

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-172073

(P2015-172073A)

(43) 公開日 平成27年10月1日(2015.10.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	ZNA 4B024
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	N 4B064
A61P 37/06 (2006.01)	A61P 37/06	4B065
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4C085
A61P 29/00 (2006.01)	A61P 29/00	4H045

審査請求 有 請求項の数 17 O L (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-117303 (P2015-117303)
 (22) 出願日 平成27年6月10日 (2015. 6. 10)
 (62) 分割の表示 特願2011-552389 (P2011-552389) の分割
 原出願日 平成22年2月23日 (2010. 2. 23)
 (31) 優先権主張番号 09154079.9
 (32) 優先日 平成21年3月2日 (2009. 3. 2)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 09157722.1
 (32) 優先日 平成21年4月9日 (2009. 4. 9)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 512333423
 バイオノビオン・ホールディング・ベスローテン・フエンノートシャップ
 BIONOVION HOLDING B.V.
 オランダ、エン・エルー5349・アー・セー・オス、モーレンベーク、79、オス・ライフ・サイエンシズ・パーク、エル・エー・1129
 (74) 代理人 110001195
 特許業務法人深見特許事務所
 (72) 発明者 メデマ、ヤン・パウ
 オランダ、エン・エルー1105 アー・ゼット アムステルダム、マイベルグドレーフ、9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 増殖誘導リガンド (APRIL) に対する抗体

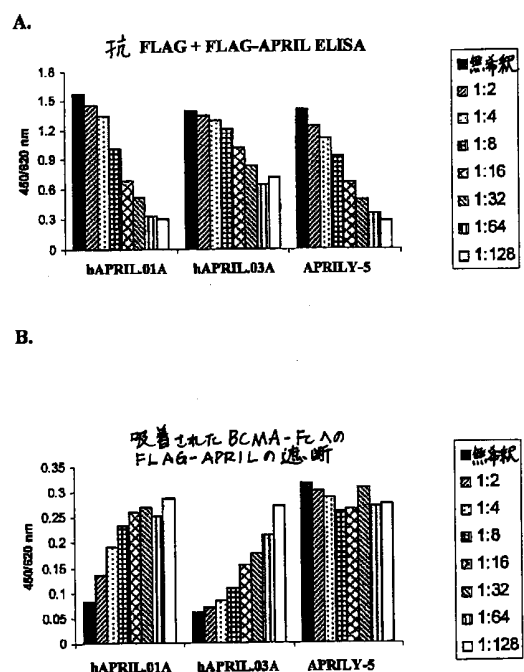
(57) 【要約】

【課題】本抗APRIL特異的抗体の組成物と、このような抗体を生物学的活性APRILの調節において、特に炎症性疾患、細胞増殖および癌の阻害において用いる方法とを提供する。

【解決手段】a. それぞれ配列番号9、10、11からなる群から選ばれるCDR1、CDR2、CDR3アミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域およびそれぞれ配列番号12、13、14からなる群から選ばれるCDR1、CDR2、CDR3アミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域、または、b. それぞれ配列番号15、16、17からなる群から選ばれるCDR1、CDR2、CDR3アミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域およびそれぞれ配列番号18、19、20からなる群から選ばれるCDR1、CDR2、CDR3アミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域を含むヒトAPRILに結合する結合化合物。

【選択図】図1

Figure 1.



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a. それぞれ配列番号 9、10、11 からなる群から選ばれる CDR1、CDR2、CDR3 アミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域およびそれぞれ配列番号 12、13、14 からなる群から選ばれる CDR1、CDR2、CDR3 アミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域、または、

b. それぞれ配列番号 15、16、17 からなる群から選ばれる CDR1、CDR2、CDR3 アミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域およびそれぞれ配列番号 18、19、20 からなる群から選ばれる CDR1、CDR2、CDR3 アミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域

を含むヒト APRIL に結合する結合化合物。

【請求項 2】

a. 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 6 の群から選ばれるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または

b. 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 8 の群から選ばれるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

を含む結合化合物から選ばれる、請求項 1 に記載の結合化合物。

【請求項 3】

結合化合物は、APRIL のヒト TACI との結合を完全に遮断し、ヒト BCMA との結合を部分的に遮断する、請求項 1 または 2 に記載の結合化合物。

【請求項 4】

結合化合物は、ヒト APRIL のヒト BCMA との結合を完全に遮断する、請求項 3 に記載の結合化合物。

【請求項 5】

結合化合物は、

a. 10 nM 以下の K_D でヒト APRIL を結合し、

b. 2 nM 以下の IC_{50} でヒト TACI および / またはヒト BCMA のヒト APRIL への結合を遮断する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の結合化合物。

【請求項 6】

請求項 2 の結合化合物のいずれかとヒト APRIL 上の結合エピトープにおいて競合し

a. 10 nM 以下の K_D でヒト APRIL を結合する、

b. 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体と同じ K_D でヒト APRIL に結合する、

c. 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体と同じ K_D でヒト APRIL に結合する、

d. 2 nM 以下の IC_{50} でヒト TACI および / またはヒト BCMA のヒト APRIL への結合を遮断する、

特徴のうち 1 つを有する、結合化合物。

【請求項 7】

結合化合物は、

a. キメラ抗体もしくはそのフラグメント、

b. ヒト抗体もしくはそのフラグメント、

c. ヒト化抗体もしくはそのフラグメント、または

d. Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(ab')₂、二重特異性 mAb および二重特異性抗体からなる群から選ばれる抗体フラグメント

である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の結合化合物。

【請求項 8】

結合化合物は、B 細胞の増殖および生存を遮断する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の結合化合物。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の結合化合物をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 10】

請求項 9 の単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 11】

請求項 10 の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の結合化合物を製造する方法であって、

a . ポリヌクレオチドが発現される条件下、請求項 11 の宿主細胞を培地中で培養することにより、その軽鎖および重鎖可変領域を含むポリペプチドを製造するステップと、
b . 宿主細胞または培地からポリペプチドを回収するステップ
とを含む方法。

10

【請求項 13】

医薬上許容されるキャリアまたは希釈剤と組合される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の結合化合物を含む組成物。

【請求項 14】

治療における使用のための請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の結合化合物。

【請求項 15】

治療が、

- a . 免疫細胞の増殖および / もしくは生存の阻害、
- b . 癌の処置、
- c . 自己免疫性疾患の処置、または
- d . 炎症性疾患の処置

20

を目的とするものである、請求項 14 に記載の結合化合物。

【請求項 16】

エクスピボまたはインビトロの診断方法における請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の結合化合物の使用。

【請求項 17】

インビボ診断方法に使用するための請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の結合化合物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト APRIL に結合する単離された抗体またはそのフラグメント、該抗体をコードするポリヌクレオチド、および上記抗体を産生する宿主細胞に関する。抗体は、免疫細胞の増殖および / または生存の阻害、癌の処置ならびに炎症性疾患の処置のために用いることができる。

【背景技術】

【0002】

APRIL は II 型膜貫通タンパク質として発現されるが、殆どの他の TNF ファミリーメンバーと異なり、主に分泌タンパク質として処理され、ゴルジ体で切断されて、そこでフェーリン転換酵素により切断され可溶性活性型を放出する (Lopez-Fraga et al., 2001, EMBO Rep 2, 945-51,)。APRIL は、タンパク質の折りたたみにおいて、多くの他の TNF ファミリーリガンドと同様の構造上相同性を有する非共有結合ホモ三量体として集合する (Wallweber et al., 2004, Mol Biol 343, 283-90)。APRIL は、B 細胞成熟抗原 (BCMA) および膜貫通アクチベーターおよびカルシウムモジュレーターおよびシクロフィリンリガンドインタラクタ (TACI) の 2 つの TNF 受容体を結合する (Kimberley et al., 2009, J Cell Physiol. 218 (1) :1-8 に概説される)。さらに、近年、APRIL がヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) を結合することが示された (Hendriks et al., 2005, Cell Death Differ 12, 637-48)。

40

50

【 0 0 0 3 】

APRILは、TNFスーパーファミリーの別のメンバーである、TNFファミリーに属するB細胞活性化因子（BAFFまたはBリンパ球刺激因子、BLyS）と高い相同性（30%）を示し、その受容体であるBCMAおよびTACIへの結合をそれと共有する。また、BAFFは、独自の受容体であるBAFF受容体を結合することが知られており、これを介してB細胞発育中に決定的な生存シグナルを媒介する（Kimberley et al., 2009, J Cell Physiol. 218(1):1-8に概説される）。APRILおよびBAFFは、混合三量体を形成することが示唆されている（Roschke et al., 2002, J Immunol. 169(8):4314-21）。このような混合三量体は、関節リウマチ（RA）患者においてより高い有病率で生じることがわかった。

【 0 0 0 4 】

APRILは、単球、マクロファージ、樹状細胞、好中球、B細胞、およびT細胞などの免疫細胞のサブセットによって優勢に発現され、これらの多くがBAFFも発現する。さらに、APRILは破骨細胞、上皮細胞およびさまざまな腫瘍組織などの非免疫細胞によっても発現され得る（Kimberley et al., 2009, J Cell Physiol. 218(1):1-8に概説される）。

【 0 0 0 5 】

APRILの機能は、マウス遺伝モデルを用いて確立された。hAPRILトランスジェニックマウスは正常に発育するが、T細胞生存の向上およびIgM抗体レベルの上昇を示した（Stein et al., 2002, J Clin Invest 109, 1587-98）。さらに、T細胞非依存性II型反応が向上した。加齢したhAPRILトランスジェニックマウスは、リンパ系の極端な拡大および再組織化と、ヒトB-CLLに酷似する表現型であるCD5陽性B細胞の浸潤による肥大した脾臓を示した（Planelles et al., 2004, Cancer Cell 6, 399-408）。APRIL欠失マウスは、循環中およびT細胞依存性抗原による攻撃の際に、IgAレベルが低下することがわかった（Castigli et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101, 3903-8; Varfolomeev et al., 2004, Mol Cell Biol 24, 997-1006）。次に、APRILは、BAFFと共に、CD40-CD40Lシグナリングとは非依存的に、抗体のIgGおよびIgAの両方へのクラススイッチ組換（CSR）において機能することが実証された（Litinskiy et al., 2002, Nat Immunol 3, 822-9）。さらに、APRILはB細胞維持においてBAFFほど決定的ではないことが実証されたが、B細胞シグナリングにおいて役割を有し、インビトロでヒトおよびマウスのB細胞の増殖および生存の両方を推進することが示された（Kimberley et al., 2009, J Cell Physiol. 218(1):1-8に概説される）。

【 0 0 0 6 】

APRILは、そもそも癌細胞におけるその発現に基づいて同定された（Hahne et al., 1998, J Exp Med 188, 1185-90）。高い発現レベルのAPRIL mRNAが、腫瘍細胞系のパネルならびに直腸などのヒト原発腫瘍およびリンパの癌腫において見られた。さらに、APRILがトランスフェクトされたマウスの繊維芽細胞NIH-3T3は、免疫不全のマウスにおいてより速く生育することが示された。さらに重要なことには、可溶性APRIL受容体を用いてAPRILを遮断すると、肺および直腸癌腫の腫瘍成長が阻害されることが示された（Rennert et al., 2000, J Exp Med 192, 1677-84）。

【 0 0 0 7 】

慢性リンパ性白血病（CLL）B細胞は、APRILおよびAPRIL受容体の両方を発現する。さらに、APRILは、自発的および薬剤性アポトーシスならびに刺激されたNF- κ B活性化からCLL細胞を保護することが示された（Kimberley et al., 2009, J Cell Physiol. 218(1):1-8に概説される）。95名のCLL患者に基づく遡及的な研究により、APRILの血清中レベルの上昇が示され、これは疾患進行および全体的な患者の生存率と相関関係にあり、APRILの血清中レベルが高い患者は、予後がより不良であった（Planelles et al., 2007, Haematologica 92, 1284-5）。

【 0 0 0 8 】

同様に、（上昇したレベルの）APRILが、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）および多発性骨髄腫（MM）において発現されることが示された（Kimberley et al., 2009, J Cell Physiol. 218(1):1-8に概説される）。DLBCL患者（NHL）の遡及的な研究に

10

20

30

40

50

より、癌病変におけるAPRILの高発現は、不良な生存率と相関関係にあることが示された (Schwaller et al., 2007, Blood 109, 331-8)。NHLおよびMM細胞系を用いて、APRILまたはBAFFによる処置が、NF- κ B活性化および生存促進性のタンパク質のアップレギュレーションを介して生存を高めることが示された (Kimberley et al., 2009, J Cell Physiol. 218 (1) :1-8に概説される)。APRILのこの生存促進の役割に従って、MM細胞は、TACI-Fcの存在下で培養されるとアポトーシスとなることが示された。BAFF受容体はアポトーシスを向上させる際の有効性がより低かったため、これにより、BAFFではなくAPRILが、これらの細胞中での生存の向上の主要な要因であることが示される (Abe et al., 2006, Leukemia 20, 1313-5)。

【 0 0 0 9 】

APRILはまた、固体腫瘍由来の多くの細胞系において過剰発現することもわかった。実際に、APRILは多くのこれらの細胞系のインビトロでの増殖を刺激することができた (Kimberley et al., 2009, J Cell Physiol. 218 (1) :1-8に概説される)。

【 0 0 1 0 】

B細胞生態学におけるその役割により、APRILは多くの自己免疫性疾患においても役割を果たしている。実際に、アタシセプト (ataccept) (市販のTACI-Fc調剤) は、既に、いくつかの自己免疫性疾患の処置のための数多くの臨床試験中である (Gatto et al., 2008, Curr Opin Investig Drugs. 9(11):1216-27に概説される)。APRILおよびBAFFの血清中レベルの上昇は、多くのSLE患者において報告されている (Koyama et al., 2005, Ann Rheum Dis 64, 1065-7)。遡及的な分析により、APRIL血清中レベルは抗二本鎖DNA抗体力価と相関関係にある傾向があることが明らかになった。APRILがSLEにおいて機能的な役割を果たしているかもしれないという証拠は、ループスを起こしやすいマウスへのTACI-Fc融合タンパク質の効果を試験することによって得られ (Gross et al., 2000, Nature 404, 995-9)、これにより疾患の発症が防止され、生存が延ばされた。

【 0 0 1 1 】

さらに、関節リウマチのCIAマウスモデルにおけるTACI-FcによるAPRILおよびBAFFの阻害により、対照と比較して、疾患の進行が防止され、かつ疾患スコアがより低くなることも分かった (Gross et al., 2001, Immunity 15, 289-302; Wang et al., 2001, Nat Immunol 2, 632-7)。また、別の関節炎モデルである、滑膜SCIDマウスキメラにおいても、TACI-Fcは有益な効果を示した (Seyler et al., 2005, J Clin Invest 115, 3083-92)。TACI-Fcによる処置は、滑膜組織中の胚中心の消失、Ig産生の低下およびIFNガンマの産生の低下という結果となった。

【 0 0 1 2 】

炎症性関節炎の患者の滑液は、骨関節炎などの非炎症性関節炎を患う患者と比較して、APRILレベルが著しく上昇していたことが後に報告された (Stohl et al., 2006, Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 6, 351-8; Tan et al., 2003, Arthritis Rheum 48, 982-92)。

【 0 0 1 3 】

いくつかの研究が、より幅広い全身の免疫に基づくりウマチ疾患 (現在は、シェーグレン症候群、ライター症候群、乾癬性関節炎、多発性筋炎、および強直性脊椎炎も含む) を患う患者の血清中APRILの存在に着目し、これらの患者においてAPRILレベルが著しく上昇していることが分かり、これらの疾患においてもAPRILの役割が重要であることが示唆された (Jonsson et al., 1986, Scand J Rheumatol Suppl 61, 166-9; Roschke et al., 2002, J Immunol 169, 4314-21)。

【 0 0 1 4 】

最後に、APRIL発現の上昇は、多発性硬化症 (MS) と結びつけられている。APRIL発現は、正常な対照と比較して、MS罹患者の星状細胞中で上昇することが分かった。このことは、記載された、神経膠芽腫および神経膠芽腫患者の血清中APRIL発現と一貫している (Deshayes et al., 2004, Oncogene 23, 3005-12; Roth et al., 2001, Cell Death Differ 8, 403-10)。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

APRILは、いくつかのB細胞悪性腫瘍、および潜在的には、一部の固体腫瘍での生存および増殖能力において決定的な役割を果たす。APRILはまた、炎症性疾患または自己免疫におけるキープレイヤーとしても台頭する。したがって、APRILに拮抗するための戦略は、多くのこれらの疾患に対する治療上の目標である。実際に、TACI-Fc（アタシセプト）によりAPRILを標的とする臨床研究が、いくつかの自己免疫疾患の処置のために現在進行中である。しかしながら、TACI-Fcは、正常なB細胞維持に係る因子であるBAFFも標的とする。APRILに対して向けられる抗体は、WO9614328、WO2001/60397、WO2002/94192、WO9912965、WO2001/196528およびWO9900518に記載されている。この発明は、APRILを特異的に標的とする抗体を記載する。この発明における抗体は、APRILのTACIへの結合を完全に遮断し、BCMAへの結合を少なくとも部分的に遮断する。発明に従う一部の抗体は、BCMAおよびTACIの両方への結合を完全に遮断する。このような分子は、循環する可溶性APRILが疾患の活性および進行と相関関係にある多くの状態のための治療において有用である。APRILの発現レベルは、異なる疾患のための診断および予後マーカーとして用いられ得るため、これらの抗体はこのような試験にも適用することができる。

【課題を解決するための手段】

【0016】

発明は、ヒトAPRILに結合する単離された抗体または抗体フラグメントなどの結合化合物を提供する。

【0017】

一部の実施形態においては、結合化合物はTACIおよびBCMAへの結合を遮断する。一部の実施形態においては、発明のAPRIL結合化合物は、配列番号9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19および20から選ばれる1以上の抗体CDR（相補性決定領域）を含み、さらなる実施形態においては、配列番号12、13、14、18、19および20のうち1以上の抗体軽鎖CDRおよび/または配列番号9、10、11、15、16および17のうち1以上の抗体重鎖CDRを含む。一部の実施形態においては、結合化合物はキメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体またはそのフラグメントである。

【0018】

1つの実施形態においては、発明は、抗体重鎖CDR配列番号9、10および11、またはいずれかの上記の配列の変異体、ならびに抗体軽鎖CDR配列番号12、13および14、またはいずれかの上記の配列の変異体を含む、ヒトAPRILに結合する結合化合物を提供する。

【0019】

別の実施形態においては、発明は、抗体重鎖CDR配列番号15、16および17またはいずれかの上記の配列の変異体ならびに抗体軽鎖CDR配列番号18、19および20またはいずれかの上記の配列の変異体を含む、ヒトAPRILに結合する結合化合物を提供する。

【0020】

別の実施形態においては、発明は、配列番号5のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域および配列番号6の群から選ばれるアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域を含む、ヒトAPRILに結合する結合化合物を含む。

【0021】

さらに別の実施形態においては、発明は、配列番号7のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域および配列番号8のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域を含む、ヒトAPRILに結合する結合化合物を含む。

【0022】

別の実施形態においては、発明は、重鎖が配列番号5の可変領域配列を有し、IgG1定常領域に連結され、また、軽鎖が配列番号6の配列を有し、定常領域に連結される、抗体を含む。特に、定常領域はマウスまたはヒトに由来する。より特定的には、抗体はhAPRIL

.01Aである。

【0023】

別の実施形態においては、発明は、重鎖が配列番号7の可変領域配列を有し、IgG1定常領域に連結され、また、軽鎖が配列番号8の配列を有し、定常領域に連結される、抗体を含む。特に、定常領域はマウスまたはヒトに由来する。より特定的には、抗体はhAPRIL.03Aである。

【0024】

別の実施形態においては、発明は、いずれの上記の変異体も、各抗体重鎖および軽鎖可変領域の先に同定されたCDRにおいて、3つまでのアミノ酸修飾を含んでよい、ヒトAPRILに結合する結合化合物の変異体を含む。

【0025】

別の実施形態においては、発明は、いずれの上記の変異体も、抗体重鎖および軽鎖可変領域各々中の先に同定されたCDR各々において、3つまでのアミノ酸修飾を含んでよい、ヒトAPRILに結合する結合化合物の変異体を含む。

【0026】

別の実施形態においては、発明は、いずれの上記の変異体も、抗体重鎖および軽鎖可変領域各々中の先に同定されたCDR配列において、3つまでのアミノ酸修飾を含んでよい、ヒトAPRILに結合する結合化合物の変異体を含む。

【0027】

発明はまた、APRILのヒトTACIとの結合を完全に遮断し、かつヒトBCMAとの結合を少なくとも部分的に遮断する結合化合物も含む。

【0028】

別の実施形態においては、発明は、APRILのヒトTACIおよびヒトBCMAとの結合を完全に遮断する結合化合物を含む。

【0029】

別の実施形態においては、発明は、結合化合物が約10 nM以下の K_D でヒトAPRILを結合し、約2 nM以下の IC_{50} でヒトTACIおよび/またはヒトBCMAのヒトAPRILへの結合を遮断する、ヒトAPRILに結合する結合化合物を含む。

【0030】

発明はまた、結合化合物が上述の抗体と同じエピトープ特異性を有する、すなわち、上述の抗体の結合エピトープにおいて競合する、ヒトAPRILに結合する結合化合物も含む。

【0031】

一部の実施形態においては、発明は、上述の抗体のいずれかとヒトAPRIL上の結合エピトープにおいて競合し、約10 nM以下の K_D で、ヒトAPRILを結合する結合化合物を含む。特に、ヒトAPRIL上のエピトープは、抗体hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03A、好ましくはhAPRIL.01Aに結合するエピトープである。

【0032】

別の実施形態においては、発明は、上述の抗体のいずれかとヒトAPRIL上の結合エピトープにおいて競合し、配列番号5のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体とほぼ同じ K_D で、ヒトAPRILに結合する結合化合物を含む。

【0033】

別の実施形態においては、発明は、上述の化合物のいずれかとヒトAPRIL上の結合エピトープにおいて競合し、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体とほぼ同じ K_D でヒトAPRILに結合する結合化合物を含む。

【0034】

別の実施形態においては、発明は、上述の抗体のいずれかとヒトAPRIL上の結合エピトープにおいて競合し、約2 nM以下の IC_{50} でのヒトTACIおよび/またはヒトBCMAのヒトAPRILへの結合を遮断する結合化合物を含む。

【0035】

別の実施形態においては、発明は、随意にTLFRおよび/またはQDVTFTMGQにより支持さ

10

20

30

40

50

れて、立体構造のヒトAPRILエピトープSMPSPH（好ましくはIRSMPSPHDPRA）に結合する結合化合物を含む。

【0036】

さらに別の実施形態においては、発明は、随意にTFTMGQにより支持されて、立体構造のヒトAPRILエピトープVSREGQGRQに結合する結合化合物を含む。

【0037】

一部の実施形態においては、発明の結合化合物は、キメラ抗体またはそのフラグメントである。

【0038】

別の実施形態においては、発明の結合化合物は、ヒト抗体またはそのフラグメントである。

10

【0039】

別の実施形態においては、発明の結合化合物は、ヒト抗体またはそのフラグメントである。

【0040】

別の実施形態においては、発明は、上記に同定されたCDRならびにヒト重鎖定常領域変異体およびヒト軽鎖定常領域変異体を有し、各定常領域変異体は、20個までの保存的に修飾されたアミノ酸置換を含む、好ましくはヒト抗体である、結合化合物を含む。

【0041】

別の実施形態においては、発明の結合化合物は、Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、F(a b')₂、二重特異性mAbまたは二重特異性抗体（diabody）フラグメントから選ばれる抗体フラグメントである。

20

【0042】

発明は、B細胞の増殖および生存を阻害する上述のような結合化合物も含む。

発明は、発明の抗APRIL結合化合物をコードする核酸も含む。発明に含まれるのは、配列番号5から20に包含されるアミノ酸配列のいずれか1つをコードする核酸である。さらに発明の範囲内に含まれるのは、配列番号1、2、3または4を含む核酸である。さらに、発明は、以上に記載したようなアミノ酸配列の変異体をコードする核酸も含む。

【0043】

発明は、発明の結合化合物をコードする核酸を含む細胞および発現ベクターも含む。

30

さらに、発明は、(a)核酸配列が発現される条件下、発明の抗体または抗体フラグメントをコードする核酸を含む宿主細胞を培地中で培養することにより、その軽鎖および重鎖可変領域を含むポリペプチドを製造するステップと、(b)宿主細胞または培地からポリペプチドを回収するステップとを含む、発明の結合化合物を製造する方法を含む。

【0044】

発明は、医薬上許容されるキャリアまたは希釈剤と組合される、発明の結合化合物を含む組成物も含む。

【0045】

発明は、治療上有効な量の発明の結合化合物を、それを必要とする被検体に投与するステップを含む、免疫細胞の増殖および/または生存を阻害する方法も含む。1つの実施形態においては、方法は癌を処置するために用いられてもよい。別の実施形態においては、方法は自己免疫疾患または炎症性疾患を処置するために用いられてもよい。

40

【0046】

一部の実施形態においては、発明は、治療上有効な量の発明の結合化合物を、それを必要とする被検体に投与するステップと、該被検体に由来するサンプル中のB細胞増殖および/または生存をエクスピボで測定するステップとをさらに含み、B細胞の増殖および/または生存の阻害は、処置が継続されるべきであることを示す、免疫細胞の増殖および/または生存を阻害する方法を含む。

【0047】

他の実施形態においては、発明は、治療上有効な量の発明の結合化合物を、それを必要

50

とする被検体に投与するステップと、該被検体に由来するサンプル中のB細胞増殖および/または生存をエクスピボで測定するステップとをさらに含み、B細胞増殖および/または生存の上昇は、処置が成功する可能性を予測する、免疫細胞の増殖および/または生存を阻害する方法を含む。

【0048】

発明は、細菌毒素または放射性毒素などの治療剤につなげられた、発明の抗APRIL結合化合物を含むイムノコンジュゲートも含む。細胞毒性剤の非限定的な例には、タキソール、サイトカラシンB、マイトマイシン、エトポシド、およびビンクリスチンまたは他の抗代謝剤、アルキル化剤、抗生物質ならびに抗有糸分裂剤が含まれる。

【0049】

発明は、免疫細胞に本発明の結合化合物を接触させるステップを含む、免疫細胞の増殖および/または生存を阻害する方法も含む。

【0050】

一部の実施形態においては、方法は、第2の治療剤または処置療法を投与するステップをさらに含む。

【0051】

一部の実施形態においては、抗APRIL結合化合物は、癌または自己免疫疾患もしくは炎症性疾患において標準的ケアと考えられる処置と組合されることができる。このような組合せの理論的根拠は、抗APRILにより同時に上昇した免疫阻害により、標準的ケアの処置への初期臨床応答が誘導または助長され、長続きする臨床応答および疾患の長期にわたる免疫制御が誘導されることである。

【0052】

別の実施形態においては、本発明の結合化合物は診断上用いられる。

さらに別の実施形態においては、発明の結合化合物は、被検体に由来するサンプル中のB細胞増殖および/または生存をエクスピボで測定するために用いられ、B細胞の増殖および/または生存の阻害は、ここに上述されるような結合化合物による処置が継続されるべきであることを示す。

【0053】

別の実施形態においては、発明に従う結合化合物は、ヒトAPRILに結合する単離された抗体または抗体フラグメントである。

【発明を実施するための形態】

【0054】

「抗体」という用語は、リガンドのその受容体への結合を阻害するなど、または受容体のリガンド誘導シグナリングを阻害することによる、望ましい生物学的活性を発揮する抗体の任意の形態を指す。したがって、「抗体」は、最も広義な意味で用いられ、具体的には、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、および多重特異性抗体（たとえば二重特異性抗体）を包含するが、これらに限定されない。

【0055】

「抗体フラグメント」および「抗体結合フラグメント」は、典型的には、親抗体の抗原結合または可変領域（たとえば1以上のCDR）の少なくとも一部を含む、抗体の抗原結合フラグメントおよびアナログを意味する。抗体フラグメントは、親抗体の結合特異性の少なくとも一部を保持する。典型的には、抗体フラグメントは、その活性をモルベースで表わすとき、親の結合活性の少なくとも10%を保持する。好ましくは、抗体フラグメントは、標的に対する親抗体の結合親和性の少なくとも20%、50%、70%、80%、90%、95%または100%以上を保持する。抗体フラグメントの例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメント；二重特異性抗体；直鎖状抗体（linear antibodies）；単鎖抗体分子、たとえば、sc-Fv、ユニボディ（unibodies）（GenMabによる技術）；ナノボディ（nanobodies）（Domantisによる技術）；ドメイン抗体（Ablynxによる技術）；および抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体を含むが、これらに限定されない。改変された抗体変異体は、Holliger and Hudson, 2005, Nat. Biotechnol. 23, 1126-113

10

20

30

40

50

6において概説される。

【0056】

「Fabフラグメント」は、1本の軽鎖ならびに1本の重鎖のC_H1および可変領域からなる。Fab分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することはできない。

【0057】

「Fc」領域は、抗体のC_H1およびC_H2ドメインを含む2つの重鎖フラグメントを含有する。2つの重鎖フラグメントは、2個以上のジスルフィド結合により、またCH3ドメインの疎水的相互作用により共に保持されている。

【0058】

「Fab'フラグメント」は、1本の軽鎖と、V_HドメインおよびC_H1ドメインならびにC_H1ドメインとC_H2ドメインとの間の領域も含有する1本の重鎖の一部とを含有するため、2つのFab'フラグメントの2本の重鎖の間に鎖間ジスルフィド結合が形成され、F(ab')₂分子を形成することができる。

10

【0059】

「F(ab')₂フラグメント」は、2本の軽鎖およびC_H1ドメインとC_H2ドメインとの間の定常領域の一部を含有する2本の重鎖を含有するため、2本の重鎖の間に鎖間ジスルフィド結合が形成される。したがって、F(ab')₂フラグメントは、2本の重鎖の間のジスルフィド結合により共に保持される2つのFab'フラグメントにより構成される。

【0060】

「Fv領域」は、重鎖および軽鎖の両方からの可変領域を含むが、定常領域はない。

20

「単鎖Fv抗体」(または「scFv抗体」)は、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含み、これらのドメインが1本のポリペプチド鎖中に存在する、抗体フラグメントを指す。一般的に、Fvポリペプチドは、V_HドメインとV_Lドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それによりscFvが抗原結合に望ましい構造を形成することができる。scFvの概説については、Pluckthun、1994、「THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES」、第113巻、Rosenburg およびMoore編、Springer-Verlag、New York、第269頁から第315頁も参照。また、国際特許出願公開WO88/01649、米国特許第4,946,778号および第5,260,203号を参照。

【0061】

「二重特異性抗体」は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントである。フラグメントは、同じポリペプチド鎖(V_H-V_LまたはV_L-V_H)において軽鎖可変ドメイン(V_L)に結び付けられた重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間で対合ができないほどに短いリンカーを用いることにより、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと強制的に対合され、2つの抗原結合部位をつくる。二重特異性抗体は、たとえばEP 404,097、WO93/11161、およびHolliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448中により十分に説明されている。

30

【0062】

「ドメイン抗体フラグメント」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントである。2つ以上のV_H領域がペプチドリンカーにより共有結合で連結され、二価のドメイン抗体フラグメントをつくる場合もある。二価のドメイン抗体フラグメントの2つのV_H領域は、同じまたは異なる抗原を標的にしてもよい。

40

【0063】

ここで用いられる、抗体hAPRIL.01Aは、重鎖が配列番号5の可変領域配列を有し、IgG1定常領域に連結され、また、軽鎖が配列番号6の可変領域配列を有し、定常領域に連結される、マウス抗体である。抗体hAPRIL.03Aは、重鎖が配列番号7の可変領域配列を有し、IgG1定常領域に連結され、また、軽鎖が配列番号8の可変領域配列を有し、定常領域に連結される、マウス抗体である。

【0064】

発明の抗体フラグメントは、たとえば、通常、重鎖間ジスルフィド結合に係るヒンジシ

50

ステインの少なくとも1つが、ここに記載されるように変更される場合、ジスルフィド結合能力が低下した重鎖の二量体化（または多量体化）を可能にするために十分な定常領域の部分を含んでもよい。別の実施形態においては、たとえば、Fc領域を含む抗体フラグメントは、FcRn結合、抗体半減期調節、ADCC（抗体依存性細胞傷害毒性）機能、および/または補体結合（たとえば、抗体がADCC機能または補体結合に必要なグリコシル化プロファイルを有する場合）など、インタクトな抗体中に存在する場合、通常はFc領域に関連する生物学的機能の少なくとも1つを保持する。

【0065】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体において、対応する配列と同一または相
10
同する一方で、鎖の残余は、別の種に由来するか、別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体において、さらには望ましい生物学的活性を発揮する限り、該抗体のフラグメントにおいて、対応する配列と同一または相
同する、抗体を指す（たとえば、米国特許第4,816,567号およびMorrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855を参照）。

【0066】

ここで用いられる、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト（たとえばマウス）抗体およびヒト抗体からの配列を含有する抗体の形態を指す。このような抗体は、非ヒト免疫グロ
20
ブリンに由来する最小限の配列を含有する。一般的に、ヒト化抗体は、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、かつFR領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のFR領域である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含む。ヒト化抗体は、随意に、典型的にはヒト免疫グロブリンのものである、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部を含む。げっ歯類抗体のヒト化形態は、本質的に、親のげっ歯類抗体と同じCDR配列を含むが、親和性を高めるため、ヒト化抗体の安定性を高めるため、または他の理由により、あるアミノ酸置換を含んでもよい。しかしながら、CDRループ交換によって、元の抗体と同じ結合性を有する抗体を均一には得られないことから、CDRループ支持に係る残基であるフレームワーク残基（FR）における変化をヒト化抗体中に導入して、抗原結合親和性を保つてもよいであろう（Kabat et al., 1991, J. Immunol. 147, 1709）。

【0067】

「抗体」という用語は、「完全にヒトの」抗体、すなわち、ヒトの免疫グロブリンタンパク質配列のみを含む抗体も含む。完全にヒトの抗体は、マウス、マウス細胞、またはマウス細胞に由来するハイブリドーマで産生される場合、マウスの炭水化物鎖を含有してもよい。同様に、「マウス抗体」または「ラット抗体」は、それぞれマウスまたはラットの免疫グロブリン配列のみを含む抗体を指す。完全にヒトの抗体は、ファージディスプレイまたは他の分子生物学的方法により、ヒトにおいて、ヒト免疫グロブリン生殖系配列を有するトランスジェニック動物において、生成されてもよい。また、トランスジェニックマウスにおいて組換え免疫グロブリンを作ってもよい。Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15,146-156を参照。また、AbgenixおよびMedarex技術も参照。
30

【0068】

本発明の抗体は、変更されたエフェクタ機能を与えるために、Fc領域が修飾（または遮断）された抗体も含む。たとえば、米国特許第5,624,821号、WO2003/086310、WO2005/120571、WO2006/0057702、Presta, 2006, Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656を参照。このような修飾は、免疫系のさまざまな反応を向上させたり抑制するために用いることができ、診断および治療において有益な効果をもたらす得る。Fc領域の変更は、アミノ酸変更（置換、欠失および挿入）、グリコシル化または脱グリコシル、および複数のFcの追加を含む。Fcへの変化により、治療用抗体における抗体の半減期を変更させることもでき、半減期がより長くなる結果、服用の頻度が少なくなり、同時に利便性が増し、材料の使用が少なくなるであろう。Presta, 2005, J. Allergy Clin. Immunol. 116, 734-35の731を
40
参照。
50

【0069】

本発明の抗体は、たとえば、標的細胞中に補体依存性細胞毒性（CDC）または抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘導する、アイソタイプIgG1の抗体など、完全なエフェクタ機能を与えるインタクトなFc領域を有する抗体も含む。

【0070】

抗体は、保存中の抗体の安定性を改善させたり、インビボで抗体の半減期を延ばしたりする分子にコンジュゲート（たとえば、共有結合）されてもよい。半減期を延ばす分子の例は、アルブミン（たとえばヒト血清アルブミン）およびポリエチレングリコール（PEG）である。抗体のアルブミン結合およびPEG化誘導体は、当該技術分野において周知の技術を用いて調製することができる。たとえば、Chapman, 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 531-545; Anderson and Tomasi, 1988, *J. Immunol. Methods* 109, 37-42; Suzuki et al., 1984, *Biochim. Biophys. Acta* 788, 248-255; およびBrekke and Sandlie, 2003, *Nature Rev.* 2, 52-62を参照。

【0071】

本発明において用いられる抗体は、普通、少なくとも約 $10^{-3}M$ 、より普通には、少なくとも $10^{-6}M$ 、典型的には、少なくとも $10^{-7}M$ 、より典型的には、少なくとも $10^{-8}M$ 、好ましくは、少なくとも約 $10^{-9}M$ 、より好ましくは、少なくとも $10^{-10}M$ 、最も好ましくは、少なくとも $10^{-11}M$ の K_D で結合する。たとえば、Presta, et al., 2001, *Thromb. Haemost.* 85, 379-389; Yang, et al., 2001, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 38, 17-23; Carnahan, et al., 2003, *Clin. Cancer Res. (Suppl.)* 9 3982s-3990sを参照。

【0072】

抗体親和性は、標準的分析を用いて求めればよい。

ここで用いられる、「超可変領域」という用語は、抗原結合の要因となる抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、配列アライメントにより定義される「相補性決定領域」、または「CDR」からのアミノ酸残基、たとえば、軽鎖可変ドメイン中の残基24 - 34（L1）、50 - 56（L2）および89 - 97（L3）、ならびに重鎖可変ドメイン中の31 - 35（H1）、50 - 65（H2）および95 - 102（H3）、を含み、Kabat et al., 1991, *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 第5版、公衆衛生局、国立衛生研究所、米国メリーランド州ベテスタを参照、および/または、構造的に定義されるような「超可変ループ」（HVL）からの残基、たとえば、軽鎖可変ドメイン中の残基26 - 32（L1）、50 - 52（L2）および91 - 96（L3）、ならびに重鎖可変ドメイン中の26 - 32（H1）、53 - 55（H2）および96 - 101（H3）、Chothia and Leskl, 1987, *J. Mol. Biol.* 196, 901-917を参照、を含む。「フレームワーク」、または「FR」残基は、ここに定義されるような超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0073】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定、分離および/または回収されたものである。その自然環境の夾雑成分は、抗体の診断上または治療上の使用に干渉するであろう材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質または非タンパク質溶質を含んでもよい。一部の実施形態においては、抗体は、（1）ローリー法により求められるような抗体の95重量%超、最も好ましくは、99重量%超まで精製されるか、（2）スピニングカップシークエネーターの使用により、N末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15個の残基を得るのに十分な程度まで精製されるか、（3）クーマシーブルーまたは好ましくは銀染色を用いて、還元または非還元条件下でSDS-PAGEにより均質になるまで精製される。単離された抗体は、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内でインサイチューの抗体を含む。しかし、普段は、単離された抗体は、少なくとも1つの精製ステップにより調製される。

【0074】

「単離された」核酸分子は、抗体核酸の自然源において普段は会合している少なくとも1つの夾雑核酸分子から同定され分離される核酸分子である。単離された核酸分子は、自然に存在する形態または状況以外のものである。したがって、単離された核酸分子は、自

然細胞中に存在するような核酸分子とは区別される。しかしながら、単離された核酸分子は、たとえば、核酸分子が自然細胞とは異なる染色体位置にある場合、普段は抗体を発現する細胞中に含有される核酸分子を含む。

【0075】

ここで用いられる、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、該集団を含む個々の抗体は、少量に存在してもよい自然発生する可能性のある突然変異を除いて、同一である。モノクローナル抗体は、単一の抗原性部位に対して向けられ、高度に特異的である。さらに、典型的には異なる決定因子（エピトープ）に対して向けられる異なる抗体を含む従来の（ポリクローナル）抗体調剤とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定因子に対して向けられる。 「モノクローナル」という修飾語は、抗体の特徴が、実質的に均質な抗体の集団から得られることを示し、任意の特定の方法による抗体の産生を要件とするとして解釈されるべきではない。たとえば、本発明に従って用いられるモノクローナル抗体は、Kohler et al., 1975, Nature 256, 495により最初に記載されたハイブリドーマ法により作られてもよく、または組換えDNA法（たとえば、米国特許第4,816,567号を参照）により作られてもよい。 「モノクローナル抗体」は、たとえば、Clackson et al., 1991, Nature 352, 624-628 およびMarks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222, 581-597に記載される技術を用いて、ファージ抗体ライブラリから単離されてもよい。ここで、モノクローナル抗体は、具体的には「キメラ」抗体を含む。

10

【0076】

ここで用いられる、「免疫細胞」という用語は、造血由来の細胞であり、免疫応答において役割を果たす細胞を含む。免疫細胞は、B細胞およびT細胞のようなリンパ球、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、好塩基性細胞、および顆粒球などの骨髄性細胞を含む。

20

【0077】

ここで用いられる「イムノコンジュゲート」は、細菌毒素、細胞毒性薬または放射性毒素などの治療部分（moiety）にコンジュゲートされた抗APRIL抗体、またはそのフラグメントを指す。毒性部分（moiety）は、当該技術分野で利用可能な方法を用いて、発明の抗体にコンジュゲートさせることができる。

【0078】

ここで用いられる、配列「変異体」は、開示された配列と1以上のアミノ酸残基で異なるが、結果として得られる分子の生物学的活性を保持する配列を指す。

30

【0079】

「保存的に修飾された変異体」または「保存的なアミノ酸置換」は、当業者に公知のアミノ酸の置換を指し、結果として得られる分子の生物学的活性を変更させることなしに、一般的に行なわれればよい。当業者であれば、ポリペプチドの非本質的な領域における単一のアミノ酸置換は、一般的に、生物学的活性を実質的に変更しないことを認識している（たとえば、ワトソン（Watson）ら、遺伝子の分子生物学（Molecular Biology of the Gene）、ベンジャミン／カミングス出版社（The Benjamin / Cummings Pub. Co.）、第224頁（第4版1987年）を参照）。このような例示的な置換は、以下に記載されるようなものに従って、好ましくは下記のように行なわれる。

40

【0080】

【表 1】

例示的な保存的アミノ酸置換

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

10

20

【0081】

ここで用いられる、「約」という用語は、当業者により求められるような、特定の値について許容される誤差範囲内にある値を指し、許容される誤差範囲は、値が如何にして測定または求められるか、すなわち、測定システムの限界に一部依存する。たとえば、「約」は、当該技術分野における実施当たり1以内または1を超える標準偏差を意味し得る。代替的には、「約」または「から本質的になる」は、20%までの範囲を意味し得る。さらに、特に生物学的システムまたはプロセスに関して、該用語は、1桁まで、または値の5倍までを意味し得る。特定の値が出願および請求項中で与えられる場合、特に明記しない限り、「約」または「から本質的になる」の意味は、その特定の値についての許容される誤差範囲内として見なされるべきである。

30

【0082】

「特異的に」結合するとは、リガンド/受容体、抗体/抗原、または他の結合対に言及する場合、タンパク質および/または他の生態の異種混合の集団における、たとえばAPRILなどのタンパク質の存在を決定し得る結合反応を示す。したがって、指定された条件下では、特定されるリガンド/抗原は、特定の受容体/抗体に結合し、サンプルに存在する他のタンパク質には大量に結合しない。

40

【0083】

「投与」および「処置」は、動物、ヒト、実験被検体、細胞、組織、器官、または生物流体に適用される場合、動物、ヒト、被検体、細胞、組織、器官、または生物流体への外来性の医薬剤、治療剤、診断用剤、または組成物の接触を指す。「投与」および「処置」は、たとえば、治療方法、薬物動態学的方法、診断方法、研究方法、および実験方法を指し得る。細胞の処置は、試薬の細胞への接触、ならびに、流体が細胞に接触している場合、流体への試薬の接触を包含する。「投与」および「処置」は、試薬、診断用の結合組成物によるか、または別の細胞による、たとえば細胞などのインビトロおよびエクスピボ処置も意味する。

【0084】

50

モノクローナル抗体

ヒトAPRILへのモノクローナル抗体は、試験被検体にヒトAPRIL抗原を注入し、次に望ましい配列または機能的特徴を有する抗体を発現するハイブリドーマを単離する当該技術分野の知識および技術に従って作ることができる。

【0085】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて（たとえば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより）簡単に単離され配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい源として作用する。一旦単離したら、DNAを発現ベクター中に配置し、次に、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髄細胞などの宿主細胞にトランスフェクトして、組換宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を得ればよい。以下、抗体の組換産生をより詳細に説明する。

10

【0086】

さらなる実施形態においては、抗体または抗体フラグメントは、McCafferty et al., 1990, Nature, 348, 552-554に記載される技術を用いて生成される抗体ファージライブラリから単離され得る。Clackson et al., 1991, Nature, 352, 624-628およびMarks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222, 581-597には、ファージライブラリを用いた、マウスおよびヒト抗体の単離がそれぞれ記載されている。それ以降の刊行物には、鎖シャフリング（Marks et al., 1992, Bio/Technology, 10, 779-783）、ならびに非常に大きなファージライブラリを構築するための戦略としての組合せ感染およびインビボ組換（Waterhouse et al., 1993, Nuc. Acids. Res. 21, 2265-2266）による、高親和性（nM範囲）ヒト抗体の産生が記載されている。したがって、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に実現可能な代替技術である。

20

【0087】

キメラ抗体

抗体DNAは、たとえば、相同性マウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインをコード配列で置換するか（米国特許第4,816,567号、Morrison, et al., 1984, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81, 6851）、または非免疫グロブリン材料のコード配列のすべてもしくは一部（たとえば、タンパク質ドメイン）を免疫グロブリンコード配列に共有結合で連結させることにより、修飾されてもよい。典型的には、このような非免疫グロブリン材料で、抗体の定常ドメインが置換されるか、抗体の1つの抗原結合部位の変換ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位と、異なる抗原に関する特異性を有する別の抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体をつくる。

30

【0088】

ヒト化およびヒト抗体

ヒト化抗体は、非ヒトである源からの1以上のアミノ酸残基を有する。非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「インポート」残基と呼ばれ、典型的には「インポート」可変ドメインから取られる。ヒト化は、一般的に、ウインター（Winter）および共同研究者の方法（Jones et al., 1986, Nature 321, 522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332, 323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239, 1534-1536）に従って、げっ歯類CDRまたはCDR配列でヒト抗体の対応する配列を置換することにより行なわれ得る。したがって、このような「ヒト化」抗体は、実質的にインタクトとはいえないヒト可変ドメインが、非ヒト種からの対応する配列により置換された抗体である。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、一部のCDR残基およびおそらく一部のFR残基が、たとえば、げっ歯類の抗体などの非ヒト中の類似部位からの残基により置換されるヒト抗体である。

40

【0089】

ヒト化抗体を作る際に用いるべき重鎖および軽鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低下させるために非常に重要である。いわゆる「最良適合（best-fit）」方法に従うと、げっ歯類の抗体の可変ドメインの配列は、公知のヒト可変ドメイン配列の全ライ

50

ブラリに対してスクリーニングされる。げっ歯類の配列に最も近いヒト配列が、次にヒト化抗体のためのヒトフレームワーク (FR) として受入れられる (Sims et al., 1987, *J. Immunol.* 151, 2296; Chothia et al., 1987, *J. Mol. Biol.* 196, 901)。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体の共通配列に由来する特定のフレームワークを用いる。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に用いてもよい (Carter et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4285; Presta et al., 1993, *J. Immunol.* 151, 2623)。

【0090】

抗体は、抗原に対する高い親和性および他の好ましい生物学的性質を保持しつつヒト化されることがさらに重要である。この目標を達成するために、好ましい方法に従うと、ヒト化抗体は、親配列、ならびに親配列およびヒト化配列の三次元モデルを用いたさまざまな概念的なヒト化生成物の分析のプロセスにより調製される。三次元免疫グロブリンモデルは一般に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選ばれた免疫グロブリン配列候補の有力な三次元立体構造を図示し表示するコンピュータプログラムが入手可能である。これらの表示を調べることにより、免疫グロブリン配列候補の機能における残基の可能な役割の分析、すなわち、免疫グロブリン候補のその抗原を結合する能力に影響する残基の分析が可能となる。このように、FR残基は、標的抗原に対するより高い親和性などの望ましい抗体特徴が達成されるように、受容体配列およびインポート配列から選ばれ、組合されることができる。一般的に、CDR残基は、抗原結合の影響に直接的、かつ最も実質的に係る。

【0091】

抗体のヒト化は、簡単なタンパク質工学作業である。ほぼすべてのマウス抗体が、CDR グラフティングによりヒト化可能であり、結果的に抗原結合が保持される。Lo, Benny, K .C. 編、*Antibody Engineering: Methods and Protocols*、第248巻、Humana Press、ニュージャージー、2004年を参照。

【0092】

代替的には、現在では、免疫化すると、内因性の免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の全レパートリを産生することが可能なトランスジェニック動物 (たとえば、マウス) を生産することが可能である。たとえば、キメラおよび生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖連結領域 (JH) 遺伝子のホモ接合体欠失の結果、内因性抗体産生が完全に阻害されることが記載されている。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイをこのような生殖細胞系突然変異マウスに移入すると、結果的に、抗原攻撃の際にヒト抗体が産生される。たとえば、Jakobovits et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2551; Jakobovits et al., 1993, *Nature* 362, 255-258; Bruggermann et al., 1993, *Year in Immunology* 7, 33; および Duchosal et al., 1992, *Nature* 355, 258 を参照。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリに由来することもできる (Hoogenboom et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 227, 381; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 1991, 222, 581-597; Vaughan et al., 1996, *Nature Biotech* 14, 309)。

【0093】

ヒト化抗APRIL抗体のアミノ酸配列変異体は、適切なヌクレオチド変化をヒト化抗APRIL抗体のDNAに導入することにより、またはペプチド合成により調製される。このような変異体は、たとえば、ヒト化抗APRIL抗体について示されるアミノ酸配列内の残基からの欠失、および/またはそれらへの挿入、および/またはそれらの置換を含む。最終的な構築物が望ましい特徴を所有する限り、最終的な構築物に到達するためには、欠失、挿入、および置換の如何なる組合せもなされる。アミノ酸変化は、グリコシル化部位の数または配置の変更など、ヒト化抗APRIL抗体の翻訳後プロセスも変更し得る。

【0094】

突然変異導入のために好ましい位置であるヒト化抗APRIL抗体ポリペプチドのある残基または領域の同定のために有用な方法は、Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244, 1081-1085 に記載されるように、「アラニン走査突然変異導入」と呼ばれる。ここでは、標

10

20

30

40

50

的残基の残基または群が同定され（たとえば、Arg、Asp、His、Lys、およびGluなどの荷電残基）、中性または負に荷電するアミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）により置き換えられて、APRIL抗原とのアミノ酸の相互作用に影響を及ぼす。次に置換に対する機能的感度を発揮するアミノ酸残基は、置換部位で、または置換部位のための、さらなるまたは他の変異体を導入することにより改良される。したがって、アミノ酸配列変異を導入する部位が予め決定されている一方で、突然変異そのものの性質を予め決定する必要はない。たとえば、所与の部位での突然変異の性能を分析するためには、標的コドンまたは領域でAla走査またはランダムな突然変異導入を行ない、発現したヒト化抗APRIL抗体の変異体を望ましい活性についてスクリーニングする。

【0095】

普段は、ヒト化抗APRIL抗体のアミノ酸配列変異体は、重鎖または軽鎖のいずれかの元のヒト化抗体アミノ酸配列と少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%、98%または99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。この配列に対する同一性または相同性をここでは、最高パーセント配列同一性を達成するために、配列同一性の一部として如何なる保存的置換も考慮せずに、配列をアライメントし、必要な場合ギャップを導入した後の、ヒト化残基と同一の配列候補中のアミノ酸残基の百分率として定義される。抗体配列へのN末端、C末端、または内部伸展、欠失、もしくは挿入のいずれも配列同一性または相同性に影響を及ぼすとして解釈されない。

【0096】

ここでヒト化抗APRIL抗体において望ましいとして同定される特徴を有する抗体は、インビトロでの阻害的生物活性または好適な結合親和性のためにスクリーニングされ得る。目的の抗体により結合されるヒトAPRIL上のBCMAまたはTACIエピトープに結合する抗体（たとえば、APRILの結合を遮断する抗体）をスクリーニングするためには、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されるような慣例的なクロスブロッキングアッセイを行なうことができる。同じエピトープに結合する抗体は、このようなアッセイでクロスブロックする可能性が高いが、クロスブロッキングは、重複するエピトープ、または近傍の非重複エピトープすらで結合する抗体による抗体結合の立体障害から生じる可能性があることから、すべてのクロスブロッキング抗体がちょうど同じエピトープで必ずしも結合するわけではない。

【0097】

代替的には、たとえばChampe et al., 1995, J. Biol. Chem. 270, 1388-1394に記載されるような、エピトープマッピングを行ない、抗体が目的のエピトープを結合するか否かを判断することができる。Cunningham and Wells, 1989, Science 244, 1081-1085により記載されるような、「アラニン走査突然変異導入」またはヒトAPRILにおけるアミノ酸残基の他の何らかの形態の点突然変異導入を用いて、本発明の抗APRIL抗体についての機能的エピトープを求めてもよい。

【0098】

本発明の抗体と同じエピトープに結合する追加的な抗体は、たとえば、エピトープに結合するためのAPRILに対して生じさせる抗体のスクリーニングにより、またはエピトープ配列（たとえば、BCMAまたはTACI）を含むヒトAPRILのフラグメントを含むペプチドで動物を免疫化することにより得られてもよい。同じ機能的エピトープに結合する抗体は、受容体結合を遮断するなど、同様の生物学的活性を発揮することが期待され得、このような活性は、抗体の機能的アッセイにより確認することができる。抗体親和性は、標準的分析を用いて求めればよい。たとえば、ヒト化抗体などの好ましい結合化合物は、約 1×10^{-7} 以下、好ましくは約 1×10^{-8} 以下、より好ましくは約 1×10^{-9} 以下、最も好ましくは約 1×10^{-10} または 1×10^{-11} M以下もの K_D 値でヒトAPRILを結合する結合化合物である。

【0099】

ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、およびIgEを含む、任意のクラスの免疫グロブリ

10

20

30

40

50

ンから選ぶことができる。抗体は、好ましくはIgG抗体である。IgG₁、IgG₂、IgG₃、およびIgG₄を含む、IgGの如何なるアイソタイプも用いることができる。IgGアイソタイプの変異体も企図される。ヒト化抗体は、1を超えるクラスまたはアイソタイプからの配列を含んでもよい。望ましい生物学的活性を生成するための必要な定常ドメイン配列の最適化は、実施例に記載される生物学的アッセイにおいて抗体をスクリーニングすることにより容易に達成される。

【0100】

同様に、ここでの組成物および方法においては、いずれのクラスの軽鎖も用い得る。具体的には、カッパ、ラムダ、またはその変異体が、本願の組成物および方法において有用である。

【0101】

発明の抗体および抗体フラグメントは、細胞毒性剤などの細胞毒性ペイロード、または⁹⁹Tc、⁹⁰Y、¹¹¹In、³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、¹³¹I、¹¹C、¹⁵O、¹³N、¹⁸F、³⁵S、⁵¹Cr、⁵⁷To、²²⁶Ra、⁶⁰Co、⁵⁹Fe、⁵⁷Se、¹⁵²Eu、⁶⁷CU、²¹⁷Ci、²¹¹At、²¹²Pb、⁴⁷Sc、¹⁰⁹Pd、²³⁴Th、および⁴⁰K、¹⁵⁷Gd、⁵⁵Mn、⁵²Trおよび⁵⁶Feのような放射性ヌクレオチドとコンジュゲートさせてもよい。このような抗体コンジュゲートは、免疫療法において、その表面上で標的（その抗体に対する抗原）を発現する細胞を選択的に標的として死滅させるために用いられてもよい。例示的な細胞毒性剤には、リシン、塩化アルカロイド、メトトレザト、シュードモナス外毒素、サポリン、ジフテリア毒素、シスプラチン、ドキシソルピシン、アプリン毒素、ゲロニンおよびヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質が含まれる。

【0102】

発明の抗体および抗体フラグメントは、希土類キレート、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、イソチオシアネート、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルデヒド、フルオレスカミン、¹⁵²Eu、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェリン、ルミナル（luminal）標識、イソルミナル（isoluminal）標識、芳香族アクリジニウムエステル標識、イミダゾール標識、アクリジミウム塩標識、シュウ酸エステル標識、エクオリン標識、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、ピオチン/アビジン、スピン標識および安定フリーラジカルなどの蛍光体を含む、蛍光性または化学発光性標識とコンジュゲートされてもよい。

【0103】

Hunter et al., 1962, Nature 144, 945; David et al., 1974, Biochemistry 13, 1014; Pain et al., 1981, J. Immunol. Meth. 40, 219; および Nygren, J., 1982, Histochem. and Cytochem. 30, 407に記載される方法を含む、発明の抗体分子またはタンパク質分子をさまざまな部分（moieties）にコンジュゲートさせるための当該技術分野において公知の如何なる方法を用いてもよい。抗体およびタンパク質をコンジュゲートさせるための方法は、当該技術分野のものであり、従来周知である。

【0104】

抗体精製

組換技術を用いる場合、抗体は、細胞内でペリプラズム空間中に産生されるか、培地中に直接分泌されることができる。抗体が、細胞内で産生される場合、第1のステップとして宿主細胞または溶解されたフラグメントのいずれかである微粒子状の壊死組織片が、たとえば、遠心分離または限外ろ過により除去される。Carter et al., 1992, Bio/Technology 10, 163-167は、大腸菌のペリプラズム空間に分泌される抗体を単離するための手順を記載している。簡潔には、細胞ペーストが、酢酸ナトリウム（pH3.5）、EDTA、およびフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）の存在下、約30分間にわたって溶かされる。細胞の壊死組織片は、遠心分離により除去することができる。抗体が培地中に分泌される場合、このような発現系からの上清は、一般的に、まず、たとえば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外ろ過ユニットなどの市販のタンパク質濃縮フィルタを用いて濃縮される。タンパク質分解を阻害するために、PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤が、上記のステップのいずれかに含まれてもよく、偶発的な夾雑物の生育を防止するために、抗生材料が

10

20

30

40

50

含まれてもよい。

【0105】

細胞から調製された抗体組成物は、たとえば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動法、透析、および親和性クロマトグラフィを用いて精製することができ、親和性クロマトグラフィが好ましい精製技術である。プロテインAの親和性リガンドとしての適性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFc領域の種およびアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒトガンマ1、ガンマ2、またはガンマ4重鎖に基づく抗体を精製するために用いることができる (Lindmark et al., 1983, J. Immunol. Meth. 62, 1-13)。プロテインGは、すべてのマウスアイソタイプおよびヒトガンマ3に推奨される (Guss et al., 1986, EMBO J5, 1567-1575)。親和性リガンドを付着させるマトリックスは、最も頻繁にはアガロースであるが、他のマトリックスも使用可能である。制御細孔ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは、アガロースにより達成し得るよりも速い流速および短い処理時間を可能とする。抗体がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(登録商標)樹脂(J.T. Baker、ニュージャージー州フィリップスバーグ)が精製に有用である。イオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカクロマトグラフィ、ヘパリンセファロース(登録商標)クロマトグラフィ、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂クロマトグラフィ(ポリアスパラギン酸カラムなど)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、および硫酸アンモニウム沈殿などの他のタンパク質精製のための技術も、回収される抗体に依存して使用可能である。

10

【0106】

1つの実施形態においては、糖タンパク質は、レクチン基質への吸着(たとえば、レクチン親和性カラム)を用いて精製されて、調剤からフコース含有糖タンパク質を除去することにより、フコースを含有しない糖タンパク質のために富化してもよい。

20

【0107】

医薬製剤

発明は、APRIL結合化合物の医薬製剤を含む。医薬または無菌組成物を調製するためには、抗体またはそのフラグメントを医薬上許容されるキャリアまたは賦形剤と混和させる、たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984)を参照。治療または診断剤の製剤は、たとえば、凍結乾燥された粉末、スラリー、水溶液または懸濁液の形態の生理学的に許容されるキャリア、賦形剤、または安定剤と混合させることにより調製されてもよい(たとえば、Hardman, et al., 2001, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (eds.), 1993, Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.), 1990, Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.), 1990, Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie, 2000, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NYを参照)。

30

【0108】

単独でまたは免疫抑制剤と組合されて投与される抗体組成物の毒性および治療効率は、たとえば、LD₅₀(集団の50%に対する致死用量)およびED₅₀(集団の50%において治療上有効な用量)を求めるための細胞培養または実験動物における標準的な医薬的手順により求めることができる。毒性作用と治療効果との間の用量比が治療指数であり、LD₅₀とED₅₀との間の比として表わされ得る。これらの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトに用いるための用量の範囲を策定する際に用いられ得る。このような化合物の用量は、毒性がほとんどないか全くないED₅₀を含む循環濃度の範囲内であることが好ましい。用量は、用いられる投与形態および利用される投与経路に依存して、この範囲内で異なってもよい。

40

【0109】

50

好適な投与経路は、筋肉内投与、静脈内投与、または皮下投与などの非経口投与、および経口投与を含む。

【0110】

医薬組成物において用いられるか、本発明の方法を実施するための抗体の投与は、経口摂取、吸入、局所適用または皮膚注射、皮下注射、腹腔内注射、非経口注射、動脈内注射、もしくは静脈内注射など、さまざまな従来のやり形で行なわれ得る。1つの実施形態においては、発明の結合化合物は静脈内投与される。別の実施形態においては、発明の結合化合物は皮下投与される。

【0111】

代替的には、抗体を、たとえば、しばしばデポまたは徐放性製剤中での、作用部位への直接的な抗体の注射を介して、全身的というよりはむしろ局所的な態様で投与してもよい。さらに、抗体を標的化薬物送達系中で投与してもよい。

【0112】

抗体、サイトカイン、および小分子の適切な容量を選ぶ際のガイダンスが入手可能である（たとえば、Wawrzynczak, 1996, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.), 1991, *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.), 1993, *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, et al., 2003, *New Engl. J. Med.* 348, 601-608; Milgrom, et al., 1999, *New Engl. J. Med.* 341, 1966-1973; Slamon, et al., 2001, *New Engl. J. Med.* 344, 783-792; Beniaminowitz, et al., 2000, *New Engl. J. Med.* 342, 613-619; Ghosh, et al., 2003, *New Engl. J. Med.* 348, 24-32; Lipsky, et al., 2000, *New Engl. J. Med.* 343, 1594-1602を参照）。

【0113】

適切な用量の決定は、臨床医によって、たとえば、処置に影響を及ぼすとして当該技術分野で知られるか考えられ、または処置に影響を及ぼすと予測される、パラメータまたは要因を用いて行なわれる。一般的に、用量は最適用量よりも若干少ない量から開始され、その後、何らかの否定的な副作用に対して望ましいか最適な効果が得られるまで、徐々に増やされる。重要な診断手段は、たとえば、炎症または産生される炎症性サイトカインのレベルなどの症状の手段が含まれる。

【0114】

好ましい用量のプロトコルは、最大用量または顕著な望ましくない副作用を回避する投与頻度に係る。1週間の全用量は、一般的に、少なくとも0.05 µg/kg体重、より一般的には少なくとも0.2 µg/kg、最も一般的には少なくとも0.5 µg/kg、典型的には少なくとも1 µg/kg、より典型的には少なくとも10 µg/kg、最も典型的には少なくとも100 µg/kg、好ましくは少なくとも0.2 mg/kg、より好ましくは少なくとも1.0 mg/kg、最も好ましくは少なくとも2.0 mg/kg、最適には少なくとも10 mg/kg、より最適には少なくとも25 mg/kg、最も最適には少なくとも50 mg/kgである（たとえば、Yang, et al., 2003, *New Engl. J. Med.* 349, 427-434; Herold, et al., 2002, *New Engl. J. Med.* 346, 1692-1698; Liu, et al., 1999, *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67, 451-456; Portielji, et al., 2003, *Cancer Immunol. Immunother.* 52, 133-144を参照）。たとえば、ペプチド模擬物、天然産物、または有機化学材料などの小分子治療剤の望ましい用量は、モル/kgベースで、抗体またはポリペプチドのとはほぼ同じである。

【0115】

ここで用いられる、「阻害する」または「処置する」または「処置」は、疾患に関連する症状の発生の遅延および/または上記疾患とともに発生するか発生すると予想されるこのような症状の重症度の軽減を含む。該用語はさらに、既存の症状の改善、付加的な症状の防止、およびこのような症状の根本的な原因を改善または防止することを含む。したがって、該用語は、疾患を患う脊椎動物の被検体に対して有益な結果が授与されたことを指す。

10

20

30

40

50

【0116】

ここで用いられる、「治療上有効な量」または「有効量」という用語は、抗APRIL抗体またはそのフラグメントが、単独またはさらなる治療剤と組合されて細胞、組織、または被検体に投与される場合に、処置されるべき疾患または状態を防止または改善するために有効な量を指す。治療上有効な用量はさらに、たとえば、関係する医学的状态の処置、治療、防止または改善など、症状の改善が得られるか、このような状態の処置、治療、防止または改善のペースの上昇が得られるのに十分な化合物の量を指す。単独で投与される個々の有効成分に適用される場合、治療上有効な用量は、その成分のみを指す。組合せに適用される場合、治療上有効な用量は、組合せて、連続的にまたは同時に投与されようと、治療効果が得られる有効成分の組合された量を指す。有効量の治療剤は、症状を典型的には少なくとも10%、普通は少なくとも20%、好ましくは少なくとも約30%、より好ましくは少なくとも40%、最も好ましくは少なくとも50%低下させる。

10

【0117】

第2の治療剤との同時投与または処置のための方法は、当該技術分野において周知であり、たとえば、Hardman, et al. (eds.), 2001, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (eds.), 2001, Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner and Longo (eds.), 2001, Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA. を参照。

20

【0118】

発明の医薬組成物は、細胞毒性剤、化学療法剤、細胞静止剤、抗血管形成剤、または代謝拮抗剤、腫瘍標的化剤、免疫刺激剤もしくは免疫調節剤または細胞毒性剤、細胞静止剤、もしくはそれ以外の毒性剤にコンジュゲートされた抗体を含むがこれらに限定されない他の薬剤を含有してもよい。

【0119】

発明の抗体および抗体フラグメントのための治療用途

ヒトAPRILに特異的に結合する発明の抗体および抗原結合フラグメントは、APRILの活性が病状の中心であるいくつかの疾患を処置するために用いることができる。広義に言うと、これは癌、自己免疫性、炎症性疾患および潜在的に多発性の硬化症、CNS疾患を含む。

30

【0120】

癌

APRILを特異的に結合する発明の抗体または抗原結合フラグメントは、癌を処置するために用いることができる。成長および生存が発明により阻害され得る好ましい癌は、APRILを発現するとして知られる如何なる癌も含み、増殖シグナルについてAPRILに依存する。このような癌の非限定的な例は、慢性リンパ性白血病 (CLL)、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫ならびにパーキット (Burkitt) リンパ腫および、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫を含む非ホジキンリンパ腫などのいくつかのB細胞悪性腫瘍、また、APRIL発現が報告されている膠芽腫などのいくつかの固体腫瘍も潜在的に含む。

【0121】

発明の結合化合物は、単独でまたは、化学療法試薬もしくは他の生物学剤など、他の抗癌剤と組合されて用いられてもよい。さらに、この発明は、治療抵抗性もしくは再発性の悪性腫瘍またはこれらの悪性腫瘍のいずれかに由来する転移の処置を含む。

40

【0122】

自己免疫疾患

発明の結合化合物は、APRILの発現が病状における役割を果たすとして示されたいくつかの自己免疫疾患を処置するために用いられてもよい。このような疾患の例は、関節リュウマチ (RA)、全身性エリテマトーデス (SLE) およびシェーグレン症候群である。さらに、多発性硬化症患者の血清中に通常の力価より高いAPRILが認められ、さらにその星状細胞中により高いレベルが認められた。したがって、APRILは疾患病状への貢献因子であ

50

り、MSにおけるAPRILの治療的遮断は有益であり得る。

【0123】

発明の抗体および抗体フラグメントのための非治療用途

これらの抗体のための非治療用途は、フローサイトメトリー、ウェスタンブロッティング、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、免疫組織化学を含む。

【0124】

この発明の抗体は、セファロースカラムへの不動化を介する親和性精製試薬として用いてもよい。

【0125】

抗体は、たとえば特定の細胞、組織、または血清中のAPRILの発現を検出するための診断アッセイにも有用である。診断的応用のためには、抗体は、典型的には、検出可能部分（moiety）により（直接または間接的に）標識付けされる。数多くの標識が利用可能であり、一般的に、ビオチン、蛍光色素、放射性ヌクレオチド、酵素、ヨウ素、および生合成標識のカテゴリにグループ化され得る。

10

【0126】

本発明の抗体は、競合結合アッセイ、直接および間接的サンドイッチアッセイ、および免疫沈澱アッセイなどの任意の公知のアッセイ方法において使用されてもよい。Zola, Monoclonal Antibodies. A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987)。

【0127】

抗体は、インビボ診断アッセイのために用いられてもよい。一般的に、抗体は、それを発現する抗原または細胞が免疫シンチグラフィまたは陽電子放出診断撮影を用いて局在化され得るように放射性ヌクレオチドで標識付けされる。

20

【図面の簡単な説明】

【0128】

【図1】hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aハイブリドーマの上清のAPRIL反応性およびBCMA遮断活性を示す図である。図1Aは、抗FLAG抗体により捕捉されたFLAG-hAPRILに結合するhAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aを示す図である。Aprily-5抗体は、陽性の対照として用いられた。図1Bは、Aprily-5ではなく、hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aハイブリドーマの上清がFLAG-hAPRILのBCMA-Fcへの結合を遮断することを実証する図である。

【図2】精製されたhAPRIL.01AおよびhAPRIL.03A抗体の別個の結合および受容体遮断特徴を示す図である。図2Aは、抗FLAG抗体により捕捉された、精製されたhAPRIL.01AおよびhAPRIL.03AのFLAG-hAPRILへの結合を確認する図である。図2Bは、hAPRIL.03AのみがBCMA-Fcにより捕捉されたFLAG-hAPRILを結合することを示す図である。図2Cは、hAPRIL.01Aが、FLAG-hAPRILのBCMA-Fcへの結合を完全に遮断する一方で、hAPRIL.03Aはこの相互作用を部分的に遮断することを示す図である。図2Dは、hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aの両方が、TACI-FcとのFLAG-hAPRILを完全に遮断することを実証する図である。

30

【図3】hAPRIL.01A、hAPRIL.03A、および12個の公知の市販のモノクローナル抗APRIL抗体についての受容体遮断ELISAを示す図である。これは、hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aが、APRILのBCMA（図3A）およびTACI（図3B）への結合を遮断する能力において独自であることを図示する。

40

【図4A】hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03AがAPRILにより促進されるB細胞増殖およびアイソタイプクラススイッチを遮断するが、BAFFにより媒介されるプロセスには影響を及ぼさないことを示す図である。図4Aは、記載されるモノクローナル抗体が、B細胞の生存および増殖ならびにクラススイッチされたIgA抗体の産生などの公知のAPRIL機能を遮断することを実証するインビトロのB細胞アッセイである。重要なのは、両方のモノクローナル抗体が、等モル濃度で投与されたTACI-Fcよりも効果的にAPRIL活性を遮断することが実証されたことである。

【図4B】hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03AがAPRILにより促進されるB細胞増殖およびアイソタイプクラススイッチを遮断するが、BAFFにより媒介されるプロセスには影響を及ぼさないことを示す図である。図4Bは、抗体がBAFFにより促進されるB細胞応答に影響を及

50

ばさない一方で、TACI-Fcはこれらのプロセスを遮断することを示す。

【図5A】T細胞非依存的なB細胞応答において、インビボでhAPRIL.01AおよびhAPRIL.03A（パネルA）またはTACI-Fc（パネルB）によりAPRILを標的とした結果を示す図である。トランスジェニックマウスは、NPフィコールにより攻撃され、週当たり2回hAPRIL.01A、hAPRIL.03AおよびTACI-Fcにより処置された。PBSおよびマウスIgG1は、陰性の対照として用いられた。免疫グロブリン力価（IgA、IgMおよびIgG）は、ELISAにより測定された。hAPRIL.01A、hAPRIL.03Aおよび、より低い程度でTACI-Fcは、hAPRILトランスジェニックマウスにおけるAPRILにより媒介されたB細胞応答を阻害し、WTよりも免疫グロブリンレベルを低下させることが可能である。

【図5B】T細胞非依存的なB細胞応答において、インビボでhAPRIL.01AおよびhAPRIL.03A（パネルA）またはTACI-Fc（パネルB）によりAPRILを標的とした結果を示す図である。トランスジェニックマウスは、NPフィコールにより攻撃され、週当たり2回hAPRIL.01A、hAPRIL.03AおよびTACI-Fcにより処置された。PBSおよびマウスIgG1は、陰性の対照として用いられた。免疫グロブリン力価（IgA、IgMおよびIgG）は、ELISAにより測定された。hAPRIL.01A、hAPRIL.03Aおよび、より低い程度でTACI-Fcは、hAPRILトランスジェニックマウスにおけるAPRILにより媒介されたB細胞応答を阻害し、WTよりも免疫グロブリンレベルを低下させることが可能である。

【図6A】脾臓（パネルA）または腹膜腔（パネルB）中のB細胞集団上でhAPRIL.01A、hAPRIL.03AおよびTACI-FcによりAPRILを標的とした効果を示す図である。トランスジェニックマウスは、NPフィコールにより攻撃され、週当たり2回hAPRIL.01A、hAPRIL.03AおよびTACI-Fcにより処置された。PBSおよびマウスIgG1は、陰性の対照として用いられた。処置の30日後、脾臓および腹膜腔からの細胞を採取し、フローサイトメトリーにより分析した。hAPRIL.01AまたはhAPRIL.03Aによる処置は、脾臓中のB細胞の（サブ）集団に影響を及ぼさなかった。対照的に、TACI-Fcは、全B細胞集団ならびに成熟およびT2サブ集団を大きく低下させた。腹膜腔においては、TACI-FcはB1対B2細胞の比に影響を及ぼしたが、一方hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aは、これらのサブ集団に影響を及ぼさなかった。

【図6B】脾臓（パネルA）または腹膜腔（パネルB）中のB細胞集団上でhAPRIL.01A、hAPRIL.03AおよびTACI-FcによりAPRILを標的とした効果を示す図である。トランスジェニックマウスは、NPフィコールにより攻撃され、週当たり2回hAPRIL.01A、hAPRIL.03AおよびTACI-Fcにより処置された。PBSおよびマウスIgG1は、陰性の対照として用いられた。処置の30日後、脾臓および腹膜腔からの細胞を採取し、フローサイトメトリーにより分析した。hAPRIL.01AまたはhAPRIL.03Aによる処置は、脾臓中のB細胞の（サブ）集団に影響を及ぼさなかった。対照的に、TACI-Fcは、全B細胞集団ならびに成熟およびT2サブ集団を大きく低下させた。腹膜腔においては、TACI-FcはB1対B2細胞の比に影響を及ぼしたが、一方hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aは、これらのサブ集団に影響を及ぼさなかった。

【図7】hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aの可変領域配列を示す図である。図7Aおよび図7Bは、それぞれhAPRIL.01Aの重鎖および軽鎖可変配列のアミノ酸配列を示す。図7Cおよび図7Dは、それぞれhAPRIL.03Aの重鎖および軽鎖可変配列のアミノ酸配列を示す。

【実施例】

【0129】

<実施例1>

抗APRIL抗体の免疫化および選択

APRIL cDNAによるマウスの免疫化

ヒトAPRILタンパク質に対する抗体を生成するために、APRILの全長オープンリーディングフレームをコードするcDNAをpCI-neoベクター（Promega、ウィスコンシン州マジソン）にサブクローン化した。得られたベクターの発現は、293細胞（American Type Culture Collection、バージニア州マナサス）へのpCI-neo-hAPRILの一過性トランスフェクションと、マウス抗hAPRIL IgG1 Aprily-5（1:5,000）（Alexis、カリフォルニア州サンディエゴ）に続き、ヤギ抗マウスIgG1-HRP（1:2,000）（Southern Biotechnology、アラバマ州バーミングハム）による免疫プロットティングにより調べた。

【0130】

メーカーの指示に従って、Helios Gene銃（BioRad、カリフォルニア州ハーキュリーズ）およびDNAコートされた金弾丸（BioRad）を用いて遺伝子銃免疫化によりマウスを免疫化した。簡潔には、pCI-neo-hAPRIL cDNAならびにマウスFlt3LおよびマウスGM-CSFの市販の発現ベクターにより、2:1:1の比（両方ともAldevron、ノースダコタ州ファーゴによる）で1 μ m金粒子をコーティングした。金弾丸500 μ gをコーティングするのに合計1 μ gのプラスミドDNAを用いた。

【0131】

具体的には、7から8週齢のメスのBALB/Cマウスは、両耳に1ショットを4または5サイクル受けることにより、遺伝子銃で耳を免疫化された。3回のDNA免疫化の後、マウス血清中、ELISAによりおよそ1:3,200抗hAPRIL力価が検出された。ELISAにおいて、すべてのインキュベーションステップの後に、PBST（0.1%Tween20含有PBS）による洗浄ステップが3回行なわれた。Maxisorp96ウェルイムノプレート（Nunc、ニューヨーク州ロchester）が、ウサギ抗FLAGポリクローナル抗体（PBS中50ng/ウェル）（Sigma、ミズーリ州セントルイス）により4で一晚コーティングされ、10%ヤギ血清/PBSTにより室温で1時間遮断された。プレートは、CMVプロモータにより促進された分泌形態のFLAG-hAPRIL（pCR3-hAPRIL）により一過的にトランスフェクトされた293T細胞からの上清（PBS中1:4）と室温で1時間インキュベートされ、その後マウス血清希釈物および1:2,000HRPコンジュゲートヤギ抗マウスIgG（Southern Biotechnology）と、室温にて各1時間ずつインキュベートされた。最終的なPBST洗浄の後、抗hAPRIL免疫反応性が、100 μ l OptiEIA TMB基質により視覚化された（BD Biosciences、ニュージャージー州フランクリンレイク）。反応は、100 μ l 0.5 M H₂SO₄により停止され、吸光度が460および620 nmで読取られた。hAPRILに対する反応性を示したマウスは、最後の4回目で免疫化され、4日後に屠殺された。赤血球を枯渇させた脾臓細胞集団が、前述のように（Steenbakkers et al., 1992, J. Immunol. Meth. 152: 69-77; Steenbakkers et al., 1994, Mol. Biol. Rep. 19: 125-134）調製され、-140で凍結された。

【0132】

B細胞を産生する抗APRIL抗体の選択

抗APRIL抗体を産生するB細胞クローンを選ぶために、1.5 \times 10⁷赤血球を枯渇させた脾細胞が、抗FLAG M2抗体（Sigma）によりコーティングされた2.3 \times 10⁷Dynabeads（登録商標）M-450トシル活性化ビーズ（Invitrogen、カリフォルニア州、カールズバッド）上での陰性パニングに2回供された。メーカーの指示に従い、500 μ l中1 \times 10⁸ビーズ当たり50 μ gの抗FLAG M2抗体がコーティングされた。ビーズおよび脾細胞懸濁液は、氷上で30分間インキュベートされ、冷たいDMEM F12/P/S/10%BCS中に再懸濁された。非結合脾細胞は、DynaL MPC（磁性粒子濃縮器）（Invitrogen）を用いてビーズから分離された。陽性パニングについては、脾細胞は、FLAG-hAPRILに結合した抗FLAG M2によりコーティングされた2.3 \times 10⁷ビーズと氷上で30分間インキュベートされた。ビーズおよび非結合脾細胞は、合計12回の洗浄により上述のように分離された。

【0133】

抗原特異的B細胞は、Steenbakkers et al., 1994, Mol. Biol. Rep. 19: 125-134に記載されるとおりに培養された。簡潔には、選ばれたB細胞は、最終容量が、96ウェル平底組織培養プレート中200 μ lのDMEM F12/P/S/10%BCSとなるように、7.5%（v/v）T細胞上清および50,000個の放射された（2,500RAD）EL-4 B5栄養細胞と混合された。8日目、上清を上述の通りにELISAによりhAPRIL反応性のためにスクリーニングした。21個のAPRIL反応性上清が同定され、APRILのBCMA-Fcとの相互作用を阻害する能力について試験された。ELISAにおいて、すべてのインキュベーションステップの後に、PBST（0.1%Tween20含有PBS）による洗浄ステップが3回行なわれた。Maxisorp96ウェルイムノプレートは、BCMA-Fc（PBS中50ng/ウェル）（R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス）により4で一晚コーティングされ、室温で1時間10%ヤギ血清/PBSTにより遮断された。FLAG-hAPRILを含有する上清は、抗体を含有するB細胞上清と室温で1時間ブレインキュベートされ

、次にBCMA-Fcによりコーティングされたプレートに室温で1時間添加された。結合されたFLAG-hAPRILは、1 µg/mlの抗FLAG BioM2-ビオチン抗体 (Sigma) および1:2,000ストレプトアビジン-HRP (Southern Biotechnology) と、室温で各1時間ずつインキュベートすることにより検出された。最後のPBST洗浄の後、APRILに結合したBCMA-Fcは、100 µlのOptiEIA TMB基質 (BD Biosciences) により可視化された。反応は、100 µlの0.5 M H₂SO₄により停止され、吸光度が460および620 nmで読取られた。

【0134】

その後、8個のB細胞クローンが、公開された手順 (Steenbakkers et al., 1992, J. Immunol. Meth. 152, 69-77; Steenbakkers et al., 1994, Mol. Biol. Rep. 19, 125-34) に従うミニ電気融合により不死化された。具体的には、B細胞が10⁶ NS-1骨髄腫細胞と混合され、血清がDMEM F12培地による洗浄によって除去された。細胞はプロナーゼ溶液で3分間処理され、融合培地により洗浄された。電気融合は、50 µlの融合チャンバ中で、30秒、2 MHz、400 V/cmの交流電界の後、10 µs、3 kV/cmの方形波高電界パルスにより、さらに再び、30秒、2 MHz、400 V/cmの交流電界により行なわれた。チャンバの中身は、ハイブリドーマ選択性培地に移され、限界希釈条件下、96ウェルプレート中に平板培養された。融合後14日目、ハイブリドーマの上清は、上述のとおりAPRIL反応性およびBCMA遮断活性のためにスクリーニングされた。hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aと名付けられた2つの別個の抗hAPRILハイブリドーマは、単離され、その完全性を保護するために限定された希釈によりサブクローン化された。hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03A抗体のhAPRIL反応性およびBCMA遮断活性は、ハイブリドーマの上清により確認された (図1を参照)。

【0135】

< 実施例 2 >

抗APRIL抗体の精製および特徴付け

ハイブリドーマを産生する抗APRILの安定化および抗APRIL抗体の精製

各ハイブリドーマについて、クローン細胞集団が、複数回の限界希釈 (hAPRIL.01Aについては6回、hAPRIL.03Aについては4回) により得られた。安定ハイブリドーマは、メーカーの指示に従って、CELLLineパイオリアクター (Integra-Biosciences、スイス、クール) を用いて、血清を含まない培地で培養された。7から10日の培養の後、上清が採取され、0.22 µMニトロセルロース膜を通してろ過された。上清は、高塩結合緩衝液 (1M グリシン / 2M NaCl、pH9.0) 中で1:1で希釈され、抗体は、プロテインG HiTrap 5mlカラム (GE Healthcare、ニュージャージー州ピスカタウェイ) により精製された。カラムのPBS洗浄の後、抗体はpH2.7の0.1M グリシンにより溶出され、3M Trisにより中和された。緩衝液は、PD-10ゲルろ過カラム (GE Healthcare) を用いてPBSに交換された。抗体は、Amicon Ultra-15遠心式フィルタユニット (Millipore、マサチューセッツ州ビレリカ) により濃縮され、分光測定を用いて定量化された。

【0136】

マウスモノクローナル抗体アイソタイピング試験キット (Serotec、ノースカロライナ州ローリー) を用いて、hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03A抗体の両方の (サブ) アイソタイプは、IgG1、カッパとして判定された。

【0137】

結合分析

タンパク質ベースのELISA実験が、精製されたhAPRIL.01AおよびhAPRIL.03A抗体を用いて行なわれ、見かけ結合親和性が求められた (EC₅₀ 値として報告された)。結合は、マウス抗hAPRIL IgG1 Aprily-5 (Alexis) と比較された。Maxisorp 96ウェルイムノプレート (Nunc) は、PBS中50 ng / ウェルでウサギ抗FLAGポリクローナル抗体 (Sigma) またはBCMA-Fc (R&D Systems) のいずれかにより4で一晚コーティングされ、10%ヤギ血清 / PBSTにより室温で1時間遮断された。プレートは、PBSTにより3回洗浄され、FLAG-hAPRILを含有する上清 (PBS中1:4) と室温で1時間インキュベートされた。プレートが再度PBSにより3回洗浄され、hAPRIL.01A、hAPRIL.03A、およびAprily-5抗体と室温で1時間イ

10

20

30

40

50

ンキュベートされた(3重の10倍希釈による10 µg/ml高試験(10 µg/ml high test with 10-fold dilutions in triplicates))。PBSTによる3回の洗浄の後、結合した抗体はヤギ抗マウスIgG-HRP(1:2,000)(Southern Biotechnology)により室温で1時間検出された。プレートはPBSTで3回洗浄され、APRIL反応性がOptiEIA TMB基質(Becton Dickinson)により可視化された。最大半量の結合についての濃度が、相対的な結合親和性の尺度として報告される。FLAG-hAPRILが抗FLAG抗体により捕捉された場合(図2A)、hAPRIL.01A、hAPRIL.03AおよびAprily-5についてのEC₅₀値は、それぞれ2.2、1.4、および1.7 nMとして算出された。FLAG-hAPRILがBCMA-Fcにより捕捉された場合(図2B)、hAPRIL.01A抗体結合は観察されず、APRIL-BCMA相互作用がhAPRIL.01Aエピトープを遮断したことが示唆された。対照的に、hAPRIL.03AのAPRIL-BCMA複合体への結合が観察された。受容体-リガンド複合体の抗体検出は、診断アッセイおよび、可溶性APRILのクリアランスに従う研究目的のために有用であると分かり得る。

【0138】

バイオライトインターフェロメトリー(ForteBio)による動態解析

抗体の結合特徴をさらに特徴付けるために、各々がOctetシステム(ForteBio、カリフォルニア州メンロパーク)上でバイオライトインターフェロメトリーを用いてプロファイリングされて、結合キネティクスが解明され、平衡結合定数が算出された。このアッセイは、標準的アミン化学を用いて、アミン反応性バイオセンサ(ForteBio)に精製されたhAPRIL.01AおよびhAPRIL.03A抗体をカップリングすることにより行なわれた。バイオセンサに結合し、かつそれから解離する組換えヒトAPRIL(R&D Systems)は、次に、1 µg/mlおよび2 µg/mlの2つの濃度で観察された。具体的には、アミン反応性バイオセンサは、0.1M MES pH = 5を含有するウェル中に2分間浸漬されることにより予め湿潤化された。次に、バイオセンサは0.1M NHS / 0.4M EDC混合物を用いて5分間活性化された。hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03A抗体は、バイオセンサを5 µg/mlの抗体の溶液に18分間浸漬させることによりカップリングされた。バイオセンサ表面は、pH 8.5の1Mエタノールアミンの溶液を用いて7分間クエンチされた。バイオセンサはPBS中で5分間平衡化された。組換えAPRILの会合は、バイオセンサを1 µg/mlまたは2 µg/mlのAPRILを含有するウェル中に配置し、20分間インターフェロメトリーをモニタリングすることにより観察された。解離は、バイオセンサをPBS中に移入させ、20分間インターフェロメトリーシグナルをモニタリングした後に測定した。観察されたオン率およびオフ率(k_{on} および k_{off})は、1:1結合グローバルフィットモデルを用いてフィッティングされ、平衡結合定数 K_D が算出された(表1を参照)。

【0139】

【表2】

表1. 発明のヒト化抗hAPRIL抗体の結合特徴

mAb	k_{on} M ⁻¹ s ⁻¹	k_{dissoc} s ⁻¹	K_D M
hAPRIL.01A	4.89E+04	3.69E-05	7.53E-10
hAPRIL.03A	7.54E+04	4.21E-05	5.58E-10

【0140】

受容体遮断

hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aの遮断能力が、精製された抗体を用いて確認された。Maxisorp 96ウェルプレートは、50 ng/ウェルでBCMA-Fc(R&D Systems)およびTACI-Fc(R&D Systems)のいずれかにより4で一晚コーティングされ、10%ヤギ血清/PBSTにより室温で1時間遮断された。FLAG-hAPRILを含有する上清は、hAPRIL.01A、hAPRIL.03A、およびAprily-5抗体と室温で1時間プレインキュベートされた(3重の10倍希釈による10 µg/ml高試験(10 µg/ml high test with 10-fold dilutions in triplicates))。プレートはPBSTで3回洗浄され、結合されたFLAG-hAPRILは、1 µg/mlの抗FLAG BioM2-ビオチン抗体(Sigma)および1:2,000ストレプトアビジン-HRP(Southern Biotechnology

10

20

30

40

50

)と、室温で各1時間ずつインキュベートすることにより検出された。最後のPBST洗浄の後、APRILに結合したBCMA-FcがOptiEIA TMB基質 (BD Biosciences) により可視化された。図2Cおよび図2Dに示されるように、hAPRIL.01Aは、FLAG-hAPRILのBCMA-FcおよびTACI-Fcへの結合を完全に遮断するが、hAPRIL.03Aは、TACI-FcへのFLAG-hAPRILの結合を完全に遮断する一方で、hAPRIL-BCMA-Fc相互作用を部分的にしか遮断しない。Aprily-5は、FLAG-hAPRILのBCMA-FcまたはTACI-Fcへのいずれかの結合を遮断しない。最大半量の阻害 (IC_{50}) の濃度は、hAPRIL.01Aについては1.2、BCMA-FcおよびTACI-Fcについては0.4 nMとそれぞれ判定された。TACI-FcへのhAPRIL.03Aについての IC_{50} は、1.3 nMと判定された。

【0141】

市販の抗体

市販の抗APRIL抗体は、表2に記載されるとおりに得られる。

【0142】

【表3】

表2. 市販の抗ヒトAPRILモノクローナル抗体

抗体	会社	カタログ番号
Aprily-1	Alexis	ALX-804-148-C100
Aprily-2	Alexis	ALX-804-844-C100
Aprily-5	Alexis	ALX-804-801-C100
Aprily-8	Alexis	ALX-804-149-C100
Sacha-1	Alexis	ALX-804-141-C100
Sacha-2	Alexis	ALX-804-804-C100
抗CD256, クローンT3-6	BioLegend	318502
マウス抗ヒトAPRIL	LifeSpan Biosciences	LS-C18658
マウス抗ヒトAPRIL	LifeSpan Biosciences	LS-C18659
マウス抗ヒトAPRIL	LifeSpan Biosciences	LS-C18687
TNFSF13モノクローナル抗体 (M01), クローンH4-E8	Tebu-bio	H00008741-M01
TNFSF13モノクローナル抗体 (M02), クローンG3	(ABNOVA)	H00008741-M02
ヒトAPRIL/TNFSF13 MAbs (クローン101115)	R and D	MAB884

【0143】

hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aの遮断特徴が独自であるか否かを研究するために、すべての公知の市販の抗APRIL抗体が、FLAG-hAPRILのBCMA-FcおよびTACI-Fcへの相互作用の遮断

10

20

30

40

50

能力（図3Aおよび図3B）について試験された。受容体結合の遮断は、ELISAを用いて研究された。ELISAプレートは、コーティング緩衝液中、 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ での50の $100\ \mu\text{l}$ のBCMA-Fcまたは $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度での $100\ \mu\text{l}$ のTACI-Fcでコーティングされ、4で一晚インキュベートされた。プレートは次にPBS/0.2%Tweenにより洗浄され、次にウェル当たり $100\ \mu\text{l}$ PBS/5% BSAで、37で1時間インキュベートされた。プレートは次にPBS/0.2%Tweenで4回洗浄された。別途のプレート中で、APRILモノクローナル抗体はAPRIL上清と予め混合され、氷上で30分間インキュベートされた。可溶性APRILを含有する調整培地は、1対4に希釈され、 $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ から開始して、2倍希釈で滴定された抗体を含有する等容量のPBSと混合された。予めインキュベートされたミックスの $100\ \mu\text{l}$ がELISAプレートに移され、37で2時間インキュベートされた。プレートは次にPBS/0.2%Tweenで4回洗浄された。抗Flag-HRP抗体はその後1:1000の濃度でPBS中に希釈され、次にこの $100\ \mu\text{l}$ が各ウェルに添加され、37で1時間インキュベートされた。次に、プレートはPBS/0.2%Tweenにより4回洗浄され、次にABTSの $100\ \mu\text{l}$ が各ウェルに添加された（ABTSは、 $10\ \text{ml}$ の試薬に加えて、添加する直前に作られた $5\ \mu\text{l}$ の H_2O_2 という比で希釈された）。発色させ、次に $405\ \text{nm}$ でのODがELISAプレートリーダーにより読取られた。ヒトIgG1が、プレートをコーティングするための対照タンパク質として用いられた。なぜなら、これがFc融合タンパク質と同じアイソタイプであり、プレートに非特異的に固着するAPRILのために制御されているためである。図3から明らかであるように、市販の抗体のいずれもFLAG-APRILのTACI-FcまたはBCMA-Fcのいずれかへの結合を遮断することは不可能であったが、hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aは、TACI-FcおよびBCMA-Fcへの結合を確かに（部分的に）阻害する。

10

20

【0144】

種交差反応性

hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03AのマウスAPRILへの結合も、BIAcoreによって検査されたが、いずれの抗体の結合も観察されなかった。抗体はヒトAPRILのみに結合すると見られる。

【0145】

<実施例3>

マウス抗ヒトAPRIL抗体の機能的プロファイリング

APRILへのマウスB細胞の応答

この発明の抗体がインビトロでAPRILを機能的に遮断することができることを示すために、マウスB細胞アッセイを用いて、B細胞における2つのAPRILにより促進される応答である、増殖およびIgA産生を検査した。

30

【0146】

すべての細胞系が $5\% \text{CO}_2$ により37に維持された。マウス脾細胞および精製されたB細胞が、 $8\% \text{FCS}$ 、 $2\ \text{mM}$ のグルタミンおよび $50\ \mu\text{M}$ のベータ-メルカプトエタノールにより補足され、かつ $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のペニシリンおよびストレプトマイシンにより補足されたRPMI-1640 (Gibco)で生育された。脾臓マウスB細胞は、CD45R/B220 MACSビーズ (Miltenyi Biotec、オランダ、ユトレヒト)を有する磁気活性化細胞分離 (MACS) カラムを用いて野生型マウスから単離された。細胞は、最終容量が $200\ \mu\text{l}$ の、 2×10^5 /ウェルの密度の96ウェル円型底付きマイクロタイタプレートで培養された。すべてのアッセイについて、さまざまな形態の可溶性APRILを含有する調整培地は、使用前に発現レベルが標準化された。増殖を測定するために、細胞は、抗IgM (Jackson ImmunoResearch) および調整培地中または $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度の精製されたタンパク質としての可溶性APRILにより処理された。架橋抗Flagモノクローナル抗体が、 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度でウェルに添加された。細胞は37でインキュベートされ、48時間後に、採取前、 $0.3\ \mu\text{Ci}$ ($0.011\ \text{MBq}$)のトリチウム化チミジン ($[6\text{-}^3\text{H}]$ チミジン、GE Healthcare、オランダ)で18時間パルスした。IgA産生を測定するために、上記のとおり、マウスB細胞が培養され、APRILにより処理された。6日間のインキュベーション後、上清を集め、ELISAによりIgA含有量についてアッセイされた。簡潔には、ELISAプレートは、 $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗マ

40

50

ウスIg (Southern Biotech) によりコーティングされ、PBS / 1% BSAにより遮断され、集められた上清とインキュベートされた。結合したIgAは、次にHRPにより標識付けされた抗マウスIgA (Southern Biotech、オランダ、アイトホールン) により検出された。対照として、細胞は、10 µg/mlのLPS (Invivogen) に加えて1 ng/mlのヒトTGF (Sigma-Aldrich) により処理された。図4 Aに示すとおり、hAPRIL.01A、およびより低い程度でhAPRIL.03Aは、マウス脾臓B細胞からのIgA分泌の低下により求められたとおり、APRIL誘導クラススイッチ組換を阻害することが可能である。対照としてのTACI-Fcは、IgA分泌を阻害する一方で、マウスIgG1およびヒトIgは、脾臓B細胞からのAPRIL誘導IgA分泌に影響を及ぼさなかった。さらに、hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aは、APRIL誘導マウス脾臓B細胞増殖を阻害することが実証された。抗体の特異性を確立するために、hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03AのBAFF誘導IgA分泌および増殖に対する作用が研究された。図4 Bに示されるように、hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03AのいずれもBAFF誘導IgA分泌および増殖を阻害しなかった一方で、対照としてのTACI-Fcは、両方のプロセスを阻害した。

10

20

30

40

50

【0147】

APRIL機能を遮断するためのインビボ実験

APRIL機能に対する抗体のインビボ遮断作用を実証するために、マウス中で、NPフィコール誘導体液性応答を遮断する抗体の能力を検査した。使用したマウスは、8から10週齢のAPRILトランスジェニック(TG)マウスおよび野生型(WT)同腹仔であり、いずれもC57BL/6背景であった。APRILトランスジェニックマウスは、導入遺伝子発現を成熟胸腺細胞および末梢Tリンパ球に導くLck遠位プロモーター下で、ヒトAPRILを発現する(Stein et al., 2002, J Clin Invest 109, 1587-98)。マウスは大学医療センターの動物施設で繁殖され、実験は施設内倫理委員会により承認された。マウスをいくつかのグループに分け、以下のように処置した。5匹のAPRIL WTマウスはPBS(200ml)により処置され、5匹のAPRILトランスジェニックマウスの5つの群は、hAPRIL.01A、hAPRIL.03A、またはTACI-Fc、またはサブアイソタイプマッチド(subisotype-matched)対照抗体msIgG1_k(200 µlのPBS中200 µg/マウス)またはPBSの分子により処置された。マウスの処置はNPフィコール免疫化3日前に開始され(0日目、250 µgの免疫原を腹腔内投与)、注射は週2回、28日間継続された。1、3、7、14および28日目に尾の静脈から血液を集めた。抗(4-ヒドロキシ-ニトロフェニル酢酸)(NP)-特異的抗体(IgM、IgGおよびIgA)が、先に記載されたように(Hardenberg et al., Immunol Cell Biol, 86(6), 530-4, (2008))、希釈血清(IgAについては1:100、IgGについては1:500、IgMについては1:2,000)を用いて、6回の独立したELISAでアッセイされた。簡潔には、96ウェルELISAプレート(Greiner)を炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.6)中で5 µg/mlのNP-BSA (Biosearch Technologies)により4で一晚コーティングされた。ウェルは1%BSAにより37で1時間ブロックされ、室温で2時間希釈血清とインキュベートした。HRPにコンジュゲートさせたアイソタイプ特異的抗体(Southern Biotechからのヤギ抗マウスIgG、IgAおよびIgM)を出現抗体(revealing antibodies)として用いた。希釈はすべてPBS/BSA 1%/Tween 20 0.05%にて行なった。一元配置分散分析(ANOVA)試験を用いて、TG(PBS)群対TG(hAPRIL.01A)とTG(PBS)群対TG(hAPRIL.03A)との間の統計的有意差を調べた。図5から明らかのように、hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aの両方が、インビボでT細胞非依存性B細胞応答を阻害した。TACI-Fcはこの応答の阻害がより非効率的であった。アイソタイプマッチド対照としてのPBSおよびマウスIgG1は、IgA、IgMおよびIgG抗NP応答に影響しなかった。B細胞集団上でのhAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aの長期的作用を検査するために、マウスを上述のように処置した。30日目、マウスを屠殺し、脾臓および腹腔浸出腔(peritoneal exudate cavity)(PEC)をフローサイトメトリーによりB細胞発現について解析した。簡潔には、PECからの脾細胞およびリンパ球を赤血球溶解緩衝液による1回の洗浄により赤血球から分離し、次に細胞を計数した。細胞をPBS/1%BSA中で洗浄および再懸濁させ、ウェル当たり 5×10^5 の密度で96ウェル円形底付きプレートに播種した。次に、細胞を推奨される濃度で、抗体B220-FITC(BD bioscience)およびCD3-APC(ebioscience); IgD-FITC (BD bioscience)およびIgM-PE (BD bioscience); IgD-FITC (BD bioscience)、CD3-APC (ebioscience)

nce)およびCD43-PE (BD bioscience)により染色した。抗体を40分間インキュベートし、PBS/1% BSAで3回洗浄し、次にFACSCalibur (Becton Dickenson)を用いてフローサイトメトリーにより解析した。脾臓中の $B220^+B$ 細胞、成熟B細胞(IgD^+IgM^{int})および $T2B$ 細胞(IgD^+IgM^+)を定量化した(図6Aを参照)。さらに、 $B1(CD43^+IgD^{int})$ および $B2(CD43^-IgD^+)$ サブ集団をPEC中で定量化した(図6Bを参照)。TACI-Fc処置に应答するB細胞の減少は、脾臓およびPECのいずれからでも明白であり、TACI-Fcの長期的投与は正常なB細胞集団に対して有害な作用を及ぼす可能性が示される。これは、hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03A抗体では見られず、BAFFでなくAPRILが病状の主要原因である場合、この発明の抗体がTACI-Fcよりも少ない副作用を示す可能性が示唆される。

10

【0148】

<実施例4>

抗APRIL抗体配列

免疫グロブリンcDNAのクローン化

縮重プライマーPCRベース法を用いて、ハイブリドーマhAPRIL.01AおよびhAPRIL.03Aにより発現されるマウス抗体のための可変領域をコードするDNA配列を求めた。全RNAをTRIZOL(Invitrogen)を用いて 5×10^6 ハイブリドーマ細胞から単離し、重鎖および軽鎖のための遺伝子特異的cDNAをメーカーの指示に従ってiScript Select cDNA合成キット(Biorad)を用いて合成した。 V_H および V_L 遺伝子をNovagenベースIgプライマーセット(Novagen、カリフォルニア州サンディエゴ)およびTaqポリメラーゼ(Invitrogen)を用いてPCR増幅した。期待される増幅産物サイズである500bpに一致したすべてのPCR産物をpCR4 TOPOベクター(Invitrogen)にクローン化し、構築物をメーカーの指示に従ってDH5a大腸菌(Invitrogen)に形質転換した。ユニバーサルM13順方向および逆方向プライマーを用いて、クローンをコロニーPCRによりスクリーニングし、各反応から2つのクローンがDNA配列決定解析のために選ばれた。配列は、NCBI Ig-Blast BLASTN 2.2.16(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/>)を用いて、生殖系および再構成IgV可変領域配列のデータベースと突き合わせてサーチした。hAPRIL.01AおよびhAPRIL.03AのBlast結果は、各抗体について1つのインフレームの V_H 配列および1つのインフレームの V_L 配列を示した。アミノ酸配列は質量分析によって確認された。配列は、添付の配列表、図7に開示され、表3に列挙される。

20

30

【0149】

【表4】

表3: 本発明のマウス抗ヒトAPRIL抗体についての配列番号

配列番号	説明
1	hAPRIL.01A 重鎖可変領域 (DNA)
2	hAPRIL.01A 軽鎖可変領域 (DNA)
3	hAPRIL.03A 重鎖可変領域 (DNA)
4	hAPRIL.03A 軽鎖可変領域 (DNA)
5	hAPRIL.01A 重鎖可変領域 (AA)
6	hAPRIL.01A 軽鎖可変領域 (AA)
7	hAPRIL.03A 重鎖可変領域 (AA)
8	hAPRIL.03A 軽鎖可変領域 (AA)
9	hAPRIL.01A 重鎖 CDR1 (AA)
10	hAPRIL.01A 重鎖 CDR2 (AA)
11	hAPRIL.01A 重鎖 CDR3 (AA)
12	hAPRIL.01A 軽鎖 CDR1 (AA)
13	hAPRIL.01A 軽鎖 CDR2 (AA)
14	hAPRIL.01A 軽鎖 CDR3 (AA)
15	hAPRIL.03A 重鎖 CDR1 (AA)
16	hAPRIL.03A 重鎖 CDR2 (AA)
17	hAPRIL.03A 重鎖 CDR3 (AA)
18	hAPRIL.03A 軽鎖 CDR1 (AA)
19	hAPRIL.03A 軽鎖 CDR2 (AA)
20	hAPRIL.03A 軽鎖 CDR3 (AA)

10

20

30

【0150】

< 実施例5 >

ペプスキャン (Pepscan) 法を用いたエピトープマッピング

ペプチドの合成およびペプスキャンスクリーニング

クレジットカード型ミニPEPSCANカード (3 μ l ウェルを有する455ウェルプレート) を用いて、Slootstra et al. (Slootstra et al., 1996, Mol. Diversity 1, 87-96) および Timmerman et al. (Timmerman et al., 2007, J. Mol. Recognit. 20, 283-299) により記載されるとおりに、合成直鎖およびCLIPSペプチドを合成してスクリーニングした。抗体 (hAPRIL.01A および hAPRIL.03A) の各ペプチドへの結合をPEPSCANベース酵素免疫測定法 (ELISA) で試験した。共有結合させたペプチドを含有する、455ウェルクレジットカード型ポリプロピレンカードをサンプル (たとえば、5%ウマ血清 (容量/容量) および5%オバルブミン (重量/容量) を含有するPBS溶液で希釈した1 μ g/ml抗体) および1%Tween80 (4、一晩) とインキュベートした。洗浄後、ペプチドを抗-抗体ペルオキシダーゼ (希釈倍数1/1000、たとえばウサギ抗マウスペルオキシダーゼ、Southern Biotech) (1時間、25) とインキュベートし、その後、ペルオキシダーゼ基質を洗浄後、2,2'-アジノ-ジ-3-エチルベンゾチアゾリンスルホン酸 (ABTS) および2 μ l/ml 3% H_2O_2 を加えた。1時間後、発色を測定した。ELISAの発色をCCDカメラおよび画像処理システムにより定量化した。設備は、CCDカメラおよび55mmレンズ (Sony CCDビデオカメラXC-77RR、Nikon Micro-nikkor 55mm f/2.8レンズ)、カメラアダプター (Sony

40

50

カメラアダプター-DC-77RR)および画像処理ソフトウェアからなる。

【0151】

合成ペプチド

まず、合計4225個のCLIPSペプチドを合成した。標的配列は、147個のアミノ酸を用い、1XU2.pdbによるアラインメントに従うループには下線を引いた：RAVLTQKQKKQHSV LHLVPI NATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRI QDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRCI RSMP SHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVI IPRARAKLNLSPHGTFLGFVKL(配列番号21)。タンパク質の「上(top)」側のループ：QKKQHSVLHL(配列番号22)、ALRRGRGL(配列番号23)、QAQGYGVRI(配列番号24)、QDAGVYLL(配列番号25)、SREGQGRQETV(配列番号26)、FHLHQGDILSV(配列番号27)およびタンパク質の「下(bottom)」側のループ：INATS KDDSDVTE(配列番号28)、VLFQDVTFTMG(配列番号29)、IRSMPSHPDRAYNSC(配列番号30)、IIPRARAKL(配列番号31)、NLSPHGTFLGF(配列番号32)。相互連結領域はほとんどがシートである。ここで、「上」および「下」側は、任意に選択される。以下のCLIPSトポロジーが使用された。T2 CLIPSは、2つのシステインの側鎖にカップリングして単一のループトポロジーを形成し、一方、T3 CLIPSは、3つのシステインの側鎖にカップリングして2重のループトポロジーを形成し、一方、T2T2 CLIPSの最初のT2が2つのシステイン(C標識付け)にカップリングし、次に2番目のT2が2つのシステインにカップリングし、最後にT2T3 CLIPSは、T2が2つのシステインにカップリングし、T3が3つのシステインにカップリングする。

10

20

【0152】

合計20の異なるペプチドのセットが合成された。

191-1(セット-1)：完全な147AA標的配列を網羅する全重複35-mer配列が合成された。このセットでは、上に定義したように、異なるループが配列中に存在するとき、2つのT2 CLIPSを通して2重ループまたはシート状トポロジー中に拘束された。

【0153】

191-2(セット-2) 合計で9つのシートが同定された。すべての9×9の組合せは、2重シート立体構造を模範するように合成された。配列GSGをリンカーとして用いた。

【0154】

191-3(セット-3) 上に説明したセット-2と同じであるが、シート長さがより短い。

30

【0155】

191-6(セット-4) 完全な147AA標的配列を網羅する全重複の直鎖状35-mer配列が合成された。

【0156】

191-7(セット-5) 完全な147AA標的配列を網羅する全重複の直鎖状15-mer配列が合成された。

【0157】

191-8(セット-6a) 完全な147AA標的配列のループ領域のみを網羅する短直鎖配列(長さが異なる)が合成された。

40

【0158】

191-16(セット-6b) 異なるペプチドが5つの「下」ループから選ばれた。これらをT3 CLIP上へと9×9のマトリックスに組み替えて、2つの異なる長さの「下」ループを有する2重ループ化トポロジーを形成した。

【0159】

191-17(セット-7) 全重複の135個の異なる15-mer配列が、1、8および15位のシステインと合成された。これら3つのシステインはT3 CLIPSにカップリングされた。

【0160】

191-18(セット-9) 6つの「上」ループの長いバージョンおよび4つの「下

50

」ループの長いバージョンが、T3 CLIPS上で互いに組換えられた。

【0161】

191-19 (セット-10) 「上」ループ領域の6+6+4の異なるサイズのループがすべてT3 CLIPS上で互いに組み替えられた。

【0162】

191-20 (セット-11、17、18、19、20) 「上」または「下」ループを広く網羅する33個の異なる配列が、T3 CLIPS上で互いに組み替えられた。これらのペプチドのセットは、セット11、17、18、19および20にある。この「散乱 (scattering)」の理由は、カードのレイアウトのためである。

【0163】

191-22 (セット-12) すべての「上」および「下」ループの異なるサイズのループが、T2 CLIPS上の単一ループとして合成された。

【0164】

191-23 (セット-13) 完全な標的タンパク質を網羅する全重複の単一ループ化15-mer配列が、T2 CLIPS上で合成された。

【0165】

191-24 (セット-14) 「上」ループを網羅する6個の異なる9-mer配列が、各々とT2T3 CLIPS組合せ上で6×6×6の3重ループ化マトリックスに組み替えられた。

【0166】

191-25 (セット-15) セット-1と同じセットの重複ペプチド。完全な147 AA 標的配列を網羅する全重複35-mer配列が合成された。このセットでは、上に定義したように、異なるループが配列中に存在するとき、T3T2 CLIPSを通して3重ループトポロジー中に拘束された。

【0167】

191-26 (セット-16) 「下」ループを網羅する6個の異なる9-mer配列が、各々とT2T3 CLIPS組合せ上で6×6×6の3重ループ化マトリックスに組換えられた。

【0168】

データ解析およびエピトープ決定

各抗体をすべての4225個のペプチド上で試験し、それらの結合値を順位付けした。ほとんどの上位の結合体 (binders) (~上位1%) 中に明らかに繰り返し発生する配列が、エピトープ候補としてみなされた。2つの追加的な支持解析を行なった。まず、複数の同定された箇所が1つの不連続なエピトープを形成できるかどうかを調査した。これは、相同的構造の1XU2.pdbを通して行なった。第2に、複数の同定された結合部分が、別の部分の支持なしに認識されるかどうかを調査した。3D構造上の共局在化および非依存的認識というこれらの2つのパラメータが、立体構造かつ不連続なエピトープが同定されたことを支持するために用いられた。hAPRIL.01Aについては、IRSMPSPDRA (配列番号33) に結合し、コア領域はSMPSP (配列番号34) であるとして判定された。TLFR (配列番号35) および/またはQDVTFTMGQ (配列番号36) (コア領域はVTFTM (配列番号37)) モチーフは、hAPRIL.01Aの結合を支持することが示された。hAPRIL.03Aは、VSREGQGRQ (配列番号38) モチーフに結合し、コア領域はEGQであることが示された。TFTMGQ (配列番号39) モチーフは、hAPRIL.03Aの結合を支持することが示された。

10

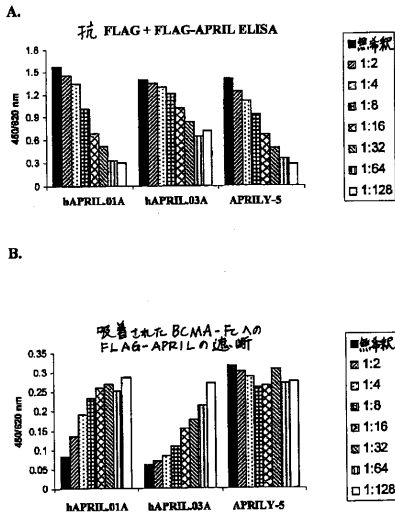
20

30

40

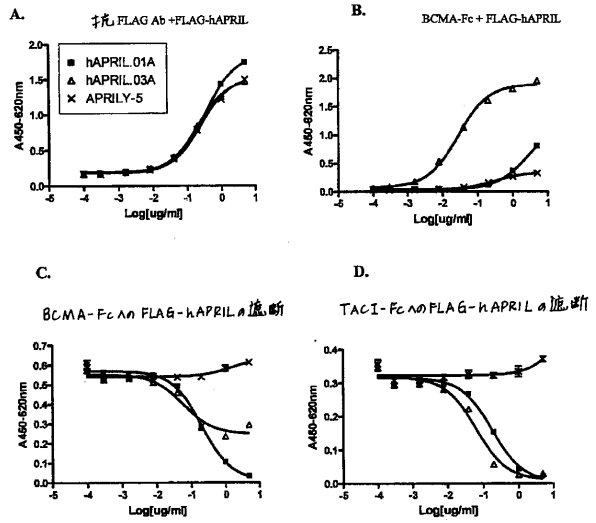
【 図 1 】

Figure 1.



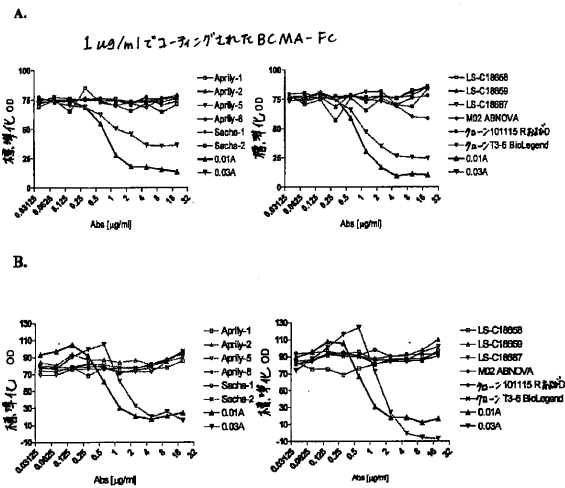
【 図 2 】

Figure 2.



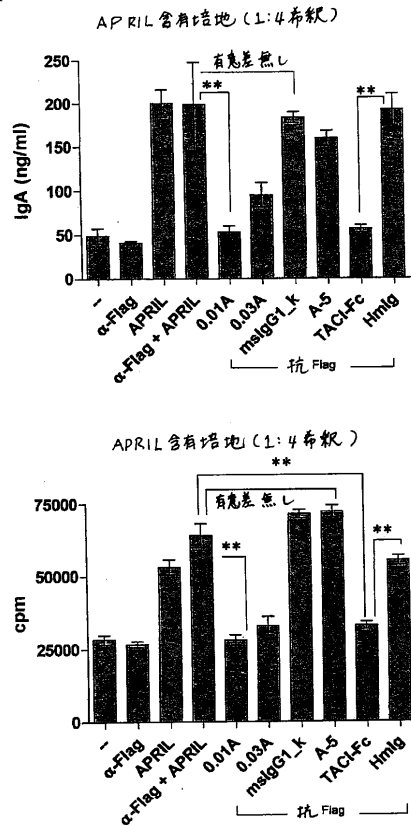
【 図 3 】

Figure 3.



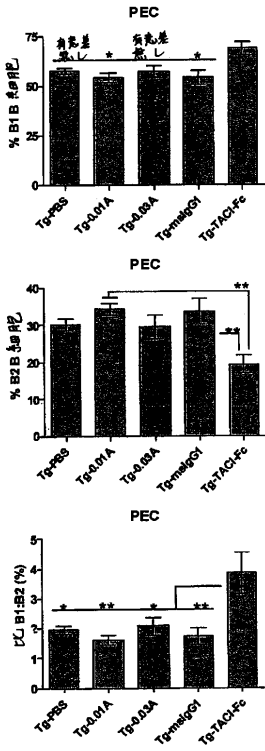
【 図 4 A 】

Figure 4. A



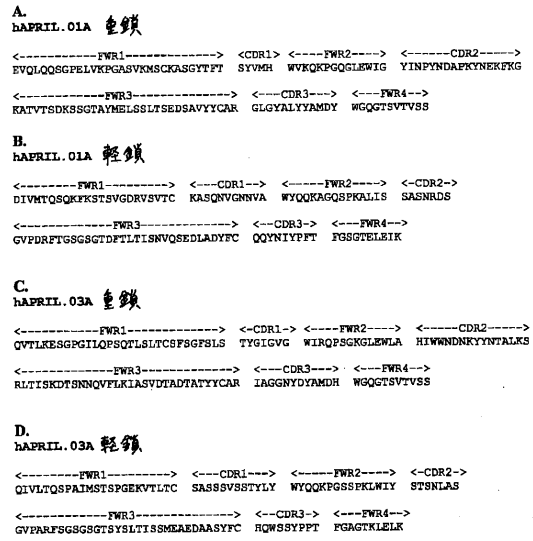
【 図 6 B 】

Figure 6. B



【 図 7 】

Figure 7.



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/02	A
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

(72)発明者 エネナム, ファン・ハンス

オランダ、エン・エル - 5 4 3 0 ベー・ハー オス、ペー・オー・ボックス・2 0

(72)発明者 グアダニョーリ, マルコ

オランダ、エン・エル - 1 1 0 5 アー・ゼット アムステルダム、マイベルグドレーフ、9

(72)発明者 キンバリー, フィオナ・クレア

オランダ、エン・エル - 1 1 0 5 アー・ゼット アムステルダム、マイベルグドレーフ、9

(72)発明者 ファン, ウィエン・トゥロン

アメリカ合衆国、0 2 1 4 1 マサチューセッツ州、ケンブリッジ、ベント・ストリート、3 2 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA53 CA04 CA20 EA04 GA03 GA10

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE10 CE12 DA01

4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA92X AB01 AB05 BA02 BA08 CA25

CA44

4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 BB41 BB43 BB50 CC23 DD62 EE01

GG02 GG03 GG04 GG08 HH03 KA03 KA04 KA05 KA29 KB82

KB91 LL18

4H045 AA11 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	增殖诱导配体抗体 (APRIL)		
公开(公告)号	JP2015172073A	公开(公告)日	2015-10-01
申请号	JP2015117303	申请日	2015-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	生物诺维对控股贝丝·罗特NFU日元笔记本闭嘴 BIONOVION控股		
申请(专利权)人(译)	Baionobion控股Besuroten和非日元纸币闭嘴		
[标]发明人	メデマヤンパウル エネナムファンハンス グアダニョーリマルコ キンバリーフィオナクレア ファンウィエントウロン		
发明人	メデマ,ヤン・パウル エネナム,ファン・ハンス グアダニョーリ,マルコ キンバリー,フィオナ・クレア ファン,ウィエン・トゥロン		
IPC分类号	C07K16/28 A61K39/395 A61P37/06 A61P35/00 A61P29/00 A61P43/00 A61K51/00 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P29/00 C07K16/2875 C07K2317/34 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2319/30 C07K2319/32 C07K16/241 C07K16/2878 G01N33/6863		
FI分类号	C07K16/28.ZNA A61K39/395.N A61P37/06 A61P35/00 A61P29/00 A61P43/00.105 A61K49/02.A C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 G01N33/53.D A61K51/00 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/04.320 A61K51/08.200 A61K51/10.200 C12N15/06.100 C12N15/13 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA10 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/CE12 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4C085/HH03 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KA05 4C085/KA29 4C085/KB82 4C085/KB91 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
优先权	2009154079 2009-03-02 EP 2009157722 2009-04-09 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及与人APRIL结合的结合化合物。更具体地，本发明提供了抗APRIL特异性抗体的组合物和使用这些抗体调节APRIL生物活性的方法，特别是在炎症性疾病中，抑制细胞增殖和癌症。

(21) 出願番号	特願2015-117303 (P2015-117303)	(71) 出願人	512333423
(22) 出願日	平成27年6月10日 (2015. 6. 10)		バイオノビオン・ホールディング・ベスロ ーテン・フエンノトシャップ
(62) 分割の表示	特願2011-552389 (P2011-552389) の分割		BIONOVION HOLDING B . V.
原出願日	平成22年2月23日 (2010. 2. 23)		オランダ、エン・エル-5349・アー セー オス、モーレンベーク、79、オス ・ライフ・サイエンシズ・パーク、エル ・エー・1129
(31) 優先権主張番号	09154079.9		
(32) 優先日	平成21年3月2日 (2009. 3. 2)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	09157722.1		
(32) 優先日	平成21年4月9日 (2009. 4. 9)	(74) 代理人	110001195
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		特許業務法人深見特許事務所
		(72) 発明者	メデマ、ヤン・バウル
			オランダ、エン・エル-1105 アー ゼット アムステルダム、マイベルグドレ ーフ、9
			最終頁に続く