

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-506318

(P2025-506318A)

(43)公表日 令和7年3月11日(2025.3.11)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	4 C 0 7 6
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全62頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-547446(P2023-547446)	(71)出願人	519063026	中山康方生物医▲薬▼有限公司 AKESO BIOPHARMA, IN C. 中国▲広▼▲東▼省中山市火炬▲開▼▲ 發▼区神▲農▼路6号 6 Shennong Road, Tor ch Development Zone Zhongshan, Guangdon g 5 2 8 4 3 7 (CN)	
(86)(22)出願日	令和5年2月14日(2023.2.14)				
(85)翻訳文提出日	令和5年8月4日(2023.8.4)				
(86)国際出願番号	PCT/CN2023/075862				
(87)国際公開番号	WO2023/151693				
(87)国際公開日	令和5年8月17日(2023.8.17)				
(31)優先権主張番号	202210132762.1				
(32)優先日	令和4年2月14日(2022.2.14)	(74)代理人	100099759	弁理士 青木 篤	
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)				
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES, FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV 最終頁に続く	(74)代理人	100123582	弁理士 三橋 真二	
		(74)代理人	100117019		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 抗TIGIT抗体と抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体を含有する医薬組成物及び使用

(57)【要約】

本発明は、医薬分野に属し、抗TIGIT抗体、その医薬組成物及び使用、特に抗PD-1-抗VEGFA抗体と併用して腫瘍を治療及び/又は予防する使用に関する。具体的に、本発明は、抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片に関し、そのうち、上記抗体の重鎖可変領域は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号3～配列番号5に示されるHCDR1～HCDR3を含み、且つ上記抗体の軽鎖可変領域は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号8～配列番号10に示されるLCDR1～LCDR3を含む。本発明の抗体は、TIGITに効果的に結合でき、腫瘍の予防及び治療に用いられる可能性を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

医薬組成物であって、

抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片、及び抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体又はその抗原結合断片を含み、前記医薬組成物は、選択的に、薬学的に許容されるベクター及び/又は賦形剤を更に含み、

そのうち、前記抗TIGIT抗体は、配列番号1に示される重鎖可変領域に含まれるHCDR1～HCDR3と、配列番号6に示される軽鎖可変領域に含まれるLCDR1～LCDR3とを含み（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、前記抗体の重鎖可変領域は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号3～配列番号5に示されるHCDR1～HCDR3を含み、且つ前記抗体の軽鎖可変領域は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号8～配列番号10に示されるLCDR1～LCDR3を含む）、

10

前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体は、

PD-1を標的とする第1タンパク質機能領域と、

VEGFAを標的とする第2タンパク質機能領域と、を含み、

そのうち、前記第1タンパク質機能領域は免疫グロブリンであり、前記第2タンパク質機能領域は一本鎖抗体であり、又は、前記第1タンパク質機能領域は一本鎖抗体であり、前記第2タンパク質機能領域は免疫グロブリンであり、そのうち、

前記免疫グロブリンは、配列番号31に示される重鎖可変領域に含まれるHCDR1～HCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号35～配列番号37に示されるHCDR1～HCDR3）と、配列番号33に示される軽鎖可変領域に含まれるLCDR1～LCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号38～配列番号40に示されるLCDR1～LCDR3）とを含み、

20

前記一本鎖抗体は、配列番号41に示される重鎖可変領域に含まれるHCDR1～HCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号45～配列番号47に示されるHCDR1～HCDR3）と、配列番号43に示される軽鎖可変領域に含まれるLCDR1～LCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号48～配列番号50に示されるLCDR1～LCDR3）とを含み、

或いは、

前記免疫グロブリンの重鎖可変領域は、アミノ酸配列が配列番号41に示される重鎖可変領域に含まれるHCDR1～HCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号45～配列番号47に示されるHCDR1～HCDR3）を含み、その軽鎖可変領域は、アミノ酸配列が配列番号43に示される軽鎖可変領域に含まれるLCDR1～LCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号48～配列番号50に示されるLCDR1～LCDR3）を含み、

30

前記一本鎖抗体の重鎖可変領域は、アミノ酸配列が配列番号31に示される重鎖可変領域に含まれるHCDR1～HCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号35～配列番号37に示されるHCDR1～HCDR3）を含み、且つその軽鎖可変領域は、アミノ酸配列が配列番号33に示される軽鎖可変領域に含まれるLCDR1～LCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号38～配列番号40に示されるLCDR1～LCDR3）を含み、

40

前記免疫グロブリンはヒトIgG1サブタイプである、

医薬組成物。

【請求項2】

前記抗TIGIT抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号1、配列番号11、配列番号13、配列番号15及び配列番号17から選ばれ、且つ前記抗TIGIT抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号6、配列番号19、配列番号21、配列番号23及び配列番号25から選ばれ、

好ましくは、前記抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片であって、そのうち、

前記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号1に示され、且つ前記抗体の軽鎖

50

可変領域のアミノ酸配列は、配列番号6に示され、

前記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号11に示され、且つ前記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号19に示され、

前記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号17に示され、且つ前記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号19に示され、

前記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号13に示され、且つ前記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号21に示され、

前記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号13に示され、且つ前記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号23に示され、

前記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号15に示され、且つ前記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号21に示され、

前記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号15に示され、且つ前記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号23に示され、

前記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号11に示され、且つ前記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号25に示され、又は、

前記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号17に示され、且つ前記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号25に示され、

好ましくは、前記抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片であって、そのうち、前記抗体は非-CDR領域を含み、且つ前記非-CDR領域は、マウス類でない種、例えばヒト抗体に由来し、

好ましくは、前記抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片であって、そのうち、前記抗体の重鎖定常領域がIg gamma-1鎖C領域（例えばNCBIアクセッション番号：P01857）であり、軽鎖定常領域がIg kappa鎖C領域（例えばNCBIアクセッション番号：P01834）であり、

好ましくは、前記抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、相補性決定領域断片、一本鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体又は二重抗体から選ばれ、

好ましくは、前記抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片であって、そのうち、前記抗体は、4E-10未満又は4E-11未満のK_DでTIGIT-mFcに結合し、好ましくは、前記K_Dは、Fortebio分子相互作用装置で測定され、

好ましくは、前記抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片であって、そのうち、前記抗体は、1.5 nM未満、1.2 nM未満又は1 nM未満のEC₅₀でTIGITに結合し、好ましくは、前記EC₅₀は、フローサイトメーターで測定され、

好ましくは、前記抗TIGIT抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）であり、

好ましくは、前記抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片であって、そのうち、前記抗体は、ハイブリドーマ細胞株LT019が産生した抗体であり、前記ハイブリドーマ細胞株LT019は、中国典型培養物寄託センター（CCTCC）に寄託され、寄託番号がCCTCC NO：C2020208である、

請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体の前記免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号31又はそれと少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列から選ばれ、且つ前記免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号33又はそれと少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列から選ばれ、及び、前記一本鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号41又はそれと少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列から選

ばれ、且つ前記一本鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号43又はそれと少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列から選ばれ、

好ましくは、前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体における前記第1タンパク質機能領域は、前記第2タンパク質機能領域に直接連結されているか又は連結断片を介して連結されており、及び/又は前記一本鎖抗体の重鎖可変領域は、前記一本鎖抗体の軽鎖可変領域に直接連結されているか又は連結断片を介して連結されており、

好ましくは、前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体における前記連結断片は、(GGGGS) n であり、 n は正の整数であり、好ましくは、 n は、1、2、3、4、5又は6であり、

好ましくは、前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体における前記第1タンパク質機能領域及び第2タンパク質機能領域は、独立的に1つ、2つ又は2つ以上であり、

好ましくは、前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体における前記一本鎖抗体（好ましくは、重鎖可変領域）は、免疫グロブリンの重鎖のC末端に連結されており、

そのうち、EU番号付けシステムに従って、前記免疫グロブリンの重鎖定常領域は、以下の変異の組合せの1つ、

L234A及びL235A、又は

L234A及びG237A、又は

L235A及びG237A、又は

L234A、L235A、G237A、を有し、

好ましくは、前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体は、

PD-1を標的とする第1タンパク質機能領域と、

VEGFAを標的とする第2タンパク質機能領域と、を含み、

前記第1タンパク質機能領域は2つであり、前記第2タンパク質機能領域は1つであり、

そのうち、前記第1タンパク質機能領域は、一本鎖抗体であり、そのうち前記一本鎖抗体は、相同又は相異であり、前記第2タンパク質機能領域は、免疫グロブリンであり、

前記免疫グロブリンの重鎖のアミノ酸配列は、配列番号31又はそれと少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列に示され、且つその軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号33又はそれと少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列に示され、

前記一本鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号41又はそれと少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列に示され、且つ前記一本鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号43又はそれと少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の相同性を有する配列に示され、

前記一本鎖抗体は免疫グロブリンの重鎖のC末端に連結されており、

前記第1タンパク質機能領域は、前記第2タンパク質機能領域に第1連結断片を介して連結され、且つ前記一本鎖抗体の重鎖可変領域は、前記一本鎖抗体の軽鎖可変領域に第2連結断片を介して連結され、前記第1連結断片と前記第2連結断片は相同又は相異であり、

好ましくは、前記第1連結断片及び前記第2連結断片のアミノ酸配列は、配列番号52及び配列番号53から独立的に選ばれ、

好ましくは、前記第1連結断片及び前記第2連結断片のアミノ酸配列は何れも配列番号53に示され、

好ましくは、前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体の重鎖アミノ酸配列は、配列番号27に示され、軽鎖アミノ酸配列は、配列番号29に示され、二重特異性抗体の構造はIgG-scFvであり、そのうち、IgG部分は抗VEGFA抗体であり、scFv部分は抗PD-1抗体で

10

20

30

40

50

ある、

請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

抗体の質量によって計算され、抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片と抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体又はその抗原結合断片の質量比が(1:5)～(5:1)であり、例えば、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1又は5:1である、

請求項1～3の何れか一項に記載の医薬組成物。

【請求項5】

独立的に包装される第1製品と第2製品を含み、

そのうち、前記第1製品は、請求項1～4の何れか一項において定義される前記抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片を含み、

前記第2製品は、請求項1～4の何れか一項において定義される前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体又はその抗原結合断片を含み、

好ましくは、前記キットは、1種又は複数種の化学療法薬を含む独立的に包装される第3製品を更に含み、

好ましくは、前記第1製品と前記第2製品は、1種又は複数種の薬学的に許容される補助剤を更に独立的に含み、

好ましくは、前記組合せ製品は、製品説明書を更に含み、

好ましくは、前記キットにおいて、抗体の質量によって計算され、抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片と抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体又はその抗原結合断片の質量比が(1:5)～(5:1)であり、例えば、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1又は5:1である、

キット。

【請求項6】

腫瘍を治療及び/又は予防する方法であって、

必要とする対象に有効量の請求項1～4の何れか一項において定義される前記抗TIGIT抗体若しくはその抗原結合断片、及び/又は請求項1～4の何れか一項に記載の前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体若しくはその抗原結合断片を投与するステップを含み、

好ましくは、1種又は複数種の化学療法薬又は治療プロセス（好ましくは、前記化学療法薬は、化学療法剤又は増殖阻害剤（例えば、アルキル化剤、アントラサイクリン剤、抗ホルモン剤、芳香酵素阻害剤、抗アンドロゲン剤、プロテインキナーゼ阻害剤、脂質キナーゼ阻害剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼ阻害剤、細胞毒性剤又は抗腫瘍性抗生物質、プロテアソーム阻害剤、抗微小管剤、EGFRアンタゴニスト、レチノイド、チロシンキナーゼ阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、及びそれらの組み合わせ）、標的治療剤（例えば、B-raf阻害剤、MEK阻害剤、K-ras阻害剤、c-Met阻害剤、Alk阻害剤、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ阻害剤、Akt阻害剤、mTOR阻害剤、ビスホスファチジルイノシトール3-キナーゼ/mTOR阻害剤及びそれらの組み合わせ）、抗体-薬物複合体（例えば、マイタンシン、モノメチルアウリスタチンE、カリケアマイシン、エスペラミシン及び放射性同位体キレート剤）、代謝拮抗薬、抗生物質、植物薬及び/又はホルモン薬、好ましくは、シクロホスファミド、ペメトレキセド、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチンなどの白金系薬、アドリアマイシン系、パクリタキセル、ビンブラスチン系、タモキシフェン、メゲストロール、ゴセレリン、アスパラギナーゼ及び/又はフルオロウラシル系抗腫瘍薬）を更に併用して投与し、

好ましくは、前記抗TIGIT抗体、抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体及び腫瘍化学療法薬は同時に又は順次投与され、より好ましくは、前記抗TIGIT抗体、抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体は、手術治療の前又は後、及び/又は放射線治療の前又は後に投与され、

好ましくは、前記抗TIGIT抗体、前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体及び/又は前記化学療法薬は、静脈内注射又は静脈内点滴に適した形態であり、好ましくは、液体の形態であり、

10

20

30

40

50

好ましくは、そのうち前記化学療法剤又は増殖阻害剤は、アルキル化剤、アントラサイクリン系、抗ホルモン剤、芳香酵素阻害剤、抗アンドロゲン剤、プロテインキナーゼ阻害剤、脂質キナーゼ阻害剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼ阻害剤、細胞毒性剤又は抗腫瘍性抗生物質、プロテアソーム阻害剤、抗微小管剤、EGFRアンタゴニスト、レチノイド、チロシンキナーゼ阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、及びそれらの組み合わせから選ばれ、

好ましくは、そのうち、前記標的治療剤は、B-raf阻害剤、MEK阻害剤、K-ras阻害剤、c-Met阻害剤、Alk阻害剤、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ阻害剤、Akt阻害剤、mTOR阻害剤、ビスホスファチジルイノシトール3-キナーゼ/mTOR阻害剤及びそれらの組み合わせから選ばれ、

好ましくは、そのうち前記抗体-薬物複合体は、マイタンシン、モノメチルアウリスチン E、カリケマイシン、エスペラミシン及び放射性同位体キレート剤からなる群より選ばれる薬物を含み、

好ましくは、前記腫瘍は、

子宮頸癌（例えば、転移性子宮頸癌）、子宮内膜癌、小細胞肺癌や非小細胞肺癌などの肺癌（例えば、扁平上皮非小細胞肺癌や非扁平上皮非小細胞肺癌）、咽頭癌、食道癌、食道扁平上皮癌、甲状腺癌、中皮種、胃癌（例えば、進行胃癌、胃腸癌、胃腺癌又は食道胃接合部腺癌）、肝癌（例えば、肝細胞癌）、腸癌、直腸癌、結腸癌、結腸直腸癌、胆管癌、肝胆癌、胆道癌、胆管癌、膵臓癌、膵臓癌、腎臓癌（例えば、腎細胞癌）、卵巣癌（例えば、進行卵巣癌）、卵管癌、腹膜癌、神経膠腫（例えば、神経膠腫、再発性神経膠腫）、皮膚癌、黒色腫、白血病（例えば、急性骨髄性白血病）、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫）、形質細胞癌、骨癌、肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、神経芽細胞腫、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、大細胞神経内分泌癌、尿路上皮癌（例えば、上尿路上皮癌又は膀胱癌）、前立腺癌、精巣癌、末梢T細胞リンパ腫、鼻咽頭癌、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）又はミスマッチ修復欠損型（dMMR）固形腫瘍、頭頸部癌、脳癌（例えば、侵襲性脳癌、例えば膠芽腫）、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺腫、乳癌（例えば三陰乳癌）、胸腺癌、回盲部腺癌、壺腹部腺癌、粘液性又は漿液性嚢胞腺癌、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、絨毛上皮癌、悪性ブドウ胎、悪性セルトリ間質細胞腫、悪性顆粒細胞腫、無性細胞腫、膠芽腫、真菌症、メルケル細胞癌及びその他の血液系悪性腫瘍の1種又は複数種から選ばれ、

好ましくは、請求項1～4の何れか一項において定義される前記抗TIGIT抗体及び/又は前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体の単回投与量は、体重1 kg当たり0.1 mg～100 mgであり、好ましくは1 mg～10 mgであり、或いは、本発明の何れか一項に記載の抗TIGIT抗体及び/又は本発明の何れか一項に記載の抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体の単回投与量は、対象1人当たり10 mg～1000 mgであり、好ましくは50 mg～500 mg、100 mg～400 mg、150 mg～300 mg、150 mg～250 mg又は200 mgであり、

好ましくは、1日2回～約2日に1回投与し、又は3日ごとに1回、4日ごとに1回、5日ごとに1回、6日ごとに1回、10日ごとに1回、週1回、2週に1回、3週に1回、4週に1回、5週に1回又は6週に1回投与し、

好ましくは、投与方式は、静脈内点滴又は静脈内注射である、

腫瘍を治療及び/又は予防する方法。

【請求項7】

好ましくは腫瘍を治療するために用いられ、そのうち、前記単位製剤は、1 mg～1000 mg（好ましくは10 mg～1000 mg、より好ましくは50 mg～500 mg、100 mg～400 mg、150 mg～300 mg、150 mg～250 mg又は200 mg）の請求項1～4の何れか一項において定義される前記抗TIGIT抗体と、1 mg～10000 mg（好ましくは1 mg～1000 mg、より好ましくは50 mg～500 mg、100 mg～400 mg、150 mg～300 mg、150 mg～250 mg、200 mg又は100 mg）の請求項1～4の何れか一項において定義される抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体と、任意選択的に請求項6において定義される1種又は複数種の前記化学療法薬（例えば、白金系薬及び/又はフルオロウラ

10

20

30

40

50

シル系抗腫瘍薬)とを含み、そのうち、前記抗TIGIT抗体、前記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体及び化学療法薬は、それぞれ単独で包装される、

単位製剤。

【請求項8】

好ましくは腫瘍を治療するために用いられ、それは、0.1 mg～10000 mg（好ましくは1 mg～1000 mg、より好ましくは50 mg～500 mg、100 mg～400 mg、150 mg～300 mg、150 mg～250 mg、200 mg又は100 mg）の請求項1～4の何れか一項において定義される前記抗TIGIT抗体と、0.1 mg～10000 mg（好ましくは1 mg～1000 mg、より好ましくは50 mg～500 mg、100 mg～400 mg、150 mg～300 mg、150 mg～250 mg、200 mg又は100 mg）の請求項1～4の何れか一項において定義される抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体とを含む、

10

単回薬物投与量単位。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬分野に属し、抗TIGIT抗体、その医薬組成物及び使用に関する。具体的に、本発明は、抗TIGITのモノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

TIGIT (T cell Ig and ITIM domain、又はWUCAM、Vstm3、VSIG9と称される) は、ポリオウイルス受容体 (PVR) /Nectinファミリーのメンバーである。TIGITは、細胞外免疫グロブリン可変領域 (IgV) ドメイン、I型膜貫通ドメイン、標準的な免疫受容体チロシン抑制モチーフ (ITIM) と免疫グロブリンチロシン尾部 (ITT) モチーフを有する細胞内ドメインからなる。TIGITは、リンパ球に、特にエフェクターと制御性CD4+T細胞に、濾胞ヘルパーCD4+T細胞とエフェクターCD8+T細胞及びナチュラルキラー (NK) 細胞に、高度に発現する (Yu X, Harden K, Gonzalez L C, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells [J] . Nature immunology, 2009, 10 (1) : 48) 。

20

【0003】

CD155 (又は、PVR、Nect5又はTage4と称される)、CD112 (又はPVRL2/nectin 2と称される) とCD113 (PVRL3と称される) は、TIGITが結合したリガンド (Martin L, Smyth M J. Balancing natural killer cell activation through paired receptors [J] . Nature Reviews Immunology, 2015, 15 (4) : 243～254) であり、そのうち、CD155は、TIGITの高親和性リガンドである。NK細胞において、TIGITがリガンドCD155とCD112に結合するのは、TIGIT高発現細胞に対するNK細胞の殺傷作用を抑制できる (Stanitsky N, Simic H, Arapovic J, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity [J] . Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106 (42) : 17858～17863) 。報告によると、PD-1とTIGITを同時に遮断する場合、CD8+T細胞の殺傷作用を増加できることが分かる (Johnston R J, Comps-Agrar L, Hackney J, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8+ T cell effector function [J] . Cancer cell, 2014, 26 (6) : 923～937) 。最新の研究において、TIGITは、NK細胞の免疫チェックポイントとし、腫瘍増殖中、阻害性受容体TIGITは、NK細胞枯渇をもたらし、抗TIGITモノクローナル抗体は、NK細胞枯渇を逆転させることができることが証明され、且つさまざまな腫瘍の免疫治療に用いられることが分かる (Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity [J] . Nature immunology, 2018, 19 (7) : 723～732) 。

30

40

50

【0004】

その他の報告によると、TIGIT遮断剤を単独で、又はPD-1ブロッカーとCD96遮断剤を併用すると、野生型とCd155^{-/-}マウスモデルでB16悪性黒色腫の成長 (Li X-Y, Das I, Lepletier A, et al. Cd155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms. J Clin Invest 2018; 128: 2613-25) を著しく減少できる。CD112R遮断剤を単独で、又はTIGIT遮断剤及び/又はPD-1遮断剤と併用し、卵巣腫瘍、子宮内膜腫瘍と肺腫瘍におけるTILのサイトカイン産生能が増加できる (Whelan S, Ophir E, Kotturi MF, et al. PVRIG and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8⁺T-cell Function. Cancer Immunol Res 2019; 7: 257-68)。

10

【0005】

抗TIGIT抗体薬物は、新しい免疫チェックポイント抗体薬物とし、幅広い応用の可能性があり、腫瘍の免疫治療に用いられる。ロシュ製薬 (Roche) が研究・開発したTiragolumabは、すでに第3相臨床試験を実施し、且つ報告によると、TIGITモノクローナル抗体TiragolumabとPD-L1薬物Tecentriq (アテゾリズマブAtezolizumab) を一次治療として併用することで、PD-L1陽性の転移性非小細胞肺癌 (NSCLC) の治療に有効である患者の第2相臨床試験では、TiragolumabとTecentriqの組合せは、耐性が良好で、疾患進行のリスクを43%減少し、併用効果が著しい (Exit C. Roche to present first clinical data on novel anti-TIGIT cancer immunotherapy tiragolumab at ASCO [J])。既存の臨床情報記録によると、TIGITは、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、黒色腫、膵臓癌、子宮頸腫、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、Bリンパ球腫、形質細胞癌の治療のための重要な標的である。

20

【0006】

しかしながら、既存の抗ヒトTIGIT抗体薬物は、親和性が低く、高い親和性を有する抗TIGIT抗体はまだ不足する。

そのため、TIGITと高い親和性を有する自己免疫疾患の治療用の抗体薬を開発し、その治療効果を向上させ、毒性と副作用を低減させることが、極めて大きな意義を有する。

【0007】

膜貫通受容体PD-1 (プログラム細胞死-1) はCD28遺伝子ファミリーのメンバーの1つであり、活性化されたT細胞、B細胞及び骨髄系細胞で発現している。PD-1のリガンドPDL1 (Programmed cell death 1 ligand 1、PD-L1とも略称される) 及びPDL2 (Programmed cell death 1 ligand 2、PD-L2とも略称される) は何れもB7スーパーファミリーに属し、そのうち、PDL1はT細胞、B細胞及び内皮細胞と上皮細胞を含む多種の細胞に発現されるが、PDL2は樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞にのみ発現される。

30

【0008】

PD-1/PDL1シグナル伝達経路は、免疫寛容、微生物感染及び腫瘍の免疫回避の調節において重要な役割を果たしている。PD-1は主にT細胞などの免疫細胞に発現されるが、PD-1のリガンドPDL1は主に多くのヒト腫瘍組織で高発現される。PD-1/PDL1シグナル伝達経路を遮断することにより、抑制されたT細胞が活性化され、ひいては癌細胞を攻撃することができる。PD-1/PDL1シグナル伝達経路を遮断することにより、腫瘍抗原特異性T細胞の増殖を促進し、腫瘍細胞を殺傷する作用を発揮し、ひいては局所腫瘍の増殖を抑制できる (Julie R et al., 2012, N Engl J Med. 366: 2455~2465)。また、PDL1を高発現する腫瘍は検出困難な癌を伴う (Hamanishi et al, 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 3360-5)。効果的な実施の方法は、抗PD-1抗体を体内に注射してPD-1の発現を制御することである。PD-1経路に対する抗体は、PD-1抗体の幅広い抗腫瘍性の有望さ及び驚くべき薬効のために、非小細胞性肺癌、腎細胞癌、卵巣癌、黒色腫 (Homet M. B., Parisi G., et al., 2015, Semin Oncol. 42 (3): 466~473)、白血病及び貧血 (Held SA, Heine A, et al., 2013, Curr Cancer Drug Targets. 13 (7): 768-74) の治療に用いられる多種の腫瘍治療の突破の進行をもた

40

50

らすと業界において一般的に考えられている。

【0009】

血管内皮増殖因子（VEGF）は、内皮細胞の分裂増殖を促進し、新生血管の形成を促進し、血管透過性を高める成長因子であり、細胞表面の血管内皮増殖因子受容体と結合し、チロシンキナーゼシグナル伝達経路の活性化を通じて機能を発揮する。腫瘍組織において、腫瘍細胞、腫瘍浸潤マクロファージ及びマスト細胞は高レベルのVEGFを分泌し、腫瘍血管内皮細胞を傍分泌の形で刺激し、内皮細胞の増殖、遊走を促進し、血管形成を誘導し、腫瘍の持続的な成長を促進し、且つ血管透過性を高め、周囲組織のフィブリン沈着を引き起こし、単球、線維芽細胞内皮細胞の浸潤を促進し、腫瘍基質の形成と腫瘍細胞の新生血管への進入を促進し、腫瘍の転移を促進するため、腫瘍血管新生の阻害は現在最も有望な腫瘍治療方法の1つであると考えられている。VEGFファミリーは、VEGFA、VEGFB、VEGFC、VEGFD及びPIGFを含む。血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）は、VEGFR1（別名Flt1）、VEGFR2（別名KDR又はFlk1）、VEGFR3（別名Flt4）及びNeuropilin-1（NRP-1）を含む。そのうち、最初の3つの受容体は、構造上類似し、何れもチロシンキナーゼスーパーファミリーに属し、何れも膜外領域、膜貫通断片、及び膜内領域の3つの部分から構成され、そのうち、膜外領域は、免疫グロブリン様ドメインからなり、膜内領域は、チロシンキナーゼ領域に属する。VEGFR1及びVEGFR2は、主に血管内皮細胞表面に位置し、VEGFR3は、主にリンパ管内皮細胞表面に位置する。

10

【0010】

VEGFファミリー分子は、幾つかの受容体に対して異なる親和性を有する。VEGFAは、主にVEGFR1、VEGFR2及びNRP-1と結合して作用を発揮する。VEGFR1は、最も早く発見された受容体であり、正常な生理学的状況でVEGFR1とVEGFAとの親和性はVEGFR2とVEGFAとの親和性よりも高いが、その細胞内段チロシンキナーゼ活性はVEGFR2よりも低い（馬莉、中国優生及び遺伝雑誌、24（5）、（2016）：146～148）。

20

【0011】

VEGFR2は血管新生及び構築の主な調節因子であり、VEGFR1と比較してVEGFR2は非常に高いチロシンキナーゼ活性を有する。VEGFR2は、リガンドVEGFAと結合した後に血管内皮細胞の増殖、分化などの挙動、並びに血管の形成過程及び血管の透過性を媒介し（Roskoski R Jr.ら、Crit Rev Oncol Hematol, 62（3）、（2007）：179～213）、VEGFAは、VEGFR2と結合した後に下流PLC- γ -PKC-Raf-MEK-MAPKシグナル伝達経路を介して細胞内関連タンパク質遺伝子の転写発現を媒介し、血管内皮細胞の増殖を促進する（Takahashi Tら、Oncogene, 18（13）、（1999）：2221～2230）。

30

【0012】

VEGFR3は、チロシンキナーゼファミリーのメンバーの1つに属し、主に胚胎時期の血管内皮細胞及び成年期のリンパ管内皮細胞に発現し、VEGFC及びVEGFDは、VEGFR3と結合してリンパ管内皮細胞の増殖及び遊走を刺激し、リンパ管の新生を促進し、NRP-1は、非チロシンキナーゼ膜貫通タンパク質であり、生物学的シグナルを独立に伝達することができないが、VEGFチロシンキナーゼ受容体と複合体を形成してからシグナル伝達を媒介することができる。（馬莉、中国優生及び遺伝雑誌、24（5）、（2016）：146～148）。

40

【0013】

VEGFA及びVEGFR2は、主に血管新生の制御に関与し、VEGFAとVEGFR2との結合前後に上下流経路において多数の中間シグナルがカスケード反応を形成することを引き起こし、最終的に内皮細胞の増殖、生存、遊走、透過性増加及び周辺組織への浸潤などの異なる形態でその生理機能を変化させる（董宏超ら、『現代腫瘍医学』、第22巻、第9期2014年9月、2231-3ページ）。

【0014】

ヒトVEGF、特にVEGFAを標的とする多くのヒト化モノクローナル抗体、例えばベバシズマブ（ベバシズマブ）が現在すでに存在しており、2004年にアメリカ食品医薬品管

50

理局に非小細胞肺癌、腎細胞癌、子宮頸癌、転移性結腸直腸癌などの多種の腫瘍の治療に次々に承認された。

従って、より有効な治療手段の開発及び併用投与の治療計画は、臨床的に大きな意義を有する。

【発明の概要】

【0015】

本発明者らは、鋭意研究と創造的な労働を経て、哺乳動物細胞発現系を利用し、組換えのヒトTIGITを抗原として発現し、マウスを免疫し、マウス脾臓細胞と骨髓腫細胞の融合により、ハイブリドーマ細胞を取得した。発明者らは、多数のサンプルに対するスクリーニングにより、ハイブリドーマ細胞株LT019（寄託番号がCCTCC NO：C2020208である）を取得した。

10

【0016】

本発明者らは驚くべきことに、ハイブリドーマ細胞株LT019がそれぞれヒトTIGITに特異的に結合する特異的モノクローナル抗体（26B12と名付けられる）を分泌及び産生でき、且つ当該モノクローナル抗体がTIGITに非常に効果的に結合し、TIGITの免疫細胞抑制作用を低下させ、T細胞活性を促進し、NK細胞枯渇を逆転させ、腫瘍に対する免疫細胞の殺傷作用を高めることができることを発見した。更に、本発明者らは、抗ヒトTIGITのヒト化抗体（26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4及び26B12H4L4と名付けられる）を創造的に作製した。

20

【0017】

本発明者らは更に驚くべきことに、本発明の抗体26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4及び26B12H4L4がTIGITに結合する活性を有し、且つ非常に強い親和性を有し、26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4及び26B12H4L4がTIGITの活性を効果的に減少できることを発見した。

【0018】

また、本発明者らは、抗TIGIT抗体と抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体とを併用することにより、腫瘍の予防及び治療に有効であることを発見した。

【0019】

本発明の抗体は、腫瘍（例えば非小細胞肺癌、小細胞肺癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、黒色腫、脾臓癌、子宮頸癌、多発性骨髓腫、非ホジキンリンパ腫、形質細胞癌）等の疾患の治療及び/又は予防に用いられる可能性がある。このため、下記発明が提供される。

30

【0020】

本発明の1つの態様は、抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片に関し、そのうち、

上記抗TIGIT抗体は、配列番号1に示される重鎖可変領域に含まれるHCDR1～HCDR3と、配列番号6に示される軽鎖可変領域に含まれるLCDR1～LCDR3とを含み、

好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、上記抗体の重鎖可変領域は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号3～配列番号5に示されるHCDR1～HCDR3を含み、且つ上記抗体の軽鎖可変領域は、アミノ酸配列がそれぞれ配列番号8～配列番号10に示されるLCDR1～LCDR3を含む。

40

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号1、配列番号11、配列番号13、配列番号15及び配列番号17から選ばれ、且つ上記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号6、配列番号19、配列番号21、配列番号23及び配列番号25から選ばれる。

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号1に示され、且つ上記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号6に示され、

上記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号11に示され、且つ上記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号19に示され、

50

上記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号17に示され、且つ上記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号19に示され、

上記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号13に示され、且つ上記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号21に示され、

上記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号13に示され、且つ上記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号23に示され、

上記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号15に示され、且つ上記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号21に示され、

上記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号15に示され、且つ上記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号23に示され、

上記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号11に示され、且つ上記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号25に示され、又は、

上記抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号17に示され、且つ上記抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号25に示される。

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記抗体は、非-CDR領域を含み、且つ上記非-CDR領域は、マウス類でない種、例えばヒト抗体に由来する。

【0021】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記抗体の重鎖定常領域はIg gamma-1鎖C領域（例えばNCBIアクセス番号：P01857）であり、軽鎖定常領域はIg kappa鎖C領域 region（例えばNCBIアクセス番号：P01834）である。

【0022】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、相補性決定領域断片、一本鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体又は二重抗体から選ばれる。

【0023】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片であって、そのうち、上記抗体は、4E-10未満又は4E-11未満のK_DでTIGIT-mFcに結合し、好ましくは、上記K_Dは、Fortebio分子相互作用装置で測定される。

【0024】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片であって、そのうち、上記抗体は、1.5 nM未満、1.2 nM未満又は1 nM未満のEC₅₀でTIGITに結合し、好ましくは、上記EC₅₀は、フローサイトメーターで測定される。

【0025】

本発明の幾つかの実施形態において、上記抗TIGIT抗体はモノクローナル抗体である。

【0026】

本発明の幾つかの実施形態において、上記抗TIGIT抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）である。

【0027】

本発明の幾つかの実施形態において、上記抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、Fab/c、相補性決定領域断片、一本鎖抗体（例えば、scFv）、ヒト化抗体、キメラ抗体又は二重特異性抗体から選ばれる。

【0028】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片であって、そのうち、上記抗体は、ハイブリドーマ細胞株LT019が産生した抗体であり、上記ハイブリドーマ細胞株LT019は、中国典型培養物寄託センター（CCTCC）、中国武漢、郵便番号430072に寄託され、寄託番号がCCTCC NO：C2020208である。

【0029】

本発明の別の態様は、本発明の何れか一項に記載の抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子に関する。

【0030】

10

20

30

40

50

本発明の更なる態様は、本発明の単離された核酸分子を含むベクターに関する。

【0031】

本発明の更なる態様は、本発明の単離された核酸分子、又は本発明のベクターを含む宿主細胞に関する。

【0032】

本発明の更なる態様は、中国典型培養物寄託センター（CCTCC）に寄託しており、寄託番号がCCTCC NO：C2020208であるハイブリドーマ細胞株LT019に関する。

【0033】

本発明の更なる態様は、抗体及びカップリング部分を含む複合体に関し、そのうち、上記抗体が、本発明の何れか一項に記載の抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片であり、上記カップリング部分が、検出可能な標識であり、好ましくは、上記カップリング部分が、放射性同位体、蛍光物質、発光物質、有色物質又は酵素である。

10

【0034】

本発明の更なる態様は、本発明の何れか一項に記載の抗TIGIT抗体若しくはその抗原結合断片を含むか、又は本発明の複合体を含むキットに関し、

好ましくは、上記キットは、上記抗体を特異的に識別する第2抗体を更に含み、任意選択的に、上記第2抗体は、検出可能な標識、例えば放射性同位体、蛍光物質、発光物質、有色物質又は酵素を更に含む。

【0035】

本発明の更なる態様は、キットの調製における本発明の何れか一項に記載の抗体又は本発明の複合体の使用に関し、上記キットはサンプルにおけるTIGITの存在又はそのレベルの検出に用いられる。

20

【0036】

本発明の更なる態様は、本発明の何れか一項に記載の抗TIGIT抗体若しくはその抗原結合断片又は本発明の複合体を含む医薬組成物に関し、選択的に、上記医薬組成物は、薬学的に許容されるベクター及び/又は賦形剤を更に含む。

【0037】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記医薬組成物は、1種又は複数種の抗PD-1抗体、又は抗VEGF抗体を更に含む。

【0038】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記医薬組成物であって、そのうち、抗体の質量によって計算され、抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片と抗PD-1抗体又は抗VEGF抗体の質量比が（1：5）～（5：1）であり、例えば、1：5、1：4、1：3、1：2、1：1、2：1、3：1、4：1又は5：1である。

30

【0039】

本発明の更なる態様は、独立的に包装される第1製品と第2製品を含む組合せ製品（例えばキット）に関し、そのうち、

上記第1製品は、本発明の何れか一項に記載の抗TIGIT抗体若しくはその抗原結合断片、本発明の複合体又は本発明の何れか一項に記載の医薬組成物を含み、

上記第2製品は、少なくとも1種の抗PD-1抗体又は1種の抗VEGF抗体、例えば抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体を含み、

40

好ましくは、上記組合せ製品は、1種又は複数種の化学療法薬を含む独立的に包装される第3製品を更に含み、

好ましくは、上記第1製品と上記第2製品は、1種又は複数種の薬学的に許容される補助剤を更に独立的に含み、

好ましくは、上記組合せ製品は、製品説明書を更に含む。

【0040】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記組合せ製品であって、そのうち、抗体の質量によって計算され、抗TIGIT抗体又はその抗原結合断片と抗PD-1抗体又は抗VEGF抗体の質量比が（1：5）～（5：1）であり、例えば、1：5、1：4、1：3、1：2、1

50

：1、2：1、3：1、4：1又は5：1である。

【0041】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記抗PD-1抗体又は抗VEGFA抗体は、抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体である。

【0042】

本発明の更なる態様は、腫瘍を治療及び/又は予防する薬物の調製における、本発明の何れか一項に記載の抗体、本発明の複合体、本発明の何れか一項に記載の医薬組成物又は本発明の何れか一項に記載の組合せ製品の使用に関し、好ましくは、上記腫瘍は、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、黒色腫、膵臓癌、子宮頸癌、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫及び形質細胞癌の1種又は複数種から選ばれる。

10

【0043】

本発明の何れか一項に記載の抗体、本発明の複合体、本発明の何れか一項に記載の医薬組成物又は本発明の何れか一項に記載の組合せ製品は、腫瘍を治療及び/又は予防するために用いられ、好ましくは、上記腫瘍は、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、黒色腫、膵臓癌、子宮頸癌、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫及び形質細胞癌の1種又は複数種から選ばれる。

【0044】

本発明の更なる態様は、腫瘍を治療及び/又は予防する方法であって、必要とする対象に有効量の本発明の何れか一項に記載の抗体、本発明の複合体、本発明の何れか一項に記載の医薬組成物又は本発明の何れか一項に記載の組合せ製品を投与するステップを含む方法に関し、好ましくは、上記腫瘍は、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、乳癌、卵巣癌、結腸直腸癌、黒色腫、膵臓癌、子宮頸癌、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫及び形質細胞癌の1種又は複数種から選ばれる。

20

【0045】

本発明は、腫瘍（特に悪性腫瘍）を予防及び/又は治療する方法であって、対象に治療有効量の抗TIGIT抗体を投与することと、抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体を併用投与することと、より好ましくは、腫瘍を治療するための1つ又は複数の薬物（好ましくは、上記薬物は、化学療法剤又は増殖阻害剤、標的治療剤、抗体-薬物複合体、キメラ抗原受容体を発現するT細胞、抗体又は抗原の結合断片、血管形成阻害剤、抗腫瘍剤、癌ワクチン、アジュバント及びそれらの組み合わせ、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗生物質、植物薬及び/又はホルモン薬、好ましくは、シクロホスファミド、ペメトレキセド、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチンなどの白金系薬、アドリアマイシン系、パクリタキセル、ビンブラスチン系、タモキシフェン、メゲストロール、ゴセレリン、アスパラギナーゼ及び/又はフルオロウラシル系抗腫瘍薬である）を更に併用投与することを含む方法に関し、好ましくは、上記抗TIGIT抗体、抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体及び腫瘍化学療法薬は同時に又は順次投与される。

30

【0046】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記化学療法剤又は増殖阻害剤は、アルキル化剤、アントラサイクリン系、抗ホルモン剤、芳香酵素阻害剤、抗アンドロゲン剤、プロテインキナーゼ阻害剤、脂質キナーゼ阻害剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼ阻害剤、細胞毒性剤又は抗腫瘍性抗生物質、プロテアソーム阻害剤、抗微小管剤、EGFRアンタゴニスト、VEGFアンタゴニスト、アンジオポエチン2アンタゴニスト、レチノイド、チロシンキナーゼ阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、及びそれらの組み合わせから選ばれる。

40

【0047】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記標的治療剤は、B-raf阻害剤、MEK阻害剤、K-ras阻害剤、c-Met阻害剤、Alk阻害剤、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ阻害剤、Akt阻害剤、mTOR阻害剤、VEGF阻害剤、ビスホスファチジルイノシトール3-キナーゼ/mTOR阻害剤及びそれらの組み合わせから選ばれる。

【0048】

50

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記抗体-薬物複合体は、マイタンシン、モノメチルアウリスタチン E、カリケアマイシン、エスペラミシン及び放射性同位体キレート剤からなる群より選ばれる薬物を含む。

【0049】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記腫瘍は、

子宮頸癌（例えば、転移性子宮頸癌）、子宮内膜癌、小細胞肺癌や非小細胞肺癌などの肺癌（例えば、扁平上皮非小細胞肺癌や非扁平上皮非小細胞肺癌）、咽頭癌、食道癌、食道扁平上皮癌、甲状腺癌、中皮種、胃癌（例えば、進行胃癌、胃腸癌、胃腺癌又は食道胃接合部腺癌）、肝癌（例えば、肝細胞癌）、腸癌、直腸癌、結腸癌、結腸直腸癌、胆管癌、肝胆癌、胆道癌、胆管癌、膵臓癌、膵臓癌、腎臓癌（例えば、腎細胞癌）、卵巣癌（例えば、進行卵巣癌）、卵管癌、腹膜癌、神経膠腫（例えば、神経膠腫、再発性神経膠腫）、皮膚癌、黒色腫、白血病（例えば、急性骨髄性白血病）、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫）、形質細胞癌、骨癌、肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、神経芽細胞腫、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、大細胞神経内分泌癌、尿路上皮癌（例えば、上尿路上皮癌又は膀胱癌）、前立腺癌、精巣癌、末梢T細胞リンパ腫、鼻咽頭癌、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）又はミスマッチ修復欠損型（dMMR）固形腫瘍、頭頸部癌、脳癌（例えば、侵襲性脳癌、例えば膠芽腫）、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺腫、乳癌（例えば三陰乳癌）、胸腺癌、回盲部腺癌、壺腹部腺癌、粘液性又は漿液性嚢胞腺癌、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、絨毛上皮癌、悪性ブドウ胎、悪性セルトリ間質細胞腫、悪性顆粒細胞腫、無性細胞腫、膠芽腫、真菌症、メルケル細胞癌及びその他の血液系悪性腫瘍の1種又は複数種から選ばれる。

【0050】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記抗PD-1二重特異性抗体は、

PD-1を標的とする第1タンパク質機能領域と、

VEGFAを標的とする第2タンパク質機能領域と、を含み、

そのうち、上記第1タンパク質機能領域は免疫グロブリンであり、上記第2タンパク質機能領域は一本鎖抗体であり、又は、上記第1タンパク質機能領域は一本鎖抗体であり、上記第2タンパク質機能領域は免疫グロブリンであり、

そのうち、

上記免疫グロブリンの重鎖可変領域は、アミノ酸配列が配列番号31に示される重鎖可変領域に含まれるHCDR1～HCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号35～配列番号37に示されるHCDR1～HCDR3）を含み、その軽鎖可変領域は、アミノ酸配列が配列番号33に示される軽鎖可変領域に含まれるLCDR1～LCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号38～配列番号40に示されるLCDR1～LCDR3）を含み、

上記一本鎖抗体の重鎖可変領域は、アミノ酸配列が配列番号41に示される重鎖可変領域に含まれるHCDR1～HCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号45～配列番号47に示されるHCDR1～HCDR3）を含み、且つその軽鎖可変領域は、アミノ酸配列43（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号48～配列番号50に示されるLCDR1～LCDR3）を含み、

或いは、

上記免疫グロブリンの重鎖可変領域は、アミノ酸配列が配列番号41に示される重鎖可変領域に含まれるHCDR1～HCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号45～配列番号47に示されるHCDR1～HCDR3）を含み、その軽鎖可変領域は、アミノ酸配列が配列番号43に示される軽鎖可変領域に含まれるLCDR1～LCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号48～配列番号50に示されるLCDR1～LCDR3）を含み、

上記一本鎖抗体の重鎖可変領域は、アミノ酸配列が配列番号31に示される重鎖可変領域に含まれるHCDR1～HCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号35～配列番号37に示されるHCDR1～HCDR3）を含み、且つその軽鎖可

変領域は、アミノ酸配列が配列番号33に示される軽鎖可変領域に含まれるLCDR1～LCDR3（好ましくは、IMGT番号付けシステムに従って、それぞれ配列番号38～配列番号40に示されるLCDR1～LCDR3）を含み、

上記免疫グロブリンはヒトIgG1サブタイプである。

【0051】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記二重特異性抗体であって、そのうち、EU番号付けシステムに従って、上記免疫グロブリンの重鎖定常領域は、以下の変異、

L234A及びL235A、又は

L234A及びG237A、又は

L235A及びG237A、

或いは

L234A、L235A、G237A、を有する。

【0052】

本発明において、特に断らない限り、部位の前のアルファベットは変異前のアミノ酸を示し、部位の後のアルファベットは変異後のアミノ酸を示す。

【0053】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記二重特異性抗体であって、そのうち、EU番号付けシステムに従って、上記免疫グロブリンの重鎖定常領域は、

N297A、D265A、D270A、P238D、L328E、E233D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D、G236R、G236A、L328R、A330S、P331S、H268A、E318A及びK320Aからなる群より選ばれる1つ又は複数の変異を更に有する。

【0054】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記二重特異性抗体であって、そのうち、

上記免疫グロブリンの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号31に示され、且つ上記免疫グロブリンの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号33に示され、及び、上記一本鎖抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号41に示され、且つ上記一本鎖抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号43に示される。

【0055】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記二重特異性抗体であって、

上記免疫グロブリンの重鎖のアミノ酸配列は、配列番号27に示され、且つその軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号29に示される。

【0056】

本発明の幾つかの実施形態において、上記二重特異性抗体における上記一本鎖抗体は、免疫グロブリンの重鎖のC末端に連結されている。免疫グロブリンは2本の重鎖があるため、1つの免疫グロブリン分子に2つの一本鎖抗体分子が連結されている。好ましくは、2つの一本鎖抗体分子は同じである。

【0057】

本発明の幾つかの実施形態において、上記二重特異性抗体における上記一本鎖抗体は2本であり、各一本鎖抗体の一端は、それぞれ免疫グロブリンの2本の重鎖のC末端又はN末端に連結されている。

【0058】

本発明の幾つかの実施形態において、上記一本鎖抗体のV_HとV_Lとの間にジスルフィド結合が存在する。抗体のV_HとV_Lとの間にジスルフィド結合を導入する方法は、当該技術分野で周知であり、例えば米国特許US5,747,654、Rajagopal et. al., Prot. Engin. 10 (1997) 1453～1459、Reiter et. al, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 1239～1245、Reiter et. al., Protein Engineering 8 (1995) :1323～1331、Webber et. al., Molecular Immunology 32 (1995) :249～258、Reiter et. al., Immunity 2 (1995) 281～287、Reiter et. al., JBC 269 (1994) :18327

10

20

30

40

50

～18331; Reiter et. al., Inter. J. of Cancer 58 (1994) 142～149、又は Reiter et. al., Cancer Res. 54 (1994) 2714～2718を参照することができ、参照により本明細書に組み込まれる。

【0059】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記二重特異性抗体における上記第1タンパク質機能領域は、上記第2タンパク質機能領域に直接連結されているか又は連結断片を介して連結されており、及び/又は上記一本鎖抗体の重鎖可変領域は、上記一本鎖抗体の軽鎖可変領域に直接連結されているか又は連結断片を介して連結されている。

【0060】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記二重特異性抗体における上記連結断片は、(GGGGS) n であり、 n は正の整数であり、好ましくは、 n は、1、2、3、4、5又は6である。

【0061】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記二重特異性抗体における上記第1タンパク質機能領域及び第2タンパク質機能領域は、独立的に1つ、2つ又は2つ以上である。

【0062】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記二重特異性抗体における上記一本鎖抗体は、免疫グロブリンの重鎖のC末端に連結されている。

【0063】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記第1タンパク質機能領域は、上記第2タンパク質機能領域に第1連結断片を介して連結され、且つ上記一本鎖抗体の重鎖可変領域は、上記一本鎖抗体の軽鎖可変領域に第2連結断片を介して連結され、上記第1連結断片と上記第2連結断片は相同又は相異であり、

好ましくは、上記第1連結断片及び上記第2連結断片のアミノ酸配列は、配列番号52及び配列番号53から独立的に選ばれ、

好ましくは、上記第1連結断片及び上記第2連結断片のアミノ酸配列は、何れも配列番号53に示される。

【0064】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記二重特異性抗体はモノクローナル抗体である。

【0065】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、上記二重特異性抗体はヒト化抗体である。

【0066】

本発明の別の態様において、好ましくは腫瘍を治療するための単位製剤に関し、そのうち、上記単位製剤は、1 mg～10000 mg（好ましくは10 mg～1000 mg、より好ましくは50 mg～500 mg、100 mg～400 mg、150 mg～300 mg、150 mg～250 mg又は200 mg）の本発明の何れかの態様に記載の抗TIGIT抗体と、1 mg～10000 mg（好ましくは1 mg～1000 mg、より好ましくは50 mg～500 mg、100 mg～400 mg、150 mg～300 mg、150 mg～250 mg、200 mg又は100 mg）の本発明の何れかの態様に記載の抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体と、任意選択的に本発明に記載の腫瘍を治療するための1種又は複数種の薬物（例えば、白金系薬及び/又はフルオロウラシル系抗腫瘍薬のような化学療法薬）とを含み、そのうち、上記抗TIGIT抗体、上記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体及び腫瘍を治療するための上記薬物は、それぞれ単独で包装される。

【0067】

本発明は、癌又は腫瘍を予防又は治療するための方法であって、そのうち、必要とする対象に1つ又は複数の本発明に記載の単位製剤を投与する方法に関し、好ましくは、上記単位製剤における抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体、抗TIGIT抗体及び腫瘍を治療するための薬物は、それぞれ分けて投与される。

【0068】

本発明の別の態様において、単回薬物投与量単位に関し、好ましくは腫瘍を治療するために用いられ、それは、0.1 mg～10000 mg（好ましくは1 mg～1000 mg、より好ましくは50 mg～500 mg、100 mg～400 mg、150 mg～300 mg、150 mg～250 mg、200 mg又は100 mg）の本発明の何れか一項に記載の抗TIGIT抗体と、0.1 mg～10000 mg（好ましくは1 mg～1000 mg、より好ましくは50 mg～500 mg、100 mg～400 mg、150 mg～300 mg、150 mg～250 mg、200 mg又は100 mg）の本発明の何れか一項に記載の抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体とを含む。

【0069】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、そのうち、上記抗TIGIT抗体、上記抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体及び/又は腫瘍を治療するための上記薬物は、静脈内注射又は静脈内点滴に適した形態であり、好ましくは、液体の形態である。

10

【0070】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、そのうち、対象に有効量の本発明の何れか一項に記載の抗TIGIT抗体及び/又は本発明の何れか一項に記載の抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体を投与するステップは、手術治療の前又は後、及び/又は放射線治療の前又は後にある。

【0071】

本発明の1つ又は複数の実施形態において、そのうち、本発明の何れか一項に記載の抗TIGIT抗体及び/又は本発明の何れか一項に記載の抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体の単回投与量は、体重1 kg当たり0.1 mg～100 mgであり、好ましくは1 mg～10 mgであり、或いは、本発明の何れか一項に記載の抗TIGIT抗体及び/又は本発明の何れか一項に記載の抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体の単回投与量は、対象1人当たり10 mg～1000 mgであり、好ましくは50 mg～500 mg、100 mg～400 mg、150 mg～300 mg、150 mg～250 mg又は200 mgであり、

20

好ましくは、1日2回～約2日に1回投与し、又は3日ごとに1回、4日ごとに1回、5日ごとに1回、6日ごとに1回、10日ごとに1回、週1回、2週に1回、3週に1回、4週に1回、5週に1回又は6週に1回投与し、

好ましくは、投与方式は、静脈内点滴又は静脈内注射である。

【0072】

軽鎖と重鎖の可変領域は、抗原の結合を決定し、各鎖の可変領域は、何れも3つの超可変領域を含み、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる（重鎖（H）のCDRは、HCDR1、HCDR2、HCDR3を含み、軽鎖（L）のCDRは、LCDR1、LCDR2、LCDR3を含み、それはKabatらによって名付けられ、Bethesda M.d., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 1991; 1-3: 91-3242を参照する）。抗体重鎖及び軽鎖可変領域配列が知られている場合、現在、Kabat、IMGT、Chothia及びAbM番号付けシステムを含む抗体CDR領域を決定する幾つかの方法がある。しかし、抗体又はその変異体に関するCDRの定義のそれぞれの適用は、本明細書で定義され使用される用語の範囲内にある。当該抗体の可変領域アミノ酸配列が与えられている場合、当業者は通常、当該配列自体以外の何れかの実験データに依存することなく、特定のCDRを決定することができる。

30

40

【0073】

好ましくは、CDRはIMGT番号付けシステムによって定義されてもよく、Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. Nucleic acids research 2009; 38 (suppl_1): D301～D307を参照されたい。

【0074】

当業者に周知される技術的手段により、例えばVBASE2データベースでIMGT定義に基づいてモノクローナル抗体配列のCDR領域のアミノ酸配列を解析する。

【0075】

50

本発明に係る抗体26B12、26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4及び26B12H4L4は、同じCDRを有する。

【0076】

その重鎖可変領域の3つのCDR領域のアミノ酸配列は、以下のようである：

HCDR1：GHSFTSDYA（配列番号3）

HCDR2：ISYSDST（配列番号4）

HCDR3：ARLDYGNYGAMDY（配列番号5）、

その軽鎖可変領域の3つのCDR領域のアミノ酸配列は、以下のようである：

LCDR1：QHVSTA（配列番号8）

LCDR2：SAS（配列番号9）

LCDR3：QQHYITPWT（配列番号10）。

【0077】

本発明において、特に言及しない限り、本明細書で使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。また、本明細書で用いられる細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、免疫学的実験室操作手順は当該技術分野で広く使用されている通常手順である。同時に、本発明をより良く理解するために、以下に関連用語の定義及び説明を提供する。

【0078】

本明細書に使用するように、TIGIT（NCBI GenBank ID: NP_776160.2）のアミノ酸配列に言及すると、それはTIGITタンパク質の全長、又は細胞外免疫グロブリン可変領域（IgV）ドメイン、又は細胞外免疫グロブリン可変領域（IgV）ドメインを含む断片を含み、TIGITの融合タンパク質、例えばマウス又はヒトIgGのFcタンパク質断片（mFc又はhFc）と融合する断片を更に含む。しかしながら、TIGITタンパク質のアミノ酸配列において、突然変異又は変異（置換、欠失及び/又は添加を含むが、それらに限定されない）は、その生物学的機能に影響を及ぼすことなく、天然に産生でき又は人工的に導入できることが、当業者には理解される。そのため、本発明において、用語「TIGITタンパク質」又は「TIGIT」は、示された配列及びその天然又は人工変異体を含む、そのような配列の全てを含むものとする。且つ、TIGITタンパク質の配列断片を説明する場合、それは配列断片を含むだけでなく、その天然又は人工変異体における対応する配列断片を更に含む。

【0079】

本明細書に使用するように、用語EC₅₀とは、半数効果濃度（concentration for 50% of maximal effect）を指し、50%最大効果をもたらすことができる濃度を指す。

【0080】

本明細書に使用するように、用語「抗体」は、一般的に2つの対のポリペプチド鎖（各対が1つの「軽」（L）鎖と1つの「重」（H）鎖を有する）からなる免疫グロブリン分子を指す。抗体軽鎖は、κとλ軽鎖に分けられる。重鎖は、μ、δ、γ、α又はεに分けられ、且つそれぞれ抗体のアイソタイプをIgM、IgD、IgG、IgA及びIgEに定義される。軽鎖と重鎖では、可変領域と定常領域は、約12個又はそれ以上のアミノ酸の「J」領域を通じて連結され、重鎖は、約3つ又はそれ以上のアミノ酸の「D」領域を更に含む。各重鎖は、重鎖可変領域（V_H）と重鎖定常領域（C_H）からなる。重鎖定常領域は、3つのドメイン（C_{H1}、C_{H2}とC_{H3}）からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（V_L）と軽鎖定常領域（C_L）からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメインC_Lからなる。抗体の定常領域は、免疫系の各種の細胞（例えば、エフェクター細胞）と古典的補体系の第1成分（C1q）を含む、免疫グロブリンと宿主組織又は因子との結合を媒介できる。V_HとV_L領域は、更に、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる比較的保存的な領域が散在する、超可変性を有する領域（相補性決定領域（CDR）と呼ばれる）に細分できる。各V_HとV_Lは、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順で、アミノ基末端からカルボキシル基末端まで配列された3つのCDRと4つのFRからなる。各重鎖/軽鎖対の可変領域（V_HとV_L）

は、それぞれ抗原結合部位を形成する。各領域又はドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda M.d. (1987 and 1991))、又はChothia & Lesk J. Mol. Biol. 1987; 196: 901~917、Chothia et al., Nature 1989; 342: 878~883又はIMGT番号付けシステムに従って定義され、Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." Nucleic acids research 2009; 38 (suppl_1): D301-D307.の定義を参照する。用語「抗体」は、抗体を産生する任意の特定の方法に限定されない。例えば、これには、特に、組換え抗体、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体が含まれる。抗体は、異なるアイソタイプの抗体であってもよく、例えば、IgG (例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4サブタイプ)、IgA1、IgA2、IgD、IgE又はIgM抗体である。

10

20

30

40

50

【0081】

本明細書に使用するように、抗体の「抗原結合断片」という用語は、完全長抗体の断片を含むポリペプチドを指し、完全長抗体が結合する同じ抗原に特異的に結合する能力を有し、及び/又は抗原への特異的結合について完全長抗体と競合し、これは「抗原結合部分」とも呼ばれる。一般的に、Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989))を参照し、それはその全文で引用により本明細書に組み込まれ、全ての目的に用いられる。抗体の抗原結合断片は、組換えDNA技術によって、又は完全抗体の酵素的又は化学的切断によって産生できる。場合によっては、抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb及び相補性決定領域(CDR)断片、一本鎖抗体(例えば、scFv)、キメラ抗体、二重抗体(diabody)、及びポリペプチドに特異性抗原結合能力を与えるのに十分な抗体の少なくとも一部を有するポリペプチドを含む。

【0082】

本明細書に使用するように、用語「Fd断片」は、V_HとC_{H1}ドメインからなる抗体断片を意味し、用語「Fv断片」は、抗体の単一アームV_LとV_Hドメインからなる抗体断片を意味し、用語「dAb断片」は、V_Hドメインからなる抗体断片を意味し(Ward et al., Nature 341: 544-546 (1989))、用語「Fab断片」は、V_L、V_H、C_LとC_{H1}ドメインからなる抗体断片を意味し、用語「F(ab')₂断片」は、ヒンジ領域上のジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む抗体断片を意味する。

【0083】

場合によっては、抗体の抗原結合断片は、V_LとV_Hドメインが単一のポリペプチド鎖として産生されることを可能にするリンカーの対を形成することによって一価分子を形成する一本鎖抗体(例えば、scFv)である(例えば、Bird et al., Science 242: 423-426 (1988)とHuston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988))を参照する)。このようなscFv分子は、NH₂-V_L-リンカー-V_H-COOH又はNH₂-V_H-リンカー-V_L-COOHという一般的な構造を有することができる。適切な先行技術のリンカーは、GGGGSアミノ酸配列の反復配列又はその変異体からなる。例えば、アミノ酸配列(GGGGS)₄を有するリンカーを使用してもよいが、その変異体を使用してもよい(Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444~6448)。本発明に用いられる他のリンカーは、Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8: 725~731、Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31: 94~106、Hu et al. (1996), Cancer Res. 56: 3055~3061、Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293: 41~56とRoovers et al. (2001), Cancer Immunol.によって説明する。

【0084】

場合によっては、抗体の抗原結合断片は二重抗体であり、即ち、V_HとV_Lドメインが単一ポリペプチド鎖に発現されるが、同じ鎖の2つのドメイン間での対合を可能にしないほ

ど短いリンカーを使用し、それによりドメインが別の鎖の相補的ドメインと対合して2つの抗原結合部位を産生することを強要する二価抗体（例えば、Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)、とPoljak R. J. et al., *Structure* 2: 1121-1123 (1994)）を参照する。

【0085】

他の場合によっては、抗体の抗原結合断片は「二重特異性抗体」であり、第1抗体（断片）と第2抗体（断片）又は抗体のようなものがカップリングアームによって形成された複合体を指し、カップリングの方式は、化学反応、遺伝子融合と酵素触媒作用を含むが、それらには限られない。抗体の抗原結合断片は、例えば、三種の異なる抗原結合特異性を有する抗体である三重特異性抗体と、四種の異なる抗原結合特異性を有する抗体である四重特異性抗体などを含む「多重特異性抗体」であってもよい。例えば、設計されたアンカータンパク質重複タンパク質（DARPin）は、IgG抗体、scFv-Fc抗体断片と連結され又はその組合せであり、例えばCN104341529Aに示すようである。抗IL-17aのfynome rは、抗IL-6R抗体と結合され、例えばWO2015141862A1に示すようである。

【0086】

当業者が既に公知の従来技術（例えば、組換えDNA技術又は酵素的若しくは化学的切断）を使用して与えられた抗体（例えば、本発明により提供されたモノクローナル抗体26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4及び26B12H4L4）から、抗体の抗原結合断片（例えば、上記抗体断片）を取得し、且つ完全抗体の方式に用いられる方式と同じ方法で、抗体の抗原結合断片を特異的にスクリーニングできる。

【0087】

本明細書に使用するように、用語「モノ抗体」及び「モノクローナル抗体」は、相同性の高い一連の抗体分子のうちの1つの抗体又は抗体の1つの断片に由来するものを指し、即ち自発的に出現する自然突然変異を除いて、完全に同じである一連の抗体分子である。モノクローナル抗体は、抗原上の単一エピトープに対する高い特異性を有する。ポリクローナル抗体は、モノクローナル抗体と比較し、一般的に、抗原上の異なるエピトープを一般的に認識する少なくとも2種以上の異なる抗体を含む。モノクローナル抗体は、一般的に、Kohlerらによって最初に発表されたハイブリドーマ技術（Kohler G, Milstein C, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity* [J]. *nature*, 1975; 256 (5517): 495）を採用して取得するが、組換えDNA技術（例えばU.S. Patent 4,816,567を参照する）を採用してもよい。

【0088】

本明細書に使用するように、用語「ヒト化抗体」とは、ヒト免疫グロブリン（レセプター抗体）のCDR領域の全て又は一部が、非ヒト抗体（ドナー抗体）のCDR領域で置換された後に取得した抗体又は抗体断片を指し、そのうちのドナー抗体は、所望の特異性、親和性又は反応性の非ヒト抗体（例えば、マウス、ラット又はウサギ）であってもよい。その他、抗体の性能を更に改良又は最適化するように、レセプター抗体のフレームワーク領域（FR）の幾つかのアミノ酸残基が対応する非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換され、又は他の抗体のアミノ酸残基に置換されることができる。ヒト化抗体の更なる詳細については、例えば、Jones et al., *Nature* 1986; 321: 522~525、Reichmann et al., *Nature* 1988; 332: 323~329、Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992; 2: 593~596、及びClark M. *Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'* [J]. *Immunol. Today*, 2000; 21 (8): 397~402を参考できる。

【0089】

本明細書に使用するように、用語「単離した」又は「単離された」とは、天然の状態得手作業で取得することを指す。ある「単離」の物質又は成分が自然界に存在する場合、それが存在する自然環境が変化したか、又は自然環境から当該物質を単離し、又はその両方である可能性がある。例えば、単離されていないポリヌクレオチド又はポリペプチドは、ある動物の生体内で天然に存在し、このような天然の状態から単離された、同じポリヌク

レオチド又はポリペプチドの高純度のものは、単離と呼ばれる。用語「単離した」又は「単離された」は、人工又は合成物質の混合物を排除するものではなく、物質活性に影響しない他の不純物の存在を排除するものではない。

【0090】

本明細書に使用するように、用語「ベクター (vector)」とは、ポリヌクレオチドが挿入されることができる核酸ビークルを指す。ベクターは、挿入されたポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の発現を可能にする場合、発現ベクターと呼ばれる。ベクターは、形質転換、形質導入又はトランスフェクションによって宿主細胞に導入でき、それが保持する遺伝物質エレメントを宿主細胞において発現させることができる。ベクターは、当業者に周知であり、プラスミド、ファージミド、コックスプラスミド、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC) 又はP1に由来する人工染色体 (PAC) 等の人工染色体、λバクテリオファージ又はM13バクテリオファージ等のバクテリオファージ及び動物ウイルス等を含むが、これらに限定されない。ベクターとしての動物ウイルスは、逆転写レトロウイルス (レンチウイルスを含む)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス (例えば単純ヘルペスウイルス)、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、パピローマバキュロウイルス (例えばSV40) を含むが、これらに限定されない。ベクターは、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択エレメント、及びレポーター遺伝子を含むが、これらに限定されず、さまざまな発現制御エレメントを含んでもよい。また、ベクターは、複製開始部位を更にも含む。

10

20

【0091】

本明細書に使用されるように、用語「宿主細胞」とは、ベクターの導入に有用な細胞を指し、例えば大腸菌又は枯草菌等の原核細胞、例えば酵母細胞又はアスペルギルス等の真菌細胞、例えばS2ショウジョウバエ細胞又はSf9等の昆虫細胞、又は例えば線維芽細胞、CHO細胞、COS細胞、NSO細胞、HeLa細胞、GS細胞、BHK細胞、HEK 293細胞又はヒト細胞等の動物細胞を含むが、これらに限定されない。

【0092】

本明細書に使用されるように、用語「特異的結合」とは、2つの分子間の非ランダムな結合反応、例えば、抗体とそれが向けられる抗原との間の反応を指す。ある実施形態において、特定の抗原に特異的に結合する抗体 (又は特定の抗原に対して特異性を有する抗体) とは、抗体が約 10^{-5} M未満、例えば約 10^{-6} M未満、 10^{-7} M未満、 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満又は 10^{-10} M未満又はそれ以下の親和性 (K_D) で当該抗原に結合することを指す。

30

【0093】

本明細書に使用するように、用語「 K_D 」は、抗体と抗原の間の結合親和性を説明するために用いられる、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指す。平衡解離定数が小さいほど、抗体-抗原結合がより密であり、抗体と抗原との間の親和性がより高い。一般的に、抗体は、約 10^{-5} M未満、例えば約 10^{-6} M未満、 10^{-7} M未満、 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満又は 10^{-10} M未満又はより小さい解離平衡定数 (K_D) で抗原 (例えば、TIGITタンパク質) に結合する。当業者の周知の方法で K_D を測定し、例えばFortebio分子相互作用装置で測定してもよい。

40

【0094】

本明細書に使用するように、用語「モノクローナル抗体」と「モノ抗体」は、同じ意味を有し、交換可能に使用され、用語「ポリクローナル抗体」と「ポリ抗体」は、同じ意味を有し、交換可能に使用され、用語「ポリペプチド」と「タンパク質」は、同じ意味を有し、交換可能に使用される。且つ本発明において、アミノ酸は、当該技術分野において周知の1文字及び3文字の略語で通常示される。例えば、アラニンは、A又はAlaで示すことができる。

【0095】

本明細書に使用するように、用語「薬学的に許容されるベクター及び/又は賦形剤」と

50

は、薬理学及び/又は生理学的に対象と活性成分適合するベクター及び/又は賦形剤を指し、これは本分野の周知であり（例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995を参照する）、且つ、pH調整剤、界面活性剤、アジュバント、イオン強度増強剤を含むが、それらに限定されない。例えば、pH調整剤は、リン酸塩緩衝液を含むが、これには限定されず、界面活性剤は、Tween（登録商標）-80等のカチオン性、アニオン性又は非イオン性界面活性剤を含むが、これらに限定されず、イオン強度増強剤は、塩化ナトリウムを含むが、これに限定されない。

【0096】

本明細書に使用されるように、用語「有効量」は、所望の効果を達成するのに、又は少なくとも部分的に達成するのに十分な量を指す。例えば、疾患（例えば腫瘍）を予防する有効量とは、疾患（例えば腫瘍）の発生を予防、阻止、又は遅延するのに十分な量を指し、治療疾患有効量とは、疾患を有している患者の疾患及びその合併症を治癒し又は少なくとも一部阻止するのに十分な量を指す。

【0097】

本明細書に使用するように、用語「ハイブリドーマ」と「ハイブリドーマ細胞株」は交換可能に使用され、且つ用語「ハイブリドーマ」と「ハイブリドーマ細胞株」に言及される場合、ハイブリドーマのサブクロニングと子孫細胞を更に含む。

【0098】

用語「単回薬物投与量単位」は、所定の投与時間に（好ましくは、対象の体重1 kgあたり基準で）対象に投与する、本発明に記載の抗TIGIT抗体及び抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体の単回薬物剤形、例えば、アンプルに配置された注射剤を表す。本発明の具体的な実施形態において、投与計画は、例えば、1日2回～約2日に1回の投与頻度で単回薬物投与量単位を投与すること、又は3日ごとに1回、4日ごとに1回、5日ごとに1回、6日ごとに1回、10日ごとに1回、週1回、2週に1回、3週に1回、4週に1回、5週に1回若しくは6週に1回投与することを含む。

【0099】

本発明では、特に説明がない限り、上記「第1」（例えば、第1タンパク質機能領域、第1連結断片）及び「第2」（例えば、第2タンパク質機能領域、第2連結断片）は、指示上の区分又は表現上の明確さを考慮するために使用されるだけで、典型的な順番を表す意味を有しない。

【0100】

薬物又は治療剤の「治療有効量」又は「治療上の有効用量」は、単独で使用する又はもう1つの治療剤と組合せて使用する時に、対象における疾患の発生を防止し又は疾患の解消を促進する薬物の任意の量であり、上記疾患の解消は、疾患の症状の重症度の低減、疾患の症状のない期間の頻度と持続時間の増加、又は疾患の苦痛による損傷又は機能障害の予防により証明される。当業者に知られる様々な方法を用いて治療剤の疾患解消を促進する能力を評価することができ、例えば、臨床試験期間中にヒト対象において、人間に対する効果を予測する動物モデルシステムにおいて、又はインビトロ測定法において上記薬剤の活性を測定する。

【0101】

薬物の「予防有効量」とは、がんが発生するリスクのある対象（例えば、悪化前の病状を有している対象）又はがんが再発するリスクのある対象に、単独で又は抗腫瘍剤と組合せて投与される場合に、がんの発生又は再発を抑制する薬物の任意の量を指す。ある実施形態において、予防有効量はがんの発生又は再発を完全に阻止する。がんの発生又は再発を「抑制」とするとは、がんが発生若しくは再発する可能性を低減させ、又はがんの発生若しくは再発を完全に阻止することを指す。

【発明の効果】

【0102】

本発明のモノクローナル抗体は、TIGITに特異的によく結合し、且つ非常に強い親和

10

20

30

40

50

性を有し、TIGIT免疫細胞の抑制作用を減少し、T細胞活性を促進し、NK細胞枯渇を逆転させ、腫瘍に対する免疫細胞の殺傷作用を増加する。TIGITを阻害する薬物、抗PD-1-抗VEGFA抗体を併用して腫瘍などの疾患を治療又は予防できる薬物の調製に使用でき、良好な応用見通しと市場価値がある。

【図面の簡単な説明】

【0103】

【図1】26B12H1L1、26B12H2L2、26B12H2L3及び26B12H3L2抗体のTIGIT-mFcへの結合活性の検出結果である。

【図2】26B12H3L3、26B12H1L4、26B12H4L1及び26B12H4L4抗体のTIGIT-mFcへの結合活性の検出結果である。

【図3】26B12H1L1、26B12H2L2、26B12H2L3及び26B12H3L2抗体の、TIGIT-mFcへの結合についてヒトCD155-hFc-ビオチンと競合する活性検出結果である。

【図4】26B12H3L3、26B12H1L4、26B12H4L1及び26B12H4L4抗体の、TIGIT-mFcへの結合についてヒトCD155-hFc-ビオチンと競合する活性検出結果である。

【図5】26B12 H3L3及びTIGIT-mFcの親和性定数の検出結果図である。図の上から下への各対の曲線における抗体添加濃度はそれぞれ5 nM、1.67 nM、0.557 nM、0.185 nM、0.06 nMである。

【図6】26B12 H1L1及びTIGIT-mFcの親和性定数の検出結果図である。図の上から下への各対の曲線における抗体添加濃度はそれぞれ5 nM、1.67 nM、0.557 nM、0.185 nM、0.06 nMである。

【図7】26B12 H2L2及びTIGIT-mFcの親和性定数の検出結果図である。図の上から下への各対の曲線における抗体添加濃度はそれぞれ5 nM、1.67 nM、0.557 nM、0.185 nM、0.06 nMである。

【図8】26B12 H2L3及びTIGIT-mFcの親和性定数の検出結果図である。図の上から下への各対の曲線における抗体添加濃度はそれぞれ5 nM、1.67 nM、0.557 nM、0.185 nM、0.06 nMである。

【図9】26B12 H3L2及びTIGIT-mFcの親和性定数の検出結果図である。図の上から下への各対の曲線における抗体添加濃度はそれぞれ5 nM、1.67 nM、0.557 nM、0.185 nM、0.06 nMである。

【図10】26B12 H4L4及びTIGIT-mFcの親和性定数の検出結果図である。図の上から下への各対の曲線における抗体添加濃度はそれぞれ5 nM、1.67 nM、0.557 nM、0.185 nM、0.06 nMである。

【図11】26B12 H1L4及びTIGIT-mFcの親和性定数の検出結果図である。図の上から下への各対の曲線における抗体添加濃度はそれぞれ5 nM、1.67 nM、0.557 nM、0.185 nM、0.06 nMである。

【図12】26B12 H4L1及びTIGIT-mFcの親和性定数の検出結果図である。図の上から下への各対の曲線における抗体添加濃度はそれぞれ5 nM、1.67 nM、0.557 nM、0.185 nM、0.06 nMである。

【図13】RG6058及びTIGIT-mFcの親和性定数の検出結果図である。図の上から下への各対の曲線における抗体添加濃度はそれぞれ5 nM、1.67 nM、0.557 nM、0.185 nM、0.06 nMである。

【図14】FACSによるヒト化抗体26B12H2L2とRG6058の293T-TIGIT細胞膜表面抗原TIGITに対する結合活性の検出である。

【図15】FACSによるヒト化抗体26B12H2L2とRG6058の293T-TIGIT細胞膜表面TIGITへの結合についてCD155と競合する活性の検出である。

【図16】FACSによるヒト化抗体26B12H2L2とRG6058の293T-TIGIT細胞膜表面TIGITへの結合についてCD112と競合する活性の検出である。

【図17】hTIGIT-BALB/c遺伝子組換えマウスCT26における腫瘍モデル効果である。

【図18】hTIGIT-BALB/c遺伝子組換えマウスCT26における腫瘍モデル体重の変化である。

10

20

30

40

50

【図19】26B12H2L2と抗PD-1-抗VEGFAの二重特異性抗体VP101(hG1DM)の併用によるBALB/c-hPD1/hTIGIT遺伝子組換えマウスCT26における腫瘍モデルに対する効果である。

【図20】26B12H2L2と抗PD-1-抗VEGFAの二重特異性抗体VP101(hG1DM)の併用によるBALB/c-hPD1/hTIGIT遺伝子組換えマウスCT26における腫瘍モデル体重の変化である。

【図21】抗TIGIT抗体と抗PD-1-抗VEGFA二機能性抗体との併用による、対応する標的とその受容体との結合によって媒介されるシグナル伝達経路への阻害を効果的に中和する結果である。

【0104】

寄託に関する生物材料：

ハイブリドーマ細胞株LT019(TIGIT-26B12)は、2020年10月23日より中国典型培養物寄託センター(CCTCC)に寄託されており、寄託番号がCCTCC NO:C2020208であり、寄託住所が、中国武漢・武漢大学であり、郵便番号が430072である。

【発明を実施するための形態】

【0105】

以下、実施例を参照しながら本発明の実施形態を詳細に説明する。当業者であれば、以下の実施例は、本発明を説明するためのものに過ぎず、本発明の範囲を制限するものではないと理解すべきである。実施例に具体的な技術又は条件が明記されていない場合、当分野の文献に記載された技術又は条件に従って(例えば、Sambrook J, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照する)、又は製品説明書に従って行われる。使用される試薬又は機器は、メーカーが明記されていない場合、市販されている一般的な製品であってもよい。例えば293TはATCCから購入されてもよい。

【0106】

本発明の下記の実施例で使用するBALB/cマウスは、広東医学実験動物センターより購入される。

【0107】

本発明の下記実施例において、使用される陽性対照抗体RG6058、その配列は、中国特許公開CN108290946における配列34と配列36を参照できる。

【0108】

本発明の下記実施例において、使用される併用抗PD-1-抗VEGFA二重特異性抗体VP101(hG1DM)は、中山康方生物医薬有限公司から生産されたものであり、その配列は、公開特許CN112830972Aに記載の抗体に由来し、そのうち、VP101(hG1DM)の重鎖アミノ酸全長配列は、配列番号27に示され、軽鎖アミノ酸全長配列は、配列番号29に示される。VP101(hG1DM)構造は、IgG-scFvであり、そのうち、IgG部分は抗VEGFA抗体であり、scFv部分は抗PD-1抗体であり、

抗VEGFA抗体のHCDR1配列は、配列番号35に示され、HCDR2配列は、配列番号36に示され、HCDR3配列は、配列番号37に示され、VH配列は、配列番号31に示され、抗VEGFA抗体のLCDR1配列は、配列番号38に示され、LCDR2配列は、配列番号39に示され、LCDR3配列は、配列番号40に示され、VL配列は、配列番号33に示され、

そのうち、抗PD1抗体のHCDR1配列は、配列番号45に示され、HCDR2配列は、配列番号46に示され、HCDR3配列は、配列番号47に示され、VH配列は、配列番号41に示され、抗PD1抗体のLCDR1配列は、配列番号48に示され、LCDR2配列は、配列番号49に示され、LCDR3配列は、配列番号50に示され、VL配列は、配列番号43に示される。

【0109】

本発明の下記実施例において、使用されるアイソタイプ対照抗体は、ヒト抗ニワトリ鶏卵リゾチーム(human anti-Hen Egg Lysozyme IgG、anti-HEL、即ちhuman IgG、略称hIgG)であり、その可変領域配列は、Aciernoらにより発表されたAffinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti

10

20

30

40

50

-protein antibodies (Aciernoら, J Mol Biol. 2007; 374 (1) : 130-46に由来する。実施例で使用されるhIgG1DMは、即ちanti-HELにhG1DM定常領域配列（配列番号55）を有するアイソタイプ対照抗体であり、中山康方生物医薬有限公司の実験室で調製されたものである。

【0110】

本発明の下記実施例において、使用されるCHO-aAPC-PDL1-PVR細胞株は、中山康方生物医薬有限公司が構築したものである。CHO-aAPC-PDL1-PVR細胞株は、PD-L1 aAPC/CHO-K1細胞（Promega社から購入）がウイルス感染によって作製され、ウイルスの調製が使用するのは、3rd Generation Lentiviral Systemsであり、例えばA Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72 (11) : 8463~8471を参照し、そのうち、使用されるレンチウイルス発現ベクターがpCDH-PVRFL-Puroである（そのうち、PVRFL Genbank ID : NP_006496.4、ベクターpCDH-CMV-MCS-EF1-Puroは、Youbioから購入され、製品番号がVT1480である）。

10

【0111】

本発明の下記実施例において、使用されるJurkat-NFAT-PD1-TIGIT細胞株は、中山康方生物医薬有限公司が構築したものである。Jurkat-NFAT-PD1-TIGIT細胞株は、PD-1エフェクター細胞（Promega社から購入）がウイルス感染によって作製され、ウイルスの調製が使用するのは、3rd Generation Lentiviral Systemsであり、例えばA Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72 (11) : 8463~8471を参照し、そのうち、使用されるレンチウイルス発現ベクターがplenti6.3/V5-TIGITFL-BSDである（そのうち、TIGIT、Genbank ID : NP_776160.2、ベクターplenti6.3/V5 TOPOは、Invitrogen社から購入され、製品番号がK531520である）。

20

【実施例】

【0112】

実施例1：抗TIGIT抗体26B12の調製

1. ハイブリドーマ細胞株LT019の調製

抗TIGIT抗体を調製するために用いられる抗原は、ヒトTIGIT-mFcである（TIGITは、Genbank ID : NP_776160.2であり、mFcの配列は、配列番号51に示される）。免疫後のマウスの脾細胞を取ってマウス骨髄腫細胞と融合し、ハイブリドーマ細胞を作製した。ヒトTIGIT-mFcを抗原とし、ハイブリドーマ細胞を間接ELISA法でスクリーニングし、TIGITに特異的に結合する抗体を分泌できるハイブリドーマ細胞を取得した。スクリーニングして取得したハイブリドーマ細胞に対し、有限希釈法で安定したハイブリドーマ細胞株を取得した。上記ハイブリドーマ細胞株をそれぞれハイブリドーマ細胞株LT019と命名し、それによって分泌されたモノクローナル抗体をそれぞれ26B12と命名した。

30

【0113】

ハイブリドーマ細胞株LT019（TIGIT-26B12とも称される）は、2020年10月23日より中国典型培養物寄託センター（CCTCC）に寄託されており、寄託番号がCCTCC NO : C2020208であり、寄託住所が、中国武漢・武漢大学であり、郵便番号が430072である。

40

【0114】

2. 抗TIGIT抗体26B12の調製

CD培地（Chemical Defined Medium、1%のペニシリン-ストレプトマイシンが含まれる）で作製された上記LT019細胞株を5%のCO₂で、37℃の条件で培養した。7日後、細胞培養上清を回収し、高速遠心で、微多孔膜により真空を引いて過し、HiTrap protein A HPカラムでの精製を経て、抗体26B12を取得した。

【0115】

50

実施例2：抗TIGITの抗体26B12の配列分析

培養細胞/細菌総RNA抽出キット（Tiangen、製品番号DP430）の方法によって、実施例1で培養したLT019細胞株からmRNAを抽出した。

Invitrogen SuperScript（登録商標）III First-Strand Synthesis System for RT-PCRキット説明書によってcDNAを合成し、PCR増幅を行った。

PCR増幅産物に対して直接TAクローニングを行い、具体的な操作は、pEASY-T1 Cloning Kit（Transgen CT101）キット説明書を参照して行われた。

TAクローニングの産物に対して直接配列決定を行い、配列決定の結果は以下のようである。

重鎖可変領域の核酸配列は、配列番号2に示される通りであり、断片の長さが363 bpである。

それがコードするアミノ酸配列は、配列番号1に示される通りであり、長さが121個のアミノ酸である。

そのうち、重鎖HCDR1の配列は、配列番号3に示される通りであり、HCDR2の配列は、配列番号4に示される通りであり、HCDR3の配列は、配列番号5に示される通りである。

軽鎖可変領域の核酸配列は、配列番号7に示される通りであり、長さが321 bpである。

それがコードするアミノ酸配列は、配列番号6に示される通りであり、長さが107個のアミノ酸である。

そのうち、軽鎖LCDR1の配列は、配列番号8に示される通りであり、LCDR2の配列は、配列番号9に示される通りであり、LCDR3の配列は、配列番号10に示される通りである。

【0116】

実施例3：抗ヒトTIGITのヒト化抗体の軽鎖と重鎖の設計と調製

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

【0117】

ヒトTIGITタンパク質の3次元結晶構造及び実施例2から取得した抗体26B12の配列に基づいて、コンピュータにおいて抗体モデルをシミュレーションし、続いてモデルに基づいて突然変異を設計し、抗体26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4及び26B12H4L4の可変領域配列を取得した（抗体定常領域配列は、NCBIのデータベースに由来し、重鎖定常領域は何れもIg gamma-1鎖C領域、アクセッション番号：P01857を採用し、軽鎖定常領域がIg kappa鎖C領域、アクセッション番号：P01834）である。

【0118】

設計された可変領域配列は、以下の表Aに示される。

10

20

30

40

50

【表 1】

番号	命名	重鎖可変領域 のアミノ酸配 列の配列番号	重鎖可変領域の 核酸配列の配列 番号	軽鎖可変領域の アミノ酸配列の 配列番号	軽鎖可変領域の 核酸配列の配列 番号
1	26B12H1L1	11	12	19	20
2	26B12H4L1	17	18	19	20
3	26B12H2L2	13	14	21	22
4	26B12H2L3	13	14	23	24
5	26B12H3L2	15	16	21	22
6	26B12H3L3	15	16	23	24
7	26B12H1L4	11	12	25	26
8	26B12H4L4	17	18	25	26

10

20

【0119】

(7) ヒト化モノクローナル抗体26B12H1L4の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域配列

以上の8つの抗体である26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4及び26B12H4L4は、重鎖可変領域の核酸配列の長さが何れも363 bpであり、それがコードするアミノ酸配列の長さが何れも121 aaであり、軽鎖可変領域の核酸配列の長さが何れも321 bpであり、それがコードするアミノ酸配列の長さが何れも107 aaである。

【0120】

且つ、8つの上記抗体は、同じHCDR1～HCDR3とLCDR1～LCDR3を有し、以下のようである。

30

HCDR1の配列は、配列番号3に示される通りであり、HCDR2の配列は、配列番号4に示される通りであり、HCDR3の配列は、配列番号5に示される通りである。

LCDR1の配列は、配列番号8に示される通りであり、LCDR2の配列は、配列番号9に示される通りであり、LCDR3の配列は、配列番号10に示される通りである。

【0121】

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

重鎖定常領域は、何れもIg gamma-1鎖C領域、アクセッション番号：P01857を採用し、軽鎖定常領域は、何れもIg kappa鎖C領域、アクセッション番号：P01834を採用した。

40

【0122】

26B12H1L1重鎖cDNAと軽鎖のcDNA、26B12H4L1重鎖cDNAと軽鎖のcDNA、26B12H2L2重鎖cDNAと軽鎖のcDNA、26B12H3L2重鎖cDNAと軽鎖のcDNA、26B12H2L3重鎖cDNAと軽鎖のcDNA、26B12H3L3重鎖cDNAと軽鎖のcDNA、26B12H1L4重鎖cDNAと軽鎖のcDNA、26B12H2L4重鎖cDNAと軽鎖のcDNA及び26B12H4L4重鎖cDNAと軽鎖のcDNAを、それぞれpUC57simple（ジェンスクリプト社が提供）ベクターにクローニングし、それぞれpUC57simple-26B12H1、pUC57simple-26B12L1、pUC57simple-26B12H4、pUC57simple-26B12L1、pUC57simple-26B12H2、pUC57simple-26B12L2、pUC57simple-26B12H3、pUC57simple

50

-26B12L2、pUC57simple-26B12H2、pUC57simple-26B12L3、pUC57simple-26B12H3、pUC57simple-26B12L3、pUC57simple-26B12H1、pUC57simple-26B12L4、pUC57simple-26B12H2、pUC57simple-26B12L4、及びpUC57simple-26B12H4、pUC57simple-26B12L4を取得した。『分子クローニング実験ガイド（第2版）』で紹介された標準的な技術を参照し、EcoRI&HindIII酵素消化により合成された重鎖・軽鎖全長遺伝子を、制限酵素（EcoRI&HindIII）の酵素消化で発現ベクターpcDNA3.1にサブクローニングし、発現プラスミドpcDNA3.1-26B12H1、pcDNA3.1-26B12L1、pcDNA3.1-26B12H4、pcDNA3.1-26B12H2、pcDNA3.1-26B12L2、pcDNA3.1-26B12H3、pcDNA3.1-26B12L3及びpcDNA3.1-26B12L4を取得し、更に組換え発現プラスミドの重鎖/軽鎖遺伝子に対して配列決定分析を行った。続いて、対応する軽鎖・重鎖が含まれる組換えプラスミドに対して遺伝子組合せ（pcDNA3.1-26B12H1/pcDNA3.1-26B12L1、pcDNA3.1-26B12H4/pcDNA3.1-26B12L1、pcDNA3.1-26B12H2/pcDNA3.1-26B12L2、pcDNA3.1-26B12H3/pcDNA3.1-26B12L2、pcDNA3.1-26B12H2/pcDNA3.1-26B12L3、pcDNA3.1-26B12H3/pcDNA3.1-26B12L3、pcDNA3.1-26B12H1/pcDNA3.1-26B12L4とpcDNA3.1-26B12H4/pcDNA3.1-26B12L4）を設計し、それぞれ293F細胞にコトランスフェクションした後、培養液を回収して精製した。正しい配列決定と検証した後、内毒素を含まない発現プラスミドを調製してプラスミドをHEK293細胞に一過性コトランスフェクションすることで抗体を発現し、7日培養後、細胞培養液を回収し、Protein Aカラムを採用して親和性精製を行うことにより、ヒト化抗体を取得した。

10

20

【0123】

実施例4：ELISA方法による抗原TIGIT-mFcに対する抗体の結合活性の測定

実験ステップ：ヤギ抗マウスIgG Fc（Jackson社から購入、ロット番号：132560）、2 µg/mLに酵素標識板を被覆した後、4℃で16時間インキュベートした。インキュベート終了後、PBSTでヤギ抗マウスIgG Fcが被覆された酵素標識板を1回洗浄し、その後、1% BSAのPBST溶液を酵素標識板のブロッキング溶液とし、2時間ブロッキングした。酵素標識板のブロッキングが終了した後、PBSTでプレートを3回洗浄した。そして抗原であるヒトTIGIT-mFc 1 µg/mLを添加し、37℃の条件で放置して30分間インキュベートした後、PBSTでプレートを3回洗浄した。酵素標識板のウェルにPBST溶液で勾配希釈した抗体を添加し、抗体希釈勾配の詳細は表1と表2に示される。被験抗体を添加した酵素標識板を37℃の条件で30分間インキュベートし、インキュベート完了後、PBSTでプレートを3回洗浄した。プレートを洗浄した後、1：5000の比率で希釈されたHRP標識ヤギ抗ヒトIgG Fc（Jackson社から購入、ロット番号：128332）二次抗体作動液を添加し、37℃の条件で放置し、30分間インキュベートした。インキュベート完了後、PBSTでプレートを4回洗浄した後、TMB（Neogen、308177）を添加して遮光して4 min発色し、停止液を添加して発色反応を終了させた。すぐに酵素標識板をマイクロプレートリーダーに置き、450 nmの光波長を選択して酵素標識板の各ウェルのOD数値を読み取った。SoftMax Pro 6.2.1ソフトウェアでデータの分析処理を行った。

30

【0124】

抗原TIGIT-mFcへの抗体の結合結果は、図1と図2に示される。各用量のOD値は、表1と表2に示される。抗体濃度を横軸、吸光度値を縦軸としてカーブフィッティングを行い、抗原への抗体の結合EC₅₀を計算し、結果は、表1、表2と図1、図2に示される。

40

50

【表 2】

表1: 26B12H1L1、26B12H2L2、26B12H2L3、26B12H3L2及びRG6058の
TIGIT-mFcへの結合活性の検出結果

被覆: ヤギ抗マウスIgG Fc (2 µg/mL)										
抗体希釈 (µg/mL)	TIGIT-mFc (1 µg/mL)									
	26B12H1L1		26B12H2L2		26B12H2L3		26B12H3L2		RG6058	
0.3330	2.789	2.701	2.623	2.609	2.560	2.542	2.513	2.430	2.644	2.689
0.1110	2.722	2.771	2.460	2.572	2.413	2.528	2.368	2.394	2.516	2.863
0.0370	2.539	2.676	2.322	2.253	2.162	2.137	2.142	2.292	2.332	2.605
0.0123	2.001	2.126	2.001	1.965	1.853	1.811	1.706	1.861	1.855	2.028
0.0041	1.262	1.349	1.211	1.221	1.038	1.103	1.106	1.092	1.142	1.263
0.0014	0.593	0.613	0.542	0.627	0.506	0.544	0.546	0.527	0.569	0.602
0.0005	0.264	0.265	0.249	0.258	0.237	0.243	0.224	0.229	0.238	0.254
0.0000	0.056	0.051	0.053	0.046	0.052	0.049	0.049	0.050	0.053	0.049
第2抗体	HRP標識のヤギ抗ヒトIgG Fc (1:5000)									
EC ₅₀ (nM)	0.034		0.033		0.040		0.037		0.036	

10

20

30

40

50

【表 3】

表2:26B12H3L3、26B12H1L4、26B12H4L1、26B12H4L4及びRG6058の
TIGIT-mFcへの結合活性の検出結果

被覆:ヤギ抗マウスIgG Fc (2 µg/mL)										
抗体希釈 (µg/mL)	TIGIT-mFc (1µg/mL)									
	26B12H3L3		26B12H1L4		26B12H4L1		26B12H4L4		RG6058	
0.3330	2.736	2.788	2.639	2.604	2.709	2.829	2.728	2.608	2.963	3.089
0.1110	2.707	2.774	2.469	2.422	2.625	2.587	2.626	2.788	2.915	3.119
0.0370	2.546	2.538	2.568	2.451	2.392	2.699	2.679	2.660	2.830	2.797
0.0123	1.861	1.881	2.049	1.882	2.113	2.091	1.987	2.045	2.237	2.237
0.0041	1.074	1.012	1.232	1.266	1.252	1.279	1.265	1.239	1.254	1.258
0.0014	0.483	0.477	0.593	0.580	0.582	0.592	0.589	0.593	0.569	0.593
0.0005	0.217	0.211	0.246	0.263	0.256	0.261	0.253	0.253	0.244	0.248
0.0000	0.065	0.060	0.053	0.051	0.051	0.051	0.052	0.054	0.065	0.061
第2抗体	HRP標識のヤギ抗ヒトIgG Fc (1:5000)									
EC ₅₀ (nM)	0.048		0.031		0.033		0.034		0.039	

【0125】

結果から、抗体26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4及び26B12H4L4は何れもヒトTIGIT-mFcに効果的に結合でき、結合効率が用量依存的であり、結合活性は、同じ標的陽性薬RG6058に相当し、26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4及び26B12H4L4がTIGITに効果的に結合する機能を有することを示すことが分かる。

【0126】

実施例5：競合ELISA方法によるTIGIT-mFcへの結合についてCD155-hFc-ビオチンと競合する抗体の活性のそれぞれの測定

実験ステップ：TIGIT-mFcを2 µg/mL酵素標識板に被覆した後、4℃で一晩中インキュベートした。インキュベート終了後、PBSTで抗原が被覆された酵素標識板を1回洗浄した後、1% BSAのPBST溶液を酵素標識板ブロッキング溶液とし、2時間ブロッキングした。酵素標識板のブロッキングが終了した後、PBSTでプレートを3回洗浄した。酵素標識板内にPBST溶液で勾配希釈した抗体を加え、抗体濃度の詳細については、表3と表4を参照し、室温で10分間インキュベートした後に等体積の2 µg/mL（最終濃度が1 µg/mL）のCD155-hFc-ビオチン（中山康方生物医薬有限公司生産、ロット番号：20170210、そのうち、CD155のGenBank番号はNP_006496.4であり、hFcの配列は配列番号54に示される）を添加し、抗体と均一に混合した後に酵素標識板を37℃の条件で置いて30分間インキュベートし、インキュベート完了後にPBSTで3回プレートを洗浄した。プレートを洗浄した後、1：4000の比率で希釈されたSA-HRP作動液を添加し、37℃の条件で放置して30分間インキュベートした。インキュベート完了後、PBSTでプレートを4回洗浄した後、TMB（Neogen、308177）を添加して遮光して5 min発色

し、停止液を添加して発色反応を終了させた。すぐに酵素標識板をマイクロプレートリーダーに置き、450 nmの光波長を選択して酵素標識板の各ウェルのOD数値を読み取った。SoftMax Pro 6.2.1ソフトウェアでデータの分析処理を行った。

【0127】

TIGIT-mFcへの結合についてCD155-hFc-ビオチンと競合する抗体の活性結果は表3と表4に示される。抗体濃度を横軸とし、吸光度値を縦軸としてカーブフィッティングし、TIGIT-mFcへの結合についてCD155-hFc-ビオチンと競合する抗体のEC₅₀を計算し、結果は、以下の表3と表4、図3と図4に示される。

【0128】

【表4】

10

表3:26B12H1L1、26B12H2L2、26B12H2L3、26B12H3L2及びRG6058の、
TIGIT-mFcへの結合についてCD155-hFc-ビオチンと競合する活性検出結果

抗体希釈	抗原被覆:TIGIT-mFc (2 µg/mL)									
	26B12H1L1		26B12H2L2		26B12H2L3		26B12H3L2		RG6058	
3 µg/mL	0.091	0.097	0.101	0.110	0.106	0.117	0.107	0.113	0.119	0.120
1:3	0.088	0.085	0.082	0.092	0.098	0.100	0.101	0.102	0.104	0.112
1:9	0.104	0.099	0.091	0.097	0.107	0.110	0.121	0.120	0.114	0.121
1:27	0.533	0.491	0.410	0.538	0.510	0.537	0.492	0.549	0.528	0.532
1:81	1.026	1.035	0.996	1.025	0.961	0.990	0.948	1.059	0.951	1.011
1:243	1.210	1.251	1.222	1.221	1.142	1.195	1.089	1.217	1.168	1.209
1:729	1.287	1.360	1.274	1.242	1.201	1.287	1.120	1.236	1.209	1.251
0	1.347	1.387	1.315	1.296	1.279	1.307	1.263	1.340	1.295	1.354
CD155-hFc-ビオチン (1 µg/mL)										
SA-HRP (1:4000)										
EC ₅₀ (nM)	0.255		0.254		0.266		0.283		0.254	

20

30

40

50

【表 5】

表4:26B12H3L3、26B12H1L4、26B12H4L1、26B12H4L4及びRG6058の、
TIGIT-mFcへの結合についてCD155-hFc-ビオチンと競合する活性検出結果

抗体希釈	抗原被覆:TIGIT-mFc (2 µg/mL)									
	26B12H3L3		26B12H1L4		26B12H4L1		26B12H4L4		RG6058	
3 µg/mL	0.087	0.085	0.091	0.084	0.102	0.086	0.091	0.085	0.091	0.093
1:3	0.083	0.082	0.077	0.086	0.086	0.086	0.084	0.082	0.089	0.084
1:9	0.139	0.146	0.094	0.096	0.106	0.102	0.103	0.103	0.101	0.100
1:27	0.646	0.650	0.449	0.495	0.495	0.561	0.516	0.532	0.530	0.539
1:81	1.031	1.027	0.938	0.967	0.931	1.030	0.974	0.999	0.946	1.037
1:243	1.239	1.294	1.171	1.224	1.180	1.232	1.131	1.218	1.152	1.223
1:729	1.318	1.378	1.336	1.382	1.278	1.292	1.123	1.335	1.302	1.346
0	1.410	1.393	1.341	1.361	1.357	1.360	1.258	1.364	1.380	1.427
CD155-hFc-ビオチン(1µg/mL)										
SA-HRP(1:4000)										
EC ₅₀ (nM)	0.294		0.217		0.250		0.271		0.236	

【0129】

結果から、同じ実験条件で、26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4及び26B12H4L4は、抗原TIGIT-mFcへの結合についてCD155-hFc-ビオチンとそれぞれ競合でき、活性は同じ標的陽性薬RG6058と相当し、26B12H1L1、26B12H4L1、26B12H2L2、26B12H3L2、26B12H2L3、26B12H3L3、26B12H1L4及び26B12H4L4はTIGIT-mFcへの効果的な結合についてCD155-hFc-ビオチンと競合する機能を有することを示唆することが分かる。

【0130】

実施例6：Fortebio分子相互作用装置によるヒト化抗体26B12H3L3、26B12H1L1、26B12H2L2、26B12H2L3、26B12H3L2、26B12H4L4、26B12H1L4、26B12H4L1及びRG6058の抗原TIGIT-mFcへの結合の動態パラメータの測定

サンプル希釈緩衝液がPBS、0.02% Tween（登録商標）-20、0.1% BSA、pH7.4である。TIGIT-mFcを3 µg/mLの濃度でAMCセンサに固定し、時間が50 sであり、センサを緩衝液に60 s平衡化し、センサに固定されたTIGIT-mFcは抗体と結合し、濃度が0.06~5 nM（3倍希釈）であり、時間が120 sであり、タンパク質は緩衝液に解離し、時間が300 sである。センサは、10 mMのグリシンを採用し、pH=1.7の溶液で再生した。検出温度が37度であり、検出頻度が0.3 Hzであり、試料板振動速度が1000 rpmである。データを1:1モデルでフィッティングして分析し、親和性定数を取得した。

【0131】

ヒト化抗体（対照抗体として）のTIGITへの親和性定数の測定結果は、表5に示され、

検出結果は、図5～図13に示される。

【表6】

表5:ヒト化抗体と抗原TIGIT-mFcの親和性定数の検出結果

抗体	分析物の 最高信号 高さ(nm)	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	S E (k_{on})	k_{dis} (1/s)	S E (k_{dis})	Rmax (nm)
26B12H3L3	0.09	9.64E-11	2.48E+06	3.22E+05	2.39E-04	8.57E-05	0.05-0.13
26B12H1L1	0.15	1.64E-11	5.44E+06	1.92E+05	8.93E-05	3.36E-05	0.06-0.17
26B12H2L2	0.14	8.40E-12	5.47E+06	2.55E+05	4.60E-05	4.40E-05	0.07-0.17
26B12H2L3	0.12	4.85E-11	3.29E+06	2.53E+05	1.59E-04	5.92E-05	0.15-0.31
26B12H3L2	0.12	5.40E-11	3.94E+06	3.60E+05	2.13E-04	7.86E-05	0.13-0.17
26B12H4L4	0.13	3.69E-11	2.81E+06	1.38E+05	1.04E-04	3.23E-05	0.14-0.20
26B12H1L4	0.12	4.63E-11	2.94E+06	1.96E+05	1.36E-04	4.88E-05	0.01-0.15
26B12H4L1	0.12	8.57E-12	2.90E+06	1.34E+05	2.48E-05	3.11E-05	0.11-0.18
RG6058	0.16	3.16E-11	4.56E+06	1.84E+05	1.44E-04	3.46E-05	0.01-0.18

K_D が親和性定数であり、 $K_D=k_{dis}/k_{on}$ 。

【0132】

結果から、ヒト化抗体26B12H3L3、26B12H1L1、26B12H2L2、26B12H2L3、26B12H3L2、26B12H4L4、26B12H1L4、26B12H4L1及びRG6058とTIGIT-mFcの親和性定数は、順次に9.64E-11 M、1.64E-11 M、8.40E-12 M、4.85E-11 M、5.40E-11 M、3.69E-11 M、4.63E-11 M、8.57E-12 M及び3.16E-11 Mであることが分かる。

【0133】

結果から、TIGIT-mFcへの結合のTIGIT各抗体の親和性は、強いものから弱いものへ順次に、26B12H2L2、26B12H4L1、26B12H1L1、RG6058、26B12H4L4、26B12H1L4、26B12H2L3、26B12H3L2、26B12H3L3であることが分かる。そのうち、ヒト化抗体26B12H2L2、26B12H4L1、26B12H1L1の親和性は、陽性薬物RG6058より強いが、26B12H4L4の親和性は陽性薬物RG6058の親和性に相当する。

【0134】

実施例7：FACSによるヒト化抗体26B12H2L2とRG6058の293T-TIGIT細胞膜表面抗原TIGITに対する結合活性の検出

実験方法：

TIGITベクターplenti6.3-TIGITFL-BSD（TIGITはGenbank ID：NP_776160.2）であり、ジェンスクリプト遺伝子にヒトTIGIT全長cDNA配列の合成を依頼し、TIGITFLと命名し、pUC57simple（ジェンスクリプト社が提供）ベクターにクローニングし、pUC57simple-TIGITFLプラスミドを得た。BamHI&XhoI二重酵素消化で合成したpUC57simple-TIGITFLプラスミドを用いて、TIGITFL目的遺伝子断片を回収し、制限性部位BamHI&XhoIによりplenti6.3発現ベクター（ベクターpLenti6.3はInvitro

gen社から購入) にサブクロニングし、293T細胞にトランスフェクションし、スクリーニングによりTIGITを安定的に発現する細胞株293T-TIGIT細胞を取得した。

【0135】

293T-TIGIT細胞(DMEM+10%FBS)を回収し、5 min遠心分離後、上清を取り除き、再懸濁し、数と生存率を計し(P7、95.79%)、細胞を希釈し、透明ポインテッドボトム96ウェルプレートにウェルごとに30万の細胞を添加し、チューブごとに1%のPBSAを200 μL添加し、5 min遠心分離し、上清を取り除いた。実験の設計によってウェルごとに100 μLの抗体を対応して添加し(最終濃度が300 nM、100 nM、33.3 nM、11.11 nM、3.7 nM、1.23 nM、0.41 nM、0.041 nM、0.0041 nM)、そしてブランク対照及びアイソタイプ対照を設計し、氷上で60 minインキュベートした。チューブごとに1% PBSAを200 μL添加し、5 min遠心分離し、上清を取り除き、2回洗浄した。サンプルごとにFITCヤギ抗ヒトIgG抗体(Jackson社から購入、製品番号:109-095-098、PBSAで500倍希釈)を添加し、氷上で遮光して40 minインキュベートし、チューブごとに200 μLのPBSAを添加し、5 min遠心分離し、上清を取り除いた。PBSAを200 μL添加して細胞を再懸濁し、フローチューブに移動し、フローサイトメーターで各濃度での細胞の平均蛍光強度を検出した。

【表7】

表6:FACSによるヒト化抗体26B12H2L2とRG6058の293T-TIGIT細胞膜表面抗原TIGITに対する結合活性の検出

抗体/ 濃度(nM)	平均蛍光強度									EC ₅₀ (nM)
	300	100	33.3	11.11	3.7	1.23	0.41	0.041	0.0041	
RG6058	505.61	554.87	493.98	537.75	431.36	266.73	109.14	24.47	14.61	1.257
26B12H2L2	514.58	467.29	412.32	645.99	466.99	320.40	122.58	28.76	12.66	0.917

【0136】

実験結果は、表6と図14に示され、細胞膜表面抗原TIGITに結合する陽性対照抗体RG6058のEC₅₀が1.257 nMであるが、細胞膜表面抗原TIGITに結合するヒト化抗体26B12H2L2のEC₅₀が0.917 nMである。

実験結果から、ヒト化抗体26B12H2L2の細胞膜表面抗原TIGITへの結合能力は、陽性対照抗体RG6058より強いことが分かった。

【0137】

実施例8:FACSによるヒト化抗体26B12H2L2とRG6058の293T-TIGIT細胞膜表面抗原TIGITへの結合についてCD155又はCD112と競合する活性の検出

実験方法:293T-TIGIT細胞を回収し、5 min遠心分離後、上清を取り除き、再懸濁し、数と生存率を計し(94.95%)、細胞を希釈し、透明ポインテッドボトム96ウェルプレートにウェルごとに30万個の細胞を添加し、チューブごとに1%のPBSAを200 μL添加し、5 min遠心分離し、上清を取り除いた。実験の設計によって、ウェルごとに100 μLの抗体(最終濃度が300 nM、100 nM、33.3 nM、11.1 nM、3.7 nM、1.23 nM、0.123 nM、0.0123 nM)を対応して添加し、且つブランク対照及びアイソタイプ対照を設計し、氷上で30 minインキュベートした。サンプルごとにCD155(最終濃度が10 nMであり、中山康方生物医薬有限公司生産、ロット番号:20190726、そのうち、CD155のGenBank番号はNP_006496.4)或いはCD112(最終濃度が30 nMであり、中山康方生物医薬有限公司生産、ロット番号:20190726、そのうち、CD112のGenBank番号はNP_001036189.1)を加え、氷上で遮光して60 minインキュベートし、更にチューブごとに200 μLの1%PBSAを加え、5 min遠心分離し、上清を取り除き、2回洗浄した。サンプルごとにAPCヤギ抗マウスIgG(Biolegend社から購入、ロ

ット番号が405308、最小限の交差反応性minimal x-reactivity) 抗体 (PBSAで300倍希釈) を添加し、氷上で遮光して40 minインキュベートし、チューブごとにPBSAを200 μ L添加し、5 min遠心分離し、上清を取り除いた。PBSAを200 μ L添加して細胞を再懸濁し、フローチューブに移動し、フローサイトメーターで各濃度での細胞の平均蛍光強度を検出した。

実験結果は、それぞれ表7と図15、及び表8と図16に示される。

【表8】

表7:FACSによるヒト化抗体26B12H2L2とRG6058の293T-TIGIT細胞膜表面抗原TIGITへの結合についてCD155と競合する活性の検出

抗体/ 濃度(nM)	平均蛍光強度								EC ₅₀ (nM)
	300	100	33.3	11.1	3.7	1.23	0.123	0.0123	
RG6058	8.85	7.44	7.6	7.71	52.1	239	530	436	1.212
26B12H2L2	8.3	7.64	7.83	8.2	36.1	200	541	449	1.049

10

【表9】

表8:FACSによるヒト化抗体26B12H2L2とRG6058の293T-TIGIT細胞膜表面抗原TIGITへの結合についてCD112と競合する活性の検出

抗体/ 濃度(nM)	平均蛍光強度								EC ₅₀ (nM)
	300	100	33.3	11.1	3.7	1.23	0.123	0.0123	
RG6058	20.1	17.8	18	19.2	37.1	72	129	126	1.224
26B12H2L2	21.4	19.2	20.3	19.8	37.1	73.1	131	134	1.140

20

30

【0138】

結果から、TIGITへの結合についてCD155と競合する陽性対照抗体RG6058のEC₅₀が1.212 nMであるが、TIGITへの結合についてCD155と競合するヒト化抗体26B12H2L2のEC₅₀が1.049 nMであり、TIGITへの結合についてCD112と競合する陽性対照抗体RG6058のEC₅₀が1.224 nMであるが、TIGITへの結合についてCD112と競合するヒト化抗体26B12H2L2のEC₅₀が1.140 nMであることが分かる。

結果から、細胞膜表面抗原TIGITへの結合についてCD155又はCD112と競合するヒト化抗体26B12H2L2の能力は、陽性対照抗体RG6058より強いことが分かる。

40

【0139】

実施例9：hTigit-BALB/c遺伝子組換えマウスにCT26マウス移植腫瘍を接種する26B12H2L2の治療作用

hTigit-BALB/c遺伝子組換えマウス (マウスは江蘇集萃藥康生物科技有限公司から購入され、購入された遺伝子組換えマウスの正常のマウスTIGIT遺伝子が、ヒトTIGIT遺伝子に置き換えられた) の背部に50万/匹のCT26細胞 (マウス結腸癌0細胞株、ATCCから購入) を接種することを採用し、実験の具体的なステップは、2500万/mLのCT26細胞を1匹あたり200 μ Lで接種マウスに接種することにより、マウス腫瘍モデルを確立することである。実験マウスは、1群あたり8匹で、アイソタイプ対照群 (投与量は20 mg/kg、投与方法は腹腔内注射 (i.p.)、週に2回) と実験群 (投与量は20 mg/kg、

50

投与方法は腹腔内注射（i.p.）、週に2回）とした。具体的な計画は、表9に示される。

【表10】

表9:マウスCT26腫瘍モデルのモデリングと抗体の投与計画

群別	細胞量	動物の数	モデリング	投与方式
アイソタイプ 対照	50万/匹	8	CT26細胞:2500 万/mL	hIgG1(中山康方生物医薬有限 公司生産、ロット番号:20190410) 20 mg/kg、 腹腔内注射(i.p.)、週に2回
26B12H2L2	50万/匹	8	接種体積:200 μL/匹	26B12H2L2 20 mg/kg、腹腔 内注射(i.p.)、週に2回

10

【0140】

実験結果は、図17に示される。

結果から、26B12H2L2はhTIGIT-BALB/c遺伝子組換えマウスCT26腫瘍モデルで、腫瘍体積が著しく減少したことが分かる。

20

結果から、26B12H2L2は、hTIGIT-BALB/c遺伝子組換えマウスCT26腫瘍モデルで強い薬効を有し、腫瘍、特に結腸癌の治療及び/又は予防に用いられる可能性がある。

同時に、図18に示すように、26B12H2L2はCT26腫瘍モデルとしてのhTIGIT-BALB/c遺伝子組換えマウスの体重に影響を与えることなく、26B12H2L2抗体がマウスに対して毒性と副作用がないことが分かる。

【0141】

実施例10：抗TIGIT抗体と抗PD-1-抗VEGFA二機能性抗体との併用による効果的な腫瘍の治療

抗TIGIT抗体と抗PD-1-抗VEGFA二機能性抗体VP101(hG1DM)との併用によるインビボ抗腫瘍活性を検出するために、最初にCT26細胞（ヒト結腸がん細胞、江蘇集萃薬康生物科技股イ分有限公司より購入）を、5週齢～7週齢の雌BALB/c-hPD1/hTIGITマウス（江蘇集萃薬康生物科技股イ分有限公司より購入）に皮下接種し、腫瘍平均体積が80 mm³～120 mm³に達すると、腫瘍体積でマウスをランダムに4群に分け、1群あたり6匹であった。群分け当日をD0日とし、群分け当日D0日に投与を開始した。併用投与群の投与方式は、薬物を単独に調合し、前後に別々に投与する（投与順序と間隔時間の特定の要求がなく、ある薬物を投与した後に別の薬物を投与する）。モデリングと具体的な投与方式は表10に示される。投与後に各群の腫瘍の長さと幅を測定し、腫瘍体積を計算した。

30

40

50

【表 1 1】

表10: 抗TIGIT抗体と抗PD-1-抗VEGFA二機能性抗体との併用によるCT26
移植腫瘍BALB/c-hPD1/hTIGITマウスモデルの治療の投与計画

群別	n	腫瘍異種移植物	投与状況
アイソタイプ対 照 5 mg/kg	6	CT26、 5×10^5 個の細胞、 BALB/c-hPD1/hTIGIT Tマウス、皮下	アイソタイプ対照抗体hIgG1(中山康 方生物医薬有限公司生産、ロット番号: 20200707)、5 mg/kg、 週2回腹腔内投与、4週間連続投与
VP101 (hG1DM) 1 mg/kg	6		VP101 (hG1DM)、1 mg/kg、 週2回腹腔内投与、4週間連続投与
26B12H2L2 4 mg/kg	6		26B12H2L2、4 mg/kg、 週2回腹腔内投与、4週間連続投与
26B12H2L2 4 mg/kg、 VP101 (hG1DM) 1 mg/kg	6		26B12H2L2、4 mg/kg、VP101 (hG1DM)、1 mg/kg、 週2回腹腔内投与、4週間連続投与

【0 1 4 2】

結果は図19に示される。結果から分かるように、アイソタイプ対照抗体hIgGと比べて、VP101 (hG1DM)、26B12H2L2は何れもマウス腫瘍の増殖を効果的に阻害することができ、且つVP101 (hG1DM) + 26B12H2L2群は当該モデルに併用抗腫瘍効果を示しており、併用の腫瘍抑制は被験薬単独群より優れていた。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.0001$ 、Two-way ANOVA (Bonferroni post test)

更に、図20に示される通り、担腫瘍マウスは被験薬VP101 (hG1DM) 及び26B12H2L2の単独及び併用に何れも良好な耐性を有し、各群では担腫瘍マウスの体重に影響を与えなかった。

【0 1 4 3】

実施例11：抗TIGIT抗体と抗PD-1-抗VEGFA二機能性抗体との併用による、対応する標的とその受容体との結合によって媒介されるシグナル伝達経路に対する阻害の効果的な中和

CHO-aAPC-PDL1-PVR細胞（康方生物より構築）を収集し、 $170 \times g$ で5 min遠心分離して上清を捨てた後、完全培地（Ham's F-12+10%FBS）で細胞を再懸濁させ、細胞数と生存率を計し、CHO-aAPC-PDL1-PVR細胞を 4×10^4 /ウェル、100 μ L/ウェル

で96ウェルのブラックプレートに加え、エッジウェルに150 μ Lの1×PBSを加え、37℃でインキュベーターで一晩中インキュベートし、Jurkat-NFAT-PD1-TIGIT細胞（康方生物より構築）を収集し、110×gで5 min遠心分離して上清を捨てた後、培地（RPMI 1640+10%FBS）を分析して細胞を再懸濁させ、細胞数と生存率を計し、96ウェルのブラックプレート内の液体を捨て、30 μ L/ウェルのJurkat-NFAT-PD1-TIGIT細胞を5×10⁴/ウェルで加え、A549肺癌細胞（中国科学院上海生命科学研究院細胞資源センターより購入、製品番号：SCSP-503）を収集し、170×gで5 min遠心分離して上清を捨てた後、培地を分析して細胞を再懸濁させ、細胞数と生存率を計し、30 μ L/ウェルのA549細胞を1×10⁴/ウェルで加え、実験の設計により抗体を希釈し（単剤群VP101（hG1DM）と26B12H2L2の最終濃度はそれぞれ3 nM、30 nM、300 nMと1000 nMであり、併用群VP101（hG1DM）+26B12H2L2におけるVP101（hG1DM）と26B12H2L2の最終濃度はそれぞれ3 nM、30 nM、150 nM、300と1000 nMである）、20 μ L/ウェルで抗体を加え、アイソタイプ対照群と陰性対照群を設定し、最終体積は80 μ L/ウェルであり、37℃でインキュベーターで6 h培養し、6 h後、80 μ LのFirefly Glo Luciferase Reporter Gene Assay Kit（Yeasenより購入、製品番号：11404ES80）反応液を加え、5 min～6 minインキュベートした後、培養プレートを機器に入れて相対蛍光単位値（Relative Light Units、RLU）を測定した。

10

結果は図21に示される。

【0144】

結果から分かるように、アイソタイプ対照抗体hIgG1DMと比較して、VP101（hG1DM）単剤、26B12H2L2単剤及びVP101（hG1DM）+26B12H2L2の併用は、何れも対応する標的とその受容体との結合によって媒介されるシグナル伝達経路に対する阻害作用を効果的に中和し、ルシフェラーゼの発現を増強することができる。そのうち、150 nMと300 nMの併用群のRLU値は、何れも単剤群の300 nMと1000 nMより明らかに高く（>3倍）、VP101（hG1DM）+26B12H2L2の併用の中和活性は、単剤群より顕著に優れていることを示した。

20

【0145】

本発明の具体的な実施形態は詳細に説明されているが、当業者には理解されたい。開示されている全ての教示によれば、これらの詳細に対する修正及び置換が可能であり、これらの変更は、本発明の請求範囲内にある。本発明の全範囲は、添付の特許請求の範囲及びそれらの何れかの均等物によって定義される。

30

【0146】

配列表（注：CDR配列は下線で示される）

26B12VHのアミノ酸配列

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGHSFTSDYAAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYS
DSTNYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQMNSVTTEDTATYYCARLDYGNYGGAMDYW
GQGTSVTVSS（配列番号1）

26B12VHのヌクレオチド配列

GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCTGGTGAAACCCTCTCAGTCTCTGT
CCCTCACCTGCACTGTCACTGGCCACTCATTCACCAGTGATTATGCCTGGAACTGG
ATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAGACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTACAGTGA
TAGCACTAACTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACAT
CCAAGAACCAGTTCTTCTTGCAGATGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACA
TATTACTGTGCAAGATTGGACTATGGTAACTACGGTGGGGCTATGGACTACTGGGG
TCAAGGGACCTCAGTCACCGTCTCCTCA（配列番号2）

40

26B12VHのHCDR1：GHSFTSDYA（配列番号3）

26B12VHのHCDR2：ISYSDST（配列番号4）

26B12VHのHCDR3：ARLDYGN YGGAMDY（配列番号5）

26B12VLのアミノ酸配列

DIVLTQSHEFMSTSLRDRVSITCKSSQHVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT

50

GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVKAEDLAVYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK (配列番号6)

26B12VLのヌクレオチド配列

GATATTGTGCTAACTCAGTCTCACGAATTCATGTCCACCTCATTACGAGACAGGG
TCAGCATCACCTGCAAATCCAGTCAACATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAA
CAGAAACCAGGACAATCTCCTAACTACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAC
TGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCA
TCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATATT
ACTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATAAAA (配列番号7)

26B12VLのLCDR1: QHVSTA (配列番号8)

26B12VLのLCDR2: SAS (配列番号9)

26B12VLのLCDR3: QQHYITPWT (配列番号10)

26B12H1のアミノ酸配列

DVQLQESGPGPLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWNWIRQFPKGKLEWIGYISYS
DSTNYNPSLKSRTISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCARLDYGNYGGMADYWG
GGTSVTVSS (配列番号11)

26B12H1のヌクレオチド配列

GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCCAGACCCTGT
CTCTGACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTTCACATCCGACTACGCCTGGAAGTGG
ATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCTCTTATAGCGA
CTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGATCACCATCAGCAGAGATACAT
CCAAGAACCAGTTCTTTCTGACGCTGAACAGCGTGACAGCCGCCGACACCGCCACA
TACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGG
CCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCC (配列番号12)

26B12H2のアミノ酸配列

DVQLQESGPGPLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPKGKLEWIGYISYSD
STNYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGNYGGMADYWG
QGTSVTVSS (配列番号13)

26B12H2のヌクレオチド配列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAGACCCTGT
CCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACGCCTGGTCTTGG
ATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCTCCTATTCTGA
CAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTCGGGTGACCATCTCTAGAGATACAA
GCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAGCCGTG
TACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGG
CCAGGGCACCAAGCGTGACAGTGTCTAGC (配列番号14)

26B12H3のアミノ酸配列

DVQLQESGPGPLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPKGKLEWIGYISYSD
STNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGNYGGMADYWG
QGTSVTVSS (配列番号15)

26B12H3のヌクレオチド配列

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAGACCCTGT
CCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACGCCTGGTCTTGG
ATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCTCCTATTCTGA
CAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTAGAGTGACCATCTCTGTGGATACAA
GCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAGCCGTG
TACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGG
CCAGGGCACCAAGCGTGACAGTGTCTAGC (配列番号16)

26B12H4のアミノ酸配列

DVQLQESGPGPLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWNWIRQFPKGKLEWMGYISYS

10

20

30

40

50

DSTNYNPSLKSRITISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCARLDYGNYGGMADYW
GQGTSVTVSS (配列番号17)

26B12H4のヌクレオチド配列

GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCCAGACCCTGT
CTCTGACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTCACATCCGACTACGCCTGGAAGTGG
ATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTACATCTCTTATAGCGA
CTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGATCACCATCAGCAGAGATACAT
CCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGCGTGACAGCCGCCGACACCGCCACA
TACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGG
CCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCC (配列番号18)

10

26B12L1のアミノ酸配列

DIQMTQSPKSLSTSVGDRVITICRSSQHVVSTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASRYRYS
GVPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGGTKLEIK (配列番号
19)

26B12L1のヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCCTGTCTACAAGCGTGGGCGATCGGG
TGACCATCACATGTAGAAGCTCCCAGCACGTGTCTACCGCAGTGGCATGGTACCAG
CAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCGCCTCTTACAGGTATTC
CGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCTCTGGCACCGATTTACCTTTACAA
TCTCTAGCGTGACGCCAGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTACATC
ACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (配列番号20)

20

26B12L2のアミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITICRSSQHVVSTALAWYQQKPGKSPKLLIYSASSRYRYS
GVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGGTKLEIK (配列番号
21)

26B12L2のヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGATAGGG
TGACCATCACATGTAGATCTAGCCAGCACGTGTCTACAGCCCTGGCATGGTACCAG
CAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCCTCCTCTAGGTATTC
TGGAGTGCCAGACCGGTTTTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGATTTACCTTTACAA
TCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATATC
ACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG (配列番号22)

30

26B12L3のアミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITICRASQHVSTALAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGGTKLEIK (配列番号
23)

26B12L3のヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGATAGGG
TGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGCACGTGAGCACAGCCCTGGCATGGTACCAG
CAGAAGCCAGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATAGCGCCTCTAGCCTGCAGTC
CGGAGTGCCATCTCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCCGGAACCGACTTTACCCTGACAA
TCTCCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTACATC
ACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG (配列番号24)

40

26B12L4のアミノ酸配列

DIQMTQSPKSMSTSVGDRVITICRSSQHVVSTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASRYRYS
GVPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGGTKLEIK (配列番号
25)

26B12L4のヌクレオチド配列

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCATGTCTACAAGCGTGGGCGACAGGG
TGACCATCACATGTAGAAGCTCCCAGCACGTGTCTACCGCAGTGGCATGGTACCAG

50

CAGAAGCCAGGCCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCGCCTCTTACAGGTATTC
CGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCTCTGGCACCGATTTACCTTTACAA
TCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTACATC
ACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (配列番号26)

VP101 (hG1DM) の重鎖のアミノ酸配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTY
TGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYF
DVWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDM
SWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAED
TALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSP
SSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGS
GSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKR (配列番号27)

VP101 (hG1DM) の重鎖の核酸配列

GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCTCTGA
GGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAACTATGGAATGAATTGGGTG
CGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTCTGGCTGGATCAACACTTACACCGG
GGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATACAA
GCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTC
TACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTTTGACGT
GTGGGGGCGAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCACCAAGGGCCAGCG
TGTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGA
TGCTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGC
TCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATT
CCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATC
TGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAA
ATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAG
GCCCTAGCGTCTTCTCTTTCTCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCAGCAGA
ACCCCTGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAA
ATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGG
AGGAACAGTACAACCTCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCA
GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGC
CCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCAGGGAGCCCCAGGTCT
ATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGC
CTGGTCAAGGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTGAGTGGGAGTCCAACGGACA
GCCCCGAGAATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCT
TCCTGTACAGCAAACCTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT
TCTTGTTCCGTGATGCATGAAGCACTGCACAACCATATACCCAGAAGTCTCTGAG
CCTGTCCCCCGGCAAGGGCGGCGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
GCTCCGGAGGCGGCGGCTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGAGTGGTG
CAGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCAGCAAGCGGATTCGCCTTTAGCTC
CTACGACATGAGCTGGGTGCGGCAGGCACCTGGCAAGGGTCTGGATTGGGTGGCAA
CCATCAGCGGAGGCGGCAGATACACATACTATCCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTC
ACCATCTCCCGCGATAACTCTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAG
GGCCGAGGACACAGCCCTGTACTATTGCGCCAACCGCTACGGCGAGGCCTGGTTTG

10

20

30

40

50

CCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGCGGGCGGGCGGCAGCGGC
GGCGGCGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGGCGGCAGCGATATCCAGATGAC
CCAGTCCCCCTCCTCTATGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCTTCACATGTA
GAGCCTCCCAGGATATCAACACCTACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCCCGGCAAG
AGCCCTAAGACACTGATCTATCGGGCCAATAGACTGGTGAGCGGAGTGCCTTCCCG
GTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGACAGGACTATACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGC
CAGAGGATATGGCCACATACTATTGCCTGCAGTATGACGAGTTCCCCCTGACCTTC
GGGGCTGGCACTAAGCTGGAGCTGAAAAGA (配列番号28)

VP101 (hG1DM) の軽鎖のアミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号29)

VP101 (hG1DM) の軽鎖のヌクレオチド配列

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGG
TCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAACTACCTGAATTGGTATCAG
CAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACTC
AGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACCA
TTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTCTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCG
TGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAGCGGACCGTGCCGCT
CCCAGTGTCTTCATTTTTTCCCCCTAGCGACGAACAGCTGAAATCCGGGACAGCCTC
TGTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCTAGAGAGGGCAAAAGTGCAAGTGGAAAG
TCGATAACGCCCTGCAGAGTGGCAATTCACAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCC
AAAGATTCTACTTATAGTCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCTGACTACGA
AAAGCATAAAGTGTATGCATGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGCAGTCCAGTCA
CCAAGTCATTCAACAGAGGCGAGTGC (配列番号30)

ベバシズマブ重鎖可変領域 (ベバシズマブ-Hv) のアミノ酸配列: (123 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTY
TGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYF
DVWGGQGLTVTVSS (配列番号31)

ベバシズマブ重鎖可変領域のヌクレオチド配列: (369 bp)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCTCTGA
GGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAACTATGGAATGAATTGGGTG
CGCCAGGCACCAGGAAAGGGGACTGGAGTGGGTTCGGCTGGATCAACACTTACACCGG
GGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATACAA
GCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTC
TACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTTTGACGT
GTGGGGGCGAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGC (配列番号32)

ベバシズマブ軽鎖可変領域 (ベバシズマブ-Lv) のアミノ酸配列: (107 aa)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK (配列番
号33)

ベバシズマブ軽鎖可変領域のヌクレオチド配列: (321 bp)

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGG
TCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAACTACCTGAATTGGTATCAG
CAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACTC
AGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACCA
TTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTCTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCG
TGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAG (配列番号34)

ベバシズマブ重鎖可変領域のHCDR1: GYTFTNYG (配列番号35)

10

20

30

40

50

ベバシズマブ重鎖可変領域のHCDR2：INTYTGEP（配列番号36）

ベバシズマブ重鎖可変領域のHCDR3：AKYPHYYGSSHWYFDV（配列番号37）

ベバシズマブ軽鎖可変領域のLCDR1：QDISNY（配列番号38）

ベバシズマブ軽鎖可変領域のLCDR2：FTS（配列番号39）

ベバシズマブ軽鎖可変領域のLCDR3：QQYSTVPWT（配列番号40）

ヒト化モノクローナル抗体14C12H1L1重鎖可変領域のアミノ酸配列：（118 aa）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGG
RYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQG
TLVTVSS（配列番号41）

ヒト化モノクローナル抗体14C12H1L1重鎖可変領域のヌクレオチド配列：（354 bp）

GAAGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGGCGGGTCACTGC
GACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTG
CGACAGGCACCAAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAG
ATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACA
GTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTG
TACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAAC
CCTGGTGACAGTCTCTAGT（配列番号42）

14C12H1L1（M）軽鎖可変領域のアミノ酸配列：（108 aa、14C12H1L1に基づ
くアミノ酸配列の変異部位は下線で示されている）

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKR（配列
番号43）

14C12H1L1（M）軽鎖可変領域のヌクレオチド配列：

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCTATGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGGG
TGACCTTCACATGTAGAGCCTCCCAGGATATCAACACCTACCTGTCTTGGTTTCAG
CAGAAGCCCGGCAAGAGCCCTAAGACACTGATCTATCGGGCCAATAGACTGGTGAG
CGGAGTGCCTTCCCGGTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGACAGGACTATACCCTGACAA
TCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGATATGGCCACATACTATTGCCTGCAGTATGACGAG
TTCCCCCTGACCTTCGGGGCTGGCACTAAGCTGGAGCTGAAAAGA（配列番号44）

14C12H1L1（M）重鎖可変領域のHCDR1：GFAFSSYD（配列番号45）

14C12H1L1（M）重鎖可変領域のHCDR2：ISGGGRYT（配列番号46）

14C12H1L1（M）重鎖可変領域のHCDR3：ANRYGEAWFAY（配列番号47）

14C12H1L1（M）軽鎖可変領域のLCDR1：QDINTY（配列番号48）

14C12H1L1（M）軽鎖可変領域のLCDR2：RAN（配列番号49）

14C12H1L1（M）軽鎖可変領域のLCDR3：LQYDEFPLT（配列番号50）

mFcのアミノ酸配列

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPD
VQISWVFNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKD
LPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTN
NGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK
SFSRTPGK（配列番号51）

第1連結断片のアミノ酸配列

GGGGSGGGSGGGGS（配列番号52）

第2連結断片のアミノ酸配列

GGGGSGGGSGGGSGGGGS（配列番号53）

hFcのアミノ酸配列

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN

10

20

30

40

50

YKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K (配列番号54)

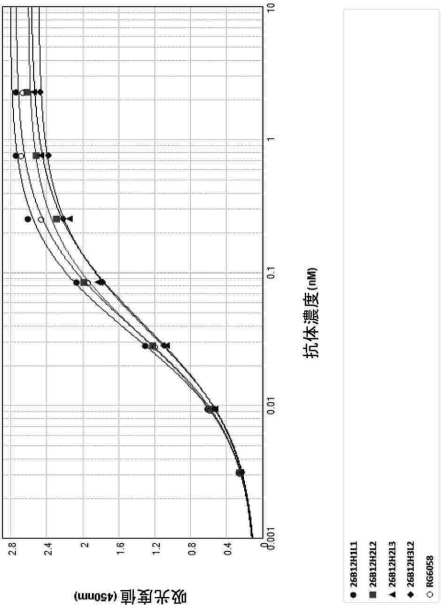
hlgG1DMの重鎖定常領域のアミノ酸配列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号55
)

【図面】

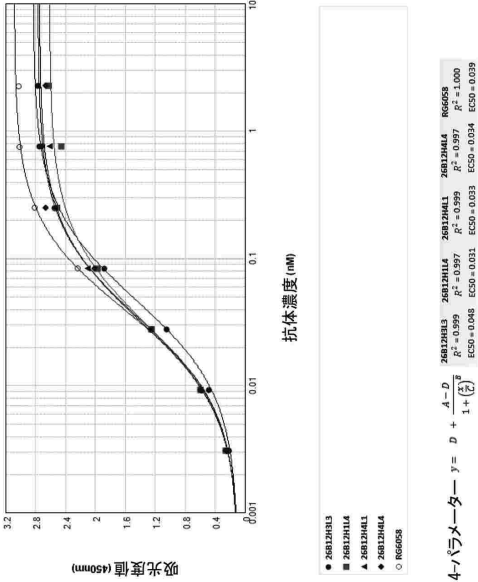
【図 1】

【図 2】



カーブフィット4-パラメーター $y = D + \frac{A-D}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^H}$

図 1



カーブフィット4-パラメーター $y = D + \frac{A-D}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^H}$

図 2

10

20

30

40

50

【図 3】

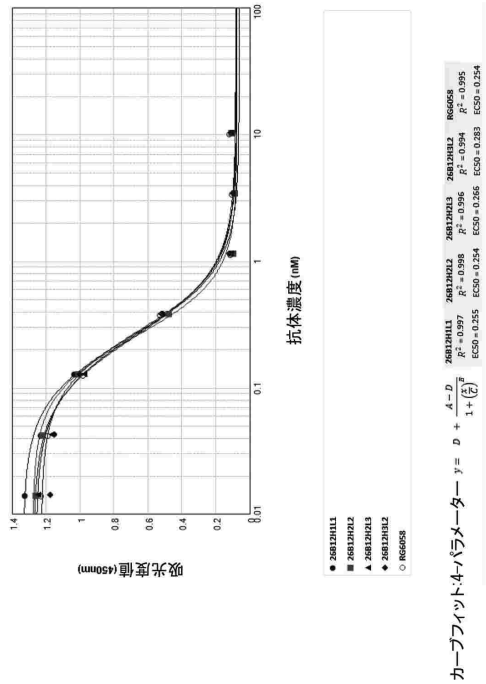


図 3

【図 4】

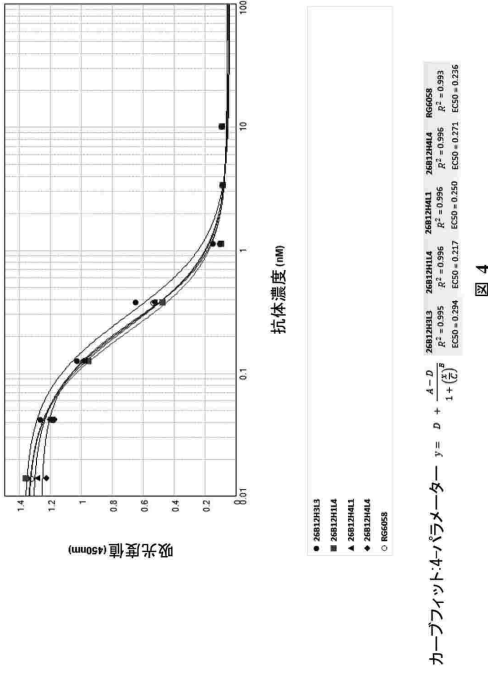


図 4

【図 5】

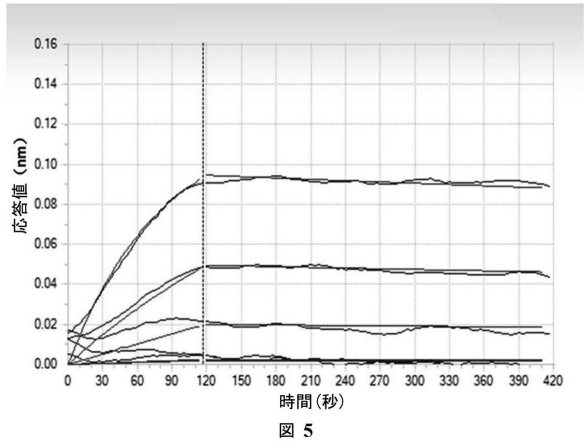


図 5

【図 6】

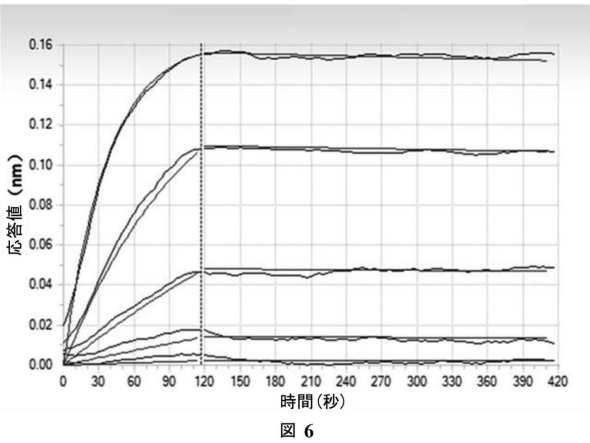


図 6

10

20

30

40

50

【 図 7 】

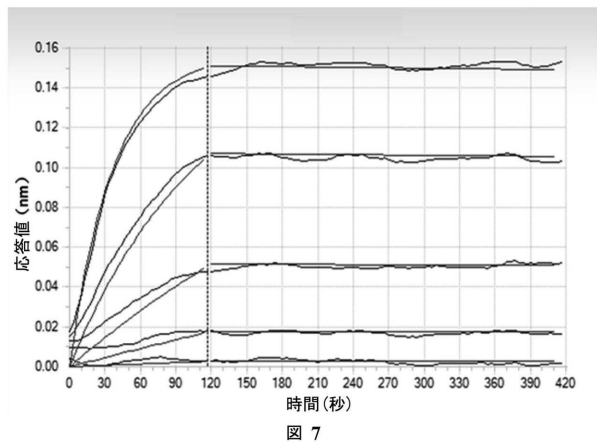


図 7

【 図 8 】

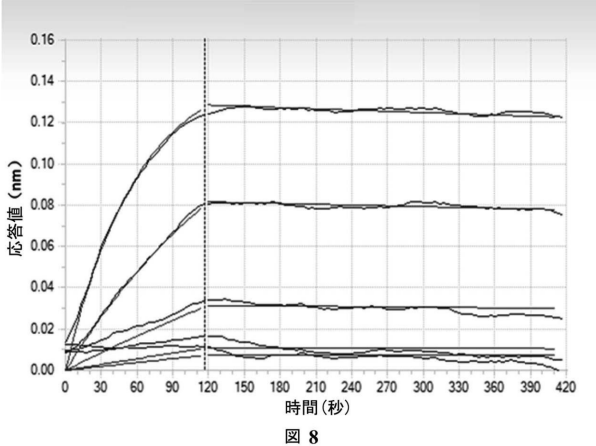


図 8

【 図 9 】

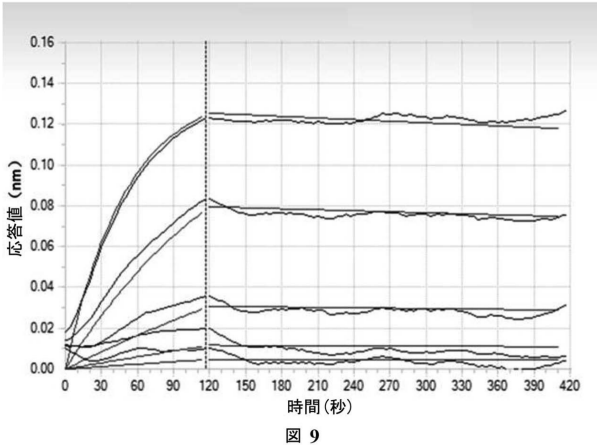


図 9

【 図 1 0 】

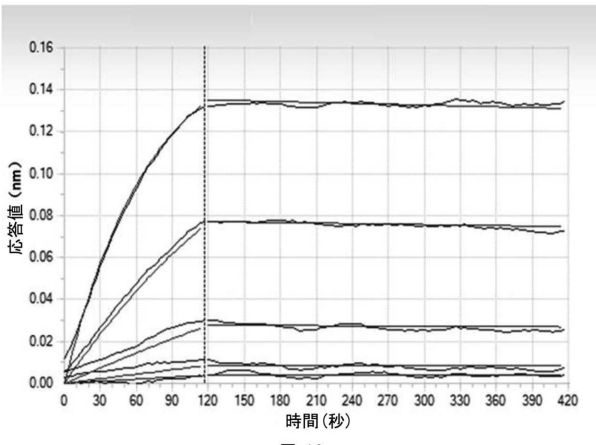


図 10

10

20

30

40

50

【図 1 1】

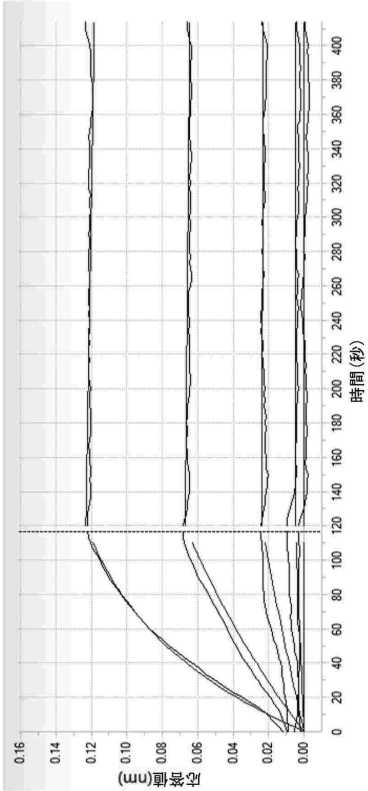


図 11

【図 1 2】

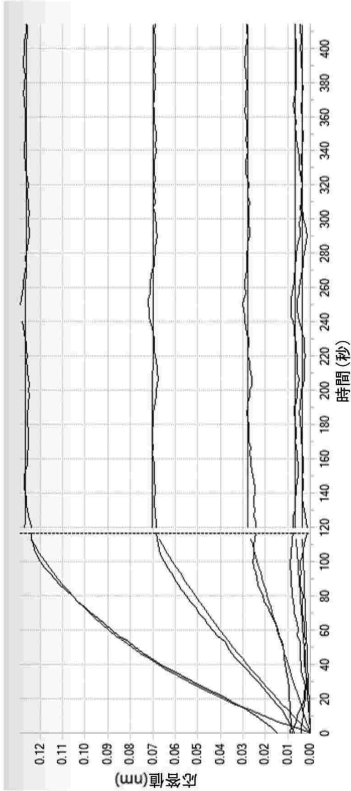


図 12

【図 1 3】

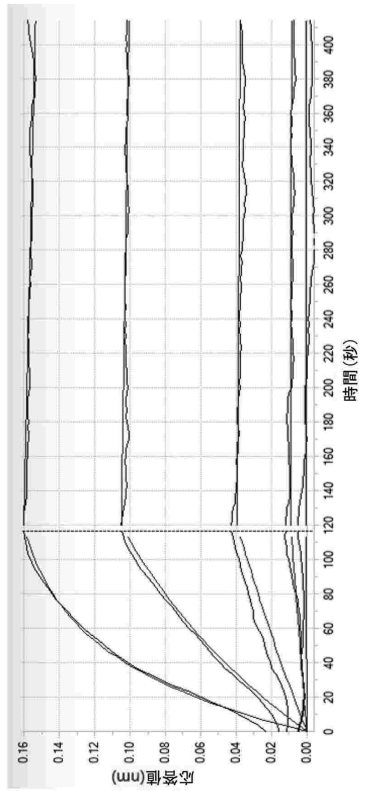


図 13

【図 1 4】

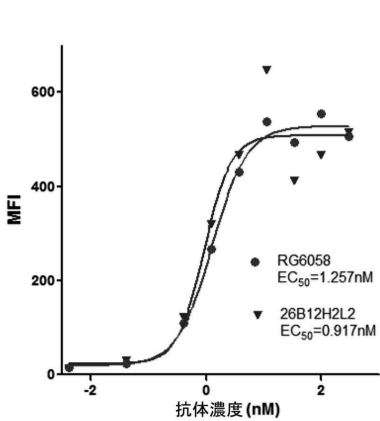


図 14

10

20

30

40

50

【図 1 5】

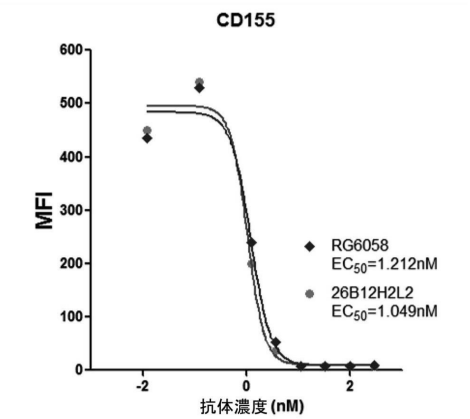


図 15

【図 1 6】

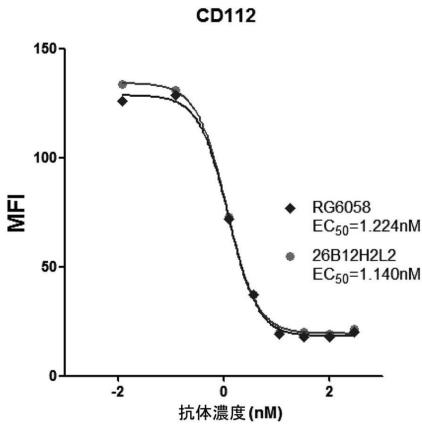


図 16

【図 1 7】

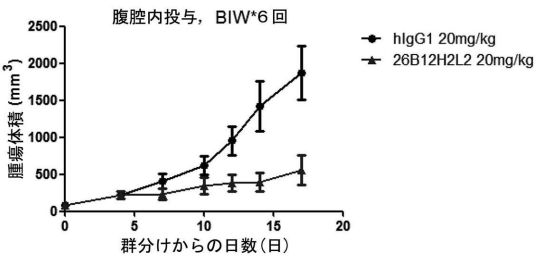


図 17

【図 1 8】

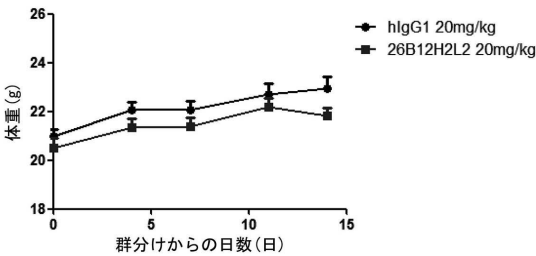


図 18

10

20

30

40

50

【図 1 9】

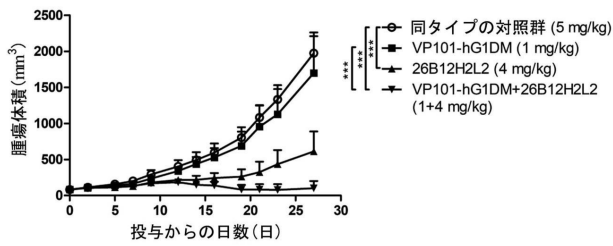


図 19

【図 2 0】

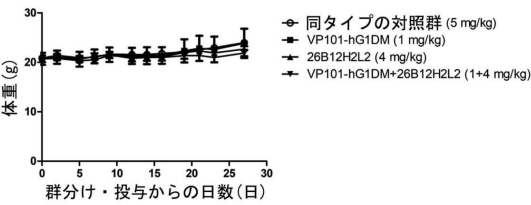


図 20

【図 2 1】

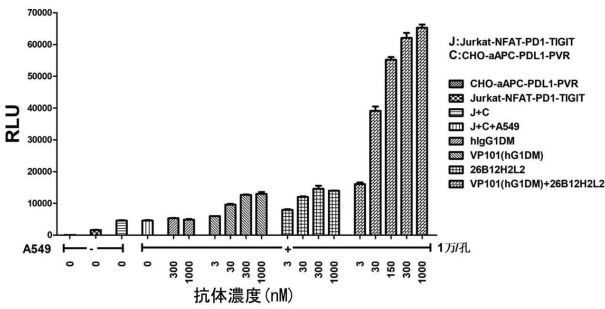


図 21

【配列表】

2025506318000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/075862
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/28(2006.01)i;A61K39/395(2006.01)i;A61P35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC:C07K A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT; ENTXT; ENTXTC; DWPI; CNKI; ISI WEB OF SCIENCES; PUBMED; STN: 抗体, 肿瘤, TIGIT, PD-1, VEGFA, antibody, tumor, SEQ ID NOS: 1, 3-6, , 8-10, 31, 33, 35-41, 43, 45-50		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114181310 A (AKESO BIOPHARMA, INC.) 15 March 2022 (2022-03-15) entire document	1-8
X	CN 112830972 A (AKESO BIOPHARMA, INC.) 25 May 2021 (2021-05-25) description, paragraphs 22-153, and preparation examples 1-4	6
A	CN 111196852 A (SICHUAN KELUN BOTAI BIOMEDICAL CO., LTD.; ANYUAN MEDICINE TECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.) 26 May 2020 (2020-05-26) entire document	1-8
A	CN 108290946 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 17 July 2018 (2018-07-17) entire document	1-8
A	US 11028172 B1 (LEPU BIOPHARMA CO., LTD.) 08 June 2021 (2021-06-08) entire document	1-8
A	WO 2019062832 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 04 April 2019 (2019-04-04) entire document	1-8
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 May 2023		Date of mailing of the international search report 15 May 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/075862

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2022031387 A1 (CRYSTAL BIOSCIENCE INC.) 10 February 2022 (2022-02-10) entire document	1-8
A	US 2018355040 A1 (AGENUS INC.) 13 December 2018 (2018-12-13) entire document	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/075862

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/075862

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 6 relates to a method for treating and/or preventing tumors, which belongs to the subject matter for which a search is not required (PCT Rule 39.1(iv)). The present authority has performed a search on the basis of the use of the TIGIT antibody, a PD-1-VEGFA bispecific antibody or antigen-binding fragments thereof in the preparation of a drug for treating and/or preventing tumors. 10
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/075862

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114181310	A	15 March 2022	None			
CN	112830972	A	25 May 2021	AU	2020390967	A1	23 June 2022
				EP	4067387	A1	05 October 2022
				CA	3162748	A1	03 June 2021
				WO	2021104302	A1	03 June 2021
				JP	2023504003	A	01 February 2023
				KR	20220104033	A	25 July 2022
				US	2023027029	A1	26 January 2023
				BR	112022010069	A2	06 September 2022
				IL	293241	A	01 July 2022
CN	111196852	A	26 May 2020	WO	2020098734	A1	22 May 2020
CN	108290946	A	17 July 2018	NZ	739750	A	29 November 2019
				WO	2017053748	A2	30 March 2017
				WO	2017053748	A3	11 May 2017
				CL	2018000744	A1	06 July 2018
				BR	112018005862	A2	16 October 2018
				UA	124573	C2	13 October 2021
				AU	2019246814	A1	31 October 2019
				TW	202237645	A	01 October 2022
				CA	2994858	A1	30 March 2017
				AU	2016325610	A1	01 March 2018
				AU	2016325610	B2	10 October 2019
				MX	2018003633	A	01 August 2018
				EP	3353210	A2	01 August 2018
				CL	2020000938	A1	14 August 2020
				JP	2020074778	A	21 May 2020
				IL	298355	A	01 January 2023
				CR	20180225	A	09 July 2018
				US	2021253693	A1	19 August 2021
				CR	20220186	A	07 July 2022
				KR	20180053742	A	23 May 2018
				KR	102279524	B1	20 July 2021
				JP	2018532397	A	08 November 2018
				JP	6764474	B2	30 September 2020
				KR	20220104289	A	26 July 2022
				RU	2018114523	A3	25 October 2019
				RU	2018114523	A	21 September 2020
				MA	42925	A	01 August 2018
				ZA	201800941	B	29 May 2019
				AU	2021250946	A1	11 November 2021
				US	2017088613	A1	30 March 2017
				US	10017572	B2	10 July 2018
				SG	10202007764	TA	29 September 2020
				PH	12018500608	A1	01 October 2018
				US	2018186875	A1	05 July 2018
				US	10047158	B2	14 August 2018
				PE	20181046	A1	03 July 2018
				IL	257636	A	30 April 2018
				CO	2018004090	A2	30 November 2018
				US	2021032328	A1	04 February 2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/075862

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				JP	2021166524	A	21 October 2021
				HK	1258058	A1	01 November 2019
				KR	2020087283	A	20 July 2020
				US	2019119376	A1	25 April 2019
				US	2022064286	A1	03 March 2022
				RU	2020120073	A	03 July 2020
				TW	201718644	A	01 June 2017
				TWI	747841	B	01 December 2021
US	11028172	B1	08 June 2021	WO	2022100573	A1	19 May 2022
WO	2019062832	A1	04 April 2019	JP	2020537509	A	24 December 2020
				EP	3689909	A1	05 August 2020
				EP	3689909	A4	29 December 2021
				TW	201915026	A	16 April 2019
				US	2020255516	A1	13 August 2020
				US	11512129	B2	29 November 2022
WO	2022031387	A1	10 February 2022	CA	3189730	A1	10 February 2022
US	2018355040	A1	13 December 2018	US	11021537	B2	01 June 2021
				MA	50957	A	14 October 2020
				CA	3062061	A1	08 November 2018
				US	2022089732	A1	24 March 2022
				TW	201843178	A	16 December 2018
				AU	2018263857	A1	21 November 2019
				WO	2018204363	A1	08 November 2018
				EP	3618863	A1	11 March 2020

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/075862
A. 主题的分类 C07K16/28(2006.01)i;A61K39/395(2006.01)i;A61P35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC:C07K A61K A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称,和使用的检索词(如使用)) CNTXT;ENTXT;ENTXTC;DWPI;CNKI;ISI WEB OF SCIENCES;PUBMED;STN:抗体,肿瘤,TIGIT,PD-1,VEGFA,antibody,tumor,SEQ ID NOs:1,3-6,,8-10,31,33,35-41,43,45-50		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件,必要时,指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 114181310 A (中山康方生物医药有限公司) 2022年3月15日 (2022 - 03 - 15) 全文	1-8
X	CN 112830972 A (中山康方生物医药有限公司) 2021年5月25日 (2021 - 05 - 25) 说明书第22-153段,制备例1-4	6
A	CN 111196852 A (四川科伦博泰生物医药股份有限公司 安源医药科技(上海)有限公司) 2020年5月26日 (2020 - 05 - 26) 全文	1-8
A	CN 108290946 A (豪夫迈·罗氏有限公司) 2018年7月17日 (2018 - 07 - 17) 全文	1-8
A	US 11028172 B1 (LEPU BIOPHARMA CO., LTD.) 2021年6月8日 (2021 - 06 - 08) 全文	1-8
A	WO 2019062832 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.等) 2019年4月4日 (2019 - 04 - 04) 全文	1-8
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。 * 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件,或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布,与申请不相抵触,但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件,单独考虑该文件,认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件,当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时,要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年5月5日		国际检索报告邮寄日期 2023年5月15日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		受权官员 李影 电话号码 (+86) 010-53961973

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/075862

G. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2022031387 A1 (CRYSTAL BIOSCIENCE INC.) 2022年2月10日 (2022 - 02 - 10) 全文	1-8
A	US 2018355040 A1 (AGENUS INC.) 2018年12月13日 (2018 - 12 - 13) 全文	1-8

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/075862
第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)	
1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的: a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的: b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)), ☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。 2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。 3. 补充意见:		

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2023/075862
第II栏	某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)	
根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:		
1.	☒ 权利要求: 6 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即: 权利要求6涉及治疗和/或预防肿瘤的方法, 属于PCT细则39.1(iv)不要求进行检索的主题, 本单位以所述TIGIT抗体、PD-1-VEGFA双特异性抗体或其抗原结合片段在制备治疗和/或预防肿瘤的药物中的应用为基础进行了检索。	10
2.	☐ 权利要求: 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:	
3.	☐ 权利要求: 因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。	20
		30
		40
		50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/075862

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	114181310	A	2022年3月15日	无			
CN	112830972	A	2021年5月25日	AU	2020390967	A1	2022年6月23日
				EP	4067387	A1	2022年10月5日
				CA	3162748	A1	2021年6月3日
				WO	2021104302	A1	2021年6月3日
				JP	2023504003	A	2023年2月1日
				KR	20220104033	A	2022年7月25日
				US	2023027029	A1	2023年1月26日
				BR	112022010069	A2	2022年9月6日
				IL	293241	A	2022年7月1日
CN	111196852	A	2020年5月26日	WO	2020098734	A1	2020年5月22日
CN	108290946	A	2018年7月17日	NZ	739750	A	2019年11月29日
				WO	2017053748	A2	2017年3月30日
				WO	2017053748	A3	2017年5月11日
				CL	2018000744	A1	2018年7月6日
				BR	112018005862	A2	2018年10月16日
				UA	124573	C2	2021年10月13日
				AU	2019246814	A1	2019年10月31日
				TW	202237645	A	2022年10月1日
				CA	2994858	A1	2017年3月30日
				AU	2016325610	A1	2018年3月1日
				AU	2016325610	B2	2019年10月10日
				MX	2018003633	A	2018年8月1日
				EP	3353210	A2	2018年8月1日
				CL	2020000938	A1	2020年8月14日
				JP	2020074778	A	2020年5月21日
				IL	298355	A	2023年1月1日
				CR	20180225	A	2018年7月9日
				US	2021253693	A1	2021年8月19日
				CR	20220186	A	2022年7月7日
				KR	20180053742	A	2018年5月23日
				KR	102279524	B1	2021年7月20日
				JP	2018532397	A	2018年11月8日
				JP	6764474	B2	2020年9月30日
				KR	20220104289	A	2022年7月26日
				RU	2018114523	A3	2019年10月25日
				RU	2018114523	A	2020年9月21日
				MA	42925	A	2018年8月1日
				ZA	201800941	B	2019年5月29日
				AU	2021250946	A1	2021年11月11日
				US	2017088613	A1	2017年3月30日
				US	10017572	B2	2018年7月10日
				SG	10202007764	TA	2020年9月29日
				PH	12018500608	A1	2018年10月1日
				US	2018186875	A1	2018年7月5日
				US	10047158	B2	2018年8月14日
				PE	20181046	A1	2018年7月3日
				IL	257636	A	2018年4月30日
				CO	2018004090	A2	2018年11月30日
				US	2021032328	A1	2021年2月4日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

10

20

30

40

50

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2023/075862			
检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利	
				JP		2021166524 A	
				HK		1258058 A1	
				KR		20200087283 A	
				US		2019119376 A1	
				US		2022064286 A1	
				RU		2020120073 A	
				TW		201718644 A	
				TWI		747841 B	
				US		11028172 B1	
				WO		2019062832 A1	
				JP		2020537509 A	
				EP		3689909 A1	
				EP		3689909 A4	
				TW		201915026 A	
				US		2020255516 A1	
				US		11512129 B2	
				WO		2022031387 A1	
				CA		3189730 A1	
				US		11021537 B2	
				MA		50957 A	
				CA		3062061 A1	
				US		2022089732 A1	
				TW		201843178 A	
				AU		2018263857 A1	
				WO		2018204363 A1	
				EP		3618863 A1	

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 0 7 K	16/22	(2006.01)	C 0 7 K	16/22	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/537	(2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	38/07	(2006.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/537	
A 6 1 K	31/7036	(2006.01)	A 6 1 K	38/07	
A 6 1 K	51/10	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/7036	
			A 6 1 K	51/10	1 0 0
			A 6 1 K	48/00	

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

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 シア ユイ

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

(72)発明者 ワン チョンミン

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

(72)発明者 リー パイヨン

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

F ターム (参考) 4C076 AA12 AA95 BB13 CC27 CC41 EE41 EE59 FF04 FF31
 4C084 AA02 AA03 AA12 AA13 AA19 BA01 BA16 BA23 MA02 MA05
 MA66 NA05 NA10 NA13 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC751
 4C085 AA13 AA14 AA16 BB31 BB36 BB41 BB43 CC22 CC23 DD62
 EE03 EE05 GG02
 4C086 AA01 AA02 CB22 EA08 MA03 MA04 MA05 MA66 NA05 NA10
 NA13 ZB26 ZB27 ZC75
 4H045 AA10 AA30 BA09 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74