(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-515337
(P2025-515337A)
(43)公表日　令和7年5月14日(2025.5.14)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ	*37/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ	*29/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ａ６１Ｐ	*19/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ	*17/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全73頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-563361(P2024-563361)
(86)(22)出願日　令和5年4月26日(2023.4.26)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月24日(2024.12.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/066258
(87)国際公開番号　WO2023/212611
(87)国際公開日　令和5年11月2日(2023.11.2)
(31)優先権主張番号　63/335,623
(32)優先日　令和4年4月27日(2022.4.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　521531344
アナプティスバイオ インコーポレイティッド
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９２１２１、サン ディエゴ、スイート ２１０、ウォーターリッジ サークル １０７７０
(74)代理人　100136629
弁理士　鎌田 光宜
(74)代理人　100080791
弁理士　高島 一
(74)代理人　100125070
弁理士　土井 京子
(74)代理人　100121212
弁理士　田村 弥栄子
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、並びに自己免疫性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結合剤の使用方法。
【選択図】図２３Ｂ

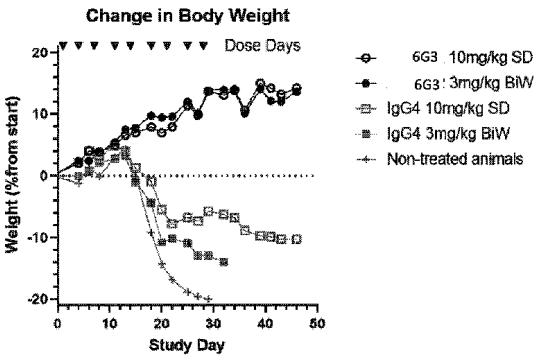


FIGURE 23B

【特許請求の範囲】
【請求項１】
免疫応答を抑制し、自己免疫性又は炎症性の疾患又は病態を治療するためのＢＴＬＡ結合剤であって、
（ｉ）少なくとも７ｍｇの週ＩＶ用量で投与される；
（ｉｉ）少なくとも２０ｍｇの週ＳＣ用量で投与される；
（ｉｉｉ）３０日間に１回以下、少なくとも１５０ｍｇの単一ＩＶ用量で投与される；
又は
（ｉｖ）３０日間に１回以下、少なくとも３００ｍｇの単一皮下用量で投与され；
（ａ）X^1SX^2MN（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）$RIYPX^1GX^2X^3DTNYX^4GKFK$（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）$X^1SGTFX^2X^3GNYX^4X^5YFDV$（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）$RX^1SENIYX^2X^3LA$（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）
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；及び
（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；
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、ＢＴＬＡ結合剤、
あるいは表３に記載のＢＴＬＡ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：
$QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYX^1FSX^2SX^3MNWV$

ＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＲＩＹＰＸ^{4}ＧＸ^{5}Ｘ^{6}ＤＴＮＹＸ^{7}ＧＫＦＫＧＲＶＴＩＴＡＤＫＸ^{8}ＴＸ^{9}ＴＡＹＭＥＬＸ^{10}ＳＬＲＳＥＸ^{11}ＴＡＶＸ^{12}ＹＸ^{13}ＣＡＸ^{14}ＳＧＴＦＸ^{15}Ｘ^{16}ＧＮＹＸ^{17}Ｘ^{18}ＹＦＤＶＷＧＫＧＴＴＶＴＶＳＳＡ（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；
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ＢＴＬＡ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、請求項１又は２に記載のＢＴＬＡ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}ＩＱＸ^{2}ＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＸ^{3}ＳＥＮＩＹＸ^{4}Ｘ^{5}ＬＡＷＹＱＱＫＸ^{6}ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＸ^{7}ＡＸ^{8}ＮＬＡＸ^{9}ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＸ^{10}ＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＸ^{11}ＦＸ^{12}ＧＰＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲ（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ＢＴＬＡ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、請求項１～４のいずれかに記載のＢＴＬＡ結合剤。

【請求項６】
（ａ）配列番号２０１を含むＣＤＲＨ１；
（ｂ）配列番号２０２を含むＣＤＲＨ２；
（ｃ）配列番号２０３を含むＣＤＲＨ３：
（ｄ）配列番号２０４を含むＣＤＲＬ１；
（ｅ）配列番号２０５を含むＣＤＲＬ２；及び
（ｆ）配列番号２０６を含むＣＤＲＬ３
を含む、請求項１～５のいずれかに記載のＢＴＬＡ結合剤。
【請求項７】
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ＣＤＲ；及び配列番号１７４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可変領域及び配列番号１７４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ＢＴＬＡ結合剤。
【請求項８】
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１～７のいずれかに記載のＢＴＬＡ結合剤。
【請求項９】
ヒト対象におけるＢＴＬＡシグナル伝達を調節する方法であって、ＢＴＬＡ結合剤を哺乳類に投与することを含み、
（ｉ）前記ＢＴＬＡ結合剤が、少なくとも７ｍｇの週ＩＶ用量で投与され；
（ｉｉ）前記ＢＴＬＡ結合剤が、少なくとも２０ｍｇの週ＳＣ用量で投与され；
（ｉｉｉ）前記ＢＴＬＡ結合剤が、３０日間に１回以下、少なくとも１５０ｍｇの単一ＩＶ用量で投与され；
（ｉｉ）前記ＢＴＬＡ結合剤が、３０日間に１回以下、少なくとも３００ｍｇの単一皮下用量で投与され；
前記ＢＴＬＡ結合剤が、
（ｄ）X^1ＳＸ^{2}ＭＮ（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；
（ｅ）ＲＩＹＰX^1Ｇ$X^2$$X^3$ＤＴＮＹ$X^4$ＧＫＦＫ（配列番号１９６）（式中、
X^1は、存在しないか又はＡであり；
X^2は、Ｄ、Ｙ、Ｑ、Ｇ、Ｌ、Ｆ、Ｈ、Ｓ、Ｐ、Ｒ、又はＴであり；
X^3は、Ｇ、Ｙ、Ａ、Ｆ、Ｓ、Ｄ、Ｖ、Ｔ、Ｅ、Ｋ、又はＲであり；
X^4は、Ｎ、Ｖ、Ｑ、Ｒ、Ａ、Ｆ、Ｙ、Ｓ、Ｇ、Ｐ、又はＴである）
を含むＣＤＲＨ２；
及び
（ｆ）X^1ＳＧＴＦ$X^2$$X^3$ＧＮＹ$X^4$$X^5$ＹＦＤＶ（配列番号１９７）（式中、
X^1は、Ｋ又はＲであり；
X^2は、Ｎ又はＤであり；
X^3は、Ｄ、Ｓ、Ｆ、Ｙ、Ｆ、Ｖ、Ｓ、Ｇ、Ｔ、Ｒ、Ｉ、Ｌ、又はＥであり；
X^4は、Ｒ又はＨであり；
X^5は、Ｗ、Ｒ、Ｆ、Ｌ、Ｎ、Ｙ、Ｐ、Ｉ、Ｖ、Ａ、Ｓ、Ｇ、Ｒ、又はＫである）
を含むＣＤＲＨ３；
を含む；あるいは配列番号４３～１５６のいずれか１つの免疫グロブリン重鎖可変領域若しくは少なくともそれらのＣＤＲ；又はそれらに対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；
（ｂ）ＲX^1ＳＥＮＩＹ$X^2$$X^3$ＬＡ（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^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；及び
（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；
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、
あるいはＢＴＬＡ結合剤が、表３に記載の通りである方法。
【請求項１０】
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９に記載の方法。
【請求項１１】
前記障害が、自己免疫性又は炎症性の疾患である、請求項１０記載の方法。
【請求項１２】
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１０又は１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記免疫グロブリン重鎖ポリペプチドが、配列：
ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹX^1ＦＳX^2ＳX^3ＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＲＩＹＰX^4Ｇ$X^5$$X^6$ＤＴＮＹ$X^7$ＧＫＦＫＧＲＶＴＩＴＡＤＫ$X^8$Ｔ$X^9$ＴＡＹＭＥＬ$X^{10}$ＳＬＲＳＥ$X^{11}$ＴＡＶ$X^{12}$Ｙ$X^{13}$ＣＡ$X^{14}$ＳＧＴＦ$X^{15}$$X^{16}$ＧＮＹ$X^{17}$$X^{18}$ＹＦＤＶＷＧＫＧＴＴＶＴＶＳＳＡ（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；
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９～１２のいずれかに記載の方法。
【請求項１４】

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、請求項９～１２のいずれかに記載の方法。

【請求項１５】

前記免疫グロブリン軽鎖ポリペプチドが、配列：

X^1ＩＱX^2ＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲX^3ＳＥＮＩＹ$X^4$$X^5$ＬＡＷＹＱＱＫ$X^6$ＧＫＡＰＫＬＬＩＹ$X^7$Ａ$X^8$ＮＬＡ$X^9$ＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤ$X^{10}$ＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱ$X^{11}$Ｆ$X^{12}$ＧＰＰＬＴＦＧＧＧＴＫＶＥＩＫＲ（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９～１２のいずれかに記載の方法。

【請求項１６】

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、請求項９～１２のいずれかに記載の方法。

【請求項１７】

前記ＢＴＬＡ結合剤が、

（ａ）配列番号２０１を含むＣＤＲＨ１；

（ｂ）配列番号２０２を含むＣＤＲＨ２；

（ｃ）配列番号２０３を含むＣＤＲＨ３：

（ｄ）配列番号２０４を含むＣＤＲＬ１；

（ｅ）配列番号２０５を含むＣＤＲＬ２；及び

（ｆ）配列番号２０６を含むＣＤＲＬ３

を含む、請求項９～１２のいずれかに記載の方法。

【請求項１８】

前記ＢＴＬＡ結合剤が、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ＣＤＲ；及び配列番号１７４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可変領域及び配列番号１７４の免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、請求項９～１２のいずれかに記載の方法。

【請求項１９】

ＢＴＬＡ結合剤による治療のために対象を選択する方法であって、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）を検出することと；前記対象からのサンプル中のｓＢＴＬＡ濃度が、同じ種の正常な非疾患対象のｓＢＴＬＡレベルよりも低い場合、前記対象を治療のために選択することと、を含む方法。

【請求項２０】

前記血液、血漿、血清、又は組織のサンプル中のｓＢＴＬＡの濃度を参照ｓＢＴＬＡ濃度と比較することを更に含む、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

前記参照ｓＢＴＬＡ濃度が、同じ種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ｓＢＴＬＡの濃度であるか；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ｓＢＴＬＡ濃度の統計分析によって確立される参照ｓＢＴＬＡ濃度である、請求項２０に記載の方法。

【請求項２２】

ＢＴＬＡ結合剤を前記対象に投与する工程を更に含む、請求項１９～２１のいずれかに記載の方法。

【請求項２３】

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ＣＤＲ；及び配列番号１７４の免疫グロブリン重軽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可変領域及び配列番号１７４に対して少なくとも９０％以上の配列同一性を有する免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、請求項２２に記載のＢＴＬＡ結合剤。

【請求項２４】

前記対象が、自己免疫性又は炎症性の疾患を有する、請求項１９～２３のいずれかに記載の方法。

【請求項２５】

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２４に記載の方法。

【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、２０２２年４月２７日出願の米国仮特許出願第６３／３３５，６２３号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、以下の通り特定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：２０２３年４月１２日付の「７６７１７０．ＸＭＬ」という名称の３３９，６４１バイトのＸＭＬファイル。

【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）。

【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。

【０００６】

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学的遮断により、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性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】

ＢＴＬＡシグナル伝達を調節する、免疫応答を抑制する、又は自己免疫性若しくは炎症性の疾患を治療する方法において使用するための、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖のポリペプチドを含むＢＴＬＡ結合剤が、本明細書において提供される。

【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ＢＴＬＡを安定的にトランスフェクトした２９３ｃ１８細胞への結合について、抗ＢＴＬＡ抗体がＨＶＥＭ－Ｆｃ及び予め形成されたＨＶＥＭ－Ｆｃ／三量体ＬＩＧＨＴ複合体と競合する能力を示す。
【図７Ａ】図７Ａは、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（灰色）にドッキングさせたヒトＢＴＬＡ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６Ｇ３抗体が結合するヒトＢＴＬＡ上にペプチドがマッピングされる。
【図７Ｂ】図７Ｂは、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（灰色）にドッキングさせたヒトＢＴＬＡ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７Ａに示した分子の図と比較して３０°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ＢＴＬＡアンタゴニスト抗体が結合するヒトＢＴＬＡ上にペプチドがマッピングされる。
【図８】図８は、ＢＴＬＡ及びＨＶＥＭが同じ細胞で発現した場合のＬＩＧＨＴ誘導ＨＶＥＭシグナル伝達を測定したＨＶＥＭ－ＮＦ－κＢ　ＨＥＫ　２９３ルシフェラーゼレポーターアッセイにおける６Ｇ３抗体の阻害活性を示すグラフである。
【図９Ａ】図９Ａは、トランスフェクトされた２９３ｃ１８細胞の表面におけるＢＴＬＡ及びＨＶＥＭ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ＢＴＬＡ及びＨＶＥＭの結合と競合する抗ＢＴＬＡ抗体の能力を示す。
【図９Ｂ】図９Ｂは、トランスフェクトされた２９３ｃ１８細胞の表面におけるＢＴＬＡ及びＨＶＥＭ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ＢＴＬＡ抗体が抗ＨＶＥＭアクセプター抗体と共にエネルギー転移シグナルを生成する能力を示す。
【図１０】図１０は、ＢＴＬＡ及びＨＶＥＭが異なる細胞で発現した場合のＢＴＬＡ誘導ＨＶＥＭシグナル伝達を測定したＨＶＥＭ－ＮＦ－κＢ　ＨＥＫ　２９３ルシフェラーゼレポーターアッセイにおける６Ｇ３抗体の部分的阻害活性を示すグラフである。
【図１１】図１１は、ＳＨＰ２動員ＰａｔｈＨｕｎｔｅｒ　Ｊｕｒｋａｔ　ＢＴＬＡ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６Ｇ３抗体のアゴニスト活性を示すグラフである。
【図１２】図１２は、ＳＨＰ２動員ＰａｔｈＨｕｎｔｅｒ　Ｊｕｒｋａｔ　ＢＴＬＡシグナル伝達アッセイにおける抗ＢＴＬＡ抗体の阻害活性を示すグラフであり、ＢＴＬＡシグナル伝達は、トランスフェクトされたＵ－２　ＯＳ細胞株においてＨＶＥＭによって誘導した。
【図１３】図１３は、ＦｃγＲの会合を提供するためにＦｃγＲＩａ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６Ｇ３抗体のアゴニスト活性を示すグラフである。
【図１４Ａ】図１４Ａ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ＮＳＧ／Ｈｕ－ＰＢＭＣマウスモデルの概略図である。
【図１４Ｂ】図１４Ｂは、本発明の実施形態に係る本明細書に記載のＮＳＧ／Ｈｕ－ＰＢＭＣ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１４Ｃ】図１４Ｃは、１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、又は１０ｍｇ／ｋｇの６Ｇ３抗体のいずれかを週２回投与した動物群について、ＮＳＧ／Ｈｕ－ＰＢＭＣ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１５】図１５は、１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、及び１０ｍｇ／ｋｇ（ＩＰ）の６Ｇ３抗体を週２回投与した後のＧｖＨＤのヒト化マウスモデルにおける、投与群毎のヒトｓＢＴＬＡの個々の及び平均（ＳＤ）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１６】図１６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全て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。全ての動物に週用量の６Ｇ３　ＩｇＧ４をＩＶ又はＳＣのいずれかで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（μｇ／ｍＬ）を示すプロットである。全ての動物に週用量の６Ｇ３　ＩｇＧ４をＩＶ又はＳＣのいずれかで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ＣＴＬＡ－４－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１μＬ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。全ての動物に週用量の６Ｇ３　ＩｇＧ４又は対照をＩＶ又はＳＣのいずれかで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ＩＦＮγ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。
【図２２Ａ】図２２Ａは、４００ｍｇ　ＳＣ投与後のＣＤ３＋細胞における受容体占有率

のプロットである。データは、４００ｍｇ　ＳＣ投与により、半減期は約９日間となり、受容体を完全に占有するのに十分な薬物動態学的曝露（～７ｕｇ／ｍＬ）が３０日超持続することを示す。
【図２２Ｂ】図２２Ｂは、４００ｍｇ　ＳＣ投与後のＣＤ１９＋細胞における受容体占有率のプロットである。データは、４００ｍｇ　ＳＣ投与により、半減期は約９日間となり、受容体を完全に占有するのに十分な薬物動態学的曝露（～７ｕｇ／ｍＬ）が３０日超持続することを示す。
【図２３Ａ】図２３Ａは、ＧｖＨＤモデルにおける、６Ｇ３抗体の１０ｍｇ／ｋｇ単回投与後、６Ｇ３抗体の３ｍｇ／ｋｇ隔週４週間投与後、ＩｇＧ４対照抗体の１０ｍｇ／ｋｇ単回投与後、ＩｇＧ４対照抗体の３ｍｇ／ｋｇ隔週４週間投与後、又は未処理動物のマウス残存率対試験日のプロットである。
【図２３Ｂ】図２３Ｂは、ＧｖＨＤモデルにおける、６Ｇ３抗体の１０ｍｇ／ｋｇ単回投与後、６Ｇ３抗体の３ｍｇ／ｋｇ隔週４週間投与後、ＩｇＧ４対照抗体の１０ｍｇ／ｋｇ単回投与後、ＩｇＧ４対照抗体の３ｍｇ／ｋｇ隔週４週間投与後、又は未処理動物のマウスの体重（開始時からの％）対試験日のプロットである。
【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）；「ＩＭＧＴ」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作製されたものであり、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、それらが生成される環境（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。

【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。

【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、
Ｘａａ１は、セリン（Ｓｅｒ）又はプロリン（Ｐｒｏ）であり、
Ｘａａ２は、プロリン（Ｌｅｕ）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、
Ｘａａ６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。

【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^1ＳX^2ＭＮ（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）ＲＩＹＰX^1Ｇ$X^2$$X^3$ＤＴＮＹ$X^4$ＧＫＦＫ（配列番号１９６）（式中、
X^1は、存在しないか又はＡであり；
X^2は、Ｄ、Ｙ、Ｑ、Ｇ、Ｌ、Ｆ、Ｈ、Ｓ、Ｐ、Ｒ、又はＴであり；
X^3は、Ｇ、Ｙ、Ａ、Ｆ、Ｓ、Ｄ、Ｖ、Ｔ、Ｅ、Ｋ、又はＲであり；
X^4は、Ｎ、Ｖ、Ｑ、Ｒ、Ａ、Ｆ、Ｙ、Ｓ、Ｇ、Ｐ、又はＴである）
を含むＣＤＲＨ２；
（ｃ）X^1ＳＧＴＦ$X^2$$X^3$ＧＮＹ$X^4$$X^5$ＹＦＤＶ（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。

【００２３】

幾つかの実施形態では、ＢＴＬＡ結合剤は、配列：
ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＳＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹX^1ＦＳX^2ＳX^3ＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＲＩＹＰX^4Ｇ$X^5$$X^6$ＤＴＮＹ$X^7$ＧＫＦＫＧＲＶＴＩＴＡＤＫ$X^8$Ｔ$X^9$ＴＡＹＭＥＬ$X^{10}$ＳＬＲＳＥ$X^{11}$ＴＡＶ$X^{12}$Ｙ$X^{13}$ＣＡ$X^{14}$ＳＧＴＦ$X^{15}$$X^{16}$ＧＮＹ$X^{17}$$X^{18}$ＹＦＤＶＷＧＫＧＴＴＶＴＶＳＳＡ（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；
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）。
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。

【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、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１５７～１９２の残基２４～３４（ＣＤＲＬ１）、５０～５６（ＣＤＲＬ２）、及び８９～９７（ＣＤＲＬ３）を含む。

【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）

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；

（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

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：

$X^1IQX^2TQSPSSLSASVGDRVTITCRX^3SENIYX^4X^5LAWYQQKX^6GKAPKLLIYX^7AX^8NLAX^9GVPSRFSGSGSGTDX^{10}TLTISSLQPEDFATYYCQX^{11}FX^{12}GPPLTFGGGTKVEIKR$（配列番号１９４）又は少なくともそのＣＤＲを含む（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）。

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、Ｋａｂａｔ、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、Ｋａｂａｔ、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Ｋａｂａｔによって決定されたそのＣＤＲ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Ｃｈｏｔｈｉａによって決定されたそのＣＤＲ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Ｍａｒｔｉｎによって決定されたそのＣＤＲ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ＩＧＭＴによって決定されたそのＣＤＲ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ＡＨｏによって決定されたそのＣＤＲを含む。

【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ＢＴＬＡ結合剤と同じエピトープに結合するＢＴＬＡ結合剤も提供される。幾つかの実施形態では、ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ結合剤と同じエピトープに結合する。ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ結合剤とＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ（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ＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤ　Ｑ７Ｚ６Ａ９又は天然に存在するバリアントヒトＢＴＬＡの対応する配列位置）に結合するＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ（例えば、配列番号２２９、２３０、及び／又は２３１）のアミノ酸残基４６～６５、８２～９１、又は１００～１０６（参照配列ＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤ　Ｑ７Ｚ６Ａ９又は天然に存在するバリアントヒトＢＴＬＡの対応する配列位置）に結合するＢＴＬＡ結合剤が本明細書に提供される。

【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、最適にアラインしたときに、対象の配列と参照配列との間で同じ（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、ＣＬＵＳＴＡＬ－Ｗ、Ｔ－Ｃｏｆｆｅｅ、及びＡＬＩＧＮ（核酸及びアミノ酸の配列をアラインするため）、ＢＬＡＳＴプログラム（例えば、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）によって運用されているＢＬＡＳＴ２．１、ＢＬ２ＳＥＱ、及びその新しいバージョン）、並びにＦＡＳＴＡプログラム（例えば、ＦＡＳＴＡ３ｘ、ＦＡＳＴＭ、及びＳＳＥＡＲＣＨ）（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、Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌ．，２１５（３）：４０３－４１０　（１９９０）、Ｂｅｉｇｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１０６（１０）：３７７０－３７７５（２００９）、Ｄｕｒｂｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ：Ｐｒｏｂａｌｉｓｔｉｃ　Ｍｏｄｅｌｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ａｎｄ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＵＫ（２００９），Ｓｏｄｉｎｇ，Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ，２１（７）：９５１－９６０（２００５）、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の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、IC_{50}）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）交差反応性を指す。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けるＢＴＬＡ活性を増大させる該剤の能力を含む。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－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産生及び／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－NH_2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無効にしない限り（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、ＣＤＲ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ＣＤＲ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、ＢＴＬＡ結合剤に含まれた場合にＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ結合剤に含まれた場合に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ＢＴＬＡ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、ＥＬＩＳＡ、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Ｂｒａｉｔｂａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｏｍｅ　Ｓｃｉ．，４：１２（２００６）を参照）。

【００４０】
ＢＴＬＡ結合剤は、ＢＴＬＡ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断片）である。幾つかの実施形態では、ＢＴＬＡ結合剤は、ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡに結合する。幾つかの実施形態では、ＢＴＬＡ結合剤は、ＢＴＬＡが媒介するシグナル伝達を増加させるようにＢＴＬＡのＨＶＥＭへの結合を増強する。ＢＴＬＡのその受容体への結合又はＢＴＬＡ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ＢＴＬＡのその受容体への結合又はＢＴＬＡ－ＨＶＥＭが媒介するシグナル伝達と比較して、結合剤の存在下におけるそのような結合又はシグナル伝達を（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。ＢＴＬＡのその受容体への結合又はＢＴＬＡ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させる又は増強することを意味する。幾つかの実施形態では、ＢＴＬＡのその受容体への結合又はＢＴＬＡが媒介するシグナル伝達は、ＢＴＬＡ活性の欠損に関連する若しくはＢＴＬＡ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若しく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、ＢＴＬＡ結合剤は、ＢＴＬＡ－受容体結合を２５％超阻害しない（例えば、ＢＴＬＡ－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、ＢＴＬＡ結合剤は、ＢＴＬＡ結合剤の非存在下におけるＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ－受容体結合を増加させる。

【００４１】

ＢＴＬＡ結合剤は、ＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ結合剤は、例えば、ＢＴＬＡと、細胞傷害性Ｔリンパ球抗原－４（ＣＴＬＡ－４）、Ｔ細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン－３（ＴＩＭ－３）、プログラム死１（ＰＤ－１）、並びに／又はリンパ球活性化遺伝子３タンパク質（ＬＡＧ－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領域及び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とき、「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存在し、これらは、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４と命名されている。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とき、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み得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CH_1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）温和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（ＶＨ又はＶＬ）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Ｏｓｂｏｕｒｎ 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ンカーによってV_Lに接続された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作製する、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。

【００４６】

幾つかの実施形態では、ＢＴＬＡ結合剤は、断片結晶化可能（F_c）領域又はその一部等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、そのバリアントを含む）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、ＢＬＴＡ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Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｍａｒｔｉｎ（Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｃｈｏｔｈｉａ）、ＩＧＭＴ、若しくはＡＨ

ｏ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Ｋａｂａｔ、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。

【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、又は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。

【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産生する細胞株）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。抗体を作製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　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，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）を用いて作製することができる。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、当技術分野で公知の任意の好適な方法を用いて作製することができ（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グラフト化を含む（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成することができる。

【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（μＭ）（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（μＭ）、又は約１μＭ～約１００μＭ）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タンパク質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。

【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る。従って、一態様では、本発明は、哺乳類におけるＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ結合剤を該哺乳類に投与し、それによって、該ＢＴＬＡ結合剤が、ＢＴＬＡのＨＶＥＭへの結合を促進若しくは増強するか又は他の方法でＢＴＬＡシグナル伝達を促進若しくは増強することを含む方法を提供する。

【００５１】

哺乳類は、ＢＴＬＡシグナル伝達の欠損に関連する又はＢＴＬＡ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てよい。そのような疾患は、ＢＴＬアゴニズムに応答し、その結果、哺乳類にＢＴＬＡ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。ＢＴＬＡシグナル伝達に関連し、ＢＴＬＡアゴニズムに応答する疾患、病態、又は障害は、ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ結合剤は、免疫抑制性のＢＴＬＡ－ＨＶＥＭ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、抗体産生及び／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産生、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癒させる。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。

【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。

【００５４】

ＢＴＬＡ結合剤は、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（例えば、Ｔ細胞又はＢ細胞駆動性の炎症性の疾患又は病態）であってよい。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（ＣＯＰＤ）、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（ＡＮＣＡ）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等）、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、線維性肺胞炎、グレーブス病、ＩｇＡ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、ＲＳ３ＰＥ、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。

【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のバイオアクティビティを増加させる量である。

【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。

【００５８】

幾つかの実施形態では、炎症性の疾患又は病態を治療する方法は、毎週少なくとも７ｍｇ、例えば、少なくとも毎週１０ｍｇ（例えば、毎週２０ｍｇ～８００ｍｇ、毎週７０ｍｇ～８００ｍｇ、毎週７０ｍｇ～約３００ｍｇ、又は毎週７０ｍｇ～約２００ｍｇ）の用量でＢＴＬＡ結合剤を投与することを含み、該用量は静脈内投与される。幾つかの実施形態では、炎症性の疾患又は病態を治療する方法は、毎週少なくとも２０ｍｇ、例えば、毎週２０ｍｇ～８００ｍｇ又は毎週７０ｍｇ～８００ｍｇ（例えば、毎週７０ｍｇ～３００ｍｇ又は毎週７０ｍｇ～２００ｍｇ）の用量のＢＴＬＡ結合剤を投与することを含み、該用量は皮下投与される。

【００５９】

幾つかの実施形態では、方法は、少なくとも１５０ｍｇ又は少なくとも２００ｍｇの単一静脈内用量でＢＴＬＡ結合剤を投与することを含み、該用量は、３週間に１回以下又は４週間に１回以下（例えば、３０日間に１回以下、６０日間に１回以下、９０日間に１回以下、１２０日間に１回以下、１５０日間に１回以下、又は１８０日間に１回以下）投与される。幾つかの実施形態では、方法は、少なくとも３００ｍｇ（例えば、３００ｍｇ～８００ｍｇ又は３００ｍｇ～５００ｍｇ）、又は少なくとも４００ｍｇ（例えば、４００ｍｇ～８００ｍｇ又は４００ｍｇ～５００ｍｇ）の単一皮下用量でＢＴＬＡ結合剤を投与することを含み、該用量は、３週間に１回以下又は４週間に１回以下（例えば、３０日間に１回以下、６０日間に１回以下、９０日間に１回以下、１２０日間に１回以下、１５０日間に１回以下、又は１８０日間に１回以下）投与される。幾つかの実施形態では、ＢＴＬＡ結合剤は、ＢＴＬＡ結合剤がＣＤ１９＋Ｂ細胞及び／又はＣＤ３＋Ｔ細胞におけるＢＴＬＡ受容体占有率を９０％以上で維持するのに十分な投与レジメン（上に開示したもの等の投与量及び投与間隔）で投与される。全ての投与レジメンは、望ましい臨床結果を得るために必要に応じて継続してよい。

【００６０】

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生成することができる。

【００６１】

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、組成物の単回ボーラス投与、組成物の複数回ボーラス投与、又は組成物の連続注入投与によって送達され得る。

【００６２】

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とき、「非経口」という用語は、静脈内、筋肉内、皮下、直腸内、膣内、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。

【００６３】

哺乳類（例えば、ヒト）に投与したら、当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し得る。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。

【００６４】

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、抗炎症剤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療する場合、ＢＴＬＡ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。

【００６５】

治療用途に加えて、本明細書に記載のＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ結合剤は、ＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ結合剤は、ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡタンパク質を検出する方法が挙げられる。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を有する又は有しないＢＴＬＡ結合剤を使用することができる。例えば、検出可能な部分は、放射性同位元素（例えば、^{3}Ｈ、^{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。本発明の状況では、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技術分野で公知の任意の方法を採用してよい（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）。

【００６６】

ＢＴＬＡタンパク質のレベルは、本明細書に提供されるＢＴＬＡ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。ＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡポリペプチドを含むか又は含む疑いのあるサンプルをＢＴＬＡ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容易にするために、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ＢＴＬＡポリペプチドの量を標準値と比較する。

【００６７】

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ＢＴＬＡ結合剤を投与することにより、ＢＴＬＡが発現している細胞の少なくとも一部からＢＴＬＡの一部が脱落し、ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ（ｓＢＴＬＡ）が増加すると考えられる。従って、対象におけるＢＴＬＡ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、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（例えば、皮膚組織）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ｓＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ結合剤によって治療するための患者を選択する方法であって、患者（患者からのサンプル）におけるｓＢＴＬＡレベルが同じ種類(the same type)の正常な非疾患対象（例えば、ヒト対象）のｓＢＴＬＡレベルと比較して減少している場合、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。ｓＢＴＬＡ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、ｓＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ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ｓＢＴＬＡは、ＢＴＬＡ結合剤（例えば、以前に投与されたＢＴＬＡ結合剤）に結合している。

【００６８】

幾つかの実施形態では、対象におけるＢＴＬＡの脱落を誘導する、対象に投与されるＢＴＬＡ結合剤は、ＢＴＬＡのＨＶＥＭへの結合を阻害しないＢＴＬＡ結合剤である。ＢＴＬＡ結合剤は、本明細書に記載のＢＴＬＡ結合剤のいずれか等の任意のＢＴＬＡ結合剤で

あり得る。幾つかの実施形態では、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つの免疫グロブリン重鎖可変領域、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む。例えば、ＢＴＬＡ結合剤は、配列番号２７、３０、３２、３６、３９、及び４１によって表されるＣＤＲを含み得る。他の実施形態では、ＢＴＬＡ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。例えば、ＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ結合剤は、配列番号２０１～２０６を含むＣＤＲ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Ｉｇの重鎖及び軽鎖、又は少なくともそれらのＣＤＲ、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Ｉｇの重鎖及び軽鎖を含む。

【００６９】

幾つかの実施形態では、ＢＴＬＡ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ｓＢＴＬＡは、ｓＢＴＬＡに結合する捕捉抗体を用いて検出される。捕捉抗体は、ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ抗体である。捕捉抗体は、対象に投与されるＢＴＬＡ結合剤と同じであっても異なっていてもよい。幾つかの実施形態では、ｓＢＴＬＡ捕捉抗体は、対象に投与されるＢＴＬＡ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。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。任意で、そのような実施形態と組み合わせて、対象に投与されるＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ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。

【００７０】

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、ＢＴＬＡのＨＶＥＭへの結合を阻害しない抗体へのＢＴＬＡ（又はｓＢＴＬＡ）の結合は、捕捉抗体のｓＢＴＬＡ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ｓＢＴＬＡ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ＢＴＬＡのＨＶＥＭへの結合を阻害しないＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡのＨＶＥＭへの結合を阻害しないＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ結合剤である。例えば、ＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ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。

【００７１】

血液、血漿、血清、又は組織中のｓＢＴＬＡ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ｓＢＴＬＡの濃度を参照ｓＢＴＬＡ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ｓＢＴＬＡ濃度は、ＢＴＬＡ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ｓＢＴＬＡの濃度である。あるいは又は更に、参照ｓＢＴＬＡ濃度は、別の対象、例えば、ＢＴＬＡ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ｓＢＴＬＡ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ｓＢＴＬＡ濃度の統計分析によって確立された参照ｓＢＴＬＡ濃度（例えば、ＢＴＬＡ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ｓＢＴＬＡ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ｓＢＴＬＡ濃度は、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ＢＴＬＡのＨＶＥＭへの結合を阻害しないＢＴＬＡ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。

【００７２】

他の実施形態では、方法は、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ｓＢＴＬＡの濃度を、該ＢＴＬＡ結合剤が対象に投与される前又は投与された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ｓＢＴＬＡの濃度と比較することを含む。例えば、ＢＴＬＡ結合剤の投与後の２つ以上の時点でｓＢＴＬＡ濃度を測定し、経時的なＢＴＬＡ結合剤の効果を評価するために、任意でＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ結合剤による治療をモニタリングすることができる。

【００７３】
更に、ＢＴＬＡのＨＶＥＭへの結合を阻害しないＢＴＬＡ結合剤とｓＢＴＬＡ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ｓＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡのＨＶＥＭへの結合を阻害しないＢＴＬＡ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。例えば、ＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ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。

【００７４】
ＢＴＬＡ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物として提供することができる。ＢＴＬＡ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もよい。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。

【００７５】
核酸
本発明はまた、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ＢＴＬＡ結合剤をコードしている１つ以上の核酸も提供する。

【００７６】
「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とき、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／又はキャッピングされたポリヌクレオチド等であるがこれらに限定されない、ヌクレオチドアナログ及び修飾ポリヌクレオチドから作製されるＲＮＡ又はＤＮＡのいずれかのアナログも含まれる。核酸は、典型的には、リン酸結合を介して連結されて核酸配列又はポリヌク

レオチドを形成するが、他の多くの結合も当技術分野において公知である（例えば、ホスホロチオエート、ボラノホスフェート等）。

【００７７】

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ＢＴＬＡ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、エピソーム、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よい。好適なベクター及びベクターの調製方法は、当技術分野において周知である（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（２００１）及びＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ & Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９９４）に概説）。

【００７８】

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。

【００７９】

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 Ｄｉｅｇｏ，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））が挙げられる。

【００８０】

本明細書で使用するとき、「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た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（一般的に使用されている

ＣＭＶプロモーター等）を含むポリヌクレオチドの多くは、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。

【００８１】

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とき、「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）；Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１５０：１－１４（１９８１）；Ｓａｎｔｅｒｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，３０：１４７－１５６（１９８４）；Ｋａｎｔｅｔ 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。

【００８２】

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。

【００８３】

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。

【００８４】

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、Ｃｒｕｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．（Ｌｅｉｄｅｎ，Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）から入手可能なアデノウイルスベースのＰｅｒ．Ｃ６系、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａ

ｄ，ＣＡ）製のレンチウイルスベースの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。

【００８５】

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、同一の発現制御配列を含んでいてもよく、又は異なる発現制御配列を含んでいてもよい。別々のベクターは、同時に又は逐次細胞に提供され得る。

【００８６】

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）に導入することができる。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。

【００８７】

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）、シュードモナス属（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）由来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）、ＤＨ５α、ＤＨ１０、ＭＣ１０６１（ＡＴＣＣ番号５３３３８）、及びＣＣ１０２）が挙げられる。

【００８８】

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（Ｒｈｉｎｏ－ｓｐｏｒｉｄｉｕｍ）、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・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓａｅ）及びピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）が挙げられる。

【００８９】

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。

【００９０】

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（Ｕｒｌａ

ｕｂ　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。

【００９１】

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（Ｃｒｕｃｅｌｌ　Ｈｏｌｌａｎｄ　Ｂ．Ｖ．，Ｌｅｉｄｅｎ，Ｔｈｅ　Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）、及びそれらの誘導体が挙げられる。

【００９２】

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とき、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））；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。

【００９３】

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み得る。

【００９４】

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】

【００９５】

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。

【００９６】

【表２】

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

【００９７】

表２の抗体又は抗体断片について、Ｋａｂａｔ付番ＣＤＲは以下の通りである：ＣＤＲＨ１は、それぞれのＶＨ配列の３１～３５位に位置し；ＣＤＲＨ２は、それぞれのＶＨ配列の５０～６６位に位置し；ＣＤＲＨ３は、それぞれのＶＨ配列の９９～１０６位に位置し；ＣＤＲＬ１は、それぞれのＶＬ配列の２４～３４位に位置し；ＣＤＲＬ２は、それぞれのＶＬ配列の５０～５６位に位置し；ＣＤＲＬ３は、それぞれのＶＬ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ＣＤＲを有するＢＴＬＡ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ＣＤＲは、更に他のＢＴＬＡ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。

【００９８】

表３は、配列番号４３～１５６の免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号１５７～１９２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。

【００９９】

【表３－１】

表３

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41	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41	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

【０１００】

【表３－２】

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
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

【０１０１】

【表３－３】

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
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

【０１０２】

【表３－４】

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
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

【０１０３】

【表３－５】

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
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

【０１０４】

表３の抗体又は抗体断片について、Ｋａｂａｔ付番ＣＤＲ領域は以下の通りである：ＣＤＲＨ１は、それぞれのＶＨ配列の３１～３５位に位置し；ＣＤＲＨ２は、ＣＤＲＨ２がそれぞれのＶＨ配列の５０～６７位に位置する＊印の付いた抗体を除いて、それぞれのＶＨ配列の５０～６６位に位置し；ＣＤＲＨ３は、ＣＤＲＨ３が１００～１１４位に位置する†印の付いた抗体を除いて、それぞれのＶＨ配列の９９～１１３位に位置し；ＣＤＲＬ１は、それぞれのＶＬ配列の２４～３４位に位置し；ＣＤＲＬ２は、それぞれのＶＬ配列の５０～５６位に位置し；ＣＤＲＬ３は、それぞれのＶＬ配列の８９～９７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ＣＤＲを有するＢＴＬＡ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ＣＤＲは、更に他のＢＴＬＡ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。

【０１０５】

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：

【０１０６】

Ａｂ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

【０１０７】

実施例１

抗体６Ｇ３は、ＢＴＬＡ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作製され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。最終的な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（ＣＨＯ）細胞で発現させた。

【０１０８】

【表１】

表１

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

【０１０９】

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５ｎＭの、そして、カニクイザルＢＴＬＡについてはK_D約１１ｎＭの結合親和性を有することを実証する。

【０１１０】

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（１０μＬ／分の流速で４２０秒間接触）。それぞれ０．５μｇ／ｍＬ）の抗体（ＡＰＥ１０５８５．０４ ６Ｇ３ ＩｇＧ１及びＡＰＥ１０８４０．０５ ６Ｇ３ ＩｇＧ４）を、１０μＬ／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。６０ｎＭ、２０ｎＭ、６．７ｎＭ、及び２．２ｎＭの濃度の単量体のヒト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、１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．６、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、３ｍＭ ＥＤＴＡ、０．０５％ポリソルベート２０を含有するバッファ（ＨＢＳ－ＥＰ＋、ｐＨ７．６；Ｔｅｋｎｏｖａ）使用した。各サイクルの最後に、３Ｍ ＭｇＣｌ２（３０μＬ／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、結合している抗原を除去した。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。

【０１１１】

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４１０ｐＭの、そして、カニクイザルＢＴＬＡについてはK_D約１．６６ｎＭの結合親和性を有することを実証する。

【０１１２】

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値を求めた。アズラクトンビーズ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、室温で２時間５０ｍＭ Na_2CO_3中ヒトＢＴＬＡ ＥＣＤ－ｈｉｓ（３０μｇ／ｍＬ）又はカニクイザルＢＴＬＡ ＥＣＤ－ｈｉｓ（２０μｇ／ｍＬ）でコーティングし、１０ｍｇ／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１００ｐＭで一定に維持した。ヒト又はカニクイザルのＢＴＬＡ ＥＣＤ－ｈｉｓを、１０００ｎＭから６８ｆＭ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ロバ抗ヒトＩｇＧ（２５０ｎｇ／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　ＰｒｏＳｏｆｔｗａｒｅ　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。

【０１１３】

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。

【０１１４】

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（２μＭ、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（2×10^5総細胞／サンプル）を指定の濃度の精製６Ｇ３　ＩｇＧ４（２つの製造ロット、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、１００μＬ／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－ＰＥ、ＦＡＣＳバッファ中０．２μｇ／ｍＬ、ＳｏｕｔｈｅｒｎＢｉｏｔｅｃｈ）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。

【０１１５】

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EC_{50}約１．７ｎＭ及び１．８ｎＭ）及びカニクイザルＢＴＬＡ　２９３ｃ１８細胞（EC_{50}約２．３ｎＭ）に対して同様の濃度依存的に飽和結合を示す。

【０１１６】

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。

【０１１７】

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2×10^{7}細胞／mLでHuman BD Fc Block（2.5μg／1×10^{6}細胞、BD Biosciences）及びLIVE／DEAD（登録商標）Fixable Yellow Dead Cell Stain（30μL、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、1×10^{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CD3ε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50μL；いずれもBioLegend，Inc．製）。フェノタイピング抗体を添加した細胞（1×10^{6}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℃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、150μL／ウェルのFACSバッファに再懸濁させ、4℃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、150μL／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EC_{50}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。

【0118】

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に飽和結合を示す。6G3抗体は、EC_{50}約2.4nMで$CD4^{+}$T細胞に、EC_{50}約3.2nMで$CD8^{+}$T細胞に、EC_{50}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）。

【0119】

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。

【0120】

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 Prob

ｅｓ）で標識し、ＡＰＥ１３７６６．０２（６Ｇ３－ＡＦ６４７）と命名した。Ａｌｔａｓｃｉｅｎｃｅｓから正常カニクイザルの新鮮末梢血を入手した。全血サンプル（８００μＬ）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 Ｈｏｒｉｚｏｎ 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（ＢＴＬＡ）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ＢＴＬＡ抗体のＭＦＩ値を図５Ａに示し、全ＣＤ２０$^{+}$細胞に対する各抗ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ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。

【０１２１】

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EC_{50}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での６Ｇ３－ＡＦ６４７の染色パターンは、３３ｎＭの市販の参照ＡＰＣ標識抗ＢＴＬＡ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）。

【０１２２】

実施例７

この実施例は、本明細書に開示される抗ＢＴＬＡ抗体が、細胞表面ＢＴＬＡ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。

【０１２３】

ヒトＢＴＬＡ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2×10^{5}／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ＢＴＬＡ　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。

【０１２４】

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。

【０１２５】

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。

【０１２６】

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（Ｃｏｍｐａａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２８０：３９５５３－３９５６１（２００５））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分間重水素で標識した。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。

【０１２７】
マッピングは、ＢＬＴＡ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　ＨＳＩＬＡＧＤＰＦＥＬＥＣＰＶＫＹＣＡＮ（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　ＹＩＫ（配列番号２３２）
ペプチド５２～６４　ＤＰＦＥＬＥＣＰＶＫＹＣＡ（配列番号２３３）
ペプチド１００～１０６　ＬＨＦＥＰＶＬ（配列番号２２８）
ペプチド１２４～１３１　ＩＥＳＨＳＴＴＬ（配列番号２３４）
【０１２８】
実施例９
この実施例は、ＢＴＬＡ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。
【０１２９】
完全長ヒトＢＴＬＡ、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細胞を作製し、単一細胞クローニングし、ｈｕＨＶＥＭ／ｈｕＢＴＬＡ／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細胞を作製し、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／ｈｕＢＴＬＡ／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％CO_2で１時間インキュベートした後、指定の濃度の６Ｇ３ＩｇＧ４（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、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EC_{50}を表す）。３７℃Ｃ、５％CO_2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　Ｍｕｌｔｉｍｏｄｅ　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。発光の相対光単位（ＲＬＵ）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。
【０１３０】
図８に示すＮＦ－κＢルシフェラーゼレポーターアッセイは、ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ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。
【０１３１】

図８に示すＮＦ－κＢルシフェラーゼレポーターアッセイは、ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡ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。

【０１３２】

実施例１０

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６Ｇ３抗体が、同じ細胞表面におけるＢＴＬＡ／ＨＶＥＭ複合体を破壊しないことを実証する。

【０１３３】

図９Ａでは、完全長ヒトＢＴＬＡ及びヒトＨＶＥＭを安定的に発現している２９３ｃ１８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％アジ化ナトリウム）で洗浄し、白色Ｕ底９６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℃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、６Ｇ３ＩｇＧ４（ＡＰＥ１２８３９．０５（Ｈ鎖配列番号１４４、Ｌ鎖配列番号１７４））、参照アンタゴニスト抗体ＩｇＧ４、及び鶏卵リゾチームに特異的なヒトＩｇＧ４Ｐ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ＨＶＥＭ（１５μｇ／ｍＬ；クローン１２２、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）に再懸濁させた。ＦＲＥＴドナー抗体はビオチンヒト化１０Ｄ８（ＡＰＥ１２７７４．０２）であり、室温で２０分間インキュベートすることによって、１０μｇ／ｍＬで０．０２５μｇ／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ＢＴＬＡ／ストレプトアビジン－ＥｕをアクセプターであるＡＰＣ－抗ＨＶＥＭ抗体と共にプレートに添加し、４℃で２４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　Ｐｌａｔｅｒ　Ｒｅａｄｅｒ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ，ＣＡ）でサンプルの蛍光を読み取った。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）で、６６５ｎｍ／６１５ｎｍ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±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。

【０１３４】

図９Ａに示すＦＲＥＴアッセイは、トランスフェクトされた２９３ｃ１８細胞上にＢＴＬＡ／ＨＶＥＭ複合体が存在すること、及び本明細書に開示される６Ｇ３抗体が、アイソタイプ対照抗体と同様に、４０μｇ／ｍＬ以下の濃度ではＢＴＬＡ／ＨＶＥＭ　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６Ｇ３抗体は、同じ細胞表面上のＢＴＬＡとＨＶＥＭとの相互作用を阻害しないことが確認される。

【０１３５】

図９Ａ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ＢＴＬＡ／ＨＶＥＭ複合体のＦＲＥＴシグナルを阻害し、IC_{50}が約０．６５μｇ／ｍＬであることを実証する。

【０１３６】

図９Ｂでは、完全長ヒトＢＴＬＡ及びヒトＨＶＥＭを安定的に発現している２９３ｃ１８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９６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ＨＶＥＭ（クローン１２２、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）又はＡＰＣ－マウスＩｇＧ１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２０分間インキュベートすることによって、１０μｇ／ｍＬで０．０２５μｇ／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－６Ｇ３ ＩｇＧ４（ＡＰＥ１３１２４．０１、これはビオチンコンジュゲートＡＰＥ１２８３９．０５（Ｈ鎖配列番号１４４、Ｌ鎖配列番号１７４）であった）、ビオチン参照アンタゴニスト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、０．３μｇ／ｍＬ抗体及び０．７５ｎｇ／ｍＬストレプトアビジン－Ｅｕであった。プレートを４℃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、６６５ｎｍ／６１５ｎｍ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±ＳＥＭである。

【０１３７】

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シグナルを生成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。

【０１３８】

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。

【０１３９】

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－κＢ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。

【０１４０】

完全長ヒトＨＶＥＭ及びＮＦ－κＢ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細胞を作製し、ＨＶＥＭ／ＮＦ－κＢ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細胞を作製し、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６Ｇ３ＩｇＧ４（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－κＢ細胞を収集し、添加した（５×１０^{4}細胞／ウェル）。３７℃、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。発光の相対光単位（ＲＬＵ）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。

【０１４１】

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、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－κＢ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抗体と共に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。

【０１４２】

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。

【０１４３】

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。

【０１４４】

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　ＤｉｓｃｏｖｅｒＸ（Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ）で作製し、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（２×１０^{4}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、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、ＥＣ$_{50}$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　ＤｉｓｃｏｖｅｒＸ（Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ）で行った。

【０１４５】

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（ＥＣ$_{50}$＝１２５ｎｇ／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させることによって機能する可能性がある。

【０１４６】

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シグナル伝達（ＥＣ$_{50}$＝２８．８ｎｇ／ｍＬ）を誘導することを実証する。図１１に示すＳＨＰ２動員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。

【０１４７】

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。

【０１４８】

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）で作製した。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（２×１０^{4}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℃、５％ＣＯ$_{2}$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、ＩＣ$_{50}$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。

【０１４９】

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。

【０１５０】

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（IC_{50}＝８．９ｎｇ／ｍＬ）。

【０１５１】

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抗体の直接ＢＴＬＡアゴニスト活性の増加を実証する。

【０１５２】

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ＦｃγＲＩａ／ＣＤ６４ａを安定的に発現するＵ－２　ＯＳ骨肉腫細胞株（Ｕ－２　ＯＳ　ｈＦｃγＲＩａ細胞）を、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ　ＤｉｓｃｏｖｅｒＸ（Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ）で作製した。Ｕ－２　ＯＳ　ｈＦｃγＲＩａ細胞を収集し、９６ウェルプレートにプレーティング（1×10^{4}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％CO_2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。Ｊｕｒｋａｔ　ＢＴＬＡ－ＥＤ　ＳＨＰ２－ＥＡ細胞を収集し、Ｕ－２　ＯＳ　ｈＦｃγＲＩａ細胞と共にアッセイプレートに添加（2×10^{4}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。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。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、EC_{50}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。

【０１５３】

図１３に示すＳＨＰ２動員ＰａｔｈＨｕｎｔｅｒ　Ｊｕｒｋａｔ　ＢＴＬＡシグナル伝達アッセイは、ＦｃγＲＩａ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６Ｇ３抗体が、増大した直接ＢＴＬＡアゴニスト活性を有し、濃度依存的にＢＴＬＡシグナル伝達を誘導する（EC_{50}＝９．３ｎｇ／ｍＬ）ことを実証する。

【０１５４】

図１３に示すＳＨＰ２動員ＰａｔｈＨｕｎｔｅｒ　Ｊｕｒｋａｔ　ＢＴＬＡシグナル伝達アッセイは、ＦｃγＲＩａ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ＢＴＬＡアンタゴニスト抗体が、直接ＢＴＬＡアゴニスト活性を有し、濃度依存的にＢＴＬＡシグナルを誘導する（EC_{50}＝３．９ｎｇ／ｍＬ）ことを実証する。

【０１５５】

図１３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抗体及び参照ＢＴＬＡアンタゴニスト抗体がいずれも、ＦｃγＲＩａなしのＪｕｒｋａｔ　ＢＴＬＡシグナル伝達アッセイと比較して

、細胞に会合しているＦｃγＲＩａ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（６Ｇ３では約１３倍強力；参照ＢＴＬＡ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６Ｇ３抗体は、ＢＴＬＡ細胞質ドメインへのＳＨＰ２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、ＦｃγＲＩａに結合した６Ｇ３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。

【０１５６】

実施例１５

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

【０１５７】

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 ＩＬ２ｒγ^{ｎｕｌｌ}（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。カプラン－マイヤー生存解析を用いて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値を算出するためのゲーハン－ブレスロー－ウィルコクソン検定を用いてＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍにおいて求めた。

【０１５８】

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処理群に比べて短い生存期間を示した。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。

【０１５９】

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Ｂ

ＴＬＡを検出するための９６ウェル電気化学発光（ＥＣＬ）サンドイッチアッセイの適格性について説明する。

【０１６０】

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サンプルを分析する。

【０１６１】

９６ウェルＭＳＤ　Ｓｔａｎｄａｒｄ　Ｂｉｎｄアッセイプレート（ＭＳＤ品番Ｌ１５ＸＡ－３）に、１．０μｇ／ｍＬの抗ＢＴＬＡクローン１０Ｄ８（ＡＰＥ１０１３４）５０μＬ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×ＰＢＳＴで３回洗浄し、２５０μＬ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５００～７．８ｎｇ／ｍＬであり、定量範囲は５００～７．８ｎｇ／ｍＬであった。１００％カニクイザル血清による２倍希釈系列を使用して標準物質を調製した。また、１００％カニクイザル血清で定量範囲に及ぶ５つの異なる濃度の品質対照（ＱＣ）を調製し、凍結させた。次いで、全ての標準物質、サンプル、及び対照を、１：１０の必要最小希釈率（ＭＲＤ）において１００μｇ／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時間シェーカー上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×ＰＢＳＴで洗浄し、５０μＬの希釈した標準物質、サンプル、ＱＣを、室温で２時間４００～５００ｒｐｍのシェーカー上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×ＰＢＳＴで３回洗浄し、０．２５μｇ／ｍＬビオチン化抗ＢＴＬＡポリクローナル検出抗体（ＰＡ５－９５５９２、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ製）５０μＬを各ウェルに添加し、室温で１時間シェーカー上でインキュベートした。次いで、プレートを１×ＰＢＳＴで３回洗浄した。次に、１ウェルあたり５０μＬの０．２μｇ／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分間シェーカー上でインキュベートした。次いで、プレートを１×ＰＢＳＴで最後に３回洗浄した。１ウェルあたり１５０μＬの２×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。標準物質、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。

【０１６２】

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。

【０１６３】

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、１００μｇ／ｍＬの６Ｇ３を希釈バッファに添加し、全ての標準物質、サンプル、及び対照を１：１０のＭＲＤに従って希釈し、室温で１時間シェーカー上で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。

【０１６４】

５００μｇ／ｍＬ、５０μｇ／ｍＬ、５μｇ／ｍＬ、０．５μｇ／ｍＬ、及び０μｇ／ｍＬの６Ｇ３　ＩｇＧ４の標準曲線を、１００μｇ／ｍＬの６Ｇ３　ＩｇＧ４を含有するアッセイバッファでＭＲＤ１：１０で希釈して、ＢＴＬＡの（％ＲＥ）及び精度（％ＣＶ）を評価した。１００μｇ／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。

【０１６５】

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規定する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（５００ｎｇ／ｍＬ）、ＨＱＣ（４００ｎｇ／ｍＬ）、ＭＱＣ（６２．４ｎｇ／ｍＬ）、ＬＱＣ（１５．６ｎｇ／ｍＬ）、及びＬＬＯＱ（７．８ｎｇ／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（％ＲＥ）の平均結果は、平均回収濃度が公称濃度の２０％以内である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。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、ＢＴＬＡでは全誤差率（％ＴＥ）が３０％を超えることはなかった。

【０１６６】

５つのレベルのＱＣ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（％ＲＥ）及び精度（％ＣＶ）を評価した。対照の正確度（％ＲＥ）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（％ＣＶ）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。

【０１６７】

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、ＵＬＯＱを超える濃度のＢＴＬＡ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。

【０１６８】

結果は、アッセイが、６Ｇ３　ＩｇＧ４を投与したカニクイザル試験から回収した血清中のＢＴＬＡ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。

【０１６９】

実施例１７

以下の実施例は、カニクイザル血清及びＮＯＤ　ｓｃｉｄマウス血漿中の可溶性ＢＴＬＡを定量的に求めるための電気化学発光（ＥＣＬ）サンドイッチアッセイの使用について説明する。

【０１７０】

９６ウェルＭＳＤ　Ｓｔａｎｄａｒｄ　Ｂｉｎｄアッセイプレート（ＭＳＤ品番Ｌ１５ＸＡ－３）に、１．０μｇ／ｍＬの抗ＢＴＬＡ捕捉試薬クローン１０Ｄ８（ＡＰＥ１０１３４）５０μＬ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×ＰＢＳＴで３回洗浄し、２５０μＬ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ｓＢＴＬＡの較正曲線範囲が７．８～５００ｎｇ／ｍＬ、定量範囲が７．８～５００ｎｇ／ｍＬであり、ＣＤ１マウス血漿では較正範囲及び定量範囲共に２．０～１０００ｎｇ／ｍＬであった。１００％種特異的マトリクスによる２倍希釈系列を使用して標準物質を調製した。また、１００％種特異的マトリクスで定量範囲に及ぶ５つの異なる濃度の品質対照（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、１００μｇ／ｍＬの６Ｇ３を含有するアッセイバッファで必要最小希釈率（ＭＲＤ）１：１０で希釈し、室温で１時間、シェーカー上でインキュベートした。

【０１７１】

ブロッキング後、プレートを１×ＰＢＳＴで洗浄し、５０μＬの希釈した標準物質、サンプル、及びＱＣを、室温で２時間４００～５００ｒｐｍのシェーカー上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×ＰＢＳＴで３回洗浄し、０．２５μｇ／ｍＬビオチン化抗ＢＴＬＡクローンＰＡ５－９５５９２（ＶＣ２９６３１０４Ｂ）検出抗体５０μＬを各ウェルに添加し、室温で１時間シェーカー上でインキュベートした。次いで、プレートを１×ＰＢＳＴで３回洗浄した。次に、１ウェルあたり５０μＬの０．２μｇ／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分間シェーカー上でインキュベートした。次いで、プレートを１×ＰＢＳＴで最後に３回洗浄した。１ウェルあたり１５０μＬの２×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。標準物質、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、ＢＴＬＡの参照標準曲線に基づいて濃度を逆算した。

【０１７２】

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（１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、及び１０ｍｇ／ｋｇ　ＩＰ）で投与した。アイソタイプ対照ＩｇＧ４（１０ｍｇ／ｋｇ）又はＣＴＬＡ－４－Ｉｇ（７５μｇ）を投与した動物を対照とした。動物に週２回投与を行い、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、ＢＴＬＡの発現を特性評価し、ヒトＴ細胞を数え上げ、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ＢＴＬＡ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。

【０１７３】

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（１０ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ；１０ｍｇ／ｋｇ　ＳＣ；及び１ｍｇ／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。

【０１７４】

第２の試験では、カニクイザル（ｎ＝３８０）に６Ｇ３を４つの用量群（１０ｍｇ／ｋｇ、５０ｍｇ／ｋｇ、及び１００ｍｇ／ｋｇ　ＳＣ、並びに１００ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ）で投与した。全ての動物に週用量の６Ｇ３　ＩｇＧ４をＩＶ又はＳＣのいずれかで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。

【０１７５】

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ｓＢＴＬＡは検出されなかった。マウス試験における最低用量群（１ｍｇ／ｋｇ）を除いて、６Ｇ３ＩｇＧ４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、脱落したｓＢＴＬＡが検出された。この結果は、ＢＴＬＡがＢ細胞及びＴ細胞の表面から脱落すること、そして、ｓＢＴＬＡ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。

【０１７６】
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ＢＴＬＡ発現を減少させることを実証する。
【０１７７】
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（１０ｍｇ／ｋｇ　ＳＣ、５０ｍｇ／ｋｇ　ＳＣ、１００ｍｇ／ｋｇ　ＳＣ、１００ｍｇ／ｋｇ　ＩＶ）及び１つの対照群の動物に６Ｇ３　ＩｇＧ４を投与した。
【０１７８】
６Ｇ３　ＩｇＧ４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（６Ｇ３　ＩｇＧ４－ＤｙＬ４８８）の結合は、ビヒクル対照処理群と比較して６Ｇ３　ＩｇＧ４を投与した全ての動物で抑制され、図２０に示す通り、６Ｇ３　ＩｇＧ４によるＢＬＴＡ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。
【０１７９】
蛍光色素で標識した非競合抗ＢＴＬＡ抗体（クローン１０Ｄ８）で検出した場合、６Ｇ３　ＩｇＧ４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ＢＴＬＡ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ＢＴＬＡの表面発現は、それぞれ約７５％及び約５０％減少した。
【０１８０】
Ｔ細胞及びＢ細胞におけるＢＴＬＡ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、６Ｇ３　ＩｇＧ４に依存した機序によってＢＴＬＡが脱落することを示唆している。抗薬物抗体（ＡＤＡ）を発現した２匹の動物は、受容体占有率の若干の低下、並びにＴ細胞及びＢ細胞におけるＢＴＬＡ発現の回復を示した。
【０１８１】
実施例１９
この実施例は、ＢＴＬＡ細胞外ドメイン（ＥＣＤ）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。
【０１８２】
プロテイナーゼ３（ＰＲ３）は、好中球のセリンプロテアーゼであり、好中球が活性化した際に細胞外空間に放出される。ＰＲ３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（ＴＩＭ－３）を切断し、細胞表面上のＴＩＭ－３のレベルを低下させることが既に示されている。
【０１８３】
６つの異なるレーンを、精製組み換えＰＲ３及び／又はＢＴＬＡ－ＥＣＤと共に最長６０分間インキュベートした。レーンは、（１）ＰＲ３対照、（２）ＰＲ３　６０ｍ対照、（３）ＢＴＬＡ対照、（４）ＰＲ３＋ＢＴＬＡ　０ｍ、（５）ＰＲ３＋ＢＴＬＡ　３０ｍ、及び（５）ＰＲ３＋ＢＴＬＡ　６０ｍからなっていた。
【０１８４】
コインキュベートした後、可溶性ＢＬＴＡ－ＥＣＤは複数のより小さな断片に切断され、ＰＲ３がＢＴＬＡ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、ＢＴＬＡ－ＥＣＤのＣ末端に向かって少なくとも１つのＰＲ２認識モチーフが提案された。
【０１８５】
実施例２０
この実施例は、６Ｇ３　ＩｇＧ４が健常対照（ＨＣ）及びアトピー性皮膚炎（ＡＤ）ドナーにおいて、Ｔ細胞の増殖及びＢＴＬＡ表面発現を減少させることを実証する。
【０１８６】

ＨＣ又はＡＤドナーのＰＢＭＣを０．５μＭ　ＣＦＳＥで標識し、次いで、１００ｎＭの６Ｇ３　ＩｇＧ４又はアイソタイプ対照（ＩｇＧ４－ＨｙＨｅｌ）の存在下又は非存在下において可溶性抗ＣＤ３（０．５ｎｇ／ｍＬ、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３００３３２）及び可溶性抗ＣＤ２８（０．５ｎｇ／ｍＬ、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０２９４３）で７２時間刺激した。ＣＦＳＥ希釈によって増殖細胞を判定した。

【０１８７】

図２１Ａは、６Ｇ３　ＩｇＧ４で処理した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示すＨＣ及びＡＤドナーのＣＦＳＥ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、ＮｏｖｏＥｘｐｒｅｓｓ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ＩＦＮγ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、ＡｎａｐｔｙｓＢｉｏ．）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。

【０１８８】

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

【０１８９】

実施例２１

この実施例は、６Ｇ３　ＩｇＧ４がヒト患者において安全な投与量で高いＢＴＬＡ受容体占有率を達成することを実証する。

【０１９０】

この試験では、７２名の単回漸増用量（ＳＡＤ）コホート及び２４名の反復漸増用量（ＭＡＤ）コホートを含む９６名の対象を無作為化／処置した。ＳＡＤコホートでは、７ｍｇ、２０ｍｇ、７０ｍｇ、２００ｍｇ、４００ｍｇ、又は８００ｍｇの単回用量を静脈内投与（ＩＶ）又は皮下投与（ＳＣ）のいずれかを介して投与した。ＭＡＤコホートには、４週間にわたり、７０ｍｇ、２００ｍｇ、又は４００ｍｇを週１回ＳＣ投与した。各コホートには８名の対象が含まれ、６名には６Ｇ３　ＩｇＧ４抗体を投与し、２名にはプラセボを投与した。ＳＡＤ対象７２名中７１名が試験を完了し、ＭＡＤ対象２４名中２１名が試験を完了した。処置は耐容性良好であり、安全性に関するシグナルは認められなかった。

【０１９１】

ＣＤ３＋Ｔ細胞及びＣＤ１９＋Ｂ細胞におけるＢＴＬＡ受容体の占有率を求めた。一部の結果を図２２Ａ及びＢに提示する。受容体占有率は、７ｍｇ　ＩＶ又は２０ｍｇ　ＳＣで最大となり、用量依存的に持続時間が増加することが判明した。２００ｍｇ　ＩＶ及び４００ｍｇ　ＳＣの単回投与により、９０％以上の受容体占有率が３０日間超持続した。ＭＡＤコホートで実証されるように、複数回ＳＣ投与により受容体の最大受容体占有率を維持することができる。

【０１９２】

実施例２２

この実施例は、単回１０ｍｇ／ｋｇ投与又は４週間にわたって隔週３ｍｇ／ｋｇ投与した場合、本明細書に開示される６Ｇ３抗体が移植片対宿主病（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。

【０１９３】

マウスに１×１０^{7}個のヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を移植した。次いで、１０ｍｇ／ｋｇ又は３ｍｇ／ｋｇの６Ｇ３抗体又はＩｇＧ４アイソタイプ対照を単回投与（ＳＤ）又は４週間にわたって隔週投与（ＢｉＷ）のいずれかで注射した。また、任意の処置又

はプラセボ注射を除いて、生着レベル及び疾患の進行をモニタリングするために、非処理動物の対照群も含めた。

【０１９４】

６Ｇ３を単回１０ｍｇ／ｋｇ投与又は４週間にわたってＢｉＷ　３ｍｇ／ｋｇ投与した動物は、４６日目までの明らかな生存効果を示した。各処理群（ＳＤ又はＢｉＷ）において病気で死亡したのは１匹だけであり、他の動物は全て試験４６日目まで生存した（ｎ＝１１）。ＩｇＧ４アイソタイプ対照の１０ｍｇ／ｋｇ単回投与で処理した動物の平均生存期間は２０．５日間、ＢｉＷ　３ｍｇ／ｋｇ投与では２０日間であった。未処理対照動物の生存期間中央値は２３日間であった。結果を図２３Ａ及び２３Ｂに示す。

【０１９５】

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照文献は、各参照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。

【０１９６】

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解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。

【０１９７】

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。

【図面】

【図１】

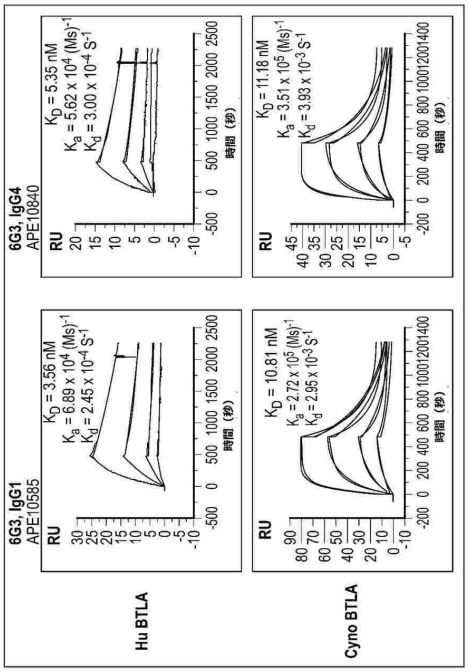


FIG. 1

【図２】

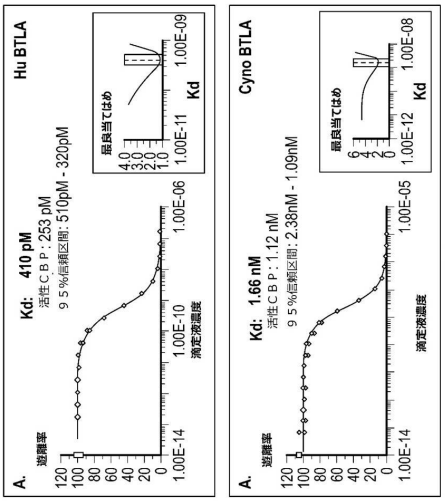


FIG. 2

【図３】

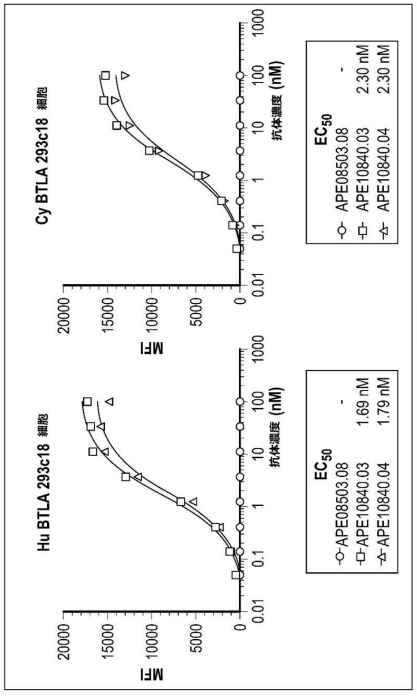


FIG. 3

【図４】

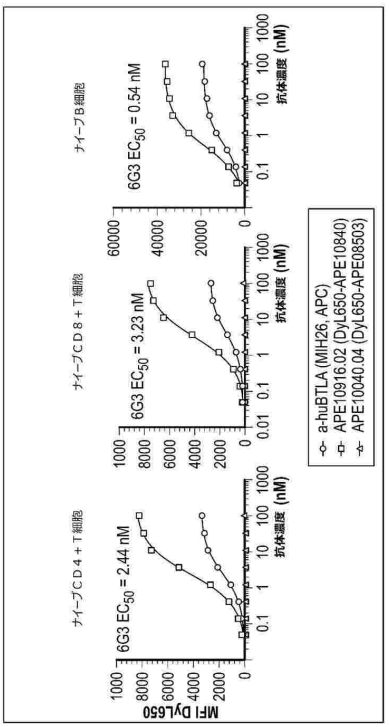
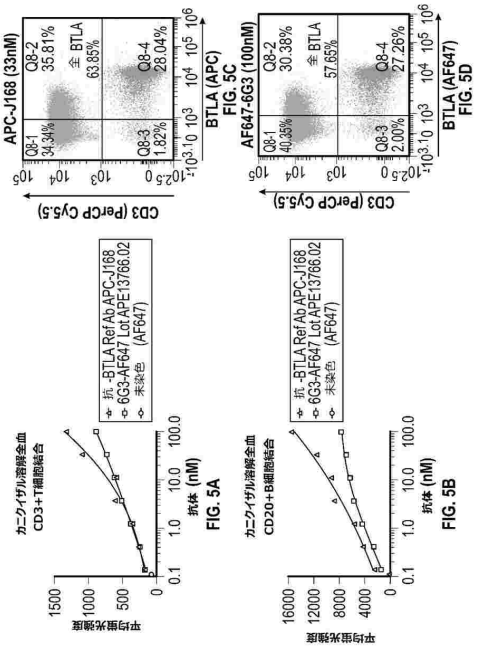
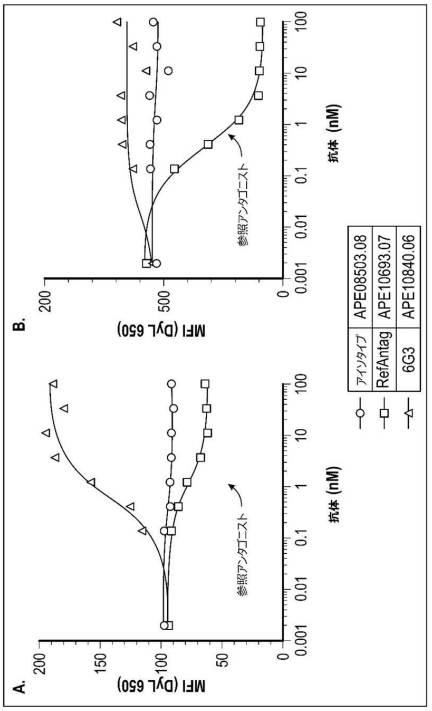


FIG. 4

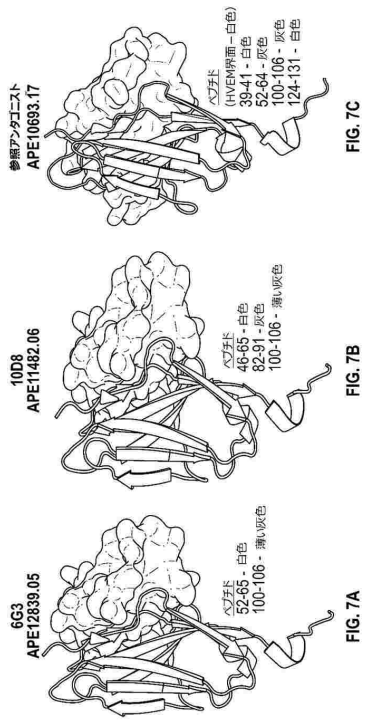
【図５】


APC-J168 (33nM)
Q8-2 35.81%
全 BTLA 63.85%
Q8-1 34.34%
Q8-4 28.04%
Q8-3 11.82%
CD3 (PerCP Cy5.5)
BTLA (APC)
FIG. 5C
AF647-6G3 (100nM)
Q8-2 30.38%
全 BTLA 57.65%
Q8-1 40.08%
Q8-4 27.26%
Q8-3 2.00%
BTLA (AF647)
FIG. 5D
カニクイザル凍結全血 CD3+T細胞結合
抗 -BTLA Ref Ab APC-J168
6G3-AF647 Lot APE13766.02
未染色 (AF647)
平均蛍光強度
抗体 (nM)
FIG. 5A
カニクイザル凍結全血 CD20+B細胞結合
FIG. 5B

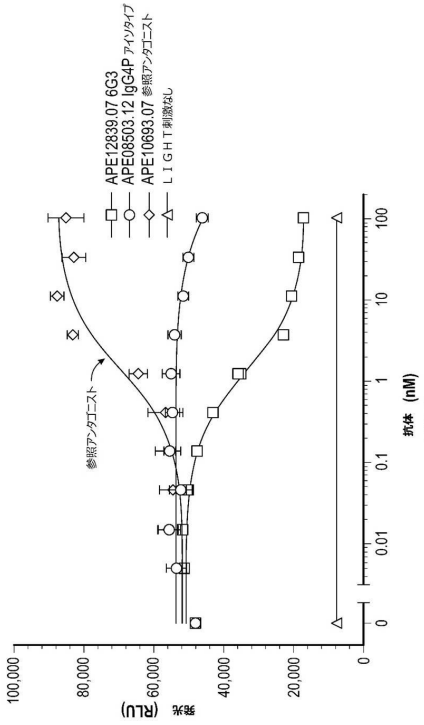
【図６】


A.
B.
MFI (DyL 650)
抗体 (nM)
参照アンタゴニスト
アイソタイプ
RefAntag
6G3
APE08503.08
APE10693.07
APE10840.06
FIG. 6

【図７】


6G3
APE12839.05
ベプチド
52-65 - 白色
100-106 - 薄い灰色
FIG. 7A
10D8
APE11482.06
ベプチド
46-65 - 白色
82-91 - 灰色
100-106 - 薄い灰色
FIG. 7B
参照アンタゴニスト
APE10693.17
ベプチド
(HVEM界面 - 白色)
39-41 - 白色
52-64 - 灰色
100-106 - 灰色
124-131 - 白色
FIG. 7C

【図８】


APE12839.07 6G3
APE08503.12 IgG4P アイソタイプ
APE10693.07 参照アンタゴニスト
LIGHT刺激なし
参照アンタゴニスト
発光 (RLU)
抗体 (nM)
FIG. 8

【図９】

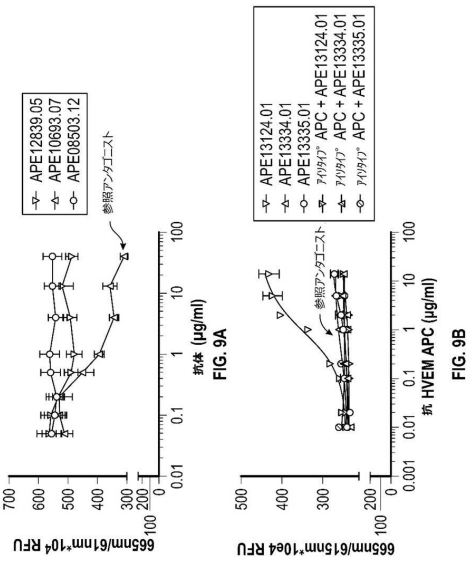


FIG. 9A

FIG. 9B

【図１０】

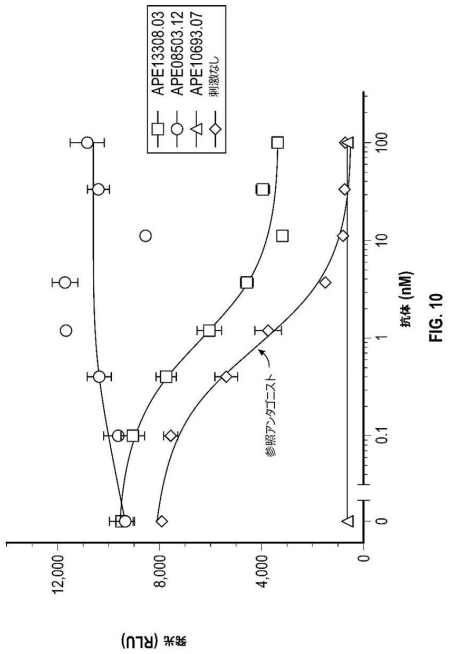


FIG. 10

【図１１】

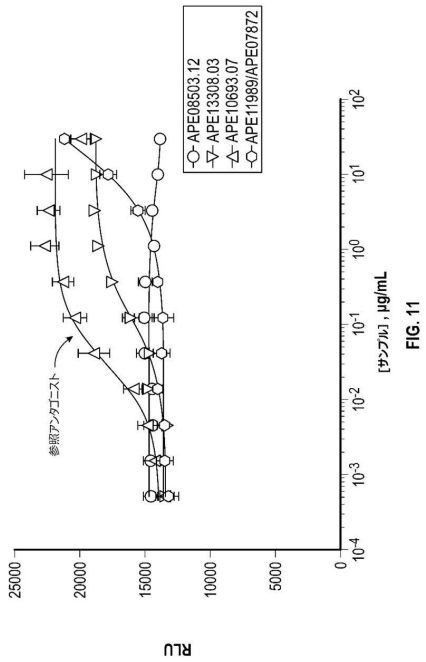


FIG. 11

【図１２】

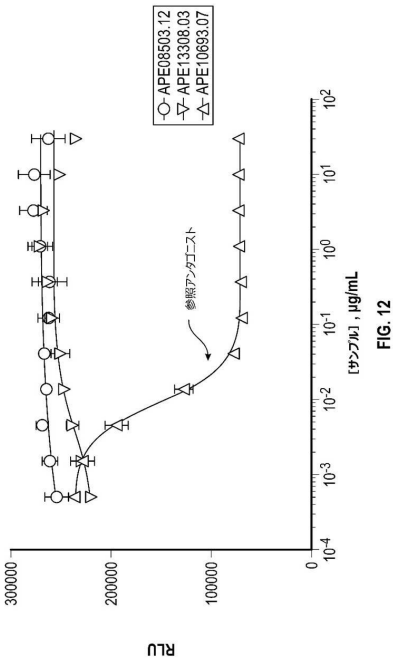


FIG. 12

【図１３】

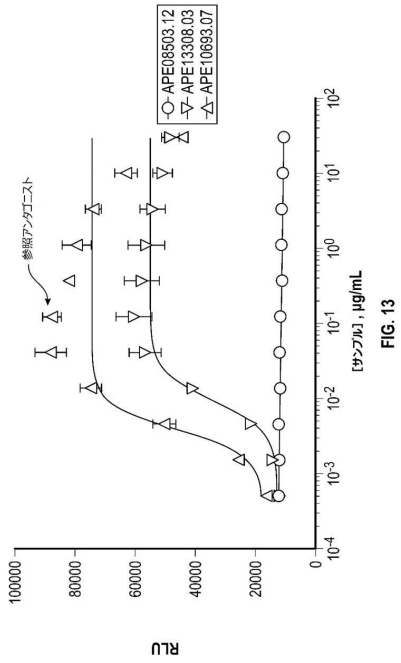


FIG. 13

【図１４Ａ】

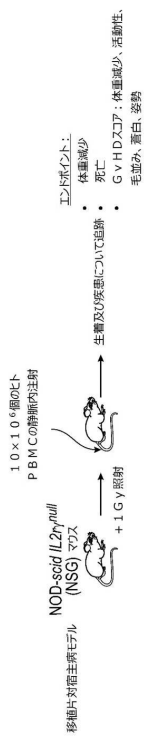


FIG. 14A

【図１４Ｂ】

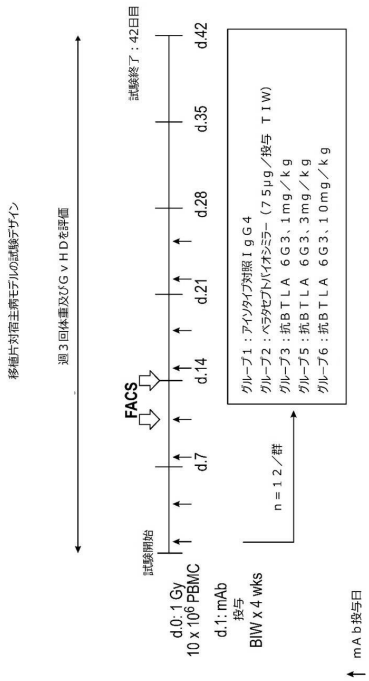


FIG. 14B

【図１４Ｃ】

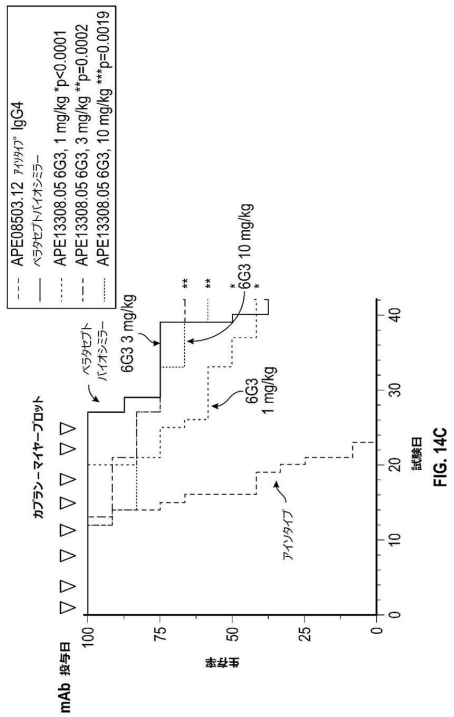


FIG. 14C

【図１５】

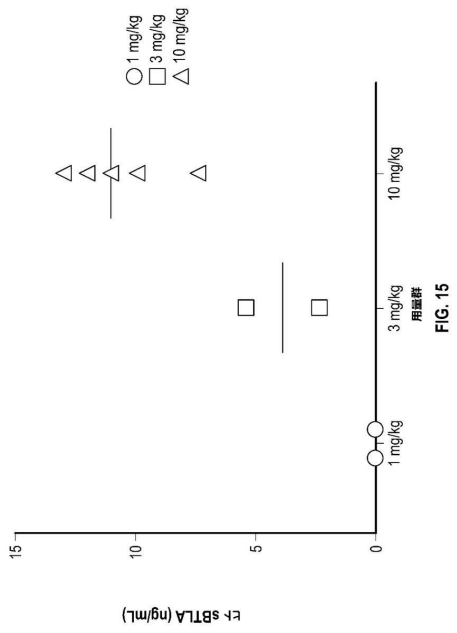


FIG. 15

【図１６】

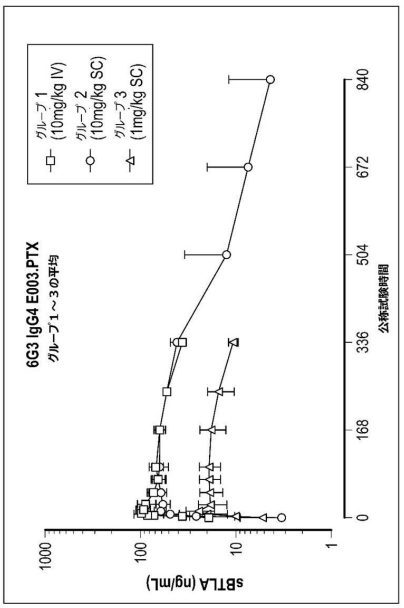


FIG. 16

【図１７】

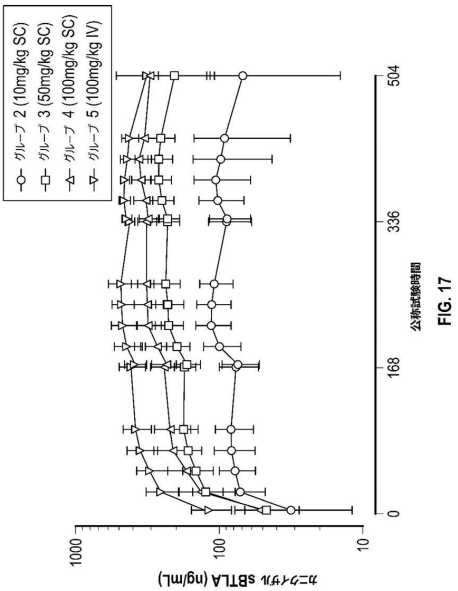


FIG. 17

【図１８】

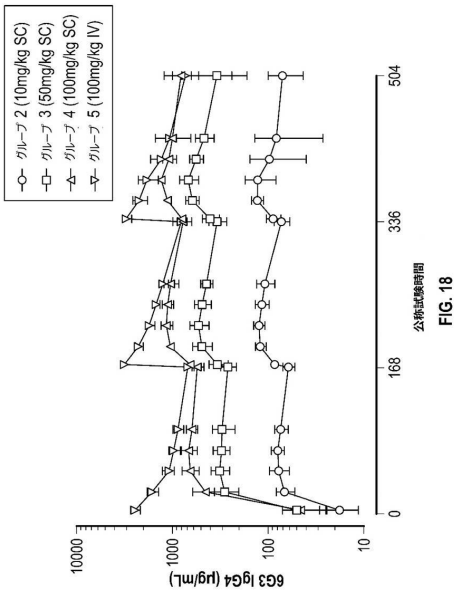


FIG. 18

【図１９】

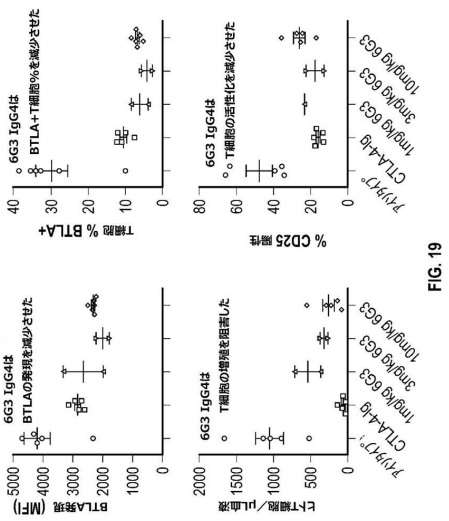


FIG. 19

【図２０】

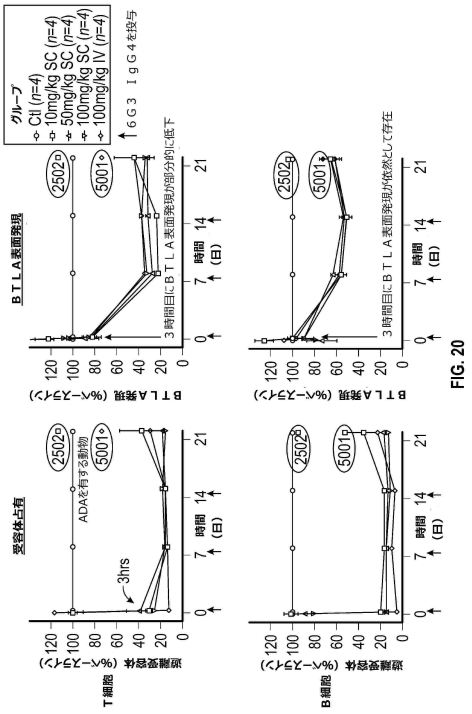


FIG. 20

【図２１Ａ】

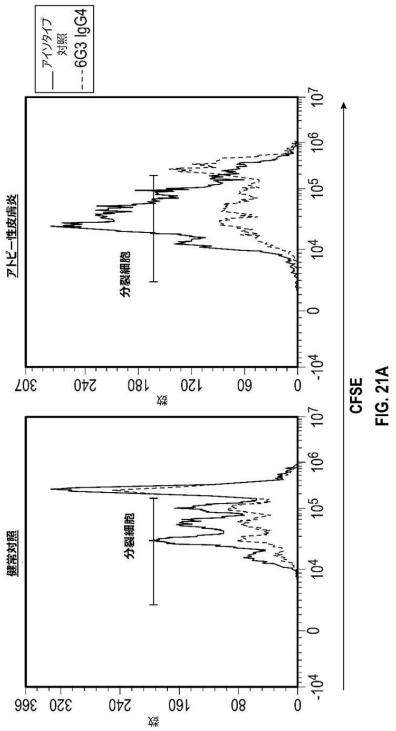


FIG. 21A

【図２１Ｂ】

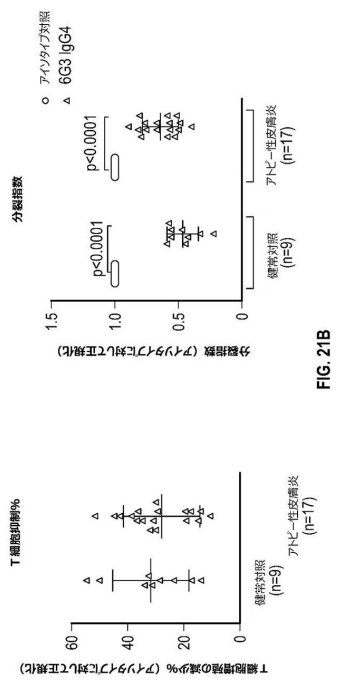


FIG. 21B

【図２１Ｃ】

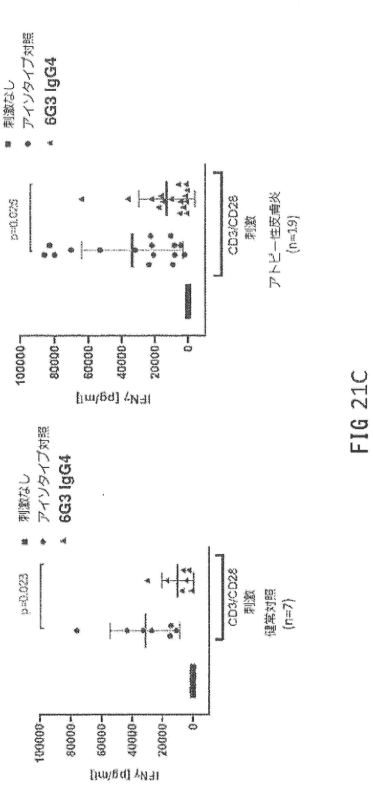


FIG 21C

【図２１Ｄ】

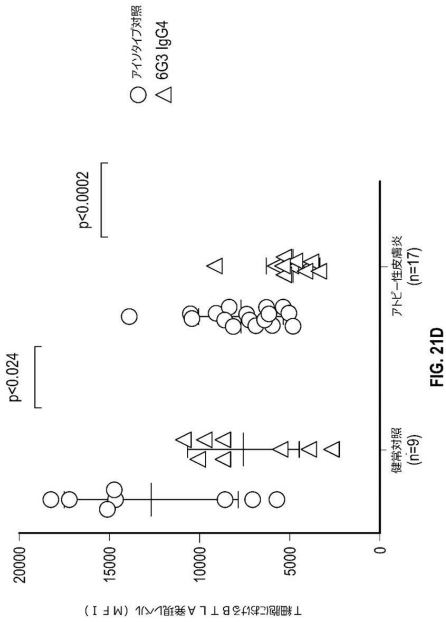


FIG. 21D

【図２２Ａ】

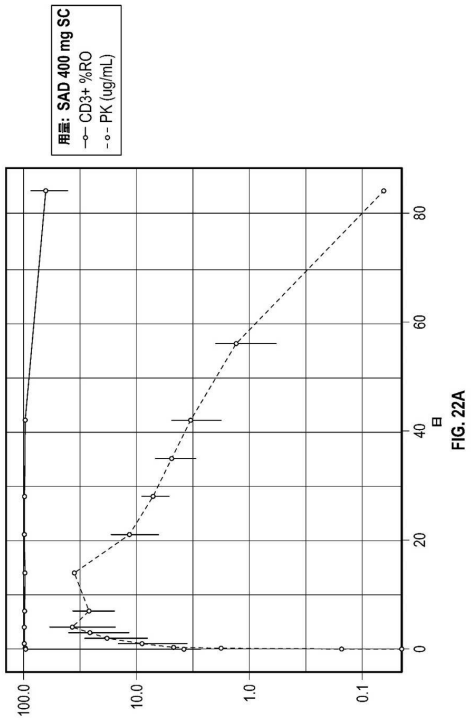


FIG. 22A

【図２２Ｂ】

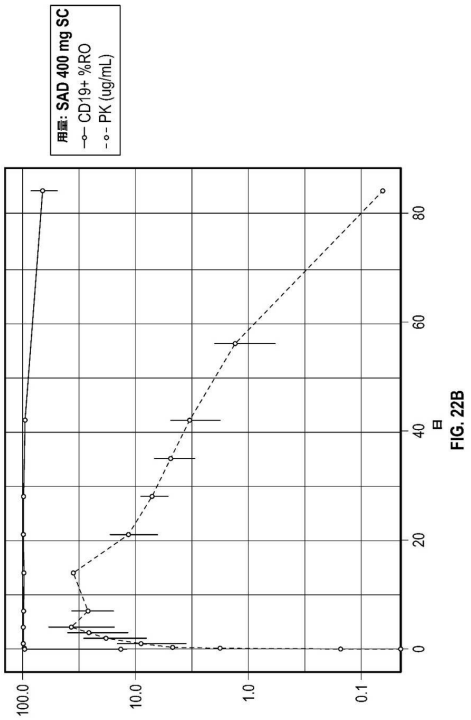


FIG. 22B

【図２３Ａ】

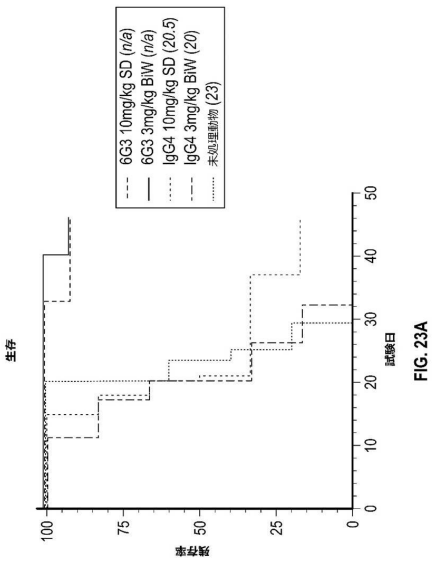


FIG. 23A

【図２３Ｂ】

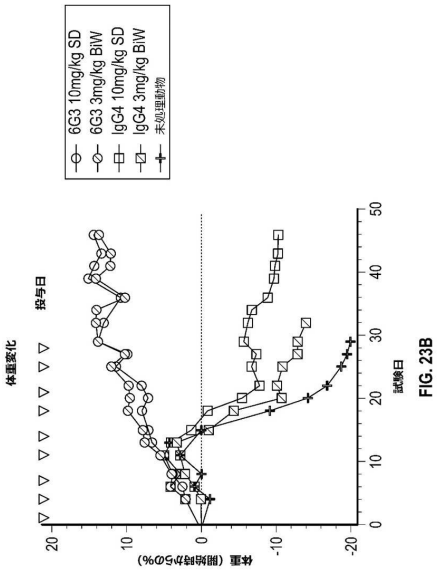


FIG. 23B

【配列表】

2025515337000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066258

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, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JÖRN C. ALBRING ET AL: "Targeting of B and T lymphocyte associated (BTLA) prevents graft-versus-host disease without global immunosuppression", JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 207, no. 12, 22 November 2010 (2010-11-22), XP055360411, US ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/jem.20102017 the whole document -----	1-25
X	WO 2011/014438 A1 (ORGANON NV [NL]; MEDAREX INC [US] ET AL.) 3 February 2011 (2011-02-03) claims 1-15; examples 1-17 ----- -/--	1-25

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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	Date of mailing of the international search report
2 August 2023	10/08/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Le Flao, Katell

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066258

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2022/087441 A2 (ANAPTYSBIO INC [US]) 28 April 2022 (2022-04-28) claims 1-43; examples 1-20 -----	1-25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/066258

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. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/066258

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011014438 A1	03-02-2011	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
		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
WO 2022087441 A2	28-04-2022	AU 2021365611 A1	08-06-2023
		CA 3196493 A1	28-04-2022
		EP 4232480 A2	30-08-2023
		IL 302135 A	01-06-2023
		KR 20230096024 A	29-06-2023
		WO 2022087441 A2	28-04-2022

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
A61P 1/04 (2006.01)		A61P	17/06	
C07K 16/28 (2006.01)		A61P	1/04	
		C07K	16/28	ZNA

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

(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 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 ９２１２１、サン ディエゴ、ウォーターリッジ サークル １０７７０、スイート ２１０
(72)発明者 パームリー、スティーブン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９２１２１、サン ディエゴ、ウォーターリッジ サークル １０７７０、スイート ２１０
(72)発明者 リズール、ポール
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９２１２１、サン ディエゴ、ウォーターリッジ サークル １０７７０、スイート ２１０
(72)発明者 ヘア、エリック
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９２１２１、サン ディエゴ、ウォーターリッジ サークル １０７７０、スイート ２１０

Ｆターム（参考） 4C085 AA13 AA14 BB11 CC22 CC23 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG08
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 FA72 FA74