

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-522961

(P2019-522961A)

(43) 公表日 令和1年8月22日(2019.8.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13 ZNA	4B064
C12N 15/63 (2006.01)	C12N 15/63 Z	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4H045
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-558735 (P2018-558735)
 (86) (22) 出願日 平成29年5月5日(2017.5.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年1月7日(2019.1.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/031281
 (87) 国際公開番号 WO2017/196663
 (87) 国際公開日 平成29年11月16日(2017.11.16)
 (31) 優先権主張番号 62/333,470
 (32) 優先日 平成28年5月9日(2016.5.9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 391015708
 ブリストル・マイヤーズ スクイブ カンパニー
 BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
 アメリカ合衆国08543ニュージャージー州 プリンストン、ルート206アンド・プロビンス・ライン・ロード
 (74) 代理人 100145403
 弁理士 山尾 憲人
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TL1A抗体およびその使用

(57) 【要約】

TL1Aとしても知られる、受容体TNFスーパーファミリメンバー15(TNFSF15)に特異的に結合する抗体が開示される。抗TL1A抗体を作製および使用する方法もまた記載される。

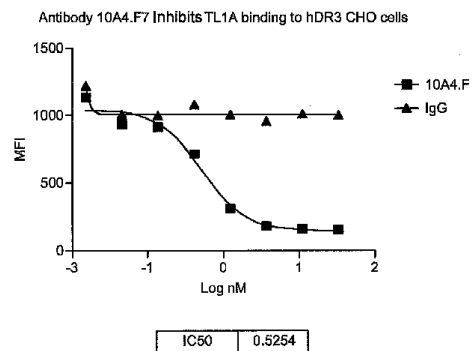


FIG. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体 10A4 と、ヒト T L 1 A (I g および I T I M ドメインを有する T 細胞免疫受容体) への結合について競合する、単離抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

1 以上の残基 102 - 116 (配列番号 16) または 166 - 180 (配列番号 17) を含むエピトープで T L 1 A に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

1 以上の残基 ¹⁶⁹ Q A G R ¹⁷² および 1 以上の残基 ¹¹³ K N Q F ¹¹⁶ を含むエピトープで T L 1 A に結合する、請求項 2 に記載の単離抗体または抗原結合断片。 10

【請求項 4】

配列 ¹⁶⁹ Q A G R ¹⁷² および / または ¹¹³ K N Q F ¹¹⁶ を含むエピトープで T L 1 A に結合する、請求項 2 に記載の単離抗体または抗原結合断片。

【請求項 5】

D R 3 へのヒト T L 1 A の結合を実質的に阻害する、先行する請求項のいずれか一項に記載の単離抗体または抗原結合断片。

【請求項 6】

ヒトおよびカニクイザル T L 1 A の両方に結合する、請求項 1 - 4 のいずれか一項に記載の単離抗体または抗原結合断片。

【請求項 7】 20

抗体 10A4 がさらに

- a) 以下を含む重鎖可変ドメイン :
- i) 配列番号 7 の配列を含む C D R H 1 ;
 - i) 配列番号 8 の配列を含む C D R H 2 ; および
 - i) 配列番号 9 の配列を含む C D R H 3 ;

および

- b) 以下を含む軽鎖可変ドメイン :
- i) 配列番号 12 の配列を含む C D R L 1 ;
 - i) 配列番号 13 の配列を含む C D R L 2 ; および
 - i) 配列番号 14 の配列を含む C D R L 3

を含む、請求項 1 に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。 30

【請求項 8】

a) 重鎖が、配列番号 6 の配列と少なくとも 80% 配列同一性を有する重鎖可変領域を含み ; および

a) 軽鎖が、配列番号 11 の配列と少なくとも 80% 配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む、

1 以上の重鎖および 1 以上の軽鎖を含む、請求項 7 に記載の単離抗体または抗原結合断片。

【請求項 9】 40

抗体が、

- a) 以下を含む重鎖可変ドメイン :
- i) 配列番号 7 の配列を含む C D R H 1 ;
 - i) 配列番号 8 の配列を含む C D R H 2 ; および
 - i) 配列番号 9 の配列を含む C D R H 3 ;

および

- b) 以下を含む軽鎖可変ドメイン :
- i) 配列番号 12 の配列を含む C D R L 1 ;
 - i) 配列番号 13 の配列を含む C D R L 2 ; および
 - i) 配列番号 14 の配列を含む C D R L 3、

を含む 10A4 であって、 50

ここで、抗体または断片がDR3へのヒトTL1Aの結合を実質的に阻害する、単離抗体またはその抗原結合断片。

【請求項10】

a) 重鎖が、配列番号6の配列と少なくとも80%配列同一性を有する重鎖可変領域を含み；および

a) 軽鎖が、配列番号11の配列と少なくとも80%配列同一性を有する軽鎖可変領域を含み、

抗体または断片がDR3へのヒトTL1Aの結合を実質的に阻害する、

1以上の重鎖および1以上の軽鎖を含む、請求項9に記載の単離抗体または抗原結合断片。

10

【請求項11】

抗体が、減少したまたは除去されたエフェクター機能を有するヒトIgG1Fcバリエーションである、先行する請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項12】

先行する請求項のいずれかに記載の抗原結合断片の抗体の重および/または軽鎖可変領域をコードする核酸。

【請求項13】

請求項12に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項14】

請求項13に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

20

【請求項15】

請求項14に記載の宿主細胞を、抗体または断片の産生を可能にする条件下で培養すること、および細胞から抗体を精製することを含む、抗TL1A抗体またはその抗原結合断片の製造方法。

【請求項16】

抗体またはその抗原結合断片とTL1A間で複合体の形成を可能にする条件下で、試料を請求項1-11のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片と接触させることを含む、試料におけるTL1Aの存在を検出し、複合体の形成を検出する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、TL1Aに対する抗体、ならびにかかる抗体を作製および使用方法に関する。該抗体は免疫系疾患を治療することにおいて特に有用であると予想される。

【背景技術】

【0002】

腫瘍壊死因子(TNF)に構造的に関連するタンパク質は、総称してTNFスーパーファミリーと呼ばれる。TNFスーパーファミリーメンバーであるTL1Aは、細胞死ドメイン受容体(DR)3に結合し、活性化リンパ球に共刺激シグナルを提供するTNF様サイトカインである。この相互作用を介して、TL1Aは、IFN-ガンマの分泌を誘導し、したがって、Tヘルパー1型エフェクター応答の発生に関与し得る。

40

【0003】

TL1AはII型膜貫通タンパク質であり、かつTNFスーパーファミリーメンバー15(TNFSF15)と命名されている。TL1Aは、内皮細胞および単球によって主に発現され、その発現はTNF-aおよびIL-1a(Migone et al., *Immunity*, 16:479-92(2002))により誘導される。TL1Aは炎症性サイトカインTNFおよびIL-1によって、また免疫複合体(IC)によっても、アップレギュレートされる(Hsu et al., *Exp. Cell Res.*, 292:241-51(2004))。

【0004】

TL1Aは、そのコグネイト受容体DR3(その活性化が死および生存因子両方を誘導

50

することが既知の死受容体)を介してシグナル伝達を媒介する。TL1Aはまた、TNFと同様に、ホモ三量体の可溶型として循環すると推定される(Kim et al., J. Immunol. Methods, 298(1-2):1-8(March 2005))。

【0005】

TL1Aは、TNF受容体ファミリーを含有する死ドメインのメンバーである細胞死受容体3(DR3)に高親和性で結合し、Wsl-1、Apo-3、TRAMP、およびLARDとも呼ばれ、今やTNF受容体スーパーファミリーメンバー25(TNFRSF25)と命名されている。細胞の状況に依存して、TL1AによるDR3のライゲーションは、2つのシグナル経路の1つ、転写制御因子NF-kBの活性化またはカスパーゼおよびアポトーシスの活性化を引き起こすことができる。TL1Aは、T細胞共刺激およびTh1極性化において機能する。活性化されたT細胞上で、TL1Aは、その表面結合受容体DR3を介して特異的に機能し、細胞生存および炎症性サイトカインの分泌を促進する。腫瘍壊死因子受容体(TNFR)スーパーファミリーの可溶性タンパク質である、分泌されたデコイ受容体3(DcR3)は、TL1Aの作用をブロックする(Kim et al., "Identification of naturally secreted soluble form of TL1A, a TNF-like cytokine," J Immunol Methods, 298:1-8(2005))。

10

【0006】

従って、アレルギー/喘息、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス(SLE)、乾癬、1型糖尿病および移植片拒絶などの、様々な炎症性および免疫疾患および障害の治療において使用され得る組成物が、当技術分野で依然として必要とされる。TL1Aに対するモノクローナル抗体に関する本発明は、この必要性を満たす。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、ヒトTL1Aに特異的に結合し、かつDR3への結合をブロックし、それによってTL1A発現細胞においてそうでなければ生じるであろう免疫刺激シグナルを阻害する、単離抗体およびその抗原結合断片に関する。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、抗体10A4とヒトTL1Aへの結合について競合する、単離抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0009】

本発明は、1以上の残基102-116(配列番号16)または166-180(配列番号17)を含むエピトープでTL1Aに結合する、単離抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0010】

本発明は、¹⁶⁹QAGR¹⁷²の1以上の残基および¹¹³KNQF¹¹⁶の1以上の残基を含むエピトープでTL1Aに結合する単離抗体またはその抗原結合断片を含む。本発明の実施形態は、配列¹⁶⁹QAGR¹⁷²または¹¹³KNQF¹¹⁶を含むエピトープでTL1Aに結合する単離抗体またはその抗原結合断片を含む。本発明の実施形態は、配列¹⁶⁹QAGR¹⁷²および¹¹³KNQF¹¹⁶を含むエピトープでTL1Aに結合する単離抗体またはその抗原結合断片を含む。

40

【0011】

本発明は、DR3へのヒトTL1Aの結合を実質的に阻害する、単離抗TL1A抗体またはその抗原結合断片を含む。本発明の実施形態は、ヒトおよびカニクイザルTL1Aの両方に結合する単離抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0012】

50

本発明は、配列番号7に示されるCDRH1配列；配列番号8に示されるCDRH2配列；および配列番号9に示されるCDRH3配列を含む重鎖可変ドメインを含むTL1Aに結合する、単離抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0013】

本発明は、配列番号12に示されるCDRL1配列；配列番号13に示されるCDRL2配列；および配列番号14に示されるCDRL3配列を含む軽鎖可変ドメインを含むTL1Aに結合する、単離抗体またはその抗原結合断片を含む。

【0014】

本発明の実施形態は、配列番号7に示されるCDRH1配列；配列番号8に示されるCDRH2配列；および配列番号9に示されるCDRH3配列を含む重鎖可変ドメインならびに配列番号12に示されるCDRL1配列；配列番号13に示されるCDRL2配列；および配列番号14に示されるCDRL3配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、TL1Aに結合する単離抗体またはその抗原結合断片を含む。

10

【0015】

本発明は、1以上の重鎖および1以上の軽鎖を含む単離抗体または抗原結合断片を含み、ここで、重鎖は、配列番号6の配列と少なくとも80%配列同一性を有する重鎖可変領域を含み；および軽鎖は、配列番号11の配列と少なくとも80%配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。

【0016】

本発明は、抗体または断片の重および/または軽鎖可変領域をコードする発現ベクターで形質転換された宿主細胞を抗体または断片を生産できる条件下で培養し、かつ細胞から抗体を精製することを含む、抗TL1A抗体またはその抗原結合断片の製造方法を含む。

20

【0017】

本発明の実施形態は、試料を抗体、または断片およびTL1A間に複合体の形成を可能にする条件下で本発明のTL1A抗体、または抗原結合断片と接触させることを含む、試料におけるTL1Aの存在を検出する方法、および複合体の形成を検出する方法を含む。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、TL1A CHO細胞上のモノクローナル抗体10A4・F7の滴定を示す。TL1A抗体の希釈液を1時間100 μ lのFACS緩衝液において10⁵ TL1A CHO細胞とインキュベートした。細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、PE抗ヒトGig (Face specific)での染色により抗体結合を検出し、かつFACSにより評価した。EC50は0.40nMである。

30

【図2】図2は、抗体10A4・F7によるhDR3 CHO細胞へのTL1A結合の阻害を示す。200ng/ml (50 μ l)のTL1A SH6を10A4・F7 (50 μ l)抗体またはコントロールIgG1抗体 (FACS緩衝液における全試薬)の希釈液とインキュベートした。混合物を30分間インキュベートし、次いで、100 μ lのFACS緩衝液中の10⁵ hDR3 CHO細胞に加え、1時間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液中で2回洗浄し、PE抗6xHis抗体 (R&D系)で細胞を染色することによりDR3 CHO細胞へのTL1A結合を検出し、FACSにより評価した。この実験におけるIC50は、0.524nMであった。

40

【図3】図3は、センサーグラムを示す。プロテインG表面上に捕捉された10A4・F7とのHu-TL1A-His (250、200、150、100および50n)

【図4】図4は、結合ダイアグラムを示す。

【図5】図5は、DSCによる10A4・F7の物理的安定性を示す。

【図6】図6は、TL1A・2-g4Pカップ軽鎖ヌクレオチド (配列番号1) およびアミノ酸配列 (配列番号2)を示す。

【図7】図7は、重鎖ヌクレオチド (配列番号3) およびアミノ酸配列 (配列番号4)を示す。

【図8】図8は、10A4・F7 VH1領域ヌクレオチド (配列番号5) およびアミノ

50

酸配列（配列番号6）を示す。CDRH1（配列番号7）、CDRH2（配列番号8）およびCDRH3（配列番号9）が示される。

【図9】図9は、10A4.F7.VL1領域ヌクレオチド（配列番号10）およびアミノ酸配列（配列番号11）を示す。CDRL1（配列番号12）、CDRL2（配列番号13）およびCDRL3（配列番号14）が示される。

【図10】図10は、10A4のHDX-MSエピトープマッピングを示す。エピトープ領域は、下線が引かれている。アミノ酸85-101（配列番号15）、102-116（配列番号16）および166-180（配列番号17）。

【図11】図11は、TL1Aのアミノ酸102-116および166-180である2つのペプチド領域の代表的なHDX動態曲線は、10A4による有意な保護を示したことを示す（青色曲線対赤色曲線）。非エピトープ領域72-84（配列番号18）は、一方で、mAb結合時の重水素取り込みにおいて変化を示さなかった。

【図12】図12は、TL1A構造上にマッピングされたHDXにより同定されたTL1Aの2つの領域を示す。

【図13】図13は、TL1Aにおける非連続的なエピトープが重鎖および軽鎖の両方からの相互作用を必要とするであろうことを示す10A4 mAbについてFABモデル（赤=H鎖、ピンク=L鎖）でのTL1A三量体を示す。ペプチド領域1（マゼンタ色）およびペプチド領域2（青色）は、溶媒に曝露された非連続的なエピトープを形成する。

【発明を実施するための形態】

【0019】

発明の詳細な説明

本発明は、ヒトTL1Aに特異的に結合し、かつDR3への結合をブロックし、それによってTL1A発現細胞においてそうでなければ生じるであろう免疫刺激シグナルを阻害する、単離抗体、特にモノクローナル抗体、例えばヒトモノクローナル抗体を開示する。単離抗体、かかる抗体の製造方法ならびに抗体または断片を含有するように製剤化された医薬組成物が、本明細書に提供される。免疫抑制のための抗体単独で、または他の免疫抑制剤と組み合わせて使用する方法もまた、本明細書に提供される。従って、本明細書中に記載される抗hUTL1A抗体は、例えば、免疫系疾患を治療することを含む広範な治療適用に使用されてもよい。

【0020】

定義

本明細書中で使用される「抗体」という用語は、抗体全体および任意の抗原結合断片（すなわち、「抗原結合部分」）またはそれらの一本鎖を含んでもよい。一実施形態では、「抗体」は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を含む糖タンパク質またはその抗原結合断片を指す。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書中で V_H と略記される）および重鎖定常領域から構成される。或る天然に存在するIgG、IgDおよびIgA抗体では、重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2およびCH3から構成される。或る天然に存在する抗体では、各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書中で V_L と略記される）および軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、CLから構成される。 V_H および V_L 領域は、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域とフレームワーク領域（FR）と呼ばれる、より保存的散在性の領域にさらに細分化され得る。各 V_H および V_L は、以下の順：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端に配置された3つのCDRおよび4つのフレームワーク領域（FR）から構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、様々な免疫系の細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的な補体系の第一成分（C1q）を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介してもよい。

【0021】

抗体は、典型的には、 $10^{-7} \sim 10^{-11}$ M以下の解離定数（ K_D ）により反映される高親和性でそれらのコグネイト抗原に特異的に結合する。約 10^{-6} Mより大きい任意

10

20

30

40

50

の K_D は、一般に、非特異的な結合を示すと考えられる。本明細書中で使用されるように、抗原に「特異的に結合する」抗体は、高親和性で抗原および実質的に同一の抗原に結合する抗体を指し、それは 10^{-7} M以下、好ましくは 10^{-8} M以下、さらにより好ましくは 5×10^{-9} M以下、および最も好ましくは 10^{-8} Mおよび 10^{-10} M間以下の K_D を有することを意味し、無関係の抗原には高親和性で結合しない。所定の抗原と高度の配列同一性を示す場合、例えば、所定の抗原の配列と少なくとも80%、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、またはさらにより好ましくは少なくとも99%配列同一性を示す場合、抗原は、所定の抗原と「実質的に同一」である。例として、ヒトTL1Aに特異的に結合する抗体はまた、或る非ヒト霊長類種（例えば、カニクイザル）からのTL1Aと交差反応してもよいが、他の種からのTL1A、またはTL1A以外の抗原と交差反応しない。

10

【0022】

免疫グロブリンは、IgA、分泌IgA、IgGおよびIgMを含むが、これらに限定されない任意の一般に既知のアイソタイプに由来してもよい。IgGアイソタイプは、或る種における以下のサブクラスに分けられる：ヒトにおけるIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4、ならびにマウスにおけるIgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3。免疫グロブリン、例えば、ヒトIgG1はいくつかのアロタイプの存在し、最大で数個のアミノ酸において互いに異なる。「抗体」は、例として、モノクローナルおよびポリクローナル抗体；キメラおよびヒト化抗体；ヒトおよび非ヒト抗体；全合成抗体；ならびに一本鎖抗体を含んでもよい。

20

【0023】

本明細書中で使用される抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」という用語は、抗原（例えば、ヒトTL1A）に特異的に結合する能力を保持する抗体の1以上の断片を指す。抗体の「抗原結合部分/断片」という用語内に包含される結合断片の例は、以下を含む(i) Fab断片-V_L、V_H、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片；(ii) F(ab')₂断片-ヒンジ領域でのジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価断片；(iii) V_HおよびCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単一のアームのV_LおよびV_HドメインからなるFv断片、および(v) V_HドメインからなるdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)。単離相補性決定領域(CDR)、または合成リンカーにより連結された2以上の単離CDRの組み合わせは、抗原に結合できる場合、抗体の抗原結合ドメインを含んでもよい。

30

【0024】

別段の指示がない限り、「抗体または断片」が、「抗体またはその抗原結合断片」と同一の意味を有するように、「断片」という用語は、請求項等で抗体について使用される場合、抗体の抗原結合断片を指す。

【0025】

本明細書中で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、特定のエピトープについて単一の結合特異性および親和性を示す抗体または全ての抗体が特定のエピトープについて単一の結合特異性および親和性を示す抗体の組成物を指す。典型的には、かかるモノクローナル抗体は、単一の細胞または抗体をコードする核酸に由来し、かつ、任意の配列変化を意図的に導入することなく増殖されるだろう。従って、「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および任意の定常領域を有するモノクローナル抗体を指す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、ハイブリドーマより産生され、例えば、トランスジェニックまたは導入染色体(transchromosomal)非ヒト動物（例えば、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウス）から得られるB細胞を不死化細胞に融合することにより得られる。

40

【0026】

本明細書中で使用される「組み換えヒト抗体」という用語は、組み換え手段により調製

50

され、発現され、作製され、または単離された全てのヒト抗体、例えば、(a) ヒト免疫グロブリン遺伝子についてのトランスジェニックまたは導入染色体 (transchromosomal) である動物 (例えば、マウス) またはそれから調製されたハイブリドマから単離された抗体、(b) 抗体を発現するよう形質転換された宿主細胞、例えば、トランスフェクターマから単離された抗体 (c) 組み換え、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、および (d) 他の DNA 配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含む任意の他の手段により調製され、発現され、作製され、または単離された抗体、を含む。かかる組み換えヒト抗体は、生殖系列遺伝子によりコードされた特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列を利用する可変および定常領域を含むが、例えば、抗体成熟の間にかかるその後の再編成および変異を含む。当技術分野で知られるように (例えば、Lonberg (2005) Nature Biotech. 23 (9) : 1117 - 1125 参照)、可変領域は、抗原結合ドメインを含有し、外来抗原に特異的な抗体を形成するよう再編成する様々な遺伝子によりコードされている。再編成に加えて、可変領域は、外来抗原への抗体の親和性を増加させるために、複数の単一アミノ酸変化 (体細胞突然変異または超変異と呼ばれる) によりさらに改変され得る。定常領域は、抗原にさらに応答して変化 (すなわち、アイソタイプスイッチ)。従って、抗原に 10 応答して軽鎖および重鎖免疫グロブリンポリペプチドをコードする、再編成され、かつ体細胞変異した核酸配列は、最初の生殖系列配列と同一でなくてもよく、代わりに実質的に同一、または類似している (すなわち、少なくとも 80% の同一性を有する)。

【0027】

「ヒト」抗体 (HuMAb) は、フレームワークおよび CDR 領域の両方が、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を指す。さらに、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域はまた、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する。本明細書中に記載される抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基を含んでもよい (例えば、インビトロのランダムまたは部位特異的な突然変異誘発によって、またはインビボでの体細胞突然変異によって導入される変異)。しかしながら、本明細書中で使用される「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来する CDR 配列が、ヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含むことを意図しない。「ヒト」抗体および「完全ヒト」抗体という用語は、同義語として 20 使用される。

【0028】

「抗原を認識する抗体」および「抗原に特異的な抗体」という語句は、本明細書において「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と互換的に使用される。

【0029】

本明細書中で使用される「単離抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を意味することを意図する (例えば、TL1A に特異的に結合する単離抗体は、TL1A 以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。しかしながら、TL1A のエピトープに特異的に結合する単離抗体は、異なる種からの他の TL1A タンパク質への交差反応性を有してもよい。

【0030】

本明細書中で使用されるように、「DR3 への TL1A の結合を阻害する」抗体は、当該分野で認識されている方法、例えば、FACS - ベースの細胞 - 結合アッセイで約 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、約 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、または約 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下などの約 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の EC50 を有する、ヒト DR3 へのヒト TL1A の結合を阻害する抗体を指す。

【0031】

10

20

30

40

50

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、免疫グロブリンまたは抗体が特異的に結合する抗原（例えば、TL1A）上の部位を指す。タンパク質抗原内のエピトープは、連続アミノ酸（通常直鎖状エピトープ）またはタンパク質の3次ホールディングにより並置された不連続アミノ酸（通常、立体構造エピトープ）の両方から形成され得る。連続アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、必ずしもそうであるとは限らないが、変性溶媒への曝露の際に保持され、一方で、3次ホールディングにより形成されたエピトープは典型的には、変性溶媒での処理の際に失われる。エピトープは、典型的には、固有の空間的な立体配座における少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15アミノ酸を含む。

【0032】

「エピトープマッピング」という用語は、抗体-抗原認識に關与する抗原上の分子決定基の同定のプロセスを指す。所定の抗体により結合されるエピトープを決定する方法は、当技術分野で周知あり、かつ例えば、イムノプロットイングおよび免疫沈降アッセイ、ここで、オーバーラップまたは連続ペプチド（例えば、TL1Aからの）は、所定の抗体（例えば、抗TL1A抗体）との反応性について試験される；X線結晶学；2次元核磁気共鳴；酵母ディスプレイ；およびHDX-MS（本明細書の実施例8参照）を含む；（例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)参照）。

【0033】

2以上の抗体に關して「同一のエピトープに結合する」という用語は、所定の方法により決定されるように抗体がアミノ酸残基の同一のセグメントに結合することを意味する。本明細書中に記載される抗体で、抗体が「TL1A上の同一のエピトープ」に結合するかどうかを決定する技術は、例えば、エピトープの原子分解能を提供する抗原：抗体複合体の結晶のX線解析および水素/重水素交換質量分析（HDX-MS）（本明細書実施例8参照）などのエピトープマッピング方法を含む。他の方法は、抗原断片（例えばタンパク質分解断片）または抗原の変異したバリエーションへの抗体の結合をモニターする、ここで、抗原配列内のアミノ酸残基の改変に起因する結合の喪失はよくエピトープ成分の指標と考えられる、例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発（Cunningham & Wells (1985) Science 244:1081）または変異標的配列バリアントの酵母ディスプレイなど。加えて、エピトープマッピングのための計算コンビナトリアル法もまた、使用され得る。これらの方法は、組み合わせのファージディスプレイペプチドライブラリーから特異的な短いペプチドをアフィニティー分離する目的の抗体の能力に依存する。VHおよびVLと同一のもしくは密接に關する、または同一のCDR1、2および3配列を有する抗体は、同一のエピトープに結合することが予想される。

【0034】

「標的への結合について別の抗体と競合する」抗体は、標的への他の抗体の結合を阻害する（部分的にまたは完全に）抗体を指す。2つの抗体が標的への結合について互いに競合するかどうか、すなわち、1の抗体が標的への他の抗体の結合を阻害するかどうか、およびその程度は、既知の競合実験を使用して決定されてもよい。或る実施形態では、抗体は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%まで標的と競合し、かつ標的への別の抗体の結合を阻害する。阻害または競合のレベルは、どの抗体が「ブロック抗体」（すなわち、標的と最初にインキュベートされるコールド抗体（cold antibody））であるかに依存して異なってもよい。競合アッセイは、例えば、Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb. Protoc.; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277またはEd Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999による「Using Antibodies」の11章に記載されるように行われ得る。競合する抗体は、同

10

20

30

40

50

一のエピトープ、オーバーラップエピトープまたは隣接するエピトープ（例えば、立体障害によって示される）に結合する。

【0035】

他の競合結合アッセイは、固相直接の、または間接のラジオイムノアッセイ（RIA）、固相直接の、または間接の酵素イムノアッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（Stahli et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242 参照）；固相直接のビオチン-アビジンEIA（Kirkland et al. (1986) *J. Immunol.* 137:3614 参照）；固相直接の標識化アッセイ、固相直接の標識化サンドイッチアッセイ（Harlow and Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press 参照）；I-125 標識を使用する固相直接の標識RIA（Morel et al. (1988) *Mol. Immunol.* 25(1):7 参照）；固相直接のビオチン-アビジンEIA（Cheung et al. (1990) *Virology* 176:546）；および直接の標識化RIA（Moldenhauer et al. (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77）を含む。

10

【0036】

本明細書中で使用される「特異的な結合」、「選択的な結合」、「選択的に結合する」、および「特異的に結合する」という用語は、他の抗原ではなく所定の抗原上のエピトープへの抗体結合を指す。典型的には、抗体は、(i) 例えば、分析物として所定の抗原、例えば、組み換えヒトTL1Aおよびリガンドとして抗体を使用するBIACORE（登録商標）2000表面プラズモン共鳴機器における表面プラズモン共鳴（SPR）技術または抗原陽性細胞への抗体の結合のスクッチャード分析（Scatchard analysis）により決定される場合、約 10^{-7} M未満、例えば約 10^{-8} M、 10^{-9} Mまたは 10^{-10} M未満またはさらに低い平衡解離定数（ K_D ）で結合し、かつ(ii) 所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的な抗原（例えば、BSA、カゼイン）への結合についてその親和性より少なくとも2倍大きい親和性で、所定の抗原に結合する。従って、「ヒトTL1Aに特異的に結合する」抗体は、 10^{-7} M以下、例えば約 10^{-8} M、 10^{-9} Mまたは 10^{-10} M未満またはさらに低い K_D で可溶性または細胞結合ヒトTL1Aに結合する抗体を指す。「カニクイザルTL1Aと交差反応する」抗体は、 10^{-7} M以下、例えば約 10^{-8} M、 10^{-9} Mまたは 10^{-10} M未満またはさらに低い K_D でカニクイザルTL1Aに結合する抗体を指す。

20

30

【0037】

本明細書中で使用される「kassoc」または「 k_a 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の結合速度定数を指し、一方で、本明細書中で使用される「kdis」または「 k_d 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数を指す。本明細書中で使用される「 K_D 」という用語は、平衡解離定数を指し、 k_d と k_a の比（すなわち、 k_d/k_a ）から得られ、かつモル濃度（M）として表される。抗体についての K_D 値は、当技術分野で確立した方法を使用して決定され得る。抗体の K_D を決定する好ましい方法は、表面プラズモン共鳴を使用して、好ましくはBIACORE（登録商標）表面プラズモン共鳴系またはフローサイトメトリーおよびスクッチャード分析などのバイオセンサー系を使用することによる。

40

【0038】

抗体またはその抗原結合断片を使用するインビトロの、またはインビボでのアッセイの文脈における「EC50」という用語は、最大応答の50%、すなわち最大応答およびベースラインの間である応答を誘導する、抗体またはその抗原結合断片の濃度を指す。

【0039】

「固定化されたTL1Aに結合する」という用語は、例えば、細胞の表面に発現された、または固体支持体に結合されたTL1Aに結合する本明細書中に記載される抗体の能力を指す。

50

【0040】

本明細書中で使用される「交差反応」という用語は、異なる種からのTL1Aに結合する本明細書中に記載される抗体の能力を指す。例えば、ヒトTL1Aに結合する本明細書中に記載される抗体はまた、別の種からのTL1A（例えば、カニクイザルTL1A）に結合してもよい。本明細書中で使用されるように、交差反応性は、結合アッセイ（例えば、SPR、ELISA）において精製された抗原との特異的な反応性を検出する、またはTL1Aを生理学的に発現する細胞と結合するもしくはそうでなければ機能的に相互作用することにより測定されてもよい。交差反応性を決定する方法は、本明細書中に記載される標準的な結合アッセイ、例えば、BIACORE（登録商標）2000 SPR機器（Biacore AB, Uppsala, Sweden）を使用するBIACORE（登録商標）表面プラズモン共鳴（SPR）解析、またはフローサイトメトリー技術を含む。

10

【0041】

本明細書中で使用される対象物に適用される「天然に存在する」という用語は、対象物が自然界に見出され得るという事実を指す。例えば、自然界の供給源から単離され得る生物（ウイルスを含む）に存在し、実験室で人間により意図的に改変されていないポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。

【0042】

「ポリペプチド」は、鎖の長さ上限に上限はなく、少なくとも2つの連続的に連結されたアミノ酸残基を含む鎖を指す。タンパク質における1以上のアミノ酸残基は、グリコシル化、リン酸化またはジスルフィド結合に限定されない改変を含有してもよい。「タンパク質」は、1以上のポリペプチドを含んでもよい。

20

【0043】

本明細書中で使用される「核酸分子」という用語は、DNA分子およびRNA分子を含むことを意図する。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であってもよくかつ、cDNAであってもよい。

【0044】

本明細書に提供される抗体配列への「保存的配列改変」、すなわちヌクレオチド配列によりコードされた、またはアミノ酸配列を含有する抗体の抗原への結合を抑制しないヌクレオチドおよびアミノ酸配列改変もまた提供される。例えば、改変は、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介変異誘発などの当技術分野で既知の標準技術により導入され得る。保存的配列改変は、保存的アミノ酸置換を含み、アミノ酸残基は類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。したがって、抗TL1A抗体における予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは同一の側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置換される。抗原結合を除去しないヌクレオチドおよびアミノ酸保存的置換を同定する方法は、当技術分野で周知である。例えば、Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al. Protein Eng. 12(10): 879-884 (1999); および Burks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997) 参照。

30

40

【0045】

あるいは、別の実施形態では、変異は、飽和突然変異誘発などにより抗TL1A抗体コーディング配列の全てまたは一部に沿ってランダムに導入され得、かつ得られた改変抗TL1A抗体は、改善された結合活性についてスクリーニングされ得る。

50

【0046】

核酸について、「実質的な相同性」という用語は、最適にアラインメントされかつ比較される場合、2つの核酸、またはその指定された配列が、適切なヌクレオチド挿入または欠失を有し、少なくとも約80%ヌクレオチド、通常少なくとも約90% - 95%、およびより好ましくは少なくとも約98% - 99.5%ヌクレオチドと同一であることを示す。あるいは、セグメントが選択的なハイブリダイゼーション条件下で鎖の相補鎖にハイブリダイズする場合、実質的な相同性が存在する。

【0047】

ポリペプチドについて、「実質的な相同性」という用語は、最適にアラインメントされかつ比較される場合、2つのポリペプチド、またはその指定された配列が、適切なアミノ酸挿入または欠失を有し、少なくとも約80%アミノ酸、通常少なくとも約90% - 95%、およびより好ましくは少なくとも約98% - 99.5%アミノ酸と同一であることを示す。

10

【0048】

2つの配列間のパーセント同一性は、ギャップの数、および各ギャップの長さを考慮して決定された最適なアラインメントで配列が最適にアラインメントされる場合、配列により共有される同一の位置の数の関数（すなわち、%相同性 = 同一の位置の数 / 位置の総数 × 100）であり、2つの配列の最適なアラインメントについて導入される必要がある。2つの配列間の配列の比較およびパーセント同一性の決定は、下記の非限定例に記載される数学的なアルゴリズムを使用して達成され得る。

20

【0049】

2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、NW S g a p d n a . C M Pマトリックスおよびギャップ重み40、50、60、70、または80および長さ重み1、2、3、4、5、または6を使用して、G C Gソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>で入手可能）におけるG A Pプログラムを使用して決定され得る。2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のパーセント同一性はまた、P A M 1 2 0重み残差表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を使用し、A L I G Nプログラム（バージョン2.0）に組み込まれたE . M e y e r sおよびW . M i l l e r（C A B I O S、4:11-17（1989））のアルゴリズムを使用して決定され得る。加えて、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、B l o s s u m 6 2マトリックスまたはP A M 2 5 0マトリックスのいずれか、およびギャップ重み16、14、12、10、8、6、または4および長さ重み1、2、3、4、5、または6を使用してG C Gソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>で入手可能）におけるG A Pプログラムに組み込まれたN e e d l e m a nおよびW u n s c h（J . M o l . B i o l .（48）:444-453（1970））アルゴリズムを使用して決定され得る。

30

【0050】

本明細書中に記載される核酸およびタンパク質配列は、公共のデータベースに対する検索を行う、例えば、関連する配列を同定するために「クエリー配列」としてさらに使用され得る。かかる検索は、A l t s c h u l , e t a l .（1990）J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 - 1 0のN B L A S TおよびX B L A S Tプログラム（バージョン2.0）を使用して行われ得る。B L A S Tヌクレオチド検索は、N B L A S Tプログラム、スコア = 100、ワード長（word length） = 12で行われ、本明細書中に記載される核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。B L A S Tタンパク質検索は、X B L A S Tプログラム、スコア = 50、ワード長（word length） = 3で行われ、本明細書中に記載されるタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためにギャップのアラインメントを得るために、G a p p e d B L A S Tは、A l t s c h u l e t a l . ,（1997）N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5（17）: 3 3 8 9 - 3 4 0 2に記載されるように利用され得る。B L A S TおよびG a p p e d B L A S Tプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、X B L A S TおよびN B L A S T）の初期状態のパラメータが、使用され得

40

50

る。www.ncbi.nlm.nih.gov.を参照されたい。

【0051】

核酸は、全細胞、細胞溶解物、または部分的に精製された、もしくは実質的に純粋な形態で存在してもよい。核酸は、他の細胞成分または他の混入物、例えば、他の細胞核酸（例えば、染色体の他の部分）またはタンパク質から、アルカリ性/SDS処理、CsClバンド形成、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当技術分野で周知の他のものを含む標準技術によって精製される場合、「単離された」または「実質的に純粋である」。F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987) 参照。

10

【0052】

核酸、例えばcDNAは、標準技術に従って、遺伝子配列を提供するために変異してもよい。コーディング配列について、これらの変異は、所望のアミノ酸配列に影響してもよい。特に、DNA配列は、本明細書中に記載される天然のV、D、J、定常領域(constant)、スイッチおよび他のかかる配列と実質的に相同、またはそれに由来することが意図される。

【0053】

本明細書中で使用される「ベクター」という用語は、連結された別の核酸を輸送する能力のある核酸分子を指すことを意図する。ベクターの1つのタイプは「プラスミド」であり、付加的なDNAセグメントが連結され得る環状二本鎖DNAループを指す。ベクターの別のタイプは、ウイルスベクターであり、ここで付加的なDNAセグメントは、ウイルスゲノムに連結されてもよい。特定のベクターは、それらが導入された宿主細胞において自律的複製できる（例えば、バクテリアの複製起点を有するバクテリアのベクターおよびエピソーマル哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーマル哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結されている遺伝子の発現を指令することができる。かかるベクターは、本明細書では、「組換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」）と呼ばれ、一般に、組み換えDNA技術において有用な発現ベクターはよくプラスミドの形態である。本明細書では、プラスミドが最も一般に使用されるベクターの形態であるため、「プラスミド」および「ベクター」は、互換的に使用されてもよい。しかしながら、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）などの他の形態の発現ベクターもまた含まれ、同等の機能を果たす。

20

30

【0054】

本明細書中で使用される「組み換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）という用語は、細胞に自然に存在しない核酸を含む細胞を指し、組み換え発現ベクターが導入された細胞であってもよいことを意図する。かかる用語は、特定の対象細胞だけでなく、かかる細胞の子孫も意味することを意図すると理解されるべきである。変異または環境の影響のいずれかに起因して後続の世代に起こり得るので、かかる子孫は、実際には親細胞と同一ではないが、本明細書中で使用される「宿主細胞」という用語の範囲内に依然として含まれる。

40

【0055】

本明細書中で使用されるように、「抗原」という用語は、タンパク質、ペプチド、またはハプテンなどの任意の天然のまたは合成の免疫原性物質を指す。抗原は、可溶性タンパク質コンストラクト、または細胞の表面を発現されたものいずれかとして、TL1Aまたはその断片であってもよい。

【0056】

「免疫調節物質(immunomodulator)」または「免疫抑制物質(immunoregulator)」は、薬剤、例えば免疫応答を調節(modulate)、

50

調節 (r e g u l a t e)、または改変することに関与し得るシグナル経路の成分を指す。免疫応答を「調節 (M o d u l a t i n g)」、「調節 (r e g u l a t i n g)」、または「改変」することは、免疫系の細胞における、またはかかる細胞 (例えば、エフェクターT細胞)の活性における任意の変化を指す。かかる調節は、様々な細胞タイプの数の増加または減少、これらの細胞の活性における増加または減少、または免疫系内で生じ得る任意の他の変化により明らかにされてもよい免疫系の刺激または抑制を含む。「免疫調節標的 (i m m u n o m o d u l a t o r y t a r g e t)」または「免疫調節標的 (i m m u n o r e g u l a t o r y t a r g e t)」は、結合について標的化されかつその活性が物質、薬剤、部分、化合物または分子の結合により変化する免疫調節物質である。免疫調節標的は、例えば、細胞の表面上の受容体 (「免疫調節受容体」)および受容体リガンド (「免疫調節リガンド」)を含む。

10

【0057】

本明細書中で使用される「投与する」は、当業者に既知の任意の様々な方法および送達系を使用する対象への治療剤を含む組成物の物理的な導入を指す。本明細書中に記載される抗体についての好ましい投与経路は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、脊髄、または他の非経口的な投与経路、例えば、注射または注入を含む。本明細書中で使用される「非経口投与」という語句は、経腸および局所投与以外の通常注射による投与様式を意味し、かつ静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、胸腔内、病巣内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および肋骨内注射および注入、並びにインビボでの電気穿孔を含むが、これらに限定されない。あるいは、本明細書中に記載される抗体は、局所的、表皮、または粘膜投与経路、例えば、鼻腔内、経口、膈内、直腸内、舌下または局所などの非経口的な経路を介して投与され得る。投与はまた、例えば、1回、複数回、および/または1つ以上の延長期間にわたり行うことができる。

20

【0058】

本明細書中で使用される「阻害する」または「ブロックする」(例えば、DR3へのTL1Aの結合の阻害/ブロックを指す)という用語は、互換的に使用され、かつ部分的なおよび完全な阻害/ブロックの両方を包含する。いくつかの実施形態では、抗TL1A抗体は、少なくとも約50%、例えば、少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%までTL1AへのDR3の結合を阻害する。

30

【0059】

本明細書中で使用される「治療する」、「治療すること」および「治療」という用語は、疾患に関連する症状、合併症、状態または生化学的徴候の進行、発症、重症度または再発の逆転、緩和、改善、阻害、または減速または予防する目的で任意のタイプの介入またはプロセスを行う、または対象に活性薬剤を投与することを指す。予防は、疾患を有しない対象への投与、疾患の発症を防ぐこと、または疾患が発症するのであれば、その影響を最小化することを指す。

【0060】

「有効な用量」または「有効量」という用語は、所望の効果を達成するかまたは少なくとも部分的に達成するのに十分な量として定義される。「治療的に有効な量」または「治療有効量」の薬物または治療剤は、単独で、または別の治療剤と組み合わせて使用される場合、疾患症状の重症度における減少により証明される疾患退行、疾患症状のない期間の頻度および持続時間における増加、または疾患の苦痛に起因する機能障害または能力障害の予防を促進する任意の量の薬物である。「予防的に有効な量」または「予防的有効量」の薬物は、単独で、または別の治療剤と組み合わせて疾患を発症するリスクのある対象、または疾患の再発を患う対象に投与される場合、疾患の発症または再発を阻害する量の薬物である。疾患退行を促進する、または疾患の発症または再発を阻害する治療上の、または予防的な薬剤の能力は、臨床試験中のヒト対象、ヒトにおける有効性を予測する動物モデル系、またはインビトロのアッセイで薬剤の活性をアッセイすることなどにより様々な当業者に既知の方法を使用して評価され得る。

40

50

【0061】

「患者」および「対象」という用語は、予防的または治療上の治療のいずれかを受ける任意のヒトまたは非ヒト動物を指す。例えば、本明細書中に記載される方法および組成物は、免疫系疾患を治療するために使用され得る。「非ヒト動物」という用語は、全ての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの哺乳動物および非哺乳動物を含む。

【0062】

本明細書中で使用される「免疫系疾患」は、乾癬、ループス（例えばエリテマトーデス、ループス腎炎）、橋本甲状腺炎、原発性粘液浮腫、グレーブス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、アジソン病、糖尿病（例えばインスリン依存性糖尿病、I型糖尿病、II型糖尿病）、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、天疱瘡群、クローン病、炎症性腸疾患、交感性眼炎、自己免疫性ぶどう膜炎、多発性硬化症、自己免疫溶血性貧血、特発性血小板減少症、原発性胆汁性胆管炎、慢性活動性肝炎（chronic action hepatitis）、潰瘍性大腸炎（ulceratis colitis）、シェーグレン症候群、リウマチ性疾患、多発性筋炎、強皮症、および混合性結合組織病を含むが、以下に限定されない。

10

【0063】

本明細書中で使用される「リウマチ性疾患」は、関節、骨、軟部組織、または脊髄に影響を及ぼす任意の疾患を意味し（Mathies, H. 1983 Rheuma）かつ炎症性リウマチ、変性リウマチ、関節外リウマチ、および膠原病を含む。さらに、リウマチ性疾患は、慢性多発性関節炎、関節症性乾癬、強直性脊椎炎、関節リウマチ、結節性多発動脈炎（panarteriitis nodosa）、全身性エリテマトーデス、進行性全身性強皮症、関節周囲炎（periarthriti humeroscapularis）、尿酸性関節炎、軟骨石灰症、皮膚筋炎、筋肉リウマチ、筋炎、および筋硬症を含むがこれらに限定されない。いくつかのリウマチ性疾患は、対象の変化した免疫応答により引き起こされる自己免疫疾患であることが知られている。

20

【0064】

本明細書中に記載される様々な態様は、以下のサブセクションでさらに詳細に記載される。

【0065】

I. 抗TL1A抗体

本願は、免疫系疾患を治療することにおける治療剤としての使用に望ましい特性を有する完全ヒト抗huTL1A抗体を開示する。これらの特性は、高親和性でヒトTL1Aに結合する能力、カニクイザルTL1Aに結合する能力およびDR3結合（したがってシグナル伝達）をブロックする能力を含む。

30

【0066】

配列により本明細書に開示された抗TL1A抗体は、実施例8および9に記載のようにして決定されたヒトTL1A上の特異的なエピトープに結合する。従って、同一または密接に関連するエピトープに結合する他の抗体は、これらの望ましい特性を共有する可能性が高い。

40

【0067】

加えて、抗体10A4.F7.2E8はカニクイザルTL1Aに結合し、ヒト治療として抗体の使用に対する規制上の承認を支持する毒性試験を実施する必要がある場合に都合がよい。10A4.F7.2E8と同一の、または類似のエピトープに結合する他の抗TL1A抗体は、cyno TL1Aへの結合のこの有利な性質を共有する可能性が高い。類似のエピトープに結合する抗体は、競合実験を行うことによって、またはそのエピトープを直接的に決定することによって発見され得る。

【0068】

本明細書に開示された抗huTL1A抗体と競合する抗TL1A抗体10A4.F7.2E8などの、huTL1Aへの結合について本発明の抗体と競合する

50

抗h u T L 1 A抗体は、本明細書中に記載されるもの（実施例1）と類似の免疫処置プロトコールを使用して産生されてもよい。本明細書中に記載される抗h u T L 1 A抗体と結合について競合する抗体はまた、ヒトT L 1 Aまたはその細胞外ドメイン（配列番号19の残基72 - 251）を含むコンストラクトでマウスを免疫することにより、または本明細書に開示された抗T L 1 A抗体（例えば10A4・F7・2E8）により結合されるエピトープを含有するヒトT L 1 Aの断片で免疫することにより、生成されてもよい。生じる抗体は、当技術分野で周知の方法、例えば、E L I S AでT L 1 Aの細胞外ドメインおよび免疫グロブリンF cドメインの融合タンパク質への結合をブロックすること、または例えばF A C Sにより表面上でh u T L 1 Aを発現する細胞に結合する能力をブロックすることによりヒトT L 1 Aへの10A4・F7・2E8の結合をブロックする能力についてスクリーニングされ得る。様々な実施形態では、試験抗体を、10A4・F7・2E8の添加前、同時、または後にT L 1 A - F c融合タンパク質（または表面上でh u T L 1 Aを発現する細胞）を接触させる。T L 1 A（F c融合として、または細胞上のいずれか）への10A4・F7・2E8の結合を、特におよそ化学量論的な濃度で、減少させる抗体は、同じ、オーバーラップする、または隣接するエピトープに結合する可能性があり、したがって、10A4・F7・2E8の望ましい機能的な特性を共有してもよい。

10

【0069】

競合する抗体はまた、当技術分野で既知の他の方法を使用して同定され得る。例えば、組み換えヒトT L 1 Aタンパク質コンストラクトがプレート上に固定化され、様々な濃度の非標識の第一の抗体が加えられ、プレートが洗浄され、標識化された第二の抗体が加えられ、洗浄され、かつ結合した標識の量が測定される標準E L I S Aアッセイまたは競合E L I S Aアッセイが使用され得る。非標識の（第一の）抗体（「ブロッキング抗体」としても呼ばれる）の増加性の濃度が標識化（第二の）抗体の結合を阻害する場合、第一の抗体は、プレート上の標的への第二の抗体の結合を阻害すると言ったことができ、または第二の抗体の結合と競合すると言ったことができる。その上または代わりに、B I A C O R E（登録商標）S P R解析は、競合する抗体の能力を評価するために使用され得る。本明細書中に記載される抗h u T L 1 A抗体のT L 1 Aへの結合を阻害する試験抗体の能力は、試験抗体がT L 1 Aへの結合について抗体と競合できることを実証する。

20

【0070】

従って、例えば、E L I S AまたはF A C Sにより測定されるように、細胞上のT L 1 Aへの本明細書中に記載される抗h u T L 1 A抗体の結合を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%まで阻害する、および/または細胞上のT L 1 Aへのその結合が少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%まで阻害された抗T L 1 A抗体が、本明細書に提供される。

30

【0071】

典型的には、同一の実験が逆に行われる、すなわち、第一の抗体が第二の抗体であり、かつ第二の抗体が第一の抗体である。或る実施形態では、1または他の抗体が第一の抗体である場合に阻害が起こるかどうかにかわらず、抗体は少なくとも部分的に（例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%）または完全に（100%）、標的、例えばヒトT L 1 Aまたはその断片への他の抗体の結合をブロックする。抗体が互いに両方の方法、すなわち、第一の抗体が最初に加えられる競合実験および第二の抗体が最初に加えられる競合実験で競合する場合、第一および第二の抗体は、標的への互いの結合を「交差ブロックする」。

40

【0072】

おおよそ等しい濃度で存在する場合、抗h u T L 1 A抗体がヒトT L 1 Aへの10A4・F7・2E8の結合を、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%

50

、70%、80%、90%まで、または100%まで阻害する場合、抗huTL1A抗体は、本明細書に開示された抗huTL1A抗体と競合すると考えられる。

【0073】

同一のエピトープに結合する抗TL1A抗体

本明細書に開示された抗体と同一の、または類似のエピトープに結合する抗huTL1A抗体は、本明細書中に記載されるもの（実施例1）と類似の免疫処置プロトコールを使用して産生されてもよい。生じる抗体は、ヒトTL1Aへの高親和性結合についてスクリーニングされ得る（実施例4）。選択された抗体は、抗体により結合される正確なエピトープを決定するために水素/重水素交換質量分析（HDX-MS）方法で研究され得る（実施例8）。ヒトTL1A上の、抗体10A4・F7・2E8と同一の、または類似のエピトープに結合する抗体は、10A4・F7・2E8の望ましい機能的な特性を共有する可能性が高い。

10

【0074】

エピトープ決定は、当技術分野で既知の任意の方法によりなされてもよい。本明細書に開示されたエピトープは、実施例8および9に記載され、図10-12に示されるようにHDX-MSおよび計算により決定される。様々な実施形態では、抗huTL1A抗体は以下の場合；

それらが10A4・F7・2E8により接触されるhuTL1Aの少なくとも1つの領域内の1以上の同一の残基と接触する場合；それらが10A4・F7・2E8により接触されるhuTL1Aの少なくとも1つの領域内の大部分の残基と接触する場合；それらが10A4・F7・2E8により接触されるhuTL1Aの各領域内の大部分の残基と接触する場合；それらが10A4・F7・2E8により接触されるhuTL1Aの全長に沿って接触の大部分と接触する場合；それらが10A4・F7・2E8により接触されるヒトTL1Aの全ての別個の領域内で接触する場合；それらが10A4・F7・2E8により接触されるヒトTL1A上の任意の1つの領域の全ての残基と接触する場合；またはそれらが10A4・F7・2E8により接触される全ての領域の全ての残基と接触する場合、本明細書に開示された抗huTL1A mAb、例えば10A4・F7・2E8と同一のエピトープに結合すると考えられる。エピトープ「領域」は、例えば配列番号16および17で提供される抗体10A4・F7・2E8により接触される一次配列に沿った残基のクラスターである。

20

30

【0075】

TL1Aにおける10A4上のHDX-MS測定は、10A4が、TL1Aにおける2つのペプチド領域から構成される非連続的なエピトープを有し、領域1が重水素取り込みにおける最も有意な変化を有することを指し示す（図10および11）：

ペプチド領域1（166-180）：EIRQAGRPNKPDSIT（配列番号17）

ペプチド領域2（102-116）：TVVRQTPTQHFKNQF（配列番号16）

【0076】

可能性のあるエピトープ領域を、TL1Aにおける10A4 FabについてHDX-MS測定により交差検証した。MSにおける重水素化されたペプチド断片化の有用性は、エピトープの空間分解能を以下にさらに精密化した：エピトープ1¹⁶⁹QAGR¹⁷²およびエピトープ2¹¹³KNQF¹¹⁶。

40

【0077】

本明細書中に記載される抗体で「TL1A上の同一のエピトープ」に結合する抗体を決定する技術は、抗原：抗体複合体の結晶のX線解析を含み、エピトープの原子分解を提供する。他の方法は、抗原断片または抗原の突然変異した変異体への抗体の結合をモニターする、ここで、抗原配列内アミノ酸残基の改変に起因する結合の喪失は、よくエピトープ成分の指標と考えられる。加えて、エピトープマッピングのためのコンピュータによる組み合わせの方法もまた、使用され得る。方法はまた、コンビナトリアルファージディスプレイペプチドライブラリーから特定の短いペプチド（天然の3次元形態または変性形態の

50

いずれか)をアフィニティー分離する目的の抗体の能力に依存してもよい。そして当該ペプチドは、ペプチドライブラリーをスクリーニングするために使用される抗体に対応するエピトープの定義のためのリードと見なされる。エピトープマッピングについて、立体構造の非連続的なエピトープをマッピングすることが示されているコンピュータによるアルゴリズムも開発されている(実施例9参照)。

【0078】

エピトープまたはエピトープを含む領域はまた、TL1Aに渡る一連のオーバーラップペプチドへの結合についてスクリーニングすることにより同定され得る。あるいは、Jespers et al. (1994) *Bio technology* 12: 899の方法は、本明細書中に記載される抗TL1A抗体と同一のエピトープを有する、従って、類似の特性を有する、抗体の選択を導くために使用されてもよい。ファージディスプレイを使用して、まず抗TL1A抗体の重鎖を軽鎖のレパートリー(好ましくはヒト)と組み合わせてTL1A結合抗体を選択し、新たな軽鎖を重鎖のレパートリー(好ましくはヒト)と組み合わせて、本明細書中に記載される抗huTL1A抗体と同一のエピトープまたはエピトープ領域を有する(好ましくはヒト)TL1A結合抗体を選択する。あるいは本明細書中に記載される抗体のパリアントは、抗体の重鎖および軽鎖をコードするcDNAの突然変異誘発により得られ得る。

10

【0079】

TL1Aにおけるアミノ酸残基の、Cunningham & Wells (1989) *Science* 244: 1081に記載されたアラニンスキャニング突然変異誘発または点突然変異誘発のいくつかの他の形態はまた、抗TL1A抗体についての機能的なエピトープを決定するために使用されてもよい。

20

【0080】

特定の抗体により結合されたエピトープまたはエピトープ領域(「エピトープ領域」はエピトープを含むまたはエピトープとオーバーラップする領域である)はまた、TL1Aの断片を含むペプチドへの抗体の結合を評価することにより決定されてもよい。TL1A(例えば、ヒトTL1A)の配列を包含する一連のオーバーラップペプチドは、合成され、かつ結合について例えば直接ELISA、競合ELISA(ペプチドはマイクロタイタープレートのウェル上に結合したTL1Aへの抗体の結合を防ぐその能力について評価される)、またはチップ上でスクリーニングされてもよい。かかるペプチドスクリーニング方法は、いくつかの非連続的な機能的なエピトープ、すなわちTL1Aポリペプチド鎖の一次配列に沿って連続していないアミノ酸残基を含む、機能的なエピトープを検出できなくともよい。

30

【0081】

エピトープはまた、タンパク質の高速光化学酸化(Photochemical Oxidation of Protein)(FPOP)などのMSベースのタンパク質フットプリント法により同定されてもよい。FPOPは、例えば、Hambley & Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16: 2057に記載されるように行われてもよく、該方法は出典明示により具体的に本明細書に組み込まれる。

40

【0082】

抗TL1A抗体により結合されるエピトープはまた、遊離の場合、および目的の抗体と複合体において結合した場合のTL1Aにおける不安定なアミド水素のH-D交換速度のNMR決定を含む、X線結晶構造決定(例えば、WO2005/044853)、分子モデリングおよび核磁気共鳴(NMR)分光法などの構造上の方法により決定されてもよい(Zinn-Justin et al. (1992) *Biochemistry* 31: 11335; Zinn-Justin et al. (1993) *Biochemistry* 32: 6884)。

【0083】

X線結晶学に関して、結晶化は、マイクロバッチ(例えばChayen (1997) S

50

structure 5:1269)、ハンギングドロップ蒸気拡散(例えばMcPherson(1976)J. Biol. Chem. 251:6300)、播種および透析を含む(例えばGiege et al. (1994) Acta Crystallogr. D50:339; McPherson(1990) Eur. J. Biochem. 189:1)当技術分野で既知の任意の方法を使用して達成されてもよい。少なくとも約1mg/mLおよび好ましくは約10mg/mL~約20mg/mLの濃度を有するタンパク質調製物を使用することが望ましい。結晶化は、約10%~約30%(w/v)の濃度範囲のポリエチレングリコール1000-20,000(PEG;約1000~約20,000Daの範囲の平均分子量)、好ましくは約5000~約7000Da、より好ましくは約6000Daを含有する沈殿剤溶液中で、最も達成されてもよい。タンパク質安定化剤、例えば約0.5%~約20%の濃度範囲のグリセリンを含むことが望ましいときもある。塩化ナトリウム、塩化リチウムまたはクエン酸ナトリウムなどの適した塩もまた、沈殿剤溶液中で、好ましくは約1mM~約1000mMの濃度で、望ましいときがある。沈殿剤は、pH約3.0~約5.0、好ましくは約4.0で好ましくは緩衝される。沈殿剤溶液で有用な特定の緩衝液は、様々であり得、当技術分野で周知である。(Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York)。有用な緩衝液の例は、HEPES、Tris、MESおよび酢酸を含むがこれらに限定されない。結晶は、2、4、8および26を含む広範囲な温度で成長されてもよい。

10

20

【0084】

抗体：抗原結晶は、周知のX線回折技術を使用して研究されてもよく、かつX-PLOR(Molecular Simulations, Inc.により配布されたYale University, 1992;例えばBlundell & Johnson(1985)Meth. Enzymol. 114 & 115, H.W. Wyckoff et al., eds., Academic Press;米国特許出願公開第2004/0014194)、およびBUSTER(Bricogne(1993)Acta Cryst. D49:37-60;Bricogne(1997)Meth. Enzymol. 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.;Roversi et al. (2000)Acta Cryst. D56:1313-1323)などのコンピュータソフトウェアを使用して精密化されてもよく、それらの開示内容は、その全体が出典明示により組み込まれる。

30

【0085】

高親和性で結合する抗TL1A抗体

いくつかの実施形態では、本発明の抗huTL1A抗体は、本明細書に開示された抗huTL1A抗体のように、高親和性でhuTL1Aに結合し、有効な治療剤である可能性を高める。様々な実施形態では、本発明の抗huTL1A抗体は、10nM、5nM、2nM、1nM、300pMまたは100pM未満の K_D でhuTL1Aに結合する。他の実施形態では、本発明の抗huTL1A抗体は、2nMおよび100pM間の K_D でhuTL1Aに結合する。huTL1Aに対する抗体の結合能力を評価する標準アッセイは、ELISA、ウェスタンブロット、BIACORE(登録商標)SPR解析およびRIAを含む。

40

【0086】

抗TL1A抗体配列バリエーション

本明細書に開示された抗体配列におけるいくつかの変異性(variableity)は、許容され、依然として抗体の望ましい特性を維持してもよい。CDR領域はカバットシステムを使用して記載されている(Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication

50

No. 91-3242)。従って、本発明は、本明細書に開示された抗体（例えば10A4・F7・2E8）のCDR配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のCDR配列を含む抗h u T L 1 A抗体をさらに提供する。本発明はまた、本明細書に開示された抗体（例えば10A4・F7・2E8）の重および/または軽鎖可変ドメイン配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の重および/または軽鎖可変ドメイン配列を含む抗h u T L 1 A抗体を提供する。

【0087】

同一の生殖系列に由来する抗T L 1 A抗体

抗原結合特異性が主にCDRによって決定されることを考慮すると、本明細書に開示された抗体（例えば10A4・F7・2E8）とCDR配列を共有する抗体は、それらの望ましい特性を共有する可能性が高い。

【0088】

或る実施形態では、本発明の抗h u T L 1 A抗体は、特定のヒト生殖系列重鎖免疫グロブリン遺伝子に由来する重鎖可変領域および/または特定のヒト生殖系列軽鎖免疫グロブリン遺伝子からの軽鎖可変領域を含む。抗体10A4は、ヒト生殖系列V4-39、D4-17およびJH3に由来する重鎖および軽鎖生殖系列VK1およびJK4を有する。ヒトT L 1 Aに結合し、かつこれらの生殖系列配列のいくつかまたは全てに由来する他の抗体は、配列、特に同一のV領域遺伝子に由来するものにおいて非常に密接に関連している可能性があり、したがって、同一の望ましい特性を共有することが予想される。

【0089】

本明細書中で使用されるように、抗体の可変領域がヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られる場合、ヒト抗体は特定の生殖系列配列「に由来する」重または軽鎖可変領域を含み、かつ抗体配列は任意の他のものよりも所定の生殖系列に由来する可能性が高い生殖系列と十分に関連する。かかる系は、目的の抗原でヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスを免疫処置することまたは目的の抗原でファージ上に提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることを含む。抗体の配列が「由来する」ヒト生殖系列免疫グロブリン配列は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較し、かつヒト抗体の配列と配列で最も近い（すなわち、最大の%の同一性）ヒト生殖系列免疫グロブリン配列を選択することにより同定され得る。特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列「に由来する」ヒト抗体は、例えば、天然に存在する体細胞突然変異または部位特異的変異の意図的な導入に起因して、生殖系列配列と比較してアミノ酸の差異を含有してもよい。しかしながら、選択されたヒト抗体は、典型的にはヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子（例えばV領域）によりコードされることアミノ酸配列とアミノ酸配列で少なくとも90%同一であり、かつ他の種の生殖系列免疫グロブリンアミノ酸配列（例えば、マウスの生殖系列配列）と比較した場合に、ヒトであるとヒト抗体を同定するアミノ酸残基を含有する。特定の場合では、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子（例えばV領域）によりコードされるアミノ酸配列とアミノ酸配列において少なくとも95%、またはより少なくとも96%、97%、98%、または99%同一であってもよい。典型的には、特定のヒト生殖系列配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子（例えばV領域）によりコードされるアミノ酸配列と10以下のアミノ酸差異を示すだろう。特定の場合では、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子（例えばV領域）によりコードされるアミノ酸配列と5以下、または4、3、2、または1以下のアミノ酸の差異を示してもよい。

【0090】

II. 遺伝子操作された抗体および改変された抗体

V_HおよびV_L領域

改変された抗体を遺伝子操作するために出発物質として本明細書に開示された1以上のV_Hおよび/またはV_L配列を有する抗体を使用して調製され得る、遺伝子操作された抗体および改変された抗体もまた提供され、改変された抗体は出発抗体から変化した特性を有

10

20

30

40

50

してもよい。抗体は、可変領域の1つまたは両方（すなわち、 V_H および / または V_L ）内、例えば、1以上のCDR領域内および / または1以上のフレームワーク領域内、の1以上の残基を改変することにより遺伝子操作され得る。その上または代わりに、例えば、抗体のエフェクター機能を変えるために、抗体は、定常領域内の残基を改変することにより遺伝子操作され得る。

【0091】

行われ得る可変領域工学の1つのタイプはCDR移植である。かかる移植は、本明細書に開示された抗h u T L 1 A抗体と結合について競合する、および / または本明細書に開示された抗h u T L 1 A抗体と同一のエピトープに結合する非ヒト抗T L 1 A抗体をヒト化する際に特に有用である。抗体は、6つの重鎖および軽鎖相補性決定領域（CDR）に位置するアミノ酸残基を主に介して標的抗原と相互作用する。この理由から、CDR内のアミノ酸配列は、CDR外の配列よりも個々の抗体間でより多様である。CDR配列は、ほとんどの抗体-抗原相互作用に参与するため、異なる特性を有する異なる抗体からのフレームワーク配列に移植された特定の参照抗体からCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって特定の参照抗体の特性を模倣する組み換え抗体を発現できる（例えば、Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321: 522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033; Winterの米国特許第5, 225, 539、およびQueen et al.の米国特許第5, 530, 101; 5, 585, 089; 5, 693, 762および6, 180, 370参照)

10

20

【0092】

かかるフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公開DNAデータベースまたは公開文献から得られ得る。例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子についての生殖系列DNA配列は、「VBase」ヒト生殖系列配列データベース（インターネット上のwww.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseで入手可能）、並びにKabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227: 776-798; and Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24: 827-836で見出すことができ; これらの各々の内容は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

30

【0093】

本明細書中に記載される抗体における使用についての好ましいフレームワーク配列は、本明細書中に記載される抗体により使用されるフレームワーク配列と構造上類似するものである。 V_H CDR 1、2および3配列、ならびに V_L CDR 1、2および3配列は、フレームワーク配列が由来する生殖系列免疫グロブリン遺伝子に見出されるものと同一の配列を有するフレームワーク領域に移植され得る、またはCDR配列は、生殖系列配列と比較して20までの、好ましくは保存的な、アミノ酸置換を含有するフレームワーク領域に移植され得る。例えば、或る例では、抗体の抗原結合能力を維持する、または増強するためにフレームワーク領域内の残基を変異させることが有益であることが見出されている（例えばQueen et alの米国特許第5, 530, 101; 5, 585, 089; 5, 693, 762および6, 180, 370参照）。

40

50

【0094】

本明細書中に記載される遺伝子操作された抗体は、例えば抗体の特性を改善するために、 V_H および/または V_L 内のフレームワーク残基に改変がなされたものを含む。典型的には、かかるフレームワーク改変は、抗体の免疫原性を減少させるために行われる。例えば、1つのアプローチは、1以上のフレームワーク残基を対応する生殖系列配列に「復帰突然変異させる」ことである。より具体的には、体細胞突然変異を受けた抗体は、抗体が由来する生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含有してもよい。かかる残基は、抗体フレームワーク配列を、抗体が由来する生殖系列配列と比較することにより同定され得る。フレームワーク領域配列をそれらの生殖系列配置に戻すために、体細胞突然変異は、例えば、部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介変異誘発により生殖系列配列に「復帰突然変異」され得る。かかる「復帰突然変異された」抗体もまた、包含されることを意図する。

10

【0095】

別のタイプのフレームワーク改変は、T細胞エピトープを除去して抗体の潜在的な免疫原性を減少させるために、フレームワーク領域内の、または1以上のCDR領域内までもの1以上の残基を突然変異させることを含む。このアプローチは、「脱免疫化」とも呼ばれ、Carr et alによる米国特許公開第20030153043にさら詳細に記載されている。

【0096】

別のタイプの可変領域改変は、目的の抗体の1以上の結合特性（例えば、親和性）を改善するためにCDR領域内のアミノ酸残基を変異させることである。部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介変異誘発は、変異および抗体結合、または目的の他の機能的なに対する効果を導入するために行うことができる。好ましくは、保存的改変が導入される。変異は、アミノ酸付加、欠失、または好ましくは置換であってもよい。さらに、典型的には、CDR領域内の1、2、3、4または5残基以下が変異される。

20

【0097】

抗体のCDRにおけるメチオニン残基は、酸化され、潜在的な化学的分解をもたらし、結果として抗体の効力が低下し得る。従って、酸化分解を受けないアミノ酸残基で置換された重および/または軽鎖CDRにおける1以上のメチオニン残基を有する抗TL1A抗体もまた提供される。

30

【0098】

同様に、脱アミド部位は、抗TL1A抗体、特にCDRから除去されてもよい。

【0099】

抗原結合ドメイン内の潜在的なグリコシル化部位は、抗原結合を妨害することがあるグリコシル化を防ぐために好ましくは除去される。例えば、米国特許第5,714,350参照。

【0100】

Fcおよび改変されたFc

抗原への抗原結合ドメインの結合から生じる治療用抗体の活性（例えばアンタゴニスト抗体の場合、コグネイトリガンドまたは受容体タンパク質、またはアゴニスト抗体の場合、誘導されたシグナル伝達をブロックする）に加えて、抗体のFc部分は、任意の数の生物学的効果を引き出すために複雑な方法で一般に免疫系と相互作用する。免疫グロブリンのFc領域などのエフェクター機能は、抗原-依存性細胞傷害性(ADCC)、補体依存性細胞傷害(CDC)、および抗体-依存性細胞介在貪食(ADCP)などの多くの重要な抗体機能に関与し、異なる機構によるものではあるが標的細胞の死滅をもたらす。重鎖定常領域(IgA、IgG、IgD、IgE、IgM)の5つの主要なクラスまたはアイソタイプが存在し、特徴的なエフェクター機能をそれぞれ有する。これらのアイソタイプは、サブクラスにさらに細分することができ、例えば、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4として知られている4つのサブクラスに分かれている。IgG分子は、抗体のIgGクラスに特異的な3つのクラスのFc受容体(FcR)、すなわ

40

50

ちFcRI、FcRII、およびFcRIIIと相互作用する。FcR受容体へのIgGの結合についての重要な配列は、CH2およびCH3ドメインに位置することが報告されている。抗体の血清半減期は、新生児のFc受容体(FcRn)に結合する抗体の能力により影響される。

【0101】

本発明の抗体は、意図した使用についての抗体の生物学的活性(もしあれば)に基づき選択された、異なるFc領域を含む定常ドメインと組み合わせた本発明の可変ドメインを含んでもよい。Salfeld(2007)Nat. Biotechnol. 25:1369。ヒトIgGは、例えば、4つのサブクラス、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4に分類でき、かつこれらの各々は、1以上のFc受容体(活性化受容体FcRI(CD64)、FcRIIA、FcRIIC(CD32); FcRIIIAおよびFcRIIIB(CD16)および阻害受容体FcRIIB)への結合についての、および補体第一成分(C1q)についての固有の特性を有するFc領域を含む。ヒトIgG1およびIgG3は、全てのFc受容体に結合する; IgG2は、FcRIIA_{H131}に結合し、かつFcRIIA_{R131} FcRIIIA_{V158}へはより低い親和性を有し; IgG4は、FcRI、FcRIIA、FcRIIB、FcRIIC、およびFcRIIIA_{V158}に結合し; および阻害受容体FcRIIBは、全ての他のFc受容体よりIgG1、IgG2およびIgG3についてより低い親和性を有する。Bruhns et al. (2009) Blood 113:3716 Id。研究は、FcRIが、IgG2に結合せず、およびFcRIIIBが、IgG2またはIgG4に結合しないことが示されている。同著。一般に、ADCC活性に関して、ヒトIgG1 IgG3 IgG4 IgG2。結果として、例えば、IgG2またはIgG4ではなくIgG1定常ドメインは、ADCCが望ましい薬物での使用のために選択されてもよい; IgG3は、FcRIIIA発現NK細胞、マクロファージの単球の活性化の場合、選択されてもよい; およびIgG4は、抗体がアレルギー患者を脱感作するために使用される場合、選択されてもよい。IgG4はまた、抗体が全てのエフェクター機能を欠如することが望ましい場合、選択されてもよい。

【0102】

従って、本明細書中に記載される抗TL1A可変領域は、Fc、例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4 Fcである、に連結されてもよく(例えば、共有結合または融合)、以下の任意のアロタイプまたはイソアロタイプであってもよい、例えば、IgG1について: G1m、G1m1(a)、G1m2(x)、G1m3(f)、G1m17(z); IgG2について: G2m、G2m23(n); IgG3について: G3m、G3m21(g1)、G3m28(g5)、G3m11(b0)、G3m5(b1)、G3m13(b3)、G3m14(b4)、G3m10(b5)、G3m15(s)、G3m16(t)、G3m6(c3)、G3m24(c5)、G3m26(u)、G3m27(v)。例えば、Jefferys et al. (2009) mAbs 1:1参照。アロタイプの選択は、潜在的な免疫原性の懸念、例えば抗薬物抗体の形成を最小化することなどにより影響されてもよい。

【0103】

本明細書中に記載される可変領域は、典型的には、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、および/または抗原-依存性細胞傷害性などの抗体の1以上の機能的な特性を変化させるために1以上の改変を含むFcに結合してもよい。さらに、本明細書中に記載される抗体は、化学的に改変されてもよい(例えば、1以上の化学的な部分は、抗体に結合され得る)または抗体の1以上の機能的な特性を変化させるためにそのグリコシル化を変化させて改変されてもよい。これらの実施形態のそれぞれは、以下にさらに詳細に説明される。Fc領域における残基のナンバリングは、カバットのEUIンデックスのものである。本明細書に開示された配列バリエーションは、残基番号と、それに続く、天然に存在するアミノ酸の代わりに置換されるアミノ酸に関連し、任意に、その位置の天然に存在する残基が先行して提供される。複数のアミノ酸は、所定の位置に存在し得る場合、例えば配列が

天然に存在するアイソタイプ間で異なる場合、または複数の変異がその位置で置換され得る場合、それらはスラッシュで区切られる（例えば「X / Y / Z」）。

【0104】

例えば、親Fcと比較した(a)抗体-依存性細胞介在性細胞傷害性(ADCC)の増加または減少、(b)補体媒介性細胞傷害性(CDC)の増加または減少、(c)C1qについての親和性の増加または減少および/または(d)Fc受容体についての親和性の増加または減少を有するFcバリエーションを生成するためにFc領域における改変を行ってもよい。かかるFc領域バリエーションは、一般に、Fc領域における少なくとも1つのアミノ酸改変を含むだろう。アミノ酸改変を組み合わせることは特に望ましいと考えられる。例えば、バリエーションFc領域は、その中に2、3、4、5などの置換を含んでもよい、例えば本明細書で同定された特定のFc領域位置。例示的なFc配列バリエーションは本明細書に開示され、かつ米国特許第5,624,821;6,277,375;6,737,056;6,194,551;7,317,091;8,101,720;PCT特許公開WO00/42072;WO01/58957;WO04/016750;WO04/029207;WO04/035752;WO04/074455;WO04/099249;WO04/063351;WO05/070963;WO05/040217、WO05/092925およびWO06/020114もまた提供される。

10

【0105】

エフェクター機能を低減すること

ADCC活性は、Fc領域を改変することによって減少されてもよい。或る実施形態では、Fc受容体への結合に影響する部位、好ましくはサルベージ受容体結合部位以外の部位は、除去されてもよい。他の実施形態では、Fc領域は、ADCC部位を除去するように改変されてもよい。ADCC部位は、当技術分野で知られている；例えば、IgG1におけるADCC部位に関してSarmay et al. (1992) Molec. Immunol. 29(5):633-9参照。一実施形態では、ヒトIgG1のG236RおよびL328Rバリエーションは、FcR結合を効率的に除去する。Horton et al. (2011) J. Immunol. 186:4223およびChu et al. (2008) Mol. Immunol. 45:3926。他の実施形態では、FcRへの減少した結合を有するFcは、アミノ酸置換L234A、L235EおよびG237Aを含んでいた。Gross et al. (2001) Immunity 15:289

20

30

【0106】

CDC活性もまた、Fc領域を改変することにより減少してもよい。IgG1位置D270、K322、P329およびP331での変異、特にアラニン変異D270A、K322A、P329AおよびP331Aは、C1qに結合し、かつ補体を活性化する対応する抗体の能力を有意に減少させる。Idusogie et al. (2000) J. Immunol. 164:4178;WO 99/51642。IgG1の331位の改変(例えばP331S)は、補体結合を減少させることを示した。Tao et al. (1993) J. Exp. Med. 178:661およびCanfield & Morrison (1991) J. Exp. Med. 173:1483。別の例では、231~239位のアミノ酸内の1以上のアミノ酸残基を変化させ、補体固定する抗体の能力を減少させる。WO94/29351。

40

【0107】

いくつかの実施形態では、減少した補体結合を有するFcは、アミノ酸置換A330SおよびP331Sを有する。Gross et al. (2001) Immunity 15:289。

【0108】

エフェクター機能が完全に回避される使用について、例えば抗原結合のみが望ましい治療効果を生み出すために十分であり、かつエフェクター機能が、望ましくない副作用を導く(またはそのリスクを増大させる)だけである場合、IgG4抗体が使用されてもよく

50

、またはFc領域またはその実質的な部分を欠く抗体または断片が考案され得、またはFcがグリコシル化を完全に除去するように変異されてもよい(例えばN297A)。あるいは、エフェクター機能を欠き、FcRに結合する能力を欠き(IgG2のような)かつ補体を活性化できない(IgG4のような)、ヒトIgG2(C_H1ドメインおよびヒンジ領域)およびヒトIgG4(C_H2およびC_H3ドメイン)のハイブリッドコンストラクトが作製されている。Rother et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25:1256。Mueller et al. (1997) Mol. Immunol. 34:441; Labrijn et al. (2008) Curr. Opin. Immunol. 20:479(エフェクター機能を一般的に減少させるFc改変を考察する)も参照されたい。

10

【0109】

他の実施形態では、Fc領域は、抗体の全てのエフェクター機能を減少させるために少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することによって変更される。例えば、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320および322から選択される1以上のアミノ酸は、抗体が、エフェクターリガンドについての減少した親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力を保持するように、異なるアミノ酸残基で置換され得る。親和性が変化されたエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体(残基234、235、236、237、297)または補体のC1成分(残基297、318、320、322)であり得る。両方ともWinter et alによる米国特許第5,624,821および5,648,260。

20

【0110】

1つの初期の特許出願はADCCを減少させるためにFcRIへの結合を減少させるIgGFc領域における改変(234A;235E;236A;G237A)またはCDCを除去するために補体成分C1qへの結合をブロックする改変(E318AまたはV/K320AおよびK322A/Q)を提案した。WO88/007089。Duncan & Winter (1988) Nature 332:563; Chappel et al. (1991) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 88:9036; およびSondermann et al. (2000) Nature 406:267(FcRIII結合へのこれらの変異の効果を考察する)も参照。

30

【0111】

エフェクター機能を低減させるFc改変はまた234G、235G、236R、237K、267R、269R、325L、および328Rなどの、234、235、236、237、267、269、325、および328位での置換、挿入、および欠失を含む。Fcバリエーションは、236R/328Rを含んでもよい。FcγRおよび補体相互作用を低減する他の改変は、297A、234A、235A、237A、318A、228P、236E、268Q、309L、330S、331S、220S、226S、229S、238S、233P、および234V置換を含む。これらおよび他の改変は、Stroh l (2009) Current Opinion in Biotechnology 20:685-691で概説される。新生児FcR結合を維持(半減期維持)しながら、エフェクター機能(ADCCおよび補体活性化の両方)は、IgG1におけるE233P、L234V、L235A、任意にG236、A327G、A330SおよびP331S; IgG4におけるE233P、F234V、L235A、任意にG236; およびIgG2におけるA330SおよびP331Sなどの、1以上の233-236および327-331位でIgG残基を突然変異させることによって減少され得る。Armour et al. (1999) Eur. J. Immunol. 29:2613; WO99/58572参照。エフェクター機能を減少させる他の変異は、IgG1におけるL234AおよびL235A(Alegre et al. (1994) Transplantation 57:1537); IgG2におけるV234AおよびG237A(Cole et al. (1997) J. Immunol. 159:3613; 米国特許第5,834,597も参照されたい); およびIgG4についてのS228PおよびL235E

40

50

(Reddy et al. (2000) J. Immunol. 164:1925)を含む。ヒトIgG1におけるエフェクター機能を低減する別の変異の組み合わせは、L234F、L235EおよびP331Sを含む。Oganesyan et al. (2008) Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 64:700。一般にLabrijn et gal. (2008) Curr. Op. Immunol. 20:479を参照されたい。Fc(IgG1)融合タンパク質(アパタセプト)との関連でエフェクター機能を減少させることが見出された付加的な変異はC226S、C229SおよびP238S(EU残基ナンバリング)である。Davis et al. (2007) J. Immunol. 34:2204。

【0112】

減少したADCCおよび/またはCDCを有する他のFcバリエーションは、以下に開示される; Glaesner et al. (2010) Diabetes Metab. Res. Rev. 26:287 (IgG4におけるADCCおよびADCPを減少させるF234AおよびL235A); Hutchins et al. (1995) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 92:11980 (IgG4におけるF234A、G237AおよびE318A); An et al. (2009) MAbs 1:572および米国特許公開第2007/0148167 (IgG2におけるH268Q、V309L、A330SおよびP331S); McEarchern et al. (2007) Blood 109:1185 (IgG1におけるC226S、C229S、E233P、L234V、L235A); Vafa et al. (2014) Methods 65:114 (IgG2におけるV234V、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S、P331S)。

【0113】

或る実施形態では、本質的にエフェクター機能を有さない、すなわち、FcRへの減少した結合および減少した補体結合を有するFcが選択される。例示的なFc、例えば、エフェクターレスであるIgG1 Fcは、以下の5つの変異を含む: L234A、L235E、G237A、A330SおよびP331S。Gross et al. (2001) Immunity 15:289。これらの5つの置換はまた、グリコシル化を除去するためにN297Aと併用されてもよい。

【0114】

III. 抗体の物理的な特性

本明細書中に記載される抗体は、軽または重鎖可変領域のいずれかにおける1以上のグリコシル化部位を含有できる。かかるグリコシル化部位は、抗体の増加した免疫原性または変化した抗原結合に起因する抗体のpKの変化をもたらしてもよい(Marshall et al (1972) Annu Rev Biochem 41:673-702; Gala and Morrison (2004) J. Immunol 172:5489-94; Wallick et al (1988) J Exp Med 168:1099-109; Spiro (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37:697-706)。グリコシル化は、N-X-S/T配列を含有するモチーフで起こることが知られている。いくつかの例では、可変領域グリコシル化を含有しない抗TL1A抗体を有することが好ましい。これは、可変領域におけるグリコシル化モチーフを含有しない抗体を選択することによる、またはグリコシル化領域内の残基を突然変異させることによる、いずれかで達成され得る。

【0115】

或る実施形態では、本明細書中に記載される抗体は、アスパラギン異性部位を含有しない。アスパラギンの脱アミドはN-GまたはD-G配列上で起こってもよく、かつ、ポリペプチド鎖にねじれを導入し、その安定性を減少させるイソアスパラギン酸残基の生成をもたらす(イソアスパラギン酸効果)。

10

20

30

40

50

【0116】

各抗体は、固有の等電点 (pI) を有し、一般に pH 6 から 9.5 間の範囲にあたる。IgG4 抗体についての pI は典型的には、6 - 8 の pH 範囲内にある。正常範囲外の pI を有する抗体は、インビボでの条件下でいくらかのアンフォールディングおよび不安定性を有してもよいという推測がある。したがって、正常範囲にあたる pI 値を含有する抗 T L 1 A 抗体を有することが好ましい。これは、正常範囲における pI を有する抗体を選択することによって、または荷電した表面残基を変異させることによってのいずれかで達成され得る。

【0117】

各抗体は、特徴的な融解温度を有し、より高い融解温度はインビボでより大きい全体の安定性を示す (Krishnamurthy R and Manning M C (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71)。一般に、 T_{M1} (初期のアンフォールディングの温度) は 60 より大きく、好ましくは 65 より大きく、さらにより好ましくは 70 より大きいことが好ましい。抗体の融点は、示差走査熱量測定 (Chen et al (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) Immunol Lett. 68:47-52) または円偏光二色性 (Murray et al. (2002) J. Chromatogr. Sci. 40:343-9) を使用して測定され得る (図5を参照されたい)。

【0118】

好ましい実施形態では、急速に分解しない抗体が選択される。抗体の分解は、キャピラリー電気泳動 (CE) および MALDI-MS を使用して測定され得る (Alexander A J and Hughes D E (1995) Anal Chem. 67:3626-32)。

【0119】

別の好ましい実施形態では、最小の凝集効果を有する抗体が選択され、凝集効果は望ましくない免疫応答の誘発および/または変化したまたは好ましくない薬物動態学的特性を引き起こし得る。一般に、抗体は、25%以下、好ましくは20%以下、さらにより好ましくは15%以下、さらにより好ましくは10%以下およびさらにより好ましくは5%以下の凝集で許容される。凝集は、サイズ排除カラム (SEC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、および光散乱を含むいくつかの技術により測定され得る。

【0120】

ヒト-IgG4 アイソタイプ (10A4-IgG4) としてフォーマットされた抗 T L 1 A mAb 10A4 は、いくつかの標準生物物理学的な技術により特徴付けられ、かつ純粋で、単量体でかつ安定なモノクローナル抗体に典型的な生物物理学的な特性を有することが示された。例えば、マルチアングル光散乱検出器 (MALS) に結合されたサイズ排除高速液体クロマトグラフィー (SE-HPLC) は、抗体の試料は純度90%以上であり、主要種は ~140 kDa の MALS 測定質量を有していたことを示した。動的な光散乱は 5.3 nm の流体力学的半径を決定し、また、溶液における単量体抗体について予想されるものと一致する。示差走査熱量測定データはまた、10A4-IgG4 が、高い熱安定性を有し、70.75、84.698 および 88.50 の転移中点 (T_m) 値を有する3つの異なる熱転移を有することを示した。

【0121】

IV. 核酸分子

本明細書中に記載される別の態様は、本明細書中に記載される抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、全細胞、細胞溶解物、または部分的に精製された、もしくは実質的に純粋な形態で存在してもよい。核酸は、アルカリ性 / SDS 処理、CsCl バンド形成、カラムクロマトグラフィー、制限酵素、アガロースゲル電気泳動および他の当技術分野で周知のものを含む標準技術により、他の細胞成分または他の混入物、例えば、他の細胞核酸 (例えば、他の染色体 DNA、例えば、天然の単離された DNA に結合している染色体

10

20

30

40

50

DNA) またはタンパク質から精製される場合、「単離された」または「実質的に純粋である」。F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York 参照。本明細書中に記載される核酸は、例えば、DNA または RNA であり得、かつイントロン配列を含有しても、しなくてもよい。或る実施形態では、核酸は cDNA 分子である。

【0122】

本明細書中に記載される核酸は、標準分子生物学技術を使用して得られ得る。ハイブリドーマ (例えば、以下にさらに詳細に記載されるヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスから調製されるハイブリドーマ) により発現される抗体について、ハイブリドーマにより作製される抗体の軽および重鎖をコードする cDNA は、標準 PCR 増幅または cDNA クローニング技術により得られ得る。免疫グロブリン遺伝子ライブラリー (例えば、ファージディスプレイ技術を使用する) から得られる抗体について、抗体をコードする核酸は、ライブラリーから回収され得る。

10

【0123】

VH および VL セグメントをコードする DNA 断片が得られると、これらの DNA 断片は、標準組み換え DNA 技術によりさらに操作され得る、例えば、可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子へ、Fab 断片遺伝子へ、または scFv 遺伝子へ変換する。これらの操作において、VL または VH をコードする DNA 断片は、抗体定常領域または可動性リンカーなどの別のタンパク質をコードする別の DNA 断片に作動可能に連結される。この文脈において使用される「作動可能に連結された」という用語は、2つの DNA 断片によりコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように2つの DNA 断片が連結されていることを意味することを意図する。

20

【0124】

VH 領域をコードする単離 DNA は、VH をコードする DNA を重鎖定常領域 (ヒンジ、CH1、CH2 および / または CH3) をコードする別の DNA 分子に作動可能に連結することにより全長重鎖遺伝子へ変換され得る。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野で知られており (例えば、以下 Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 を参照されたい) かつこれらの領域を包含する DNA 断片は、標準 PCR 増幅により得られ得る。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM または IgD 定常領域、例えば、IgG1 領域であり得る。Fab 断片重鎖遺伝子について、VH をコードする DNA は、重鎖 CH1 定常領域のみをコードする別の DNA 分子に作動可能に連結され得る。

30

【0125】

VL 領域をコードする単離 DNA は、VL をコードする DNA を軽鎖定常領域、CL をコードする別の DNA 分子に作動可能に連結することにより全長軽鎖遺伝子 (並びに Fab 軽鎖遺伝子) へ変換され得る。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野で知られており (例えば、Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 を参照されたい)、かつこれらの領域を包含する DNA 断片は、標準 PCR 増幅により得られ得る。軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ定常領域であり得る。

40

【0126】

scFv 遺伝子を作製するために、VH および VL 配列が可動性リンカーに連結された VL および VH 領域を有して連続した一本鎖タンパク質として発現されるように、VH および VL をコードする DNA 断片が可動性リンカーをコードする、例えば、アミノ酸配

50

列 (Gly₄-Ser)₃ をコードする別の断片に作動可能に連結され得る (例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554 参照)。

【0127】

V. 抗体産生

本発明の様々な抗体、例えば本明細書に開示された抗ヒトTL1A抗体と同一のエピトープと、競合または結合する抗体は、Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975) に記載された標準体細胞ハイブリダイゼーション技術などの様々な既知の技術を使用して産生され得る。体細胞ハイブリダイゼーション法が好ましいが、原理上、モノクローナル抗体を産生する他の技術、例えば、Bリンパ球のウイルス性または発癌性形質転換、ヒト抗体遺伝子のライブラリーを使用するファージディスプレイ技術もまた、利用され得る。

【0128】

ハイブリドーマを調製する好ましい動物系として、マウス系がある。マウスにおけるハイブリドーマ産生は、非常に確立された手順である。免疫処置プロトコールおよび融合のための免疫処置された脾臓細胞の単離のための技術は、当技術分野で知られている。融合パートナー (例えば、マウスの骨髄腫細胞) および融合手順もまた、知られている。

【0129】

本明細書中に記載されるキメラの、またはヒト化抗体は、上記に記載されたように調製されたマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて調製され得る。標準分子生物学技術を使用して、重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、目的のマウスのハイブリドーマから得ることができ、かつ非マウスの (例えば、ヒト) 免疫グロブリン配列を含有するよう遺伝子操作できる。例えば、キメラ抗体を作製するために、マウスの可変領域は、当技術分野で既知の方法を使用してヒト定常領域に結合され得る (例えば、米国特許第4,816,567 Cabilly et al. 参照)。ヒト化抗体を作製するために、マウスのCDR領域は、当技術分野で既知の方法を使用してヒトフレームワークに挿入され得る (例えば、Winterの米国特許第5,225,539、およびQueen et al. の米国特許第5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 および6,180,370 参照)。

【0130】

一実施形態では、本明細書中に記載される抗体はヒトモノクローナル抗体である。TL1Aに対するかかるヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくむしろヒト免疫系の一部を有するトランスジェニックまたはトランスクロモゾームマウスを使用して生成され得る。これらのトランスジェニックおよびトランスクロモゾームマウスは、それぞれ本明細書中でHuMAbマウスおよびKMマウスとして呼ばれるマウスを含み、本明細書中でまとめて「ヒトIgマウス」として呼ばれる。

【0131】

HuMAbマウス (登録商標) (Medarex, Inc.) は、内因性μおよび鎖遺伝子座を不活性化する標的変異とともに、再編成されていないヒト重 (μおよび) および軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座 (miniloci) を含有する (例えば、Lonberg, et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859 参照)。従って、マウスはマウスIgMまたは の減少した発現を示し、かつ免疫処置に应答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子は、高親和性ヒトIgGモノクローナルを生成するよう、クラススイッチおよび体細胞突然変異を受ける (Lonberg, N. et al. (1994), supra; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13:

10

20

30

40

50

65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764: 536-546に概説される)。HuMa bマウスの調製および使用、およびかかるマウス保有されるゲノム改変は、以下にさらに記載され：Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuail lon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuail lon et al. (1994) J. Immu 10 nol. 152: 2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) I nternational Immunology 6: 579-591; and Fi shwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnolog y 14: 845-851、その全体が出典明示により具体的に本明細書に組み込まれる。さらに、米国特許第5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; および5,770,429; 全てLonbe 20 rgおよびKay; Surani et al.の米国特許第5,545,807; PC T公開番号WO92/03918、WO93/12227、WO94/25585、WO 97/13852、WO98/24884およびWO99/45962、全てLonbe rgおよびKay; およびKorman et alのPCT公開番号WO01/144 24を参照。

【0132】

或る実施形態では、本明細書中に記載される抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖トランス染色体を有するマウスなどの、導入遺伝子およびトランス染色体上にヒト免疫グロブリン配列を有するマウスを使用して産生される。本明細書中で「KMマウス」として呼ばれるかかるマウスは、Ishida et alのPCT公開WO02/4347 8で詳細に記載される。

【0133】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替トランスジェニック動物系は、当技術分野で入手可能であり、かつ、本明細書中に記載される抗TL1A抗体を産生するために使用され得る。例えば、ゼノマウス(Xenomouse)(Abgenix, Inc.)として呼ばれる代替のトランスジェニック系が使用され得;かかるマウスは、例えば、Kucherlapati et alの米国特許第5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584および6,162,963に記載される。

【0134】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替のトランスクロモソーム動物系は、当技術分野で入手可能であり、かつ本明細書中に記載される抗TL1A抗体を産生するために使用され得る。例えば、「TCマウス」として呼ばれるヒト重鎖トランス染色体およびヒト軽鎖トランス染色体の両方を有するマウスが使用され得;かかるマウスは、Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727に記載される。さらに、ヒト重鎖および軽鎖トランス染色体を有するウシは、当技術分野で記載され(Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20: 889-894)、かつ本明細書中に記載される抗TL1A抗体を産生するために使用され得る。

【0135】

ヒト抗体、例えば、ヒト抗TL1A抗体を作製するための当技術分野において記載されるさらなるマウス系として、(i)内因性マウス重鎖および軽鎖可変領域が、相同組換えによって、内因性マウス定常領域に作動可能に連結された、ヒト重鎖および軽鎖可変領域

10

20

30

40

50

と置換されており、その結果、マウスにおいてキメラ抗体（ヒトV/マウスC）が作製され、次いで、その後、標準組換えDNA技術を使用して完全ヒト抗体に変換される、VELOCIMMUNE（登録商標）マウス（Regeneron Pharmaceuticals, Inc.）ならびに（ii）マウスが再編成されていないヒト重鎖可変領域、しかし単一の再変性されたヒト共通軽鎖可変領域を含有するMeMo（登録商標）マウス（Merus Biopharmaceuticals, Inc.）が挙げられる。このようなマウスおよび抗体を作製するためのその使用は、例えば、WO2009/15777、US2010/0069614、WO2011/0722204、WO2011/097603、WO2011/163311、WO2011/163314、WO2012/148873、US2012/0070861およびUS2012/0073004に記載されている。

10

【0136】

本明細書に記載されるヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を使用して調製できる。ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ法は、当技術分野で確立されている。例えば、Ladner et al.の米国特許第5,223,409号；同5,403,484号；および同5,571,698号；Dower et al.の米国特許第5,427,908号および同5,580,717号；McCafferty et al.の米国特許第5,969,108号および同6,172,197号；ならびにGriffiths et al.の米国特許第5,885,793号；同6,521,404号；同6,544,731号；同6,555,313号；同6,582,915号および同6,593,081号を参照のこと。

20

【0137】

本明細書に記載されるヒトモノクローナル抗体はまた、免疫処置の際にヒト抗体応答が生じ得るようヒト免疫細胞が再編成されているSCIDマウスを使用して調製できる。このようなマウスは、例えば、Wilson et alの米国特許第5,476,996号および同5,698,767号に記載されている。

【0138】

免疫処置

ヒトTL1Aに対する完全ヒト抗体を作製するために、例えば、Lonberg et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851およびWO98/24884によって、その他の抗原について記載されるように、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含有するトランスジェニックまたはトランスクロモソーマルマウス（例えば、HC012、HC07またはKMマウス）を、TL1A抗原および/またはTL1Aを発現する細胞の精製または濃縮された調製物を用いて免疫処置できる。あるいは、マウスをヒトTL1AをコードするDNAを用いて免疫処置できる。好ましくは、マウスは、第1の注入の際に6~16週齢とする。例えば、HuMAbマウスを腹膜内に免疫処置するために、組換えTL1A抗原の精製または濃縮された調製物（5~50μg）を使用できる。TL1A抗原の精製または濃縮された調製物を使用する免疫処置が抗体をもたらさない事象では、TL1Aを発現する細胞、例えば、細胞系統を用いてマウスを免疫処置して、免疫応答を促進することもできる。例示的細胞系統として、TL1A過剰発現性安定CHOおよびRaji細胞系統が挙げられる。

30

40

【0139】

種々の抗原を用いる累積的経験は、HuMAbトランスジェニックマウスは、Ribiaジュバント中の抗原を用いる最初に腹腔内（IP）または皮下（SC）免疫処置と、それに続く、Ribiaジュバント中の抗原を用いる隔週でのIP/SC免疫処置（最大合計10）の際に最良に応答することを示した。免疫応答は、後眼窩出血によって得られている血漿試料を用いて、免疫処置プロトコルの過程にわたってモニタリングできる。血漿は、ELISAおよびFACSによってスクリーニングでき（以下に記載されるように

50

)、抗 T L 1 A ヒト免疫グロブリンの十分な力価を有するマウスを融合のために使用できる。マウスを、抗原を用いて静脈内に追加免疫し、3日後に、屠殺し、脾臓およびリンパ節を採取できる。各免疫処置のために2~3回の融合が実施されることが必要であり得ると予測される。各抗原について、6から24匹の間のマウスが、通常免疫処置される。普通、H C o 7、H C o 1 2 および K M 系統が使用される。さらに、H C o 7 および H C o 1 2 導入遺伝子は両方とも、2種の異なるヒト重鎖導入遺伝子を有する(H C o 7 / H C o 1 2)単一マウスと一緒に育種され得る。

【0140】

T L 1 A に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

本明細書に記載されるヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するために、免疫処置されたマウスから脾細胞および/またはリンパ節細胞を単離し、マウス骨髄腫細胞系統などの適当な不死化細胞系統と融合できる。得られたハイブリドーマを抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングできる。例えば、50% P E G を用いて、免疫処置マウス由来の脾臓リンパ球の単細胞懸濁液を、S p 2 / 0 非分泌性マウス骨髄腫細胞(A T C C、C R L 1 5 8 1)と融合できる。細胞を、およそ 2×10^5 で平底マイクロタイタープレートにプレティングし、続いて、10%胎児クローン血清、18%「653」コンディショニング培地、5%オリゲン(ori gen)(I G E N)、4 mM L - グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム、5 mM H E P E S、0.055 mM 2 - メルカプトエタノール、50 ユニット/ml ペニシリン、50 mg/ml ストレプトマイシン、50 mg/ml ゲンタマイシンおよび1 X H A T (S i g m a) を含有する選択培地で2週間インキュベートする。およそ2週間後、細胞をH A T が H T と置換されている培地で培養できる。次いで、個々のウェルを、ヒトモノクローナルI g M およびI g G 抗体についてE L I S A によってスクリーニングできる。広範なハイブリドーマ成長が起こると、10~14日後に普通に培地を観察できる。抗体を分泌するハイブリドーマを再プレティングし、再度スクリーニングでき、ヒトI g G について依然として陽性である場合に、制限希釈によってモノクローナル抗体を少なくとも2回サブクロニングできる。次いで、安定なサブクローンをインビトロで培養して、特性決定のために組織培養培地において少量の抗体を作製できる。

【0141】

ヒトモノクローナル抗体を精製するために、選択されたハイブリドーマを、2リットルのスピナーフラスコ中で成長させることができる。プロテインA - セファロース(P h a r m a c i a , P i s c a t a w a y , N . J .) を用いるアフィニティークロマトグラフィーの前に、上清を濾過し、濃縮できる。溶出されたI g G を、ゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィーによって調べ、純度を確実にすることができる。バッファー溶液は、P B S に交換でき、1.43吸光係数を使用してO D 2 8 0 によって濃度を決定できる。モノクローナル抗体をアリコートにし、- 8 0 で保存できる。

【0142】

V I . 抗体製造

T L 1 A に対するモノクローナル抗体を産生するトランスフェクターマの作製

配列が提供される特異的抗体およびその他の関連抗 T L 1 A 抗体の両方を含めた、本発明の抗体を、当技術分野で周知であるように、例えば、組換えD N A 技術および遺伝子トランスフェクション法の組合せを使用して宿主細胞トランスフェクターマにおいて産生できる(M o r r i s o n , S . (1 9 8 5) S c i e n c e 2 2 9 : 1 2 0 2) 。

【0143】

例えば、抗体またはその抗体断片を発現させるために、部分または全長軽鎖および重鎖をコードするD N A を、標準分子生物学技術(例えば、P C R 増幅または対象の抗体を発現するハイブリドーマを使用するc D N A クローニング)によって得ることができ、遺伝子が、転写および翻訳制御配列に作動可能に連結されるように、D N A を発現ベクター中に挿入することができる。これに関連して、用語「作動可能に連結された」は、ベクター内の転写および翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するというその意図

される機能を果たすよう、抗体遺伝子がベクター中にライゲーションされることを意味するものとする。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合するよう選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別個のベクター中に挿入されてもよく、または両遺伝子は、同一発現ベクター中に挿入される。抗体遺伝子は、標準方法（例えば、抗体遺伝子断片上の相補的制限部位およびベクターの連結または制限部位が存在しない場合には平滑末端連結）によって、発現ベクター（単数または複数）中に挿入される。本明細書に記載される抗体の軽鎖および重鎖可変領域を使用し、 V_H セグメントがベクター内の C_H セグメント（単数または複数）と作動可能に連結され、 V_L セグメントが、ベクター内の C_L セグメントと作動可能に連結されるように、それらを所望のアイソタイプの重鎖定常および軽鎖定常領域をすでにコードする発現ベクター中に挿入することによって任意の抗体アイソタイプの全長抗体遺伝子を作製できる。さらに、またはあるいは、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードし得る。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが、抗体鎖遺伝子のアミノ末端とインフレームで連結されるように、ベクター中にクロニングできる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であり得る。

10

【0144】

組換え発現ベクターは、抗体鎖遺伝子に加えて、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を保持し得る。用語「調節配列」とは、プロモーター、エンハンサーおよび抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するその他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むものとする。このような調節配列は、例えば、Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)) に記載されている。調節配列の選択を含めた発現ベクターの設計は、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に応じて変わり得る当業者には明らかである。哺乳動物宿主細胞発現のための好ましい調節配列として、サイトメガロウイルス (CMV)、サルウイルス40 (SV40)、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター (AdMLP) およびポリオーマ由来のプロモーターおよび/またはエンハンサーなどの、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現を指示するウイルスエレメントが挙げられる。あるいは、ユビキチンプロモーターまたは - グロビンプロモーターなどの非ウイルス調節配列を使用してもよい。なおさらに、調節エレメントは、SV40初期プロモーター由来の配列およびヒトT細胞白血病ウイルス1型の長い末端反復配列を含有する、SRプロモーター系などの異なる供給源に由来する配列からなる (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466 - 472)。

20

30

【0145】

組換え発現ベクターは、抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列（例えば、複製の起点）などのさらなる配列および選択マーカー遺伝子を保持し得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を促進する（例えば、すべてAxel et al. による米国特許第4,399,216号、同4,634,665号および同5,179,017号を参照のこと）。例えば、通常、選択マーカー遺伝子は、G418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を、ベクターが導入されている宿主細胞に付与する。好ましい選択マーカー遺伝子として、ジヒドロホレートレダクターゼ (DHFR) 遺伝子（メトトレキサート選択/増幅とともに、dhfr-宿主細胞において使用するための）およびneo遺伝子（G418選択のための）が挙げられる。

40

【0146】

軽鎖および重鎖の発現のために、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクター（単数または複数）を、標準技術によって宿主細胞にトランスフェクトする。用語「トランスフェクション」の種々の形態は、原核生物または真核生物宿主細胞への外因性DNAの導入のため

50

によく使用されるさまざまな技術、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含するものとする。原核生物または真核生物宿主細胞のいずれかにおいて本明細書に記載される抗体を発現させることは理論上可能であるが、真核細胞、最も好ましくは、哺乳動物宿主細胞における抗体の発現が、最も好ましいが、これは、このような真核細胞、特に、哺乳動物細胞は、適切にフォールディングされ、免疫学的に活性な抗体を組み立て、分泌する可能性が原核細胞よりも高いからである。抗体遺伝子の原核生物発現は、活性な抗体の高効率の産生にとっては有効ではないと報告されている (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6: 12-13)。本発明の抗体はまた、酵母ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) の糖鎖操作された株においても産生できる。Li et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24: 210。

【0147】

本明細書に記載される組換え抗体を発現させるための好ましい哺乳動物宿主細胞として、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO細胞) (例えば、R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621に記載されるように、DHFR選択マーカータとも使用される、Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220に記載されたdhfr-CHO細胞を含む)、NSO骨髄腫細胞、COS細胞およびSP2細胞が挙げられる。特に、NSO骨髄腫細胞とともに使用するためには、別の好ましい発現系として、WO87/04462、WO89/01036およびEP338,841に開示されるGS遺伝子発現系がある。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターは、哺乳動物宿主細胞中に導入され、抗体は、宿主細胞を、宿主細胞における抗体の発現、またはより好ましくは、宿主細胞が成長した培養培地への抗体の分泌を可能にするのに十分な期間培養することによって産生される。抗体は、標準タンパク質精製法を使用して培養培地から回収できる。

【0148】

本発明の抗体ポリペプチド鎖のNおよびC末端は、よく観察される翻訳後修飾によって予測される配列とは異なることもある。例えば、C末端リシン残基は、抗体重鎖から失われていることが多い。Dick et al. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100: 1132。N末端グルタミン残基およびより少ない程度であるが、グルタミン酸残基は、治療用抗体の軽鎖および重鎖の両方でピログルタミン酸残基に変換されることが頻繁にある。Dick et al. (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97: 544; Liu et al. (2011) *JBC* 286: 11211; Liu et al. (2011) *J. Biol. Chem.* 286: 11211。

【0149】

VII. アッセイ

本明細書に記載される抗体は、TL1Aとの結合について、例えば、標準ELISAによって試験できる。手短には、マイクロタイタープレートに精製されたTL1Aを、PBS中1~2 μg/mLで用いてコーティングし、次いで、PBS中5%ウシ血清アルブミンを用いてブロッキングする。各ウェルに抗体の希釈物 (例えば、TL1A免疫処置マウスから得た血漿の希釈物) を添加し、37°Cで1~2時間インキュベートする。プレートをPBS/Tweenを用いて洗浄し、次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) とコンジュゲートしている二次試薬 (例えば、ヒト抗体、ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクローナル試薬) とともに37°Cで1時間インキュベートする。洗浄した後、プレートをABTS基質 (Moss Inc, product: ABTS-1000) を用いて発色させ、OD415~495で分光光度計によって分析する。次いで、免疫処置されたマウスから得た血清を、TL1Aを発現しないコントロール細胞株とではなく、ヒトTL1Aを発現する細胞株との結合についてフローサイトメトリーによってさらにスクリーニングする。手短には、抗TL1A抗体の結合を、TL1A発現性CHO細胞を1:20希

10

20

30

40

50

釈の抗 T L 1 A 抗体とともにインキュベートすることによって評価する。細胞を洗浄し、結合を、P E 標識された抗ヒト I g G A b を用いて検出する。F A C S c a n フローサイトメトリー (B e c t o n D i c k i n s o n , S a n J o s e , C A) を使用してフローサイトメトリー分析を実施する。最高の力価を発生するマウスが、融合に使用されることが好ましい。

【 0 1 5 0 】

上記のような E L I S A アッセイを使用して、抗体、ひいては、T L 1 A 免疫原と陽性の反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマについてスクリーニングできる。好ましくは、高親和性で T L 1 A と結合する抗体を産生するハイブリドーマを、サブクロニングし、さらに特性決定できる。細胞バンクを作製するために、抗体精製のために、親細胞の反応性を保持する (E L I S A によって) 各ハイブリドーマから 1 つのクローンを選択できる。

10

【 0 1 5 1 】

抗 T L 1 A 抗体を精製するために、モノクローナル抗体精製のために 2 リットルのスピナーフラスコ中で選択されたハイブリドーマを成長させることができる。プロテイン A - セファロース (P h a r m a c i a , P i s c a t a w a y , N J) を用いるアフィニティークロマトグラフィーの前に、上清を濾過し、濃縮できる。溶出された I g G を、ゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィーによって調べ、純度を確実にすることができる。バッファー溶液は、P B S に交換でき、1 . 4 3 吸光係数を使用して O D _{2 8 0} によって濃度を決定できる。モノクローナル抗体をアリコートにし、- 8 0 で保存できる。

20

【 0 1 5 2 】

選択された抗 T L 1 A モノクローナル抗体が独特のエピトープと結合するか否かを調べるために、市販の試薬 (P i e r c e , R o c k f o r d , I L) を使用して各抗体をビオチン化できる。ビオチン化 M A b 結合は、ストレプトアビジン標識されたプローブを用いて検出できる。上記のように、T L 1 A コーティングされた E L I S A プレートを使用して、非標識モノクローナル抗体およびビオチン化モノクローナル抗体を使用する競合研究を実施できる。

【 0 1 5 3 】

精製された抗体のアイソタイプを調べるために、特定のアイソタイプの抗体に対して特異的な試薬を使用してアイソタイプ E L I S A を実施できる。例えば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを調べるために、1 μ g / m l の抗ヒト免疫グロブリンを用いてマイクロタイタープレートのウェルを、4 で一晚コーティングできる。1 % B S A を用いてブロッキングした後、プレートを、1 μ g / m l 以下の試験モノクローナル抗体または精製されたアイソタイプコントロールと周囲温度で 1 ~ 2 時間反応させる。次いで、ウェルをヒト I g G 1 またはヒト I g M 特異的アルカリホスファターゼがコンジュゲートしているプローブのいずれかと反応させる。プレートを上記のように発色させ、分析する。

30

【 0 1 5 4 】

モノクローナル抗体の、T L 1 A を発現する生存細胞との結合を調べるために、実施例 1 7 に記載されるようにフローサイトメトリーを使用できる。手短には、膜結合性 T L 1 A を発現する細胞株 (標準成長条件下で成長させた) を、0 . 1 % B S A を含有する P B S 中、種々の濃度のモノクローナル抗体と 4 で 1 時間混合する。洗浄した後、細胞を、一次抗体染色と同一条件下でフィコエリトリン (P E) 標識された抗 I g G 抗体と反応させる。試料を光および側方散乱特性を使用する F A C S c a n 機器によって分析して、単細胞でゲート開閉し、標識された抗体の結合を調べる。フローサイトメトリーアッセイ (に加えて、または代わりに) 、蛍光顕微鏡を使用する代替アッセイを使用してもよい。上記のように細胞を正確に染色し、蛍光顕微鏡によって調べることができる。この方法によって、個々の細胞の可視化が可能となるが、抗原の密度に応じて減少した感受性を有し得る。

40

【 0 1 5 5 】

50

抗 T L 1 A 抗体は、ウエスタンブロッティングによって T L 1 A 抗原との反応性についてさらに試験できる。手短には、T L 1 A を発現する細胞から細胞抽出物を調製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動に付すことができる。電気泳動後、分離された抗原をニトロセルロースメンブランにトランスファーし、20%マウス血清を用いてブロッキングし、試験されるべきモノクローナル抗体を用いてプロービングする。抗 I g G アルカリホスファターゼを使用して I g G 結合を検出し、B C I P / N B T 基質錠剤を用いて発色させることができる (S i g m a C h e m . C o . , S t . L o u i s , M O) 。

【 0 1 5 6 】

種々の抗 T L 1 A 抗体の結合親和性、交差反応性および結合速度論を解析する方法は、当技術分野で公知の標準アッセイ、例えば、B I A C O R E (登録商標) 2 0 0 0 S P R 機器 (B i a c o r e A B , U p p s a l a , S w e d e n) を使用する B I A C O R E (登録商標) 表面プラズモン共鳴 (S P R) 分析を含む。

10

【 0 1 5 7 】

一実施形態では、抗体は、ヒト T L 1 A の細胞外領域と特異的に結合する。抗体は、T L 1 A の細胞外ドメイン内の特定のドメイン (例えば、機能的ドメイン) と特異的に結合し得る。特定の実施形態では、抗体は、D R 3 が結合する T L 1 A 上の部位と特異的に結合する。特定の実施形態では、抗体は、ヒト T L 1 A の細胞外領域およびカニクイザル T L 1 A の細胞外領域と特異的に結合する。好ましくは、抗体は、高親和性でヒト T L 1 A と結合する。

20

【 0 1 5 8 】

V I I I . 組成物

容される担体と一緒に製剤化された、本明細書に記載される抗 T L 1 A 抗体またはその抗原結合断片 (単数または複数) の 1 つまたは組み合わせを含有する組成物、例えば、医薬組成物がさらに提供される。

【 0 1 5 9 】

或る実施形態では、組成物は、少なくとも 1 m g / m l 、 5 m g / m l 、 1 0 m g / m l 、 5 0 m g / m l 、 1 0 0 m g / m l 、 1 5 0 m g / m l 、 2 0 0 m g / m l の濃度で、または 1 ~ 3 0 0 m g / m l もしくは 1 0 0 ~ 3 0 0 m g / m l で抗 T L 1 A 抗体を含む。

30

【 0 1 6 0 】

本明細書に記載される医薬組成物はまた、併用療法において、すなわち、その他の薬剤と組み合わせて投与できる。例えば、併用療法は、少なくとも 1 種のその他の免疫抑制剤と組み合わせた、本明細書に記載される抗 T L 1 A 抗体を含み得る。

【 0 1 6 1 】

本明細書において、「医薬上許容される担体」として、生理学的に適合する、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられる。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与 (例えば、注射または注入による) に適している。投与経路に応じて、化合物を、酸および化合物を不活性化し得るその他の天然条件作用から保護するために、材料において、活性化化合物、すなわち、抗体、免疫複合体または二重特異性分子をコーティングしてもよい。

40

【 0 1 6 2 】

本明細書に記載される医薬化合物は、1種または複数の医薬上許容される塩を含み得る。「医薬上許容される塩」とは、親化合物の所望の生物活性を保持し、何らかの望ましくない毒物学的影響を付与しない塩を指す (例えば、B e r g e , S . M . , e t a l . (1 9 7 7) J . P h a r m . S c i . 6 6 : 1 - 1 9 を参照のこと) 。このような塩の例として、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩として、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などといった非毒性無機酸に由来するものならびに脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカ

50

ン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などといった非毒性有機酸に由来するものが挙げられる。塩基付加塩として、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどといったアルカリ土類金属に由来するものならびにN, N' -ジベンジルエチレンジアミン、N -メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどといった非毒性有機アミンに由来するものが挙げられる。

【0163】

本明細書に記載される医薬組成物はまた、医薬上許容される抗酸化物質を含み得る。医薬上許容される抗酸化物質の例として、(1)アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどといった水溶性抗酸化物質、(2)パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなどといった油溶性抗酸化物質および(3)クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などといった金属キレート化剤が挙げられる。

10

【0164】

本明細書に記載される医薬組成物において使用され得る、適した水性および非水性担体の例として、水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどといった)およびそれらの適した混合物、オリーブオイルなどの植物油およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散物の場合には必要な粒径の維持によって、また界面活性剤の使用によって維持できる。

20

【0165】

これらの組成物はまた、保存料、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントを含有し得る。微生物の存在の防止は、滅菌法手順、前掲によって、また種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などを含めることの両方によって確実にできる。糖、塩化ナトリウムなどといった等張剤を組成物中に含めることが望ましい場合もある。さらに、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延する薬剤を含めることによって、注射用医薬品形態の長期の吸収を引き起こすことができる。

【0166】

医薬上許容される担体として、滅菌水溶液または分散物および滅菌注射用溶液または分散物の即時調製のための滅菌散剤が挙げられる。医薬上活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で公知である。任意の従来媒体または薬剤が、活性化化合物と不適合である場合を除いて、本明細書に記載される医薬組成物におけるその使用が考慮される。補足活性化化合物もまた、組成物中に組み込まれ得る。

30

【0167】

治療用組成物は、通常、製造および貯蔵の条件下で無菌で、安定でなくてはならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソームまたは高薬物濃度に適したその他の秩序構造として製剤化できる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど)およびそれらの適した混合物を含有する、溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散物の場合には必要な粒径の維持によって、また界面活性剤の使用によって維持できる。多くの場合、組成物中に、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールまたは塩化ナトリウムなどのポリアルコールを含めることが好ましいであろう。組成物中に吸収を遅延する薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを含めることによって、注射用組成物の長期吸収を引き起こすことができる。

40

【0168】

滅菌注射用溶液は、必要に応じて、上記で列挙された成分のうち1種または組合せとともに、適当な溶媒中に必要な量の活性化化合物を組み込むことと、それに続く、滅菌精密濾過によって調製できる。一般に、分散物は、基本分散媒および上記で列挙されたものから

50

必要なその他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に活性化化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌散剤の場合には、調製の好ましい方法として、その前もって滅菌濾過された溶液から有効成分および任意のさらなる所望の成分の粉末が得られる、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）がある。

【0169】

単一投与形を生産するための担体材料と組み合わせられ得る有効成分の量は、治療されている対象および特定の投与様式に応じて変わる。単一投与形を生産するための担体材料と組み合わせられ得る有効成分の量は、一般に、治療効果を生産する組成物の量となる。一般に、医薬上許容される担体との組合せにおいて、この量は、100パーセントのうち、有効成分の約0.01パーセント～約99パーセント、好ましくは、約0.1パーセント～約70パーセント、最も好ましくは、有効成分の約1パーセント～約30パーセントの範囲となる。

10

【0170】

投与計画は、最適の所望の応答（例えば、治療的応答）を提供するよう調整される。例えば、単回ボラスを投与してもよく、いくつかの分割用量を経時的に投与してもよく、または治療状況の緊急事態によって示されるように、用量を比例的に低減または増大してもよい。投与の容易性および投与形の均一性のための投与単位形に非経口組成物を製剤化することは特に有利である。本明細書において、投与単位形とは、治療されている対象の単位投与量として適している物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要な医薬担体と関連して所望の治療効果を生産するよう算出された所定の量の活性化化合物を含有する。本明細書に記載される投与単位形の仕様は、（a）活性化化合物の独特の特徴および達成されるべき特定の治療効果ならびに（b）個体における感受性の治療のためのこのような活性化化合物の配合の技術分野に固有の制限によって決定され、それらに直接左右される。

20

【0171】

抗体の投与のために、投与量は、約1～100mg/宿主体重1kg、より通常は、1～50mg/宿主体重1kgの範囲である。例えば、投与量は、40mg/体重1kg、30mg/体重1kg、20mg/体重1kg、15mg/体重1kg、10mg/体重1kgまたは5mg/体重1kgまたは1～20mg/kgの範囲内であり得る。例示的治療計画は、週に1回、2週に1回、3週に1回、4週に1回、月に1回、3～6ヶ月に1回の投与を必要とする。

30

【0172】

抗体は、持続放出製剤として投与でき、この場合には、あまり頻繁ではない投与が必要とされる。投与量および頻度は、患者における抗体の半減期に応じて変わる。一般に、ヒト抗体は、最長の半減期を示し、ヒト化抗体、キメラ抗体および非ヒト抗体が続く。投与の投与量および頻度は、治療が維持的であるか、治療的であるかに応じて変わり得る。維持的適用では、比較的少ない投与量が、比較的頻繁ではない間隔で長期間にわたって投与される。一部の患者は、生涯治療を受け続ける。治療的適用では、疾患の進行が低減または終結されるまで、好ましくは、患者が疾患の症状の部分的または完全寛解を示すまで、比較的短い間隔の比較的多い投与量が時には必要である。その後、患者は、投与計画を投与されることがある。

40

【0173】

本明細書に記載される医薬組成物中の有効成分の実際の投与量レベルは、特定の患者、組成物および投与様式について所望の治療応答を達成するのに有効である有効成分の量を得るよう変えてもよい。選択される投与量レベルは、使用される本明細書に記載される特定の組成物またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与の時間、使用されている特定の化合物の排出速度、治療期間、使用される特定の組成物と組み合わせて使用されるその他の薬物、化合物および/または材料、治療されている患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康および先の病歴および医薬の技術分野において周知の同様の因子を含めた種々の薬物動態因子に応じて変わる。

【0174】

50

本明細書中に記載される抗 T L 1 A 抗体の「治療有効量」は、好ましくは疾患症状の重症度における減少、疾患症状のない期間の頻度および持続時間における増加、または疾患の苦痛に起因する機能障害または能力障害の予防をもたらす。

【0175】

本明細書に記載される組成物は、当技術分野で公知の1種または複数の種々の方法を使用して、1種または複数の投与経路によって投与できる。当業者には明らかであろうが、投与経路および/または投与様式は、所望の結果に応じて変わる。本明細書に記載される抗体の好ましい投与経路として、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または例えば、注射もしくは注入によるその他の非経口投与経路が挙げられる。本明細書において、語句「非経口投与」とは、経腸および局所投与以外の、通常注射による投与様式を意味し、制限するものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および注入が挙げられる。

10

【0176】

あるいは、本明細書中に記載される抗体は、局所的な、表皮、または粘膜投与経路、例えば、鼻腔内、経口、膈内、直腸内、舌下または局所などの非経口的な経路を介して投与され得る。

【0177】

留置用剤、経皮パッチおよびマイクロカプセル化送達系を含めた徐放性製剤など、活性化化合物を、化合物を迅速な放出から保護する担体を用いて調製できる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用できる。このような製剤を調製するための多数の方法が、特許権をとられているか、または一般的に、当業者に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照のこと。

20

【0178】

治療用組成物は、当技術分野で公知の医療装置を用いて投与できる。例えば、好ましい実施形態では、本明細書に記載される治療用組成物は、米国特許第5,399,163号；同5,383,851号；同5,312,335号；同5,064,413号；同4,941,880号；同4,790,824号；または同4,596,556号に開示される装置などの注射針無し皮下注射装置を用いて投与できる。本明細書に記載される抗 T L 1 A 抗体とともに使用するための周知の留置用剤およびモジュールの例として、制御された速度で医薬を分配するための埋め込み可能な微量注入ポンプを開示する米国特許第4,487,603号が挙げられる。；皮膚を通して医薬を投与するための治療用装置を開示する同4,486,194号；正確な注入速度で医薬を送達するための医薬注入ポンプを開示する同4,447,233号；連続薬物送達のための可変流動埋め込み可能注入器具を開示する同4,447,224号；マルチチャンバーコンパートメントを有する浸透圧薬物送達システムを開示する同4,439,196号；および浸透圧薬物送達システムを開示する同4,475,196号が挙げられる。これらの特許は、参照により本明細書に組み込まれる。多数のその他のこのような留置用剤、送達系およびモジュールが、当業者に公知である。

30

40

【0179】

IX. 使用および方法

本明細書に記載される抗体、抗体組成物および方法は、例えば、T L 1 A シグナル伝達をブロックすることによる免疫応答の抑制または T L 1 A の検出に絡む多数のインビトロおよびインビボ有用性を有する。好ましい実施形態では、本明細書に記載される抗体は、ヒト抗体である。例えば、本明細書に記載される抗 T L 1 A 抗体は、インビトロもしくはエキソビボで培養細胞に、または種々の疾患において免疫性を抑制するために、例えば、インビボでヒト対象に投与できる。したがって、対象において免疫応答が改変されるよう

50

に、対象に、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、対象において免疫応答を改変する方法が、本明細書において提供される。好ましくは、応答は、阻害され、抑制され、または減少する。

【0180】

また、試料およびコントロール試料を、ヒトTL1Aと特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、抗体または断片とヒトTL1Aとの複合体の形成を可能にする条件下で接触させることを含む、試料におけるヒトTL1A抗原の存在を検出するか、またはヒトTL1A抗原の量を測定するための方法も包含される。次いで、複合体の形成を検出し、これでは、コントロール試料と比較した、試料間の複合体形成の相違が、試料におけるヒトTL1A抗原の存在を示す。さらに、本明細書に記載される抗TL1A抗体は、イムノアフィニティー精製によってヒトTL1Aを精製するために使用できる。

10

【実施例1】

【0181】

実施例1

TL1A免疫処置および融合

KM免疫処置：

TL1Aへの完全ヒトモノクローナル抗体を生成するために、KMマウス^{T^M}を精製された組み換えTL1A抗原(R&D systems 1319-TL/CF)で免疫処置した(表1)。

20

【表1】

表1 TL1A融合2596

マウス系	マウス	融合	融合力価	リンパ球融合	TL1A陽性ハイブリドーマ
KM	238401	2596	4050	5 x 10 ⁷	70

Ribiアジュバントにおける15ugの可溶性のTL1Aプラス5ugのTNP標識化TL1Aを0、5、8、11、15、および18日にSCプラスホックで注射し、その後22日に融合した。

30

【0182】

Ribiアジュバントにおける15ugの天然抗原、および5ugのTNP改変抗原の混合物を0、5、8、11、15および18日にホックプラス複数部位の皮下(SC)に注射し、その後22日に脾臓およびリンパ節B細胞の融合をした。TNP改変TL1Aを、5μlのピクリルスルホン酸(Sigma 92822)を1mgのTL1Aと4時間、4で混合することにより作製し、その後PBSで一晩透析した。

【0183】

BTLAへのヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの産生：

KMマウス^{T^M}から単離されたリンパ球を電気融合によりマウス骨髄腫細胞株と融合した。電気融合は、Cytoplus^{T^M}融合キュベット中の電極間にリンパ球および骨髄腫細胞を整列させるよう電流を使用し、かつ細胞膜を横切る電位を短時間上昇させることにより達成した。電流の短いパルスは、隣接する細胞間の孔を開く膜を不安定化させる。このプロセスの間に、隣接する細胞の膜は融合し、ハイブリッド骨髄腫：リンパ球(hybridoma)細胞をもたらす。

40

【0184】

免疫処置マウスからのリンパ球の単一の細胞懸濁液を、電気融合により同数のP3X63-Ag8.653非分泌性マウス骨髄腫細胞(ATCC、CRL 1580)と融合した。細胞を平底マイクロタイタープレートに約2.5 x 10⁴で播種し、その後10% FBS、3-5% Origin(IGEN)、OPI supplement(Sigm

50

a O 5003 : 1.1×10^{-3} M オキサロ酢酸、 4.5×10^{-4} M ピルビン酸ナトリウム、4 mM L - グルタミン、0.055 mM 2 -メルカプトエタノール、および 1 X HAT (Sigma H0262) を含有する選択培地でのインキュベーションが続く。約 1 週間後、細胞を HAT を HT (Sigma H0137) で置換した培地で培養した。次いで、個々のウェルを自動均質アッセイによってスクリーニングして、ヒト Ig G カップ抗体を産生するウェルを選択した。引き続き、これらのヒト Ig G 陽性ウェルを TL1A 抗原被覆プレート上で ELISA によりスクリーニングして、TL1A 特異的なヒト Ig G カップ抗体を分泌するハイブリドーマを選択した。抗体分泌ハイブリドーマを 24 ウェルプレートへ再播種し、再度スクリーニングし、それらが TL1A に特異的な抗体を依然として産生する場合、細胞を - 80 または液体窒素 (LN2) 下で凍結して保存した。抗 TL1A モノクローナル抗体を限界希釈によって少なくとも 2 回サブクロニングした。安定なサブクローンをインビトロで培養し、さらなる特性評価のために組織培養培地で少量の抗体を生成した。サブクローンの凍結アリコートで LN2 で凍結させることにより保存した。

10

【0185】

このハイブリドーマ : TL1A 2596 . 10A4 . F7 . 2E8 について使用される命名プロトコールは以下の通りである。抗体は、TL1A に特異的であり、かつ融合 2596 に由来する。親クローンはプレート 10 ウェル A4 から単離された。10A4 . F7 は、親クローン 10A4 のサブクローンであり、かつ 10A4 . F7 . 2E8 は、10A4 . F7 のサブクローンである。

20

【0186】

抗原への抗体結合の特性評価

本開示の抗体は、例えば、標準 ELISA により TL1A への結合について試験され得る。簡潔には、マイクロタイタープレートは PBS 中で $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製された TL1A でコーティングされ、PBS / tween 中で 1% ウシ血清アルブミンでブロックされる。抗体の希釈液 (例えば、TL1A - 免疫処置マウスからの血漿、または細胞培養上清の希釈液) は、各ウェルに加えられ、周囲温度で 1 - 2 時間インキュベートした。プレートを PBS / Tween で洗浄し、次いで西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした二次試薬 (例えば、ヒト抗体、ヤギ抗ヒト Ig G Fc 特異的ポリクローナル試薬) と周囲温度で 1 時間インキュベートした。洗浄後、プレートを ABTS (2, 2' - アジノ - ビス - (3 - エチルベンズチアゾリン (ethyl benz thiazoline) - 6 - スルホン酸) 基質 (Moss Substrates, $1.46 \text{ mmol}/\text{L}$) で発色し、OD405 で解析した。

30

【0187】

上記に記載された ELISA アッセイはまた、TL1A 免疫原と陽性反応性を示すハイブリドーマについてスクリーニングするために使用され得る。TL1A に高い結合活性で結合するハイブリドーマをサブクロニングし、さらに特性評価する。親細胞の反応性を保持する (ELISA による) 各ハイブリドーマからの 1 つのクローンは、- 140 で保存された 5 - 10 のバイアル細胞バンクを作製するため、および抗体精製のために選択され得る。

40

【0188】

抗 TL1A 抗体を精製するために、選択されたハイブリドーマは、モノクローナル抗体精製のために組織培養フラスコ中で 1 - 2 L の容積まで増殖され得る。上清はプロテイン A - セファロース (Pharmacia, Piscataway, NJ) を用いるアフィニティークロマトグラフィー前に濾過され、かつ濃縮され得る。溶出された Ig G は、純度を保証するためにゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーにより確認される。緩衝液は、PBS に交換することができ、濃度は、 1.43 吸光係数を使用して OD₂₈₀ により決定され得る。モノクローナル抗体は分注され、- 80 で保存され得る。

【0189】

選択された抗 TL1A モノクローナル抗体が、固有のエピトープに結合するかを決定す

50

るために、各抗体は、商業的に入手可能な試薬 (Pierce, Rockford, IL) を使用してビオチン化され得る。非標識モノクローナル抗体およびビオチン化モノクローナル抗体を使用する競合研究は、上記に記載されるように T L 1 A 被覆 - E L I S A プレートを使用して行われ得る。ビオチン化 m A b 結合は、ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼプローブで検出され得る。その上、類似の競合研究は、T L 1 A - C H O 細胞の F A C S によりなされ得る。細胞への T L 1 A 抗体の結合は、抗ヒト I g - フィコエリトリンプローブを用いて検出され得る。

【0190】

精製された抗体のアイソタイプを決定するために、アイソタイプ E L I S A は、特定のアイソタイプの抗体に特異的な試薬を使用して行われ得る。例えば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを決定するために、マイクロタイプレートのウェルは、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗ヒト免疫グロブリンで一晩、4 でコートされ得る。1% B S A でブロッキングした後、プレートを1から2時間周囲温度で $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の試験モノクローナル抗体または精製されたアイソタイプコントロールと反応させる。ウェルは、ヒト I g G 1 またはヒト I g M - 特異的西洋ワサビペルオキシダーゼ - 抱合型プローブのいずれかと反応され得る。上記に記載されたように、プレートを発色し、解析する。

10

【0191】

F A C S アッセイを、本開示の抗体が細胞上で発現される天然 T L 1 A に結合することを検証するために使用した。簡潔には、P B S 1% B S A プラス 0.5% アジ化ナトリウム (F A C S 緩衝液) 中の抗体の希釈液を T L 1 A を発現するトランスフェクト C H O 細胞 (10^5 細胞) と 4 で 30 - 60 分間インキュベートした。細胞を、遠心分離、上清の吸引、および新鮮な F A C S 緩衝液の添加により、2 回洗浄した。細胞上の T L 1 A への抗体結合を、4 で 30 分間 P E (フィコエリトリン) 標識化ヤギ抗ヒト I g G (F c 特異的) 抗体中で細胞をインキュベートし、上記のように 2 回 (2 x) 細胞を洗浄し、かつ F A C S で解析することにより検出した (図 1)。

20

【0192】

D R 3 への T L 1 A 結合をブロックする抗 T L 1 A 抗体の同定はまた、C H O 細胞上で発現される h D R 3 (D R 3 C H O) への可溶性 T L 1 A - S H 6 タンパク質 (h i s でタグされた) 結合を使用することによる F A C S により行われた。抗 T L 1 A またはコントロール抗体を F A C S 緩衝液中で 30 分間 $0.1 - 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で T L 1 A S H 6 抗原とインキュベートし、次いで h D R 3 C H O 細胞を抗体 T L 1 A 混合物に加え、30 分間インキュベートした。細胞を洗浄し、h D R 3 C H O 細胞への T L 1 A 結合を P E 抗 h i s 抗体および、その後の F A C S で検出した。ブロッキング抗体は、T L 1 A S H 6 が h D R 3 C H O 細胞に結合することを防ぐ (図 2)。

30

【0193】

実施例 2

抗 T L 1 A 抗体精製

ハイブリドーマからの元の抗 T L 1 A 抗体、1490 - 2596 - 10A4 . F7 . 2E8 は、C H O 細胞中で組み換えタンパク質として発現され、T L 1 A . 2 と呼ばれる。このタンパク質は、G 4 P F c バージョン並びに G 1 . 1 f F c バージョンとして発現される。C H O 細胞から得られる上清は M a b S e l e c t S u r e プロテイン A カラムで精製した。簡潔には、C H O 上清を P B S (リン酸緩衝液生理食塩水)、p H 7 . 4 で予め平衡化したプロテイン A カラムにかけた。サンプルローディング後に P B S で広範にカラムを洗浄し、その後 0.1 M クエン酸緩衝液、p H 3 . 0 を使用して結合タンパク質を溶出した。溶出したタンパク質を、適切な量の 1 M T r i s 緩衝液の添加により直ちに中性 p H にした。次いで、試料を広範な透析により P B S へ緩衝液を交換した。

40

【0194】

精製された抗体の濃度は、 280 nm でタンパク質の吸光度を測定することにより決定された。 280 nm での 1 . 4 の吸光度は、 $1 \text{ mg}/\text{mL}$ の抗体と等しいと考えられる。抗体の純度は B i o a n a l y z e r 並びに C E - S D S 方法により確認した。精製され

50

た試料中での内毒素レベルをLAL動態法により測定した。

【0195】

凝集レベルは、SEC-HPLC並びにSEC-MALLS法により決定した。抗体の同一性は、エドマン配列決定により抗体の軽および重鎖のN-末端アミノ酸配列を決定することにより確認した。抗体の軽および重鎖の質量はLC-MS法により決定した。抗体の不均一性は、TSK Ether 5PWカラムを使用する疎水性相互作用クロマトグラフィーにより評価した。抗体のオリゴ糖特性は、PNGase F酵素を使用して抗体からグリカン構造を除去し、オリゴを蛍光標識化し、かつキャピラリー電気泳動法によるさらなる解析により決定した。

【0196】

実施例3

ベクター構築および発現

10A4 VKを、鋳型としてV_KクローンMP.1_06132012-A06を利用するPCRにより増幅し、かつオステオネクチンシグナル配列およびヒトC_μ定常領域を含有するベクターpICOFSCneoKにクローン化し、プラスミドpICOFSCneoK(TL1A.10A4)を生成した。

【0197】

10A4 VHを、鋳型としてV_HクローンMP.1_06132012-E02を利用するPCRにより増幅し、かつオステオネクチンシグナル配列およびヒトIgG4-S228P定常領域を含有するベクターpICOFSCpurG4Pにクローン化し、プラスミドpICOFSCpurG4P(TL1A.10A4)を生成した。プラスミドpICOFSCpurG4P(TL1A.10A4)およびpICOFSCneoK(TL1A.10A4)をCHO-S細胞に同時トランスフェクトし、かつ研究使用のためTL1A.2-g4Pの発現について安定なプールを選択し、かつスケールアップした。

【0198】

実施例4

親和性測定についてのプロトコール

プロテインGチップ(CM5)を、それを酢酸緩衝液(pH2.9)を使用して~400 Rusでコーティングすることにより作製した。10A4.F7 mab(7.5ug/mL、12uL)をプロテインG表面上で10uL/分の流速で捕捉した。複数の濃度(250、200、150、100&50n)でのHu-TL1A-His抗原(Lot#50182AS151)を、捕捉されたmab上に25μl/分で5分間流し、かつ、7.5分間解離させた。プロテインG表面を100uL/分の流速で10uLの50mM NaOHおよび5uLの25mM HCLで再生した。データはBiaevaluation 3.1を使用することにより解析した。(図3)

【0199】

実施例5

エピトープ結合についてのプロトコール

10A4.A7(4.6KRUs)、17H11.C2(6.3KRUs)および10A6.B6(9.6KRUs)をCM5チップ上でコーティングした。Mabを30ug/mLから滴定し(1:3)、~2時間25n Hu-TL1A-His抗原でインキュベートした。mab上に注入された抗体-抗原複合体が2.5分間表面を覆った。表面を25mM NaOHで再生した。プロットをlog[Ab]対応答を使用して生成し、ここで、抗体-抗原複合体シグナルの減少は、同一のエピトープピンを示す。(図4)

【0200】

実施例6

DESCによる10A4.7の物理的安定性

10A4.7の物理的安定性をDESCにより行った。図5。

【0201】

実施例7

10

20

30

40

50

可変領域シーケンシング

総RNAをハイブリドマクローン1490.2596.10A4.F7.2E8から調製し、かつV_HおよびV_KcDNAを2通り調製した。抗体の可変領域を、5' RACEユニバーサルプライマーミックスと対の3' ヒト-特異的な定常領域プライマーを使用してcDNA末端の迅速増幅(rapid amplification of cDNA ends)(RACE)手法により増幅した。可変領域を含有する得られたPCR産物をpCR4-TOPOベクターにクローニングした。Templiphi試料をTOPOクローンから調製し、かつDNAシーケンシングに供した。得られたDNA配列をインフレームの再編成および他の抗体特性について解析した。クローンMP.1_06132012-E02からのV_H配列(図7および8)およびクローンMP.1_06132012-A06からのV_K配列(図6および9)を代表的な配列として選択した。

10

【0202】

実施例8

HDX-MSによるTL1A/10A4エピトープマッピング

水素/重水素交換質量分析(HDX-MS)方法は、主鎖アミド水素原子の重水素交換の速度および程度をモニターすることによって溶液中のタンパク質立体配座および立体配座動態を調べる。HDXのレベルは、主鎖アミド水素原子の溶媒接触性およびタンパク質水素結合に依存する。HDXのタンパク質の質量増加は、MSによって正確に測定することができる。この技術を酵素消化と組み合わせると、ペプチドレベルでの構造特徴を解明することができ、内部に折りたたまれたペプチドと表面露出ペプチドを区別できる。典型的には、重水素標識およびその後のクエンチング実験が行われ、その後オンラインペプシン消化、ペプチド分離およびMS解析が行われる。

20

【0203】

エピトープマッピングを、抗TL1A mAb(10A4)でTL1A三量体および10A4 FabでTL1A三量体で行った。エピトープマッピング実験の前に、非重水素化実験を行って、組み換え全長ヒトTL1A三量体(4 μM)と10A4を有するTL1A三量体または10A4 Fabを有するTL1A三量体(1:3モル比)のタンパク質複合体についての一般的な消化ペプチドのリストを生成し、TL1Aにつき80%配列カバレッジを達成した。HDX-MS実験では、5 μlの各試料(mAb/FabでのTL1AまたはTL1A)を55 μlのD₂O緩衝液(10 mMリン酸緩衝液、D₂O、pD 7.0)に希釈し、標識反応を開始した。30秒、5分、20分、60分および240分の異なる時間で反応を行った。各標識反応期間の終わりに、反応を、クエンチング緩衝液(100 mMリン酸緩衝液、4 M GdnCl、pH 2.5、1:1、v/v)を添加することによってクエンチし、かつ50 μlのクエンチした試料を解析のためにWaters HDX-MS系に注入した。一般的な消化ペプチドの重水素取り込みレベルを、10A4または10A4 Fabの非存在/存在下でモニターした。(図10)

30

【0204】

実施例9

コンピュータモデリングによるTL1A/10A4エピトープマッピング

TL1A三量体の構造を用いて、コンピュータ解析を行った。TNF様リガンド1A(TL1A)は、そのコグネイト受容体DR3およびデコイ受容体DcR3に結合する。TL1Aは、従来のTNFリガンドファミリーに属し、現在は、8つの他のメンバー: FasL、LIGHT、TNF、LT、LT、TRAIL、RANKLおよびCD40Lを含む。

40

【0205】

ヒトTL1Aは、251アミノ酸からなり、35個は細胞質ドメイン、24個は膜貫通領域、192個は細胞外ドメインである。TL1Aアミノ酸配列中に2つの潜在的なN結合型グリコシル化部位、133および229位のAsn残基が存在する。TL1A構造は、TNFスーパーファミリーに典型的なゼリーロールフォールドを示す。TNFスーパーファミリーのメンバーは、TNFファミリーに典型的な、A'AHCFおよびB'BGD

50

E鎖からなる内側および外側シートをそれぞれ有するゼリーロールフォールドを採用する非共有ホモ三量体を形成するII型膜貫通タンパク質である。密に充填された三量体はTNFスーパーファミリーの典型である。三量体集合体中に埋め込まれた各単量体の溶媒接触可能表面面積は1977 Å²であり、他の安定な三量体TNFリガンド中で観察されたもの(TNF α 、2412 Å²; TRAIL、2261 Å²; CD40L、2091 Å²)に匹敵する。他の従来のTNFリガンドと同様に、TL1Aのサブユニット界面は、1つの単量体(EおよびF鎖)におけるβ-サンドイッチの端および隣接単量体(A、H、CおよびF鎖)の内部シート間の相互作用により形成される。この界面の中央領域は、主に、三量体の疎水性コアへ寄与するように位置する各単量体からのF81、Y146、F182およびL184を有する疎水性の残基からなる。他の従来のTNFリガンドにおけるこれらの4つの位置での対応する残基は、一般に保存され、最も一般的なドメイン間疎水性接触を形成する。

10

【0206】

HDXにより同定されるTL1Aの2つの領域をTL1A構造にマッピングした。図12。個々の単量体主鎖リボンは、灰色、緑色および黄色に着色している。ペプチド領域1(マゼンタ色)およびペプチド領域2(青色)は、溶媒へ曝露された非連続的なエピトープを形成する。図13は、10A4 mAbについてのFABモデル(赤=H鎖、ピンク=L鎖)でTL1A三量体を示し、TL1Aにおける非連続的なエピトープが、重鎖および軽鎖の両方からの相互作用を必要とするであろうことを示す。タンパク質複合体の計算評価は、タンパク質界面に位置する選択された残基がタンパク質-タンパク質相互作用エネルギーに有意に寄与し得ることを示す。タンパク質相互作用に有意に寄与することが示されている残基は、芳香族アミノ酸(Tyr、Phe、Trp)、塩基性アミノ酸(Arg、Lys)、酸性アミノ酸(Asp、Glu)および極性アミノ酸(Gln、Asn、Ser、Thr)を含む。

20

【0207】

表2および3は、ペプチド領域1および2に対応する露出アミノ酸の計算評価を含有する。これらの表は、これらのペプチド領域における機能的な残基についての接近可能性を評価するために使用することができる側鎖曝露および側鎖曝露パーセントを示す。ペプチド領域1、表2について、E¹⁶⁶、R¹⁶⁸、Q¹⁶⁹、R¹⁷²、およびK¹⁷⁵は、極度に曝露された(50-97%)機能性アミノ酸側鎖を有する注目することは興味深い。興味深いことに、97%で最も曝露された残基Q¹⁶⁹を有する領域1¹⁶⁹QAGR¹⁷²についてのペプチド断片化MS空間エピトープからのデータとの良好な相関がある。R¹⁶⁸およびR¹⁷²の両方がTL1A構造におけるQ¹⁶⁹に近接しており、モデリング、三次元構造およびHDX実験の相関を示している。

30

【0208】

表2 ペプチド領域1に対応する露出アミノ酸の計算評価

【表 2】

SECSEIRQAGRPNKPSIT

EIRQAGRPNKPSIT (166-180) 93-107 - HDXペプチド領域1				
分子	残基	側鎖曝露	側鎖曝露の割合	重要な機能的アミノ酸
TL1A_A	E166	138.046707	0.738218	X *
TL1A_A	I167	80.786659	0.416426	
TL1A_A	R168	168.333267	0.68989	X *
TL1A_A	Q169	184.482407	0.97096	X *
TL1A_A	A170	81.956467	0.660939	
TL1A_A	G171	78.1968	0.878616	
TL1A_A	R172	126.085464	0.516744	X *
TL1A_A	P173	91.752304	0.611682	
TL1A_A	N174	30.269852	0.188012	
TL1A_A	K175	168.50209	0.787393	X *
TL1A_A	P176	66.328865	0.442192	
TL1A_A	D177	67.25705	0.436734	
TL1A_A	S178	67.517006	0.535849	
TL1A_A	I179	1.554886	0.008015	
TL1A_A	T180	11.607443	0.076365	

10

【0209】

20

ペプチド領域2について、最も曝露された機能的な残基はH¹¹¹、F¹¹²、K¹¹³、およびN¹¹⁴である。これらの機能的なアミノ酸も非常に曝露され(62-93%)、かつ非連続的なエピトープの第二のバルクを形成する。モデリングにより同定される機能的な残基は、断片化MS¹¹³KNQF¹¹⁶により同定される領域2についてのMS空間エピトープと関連する。

【0210】

表3 ペプチド領域2に対応する露出アミノ酸の計算評価

【表 3】

TPTQHFKNQFPALH

30

TPTQHFKNQFPALH (107-120) - HDXペプチド領域2の最も曝露された領域				
分子	残基	側鎖曝露	側鎖曝露の割合	重要な機能的アミノ酸
TL1A_A	T107	92.135231	0.606153	
TL1A_A	P108	122.209305	0.814729	
TL1A_A	T109	96.343613	0.63384	X ?
TL1A_A	Q110	124.388191	0.654675	X ?
TL1A_A	H111	154.51297	0.768721	X *
TL1A_A	F112	155.469727	0.703483	X *
TL1A_A	K113	134.771896	0.629775	X *
TL1A_A	N114	150.291626	0.933488	X ?
TL1A_A	Q115	124.734985	0.6565	X *
TL1A_A	F116	86.689079	0.392258	
TL1A_A	P117	43.018517	0.28679	
TL1A_A	A118	24.548649	0.197973	
TL1A_A	L119	0.518295	0.002618	
TL1A_A	H120	38.194756	0.190024	

40

【0211】

まとめると、構造モデリングおよびHDXデータは、10A4 mA bパラトープと接触しているTL1Aの表面上の非連続的なエピトープを定義する。

【0212】

実施例10

T細胞増殖アッセイ

50

1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 0.219 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TL1A 抗体 10A4.F7.2E8 huIgG4 の用量応答曲線は、StemCell Kit (19052) 富化 CD4 + ヒト T 細胞を加える前に 37 で 30 分間、5% CO₂ で抗ヒト CD3 (Biolegend 300314) とインキュベートした。37、5% CO₂ でのインキュベーションの 4 日の後、3H-チミジン (0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ウェル}$) を最後の 18 - 20 時間添加した。プレートを Packard Filtermate harvester を使用して UniFilter GF/C プレート (Packard 5007185) 上に回収し、乾燥させた。50 $\mu\text{l}/\text{ウェル}$ PerkinElmer Microscint-20 scintillant を加え、プレートを Packard TopCount シンチレーションカウンターで計数した。EC50 値を、GraphPad Prism ソフトウェアを使用して最大マイナスパックグラウンドのパーセントをプロットすることにより計算した。

10

【0213】

表 4 抗 CD3 駆動 T 細胞増殖アッセイ (Hu CD4 + T 細胞) (2.45 mg/ml)

【表 4】

2.45 mg/ml ELN ref	EC50 [nM]	
	ドナー A	ドナー B
99103-061	0.211	2.2
99103-067	0.328	1.2
99103-072	0.295	0.318
99103-078	0.242	0.196
99103-079	0.277	0.341
99103-090	0.323	0.329

20

【0214】

実施例 11

ヒト PBMC IFN γ 阻害アッセイ (可溶性の TL1A stim)

3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 0.3 ng/ml の TL1A 抗体 10A4.F7.2E8 huIgG4 の用量応答曲線を、ヒト全血から単離された PBMC を有する 96 ウェル丸底プレート中で 50 ng/ml ヒト TL1A (社内) プラス 0.25 ng/ml hIL-12 (Peptotech) および 1 ng/ml hIL-18 (R&D Systems) とインキュベートした。37、5% CO₂ で一晩のインキュベートした後、上清を回収し、IFN γ レベルをマッチペアサンドイッチ ELISA 抗体 (Thermo Scientific) で試験した。EC50 値を、GraphPad Prism ソフトウェアを使用して最大マイナスパックグラウンドのパーセントをプロットすることにより計算した。

30

【0215】

表 5 TL1A + IL-12 + IL-18 駆動 IFN γ (Hu PBMC) (2.45 mg/ml)

40

【表 5】

2.45mg/ml ELN ref	EC50 [nM]	
	ドナーA	ドナーB
97305-032	0.131	0.197
97305-037	0.138	0.289
97305-040	0.167	0.146
97305-041	0.209	0.283
97305-044	0.272	0.211
97305-047	0.095	0.185
97305-050	0.209	0.163
97305-061	0.26	0.152
99932-005481	0.301	0.196

10

【0216】

表6 TL1A+IL-12+IL-18 駆動 IFN γ (Hu PBMCs) (5.9 mg/ml)

【表 6】

5.9mg/ml ELN ref	EC50 [nM]	
	ドナーA	ドナーB
99932-005481	0.295	0.241

20

【0217】

実施例 12

ヒト PBMC IFN γ 阻害アッセイ (TL1A 発現 CHO 細胞 stim)
 3 μ g/ml - 0.3 ng/ml の TL1A 抗体 10A4.F7.2E8 huIgG4
 の用量応答曲線を、ヒト全血から単離された PBMC を有する 96 ウェル丸底プレート
 で照射 TL1A 発現 CHO 細胞 プラス 0.25 ng/ml hIL-12 (Peprotech)
 および 1 ng/ml hIL-18 (R&D Systems) とインキュベートした。
 37、5% CO₂ で一晩インキュベートした後、上清を回収し、IFN γ レベル
 をマッチペアサンドイッチ ELISA 抗体 (Thermo Scientific) で試験した。
 EC50 値を、GraphPad Prism ソフトウェアを使用して最大
 マイナスバックグラウンドのパーセントをプロットすることにより計算した。

30

【0218】

表7 TL1A 発現 CHO 細胞 + IL-12 + IL-18 駆動 IFN γ (Hu PBMC) (2.45 mg/ml)

【表 7】

2.45mg/ml ELN ref	EC50 [nM]	
	ドナーA	ドナーB
97305-034	0.234	0.214

40

【0219】

実施例 13

ヒト T 細胞 IFN γ 阻害アッセイ

3 μ g/ml - 0.3 ng/ml の TL1A 抗体 10A4.F7.2E8 huIgG4
 の用量応答曲線を、Stem Cell (19051) 富化ヒト T 細胞を有する 96 ウェル丸底プレート
 中で 50 ng/ml ヒト TL1A (社内の) プラス 0.5 ng/ml hIL-12 (Peprotech)
 および 5 ng/ml hIL-18 (R&D Sy

50

systems)とインキュベートした。37℃、5% CO₂で一晩インキュベートした後、上清を回収し、IFN γ レベルをマッチペアサンドイッチELISA抗体(Thermo Scientific)で試験した。EC₅₀値を、GraphPad Prismソフトウェアを使用して最大マイナスバックグラウンドのパーセントをプロットすることにより計算した。

【0220】

表8 TL1A+IL-12+IL-18駆動IFN γ (Hu T細胞)(2.45mg/ml)

【表8】

2.45mg/ml ELN ref	EC ₅₀ [nM]	
	ドナーA	ドナーB
97305-062	0.18	0.259
97305-064	0.235	0.199
97305-066	0.331	0.347
97305-077	0.241	0.258
97305-082	0.034	0.039
99932-003797	0.355	0.312
99932-004083	0.393	0.311
99932-004084	0.367	0.303
99932-004439	0.185	0.194
99932-004774	0.22	0.319
99932-004955	0.172	0.211

10

20

【0221】

表9 TL1A+IL-12+IL-18駆動IFN γ (Hu T細胞)(5.9mg/ml)

【表9】

5.9mg/ml ELN ref	EC ₅₀ [nM]	
	ドナーA	ドナーB
99932-004774	0.171	0.243
99932-004955	0.273	0.182

30

【0222】

表10 TL1A+IL-12+IL-18駆動IFN γ (Hu T細胞)(4.8mg/ml)

【表10】

4.8mg/ml ELN ref	EC ₅₀ [nM]	
	ドナーA	ドナーB
97305-082	0.162	0.143
99932-003797	0.303	0.361
99932-004083	0.27	-
99932-004084	0.316	0.345
99932-004439	0.262	0.157
99932-004774	0.177	0.267
99932-004955	0.193	0.287
99932-005751	0.216	0.138

40

【0223】

実施例14

ヒトNK細胞IFN γ 阻害アッセイ

3 μ g/ml - 0.3 ng/ml のTL1A抗体10A4.F7.2E8 huIgG4の用量応答曲線を、Stem Cell (19055) 富化ヒトNK細胞を有する96ウェル丸底プレート中で50 ng/ml ヒトTL1A (社内の) プラス0.5 ng/ml hIL-12 (Peprotech) および1 ng/ml hIL-18 (R&D Systems) でインキュベートした。37、5% CO₂で一晩インキュベートした後、上清を回収し、IFN γ レベルをマッチペアサンドイッチELISA抗体 (Thermo Scientific) で試験した。EC50値を、GraphPad Prismソフトウェアを使用して最大マイナスバックグラウンドのパーセントをプロットすることにより計算した。

10

【0224】

表11 TL1A + IL-12 + IL-18 駆動IFN γ (Hu NK細胞) (2.45 mg/ml)

【表11】

2.45 mg/ml	EC50 [nM]	
<u>ELN ref</u>	<u>ドナーA</u>	<u>ドナーB</u>
97305-070	0.16	0.253
97305-075	0.147	0.162

20

【0225】

実施例15

ヒト全血IFN γ 阻害アッセイ

3 μ g/ml - 0.3 ng/ml のTL1A抗体10A4.F7.2E8 huIgG4の用量応答曲線を、ヘパリン処置ヒト全血を有する96ウェル丸底プレート中で50 ng/ml ヒトTL1A (社内の) プラス0.5 ng/ml hIL-12 (Peprotech) および5 ng/ml hIL-18 (R&D Systems) とインキュベートした。37、5% CO₂で一晩インキュベートした後、プレートを10分間、1900 rpmで遠心分離し、血漿を回収し、かつIFN γ レベルをマッチペアサンドイッチELISA抗体 (Thermo Scientific) で試験した。EC50値を、GraphPad Prismソフトウェアを使用して最大マイナスバックグラウンドのパーセントをプロットすることにより計算した。

30

【0226】

表12 TL1A + IL-12 + IL-18 駆動IFN γ (Hu WB) (2.45 mg/ml)

【表12】

2.45 mg/ml	EC50 [nM]	
<u>ELN ref</u>	<u>ドナーA</u>	<u>ドナーB</u>
97305-029	0.32	0.54
97305-033	0.284	0.108

40

【0227】

実施例16

カニクイザルPBMC IFN γ 阻害アッセイ

【0228】

3 μ g/ml - 0.3 ng/ml のTL1A抗体10A4.F7.2E8 huIgG4の用量応答曲線を、カニクイザル全血から単離されたPBMCを有する96ウェル丸底

50

プレート中で50 ng/ml カニクイザルTL1A (社内の) プラス 2 ng/ml hIL-12 (Peprotech) および5 ng/ml hIL-18 (R&D Systems) とインキュベートした。37、5% CO₂で一晩インキュベートした後、上清を回収し、IFN γ レベルを霊長類ELISA kit (R&D Systems) で試験した。EC50値を、GraphPad Prismソフトウェアを使用して最大マイナスバックグラウンドのパーセントをプロットすることにより計算した。

【0229】

表13 TL1A + IL-12 + IL-18 駆動IFN γ (Cyno PBMCs) (2.45 mg/ml)

【表13】

2.45 mg/ml ELN ref	EC50 [nM]	
	ドナーA	ドナーB
97305-067	0.122	0.164
97305-071	0.154	0.133
97305-074	0.105	0.129
97305-076	0.097	0.093

10

【0230】

実施例17

ヒトpNFkB阻害アッセイ

TL1A抗体10A4.F7.2E8 huIgG4の用量応答曲線を0.5 μ g/ml ヒトTL1A (社内の) と37 で15分間; 5% CO₂、96ウェルディープウェルプレートにおいてヘパリン処置ヒト全血でインキュベートした。刺激後、細胞を溶解/固定し、透過処理し、抗体の適切なパネルで染色した。測定はフローサイトメーターで行い、かつ解析はTreeStarのFlowJo解析ソフトウェアで行った。EC50値はGraphPad Prismソフトウェアを使用して計算した。

20

【0231】

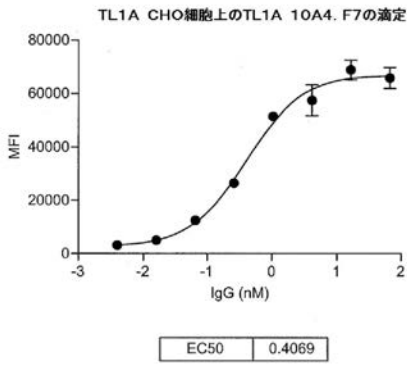
表14 Hu全血におけるTL1A駆動ホスホ-NFkB (2.45 mg/ml)

【表14】

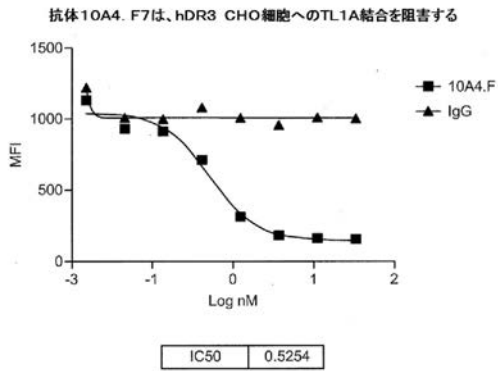
2.45 mg/ml ELN ref	EC50 [nM]		細胞タイプ
	ドナーA	ドナーB	
A010F-003	2.64	2.94	CD4+T細胞
A010F-007	0.770	3.240	CD4+T細胞
	0.850	N/A	CD8+T細胞
	0.830	N/A	CD3+CD4-CD8-T細胞

30

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

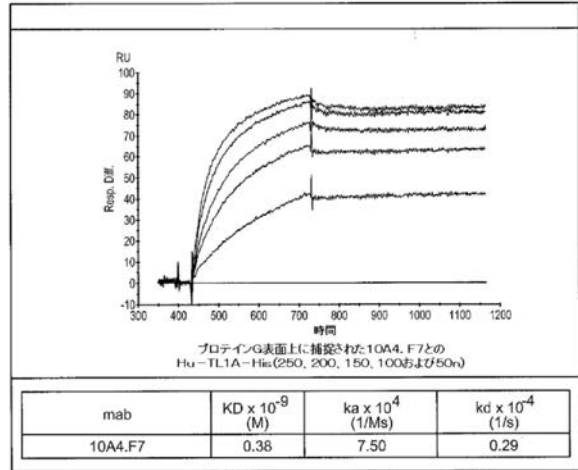
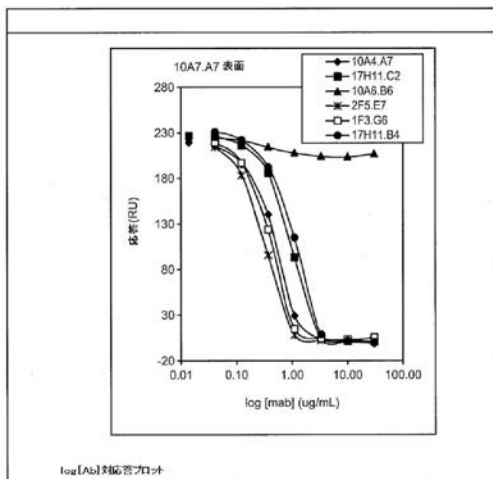
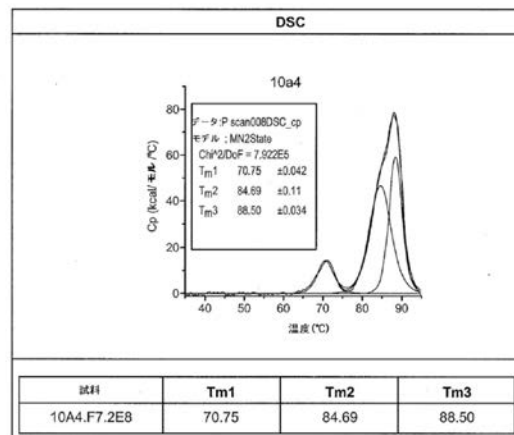


FIG. 3

【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 - 1 】

TL1A. 2-g4Pカッパ鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列

A I Q L T Q S P S S L S A S V
 1 GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA
 G D R V T I T C R A S Q G I S
 46 GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC AIT AGC
 S A L A W Y Q Q K P G K A P K
 91 AGT GCT TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG
 L L I Y D A S S L E S G V P S
 136 CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA
 R F S G S G S G T D F T L T I
 181 AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC
 S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 226 AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG
 F N S Y P L T F G G G T K V E
 271 TTT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG
 I K R T V A A P S V F I F P P
 316 ATC AAA CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA

【 図 6 - 2 】

S D E Q L K S G T A S V V C L
 361 TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GPT GTG TGC CTG
 L N N F Y P R E A K V Q W K V
 406 CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG
 D N A L Q S G N S Q E S V T E
 451 GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG
 Q D S K D S T Y S L S S T L T
 496 CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG
 L S K A D Y E K H K V Y A C E
 541 CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA
 V T H Q G L S S P V T K S F N
 586 GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC
 R G E C *
 631 AGG GGA GAG TGT TAG

【 図 7 - 1 】

TL1A. 2-g4P重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列

Q L Q L Q E S G P G L V K P S
 1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG
 E T L S L T C T V S G G S I S
 46 GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC
 S R S Y Y W G W I R Q P P G K
 91 AGT AGG AGT TAC TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG
 G L E W I G S I Y Y N G R T Y
 136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TAT TAT AAT GGG AGA ACC TAC
 Y N P S L K S R V T I S V D T
 181 TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG
 S K N Q F S L K L S S V T A A
 226 TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA
 D T A V Y Y C A R E D Y G D Y
 271 GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GAG GAC TAC GGT GAC TAC
 G A F D I W G Q G T M V T V S
 316 GGA GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT
 S A S T K G P S V F P L A P C
 361 TCA GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCG CCC TGC

【 図 7 - 2 】

S R S T S E S T A A L G C L V
 406 TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC CTG GTC
 K D Y F P E P V T V S W N S G
 451 AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC
 A L T S G V H T F P A V L Q S
 496 GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC
 S G L Y S L S S V V T V P S S
 541 TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC
 S L G T K T Y T C N V D H K P
 586 AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC GTA GAT CAC AAG CCC
 S N T K V D K R V E S K Y G P
 631 AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT GAG TCC AAA TAT GGT CCC
 P C P P C P A P E F L G G P S
 676 CCA TGC CCA CCA TGC CCA GCA CCT GAG TTC CTG GGG GGA CCA TCA
 V F L F P P K P K D T L M I S
 721 GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC TCC
 R T P E V T C V V V D V S Q E
 766 CCG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA

【 図 7 - 3 】

D P E V Q F N W Y V D G V E V
 811 GAC CCC GAG GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG
 H N A K T K P R E E Q F N S T
 856 CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG
 Y R V V S V L T V L H Q D W L
 901 TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG
 N G K E Y K C K V S N K G L P
 946 AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG
 S S I E K T I S K A K G Q P R
 991 TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA
 E P Q V Y T L P P S Q E E M T
 1036 GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC
 K N Q V S L T C L V K G F Y P
 1081 AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC
 S D I A V E W E S N G Q P E N
 1126 AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC
 N Y K T T P P V L D S D G S F
 1171 AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC

【 図 7 - 4 】

F L Y S R L T V D K S R W Q E
 1216 TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG
 G N V F S C S V M H E A L H N
 1261 GGG AAY GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC
 H Y T Q K S L S L S L G K *
 1306 CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA

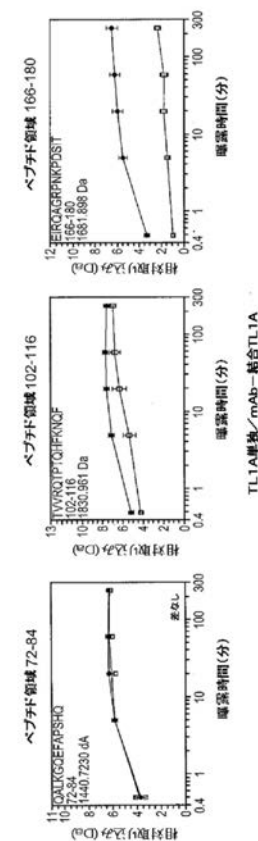
【 図 8 】

1490.2596.10A4.F7.2E8-VH1
 1 Q L Q L Q E S G P G L V K P S E T
 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TGG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC
 52 L S L T C T V S G G S I S CDR1
 CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC AGT AGG AGT TAC
 Y W G W I R Q P P G K G L E W I G
 103 TAC TGG GGC TGG ATC GGC CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG
 S I Y Y N G R T Y Y N P S L K S R CDR2
 154 AGT ATC TAT TAT AAT GGG AGA ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CCA
 V T I S V D T S E N Q F S L R L S
 205 GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGS
 S V T A A D T A V Y Y C A R E D Y CDR3
 256 TCT GTG ACC GCC GCA GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GAG GAC TAC
 G D Y G A F D I W G Q G T M V T V
 307 GGT GAC TAC GGA GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC
 S S
 358 TCT TCA

【 図 9 】

1490.2596.10A4.F7.2E8-VH1
 1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D
 GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG GCA TCT GTA GGA GAC
 R V T I T C R A S Q G I S S A L A CDR1
 52 AGA GTC ACC ACC ACT TGC CCG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GGC
 W Y Q Q K P G R A P R L L I Y D A CDR2
 103 TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GGC
 S S L E S G V P S R F S G S G S G
 154 TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TAC AAG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG
 T D F T L T I S S L Q P E D F A T
 205 ACA GAT TTC ATC CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG OCT GAA GAT TTT GCA ACT
 Y Y C Q Q F H S Y P L T F G G G T CDR3
 256 TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG AAC
 K V E I K
 307 AAG GTG GAG ATC AAA

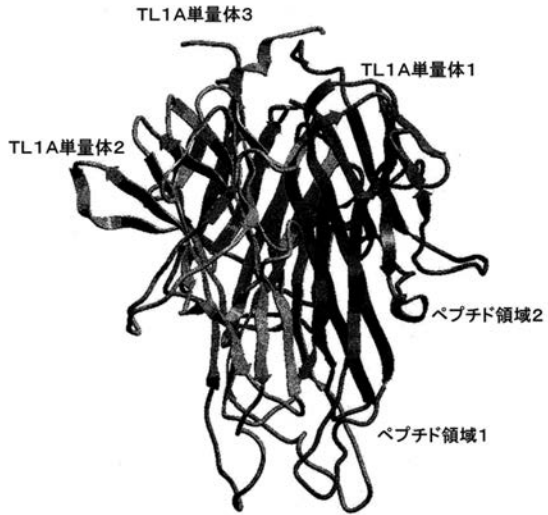
【 図 1 1 】



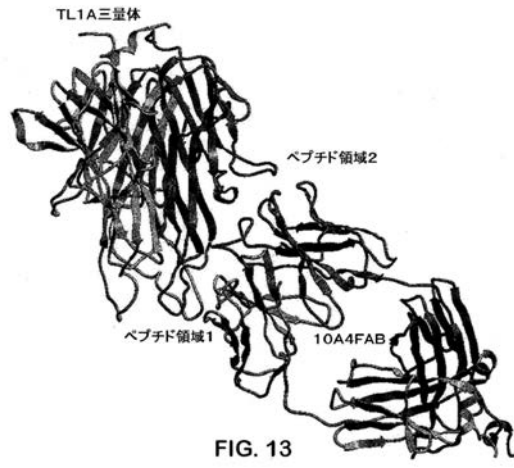
【 図 1 0 】

1 TSGSSHHHHH HSSGIEGRGS HMGDRMKQIE DKIEEILSKI
 50 YHIENEIARI KKLIGERASQ LRAQGEACVQ FQALKGQFEA
 90 PSHQVYAPL RADGDKPRAH LTVVRQTPTQ HFKNQFPALH
 130 WEHELGLAFT KNRMNYTNKF LLIPESGDYF IYSQVTFRGM
 170 TSECSEIRQA GRPNKPSDIT VVITKVTDSY PEPTQLLMGT
 210 KSVCEVGSNW FQPIYLGAMF SLQEGDKLMV NVSDISLVDY
 250 TKEDKTFFGA FLL

【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 配 列 表 】

2019522961000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/031281

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 ADD. A61K39/00		
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		
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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/114654 A1 (CLASSON BRENDAN J [US] ET AL) 10 May 2012 (2012-05-10) abstract page 1, paragraph 0008 page 16, paragraph 104 page 17, paragraph 106 -----	1-16
X	WO 2015/073580 A1 (PFIZER [US]; SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]) 21 May 2015 (2015-05-21) abstract page 137, line 31 - line 34 page 195 - page 196; tables 13-17 page 202; example 10 page 233; table 37 ----- -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 July 2017		Date of mailing of the international search report 31/07/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Malamoussi, A

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/031281

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/044298 A1 (CEPHALON AUSTRALIA PTY LTD [AU]) 4 April 2013 (2013-04-04) abstract page 157, line 12 - line 16 page 172 - page 173; example 11 -----	1-16
X	WO 2014/106602 A1 (GLENMARK PHARMACEUTICALS SA [CH]) 10 July 2014 (2014-07-10) page 57; example 1 page 68 - page 69; example 5 page 68; example 4 page 75; example 7 -----	1-16
X	WO 2009/064854 A2 (COGENESYS INC [US]; SMITH RODGER [US]; KANAKARAJ PALANISAMY [US]; ROOSC) 22 May 2009 (2009-05-22) abstract page 25; example 2 -----	1-16
X	US 2012/079611 A1 (SHIH DAVID Q [US] ET AL) 29 March 2012 (2012-03-29) page 14; example 25 -----	1-16
X	US 2011/217310 A1 (SIEGEL RICHARD M [US] ET AL) 8 September 2011 (2011-09-08) page 46; example 4 figure 20E -----	1-16
A	CHENYANG ZHAN ET AL: "Biochemical and Structural Characterization of the Human TL1A Ectodomain", BIOCHEMISTRY, vol. 48, no. 32, 18 August 2009 (2009-08-18), pages 7636-7645, XP055174305, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi900031w the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/031281

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 2012114654 A1	10-05-2012	AR 083785 A1	20-03-2013		
		AU 2011326097 A1	09-05-2013		
		CA 2816799 A1	18-05-2012		
		CL 2013001279 A1	07-03-2014		
		CN 103261228 A	21-08-2013		
		EA 201370105 A1	30-12-2013		
		EP 2638069 A1	18-09-2013		
		IL 226172 A	31-08-2016		
		JP 6076911 B2	08-02-2017		
		JP 2014500014 A	09-01-2014		
		JP 2016220693 A	28-12-2016		
		KR 20130132842 A	05-12-2013		
		NZ 610294 A	26-06-2015		
		NZ 706986 A	29-04-2016		
		SG 190176 A1	28-06-2013		
		SG 10201504265R A	29-06-2015		
		TW 201233796 A	16-08-2012		
		US 2012114654 A1	10-05-2012		
		US 2014120109 A1	01-05-2014		
		US 2017096491 A1	06-04-2017		
		UY 33715 A	31-05-2012		
		WO 2012064682 A1	18-05-2012		
		ZA 201304114 B	26-02-2014		
		WO 2015073580 A1	21-05-2015	CA 2929784 A1	21-05-2015
				CN 105814081 A	27-07-2016
				EP 3068801 A1	21-09-2016
JP 2016539638 A	22-12-2016				
KR 20160078499 A	04-07-2016				
PE 10922016 A1	28-10-2016				
PH 12016500878 A1	20-06-2016				
SG 11201602671W A	30-05-2016				
TW 201524999 A	01-07-2015				
US 2015132311 A1	14-05-2015				
WO 2015073580 A1	21-05-2015				
WO 2013044298 A1	04-04-2013			AU 2012315474 A1	20-03-2014
		BR 112014007426 A2	04-04-2017		
		CA 2850549 A1	04-04-2013		
		CN 104114577 A	22-10-2014		
		EA 201400390 A1	30-09-2014		
		EP 2760889 A1	06-08-2014		
		JP 2014531210 A	27-11-2014		
		KR 20140101727 A	20-08-2014		
		US 2014255302 A1	11-09-2014		
		US 2016333104 A1	17-11-2016		
		WO 2013044298 A1	04-04-2013		
		ZA 201401843 B	29-07-2015		
		WO 2014106602 A1	10-07-2014	AU 2013371957 A1	13-08-2015
CA 2896894 A1	10-07-2014				
CL 2015001895 A1	17-06-2016				
CN 105102067 A	25-11-2015				
EA 201591153 A1	29-01-2016				
EP 2941302 A1	11-11-2015				
HK 1217426 A1	13-01-2017				
JP 2016503818 A	08-02-2016				
KR 20150117259 A	19-10-2015				

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/031281

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		PE 12892015 A1	05-10-2015
		PH 12015501505 A1	28-09-2015
		SG 11201505186S A	30-07-2015
		US 2014308271 A1	16-10-2014
		WO 2014106602 A1	10-07-2014

WO 2009064854	A2	22-05-2009	
		AU 2008320987 A1	22-05-2009
		BR PI0819205 A2	23-06-2015
		CA 2705292 A1	22-05-2009
		CN 101903402 A	01-12-2010
		EA 201070596 A1	30-12-2010
		EP 2220122 A2	25-08-2010
		EP 2500362 A2	19-09-2012
		IL 205502 A	31-03-2016
		JP 5745854 B2	08-07-2015
		JP 2011502522 A	27-01-2011
		KR 20100097683 A	03-09-2010
		NZ 585559 A	30-11-2012
		UA 104132 C2	10-01-2014
		US 2009280116 A1	12-11-2009
		US 2012308480 A1	06-12-2012
		US 2014315250 A1	23-10-2014
		WO 2009064854 A2	22-05-2009

US 2012079611	A1	29-03-2012	
		US 2012079611 A1	29-03-2012
		US 2015026831 A1	22-01-2015

US 2011217310	A1	08-09-2011	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
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
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28

(81)指定国・地域 AP(BW, 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, MC, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 アチャル・パシン

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 グオドン・チェン

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

F ターム(参考) 4B064 AG26 AG27 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01

4B065 AA01X AA57X AA83X AA87X AA87Y AA90X AA90Y AA91X AA91Y AB01

AB05 AC14 BA01 BA02 CA25 CA44

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74

GA26

专利名称(译)	TL1A抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2019522961A	公开(公告)日	2019-08-22
申请号	JP2018558735	申请日	2017-05-05
[标]申请(专利权)人(译)	百时美施贵宝公司		
申请(专利权)人(译)	布里斯托尔 - 迈尔斯宝公司		
[标]发明人	グオドン・チェン		
发明人	アチャル・パシン グオドン・チェン		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 C07K16/28		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53.D C07K16/28		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA83X 4B065/AA87X 4B065/AA87Y 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	阿依鸭毛 富田健二		
优先权	62/333470 2016-05-09 US		
其他公开文献	JP2019522961A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种特异性结合受体TNF超家族成员15 (TNFSF15) 的抗体，也称为TL1A。还描述了制备和使用抗TL1A抗体的方法。

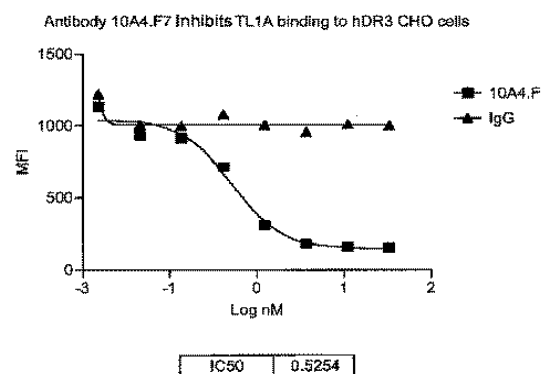


FIG. 2