

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-518873

(P2010-518873A)

(43) 公表日 平成22年6月3日(2010.6.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 113 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-551698 (P2009-551698)	(71) 出願人	509012625
(86) (22) 出願日	平成20年2月26日 (2008.2.26)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成21年10月23日 (2009.10.23)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/002498		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(87) 国際公開番号	W02008/106116		ウェイ 1
(87) 国際公開日	平成20年9月4日 (2008.9.4)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/903,693		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成19年2月27日 (2007.2.27)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 アンタゴニスト抗OX40抗体および炎症性疾患および自己免疫性疾患の処置におけるその使用

(57) 【要約】

本発明は、ヒトOX40レセプター(CD134)およびそのフラグメントに対するアンタゴニスト抗体に関し、それにはアンタゴニスト抗体のアミノ酸配列およびその抗体をコードする核酸が包含される。前記抗体の軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域由来の抗原結合領域(CDR)もまた、本発明に包含される。本発明の別の局面は、炎症性疾患および自己免疫疾患を処置する際の抗OX40アンタゴニスト抗体の使用である。本発明は、アンタゴニスト抗体A10のヒト化配列、およびその抗体の結合部位のエピトープマッピングにも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト O X 4 0 エピトープに特異的に結合する、単離されたアンタゴニスト抗体であって、該抗体は：

a .

i . 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および / または

i i i . 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) ならびに / あるいは

b .

i . 配列番号 1 2 、 1 5 または 6 1 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ；および / または

i i i . (3) 配列番号 1 4 または 1 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、抗体。

【請求項 2】

前記抗体が：

a .

i . 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および

i i i . 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) および / または

b .

i . 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ；および

i i i . (3) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体が：

a .

i . 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および

i i i . 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) ならびに / または

b .

i . 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ；および

i i i . 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗体が：

a .

i . 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および

i i i . (3) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) ならびに / または

b .

i . 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ；

10

20

30

40

50

i i . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ; および
 i i i . (3) 配列番号 14 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3
 を含む軽鎖可変領域 (V L)
 を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗体が：

a .
 i . 配列番号 17 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ;
 i i . 配列番号 18 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ; および
 i i i . 配列番号 19 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ;
 を含む重鎖可変領域 (V H) ならびに / または

10

b .
 i . 配列番号 15 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ;
 i i . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ; および配列番号 16 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3
 を含む軽鎖可変領域 (V L)
 を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体が：

a . 配列番号 10 もしくは 11 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (V H)、および / または
 b . 配列番号 7、8 もしくは 9 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (V L)
 を含む、請求項 1 に記載の抗体。

20

【請求項 7】

前記抗体が：

a . 配列番号 25、26 もしくは 27 の核酸配列のいずれか 1 つによってコードされる重鎖可変領域 (V H) ; および / または
 b . 配列番号 20、21、22、23 もしくは 24 の核酸配列のいずれか 1 つによってコードされる軽鎖可変領域 (V L)
 を含む、請求項 1 に記載の抗体。

30

【請求項 8】

前記抗体が：

a . 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有する V H、および配列番号 7 もしくは 8 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列を有する V L ; または
 b . 配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を有する V H、および配列番号 9 に示されているアミノ酸配列を有する V L
 を含む、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 9】

前記抗体が：

a . 配列番号 25 の核酸配列によってコードされる V H、および配列番号 20 もしくは 21 の核酸配列によってコードされる V L ;
 b . 配列番号 26 の核酸配列によってコードされる V H、および配列番号 22、23 もしくは 24 の核酸配列によってコードされる V L ; または
 c . 配列番号 27 の核酸配列によってコードされる V H、および配列番号 22、23 もしくは 24 の核酸配列によってコードされる V L
 を含む、請求項 7 に記載の抗体。

40

【請求項 10】

前記 V H が、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の抗体。

50

【請求項 1 1】

前記 V H が、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 1 2】

前記 V H が、配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 1 3】

定常領域をさらに含む、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

C H 1、C H 2 または C H 3 ドメインを含む抗体定常領域をさらに含む、請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 5】

前記定常領域が、I g G 抗体由来である、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 1 6】

前記 I g G 抗体が、I g G 1 抗体、I g G 2 抗体、I g G 3 抗体または I g G 4 抗体である、請求項 1 5 に記載の抗体。

【請求項 1 7】

前記抗体が、ヒト抗体である、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 1 8】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、モノクローナル抗体または組換え抗体である、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 1 9】

前記抗体が、F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、一本鎖 F v、一本鎖抗体、ジスルフィド結合 F v、単ドメイン抗体、抗原結合フラグメント、ダイアボディ、トリアボディまたはミニボディである、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

標識をさらに含む、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 2 1】

細胞毒または免疫毒素をさらに含む、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 2 2】

請求項 1 に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 5】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体と、生理的に許容可能なキャリア、希釈剤、賦形剤および安定剤のうちの少なくとも 1 つとを含む組成物。

【請求項 2 6】

患者において O X - 4 0 媒介性障害を処置する方法であって、該方法は、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 のいずれか 1 項に記載の、有効量の抗体を該患者に投与する工程を包含し、ここで、該抗体は、O X 4 0 に対する O X 4 0 L の結合を阻止し、そして / または O X 4 0 に対する O X 4 0 L の結合に関連する 1 つ以上の機能を阻害する方法。

【請求項 2 7】

前記 O X 4 0 媒介性障害が、炎症性疾患または自己免疫疾患である、請求項 2 6 に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 28】

前記疾患が、アレルギー、喘息、または自己免疫および炎症に関連する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）、自己免疫性神経障害、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、重症筋無力症、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎（例えば、潰瘍性大腸炎）、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病、バセドウ病、サルコイドーシス、悪性貧血、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、血管炎（例えば、ウェゲナー肉芽腫症）、ベーチェット病、疱疹状皮膚炎、尋常性天疱瘡、白斑、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、橋本甲状腺炎、自己免疫性の卵巣炎および睾丸炎、副腎の自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症（例えば、強直性脊椎炎）、ライター症候群、またはシェーグレン症候群である、請求項 27 に記載の方法。

10

【請求項 29】

前記疾患が、アレルギー、喘息、または自己免疫および炎症に関連する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎（例えば、潰瘍性大腸炎）、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病またはバセドウ病である、請求項 27 に記載の方法。

20

【請求項 30】

前記抗体が、静脈内、腹腔内、吸入、筋肉内、皮下および経口経路を含む経路のうちの 1 つ以上を介して前記患者に投与される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 31】

患者において IgE 抗体産生を阻害することによって障害を処置するための方法であって、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 のいずれか 1 項に記載の、有効量の抗体を該患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 32】

前記障害が、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性皮膚炎、アナフィラキシー、じんま疹またはアトピー性皮膚炎である、請求項 31 に記載の方法。

30

【請求項 33】

哺乳動物において喘息の重症度を低下させるための方法であって、該方法は、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 のいずれか 1 項に記載の、有効量の抗体を該哺乳動物に投与する工程を包含し、ここで、該抗体は、以下の特性：（a）ヒト OX40 に、約 1×10^{-10} 乃至約 1×10^{-12} M の K_D で結合する；（b）OX40 への結合に関連する 1 つ以上の機能を阻害する；および（c）OX40 に対する OX40L の結合を阻害する、のうちの少なくとも 1 つを備えている、方法。

【請求項 34】

前記抗体が、約 1×10^{-12} 乃至約 1×10^{-11} M、約 1×10^{-11} 乃至約 1×10^{-10} M、約 1×10^{-10} 乃至約 1×10^{-9} M、約 1×10^{-9} 乃至約 1×10^{-8} M、または約 1×10^{-8} 乃至約 1×10^{-7} M の K_D でヒト OX40 に結合する、請求項 33 に記載の方法。

40

【請求項 35】

請求項 24 に記載の細胞を、抗体の産生に適した条件下で培養する工程および該抗体を単離する工程を包含する、抗体の生成方法。

【請求項 36】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載されたような抗体を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項 37】

医薬の調製における、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

50

【請求項 38】

OX 40に関連する疾患または障害を処置するための、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8または9のいずれか1項に記載の抗体の使用。

【請求項 39】

前記疾患が、アレルギー、喘息、または自己免疫および炎症に関連する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、自己免疫性神経障害、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、重症筋無力症、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎(例えば、潰瘍性大腸炎)、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病、バセドウ病、サルコイドーシス、悪性貧血、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、血管炎(例えば、ウェ

10

【請求項 40】

前記疾患が、アレルギー、喘息、または自己免疫および炎症に関連する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎(例えば、潰瘍性大腸炎)、接触過敏症反応、糖尿病またはクローン病である、請求項 39に記載の使用

20

【請求項 41】

OX 40を検出するための、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8または9に記載の抗体の使用。

【請求項 42】

サンプル中のOX 40を検出するための方法であって、該サンプルと、請求項 20に記載の抗体とを接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 43】

容器に入った所定量の請求項 1、2、3、4、5、6、7、8または9に記載の抗体、および別個の容器に入った緩衝液を備えた、キット。

30

【請求項 44】

容器に入った所定量の請求項 25に記載の組成物、および別個の容器に入った緩衝液を備えた、キット。

【請求項 45】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、8または9に記載の抗体を備えた、医療デバイス

【請求項 46】

吸入デバイスである、請求項 45に記載の医療デバイス。

【請求項 47】

請求項 25に記載の組成物を備えた、医療デバイス。

40

【請求項 48】

吸入デバイスである、請求項 47に記載の医療デバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 発明の分野

ヒトOX 40ポリペプチド、OX 40ポリペプチドフラグメントまたは他のOX 40エピトープに免疫特異的に結合する抗体が、本明細書中で提供される。本発明はまた、ヒトOX 40ポリペプチド、OX 40ポリペプチドフラグメントまたはOX 40エピトープに免疫特異的に結合するヒト化抗体にも関する。OX 40ポリペプチド、OX 40ポリペプ

50

チドフラグメントまたはOX40エピトープに免疫特異的に結合する抗体をコードする、単離された核酸もまた提供される。本発明はさらに、ヒトOX40ポリペプチド、OX40ポリペプチドフラグメントまたはOX40エピトープに免疫特異的に結合する抗体をコードする核酸を含むベクターおよび宿主細胞、ならびにそれらの抗体を作製する方法を提供する。本明細書中に提供される抗OX40抗体を使用して、OX40の生物学的活性を阻害する方法、および/またはOX40媒介性疾患を処置もしくは予防する方法もまた提供される。

【背景技術】

【0002】

2. 発明の背景

われわれの免疫系は、外来性の病原体から自身の身体を防御するものであり、外来性物質に対する免疫の活性化と、自己組織に対する寛容とのバランスを必要とする機能である。例えば、ウイルス病原体が原因の急性感染症は、2つのタイプの長期間記憶：体液性免疫（Bリンパ球（B細胞）が、抗体を産生することにより、これらの外来性病原体による感染を防ぐ）；および細胞性免疫（特定の抗原によって活性化されたTリンパ球（T細胞）が、感染細胞を殺滅し、サイトカインも産生する）を誘導する。T細胞は、主に細胞性免疫において機能し、リンパ球の約70%を構成する。T細胞の大部分は、CD4+「ヘルパー」T細胞であり、主にB細胞およびマクロファージの活性化に参与する。CD8+T細胞、すなわち細胞傷害性Tリンパ球（CTL）は、細胞媒介性の細胞傷害性反応に参与し、T細胞集団の約35%を構成する。T細胞は、3つの異なる集団：ナイーブ細胞、エフェクター細胞および記憶細胞に分けることができる。ナイーブT細胞は、抗原の存在下において活性化し、エフェクター細胞になる。主要組織適合遺伝子複合体クラスI（MHCクラスI）分子は、侵入病原体の抗原をT細胞レセプターに「提示」することによって、このエフェクター応答において主要な役割を果たし、また、その病原体を認識し、それらを攻撃する。

【0003】

多くのレセプター-リガンド相互作用は、外来抗原に対する免疫応答の誘導、確立および調節に参与する。少なくとも2つのシグナルが、ある1つの抗原に対するCD4+またはCD8+T細胞応答を活性化するために必要である。第1のシグナルは、抗原提示細胞（APC）の表面上の主要組織適合（MHC）クラスIまたはII分子に結合した抗原によって、T細胞レセプター（TCR）を介して送達される。第2のシグナルは、T細胞の表面上の第2のレセプター分子と、APCの表面上に存在するリガンドとの結合に参与する。この第2のシグナルは、共刺激と呼ばれ、APCリガンドは、しばしば共刺激分子と呼ばれる（非特許文献1）。共刺激シグナル伝達分子としては、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバー、腫瘍壊死因子レセプター（TNFR）スーパーファミリーのメンバー、およびサイトカインレセプターが挙げられる（総説の非特許文献2；非特許文献3参照）。これらの2つのシグナルは、組み合わせされると、T細胞を活性化し、それによりサイトカインが分泌され、増殖する。

【0004】

共刺激分子の1つの例は、TNFRスーパーファミリーのメンバーのOX40レセプター（CD134）であり、これは、膜結合型であり、主に活性化CD4+T細胞上で（すなわち、炎症部位において）発現される（非特許文献4）。そのリガンド（OX40L）は、TNFファミリーに属するII型膜タンパク質であり、抗原提示細胞（例えば、活性化B細胞、樹状細胞および内皮細胞）上で発現される（Stuberら、Immunity 2:507（1995）；Weinbergら、J Immunol 162:1818（1999）；Noharaら、J Immunol 166:2108（2001）；Malmsstromら、J Immunol 166:6972（2001））。OX40レセプター（本明細書中以後「OX40」）を介するシグナル伝達は、エフェクターT細胞に対する共刺激であり、T細胞の増殖を引き起こす（Weinberg, J Immunol 152:4712（1994）；総説のWatts, Annu Rev

10

20

30

40

50

Immunol 23:23(2005)参照)。OX40の研究によって、その主な役割が、主要な免疫応答において蓄積するエフェクターT細胞の数を決定し、その結果、その後発達し、生存する記憶T細胞の数を管理することであると示唆されている(総説の非特許文献2参照)。

【0005】

いくつかのインビトロ研究では、OX40が、T細胞増殖およびサイトカイン産生の増強をもたらす共刺激シグナルを提供すると示されている(Baum PRら、EMBO J, 1994; Akiba Hら、Biochem. Biophys. Res, 1998)。OX40/OX40L相互作用は、ある特定の状況において、Th2細胞の発達において優先的な役割を果たし得ることが示唆されている(Ohshimaら、Blood 92:3338(1998); Flynnら、J Exp Med 188:297(1998))。免疫活性化が、過剰であるか、または制御されていないとき、異常なアレルギー、喘息、炎症、自己免疫性疾患および他の関連疾患が生じることがある。そのような場合において、T細胞の活性化および分化は、重要な役割を果たす。OX40は、免疫応答を増強するように機能するので、自己免疫性疾患および炎症性疾患を悪化させることがある。OX40-OX40Lの相互作用は、いくつかの疾患モデルの病原に結びつけられている。大多数の証拠から、OX40-OX40L相互作用が、アレルギー、喘息、ならびに自己免疫および炎症に関連する疾患(それらとしては、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、実験的リーシュマニア症(experimental leishmaniasis)、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎(例えば、潰瘍性大腸炎)、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病およびパセドウ病が挙げられる)において重要な役割を果たすことが示唆されている(Arestidesら、Eur J Immunol 32:2874(2002); Jemberら、J Exp Med 193:387(2001); 非特許文献3; Pakalaら、Eur J Immunol 34:3039(2004); Xiaoyanら、Clin Exp Immunol 143:110(2006); Weinbergら、J Immunol 152:4712(1994); Weinbergら、Nat Med 2:183(1996); Malstromら、J Immunol 166:6972(2001); Higginsら、J Immunol 162:486(1999); Akibaら、J Exp Med 191:375(2000); Stuberら、Gastroenterology 115:1205(1998); Tsukadaら、Blood 95:2434(2000); Yoshiokaら、Eur J Immunol 30:2815(2000); Stuberら、Eur J Clin Invest 30:594(2000); Bossowskiら、J Pediatr Endocrinol Metab 18:1365(2005); 総説のWatts, Annu Rev Immunol 23:23(2005)参照)。

【0006】

自己免疫性疾患および炎症性疾患に対する現在の治療としては、ステロイド単独の長期間の投与、または細胞傷害性薬物および/もしくは生物製剤との併用でのステロイドの長期間の投与が挙げられる。TNF- α に対する抗体は、現在、関節リウマチ、クローン病および炎症性腸疾患をはじめとしたいくつかの疾患に対して処方されている。さらに、臨床評価における新規の実験的治療は、関節リウマチに対する、融合タンパク質CTLA4-Ig(可溶性の細胞傷害性Tリンパ球関連抗原-4)である。これらの代替物が出現してきたにもかかわらず、ほとんどの免疫抑制性の治療は、患者の免疫無防備状態をはじめとした重篤な副作用を引き起こす。T細胞媒介性疾患の処置は、理想的には、疾患を引き起こす[抗原特異的]細胞を標的化するものであるが、残りのT細胞レパートリーを残しうるものであろう(Weinberg, Trends Immunol 23:102(2002))。ゆえに、自己免疫性疾患および炎症性疾患に対する代替療法が強く求められている。

【0007】

これらの方法に加えて、T細胞集団を増加させるようにレセプターを刺激する多くのアゴニスト抗OX40抗体が開発されている。初めて公開された抗OX40モノクローナル抗体(mAb)のMRC OX-40は、活性化ラットCD4⁺T細胞上の細胞表面抗原としてレセプターを認識するマウス抗体だった(非特許文献4)。この抗体は、T細胞増殖アッセイを刺激する際に、中程度の作用を有していた。それ以来、多くのアゴニスト抗OX40 mAbが作製され、免疫応答を高めるために用いられている(Weatherillら、Cell Immunol 209:63(2001); Banal-Pakalalaら、Nat Med 7:907(2001); De Smedtら、J Immunol 168:661(2002); Panら、Mol Ther 6:528(2002); Curtiら、Blood 101:568(2003); Nakaeら、Proc Natl Acad Sci USA 100:5986(2003); Lustgartenら、Eur J Immunol 34:752(2004); Soら、J Immunol 172:4292(2004); Kogaら、Cancer Sci 95:411(2004); Lanthorpら、J Immunol 172:6735(2004); Polymenidouら、Proc Natl Acad Sci USA 101 Suppl 2:14670(2004); Lustgartenら、J Immunol 173:4510(2004); Valzasinaら、Blood 105:2845(2005); Cuadrosら、Int J Cancer 116:934(2005); Sharmaら、Exp Gerontol 41:78(2006))。しかしながら、先に述べた自己免疫性疾患および炎症性疾患では、T細胞集団の刺激は、望まれる結果ではない。

【0008】

抗OX40L抗体を使用することによってOX40-OX40Lシグナル伝達を阻止することが、1つの治療法である。OX40Lを標的化するいくつかのmAbが生成され、OX40シグナル伝達経路、他の経路に対するその作用、および様々な疾患におけるOX40の役割を解明するために試験された(例えば、Blazarら、Blood 101:3741(2003); Ukyoら、Immunology 109:226(2003); Wangら、Tissue Antigens 64:566(2004); Chouら、J Immunol 174:436(2005)参照)。OX40シグナルを阻害する他の方法としては、抗OX40免疫毒素、OX40-IgG融合タンパク質、およびOX40リボソームの使用が挙げられる(Weinbergら、Nat Med 2:193(1996); Higginsら、J Immunol 162:486(1999); Satakeら、Biochem Biophys Res Commun 270:1041(2000); Taylorら、J Leukoc Biol 72:522(2002); Bootら、Arthritis Res Ther 7:R604(2005))。

【0009】

上記リガンドを標的化する別の方法は、OX40レセプター(CD134)に対する治療を開発することである。アンタゴニスト抗OX40抗体を作製する試みがなされている。Stuberおよび共同研究者らは、ポリクローナルウサギ抗マウスOX40抗体を用いることにより、OX40とOX40Lとの相互作用を阻害した(J Exp Med 183:979(1996))。Imuraらは、OX40経路によって媒介されるプロセスである、血管内皮細胞に対するCD4⁺T細胞の接着およびT細胞の増殖を阻害する抗マウスOX40抗体131および315を作製した。Weinbergによって開示された抗ヒトOX40抗体は、活性化CD4⁺T細胞を枯渇させる能力を示した;しかしながら、その抗体は、リシン-A鎖などの毒性分子への抗体の結合体化に依存するものであった(特許文献1)。市販されているL106などの、開示されている他の抗OX40抗体は、機能的な活性を有しなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

【特許文献1】米国特許第5,759,546号明細書

【非特許文献】

【 0 0 1 1 】

【非特許文献1】Lenschowら、Annu Rev Immunol (1996) 14:233

【非特許文献2】Croft, Cytokine Growth Factor Rev (2003) 14:265

【非特許文献3】Kroczeckら、J Allergy Clin Immunol (2005) 116:906

10

【非特許文献4】Paterersonら、Mol Immunol (1987) 24:1281

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 2 】

したがって、OX40経路を干渉することができ、ヒトOX40を標的化する、真の機能性アンタゴニスト抗体が求められている。そのような抗体は、現在、ニーズがあり、まだ対処されていない多くの疾患を処置する可能性を有する。本発明は、このまだ対処されていない医療ニーズを解決するものである。

【課題を解決するための手段】

20

【 0 0 1 3 】

3. 発明の概要

1つの局面において、本発明は、ヒトOX40レセプター(CD134)およびそのフラグメントに対するアンタゴニスト抗体に関する。別の実施形態は、アンタゴニスト抗体のアミノ酸配列およびその抗体をコードする核酸を包含する。

【 0 0 1 4 】

前記抗体の軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域由来の抗原結合領域(CDR)もまた本発明に包含される。本発明の抗体は、組換え抗体であり得る。本発明の抗体は、モノクローナルであり得、モノクローナル抗体は、ヒト抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体であり得る。

30

【 0 0 1 5 】

本発明は、配列番号17のアミノ酸配列を有するVH CDR1;配列番号18のアミノ酸配列を有するVH CDR2;および/または配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む重鎖可変領域(VH);ならびに/あるいは配列番号12、15もしくは61のアミノ酸配列を有するVL CDR1;配列番号13のアミノ酸配列を有するVL CDR2;および/または配列番号14もしくは16のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体を包含する。ある実施形態において、本抗体は、配列番号17、18もしくは19から選択されるアミノ酸配列を有する2つのVH CDR、および/または配列番号12、13、14、15、16もしくは61から選択されるアミノ酸配列を有する2つのVL CDRを含む。

40

【 0 0 1 6 】

本発明は、配列番号17のアミノ酸配列を有するVH CDR1;配列番号18のアミノ酸配列を有するVH CDR2;および配列番号19のアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む重鎖可変領域(VH);ならびに/または配列番号12のアミノ酸配列を有するVL CDR1;配列番号13のアミノ酸配列を有するVL CDR2;および配列番号14のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む軽鎖可変領域(VL)を含む抗体を包含する。

【 0 0 1 7 】

本発明は、配列番号17のアミノ酸配列を有するVH CDR1;配列番号18のアミノ酸配列を有するVH CDR2;および配列番号19のアミノ酸配列を有するVH C

50

D R 3を含む重鎖可変領域 (V H) ; ならびに / または配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ; 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ; および配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 を有する軽鎖可変領域 (V L) を含む抗体を包含する。

【 0 0 1 8 】

本発明は、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ; および配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含む重鎖可変領域 (V H) ; ならびに / または : 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ; 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ; および配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域 (V L) を含む抗体を包含する。

10

【 0 0 1 9 】

本発明は、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ; 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ; および配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含む重鎖可変領域 (V H) ; ならびに / または配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ; 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ; および配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域 (V L) を含む抗体を包含する。

【 0 0 2 0 】

本発明は、配列番号 1 0 もしくは 1 1 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (V H) 、および / または配列番号 7、8 もしくは 9 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (V L) を含む抗体を包含する。

20

【 0 0 2 1 】

本発明は、配列番号 2 5、2 6 もしくは 2 7 の核酸配列のいずれか 1 つによってコードされる重鎖可変領域 (V H) ; および / または配列番号 2 0、2 1、2 2、2 3 もしくは 2 4 のいずれか 1 つの核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域 (V L) を含む抗体を包含する。

【 0 0 2 2 】

本発明は、配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列を有する V H および配列番号 7 もしくは 8 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列を有する V L ; 配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列を有する V H および配列番号 9 に示される V L ; 配列番号 2 5 の核酸配列によってコードされる V H および配列番号 2 0 もしくは 2 1 の核酸配列によってコードされる V L ; 配列番号 2 6 の核酸配列によってコードされる V H および配列番号 2 2、2 3 もしくは 2 4 の核酸配列によってコードされる V L ; または配列番号 2 7 の核酸配列によってコードされる V H および配列番号 2 2、2 3 もしくは 2 4 の核酸配列によってコードされる V L を含む抗体を包含する。

30

【 0 0 2 3 】

本発明は、V H が配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列を含み、V L が配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む、抗体を包含する。

【 0 0 2 4 】

本発明は、V H が配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列を含み、V L が配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む、抗体を包含する。

40

【 0 0 2 5 】

本発明は、V H が配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列を含み、V L が配列番号 9 に示されるアミノ酸配列を含む、抗体を包含する。

【 0 0 2 6 】

本発明は、V H が、ストリンジェントな条件下で、配列番号 1 0、1 1、1 7、1 8 または 1 9 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の相補鎖 (c o m p l e m e n t) にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされ ; そして / または V L が、ストリンジェントな条件下で、配列番号 7、8、9、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6 また

50

は 6 1 のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる、抗体を包含する。

【 0 0 2 7 】

本発明は、V H が、ストリンジェントな条件下で、配列番号 2 5、2 6 もしくは 2 7 のうちのいずれか 1 つに示されるようなヌクレオチド配列の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされ；そして / または V L が、ストリンジェントな条件下で、配列番号 2 0、2 1、2 2、2 3 もしくは 2 4 のうちのいずれか 1 つに示されるようなヌクレオチド配列の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる、抗体を包含する。

【 0 0 2 8 】

本発明は、約 1×10^{-12} ~ 約 1×10^{-11} M、約 1×10^{-11} ~ 約 1×10^{-10} M、約 1×10^{-10} ~ 約 1×10^{-9} M、約 1×10^{-9} ~ 約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-8} ~ 約 1×10^{-7} M の解離定数でヒト O X 4 0 エピトープに特異的に結合する、単離されたアンタゴニスト抗体を包含する。

【 0 0 2 9 】

本発明は、配列番号 7 に示される配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、および配列番号 1 0 に示される配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列を包含する。

【 0 0 3 0 】

本発明は、配列番号 8 に示される配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、および配列番号 1 0 に示される配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列を包含する。

【 0 0 3 1 】

本発明は、配列番号 9 に示される配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、および配列番号 1 1 に示される配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列を包含する。

【 0 0 3 2 】

本発明はまた、配列番号 1 7 (C D R - H 1)、配列番号 1 8 (C D R - H 2) および配列番号 1 9 (C D R - H 3) を含む重鎖可変領域、ならびに / または配列番号 1 2、配列番号 1 5 もしくは配列番号 6 1 (C D R - L 1)；配列番号 1 3 (C D R - L 2)；および配列番号 1 4 もしくは配列番号 1 6 (C D R - L 3) を含む軽鎖可変領域を含む抗体分子も包含する。

【 0 0 3 3 】

本発明は、本発明の抗体のヒト抗原結合抗体フラグメントを包含し、そのようなフラグメントとしては、F a b、F a b' および F (a b')₂、F d、一本鎖 F v (s c F v)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合 F v s (s d F v)、ダイアボディ、トリアボディ (t r i a b o d i e s) またはミニボディ (m i n i b o d i e s) が挙げられるがこれらに限定されない。本発明はまた、V L ドメインまたは V H ドメインのいずれかを含む単一ドメイン抗体も包含する。

【 0 0 3 4 】

本発明は、モノクローナル抗体 A 1 0 (T H) h u 3 3 6 F およびそのバリエーションのヒト化配列を包含する。これらのバリエーションをコードする核酸は、配列番号 2 0 ~ 2 7 を含む。A 1 0 (T H) h u 3 3 6 F は、配列番号 9 を含む軽鎖可変領域および配列番号 1 1 を含む重鎖可変領域を含む。その可変重鎖領域は、定常領域の C H 1、C H 2 および C H 3 ドメインのうちの少なくとも 1 つのドメインをさらに含んでもよい。その重鎖定常領域は、I g G 抗体であり得、ここで、その I g G 抗体は、I g G 1 抗体、I g G 2 抗体、I g G 3 抗体または I g G 4 抗体である。

【 0 0 3 5 】

本発明の抗体は、O X 4 0 に対する結合活性が実質的に保持されている場合、任意の適当なフレームワーク可変ドメイン配列を含むことができる。例えば、いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

において、本発明の抗体は、ヒトサブグループ I I I 重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。これらの抗体の 1 つの実施形態において、そのフレームワークコンセンサス配列は、71 位、73 位および / または 78 位に置換を含む。これらの抗体のいくつかの実施形態において、71 位は、A であり、73 位は、T であり、そして / または 78 位は、A である。1 つの実施形態において、これらの抗体は、huMAb4D5-8 (HERCEPTIN (登録商標), Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (米国特許第 6,407,213 号および同第 5,821,337 号ならびに Lee ら、J. Mol. Biol. (2004), 340 (5): 1073-93 においても言及されている) の重鎖可変ドメインフレームワーク配列を含む。1 つの実施形態において、これらの抗体は、ヒト κ I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列をさらに含む。1 つの実施形態において、本抗体は、図 12B (IGHV1-46 配列) に示される、サブグループ V1 の IGHV1-46 (GeneBank アクセッション番号 X92343) と、生殖系列 IGHJ4 (GeneBank アクセッション番号 J00256) との組み合わせを含む。1 つの実施形態において、上記フレームワーク配列は、69 位に置換を含む。いくつかの実施形態において、69 位は、L である。V_L 鎖について選択されたヒト鋳型は、図 12A (IGKV4-1 配列) に示される、IGKV4-1 (GeneBank アクセッション番号 Z00023) と、生殖系列 J 鋳型 IGHJ1 (GeneBank アクセッション番号 J00242) との組み合わせだった。

10

【0036】

1 つの実施形態において、本発明の抗体は、フレームワーク配列が、配列番号 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47 および / または 48 の配列を含む重鎖可変ドメインを含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は、フレームワーク配列が配列番号 49、50、51 および / または 52 の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。

20

【0037】

1 つの実施形態において、本発明の抗体は、フレームワーク配列が配列番号 57、58、59 および / または 60 の配列を含む、重鎖可変ドメインを含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は、フレームワーク配列が配列番号 53、54、55 および / または 60 の配列を含む、軽鎖可変ドメインを含む。

30

【0038】

1 つの実施形態において、本発明の抗体は、フレームワーク配列が配列番号 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47 および / または 48 の配列を含み、HVR H1、H2 および H3 配列がそれぞれ配列番号 17、18 および / または 19 である、重鎖可変ドメインを含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は、フレームワーク配列が配列番号 49、50、51 および / または 52 の配列を含み、HVR L1、L2 および L3 配列がそれぞれ配列番号 12、13 および / または 16 である、軽鎖可変ドメインを含む。

【0039】

1 つの実施形態において、本発明の抗体は、フレームワーク配列が配列番号 57、58、59 および / または 60 の配列を含み、HVR H1、H2 および H3 配列が、それぞれ配列番号 17、18 および / または 19 である、重鎖可変ドメインを含む。1 つの実施形態において、本発明の抗体は、フレームワーク配列が配列番号 53、54、55 および / または 56 の配列を含み、HVR L1、L2 および L3 配列がそれぞれ配列番号 12、13 および / または 16 である、軽鎖可変ドメインを含む。

40

【0040】

本発明は、検出可能なタグをさらに含んでいる抗 OX40 抗体を包含する。本発明は、インビボにおいて、またはサンプル中の、OX40 を検出する方法をさらに包含する。そのような方法は、OX40 抗体を、被験体または被験体から得たサンプルと接触させる工程を包含する

本発明は、標識をさらに含んでいる抗体を包含する。

50

【 0 0 4 1 】

本発明は、細胞毒または免疫毒素をさらに含む、上に記載した抗 O X 4 0 抗体、および以下に記載する疾患または状態を処置する際のそれらの使用を包含する。

【 0 0 4 2 】

本発明は、抗体 A 1 0 (T H) h u 3 3 6 F と同じエピトープに結合する抗体も包含する。

【 0 0 4 3 】

本発明は、本発明の抗体をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を包含する。

【 0 0 4 4 】

本発明は、本発明の核酸分子を含むベクターを包含する。

【 0 0 4 5 】

本発明は、本発明のベクターを含む宿主細胞を包含する。

【 0 0 4 6 】

本発明は、本発明の抗体を産生するハイブリドーマを包含する。

【 0 0 4 7 】

本発明は、本発明の抗体をコードする、単離された核酸分子を包含し、ここで、そのヌクレオチド配列は、配列番号 2 0、2 1、2 2、2 3 もしくは 2 4 のうちのいずれか 1 つを含む。

【 0 0 4 8 】

本発明は、配列番号 7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8 または 1 9 のアミノ酸配列を含む本発明の抗体をコードする、単離された核酸分子を包含する。

【 0 0 4 9 】

本発明は、配列番号 1 0、1 1、1 7、1 8 もしくは 1 9 のうちのいずれか 1 つに示されるか、または配列番号 2 5、2 6 もしくは 2 7 の核酸配列によってコードされる重鎖可変領域 (V H) アミノ酸配列、および / あるいは、配列番号 7、8、9、1 2、1 3、1 4、1 5 もしくは 1 6 のいずれか 1 つに示されるか、または配列番号 2 0、2 1、2 2、2 3 もしくは 2 4 の核酸配列によってコードされる軽鎖可変領域 (V L) アミノ酸配列、をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子を包含する。

【 0 0 5 0 】

本発明は、特許請求される本発明の抗体を生理的に許容可能なキャリア、希釈剤、賦形剤または安定剤とともに含む組成物を包含する。

【 0 0 5 1 】

本発明は、特許請求される本発明の抗体を作製するための方法を包含し、この方法は、本発明の細胞を、抗体の作製および抗体の単離に適した条件下で培養する工程を包含する。

【 0 0 5 2 】

本発明の別の局面は、炎症性疾患および自己免疫疾患の処置における抗 O X 4 0 アンタゴニスト抗体の使用である。

【 0 0 5 3 】

本発明は、患者において I g E 抗体産生を阻害することによって障害を予防するための方法を包含し、この方法は、患者に本発明の有効量の抗体を投与する工程を包含する。上記障害としては、喘息 (例えば、アレルギー性喘息)、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、移植拒絶反応およびアテローム性動脈硬化症が挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 0 5 4 】

本発明は、患者において I g E 抗体産生を阻害するための方法を包含し、この方法は、患者に特許請求される本発明のアンタゴニスト抗 O X 4 0 抗体を投与する工程を包含する。I g E 抗体産生の阻害によって、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性皮膚炎

10

20

30

40

50

、アナフィラキシー、じんま疹およびアトピー性皮膚炎が予防され得る。

【0055】

本発明は、患者においてOX-40媒介性障害を処置する方法を包含し、この方法は、患者に特許請求される本発明の有効量の抗体または抗原結合フラグメントを投与する工程を包含し、ここで、前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、OX40に対するOX40Lの結合を阻止し、そして/またはOX40に対するOX40Lの結合に関連する1つ以上の機能を阻害する。

【0056】

本発明は、喘息の症状に苦しんでいる被験体を処置する方法を包含し、この方法は、被験体、例えば、そのような処置の必要のある被験体に、喘息の症状を減少させるのに有効な、特許請求される本発明のある量の抗体を投与する工程を包含する。

10

【0057】

本発明の抗体は、静脈内、腹腔内、吸入、筋肉内、皮下および経口経路を含む経路のうちの1つ以上によって投与され得る。本発明は、特許請求される本発明の治療有効量の抗体を患者に送達する吸入デバイスを包含する。

【0058】

本発明は、哺乳動物において喘息の重症度を低下させるための方法を包含し、この方法は、以下の特性：約 1×10^{-10} ~ 約 1×10^{-12} Mの K_D でヒトOX40に結合する能力；OX40レセプターへの結合および前記レセプターに対するOX40Lの結合の阻害に関連する1つ以上の機能を阻害する能力、のうちの少なくとも1つを有する、治療有効量の抗OX40抗体を哺乳動物に投与する工程を包含する。

20

【0059】

ある特定の実施形態において、本抗体は、約 1×10^{-12} ~ 約 1×10^{-11} M、約 1×10^{-11} ~ 約 1×10^{-10} M、約 1×10^{-10} ~ 約 1×10^{-9} M、約 1×10^{-9} ~ 約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-8} ~ 約 1×10^{-7} Mの解離定数でヒトOX40に結合する。

【0060】

本発明は、哺乳動物において喘息の重症度を低下させるための方法を包含し、この方法は、哺乳動物に有効量の抗体を投与する工程を包含し、ここで、その抗体は、以下の特性：(a) ヒトOX40に、約 1×10^{-12} ~ 約 1×10^{-8} Mの K_D で結合する；(b) OX40に対する結合に関連する1つ以上の機能を阻害する；および(c) OX40に対するOX40Lの結合を阻害する、のうちの少なくとも1つを備えている。

30

【0061】

本発明の抗体は、以下のものに限定されないが、アレルギー、喘息、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、自己免疫性神経障害(例えば、ギラン・バレー)、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、重症筋無力症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎(例えば、潰瘍性大腸炎)、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病およびバセドウ病の処置にも有用であり得る。

【0062】

本発明の抗体はまた、サルコイドーシス、実験的リーシュマニア症、悪性貧血、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、血管炎(例えば、ウェゲナー肉芽腫症)、ベーチェット病、疱疹状皮膚炎、尋常性天疱瘡、白斑、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、橋本甲状腺炎、自己免疫性の卵巣炎および睾丸炎、副腎の自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症(例えば、強直性脊椎炎)、ライター症候群、シェーグレン症候群およびその他のものの処置にも有用であり得る。

40

【0063】

本発明は、薬物調製の際の本発明の抗体の使用を包含する。

【0064】

本発明は、OX40に関連する疾患または障害を処置するための、本発明の抗体の使用

50

を包含する。

【 0 0 6 5 】

本発明は、OX40を検出するための、本発明の抗体の使用を包含する。

【 0 0 6 6 】

本発明は、容器に入った所定量の本発明の抗体および別個の容器に入った緩衝液を備えるキットを包含する。

【 0 0 6 7 】

本発明は、容器に入った所定量の本発明の組成物および別個の容器に入った緩衝液を備えるキットを包含する。

【 0 0 6 8 】

本発明は、本発明の抗体を備える医療デバイスを包含する。

【 0 0 6 9 】

本発明は、本発明の組成物を備える医療デバイスを包含する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 0 】

【図1A】ヒトOX40 cDNAに対する核酸配列（アクセッション番号 NM__004295）を示している。

【図1B】ヒトOX40タンパク質に対するアミノ酸配列（アクセッション番号 NM__003318）を示している。

【図2】インビトロにおいて活性化されたナイーブヒトCD4+T細胞によるIL-2（2A）およびIL-13（2B）の産生に対するマウス抗OX40 mAbであるB66の阻害作用を示している。

【図3】インビトロにおいて活性化されたナイーブヒトCD4+T細胞の増殖に対するマウス抗OX40 mAbであるB66の阻害作用を示している。

【図4】インビトロにおいてプライミングされたヒトTh2細胞に対するキメラ抗OX40 mAbであるA10およびB66のアポトーシス作用を示している。

【図5】インビトロにおいてプライミングされたヒトTh2細胞の増殖に対するキメラ抗OX40 mAbであるA10およびB66の阻害作用を示している。白四角は、ナイーブCD4を表し；白三角は、コントロールL細胞を用いたときのナイーブCD4+を表し；黒三角は、ナイーブCD4+およびOX40L-L細胞を用いたときのB66を表し；黒四角は、ナイーブCD4+およびOX40L-L細胞を用いたときの2C4（IC）を表し；そして黒丸は、ナイーブCD4+およびOX40L-L細胞を用いたときのA10を表す。

【図6】インビトロにおいてプライミングされたヒトTh2細胞によるIL2（6A）およびIL-13（6B）の産生に対するキメラ抗OX40 mAbであるA10およびB66の阻害作用を示している。白四角は、ナイーブCD4を表し；白三角は、コントロールL細胞を用いたときのナイーブCD4+を表し；黒三角は、ナイーブCD4+およびOX40L-L細胞を用いたときのB66を表し；黒四角は、ナイーブCD4+およびOX40L-L細胞を用いたときの2C4（IC）を表し；そして黒丸は、ナイーブCD4+およびOX40L-L細胞を用いたときのA10を表す。

【図7】インビトロにおいて活性化されたナイーブヒトCD4+T細胞によるIL-2およびIL-13の産生に対する、キメラ抗OX40 mAbであるB66と市販の抗OX40 mAbであるL106との阻害作用の比較を示している表。

【図8】インビトロにおいて活性化されたナイーブヒトCD4+T細胞の増殖、ならびにそれらのIL-2、IL-5およびIL-13の産生に対する、ヒト化、キメラおよびマウス抗OX40 mAb A10の阻害作用を示している表。

【図9】インビトロにおいてプライミングされたヒトTh1細胞の増殖、ならびにそれらのIL-2、IL-5およびIL-13の産生に対する、ヒト化、キメラおよびマウス抗OX40 mAb A10の阻害作用を示している表。

【図10】インビトロにおいてプライミングされたヒトTh2細胞の増殖、ならびにそれ

10

20

30

40

50

らの I L - 2、I L - 5 および I L - 13 の産生に対する、ヒト化、キメラおよびマウス抗 O X 40 m A b A 10 の阻害作用を示している表。

【図 11】同種異系 T S L P 活性化ミエロイド樹状細胞を用いたときの、インビトロにおいてプライミングされたヒト T h 2 細胞の増殖、ならびにそれらの I L - 2、I L - 5 および I L - 13 の産生に対する、ヒト化、キメラおよびマウス抗 O X 40 m A b A 10 の阻害作用を示している表。

【図 12 A】ヒト鑄型 I G K V 4 - 1 / I G K J 1 と比較しながら、マウス抗体 A 10 および B 66 に対する可変軽鎖アミノ酸配列、ならびに A 10 (T H) h u 336 F の得られたヒト化配列を示している。上に付いている番号は、K a b a t に従ったアミノ酸位置を示している。

【図 12 B】ヒト鑄型 I G H V 1 - 46 / I G H J 4 と比較しながら、マウス抗体 A 10 に対する可変重鎖アミノ酸配列、および A 10 (T H) h u 336 F の得られたヒト化配列を示している。上に付いている番号は、K a b a t に従ったアミノ酸位置を示している。

【図 13】親マウス抗体 A 10 (黒塗りの円) およびそのキメラ型 (黒塗りの三角形) よりも、ヒト化クローン A 10 (T H) h u 336 F (黒塗りの四角形) の結合活性が高いことを示している。

【図 14 - 1】抗 O X 40 のマウス可変領域およびヒト化可変領域の核酸配列を示している：A) 軽鎖カッパー可変 252 - A 10 ; B) 軽鎖カッパー可変 252 - B 66 ; C) ヒト化軽鎖可変 A 10 (S N)、全抗体 B および E ; D) ヒト化軽鎖可変 A 10 (S H)、全抗体 A および D ; E) ヒト化軽鎖可変 A 10 (T H) h u 336、全抗体 C および F ; F) 重鎖可変 252 - A 10 ; G) 重鎖可変 A 10 (T H) h u 336、全抗体 D - F ; H) 重鎖可変 A 10 L 70、全抗体 A - C。

【図 14 - 2】抗 O X 40 のマウス可変領域およびヒト化可変領域の核酸配列を示している：A) 軽鎖カッパー可変 252 - A 10 ; B) 軽鎖カッパー可変 252 - B 66 ; C) ヒト化軽鎖可変 A 10 (S N)、全抗体 B および E ; D) ヒト化軽鎖可変 A 10 (S H)、全抗体 A および D ; E) ヒト化軽鎖可変 A 10 (T H) h u 336、全抗体 C および F ; F) 重鎖可変 252 - A 10 ; G) 重鎖可変 A 10 (T H) h u 336、全抗体 D - F ; H) 重鎖可変 A 10 L 70、全抗体 A - C。

【図 15】ヒト化クローン A 10 (T H) h u 336 F (黒塗りの四角形)、マウス A 10 (黒塗りの円) およびそのキメラ型 (黒塗りの三角形) が、O X 40 に対して等しく十分に競合することを示している。

【図 16 A】以下のとおりの、本発明を実施する際に使用するための例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を配列識別名とともに示している：可変重鎖 (V H) コンセンサスフレームワーク (図 16 A、16 B) ヒト V H サブグループ I コンセンサスフレームワーク - K a b a t C D R (配列番号 30 ; ヒト V H サブグループ I コンセンサスフレームワーク - 延長された超可変領域 (配列番号 31 ~ 33) ; ヒト V H サブグループ I I コンセンサスフレームワーク - K a b a t C D R (配列番号 34) ; ヒト V H サブグループ I I コンセンサスフレームワーク - 延長された超可変領域 (配列番号 35 ~ 37) ; ヒト V H サブグループ I I I コンセンサスフレームワーク - K a b a t C D R (配列番号 38) ; ヒト V H サブグループ I I I コンセンサスフレームワーク - 延長された超可変領域 (配列番号 39 ~ 41) ; ヒト V H アクセプターフレームワーク - K a b a t C D R (配列番号 42) ; ヒト V H アクセプターフレームワーク - 延長された超可変領域 (配列番号 43 ~ 44) ; ヒト V H アクセプター 2 フレームワーク - K a b a t C D R (配列番号 45) ; ヒト V H アクセプター 2 フレームワーク - 延長された超可変領域 (配列番号 46 ~ 48)。

【図 16 B】以下のとおりの、本発明を実施する際に使用するための例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を配列識別名とともに示している：可変重鎖 (V H) コンセンサスフレームワーク (図 16 A、16 B) ヒト V H サブグループ I コンセンサスフレームワーク - K a b a t C D R (配列番号 30 ; ヒト V H サブグループ I コンセ

10

20

30

40

50

ンサスフレームワーク - 延長された超可変領域 (配列番号 31 ~ 33) ; ヒト V H サブグループ I I コンセンサスフレームワーク - K a b a t C D R (配列番号 34) ; ヒト V H サブグループ I I コンセンサスフレームワーク - 延長された超可変領域 (配列番号 35 ~ 37) ; ヒト V H サブグループ I I I コンセンサスフレームワーク - 延長されたヒト V H サブグループ I I I コンセンサスフレームワーク - K a b a t C D R (配列番号 38) ; ヒト V H サブグループ I I I コンセンサスフレームワーク - 延長された超可変領域 (配列番号 39 ~ 41) ; ヒト V H アクセプターフレームワーク - K a b a t C D R (配列番号 42) ; ヒト V H アクセプターフレームワーク - 延長された超可変領域 (配列番号 43 ~ 44) ; ヒト V H アクセプター 2 フレームワーク - K a b a t C D R (配列番号 45) ; ヒト V H アクセプター 2 フレームワーク - 延長された超可変領域 (配列番号 46 ~ 48) 。

【図 17 A】以下のとおりの、本発明を実施する際に使用するための例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を配列識別名とともに示している：可変軽鎖 (V L) コンセンサスフレームワーク (図 17 A、17 B) ; ヒト V L カッパーサブグループ I コンセンサスフレームワーク (配列番号 49) ; ヒト V L カッパーサブグループ I I コンセンサスフレームワーク (配列番号 50) ; ヒト V L カッパーサブグループ I I I コンセンサスフレームワーク (配列番号 51) ; ヒト V L カッパーサブグループ I V コンセンサスフレームワーク (配列番号 52) 。

【図 17 B】以下のとおりの、本発明を実施する際に使用するための例示的なアクセプターヒトコンセンサスフレームワーク配列を配列識別名とともに示している：可変軽鎖 (V L) コンセンサスフレームワーク (図 17 A、17 B) ; ヒト V L カッパーサブグループ I コンセンサスフレームワーク (配列番号 49) ; ヒト V L カッパーサブグループ I I コンセンサスフレームワーク (配列番号 50) ; ヒト V L カッパーサブグループ I I I コンセンサスフレームワーク (配列番号 51) ; ヒト V L カッパーサブグループ I V コンセンサスフレームワーク (配列番号 52) 。

【図 18】h u M A b 4 D 5 - 8 軽鎖および重鎖のフレームワーク領域配列を示している。上付き / 太字の番号は、K a b a t に従ったアミノ酸位置を示している。

【図 19】h u M A b 4 D 5 - 8 軽鎖および重鎖の改変 / バリエーションフレームワーク領域配列を示している。上付き / 太字の番号は、K a b a t に従ったアミノ酸位置を示している。

【発明を実施するための形態】

【0071】

5 . 詳細な説明

本明細書中に記載される特定の方法、プロトコル、細胞株、ベクターまたは試薬は、変化し得るので、本発明は、これらに限定されない。さらに、本明細書中で使用される用語は、特定の実施形態を説明するだけの目的であり、本発明の範囲を限定すると意図されない。本明細書中、および添付の請求項において使用されるとき、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかに別のことを示さない限り、複数の言及物を包含し、例えば、「宿主細胞 (a h o s t c e l l)」という言及は、複数のそのような宿主細胞を包含する。別段定義されない限り、本明細書中で用いられるすべての専門用語および科学用語ならびに任意の頭字語は、本発明の分野の当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。本発明を実施する際に、本明細書中に記載される方法および材料と類似または等価な任意の方法および材料を用いることができるが、例示的な方法、デバイスおよび材料を本明細書中で説明する。

【0072】

本明細書中で述べられるすべての特許および刊行物は、それらの特許および刊行物に報告されている、本発明とともに用いられ得るタンパク質、酵素、ベクター、宿主細胞および方法を説明および開示する目的で、法が認める程度に参考として本明細書中に組み込まれる。しかしながら、先行発明という理由で本発明がそのような開示に先行する権利を与えられないという承認として解釈されるべきものは、本明細書中には何も無い。

【0073】

5.1 定義

本願を通して用いられる用語は、当業者にとって通常かつ典型的な意味を用いて解釈されるべきである。しかしながら、本出願人は、下記で定義されるような特定の定義を以下の用語に与えることを要求する。

【0074】

抗体鎖ポリペプチド配列に関する句「実質的に同一」は、参照ポリペプチド配列に対して少なくとも70%または80%または90%または95%の配列同一性を示す抗体鎖と解釈され得る。核酸配列に関してこの用語は、参照核酸配列に対して少なくとも約85%または90%または95%または97%の配列同一性を示すヌクレオチドの配列と解釈され得る。

10

【0075】

用語「同一性」または「相同性」は、配列をアラインメントし、ギャップを導入することにより、必要であれば、配列全体に対して最大の同一性パーセントを達成させた後の（配列同一性の一部として、いかなる保存的置換も考慮しない）、比較される対応配列の残基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のことを意味すると解釈されなければならない。N末端またはC末端の伸長も挿入も、同一性または相同性を低下させると解釈されるべきではない。アラインメントするための方法およびコンピュータプログラムは、当該分野で周知である。配列同一性は、配列解析ソフトウェアを用いて測定され得る。

【0076】

用語「抗体」は、最も広い意味で用いられ、この用語には、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子が含まれ、具体的には、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体および多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）を網羅する。抗体（Ab）および免疫グロブリン（Ig）は、同じ構造上の特性を有する糖タンパク質である。抗体が、特定の標的に対して結合特異性を示すのに対し、免疫グロブリンは、抗体と、標的特異性を欠く他の抗体様分子との両方を包含する。天然の抗体および免疫グロブリンは、通常、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、2本の同一の軽（L）鎖および2本の同一の重（H）鎖から構成される。各重鎖は、片端に可変ドメイン（V_H）を有し、続いていくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、片端に可変ドメイン（V_L）を有し、もう片端に定常ドメインを有する。さらに、用語「抗体」（Ab）または「モノクローナル抗体」（mAb）は、タンパク質に特異的に結合することができるインタクトな分子と、抗体フラグメント（例えば、FabおよびF(ab')₂フラグメント）との両方を包含すると意味される。FabおよびF(ab')₂フラグメントは、インタクトな抗体のFcフラグメントを欠き、動物または植物の循環から、より迅速にクリアランスされ、そしてインタクトな抗体よりも低い非特異的な組織結合性を有し得る（Wahlら、J Nucl Med 24:316（1983））。

20

30

【0077】

本明細書中で使用されるとき、「抗OX40抗体」は、そのようなOX40とそのリガンドであるOX40リガンドとの結合を阻害するか、または実質的に低下させるような様式でヒトOX40に結合する抗体のことを意味する。

40

【0078】

本明細書中で使用されるとき、用語「OX40媒介性障害」には、アレルギー、喘息、ならびに自己免疫および炎症に関連する疾患（例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）、実験的リシェミア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎（例えば、潰瘍性大腸炎）、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病およびバセドウ病が挙げられる）に関連する状態が含まれる。他の状態（例えば、サルコイドーシス、自己免疫性の眼球の疾患、自己免疫性ブドウ膜炎、アトピー性皮膚炎、重症筋無力症、自己免疫性神経障害（例えば、ギラン・バレー）、自己免疫

50

性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、悪性貧血、自己免疫性血小板減少症、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、血管炎（例えば、ウェゲナー肉芽腫症）、ベーチェット病、乾癬、疱疹状皮膚炎、尋常性天疱瘡、白斑、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、橋本甲状腺炎、自己免疫性の卵巣炎および睾丸炎、副腎の自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症（例えば、強直性脊椎炎）、ライター症候群およびシェーグレン症候群）もまた、この用語の範囲に包含される。

【0079】

抗体の可変ドメインとの関連において用語「可変」とは、可変ドメインのある特定の一部分が、抗体間でその配列に広く相違があり、特定の抗体の各々の特定の標的に対する結合性および特異性において用いられるという事実のことを指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン全体にわたって均等に分布していない。可変性は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの両方において、超可変領域としても知られる相補性決定領域（CDR）と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインの高度に保存された部分は、フレームワーク（FR）と呼ばれる。当該分野で公知であるように、抗体の超可変領域を線引きするアミノ酸位置/境界は、状況および当該分野で公知の様々な定義に応じて変化し得る。可変ドメイン内のいくつかの位置が、1つの基準セットの下では超可変領域内であるとみなされ得る一方で、異なる基準セットの下では超可変領域の外側であるとみなされるという点で、これらの位置が、ハイブリッド超可変位置とみなされることがある。これらの位置のうちの1つ以上は、延長された超可変領域においても見られることがある。本発明は、これらのハイブリッド超可変位置において改変を含む抗体を提供する。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、各々、3つのCDRに接続された、主としてβシート配置をとる4つのFR領域を含み、それらは、そのβシート構造を接続するループを形成し、いくつかの場合においては、そのβシート構造の一部を形成する。各鎖内のCDRは、FR領域と近接して一緒に保持され、他方の鎖のCDRは、抗体の標的結合部位の形成に寄与する（Kabataら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1987) 参照）。本明細書中で使用されるとき、免疫グロブリンアミノ酸残基の付番は、別段示されない限り、Kabataらの免疫グロブリンアミノ酸残基の付番方式に従って行われる。

【0080】

用語「抗体フラグメント」とは、完全長抗体の一部、通常、標的結合領域または可変領域のことを指す。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFvフラグメントが挙げられる。抗体の「抗原結合フラグメント」という句は、完全長抗体と共通する質的な生物学的活性を有する化合物である。例えば、抗OX40抗体の抗原結合フラグメントは、そのような分子がOX40リガンドに結合する能力を有することを妨害するか、または実質的に減少させるような様式で、OX40レセプターに結合することができるものである。本明細書中で使用されるとき、抗体に関して「機能的フラグメント」とは、Fv、F(ab)およびF(ab')₂フラグメントのことを指す。「Fv」フラグメントは、完全な標的認識部位および標的結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。この領域は、堅固な非共有結合性の会合での、1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる（V_H-V_L二量体）。この配置で、各可変ドメインの3つのCDRは、V_H-V_L二量体の表面上の標的結合部位を定義するように相互作用する。6つのCDRは、集団で、その抗体に対して標的結合特異性を付与する。しかしながら、結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、単一可変ドメイン（または、標的に特異的な3つのCDRだけを含むFvの半分）でさえも、標的を認識し、結合する能力を有する。「一本鎖Fv」または「sFv」抗体フラグメントは、抗体のV_HドメインおよびV_Lドメインを含み、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。一般に、Fvポリペプチドは、V_HドメインとV_Lドメインとの間に、sFvが標的に結合するための所望の構造を形成させるポリペプチドリッカーをさらに含む。

【0081】

F a b フラグメントは、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第 1 定常ドメイン (C H 1) を含む。F a b ' フラグメントは、抗体ヒンジ領域由来の 1 つ以上のシステインを含む重鎖 C H 1 ドメインのカルボキシル末端においていくつかの残基が付加されているという点で F a b フラグメントと異なる。F (a b ') フラグメントは、F (a b ') ₂ ペプシン消化産物のヒンジシステインにおけるジスルフィド結合を切断することによって生成される。抗体フラグメントのさらなる化学的結合は、当業者に公知である。

【 0 0 8 2 】

用語「モノクローナル抗体」とは、本明細書中で使用されるとき、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体のことを指し、すなわち、その集団を構成する個別の抗体は、微量で存在し得かつ天然に存在し得る変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、単一の標的部位に対するものである。さらに、代表的には様々な決定基 (エピトープ) に対する様々な抗体を含む従来の (ポリクローナル) 抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体の各々は、標的上の単一の決定基に対するものである。モノクローナル抗体は、それらの特異性に加えて、他の免疫グロブリンによって汚染されていないハイブリドーマ培養物によって合成され得るという点において有利である。修飾語「モノクローナル」とは、実質的に均一な抗体集団から得られるという抗体の性質のことを示し、その抗体の作製に任意の特定の方法が必要であると解釈されるべきでない。例えば、本発明とともに使用するためのモノクローナル抗体は、周知の手法を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離され得る。本発明に従って用いられる親モノクローナル抗体は、K o h l e r ら、N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5) によって初めて報告されたハイブリドーマ法によって作製されてもよいし、組換え法によって作製されてもよい。

10

20

【 0 0 8 3 】

用語「キメラ」抗体とは、本明細書中で使用されるとき、非ヒト免疫グロブリン (例えば、ラットまたはマウス抗体) 由来の可変配列、および代表的にはヒト免疫グロブリン鑄型から選択されるヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体のことを指す。

【 0 0 8 4 】

非ヒト (例えば、マウス) 抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント (例えば、F v、F a b、F a b '、F (a b ') ₂ または抗体の他の標的結合部分列 (s u b s e q u e n c e s)) である。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも 1 つ、および代表的には 2 つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、ここで、C D R 領域のすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリンの C D R 領域に対応し、F R 領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の F R 領域である。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域 (F c) の少なくとも一部、代表的には、選択されるヒト免疫グロブリン鑄型の一部も含み得る。

30

【 0 0 8 5 】

本明細書中で使用されるとき、「ヒト抗体」は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を包含し、そしてヒト免疫グロブリンライブラリーから単離された抗体、または下記および例えば K u c h e r l a p a t i らによる米国特許第 5 , 9 3 9 , 5 9 8 号に記載されているような、1 つ以上のヒト免疫グロブリンについて遺伝子導入されていて、かつ内因性の免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体を包含する。

40

【 0 0 8 6 】

用語「細胞」、「細胞株」および「細胞培養物」には、子孫が包含される。すべての子孫が、故意または偶然の変異に起因して、D N A 含有量が正確には同一ではないことがあることも理解される。初めに形質転換された細胞においてスクリーニングされるとき、同じ機能または生物学的特性を有する変異体の子孫が包含される。本発明において用いられる「宿主細胞」は、通常、原核生物または真核生物の宿主である。

【 0 0 8 7 】

D N A による細胞性生物の「形質転換」とは、D N A が染色体外のエレメントとして、または染色体への組み込みによって、複製可能になるように、D N A を生物に導入するこ

50

とを意味する。DNAによる細胞性生物の「トランスフェクション」とは、任意のコード配列が実際に発現されるか否かに関係なく、その細胞または生物によるDNA（例えば、発現ベクター）の取り込みのことを指す。用語「トランスフェクトされた宿主細胞」および「形質転換された」とは、DNAが導入された細胞のことを指す。その細胞は、「宿主細胞」と呼ばれ、原核生物の細胞であってもよいし、真核生物の細胞であってもよい。代表的な原核生物の宿主細胞としては、様々な株の*E. coli*が挙げられる。代表的な真核生物の宿主細胞は、哺乳動物の細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞）またはヒト起源の細胞である。導入されるDNA配列は、宿主細胞と異なる種の宿主細胞と同じ種由来であり得るか、またはいくつかの外来性DNAおよびいくつかの相同DNAを含むハイブリッドDNA配列であり得る。

10

【0088】

用語「ベクター」とは、適当な宿主においてDNAの発現に影響することができる適当な調節配列に作動可能に連結されたDNA配列を含むDNA構築物のことを意味する。そのような調節配列としては、転写に影響するプロモーター、そのような転写を調節する任意のオペレーター配列、適当なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、ならびに転写および翻訳の終結を調節する配列が挙げられる。ベクターは、プラスミド、ファージ粒子または単にゲノムの挿入物になり得るものであり得る。ベクターは、適当な宿主に形質転換されると、宿主ゲノムとは独立して複製および機能し得るか、またはいくつかの場合ではそのゲノム自体に組み込まれ得る。プラスミドが、最もよく用いられるベクターの形態であるので、本明細書では「プラスミド」と「ベクター」は、時折、交換可能に用いられる。しかしながら、本発明は、等価な機能を果たし、当該分野で公知であるかまたは公知になる、そのような他の形態のベクターを包含すると意図される。

20

【0089】

処置の目的での「哺乳動物」とは、哺乳動物として分類される任意の動物のことを指し、それには、ヒト、家畜および農場の動物、非ヒト霊長類、ならびに動物園の動物、競技用の動物または愛玩動物（例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなど）が包含される。

【0090】

単語「標識」とは、本明細書中で使用されるとき、分子またはタンパク質、例えば、抗体に直接的または間接的に結合体化され得る検出可能な化合物または組成物のことを指す。その標識自体が、検出可能であってもよいし（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）、酵素的な標識の場合は、検出可能な基質化合物または基質組成物の化学変化を触媒するものであってもよい。

30

【0091】

本明細書中で使用されるとき、「固相」とは、本発明の抗体が付着することができる非水性マトリックスのことを意味する。本明細書中で包含される固相の例としては、ガラス（例えば、コントロールドポアガラス（controlled pore glass））、多糖（例えば、アガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコールおよびシリコンで部分的または全体的に形成されているものが挙げられる。ある特定の実施形態において、固相は、状況に応じて、アッセイプレートのウェルを含み得る；他の状況では、固相は、精製カラム（例えば、アフィニティークロマトグラフィカラム）である。

40

【0092】

5.2 免疫原

2つの形態のOX40レセプターを、本発明の抗OX40抗体を作製するための免疫原として用いた：（1）1つは、ヌクレオチド残基105～627によってコードされるヒトFcγ1および細胞外ドメインを含む融合タンパク質として発現されるヒトOX40レセプターの可溶性だった；そして（2）2つ目は、安定的にトランスフェクトされたマウス線維芽細胞L細胞の表面上に発現される完全長OX40を含む細胞ベースの免疫原だった。可溶性OX40レセプターまたはそのフラグメントを、本発明の抗体を作製するために免疫原として用いてもよい。得られるアンタゴニスト抗体は、OX40に対するもので

50

あり、OX40LがOX40と相互作用するのを阻害することにより、レセプター活性を中和することができる。免疫原は、好ましくは、ポリペプチドであり、膜貫通型分子であり得る。免疫原は、組換え的に作製されてもよいし、合成方法を用いて生成されてもよい。また、免疫原は、天然の起源から単離されてもよい。

【0093】

免疫原は、OX40の細胞外ドメインを含み得る。あるいは、その細胞外ドメインを含む膜貫通タンパク質を発現する細胞を、免疫原として使用してもよい。そのような細胞は、天然の起源（例えば、T細胞株）に由来するものであってもよいし、それらの表面上にレセプターを発現させるために組換え手法によって形質転換された細胞であってもよい。抗体を作製するために有用な他の免疫原およびその形態は、当業者に明らかであろう。全細胞の免疫原を用いた、げっ歯類などの宿主動物の免疫は、当該分野で周知である。

10

【0094】

あるいは、OX40をコードする遺伝子またはcDNAは、プラスミドまたは他の発現ベクターにクローニングされ、そして当業者に周知の方法に従って、いくつかの発現系のいずれかにおいて発現し得る。OX40およびOX40に対する核酸配列の、クローニングおよび発現の方法は、周知である（例えば、米国特許第5,821,332号および同第5,759,546号参照）。遺伝暗号の縮重が原因で、OX40ポリペプチドをコードする多数のヌクレオチド配列が生成され得る。可能性のあるコドンの選択に基づいて組み合わせを選択することにより、ヌクレオチド配列を変化させてもよい。これらの組み合わせは、天然に存在するOX40ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に適用されるような標準的なトリプレット遺伝暗号に従って作製され、そのようなすべてのバリエーションが、考慮されるべきである。これらのポリペプチドのうちのいずれか1つを、OX40に結合する抗体を作製するための動物の免疫に用いることができる。

20

【0095】

免疫原であるOX40ポリペプチドは、それが有益であるとき、別のポリペプチド（例えば、免疫グロブリンFc領域）に融合されたOX40ポリペプチドを有する融合タンパク質として発現されてもよい。その融合ポリペプチドは、しばしば、例えば、融合タンパク質が単離されて、アフィニティークロマトグラフィによって精製されるのを可能にすることによって、タンパク質精製を助ける。融合タンパク質は、そのタンパク質のカルボキシル末端および/またはアミノ末端に結合された融合セグメントを含むタンパク質をコードする融合核酸配列で形質転換された組換え細胞を培養することによって作製され得る。融合セグメントとしては、免疫グロブリンFc領域、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、二価の金属イオンに結合することができるポリヒスチジンセグメント、およびマルトース結合タンパク質が挙げられ得るが、これらに限定されない。

30

【0096】

本発明では、組換えOX40を用いてマウスを免疫することにより、アンタゴニスト抗体を作製した。組換えOX40は、いくつかの供給源から市販されている（例えば、R&D Systems, Minneapolis, MN., Peprotech, Inc., NJおよびSanofi Bio-Industries, Inc., Tervose, PA. 参照）。例示的なポリペプチドは、配列番号1およびそのバリエーションのすべてまたは一部を含む。

40

【0097】

5.3 抗体の作製

本発明の抗体は、当該分野で公知の任意の適当な方法によって作製され得る。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体を含み得る。ポリクローナル抗体の調製方法は、当業者に公知である（Harlowら、Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)）この全体が、本明細書中で参考として組み込まれる。

【0098】

50

例えば、上に記載したような免疫原は、様々な宿主動物（例えば、ウサギ、マウス、ラットなどが挙げられるがこれらに限定されない）に投与されて、その抗原に特異的なポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導し得る。免疫原の投与は、免疫剤、および所望であればアジュバントの1回以上の注射を必要とし得る。宿主種に応じて、様々なアジュバントを用いることにより、免疫応答を増強することができ、そのようなアジュバントとしては、フロイント（完全および不完全）、無機物ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン）、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノールおよび潜在的に有用なヒトアジュバント（例えば、BCG（カルメット・ゲラン桿菌）および *Corynebacterium parvum*）が挙げられるがこれらに限定されない。用いられ得るアジュバントのさらなる例としては、MPL-TDMアジュバント（モノホスホリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコレート）が挙げられる。免疫プロトコルは、当該分野で周知であり、選択される動物宿主において免疫応答を誘発する任意の方法によって行われ得る。アジュバントも当該分野で周知である。

【0099】

代表的には、免疫原（アジュバント有りまたは無し）は、複数回の皮下注射もしくは腹腔内注射によって、または筋肉内もしくはIVを介して、哺乳動物に注射される。免疫原には、OX40ポリペプチド、融合タンパク質またはそのバリエーションが包含され得る。ポリペプチドの性質（すなわち、疎水性のパーセント、親水性のパーセント、安定性、正味電荷、等電点など）に応じて、免疫原と、免疫される哺乳動物において免疫原性であることが知られているタンパク質との結合体化が、有用であることがある。そのような結合体化には、免疫原と免疫原性タンパク質との両方に対する化学官能基の活性な誘導体化による化学的な結合体化（共有結合が形成されるように結合体化される）、もしくは融合タンパク質ベースの方法を介した化学的な結合体化のいずれか、または当業者に公知の他の方法が包含される。そのような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、オバルブミン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、ダイズトリブシンインヒビターおよび混交Tヘルパーペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。様々なアジュバントを用いることにより、上に記載したような免疫応答を増強することができ

【0100】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体を含み得る。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位を認識する抗体である。それらの均一な特異性のおかげで、モノクローナル抗体は、通常種々の異なる抗原部位を認識する抗体を含むポリクローナル抗体よりも一層有用になる。モノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature 256:495 (1975)；米国特許第4,376,110号；Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)およびHammerlingら、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier (1981)によって報告されているようなハイブリドーマ技術、組換えDNA法、または当業者に公知の他の方法を用いて調製され得る。モノクローナル抗体を作製するために用いられ得る方法の他の例としては、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kosborら、Immunology Today 4:72 (1983)；Coleら、Proc Natl Acad Sci USA 80:2026 (1983)）、およびEBV-ハイブリドーマ技術（Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96, Alan R. Liss (1985)）が挙げられるが、これらに限定されない。そのような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDおよびそれらの任意のサブクラスをはじめとした任意の免疫グロブリンクラスであり得る。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、インビトロにおいて培養されてもよいし、インビボにおいて培養されてもよい

【0101】

ハイブリドーマモデルでは、宿主（例えば、マウス、ヒト化マウス、ヒト免疫系を有するマウス、ハムスター、ウサギ、ラクダまたは他の任意の適切な宿主動物）を免疫することにより、免疫に用いられたタンパク質に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生することができるリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球をインビトロにおいて免疫してもよい。次いで、ポリエチレングリコールなどの適当な融合剤を用いて、リンパ球をミエローマ細胞に融合して、ハイブリドーマ細胞を形成させる（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp. 59 - 103 (1986)）。

【0102】

一般に、抗体産生ハイブリドーマを作製する際に、ヒト起源の細胞が望ましい場合は、末梢血リンパ球（「PBL」）を用いるか、または非ヒト哺乳動物起源が望ましい場合は、脾臓細胞もしくはリンパ節細胞を用いる。次いで、ポリエチレングリコールなどの適当な融合剤を用いて、そのリンパ球を不死化細胞株と融合して、ハイブリドーマ細胞を形成させる（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp. 59 - 103 (1986)）。不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特に、げっ歯類、ウシまたはヒト起源のミエローマ細胞である。代表的には、ラットまたはマウスのミエローマ細胞株が用いられる。好ましくは、未融合の不死化細胞の成長または生存を阻害する1つ以上の物質を含む適当な培養液中で、そのハイブリドーマ細胞を培養してもよい。例えば、親細胞が、酵素ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPR T）を欠いている場合、ハイブリドーマに対する培養液は、代表的には、HGPRT欠損細胞の成長を妨害する物質である、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含むものである（「HAT培地」）。

【0103】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択される抗体産生細胞によって安定な高レベルの抗体産生を助け、そしてHAT培地などの培地に感受性である、細胞株である。これらのミエローマ細胞株としては、Sal k Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. U.S. Application No. から入手可能なMOPC - 21およびMPC - 11マウス腫瘍、ならびにAmerican Type Culture Collection, Rockville, Md. USAから入手可能なSP2/0またはX63 - Ag8 - 653細胞に由来するものなどのマウスのミエローマ株である。ヒトミエローマ細胞株およびマウス - ヒトヘテロミエローマ細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について報告されている（Kozbor, J Immunol 133: 3001 (1984); Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc, pp. 51 - 63 (1987)）。マウスミエローマ細胞株NSOを用いてもよい（European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wilshire, UK）。

【0104】

ハイブリドーマ細胞を生育する培養液を、OX40に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素免疫結合吸着測定法（ELISA））によって測定され得る。そのような手法は、当該分野で公知であり、当業者の技術の範囲内である。OX40に対するモノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、スキャッチャード解析によって測定され得る（Munsonら、Anal Biochem 107: 220 (1980)）。

【0105】

所望の特異性、親和性および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定

10

20

30

40

50

されたら、そのクローンを、限界希釈手順によってサブクローン化し、標準的な方法によって生育する (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp. 59 - 103 (1986))。この目的に適した培養液としては、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地 (D-MEM) または RPMI - 1640 培地が挙げられる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、動物内の腹水腫瘍としてインビボにおいて生育してもよい。

【0106】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順 (例えば、プロテイン A - セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、ゲル排除クロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティークロマトグラフィ) によって、培養液、腹水または血清から適切に分離または単離される。

10

【0107】

モノクローナル抗体を作製するための種々の方法が当該分野に存在するので、本発明は、ハイブリドーマ作製方法だけに限定されない。例えば、モノクローナル抗体は、米国特許第 4, 816, 567 号に記載されているような組換え DNA 法によって作製されてもよい。ハイブリドーマ細胞は、そのような DNA の起源として機能する。その DNA は、いったん単離されると、発現ベクターに入れられ、そして、別途免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞 (例えば、E. coli 細胞、NS0 細胞、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞またはミエローマ細胞) にトランスフェクトされて、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成がもたらされ得る。その DNA を、例えば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖の定常ドメインに対するコード配列で置換することによって (米国特許第 4, 816, 567 号; Morrison ら、Proc Natl Acad Sci USA 81: 6851 (1984))、または非免疫グロブリンポリペプチドに対するコード配列のすべてまたは一部を、免疫グロブリンコード配列に共有結合的に連結することによって、改変してもよい。そのような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインで置換され得るか、またはキメラ二価抗体を作製するために本発明の抗体の 1 つの抗原結合部位の可変ドメインで置換され得る。

20

【0108】

本抗体は、一価の抗体であり得る。一価の抗体を作製するための方法は、当該分野で周知である。例えば、1 つの方法は、免疫グロブリン軽鎖および改変された重鎖の組換え発現を含む。その重鎖は、重鎖の架橋を妨害するように、一般に Fc 領域内の任意の点において切断されている。あるいは、関連するシステイン残基が、架橋を妨害するように、別のアミノ酸残基で置換されているか、または欠失している。

30

【0109】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の手法によって作製され得る。従来、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク分解性消化によって得られていた (例えば、Morimoto ら、J Biochem Biophys Methods 24: 107 (1992); Brennan ら、Science 229: 81 (1985) 参照)。例えば、本発明の Fab および F(ab')₂ フラグメントは、バリン (Fab フラグメントを生成する) またはペプシン (F(ab')₂ フラグメントを生成する) などの酵素を用いる、免疫グロブリン分子のタンパク分解性切断によって作製され得る。F(ab')₂ フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖の CH1 ドメインを含む。しかしながら、これらのフラグメントは、現在、組換え宿主細胞によって直接産生され得る。例えば、抗体フラグメントは、抗体ファージライブラリーから単離され得る。あるいは、F(ab')₂ - SH フラグメントは、E. coli から直接回収され、化学的に結合されることによって、F(ab')₂ フラグメントが形成され得る (Carter ら、Bio/Technology 10: 163 (1992))。別のアプローチによれば、F(ab')₂ フラグメントは、組換え宿主細胞培養物から直接単離され得る。抗体フラグメントを作製するための他の手法は、当業者に明らかであろう。他

40

50

の実施形態において、最適な抗体は、一本鎖 Fv フラグメント (Fv) (PCT 特許出願 WO 93 / 16185) である。

【0110】

ヒトにおける抗体のインビボにおける用途およびインビトロ検出アッセイをはじめとしたいいくつかの用途のために、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体を使用することが好ましいことがある。キメラ抗体は、抗体の様々な部分が、異なる動物種から得られている分子、例えば、マウスモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体である。キメラ抗体を作製するための方法は、当該分野で公知である。例えば、Morrisson, Science 229:1202 (1985); Oi ら、BioTechniques 4:214 (1986); Gillies ら、J Immunol Methods 125:191 (1989); 米国特許第 5,807,715 号; 同第 4,816,567 号; および同第 4,816,397 号 (これらの全体が、本明細書中で参考として組み込まれる) 参照。

10

【0111】

ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリンに対して、動物由来のモノクローナル抗体よりも高い相同性を有するように設計されている。ヒト化は、実質的にはインタクトではないヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応配列で置換されている、キメラ抗体を作製するための手法である。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の 1 つ以上の相補性決定領域 (CDR) およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク (FR) 領域を有し、所望の抗原に結合する、非ヒト種において産生される抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域内のフレームワーク残基は、抗原結合性を变化させる、好ましくは、改善する、CDR ドナー抗体由来の対応残基で置換される。これらのフレームワーク置換は、当該分野で周知の方法、例えば、CDR 残基とフレームワーク残基との相互作用をモデル化して抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定すること、および特定の位置における稀なフレームワーク残基を同定する配列比較によって同定される。例えば、米国特許第 5,585,089 号; Riechmann ら、Nature 332:323 (1988) (これらの全体が、本明細書中で参考として組み込まれる) 参照。例えば、CDR 移植 (EP 239,400; PCT 公開 WO 91 / 09967; 米国特許第 5,225,539 号; 同第 5,530,101 号; および同第 5,585,089 号)、ベニアリング (veneering) またはリサーフェシング (resurfacing) (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28:489 (1991); Studnicka ら、Protein Engineering 7:805 (1994); Roguska ら、Proc Natl Acad Sci USA 91:969 (1994)) およびチェインシャフリング (米国特許第 5,565,332 号) をはじめとした当該分野で公知の種々の手法を用いて、抗体をヒト化することができる。

20

30

【0112】

一般に、ヒト化抗体には、非ヒトである起源から 1 つ以上のアミノ酸残基が導入されている。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「移入 (import)」残基と呼ばれ、これらは、代表的には、「移入」可変ドメインから得られる。ヒト化は、本質的には、Winter および共同研究者らの方法 (Jones ら、Nature 321:522 (1986); Riechmann ら、Nature 332:323 (1988); Verhoeyen ら、Science 239:1534 (1988)) に従って、非ヒト CDR または CDR 配列を、ヒト抗体の対応配列で置換することによって行われ得る。したがって、そのような「ヒト化」抗体は、実質的にはインタクトではないヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応配列によって置換されているキメラ抗体である (米国特許第 4,816,567 号)。実際、ヒト化抗体は、代表的には、いくつかの CDR 残基および可能性のあるいくつかの FR 残基が、げっ歯類抗体における類似の部位で置換されている、ヒト抗体である。

40

【0113】

50

ヒト化抗体が、抗原に対してより高い親和性および他の好ましい生物学的特性を保持することは、さらに重要である。この目標を達成するために、好ましい方法によれば、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の3次元モデルを用いて、親配列および様々な概念的なヒト化産物の解析のプロセスによって調製される。3次元免疫グロブリンモデルは、商業的に入手可能であり、当業者に知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の有望な3次元立体配座構造を図示および表示するコンピュータプログラムが入手可能である。これらの表示を調べることにより、候補免疫グロブリン配列が機能する際の、ある特定の残基の果たし得る役割の解析、すなわち、候補免疫グロブリン配列の能力に影響を及ぼす残基の解析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の解析が可能になる。このように、所望の抗体特性（例えば、標的抗原に対する親和性の増大）が最大になるように、FR残基をレシピエント配列および移入配列から選択し、組み合わせることができるが、抗原結合性に直接かつ最も実質的に影響を及ぼすのは、CDR残基である。

10

【0114】

ヒト化抗体を作製する際に用いられる軽鎖と重鎖の両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低下させるために重要である。いわゆる「ベストフィット (best-fit)」法によれば、非ヒト抗体の可変ドメインの配列を、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次いで、非ヒト親抗体の配列に最も近いヒト配列をヒト化抗体用のヒトFRとして採用する (Simsら、J Immunol 151:2296 (1993); Chothiaら、J Mol Biol 196:901 (1987))。

20

【0115】

別の方法では、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのヒト抗体すべてのコンセンサス配列由来の特定のフレームワークを使用する。いくつかの異なるヒト化抗体に対して、同じフレームワークを用いてもよい (Carterら、Proc Natl Acad Sci USA 89:4285 (1992); Prestaら、J Immunol 151:2623 (1993))。本発明の抗体は、任意の適当なヒト軽鎖もしくは重鎖フレームワーク配列またはヒトコンセンサス軽鎖もしくは重鎖フレームワーク配列を含み得るが、ただし、本抗体は、所望の生物学的特性（例えば、所望の結合親和性）を示す。いくつかの実施形態では、ヒトおよび/またはヒトコンセンサス非超可変領域配列内に、1つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9またはそれ以上）のさらなる改変が存在する。1つの実施形態において、本発明の抗体は、ヒト軽鎖のフレームワーク配列の少なくとも一部（またはすべて）を含む。1つの実施形態において、本発明の抗体は、ヒト重鎖のフレームワーク配列の少なくとも一部（またはすべて）を含む。1つの実施形態において、本発明の抗体は、ヒトサブグループIフレームワークコンセンサス配列の少なくとも一部（またはすべて）を含む。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、ヒトサブグループIII重鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。1つの実施形態において、本発明の抗体のフレームワークコンセンサス配列は、71位、73位および/または78位に置換を含む。これらの抗体のいくつかの実施形態において、71位は、Aであり、73位は、Tであり、そして/または78位は、Aである。

30

40

【0116】

完全ヒト抗体は、ヒト患者の治療上の処置にとって特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体ライブラリーを用いる、上に記載したファージディスプレイ法をはじめとした当該分野で公知の種々の方法によって作製することができる。米国特許第4,444,887号および同第4,716,111号；およびPCT公開WO98/46645、WO98/50433、WO98/24893、WO98/16654、WO96/34096、WO96/33735およびWO91/10741もまた参照のこと；これらの各々の全体が本明細書中で参考として組み込まれる。ColeらおよびBoernerらの手法もまた、ヒトモノクローナル抗体を調製するために利用可能である (Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer T

50

herapy, Alan R. Riss (1985); および Boernerら、J Immunol 147:86 (1991)。

【0117】

ヒト抗体は、機能的な内因性の免疫グロブリンを発現することができないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができる、トランスジェニックマウスを用いても作製することができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子複合体をランダムに、または相同組換えによって、マウス胚性幹細胞に導入することができる。あるいは、ヒト重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子に加えて、ヒトの可変領域、定常領域および多様性領域をマウス胚性幹細胞に導入してもよい。マウスの重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子を、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入とは別で機能しないようにさせてもよいし、同時に機能しないようにさせてもよい。特に、JH領域のホモ欠失によって、内因性の抗体産生が妨害される。改変された胚性幹細胞を増殖させ、胚盤胞にマイクロインジェクションすることにより、キメラマウスを作出する。次いで、そのキメラマウスを成育することにより、ヒト抗体を発現するホモ接合性の子孫を作出する。例えば、Jakobovitisら、Proc Natl Acad Sci USA 90:2551 (1993); Jakobovitisら、Nature 362:255 (1993); Bruggermannら、Year in Immunol 7:33 (1993); Duchosalら、Nature 355:258 (1992)参照。

10

【0118】

そのトランスジェニックマウスを、選択された抗原、例えば、本発明のポリペプチドのすべてまたは一部を用いて、通常の様式で免疫する。その抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いて、免疫されたトランスジェニックマウスから得ることができる。このトランスジェニックマウスが内部に有するヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化中に再配列され、続いて、クラススイッチおよび体細胞変異を起こす。このような手法を用いることにより、治療的に有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を作製することができる。ヒト抗体を作製するためのこの技術に関する概要については、Lonbergら、Int Rev Immunol 13:65-93 (1995)参照。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を作製するためのこの技術、ならびにそのような抗体を作製するためのプロトコルに関する詳細な議論については、例えば、PCT公開WO98/24893; WO92/01047; WO96/34096; WO96/33735; 欧州特許番号0598877; 米国特許第5,413,923号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,569,825号; 同第5,661,016号; 同第5,545,806号; 同第5,814,318号; 同第5,885,793号; 同第5,916,771号; および同第5,939,598号(これらの全体が本明細書中で参考として組み込まれる)参照。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.), Genpharm (San Jose, Calif.) および Medarex, Inc. (Princeton, N.J.) などの会社は、上に記載した技術と同様の技術を用いることによる、選択された抗原に対するヒト抗体の提供に参与している。

20

30

【0119】

また、ヒトmAbは、ヒト末梢血白血球、脾細胞または骨髄が移植されたマウスを免疫することによって、作製することができる(例えば、XTLのトリオーマ技術)。選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導選択(guided selection)」と呼ばれる技術を用いて作製することができる。このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えば、マウス抗体を用いることにより、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択が誘導される(Jespersら、Bio/technology 12:899 (1988))。

40

【0120】

さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、当業者に周知の手法を用いて、本発明のポリペプチドを「模倣する」抗イディオタイプ抗体を作製するために用いることができ

50

る（例えば、Greenspanら、FASEB J 7:437(1989); Nissinoff, J Immunol 147:2429(1991)参照）。例えば、ポリペプチドに結合し、かつ、そのポリペプチドの多量体化および／またはリガンドに対する本発明のポリペプチドの結合を競合的に阻害する抗体を用いることにより、そのポリペプチドの多量体化および／または結合ドメインを「模倣」し、結果として、ポリペプチドおよび／またはそのリガンドに結合し、それらを中和する抗イディオタイプを作製することができる。そのような中和抗イディオタイプまたはそのような抗イディオタイプのFabフラグメントは、治療レジメンでは、ポリペプチドリガンドを中和するために用いることができる。例えば、そのような抗イディオタイプ抗体を用いることにより、本発明のポリペプチドに結合し、そして／またはそのリガンド／レセプターに結合し、それにより、その生物学的活性を阻止することができる。

【0121】

本発明の抗体は、二重特異性抗体であり得る。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有する、モノクローナルの、好ましくは、ヒト抗体またはヒト化抗体である。本発明において、結合特異性のうちの1つは、OX40に対するものであり得、その他の結合特異性は、他の任意の抗原、および好ましくは細胞表面タンパク質、レセプター、レセプターサブユニット、組織特異的抗原、ウイルス由来タンパク質、ウイルスにコードされるエンベロープタンパク質、細菌由来タンパク質、または細菌表面タンパク質などに対するものであり得る。

【0122】

二重特異性抗体を作製するための方法は、周知である。従来から、二重特異性抗体の組換え作製は、2つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対（ここで、その2つの重鎖は、異なる特異性を有する）の同時発現に基づくものである（Milsteinら、Nature 305:537(1983)）。免疫グロブリン重鎖と軽鎖とがランダムに組み合わせられるので、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、10個の異なる抗体分子（それらのうちの1つだけが正しい二重特異性構造を有する）の潜在的な混合物を産生する。その正しい分子の精製は、通常、アフィニティークロマトグラフィ工程によって行われる。同様の手順が、WO93/08829およびTraunckerら、EMBO J 10:3655(1991)に開示されている。

【0123】

所望の結合特異性（抗体抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインを、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合することができる。その融合は、好ましくは、ヒンジ、CH2およびCH3領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。その免疫グロブリン重鎖定常ドメインは、その融合物のうちの少なくとも1つに存在する、軽鎖結合に必要な部位を含む第1重鎖定常領域（CH1）を有し得る。免疫グロブリン重鎖融合物、および所望であれば免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別個の発現ベクターに挿入し、そして適当な宿主生物に同時に形質転換する。二重特異性抗体の作製に関するさらなる詳細については、例えば、Sureshら、Meth In Enzym 121:210(1986)参照。

【0124】

ヘテロ結合体（Heteroconjugate）抗体もまた、本発明によって企図される。ヘテロ結合体抗体は、2つの共有結合された抗体から構成される。そのような抗体は、例えば、不必要な細胞に免疫系細胞を標的化するために提案されている（米国特許第4,676,980号）。その抗体は、架橋剤が関与する方法をはじめとした合成タンパク質化学における公知の方法を用いて、インビトロにおいて調製され得ることが企図される。例えば、ジスルフィド交換反応を用いて、またはチオエステル結合を形成することによって、免疫毒素を構築してもよい。この目的に適した試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデートおよび例えば、米国特許第4,676,980号に開示されたものが挙げられる。

【0125】

さらに、OX40に対する単ドメイン抗体を作製することができる。この技術の例は、Camelidae重鎖Ig由来の抗体についてのWO9425591に記載されており、また、ファージライブラリーからの単ドメイン完全ヒト抗体の単離を説明しているUS20030130496にも記載されている。

【0126】

重鎖Fv領域と軽鎖Fv領域とが接続されている単一ペプチド鎖結合分子を作製することもできる。一本鎖抗体(「scFv」)およびそれらを構築する方法は、米国特許第4,946,778号に記載されている。あるいは、Fabは、同様の手段によって構築することができ、発現させることができる。完全ヒト抗体および部分的なヒト抗体のすべてが、完全なマウスmAbよりも免疫原性が低く、また、そのフラグメントおよび一本鎖抗体も、免疫原性が低い。

10

【0127】

抗体または抗体フラグメントは、McCaffertyら、Nature 348:552(1990)に記載されている手法を用いて作製される抗体ファージライブラリーから単離することができる。Clarksonら、Nature 352:624(1991)およびMarksら、J Mol Biol 222:581(1991)には、ファージライブラリーを用いた、それぞれマウス抗体およびヒト抗体の単離が記載されている。その後の刊行物には、チェーンシャフリングによる高親和性(nM範囲)のヒト抗体の作製(Marksら、Bio/Technology 10:779(1992))、ならびに非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染およびインビボ組換え(Waterhouseら、Nuc Acids Res 21:2265(1993))が記載されている。このように、これらの手法は、モノクローナル抗体を単離するための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ手法に対する実行可能な代替物である。

20

【0128】

例えば、相同なマウス配列の代わりに、ヒト重鎖および軽鎖の定常ドメインに対するコード配列で置換することによって、そのDNAを改変することもできる(米国特許第4,816,567号;Morrisonら、Proc Natl Acad Sci USA 81:6851(1984))。

【0129】

別の代替物は、ハイブリドーマを形成するために、化学的な融合ではなく、電気的な融合を用いることである。この手法は、十分に確立されている。融合の代わりに、例えば、エプスタイン・バーウイルス、またはトランスフォーミング遺伝子を用いて、B細胞を形質転換して不死にすることもできる。例えば、“Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity”, Zurawakiら、Monoclonal Antibodies, Kennettら編, Plenum Press, pp. 19-33. (1980)参照。げっ歯類(例えば、マウス、ラット、ハムスターおよびモルモット)を、真核生物系または原核生物系によって発現されるOX40タンパク質、融合タンパク質、またはそれらのフラグメントで免疫することによって、抗OX40mAbを産生させることができる。免疫のために、他の動物、例えば、非ヒト霊長類、トランスジェニックマウス発現免疫グロブリン、およびヒトBリンパ球が移植された重症複合免疫不全(SCID)マウスも用いることができる。ハイブリドーマは、先に記載されているように(Koehtlerら、Nature 256:495(1975))、免疫された動物由来のBリンパ球を、ミエローマ細胞(例えば、Sp2/0およびNS0)と融合することによって、従来の手順によって作製することができる。さらに、抗OX40抗体は、ファージディスプレイシステムにおいて、ヒトBリンパ球からの組換え一本鎖FvまたはFabライブラリーのスクリーニングによって作製することができる。そのmAbのOX40に対する特異性は、ELISA、ウエスタン免疫ブロット法または他の免疫化学的手法によって試験することができる。CD4+T

30

40

50

細胞活性化に対するその抗体の阻害活性は、増殖アッセイ、サイトカイン放出アッセイおよびアポトーシスアッセイによって評価することができる。陽性ウェル内に存在するハイブリドーマを、限界希釈によってクローン化する。ヒト O X 4 0 に対する特異性について、上に記載したアッセイによって特徴付けするために、その抗体を精製する。

【 0 1 3 0 】

5 . 4 アンタゴニスト抗 O X 4 0 抗体の同定

本発明は、O X 4 0 の作用を阻害および中和するアンタゴニストモノクローナル抗体を提供する。特に、本発明の抗体は、O X 4 0 に結合し、O X 4 0 の活性化を阻害する。本発明の抗体は、A 1 0 および B 6 6 と命名された抗体を包含し、これらのマウス抗体のヒト化抗体を開示する。本発明はまた、これらの抗体のエピトープ、例えば、モノクローナル抗体 A 1 0 (T H) h u 3 3 6 F のエピトープと同じエピトープに結合する抗体も包含する。

10

【 0 1 3 1 】

候補抗 O X 4 0 抗体を：(1) 蛍光微量 (f l u o r o m e t r i c m i c r o - v o l u m e) アッセイ技術 (F M A T) (A p p l i e d B i o s y s t e m , C A) 、(2) 酵素免疫結合吸着測定法 (E L I S A) 、および (3) フローサイトメトリー免疫アッセイ、を用いてスクリーニングした。選択された抗体を特徴付けるために行われるアッセイとしては：(1) H u t - 7 8 アッセイ；(2) ナイーブ C D 4 + T 細胞アッセイ；(3) T H 1 、T H 2 および T H 1 7 条件；(4) T C R - 活性化ナイーブ C D 4 + T 細胞プロトコル；(5) アポトーシスアッセイ、および (6) 交差反応性試験が挙げられた。実験の詳細は、実施例で説明する。

20

【 0 1 3 2 】

本発明の抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、一価抗体、二重特異性抗体、ヘテロ結合体抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、F a b フラグメント、F (a b ') フラグメント、F a b 発現ライブラリーによって産生されるフラグメント、抗イディオタイプ (抗 I d) 抗体 (例えば、本発明の抗体に対する抗 I d 抗体を含む) 、および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 3 3 】

本発明の免疫グロブリン分子は、任意のタイプ (例えば、I g G 、I g E 、I g M 、I g D 、I g A および I g Y) 、任意のクラス (例えば、I g G 1 、I g G 2 、I g G 3 、I g G 4 、I g A 1 および I g A 2) または任意のサブクラスの免疫グロブリン分子であり得る。本抗体は、本発明の抗原結合抗体フラグメントであり得、それらとしては、F a b 、F a b ' および F (a b ') ₂ 、F d 、一本鎖 F v (s c F v) 、一本鎖抗体、ジスルフィド結合 F v (s d F v) および V L ドメインまたは V H ドメインのいずれかを含む単ドメイン抗体が挙げられるが、これらに限定されない。一本鎖抗体をはじめとした抗原結合抗体フラグメントは、可変領域を単独で、または以下：ヒンジ領域、C H 1 、C H 2 および C H 3 ドメインの全体または一部と組み合わせて、含み得る。可変領域と、ヒンジ領域、C H 1 、C H 2 および C H 3 ドメインとの任意の組み合わせを含む抗原結合フラグメントもまた、本発明に包含される。本発明の抗体は、鳥類および哺乳動物をはじめとした任意の動物起源に由来し得る。好ましくは、本抗体は、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類 (例えば、マウスおよびラット) 、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマまたはニワトリに由来する。

30

40

【 0 1 3 4 】

本発明の抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、またはそれ以上の多重特異性であり得る。多重特異性抗体は、O X 4 0 の異なるエピトープに対して特異的であってもよいし、O X 4 0 と、非相同のエピトープ (例えば、非相同のポリペプチドまたは固体支持体材料) との両方に対して特異的であってもよい。例えば、P C T 公開 W O 9 3 / 1 7 7 1 5 ; W O 9 2 / 0 8 8 0 2 ; W O 9 1 / 0 0 3 6 0 ; W O 9 2 / 0 5 7 9 3 ; T u t t ら、J I m m u n o l 1 4 7 : 6 0 (1 9 9 1) ; 米国特許第 4 , 4 7 4 , 8 9 3

50

号；同第4，714，681号；同第4，925，648号；同第5，573，920号；同第5，601，819号；K o s t e l n y ſ、J I m m u n o l 148:1547(1992)参照。

【0135】

本発明の抗体は、それらが認識するかまたは特異的に結合するOX40のエピトープまたは部分に関して記載され得るか、または特定され得る。そのエピトープまたはポリペプチド部分は、本明細書中に記載されるように、例えば、N末端およびC末端の位置、連続するアミノ酸残基のサイズによって特定され得るか、または表および図に列挙され得る。

【0136】

本発明の抗体はまた、交差反応性に関して記載され得るか、または特定され得る。OX40に対して少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%および少なくとも50%の同一性（当該分野において公知で、本明細書中に記載される方法を用いて計算される）を有するOX40ポリペプチドに結合する抗体もまた、本発明に包含される。抗OX40抗体は、約 10^{-7} M未満の、約 10^{-6} M未満または約 10^{-5} M未満の K_D で、他のタンパク質（例えば、その抗OX40抗体が対象としている種以外の種由来の抗OX40抗体）にも結合し得る。

【0137】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、ヒトOX40およびその対応エピトープの他の哺乳動物ホモログと交差反応し得る。特定の実施形態において、上記の交差反応性は、任意の単一の特定の抗原性ポリペプチドもしくは免疫原性ポリペプチド、または本明細書中に開示される特定の抗原性ポリペプチドおよび/もしくは免疫原性ポリペプチドの組み合わせに関するものである。

【0138】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でOX40をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに結合する抗体も、さらに本発明に包含される。本発明の抗体は、本発明のポリペプチドに対する結合親和性に関して記載され得るか、または特定され得る。好ましい結合親和性としては、 $10^{-8} \sim 10^{-15}$ M、 $10^{-8} \sim 10^{-12}$ M、 $10^{-8} \sim 10^{-10}$ Mまたは $10^{-10} \sim 10^{-12}$ Mの平衡解離定数すなわち K_D を有するものが挙げられる。本発明はまた、競合的結合を測定するための当該分野で公知の任意の方法（例えば、本明細書中に記載されるイムノアッセイ）によって測定されるような、本発明のエピトープへの抗体の結合を競合的に阻害する抗体を提供する。好ましい実施形態において、本抗体は、エピトープへの結合を、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%または少なくとも50%、競合的に阻害する。

【0139】

5.5 ベクターおよび宿主細胞

別の局面において、本発明は、本明細書中に開示されるような抗体をコードする、単離された核酸配列、本発明の抗体をコードするヌクレオチド配列を含むベクター構築物、そのようなベクターを含む宿主細胞、および本抗体を作製するための組換え手法を提供する。

【0140】

本抗体の組換え作製のために、本抗体をコードする核酸を単離し、さらなるクローニング（DNAの増幅）または発現に向けて、複製可能なベクターに挿入する。本抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて（例えば、本抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって）、容易に単離および配列決定される。クローニングおよび形質転換のための標準的な手法は、本発明の抗体を発現する細胞株の調製において用いられ得る。

【0141】

5.5.1 ベクター

多くのベクターが利用可能である。そのベクターの成分としては、一般に、以下：シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終結配列、のうちの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターは、周知の手法を用いて調製することができる。発現ベクターは、適当な転写制御ヌクレオチド配列または翻訳制御ヌクレオチド配列（例えば、哺乳動物、微生物、ウイルスまたは昆虫の遺伝子に由来するもの）に作動可能に連結されたヌクレオチド配列を含み得る。制御配列の例としては、転写プロモーター、オペレーター、エンハンサー、mRNAリボソーム結合部位、ならびに/または転写および翻訳の開始および終結を調節する他の適切な配列が挙げられる。ヌクレオチド配列は、制御配列が、適切なポリペプチドに対してそのヌクレオチド配列に機能的に関連するとき、「作動可能に連結」されている。したがって、プロモーターヌクレオチド配列は、そのプロモーターヌクレオチド配列が、適切なヌクレオチド配列の転写を調節する場合、例えば抗体重鎖配列に作動可能に連結されている。本発明の抗体の発現に有用な発現ベクターの例は、出願WO 04/070011（これは、本明細書中で参考として組み込まれる）に見られる。

10

20

30

40

50

【0142】

さらに、抗体の重鎖配列および/または軽鎖配列と天然には関連しない適切なシグナルペプチドをコードする配列が、発現ベクターに組み込まれ得る。例えば、シグナルペプチド（分泌リーダー）に対するヌクレオチド配列は、その抗体が細胞周辺腔または培地中に分泌されるように、ポリペプチド配列にインフレームで融合され得る。意図される宿主細胞において機能性であるシグナルペプチドは、適切な抗体の細胞外分泌を増大させる。そのシグナルペプチドは、細胞から抗体が分泌されるとき、ポリペプチドから切断され得る。そのような分泌シグナルの例は、周知であり、それらとしては、例えば、米国特許第5,698,435号；同第5,698,417号；および同第6,204,023号に記載されているものが挙げられる。

【0143】

5.5.2 宿主細胞

本発明において有用な宿主細胞は、原核生物細胞、酵母細胞または高等真核細胞であり、それらとしては、抗体コード配列を含む、組換えバクテリオファージDNA発現ベクター、プラスミドDNA発現ベクターまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、*E. coli*、*B. subtilis*）などの微生物；抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、*Saccharomyces*、*Pichia*）；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）で感染させた昆虫細胞系；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、*CaMV*；タバコモザイクウイルス、*TMV*）で感染させたか、または抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、*Ti*プラスミド）で形質転換された、植物細胞系；または哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）もしくは哺乳動物ウイルス由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0144】

本発明において宿主細胞として有用な原核生物としては、グラム陰性生物またはグラム陽性生物（例えば、*E. coli*、*B. subtilis*、*Enterobacter*、*Erwinia*、*Klebsiella*、*Proteus*、*Salmonella*、*Serratia*および*Shigella*、ならびに*Bacilli*、*Pseudomonas*および*Streptomyces*）が挙げられる。1つの好ましい*E. coli*クローニング宿主は、*E. coli* 294（ATCC 31,446）であるが、他の株（例えば、*E. coli* B、*E. coli* X1776（ATCC 31,537）および*E. c*

oli W3110 (ATCC 27, 325) も適当である。これらの例は、限定するものでなく、例示である。

【0145】

原核生物宿主細胞において使用するための発現ベクターは、一般に、1つ以上の表現型選択マーカー遺伝子を含む。表現型選択マーカー遺伝子は、例えば、抗生物質耐性を付与するか、または独立栄養要求性を与えるタンパク質をコードする遺伝子である。原核生物宿主細胞に有用な発現ベクターの例としては、市販のプラスミド（例えば、pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)、pGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wisconsin, USA) および pET (Novagen, Madison, Wisconsin, USA) および pRSET (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA) の一連のベクター (Studier, J Mol Biol 219:37 (1991); Schoepfer, Gene 124:83 (1993)) から得られるものが挙げられる。組換え原核生物宿主細胞発現ベクターに通常用いられるプロモーター配列としては、T7 (Rosenbergら、Gene 56:125 (1987))、 β -ラクタマーゼ (ペニシリナーゼ)、ラクトースプロモーター系 (Changら、Nature 275:615 (1978); Goeddelら、Nature 281:544 (1979))、トリプトファン (trp) プロモーター系 (Goeddelら、Nucl Acids Res 8:4057 (1980)) および tac プロモーター (Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990)) が挙げられる。

【0146】

本発明において有用な酵母または糸状菌としては、Saccharomyces 属、Pichia 属、Actinomyces 属、Kluyveromyces 属、Schizosaccharomyces 属、Candida 属、Trichoderma 属、Neurospora 属由来のものおよび糸状菌（例えば、Neurospora、Penicillium、Tolypocladium および Aspergillus）が挙げられる。酵母ベクターは、しばしば、2 μ 酵母プラスミド由来の複製起点配列、自律複製配列 (ARS)、プロモーター領域、ポリアデニル化のための配列、転写終結のための配列、および選択マーカー遺伝子を含む。酵母ベクターにとって適当なプロモーター配列としては、とりわけ、メタロチオネイン、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (Hitze manら、J Biol Chem 255:2073 (1980)) または他の糖分解酵素 (Hollandら、Biochem 17:4900 (1978))（例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼおよびグルコキナーゼ）に対するプロモーターが挙げられる。酵母での発現において用いるための他の適当なベクターおよびプロモーターは、さらに、Fleerら、Gene 107:285 (1991) に記載されている。酵母にとって他の適当なプロモーターおよびベクターならびに酵母形質転換プロトコルは、当該分野で周知である。酵母形質転換プロトコルは、周知である。1つのそのようなプロトコルは、Hinnenら、Proc Natl Acad Sci 75:1929 (1978) によって報告されている。このHinnenプロトコルは、選択培地中でTrp⁺形質転換体を選択するものである。

【0147】

哺乳動物または昆虫の宿主細胞培養系を、組換え抗体を発現させるために用いてもよい。原則として、脊椎動物の培養物由来であるか、無脊椎動物の培養物由来であるかに関係なく、いずれの高等真核細胞培養物も用いることができる。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞および昆虫細胞が挙げられる (Luckowら、Bio/Technology

y 6:47 (1988); Millerら、Genetics Engineering, Setlowら編、Vol. 8, pp. 277-9, Plenum Publishing (1986); Msedaら、Nature 315:592 (1985))。例えば、異種タンパク質の生成のために、バキュロウイルス系を用いてもよい。昆虫系では、Autographa californica核多角体病ウイルス(AcNPV)が、外来遺伝子を発現させるベクターとして用いられ得る。そのウイルスは、Spodoptera frugiperda細胞において生育する。抗体コード配列を、そのウイルスの非必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)に個別にクローニングし、AcNPVプロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の支配下に置いてよい。同定されている他の宿主としては、Aedes、Drosophila melanogaster およびBombyx moriが挙げられる。トランスフェクション用の種々のウイルス株(例えば、AcNPVのL-1バリエーションおよびBombyx mori NPVのBm-5株)が、公的に入手可能であり、そ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本発明に従って本明細書中でウイルスとして用いられ得る。さらに、ワタ、トウモロコシ、ジャガイモ、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また、宿主として用いられる。

【0148】

培養(組織培養)における、脊椎動物細胞、および脊椎動物細胞の増殖は、通例の手順になっている。Tissue Culture, Kruseら編, Academic Press (1973) 参照。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、サル腎臓; ヒト胎児腎臓; ベビーハムスター腎臓細胞; チャイニーズハムスター卵巣細胞 / -DHFR (CHO, Urlaubら、Proc Natl Acad Sci USA 77:4216 (1980)); マウスセルトリ細胞; ヒト子宮頸癌細胞(HELA); イヌ腎臓細胞; ヒト肺細胞; ヒト肝臓細胞; マウス乳腺腫瘍; およびNS0細胞である。

【0149】

宿主細胞は、抗体産生のために、上記ベクターで形質転換され、そして、適切な場合に、プロモーター、転写調節配列および翻訳調節配列を誘導するため、形質転換体を選択するため、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために、改変された従来の栄養培地中で培養される。通常用いられるプロモーター配列およびエンハンサー配列は、ポリオーマウイルス、アデノウイルス2、サルウイルス40 (SV40) およびヒトサイトメガロウイルス(CMV) 由来である。SV40ウイルスゲノム由来のDNA配列は、哺乳動物宿主細胞内の構造遺伝子配列、例えば、SV40起源、初期および後期プロモーター、エンハンサー、スプライシング部位およびポリアデニル化部位を発現させるための他の遺伝因子を提供するために用いられ得る。ウイルスの初期プロモーターと後期プロモーターの両方が、ウイルス複製起点も含み得るフラグメントとしてウイルスゲノムから容易に得られるので、それらが特に有用である。哺乳動物宿主細胞において用いるための例示的な発現ベクターは、市販されている。

【0150】

本発明の抗体を作製するために用いられる宿主細胞は、種々の培地中で培養され得る。市販の培地(例えば、Ham's F10 (Sigma)、基礎培地(MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) およびダルベッコ改変イーグル培地(DMEM, Sigma))が、宿主細胞の培養に適している。さらに、Hamら、Meth Enzymol 58:44 (1979)、Barnesら、Anal Biochem 102:255 (1980) および米国特許第4,767,704号; 同第4,657,866号; 同第4,560,655号; 同第5,122,469号; 同第5,712,163号; または同第6,048,728号に記載されている任意の培地を、宿主細胞用の培養液として用いてもよい。これらの培地のうちのいずれかには、必要に応じて、ホルモンおよび/または他の成長因子(例えば、インスリン、トランスフェリンまたは上皮成長因子)、塩(例えば、塩化X(ここで、Xは、ナトリウム、カルシウム、マグネシウムである); およびリン酸塩)、緩衝液(例えば、HEPES)、ヌクレオチド(例えば、アデ

ノシンおよびチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCIN(商標)薬)、微量元素(マイクロモルの範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物として定義される)、およびグルコースまたは等価なエネルギー源が補充されていてもよい。他の任意の必要な補充物もまた、当業者に公知の適切な濃度で含まれていてもよい。温度、pHなどの培養条件は、発現について選択される宿主細胞とともにそれまで用いられていたものであり、当業者には明らかであろう。

【0151】

5.6 抗体をコードするポリヌクレオチド

本発明は、本発明の抗体およびそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドまたは核酸、例えば、DNAをさらに提供する。例示的なポリヌクレオチドとしては、本明細書中に記載されるアミノ酸配列のうちの1つ以上を含む抗体鎖をコードするものが挙げられる。本発明はまた、ストリンジェントな、またはそれより低いストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含する。

10

【0152】

本ポリヌクレオチドは、当該分野で公知の任意の方法によって、入手され、そしてそのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が決定され得る。例えば、本抗体のヌクレオチド配列が既知である場合、本抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチド(例えば、Kutmeierら、Bio/Techniques 17: 242(1994))に記載されているように)から構築され得、その構築は、簡潔には、本抗体をコードする配列の一部を含む重複オリゴヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、次いで、その連結されたオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅が含まれる。

20

【0153】

あるいは、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適当な起源由来の核酸から作製され得る。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンが入手できないが、その抗体分子の配列が既知である場合、その免疫グロブリンをコードする核酸は、その配列の3'および5'末端にハイブリダイズすることができる合成プライマーを用いたPCR増幅、または特定の遺伝子配列(例えば、本抗体をコードするcDNAライブラリーからcDNAクローンを同定するための配列)に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いるクローニングによって、適当な起源(例えば、本抗体を発現する任意の組織または細胞(例えば、本発明の抗体を発現させるために選択されたハイブリドーマ細胞)から作製された抗体cDNAライブラリーもしくはcDNAライブラリー、またはそのような組織もしくは細胞から単離された核酸、好ましくは、ポリA⁺RNA)から化学的に合成され得るか、または入手され得る。次いで、PCRによって生成された増幅核酸を、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングすることができる。

30

【0154】

いったん、本抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、その抗体のヌクレオチド配列を、ヌクレオチド配列の操作にむけて、当該分野で周知の方法、例えば、組換えDNA技術、部位特異的突然変異誘発、PCRなど(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory(1990); Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons(1998)(この両方の全体が、本明細書中で参考として組み込まれる)に記載されている技術参照)を用いて、操作することにより、異なるアミノ酸配列を有する抗体を作製してもよく、例えば、アミノ酸の置換、欠失および/または挿入をもたらしてもよい。

40

【0155】

特定の実施形態において、重鎖および/または軽鎖の可変ドメインのアミノ酸配列を、周知の方法(例えば、配列の超可変性の領域を決定するための、他の重鎖可変領域および

50

軽鎖可変領域の既知のアミノ酸配列との比較)によって調べることで、CDRの配列を同定してもよい。通例の組換えDNA技術を用いて、そのCDRのうちの1つ以上をフレームワーク領域内、例えば、ヒトフレームワーク領域内に挿入することにより、前に記載したように非ヒト抗体をヒト化してもよい。そのフレームワーク領域は、天然に存在するフレームワーク領域またはコンセンサスフレームワーク領域であり得、好ましくは、ヒトフレームワーク領域であり得る(例えば、ヒトフレームワーク領域の列挙についてChothiaら、J Mol Biol 278:457(1998)参照)。好ましくは、フレームワーク領域とCDRとを組み合わせることによって作製されるポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、前で述べられたように、1つ以上のアミノ酸が、フレームワーク領域内で置換されてもよく、好ましくは、そのアミノ酸置換は、抗原に対するその抗体の結合を高めるものである。さらに、そのような方法を用いることにより、鎖内ジスルフィド結合に關与する1つ以上の可変領域システイン残基のアミノ酸を置換または欠失させることにより、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合を欠く抗体分子を作製してもよい。本ポリヌクレオチドに対する他の変更も、本発明によって包含され、それは、当該分野の技術範囲内である。

10

【0156】

さらに、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子とともに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子をスプライシングすることによる、「キメラ抗体」を作製するために開発された手法(Morrisonら、Proc Natl Acad Sci 81:851(1984); Neubergerら、Nature 312:604(1984); Takedaら、Nature 314:452(1985))を用いることができる。前に記載されたように、キメラ抗体は、様々な部分が様々な動物種由来の分子(例えば、マウスmAb由来の可変領域、およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する分子、例えば、ヒト化抗体)である。

20

【0157】

あるいは、一本鎖抗体の作製について報告されている手法(米国特許第4,946,778号; Bird, Science 242:423(1988); Hustonら、Proc Natl Acad Sci USA 85:5879(1988); および Wardら、Nature 334:544(1989))を、一本鎖抗体を作製するために適合させることができる。一本鎖抗体は、アミノ酸の架橋を介して、Fv領域の重鎖フラグメントと軽鎖フラグメントとを連結することによって形成され、その結果、一本鎖ポリペプチドがもたらされる。E.coliにおいて機能的なFvフラグメントを構築するための手法を用いてもよい(Skerreraら、Science 242:1038(1988))。

30

【0158】

5.7 抗OX40抗体の作製方法

本発明の抗体は、抗体を合成するための当該分野で公知の任意の方法、特に化学合成、または好ましくは組換え発現技術によって、作製され得る。

【0159】

本発明の抗体またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ(例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の一本鎖抗体)の組換え発現には、本抗体または本抗体のフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築が必要である。いったん、抗体分子をコードするポリヌクレオチドが得られると、本抗体の作製用のベクターは、組換えDNA技術によって作製され得る。抗体コード配列、ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含む発現ベクターが構築される。これらの方法としては、例えば、インビトロにおける組換えDNA技術、合成技術およびインビボにおける遺伝的組換えが挙げられる。

40

【0160】

その発現ベクターは、従来の手法によって宿主細胞に移入され、次いで、トランスフェクトされた細胞は、従来の手法によって培養されて、本発明の抗体が産生される。本発明

50

の1つの局面において、重鎖と軽鎖の両方をコードするベクターは、以下で詳述されるように免疫グロブリン分子全体の発現のために、宿主細胞において同時発現され得る。

【0161】

種々の宿主発現ベクターシステムを用いることにより、上に記載したように本発明の抗体分子が発現され得る。そのような宿主発現系は、目的のコード配列を作製し、続いて精製し得るビヒクルであるが、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトされたときに、本発明の抗体分子をインサイチュで発現し得る細胞でもある。E. coliなどの細菌細胞および真核細胞は、通常、組換え抗体分子の発現のために、特に、組換え抗体分子全体の発現のために、用いられる。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期(major intermediate early)遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターとともに用いられるCHOなどの哺乳動物細胞は、抗体に対して有効な発現系である(Foeckingら、Gene 45:101(1986); Cockettら、Bio/Technology 8:2(1990))。

10

【0162】

さらに、挿入された配列の発現を調節するか、または遺伝子産物を所望の特定の様式で改変およびプロセッシングする宿主細胞株が選択され得る。タンパク質産物のそのような改変(例えば、グリコシル化)およびプロセッシング(例えば、切断)は、そのタンパク質が機能するのに重要であり得る。様々な宿主細胞が、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後のプロセッシングおよび改変に対して特徴的かつ特定のメカニズムを有している。適切な細胞株または宿主系を選択することにより、発現する外来タンパク質の適正な改変およびプロセッシングを確実に行うことができる。この目的のために、一次転写物の適正なプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化に対する細胞機構を有する真核生物宿主細胞を用いることができる。そのような哺乳動物宿主細胞としては、CHO、COS、293、3T3またはミエローマ細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0163】

長期間にわたり高収率で組換えタンパク質を産生するためには、安定な発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定して発現する細胞株を作り出してもよい。ウイルス複製開始点を含む発現ベクターを用いるのではなく、宿主細胞を、適切な発現調節領域(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)によって制御されるDNAおよび選択マーカーで形質転換することができる。外来DNAを導入した後、作り出された細胞を強化培地中で1~2日間生育し、次いで選択培地に切り替える。その組換えプラスミド内の選択マーカーは、その選択に対する抵抗性を付与するものであり、その選択マーカーによって、その細胞の染色体にプラスミドを安定的に組み込むことができるようになり、そしてその細胞が生育されることにより遺伝子座が形成され、そしてその細胞は、クローン化されて、細胞株に増幅され得る。この方法は、抗体分子を発現する細胞株を作り出すために都合よく用いられ得る。そのような作り出された細胞株は、抗体分子と直接的または間接的に相互作用する化合物のスクリーニングおよび評価において特に有用であり得る。

30

【0164】

いくつかの選択システムを用いてもよく、それらとしては、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wiglerら、Cell 11:223(1977))、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalskaら、Proc Natl Acad Sci USA 48:202(1992))およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら、Cell 22:817(1980))遺伝子が挙げられるがこれらに限定されず、それらは、それぞれtk細胞、hgprt細胞またはaprt細胞において用いられ得る。また、以下の遺伝子:dhfr(メトトレキサートに対する抵抗性を付与する)(Wiglerら、Proc Natl Acad Sci USA 77:357(1980); O'Hareら、Proc Natl Acad Sci USA 78:1527(1981)); gpt(ミコフェノール酸に対する抵抗性を付与する)(Mulliganら、Proc Natl Acad Sci

40

50

USA 78:2072(1981); neo(アミノグリコシドG-418に対する抵抗性を付与する)(Wuら、Biotherapy 3:87(1991)); およびhygro(ハイグロマイシンに対する抵抗性を付与する)(Santerreら、Gene 30:147(1984))に対する選択の根拠として、代謝拮抗物質抵抗性を用いることができる。組換えDNA技術の分野で通常知られている方法を日常的に適用することにより、所望の組換えクローンを選択してもよく、そのような方法は、例えば、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons(1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press(1990); およびDracopoliら編、Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons(1994)の第12および13章; Colb erre-Garapinら、J Mol Biol 150:1(1981)(これらの全体が本明細書中で参考として組み込まれる)に記載されている。

【0165】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって高めることができる(総説として、Bebbingtonら、"The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells" DNA Cloning, Vol. 3. Academic Press(1987)参照)。抗体を発現するベクターシステム内のマーカーが増幅可能であるとき、宿主細胞の培養物中に存在するインヒビターのレベルを上昇させることにより、マーカー遺伝子のコピー数を増加させる。その増幅された領域は、抗体遺伝子に関連するので、その抗体の産生も増加することになる(Crouseら、Mol Cell Biol 3:257(1983))。

【0166】

本発明の2つの発現ベクターを用いて、宿主細胞を同時にトランスフェクトしてもよく、ここで、第1のベクターは、重鎖由来のポリペプチドをコードし、第2のベクターは、軽鎖由来のポリペプチドをコードする。その2つのベクターは、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの発現を等しくする同一の選択マーカーを含み得る。あるいは、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの両方をコードし、発現することができる単一ベクターを用いてもよい。そのような状況では、有毒な遊離重鎖が過剰にならないようにするために、軽鎖を重鎖の前に配置するべきである(Proudfoot, Nature 322:52(1986); Kohler, Proc Natl Acad Sci USA 77:2197(1980))。重鎖および軽鎖に対するコード配列には、cDNAまたはゲノムDNAが含まれ得る。

【0167】

いったん、本発明の抗体分子が、動物によって産生されるか、化学的に合成されるか、または組換え的に発現されたら、その抗体分子を、免疫グロブリン分子を精製するための当該分野で公知の任意の方法によって、例えば、クロマトグラフィ(例えば、イオン交換、親和性(特に、プロテインAの後の特定の抗原に対する親和性)およびサイズ排除クロマトグラフィ)、遠心分離、差次的な溶解性、またはタンパク質を精製するための他の任意の標準的な手法によって精製してもよい。さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントを、本明細書中に記載されるかまたは別途当該分野で公知の異種ポリペプチド配列に融合して、精製を容易にすることができる。

【0168】

本発明は、ポリペプチドに組換え的に融合されているか、または化学的に結合体化されている(共有結合的な結合体化と非共有結合的な結合体化の両方を含む)抗体を包含する。融合または結合体化された本発明の抗体は、精製を容易にするために用いられ得る。例えば、PCT公開WO93/21232; EP439,095; Naramuraら、Immunol Lett 39:91(1994); 米国特許第5,474,981号;

Gilliesら、Proc Natl Acad Sci USA 89:1428 (1992); Fellら、J Immunol 146:2446 (1991) (これらの全体が本明細書中で参考として組み込まれる) 参照。

【0169】

さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントを、マーカー配列 (例えば、精製を容易にするペプチド) に融合することができる。好ましい実施形態において、そのマーカーアミノ酸配列は、ヘキサ - ヒスチジンペプチド (例えば、とりわけ、pQEベクター (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif, 91311) 内に提供されるタグであり、これらの多くが市販されている。Gentzら、Proc Natl Acad Sci USA 86:821 (1989) に記載されているように、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の便利な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグとしては、「HA」タグ (インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに相当するタグ) (Wilsonら、Cell 37:767 (1984)) および「flag」タグが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0170】

5.8 抗体の精製

組換え手法を用いるとき、本抗体は、細胞内で、もしくは細胞周辺腔内に産生され得るか、または直接、培地に分泌され得る。本抗体が、細胞内で産生される場合、第1工程として、粒状の破片、すなわち、宿主細胞または溶解フラグメントを、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去してもよい。Carterら、Bio/Technology 10:163 (1992) には、E. coliの細胞周辺腔に分泌された抗体を単離するための手順が記載されている。簡潔には、酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTAおよびフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) の存在下において、約30分間にわたって細胞ペーストを溶かす。細胞残屑を遠心分離によって除去する。その抗体が培地中に分泌される場合、一般に、まず、そのような発現系からの上清を、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用いて、濃縮する。タンパク質分解を阻害するために、PMSFなどのプロテアーゼインヒビターを前述の工程のいずれかに含めてもよく、外因性の夾雑物の増殖を防ぐために、抗生物質を含めてもよい。

20

30

【0171】

細胞から調製される抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析およびアフィニティークロマトグラフィを用いて精製され得、アフィニティークロマトグラフィが、好ましい精製手法である。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、その抗体に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに左右される。プロテインAを用いることにより、ヒトIgG1、IgG2またはIgG4重鎖に基づいて抗体を精製することができる (Lindmarkら、J Immunol Meth 62:1 (1983))。プロテインGは、すべてのマウスアイソタイプおよびヒトIgG3に対して推奨される (Gussら、EMBO J 5:1567 (1986))。親和性リガンドを付着させるマトリックスは、アガロースであることが最も多いが、他のマトリックスも利用可能である。力学的に安定なマトリックス (例えば、コントロールドポアガラスまたはポリ (スチレンジビニル) ベンゼン) では、アガロースよりも速い流速かつ短いプロセス時間が達成され得る。抗体がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABXTM樹脂 (J. T. Baker; Phillipsburg, N. J.) が精製に有用である。タンパク質を精製するための他の手法 (例えば、イオン交換カラムにおける分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカにおけるクロマトグラフィ、ヘパリンSEPHAROSE (商標) におけるクロマトグラフィ、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂におけるクロマトグラフィ (例えば、ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGEおよび硫酸塩析) も、回収される抗体に応じて利用可能である。任意の予備的な精製工程の後、目的の抗体および夾雑物

40

50

を含む混合物を、約 2.5 ~ 4.5 の pH の溶出緩衝液を用いて低 pH 疎水性相互作用クロマトグラフィに供してもよく、好ましくは、低塩濃度（例えば、約 0 ~ 0.25 M の塩）において行われ得る。

【0172】

5.9 薬学的処方物

本ポリペプチドまたは本抗体の治療的な処方物は、所望の純度を有する本ポリペプチドと、当該分野において代表的に用いられる、任意の「薬学的に許容可能な」キャリア、賦形剤または安定剤（これらのすべてが、「賦形剤」と呼ばれる）、すなわち、緩衝剤、安定化剤、保存剤、等張化剤（isotonicifier）、非イオン性洗浄剤、酸化防止剤および他の種々雑多な添加剤とを混合することによって、凍結乾燥された処方物または水溶液として貯蔵用に調製され得る。Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol 編（1980）参照。そのような添加剤は、用いられる投薬量および濃度においてレシipientに対して無毒性でなければならない。

【0173】

緩衝剤は、生理学的条件に近似の範囲内に pH を維持するのを助ける。緩衝剤は、好ましくは、約 2 mM ~ 約 50 mM の範囲の濃度で存在する。本発明とともに使用するのに適した緩衝剤としては、有機酸と無機酸の両方、およびそれらの塩（例えば、クエン酸緩衝液（例えば、クエン酸ナトリウム - クエン酸二ナトリウム混合物、クエン酸 - クエン酸三ナトリウム混合物、クエン酸 - クエン酸ナトリウム混合物など）、コハク酸緩衝液（例えば、コハク酸 - コハク酸ナトリウム混合物、コハク酸 - 水酸化ナトリウム混合物、コハク酸 - コハク酸二ナトリウム混合物など）、酒石酸緩衝液（例えば、酒石酸 - 酒石酸ナトリウム混合物、酒石酸 - 酒石酸カリウム混合物、酒石酸 - 水酸化ナトリウム混合物など）、フマル酸緩衝液（例えば、フマル酸 - フマル酸ナトリウム混合物など）、フマル酸緩衝液（例えば、フマル酸 - フマル酸ナトリウム混合物、フマル酸 - フマル酸二ナトリウム混合物、フマル酸ナトリウム - フマル酸二ナトリウム混合物など）、グルコン酸緩衝液（例えば、グルコン酸 - グルコン酸ナトリウム混合物、グルコン酸 - 水酸化ナトリウム混合物、グルコン酸 - グルコン酸カリウム混合物など）、シュウ酸緩衝液（例えば、シュウ酸 - シュウ酸ナトリウム混合物、シュウ酸 - 水酸化ナトリウム混合物、シュウ酸 - シュウ酸カリウム混合物など）、乳酸緩衝液（例えば、乳酸 - 乳酸ナトリウム混合物、乳酸 - 水酸化ナトリウム混合物、乳酸 - 乳酸カリウム混合物など）および酢酸緩衝液（例えば、酢酸 - 酢酸ナトリウム混合物、酢酸 - 水酸化ナトリウム混合物など））が挙げられる。さらに、リン酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液および Tris などのトリメチルアミン塩も挙げられ得る。

【0174】

微生物の成長を遅延させるために保存剤を加えてもよく、それは、0.2% ~ 1% (w/v) の範囲の量で加えてもよい。本発明とともに用いるのに適した保存剤としては、フェノール、ベンジルアルコール、メタ - クレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、ベンザルコニウムハロゲン化物（例えば、塩化物、臭化物およびヨウ化物）、塩化ヘキサメトニウムおよびアルキルパラベン（例えば、メチルパラベンまたはプロピルパラベン）、カテコール、レソルシノール、シクロヘキサノールおよび 3 - ペンタノールが挙げられる。時折「安定剤」として知られる等張剤（Isotonicifiers）は、本発明の液体組成物の等張性を確実にするために加えられることがあり、それらとしては、多価糖アルコール、好ましくは、三価またはそれ以上の糖アルコール（例えば、グリセリン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトールおよびマンニトール）が挙げられる。

【0175】

安定剤とは、増量剤から、治療薬を可溶化するかまたは変性の妨害もしくは容器の壁への接着の妨害を助ける添加剤までの範囲の機能を有し得る、広いカテゴリーの賦形剤のことを指す。代表的な安定剤は、多価糖アルコール（上に列挙したもの）；アミノ酸（例え

ば、アルギニン、リシン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L - ロイシン、2 - フェニルアラニン、グルタミン酸、トレオニンなど）、有機糖または有機糖アルコール（例えば、ラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイニシトール（myoinisitol）、ガラクトール、グリセロールなど（イノシトールなどのシクリトールを含む））；ポリエチレングリコール；アミノ酸ポリマー；硫黄含有還元剤（例えば、尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、アルファ - モノチオグリセロールおよびチオ硫酸ナトリウム）；低分子量ポリペプチド（すなわち < 10 残基）；タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）単糖類（例えば、キシロース、マンノース、フルクトース、グルコース）；二糖類（例えば、ラクトース、マルトース、スクロース）および三糖類（例えば、ラフィノース）；および多糖類（例えば、デキストラン）であり得る。安定剤は、活性なタンパク質の 1 重量部あたり 0.1 ~ 10,000 重量の範囲で存在し得る。

10

【0176】

非イオン性の界面活性物質または洗浄剤（「湿潤剤」としても知られる）は、治療薬の可溶化を助けるため、ならびに振動に誘導される凝集から治療タンパク質を保護するために加えられてもよい（それらによって、タンパク質を変性させることなく、その処方物が、圧力がかけられた剪断面に曝露される）。適当な非イオン性界面活性物質としては、ポリソルベート（20、80 など）、ポリオキサマー（polyoxamers）（184、188 など）、プルロニックポリオール、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル（TWEEN（登録商標）- 20、TWEEN（登録商標）- 80 など）が挙げられる。非イオン性界面活性物質は、約 0.05 mg/ml ~ 約 1.0 mg/ml、好ましくはは約 0.07 mg/ml ~ 約 0.2 mg/ml の範囲で存在し得る。

20

【0177】

さらなる種々雑多な賦形剤としては、増量剤（例えば、デンプン）、キレート剤（例えば、EDTA）、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミン E）および共溶媒が挙げられる。本明細書中の処方物はまた、処置される特定の徴候に対して必要に応じて、2 つ以上の活性な化合物を含んでもよく、それらは、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない補完的な活性を有するものである。例えば、免疫抑制剤をさらに提供することが望ましいことがある。そのような分子は、意図される目的に有効な量で組み合わせられて適当に存在する。その活性成分はまた、例えば、コアセルベーション手法もしくは界面重合（例えば、ヒドロキシメチルセルロース）によって調製されるマイクロカプセル内、またはゼラチン - マイクロカプセル内、およびポリ - （メタクリル酸メチル）マイクロカプセル内に、それぞれ、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンにおいて、封入され得る。そのような手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osal 編（1980）に開示されている。

30

【0178】

インビボ投与に使用する処方物は、滅菌されていなければならない。これは、例えば、滅菌濾過膜での濾過によって、容易に達成される。徐放調製物を調製してもよい。徐放調製物の適当な例としては、本抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形された物、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。徐放マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2 - ヒドロキシエチル - メタクリレート）、ポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第 3,773,919 号）、L - グルタミン酸とエチル - L - グルタメートとの共重合体、非分解性エチレン - 酢酸ビニル、分解性乳酸 - グリコール酸共重合体（例えば、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸 - グリコール酸共重合体および酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なミクロスフェア））およびポリ - D - （

40

50

-) - 3 - ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン - 酢酸ビニルおよび乳酸 - グリコール酸などのポリマーが、100日を越えて分子を放出することができるのに対し、ある特定のヒドロゲルは、それよりも短い時間にわたってタンパク質を放出する。カプセルに入れられた抗体が、体内に長時間にわたって存在するとき、37℃での水分への曝露の結果として、それらの抗体は、変性または凝集し、生物学的活性を喪失し得、免疫原性の変化が生じ得る。

【0179】

関与するメカニズムに応じて、安定性のために、合理的なストラテジーを工夫することができる。例えば、凝集メカニズムが、チオ - ジスルフィド交換を介した分子間S - S結合の形成であると発見される場合、スルフヒドリル残基の改変、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加物の使用、および特定のポリマーマトリックス組成物の開発によって、安定性が達成されることがある。

10

【0180】

特定の障害または状態の処置に有効な、治療的なポリペプチド、抗体またはそのフラグメントの量は、その障害または状態の性質に左右され、標準的な臨床上の手法によって決定され得る。可能である場合、まずはインビトロにおいて、次いで、ヒトでの試験の前に有用な動物モデル系において、用量反応曲線および本発明の薬学的組成物を決定することが望ましい。

【0181】

好ましい実施形態において、治療的なポリペプチド、抗体またはそのフラグメントの水溶液は、皮下注射によって投与される。各用量は、約0.5 μg ~ 約50 μg / キログラム体重、またはより好ましくは、約3 μg ~ 約30 μg / キログラム体重の範囲であり得る。

20

【0182】

皮下投与用の投薬スケジュールは、疾患のタイプ、疾患の重症度およびその治療薬に対する被験体の感度をはじめとしたいいくつかの臨床学的因子に応じて、1ヶ月に1回から1日に1回まで様々であり得る。

【0183】

5.10 抗OX40抗体の診断での使用

本発明の抗体は、改変された誘導体、すなわち、本抗体に対する、任意のタイプの分子の共有結合（OX40への結合を干渉しないような共有結合）によって改変された誘導体を包含する。例えば、その抗体誘導体としては、例えば、ビオチン化、HRPまたは他の任意の検出可能な部分によって改変されている抗体が挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0184】

本発明の抗体は、例えば、OX40を精製または検出（インビトロとインビボの両方における診断方法を含む）するために用いられ得るが、これらに限定されない。例えば、本抗体は、生物学的サンプル中のOX40のレベルを定性的および定量的に測定するためのイムノアッセイにおける用途を有する。例えば、Harlowら、Antibodies : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)（この全体が本明細書中で参考として組み込まれる）参照。

40

【0185】

以下で詳細に述べられるように、本発明の抗体は、単独で用いてもよいし、他の組成物と組み合わせて用いてもよい。本抗体は、さらに、N末端またはC末端において異種ポリペプチドに組換え的に融合されてもよいし、ポリペプチドまたは他の組成物に化学的に結合体化されてもよい（共有結合的および非共有結合的な結合体化を含む）。例えば、本発明の抗体は、検出アッセイにおける標識として有用な分子に、組換え的に融合されてもよいし、結合体化されてもよい。

【0186】

50

本発明は、診断用薬剤に結合体化された抗体またはそのフラグメントをさらに包含する。その抗体は、診断的に、例えば、特定の細胞、組織または血清において目的の標的の発現を検出するために；または例えば、所与の処置レジメンの有効性を判定するための臨床試験手順の一部として免疫学的応答の発生もしくは進行をモニターするために、用いることができる。検出は、その抗体と検出可能な物質とを結合させることによって容易になり得る。検出可能な物質の例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光性材料、発光性材料、生物発光性材料、放射性材料、様々なポジトロン放出断層撮影を用いる陽電子放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。その検出可能な物質は、当該分野で公知の手法を用いて、抗体（またはそのフラグメント）に直接、または中間体（例えば、当該分野で公知のリンカー）を介して間接的に、結合または結合体化され得る。酵素標識の例としては、ルシフェラーゼ（例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO））、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類酸化酵素（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ）、複素環オキシダーゼ（例えば、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ）、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼなどが挙げられる。

10

【0187】

酵素を抗体に結合体化するための手法は、O'Sullivanら、“Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay” Methods in Enzymology, Langoneら編、pp.147-66, Academic Press (1981)に記載されている。例えば、本発明に従って診断薬として使用するために、抗体に結合体化することができる金属イオンについての、米国特許第4,741,900号参照。適当な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適当な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適当な蛍光性材料の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光性材料の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光性材料の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；そして適当な放射性材料の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In または ^{99}Tc が挙げられる。

20

30

【0188】

時折、標識は、抗体に間接的に結合体化される。当業者は、これを達成するための様々な手法を知っている。例えば、抗体をビオチンと結合体化し、そして上で述べた3つの広いカテゴリーの標識のうちのいずれかをアビジンと結合体化するか、またはその逆でもよい。ビオチンは、アビジンに選択的に結合するので、この間接的な様式で、標識を抗体と結合体化することができる。あるいは、標識と抗体との間接的な結合体化を達成するために、抗体を小型ハプテン（例えば、ジグロキシシン）で結合体化し、そして上で述べた標識のうちの異なるタイプの1つを抗ハプテン抗体（例えば、抗ジグロキシシン抗体）で結合体化する。このように、抗体と標識との間接的な結合体化を達成することができる。

40

【0189】

本発明の別の実施形態では、本抗体は、標識される必要はなく、その存在は、その抗体に結合する標識された抗体を用いて検出することができる。

【0190】

本発明の抗体は、任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ）において用いられ得る。Zolla, Monoclonal Antibodies: A Manual of Tech

50

niques, pp. 147 - 158, CRC Press (1987) 参照。

【0191】

競合結合アッセイは、標識された標準物質が、限られた量の抗体との結合について被験サンプルと競合する能力に依存している。被験サンプル中の標的の量は、その抗体に結合するようになる標準物質の量に反比例する。結合するようになる標準物質の量の測定を容易にするために、その抗体は、一般に競合の前または後で不溶化される。結果として、抗体に結合している標準サンプルおよび被験サンプルは、未結合のままの標準サンプルおよび被験サンプルから都合よく分離され得る。

【0192】

サンドイッチアッセイは、2つの抗体の使用を含み、その各々は、異なる免疫原性部分すなわちエピトープまたは検出されるべきタンパク質に結合することができる。サンドイッチアッセイでは、解析される被験サンプルが、固体支持体上に固定化されている1次抗体に結合し、その後、2次抗体がその被験サンプルに結合し、そして不溶性の3つの部分の複合体が形成される。例えば、米国特許第4,376,110号参照。2次抗体は、それ自体が検出可能な部分で標識されているものであってもよいし（直接サンドイッチアッセイ）、検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定されるものであってもよい（間接サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの1つのタイプは、ELISAアッセイであり、この場合、検出可能な部分は、酵素である。

【0193】

抗体を固体支持体に付着させてもよく、これは、イムノアッセイまたは標的抗原の精製に特に有用である。そのような固体支持体としては、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられるが、これらに限定されない。このプロセスにおいて、抗体は、当該分野で周知の方法を用いて、固体支持体（例えば、SEPHADEX（商標）樹脂または濾紙）上に固定化される。その固定化された抗体を、精製される標的を含んでいるサンプルと接触させ、その後、その支持体を、固定化された抗体に結合している精製される標的以外のサンプル中の実質的にすべての材料を除去する適当な溶媒で洗浄する。最後に、その支持体を、その抗体から標的を放出させる別の適当な溶媒（例えば、グリシン緩衝液）で洗浄する。

【0194】

OX40に特異的に結合する、標識抗体、ならびにその誘導体およびアナログは、OX40の異常な発現および/または活性に関連する疾患、障害および/または状態を検出、診断またはモニターするために、診断目的で用いられる。本発明は、OX40の異常な発現の検出を提供し、その検出は、(a) OX40に特異的な本発明の1つ以上の抗体を用いて、ある個体の細胞または体液中のOX40の発現をアッセイする工程、および(b) その遺伝子発現のレベルを、標準的な遺伝子発現レベルと比較することにより、標準的な発現レベルと比べて、アッセイされたOX40発現レベルが高いかまたは低いことが、異常な発現を示す工程、を包含する。

【0195】

抗体は、サンプル中の、例えば、体液サンプル中または組織サンプル中の、OX40の存在および/またはレベルを検出するために用いられ得る。この検出方法は、サンプルをOX40抗体と接触させる工程、およびそのサンプルに結合した抗体の量を測定する工程を包含し得る。免疫組織化学のために、サンプルは、新鮮なものであってもよいし、凍結されたものであってもよいし、パラフィン内に包埋され、例えば、ホルマリンなどの保存剤で固定されたものであってもよい。

【0196】

本発明は、障害を診断するための診断アッセイを提供し、そのアッセイは、(a) 本発明の1つ以上の抗体を用いて、ある個体の細胞または体液中のOX40の発現をアッセイする工程、および(b) その遺伝子発現のレベルを、標準的な遺伝子発現レベルと比較することにより、標準的な発現レベルと比べて、アッセイされた遺伝子発現レベルが高いかまたは低いことが、特定の障害を示す工程、を包含する。

【0197】

本発明の抗体を用いることにより、当業者に公知の従来の免疫組織学的方法を用いて、生物学的サンプル中のタンパク質レベルをアッセイすることができる（例えば、Jalkanenら、J Cell Biol 101:976(1985); Jalkanenら、J Cell Biol 105:3087(1987)参照）。タンパク質遺伝子発現の検出に有用な他の抗体ベースの方法としては、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）およびラジオイムノアッセイ（RIA）などのイムノアッセイが挙げられる。適当な抗体アッセイ標識は、当該分野で公知であり、それらとしては、グルコースオキシダーゼなどの酵素標識；放射性同位体（例えば、ヨウ素（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{127}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{112}In 、 ^{111}In ）およびテクネチウム（ ^{99}Tc ）；ルミノールなどの発光性標識；および蛍光標識（例えば、フルオレセイン、ローダミンおよびビオチン）が挙げられる。放射性同位体結合型の同位体は、免疫シンチグラフィを用いて局在化され得る。

10

【0198】

本発明の1つの局面は、動物、好ましくは、哺乳動物、最も好ましくは、ヒトにおけるOX40の異常な発現に関連する疾患または障害の検出および診断である。1つの実施形態において、診断は：a) OX40に特異的に結合する有効量の標識分子を被験体に投与する工程（例えば、非経口的、皮下または腹腔内に）；b) 投与後に、その標識分子が、そのポリペプチドが発現する被験体内の部位に優先的に集中すること（および未結合の標識分子がバックグラウンドレベルにクリアランスされること）が可能となる時間だけ待つ工程；c) バックグラウンドレベルを決定する工程；およびd) 被験体内の標識分子を検出し、バックグラウンドレベルより高い標識分子が検出されることによって、その被験体がOX40の異常な発現に関連する特定の疾患または障害を有することが示唆される工程、を包含する。バックグラウンドレベルは、特定の系に対して、予め測定しておいた標準的な値と検出される標識分子の量との比較をはじめとした、様々な方法によって決定され得る。

20

【0199】

被験体のサイズおよび用いられるイメージングシステムが、診断画像を生成するのに必要なイメージング部分の質を決定することは、当該分野において理解されるだろう。放射性同位体部分の場合、ヒト被験体に対しては、注射される放射能の量は、 ^{99}Tc に関して、通常、約5～20ミリキュリーの範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、特定のタンパク質を含む細胞の位置に優先的に蓄積する。インビボイメージングは、Burchielら、“Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments.” Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, Burchielら編, Masson Publishing (1982)の第13章に記載されている。

30

【0200】

用いられる標識のタイプおよび投与様式をはじめとしたいくつかの可変要素に応じて、標識分子が被験体内の部位に優先的に集中すること、および未結合の標識分子がバックグラウンドレベルにクリアランスされることを可能にするための投与後の時間は、6～48時間、6～24時間または6～12時間である。別の実施形態において、投与後のその時間は、5～20日間または5～10日間である。

40

【0201】

ある実施形態において、上記疾患または障害のモニタリングは、その疾患または疾患を診断するための方法を繰り返すことによって行われる（例えば、最初の診断の1ヶ月後、最初の診断の6ヶ月後、最初の診断の1年後など）。

【0202】

標識分子の存在は、インビボにおけるスキャンングのための当該分野で公知の方法を用いて、患者において検出され得る。これらの方法は、用いる標識のタイプに依存する。当

50

業者は、特定の標識を検出するために適切な方法を判断することができる。本発明の診断方法において用いられ得る方法およびデバイスとしては、コンピュータ断層撮影（ＣＴ）、全身スキャン（例えば、陽電子放出断層撮影法（ＰＥＴ）、磁気共鳴画像（ＭＲＩ）および超音波検査）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２０３】

特定の実施形態において、上記分子は、放射性同位体で標識され、患者において放射線応答性手術装置（米国特許第５，４４１，０５０号）を用いて検出される。別の実施形態では、上記分子は、蛍光性化合物で標識され、患者において蛍光応答性走査装置を用いて検出される。別の実施形態では、上記分子は、陽電子放出金属で標識され、患者において陽電子放出断層撮影法を用いて検出される。なおも別の実施形態では、上記分子は、常磁性標識で標識され、患者において磁気共鳴画像（ＭＲＩ）を用いて検出される。

10

【０２０４】

別の局面において、本発明は、サイトカインの制御されていない発現が原因の疾患を発症する患者の素因を診断するための方法を提供する。ある特定の患者の細胞、組織または体液中のＯＸ４０の量が多いことは、その患者が、ある特定の疾患に罹患しやすいことを示唆し得る。１つの実施形態において、本方法は、低レベルまたは正常なレベルのＯＸ４０を有することが知られている被験体から細胞、組織または体液サンプルを回収する工程、その組織中のＯＸ４０の存在についてその組織または体液を解析する工程、およびその組織または体液中のＯＸ４０の発現レベルに基づいて、ある特定の疾患に対するその患者の素因を予測する工程を包含する。別の実施形態では、本方法は、規定のレベルのＯＸ４０を含むことが知られている細胞、組織または体液サンプルを患者から回収する工程、その組織または体液をＯＸ４０の量について解析する工程、および正常な細胞、組織または体液に対して確立された規定レベルまたは被験レベルに対するＯＸ４０の量の変化に基づいて、ある特定の疾患に対するその患者の素因を予測する工程を包含する。上記のＯＸ４０の規定レベルは、文献値に基づいた既知の量であってもよいし、正常な細胞、組織または体液中の量を測定することによって前もって決定されたものであってもよい。具体的には、ある特定の組織または体液中のＯＸ４０レベルの測定は、好ましくは疾患が発生する前に、その患者における疾患の特異的かつ早期の検出を可能にする。本方法を用いて診断することができる疾患としては、本明細書中に記載される疾患が挙げられるが、それらに限定されない。好ましい実施形態において、上記組織または体液は、末梢血、末梢血白血球、バイオブシー組織（例えば、肺または皮膚のバイオブシー）および組織である。

20

30

【０２０５】

本発明の抗体は、キット、すなわち、診断アッセイを行うための指示を含む、所定量の試薬のパッケージ化された組み合わせとして提供され得る。本抗体が酵素で標識される場合、そのキットは、その酵素が必要とする基質および補因子（例えば、検出可能な発色団またはフルオロフォアをもたらす基質前駆体）を備えていてもよい。さらに、他の添加剤（例えば、安定剤、緩衝液（例えば、ブロッキング緩衝液または溶解緩衝液）など）も備えていてもよい。様々な試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最適化する試薬溶液における濃度を提供するために、広く変化し得る。特に、それらの試薬は、溶解時に適切な濃度を有する試薬溶液をもたらす賦形剤を含む、乾燥粉末、通常は凍結乾燥されたものとして提供され得る。

40

【０２０６】

５．１１ 抗ＯＸ４０抗体の治療上の使用

本発明の抗体は、哺乳動物を処置するために用いられ得ることが企図される。１つの実施形態において、本抗体は、例えば前臨床データを得る目的で、非ヒト哺乳動物に投与される。処置される例示的な非ヒト哺乳動物としては、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、げっ歯類および前臨床試験が行われる他の哺乳動物が挙げられる。そのような哺乳動物は、本抗体を用いて処置される疾患に対して確立された動物モデルであり得るか、または目的の抗体の毒性を研究するために用いられ得る。これらの実施形態の各々において、用量漸増研究が、その哺乳動物に対して行われ得る。

50

【0207】

単独で投与されるかまたは細胞傷害性因子とともに投与される抗体（結合体化される治療的な部分有りまたは無し）を治療薬として用いることができる。本発明は、抗体ベースの治療に関し、その治療は、OX40媒介性の疾患、障害または状態を処置するために、本発明の抗体を動物、哺乳動物、またはヒトに投与する工程を包含する。その動物または被験体は、特定の処置を必要とする動物（例えば、特定の障害、例えば、OX40に関連する障害を有すると診断された動物）であり得る。OX40に対する抗体は、動物（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌ、非ヒト霊長類などが挙げられるがこれらに限定されない）ならびにヒトにおいて、アレルギー、喘息、自己免疫性疾患および炎症性疾患に有用である。例えば、治療的に許容可能な用量の本発明の抗体もしくは本抗体のカクテルを投与するによって、またはそれらを様々な起源の他の抗体とともに投与することによって、自己免疫性疾患または炎症性疾患の症状が、処置される哺乳動物において低減され得るか、または取り除かれ得る。

10

【0208】

本発明の治療化合物としては、本発明の抗体（本明細書中に記載されるような、そのフラグメント、アナログおよび誘導体を含む）および以下に記載されるような本発明の抗体をコードする核酸（本明細書中に記載されるようなそのフラグメント、アナログおよび誘導体、ならびに抗イディオタイプ抗体を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体を用いることにより、OX40の異常な発現および/または活性に関連する疾患、障害または状態（例えば、本明細書中に記載される疾患、障害または状態のうちのいずれか1つ以上が挙げられるがこれらに限定されない）を処置、阻害または予防することができる。OX40の異常な発現および/または活性に関連する疾患、障害または状態の処置および/または予防としては、それらの疾患、障害または状態に関連する少なくとも1つの症状の軽減が挙げられるがこれに限定されない。本発明の抗体は、当該分野で公知かまたは本明細書中に記載されるような、薬学的に許容可能な組成物として提供され得る。

20

【0209】

本発明の抗OX40抗体は、種々の疾患において治療的に用いられ得る。本発明は、哺乳動物においてOX40媒介性疾患を予防または処置するための方法を提供する。その方法は、疾患を予防または処置する量の抗OX40抗体を哺乳動物に投与する工程を包含する。抗OX40抗体は、OX40に結合し、かつ、サイトカインおよび細胞レセプター発現を制御し、それにより、非疾患状態に特有のサイトカインレベルをもたらすものである。OX40シグナル伝達は、様々な疾患（例えば、アレルギー、喘息、ならびに自己免疫および炎症に関連する疾患（例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎（例えば、潰瘍性大腸炎）、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病およびバセドウ病が挙げられる））に結びつけられている。

30

【0210】

本発明の抗体はまた、他の疾患（例えば、サルコイドーシス、自己免疫性の眼球の疾患、自己免疫性ブドウ膜炎、アトピー性皮膚炎、重症筋無力症、自己免疫性神経障害（例えば、ギラン・バレー）、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、悪性貧血、自己免疫性血小板減少症、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、血管炎（例えば、ウェゲナー肉芽腫症）、ベーチェット病、乾癬、疱疹状皮膚炎、尋常性天疱瘡、白斑、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、橋本甲状腺炎、自己免疫性の卵巣炎および睾丸炎、副腎の自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症（例えば、強直性脊椎炎）、ライター症候群、シェーグレン症候群およびその他の疾患が挙げられる）を予防および処置するために有用であり得る。

40

【0211】

宿主被験体において用いるための治療薬は、好ましくは、前記被験体においてその薬剤に対する免疫原性応答をほとんどから全く誘発しない。1つの実施形態において、本発明

50

は、そのような薬剤を提供する。例えば、1つの実施形態において、本発明は、宿主被験体において、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体と比べて実質的に低レベルでヒト抗マウス抗体応答（HAMA）を誘発する、および/または誘発すると予想される、ヒト化抗体を提供する。別の例では、本発明は、最小のヒト抗マウス抗体応答（HAMA）を誘発する、および/もしくは誘発すると予想されるか、または全く誘発しない、および/もしくは誘発しないと予想される、ヒト化抗体を提供する。1つの例において、本発明の抗体は、臨床的に許容可能なレベル、またはそれ未満のレベルで抗マウス抗体応答を誘発する。

【0212】

OX40の異常な発現および/または活性に関連する疾患または障害の処置、阻害および予防において有効な本抗体の量は、標準的な臨床手法によって決定することができる。投薬量は、処置される疾患のタイプ、疾患の重症度および経過（本抗体が予防的な目的で投与されるのか、治療的な目的で投与されるのかに関係なく）、これまでの治療、患者の病歴および本抗体に対する反応性、ならびに主治医の裁量に依存する。本抗体は、その疾患にふさわしい処置レジメンで投与され得る（例えば、疾患状態を寛解させるために1日～数日間にわたる1回もしくは数回の投薬、またはアレルギーもしくは喘息を予防するために、長期間にわたる周期的な投薬）。さらに、インビトロアッセイを必要に応じて用いることにより、最適な投薬量の範囲の特定が助けられることがある。処方物において用いられるべき正確な用量もまた、投与経路および疾患または障害の重症度に依存し、従事者の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。有効量は、インビトロまたは動物モデル試験システムから得られた用量反応曲線からの外挿により決定されてもよい。

【0213】

抗体について、患者に投与される投薬量は、代表的には、0.1mg/kg～150mg/kg患者体重である。好ましくは、患者に投与される投薬量は、0.1mg/kg～20mg/kg患者体重、より好ましくは、1mg/kg～10mg/kg患者体重である。一般に、ヒト抗体の半減期は、外来ポリペプチドに対する免疫応答に起因して、他の種由来の抗体よりもヒトの体内において長い。したがって、ヒト抗体では、低投薬量および低頻度の投与が可能になることが多い。さらに、例えば脂質化などの改変によって、抗体の取り込みおよび組織（例えば、脳）への透過を高めることにより、本発明の抗体の投薬量および投与の頻度は、低くなり得る。状態に応じて数日間またはそれ以上にわたる反復投与については、その処置は、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続される。しかしながら、他の投与レジメンも有用であり得る。この治療の進捗は、従来の手法およびアッセイによって容易にモニターされる。抗LFA-1抗体または抗ICAM-1抗体に対する例示的な投薬レジメンは、WO94/04188に開示されている。

【0214】

組成物の形態であり得る本発明の抗体は、良好な医療行為にふさわしい様式で製剤化、投薬および投与されるべきである。この文脈において考慮する因子としては、処置される特定の障害、処置される特定の哺乳動物、個別の患者の臨床状態、その障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、および医師に公知の他の因子が挙げられる。投与される抗体組成物の「治療有効量」は、上記のような考慮される因子に左右され、その治療有効量は、疾患または障害の予防、寛解または処置に必要な最小量である。本抗体は、対象の障害を予防または処置するために現在用いられている1つ以上の薬剤とともに製剤化される必要はないが、必要に応じてそれらとともに製剤化される。そのような他の薬剤の有効量は、処方物中に存在する抗体の量、障害または処置のタイプ、および上で述べた他の因子に依存する。これらは、通常、同じ投薬量、および本明細書の前で用いられたような投与経路、またはこれまでに用いられた投薬量の約1～99%で、使用される。

【0215】

本発明の抗体は、他のモノクローナル抗体またはキメラ抗体、あるいは例えば、本抗体と相互作用するエフェクター細胞の数もしくは活性を増加させるように働くリンフォカインまたは造血性成長因子（例えば、IL-2、IL-3、IL-7およびIFN-γ）と

組み合わせて都合よく用いられ得る。

【0216】

本発明の抗体は、単独で投与されてもよいし、他のタイプの処置（例えば、抗炎症性治療、免疫抑制性の薬物、免疫療法、化学療法、気管支拡張薬、抗IgE分子、抗ヒスタミンまたは抗ロイコトリエン）と組み合わせて投与されてもよい。

【0217】

好ましい局面において、本抗体は、実質的に精製される（例えば、その作用を限定するかまたは望まれない副作用をもたらす物質を実質的に含まない）。様々な送達系が知られており、本発明の抗体を投与するためにそれらを用いることができ、そのような送達系としては、注射、例えば、リボソーム、微小粒子、マイクロカプセル、本化合物を発現することができる組換え細胞内への封入、レセプター媒介性のエンドサイトーシス（例えば、Wuら、J Biol Chem 262:4429(1987)参照）、レトロウイルスベクターまたは他のベクターの一部としての核酸の構築物などが挙げられる。

10

【0218】

抗OX40抗体は、任意の許容可能な様式で哺乳動物に投与され得る。導入方法としては、非経口、皮下、腹腔内、肺内、鼻腔内、硬膜外、吸入および経口経路、ならびに所望であれば、免疫抑制性の処置のための病巣内投与が挙げられるがこれらに限定されない。非経口注入としては、筋肉内、皮内、静脈内、動脈内または腹腔内の投与が挙げられる。本抗体または本組成物は、任意の通例の経路によって、例えば、注入またはボーラス注射、上皮もしくは粘膜皮膚の裏打ち（例えば、口内の粘膜、直腸および腸管の粘膜など）を通過する吸収、によって投与され得、そして他の生物学的に活性な薬剤とともに投与され得る。投与は、全身性または局所性であり得る。さらに、脳室内注射および髄腔内注射をはじめとした任意の適当な経路によって、本発明の治療用抗体または治療用組成物を中枢神経系に導入することが望ましいことがある；脳室内注射は、脳室内カテーテル、例えば、レザバー（例えば、オマヤレザバー）に取り付けられたものによって容易になり得る。さらに、本抗体は、パルス注入によって適切に、特に本抗体の用量を減少させながら、投与される。投与が、短時間であるか長期間であるかに部分的に応じて、好ましくは注射によって、最も好ましくは静脈内注射または皮下注射によって、投薬される。

20

【0219】

例えば、吸入器または噴霧器、およびエアロゾル化剤を含む処方物を使用することによって、経肺投与もまた用いることができる。また、本抗体は、乾燥粉末組成物の形態で患者の肺に投与され得る（例えば、米国特許第6,514,496号参照）。

30

【0220】

特定の実施形態では、本発明の治療用抗体または治療用組成物を、処置の必要な領域に局所的に投与することが望ましいことがある；これは、例えば、局所的注入、局所的適用、カテーテルを用いる注射によって、坐剤を用いて、または埋没物を用いて、達成され得るが、これらに限定されず、前記埋没物は、多孔性、非多孔性またはゼラチン状の材料（シラスチック膜などの膜または繊維を含む）である。好ましくは、本発明の抗体を投与するときは、タンパク質を吸収しない材料を使用するように注意を払わなければならない。

40

【0221】

別の実施形態において、本抗体は、小胞、特にリボソームとして送達され得る（Langer, Science 249:1527(1990); Treatら、Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Beresteinら編、pp.353-365(1989); Lopez-Berestein, 同書, pp.317-27参照；広く同書参照）。

【0222】

なおも別の実施形態では、本抗体は、放出制御システムで送達され得る。1つの実施形態において、ポンプが使用され得る（Langer, Science 249:1527(1990); Sefton, CRC Crit Ref Biomed Eng 14

50

: 201 (1987); Buchwaldら、Surgery 88: 507 (1980); Saudekら、N Engl J Med 321: 574 (1989) 参照)。別の実施形態では、ポリマー性材料が使用され得る (Medical Applications of Controlled Release, Langerら編、CRC Press (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolenら編、Wiley (1984); Rangerら、J Macromol Sci Rev Macromol Chem 23: 61 (1983) 参照; Levyら、Science 228: 190 (1985); Duringら、Ann Neurol 25: 351 (1989); Howardら、J Neurosurg 71: 105 (1989) もまた参照)。なおも別の実施形態では、放出制御システムが、治療標的の近位に設置され得る。

10

【0223】

本発明は、薬学的組成物も提供する。そのような組成物は、治療有効量の抗体および生理的に許容可能なキャリアを含む。特定の実施形態において、用語「生理的に許容可能な」とは、連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認されていること、または米国薬局方、もしくは、動物、より詳細にはヒトにおいて使用するための他の一般に認識されている薬局方に列挙されていることを意味する。用語「キャリア」とは、その治療薬とともに投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルのことを指す。そのような生理学的キャリアは、滅菌された液体（例えば、水および油（例えば、石油、動物、野菜または合成起源のもの（例えば、落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油など）が挙げられる））であり得る。その薬学的組成物が静脈内投与されるとき、水が好ましいキャリアである。食塩水溶液および水性のデキストロス溶液およびグリセロール溶液もまた、液体キャリアとして、特に注射可能な溶液において、用いられ得る。適当な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、イネ、穀粉、胡粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。また、本組成物は、所望であれば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤またはpH緩衝剤を含んでもよい。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル、散剤、徐放処方物などの形態をとり得る。本組成物は、従来の結合剤およびキャリア（例えば、トリグリセリド）とともに、坐剤として製剤化され得る。経口処方物は、標準的なキャリア（例えば、薬学的グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなど）を含み得る。適当なキャリアの例は、E. W. Martinによる“Remington's Pharmaceutical Sciences”に記載されている。そのような組成物は、患者への適正な投与のための形態を提供するために、有効量の抗体、好ましくは精製された形態の抗体を、適当量のキャリアとともに含む。本処方物は、投与様式に適しているべきである。

20

30

【0224】

1つの実施形態において、本組成物は、人間への静脈内投与に適合させた薬学的組成物として、通例の手順に従って製剤化される。代表的には、静脈内投与用の組成物は、滅菌された等張性水性緩衝液における溶液である。必要であれば、本組成物は、可溶化剤、および注射部位における疼痛を和らげるリグノカインなどの局所麻酔剤も含んでもよい。通常、それらの成分は、別々に供給されるか、または密閉された容器（例えば、活性な薬剤の量を示しているアンプルまたは小袋）内に、単位剤形で、例えば、凍結乾燥された粉末もしくは水を含まない濃縮物として、一緒に混合される。本組成物が、注入によって投与される場合、本組成物は、滅菌された薬学的グレードの水または食塩水が入った注入ボトルを用いて調剤されていてもよい。本組成物が、注射によって投与される場合、それらの成分が投与前に混合され得るように注射用の滅菌水または食塩水のアンプルが、提供され得る。

40

50

【 0 2 2 5 】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の成分のうちの1つ以上で満たされた1つ以上の容器を備えた薬学的なパッケージまたはキットも提供する。医薬品または生物製品の製造、使用または販売を取り締まっている行政機関によって規定された形態の注意書きは、そのような容器に必要な応じて関連づけられ得、その注意書きは、ヒトへの投与についての製造、使用または販売に関する機関による承認を表したものである。

【 0 2 2 6 】

さらに、本発明の抗体は、様々なエフェクター分子（例えば、異種ポリペプチド、薬物、放射性ヌクレオチドまたはトキシン）に結合体化され得る。例えば、PCT公開WO 92/08495；WO 91/14438；WO 89/12624；米国特許第5,314,995号；およびEP 396,387参照。抗体またはそのフラグメントは、治療的な部分（例えば、細胞毒（例えば、細胞分裂抑制剤または細胞破壊剤））、治療薬または放射性金属イオン（例えば、アルファ放射体、例えば、²¹³Bi）に結合体化され得る。細胞毒または細胞傷害性薬剤には、細胞にとって有害な任意の薬剤が含まれる。例としては、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラセンジオン、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、糖質コルチコイド、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ビユーロマイシン、ならびにそれらのアナログまたはホモログが挙げられる。治療薬としては、代謝拮抗物質（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、ダカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパ、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）、シクロホスファミド、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およびcis-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、ダウノルビシン（以前のダウノマイシン）およびドキソルビシン）、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、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 2 2 7 】

抗体に対してそのような治療的な部分を結合体化するための手法は、周知であり、例えば、Arnonら、“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy” Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeldら（編）、pp. 243-56 Alan R. Liss (1985)；Hellstromら、“Antibodies For Drug Delivery” Controlled Drug Delivery, 2nd ed., Robinsonら編、pp. 623-53, Marcel Dekker (1987)；Thorpe “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review” Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pincheraら編、pp. 475-506 (1985)；“Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy,” Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwinら編、pp. 303-16, Academic Press (1985)；およびThorpeら、Immunol Rev 62:119 (1982)参照。あるいは、抗体は、2次抗体に結合体化されて、ヘテロ結合体抗体を形成し得る。例え

10

20

30

40

50

ば、米国特許第 4, 676, 980 号参照。

【0228】

本発明の結合体は、所与の生物学的応答を改変するために用いられ得、治療薬部分または薬物部分は、従来の化学的な治療薬に限定されると解釈されるべきでない。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り得る。そのようなタンパク質としては、例えば、トキシン（例えば、アブリン、リシン A、シュードモナス外毒素またはジフテリアトキシン）；タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、アポトーシス剤、例えば、TNF- α 、TNF- β 、AIM I（国際公開番号 WO 97/33899 参照）、AIM II（国際公開番号 WO 97/34911 参照）、Fas リガンド（Takahashi ら、Int Immunol, 6:1567 (1994)）、VEGI（国際公開番号 WO 99/23105 参照））；血栓剤（thrombotic agent）；抗血管新生剤、例えば、アンジオスタチンまたはエンドスタチン；または生物学的応答改変物質（modifiers）（例えば、リンフォカイン、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」）または他の成長因子）が挙げられ得る。

10

【0229】

5.12 抗体ベースの遺伝子治療

20

本発明の別の局面において、抗体またはその機能的な誘導体をコードする配列を含む核酸が、遺伝子治療によって、OX40 の異常な発現および/または活性に関連する疾患または障害を処置、阻害または予防するために投与される。遺伝子治療とは、発現された核酸または発現可能な核酸を被験体に投与することによって行われる治療のことを指す。本発明のこの実施形態において、その核酸は、治療効果を媒介するそれらのコードされるタンパク質を生成する。利用可能な遺伝子治療のための方法のいずれかが、本発明に従って用いることができる。例示的な方法を下記に記載する。

【0230】

遺伝子治療の方法に関する一般的な総説としては、Goldspiel ら、Clinic Pharmacol 12:488 (1993)；Wu ら、Biotherapy 3:87 (1991)；Tolstoshev, Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573 (1993)；Mulligan, Science 260:926 (1993)；Morgan ら、Ann Rev Biochem 62:191 (1993)；May, TIBTECH 11:155 (1993) 参照。

30

【0231】

1つの局面において、本化合物は、抗体をコードする核酸配列を含み、前記核酸配列は、適当な宿主において、抗体、あるいはそのフラグメントもしくはキメラタンパク質または重鎖もしくは軽鎖を発現する発現ベクターの一部である。特に、そのような核酸配列は、抗体コード領域に作動可能に連結されたプロモーターを有し、前記プロモーターは、誘導性または構成性であり、必要に応じて、組織特異的である。

40

【0232】

別の特定の実施形態において、抗体コード配列および他の任意の所望の配列が、ゲノム内の所望の部位における相同組換えを促進する領域と隣接しているがゆえに、抗体をコードする核酸の染色体内発現をもたらす核酸分子が用いられる（Koller ら、Proc Natl Acad Sci USA 86:8932 (1989)；Zijlstra ら、Nature 342:435 (1989)）。特定の実施形態において、発現される抗体分子は、一本鎖抗体である；あるいは、核酸配列は、抗体の重鎖と軽鎖の両方をコードする配列、またはそのフラグメントを含む。

【0233】

患者への上記核酸の送達は、直接的（患者が核酸または核酸を有するベクターに直接曝

50

露される場合)であってもよいし、間接的(細胞をまずインビトロにおいて核酸で形質転換し、次いで、患者に移植される場合)であってもよい。これらの2つのアプローチは、それぞれ、インビボ遺伝子治療またはエキソビボ遺伝子治療として知られている。

【0234】

特定の実施形態において、上記核酸配列は、その核酸配列が、コードされる生成物をもたらすように発現される場合、インビボにおいて直接投与される。これは、当該分野で公知の数多くの方法のいずれかによって、例えば、適切な核酸発現ベクターの一部として核酸配列を構築し、それが細胞内のものになるようにそのベクターを投与することによって(例えば、欠損レトロウイルスベクターもしくは弱毒性レトロウイルスベクターまたは他のウイルスベクターを用いる感染によって(米国特許第4,980,286号参照)、あるいは裸のDNAの直接的な注射によって、あるいは微小粒子銃(microparticle bombardment)(例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont)を使用することによって)、あるいは、リボソーム内、微小粒子内またはマイクロカプセル内に封入したものを脂質または細胞表面レセプターまたはトランスフェクト剤で被覆することによって、あるいは、それらを、核に入ることが知られているペプチドに連結した状態で投与することによって(それを、レセプター媒介性のエンドサイトーシスを起こしやすいリガンドに連結された状態で投与することによって)(例えば、Wuら、J Biol Chem 262:4429(1987)参照)(これは、レセプターを特異的に発現する細胞型を標的化するために用いることができる)などによって、達成することができる。別の実施形態では、核酸-リガンド複合体を形成することができ、ここで、そのリガンドは、エンドソームを破壊する融合性のウイルスペプチドを含むことにより、その核酸がリソソームの分解を回避することができるようになる。なおも別の実施形態では、特定のレセプターを標的化することによって、インビボにおいて細胞特異的な取り込みおよび発現に核酸を標的化することができる(例えば、PCT公開WO92/06180; WO92/22635; WO92/20316; WO93/14188、WO93/20221参照)。あるいは、上記核酸は、細胞内に導入され得、相同組換えによって発現用の宿主細胞DNA内に組み込まれ得る(Kollerら、Proc Natl Acad Sci USA 86:8932(1989); Zijlstraら、Nature 342:435(1989))。

【0235】

特定の実施形態では、本発明の抗体をコードする核酸配列を含むウイルスベクターを用いる。例えば、レトロウイルスベクターを用いることができる(Millerら、Meth Enzymol 217:581(1993)参照)。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの正確なパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組み込みに必要な成分を含む。遺伝子治療において用いられる抗体をコードする核酸配列は、1つ以上のベクターにクローニングされ、それにより、患者への遺伝子の送達が容易になる。レトロウイルスベクターについての詳細は、Boesenら、Biotherapy 6:291(1994)に見られ、そこには、化学療法に対してより抵抗性の幹細胞を作製するために、mdr1遺伝子を造血性幹細胞に送達するためのレトロウイルスベクターの使用が記載されている。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を説明している他の参考文献は: Clowesら、J Clin Invest 93:644(1994); Kiemら、Blood 83:1467(1994); Salmonsonら、Human Gene Therapy 4:129(1993); および Grossmanら、Curr Opin Gen and Dev 3:110(1993)である。

【0236】

アデノウイルスを本発明において用いてもよい。アデノウイルスは、抗体を呼吸上皮に送達するための、本発明において特に魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、呼吸上皮に天然に感染する。アデノウイルスの送達系に対する他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染することができるという利点を有する。Kozarskyら、Curr Opin Gen Dev

10

20

30

40

50

3:499(1993)には、アデノウイルスベースの遺伝子治療に関する総説が提供されている。Boutら、Human Gene Therapy 5:3(1994)では、遺伝子をアカゲザルサルの呼吸上皮に移入するアデノウイルスベクターの使用が実証されている。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用に関する他の例は、Rosenfeldら、Science 252:431(1991); Rosenfeldら、Cell 68:143(1992); Mastrangeliら、J Clin Invest 91:225(1993); PCT公開WO94/12649; Wangら、Gene Therapy 2:775(1995)に見られる。アデノ随伴ウイルス(AAV)もまた、遺伝子治療において使用するために提案されている(Walshら、Proc Soc Exp Biol Med 204:289(1993); 米国特許第5, 436, 146号; 同第6, 632, 670号; および同第6, 642, 051号)。

10

【0237】

遺伝子治療に対する別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介性のトランスフェクションまたはウイルス感染などの方法によって、組織培養物内の細胞への遺伝子の移入を含む。通常、この移入方法は、細胞への選択マーカーの移入を含む。次いで、その細胞を選択下に置くことにより、遺伝子を取り込み、その移入された遺伝子を発現している細胞が単離される。そして、それらの細胞が、患者に送達される。

【0238】

この実施形態において、その核酸が細胞に導入された後、得られた組換え細胞がインビボにおいて投与される。そのような導入は、当該分野で公知の任意の方法によって行われ得、そのような方法としては、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体媒介性の遺伝子導入、微小核体(microcell)媒介性の遺伝子導入、スフェロプラスト融合などが挙げられるがこれらに限定されない。外来遺伝子を細胞に導入するための数多くの手法が、当該分野で公知であり(例えば、Loefflerら、Meth Enzymol 217:599(1993); Cohenら、Meth Enzymol 217:618(1993); Cline, Pharmac Ther 29:69(1985)参照)、それらの方法は、本発明に従って用いられ得るが、ただし、レシピエント細胞の必要な発生的および生理学的な機能は、破壊

20

30

【0239】

得られた組換え細胞は、当該分野で公知の様々な方法によって患者に送達され得る。組換え血液細胞(例えば、造血性幹細胞または造血性前駆細胞)は、好ましくは、静脈内に投与される。使用が想定される細胞の量は、所望の作用、患者の状態などに依存し、当業者が決定することができる。

【0240】

遺伝子治療の目的で核酸を導入することができる細胞には、任意の所望の入手可能な細胞型が包含され、それらとしては、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞; 血液細胞(例えば、Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球); 様々な幹細胞または前駆細胞、特に、造血性幹細胞または造血性前駆細胞、例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝から得られるようなものなどが挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0241】

1つの実施形態において、遺伝子治療のために用いられる細胞は、患者にとって自己由来のものである。本発明の抗体をコードする核酸配列は、それらが細胞またはその子孫によって発現可能であるように細胞に導入され、次いで、その組換え細胞を、治療効果のためにインビボにおいて投与する。特定の実施形態では、幹細胞または前駆細胞が用いられ

50

る。インビトロにおいて単離および維持することができる任意の幹細胞および/または前駆細胞は、潜在的には、本発明のこの実施形態に従って用いることができる（例えば、PCT公開WO94/08598; Stempleら、Cell 71:973(1992); Rheinwald, Meth Cell Bio 21A:229(1980); Pittelkowら、Mayo Clinic Proc 61:771(1986)参照）。

【実施例】

【0242】

6. 実施例

本発明は、以下の本発明の好ましい実施形態の例によってさらに例示され得るが、これらの実施例は、単なる例示の目的で含まれるものであり、別段具体的に示されない限り、本発明の範囲を限定する意図はないことが理解されるだろう。

【0243】

実施例1：ヒトOX40/Fc免疫原の調製

2つの型のOX40レセプターを免疫原として用いることにより、本発明のアンタゴニスト抗OX40抗体を作製した。その1つ目は、配列番号1のヌクレオチド残基105～627によってコードされるヒトFcγ1および細胞外ドメインを含む融合タンパク質として発現される、可溶性のヒトOX40レセプターであった。2つ目の型は、安定的にトランスフェクトされたマウス線維芽細胞のL細胞の表面上に発現される完全長OX40を含む細胞ベースの免疫原であった。

【0244】

可溶性のOX40を、TCR活性化ヒトCD4T細胞から単離されたOX40cDNAクローンからクローニングした。OX40cDNAクローンを作製するために用いた2つのプライマーは：(1) HindIII部位を含むヌクレオチド配列cccaagctttaccaccagcaacgaccgggtgctgc(配列番号3)を有するセンスプライマー、および(2)ヒトFcγ1とインフレーションでXhoI部位を含むヌクレオチド配列cgccctcgaggacctccacggggccgggtgg(配列番号4)を有するアンチセンスプライマーであった。得られた540bpのPCRフラグメントを、5'末端に分泌シグナルペプチド配列および3'末端にヒトFcγ1配列(ヒンジならびに定常領域CH2およびCH3)を含む市販のベクターにサブクローニングした。配列決定することにより、その構築物の構成内容を確認した。

【0245】

一過性の発現のために、OX40/Fcγ1DNAを、製造者のプロトコルに従い、Lipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)によって、293T細胞(Invitrogen, Carlsbad, CA)にトランスフェクトした。トランスフェクションの72時間後に、トランスフェクトされた細胞の培養上清を、精製するために回収した。OX40/Fcγ1の安定な発現もまた、293T細胞株において確立した。発現を確認するために、培養上清を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって解析した。分離されたタンパク質を、ニトロセルロース膜に転写し、そしてHRP-ロバ抗ヤギIgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)で検出される西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)に結合体化された、マウス抗ヒトIgG(Fc)モノクローナル抗体(Sigma, St. Louis, MO)またはポリクローナルヤギ抗OX40抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN)で検出した。高感度の化学発光検出(Pierce, Rockford, IL)を用いて、免疫反応性のタンパク質をフィルム上で同定した。OX40/Fcγ1を、リン酸緩衝食塩水(PBS)で平衡させたプロテインAアフィニティーカラム(Invitrogen, Carlsbad, CA)で精製した。上記細胞培養上清をそのカラムにアプライした後、樹脂を約20カラム容積のPBSで洗浄し、続いてSCC緩衝洗浄液(0.05Mクエン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム, pH6.0)で洗浄する

10

20

30

40

50

ことにより、未結合タンパク質を除去した。0.05 M クエン酸ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウム (pH 3.0) を用いて、OX40 融合タンパク質を溶出した後、PBS (pH 7.0) 中で透析した。OX40/Fcγ1 を含むアフィニティークラムからの画分を SDS-PAGE で解析した。そのタンパク質の純度を、クマシーブルー染色、ならびに上に記載したようなヤギ抗ヒト IgG (Fc) 抗体 (Sigma, St. Louis, MO) およびヤギ抗ヒト OX40 抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いるウエスタン免疫プロット法によるタンパク質の同一性によって解析した。

【0246】

2 つ目の型の免疫原は、TCR 活性化ヒト CD4 T 細胞からクローニングされた完全長ヒト OX40 cDNA を用いて構築した。用いた 2 つのプライマーは、ヌクレオチド配列 caccatgtgcgtgggggctcggcgggctggg (配列番号 5) および gatcttgccagggtggagtgggcgctcggcc (配列番号 6) を有する OX40 特異的プライマーであった。得られた PCR 産物を、市販のベクターに直接クローニングし、高レベルで OX40 を発現させるためにマウス L 線維芽細胞に安定的にトランスフェクトした。投与の前に、GammaCell 1000 Elite モデル A (MDS Nordion, Ottawa Canada) を用いて、その細胞ベースの免疫原の L 細胞に 6800 Gray で照射することにより、その免疫原の増殖を阻害した。

10

【0247】

20

実施例 2：抗 OX40 MAb の作製

約 20 μg の可溶性 OX40/Fcγ1 免疫原をフロイントアジュバントと混合し (1:1)、2 匹の 6 週齢 A/J マウス (Harlan, Houston, Tex.) の皮下に 3 回注射して投与し、7 日後に 1 回、腹腔内注射した (アジュバント無し)。最後の注射の 3 日後に、免疫されたマウスの脾細胞を、以下に記載されるような Groth および Scheidegger (J Immunol Methods, 1980) の方法に従ってマウスミエローマ SP2/0 細胞と融合させた。

【0248】

細胞ベースの免疫原に対しては、OX40 で安定的にトランスフェクトされ、ガンマ線照射された 3×10^6 個の L 細胞を、6 週齢 A/J マウス (Harlan, Houston, Tex.) の皮下に PBS 中のものを 3 回注射して投与し、7 日後に 1 回、腹腔内注射した。最後の注射の 3 日後に、免疫されたマウスの脾細胞を、以下に記載されるようにマウスミエローマ SP2/0 細胞と融合させた。

30

【0249】

抗 OX40 mAb の作製をもたらす融合では、免疫されたマウスの脾臓から単一細胞懸濁液を調製し、それを、適当な融合剤であるポリエチレングリコール (M.W. 1450) (Kodak, Rochester, NY) および 5% ジメチルスルホキシド (Sigma, St. Louis, MO) を用いる不死化 Sp2/0 ミエローマ細胞との融合 (1:1 の比) に用いることにより、ハイブリドーマ細胞を形成させた (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp. 59-103 (1986))。10 日後、そのハイブリドーマ細胞株を、好ましくは、融合していない不死化細胞の成長または生存を阻害する物質であるヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン (HAT) を含む、適当な DMEM 培養完全培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中で培養した。2 回の融合実験から、効率的に融合され、抗体を安定して高レベルで産生し、そして HAT 培地に感受性の、24,000 個の好ましい不死化細胞株が得られた。

40

【0250】

実施例 3：アンタゴニスト抗 OX-40 抗体についてのスクリーニング

上記ハイブリドーマ細胞が生育している培養液を、OX40 に対するモノクローナル抗体 (mAb) の産生についてアッセイした。そのハイブリドーマ細胞によって産生される

50

m A b の結合特異性を、3つの異なるアプローチ：F M A T、E L I S A およびフローサイトメトリー・免疫アッセイによって測定した。

【0251】

A．F M A T スクリーニング

F M A T アプローチを用いて、マウス抗ヒト O X 4 0 m A b を分泌する 2 2 0 個のハイブリドーマ細胞株を、O X 4 0 で一過性にトランスフェクトされた L 細胞に対しては強力な反応性を有するが、トランスフェクトされていないモック (m o c k) L 細胞に対しては反応性を有しないことによって同定した。96 ウェルマイクロタイタープレート形式において細胞数と蛍光の両方を画像化および定量化する、大共焦点 (m a c r o c o n f o c a l) 走査型プラットフォームを使用する F M A T を用いて、抗 O X 4 0 ハイブリドーマ上清をスクリーニングした。O X 4 0 抗原を発現する L 細胞を、5 μ l の抗 O X 4 0 ハイブリドーマ上清とともにインキュベートし、そして、スクリーニング緩衝液中に 0 . 1 2 5 μ g / m l に希釈された C y - 5 結合体化ヤギ抗マウス I g G - F c y 抗体 (J a c k s o n L a b o r a t o r i e s , P A) で蛍光標識した。インキュベートの 2 時間後に、F M A T 8 1 0 0 H T S システム (A p p l i e d B i o s y s t e m , C A) を用いて、そのプレートをスキャンした。下記の表 1 における結果は、クローン B 2 4 および B 3 9 が、ポジティブコントロールに匹敵する活性を有することを示している。

10

【0252】

B．E L I S A スクリーニング

ポリ塩化ビニル 96 ウェルプレート (N u n c , R o s k i l d e , D e n m a r k) を、4 において一晩、O X 4 0 / F c y 1 (5 n g / ウェル) またはスクリーニングコントロールとしてヒト F c y 1 (2 5 n g / ウェル) でコーティングした後、P B S 中の 2 % B S A とともに 1 時間インキュベートすることにより、非特異的な結合をブロッキングした。約 5 0 μ l のハイブリドーマ上清を加え、1 時間インキュベートした。0 . 0 5 % T W E E N (登録商標) - P B S で 4 回洗浄した後、約 0 . 2 μ g の H R P - ヤギ抗マウス I g G F c y (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s , P A) を R T で 1 時間にわたって加えることにより、結合している抗 O X 4 0 抗体の存在を検出した。新しく作製した基質溶液である 1 0 0 μ l の 1 m M T M B (S i g m a) を各ウェルに 3 0 分間加え、そして 5 0 m l の 0 . 2 M H ₂ S O ₄ を加えることによって反応を停止させ、そのプレートを、マイクロプレートリーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s , C A) を用いて 4 5 0 n m で読み出した。2 4 , 0 0 0 ウェルのうち、2 2 0 個が、F M A T および E L I S A によって陽性であると考えられた。代表的なデータを表 1 に報告する。

20

30

【0253】

【表 1】

表 1

	FL1 (蛍光の平均)	蛍光細胞の数	OD ₄₅₀
クローン #B24	5560	39	3.4
クローン #B39	7665.3	44	3.6
ネガティブコントロール	0	0	NA
ポジティブコントロール	5028.5	41	NA

40

C．フローサイトメトリー・スクリーニング

5 μ l の抗 O X 4 0 ハイブリドーマ上清を用いて染色し、そして F I T C - 結合体化ヤギ抗マウス I g G - F c y 抗体 (J a c k s o n L a b o r a t o r i e s , P A) で蛍光標識した、O X 4 0 で安定的にトランスフェクトされた L 細胞を用いるフローサイトメトリーによってもまた、F M A T および E L I S A によって選択された 2 2 0 個の陽性ハイブリドーマを試験した。表 2 に示すデータは、抗 O X 4 0 ハイブリドーマ上清を用いて染色された、O X 4 0 でトランスフェクトされた全 L 細胞のパーセンテージに対応する

50

。

【 0 2 5 4 】

【 表 2 】

表2

	クローン#B2 %蛍光細胞	クローン#B17 %蛍光細胞	クローン#B36 %蛍光細胞	クローン#B37 %蛍光細胞
L-細胞	0.82	0.7	0.9	0.4
OX40L L-細胞	30.4	0.3	15.0	32.7

10

表 1 および 2 において同定された 220 個の抗 O X 4 0 m A b のうち、抗 O X 4 0 m A b クローン B 2、B 2 4、B 3 6、B 3 7 および B 3 9 が、O X 4 0 L L 細胞に対して陽性の結合性を示したが、トランスフェクトされていない L 細胞に対しては陽性の結合性を示さなかった。B - 1 7 は、O X 4 0 L L 細胞に対する結合性を示さなかったので、却下された。

【 0 2 5 5 】

実施例 4：アンタゴニスト抗 O X 4 0 M A B の最初の特徴づけ

ヒト O X 4 0 に特異的な抗体を産生する 220 個のハイブリドーマを同定した後、それらのクローンを限界希釈手順によってサブクローン化し、標準的な方法 (G o d i n g , M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : P r i n c i p l e s a n d P r a c t i c e , A c a d e m i c P r e s s , p p . 5 9 - 1 0 3 (1 9 8 6)) によって生育した。それらのサブクローンによって分泌される 220 個の抗 O X 4 0 m A b を、プロテイン A - セファロースを用いる従来の精製手順によって、培養液から精製した。

20

【 0 2 5 6 】

A . 細胞株の調製

ヒト C D 4 + T 細胞の発達に対する O X 4 0 共刺激の影響を、特定の細胞株および新たに単離されたヒトナイーブ C D 4 + T 細胞を用いて調べることにより、220 個の抗 O X 4 0 m A b 結合物を特徴付けた。これらの細胞株としては：(1) O X 4 0 でトランスフェクトされたヒト H u t - 7 8 白血病性 C D 4 + T 細胞株、(2) O X 4 0 L でトランスフェクトされた L 線維芽細胞マウス L 細胞およびそれらの親細胞株 (D r . Y o n g - J u n L i u , M . D . A n d e r s o n C a n c e r C e n t e r , H o u s t o n , T X から提供)、(3) ヒトナイーブ C D 4 + T 細胞、ならびに (4) ヒト I L - 4 および G M - C S F の存在下で培養され、単離された C D 1 4 + 単球から分化した、ヒト樹状細胞 (D C) が挙げられた。健康な成人個体から回収された血液のバフィーコート画分は、磁性枯渇 (m a g n e t i c d e p l e t i o n) によって単離されたヒトナイーブ T 細胞 (C D 4 +、C D 4 5 R A +、C D 4 5 R O - および C D 1 4 - 表現型) の起源として；細胞選別によって単離された C D 1 1 c + 樹状細胞 (D C) の起源として；または未熟 D C に分化した単離 C D 1 4 + 単球の起源として、役割を果たした。

30

【 0 2 5 7 】

B . 機能アッセイ

40

1 . H u t - 7 8 アッセイ

O X 4 0 でトランスフェクトされたヒト H u t - 7 8 白血病性 C D 4 + T 細胞を、96 ウェルプレートにおいて、O X 4 0 L でトランスフェクトされ照射された (6 8 0 0 c G r a y) L 細胞またはトランスフェクトされていない L 細胞の存在下 (4 : 1 の比 (O X 4 0 - H u t 7 8 細胞 / L 細胞)) において、5 μ g / m l の抗 C D 3 (O K T 3 , B D B i o s c e n c e s , C A) および 1 μ g / m l の抗 C D 2 8 m A b (C D 2 8 . 2 , B D B i o s c e n c e s , C A) で 4 8 時間プライミングした。実施例 3 において同定された 220 個の抗 O X 4 0 m A b を、アッセイの始めに加えることにより、C D 4 + T 細胞のサイトカイン放出の阻害として定義されるアンタゴニスト活性についてスクリーニングした。このアッセイを、同じプロトコルを用いて 3 回繰り返した。表 3 にまとめ

50

た実験は、3つの代表的な抗OX40mAb(B66、B76およびB86)の例であり、これは、OX40Lでトランスフェクトされた細胞の存在下で活性化されたT細胞が、トランスフェクトされていないL細胞の存在下で活性化されたとき(IL-2産生に対しては22pg/mlおよびIL-13産生に対しては70pg/ml)よりも、少なくとも10倍多くIL-2(138pg/ml)およびIL-13(620pg/ml)を産生したことを示した。精製された抗OX40mAbのB66およびB76を細胞培養物に加えることにより、用量応答様式でHut-78CD4⁺T細胞株のサイトカイン産生が抑制された。クローンB66は、最高濃度において88%のIL-2および92%のIL-13サイトカイン産生を阻害した(表3)。試験された220個の抗OX40mAbのうち、IL-2およびIL-13のサイトカイン産生を60%超阻害した10個のクローンを選択した(データ示さず)。

【0258】

【表 3】

	OX40 Hut-78+	OX40 Hut78+ + L-細胞	OX40-Hut-78+ + OX40L-L細胞+														
			IC (n:3)			B66 (n:3)			B76 (n:3)			B86 (n:3)					
			0	20	0	1	5	20	0	1	5	20	0	1	5	20	
サイトカイン産生																	
AbConc(μg/ml)																	
IL2 (pg/ml)	22	0	138	148	138	61	27	15	138	69	21	12	138	161	135	152	
±SD	8.7	5.2	13.9	13.5	13.9	1.1	3	5.7	13.9	10.1	8.6	9.3	13.9	15	6.3	26.8	
IL13 (pg/ml)	70	0	620	712	620	139	95	41	620	316	234	223	620	623	616	645	
±SD	0	18.7	49.5	64.7	49.5	33.3	21.1	23.6	49.5	11.3	25.1	46.2	49.5	22.8	27.9	17.1	

表 3

C. ナイーブCD4+T細胞アッセイ

T細胞増殖およびサイトカイン産生のOX40共刺激を抑制するために、220個の抗OX40 mAbを、ヒトCD4⁺T細胞における、サイトカイン産生の阻害、増殖の阻害およびアポトーシスの誘導の能力について機能的にスクリーニングした。健常な成人志願者(Gulf Coast Regional Blood Center, Houston, TX)由来のヒト血液のバフィーコートから、市販のナイーブCD4⁺T細胞単離キット(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)を用いて、ナイーブヒトCD4⁺T細胞を単離した。単離されたナイーブヒトCD4⁺T細胞を、OX40Lで

10

20

30

40

50

トランスフェクトされ照射された L 細胞または親 L 細胞の存在下 (1 : 4 の比 (L 細胞 / ナイープ CD 4 + T 細胞)) において、5 μ g / mL の抗 CD 3 (OK T 3 , B D Biosciences , CA) および 1 μ g / mL の抗 CD 2 8 mAb (CD 2 8 . 2 , B D Biosciences , CA) で活性化した。培養の 7 日後、OX 4 0 L トランスフェクタントの存在下で活性化されたナイープ CD 4 + T 細胞は、L 細胞の存在下でプライミングされたものよりも、少なくとも 1 0 倍多く IL - 2 および IL - 1 3 を産生した (図 2)。サイトカイン産生のレベルは、R & D Systems (Minneapolis , MN) 製の ELISA キットを用いて測定した。それらの細胞は、図 3 に示されるように OX 4 0 共刺激の存在下でより多く増殖した)。図 2 および 3 について：白四角は、ナイープ CD 4 を表し；白三角は、コントロール L 細胞を用いたときのナイープ CD 4 + を表し；黒三角は、ナイープ CD 4 + および OX 4 0 L L 細胞を用いたときの B 6 6 を表し；黒四角は、ナイープ CD 4 + および OX 4 0 L L 細胞を用いたときの 2 C 4 (アイソタイプコントロール) を表し；そして黒丸は、ナイープ CD 4 + および OX 4 0 L - L 細胞を用いたときの無関係な G 3 - 5 1 9 mAb コントロールを表す。

10

【 0 2 5 9 】

抗 OX 4 0 mAb の B 6 6 を培養物に加えることにより、プライミングされた CD 4 + T 細胞において、2 C 4 または G 3 - 5 1 9 コントロールと比べて用量依存的様式で、サイトカイン放出 (図 2)、細胞増殖 (図 3) が阻害され、アポトーシスが誘導された (表 4)。

20

【 0 2 6 0 】

【表 4】

	アポトーシス細胞 (%)	生存の阻害(%)
ナイーブCD4 ⁺ T-細胞 + L-細胞	21.9	22
ナイーブCD4 ⁺ T-細胞 + OX40L L-細胞	11.0	11
ナイーブCD4 ⁺ T-細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (20 µg/ml)	37.9	38
ナイーブCD4 ⁺ T-細胞 + OX40L L-細胞 + A10 (20 µg/ml)	32.3	32
ナイーブCD4 ⁺ T-細胞 + OX40L L-細胞 + IC:G3-519 (20 µg/ml)	11.7	12

表4

実施例 5：選択されたアンタゴニスト抗OX40MA Bのさらなる特徴付け

サイトカインは、ナイーブCD4⁺ T細胞の分化を調節することができ、そのナイーブCD4⁺ T細胞は、そのサイトカイン産生プロファイルによって定義されるT細胞サブセットをもたらす。IL-12は、Th1細胞（主にIFN-γおよびIL-2を産生し、かつ細胞媒介性免疫および炎症促進性応答の調節に関与する細胞）を分化させる。IL-4は、ナイーブCD4⁺ T細胞をTh2細胞（主にIL-4およびIL-5を産生し、かつ体液性免疫および抗炎症性反応の調節に関与する細胞）に極性化する。最初の特徴づけから選択された2つの抗OX40mAbのA10およびB66を、それらの生存増殖およびサイトカイン放出を抑制する能力について、Th1細胞とTh2細胞の両方において試験した。この試験を行うために、まず、それらを、マウス親抗体的可変領域およびヒト定常領域を含むキメラ型に変換した。すべての市販の抗体およびサイトカインは、BD Biosciences, CAから購入した。

【0261】

A. Th1アッセイ

上記の実施例 4 (B) (2) に記載したようなキットを用いて、ヒト血液のパフィーコートからヒトナイーブ CD4⁺ T 細胞を単離した。50 ng/ml の IL-12 サイトカインおよびが補充された培地中の、5 μg/ml の抗 CD3 (OKT3、1 μg/ml の抗 CD28 (CD28.2) および 10 μg/ml の抗 IL-4 中和抗体 (MP4-25D2) を用いて、Th1-サイトカイン産生プロファイルを誘導するために、上記細胞を 7 日間プライミングした。それらの細胞を、OX40L でトランスフェクトされ照射された L 細胞または親 L 細胞の存在下 (1:4 の比 (L 細胞/ナイーブ CD4⁺ T 細胞)) において、抗 CD3 および抗 CD28 mAb とともに培養した。OX40 共刺激は、アネキシン染色陽性の CD4⁺ 細胞の数が減少することによって示されるように Th1 エフェクター細胞の生存を増加させる (表 5)。照射された L 細胞の共培養の開始時にキメラ抗 OX40 mAb の B66 を加えることにより、この生存が阻害された。OX40 共刺激は、IFN-γ 産生も増加させるが、B66 の添加は、その産生を用量依存的様式で阻害した (表 6)。

【0262】

【表 5】

表5

	Th1 生存 (%)
ナイーブ CD4 ⁺ T-細胞 + L-細胞	52.6
ナイーブ CD4 ⁺ T-細胞 + OX40L L-細胞	65.9
ナイーブ CD4 ⁺ T-細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (0.2 μg/ml)	58.4
ナイーブ CD4 ⁺ T-細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (2 μg/ml)	55.9
ナイーブ CD4 ⁺ T-細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (20 μg/ml)	53.2

【0263】

【表 6】

表6

	IFN-γ Conc (pg/ml)	SD (n:3)
Th1 細胞	10280.2	123.0
Th1 細胞 + L-細胞	10934.4	267.7
Th1 細胞 + OX40L L-細胞	33040.4	237.5
Th1 細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (0.2 μg/ml)	17148.3	234.6
Th1 細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (2 μg/ml)	11049.3	141.7
Th1 細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (20 μg/ml)	11540.6	51.6

B. Th2 アッセイ

ヒトナイーブ CD4⁺ T 細胞を、上に記載したように単離した。50 ng/ml の IL-4 サイトカインが補充された培地中の、5 μg/ml の抗 CD3、1 μg/ml の抗 CD28 および 10 μg/ml の抗 IFN-γ 中和抗体を用いて、Th2-サイトカイン産生プロファイルを誘導するために、上記細胞を 7 日間プライミングした。それらの細胞を、OX40L でトランスフェクトされ照射された L 細胞または親 L 細胞の存在下 (1:4 の比 (L 細胞/ナイーブ CD4⁺ T 細胞)) において、抗 CD3 および抗 CD28 mAb とともに培養した。OX40 共刺激は、アネキシン染色陽性の CD4⁺ 細胞の数が減少することによって示されるように Th2 エフェクター細胞の生存を増加させる (図 4)。照射された L 細胞の共培養の開始時に抗 OX40 mAb の A10 および B66 を加えることにより、用量依存的様式で、この生存 (図 4) ならびに Th2 細胞の増殖 (図 5) が阻害され、IL-2 (図 6A および IL-13 (図 6B) のサイトカイン産生が阻害された。

【0264】

C. Th17 アッセイ

IL-23 の存在によってプライミングされた T 細胞の独自のサブセットは、IL-1

7の産生によって特徴づけられ、それらは、ある特定の慢性炎症性疾患の病原に決定的に関連するものである。最近データから、Th17細胞が、Th1系列およびTh2系列から初期に分岐するCD4⁺T細胞と完全に別個の系列であること、ならびにTh1細胞およびTh2細胞の発達を支配するサイトカインおよびシグナル伝達経路によって拮抗されることが証明されている。OX40共刺激の作用、および拮抗性の抗OX40mAbがTh17分化を阻害する能力を研究するために、Th17T細胞をプライミングした。

【0265】

ナイーブCD4⁺T細胞を、実施例4(B)(2)に記載したようにバフィーコートから単離した。100ng/mlのIL-23サイトカイン(R&D, Minneapolis, MN)、それぞれ20ng/mlのhIL-6およびhTGFβ1、5μg/mlの事前にコーティングされた抗CD3(OKT3, BD Biosciences, CA)、1μg/mlの可溶性抗CD28(CD28.2)、それぞれ10μg/mlの抗IL4(MP4-25D2)および抗IFN-γ(B27)の存在下で、上記細胞を7日間プライミングした。そのプライミングした細胞を洗浄し、OX40Lでトランスフェクトされ照射されたL細胞または親L細胞の存在下(1:4の比(L細胞/ナイーブCD4⁺T細胞))において、抗CD3および抗CD28mAbとともにさらに3日間継代培養した。OX40L-L細胞を介したOX40共刺激を誘導することによって、Th17細胞は、OX40L共刺激なしにおいて培養された同じ細胞と比べて4倍増殖する。抗OX40mAbのA10およびB66は、Th17増殖を用量依存的様式で阻害した(表7)。

【0266】

【表7】

表7

	CMP平均 (n:3)	±SD
Th17細胞 + L-細胞	18092	2592.6
Th17細胞 + OX40L L-細胞	66035.7	2106.2
Th17細胞 + OX40L L-細胞 + アインタイプコントロール(20 μg/ml)	70176.7	3080.8
Th17細胞 + OX40L L-細胞 + A10 (0.2 μg/ml)	70176.7	7622.6
Th17細胞 + OX40L L-細胞 + A10 (2 μg/ml)	40347.7	8059.5
Th17細胞 + OX40L L-細胞 + A10 (20 μg/ml)	17456.7	563.9
Th17細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (0.2 μg/ml)	46735.3	10667.1
Th17細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (2 μg/ml)	31658.0	5492.6
Th17細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (20 μg/ml)	18336.3	956.4

表8のデータから、OX40Lが、Th-17の生存を有意に増加させたことが証明された(68% 対 84%)。この生存の増加は、抗OX40mAbのA10およびB66によって、用量依存的様式で抑制された(表8)。

【0267】

【表 8】

表8

	Th-17生存 (%)
Th17 細胞 + L-細胞	68.4
Th17 細胞 + OX40L L-細胞	84.3
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + アイソタイプコントロール(20 µg/ml)	84.3
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + A10 (0.2 µg/ml)	80.7
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + A10 (2 µg/ml)	72.3
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + A10 (20 µg/ml)	70.7
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (0.2 µg/ml)	77.0
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (2 µg/ml)	74.1
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (20 µg/ml)	67.3

10

アポトーシスのインヒビターであり、かつOX40タンパク質の潜在的な標的であるサバイビンというタンパク質の細胞内発現を評価することによると、OX40刺激によって、その発現が増加した。この発現の増加は、抗OX40 mAbのA10およびB66によって用量依存的様式で阻害された（表9）。

【0268】

【表 9】

表9

	サバイビンの発現 (%)
Th17 細胞 + L-細胞	19.2
Th17 細胞 + OX40L L-細胞	49.0
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + アイソタイプコントロール(20 µg/ml)	45.4
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + A10 (0.2 µg/ml)	34.3
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + A10 (2 µg/ml)	22.8
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + A10 (20 µg/ml)	15.4
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (0.2 µg/ml)	45.2
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (2 µg/ml)	28.3
Th17 細胞 + OX40L L-細胞 + B66 (20 µg/ml)	20.3

30

プライミングされたTh1細胞と比べて、TH17細胞は、ナイーブCD4⁺T細胞のプライミングの7日後に、有意に高いレベルのIL-17を示した。Th17をOX40Lでトランスフェクトされ照射されたL細胞または親L細胞とさらに共培養した後、そのTh17細胞は、プライミングされたTh1細胞と比べて、OX40共刺激の存在下において有意水準のIL-17を産生した。このIL17産生は、アイソタイプコントロールG3-519(IC)と比べて、キメラ抗OX40 mAbのA10およびB66によって用量依存的様式で阻害された（表10）。

【0269】

【表 10】

	TH-17		TH-1	
	IL-17 Conc (pg/ml)	SD (n:3)	IL-17 Conc (pg/ml)	SD (n:3)
CD4 ⁺ 細胞 + L-細胞	409.7	41.1	29.8	5.4
CD4 ⁺ 細胞/OX40L L-細胞	2264.1	40.8	20.5	4.7
CD4 ⁺ 細胞/OX40L L-細胞 + IC (20μg/ml)	2032.7	90.0	56.1	10.7
CD4 ⁺ 細胞/OX40L L-細胞 + A10 (0.2μg/ml)	2054.6	254.0	41.4	8.4
CD4 ⁺ 細胞/OX40L L-細胞 + A10 (2μg/ml)	1795.1	304.6	39.3	9.4
CD4 ⁺ 細胞/OX40L L-細胞 + A10 (20μg/ml)	1059.9	448.6	54.1	5.7
CD4 ⁺ 細胞/OX40L L-細胞 + B66 (0.2μg/ml)	2296.3	56.8	56.6	5.8
CD4 ⁺ 細胞/OX40L L-細胞 + B66 (2μg/ml)	1144.0	224.5	63.1	3.7
CD4 ⁺ 細胞/OX40L L-細胞 + B66 (20μg/ml)	1069.5	224.5	71.5	6.9

表10

D . L 1 0 6 との比較

OX40 共刺激の存在下において抗 OX40 mAb の A10 および B66 が活性化ヒト CD4⁺ T 細胞からのサイトカイン IL-2 および IL-13 の放出を阻害する能力を、実施例 4 (B) (2) と同じプロトコルを用いて市販の抗 OX40 抗体 L106 (BD Bioscience, San Jose, CA) と比較した。L106 によるサイトカイン産生の阻害は、コントロール抗体との統計的な相違は見られなかった (図 7 参照)。したがって、この抗体は、非機能的である (すなわち、アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性が無い) とみられた。

【0270】

実施例6：抗OX40MABのヒト化

マウスmAbであるA10およびB66の重鎖可変領域（V_H）および軽鎖可変領域（V_L）の核酸配列を図14A～14Dに示す。図12には、選択されたヒト軽鎖鑄型と比較しながら、252-B66および252-A10のマウス抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（DNA配列から得られたもの）が提供されている。両方の抗体が、OX40アンタゴニストとして機能し、互いに競合する。これらの配列を、公的データベースにおいて入手可能なヒト抗体生殖細胞系列配列と比較した。鑄型を決定する際に、全体の長さ、フレームワーク内の類似のCDRの位置、全体的な相同性、CDRのサイズなどをはじめとしたいくつかの基準を用いた。これらの基準のすべてが一緒になって、図12Aおよび12Bに示される、A10とB66のmAbの重鎖配列および軽鎖配列と、それぞれのヒト鑄型配列との配列アラインメントに示されるような最適なヒト鑄型を選択するための結果を提供した。マウスA10の可変領域と、ヒトカップー鎖の定常領域と、ヒトIgGのCH1部分とを組み合わせたコントロールとして、キメラFabをファージベクター内に構築した。

10

【0271】

この場合、この抗体を設計するために2つ以上のヒトフレームワーク鑄型を用いた。V_H鎖について選択されたヒト鑄型は、サブグループV1のIGHV1-46（GeneBankアクセッション番号X92343）と生殖系列IGHJ4（GeneBankアクセッション番号J00256）との組み合わせであった（図12B参照）。V_L鎖について選択されたヒト鑄型は、IGKV4-1（GeneBankアクセッション番号Z00023）と生殖系列J鑄型IGHJ1（GeneBankアクセッション番号J00242）との組み合わせであった（図12A参照）。図12Bには、マウス抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列（DNA配列から得られたもの）、選択されたヒト生殖系列鑄型とのそのアラインメント、およびA10（TH）hu336Fのヒト化可変領域の配列が提供されている。Kabataの方法に従って、そのアミノ酸配列の付番を行った。A10のマウスCDRをヒト可変フレームワークに移植した。この配列において、そのフレームワーク内のアミノ酸残基の総数は、87であり；ヒトフレームワークとマウスフレームワークとで異なるアミノ酸残基の総数は、21であり、マウスの残基は、ヒト化重鎖のフレームワーク内で保持されていない。

20

30

【0272】

配列比較によって、マウス抗体B66は、A10と可変配列内の4アミノ酸だけ異なることが明らかになったが、上記の実施例4で述べた機能解析から、B66のほうが、OX40結合性およびアンタゴニスト活性が高いことが示された。B66におけるアミノ酸変更のうちの2つは、第1CDRに存在し、マウス生殖細胞系列配列からの変更である。これらの変更が、B66の活性の増大に関与し得ると推論された。しかしながら、これらの抗体由来のCDRが、ヒト可変フレームワークに移植されるとき、B66の分泌は不十分だったので、さらなる発達に適していなかった。それゆえ、B66のCDRL1、ならびにA10のCDRL2およびCDRL3を選択して、ヒト可変鑄型に移植することにより、ヒト化抗OX40アンタゴニストを作製した。この方法によって、ヒト化A10分子の結合親和性およびアンタゴニスト活性は、親マウス抗体と比べて、増加した。

40

【0273】

A.BiaCoreによる抗OX40Fabの動態解析

図13は、もとのマウス分子との比較で、得られた分子のOX40結合活性を示している。CDRL1も変異させることにより、A10のもとのCDRL1配列を反映させた。A10のCDRL1をB66のCDRL1で置換することにより、「ヒト化」A10分子A10（TH）hu336Fの結合活性が増大した。図15は、ヒト化クローンA10（TH）hu336F、マウスA10およびそのキメラ型が、OX40に対して等しく十分に競合することを示している。

【0274】

50

実施例 7 : A 1 0 (T H) H U 3 3 6 F のヒト化バリエーションの特徴づけ

ヒト化 A 1 0 候補である A 1 0 (T H) h u 3 3 6 F の 6 つのバリエーションを、結合 E L I S A 、細胞ベースの結合アッセイ、およびそれらのアンタゴニスト活性を証明するさらなる機能アッセイを用いてスクリーニングした。6 つのヒト化 A 1 0 のうちの 2 つであるバリエーション A 1 0 - D および F を 6 つの機能アッセイに供した。

【 0 2 7 5 】

上に記載したヒト化可変領域が、発現したときにヒト定常領域とインフレーションで融合されるように、そのヒト化可変領域を哺乳動物発現ベクターにクローニングした。試験用の全抗体を作製するために、さらなるヒト化候補も哺乳動物発現ベクターにクローニングした。これらの追加候補は、もとの A 1 0 の C D R L 1 を含むヒト化 A 1 0 V L 領域 (A および D) 、アスパラギン (N) からヒスチジン (H) に変更された K a b a t 番号 3 4 を含むヒト化 A 1 0 V L 領域 (B および E) (このバリエーション中の C D R - L 1 は、アミノ酸配列 K A S Q T V D Y D G D S Y M H (配列番号 6 1) を含む) 、および配列の番号 7 0 においてマウスロイシン (L) を含む代替のヒト化 V H 領域 (A 1 0 L 7 0) (K a b a t 番号 6 9) を含む。抗体を、表 1 1 に示される組み合わせで哺乳動物細胞において発現させた。表 1 2 は、対応する B i a c o r e データを示している。これらのヒト化候補の可変領域ならびにマウス可変領域の核酸配列を図 1 4 に示す。

【 0 2 7 6 】

【表 1 1 】

表 11

全抗体の名称	κ 可変候補	重鎖可変候補
A	A10 LC (SH),	A10 L70
B	A10 LC (SN)	A10 L70
C	A10 LC (TH) hu 336	A10 L70
D	A10 LC (SH),	A10 ヒト化型
E	A10 LC (SN)	A10 ヒト化型
F	A10 LC (TH) hu 336	A10 ヒト化型

【 0 2 7 7 】

【表 1 2 】

表 12

サンプル	KD [nM]	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	SE (k_a)	k_d [s ⁻¹]	SE (k_d)	χ^2
A	1.38	1.31 e5	452	1.79 e-4	7.44 e-7	0.257
B	0.94	1.70 e5	355	1.56 e-4	6.50 e-7	0.524
C	1.44	1.16 e5	483	1.51 e-4	8.28 e-7	0.352
D	1.21	1.40 e5	508	1.70 e-4	8.55 e-7	0.319
E	1.25	1.51 e5	391	1.91 e-4	8.48 e-7	0.395
F	1.12	1.41 e5	474	1.58 e-4	7.53 e-7	0.267

A . T C R 活性化 ナイーブ C D 4 + T 細胞 アッセイ

上記の実施例 4 (B) (2) に記載したプロトコルと同じプロトコルに従って、ナイーブヒト C D 4 + T 細胞を活性化させた。O X 4 0 L の存在下で活性化されたナイーブ C D 4 + T 細胞は、培養の 7 日後に、L 細胞の存在下でプライミングされたときよりも I L - 2 、 I L - 5 および I L - 1 3 を少なくとも 1 0 倍多く産生し、有意に多く増殖した (図 8) 。

【 0 2 7 8 】

ヒト化バリエーションである A 1 0 - D および A 1 0 - F は、アイソタイプコントロールと比べて、マウス親およびキメラ型の A 1 0 と同じレベルにまでサイトカイン放出 (I L -

2 / I L - 5 / I L - 1 3) を阻害し、C D 4 + T 細胞の増殖を阻害した (図 8) 。

【 0 2 7 9 】

B . プライミングされた T 細胞のアッセイ

ヒト化バリエーションである A 1 0 - D および A 1 0 - F を、そのアンタゴニスト活性 ; O X 4 0 L でトランスフェクトされ照射された L 細胞または親 L 細胞の存在下における、T h 1 でプライミングされた T 細胞、T h 2 でプライミングされた T 細胞および T h 1 7 細胞の増殖およびサイトカイン放出の阻害について試験した (実施例 5 のプロトコル参照) 。

【 0 2 8 0 】

T h 1 条件下において、ヒト化バリエーションである A 1 0 - D および A 1 0 - F) は、I L - 2、I L - 5、I L - 1 3 サイトカインの産生および細胞増殖を、アイソタイプコントロールと比べて、キメラ (C C - A 1 0) m A b および親マウス (M - A 1 0) m A b と同じ程度にまで阻害した (図 9) 。

10

【 0 2 8 1 】

T h 2 条件下において、ヒト化バリエーションである A 1 0 - D および A 1 0 - F は、活性化 C D 4 + T 細胞の増殖およびサイトカイン放出 (I L - 2、I L - 5 および I L - 1 3) を阻害することによって、その細胞に対するアンタゴニスト作用を示した (図 1 0) 。

【 0 2 8 2 】

ヒト化バリエーションである A 1 0 D および A 1 0 - F を、T h 1 7 細胞増殖、I L - 1 7 サイトカイン産生および細胞アポトーシスに対するそれらのアンタゴニスト活性を比較するために、それらのキメラ m A b およびマウス抗 O X 4 0 m A b と平行して試験した。結果を表 1 3 に示す。

20

【 0 2 8 3 】

【表 1 3】

	増殖 (CPM) ±SD	IL-17 (pg/ml) ±SD	GM-CSF (pg/ml) ±SD
Th17+L-細胞	23997±1715	14±9	319±290
Th17+OX40L-L-細胞	167684±581	858±205	1941±246
Th17+OX40L-L-細胞 +A10-D (0.3 µg/ml)	87715±10048	313±76	1730±187
Th17+OX40L-L-細胞 +A10-D (3 µg/ml)	11486±1901	107±49	533±120
Th17+OX40L-L-細胞 +A10-D (30 µg/ml)	12365±3514	184±214	410±312
Th17+OX40L-L-細胞 +A10-F (0.3 µg/ml)	65957±18160	240±37	1414±240
Th17+OX40L-L-細胞 +A10-F (3 µg/ml)	10376±2628	152±26	455±108
Th17+OX40L-L-細胞 +A10-F (30 µg/ml)	9380±2673	106±33	203±63
Th17+OX40L-L-細胞 +CC-A10 (0.3 µg/ml)	94905±15869	278±46	1743±303
Th17+OX40L-L-細胞 +CC-A10 (3 µg/ml)	17566±1636	135±55	626±224
Th17+OX40L-L-細胞 +CC-A10 (30 µg/ml)	9029±2090	125±58	235±125
Th17+OX40L-L-細胞 +M-A10 (0.3 µg/ml)	106682±8066	373±99	1550±695
Th17+OX40L-L-細胞 +M-A10 (3 µg/ml)	18797±4807	88±9	253±23
Th17+OX40L-L-細胞 +M-A10 (30 µg/ml)	6934±997	97±48	40±16
Th17+OX40L-L-細胞 +IC (0.3 µg/ml)	168442±21659	866±218	1937±131
Th17+OX40L-L-細胞 +IC (3 µg/ml)	151481±3176	862±371	1861±295
Th17+OX40L-L-細胞 +IC (30 µg/ml)	149621±6010	918±259	1575±229

表 13

10

20

30

フローサイトメトリーおよびアネキシン V 染色によってアポトーシス細胞を同定することにより、アイソタイプコントロール G 3 - 5 1 9 処理 (I C) と比べて、 O X 4 0 L が、 T h 1 7 のアポトーシスを有意に減少させた一方で、ヒト化バリエーションである A 1 0 - D および A 1 0 - F が、アポトーシスを用量依存的様式で増加させたことを、表 1 2 に示されるデータは証明している (表 1 4) 。

【 0 2 8 4 】

【表 1 4】

表14

	TH17生存 (%)
Th17+L-細胞	20.4
Th17+OX40L-L-細胞	39.2
Th17+OX40L-L-細胞 +A10-D (0.3 µg/ml)	49.6
Th17+OX40L-L-細胞 +A10-D (3 µg/ml)	18.0
Th17+OX40L-L-細胞 +A10-D (30 µg/ml)	22.3
Th17+OX40L-L-細胞 +IC (0.3 µg/ml)	46.6
Th17+OX40L-L-細胞 +IC (3 µg/ml)	47.1
Th17+OX40L-L-細胞 +IC (30 µg/ml)	44.8

10

C. Th2 / TSLP - DC

CD11c⁺ 樹状細胞 (DC) を、健常な成人志願者由来のヒト血液のバフィーコートから単離した。系列マーカーCD3 (OKT3)、CD14 (M5E2)、CD15 (HB78)、CD20 (L27)、CD56 (B159) およびCD235α (10F7MN) に対するmAbの混合物を用いるネガティブ免疫選択によって、DCが豊富な集団をPBMCから得た。その集団をヤギ抗マウスIgGでコーティングされた磁気ビーズ (M-450; Miltenyi Biotec; CA) に通すことにより、結合した細胞を除去した。FACS Aria (アロフィコシアニン (APC) で標識された抗CD11c (B-ly6)、FITCで標識されたmAbのCD19 (HIB19) とCD56 (NCAM16.2) との混合物、およびAPC-Cy7で標識されたCD4 (RPA-T4) を用いる) によってCD11c⁺ 系列およびCD4⁺ 細胞を単離することにより、>99%の純度に達した。CD11c⁺ DCを、2%ヒトAB血清 (Gemini Bio-Products, Woodland, CA) を含むYssel培地中で培養した。細胞を、 2×10^5 細胞 / 200ml 培地の密度で平底96ウェルプレートに、15 ng / ml のTSLP (Dr. Yun-Jun Liu, M.D. Anderson Cancer Center のご厚意により贈っていただいた組換えヒトTSLP) の存在下において24時間播種した。

20

【0285】

30

同種異系CD4⁺ CD45RA⁺ ナイーブT細胞 (純度>99%) を、CD4⁺ T細胞単離キットII (Miltenyi Biotec, CA) を用いて単離した後、細胞選別した (CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD25⁻ 画分として)。その細胞を、丸底96ウェル培養プレートにおいて7日間、TSLPで刺激され洗浄されたミエロイド樹状細胞 (mDC) と共培養した (DC / T細胞比, 1 : 5)。そのmDCによる刺激の1サイクル (7日間) の後、プライミングされたCD4⁺ T細胞を回収し、洗浄した。

【0286】

培養上清中のサイトカイン産生を検出するために、上記T細胞を 10^6 細胞 / ml の濃度で、プレートに結合された5 µg / ml の抗CD3および1 µg / ml の可溶性抗CD28で再度、48時間刺激した。IL-5、IL-13およびTNF-αのレベルをELISAで測定した。TSLP活性化ミエロイドDCでプライミングされたTh2細胞における細胞増殖およびサイトカイン産生は、アイソタイプコントロール抗体と比べて、ヒト化バリエーションA10-Fの存在下において阻害された (表15)。

40

【0287】

【表 1 5】

	増殖 (CPM) ±SD	IL-5 (pg/ml) ±SD	IL-13 (pg/ml) ±SD	TNF-α (pg/ml) ±SD
Th2	2745±31	0	0	0
Th2+TSLP-DCs	195546±17034	2188±560	5107±934	456±50
Th2+ TSLP-DCs +A10-F (0.12 μg/ml)	95335±13716	2109±811	1973±289	174±14
Th2+ TSLP-DCs +A10-F (6 μg/ml)	70750±19116	509±93	1943±68	95±8
Th2+ TSLP-DCs +A10-F (60 μg/ml)	56792±2993	384±133	1728±243	93±75
Th2+ TSLP-DCs +IC (0.12 μg/ml)	191760±11838	3271±652	5341±1184	543±59
Th2+ TSLP-DCs +IC-F (6 μg/ml)	211124±16370	1885±281	4887±673	392±36
Th2+ TSLP-DCs +IC (12 μg/ml)	213641±14303	2261±116	5632±356	471±75

表15

細胞内サイトカイン産生のために、プライミングされたCD4⁺T細胞を、50 ng / ml のPMA + 2 μg / ml のイオノマイシンで6時間刺激した。最後の2時間に、10 μg / ml のプレフェルジンA (eBioscience, San Diego, CA) を加えた。その細胞を、Fixation緩衝液およびPermeabilization緩衝液 (eBioscience, CA) を用いて、IL-2およびIL-13に対するPE標識mAbと、FITC標識抗IFN-γまたは抗TNF-αとの組み合わせで染色した。TSLP活性化ミエロイドDCでプライミングされたTh2細胞におけるIL-2、IL-13およびTNF-αサイトカイン産生は、アイソタイプコントロール抗体と比べて、ヒト化バリエーションA10-Fの存在下において阻害された(表16)。

【0288】

【表 16】

表16

	IL-2 % 蛍光細胞	IL-13 % 蛍光細胞	TNF- α % 蛍光細胞
Th2	NA	NA	NA
Th2+TSLP-DCs	71	11	44
Th2+ TSLP-DCs +A10-F (0.12 $\mu\text{g/ml}$)	63	10	31
Th2+ TSLP-DCs +A10-F (6 $\mu\text{g/ml}$)	57	5	30
Th2+ TSLP-DCs +A10-F (60 $\mu\text{g/ml}$)	57	5	28
Th2+ TSLP-DCs +IC (0.12 $\mu\text{g/ml}$)	72	15	53
Th2+ TSLP-DCs +IC (6 $\mu\text{g/ml}$)	73	13	54
Th2+ TSLP-DCs +IC (12 $\mu\text{g/ml}$)	69	16	49

10

アネキシンで染色されたCD4+細胞の数の減少および細胞内でサバイピンタンパク質が発現しているCD4+細胞の数の増加によって示されるように、OX40共刺激は、プライミングされたTh2細胞の生存を増加させた。しかしながら、上記細胞培養物にヒト化バリエーションA10-Fを加えることによって、アポトーシスの有意な増加およびサバイピン発現の低下が誘導された(表17)。

20

【0289】

【表17-1】

表17

	アネキシン染色 (%)	サバイピン (%)
Th2	NA	NA
Th2+TSLP-DCs	12	90
Th2+ TSLP-DCs +A10-F (0.12 $\mu\text{g/ml}$)	24	86
Th2+ TSLP-DCs +A10-F (6 $\mu\text{g/ml}$)	29	76
Th2+ TSLP-DCs +A10-F (60 $\mu\text{g/ml}$)	35	70

30

【0290】

【表17-2】

Th2+ TSLP-DCs +IC (0.12 $\mu\text{g/ml}$)	14	90
Th2+ TSLP-DCs +IC-F (6 $\mu\text{g/ml}$)	14	86
Th2+ TSLP-DCs +IC (12 $\mu\text{g/ml}$)	14	90

40

D. Th1/LPS-DCプロトコル

Th1プロファイルへのT細胞の極性化(polarization)を解析するために、ナイーブCD4T細胞を、LPSで刺激しておいた同種異系単球由来DCとともに24時間、共培養した。DCは、当該分野で周知の標準的なプロトコルによってヒトPBMCから生成した。低密度PBMCを回収し、CD14-微小ビーズおよびAutoMacs装置(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)を用いて、CD14+細胞をポジティブ選択した。DC分化を誘導するために、37、5%CO₂下、完全培地(RPMI-10%FBS)、500IU/mlヒトrGM-CSF(R&D Systems, MN)および400IU/mlヒトrIL-4(R&D Systems, MN)中で、10⁶細胞/mlのCD14+単球を培養した。2または3日目に、DC培養

50

物に、さらなる用量の G M - C S F および I L - 4 を与えた。5 日目に、静かにピペッティングすることによって非接着性 D C を回収し、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の L P S (S i g m a - A l d r i c h , M O) とともに再度培養した。L P S で活性化された D C を回収し、洗浄し、そしてナイーブ C D 4 T 細胞を、T h - 1 極性化 T 細胞にプライミングするために用いた。その細胞を、1 : 4 という D C / T 細胞の比で 96 ウェルプレートにおいてインキュベートした。ヒト化バリエーションの A 10 - D および A 10 - F を、アンタゴニスト活性 ; ならびに L P S で活性化された D C の存在下において T h 1 でプライミングされた T 細胞の増殖およびサイトカイン産生を阻害する能力について試験した。ヒト化バリエーションの A 10 - D および F は、I L - 2、I F N - γ および T N F - α サイトカインの産生ならびに細胞増殖を、アイソタイプコントロールと比べて、キメラ (C C - A 10) およびマウス (M - A 10) バリエーション m A b と同じ程度にまで阻害した (図 11)。L P S で活性化された D C は、O X 40 以外の他の共刺激シグナルを提供することができるので、細胞増殖ならびに I F N - γ および T N F - α サイトカイン産生の阻害は、完全ではなかった。

【 0 2 9 1 】

E . 交差反応性アッセイ

公開されている文献によれば、ヒト O X 40 タンパク質とマウス O X 40 タンパク質との間で共有される相同性は、低いと考えられている。これと一致して、キメラ A 10 および B 66 は、E L I S A プラットフォームにおいて、アイソタイプコントロール (I C : 2 C 4) と比べてマウス O X 40 タンパク質に対していかなる交差反応性も示さなかった (表 18)。

【 0 2 9 2 】

【 表 18 】

表 18

OD450	マウス OX40 Fc (ng/ml)				ヒト OX40 Fc (ng/ml)			
	0	3.9	62.5	250	0	3.9	62.5	250
B66	0.134	0.034	0.039	0.045	0.02	1.225	2.859	3.377
A10	0.025	0.04	0.035	0.035	0.019	1.308	2.586	2.832
IC (2C4)	0.035	0.046	0.078	0.294	0.02	0.031	0.027	0.031
抗マウス OX40Ab	0.051	2.486	4.0	4.0	0.026	0.047	0.046	0.083

ゆえに、フローサイトメトリ染色を用いることにより、抗 O X 40 m A b がサル O X 40 タンパク質と交差反応するか否かを判定するように設定した前臨床動物モデルにおいて、その抗 O X 40 m A b を試験した。C D 4 微小ビーズ (M i l t e n y i B i o t e c , A u b u r n , C A) を用いて、全 C D 4 ⁺ T 細胞をアカゲザルおよびカニクイザルの全血、ならびにヒトパフィーコートから単離した。その単離された C D 4 ⁺ T 細胞を、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の事前にコーティングされた抗 C D 3 m A b (S P 3 4 , ヒトおよびサル種のアカゲザルとカニクイザルの両方の C D 3 タンパク質に交差反応することができるもの) および $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の可溶性抗 C D 2 8 m A b (C D 2 8 . 2 , ヒトおよびサル種のアカゲザルとカニクイザルの両方の C D 2 8 タンパク質に交差反応することができるもの) を用いて 2 日間活性化させた。それらの細胞を、サルおよびヒトの C D 4 (L 2 0 0) および C D 2 5 (M - A 2 5 1) タンパク質に交差反応する抗体を用いる表面染色に供した。O X 40 細胞表面発現に対して、P E に結合体化されたヒト化 A 10 - F O X 40 m A b を用いた。データ解析から、A 10 - F が、ヒト、アカゲザルおよびカニクイザルの活性化 C D 4 T 細胞を容易に認識することが示された (表 19)。

【 0 2 9 3 】

【表 19】

表19

	認識された活性化CD4+ T細胞
ヒト	70
カニクイザル	88
アカゲザル	75

実施例 8：エピトープマッピング

10

エピトープマッピングに対する 2 つの標準的なアプローチである、酵母表面ディスプレイおよびキメラ分子の構築を用いて、A 1 0 (T H) h u 3 3 6 F が結合する O X 4 0 エピトープをマッピングした。酵母表面ディスプレイでは、分泌されて酵母の表面上でディスプレイされることができるタンパク質融合物として、O X 4 0 の細胞外ドメインを *S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* において発現させる。O X 4 0 発現ベクターのランダム突然変異誘発により、O X 4 0 変異タンパク質のライブラリーを酵母表面上で発現させる。O X 4 0 に結合しないタンパク質を発現する変異体 (C 末端タグの存在によって判断される) を、蛍光性抗体を用いて染色し、F A C S によって単離することができる。その変異体発現プラスミドを、レスキューされた酵母から単離し、そして配列決定することにより、どのアミノ酸残基が A 1 0 (T H) h u 3 3 6 F と O X 4 0 との結合に必要であるかを決定する。

20

【 0 2 9 4 】

2 つ目のエピトープマッピングアプローチは、A 1 0 (T H) h u 3 3 6 F が、ヒト O X 4 0 には結合するが、マウス O X 4 0 には結合しないという観察結果に依存している。マウス O X 4 0 の相同領域で置換されたヒト O X 4 0 の領域を有するキメラ O X 4 0 分子を構築する。そのキメラ分子を、哺乳動物細胞の表面上で発現させ、蛍光標識された A 1 0 (T H) h u 3 3 6 F への結合を F A C S によってモニターする。ヒト O X 4 0 のどの領域が A 1 0 (T H) h u 3 3 6 F 結合に必要であるかを解析することによって、O X 4 0 結合エピトープを決定する。

【 0 2 9 5 】

30

当業者は、単なる通例の実験を用いることにより、本明細書中に記載した本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、または確かめることができる。そのような等価物は、以下の請求項によって包含されると意図される。

【図 4】

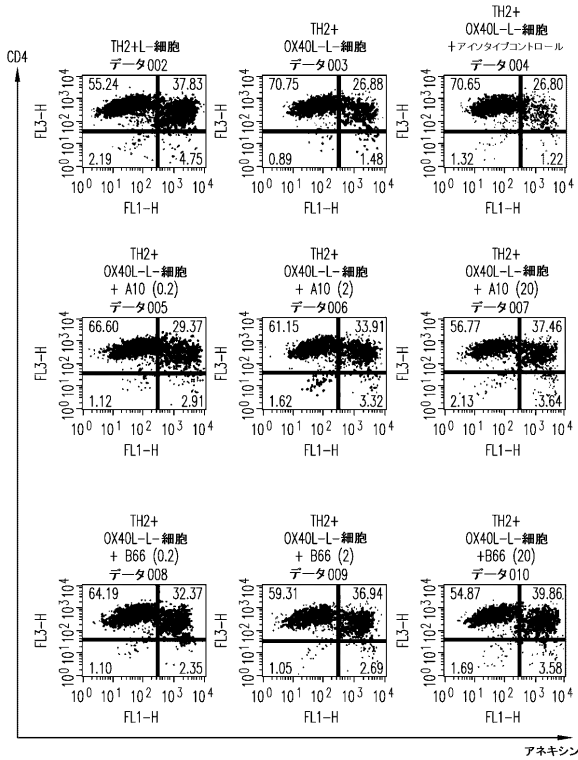


FIG.4

【図 8】

	増殖 (CPM)±SD	IL-2 (pg/ml)±SD	IL-5 (pg/ml)±SD	IL-13 (pg/ml)±SD
NCDA+L-細胞	11167±1399	347±104	215±133	123±49
NCDA+OX40L-L-細胞	85573±18267	1687±609	467±679	12883±2412
NCDA+OX40L-L-細胞+A10-D (0.3 μg/ml)	47078±5265	31±118	3634±188	3159±1000
NCDA+OX40L-L-細胞+A10-D (3 μg/ml)	45535±1508	33±0	790±405	328±176
NCDA+OX40L-L-細胞+A10-D (30 μg/ml)	49810±1178	1517	599±394	306±78
NCDA+OX40L-L-細胞+A10-F (0.3 μg/ml)	59644±8943	799±377	3525±1045	4±1
NCDA+OX40L-L-細胞+A10-F (3 μg/ml)	45342±4503	1613	500±71	3±1
NCDA+OX40L-L-細胞+A10-F (30 μg/ml)	41114±3284	25±0	366±170	11±5
NCDA+OX40L-L-細胞+CC-A10 (0.3 μg/ml)	49501±10915	919±150	3607±180	4018±2116
NCDA+OX40L-L-細胞+CC-A10 (3 μg/ml)	44088±2967	714±5	380±180	279±29
NCDA+OX40L-L-細胞+CC-A10 (30 μg/ml)	3635±4817	41±37	118±59	155±19
NCDA+OX40L-L-細胞+M-A10 (0.3 μg/ml)	44906±5451	1173±95	4459±110	664±2186
NCDA+OX40L-L-細胞+M-A10 (3 μg/ml)	34550±5779	164±81	1230±43	279±47
NCDA+OX40L-L-細胞+M-A10 (30 μg/ml)	26088±1500	301±5	115±10	151±33
NCDA+OX40L-L-細胞+HC (0.3 μg/ml)	64307±7992	2110±897	5306±560	16620±5370
NCDA+OX40L-L-細胞+HC (3 μg/ml)	61848±1338	1634±243	4564±93	13759±3507
NCDA+OX40L-L-細胞+HC (30 μg/ml)	8014±4731	192±274	5046±42	13347±1511

FIG.8

【図 7】

抗体 (μg/ml)	0	0.0096	0.048	0.24	1.2	6	30
ナイーブCD4 ⁺ T細胞 + L細胞	108±13	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ナイーブCD4 ⁺ T細胞 + OX40L L細胞	2950±36	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ナイーブCD4 ⁺ T細胞 + OX40L L細胞 + アイソタイプコントロール	2950±36	NA	3008±53	3784±45	3623±67	3246±35	3294±94
ナイーブCD4 ⁺ T細胞 + OX40L L細胞 + L106	2950±36	3038±31	2553±48	3751±210	2850±246	3250±75	4012±45
ナイーブCD4 ⁺ T細胞 + OX40L L細胞 + B66	2950±36	2608±38	1884±56	518±89	0	0	0
ナイーブCD4 ⁺ T細胞 + L細胞	3056±512	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ナイーブCD4 ⁺ T細胞 + OX40L L細胞	511±31	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ナイーブCD4 ⁺ T細胞 + OX40L L細胞 + アイソタイプコントロール	511±31	NA	6002±16	5730±16	5861±76	555±83	5956±133
ナイーブCD4 ⁺ T細胞 + OX40L L細胞 + L106	511±31	6111±27	6209±51	5665±45	6155±78	5978±24	5524±89
ナイーブCD4 ⁺ T細胞 + OX40L L細胞 + B66	511±31	649±69	6188±81	6105±42	3990±44	3306±30	3505±14

FIG.7

【図 9】

	増殖 (CPM)±SD	IL-2 (pg/ml)±SD	IL-5 (pg/ml)±SD	IL-13 (pg/ml)±SD
Th1-L-細胞	47484±5038	54±8	6660±10	112±14
Th1+OX40L-L-細胞	149756±4952	2866±101	454±74	192±23
Th1+OX40L-L-細胞+A10-D (0.3 μg/ml)	144022±9812	2209±236	259±116	1638±382
Th1+OX40L-L-細胞+A10-D (3 μg/ml)	94044±15823	323±80	70±56	312±32
Th1+OX40L-L-細胞+A10-D (30 μg/ml)	93777±6334	124±18	82±2	256±85
Th1+OX40L-L-細胞+A10-F (0.3 μg/ml)	12598±15373	1679±109	291±29	1763±116
Th1+OX40L-L-細胞+A10-F (3 μg/ml)	106887±19132	709±59	554±31	254±96
Th1+OX40L-L-細胞+A10-F (30 μg/ml)	70287±22237	453±149	471±2	267±42
Th1+OX40L-L-細胞+CC-A10 (0.3 μg/ml)	131002±8561	237±128	575±48	1518±344
Th1+OX40L-L-細胞+CC-A10 (3 μg/ml)	91313±3042	640±103	761±26	467±92
Th1+OX40L-L-細胞+CC-A10 (30 μg/ml)	79975±14740	1501±03	0	163±13
Th1+OX40L-L-細胞+M-A10 (0.3 μg/ml)	113720±15768	2499±245	253±38	1674±331
Th1+OX40L-L-細胞+M-A10 (3 μg/ml)	8535±1504	434±31	21±12	358±119
Th1+OX40L-L-細胞+M-A10 (30 μg/ml)	59326±6261	401±6	0	127±23
Th1+OX40L-L-細胞+HC (0.3 μg/ml)	140155±9320	4633±467	565±34	2880±150
Th1+OX40L-L-細胞+HC (3 μg/ml)	151538±5404	3782±406	NA	2512±12
Th1+OX40L-L-細胞+HC (30 μg/ml)	184029±20195	359±102	335±61	209±252

FIG.9

【 図 1 0 】

	増殖 (CPM)±SD	L-2 (pg/ml)±SD	L-5 (pg/ml)±SD	L-13 (pg/ml)±SD
Tb2+L-細胞				
Tb2+OX40-L-細胞	1422±1110	31±83	11±11	185±19
Tb2+OX40-L-細胞+AI0-D (0.3 μg/ml)	112776±10980	2595±151	2502±145	2565±2794
Tb2+OX40-L-細胞+AI0-D (3 μg/ml)	10800±6031	2648±609	1979±160	2866±192
Tb2+OX40-L-細胞+AI0-D (30 μg/ml)	6369±5108	173±22	327±25	207±17
Tb2+OX40-L-細胞+AI0-D (30 μg/ml)	74237±3078	7±1	527±50	267±41
Tb2+OX40-L-細胞+AI0-F (0.3 μg/ml)	108826±11634	1713±239	148±162	1429±557
Tb2+OX40-L-細胞+AI0-F (3 μg/ml)	70615±21198	64±20	265±63	232±23
Tb2+OX40-L-細胞+AI0-F (30 μg/ml)	5633±6887	0.2	243±102	210±34
Tb2+OX40-L-細胞+CC-AI0 (0.3 μg/ml)	90750±5646	250±476	2149±63	5727±1439
Tb2+OX40-L-細胞+CC-AI0 (3 μg/ml)	68776±6277	35±64	487±184	283±64
Tb2+OX40-L-細胞+CC-AI0 (30 μg/ml)	45627±5087	0	205±73	275±84
Tb2+OX40-L-細胞+M-AI0 (0.3 μg/ml)	103169±9872	2565±534	2103±171	6627±3086
Tb2+OX40-L-細胞+M-AI0 (3 μg/ml)	71706±16730	382±630	393±70	206±19
Tb2+OX40-L-細胞+M-AI0 (30 μg/ml)	42272±5018	14	93±23	185±9
Tb2+OX40-L-細胞+HC (0.3 μg/ml)	11747±10923	291±359	2618±164	26348±3035
Tb2+OX40-L-細胞+HC (3 μg/ml)	109960±14213	3418±576	2499±296	24934±3225
Tb2+OX40-L-細胞+HC (30 μg/ml)	134068±19117	3688±677	2355±75	24880±4694

FIG.10

【 図 1 1 】

	増殖 (CPM)±SD	L-2 (pg/ml)±SD	IFN-γ (pg/ml)±SD	INF-α (pg/ml)±SD
CD4+	417±73	218	30	0
CD4+DCs	125462±3065	658±168	780±185	629±32
CD4+DCs+AI0-D (0.6μg/ml)	48776±618	0	352±228	465±126
CD4+DCs+AI0-D (6μg/ml)	50335±1872	0	402±86	402±51
CD4+DCs+AI0-D (60μg/ml)	52114±2401	0	464±9	397±26
CD4+DCs+AI0-F (0.6μg/ml)	48628±1352	7±2	584±147	372±11
CD4+DCs+AI0-F (6μg/ml)	51290±1686	64	518±90	414±57
CD4+DCs+AI0-F (60μg/ml)	49383±1360	0	27±60	353±16
CD4+DCs+CC-AI0 (0.6μg/ml)	51236±933	37	600±182	357±16
CD4+DCs+CC-AI0 (6μg/ml)	47832±2016	0	501±208	336±17
CD4+DCs+CC-AI0 (60μg/ml)	47009±3194	0	144±67	373±40
CD4+DCs+M-AI0 (0.6μg/ml)	5861±3805	32±31	523±333	384±70
CD4+DCs+M-AI0 (6μg/ml)	56466±1570	0±0	664±340	386±57
CD4+DCs+M-AI0 (60μg/ml)	55846±1201	0±0	546±338	378±32
CD4+DCs+HC (0.6μg/ml)	127392±3564	712±213	994±253	543±13
CD4+DCs+HC (6μg/ml)	128305±3274	581±134	867±119	587±36
CD4+DCs+HC (60μg/ml)	118878±12137	537±252	984±242	676±60

FIG.11

【図 1 A】

ヒトOX40 cDNA (アクセッションNo. NM_004295)

```
cgaggatgtg cgtgggggct cggcgggctgg gccgcggggc gtgtgcggct ctgtctctcc 60
tgggcctggg gctgagcacc gtgacggggc tccactgtgt cggggacacc taccacagca 120
acgaccggtg ctgccacgag tgcaggccag gcaacgggat ggtgagccgc tgcagccgct 180
cccagaacac ggtgtgccgt ccgtgcgggc cgggcttcta caacgacgtg gtcagctcca 240
agccgtgcaa gccctgcacg tgggtgaacc tcagaagtgg gagtgagcgg aagcagctgt 300
gcacggccac acaggacaca gtctgccgt gccgggcggg caccagccc ctggacagct 360
acaagcctgg agttgactgt gccccctgcc ctccagggca ctctcccca ggcgacaacc 420
aggcctgcaa gccctggacc aactgcacct tggctgggaa gcacaccctg cagccggcca 480
gcaatagctc ggacgcaatc tgtgaggaca gggaccccc agccacgcag cccagggaga 540
cccagggcc cccggccagg cccatcactg tccagcccac tgaagcctgg cccagaacct 600
cacagggacc ctccaccggg cccgtggagg tccccggggg ccgtgcggtt gcgcctatcc 660
tgggcctggg cctggtgctg gggctgctgg gccccctggc cctctgctg gccctgtacc 720
tgctccggag ggaccagagg ctgccccccg atgcccacaa gccccctggg ggaggcagtt 780
tccggacccc catccaagag gagcaggccg acgcccactc caccctggcc aagatctgac 840
ctggggccac caaggtggac gctggggccc gccaggctgg agcccggagg gtctgtctgg 900
cgagcagggc aggtgcaggc cgcctgcccc gccacgctcc tgggccaact ctgcaccgtt 960
ctaggtgccg atggctgcct cgggctctct gcttacgtat gccatgcata cctcctgccc 1020
cgcgggacca caataaaaac ctgggcagac gggagtctcc gaccggcaaa aaaaaaaaaa 1084
aaaa
```

(配列番号1)

FIG.1A

ヒトOX40アミノ酸配列 (アクセッション No. NM_003318)

10	20	30	40	50
MCVGARRLGR	GPCAALLLLG	LGLSTVTGLH	CVGDTYPSND	RCCHECRPGN
60	70	80	90	100
GMVSRCSRSQ	NTVCRPCGPG	FYNDWSSKP	CKPCTWCNLR	SGSERKQLCT
110	120	130	140	150
ATQDTVCRCR	AGTQPLDSYK	PGVDCAPCPP	GHFSPGDNQA	CKPWTNCTLA
160	170	180	190	200
GKHTLQPASN	SSDAICEDRD	PPATQPQETQ	GPPARPITVQ	PTEAWPRTSQ
210	220	230	240	250
GPSTRPVEVP	GGRAVAAILG	LGLVLGLLGP	LAILLALYLL	RRDQRLPPDA
260	270	277		
HKPPGGGFR	TPIQEEQADA	HSTLAKI.	(配列番号2)	

FIG.1B

【 図 2 】

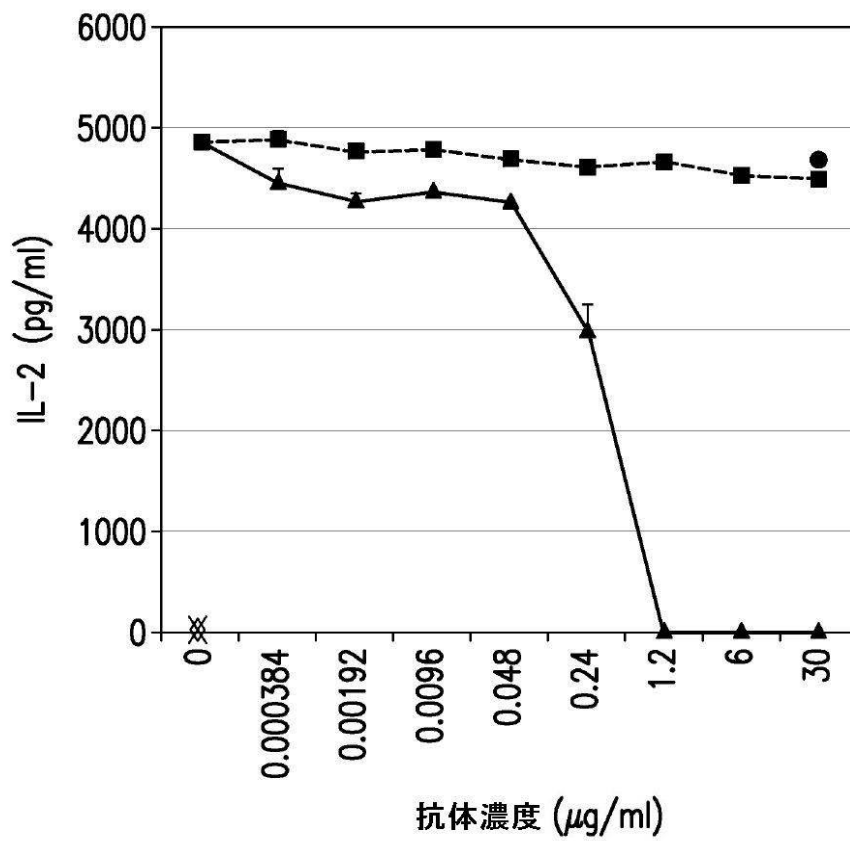


FIG.2A

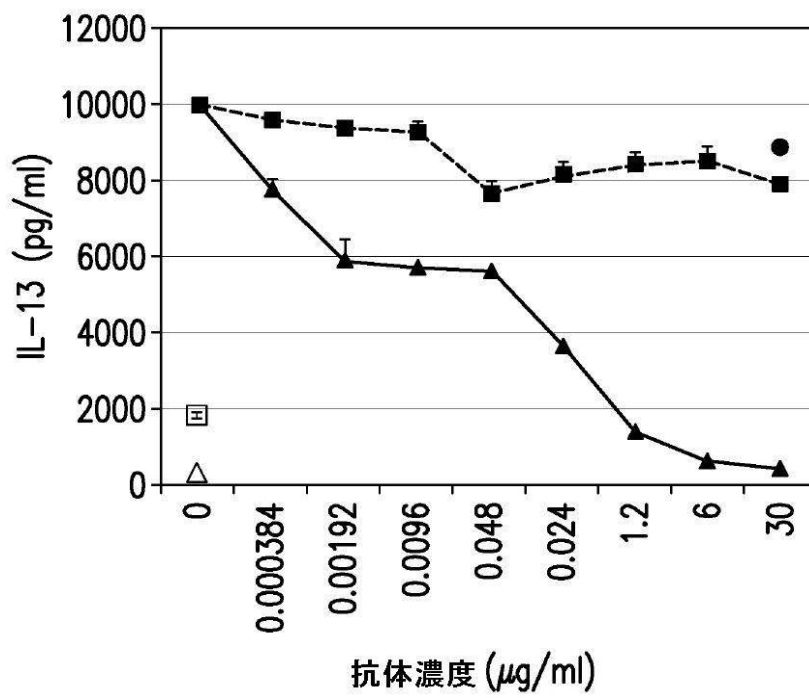


FIG.2B

【 図 3 】

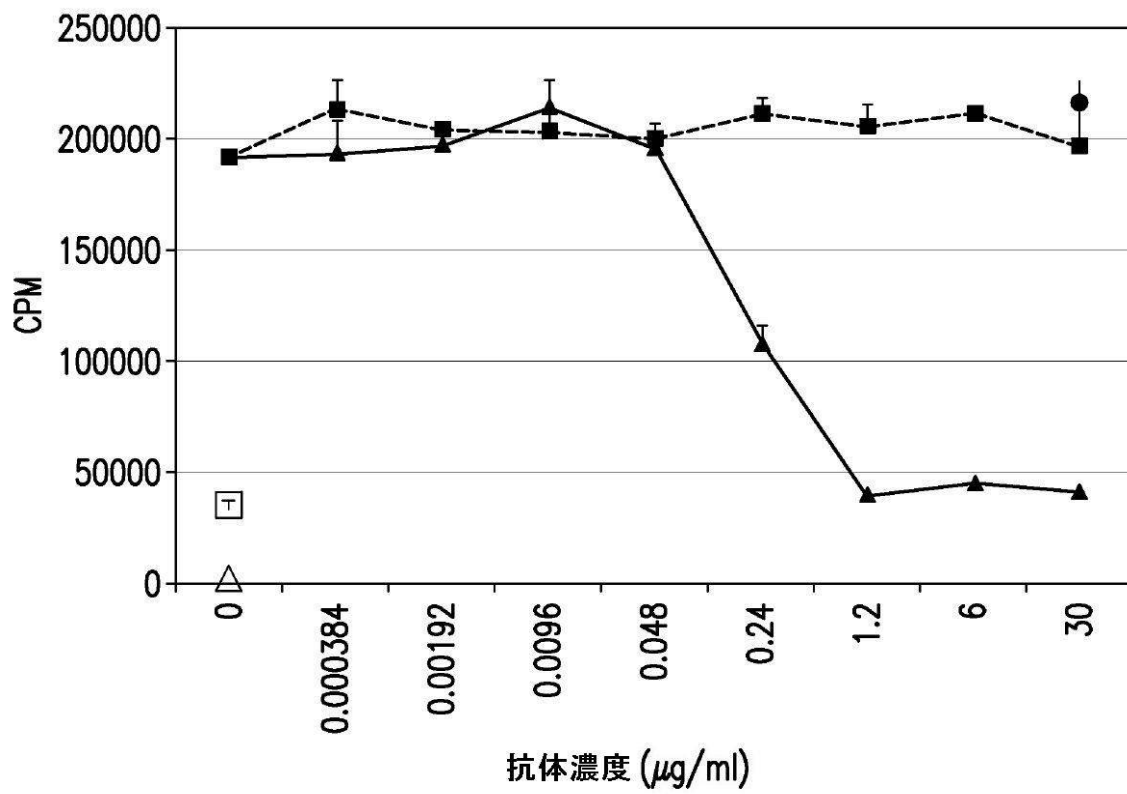


FIG.3

【 図 5 】

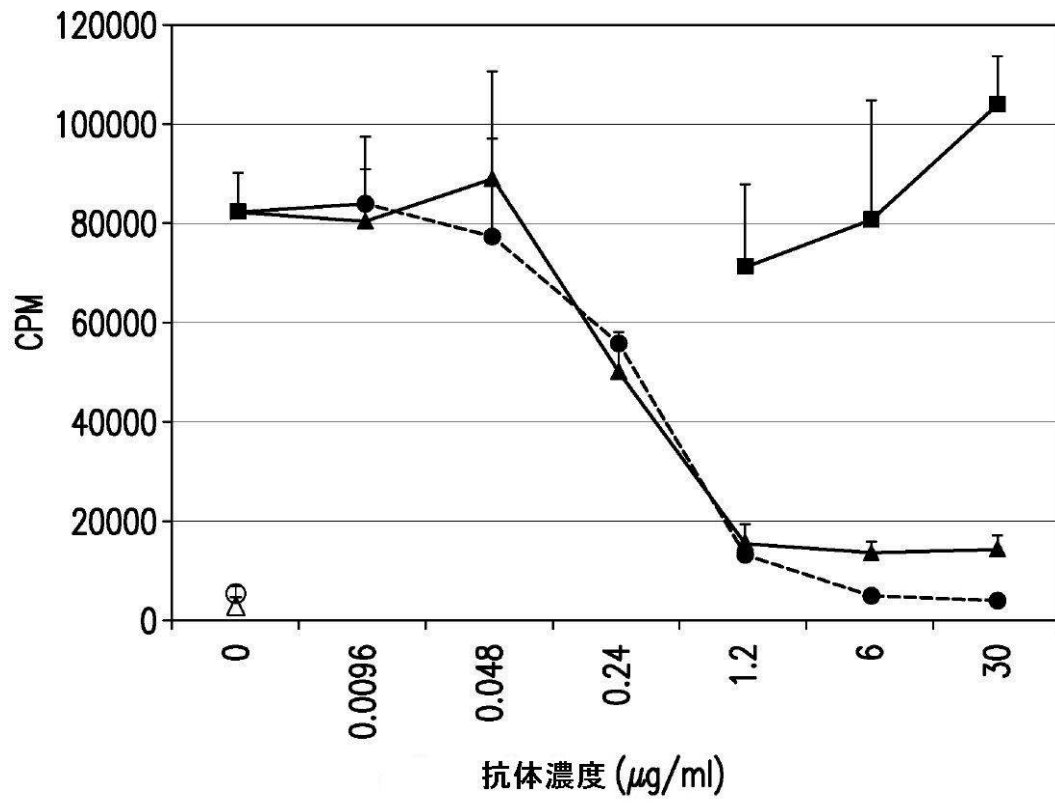


FIG.5

【 図 6 】

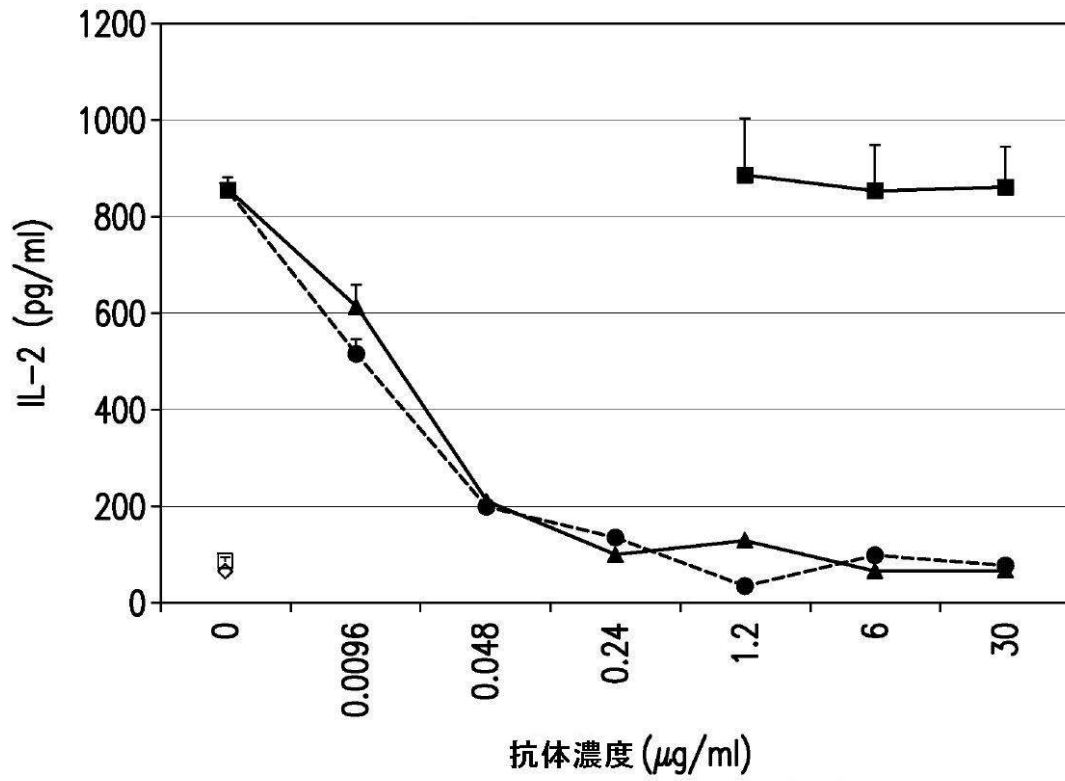


FIG.6A

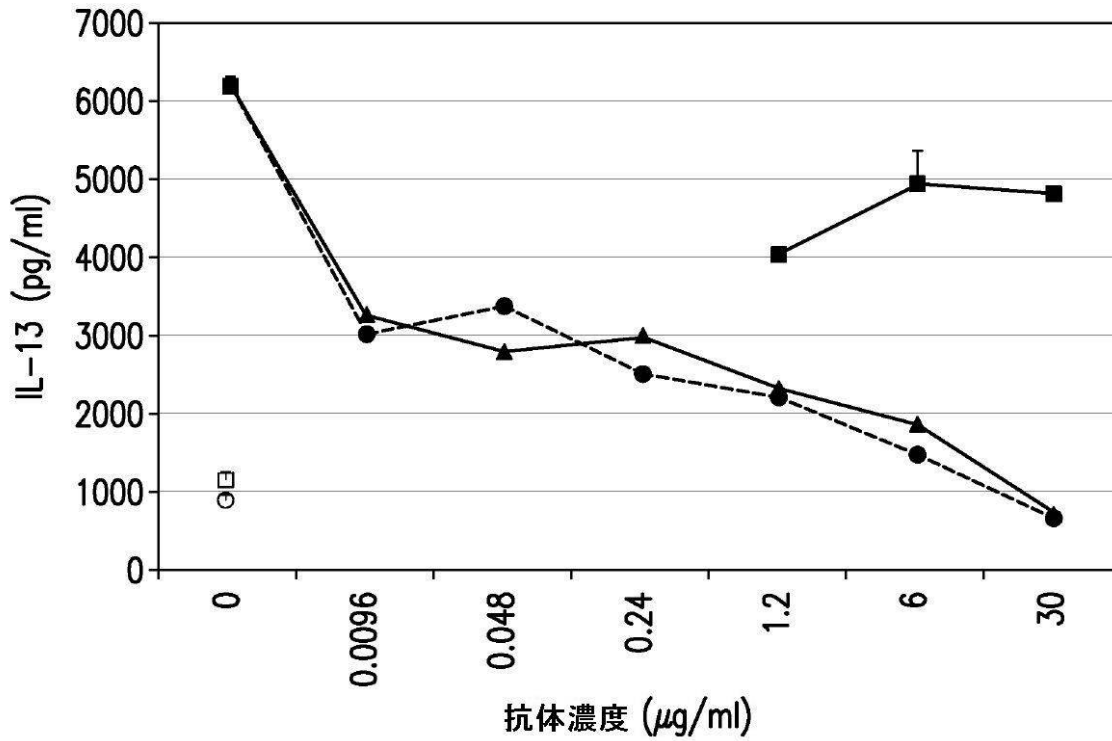


FIG. 6B

【図 1 2 A】

Kabat #
IGKV4-1
252-B66
252-A10
ヒト化
A10 (TH)hu336F

1	10	20	27	27b	27d	29
D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C	K A S Q	T V D Y D G D S Y M H				
D I V L T Q S P T S L A V S L G Q R A T I S C	K A S Q	S V D Y D G D S Y M N				
D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C	K A S Q	T V D Y D G D S Y M H				

CDRL1

Kabat #
IGKV4-1
252-B66
252-A10
ヒト化
A10 (TH)hu336F

35	40	50	60	70
W Y Q Q K P G Q P K L L I Y	- - - - -	G V P D R F S G S G S G T D F T		
W Y Q Q K P G Q P K L L I Y	A A S N L E S G I P A R F S G S G S G T D F T			
W Y Q Q K P G Q P K L L I Y	A A S N L E S G I P A R F S G S G S G T D F T			
W Y Q Q K P G Q P K L L I Y	A A S N L E S G V P D R F S G S G S G T D F T			

CDR-L2

Kabat #
IGKV4-1/IGKJ1
252-B66
252-A10
ヒト化
A10 (TH)hu336F

75	80	90	100	106a
L T I S S L Q A E D V A V Y Y C	- - - - -	F G Q G T K V E I K (配列番号28)		
L N I H P V E E D A	A T Y Y C	Q Q S N E D P Y I F G G G T K L E I K (配列番号7)		
L N I H P V E E D A	T T Y Y C	H Q S N E D P W I F G G G T K L E I K (配列番号8)		
L T I S S L Q A E D V A V Y Y C	H Q S N E D P W I F G Q G T K V E I K (配列番号9)			

CDRL3

FIG.12A

【 図 1 2 B 】

Kabat 番号
252-A10
IGHV1-46
ヒト化
A10 (TH)hu336F

11010203036
QVQLQQPGSVLV R P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y W M H W V
QVQLVQSGAEVK K P G A S V K V S C K A S G Y T F T - - - - W V
QVQLVQSGAEVK K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y W M H W V

CDR-H1

Kabat 番号
252-A10
IGHV1-46
ヒト化
A10 (TH)hu336F

405052a54606670
KQRP G Q G L E W I G E I H P K S G N S N Y N E K F K G R A T L T V D T
RQAP G Q G L E W M G - - - - - - - - - - - - - - R V T M T R D T
RQAP G Q G L E W M G E I H P K S G N S N Y N E K F K G R V T M T R D T

CDR-H2

Kabat 番号
252-A10
IGHV1-46
ヒト化
A10 (TH)hu336F

808282b8390100100b101
S S S T A Y V D L S S L T S E D S A V Y Y C A R G P E Y S N F W F A Y
S T S T V Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R - - - - - - - -
S T S T V Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G P E Y S N F W F A Y

CDR-H3

Kabat 番号
252-A10
IGHJ4
ヒト化
A10 (TH)hu336F

110113
W G Q G T L V T V S A (配列番号10)
W G Q G T L V T V S S (配列番号29)
W G Q G T L V T V S S (配列番号11)

FIG.12B

【 図 1 3 】

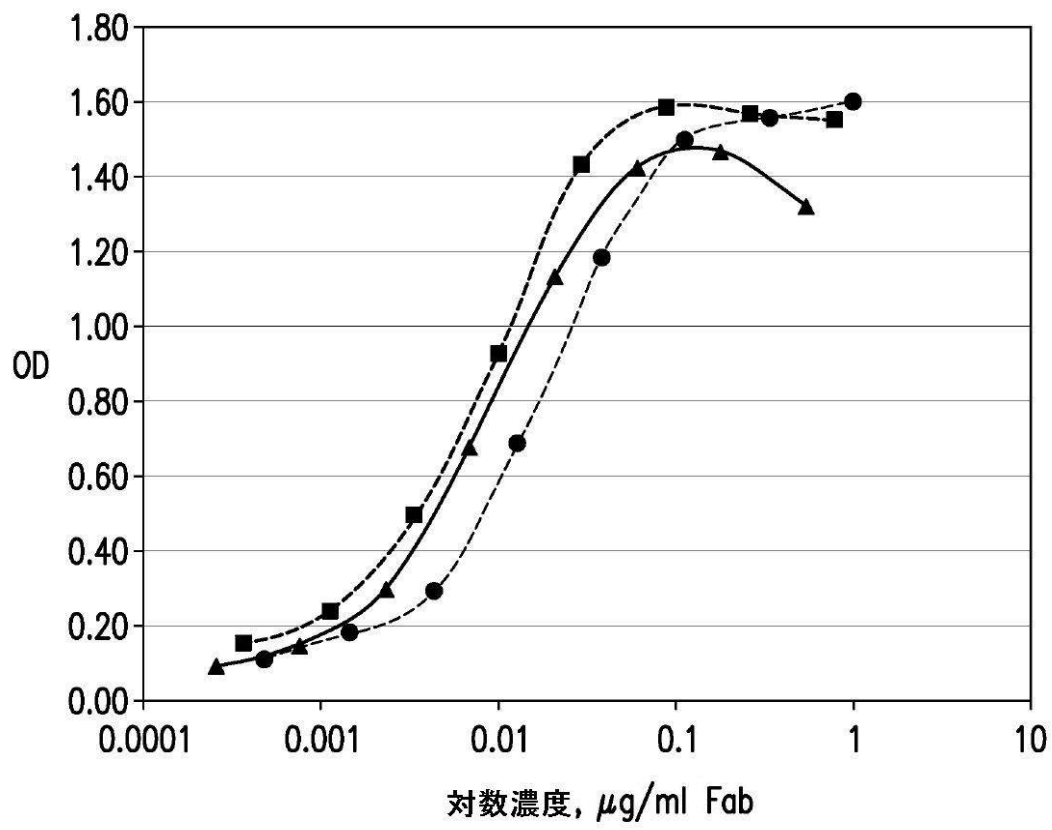


FIG.13

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAATCTTTGGCTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGTTGATTATGATGG
TGATAGTTATGAAC TGGTACCAACAGAAACAGGACAGCCACCACCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAACTAGAACTCTGGATCCCAGCCAGGT
TTAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCTGTGGAGGAGGAGGATGCTACAACTATTACTGTCACCAGAGTAATGAGGAT
CCGTGGACGTTGCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (配列番号20)

FIG.14A

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCTGCAAGGCCAGCCAAACTGTTGATTATGATGG
TGACAGTTATATGCAATTGGTACCAACAGAAACAGGACAGCCACCACCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAACTAGAACTCTGGATCCCAGCCAGGT
TTAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAAGTAATGAGGAT
CCGTACACGTTGCGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (配列番号21)

FIG.14B

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCGACAGCGCTGGCCGTGAGCCTGGGGAGCGCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGGACTACGACGGC
GACAGCTACATGAAC TGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCACCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAACTGGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTC
AGCGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTGCCACCAGAGCAACGAGGACCCCA
TGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG (配列番号22)

FIG.14C

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCGACAGCGCTGGCCGTGAGCCTGGGGAGCGCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGGACTACGACGGC
GACAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCACCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAACTGGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTC
AGCGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTGCCACCAGAGCAACGAGGACCCCA
TGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG (配列番号23)

FIG.14D

GACATCGTGATGACCCAGAGCCCGACAGCGCTGGCCGTGAGCCTGGGGAGCGCGCCACCATCAACTGCAAGGCCAGCCAGACCGTGGACTACGACGGC
GACAGCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCACCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAACTGGAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTC
AGCGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTGCCACCAGAGCAACGAGGACCCCA
TGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG (配列番号24)

FIG.14E

CAGGTCCAACCTGCAGAGCCTGGGTCTGTGCTGGTGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTCACCAGCTACTGG
ATGCATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTCATCTAAAGTGGTAATAGTAACATACTAATGAGAAGTTCAAGGGC
AGGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACGTGGATCTTAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGT
CCGGAATATAGTAATTTTGGTTTGGTTTATTGGGGCCAAAGGAACCTCTGGTCACTGTCTCTGTCA (配列番号25)

FIG.14F

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCAGGGGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTCACCAGCTACTGG
ATGCACCTGGGTGGCCAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGAGATCCACCCAAAGAGCGGCAACAGCAACTACAACGAGAAGTTCAAGGGC
CGCGTGACCATGACCCGCGACACACAGCACCCAGCACCGTGTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCGCAGCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGGC
CCAGAGTACAGCAACTTCTGGTTGCGCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC (配列番号26)

FIG.14G

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCAGGGGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTCACCAGCTACTGG
ATGCACCTGGGTGGCCAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGAGATCCACCCAAAGAGCGGCAACAGCAACTACAACGAGAAGTTCAAGGGC
CGCGTGACCCCTGACCCGCGACACACAGCACCCAGCACCGTGTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCGCAGCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGGC
CCAGAGTACAGCAACTTCTGGTTGCGCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC (配列番号27)

FIG.14H

【 図 1 5 】

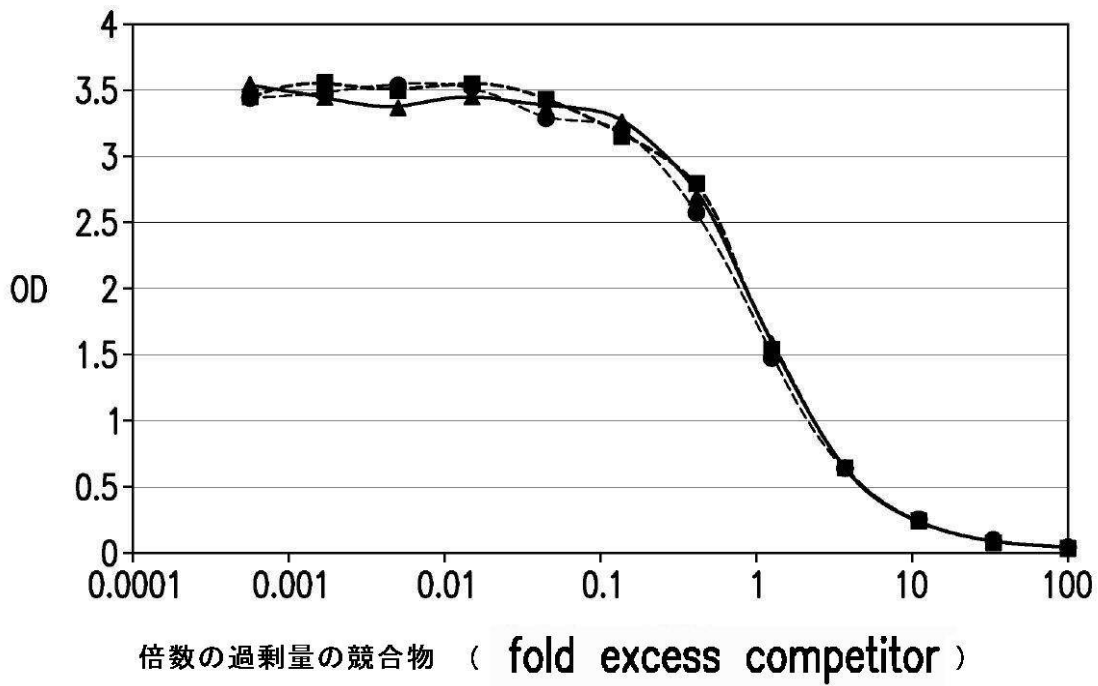


FIG.15

【図 16 A】

I	A	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G
	B	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	
	C	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	
	D	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	
II	A	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	V	S	-HI-	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	G
	B	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	
	C	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	
	D	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	T	V	S	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	
III	A	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S
	B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	
	C	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	
	D	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	
アクセプター																																-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S
第2アクセプター	A	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	N	I	K	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S
	B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	
	C	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	
	D	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	-HI-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	

FIG.16A

【図 16B】

-H2-	R	V	T	I	T	A	D	T	S	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 30
-H2-	R	V	T	I	T	A	D	T	S	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 31
-H2-	R	V	T	I	T	A	D	T	S	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 32
-H2-	R	V	T	I	T	A	D	T	S	T	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 33	
-H2-	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 34
-H2-	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 35
-H2-	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 36
-H2-	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 37	
-H2-	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 38
-H2-	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 39
-H2-	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 40
-H2-	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 41	
-H2-	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 42
-H2-	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 43
-H2-	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 44
-H2-	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 45
-H2-	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 46
-H2-	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 47
-H2-	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	R	-H3-	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	配列番号 48	

FIG.16B

【図 17A】

kv1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C -L1- W Y Q Q K P G K A P K L L I Y -L2-

kv2 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C -L1- W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y -L2-

kv3 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C -L1- W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y -L2-

kv4 D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C -L1- W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y -L2-

FIG.17A

【図 17B】

GVP	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	-L3-	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	配列番号 49
GVP	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	-L3-	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	配列番号 50
GIP	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	-L3-	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	配列番号 51
GVP	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	-L3-	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	配列番号 52

FIG.17B

huMAb4D5-8軽鎖のフレームワーク配列

LC-FR1	¹ Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys ²³ (配列番号53)
LC-FR2	³⁵ Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr ⁴⁹ (配列番号54)
LC-FR3	⁵⁷ Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys ⁸⁸ (配列番号55)
LC-FR4	⁹⁸ Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys ¹⁰⁷ (配列番号56)

huMAb4D5-8重鎖のフレームワーク配列

HC-FR1	¹ Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser ²⁵ (配列番号57)
HC-FR2	³⁶ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val ⁴⁸ (配列番号58)
HC-FR3	⁶⁶ Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn ⁸³ Ser ^{83a} Leu ^{83b} Arg ^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys ⁹² (配列番号59)
HC-FR4	¹⁰³ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ¹¹³ (配列番号60)

FIG.18

【 図 1 9 】

66位(下線部)が改変されたhuMAb4D5-8軽鎖のフレームワーク配列	
LC-FR1	¹ Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys ²³ (配列番号53)
LC-FR2	³⁵ Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr ⁴⁹ (配列番号54)
LC-FR3	⁵⁷ Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys ⁸⁸ (配列番号55)
LC-FR4	⁹⁸ phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys ¹⁰⁷ (配列番号56)
71、73および78位(下線部)が改変されたhuMAb4D5-8重鎖のフレームワーク配列	
HC-FR1	¹ Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser ²⁵ (配列番号57)
HC-FR2	³⁶ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val ⁴⁸ (配列番号58)
HC-FR3	⁶⁶ Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp <u>Asn</u> Ser Lys Asn Thr <u>Leu</u> Tyr Leu Gln Met <u>Asn</u> ⁸³ Ser ^{83a} Leu ^{83b} Arg ^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys ⁹² (配列番号59)
HC-FR4	¹⁰³ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ¹¹³ (配列番号60)

FIG.19

【 配 列 表 】
2010518873000001.app
【 手 続 補 正 書 】
【 提 出 日 】 平成21年10月27日 (2009.10.27)
【 手 続 補 正 1 】
【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書
【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 6 9
【 補 正 方 法 】 変 更
【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 6 9 】

本発明は、本発明の組成物を備える医療デバイスを包含する。

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目1)

ヒト O X 4 0 エピトープに特異的に結合する、単離されたアンタゴニスト抗体であって、この抗体は：

a .

i . 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および / または

i i i . 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) ならびに / あるいは

b .

i . 配列番号 1 2 、 1 5 または 6 1 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ；および / または

i i i . (3) 配列番号 1 4 または 1 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、抗体。

(項目2)

上記抗体が：

a .

i . 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および

i i i . 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) および / または

b .

i . 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ；および

i i i . (3) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、項目 1 に記載の抗体。

(項目3)

上記抗体が：

a .

i . 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および

i i i . 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) ならびに / または

b .

i . 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ；および

i i i . 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、項目 1 に記載の抗体。

(項目4)

上記抗体が：

a .

i . 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および

i i i . (3) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) ならびに / または

b .

i . 配列番号 15 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ;

i i . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ; および

i i i . (3) 配列番号 14 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、項目 1 に記載の抗体。

(項目 5)

上記抗体が :

a .

i . 配列番号 17 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ;

i i . 配列番号 18 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ; および

i i i . 配列番号 19 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ;

を含む重鎖可変領域 (V H) ならびに / または

b .

i . 配列番号 15 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ;

i i . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ; および配列番号 16 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、項目 1 に記載の抗体。

(項目 6)

上記抗体が :

a . 配列番号 10 もしくは 11 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (V H)、および / または

b . 配列番号 7、8 もしくは 9 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (V L)

を含む、項目 1 に記載の抗体。

(項目 7)

上記抗体が :

a . 配列番号 25、26 もしくは 27 の核酸配列のいずれか 1 つによってコードされる重鎖可変領域 (V H) ; および / または

b . 配列番号 20、21、22、23 もしくは 24 の核酸配列のいずれか 1 つによってコードされる軽鎖可変領域 (V L)

を含む、項目 1 に記載の抗体。

(項目 8)

上記抗体が :

a . 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有する V H、および配列番号 7 もしくは 8 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列を有する V L ; または

b . 配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を有する V H、および配列番号 9 に示されているアミノ酸配列を有する V L

を含む、項目 6 に記載の抗体。

(項目 9)

上記抗体が :

a . 配列番号 25 の核酸配列によってコードされる V H、および配列番号 20 もしくは 21 の核酸配列によってコードされる V L ;

b . 配列番号 26 の核酸配列によってコードされる V H、および配列番号 22、23 もしくは 24 の核酸配列によってコードされる V L ; または

c . 配列番号 27 の核酸配列によってコードされる V H、および配列番号 22、23 もしくは 24 の核酸配列によってコードされる V L

を含む、項目 7 に記載の抗体。

(項目 10)

上記 V H が、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を含み、上記 V L が、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む、項目 8 に記載の抗体。

(項目 11)

上記 V H が、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を含み、上記 V L が、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む、項目 8 に記載の抗体。

(項目 12)

上記 V H が、配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を含み、上記 V L が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列を含む、項目 8 に記載の抗体。

(項目 13)

定常領域をさらに含む、項目 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

(項目 14)

C H 1、C H 2 または C H 3 ドメインを含む抗体定常領域をさらに含む、項目 13 に記載の抗体。

(項目 15)

上記定常領域が、I g G 抗体由来である、項目 14 に記載の抗体。

(項目 16)

上記 I g G 抗体が、I g G 1 抗体、I g G 2 抗体、I g G 3 抗体または I g G 4 抗体である、項目 15 に記載の抗体。

(項目 17)

上記抗体が、ヒト抗体である、項目 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

(項目 18)

上記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、モノクローナル抗体または組換え抗体である、項目 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

(項目 19)

上記抗体が、F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、一本鎖 F v、一本鎖抗体、ジスルフィド結合 F v、単ドメイン抗体、抗原結合フラグメント、ダイアボディ、トリアボディまたはミニボディである、項目 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

(項目 20)

標識をさらに含む、項目 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

(項目 21)

細胞毒または免疫毒素をさらに含む、項目 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

(項目 22)

項目 1 に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

(項目 23)

項目 22 に記載の核酸分子を含むベクター。

(項目 24)

項目 23 に記載のベクターを含む宿主細胞。

(項目 25)

項目 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体と、生理的に許容可能なキャリア、希釈剤、賦形剤および安定剤のうちの少なくとも 1 つとを含む組成物。

(項目 26)

患者において O X - 40 媒介性障害を処置する方法であって、この方法は、項目 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 のいずれか 1 項に記載の、有効量の抗体をこの患者に投与する工程を包含し、ここで、この抗体は、O X 40 に対する O X 40 L の結合を阻止し、そして / または O X 40 に対する O X 40 L の結合に関連する 1 つ以上の機能を阻害する、方法。

(項目 27)

上記 O X 4 0 媒介性障害が、炎症性疾患または自己免疫疾患である、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

上記疾患が、アレルギー、喘息、または自己免疫および炎症に関連する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (E A E)、自己免疫性神経障害、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、重症筋無力症、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎 (例えば、潰瘍性大腸炎)、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病、バセドウ病、サルコイドーシス、悪性貧血、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、血管炎 (例えば、ウェゲナー肉芽腫症)、ベーチェット病、疱疹状皮膚炎、尋常性天疱瘡、白斑、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、橋本甲状腺炎、自己免疫性の卵巣炎および睾丸炎、副腎の自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症 (例えば、強直性脊椎炎)、ライター症候群、またはシェーグレン症候群である、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 2 9)

上記疾患が、アレルギー、喘息、または自己免疫および炎症に関連する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (E A E)、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎 (例えば、潰瘍性大腸炎)、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病またはバセドウ病である、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 3 0)

上記抗体が、静脈内、腹腔内、吸入、筋肉内、皮下および経口経路を含む経路のうちの 1 つ以上を介して上記患者に投与される、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 3 1)

患者において I g E 抗体産生を阻害することによって障害を処置するための方法であって、項目 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 のいずれか 1 項に記載の、有効量の抗体をこの患者に投与する工程を包含する、方法。

(項目 3 2)

上記障害が、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性皮膚炎、アナフィラキシー、じんま疹またはアトピー性皮膚炎である、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

哺乳動物において喘息の重症度を低下させるための方法であって、この方法は、項目 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 のいずれか 1 項に記載の、有効量の抗体をこの哺乳動物に投与する工程を包含し、ここで、この抗体は、以下の特性：(a) ヒト O X 4 0 に、約 1×10^{-10} 乃至約 1×10^{-12} M の K_D で結合する；(b) O X 4 0 への結合に関連する 1 つ以上の機能を阻害する；および (c) O X 4 0 に対する O X 4 0 L の結合を阻害する、のうちの少なくとも 1 つを備えている、方法。

(項目 3 4)

上記抗体が、約 1×10^{-12} 乃至約 1×10^{-11} M、約 1×10^{-11} 乃至約 1×10^{-10} M、約 1×10^{-10} 乃至約 1×10^{-9} M、約 1×10^{-9} 乃至約 1×10^{-8} M、または約 1×10^{-8} 乃至約 1×10^{-7} M の K_D でヒト O X 4 0 に結合する、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

項目 2 4 に記載の細胞を、抗体の産生に適した条件下で培養する工程およびこの抗体を単離する工程を包含する、抗体の生成方法。

(項目 3 6)

項目 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載されたような抗体を産生する、ハイブリドーマ。

(項目 3 7)

医薬の調製における、項目 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 のいずれか 1 項に

記載の抗体の使用。

(項目38)

OX40に関連する疾患または障害を処置するための、項目1、2、3、4、5、6、7、8または9のいずれか1項に記載の抗体の使用。

(項目39)

上記疾患が、アレルギー、喘息、または自己免疫および炎症に関連する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、自己免疫性神経障害、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、重症筋無力症、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎(例えば、潰瘍性大腸炎)、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病、バセドウ病、サルコイドーシス、悪性貧血、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、血管炎(例えば、ウェゲナー肉芽腫症)、ベーチェット病、疱疹状皮膚炎、尋常性天疱瘡、白斑、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、橋本甲状腺炎、自己免疫性の卵巣炎および睾丸炎、副腎の自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症(例えば、強直性脊椎炎)、ライター症候群またはシェーグレン症候群である、項目38に記載の使用。

(項目40)

上記疾患が、アレルギー、喘息、または自己免疫および炎症に関連する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎(例えば、潰瘍性大腸炎)、接触過敏症反応、糖尿病またはクローン病である、項目39に記載の使用。

(項目41)

OX40を検出するための、項目1、2、3、4、5、6、7、8または9に記載の抗体の使用。

(項目42)

サンプル中のOX40を検出するための方法であって、このサンプルと、項目20に記載の抗体とを接触させる工程を包含する、方法。

(項目43)

容器に入った所定量の項目1、2、3、4、5、6、7、8または9に記載の抗体、および別個の容器に入った緩衝液を備えた、キット。

(項目44)

容器に入った所定量の項目25に記載の組成物、および別個の容器に入った緩衝液を備えた、キット。

(項目45)

項目1、2、3、4、5、6、7、8または9に記載の抗体を備えた、医療デバイス。

(項目46)

吸入デバイスである、項目45に記載の医療デバイス。

(項目47)

項目25に記載の組成物を備えた、医療デバイス。

(項目48)

吸入デバイスである、項目47に記載の医療デバイス。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトOX40エピトープに特異的に結合する、単離されたアンタゴニスト抗体であって

、該抗体は：

a .

i . 配列番号 17 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 18 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および / または

i i i . 配列番号 19 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) ならびに / あるいは

b .

i . 配列番号 12、15 または 61 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ；

i i . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ；および / または

i i i . (3) 配列番号 14 または 16 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、抗体。

【請求項 2】

前記抗体が：

a .

i . 配列番号 17 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 18 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および

i i i . 配列番号 19 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) および / または

b .

i . 配列番号 12 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ；

i i . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ；および

i i i . (3) 配列番号 14 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体が：

a .

i . 配列番号 17 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 18 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および

i i i . 配列番号 19 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) ならびに / または

b .

i . 配列番号 12 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ；

i i . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ；および

i i i . 配列番号 16 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗体が：

a .

i . 配列番号 17 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 18 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および

i i i . (3) 配列番号 19 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) ならびに / または

b .

i . 配列番号 15 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ；

i i . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ；および

i i i . (3) 配列番号 14 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗体が：

a .

i . 配列番号 17 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 ；

i i . 配列番号 18 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；および

i i i . 配列番号 19 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 ；

を含む重鎖可変領域 (V H) ならびに / または

b .

i . 配列番号 15 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 ；

i i . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 ；および配列番号 16 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む軽鎖可変領域 (V L)

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体が：

a . 配列番号 10 もしくは 11 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (V H) 、および / または

b . 配列番号 7、8 もしくは 9 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (V L)

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 7】

前記抗体が：

a . 配列番号 25、26 もしくは 27 の核酸配列のいずれか 1 つによってコードされる重鎖可変領域 (V H) ；および / または

b . 配列番号 20、21、22、23 もしくは 24 の核酸配列のいずれか 1 つによってコードされる軽鎖可変領域 (V L)

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

前記抗体が：

a . 配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を有する V H、および配列番号 7 もしくは 8 のいずれか 1 つに示されているアミノ酸配列を有する V L ；または

b . 配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を有する V H、および配列番号 9 に示されているアミノ酸配列を有する V L

を含む、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 9】

前記抗体が：

a . 配列番号 25 の核酸配列によってコードされる V H、および配列番号 20 もしくは 21 の核酸配列によってコードされる V L ；

b . 配列番号 26 の核酸配列によってコードされる V H、および配列番号 22、23 もしくは 24 の核酸配列によってコードされる V L ；または

c . 配列番号 27 の核酸配列によってコードされる V H、および配列番号 22、23 もしくは 24 の核酸配列によってコードされる V L

を含む、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記 V H が、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 11】

前記 V H が、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 1 2】

前記 V H が、配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 1 3】

定常領域をさらに含む、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

C H 1、C H 2 または C H 3 ドメインを含む抗体定常領域をさらに含む、請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 5】

前記定常領域が、I g G 抗体由来である、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 1 6】

前記 I g G 抗体が、I g G 1 抗体、I g G 2 抗体、I g G 3 抗体または I g G 4 抗体である、請求項 1 5 に記載の抗体。

【請求項 1 7】

前記抗体が、ヒト抗体である、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 1 8】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、モノクローナル抗体または組換え抗体である、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 1 9】

前記抗体が、F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、一本鎖 F v、一本鎖抗体、ジスルフィド結合 F v、単ドメイン抗体、抗原結合フラグメント、ダイアボディ、トリアボディまたはミニボディである、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

標識をさらに含む、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 2 1】

細胞毒または免疫毒素をさらに含む、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 2 2】

請求項 1 に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 5】

請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に記載の抗体と、生理的に許容可能なキャリア、希釈剤、賦形剤および安定剤のうちの少なくとも 1 つとを含む組成物。

【請求項 2 6】

患者において O X - 4 0 媒介性障害を処置するための組成物であって、該組成物は、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 のいずれか 1 項に記載の、有効量の抗体を含み、ここで、該抗体は、O X 4 0 に対する O X 4 0 L の結合を阻止し、そして / または O X 4 0 に対する O X 4 0 L の結合に関連する 1 つ以上の機能を阻害する、組成物。

【請求項 2 7】

前記 O X 4 0 媒介性障害が、炎症性疾患または自己免疫疾患である、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記疾患が、アレルギー、喘息、または自己免疫および炎症に関連する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄

炎（EAE）、自己免疫性神経障害、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、重症筋無力症、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎（例えば、潰瘍性大腸炎）、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病、バセドウ病、サルコイドーシス、悪性貧血、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、血管炎（例えば、ウェゲナー肉芽腫症）、ベーチェット病、疱疹状皮膚炎、尋常性天疱瘡、白斑、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、橋本甲状腺炎、自己免疫性の卵巣炎および睾丸炎、副腎の自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症（例えば、強直性脊椎炎）、ライター症候群、またはシェーグレン症候群である、請求項27に記載の組成物。

【請求項29】

前記疾患が、アレルギー、喘息、または自己免疫および炎症に関連する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎（例えば、潰瘍性大腸炎）、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病またはバセドウ病である、請求項27に記載の組成物。

【請求項30】

前記抗体が、静脈内、腹腔内、吸入、筋肉内、皮下および経口経路を含む経路のうちの1つ以上を介して前記患者に投与されることを特徴とする、請求項26に記載の組成物。

【請求項31】

患者においてIgE抗体産生を阻害することによって障害を処置するための組成物であって、請求項1、2、3、4、5、6、7、8または9のいずれか1項に記載の、有効量の抗体を含む、組成物。

【請求項32】

前記障害が、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性皮膚炎、アナフィラキシー、じんま疹またはアトピー性皮膚炎である、請求項31に記載の組成物。

【請求項33】

哺乳動物において喘息の重症度を低下させるための組成物であって、該組成物は、請求項1、2、3、4、5、6、7、8または9のいずれか1項に記載の、有効量の抗体を含む、ここで、該抗体は、以下の特性：（a）ヒトOX40に、約 1×10^{-10} 乃至約 1×10^{-12} Mの K_D で結合する；（b）OX40への結合に関連する1つ以上の機能を阻害する；および（c）OX40に対するOX40Lの結合を阻害する、のうちの少なくとも1つを備えている、組成物。

【請求項34】

前記抗体が、約 1×10^{-12} 乃至約 1×10^{-11} M、約 1×10^{-11} 乃至約 1×10^{-10} M、約 1×10^{-10} 乃至約 1×10^{-9} M、約 1×10^{-9} 乃至約 1×10^{-8} M、または約 1×10^{-8} 乃至約 1×10^{-7} Mの K_D でヒトOX40に結合する、請求項33に記載の組成物。

【請求項35】

請求項24に記載の細胞を、抗体の産生に適した条件下で培養する工程および該抗体を単離する工程を包含する、抗体の生成方法。

【請求項36】

請求項1、2、3、4、5、6、7、8または9に記載されたような抗体を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項37】

医薬の調製における、請求項1、2、3、4、5、6、7、8または9のいずれか1項に記載の抗体の使用。

【請求項38】

OX40に関連する疾患または障害を処置するための医薬を調製することにおける、請求項1、2、3、4、5、6、7、8または9のいずれか1項に記載の抗体の使用。

【請求項39】

前記疾患が、アレルギー、喘息、または自己免疫および炎症に関連する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）、自己免疫性神経障害、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、重症筋無力症、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎（例えば、潰瘍性大腸炎）、接触過敏症反応、糖尿病、クローン病、バセドウ病、サルコイドーシス、悪性貧血、側頭動脈炎、抗リン脂質症候群、血管炎（例えば、ウェゲナー肉芽腫症）、ベーチェット病、疱疹状皮膚炎、尋常性天疱瘡、白斑、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、橋本甲状腺炎、自己免疫性の卵巣炎および睾丸炎、副腎の自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス、強皮症、皮膚筋炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、脊椎関節症（例えば、強直性脊椎炎）、ライター症候群またはシェーグレン症候群である、請求項38に記載の使用。

【請求項40】

前記疾患が、アレルギー、喘息、または自己免疫および炎症に関連する疾患、例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘発関節炎、大腸炎（例えば、潰瘍性大腸炎）、接触過敏症反応、糖尿病またはクローン病である、請求項39に記載の使用。

【請求項41】

OX40を検出するための、請求項1、2、3、4、5、6、7、8または9に記載の抗体の使用。

【請求項42】

サンプル中のOX40を検出するための方法であって、該サンプルと、請求項20に記載の抗体とを接触させる工程を包含する、方法。

【請求項43】

容器に入った所定量の請求項1、2、3、4、5、6、7、8または9に記載の抗体、および別個の容器に入った緩衝液を備えた、キット。

【請求項44】

容器に入った所定量の請求項25に記載の組成物、および別個の容器に入った緩衝液を備えた、キット。

【請求項45】

請求項1、2、3、4、5、6、7、8または9に記載の抗体を備えた、医療デバイス。

【請求項46】

吸入デバイスである、請求項45に記載の医療デバイス。

【請求項47】

請求項25に記載の組成物を備えた、医療デバイス。

【請求項48】

吸入デバイスである、請求項47に記載の医療デバイス。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2008/002498
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P37/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/019866 A (IMMUNEX CORP [US]; BURTON PAUL B [US]; DEISHER THERESA A [US]) 11 March 2004 (2004-03-11) page 20 - page 78	1-48
Y	LATZA U ET AL: "The human OX40 homolog: cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the ACT35 antigen" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, vol. 24, no. 3, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 677-683, XP009003157 ISSN: 0014-2980 the whole document	1-21
----- -/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. 'A' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 July 2008		Date of mailing of the international search report 13/08/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5616 Patentlaan 2, NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pérez-Mato, Isabel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2008/002498

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LI MING ET AL: "Effect of antibody to CD134 on perforin-mediated cytotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells." HYBRIDOMA (2005) JUN 2006, vol. 25, no. 3, June 2006 (2006-06), pages 145-153, XP002489557 ISSN: 1554-0014 the whole document	1-21
Y	US 2006/281072 A1 (BAKKER ALEXANDER BERTHOLD H [NL]) 14 December 2006 (2006-12-14) page 1 - page 17	1-25, 35-38, 41-48
Y	WEINBERG ET AL: "Antibodies to OX-40 (CD134) can identify and eliminate autoreactive T cells: implications for human autoimmune disease" MOLECULAR MEDICINE TODAY, ELSEVIER, CAMBRIDGE, GB, vol. 4, no. 2, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 76-83, XP005030015 ISSN: 1357-4310 the whole document	16-34, 38-40
Y	SUGAMURA K ET AL: "THERAPEUTIC TARGETING OF THE EFFECTOR T-CELL CO-STIMULATORY MOLECULE OX40" NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY, XX, XX, vol. 4, no. 6, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 420-431, XP009040312 ISSN: 1474-1733 the whole document	26-34, 38-40
A	WO 2006/113665 A (MACROGENICS INC [US]; JOHNSON LESLIE S [US]; HUANG LING [US]) 26 October 2006 (2006-10-26) sequence 73	
A	WO 2005/080432 A (GENENTECH INC [US]; DENNIS MARK S [US]) 1 September 2005 (2005-09-01)	
A	US 6 057 421 A (MULLER SYBILLE [US] ET AL) 2 May 2000 (2000-05-02) figure 8	
P, Y	WO 2007/062245 A (KIRIN BREWERY [JP]; JOLLA INST ALLERGY IMMUNOLOG [US]; KATO SHINICHIRO) 31 May 2007 (2007-05-31) the whole document	1-48

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/002498**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 26-34 and 38-40 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/002498

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004019866	A	11-03-2004	AU 2003259995 A1 CA 2496795 A1 EP 1545578 A2 JP 2006508056 T MX PA05002219 A	19-03-2004 11-03-2004 29-06-2005 09-03-2006 05-07-2005
US 2006281072	A1	14-12-2006	NONE	
WO 2006113665	A	26-10-2006	AU 2006236439 A1 CA 2605024 A1 EP 1868650 A2	26-10-2006 26-10-2006 26-12-2007
WO 2005080432	A	01-09-2005	AU 2005214382 A1 CA 2555820 A1 EP 1716181 A2	01-09-2005 01-09-2005 02-11-2006
US 6057421	A	02-05-2000	NONE	
WO 2007062245	A	31-05-2007	AU 2006318329 A1	31-05-2007

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1	4 H 0 4 5		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2			
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1			
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	48/00				
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D			
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N			
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	29/00				
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02				
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/08				
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/02				
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1			
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/04				
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/06				
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	27/02				
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06				
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04				
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	25/00				
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/06				
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/04				
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	3/10				
A 6 1 P	17/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/00				
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	17/00				
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	A 6 1 P	1/16				
			A 6 1 P	43/00	1 0 5			
			A 6 1 P	17/04				
			G 0 1 N	33/53	D			
			C 1 2 P	21/08				

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

(72) 発明者 ラムハメディシェラッディ, サラ - エディン
アメリカ合衆国 テキサス 7 7 5 8 4, ペアランド, ロッキー コーブ コート 2 2 1 7

(72) 発明者 ヤオ, チェンビン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 9 3 1 2, バーウィン, スタンウィッチ ドライブ 2 0 0 2

(72) 発明者 シン, サンジャヤ
アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 8 2, サンディー フック, オウル リッジ レーン 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA41 CA04 CA20 DA02 GA03 GA11
4B064 AG27 CA20 DA01
4B065 AA92X AA92Y AB05 AC14 BA08 CA25 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 MA52 MA55 MA56 MA65 MA66 NA14 ZA01

	ZA36	ZA53	ZA55	ZA59	ZA66	ZA75	ZA89	ZA94	ZA96	ZB07
	ZB08	ZB11	ZB13	ZB15	ZC35					
4C085	AA13	AA14	AA16	EE01	GG02	GG03	GG04	GG06	GG08	
4H045	AA11	BA10	DA76	EA20	FA74					

专利名称(译)	拮抗性抗OX40抗体及其在治疗炎症性疾病和自身免疫性疾病中的应用		
公开(公告)号	JP2010518873A	公开(公告)日	2010-06-03
申请号	JP2009551698	申请日	2008-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ラムハメディシエラッディサラエディン ヤオチェンビン シンサンジャヤ		
发明人	ラムハメディシエラッディ, サラ-エディン ヤオ, チェンビン シン, サンジャヤ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P43/00 A61K48/00 A61K39/395 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P19/02 A61P1/04 A61P37/06 A61P27/02 A61P7/06 A61P7/04 A61P25/00 A61P11/06 A61P21/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P17/00 A61P1/16 A61P17/04 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/04 A61P19 /02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 C07K16/2878 C07K2317/24 C07K2317 /56 C07K2317/565 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2319/30 Y02A50/41		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.102 A61P43 /00.111 A61K48/00 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P29/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P1/04 A61P37/06 A61P27/02 A61P7/06 A61P7/04 A61P25/00 A61P11/06 A61P21 /04 A61P3/10 A61P9/00 A61P17/00 A61P1/16 A61P43/00.105 A61P17/04 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/GA11 4B064 /AG27 4B064/CA20 4B064/DA01 4B065/AA92X 4B065/AA92Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084 /MA56 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA36 4C084/ZA53 4C084/ZA55 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA75 4C084/ZA89 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZB07 4C084 /ZB08 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZB15 4C084/ZC35 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045 /BA10 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/903693 2007-02-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及抗人OX40受体 (CD134) 的拮抗剂抗体及其片段, 包括拮抗剂抗体的氨基酸序列和编码该抗体的核酸。来自所述抗体的轻链可变区和/或重链可变区的抗原结合区 (CDR) 也包括在本发明中。本发明的另一方面是抗OX40拮抗剂抗体在治疗炎性和自身免疫疾病中的用途。本发明还涉及拮抗剂抗体A10的人源化序列和抗体结合位点的表位作图。

	FL1 (蛍光の平均)	蛍光細胞の数	OD ₄₅₀
クローン#B24	5560	39	3.4
クローン#B39	7665.3	44	3.6
ネガティブコントロール	0	0	NA
ポジティブコントロール	5028.5	41	NA