

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-213520

(P2019-213520A)

(43) 公開日 令和1年12月19日(2019.12.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4

審査請求 有 請求項の数 67 O L (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-104214 (P2019-104214)
 (22) 出願日 令和1年6月4日 (2019.6.4)
 (62) 分割の表示 特願2017-237351 (P2017-237351) の分割
 原出願日 平成24年7月9日 (2012.7.9)
 (31) 優先権主張番号 61/506,491
 (32) 優先日 平成23年7月11日 (2011.7.11)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 510168852
 グレンマーク ファーマシューティカルズ
 , エセ. アー.
 スイス国 ツェーハー 2300 ラ シ
 ョーードーフォン, シュマン ド ラ
 コンベタ 5
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100119183
 弁理士 松任谷 優子
 (74) 代理人 100149076
 弁理士 梅田 慎介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 O X 4 O と結合する抗体およびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ヒト O X 4 O と結合するアンタゴニスト抗体又はその断片、それらの調製のための方法及び O X 4 O 媒介性障害を処置するための方法の提供。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 1、及び/又は特定のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2、及び/又は特定のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3、並びに/あるいは特定のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1、及び/又は特定のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2、及び/又は特定のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 を含む、ヒト O X 4 O と結合するアンタゴニスト抗体又はその断片。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片であって、下記を含むアンタゴニスト抗体またはその断片：

配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、および/または配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、および/または配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3；ならびに/あるいは

配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、および/または配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および/または配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3。

10

【請求項 2】

配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、および配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3；ならびに/あるいは

配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3

を含む、

請求項1に記載の抗体またはその断片。

【請求項 3】

マウス抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

20

【請求項 4】

ヒト化抗体である、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

【請求項 5】

配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

【請求項 6】

配列番号7の重鎖可変領域配列の非CDR領域と少なくとも80%同一である重鎖可変領域配列の非CDR領域を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

【請求項 7】

配列番号35、36、37および38からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖配列を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

30

【請求項 8】

重鎖配列が、配列番号35、36、37または38からなる群より選択される重鎖配列の重鎖可変領域配列の非CDR領域と少なくとも80%同一である非CDR領域を含む、請求項7に記載の抗体またはその断片。

【請求項 9】

配列番号58、59、79および80からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

【請求項 10】

配列番号58、59、79および80からなる群より選択される重鎖可変領域配列の非CDR領域と少なくとも80%同一である重鎖可変領域配列の非CDR領域を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

40

【請求項 11】

I G H V 2 - 7 0 * 1 0 (配列番号19)、I G H V 2 - 7 0 * 0 1 (配列番号20)、I G H V 2 - 7 0 * 1 3 (配列番号21)、I G H V 2 - 5 * 0 9 (配列番号22)およびI G H V 2 - 7 0 * 1 1 (配列番号23)からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

【請求項 12】

抗体またはその断片が、ヒト遺伝子I G H V 2 - 7 0 * 1 0 (配列番号19)の産物で

50

あるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域を含み、重鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の対応する重鎖可変フレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

【請求項13】

抗体またはその断片が、配列番号32のアミノ酸配列を含む重鎖配列を含み、重鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の対応する重鎖可変フレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

【請求項14】

アミノ酸改変が、23位、35b位、48位、50位、60位および62位からなる群より選択されるアミノ酸位置でのアミノ酸置換を含み、各群メンバーのアミノ酸位置がKabab番号付けに従って示される、請求項12または13に記載の抗体またはその断片。

10

【請求項15】

アミノ酸改変が、23S、35bG、48L、50H、60Nおよび62Aからなる群より選択されるアミノ酸置換を含み、各群メンバーのアミノ酸位置がKabab番号付けに従って示される、請求項12または13に記載の抗体またはその断片。

【請求項16】

配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

20

【請求項17】

配列番号8の軽鎖可変領域配列の非CDR領域と少なくとも80%同一である軽鎖可変領域配列の非CDR領域を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

【請求項18】

配列番号45、46、47および49からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖配列を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

【請求項19】

軽鎖配列が、配列番号45、46、47または49からなる群より選択される軽鎖配列の軽鎖可変領域配列の非CDR領域と少なくとも80%同一である非CDR領域を含む、請求項18に記載の抗体またはその断片。

30

【請求項20】

配列番号60、86、87および89からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

【請求項21】

配列番号60、86、87および89からなる群より選択される重鎖可変領域配列の非CDR領域と少なくとも80%同一である軽鎖可変領域配列の非CDR領域を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

【請求項22】

IGKV3-11^{*}01(配列番号24)、IGKV1-39^{*}01(配列番号25)、IGKV1D-39^{*}01(配列番号26)、IGKV3-11^{*}02(配列番号27)およびIGKV3-20^{*}01(配列番号28)からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

40

【請求項23】

抗体またはその断片が、ヒト遺伝子IGKV3-11^{*}01(配列番号24)の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含み、軽鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の軽鎖可変領域の対応するフレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、請求項1または2に記載の抗体またはその断片。

【請求項24】

50

抗体またはその断片が、配列番号 39 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列を含み、軽鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の対応する軽鎖可変フレームワーク領域からの少なくとも 1 つのアミノ酸改変を含む、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 25】

アミノ酸改変が、1 位、33 位、34 位、46 位、47 位、54 位、56 位および 71 位からなる群より選択されるアミノ酸位置でのアミノ酸置換を含み、各群メンバーのアミノ酸位置が K a b a t 番号付けに従って示される、請求項 23 または 24 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 26】

アミノ酸改変が、1 Q、33 M、34 H、46 P、47 W、54 L、56 S および 71 Y からなる群より選択されるアミノ酸置換を含み、各群メンバーのアミノ酸位置が K a b a t 番号付けに従って示される、請求項 23 または 24 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 27】

アミノ酸改変が、アミノ酸位置 31 位でのアミノ酸欠失を含み、アミノ酸位置が K a b a t 番号付けに従って示される、請求項 23 または 24 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 28】

(a) 配列番号 37 または配列番号 38 のアミノ酸配列を含む重鎖配列と、
(b) 配列番号 47 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列と
を含む、請求項 2 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 29】

(a) 配列番号 58 または配列番号 59 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列と、
(b) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列と
を含む、請求項 2 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 30】

重鎖 C D R の少なくとも 1 つおよび / または軽鎖 C D R の少なくとも 1 つが、少なくとも 1 つのアミノ酸改変を含む、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項 31】

重鎖および / または軽鎖定常領域をさらに含む、請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項 32】

ヒト重鎖定常領域が、I G H G 1、非フコシル化 I G H G 1 および I G H G 4 からなる、ヒト免疫グロブリンの群から選択される、請求項 31 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 33】

抗体が、1 価抗体である、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項 34】

抗体が、全長抗体である、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項 35】

抗体が、F a b、F a b'、F a b' - S H、F d、F v、d A b、F (a b') 2、s c F v、2 重特異性単鎖 F v 2 量体、ダイアボディ、トリアボディおよび同じまたは異なる抗体と遺伝子的に融合した s c F v からなる群より選択される抗体断片である、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項 36】

抗体が、親抗体の F c 領域と比べて少なくとも 1 つのアミノ酸改変を含むバリエーション F c 領域を含み、バリエーション F c 領域を含む抗体が、親抗体と比較して変更されたエフェクター機能を示す、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項 37】

10

20

30

40

50

110 nM以下の親和性(K_D)でヒトOX40と結合する、請求項1から36のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項38】

対応するキメラ抗体のOX40結合親和性(K_D)の少なくとも75%を保持する、請求項1から36のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項39】

対応するキメラ抗体と比較した場合に、等しいかまたはより高いOX40結合親和性(K_D)を有する、請求項1から36のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項40】

抗体が、75℃を超えるFAB断片耐熱温度を有する、請求項1から36のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

10

【請求項41】

ヒトOX40と結合する抗体またはその断片であって、請求項1から36のいずれか一項に記載の抗体と同じエピトープと結合する、抗体またはその断片。

【請求項42】

請求項1から36のいずれか一項に記載の抗体と結合する、ヒトOX40細胞外ドメイン上のエピトープ。

【請求項43】

ヒトOX40細胞外ドメインが、ドメイン2(配列番号76)である、請求項42に記載のエピトープ。

20

【請求項44】

請求項1から41のいずれか一項に記載の抗体またはその断片をコードする単離核酸。

【請求項45】

配列番号61もしくは62の核酸配列を含む、重鎖可変領域をコードするDNA;および/または

配列番号63の核酸配列を含む、軽鎖可変領域をコードするDNAを含む、請求項44に記載の単離核酸。

【請求項46】

請求項44または45に記載の単離核酸を含むベクター。

30

【請求項47】

請求項44もしくは45に記載の単離核酸または請求項46に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項48】

核酸が発現され、抗体が生成されるように、請求項47に記載の宿主細胞を培養するステップを含む、ヒトOX40と結合する抗体またはその断片を生成する方法。

【請求項49】

請求項44または45に記載の単離核酸によりコードされる、ヒトOX40と結合する抗体またはその断片。

【請求項50】

請求項1から41のいずれか一項に記載の抗体またはその断片と、薬学的に許容される担体とを含む組成物。

40

【請求項51】

治療剤に連結した請求項1から41のいずれか一項に記載の抗体またはその断片を含むイムノコンジュゲート。

【請求項52】

請求項51に記載のイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体とを含む組成物。

【請求項53】

別の医薬活性物質をさらに含む、請求項50または52に記載の組成物。

【請求項54】

50

対象における O X 4 0 媒介性障害を処置するための方法であって、対象に治療有効量の請求項 1 から 4 1 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片を投与するステップを含む方法。

【請求項 5 5】

O X 4 0 媒介性障害が、感染症（ウイルス、細菌、真菌および寄生虫）、感染症に伴う内毒素ショック、関節炎、関節リウマチ、喘息、C O P D、骨盤内炎症性疾患、アルツハイマー病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ペロニー病、セリアック病、胆嚢疾患、毛巣病、腹膜炎、乾癬、血管炎、外科的癒合、脳卒中、I 型糖尿病、ライム病、関節炎、髄膜脳炎、自己免疫性ぶどう膜炎、中枢および末梢神経系の免疫媒介性炎症性障害、例えば多発性硬化症、ループス（例えば全身性エリテマトーデス）およびギラン - バレー症候群、アトピー性皮膚炎、自己免疫性肝炎、線維化胞隔炎、グレーブス病、I g A 腎症、特発性血小板減少性紫斑病、メニエール病、天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、サルコイドーシス、強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、他の自己免疫障害、膵炎、外傷（手術）、移植片対宿主疾患（G V H D）、移植片拒絶、虚血性疾患を含む心血管疾患、例えば心筋梗塞およびアテローム動脈硬化症、血管内凝固、骨吸収、骨粗鬆症、変形性関節症、歯周炎、低酸症ならびに視神経脊髄炎からなる群より選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

10

【請求項 5 6】

O X 4 0 媒介性障害が、感染症（ウイルス、細菌、真菌および寄生虫）、感染症に伴う内毒素ショック、関節炎、関節リウマチ、喘息、気管支炎、インフルエンザ、呼吸器多核体ウイルス、肺炎、C O P D、特発性肺線維症（I P F）、原因不明の線維化胞隔炎（C F A）、特発性線維化間質性肺炎、肺気腫、骨盤内炎症性疾患、アルツハイマー病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ペロニー病、セリアック病、胆嚢疾患、毛巣病、腹膜炎、乾癬、血管炎、外科的癒合、脳卒中、I 型糖尿病、ライム病、関節炎、髄膜脳炎、自己免疫性ぶどう膜炎、中枢および末梢神経系の免疫媒介性炎症性障害、例えば多発性硬化症、ループス（例えば全身性エリテマトーデス）およびギラン - バレー症候群、アトピー性皮膚炎、自己免疫性肝炎、線維化胞隔炎、グレーブス病、I g A 腎症、特発性血小板減少性紫斑病、メニエール病、天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、サルコイドーシス、強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、他の自己免疫障害、膵炎、外傷（手術）、移植片対宿主疾患（G V H D）、移植片拒絶、虚血性疾患を含む心血管疾患、例えば心筋梗塞およびアテローム動脈硬化症、血管内凝固、骨吸収、骨粗鬆症、変形性関節症、歯周炎、低酸症ならびに視神経脊髄炎からなる群より選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

20

30

【請求項 5 7】

対象が、低い O X 4 0 発現レベルを有する、請求項 5 4 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

抗体が、ヒト重鎖定常領域 I G H G 1 を有する抗体と比較して、細胞傷害作用が増進している、請求項 5 4 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

医薬品としての請求項 1 から 4 1 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片の使用。

【請求項 6 0】

O X 4 0 媒介性障害の処置のための医薬品の調製における、請求項 1 から 4 1 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片の使用。

40

【請求項 6 1】

O X 4 0 媒介性障害が、G V H D であり、抗体またはその断片が、G V H D の抑制において E n b r e 1（登録商標）より効果的である、請求項 6 0 に記載の抗体またはその断片の使用。

【請求項 6 2】

医薬品として用いるための、請求項 1 から 4 1 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項 6 3】

50

OX40 媒介性障害を処置するための方法において用いるための、請求項1から41のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項64】

OX40 媒介性障害を処置するための方法において用いるための、請求項1から41のいずれか一項に記載の抗体またはその断片であって、OX40 媒介性障害が、GVHDであり、抗体またはその断片が、GVHDの抑制においてEnbre1（登録商標）より効果的である、抗体またはその断片。

【請求項65】

請求項1から41のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、請求項50、52もしくは53に記載の組成物または請求項51に記載のイムノコンジュゲートを含む、OX40 媒介性障害の処置のための製造品。

10

【請求項66】

請求項1から30のいずれか一項に記載の抗体もしくはその断片、請求項50、52もしくは53に記載の組成物または請求項51に記載のイムノコンジュゲートを含む、OX40 媒介性障害の処置のためのキット。

【請求項67】

OX40の発現レベルが低い患者を検出する *in vitro* スクリーニング方法であって、下記を含む方法：

- (a) 患者血液試料から末梢血単核細胞 (PBMC) を精製するステップ、
- (b) PBMC をフローサイトメトリー分析に供するステップ、および
- (c) CD4⁺ および / または CD8⁺ T 細胞中の OX40 陽性細胞の数を決定し、前記数を対照レベルと比較するステップ。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2011年7月11日に提出された米国仮出願第61/506,491号（これらの全ては本明細書に参照によりそれらの全体が組み込まれている）の利益を主張する。

【0002】

本発明は、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片に関する。より具体的には、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、および / または配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、および / または配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、ならびに / あるいは配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、および / または配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および / または配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片に関する。

30

【背景技術】

【0003】

OX40は、受容体のTNFRスーパーファミリーの一員であり、ラットの活性化CD4⁺T細胞上で発現される50kDaの糖タンパク質として1987年に最初に同定された (Paterson DJら、(1987) *Mol. Immunol.* 24:1281~90頁)。OX40の細胞外リガンド結合ドメインは、3つの全長システインリッチドメイン (CRD) と部分的な4つ目のC末端CRDとで構成される (Bodmer JLら、(2002) *Trends Biochem. Sci.* 27:19~26頁)。OX40のリガンドは、OX40L (CD252) であり、3コピーのOX40が、3量体リガンドと結合してOX40-OX40L複合体を形成する (Compaan DMおよびHymowitz SG (2006) *Structure*, 14:1321~1330頁)。OX40は、膜結合型受容体である。しかし、可溶性のアイソフォームも検出されている (Taylor LおよびSchwarz H (2001) *J. Immunol. M*

40

50

ethods、255:67~72頁)。CD28と違って、OX40はナイーブT細胞上で構成的に発現されず、T細胞受容体(TCR)のエンゲージメント後に誘導される。OX40は、2次共刺激分子であり、活性化の24~72時間後に発現される。OX40のリガンドであるOX40Lも休止抗原提示細胞上で発現されず、それらの活性化の後に発現される。OX40は、主に活性化CD4+T細胞により発現され、そして制限された程度で活性化CD8+T細胞により発現される(Salek-Ardakani Sら、(2006)Curr.Immunol.Rev.2:37~53頁)。

【発明の概要】

【0004】

本開示は、全般的に、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片、それらの調製のための方法およびOX40媒介性障害を処置するための方法を含む使用に関する。ヒトOX40と結合する本発明のアンタゴニスト抗体またはその断片は、拮抗性抗体であり、アゴニスト作用を示さず、かつ/または結合によりヒトOX40を活性化しない。

10

【0005】

一態様では、本開示は、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片であって、配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、および/または配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、および/または配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3;ならびに/あるいは配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、および/または配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および/または配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、アンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。

20

【0006】

さらなる態様では、本発明は、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片であって、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含む、アンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。さらなる態様では、本発明は、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片であって、IGHV2-70*10(配列番号19)、IGHV2-70*01(配列番号20)、IGHV2-70*13(配列番号21)、IGHV2-5*09(配列番号22)およびIGHV2-70*11(配列番号23)からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域を含む、アンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。

30

【0007】

さらなる態様では、本発明は、配列番号32のアミノ酸配列を含む重鎖配列を含むアンタゴニスト抗体またはその断片であって、重鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の対応する重鎖可変フレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、抗体またはその断片を提供する。

【0008】

さらなる態様では、本発明は、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列を含む、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。さらなる態様では、本発明は、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片であって、IGKV3-11*01(配列番号24)、IGKV1-39*01(配列番号25)、IGKV1D-39*01(配列番号26)、IGKV3-11*02(配列番号27)およびIGKV3-20*01(配列番号28)からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含む、アンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。

40

【0009】

さらなる態様では、本発明は、ヒト遺伝子IGKV3-11*01(配列番号24)の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含むアンタゴニスト抗体またはその断片であって、軽鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の軽鎖可変領域の対応するフレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、抗体またはその断片を提供する。

50

【 0 0 1 0 】

さらなる態様では、本発明は、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片であって、配列番号32、33、34、35、36、37および38からなる群より選択される重鎖配列を含む、アンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。さらなる態様では、本発明は、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片であって、配列番号39、40、41、42、43、44、45、46、47、48および49からなる群より選択される軽鎖配列を含む、拮抗性抗体またはその断片を提供する。

【 0 0 1 1 】

さらなる態様では、本発明は、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片であって、

- (a) 配列番号37または38のアミノ酸配列を含む重鎖配列と、
 - (b) 配列番号47のアミノ酸配列を含む軽鎖配列と
- を含む、アンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。

10

【 0 0 1 2 】

さらなる態様では、本発明は、配列番号58、59、79および80からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片を提供する。さらなる態様では、本発明は、配列番号60、86、87および89からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片を提供する。

20

【 0 0 1 3 】

さらなる態様では、本発明は、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片であって、

- (a) 配列番号58または59のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、
 - (b) 配列番号60のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と
- を含む、アンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。

【 0 0 1 4 】

さらなる態様では、本発明は、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片であって、前記抗体が、ヒトIgG4Fc領域を含み、前記抗体が、Fc媒介性細胞傷害性を有さない、抗体またはその断片を提供する。さらなる態様では、本発明は、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片であって、前記抗体が、ヒトIGHG1Fc領域を含み、前記抗体が、抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)などの細胞傷害作用機序について有能である、抗体またはその断片を提供する。好ましい態様では、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片は、非フコシル化IGHG1Fc領域を有し、ADCCなどのFc媒介性細胞傷害作用機序が増進している。

30

【 0 0 1 5 】

別の態様では、本発明の開示は、対応するキメラ抗体と同様の親和性でヒトOX40と結合する、例えば対応するキメラ抗体のOX40結合親和性(K_D)の少なくとも75%を保持するか、または対応するキメラ抗体と比較した場合に少なくとも等しいかもしくはより高いOX40結合親和性(K_D)を有する、拮抗性ヒト化抗体またはその断片についても記載する。さらなる態様では、本発明は、ヒトOX40細胞外領域の第2ドメイン内のエピトープと結合するアンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。

40

【 0 0 1 6 】

本発明の開示は、ヒトOX40と結合する抗体およびその断片をコードする単離核酸、ベクターならびに前記核酸またはベクターを含む宿主細胞も提供する。アンタゴニスト抗体またはその断片と薬学的に許容される担体とを含む組成物、および治療剤に連結したアンタゴニスト抗体またはその断片を含むイムノコンジュゲートも提供される。

【 0 0 1 7 】

本開示は、OX40媒介性障害を処置するための方法も提供する。一態様では、アロ反応性T細胞活性化および増殖の*in vitro*モデル(混合リンパ球反応;MLR)において、拮抗性抗体またはその断片は、およそ100ng/mLのEC₅₀値で、2の異なる

50

る個体（レスポナー）におけるMLRを効率的に阻害する。さらに、ヒト患者における骨髄移植後に観察される同種間移植片対宿主疾患（GVHD）についてのモデルである異種間移植片対宿主反応において、拮抗性抗体またはその断片は、GVHD反応を有力に抑制する。

【0018】

本開示は、抗体もしくはその断片、組成物またはイムノコンジュゲートを含む、OX40媒介性障害の処置のためのキットおよび製造品も提供する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1A】固定化組換えヒトOX40-hisに対する直接結合ELISAを示す図である。ヒトOX40に対するキメラ2F8および1D4抗体の結合を、直接ELISAにより測定した。様々な濃度（10から0.01mg/mlまでの範囲）の1D4（黒のヒストグラム）および2F8（白のヒストグラム）を、4にて1晩96ウェルプレート中で、プレートに被覆された2mg/mlの組換えヒトOX40-hisタグ付加タンパク質とインキュベートした。OX40とのそれぞれの抗体の結合を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）コンジュゲート抗ヒト抗体により検出した。

10

【図1B】固定化組換えヒトOX40-Fcに対する競合ELISAを示す図である。固定化組換えヒトOX40-Fcに対する競合ELISA。OX40/OX40L相互作用に対するキメラ1D4および2F8の阻害効果を、阻止ELISAにより評価した。様々な濃度（10から0.01mg/mlまでの範囲）の1D4（黒のヒストグラム）および2F8（白のヒストグラム）を、4にて1晩96ウェルプレート中で、プレートに被覆された2mg/mlの組換えヒトOX40-Fcタグ付加タンパク質とインキュベートした。5分後に、一定濃度のビオチン化組換えヒトOX40L（0.04mg/ml）を各ウェルに加え、室温にて30分間インキュベートした。OX40LとOX40との結合を、ストレプトアビジン-HRPを用いて検出した。

20

【図2】³Hチミジン取り込みにより測定される1方向混合リンパ球反応（MLR）を示す図である。バーは、少なくとも3重の³Hチミジン取り込み（カウント）の平均±標準誤差を示す。アイソタイプ対照（トラスツズマブ）および陽性対照（エファリズマブ）を示す。エフェクターは、エフェクター細胞のみを表す。エフェクター+標的は、抗体を省いた測定を表す。

30

【図3A】キメラ1D4抗体のフローサイトメトリー分析を示す図である。ヒト活性化末梢血単核細胞（PBMC）およびHPB-ALL細胞での染色。ヒストグラムプロットは、蛍光強度（X軸）および相対的細胞数（最大事象の%、Y軸）を示す。染色された細胞の型を示す。ヒトPBMCは、測定の前に48時間にわたってPHAおよびIL-2を用いて活性化した。

【図3B】キメラ1D4抗体のフローサイトメトリー分析を示す図である。活性化カニクイザルPBMCでの染色。キメラ1D4抗体とカニクイザルOX40との結合を、フローサイトメトリーにより評価した。末梢血単核細胞（PBMC）を、カニクイザルから回収した全血から単離し、 3×10^6 の細胞を50時間、10mg/mlのPHAおよび100U/mlのrhIL-2の存在下で培養した。活性化PBMCを、25mg/mlの対照抗体（上のプロファイル（i））またはビオチン化ヒツジ抗ヒトOX40抗体（真ん中のプロファイル（ii））またはビオチン化キメラ1D4抗体（下のプロファイル（iii））のいずれかとインキュベートした。各抗体とカニクイザルOX40との結合を、ストレプトアビジン-APCを用いて検出した。

40

【図4A】抗OX40抗体の表面プラズモン共鳴測定を示す図である。データは、応答数（RUと略記する；Y軸）対時間（X軸）として表す。A-VH1/VL1抗体対1D4キメラ。

【図4B】抗OX40抗体の表面プラズモン共鳴測定を示す図である。データは、応答数（RUと略記する；Y軸）対時間（X軸）として表す。VH1、VH2およびVH3に基づくヒト化抗体（示すとおり）対1D4キメラ。

50

【図4C】抗OX40抗体の表面プラズモン共鳴測定を示す図である。データは、応答数（RUと略記する；Y軸）対時間（X軸）として表す。乏しい結合体の例：VH4/VL4、VH5/VL4、VH5/VL5およびVH5/VL6。

【図4D】抗OX40抗体の表面プラズモン共鳴測定を示す図である。データは、応答数（RUと略記する；Y軸）対時間（X軸）として表す。弱い結合体（VH5/VL9およびVH4/VL9）および良好な結合体（VH6/VL9およびVH7/VL9）の例。

【図4E】抗OX40抗体の表面プラズモン共鳴測定を示す図である。データは、応答数（RUと略記する；Y軸）対時間（X軸）として表す。VH7に基づくヒト化抗体。

【図4F】抗OX40抗体の表面プラズモン共鳴測定を示す図である。データは、応答数（RUと略記する；Y軸）対時間（X軸）として表す。VH6/VL9は、1D4キメラおよびヒト化バリエーションVH7/VL9を超える最良の結合特性を有する。

【図5A】配列アラインメントを示す図である。1D4の重鎖可変領域と、IMGTからの選択された生殖系列フレームワーク（IGHV2-70*10（配列番号19）およびIGKV3-11*01（配列番号24））および逆突然変異可変領域バリエーション（VH1（配列番号29）、VH2（配列番号77）、VH3（配列番号78）、VH4（配列番号79）、VH5（配列番号80）、VH6（配列番号58）、VH7（配列番号59）、（VL1（配列番号30）、VL2（配列番号81）、VL3（配列番号82）、VL4（配列番号83）、VL5（配列番号84）、VL6（配列番号85）、VL7（配列番号86）、VL8（配列番号87）、VL9（配列番号60）VL10（配列番号88）、VL11（配列番号89）とのアラインメント。

【図5B】配列アラインメントを示す図である。1D4の軽鎖可変領域と、IMGTからの選択された生殖系列フレームワーク（IGHV2-70*10（配列番号19）およびIGKV3-11*01（配列番号24））および逆突然変異可変領域バリエーション（VH1（配列番号29）、VH2（配列番号77）、VH3（配列番号78）、VH4（配列番号79）、VH5（配列番号80）、VH6（配列番号58）、VH7（配列番号59）、（VL1（配列番号30）、VL2（配列番号81）、VL3（配列番号82）、VL4（配列番号83）、VL5（配列番号84）、VL6（配列番号85）、VL7（配列番号86）、VL8（配列番号87）、VL9（配列番号60）VL10（配列番号88）、VL11（配列番号89）とのアラインメント。

【図6】示差走査熱量分析を用いるヒト化抗OX40抗体VH6/VL9 FAB断片の耐熱性の測定を示す図である。データは、過剰モル熱容量（Cp[kcal/mol]と略記する；Y軸）対温度（X軸）として表す。

【図7】エピトープ特徴決定を示す図である。この図は、実施例7に記載するELISAアッセイの結果に基づくヒト化抗OX40抗体VH6/VL9エピトープを示す。

【図8A】³Hチミジン取り込みにより測定される混合リンパ球反応（MLR）を示す図である。2名の無関係のドナーからの混合リンパ球反応の結果を示す。増殖は、³Hチミジン取り込みにより測定した。グラフは、各条件についての絶対カウント値±SEMを示す。レスポンド細胞は未処置PBMCであり、刺激細胞はマイトマイシン処置PBMCであった。試験抗体を用いる全ての条件は、異種刺激PBMCと混合したレスポンド細胞を用いて行った。陽性対照は、エファリズマブ（抗LFA-1抗体）であった。

【図8B】³Hチミジン取り込みにより測定される混合リンパ球反応（MLR）を示す図である。2名の無関係のドナーからの混合リンパ球反応の結果を示す。増殖は、³Hチミジン取り込みにより測定した。グラフは、各条件についての絶対カウント値±SEMを示す。レスポンド細胞は未処置PBMCであり、刺激細胞はマイトマイシン処置PBMCであった。試験抗体を用いる全ての条件は、異種刺激PBMCと混合したレスポンド細胞を用いて行った。陽性対照は、エファリズマブ（抗LFA-1抗体）であった。

【図9】異種間移植片対宿主反応モデルを示す図である。この図は、それぞれ言及される条件についての8匹の動物の群内のパーセント生存を示す。媒体（vehicle）：PBSのみ。垂直の点線は、処置の最終日を示す。PBMCを受けなかった2匹の照射対照動物の群（示さず）において、死亡および症状は観察されなかった。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0020】

本開示は、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体およびその断片に関する。

【0021】

用語「ヒトOX40」は、本明細書で用いる場合、ヒトOX40のバリエーション、アイソフォームおよび種ホモログを含む。したがって、本開示の抗体は、あるいくつかの場合では、ヒト以外の種からのOX40と交差反応することがある。あるいくつかの実施形態では、抗体は、1または複数のヒトOX40タンパク質に完全に特異的であってよく、種またはその他の型の非ヒト交差反応性を示さないことがある。例示的なヒトOX40の完全アミノ酸配列は、Swiss-Prot受託番号P43489 (TNR4_HUMAN; 配列番号12)を有する。OX40は、CD134、TNFRSF4、ACT35またはTXGP1Lとしても知られる。ヒトOX40には、Entrez GeneによりGeneID:7293、およびHGNCによりHGNC:11918が割り当てられている。OX40には、CD134(分化クラスター134)も割り当てられている。OX40は、TNFRSF4/OX40と表される遺伝子によりコードされ得る。

10

【0022】

本明細書における「ヒトOX40」の使用は、ヒトOX40の全ての既知またはまだ見出されていない対立遺伝子および多型を包含する。用語「ヒトOX40」、「OX40」または「OX40受容体」は、本明細書において等価に用いられ、そうでないと具体的に記載しないならば「ヒトOX40」を意味する。

20

【0023】

用語「OX40リガンド」または「OX40L」は、本明細書において等価に用いられ、OX40リガンド、特にヒトOX40リガンドを含む。OX40Lは、TNFスーパーファミリーの一員であり、gp34またはCD252としても知られる。OX40Lには、CD252(分化クラスター252)が割り当てられ、配列データベース受託番号P23510(Swiss-Prot)またはQ6FGS4(Uniprot)を有する。OX40Lは、活性化B細胞、T細胞、樹状細胞および内皮細胞の表面上で発現する。

【0024】

用語「ヒトOX40と結合する抗体またはその断片」は、本明細書で用いる場合、500nM以下、好ましくは200nM以下、より好ましくは150nM以下、より好ましくは120nM以下、さらにより好ましくは110nM以下の親和性(K_D)でヒトOX40、例えば単離形のヒトOX40と結合する抗体またはその断片を含む。用語「ヒトOX40と結合する抗体またはその断片」は、抗体またはその抗原結合断片を含む。

30

【0025】

用語「拮抗性抗体」または「アンタゴニスト抗体」は、本明細書において等価に用いられ、例えばOX40とOX40リガンドとの結合を阻止もしくは実質的に低減し、よってOX40により引き起こされるシグナル伝達経路を阻害もしくは低減し、かつ/あるいはリンパ球増殖、サイトカイン発現もしくはリンパ球生存のようなOX40媒介性細胞応答を阻害または低減することにより、OX40の生物学的シグナル伝達活性を阻害および/または中和できる抗体を含む。

40

【0026】

用語「抗体」は、本明細書で言及する場合、抗体全体およびその任意の抗原結合断片または鎖を含む。「抗体」は、ジスルフィド結合で相互接続された少なくとも2つの重(H)鎖と2つの軽(L)鎖とを含む糖タンパク質またはその抗原結合断片のことをいう。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書においてVHと略記する)と重鎖定常領域とで構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2およびCH3で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書においてVLと略記する)と軽鎖定常領域とで構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、CLで構成される。VHおよびVL領域は、相補性決定領域(CDR)とよばれる超可変性の領域にさらに細分化でき、CDRは、配列が超可変性であり、かつ/または抗原認識に関与し、かつ/またはより保存されたフレーム

50

ワーク領域 (FR または FW) とよばれる領域に散在している、構造が規定されたループを通常形成する。それぞれの VH および VL は、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序で配置される 3 つの CDR および 4 つの FW で構成される: FW 1、CDR 1、FW 2、CDR 2、FW 3、CDR 3、FW 4。FW 1、FW 2、FW 3 および FW 4 のアミノ酸配列は全て一緒に、本明細書で言及する場合、VH または VL の「非 CDR 領域」または「非拡張 CDR 領域」を構成する。

【0027】

用語「重鎖可変フレームワーク領域」は、本明細書で言及する場合、1 または複数 (例えば 1、2、3 および / または 4 つ) の重鎖フレームワーク領域配列 (例えばフレームワーク 1 (FW 1)、フレームワーク 2 (FW 2)、フレームワーク 3 (FW 3) および / またはフレームワーク 4 (FW 4)) を含み得る。好ましくは、重鎖可変領域フレームワークは、FW 1、FW 2 および / または FW 3、より好ましくは FW 1、FW 2 および FW 3 を含む。用語「軽鎖可変フレームワーク領域」は、本明細書で言及する場合、1 または複数 (例えば 1、2、3 および / または 4 つ) の軽鎖フレームワーク領域配列 (例えばフレームワーク 1 (FW 1)、フレームワーク 2 (FW 2)、フレームワーク 3 (FW 3) および / またはフレームワーク 4 (FW 4)) を含み得る。好ましくは、軽鎖可変領域フレームワークは、FW 1、FW 2 および / または FW 3、より好ましくは FW 1、FW 2 および FW 3 を含む。

10

【0028】

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、免疫グロブリンと、免疫系の様々な細胞 (例えばエフェクター細胞) および古典的な補体系の第 1 成分 (C1q) を含む宿主組織または因子との結合を媒介できる。

20

【0029】

抗体は、定常領域により遺伝子的に決定される、アイソタイプともよばれるクラスに群分けされる。ヒト定常軽鎖は、カッパ (C_κ) およびラムダ (C_λ) 軽鎖として分類される。重鎖は、ミュー (μ)、デルタ (C_δ)、ガンマ (C_γ)、アルファ (C_α) またはイプシロン (C_ε) として分類され、それぞれ IgM、IgD、IgG、IgA および IgE として抗体のアイソタイプを定義する。よって、「アイソタイプ」は、本明細書で用いる場合、それらの定常領域の化学的および抗原的特徴により定義される免疫グロブリンのクラスおよび / またはサブクラスのいずれかを意味する。既知のヒト免疫グロブリンアイソタイプは、IgG1 (IGHG1)、IgG2 (IGHG2)、IgG3 (IGHG3)、IgG4 (IGHG4)、IgA1 (IGHA1)、IgA2 (IGHA2)、IgM (IGHM)、IgD (IGHD) および IgE (IGHE) である。いわゆるヒト免疫グロブリン偽ガンマ IGHGP 遺伝子は、配列決定されているが、スイッチ領域の変更によりタンパク質をコードしないさらなるヒト免疫グロブリン重鎖定常領域遺伝子を表す (Benismana Mら、(1988) Nucleic Acids Res. 16(7): 3108頁)。スイッチ領域が変更されているにもかかわらず、ヒト免疫グロブリン偽ガンマ IGHGP 遺伝子は、全ての重鎖定常ドメイン (CH1 ~ CH3) およびヒンジについてのオープンリーディングフレームを有する。その重鎖定常ドメインについての全てのオープンリーディングフレームは、予測される構造特徴を有する全てのヒト免疫グロブリン定常ドメインと良好に整列されるタンパク質ドメインをコードする。このさらなる偽ガンマアイソタイプは、本明細書において、IgGP または IGHGP という。ヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメインイプシロン P1 および P2 偽遺伝子 (IGHEP1 および IGHEP2) などの他の偽免疫グロブリン遺伝子が、報告されている。IgG クラスは、治療目的のために最も一般的に用いられている。ヒトにおいて、このクラスは、サブクラス IgG1、IgG2、IgG3 および IgG4 を含む。マウスにおいて、このクラスは、サブクラス IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c および IgG3 を含む。

30

40

【0030】

用語「キメラ抗体」は、本明細書で用いる場合、可変領域配列がある種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域

50

配列がヒト抗体に由来する抗体を含む。

【0031】

用語「ヒト化抗体」または「ヒト化抗OX40抗体」は、本明細書で用いる場合、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グラフトされた抗体を含む。さらなるフレームワーク領域改変を、ヒトフレームワーク配列内および別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列内で作製してよい。

【0032】

用語「Fab」または「Fab領域」は、本明細書で用いる場合、VH、CH1、VLおよびCL免疫グロブリンドメインを含むポリペプチドを含む。Fabは、単離されたこの領域または全長抗体もしくは抗体断片の関係におけるこの領域のことをいうことがある。

10

【0033】

用語「Fc」または「Fc領域」は、本明細書で用いる場合、第1定常領域免疫グロブリンドメインを除外した抗体の定常領域を含むポリペプチドを含む。よって、Fcは、IgA、IgDおよびIgGの最後の2つの定常領域免疫グロブリンドメインと、IgEおよびIgMの最後の3つの定常領域免疫グロブリンドメインと、これらのドメインからN末端側にあるフレキシブルヒンジとをいう。IgAおよびIgMについて、Fcは、J鎖を含むことがある。IgGについて、Fcは、免疫グロブリンドメインであるCガンマ2およびCガンマ3(C₂およびC₃)と、Cガンマ1(C₁)とCガンマ2(C₂)との間のヒンジとを含む。Fc領域の境界は変動し得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、残基C226またはP230をそのカルボキシル末端に含むと通常定義される(番号付けはEU番号付けシステムに従う)。ヒトIgG1について、Fc領域は、本明細書において、残基P232をそのカルボキシル末端に含むと定義される(番号付けはEU番号付けシステムに従う)(Edelman GMら、(1969) Proc Natl Acad Sci USA、63(1):78~85頁)。Fcは、単離されたこの領域またはFcポリペプチド、例えば抗体の関係におけるこの領域のことをいうことがある。

20

【0034】

用語「ヒンジ」または「ヒンジ領域」または「抗体ヒンジ領域」は、本明細書において、抗体の第1定常ドメインと第2定常ドメインとの間のアミノ酸を含むフレキシブルポリペプチドを含む。「ヒンジ領域」は、本明細書で言及する場合、6~62アミノ酸長で、IgA、IgDおよびIgGのみに存在し、2つの重鎖を橋かけするシステイン残基を包含する配列領域である。構造的には、IgG CH1ドメインは、EU位220にて終了し、IgG CH2ドメインは、EU位237の残基にて開始する。よって、IgGについて、抗体ヒンジは、本明細書において、221位(IgG1におけるD221)~231位(IgG1におけるA231)を含むと定義される(番号付けはEU番号付けシステムに従う)(Edelman GMら、既出)。

30

【0035】

用語「親抗体」または「親免疫グロブリン」は、本明細書で用いる場合、バリエーションを作製するために後で改変される、未改変の抗体を含む。前記親抗体は、自然に存在する抗体、または自然に存在する抗体のバリエーションもしくは工学改変バージョンであり得る。親抗体は、抗体自体、親抗体を含む組成物または親抗体をコードするアミノ酸配列のことをいうことがある。「親抗OX40抗体」は、本明細書で用いる場合、ヒトOX40と結合し、バリエーションを作製するために改変される抗体または免疫グロブリンを意味する。「対応するマウス抗体」は、本明細書で用いる場合、ヒトOX40と結合し、バリエーションを作製するために改変できるマウス抗体または免疫グロブリン、具体的には本明細書で開示するマウス抗体1D4を意味する。

40

【0036】

用語「バリエーション抗体」または「抗体バリエーション」は、本明細書で用いる場合、親と比較して少なくとも1つのアミノ酸改変により親抗体配列のものと異なる抗体配列を含む。

50

バリエーション抗体配列は、本明細書において、親抗体配列と好ましくは少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。抗体バリエーションは、抗体自体、抗体バリエーションを含む組成物または抗体バリエーションをコードするアミノ酸配列のことをいうことがある。

【0037】

用語「アミノ酸改変」は、本明細書において、ポリペプチド配列におけるアミノ酸置換、挿入および/または欠失を含む。「アミノ酸置換」または「置換」は、本明細書において、親ポリペプチド配列中の特定の位置での別のアミノ酸へのアミノ酸の置き換えを意味する。例えば、置換R94Kは、バリエーションポリペプチド、この場合、94位のアルギニンがリシンで置き換えられた重鎖可変フレームワーク領域バリエーションのことをいう。前出の例について、94Kは、94位でのリシンへの置換を示す。本明細書における目的のために、複数の置換は、斜線により典型的に分けられる。例えば、R94K/L78Vは、置換R94KおよびL78Vを含む2重バリエーションのことをいう。「アミノ酸挿入」または「挿入」は、本明細書で用いる場合、親ポリペプチド配列中の特定の位置でのアミノ酸の付加を意味する。例えば、挿入-94は、94位での挿入を示す。「アミノ酸欠失」または「欠失」は、本明細書で用いる場合、親ポリペプチド配列中の特定の位置でのアミノ酸の除去を意味する。例えば、R94-は、94位でのアルギニンの欠失を示す。

10

【0038】

本明細書で用いる場合、用語「保存改変」または「保存配列改変」は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特徴に著しく影響しないかまたは前記特徴を著しく改変しないアミノ酸改変のことをいうことを意図する。このような保存改変は、アミノ酸置換、挿入および欠失を含む。改変は、本発明の抗体に、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介突然変異誘発などの当技術分野において知られる標準的な技術により導入できる。保存アミノ酸置換は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基でアミノ酸残基を置き換えるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えばリシン、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）、非荷電極性側鎖（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）、ベータ分岐側鎖（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。よって、本発明の抗体のCDR領域内またはフレームワーク領域内の1または複数のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置き換えることができ、変化した抗体（バリエーション抗体）を、保持された機能について試験できる。

20

30

【0039】

全てのヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメインについて、番号付けは、「EU番号付けシステム」に従う（Edelman GMら、(1969) Proc Natl Acad Sci USA、63(1):78~85頁）。

【0040】

ヒトカッパ免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（IGKC）について、番号付けは、「EU番号付けシステム」に従う（Edelman GMら、既出）。

40

【0041】

ヒトラムダ免疫グロブリン軽鎖定常ドメイン（IGLC1、IGLC2、IGLC3、IGLC6およびIGLC7）について、番号付けは、Darivach Pら、(1987) Proc Natl Acad Sci USA、84(24):9074~8頁およびFrangione Bら、(1985) Proc Natl Acad Sci USA、82(10):3415~9頁により記載されるように、「Kabats番号付けシステム」に従う（Kabats EAら、(1991) Sequences of proteins of immunological interest、第5版 - U

50

S Department of Health and Human Services、NIH出版第91-3242号)。

【0042】

用語「可変ドメイン」は、抗原結合を媒介し、特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定義するドメインのことをいう。自然に存在する抗体では、抗原結合部位は、特異性を定義する2つの可変ドメイン(一方は重鎖(VH)中にあり、他方は軽鎖(VL)中にある)からなる。いくつかの場合では、特異性は、ラクダにおいて見出される重鎖抗体からの単一ドメイン抗体のように、2つのドメインの一方のみにもっぱら帰することがある。V領域は、通常、約110アミノ酸長であり、9~12アミノ酸長の「超可変領域」とよばれる非常に可変性のより短い領域で分けられた、15~30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)とよばれる比較的不变のアミノ酸配列の連続からなる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、ループを形成する3つの超可変領域により接続されたシート(beat-sheet)構造を一般的に採用する4つのFRを含む。各鎖中の超可変領域は、FRにより接近して一緒にされ、他の鎖からの超可変領域と一緒に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat EAら、既出を参照されたい)。用語「超可変領域」は、本明細書で用いる場合、抗原結合を担う、抗体のアミノ酸残基のことをいう。超可変領域は、配列可変性が最高であり、かつ/または抗原認識に関与する「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基を一般的に含む。全ての可変ドメインについて、番号付けは、Kabatに従う(Kabat EAら、既出)。

10

【0043】

いくつかのCDR定義を本明細書において用い、包含する。Kabat定義は、配列可変性に基づき、最も一般的に用いられる(Kabat EAら、既出)。Chothiaは、代わりに、構造ループの場所に言及する(Chothia CおよびLesk AM(1987)J.Mol.Biol.196:901~917頁)。AbM定義は、KabatとChothia定義との間の折衷案であり、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより用いられている(Martin ACRら、(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA、86:9268~72頁;Martin ACRら、(1991)Methods Enzymol.203:121~153頁;Pedersen JTら、(1992)Immunomethods、1:126~136頁;Sternberg M.J.E.(編)、Protein Structure Prediction.Oxford University Press、Oxford、141~172頁中のRees ARら、(1996))。接触による定義(contact definition)は最近導入され(MacCallum RMら、(1996)J.Mol.Biol.262:732~745頁)、Protein Databankにおいて入手可能な、入手可能な複合体構造の分析に基づく。IMGT(登録商標)、すなわちthe international Immunogenetics information system(登録商標)(http://www.imgt.org)によるCDRの定義は、全ての免疫グロブリンおよび全ての種のT細胞受容体V領域についてIMGT番号付けに基づく(IMGT(登録商標)、the international Immunogenetics information system(登録商標);Lefranc MPら、(1991)Nucleic Acids Res.27(1):209~12頁;Ruiz Mら、(2000)Nucleic Acids Res.28(1):219~21頁;Lefranc MP(2001)Nucleic Acids Res.29(1):207~9頁;Lefranc MP(2003)Nucleic Acids Res.31(1):307~10頁;Lefranc MPら、(2005)Dev.Comp.Immunol.29(3):185~203頁;Kaas Qら、(2007)Briefings in Functional Genomics & Proteomics、6(4):253~64頁)。

20

30

40

【0044】

50

本発明において論じる全ての相補性決定領域(CDR)は、好ましくはIMGT(登録商標)に従って定義される。これらのCDRのそれぞれについての可変ドメイン残基は、以下のとおりである(番号付けは、Kabata EAら、既出に従う): LCDR1: 27~32、LCDR2: 50~52、LCDR3: 89~97、HCDR1: 26~35、HCDR2: 51~57およびHCDR3: 93~102。VL領域の「非CDR領域」は、本明細書で用いる場合、アミノ酸配列: 1~26(FR1)、33~49(FR2)、53~88(FR3)および98~およそ107(FR4)を含む。VH領域の「非CDR領域」は、本明細書で用いる場合、アミノ酸配列: 1~25(FR1)、36~50(FR2)、58~92(FR3)および103~およそ113(FR4)を含む。

【0045】

本発明のCDRは、上記の定義に基づき、以下の可変ドメイン残基を有する「拡張CDR」を含むことがある: LCDR1: 24~36、LCDR2: 46~56、LCDR3: 89~97、HCDR1: 26~36、HCDR2: 47~65、HCDR3: 93~102。これらの拡張CDRも、Kabataら、既出に従って番号付けされる。VL領域の「非拡張CDR領域」は、本明細書で用いる場合、アミノ酸配列: 1~23(FR1)、37~45(FR2)、57~88(FR3)および98~およそ107(FR4)を含む。VH領域の「非拡張CDR領域」は、本明細書で用いる場合、アミノ酸配列: 1~25(FR1)、37~46(FR2)、66~92(FR3)および103~およそ113(FR4)を含む。

【0046】

用語「全長抗体」は、本明細書で用いる場合、可変および定常領域を含む抗体の自然の生物学的な形を構成する構造を含む。例えば、ヒトおよびマウスを含むほとんどの哺乳動物では、IgGクラスの全長抗体は、4量体であり、2つの免疫グロブリン鎖の2つの同一の対からなり、各対は、1つの軽鎖および1つの重鎖を有し、各軽鎖は、免疫グロブリンドメインVLおよびCLを含み、各重鎖は、免疫グロブリンドメインVH、CH1(C1)、CH2(C2)およびCH3(C3)を含む。いくつかの哺乳動物、例えばラクダおよびラマでは、IgG抗体は、2つの重鎖のみからなることがあり、各重鎖は、Fc領域に付いた可変ドメインを含む。

【0047】

抗体断片は、それらに限定されないが、(i) Fab'およびFab'-SHを含む、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなるFab断片、(ii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iii) 単一抗体のVLおよびVHドメインからなるFv断片; (iv) 単一可変領域からなるdAb断片(Ward ESら、(1989) Nature、341: 544~546頁)、(v) 2つの連結されたFab断片を含む2価断片であるF(ab')₂断片、(vi) VHドメインとVLドメインとが、2つのドメインが会合して抗原結合部位を形成できるようにするペプチドリナーで連結された単鎖Fv分子(scFv)(Bird REら、(1988) Science 242: 423~426頁; Huston JSら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85: 5879~83頁)、(vii) 2重特異性単鎖Fv2量体(PCT/US92/09965)、(viii) 遺伝子融合により構築された多価または多重特異性断片である「ダイアボディ」または「トリアボディ」(Tomlinson IおよびHollinger P(2000) Methods Enzymol. 326: 461~79頁; WO94/13804; Hollinger Pら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90: 6444~48頁)および(ix) 同じまたは異なる抗体と遺伝子的に融合されたscFv(Coloma MJおよびMorrison SL(1997) Nature Biotechnology、15(2): 159~163頁)を含む。

【0048】

用語「エフェクター機能」は、本明細書で用いる場合、抗体Fc領域とFc受容体またはリガンドとの相互作用に起因する生化学的事象を含む。エフェクター機能は、ADCC

10

20

30

40

50

(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用)およびADC P (抗体依存性細胞媒介性食作用)などのFc R 媒介性エフェクター機能、ならびにCDC (補体依存性細胞傷害作用)などの補体媒介性エフェクター機能を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc受容体または補体成分などのエフェクター分子についての抗体の親和性を変更、すなわち増進または低減、好ましくは増進することにより変更できる。結合親和性は、エフェクター分子結合部位を改変することにより一般的に変動され、この場合、対象の部位を置き、前記部位の少なくとも一部を適切な方法で改変することが適当である。エフェクター分子についての抗体の結合部位における変更は、全体的な結合親和性を著しく変更する必要はないが、相互作用の幾何学的配置を変更して、非生産的結合におけるようにエフェクター機序を無効にすることも構想される。エフェクター分子結合に直接関与しないがエフェクター機能の性能に關与する部位を改変することにより、エフェクター機能を変更することもさらに構想される。抗体のエフェクター機能を変更することにより、免疫応答の様々な態様を制御すること、例えば免疫系の様々な反応を増進または抑制することが可能になり、診断および治療において有益な効果を有する可能性がある。

10

【0049】

本明細書で用いる場合、用語「OX40 媒介性障害」は、アレルギー、喘息、COPD、関節リウマチ、乾癬ならびに自己免疫および炎症に関連する疾患のような状態を含む。

【0050】

本明細書で用いる場合、用語「対象」は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。用語「非ヒト動物」は、全ての脊椎動物、例えば哺乳動物および非哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などを含む。好ましくは、対象はヒトである。

20

【0051】

抗OX40抗体

第1の態様では、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、および/または配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、および/または配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、ならびに/あるいは配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、および/または配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、および/または配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。

30

【0052】

いくつかの実施形態では、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片は、配列番号13のアミノ酸配列を含む拡張重鎖CDR1、および/または配列番号14のアミノ酸配列を含む拡張重鎖CDR2、および/または配列番号15のアミノ酸配列を含む拡張重鎖CDR3を含み、かつ/あるいは配列番号16のアミノ酸配列を含む拡張軽鎖CDR1、および/または配列番号17のアミノ酸配列を含む拡張軽鎖CDR2および/または配列番号18のアミノ酸配列を含む拡張軽鎖CDR3を含む。

【0053】

好ましくは、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片は、配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、ならびに/または配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む。より好ましくは、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片は、配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号2のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、ならびに配列番号4のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む。

40

【0054】

CDR1および/またはCDR2ドメイン(複数可)とは独立してCDR3ドメイン単

50

独で同族抗原についての抗体の結合特異性を決定できること、および同じ結合特異性を有する複数の抗体を、共通のCDR3配列に基づいて予想通りに作製できることが当技術分野においてよく知られている。例えばKlimka Aら、(2000)Br. J. Cancer、83(2):252~260(マウス抗CD30抗体Ki-4の重鎖可変ドメインCDR3のみを用いるヒト化抗CD30抗体の生成について記載している); Beiboer SHら、(2000)J. Mol. Biol. 296:833~849頁(親マウスMOC-31抗EGP-2抗体の重鎖CDR3配列のみを用いる組換え上皮糖タンパク質-2(EGP-2)抗体について記載している); Rader Cら、(1998)Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95:8910~8915頁(マウス抗インテグリン α 3抗体LM609の重鎖および軽鎖可変CDR3ドメインを用いる一連のヒト化抗インテグリン α 3抗体であって、それぞれのメンバー抗体が、CDR3ドメインの外側に異なる配列を含み、親マウス抗体と同じエピトープに、親マウス抗体と同等以上の親和性で結合できる抗体について記載している); Barbasc Cら、(1994)J. Am. Chem. Soc. 116:2161~2162頁(CDR3ドメインが抗原結合に最も著しく寄与することを開示する)を参照されたい。

【0055】

したがって、本発明は、1または複数の重鎖および/または軽鎖CDR3ドメインを含む、特に配列番号3のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3および/または配列番号6のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、ヒトOX40と結合する抗体およびその断片であって、抗体がヒトOX40と結合できる、抗体およびその断片を提供する。いくつかの実施形態では、非ヒト抗体からの1または複数の重鎖および/または軽鎖CDR3ドメインを含むこのような発明の抗体は、対応する親非ヒト抗体、例えばマウス抗体と(a)結合について競合でき、(b)前記抗体と同じ機能的特徴を保持し、(c)前記抗体と同じエピトープと結合し、かつ/または(d)前記抗体と同様の結合親和性を有する。

【0056】

さらなる態様では、本発明は、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含む、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。別の態様では、本発明は、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列を含む、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。いくつかの実施形態では、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片は、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列と、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列とを含む。

【0057】

別の態様では、本発明は、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片のバリエーションを提供する。よって、本発明は、例えばそれぞれ配列番号7または配列番号8におけるような重鎖および軽鎖可変領域配列のいずれかの重鎖または軽鎖のいずれかの親アンタゴニスト抗体の重鎖および/または軽鎖可変領域配列の非CDR領域のアミノ酸配列と少なくとも80%同一である(少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有する)重鎖および/または軽鎖可変領域配列の非CDR領域のアミノ酸配列を有する抗体またはその断片を提供する。重鎖または軽鎖のいずれかの親アンタゴニスト抗体の重鎖および/または軽鎖可変領域配列の非拡張CDR領域のアミノ酸配列と少なくとも80%同一である重鎖および/または軽鎖可変領域配列の非拡張CDR領域のアミノ酸配列を有する抗体またはその断片も、本発明により提供される。重鎖および/または軽鎖可変領域配列の非CDR領域または非拡張CDR領域のアミノ酸配列同一性は、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%、特に96%、より特には97%、さらにより特には98%、最も特には99%(例えば80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%および100%を含む)である。アミノ酸配列に関する同一性または相同性は、本明細書において、配列を整列させ、必要であればギャップを導入して最大限のパーセント配列同一性を達成した後

の、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。よって、配列同一性は、2つのポリペプチドのアミノ酸の位置の類似性を比較するために一般的に用いられる標準的な方法により決定できる。BLASTまたはFASTAなどのコンピュータプログラムを用いて、2つのポリペプチドを、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な一致のために整列させる（一方もしくは両方の配列の全長にわたって、または一方もしくは両方の配列の予め決定された部分にわたって）。これらのプログラムは、デフォルトのオープニングペナルティおよびデフォルトのギャップペナルティを提供し、PAM250（標準的スコア行列；Atlas of Protein Sequence and Structure、第5巻、補遺3号中のDayhoff MOら、（1978）を参照されたい）などのスコア行列をコンピュータプログラムとともに用いることができる。例えば、パーセント同一性は、同一の一致の総数に100を乗じ、一致したひと続き内の長いほうの配列の長さ、2つの配列を整列させるために長いほうの配列に導入したギャップの数との和で除することにより算出できる。

10

20

30

40

50

【0058】

いくつかの実施形態では、本開示は、よって、配列番号19、20、21、22もしくは23のフレームワーク領域配列と少なくとも70%同一である重鎖可変フレームワーク領域配列ならびに/または配列番号24、25、26、27および28のフレームワーク領域配列と少なくとも60%同一である軽鎖可変フレームワーク領域配列を含む、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号19のフレームワーク領域配列と少なくとも74%同一である重鎖可変フレームワーク領域配列ならびに/または配列番号24のフレームワーク領域配列と少なくとも65%同一である軽鎖可変フレームワーク領域配列を含む、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片を提供する。

【0059】

別の態様では、本発明は、上記の重鎖および軽鎖CDRを含み、IGHV2-70^{*}10（配列番号19）、IGHV2-70^{*}01（配列番号20）、IGHV2-70^{*}13（配列番号21）、IGHV2-5^{*}09（配列番号22）およびIGHV2-70^{*}11（配列番号23）からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域、好ましくはヒト遺伝子IGHV2-70^{*}10（配列番号19）の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域をさらに含む、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片を提供する。重鎖可変フレームワーク領域は、これらのヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する1または複数（例えば1、2、3および/または4つ）の重鎖フレームワーク領域配列（例えばフレームワーク1（FW1）、フレームワーク2（FW2）、フレームワーク3（FW3）および/またはフレームワーク4（FW4））を含むことがある。好ましくは、重鎖可変領域フレームワークは、IGHV2-70^{*}10（配列番号19）、IGHV2-70^{*}01（配列番号20）、IGHV2-70^{*}13（配列番号21）、IGHV2-5^{*}09（配列番号22）およびIGHV2-70^{*}11（配列番号23）からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来するFW1、FW2および/またはFW3、より好ましくはFW1、FW2およびFW3を含む。重鎖フレームワーク領域配列は、本明細書で用いる場合、FW1（1位～25位）、FW2（36位～49位）、FW3（66位～94位）およびFW4（103位～113位）（アミノ酸の位置は、Kabataに示す番号付けシステムを利用して示す）を含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、本開示は、抗体またはその断片であって、前記抗体またはその断片が、ヒト遺伝子IGHV2-70^{*}10（配列番号19）の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域を含み、重鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の対応する重鎖可変フレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。

【0061】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号32のアミノ酸配列を含む重鎖配列を含む抗体またはその断片であって、重鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の対応する重鎖可変フレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。

【0062】

好ましくは、アミノ酸改変は、23位、35b位、48位、50位、60位および62位からなる群より選択されるアミノ酸位置、より好ましくは23位、35b位、50位、60位および62位からなる群より選択されるアミノ酸位置、最も好ましくは35b位のアミノ酸位置でのアミノ酸置換を含み、各群メンバーのアミノ酸位置がK a b a t 番号付けに従って示される。具体的に、アミノ酸改変は、23S、35bG、48L、50H、60Nおよび62Aからなる群より選択されるアミノ酸置換、好ましくはT23S、S35bG、I48L、R50H、S60NおよびS62Aからなる群より選択されるアミノ酸置換を含み、S35bGが最も好ましいアミノ酸置換である（各群メンバーのアミノ酸位置は、K a b a t 番号付けに従って示す）。

10

【0063】

別の態様では、本発明は、I G K V 3 - 1 1^{*} 0 1（配列番号24）、I G K V 1 - 3 9^{*} 0 1（配列番号25）、I G K V 1 D - 3 9^{*} 0 1（配列番号26）、I G K V 3 - 1 1^{*} 0 2（配列番号27）およびI G K V 3 - 2 0^{*} 0 1（配列番号28）からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域、好ましくはヒト遺伝子I G K V 3 - 1 1^{*} 0 1（配列番号24）の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含む、ヒトO X 4 0と結合する拮抗性抗体またはその断片を提供する。軽鎖可変領域フレームワーク領域は、これらのヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する1または複数（例えば1、2、3および/または4つ）の軽鎖フレームワーク領域配列（例えばフレームワーク1（FW1）、フレームワーク2（FW2）、フレームワーク3（FW3）および/またはフレームワーク4（FW4））を含むことがある。好ましくは、軽鎖可変領域フレームワークは、V 3 - 1 1^{*} 0 1（配列番号24）、I G K V 1 - 3 9^{*} 0 1（配列番号25）、I G K V 1 D - 3 9^{*} 0 1（配列番号26）、I G K V 3 - 1 1^{*} 0 2（配列番号27）およびI G K V 3 - 2 0^{*} 0 1（配列番号28）からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来するFW1、FW2および/またはFW3、より好ましくはFW1、FW2およびFW3を含む。軽鎖フレームワーク領域配列は、本明細書で用いる場合、FW1（1位～23位）、FW2（35位～49位）、FW3（57位～88位）およびFW4（98位～108位）（アミノ酸の位置は、K a b a t に示す番号付けシステムを利用して示す）を含む。

20

30

【0064】

いくつかの実施形態では、本開示は、ヒト遺伝子I G K V 3 - 1 1^{*} 0 1（配列番号24）の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含む抗体またはその断片であって、軽鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の軽鎖可変領域の対応するフレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。

40

【0065】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号39のアミノ酸配列を含む軽鎖配列を含む抗体またはその断片であって、軽鎖配列の軽鎖可変フレームワーク領域が、対応するマウス抗体の対応する軽鎖可変フレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。

【0066】

好ましくは、アミノ酸改変は、1位、33位、34位、46位、47位、54位、56位および71位からなる群より選択されるアミノ酸位置でのアミノ酸置換、ならびに/または31位のアミノ酸位置での欠失、より好ましくは33位、34位、46位、47位、

50

54位、56位および71位からなる群より選択されるアミノ酸位置でのアミノ酸置換、ならびに/または31位のアミノ酸位置での欠失、最も好ましくは46位および/または47位のアミノ酸位置でのアミノ酸置換を含み、各群メンバーのアミノ酸位置がKabat番号付けに従って示される。具体的に、アミノ酸改変は、1Q、33M、34H、46P、47W、54L、56Sおよび71Yからなる群より選択されるアミノ酸置換、ならびに/またはT31での欠失、好ましくは1Q、33M、34H、46P、47W、54L、56Sおよび71Yからなる群より選択されるアミノ酸置換、より好ましくは33M、34H、46P、47Wおよび71Yからなる群より選択されるアミノ酸置換を含み、46P、47Wが特に好ましい(各群メンバーのアミノ酸位置は、Kabat番号付けに従って示す)。

10

【0067】

いくつかの実施形態では、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片は、V2-70^{*}10(配列番号19)、V2-70^{*}01(配列番号20)、V2-70^{*}13(配列番号21)、V2-5^{*}09(配列番号22)およびV2-70^{*}11(配列番号23)からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域と、V3-11^{*}01(配列番号24)、IGKV1-39^{*}01(配列番号25)、IGKV1D-39^{*}01(配列番号26)、IGKV3-11^{*}02(配列番号27)およびIGKV3-20^{*}01(配列番号28)からなる群より選択されるヒト遺伝子の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域、好ましくはヒト遺伝子V2-70^{*}10(配列番号19)の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域と、ヒト遺伝子V3-11^{*}01(配列番号24)の産物であるかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変フレームワーク領域とを含む。上記の異なるヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する重鎖可変フレームワーク領域、および/または上記の異なるヒト遺伝子の産物中に存在するかまたは前記遺伝子に由来する軽鎖可変領域フレームワーク領域の組み合わせも、本発明に含まれる。

20

【0068】

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(www.mrccep.cam.ac.uk/vbaseにてインターネットで利用可能)、ならびにKabat EAら、既出;Tomlinson IMら、(1992)J.Mol.Biol.227:776~798頁およびCox JPLら、(1994)Eur.J.Immunol.24:827~836頁で見出すことができる。別の例として、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、Genbankデータベースで見出すことができる。

30

【0069】

別の態様では、本開示は、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片であって、重鎖CDRの少なくとも1つおよび/または軽鎖CDRの少なくとも1つが少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介突然変異誘発を行って、改変(複数可)を導入でき、抗体結合またはその他の対象の機能的特性に対する影響を、in vitroまたはin vivoアッセイにおいて評価できる。好ましくは、保存改変を導入する。改変(複数可)は、アミノ酸置換、付加または欠失であり得るが、好ましくは置換である。典型的に、5以下、好ましくは4以下、より好ましくは3以下、さらにより好ましくは2以下、最も好ましくは1以下のアミノ酸改変をCDR領域内で行う。

40

【0070】

あるいくつかの実施形態では、フレームワーク配列を用いて可変領域を工学改変して、バリエーション抗体を生成できる。本発明のバリエーション抗体は、VHおよび/またはVK内のフレームワーク残基に対して改変を行って、例えば抗体の特性を改良するものを含む。典型的に、このようなフレームワーク改変を行って、抗体の免疫原性を低減する。例えば、あるアプローチは、1もしくは複数のフレームワーク残基を対応するマウス配列に「逆突

50

然変異」させるか、または1もしくは複数のフレームワーク残基を対応する生殖系列配列に「逆突然変異」させることである。

【0071】

よって、さらなる態様では、本開示は、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片であって、ヒト化抗体またはその断片の重鎖可変領域のフレームワーク領域配列の少なくとも1つが、対応するマウス抗体の重鎖可変領域の対応するフレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。好ましくは、アミノ酸改変は、アミノ酸置換である。典型的に、6以下、好ましくは5以下、好ましくは4以下、より好ましくは3以下、さらにより好ましくは2以下、最も好ましくは1以下のアミノ酸改変をフレームワーク領域内で行う。いくつかの実施形態では、本開示は、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片であって、重鎖可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸改変が、23位、35b位、48位、50位、60位および62位からなる群より選択されるアミノ酸位置でのアミノ酸置換を含み、各群メンバーのアミノ酸位置がK a b a t番号付けに従って示される、抗体およびその断片を提供する。重鎖可変領域のフレームワーク領域の好ましいアミノ酸置換は、23位、35b位、50位、60位および62位からなる群より選択されるアミノ酸位置である。重鎖可変領域のフレームワーク領域のより好ましいアミノ酸置換は、23S、35bG、48L、50H、60Nおよび62Aからなる群より選択され、35bGが重鎖可変領域のフレームワーク領域の最も好ましいアミノ酸置換である。

10

【0072】

本開示は、また、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片であって、ヒト化抗体またはその断片の軽鎖可変領域のフレームワーク領域配列の少なくとも1つが、対応するマウス抗体の軽鎖可変領域の対応するフレームワーク領域からの少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、抗体およびその断片を提供する。好ましくは、アミノ酸改変は、アミノ酸置換および/またはアミノ酸欠失である。典型的に、6以下、好ましくは5以下、好ましくは4以下、より好ましくは3以下、さらにより好ましくは2以下、最も好ましくは1以下のアミノ酸改変をフレームワーク領域内で行う。いくつかの実施形態では、本開示は、ヒト化抗体またはその断片であって、軽鎖可変領域配列のフレームワーク領域のアミノ酸改変が、1位、33位、34位、46位、47位、54位、56位および71位からなる群より選択されるアミノ酸位置でのアミノ酸置換、ならびに/または31位のアミノ酸位置での欠失を含む、抗体およびその断片を提供する。軽鎖可変領域配列のフレームワーク領域のより好ましいアミノ酸改変は、Y31での欠失ならびに/または1Q、33M、34H、46P、47W、54L、56Sおよび71Yからなる群より選択される置換を含み、各群メンバーのアミノ酸位置がK a b a t番号付けに従って示される。軽鎖可変領域配列のフレームワーク領域のより好ましいアミノ酸改変は、T31での欠失ならびに/または33M、34H、46P、47Wおよび71Yからなる群より選択される置換を含み、46Pおよび/またはL47Wが特に好ましい。いくつかの実施形態では、本発明のヒト化抗体またはその断片は、上記のとおり重鎖可変領域配列のフレームワーク領域のアミノ酸改変と、上記のとおり軽鎖可変領域配列のフレームワーク領域のアミノ酸改変とを含むことがある。

20

30

40

【0073】

本開示は、配列番号29、58、59、77、78、79および80からなる群より選択され、好ましくは配列番号58、59、79および80からなる群より選択され、より好ましくは配列番号58および59からなる群より選択される重鎖可変領域を含む、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片も提供する。本開示は、配列番号30、60、81、82、83、84、85、86、87、88および89からなる群より選択され、好ましくは配列番号60、86、87および89からなる群より選択され、より好ましくは配列番号60である軽鎖可変領域を含む、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片も提供する。いくつかの実施形態では、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片は、配列番号29、58、59、77、78、79および80からなる群よ

50

り選択される重鎖可変領域と、配列番号30、60、81、82、83、84、85、86、87、88および89からなる群より選択される軽鎖可変領域とを含む。これらの重鎖および軽鎖可変領域配列のそれぞれがヒトOX40と結合できることに鑑みて、重鎖および軽鎖可変領域配列を「様々に組み合わせ」て、本発明の抗OX40結合分子を創出できる。このような「様々に組み合わせ」た抗体のOX40結合は、例えば実施例に記載する結合アッセイを用いて試験できる。

【0074】

いくつかの実施形態では、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片は、配列番号58および59からなる群より選択される重鎖可変領域と、配列番号60および89からなる群より選択される軽鎖可変領域とを含む。より好ましい実施形態では、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片は、配列番号58のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号60のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、配列番号58のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、配列番号59のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号60のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、または配列番号59のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号89のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。最も好ましくは、配列番号58および59からなる群より選択される重鎖可変領域と、配列番号60のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片である。

10

【0075】

本開示は、配列番号32、33、34、35、36、37および38からなる群より選択され、好ましくは配列番号35、36、37および38からなる群より選択され、より好ましくは配列番号37および38からなる群より選択される重鎖配列を含む、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片を提供する。本開示は、配列番号39、40、41、42、43、44、45、46、47、48および49からなる群より選択され、好ましくは配列番号45、46、47および49からなる群より選択され、より好ましくは配列番号47である軽鎖配列を含む、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片も提供する。いくつかの実施形態では、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片は、配列番号32、33、34、35、36、37および38からなる群より選択される重鎖配列と、配列番号39、40、41、42、43、44、45、46、47、48および49からなる群より選択される軽鎖配列とを含む。これらの重鎖および軽鎖可変領域配列のそれぞれがヒトOX40と結合できることに鑑みて、重鎖および軽鎖可変領域配列を「様々に組み合わせ」て、本発明の抗OX40結合分子を創出できる。このような「様々に組み合わせ」た抗体のOX40結合は、実施例に記載する結合アッセイを用いて試験できる。

20

30

【0076】

いくつかの実施形態では、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片は、配列番号37および38からなる群より選択される重鎖配列と、配列番号47および49からなる群より選択される軽鎖配列とを含む。より好ましい実施形態では、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片は、配列番号37のアミノ酸配列を含む重鎖配列と配列番号47のアミノ酸配列を含む軽鎖配列、配列番号37のアミノ酸配列を含む重鎖配列と配列番号49のアミノ酸配列を含む軽鎖配列、配列番号38のアミノ酸配列を含む重鎖配列と配列番号47のアミノ酸配列を含む軽鎖配列、または配列番号38のアミノ酸配列を含む重鎖配列と配列番号49のアミノ酸配列を含む軽鎖配列を含む。最も好ましくは、配列番号37および38からなる群より選択される重鎖配列と、配列番号47のアミノ酸配列を含む軽鎖配列とを含む、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片である。

40

【0077】

本開示の一実施形態では、アンタゴニスト抗体またはその断片は、マウス抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体、好ましくはヒト化抗体、より好ましくはモノクローナルマウス抗体、モノクローナルキメラ抗体またはモノクローナルヒト化抗体である。

【0078】

50

本開示は、ヒトOX40と結合する1価抗体またはその断片、すなわち単一抗原結合腕からなる抗体も提供する。本開示は、Fab、Fab'、Fab'-SH、Fd、Fv、dAb、F(ab')₂、scFv、2重特異性単鎖Fv₂量体、ダイアボディ、トリアボディおよび同じまたは異なる抗体と遺伝子的に融合したscFvからなる群より選択される、ヒトOX40と結合する抗体の断片も提供する。好ましい断片は、scFv、2重特異性単鎖Fv₂量体およびダイアボディである。本開示は、ヒトOX40と結合する全長抗体も提供する。

【0079】

本開示は、重鎖および/または軽鎖定常領域、特にヒト重鎖および/またはヒト軽鎖定常領域をさらに含む、ヒトOX40と結合する抗体またはその断片も提供する。ヒト重鎖定常領域は、IgG1 (IGHG1)、IgG2 (IGHG2)、IgG3 (IGHG3)、IgG4 (IGHG4)、IgA1 (IGHA1)、IgA2 (IGHA2)、IgM (IGHM)、IgD (IGHD)またはIgE (IGHE)からなるヒト免疫グロブリンの群より選択でき、ヒト重鎖定常領域IgG、特にIgG1 (IGHG1)が好ましい。ヒト軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ定常領域からなるヒト免疫グロブリンの群より選択でき、ヒトカッパ定常領域が好ましい。好ましい実施形態では、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片は、ヒトIgG1 (IGHG1)重鎖定常ドメインとヒト軽鎖カッパ定常ドメインとを含む。

【0080】

フレームワーク領域またはCDR領域内に作製する改変に加えてまたは前記改変の代わりに、本発明の抗体を、Fc領域内に改変を含むように工学的に改変して、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作用のような抗体の1または複数の機能特性を典型的に変更してよい。さらに、本発明の抗体を化学的に改変(例えば1または複数の化学的部分を抗体に付けることができる)またはそのグリコシル化を変更するように改変してよい。これらの実施形態のそれぞれは、以下にさらに詳細に記載する。以下に概説するFc領域内の改変は、Fc領域中の残基のEU番号付けに従う。一実施形態では、CH1のヒンジ領域を、ヒンジ領域中のシステイン残基の数が変更、例えば増加または減少されるように改変する。このアプローチは、Bodmerらによる米国特許第5,677,425号にさらに記載されている。CH1のヒンジ領域中のシステイン残基の数を変更して、例えば軽鎖と重鎖の集合を容易にするか、または抗体の安定性を増加もしくは減少させる。別の実施形態では、抗体のFcヒンジ領域を変異させて、抗体の生物学的半減期を減少させる。より具体的には、抗体のブドウ球菌プロテインA(SpA)結合が天然のFc-ヒンジドメインSpA結合と比べて損なわれるようにFc-ヒンジ断片のCH2-CH3ドメイン界面領域中に1または複数のアミノ酸変異を導入する。このアプローチは、Wardらによる米国特許第6,165,745号にさらに詳細に記載されている。別の実施形態では、抗体を改変して、その生物学的半減期を増加させる。様々なアプローチが可能である。例えば、Wardへの米国特許第6,277,375号に記載されるように、以下の変異の1または複数を導入できる:T252L、T254S、T256F。代わりに、生物学的半減期を増加させるために、Presteraらによる米国特許第5,869,046号および第6,121,022号に記載されるように、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから得たサルベージ受容体結合エピトープを含有するようにCH1またはCL領域内で抗体を変更できる。さらなる実施形態では、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き換えて、抗体のエフェクター機能(複数可)を変更することによりFc領域を変更する。例えば、エフェクターリガンドに対する抗体の親和性が変更されるが、親抗体の抗原結合能力を抗体が保持するように、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または複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。親和性が変更されるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分であり得る。このアプローチは、ともにWinterらによる米国特許第5,624,821号および第5,648,260号にさらに詳細に記載されている。別の例では、抗体

10

20

30

40

50

の C1q 結合が変更され、かつ/または補体依存性細胞傷害作用 (CDC) が低減もしくは廃止されるようにアミノ酸残基 329、331 および 322 から選択される 1 または複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。このアプローチは、Idusogie らによる米国特許第 6,194,551 号にさらに詳細に記載されている。別の例では、CH2 ドメインの N 末端領域中の 231 位 ~ 238 位のアミノ酸内の 1 または複数のアミノ酸残基を変更し、そのことにより、補体と結合する抗体の能力を変更する。このアプローチは、Bodmer らによる PCT パンフレット WO94/29351 にさらに記載されている。なお別の例では、以下の位置での 1 もしくは複数のアミノ酸を改変することにより Fc 領域を改変して、抗体依存性細胞傷害作用 (ADCC) を媒介する抗体の能力を増加させ、かつ/または Fc 受容体に対する抗体の親和性を増加させる：

【0081】

本開示は、ヒト重鎖および/または軽鎖定常領域を含むヒト OX40 と結合する拮抗性抗体またはその断片であって、ヒト重鎖定常領域が、ヒト IgG4 (IGHG4) からの CH1 領域、ヒンジ領域、CH2 領域および CH3 領域を含むアイソタイプバリエーションを含み、ヒンジ領域が、228 位のセリンからプロリンへの置換を含む、抗体またはその断片も提供する。好ましくは、アイソタイプバリエーションを含むヒト化抗体は、全長抗体である。ヒト IgG4 (IGHG4) からの CH1 と、S228P 置換を有するヒト IgG4 (IGHG4) からのヒンジと、ヒト IgG4 (IGHG4) からの CH2 および CH3 とを含むアイソタイプバリエーションを含む、ヒト OX40 と結合する特に好ましいヒト化抗体またはその断片は、配列番号 57 のアミノ酸配列を含む重鎖配列と、配列番号 47 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列とを含む。アイソタイプバリエーションは、ヒト IgG1 (IGHG1) (これは、通常、天然のヒト IgG1 である) からのヒト重鎖定常領域を含む、ヒト OX40 と結合する拮抗性抗体またはその断片と比較して、すなわち改変された重鎖定常領域に関してアイソタイプバリエーションから異なるだけである、ヒト OX40 と結合する拮抗性抗体またはその断片と比較して、ADCC のような Fc 媒介性細胞傷害作用機序を示さないことが見出されている。

【0082】

本開示は、ヒト IgG Fc 領域を含むヒト OX40 と結合する拮抗性抗体またはその断片であって、ヒト IgG Fc 領域に付いた成熟コア炭水化物構造がフコースを欠く (本明細書において、代わりに「非フコシル化」という)、抗体またはその断片も提供する。好ましくは、抗体は、ヒト IgG1 (IGHG1) Fc 領域を含み、ヒト IgG1 (IGHG1) Fc 領域に付いた成熟コア炭水化物構造は、フコースを欠く。より好ましくは、ヒト IgG1 (IGHG1) Fc 領域に付いた成熟コア炭水化物構造がフコースを欠く、ヒト IgG1 (IGHG1) Fc 領域を含む全長抗体である。WO03/035835 から、ヒト IgG Fc 領域に付いた成熟コア炭水化物構造中のフコースの欠如は、ADCC を増進し得ることが知られている。よって、さらなる実施形態では、本開示の拮抗性抗体またはその断片は、ヒト IgG1 (IGHG1) Fc 領域を含み、ヒト IgG1 (IGHG1) Fc 領域に付いた成熟コア炭水化物構造は、フコースを欠き、フコースを欠く抗体は、フコースを欠かない親ヒト化抗体またはその断片と比較して、ADCC の増進を示す。フコースを欠く抗体を作製する方法は、例えば (a) 細胞内で発現されるタンパク質をフコース化する能力が低減される (またはフコース化できない) ようにフコース代謝が欠損している工学改変または変異宿主細胞の使用; (b) フコース化を防止もしくは低

10

20

30

40

50

減する条件下での細胞の培養；(c) フコースの翻訳後除去（例えばフコシダーゼ酵素を用いて）；(d) 例えば非グリコシル化糖タンパク質の組換え発現後の所望の炭水化物の翻訳後付加；または(e) フコース化されていない産物を選択するような糖タンパク質の精製である。好ましく用いられるものは、WO10/095031の実施例14に記載される方法、例えばLongmoreら、(1982) Carbohydr. Res. 365~92頁またはImai-Nishiyara、(2007)、BMC Biotechnol. 7: 84頁に記載される方法である。

【0083】

本発明は、配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変配列および/または配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変配列を含む抗体と同じエピトープと結合する、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片も提供する。本発明は、本発明が提供する抗体、特に配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変配列および/または配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変配列を含む抗体が結合する、ヒトOX40、特にヒトOX40受容体細胞外ドメインの特定の領域またはエピトープも提供する。ヒトOX40ポリペプチドのこの特定の領域またはエピトープは、本発明が提供する抗体のいずれか1つと組み合わせ、当技術分野において知られる任意の適切なエピトープマッピング方法により同定できる。このような方法の例は、OX40に由来する様々な長さのペプチドを、本発明の抗体との結合について、抗体により認識されるエピトープの配列を含有する抗体と特異的に結合できる最小の断片を用いてスクリーニングすることを含む。OX40ペプチドは、合成により、またはOX40ポリペプチドのタンパク質分解消化により生成できる。抗体と結合するペプチドは、例えば質量分析により同定できる。別の例では、NMR分光法またはX線結晶学を用いて、本発明の抗体と結合するエピトープを同定できる。一端同定されると、本発明の抗体と結合するエピトープ断片を、所望により、免疫原として用いて、同じエピトープと結合するさらなるアンタゴニスト抗体を得ることができる。

【0084】

抗OX40抗体特性

例えばELISA、BIACore（登録商標）、ウェスタンブロット、RIAおよびフローサイトメトリー分析を含む、例えばヒトOX40に対する抗体の結合能力を評価するための標準的なアッセイは、当技術分野において知られている。適切なアッセイは、実施例に詳細に記載する。抗体の結合動態（例えばKDのような結合親和性）も、スキャッチャードまたはBIACore（登録商標）システム分析によるなどの当技術分野において知られる標準的なアッセイにより評価できる。相対的結合親和性 K_i は、当技術分野において知られる標準的な競合アッセイにより評価できる。

【0085】

さらなる態様では、本発明は、組換えヒト化抗体エファリズマブよりも高い程度まで用量依存的様式でヒト混合リンパ球反応(MLR)を阻止する、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片を提供する。組換えヒト化抗体エファリズマブは、リンパ球機能関連抗原1のCD11aサブユニットと結合する。MLRは、実施例3に従って行って測定できる。

【0086】

さらなる態様では、本発明は、カニクイザルOX40も認識できる、ヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。ヒトおよびカニクイザル両方の末梢血単核細胞(PBMC)との拮抗性抗OX40抗体の結合は、実施例4に従ってかつ図3に示すように行って測定できる。抗体は、ヒトおよびカニクイザルの活性化リンパ球の表面上で発現されたOX40を認識することが見出され、この抗体が交差反応特性を有することが示された。

【0087】

さらなる態様では、本発明は、例えば、実施例5および6に詳細に記載し、図4で説明するように、分析物として用いる組換え1価ヒトOX40受容体細胞外ドメイン(配列番号11)を有するプロテインA結合CM5研究グレードセンサチップ(GE Health

10

20

30

40

50

h c a r e E u r o p e G m b H、G l a t t b r u g g、S w i t z e r l a n d ; B R - 1 0 0 0 - 1 4) 上 に 抗 体 を 捕 捉 す る こ と に よ り、B I A c o r e (登 録 商 標) 装 置 (G E H e a l t h c a r e E u r o p e G m b H、G l a t t b r u g g、S w i t z e r l a n d) で 表 面 プ ラ ズ モ ン 共 鳴 (S P R) に よ り 測 定 さ れ る、5 0 0 n M 以 下、好 ま し く は 2 0 0 n M 以 下、よ り 好 ま し く は 1 5 0 n M 以 下、よ り 好 ま し く は 1 2 0 n M 以 下、さ ら に よ り 好 ま し く は 1 1 0 n M 以 下 の 親 和 性 (K_D) で ヒ ト O X 4 0、特 に 単 離 形 の ヒ ト O X 4 0 と 結 合 す る 拮 抗 性 抗 体 ま た は そ の 断 片 を 提 供 す る。O X 4 0 受 容 体 を 用 い る 親 和 性 測 定 に 関 す る 「 1 価 」 は、本 明 細 書 で 用 い る 場 合、例 え ば ド メ イ ン が ア ミ ノ 末 端 に て 免 疫 グ ロ ブ リ ン F c 部 分 と 融 合 す る 場 合 の よ う に 人 工 的 に 2 量 体 化 ま た は 多 量 体 化 さ れ て い な い、細 胞 外 ド メ イ ン の よ う な ヒ ト O X 4 0 受 容 体 ド メ イ ン の こ と を い う。好 ま し い 態 様 で は、本 発 明 は、対 応 す る キ メ ラ 抗 体 の O X 4 0 結 合 親 和 性 (K_D) の 少 な く と も 7 5 % を 保 持 す る ヒ ト 化 抗 体 ま た は そ の 断 片 を 提 供 す る。好 ま し く は、ヒ ト 化 抗 体 ま た は そ の 断 片 は、対 応 す る キ メ ラ 抗 体 と 等 価 な 親 和 性 で ヒ ト O X 4 0 と 結 合 す る。「 等 価 な 親 和 性 」 は、対 応 す る キ メ ラ 抗 体 の O X 4 0 結 合 親 和 性 の $\pm 10\%$ の 範 囲 内 で あ る 親 和 性 の 値 を 意 味 す る。よ り 具 体 的 に は、本 発 明 は、対 応 す る キ メ ラ 抗 体 よ り 高 い 親 和 性 で ヒ ト O X 4 0 と 結 合 す る ヒ ト 化 抗 体 ま た は そ の 断 片 を 提 供 す る。本 発 明 の 好 ま し い 態 様 で は、例 え ば、実 施 例 5 お よ び 6 に 詳 細 に 記 載 し、図 4 で 説 明 す る よ う に、分 析 物 と し て 用 い る 組 換 え 1 価 ヒ ト O X 4 0 受 容 体 細 胞 外 ド メ イ ン (配 列 番 号 1 1) を 有 す る プ ロ テ イ ン A 結 合 C M 5 研 究 グ レ ード セ ン サ チ ャ ッ プ (G E H e a l t h c a r e E u r o p e G m b H、G l a t t b r u g g、S w i t z e r l a n d ; B R - 1 0 0 0 - 1 4) 上 に 抗 体 を 捕 捉 す る こ と に よ り、B I A c o r e (登 録 商 標) 装 置 (G E H e a l t h c a r e E u r o p e G m b H、G l a t t b r u g g、S w i t z e r l a n d) で 表 面 プ ラ ズ モ ン 共 鳴 (S P R) に よ り 測 定 さ れ る、1 1 0 n M 以 下、好 ま し く は 1 0 0 n M 以 下、よ り 好 ま し く は 9 0 n M 以 下、よ り 好 ま し く は 8 0 n M 以 下、さ ら に よ り 好 ま し く は 7 0 n M 以 下 の 結 合 親 和 性 (K_D) を 有 す る、ヒ ト O X 4 0 と 結 合 す る 拮 抗 性 抗 体 ま た は そ の 断 片 が 提 供 さ れ る。

【 0 0 8 8 】

本 発 明 の さ ら な る 態 様 は、良 好 な 熱 安 定 性 を 有 す る、ヒ ト O X 4 0 と 結 合 す る 拮 抗 性 抗 体 ま た は そ の 断 片 を 提 供 す る。好 ま し い 実 施 形 態 で は、ヒ ト O X 4 0 と 結 合 す る 拮 抗 性 ヒ ト 化 抗 体 ま た は そ の 断 片 は、7 0 を 超 え、好 ま し く は 7 5 を 超 え、よ り 好 ま し く は 8 0 を 超 え、さ ら に よ り 好 ま し く は 8 5 を 超 え る F A B 断 片 耐 熱 温 度 を 有 す る。F A B 断 片 耐 熱 性 の 分 析 の た め に 示 差 走 査 熱 量 分 析 測 定 を 用 い、前 記 測 定 で は、全 長 I g G の 関 係 に お け る F A B 断 片 の 中 間 融 解 温 度 が 同 定 さ れ る。こ れ ら の 種 類 の 熱 量 測 定 は、当 業 者 に 知 ら れ て お り、実 施 例 6 に さ ら に 記 載 し て 図 6 に 示 す よ う に、例 え ば G a r b e r お よ び D e m a r e s t (2 0 0 7)、B B R C、3 5 5 : 7 5 1 ~ 7 頁 に 従 っ て 行 う こ と が 可 能 だ ろ う。

【 0 0 8 9 】

さ ら な る 態 様 で は、本 発 明 は、ヒ ト O X 4 0 細 胞 外 領 域 上 の エ ピ ト ー プ と 結 合 す る 拮 抗 性 抗 体 ま た は そ の 断 片 に つ い て 記 載 す る。実 施 例 7 に 記 載 し て 図 7 に 示 す よ う に、O X 4 0 細 胞 外 領 域 の 4 つ の ド メ イ ン の う ち の 1 ま た は 複 数 を、ヒ ト 配 列 と ラ ッ ト 配 列 と の 間 で 交 換 し て、F c 融 合 タ ン パ ク 質 を 作 製 し た。結 合 E L I S A を 次 い で 行 っ て、ヒ ト O X 4 0 細 胞 外 領 域、ラ ッ ト O X 4 0 細 胞 外 領 域 お よ び 4 つ の ヒ ト - ラ ッ ト キ メ ラ タ ン パ ク 質 に 対 す る 拮 抗 性 ヒ ト 化 抗 体 の 反 応 性 を 試 験 し た。よ っ て、本 発 明 は、ヒ ト O X 4 0 細 胞 外 領 域 の 第 2 ド メ イ ン 内 に マ ッ ピ ン グ さ れ る 拮 抗 性 抗 体 ま た は そ の 断 片 を 提 供 す る。

【 0 0 9 0 】

本 発 明 は、免 疫 反 応 を 抑 制 す る た め に 用 い る こ と が 可 能 な 拮 抗 性 抗 体 ま た は そ の 断 片 も 提 供 す る。拮 抗 性 ヒ ト 化 抗 O X 4 0 抗 体 の 効 果 を、ア ロ 反 応 性 T 細 胞 活 性 化 お よ び 増 殖 の *in vitro* モ デ ル と し て 用 い た M L R に お い て (実 施 例 8 を 参 照 さ れ た い) 試 験 し た (O ' F l a h e r t y E ら、(2 0 0 0) *Immunology*、1 0 0 (3) : 2 8 9 ~ 9 9 頁 ; D u P o n t B お よ び H a n s e n J A (1 9 7 6) *Adv. Im*

10

20

30

40

50

munol. 23: 107~202頁)。2名の無関係のドナーからのPBM Cを混合して、T細胞の活性化およびTリンパ球の増殖をもたらした。さらに、3つの異なるフォーマット、すなわちIgG1 (IGHG1)フォーマット、非フコシル化IgG1 (IGHG1)フォーマットおよびIgG4 (IGHG4)フォーマットの拮抗性ヒト化抗OX40抗体をこのアッセイにおいて試験して、MLRの阻害に対するADCCなどの細胞傷害性機序の寄与をさらに決定した。拮抗性ヒト化抗OX40抗体は、2名の異なる個体(レスポナー)において、およそ100ng/mLのEC50値でMLRを効率的に阻害した。しかし、結果は、用いた抗体のフォーマットに依存する差を示した。第1個体(レスポナー1)では、T細胞反応性は、IgG1 (IGHG1)およびIgG4 (IGHG4)抗体フォーマットにより効率的に阻害され、このことは、細胞傷害性機序がこの個体にとって重要でないことを示した。第2個体(レスポナー2)について、IgG1 (IGHG1)フォーマットは60%を超える阻害を達成したが、IgG4 (IGHG4)フォーマットは、MLRを乏しく阻止しただけであった。両方の個体では、非フコシル化IgG1 (IGHG1)フォーマットは、MLRの阻害について非常に効果的であった。これらの結果は、MLRを阻害するためにOX40活性化を阻止することがいくらかの個体において十分であり得るが、この効果は、さらなる細胞傷害性機序により大きく増進できることを示す。よって、障害が患者のOX40共刺激状態とは独立しているとみられるOX40媒介性障害に罹患している患者、例えばOX40発現レベルが低い患者の処置のために、細胞傷害性機序が増進している、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片を投与することが特に効果的であり得る。本発明の好ましい実施形態は、OX40媒介性障害に罹患している患者の処置のための、ヒトOX40と結合する拮抗性ヒト化抗体を提供する。さらに、患者は、OX40の発現レベルが低いことがある。好ましくは、ヒトOX40と結合する拮抗性ヒト化抗体は、IgG1 (IGHG1)領域を含む。より好ましくは、ヒトOX40と結合する拮抗性ヒト化抗体は、非フコシル化IgG1領域を含む。

【0091】

本発明のさらなる態様では、拮抗性抗体またはその断片の効果、SCIDマウスがヒトPBM Cで再構築された異種間移植片対宿主反応において実証する。この反応により、ヒト患者において骨髄移植の後に観察される同種間移植片対宿主疾患(GVHD)のモデルが得られる。このモデルでは、ヒトPBM Cおよび特にTリンパ球がマウス宿主細胞に対する強い応答を開始し、これによって重度の炎症症状が生じる。実施例9に記載して図9および表10に示すように、ヒトOX40と結合する拮抗性ヒト化抗体は、GVHD反応を1mg/kgの用量にて有力に抑制した。驚くべきことに、この抗体は、GVHDについて認められている治療であるEnbrel(登録商標)よりもよい効力を示した(Xhaard Aら、(2011)Bull. Cancer、98(8): 889~99頁; Simpson D(2001)Expert Opin. Pharmacother. 2(7): 1109~17頁)。よって、好ましい実施形態では、本発明は、GVHDの処置において効果的である、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片を提供する。好ましくは、対象への抗体の投与は、媒体の投与と比較して生存中央値(日)を4倍改善する。より好ましくは、対象への抗体の投与は、Enbrel(登録商標)の投与と比較して生存中央値(日)を2倍改善する。本発明は、よって、GVHDの患者の処置および/またはGVHDの抑制においてEnbrel(登録商標)よりも効果的である、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体または断片を提供する。さらに、アゴニスト性抗OX40結合抗体が同種間マウスGVHDモデルにおいてGVHDを悪化させることが報告されており(Valzasina Bら、(2005)Blood、105(7): 2845~51頁; Blazar BRら、(2003)Blood、101(9): 3741~8頁)、よって、実施例9から、このモデルにおいてGVHDの悪化が観察されなかったため、本発明の拮抗性抗体およびその断片は、ヒトOX40との結合に対してアゴニスト効果を示さないと結論付けることができる。よって、本発明は、結合に対してアゴニスト活性を示さない、ヒトOX40と結合するヒト化抗体またはその断片を提供する。

【0092】

核酸、ベクターおよび宿主細胞

本開示は、ヒトOX40と結合する抗体およびその断片をコードする単離核酸、ベクターおよび核酸またはベクターを含む宿主細胞も提供する。核酸は、細胞全体、細胞溶解物または部分的に精製もしくは実質的に精製された形で存在することがある。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンド分け、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においてよく知られている他のものを含む標準的な技法により、他の細胞構成成分または他の混入物、例えば他の細胞性核酸またはタンパク質から精製分離された場合に、「単離」または「実質的に純粋に」されている。例えばF. Ausubelら編(1987) Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing and Wiley Interscience、New Yorkを参照されたい。本発明の核酸は、例えば、DNAまたはRNAであり得、イントロン配列を含んでも含まなくてもよい。好ましい実施形態では、核酸は、cDNA分子である。

10

【0093】

本発明の核酸は、標準的な分子生物学技法を用いて得ることができ、例えば抗体の軽鎖および重鎖をコードするかまたはVHおよびVLセグメントをコードするcDNAは、標準的PCR増幅またはcDNAクローニング技法により得ることができる。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法を用いて)から得られる抗体について、抗体をコードする1または複数の核酸をライブラリーから回収できる。外因性核酸を宿主細胞に導入する方法は、当技術分野においてよく知られており、用いる宿主により変動する。技法は、それらに限定されないが、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、塩化カルシウム処理、ポリエチレンイミン媒介トランスフェクション、ポリプレックス媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ウイルスまたはファージ感染、リポソームへのポリヌクレオチド(複数可)の封入、および核へのDNAの直接マイクロインジェクションを含む。哺乳動物細胞の場合、トランスフェクションは一過性または安定性のいずれかであってよい。

20

【0094】

本発明の好ましい核酸分子は、配列番号32、33、34、35、36、37および38からなる群より選択される重鎖配列、ならびに/または配列番号39、40、41、42、43、44、45、46、47、48および49からなる群より選択される軽鎖配列をコードするものである。本発明の好ましい核酸分子は、配列番号29、58、59、77、78、79および80からなる群より選択される重鎖可変領域、ならびに/または配列番号30、60、81、82、83、84、85、86、87、88および89からなる群より選択される軽鎖可変領域をコードするものである。

30

【0095】

本発明の好ましい核酸分子は、配列番号8の軽鎖可変領域および/または配列番号7の重鎖可変領域をコードするもの、例えば配列番号9の核酸配列を含む重鎖可変領域をコードするDNA、および/または配列番号10の核酸配列を含む軽鎖可変領域をコードするDNAである。本発明のより好ましい核酸分子は、配列番号58もしくは59の重鎖可変領域および/または配列番号60の軽鎖可変領域をコードするもの、例えば配列番号61もしくは62の核酸配列を含む重鎖可変領域をコードするDNA、および/または配列番号63の核酸配列を含む軽鎖可変領域をコードするDNAであり、これらが最も好ましい。

40

【0096】

VHおよびVLセグメントをコードするDNA断片が一旦得られると、これらのDNA断片を、標準的な組換えDNA技法によりさらに操作して、例えば可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子またはFab断片遺伝子もしくはscFv遺伝子のような上記の断片に対応する断片遺伝子に変換できる。これらの操作では、VLまたはVHをコードするDNA断片は、抗体定常領域またはフレキシブルリンカーのようななどの別のタンパク質をコード

50

する別のDNA断片に作動可能に連結している。用語「作動可能に連結する」は、この文脈で用いる場合、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断片をつなぐことを意味する。VH領域をコードする単離DNAは、重鎖定常領域(CH1、CH2およびCH3)をコードする別のDNA分子にVHをコードするDNAを作動可能に連結することにより、全長重鎖遺伝子に変換できる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野において知られており(例えばKabata E Aら、既出を参照されたい)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準的なPCR増幅により得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1(IHGG1)、IgG2(IHGG2)、IgG3(IHGG3)、IgG4(IHGG4)、IgA1(IHGA1)、IgA2(IHGA2)、IgM(IGHM)、IgD(IGHD)またはIgE(IGH E)定常領域であり得るが、最も好ましくはIgG1(IHGG1)定常領域である。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できる。VL領域をコードする単離DNAは、軽鎖定常領域、CLをコードする別のDNA分子にVLをコードするDNAを作動可能に連結することにより、全長軽鎖遺伝子(およびFab軽鎖遺伝子)に変換できる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野において知られており(例えばKabata E Aら、既出を参照されたい)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準的なPCR増幅により得ることができる。好ましい実施形態では、軽鎖定常領域は、カップまたはラムダ定常領域、好ましくはカップ定常領域であり得る。scFv遺伝子を創出するために、VHおよびVLをコードするDNA断片を、フレキシブルリンカーをコードする、例えばアミノ酸配列(Gly4-Ser)3をコードする別の断片に作動可能に連結して、VLおよびVH領域がフレキシブルリンカーによりつながれた連続単鎖タンパク質としてVHおよびVL配列が発現できるようにする(例えばBird REら、(1988) Science、242:423~426頁;Huston JSら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85:5879~83頁;McCafferty Jら、(1990) Nature、348:552~554頁を参照されたい)。抗体の抗体断片生成のために様々な技法が開発されている。伝統的に、これらの断片は、インタクト抗体のタンパク質分解消化により導かれた(例えばMorimoto Kら、(1992) J. Biochem. & Biophysical Methods、24:107~117頁およびBrennan Mら、(1985) Science、229:81~3頁を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在、組換え宿主細胞により直接生成できる。例えば、抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリーから単離できる。代わりに、Fab'-SH断片は、E. coliから直接回収でき、化学的にカップリングさせて(Fab')₂断片を形成できる(Carter Pら、(1992) Bio/Technology、10:163~167頁)。別のアプローチによると、(Fab')₂断片は、組換え宿主細胞培養から直接単離できる。抗体断片の生成のための他の技法は、当業者にとって明らかである。別の実施形態では、選択される抗体は、単鎖Fv断片(scFv)である。例えばWO1993/16185;米国特許第5,571,894号および米国特許第5,587,458号を参照されたい。抗体断片は、例えば米国特許第5,641,870号に例えば記載される「直鎖抗体」であってもよい。

【0097】

本発明の抗体をコードする核酸は、タンパク質を発現するためにベクター、好ましくは発現ベクターに組み込むことができる。様々な発現ベクターをタンパク質発現のために利用できる。発現ベクターは、自己複製染色体外ベクターまたは宿主ゲノムに組み込まれるベクターを含み得る。発現ベクターは、宿主細胞型と適合するように構築される。よって、本発明において用いることができるベクター、好ましくは発現ベクターは、それらに限定されないが、哺乳動物細胞、細菌、昆虫細胞、酵母においておよび*in vitro*系においてタンパク質発現を可能にするものを含む。当技術分野において知られるように、抗体を発現するために本発明において用いることができる様々な発現ベクターが市販または他の方法で入手可能である。

10

20

30

40

50

【0098】

発現ベクターは、典型的に、制御もしくは調節配列、選択マーカー、任意の融合パートナーおよび/またはさらなるエレメントに作動可能に連結したタンパク質を含む。本明細書において「作動可能に連結」とは、核酸が別の核酸配列と機能的関係にあることを意味する。用語「調節配列」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）を含むことを意図する。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))に記載される。一般的に、これらの発現ベクターは、抗体をコードする核酸に作動可能に連結した転写および翻訳調節核酸を含み、タンパク質を発現するために用いる宿主細胞にとって典型的に適当である。一般に、転写および翻訳調節配列は、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始および終結配列、翻訳開始および終結配列、ならびにエンハンサーまたはアクチベーター配列を含み得る。これもまた当技術分野において知られるように、発現ベクターは、選択遺伝子またはマーカーを典型的に含有して、発現ベクターを含有する形質転換宿主細胞の選択を可能にする。選択遺伝子は当技術分野において知られており、用いる宿主細胞により変動する。例えば、典型的に、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セートなどの薬物に対する耐性を、ベクターが導入された宿主細胞に与える。好ましい選択可能マーカーは、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子 (メトトレキセート選択/増幅を用いる dhfr - 宿主細胞において用いるため) および neo 遺伝子 (G418 選択のため) を含む。

10

20

【0099】

クローニングまたは本明細書におけるベクター中でのDNAの発現のために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母または高等真核生物細胞である。この目的のために適切な原核生物は、グラム陰性またはグラム陽性生物を含む真正細菌、例えばEnterobacteriaceae、例えばEscherichia、例えばE. coli、Enterobacter、Klebsiella、Proteus、Salmonella、例えばSalmonella typhimurium、Serratia、例えばSerratia marcescansおよびShigella、ならびにBacilli、例えばB. subtilisおよびB. licheniformis、Pseudomonas、例えばP. aeruginosa、ならびにStreptomycesを含む。適切なE. coliクローニング宿主は、E. coli 294 (ATCC31,446)、E. coli B、E. coli X1776 (ATCC31,537) およびE. coli W3110 (ATCC27,325) を含む。原核生物に加えて、糸状菌または酵母のような真核微生物は、適切なクローニングまたは発現宿主である。Saccharomyces cerevisiaeまたは一般的なパン酵母は、下等真核宿主微生物のうちで最も一般的に用いられる。しかし、Schizosaccharomyces pombe; K. lactis、K. fragilis (ATCC12,424)、K. bulgaricus (ATCC16,045)、K. wickerhamii (ATCC24,178)、K. WaiTH (AJCC56,500)、K. drosopmarum (ATCC36,906)、K. thermotoleransまたはK. marxianus yarrowia (EP402226) を含むKluyveromyces宿主; Pichia pastoris (EP183070); Candida; Trichoderma reesia (EP244234); Neurospora crassa; Schwanniomyces、例えばSchwanniomyces occidentalis; およびNeurospora、Penicillium、TolypocladiumまたはA. nidulansもしくはA. nigerのようなAspergillus宿主を含む糸状菌のなどのいくつかの他の属、種および株が一般的に利用可能であり、有用である。

30

40

【0100】

50

本発明の抗体の発現のために適切な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例は、プラリル (plaril) および昆虫細胞を含む。多数のバキュロウイルス株およびバリエーション、並びに *Spodoptera frugiperda* (イモムシ)、*Aedes aegypti* (カ)、*Aedes albopictus* (カ)、*Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ) および *Bombyx mori* など宿主からの対応する許容される昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクションのための様々なウイルス株、例えば *Autographa californica* NPV の L-1 バリエーションおよび *Bombyx mori* NPV の Bm-5 株が公共で利用可能であり、このようなウイルスは、特に *Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクションのために用いることができる。ワタ、トウモロコシ、パレイショ、ダイズ、ペチュニア、トマトおよびタバコの植物細胞培養物も宿主として利用できる。

10

【0101】

本発明の組換え抗体の発現のための宿主細胞は、好ましくは哺乳動物宿主細胞であり、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO 細胞) (Urlaub G および Chasin L A (1980) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 77: 4216~4220 頁に記載される dhfr^r CHO 細胞を含む、例えば Kaufman R J および Sharp P A (1982) J. Mol. Biol, 159: 601~621 頁に記載されるように DHFR 選択可能マーカーとともに用いられる)、NSO 骨髄腫細胞、COS 細胞および SP2 細胞を含む。特に、NSO 骨髄腫細胞とともに用いるために、別の好ましい発現系は、WO 87/04462 (Wilson)、WO 89/01036 (Bebbington) および EP 338841 (Bebbington) に開示される GS 遺伝子発現系である。組換え抗体遺伝子を哺乳動物宿主細胞に導入した場合、抗体は、宿主細胞中での抗体の発現を可能にするためまたはより好ましくは宿主細胞が成長する培養培地への抗体の分泌を可能にするために十分な期間、宿主細胞を培養することにより生成される。ヒト OX40 と結合する抗体を生成するために有用な宿主細胞は、様々な培地で培養できる。ハム F10 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)、最少必須培地 (MEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH)、RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Basel, Switzerland) およびダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) など市販で入手可能な培地は、宿主細胞の培養のために適切である。抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培養培地から回収できる。

20

30

【0102】

抗体は、融合パートナーに作動可能に連結して、発現されたタンパク質の標的化、精製、スクリーニング、ディスプレイなどができるようにしてよい。融合パートナーは、リンカー配列により抗体配列に連結してよい。リンカー配列は、少数、典型的に 10 未満のアミノ酸を一般的に含むが、より長いリンカーも用いてよい。典型的に、リンカー配列は、フレキシブルで分解に対して耐性であるように選択される。当業者により認識されるように、多様な配列のいずれもリンカーとして用いることができる。例えば、一般的なリンカー配列は、アミノ酸配列 GGGGS を含む。融合パートナーは、抗体および任意の付随する融合パートナーを所望の細胞の場所または細胞外培地に向ける標的化またはシグナル配列であってよい。当技術分野において知られるように、あるいくつかのシグナル配列は、タンパク質を成長培地または細胞の内膜と外膜との間にある細胞膜周辺腔に分泌されるように標的化させることがある。融合パートナーは、精製および/またはスクリーニングを可能にするペプチドまたはタンパク質をコードする配列であってよい。このような融合パートナーは、それらに限定されないが、ポリヒスチジンタグ (His タグ) (例えば H6 および H10 または固定化金属親和性クロマトグラフィー (IMAC) 系 (例えば Ni⁺² 親和性カラム) とともに用いるための他のタグ)、GST 融合、MBP 融合、Streptag、細菌酵素 BirA の BSP ビオチン化標的配列、および抗体が標的にするエピト

40

50

ーブタグ（例えばc-mycタグ、flagタグなど）を含む。当業者により認識されるように、このようなタグは、精製、スクリーニングまたはその両方のために有用であり得る。

【0103】

抗体の構築および生成

OX40ポリペプチドに対して作製された抗体は、よく知られており日常的なプロトコルを用いて、動物の免疫化、すなわち動物、好ましくは非ヒト動物へのポリペプチドの投与により得ることができる。例えばHandbook of Experimental Immunology (Weir DM (編)、第4巻、Blackwell Scientific Publishers、Oxford、England、1986)を参照されたい。ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ウシ、ラクダまたはブタなどの多くの温血動物を免疫できる。しかし、マウス、ウサギ、ブタおよびラット、特にマウスは、一般的に最も適切である。抗体は、当業者に知られる組換えDNA技法によっても生成できる。さらに、抗体は、自然に存在する抗体の酵素または化学的切断により生成できる。本発明のヒト化抗体は、非ヒト動物（例えばマウス）からのVHおよび/またはVL領域からの1もしくは複数のCDRまたはその一部を、ヒトVHおよび/またはVL領域からの1または複数のフレームワーク領域に移行することにより構築できる。場合によっては、このようにVHおよび/またはVL領域中に存在するヒトフレームワーク残基は、抗体の免疫原性を減少させ、かつ/または結合親和性を維持するために必要または所望される場合に、対応する非ヒト（例えばマウス）残基で置き換えることができる。場合によっては、CDR中に存在する非ヒトアミノ酸残基は、ヒト残基で置き換えてよい。本発明のキメラまたはヒト化抗体は、上記のようにして調製した非ヒトモノクローナル抗体の配列に基づいて調製できる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、対象の非ヒトハイブリドーマから得て、非マウス（例えばヒト）免疫グロブリン配列を含有するように、標準的な分子生物学的技法を用いて工学改変できる。例えば、キメラ抗体を創出するために、当技術分野において知られる方法を用いて、マウス可変領域をヒト定常領域に連結できる（例えばCabillyらへの米国特許第4,816,567号を参照されたい）。ヒト化抗体を創出するために、当技術分野において知られる方法を用いて、マウスCDR領域をヒトフレームワークに挿入できる（例えばWinterへの米国特許第5,225,539号、Queenらへの米国特許第5,530,101号；第5,585,089号；第5,693,762号および第6,180,370号を参照されたい）。

10

20

30

40

【0104】

重鎖可変領域についてのヒトアクセプター分子を、可能性のあるアクセプター分子可変領域とマウス抗体の重鎖可変領域との間の相同性を考慮して選択して、本発明のヒト化抗体を構築してよい。生殖系列候補ヒトアクセプター分子は、可能性のある免疫原性を低減するので好ましい。生殖系列データベースは、重鎖FW3領域の端および部分的にCDR3配列内まで通して読んだ抗体配列でつくられている。FW4領域の選択のために、選択された生殖系列分子に由来する成熟抗体配列のデータベースを検索できるか、またはヒトドナーからの選択された生殖系列分子に由来する抗体配列を用いることができる。ヒトアクセプター分子は、マウスドナー分子と同じ重鎖クラスから好ましく選択され、マウスドナー分子の可変領域と同じ基準構造クラスのものである。重鎖可変領域についてのヒトアクセプター分子の選択のための2次的な考慮は、マウスドナー分子とヒトアクセプター分子との間のCDR長における相同性を逃れる。ヒトアクセプター抗体分子は、V-BASEデータベースでの相同性検索により選択されることが好ましいが、Kabataおよび公共NCBIデータベースなどの他のデータベースも用いてよい。

【0105】

軽鎖可変領域についてのヒトアクセプター分子を、可能性のあるアクセプター分子可変領域とマウス抗体の軽鎖可変領域との間の相同性を考慮して選択して、本発明のヒト化抗体を構築してよい。生殖系列候補ヒトアクセプター分子は、可能性のある免疫原性を低減するので好ましい。生殖系列データベースは、重鎖FW3領域の端および部分的にCDR

50

3配列内まで通して読んだ抗体配列でつくられている。FW4領域の選択のために、選択された生殖系列分子に由来する成熟抗体配列のデータベースを検索できるか、またはヒトドナーからの選択された生殖系列分子に由来する抗体配列を用いることができる。ヒトアクセプター分子は、マウスドナー分子と同じ軽鎖クラスから好ましく選択され、マウスドナー分子の変領域と同じ基準構造クラスのものである。軽鎖可変領域についてのヒトアクセプター分子の選択のための二次的な考慮は、マウスドナー分子とヒトアクセプター分子との間のCDR長における相同性を含む。ヒトアクセプター抗体分子は、V-BASEデータベースでの相同性検索により選択されることが好ましいが、Kababおよび公共NCBIデータベースなどの他のデータベースも用いてよい。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、以下の実施例6を含んで本明細書に記載する。

10

【0106】

本発明は、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体またはその断片を生成する方法であって、核酸が発現され、抗体が生成されるように、ヒトOX40と結合する拮抗性抗体もしくはその断片をコードする単離核酸またはヒトOX40と結合する拮抗性抗体もしくはその断片をコードする単離核酸を含むベクターを含む宿主細胞を培養するステップを含む方法を提供する。好ましくは、抗体は、単離される。宿主細胞、核酸およびベクターについて、上記のものを用いることができる。核酸の発現は、例えば、当技術分野においてよく知られ(例えばMorrisson S (1985) Science 229:1202頁)、上でさらに概説する組換えDNA技法と遺伝子トランスフェクション方法との組み合わせにより得ることができる。例えば抗体またはその抗体断片を発現するために、部分または全長軽鎖および重鎖をコードするDNAを、標準的な分子生物学的技法を用いて得(例えばPCR増幅または対象の抗体を発現するハイブリドーマを用いるcDNAクローニング)、DNAを発現ベクターのようなベクターに挿入できる。発現ベクターおよび発現制御配列は、用いる発現宿主細胞に適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子を別々のベクターに挿入できるか、またはより典型的には、両方の遺伝子を同じ発現ベクターに挿入する。抗体遺伝子が発現ベクターに、標準的な方法により挿入する(例えば抗体遺伝子断片およびベクター上の相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しないならば平滑端ライゲーション)。本明細書に記載する抗体の軽鎖および重鎖可変領域を用いて任意の抗体アイソタイプの全長抗体遺伝子を創出でき、このことは、VHセグメントがベクター内のCH1セグメント(複数可)に作動可能に連結し、VKセグメントがベクター内のCKセグメントに作動可能に連結するように、所望のアイソタイプの重鎖定常および軽鎖定常領域を予めコードする発現ベクターに本明細書に記載する抗体の軽鎖および重鎖可変領域を挿入することによる。

20

30

【0107】

抗OX40抗体の特徴決定および精製

抗体についてのスクリーニングを、ヒトOX40との結合を測定するためのアッセイおよび/またはOX40とそのリガンドであるOX40Lとの結合を阻止する能力を測定するためのアッセイを用いて行うことができる。結合アッセイの例は、特に、プレート上に固定化されたヒトOX40とヒトFcとの融合タンパク質を用い、融合タンパク質と結合した抗OX40抗体を検出するためのコンジュゲート2次抗体を採用するELISAである。阻止アッセイの例は、ヒトCD4細胞上のOX40へのOX40リガンド融合タンパク質結合の阻止を測定する、フローサイトメトリーに基づくアッセイである。蛍光標識2次抗体を用いて、細胞と結合するOX40リガンド融合タンパク質の量を検出する。このアッセイは、上清中の抗体が、OX40とリガンド融合タンパク質との結合を阻止するにつれてのシグナルの低減を求める。阻止アッセイのさらなる例は、プレートを被覆するOX40リガンド融合タンパク質が媒介するナイーブヒトT細胞の共刺激の阻止を、チミジン取り込みを測定することにより測定するアッセイである。抗OX40抗体の機能的活性、例えばT細胞活性化の低減を評価するためのアッセイとして、実施例3および8に記載するヒト混合リンパ球反応(MLR)を用いることができる。本発明の抗体は、当業者に知られる様々な方法で単離または精製できる。標準的な精製方法は、大気圧またはFPL

40

50

CおよびHPLCのようなシステムを用いて高圧で行う、イオン交換、疎水性相互作用、親和性、サイズ分けまたはゲルろ過および逆相を含むクロマトグラフィー技法を含む。精製方法は、電気泳動、免疫学的、沈降、透析および等電点電気泳動の技法も含む。タンパク質濃縮とともに限外ろ過およびダイアフィルトレーション技法も有用である。OX40抗体を精製するために、選択された宿主細胞を、例えばモノクローナル抗体精製のためにスピナーフラスコ中で成長させることができる。上清をろ過し、濃縮した後に、プロテインA-セファロース(Pharmacia, Piscataway, NJ)を用いて親和性クロマトグラフィーを行う。溶出された抗体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り確認して、純度を確認できる。本発明の好ましい抗体は、よって、ヒトOX40と結合する単離および/または精製抗体である。

10

【0108】

イムノコンジュゲート

別の態様では、本発明は、細胞毒、薬物(例えば免疫抑制剤)または放射性毒素のような治療剤に連結した、ヒトOX40と結合するアンタゴニストOX40抗体またはその断片を提供する。このようなコンジュゲートは、本明細書において、「イムノコンジュゲート」という。1または複数の細胞毒を含むイムノコンジュゲートは、「免疫毒素」という。細胞毒または細胞傷害性薬剤は、細胞に有害な(例えば死滅させる)任意の薬剤を含む。例は、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにそれらの類似体またはホモログを含む。治療剤は、例えば、代謝拮抗薬(例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えばメクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロトスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCならびにシス-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えばダウノルピシン(以前のダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えばダクチノマイシン(以前のアクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン(AMC))および有糸分裂阻害剤(例えばピンクリスチンおよびピンブラスチン)も含む。本発明の抗体と連結できる治療用細胞毒の他の例は、デュオカルマイシン、カリチアマイシン、マイタンシンおよびオーリスタチン、ならびにそれらの誘導体を含む。カリチアマイシン抗体コンジュゲートの例は、市販で入手可能である(Mylo targ(登録商標); American Home Products)。細胞毒は、本発明の抗体と、当技術分野において利用可能なリンカー技法を用いて連結できる。細胞毒と抗体とをコンジュゲートするために用いられているリンカーの型の例は、それらに限定されないが、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィドおよびペプチド含有リンカーを含む。例えばリソソーム区画内の低pHによる切断に感受性またはカテプシン(例えばカテプシンB、C、D)のような腫瘍組織において優先的に発現されるプロテアーゼのようなプロテアーゼによる切断に感受性であるリンカーを選択できる。細胞毒の型、リンカーおよび治療剤と抗体をコンジュゲートする方法についてのさらなる議論について、Saito Gら、(2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199~215頁; Trail PAら、(2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328~337頁; Payne G(2003) Cancer Cell, 3: 207~212頁; Allen TM(2002) Nat. Rev. Cancer, 2: 750~763頁; Pastan IおよびKreitman RJ(2002) Curr. Opin. Investig. Drugs, 3: 1089~1091頁; Senter PDおよびSpringer CJ、(2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53: 247~264頁も参

20

30

40

50

照されたい。本発明の抗体は、放射活性同位体に連結して、ラジオイムノコンジュゲートともよばれる細胞傷害性放射性医薬品を作製することもできる。診断または治療用に用いるために抗体とコンジュゲートできる放射活性同位体の例は、それらに限定されないが、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、イットリウム⁹⁰およびルテニウム¹⁷⁷を含む。ラジオイムノコンジュゲートを調製するための方法は、当技術分野において確立されている。ラジオイムノコンジュゲートの例は、Zevalin（登録商標）（EDEC Pharmaceuticals）およびBexxar（登録商標）（Corixa Pharmaceuticals）を含んで市販で入手可能であり、同様の方法を用いて、本発明の抗体を用いてラジオイムノコンジュゲートを調製できる。本発明の抗体イムノコンジュゲートを用いて所定の生物学的応答を改変でき、薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってよい。このようなタンパク質は、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素もしくはジフテリア毒素のような酵素活性毒素またはその活性断片；腫瘍壊死因子もしくはインターフェロン - のようなタンパク質；あるいは例えばリンホカイン、インターロイキン - 1（「IL - 1」）、インターロイキン - 2（「IL - 2」）、インターロイキン - 6（「IL - 6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM - CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G - CSF」）もしくは他の増殖因子のような生物学的応答改変物質を含むことがある。

10

【0109】

このような治療剤を抗体に連結する技法はよく知られており、例えば、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら（編）、243～56頁（Alan R. Liss, Inc. 1985）中のArnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」；Controlled Drug Delivery（第2版）、Robinsonら（編）、623～53頁（Marcel Dekker, Inc. 1987）中のHellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」；Monoclonal Antibodies' 84: Biological And Clinical Applications、Pincheraら（編）、475～506頁（1985）中のThorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」；Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwinら（編）、303～16頁（Academic Press 1985）中の「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」ならびにThorpe PEおよびRoss WC（1982）Immunol. Rev. 62: 119～58頁を参照されたい。

20

30

【0110】

別の態様では、本発明は、細胞毒、薬物（例えば免疫抑制剤）または放射性毒素のような治療剤と一緒に投与される、ヒトOX40と結合するアンタゴニストOX40抗体またはその断片を提供する。

40

【0111】

医薬組成物

別の態様では、本発明は、本発明のアンタゴニスト抗体またはその断片と薬学的に許容される担体とを含む組成物、例えば医薬組成物を提供する。このような組成物は、1もしくはは組み合わせ（例えば2以上の異なる）抗体、および/または本発明のイムノコンジュゲート、および/または上記のような細胞毒、薬物（例えば免疫抑制剤）もしくは放射性毒素のような治療剤を含むことがある。例えば、本発明の医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープと結合するか、または相補的な活性を有する抗体の組み合わせ（またはイ

50

ムノコンジュゲート)を含み得る。本発明の医薬組成物は、併用治療において投与することもでき、すなわち他の薬剤と組み合わせることができる。例えば、併用治療は、少なくとも1つの他の抗炎症剤または免疫抑制剤と組み合わせた本発明のアンタゴニストOX40抗体を含み得る。

【0112】

本明細書で用いる場合、「薬学的に許容される担体」は、任意のそして全ての生理的に適合する溶剤、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張化および吸収遅延剤などを含む。好ましくは、担体は、静脈内、筋内、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)のために適切である。投与経路に応じて、活性化化合物、すなわち抗体またはイムノコンジュゲートのある材料中にコーティングして、化合物を不活性化できる酸およびその他の自然の状態から化合物を保護してよい。薬学的に許容される担体は、滅菌水溶液または分散液および滅菌注射用液または分散液の即時調製用の滅菌粉末を含む。医薬活性物質のためのこのような媒体および作用物質の使用は、当技術分野において知られている。任意の従来の媒体または作用物質が活性化化合物と適合しない場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるこれらの使用が構想される。補助的活性化化合物も組成物に組み込むことができる。

10

【0113】

別の態様では、本発明は、治療剤に連結したヒトOX40と結合するアンタゴニスト抗体またはその断片を含むイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体とを含む組成物を提供する。用いることができるイムノコンジュゲートおよび治療剤については、上で記載している。

20

【0114】

別の態様では、本発明は、別の医薬活性物質をさらに含む本発明のアンタゴニスト抗体またはその断片を含む組成物を提供する。好ましくは、別の医薬活性物質は、a)ヒトOX40に対する別のアンタゴニスト、b)鎮痛剤およびc)免疫抑制剤、例えばプレドニゾンのようなグルココルチコイドの1または複数である。

【0115】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される抗酸化剤も含んでよい。薬学的に許容される抗酸化剤の例は、(1)アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどのような水溶性抗酸化剤；(2)パルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアルコール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロールなどのような脂溶性抗酸化剤；および(3)クエン酸、エチレンジアミン4酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などのような金属キレート化剤を含む。本発明の医薬組成物において採用できる適切な水性および非水性担体の例は、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、ポリエチレングリコールなど)およびそれらの適切な混合物、オリーブ油のような植物油ならびにオレイン酸エチルのような注射用有機エステルを含む。適当な流動性は、例えばレシチンのようなコーティング材料の使用、分散液の場合に、要求される粒径の維持および界面活性剤の使用により維持できる。これらの組成物は、保存剤、湿潤化剤、乳化剤および分散剤のような補助剤も含有してよい。微生物の存在は、上記の滅菌化手順および様々な抗菌および抗真菌剤、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の添加の両方により確実に防止できる。糖、塩化ナトリウムなどのような等張化剤を組成物に含めることが望ましいこともある。さらに、注射用医薬形の吸収の延長を、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような吸収を遅延させる作用物質を含めることによりもたらしてもよい。

30

40

【0116】

治療用およびその他の使用

本発明のアンタゴニスト抗体は、OX40媒介性障害の診断および処置を含む、多数の*in vitro*および*in vivo*の診断および治療用の利用性がある。例えば、これらの分子は、*in vitro*もしくは*ex vivo*で培養中の細胞に、または例え

50

ば *in vivo* でヒト対象に投与して、様々なOX40媒介性障害を処置、防止および診断できる。好ましい対象はヒトであり、OX40活性により媒介される障害（OX40媒介性障害）を有する患者を含む。本発明のアンタゴニスト抗体は、患者のOX40共刺激状態とは独立して、患者を処置するために効果的であり得る。より好ましい対象はヒトであり、低レベルのOX40を発現する患者を含む。

【0117】

本発明の目的のための「患者」は、ヒトおよびその他の動物の両方、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを含む。よって、本発明の抗体は、ヒト治療および獣医学的用途の両方を有する。本発明における用語「処置」または「処置する」は、疾患または障害についての治療的処置および予防的または抑制的措置を含むことを意味する。よって、例えば疾患の発症前の抗体投与の成功は、疾患の処置をもたらす。別の例として、疾患の症状と闘うための疾患の臨床的顕性化の後の抗体の投与の成功は、疾患の処置を含む。「処置」および「処置する」は、疾患を根絶するための疾患の出現の後の抗体の投与も包含する。臨床症状の可能性のある減少およびおそらく疾患の改善を伴う、発症後および臨床症状が生じた後の抗体の投与の成功は、疾患の処置を含む。「処置を必要とする」者は、疾患または障害を既に有する哺乳動物、および疾患または障害を防止しようとする哺乳動物を含む、疾患または障害を有しやすい哺乳動物を含む。

10

【0118】

特定の実施形態では、アンタゴニスト抗体を *in vivo* で用いて、様々なOX40媒介性障害を処置、防止または診断する。よって、本発明は、対象におけるOX40媒介性障害を処置するための方法であって、対象に治療有効量のアンタゴニスト抗体またはその断片を投与するステップを含む方法を提供する。例示的なOX40媒介性障害は、感染症（ウイルス、細菌、真菌および寄生虫）、感染症に伴う内毒素ショック、関節炎、関節リウマチ、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、骨盤内炎症性疾患、アルツハイマー病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ペロニー病、セリアック病、胆嚢疾患、毛巣病、腹膜炎、乾癬、血管炎、外科的癒合、脳卒中、I型糖尿病、ライム病、関節炎、髄膜脳炎、自己免疫性ぶどう膜炎、中枢および末梢神経系の免疫媒介性炎症性障害、例えば多発性硬化症、ループス（例えば全身性エリテマトーデス）およびギラン・バレー症候群、アトピー性皮膚炎、自己免疫性肝炎、線維化胞隔炎、グレーブス病、IgA腎症、特発性血小板減少性紫斑病、メニエール病、天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、サルコイドーシス、強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、膵炎、外傷（手術）、移植片対宿主疾患（GVHD）、移植片拒絶、虚血性疾患を含む心血管疾患、例えば心筋梗塞およびアテローム動脈硬化症、血管内凝固、骨吸収、骨粗鬆症、変形性関節症、歯周炎、低酸症ならびに視神経脊髄炎を含む。

20

30

【0119】

他の例示的なOX40媒介性障害は、感染症（ウイルス、細菌、真菌および寄生虫）、感染症に伴う内毒素ショック、関節炎、関節リウマチ、喘息、気管支炎、インフルエンザ、呼吸器多核体ウイルス、肺炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、特発性肺線維症（IPF）、原因不明の線維化胞隔炎（CFA）、特発性線維化間質性肺炎、肺気腫、骨盤内炎症性疾患、アルツハイマー病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ペロニー病、セリアック病、胆嚢疾患、毛巣病、腹膜炎、乾癬、血管炎、外科的癒合、脳卒中、I型糖尿病、ライム病、関節炎、髄膜脳炎、自己免疫性ぶどう膜炎、中枢および末梢神経系の免疫媒介性炎症性障害、例えば多発性硬化症、ループス（例えば全身性エリテマトーデス）およびギラン・バレー症候群、アトピー性皮膚炎、自己免疫性肝炎、線維化胞隔炎、グレーブス病、IgA腎症、特発性血小板減少性紫斑病、メニエール病、天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、サルコイドーシス、強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、膵炎、外傷（手術）、移植片対宿主疾患（GVHD）、移植片拒絶、虚血性疾患を含む心血管疾患、例えば心筋梗塞およびアテローム動脈硬化症、血管内凝固、骨吸収、骨粗鬆症、変形性関節症、歯周炎、低酸症ならびに視神経脊髄炎を含む。

40

【0120】

50

本発明の抗体を用いて処置される好ましいOX40媒介性障害は、多発性硬化症、関節リウマチ、大腸炎、乾癬、喘息、COPD、IPF、移植片対宿主疾患(GVHD)、アテローム動脈硬化症および糖尿病からなる群より選択される。本発明の抗体を用いて処置される特に好ましいOX40媒介性障害は、移植片対宿主疾患(GVHD)である。

【0121】

本発明は、疼痛、特に炎症に伴う疼痛の処置において用いるための抗体も提供する。

【0122】

一実施形態では、本発明の抗体を用いて、OX40のレベル、または細胞膜表面上にOX40を含有する細胞のレベルを検出でき、前記レベルは、よって、ある疾患症状につながるができる。代わりに、抗体を用いて、OX40機能を阻害または阻止でき、前記機能は、よって、ある疾患症状の防止または改善につながるができる、そのことにより、OX40が疾患のメディエーターとして関わる。このことは、試料および対照試料を、OX40抗体と、抗体とOX40との間の複合体の形成を可能にする条件下で接触させることにより達成できる。抗体とOX40との間で形成された任意の複合体を検出し、試料および対照において比較する。本発明の抗体とOX40との特異的結合に鑑みて、本発明の抗体を用いて細胞の表面上のOX40発現を特異的に検出でき、例えば前記抗体を用いてOX40の発現レベルが低い患者を検出できる。本発明の抗体を用いて、免疫親和性精製によりOX40を精製することもできる。

10

【0123】

よって、本発明は、OX40の発現レベルが低い患者を検出するin vitroスクリーニング方法であって、

20

(a) 患者血液試料から末梢血単核細胞(PBMC)を精製するステップと、
(b) PBMCをフローサイトメトリー分析に供するステップと、
(c) CD4⁺および/またはCD8⁺T細胞中のOX40陽性細胞の数を決定し、前記数を対照レベルと比較するステップと
を含む方法も提供する。

【0124】

好ましい実施形態では、OX40の低い発現レベルは、対照レベルと比較した場合に10%まで、より好ましくは20%まで、さらにより好ましくは30%までのOX40陽性細胞の発現レベルの増加により示される。OX40発現を決定するアプローチは、Kotani Aら、(2001) Blood、98:3162~4頁およびXiaoyan Zら、(2005) Clin. Exp. Immunol. 143:110~6頁にさらに記載されている。

30

【0125】

別の実施形態では、本発明の抗体は、in vitroでの治療または診断用の使用に付随する結合活性について初期に試験できる。例えば、本発明の組成物は、フローサイトメトリー分析を用いて試験できる。

【0126】

本開示は、医薬品としてのアンタゴニスト抗体またはその断片の使用、およびOX40媒介性障害の処置のための医薬品の調製におけるアンタゴニスト抗体またはその断片の使用をさらに提供する。さらなる実施形態では、本開示は、医薬品として用いるためのアンタゴニスト抗体またはその断片を提供する。本開示は、OX40媒介性障害を処置するための方法において用いるためのアンタゴニスト抗体またはその断片も提供する。OX40媒介性障害は、上記のものである。本発明のアンタゴニスト抗体は、患者のOX40共刺激状態とは独立して、OX40媒介性障害を処置するために特に有用であり得る。好ましい実施形態では、アンタゴニスト抗体またはその断片は、患者が低レベルのOX40を発現するOX40媒介性障害を処置するために用いることができる。

40

【0127】

以前に記載するように、本発明のアンタゴニストOX40抗体は、1または複数の他の治療剤、例えば細胞傷害性薬剤、放射毒性薬剤または免疫抑制剤と共投与できる。抗体は

50

、薬剤と連結できる（上記のようなイムノコンジュゲートとして）か、または薬剤と分けて投与できる。後者の場合（別の投与）、抗体は、薬剤の前、後もしくは薬剤と同時に投与できるか、または他の既知の治療、例えば抗がん治療、例えば放射線照射と共投与できる。

【0128】

抗体の投与のために、投与量は、約0.0001から100mg/kg宿主体重まで、より通常は0.01から10mg/kg宿主体重までの範囲である。例示的な処置計画は、週1回、2週間ごとに1回、3週間ごとに1回、4週間ごとに1回、1カ月に1回、3カ月ごとに1回または3～6カ月ごとに1回の投与を必要とする。抗体は、複数の機会に通常投与される。単独投与間の間隔は、例えば、毎週、毎月、3カ月ごと、または毎年であり得る。間隔は、患者において標的抗原に対する抗体の血中レベルを測定することにより示されるように不定期的でもあり得る。いくつかの方法では、投与量は、約1～1000μg/ml、いくつかの方法では約25～300μg/mlの血漿抗体濃度を達成するように調整される。代わりに、抗体は、持続放出製剤として投与でき、この場合、要求される投与頻度がより低い。投与量および頻度は、患者における抗体の半減期に依存して変動する。投与の投与量および頻度は、処置が予防的または治療的であるかに依存して変動できる。予防的用途では、比較的低い投与量が、長期間にわたって比較的頻繁でない間隔で投与される。残りの寿命にわたって処置を受け続ける患者もいる。治療的用途では、疾患の進行が低減または終結するまで、比較的短い間隔での比較的高い用量が時折要求される。

10

20

【0129】

本発明の医薬組成物中の活性成分、すなわち抗体の実際の投与量レベルは、患者にとって毒性にならずに、特定の患者、組成物および投与方法について所望の治療応答を達成するために効果的な活性成分の量を得るように変動できる。選択された投与量レベルは、採用される本発明の特定の組成物の活性、投与経路、投与時間、採用される特定の抗体の排出速度、処置持続期間、採用される特定の組成物と組み合わせて用いる他の薬物、化合物および/または物質、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康および以前の医療履歴などの、医療の分野においてよく知られている因子を含む様々な薬物動態因子に依存する。

【0130】

「治療有効量の」本発明のOX40抗体は、好ましくは、疾患症状の重症度の減少、無疾患症状期間の頻度および持続期間の増加、ならびに/または疾患の苦痛による障害もしくは機能障害の防止をもたらす。OX40媒介性障害の処置についての化合物の能力は、ヒトにおける効力を予測できる動物モデル系において評価できる。代わりに、組成物のこの特性は、細胞成長を阻害する化合物の能力を調べることにより評価でき、このような阻害は、当業者に知られるアッセイにより*in vitro*で測定できる。当業者は、このような量を、対象のサイズ、対象の症状の重症度および選択される特定の組成物または投与経路のような因子に基づいて決定できる。

30

【0131】

本発明の抗体または組成物は、1または複数の投与経路により、当技術分野において知られる様々な方法の1または複数を用いて投与できる。当業者により認識されるように、投与の経路および/または方法は、所望の結果に依存して変動する。好ましい投与経路は、静脈内、筋内、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他の非経口投与経路を含む。より好ましい投与経路は、静脈内または皮下である。「非経口投与」との句は、本明細書で用いる場合、通常注射による、経腸および局所投与以外の投与の方法を意味し、限定することなく、静脈内、筋内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、真皮内、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の注射および注入を含む。代わりに、本発明の抗体は、局所、表皮または粘膜投与経路、例えば鼻内、口腔、膣、直腸、舌下または局所によるような非経口でない経路により投与できる。

40

50

【0132】

製造品およびキット

本開示の別の実施形態では、OX40媒介性障害の処置のための、本発明のアンタゴニスト抗体もしくはその断片、組成物またはイムノコンジュゲートを含む製造品が提供される。製造品は、容器と、容器上のまたは容器に付随するラベルまたは添付文書を含むことがある。適切な容器は、例えば瓶、バイアルまたはシリンジを含む。容器は、ガラスまたはプラスチックのような様々な材料から形成してよい。容器は、状態を処置するために効果的であり得る組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有することがある（例えば容器は、皮下注射針が突き刺すことができるストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも1つの活性物質は、本明細書に記載するアンタゴニスト抗体であってよい。ラベルまたは添付文書は、組成物を、がんのような所望の状態を処置するために用いることができることを示してよい。一実施形態では、ラベルまたは添付文書は、アンタゴニスト抗体を含む組成物を用いてOX40媒介性障害を処置できることを示してよい。

10

【0133】

さらに、製造品は、(a)組成物を含有する第1容器であって、組成物が、本明細書のアンタゴニスト抗体を含む第1容器と、(b)組成物を含有する第2容器であって、組成物が、アンタゴニスト抗体以外の治療剤を含む第2容器とを含むことがある。本開示の本実施形態の製造品は、第1および第2組成物を組み合わせて用いて、OX40媒介性疾患または障害を処置できることを示す添付文書をさらに含んでよい。このような治療剤は、先行する項において記載する任意の補助治療であってよい（例えば血栓溶解剤、血小板凝集抑制薬、化学療法剤、血管新生抑制薬、抗ホルモン化合物、心臓保護剤および/またはサイトカインを含む、哺乳動物における免疫機能の調節物質）。代わりにまたはさらに、製造品は、注射用の静菌水(BWFI)、リン酸塩緩衝食塩水、リンゲル液およびブドウ糖液のような薬学的に許容される緩衝液を含む第2（または第3）容器をさらに含んでよい。製造品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針およびシリンジを含む、商業的および使用者の視点から望まれる他の物質をさらに含んでよい。

20

【0134】

本発明の抗体、組成物またはイムノコンジュゲートと使用説明書とを含むキットも本発明の範囲内である。キットは、免疫抑制剤、細胞傷害性薬剤もしくは放射毒性剤、または1もしくは複数の本発明のさらなるアンタゴニスト抗体（例えば、第1アンタゴニスト抗体とは異なるOX40抗原中のエピトープと結合する、相補的活性を有するアンタゴニスト抗体）のようなもう1つのさらなる試薬をさらに含有できる。

30

【0135】

さらなる記載なしで、当業者は、先行する記載および以下の説明的な実施例を用いて、本開示の薬剤を利用して、特許請求の範囲に記載される方法を実施できると考えられる。以下の実行実施例は、本開示の実施を容易にするために与えられ、残りの本開示をいずれの様式でも限定すると解釈されない。

【実施例1】

【0136】

マウス抗ヒトOX40抗体の作製およびスクリーニング

組換えヒトOX40-Fcタンパク質を生成するために、ヒトTNFRSF4についてのcDNAをiMaGenes（クローン番号：RZPDB737H0329D；Berlin, Germany）から購入した。このcDNAを鋳型として用いて、ヒトTNFRSF4細胞外ドメインのDNAコード領域（配列番号11）をPCR増幅した。別のPCR反応では、ヒトIgG1のFc領域（EU位223～451）をPCRにより増幅して、5'GSGGGリンカーおよび3'SA-6xHisリンカーならびにクローニングのための制限部位を付加した。2つの得られた産物を、次いで、フランキングプライマーを用いるオーバーラップ伸長PCRを用いて融合して、米国特許第5924939号に記載されるIgドナーアクセプター断片（第1イントロン）を有するヒトCMVプロモータ

40

50

一、OriP配列(Koons MDら、(2001) J Virol. 75(22): 10582~92頁)、SV40エンハンサーおよびKim Dら、(2003) Biotechnol. Prog. 19(5): 1620~2頁に記載されるガストリンターミネーターと融合したSV40ポリAを含有する、InvitrogenからのpcDNA3.1(-)プラスミドに基づく改変哺乳動物発現ベクター(Invitrogen AG、Basel、Switzerland、Cat.No.V795-20)への後続のクローニングのための制限部位を付加した。この組換えプラスミドは、哺乳動物細胞でのヒトTNFRSF4細胞外ドメイン-Fc融合タンパク質の発現と、ヒトTNFRSF4タンパク質の天然のシグナルペプチドにより駆動される細胞培養培地への分泌とを可能にした。組換えタンパク質生成のために、上記の組換えベクターを懸濁馴化HEK293細胞(ATCC番号CRL1573)に、jetPEI(商標)トランスフェクション試薬(Polyplus-transfection S.A.、Strasbourg、France;流通業者:Brunschwig、Basel、Switzerland)を用いてトランスフェクトした。細胞培養上清を5日後に回収し、AKTA FPLCシステム(GE Healthcare Europe GmbH、Glatbrugg、Switzerland)上で操作されるプロテインA親和性精製カラム(HiTrapプロテインAセファロースカラム;GE Healthcare Europe GmbH、Glatbrugg、Switzerland)を用いてさらに精製した。

10

【0137】

組換えヒトOX40-hisタンパク質を生成するために、ヒトTNFRSF4の細胞外領域(配列番号11)をPCRにより増幅して、3'GSG-6xHisリンカーおよびクローニングのための制限部位を付加した。PCR産物を、その後、上記の改変pcDNA3.1(-)プラスミドにクローニングした。この組換えプラスミドは、哺乳動物細胞でのヒトOX40-hisタンパク質の発現と、ヒトTNFRSF4タンパク質の天然のシグナルペプチドにより駆動される細胞培養培地への分泌とを可能にした。タンパク質生成のために、組換えベクターを懸濁馴化HEK293細胞(ATCC番号CRL1573)に、jetPEI(商標)トランスフェクション試薬(Polyplus-transfection S.A.、Strasbourg、France;流通業者:Brunschwig、Basel、Switzerland)を用いてトランスフェクトした。細胞培養上清をトランスフェクションの5日後に回収し、AKTA FPLCシステム(GE Healthcare Europe GmbH、Glatbrugg、Switzerland)上で操作されるNi²⁺-NTA親和性精製カラム(HiTrap Ni²⁺-NTAセファロースカラム;GE Healthcare Europe GmbH、Glatbrugg、Switzerland)を用いて精製した。組換えヒトOX40-FcおよびOX40-hisタンパク質は、SDS-PAGEにより判断して95%純粋であることが見出され、使用前にリン酸塩緩衝食塩水(PBS)に緩衝液をさらに交換した。

20

30

【0138】

PBS中に溶解した組換えヒトOX40-Fcタンパク質を、等容量のStimuneアジュバント(Prionics、Switzerland、ref:7925000)と混合し、乳化液を調製した。乳化液を0.5mLインスリンシリンジ(BD Pharmingen、Allschwil、Switzerland)に移し、BALB/c動物(Harlan、Netherlands)を、50μgの乳化タンパク質を用いて後肢の肉趾、尾の基部および首に皮下免疫した。免疫化は、同じ量の抗原および同じ注射経路を用いて2週間後に反復した。

40

【0139】

免疫化マウス血清中の循環抗ヒトOX40抗体の存在は、組換えヒトOX40-hisタンパク質で被覆したプレートを用いる直接ELISAにより評価した。異なるマウス血清の系列希釈(1:10⁰から1:10⁹まで)をプレートに加え、結合した抗体を、ヤギ抗マウスH+L全分子-HRP(Sigma-Aldrich Chemie GmbH

50

、 Buchs、Switzerland) を用いて検出した。アジュバントを含まずに 50 μ g の抗原を用いる最後の皮下ブースター注射を、最良の抗ヒトOX40 IgG血清力価を示す動物において行い、3日後に屠殺した。

【0140】

動物を安楽死させ、鼠径、腋窩、上腕、膝窩および坐骨リンパ節を回収して、リンパ節の構造を、DNAse (Roche Diagnostics (Schweiz) AG、Rotkreuz、Switzerland) およびコラゲナーゼ (Roche Diagnostics (Schweiz) AG、Rotkreuz、Switzerland) 溶液中で2本の25G針を用いて壊すことにより、単細胞懸濁液を調製した。単細胞懸濁液を、骨髓腫株化細胞X63AG8.653 (マウスBALB/c 骨髓腫株化細胞; ATCC受託番号: CRL1580; Kearney JFら、(1979) J. Immunol. 123(4): 1548~1550頁) と、7:1の比率 (融合パートナー対採集されたリンパ節細胞) で、ポリエチレングリコール1500 (Roche Diagnostics (Schweiz) AG、Rotkreuz、Switzerland) を用いて融合した。融合細胞を、10%胎仔ウシ血清 (FBS、PAA Laboratories、Pasching、Austria)、2mM L-グルタミン、100U/ml (Biochrom AG、Germany) ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン (Biochrom AG、Germany)、10mM HEPES (Invitrogen AG、Basel、Switzerland)、50 μ M -メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich Chemie GmbH、Buchs、Switzerland)、HAT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH、Buchs、Switzerland) および1%増殖因子 (ハイブリドカイン、Interchim/Uptima、Montluçon、France) を補ったDMEM-10培地 (Invitrogen AG、Basel、Switzerland) 中にマウスマクロファージを含有する、96ウェル平底プレートに播種した。

10

20

【0141】

融合からのおよそ800のウェルを、ヒトOX40を認識し、受容体に対するヒトOX40Lの結合を阻止するマウスIgGの存在について、ELISAによりスクリーニングした。陽性ウェルを増殖させ、2回のサブクローニングに供した。細胞を回収し、重鎖および軽鎖をクローニングして配列決定した。

30

【実施例2】

【0142】

ハイブリドーマ細胞からの抗OX40抗体のVHおよびVL鎖のクローニングおよび配列決定

陽性選択したそれぞれのハイブリドーマについて、トータルRNAを調製し、cDNAに逆転写し、VHおよびVL遺伝子をそれぞれPCRにより増幅した。これらのPCR産物を、レスキューベクター (pDriveベクター; QIAGEN AG、Hombrechtikon、Switzerland; Cat. No. 231124) にライゲーションして、個別のPCR産物のDNA配列決定および選択したハイブリドーマの単クローン性または多クローン性の決定を可能にした。このベクターにより、IPTGおよびX-galを含有するLB寒天プレート上での青/白の選択が可能になった (LacZペプチドによるX-galの分解のために、挿入断片を有さないコロニーは青色であった)。陽性 (白) 細菌クローンから組換えプラスミドを調製し、ベクター主鎖に特異的な標準的DNA配列決定プライマー (M13rev、M13fwd、T7またはSP6) を用いて配列決定した。DNA配列を、最終的に、哺乳動物細胞での対象の抗体の組換え発現のために発現ベクターにサブクローニングした。

40

【0143】

RNA単離

トータルRNAを、2~10 \times 10⁶細胞から、QIAGENからのRNeasyミニキット (QIAGEN AG、Hombrechtikon、Switzerland;

50

Cat. No. 74106) を製造者のプロトコールに従って用いて単離した。試料を、NanoDrop ND-1000 分光光度計 (WITEC AG, Littau, Switzerland) を用いて定量した。

【0144】

ワンステップ RT-PCR

上記のトータル RNA 調製物を、cDNA にさらに逆転写し、VH および VL 断片を PCR により、縮合プライマーの 2 つの異なる混合物 (それぞれ 1 つがマウス免疫グロブリン重鎖可変断片および可変重鎖接合領域の全ての異なるサブファミリーの回収、または全てのマウス免疫グロブリン軽鎖カッパ可変断片および可変軽鎖カッパ接合領域の回収を可能にした) を用いて増幅した。逆転写および増幅のために用いたプライマーは、Microsynth (Balgach, Switzerland) により合成され、HPLC 精製された (表 1~4)。逆転写および PCR 増幅はともに、QIAGEN ワンステップ RT-PCR キット (QIAGEN AG, Hombrechtikon, Switzerland; Cat. No. 210212) を用いて同時に行った。この技法は特異的プライマーを用いたので、それぞれの mRNA 試料を、次いで、2 重に処理して、VH または VL 断片のいずれかの個別の逆転写および増幅を可能にした。RNアーゼフリー水に 30 μ l の最終容量で溶解した 2 μ g のトータル RNA を、10 μ l の QIAGEN ワンステップ RT-PCR 緩衝液の 5 \times ストック溶液、2 μ l の dNTP ミックス (10 mM の濃度)、3 μ l のプライマーミックス (10 μ M の濃度) および 2 μ l の QIAGEN ワンステップ RT-PCR 酵素ミックスと混合した。最終混合物を、次いで、PCR チューブに入れ、以下の設定を用いて PCR サーマサイクラー (BioRad iCycler バージョン 4.006, Bio-Rad Laboratories AG, Reinach, Switzerland) でサイクルにかけた：

50 にて 30 分
 95 にて 15 分
 40 サイクル：94 にて 30 秒
 55 にて 30 秒
 72 にて 1 分
 72 にて 10 分
 4 にて 保持

【0145】

pDrive クローニング

PCR 産物を、2% アガロースゲルに泳動させた。DNA 電気泳動の後に、対象の断片 (およそ 450 bp) をアガロースゲルから切り出し、Macherey-Nagel NucleoSpin 抽出 II キット 250 (Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland; Cat. No. 740609.250) を用いてさらに抽出した。DNA 配列決定のために、抽出した PCR 産物を上記のレスキューベクター (pDrive ベクター、QIAGEN AG, Hombrechtikon, Switzerland; Cat. No. 231124) にクローニングし、E. coli TOP10 株 (Invitrogen AG, Basel, Switzerland; Cat. No. C404006) を形質転換した。

【0146】

ミニプレップ抽出

陽性コロニーを、Macherey-Nagel 方形ウェルブロックプレート (Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland; Cat. No. 740488.24) 中に播種し、100 μ g/ml アンピシリンを補った 1.5 ml の Luria Bertani (LB) 培地中で 37 にて 1 晩 (振とう 250 RPM) 培養した。次の日に、DNA ミニプレップ抽出を、NucleoSpin マルチ 8 プラス ミドキット (Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland; Cat. No. 740620.5) を用いて行った。

【 0 1 4 7 】

配列決定および配列分析

試料を、DNA配列決定のために、DNA配列決定サービス業者であるFasteris (Plan-les-Ouates, Switzerland) に送った。標準的なプライマーであるM13rev、M13fwd、T7、SP6を用いた(表5)。DNA配列を分析するために、クローンマネージャ9プロフェッショナル版(Scientific & Educational Software, NC, USA)およびBioEdit配列アラインメントエディタ(Hall, TA(1999)Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95~98頁)を用いた。

【 0 1 4 8 】

組換えキメラ抗体発現のための発現ベクターのクローニング

哺乳動物細胞での組換え発現のために、単離マウスVHおよびVL断片を、アセンブリベースのPCR法を用いて、キメラ免疫グロブリンとしてフォーマットした。これらのキメラ抗体は、マウス重鎖可変ドメインがヒトIgG1重鎖定常ドメイン(1、ヒンジ、2および3領域)と融合した重鎖と、マウス軽鎖可変ドメインがヒトカッパ定常ドメイン(C)と融合した軽鎖とからなる。PCRにより集合させたマウス可変およびヒト定常部分を、その後、実施例1にて言及したが、ヒト免疫グロブリン軽鎖カッパリーダーペプチドを採用してタンパク質分泌を駆動したことが異なるInvitrogenからの改変pcDNA3.1(-)ベクターに基づく改変哺乳動物発現ベクターにクローニングした。免疫グロブリン候補のタンパク質生成のために、等量の重鎖および軽鎖ベクターDNAを、懸濁馴化HEK-293(ATCC番号: CRL-1573)に同時トランスフェクトした。細胞培養上清を5日後に回収し、AKTA FPLCシステム上で操作されるプロテインA親和性精製カラム(HiTrapプロテインAセファロースカラム)(ともにGE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerlandから)を用いて精製した。

【 0 1 4 9 】

【表1】

表1:プライマーミックスVH-バック

GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTR MAG CTT CAG GAG TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTB CAG CTB CAG CAG TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTG CAG CTG AAG SAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTC CAR CTG CAA CAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAG CTB CAG CAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTY CAR CTG CAG CAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAC GTG AAG CAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAS STG GTG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAV GTG AWG STG GTG GAG TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAG STG GTG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAK GTG CAM CTG GTG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG CTG ATG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG CAR CTT GTT GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAR GTR AAG CTT CTC GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAA GTG AAR STT GAG GAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTT ACT CTR AAA SAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC CAG GTC CAA CTV CAG CAR CC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAT GTG AAC TTG GAA SAR TC
 GTGATC GCC ATG GCG TCG ACC GAG GTG AAG GTC ATC GAR TC

【 0 1 5 0 】

【表 2】

表2:プライマーミックス VH-フォワード

CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA AAC GGT GAC CGT GGT
 CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC TGT GAG AGT GGT
 CCTCCACCACTCGAGCC CGC AGA GAC AGT GAC CAG AGT
 CCTCCACCACTCGAGCC CGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT

【 0 1 5 1 】

【表 3】

表3:プライマーミックス VL-バック

GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATC CAG CTG ACT CAG CC
 GGCGGTGGC GCT AGC CAA ATT GTT CTC ACC CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG MTM ACT CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG YTR ACA CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTR ATG ACM CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT MAG ATR AMC CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT CAG ATG AYD CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATY CAG ATG ACA CAG AC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTT CTC AWC CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GWG CTS ACC CAA TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT STR ATG ACC CAR TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY RTT KTG ATG ACC CAR AC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT GTG ATG ACB CAG KC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATA ACY CAG GA
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACC CAG WT
 GGCGGTGGC GCT AGC GAY ATT GTG ATG ACA CAA CC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAY ATT TTG CTG ACT CAG TC
 GGCGGTGGC GCT AGC GAA ACA ACT GTG ACC CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC GAA AAT GTK CTS ACC CAG TC
 GGCGGTGGCGCT AGC CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TC

10

20

30

【 0 1 5 2 】

【表 4】

表4:プライマーミックス VL-フォワード

ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT KAT TTC CAG CTT GG
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT TAT TTC CAA CTT TG
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACG TTT CAG CTC CAG CTT GG
 ATGCTGAC GC GGC CGC ACC TAG GAC AGT CAG TTT GG

【 0 1 5 3 】

【表 5】

表5:配列決定プライマー

M13-Fwd GTAAAACGACGGCCAGT
 M13-Rev AACAGCTATGACCATG
 T7 TAATACGACTCACTATAGG
 SP6 GATTTAGGTGACACTATAG

40

【実施例 3】

【 0 1 5 4 】

抗ヒトOX40抗体の生物学的特徴決定

OX40特異的抗体検出ELISA:

50

ハイブリドーマおよび組換え抗体候補による抗体力価、特異性および生成を、直接ELISAにより決定した。簡単に述べると、96ウェルマイクロタイタープレート(Costar USA、流通業者VWR AG、Nyon、Switzerland)をPBS中2 μ g/mlでの100 μ lの組換えヒトOX40-hisで被覆した(OX40-hisタンパク質の作製について実施例1を参照されたい)。プレートを4にて1晩インキュベートし、次いで、PBS2%BSA(ウシ血清アルブミン、PAA Laboratories、Pasching、Austria)を用いて室温(RT)にて1時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を除去し、ハイブリドーマ上清または精製抗体を加えた。プレートをRTにて30分間インキュベートし、次いで、PBS0.01%Tween-20(Sigma-Aldrich Chemie GmbH、Buchs、Switzerland)で9回洗浄し、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識ヤギ抗マウスH+L検出抗体(Sigma-Aldrich Chemie GmbH、Buchs、Switzerland)を1:1000の希釈で加えた。ヒトFcを有する組換えキメラ抗体(実施例2を参照されたい)を検出するために、HRP標識ウサギ抗ヒトIgG抗体(Sigma-Aldrich Chemie GmbH、Buchs、Switzerland)を1:1000の希釈で検出抗体として用いた。プレートを30分間室温(RT)にてインキュベートし、PBS0.01%Tween-20で9回洗浄し、TMB基質(Bio-rad Laboratories AG、Reinach、Switzerland)をプレートに加え、6分後にH₂SO₄を加えることにより反応を停止した。吸光度を次いで450nmにてマイクロプレートリーダー(Biotek、USA;流通業者:WITTEC AG、Littau、Switzerland)で読み取った。図1Aは、キメラ1D4抗体およびキメラ2F8抗体がOX40-his被覆タンパク質を認識することを示す。

【0155】

OX40L阻止ELISA:

組換えヒトOX40リガンドタンパク質(OX40L)を以下のようにして作製した:ヒトTNFSF4についてのcDNA(クローン名:IOH46203)をimaGenes(Berlin、Germany)から購入し、ヒトTNFSF4リガンドの細胞外部分(アミノ酸51~183)(番号付けはUniprot Q6FGS4配列に従う)を、フランキング制限部位とともに増幅した。ASAリンカーおよび8-Hisタグ配列を5'端に包含する得られたPCR産物を、その後、CMVプロモーター、ウシ成長ホルモンポリアデニル化およびマウスVJ2Cリーダーペプチドを有して組換えタンパク質の分泌を駆動する、Invitrogen(Invitrogen AG、Basel、Switzerland)からの改変バージョンのpREP4ベクターにクローニングした。組換えタンパク質生成のために、組換えベクターを懸濁馴化HEK293細胞(ATCC番号CRL1573)に、jetPEI(商標)トランスフェクション試薬(Polyplus-transfection S.A.、Strasbourg、France;流通業者:Brunschwig、Basel、Switzerland)を用いてトランスフェクトした。細胞培養上清を5日後に回収し、AKTA FPLCシステム(GE Healthcare Europe GmbH、Glatbrugg、Switzerland)上で操作されるプロテインA親和性精製カラム(HiTrapプロテインAセファロースカラム;GE Healthcare Europe GmbH、Glatbrugg、Switzerland)を用いて精製した。

【0156】

作製された抗OX40抗体がOX40LとOX40受容体との結合を阻止できるかを決定するために、阻止ELISAを開発した。96ウェルマイクロタイタープレート(Costar、USA;流通業者VWR AG、Nyon、Switzerland)をPBS中2 μ g/mlでの100 μ lの組換えヒトOX40-Fc(実施例1を参照されたい)で被覆した。プレートを4にて1晩インキュベートし、次いで、PBS2%BSAを用いてRTにて1時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を除去し、ハイブリドーマ上

清または精製抗体をプレートに加えた。5分後に、50 μ lのビオチン化組換えヒトOX40Lを0.04mg/mlにて各ウェルに加えた。プレートをRTにて60分間インキュベートし、次いでPBS0.01%Tween-20で9回洗浄し、HRP-ストレプトアビジン(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)を1:2000の希釈で加えた。プレートをRTにて30分間インキュベートし、PBS0.01%Tween-20で9回洗浄し、TMB基質(Biorad Laboratories AG, Reinach, Switzerland)をプレートに加え、6分後にH₂SO₄を加えることにより反応を停止した。吸光度を次いで450nmにてマイクロプレートリーダー(Biotek, USA; 流通業者: WITTEC AG, Littau, Switzerland)で読み取った。図1Bは、キメラ1D4抗体がOX40とOX40Lとの間の相互作用を用量依存的様式で阻止できるが、キメラ2F8抗体はOX40とOX40Lとの間の相互作用を阻止できないことを示す。

10

【0157】

ヒト混合リンパ球反応(MLR)

2名の異なるドナーからの血液を、クエン酸塩を抗凝固剤として含む3本の10mL S-Monovette(Sarstedt, Numbrecht, Germany)に回収した。ドナー第1号からの細胞をエフェクター細胞として用い、ドナー第2号からの細胞を標的細胞として用いた。2名のドナーからのPBMC(末梢血単核細胞)を、製造者の使用説明に従って50mL Blood-Sep-Filterチューブ(流通業者: Brunschwig, Basel, Switzerland)を用いて精製した。細胞を、FBSを含まないロズウェルパーク記念研究所(RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria)培地で2回洗浄した。標的細胞を、50 μ g/mlのマイトマイシンC(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)と37 $^{\circ}$ Cにて30分間インキュベートした。細胞を、次いで、FBSを含まないRPMIで3回洗浄し、RPMI、10%FBS(PAA Laboratories, Pasching, Austria)、2mM L-グルタミン(Lonza, Leuven, Belgium)、100U/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン(Biochrom AG, Berlin, Germany)中に1 \times 10⁶細胞/mlにて再懸濁した。96ウェルU底マイクロプレート(TPP, Trasadingen, Switzerland)中に、50'000の標的細胞および80'000のエフェクター細胞を、各ウェルに100 μ lの最終容量で分配した。100 μ lの抗体希釈物をウェルに加えた。プレートを37 $^{\circ}$ Cにて5%CO₂インキュベータ中で7日間インキュベートした。MLRの開始の7日後に、0.5 μ Ciの³Hチミジン(Perkin Elmer)で細胞をパルスした。パルスの18時間後に、細胞を採集し、取り込まれた放射活性を、Wallacベータカウンタで定量した。図2は、キメラ1D4抗体が陽性対照よりも高い程度までMLRを用量依存的な様式で阻止できることを示す。

20

30

【実施例4】

【0158】

フローサイトメトリーによる、ヒトおよび他の動物種の活性化末梢血単核細胞(PBMC)との抗ヒトOX40抗体の結合

ヒト細胞

ヒト白血球を含有するフィルタを、La Chaux-de-Fonds, Switzerlandの血液採取センター(Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Serologie, rue Sophie-Mairet 29, CH-2300)から回収した。細胞を、10U/mlのリケミン(Drossapharm AG, Lucern, Switzerland)を含有する60mLのPBSを逆に流すことによりフィルタから取り出した。PBMCを、次いで、製造者の使用説明に従って50mL Blood-Sep-Filterチ

40

50

チューブ（流通業者：Brunschwig、Basel、Switzerland）を用いて精製した。細胞を、FBS（PAA Laboratories、Pasching、Austria）を含むロズウェルパーク記念研究所（RPMI、PAA Laboratories、Pasching、Austria）培地で3回洗浄した。細胞を、 3×10^6 細胞/mlにて、24ウェルプレート（TPP、Trasadingen、Switzerland）中で、RPMI、10%FBS（PAA Laboratories、Pasching、Austria）、2mMウルトラグルタミン（Lonza、Leuven、Belgium）、100U/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン（Biochrom AG、Berlin、Germany）、10 μ g/mlのフィトヘマグルチニン（PHA；Sigma-Aldrich Chemie GmbH、Buchs、Switzerland）+100U/mlのrHu IL-2（プロリウキン、Novartis、Basel、Switzerland）に再懸濁した。48時間後に、細胞を回収し、以下に記載するようにしてフローサイトメトリーにより分析した。

10

【0159】

HPB-ALL細胞（T急性リンパ性白血病株化細胞、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH、Braunschweig、Germanyから）を、RPMI、10%FBS中で培養した。2 $\times 10^5$ 細胞を、96ウェルV底プレート（TPP、Trasadingen、Switzerland）に分配し、1300rpmにて3分間遠心分離した。上清を捨て、細胞を回収し、以下に記載するようにしてフローサイトメトリーにより分析した。

20

【0160】

上記のようにして調製したPBMCおよびHPB-ALL細胞を、5 μ g/mlのキメラ1D4抗体または5 μ g/mlの適当なアイソタイプ対照を含む50 μ lのFACS緩衝液（PBS、2%FBS、10%パーゼン（Invitrogen、USA）、または20 μ lのPE標識した市販の抗ヒトOX40抗体（クローンL106、BD Biosciences、Allschwil、Switzerland）に再懸濁した。細胞を氷上で30分間インキュベートし、2回洗浄し、50 μ lのFACS緩衝液に再懸濁した。1/200に希釈した抗ヒトIgG-フィコエリスリン-PE（BD Biosciences、Allschwil、Switzerland）を用いて、キメラ1D4抗体およびアイソタイプ対照抗体を検出した。細胞を氷上で15分間インキュベートし、1回洗浄し、400 μ lのFACS緩衝液に再懸濁し、FACS装置（Cyan、Beckman Coulter International S.A.、Nyon、Switzerland）で分析した。

30

【0161】

カニクイザル初代細胞

カニクイザルからの全血（Eric Rouiller教授、Laboratory of Neurophysiology、University of Fribourg、Fribourg、Switzerlandから得た）を、クエン酸塩チューブ（BD Biosciences、Allschwil、Switzerland）に回収した。2mlのPBSを3mlの血液と混合し、混合物を、10mlの85:15のフィコール：PBS混合物（GE Healthcare Europe GmbH、Glatbrugg、Switzerland）の頂部に重層した。試料を室温にて休止せずに20分間遠心分離した。PBMC層を回収し、PBSで3回洗浄した。細胞を 3×10^6 細胞/mlにてダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、PAA Laboratories、Pasching、Austria）、10%FBS（PAA Laboratories、Pasching、Austria）、非必須アミノ酸（PAA Laboratories、Pasching、Austria）、1mMピルビン酸ナトリウム（PAA Laboratories、Pasching、Austria）、2mMウル

40

50

トラグルタミン (Lonza, Belgium)、100 U/ml ペニシリン (Biochrom AG, Germany)、100 µg/ml ストレプトマイシン (Biochrom AG, Germany) に再懸濁した。1 mL の細胞懸濁液を 24 ウェルプレート (TPP, Trasadingen, Switzerland) に分配し、10 µg/ml の PHA (PHA/M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)、100 U/ml の rHu IL-2 (プロリユウキン、Novartis, Basel, Switzerland) を加えた。細胞を 50 時間、37 °C にて、5% CO₂ インキュベータ中でインキュベートした。活性化 PBMC を回収し、PBS/2.5% FBS (FACS 緩衝液) に再懸濁した。50 µl の FACS 緩衝液中の 5000 細胞を 96 ウェル V 底プレートに分配し、ビオチン化抗ヒト OX40-キメラ 1D4 抗体またはビオチン化アイソタイプ対照抗体またはビオチン化した、ヒツジで産生させた市販の抗ヒト OX40 (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland) をウェルに 25 µg/ml にて加えた。試料を氷上で 20 分間インキュベートし、次いで、細胞を冷 FACS 緩衝液で 2 回洗浄し、1:20 希釈でのストレプトアビジン-PE (BD Biosciences, Allschwil, Switzerland) と氷上で 15 分間インキュベートした。細胞を FACS 緩衝液で 1 回洗浄し、次いで、300 µl の FACS 緩衝液に再懸濁した。2 µl の容量のヨウ化プロピジウム (PI; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) を各試料に加えて、死滅細胞を除外した。細胞を、フローサイトメトリーにより分析した (Cyan, Beckman Coulter International S.A., Nyon, Switzerland)。

【0162】

図 3 A および 3 B は、キメラ 1D4 抗体が、それぞれヒトおよびカニクイザル活性化リンパ球の表面上で発現された OX40 を認識でき、よって、薬物開発のために非常に所望される交差反応特性をもたらすことを示す。

【実施例 5】

【0163】

表面プラズモン共鳴 (SPR) による、ヒト OX40 受容体細胞外ドメインについてのキメラ 1D4 抗体の動的結合親和性定数

動的結合親和性定数 (KD) を、プロテイン A 捕捉抗体上で、実施例 1 に記載するような組換えヒスチジンタグ付加ヒト OX40 受容体細胞外ドメインを分析物として用いて測定した。測定は、BIAcore 2000 (GE Healthcare-BIAcore, Uppsala, Sweden) で室温にて行い、BiaEvaluation ソフトウェア (BIAcore; v4.1) を用いて分析した。

【0164】

CM5 研究グレードセンサチップ (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Switzerland; BR-1000-14) を、35 µl の 1:1 N-ヒドロキシスルホスクシンイミド (NHS) / 1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 溶液 (v/v; 5 µl/分の流速; 流路 1 および 2 にて) を注入することにより活性化した。プロテイン A (ref. P7837; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) を、酢酸緩衝液 pH 4.5 (GE, BR-1003-50; pI よりも 1 pH 単位低い) 中で 50 µg/ml の最終濃度まで希釈し、その後、予め活性化した CM5 センサチップ上に、35 µl を両方の流路 1 および 2 に注入することにより (5 µl/分) (これは、およそ 1500 応答単位 (RU) に相当する) 固定化した。プロテイン A-CM5 センサチップを、次いで、35 µl のエタノールアミン溶液を注入することにより (5 µl/分) 不活性化した。最後に、10 µl のグリシン溶液 (GE, ref. BR-1003-54; 10 mM; pH 1.5) を 2 回注入して、架橋されていないプロテイン A 分子を遊離させた。

【0165】

10

20

30

40

50

親和性測定の前に、一定濃度の分析物を、一定量のプロテインA捕捉抗体上に異なる流速（5、15、30、50、75 μl / 分で2分間）注入することにより、物質移動限界試験を行った。異なる流速での会合速度（on-rate）の傾きの分析が物質移動を示した。

【0166】

親和性測定のために、1xPBS緩衝液中で貯蔵したキメラ1D4抗体を、HBS-E緩衝液（GE、ref. BR-1001-88；0.01M Hepes、0.15M NaCl、EDTA 3mM、0.005%サーファクタントP20、pH7.4）中で15nMの最終濃度まで希釈した。10 μl のこの希釈ストックを、続いて、プロテインA CM5チップの流路2に、200~250RUに達するまで注入した（30 μl / 分）。この捕捉ステップの後に、組換えヒスチジntag付加ヒトOX40受容体細胞外ドメインを異なる濃度（50nM~0.4 μM ）にて流路1および2（流路1は参照として用いる）に30 μl / 分の流速で注入した。それぞれの結合事象の後に、表面を、グリシン緩衝液pH1.5を1分間注入することにより（10 μl / 分）再生した。

10

【0167】

測定（センサーグラム：fc2~fc1）は、物質移動ありの2：1二価分析物モデルと最もよくフィットした。それぞれの測定の開始時のプロテインA捕捉抗体における実験的な変動を説明するために、Rmax値を全てのフィットにおいてローカルに設定した。解離時間は、少なくとも300~600秒程度であった。測定を2重に行い、参照のためのゼロ濃度試料を含めた。カイ2値は、各点での実験データと参照データとの間の差の2乗和を表すが、残差のプロットは、フィットにおけるそれぞれの点の実験データと参照データとの間の差を示す。カイ2および残差の両方の値を用いて、実験データと個別の結合モデルとの間のフィットの質を評価した。

20

【0168】

測定を、プロテインAセンサチップ上に固定化した捕捉キメラ1D4抗ヒトOX40抗体と、分析物としての組換えヒスチジntag付加ヒトOX40受容体細胞外ドメインとを用いて2重に行った。KD値は、カイ2値<1.25で91から116nMまでの間であった。

【実施例6】

【0169】

マウスモノクローナル抗体1D4のヒト化

ヒトアクセプターフレームワーク、逆突然変異ならびにヒトCDRグラフト化アクセプターフレームワークの結合特性を実質的に保持および/または改善する変異の選択を含む、抗ヒトOX40マウス抗体1D4のヒト化について本明細書に記載する。

30

【0170】

再整形した可変領域の設計

相同性一致を用いて、1D4 CDRにグラフトするヒトアクセプターフレームワークを選択した。データベース、例えばヒトおよびマウスの免疫グロブリン遺伝子座からの生殖系列可変遺伝子のデータベース（IMGTデータベース（the international Immunogenetics information system（登録商標）；Lefranc MPら、（1999）Nucleic Acids Res. 27（1）：209~12頁；Ruiz Mら、（2000）Nucleic Acids Res. 28（1）：219~21頁；Lefranc MP（2001）Nucleic Acids Res. 29（1）：207~9頁；Lefranc MP（2003）Nucleic Acids Res. 31（1）：307~10頁；Lefranc MPら、（2005）Dev. Comp. Immunol. 29（3）：185~203頁；Kaas Qら、（2007）Briefings in Functional Genomics & Proteomics、6（4）：253~64頁）もしくはVBASE2（Retter Iら、（2005）Nucleic Acids Res. 33、データベース版D671~D674）もしくはKabataデータベース（

40

50

Johnson Gら、(2000) *Nucleic Acids Res.* 28:214~218頁)または出版物(例えばKabata EAら、既出)を用いて、マウス重鎖および軽鎖V領域が属するヒトサブファミリーを同定し、アクセプター分子として用いるために最もよくフィットするヒト生殖系列フレームワークを決定できる。アクセプターとして用いるためのこれらのサブファミリー内での重鎖および軽鎖可変配列(VHおよびVL)の選択は、配列相同性および/またはグラフト後に6つのCDRの適当な相対的提示を保存する助けとなるCDR1およびCDR2領域の構造の一致に基づくことができる。

【0171】

例えば、IMGTデータベースを用いることにより、1D4重鎖可変ドメインフレームワークとヒト重鎖可変ドメインサブファミリー2のメンバーとの間の良好な相同性が示される。CDRおよびフレームワーク配列両方の最高の相同性および同一性は、生殖系列配列:IGHV2-70*10(配列番号19)、IGHV2-70*01(配列番号20)、IGHV2-70*13(配列番号21)、IGHV2-5*09(配列番号22)およびIGHV2-70*11(配列番号23)について観察され、これらは全て、CDR3までの配列全体について73%を超える配列同一性を有した。IGHV2-70*10、IGHV2-70*01およびIGHV2-70*13は、74%の配列同一性を有し、IGHV2-5*09およびIGHV2-70*11は、それぞれ73.5%および73%の配列同一性を有する。

10

【0172】

同じアプローチを用いて、1D4軽鎖可変ドメイン配列は、ヒト軽鎖可変ドメインカッパサブファミリー3のメンバーと良好な相同性を示した。CDRおよびフレームワーク配列両方の最高の相同性および同一性は、生殖系列配列:IGKV3-11*01(配列番号24)(65.3%同一)、IGKV1-39*01(配列番号25)(64.9%同一)、IGKV1D-39*01(配列番号26)(64.9%同一)、IGKV3-11*02(配列番号27)(64.2%同一)およびIGKV3-20*01(配列番号28)(62.5%同一)について観察された。

20

【0173】

ヒト化プロセスの開始点として、ヒトIGHV2-70*10(配列番号19)およびIGKV3-11*01(配列番号24)可変ドメインを、1D4 CDRへのアクセプターとして選択した。IGHV2-70*10は、フレームワーク1領域中での1D4との相同性が優れているので、他のヒト重鎖可変ドメインを超えて選択した。

30

【0174】

ヒトガンマ1アイソタイプの第1ヒト化抗体を調製した(以下を参照されたい)。抗体は、ヒト-マウスハイブリッド重鎖可変ドメインおよびヒト-マウスハイブリッド軽鎖可変ドメインを包含した。前記ハイブリッド重鎖可変ドメインは、生殖系列CDR1および2がそれぞれ1D4重鎖CDR1および2を置き換えているヒト重鎖可変ドメインIGHV2-70*10に基づいた。ヒトアクセプターフレームワークと最良に一致するJHセグメント配列を、上記のIMGT検索から同定した。ヒトIGHV2-70*10フレームワーク領域、1D4マウスCDRおよびヒトアクセプターと最良に一致するJHを有する、得られたヒト-マウスハイブリッド重鎖可変配列を、本明細書において、配列番号29を有する重鎖可変ドメインVH1という。同様に、この第1ヒト化抗体候補について用いたヒト-マウスハイブリッド軽鎖可変ドメインは、ヒトIGKV3-11*01フレームワーク領域、1D4マウスCDRおよびヒトアクセプターと最良に一致するJKを有し、本明細書において、配列番号30を有する軽鎖可変ドメインVL1という。VH1およびVL1を包含する第1ヒト化抗体は、本明細書において、VH1/VL1抗体と略記する。

40

【0175】

第1ヒト化抗体プロトタイプの生成

VH1およびVL1についてのコードDNA配列(cDNA)を、scFvフォーマットにおいてGENEART AG(Regensburg, Germany)により合成

50

して、そのことにより、単一DNA配列が両方の可変ドメイン（配列番号31）を包含することを可能にした。個別の可変ドメインcDNAは、このscFv構築物からPCRにより引き出し、PCRアセンブリ技法を用いて、それらのそれぞれの定常ドメインcDNA配列（複数可）の上流でさらに組み立てた。最後に、完全重鎖および軽鎖cDNAを、CMVプロモーターおよびウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを有する改変pcDNA3.1ベクター（Invitrogen、CA、USA）に基づく独立ベクターにライゲーションした。軽鎖特異的ベクターは、対象の軽鎖可変ドメインcDNAをカップ軽鎖定常ドメインcDNAの前にBamHIおよびBsiWI制限酵素部位を用いてライゲーションすることにより、ヒトカップアイソタイプ軽鎖の発現を可能にしたが、重鎖特異的ベクターは、工学改変して、対象の重鎖可変ドメインcDNAを、ヒトIGHG1 CH1、IGHG1ヒンジ領域、IGHG1 CH2およびIGHG1 CH3定常ドメインをコードするcDNA配列の前に、BamHIおよびSalI制限酵素部位を用いてライゲーションできるようにした。重鎖および軽鎖両方の発現ベクターにおいて、分泌は、BamHI部位を含有するマウスVJ2リーダーペプチドにより駆動した。BsiWI制限酵素部位は、カップ定常ドメイン中にあり、SalI制限酵素部位は、IGHG1 CH1ドメイン中に見出される。

10

【0176】

VH1/VL1抗体は、等量の重鎖および軽鎖ベクターを懸濁馴化HEK293-EBNA1細胞（ATCC（登録商標）カタログ番号：CRL-10852）にポリエチレンイミン（PEI、Sigma、Buchs、Switzerland）を用いて同時トランスフェクトすることにより一過的に生成した。典型的に、1mlあたり0.8~1.2百万細胞の密度の100mlの懸濁された細胞に、50μgの重鎖をコードする発現ベクターと50μgの軽鎖をコードする発現ベクターとを含有するDNA-PEI混合物をトランスフェクトする。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが宿主細胞に導入されると、細胞を4~5日の期間さらに培養して、0.1%プルロニック酸、4mMグルタミンおよび0.25μg/mlジェネテシンを補った培養培地（EX-CELL293、HEK293血清フリー培地；Sigma、Buchs、Switzerland）への分泌を可能にすることにより、抗体を生成する。

20

【0177】

VH1/VL1抗体を、無細胞上清から、組換えプロテインAストリームライン媒体（GE Healthcare Europe GmbH、Glatbrugg、Switzerland）を用いて精製し、アッセイの前にリン酸塩緩衝食塩水に緩衝液交換した。ヒトOX40との結合を、実施例5に記載するようにしてSPRにより測定した。

30

【0178】

グラフト化ヒトフレームワークの逆突然変異

1D4マウス抗体からのCDRの単純なグラフト化によりヒトOX40と結合しない候補が得られたので（表6および図4）、ヒト残基がマウス残基で置換される突然変異誘発を開始した。このプロセスは逆突然変異とよばれ、モノクローナル抗体のヒト化において最も予測不可能な手順である。これは、親和性を保存し、同時にヒト化抗体における免疫原性の可能性を最小限にするために、保持する必要があるマウス抗体からの重要なフレームワーク残基の同定および選択を必要とする。表7、表8および図5は、マウス抗体フレームワークとヒト抗体フレームワークとの間で異なる残基（Kabab番号付け）を示す。CDRの高次構造または可変ドメイン間充填に影響し得る残基は、抗体親和性に最も高い影響を与え得るので、特に興味の対象である。

40

【0179】

CDR高次構造および/または可変ドメイン間充填に最も影響を与え得る残基を同定するために、可変ドメインのVH1-VL1対の3Dモデルを、自動化モードに設定した構造相同性モデル化サーバSWISS-MODEL（Arnold Kら、（2006）Bioinformatics、22（2）：195~201頁；http://swissmodel.expasy.org）を用いて算出した。モデル分析により、CDR領

50

域および/または重鎖 - 軽鎖可変ドメイン充填に対する影響の推定に基づく位置の部分集合を選択できた。この位置の部分集合は、可変重鎖位置：23、35b、48、50、60および62、ならびに可変軽鎖位置：1、33、34、46、47、54、56および71（Kabab番号付け）からなった。これらの逆突然変異に加えて、VH1/VL1抗体中に見出された軽鎖位置Y31は、いくつかの候補において欠失していた。

【0180】

重鎖および軽鎖置換の様々な組み合わせに基づくさらなるヒト化候補を、VH1/VL1抗体配列の関係において、標準的な突然変異誘発および上記の方法を用いて調製した。ヒト化抗体候補を、それらの結合親和性について、実施例5に記載するようにしてSPRによりアッセイした。

【0181】

これらの単一または組み合わせ置換に基づくヒト化抗体のいくつかの生成収率および結合特性を、表6に示す。示した28の抗体のうち、9つの候補はヒトOX40に対する結合を全く示さず、9つの別の群は結合が乏しかった。VL9に基づくヒト化抗体は、SPRにより、ヒトOX40との弱い結合を最も一貫して示した。2つの抗体、VH6/VL9およびVH7/VL9だけが、ヒトOX40との良好な結合を示した。これらの両方のヒト化抗体は、可変重鎖位置：23、35b、50、60および62ならびに可変軽鎖位置：33、34、46、47および71（Kabab番号付け）にて逆突然変異を有した。これらの逆突然変異に加えて、VH6/VL9およびVH7/VL9はともに、軽鎖位置31の除去により利益を受けていた。驚くべきことに、VH7/VL9は、1D4キメラ抗体およびVH6/VL9パリアントよりも、ヒトOX40についての親和性が改善されていた。これらのヒト化抗体の結合親和性を、表9にまとめる。

【0182】

示差走査熱量分析による、選択されたヒト化抗OX40抗体の耐熱性

ヒト化抗体の耐熱性を、示差走査熱量分析（DSC）を用いて測定した。モノクローナル抗体融解プロファイルは、それらのアイソタイプの特徴である（Garber EおよびDemarest SJ（2007）Biochem. Biophys. Res. Commun. 355：751～7頁）が、FAB断片の中間融解温度は、全長IgGの関係においてさえ容易に同定できる。FAB部分のこのような中間融解温度を用いて、ヒト化候補のモノクローナル安定性をモニタリングした。

【0183】

熱量測定を、VP-DSC示差走査微小熱量計（MicroCal、Northampton、UK）で行った。セル容量は0.128mlであり、加熱速度は200/hであり、過圧は65psiに維持した。全ての抗体を、PBS（pH7.4）中で1mg/mlの濃度にて用いた。抗体のモル熱容量は、抗体を除いた同一の緩衝液を含有する2重の試料との比較により見積もった。部分モル熱容量および融解曲線を、標準的な手順を用いて分析した。サーモグラムをベースライン補正し、濃度を標準化した後に、ソフトウェアOrigin v7.0において非2状態モデルを用いてさらに分析した。

【0184】

ヒト化パリアントVH6/VL9 FAB断片は、76.3の単一の移行とともに、密に折りたたまれたFAB断片について通常観察される協同的アンフォールディングと一貫する形状および振幅を示し、工学改変プロセスが、FAB安定性をうまく保持したことを示した。全体的に、ヒト化パリアントは、良好な熱安定性を示した。

【0185】

10

20

30

40

【表 6】

表6:ヒト化抗ヒト OX40 抗体

ヒト化抗体 バリエーション (IGHG1)	配列 番号	変異 VH/VL	一過性 発現 (mg/l)	ヒト OX40 との結 合
VH1/VL1	32, 39	N.A./N.A.	40	なし
VH1/VL2	32, 40	N.A./L33M	21	なし
VH1/VL3	32, 41	N.A./F71Y	17	なし
VH2/VL1	33, 39	T23S/N.A.	13	なし
VH2/VL2	33, 40	T23S/L33M	17	なし
VH2/VL3	33, 41	T23S/F71Y	14	なし
VH3/VL1	34, 39	R50H/N.A.	23	なし
VH3/VL2	34, 40	R50H/L33M	22	なし
VH3/VL3	34, 41	R50H/F71Y	18	なし
VH4/VL4	35, 42	T23S-R50H/L33M-F71Y	15	乏しい
VH4/VL9	35, 47	T23S-R50H/Y31 欠失-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3	弱い
VH5/VL4	36, 42	T23S-R50H-S60N-S62A/L33M-F71Y	15	乏しい
VH5/VL5	36, 43	T23S-R50H-S60N-S62A/L33M-L46P-L47W-F71Y	2	乏しい
VH5/VL6	36, 44	T23S-R50H-S60N-S62A/E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	2	乏しい
VH5/VL9	36, 47	T23S-R50H-S60N-S62A/Y31 欠失-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	6	弱い
VH6/VL5	37, 43	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/L33M-L46P-L47W-F71Y	0	N.D.
VH6/VL6	37, 44	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	0.5	N.D.
VH6/VL7	37, 45	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/Y31 欠失-L33M-F71Y	14	N.D.
VH6/VL8	37, 46	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/Y31 欠失-L33M-A34H-F71Y	7	N.D.
VH6/VL9	37, 47	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31 欠失-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3.5	良好
VH6/VL10	37, 48	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/Y31 欠失-L33M-R54L-T56S-F71Y	0.5	N.D.
VH6/VL11	37, 49	T23S-S35bG-R50H-S60N-S62A/ Y31 欠失-L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	5.5	N.D.
VH7/VL5	38, 43	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/L33M-L46P-L47W-F71Y	1	N.D.
VH7/VL6	38, 44	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/E1Q-L33M-L46P-L47W-F71Y	1	N.D.
VH7/VL7	38, 45	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/Y31 欠失-L33M-F71Y	1.5	弱い
VH7/VL8	38, 46	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/Y31 欠失-L33M-A34H-F71Y	10	弱い
VH7/VL9	38, 47	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31 欠失-L33M-A34H-L46P-L47W-F71Y	3	良好
VH7/VL11	38, 49	T23S-S35bG-I48L-R50H-S60N-S62A/ Y31 欠失-L33M-A34H-R54L-T56S-F71Y	11.5	弱い/良 好

【 0 1 8 6 】

10

20

30

40

【表 7】

表 7:ID4 とヒトアクセプター重鎖可変IGHV2-70*10 フレームワークとの比較

Kabat 位置	ID4	CDR グラフト化 IGHV2-70*10
10	G	A
11	I	L
12	L	V
13	Q	K
15	S	T
19	S	T
23	S	T
35b	G	S
41	S	P
44	G	A
48	L	I
50	H	R
60	N	S
62	A	S
65	S	T
66	G	R
79	F	V
81	K	T
82	I	M
82a	A	T
82b	S	N
82c	Y	M
84	T	P
85	T	V

10

20

30

【 0 1 8 7 】

【表 8】

表 8:1D4 とヒトアクセプター軽鎖可変 IGKV3-11*01 フレームワークとの比較

Kabat 位置	1D4	CDR グラフト化 IGKV3-11*01
1	Q	E
10	I	T
13	A	L
18	K	R
19	V	A
21	M	L
22	T	S
33	M	L
34	H	A
42	S	Q
43	S	A
45	K	R
46	P	L
47	W	L
54	L	R
56	S	T
58	V	I
70	S	D
71	Y	F
72	S	T
76	N	S
77	R	S
78	V	L
80	A	P
83	A	F
85	T	V

10

20

30

【 0 1 8 8 】

【表 9】

表 9:選択されたヒト化およびキメラ抗 OX40 抗体の結合の特徴。

ヒト化バリエーション	配列番号	$k_{on}(1/Ms)$	$k_{off}(1/s)$	$K_D(nM)$
1D4 キメラ	50, 51	3.4×10^4	3.08×10^{-3}	91
VH6/VL9	37, 47	3.54×10^4	3.56×10^{-3}	101
VH7/VL9	38, 47	4.45×10^4	3.12×10^{-3}	70

40

【実施例 7】

【 0 1 8 9 】

ヒト化抗 OX40 抗体のエピトープ特徴決定。

ヒト化抗 OX40 抗体のエピトープの特徴を決定するために、VH6/VL9 抗体を、様々なヒト-ラット OX40 キメラタンパク質を用いて、ヒト OX40 細胞外領域の規定されたドメインにマッピングした。

【 0 1 9 0 】

ヒト-ラット OX40 キメラタンパク質の調製および ELISA

ラットおよびヒト-ラット OX40 タンパク質を、実施例 1 に記載した方法に従って F

50

c融合タンパク質としてフォーマットした。ELISAのために、PBS中2 µg/mLのOX40タンパク質で、4にて1晩、高結合96ウェルプレート(Coastar)を被覆した。プレートを、PBS2%ウシ血清アルブミン(BSA)でブロッキングした後に、VH6/VL9抗体またはアイソタイプ対照抗体とインキュベートした。プレートを、次いで、洗浄し、ヤギ-抗ヒトIgG(Fab')₂断片特異的-HRP(Jackson ImmunoResearch Europe Ltd、Newmarket、UK)とインキュベートした。洗浄の後に、プレートをTMB基質(Bio-Rad Laboratories AG、Reinach、Switzerland)とインキュベートして、抗体結合を明らかにした。反応を、2M H₂SO₄を加えることにより停止し、光学密度を450nm(OD_{450nm})にて、Synergy HT2分光光度計(Biotek、USA;流通業者:WITTEC AG、Littau、Switzerland)で読み取った。

10

【0191】

結果

その起源に関係なく、OX40細胞外領域は、ドメイン1、2、3および4とよばれる4つの構造モジュールに分けられている(Compagnon DMおよびHymowitz SG(2006)Structure、14(8):1321~30頁)。ヒトOX40の細胞外領域(ヒトTNFRSF4のアミノ酸29~214、番号付けはUniProt P43489配列に従う)に対応するキメラOX40タンパク質を、4つのドメインの1または複数をヒト配列とラット配列との間で交換することにより構築した。例えば、キメラRHRROX40タンパク質は、第2ドメインが対応するヒトドメイン配列で置き換えられたラットOX40細胞外領域に対応する。

20

【0192】

結合ELISAを行って、ヒトOX40細胞外領域(配列番号11を有するHHHHと略記する)、ラットOX40細胞外領域(配列番号52を有するRRRRと略記する)ならびに4つのヒト-ラットキメラタンパク質:RHRR(配列番号53)、HRRR(配列番号54)、HHRR(配列番号55)およびRRHH(配列番号56)に対するVH6/VL9抗体の反応性を試験した。このELISAの結果を図7に示す。このエピトープマッピング実験の必要条件として、VH6/VL9抗体は、ヒトOX40タンパク質との結合を示したが、ラットOX40タンパク質との結合を示さなかった。これは、ラットOX40との交差反応性がないことを示す。VH6/VL9抗体がRHRRおよびHHRRと結合したが、HRRRまたはRRHHと結合しなかったことがわかり、VH6/VL9エピトープが、ヒトOX40細胞外領域の第2ドメイン内にマッピングされることを示した。

30

【実施例8】

【0193】

VH6/VL9抗体は、死滅および阻止機序によりヒト混合リンパ球反応を阻止する

*in vitro*免疫反応を抑制するVH6/VL9抗体の効力を、1方向同種混合リンパ球反応(MLR)において試験した。MLRは、アロ反応性T細胞活性化および増殖の*in vitro*モデルである(O'Flaherty Eら、(2000)Immunology、100(3):289~99頁;DuPont BおよびHansen JA(1976)Adv.Immunol.23:107~202頁)。2名の無関係のドナーからの末梢血単核細胞(PBMC)を混合した場合に、T細胞は、同種主要組織適合性(MHC)分子の認識により活性化される。この活性化は、Tリンパ球の増殖をもたらす。MLR反応は、T細胞標的化免疫抑制薬の効果を実証するために広く用いられている(Bromelow KVら、(2001)J.Immunol.Methods、247(1~2):1~8頁)。シクロスポリンのような免疫抑制薬は、T細胞活性化を阻害することにより主に働く。VH6/VL9抗体による阻止効果を試験することに加えて、MLRの阻害に対する抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)のような細胞傷害性機序の寄与も調べた。VH6/VL9抗体の3つの異なる抗体フォーマット:IGHG1フォー

40

50

マット（本明細書においてVH6/VL9という）、非フコシル化IGHG1（IgG1）フォーマット（本明細書において非フコシル化VH6/VL9という）およびIGHG4（IgG4）フォーマット（本明細書においてVH6/VL9 IGHG4 S228Pという）を、このアッセイにおいて試験した。IGHG1（IgG1）抗体は、ADCCのような細胞傷害作用機序について有能であることが知られている。非フコシル化IGHG1抗体は、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）のような細胞傷害性細胞上で発現されるFcγRIIIaに対する親和性がより高いので、ADCC活性の増進を示すことが知られている（Mizushima 他、(2011) *Genes Cells*, 16(11): 1071~80頁）。対照的に、IGHG4（IgG4）抗体は、ADCCのようなFc媒介性細胞傷害作用機序を有さないことが知られている。

10

【0194】

VH6/VL9抗体のフォーマット化

IGHG1 CH1、IGHG1ヒンジ領域、IGHG1 CH2およびIGHG1 CH3定常ドメインをコードするcDNA配列を、実施例6に記載する重鎖特異的ベクター中のIGHG4 CH1、S228P置換を有するIGHG4ヒンジ領域、IGHG4 CH2およびIGHG4 CH3定常ドメインをコードするcDNA配列で置き換えることにより、置換S228Pを有するIGHG4免疫グロブリンフォーマット化を達成した。置換S228Pは、ヒトIGHG4重鎖cDNA鋳型に、標準的なPCR突然変異誘発技法により導入した。得られた重鎖は、配列番号57を有する。非フコシル化VH6/VL9 IGHG1抗体の生成は、WO2010/095031パンフレットの実施例14に記載するプロトコールに従った。

20

【0195】

混合リンパ球反応

2名の異なるヒトドナーからの血液を、抗凝固剤としてクエン酸塩を含む3本の10 mL S-Monovette (Sarstedt, Numbrecht, Germany) に回収した。2名のヒトドナーからの末梢血単核細胞 (PBMC) を、製造者の使用説明に従って50 mL Blood-Sep-Filterチューブ (流通業者: Brunschwig, Basel, Switzerland) を用いて精製した。細胞を、FBSを含まないロズウェルパーク記念研究所 (RPMI, PAA Laboratories, Pasching, Austria) 培地で2回洗浄した。2名のドナーからの刺激細胞を、50 µg/mlのマイトマイシンC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) との37 °Cにて30分間のインキュベーションにより調製した。細胞を、次いで、FBSを含まないRPMIで3回洗浄し、RPMI、10% FBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria)、2 mM L-グルタミン (Lonza, Leuven, Belgium)、100 U/ml ペニシリンおよび100 µg/ml ストレプトマイシン (Biochrom AG, Berlin, Germany) 中に 1×10^6 細胞/mLにて再懸濁した。レスポナー細胞を、96ウェルU底マイクロプレート (TPP, Trasadingen, Switzerland) 中でRPMI、10% FBS、L-グルタミン、100 U/ml ペニシリンおよび100 µg/ml ストレプトマイシン中に再懸濁した。50 ' 000の刺激細胞および80 ' 000のレスポナー細胞を、各ウェルに100 µlの最終容量で分配した。100 µlの抗体希釈物 (または培地のみ) をウェルに加えた。プレートを37 °Cにて5% CO₂ インキュベータ中で7日間インキュベートした。最後の18時間、0.5 µCiの³Hチミジン (Perkin Elmer, Basel Switzerland) で細胞をパルスした。細胞をフィルタマットフィルタ (Perkin Elmer) 上に採集し、取り込まれた放射活性を、Wallacベータカウンタ (Perkin Elmer) で定量した。

30

40

【0196】

結果

図8に示す結果は、VH6/VL9抗体が、2名の異なる個体 (レスポナー) につい

50

でのMLRを、およそ100ng/mLのEC₅₀値で効率的に阻害できることを実証する。結果は、用いる抗体フォーマットに依存して異なる応答も示し、阻止および細胞傷害性機序の寄与における差が、異なる個体からのMLRにおいて観察される。

【0197】

レスポナー1からのT細胞の反応性(図8A)は、IGHG1およびIGHG4フォーマットにより効率的に阻害され、このことは、細胞傷害性機序が、レスポナー1にとって重要でないことを示す。対照的に、IGHG4フォーマットは、レスポナー2からのMLRを高濃度にて乏しく阻止できたただけであり(図8B)、より低い濃度にてその効果を非常に迅速に喪失したが、IGHG1フォーマットは、60%を超える阻害を達成でき、このことは、レスポナー2について、死滅機序が、阻害効果のほとんどの原因であることを意味した。

10

【0198】

作用形態におけるこの差は、MLR反応におけるT細胞の活性化、増殖および生存が、アレゲン性の反応性およびおそらく他の共刺激シグナルの程度に依存して、個体間のOX40共刺激シグナルに様々に依存するという事実により生じる可能性がある。OX40由来共刺激シグナルに乏しく依存する個体について、ADCC機序による活性化T細胞の除外は、VH6/VL9の作用の主な機序である。

【0199】

驚くべきことに、非フコシル化IGHG1フォーマットは、両方のレスポナーについてのMLRを阻害する非常に有効な能力を提示した。この観察は、阻止機序がMLRの阻害を達成するために十分であったとしても、死滅機序の付加または増進は、抗OX40抗体の阻害効果を改善するという事実を強調する。このような増進は、患者のOX40共刺激状態に関係なく、例えば患者のOX40発現レベルが低い場合に、OX40媒介性障害を処置するとき特に有用である。

20

【実施例9】

【0200】

VH6/VL9抗体は、異種間移植片対宿主疾患を阻止する

異種間移植片対宿主(GVH)反応は、ヒト患者における骨髄移植後に観察される同種間移植片対宿主疾患(GVHD)についてのモデルである。GVH反応は、同種または異種MHC認識の結果として宿主環境を攻撃する、グラフト化免疫細胞により媒介される急性免疫応答である(Murphy WJら、(1996)Semin.Immunol.8(4):233~41頁)。Tリンパ球は、GVH反応の主なエフェクター細胞である。VH6/VL9抗体の免疫抑制効力を、ヒトPBMCを用いるSCIDマウスの再構築に基づく異種GVHDモデルにおいて試験した。このモデルでは、ヒトPBMCおよび主にTリンパ球が、マウス宿主細胞に対して強い応答を開始する。この反応は、特に、体重減少を伴う重度の皮膚および腸の炎症を導く。このモデルの最も適当な読出しは、動物の生存である。

30

【0201】

方法

動物(SCIDマウス)を、致死量以下で照射した後に、30百万のヒトPBMCを用いて腹腔内で再構築した。また、TMベータ1抗体を週2回注射することにより、マウスNK細胞をマウスから枯渇させた。VH6/VL9抗体、Enbre1(登録商標)または媒体を用いる処置を、毎週5回の連続する用量をi.v.で与え、PBMC注射の2日前に開始した。動物は、媒体(PBS)、または10mg/kgもしくは1mg/kgのVH6/VL9抗体、または8mg/kgのEnbre1(登録商標)(ヒトIgG1のFc成分と融合したヒト可溶性TNF受容体2の融合タンパク質、Amgen-Pfizer)のいずれかで処置した。動物を、体重減少、下痢、毛皮の外観および全体的な挙動を含むGVHD症状について毎週3回確認して評点した。症状が重度すぎると考えられるならば、動物を道徳的に屠殺した。

40

【0202】

50

結果

図9は、VH6/VL9抗体が、より低い1mg/kg用量であっても、GVHD反応を非常に有力に抑制したことを示す。驚くべきことに、VH6/VL9抗体は、ヒトにおけるGVHDについての認識された治療であるEnbrel(登録商標)を超える、改善された効力を示した(Xhaard Aら、(2011)Bull.Cancer、98(8):889~99頁;Simpson D(2001)Expert Opin.Pharmaoother.2(7):1109~17頁)。1または10mg/kgのVH6/VL9抗体で処置した動物の生存時間中央値は、媒体処置群(表10)と比較して4倍長く、Enbrel(登録商標)と比較して2倍長かった。さらに、この結果は、VH6/VL9抗体が、アゴニスト活性を有さないことを強調する。なぜなら、アゴニスト性抗OX40抗体は、同種マウスGVHDモデルにおいてGVHDを悪化させると報告されているが(Valzasina Bら、(2005)Blood、105(7):2845~51頁;Blazar BRら、(2003)Blood、101(9):3741~8頁)、この事象は本研究で観察されなかったからである。

10

【0203】

【表10】

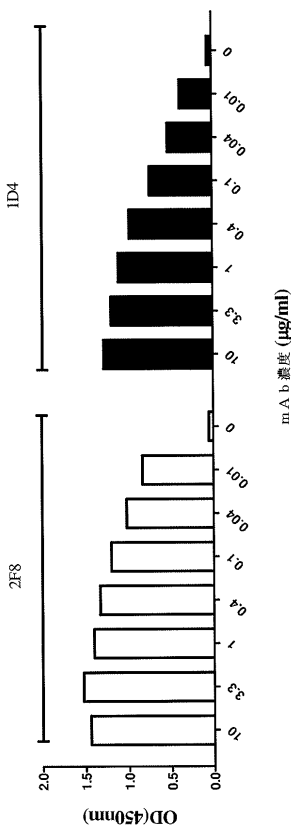
表10:記載する処置群の生存時間中央値(日)

処置	媒体	Enbrel (登録商標)	1D4 (1mg/kg)	1D4 (10mg/kg)
生存中央値 (日)	11.5	20.5	42	47.5

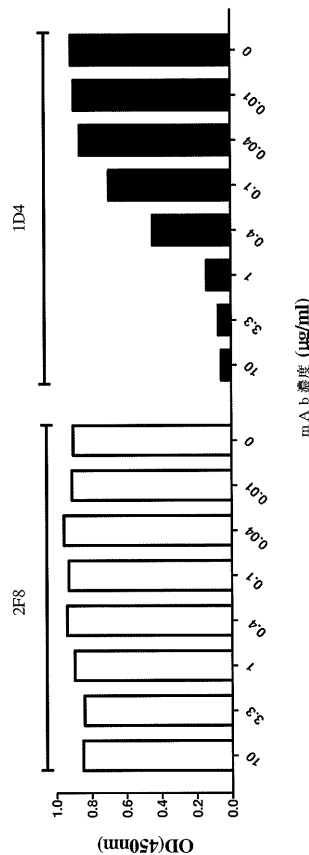
20

媒体:PBSのみ。1D4:GBR 830-1D4抗体;Enbrel(登録商標)は、臨床製品 (clinical product) であった。

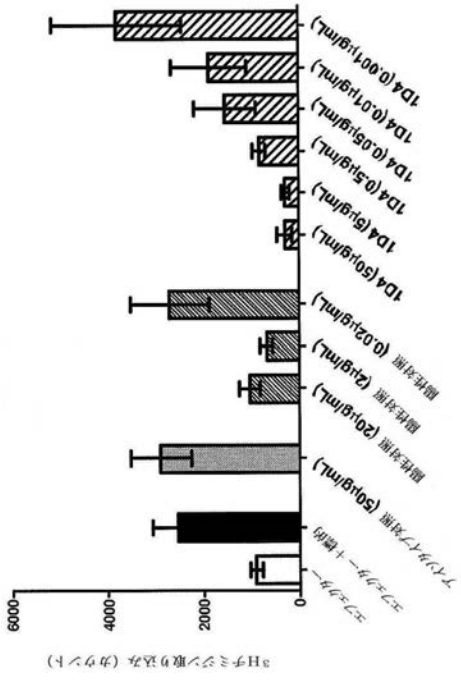
【図1A】



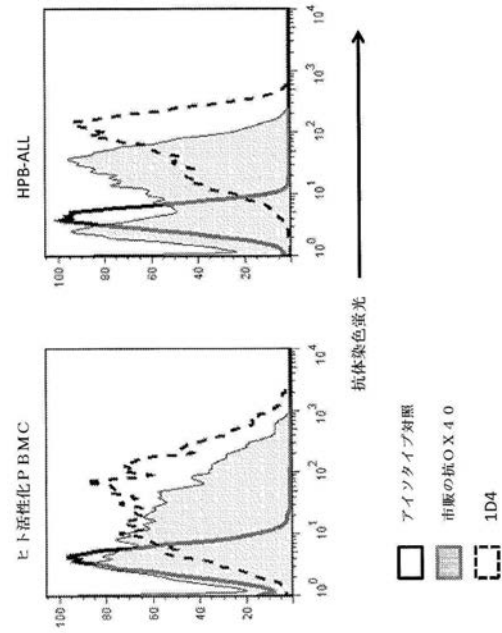
【図1B】



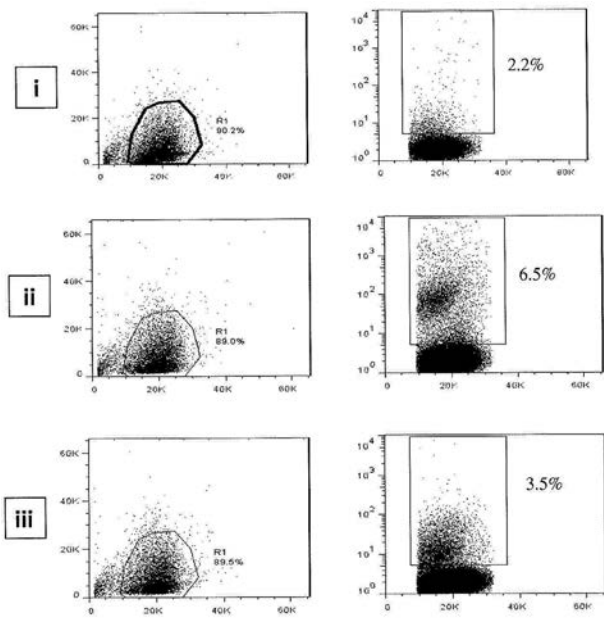
【図2】



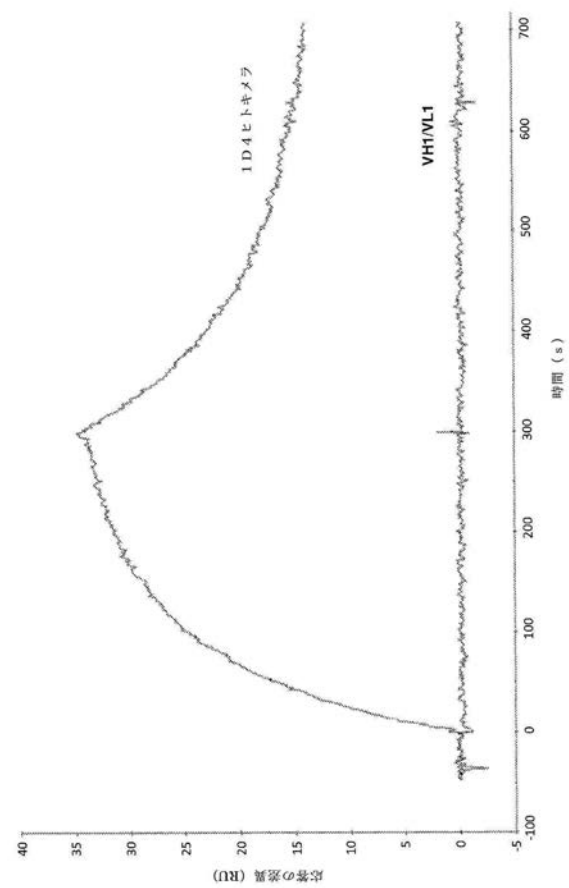
【図3A】



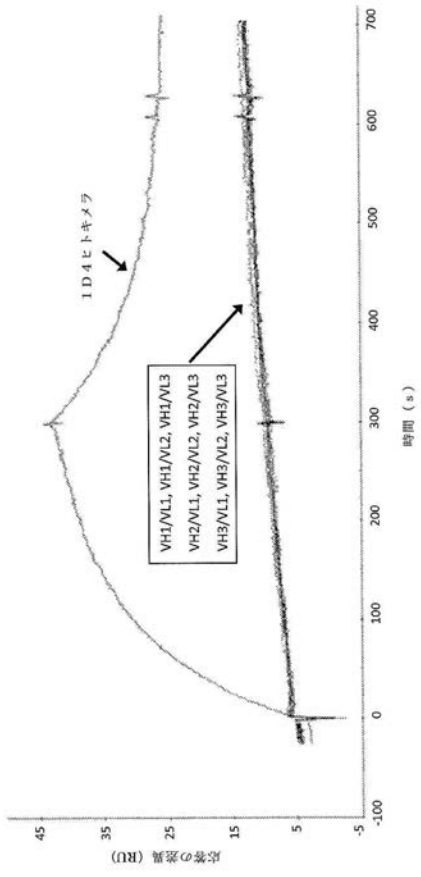
【図3B】



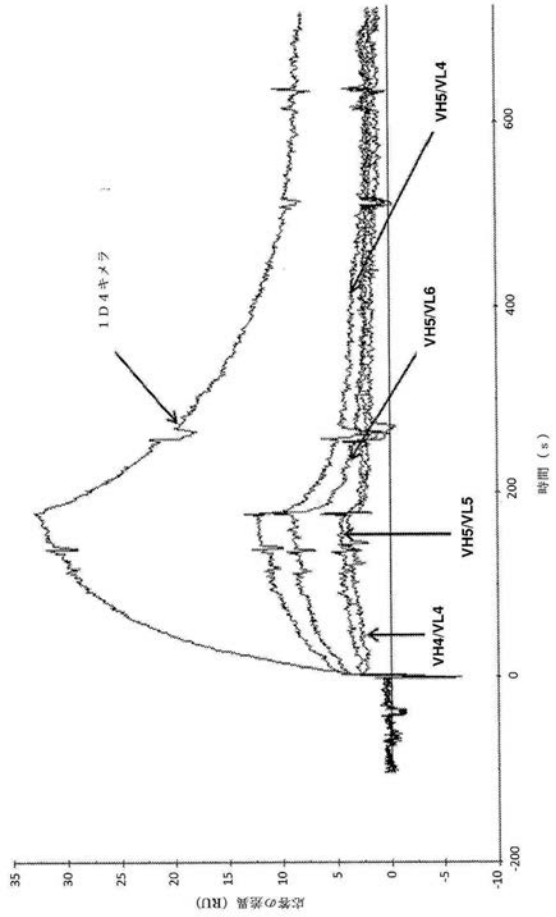
【図4A】



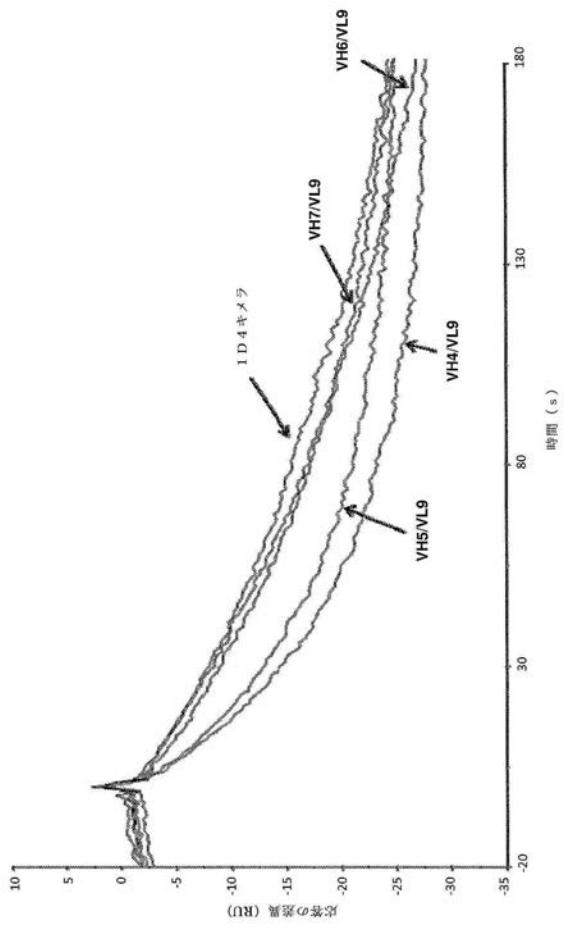
【 図 4 B 】



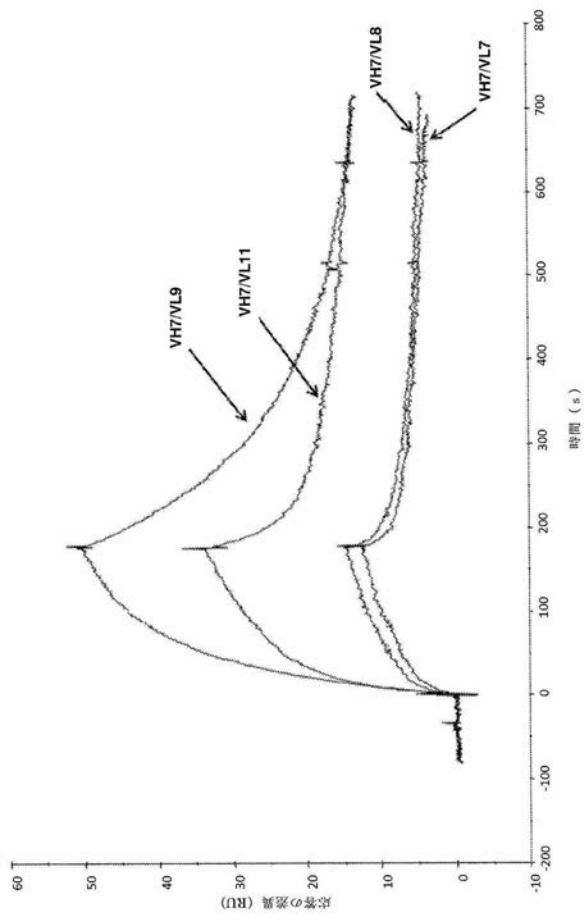
【 図 4 C 】



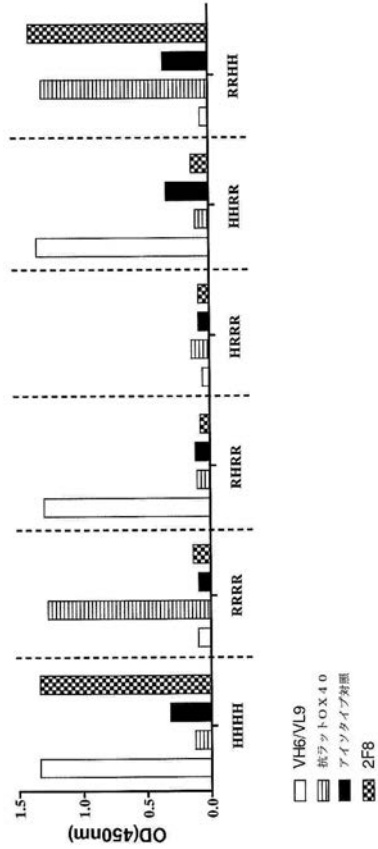
【 図 4 D 】



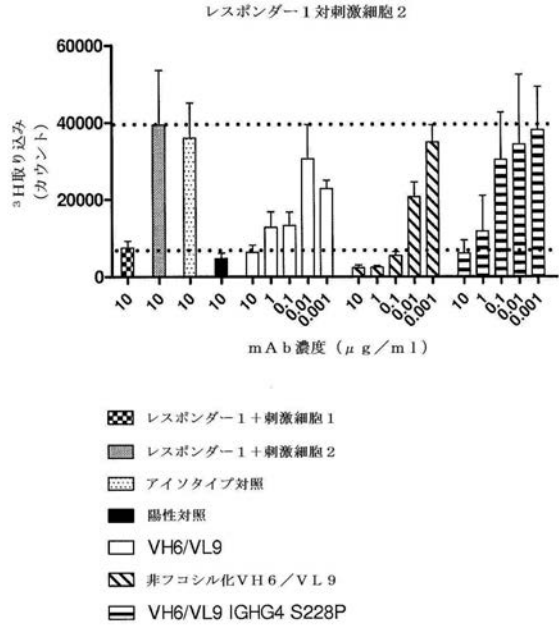
【 図 4 E 】



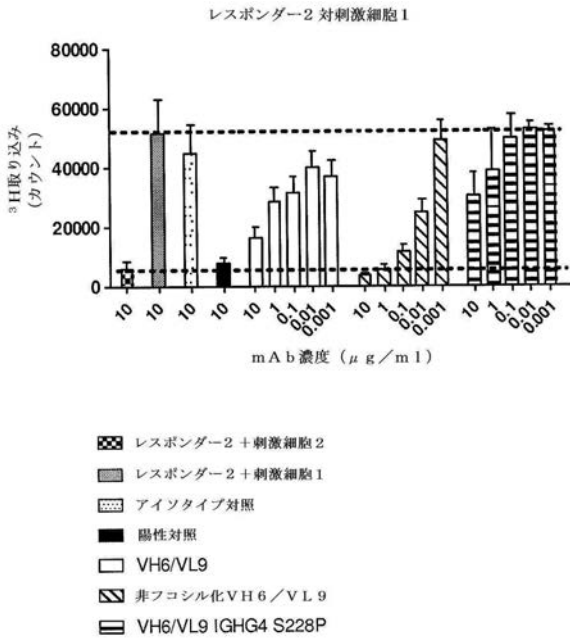
【 図 7 】



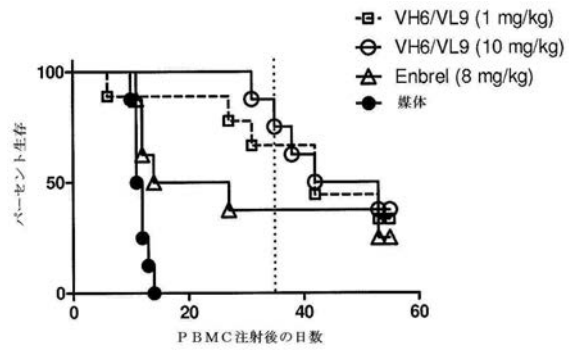
【 図 8 A 】



【 図 8 B 】



【 図 9 】



【配列表】

2019213520000001.app

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 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 33/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 33/14	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	G 0 1 N 33/53	K

- (72)発明者 アティンガー, アントワネ
 スイス国 ツェーハー - 2 3 0 0 ラ ショー - ド - フォン, シュマン ド ラ コンベタ 5
- (72)発明者 ブレイン, スタニスラス
 スイス国 ツェーハー - 2 3 0 0 ラ ショー - ド - フォン, シュマン ド ラ コンベタ 5
- (72)発明者 バック, ジョナサン, アルバート

スイス国 ツェーハー - 2 3 0 0 ラ ショー - ド - フォン , シュマン ド ラ コンベタ 5
 (72)発明者 リッシラ , ラミ

スイス国 ツェーハー - 2 3 0 0 ラ ショー - ド - フォン , シュマン ド ラ コンベタ 5
 (72)発明者 ホウ , サミュエル

スイス国 ツェーハー - 2 3 0 0 ラ ショー - ド - フォン , シュマン ド ラ コンベタ 5
 F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ08 QS10 QS39 QX01

4B064 AG20 AG26 AG31 CA10 CA20 CC15 CC24 CE12 DA01

4B065 AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA08 BD15
 BD16 CA25 CA44

4C076 AA95 CC01 CC04 CC07 CC11 CC15 CC16 CC18 CC19 CC32
 CC34 CC35 CC41 EE41 EE59 FF70

4C084 AA19 NA13 NA14 ZA02 ZA16 ZA36 ZA59 ZA61 ZA66 ZA96
 ZB11 ZB15 ZB33 ZB35 ZB37 ZC42 ZC75

4C085 AA13 AA14 BB11 CC22 DD33 DD62 DD63 EE01 EE03

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 BA72 CA40 DA50 DA76 DA86
 EA20 FA74 GA26

专利名称(译)	与ox40结合的抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2019213520A	公开(公告)日	2019-12-19
申请号	JP2019104214	申请日	2019-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	格兰马克药品股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	格伦标明药品, Essey啊.		
[标]发明人	アティンガーアントワネ ブレインスタニスラス バックジョナサンアルバート リッシラミ ハウサミュエル		
发明人	アティンガー,アントワネ ブレイン,スタニスラス バック,ジョナサン,アルバート リッシラ,ラミ ハウ,サミュエル		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C12P21/08 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/06 C07K16/46 A61K39/395 A61K47/68 A61K45/00 A61P43/00 A61P31/12 A61P31/04 A61P31/10 A61P33 /14 A61P19/02 A61P11/06 A61P11/00 A61P29/00 A61P1/04 A61P25/28 A61P1/00 A61P1/16 A61P17 /06 A61P9/00 A61P25/00 A61P37/02 A61P17/00 A61P37/08 A61P7/00 A61P13/12 A61P27/16 A61P1 /18 A61P17/02 A61P37/06 A61P9/10 A61P7/02 A61P19/00 A61P19/10 A61P1/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K45/06 A61K2039/505 C07K16/2878 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/41 C07K2317/52 C07K2317/53 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 A61P1/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/14 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/00 A61P7 /00 A61P7/02 A61P7/04 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P25/00 A61P25 /02 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P33/00 A61P33/14 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P41 /00 A61P43/00 G01N2333/70578 A61K39/3955		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C12P21/08 C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/06 C07K16/46 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K47/68 A61K45/00 A61P43/00.121 A61P31 /12 A61P31/04 A61P31/10 A61P33/14 A61P19/02 A61P11/06 A61P11/00 A61P29/00 A61P1/04 A61P25/28 A61P1/00 A61P1/16 A61P17/06 A61P9/00 A61P25/00 A61P37/02 A61P17/00 A61P37/08 A61P7/00 A61P13/12 A61P27/16 A61P1/18 A61P17/02 A61P37/06 A61P9/10 A61P7/02 A61P19/00 A61P19/10 A61P1/02 A61P43/00.111 G01N33/53.K		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QS10 4B063/QS39 4B063/QX01 4B064 /AG20 4B064/AG26 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/BD15 4B065/BD16 4B065/CA25 4B065/CA44 4C076 /AA95 4C076/CC01 4C076/CC04 4C076/CC07 4C076/CC11 4C076/CC15 4C076/CC16 4C076/CC18 4C076/CC19 4C076/CC32 4C076/CC34 4C076/CC35 4C076/CC41 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076 /FF70 4C084/AA19 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA16 4C084/ZA36 4C084/ZA59 4C084/ZA61 4C084/ZA66 4C084/ZA96 4C084/ZB11 4C084/ZB15 4C084/ZB33 4C084/ZB35 4C084 /ZB37 4C084/ZC42 4C084/ZC75 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC22 4C085/DD33 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/BA41 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA26		

代理人(译) 松任谷裕子

優先権 61/506491 2011-07-11 US

外部链接 Espacenet

摘要(译)

为了提供与人OX40结合的拮抗剂抗体或其片段，其制备方法和治疗OX40介导的疾病的方法。解决方案：本发明涉及与人OX40结合的拮抗剂抗体或其片段，其包含重链CDR1，其包含特定氨基酸序列和/或包含特定氨基酸序列的重链CDR2和/或包含特定氨基酸序列和/或包含轻链CDR1的包含特定氨基酸序列的重链CDR3和/或包含特定氨基酸序列的轻链CDR2和/或包含特定氨基酸序列的轻链CDR3。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2019-213520 (P2019-213520A)
		(43) 公開日 令和1年12月19日 (2019.12.19)
(51) Int. Cl. C12N 15/13 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01) C12N 1/15 (2006.01)	FI C12N 15/13 ZNA C07K 16/28 C12P 21/08 C12N 15/63 Z C12N 1/15 審査請求 有 請求項の数 67 O L (全 69 頁) 最終頁に続く	テーマコード (参考) 4B063 4B064 4B065 4C076 4C084
(21) 出願番号 特願2019-104214 (P2019-104214)	(71) 出願人 510188852	
(22) 出願日 令和1年6月4日 (2019.6.4)	ダレンマーク ファーマシューティカルズ	
(62) 分割の表示 特願2017-237351 (P2017-237351) の分割	, エセ. アー. スイス国 ツェーハー 2300 ラシ	
原出願日 平成24年7月9日 (2012.7.9)	ヨードーフォン, シュマン ドラ	
(31) 優先権主張番号 61/506,491	コンベタ 5	
(32) 優先日 平成23年7月11日 (2011.7.11)	(74) 代理人 弁理士 大野 聖二	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	100119183	
	弁理士 松任谷 優子	
	100149076	
	弁理士 梅田 慎介	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 OX40と結合する抗体およびその使用		