6のアミノ酸残基から、またはP r o 2 3 0から、そのカルボキシル末端まで伸展すると定義される。F c領域のC末端リジン（E U番号付けシステムによる残基4 4 7）を、抗体の産生もしくは精製の間に、または抗体の重鎖をコードする核酸の組み換え操作により除去してもよい。したがって、無傷抗体の組成物は、全てのK 4 4 7残基が除去された抗体集団、K 4 4 7残基が除去されていない抗体集団、及びK 4 4 7残基を伴う及び伴わない抗体の混合物を有する抗体集団を含み得る。本明細書に記載の使用のための適当な天然配列F c領域は、ヒトI g G 1、I g G 2（I g G 2 A、I g G 2 B）、I g G 3、及びI g G 4を含む。

30

【0058】

「結合親和性」は、一般的に、分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）の間での非共有結合的な相互作用の合計の強度を指す。別段の指定がない限り、本明細書で使用する場合、「結合親和性」は、結合対のメンバーの間での1 : 1の相互作用を反映する内因性の結合親和性を指す。結合親和性は、 K_d 、 K_{off} 、 K_{on} 、または K_a によって示すことができる。「 K_{off} 」という用語は、本明細書で使用する場合、動態選択の機構から決定される、抗体／抗原複合体からの抗体（または抗原結合ドメイン）の解離についての off 速度定数を指すことを意図し、 s^{-1} の単位で表される。「 K_{on} 」という用語は、本明細書で使用する場合、抗体（または抗原結合ドメイン）が抗原に会合して、抗体／抗原複合体を形成する on 速度定数を指すことを意図し、 $M^{-1}s^{-1}$ の単位で表される。平衡解離定数「 K_D 」または「 K_d 」という用語は、本明細書で使用する場合、特定の抗体－抗原相互作用の解離定数を指し、平衡状態にある抗体分子の溶液中に存在する全ての抗体結合ドメインの半分を占めるのに必要な抗原の濃度を示し、 K_{off}/K_{on} に等しく、Mの単位で表される。 K_d の測定から、全ての結合剤が溶液中にあることが想定される。例えば、酵母発現系で、抗体が細胞壁に繋がっている場合、対応する平衡速度定数は、 EC_{50} として表され、それから K_d の良好な近似値が得ら

40

50

れる。親和性定数 K_a は、解離定数 K_d の逆数であり、 M^{-1} の単位で表される。解離定数 (K_D または K_d) は、抗体の抗原に対する親和性を示す指標として使用される。例えば、各種標識剤で標識した抗体を用いたスキャチャード方法、ならびに市販の測定キットである *Biacore X* (*Amersham Biosciences* 社製) または類似のキットを用いて、当該キットに添付された取扱い説明書及び実験操作方法に従って容易に分析することができる。これらの方法を用いて求められる K_D 値は、 M (モル) の単位で表される。標的に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片は、例えば、 $\leq 10^{-5} M$ 、 $\leq 10^{-6} M$ 、 $\leq 10^{-7} M$ 、 $\leq 10^{-8} M$ 、 $\leq 10^{-9} M$ 、 $\leq 10^{-10} M$ 、 $\leq 10^{-11} M$ 、または $\leq 10^{-12} M$ の解離定数 (K_d) を有し得る。

【0059】

半分の最大阻害濃度 (IC_{50}) は、特定の生物学的または生化学的機能を阻害する際
の物質 (例えば、抗体) の効力の尺度である。それは、どの程度の量の特定の薬物または
他の物質 (阻害剤、例えば、抗体) が、所与の生物学的過程 (例えば、*TIGIT* 及び *CD155*
の間の結合、または過程の成分、すなわち、酵素、細胞、細胞受容体、または微
生物) を半分まで阻害するのに必要とされるかということを示す。値は、典型的には、モ
ル濃度として表される。 IC_{50} は、作動薬または他の物質 (例えば、抗体) に対する EC_{50}
に匹敵する。 EC_{50} は、最大効果の 50% をインビボで細胞に基づくサイトカイン放
出アッセイも表す。本明細書で使用する場合、「 IC_{50} 」は、抗原の生物学的活性 (例
えば、*TIGIT* の生物学的活性) の 50% をインビトロで中和するために必要な抗体 (例
えば、抗 *TIGIT* s d A b) の有効な濃度を示すように使用される。 IC_{50} または
 EC_{50} は、バイオアッセイ、例えば、*FACS* 分析によるリガンド結合の阻害 (競合結
合アッセイ)、細胞ベースサイトカイン放出アッセイ、または増幅発光近接均質アッセイ
(*AlphaLISA*) によって測定することができる。

【0060】

ペプチド、ポリペプチド、または抗体配列に関する「パーセント (%) アミノ酸配列同
一性」及び「相同性」は、配列を整列させ、ギャップを導入し (必要な場合)、最高パー
セント配列同一性を達成した後 (任意の保存的置換を配列同一性の部分として考えず)、
特定のペプチドまたはポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である候補配列中の
アミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定
する目的のためのアライメントは、当該技術分野内にある種々の方法で、例えば、公的に
利用可能なコンピューターソフトウェア、例えば、*BLAST*、*BLAST-2*、*ALIGN*、または
MEGALIGN (商標) (*DNA STAR*) ソフトウェアなどを使用して達成することができる。
当業者は、アライメントを測定するための適切なパラメーター (比較されている配列の全長にわたる最高アライメントを達成するために必要とされる任意
のアルゴリズムを含む) を決定することができる。

【0061】

本明細書に記載の構築物、抗体、またはその抗原結合断片をコードする「単離」核酸分
子は、それが産生された環境において通常会合している少なくとも 1 つの混入核酸分子か
ら同定及び分離される核酸分子である。好ましくは、単離核酸は、産生環境に関連する全
ての成分との会合がない。本明細書に記載のポリペプチド及び抗体をコードする単離核酸
分子は、それが天然で見出される形態または設定以外の形態である。単離核酸分子は、従
って、細胞中に天然に生じる本明細書に記載のポリペプチド及び抗体をコードする核酸か
ら区別される。単離核酸は、核酸分子を通常含有する細胞中に含有される核酸分子を含む
が、その核酸分子は、染色体外に、またはその天然染色体位置とは異なる染色体位置に存
在する。

【0062】

本明細書に記載の本発明の実施形態は、実施形態「からなる」こと、及び／または実施
形態「から本質的になる」を含むことを理解されたい。

【0063】

「約」に関して、本明細書における値またはパラメーターは、その値またはパラメータ

10

20

30

40

50

一それ自体を対象とする変化量を含む（記載されている）。例えば、「約X」という記述は、「X」の記述を含む。

【0064】

本明細書で使用する場合、ある値またはパラメーター「ではない」という言及は、一般にある値またはパラメーター「以外」を意味し、記載する。例えば、方法は、タイプXのがんを治療するために使用されないということは、この方法は、X以外のタイプのがんを治療するために使用されることを意味する。

【0065】

本明細書で使用される「約X～Y」という用語は、「約X～約Y」と同じ意味を有する。

【0066】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で用いられる単数形の「ある」、「または」、及び「その」は、文脈が別段に決定することが明らかな限り、複数の指示を包含する。

【0067】

II. 抗TIGIT構築物

(I) 抗TIGIT単ドメイン抗体部分

本明細書に記載の単離抗TIGIT構築物は、TIGIT（または「抗TIGIT sdAb」）を特異的に認識する単ドメイン抗体（sdAb）部分を含む。いくつかの実施形態では、単離抗TIGIT構築物は、抗TIGIT sdAbである。

【0068】

いくつかの実施形態では、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合の K_d は、約 $10^{-5} M$ ～約 $10^{-12} M$ （例えば、約 $10^{-7} M$ ～約 $10^{-12} M$ 、または約 $10^{-8} M$ ～約 $10^{-12} M$ ）である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。

【0069】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含み、アミノ酸置換は、CDR1及び／またはCDR2内である。従って、いくつかの実施形態では、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合の K_d は、約 $10^{-5} M$ ～約 $10^{-12} M$ （例えば、約 $10^{-7} M$ ～約 $10^{-12} M$ 、または約 $10^{-8} M$ ～約 $10^{-12} M$ ）である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。

【0070】

いくつかの実施形態では、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67

10

20

30

40

50

、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、CDR1及び／またはCDR2内である。

【0071】

いくつかの実施形態では、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。

【0072】

本明細書に記載したCDRの配列を以下の表22に提供する。CDRは、種々のペアワイズ組み合わせで組み合わせて、多くの抗TIGIT sdAb部分を生成することができる。

【0073】

例えば、いくつかの実施形態では、配列番号36のアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106のアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176のアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号36のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176のアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、CDR1及び／またはCDR2内である。いくつかの実施形態では、配列番号36のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176のアミノ酸配列を含むCDR3を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。

【0074】

いくつかの実施形態では、配列番号37のアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号107のアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号177のアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号37のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号107のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号177のアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、CDR1及び／またはCDR2内である。いくつかの実施形態では、配列番号37のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号107のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号177のアミノ酸配列を含むCDR3を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。

【0075】

いくつかの実施形態では、配列番号38のアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で

10

20

30

40

50

50

【 0 0 7 9 】

【 0 0 8 0 】

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態では、配列番号 56 のアミノ酸配列を含む CDR1、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号 126 のアミノ酸配列を含む CDR2、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号 196 のアミノ酸配列を含む CDR3、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗 TIGIT sdAb 部分を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号 56 のアミノ酸配列を含む CDR1；配列番号 126 のアミノ酸配列を含む CDR2；及び配列番号 196 のアミノ酸配列を含む CDR3；または CDR 領域において最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗 TIGIT sdAb 部分を提供する。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、CDR1 及び／または CDR2 内である。いくつかの実施形態

【 0 0 8 2 】

10

【 0 0 8 3 】

20

【 0 0 8 4 】

30

【 0 0 8 5 】

50

10

20

30

50

かの実施形態では、配列番号67のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号137のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号207のアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT s d A b部分を提供する。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、CDR1及び／またはCDR2内である。いくつかの実施形態では、配列番号67のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号137のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号207のアミノ酸配列を含むCDR3を含む、抗TIGIT s d A b部分を提供する。

【0089】

いくつかの実施形態では、配列番号69のアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号139のアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号209のアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT s d A b部分を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号69のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号139のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号209のアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT s d A b部分を提供する。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、CDR1及び／またはCDR2内である。いくつかの実施形態では、配列番号69のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号139のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号209のアミノ酸配列を含むCDR3を含む、抗TIGIT s d A b部分を提供する。

【0090】

いくつかの実施形態では、配列番号70のアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号140のアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号210のアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT s d A b部分を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号70のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号140のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号210のアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT s d A b部分を提供する。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、CDR1及び／またはCDR2内である。いくつかの実施形態では、配列番号70のアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号140のアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号210のアミノ酸配列を含むCDR3を含む、抗TIGIT s d A b部分を提供する。

【0091】

抗TIGIT s d A b部分は、1つ以上のFR配列中に1つ以上の「ホールマーク残基」を含み得る。いくつかの実施形態では、抗TIGIT s d A b部分は、以下のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含み得る：a-1）37位のアミノ酸残基は、F、Y、V、L、A、H、S、I、W、C、N、G、D、T、及びP（例えば、F、Y、L、I、またはV、例えば、FまたはY、または例えば、F）からなる群から選択され；a-2）44位のアミノ酸残基は、E、Q、G、D、A、K、R、L、P、S、V、H、T、N、W、M、及びI（例えば、A、G、E、D、Q、R、S、またはL、または例えば、G、E、またはQ）からなる群から選択され；a-3）45位のアミノ酸残基は、L、R、P、H、F、G、Q、S、E、T、Y、C、I、D、及びV（例えば、L、C、またはR、または例えば、LまたはR）からなる群から選択され；a-4）103位のアミノ酸残基は、W、R、G、S、K、A、M、Y、I、F、T、N、V、Q、P、E

、及びC（例えば、W、G、またはR、または例えば、W）からなる群から選択され；及びa-5）108位のアミノ酸残基は、Q、L、R、P、E、K、S、T、M、A、及びH（例えば、Q）からなる群から選択され；またはb-1）37位のアミノ酸残基は、F、Y、L、I、及びV（例えば、FまたはY、または例えば、F）からなる群から選択され；b-2）44位のアミノ酸残基は、E及びQからなる群から選択され；b-3）45位のアミノ酸残基は、R及びL（例えば、R）からなる群から選択され；b-4）103位のアミノ酸残基は、W、R、G、及びS（例えば、W）からなる群から選択され；及びb-5）108位のアミノ酸残基は、Q及びL（例えば、Q）からなる群から選択され；またはc-1）37位のアミノ酸残基は、F、Y、L、I、及びV（例えば、FまたはY、または例えば、F）からなる群から選択され；c-2）44位のアミノ酸残基は、A、G、E、D、Q、R、S、及びL（例えば、G、E、またはQ）からなる群から選択され；c-3）45位のアミノ酸残基は、L、R、及びC（例えば、LまたはR）からなる群から選択され；c-4）103位のアミノ酸残基は、P、R、及びS（例えば、RまたはS）からなる群から選択され；及びc-5）108位のアミノ酸残基は、Q及びL（例えば、Q）からなる群から選択され；アミノ酸位置は、Kabatt番号付けに従う。Kabatt番号付けによるアミノ酸位置37、44、45、103及び108でのこれらの「ホールマーク残基」は、天然V_HH配列の抗TIGIT sdAb部分に適用し、及びヒト化中に置換することができることに留意すべきである。例えば、Kabatt番号付けによるアミノ酸位置108でのQは、Lに適宜ヒト化することができる。他のヒト化置換は、当業者には明らかであろう。例えば、潜在的に有用なヒト化置換は、天然に生じるV_HHのFR配列を、1つ以上の密接に関連するヒトV_Hの対応するFR配列と比較した後、当該技術分野で公知の（本明細書にも記載される）方法を用いて、1つ以上のそのような潜在的に有用なヒト化置換を前記V_HHに導入することで決定することができる。得られるヒト化V_HH配列は、TIGIT結合親和性、安定性、発現のしやすさ及びレベル、及び／または他の所望の特性について試験することができる。可能な残基置換は、抗体V_Hドメインから来てもよく、V_H/V_L界面は、1つ以上の高電荷アミノ酸残基を含む。本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分は、部分的または完全にヒト化することができる。好ましくは、得られるヒト化抗TIGIT sdAbは、本明細書に記載のK_d、K_{on}、K_{off}でTIGITに結合する。

【0092】

いくつかの実施形態では、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、または配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つに対して少なくとも約80%（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のいずれか）の配列同一性を有するその変異体を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、またはV_HHドメインにおいて最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、またはその変異体を含む抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのCDR、例えば、CDR1、及び／またはCDR2、及び／またはCDR3においてアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、またはその変異体を含む抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含み、アミノ酸置換は、

配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのFR、例えば、FR1、及び／またはFR2、及び／またはFR3、及び／またはFR4内である。いくつかの実施形態では、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、またはその変異体を含む抗TIGIT sdAb部分は、CDR及びFRの両方においてアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む、抗TIGIT sdAb部分を提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合のK_dは、約10⁻⁵M～約10⁻¹²M（例えば、約10⁻⁷M～約10⁻¹²M、または約10⁻⁸M～約10⁻¹²M）である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。

【0093】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分のいずれか1つと競合的にTIGITに特異的に結合する抗TIGIT sdAb部分（以下、「競合抗TIGIT sdAb部分」または「競合抗TIGIT sdAb」と呼ばれる）または抗TIGIT sdAb部分を含む、抗TIGIT構築物（以下、「競合抗TIGIT構築物」と呼ばれる）を提供する。いくつかの実施形態では、競合的結合は、ELISAアッセイを用いて決定してもよい。例えば、いくつかの実施形態では、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含む抗TIGIT sdAb部分と競合的にTIGITに特異的に結合する。別の例では、いくつかの実施形態では、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む抗TIGIT sdAb部分と競合的にTIGITに特異的に結合する、抗TIGIT sdAb部分（または抗TIGIT sdAb部分を含む抗TIGIT構築物）を提供する。いくつかの実施形態では、競合抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合のK_dは、約10⁻⁵M～約10⁻¹²M（例えば、約10⁻⁷M～約10⁻¹²M、または約10⁻⁸M～約10⁻¹²M）である。いくつかの実施形態では、競合抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。

【0094】

単ドメイン抗体

例示的なsdAbとしては、重鎖のみ抗体に由来する重鎖可変ドメイン（例えば、ラクダ科におけるV_HH（重鎖抗体の重鎖の可変ドメイン）または軟骨魚類におけるV_{NAR}（サメ新抗原受容体の可変ドメイン））、軽鎖を天然に欠く結合分子、慣用の4鎖抗体に由来する単ドメイン（例えば、V_HまたはV_L）、ヒト化重鎖のみ抗体、ヒト重鎖セグメントを発現するトランスジェニックマウスまたはラットにより産生されたヒト単ドメイン抗体、及び抗体に由来するもの以外の操作されたドメイン及び単ドメイン足場が挙げられるが、これらに限定されない。sdAbは、マウス、ラット、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤツメウナギ、サカナ、サメ、ヤギ、ウサギ、及びウシを含むが、これらに限定されない任意の種由来であってもよい。本明細書で検討される単ドメイン抗体は、ラクダ科及びサメ以外の種に由来する天然に生じる単ドメイン抗体分子も含む。

【0095】

いくつかの実施形態では、sdAbは、軽鎖を欠く重鎖として知られる天然に生じる単

ードメイン抗原結合分子（「重鎖のみ抗体」、または「H C A b」とも本明細書中で呼ばれる）由来である。そのような単ドメイン分子は、例えば、WO 94 / 04678号及びHamers - Casterman, C. et al. (1993) Nature 363: 446 - 448に開示されている。明確化するために、天然に軽鎖を欠く重鎖分子に由来する可変ドメインは、4鎖免疫グロブリンの慣用のV_Hと区別するために、V_HHとして本明細書で知られる。そのようなV_HH分子は、ラクダ科種、例えば、ラクダ、ラマ、ビクーニャ、ヒトコブラクダ、アルカパ、及びグアナコで育った抗体由来であり得る。ラクダ科以外の他の種は、天然に軽鎖を欠く重鎖分子を産生し得、そのようなV_HHは、本出願の範囲内である。

【0096】

いくつかの実施形態では、s d A bは、軟骨魚類で見られる免疫グロブリンの可変領域由来である。例えば、s d A bは、サメの血清に見られる新規抗原受容体（NAR）として知られる免疫グロブリンアイソタイプ由来であり得る。NAR（「IgNAR」）の可変領域に由来する単ドメイン分子を生成する方法は、WO 03 / 014161号及びStreltsov (2005) Protein Sci. 14: 2901 - 2909に記載されている。

【0097】

いくつかの実施形態では、s d A bは、組み換え、CDR移植、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化、及び／またはインビトロで生成される（例えば、ファージディスプレイにより選択される）。いくつかの実施形態では、フレームワーク領域のアミノ酸配列は、フレームワーク領域における特定のアミノ酸残基の「ラクダ化」によって変更され得る。ラクダ化とは、従来の4鎖抗体からの（天然に生じる）V_Hドメインのアミノ酸配列における1つ以上のアミノ酸残基を、重鎖抗体のV_HHドメインにおける対応する位置（複数可）で生じる1つ以上のアミノ酸残基と置き換えるまたは置換することを指す。これは、それ自体が知られた方法で行うことができ、例えば、本明細書中のさらなる説明に基づいて、当業者には明白であろう。そのような「ラクダ化」置換は、本明細書で定義するように、V_H-V_L界面及び／またはいわゆるラクダ科動物のホールマーク残基に形成される、及び／または存在するアミノ酸位置に挿入するのが好ましい（例えば、WO 94 / 04678、Davies及びRiechmann FEBS Letters 339: 285 - 290、1994; Davies and Riechmann Protein Engineering 9 (6): 531 - 537, 1996; Riechmann J. Mol. Biol. 259: 957 - 969, 1996; 及びRiechmann and Muyldermans J. Immunol. Meth. 231: 25 - 38, 1999を参照されたい）。

【0098】

いくつかの実施形態では、s d A bは、ヒト重鎖セグメントを発現するトランスジェニックマウスまたはラットが産生するヒトs d A bである。例えば、US 20090307787 A1、米国特許第8,754,287号、US 20150289489 A1、US 20100122358 A1、及びWO 2004049794を参照されたい。いくつかの実施形態では、s d A bは、親和性成熟される。

【0099】

いくつかの実施形態では、特定の抗原または標的に対する天然に生じるV_HHドメインは、ラクダ科動物のV_HH配列の（ナীবまたは免疫）ライブラリーから得ることができる。そのような方法は、1つ以上のそれ自体が知られたスクリーニング技術を使用して、前記抗原または標的、またはその少なくとも一部、断片、抗原決定基またはエピトープを用いてそのようなライブラリーをスクリーニングすることを伴ってもよいし、伴わなくてもよい。そのようなライブラリー及び技術は、例えば、WO 99 / 37681、WO 01 / 90190、WO 03 / 025020、及びWO 03 / 035694に記載されている。あるいは、（ナীবまたは免疫）V_HHライブラリーに由来する改良した合成または半合成ライブラリーは、例えば、WO 00 / 43507に記載されるように、無作為突

10

20

30

40

50

然変異誘発及び／またはCDRシャッフリングなどの技術によって（ナイーブまたは免疫）V_HHライブラリーから得られたV_HHライブラリーのように使用してもよい。

【0100】

いくつかの実施形態では、sdAbは、従来の4鎖抗体から生成される。例えば、EP 0368684、Ward et al. (Nature 1989 Oct. 12; 341 (6242): 544-6)、Holt et al., Trends Biotechnol., 2003, 21 (11): 484-490; WO06/030220; 及びWO06/003388を参照されたい。

【0101】

sdAbの特有な特性により、V_HHドメインを単一抗原結合タンパク質または抗原結合ドメイン（すなわち、より大きいタンパク質やポリペプチドの一部として）として使用することは、従来のV_H及びV_L領域、scFvまたは従来の抗体断片（例えば、Fabまたは(Fab')₂）を上回る多くの有意な優位性を提供する：1）たった1つのドメインしか抗原が高い親和性で結合するのに必要でないで、第2のドメインを有する必要も、これら2つのドメインが正しい空間的な構造及び立体配置に存在することを確認する必要もない（例えば、折り畳み中に重鎖と軽鎖を対合する必要がない、特別に設計されたリンカー（例えば、scFvに対して）を使用する必要がない）；2）V_HHドメイン及び他のsdAbは、1つの遺伝子から発現することができ、転写後の折り畳みまたは改変の必要がない；3）V_HHドメイン及び他のsdAbは、簡単に多価及び多重特異的な形態（本明細書でさらに議論するように）に操作することができる；4）V_HHドメイン及び他のsdAbは、高い可溶性を示し、凝集しやすい傾向（マウス由来「dAbs」に見られるような、Ward et al., Nature. 1989 Oct 12; 341 (6242): 544-6）に記載されている）が見られない；5）V_HHドメイン及び他のsdAbは、熱、pH、プロテアーゼ、及び他の変性剤や変性条件に対して高い安定性を示す；6）V_HHドメイン及び他のsdAbは、例えば、微生物発酵を用いて、（大規模な生産規模であっても）容易かつ比較的安価に調製でき、（例えば、従来の抗体断片の生産に必要な）哺乳類の発現系を必要としない；7）V_HHドメイン及び他のsdAbは、従来の4鎖抗体及びそれらの抗原結合断片と比較して比較的小さい（従来のIgGよりもおよそ15kDaまたは10倍小さい）ため、例えば、固形腫瘍及び他の密集組織への（より）高い組織浸透能力を有する；8）V_HHドメイン及び他のsdAbは、（従来のV_Hドメインのものと比較して拡張されたCDR3ループにより）いわゆる「空洞結合特性」を示すため、従来の4鎖抗体及びその抗原結合断片が接近できなかった標的及びエпитープに接近することができる。例えば、V_HHドメイン及び他のsdAbは、酵素を阻害することができることが示されている（例えば、WO1997049805; Transue et al., Proteins. 1998 Sep 1; 32 (4): 515-22; Lauwereys et al., EMBO J. 1998 Jul 1; 17 (13): 3512-20を参照されたい）。

【0102】

TIGIT

TIGITは、CD28ファミリーに属する。26kDaのタンパク質は、細胞質中に細胞外IgVドメイン、I型膜貫通領域、細胞内免疫グロブリンテールチロシン（ITT）様モチーフ、及びC末端免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ（ITIM）モチーフからなる。ナイーブT細胞及びNK細胞では、TIGITは、細胞表面上でほとんど検出できないが、T細胞及びNK細胞の活性化の際に上方調節される。

【0103】

「Ig及びITIMドメインを有するT細胞免疫受容体」、「TIGIT」、「TIGIT抗原」、「TIGITEpitope」、「Vstm3」及び「WUCAM」という用語は、交換可能に使用され、ヒトTIGITの変異体、アイソフォーム、種ホモログ、及びTIGIT少なくとも1つの共通エпитープを有するアナログが含まれる。

【0104】

ヒトTIGITのアミノ酸配列は、Genbank受託番号NP_776160で開示される。アミノ酸1～21の領域は、シグナルペプチドであり；22～141は、細胞外ドメインであり；142～162は、膜貫通ドメインであり；及び163～244は、細胞質ドメインである。mRNAの選択的スプライシングによって170アミノ酸を有するアミノ酸配列の変異体が報告されている。ヒトTIGIT mRNAのヌクレオチド配列は、NM_173799で開示される。173位でのAからGへの転移を有するヌクレオチド配列の変異体が報告されている。

【0105】

特定のヒトTIGIT配列は、一般的に、Genbank受託番号NP_776160のヒトTIGITに対するアミノ酸配列が少なくとも90%同一であり、他の種（例えば、ネズミ）のTIGITアミノ酸配列と比較した場合にアミノ酸配列をヒトとして同定するアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、ヒトTIGITは、Genbank受託番号NP_776160のTIGITに対してアミノ酸配列が少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%同一であり得る。いくつかの実施形態では、ヒトTIGIT配列は、Genbank受託番号NP_776160のTIGITから10未満のアミノ酸差異を示す。いくつかの実施形態では、ヒトTIGITは、Genbank受託番号NP_776160のTIGITから5、4、3、2、または1未満のアミノ酸差異を示し得る。同一性パーセントは、本明細書に記載されるように決定することができる。いくつかの実施形態では、ヒトTIGIT配列は、例えば、保存された突然変異または非保存領域中の突然変異を有することによってGenbank受託番号NP_776160のヒトTIGITと異なる場合があり、TIGITは、Genbank受託番号NP_776160のヒトTIGITと実質的に同じ生物学的機能を有する。例えば、ヒトTIGITの生物学的機能は、本開示の抗TIGIT構築物によって特異的に結合されるTIGITの細胞外ドメイン中にエピトープを有することであり、またはヒトTIGITの生物学的機能は、T細胞活性の調節である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分は、Genbank受託番号NP_776160のTIGITに対して100%のアミノ酸配列同一性を有するTIGITポリペプチドを特異的に認識する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分は、配列番号368のアミノ酸配列を含むTIGITポリペプチドを特異的に認識する。

【0106】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ヒト以外の種、またはヒトTIGITに構造的に関連する他のタンパク質（例えば、ヒトTIGITホモログ）に由来するTIGITと交差反応し得る。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ヒトTIGITに対して完全に特異的であり、種または他の種類の交差反応性を示さない。

【0107】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分は、TIGITの細胞外ドメイン（ECD）を特異的に認識する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、TIGIT細胞外ドメイン（ECD）のN末端部分を特異的に認識する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、TIGIT細胞外ドメイン（ECD）のC末端部分を特異的に認識する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、TIGIT細胞外ドメイン（ECD）の中央部分を特異的に認識する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分によって特異的に認識されるTIGITのECDは、Genbank受託番号NP_776160のTIGITの細胞外ドメインに対してアミノ酸配列が少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%同一である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分によって特異的に認識されるTIGITのECDは、Genbank受託番号NP_776160のTIGITの細胞外ドメインに対してアミノ酸配列が100%同一である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号369のアミノ酸配列を含むTIGITポリペプチドを特異的に認識する。

【0108】

抗体親和性

抗体または抗原結合ドメインの結合特異性は、当該技術分野で公知の方法によって実験的に決定することができる。そのような方法は、ウェスタンブロット、ELISAー、RIAー、ECLー、IRMAー、EIAー、BIACore試験及びペプチドスキャンを含むが、これらに限定されるものではない。

【0109】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合の K_d は、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-6}M$ 、約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-7}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-8}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-9}M$ 、約 $10^{-9}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-10}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-11}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-9}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-10}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-9}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-9}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-9}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-8}M$ 、または約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-8}M$ である。

【0110】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合の K_{on} は、約 $10^2M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^4M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^4M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^6M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^6M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^2M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^3M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^4M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^5M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^3M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^6M^{-1}s^{-1}$ 、または約 $10^4M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^6M^{-1}s^{-1}$ である。

【0111】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合の K_{off} は、約 $1s^{-1}$ ～約 $10^{-2}s^{-1}$ 、約 $10^{-2}s^{-1}$ ～約 $10^{-4}s^{-1}$ 、約 $10^{-4}s^{-1}$ ～約 $10^{-5}s^{-1}$ 、約 $10^{-5}s^{-1}$ ～約 $10^{-6}s^{-1}$ 、約 $1s^{-1}$ ～約 $10^{-6}s^{-1}$ 、約 $10^{-2}s^{-1}$ ～約 $10^{-6}s^{-1}$ 、約 $10^{-3}s^{-1}$ ～約 $10^{-6}s^{-1}$ 、約 $10^{-4}s^{-1}$ ～約 $10^{-6}s^{-1}$ 、約 $10^{-2}s^{-1}$ ～約 $10^{-5}s^{-1}$ 、または約 $10^{-3}s^{-1}$ ～約 $10^{-5}s^{-1}$ である。

【0112】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分の EC_{50} は、増幅発光近接均質アッセイ (AlphaLISA) で $10nM$ 未満である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分の EC_{50} は、FACS分析 (競合結合アッセイ) によるリガンド結合の阻害、または細胞ベースサイトカイン放出アッセイにおいて $500nM$ 未満である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分の IC_{50} は、 $1nM$ 未満 (例えば約 $0.001nM$ ～約 $0.01nM$ 、約 $0.01nM$ ～約 $0.1nM$ 、約 $0.1nM$ ～約 $1nM$ 等)、約 $1nM$ ～約 $10nM$ 、約 $10nM$ ～約 $50nM$ 、約 $50nM$ ～約 $100nM$ 、約 $100nM$ ～約 $200nM$ 、約 $200nM$ ～約 $300nM$ 、約 $300nM$ ～約 $400nM$ 、または約 $400nM$ ～約 $500nM$ 未満である。

【0113】

キメラまたはヒト化抗体

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗TIGIT sdAb部分は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号、及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984) に記載されている。一例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域 (例えば、ラクダ科の種、例えば、ラマに由来する可変領域) 及びヒト定常領域を含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のものから変更された「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

【0114】

いくつかの実施形態では、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減するために、親の非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持したまま、ヒト化されている。一般的に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR（またはその一部）が非ヒト抗体から由来し、FR（またはその一部）がヒト抗体配列に由来する、1つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、場合により、ヒト定常領域の少なくとも部分も含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体のいくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を回復もしくは改善するために、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）に由来する対応する残基で置換されている。

【0115】

ヒト化抗体及びそれらの製造方法は、例えば、Almagro and Franssón, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) に総説される。ヒト化に用いられ得るヒトフレームワーク領域は、限定されないが、「最適フィット」法を用いて選択されるフレームワーク領域；軽鎖または重鎖の可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域；ヒト成熟（体細胞変異）フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系フレームワーク領域；及びFRライブラリースクリーニングに由来するフレームワーク領域を含む。

【0116】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT s d A b は、異種の種に対するその免疫原性を減少させながら、抗原に対するドメインの天然の親和性を減少させることなく改変される、例えば、ヒト化される。例えば、ラマ抗体の抗体可変ドメイン（V_HH）のアミノ酸残基は、決定することができ、例えば、フレームワーク領域におけるラクダ科動物のアミノ酸の1つ以上は、ポリペプチドがその典型的な特徴を失うことなく、すなわち、ヒト化が、結果として生じるポリペプチドの抗原結合能力に著しく影響を及ぼさないように、ヒトコンセンサス配列に見られるようなそれらのヒト対応物に置き換えられる。ラクダ科動物の単ドメイン抗体のヒト化には、単一ポリペプチド鎖における限られた量のアミノ酸の導入及び突然変異誘発が必要である。これは、2本の鎖、軽鎖及び重鎖におけるアミノ酸変化の導入、ならびに両鎖のアセンブリの保存が必要なs c F v、F a b'、（F a b'）₂、及びI g Gのヒト化と対照的である。

【0117】

V_HHドメインを含むs d A b は、ヒト様配列を有するようにヒト化することができる。いくつかの実施形態では、本明細書で使用されるV_HHドメインのFR領域は、ヒトV_Hフレームワーク領域に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上のいずれか1つのアミノ酸配列相同性を含む。ヒト化V_HHドメインの1つの例示的なクラスは、そのV_HHが、K a b a t 番号付けに従って、位置45にグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリン、スレオニン、アスパラギン、またはグルタミンからなる群より選ばれるアミノ酸（例えば、L45など）を持ち、位置103にトリプトファンを持つことを特徴とする。したがって、このクラスに属するポリペプチドは、ヒトV_Hフレームワーク領域に対して高いアミノ酸配列相同性を示し、前記ポリペプチドは、望ましくない免疫応答を引き起こす可能性を伴わず、かつさらなるヒト化の負担も伴わずに、ヒトに直接投与され得る。

【0118】

ヒト化ラクダ科単ドメイン抗体の別の例示的なクラスは、W003/035694に記載されており、ヒト起源のまたは他の種由来の従来型抗体に典型的に見られる疎水性FR2残基を含有するが、この親水性の喪失を、二本鎖抗体由来のV_Hに存在する保存されたトリプトファン残基に代わる103位の荷電アルギニン残基によって補償している。したがって、これら2つのクラスに属するペプチドは、ヒトV_Hフレームワーク領域に対して高いアミノ酸配列相同性を示し、前記ペプチドは、望ましくない免疫応答を引き起こす可能性を伴わず、かつさらなるヒト化の負担も伴わずに、ヒトに直接投与され得る。

10

20

30

40

50

【0119】

ヒトドメイン抗体

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗TIGIT s d A b部分は、ヒト抗体（ヒトドメイン抗体、またはヒトD a bとして知られる）である。ヒト抗体は、当該技術分野で公知の様々な技術を用いて生産することができる。ヒト抗体は、一般的に、C h e n, M o l. I m m u n o l. 47 (4) : 912-21 (2010)に記載されている。完全ヒト単ドメイン抗体（またはD A b）を産生することができるトランスジェニックマウスまたはラットは、当該技術分野で公知である。例えば、U S 20090307787 A1、米国特許第8,754,287号、U S 20150289489 A1、U S 20100122358 A1、及びW O 2004049794を参照されたい。

10

【0120】

ヒト抗体（例えば、ヒトD A b）は、抗原攻撃に応答して、無傷ヒト抗体またはヒト可変領域を持つ無傷抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に、免疫原を投与することにより調製することができる。そのような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置換するか、または染色体外に存在するかもしれない動物の染色体にランダムに組み込まれている、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含む。そのようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般的に不活性化される。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の総説については、L o n b e r g, N a t. B i o t e c h. 23:1117-1125 (2005)を参照されたい。そのような動物で生成された無傷抗体に由来するヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることにより、さらに改変される可能性がある。

20

【0121】

ヒト抗体（例えば、ヒトD A b）は、ハイブリドーマベース法によって作成することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種細胞株は、当該技術分野において公知である。

【0122】

ヒト抗体（例えば、ヒトD A b）は、ヒトに由来するファージディスプレイライブラリーから選択されたF v クローン可変ドメイン配列を単離することによっても生成され得る。そのような可変ドメイン配列は、次に所望のヒト定常ドメインと組み合わせてもよい。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術が、以下に説明される。

30

【0123】

特定の抗原または標的に対するV_HH配列を得る1つの技術は、重鎖抗体を発現することができるトランスジェニック哺乳動物を適当に免疫化すること（すなわち、免疫応答及び／または前記抗原または標的に対する重鎖抗体をもたらすために）、前記V_HH配列（をコードする核酸配列）を含有する前記トランスジェニック哺乳動物から適当な生物学的試料（例えば、血液試料、血清試料またはB細胞の試料）を得ること、及び次に、それ自体公知である任意の適当な技術（例えば、本明細書に記載の方法のいずれかまたはハイブリドーマ技術）を用いて、前記試料から出発して、前記抗原または標的に対するV_HH配列を生成することを伴う。例えば、この目的のために、重鎖抗体を発現するマウス、及びW O 02/085945、W O 04/049794及びW O 06/008548及びJ a n s s e n s e t a l., P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A. 2006年10月10日; 103 (41) : 15130~5頁に記載されるさらなる方法及び技術を用いることができる。例えば、そのような重鎖抗体を発現するマウスは、任意の適当な（単一）可変ドメイン、例えば、天然の供給源からの（単一）可変ドメイン（例えば、ヒトの（単一）可変ドメイン、ラクダ科動物の（単一）可変ドメインまたはサメの（単一）可変ドメイン）、ならびに、例えば、合成または半合成の（単一）可変ドメインを有する重鎖抗体を発現することができる。

40

【0124】

ライブラリー由来抗体

本出願の抗体は、所望の活性または活性（複数）を有する抗体についてコンビナトリア

50

ルライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。例えば、種々の方法が、ファージディスプレイライブラリーを生成し、所望の結合特性を有する抗体についてのライブラリーをスクリーニングするために、当該技術分野で知られている。単一ドメイン抗体ライブラリーを構築する方法は、例えば、米国特許第7371849号に記載されている。

【0125】

ある特定のファージディスプレイ法では、 V_H 及び V_L 遺伝子のレパートリーがポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により別々にクローニングされ、ファージライブラリーにおいてランダムに組み換えられ、これをその後、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。 V_H 遺伝子のレパートリーは、PCRにより同様にクローニングされ、ファージライブラリーにおいてランダムに組み換えられ、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは、典型的には、抗体断片を、一本鎖Fv (scFv)断片またはFab断片のいずれかとして提示する。免疫された供給源由来のライブラリーは、ハイブリドーマを構築することを必要とせずに、免疫原に対して親和性の高い抗体を提供する。あるいは、Griffiths et al., EMBO J. 12: 725-734 (1993)に記載されるようにして、ナイーブレパートリーを（例えば、ヒトから）クローニングし、いかなる免疫付与も無しに、広範囲の非自己抗原及び自己抗原に対する、単一供給源の抗体を提供できる。最後に、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227: 381-388 (1992)に記載されるように、幹細胞由来の再構成されていないV遺伝子セグメントをクローニングして、高度可変CDR3領域をコードし、インビトロでの再構成を達成するランダム配列を含むPCRプライマーを使用することによって、ナイーブライブラリーを合成的に製造することもできる。

【0126】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体または抗体断片は、本明細書でヒト抗体またはヒト抗体断片とみなされる。

【0127】

生物学的活性

本明細書に記載の抗TIGIT s d A b部分の生物学的活性は、その50%阻害濃度（EC₅₀）を測定することで決定することができ、これは、特異的な生物学的または生化学的機能を阻害する（例えば、TIGIT及びその主要リガンドCD155の間の結合を阻害する）抗体の効力の尺度である。例えば、ここで、EC₅₀は、TIGIT生物活性の50%をインビトロで中和するのに必要な抗TIGIT s d A bの有効濃度を示すために使用することができる。EC₅₀は、作動薬または他の物質（例えば、抗体）のEC₅₀に匹敵する。EC₅₀は、最大効果の50%をインビボで細胞に基づくサイトカイン放出アッセイも表す。EC₅₀は、当該技術分野で公知のアッセイ、例えば、FACS分析（競合結合アッセイ）によるリガンド結合の阻害などのバイオアッセイ、細胞ベースサイトカイン放出アッセイ、または増幅発光近接均質アッセイ（AlphaLISA）によって測定することができる。

【0128】

例えば、リガンド結合の遮断は、フローサイトメトリーを用いて試験することができる（実施例2も参照されたい）。ヒトTIGITを発現するCHO細胞を接着培養フラスコから解離して、種々の濃度の試験用の抗TIGIT s d A b、及び一定濃度の標識CD155-Fcタンパク質と混合することができる。抗TIGIT抗体陽性対照、例えば、22G2（US2016/0176963における配列番号7及び9を参照されたい）を使用することができる。混合物を室温で30分間平衡化し、FACS緩衝液（1%BSAを含有するPBS）で3回洗浄した。その後、一定濃度の標識CD155タンパク質を特異的に認識する抗体（例えば、PE/Cy5ストレプトアビジン二次抗体）を加え、室温で15分間インキュベートする。細胞をFACS緩衝液で洗浄し、フローサイトメトリー

で分析する。非線形回帰を用いて、PRISM（商標）（GraphPad Software、San Diego、CA）でデータを分析し、EC₅₀を算出することができる。競合アッセイからの結果は、抗TIGIT sdAbが標識CD155とTIGITの間の相互作用を阻害する能力を示すことができる。

【0129】

抗TIGIT sdAb部分の生物学的活性はまた、TIGIT／CD155遮断レポーターアッセイまたはIL-2放出アッセイによって試験することができる（実施例2も参照されたい）。その主要リガンド、CD155に結合する際に、そのITIMドメインにおけるTIGITのその後のリン酸化は、阻害シグナルを変換して、T細胞におけるIFN- γ 発現を下方調節する。例えば、TIGITエフェクター細胞は、一晩載置した後、抗TIGIT sdAbを含む抗TIGIT構築物の連続希釈でインキュベートし、CD155 aAPC／CHO-K1細胞を適当なE：T比で加えることができる。37℃、5%CO₂での誘導の6時間後、Bio-Glo（商標）ルシフェラーゼアッセイ試薬を加えることができ、発光を判断することができる。結果は、抗TIGIT sdAbがCD155とTIGITの間の相互作用を阻害する能力を示すことができる。

【0130】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、TIGIT受容体により形質導入されたシグナルを遮断またはまたは拮抗する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、CD155との相互作用からTIGITを阻害するように、TIGIT上のエピトープに結合することができる。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、抗体結合部位対TIGITリガンド結合部位の比が1：1より大きく、かつ、抗体の濃度が10⁻⁸Mより大きい条件下で、TIGITのCD155への結合を少なくとも約5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%、99%、または99.9%のいずれかまで減少させることができる。

【0131】

（II）抗TIGIT sdAb部分を含む構築物

抗TIGIT sdAb部分を含む抗TIGIT構築物は、任意の可能な形式のものであり得る。

【0132】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分を含む抗TIGIT構築物は、追加のポリペプチド配列、例えば、1つ以上の抗体部分（または抗原結合部分）、または免疫グロブリンのFc断片をさらに含み得る。そのような追加のポリペプチド配列は、抗TIGIT sdAbの（生物学的）特性に変化あるいはそれに影響を及ぼしても及ぼさなくてもよく、本明細書に記載の抗TIGIT sdAbにさらなる機能性を追加しても追加しなくてもよい。いくつかの実施形態では、追加のポリペプチド配列は、本発明の抗TIGIT sdAbに1つ以上の所望の特性または機能性を与える。

【0133】

いくつかの実施形態では、追加のポリペプチド配列は、第2の抗原または第2のエピトープを特異的に認識する第2の抗体部分（例えば、sdAb、scFv、Fab、完全長抗体）であってもよい。いくつかの実施形態では、第2の抗原は、TIGIT由来である。いくつかの実施形態では、第2のエピトープは、TIGIT由来でない。いくつかの実施形態では、第2の抗体部分（または第2の抗原結合部分）は、本明細書に記載される抗TIGIT sdAbとして、TIGIT上の同じエピトープを特異的に認識する。いくつかの実施形態では、第2の抗体部分（または第2の抗原結合部分）は、本明細書に記載される抗TIGIT sdAbとして、TIGIT上の異なるエピトープを特異的に認識する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、適宜リンカー（例えば、ペプチドリンカー）を介して一緒に連結した、本明細書に記載の2つ以上の抗TIGIT-sdAb部分を含む。一緒に連結した2つ以上の抗TIGIT-sdAb部分は、同じか、または異なり得る。

【0134】

いくつかの実施形態では、追加のポリペプチド配列は、本明細書に記載の抗TIGIT s d A bそれ自体と比較して、本発明の抗TIGIT構築物の抗体構築物半減期、溶解度もしくは吸収を増加させ、免疫原性もしくは毒性を低減し、望ましくない副作用を排除もしくは軽減し、及び／または他の有利な特性をそれに付与し、及び／またはその望ましくない特性を低減してもよい。そのような追加のポリペプチド配列のいくつかの非限定例は、血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン（例えば、W000／27435を参照されたい）またはハプテン分子（例えば、循環抗体によって認識されるハプテン、例えば、W098／22141を参照されたい）である。免疫グロブリンの断片（例えば、V_Hドメイン）を血清アルブミンまたはその断片に連結することが、抗体半減期を増加させ得ることを示した（例えば、W000／27435及びW001／077137を参照されたい）。従って、いくつかの実施形態では、本発明の抗TIGIT構築物は、適当なリンカー（例えば、ペプチドリンカー）を適宜介して、血清アルブミン（またはその適当な断片）に連結した本明細書に記載の抗TIGIT s d A b部分を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT s d A b部分は、血清アルブミンドメインIIIを少なくとも含む血清アルブミンの断片に連結することができる（PCT／EP2007／002817を参照されたい）。抗TIGIT s d A b－HSA融合タンパク質は、例えば、（s d A b）_n－HSA（nは、少なくとも1の整数である）、s d A b－HSA－s d A bなどの任意のフォーマットであり得る。

【0135】

抗TIGIT s d A b－Fc融合タンパク質

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT s d A b部分は、リンカー配列を適宜介して、1つ以上の（好ましくは、ヒト）C_H2及び／またはC_H3ドメイン、例えば、Fc断片に連結して、その半減期をインビボで増加させることができる。

【0136】

従って、いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、免疫グロブリン、例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMのFc断片に融合した本明細書に記載の抗TIGIT s d A b部分を含む抗TIGIT s d A b－Fc融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT s d A b－Fc融合タンパク質は、IgG、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のいずれかのFc配列を含む。いくつかの実施形態では、Fc断片は、ヒトFc、例えば、ヒトIgG1（hIgG1）Fc、hIgG2Fc、またはhIgG4 Fcである。いくつかの実施形態では、Fc断片は、抗体エフェクター機能が減少、最小化、または排除されたエフェクターレス、例えば、ADCC、CDC、及び／またはADCP（抗体依存性細胞貪食）である。例えば、いくつかの実施形態では、エフェクターレスFcは、C_H2領域においてN297AまたはDANA突然変異（D265A＋N297A）を含む。いくつかの実施形態では、エフェクターレスFcは、K322A及びL234A／L235A（LALA）突然変異を含む。いくつかの実施形態では、Fc断片は、エフェクターレス（不活性）IgG1 Fc、例えば、エフェクターレスhIgG1 Fcである。いくつかの実施形態では、Fc断片は、配列番号355、356、及び389のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT s d A b－Fc融合タンパク質は、単量体である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT s d A b－Fc融合タンパク質は、二量体である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT s d A b部分及びFc断片は、ペプチドリンカーによって適宜連結される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、ヒトIgG1ヒンジ（配列番号370）である。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、変異型ヒトIgG1ヒンジ（配列番号371）である。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、ヒトIgG4ヒンジ（配列番号324）である。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、hIgG2ヒンジである。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号372～378のいずれか1つのアミノ酸配列、例えば、配列番号372または373を含む。

【0137】

従って、例えば、いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するs d A b部分を含む抗TIGIT s d A b-F c融合タンパク質であって、抗TIGIT s d A b部分は、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含み、抗TIGIT s d A b部分は、適宜リンカーを介して免疫グロブリンのF c断片に融合される、抗TIGIT s d A b-F c融合タンパク質を提供する。

いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するs d A b部分を含む抗TIGIT s d A b-F c融合タンパク質であって、s d A b部分は、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含み、抗TIGIT s d A b部分は、適宜リンカーを介して免疫グロブリンのF c断片に融合される、抗TIGIT s d A b-F c融合タンパク質を提供する。

いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、CDR1及び／またはCDR2内である。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するs d A b部分を含む抗TIGIT s d A b-F c融合タンパク質であって、s d A b部分は、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含み、抗TIGIT s d A b部分は、適宜リンカーを介して免疫グロブリンのF c断片に融合される、抗TIGIT s d A b-F c融合タンパク質を提供する。

いくつかの実施形態では、F c断片は、ヒトIgG1 F c、ヒトエフェクターレスIgG1 F c、hIgG2 F c、またはヒトIgG4 F cである。いくつかの実施形態では、F c断片は、配列番号355、356、及び389のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT s d A b-F c融合タンパク質は、単量体である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT s d A b-F c融合タンパク質は、二量体である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT s d A b部分及びF c断片は、ペプチドリンカーによって適宜連結される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号324及び370~378のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT s d A b部分とTIGITの間の結合の K_d は、約 $10^{-5}M$ ~約 $10^{-12}M$ （例えば、約 $10^{-7}M$ ~約 $10^{-12}M$ 、または約 $10^{-8}M$ ~約 $10^{-12}M$ ）である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT s d A b部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。

【0138】

いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するs d A b部分を含む抗TIGIT s d A b-F c融合タンパク質であって、s d A b部分は、配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、または配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つに対して少なくとも

約80%（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のいずれか）の配列同一性を有するその変異体を含み、抗TIGIT sdAb部分は、適宜リンカーを介して免疫グロブリンのFc断片に融合される、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質であって、sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、またはV_HHドメインにおいて最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含み、抗TIGIT sdAb部分は、適宜リンカーを介して免疫グロブリンのFc断片に融合される、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、V_HHドメインにおけるアミノ酸置換は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3などのCDR内である。いくつかの実施形態では、V_HHドメインにおけるアミノ酸置換は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのFR1、及び／またはFR2、及び／またはFR3、及び／またはFR4などのFR内である。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つの両方のCDR及びFR内である。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質であって、sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含み、抗TIGIT sdAb部分は、適宜リンカーを介して免疫グロブリンのFc断片に融合される、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質であって、sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含み、抗TIGIT sdAb部分は、適宜リンカーを介して免疫グロブリンのFc断片に融合される、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、Fc断片は、ヒトIgG1 Fc、エフェクターレスヒトIgG1 Fc、hIgG2 Fc、またはヒトIgG4 Fcである。いくつかの実施形態では、Fc断片は、配列番号355、356、及び389のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質は、単量体である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質は、二量体である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分及びFc断片は、ペプチドリンカーによって適宜連結される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合のK_dは、約10⁻⁵M～約10⁻¹²M（例えば、約10⁻⁷M～約10⁻¹²M、または約10⁻⁸M～約10⁻¹²M）である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。

【0139】

いくつかの実施形態では、配列番号288～294、306、308～311、315、317～319、321～322、及び365～367のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質を提供する。

【0140】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、抗TIGIT sdAb、または本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む抗TIGIT構築物のいずれか1つと競合的にTIGITに特異的に結合する、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質（以下、「競合抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質」と呼

10

20

30

40

50

ばれる)も提供される。競合的結合は、ELISAアッセイを用いて決定してもよい。例えば、いくつかの実施形態では、配列番号288~294、306、308~311、315、317~319、321~322、及び365~367のいずれか1つのアミノ酸配列を含む抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質と競合的にTIGITに特異的に結合する、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質と競合的にTIGITに特異的に結合する、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む抗TIGIT sdAb (または抗TIGIT sdAb部分を含む抗TIGIT構築物)と競合的にTIGITに特異的に結合する、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、競合抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質のFc断片は、配列番号355、356、及び389のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、競合抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質とTIGITの間の結合の K_d は、約 $10^{-5}M$ ~約 $10^{-12}M$ (例えば、約 $10^{-7}M$ ~約 $10^{-12}M$ 、または約 $10^{-8}M$ ~約 $10^{-12}M$)である。いくつかの実施形態では、競合抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。

【0141】

多価及び／または多重特異性抗体

いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、1つ以上の他の抗体部分または抗原結合部分 (例えば、別の抗原または別のエピトープを特異的に認識する抗体部分)に融合した本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む。1つ以上の他の抗体部分は、任意の抗体または抗体断片形式、例えば、多重特異性sdAb (例えば、二重特異性sdAb)、完全長抗体、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、一本鎖Fv (scFv)、scFv-scFv、ミニボディ、ダイアボディ、またはsdAbであり得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗体部分 (または抗原結合部分)は、重鎖可変ドメイン (V_H)及び軽鎖可変ドメイン (V_L)を含む。抗体断片は、種々の技術で作成することができ、限定されないが、本明細書に記載されるように、無傷抗体のタンパク質分解、ならびに組み換え宿主細胞 (例えば、E. coliまたはファージ)による産生を含む。

【0142】

多重特異性抗体を製造するための技術には、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組み換え同時発現、及び「ノブ-イン-ホール」操作；ロイシンジッパーを使って二重特異性抗体を製造すること；二重特異性抗体断片を作製するために「ダイアボディ」技術を使用すること；及び一本鎖Fv (sFv)二量体を使用すること；及び、例えば、Tuttle et al., J. Immunol. 147:60 (1991)に記載されているようにして、三重特異性抗体を調製すること；及びタンDEM単ドメイン抗体を含むポリペプチドを生成することなどが含まれるが、それらに限定されない。「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の機能的抗原結合部位を有する改変抗体も、これに含まれる (例えば、US2006/0025576A1を参照されたい)。

【0143】

ペプチドリンカー

いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物内の抗TIGIT sdAb及び他の1

つ以上の抗体部分（例えば、完全長抗体、s d A b、またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）は、場合により、ペプチドリンカーによって連結することができる。抗T I G I T構築物で使用されるペプチドリンカー（複数可）の長さ、柔軟性の程度、及び／または他の特性は、1つ以上の特定の抗原またはエピトープに対する親和性、特異性、またはアビディティを含むが、これらに限定されない特性にいくらかの影響を与え得る。例えば、2つの隣接するドメインが互いに立体的に干渉しないことを確実にするために、より長いペプチドリンカーが選択され得る。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、隣接するドメインが互いに自由に動くように、可動性残基（例えば、グリシン及びセリン）を含む。例えば、グリシン-セリンダブルレットは、適当なペプチドリンカーであり得る。

【0144】

ペプチドリンカーは、任意の適当な長さであり得る。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100以上のアミノ酸長のいずれかである。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、約100、75、50、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5未満のアミノ酸長のいずれかである。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーの長さは、約1アミノ酸～約10アミノ酸、約1アミノ酸～約20アミノ酸、約1アミノ酸～約30アミノ酸、約5アミノ酸～約15アミノ酸、約10アミノ酸～約25アミノ酸、約5アミノ酸～約30アミノ酸、約10アミノ酸～約30アミノ酸長、約30アミノ酸～約50アミノ酸、約50アミノ酸～約100アミノ酸、または約1アミノ酸～約100アミノ酸のいずれかである。

【0145】

ペプチドリンカーは、天然に生じる配列または非天然に生じる配列を有し得る。例えば、重鎖のみ抗体のヒンジ領域に由来する配列は、リンカーとして使用され得る。例えば、WO1996/34103を参照されたい。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、ヒトIgG1ヒンジ（配列番号370）である。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、変異ヒトIgG1ヒンジ（配列番号371）である。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、ヒトIgG4ヒンジ（配列番号324）である。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、ヒトIgG2ヒンジである。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、可動性リンカーである。例示的な可動性リンカーとしては、グリシンポリマー（G）_n（配列番号374）、グリシン-セリンポリマー（例えば、（GS）_n（配列番号375）、（GS GGS）_n（配列番号376）、（GGGS）_n（配列番号377）、及び（GG GGS）_n（配列番号378）、nは、少なくとも1つの整数である）、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び当該技術分野で公知の他の可動性リンカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号372（GG GGS G GGS）または配列番号373（GG GGS G G GGS G G GGS）のアミノ酸配列を含む。

【0146】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗T I G I T s d A b部分及び1つ以上の他の抗体部分（例えば、完全長抗体、s d A b、またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）を含む抗T I G I T構築物は、単一特異性である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗T I G I T s d A b部分、及び1つ以上の他の抗体部分（例えば、完全長抗体、s d A b、またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）を含む抗T I G I T構築物は、多重特異性（例えば、二重特異性）である。多重特異性分子は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する分子である（例えば、二重特異性抗体は、2つのエピトープに対して結合特異性を有する）。3つ以上の価数及び／または特異性を有する多重特異性分子も考慮される。例えば、三重特異性抗体は、調製することができる。Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)。当業者であれば、本明細書に記載の個々の多重特異性分子の適切な機能を選択して、互いに組み合わせて、本発明の多重特異性の抗T I G I T分子を形成できることが理解されるはずである。

【0147】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、多価であるが、単一特異性である、すなわち、抗TIGIT構築物は、抗TIGIT sdAb部分と同じTIGITエピトープを特異的に認識する、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分、及び少なくとも第2の抗体部分（例えば、完全長抗体、sdAb、またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分と同じTIGITエピトープを特異的に認識する1つ以上の抗体部分は、抗TIGIT sdAb部分と同じCDR及び／または同じV_HHアミノ酸配列を含み得る。例えば、抗TIGIT構築物は、2つ以上の本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含み得、2つ以上の抗TIGIT sdAb部分は、同じである。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ペプチドリンカー（複数可）によって適宜連結される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

10

【0148】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、多価及び多重特異性である、すなわち、抗TIGIT構築物は、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分、及びTIGIT以外の第2の抗原を特異的に認識する少なくとも第2の抗体部分（例えば、完全長抗体、sdAb、またはV_H及びV_Lを含む抗原結合部分）、または本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分により認識される異なるTIGITエピトープを含む。いくつかの実施形態では、第2の抗体部分は、sdAbである。いくつかの実施形態では、第2の抗体部分は、ヒト血清アルブミン（HSA）を特異的に認識する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分は、第2の抗体部分のN末端及び／またはC末端に融合される。いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、三価及び二重特異性である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、本明細書に記載の2つの抗TIGIT sdAb、及び第2の抗体部分（例えば、抗HSA sdAb）を含み、前記第2の抗体部分は、2つの抗TIGIT sdAb部分の間にある。いくつかの実施形態では、抗体部分は、ペプチドリンカー（複数可）によって適宜連結される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

20

【0149】

2つ以上の抗TIGIT sdAb部分を含む単一特異性または多重特異性の抗TIGIT構築物は、本明細書に記載の単一抗TIGIT sdAb部分のものと比較して、アビディティの増加を有し得る。

30

【0150】

完全長抗体に融合した抗TIGIT sdAb部分を含む二重特異性抗体

いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、第2の抗体部分に融合した本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含み、第2の抗体部分は、2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体（例えば、抗PD-1または抗PD-L1完全長抗体）である。完全長抗体のFc断片は、例えば、IgG1 Fc、エフェクターレスIgG1 Fc、IgG2 Fc、またはIgG4 Fcであり得る。いくつかの実施形態では、Fc断片は、配列番号355、356、及び389のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、刺激性免疫チェックポイント分子のアクチベーターである。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、免疫チェックポイント阻害薬、例えば、PD-1またはPD-L1の阻害剤である。

40

【0151】

TIGIT及びPD-1に対する二重特異性を含む構築物は、「抗TIGIT/PD-1抗体」、「抗TIGIT/PD-1構築物」、「PD-1×TIGIT抗体」または「PD-1×TIGIT BAP」と以下で呼ばれる。TIGIT及びPD-L1に対する二重特異性を含む構築物は、「抗TIGIT/PD-L1抗体」、「抗TIGIT/PD-L1構築物」、「PD-L1×TIGIT抗体」、または「PD-L1×TIGIT

50

「B A B P」と以下で呼ばれる。

【0152】

P D - 1 及び P D - L 1 は、T I G I T と同様に、阻害性免疫チェックポイント分子である。

【0153】

P D - 1 は、T 細胞活性化及び耐性を調節する共刺激分子の B 7 / C D 2 8 ファミリーの一部であるため、アンタゴニスト抗 P D - 1 抗体は、耐性を克服するために有用であり得る。P D - 1 は、B 7 - 4 の受容体として定義されている。B 7 - 4 は、免疫細胞上の阻害性受容体に結合する際に免疫細胞活性化を阻害することができる。P D - 1 / P D - L 1 経路の関与は、T 細胞エフェクター機能、サイトカイン分泌及び増殖の阻害をもたらす (Turnis et al., OncoImmunology 1 (7) : 1172 - 1174, 2012)。高レベルの P D - 1 は、疲弊した T 細胞または慢性的に刺激された T 細胞と関連する。さらに、P D - 1 発現の増加は、がん患者の生存率の低下と関連している。P D - 1、B 7 - 4、及び免疫細胞中の B 7 - 4 及び P D - 1 阻害シグナル間の相互作用を下方調節する薬剤は、免疫応答の増強をもたらす得る。本出願に適用することができる例示的な抗 P D - 1 抗体としては、ペムブロリズマブ (例えば、キイトルーダ (登録商標))、P D 1 - B M - m i n、及びニボルマブ (例えば、オプジーボ (登録商標)) が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0154】

P D - L 1 (プログラム細胞死リガンド 1) は、分化クラスター 2 7 4 (C D 2 7 4) または B 7 ホモログ 1 (B 7 - H 1) としても知られる。P D - L 1 は、P D - 1 のリガンドとして機能し、特定の事象、例えば、妊娠、組織同種移植片、自己免疫疾患及び他の疾患状態、例えば、肝炎及びがんの最中の免疫系の抑制に主要な役割を果たす。P D - 1 受容体 / P D - L 1 リガンド複合体の形成により、リンパ節で C D 8 + T 細胞の増殖を低下させる阻害シグナルを伝える。本発明に適用することができる例示的な抗 P D - L 1 抗体としては、アテゾリズマブ (例えば、テセントリク (登録商標)) 及びデュルバルマブ (例えば、M E D I 4 7 3 6、I M F I N Z I (商標))、アベルマブ (例えば、B a v e n c i o (登録商標))、及び h 5 3 C 1 (ヒト化 5 3 C 1) が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、h 5 3 C 1 抗 P D - L 1 抗体は、1) 配列番号 3 4 9 のアミノ酸配列を含む H C - C D R 1、配列番号 3 5 0 のアミノ酸配列を含む H C - C D R 2、及び配列番号 3 5 1 のアミノ酸配列を含む H C - C D R 3 を含む V_H、及び 2) 配列番号 3 5 2 のアミノ酸配列を含む L C - C D R 1、配列番号 3 5 3 のアミノ酸配列を含む L C - C D R 2、及び配列番号 3 5 4 のアミノ酸配列を含む L C - C D R 3 を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、h 5 3 C 1 抗 P D - L 1 抗体は、配列番号 3 3 9 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 3 4 0 のアミノ酸配列を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、h 5 3 C 1 抗 P D - L 1 抗体は、配列番号 3 2 3 または 3 2 7 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 3 2 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、h 5 3 C 1 抗 P D - L 1 抗体は、配列番号 3 2 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 3 3 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

20

30

【0155】

いくつかの実施形態では、T I G I T を特異的に認識する s d A b 部分及び抗 P D - 1 完全長抗体を含む単離抗 T I G I T 構築物であって、抗 T I G I T s d A b 部分は、配列番号 3 6 ~ 4 2、5 4、5 6 ~ 5 9、6 3、6 5 ~ 6 7、6 9 ~ 7 0 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む C D R 1、または最大で約 3 つ (例えば、約 1、2、または 3 のいずれか) のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号 1 0 6 ~ 1 1 2、1 2 4、1 2 6 ~ 1 2 9、1 3 3、1 3 5 ~ 1 3 7、1 3 9 ~ 1 4 0 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む C D R 2、または最大で約 3 つ (例えば、約 1、2、または 3 のいずれか) のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号 1 7 6 ~ 1 8 2、1 9 4、1 9 6 ~ 1 9 9、2 0 3、2 0 5 ~ 2 0 7、2 0 9 ~ 2 1 0 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む C D R 3、または最大で約 3 つ (例えば、約 1、2、または 3 のいずれか) のアミノ酸置換を含むその変異体

40

50

を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3；またはCDR領域において最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。

いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、CDR1及び／またはCDR2内である。

いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。

いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、sdAbは、配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、または配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つに対して少なくとも約80%（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のいずれか）の配列同一性を有するその変異体を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。

いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、sdAbは、配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメイン、またはV_HHドメインにおいて最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。

いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つのCDR1、及び／またはCDR2、及び／またはCDR3などのCDR内である。

いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つのFR1、及び／またはFR2、及び／またはFR3、及び／またはFR4などのFR内である。

いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つのCDR及びFRの両方の内である。

いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、sdAbは、配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。

いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、sdAb部分は、配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む。

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号385のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号386のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含む。

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号385のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号386のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。

10

20

30

40

50

実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号325のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号326のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号387のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号388のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号387のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号388のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号406のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号407のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号406のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号407のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体のFc断片は、hIgG1 Fc、エフェクターレスhIgG1 Fc、hIgG2 Fc、またはhIgG4 Fcである。いくつかの実施形態では、完全長抗体のFc断片は、配列番号355、356、及び389のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分のN末端は、完全長抗体の重鎖の少なくとも1つのC末端に融合される。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、完全長抗体の重鎖の少なくとも1つのN末端に融合される。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分のN末端は、完全長抗体の軽鎖の少なくとも1つのC末端に融合される。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、完全長抗体の軽鎖の少なくとも1つのN末端に融合される。いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、本明細書に記載の4つの抗TIGIT sdAb部分を含み、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、完全長抗体の重鎖及び軽鎖の両方のN末端に融合される（図21に例示される）。いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、本明細書に記載の4つの抗TIGIT sdAb部分を含み、2つの抗TIGIT sdAbは、第1の適宜リンカーを介して一緒に融合し、他方の2つの抗TIGIT sdAbは、第2の適宜リンカーを介して一緒に融合し、2つの抗TIGIT sdAb融合体の各セットのC末端は、完全長抗体の各重鎖のN末端に第3及び第4の適宜リンカーを介して融合される（図22に例示される）。いくつかの実施形態では、4つの抗TIGIT sdAbは、同一である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分及び完全長抗体は、ペプチドリンカーによって適宜連結される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合のK_dは、約10⁻⁵M～約10⁻¹²M（例えば、約10⁻⁷M～約10⁻¹²M、または約10⁻⁸M～約10⁻¹²M）である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。

【0156】

いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-1完全長抗体の重鎖の少なくとも1つのN末端に融合され、抗PD-1完全長抗体は、配列番号390のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号391または395のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、及び重鎖融合ポリペプチドは、配列番号394のアミノ酸配列を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する（以後、「BTP-11」と表記する）。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-1完全長抗体の両方の重鎖のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT sdAb部分のN末端は、抗PD-1完全長抗体の重鎖の少なくとも1つのC末端に融合され、抗PD-1完全長抗体は、配列番号390のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号391または397のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、及び重鎖融合ポリペプチドは、配列番号396のアミノ酸配列を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する（以後、「BTP-12」と表記する）。いくつかの実施形態では、抗TIGIT

10

20

30

40

50

G I T s d A b 部分の C 末端は、抗 P D - 1 完全長抗体の両方の重鎖の N 末端に融合される。いくつかの実施形態では、T I G I T を特異的に認識する s d A b 部分及び抗 P D - 1 完全長抗体を含む単離抗 T I G I T 構築物であって、抗 T I G I T s d A b 部分の C 末端は、抗 P D - 1 完全長抗体の軽鎖の少なくとも 1 つの N 末端に融合され、抗 P D - 1 完全長抗体は、配列番号 390 または 398 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 391 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、軽鎖融合ポリペプチドは、配列番号 399 のアミノ酸配列を含む、単離抗 T I G I T 構築物を提供する（以後、「B T P - 13」と表記する）。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T s d A b 部分の C 末端は、抗 P D - 1 完全長抗体の両方の軽鎖の N 末端に融合される。いくつかの実施形態では、T I G I T を特異的に認識する s d A b 部分及び抗 P D - 1 完全長抗体を含む単離抗 T I G I T 構築物であって、抗 T I G I T s d A b 部分の N 末端は、抗 P D - 1 完全長抗体の軽鎖の少なくとも 1 つの C 末端に融合され、抗 P D - 1 完全長抗体は、配列番号 390 または 400 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 391 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、軽鎖融合ポリペプチドは、配列番号 401 のアミノ酸配列を含む、単離抗 T I G I T 構築物を提供する（以後、「B T P - 14」と表記する）。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T s d A b 部分の N 末端は、抗 P D - 1 完全長抗体の両方の軽鎖の C 末端に融合される。いくつかの実施形態では、配列番号 394 及び 396 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖融合ポリペプチドの 2 つの同一のコピー、及び配列番号 391、395 または 397 のアミノ酸配列を含む軽鎖の 2 つの同一のコピーを含む、単離抗 T I G I T 構築物を提供する。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T 構築物は、図 17 及び 18 に示す構造を有する。いくつかの実施形態では、配列番号 390、398 または 400 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖融合ポリペプチドの 2 つの同一のコピー、及び配列番号 399 または 401 のアミノ酸配列を含む軽鎖の 2 つの同一のコピーを含む、単離抗 T I G I T 構築物を提供する。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T 構築物は、図 19 及び 20 に示す構造を有する。

【0157】

従って、いくつかの実施形態では、T I G I T を特異的に認識する s d A b 部分及び抗 P D - L 1 完全長抗体を含む単離抗 T I G I T 構築物であって、抗 T I G I T s d A b 部分は、配列番号 36 ~ 42、54、56 ~ 59、63、65 ~ 67、69 ~ 70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む C D R 1、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号 106 ~ 112、124、126 ~ 129、133、135 ~ 137、139 ~ 140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む C D R 2、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号 176 ~ 182、194、196 ~ 199、203、205 ~ 207、209 ~ 210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む C D R 3、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含み；及び抗 P D - L 1 完全長抗体は、配列番号 381 のアミノ酸配列の H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む V_H、及び配列番号 382 のアミノ酸配列の L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む V_L を含む、単離抗 T I G I T 構築物を提供する。

【0158】

いくつかの実施形態では、T I G I T を特異的に認識する s d A b 部分及び抗 P D - L 1 完全長抗体を含む単離抗 T I G I T 構築物であって、抗 T I G I T s d A b 部分は、配列番号 36 ~ 42、54、56 ~ 59、63、65 ~ 67、69 ~ 70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む C D R 1；配列番号 106 ~ 112、124、126 ~ 129、133、135 ~ 137、139 ~ 140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む C D R 2；及び配列番号 176 ~ 182、194、196 ~ 199、203、205 ~ 207、209 ~ 210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む C D R 3 を含み；及び抗 P D - L 1 完全長抗体は、配列番号 381 のアミノ酸配列の H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む V_H、及び配列番号 382 のアミノ酸配列の L C - C D R 1、L C - C

DR2、及びLC-CDR3を含むVLを含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-L1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、sdAbは、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むVHHドメイン、または配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つに対して少なくとも約80%（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のいずれか）の配列同一性を有するその変異体を含み；及び抗PD-L1完全長抗体は、配列番号381のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むVH、及び配列番号382のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むVLを含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-L1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、sdAbは、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むVHHドメインを含み；及び抗PD-L1完全長抗体は、配列番号381のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むVH、及び配列番号382のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むVLを含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-L1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含み；及び抗PD-L1完全長抗体は、配列番号381のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むVH、及び配列番号382のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むVLを含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。いくつかの実施形態では、完全長抗体のFc断片は、配列番号355、356、及び389のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号331のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号332のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号333のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0159】

いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-L1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-L1完全長抗体の重鎖の少なくとも1つのN末端に融合され、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号331のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号332または348のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、及び重鎖融合ポリペプチドは、配列番号347のアミノ酸配列を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する（以後、「BTP-7」と表記する）。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-L1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-L1完全長抗体の重鎖の少なくとも1つのN末端に融合され、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号333のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号334または346のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、及び重鎖融合ポリペプチドは、配列番号345のアミノ酸配列を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する（以後、「BTP-6」と表記する）。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-L1完全長抗体の両方の重鎖のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、配列番号345または347のアミノ酸配列を含む重鎖融合ポリペプチドの2つの同一のコピー、及び配列番号332、334、346及び348のいずれか1つのアミノ酸配列を含む軽鎖の2つの同一のコピーを含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物は、図17に示す構造を有する。

【0160】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT／抗PD-L1構築物のいずれかによれば、抗PD-L1完全長抗体は、1) 配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含むV_H、及び2) 配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含むV_Lを含む。

【0161】

いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-L1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-L1完全長抗体の重鎖の少なくとも1つのN末端に融合され、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号329のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号330または342のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、及び重鎖融合ポリペプチドは、配列番号341のアミノ酸配列を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する（以後、「BTP-4」と表記する）。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-L1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-L1完全長抗体の重鎖の少なくとも1つのN末端に融合され、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号327のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328または344のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、及び重鎖融合ポリペプチドは、配列番号343のアミノ酸配列を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する（以後、「BTP-5」と表記する）。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-L1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-L1完全長抗体の重鎖の少なくとも1つのN末端に融合され、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号323のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328または358のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、及び重鎖融合ポリペプチドは、配列番号357のアミノ酸配列を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する（以後、「BTP-15」と表記する）。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-L1完全長抗体の両方の重鎖のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-L1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-L1完全長抗体の重鎖の少なくとも1つのC末端に融合され、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号323のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328または360のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、及び重鎖融合ポリペプチドは、配列番号359のアミノ酸配列を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する（以後、「BTP-16」と表記する）。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分のN末端は、抗PD-L1完全長抗体の両方の重鎖のC末端に融合される。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-L1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-L1完全長抗体の軽鎖の少なくとも1つのN末端に融合され、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号323または361のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、及び重鎖融合ポリペプチドは、配列番号362のアミノ酸配列を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する（以後、「BTP-17」と表記する）。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-L1完全長抗体の両方の軽鎖のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-L1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT sdAb部分のC末端は、抗PD-L1完全長抗体の軽鎖の少なくとも1つのC末端に融合され、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号323または363のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、及び重鎖融合ポリペプチドは、配列番号364のアミノ酸配列を含む、単離抗TIGIT構築物を提供する（以後、「BTP-18」と表記する）。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分のN末端は、抗PD-L1完全長抗体の両方の軽鎖のC末端に融合される。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

では、T I G I T を特異的に認識する s d A b 部分及び抗 P D - L 1 完全長抗体を含む単離抗 T I G I T 構築物であって、抗 T I G I T s d A b 部分の C 末端は、抗 P D - L 1 完全長抗体の重鎖の少なくとも 1 つの N 末端に融合され、抗 P D - L 1 完全長抗体は、配列番号 3 2 9 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 3 3 0 または 4 0 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、及び重鎖融合ポリペプチドは、配列番号 4 0 2 のアミノ酸配列を含む、単離抗 T I G I T 構築物を提供する（以後、「B T P - 2 1」と表記する）。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T s d A b 部分の C 末端は、抗 P D - L 1 完全長抗体の両方の重鎖の N 末端に融合される。いくつかの実施形態では、T I G I T を特異的に認識する s d A b 部分及び抗 P D - L 1 完全長抗体を含む単離抗 T I G I T 構築物であって、抗 T I G I T s d A b 部分の C 末端は、抗 P D - L 1 完全長抗体の軽鎖の少なくとも 1 つの N 末端に融合され、抗 P D - L 1 完全長抗体は、配列番号 3 2 9 または 4 0 4 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 3 3 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、及び重鎖融合ポリペプチドは、配列番号 4 0 5 のアミノ酸配列を含む、単離抗 T I G I T 構築物を提供する（以後、「B T P - 2 2」と表記する）。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T s d A b 部分の C 末端は、抗 P D - L 1 完全長抗体の両方の軽鎖の N 末端に融合される。いくつかの実施形態では、配列番号 3 4 1、3 4 3、3 5 7、3 5 9 及び 4 0 2 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖融合ポリペプチドの 2 つの同一のコピー、及び配列番号 3 2 8、3 3 0、3 4 2、3 4 4、3 5 8、3 6 0 及び 4 0 3 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む軽鎖の 2 つの同一のコピーを含む、単離抗 T I G I T 構築物を提供する。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T 構築物は、図 1 7 及び 1 8 に示す構造を有する。いくつかの実施形態では、配列番号 3 2 3、3 2 9、3 6 1、3 6 3、及び 4 0 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む重鎖融合ポリペプチドの 2 つの同一のコピー、及び配列番号 3 6 2、3 6 4 及び 4 0 5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む軽鎖の 2 つの同一のコピーを含む、単離抗 T I G I T 構築物を提供する。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T 構築物は、図 1 9 及び 2 0 に示す構造を有する。

【0162】

本明細書に記載の抗 T I G I T / 抗 P D - L 1 構築物のいずれかによるいくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 完全長抗体は、配列番号 3 7 9 のアミノ酸配列の H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む V_H、及び配列番号 3 8 0 のアミノ酸配列の L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、T I G I T を特異的に認識する s d A b 部分及び抗 P D - L 1 完全長抗体を含む単離抗 T I G I T 構築物であって、s d A b は、配列番号 2 5 3 ~ 2 5 9、2 7 1、2 7 3 ~ 2 7 6、2 8 0、2 8 2 ~ 2 8 4、2 8 6 ~ 2 8 7 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む V_H H D メインを含み；及び抗 P D - L 1 完全長抗体は、配列番号 3 7 9 のアミノ酸配列の H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む V_H、及び配列番号 3 8 0 のアミノ酸配列の L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む V_L を含む、単離抗 T I G I T 構築物を提供する。いくつかの実施形態では、T I G I T を特異的に認識する s d A b 部分及び抗 P D - L 1 完全長抗体を含む単離抗 T I G I T 構築物であって、s d A b 部分は、配列番号 2 5 3 ~ 2 5 9、2 7 1、2 7 3 ~ 2 7 6、2 8 0、2 8 2 ~ 2 8 4、2 8 6 ~ 2 8 7 のいずれか 1 つの C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含み；及び抗 P D - L 1 完全長抗体は、配列番号 3 7 9 のアミノ酸配列の H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む V_H、及び配列番号 3 8 0 のアミノ酸配列の L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む V_L を含む、単離抗 T I G I T 構築物を提供する。

【0163】

本明細書に記載の抗 T I G I T / 抗 P D - L 1 構築物のいずれかによるいくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 完全長抗体は、配列番号 3 8 3 のアミノ酸配列の H C - C D R 1、H C - C D R 2、及び H C - C D R 3 を含む V_H、及び配列番号 3 8 4 のアミノ酸配列の L C - C D R 1、L C - C D R 2、及び L C - C D R 3 を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、T I G I T を特異的に認識する s d A b 部分及び抗 P D - L 1 完全長抗体

を含む単離抗TIGIT構築物であって、sdAbは、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含み；及び抗PD-L1完全長抗体は、配列番号383のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号384のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分及び抗PD-L1完全長抗体を含む単離抗TIGIT構築物であって、sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含み；及び抗PD-L1完全長抗体は、配列番号383のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号384のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含む、単離抗TIGIT構築物を提供する。

【0164】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT構築物のいずれか1つ（例えば、抗TIGIT sdAb、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む多重特異性または単一特異性の抗TIGIT構築物、例えば、本明細書に記載の抗TIGIT/PD-1構築物または抗TIGIT/PD-L1構築物）と競合的にTIGITに特異的に結合するTIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む抗TIGIT構築物（以下、「競合抗TIGIT構築物」と呼ばれる）も提供される。

【0165】

抗TIGIT多重特異性抗原結合タンパク質（MABP）

本出願は、一般的には、完全長抗体またはV_H及びV_Lを含む抗原結合断片に融合した本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む抗TIGIT構築物であって、抗TIGIT構築物は、多重特異性である（以下、「多重特異性抗TIGIT構築物」または「抗TIGIT多重特異性抗原結合タンパク質（MABP）」と呼ぶ）、抗TIGIT構築物を提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABPは、二重特異性（以下、「二重特異性抗TIGIT構築物」または「抗TIGIT二重特異性抗原結合タンパク質（BABP）」と呼ぶ）である。抗TIGIT sdAb部分は、完全長抗体またはV_H及びV_Lを含む抗原結合断片により認識される標的（複数可）とは異なるTIGITに特異的に結合することで、より広範な標的化能力を与える。sdAbの小さいサイズのため、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT MABP（またはBABP）は、完全長抗体または抗原結合断片成分のものと比較して、同様の分子量及び薬物動態特性を有し得る。例えば、抗TIGIT MABPは、臨床効果及び安全性が証明されたモノクローナル抗体に1つ以上の抗TIGIT sdAb部分を融合させることで設計し、多重特異性構築物の発現性を妨げることなく臨床的有用性の増加及び望ましい薬物動態特性を提供することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の1つ以上の抗TIGIT sdAb部分は、適宜ペプチドリinkerによって完全長抗体または抗原結合断片に融合される。本明細書に記載の抗TIGIT MABP（またはBABP）は、TIGITの他にも種々の疾患関連エピトープまたは抗原の組み合わせ、例えば、免疫チェックポイント分子、細胞表面抗原（例えば、腫瘍抗原）、または炎症促進性分子との組み合わせによるTIGITを標的にするように適用し、種々の疾患及び状態、例えば、がん、炎症、及び自己免疫疾患の治療に有用な薬剤を提供することができる。抗TIGIT MABPは、PCT/CN2017/093644に開示されるものなど任意の形式であってもよく、それらの全体を参照することによって本明細書に組み込まれる。

【0166】

従って、例えば、いくつかの実施形態では、（a）配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその

変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分、及び（b）V_H及びV_Lを含む第2の抗原結合部分を含み、V_H及びV_Lは一緒に、第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、第1の抗原結合部分及び第2の抗原結合部分は、互いに融合される、を含む抗TIGIT構築物（例えば、MABPまたはBABP）を提供する。いくつかの実施形態では、（a）配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分、及び（b）V_H及びV_Lを含む第2の抗原結合部分を含み、V_H及びV_Lは一緒に、第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、第1の抗原結合部分及び第2の抗原結合部分は、互いに融合される、を含む抗TIGIT構築物（例えば、MABPまたはBABP）を提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合のK_dは、約10⁻⁵M～約10⁻¹²M（例えば、約10⁻⁷M～約10⁻¹²M、または約10⁻⁸M～約10⁻¹²M）である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、第2のエピトープは、免疫チェックポイント分子（例えば、PD-1、PD-L1）である。いくつかの実施形態では、第2のエピトープは、炎症促進性分子である。いくつかの実施形態では、第2のエピトープは、細胞表面抗原（例えば、腫瘍抗原、または免疫エフェクター細胞上の細胞表面抗原）である。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、V_Hを含む重鎖及びV_Lを含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合部分は、重鎖のN末端、軽鎖のN末端、Fc領域のN末端、重鎖のC末端、または軽鎖のC末端で第2の抗原結合部分に融合される。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、FabまたはscFVを含む。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合部分は、FabまたはscFVのC末端で第2の抗原結合部分に融合される。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、完全長4鎖抗体を含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、抗PD-1完全長抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1完全長抗体（またはFab、scFV）は、配列番号385のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号386のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1完全長抗体（またはFab、scFV）は、配列番号385のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号386のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1完全長抗体は、配列番号325のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号326のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1完全長抗体（またはFab、scFV）は、配列番号387のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号388のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1完全長抗体（またはFab、scFV）は、配列番号387のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号388のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1完全長抗体（またはFab、scFV）は、配列番号406のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号407のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1完全長抗体（またはFab、scFV）は、配列番号406のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号407のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、抗PD-L1完全長抗体（ま

10

20

30

40

50

たはF a b、s c F V)を含む。いくつかの実施形態では、抗P D-L 1完全長抗体（またはF a b、s c F V)は、配列番号3 8 1のアミノ酸配列のH C-C D R 1、H C-C D R 2、及びH C-C D R 3を含むV_H、及び配列番号3 8 2のアミノ酸配列のL C-C D R 1、L C-C D R 2、及びL C-C D R 3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗P D-L 1完全長抗体（またはF a b、s c F V)は、配列番号3 8 1のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号3 8 2のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗P D-L 1完全長抗体は、配列番号3 3 1のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号3 3 2のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗P D-L 1完全長抗体は、配列番号3 3 3のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号3 3 4のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗P D-L 1完全長抗体（またはF a b、s c F V)は、配列番号3 7 9のアミノ酸配列のH C-C D R 1、H C-C D R 2、及びH C-C D R 3を含むV_H、及び配列番号3 8 0のアミノ酸配列のL C-C D R 1、L C-C D R 2、及びL C-C D R 3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗P D-L 1完全長抗体（またはF a b、s c F V)は、配列番号3 7 9のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号3 8 0のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗P D-L 1完全長抗体（またはF a b、s c F V)は、配列番号3 8 3のアミノ酸配列のH C-C D R 1、H C-C D R 2、及びH C-C D R 3を含むV_H、及び配列番号3 8 4のアミノ酸配列のL C-C D R 1、L C-C D R 2、及びL C-C D R 3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗P D-L 1完全長抗体（またはF a b、s c F V)は、配列番号3 8 3のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号3 8 4のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗P D-L 1完全長抗体（またはF a b、s c F V)は、1)配列番号3 4 9のアミノ酸配列を含むH C-C D R 1、配列番号3 5 0のアミノ酸配列を含むH C-C D R 2、及び配列番号3 5 1のアミノ酸配列を含むH C-C D R 3を含むV_H、及び2)配列番号3 5 2のアミノ酸配列を含むL C-C D R 1、配列番号3 5 3のアミノ酸配列を含むL C-C D R 2、及び配列番号3 5 4のアミノ酸配列を含むL C-C D R 3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗P D-L 1完全長抗体（またはF a b、s c F V)は、配列番号3 3 9のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号3 4 0のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗P D-L 1完全長抗体は、配列番号3 2 3または3 2 7のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号3 2 8のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗P D-L 1完全長抗体は、配列番号3 2 9のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号3 3 0のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合部分は、第2の抗原結合部分に化学的に融合される。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合部分は、ペプチドリンカーを介して第2の抗原結合部分に融合される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、約3 0未満（例えば、約2 5、2 0、または1 5のいずれか1つ未満）のアミノ酸長である。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号3 2 4及び3 7 0~3 7 8のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合断片は、F c領域、例えば、I g G 1 F c、エフェクターレスI g G 1 F c、I g G 2 F c、またはI g G 4 F cを含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合断片は、配列番号3 5 5、3 5 6、及び3 8 9のいずれか1つのアミノ酸配列を含むF c領域を含む。

【0 1 6 7】

いくつかの実施形態では、抗T I G I T構築物（例えば、M A B PまたはB A B P)は、少なくとも2つの異なるエпитープに特異的に結合することができる少なくとも2つの抗原結合部分を含む。少なくとも2つの抗原結合部分のいくつかは、M A B Pが2つの異なるエпитープに対する結合部位を有する限り、同一であってもよい。抗T I G I T M A B P（またはB A B P)は、対称または非対称であり得る。例えば、抗T I G I T M A B P（またはB A B P)は、本明細書に記載の抗T I G I T s d A b部分を含む第1の抗原結合部分の1~8つのコピー、及びV_H及びV_Lを含む第2の抗原結合部分の1または2つのコピーを含み得る。いくつかの実施形態では、抗T I G I T M A B P（また

10

20

30

40

50

はBABP)は、2つの異なる抗原結合部分を含み、各々は、V_Hドメイン及びV_Lドメインを含み、異なる抗原結合部位と一緒に形成する。例えば、第2の抗原結合部分は、二重特異性抗体であり得る。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、単一特異性完全長抗体、またはその抗原結合断片、例えば、FabまたはscFvである。

【0168】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP (またはBABP)は、1、2、3、4、5、6、7、8以上の異なる抗原結合部分のいずれか1つを含み、各々は、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む。いくつかの実施形態では、2つの同一の抗TIGIT sdAbは、互いに融合され、第2の抗原結合部分にさらに融合される。いくつかの実施形態では、2つの異なる抗TIGIT sdAbは、互いに融合され、第2の抗原結合部分にさらに融合される。

10

【0169】

抗TIGIT構築物 (例えば、MABP)は、TIGIT及び／または第2のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1)の任意の適当な数の価数、及び任意の適当な数の特異性を有し得る。いくつかの実施形態では、MABP (またはBABP)は、二価、三価、四価、五価、六価、またはそれよりも高い価数のTIGITである。いくつかの実施形態では、MABP (またはBABP)は、二価、三価、四価、五価、六価、またはそれよりも高い価数の第2のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1)である。いくつかの実施形態では、MABPは、二重特異性 (例えば、TIGIT×PD-1 BABP、TIGIT×PD-L1 BABP)である。例示的なBABPを図17～26に示す。いくつかの実施形態では、MABPは、三重特異性である。いくつかの実施形態では、MABPは、四重特異性である。いくつかの実施形態では、MABPは、4つ以上の特異性である。

20

【0170】

いくつかの実施形態では、(a)配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ (例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ (例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ (例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体を含む抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分の1つ以上のコピー (例えば、2)、及び(b)V_H及びV_Lを含む第2の抗原結合部分の単一コピーを含み、V_H及びV_Lは一緒に、第2のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1)に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、第1の抗原結合部分の各コピーは、第2の抗原結合部分に融合される、抗TIGIT BABPを提供する。

30

【0171】

いくつかの実施形態では、(a)配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ (例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ (例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ (例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、複数 (例えば、2、3、4、5、6、7、8、またはそれ以上)の同一または異なる抗TIGIT sdAb部分、及び(b)V_H及びV_Lを含む複数 (例えば、2、3、4、5、6、またはそれ以上)の第2の抗原結合部分を含み、V_H及びV_Lは一緒に、第2のエピトープ (例えば、PD-1、PD-L1

40

50

）に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、第1の抗原結合部分の各コピーは、第2の抗原結合部分に融合される、抗TIGIT MABPを提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAbは、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分の1つ以上は各々、別の同一または異なる抗TIGIT sdAb部分にさらに融合される。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、抗PD-1完全長抗体（またはFab、scFV）を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1完全長抗体（またはFab、scFV）は、配列番号339のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号340のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号323または327のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1完全長抗体は、配列番号329のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号330のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合部分は、ペプチドリンカーを介して第2の抗原結合部分に融合される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合断片は、Fc領域、例えば、IgG1 Fc、エフェクターレスIgG1 Fc、IgG2 Fc、またはIgG4 Fcを含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合断片は、配列番号355、356、及び389のいずれか1つのアミノ酸配列を含むFc領域を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合のK_dは、約10⁻⁵M～約10⁻¹²M（例えば、約10⁻⁷M～約10⁻¹²M、または約10⁻⁸M～約10⁻¹²M）である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。

【0172】

いくつかの実施形態では、（a）配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分の単一コピー、及び（b）V_H及びV_Lを各々が含む第2の抗原結合部分の2つのコピーを含み、V_H及びV_Lは一緒に、第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、第1の抗原結合部分は、第2の抗原結合部分の2つのコピーに融合される、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。

【0173】

いくつかの実施形態では、（a）配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140の

いずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む抗TIGIT sdAb部分を各々が含む第1の抗原結合部分の2つのコピー、及び（b）V_H及びV_Lを各々が含む第2の抗原結合部分の2つのコピーを含み、V_H及びV_Lは一緒に、第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、第1の抗原結合部分の1つのコピーは、第2の抗原結合部分の各コピーに融合される、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する（図17～20、23及び24に例示される）。いくつかの実施形態では、1つ以上の抗TIGIT sdAbは各々、別の同一または異なる抗TIGIT sdAb部分にさらに融合される。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。

【0174】

a) 融合ポリペプチド

本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分、及び抗TIGIT MABP（またはBABP）のV_H及びV_Lを含む第2の抗原結合部分は、互いに融合される（すなわち、共有結合される）。従って、本出願の抗TIGIT MABP（またはBABP）は、1つ以上の融合ポリペプチドを含む。各融合ポリペプチドは、本明細書に記載の抗TIGIT sdAbを含む第1の抗原結合部分、及び第2の抗原結合部分に由来するポリペプチドを含み得る。

【0175】

本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分、及びV_H及びV_Lを含む第2の抗原結合部分は、単一の化学結合（例えば、ペプチド結合）によって、またはペプチドリinkerを介して直接結合され得る。抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分は、第2の抗原結合部分のいずれか1つ（各々を含む）のポリペプチドのN末端またはC末端のいずれかで融合され得る、または第2の抗原結合部分のいずれか1つ（各々を含む）のポリペプチドの内部位置で、例えば、第2の抗原結合部分の重鎖中のFc領域のN末端で融合され得る。融合ポリペプチドは、組み換えまたは化学的のいずれかで得られ得る。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分のC末端は、化学結合（例えば、ペプチド結合）またはペプチドリinkerを介して第2の抗原結合部分の任意（各々を含む）のポリペプチドのN末端に融合される。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分のN末端は、化学結合（例えば、ペプチド結合）またはペプチドリinkerを介して第2の抗原結合部分の任意（各々を含む）のポリペプチドのC末端に融合される。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分は、アミノ酸の主鎖化学基を伴うペプチド結合ではない化学結合を介して第2の抗原結合部分に融合される。

【0176】

いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、V_H及びV_Lを含む一本鎖抗体断片を含む。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、scFvを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端の方向において、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分、適宜ペプチドリinker、V_Hドメイン及びV_Lドメインを含む第1の抗原結合部分を含む融合ポリペプチドを含む。い

いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端の方向において、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分、適宜ペプチドリンカー、V_Lドメイン及びV_Hドメインを含む第1の抗原結合部分を含む融合ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端の方向において、V_Hドメイン、V_Lドメイン、適宜ペプチドリンカー、及び本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分を含む融合ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端の方向において、V_Lドメイン、V_Hドメイン、適宜ペプチドリンカー、及び本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分を含む融合ポリペプチドを含む。

10

【0177】

いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、V_Hを含む重鎖ドメイン、及びV_Lを含む軽鎖ドメインを含む。いくつかの実施形態では、重鎖は、1つ以上の重鎖定常ドメイン、例えば、C_H1、C_H2、C_H3、及びC_H4、及び／または抗体ヒンジ領域（H_R）をさらに含む。いくつかの実施形態では、軽鎖は、軽鎖定常ドメイン（C_L）、例えば、ラムダC_LドメインまたはカッパC_Lドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分のN末端は、重鎖のC末端に融合される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分のC末端は、重鎖のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分のN末端は、軽鎖のC末端に融合される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分のC末端は、軽鎖のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端において、重鎖、適宜ペプチドリンカー、及び本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分を含む第1のポリペプチド；及び軽鎖を含む第2のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端において、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分、適宜ペプチドリンカー、及び重鎖を含む第1のポリペプチド；及び軽鎖を含む第2のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端において、軽鎖、適宜ペプチドリンカー、及び本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分を含む第1のポリペプチド；及び重鎖を含む第2のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端において、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分、適宜ペプチドリンカー、及び軽鎖を含む第1のポリペプチド；及び重鎖を含む第2のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、本明細書に記載の2つの同一の第1のポリペプチド及び2つの同一の第2のポリペプチドを含む。

20

30

【0178】

いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体（例えば、抗PD-1または抗PD-L1完全長抗体）を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、2つの同一の重鎖及び2つの同一の軽鎖からなる完全長モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端において、重鎖、適宜ペプチドリンカー、及び本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分を各々が含む2つの同一の第1のポリペプチド；及び軽鎖を各々が含む2つの同一の第2のポリペプチドを含む（例えば、図18を参照されたい）。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端において、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分、適宜ペプチドリンカー、及び重鎖を各々が含む2つの同一の第1のポリペプチド；及び軽鎖を各々が含む2つの同一の第2のポリペプチドを含む（例えば、図17を参照されたい）。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP

40

50

(またはBABP)は、N末端からC末端において、軽鎖、適宜ペプチドリンカー、及び本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分を各々が含む2つの同一の第1のポリペプチド；及び重鎖を各々が含む2つの同一の第2のポリペプチドを含む(例えば、図20を参照されたい)。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP(またはBABP)は、N末端からC末端において、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む第1の抗原結合部分、適宜ペプチドリンカー、及び軽鎖を各々が含む2つの同一の第1のポリペプチド；及び重鎖を含む2つの同一の第2のポリペプチドを含む(例えば、図19を参照されたい)。

【0179】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP(またはBABP)は、(a)第1及び第2の重鎖及び第1及び第2の軽鎖からなる完全長抗体であって、第1のエピトープ(例えば、PD-1、PD-L1)を特異的に認識する、完全長抗体；(b)第2のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第1の抗TIGIT sdAb部分；(c)第3のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第2の抗TIGIT sdAb部分；(d)第4のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第3の抗TIGIT sdAb部分；及び(e)第5のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第4の抗TIGIT sdAb部分を含み；第1の抗TIGIT sdAb部分のC末端は、第1の軽鎖のN末端に融合され、第2の抗TIGIT sdAb部分のC末端は、第2の軽鎖のN末端に融合され、第3の抗TIGIT sdAb部分のC末端は、第1の重鎖のN末端に融合され、及び第4の抗TIGIT sdAb部分のC末端は、第2の重鎖のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、4つの抗TIGIT sdAb部分は、異なる。いくつかの実施形態では、4つの抗TIGIT sdAb部分は、同一である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP(またはBABP)は、N末端からC末端において、第3または第4の抗TIGIT sdAb部分、適宜ペプチドリンカー、及び重鎖を各々が含む2つの同一の第1のポリペプチド；及び第1または第2の抗TIGIT sdAb部分、適宜ペプチドリンカー、及び軽鎖を各々が含む2つの同一の第2のポリペプチドを含む。例えば、図21を参照されたい。

【0180】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP(またはBABP)は、(a)2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体であって、第1のエピトープ(例えば、PD-1、PD-L1)を特異的に認識する、完全長抗体；(b)第2のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第1の抗TIGIT sdAb部分；(c)第3のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第2の抗TIGIT sdAb部分；(d)第4のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第3の抗TIGIT sdAb部分；及び(e)第5のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第4の抗TIGIT sdAb部分を含み；第1の抗TIGIT sdAb部分のC末端は、第2の抗TIGIT sdAb部分のN末端に融合され、及び第2の抗TIGIT sdAb部分のC末端は、一方の重鎖のN末端に融合され、及び第3の抗TIGIT sdAb部分のC末端は、第4の抗TIGIT sdAb部分のN末端に融合され、及び第4の抗TIGIT sdAb部分のC末端は、他方の重鎖のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、4つの抗TIGIT sdAb部分は、異なる。いくつかの実施形態では、4つの抗TIGIT sdAb部分は、同一である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP(またはBABP)は、N末端からC末端において、第1または第3の抗TIGIT sdAb部分、適宜ペプチドリンカー、第2または第4の抗TIGIT sdAb部分、適宜ペプチドリンカー、及び重鎖を各々が含む2つの同一の第1のポリペプチド；及び軽鎖を各々が含む2つの同一の第2のポリペプチドを含む。例えば、図22を参照されたい。

【0181】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP(またはBABP)は、(a)2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体であって、第1のエピトープ(例えば、PD-1、PD-L1)を特異的に認識する完全長抗体；(b)第2のエピトープを特異的に認

識する本明細書に記載の第1の抗TIGIT s d A b部分；及び（c）第3のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第2の抗TIGIT s d A b部分を含み、第1または第2の抗TIGIT s d A b部分のN末端は、重鎖のC_H1領域のC末端に融合され、及び第1または第2の抗TIGIT s d A b部分のC末端は、重鎖のC_H2領域のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、2つの抗TIGIT s d A b部分は、同一である。いくつかの実施形態では、2つの抗TIGIT s d A b部分は、異なる。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端において、V_H-C_H1-適宜ペプチドリンカー-抗TIGIT s d A b-C_H2-C_H3を各々が含む2つの同一の第1のポリペプチド；及び軽鎖を各々が含む2つの同一の第2のポリペプチドを含む。例えば、図23を参照されたい。

10

【0182】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、（a）第1のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）を特異的に認識する第1のs c F v；（b）第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）を特異的に認識する第2のs c F v；（c）Fc領域；（d）第3のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第1の抗TIGIT s d A b部分；及び（d）第4のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第2の抗TIGIT s d A b部分を含み、各抗TIGIT s d A b部分のN末端は、s c F vのC末端に融合され、抗TIGIT s d A b部分のC末端は、Fc領域のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、2つの抗TIGIT s d A b部分は、同一である。いくつかの実施形態では、2つの抗TIGIT s d A b部分は、異なる。いくつかの実施形態では、2つのs c F vは、同一である。いくつかの実施形態では、2つのs c F vは、異なる。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端において、s c F v-適宜ペプチドリンカー-抗TIGIT s d A b部分-C_H2-C_H3、例えば、V_H-V_L-適宜ペプチドリンカー-抗TIGIT s d A b部分-C_H2-C_H3、またはV_L-V_H-適宜ペプチドリンカー-抗TIGIT s d A b部分-C_H2-C_H3を各々が含む2つの同一のポリペプチドを含む。例えば、図24を参照されたい。

20

【0183】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、（a）第1のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）を特異的に認識する第1のF a b；（b）第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）を特異的に認識する第2のF a b；（c）Fc領域；（d）第3のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第1の抗TIGIT s d A b部分、及び第4のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第2の抗TIGIT s d A b部分を含む第1のF a b様ドメイン；（e）第5のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第3の抗TIGIT s d A b部分及び第6のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第4の抗TIGIT s d A b部分を含む第2のF a b様ドメインを含み、各F a b様ドメインのN末端は、F a bのC末端に融合され、F a b様ドメインの2つのC末端の1つは、Fc領域のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、4つの抗TIGIT s d A b部分は、同一である。いくつかの実施形態では、4つの抗TIGIT s d A b部分は、異なる。いくつかの実施形態では、2つのF a bは、同一である。いくつかの実施形態では、2つのF a bは、異なる。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、N末端からC末端において、V_H-C_H1-適宜ペプチドリンカー-抗TIGIT s d A b部分-C_H1-C_H2-C_H3を各々が含む2つの同一の第1のポリペプチド；N末端からC末端において、及びV_L-C_L-適宜ペプチドリンカー-抗TIGIT s d A b部分-C_Lを各々が含む2つの同一の第2のポリペプチドを含む。例えば、図25を参照されたい。

30

40

【0184】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（またはBABP）は、（a）第1のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）を特異的に認識する第1のs c F v；（b）第2のエピトープ（例えば、PD-1、PD-L1）を特異的に認識する第2のs c

50

F_v; (c) F_c領域; (d) 第3のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第1の抗TIGIT s d A b部分、及び第4のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第2の抗TIGIT s d A b部分を含む第1のF a b様ドメイン; (e) 第5のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第3の抗TIGIT s d A b部分、及び第6のエピトープを特異的に認識する本明細書に記載の第4の抗TIGIT s d A b部分を含む第2のF a b様ドメインを含み、各F a b様ドメインの2つのN末端の1つは、s c F_vのC末端に融合され、F a b様ドメインの2つのC末端の1つは、F_c領域のN末端に融合される。いくつかの実施形態では、4つの抗TIGIT s d A b部分は、同一である。いくつかの実施形態では、4つの抗TIGIT s d A b部分は、異なる。いくつかの実施形態では、2つのs c F_vは、同一である。いくつかの実施形態では、2つのs c F_vは、異なる。いくつかの実施形態では、抗TIGIT M A B P (またはB A B P) は、N末端からC末端において、s c F_v-適宜ペプチドリンカー-抗TIGIT s d A b部分-C_H1-C_H2-C_H3を各々が含む2つの同一の第1のポリペプチド; 及びN末端からC末端において、抗TIGIT s d A b部分-C_Lを各々が含む2つの同一の第2のポリペプチドを含む。例えば、図26を参照されたい。

【0185】

本明細書に記載の抗TIGIT M A B P (またはB A B P) は、第1の抗原結合部分と第2の抗原結合部分の間に位置する1つ以上のペプチドリンカーを含み得る。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分の重鎖ポリペプチドと第1の抗原結合部分の間のペプチドリンカーは、第2の抗原結合部分の軽鎖ポリペプチドと第1の抗原結合部分の間のペプチドリンカーと同じである。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分の重鎖ポリペプチドと第1の抗原結合部分の間のペプチドリンカーは、第2の抗原結合部分の軽鎖ポリペプチドと第1の抗原結合部分の間のペプチドリンカーと異なる。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合部分と第2の抗原結合部分は、その間に配置されるペプチドリンカー無しで互いに直接融合される。2つ以上の抗TIGIT s d A b部分の間のペプチドリンカーは、抗TIGIT s d A b部分と第2の抗原結合部分の間のものと同じかまたは異なってもよい。「ペプチドリンカー」セクションにおいて上述されたペプチドリンカーのいずれかを本明細書に記載の抗TIGIT M A B P (またはB A B P) のいずれかで使用することができる。

【0186】

b) V_H及びV_Lを含む第2の抗原結合部分

抗TIGIT M A B P (例えば、B A B P) は、V_H及びV_Lを含む少なくとも1つの第2の抗原結合部分を含む。そのような抗原結合部分は、2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長の従来抗体、またはそれらに由来する抗原結合断片であり得る。

【0187】

いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、V_Hドメインを含む重鎖及びV_Lドメインを含む軽鎖を含む抗原結合断片である。本明細書で検討される例示的な抗原結合断片としては、F a b、F a b'、F (a b')₂、及びF_v断片; ダイアボディ; 線状抗体; 一本鎖抗体分子 (例えば、s c F_v) ; 及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0188】

いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、F_c領域、例えば、ヒトF_c領域を含む。いくつかの実施形態では、F_c領域は、I g G分子、例えば、I g G1、I g G2、I g G3、またはI g G4サブクラスのいずれか1つに由来する。いくつかの実施形態では、F_c領域は、抗体エフェクター機能、例えば、A D C C及び/またはC D Cを媒介することができる。例えば、野生型F_c配列を有するサブクラスI g G1、I g G2、及びI g G3の抗体は、通常、C1q及びC3結合を含む補体活性化を示し、一方、I g G4は、補体系を活性化せず、C1q及び/またはC3に結合しない。いくつかの実施形態では、F_c領域は、F_c領域のF_c受容体への結合親和性を減少させる改変を含む。いくつかの実施形態では、F_c領域は、I g G1 F_cである。いくつかの実施形態では、I

10

20

30

40

50

g G 1 F c は、2 3 3 ~ 2 3 6 位に 1 つ以上の突然変異、例えば、L 2 3 4 A 及び／または L 2 3 5 A を含む。いくつかの実施形態では、F c 領域は、エフェクターレス I g G 1 F c である。いくつかの実施形態では、F c 領域は、I g G 4 F c である。いくつかの実施形態では、I g G 4 F c は、3 2 7、3 3 0 及び／または 3 3 1 位に突然変異を含む。例えば、Armour K L et al., Eur J. Immunol. 1999; 29: 2613; 及び Shields R L et al., J. Biol. Chem. 2001; 276: 6591 を参照されたい。いくつかの実施形態では、F c 領域は、P 3 2 9 G 突然変異を含む。いくつかの実施形態では、F c 領域は、配列番号 3 5 5、3 5 6 及び 3 8 9 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。

【0189】

いくつかの実施形態では、F c 領域は、2 つの同一でない重鎖のヘテロ二量体化を促進する改変を含む。そのような改変 F c 領域は、非対称設計を有する本明細書に記載の抗 T I G I T M A B P (例えば、B A B P) に対して特に興味深いものであり得る。いくつかの実施形態では、前記改変は、重鎖または重鎖融合ポリペプチドの一方にノブ改変、及び 2 つの重鎖または重鎖融合ポリペプチドの他方にホール改変を含むノブ-イントゥー-ホール改変である。一実施形態では、F c 領域は、C H 3 ドメインにおける 2 つの重鎖の間の界面内に改変を含み、i) 1 つの重鎖の C H 3 ドメインでは、アミノ酸残基は、より大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基と置換され、それにより他方の重鎖の C H 3 ドメインにおける界面内の空洞(「ホール」)で配置可能である 1 つの重鎖の C H 3 ドメインにおける界面内の隆起(「ノブ」)を生成し、ii) 他方の重鎖の C H 3 ドメインでは、アミノ酸残基は、より小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基と置換され、それにより第 1 の C H 3 ドメインにおける界面内の隆起(「ノブ」)が配置可能である第 2 の C H 3 ドメインにおける界面内の空洞(「ホール」)を生成する。ノブ-イントゥー-ホール改変の例は、例えば、U S 2 0 1 1 / 0 2 8 7 0 0 9、U S 2 0 0 7 / 0 1 7 8 5 5 2、W O 9 6 / 0 2 7 0 1 1、W O 9 8 / 0 5 0 4 3 1、及び Zhu et al., 1997, Protein Science 6: 781-788 に記載されている。ヘテロ二量体化を促進する F c 領域に対する他の改変も、本明細書で検討される。例えば、静電ステアリング効果を F c 領域中に操作して、F c-ヘテロ二量体分子を提供することができる(例えば、U S 4 6 7 6 9 8 0、及び Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) を参照されたい)。

【0190】

いくつかの実施形態では、F c 領域は、F a b アーム交換を阻害する改変を含む。例えば、I g G 4 F c における S 2 2 8 P 突然変異は、F a b アーム交換を阻害する。

【0191】

いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、カッパ軽鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、ラムダ軽鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、重鎖定常領域を含む。

【0192】

いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、2 つの重鎖及び 2 つの軽鎖からなる完全長抗体である。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、2 つの重鎖及び 2 つの軽鎖からなるモノクローナル抗体を含む(「4 鎖抗体」とも本明細書中で呼ばれる)。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、2 つの重鎖及び 2 つの軽鎖からなる多重特異性(例えば、二重特異性)完全長抗体を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、突然変異 L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A を有する、ヒト I g G 1 サブクラス、エフェクターレス h I g G 1 サブクラス、またはヒト I g G 1 サブクラスの完全長抗体を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、ヒト I g G 2 サブクラスの完全長抗体を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、ヒト I g G 3 サブクラスの完全長抗体を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、ヒト I g G 4 サブクラスの完全長抗体、またはさらなる突然変異 S 2 2 8 P を有するヒト I g G 4 サブクラスの完全長抗体を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体の F c 領域は、配列

番号 355、356 及び 389 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。

【0193】

当該技術分野で公知の任意の完全長 4 鎖抗体、またはそれに由来する抗原結合断片は、抗 TIGIT MABP（例えば、BABP）における第 2 の抗原結合部分として使用することができる。臨床効果、安全性、及び薬物動態プロファイルが証明された抗体または抗体断片が、特に注目されるものである。いくつかの実施形態では、当該技術分野で公知の抗体または抗体断片は、さらに操作され、例えば、ヒト化または突然変異誘発され、第 1 の抗原結合部分と融合する前に適当な親和性を有する変異体を選択し、抗 TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、当該技術分野で公知のモノクローナル抗体または抗体断片の V_H 及び V_L ドメイン、及び改変された重鎖定常領域及び／または軽鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、当該技術分野で公知のモノクローナル抗体、及び改変 Fc 領域、例えば、S228P 突然変異を有する IgG4 Fc、またはエフェクターレス IgG1 Fc を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、ヒト、ヒト化、またはキメラ完全長抗体、または抗体断片を含む。

【0194】

いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、抗 PD-1 抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab または scFv）である。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 抗体は、ペムプロリズマブ（例えば、キイトルーダ（登録商標））、PD1-BM-min、またはニボルマブ（例えば、オプジーボ（登録商標））である。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab または scFv）は、配列番号 385 のアミノ酸配列の HC-CDR1、HC-CDR2、及び HC-CDR3 を含む V_H、及び配列番号 386 のアミノ酸配列の LC-CDR1、LC-CDR2、及び LC-CDR3 を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab または scFv）は、配列番号 385 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 386 のアミノ酸配列を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 抗体は、配列番号 325 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 326 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab または scFv）は、配列番号 387 のアミノ酸配列の HC-CDR1、HC-CDR2、及び HC-CDR3 を含む V_H、及び配列番号 388 のアミノ酸配列の LC-CDR1、LC-CDR2、及び LC-CDR3 を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab または scFv）は、配列番号 387 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 388 のアミノ酸配列を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab または scFv）は、配列番号 406 のアミノ酸配列の HC-CDR1、HC-CDR2、及び HC-CDR3 を含む V_H、及び配列番号 407 のアミノ酸配列の LC-CDR1、LC-CDR2、及び LC-CDR3 を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab または scFv）は、配列番号 406 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 407 のアミノ酸配列を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原結合部分は、抗 PD-L1 抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab または scFv）である。いくつかの実施形態では、抗 PD-L1 抗体は、アテゾリズマブ（例えば、テセントリク（登録商標））、デュルバルマブ（例えば、MED14736、IMFINZI（商標））、アベルマブ（例えば、バベンチオ（登録商標））、またはヒト化 53C1（h53C1）である。いくつかの実施形態では、抗 PD-L1 抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab または scFv）は、配列番号 381 のアミノ酸配列の HC-CDR1、HC-CDR2、及び HC-CDR3 を含む V_H、及び配列番号 382 のアミノ酸配列の LC-CDR1、LC-CDR2、及び LC-CDR3 を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、抗 PD-L1 抗体またはその抗原結合断片（例えば、Fab または scFv）は、配列番号 381 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 382 のアミノ酸配列を含む V_L を含む。いく

つかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号331のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号332のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号333のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合断片（例えば、FabまたはscFv）は、配列番号379のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号380のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合断片（例えば、FabまたはscFv）は、配列番号379のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号380のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合断片（例えば、FabまたはscFv）は、配列番号383のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号384のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合断片（例えば、FabまたはscFv）は、配列番号383のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号384のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合断片（例えば、FabまたはscFv）は、1）配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含むV_H、及び2）配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合断片（例えば、FabまたはscFv）は、配列番号339のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号340のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号323または327のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号328のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号329のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号330のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0195】

c) 例示的な抗TIGIT MABP及びBABP

いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）は、（a）本明細書に記載のTIGITを特異的に認識するsdAbを含む第1の抗原結合部分、及び（b）V_H及びV_Lを含む第2の抗原結合部分を含み、V_H及びV_Lと一緒に、PD-1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、第1の抗原結合部分及び第2の抗原結合部分は、互いに融合され、「TIGIT×PD-1 BABP」または「TIGIT×PD-1 BABP」と以下で呼ばれる。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）は、（a）本明細書に記載のTIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む第1の抗原結合部分、及び（b）V_H及びV_Lを含む第2の抗原結合部分を含み、V_H及びV_Lと一緒に、PD-L1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、第1の抗原結合部分及び第2の抗原結合部分は、互いに融合され、「PD-L1×TIGIT BABP」または「TIGIT×PD-L1 BABP」と以下で呼ばれる。

【0196】

いくつかの実施形態では、（a）配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含むTIGITを特異的に認識するsdAb部分

を含む第1の抗原結合部分、及び(b)2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体(例えば、ペムプロリズマブ、PD1-BM-min、またはニボルマブ)を含む第2の抗原結合部分を含み、完全長抗体は、PD-1に特異的に結合し;第1の抗原結合部分及び第2の抗原結合部分は、互いに融合される、抗TIGIT MABP(例えば、BABP)を提供する。いくつかの実施形態では、(a)配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ(例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体;配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ(例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体;及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ(例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体を含むTIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む第1の抗原結合部分、及び(b)2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体を含む第2の抗原結合部分を含み、完全長抗体は、PD-1に特異的に結合し;完全長抗体は、配列番号385のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号386のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含み;及び第1の抗原結合部分及び第2の抗原結合部分は、互いに融合される、抗TIGIT MABP(例えば、BABP)を提供する。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号385のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号386のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号325のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号326のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、(a)配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ(例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体;配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ(例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体;及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ(例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体を含むTIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む第1の抗原結合部分、及び(b)2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体を含む第2の抗原結合部分を含み、完全長抗体は、PD-1に特異的に結合し;完全長抗体は、配列番号387のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号388のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含み;及び第1の抗原結合部分及び第2の抗原結合部分は、互いに融合される、抗TIGIT MABP(例えば、BABP)を提供する。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号387のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号388のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、(a)配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ(例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体;配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ(例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体;及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ(例えば、約1、2、または3のいずれか)のアミノ酸置換を含むその変異体を含むTIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む第1の抗原結合部分、及び(b)2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体を含む第2の抗原結合部分を含み、完全長抗体は、PD-1に特異的に結合し;完全長抗体

10

20

30

40

50

は、配列番号406のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号407のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含み；及び第1の抗原結合部分及び第2の抗原結合部分は、互いに融合される、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号406のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号407のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合部分は、2つの重鎖の1つまたは各々のN末端、2つの軽鎖の1つまたは各々のN末端、Fc領域のN末端、2つの重鎖の1つまたは各々のC末端、または2つの軽鎖の1つまたは各々のC末端で第2の抗原結合部分に融合される。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合部分は、第2の抗原結合部分に化学的に融合される。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合部分は、ペプチド結合またはペプチドリinkerを介して第2の抗原結合部分に融合される。いくつかの実施形態では、ペプチドリinkerは、約30未満（例えば、約25、20、または15のいずれか1つ未満）のアミノ酸長である。いくつかの実施形態では、ペプチドリinkerは、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体のFc領域は、例えば、IgG1 Fc、エフェクターレスIgG1 Fc、IgG2 Fc、またはIgG4 Fcであり得る。いくつかの実施形態では、Fc領域は、配列番号355、356、及び389のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合のK_dは、約10⁻⁵M～約10⁻¹²M（例えば、約10⁻⁷M～約10⁻¹²M、または約10⁻⁸M～約10⁻¹²M）である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。

【0197】

いくつかの実施形態では、（a）配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含むTIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む第1の抗原結合部分、及び（b）2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体（例えば、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、またはh53C1）を含む第2の抗原結合部分を含み、完全長抗体は、PD-L1に特異的に結合し；及び第1の抗原結合部分及び第2の抗原結合部分は、互いに融合される、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。いくつかの実施形態では、（a）配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～1

37、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含むTIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む第1の抗原結合部分、及び（b）2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体を含む第2の抗原結合部分を含み、完全長抗体は、PD-L1に特異的に結合し；完全長抗体は、配列番号381のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号382のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含み；及び第1の抗原結合部分及び第2の抗原結合部分は、互いに融合される、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号381のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号382のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号331のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号332のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号333のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、（a）配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含むTIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む第1の抗原結合部分、及び（b）2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体を含む第2の抗原結合部分を含み、完全長抗体は、PD-L1に特異的に結合し；完全長抗体は、配列番号379のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号380のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含み；及び第1の抗原結合部分及び第2の抗原結合部分は、互いに融合される、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号379のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号380のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、（a）配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含むTIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む第1の抗原結合部分、及び（b）2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる完全長抗体を含む第2の抗原結合部分を含み、完全長抗体は、PD-L1に特異的に結合し；完全長抗体は、配列番号383のアミノ酸配列のHC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含むV_H、及び配列番号384のアミノ酸配列のLC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含むV_Lを含み；及び第1の抗原結合部分及び第2の抗原結合部分は、互いに融合される、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号383のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号384のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、（a）配

10

20

30

40

50

列番号 36～42、54、56～59、63、65～67、69～70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR1、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号 106～112、124、126～129、133、135～137、139～140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR2、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号 176～182、194、196～199、203、205～207、209～210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR3、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む TIGIT を特異的に認識する sdAb 部分を含む第 1 の抗原結合部分、及び（b）2 つの重鎖及び 2 つの軽鎖からなる完全長抗体を含む第 2 の抗原結合部分を含み、完全長抗体は、PD-L1 に特異的に結合し；完全長抗体は、1）配列番号 349 のアミノ酸配列を含む HC-CDR1、配列番号 350 のアミノ酸配列を含む HC-CDR2、及び配列番号 351 のアミノ酸配列を含む HC-CDR3 を含む V_H、及び 2）配列番号 352 のアミノ酸配列を含む LC-CDR1、配列番号 353 のアミノ酸配列を含む LC-CDR2、及び配列番号 354 のアミノ酸配列を含む LC-CDR3 を含む V_L を含み；及び第 1 の抗原結合部分及び第 2 の抗原結合部分は、互いに融合される、抗 TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。いくつかの実施形態では、抗 PD-L1 抗体は、配列番号 339 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 340 のアミノ酸配列を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、抗 PD-L1 抗体は、配列番号 323 または 327 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 328 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗 PD-L1 抗体は、配列番号 329 のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 330 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb 部分は、配列番号 36～42、54、56～59、63、65～67、69～70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR1；配列番号 106～112、124、126～129、133、135～137、139～140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR2；及び配列番号 176～182、194、196～199、203、205～207、209～210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR3 を含む。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb 部分は、配列番号 253～259、271、273～276、280、282～284、286～287 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む V_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb 部分は、配列番号 253～259、271、273～276、280、282～284、286～287 のいずれか 1 つの CDR1、CDR2、及び CDR3 を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の抗原結合部分は、2 つの重鎖の 1 つまたは各々の N 末端、2 つの軽鎖の 1 つまたは各々の N 末端、Fc 領域の N 末端、2 つの重鎖の 1 つまたは各々の C 末端、または 2 つの軽鎖の 1 つまたは各々の C 末端で第 2 の抗原結合部分に融合される。いくつかの実施形態では、第 1 の抗原結合部分は、第 2 の抗原結合部分に化学的に融合される。いくつかの実施形態では、第 1 の抗原結合部分は、ペプチド結合またはペプチドリンカーを介して第 2 の抗原結合部分に融合される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、約 30 未満（例えば、約 25、20、または 15 のいずれか 1 つ未満）のアミノ酸長である。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号 324 及び 370～378 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、完全長抗体の Fc 領域は、例えば、IgG1 Fc、エフェクターレス IgG1 Fc、IgG2 Fc、または IgG4 Fc であり得る。いくつかの実施形態では、Fc 領域は、配列番号 355、356、及び 389 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb 部分と TIGIT の間の結合の K_d は、約 10⁻⁵ M～約 10⁻¹² M（例えば、約 10⁻⁷ M～約 10⁻¹² M、または約 10⁻⁸ M～約 10⁻¹² M）である。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb 部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。

【0198】

いくつかの実施形態では、（a）N 末端から C 末端において、V_H-C_H1-C_H2-C

H₃-抗TIGIT sdAb部分を含む第1のポリペプチド；及び（b）N末端からC末端において、V_L-C_Lを含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、PD-1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT BARPを提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAbは、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、ペムプロリズマブ、PD1-BM-min、またはニボルマブ由来である。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号385のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号386のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号387のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号388のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号406のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号407のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C_H3及び抗TIGIT sdAb部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG1Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BARPは、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BARPは、（a）配列番号396のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び（b）配列番号397のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、PD-1×TIGIT BARPは、図18に示す構造を有する。

【0199】

いくつかの実施形態では、（a）N末端からC末端において、V_H-C_H1-C_H2-C_H3-抗TIGIT sdAb部分を含む第1のポリペプチド；及び（b）N末端からC末端において、V_L-C_Lを含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、PD-1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～

207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT BABPを提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAbは、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、またはh53C1由来である。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、1）配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含むV_H、及び2）配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、配列番号339のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号340のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号381のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号382のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号379のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号380のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号383のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号384のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号339のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号340のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C_H3及び抗TIGIT sdAb部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG1Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BABPは、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BABPは、（a）配列番号359のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び（b）配列番号360のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、PD-L1×TIGIT BABPは、図18に示す構造を有する。

【0200】

いくつかの実施形態では、（a）N末端からC末端において、抗TIGIT sdAb部分-V_H-C_H1-C_H2-C_H3-を含む第1のポリペプチド；及び（b）N末端からC末端において、V_L-C_Lを含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、PD-1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で

約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT BABPを提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、ペムブオリズマブ、PD1-BM-min、またはニボルマブ由来である。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号385のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号386のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号387のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号388のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号406のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号407のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_H及び抗TIGIT sdAb部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG1Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BABPは、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BABPは、（a）配列番号394のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び（b）配列番号395のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、PD-1×TIGIT BABPは、図17に示す構造を有する。

【0201】

いくつかの実施形態では、（a）N末端からC末端において、抗TIGIT sdAb部分-V_H-C_H1-C_H2-C_H3を含む第1のポリペプチド；及び（b）N末端からC末端において、V_L-C_Lを含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、PD-L1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT BABPを提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を

含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、またはh53C1由来である。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、1) 配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含むV_H、及び2) 配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、配列番号339のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号340のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号381のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号382のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号379のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号380のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号383のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号384のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号339のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号340のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_H及び抗TIGIT s d A b部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG1 Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスIgG1 Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT B A B Pは、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT s d A b部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT B A B Pは、(a) 配列番号345のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び(b) 配列番号346のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT B A B Pは、(a) 配列番号347のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び(b) 配列番号348のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT B A B Pは、(a) 配列番号341のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び(b) 配列番号342のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT B A B Pは、(a) 配列番号343のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び(b) 配列番号344のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT B A B Pは、(a) 配列番号357のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び(b) 配列番号358のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT B A B Pは、(a) 配列番号402のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び(b) 配列番号403のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、PD-L1×TIGIT B A B Pは、図17に示す構造を有する。

【0202】

いくつかの実施形態では、(a) N末端からC末端において、V_H-C_H1-C_H2-C_H3を含む第1のポリペプチド；及び(b) N末端からC末端において、V_L-C_L-抗TIGIT s d A b部分を含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、PD-1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT s d A b部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、1

10

20

30

40

50

33、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT BABPを提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、ペムプロリズマブ、PD1-BM-min、またはニボルマブ由来である。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号385のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号386のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号387のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号388のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号406のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号407のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C_L及び抗TIGIT sdAb部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG1Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BABPは、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BABPは、（a）配列番号400のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び（b）配列番号401のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、PD-1×TIGIT BABPは、図20に示す構造を有する。

【0203】

いくつかの実施形態では、（a）N末端からC末端において、V_H-C_H1-C_H2-C_H3を含む第1のポリペプチド；及び（b）N末端からC末端において、V_L-C_L-抗TIGIT sdAb部分を含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、PD-L1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT BABPを提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むC

DR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、またはh53C1由来である。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、1) 配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含むV_H、及び2) 配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、配列番号339のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号340のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号381のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号382のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号379のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号380のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号383のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号384のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号339のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号340のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C_L及び抗TIGIT sdAb部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG1Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BAPは、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BAPは、(a) 配列番号363のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び(b) 配列番号364のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、PD-L1×TIGIT BAPは、図20に示す構造を有する。

【0204】

いくつかの実施形態では、(a) N末端からC末端において、V_H-C_H1-C_H2-C_H3を含む第1のポリペプチド；及び(b) N末端からC末端において、抗TIGIT sdAb部分-V_L-C_Lを含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、PD-L1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT BAPを提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～2

07、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、ペムブルリズマブ、PD1-BM-min、またはニボルマブ由来である。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号385のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号386のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号387のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号388のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号406のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号407のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_L及び抗TIGIT sdAb部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG1Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BAPは、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BAPは、(a) 配列番号398のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び(b) 配列番号399のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、PD-1×TIGIT BAPは、図19に示す構造を有する。

【0205】

いくつかの実施形態では、(a) N末端からC末端において、V_H-C_H1-C_H2-C_H3を含む第1のポリペプチド；及び(b) N末端からC末端において、抗TIGIT sdAb部分-V_L-C_Lを含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、PD-L1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT BAPを提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、またはh53C1由来である。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、1) 配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含むV_H、及び2) 配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び

配列番号 354 のアミノ酸配列を含む LC-CDR3 を含む VL を含む。いくつかの実施形態では、h53C1 抗 PD-L1 抗体は、配列番号 339 のアミノ酸配列を含む VH、及び配列番号 340 のアミノ酸配列を含む VL を含む。いくつかの実施形態では、VH は、配列番号 381 のアミノ酸配列を含み、及び VL は、配列番号 382 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH は、配列番号 379 のアミノ酸配列を含み、及び VL は、配列番号 380 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH は、配列番号 383 のアミノ酸配列を含み、及び VL は、配列番号 384 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VH は、配列番号 339 のアミノ酸配列を含み、及び VL は、配列番号 340 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VL 及び抗 TIGIT sdAb 部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号 324 及び 370~378 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、CH2 及び CH3 ドメインは、IgG4Fc 由来、例えば、配列番号 389 である。いくつかの実施形態では、CH2 及び CH3 ドメインは、IgG1Fc 由来、例えば、配列番号 356 である。いくつかの実施形態では、CH2 及び CH3 ドメインは、エフェクターレス IgG1Fc 由来、例えば、配列番号 355 である。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT BAP は、第 1 のポリペプチドの 2 つの同一のコピー、及び第 2 のポリペプチドの 2 つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb 部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT BAP は、(a) 配列番号 361 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドの 2 つの同一のコピー、及び (b) 配列番号 362 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドの 2 つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT BAP は、(a) 配列番号 404 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドの 2 つの同一のコピー、及び (b) 配列番号 405 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドの 2 つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 x TIGIT BAP は、図 19 に示す構造を有する。

【0206】

いくつかの実施形態では、(a) N 末端から C 末端において、抗 TIGIT sdAb 1 部分-VH-CH1-CH2-CH3 を含む第 1 のポリペプチド；及び (b) N 末端から C 末端において、抗 TIGIT sdAb 2 部分-VL-CL を含む第 2 のポリペプチドを含み、VH 及び VL は、PD-1 に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗 TIGIT sdAb 1 部分及び抗 TIGIT sdAb 2 部分は各々、配列番号 36~42、54、56~59、63、65~67、69~70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR1、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号 106~112、124、126~129、133、135~137、139~140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR2、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号 176~182、194、196~199、203、205~207、209~210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR3、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗 TIGIT MABP（例えば、BAP）を提供する。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb 1 部分及び抗 TIGIT sdAb 2 部分は各々、配列番号 36~42、54、56~59、63、65~67、69~70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR1；配列番号 106~112、124、126~129、133、135~137、139~140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR2；及び配列番号 176~182、194、196~199、203、205~207、209~210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR3 を含む。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb 1 部分及び抗 TIGIT sdAb 2 部分は各々、配列番号 253~259、271、273~276、280、282~284、286~287 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む VH H ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb 1 部分及び抗 TIGIT sdAb 2 部分は、同じである。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT

IT s d A b 1 部分及び抗 T I G I T s d A b 2 部分は、異なる。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、ペムプロリズマブ、PD1-BM-min、またはニボルマブ由来である。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号385のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号386のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号387のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号388のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号406のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号407のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_L及び抗 T I G I T s d A b 2 部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、V_H及び抗 T I G I T s d A b 1 部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG1Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T M A B P（例えば、B A B P）は、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T s d A b 部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、PD-1×T I G I T M A B P（例えば、B A B P）は、図21に示す構造を有する。

【0207】

いくつかの実施形態では、（a）N末端からC末端において、抗 T I G I T s d A b 1 部分-V_H-C_H1-C_H2-C_H3を含む第1のポリペプチド；及び（b）N末端からC末端において、抗 T I G I T s d A b 2 部分-V_L-C_Lを含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、PD-L1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗 T I G I T s d A b 1 部分及び抗 T I G I T s d A b 2 部分は各々、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗 T I G I T M A B P（例えば、B A B P）を提供する。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T s d A b 1 部分及び抗 T I G I T s d A b 2 部分は各々、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T

s d A b 1 部分及び抗 T I G I T s d A b 2 部分は各々、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T s d A b 1 部分及び抗 T I G I T s d A b 2 部分は、同じである。いくつかの実施形態では、抗 T I G I T s d A b 1 部分及び抗 T I G I T s d A b 2 部分は、異なる。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、またはh53C1由来である。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、1）配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミ

ノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含むV_H、及び2)配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、h53c1抗PD-L1抗体は、配列番号339のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号340のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号381のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号382のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号379のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号380のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号383のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号384のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号339のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号340のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_L及び抗TIGIT sdAb2部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370~378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、V_H及び抗TIGIT sdAb1部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370~378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG1Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）は、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、PD-L1×TIGIT MABP（例えば、BABP）は、図21に示す構造を有する。

【0208】

(a) N末端からC末端において、抗TIGIT sdAb1部分-抗TIGIT sdAb2部分-V_H-C_H1-C_H2-C_H3を含む第1のポリペプチド；及び(b) N末端からC末端において、V_L-C_Lを含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、PD-1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT sdAb1部分及び抗TIGIT sdAb2部分は各々、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb1部分及び抗TIGIT sdAb2部分は各々、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb1部分及び抗TIGIT sdAb2部分は各々、配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb1部分及び抗TIGIT

sdAb2部分は、同じである。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb1

部分及び抗TIGIT sdAb 2部分は、異なる。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、ペムブロリズマブ、PD1-BM-min、またはニボルマブ由来である。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号385のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号386のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号387のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号388のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号406のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号407のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb 1部分及び抗TIGIT sdAb 2部分、及び／またはV_H及び抗TIGIT sdAb 2部分は、ペプチドリinker、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリinkerを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG1Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）は、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、PD-1×TIGIT MABP（例えば、BABP）は、図22に示す構造を有する。

【0209】

いくつかの実施形態では、（a）N末端からC末端において、抗TIGIT sdAb 1部分-抗TIGIT sdAb 2部分-V_H-C_H1-C_H2-C_H3を含む第1のポリペプチド；及び（b）N末端からC末端において、V_L-C_Lを含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、PD-L1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT sdAb 1部分及び抗TIGIT sdAb 2部分は各々、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb 1部分及び抗TIGIT sdAb 2部分は各々、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT

sdAb 1部分及び抗TIGIT sdAb 2部分は各々、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb 1部分及び抗TIGIT sdAb 2部分は、同じである。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb 1部分及び抗TIGIT sdAb 2部分は、異なる。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、またはh53C1由来である。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、1）配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含むV_H、及び2）配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号

353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、配列番号339のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号340のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号381のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号382のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号379のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号380のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号383のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号384のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号339のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号340のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb1部分及び抗TIGIT sdAb2部分、及び／またはV_H及び抗TIGIT sdAb2部分は、ペプチドリinker、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリinkerを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG1Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）は、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、PD-L1×TIGIT MABP（例えば、BABP）は、図22に示す構造を有する。

【0210】

いくつかの実施形態では、（a）N末端からC末端において、V_H-C_H1-抗TIGIT sdAb部分-C_H2-C_H3を含む第1のポリペプチド；及び（b）N末端からC末端において、V_L-C_Lを含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、PD-1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT BABPを提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、ペムプロリズマブ、PD1-BM-min、またはニボルマブ由来である。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号385のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号386のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号387のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号388のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号406のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号407のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C_H1及び抗TIGIT sdAb部分は、ペプチドリ

10

20

30

40

50

ンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、 C_H2 及び C_H3 ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、 C_H2 及び C_H3 ドメインは、IgG1Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、 C_H2 及び C_H3 ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT BAPは、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、PD-1×TIGIT BAPは、図23に示す構造を有する。

【0211】

いくつかの実施形態では、(a) N末端からC末端において、 V_H - C_H1 -抗TIGIT sdAb部分- C_H2 - C_H3 を含む第1のポリペプチド；及び(b) N末端からC末端において、 V_L - C_L を含む第2のポリペプチドを含み、 V_H 及び V_L は、PD-L1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT BAPを提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含む V_H Hドメインを含む。いくつかの実施形態では、 V_H 及び V_L ドメインは、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、またはh53C1由来である。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、1) 配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含む V_H 、及び2) 配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、配列番号339のアミノ酸配列を含む V_H 、及び配列番号340のアミノ酸配列を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、 V_H は、配列番号381のアミノ酸配列を含み、及び V_L は、配列番号382のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 V_H は、配列番号379のアミノ酸配列を含み、及び V_L は、配列番号380のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 V_H は、配列番号383のアミノ酸配列を含み、及び V_L は、配列番号384のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 V_H は、配列番号339のアミノ酸配列を含み、及び V_L は、配列番号340のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 C_H1 及び抗TIGIT sdAb部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、 C_H2 及び C_H3 ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、 C_H2 及び C_H3 ドメインは、IgG1Fc由来、

10

20

30

40

50

例えば、配列番号 356 である。いくつかの実施形態では、 C_H2 及び C_H3 ドメインは、エフェクターレス $IgG1-Fc$ 由来、例えば、配列番号 355 である。いくつかの実施形態では、抗 $TIGIT-BABP$ は、第 1 のポリペプチドの 2 つの同一のコピー、及び第 2 のポリペプチドの 2 つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗 $TIGIT-sdAb$ 部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、 $PD-L1 \times TIGIT-BABP$ は、図 23 に示す構造を有する。

【0212】

いくつかの実施形態では、N 末端から C 末端において、 V_L-V_H -抗 $TIGIT-sdAb$ 部分- C_H2-C_H3 を含むポリペプチドを含み、 V_L 及び V_H は、 $PD-1$ に特異的に結合する $scFv$ を一緒に形成し、及び抗 $TIGIT-sdAb$ 部分は、配列番号 36~42、54、56~59、63、65~67、69~70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR1、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号 106~112、124、126~129、133、135~137、139~140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR2、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号 176~182、194、196~199、203、205~207、209~210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR3、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗 $TIGIT-BABP$ を提供する。いくつかの実施形態では、N 末端から C 末端において、 V_H-V_L -抗 $TIGIT-sdAb$ 部分- C_H2-C_H3 を含むポリペプチドを含み、 V_L 及び V_H は、 $PD-1$ に特異的に結合する $scFv$ を一緒に形成し、及び抗 $TIGIT-sdAb$ 部分は、配列番号 36~42、54、56~59、63、65~67、69~70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR1、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号 106~112、124、126~129、133、135~137、139~140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR2、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号 176~182、194、196~199、203、205~207、209~210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR3、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗 $TIGIT-BABP$ を提供する。いくつかの実施形態では、抗 $TIGIT-sdAb$ 部分は、配列番号 36~42、54、56~59、63、65~67、69~70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR1；配列番号 106~112、124、126~129、133、135~137、139~140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR2；及び配列番号 176~182、194、196~199、203、205~207、209~210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR3 を含む。いくつかの実施形態では、抗 $TIGIT-sdAb$ 部分は、配列番号 253~259、271、273~276、280、282~284、286~287 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む V_HH ドメインを含む。いくつかの実施形態では、 $scFv$ （または $scFv$ を形成する V_L 及び V_H ）は、ペムプロリズマブ、 $PD1-BM-m$ 、またはニボルマブ由来である。いくつかの実施形態では、 V_H は、配列番号 385 のアミノ酸配列を含み、及び V_L は、配列番号 386 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 V_H は、配列番号 387 のアミノ酸配列を含み、及び V_L は、配列番号 388 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 V_H は、配列番号 406 のアミノ酸配列を含み、及び V_L は、配列番号 407 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 $scFv$ を形成する V_H 及び V_L 、及び／または $scFv$ 及び抗 $TIGIT-sdAb$ 部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号 324 及び 370~378 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、 C_H2 及び C_H3 ドメインは、 $IgG4-Fc$ 由来、例えば、配列番号 389 である。いくつかの実施形態では、 C_H2 及び C_H3 ドメインは、 $IgG1-Fc$ 由来、例えば

10

20

30

40

50

、配列番号356である。いくつかの実施形態では、 C_H2 及び C_H3 ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGITBABPは、ポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGITsdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、PD-1×TIGITBABPは、図24に示す構造を有する。

【0213】

いくつかの実施形態では、N末端からC末端において、 V_L - V_H -抗TIGITsdAb部分- C_H2 - C_H3 を含むポリペプチドを含み、 V_L 及び V_H は、PD-L1に特異的に結合するscFvと一緒に形成し、及び抗TIGITsdAb部分は、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGITBABPを提供する。いくつかの実施形態では、N末端からC末端において、 V_H - V_L -抗TIGITsdAb部分- C_H2 - C_H3 を含むポリペプチドを含み、 V_L 及び V_H は、PD-L1に特異的に結合するscFvと一緒に形成し、及び抗TIGITsdAb部分は、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGITBABPを提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGITsdAb部分は、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGITsdAb部分は、配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つのアミノ酸配列を含む V_H ドメインを含む。いくつかの実施形態では、scFv（またはscFvを形成する V_L 及び V_H ）は、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、またはh53C1由来である。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、1）配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含む V_H 、及び2）配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、配列番号339のアミノ酸配列を含む V_H 、及び配列番号340のアミノ酸配列を含む V_L を含む。いくつかの実施形態では、 V_H は、配列番号381のアミノ酸配列を含み、及び V_L は、配列番号382のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 V_H は、配列番号379のアミノ酸配列を含み、及び V_L は、配列番号380のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 V_H は、配列番号383のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を含み、及びV_Lは、配列番号384のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号339のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号340のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、s c F vを形成するV_H及びV_L、及び／またはs c F v及び抗T I G I T s d A b部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、I g G 4 F c由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、I g G 1 F c由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスI g G 1 F c由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗T I G I T B A B Pは、ポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗T I G I T s d A b部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、P D - L 1 × T I G I T B A B Pは、図24に示す構造を有する。

【0214】

いくつかの実施形態では、(a) N末端からC末端において、V_H-C_H1-抗T I G I T s d A b 1部分-C_H1-C_H2-C_H3を含む第1のポリペプチド；及び(b) N末端からC末端において、V_L-C_L-抗T I G I T s d A b 2部分-C_Lを含む第2のポリペプチドを含み、V_H及びV_Lは、P D - 1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗T I G I T s d A b 1部分及び抗T I G I T s d A b 2部分は各々、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むC D R 1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むC D R 2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むC D R 3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗T I G I T M A B P（例えば、B A B P）を提供する。いくつかの実施形態では、抗T I G I T s d A b 1部分及び抗T I G I T s d A b 2部分は各々、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むC D R 1；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むC D R 2；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むC D R 3を含む。いくつかの実施形態では、抗T I G I T s d A b 1部分及び抗T I G I T s d A b 2部分は各々、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗T I G I T s d A b 1部分及び抗T I G I T s d A b 2部分は、同じである。いくつかの実施形態では、抗T I G I T s d A b 1部分及び抗T I G I T s d A b 2部分は、異なる。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメインは、ペムプロリズマブ、P D 1 - B M - m i n、またはニボルマブ由来である。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号385のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号386のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号387のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号388のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号406のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号407のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C_H1及び抗T I G I T s d A b 1部分、及び／またはC_L及び抗T I G I T s d A b 2部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、I g G 4 F c由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、I g G 1

10

20

30

40

50

Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、CH2及びCH3ドメインは、エフェクターレスIgG1 Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）は、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、PD-1×TIGIT MABP（例えば、BABP）は、図25に示す構造を有する。

【0215】

いくつかの実施形態では、(a) N末端からC末端において、VH-CH1-抗TIGIT sdAb1部分-CH1-CH2-CH3を含む第1のポリペプチド；及び(b) N末端からC末端において、VL-CL-抗TIGIT sdAb2部分-CLを含む第2のポリペプチドを含み、VH及びVLは、PD-L1に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、及び抗TIGIT sdAb1部分及び抗TIGIT sdAb2部分は各々、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb1部分及び抗TIGIT sdAb2部分は各々、配列番号36~42、54、56~59、63、65~67、69~70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1；配列番号106~112、124、126~129、133、135~137、139~140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2；及び配列番号176~182、194、196~199、203、205~207、209~210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb1部分及び抗TIGIT sdAb2部分は各々、配列番号253~259、271、273~276、280、282~284、286~287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むVHHドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb1部分及び抗TIGIT sdAb2部分は、同じである。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb1部分及び抗TIGIT sdAb2部分は、異なる。いくつかの実施形態では、VH及びVLDメインは、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、またはh53C1由来である。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、1) 配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含むVH、及び2) 配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含むVLを含む。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、配列番号339のアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号340のアミノ酸配列を含むVLを含む。いくつかの実施形態では、VHは、配列番号381のアミノ酸配列を含み、及びVLは、配列番号382のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VHは、配列番号379のアミノ酸配列を含み、及びVLは、配列番号380のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VHは、配列番号383のアミノ酸配列を含み、及びVLは、配列番号384のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VHは、配列番号339のアミノ酸配列を含み、及びVLは、配列番号340のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CH1及び抗TIGIT sdAb1部分、及び／またはCL及び抗TIGIT sdAb2部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370~378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに

10

20

30

40

50

融合される。いくつかの実施形態では、 C_H2 及び C_H3 ドメインは、IgG4Fc 由来、例えば、配列番号 389 である。いくつかの実施形態では、 C_H2 及び C_H3 ドメインは、IgG1Fc 由来、例えば、配列番号 356 である。いくつかの実施形態では、 C_H2 及び C_H3 ドメインは、エフェクターレス IgG1Fc 由来、例えば、配列番号 355 である。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT MABP（例えば、BABP）は、第 1 のポリペプチドの 2 つの同一のコピー、及び第 2 のポリペプチドの 2 つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb 部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、PD-L1×TIGIT MABP（例えば、BABP）は、図 25 に示す構造を有する。

【0216】

いくつかの実施形態では、(a) N 末端から C 末端において、 V_L – V_H –抗 TIGIT sdAb1 部分– C_H2 – C_H3 を含む第 1 のポリペプチド；及び (b) N 末端から C 末端において、抗 TIGIT sdAb2 部分– C_L を含む第 2 のポリペプチドを含み、scFv を形成する V_L 及び V_H は、PD-1 に特異的に結合し、及び抗 TIGIT sdAb1 部分及び抗 TIGIT sdAb2 部分は各々、配列番号 36～42、54、56～59、63、65～67、69～70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR1、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号 106～112、124、126～129、133、135～137、139～140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR2、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号 176～182、194、196～199、203、205～207、209～210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR3、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗 TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。いくつかの実施形態では、(a) N 末端から C 末端において、 V_H – V_L –抗 TIGIT sdAb1 部分– C_H2 – C_H3 を含む第 1 のポリペプチド；及び (b) N 末端から C 末端において、抗 TIGIT sdAb2 部分– C_L を含む第 2 のポリペプチド、scFv を形成する V_L 及び V_H は、PD-1 に特異的に結合し、及び抗 TIGIT sdAb1 部分及び抗 TIGIT sdAb2 部分は各々、配列番号 36～42、54、56～59、63、65～67、69～70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR1、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号 106～112、124、126～129、133、135～137、139～140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR2、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号 176～182、194、196～199、203、205～207、209～210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR3、または最大で約 3 つ（例えば、約 1、2、または 3 のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗 TIGIT MABP（例えば、BABP）を提供する。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb1 部分及び抗 TIGIT sdAb2 部分は各々、配列番号 36～42、54、56～59、63、65～67、69～70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR1；配列番号 106～112、124、126～129、133、135～137、139～140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR2；及び配列番号 176～182、194、196～199、203、205～207、209～210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む CDR3 を含む。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb1 部分及び抗 TIGIT sdAb2 部分は各々、配列番号 253～259、271、273～276、280、282～284、286～287 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む V_H Hドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb1 部分及び抗 TIGIT sdAb2 部分は、同じである。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT sdAb1 部分及び抗 TIGIT sdAb2 部分は、異なる。いくつかの実施形態では、 V_H 及び V_L ドメイン（または scFv）は、ペムプロリズマブ、PD1-BM-min、またはニボルマブ由来である。いくつかの実施形態では、 V_H は、

10

20

30

40

50

配列番号 385 のアミノ酸配列を含み、及び V_L は、配列番号 386 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 V_H は、配列番号 387 のアミノ酸配列を含み、及び V_L は、配列番号 388 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 V_H は、配列番号 406 のアミノ酸配列を含み、及び V_L は、配列番号 407 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 $s c F v$ を形成する V_H 及び V_L 、及び／または $s c F v$ 及び抗 $T I G I T s d A b 1$ 部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号 324 及び 370～378 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、 $C_H 2$ 及び $C_H 3$ ドメインは、 $I g G 4 F c$ 由来、例えば、配列番号 389 である。いくつかの実施形態では、 $C_H 2$ 及び $C_H 3$ ドメインは、 $I g G 1 F c$ 由来、例えば、配列番号 356 である。いくつかの実施形態では、 $C_H 2$ 及び $C_H 3$ ドメインは、エフェクターレス $I g G 1 F c$ 由来、例えば、配列番号 355 である。いくつかの実施形態では、抗 $T I G I T M A B P$ (例えば、 $B A B P$) は、第 1 のポリペプチドの 2 つの同一のコピー、及び第 2 のポリペプチドの 2 つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗 $T I G I T s d A b$ 部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、 $P D-1 \times T I G I T M A B P$ (例えば、 $B A B P$) は、図 26 に示す構造を有する。

【0217】

いくつかの実施形態では、(a) N 末端から C 末端において、 V_L-V_H -抗 $T I G I T s d A b 1$ 部分- $C_H 2-C_H 3$ を含む第 1 のポリペプチド；及び (b) N 末端から C 末端において、抗 $T I G I T s d A b 2$ 部分- C_L を含む第 2 のポリペプチドを含み、 $s c F v$ を形成する V_L 及び V_H は、 $P D-L 1$ に特異的に結合し、及び抗 $T I G I T$

$s d A b 1$ 部分及び抗 $T I G I T s d A b 2$ 部分は各々、配列番号 36～42、54、56～59、63、65～67、69～70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む $C D R 1$ 、または最大で約 3 つ (例えば、約 1、2、または 3 のいずれか) のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号 106～112、124、126～129、133、135～137、139～140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む $C D R 2$ 、または最大で約 3 つ (例えば、約 1、2、または 3 のいずれか) のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号 176～182、194、196～199、203、205～207、209～210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む $C D R 3$ 、または最大で約 3 つ (例えば、約 1、2、または 3 のいずれか) のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗 $T I G I T M A B P$ (例えば、 $B A B P$) を提供する。いくつかの実施形態では、(a) N 末端から C 末端において、 V_H-V_L -抗 $T I G I T s d A b 1$ 部分- $C_H 2-C_H 3$ を含む第 1 のポリペプチド；及び (b) N 末端から C 末端において、抗 $T I G I T s d A b 2$ 部分- C_L を含む第 2 のポリペプチドを含み、 $s c F v$ を形成する V_L 及び V_H は、 $P D-L 1$ に特異的に結合し、及び抗 $T I G I T s d A b 1$ 部分及び抗 $T I G I T s d A b 2$ 部分は各々、配列番号 36～42、54、56～59、63、65～67、69～70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む $C D R 1$ 、または最大で約 3 つ (例えば、約 1、2、または 3 のいずれか) のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号 106～112、124、126～129、133、135～137、139～140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む $C D R 2$ 、または最大で約 3 つ (例えば、約 1、2、または 3 のいずれか) のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号 176～182、194、196～199、203、205～207、209～210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む $C D R 3$ 、または最大で約 3 つ (例えば、約 1、2、または 3 のいずれか) のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、抗 $T I G I T M A B P$ (例えば、 $B A B P$) を提供する。いくつかの実施形態では、抗 $T I G I T s d A b 1$ 部分及び抗 $T I G I T s d A b 2$ 部分は各々、配列番号 36～42、54、56～59、63、65～67、69～70 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む $C D R 1$ ；配列番号 106～112、124、126～129、133、135～137、139～140 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む $C D R 2$ ；及び配列番号 176～182、194、196～199、203、205～207、209～210 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む $C D R 3$ を含む。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

では、抗TIGIT sdAb 1部分及び抗TIGIT sdAb 2部分は各々、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb 1部分及び抗TIGIT sdAb 2部分は、同じである。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb 1部分及び抗TIGIT sdAb 2部分は、異なる。いくつかの実施形態では、V_H及びV_Lドメイン（またはscFv）は、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、またはh53C1由来である。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、1）配列番号349のアミノ酸配列を含むHC-CDR1、配列番号350のアミノ酸配列を含むHC-CDR2、及び配列番号351のアミノ酸配列を含むHC-CDR3を含むV_H、及び2）配列番号352のアミノ酸配列を含むLC-CDR1、配列番号353のアミノ酸配列を含むLC-CDR2、及び配列番号354のアミノ酸配列を含むLC-CDR3を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、h53C1抗PD-L1抗体は、配列番号339のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号340のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号381のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号382のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号379のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号380のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号383のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号384のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V_Hは、配列番号339のアミノ酸配列を含み、及びV_Lは、配列番号340のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、scFvを形成するV_H及びV_L、及び／またはscFv及び抗TIGIT sdAb 1部分は、ペプチドリンカー、例えば、配列番号324及び370～378のいずれか1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーを介して互いに融合される。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG4Fc由来、例えば、配列番号389である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、IgG1Fc由来、例えば、配列番号356である。いくつかの実施形態では、C_H2及びC_H3ドメインは、エフェクターレスIgG1Fc由来、例えば、配列番号355である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT MABP（例えば、BABP）は、第1のポリペプチドの2つの同一のコピー、及び第2のポリペプチドの2つの同一のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、PD-L1×TIGIT MABP（例えば、BABP）は、図26に示す構造を有する。

【0218】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT構築物のいずれか1つ（例えば、抗TIGIT sdAb部分、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む多重特異性（例えば、二重特異性）または単一特異性の抗TIGIT構築物、例えば、本明細書に記載の抗TIGIT/PD-1構築物（例えば、MABPまたはBABP）または抗TIGIT/PD-L1構築物（例えば、MABPまたはBABP））と競合的にTIGITに特異的に結合するTIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む抗TIGIT MABP（例えば、BABP）（以下、「競合抗TIGIT構築物」、「競合抗TIGIT MABP」、または「競合抗TIGIT BABP」と呼ばれる）も提供される。

【0219】

（III）抗TIGIT構築物抗体変異体

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗TIGIT構築物（例えば、抗TIGIT sdAb部分、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、抗TIGIT MABP/BABP）のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードする核酸配列に適切な改変を導入するか、またはペプチド合成によって調製し得る。そのような改変には、例えば、抗体のアミノ酸配列内における残基の欠

失、及び／または挿入、及び／または置換が含まれる。最終構築物が所望の特徴（例えば、抗原結合）を有する限り、最終構築物に到達するために、欠失、挿入及び置換のいかなる組み合わせをも行うことができる。

【0220】

a) 置換、挿入、欠失、及び変異体

いくつかの実施形態では、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体を提供する。置換突然変異誘発のための目的の部位には、HVR（またはCDR）及びFRが含まれる。保存的置換は、「好ましい置換」という見出しの下で表2に示す。より実質的な変化は、「例示的な置換」という見出しの下で表2に提供し、これは、アミノ酸側鎖クラスに関連して以下にさらに記載する通りである。アミノ酸置換を目的の抗体に導入し、生成物を所望の活性、例えば、保持／改善された抗原結合、低減した免疫原性、または改善されたADCCもしくはCDCについて、スクリーニングすることができる。

表2. アミノ酸置換

【表2】

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala(A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg(R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn(N)	Gln;His;Asp;Lys;Arg	Gln
Asp(D)	Glu;Asn	Glu
Cys(C)	Ser;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn;Glu	Asn
Glu(E)	Asp;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile(I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;ノロイシン	Leu
Leu(L)	ノロイシン;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys(K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met(M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe(F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val;Ser	Ser
Trp(W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val(V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;ノロイシン	Leu

【0221】

アミノ酸は、側鎖の共通する特性に従って分類することができる：（1）疎水性：ノロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；（2）中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；（3）酸性：Asp、Glu；（4）塩基性：His、Lys、Arg；（5）鎖配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；（6）芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0222】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。

【0223】

置換変異体の1つのタイプは、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基を置換することを伴う。一般的に、さらなる研究のために選択される得られる変異体（複数可）は、ある特定の生物学的特性（例えば、増加した親和性、低減した

免疫原性)において、親抗体に比して改変(例えば、改善)されているか、及び／または、親抗体のある特定の生物学的特性が実質的に保持されている。例示的な置換変異体は、例えば、本明細書に記載するようなファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を用いて簡便に生成され得る親和性成熟抗体である。簡単に言うと、1つ以上のHVR残基を突然変異させ、ファージ上で変異体抗体を提示させ、特定の生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングする。

【0224】

変化(例えば、置換)を、例えば、抗体親和性を改善するために、HVRにおいて起こさせてもよい。そのような変化を、HVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程の間に高頻度に突然変異を起こすコドンによってコードされる残基(例えば、Chowdhury, P. S., *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)を参照されたい)、及び／またはSDR(a-CDR)によってコードされる残基において起こさせてもよく、得られた変異体V_HまたはV_Lを結合親和性について試験する。二次ライブラリーを構築し、そこから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施形態では、種々の方法(例えば、エラープロードPCR、鎖シャッフリングまたはオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発)のいずれかによって、成熟のために選択された可変遺伝子に多様性を導入する。次いで、二次ライブラリーを作製する。次いで、ライブラリーをスクリーニングして、所望の親和性を有するあらゆる抗体変異体を同定する。多様性を導入するための別の方法は、数個のHVR残基(例えば、一度に4~6残基)をランダム化するHVR特異的なアプローチを伴う。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキニング突然変異誘発またはモデル化を用いて具体的に同定され得る。特に、CDR-H3及びCDR-L3は標的とされることが多い。

【0225】

いくつかの実施形態では、置換、挿入、または欠失は、そのような変更が、抗体が抗原に結合する能力を実質的に低減させない範囲で、1つ以上のHVR内で生じててもよい。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的变化(例えば、本明細書で提供される保存的置換)を、HVR内で起こさせてもよい。そのような変化は、例えば、HVR「ホットスポット」またはCDRの外であってもよい。上で提供された変異体V_HH配列のいくつかの実施形態では、各HVRは変化していないか、1、2、または3以下のアミノ酸置換しか含まない。

【0226】

突然変異誘発のための標的とし得る抗体の残基または領域を同定するための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085に記載されるように、「アラニンスキニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、残基または一群の標的残基(例えば、Arg、Asp、His、Lys及びGluのような荷電残基)を同定し、それを中性または負電荷を持つアミノ酸(例えば、アラニンまたはポリアラニン)で置換して、抗体の、抗原との相互作用が影響を受けるか否かを決定する。最初の置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置に、さらなる置換を導入してもよい。あるいは、またはさらに、抗体と抗原の間の接触点を同定するために、抗原-抗体複合体の結晶構造を用いることができる。このような接触残基及びその隣接残基を、置換の候補として標的にしても、排除してもよい。変異体をスクリーニングして、それらが所望の特性を含むか否かを決定してもよい。

【0227】

アミノ酸配列挿入には、1残基から、100残基またはそれ以上を含有するポリペプチドまでに及ぶ長さのアミノ末端及び／またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入も含まれる。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体には、抗体のN末端またはC末端へ

の、酵素（例えば、ADEPTの場合）、または抗体の血清中半減期を増加させるポリペプチドの融合が含まれる。

【0228】

b) グリコシル化変異体

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗TIGIT構築物を変化させて、構築物がグリコシル化される程度を増加または減少させる。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作出または除去されるようにアミノ酸配列を変化させることによって、簡便に達成することができる。

【0229】

抗TIGIT構築物がFc領域（例えば、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、PD-1×TIGIT MABP、またはPD-L1×TIGIT MABP）を含む場合、そこに結合する糖質を変化させてもよい。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は、典型的には、分岐した二分岐オリゴ糖を含み、これは一般的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN連結によって結合される。例えば、Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997) を参照されたい。オリゴ糖は、種々の炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、シアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに結合したフコースを含み得る。いくつかの実施形態では、本出願の抗TIGIT構築物におけるオリゴ糖の改変は、一定の改善された特性を有する抗体変異体を作成するために行われ得る。

【0230】

いくつかの実施形態では、Fc領域に（直接または間接的に）結合したフコースを欠く糖質構造を有する、抗TIGIT構築物抗体変異体を提供する。例えば、そのような抗体におけるフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%または20%~40%であってもよい。フコースの量は、例えば、WO2008/077546号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析によって測定される、Asn297に結合した全ての糖構造（例えば、複合型、混成型、及び高マンノース型構造）の合計に比しての、Asn297における糖鎖内のフコースの平均量を算出することによって決定される。Asn297は、Fc領域内の約297位（Fc領域残基のEU番号付け）に位置するアスパラギン残基を指す；しかしながら、抗体における軽微な配列変異のため、Asn297は、297位の上流側または下流側約±3アミノ酸、すなわち294位と300位の間に位置する場合もあり得る。そのようなフコシル化変異体は、改善されたADCC機能を有し得る。例えば、米国特許公開第2003/0157108号（Presta, L.）；US2004/0093621（Kyowa Hakkō Kogyo Co., Ltd）を参照されたい。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異体に関する刊行物の例としては、US2003/0157108；WO2000/61739；WO2001/29246；US2003/0115614；US2002/0164328；US2004/0093621；US2004/0132140；US2004/0110704；US2004/0110282；US2004/0109865；WO2003/085119；WO2003/084570；WO2005/035586；WO2005/035778；WO2005/053742；WO2002/031140；Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004) が挙げられる。

【0231】

抗TIGIT構築物変異体は、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分されている二分オリゴ糖とともにさらに与えられる。そのような抗体変異体は、フコシル化を減少させ、及び／またはADCC機能を改善している可能性がある。そのような抗体変異体の例は、例えば、WO2003/011878（Jean-Mairet et al.）；米国特許第6,602,684号（Umana et al.）；及びUS2005/0123546（Umana et al.）に記載され

10

20

30

40

50

ている。Fc領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を持つ抗体変異体も提供される。そのような抗体変異体は、CDC機能を改善させた可能性がある。そのような抗体変異体は、例えば、WO1997/30087 (Patel et al.) ; WO1998/58964 (Raju, S.) ; 及びWO1999/22764 (Raju, S.) に記載されている。

【0232】

c) Fc領域変異体

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗TIGIT構築物（例えば、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、PD-1×TIGIT MABP、またはPD-L1×TIGIT MABP）のFc領域に1つ以上のアミノ酸改変を導入することにより、Fc領域変異体を生成させてもよい。Fc領域変異体は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸改変（例えば、置換）を含むヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4Fc領域）を含み得る。

【0233】

いくつかの実施形態では、本出願は、インビボにおける抗TIGIT構築物の半減期が重要であるが、ある特定のエフェクター機能（例えば、補体及びADCCなど）が不要または有害である用途のための望ましい候補とならしめる、全てではないが一部のエフェクター機能を有する抗TIGIT構築物（例えば、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、PD-1×TIGIT MABP、またはPD-L1×TIGIT MABP）変異体を意図している。インビトロ及び／またはインビボでの細胞傷害性アッセイを、CDC活性及び／またはADCC活性の減少／枯渇を確認するために行うことができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイは、抗体がFcγR結合を欠くが（それゆえ、恐らくADCC活性を欠く）、FcRn結合能力を保持していることを確認するために行うことができる。ADCC、NK細胞を媒介する初代細胞は、FcγRIIIのみを発現するが、単球はFcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991) の464ページの表2に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) を参照されたい）及びHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985) ; 同第5,821,337号（Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987) を参照されたい）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を用いることができる（例えば、フローサイトメトリー用のACTI（商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Cell Technology, Inc. Mountain View, CA ; 及びCytotox非放射性細胞傷害性アッセイ（Promega, Madison, WI）を参照されたい）。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。あるいは、またはさらに、目的の分子のADCC活性は、Clynes et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) に開示されるように、インビボで、例えば、動物モデルにおいて評価することができる。C1q結合アッセイはまた、抗体が体C1qを結合することができないこと、したがって、CDC活性を欠いていることを確認するために行うことができる。例えば、WO2006/029879及びWO2005/100402のC1q及びC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行うことができる。FcRn結合、及びインビボでのクリアランス／半減期の測定も当該技術分野で公知の方法を用いて行うことができる（例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006) を参照されたい）。

【0234】

10

20

30

40

50

エフェクター機能が減少した抗体は、Fc領域の残基238、265、269、270、297、327、329の1つ以上の置換を有するものが含まれる（米国特許第6,737,056号）。そのようなFc変異体は、残基265及び297のアラニンへの置換を有する、いわゆる「DANA」Fc変異体を含む、アミノ酸位置265、269、270、297及び327の2つ以上での置換を有するFc変異体を含む（米国特許第7,332,581号）。

【0235】

FcRへの改善または減少させた結合を持つある特定の抗体変異体が記載されている。（例えば、米国特許第6,737,056号；WO2004/056312、及びShields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)を参照されたい）。

10

【0236】

いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物変異体は、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の位置298、333、及び／または334における置換（残基のEU番号付け）を含む。

【0237】

いくつかの実施形態では、改変された（すなわち、改善されたか減少したのいずれか）C1q結合及び／または補体依存性細胞傷害（CDC）を生じる、Fc領域における改変がなされ、例えば、米国特許第6,194,551号、WO99/51642、及びIdusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184(2000)に記載される。

20

【0238】

いくつかの実施形態では、半減期を増加し、及び／または新生児Fc受容体（FcRn）への結合を改善する1つ以上のアミノ酸置換を含む変異体Fc領域を含む抗TIGIT構築物（例えば、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、PD-1×TIGIT MABP、またはPD-L1×TIGIT MABP）変異体を提供する。増加した半減期を持ち、胎仔への母性IgGの移送を担う、新生児Fc受容体（FcRn）への結合が改善された抗体（Guyer et al., J. Immunol. 117:587(1976)及びKim et al., J. Immunol. 24:249(1994)）が、US2005/0014934A1（Hinton et al.）に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する1つ以上の置換を有するFc領域を含む。そのようなFc変異体は、Fc領域の残基の1つ以上の置換、例えば、Fc領域の残基434の置換を有するものが含まれる（米国特許第7,371,826号）。

30

【0239】

Fc領域の変異体の他の例に関しては、Duncan & Winter, Nature 322:738-40(1988)；米国特許第5,648,260号；米国特許第5,624,821号；及びWO94/29351も参照されたい。

【0240】

本明細書に記載のFc変異体のいずれかまたはそれらの組み合わせを含む抗TIGIT構築物（例えば、本明細書に記載の、sdAb-Fc融合タンパク質、完全長抗体に融合した抗TIGIT sdAb、または抗TIGIT MABP/BABP）が企図される。

40

【0241】

d) システイン改変抗体変異体

いくつかの実施形態では、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン改変抗TIGIT構築物、例えば、「チオMAb」を作成することが望まれ得る。特定の実施形態では、置換された残基は、抗体のアクセス可能な部位で起きる。それらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基は、それによって抗体のアクセス可能な部位に配置され、本明細書中でさらに記載されるように、イムノコンジュゲートを作成するために、例えば、薬物部分またはリンカー-薬剤部分などの他の部分に抗体をコンジュゲートするために使用することができる。いくつかの実施形態では、以下

50

の残基のいずれか1つ以上がシステインで置換され得る：軽鎖のA118（EU番号付け）；及び重鎖Fc領域のS400（EU番号付け）。システイン改変抗TIGIT構築物は、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されるように生成され得る。

【0242】

e) 抗体誘導体

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗TIGIT構築物は、当該技術分野で知られ、容易に入手されている追加の非タンパク質部分を含むようにさらに改変することができる。抗体の誘導体化に適した部分としては、限定されないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール／プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ－1,3-ジオキサラン、ポリ－1,3,6-トリオキサラン、エチレン／無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸（単独重合体またはランダム共重合体のいずれか）及びデキストランまたはポリ（n-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコール単独重合体、プロピレンオキシド／エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール及びこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、その水中での安定性のために製造上の利点を有し得る。ポリマーは、いずれかの分子量のものであり得、分枝鎖または未分枝鎖であり得る。抗体に結合するポリマーの数は、変動し得、1つ以上の重合体が結合する場合、それらは同じかまたは異なる分子であることができる。一般的に、誘導体化に使用するポリマーの数及び／または種類は、限定されないが、向上させるべき抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が特定の条件下で治療に使用されるのかなどを考慮しながら決定することができる。

【0243】

いくつかの実施形態では、放射線への曝露によって選択的に加熱されてもよい抗TIGIT構築物と非タンパク質部分とのコンジュゲートを提供する。いくつかの実施形態では、非タンパク質部分は、カーボンナノチューブである（Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005)）。放射線は、任意の波長であってよいが、限定されないものの、通常の細胞に害を与えないが、抗体-非タンパク質部分の近位細胞が死滅される温度に非タンパク質部分を加熱する波長が含まれる。

【0244】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗TIGIT構築物（例えば、抗TIGIT sdAb、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、抗TIGIT/PD-1二重特異性抗体、抗TIGIT/PD-L1二重特異性抗体、または抗TIGIT MABP（例えば、BABP））は、1つ以上の生物学的に活性なタンパク質、ポリペプチドまたはその断片を含むようにさらに改変されてもよい。「生物活性」または「生物学的に活性な」は、本明細書で交換可能に使用する場合、具体的な機能を実行するために体内で生物学的活性を示すことを意味する。例えば、それは、特定の生体分子、例えば、タンパク質、DNAなどとの組み合わせ、次いで、そのような生体分子の活性の促進または阻害を意味し得る。いくつかの実施形態では、生物活性タンパク質またはその断片には、疾患もしくは状態の予防または治療のための活性薬物として患者に投与されるタンパク質及びポリペプチド、ならびに診断目的に使用されるタンパク質及びポリペプチド、例えば、診断検査またはインビトロアッセイで使用される酵素、ならびに疾患を予防するために患者に投与されるタンパク質及びポリペプチド、例えば、ワクチンが含まれる。いくつかの実施形態では、生物活性タンパク質またはその断片は、免疫刺激／免疫調節、膜輸送、または酵素活性を有する。いくつかの実施形態では、生物学的に活性なタンパク質、ポリペプチドまたはその断片は、酵素、ホルモン、成長因子、サイトカイン、またはこれらの混合物である。いくつかの実施形態では、生物学的に活性なタンパク質、ポリペプチドまたは断片は、標的ペプチド（例えば、抗原または他のタンパク質）を特異的に認識すること

ができる。

【0245】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT構築物内に含まれ得る生物活性タンパク質またはその断片は、タンパク質結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT構築物内に含まれ得る生物活性タンパク質またはその断片は、抗体によく似ている、抗原結合ドメインを含む小さな操作されたタンパク質である抗体模倣物である（Geering and Fussenegger, Trends Biotechnol., 33 (2) : 65-79, 2015）。これらの分子は、既存のヒト足場タンパク質に由来し、単一ポリペプチドを含む。本明細書に記載の抗TIGIT構築物内に含まれ得る例示的な抗体模倣物は、限定されないが、設計されたアンキリンリピートタンパク質（DARPin; N末端及びC末端Capドメインが隣接する3〜5の完全合成アンキリンリピートを含む）、アビディティマルチマー（アビマー; 複数のAドメインを含む高親和性タンパク質、各ドメインは、標的に対する親和性が低い）、またはアンチカリン（4つのアクセス可能なループを有するリポカリンの足場に基づく、各々の配列は、無作為化され得る）であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT構築物内に含まれ得る生物活性タンパク質またはその断片は、アルマジロリピート単位（約40残基長の特徴的な繰返しアミノ酸配列）を含むアルマジロリピートタンパク質（例えば、 β -カテニン、 α -インポーチン、プラコグロビン、大腸腺腫様性ポリポーシス（APC））である。各アルマジロリピートは、ヘアピン構造を形成する一対のアルファヘリックスからなる。リピート形態の複数コピーは、アルファソレノイド構造として知られるものである。アルマジロリピートタンパク質は、特定の保存された側鎖を必要とせずに、またはペプチドの遊離N末端またはC末端との相互作用せずに、ペプチド骨格の結合の一定の方法に依存して、異なるタイプのペプチドに結合することができる。リピートタンパク質の固有のモジュール性と組み合わせた、残基によるペプチド残基の認識の可能性により、アルマジロリピートタンパク質は、ペプチド結合に対する一般的な足場の設計の有望な候補になる。

【0246】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT構築物内に含まれ得る生物学的に活性なタンパク質またはその断片は、リガンド、例えば、特定の細胞受容体と相互作用するリンホカイン及び細胞因子である。リンホカインは、抗原またはレクチンがT細胞の増殖を刺激する場合にT細胞により分泌される低分子タンパク質である。

【0247】

III. 医薬組成物

本明細書に記載されるようにTIGITを特異的に認識するsdAbを含む抗TIGIT構築物のいずれか1つ（例えば、抗TIGIT sdAb、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、抗TIGIT/PD-1二重特異性抗体（例えば、PD-1×TIGIT BAP）、または抗TIGIT/PD-L1二重特異性抗体（例えば、PD-L1×TIGIT BAP））、及び適宜、薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物が本発明でさらに提供される。医薬組成物は、所望の純度を有する本明細書に記載の抗TIGIT構築物を、薬学的に許容可能な担体、賦形剤、または安定剤と適宜混合することにより（Remington's Pharmaceutical sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製することができる。

【0248】

医薬組成物は、安定的であることが好ましく、その中で、本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む抗TIGIT構築物は、その物理的及び化学的安定性ならびに保管時の完全性を本質的に保持する。安定性は、選択された温度で選択された期間、測定することができる。迅速スクリーニングの場合、製剤を2週間から1ヵ月間40℃で保持し、その間安定性を測定する。製剤が2〜8℃で保管される場合、一般的には、製剤は30℃または40℃で少なくとも1ヵ月間安定的であるべきであり、及び／または2〜8℃で

は少なくとも2年間安定的であるべきである。製剤が30℃で保管される場合、一般的には、製剤は30℃で少なくとも2年間安定的であるべきであり、及び／または40℃では少なくとも6ヵ月間安定的であるべきである。例えば、保管中の凝集の程度は、タンパク質安定性の指標として使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT構築物の安定製剤は、製剤中に凝集体として存在する約10%未満（好ましくは、約5%未満）の抗TIGIT構築物を含み得る。

【0249】

許容される担体、賦形剤、または安定剤は、用いる投与量及び濃度ではレシピエントに対して無毒性であり、緩衝液、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE、異性重亜硫酸ナトリウムを含む抗酸化剤；防腐剤、等張剤（例えば、塩化ナトリウム）、安定剤、金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；EDTAなどのキレート剤、及び／または非イオン性界面活性剤を含む。

【0250】

生理学的に許容可能な担体の例としては、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例として、Zn-タンパク質錯体）；及び／またはTWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（登録商標）またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン界面活性剤が挙げられる。

【0251】

治療効果を最適化する範囲にpHを制御するために緩衝剤が使用され、特に安定性がpH依存である場合に使用される。緩衝剤は、好ましくは、約50mM～約250mMの範囲の濃度で存在する。本発明で使用するための適当な緩衝剤は、有機酸及び無機酸の両方ならびにその塩を含む。例えば、クエン酸、リン酸、コハク酸、酒石酸、フマル酸、グルコン酸、シュウ酸、乳酸、酢酸である。さらに、緩衝剤は、ヒスチジン及びトリメチルアミン塩を含み得、例えば、Trisである。

【0252】

保存料は微生物の増殖を遅らせるために添加され、典型的には、0.2%～1.0%（w/v）の範囲で存在する。保存料の添加は、例えば、複数回使用（複数回投与）製剤の生産を容易にし得る。本発明での使用に適当な保存料には、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；ベンザルコニウムハロゲン化合物（例えば、塩化物、臭化物、ヨウ化物）、塩化ベンゼトニウム；チメロサル、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾールが含まれる。

【0253】

「安定剤」としても知られる等張化剤は、組成物中の液体の緊張性を調節または維持するために存在する。タンパク質や抗体などの大きな荷電生体分子と共に用いる場合、それらは、アミノ酸側鎖の荷電基と相互作用して分子内及び分子間相互作用の潜在性を減少させることができるため、しばしば「安定剤」と称される。等張化剤は、他の成分との相対的な量を考慮して、0.1重量%～25重量%、好ましくは1%～5%の間の任意の量で存在し得る。好ましい等張化剤には、多価糖アルコール、好ましくは、三水素またはより

10

20

30

40

50

高い糖アルコール、例えば、グリセリン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトールが含まれる。

【0254】

さらなる賦形剤には、以下のものの1つ以上として機能し得る薬剤が含まれる：(1) 充填剤、(2) 溶解亢進剤、(3) 安定剤、及び(4) 変性や容器壁への付着を防止する作用剤。そのような賦形剤は、多価糖アルコール（上に列挙）；アミノ酸、例えば、アラニン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、リジン、オルニチン、ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニンなど；有機糖または糖アルコール、例えば、スクロース、ラクトース、ラクチトール、トレハロース、スタキオース、マンノース、ソルボース、キシロース、リボース、リビトール、ミオイノシトース、ミオイノシトール、ガラクトース、ガラクトチトール、グリセロール、シクリトール（例えば、イノシトール）、ポリエチレングリコール；硫黄含有還元剤、例えば、尿素、グルタチオン、チオクト酸、ナトリウムチオグリコール酸塩、チオグリセロール、 α -モノチオグリセロール及びナトリウムチオ硫酸塩；低分子量タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチンまたは他の免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；単糖類（例えば、キシロース、マンノース、フルクトース、ブドウ糖）；二糖類（例えば、ラクトース、マルトース、スクロース）；三糖類、例えば、ラフィノース；及び多糖類、例えば、デキストリンまたはデキストランが含まれる。

【0255】

非イオン性界面活性剤または洗剤（「湿潤剤」としても公知）が存在し、治療用薬剤を安定化させ、ならびに、攪拌誘導性の凝集に対して治療用タンパク質を保護することを助け、それは、また、活性な治療用タンパク質または抗体の変性を引き起こすことなく、製剤が剪断表面ストレスに対して暴露されることを許す。非イオン性界面活性剤は、約0.05mg/ml〜約1.0mg/ml、好ましくは、約0.07mg/ml〜約0.2mg/mlの範囲で存在する。

【0256】

適当な非イオン性界面活性剤には、ポリソルベート（20、40、60、65、80など）、ポロキサマー（184、188など）、PLURONIC（登録商標）ポリオール、TRITON（登録商標）、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル（TWEEN（登録商標）-20、TWEEN（登録商標）-80など）、ラウロマクロゴール400、ステアリン酸ポリオキシシル40、ポリオキシエチレン水素化カスター油10、50、及び60、グリセロールモノステアレート、スクロース脂肪性酸エステル、メチルセルロース、及びカルボキシメチルセルロースが含まれる。使用することができる陰イオン性洗剤は、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルソジウムスルホサキシネート、及びジオクチルソジウムスルホネートを含む。陽イオン性洗剤は、ベンザルコニウムクロリドまたはベンゼトニウムクロリドを含む。

【0257】

医薬組成物をインビボでの投与のために使用するために、それらは無菌でなければならない。医薬組成物を、無菌ろ過膜を通じたる過により無菌にしてもよい。本明細書における医薬組成物は、一般的に、無菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射針により穴を開けることができるストッパーを有する静脈用溶液のバッグまたはバイアル中に置く。

【0258】

投与経路は、公知の受け入れられた方法に従って、例えば、適した様式での長期間にわたる単回または複数回のボーラスまたは注入、例えば、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、病巣内、または関節内経路による注射または注入、局所投与、吸入あるいは持続放出または延長放出の手段による。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、局所投与、例えば、腫瘍内に投与される。

【0259】

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の適当な例としては、アンタゴニストを

含む固体疎水性重合体の半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、フィルムまたはマイクロカプセルなどの成形品の形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２-ヒドロキシエチルメタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー、例えば、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注入可能なミクロスフィア）、及びポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【0260】

ここで、医薬組成物は、治療される特定の効能に必要な1つ以上の活性化合物、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含有し得る。あるいは、またはさらに、組成物は、細胞毒性剤、化学療法剤、サイトカイン、免疫抑制剤、または成長阻害剤を含み得る。そのような分子は、好適には、意図した目的に有効な量で組み合わせて存在する。

【0261】

また、活性成分は、例えば、コアセルベーション技術または界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロ乳剤、ナノ粒子及びナノカプセル）またはマクロ乳剤に捕捉することができる。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th editionに開示されている。

【0262】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、単回使用のバイアル、例えば、単回使用の密封バイアル中に含まれる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、複数回使用のバイアル中に含まれる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、容器中に大量に含まれる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、凍結保存される。

【0263】

IV. TIGIT関連疾患の治療方法

本明細書に記載されるようにTIGITを特異的に認識するs d A b部分を含む抗TIGIT構築物（例えば、抗TIGIT s d A b、抗TIGIT s d A b-Fc融合タンパク質、抗TIGIT/PD-1二重特異性抗体（例えば、PD-1×TIGIT B A B P）、または抗TIGIT/PD-L1二重特異性抗体（例えば、PD-L1×TIGIT B A B P））、及びその組成物（例えば、医薬組成物）は、種々の用途、例えば、診断、分子アッセイ、及び治療において有用である。

【0264】

本発明の一態様は、本明細書に記載の抗TIGIT構築物を含む医薬組成物の有効量を個体に投与することを含む、それを必要とする個体におけるTIGIT関連疾患もしくは状態の治療方法を提供する。いくつかの実施形態では、TIGIT関連疾患は、がんである。いくつかの実施形態では、TIGIT関連疾患は、病原性感染、例えば、ウイルス感染である。いくつかの実施形態では、TIGIT関連疾患は、免疫関連疾患である。いくつかの実施形態では、免疫関連疾患は、T細胞機能不全障害と関連する。いくつかの実施形態では、T細胞機能不全障害は、T細胞消耗によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、免疫関連疾患は、未解明な急性感染、慢性感染、及び腫瘍免疫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗TIGIT構築物は、それを必要とする対象における免疫応答または機能の増加、増強、または刺激に使用され得る。いくつかの実施形態では、TIGIT関連疾患（例えば、がん、免疫関連疾患）は、PD-1またはPD-L1遮断に部分的な耐性を示す（例えば、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体治療に部分的な耐性を示す）。

【0265】

本発明は、一部、少なくともいくつかの態様では、薬学的に許容可能な担体または賦形剤と一緒に、単体または別の治療法と任意の組み合わせのいずれかで投与することができる、タンパク質構築物（例えば、抗TIGIT sdAb、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、抗TIGIT/PD-1二重特異性抗体（例えば、PD-1×TIGIT BABP）、または抗TIGIT/PD-L1二重特異性抗体（例えば、PD-L1×TIGIT BABP））、核酸分子及び／またはそれをコードするベクター、核酸分子及び／またはそれをコードするベクターを含む宿主細胞を企図している。いくつかの実施形態では、抗TIGIT構築物の投与前に、それらは、当該技術分野で周知の適当な医薬担体及び賦形剤と組み合わせてもよい。本開示に従って調製された組成物は、がんの治療またはがんの悪化の遅延、または、それを必要とする対象における免疫応答または機能の増加、増強、または刺激に使用することができる。

【0266】

いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む単離抗TIGIT構築物（例えば、抗TIGIT sdAb、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、抗TIGIT/PD-1二重特異性抗体（例えば、PD-1×TIGIT BABP）、または抗TIGIT/PD-L1二重特異性抗体（例えば、PD-L1×TIGIT BABP））を含む医薬組成物の有効量を個体に投与することを含む、TIGIT関連疾患（例えば、がん、免疫関連疾患、例えば、T細胞機能不全障害と関連するもの）の治療方法であって、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び適宜薬学的に許容可能な担体を含む、TIGIT関連疾患の治療方法を提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合の K_d は、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-12}M$ （例えば、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、または約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-12}M$ ）である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、TIGIT関連疾患は、がんである。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍（例えば、大腸がん）である。いくつかの実施形態では、TIGIT関連疾患は、免疫関連疾患である。いくつかの実施形態では、免疫関連疾患は、T細胞機能不全障害と関連する。いくつかの実施形態では、T細胞機能不全障害は、T細胞消耗によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、免疫関連疾患は、未解明な急性感染、慢性感染、及び腫瘍免疫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TIGIT関連疾患（例えば、がん、免疫関連疾患）は、PD-1またはPD-L1遮断に部分的な耐性を示す（例えば、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体治療に部分的な耐性を示す）。いくつかの実施形態では、方法は、追加の療法（例えば、がん療法、例えば、外科手術、放射線、化学療法、免疫療法、ホルモン療法、またはそれらの組み合わせ）を個体に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、追加の療法は、例えば、免疫調節薬を含む第2の医薬組成物の有効量を個体に投与することによる免疫療法である。いくつかの実施形態では、免疫調節薬は、免疫チェックポイント阻害薬、例えば、抗PD-1または抗PD-L1抗体である。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、全身投与される（例えば、静脈内または腹腔内）。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、局所投与される（例えば、腫瘍内）。いくつかの実施形態では、個体は、ヒトである。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

では、がんの治療方法は、以下の生物学的活性：（１）がん細胞の死滅（バースタンダー死滅を含む）；（２）がん細胞の増殖の阻害；（３）腫瘍における免疫応答の誘導；（４）腫瘍サイズの減少；（５）がんを有する個体における１つ以上の症状の軽減；（６）腫瘍転移の阻害；（７）生存の延長；（８）がんの進行までの時間の延長；及び（９）がんの再発の可能性の防止、阻害、または低減の１つ以上を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物によって仲介されるがん細胞の死滅方法は、少なくとも約４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、またはそれ以上のいずれかの腫瘍細胞死率を達成することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物によって仲介されるがん細胞の死滅方法は、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、またはそれ以上のいずれかの（抗ＴＩＧＩＴ構築物をコードする腫瘍溶解度ＶＶによって非感染な）バースタンダー腫瘍細胞死率を達成することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物によって仲介される腫瘍サイズの減少方法腫瘍サイズの少なくとも約１０％（例えば、少なくとも約２０％、３０％、４０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％のいずれか）を減らすことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物によって仲介される腫瘍転移の阻害方法は、転移の少なくとも約１０％（例えば、少なくとも約２０％、３０％、４０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％のいずれか）を阻害することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物によって仲介される個体（例えば、ヒト）の生存の延長方法は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１８、または２４ヵ月のいずれかまで個体の生存率を延ばすことができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物によって仲介されるがんの進行までの時間の延長方法は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２週間のいずれかまでがんの進行までの時間を延ばすことができる。いくつかの実施形態では、免疫関連疾患の治療方法は、対象における免疫応答または機能の増加、増強、または刺激することができる。いくつかの実施形態では、免疫応答または機能は、対象におけるエフェクター細胞（例えば、Ｔ細胞、例えば、ＣＤ８＋及び／またはＣＤ４＋Ｔ細胞）を活性化する、エフェクター細胞集団を拡張する（増加させる）、及び／または（例えば、標的腫瘍細胞）を死滅させることによって増加、増強、または刺激することができる。いくつかの実施形態では、個体におけるＣＤ４及び／またはＣＤ８　Ｔ細胞は、本明細書に記載の抗ＴＩＧＩＴ構築物を含む医薬組成物の投与前と比べて、プライミング、活性化、増殖、サイトカイン放出、及び／または細胞溶解活性を増加または増強している。いくつかの実施形態では、ＣＤ４及び／またはＣＤ８　Ｔ細胞の数は、本明細書に記載の抗ＴＩＧＩＴ構築物を含む医薬組成物の投与前と比べて上昇している。いくつかの実施形態では、活性化ＣＤ４及び／またはＣＤ８　Ｔ細胞の数は、本明細書に記載の抗ＴＩＧＩＴ構築物を含む医薬組成物と比べて上昇している。いくつかの実施形態では、活性化ＣＤ４及び／またはＣＤ８　Ｔ細胞は、 γ -ＩＦＮ⁺産生ＣＤ４及び／またはＣＤ８　Ｔ細胞、及び／または本明細書に記載の抗ＴＩＧＩＴ構築物を含む医薬組成物の投与前と比べて増強された細胞溶解活性を特徴とする。いくつかの実施形態では、ＣＤ４及び／またはＣＤ８　Ｔ細胞は、ＩＦＮ- γ 、ＴＮＦ- α 、及びインターロイキンからなる群から選択されるサイトカインの放出の増加を呈する。本発明の方法のいくつかの実施形態では、ＣＤ４及び／またはＣＤ８　Ｔ細胞は、エフェクターメモリーＴ細胞である。いくつかの実施形態では、ＣＤ４及び／またはＣＤ８エフェクターメモリーＴ細胞は、 γ -ＩＦＮ⁺産生ＣＤ４及び／またはＣＤ８

Ｔ細胞、及び／または増強された細胞溶解活性を特徴とする。いくつかの実施形態では、ＣＤ４及び／またはＣＤ８エフェクターメモリーＴ細胞は、ＣＤ４４^{high}ＣＤ６２^{low}の発現を有することを特徴とする。いくつかの実施形態では、がんは、Ｔ細胞浸潤レベルが上昇している。

【０２６７】

本明細書に記載の方法は、固形がん及び液体がんの両方を含む、種々のがんの治療に相当である。方法は、早期がん、非転移性がん、原発性がん、進行がん、局所進行がん、転

10

20

30

40

50

移行がん、または寛解のがんを含む、全てのステージのがんに適用可能である。本明細書に記載の方法は、アジュバント設定またはネオアジュバント設定において、第1の療法、第2の療法、第3の療法、または当該技術分野で公知の他の種類のがん治療、例えば、化学療法、外科手術、ホルモン療法、放射線、遺伝子療法、免疫療法（例えば、T細胞療法、または免疫調節薬の投与）、骨髄移植、幹細胞移植、標的治療、凍結療法、超音波療法、光線力学療法、ラジオ波焼灼療法などとの併用療法として使用され得る（すなわち、方法は、一次／根治治療の前に実施してもよい）。いくつかの実施形態では、方法を用いて、以前に治療されている個体を治療する。いくつかの実施形態では、がんは、前治療に無効であった。いくつかの実施形態では、方法を用いて、以前に治療されていない個体を治療する。いくつかの実施形態では、がんは、PD-1またはPD-L1遮断に部分的な耐性を示す（例えば、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体治療に部分的な耐性を示す）。

10

【0268】

いくつかの実施形態では、方法は、異常なTIGIT発現、活性、及び／またはシグナリングを有するがん（非限定的な例としては、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞がん、結腸直腸がん、卵巣がん、乳がん、膵臓がん、胃がん、膀胱がん、食道がん、中皮腫、黒色腫、頭頸部がん、甲状腺がん、肉腫、前立腺がん、膠芽腫、子宮頸がん、胸腺がん、白血病、リンパ腫、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫（MM））、菌状息肉腫、メルケル細胞がん、及び血液悪性腫瘍が挙げられる）の治療に适当である。

【0269】

従って、いくつかの実施形態では、TIGITを特異的に認識するsdAb部分を含む単離抗TIGIT構築物（例えば、抗TIGIT sdAb、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、抗TIGIT/PD-1二重特異性抗体（例えば、PD-1×TIGIT B A B P）、または抗TIGIT/PD-L1二重特異性抗体（例えば、PD-L1×TIGIT B A B P））を含む医薬組成物の有効量を個体に投与することを含む、免疫療法応答性固形腫瘍（例えば、がん腫または腺がん、例えば、異常なTIGIT発現、活性、及び／またはシグナリングを有するがん）の治療方法であって、sdAb部分は、配列番号36～42、54、56～59、63、65～67、69～70のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR1、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；配列番号106～112、124、126～129、133、135～137、139～140のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR2、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び配列番号176～182、194、196～199、203、205～207、209～210のいずれか1つのアミノ酸配列を含むCDR3、または最大で約3つ（例えば、約1、2、または3のいずれか）のアミノ酸置換を含むその変異体；及び適宜薬学的に許容可能な担体を含む、治療方法を提供する。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分とTIGITの間の結合の K_d は、約 10^{-5} M～約 10^{-12} M（例えば、約 10^{-7} M～約 10^{-12} M、または約 10^{-8} M～約 10^{-12} M）である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、ラクダ、キメラ、ヒト、部分ヒト化、または完全ヒト化である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT sdAb部分は、配列番号253～259、271、273～276、280、282～284、286～287のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV_HHドメインを含む。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍（例えば、大腸がん）である。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、全身投与される（例えば、静脈内または腹腔内）。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、局所投与される（例えば、腫瘍内）。いくつかの実施形態では、方法は、追加のがん療法（例えば、外科手術、放射線、化学療法、免疫療法、ホルモン療法、またはそれらの組み合わせ）を個体に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、追加の療法は、例えば、抗PD-1または抗PD-L1抗体などの免疫調節薬を含む第2の医薬組成物の有効量を個体に投与することによる免疫療法である。いくつかの実施形態では、個体は、ヒトである。いくつかの実施形態では、免疫療法応答性固形腫瘍は、PD-1またはPD-L1遮断に部分的な耐性を示す（例えば、抗PD-1抗

20

30

40

50

体または抗PD-L1抗体治療に部分的な耐性を示す)。

【0270】

いくつかの実施形態では、方法は、異常なPD-1またはPD-L1/PD-L2発現、活性、及び/またはシグナリングを有するがん(非限定的な例としては、血液がん及び/または固形腫瘍が挙げられる)の治療に相当である。本発明の抗体を使用して増殖が阻害され得るいくつかのがんは、一般的に、免疫療法に応答するがんを含む。治療のための他のがんの非限定的な例としては、黒色腫(例えば、転移性悪性黒色腫)、腎臓がん(例えば、明細胞がん腫)、前立腺がん(例えば、ホルモン抵抗性前立腺がん)、乳がん、大腸がん及び肺がん(例えば、非小細胞性肺がん)が挙げられる。さらに、本発明は、本発明の抗体を使用して増殖が阻害され得る難治性または再発性悪性腫瘍を含む。本発明の方法を使用して治療し得る他のがんの例としては、骨がん、脾臓がん、皮膚がん、頭部または頸部のがん、皮膚または眼内の悪性黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃がん、精巣がん、子宮がん、卵管のがん腫、子宮内膜のがん腫、子宮頸のがん腫、膣のがん腫、外陰のがん腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、軟組織の肉腫、尿道のがん、陰茎のがん、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病を含む慢性または急性白血病、幼児期の固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱のがん、腎臓または尿管のがん、腎盂のがん腫、中枢神経系(CNS)の新生物、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管形成、脊椎腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮がん、扁平上皮がん、T細胞リンパ腫、アスベストにより誘導されるがんを含む環境的に誘導されるがん、及び前記がんの組み合わせが挙げられる。本発明は、転移性がん、特に、PD-L1を発現する転移性がんの治療にも有用である(Iwai et al. (2005) Int. Immunol. 17:133-144)。いくつかの実施形態では、異常なPD-1またはPD-L1/PD-L2発現、活性、及び/またはシグナリングを有するがんは、PD-1またはPD-L1遮断に部分的な耐性を示す(例えば、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体治療に部分的な耐性を示す)。

【0271】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、大腸がん、例えば、腺がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、平滑筋肉腫、黒色腫、または扁平上皮細胞がん腫の治療に相当である。

【0272】

本出願の医薬組成物の投与量及び所望の薬物濃度は、想定される特定用途に応じて変わり得る。適切な投与量または投与経路の決定は、当業者の能力の十分に範囲内である。動物実験は、ヒトの治療に対する有効量の決定において、信頼性のあるガイダンスを提供する。有効量の外挿は、Mordenti, J. and Chappell, W. 「The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics」, In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-46に著される原則に従って実施することができる。

【0273】

本明細書に記載の抗TIGIT sdAb部分を含む抗TIGIT構築物(例えば、抗TIGIT sdAb、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、抗TIGIT/PD-1二重特異性抗体(例えば、PD-1×TIGIT BABP)、または抗TIGIT/PD-L1二重特異性抗体(例えば、PD-L1×TIGIT BABP))のインビボでの投与を使用する場合、通常の投与量は、投与経路に依存して、1日当たり約10 ng/kg~約100 mg/kg(哺乳動物の体重)またはそれ以上、好ましくは、約1 mg/kg/日~10 mg/kg/日、例えば、約1~3 mg/kg/日、約2~4 mg/kg/日、約3~5 mg/kg/日、約4~6 mg/kg/日、約5~7 mg/kg/日、約6~8 mg/kg/日、約6~6.5 mg/kg/日、約6.5~7 mg/kg/日、

日、約7～9 mg/kg/日、または約8～10 mg/kg/日まで変動し得る。異なる製剤が異なる治療及び異なる疾患に有効であり、特定の器官または組織の治療に意図された投与が、別の器官または組織とは異なる方法での送達を必要とし得ることは、本出願の範囲内である。さらに、投与量を、1回または複数回の別々の投与によって、または持続的注入によって投与してもよい。数日以上にわたる繰り返し投与において、その状態に応じて、疾患症状の所望される抑制が生じるまで、治療を継続する。しかしながら、他の投与計画が有用であってよい。治療の進行は、従来技術及びアッセイによって容易にモニタリングされる。

【0274】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、単回で投与される（例えば、ボラス注射）。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、複数回で投与される（例えば、2回、3回、4回、5回、6回、またはそれ以上の回数のいずれか）。複数回投与する場合、同じまたは異なる経路で行ってもよく、同じ部位または代替部位で行ってもよい。医薬組成物は、週2回、週3回、週4回、週5回、毎日、休み無く毎日、週1回、休み無く毎週、2週間に1回、3週間に1回、1カ月に1回、2カ月に1回、3カ月に1回、4カ月に1回、5カ月に1回、6カ月に1回、7カ月に1回、8カ月に1回、9カ月に1回、10カ月に1回、11カ月に1回、または1年に1回投与してもよい。投与間隔は、約24時間～48時間、2日～3日、3日～5日、5日～1週間、1週間～2週間、2週間～1ヵ月、1ヵ月～2ヵ月、2ヵ月～3ヵ月、3ヵ月～6ヵ月、または6ヵ月～1年のいずれか1つであってもよい。間隔は、不規則であってもよい（例えば、腫瘍進行後）。いくつかの実施形態では、投与スケジュール中に休みはない。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、4日ごとに4回投与される。特定の患者に対する最適な投与量及び治療計画は、疾患の兆候について患者をモニタリングし、それに応じて治療を調整することによって、医療分野における当業者によって容易に決定できる。

【0275】

再溶解製剤または液体製剤などが挙げられるが、これらに限定されない本出願の医薬組成物は、本明細書に記載の抗TIGIT構築物（例えば、抗TIGIT sdAb、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、抗TIGIT/PD-1二重特異性抗体（例えば、PD-1×TIGIT BABP）、または抗TIGIT/PD-L1二重特異性抗体（例えば、PD-L1×TIGIT BABP））による治療を必要とする個体、好ましくはヒトに、既知の方法、例えば、単回または一定時間にわたる持続的注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、静脈内（i.v.）、関節内、滑液内、髄腔内、経口、局所、または吸入経路によって投与される。再溶解製剤は、本明細書に記載の凍結乾燥した抗TIGIT構築物を、タンパク質が全体に分散されるように希釈剤中に溶解させることによって調製することができる。本出願での使用に適当な例示的な薬学的に許容可能な（ヒトへの投与について安全かつ非毒性な）希釈剤としては、滅菌水、静菌性注射用水（BWF I）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝食塩水）、無菌生理食塩液、リンゲル液、またはデキストロース溶液、または塩及び/または緩衝剤の水溶液が挙げられるが、これらに限定されない。

【0276】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、皮下（すなわち、皮膚の下）投与により個体に投与される。そのような目的のために、医薬組成物は、シリンジを使用して注射してもよい。しかしながら、医薬組成物の投与のための他のデバイス、例えば、注射デバイス；インジェクターペン；オートインジェクターデバイス、無針デバイス；及び皮下パッチ送達システムが利用可能である。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、個体の静脈内に投与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、点滴静注などの注入によって個体に投与される。

【0277】

V. 調製方法

本明細書に記載の抗TIGIT構築物（例えば、抗TIGIT sdAb、抗TIGIT

10

20

30

40

50

s d A b - F c 融合タンパク質、抗 T I G I T / P D - 1 二重特異性抗体（例えば、P D - 1 × T I G I T B A B P）、または抗 T I G I T / P D - L 1 二重特異性抗体（例えば、P D - L 1 × T I G I T B A B P）は、当該技術分野で公知の任意の方法を用いて、または本明細書に記載されるように調製され得る。実施例 1、2、4 及び 6 も参照されたい。いくつかの実施形態では、（a）コードされた抗 T I G I T 構築物の発現に効果的な条件下で本明細書に記載の抗 T I G I T 構築物をコードする単離核酸またはベクターを含むの宿主細胞を培養すること；及び（b）発現された抗 T I G I T 構築物を前記宿主細胞から得ることを含む、抗 T I G I T 構築物の産生方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、（a）本明細書に記載の抗 T I G I T 構築物をコードする単離核酸またはベクターを含む宿主細胞を産生する工程をさらに含む。

10

【0278】

s d A b の調製方法は記載されている。例えば、E l s P a r d o n e t a l . , N a t u r e P r o t o c o l , 2 0 1 4 ; 9 (3) : 6 7 4 を参照されたい。s d A b（例えば、V_HH）は、当該技術分野で公知の方法、例えば、ラクダ科の種（例えば、ラクダまたはラマ）を免疫化して、それからハイブリドーマを得ることによって、または当該技術分野で公知の分子生物学技術を用いて単一ドメイン抗体のライブラリーをクローニングして、未選択ライブラリーの個別クローンによる E L I S A によるその後の選択によって、またはファージディスプレイを用いることによって得られ得る。

【0279】

s d A b の組み換え産生の場合、単一ドメイン抗体をコードする核酸を単離し、複製可能なベクターに挿入し、さらにクローニング（DNA の増幅）または発現させる。単一ドメイン抗体をコードする DNA は、従来の手順を用いて（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて）容易に単離され、配列決定される。多くのベクターが入手可能である。ベクターの選択は、使用される宿主細胞に部分的に依存する。一般的に、好ましい宿主細胞は、原核生物または真核生物（一般的に、哺乳動物）起源のいずれかのものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗 T I G I T 構築物をコードする単離核酸は、配列番号 2 4 6 ~ 2 5 2 のいずれか 1 つの核酸配列を含む。

20

【0280】

1. 原核細胞における組み換え産生

30

a) ベクター構築

本出願の抗体をコードするポリ核酸配列は、標準的な組み換え技術を使用して得ることができる。所望のポリ核酸配列は、抗体産生細胞、例えば、ハイブリドーマ細胞から単離し、配列決定してもよい。あるいは、ポリヌクレオチドをヌクレオチドシンセサイザーまたは P C R 技術を使用して合成することができる。一旦得られると、ポリペプチドをコードする配列を、原核生物宿主において異種ポリヌクレオチドを複製及び発現することができる組み換えベクター中に挿入する。当該技術分野において利用可能で公知の多くのベクターを、本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、ベクター中に挿入される核酸のサイズ及びそのベクターを用いて形質転換される特定の宿主細胞に主に依存するであろう。各ベクターは、その機能（異種ポリヌクレオチドの増幅または発現、あるいは両方）及びそれが存在する特定の宿主細胞とのその適合性に依存して、種々の成分を含む。ベクター成分は、一般的に、限定はされないが、以下：複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボゾーム結合部位（R B S）、シグナル配列、異種核酸挿入、及び転写終結配列を含む。

40

【0281】

一般的に、宿主細胞と適合する種に由来するレプリコン配列及び制御配列を含むプラスミドベクターを、これらの宿主に関連して使用する。ベクターは、通常、複製部位、ならびに形質転換細胞において表現型選択を提供することができる標識配列を持つ。

【0282】

また、宿主微生物と適合するレプリコン配列及び制御配列を含むファージベクターを、

50

これらの宿主に関連して形質転換ベクターとして使用することができる。例えば、バクテリオファージ（例えば、GEM（商標）-11など）を、感受性宿主細胞（例えば、E. coli LE392など）を形質転換するために使用することができる組み換えベクターを作製する際に利用してもよい。

【0283】

本出願の発現ベクターは、ポリペプチド成分の各々をコードする2つ以上のプロモーター-シストロン対を含み得る。プロモーターは、その発現を調節するシストロンの上流（5'）に位置付けられる非翻訳調節配列である。原核生物プロモーターは、典型的には、2つのクラス（誘導的及び恒常的）に分類される。誘導的プロモーターは、培養条件における変化（例えば、栄養分の存在もしくは非存在または温度における変化）に応答したその制御下での増加レベルのシストロンの転写を開始するプロモーターである。

【0284】

種々の潜在的な宿主細胞により認識される多数のプロモーターが、周知である。選択されたプロモーターを、制限酵素消化を介した供給源DNAからプロモーターを除去し、単離したプロモーター配列を本発明のベクター中に挿入することにより、軽鎖または重鎖をコードするシストロンDNAに機能的に連結することができる。天然プロモーター配列及び多くの異種プロモーターの両方を使用し、標的遺伝子の増幅及び／または発現に向けてもよい。いくつかの実施形態では、異種プロモーターを利用する。なぜなら、それらは、一般的に、天然標的ポリペプチドプロモーターと比較して、発現された標的遺伝子のより大きな転写及びより高い産出を許すからである。

【0285】

原核生物宿主との使用のために適したプロモーターは、PhoAプロモーター、ガラクトマーゼ及びラクトースプロモーターシステム、トリプトファン（trp）プロモーターシステム、及びハイブリッドプロモーター（例えば、tacまたはtrcプロモーターなど）を含む。しかしながら、細菌において機能的である他のプロモーター（例えば、他の公知の細菌またはファージのプロモーターなど）も適している。それらのヌクレオチド配列が発表されており、それにより当業者が、それらを、標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロン（Siebenlist et al. (1980) Cell 20:269）に、任意の要求される制限部位を供給するためのリンカーまたはアダプターを使用して機能的に連結することが可能になる。

【0286】

一態様では、組み換えベクター内の各シストロンは、発現されたポリペプチドの膜を横断する直接的な転位に向ける分泌シグナル配列成分を含む。一般的に、シグナル配列は、ベクターの成分であり得る、または、それは、ベクター中に挿入される標的ポリペプチドDNAの一部であり得る。本発明の目的のために選択されるシグナル配列は、宿主細胞により認識され、処理される（すなわち、シグナルペプチダーゼにより切断される）ものでなければならない。異種ポリペプチドに対して天然であるシグナル配列を認識し、処理しない原核生物宿主細胞について、シグナル配列が、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ipp、または熱安定エンテロトキシンII（STII）リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpA、及びMBPからなる群より選択される原核生物シグナル配列により置換される。本出願のいくつかの実施形態では、発現系の両シストロンにおいて使用されるシグナル配列は、STIIシグナル配列またはその変異体である。

【0287】

いくつかの実施形態では、本出願による抗TIGIT構築物の産生は、宿主細胞の細胞質中で起こり得るが、従って、各シストロン内に分泌シグナル配列の存在は要求されない。いくつかの実施形態では、ポリペプチド成分、例えば、第1の抗原結合部分に適宜融合した第2の抗原結合部分のV_Hドメインをコードするポリペプチド、及び第1の抗原結合部分に適宜融合した第2の抗原結合部分のV_Lドメインをコードするポリペプチドは、発現され、折り畳まれ、組み立てられて、細胞質内に機能的な抗体が形成される。ある特定の宿主株（例えば、E. coli trxB-株）は、ジスルフィド結合形成に好ましい

細胞質状態を提供し、それにより発現されたタンパク質サブユニットの適切な折り畳み及び組み立てを許す。Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)。

【0288】

本発明は、発現されるポリペプチド成分の定量的比率を、分泌されて適切に組み立てられる本出願の抗体の産出を最大限にするために調節することができる発現系を提供する。そのような調節は、少なくとも部分的に、ポリペプチド成分についての翻訳強度を同時に調節することにより達成される。翻訳強度を調節するための1つの技術が、Simmons et al., 米国特許第5,840,523号に開示される。それは、シストロン内の翻訳開始領域(TIR)の変異体を利用する。所与のTIRについて、一連のアミノ酸または核酸配列変異体を、翻訳強度の範囲を用いて作製することができ、それにより特定の鎖の所望の発現レベルについてこの因子を調整するための便利な手段を提供する。TIR変異体を、アミノ酸配列を変化させることができるコドン変化をもたらす従来の突然変異誘発技術により生成することができるが、核酸配列におけるサイレントな変化が好ましい。TIRにおける変化は、例えば、Shine-Dalgarno配列の数または間隔における変化を、シグナル配列における変化と共に含むことができる。突然変異シグナル配列を生成するための1つの方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変化させない(すなわち、変化がサイレントである)コード配列の開始での「コドンバンク」の生成である。これは、各コドンの3番目のヌクレオチド位置を変化させることにより達成することができる;加えて、いくつかのアミノ酸、例えば、ロイシン、セリン、及びアルギニンなどは、バンクを作製する際に複雑度を加えることができる複数の1番目及び2番目の位置を有する。

【0289】

好ましくは、ベクターの組は、その中の各シストロンについてのTIR強度の範囲を用いて生成する。この限定された組は、各鎖の発現レベルの比較ならびに種々のTIR強度の組み合わせ下の所望のタンパク質産物の産出を提供する。TIR強度を、Simmons et al., 米国特許第5,840,523号に詳細に記載されるレポーター遺伝子の発現レベルを定量化することにより決定することができる。翻訳強度比較に基づき、所望の個々のTIRを選択し、本出願の発現ベクター構築物において組み合わせる。

【0290】

b) 原核生物宿主細胞

本出願の抗体を発現させるために適した原核生物宿主細胞は、古細菌と真正細菌、例えば、グラム陰性またはグラム陽性生物などを含む。有用な細菌の例としては、エシェリキア属(例えば、E. coli)、バシラス属(例えば、B. subtilis)、腸内細菌、シュドモナス属(例えば、P. aeruginosa)、サルモネラ・チフィリウム、セラチア・マルセッセンス、クレブシエラ属、プロテウス属、シゲラ属、根粒菌、ピトレオシラ属、またはパラコッカス属が挙げられる。いくつかの実施形態では、グラム陰性細胞を使用する。いくつかの実施形態では、E. coli細胞を本発明のための宿主として使用する。E. coli株の例としては、W3110株Afhua (AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE) degP41 kan^R (米国特許第5,639,635号)を有する33D3株を含む。他の株及びその誘導体、例えば、E. coli 294(ATCC31,446)、E. coli B、E. coli 1776(ATCC31,537)及びE. coli RV308(ATCC31,608)なども適する。これらの例は、限定的よりも、むしろ説明的である。一般的に、細菌の細胞におけるレプリコンの複製能を考慮に入れて適切な細菌を選択することが必要である。例えば、E. coli、セラチア属、またはサルモネラ属が、周知のプラスミド(例えば、pBR322、pBR325、pACYC177、またはpKN410など)を、レプリコンを供給するために使用する場合、宿主として使用するのに適し得る。

【0291】

典型的には、宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素を分泌すべきであり、追加のプロテアーゼ阻害剤が望ましくは細胞培養に取り込まれ得る。

【0292】

c) タンパク質産生

宿主細胞を上記の発現ベクターを用いて形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適宜改変された従来の栄養培地中で培養する。形質転換は、DNAを原核生物宿主中に導入し、DNAが、染色体外エレメントとしてまたは染色体組み込み体のいずれかとして複製可能であることを意味する。使用する宿主細胞に依存して、形質転換は、そのような細胞に適切である標準的な技術を使用して行う。塩化カルシウムを用いたカルシウム処理は、実質的な細胞壁バリアを含む細菌細胞のために一般的に使用される。形質転換のための別の方法では、ポリエチレングリコール／DMSOを用いる。使用されるさらに別の技術は、エレクトロポレーションである。

10

【0293】

宿主細胞を上記の発現ベクターを用いて形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適宜改変された従来の栄養培地中で培養する。形質転換は、DNAを原核生物宿主中に導入し、DNAが、染色体外エレメントとしてまたは染色体組み込み体のいずれかとして複製可能であることを意味する。使用する宿主細胞に依存して、形質転換は、そのような細胞に適切である標準的な技術を使用して行う。塩化カルシウムを用いたカルシウム処理は、実質的な細胞壁バリアを含む細菌細胞のために一般的に使用される。形質転換のための別の方法では、ポリエチレングリコール／DMSOを用いる。使用されるさらに別の技術は、エレクトロポレーションである。

20

【0294】

本出願の抗体を産生するために使用される原核細胞は、当該技術分野において公知の、選択された宿主細胞の培養に適した培地中で増殖される。適した培地の例としては、Luria培地（LB）+必要な栄養分補給が挙げられる。いくつかの実施形態では、培地はまた、発現ベクターの構築に基づき選択された選択剤を含み、発現ベクターを含む原核細胞の増殖を選択的に許す。例えば、アンピシリンを、アンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖用の培地に加える。

30

【0295】

任意の必要な補給剤（炭素、窒素、及び無機リン酸供給源の他）も、単独でまたは別の補給剤を伴う混合物もしくは培地（例えば、複雑な窒素供給源など）として導入された適切な濃度で含んでもよい。場合により、培養液は、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリスリトール、及びジチオスレイトールからなる群より選択される1つ以上の還元剤を含んでもよい。原核生物宿主細胞に適した温度で培養する。E. coli増殖について、例えば、好ましい温度は、約20℃～約39℃、より好ましくは25℃～約37℃の範囲、さらにより好ましくは30℃である。培地のpHは、主に宿主生物に依存して、約5～約9の範囲の任意のpHであり得る。E. coliについて、pHは、好ましくは約6.8～約7.4、より好ましくは約7.0である。

40

【0296】

誘導性プロモーターを本出願の発現ベクター中で使用する場合、タンパク質発現を、プロモーターの活性化のために適した条件下で誘導する。本出願の一態様では、PhoAプロモーターをポリペプチドの転写を制御するために使用する。したがって、形質転換された宿主細胞を、誘導用のリン酸制限培地中で培養する。好ましくは、リン酸制限培地は、C. R. A. P培地である。種々の他の誘導因子を、用いられるベクター構築物に応じて、当該技術分野において公知の通りに使用してもよい。

【0297】

本出願の発現された抗TIGIT構築物は、宿主細胞のペリプラズム中に分泌され、そこから回収される。タンパク質の回収は、典型的には、微生物の破壊（一般的に、浸透圧

50

ショック、超音波処理、または溶解などの手段による)を含む。一旦、細胞が破壊されると、細胞片または全細胞を遠心分離またはろ過により除去してもよい。タンパク質を、さらに、例えば、親和性樹脂クロマトグラフィーにより精製してもよい。あるいは、タンパク質を培養液中に輸送し、その中で単離することができる。細胞を培養物から除去してもよく、培養上清を、産生されたタンパク質のさらなる精製のためにろ過及び濃縮する。発現されたポリペプチドを、さらに、一般的に公知の方法(例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)及びウエスタンブロットアッセイなど)を使用して単離及び同定することができる。

【0298】

あるいは、タンパク質産生は、発酵プロセスにより大量に行われる。種々の大規模流加発酵手順を、組み換えタンパク質の産生のために利用可能である。大規模発酵は、少なくとも1000リットルの能力、好ましくは約1,000~100,000リットルの能力を有する。これらの発酵槽ではアジテーターインペラを使用し、酸素及び栄養分、特にグルコース(好ましい炭素/エネルギー供給源)を分布させる。小規模発酵は、一般的に、わずか約100リットルの容積である、約1リットル~約100リットルの範囲であり得る発酵槽中での発酵を指す。

【0299】

発酵プロセスの間に、タンパク質発現の誘導は、典型的には、細胞が適した条件下で所望の密度(例えば、OD₅₅₀が約180~220)まで増殖させた後に開始され、その段階で細胞は初期の静止期にある。種々の誘導因子を、用いられるベクター構築物に応じて、当該技術分野において公知であり、上に記載する通りに使用してもよい。細胞を、誘導前に短い期間にわたり増殖させてもよい。細胞を、通常、約12~50時間にわたり誘導するが、より長いまたはより短い誘導時間を使用してもよい。

【0300】

本出願の抗体の産出及び質を改善するために、種々の発酵プロセスを改変することができる。例えば、分泌されたポリペプチドの適切な組み立て及び折り畳みを改善するために、シャペロンタンパク質、例えば、Dsbタンパク質(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD、及び/またはDsbG)またはFkpA(シャペロン活性を伴うペプチジルプロリルシス、トランスイソメラーゼ)などを過剰発現する追加のベクターを使用して、宿主原核細胞を同時形質転換することができる。シャペロンタンパク質は、細菌宿主細胞において産生される異種タンパク質の適切な折り畳み及び溶解度を促進することが実証されている。

【0301】

発現された異種タンパク質(特に、タンパク分解に感受性であるもの)のタンパク質分解を最小限にするために、タンパク質分解酵素が欠損したある特定の宿主株を本発明のために使用することができる。例えば、宿主細胞株を改変し、公知の細菌プロテアーゼ(例えば、プロテアーゼIII、OmpT、DegP、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVI、及びその組み合わせなど)をコードする遺伝子における遺伝的突然変異(複数可)に効果を及ぼしてもよい。

【0302】

タンパク質分解酵素が欠損し、1つ以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドを用いて形質転換されたE.coli株を、本出願の抗体をコードする発現系において宿主細胞として使用してもよい。

【0303】

d) タンパク質精製

本明細書において産生される抗TIGIT構築物をさらに精製し、さらなるアッセイ及び使用のための実質的に均質である調製物を得る。当該技術分野において公知の標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の手順:免疫親和性カラムまたはイオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上または陽イオン交換樹脂(例えば、DEAEなど)上でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SD

10

20

30

40

50

S-PAGE、硫酸塩析、及びゲルろ過（例えば、Sephadex G-75を使用）は、適した精製手順の例示である。

【0304】

いくつかの実施形態では、固相に固定化されるプロテインAは、本出願のFc領域を含む抗体の免疫親和性精製のために使用される。プロテインAは、黄色ブドウ球菌からの411D細胞壁タンパク質であり、高親和性を伴い抗体のFc領域に結合する。Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。プロテインAが固定化される固相は、好ましくは、ガラスまたはシリカ表面を含むカラム、より好ましくは制御された細孔ガラスカラムまたはケイ酸カラムである。一部の適用において、カラムを、混入物の非特異的付着を予防するために、試薬（例えば、グリセロールなど）を用いて被覆している。固相を次に洗浄し、固相に非特異的に結合した混入物を除去する。最後に、目的の抗体を、溶出により固相から回収する。

10

【0305】

2. 真核細胞における組み換え産生

真核生物での発現のために、ベクター成分は、一般的に、限定はされないが、以下：シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、ならびにエンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列の1つ以上を含む。

【0306】

a) シグナル配列成分

真核生物宿主における使用のためのベクターはまた、成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特定の切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドをコードするインサートを含んでもよい。選択される異種シグナル配列は、宿主細胞により認識され、処理される（すなわち、シグナルペプチダーゼにより切断される）ものである。哺乳動物細胞での発現において、哺乳動物シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスgDシグナルを利用可能である。

20

【0307】

そのような前駆体領域のためのDNAを、リーディングフレーム中で、本出願の抗体をコードするDNAに連結する。

【0308】

b) 複製起点

一般的に、複製起点成分は、哺乳動物発現ベクターのために必要とされない（SV40起点を典型的に使用してもよい。なぜなら、ただ、それは初期プロモーターを含むからである）。

30

【0309】

c) 選択遺伝子成分

発現ベクター及びクローニングベクターは、選択遺伝子（選択可能マーカーとも呼ばれる）を含んでもよい。典型的な選択遺伝子は、（a）抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、またはテトラサイクリン）に対して耐性を付与する、（b）栄養要求性欠損を補完する、または（c）複雑な培地から利用可能ではない決定的な栄養分を供給するタンパク質をコードする（例えば、バシラス属についてのDアラニンラセマーゼをコードする遺伝子）。

40

【0310】

選択計画の1例では、宿主細胞の増殖を停止させるための薬物を利用する。異種遺伝子を用いて成功裏に形質転換されるそれらの細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を産生し、このように選択計画中に生存する。そのような優性選択の例では、薬物（ネオマイシン、ミコフェノール酸、及びハイグロマイシン）を使用する。

【0311】

哺乳動物細胞のための適した選択マーカーの別の例は、本出願の抗体をコードする核酸を取り込む能力がある細胞の同定を可能にするものである（例えば、DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネインI及びII、好ましくは霊長類のメタロチオネイン遺伝子、

50

アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなど)。

【0312】

例えば、DHFR選択遺伝子を用いて形質転換された細胞は、最初に、メトトレキサート(Mtx)(DHFRの競合的アンタゴニスト)を含む培養液中で形質転換体の全てを培養することにより同定される。野生型DHFRを用いた場合での適切な宿主細胞は、DHFR活性が欠損したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株(例えば、ATCC CRL-9096)である。

【0313】

あるいは、ポリペプチドをコードするDNA配列、野生型DHFRタンパク質、及び別の選択マーカー、例えば、アミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(APH)などを用いて形質転換または同時形質転換された宿主細胞(特に、内因性DHFRを含む野生型宿主)を、選択マーカー用の選択薬剤(例えば、アミノグリコシド抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシン、またはG418など)を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。

【0314】

d) プロモーター成分

発現ベクター及びクローニングベクターは、通常、宿主生物により認識され、所望のポリペプチド配列をコードする核酸に機能的に連結されたプロモーターを含む。事実上、全ての真核生物遺伝子が、転写が開始される部位から約25~30塩基上流に位置付けられるATリッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写の開始から70~80塩基上流に見出される別の配列は、CNCAAT領域であり、そこでNは任意のヌクレオチドであり得る。大半の真核生物の3'末端は、AATAAA配列であり、それはコード配列の3'末端へのポリAテールの付加のためのシグナルであり得る。これらの配列の全てを、真核生物発現ベクター中に挿入してもよい。

【0315】

原核生物宿主との使用のために適した他のプロモーターは、phoAプロモーター、ラクタマーゼ及びラクトースプロモーターシステム、アルカリホスファターゼプロモーター、トリプトファン(trp)プロモーターシステム、及びハイブリッドプロモーター(例えば、tacプロモーターなど)を含む。しかしながら、他の公知の細菌プロモーターが適する。細菌システムにおける使用のためのプロモーターはまた、抗体をコードするDNAに機能的に連結されたShine-Dalgarno(S.D.)配列を含み得る。

【0316】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの抗体ポリペプチド転写は、例えば、以下のウイルスのゲノムから得られるプロモーターにより制御される：例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス2など)、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、及び最も好ましくはサルウイルス40(SV40)、異種哺乳動物プロモーターから、例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーター(そのようなプロモーターが宿主細胞系に適合するという条件で)。

【0317】

SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起点も含むSV40制限断片として便利に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII-E制限断片として便利に得られる。ウシパピローマウイルスをベクターとして使用して哺乳動物宿主においてDNAを発現させるためのシステムが、米国特許第4,419,446号に開示されている。このシステムの改変が、米国特許第4,601,978号に記載されている。また、マウス細胞における単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのヒトインターフェロンcDNAの発現に関するReyes et al., Nature 297:598-601(1982)を参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルス末端反復配列をプロモーターとして使用することができる。

10

20

30

40

50

【0318】

e) エンハンサーエレメント成分

より高い真核生物による本出願の抗体をコードするDNAの転写は、しばしば、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することにより増加される。多くのエンハンサー配列が、現在、哺乳動物遺伝子から公知である（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、及びインスリン）。典型的には、しかしながら、真核細胞ウイルスからのエンハンサーが使用され得る。例としては、複製開始点の後期側のSV40エンハンサー（100～270bp）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。エンハンサーは、抗体コード配列に対する位置5'または3'でベクター中にスプライシングされ得るが、しかし、好ましくはプロモーターから部位5'に位置付けられる。

10

【0319】

f) 転写終結成分

真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物からの有核細胞）において使用される発現ベクターは、転写の終結のために及びmRNAを安定化させるために必要な配列も含み得る。そのような配列は、一般的に、真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'及び、時には3'の非翻訳領域から利用可能である。これらの領域は、ポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分におけるポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。1つの有用な転写終結成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO94/11026及びその中で開示される発現ベクターを参照されたい。

20

【0320】

g) 宿主細胞の選択及び形質転換

本明細書におけるベクター中でDNAをクローン化または発現するための適した宿主細胞は、本明細書に記載のより高い真核細胞（脊椎動物宿主細胞を含む）を含む。培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は、通常の手順になっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、以下：SV40により形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7, ATCC CRL 1651）；ヒト胚腎臓株（293細胞または浮遊培養中での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)）；仔ハムスター腎細胞（BHK, ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／－DHFR（CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)）；マウスセルトリ細胞（TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)）；サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76, ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA, ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（MDCK, ATCC CCL 34）；バッファローラット肝細胞（BRL 3A, ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138, ATCC CCL 75）；ヒト肝細胞（Hep G2, HB 8065）；マウス乳癌（MMT 060562, ATCC CCL 51）；TRI細胞（Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)）；MRC5細胞；FS4細胞；及びヒト肝細胞癌株（Hep G2）である。

30

40

【0321】

宿主細胞を、抗体産生のための上記の発現またはクローニングベクターを用いて形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適宜改変された従来の栄養培地中で培養する。

【0322】

h) 宿主細胞の培養

本出願の抗体を産生するために使用される宿主細胞を、種々の培地中で培養してもよい。商業的に利用可能な培地、例えば、Ham's F10（Sigma）、最小必須培地（MEM）、（Sigma）、RPMI-1640（Sigma）、及びダルベッコ改変

50

イーグル培地（（DMEM）、Sigma）などが、宿主細胞を培養するために適する。これらの培地に、必要に応じて、以下を補給してもよい：ホルモン及び／または他の増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、または上皮増殖因子など）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸など）、緩衝剤（例えば、HEPESなど）、ヌクレオチド（例えば、アデノシン及びチミジンなど）、抗生物質（例えば、GENTAMYCIN（商標）薬物など）、微量元素（通常マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される）、及びグルコースまたは等価のエネルギー供給源。任意の他の必要な補給剤も、当業者に公知であり得る適切な濃度で含めてもよい。培養条件、例えば、温度、pHなどは、発現のために選択された宿主細胞と共に以前に使用されたものであり、当業者に明らかであろう。

【0323】

i) タンパク質精製

組み換え技術を使用する場合、抗体は、細胞内に、ペリプラズマ間隙中に産生され得る、または培地中に直接的に分泌され得る。抗体が細胞内に産生される場合、最初の工程として、微粒子細片、宿主細胞または溶解断片のいずれかを、例えば、遠心分離または限外ろ過により除去する。Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992) には、E. coli のペリプラズマ間隙に分泌される抗体を単離するための手順が記載される。簡単に説明すると、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム（pH 3.5）、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）の存在において約30分にわたり溶解させる。細胞片を遠心分離により除去することができる。抗体が培地中に分泌される場合、そのような発現系からの上清を、一般的に、商業的に利用可能なタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon 限外ろ過ユニットを使用して最初に濃縮する。プロテアーゼ阻害剤、例えば、PMSFなどを、先の工程のいずれかに含め、タンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含め、外来性混入菌の増殖を予防してもよい。

【0324】

細胞から調製された抗体組成物を、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及び親和性クロマトグラフィーを使用して精製することができ、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインAを使用し、1、2、または4の重鎖を含むヒト免疫グロブリンに基づく抗体を精製することができる。プロテインGが全てのマウスアイソタイプについて及びヒト3について推奨される。親和性リガンドが付着するマトリクスは、最もしばしばアガロースであるが、しかしながら、他のマトリクスも利用可能である。機械的に安定なマトリクス、例えば、制御された細孔ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼンによって、アガロースを用いて達成することができるよりも速い流速及び短い処理時間が可能になる。抗体がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX（商標）樹脂（J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.）が精製のために有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えば、イオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上でのクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂（例えば、ポリアスパラギン酸カラムなど）上でのヘパリンSEPHAROSE（商標）クロマトグラフィー上でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸塩析も、回収される抗体に依存して利用可能である。

【0325】

任意の予備精製工程（複数可）に続き、目的の抗体及び混入物を含む混合物を、pHが約2.5～4.5の溶出バッファーを使用し、好ましくは低塩濃度（例えば、約0～0.25 M塩）で実施される、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに供してもよい。

【0326】

3. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、一般的に、関連抗原及びアジュバントの複数回の皮下（s.c.）または腹腔内（i.p.）注射により動物において産生される。関連抗原を、免疫化される種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、または大豆トリプシン阻害剤に、二機能性薬剤または誘導体化薬剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を通じた抱合）、Nヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を通じて）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、 SOCl_2 、または $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ （式中、R及び R^1 は、非依存的により低いアルキル基である）を使用して抱合することが有用であり得る。用いてもよいアジュバントの例としては、フロイント完全アジュバント及びMPL- TDM アジュバント（モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコラート）が挙げられる。免疫化プロトコルは、過度の実験なしに当業者により選択され得る。

【0327】

動物を、抗原、免疫原性コンジュゲート、または誘導体に対して、例えば、 $100\mu\text{g}$ または $5\mu\text{g}$ のタンパク質またはコンジュゲート（それぞれウサギまたはマウス用）を3容積のフロイント完全アジュバントと組み合わせることにより、及び、溶液を複数部位に皮内注射することにより免疫化する。1ヶ月後、動物に、フロイント完全アジュバント中のペプチドまたはコンジュゲートの最初の量の $1/5\sim 1/10$ を用いて、複数部位での皮下注射により追加免疫する。7～14日後、動物を出血させ、血清を抗体価についてアッセイする。動物に、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。コンジュゲートも、タンパク質融合体として組み換え細胞培養において作製することができる。また、凝集剤（例えば、ミョウバンなど）が免疫応答を増強するために適する。ラクダの免疫化について実施例1も参照されたい。

【0328】

4. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体を実質的に均質な抗体の集団から得る、すなわち、その集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る、天然に生じる突然変異及び／または翻訳後改変（例えば、異性化、アミド化）を除いて同一である。従って、改変語「モノクローナル」は、別々の抗体の混合物ではないとして抗体の特徴を示す。例えば、モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ方法を使用して作製してもよく、または組み換えDNA方法により作製してもよい（米国特許第4,816,567号）。ハイブリドーマ方法では、マウスまたは他の適切な宿主動物（例えば、ハムスターまたはラマなど）を本明細書で上に記載する通りに免疫化し、免疫化のために使用されるタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生するまたは産生することができるリンパ球を誘導する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫化してもよい。リンパ球を、次に、ミエローマ細胞と、適した融合剤（例えば、ポリエチレングリコールなど）を使用して融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)）。ラクダの免疫化について実施例1も参照されたい。

【0329】

免疫化薬剤は、典型的には、抗原性タンパク質またはその融合変異体を含み得る。一般的に、末梢血リンパ球（「PBL」）が、ヒト由来細胞が所望である場合に使用され、または、脾細胞またはリンパ節細胞が、非ヒト哺乳動物の供給源が所望である場合に使用される。リンパ球を、次に、不死化細胞株と、適した融合剤（例えば、ポリエチレングリコールなど）を使用して融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する。Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), pp. 59-103。

【0330】

不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特に、げっ歯類、ウシ、及びヒ

10

20

30

40

50

トに由来するミエローマ細胞である。通常、ラットまたはマウスミエローマ細胞株を用いる。このように調製されたハイブリドーマ細胞を、好ましくは非融合親ミエローマ細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含む適した培養液中に播種し、増殖させる。例えば、親ミエローマ細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRT）を欠く場合、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン（HAT培地）（HGPRT欠損細胞の増殖を予防する物質である）を含み得る。

【0331】

好ましい不死化ミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定した高レベル産生を支持し、培地（例えば、HAT培地など）に感受性であるものである。これらの内、マウスミエローマ株、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USAから利用可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍に由来するもの、及びAmerican Type Culture Collection, Manassas, Va. USAから利用可能なSP-2細胞（及びその誘導体、例えば、X63-Ag8-653）などが好ましい。

【0332】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培養培地を、抗原に対して向けられたモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性を、免疫沈降によりまたはインビトロ結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）など）により決定する。

【0333】

ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、所望の抗原に対して向けられたモノクローナル抗体の存在についてアッセイすることができる。好ましくは、モノクローナル抗体の結合親和性及び特異性を、免疫沈降によりまたはインビトロ結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）など）により決定することができる。そのような技術及びアッセイは、当該技術分野において公知である。例えば、結合親和性を、Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980) のスキッチャード分析により決定してもよい。

【0334】

所望の特異性、親和性、及び／または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈手順によりサブクローン化し、標準的な方法（Goding, supra）により増殖してもよい。この目的のための適した培養液は、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地を含む。また、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物において腫瘍としてインビボで増殖し得る。

【0335】

サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、培養培地、腹水、または血清から、従来の免疫グロブリン精製手順、例えば、プロテインA-Sepharose、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、または親和性クロマトグラフィーなどにより適切に分離される。

【0336】

モノクローナル抗体はまた、組み換えDNA方法により作製してもよい。モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して容易に単離及び配列決定される（例えば、ネズミ抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる）。ハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源としての役割を果たす。一旦、単離されると、DNAを発現ベクター中に置いてよく、それを次に、本来なら免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞、例えば、E. coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、またはミエローマ細胞などにトランスフェクションする（そのような組み換

10

20

30

40

50

え宿主細胞においてモノクローナル抗体を合成するために)。

【0337】

さらなる実施形態では、抗体を、McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)に記載される技術を使用して生成された抗体ファージライブラリーから単離することができる。Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)及びMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)には、ファージライブラリーを使用した、それぞれネズミ及びヒトの抗体の単離が記載されている。続く刊行物には、鎖シャッフリングによる高親和性(nM幅)ヒト抗体の産生(Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992))、ならびに組み合わせ感染及び非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略としてのインビボ組み換え(Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21:2265-2266 (1993))が記載されている。従って、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する実行可能な代替物である。

【0338】

また、DNAを、例えば、相同ネズミ配列の場所でヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインについてのコード配列を置換することにより(米国特許第4,816,567号;Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984))、または免疫グロブリンコード配列に、非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列の全部または一部を共有結合的に連結させることにより改変してもよい。典型的には、そのような非免疫グロブリンポリペプチドを、抗体の定常ドメインについて置換し、または、それらを、抗体の抗原組み合わせ部位の変域ドメインについて置換し、抗原についての特異性を有する1つの抗原組み合わせ部位及び異なる抗原についての特異性を有する別の抗原組み合わせ部位を含むキメラ二価抗体を作製する。

【0339】

本明細書に記載のモノクローナル抗体は、一価であり得るが、その調製は、当該技術分野において周知である。例えば、1つの方法は、免疫グロブリン軽鎖及び改変重鎖の組み換え発現を含む。重鎖は、重鎖の架橋を予防するように、Fc領域中の任意の点で一般的に切断される。あるいは、関連するシステイン残基を、架橋を予防するために、別のアミノ酸残基と置換してもよく、または欠失させる。インビトロでの方法が、また、一価抗体を調製するために適している。その断片、特に、Fab断片を産生するための抗体の消化を、当該技術分野において公知の通常の技術を使用して達成することができる。

【0340】

キメラ抗体またはハイブリッド抗体を、また、合成タンパク質化学において公知の方法(架橋剤を含むものを含む)を使用してインビトロで調製してもよい。例えば、免疫毒素を、ジスルフィド交換反応を使用してまたはチオエーテル結合を形成することにより構築してもよい。この目的のための適した試薬の例としては、イミノチオラート及びメチル-4-メルカプトブチルイミデートが挙げられる。

【0341】

モノクローナルs d A b 産生について実施例1も参照されたい。

【0342】

5. ヒト化抗体

非ヒト(例えば、ネズミ)抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはその断片(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合部分配列)である。ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含み、それにおいてレシピエントのCDRからの残基が、非ヒト種(例えば、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、またはウサギ、ラクダ、またはラマ)(ドナー抗体)のCDRからの残基により置換される。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基

は、対応する非ヒト残基により置換される。ヒト化抗体は、レシピエント抗体においてまたは移入されたCDRまたはフレームワーク配列において見出されない残基も含み得る。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的に2つの可変ドメインの実質的に全てを含み得るが、それにおいてCDR領域の全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも部分、典型的には、ヒト免疫グロブリンのそれを含む。例えば、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988) 及び Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992) を参照されたい。

10

【0343】

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当該技術分野において周知である。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からその中に導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「インポート」残基と呼ばれ、インポート残基は、典型的には「インポート」可変ドメインから取られる。ヒト化は、本質的に、Winter 及び共同研究者 (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988)) の方法に従い、またはヒト抗体の対応する配列についてのげっ歯類CDRまたはCDR配列の置換を通じて実施することができる。したがって、そのような「ヒト化」抗体は、抗体（米国特許第4,816,567号）であり、それにおいて実質的に無傷に満たないヒト可変ドメインが、非ヒト種からの対応する配列により置換されている。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、一部のCDR残基及び恐らくは一部のFR残基が、げっ歯類抗体中の類似部位からの残基により置換されるヒト抗体である。

20

【0344】

ヒト化抗体を作製する上で用いられる、軽鎖及び重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低下させるために非常に重要である。いわゆる「最適フィット」法に従って、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。続いて、齧歯動物のものに最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワーク（FR）として受け入れる。Sims et al., J. Immunol, 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol, 196:901 (1987)。別の方法では、軽鎖または重鎖の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを用いる。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に用いることができる。

30

【0345】

抗体は、標的抗原に対する高い親和性及び他の有利な生物学的特性を保ったままでヒト化することがさらに重要である。この目標を達成するため、好ましい方法によれば、親配列及びヒト化配列の三次元モデルを用いた親配列及び様々な概念上のヒト化産物の分析の過程によって、ヒト化抗体が調製される。免疫グロブリンの三次元モデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列に関して可能性のある三次元立体構造を図示及び表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の検討により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の考えられる役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原と結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、標的抗原（複数可）に対する親和性の増大といった所望の抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント配列及びインポート配列から選択し、組み合わせることができる。一般に、CDR残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接かつ最も実質的に関与している。

40

【0346】

いくつかの実施形態では、sdAbは、抗原に対するドメインの生来の親和性を低下さ

50

せない一方で、異種種に対するその免疫原性を減少させるように修飾、例えば、ヒト化される。例えば、ラマ抗体の抗体可変ドメイン ($V_H H$) のアミノ酸残基が決定され得、例えば、フレームワーク領域内のラクダ科アミノ酸のうちの1つ以上が、ポリペプチドがその典型的な特徴を失うことなく、すなわち、ヒト化が結果として生じるポリペプチドの抗原結合能力に著しく影響を及ぼさないように、ヒトコンセンサス配列に見られるようなそれらのヒト対応物に置き換えられる。ラクダ科単ドメイン抗体のヒト化は、単一ポリペプチド鎖内の限定された量のアミノ酸の導入及び変異誘発を必要とする。これは、2つの鎖（軽鎖及び重鎖）へのアミノ酸変化の導入、ならびに両方の鎖のアセンブリの保存を必要とする $s c F v$ 、 $F a b'$ 、 $(F a b')_2$ 、及び $I g G$ のヒト化とは対照的である。

【0347】

6. ヒト抗体

ヒト化の代わりに、ヒト抗体を生成することができる。例えば、内因性の免疫グロブリン産生がなくともヒト抗体の全レパートリーを免疫化することで産生することのできるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域 (J_H) 遺伝子の同型接合除去が、内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。このような生殖系列突然変異体マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子列の転移は、抗原投与時にヒト抗体の産生をもたらす。

【0348】

あるいは、ファージディスプレイ技術は、免疫処置を受けていないドナーの免疫グロブリン可変 (V) ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産生させるために用いることができる。McCafferty et al., *Nature* 348: 552-553 (1990); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991)。この技術によれば、抗体 V ドメイン遺伝子を、糸状バクテリオファージ、例えば、 $M13$ または $f d$ の主要コートタンパク質またはマイナーコートタンパク質の遺伝子中にインフレームでクローニングして、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として提示させる。糸状粒子は、ファージゲノムの一本鎖 DNA コピーを含むため、抗体の機能特性に基づく選択により、それらの特性を呈する抗体をコードする遺伝子の選択ももたらされる。従って、ファージは、 B 細胞のいくつかの特性を模倣する。ファージディスプレイは、種々のフォーマットで行うことができる。 V 遺伝子セグメントのいくつかの供給源をファージディスプレイに用いることができる。Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) は、免疫処置を受けたマウスの脾臓に由来する V 遺伝子の小規模なランダムコンビナトリアルライブラリーから、抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離している。免疫処置を受けていないヒトドナーから V 遺伝子のレパートリーを構築して、抗原（自己抗原を含む）の多様なアレイに対する抗体を、本質的には Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)、または Griffith et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993) に記載された手法に従って単離することができる。米国特許第 5, 565, 332 号及び第 5, 573, 905 号も参照されたい。

【0349】

Cole et al. 及び Boerner et al. の技術は、ヒトモノクローナル抗体の調製のためにも利用可能である (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) 及び Boerner et al., *J. Immunol.* 147 (1): 86-95 (1991))。同様に、例えば内因性の免疫グロブリン遺伝子が部分的にまたは完全に不活性化されているマウスなどの、トランスジェニック動物へのヒト免疫グロブリン座の導入によって、ヒト抗体を作成することができる。チャレンジによって、ヒト抗体産生が観察され、それは、遺伝子再配列、遺伝子アセンブリ、及び抗体レパートリーを含む、全ての点においてヒトで見られる抗体産生に酷似している。このアプロ

10

20

30

40

50

一チは、例えば、米国特許第5,545,807号;第5,545,806号;第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;第5,661,016号、及びMarks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)に記載されている。例えば、いくつかの実施形態では、ヒト抗体(例えば、ヒトDAb)は、ヒトHCAbマウスの免疫化によって生成することができる。例えば、内因性マウス抗体の発現を消失させ、ヒト導入遺伝子を導入してあるトランスジェニックマウスを免疫化することによって、HCAb(例えば、sdAb-Fc融合タンパク質)を作製することができる。HCAbマウスは、US8,883,150、US8,921,524、US8,921,522、US8,507,748、US8,502,014、US2014/0356908、US2014/0033335、US2014/0037616、US2014/0356908、US2013/0344057、US2013/0323235、US2011/0118444、及びUS2009/0307787に開示されており、トランスジェニックマウスにおける重鎖のみ抗体及びその作製に関するそれらの開示内容の全てが参照により本明細書に組み込まれる。HCAbマウスを免疫化し、得られる感作脾臓細胞をマウス骨髓腫細胞と融合させてハイブリドーマを形成させる。その後、得られるHCAbは、マウスのCH2領域及びCH3領域をヒト配列と置き換えることによって完全ヒトに作製可能である。

【0350】

最終的に、ヒト抗体は、インビトロで活性化されたB細胞(米国特許第5,567,610号及び同第5,229,275号を参照されたい)によって、または当該技術分野で公知の種々の技術、例えば、ファージディスプレイライブラリーを用いても産生され得る(Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991))。

【0351】

VI. 製造品及びキット

単離抗TIGIT構築物(例えば、抗TIGIT sdAb、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質、PD-1×TIGIT二重特異性構築物(例えば、BABP)、PD-L1×TIGIT二重特異性構築物(例えば、BABP))、単離核酸またはそれをコードするベクター、または本明細書に記載の抗TIGIT構築物をコードする単離核酸またはベクターを含む単離宿主細胞のいずれかを含むキット及び製造品がさらに提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物のいずれか1つを含むキットが提供され、好ましくは、その使用のための説明書を提供する。

【0352】

本出願のキットは、適当に包装されている。適当な包装には、バイアル、ボトル、ジャー、可動性包装(例えば、密封マイラーまたはビニール袋)などがあるが、これらに限定されない。キットは、例えば、緩衝剤及び解説情報などの追加の成分を適宜提供する。従って、本出願は、バイアル(例えば、密封バイアル)、ボトル、ジャー、可動性包装などを含む製造品も提供する。

【0353】

製造品は、容器、及び容器上のまたは容器に付随するラベルまたは添付文書を含み得る。適当な容器には、例えば、瓶、バイアル、シリンジなどが含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなど種々の材料で形成され得る。一般的に、容器は、本明細書に記載の疾患または疾病(例えば、がん)を治療するのに有効な組成物を保持し、滅菌アクセスポ

ートを有し得る（例えば、容器は、静脈内溶液バッグ、または皮下注射針で突き刺すことができる栓を有するバイアルであってよい）。ラベルまたは添付文書は、その組成物が個体における特定の状態の治療に使用されることを示す。ラベルまたは添付文書は、組成物を個体に投与するための説明書をさらに含むであろう。ラベルは、再構成及び／または使用のための指示を示し得る。医薬組成物を保持する容器は、再構成製剤の反復投与（例えば、2～6回投与）を可能にする複数回使用バイアルであり得る。添付文書は、そのような治療用製品の使用に関する適応、用途、投与量、投与、禁忌及び／または警告についての情報を含む、治療用製品の市販包装に通例含まれる指示書を指す。さらに、製造品は、静菌性注射用水（BWF I）、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液及びデキストロース溶液などの薬学的に許容可能な緩衝剤を含む第2の容器をさらに含み得る。商業的観点及び使用者の観点から望ましい他の材料、例えば、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針及びシリンジをさらに含み得る。

10

【0354】

キットまたは製造品は、複数単位用量の医薬組成物及び使用説明書を含んでもよく、薬局、例えば、病院薬局及び調剤薬局で貯蔵及び使用するために十分な量で包装されている。

【実施例】

【0355】

以下の実施例は、完全に本発明の例であることを意図しており、したがって決して本発明を限定すると思えられるべきではない。以下の実施例及び詳細な説明は、限定としてではなく例証として提供される。

20

【0356】

実施例1：抗TIGIT s d A bの生成
免疫化

最新の動物保護規制に全て従い、組み換えTIGIT-Fc（Acrobiosystems）タンパク質によりラマを免疫化した。免疫化用に、抗原をCFA（完全フロイントアジュバント；一次免疫化）またはIFA（不完全フロイントアジュバント；ブースト免疫化）による乳剤として製剤化した。抗原は、首の筋肉内に投与した。各動物に、CFA乳剤中で100 µgのTIGIT-Fcを含む乳剤を5本注射し、続いてIFA乳剤中のTIGIT-Fcを2週間間隔で4回注射した。免疫化の間の異なった時点で、動物から10 mlの血液試料を回収し、血清を調製した。抗原特異的体液免疫応答の誘導は、固定化したTIGIT-Hisタンパク質によるELISAに基づく実験で血清試料を用いて確認し（図1及び図2）、重鎖免疫グロブリン（HCAb）を含む応答の十分な誘導を示した。最後の免疫化から5日後、300 mlの血液試料を回収した。末梢血リンパ球（PBL）を、ラクダHCAbの遺伝源として、血液試料300 mlからFicoll-Paque勾配（Amersham Biosciences）を用いて単離し、 1×10^9 個のPBLを得た。

30

【0357】

ライブラリー構築

PBLから抽出したRNAを、RT-PCRの出発物質として使用して、s d A bをコードする遺伝子断片を増幅した。これらの断片を社内プラスミドベクターにクローニングした。s d A bコード配列とインフレーションで、ベクターは、C末端 His-Tagをコードしていた。ライブラリーサイズは、約 6×10^8 個である。ライブラリーファージは、標準プロトコルに従って調製し、滅菌濾過の後、さらなる使用のために4℃で保管した。

40

【0358】

選別及びハイスループットスクリーニング

選別は、固形パニングならびに細胞に基づくパニングを用いて、上記ライブラリーで実施した。両方の条件について選別を1回だけ行なった。各々の選別のアウトプットを濃縮係数（対照と比べた溶出液中に存在するファージの数）、多様性、及びTIGIT陽性クローンの割合（ELISA）について分析した。これらのパラメーターに基づき、さらなる分析のために最良の選別を選択した。そのために、各々の選別からのアウトプットを、

50

ハイスルーブットスクリーニング用の可溶性発現ベクターにプールとして再クローニングした。s d A bコード配列とインフレームで、ベクターは、C末端H i s タグをコードしていた。コロニーを採取して、96ディープウェルプレート（1m l容量）で培養し、IPTG及び0.1%T r i t o nを添加することにより上清中でs d A b発現を誘導した。【0359】

（E L I S Aによって）T I G I Tタンパク質及び（F A C Sによって）T I G I T発現C H O-K1安定細胞株に結合する能力について上清を分析した。陽性バインダーを配列決定し、固有のクローンを選別し、さらに特徴付けた。【0360】

固有のクローンを2X Y T培地中で増殖させ、IPTGにより上清中でs d A b発現を誘導した。C D 155とT I G I Tの間の相互作用を阻害する能力について、固有のバインダーの上清を分析した。そのために、T I G I Tを発現する安定したC H O細胞をs d A b含有上清でまずインキュベートした後、C D 155-F c（A c r o b i o s y s t e m s）、続いて、ヒトF cに対するフルオロフォア標識した二次抗体でインキュベートした。抗T I G I T s d A b遮断をしない試料と比較した平均蛍光強度（M F I）のシフトは、C D 155/T I G I T結合の遮断を表す。【0361】

全ての潜在的インヒビターを選別し、B I A c o r e T 200機器上の表面プラズモン共鳴（S P R）によってK D分析した。解離相を使用して、個別のs d A bごとのk_{off}値を算出した。【0362】

実施例2：抗T I G I T s d A b-F c融合タンパク質の調製及びインビトロ評価
s d A b-F c融合タンパク質の産生

抗T I G I T s d A b-F c融合タンパク質構築物は、抗T I G I T s d A bをヒトI g G 1 F c領域と融合することで生成した。構築物のマキシプレップを調製して、C H O-K1細胞を一過性発現させて、精製した。発現した抗T I G I T s d A b-F c融合タンパク質は、プロテインAアガロース樹脂を含有するカラムを通して、クロマトグラフィーによって精製した。タンパク質純度は、S E C-H P L Cによって決定した。B r i s t o l-M y e r s S q u i b bによって生成された抗T I G I T抗体、22G2は、ヒトI g G 1バックボーンにおいて、公開特許の配列（U S 2016/0176963を参照されたい、配列番号7及び9）に従って産生された。ネズミT I G I Tを遮断するハムスター抗体、10A7は、ヒトI g G 1バックボーンにおいて、公開特許で報告された配列（U S 2015/0216970を参照されたい、配列番号13及び15）に従って産生された。【0363】

表面プラズモン共鳴（S P R）による標的タンパク質結合及び種間反応試験

B I A c o r e T 200機器を利用して、S P Rによって、各抗T I G I T s d A b-F c融合タンパク質の親和性定数（K_D）を決定した。簡単に言えば、ヒト、カニクイザルまたはマウスT I G I T-H i sタンパク質（A c r o b i o s y s t e m s）を、100RU以下の密度でC M 5センサーチップにアミン結合させた。抗T I G I T s d A b-F c融合タンパク質を、5つ以上の異なる濃度で注入した。いくつかの例示の抗T I G I T s d A b-F c融合タンパク質の動態データを表3にまとめた。

表3. T I G I Tに対する非ヒト化抗T I G I T s d A b-F c融合タンパク質の親和性決定

【表3-1】

標的	構築物	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)
ヒトTIGIT-His	AS19584-Fc	7.9E+05	4.3E-04	5.4E-10

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

	AS19886-Fc	1.0E+06	1.9E-03	1.9E-09
	AS20160-Fc	6.8E+05	1.9E-03	2.7E-09
	22G2	1.4E+06	2.7E-04	1.9E-10
カニクイザ ^ル TIGIT-His	AS19584-Fc	2.7E+05	1.4E-02	5.1E-08
	AS19886-Fc	1.9E+05	1.6E-02	8.2E-08
	AS20160-Fc	1.3E+05	2.5E-02	2.0E-07
	22G2	2.0E+06	6.8E-03	3.4E-09
マウス TIGIT-His	AS19584-Fc	1.4E+06	7.2E-04	5.0E-10
	AS19886-Fc	/	/	/
	AS20160-Fc	/	/	/
	22G2	/	/	/

10

【 0 3 6 4】

FACS分析によるリガンド結合のCHO-TIGIT細胞結合及び阻害

細胞結合EC₅₀を決定するため、ヒト、カニクイザ^ルまたはネズミTIGITを発現するCHO-K1細胞を収穫し、勾配濃度の抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質でインキュベートした後、ヒトFcに対する二次抗体をフルオロフォア標識した。遮断アッセイでは、固定濃度のビオチン化CD155-Fcタンパク質(Acrobiosystems)をインキュベーションに加え、CHO/ヒトTIGIT細胞へのCD155-Fcの結合をフルオロフォア標識ストレプトアビジンで検出した。フローサイトメトリーで試料を分析した。抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の結合及び遮断能力のEC₅₀を表4にまとめた。抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質は、陽性対照22G2と同様、または陽性対照22G2より良い、CHO細胞上で発現したヒトTIGITに結合する能力を有した一方、AS19584-Fc、AS19886-Fc及びAS20160-Fcは、22G2よりも優れたリガンド遮断能力を示した。さらに、AS19584-Fcは、CHO細胞上で発現したマウスTIGITに結合し、CHO細胞上で発現したヒトTIGITへのその結合のEC₅₀は同様であることが分かった。マウスTIGIT架橋結合体対照、10A7は、AS19584-Fcと同様の0.709 nMのCHO/マウスTIGIT結合EC₅₀で検出された。

20

30

表4. TIGITに対する非ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質のリガンド結合データの結合及び遮断

【表 4 - 1】

EC50 (nM)	結合アッセイ			遮断アッセイ
	ヒト	カニクイザ ^ル	マウス	ヒト
AS19584-Fc	0.571	3.851	0.806	1.085
AS19852-Fc	0.383	>100	/	/
AS19858-Fc	0.223	>100	/	/
AS19886-Fc	0.340	1.172	/	0.643
AS19887-Fc	0.497	>100	/	/
AS19888-Fc	1.004	>100	/	/
AS20160-Fc	0.876	14.48	/	1.177
22G2	1.140	0.604	/	2.699

40

【表 4 - 2】

10A7	4.057	>100	0.709	5.273
------	-------	------	-------	-------

50

【0365】

CT26、ネズミ大腸がん細胞株は、高発現のネズミCD155を有する（データ不図示）。AS19584-Fcは、ネズミTIGITと交差反応するので、その主要なリガンドであるCD155とのTIGIT相互作用を遮断するその能力を評価するため、CT26細胞は、勾配濃度のAS19584-Fc融合タンパク質の存在下で、ネズミTIGIT-Fcでインキュベートした。CT26細胞へのネズミTIGIT-Fc結合は、ヒトFcに対する二次抗体を蛍光色素共役体で染色し、FACSによって検出することで評価した。遮断のEC50は、AS19584-Fcでは77.90 nM、ネズミTIGIT遮断剤である10A7では71.33 nMであった。従って、AS19584-Fc及び10A7は、TIGITリガンドCD155を遮断する能力が匹敵する。

10

【0366】

TIGIT/CD155遮断レポーターアッセイ

TIGIT/CD155遮断レポーターアッセイは、アッセイキット（Promega、カタログ番号CS198811）のマニュアルに従って、プロメガTIGIT/CD155遮断レポーターアッセイキット（Promega、カタログ番号CS198811）を用いて行った。簡単に言えば、Thaw-and-Use TIGITエフェクター細胞を一晩培養した後、連続希釈の抗TIGIT抗体または抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質でインキュベートし、その後、CD155 aAPC/CHO-K1細胞を適切なE:T比で加えた。37℃、5%CO₂で誘導した6時間後、Bio-Glo（商標）ルシフェラーゼアッセイ試薬を加え、発光を判断した。GraphPad Prism 6ソフトウェアで4パラメーターロジスティック曲線分析を行った。データ曲線を図3に示し、表5にまとめる。AS19584-Fc、AS19886-Fc及びAS20160-Fcは、22G2に匹敵するかまたは22G2よりも優れた遮断機能を有する。

20

表5. TIGIT/CD155遮断レポーターアッセイ

【表5】

構築物	EC50 (nM)	シグナルスパン
AS19584-Fc	1.470	111.5
AS19886-Fc	3.044	101.5
AS20160-Fc	5.464	88.8
22G2	7.922	107.9

30

【0367】

実施例3：同系腫瘍モデルにおける抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質のインビボ効力

CT26同系腫瘍モデルにおける10A7及びAS19584-Fcの比較の効力研究

AS19584-Fc融合タンパク質及び10A7は、マウスTIGITと非常に近い細胞結合及び遮断EC50を有するため（表4を参照）、同じモル用量で異なる分子モダリティにおける2つの抗体を比較するように研究を実施した。ネズミCD155を発現するCT26腫瘍細胞を培養し、マグネシウム及びカルシウムを含まないHBSS-/-中に懸濁させて、 5×10^5 個の細胞を、6～8週齢の雌のBalb/cマウスの脇腹に皮下注射した。腫瘍体積は、キャリパーを用いて測定し、式：（長さ×幅×幅）／2で算出した。平均腫瘍体積が90～100 mm³に到達した場合、マウスを無作為化して、処置を開始した。被験物質を、腹腔内（i.p.）を介して4日に一度投与した。研究全体を通じて体重を測定した。動物を犠牲にし、投与後の18日目に腫瘍組織を収穫し、コラゲナーゼIV/DNase Iで消化させて、単細胞懸濁液を調製して、表面マーカーCD3/CD4/CD8の染色、及びフローサイトメトリー分析を行った。

40

【0368】

CT26腫瘍モデルは、PD-1遮断に部分的な耐性を示す。図4A及び4Cに示すように、ラット抗ネズミPD-1抗体、RMP1-14（Bioxcell）は、5 mg／

50

kgでCT26腫瘍成長に対する阻害が制限されている。AS19584-Fc及び10A7は両方とも、単体またはRMP1-14との組み合わせのいずれかで、同じモル用量（それぞれ、10mg/kg及び18.8mg/kg）で腫瘍進行を著しく遅らせた。特に、AS19584-Fcは、投与後一週間以内により速い応答を示し、結果的に、試験したモル用量で、10A7よりも均一な応答を示した。この現象は、腫瘍学における異なる標的の他の研究においても観察された（データ不図示）。これは、完全長モノクローナル抗体（それぞれ、約80kDa対150kDa）と比較して、より小さい分子量のsdAb-Fc融合タンパク質と関連してもよい。マウスのPK研究では、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質は、定常状態での見かけの分布量（Vss）が約1.5～2倍大きく、抗TIGIT完全長抗体よりも低いピーク血漿濃度（Cmax）を有した（図9；さらなるデータ不図示）。この差異は、抗体がマウスTIGITと交差反応するかどうかに関係はなかった。sdAb-Fc融合タンパク質が、そのサイズが小さいために完全長抗体よりも速くかつ強い組織（例えば、腫瘍）透過性を有し得、より速い薬効が、この特異的な性質とも関連し得ることを、観察は示している。フローサイトメトリーで評価したように、AS19584-Fcによる処置は、CD8+及びCD4+T細胞腫瘍内浸潤を増強させた一方、RMP1-14との併用は、そのような浸潤をさらに増強させた（図4B）。

【0369】

CT26同系腫瘍モデルにおけるPD-1/TIGIT二重遮断を試験する効力研究

CT26腫瘍細胞を培養し、マグネシウム及びカルシウムを含まないHBSS-/-中に懸濁させて、 5×10^5 個の細胞を、6～8週齢の雌のBalb/cマウスの脇腹に皮下注射した。腫瘍体積は、キャリパーを用いて測定し、式：（長さ×幅×幅）/2で算出した。平均腫瘍体積が90～100mm³に到達した場合、マウスを無作為化して、処置を開始した。被験物質を、腹腔内（i.p.）を介して4日に一度投与した。研究全体を通して体重を測定した。

【0370】

CT26腫瘍モデルは、PD-1遮断に部分的な耐性を示す。図5A及び5Bに示すように、ラット抗ネズミPD-1抗体、RMP1-14（Bioxcell）は、5mg/kgでCT26腫瘍成長を適度ではあるが著しく阻害した。AS19584-Fc融合タンパク質は、RMP1-14と同じモル用量で、際立った腫瘍阻害を示した。同じモル用量（それぞれ、5mg/kg及び2.67mg/kg）でのRMP1-14及びAS19584-Fcの併用は、著しく改善された効力を示し、腫瘍完全退縮は、8匹のうちの6匹のマウスで観察された。

【0371】

MC38同系腫瘍モデルにおけるPD-1/TIGIT二重遮断を試験する効力研究

MC38腫瘍細胞を培養し、マグネシウム及びカルシウムを含まないHBSS-/-中に懸濁させて、 1×10^6 個の細胞を、6～8週齢の雌のC57BL/6マウスの脇腹に皮下注射した。腫瘍体積は、キャリパーを用いて測定し、式：（長さ×幅×幅）/2で算出した。平均腫瘍体積が90～100mm³に到達した場合、マウスを無作為化して、処置を開始した。被験物質を、腹腔内（i.p.）を介して4日に一度投与した。研究全体を通して体重を測定した。

【0372】

MC38腫瘍モデルは、PD-1遮断に敏感である。図6A及び6Bに示すように、RMP1-14は、3mg/kgでMC38腫瘍成長を実質的に遅らせた。AS19584-Fc融合タンパク質は、用量依存的に腫瘍成長を阻害した。同じモル用量（それぞれ、3mg/kg及び1.6mg/kg）でのRMP1-14及びAS19584-Fcの併用は、PD-1及びTIGITを同時に標的化する相乗効果を示し、7匹のうちの5匹のマウスにおいて、効力の著しい改善及び完全退縮が得られた。RMP1-14及び高用量のAS19584-Fc（それぞれ、3mg/kg及び10mg/kg）の併用は、全ての動物（7匹のうちの7匹）における腫瘍生着を完全に廃止した。

【0373】

実施例4：抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質のヒト化、産生及び特徴付け
抗TIGIT s d A b のヒト化

s d A b A S 1 9 5 8 4 及び A S 1 9 8 8 6 のタンパク質配列を、高度の相同性を共有する5つの最も近いヒト生殖系列配列と整列させた。最良のヒト生殖系列配列は、ヒトアクセプターとして選択した。相同性モデルを作成した。モデル分析データに従って、抗原結合または抗体足場形成に潜在的に重要な残基を手付かずにした一方、残りは、ヒト対応物への変換のために選択した。最初に、4～6個の配列最適化した変異体のパネルを生成した（ステージ1）。これらの変異体を多くのパラメーターについて分析し、得られた結果を使用して、第2セットのs d A b を設計した（ステージ2）。ヒト化s d A b は、それらの名称において「VH」で示した。

10

【0374】

ヒト化抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質の産生

ヒト化変異体のうち、A S 1 9 5 8 4 V H 2 8、A S 1 9 8 8 6 V H 5、及びA S 1 9 8 8 6 V H 8 を選択して、親和性及び小規模生産レベルに従って産生し、特徴付けた。ヒト化抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質構築物は、ヒト化抗TIGIT s d A b をヒトI g G 1 F c 領域と融合させることで生成した。構築物のマキシプレップを調製して、H E K 2 9 3 細胞を一過性発現させて、精製した。発現したヒト化抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質は、プロテインAアガロース樹脂を含有するカラムを通して、クロマトグラフィーによって精製した。タンパク質純度は、S E C - H P L C によって決定した。発現結果を表6にまとめた。

20

表6．ヒト化抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質の発現

【表6-1】

構築物	一過性発現 (mg/L)	純度 (%)	エントロピーレベル
-----	--------------	--------	-----------

【表6-2】

			(EU/mg)
AS19584VH28-Fc	212.0	98.83	0.1
AS19886VH5-Fc	76.8	98.36	0.1
AS19886VH8-Fc	70.0	96.47	0.2

30

【0375】

安定性分析

加熱中のより大きいタンパク質凝集物の形成は、動的光散乱法（DLS）を用いて検出した。約0.75℃の温度間隔を有する25℃～75℃の温度傾斜を、DYNAPRO（登録商標）NANOSTAR（登録商標）プレートリーダー（Wyatt, Santa Barbara, California）を用いて、1.5mg/mlで抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質試料について行った。20µlの各試料をWYATT（登録商標）使い捨てキュベットに加えた後、試料を10µlの鉱油（Sigma 8410）で覆い、蒸発を防いだ。三重測定（5個の取得／各測定）を抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質試料ごとに平均化した。選択された温度間隔による実験の最中に、熱走査速度は、1.5℃/分になるように算出した。各試料を測定しながら、標的温度が75℃（約40分）に到達するまで温度を継続的に加熱した。凝集温度（T_{agg}）は、DYNAMICS（商標）7.6.0.48ソフトウェア（Wyatt, Santa Barbara, California）で開始分析方法により分析した。種々の試料の測定された凝集開始温度（T_{agg}）を表7に示した。

40

【0376】

酸性安定性は、以下のように評価した。各抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質試料は、異なるpH：3.6、3.3、3.0及び2.7を有する50mMのクエン酸

50

ナトリウム緩衝液中で10mg/mlにて調製し、1つの対照は、pH7.2のリン酸ナトリウム緩衝液で調製した。室温で酸性条件下での暴露の1時間後、リン酸ナトリウム緩衝液によって試料をpH7.2に中和した。その後、各試料は、純度分析及びSPR活性のためにSDS-PAGEで検出した。種々の酸性条件での活性濃度のパーセントを表7にまとめた。

【0377】

凍結融解安定性は、以下のように試験した。4%スクロース、50mMのヒスチジン及び50mMのアルギニン（pH6.0）を有する緩衝液中の>50mg/mlの濃度での抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質試料を5回サイクルで完全に凍結融解した。全ての試料の無傷で完全な単量体分子の画分をSEC-HPLCで評価し、データを記録し、製造者によって提供されるCHROMELEON（商標）ソフトウェアを用いて分析した。凍結融解サイクル後の各抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の回収率を表7に示した。

【0378】

表7のデータは、試験した全てのヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質が、熱、酸性、及び凍結融解の安定性試験で安定であったことを示した。

表7．ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の安定性分析

【表7-1】

構築物	熱安定性	酸性安定性	凍結融解安定
-----	------	-------	--------

【表7-2】

	Tagg (°C)	活性濃度 (%)					性
		対照	pH3.6	pH3.3	pH3.0	pH2.7	回収率 (%)
AS19584VH28-Fc	66.0	100	99.9	100	100	100	101
AS19886VH5-Fc	60.2	100	99.9	100	100	100	112
AS19886VH8-Fc	66.0	100	100.4	100.3	99.7	99	103

【0379】

疎水性分析

ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の疎水性は、疎水性相互作用 クロマトグラフィー（HIC）によって試験した。各試料は、移動相としてトリス緩衝液（pH7.0）を含有する（NH₄）₂SO₄の量を1ml/分の流量で増加させながら、TSKgel（登録商標）ブチル-NPR HPLCカラム上で分析した。保持時間を使用して、各試料の疎水性を比較した。表8に示すように、全てのヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質は、疎水性に関して適格である。

表8．ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の疎水性分析

【表8】

構築物	保持時間(分)
AS19584VH28-Fc	21.6
AS19886VH5-Fc	18.7
AS19886VH8-Fc	18.7

【0380】

溶解度分析

溶解度を評価するため、精製したヒト化抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質を、交差相互作用クロマトグラフィー（CIC）カラムを用いて測定した。プールマウス血清から精製したネズミポリクローナル抗体は、S i g M a - A l d r i c h（I 5 3 8 1）から購入した。ネズミポリクローナル抗体を樹脂マトリックスに約30mg/mLで連結させた。PBS緩衝液中の精製抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質を、ネズミI g G連結カラム及び対照カラムに0.05～0.20mg/mLの範囲の濃度でそれぞれ注入した。保持時間を使用して、表9に報告された保持因子 k' 値を算出した： $k' = (V_r - V_o) / V_o = (T_r - T_m) / T_m$ 。V_rは、タンパク質連結カラム上の試料の溶出体積を表し、V_oは、対照カラムからの溶出体積を表し、T_rは、タンパク質連結カラム上の保持時間を表し、T_mは、対照カラム上の保持時間を表す。多くの試料を同じカラム上で2回ランさせた。 k' 値>0.6の抗体は、一般的に大幅に少ない可溶性である。表9によれば、全てのヒト化抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質試料は、優れた溶解度を示した。

表9．ヒト化抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質の溶解度分析

【表9-1】

構築物	K'
AS19584VH28-Fc	0.041

【表9-2】

AS19886VH5-Fc	-0.037
AS19886VH8-Fc	0.030

【0381】

表面プラズモン共鳴（SPR）による標的タンパク質結合及び種間反応試験

B I A c o r e T 2 0 0 機器を利用して、SPRによる各抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質の親和性定数（ K_D ）を決定した。簡単に言えば、ヒト、カニクイザルまたはマウスTIGIT-His（A c r o b i o s y s t e m s）を、100RU以下の密度でCM5センサーチップにアミンカップリングさせた。抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質を5以上の異なる濃度で注入した。動態データを表10にまとめた。表10．TIGITに対する抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質の親和性決定

【表 10】

標的	構築物	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
ヒト TIGIT-His	AS19584VH28-Fc	7.3E+05	2.1E-04	2.9E-10
	AS19886VH5-Fc	5.5E+05	1.6E-03	2.9E-09
	AS19886VH8-Fc	7.3E+05	1.7E-03	2.4E-09
	AS19584-Fc	9.5E+05	3.4E-04	3.5E-10
	AS19886-Fc	8.8E+05	2.3E-03	2.6E-09
	22G2	1.4E+06	1.6E-04	1.2E-10
カニクイサル TIGIT-His	AS19584VH28-Fc	3.4E+05	1.2E-02	3.4E-08
	AS19886VH5-Fc	9.5E+04	2.7E-02	2.8E-07
	AS19886VH8-Fc	1.4E+05	2.3E-02	1.6E-07
	AS19584-Fc	4.6E+05	1.7E-02	3.8E-08
	AS19886-Fc	1.4E+05	1.1E-02	7.6E-08
	22G2	1.3E+06	5.6E-03	4.1E-09
マウス TIGIT-His	AS19584VH28-Fc	6.2E+05	4.9E-04	7.8E-10
	AS19886VH5-Fc	/	/	/
	AS19886VH8-Fc	/	/	/
	AS19584-Fc	8.8E+05	4.9E-04	5.5E-10
	AS19886-Fc	/	/	/
	22G2	/	/	/

10

20

【0382】

FACS分析によるリガンド結合のCHO-TIGIT細胞結合及び阻害

抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質が、CHO-K1細胞上で発現したTIGITに結合して、CD155リガンド結合を遮断する能力は、実施例2に記載のものと
同じ方法で判断した。抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の結合及び遮断能力
のEC₅₀を表11にまとめた。全てのヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク
質は、それらの親抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質に匹敵する結合及び遮断
能力を有する。

30

表11. TIGITに対する抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の結合及び遮断データ

【表 11】

構築物	結合アッセイ EC50 (nM)		遮断アッセイ EC50 (nM)
	ヒト	カニクイサル	ヒト
AS19584VH28-Fc	0.432	1.017	1.651
AS19886VH5-Fc	0.657	2.062	2.818
AS19886VH8-Fc	0.676	2.277	2.486
AS19584-Fc	0.391	0.664	1.700
AS19886-Fc	0.541	1.354	2.377
22G2	0.494	1.120	1.944

40

【0383】

TIGIT/CD155遮断レポーターアッセイ及びIL-2放出アッセイ

TIGIT/CD155遮断レポーターアッセイ：研究は、実施例2に記載の方法に従
って実施した。22G2は、陽性対照として機能した。データ曲線を図7に示し、表12
にまとめる。ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質が、リガンド遮断に関
して、それらの親クローンに匹敵する機能を有することを結果が示している。

50

【0384】

IL-2 放出アッセイ：GenScriptが開発したCD155発現標的細胞を96ウェルプレートで一晩培養した後、連続希釈の抗TIGIT抗体または抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質でインキュベートし、その後、社内開発されたTIGITエフェクター細胞を適切なE:T比で加えた。37℃、5%CO₂での誘導の24時間後、細胞培養上清中のインターロイキン2（IL-2）の濃度をヒトIL-2 HTRFアッセイキットによって測定した。GraphPad Prism 6ソフトウェアで4パラメーターロジスティック曲線分析を行った。データ曲線を図8に示し、表12にまとめる。22G2は、陽性対照として機能した。ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質が、エフェクターT細胞中のIL-2放出誘導に関して、それらの親クローンに匹敵する機能を有することを結果が示している。

表12．抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の機能性アッセイ

【表12】

構築物	レポーターアッセイ EC50 (nM)	IL-2 放出アッセイ EC50 (nM)
AS19584VH28-Fc	2.12	0.818
AS19886VH5-Fc	3.54	3.150
AS19886VH8-Fc	3.27	5.850
AS19584-Fc	2.20	1.025
AS19886-Fc	3.16	2.644
22G2	3.04	3.072

【0385】

実施例5：ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質のインビボ研究

ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の薬物動態研究

8週齢のC57BL/6マウスは、3mg/kgの用量で、22G2またはAS19584VH28-Fc融合タンパク質のいずれかの1回の静脈内ボラス注射を受けた。種々の時点で、末梢血液試料を収穫し、血漿を調製し、サンドイッチELISAを用いて検査抗体の濃度を決定した。WinNonlinを使用して、各検査抗体の薬物動態プロファイル为非コンパートメント分析でモデリングした（モデル201）。データを表13にまとめ、薬物動態曲線を図9に示した。モノクローナル抗体と比較して、抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質は、半減期が短く、クリアランスが高いが、定常状態での見かけの分布量が大きいことを、本研究及びいくつかの他のもの（データ不図示）の結果が示している。

表13．モノクローナル抗TIGIT抗体及びヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の薬物動態プロファイル

【表13】

パラメーター	単位	22G2	AS19584VH28-Fc
t _{1/2} (終末相半減期)	hr	267.031±8.071	207.153±14.739
CL	ml/hr/kg	0.262±0.005	0.459±0.064
C _{max}	μg/ml	55.973±6.805	51.344±7.644
V _{ss}	ml/kg	102.086±3.562	138.449±6.166
MRT	hr	389.45±6.564	304.32±33.505
AUC _{0-t}	hr*μg/ml	9535.171±260.896	5910.564±673.563
AUC _{0-∞}	hr*μg/ml	11449.56±207.903	6616.818±941.466

【0386】

MC38腫瘍を担持するTIGIT-ヒト化マウスにおけるヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の効力

MC38腫瘍細胞を培養し、マグネシウム及びカルシウムを含まないHBSS^{-/-}中に懸濁させて、 1×10^6 個の細胞を、6～8週齢の、ヒトTIGITノックイン(KI)を有する雌のC57BL/6マウスの脇腹に皮下注射した(Biocytogen)。腫瘍体積は、キャリパーを用いて測定し、式：(長さ×幅×幅)/2で算出した。平均腫瘍体積が90～100mm³に到達した場合、マウスを無作為化して、処置を開始した。被験物質を、腹腔内(i.p.)を介して4日に一度投与した。研究全体を通して体重を測定した。

【0387】

図10A及び10Bに示すように、3つのヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質を含む全ての検査抗体、及び陽性対照22G2は、MC38腫瘍の増殖を著しく阻害し、ヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質のインビボ効力を実証した。本研究におけるヒト化抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質に対する22G2の優れた効力(インビトロ研究結果と矛盾する)は、規則完全長抗体(図9及び表13も参照されたい)と比較して抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質の短い半減期、ならびにこの場合に適用された低試験用量に恐らくよるものである。

【0388】

実施例6：PD-1/PD-L1及びTIGITを標的化する概念証明型(POC)二重特異性分子の生成及びインビトロ特徴付け

PD-1×TIGIT及びPD-L1×TIGIT POC二重特異性抗原結合タンパク質(BABP)の構築及び発現

BABPは、完全長抗体に融合した抗TIGIT sdAb、または、Fc領域がC末端にある完全長抗体由来のscFvまたはFab領域、例えば、抗PD-1抗体、例えば、キイトルーダ(登録商標)(ペンブロリズマブ)、PD1-BM-min、オブジーボ(登録商標)(ニボルマブ)、または抗PD-L1抗体、例えば、テセントリク(登録商標)(アテゾリズマブ)、IMFINZI(商標)(デュルバルマブ)、バベンチオ(登録商標)(アベルマブ)、またはヒト化53C1(h53C1)で構築することができる。抗TIGIT sdAbは、リンカー(例えば、9-アミノ酸Gly/Serリンカー(9GSリンカー)、ヒトIgG1(hIgG1)ヒンジ、または変異型hIgG1ヒンジ)を介して、またはリンカーを介さずに、完全長抗体(または、Fc領域がC末端にある完全長抗体由来のscFvまたはFab領域)に連結することができる。BABPは、図17～26に例示するいずれかの構成であり得る。例えば、抗TIGIT sdAbは、N末端またはC末端を介して、重鎖の少なくとも1つ、軽鎖の少なくとも1つ、または重鎖及び軽鎖の両方に融合することができる(図17～20を参照)。

【0389】

本実施例は、概念証明型(POC)のPD-L1×TIGIT BABPの構築及び発現について説明する。抗TIGIT sdAb AS19584は、変異型ヒトIgG1(hIgG1)ヒンジを介して、抗PD-L1抗体h53C1(BTP-4及びBTP-5)またはテセントリクバイオシミラー(BTP-6及びBTP-7)の重鎖のN末端に融合した。野生型ヒトIgG1 FcをBTP-5及びBTP-7に使用した一方、エフェクターレスヒトIgG1(不活性hIgG1)FcをBTP-4及びBTP-6に使用した。全てのPOC PD-L1×TIGIT BABP構築物は、図17に示す構造を有する。POC BABP構築物は、Exp1293F細胞で一時的に発現され、プロテインA親和性カラムでタンパク質を精製した。タンパク質純度をSEC-HPLCで決定した。結果を表14にまとめた。

表14. POC PD-L1×TIGIT BABPの発現

10

20

30

40

50

【表 1 4】

構築物	産生 (mg/L)	純度 (%)	エンドトキシンレベル (EU/mg)
BTP-4	98.4	97.09	0.1
BTP-5	114.1	99.52	0.1
BTP-6	269.8	95.27	0.1
BTP-7	318.6	95.15	0.1

【0390】

BABPの親和性決定

POC PD-L1×TIGIT BABPをその親エレメント（抗PD-L1 Ab及び抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質）と比較するため、テセントリク（登録商標）のFc領域を、対照として野生型ヒトIgG1（hIgG1）Fcに変更し、h53C1及びAS19584-Fc融合タンパク質は、対照として、野生型hIgG1 FcまたはエフェクターレスヒトIgG1（不活性hIgG1）Fcのいずれかで産生した。ヒト及びマウスTIGIT-His及びヒトPD-L1は、Acrobiosystemsから購入した。POC PD-L1×TIGIT BABPの親和性は、実施例2に記載のように試験し、データを表15に示した。PD-L1×TIGIT BABPは、それらの親エレメントのモノクローナル抗体、及び対応するアイソタイプを有する抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質と比較して、標的タンパク質への親和性が同等または僅かに減少している。

表15. POC PD-L1×TIGIT BABPの親和性決定

【表 1 5】

親和性 (K _d , M)	ヒト PD-L1	ヒト TIGIT	マウス TIGIT
BTP-4 (h53C1 不活性 IgG1)	5.1E-10	4.1E-10	5.6E-10
BTP-5 (h53C1 IgG1)	4.9E-10	4.1E-10	5.9E-10
BTP-6 (テセントリク [®] イオシミア-不活性 IgG1)	3.4E-10	3.6E-10	5.4E-10
BTP-7 (テセントリク [®] イオシミア IgG1)	3.4E-10	4.1E-10	5.6E-10
h53C1 (IgG1)	5.0E-10	/	/
h53C1 (不活性 IgG1)	4.1E-10	/	/
テセントリク [®] イオシミア (IgG1)	3.1E-10	/	/
テセントリク [®] イオシミア (不活性 IgG1)	2.8E-10	/	/
AS19584-Fc (IgG1)	/	4.0E-10	5.7E-10
AS19584-Fc (不活性 IgG1)	/	4.9E-10	7.1E-10

【0391】

FACS分析によるリガンド結合のCHO-TIGITまたはCHO-PD-L1細胞結合及び阻害

POC PD-L1×TIGIT BABPが、CHO細胞上で発現したTIGITに結合し、CHO-TIGIT細胞へのCD155結合を遮断する能力は、実施例2に記載されるように評価した。CHO細胞上で発現したPD-L1に結合し、CHO-PD-L1細胞へのPD-1結合を遮断する能力についても、実施例2に記載されるように同様に評価した。22G2は、陽性抗TIGIT Ab対照として使用した。結果を表16にまとめる。PD-L1×TIGIT BABPは、それらの親エレメントのモノクローナル抗体（抗PD-L1 Ab）、及び対応するアイソタイプを有する抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質と比較して、標的細胞結合及びリガンド遮断能力が同等または僅かに減少している。

表16. POC PD-L1×TIGIT BABPの結合及び遮断データ

【表 16】

EC50 (nM)	PD-L1		TIGIT	
	結合	遮断	結合	遮断
BTP-4(h53C1 不活性 IgG1)	0.627	0.469	1.008	0.913
BTP-5(h53C1 IgG1)	0.636	0.468	0.829	1.013
BTP-6(テセントリクハ [®] イオシミラー不活性 IgG1)	2.957	2.275	3.729	6.166
BTP-7(テセントリクハ [®] イオシミラー IgG1)	1.692	1.285	1.427	2.473
h53C1(IgG1)	0.466	0.432	/	/
h53C1(不活性 IgG1)	0.451	0.339	/	/
テセントリクハ [®] イオシミラー(IgG1)	1.292	0.872	/	/
テセントリクハ [®] イオシミラー(不活性 IgG1)	1.288	0.873	/	/
AS19584-Fc(IgG1)	/	/	0.713	0.884
AS19584-Fc(不活性 IgG1)	/	/	1.036	1.415
22G2(IgG1)	/	/	2.455	1.113

10

【0392】

POC PD-L1×TIGIT BABPのインビトロ機能性アッセイ

PD-L1細胞ベースアッセイ：PD-L1標的細胞（GS-C2/PD-L1、GenScript、カタログ番号M00613）を一晩培養した後、連続希釈の検査試料でインキュベートし、その後、PD-1エフェクター細胞（GS-J2/PD-1、GenScript、カタログ番号M00612）を適切なE：T比で加えた。37℃、5%CO₂での誘導の6時間後、One-Glo（商標）ルシフェラーゼアッセイ試薬を加え、発光を判断した。GraphPad Prism 6ソフトウェアで4パラメーターロジスティック曲線分析を行った。結果を図11に示す。

20

【0393】

混合リンパ球反応（MLR）：樹状細胞（DC）及びCD4⁺T細胞をヒト末梢血単核細胞（PBMC）から単離した。FACSアッセイにおける共刺激分子及びMHCクラスIIの発現についてDCを分析した（それらの表面マーカー、CD1a、CD83、CD86、及びHLA-DRの発現データを検証した、データ不図示）。適切な比のCD4⁺T細胞及びDCを96ウェルプレートのウェルに播種し、検査抗体で処理した。アッセイプレートを37℃/5%CO₂インキュベーターで72時間インキュベートし、ヒトIL2 HTRFキット（Cisbio、カタログ番号64IL2PEB）を用いて、細胞が放出したIL-2を測定した。結果を図12に示す。

30

【0394】

TIGIT/CD155遮断レポーターアッセイ及びIL-2放出アッセイは、実施例2及び実施例4に記載の方法にそれぞれ従って実施した。結果を図13、図14にそれぞれ示す。

【0395】

上記のインビトロ細胞ベース機能性アッセイの全ての結果を表17にまとめた。POC PD-L1×TIGIT BABPは、それらの親エレメントのモノクローナル抗体（抗PD-L1 Ab）、及び対応するアイソタイプを有する抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質と比較して、同等または僅かに減少したインビトロ機能を示した。表17. POC PD-L1×TIGIT BABPのインビトロ機能性アッセイ

40

50

【表 17-1】

EC50 (nM)	PD-L1	MLR	TIGIT	
			レポーターアッセイ	IL-2 放出
BTP-4(h53C1 不活性 IgG1)	1.792	0.924	4.00	1.562
BTP-5(h53C1IgG1)	1.968	1.045	3.99	2.403
BTP-6(テセントリクハ [®] イオシミラー不活性 IgG1)	3.202	1.753	4.37	6.428
BTP-7(テセントリクハ [®] イオシミラー IgG1)	1.812	1.534	3.76	4.083
h53C1(IgG1)	1.871	0.270	/	/
h53C1(不活性 IgG1)	1.810	0.499	/	/
テセントリクハ [®] イオシミラー(IgG1)	2.060	1.942	/	/
テセントリクハ [®] イオシミラー(不活性 IgG1)	1.534	1.590	/	/
AS19584(IgG1)	/	>100	2.44	1.992

10

【表 17-2】

AS19584(不活性 IgG1)	/	>100	3.40	1.820
22G2(IgG1)	/	>100	6.01	2.263

20

【0396】

PD-L1/TIGIT細胞ベース二機能性レポーターアッセイ：PD-L1/CD155 標的細胞（PD-L1 及び CD155 を発現する細胞）を一晩培養した後、連続希釈の検査試料でインキュベートし、その後、PD-L1/TIGITエフェクター細胞（PD-L1 及び TIGIT を発現する細胞）を適切な E:T 比で加えた。37℃、5%CO₂での誘導の6時間後、One-Glo（商標）ルシフェラーゼアッセイ試薬を加え、発光を判断し、エフェクター細胞活性化を表した。

【0397】

図15に示すように、h53C1は、PD-L1を遮断することによって、T細胞においてIL-2発現を誘導することができた。低用量と高用量の間の効果の差異は最小であった。TIGIT遮断剤であるAS19584-Fc（IgG1または不活性IgG1）のみは、アッセイ条件においてT細胞を活性化することができない。比較して、POC PD-L1×TIGIT BAP（BTP-4及びBTP-5）は、それらの親エレメントのモノクローナル抗体（抗PD-L1 Ab）、及び対応するアイソタイプを有する抗TIGIT s d Ab-Fc融合タンパク質と比較して、エフェクター細胞におけるIL-2発現を誘導することによってT細胞機能を増強させる能力が優れていることを示した。POC PD-L1×TIGIT BAPの効果は、対応する組み合わせ（h53C1+AS19584-Fc、IgG1または不活性IgG1 Fc断片のいずれかを有する）のものに匹敵した。

30

【0398】

実施例7：PD-L1及びTIGITを標的化するPOC PD-L1×TIGIT BAPのインビボ効力

MC38-hPD-L1腫瘍モデルを担持するC57BL/6ヒトPD-1ノックイン（KI）マウスの効力研究

MC38腫瘍細胞におけるマウスPD-L1遺伝子をノックアウトして、ヒトPD-L1は、レンチウイルス形質導入によって安定して発現された。生成したMC38-hPD-L1細胞を培養し、マグネシウム及びカルシウムを含まないHBSS中に懸濁させて、1×10⁶個の細胞を、6～8週齢の雌のC57BL/6ヒトPD-1 KIマウス（Biocytogen）の脇腹に皮下注射し、ここで、ネズミPD-1遺伝子の細胞外ドメインは、ヒト対応物に置き換えている。腫瘍体積は、キャリパーを用いて測定し、

40

50

式：（長さ×幅×幅）／2で算出した。平均腫瘍体積が90～100mm³に到達した場合、マウスを無作為化して、処置を開始した。被験物質を、腹腔内（i.p.）を介して3回投与した。研究全体を通じて体重を測定した。

【0399】

図16A及び16Bに示すように、h53C1及びAS19584-Fc（野生型IgG1を有する）のみは両方とも、PD-L1及びTIGITをそれぞれ遮断することによって、MC38-hPD-L1腫瘍成長を適度に遅れさせたが、統計的有意性はなかった。h53C1及びAS19584-Fcの併用療法は、いずれかの単剤療法の効力を改善させず、一部の動物は、非応答であった。しかしながら、BTP-5を受けた動物は、腫瘍成長が一貫して遅れ、POC PD-L1×TIGIT BABPが、インビボでの単剤療法のいずれか及び併用療法より良い治療効力を有することを示した。

10

【0400】

実施例8：PD-1×TIGIT及びPD-L1×TIGIT BABPの生成

PD-1×TIGIT及びPD-L1×TIGIT BABPの構築

この実施例は、PD-L1×TIGIT及びPD-1×TIGIT BABPの構造を説明する。

【0401】

ヒト化抗TIGIT sdAb AS19584VH28は、抗PD-L1モノクローナルAb h53C1の重鎖N末端、重鎖C末端、軽鎖N末端、または軽鎖C末端に融合されて、リンカーとして変異型ヒトIgG1（hIgG1）ヒンジを介して、PD-L1×TIGIT BABP BTP-15、BTP-16、BTP-17、及びBTP-18をそれぞれ生成した。h53C1の重鎖は、野生型ヒトIgG1 Fc領域を含む。BTP-15、BTP-16、BTP-17、及びBTP-18は、図17、図18、図19、及び図20に示す例示的な構造をそれぞれ有する。

20

【0402】

ヒト化抗TIGIT sdAb AS19584VH28は、抗PD-1抗体の重鎖N末端、重鎖C末端、軽鎖N末端、または軽鎖C末端に融合されて、リンカーとして変異型ヒトIgG1（hIgG1）ヒンジを介して、PD-1×TIGIT BABPを生成した。抗PD-1抗体の重鎖は、ヒトIgG4 Fc領域を含む。PD-1×TIGIT BABPは、図17～20に示す例示的な構造を有する。

30

【0403】

実施例9：PD-1×TIGIT及びPD-L1×TIGIT BABPの生成及び特徴付け

PD-1×TIGIT及びPD-L1×TIGIT BABPの構築

この実施例は、PD-L1×TIGIT及びPD-1×TIGIT BABPの構造を説明する。

【0404】

ヒト化抗TIGIT sdAb AS19584VH28は、抗PD-1モノクローナルAb PD1-BM-minの重鎖N末端、重鎖C末端、軽鎖N末端、または軽鎖C末端に融合されて、リンカーとして変異型ヒトIgG1（hIgG1）ヒンジを介して、PD-1×TIGIT BABP BTP-11、BTP-12、BTP-13、及びBTP-14をそれぞれ生成した。PD1-BM-minの重鎖は、ヒトIgG4 Fc領域を含む。BTP-11、BTP-12、BTP-13、及びBTP-14は、図17、図18、図19、及び図20に示す例示的な構造をそれぞれ有する。

40

【0405】

ヒト化抗TIGIT sdAb AS19584VH28は、抗PD-L1モノクローナルAb h53C1の重鎖N末端、重鎖C末端、軽鎖N末端、または軽鎖C末端に融合されて、リンカーとして変異型ヒトIgG1（hIgG1）ヒンジを介して、PD-L1×TIGIT BABP BTP-15、BTP-16、BTP-17、及びBTP-18をそれぞれ生成した。h53C1の重鎖は、野生型ヒトIgG1 Fc領域を含む。BTP

50

－１５、ＢＴＰ－１６、ＢＴＰ－１７、及びＢＴＰ－１８は、図１７、図１８、図１９、及び図２０に示す例示的な構造をそれぞれ有する。

【０４０６】

ヒト化抗ＴＩＧＩＴ ｓｄＡｂ ＡＳ１９５８４ＶＨ２８は、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナルＡｂ ｈ５３Ｃ１の重鎖Ｎ末端または軽鎖Ｎ末端に融合されて、リンカーとして変異型ヒトＩｇＧ１（ｈＩｇＧ１）ヒンジを介して、ＰＤ－Ｌ１×ＴＩＧＩＴ ＢＡＢＰ ＢＴＰ－２１及びＢＴＰ－２２をそれぞれ生成した。ｈ５３Ｃ１の重鎖は、不活性ヒトＩｇＧ１Ｆｃ領域を含む。ＢＴＰ－２１及びＢＴＰ－２２は、図１７及び図１９に示す例示的な構造をそれぞれ有する。

【０４０７】

ＢＡＢＰの親和性決定

ヒトＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ヒトＴＩＧＩＴ、及びマウスＴＩＧＩＴに対するＢＡＢＰの親和性は、上述のように評価した。結果を表１８にまとめた。簡単に言えば、ＰＤ－１×ＴＩＧＩＴ ＢＡＢＰをその親エレメント（抗ＰＤ－１Ａｂ及び抗ＴＩＧＩＴ ｓｄＡｂ－Ｆｃ融合タンパク質）と比較するため、ＰＤ１－ＢＭ－ｍｉｎ及びＡＳ１９５８４ＶＨ２８－Ｆｃ融合タンパク質は、対照として、野生型ヒトＩｇＧ４ Ｆｃで産生した。ＰＤ－Ｌ１×ＴＩＧＩＴ ＢＡＢＰをその親エレメント（抗ＰＤ－Ｌ１ Ａｂ及び抗ＴＩＧＩＴ ｓｄＡｂ－Ｆｃ融合タンパク質）と比較するため、ｈ５３Ｃ１及びＡＳ１９５８４ＶＨ２８－Ｆｃ融合タンパク質は、対照として、エフェクターレスヒトＩｇＧ１（不活性ｈＩｇＧ１）で産生した。ヒト及びマウスＴＩＧＩＴ－Ｈｉｓ、及びヒトＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１は、Ａｃｒｏｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓから購入した。ＰＤ－１×ＴＩＧＩＴ ＢＡＢＰ及びＰＤ－Ｌ１×ＴＩＧＩＴ

ＢＡＢＰの両方は、それらのそれぞれの親エレメント：対応するアイソタイプを有するモノクローナル抗体及び抗ＴＩＧＩＴ ｓｄＡｂ－Ｆｃ融合タンパク質と比較して、標的タンパク質に対する親和性が、同程度であるかまたはほんの少しだけ低下している。

表１８．ＰＤ－１×ＴＩＧＩＴ ＢＡＢＰ及びＰＤ－Ｌ１×ＴＩＧＩＴ ＢＡＢＰの親和性決定

【表１８－１】

実験	親和性 (K_D , M)	ヒト PD-1	ヒト TIGIT	マウス TIGIT
#1 PD-1/TIGIT (IgG4)	BTP-11 (IgG4)	4.0E-09	2.8E-10	5.0E-10
	BTP-13 (IgG4)	4.2E-10	2.6E-10	6.2E-10
	PD1-BM-min (IgG4)	1.2E-09	/	/
	AS19584VH28 (IgG4)	/	6.8E-10	1.1E-09
	親和性 (K_D , M)	ヒト PD-L1	ヒト TIGIT	マウス TIGIT
#2 PD-L1/TIGIT (IgG1)	BTP-15 (IgG1)	5.4E-10	2.5E-10	7.5E-10
	BTP-17 (IgG1)	6.5E-10	2.6E-10	8.1E-10
	h53C1 (IgG1)	3.5E-10	/	/
	AS19584VH28 (IgG1)	/	2.9E-10	1.0E-09
#3 PD-L1/TIGIT (不活性 IgG1)	BTP-21 (不活性 IgG1)	5.0E-10	3.0E-10	7.9E-10
	BTP-22 (不活性 IgG1)	7.9E-10	3.1E-10	7.7E-10
	h53C1 (不活性 IgG1)	4.4E-10	/	/

【表１８－２】

	AS19584VH28 (不活性 IgG1)	/	3.6E-10	1.1E-09
--	------------------------	---	---------	---------

【０４０８】

FACS分析によるリガンド結合のCHO-TIGIT、CHO-PD-1またはCHO-PD-L1細胞結合及び阻害

PD-1×TIGIT BABP及びPD-L1×TIGIT BABPが、CHO細胞上で発現したPD-1、PD-L1またはTIGITに結合する能力、及び、CHO-PD-L1細胞へのPD-1の結合、CHO-PD-1細胞へのPD-L1の結合、またはCHO-TIGIT細胞へのCD155の結合を遮断するそれらの能力は、実施例2に記載されるように評価した。22G2(IgG1)は、抗TIGITモノクローナル抗体であり、公開配列に従って発現される。Tiragolumab(臨床試験における抗TIGITモノクローナル抗体)、デュルバルマブ及びアテゾリズマブ(両方とも市販の抗PD-L1抗体として)は、それらの公開配列に従って発現され、追加の対照として使用した。結果を表19にまとめる。PD-1×TIGIT BABPは、それらの親エレメントのモノクローナル抗体(抗PD-1Ab、PD-1-BM-min)、及び対応するアイソタイプを有する抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質と比較して、標的細胞結合及びリガンド遮断能力が同等またはほんの僅かに減少している。PD-L1×TIGIT BABPは、それらの親エレメントのモノクローナル抗体(抗PD-L1Ab、h53C1)、及び対応するアイソタイプを有する抗TIGIT sdAb-Fc融合タンパク質と比較して、標的細胞結合及びリガンド遮断能力が同等またはほんの僅かに減少している。

表19. PD-1×TIGIT BABP及びPD-L1×TIGIT BABPの結合及び遮断データ

【表19-1】

実験	EC50 (nM)	PD-1		TIGIT	
		結合	遮断	結合	遮断
#1PD-1/TIGIT(IgG4)	BTP-11(IgG4)	6.308	8.681	1.405	0.9255
	BTP-13(IgG4)	1.921	2.211	1.354	1.111
	PD1-BM-min(IgG4)	1.715	1.508	/	/
	AS19584VH28(IgG4)	/	/	2.398	0.8913
	EC50 (nM)	PD-L1		TIGIT	
		結合	遮断	結合	遮断
#2PD-L1/TIGIT(IgG1)	BTP-15(IgG1)	3.530	1.834	1.792	0.2166
	BTP-17(IgG1)	3.564	2.352	0.8443	0.6238
	h53C1(IgG1)	1.248	0.6361	/	/
	AS19584VH28(IgG1)	/	/	0.8914	0.3353
#3PD-L1/TIGIT(不活性 IgG1)	BTP-21(不活性 IgG1)	3.357	3.662	3.096	3.139
	BTP-22(不活性 IgG1)	4.856	5.910	4.590	4.471
	h53C1(不活性 IgG1)	2.006	1.967	/	/
	AS19584VH28(不活性 IgG1)	/	/	5.762	4.779
	アテゾリズマブ	2.940	3.355	/	/
	デュルバルマブ	0.7440	0.8597	/	/
	22G2(IgG1)	/	/	1.600	2.307

【表19-2】

	Tiragolumab	/	/	2.236	2.421
--	-------------	---	---	-------	-------

【0409】

インビトロ機能性アッセイ

PD-1×TIGIT BABP及びPD-L1×TIGIT BABPのインビトロ機

能は、実施例 2、4 及び 6 に記載されたものと同様に、TIGIT に対する PD-1 細胞ベースアッセイ、PD-L1 細胞ベースアッセイ、TIGIT 細胞ベースレポーターアッセイ及び IL-2 放出アッセイによって分析した。22G2 (IgG1) は、抗 TIGIT モノクローナル抗体であり、公開配列に従って発現される。Tiragolumab (臨床試験における抗 TIGIT モノクローナル抗体)、デュルバルマブ及びアテゾリズマブ (両方とも市販の抗 PD-L1 抗体として) は、それらの公開配列に従って発現され、追加の対照として使用した。結果を表 20 にまとめる。PD-1 × TIGIT BABP 及び PD-L1 × TIGIT BABP は、それらの親エレメントのモノクローナル抗体 (それぞれ、PD1-BM-min 及び h53C1)、及び対応するアイソタイプを有する抗 TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質と比較して、同等またはほんの僅かに減少したインビトロ機能を示した。PD-L1 × TIGIT BABP BTP-21 及び BTP-22 は、市販の抗 TIGIT 抗体 Tiragolumab と比較して、さらに良好な TIGIT 遮断機能を呈した。

表 20. PD-1 × TIGIT BABP 及び PD-L1 × TIGIT BABP のインビトロ機能性アッセイ

【表 20-1】

実験	EC50 (nM)	PD-1	TIGIT	
			レポーターアッセイ	IL-2 放出
#1 PD-1/TIGIT (IgG4)	BTP-11 (IgG4)	8.514	7.814	0.778
	BTP-13 (IgG4)	2.326	4.027	0.565
	PD1-BM-min (IgG4)	1.209	/	/
	AS19584VH28 (IgG4)	/	4.058	0.737
	ペンゾリスマブ (抗 PD-1)	1.596	/	/
	EC50 (nM)	PD-L1	TIGIT	
			レポーターアッセイ	IL-2 放出
#2 PD-L1/TIGIT (IgG1)	BTP-15 (IgG1)	8.106	21.65	2.450
	BTP-17 (IgG1)	3.836	2.611	0.509
	h53C1 (IgG1) (抗 PD-L1)	4.017	/	/
	AS19584VH28 (IgG1)	/	3.123	0.223
#3 PD-L1/TIGIT (不活性 IgG1)	BTP-21 (不活性 IgG1)	5.042	5.913	試験せず
	BTP-22 (不活性 IgG1)	5.826	5.353	
	h53C1 (不活性 IgG1)	6.875	/	
	AS19584VH28 (不活性 IgG1)	/	5.420	
	アテゾリズマブ (抗 PD-L1)	5.146	/	
	デュルバルマブ (抗 PD-L1)	5.499	/	
	22G2 (IgG1) (抗 TIGIT)	/	4.648	

【表 20-2】

	Tiragolumab (抗 TIGIT)	/	11.36	
--	-----------------------	---	-------	--

【0410】

PD-L1 / TIGIT 二機能性レポーターアッセイ：PD-L1 / PD-1 経路及び CD155 / TIGIT 経路を同時に標的化することによって、PD-1 × TIGIT BABP または PD-L1 × TIGIT BABP が T 細胞を相乗的に活性化する能力を評価するため、PD-L1 / TIGIT 二機能性レポーターアッセイを実施例 6 に記載の

ように実施した。簡単に言えば、PD-L1/CD155標的細胞（PD-L1及びCD155を発現する細胞）を一晩培養した後、連続希釈の検査試料でインキュベートし、その後、PD-1/TIGITエフェクター細胞（PD-1及びTIGITを発現する細胞）を適切なE:T比で加えた。37℃、5%CO₂での誘導の6時間後、One-Glo（商標）ルシフェラーゼアッセイ試薬を加え、発光を判断し、エフェクター細胞活性化を表した。22G2（IgG1）は、抗TIGITモノクローナル抗体であり、公開配列に従って発現される。Tiragolumab（臨床試験における抗TIGITモノクローナル抗体）、ペンブロリズマブ（市販の抗PD-1モノクローナル抗体；Pembroと略称する）、デュルバルマブ及びアテゾリズマブ／テセントリク（登録商標）（両方とも市販の抗PD-L1抗体として）は、それらの公開配列に従って発現され、追加の対照として使用した。図27A～27Cから分かるように、抗PD-1、抗PD-L1、または抗TIGIT Abを用いる単剤療法は、PD-L1/PD-1及びCD155/TIGIT経路を同時に効果的に遮断して、エフェクター細胞活性化を惹起することができなかった。BTP-11、BTP-13（図27Aに示すように）、BTP-15、BTP-17（図27Bに示すように）、BTP-21及びBTP-22（図27C及び表21に示すように）は、PD-L1/PD-1及び／またはCD155/TIGIT経路を遮断することによって、レポーター細胞におけるシグナルを相乗的に惹起し、試験した単剤療法のいずれかと比較して、最大シグナルの劇的な増加を示した。BTP-11及びBTP-13はさらに、ペンブロリズマブ（抗PD-1）及び22G2（抗TIGIT）併用療法と比較して、優れたエフェクター細胞活性化機能を呈した（図27A）。BTP-21及びBTP-22 BABPは、Tiragolumab＋アテゾリズマブまたはTiragolumab＋デュルバルマブ併用療法のものと比較して、同等またはさらに良い（BTP-22）同時のPD-L1/PD-1及びCD155/TIGIT遮断活性を示した（図27C）。

表21. PD-L1×TIGIT BABPのPD-L1/TIGIT二機能性レポーターアッセイ

【表21-1】

	シグナルの上方プラット	EC50 (nM)
BTP-21	11524	12.88
BTP-22	10263	5.47
h53C1 不活性 IgG1 (抗 PD-L1)	2660	2.76
アテゾリスマブ [®] (抗 PD-L1Ab)	3527	2.36
デュルバルマブ [®] (抗 PD-L1Ab)	3109	2.66
AS19584VH28-Fc 不活性 IgG1	1608	10.57
Tiragolumab (抗 TIGIT)	983	3.61
Tiragolumab+アテゾリスマブ [®]	13636	7.99

【表21-2】

Tiragolumab+デュルバルマブ [®]	12851	9.68
----------------------------------	-------	------

【0411】

初代T細胞結合：PD-L1×TIGIT BABPが初代細胞に結合する能力を評価するため、CD8⁺T細胞単離キット（Miltenyi、カタログ番号130-096-495）またはCD4⁺T細胞単離キット（Miltenyi、カタログ番号130-096-533）のいずれかでヒト初代T細胞をPBMC（HemaCare）から単離した。単離したT細胞を活性化し、T細胞活性化／拡張キットで拡張した（Miltenyi、カタログ番号130-092-919）。実施例2に記載のようにFACS分析を行い、PD-L1×TIGIT BABPの、活性化CD8⁺及びCD4⁺T細胞のそれぞ

れへの結合を判断した。図28A及び28Bに示すように、BTP-21は、基準抗体または親抗体に匹敵する、一次CD8及びCD4 T細胞に対する強力な結合能力を実証した。

【0412】

PBMC IFN- γ 放出アッセイ：健康なドナー由来の新しく解凍したヒトPBMC (HemaCare) を、勾配濃度の被験物質の存在下で、37℃、5% CO₂でのインキュベーターにおいて、10% FBSが補充されたRPMI 1640培地中で3:1の比で、PD-L1標的細胞(GS-C2/PD-L1、GenScript、カタログ番号M00613)と72時間共培養した。その後、細胞をスピンドウンし、上清を回収して、ヒトIFN- γ HTRFキット(Cisbio、カタログ番号62HIFNGPEH)及びPHERAstar Plusマシン(BMG Labtech)を用いてIFN- γ 濃度を判断した。研究は、3人の異なるドナーで実施した。BTP-21が、基準抗体及び親抗体に匹敵するEC50を有した一方、サイトカイン放出誘導のその最大潜在性は、他のPD-L1抗体におけるものよりもBTP-21において一貫して高かったことを結果は示した(図29)。

【0413】

PD-1×TIGIT BABPのインビボ効力研究

BTP-11のインビボ抗腫瘍活性は、ヒトPD-1 KIを有するBalb/cマウスで確立した(ネズミCD155を発現する)同系CT26大腸がんモデルで評価した。このCT26腫瘍モデルは、実施例3のように構築した。腫瘍サイズが約100mm³に到達した場合、動物は処置を受け始めた。被験物質を、腹腔内(i.p.)を介して4日に一度投与した。研究全体を通じて体重を測定した。腫瘍体積が10mm³未満の動物は、無腫瘍(TF)と見なした。

【0414】

図30に示すように、CT26腫瘍モデルは、抗TIGITモノ遮断(AS19584 VH28 IgG4を参照)に部分的な耐性を示し、8匹のうち1匹のマウスのみが無腫瘍を得られた。抗PD-1抗体(PD1-BM-min)のみは、10mg/kgでPD-1 KIマウスにおけるCT26腫瘍成長を適度に阻害し、8匹のうち3匹のマウスが無腫瘍を得られた。BTP-11は、同じモル用量(12.33mg/kg)で腫瘍退縮を引き起こす優れた効果を実証し、8匹のうち5匹のマウスが無腫瘍を得られた。この効果は、同じモル用量(それぞれ、10mg/kg及び5.33mg/kg)でPD1-BM-min及びAS19584 VH28 IgG4を用いた併用療法(8匹のうち1匹のマウスのみが無腫瘍が得られた)よりもさらに良好であった。

【0415】

PD-L1×TIGIT BABPのインビボ効力研究

BTP-21のインビボ抗腫瘍活性を評価するため、ヒトPD-L1(MC38-hPD-L1)を過剰発現するネズミMC38大腸がん細胞を、実施例3に記載されたものと同様に、C57BL/6ヒトPD-1/PD-L1ダブルKIマウスに移植した。アテゾリズマブ(市販の抗PD-L1抗体)は、公開配列に従って発現され、追加の対照として使用した。腫瘍サイズが約100mm³に到達した場合、動物を無作為化して処置した。被験物質を、腹腔内(i.p.)を介して、0、4、6、及び8日目に投与した。研究全体を通じて体重を測定した。

【0416】

図31から分かるように、アテゾリズマブ及びh53C1(不活性IgG1)モノ遮断は両方とも、5mg/kgでMC38-hPD-L1腫瘍成長を阻害することができ、処置後30日目に、8匹のうち4匹のマウス、及び8匹のうち3匹のマウスが無腫瘍をそれぞれ得られた。2.67mg/kgでのAS19584 VH28不活性IgG1を用いたモノ遮断は、8匹のうち4匹の無腫瘍マウスが得られた。BTP-21及び(h53C1(不活性IgG1)及びAS19584 VH28不活性IgG1の)併用療法は、より高い率の無腫瘍マウス(それぞれ、8匹のうち6匹、及び7匹のうち6匹)を示した。BT

P-21及び併用療法が、試験したいずれの単剤療法よりも無腫瘍状態の始まりが遥かに速かったことも注目に値する。BTP-21処置群または併用療法処置群の最も早い応答者は、処置後10～15日の間に無腫瘍状態に到達した一方、単剤療法群は、いずれかのマウスが無腫瘍状態に到達するまで20～25日かかった。さらに、BTP-21は、高用量(6.17mg/kg)または同じモル用量の併用療法(5mg/kgのh53C1+2.67mg/kgのAS19584VH28不活性IgG1)でBTP-21を投与した場合と比較して、低用量(2.06mg/kg)で同様の優れた治療効果を実証した(図31)。

【0417】

上記の研究は、本明細書に記載のBABPが、PD-L1/PD-1及びCD155/TIGIT経路を同時に遮断することによって、ヒト化標的を担持するマウス腫瘍モデルにおいて、2つの経路のいずれかを標的化する単剤療法と比較して、優れた抗腫瘍活性を示したことを実証した。

【0418】

配列表

表22. 抗TIGIT sdAb配列番号

10

20

30

40

50

【表 2 2】

	配列 番号	FR1	配列 番号	CDR1	配列 番号	FR2	配列 番号	CDR2	配列 番号	FR3	配列 番号	CDR3	配列 番号	FR4
AS19584	1	QVQLAESGG GSVQAGGSL RLSCAAS	36	GKYYG VYSMG	71	WFRQAP GKEREG VA	106	AICSGGR TTYSDSV KG	141	RFTISKDSAN QILYLQMNLSL KPEDTAMYY CAA	176	RPLWTGD CDLSSSW YKT	211	WGQGTQV TVSS
AS19852	2	QVQLAESGG GSVQAGGSL RLSCAAS	37	GNTGS RRYVA	72	WFRQAP GKEREG VA	107	RLITDSGS TYADSV KG	142	RFHSQDNAKN ITVYLQMNIL KPEDTAMYY CAE	177	ELAPARS GGIWFGG RYFSY	212	WGQGTQV TVSS
AS19858	3	QIQLVESGG GSVQAGGSL RLSCATS	38	GYTYR QKCM G	73	WFRQAP GKEREG VA	108	AIYTSVG GSRTYVA DSAKG	143	RFTVSQDNAK NTVYLQMNLS LKPEDTAMYY YCAA	178	KSPYDGA CSYEADF TY	213	WGQGTQV TVSS
AS19886	4	QVQLVESGG GSVQAGGSL RLSCVA	39	SGYTY SRKCR G	74	WFRQAP GKEREG VA	109	ILYTSSG GTYFDTY ADSVRG	144	RFTISQDNAK NTVYLQMNLS LKPEDSGIYY CAA	179	RLSTDFC GPRADFD Y	214	WGQGTQV TVSS
AS19887	5	QVQLAESGG GSVQAGGSL RLSCAAS	40	GVTSD SYHMG	75	WFRQAP GKEREG VA	110	VKTGDA STYYTDS VKG	145	RFTISQDNAK NTLYLQMNLSL KPEDTAMYY CAA	180	RRGWVP APLSQYN YNY	215	WGQGTQV TVSS
AS19888	6	QVQLAESGG GSVQAGGSL RLSCEAS	41	GVAAS GYCM A	76	WFRQAP GKERER VA	111	AISSNDLV AYADSVK G	146	RFTISKDNAK ITLYLQMNLSL KPEDTAMYY CAA	181	DGGYGG YCGRLRP GTGY	216	WGQGTQV TVSS
AS20160	7	EVQLAESGG GSVQAGGSL RLSCCTS	42	GYTYS RNCMG	77	WFRQAP GKEREG VA	112	ITVSAAS TSFATYA DSVKG	147	RFTISLDKAK NTVYLQMNLS LKPEDTAMYY YCAA	182	DPPDRISN PCGPRRP DFGY	217	WGQGTQV TVSS
AS19584VH2 6	19	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	54	GKYYG VYSMG	89	WFRQAP GKLEG VS	124	AICSGGR TTYSDSV KG	159	RFTISRDNASKQ ITLYLQMNLSL AEDTAVYYC AA	194	RPLWTGD CDLSSSW YKT	229	WGQGTIV TVSS
AS19584VH2 8	21	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	56	GKYYG VYSMG	91	WFRQAP GKLEG VS	126	AICSGGR TTYSDSV KG	161	RFTISRDNASKQ ITLYLQMNLSL AEDTAVYYC AA	196	RPLWTGD CDLSSSW YKT	231	WGQGTIV TVSS
AS19584VH2 9	22	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	57	GKYYG VYSMG	92	WFRQAP GKEREG VS	127	AICSGGR TTYSDSV KG	162	RFTISRDNASKQ ITLYLQMNLSL AEDTAVYYC AA	197	RPLWTGD CDLSSSW YKT	232	WGQGTIV TVSS
AS19584VH3 0	23	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	58	GKYYG VYSMG	93	WFRQAP GKEREG VS	128	AICSGGR TTYSDSV KG	163	RFTISRDNASKN ITLYLQMNLSL AEDTAVYYC AA	198	RPLWTGD CDLSSSW YKT	233	WGQGTIV TVSS
AS19584VH3 1	24	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	59	GKYYG VYSMG	94	WFRQAP GKEREG VS	129	AICSGGR TTYSDSV KG	164	RFTISRDNASKQ ITLYLQMNLSL AEDTAVYYC AA	199	RPLWTGD CDLSSSW YKT	234	WGQGTIV TVSS
AS19886VH5 28	28	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	63	GYTYS RKCRG	98	WFRQAP GKLEG VA	133	ILYTSSG GTYFDTY ADSVRG	168	RFTISRDNASKN ITVYLQMNLSL AEDTGVYYC AA	203	RLSTDFC GPRADFD Y	238	WGQGTIV TVSS
AS19886VH8 30	30	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	65	GYTYS RKCRG	100	WFRQAP GKLEG VA	135	ILYTSSG GTYFDTY ADSVRG	170	RFTISQDNASK NTLYLQMNLSL RAEDTAVYY CAA	205	RLSTDFC GPRADFD Y	240	WGQGTIV TVSS
AS19886VH9 31	31	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	66	GYTYS RKCRG	101	WFRQAP GKLEG VA	136	ILYTSSG GTYFDTY ADSVRG	171	RFTISRDNASKN ITLYLQMNLSL AEDTAVYYC AA	206	RLSTDFC GPRADFD Y	241	WGQGTIV TVSS
AS19886VH1 0	32	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	67	GYTYS RKCRG	102	WFRQAP GKLEG VA	137	ILYTSSG GTYFDTY ADSVRG	172	RFTISRDNASKN ITVYLQMNLSL AEDTAVYYC AA	207	RLSTDFC GPRADFD Y	242	WGQGTIV TVSS
AS19886VH1 9	34	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	69	GYTYS RKCRG	104	WFRQAP GKREG VA	139	ILYTSSG GTYFDTY ADSVRG	174	RFTISRDNASK NTLYLQMNLSL RPEDTAVYYC AA	209	RLSTDFC GPRADFD Y	244	WGQGTIV TVSS
AS19886VH2 0	35	EVQLVESGG GLVQPGGSL RLSCAAS	70	GYTYS RKCRG	105	WFRQAP GKREG VA	140	ILYTSSG GTYFDTY ADSVRG	175	RFTISRDNASK NTVYLQMNLS LRPEDTAVYY CAA	210	RLSTDFC GPRADFD Y	245	WGQGTIV TVSS

配列番号 246 (AS19584 s d A b 核酸配列)

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

AAGCTCATCTTGGTATAAAACCTGGGGCCAGGGGACCCAG
GTCACCGTCTCCTCA

配列番号247 (AS19852 sdAb核酸配列)

CAGGTGCAGCTGGCGGAGTCTGGAGGAGGCTCGGTGCAGA
CTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAA
CACCGGTAGTCGCCGGTATGTGGCATGGTTCCGCCAGGCG
CCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGTGTCGCACGACTCATTACTG
ATAGTGGCAGCACATACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCG
ATTCATCATCTCCCAAGACAACGCCAAGAACACGGGTGTAT
CTGCAAATGAACACCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGT
ACTACTGTGCGGAAGAATTAGCACCCAGCTCGCAGCGGTGG
TATTTGGTTTGGTGGACGGTACTTCAAGTTACTGGGGCCAG
GGGACCCAGGTACCGTCTCCTCA

10

配列番号248 (AS19858 sdAb核酸配列)

CAGATTCAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGG
CTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAACGTCTGGATA
CACGTACAGACAGAAATGCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGGTGCGCAGCGATTTATACTT
CTGTTGGTGGTAGTAGGACATACGTTGCCGACTCCGCGAA
GGGCCGATTACCGTCTCCCAAGACAACGCCAANAACACG
GTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTG
CCATGTACTACTGTGCGGCCAAGAGTCCGTACGATGGTGC
ATGCTCTTACGAAGCTGACTTTACTTACTGGGGCCAGGGG
ACCCAGGTACCGTCTCCTCA

20

配列番号249 (AS19886 sdAb核酸配列)

CAGGTTCAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGG
CTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATA
CACCTATAGTAGGAAATGTAGGGGGCTGGTTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGGTGCGCAGCTCTTTATACTA
GTTCAAGGGGGGACATATTTTGTACACCTATGCCGACTCCGT
GAGGGGGCCGGTTCAACATCTCCCAAGACAACGCCAAGAAC
ACGGTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCGGAGGACA
GTGGCATATACTACTGTGCGGCCACGCCTGAGTACGGACTT
TTGCGGACCAAGAGCTGACTTTGATTACTGGGGCCAGGGG
ACCCAGGTACCGTCTCCTCA

30

配列番号250 (AS19887 sdAb核酸配列)

CAGGTGCAGCTGGCGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGG
CTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGT
CACCTCCGATAGTTACCAACATGGGCTGGTTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGGTGCGCAGTTATTAAACTG
GTGATGCCAGCACATACTATAACGACTCCGTGAAGGGCCG
ATTCACCATCTCCCAAGACAACGCCAAGAACACGCTGTAC
CTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGT
ACTACTGTGCGGCAAGACGGGGTTGGGTGCCGGCTCCCT
CTCGCAATATAATTATAACTATTGGGGCCAGGGGACCCAG
GTCACCGTCTCCTCA

40

配列番号251 (AS19888 sdAb核酸配列)

CAGGTGCAACTGGCGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGA
CTGGAGGGTCTCTGAGACTTTCTGTGAAGCCTCTGGAGT
GGCCGCCAGTGGCTACTGCATGGCCTGGTTCCGCCAGGCT

50

CCGGGGAAGGAGCGCGAAAGGGTCTCGCAGCTATTAGTAGTA
ATGATCTAGTTGCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT
CACCATCTCCAAGGACAACGCCAAGACCACTCTGTATCTA
CAAATGAACAACCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACT
ACTGTGCGGCAGATGGAGGTTATGGTGGTTACTGCGGACG
GTTGCGACCTGGCACTGGTTACTGGGGCCAGGGGACCCAG
GTCACCGTCTCTCTCA

配列番号 252 (AS20160 sdAb 核酸配列)

GAGGTGCAGCTGGCGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGG
CTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACAACCTCTGGATA
CACCTACAGTCGCAACTGCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTCTCGCAACTATTTATGTAA
GTGCTGCAAGCACAAAGCTTTGCCACATATGCCGACTCCGT
AAAGGGCCGATTCAACCATCTCCCTAGACAAGGCCAAGAAC
ACGGTATATCTGCAAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACA
CTGCCATGTACTACTGTGCGGCAGATCCCCCGATCGTAT
CTCGAACCCCTGCGGACCCCGCCGCTGACTTTGGATAC
TGGGGCCAGGGAACCCAGGTCAACCGTCTCTCTCA

10

配列番号 253 (AS19584 sdAb アミノ酸配列; CDR は下線付き)

【化 1】

20

QVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRAPGKEREGVAAICSGGRTTYSDSVKGRFTISKDSANQILYLQMNSLKPE
EDTAMYYCAELAPLWTGDCDLSSWYKTWGQGTQVTVSS

配列番号 254 (AS19852 sdAb アミノ酸配列; CDR は下線付き)

【化 2】

QVQLAESGGGSVQTGGSLRLSCAASGNTGSRRYVAWFRQAPGKEREGVARLITDSGSTYYADSVKGRFIISQDNAKNTVYLQMNTLKP
EDTAMYYCAELAPARSGGIWFGGRYFSYWGQGTQVTVSS

配列番号 255 (AS19858 sdAb アミノ酸配列; CDR は下線付き)

【化 3】

30

QIQLVESGGGSVQAGGSLRLSCATSGYTYROKCMGWFRQAPGKEREGVAAIYTSVGGSRITYVADSAGKGRFTVSQDNAKNTVYLQMN
SLKPEDTAMYYCAAKSPYDGACSYEADFTYWGQGTQVTVSS

配列番号 256 (AS19886 sdAb アミノ酸配列; CDR は下線付き)

【化 4】

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVAGSYTSRKCRGWFRQAPGKEREGVALIYTSSGGTYEDTYADSVRGRFTISQDNAKNTVYLQMN
NLKPEDSGIYYCAARLSTDFCGPRADEFYWGQGTQVTVSS

配列番号 257 (AS19887 sdAb アミノ酸配列; CDR は下線付き)

【化 5】

40

QVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAASGVTSDSYHMGWFRQAPGKEREGVAVIKTGDASTYYTDSVKGRFTISQDNAKNTLYLQMNSLK
PEDTAMYYCAARRGWVAPLSQYNNYWGQGTQVTVSS

配列番号 258 (AS19888 sdAb アミノ酸配列; CDR は下線付き)

【化 6】

QVQLAESGGGSVQTGGSLRLSCEASGVAAAGYCMWFRQAPGKERERVAAISSNDLVAYADSVKGRFTISKDNAKTLYLQMNNLKP
EDTAMYYCAADGGYGGYCGRLRPGTGYWGQGTQVTVSS

配列番号 259 (AS20160 sdAb アミノ酸配列; CDR は下線付き)

50

【化 7】

EVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCTTSGYTYSRNCMGWFRQAPGKEREGVATIYVSAASTSEATYADSVKGRFTISLTDKAKNTVYLQMNS
LKPEDTAMYYCAADPPDRISNCPGPRPDEGYWGQGTQVTVSS

配列番号 271 (AS19584VH26 ヒト化 s d A b アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 8】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRQAPGKGLEGVSAICSGGRTTYSDSVKGRFTISRDNQKTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTILVTVSS

10

配列番号 273 (AS19584VH28 ヒト化 s d A b アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 9】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRQAPGKGLEGVSAICSGGRTTYSDSVKGRFTISRDNQKTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTILVTVSS

配列番号 274 (AS19584VH29 ヒト化 s d A b アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 10】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRQAPGKEREGVSAICSGGRTTYSDSVKGRFTISRDNQKTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTILVTVSS

20

配列番号 275 (AS19584VH30 ヒト化 s d A b アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 11】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRQAPGKEREGVSAICSGGRTTYSDSVKGRFTISRDNQKTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTILVTVSS

配列番号 276 (AS19584VH31 ヒト化 s d A b アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 12】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRQAPGKEREGVSAICSGGRTTYSDSVKGRFTISRDNQKTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTILVTVSS

30

配列番号 280 (AS19886VH5 ヒト化 s d A b アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 13】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSRKCRGWFRQAPGKGLEGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNQKNTVYLQMNS
SLRAEDTGYYCAARLSTDFCGPRAEDFYWGQGTILVTVSS

配列番号 282 (AS19886VH8 ヒト化 s d A b アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 14】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSRKCRGWFRQAPGKGLEGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNQKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAARLSTDFCGPRAEDFYWGQGTILVTVSS

40

配列番号 283 (AS19886VH9 ヒト化 s d A b アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 15】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSRKCRGWFRQAPGKGLEGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNQKNTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAARLSTDFCGPRAEDFYWGQGTILVTVSS

配列番号 284 (AS19886VH10 ヒト化 s d A b アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

50

き)

【化 1 6】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSRKCRGWFRQAPGKGLEGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMN
SLRAEDTAVYYCAARLSTDFCGPRADFDYWGQGTILVTSS

配列番号 286 (AS19886VH19 ヒト化 s d A b アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 1 7】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSRKCRGWFRQAPGKGREGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMN
SLRPEDTAVYYCAARLSTDFCGPRADFDYWGQGTILVTSS

10

配列番号 287 (AS19886VH20 ヒト化 s d A b アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 1 8】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSRKCRGWFRQAPGKGREGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMN
SLRPEDTAVYYCAARLSTDFCGPRADFDYWGQGTILVTSS

配列番号 288 (AS19584 s d A b - F c (I g G 1) 融合タンパク質二量体型
アミノ酸配列 ; C D R は下線付き、リンカーは太字)

【化 1 9】

QVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRAPGKEREGVAICSGGRTTYSDSVKGRFTISKDSANQILYLQMNLSKPE
DTAMYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGGGTQVTVSS**EPKSCDKTHTCPPC**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

20

配列番号 289 (AS19852 s d A b - F c (I g G 1) 融合タンパク質二量体型
アミノ酸配列 ; C D R は下線付き、リンカーは太字)

【化 2 0】

QVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAASGNTGSRRYVAWFRQAPGKEREGVARLITDSGSTYYADSVKGRFHSQDNAKNTVYLQMNTLKP
EDTAMYYCAEELAPARSGGIWFGGRYFESYWGQGTQVTVSS**EPKSCDKTHTCPPC**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYT
QKSLSPGK

30

配列番号 290 (AS19858 s d A b - F c (I g G 1) 融合タンパク質二量体型
アミノ酸配列 ; C D R は下線付き、リンカーは太字)

【化 2 1】

QIQLVESGGGSVQAGGSLRLSCATSGYTYROKCMGWFRQAPGKEREGVAIYTSVGGSRYYADSAKGRFTVSQDNAKNTVYLQMN
SLKPEDTAMYYCAARLSPYDGACSYEADFTYWGQGTQVTVSS**EPKSCDKTHTCPPC**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYT
QKSLSPGK

配列番号 291 (AS19886 s d A b - F c (I g G 1) 融合タンパク質二量体型
アミノ酸配列 ; C D R は下線付き、リンカーは太字)

40

【化 2 2】

QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASGYTYSRKCRGWFRQAPGKEREGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMN
NLKPEDSGIYYCAARLSTDFCGPRADFDYWGQGTQVTVSS**EPKSCDKTHTCPPC**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQK
LSLSPGK

配列番号 292 (AS19887 s d A b - F c (I g G 1) 融合タンパク質二量体型
アミノ酸配列 ; C D R は下線付き、リンカーは太字)

50

【化 2 3】

QVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAASGVTSDSYHMGWFRQAPGKEREGVAVIKTGDASTYYTDSVKGRFTISQDNAKNTLYLQMNSLK
 PEDTAMY YCAARRGWVPAPLSQYNNYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

配列番号 293 (AS19888 sdAb-Fc (IgG1) 融合タンパク質二量体型
 アミノ酸配列；CDRは下線付き、リンカーは太字)

【化 2 4】

QVQLAESGGGSVQTGGSLRLSCEASGVAAAGYCMWFRQAPGKERERVAISSNDLVAYADSVKGRFTISKDNAKTILYLQMNNLKP
 EDTAMY YCAADGGYGGYCGRLRPGTGYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

10

配列番号 294 (AS20160 sdAb-Fc (IgG1) 融合タンパク質二量体型
 アミノ酸配列；CDRは下線付き、リンカーは太字)

【化 2 5】

EVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCTTSQYTYSRNCMGWFRQAPGKEREGVATIIYVSAASTSEATYADSVKGRFTISLDKAKNTVYLQMNS
 LKPEDTAMY YCAADPPDRISNPCGPRPDEFGYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK

配列番号 306 (AS19584VH26 sdAb-Fc (IgG1) 融合タンパク質
 二量体型アミノ酸配列；CDRは下線付き、リンカーは太字)

20

【化 2 6】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGYYSMGWFRQAPGKGLEGVSAICSGGRITTYSDSVKGRFTISRDNKQTLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTILVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

配列番号 308 (AS19584VH28 sdAb-Fc (IgG1) 融合タンパク質
 二量体型アミノ酸配列；CDRは下線付き、リンカーは太字)

【化 2 7】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGYYSMGWFRQAPGKGLEGVSAICSGGRITTYSDSVKGRFTISRDNKQTLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTILVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

30

配列番号 309 (AS19584VH29 sdAb-Fc (IgG1) 融合タンパク質
 二量体型アミノ酸配列；CDRは下線付き、リンカーは太字)

【化 2 8】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGYYSMGWFRQAPGKEREGVSAICSGGRITTYSDSVKGRFTISRDNKQTLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTILVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

40

配列番号 310 (AS19584VH30 sdAb-Fc (IgG1) 融合タンパク質
 二量体型アミノ酸配列；CDRは下線付き、リンカーは太字)

【化 2 9】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGYYSMGWFRQAPGKEREGVSAICSGGRITTYSDSVKGRFTISRDNKQTLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTILVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTL
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

配列番号 311 (AS19584VH31 sdAb-Fc (IgG1) 融合タンパク質
 二量体型アミノ酸配列；CDRは下線付き、リンカーは太字)

50

【化 3 0】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRQAPGKEREGVSAICSGGRITTSYSDSVKGRFTISRDNQILYLQMNSLRAE
DTAVYYCAARPLWTGDCDLSSWYKTWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLSPGK

配列番号 3 1 5 (A S 1 9 8 8 6 V H 5 s d A b - F c (I g G 1) 融合タンパク質二
量体型アミノ酸配列；C D Rは下線付き、リンカーは太字)

【化 3 1】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSRKCRGWFRQAPGKGLEGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMN
SLRAEDTGVYYCAARLTDFCGPRADEFDYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

10

配列番号 3 1 7 (A S 1 9 8 8 6 V H 8 s d A b - F c (I g G 1) 融合タンパク質二
量体型アミノ酸配列；C D Rは下線付き、リンカーは太字)

【化 3 2】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSRKCRGWFRQAPGKGLEGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMN
SLRAEDTGVYYCAARLTDFCGPRADEFDYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

20

配列番号 3 1 8 (A S 1 9 8 8 6 V H 9 s d A b - F c (I g G 1) 融合タンパク質二
量体型アミノ酸配列；C D Rは下線付き、リンカーは太字)

【化 3 3】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSRKCRGWFRQAPGKGLEGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMN
SLRAEDTGVYYCAARLTDFCGPRADEFDYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

配列番号 3 1 9 (A S 1 9 8 8 6 V H 1 0 s d A b - F c (I g G 1) 融合タンパク質
二量体型アミノ酸配列；C D Rは下線付き、リンカーは太字)

【化 3 4】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSRKCRGWFRQAPGKGLEGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMN
SLRAEDTGVYYCAARLTDFCGPRADEFDYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

30

配列番号 3 2 1 (A S 1 9 8 8 6 V H 1 9 s d A b - F c (I g G 1) 融合タンパク質
二量体型アミノ酸配列；C D Rは下線付き、リンカーは太字)

【化 3 5】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSRKCRGWFRQAPGKGREGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMN
SLRPEDTAVYYCAARLTDFCGPRADEFDYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

40

配列番号 3 2 2 (A S 1 9 8 8 6 V H 2 0 s d A b - F c (I g G 1) 融合タンパク質
二量体型アミノ酸配列；C D Rは下線付き、リンカーは太字)

【化 3 6】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTYSRKCRGWFRQAPGKGREGVATLYTSSGGTYFDYADSVRGRFTISRDNKNTVYLQMN
SLRPEDTAVYYCAARLTDFCGPRADEFDYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

50

配列番号 3 2 3 (h 5 3 C 1 (I g G 1) m A b __ H C アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)
【化 3 7】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTGYGITWVRQAPGQGLEWMGEIIFPRRVQTYTSEKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS
DDTAVYYCARDYDPYFALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYITLP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

配列番号 3 2 4 (ヒト I g G 4 (h I g G 4) ヒンジアミノ酸配列)
E S K Y G P P C P P C P

配列番号 3 2 5 (キイトルーダバイオシミラー (I g G 4) m A b __ H C アミノ酸配列 ;
C D R は下線付き)
【化 3 8】

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNENEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSL
QFDDTAVYYCARRDYREDMGFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
AVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYITLP
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCFSVMHEALHNHYTQK
SLSLSLGK

配列番号 3 2 6 (キイトルーダバイオシミラー (I g G 4) m A b __ L C アミノ酸配列 ;
C D R は下線付き)
【化 3 9】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESQVPAARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYY
CQHSDRLPLTFGGGTEVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSL
SLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 3 2 7 (h 5 3 C 1 (I g G 1) m A b __ H C アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)
【化 4 0】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTGYGITWVRQAPGQGLEWMGEIIFPRRVQTYTSEKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS
DDTAVYYCARDYDPYFALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKCDKTHCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYITLP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

配列番号 3 2 8 (h 5 3 C 1 (I g G 1) m A b __ L C アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)
【化 4 1】

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVDWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQ
HYSIPETFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 3 2 9 (h 5 3 C 1 (不活性 I g G 1) m A b __ H C アミノ酸配列 ; C D R は下
線付き)
【化 4 2】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTGYGITWVRQAPGQGLEWMGEIIFPRRVQTYTSEKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS
DDTAVYYCARDYDPYFALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYITLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

配列番号 3 3 0 (h 5 3 C 1 (不活性 I g G 1) m A b __ L C アミノ酸配列 ; C D R は下
線付き)
【化 4 3】

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVDWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQ
HYSIPETFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 3 3 1 (テセントリクバイオシミラー (I g G 1) m A b __ H C アミノ酸配列 ;

10

20

30

40

50

C D R は下線付き)

【化 4 4】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCARRHWPGGEDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

配列番号 3 3 2 (テセントリクバイオシミラー (I g G 1) m A b __ L C アミノ酸配列 ;
C D R は下線付き)

【化 4 5】

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOY
LYHPATFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

配列番号 3 3 3 (テセントリクバイオシミラー (不活性 I g G 1) m A b __ H C アミノ酸
配列 ; C D R は下線付き)

【化 4 6】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCARRHWPGGEDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

20

配列番号 3 3 4 (テセントリクバイオシミラー (不活性 I g G 1) m A b __ L C アミノ酸
配列 ; C D R は下線付き)

【化 4 7】

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOY
LYHPATFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 3 3 5 (2 2 G 2 (I g G 1) m A b __ H C アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)
【化 4 8】

SQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGIYYWSWIRQPPGKGLEWIGIYYSGSTNYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSSTVTA
DTAVYYCARDYYVSGNYNVDYVYFEGVDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
LHNHYTQKLSLSPGK

30

配列番号 3 3 6 (2 2 G 2 (I g G 1) m A b __ L C アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)
【化 4 9】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAQSQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQORS
NWPPLETFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 3 3 7 (1 0 A 7 m A b __ H C アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)
【化 5 0】

EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTESSEFMHWVRQSPGKGLEWVAFIRSGSGHVFYADAVRGRFTISRDNKNNLLFLQMNDLKSE
DTAMYYCARRPLGHNTFDSWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP

SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

40

配列番号 3 3 8 (1 0 A 7 m A b __ L C アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

50

【化 5 1】

DIVMTQSPSSLAIVSPGEKVTMTCKSSOSLYYSGVKENLLAWYQOKPGQSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITSVQAEDM
GQYFCQQGINNPLTFGDGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSITLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 339 (h 5 3 C 1 V H アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 5 2】

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTGYGITWVRQAPGQGLEWMGEIFPRRVOTYY
SEKFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDPYFALDYWGQGTTVTVSS

配列番号 340 (h 5 3 C 1 V L アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 5 3】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVDWYQOKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPD
RFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQHYSIPFTFGQGTKLEIK

配列番号 349 (h 5 3 C 1 H C - C D R 1 アミノ酸配列)

G Y I F T G Y G I T

配列番号 350 (h 5 3 C 1 H C - C D R 2 アミノ酸配列)

E I F P R R V Q T Y Y S E K F K G

配列番号 351 (h 5 3 C 1 H C - C D R 3 アミノ酸配列)

D Y D P Y F A L D Y

配列番号 352 (h 5 3 C 1 L C - C D R 1 アミノ酸配列)

R A S Q D V S T A V D

配列番号 353 (h 5 3 C 1 L C - C D R 2 アミノ酸配列)

S A S Y R Y T

配列番号 354 (h 5 3 C 1 L C - C D R 3 アミノ酸配列)

Q Q H Y S I P F T F

配列番号 355 (ヒト不活性 I g G 1 F c 領域アミノ酸配列)

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

配列番号 356 (ヒト I g G 1 F c 領域アミノ酸配列)

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

表 23 . 抗 T I G I T / P D - 1 及び抗 T I G I T / P D - L 1 二重特異性抗体アミノ酸
配列 (s d A b 配列は下付き、リンカー配列は太字)

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 1】

配列番号 341 BTP-4 HC (AS19584 変異型 hlgG1 ヒンジ h53C1 (不活性 IgG1) HC)	QVQLAESGGGVSQAGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRAPGKEREGVAICSGGRITTYSDSVKGRFTISKDSANQ ILYLQMNLSLKPEDTAMYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKWTGCGTQVTVSSEPKSSDKTHTSPSPSEVQLVQSGAEV KKPGASVKVSCASGYIFTGYGITWVRQAPQGQLEWMGEIFPRRVQTYTSEKFKGRVTMTTDTSTAYMELRSLR SDDTAVYYCARDYDPYFALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSG ALTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 342 BTP-4 LC (h53C1 (不活性 IgG1) LC)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVDWYQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVDPDRFSGSGSGTDFTFTISL QPEDIATYYCQHYHPIPTFGQGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 343 BTP-5 HC	QVQLAESGGGVSQAGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRAPGKEREGVAICSGGRITTYSDSVKGRFTISKDSANQ ILYLQMNLSLKPEDTAMYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKWTGCGTQVTVSSEPKSSDKTHTSPSPSEVQLVQSGAEV KKPGASVKVSCASGYIFTGYGITWVRQAPQGQLEWMGEIFPRRVQTYTSEKFKGRVTMTTDTSTAYMELRSLR

10

【表 2 3 - 2】

(AS19584 変異型 hlgG1 ヒンジ h53C1 (IgG1) HC)	SDDTAVYYCARDYDPYFALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSG ALTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 344 BTP-5 LC (h53C1 (IgG1) LC)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVDWYQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVDPDRFSGSGSGTDFTFTISL QPEDIATYYCQHYHPIPTFGQGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 345 BTP-6 HC (AS19584 変異型 hlgG1 ヒンジセン トリクバイオシミ ラー (不活性 IgG1) HC)	QVQLAESGGGVSQAGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRAPGKEREGVAICSGGRITTYSDSVKGRFTISKDSANQ ILYLQMNLSLKPEDTAMYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKWTGCGTQVTVSSEPKSSDKTHTSPSPSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKLEWVVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSR AEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGA LTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 346 BTP-6 LC (テセントリクバ イオシミラー (不活 性 IgG1) LC)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVDPDRFSGSGSGTDFTFTISLQ PEDFATYYCQYL YHPATFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 347 BTP-7 HC (AS19584 変異型 hlgG1 ヒンジセン トリクバイオシミ ラー (IgG1) HC)	QVQLAESGGGVSQAGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRAPGKEREGVAICSGGRITTYSDSVKGRFTISKDSANQ ILYLQMNLSLKPEDTAMYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKWTGCGTQVTVSSEPKSSDKTHTSPSPSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKLEWVVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSR AEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGA LTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 348 BTP-7 LC (テセントリクバ イオシミラー (IgG1) LC)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVDPDRFSGSGSGTDFTFTISLQ PEDFATYYCQYL YHPATFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 357 BTP-15 HC (AS19584VH28 変異型 hlgG1 ヒンジ h53C1 (IgG1) HC)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRAPGKLEGVSAICSGGRITTYSDSVKGRFTISRDNSNQL LYLQMNLSRAEDTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKWTGCGTITVTVSSEPKSSDKTHTSPSPSEVQLVQSGAEV KKPGASVKVSCASGYIFTGYGITWVRQAPQGQLEWMGEIFPRRVQTYTSEKFKGRVTMTTDTSTAYMELRSLR SDDTAVYYCARDYDPYFALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGA LTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 358 BTP-15 LC (h53C1 (IgG1) LC)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVDWYQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVDPDRFSGSGSGTDFTFTISL QPEDIATYYCQHYHPIPTFGQGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 359 BTP-16 HC (h53C1 (IgG1) HC 変異型 hlgG1 ヒンジ AS19584VH28)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTGYGITWVRQAPQGQLEWMGEIFPRRVQTYTSEKFKGRVTMTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDPYFALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPTVSWNSGALTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKPKSSDKTHTS PPSPSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRAPGKLEGVSAICSGGRITTYSDSVKGRFTISRD NSNQLLYLQMNLSRAEDTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKWTGCGTITVTVSS
配列番号 360 BTP-16 LC (h53C1 (IgG1) LC)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVDWYQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVDPDRFSGSGSGTDFTFTISL QPEDIATYYCQHYHPIPTFGQGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 361 BTP-17 HC (h53C1 (IgG1) HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTGYGITWVRQAPQGQLEWMGEIFPRRVQTYTSEKFKGRVTMTTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDPYFALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPTVSWNSGALTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 362	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRAPGKLEGVSAICSGGRITTYSDSVKGRFTISRDNSNQL LYLQMNLSRAEDTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKWTGCGTITVTVSSEPKSSDKTHTSPSPDIQMTQSPSSLSA

20

30

40

50

【表 2 3 - 3】

BTP-17_LC (AS19584VH28 変異型 hIgG1 ヒンジ h53C1 (IgG1) LC)	SVGDRVTITCRASQDVSTAVDWYQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQH YSIPFTFGQGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 363	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTGYGHTVVRQAPGQGLEWMGEIFPRRVQITYSEKFKGRVTMTDTST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDPYALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
BTP-18_HC (h53C1 (IgG1) HC)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVDWYQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSL QPEDIATYYCQQHYSIPFTFGQGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ GNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <u>EPKSSDKTHTSPSP</u> EVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRQAPGKLEGVSAICSGGRITTYSDSVKGRFTISRDNNSQILYQ MNSLR AEDTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTITVTVSS
配列番号 364	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVDWYQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSL QPEDIATYYCQQHYSIPFTFGQGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ GNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC <u>EPKSSDKTHTSPSP</u> EVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRQAPGKLEGVSAICSGGRITTYSDSVKGRFTISRDNNSQILYQ MNSLR AEDTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTITVTVSS
BTP-18_LC (h53C1 (IgG1) LC 変異型 hIgG1 ヒンジ AS19584VH28)	

10

配列番号 365 (AS19584 sdAb-Fc (不活性 IgG1) 融合タンパク質二
量体型アミノ酸配列; CDRは下線付き、リンカーは太字)

【化 5 4】

QVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRAPGKEREGVAICSGGRITTYSDSVKGRFTISKDSANQILYQMNLSKPE
DTAMYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTL
PSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

配列番号 366 (AS19584 sdAb-Fc (IgG4) 融合タンパク質二量体型
アミノ酸配列; CDRは下線付き)

【化 5 5】

QVQLAESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRAPGKEREGVAICSGGRITTYSDSVKGRFTISKDSANQILYQMNLSKPE
DTAMYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE
MITKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SGK

20

配列番号 367 (AS19584VH28 sdAb-Fc (IgG4) 融合タンパク質
二量体型アミノ酸配列; CDRは下線付き)

【化 5 6】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKYGVYSMGWFRQAPGKLEGVSAICSGGRITTYSDSVKGRFTISRDNNSQILYQMNLSRAE
DTAVYYCAARPLWTGDCDLSSSWYKTWGQGTITVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE
MITKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGK

30

配列番号 368 (完全長ヒトTIGITアミノ酸配列、シグナルペプチドを有さない)

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQ
QDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVN
DTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESVAEHGARFQIP
LLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRKKKALRIHSVEGDLRR
KSAGQEEWSPSPSPPGSCVQAEAAAPAGLCGEQRGEDCAE
LHDYFNVLSYRSLGNCSSFFTETG

40

配列番号 369 (ヒトTIGITアミノ酸配列の細胞外ドメイン)

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQ
QDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVN
DTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESVAEHGARFQIP

配列番号 370 (ヒトIgG1 (hIgG1) ヒンジアミノ酸配列)

EPKSCDKTHTCPPCP

配列番号 371 (変異型ヒトIgG1 (hIgG1) ヒンジアミノ酸配列)

EPKSSDKTHTSPSP

配列番号 372 (リンカーペプチド (9GS) アミノ酸配列)

50

G G G G S G G G S

配列番号 373 (リンカーペプチドアミノ酸配列)

G G G G S G G G G S G G G S

配列番号 374 (リンカーペプチドアミノ酸配列、n は少なくとも 1 つの整数)
(G) _n

配列番号 375 (リンカーペプチドアミノ酸配列、n は少なくとも 1 つの整数)
(G S) _n

配列番号 376 (リンカーペプチドアミノ酸配列、n は少なくとも 1 つの整数)
(G S G G S) _n

配列番号 377 (リンカーペプチドアミノ酸配列、n は少なくとも 1 つの整数)
(G G G S) _n

配列番号 378 (リンカーペプチドアミノ酸配列、n は少なくとも 1 つの整数)
(G G G G S) _n

配列番号 379 (デュルバルマブ V H アミノ酸配列；C D R は下線付き)
【化 5 7】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR
AEDTAVYYCAREGGWEGELAFDYWGQGLTVTVSS

配列番号 380 (デュルバルマブ V L アミノ酸配列；C D R は下線付き)
【化 5 8】

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRYSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ
YGSIPWTFGQGTKVEIK

配列番号 381 (テセントリク V H アミノ酸配列；C D R は下線付き)
【化 5 9】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR
AEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS

配列番号 382 (テセントリク V L アミノ酸配列；C D R は下線付き)
【化 6 0】

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQY
LYHPATFGQGTKVEIK

配列番号 383 (アベルマブ V H アミノ酸配列；C D R は下線付き)
【化 6 1】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARIKLGTVTVDYWGQGLTVTVSS

配列番号 384 (アベルマブ V L アミノ酸配列；C D R は下線付き)
【化 6 2】

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYSWYQQHPGKAPKLMIDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC
SSYTSSSIRVFGTGKVTVL

配列番号 385 (キイトルーダ V H アミノ酸配列；C D R は下線付き)
【化 6 3】

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSL
QFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSS

配列番号 386 (キイトルーダ V L アミノ酸配列；C D R は下線付き)

10

20

30

40

50

【化 6 4】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYY
QHRSRDLPTFGGGTKVEIK

配列番号 387 (オブジーボ V H アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 6 5】

QVQLVESGGGVVQPGSRRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSENKNTLFLQMNSLR
AEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSS

配列番号 388 (オブジーボ V L アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 6 6】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQOSS
NWPRTFGGGTKVEIK

配列番号 389 (ヒト I g G 4 F c 領域アミノ酸配列)

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

配列番号 390 (P D 1 - B M - m i n _ H C アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 6 7】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEVSRYDMAWVRQAPGKGLEWVSFISGGGSNTYYPDTVKGRFTISRDNSENKNTLYLQMNSLR
AEDTAVYYCISPYYYAMEYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSVTVTPSSSLGKTITCTNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
GK

配列番号 391 (P D 1 - B M - m i n _ L C アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 6 8】

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKASQDVDTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ
QYSTEPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSST
LTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 392 (T i r a g o l u m a b _ H C アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 6 9】

EVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGKTYYREFKWYSDYAVSVKGRITINPDTSKNQFSLQLNSV
TPEDTAVFYCTRESTTYDLLAGPFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPET
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

配列番号 393 (T i r a g o l u m a b _ L C アミノ酸配列 ; C D R は下線付き)

【化 7 0】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKKYLAWYQQKPGQPNNLLIYWASTRESGVPRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVA
VYYCQOYYSTIPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

表 24. 抗 T I G I T / P D - 1 及び抗 T I G I T / P D - L 1 二重特異性抗体アミノ酸
配列 (s d A b 配列は下付き、リンカー配列は太字)

10

20

30

40

50

【表 2 4】

配列番号 394 BTP-11_HC (AS19584VH28 変異型 hlgG1 ヒンジ PD1-BM- min HC)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKYKGVYSMGWFRQAPGKGLEGVSAICSGGRITTSYSDSVKGRFTISRDN LYLOMNSLRAEDTAVYYCAARPLWTGDCDLSWYKTVWGQGLTVTSSEPKSSDKTHTSPSPSEVQLVQSGAEV QPGGSLRLSCAASGTFVFSRYDMAWVRQAPGKGLEWVSFISGGGSNTYYPDYVKGRFTISRDNKNTLYLOMNSLRA EDTAVYYCISPIYYAMEYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFP KDTLMISRTPETCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFELYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 395 BTP-11_LC (PD1-BM-min LC)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASQDVTAVAWYQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LPEDFATYYCQYSTFPWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 396 BTP-12_HC (PD1-BM-min HC 変異型 hlgG1 ヒンジ AS19584VH28)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFVFSRYDMAWVRQAPGKGLEWVSFISGGGSNTYYPDYVKGRFTISRDN NTLYLOMNSLRAEDTAVYYCISPIYYAMEYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEF LGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPETCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFELYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 397 BTP-12_LC (PD1-BM-min LC)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASQDVTAVAWYQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LPEDFATYYCQYSTFPWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 398 BTP-13_HC (PD1-BM-min HC)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFVFSRYDMAWVRQAPGKGLEWVSFISGGGSNTYYPDYVKGRFTISRDN NTLYLOMNSLRAEDTAVYYCISPIYYAMEYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEF LGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPETCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFELYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 399 BTP-13_LC (AS19584VH28 変異型 hlgG1 ヒンジ PD1-BM- min LC)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKYKGVYSMGWFRQAPGKGLEGVSAICSGGRITTSYSDSVKGRFTISRDN LYLOMNSLRAEDTAVYYCAARPLWTGDCDLSWYKTVWGQGLTVTSSEPKSSDKTHTSPSPSEVQLVQSGAEV QPGGSLRLSCAASGTFVFSRYDMAWVRQAPGKGLEWVSFISGGGSNTYYPDYVKGRFTISRDNKNTLYLOMNSLRA EDTAVYYCISPIYYAMEYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFP KDTLMISRTPETCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFELYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 400 BTP-14_HC (PD1-BM-min HC)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFVFSRYDMAWVRQAPGKGLEWVSFISGGGSNTYYPDYVKGRFTISRDN NTLYLOMNSLRAEDTAVYYCISPIYYAMEYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEF LGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPETCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFELYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 401 BTP-14_LC (PD1-BM-min LC 変異型 hlgG1 ヒンジ AS19584VH28)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASQDVTAVAWYQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LPEDFATYYCQYSTFPWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 402 BTP-21_HC (AS19584VH28 変異型 hlgG1 ヒンジ h53C1 (不活性 IgG1) HC)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKYKGVYSMGWFRQAPGKGLEGVSAICSGGRITTSYSDSVKGRFTISRDN LYLOMNSLRAEDTAVYYCAARPLWTGDCDLSWYKTVWGQGLTVTSSEPKSSDKTHTSPSPSEVQLVQSGAEV KPGASVKSCASGYFTGYGHTWVRQAPGQGLEWMGEIFPRRVQTYYSSEKFKGRVMTITDSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDYDPYFALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSV FLFPKPKDITLMISRTPETCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIETISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFELYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 403 BTP-21_LC (h53C1 (不活性 IgG1) LC)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASQDVTAVAWYQKPGKAPKLLIYASRYRTPGPDPRFSGSGSGTDFTLTIS LPEDFATYYCQYHISIFTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 404 BTP-22_HC (h53C1 (不活性 IgG1) HC)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTGYGHTWVRQAPGQGLEWMGEIFPRRVQTYYSSEKFKGRVMTITDST STAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYDPYFALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPCCPP CPAPEFLGGPSVFLFPKPKDITLMISRTPETCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIETISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFELYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 405 BTP-22_LC (AS19584VH28 変異型 hlgG1ヒンジ h53C1 (不活性 IgG1) LC)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKYKGVYSMGWFRQAPGKGLEGVSAICSGGRITTSYSDSVKGRFTISRDN LYLOMNSLRAEDTAVYYCAARPLWTGDCDLSWYKTVWGQGLTVTSSEPKSSDKTHTSPSPSEVQLVQSGAEV KPGASVKSCASGYFTGYGHTWVRQAPGQGLEWMGEIFPRRVQTYYSSEKFKGRVMTITDSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDYDPYFALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSV FLFPKPKDITLMISRTPETCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIETISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFELYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 406 (PD1-BM-min_VH アミノ酸配列; CDR は下線付き)
【化 7 1】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFVFSRYDMAWVRQAPGKGLEWVSFISGGGSNTYYPDYVKGRFTISRDNKNTLYLOMNSLRAEDTAVYYCISPIYYAMEYWGQGTITVTVSS

配列番号 407 (PD1-BM-min_VL アミノ酸配列; CDR は下線付き)
【化 7 2】

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASQDVTAVAWYQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLPEDFATYYCQYSTFPWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK

10

20

30

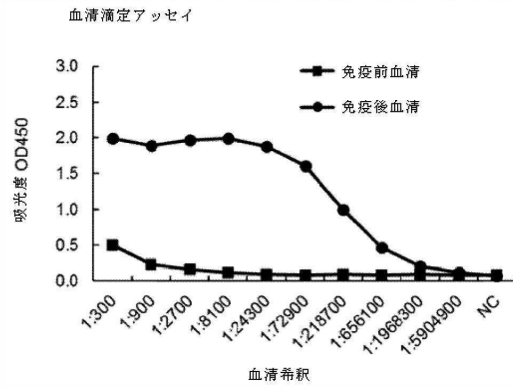
40

50

【図面】

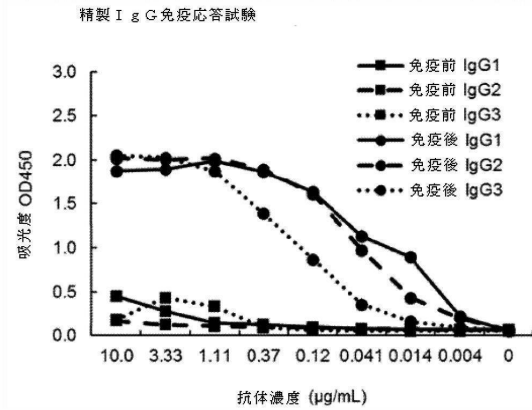
【図 1】

【図 1】



【図 2】

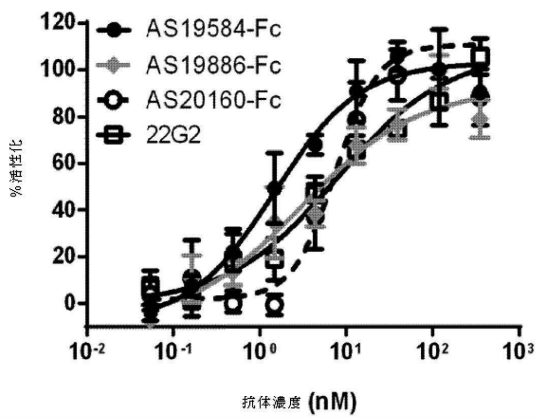
【図 2】



【図 3】

【図 3】

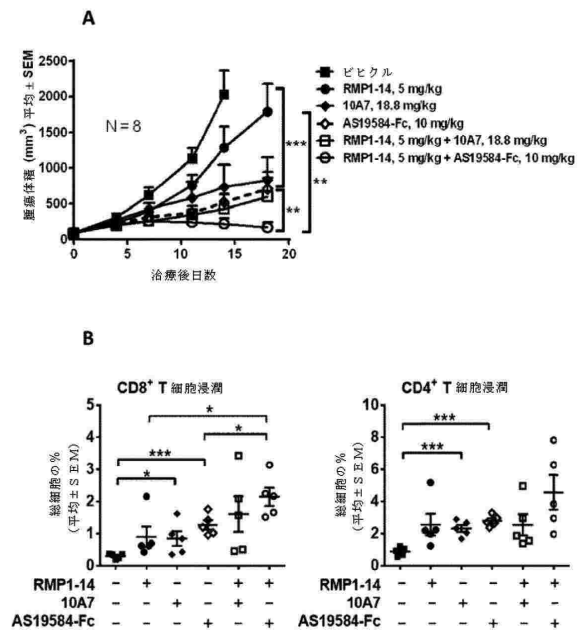
非ヒト化抗 TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質及び
22G2 の TIGIT / CD155 遮断レポーターアッセイ



【図 4 - 1】

【図 4 - 1】

CT26 同系腫瘍モデルにおける非ヒト化抗 TIGIT s d A b - F c
融合タンパク質及び 10A7 の効力



10

20

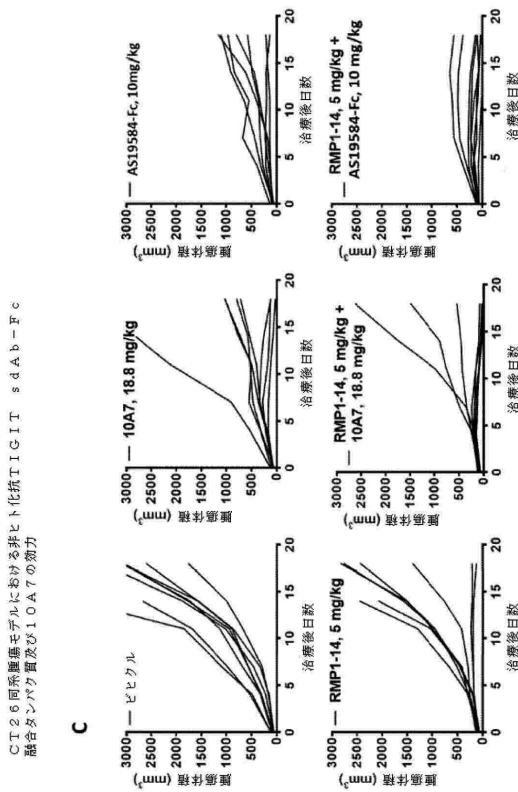
30

40

50

【図 4 - 2】

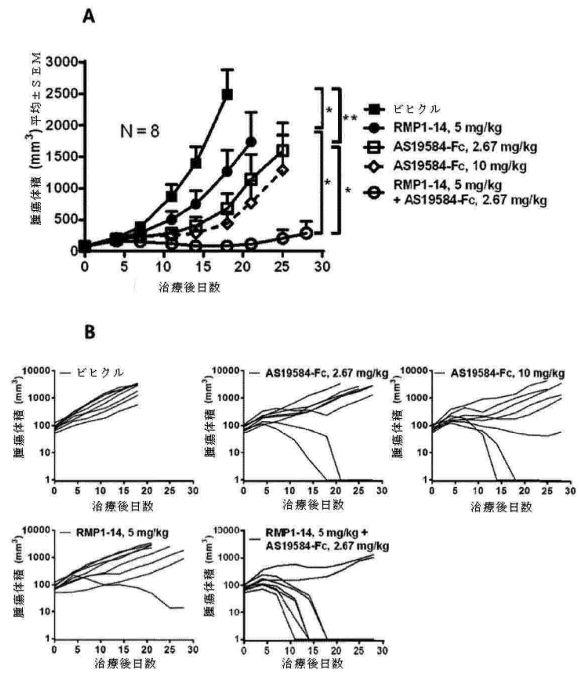
【図 4 - 2】



【図 5】

【図 5】

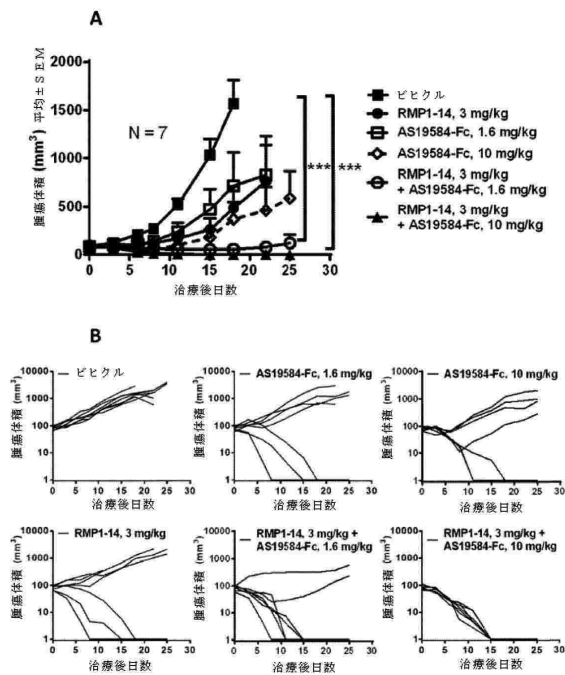
CT26 同系腫瘍モデルにおける非ヒト化抗 TIGIT s d a b - F c 融合タンパク質の効力



【図 6】

【図 6】

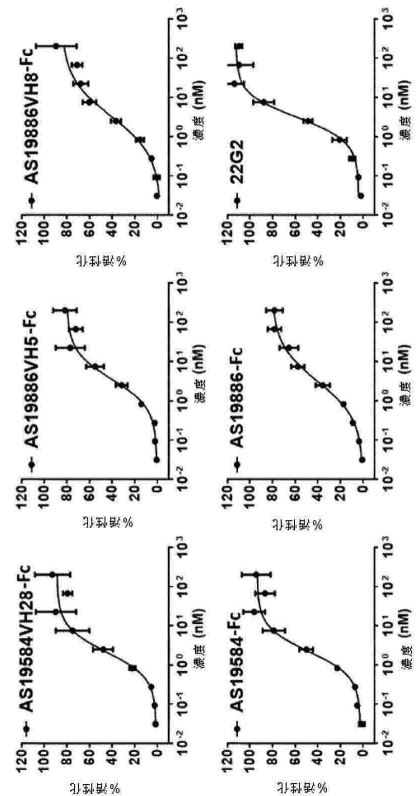
MC38 同系腫瘍モデルにおける非ヒト化抗 TIGIT s d a b - F c 融合タンパク質の効力



【図 7】

【図 7】

抗 TIGIT s d a b - F c 融合タンパク質の TIGIT/CD155 遮断レポーターアッセイ



10

20

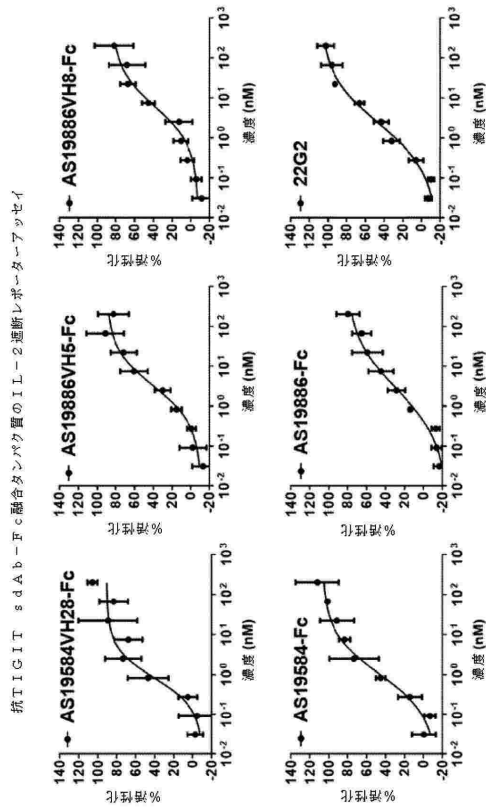
30

40

50

【図 8】

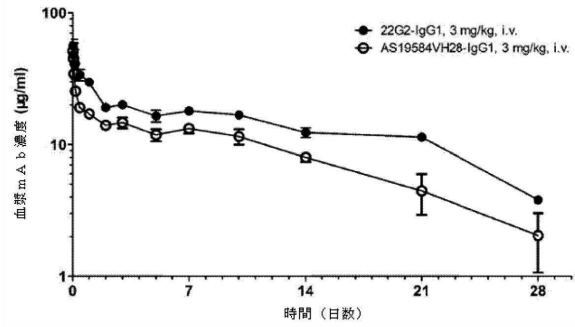
【図 8】



【図 9】

【図 9】

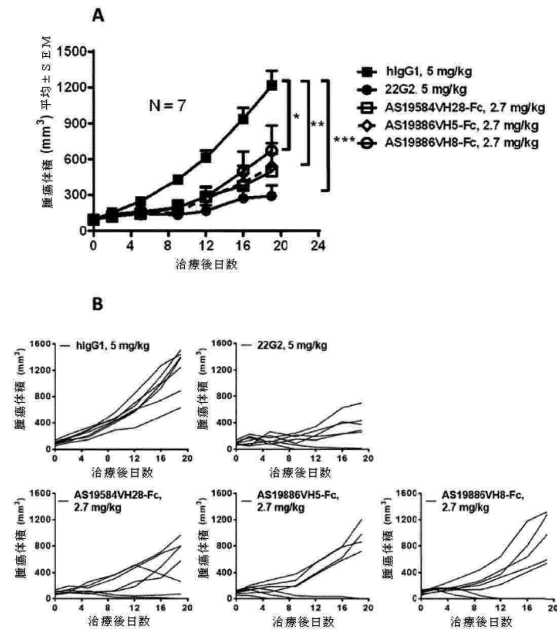
ヒト化抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質対抗TIGIT完全長抗体 22G2 の薬物動態曲線



【図 10】

【図 10】

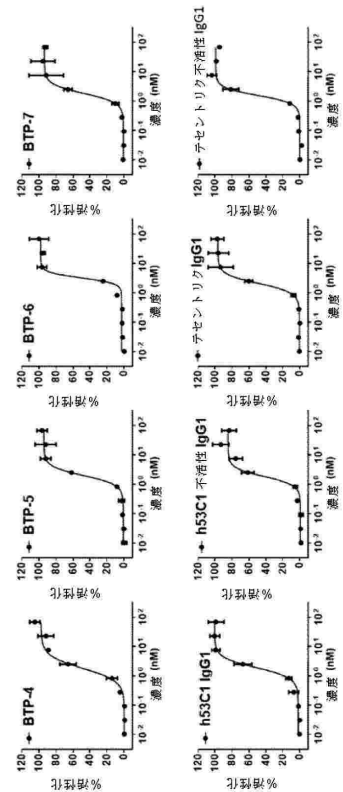
MC38腫瘍を担持するヒトTIGIT KIマウスにおけるヒト化抗TIGIT s d A b - F c 融合タンパク質の効力



【図 11】

【図 11】

POC PD-L1×TIGIT BAPD-PD-L1 阻害性アッセイ



10

20

30

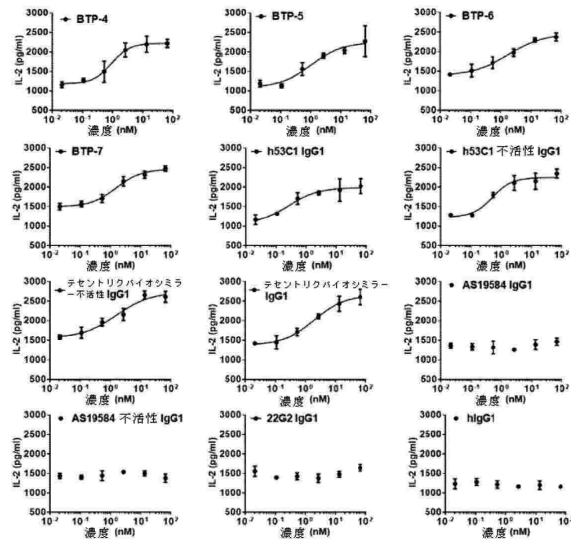
40

50

【図 1 2】

【図 1 2】

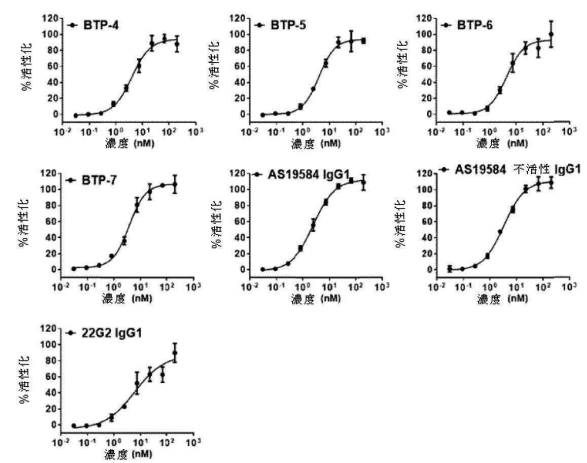
POC PD-L1×TIGIT BABPのMLRアッセイ



【図 1 3】

【図 1 3】

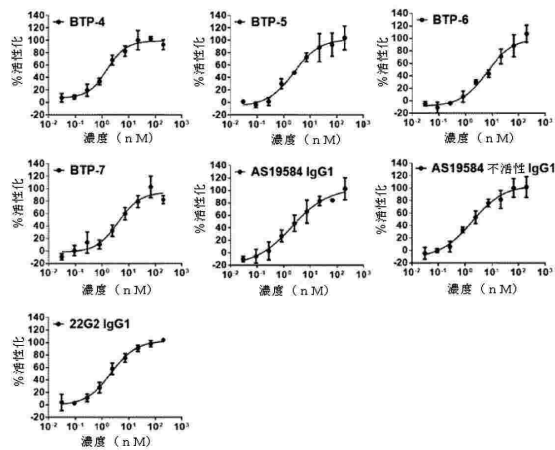
POC PD-L1×TIGIT BABPのTIGIT/CD155遮断レポーターアッセイ



【図 1 4】

【図 1 4】

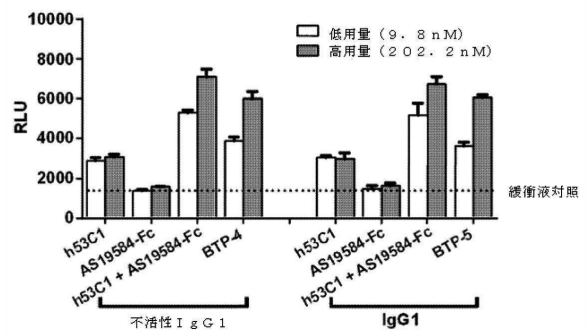
POC PD-L1×TIGIT BABPのIL-2放出アッセイ



【図 1 5】

【図 1 5】

POC PD-L1×TIGIT BABPのPD-L1/TIGIT二機能性レポーターアッセイ



10

20

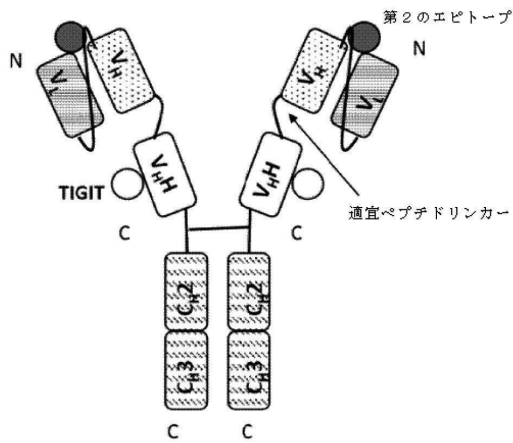
30

40

50

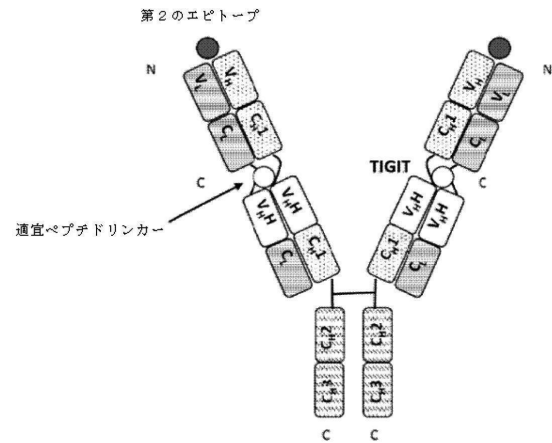
【図 2 4】

【図 2 4】



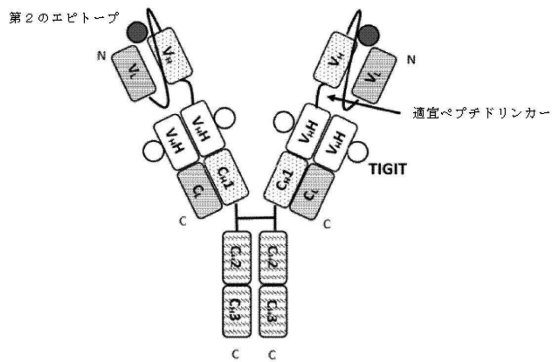
【図 2 5】

【図 2 5】



【図 2 6】

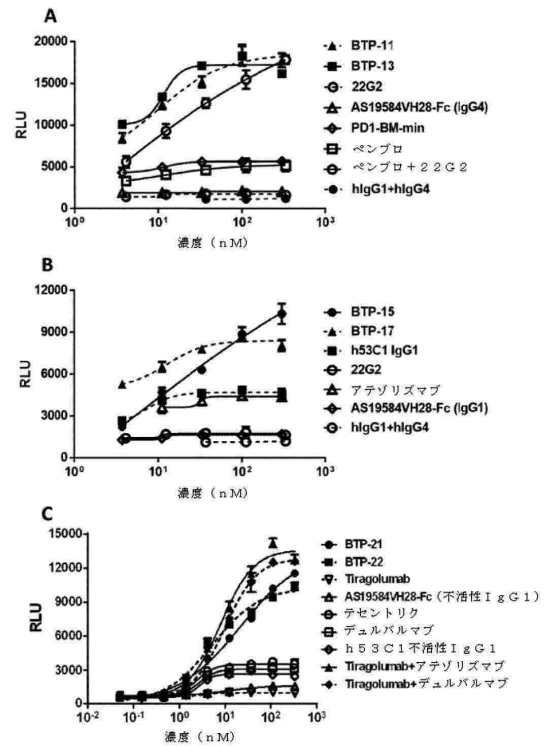
【図 2 6】



【図 2 7】

【図 2 7】

PD-1/TIGIT、PD-L1/TIGIT二機能性レポーターアッセイ



10

20

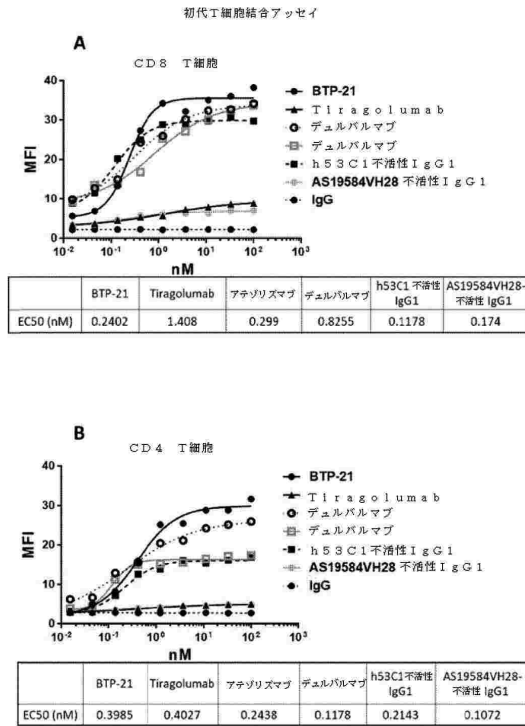
30

40

50

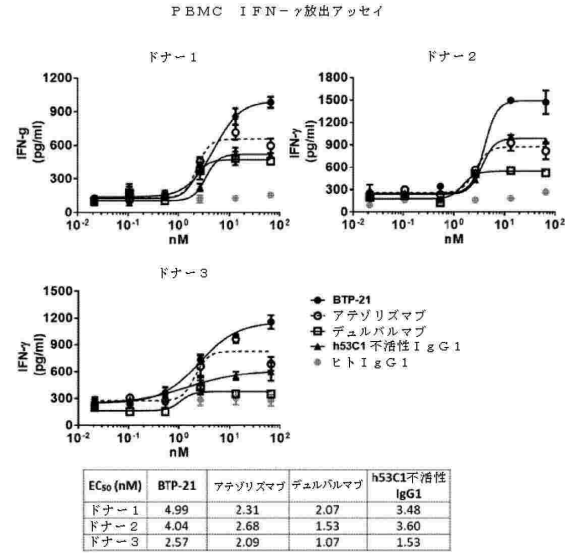
【図 28】

【図 28】



【図 29】

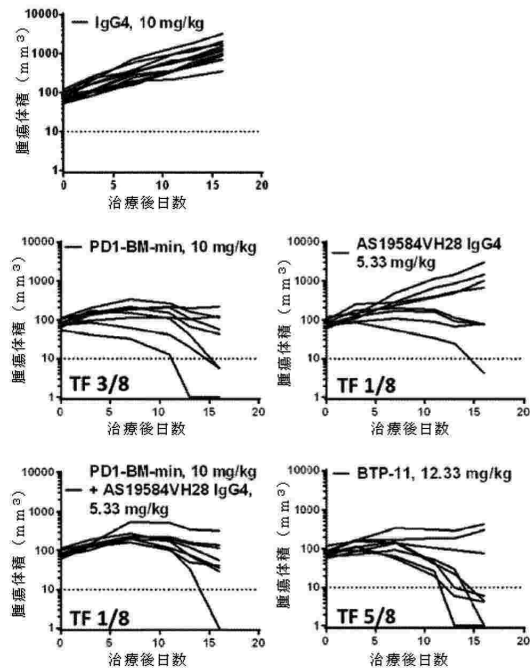
【図 29】



【図 30】

【図 30】

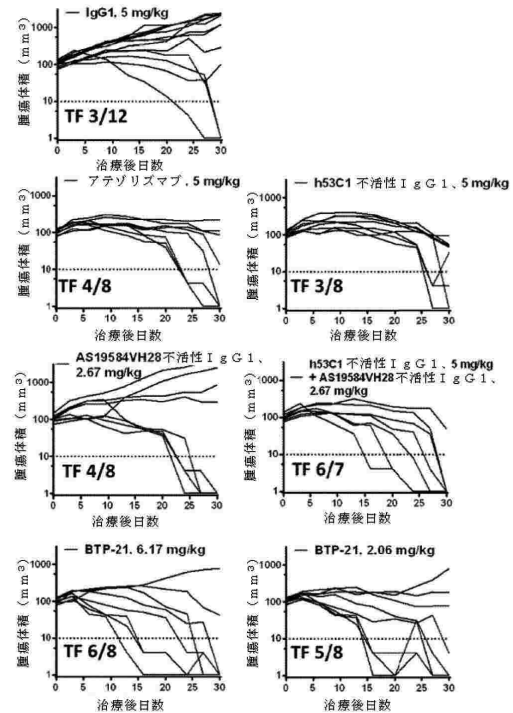
CT26腫瘍を担持するBalb/cヒトPD-1 KIマウスにおけるBTP-11の効力



【図 31】

【図 31】

MC38-hPDL1腫瘍を担持するC57BL/6ヒトPD-1/PD-L1ダブルKIマウスにおけるBTP-21の効力



10

20

30

40

50

【配列表】
0007544937000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 P 37/04 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 U
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 43/00 1 2 1
 A 6 1 P 37/04
 C 1 2 P 21/08

(33)優先権主張国・地域又は機関

中国(CN)

ity, Jiangsu, China

(74)代理人

100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人

100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人

100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人

100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人

230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者

ジャン ワン

中華人民共和国 2 1 0 0 0 0 ジアンス, ナンジン, チンファイ ディストリクト, シーヤン
 ロード 1 0 8, ビルディング 1 0, ルーム 1 3 0 5

(72)発明者

ウー シュ

中華人民共和国 2 1 1 1 0 0 ジアンス, ナンジン, ジアンニン ディストリクト, モリン ス
 トリート, ファユ コート, チェンシュ ロード 2 8, ビルディング 3, ルーム 5 0 1

(72)発明者

ヤン シュアイ

中華人民共和国 2 1 1 1 0 0 ジアンス, ナンジン, ジアンニン ディストリクト, ティアン
 ユアン イースト ロード 2 2 8, ランダー イースト カウンティ, インシャユアン ナンバー
 1 0 - 2 0 3

(72)発明者

チー パン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 1 4, ニューヨーク, チャパクア, ハイ ポイント サ
 クル 2

(72)発明者

チュアンーチュ チョウ

アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7 0 9 0, ウェストフィールド, プロスペクト ストリ
 ト 9 0 9

審査官

田中 晴絵

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 7 / 0 5 3 7 4 8 (WO, A 2)

特表 2 0 1 5 - 5 0 1 1 3 5 (JP, A)

特表 2 0 1 5 - 5 2 4 7 9 0 (JP, A)

特表 2 0 1 0 - 5 2 7 5 9 7 (JP, A)

特表 2 0 1 5 - 5 0 9 0 9 7 (JP, A)

国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 5 5 9 0 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 1 5 2 7 4 (WO, A 1)

MEDCHEM NEWS, 2017年02月01日, 27 (1), 35-41

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C07K 16/00-16/46

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)