

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-546713

(P2023-546713A)

(43)公表日 令和5年11月7日(2023.11.7)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 3
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全78頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-524833(P2023-524833)	(71)出願人	521531344	アナプティスバイオ インコーポレイテッド アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 2 1、サン ディエゴ、スイート 2 1 0、ウォーターリッジ サークル 1 0 7 7 0	
(86)(22)出願日	令和3年10月22日(2021.10.22)	(74)代理人	100136629		
(85)翻訳文提出日	令和5年6月20日(2023.6.20)		弁理士 鎌田 光宣		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/056289	(74)代理人	100080791		
(87)国際公開番号	WO2022/087441		弁理士 高島 一		
(87)国際公開日	令和4年4月28日(2022.4.28)	(74)代理人	100125070	最終頁に続く	
(31)優先権主張番号	63/105,067		弁理士 土井 京子		
(32)優先日	令和2年10月23日(2020.10.23)	(74)代理人	100121212		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 田村 弥栄子		
(31)優先権主張番号	63/192,984				
(32)優先日	令和3年5月25日(2021.5.25)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			最終頁に続く	
	最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 B及びTリンパ球アテニュエータ(BTLA)調節因子及びその使用方法

(57)【要約】

BTLA結合剤、並びに該結合剤の免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖のポリペプチド、並びに自己免疫又は炎症性の疾患等のBTLAアゴニズムに応答する障害又は疾患を治療するためのBTLA結合剤の使用法。

【選択図】図1

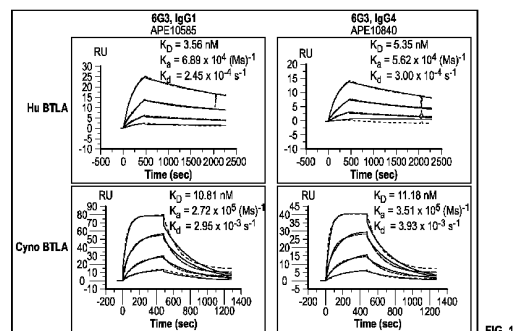


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) $X^1 S X^2 M N$ (配列番号 195) (式中、 X^1 は、N 又は T であり、 X^2 は、W、F、H、G、P、R、K、D、S、L、V、N、又は Y である) を含む CDRH1；

(b) $R I Y P X^1 G X^2 X^3 D T N Y X^4 G K F K$ (配列番号 196) (式中、

X^1 は、存在しないか又は A であり；

X^2 は、D、Y、Q、G、L、F、H、S、P、R、又は T であり；

X^3 は、G、Y、A、F、S、D、V、T、E、K、又は R であり；

X^4 は、N、V、Q、R、A、F、Y、S、G、P、又は T である)

を含む CDRH2；

及び

(c) $X^1 S G T F X^2 X^3 G N Y X^4 X^5 Y F D V$ (配列番号 197) (式中、

X^1 は、K 又は R であり；

X^2 は、N 又は D であり；

X^3 は、D、S、F、Y、F、V、S、G、T、R、I、L、又は E であり；

X^4 は、R 又は H であり；

X^5 は、W、R、F、L、N、Y、P、I、V、A、S、G、R、又は K である)

を含む CDRH3；

を含む；あるいは配列番号 43～156 のいずれか 1 つの免疫グロブリン重鎖可変領域若しくは少なくともそれらの CDR；又はそれらに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；

(a) $R X^1 S E N I Y X^2 X^3 L A$ (配列番号 198) (式中、

X^1 は、A 又は V であり；

X^2 は、S 又は N であり；

X^3 は、H、N、又は Y である)

を含む CDRL1；

(b) $X^1 A X^2 N L A X^3$ (配列番号 199) (式中、

X^1 は、A 又は N であり；

X^2 は、T 又は K であり；

X^3 は、N、L、Q、G、F、V、K、S、R、T、H、又は P である)

を含む CDRL2；及び

(c) $Q X^1 F X^2 G P P L T$ (配列番号 200) (式中、

X^1 は、L 又は H であり；

X^2 は、W、F、Y、P、N、V、K、M、L、G、又は S である)

を含む CDRL3；

を含む；あるいは配列番号 157～192 のいずれかの免疫グロブリン軽鎖可変領域若しくは少なくともそれらの CDR；又はそれらに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と；

を含む、BT LA 結合剤、

あるいは表 3 に記載の BT LA 結合剤。

【請求項 2】

前記免疫グロブリン重鎖ポリペプチドが、配列：

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G Y X^1 F S X^2 S X^3 M N W V
R Q A P G Q G L E W M G R I Y P X^4 G X^5 X^6 D T N Y X^7 G K F K G R V T I T A
D K X^8 T X^9 T A Y M E L X^{10} S L R S E X^{11} T A V X^{12} Y X^{13} C A X^{14} S G
T F X^{15} X^{16} G N Y X^{17} X^{18} Y F D V W G K G T T V T V S S A (配列番号 193)

) (式中、

X^1 は、A 又は V であり；

X^2 は、N 又は T であり；

X^3 は、W、F、H、G、P、R、K、D、S、L、V、N、又は Y であり；

10

20

30

40

50

X^4 は、存在しないか又は A であり；
 X^5 は、D、Y、Q、G、L、F、H、S、P、R、又は T であり；
 X^6 は、G、Y、A、F、S、D、V、T、E、K、又は R であり；
 X^7 は、N、V、Q、R、A、F、Y、S、G、P、又は T であり；
 X^8 は、S 又は F であり；
 X^9 は、S、T、又は N であり；
 X^{10} は、S 又は R であり；
 X^{11} は、D 又は V であり；
 X^{12} は、存在しないか又は Y であり；
 X^{13} は、Y 又は F であり；
 X^{14} は、K 又は R であり；
 X^{15} は、N 又は D であり；
 X^{16} は、D、S、F、Y、F、V、S、G、T、R、I、L、又は E であり；
 X^{17} は、R 又は H であり；
 X^{18} は、W、R、F、L、N、Y、P、I、V、A、S、G、R、又は K である）

を含む、請求項 1 に記載の B T L A 結合剤。

【請求項 3】

前記免疫グロブリン重鎖ポリペプチドが、配列番号 43～156 のいずれか 1 つ若しくは少なくともそれらの C D R；又はそれらに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の B T L A 結合剤。

【請求項 4】

前記免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドが、配列：

X^1 I Q X^2 T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R X^3 S E N I Y X^4 X^5 L A W
 Y Q Q K X^6 G K A P K L L I Y X^7 A X^8 N L A X^9 G V P S R F S G S G S G T D X^{10}
 X^{11} T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q X^{12} F X^{13} G P P L T F G G G T K V E
 I K R（配列番号 194）（式中、

X^1 は、A 又は D であり；
 X^2 は、L 又は M であり；
 X^3 は、A 又は V であり；
 X^4 は、S 又は N であり；
 X^5 は、H、N、又は Y であり；
 X^6 は、P 又は Q であり；
 X^7 は、A 又は N であり；
 X^8 は、T 又は K であり；
 X^9 は、N、L、Q、G、F、V、K、S、R、T、H、又は P であり；
 X^{10} は、F 又は Y であり；
 X^{11} は、L 又は H であり；
 X^{12} は、W、F、Y、P、N、V、K、M、L、G、S である）

を含む、請求項 1～3 のいずれかに記載の B T L A 結合剤。

【請求項 5】

前記免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドが、配列番号 157～192 のいずれか若しくは少なくともそれらの C D R；又はそれらに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1～4 のいずれかに記載の B T L A 結合剤。

【請求項 6】

- (a) 配列番号 201 を含む C D R H 1；
- (b) 配列番号 202 を含む C D R H 2；
- (c) 配列番号 203 を含む C D R H 3；
- (d) 配列番号 204 を含む C D R L 1；
- (e) 配列番号 205 を含む C D R L 2；及び
- (f) 配列番号 206 を含む C D R L 3

10

20

30

40

50

を含む、請求項 1～5 のいずれかに記載の B T L A 結合剤。

【請求項 7】

配列番号 1 4 4 の免疫グロブリン重鎖可変領域若しくは少なくともその C D R ; 及び配列番号 1 7 4 の免疫グロブリン軽鎖可変領域若しくは少なくともその C D R ; 又は配列番号 1 4 4 に対して 9 0 % 以上の配列同一性を有する免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号 1 7 4 の免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、請求項 1～5 のいずれかに記載の B T L A 結合剤。

【請求項 8】

(a) A s p T y r T h r I l e H i s (配列番号 2 7) を含む C D R H 1 ;
(b) T r p I l e T y r P r o G l y S e r G l y A s n T h r L y s T y r A s n A s p L y s P h e L y s X a a (配列番号 3 0) (式中、X a a は、アスパラギン酸 (A s p) 又はバリン (V a l) である) を含む C D R H 2 ;

10

(c) A r g X a a 1 X a a 2 T y r X a a 3 M e t X a a 4 T y r (配列番号 3 2) (式中、

X a a 1 は、アスパラギン (A s n) 又はセリン (S e r) であり、

X a a 2 は、チロシン (T y r) 又はヒスチジン (H i s) であり、

X a a 3 は、アラニン (A l a) 又はバリン (V a l) であり、

X a a 4 は、グルタミン酸 (G l u) 又はアスパラギン酸 (A s p) である)

を含む C D R H 3 ;

20

を含む; あるいは配列番号 1～15、207、208、217、若しくは218のいずれか1つを含む重鎖可変領域又は少なくともそれらのC D R、あるいはそれらに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖免疫グロブリン可変領域と;

(a) L y s A l a S e r G l n A s n V a l P h e T h r A s n V a l A l a (配列番号 3 6) を含む C D R L 1 ;

(b) S e r A l a S e r T y r A r g X a a S e r (配列番号 3 9) (式中、X a a は、チロシン (T y r) 又はセリン (S e r) である) を含む C D R L 2 ; 及び

(c) G l n G l n T y r X a a 1 X a a 2 T y r P r o T y r T h r (配列番号 4 1) (式中、

30

X a a 1 は、セリン (S e r) 又はアスパラギン (A s n) であり、

X a a 2 は、スレオニン (T h r) 又はセリン (S e r) である)

を含む C D R L 3 ;

を含む; あるいは配列番号 16～25、209、210、219、若しくは220のいずれか1つを含む軽鎖可変領域又は少なくともそれらのC D R、あるいはそれらに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖免疫グロブリン可変領域と;

を含む、B T L A 結合剤、

あるいは表 2 に記載の B T L A 結合剤。

【請求項 9】

前記 C D R H 2 が、配列番号 3 1 を含み; C D R H 3 が、配列番号 3 3 又は 3 4 を含む、請求項 8 7 に記載の B T L A 結合剤。

40

【請求項 10】

前記 C D R L 2 が、配列番号 4 0 を含み; 前記 C D R L 3 が、配列番号 4 2 を含む、請求項 8 又は 9 のいずれかに記載の B T L A 結合剤。

【請求項 11】

前記結合剤が、アミノ酸配列 G l n V a l G l n L e u V a l G l n S e r G l y A l a G l u V a l L y s L y s P r o G l y A l a S e r V a l L y s V a l S e r C y s L y s A l a S e r G l y X a a 1 T h r X a a 2 T h r A s p T y r T h r I l e H i s T r p V a l A

50

r g G l n A l a P r o G l y G l n A r g L e u G l u T r p M e
t G l y T r p I l e T y r P r o G l y S e r G l y A s n T h r
L y s T y r A s n A s p L y s P h e L y s X a a 3 A r g V a l
T h r I l e T h r X a a 4 A s p X a a 5 S e r X a a 6 X a a 7 T
h r A l a T y r M e t G l u L e u S e r S e r L e u A r g S e
r G l u A s p T h r A l a V a l T y r X a a 8 C y s A l a A r
g A r g X a a 9 X a a 10 T y r X a a 11 M e t X a a 12 T y r
T r p G l y G l n G l y T h r T h r V a l T h r V a l S e r S
e r A l a (配列番号 26) (式中、

X a a 1 は、フェニルアラニン (P h e) 又はチロシン (T y r) であり、

10

X a a 2 は、フェニルアラニン (P h e) 又はロイシン (L e u) であり、

X a a 3 は、アスパラギン酸 (A s p) 又はバリン (V a l) であり、

X a a 4 は、アラニン (A l a) 又はアルギニン (A r g) であり、

X a a 5 は、リジン (L y s) 又はスレオニン (T h r) であり、

X a a 6 は、アラニン (A l a) 又はセリン (S e r) であり、

X a a 7 は、セリン (S e r) 又はスレオニン (T h r) であり、

X a a 8 は、チロシン (T y r) 又はフェニルアラニン (P h e) であり、

X a a 9 は、アスパラギン (A s n) 又はセリン (S e r) であり、

X a a 10 は、チロシン (T y r) 又はヒスチジン (H i s) であり、

20

X a a 11 は、アラニン (A l a) 又はバリン (V a l) であり、

X a a 12 は、グルタミン酸 (G l u) 又はアスパラギン酸 (A s p) である)

を含む重鎖可変領域を含む、請求項 8～10 のいずれかに記載の B T L A 結合剤。

【請求項 12】

配列番号 1～15、207、208、217、若しくは 218 のいずれか 1 つを含む重鎖可変領域、又は少なくともそれらの C D R、あるいはそれらに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 8～11 のいずれかに記載の B T L A 結合剤。

【請求項 13】

アミノ酸配列 A s p I l e V a l M e t T h r G l n S e r P r o A s
p S e r L e u A l a V a l S e r L e u G l y G l u A r g A l a
T h r I l e A s n C y s L y s A l a S e r G l n A s n V a l P
h e T h r A s n V a l A l a T r p T y r G l n G l n L y s P r
o G l y G l n X a a P r o L y s X a a L e u I l e T y r S e r
A l a S e r T y r A r g X a a S e r G l y V a l P r o A s p A
r g P h e S e r G l y S e r G l y S e r G l y T h r A s p P h
e T h r L e u T h r I l e S e r S e r L e u G l n A l a G l u
A s p V a l A l a V a l T y r X a a C y s G l n G l n T y r X
a a X a a T y r P r o T y r T h r P h e G l y G l n G l y T h
r L y s L e u G l u I l e L y s A r g (配列番号 35) (式中、

30

X a a 1 は、セリン (S e r) 又はプロリン (P r o) であり、

40

X a a 2 は、プロリン (P r o) 又はロイシン (L e u) であり、

X a a 3 は、チロシン (T y r) 又はセリン (S e r) であり、

X a a 4 は、チロシン (T y r) 又はフェニルアラニン (P h e) であり、

X a a 5 は、セリン (S e r) 又はアスパラギン (A s n) であり、

X a a 6 は、スレオニン (T h r) 又はセリン (S e r) である)

を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 8～12 のいずれかに記載の B T L A 結合剤。

【請求項 14】

配列番号 16～25、209、210、219、若しくは 220 のいずれか 1 つを含む軽鎖可変領域、又は少なくともそれらの C D R、あるいはそれらに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 8～13 のいずれかに記載の B T L

50

A 結合剤。

【請求項 15】

抗体、抗体コンジュゲート、又はそれらの抗原結合断片であり、任意で IgG1 又は IgG4 の抗体である、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の BTLA 結合剤。

【請求項 16】

F(ab')₂ 断片、Fab' 断片、Fab 断片、Fv 断片、scFv 断片、dsFv 断片、dAb 断片、又は一本鎖結合ポリペプチドである、請求項 15 に記載の BTLA 結合剤。

【請求項 17】

任意でベクター中の、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の BTLA 結合剤の免疫グロブリンの重鎖及び／又は軽鎖のポリペプチドをコードしている核酸配列。 10

【請求項 18】

請求項 17 に記載の核酸を含む細胞。

【請求項 19】

(a) 請求項 1～16 のいずれか一項に記載の BTLA 結合剤又はそれをコードしている核酸と、(b) 薬学的に許容される担体と、を含む組成物。

【請求項 20】

哺乳類における BTLA シグナル伝達を調節する方法であって、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の BTLA 結合剤、それをコードしている核酸、又はそれを含む組成物を前記哺乳類に投与することを含む方法。 20

【請求項 21】

前記哺乳類が、BTLA 調節に応答する障害を有し、前記障害がそれによって治療される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記障害が、自己免疫又は炎症性の疾患である、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

前記疾患が、関節リウマチ、移植片対宿主病、乾癬、又は炎症性腸疾患である、請求項 21 又は 22 に記載の方法。

【請求項 24】

請求項 1～16 のいずれかに記載の BTLA 結合剤を調製する方法であって、免疫グロブリン重鎖ポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列及び免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドをコードしている核酸を細胞内で発現させることを含む方法。 30

【請求項 25】

血液、血漿、血清、又は組織のサンプルを請求項 8～14 のいずれかに記載の抗体と接触させることを含む、血液、血漿、血清、又は組織中の可溶性 BTLA を検出する方法であって、任意で、前記血液、血漿、血清、若しくは組織のサンプル中の前記可溶性 BTLA を、請求項 1～7 のいずれかに記載の抗体と結合させるか、又は前記血液、血漿、血清、若しくは組織のサンプルを請求項 8～14 のいずれかに記載の抗体及び請求項 1～7 のいずれかに記載の抗体と接触させる方法。

【請求項 26】

対象における BTLA 結合剤の薬理活性を検出、測定、若しくはモニタリングする、又は BTLA 結合剤による治療のための対象を選択する方法であって、BTLA 結合剤が投与された対象からの血液、血漿、血清、又は組織のサンプル中の可溶性 BTLA (sBTLA) を検出することを含む方法。 40

【請求項 27】

前記 BTLA 結合剤が、抗 BTLA 抗体である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 BTLA 結合剤が、BTLA の HVEM への結合を実質的に阻害することなく BTLA に結合するか、又は BTLA に結合し、BTLA シグナル伝達を増強する抗 BTLA 抗体である、請求項 26 又は 27 に記載の方法。 50

【請求項 29】

前記 B T L A 結合剤が、請求項 1～7 のいずれかに記載の B T L A 結合剤である、請求項 26～28 のいずれかに記載の方法。

【請求項 30】

前記血液、血漿、血清、若しくは組織のサンプル又はそれらの画分を、s B T L A に結合する抗 B T L A 捕捉抗体と接触させることにより、前記血液、血漿、血清、又は組織のサンプル中の s B T L A を検出することを含む、請求項 26～29 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

前記抗 B T L A 捕捉抗体が、請求項 8～14 のいずれかに記載の抗体である、請求項 30 に記載の方法。

10

【請求項 32】

前記血液、血漿、血清、又は組織のサンプル中の s B T L A の濃度を参照 s B T L A 濃度と比較することを更に含む、請求項 26～31 のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

前記参照 s B T L A 濃度が、前記 B T L A 結合剤を投与する前の同じ患者からの血液、血漿、血清、若しくは組織のサンプル中の s B T L A の濃度；又は B T L A 結合剤を投与されたことのない同じ種類の別の正常な非疾患対象の血液、血漿、血清、若しくは組織中の s B T L A の濃度；又はそのような対象の集団の血液、血漿、血清、若しくは組織中の s B T L A 濃度の統計分析によって確立される参照 s B T L A 濃度である、請求項 32 に記載の方法。

20

【請求項 34】

B T L A 結合剤を前記対象に投与する工程を更に含む、請求項 26～33 のいずれかに記載の方法。

【請求項 35】

B T L A 結合剤が投与された対象からの血液、血漿、血清、又は組織のサンプル中の s B T L A の濃度を、前記 B T L A 結合剤が対象に投与される前又は後のいずれかの異なる時点における同じ対象からの血液、血漿、血清、又は組織のサンプル中の s B T L A の濃度と比較することを含む、請求項 26～34 のいずれかに記載の方法。

【請求項 36】

前記対象の血液、血漿、血清、又は組織のサンプルにおいて検出される s B T L A が、前記 B T L A 結合剤に結合している s B T L A である、請求項 26～36 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 37】

前記参照 s B T L A 濃度が、前記対象の血液、血漿、血清、若しくは組織のサンプル、又は対象の集団からの血液、血漿、血清、若しくは組織のサンプルを、請求項 1～7 のいずれかに記載の B T L A 結合剤及び請求項 8～14 のいずれかに記載の捕捉抗体と接触させることを含む方法によって確立される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 38】

請求項 20～37 のいずれかに記載の方法において使用するための、請求項 1～7 のいずれかに記載の B T L A 結合剤、請求項 8～14 のいずれかに記載の B T L A 結合剤、又はその両方を含む組成物。

40

【請求項 39】

哺乳類における B T L A 調節に応答する障害を治療するための、請求項 8～14 のいずれかに記載の B T L A 結合剤。

【請求項 40】

哺乳類における B T L A 調節に応答する障害を治療するための、請求項 1～7 のいずれかに記載の B T L A 結合剤。

【請求項 41】

配列番号 144 の免疫グロブリン重鎖可変領域若しくは少なくともその C D R ；及び配

50

列番号 174 の免疫グロブリン重鎖鎖可変領域若しくは少なくともその CDR を含むか；又は配列番号 144 に対して 90 % 以上の配列同一性を有する免疫グロブリン重鎖鎖可変領域及び配列番号 174 の免疫グロブリン軽鎖鎖可変領域を含む、請求項 40 に記載の BTLA 結合剤。

【請求項 42】

前記障害が、自己免疫又は炎症性の疾患である、請求項 39～41 のいずれかに記載の方法。

【請求項 43】

前記疾患が、関節リウマチ、移植片対宿主病、乾癬、又は炎症性腸疾患である、請求項 39～41 のいずれかに記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本特許出願は、2021年5月25日に出願された米国仮特許出願第63／192,984号及び2020年10月23日に出願された米国仮特許出願第63／105,067に対する優先権を主張し、その開示全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

電子的に提出された文献の参照による援用

本明細書と同時に提出されるコンピュータ可読ヌクレオチド／アミノ酸配列表は、その全体が参照により本明細書に援用される。

20

【背景技術】

【0003】

Tリンパ球は、T細胞受容体（TCR）の会合と共刺激性分子からの正のシグナルとの組み合わせによってナイーブな状態から活性化される。逆に、共阻害性分子は、負のシグナルを送って正の共刺激性シグナルを相殺することにより、T細胞の活性の調節において重要な役割を果たす。共阻害性分子は、自己に対する免疫寛容を維持し、感染症及び炎症等の免疫侵襲を解決した後に活性化したT細胞を制御するためのチェックポイントとして作用する。

【0004】

CD28は、T細胞における主要な共刺激性分子であり、抗原提示細胞（APC）の表面上のリガンドB7.1又はB7.2と会合すると、TCRの会合と同時にT細胞の増殖及び分化を促進する細胞内シグナルを送る。同じリガンドがT細胞上の共阻害性分子である細胞傷害性Tリンパ球抗原-4（CTLA-4）に会合すると、T細胞の増殖及びエフェクター機能が阻害される（Chambers et al., Ann. Rev. Immunol., 19:565-594, 2001; Egen et al., Nature Immunol., 3:611-618, 2002）。同様に、PD-L1を発現している細胞がT細胞上の共阻害性分子PD-1と会合すると、T細胞の増殖及びエフェクター機能が阻害される（Carter et al. Eur J Immunol., 32:634-43, 2002）。

30

【0005】

負のチェックポイントシグナルの機能不全は、通常自己反応性のB及びTリンパ球を制御する抑制性シグナルを妨げることにより、慢性炎症状態の一因となる可能性がある。自己免疫障害の患者では、免疫系が正常な身体組織とまるで異物であるかのように反応し、自己抗原に対する寛容性が破壊された活性化T細胞及びB細胞が組織に浸潤できるようになる。結果として、自己免疫T及びBリンパ球が炎症及び組織損傷を媒介する。B及びTリンパ球アテニュエータ（BTLA）、細胞傷害性Tリンパ球抗原-4（CTLA-4）、及びPD-1等の共阻害性分子を発現しているリンパ球は、通常、対応するリガンドを発現する組織における他の免疫細胞又は非免疫細胞によって抑制される。

40

【0006】

50

様々ながんの動物モデルにおいて、共阻害性分子のノックアウト又は共阻害性相互作用の薬理的遮断により、抑制性破壊が解除され、腫瘍特異的T細胞集団の増殖が誘導され、腫瘍細胞を攻撃及び殺傷するように仕向けられることが示されている。BTLAノックアウトマウスは、実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する感受性が増大する(Watanabe et al., Nat. Immunol., 4: 670-679, 2003)。逆に、マウスBTLAを標的とするアゴニスト抗体は、T細胞の活性を抑制することが示されており、移植片対宿主病(GvHD)のマウスモデルにおける有効性が実証されている(Albring et al., J. Exp. Med., 207: 2551-2559, 2010)。

【0007】

BTLAのリガンドは、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー14(TNFRSF14)としても知られているヘルペスウイルス侵入メディエータ(HVEM)である。HVEMは、2つの分泌型成長因子であるリンホトキシンアルファ及びLIGHTに結合する正の共刺激性分子でもあり、単純ヘルペスウイルス(HSV)が細胞内に侵入するためにも使用される。腫瘍細胞又は他の免疫細胞上で発現したHVEMがT細胞上のBTLAに会合すると、負の抑制性シグナルが生じる。BTLAに結合し、アゴナイズする抗BTLA抗体は、ネイティブリガンドであるHVEMが送るのと同様の直接的な負のシグナルを誘導し、それによって自己免疫及び炎症性の疾患における自己反応性のT細胞及びB細胞の応答を抑制することができる。更に、天然のHVEM-BTLA相互作用に干渉することなくBTLAに会合するアゴニスト抗体は、天然の共阻害性シグナルを増強することができる。

【0008】

従って、BTLAに結合し、免疫チェックポイントシグナルを調節することができる剤が必要とされている。

【発明の概要】

【0009】

免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖のポリペプチドを含むBTLA結合剤が本明細書に提供される。また、哺乳類におけるHVEMとBTLAとの相互作用及び／又はT細胞応答を調節するためにBTLA結合剤を使用する方法も本明細書に提供される。

【0010】

また、以下の詳細な説明から明らかになるように、関連する組成物及び方法も提供される。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、ヒトBTLA及びカニクイザルBTLAの細胞外ドメインに対する6G3抗体の表面プラズモン共鳴結合反応速度の結果を示す。

【図2】図2は、ヒトBTLA及びカニクイザルBTLAの細胞外ドメインに対する6G3抗体の結合平衡除外アッセイの結合反応速度の結果を示すグラフである。

【図3】図3は、ヒトBTLA及びカニクイザルBTLAを安定的にトランスフェクトした293c18細胞に対する6G3抗体の結合の結果を示すグラフである。

【図4】図4は、正常ドナーヒト末梢血CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、及びCD20⁺B細胞に対する6G3抗体の結合の結果を示すグラフである。

【図5A】図5Aは、正常カニクイザル末梢血CD3⁺T細胞に対する6G3抗体の結合の結果を示すグラフである。

【図5B】図5Bは、正常カニクイザル末梢血CD20⁺B細胞に対する6G3抗体の結合の結果を示すグラフである。

【図5C】図5Cは、正常カニクイザル末梢血CD3⁺細胞及びCD3⁻細胞に対する参照抗BTLA抗体の結合の結果を示すフローサイトメトリードットプロットである。

【図5D】図5Dは、正常カニクイザル末梢血CD3⁺細胞及びCD3⁻細胞に対する6G3抗体の結合の結果を示すフローサイトメトリードットプロットである。

【図 6】図 6 は、競合アッセイの結果を示すグラフであり、ヒト B T L A を安定的にトランスフェクトした 2 9 3 c 1 8 細胞への結合について、抗 B T L A 抗体が H V E M - F c 及び予め形成された H V E M - F c / 三量体 L I G H T 複合体と競合する能力を示す。

【図 7 A】図 7 A は、ヒト H V E M 細胞外結合ドメインの結晶構造の空間充填モデル（灰色）にドッキングさせたヒト B T L A 細胞外ドメインの結晶構造のリボンモデル図（黒）である。このモデルは、水素-重水素交換実験の結果を示し、これによって 6 G 3 抗体が結合するヒト B T L A 上のペプチドがマッピングされる。

【図 7 B】図 7 B は、ヒト H V E M 細胞外結合ドメインの結晶構造の空間充填モデル（灰色）にドッキングさせたヒト B T L A 細胞外ドメインの結晶構造のリボンモデル図（黒）である。分子は、図 7 A に示した分子の図と比較して 3 0 ° 回転されており、水素-重水素交換実験の結果を示し、これによって参照抗 B T L A アンタゴニスト抗体が結合するヒト B T L A 上のペプチドがマッピングされる。

【図 8】図 8 は、B T L A 及び H V E M が同じ細胞で発現した場合の L I G H T 誘導 H V E M シグナル伝達を測定する H V E M - N F - κ B H E K 2 9 3 ルシフェラーゼレポーターアッセイにおける 6 G 3 抗体の阻害活性を示すグラフである。

【図 9 A】図 9 A は、トランスフェクトされた 2 9 3 c 1 8 細胞の表面における B T L A 及び H V E M の会合を測定した蛍光共鳴エネルギー転移アッセイの結果を示すグラフであり、同じ細胞表面上における B T L A 及び H V E M の結合と競合する抗 B T L A 抗体の能力を示す。

【図 9 B】図 9 B は、トランスフェクトされた 2 9 3 c 1 8 細胞の表面における B T L A 及び H V E M の会合を測定した蛍光共鳴エネルギー転移アッセイの結果を示すグラフであり、蛍光ドナーである抗 B T L A 抗体が抗 H V E M アクセプター抗体と共にエネルギー転移シグナルを産生する能力を示す。

【図 1 0】図 1 0 は、B T L A 及び H V E M が異なる細胞で発現した場合の B T L A 誘導 H V E M シグナル伝達を測定する H V E M - N F - κ B H E K 2 9 3 ルシフェラーゼレポーターアッセイにおける 6 G 3 抗体の部分的阻害活性を示すグラフである。

【図 1 1】図 1 1 は、S H P 2 動員 P a t h H u n t e r J u r k a t B T L A シグナル伝達アッセイにおいて可溶性抗体として添加された 6 G 3 抗体のアゴニスト活性を示すグラフである。

【図 1 2】図 1 2 は、S H P 2 動員 P a t h H u n t e r J u r k a t B T L A シグナル伝達アッセイにおける抗 B T L A 抗体の阻害活性を示すグラフであり、B T L A シグナル伝達は、トランスフェクトされた U - 2 O S 細胞株において H V E M によって誘導した。

【図 1 3】図 1 3 は、F c γ R の会合を提供するために F c γ R I a をトランスフェクトした U - 2 O S 細胞を添加した S H P 2 動員 P a t h H u n t e r J u r k a t B T L A シグナル伝達アッセイにおける 6 G 3 抗体のアゴニスト活性を示すグラフである。

【図 1 4 A】図 1 4 A は、本発明の実施形態に係る本明細書に記載の移植片対宿主病試験のための異種 N S G / H u - P B M C マウスモデルの概略図である。

【図 1 4 B】図 1 4 B は、本発明の実施形態に係る本明細書に記載の N S G / H u - P B M C 移植片対宿主病試験の予定表、投与スケジュール、及びモデル群を示す概略図である。

【図 1 4 C】図 1 4 C は、1 m g / k g 、 3 m g / k g 、又は 1 0 m g / k g の 6 G 3 抗体のいずれかを週 2 回投与した動物群について、N S G / H u - P B M C 移植片対宿主病試験における全生存の結果を示すグラフである。

【図 1 5】図 1 5 は、1 m g / k g 、 3 m g / k g 、及び 1 0 m g / k g (I P) の 6 G 3 抗体を週 2 回投与した後の G v H D のヒト化マウスモデルにおける、投与群毎のヒト s B T L A の個々の及び平均 (S D) の濃度を示すプロットである。血漿サンプルは、試験の中間地点で心臓採血によって回収した。

【図 1 6】図 1 6 は、6 G 3 I g G 4 を投与した後のカニクイザルにおける投与群毎のカニクイザル s B T L A の平均 (S D) 血清濃度を示すプロットである。全ての動物に 6

10

20

30

40

50

G3 IgG4をIV又はSCのいずれかで単回投与し、投与前、投与の3時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、168時間、240時間、336時間、504時間、672時間、及び840時間後に全ての群の動物から血液サンプルを回収した。

【図17】図17は、6G3 IgG4を投与した後のカニクイザルにおける投与群毎のカニクイザルsBTLAの平均(SD)血清濃度を示すプロットである。全ての動物に6G3 IgG4をIV又はSCのいずれかで週1回1日目、8日目、及び15日目に投与し、1日目、8日目、及び15日目に全ての群の全ての動物から血液サンプルを回収した：投与前、投与の3時間、24時間、48時間、72時間、96時間後。

【図18】図18は、6G3 IgG4を投与した後のカニクイザルにおける投与群毎の6G3 IgG4の平均(SD)血清濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)を示すプロットである。全ての動物に6G3 IgG4をIV又はSCのいずれかで週1回1日目、8日目、及び15日目に投与し、1日目、8日目、及び15日目に全ての群の全ての動物から血液サンプルを回収した：投与前、投与の3時間、24時間、48時間、72時間、96時間後。

【図19】図19は、6G3 IgG4、アイソタイプ対照、又はCTL4-Ig対照を投与した後のカニクイザルにおける投与群毎の種々のデータを示す4つのプロットである。最初のプロットは、投与群毎のBTLA発現(MFI)を示す。2番目のプロットは、投与群毎のBTLA+T細胞の割合を示す。3番目のプロットは、投与群毎の血液1 μL あたりのヒトT細胞数を示す。4番目のプロットは、投与群毎のCD25陽性率を示す。

【図20】図20は、6G3 IgG4を投与した後のカニクイザルにおける投与群毎のT細胞及びB細胞の受容体占有率及びBTLA表面発現を示す4つのプロットである。全ての動物に、6G3 IgG4又は対照をIV又はSCのいずれかで週1回1日目、8日目、及び15日目に投与した。最初のプロットは、T細胞上の遊離受容体のベースラインからの変化率を示す。2番目のプロットは、T細胞上のBTLA発現のベースラインからの変化率を示す。3番目のプロットは、B細胞上の遊離受容体のベースラインからの変化率を示す。4番目のプロットは、B細胞におけるBTLA発現のベースラインからの変化率を示す。

【図21A】図21Aは、6G3 IgG4処理したCD3+T細胞にアイソタイプ対照を重ね合わせたヒストグラムとして提示する健常対照及びアトピー性皮膚炎ドナーの2つのヒストグラムである。

【図21B】図21Bは、健常対照及びアトピー性皮膚炎ドナーにおける6G3 IgG4によるT細胞増殖の減少を、増殖の減少率(左)及び分裂指数(右)として示した2つのプロットである。

【図21C】図21Cは、100nMの6G3 IgG4又はアイソタイプ対照の存在下又は非存在下における抗CD3及び抗CD28刺激の72時間後の健常対照及びアトピー性皮膚炎ドナーのPBMC培養上清のIFN γ レベルを示す2つのプロットである。

【図21D】図21Dは、健常対照及びアトピー性皮膚炎ドナーからのCD3+T細胞における表面BTLA発現レベル(平均蛍光強度(MFI)としてプロット)を示すプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖のポリペプチドを含むBTLA結合剤が本明細書に提供される。BTLAは、免疫グロブリン様細胞外ドメイン、免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ(ITIM)、及び免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ(ITSM)を有する、30キロダルトン(kD)の1型膜貫通タンパク質である。BTLAは、B細胞及びT細胞で発現し、腫瘍細胞又はAPCで発現するその受容体であるヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)との相互作用を通してB細胞及びT細胞の両方の活性の負の制御因子として作用する(Watanabe et al., Nat. Immunol., 4:670-679, 2003)。幾つかの実施形態では、BTLA結合剤は

、BTLAとHVEMとの間の結合を阻害することなくBTLAに結合する。一態様では、BTLA結合剤は、BTLAとHVEMとの間の結合を増強する。

【0013】

PD-1結合剤は、免疫グロブリン重鎖可変領域及び免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、これらはそれぞれ、通常CDR1、CDR2、又はCDR3と呼ばれる3つの相補性決定領域(CDR)を含む。CDR領域は、命名法においてそれぞれ重鎖又は軽鎖を意味する「H」又は「L」を用いて参照することもでき、すなわち、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、又はCDRL3である。所与のIg配列のCDRは、Kabat、Chothia、Martin(Enhanced Chothia)、IGMT、又はAHO等の幾つかの従来の付番スキームのいずれかによって決定することができる(これらは、当技術分野において広く知られている付番スキームで一般的に使用されている名称であり、既刊文献に記載されている、例えば、「Kabat」付番スキームについて記載しているKabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Health and Human Services, NIH(1991); 「Chothia」付番スキームについて記載しているChothia, et al., Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins, J. Mol. Biol., 196:901-917(1987)及びAl-Lazikani et al., Standard Conformations for the Canonical Structures of Immunoglobulins, J. Mol. Biol., 273:927-948(1997); 「Martin」又は「Enhanced Chothia」付番スキームについて記載しているAbhinandan et al., Analysis and Improvements to Kabat and Structurally Correct Numbering of Antibody Variable Domains, Mol. Immunol., 45:3832-3839(2008); 「IGMT」付番スキームについて記載しているLefranc et al., The IMGT unique numbering for immunoglobulins, T cell Receptors and Ig-like domains, The Immunologist, 7:132-136(1999)及びLefranc et al., IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and I superfamily V-like domains, Dev. Comp. Immunol., 27:55-77(2003); 並びに「AHO」付番スキームについて記載しているHonegger et al., Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool, J. Mol. Biol. 309:657-670(2001)を参照)。本明細書で提供されるBTLA結合剤は人工物であり、天然には存在しない。これらは実験室の技術によって産生されたものであり、従って、組換え又は合成のアミノ酸配列を含む組換え又は合成の分子と考えるのが適切である。免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖のポリペプチドは、それらが生産される環境(例えば、細胞培養)から取り出され、任意の程度精製されるという意味で、「単離」され得る。

【0014】

本開示の一態様によれば、BTLA結合剤は、配列番号1~15、207、208、217、若しくは218のいずれか1つのアミノ酸配列又は少なくともそれらのCDRを含む;あるいは配列番号1~15、207、208、217、又は218のいずれか1つに対して少なくとも80%(例えば、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少

10

20

30

40

50

なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99%) の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む BTLA 結合剤の免疫グロブリン重鎖ポリペプチドを含む。CDR は、Kabat、Chothia、Martin (Enhanced Chothia)、IGMT、又は Aho 等の任意の公知の付番スキームを用いて決定される通りであってよい。幾つかの実施形態では、CDR1、CDR2、及び CDR3 は、配列番号 1~15、207、208、217、又は 218 の残基 31~35 (CDRH1)、50~66 (CDRH2)、及び 99~106 (CDRH3) を含む。

【0015】

幾つかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖は、以下の CDR :

- (a) Asp Tyr Thr Ile His (配列番号 27) を含む CDRH1 ;
- (b) Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Asp Xaa1 Phe Lys Xaa2 (配列番号 30) (式中、Xaa1 は、リジン (Lys) 又はグルタミン酸 (Glu) であり、Xaa2 は、アスパラギン酸 (Asp) 又はバリン (Val) である) を含む CDRH2 (例えば、配列番号 28、30、31、212、又は 222) ; 及び
- (c) Arg Xaa1 Xaa2 Tyr Xaa3 Met Xaa4 Tyr (配列番号 32) (式中、Xaa1 は、アスパラギン (Asn) 又はセリン (Ser) であり、Xaa2 は、チロシン (Tyr) 又はヒスチジン (His) であり、Xaa3 は、アラニン (Ala) 又はバリン (Val) であり、Xaa4 は、グルタミン酸 (Glu) 又はアスパラギン酸 (Asp) である) を含む CDRH3 を含む。そのような CDRH3 配列の例としては、例えば、配列番号 29、33、34、213、又は 223 が挙げられる。

【0016】

幾つかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖ポリペプチドは、アミノ酸配列 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Xaa1 Thr Xaa2 Thr Asp Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Asp Xaa3 Phe Lys Xaa4 Arg Val Thr Ile Thr Xaa5 Asp Xaa6 Ser Xaa7 Xaa8 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Xaa9 Cys Ala Arg Arg Xaa10 Xaa11 Tyr Xaa12 Met Xaa13 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala (配列番号 26) 又は少なくともその CDR 領域を含む (式中、

- Xaa1 は、フェニルアラニン (Phe) 又はチロシン (Tyr) であり、
- Xaa2 は、フェニルアラニン (Phe) 又はロイシン (Leu) であり、
- Xaa3 は、リジン (Lys) 又はグルタミン酸 (Glu) であり、
- Xaa4 は、アスパラギン酸 (Asp) 又はバリン (Val) であり、
- Xaa5 は、アラニン (Ala) 又はアルギニン (Arg) であり、
- Xaa6 は、リジン (Lys) 又はスレオニン (Thr) であり、
- Xaa7 は、アラニン (Ala) 又はセリン (Ser) であり、
- Xaa8 は、セリン (Ser) 又はスレオニン (Thr) であり、
- Xaa9 は、チロシン (Tyr) 又はフェニルアラニン (Phe) であり、
- Xaa10 は、アスパラギン (Asn) 又はセリン (Ser) であり、
- Xaa11 は、チロシン (Tyr) 又はヒスチジン (His) であり、
- Xaa12 は、アラニン (Ala) 又はバリン (Val) であり、

Xaa13は、グルタミン酸（Glu）又はアスパラギン酸（Asp）である）。幾つかの実施形態では、Ig重鎖ポリペプチドは配列番号26を含むが、ただし、配列番号1～15、207、208、217、又は218のいずれかの同じCDR（CDR1、CDR2、及びCDR3）を保持している。

【0017】

本開示のこの態様によれば、BTLA結合剤の免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドは、配列番号16～25、209、210、219、若しくは220のいずれか1つのアミノ酸配列又は少なくともそれらのCDR；あるいは配列番号16～25、209、210、219、又は220のいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含み得る。Ig重鎖と同様に、CDRは、Kabat、Chothia、Martin（Enhanced Chothia）、IGMT、又はAho等の任意の公知の付番スキームを用いて決定される通りであってよい。幾つかの実施形態では、CDR1、CDR2、及びCDR3は、配列番号16～25、209、210、219、又は220の残基24～34（CDRL1）、50～56（CDRL2）、及び89～97（CDRL3）を含む。

10

20

【0018】

幾つかの実施形態では、Ig軽鎖は、以下のCDR：

- (a) Lys Ala Ser Gln Asn Val Phe Thr Asn Val Ala（配列番号36）を含むCDRL1；
- (b) Ser Ala Ser Tyr Arg Xaa Ser（配列番号39）（式中、Xaaは、チロシン（Tyr）又はセリン（Ser）である）を含むCDRL2（例えば、配列番号37、40、215、又は225）；及び
- (c) Gln Gln Tyr Xaa1 Xaa2 Tyr Pro Tyr Thr（配列番号41）（式中、Xaa1は、セリン（Ser）又はアスパラギン（Asn）であり、Xaa2は、スレオニン（Thr）又はセリン（Ser）である）を含むCDRL3（例えば、配列番号38、41、42、216、又は226）を含む。

30

【0019】

他の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドは、アミノ酸配列 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Phe Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Xaa1 Pro Lys Xaa2 Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Xaa3 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Xaa4 Cys Gln Gln Tyr Xaa5 Xaa6 Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg（配列番号35）又は少なくともそのCDR領域を含む（式中、

40

- Xaa1は、セリン（Ser）又はプロリン（Pro）であり、
- Xaa2は、プロリン（Pro）又はロイシン（Leu）であり、
- Xaa3は、チロシン（Tyr）又はセリン（Ser）であり、
- Xaa4は、チロシン（Tyr）又はフェニルアラニン（Phe）であり、
- Xaa5は、セリン（Ser）又はアスパラギン（Asn）であり、

50

X a a 6 は、スレオニン (Thr) 又はセリン (Ser) である)。幾つかの実施形態では、Ig 軽鎖ポリペプチドは配列番号 35 を含むが、ただし、配列番号 16 ~ 25、209、210、219、又は 220 のいずれか 1 つの同じ CDR (CDR1、CDR2、及び CDR3) を保持している。

【0020】

本開示の別の態様では、BTLA 結合剤は、配列番号 43 ~ 156 のいずれか 1 つ若しくは少なくともそれらの CDR；又は配列番号 43 ~ 156 のいずれか 1 つに対して少なくとも 80%、85%、若しくは 90% の配列同一性（例えば、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖ポリペプチドを含む。CDR は、Kabat、Chothia、Martin (Enhanced Chothia)、IGMT、又は Aho 等の任意の公知の付番スキームを用いて決定される通りであってよい。幾つかの実施形態では、配列番号 66 では CDRH1 が残基 50 ~ 67 であり得、CDRH3 が残基 100 ~ 114 であり得、そして、配列番号 141、150、152、153、155、及び 156 では CDRH3 が残基 100 ~ 114 であり得ることを除いて、CDR1、CDR2、及び CDR3 は、配列番号 43 ~ 156 の残基 31 ~ 35 (CDRH1)、50 ~ 66 (CDRH2)、及び 99 ~ 113 (CDRH3) を含む。

10

20

【0021】

幾つかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖ポリペプチドは、以下の CDR：

(a) $X^1 S X^2 M N$ (配列番号 195) (式中、 X^1 は、N 又は T であり、 X^2 は、W、F、H、G、P、R、K、D、S、L、V、N、又は Y である) を含む CDRH1；

(b) $R I Y P X^1 G X^2 X^3 D T N Y X^4 G K F K$ (配列番号 196) (式中、 X^1 は、存在しないか又は A であり； X^2 は、D、Y、Q、G、L、F、H、S、P、R、又は T であり； X^3 は、G、Y、A、F、S、D、V、T、E、K、又は R であり； X^4 は、N、V、Q、R、A、F、Y、S、G、P、又は T である)

30

を含む CDRH2；および

(c) $X^1 S G T F X^2 X^3 G N Y X^4 X^5 Y F D V$ (配列番号 197) (式中、

X^1 は、K 又は R であり；

X^2 は、N 又は D であり；

X^3 は、D、S、F、Y、F、V、S、G、T、R、I、L、又は E であり；

X^4 は、R 又は H であり；

X^5 は、W、R、F、L、N、Y、P、I、V、A、S、G、R、又は K である)

を含む CDRH3

を含む。

【0022】

幾つかの実施形態では、Ig 重鎖は、配列番号 201 を含む CDRH1、配列番号 202 を含む CDRH2、及び配列番号 203 を含む CDRH3 を含む。

40

【0023】

幾つかの実施形態では、BTLA 結合剤は、配列：

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G Y X^1 F S X^2 S X^3 M N W V
R Q A P G Q G L E W M G R I Y P X^4 G X^5 X^6 D T N Y X^7 G K F K G R V T I T A
D K X^8 T X^9 T A Y M E L X^{10} S L R S E X^{11} T A V X^{12} Y X^{13} C A X^{14} S G
T F X^{15} X^{16} G N Y X^{17} X^{18} Y F D V W G K G T T V T V S S A (配列番号 193
) 又は少なくともその CDR 領域を含む免疫グロブリン重鎖ポリペプチドを含む (式中、 X^1 は、A 又は V であり；

50

X^2 は、N 又は T であり；
 X^3 は、W、F、H、G、P、R、K、D、S、L、V、N、又は Y であり；
 X^4 は、存在しないか又は A であり；
 X^5 が、D、Y、Q、G、L、F、H、S、P、R、又は T であり；
 X^6 は、G、Y、A、F、S、D、V、T、E、K、又は R であり；
 X^7 は、N、V、Q、R、A、F、Y、S、G、P、又は T であり；
 X^8 は、S 又は F であり；
 X^9 は、S、T、又は N であり；
 X^{10} は、S 又は R であり；
 X^{11} は、D 又は V であり；
 X^{12} は、存在しないか又は Y であり；
 X^{13} は、Y 又は F であり；
 X^{14} は、K 又は R であり；
 X^{15} は、N 又は D であり；
 X^{16} は、D、S、F、Y、F、V、S、G、T、R、I、L、又は E であり；
 X^{17} は、R 又は H であり；
 X^{18} は、W、R、F、L、N、Y、P、I、V、A、S、G、R、又は K である）。

10

幾つかの実施形態では、Ig 重鎖ポリペプチドは、配列番号 193 を含むが、ただし、配列番号 43～156 のいずれかの同じ CDR (CDR1、CDR2、及び CDR3) を保持している。

20

【0024】

本開示のこの態様によれば、結合剤は、配列番号 157～192 のいずれか若しくは少なくともそれらの CDR；又は配列番号 157～192 のいずれか 1 つに対して少なくとも 80%、85%、若しくは 90% の配列同一性（例えば、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む Ig 軽鎖を更に含む。CDR は、Kabata、Chothia、Martin (Enhanced Chothia)、IGMT、又は Aho 等の任意の公知の付番スキームを用いて決定される通りであってよい。幾つかの実施形態では、CDR1、CDR2、及び CDR3 は、配列番号 157～192 の残基 24～34 (CDRL1)、50～56 (CDRL2)、及び 89～97 (CDRL3) を含む。

30

【0025】

幾つかの実施形態では、BTLA 結合剤は、

(a) $RX^1SENIYX^2X^3LA$ (配列番号 198) (式中、

X^1 は、A 又は V であり；

X^2 は、S 又は N であり；

X^3 は、H、N、又は Y である)

40

を含む CDRL1；

(b) $X^1AX^2NLAX^3$ (配列番号 199) (式中、

X^1 は、A 又は N であり；

X^2 は、T 又は K であり；

X^3 は、N、L、Q、G、F、V、K、S、R、T、H、又は P である)

を含む CDRL2；および

(c) QX^1FX^2GPPLT (配列番号 200) (式中、

X^1 は、L 又は H であり；

X^2 は、W、F、Y、P、N、V、K、M、L、G、又は S である)

を含む CDRL3

50

を含む免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドを含み得る。

【0026】

幾つかの実施形態では、Ig軽鎖は、配列番号204を含むCDRL1、配列番号205を含むCDRL2、及び配列番号206を含むCDRL3を含む。

【0027】

幾つかの実施形態では、免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドは、配列：

X¹IQX²TQSPSSLASVGDRTITCRX³SENIYX⁴X⁵LAW
YQQKX⁶GKAPKLLIYX⁷AX⁸NLAX⁹GVPSRFSGSGSGTDX
1⁰TLTISSSLQPEDFATYYCQX¹¹FX¹²GPPLTFGGGTKVE
IKR（配列番号194）又は少なくともそのCDRを含む（式中、

X¹は、A又はDであり；

X²は、L又はMであり；

X³は、A又はVであり；

X⁴は、S又はNであり；

X⁵は、H、N、又はYであり；

X⁶は、P又はQであり；

X⁷は、A又はNであり；

X⁸は、T又はKであり；

X⁹は、N、L、Q、G、F、V、K、S、R、T、H、又はPであり；

X¹⁰は、F又はYであり；

X¹¹は、L又はHであり；

X¹²は、W、F、Y、P、N、V、K、M、L、G、Sである）。幾つかの実施形態では、Ig軽鎖ポリペプチドは、配列番号194を含むが、ただし、配列番号157～192のいずれか1つの同じCDR（CDR1、CDR2、及びCDR3）を保持している。

【0028】

一実施形態によれば、BTLA結合剤は、配列番号144の免疫グロブリン重鎖可変領域又はそれに対して少なくとも80%、85%、若しくは90%の配列同一性（例えば、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性）を有するアミノ酸配列；あるいは少なくとも配列番号144のCDRを含む免疫グロブリン重鎖可変領域であって、該CDRの領域が、上に提供された通りである（例えば、CDR1－配列番号201、CDR2－配列番号202、及びCDR3－配列番号203）か又は種々の公知の免疫グロブリン付番スキーム（例えば、Kabata、Chothia、Martin（Enhanced Chothia）、IGMT、又はAho）のいずれかに従って決定される通りである免疫グロブリン重鎖可変領域と；配列番号174の免疫グロブリン軽鎖可変領域又はそれに対して少なくとも80%、85%、若しくは90%の配列同一性（例えば、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の配列同一性）を有するアミノ酸配列；あるいは少なくとも配列番号174のCDRを含む免疫グロブリン軽鎖可変領域であって、該CDRの領域が、上に提供された通りである（例えば、CDR1－配列番号204、CDR2－配列番号205、及びCDR3－配列番号206）か又は種々の公知の免疫グロブリン付番スキーム（例えば、Kabata、Chothia、Martin（Enhanced Chothia）、IGMT、又はAho）のいずれかに従っ

て決定される通りである免疫グロブリン軽鎖可変領域と；を含む。幾つかの実施形態では、抗体は、配列番号144の重鎖可変領域及び配列番号174の軽鎖可変領域、又は少なくともK a b a tによって決定されたそのC D Rを含む。幾つかの実施形態では、抗体は、配列番号144の重鎖可変領域及び配列番号174の軽鎖可変領域、又は少なくともC h o t h i aによって決定されたそのC D Rを含む。幾つかの実施形態では、抗体は、配列番号144の重鎖可変領域及び配列番号174の軽鎖可変領域、又は少なくともM a r t i nによって決定されたそのC D Rを含む。幾つかの実施形態では、抗体は、配列番号144の重鎖可変領域及び配列番号174の軽鎖可変領域、又は少なくともI G M Tによって決定されたそのC D Rを含む。幾つかの実施形態では、抗体は、配列番号144の重鎖可変領域及び配列番号174の軽鎖可変領域、又は少なくともA H oによって決定されたそのC D Rを含む。

10

【0029】

また、本明細書に記載の免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖のポリペプチドを含むB T L A結合剤と同じエピトープに結合するB T L A結合剤も提供される。幾つかの実施形態では、B T L A結合剤は、配列番号144の重鎖可変領域及び配列番号174の軽鎖可変領域を含むB T L A結合剤と同じエピトープに結合する。幾つかの実施形態では、B T L A結合剤は、配列番号5の重鎖可変領域及び配列番号17を含む軽鎖可変領域を含むB T L A結合剤；配列番号207の重鎖可変領域及び配列番号209を含む軽鎖可変領域を含むB T L A結合剤；又は配列番号217の重鎖可変領域及び配列番号219を含む軽鎖可変領域を含むB T L A結合剤と同じエピトープに結合する。B T L A結合剤は、本明細書に記載の免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖のポリペプチドを含むB T L A結合剤とB T L Aへの結合について競合する場合、同じエピトープに結合すると考えられる。幾つかの実施形態では、ヒトB T L A（例えば、配列番号227及び／又は228）のアミノ酸残基52～65及び／又は100～106（参照配列U n i P r o t I D Q 7 Z 6 A 9又は天然に存在するバリエーションヒトB T L Aの対応する配列位置）に結合するB T L A結合剤が本明細書に提供される。幾つかの実施形態では、ヒトB T L A（例えば、配列番号229、230、及び／又は231）のアミノ酸残基46065、82～91、又は100～106（参照配列U n i P r o t I D Q 7 Z 6 A 9又は天然に存在するバリエーションヒトB T L Aの対応する配列位置）に結合するB T L A結合剤が本明細書に提供される。

20

【0030】

核酸又はアミノ酸の配列に関連して使用するとき、配列「同一性」は、対象となる核酸又はアミノ酸の配列を参照の核酸又はアミノ酸の配列と比較することによって求めることができる。同一性パーセントとは、最適にアライメントしたときに、対象の配列と参照配列の間で同じ（すなわち、同一）であるヌクレオチド又はアミノ酸の残基の割合である。最適なアライメントを得、2つ以上の配列間の同一性を計算するための多数の数学的アルゴリズムが知られており、公的に利用可能である。そのようなプログラムの例としては、C L U S T A L - W、T - C o f f e e、及びA L I G N（核酸及びアミノ酸の配列をアライメントするため）、B L A S Tプログラム（例えば、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n（B e t h e s d a, M D）によって運用されているB L A S T 2. 1、B L 2 S E Q、及びその新しいバージョン）、並びにF A S T Aプログラム（例えば、F A S T A 3 x、F A S T M、及びS E A R C H）（配列アライメント及び配列類似性検索のため）が挙げられる。また、配列アライメントアルゴリズムは、例えば、A l t s c h u l e t a l., J. M o l e c u l a r B i o l., 215 (3): 403-410 (1990)、B e i g e r t e t a l., P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, 106 (10): 3770-3775 (2009)、D u r b i n e t a l., e d s., B i o l o g i c a l S e q u e n c e A n a l y s i s: P r o b a l i s t i c M o d e l s o f P r o t e i n s a n d N u c l e i c A c i d s, C a m b r i d g e U n i v e r s i t y P r e s s, C a m b r i d g e, U K (2009)、S o d i n g, B i o i n f o r m a t i c s, 21 (7): 951-960 (2005)

30

40

50

)、Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25 (17): 3389-3402 (1997)、及びGusfield, Algorithms on Strings, Trees and Sequences, Cambridge University Press, Cambridge UK (1997)に開示されている。

【0031】

上に具体的に記載した重鎖及び軽鎖の配列と100%未満の同一性を有する配列に関して、ポリペプチドの活性（例えば、BTLA結合剤の一部として存在する場合にBTLAに結合する能力）が実質的に保持されている限り、前述の免疫グロブリン重鎖ポリペプチド及び／若しくは軽鎖ポリペプチドの1つ以上のアミノ酸を異なるアミノ酸で置き換え若しくは置換してもよい、並びに／又はより多くのアミノ酸のうちの1つを開示されているアミノ酸配列から欠失若しくは該アミノ酸配列に挿入してもよい。BTLA結合剤の「生物活性」とは、（例えば、BTLAのその受容体への結合を阻害しない及び／又はインビボにおけるBTLA活性（例えば、IC₅₀）を阻害しない）特定のBTLAエピトープについての結合親和性、薬物動態、及び（例えば、BTLAタンパク質の非ヒトのホモログ若しくはオルソログ、又は他のタンパク質若しくは組織との）交差反応を指す。幾つかの実施形態では、BTLA結合剤の生物活性は、BTLAのその受容体（複数可）への結合を増強する及び／又はその他の方法でインビボにおいてBTLA活性を増大させる剤の能力を含む。当技術分野において認識されている抗原結合剤の他の生物学的特性又は特徴としては、例えば、結合力、選択性、可溶性、フォールディング、免疫毒性、発現、及び処方が挙げられる。前述の特性又は特徴は、ELISA、競合ELISA、表面プラズモン共鳴分析（BIACORE（商標））、又は溶液相競合（KINEXA（商標））、インビトロ若しくはインビボ中和アッセイ、受容体ーリガンド結合アッセイ、サイトカイン若しくは成長因子の生産及び／若しくは分泌アッセイ、並びにシグナル伝達及び免疫組織化学アッセイを含むがこれらに限定されない標準技術を用いて観察、測定、及び／又は評価することができる。

【0032】

アミノ酸の置き換え又は置換は、保存的、半保存的、又は非保存的であり得る。「保存的アミノ酸置換」又は「保存的変異」という語句は、あるアミノ酸を共通の特性を有する別のアミノ酸で置き換えることを指す。個々のアミノ酸間の共通の特性を定義するための機能的な方法は、相同な生物の対応するタンパク質間でアミノ酸変化の正規化された頻度を解析することである（Schulz and Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979)）。このような解析によれば、グループ内のアミノ酸が互いに優先的に交換され、従って、タンパク質構造全体に対する影響において互いに最も類似しているアミノ酸のグループを定義することができる（Schulz and Schirmer、上掲）。

【0033】

アミノ酸は、「芳香族」又は「脂肪族」に大別される。芳香族アミノ酸は、芳香環を含む。「芳香族」アミノ酸の例としては、ヒスチジン（H又はHis）、フェニルアラニン（F又はPhe）、チロシン（Y又はTyr）、及びトリプトファン（W又はTrp）が挙げられる。非芳香族アミノ酸は、「脂肪族」に大別される。「脂肪族」アミノ酸の例としては、グリシン（G又はGly）、アラニン（A又はAla）、バリン（V又はVal）、ロイシン（L又はLeu）、イソロイシン（I又はIle）、メチオニン（M又はMet）、セリン（S又はSer）、スレオニン（T又はThr）、システイン（C又はCys）、プロリン（P又はPro）、グルタミン酸（E又はGlu）、アスパラギン酸（A又はAsp）、アスパラギン（N又はAsn）、グルタミン（Q又はGln）、リジン（K又はLys）、及びアルギニン（R又はArg）が挙げられる。

【0034】

脂肪族アミノ酸は、4つのサブグループに細分化することができる。「大脂肪族非極性

サブグループ」は、バリン、ロイシン、及びイソロイシンからなる。「脂肪族微極性サブグループ」は、メチオニン、セリン、スレオニン、及びシステインからなる。「脂肪族極性／荷電サブグループ」は、グルタミン酸、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、リジン、及びアルギニンからなる。「小残基サブグループ」は、グリシン及びアラニンからなる。荷電／極性アミノ酸のグループは、3つのサブグループ：リジン及びアルギニンからなる「正荷電サブグループ」、グルタミン酸及びアスパラギン酸からなる「負荷電サブグループ」、並びにアスパラギン及びグルタミンからなる「極性サブグループ」に細分化することができる。

【0035】

芳香族アミノ酸は、ヒスチジン及びトリプトファンからなる「窒素環サブグループ」並びにフェニルアラニン及びチロシンからなる「フェニルサブグループ」の2つのサブグループに細分化することができる。

【0036】

保存的アミノ酸置換の例としては、上記サブグループ内のアミノ酸の置換、例えば、正電荷が維持され得るようなアルギニンのリジンによる置換（逆も同様）、負電荷が維持され得るようなアスパラギン酸のグルタミン酸による置換（逆も同様）、遊離－OHが維持され得るようなスレオニンのセリンによる置換、及び遊離－NH₂が維持され得るようなアスパラギンのグルタミンによる置換が挙げられる。「半保存的変異」は、上に列挙した同じグループ内であるが、同じサブグループ内ではないアミノ酸のアミノ酸置換を含む。例えば、アスパラギンのアスパラギン酸による又はリジンのアスパラギンによる置換には、同じグループ内であるが、異なるサブグループ内のアミノ酸が関与している。「非保存的変異」は、異なるグループ間でのアミノ酸置換、例えば、トリプトファンのリジンによる又はセリンのフェニルアラニンによる置換等を含む。

【0037】

前述の変異（例えば、置換）は、Ig鎖の任意の領域で行われてよい。幾つかの実施形態では、免疫グロブリンの重鎖ポリペプチド及び／又は軽鎖ポリペプチドのCDR（例えば、CDR1、CDR2、又はCDR3）におけるアミノ酸（複数可）が置換される；他の実施形態では、フレームワーク領域におけるアミノ酸（複数可）が置換され、CDRでは置換されない；更に他の実施形態では、フレームワーク領域及びCDRの両方におけるアミノ酸が置換される。幾つかの実施形態では、前述の変異は、CDR以外の領域で行われる。言い換えれば、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、本明細書で提供される配列に対して規定の配列同一性を有することができるが、具体的に提供される配列のCDRを保持することができる。

【0038】

更に、BTLA結合剤の文脈におけるポリペプチドの機能を抑制しない限り（例えば、BTLAのその受容体への結合を阻害することなく、ポリペプチドを含む結合剤がBTLAに結合することを妨げない限り）、1つ以上のアミノ酸を前述の免疫グロブリンの重鎖ポリペプチド及び／又は軽鎖ポリペプチドに挿入してもよい。任意の数の任意の好適なアミノ酸を、免疫グロブリンの重鎖ポリペプチド及び／又は軽鎖ポリペプチドのアミノ酸配列に挿入してよい。幾つかの実施形態では、少なくとも1個のアミノ酸（例えば、2個以上、5個以上、又は10個以上のアミノ酸）であるが、20個以下のアミノ酸（例えば、18個以下、15個以下、又は12個以下のアミノ酸）を、免疫グロブリンの重鎖ポリペプチド及び／又は軽鎖ポリペプチドのアミノ酸配列に挿入してよい。他の実施形態では、1～10個のアミノ酸（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、又は10個のアミノ酸）が、免疫グロブリンの重鎖ポリペプチド及び／又は軽鎖ポリペプチドのアミノ酸配列に挿入される。これに関して、任意の好適な位置で前述の免疫グロブリンの重鎖ポリペプチド及び／又は軽鎖ポリペプチドのいずれか1つにアミノ酸（複数可）を挿入してよい。幾つかの実施形態では、免疫グロブリンの重鎖ポリペプチド及び／又は軽鎖ポリペプチドのCDR（例えば、CDR1、CDR2、又はCDR3）にアミノ酸（複数可）が挿入される；他の実施形態では、フレームワーク領域にアミノ酸（複数

可) が挿入され、C D Rには挿入されない；更に他の実施形態では、フレームワーク領域及びC D Rの両方にアミノ酸が挿入される。

【0039】

本発明の単離された免疫グロブリンの重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドは、本明細書に記載の特定のアミノ酸配列を含むポリペプチドに限定されるものではなく、B T L A結合剤に含まれる場合、B T L Aに対する結合について本発明の免疫グロブリンの重鎖ポリペプチド又は軽鎖ポリペプチドと競合する任意の重鎖ポリペプチド又は軽鎖ポリペプチドも含む。これに関して、例えば、免疫グロブリンの重鎖ポリペプチド又は軽鎖ポリペプチドは、B T L A結合剤に含まれる場合、本明細書に記載の重鎖及び軽鎖のポリペプチドによって認識されるB T L Aの同じエピトープに結合する任意の重鎖ポリペプチド又は軽鎖ポリペプチドであってよい。抗体競合は、E L I S A、ウェスタンブロット、又は免疫組織化学的方法を利用するルーチンのペプチド競合アッセイを用いてアッセイすることができる（例えば、米国特許第4, 828, 981号及び同第8, 568, 992号；並びにB r a i t b a r d e t a l . , P r o t e o m e S c i . , 4 : 12 (2006)を参照）。

10

【0040】

B T L A結合剤は、B T L Aタンパク質に特異的に結合する本明細書に記載の免疫グロブリンの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むタンパク質性分子（例えば、抗体又はその抗原結合性断片）である。幾つかの実施形態では、B T L A結合剤は、B T L Aのその受容体への結合を抑制することなく、又は幾つかの実施形態では阻害することなくB T L Aに結合する。幾つかの実施形態では、B T L A結合剤は、B T L Aが媒介するシグナル伝達を増加させるようにB T L AのH V E Mへの結合を増強する。B T L Aのその受容体への結合又はB T L Aが媒介するシグナル伝達に関して本明細書で使用するとき、「阻害する」という用語は、結合剤の非存在下におけるそのような結合又はシグナル伝達と比較して、結合剤の存在下におけるB T L Aのその受容体への結合又はB T L A-H V E Mが媒介するシグナル伝達を（全体又は部分的に）実質的に拮抗、禁止、防止、制限、減速、妨害、変更、排除、又は停止する能力を指す。B T L Aのその受容体への結合又はB T L Aが媒介するシグナル伝達に関して使用するとき、「増加」又は「増強」という用語は、結合剤の非存在下におけるそのような結合又はシグナル伝達と比較して、結合剤の存在下において任意の方法で任意の程度そのような結合又はシグナル伝達を増加又は増強することを意味する。幾つかの実施形態では、B T L Aのその受容体への結合又はB T L Aが媒介するシグナル伝達は、B T L A活性の欠損に関連する若しくはB T L A活性の増強によって利益を得る疾患若しくは病態の任意の症状を低減若しくは軽減するのに、又はそのような疾患若しくは病態の進行又は重症度を逆行させるのに十分に増加する。幾つかの実施形態では、B T L A結合剤は、B T L A-受容体結合を25%超阻害しない（例えば、B T L A-受容体結合を10%超又は5%超阻害しない）。幾つかの実施形態では、B T L A結合剤は、B T L A結合剤の非存在下におけるB T L Aの活性と比較して、少なくとも約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約100%、又は上述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲だけB T L A-受容体結合を増加させる。

20

30

40

【0041】

B T L A結合剤は、B T L A及び別の抗原に結合する多重特異性（例えば、二重特異性又は「二重反応性」）コンストラクト（例えば、二重特異性又は二重反応性の抗体等の多重特異性抗体）の一部であってよい。そのようなコンストラクトは、B T L A以外の抗原に結合する免疫グロブリンからの免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖と組み合わせた、本明細書に記載のB T L Aに結合する免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖のポリペプチドを含んでいてよい。そのような二重特異性B T L A結合剤は、例えば、B T L Aと、細胞傷害性Tリンパ球抗原-4（C T L A-4）、T細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン-3（T I M-3）、プログラム死1（P D-1）、並びに／又はリンパ球活性化遺伝子3タンパク質（L A G-3）等の免疫系の別の負の制御因子とに結合することができる。そのような

50

他の標的抗原に結合する免疫グロブリンは、当技術分野において公知である。

【0042】

抗体コンジュゲートも本明細書に提供される。例えば、BTLA結合剤は、(1)抗BTLA抗体又はその断片と、(2)二次タンパク質又は非タンパク質の部分とのコンジュゲートであってよい。更に例示すると、BTLA結合剤は、別のペプチド、蛍光分子、又は化学療法剤にコンジュゲートした抗BTLA抗体又はその断片を含んでいてよい。

【0043】

幾つかの実施形態では、BTLA結合剤は、免疫グロブリン「全体」又は抗原結合免疫グロブリン「断片」であり得る。免疫グロブリン「全体」は、典型的には、4つのポリペプチド：2つの重(H)鎖ポリペプチド及び2つの軽(L)鎖ポリペプチドからなる。各重鎖は、1つのN末端可変(V_H)領域と3つのC末端定常(C_{H1}、C_{H2}、及びC_{H3})領域とを含み、各軽鎖は、1つのN末端可変(V_L)領域と1つのC末端定常(C_L)領域とを含む。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて2つの異なる種類のうちの1つ、カッパ(κ)又はラムダ(λ)のいずれかに割り当てられ得る。典型的な免疫グロブリンでは、各軽鎖はジスルフィド結合によって重鎖に連結されており、2本の重鎖はジスルフィド結合によって互いに連結されている。この構成では、軽鎖可変領域は、一般に重鎖の可変領域と整列し、軽鎖定常領域は、一般に重鎖の第1の定常領域と整列する。重鎖の残りの定常領域は、一般に、互いに整列する。

【0044】

軽鎖及び重鎖の各対の可変領域又は超可変領域は、抗体の抗原結合部位を形成する。V_H及びV_L領域は同じ一般構造を有し、各領域は4つのフレームワーク(FW又はFR)領域を含む。本明細書で使用する時、「フレームワーク領域」という用語は、超可変領域と相補的決定領域(CDR)との間に位置する可変領域内の比較的保存されたアミノ酸配列を指す。各可変ドメインには4つのフレームワーク領域があり、これらは、FR1、FR2、FR3、及びFR4と呼ばれている。フレームワーク領域は、可変領域の構造骨組を提供するβシートを形成する(例えば、C. A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)を参照)。フレームワーク領域は、3つの相補性決定領域(CDR)によって接続されている。CDR1、CDR2、及びCDR3として知られている3つのCDRは抗体の「超可変領域」を形成し、これは、一般に抗原結合に関与すると考えられる。

【0045】

用語「抗体断片」及び類似の用語(例えば、「抗体の断片」、「抗体断片」、「抗体の機能的断片」)は、本明細書において互換的に用いられ、抗原に特異的に結合する能力を保持している抗体の1つ以上の断片又は部分を意味する(一般に、Holliger et al., Nat. Biotech., 23(9):1126-1129(2005)を参照)。抗体「断片」は、本明細書で使用する時、当技術分野で日常的に使用されている通り、文字通りの意味での抗体全体の断片又は小片だけでなく、抗体の断片に加えて天然の抗体には存在しないリンカー又は他の要素を含む場合がある他の公知の操作された抗体様コンストラクトも含む。抗体断片は、例えば、1つ以上(又は全て)のCDR、可変領域(又はその一部)、定常領域(又はその一部)、又はそれらの幾つかの組み合わせを含み得る。抗体断片の例としては、(i) V_L、V_H、C_L、及びC_{H1}のドメインからなる一価断片であるFab断片、(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab')₂断片、(iii) 抗体の単一アームのV_L及びV_HのドメインからなるFv断片、(iv) 穏やかな還元条件を用いてF(ab')₂断片のジスルフィド架橋を破壊した結果生じるFab'断片、(v) ジスルフィド安定化Fv断片(dsFv)、並びに(vi) 抗原に特異的に結合する抗体単一可変領域ドメイン(V_H又はV_L)ポリペプチドであるドメイン抗体(dAb)が挙げられるが、これらに限定されない。BTLA結合剤は、一本鎖抗体断片であってもよい。一本鎖抗体断片の例としては、(i) 2つのドメインを単一のポリペプチド鎖として合成す

10

20

30

40

50

ることを可能にする合成リンカーによって接合されたFv断片の2つのドメイン（すなわち、V_L及びV_H）からなる一価分子である一本鎖Fv（scFv）（例えば、Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988); 及びOsbourne et al., Nat. Biotechnol., 16: 778 (1998)を参照）、及び(ii)短すぎて同じポリペプチド鎖におけるV_HとV_Lとの間を対合させることができないペプチドリinkerによってV_Lに連結されたV_Hを各々含み、それによって、異なるV_H-V_Lポリペプチド鎖における相補的ドメイン間の対合を駆動して2つの機能的抗原結合部位を有する二量体分子を産生する、ポリペプチド鎖の二量体であるダイアボディが挙げられるが、これらに限定されない。抗体断片は、当技術分野において公知であり、例えば、米国特許出願公開第2009/0093024 A1号により詳細に記載されている。

10

【0046】

幾つかの実施形態では、BTLA結合剤は、断片結晶化可能（Fc）領域又はその一部の重鎖定常領域を含む。Fc領域は、任意のIgクラス／サブクラス（IgA（IgA1、IgA2）、IgD、IgE、IgG（IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4）、IgM、そのバリエーションを含む）であってよい。幾つかの実施形態では、BTLA結合剤は、「全体」又は「完全」Ig（すなわち、抗体）である。幾つかの実施形態では、BTLA結合剤は、IgG1又はIgG4等のIgG Fc領域を含む。例えば、BTLA結合剤は、IgG1又はIgG4の抗体であり得る。幾つかの実施形態では、BTLA結合剤は、それぞれ配列番号144及び174を含む可変重鎖領域及び可変軽鎖領域、又は少なくともそれらのCDR（本明細書に提供される通り、又はKabata、Chothia、Martin（Enhanced Chothia）、IGMT、若しくはAhoの付番に従って決定する通り）、又はそれらに対して90%の同一性を有する配列を含み、該BTLA結合剤は、IgG1抗体である。幾つかの実施形態では、BTLA結合剤は、それぞれ配列番号144及び174を含む可変重鎖領域及び可変軽鎖領域、又は少なくともそれらのCDR（本明細書に提供される通り、又はKabata、Chothia、Martin（Enhanced Chothia）、IGMT、若しくはAhoの付番に従って決定する通り）、又はそれらに対して90%の同一性を有する配列を含み、該BTLA結合剤は、IgG4抗体である。

20

30

【0047】

BTLA結合剤は、ヒト抗体、非ヒト抗体、若しくはキメラ抗体であってもよく、それらから得られたものであってもよい。「キメラ」とは、ヒト領域及び非ヒト領域を両方含む抗体又はその断片を意味する。好ましくは、BTLA結合剤は、ヒト化抗体である。「ヒト化」抗体とは、ヒト抗体の足場と、非ヒト抗体から得られた又は由来する少なくとも1つのCDRとを含むモノクローナル抗体である。非ヒト抗体としては、例えば、げっ歯類（例えば、マウス又はラット）等の任意の非ヒト動物から単離された抗体が挙げられる。ヒト化抗体は、非ヒト抗体から得られた又は由来する1つ、2つ、又は3つのCDRを含み得る。本発明の一実施形態では、本発明のBTLA結合剤のCDRH3は、マウスモノクローナル抗体から得られたか又は由来するが、本発明のBTLA結合剤の残りの可変領域及び定常領域は、ヒトモノクローナル抗体から得られたか又は由来する。

40

【0048】

ヒト抗体、非ヒト抗体、キメラ抗体、又はヒト化抗体は、インビトロ供給源（例えば、ハイブリドーマ又は組換え的に抗体を生産する細胞株）及びインビボ供給源（例えば、げっ歯類）を介するものを含む、任意の手段によって得ることができる。抗体を産生する方法は当技術分野において公知であり、例えば、Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 5: 511-519 (1976); Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988); 及びJaneway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publis

50

hing, New York, NY (2001)に記載されている。特定の実施形態では、ヒト抗体又はキメラ抗体は、1つ以上の内因性免疫グロブリン遺伝子が1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子で置き換えられたトランスジェニック動物（例えば、マウス）を用いて産生することができる。内因性抗体遺伝子がヒト抗体遺伝子で有効に置き換えられたトランスジェニックマウスの例としては、Medarex HUMAB-MOUSE（商標）、Kirin TC MOUSE（商標）、及びKyowa Kirin KM-MOUSE（商標）が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Lonberg, Nat. Biotechnol., 23(9):1117-25(2005)及びLonberg, Handb. Exp. Pharmacol., 181:69-97(2008)を参照）。ヒト化抗体は、当該技術分野で公知の任意の好適な方法を用いて産生することができ（例えば、An, Z. (ed.), Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2009)を参照）、例えば、非ヒトCDRのヒト抗体足場への移植を含む（例えば、Kashmiri et al., Methods, 36(1):25-34(2005); 及びHou et al., J. Biochem., 144(1):115-120(2008)を参照）。一実施形態では、ヒト化抗体は、例えば、米国特許出願公開第2011/0287485 A1号に記載の方法を用いて生産することができる。

10

【0049】

BTLA結合剤は、そのエピトープに対する任意の特定の親和性によって制限されることはない。「親和性」という用語は、2つの剤の可逆的な結合についての平衡定数を指し、解離定数(K_D)として表される。しかし、幾つかの実施形態では、BTLAは、約1ピコモル濃度(pM)～約100マイクロモル濃度(μ M)（例えば、約1ピコモル濃度(pM)～約1ナノモル濃度(nM)、約1nM～約1マイクロモル濃度(μ M)、又は約1 μ M～約100 μ M)のBTLAについての親和性を有し得る。一実施形態では、BTLA結合剤は、1ナノモル濃度以下（例えば、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM、0.05nM、0.025nM、0.01nM、0.001nM、又は前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲）の K_D でBTLAタンパク質に結合することができる。別の実施形態では、BTLA結合剤は、200pM以下（例えば、190pM、175pM、150pM、125pM、110pM、100pM、90pM、80pM、75pM、60pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM、5pM、1pM、又は前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲）の K_D でBTLAに結合することができる。対象となる抗原又はエピトープに対する免疫グロブリンの親和性は、任意の当該技術分野において認識されているアッセイを使用して測定することができる。このような方法としては、例えば、蛍光活性化細胞選別(FACS)、分離可能ビーズ（例えば、磁気ビーズ）、表面プラズモン共鳴(SPR)、溶液相競合(KINEXA（商標））、抗原パニング、競合結合アッセイ、及び／又はELISAが挙げられる（例えば、Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th ed., Garland Publishing, New York, NY, 2001を参照）。幾つかの実施形態では、BTLA結合剤は、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて測定した場合、上記の通りのBTLAに対する親和性（例えば、1nM以下又は200pM以下）を有する。幾つかの実施形態では、BTLA結合剤は、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて測定した場合、上記の通りのBTLAに対する親和性（例えば、1nM以下又は200pM以下）を有する。

20

30

40

【0050】

本明細書で提供されるBTLA結合剤は、哺乳類におけるBTLAシグナル伝達の調節（例えば、促進又は増強）、哺乳類における免疫応答の調節（例えば、阻害）、及び／又はBTLAシグナル伝達の欠損に関連する（例えば、BTLAが媒介する免疫応答に関連する）疾患若しくは病態の治療若しくは予防等の任意の目的のために使用することができ

50

る。従って、一態様では、本発明は、哺乳類における B T L A シグナル伝達を促進又は増強する方法であって、本明細書に記載の B T L A 結合剤を該哺乳類に投与し、それによって、該 B T L A 結合剤が、B T L A の H V E M への結合を促進若しくは増強するか又は他の方法で B T L A シグナル伝達を促進若しくは増強する方法を提供する。

【0051】

哺乳類は、B T L A シグナル伝達の欠損に関連する又は B T L A が媒介する免疫応答に関連する疾患若しくは病態に罹患している哺乳類であり得る。例えば、哺乳類は、免疫抑制によって改善される疾患又は病態に罹患している場合がある。そのような疾患は、B T L A アゴニズムに応答し、その結果、哺乳類に B T L A 結合剤を投与することによって疾患又は病態が治療又は予防される。B T L A シグナル伝達に関連し、B T L A アゴニズムに
10 応答する疾患、病態、又は障害は、B T L A 活性の増加が哺乳類、好ましくはヒトにおいて治療上の利益を有する、又は B T L A の低発現若しくは活性の低下が疾患若しくは障害の病理学的作用を引き起こすか若しくはそれに寄与する任意の疾患又は障害であり得る。いかなる理論にも作用機序にも束縛されることを望むものではないが、B T L A 結合剤は、免疫抑制性の B T L A - H V E M シグナル伝達を促進し、その結果、免疫応答を抑制すると考えられる。

【0052】

「免疫応答」は、例えば、抗体生産及び／若しくは免疫エフェクター細胞（例えば、T 細胞）の活性化、炎症性サイトカインの生産、又は本明細書に記載されているか若しくは他の方法で当技術分野において公知の適応症若しくは障害のいずれかを伴い得る。本明細書で使用する
20 とき、「治療」、「治療する」等の用語は、所望の薬理学的及び／又は生理学的な効果を得ることを指す。好ましくは、効果は治療的である、すなわち、効果は、疾患及び／又は該疾患に起因し得る有害な症状を部分的又は完全に治療させる。この目的のために、本発明の方法は、「治療的に有効な量」の B T L A 結合剤を投与することを含む。「治療的に有効な量」とは、所望の治療結果を達成するために必要な投与量及び期間で有効な量を指す。治療的に有効な量は、疾患の状態、個体の年齢、性別、及び体重、並びに個体において所望の応答を惹起する B T L A 結合剤の能力等の要因に応じて変化し得る。

【0053】

あるいは、薬理学的及び／又は生理学的な効果は予防的であってもよい、すなわち、その効果は、疾患又はその症状を完全に又は部分的に予防する。これに関して、本発明の方法は、「予防的に有効な量」の B T L A 結合剤を投与することを含む。「予防的に有効な量」とは、所望の予防結果（例えば、疾患の発症の予防）を達成するために必要な投与量及び期間で有効な量を指す。
30

【0054】

B T L A 結合剤は、抗原に対する免疫応答を抑制し、異常又は過剰な免疫応答に関連する任意の疾患又は病態を治療するために有用である。疾患又は障害は、炎症性又は自己免疫性の障害であり得る。炎症性又は自己免疫性の障害の例としては、例えば、感染症（ウイルス性、細菌性、真菌性、及び寄生虫性）、感染に伴う内毒素性ショック、関節炎、関節リウマチ、喘息、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、骨盤内炎症性疾患、ベーチェット病、アルツハイマー病；クローン病及び潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患；ペイロニー病、セリアック病、胆嚢疾患、毛巣疾患、腹膜炎、乾癬、乾癬性関節炎、血管炎、抗好中球細胞質抗体関連（A N C A）血管炎、外科的癒着、脳卒中、I 型糖尿病、ライム病、関節炎、髄膜脳炎、自己免疫性ぶどう膜炎；多発性硬化症、ループス（全身性エリテマトーデス及び慢性円板状エリテマトーデス）、及びギラン・バレー症候群等の中枢及び末梢の神経系の免疫媒介性炎症性障害；アトピー性皮膚炎、多発筋炎、皮膚筋炎、自己免疫性肝炎、線維性肺肺炎、グレーブス病、I g A 腎症、特発性血小板減少性紫斑病、メニエール病、天疱瘡、類天疱瘡、原発性胆汁性胆管炎、肝炎、サルコイドーシス、強皮症（局所性強皮症、全身性強皮症、及び進行性全身型強皮症）、多発血管炎性肉芽腫症、その他の自己免疫障害、胆管炎、膵炎、外傷（手術）、移植片対宿主病、移植拒絶反応；心筋梗塞等の虚
40
50

血性疾患及びアテローム動脈硬化症を含む心臓病；結節性動脈周囲炎（結節性多発動脈炎及び顕微鏡性多発血管炎）、アレルギー性肉芽腫性血管炎、過敏性血管炎、大動脈炎症候群（高安動脈炎）、側頭動脈炎、血管内凝固、骨吸収、骨粗鬆症、変形性関節症、歯周炎及び低塩酸、スティル病、コーガン症候群、R S 3 P E、リウマチ性多発筋痛、線維筋痛症候群、抗リン脂質抗体症候群、好酸球性筋膜炎、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、慢性萎縮性胃炎、グッドパスチャー症候群、急速進行性糸球体腎炎、巨赤芽球性貧血、溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、橋本甲状腺炎、自己免疫性副腎不全、原発性甲状腺機能低下症、特発性アジソン病（慢性副腎不全）、妊娠ヘルペス、線状IgA水疱性皮膚疾患、後天性表皮水疱症、円形脱毛症、白斑、原田病、自己免疫性視神経症、特発性無精子症、再発性胎児消失、又は胎児－母体間寛容性の欠如に関連する不妊が挙げられる。

10

【0055】

幾つかの実施形態では、疾患又は障害は、関節炎（例えば、関節リウマチ又はTNF不応性関節リウマチ）、巨細胞性動脈炎、リウマチ性多発筋痛、原発性シェーグレン症候群、円形脱毛症、原発性胆汁性胆管炎（PBC）、白斑、ANCA血管炎、1型糖尿病、非感染性ぶどう膜炎乾癬、移植片対宿主病（GVHD）又は炎症性腸疾患である。

【0056】

本明細書で使用するとき、「治療」、「治療する」等の用語は、所望の薬理学的及び／又は生理学的な効果を得ることを指す。好ましくは、効果は治療的である、すなわち、効果は、疾患を部分的若しくは完全に治癒させる、及び／又は該疾患に起因し得る有害な症状を任意の程度軽減する。この目的のために、本発明の方法は、「治療的に有効な量」のBTLA結合剤を投与することを含む。「治療的に有効な量」とは、所望の治療結果を達成するために必要な投与量及び期間で有効な量を指す。治療的に有効な量は、疾患の状態、個体の年齢、性別、及び体重、並びに個体において所望の応答を惹起するBTLA結合剤の能力等の要因に応じて変化し得る。例えば、本発明のBTLA結合剤の治療的に有効な量は、ヒトにおけるBTLAの生理活性を増加させる量である。

20

【0057】

あるいは、薬理学的及び／又は生理学的な効果は予防的であってもよい、すなわち、その効果は、疾患又はその症状を完全に又は部分的に予防する。これに関して、本発明の方法は、「予防的に有効な量」のBTLA結合剤を投与することを含む。「予防的に有効な量」とは、所望の予防結果（例えば、疾患の発症の予防）を達成するために、必要な投与量及び期間で有効な量を指す。

30

【0058】

BTLA結合剤は、哺乳類への投与に好適な組成物の一部であり得る。好ましくは、組成物は、担体、好ましくは薬学的に許容される（例えば、生理学的に許容される）担体と、本発明のアミノ酸配列、抗原結合剤、又はベクターとを含む、薬学的に許容される（例えば、生理学的に許容される）組成物である。任意の好適な担体を本発明の状況において使用することができ、そのような担体は当技術分野において周知である。担体の選択は、部分的には、組成物を投与し得る具体的な部位及び組成物を投与するために使用される具体的な方法によって決定される。組成物はまた、例えばバッファ、浸透圧調整剤、安定剤、界面活性剤等を含む、治療用分子（例えば、タンパク質又は抗体）、特に非経口製剤の製剤化において用いられる任意の他の賦形剤を含んでいてもよい。組成物は、任意で無菌であってもよい。組成物は、保存のために凍結又は凍結乾燥させ、使用前に好適な無菌担体中で再構成してもよい。組成物は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001)に記載されている従来技術に従って産生することができる。

40

【0059】

典型的な用量は、例えば、1pg/kg～20mg/kg（動物又はヒトの体重）の範囲であってもよいが、この例示的範囲よりも低い又は高い用量も本発明の範囲内である。非経口一日量は、約0.00001µg/kg～20mg/kg（総体重）（例えば、約0

50

・ $0.001 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $10 \text{mg}/\text{kg}$ 、又は前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲)、好ましくは、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \text{mg}/\text{kg}$ (総体重) (例えば、約 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1.5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $5 \text{mg}/\text{kg}$ 、又は前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲)、より好ましくは、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 5 \text{mg}/\text{kg}$ (総体重) (例えば、約 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $75 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $900 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $2 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $4 \text{mg}/\text{kg}$ 、又は前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲)、更により好ましくは約 $0.5 \sim 15 \text{mg}/\text{kg}$ (体重)/日 (例えば、約 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $2.5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $3 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $6 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $9 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $11 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $13 \text{mg}/\text{kg}$ 、又は前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲)であってよい。治療又は予防の有効性は、治療を受けた患者を定期的に評価することによってモニタリングすることができる。数日間又はそれ以上にわたって繰り返し投与する場合、状態に応じて、疾患の症状が所望の通り抑制されるまで治療を繰り返してもよく、あるいは患者の生涯にわたって治療を継続してもよい。しかし、他の投与レジメンが有用である場合もあり、これも本発明の範囲内である。所望の投与量は、組成物の単回ボラス投与、組成物の複数回ボラス投与、又は組成物の連続注入投与によって送達され得る。

10

【0060】

20

投与は、経口、静脈内、腹腔内、皮下、肺、経皮、筋肉内、鼻腔内、頬側、舌下、又は坐剤の投与を含む任意の標準的な投与技術を使用して実施することができる。好ましくは、組成物は、非経口投与に適している。本明細書で使用する時、「非経口」という用語は、静脈内、筋肉内、皮下、直腸内、膈内、及び腹腔内への投与を含む。より好ましくは、組成物は、静脈内、腹腔内、又は皮下への注射による末梢全身送達を用いて哺乳類に投与される。

【0061】

哺乳類 (例えば、ヒト) に投与したら、当該技術分野において公知の任意の好適な方法によってBTLA結合剤の生物活性を測定することができる。生物活性は、体内でのBTLA結合剤の安定性と相関がある可能性がある。本発明の一実施形態では、BTLA結合剤 (例えば、抗体) は、約30分間～45日間 (例えば、約30分間、約45分間、約1時間、約2時間、約4時間、約6時間、約10時間、約12時間、約1日間、約5日間、約10日間、約15日間、約25日間、約35日間、約40日間、約45日間、又は前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲) のインビボ半減期を有する。別の実施形態では、BTLA結合剤は、約2時間～20日間 (例えば、約5時間、約10時間、約15時間、約20時間、約2日間、約3日間、約7日間、約12日間、約14日間、約17日間、約19日間、又は前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲) のインビボ半減期を有する。別の実施形態では、BTLA結合剤は、約10日間～約40日間 (例えば、約10日間、約13日間、約16日間、約18日間、約20日間、約23日間、約26日間、約29日間、約30日間、約33日間、約37日間、約38日間、約39日間、約40日間、又は前述の値のうちのいずれか2つによって規定される範囲) のインビボ半減期を有する。

30

40

【0062】

本発明のBTLA結合剤は、単独で投与してもよく、他の薬物と組み合わせて投与してもよい。例えば、BTLA結合剤は、本明細書に開示される疾患を治療又は予防するための他の剤、例えば、他の剤、抗炎症又は免疫抑制剤と組み合わせて投与してよい。これに関して、例えば、BTLA結合剤は、例えば当該技術分野で公知の任意の抗炎症剤、グルココルチコイド、低分子免疫抑制剤、ワクチン、生物学的療法 (例えば、他のモノクローナル抗体、ウイルス、遺伝子療法、及び養子T細胞移植)、及び/又は外科手術を含む少なくとも1つの他の剤と組み合わせて使用してよい。本発明の方法によって感染性疾患を治

50

療する場合、B T L A 結合剤は、少なくとも1つの抗菌剤又は少なくとも1つの抗ウイルス剤と組み合わせて投与してよい。これに関して、抗菌剤は、当技術分野で公知の任意の好適な抗生物質であってよい。抗ウイルス剤は、特定のウイルスを特異的に標的とする任意の好適な種類の任意のワクチン（例えば、生弱毒化ワクチン、サブユニットワクチン、組換えベクターワクチン）及び任意の低分子抗ウイルス療法（例えば、ウイルス複製阻害剤及びヌクレオシドアナログ）であってよい。

【0063】

治療用途に加えて、本明細書に記載のB T L A 結合剤は、診断又は研究用途で使用することもできる。これに関して、B T L A 結合剤は、B T L A の不適切な発現（例えば、低発現）又は活性の低下が疾患若しくは障害の病理学的作用を引き起こすか又はそれに寄与する障害又は疾患を診断する方法において使用することができる。同様に、B T L A 結合剤は、B T L A 促進に応答する疾患又は障害について検査される対象におけるB T L A タンパク質レベルをモニタリングするアッセイにおいて使用することができる。研究用途としては、例えば、B T L A 結合剤及び標識を利用して、サンプル中、例えばヒト体液中又は細胞若しくは組織の抽出物中のB T L A タンパク質を検出する方法が挙げられる。B T L A 結合剤は、検出可能な部分による共有結合性又は非共有結合性の標識等の修飾の有無しで使用してよい。例えば、検出可能な部分は、放射性同位元素（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、又は ^{125}I ）、蛍光又は化学発光化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、又はルシフェリン）、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ）、又は補欠分子族であってよい。抗原結合剤（例えば、抗体）を検出可能な部分に別々にコンジュゲートさせるための当該技術分野で公知の任意の方法を、本発明の状況において採用してよい（例えば、Hunter et al., Nature, 194: 495-496 (1962); David et al., Biochemistry, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40: 219-230 (1981); 及びNygren, J. Histochem. and Cytochem., 30: 407-412 (1982)を参照）。

【0064】

B T L A タンパク質のレベルは、本明細書に提供されるB T L A 剤を用いて、当技術分野において公知の任意の好適な方法によって測定することができる。そのような方法としては、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）及びFACSが挙げられる。B T L A の正常又は標準の発現値は、例えば、抗原-抗体複合体を形成するのに好適な条件下で、B T L A を含むか又は含む疑いのあるサンプルをB T L A 特異的抗体と合わせることにより、任意の好適な技術を使用して確立することができる。抗体は、結合又は非結合の抗体の検出を促進するために、検出可能な物質で直接又は間接的に標識される。好適な検出可能な物質としては、各種酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、及び放射性物質が挙げられる（例えば、Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987)を参照）。次いで、サンプルで発現したB T L A ポリペプチドの量を標準値と比較する。

【0065】

いかなる特定の理論にも作用機序にも束縛されることを望むものではないが、本明細書に記載のB T L A 結合剤を投与することにより、B T L A が発現している細胞の少なくとも一部からB T L A が脱落し、B T L A 結合剤が投与された対象の血液、血漿、血清、又は組織（例えば、皮膚組織）に存在する可溶性B T L A（s B T L A）が増加すると考えられる。従って、対象におけるB T L A 結合剤の薬理活性を検出、測定、又はモニタリングする方法（例えば、インビトロ法）であって、B T L A 結合剤が投与された対象からの血液、血漿、血清、又は組織（例えば、皮膚組織）のサンプル中の可溶性B T L A（s B T L A）を検出することを含む方法が、本明細書に提供される。また、患者からの血液、血漿、血清、又は組織（例えば、皮膚組織）のサンプル中のs B T L Aを（例えば、インビトロにおいて）検出又は測定することによりB T L A 結合剤による治療のための患者を

選択する方法であって、s B T L A レベルが同じ種類の正常な非疾患対象と比較して増加している場合、該患者を治療のために選択する方法も本明細書に提供される。s B T L A は、当技術分野において公知の幾つかの技術のいずれかを用いて検出し、任意で定量することができる。幾つかの実施形態では、s B T L A は、対象からの血液、血漿、血清、又は組織のサンプルを（例えば、インビトロにおいて）本明細書に提供される B T L A 結合剤と接触させることによって検出される。幾つかの実施形態では、対象の血液、血漿、血清、又は組織のサンプルにおいて検出される s B T L A は、B T L A 結合剤（例えば、以前に投与された B T L A 結合剤）に結合している。

【0066】

幾つかの実施形態では、対象における B T L A の脱落を誘導する、対象に投与される B T L A 結合剤は、B T L A の H V E M への結合を阻害しない B T L A 結合剤である。B T L A 結合剤は、本明細書に記載の B T L A 結合剤のいずれか等の任意の B T L A 結合剤であり得る。幾つかの実施形態では、B T L A 結合剤は、配列番号 1 ~ 15、207、208、217、若しくは 218 のいずれか 1 つの免疫グロブリン重鎖可変領域、又は少なくともそれらの C D R、あるいはそれらに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列と；配列番号 16 ~ 25、209、210、219、若しくは 220 のいずれかの免疫グロブリン軽鎖可変領域、又は少なくともそれらの C D R、あるいはそれらに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列とを含む。例えば、B T L A 結合剤は、配列番号 27、30、32、36、39、及び 41 によって表される C D R を含み得る。他の実施形態では、B T L A 結合剤は、配列番号 43 ~ 156 のいずれか 1 つの免疫グロブリン重鎖可変領域、若しくは少なくともそれらの C D R、又はそれらに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列と；配列番号 157 ~ 192 のいずれかの免疫グロブリン軽鎖可変領域、若しくは少なくともそれらの C D R、又はそれらに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列とを含み、本明細書に記載される他の特徴のいずれか又は全てを有する。例えば、B T L A 結合剤は、配列番号 195 ~ 200 によって表される C D R を含み得る；例えば、B T L A 結合剤は、配列番号 201 ~ 206 を含む C D R を含む、あるいは配列番号 193 及び 194 若しくは配列番号 144 及び 174 の I g の重鎖及び軽鎖、又は少なくともそれらの C D R、あるいはそれぞれ配列番号 193 及び 194 若しくは配列番号 144 及び 174 に対して 90 % 以上の配列同一性を有する I g の重鎖及び軽鎖を含む。

【0067】

幾つかの実施形態では、B T L A が投与された対象の血液、血漿、血清、又は組織（例えば、皮膚組織）中の s B T L A は、s B T L A に結合する捕捉抗体を用いて検出される。捕捉抗体は、B T L A に結合する任意の抗体であってよい。幾つかの実施形態では、捕捉抗体は、本明細書で提供される B T L A 抗体である。捕捉抗体は、対象に投与される B T L A 結合剤と同じであっても異なってもよい。幾つかの実施形態では、s B T L A 捕捉抗体は、対象に投与される B T L A 結合剤とは異なる。幾つかの実施形態では、捕捉抗体は、配列番号 1 ~ 15、207、208、217、若しくは 218 のいずれか 1 つを含む重鎖可変領域、又は少なくともそれらの C D R、あるいはそれらに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列と；配列番号 16 ~ 25、209、210、219、若しくは 220 のいずれか 1 つを含む軽鎖可変領域、又は少なくともそれらの C D R、あるいはそれらに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列とを含み；本明細書に記載される他の特徴のいずれか又は全てを有する。更なる実施形態では、捕捉抗体は、配列番号 27、30、及び 32 によって表される重鎖 C D R 1 ~ 3；並びに配列番号 36、39、及び 41 によって表される軽鎖 C D R 1 ~ 3；又は本明細書に提供されるより具体的に言及される C D R のいずれかを含み得る。例えば、捕捉抗体は、配列番号 26 の I g 重鎖（例えば、配列番号 1 ~ 15、207、208、217、又は 218 のいずれか）及び配列番号 35 の I g 軽鎖（例えば、配列番号 16 ~ 25、209、210、219、又は 220 のいずれか）を含み得る。任意で、そのような実施形態と組み合わせ、対象に投与される B T L A 結合剤は、配列番号 43 ~ 156 のいずれか 1 つの免

疫グロブリン重鎖可変領域、若しくは少なくともそれらのCDR、又はそれらに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列と；配列番号157～192のいずれかの免疫グロブリン軽鎖可変領域、若しくは少なくともそれらのCDR、又はそれらに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列とを含み得；本明細書に記載される他の特徴のいずれか又は全てを有する。例えば、BT LA結合剤は、配列番号195～200によって表されるCDRを含み得る；例えば、BT LA結合剤は、配列番号201～206を含むCDRを含む、又は配列番号193及び194若しくは配列番号144及び174のIgの重鎖及び軽鎖を含む。

【0068】

いかなる特定の理論にも作用機序にも束縛されることを望むものではないが、本明細書に記載する通り、BT LAのHVEMへの結合を阻害しない抗体へのBT LA（又はsBT LA）の結合は、捕捉抗体のsBT LAへの結合を増強すると考えられる。従って、血液、血漿、血清、又は組織（例えば、皮膚組織）中のsBT LAを検出及び／又は定量するアッセイであって、血液、血漿、血清、又は組織（例えば、皮膚組織）のサンプルを、捕捉抗体及びBT LAのHVEMへの結合を阻害しないBT LA結合剤と接触させることを含む方法も本明細書に提供される。幾つかの実施形態では、BT LAのHVEMへの結合を阻害しないBT LA結合剤は、配列番号43～156のいずれか1つの免疫グロブリン重鎖可変領域、若しくは少なくともそれらのCDR、又はそれらに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列と；配列番号157～192のいずれかの免疫グロブリン軽鎖可変領域、若しくは少なくともそれらのCDR、又はそれらに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列とを含み；本明細書に記載される他の特徴のいずれか又は全てを有するBT LA結合剤である。例えば、BT LA結合剤は、配列番号195～200によって表されるCDRを含み得る；例えば、BT LA結合剤は、配列番号201～206を含むCDRを含む、又は配列番号193及び194若しくは配列番号144及び174のIgの重鎖及び軽鎖を含む。幾つかの実施形態では、捕捉抗体は、配列番号1～15、207、208、217、若しくは218のいずれか1つを含む重鎖可変領域、又は少なくともそれらのCDR、あるいはそれらに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列と；配列番号16～25、209、210、219、若しくは220のいずれか1つを含む軽鎖可変領域、又は少なくともそれらのCDR、あるいはそれらに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列とを含み；本明細書に記載される他の特徴のいずれか又は全てを有する。例えば、捕捉抗体は、配列番号27、30、及び32によって表される重鎖CDR1～3；並びに配列番号36、39、及び41によって表される軽鎖CDR1～3；又は本明細書に提供されるより具体的に言及されるCDRのいずれかを含み得る。例えば、捕捉抗体は、配列番号26のIg重鎖（例えば、配列番号1～15、207、208、217、又は218のいずれか）及び配列番号35のIg軽鎖（例えば、配列番号16～25、209、210、219、又は220のいずれか）を含み得る。

【0069】

血液、血漿、血清、又は組織中のsBT LAを検出、測定、又は定量（qualifying）する前述の方法の幾つかの実施形態では、方法は、血液、血漿、血清、又は組織のサンプル中のsBT LAの濃度を参照sBT LA濃度と比較することを更に含み得る。任意の好適な参照濃度を使用してよい。幾つかの実施形態では、参照sBT LA濃度は、BT LA結合剤を投与する前の同じ患者又は対象からの血液、血漿、血清、又は組織のサンプルにおけるsBT LAの濃度である。あるいは又は更に、参照sBT LA濃度は、別の対象、例えば、BT LA結合剤の投与を受けていない同じ種類の正常な非疾患対象の血液、血漿、血清、若しくは組織におけるsBT LA濃度、又はそのような対象の集団の血液、血漿、血清、若しくは組織におけるsBT LA濃度の統計分析によって確立された参照sBT LA濃度（例えば、BT LA結合剤による治療を受けていない正常な非疾患対象の集団からの血液、血漿、血清、又は組織のサンプル中のsBT LAの平均濃度）によって提供されてもよい。幾つかの実施形態では、参照sBT LA濃度は、対象の血液、血漿

10

20

30

40

50

、血清、若しくは組織のサンプル、又は対象の集団からの血液、血漿、血清、若しくは組織のサンプルを上記の捕捉抗体と接触させることと；任意で、同時に又は任意の順序で逐次、該血液、血漿、血清、又は組織のサンプルを、本明細書に記載のB T L AのH V E Mへの結合を阻害しないB T L A結合剤と接触させることも含む方法によって確立される。

【0070】

他の実施形態では、方法は、B T L A結合剤が投与された対象からの血液、血漿、血清、又は組織のサンプル中のs B T L Aの濃度を、該B T L A結合剤が対象に投与される前又は後のいずれかの異なる時点における同じ対象からの血液、血漿、血清、又は組織のサンプル中のs B T L Aの濃度と比較することを含む。例えば、B T L A結合剤の投与後の2つ以上の時点でs B T L A濃度を測定し、経時的なB T L A結合剤の効果を評価するために、任意でB T L A結合剤の1つ以上の追加の介在投与と比較してよい。このようにして、B T L A結合剤による治療をモニタリングすることができる。

【0071】

更に、B T L AのH V E Mへの結合を阻害しないB T L A結合剤とs B T L Aに結合する第2の捕捉抗体とを含む組成物であって、血液、血漿、血清、又は組織におけるs B T L Aを検出、測定、又はモニタリングする前述の方法において有用である組成物が本明細書に提供される。幾つかの実施形態では、B T L AのH V E Mへの結合を阻害しないB T L A結合剤は、配列番号43～156のいずれか1つの免疫グロブリン重鎖可変領域、若しくは少なくともそれらのC D R、又はそれらに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列と；配列番号157～192のいずれかの免疫グロブリン軽鎖可変領域、若しくは少なくともそれらのC D R、又はそれらに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列とを含み；本明細書に記載される他の特徴のいずれか又は全てを有する。例えば、B T L A結合剤は、配列番号195～200によって表されるC D Rを含み得る；例えば、B T L A結合剤は、配列番号201～206を含むC D Rを含む、又は配列番号193及び194若しくは配列番号144及び174のI gの重鎖及び軽鎖を含む。幾つかの実施形態では、捕捉抗体は、配列番号1～15、207、208、217、若しくは218のいずれか1つを含む重鎖可変領域、又は少なくともそれらのC D R、あるいはそれらに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列と；配列番号16～25、209、210、219、若しくは220のいずれか1つを含む軽鎖可変領域、又は少なくともそれらのC D R、あるいはそれらに対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列とを含み；本明細書に記載される他の特徴のいずれか又は全てを有する。例えば、捕捉抗体は、配列番号27、30、及び32によって表される重鎖C D R 1～3；並びに配列番号36、39、及び41によって表される軽鎖C D R 1～3；又は本明細書に提供されるより具体的に言及されるC D Rのいずれかを含み得る。例えば、捕捉抗体は、配列番号26のI g重鎖（例えば、配列番号1～15、207、208、217、又は218のいずれか）及び配列番号35のI g軽鎖（例えば、配列番号16～25、209、210、219、又は220のいずれか）を含み得る。

【0072】

B T L A結合剤、補足抗体、又は組成物は、キット、すなわち、所定の量の試薬と診断アッセイを行うための説明書との包装された組み合わせとして提供することができる。B T L A結合剤が酵素で標識されている場合、キットは、酵素が必要とする基質及び補因子（例えば、検出可能な発色団又は蛍光団を提供する基質前駆体）を含むことが望ましい。更に、安定剤、バッファ（例えば、ブロッキングバッファ又は溶解バッファ）等の他の添加剤がキットに含まれていてもよい。アッセイの感度を実質的に最適化する試薬の溶液中濃度を提供するように、各種試薬の相対量を変化させてよい。試薬は、溶解した際に適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む、乾燥粉末（典型的には、凍結乾燥）として提供することができる。

【0073】

核酸

また、本発明は、免疫グロブリン重鎖ポリペプチド、免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド

、及び本明細書に提供されるB T L A結合剤をコードしている1つ以上の核酸も提供する。

【0074】

「核酸配列」という用語は、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、非天然の、すなわち改変されたヌクレオチドを含有していてもよいDNA又はRNAのポリマー、すなわちポリヌクレオチドを包含することを意図する。「核酸」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で使用する時、リボヌクレオチド(RNA)又はデオキシリボヌクレオチド(DNA)のいずれかである、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。これら用語は、分子の一次構造を指し、従って、二本鎖及び一本鎖のDNA並びに二本鎖及び一本鎖のRNAを含む。この用語には、等価物として、例えばメチル化及び／又は

10

【0075】

免疫グロブリン重鎖ポリペプチド、免疫グロブリン軽鎖ポリペプチド、又はB T L A結合剤をコードしている核酸は、ベクターの一部であってもよい。ベクターは、例えば、プラスミド、エピソード、コスミド、ウイルスベクター(例えば、レトロウイルス又はアデノウイルス)、又はファージであってもよい。好適なベクター及びベクターの調製方法は、

20

【0076】

ベクターは、典型的には、宿主細胞においてコード配列を発現させる発現制御配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、転写ターミネーター、シグナルペプチド(例えば、オステオネクチンシグナルペプチド)、配列内リボソーム進入部位(IRES)等を含む。例示的な発現制御配列は当技術分野において公知であり、例えば、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。

30

【0077】

様々な異なる供給源からの構成的、誘導性、及び抑制性のプロモーターを含む多数のプロモーターが、当技術分野で周知である。プロモーターの代表的な供給源としては、例えば、ウイルス、哺乳類、昆虫、植物、酵母、及び細菌が挙げられ、これら供給源からの好適なプロモーターは、例えばATCC等の寄託機関並びに他の商用又は個人の供給源から公的に入手可能な配列に基づいて、容易に入手可能であるか又は合成的に作製することができる。プロモーターは、一方向性(すなわち、一方向に転写を開始する)であってもよく、二方向性(すなわち、3'又は5'方向のいずれにも転写を開始する)であってもよい。プロモーターの非限定的な例としては、例えば、T7細菌発現系、pBAD(araA)細菌発現系、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーターが挙げられる。誘導性プロモーターとしては、例えば、Tet系(米国特許第5,464,758号及び同第5,814,618号)、Ecdysone誘導性系(No et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93:3346-3351(1996))、T-REX(商標)系(Invitrogen, Carlsbad, CA)、LACSWITCH(商標)系(Stratagene, San Di

40

50

ego, CA)、及びCre-ERTタモキシフェン誘導性リコンビナーゼ系 (Indra et al., Nuc. Acid. Res., 27:4324-4327 (1999); Nuc. Acid. Res., 28:e99 (2000); 米国特許第7,112,715号; 及びKramer & Fussenegger, Methods Mol. Biol., 308:123-144 (2005)を参照)が挙げられる。

【0078】

本明細書で使用する時、「エンハンサー」という用語は、例えば、それが動作可能に連結される核酸配列の転写を増加させるDNA配列を指す。エンハンサーは、核酸配列のコード領域から何キロベースも離れて位置する場合もあり、制御因子の結合、DNAメチル化のパターン、又はDNA構造の変化を媒介することができる。様々な異なる供給源からの多数のエンハンサーが当技術分野において周知であり、(例えば、ATCC等の寄託機関、並びに他の商用又は個人の供給源から)クローニングされたポリヌクレオチドとして又は該ポリヌクレオチド内で入手可能である。プロモーターを含むポリヌクレオチド(一般的に使用されているCMVプロモーター等)の多くは、エンハンサー配列も含む。エンハンサーは、コード配列の上流、内、又は下流に位置し得る。

【0079】

また、ベクターは、「選択マーカー遺伝子」を含んでいてもよい。本明細書で使用する時、「選択マーカー遺伝子」という用語は、対応する選択剤の存在下で、核酸配列を発現している細胞を特異的に選択するまたは選択しないことを可能にする核酸配列を指す。好適な選択マーカー遺伝子は当技術分野において公知であり、例えば、国際公開第1992/008796号及び同第1994/028143号; Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:3567-3570 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527-1531 (1981); Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072-2076 (1981); Colbrese-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150:1-14 (1981); Santerre et al., Gene, 30:147-156 (1984); Kent et al., Science, 237:901-903 (1987); Wigler et al., Cell, 11:223-232 (1977); Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026-2034 (1962); Lowy et al., Cell, 22:817-823 (1980); 並びに米国特許第5,122,464号及び同第5,770,359号に記載されている。

【0080】

幾つかの実施形態では、ベクターは、宿主細胞内で複製することができ、適切な選択圧の存在下で宿主細胞内においてDNAの染色体外セグメントとして存続する「エピソーマル発現ベクター」又は「エピソーム」である(例えば、Conese et al., Gene Therapy, 11:1735-1742 (2004)を参照)。代表的な市販のエピソーマル発現ベクターとしては、エプスタイン・バーウイルス由来核抗原1 (EBNA1) 及びエプスタイン・バーウイルス (EBV) 複製起点 (oriP) を利用するエピソーマルプラスミドが挙げられるが、これに限定されない。Invitrogen (Carlsbad, CA) 製のベクターpREP4、pCEP4、pREP7、及びpcDNA3.1、並びにStratagene (La Jolla, CA) 製のpBK-CMVは、EBNA1及びoriPの代わりにT-抗原及びSV40複製起点を使用するエピソーマルベクターの非限定的な例を表す。

【0081】

他の好適なベクターとしては、宿主細胞のDNAにランダムに組み込まれ得るか、又は発現ベクターと宿主細胞の染色体との間の特異的組換えを可能にする組換え部位を含み得る組み込み発現ベクターが挙げられる。そのような組み込み発現ベクターは、宿主細胞の染色体の内因性発現制御配列を利用して所望のタンパク質を発現させることができる。部

位特異的に組み込まれるベクターの例としては、例えば、Invitrogen (Carlsbad, CA) 製の flp-in 系 (例えば、pcDNA (商標) 5/FRT) 又は例えば Stratagene (La Jolla, CA) 製の pExchange-6 コアベクターに見出すことができる cre-lox 系の構成要素が挙げられる。宿主細胞の染色体にランダムに組み込まれるベクターの例としては、例えば、Life Technologies (Carlsbad, CA) 製の pcDNA3.1 (T-抗原の非存在下で導入された場合)、Millipore (Billerica, MA) 製の UCOE、及び Promega (Madison, WI) 製の pCI 又は pFN10A (ACT) FLEXI (商標) が挙げられる。

【0082】

ウイルスベクターを使用してもよい。代表的な市販のウイルス発現ベクターとしては、Cruce ll, Inc. (Leiden, The Netherlands) から入手可能なアデノウイルススペースの Per. C6 系、Invitrogen (Carlsbad, CA) 製のレンチウイルススペースの pLP1、及び Stratagene (La Jolla, CA) 製のレトロウイルスベクター pFB-ERV plus pCFB-EGSH が挙げられるが、これらに限定されない。

【0083】

本発明のアミノ酸配列をコードしている核酸配列は、同一のベクター上で (すなわち、シスで) 細胞に提供することができる。一方向性のプロモーターを使用して、各核酸配列の発現を制御することができる。別の実施形態では、二方向性プロモーター及び一方向性のプロモーターの組み合わせを使用して、複数の核酸配列の発現を制御することができる。あるいは、本発明のアミノ酸配列をコードしている核酸配列は、別々のベクター上で (すなわち、トランスで) 細胞の集団に提供することもできる。別々の各ベクターにおける各核酸配列は、同一の又は異なる発現制御配列を含み得る。別々のベクターは、同時に又は逐次細胞に提供してよい

【0084】

本発明のアミノ酸配列をコードしている核酸 (複数可) を含むベクター (複数可) は、それによってコードされているポリペプチドを発現させることができる宿主細胞 (任意の好適な原核細胞又は真核細胞を含む) に導入してよい。このように、本発明は、本発明のベクターを含む単離細胞を提供する。好ましい宿主細胞は、容易かつ確実に成長させることができ、適度に速い成長速度を有し、十分に特徴付けられた発現系を有し、容易かつ効率的に形質転換又はトランスフェクトすることができるものである。

【0085】

好適な原核細胞の例としては、バチルス属 (Bacillus) (枯草菌 (Bacillus subtilis) 及びブレブス菌 (Bacillus brevis) 等)、エシェリキア属 (Escherichia) (大腸菌 (E. coli) 等)、シュドモナス属 (Pseudomonas)、ストレプトミセス属 (Streptomyces)、サルモネラ属 (Salmonella)、及びエルウィニア属 (Erwinia) の細胞が挙げられるが、これらに限定されない。特に有用な原核細胞としては、大腸菌の各種株 (例えば、K12、HB101 (ATCC 番号 33694)、DH5 α 、DH10、MC1061 (ATCC 番号 53338)、及び CC102) が挙げられる。

【0086】

幾つかの実施形態では、ベクターは、真核細胞に導入される。好適な真核細胞は、当技術分野において公知であり、例えば、酵母細胞、昆虫細胞、及び哺乳類細胞が挙げられる。好適な酵母細胞の例としては、クルイベロミセス属 (Kluyveromyces)、ピキア属 (Pichia)、リノスポリジウム属 (Rhinosporidium)、サッカロミセス属 (Saccharomyces)、及びシゾサッカロミセス属 (Schizosaccharomyces) 由来のものが挙げられる。好ましい酵母細胞としては、例えば、サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 及びピキア・パストリス (Pichia pastoris) が挙げられる。

【0087】

好適な昆虫細胞は、例えば、Kitts et al., *Biotechniques*, 14:810-817 (1993); Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4:564-572 (1993); 及び Lucklow et al., *J. Virol.*, 67:4566-4579 (1993) に記載されている。好ましい昆虫細胞としては、Sf-9 及び HI5 (Invitrogen, Carlsbad, CA) が挙げられる。

【0088】

幾つかの実施形態では、本発明において哺乳類細胞を利用する。多数の好適な哺乳類宿主細胞が当技術分野において公知であり、多くは American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から入手可能である。好適な哺乳類細胞の例としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) (例えば、CHO-K1 細胞、ATCC 番号 CCL61)、CHO DHFR-細胞 (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:4216-4220 (1980))、ヒト胚腎臓 (HEK) 293 又は 293T 細胞 (ATCC 番号 CRL1573)、及び 3T3 細胞 (ATCC 番号 CCL92) が挙げられるが、これらに限定されない。他の好適な哺乳類細胞株は、サル COS-1 (ATCC 番号 CRL1650) 及び COS-7 細胞株 (ATCC 番号 CRL1651)、並びに CV-1 細胞株 (ATCC 番号 CCL70) である。更に例示的な哺乳類宿主細胞としては、霊長類細胞株及びげっ歯類細胞株が挙げられ、形質転換細胞株も含まれる。通常の二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養から得られる細胞株に加えて、一次外植片も好適である。他の好適な哺乳類細胞株としては、マウス神経芽腫 N2A 細胞、HeLa、マウス L-929 細胞、及び BHK 又は HaK のハムスター細胞株が挙げられるが、これらに限定されず、これらは全て ATCC から入手可能である。好適な哺乳類宿主細胞を選択する方法、並びに細胞の形質転換、培養、増幅、スクリーニング、及び精製の方法は、当技術分野において公知である。

【0089】

一実施形態では、哺乳類細胞はヒト細胞である。例えば、哺乳類細胞は、前 B リンパ球起源の細胞株等、ヒトのリンパ球又はリンパ球由来の細胞株であってよい。ヒトリンパ球細胞株の例としては、限定されるものではないが、RAMOS (CRL-1596)、Daudi (CCL-213)、EB-3 (CCL-85)、DT40 (CRL-2111)、18-81 (Jack et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1581-1585 (1988))、Raji 細胞 (CCL-86)、PER.C6 細胞 (CruceCell Holland B.V., Leiden, The Netherlands)、及びそれらの誘導体が挙げられる。

【0090】

本発明のアミノ酸配列をコードしている核酸配列は、「トランスフェクション」、「形質転換」、又は「形質導入」等の任意の好適な方法によって細胞に導入することができる。「トランスフェクション」、「形質転換」、又は「形質導入」とは、本明細書で使用する時、物理的又は化学的方法を使用することによって1つ以上の外因性ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入することを指す。多くの好適な技術が当技術分野において公知であり、例えば、リン酸カルシウム DNA 共沈 (例えば、Murray E. J. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, *Gene Transfer and Expression Protocols*, Humana Press (1991) を参照); DEAE-デキストラン; エレクトロポレーション; カチオン性リポソーム媒介性トランスフェクション; タングステン粒子促進性マイクロ粒子銃 (Johnston, *Nature*, 346:776-777 (1990)); 及びリン酸ストロンチウム DNA 共沈 (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7:2031-2034 (1987) が挙げられる。その多くが市販されている好適なパッケージング細胞において感染粒子を成長させた後、ファージ又はウイルスのベ

クターを宿主細胞に導入してよい。

【0091】

核酸及び細胞は、本明細書に記載のBTLA結合剤の製造等、任意の目的のために使用することができる。これに関して、本発明は、BTLA結合剤の重及び／又は軽免疫グロブリンポリペプチドをコードしている核酸を含む細胞を培養することを含む、BTLA結合剤を調製する方法を提供する。異なる言い方をすれば、方法は、BTLA結合剤の免疫グロブリンの重鎖及び／又は軽鎖をコードしている核酸を、細胞（例えば、CHO細胞及びCHO-K1細胞を含む本明細書で論じる細胞株のいずれか等のインビトロ細胞）において発現させることを含む。所与の細胞において単一の核酸から免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖を発現させてもよく、又は同一の細胞において別々の核酸から免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖を発現させてもよいことが理解されるであろう。方法は、公知の技術を用いて、細胞又は細胞培養培地からBTLA結合剤を収集及び／又は精製することを更に含む得る。

10

【0092】

以下の実施例は、本発明を更に説明するが、無論、いかなる方法でもその範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【実施例】

【0093】

表2は、配列番号1～15の免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号16～25の軽鎖可変領域を含むBTLA結合剤（例えば、抗体又は抗体断片）の例を提供する。

20

【0094】

30

40

50

【表 2】

Ab識別情報	重鎖可変領域	軽鎖可変領域
APE08678	配列番号1	配列番号16
APE08729	配列番号2	配列番号16
APE08730	配列番号1	配列番号18
APE08731	配列番号1	配列番号17
APE08756	配列番号4	配列番号18
APE08757	配列番号4	配列番号16
APE08758	配列番号3	配列番号18
APE08759	配列番号3	配列番号16
APE08793	配列番号4	配列番号17
APE08794	配列番号3	配列番号17
APE08795	配列番号2	配列番号18
APE08796	配列番号2	配列番号17
APE09032	配列番号2	配列番号19
APE09033	配列番号1	配列番号19
APE09065	配列番号1	配列番号21
APE09066	配列番号1	配列番号20
APE09067	配列番号7	配列番号17
APE09068	配列番号6	配列番号17
APE09069	配列番号5	配列番号17
APE09356	配列番号10	配列番号21
APE09357	配列番号10	配列番号17
APE09358	配列番号9	配列番号17
APE09359	配列番号8	配列番号21
APE09360	配列番号8	配列番号17
APE09361	配列番号7	配列番号21
APE09362	配列番号5	配列番号21
APE09491	配列番号5	配列番号19
APE09495	配列番号11	配列番号19
APE09496	配列番号11	配列番号17
APE09785	配列番号13	配列番号19
APE09786	配列番号13	配列番号17
APE09787	配列番号12	配列番号19
APE09788	配列番号12	配列番号17
APE09833	配列番号8	配列番号19
APE09834	配列番号8	配列番号23
APE09835	配列番号8	配列番号22
APE09836	配列番号5	配列番号23
APE09837	配列番号5	配列番号22
APE09838	配列番号2	配列番号23
APE09839	配列番号2	配列番号22
APE09840	配列番号15	配列番号17
APE09841	配列番号15	配列番号19
APE09842	配列番号14	配列番号17
APE09843	配列番号14	配列番号19
APE09897	配列番号8	配列番号25
APE09898	配列番号8	配列番号24
APE09899	配列番号5	配列番号25
APE09900	配列番号5	配列番号24
APE09901	配列番号2	配列番号25
APE09902	配列番号2	配列番号24

10

20

30

40

【0095】

表2の抗体又は抗体断片について、K a b a t付番C D Rは以下の通りである：C D R H 1は、それぞれのV H配列の31～35位に位置し；C D R H 2は、それぞれのV H配列の50～66位に位置し；C D R H 3は、それぞれのV H配列の99～106位に位置し；C D R L 1は、それぞれのV L配列の24～34位に位置し；C D R L 2は、それぞれのV L配列の50～56位に位置し；C D R L 3は、それぞれのV L配列の89～97位に位置する。表2に記載の重鎖及び軽鎖の可変領域の対又は少なくともそれらのC D Rを有するB T L A結合剤は、本開示の特定の実施形態を提供する。表2の重鎖及び軽鎖の可変領域の追加の対又は少なくともそれらのC D Rは、更に他のB T L A結合剤を提供し

50

、本開示の範囲内であることが企図される。

【 0 0 9 6 】

表 3 は、配列番号 4 3 ～ 1 5 6 の免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号 1 5 7 ～ 1 9 2 の軽鎖可変領域を含む B T L A 結合剤（例えば、抗体又は抗体断片）の例を提供する。

【 0 0 9 7 】

【表 3 - 1】

Ab識別情報	重鎖可変領域	軽鎖可変領域
APE08876	配列番号45	配列番号159
APE08894	配列番号45	配列番号158
APE08895	配列番号45	配列番号157
APE08896	配列番号44	配列番号160
APE08897	配列番号44	配列番号159
APE08898	配列番号44	配列番号158
APE08899	配列番号44	配列番号157
APE08900	配列番号43	配列番号160
APE08901	配列番号43	配列番号159
APE08902	配列番号43	配列番号158
APE08903	配列番号43	配列番号157
APE08904	配列番号45	配列番号160
APE09035	配列番号49	配列番号160
APE09036	配列番号48	配列番号160
APE09037	配列番号47	配列番号160
APE09038	配列番号46	配列番号160
APE09043	配列番号45	配列番号166
APE09044	配列番号45	配列番号165
APE09045	配列番号45	配列番号164
APE09046	配列番号45	配列番号163
APE09047	配列番号45	配列番号162
APE09048	配列番号45	配列番号161
APE09076	配列番号45	配列番号167
APE09233	配列番号44	配列番号167
APE09234	配列番号44	配列番号165
APE09235	配列番号44	配列番号161
APE09236	配列番号52	配列番号161
APE09237	配列番号51	配列番号161
APE09238	配列番号50	配列番号161
APE09261	配列番号52	配列番号160
APE09262	配列番号51	配列番号160
APE09263	配列番号50	配列番号160
APE09783	配列番号54	配列番号160
APE09784	配列番号53	配列番号160
APE09987	配列番号44	配列番号168
APE09988	配列番号45	配列番号168
APE10018	配列番号61	配列番号160
APE10019	配列番号60	配列番号160
APE10020	配列番号59	配列番号160
APE10021	配列番号58	配列番号160
APE10022	配列番号57	配列番号160
APE10023	配列番号56	配列番号160
APE10024	配列番号55	配列番号160
APE10068	配列番号65	配列番号168
APE10070	配列番号63	配列番号168
APE10070	配列番号64	配列番号168
APE10071	配列番号62	配列番号168
APE10072	配列番号65	配列番号160
APE10074	配列番号64	配列番号160
APE10074	配列番号63	配列番号160
APE10075	配列番号62	配列番号160
APE10265	配列番号83	配列番号168
APE10266	配列番号82	配列番号168

10

20

30

40

【 0 0 9 8 】

50

【表 3 - 2】

APE10267	配列番号81	配列番号168
APE10268	配列番号80	配列番号168
APE10269	配列番号79	配列番号168
APE10270	配列番号78	配列番号168
APE10271	配列番号77	配列番号168
APE10272	配列番号76	配列番号168
APE10273	配列番号75	配列番号168
APE10274	配列番号74	配列番号168
APE10275	配列番号73	配列番号168
APE10276	配列番号72	配列番号168
APE10277	配列番号71	配列番号168
APE10278	配列番号70	配列番号168
APE10279	配列番号69	配列番号168
APE10280	配列番号68	配列番号160
APE10281	配列番号67	配列番号160
APE10282*†	配列番号66	配列番号160
APE10284	配列番号68	配列番号168
APE10285	配列番号67	配列番号168
APE10286*†	配列番号66	配列番号168
APE10297	配列番号99	配列番号168
APE10298	配列番号98	配列番号168
APE10299	配列番号97	配列番号168
APE10300	配列番号96	配列番号168
APE10301	配列番号95	配列番号168
APE10302	配列番号94	配列番号168
APE10303	配列番号93	配列番号168
APE10304	配列番号92	配列番号168
APE10305	配列番号91	配列番号168
APE10306	配列番号90	配列番号168
APE10307	配列番号89	配列番号168
APE10308	配列番号88	配列番号168
APE10309	配列番号87	配列番号168
APE10310	配列番号86	配列番号168
APE10311	配列番号85	配列番号168
APE10312	配列番号84	配列番号168
APE10343	配列番号65	配列番号179
APE10344	配列番号65	配列番号178
APE10345	配列番号65	配列番号177
APE10346	配列番号65	配列番号176
APE10347	配列番号65	配列番号175
APE10348	配列番号65	配列番号174
APE10349	配列番号65	配列番号173
APE10350	配列番号65	配列番号172
APE10351	配列番号65	配列番号171
APE10352	配列番号65	配列番号170
APE10353	配列番号65	配列番号169
APE10426	配列番号68	配列番号187
APE10427	配列番号68	配列番号186
APE10428	配列番号68	配列番号185
APE10429	配列番号68	配列番号184
APE10430	配列番号68	配列番号183
APE10431	配列番号68	配列番号182
APE10432	配列番号68	配列番号181
APE10433	配列番号68	配列番号180

10

20

30

40

【 0 0 9 9 】

【表 3 - 3】

APE10462	配列番号118	配列番号175
APE10463	配列番号117	配列番号175
APE10464	配列番号116	配列番号175
APE10465	配列番号115	配列番号175
APE10466	配列番号114	配列番号175
APE10467	配列番号113	配列番号175
APE10468	配列番号112	配列番号175
APE10469	配列番号111	配列番号175
APE10470	配列番号139	配列番号175
APE10471	配列番号138	配列番号175
APE10472	配列番号137	配列番号175
APE10473	配列番号136	配列番号175
APE10474	配列番号135	配列番号175
APE10475	配列番号134	配列番号175
APE10476	配列番号133	配列番号175
APE10477	配列番号132	配列番号175
APE10478	配列番号131	配列番号175
APE10479	配列番号130	配列番号175
APE10480	配列番号129	配列番号175
APE10481	配列番号128	配列番号175
APE10482	配列番号127	配列番号175
APE10483	配列番号126	配列番号175
APE10484	配列番号125	配列番号175
APE10485	配列番号124	配列番号175
APE10486	配列番号123	配列番号175
APE10487	配列番号122	配列番号175
APE10488	配列番号121	配列番号175
APE10489	配列番号120	配列番号175
APE10490	配列番号119	配列番号175
APE10491	配列番号110	配列番号175
APE10492	配列番号109	配列番号175
APE10493	配列番号108	配列番号175
APE10494	配列番号107	配列番号175
APE10495	配列番号106	配列番号175
APE10496	配列番号105	配列番号175
APE10497	配列番号104	配列番号175
APE10498	配列番号103	配列番号175
APE10499	配列番号102	配列番号175
APE10500	配列番号101	配列番号175
APE10501	配列番号100	配列番号175
APE10513	配列番号139	配列番号174
APE10514	配列番号138	配列番号174
APE10515	配列番号137	配列番号174
APE10516	配列番号136	配列番号174
APE10517	配列番号135	配列番号174
APE10518	配列番号134	配列番号174
APE10519	配列番号133	配列番号174
APE10520	配列番号132	配列番号174
APE10521	配列番号131	配列番号174
APE10522	配列番号130	配列番号174
APE10523	配列番号129	配列番号174
APE10524	配列番号128	配列番号174
APE10525	配列番号127	配列番号174
APE10526	配列番号126	配列番号174

10

20

30

40

【 0 1 0 0 】

50

【表 3 - 4】

APE10527	配列番号125	配列番号174
APE10528	配列番号124	配列番号174
APE10529	配列番号123	配列番号174
APE10530	配列番号122	配列番号174
APE10531	配列番号121	配列番号174
APE10532	配列番号120	配列番号174
APE10533	配列番号119	配列番号174
APE10534	配列番号110	配列番号174
APE10535	配列番号109	配列番号174
APE10536	配列番号108	配列番号174
APE10537	配列番号107	配列番号174
APE10538	配列番号106	配列番号174
APE10539	配列番号105	配列番号174
APE10540	配列番号104	配列番号174
APE10541	配列番号103	配列番号174
APE10542	配列番号102	配列番号174
APE10543	配列番号101	配列番号174
APE10544	配列番号100	配列番号174
APE10545	配列番号118	配列番号174
APE10546	配列番号117	配列番号174
APE10547	配列番号116	配列番号174
APE10548	配列番号115	配列番号174
APE10549	配列番号114	配列番号174
APE10550	配列番号113	配列番号174
APE10551	配列番号112	配列番号174
APE10552	配列番号111	配列番号174
APE10553	配列番号68	配列番号189
APE10554	配列番号68	配列番号188
APE10555	配列番号143	配列番号174
APE10556	配列番号142	配列番号174
APE10570 †	配列番号141	配列番号174
APE10571	配列番号140	配列番号174
APE10577	配列番号68	配列番号174
APE10580	配列番号146	配列番号189
APE10581	配列番号145	配列番号189
APE10583	配列番号146	配列番号174
APE10584	配列番号145	配列番号174
APE10620	配列番号149	配列番号189
APE10621	配列番号148	配列番号189
APE10622	配列番号147	配列番号189
APE10623	配列番号149	配列番号174
APE10624	配列番号148	配列番号174
APE10625	配列番号147	配列番号174
APE10657 †	配列番号153	配列番号174
APE10658 †	配列番号152	配列番号174
APE10659	配列番号151	配列番号174
APE10660	配列番号118	配列番号191
APE10661	配列番号147	配列番号190
APE10663	配列番号118	配列番号190
APE10664 †	配列番号150	配列番号189
APE10665 †	配列番号150	配列番号174
APE10677 †	配列番号153	配列番号192
APE10679	配列番号151	配列番号192
APE10678 †	配列番号152	配列番号192

10

20

30

40

【 0 1 0 1 】

【表 3 - 5】

APE10680 †	配列番号156	配列番号174
APE10681 †	配列番号155	配列番号174
APE10682	配列番号154	配列番号174
APE10840	配列番号144	配列番号174

50

【 0 1 0 2 】

表 3 の抗体又は抗体断片について、K a b a t 付番 C D R 領域は以下の通りである：C D R H 1 は、それぞれの V H 配列の 3 1 ～ 3 5 位に位置し；C D R H 2 は、C D R H 2 がそれぞれの V H 配列の 5 0 ～ 6 7 位に位置する＊印の付いた抗体を除いて、それぞれの V H 配列の 5 0 ～ 6 6 位に位置し；C D R H 3 は、C D R H 3 が 1 0 0 ～ 1 1 4 位に位置する＋印の付いた抗体を除いて、それぞれの V H 配列の 9 9 ～ 1 1 3 位に位置し；C D R L 1 は、それぞれの V L 配列の 2 4 ～ 3 4 位に位置し；C D R L 2 は、それぞれの V L 配列の 5 0 ～ 5 6 位に位置し；C D R L 3 は、それぞれの V L 配列の 8 9 ～ 9 7 位に位置する。表 3 に記載の重鎖及び軽鎖の可変領域の対又は少なくともそれらの C D R を有する B T L A 結合剤は、本開示の特定の実施形態を提供する。表 3 の重鎖及び軽鎖の可変領域の追加の対又は少なくともそれらの C D R は、更に他の B T L A 結合剤を提供し、本開示の範囲内であることが企図される。

10

【 0 1 0 3 】

以下の実施例において、言及される抗体は以下の通りである：

【 0 1 0 4 】

A b 番号	配列番号							
6G3	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3	重鎖可変領域	軽鎖可変領域
APE10840. x	201	202	203	204	205	206	144	174
APE12839. x	201	202	203	204	205	206	144	174
APE13308. x	201	202	203	204	205	206	144	174
APE10585. x	201	202	203	204	205	206	144	174
10D8								
APE10134	211	212	213	214	215	216	207	209
APE12774. x	221	222	223	224	225	226	217	219
APE11482	221	222	223	224	225	226	217	219

20

30

【 0 1 0 5 】

実施例 1

抗体 6 G 3 は、B T L A で免疫したマウスの脾臓細胞から標準的な融合技術によって産生したマウスハイブリドーマに由来していた。この抗体を、本明細書に記載される標準的な技術を使用してヒト化した。最終的に最適化された抗体を、表 1 にまとめたベクターを用いてチャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞で発現させた。

【 0 1 0 6 】

【表 1】

40

6G3	発現条件	H鎖可変領域	L鎖可変領域
APE10840	Exp iCH0-S（商標） 一過的	配列番号144	配列番号174
APE12839	Exp iCH0-S選別された 安定的なプール	配列番号144	配列番号174
APE13308	CH0-K1安定的なプール	配列番号144	配列番号174

50

【0107】

実施例 2

この実施例は、本明細書に開示される6G3抗BTLA抗体が、表面プラズモン共鳴によって求めたとき、ヒトBTLAについては K_D 約5 nMの、そして、カニクイザルBTLAについては K_D 約11 nMの結合親和性を有することを実証する。

【0108】

Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences) を用いて、表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析を実施した。Biacore T200 Evaluation Software の1:1結合モデルを用いて速度定数を求めて、オンレート及びオフレート (それぞれ k_a 及び k_d) 並びに親和性全体の尺度としての解離定数 (K_D) を算出した。EDC 活性化アミンカップリングケミストリーを用いて抗ヒトIgG (GE Healthcare Life Sciences) をCM5チップ上に固定化した (10 μ L / 分の流速で420秒間接触)。それぞれ0.5 μ g / mL) の抗体 (APE10585.04 6G3 IgG1及びAPE10840.05 6G3 IgG4) を、10 μ L / 分の流速を用いてフローセルと60秒間接触させて捕捉した。60 nM、20 nM、6.7 nM、及び2.2 nMの濃度の単体のヒトBTLA-his又はカニクイザルBTLA-hisを捕捉抗体上に流した (480秒間会合、1800秒間解離)。実験は25℃で行い、移動相及び全ての希釈液には、10 mM HEPES、pH 7.6、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05%ポリソルベート20を含有するバッファ (HBS-EP+、pH 7.6; Teknova) を使用した。各サイクルの最後に、3 M MgCl₂ (30 μ L / 分) に2回連続して曝露 (60秒間及び90秒間) して再生することによって、結合した抗原を除去した。実験に対応するセンサグラム及び結合定数を図1 (ヒトBTLA) 及び図1 (カニクイザルBTLA) に示す。抗体捕捉レベル (共鳴単位 (RU)) を、各パネルの右側に記載する。

【0109】

実施例 3

この実施例は、本明細書に開示される6G3抗BTLA抗体が、結合平衡除外アッセイによって求めたとき、ヒトBTLAについては K_D 約410 pMの、そして、カニクイザルBTLAについては K_D 約1.66 nMの結合親和性を有することを実証する。

【0110】

KinExA 3000 (Sapidyne Instruments) で、BTLAに結合する6G3 IgG4 (APE10840.04 (H鎖配列番号144、L鎖配列番号174)) の溶液ベースの親和性測定を行った。アズラクトンビーズ (Thermo Fisher Scientific) を、室温で2時間50 mM Na₂CO₃中ヒトBTLA ECD-his (30 μ g / mL) 又はカニクイザルBTLA ECD-his (20 μ g / mL) でコーティングし、10 mg / mL BSAでブロッキングした。ヒト及びカニクイザルの両方のBTLA実験において、結合のために6G3 IgG4 APE10840.04の濃度を100 pMで一定に維持した。ヒト又はカニクイザルのBTLA ECD-hisを、1000 nMから68 fMまで2.5倍希釈で25℃において添加した。サンプルセットを4℃で72時間平衡化し、6時間かけて室温にした後、BTLAにカップリングしたアズラクトンビーズで遊離抗体を捕捉した。ビーズに結合した6G3を定量するための二次抗体は、Alexa-Fluor-647 AffiPure抗ヒトIgG (250 ng / mL、Jackson ImmunoResearch Laboratories) であった。それぞれ6G3のみ及びバッファのみを含むサンプルで、最大及びバックグラウンドのシグナルを求めた。KinExA Pro Software 3.2.6を使用してデータを解析した。6G3抗体のヒトBTLA及びカニクイザルBTLAへの結合についての K_D 値の解析における95%信頼区間を図2に示す。

【0111】

実施例 4

この実施例は、本明細書に開示される6G3抗体が、安定的にトランスフェクトされた293c18細胞で発現したヒト及びカニクイザルのBTLAに対して飽和結合を示すことを実証する。

【0112】

ヒトBTLAコンストラクトを安定的に発現する293c18細胞クローン1E4又はカニクイザルBTLAを安定的に発現するクローン1G5をAccutase溶液(Millipore Sigma/Sigma-Aldrich)で収集し、リン酸緩衝生理食塩水、1%BSAで1回洗浄した。室温で10分間穏やかに揺らすことによって、親油性カルボシアニン色素DiD(2 μ M、1,1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テトラメンチルインドジカルボシアニン; ThermoFisher Scientific)を293c18カニクイザルBTLA細胞に負荷した。DiDで染色された細胞をPBS、1%BSAで洗浄し、等量のヒトBTLA 293c18細胞及びカニクイザルBTLA 293c18-DiD染色細胞を混合した。FACSバッファ(PBS、1%BSA、0.02%アジ化ナトリウム)中において4℃で10分間穏やかに振盪しながら、細胞(2 $\times 10^5$ 総細胞/サンプル)を指定の濃度の精製6G3 IgG4(2つの生産ロット、APE10840.03及びAPE10840.04(H鎖配列番号144、L鎖配列番号174))又は鶏卵リゾチームに特異的なヒトIgG4アイソタイプ対照抗体と共にインキュベートした。細胞を遠心分離し、FACSバッファで1回洗浄し、FACSバッファに再懸濁させ、4℃で更に20分間穏やかに振盪しながらインキュベートした。細胞を遠心分離し、BSAを含まないFACSバッファで1回洗浄し、室温で10分間、100 μ L/ウェルのPBS中2%パラホルムアルデヒドで固定した。細胞をFACSバッファで1回洗浄し、4℃で10分間穏やかに振盪しながら二次抗体(ヤギ抗ヒトカッパーPE、FACSバッファ中0.2 μ g/mL、Southern Biotech)と共にインキュベートした。細胞を洗浄し、FACSバッファに再懸濁させ、BD FACSArray(BD Biosciences)で蛍光を分析した。カニクイザルBTLAを発現しているDiD染色細胞(図3)を、ヒトBTLAを発現している細胞(図3)とは別に蛍光強度中央値(MFI)について分析した。GraphPad Prism(GraphPad Software, Inc)のlog(阻害剤)対応答-可変勾配(4パラメータ)の最小二乗当てはめ解析で曲線を当てはめた。

【0113】

本明細書に開示される6G3抗体の2つのロット(APE10840.03及びAPE10840.04)は、図3に示す通り、ヒトBTLA 293c18細胞(それぞれEC₅₀約1.7nM及び1.8nM)及びカニクイザルBTLA 293c18細胞(EC₅₀約2.3nM)に対して同様の濃度依存的かつ飽和結合を示す。

【0114】

実施例5

この実施例は、本明細書に開示される6G3抗体が、正常ドナーのヒト末梢血CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、及びCD20⁺B細胞に対して飽和結合を示すことを実証する。

【0115】

San Diego Blood Bank(San Diego, CA)から入手した正常ドナー血液のHistopaque(Sigma-Aldrich)密度勾配遠心分離によって、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)を単離した。PBMCを洗浄し、FACSバッファ(PBS、1%BSA、0.02%アジ化ナトリウム)中2 $\times 10^7$ 細胞/mLでHuman BD Fc Block(2.5 μ g/1 $\times 10^6$ 細胞、BD Biosciences)及びLIVE/DEAD(登録商標)Fixable Yellow Dead Cell Stain(30 μ L、ThermoFisher Scientific)と共に氷上で10分間インキュベートした。細胞をFACSバッファで1回洗浄し、1 $\times 10^7$ 細胞/mLでFACSバッファに再懸濁させ、以下のフェノタイピング抗体を添加した: Alexa Fluor 488-抗ヒトCD3 ϵ クローンSK7

、Brilliant Violet 421-抗ヒトCD4クローンOKT4、Brilliant Violet 785-抗ヒトCD8クローンSK1、及びBrilliant Violet 570-抗ヒトCD20クローン2H7（各50 μ L；いずれもBioLegend, Inc. 製）。フェノタイピング抗体を添加した細胞（1 $\times$ 10⁶細胞／サンプル）をU底96ウェルプレートにプレーティングし、FACSバッファ中において4 $^{\circ}$ Cで20分間穏やかに振盪しながら、指定の濃度のDyLight650標識抗BTLA抗体又はアイソタイプ対照抗体と共にインキュベートした。6G3 IgG4（APE10916.02）は、DyLight650（抗体1molあたり3.44mol DyL650）で標識されたAPE10840であった。鶏卵リゾチームに特異的なヒトIgG4アイソタイプ対照抗体をDyLight650で標識した（抗体1molあたり3.22mol DyL650）。参照抗BTLA抗体MIH26は、BioLegend, Inc. からアロフィコシアニン（APC）標識抗体として購入した。サンプルをFACSバッファで1回洗浄し、150 μ L／ウェルのFACSバッファに再懸濁させ、4 $^{\circ}$ Cで10分間更に洗浄した。サンプルを遠心分離し、室温で10分間、リン酸緩衝生理食塩水中4%パラホルムアルデヒドで固定した。サンプルをFACSバッファで2回洗浄し、150 μ L／ウェルのFACSバッファに再懸濁させ、NovoCyteフローサイトメータ（ACEA Biosciences, Inc.）で蛍光を分析した。NovoExpress Software（ACEA Biosciences, Inc.）を使用してデータを解析した。ゲーティングされたCD4⁺T細胞（図4）、CD8⁺T細胞（図4）、又はCD20⁺B細胞（図4）における抗BTLA又はアイソタイプ染色の蛍光強度中央値をグラフ化し、GraphPad Prism（GraphPad Software, Inc）においてEC₅₀を算出するためにlog（アゴニスト）対応答（3パラメータ）最小二乗当てはめで曲線を当てはめた。

10

20

30

40

50

【0116】

DyLight650で標識された本明細書に開示される6G3抗体は、健常ドナーのCD4⁺T細胞（図4）、CD8⁺T細胞（図4）、及びB細胞（図4）に対して濃度依存的かつ飽和結合を示す。6G3抗体は、EC₅₀約2.4nMでCD4⁺T細胞に、EC₅₀約3.2nMでCD8⁺T細胞に、EC₅₀約0.5nMでCD20⁺B細胞に結合する。陽性対照の抗BTLA抗体MIH26-APCによる染色は、6G3抗体による染色と同等である。DyLight650で標識したヒトIgG4アイソタイプ対照抗体は、これら細胞集団の染色を示さない（図4）。

【0117】

実施例6

この実施例は、本明細書に開示される6G3抗体が、正常カニクイザル末梢血のCD3⁺T細胞及びCD20⁺B細胞に対して濃度依存的な結合を示すことを実証する。

【0118】

安定的にトランスフェクトされたCHO-K1細胞のプールから製造された6G3 IgG4（APE13308）を、製造者の指示に従ってAlexa Fluor 647（AF647）（Alexa Fluor Antibody Labeling Kit；ThermoFisher Scientific／Molecular Probes）で標識し、APE13766.02（6G3-AF647）と命名した。Alta sciencesから正常カニクイザルからの新鮮末梢血を入手した。全血サンプル（800 μ L）をFcR Blocking Reagent、ヒト（Miltenyi Biotec, Inc）と共に室温で10分間インキュベートし、次いで、暗所において室温で20分間、カニクイザルのT細胞集団とB細胞集団とを識別するための蛍光標識抗体の混合物〔PerCP-Cy5.5マウス抗ヒトCD3（クローンSP34-2；BD Biosciences）、BD Horizon V450マウス抗ヒトCD4（クローンL200；BD Biosciences）、APC／Cy7マウス抗ヒトCD8（クローンSK1；BD Biosciences）、Brilliant Violet 785抗CD20（クローン2H7；BioLegend, Inc.）、BD Hori

zon V500マウス抗NHP CD45 (クローンD058-1283; BD Biosciences)] で染色した。次いで、血液をウェルに分注し、指定の濃度の6G3-AF647 (APE13766.02) 又はAPC-マウス抗ヒトCD272 (BT LA) 参照抗体 (クローンJ168-540; BD Biosciences) と共に、暗所において室温で30分間インキュベートした。インキュベーション後、2.0mLの希釈したBD Pharm Lyse溶解液 (BD Biosciences) を添加することによって赤血球を10分間溶解し、サンプルを200×gで5分間遠心し、FACSバッファ [ダルベッコPBS、カルシウムなし、マグネシウムなし (Gibco/ThermoFisher Scientific)、25mM HEPES、pH7.2、0.1% BSA、0.1% アジ化ナトリウム] で洗浄し、室温で10分間、4% パラホルムアルデヒド (200μL/サンプル) で固定した。サンプルをFACSバッファで2回洗浄し、NovoCyte Quanteonフローサイトメータ (ACEA Biosciences, Inc) で蛍光を分析した。NovoExpress Software (ACEA Biosciences, Inc.) を使用してデータを解析した。平均蛍光強度 (MFI) 値をグラフ化し、GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc) において非線形回帰分析で当てはめた。全CD3⁺細胞に対する各抗BT LA抗体のMFI値を図5Aに示し、全CD20⁺細胞に対する各抗BT LA抗体のMFI値を図5Bに示す。図5Cは、抗CD3染色及び33nM APC標識抗BT LA参照抗体 (クローンJ168-540) 染色のドットプロット解析を示す。図5Dは、抗CD3染色及び100nM 6G3-AF647染色のドットプロット解析を示す。図5C及び図5DにおけるCD3⁻細胞に対する各抗BT LA抗体の結合 (各パネルの下象限の緑色の細胞) は、CD20⁺B細胞への結合を反映している。

10

20

30

40

50

【0119】

AF647で標識した本明細書に開示される6G3抗体は、正常カニクイザルからの末梢血CD3⁺T細胞及びCD20⁺B細胞に対して濃度依存的な結合を示す。CD3⁺末梢血T細胞への結合は、使用した染色条件下において100nM抗体では飽和せず (図5A) (推定EC₅₀約3.4nM)、6G3-RF647のCD20⁺末梢血B細胞への結合は飽和し始めている (概算EC₅₀約1.4nM) (図5B)。B細胞の6G3-AF647染色のMFIは、T細胞の6G3-AF647染色のMFIよりも約9倍大きい。正常CD3⁺及びCD3⁻ (CD20⁺) カニクイザル細胞における100nMの6G3-AF647の染色パターンは、33nMの市販の参照APC標識抗BT LA抗体J168の染色パターンと酷似している (それぞれ、図5D及び5C)。

【0120】

実施例7

この実施例は、本明細書に開示される抗BT LA抗体が、細胞表面BT LAへの結合についてHVEMともHVEM/LIGHT複合体とも競合しないことを実証する。

【0121】

ヒトBT LAを安定的に発現している293c18細胞クローン1E4をAccutase溶液 (Millipore Sigma/Sigma-Aldrich) で収集し、PBS、1% BSAで1回洗浄した。U底96ウェルプレートに2×10⁵/ウェルで細胞をプレーティングし、氷上に置いた。指定の濃度の2倍の精製抗体をFACSバッファ (PBS、1% BSA、0.02% アジ化ナトリウム) で3倍連続希釈した。試験した抗体は、鶏卵リゾチームに特異的なヒトIgG4アイソタイプ対照抗体、参照BT LA IgG4アンタゴニスト抗体、及び6G3 IgG4 (APE10840.06) であった。等モル濃度 (各60nM) 量のDyLight650-HVEMヒトIgG1 Fc及び三量体LIGHT-foldon-hisを混合し、室温で15分間プレインキュベートすることによって、三量体HVEM/LIGHT複合体を予め形成した。DyLight650-HVEM-Fc (最終濃度100nM; 図6A) 又は予め形成されたDyLight650-HVEM/LIGHT複合体 (HVEM/LIGHTの最終濃度、各30nM; 図6B) のいずれかを、希釈した抗体 (抗体の最終濃度は指定通り) に添加し、氷

上で15分間インキュベートした。細胞を遠心分離し、抗体及びHVEM（図6A）又は抗体及びHVEM／LIGHT複合体（図6B）の混合物に穏やかに再懸濁させ、氷上で30分間インキュベートした。細胞を遠心分離し、FACSバッファで1回洗浄し、室温で10分間、PBS中2%パラホルムアルデヒドで固定した。細胞を1回洗浄し、FACSバッファに再懸濁させ、BD FACSArray（BD Biosciences）で蛍光を分析した。蛍光強度の中央値（MFI）をGraphPad Prism（GraphPad Software, Inc）でグラフ化し、log（アゴニスト）対応答（3パラメータ）の最小二乗当てはめで曲線を当てはめた。

【0122】

本明細書に開示される6G3抗体（APE10840.06）は、細胞表面BTLAに対するHVEM-Fcの結合（図6A）又はHVEM／LIGHT複合体の結合（図6B）のいずれとも競合しない。6G3抗体の存在下では、HVEM-Fcの細胞表面BTLAへの結合の増加が観察される（図6A）。6G3依存的なHVEM結合の増加は、HVEM／LIGHT複合体を用いた場合にも観察されるが、HVEM-Fc単独でより顕著である（図6A及び図6B）。参照アンタゴニスト抗体は、HVEM及びHVEM／LIGHTのBTLAへの結合の濃度依存的な阻害を示す（図6A及び図6B）。無関係なアイソタイプ一致IgG4抗体は、HVEM又はHVEM／LIGHTのBTLAへの結合に影響を及ぼさない。

【0123】

実施例8

この実施例は、本明細書に開示される6G3抗体及び10D8抗体が結合するヒトBTLA上のエピトープが、BTLAのHVEM結合部位とは反対側の面にあることを実証する。

【0124】

組換えヒトBTLAモノマーを用いて、本明細書に開示される6G3抗体及び10D8抗体が結合したBTLA上のペプチドの水素-重水素交換マッピングを行った。実験に使用したBTLAは、hBTLAのアミノ酸番号31～155（UniProt ID# Q7Z6A9）の後に6-hisタグが付いたものであった。図7A、7B、及び7Cは、Protein Data Bank構造（Compaa et al., J. Biol Chem 280:39553-39561（2005）を参照）からPyMOLでレンダリングしたヒトHVEM細胞外結合ドメインの結晶構造の空間充填モデル（薄い灰色）と複合体化したヒトBTLA細胞外ドメインの結晶構造のリボンモデル（黒）を示す。図7Aは、6G3抗体（APE12839.05（H鎖配列番号144、L鎖配列番号174））を用いた水素-重水素交換実験をまとめたものであり、図7Bは、10D8抗体（APE11482.06）を用いた水素-重水素交換実験をまとめたものであり、図7Cは、参照BTLAアンタゴニスト抗体（APE10693.17）を用いた水素-重水素交換実験をまとめたものである。各実験では、交換速度をみるためにBTLA／抗体混合物又はBTLAのみを4分間、10分間、又は60分間重水素標識した。インキュベーション後、BTLAタンパク質を酸性pHで急速に酵素的にタンパク質分解し、得られたペプチドへの重水素の取り込みを液体クロマトグラフィー質量分析によって定量した。

【0125】

マッピングは、BTLAの以下の残基の関与を示した：

6G3結合

ペプチド52～65 DPFELECPVKYCAN（配列番号227）

ペプチド100～106 LHFEPVL（配列番号228）

10D8結合

ペプチド46～65 HSI LAGDPFELECPVKYCAN（配列番号229）

ペプチド82～91 LEDRQTSWKE（配列番号230）

ペプチド100～106 LHFEPVL（配列番号231）

参照アンタゴニスト結合

ペプチド39～41 Y I K (配列番号232)

ペプチド52～64 D P F E L E C P V K Y C A (配列番号233)

ペプチド100～106 L H F E P V L (配列番号228)

ペプチド124～131 I E S H S T T L (配列番号234)

【0126】

実施例9

この実施例は、BT LA及びHVEMが同じ細胞で発現した場合、本明細書に開示される6G3抗体は、NF-κBルシフェラーゼレポーターアッセイにおいてLIGHT誘導HVEMシグナル伝達を阻害することを実証する。

【0127】

完全長ヒトBT LA、完全長ヒトHVEM、及びpGL4.32由来のNF-κBルシフェラーゼレポーターコンストラクト[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] (Promega)を安定的に発現する293c18細胞を産生し、単一細胞クローニングし、huHVEM/huBT LA/NF-κBルシフェラーゼ、クローン8と命名した。完全長ヒトLIGHTを安定的に発現するCHO-S細胞を産生し、安定的なプールとして最も高いLIGHT発現について2回選別した。huHVEM/huBT LA/NF-κBルシフェラーゼ細胞をAccutase溶液(Sigma-Aldrich/Millipore Sigma)で収集し、10%ウシ胎仔血清を補充したダルベッコ変法イーグル培地に再懸濁させ、平底96ウェルプレートにプレーティング(5×10^4 細胞/ウェル)した。37℃、5%CO₂で1時間インキュベートした後、指定の濃度の6G3 IgG4(APE12839.07(H鎖配列番号144、L鎖配列番号174))、鶏卵リゾチームに特異的なヒトIgG4アイソタイプ対照抗体、又はヒトIgG4参照抗BT LAアンタゴニスト抗体を細胞に添加した。室温で30分インキュベートした後、CHO-S LIGHT細胞を収集し、添加した(0.55×10^4 細胞/ウェル;最終条件、9:1 HVEM-NF-κB応答因子:CHO-S LIGHT刺激因子細胞、これはNF-κB応答のEC₅₀を表す)。37℃、5%CO₂で4時間後、等体積のSteady-Glo Luciferase Assay System(Promega)をウェルに添加し、室温で10分間インキュベートした。EnVision Multi mode Plater Reader(PerkinElmer)を用いて0.1秒の測定時間でサンプルの発光を読み取った。相対光単位(RLU)での発光をグラフ化し、GraphPad Prism(GraphPad Software)でlog(アゴニスト)対応答(3パラメータ)の最小二乗当てはめで曲線を当てはめた。

【0128】

図8に示すNF-κBルシフェラーゼレポーターアッセイは、BT LA及びHVEMが同じ細胞で発現した場合、本明細書に開示される6G3抗体が、CHO-S LIGHTに応答して、濃度依存的にHVEM依存性NF-κBシグナル伝達を阻害することを実証する。このことは、これら条件下において、本明細書に開示される6G3抗体が同じ細胞におけるHVEMとBT LAとの間の相互作用を促進し、その結果、LIGHTが駆動するHVEM依存性NF-κBシグナル伝達を減少させる可能性があることを示唆する。

【0129】

図8に示すNF-κBルシフェラーゼレポーターアッセイは、BT LA及びHVEMが同じ細胞で発現した場合、参照アンタゴニスト抗体が、CHO-S LIGHTに応答して、濃度依存的にLIGHTが媒介するHVEM依存性NF-κBシグナル伝達を増強することを実証する。同じ細胞におけるBT LAとHVEMとの相互作用を妨害することによって、アンタゴニスト抗体は、より多くの未結合HVEM分子をLIGHTとの相互作用に利用できるようにすることができ、それによって、LIGHTが駆動するHVEM依存性NF-κBシグナル伝達が増加する。

【0130】

実施例10

10

20

30

40

50

この実施例は、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) アッセイにおいて、本明細書に開示される 6 G 3 抗体が、同じ細胞表面における B T L A / H V E M 複合体を破壊しないことを実証する。

【0131】

図 9 A では、完全長ヒト B T L A 及びヒト H V E M を安定的に発現している 2 9 3 c 1 8 細胞クローンを Accutase 溶液 (Millipore Sigma / Sigma - Aldrich) で収集し、FACS バッファ (PBS、1 % BSA、0.02 % 酸化ナトリウム) で洗浄し、白色 U 底 9 6 ウェルプレートにプレーティング (2×10^5 細胞 / ウェル) した。細胞を遠心分離し、指定の濃度の 3 倍連続希釈した抗体を添加し、4 °C で穏やかに振盪しながら 1 時間細胞をインキュベートした。試験した抗体は、6 G 3 I g G 4 (A P E 1 2 8 3 9.05 (H 鎖配列番号 1 4 4、L 鎖配列番号 1 7 4))、参照アンタゴニスト抗体 I g G 4、及び鶏卵リゾチームに特異的なヒト I g G 4 P アイソタイプ対照抗体であった。細胞を遠心分離し、FACS バッファで洗浄し、FRET アクセプター抗体である APC-抗 H V E M ($15 \mu\text{g} / \text{mL}$; クローン 1 2 2、BioLegend) に再懸濁させた。FRET ドナー抗体はビオチンヒト化 1 0 D 8 (A P E 1 2 7 7 4.02) であり、室温で 2 0 分間インキュベートすることによって、 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ で $0.025 \mu\text{g} / \text{mL}$ ストレプトアビジン-Eu (LANCE Eu-W8044-ストレプトアビジン AD0060、PerkinElmer) と予め複合体化させた。ドナー複合体であるビオチン-抗 B T L A / ストレプトアビジン-Eu をアクセプターである APC-抗 H V E M 抗体と共にプレートに添加し、4 °C で 2 4 時間インキュベートした。プレートを冷 FACS バッファで洗浄し、EnVision Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Santa Clara, CA) でサンプルの蛍光を読み取った。GraphPad Prism (GraphPad Software) で、 $665 \text{ nm} / 615 \text{ nm}$ における蛍光の比をグラフ化した。各点は、3 つの独立した複製実験の平均 $\pm$ SEM である。各実験の各サンプル条件は、5 つの複製ウェルにおけるものであった。

10

20

【0132】

図 9 A に示す FRET アッセイは、トランスフェクトされた 2 9 3 c 1 8 細胞上に B T L A / H V E M 複合体が存在すること、及び本明細書に開示される 6 G 3 抗体が、アイソタイプ対照抗体と同様に、 $40 \mu\text{g} / \text{mL}$ 以下の濃度では B T L A / H V E M FRET シグナルの阻害を示さないことを実証する。この結果から、本明細書に開示される 6 G 3 抗体は、同じ細胞表面上の B T L A と H V E M との相互作用を阻害しないことが確認される。

30

【0133】

図 9 A に示す FRET アッセイは、参照アンタゴニスト抗体が濃度依存的に B T L A / H V E M 複合体の FRET シグナルを阻害し、 IC_{50} が約 $0.65 \mu\text{g} / \text{mL}$ であることを実証する。

【0134】

図 9 B では、完全長ヒト B T L A 及びヒト H V E M を安定的に発現している 2 9 3 c 1 8 細胞クローンを Accutase 溶液 (Millipore Sigma / Sigma - Aldrich) で収集し、FACS バッファで洗浄し、白色 U 底 9 6 ウェルプレートにプレーティング (2×10^5 細胞 / ウェル) した。細胞を遠心分離し、指定の濃度の 3 倍連続希釈した FRET アクセプター抗体である APC-抗 H V E M (クローン 1 2 2、BioLegend) 又は APC-マウス I g G 1 アイソタイプ対照抗体をプレートに添加した。ビオチン化 FRET ドナー抗体を、室温で 2 0 分間インキュベートすることによって、 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ で $0.025 \mu\text{g} / \text{mL}$ ストレプトアビジン-Eu (LANCE Eu-W8044-ストレプトアビジン AD0060、PerkinElmer) と予め複合体化させた。試験したビオチンコンジュゲート FRET ドナー抗体は、ビオチン-6 G 3 I g G 4 (A P E 1 3 1 2 4.01、これはビオチンコンジュゲート A P E 1 2 8 3 9.05 (H 鎖配列番号 1 4 4、L 鎖配列番号 1 7 4) であった)、ビオチン参照アン

40

50

タゴニスト IgG4 抗体、及び鶏卵リゾチームに特異的なビオチン-ヒト IgG4 アイソタイプ対照抗体であった。全てのウェルにおけるドナービオチン-抗体/ストレプトアビジン-Eu 複合体の最終濃度は、 $0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 抗体及び $0.75 \text{ ng}/\text{mL}$ ストレプトアビジン-Eu であった。プレートを 4°C で 24 時間インキュベートし、冷 FACS バッファで洗浄し、EnVision Multimode Plater Reader (PerkinElmer) でサンプルの蛍光を読み取った。GraphPad Prism (GraphPad Software) で、 $665 \text{ nm}/615 \text{ nm}$ における蛍光の比をグラフ化した。各点は、2つの複製ウェルの平均 $\pm$ SEM である。

【0135】

図9Bに示すFRETアッセイは、ストレプトアビジン-Euと複合化した本明細書に開示されるビオチン-6G3抗体の存在下において、漸増濃度のAPC-抗HVEMが、濃度依存的に増加するFRETシグナルを産生することを実証する。この実施例は、6G3抗体が細胞表面のBTLAに結合した場合、BTLAは依然として同じ細胞表面上のHVEMと複合体を形成できることを実証する。

10

【0136】

図9Bに示すFRETアッセイは、ストレプトアビジン-EUと複合化したビオチン参照アンタゴニスト抗体の存在下において、BTLA/HVEM複合体のFRETシグナルは検出不可能であり、ビオチン-アイソタイプ対照抗体と同様であることを実証する。この実施例は、参照BTLAアンタゴニスト抗体が、同じ細胞表面上のBTLA-HVEM複合体を破壊することを実証する。

20

【0137】

実施例11

この実施例は、BTLA及びHVEMが異なる細胞で発現した場合、本明細書に開示される6G3抗体は、NF- κ Bルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、BTLAが誘導するHVEMシグナル伝達を部分的に阻害することを実証する。

【0138】

完全長ヒトHVEM及びNF- κ Bルシフェラーゼレポーターコンストラクトを安定的に発現する293c18細胞を産生し、HVEM/NF- κ Bルシフェラーゼ、クローン11と命名した。完全長ヒトBTLAを安定的に発現する293c18細胞を産生し、単一細胞クローニングし、huBTLA 293c18、クローン2と命名した。ヒトBTLA 293c18細胞をAccutase溶液 (Sigma-Aldrich/Millipore Sigma) で収集し、10% FBSを補充したDMEMに再懸濁させ、平底96ウェルプレートにプレーティング (0.5×10^4 細胞/ウェル) した。指定の濃度の安定的にトランスフェクトされたCHO-K1細胞のプールから製造された6G3 IgG4 (APE13308.03) 抗体、鶏卵リゾチームに特異的なヒトIgG4アイソタイプ対照抗体、又はIgG4参照抗BTLAアンタゴニスト抗体) を細胞に添加した。室温で30分インキュベートした後、HVEM/NF- κ B細胞を収集し、添加した (5×10^4 細胞/ウェル)。 37°C 、5% CO_2 で5時間後、等体積のSteady-Glo Luciferase Assay System (Promega) をウェルに添加し、室温で10分間インキュベートした。GloMax Navigator Microplate Luminometer (Promega) において0.3秒の測定時間でサンプルの発光を読み取った。相対光単位 (RLU) での発光をグラフ化し、GraphPad Prism (GraphPad Software) でlog (アゴニスト) 対応答 (3パラメータ) の最小二乗当てはめで曲線を当てはめた。

30

40

【0139】

図10に示すNF- κ Bルシフェラーゼレポーターアッセイは、HVEM及びBTLAが異なる細胞で発現した場合、本明細書に開示される6G3抗体が、BTLA 293c18細胞に応答して、濃度依存的にHVEM依存性NF- κ Bシグナル伝達を部分的に阻害することを実証する。このことは、これら条件下において、本明細書に開示される6G3抗体が、BTLAが異なる細胞上にある場合にHVEMシグナル伝達を部分的に阻害す

50

る可能性があることが示唆している。本明細書に開示される6G3抗体とインキュベートする前にヒトBTLA 293c18細胞をパラホルムアルデヒドで固定した場合又はエンドサイトーシスをブロックするダイナミンGTPaseの阻害剤で細胞を処理した場合にも同じ結果が得られる。

【0140】

図10に示すNF-κBルシフェラーゼレポーターアッセイは、HVEM及びBTLAが異なる細胞で発現した場合、参照アンタゴニスト抗BTLA抗体の添加により、BTLAが媒介するHVEM依存性NF-κBシグナル伝達が濃度依存的に完全に阻害されることを実証する。

【0141】

実施例12

この実施例は、SHP2動員PathHunter Jurkat BTLAシグナル伝達アッセイにおいて、本明細書に開示される6G3抗体の直接BTLAアゴニスト活性を実証する。

【0142】

β-ガラクトシダーゼ酵素ドナー(ED)タグ付きヒトBTLA及びβ-ガラクトシダーゼ酵素アクセプター(EA)タグ付きヒトSHP2を安定的に発現するクローンJurkat細胞株をEurofins Discover X (Fremont, CA)で産生し、Jurkat BTLA-ED SHP2-EA細胞と命名した。アッセイ設定のために、Jurkat BTLA-ED SHP2-EA細胞を収集し、96ウェルプレートにプレーティング(2×10⁴細胞/ウェル)した。抗体希釈液を別のプレートで調製した。試験した抗体及びタンパク質は、安定的にトランスフェクトしたCHO-K1細胞のプールから製造した6G3 IgG4 (APE13308.03)抗体、鶏卵リゾチームに特異的なヒトIgG4アイソタイプ対照抗体、参照BTLAアンタゴニストIgG4抗体、及びヒトHVEM-IgG1 Fc/三量体LIGHT (1対1.1のモル比のAPE11989.16及びAPE07872.05)の可溶性複合体であった。抗体及びタンパク質を細胞アッセイプレートに添加し、室温で2時間インキュベートした。PathHunter Bioassay Detection試薬を全てのウェルに添加し、室温で20分間インキュベートした。次いで、Bioassay Detection Reagent 2を全てのウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした後、En Vision Multimode Plater Reader (PerkinElmer)において0.1秒の積分時間で発光シグナルを測定した。GraphPad Prism (GraphPad Software)でデータをグラフ化した。可変勾配(4パラメータ)で制約のないS字型用量応答曲線当てはめを用い、最小二乗当てはめ法を用いて、EC₅₀値を算出した。データは、各点毎のトリプリケートサンプルの平均(±標準偏差)を表す。アッセイ及びデータ解析は、プロジェクトID: DRAX-ANAB-190724の下、Eurofins Discover X (Fremont, CA)で行った。

【0143】

図11に示すSHP2動員PathHunter Jurkat BTLAシグナル伝達アッセイは、可溶性抗体としての本明細書に開示される6G3抗体が、直接BTLAアゴニスト活性を有し、濃度依存的な低振幅のBTLAシグナル伝達(EC₅₀=125 ng/mL)を誘導することを実証する。BTLA細胞質ドメインへのSHP2の動員を誘導することにより、本明細書に開示される6G3抗体は、活性化されたT細胞及びB細胞における阻害性シグナル伝達を開始することによって機能する可能性がある。

【0144】

図11に示すSHP2動員PathHunter Jurkat BTLAシグナル伝達アッセイは、可溶性抗体としての参照BTLAアンタゴニスト抗体が直接BTLAアゴニスト活性を有し、最大シグナルが6G3抗体よりも高い濃度依存的なBTLAシグナル(EC₅₀=28.8 ng/mL)を誘導することを実証する。図11に示すSHP2動

10

20

30

40

50

員 PathHunter Jurkat BTLA シグナル伝達アッセイでは、可溶性 HVEM/LIGHT 複合体は、恐らく抗体と比較して可溶性 HVEM の BTLA に対する親和性が低いことから、飽和しない弱い濃度依存的な誘導 BTLA シグナル伝達を誘導する。

【0145】

実施例 13

この実施例は、SHP2 動員 PathHunter Jurkat BTLA シグナル伝達アッセイにおいて、本明細書に開示される 6G3 抗体が、トランスフェクトされた U-2 OS 細胞株において HVEM によって誘導される BTLA シグナル伝達を阻害しないことを実証する。

【0146】

β -ガラクトシダーゼ酵素ドナー (ED) タグ付きヒト BTLA 及び β -ガラクトシダーゼ酵素アクセプター (EA) タグ付きヒト SHP2 を安定的に発現するクローン Jurkat 細胞株 (Jurkat BTLA-ED SHP2-EA 細胞) 並びにヒト HVEM を安定的に発現する U-2 OS 骨肉腫細胞株 (U-2 OS hHVEM 細胞) を、Eurofins DiscoverX (Fremont, CA) で産生した。アッセイ設定のために、Jurkat BTLA-ED SHP2-EA 細胞を収集し、96 ウェルプレートにプレーティングした (2×10^4 細胞/ウェル)。抗体希釈液を別のプレートで調製した。試験した抗体は、安定的にトランスフェクトされた CHO-K1 細胞のプールから製造された 6G3 IgG4 (APE13308.03) 抗体、鶏卵リゾチームに特異的なヒト IgG4 アイソタイプ対照抗体、及び参照 BTLA アンタゴニスト IgG4 抗体であった。指定の濃度の抗体をアッセイプレートに添加し、37°C、5% CO₂ の加湿インキュベーター内で 1 時間インキュベートした。U-2 OS hHVEM 細胞を収集し、再懸濁させ、Jurkat BTLA-ED SHP2-EA 細胞と共にアッセイプレートに添加 (5×10^4 細胞/ウェル) し、室温で 2 時間インキュベートした。PathHunter Bioassay Detection 試薬を全てのウェルに添加し、室温で 30 分間インキュベートした。次いで、Bioassay Detection Reagent 2 を全てのウェルに添加し、室温で 1 時間インキュベートした後、EnVision Multimode Plater Reader (PerkinElmer) において 0.1 秒の積分時間で発光シグナルを測定した。GraphPad Prism (GraphPad Software) でデータをグラフ化し; 可変勾配 (4 パラメータ) で制約のない S 字型用量応答曲線当てはめを用い、最小二乗当てはめ法を用いて、IC₅₀ 値を算出した。データは、各点毎のトリプリケートサンプルの平均 (± 標準偏差) を表す。アッセイ及びデータ解析は、プロジェクト ID: DRX-ANAB-191210 の下、Eurofins DiscoverX (Fremont, CA) で行った。

【0147】

図 12 に示す SHP2 動員 PathHunter Jurkat BTLA シグナル伝達アッセイは、本明細書に開示される 6G3 抗体が、異なる細胞で HVEM によって誘導される BTLA への SHP2 動員に影響を与えないことを実証する。

【0148】

図 12 に示す SHP2 動員 PathHunter Jurkat BTLA シグナル伝達アッセイは、参照 BTLA アンタゴニスト抗体が、異なる細胞で HVEM によって誘導される BTLA シグナル伝達を強力に濃度依存的に阻害することを実証する (IC₅₀ = 8.9 ng/mL)。

【0149】

実施例 14

この実施例は、FcγR の会合を提供するために FcγRIa (CD64a) をトランスフェクトした U-2 OS 細胞を添加した SHP2 動員 PathHunter Jurkat BTLA シグナル伝達アッセイにおける、本明細書に開示される 6G3 抗体の直

10

20

30

40

50

接 B T L A アゴニスト活性の増加を実証する。

【0150】

β-ガラクトシダーゼ酵素ドナー (E D) タグ付きヒト B T L A 及び β-ガラクトシダーゼ酵素アクセプター (E A) タグ付きヒト S H P 2 を安定的に発現するクローン J u r k a t 細胞株 (J u r k a t B T L A - E D S H P 2 - E A 細胞) 並びにヒト F c y R I a / C D 6 4 a を安定的に発現する U - 2 O S 骨肉腫細胞株 (U - 2 O S h F c y R I a 細胞) を、E u r o f i n s D i s c o v e r X (F r e m o n t , C A) で産生した。U - 2 O S h F c y R I a 細胞を収集し、96 ウェルプレートにプレATING (1 × 10⁴ 細胞 / ウェル) した。抗体希釈液を別のプレートで調製し、アッセイプレートに添加し、37℃、5% C O₂ の加湿インキュベーター内で1時間インキュベートした。試験した抗体は、安定的にトランスフェクトされた C H O - K 1 細胞のプールから製造された 6 G 3 I g G 4 (A P E 1 3 3 0 8 . 0 3) 抗体、鶏卵リゾチームに特異的なヒト I g G 4 アイソタイプ対照抗体、及び参照 B T L A アンタゴニスト I g G 4 抗体であった。J u r k a t B T L A - E D S H P 2 - E A 細胞を収集し、U - 2 O S h F c y R I a 細胞と共にアッセイプレートに添加 (2 × 10⁴ 細胞 / ウェル) した。プレートを室温で2時間インキュベートした。P a t h H u n t e r B i o a s s a y D e t e c t i o n 試薬を全てのウェルに添加し、室温で30分間インキュベートした。B i o a s s a y D e t e c t i o n R e a g e n t 2 を全てのウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした後、E n V i s i o n M u l t i m o d e P l a t e r R e a d e r (P e r k i n E l m e r) において0.1秒の積分時間で発光シグナルを測定した。G r a p h P a d P r i s m (G r a p h P a d S o f t w a r e) でデータをグラフ化し; 可変勾配 (4パラメータ) で制約のないS字型用量応答曲線当てはめを用い、最小二乗当てはめ法を用いて、E C₅₀ 値を算出した。データは、各点毎のトリプリケートサンプルの平均 (±標準偏差) を表す。アッセイ及びデータ解析は、プロジェクトID: D R X - A N A B - 1 9 1 2 1 0 の下、E u r o f i n s D i s c o v e r X (F r e m o n t , C A) で行った。

10

20

【0151】

図13に示す S H P 2 動員 P a t h H u n t e r J u r k a t B T L A シグナル伝達アッセイは、F c y R I a の会合を提供する細胞の存在下において、可溶性抗体としての本明細書に開示される 6 G 3 抗体が、増大した直接 B T L A アゴニスト活性を有し、濃度依存的に B T L A シグナル伝達を誘導する (E C₅₀ = 9.3 ng / mL) ことを実証する。

30

【0152】

図13に示す S H P 2 動員 P a t h H u n t e r J u r k a t B T L A シグナル伝達アッセイは、F c y R I a の会合を提供する細胞の存在下において、可溶性抗体としての参照 B T L A アンタゴニスト抗体が、直接 B T L A アゴニスト活性を有し、濃度依存的に B T L A シグナルを誘導する (E C₅₀ = 3.9 ng / mL) ことを実証する。

【0153】

図13に示す S H P 2 動員 P a t h H u n t e r J u r k a t B T L A シグナル伝達アッセイは、本明細書に開示される 6 G 3 抗体及び参照 B T L A アンタゴニスト抗体が、いずれも、F c y R I a なしの J u r k a t B T L A シグナル伝達アッセイと比較して、細胞に会合している F c y R I a の存在下において増大した効力のアゴニスト活性を示す (6 G 3 では約13倍強力; 参照 B T L A アンタゴニストでは約7.4倍強力) (図11及び図13を比較) ことを実証する。本明細書に開示される可溶性 6 G 3 抗体は、B T L A 細胞質ドメインへの S H P 2 動員を誘導し、活性化された T 細胞及び B 細胞において阻害性シグナル伝達を開始させることができるが、F c y R I a に結合した 6 G 3 抗体が直接阻害性シグナル伝達を誘導する潜在力は増強され得る。

40

【0154】

実施例 15

この実施例は、1 mg / kg、3 mg / kg、又は 10 mg / kg の本明細書に開示さ

50

れる6G3抗体を4週間にわたって週2回投与した場合、異種NSG/Hu-PBMC移植片対宿主病(GvHD)モデルにおいてインビボで有効性を示すことを実証する。

【0155】

本明細書に開示される6G3抗BTLA抗体の有効性を試験する異種NSG/Hu-PBMC GvHDモデルを、The Jackson Laboratory JAX(登録商標) In Vivo Pharmacology Services (Sacramento, CA)で実施した。図14Aに示す通り、NOD-scid IL2ryⁿull (NSG)マウスに1Gyを照射した後、各マウスに 10×10^6 個のヒトPBMCを静脈内注射した。抗体(鶏卵リゾチームに特異的なヒトIgG4アイソタイプ対照抗体及び安定的にトランスフェクトされたCHO-K1細胞のプールから製造された6G3 IgG4 APE13308.05抗体)をPBMC注射の翌日から開始して4週間にわたって週2回腹腔内投与した。1mg/kg、3mg/kg、又は10mg/kgのいずれかで本明細書に開示される6G3抗体を投与し、ヒトIgG4アイソタイプ対照抗体は10mg/kgで投与した。各抗体処理群につき12匹/群であった。ベラタセプトバイオシミラー陽性対照は、4週間にわたって週3回75µg/マウスで腹腔内投与した。ベラタセプトバイオシミラー処理群は8匹であった。この試験における投与レジメン及び投与群を図14Bに示す。42日間の試験期間中、体重減少、死亡、及びGvHDスコア(体重減少、活動性、毛並み、蒼白、及び姿勢を測定)によって疾患を週3回モニタリングした。10%を超える体重減少を示した動物は毎日疾患をモニタリングし、出発体重から20%を超える体重減少を示した動物は安楽死させた。生存には、死亡が確認された動物及びThe Jackson Laboratory JAX(登録商標) In Vivo Pharmacology Servicesの試験プロトコルに定義されているエンドポイントに起因して試験から除外された動物が含まれていた。 Kaplan-Meier生存解析を用いてGraphPad Prism(GraphPad Software)で生存データをグラフ化し、これによって各群の生存期間の中央値を算出した。アイソタイプ対照群との対比較における処理群の統計的有意性は、p値を算出するためにゲートプレスローウィルコクソン検定を用いてGraphPad Prismにおいて求めた。

【0156】

図14Cに示すGvHD試験についての生存結果は、本明細書に開示される6G3抗BTLA抗体が、アイソタイプ対照抗体と比較して、試験した全ての用量で生存期間の延長において高度に統計的に有意な効果を示すことを実証する。6G3抗体の有効性は用量応答的であり、1mg/kg用量処理群は3mg/kg及び10mg/kg処理群に比べて生存期間の短縮を示した。試験期間にわたる生存期間の中央値は、アイソタイプ対照群では16日間、1mg/kgの6G3処理群では35日間、そして、3mg/kg及び10mg/kgの6G3処理群では明確でなかった。二次対照として10mg/kgの参照アンタゴニスト抗BTLA抗体を投与した。参照アンタゴニスト抗体で処理した動物では、アイソタイプ対照で処理した動物と比較して生存期間の利益は観察されなかった。

【0157】

実施例16

この実施例は、カニクイザル血清において6G3 IgG4抗BTLA抗体投与後にBTLAを検出するための96ウェル電気化学発光(ELC)サンドイッチアッセイの適格性について説明する。

【0158】

方法の開発中に、捕捉試薬の濃度、MRD、アッセイバッファの種類、及び検出試薬の濃度等のアッセイパラメーターを確立した。次いで、アッセイ内及びアッセイ間の精度及び正確度、希釈直線性、特異度、並びに凍結融解安定性を評価することによって、アッセイの方法適格性確認を実施した。最終的な方法を使用して、カニクイザルにおける非GLPの単回又は複数回投与のPK、TK、及び忍容性の試験からのサンプルを分析する。

【0159】

96ウェルMSD Standard Bindアッセイプレート（MSD品番L15XA-3）に、 $1.0\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗BTLAクローン10D8（APE10134） $50\mu\text{L}$ を 4°C で一晩コーティングした。翌日、コーティングしたプレートを $1\times\text{PBST}$ で3回洗浄し、 $250\mu\text{L}$ のブロッキングバッファで60～120分間ブロッキングした。BTLAの較正曲線範囲は $500\sim 7.8\text{ng}/\text{mL}$ であり、定量範囲は $500\sim 7.8\text{ng}/\text{mL}$ であった。 100% カニクイザル血清における2倍希釈系列を使用して標準を調製した。また、定量範囲に及ぶ5つの異なる濃度の 100% カニクイザル血清中で品質対照（QC）を調製し、凍結させた。次いで、全ての標準、サンプル、及び対照を、 $1:10$ の必要最小希釈率（MRD）において $100\mu\text{g}/\text{mL}$ の6G3 IgG4を含有するアッセイバッファで希釈し、室温で1時間、シェーカーでインキュベートした。ブロッキングした後、プレートを $1\times\text{PBST}$ で洗浄し、 $50\mu\text{L}$ の希釈した標準、サンプル、QCを室温で2時間、 $400\sim 500\text{rpm}$ のシェーカーでインキュベートした。サンプルをインキュベートした後、プレートを $1\times\text{PBST}$ で3回洗浄し、 $0.25\mu\text{g}/\text{mL}$ ビオチン化-抗BTLAポリクローナル検出抗体（PA5-95592、ThermoFisher製） $50\mu\text{L}$ を各ウェルに添加し、室温で1時間、シェーカーでインキュベートした。次いで、プレートを $1\times\text{PBST}$ で3回洗浄した。次に、1ウェルあたり $50\mu\text{L}$ の $0.2\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトアビジン-SulfoTag二次検出試薬を各ウェルに添加し、室温で30分間、シェーカーでインキュベートした。次いで、プレートを $1\times\text{PBST}$ で最後に3回洗浄した。1ウェルあたり $150\mu\text{L}$ の2X MSD Read Buffer Tを各ウェルに添加し、MSD Quickplex Plate Readerでプレートを読み取った。標準、サンプル、及び対照の複製をデュープリケートで試験し、SoftMax Pro 7.01及び $1/y^2$ 重み付けによる4パラメータ曲線当てはめを用いて、リード候補の参照標準曲線に基づいて血清濃度を逆算した。

10

20

30

40

50

【0160】

方法の適格性確認を開始する前に、6G3 IgG4抗体についての血清マトリックス干渉を評価した。マトリックス効果は観察されず、 $1:10$ の最小必要希釈率（MRD）を選択した。

【0161】

捕捉抗体として抗体10D8（APE10134）を使用した。恐らくカニクイザル血清中で6G3 IgG4と結合した際のBTLAの高次構造変化を通して、6G3 IgG4抗体の存在下では10D8のBTLAへの結合が増加することが見出された。BTLAの推定上の高次構造変化を正規化するために、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ の6G3を希釈バッファに添加し、全ての標準、サンプル、及び対照を $1:10$ のMRDに従って希釈し、シェーカーにおいて室温で1時間インキュベートした後、10D8でコーティングされたMSDプレートにサンプルを添加した。

【0162】

$500\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び $0\mu\text{g}/\text{mL}$ の6G3 IgG4の標準曲線を、 $1:10$ のMRDで $100\mu\text{g}/\text{mL}$ の6G3 IgG4を含有するアッセイバッファで希釈して、BTLAの（%RE）及び精度（%CV）を評価した。 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ の6G3 IgG4と共にインキュベートした5つの標準曲線条件はいずれも、定量アッセイ範囲内の標準的な濃度を有し、平均回収（%RE）濃度が公称濃度の 20% 以内であるという許容基準を満たしていた。精度（%CV）の平均結果は許容基準を満たし、全てのサンプルで 20% を超えなかった。BTLAでは、全誤差率（%TE）が 30% を超えることはなかった。

【0163】

アッセイ間の正確度（%RE）及び精度（%CV）は、異なる2日に実施した6回のアッセイランで評価され、各プレートの較正曲線及び定量範囲を定義する5つのレベルのQCを含んでいた。評価したQCの5つのレベルは、ULOQ（ $500\text{ng}/\text{mL}$ ）、HQC（ $400\text{ng}/\text{mL}$ ）、MQC（ $62.4\text{ng}/\text{mL}$ ）、LQC（ $15.6\text{ng}/\text{mL}$ ）、及びLLOQ（ $7.8\text{ng}/\text{mL}$ ）であった。ラン毎の各QCレベルにおいて、合計

3つの独立した複製をデュープリケートで分析した。定量アッセイ範囲内の全ての対照及び標準濃度の正確度（% R E）の平均結果は、平均回収濃度が公称濃度の20%以内であるという許容基準を満たしていた。精度（% C V）の平均結果は許容基準を満たし、全てのサンプルで20%を超えなかった。アッセイの定量範囲内のいずれの濃度においても、標準曲線又は品質対照のいずれについても、B T L Aでは全誤差率（% T E）が30%を超えることはなかった。

【0164】

5つのレベルのQ Cの6つの独立した複製の1回のランで、方法のアッセイ内の正確度（% R E）及び精度（% C V）を評価した。対照の正確度（% R E）の平均結果は、平均回収濃度が公称濃度の20%以内であるという許容基準を満たしていた。精度（% C V）の平均結果は許容基準を満たしており、20%を超えなかった。

10

【0165】

高濃度の試験物品を定量範囲に希釈できること及びアッセイが前地帯効果を有していないことを実証するために、U L O Qを超える濃度のB T L Aを添加したサンプルに対して様々な希釈を行うことによって希釈直線性を評価した。サンプルをアッセイの定量範囲に希釈し、逆算された濃度を評価した。平均結果は、1：1600以下の希釈係数で定量範囲までサンプルを希釈することが可能であることを示す。評価した濃度では、前地帯の「フック効果」は存在しなかった。

【0166】

結果は、アッセイが6 G 3 I g G 4を投与したカニクイザル試験から回収した血清中のB T L A濃度を評価するための感度及び再現性を有することを示す。

20

【0167】

実施例17

以下の実施例は、カニクイザル血清及びN O D s c i dマウス血漿中の可溶性B T L Aを定量的に求めるための電気化学発光（E C L）サンドイッチアッセイの使用について説明する。

【0168】

96ウェルM S D S t a n d a r d B i n dアッセイプレート（M S D品番L15 X A - 3）に、1.0 μ g / mLの抗B T L A捕捉試薬クローン10 D 8（A P E 10134）50 μ Lを4℃で一晩コーティングした。翌日、コーティングしたプレートを1 $\times$ P B S Tで3回洗浄し、250 μ Lのブロッキングバッファで60～120分間ブロッキングした。カニクイザル血清ではs B T L Aの較正曲線範囲が7.8～500 ng / mL、定量範囲が7.8～500 ng / mLであり、C D 1マウス血漿では較正及び定量範囲共に2.0～1000 ng / mLであった。100%種特異的マトリクスにおける2倍希釈系列を使用して標準を調製した。また、定量範囲に及ぶ5つの異なる濃度の100%種特異的マトリクス中で品質対照（Q C）を調製し、凍結させた。次いで、全ての標準、サンプル、及び対照を、1：10の必要最小希釈率（M R D）において100 μ g / mLの6 G 3を含有するアッセイバッファで希釈し、室温で1時間、シェーカーでインキュベートした。

30

【0169】

ブロッキング後、プレートを1 $\times$ P B S Tで洗浄し、50 μ Lの希釈した標準、サンプル、及びQ Cを、室温で2時間400～500 r p mのシェーカーでインキュベートした。サンプルをインキュベートした後、プレートを1 $\times$ P B S Tで3回洗浄し、0.25 μ g / mL ビオチン化抗B T L AクローンP A 5 - 95592（V C 2963104 B）検出抗体50 μ Lを各ウェルに添加し、室温で1時間シェーカーにおいてインキュベートした。次いで、プレートを1 $\times$ P B S Tで3回洗浄した。次に、1ウェルあたり50 μ Lの0.2 μ g / mL ストレプトアビジン-S u l f o T a g二次検出試薬を各ウェルに添加し、室温で30分間、シェーカーでインキュベートした。次いで、プレートを1 $\times$ P B S Tで最後に3回洗浄した。1ウェルあたり150 μ Lの2 X M S D R e a d B u f f e r Tを各ウェルに添加し、M S D Q u i c k p l e x P l a t e R e a d

40

50

erでプレートを読み取った。標準、サンプル、及び対照の複製をデュープリケートで試験し、SoftMax Pro 7.01及び $1/y^2$ 重み付けによる4-パラメータ曲線当てはめを用いて、BT LAの参照標準曲線に基づいて濃度を逆算した。

【0170】

ヒトPBMCが生着したNOD Scidマウス ($n=19$) に、6G3 IgG4抗体 (APE13308) を3つの用量群 (1 mg/kg 、 3 mg/kg 、及び 10 mg/kg IP) で投与した。アイソタイプ対照IgG4 (10 mg/kg) 又はCTLA-4-Ig ($75\text{ }\mu\text{g}$) を投与した動物を対照とした。動物に週2回投与し、心臓採血を介して試験の中間点に血漿サンプルを回収した。結果を図15に提示する。更に、循環ヒトT細胞をフローサイトメトリーによって解析して、BT LAの発現を特性評価し、ヒトT細胞を列挙し、活性化マーカーCD25を特性評価した。結果を図19に示す。6G3 IgG4は、全ての用量でヒトT細胞上のBT LA発現を減少させ、用量依存的にT細胞の増幅を阻害し、活性化マーカーCD25の発現を減少させた。

10

【0171】

2つの研究からのカニクイザルから、血液サンプルを分析した。最初の試験 ($n=180$) は、3つの投与群 (10 mg/kg IV; 10 mg/kg SC; 及び 1 mg/kg SC) からなっていた。全ての動物に単一用量の6G3 IgG4をIV又はSCのいずれかで投与し、投与前、投与の3時間後、6時間後、12時間後、24時間後、48時間後、72時間後、96時間後、168時間後、240時間後、336時間後、504時間後、672時間後、及び840時間後に全ての群の全ての動物から血液サンプルを回収した。投与前のサンプル及びビヒクル対照を投与した動物を対照とした。結果を図16に提示する。

20

【0172】

第2の試験では、カニクイザル ($n=380$) に6G3を4つの用量群 (10 mg/kg 、 50 mg/kg 、及び 100 mg/kg SC、並びに 100 mg/kg IV) で投与した。全ての動物に6G3 IgG4をIV又はSCのいずれかで週1回1日目、8日目、及び15日目に投与し、1日目、8日目、及び15日目に全ての群の全ての動物から血液サンプルを回収した：投与前、投与の3時間後、24時間後、48時間後、72時間後、96時間後。結果を図17に提示する。また、6G3 IgG4の血清レベルも測定した。結果を図18に提示する。

30

【0173】

IgG4アイソタイプ対照若しくはCTLA-4-Igを投与したヒトPBMCが生着したNOD scidマウスからのサンプル、又はカニクイザル試験からのカニクイザルの投与前若しくはビヒクル対照で処理したサンプルでは、測定可能なレベルのsBT LAは検出されなかった。脱落したsBT LAは、マウス試験における最低用量群 (1 mg/kg) を除いて、6G3 IgG4を投与した全てのカニクイザルからの血清サンプル及びヒトPBMCが生着したNOD scidマウスからの全ての血漿サンプルで検出された。この結果は、BT LAがB細胞及びT細胞の表面から脱落すること、そして、sBT LAがインビボにおける6G3 IgG4活性の薬力学的マーカーとなることを示唆している。

40

【0174】

実施例18

この実施例は、6G3 IgG4が受容体占有を達成し、カニクイザルにおけるT細胞及びB細胞上のBT LA発現を減少させることを実証する。

【0175】

用量範囲探索試験 (DRFS) において、複数用量の6G3 IgG4の影響について、フローサイトメトリーを用いてカニクイザル末梢血を分析した。4つの異なる処理群 (10 mg/kg SC、 50 mg/kg SC、 100 mg/kg SC、 100 mg/kg IV) 及び1つの対照群の動物に6G3 IgG4を投与した。

【0176】

50

6 G 3 I g G 4 は、ビヒクル対照試験動物と比較して、T細胞、B細胞、及びNK細胞の絶対数にも分布率にも有意な変化を引き起こさなかった。蛍光色素で標識した薬物（6 G 3 I g G 4 - D y L 4 8 8）の結合は、ビヒクル対照処理群と比較して6 G 3 I g G 4 を投与した全ての動物で抑制され、図20に示す通り、6 G 3 I g G 4 によるB L T A の受容体占有率はT細胞で80%超、B細胞では約70%であることが実証された。

【0177】

蛍光色素で標識した非競合抗B T L A 抗体（クローン10D8）で検出した場合、6 G 3 I g G 4 を投与した全ての動物で、ビヒクル対照処理動物と比較してT細胞及びB細胞におけるB T L A 表面発現が減少した。図20に示す通り、T細胞及びB細胞におけるB T L A の表面発現は、それぞれ約75%及び約50%減少した。

10

【0178】

T細胞及びB細胞におけるB T L A 発現の減少が比較的緩徐に起こるのに比べて、T細胞及びB細胞における受容体占有は非常に急速に起こるという速度の差があることが見出された。これは、6 G 3 I g G 4 に依存した機序でB T L A が脱落することを示唆している。抗薬物抗体（A D A）を発現した2匹の動物は、受容体の占有率の若干の低下、並びにT細胞及びB細胞におけるB T L A 発現の回復を示した。

【0179】

実施例19

この実施例は、B T L A 細胞外ドメイン（E C D）がセリンプロテアーゼ3によって膜貫通ドメイン近傍の提案認識部位で切断されることを実証する。

20

【0180】

プロテイナーゼ3（P R 3）は、好中球のセリンプロテアーゼであり、好中球が活性化された際に細胞外空間に放出される。P R 3 は、チェックポイント受容体であるT細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン3（T I M - 3）を切断し、細胞表面上のT I M - 3 のレベルを低下させることが既に示されている。

【0181】

6つの異なるレーンを、精製組み換えP R 3 及び／又はB T L A - E C D と共に最長60分間インキュベートした。レーンは、（1）P R 3 対照、（2）P R 3 60m対照、（3）B T L A 対照、（4）P R 3 + B T L A 0m、（5）P R 3 + B T L A 30m、及び（5）P R 3 + B T L A 60mからなっていた。

30

【0182】

コインキュベートした後、可溶性B L T A - E C D は複数のより小さな断片に切断され、P R 3 がB T L A を切断する能力を有することが実証された。配列の解析から、B T L A - E C D のC末端に向かって少なくとも1つのP R 2 認識モチーフが提案された。

【0183】

実施例20

この実施例は、6 G 3 I g G 4 が健常対照（H C）及びアトピー性皮膚炎（A D）ドナーにおいて、T細胞の増殖及び表面B T L A 発現を減少させることを実証する。

【0184】

H C 又はA D ドナーのP B M C を0.5 μ M C F S E で標識し、次いで、100 n M の6 G 3 I g G 4 又はアイソタイプ対照（I g G 4 - H y H e l）の存在下又は非存在下において可溶性抗C D 3（0.5 n g / m L、B i o l e g e n d、カタログ番号300332）及び可溶性抗C D 28（0.5 n g / m L、B i o l e g e n d、カタログ番号302943）で72時間刺激した。C F S E 希釈によって増殖細胞を判定した。

40

【0185】

図21Aは、6 G 3 I g G 4 で処理したC D 3 + T細胞にアイソタイプ対照を重ね合わせたヒストグラムとして示すH C 及びA D ドナーのC F S E ヒストグラムを提供する。図21Bは、増殖におけるT細胞増殖減少率（左）及び分裂指数（右）を示す。分裂指数は、各世代における分裂回数の合計を元の細胞数で除したものであり、N o v o E x p r

50

essソフトウェアの自動細胞周期増殖分析によって算出される。100nMの6G3 IgG4又はアイソタイプ対照の存在下又は非存在下において72時間抗CD3及び抗CD28で刺激した後、HC及びADドナーのPBMC培養上清のIFN γ レベルをMesoscale MDS アッセイによって測定した。結果を図21Cに示す。図21Dは、AF647コンジュゲート抗BTLA（クローン#10D8、Anapty Bio.）によって求められたHC及びADドナーのCD3⁺T細胞上のBTLA表面発現（平均蛍光強度（MFI）としてプロット）を示す。

【0186】

結果は、6G3 IgG4が対照と比較してT細胞増殖及び表面BTLA発現を減少させることを示す。

【0187】

本明細書に引用した刊行物、特許出願、及び特許を含む全ての参考文献は、各参考文献が個々にかつ具体的に参照によって援用されると示されており、かつその全体が本明細書に記載されているかのように、参照によって本明細書に援用される。

【0188】

本発明の説明に関連して（特に以下の特許請求の範囲に関連して）用語「a」及び「an」及び「the」及び「少なくとも1つ」、並びに類似の参照対象の使用は、本明細書において他の指定がない限り又は文脈から明らかに矛盾していない限り、単数形及び複数形の両方を網羅すると解釈されるべきである。1つ以上の項目を列挙した後の用語「少なくとも1つ」の使用（例えば、「A及びBのうちの少なくとも1つ」）は、本明細書において他の指定がない限り又は文脈から明らかに矛盾していない限り、列挙される項目から選択される1つの項目（A又はB）又は列挙される項目のうちの2つ以上の任意の組み合わせ（A及びB）を意味すると解釈される。用語「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」、及び「含有する（containing）」は、特に断らない限り、オープンエンドな用語である（すなわち、「含むがこれらに限定されない」を意味する）と解釈される。本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書において他の指定がない限り、単に範囲内の各別個の値を個々に参照する省略法として機能することを意図し、各別個の値は、本明細書に個々に列挙されているかのように明細書に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書において他の指定がない限り又は文脈から明らかに矛盾していない限り、任意の好適な順序で実施することができる。本明細書に提供される任意の及び全ての例又は例示的な表現（例えば、「等」）の使用は、特に主張しない限り、単に本発明をより深く説明することを意図し、本発明の範囲の限定を提起するものではない。明細書中の表現はいずれも、任意の請求されていない要素が本発明の実施に必須であることを示すと解釈されるべきではない。

【0189】

本発明を実施するための本発明者らに公知の最良の形態を含む本発明の好ましい実施形態が、本明細書に記載される。好ましい実施形態の変形は、前述の記載を読んだときに当業者に明らかになり得る。本発明者らは、当業者がこのような変形を適宜使用すると予想し、そして、本発明者らは、本明細書に具体的に記載されているのとは別の方法で本発明が実施されることを意図している。従って、本発明は、準拠法によって認められている通り、本明細書に添付される特許請求の範囲に列挙される発明主題の全ての変形及び等価物を含む。更に、その全ての可能な変形における上記要素の任意の組み合わせは、本明細書において他の指定がない限り又は文脈から明らかに矛盾していない限り、本発明によって包含される。

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

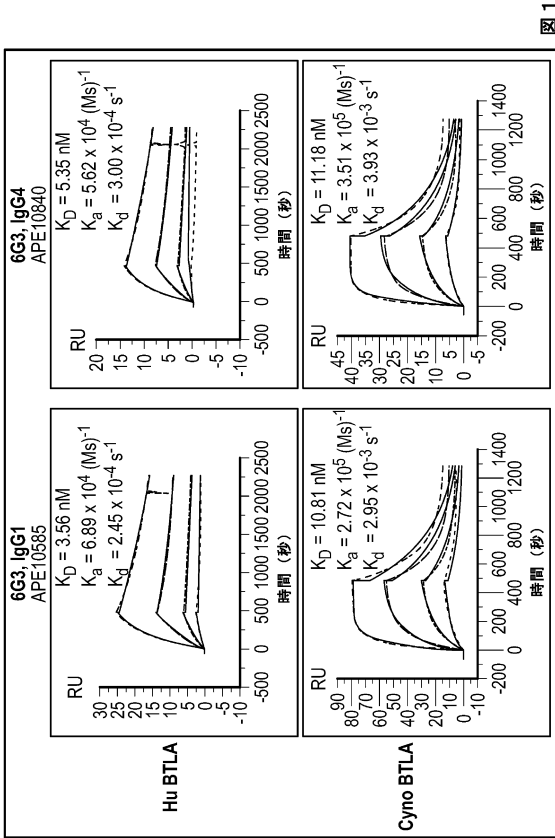


図 1

【図 2】

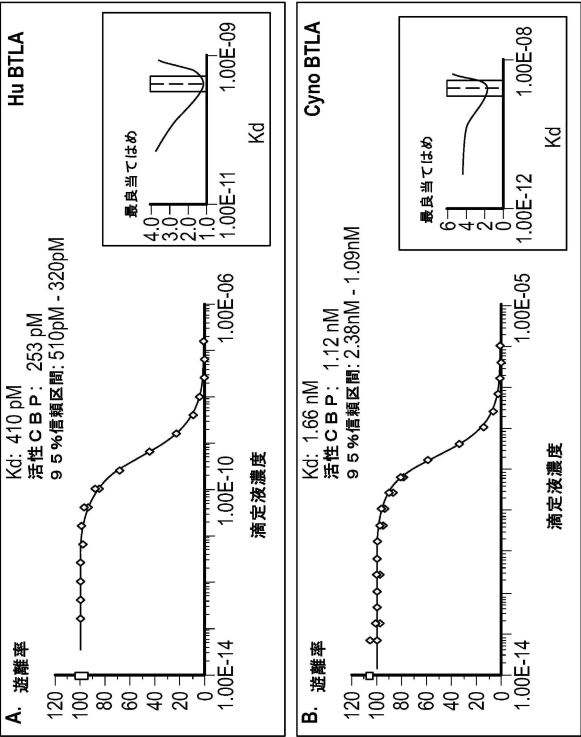


図 2

【図 3】

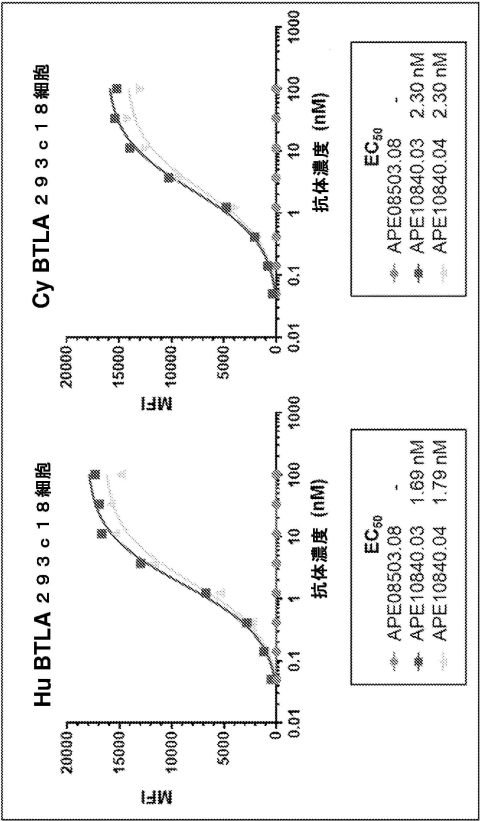


図 3

【図 4】

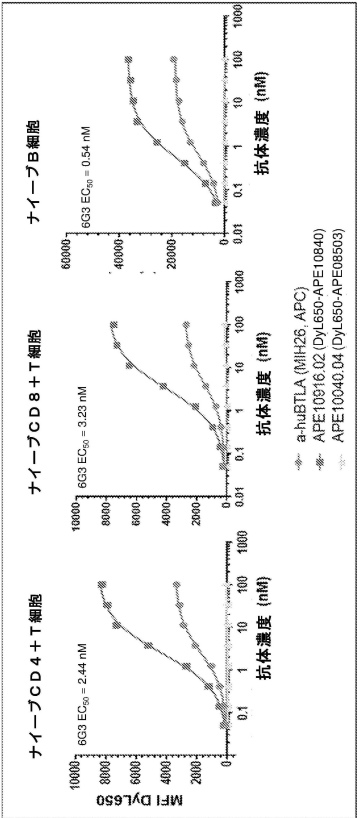


図 4

【図 5 A】

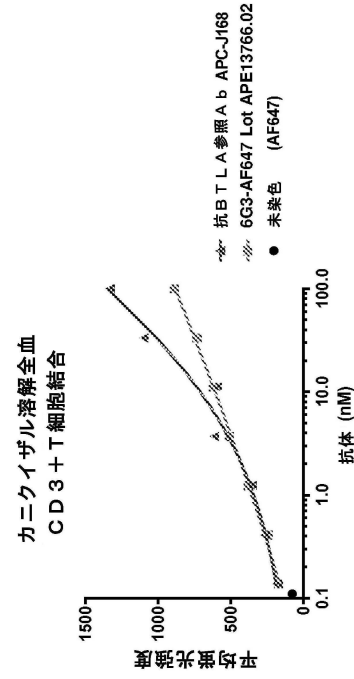


図 5 A

【図 5 B】

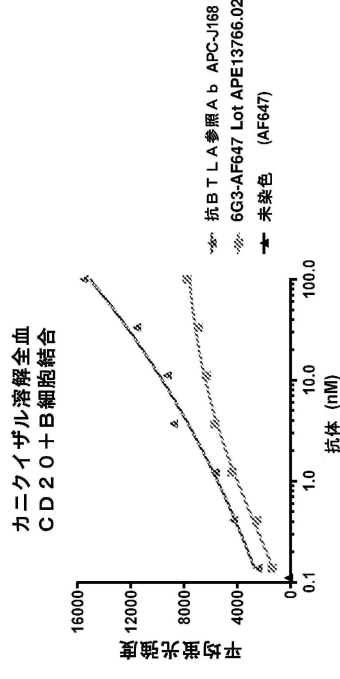


図 5 B

【図 5 C】

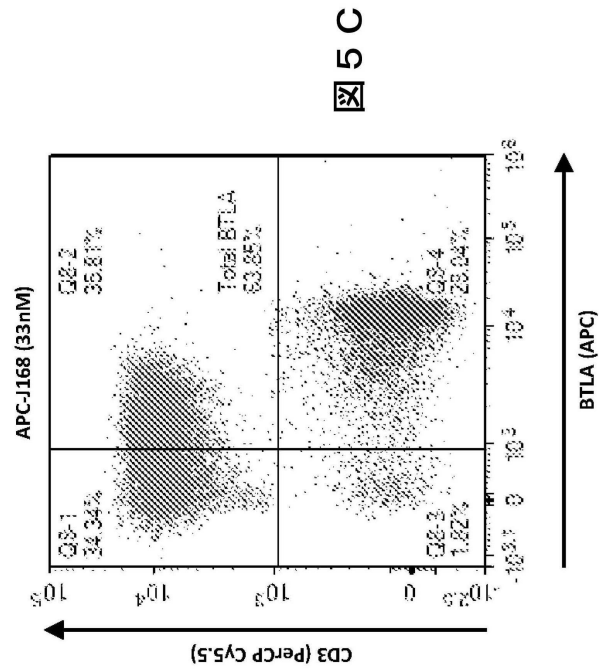


図 5 C

【図 5 D】

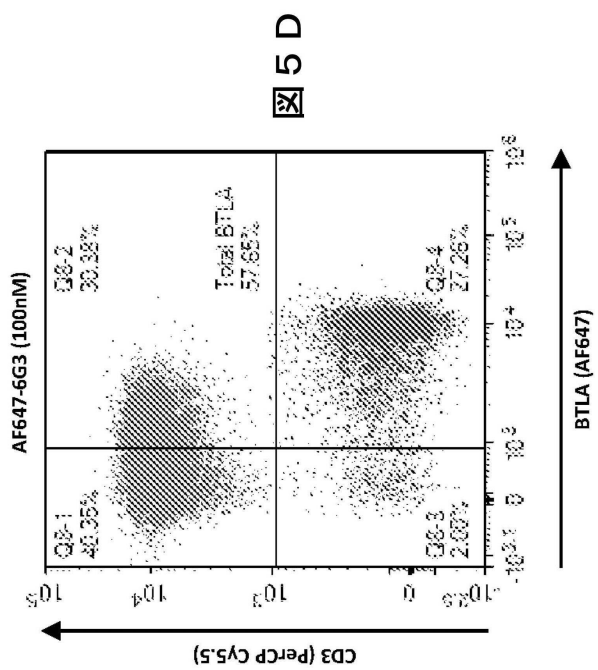


図 5 D

10

20

30

40

50

【図 6】

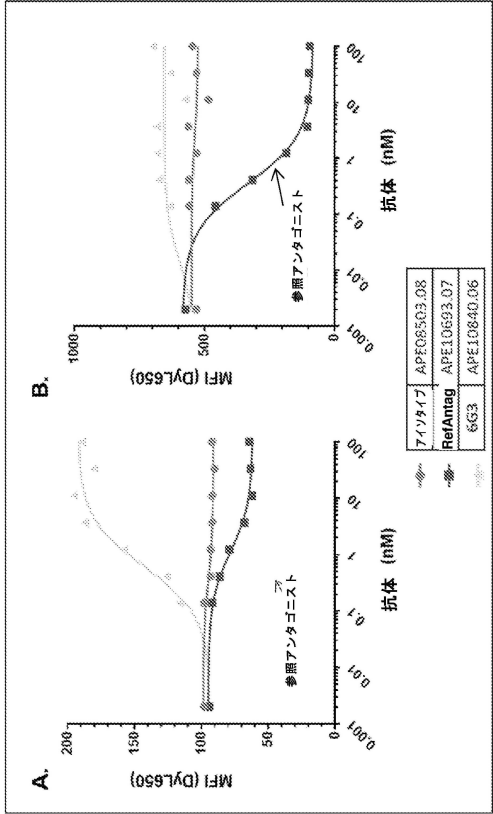


図 6

【図 7 A】

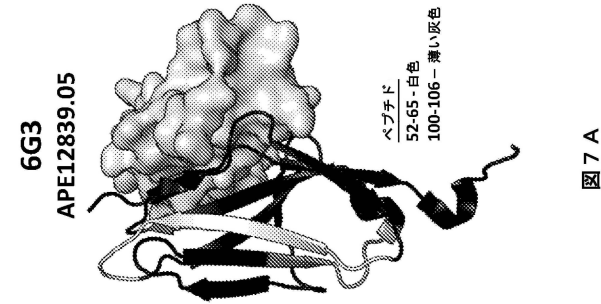


図 7 A

【図 7 C - 1】

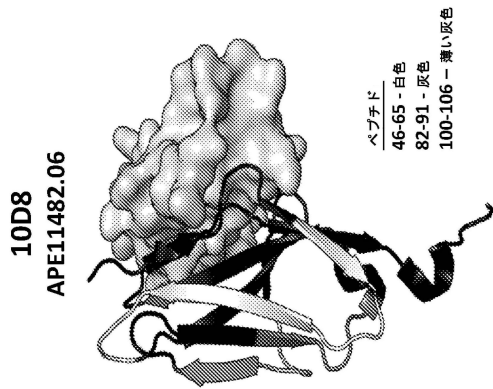


図 7 C

【図 7 C - 2】

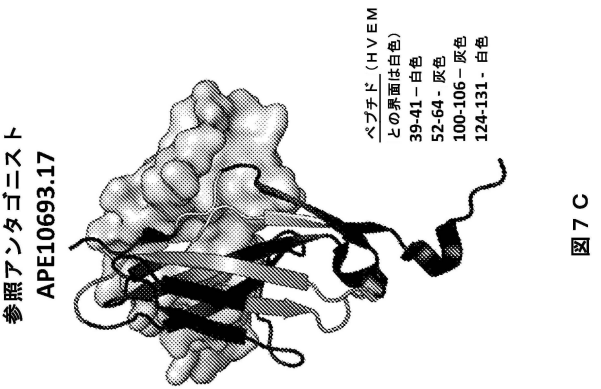


図 7 C

10

20

30

40

50

【 図 8 】

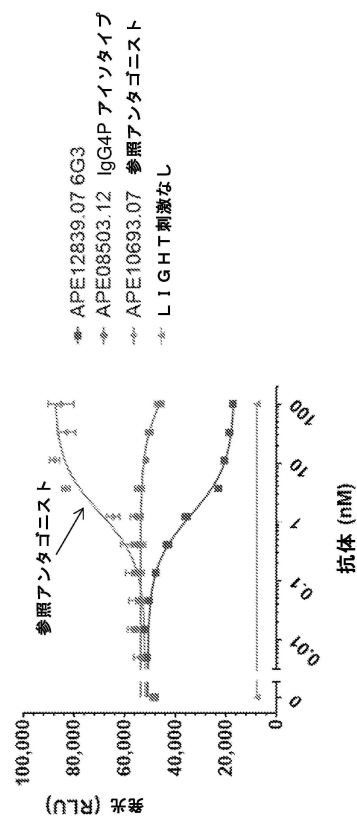


図 8

【 図 9 A 】

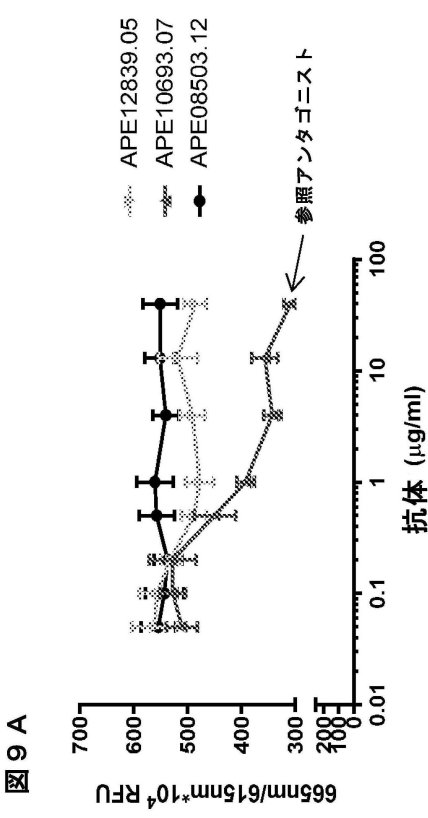


図 9 A

【 図 9 B 】

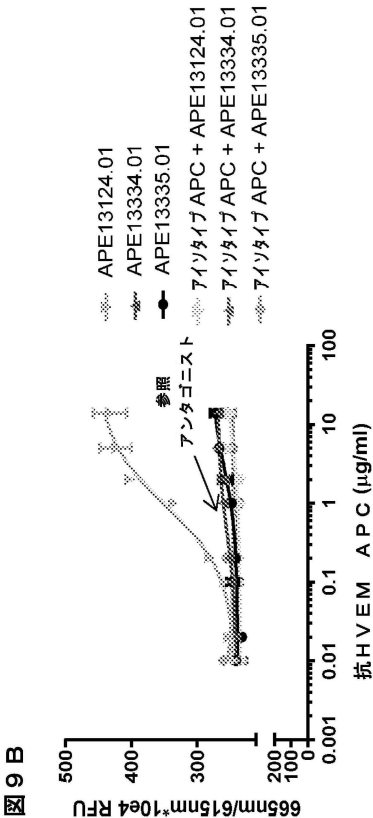


図 9 B

【 図 1 0 】

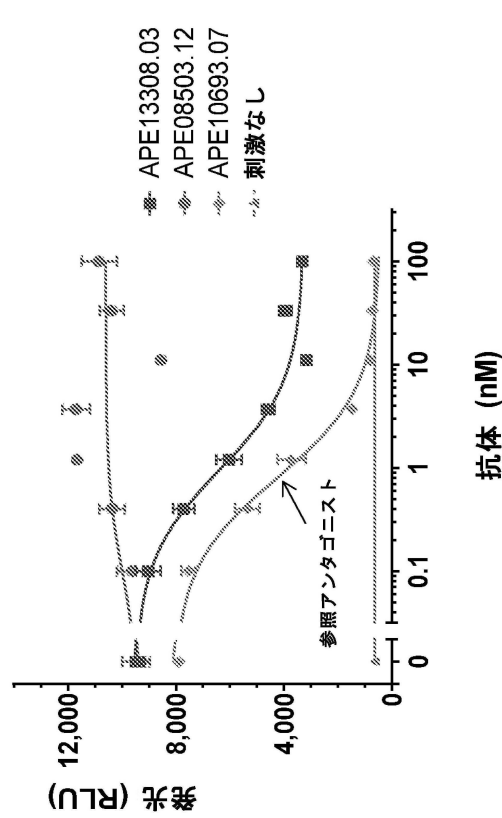


図 1 0

10

20

30

40

50

【 図 1 1 】

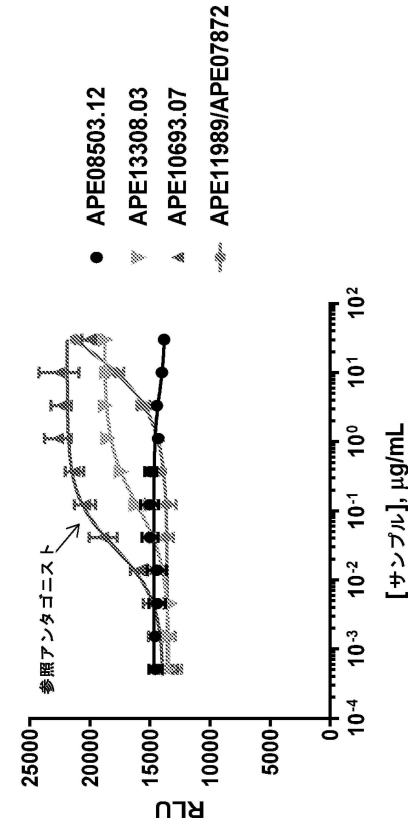


図 1 1

【 図 1 2 】

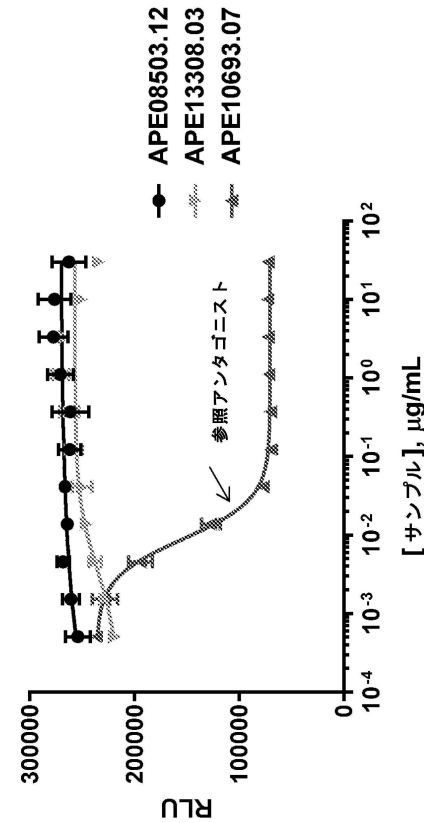


図 1 2

【 図 1 3 】

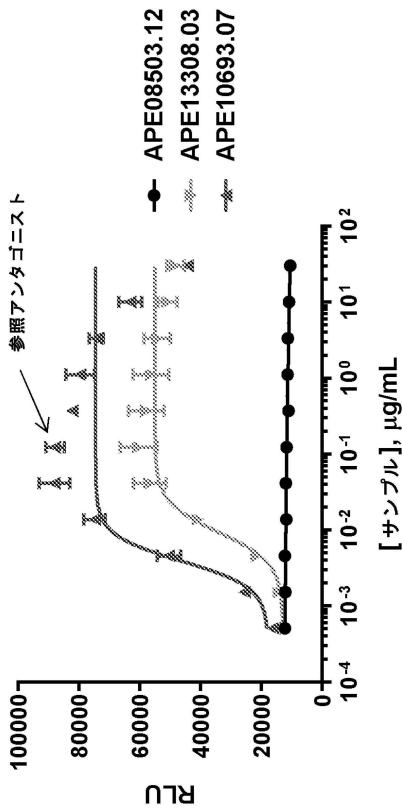


図 1 3

【 図 1 4 A 】

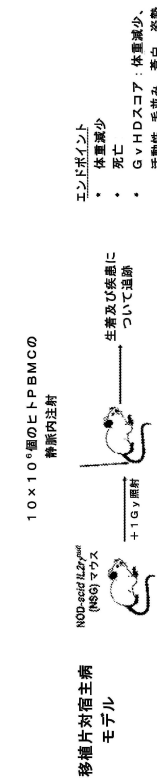


図 1 4 A

10

20

30

40

50

【図 1 4 B】

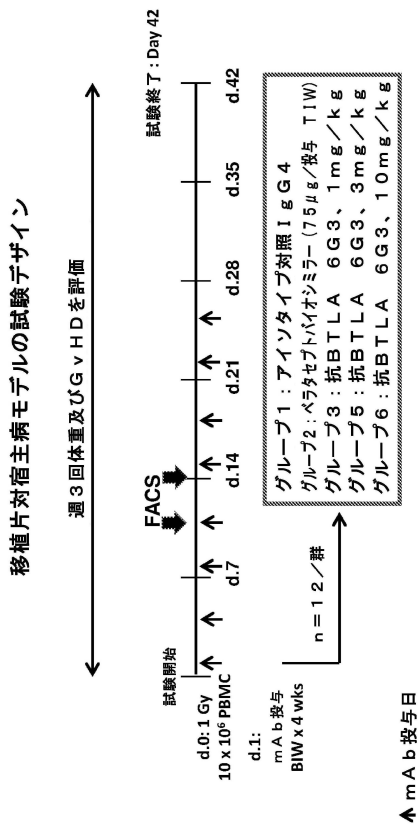


図 1 4 B

【図 1 4 C】

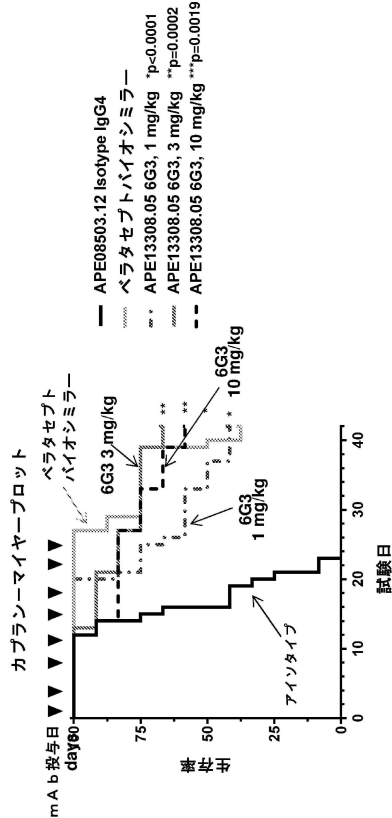


図 1 4 C

【図 1 5】

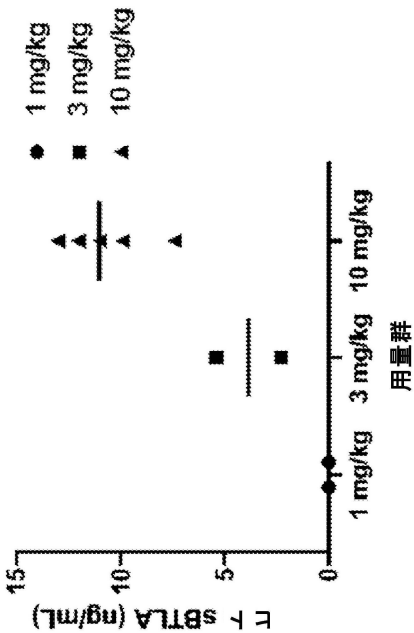


図 1 5

【図 1 6】

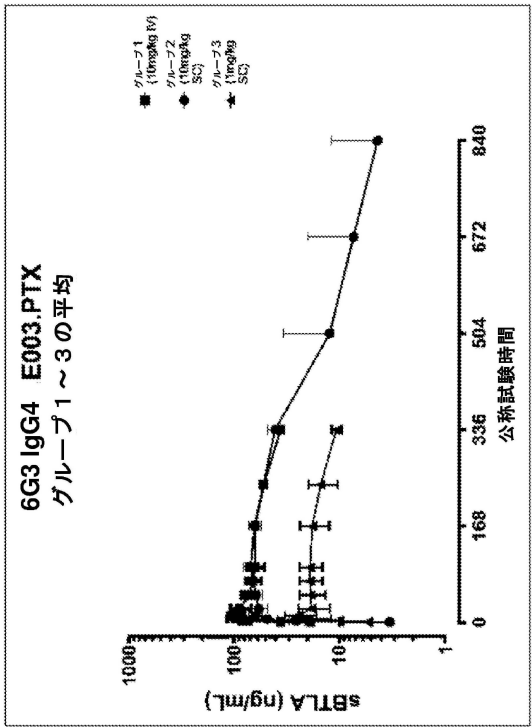
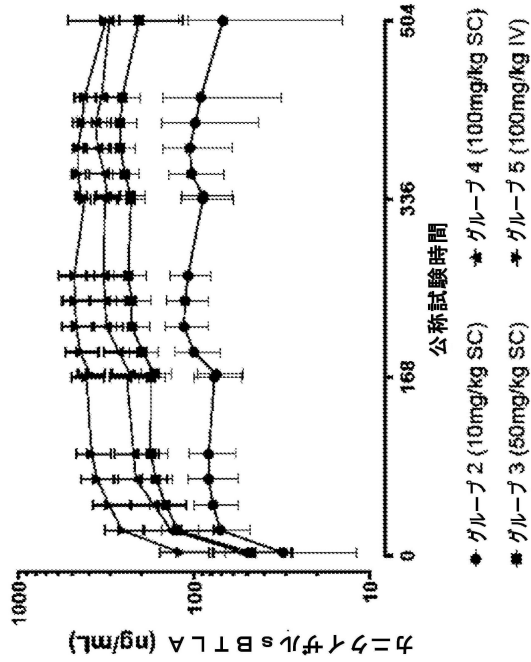


図 1 6

【図 17】



【図 18】

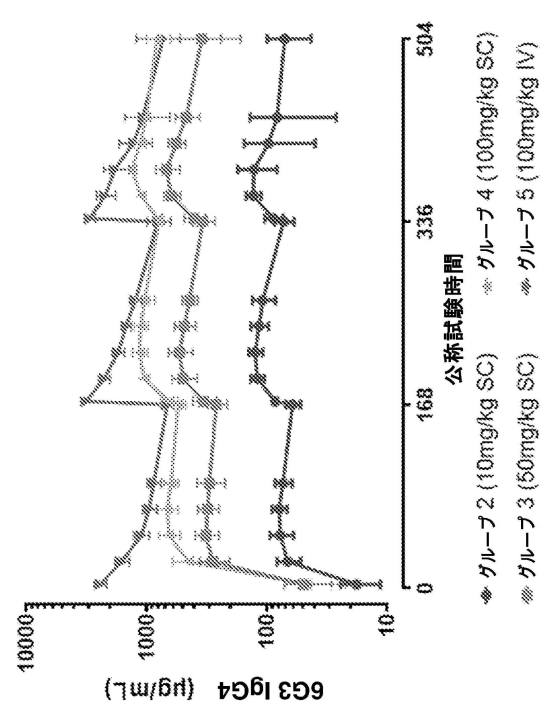
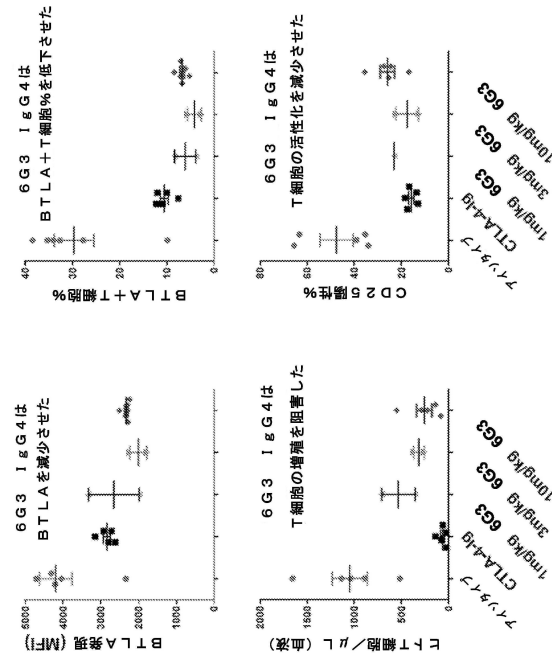


図 17

図 18

【図 19】



【図 20】

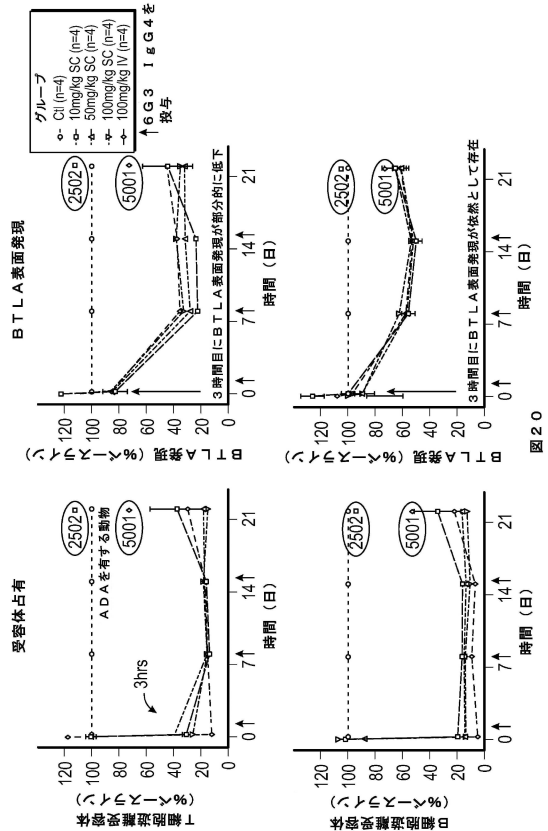


図 19

図 20

【図 2 1 A】

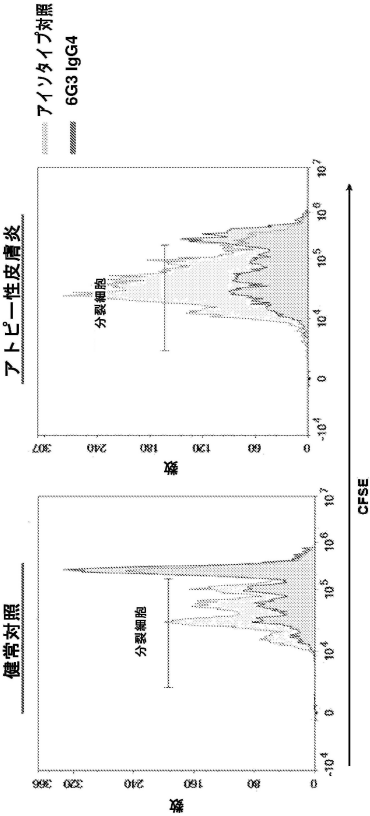


図 2 1 A

【図 2 1 B】

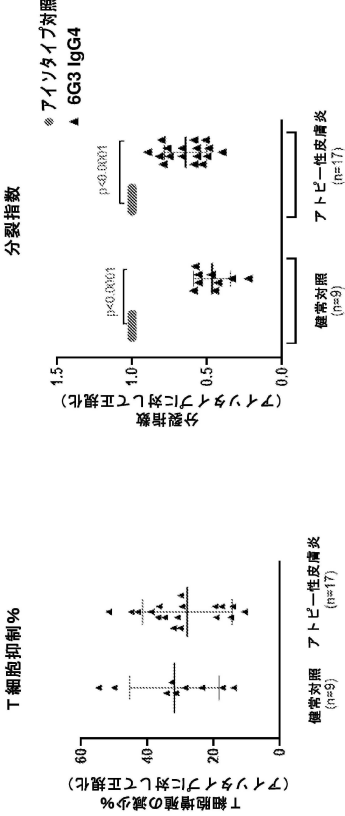


図 2 1 B

【図 2 1 C】

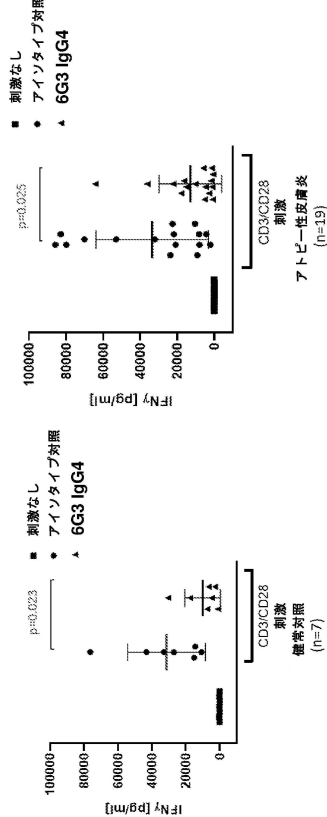


図 2 1 C

【図 2 1 D】

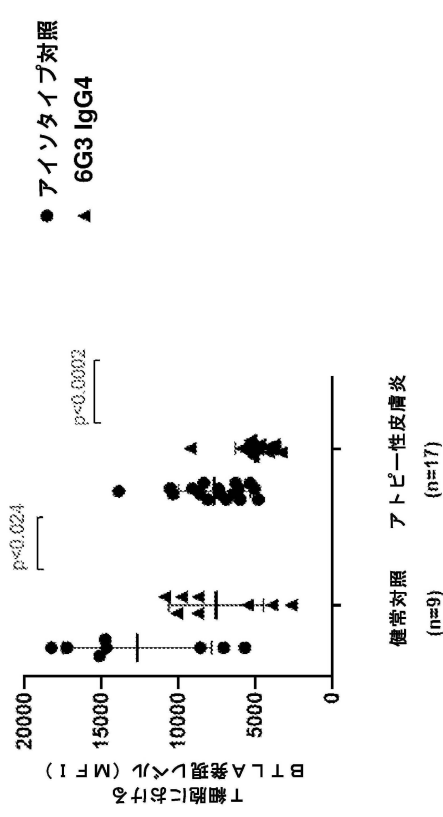


図 2 1 D

【配列表】

2023546713000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/056289

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 A61P37/06

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/128446 A2 (UNIV OXFORD INNOVATION LTD [GB]; MIROBIO LTD [GB]) 25 June 2020 (2020-06-25) the whole document; in particular figures 1, 2, 4, 6-9 and examples 2-6, 8, 9, 11, 12, 19-21	1-7, 15-25, 38-43
X	WO 2020/205849 A1 (LAKEPHARMA INC [US]; TRIANNI INC [US]) 8 October 2020 (2020-10-08) paragraphs [0008] - [0016], [0144] - [0148], [0166] - [0168]; example 1; tables 1, 3, 4	1-7, 15-25, 38-43

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 July 2022

Date of mailing of the international search report

29/07/2022

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stein, Annette

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/056289

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/213113 A1 (LILLY CO ELI [US]) 22 November 2018 (2018-11-22) the whole document; in particular examples, table 2 -----	1-7, 15-25, 38-43
X	EP 3 199 551 A2 (SQUIBB & SONS LLC [US]) 2 August 2017 (2017-08-02) paragraphs [0020] - [0062], [0072], [0146] - [0148], [0153]; examples 1-17 -----	1-7, 15-25, 38-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/056289

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/056289

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **1-5, 8-40, 42, 43(all partially)**
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
6, 7, 41(completely); 1-5, 15-25, 38-40, 42, 43(partially)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2021/056289

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5, 15-25, 38-40, 42, 43(all partially)

A BTLA-binding agent comprising an immunoglobulin heavy chain variable region and an immunoglobulin light chain variable region of SEQ ID NO: 157 as set forth in table 3, and related subject-matter.

2-36. claims: 6, 7, 41(completely); 1-5, 15-25, 38-40, 42, 43(partially)

A BTLA-binding agent comprising an immunoglobulin heavy chain variable region and an immunoglobulin light chain variable region of any of SEQ ID NOs: 158-192 as set forth in table 3, wherein each of said alternative immunoglobulin light chain variable regions defines one group of invention, and related subject-matter.

37-48. claims: 8-14(completely); 1-5, 15-25, 38-40, 42, 43(partially)

A BTLA-binding agent comprising an immunoglobulin heavy chain variable region and an immunoglobulin light chain variable region of any of SEQ ID NOs: 16-25 as set forth in table 2, wherein each of said alternative immunoglobulin light chain variable regions defines one group of invention, or the antibody designated 10D8 defined by its sequences in paragraph [0127], and related subject-matter.

49. claims: 26-37

A method of detecting, measuring, or monitoring the pharmacological activity of a BTLA binding agent in a subject, or selecting a subject for treatment with a BTLA binding agent, the method comprising detecting soluble BTLA (sBTLA) in a sample of blood, plasma, serum, or tissue from a subject to whom a BTLA binding agent has been administered.

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/US2021/056289

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-5, 8-40, 42, 43(all partially)

Present claims 1-5, 8-40, 42 and 43 relate to an extremely large number of possible antibodies. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for only a very small proportion of the antibodies claimed, see the antibodies defined by at least all of their six CDR sequences in the right order and according to a clear definition disclosed and supported by the present application in tables 1-3 and paragraphs 124-127 on pages 42-50. Combinations of CDRs of different antibodies (including various CDR variations) is not supported nor disclosed by the present application. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of these claims (PCT Guidelines 9.19 and 9.23). The search of claims 1-5, 8-40, 42 and 43 would have been restricted to those claimed antibodies which appear to be supported (see sequences of CDRs, VH/VL in tables 1-3 and paragraphs 124-127 on pages 42-50). However, due to further lack of unity, the search was restricted to particular antibodies as disclosed in table 3 of the application (see defined invention 1).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/056289

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020128446 A2	25-06-2020	AU 2019411511 A1	10-06-2021
		CA 3120804 A1	25-06-2020
		CN 113454119 A	28-09-2021
		EP 3898684 A2	27-10-2021
		GB 2595379 A	24-11-2021
		JP 2022517441 A	08-03-2022
		KR 20210131997 A	03-11-2021
		SG 11202106171W A	29-07-2021
		US 2021277123 A1	09-09-2021
		US 2022177589 A1	09-06-2022
		WO 2020128446 A2	25-06-2020
WO 2020205849 A1	08-10-2020	CA 3135836 A1	08-10-2020
		CN 114585416 A	03-06-2022
		EP 3946622 A1	09-02-2022
		IL 286838 A	31-10-2021
		JP 2022528005 A	07-06-2022
		KR 20220047536 A	18-04-2022
		US 2020325230 A1	15-10-2020
		WO 2020205849 A1	08-10-2020
WO 2018213113 A1	22-11-2018	AR 111752 A1	14-08-2019
		AU 2018269585 A1	31-10-2019
		AU 2021277743 A1	23-12-2021
		BR 112019021547 A2	12-05-2020
		CA 3064518 A1	22-11-2018
		CL 2019003215 A1	13-04-2020
		CN 110621699 A	27-12-2019
		CO 2019012756 A2	17-01-2020
		CR 20190521 A	06-01-2020
		DO P2019000293 A	15-12-2019
		EA 201992460 A1	18-03-2020
		EC SP19082184 A	30-11-2019
		EP 3625257 A1	25-03-2020
		JP 6790304 B2	25-11-2020
		JP 7072622 B2	20-05-2022
		JP 2020518288 A	25-06-2020
		JP 2021019642 A	18-02-2021
		KR 20190140969 A	20-12-2019
		KR 20210106033 A	27-08-2021
		MA 49133 A	25-03-2020
		PE 20191843 A1	31-12-2019
		PH 12019502575 A1	13-07-2020
		TW 201904991 A	01-02-2019
		TW 201946932 A	16-12-2019
		US 2018334502 A1	22-11-2018
		US 2020239578 A1	30-07-2020
		WO 2018213113 A1	22-11-2018
		ZA 201906954 B	30-06-2021
EP 3199551 A2	02-08-2017	AR 077594 A1	07-09-2011
		AU 2010276580 A1	15-03-2012
		BR 112012007875 A2	22-11-2016
		CA 2769473 A1	03-02-2011
		CL 2012000254 A1	12-04-2013
		CN 102762593 A	31-10-2012
		CO 6612216 A2	01-02-2013
		EA 201270228 A1	28-09-2012

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/056289

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 2459594 A1	06-06-2012
		EP 3199551 A2	02-08-2017
		JP 5898617 B2	06-04-2016
		JP 2013500715 A	10-01-2013
		KR 20120090037 A	16-08-2012
		SG 177689 A1	28-02-2012
		TW 201121564 A	01-07-2011
		US 2012183565 A1	19-07-2012
		US 2014017255 A1	16-01-2014
		US 2016222114 A1	04-08-2016
		US 2019119381 A1	25-04-2019
		WO 2011014438 A1	03-02-2011
		ZA 201200732 B	31-07-2013

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/06 (2006.01)
 A 6 1 K 39/00 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7088(2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 P 37/06 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 P 19/02 (2006.01)
 A 6 1 P 17/06 (2006.01)
 A 6 1 P 1/00 (2006.01)
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)

C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 Q 1/06
 A 6 1 K 39/00 H
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 29/00 1 0 1
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 1/00
 G 0 1 N 33/53 D

4 C 0 8 6
 4 H 0 4 5

,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,D
 K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
 A(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,B
 B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
 ,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,
 LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,
 RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
 W

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(74)代理人 100152308

弁理士 中 正道

(74)代理人 100201558

弁理士 亀井 恵二郎

(72)発明者 ダール、マーティン エドワード

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 3 0、サン ディエゴ、ヴィア ホルグラ 3 9 8 0

(72)発明者 バームリー、スティーブン

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 2 8、サン ディエゴ、セルヴァ ドライヴ 1 6 1 7 2

(72)発明者 ケーリー、マリリン

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 3 1、サン ディエゴ、ロック クリーク ドライヴ 1
 0 4 4 0

(72)発明者 コレイア、ジャン ダ シルヴァ

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 0 3、サン ディエゴ、クリーヴランド アヴェニュー
 4 1 6 3

(72)発明者 ショウ、モレナ

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 2 1、サン ディエゴ、ウォーターリッジ サークル
 1 0 7 7 0、スイート 2 1 0

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ79 QR48 QS33 QX02

4B064 AG26 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA83X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25
 CA44 CA46

4C084 AA13 NA14 ZA66 ZA89 ZA96 ZB08 ZB11 ZB15 ZC41

Fターム (参考)	4C085	BB11 BB36 BB41 BB43 EE01
	4C086	AA01 AA02 EA16 NA14 ZA66 ZA96 ZB08 ZB11 ZB15 ZC41
	4H045	AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50
		FA74