

(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2009-518005
(P2009-518005A)

(43) 公表日 平成21年5月7日(2009.5.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	4B065
A61P 37/06 (2006.01)	A61K 39/395 U	4C085
A61P 19/02 (2006.01)	A61P 37/06	4H045
A61P 29/00 (2006.01)	A61P 19/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-542473 (P2008-542473)
 (86) (22) 出願日 平成18年11月27日 (2006.11.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年7月23日 (2008.7.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/045522
 (87) 国際公開番号 W02007/062245
 (87) 国際公開日 平成19年5月31日 (2007.5.31)
 (31) 優先権主張番号 60/739, 659
 (32) 優先日 平成17年11月25日 (2005.11.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 000001029
 協和発酵キリン株式会社
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
 (71) 出願人 508154184
 ラ ホヤ インスティテュート フォー
 アラジー アンド イムノロジー
 アメリカ合衆国 92037 カリフォル
 ニア州, ラ ホヤ, アテナ サークル 9
 420
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

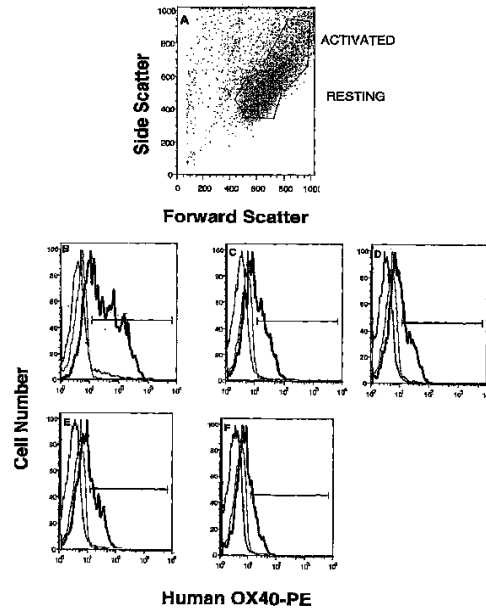
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトモノクローナル抗体ヒトCD134 (OX40) ならびにその作製および使用方法

(57) 【要約】

本発明は、OX40(CD134)と特異的に結合する、OX40抗体、抗OX40または抗OX40抗体と呼ばれる抗体を提供する。OX40と特異的に結合する本発明抗体には、哺乳類(ヒト、霊長類など)抗OX40抗体、ヒト化抗OX40抗体およびキメラ抗OX40抗体が含まれる。OX40と特異的に結合する本発明抗体および抗体部分配列(フラグメント)には、精製および単離された抗体、ならびにそれらの医薬製剤が含まれ、治療法、スクリーニング方法および検出方法を含む様々な方法に有用である。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

OX40細胞外ドメインのアミノ酸配列中のエピトープと特異的に結合する単離または精製された抗体であって、該抗体がヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体を含み、かつ該抗体がOX40アンタゴニスト活性を有する、前記抗体。

【請求項 2】

前記OX40アンタゴニスト活性が、サイトカインもしくはインターフェロンの産生、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞もしくは制御性T細胞の生存または増殖、抗アポトーシスタンパク質もしくはプロアポトーシスタンパク質の発現を減少または増加させる、請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 3】

前記サイトカインがIL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-14、IL-16、IL-17、IL-23、IL-26、TNF- α 、インターフェロン γ 、およびGM-CSFから選択される、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗アポトーシスタンパク質またはプロアポトーシスタンパク質がBcl-xL、Bcl-2、BadおよびBimから選択される、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記OX40細胞外ドメインのアミノ酸配列中のエピトープが、
MCVGARRLRGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSRQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKP
CKPCTWCNLRSGSERKQLCTATGDTVCRRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASN
SSDAICEDRDPPATQPQETQGPAPRPI TVQPTEAWPRTSQGPS (配列番号50)
として記載される配列内に存在する、請求項 1 に記載の抗体。

20

【請求項 6】

OX40細胞外ドメインのアミノ酸配列中のエピトープと特異的に結合する単離または精製された抗体であって、該抗体が、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体が結合するアミノ酸配列と結合するヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体を含む、前記抗体。

【請求項 7】

112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約1~5000倍の範囲内でOX40結合親和性を有する、単離または精製された抗体。

30

【請求項 8】

112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体よりも高いまたは低いOX40結合親和性を有する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約KD 10^{-6} M~約KD 10^{-13} Mの範囲内でOX40結合親和性を有する、請求項 1、請求項 6、請求項 7 または請求項 8 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 10】

112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の結合特異性を有し；あるいはOX40との結合について112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体と競合する、請求項 1、請求項 6、請求項 7 または請求項 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 11】

112V8、112Y55およびY131のものと同一エピトープと結合し、OX40リガンド(OX40L)とのOX40の結合を85%以上阻害または阻止する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 12】

50

112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される、請求項1に記載の抗体。

【請求項13】

ELISAアッセイによって決定されるように、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体のOX40との結合を阻害または阻止する、請求項1、請求項6、請求項7または請求項8のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項14】

ELISAアッセイによって決定されるように、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体のOX40との結合の少なくとも50%を阻害する、請求項1、請求項6、請求項7または請求項8のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項15】

非T細胞で発現されるOX40と特異的に結合する抗体であって、所望により、該非T細胞がナチュラルキラー細胞、顆粒球、単球、B細胞またはOX40でトランスフェクトされた非T細胞系から選択され、所望により、OX40でトランスフェクトされた該非T細胞系がCHO細胞、L929細胞およびHELA細胞から選択される、請求項1、請求項6、請求項7または請求項8のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項16】

配列番号7~10および配列番号44~49で示される成熟重鎖または軽鎖可変領域配列、あるいは配列番号7~10および配列番号44~49で示される成熟重鎖または軽鎖可変領域配列の部分配列を含む、請求項1に記載の抗体。

20

【請求項17】

前記部分配列が、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、単鎖Fv(scFv)、ジスルフィド結合Fv(s dFv)およびV_LまたはV_Hから選択される、請求項16に記載の抗体。

【請求項18】

前記抗体の配列番号7~10および配列番号44~49で示される成熟重鎖または軽鎖可変領域配列が、定常領域、相補性決定領域(CDR)またはフレームワーク(FR)領域の内部または外部に1つ以上のアミノ酸置換を有する、請求項16に記載の抗体。

【請求項19】

前記アミノ酸置換が定常領域、相補性決定領域(CDR)またはフレームワーク(FR)領域の内部または外部での保存的アミノ酸置換である、請求項18に記載の抗体。

30

【請求項20】

前記アミノ酸置換が1~3個、3~5個、5~10個またはそれより多いアミノ酸残基を含む、請求項18に記載の抗体。

【請求項21】

112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の検出可能な活性を保持する、請求項1、請求項6、請求項7または請求項8のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項22】

前記活性がT細胞の増殖または生存、あるいは活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数、あるいは活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の枯渇をモジュレートすることを含む、請求項21に記載の抗体。

40

【請求項23】

前記活性がOX40シグナル伝達を阻害することを含む、請求項21に記載の抗体。

【請求項24】

前記活性が自己抗原に特異的な自己反応性T細胞の数を低減または除去することを含み、所望により、該自己抗原がミエリン塩基性タンパク質、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質、プロテオリピドタンパク質、コラーゲン、滑膜関節組織抗原、インスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、腸抗原、甲状腺抗原、ヒストンタンパク質、筋肉抗原お

50

よび皮膚抗原から選択される、請求項 2 1 に記載の抗体。

【請求項 2 5】

OX40細胞外ドメインのアミノ酸配列中のエピトープと特異的に結合する単離または精製された抗体であって、該抗体が、配列番号7~10および配列番号44~49で示される成熟重鎖または軽鎖可変領域配列の配列に対して、80%~85%、85%~90%、90%~95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い同一性を有する、前記抗体。

【請求項 2 6】

休止T細胞ではなく、活性化ヒトT細胞と特異的に結合する、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 7】

ELISAアッセイによって決定されるように、抗体L106のOX40との結合を阻害または阻止しない、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 2 8】

OX40リガンドのOX40との結合を阻害または阻止する、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 9】

OX40リガンドの活性化T細胞との結合を阻害または阻止する、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 3 0】

OX40媒介細胞シグナル伝達をモジュレートしまたはOX40媒介細胞応答をモジュレートする、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 3 1】

OX40媒介細胞シグナル伝達を阻害または阻止する、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 3 2】

OX40媒介細胞応答を阻害または阻止する、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 3 3】

前記OX40媒介細胞応答が、リンパ球増殖、サイトカイン発現、リンパ球生存、NF-κBの活性化、PKB(Akt)活性の維持、またはサバイビンのアップレギュレーションを含む、請求項 3 2 に記載の抗体。

【請求項 3 4】

ナチュラルキラー細胞、マクロファージまたは好中球の媒介によりEL4-ヒトOX40発現細胞または活性化ヒトT細胞を溶解し、10 μg/mlの抗体で誘導される特異的細胞溶解率(%)が、約15~75%、25~65%、または30~60%、または50~100%である、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 3 5】

急性または慢性異種移植片宿主病モデルにおいて移植片対宿主病の症状を軽減、減少または抑制し、あるいは急性または慢性異種移植片宿主病モデルにおいて移植片対宿主病の緩解または退行をもたらす、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 3 6】

前記異種移植片宿主病モデルが抗IL2R 鎖抗体の投与と亜致死線量の照射の後にヒト末梢血単核細胞(PBMC)を受けた免疫不全(SCID)マウスを含む、請求項 3 5 に記載の抗体。

【請求項 3 7】

移植片対宿主病の症状が、体重減少、脱毛、皮膚発疹、血尿、腹水、および肝臓、腸管、肺、皮膚中への炎症細胞浸潤、および死から選択される、請求項 3 5 に記載の抗体。

【請求項 3 8】

肺、皮膚、または腸における炎症を軽減、減少または抑制する、請求項 1、請求項 6、

10

20

30

40

50

請求項 7、請求項 8 または請求項 25 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 39】

自己免疫障害の症状を軽減、減少または抑制する、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 25 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 40】

前記自己免疫障害が関節リウマチ、多発性硬化症、糖尿病、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、セリアック病、乾癬、増殖性ループス腎炎、肉芽腫性筋疾患、および多発性筋炎から選択される、請求項 39 に記載の抗体。

【請求項 41】

前記OX40がヒトである、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 25 のいずれか一項に記載の抗体。 10

【請求項 42】

前記OX40が配列：MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVSSKPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAI LGLGLV LGLLLGPLA ILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSRPTIQEEQADAHSTLAKI (配列番号49) を含む、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 25 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 43】

モノクローナルまたはポリクローナルである、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 25 のいずれか一項に記載の抗体。 20

【請求項 44】

IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgDイソタイプである、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 25 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 45】

異種ドメインをさらに含む、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 25 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 46】

請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 25 のいずれか一項に記載の抗体と、製薬上許容される担体または賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 47】

配列番号7~10および配列番号44~49で示される成熟重鎖または軽鎖可変領域配列の配列、あるいはその部分配列をコードする、単離核酸。 30

【請求項 48】

前記配列が、配列番号3~6および配列番号38~43、または配列番号3~6および配列番号38~43に関する縮重配列を含む、請求項 47 に記載の単離核酸。

【請求項 49】

発現制御配列をさらに含む、請求項 47 に記載の単離核酸。

【請求項 50】

ベクターをさらに含む、請求項 47 に記載の単離核酸。

【請求項 51】

宿主細胞をさらに含む、請求項 47 に記載の単離核酸。 40

【請求項 52】

配列番号7~10および配列番号44~49で示される重鎖または軽鎖可変領域配列の、1個以上の置換、付加または欠失されたアミノ酸残基を有するアミノ酸配列をコードする核酸であって、該アミノ酸配列がOX40細胞外ドメインのエピトープに対して結合親和性を有する、前記核酸。

【請求項 53】

配列番号7~10および配列番号44~49で示される重鎖または軽鎖可変領域配列の1個以上の置換、付加または欠失されたアミノ酸残基を有するアミノ酸配列をコードする核酸であって、該アミノ酸配列が112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示され 50

るハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の活性を有する、前記核酸。

【請求項 5 4】

112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体と、該抗体による処置を必要とする被験体に該抗体を投与するための使用説明書とを含む、キット。

【請求項 5 5】

112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体としての結合特異性を有する抗体を発現する、単離細胞。

【請求項 5 6】

処置を必要とする被験体において慢性または急性免疫疾患または障害、あるいは慢性または急性免疫疾患または障害の症状を治療するための方法であって、該被験体に、該被験体において該慢性または急性免疫疾患または障害、あるいは該慢性または急性免疫疾患または障害の症状を治療するのに有効な、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体あるいは請求項 4 6 に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

10

【請求項 5 7】

前記被験体が慢性または急性免疫疾患または障害の候補であるかあるいは慢性または急性免疫疾患または障害の治療を受けたものである、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記処置が、慢性または急性免疫疾患または障害に関連する1種以上の有害な症状または身体的影響の軽減または改善をもたらす、請求項 5 6 に記載の方法。

20

【請求項 5 9】

移植片対宿主病を治療する方法であって、処置を必要とする被験体に、移植片対宿主病を治療するのに有効な、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体あるいは請求項 4 7 に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 6 0】

前記被験体が移植片対宿主病の候補であるかあるいは移植片対宿主病の治療を受けたものである、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記処置が移植片対宿主病に関連する1種以上の有害な症状または身体的影響の発症、頻度、期間または重症度を軽減、減少または抑制し、あるいは前記処置が移植片対宿主病の緩解または退行をもたらす、あるいは前記処置が移植片対宿主病の予防をもたらす、請求項 5 9 に記載の方法。

30

【請求項 6 2】

前記移植片対宿主病の症状が体重減少、脱毛、皮膚発疹、血尿、腹水、肝臓、腸管、肺中への炎症細胞浸潤および死から選択される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記移植片が骨髄、造血幹細胞、末梢血幹細胞または臍帯血幹細胞を含む、請求項 5 9 に記載の方法。

40

【請求項 6 4】

移植拒絶を治療する方法であって、処置を必要とする被験体に、移植拒絶を治療するのに有効な、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体あるいは請求項 4 6 に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 6 5】

前記被験体が移植拒絶の候補であるかあるいは移植拒絶の治療を受けた、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記処置が移植拒絶に関連する1種以上の有害な症状または身体的影響の発症、頻度、期間または重症度を軽減、減少または抑制し、あるいは前記処置が移植拒絶の緩解または

50

退行をもたらし、あるいは前記処置が移植拒絶の予防をもたらす、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記移植拒絶の症状が移植物に対する免疫応答または移植細胞もしくは組織の破壊を含む、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記移植物が腎臓、心臓、肺、皮膚、肝臓または膵臓を含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 9】

炎症を軽減、減少または抑制する方法であって、処置を必要とする被験体に、炎症の発症、頻度、期間または重症度を軽減、減少または抑制するのに有効な、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体あるいは請求項 4 6 に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

10

【請求項 7 0】

前記炎症が肺、関節、筋肉、皮膚、中枢もしくは末梢神経系、または腸に存在する、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記被験体が炎症の候補であるかあるいは炎症の治療を受けたものである、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記処置が炎症に関連する1種以上の有害な症状または身体的影響の発症、頻度、期間または重症度の軽減をもたらす、請求項 6 9 に記載の方法。

20

【請求項 7 3】

自己免疫障害を治療する方法であって、処置を必要とする被験体に、自己免疫障害の症状の発症、頻度、期間または重症度を軽減、減少または抑制するのに有効な、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体あるいは請求項 4 6 に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 7 4】

前記自己免疫障害が関節リウマチ、多発性硬化症、糖尿病、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、セリアック病、乾癬、増殖性ループス腎炎、肉芽腫性筋疾患、および多発性筋炎から選択される、請求項 7 3 に記載の方法。

30

【請求項 7 5】

前記被験体が自己免疫障害の候補であるかあるいは自己免疫障害の治療を受けたものである、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

処置が自己免疫障害に関連する1種以上の有害な症状または身体的影響の発症、頻度、期間または重症度の軽減、減少または抑制をもたらす、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 7】

OX40 媒介細胞応答を阻害または抑制する方法であって、OX40 媒介細胞応答の阻害または抑制を必要とする被験体に、OX40 媒介細胞応答を阻害または抑制するのに有効な、請求項 1、請求項 6、請求項 7、請求項 8 または請求項 2 5 のいずれか一項に記載の抗体あるいは請求項 4 6 に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

40

【請求項 7 8】

前記細胞応答がリンパ球増殖、サイトカイン発現、またはリンパ球生存を含む、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記被験体がOX40媒介細胞応答の候補であるかあるいはOX40媒介細胞応答の治療を受けたものである、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 8 0】

活性化T細胞とのOX40リガンドの結合を阻害または遮断する方法であって、活性化T細胞

50

とのOX40リガンドの結合の遮断、阻害または阻止を必要とする被験体に、活性化T細胞とのOX40リガンドの結合を阻害または阻止するのに有効な、請求項1、請求項6、請求項7、請求項8または請求項25のいずれか一項に記載の抗体あるいは請求項46に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項81】

OX40とのOX40リガンドの結合を阻害または遮断する方法であって、OX40とのOX40リガンドの結合の遮断、阻害または阻止を必要とする被験体に、OX40とのOX40リガンドの結合を阻害または阻止するのに有効な、請求項1、請求項6、請求項7、請求項8または請求項25のいずれか一項に記載の抗体あるいは請求項46に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

10

【請求項82】

OX40媒介細胞シグナル伝達をモジュレートする方法であって、OX40媒介細胞シグナル伝達をモジュレーションを必要とする被験体に、OX40媒介細胞シグナル伝達をモジュレートするのに有効な、請求項1、請求項6、請求項7、請求項8または請求項25のいずれか一項に記載の抗体あるいは請求項46に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項83】

活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数を低減する方法であって、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数の低減を必要とする被験体に、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数を低減するのに十分な、請求項1、請求項6、請求項7、請求項8または請求項25のいずれか一項に記載のある量の抗体を投与することを含む、前記方法。

20

【請求項84】

活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞に起因する疾患または障害を治療する方法であって、被験体に、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞に起因する該疾患または障害の進行を軽減、減少または抑制し、あるいは活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞を枯渇させるのに十分な、請求項1、請求項6、請求項7、請求項8または請求項25のいずれか一項に記載のある量の抗体を投与することを含む、前記方法。

【請求項85】

前記疾患または障害が移植片対宿主病、炎症または自己免疫障害を含む、請求項84に記載の方法。

30

【請求項86】

前記被験体が哺乳類である、請求項56～85のいずれか一項に記載の方法。

【請求項87】

前記被験体がヒトである、請求項56～85のいずれか一項に記載の方法。

【請求項88】

前記抗体が被験体に局所的に、局部的に、または全身的に投与される、請求項56～85のいずれか一項に記載の方法。

【請求項89】

急性または慢性異種移植片宿主病モデルにおいて血液、脾臓、リンパ節、腸、肝臓、肺、または皮膚中の活性化T細胞の数を減少させる方法であって、該急性または慢性異種移植片宿主病モデルに、血液、脾臓、リンパ節、腸、肝臓、肺、または皮膚中の活性化T細胞の数を減少させるのに十分な量の請求項1、請求項6、請求項7、請求項8または請求項25のいずれか一項に記載の抗体を投与することを含む、方法。

40

【請求項90】

OX40アンタゴニスト活性を有するヒトOX40抗体を作製する方法であって、

a) ヒトFc組換えタンパク質とコンジュゲートされたヒトOX40細胞外ドメインまたは活性化ヒトT細胞を、ヒト免疫グロブリンを発現可能な動物に投与すること；

b) 該動物をヒトOX40抗体の発現についてスクリーニングすること；

50

- c) ヒトOX40抗体を産生する動物を選択すること；
- d) 選択された動物から抗体を単離すること；
- e) 該ヒトOX40抗体がOX40アンタゴニスト活性を有するかどうかを判定することを含む、前記方法。

【請求項 9 1】

OX40リガンド(OX40L)とのOX40の結合を阻害または阻止するヒトOX40抗体を作製する方法であって、

- a) ヒトFc組換えタンパク質とコンジュゲートされたヒトOX40細胞外ドメインまたは活性化ヒトT細胞を、ヒト免疫グロブリンを発現可能な動物に投与すること；
- b) 該動物をヒトOX40抗体の発現についてスクリーニングすること；
- c) ヒトOX40抗体を産生する動物を選択すること；
- d) 選択された動物から抗体を単離すること；
- e) 該ヒトOX40抗体がOX40リガンド(OX40L)とのOX40の結合を阻害または阻止するかどうかを判定することを含む、前記方法。

【請求項 9 2】

前記ヒト免疫グロブリンを発現可能な動物がトランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウシを含む、請求項 9 0 または請求項 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 3】

非ヒトトランスジェニック動物であって、

- a) 112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体と同一である抗体；
- b) 112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体が結合するOX40細胞外ドメインのアミノ酸配列中のエピトープと結合する抗体；
- c) 112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約1～5000倍の範囲内でOX40結合親和性を有する抗体；
- d) 112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約KD 10^{-6} M～約KD 10^{-12} Mの範囲内でOX40結合親和性を有する抗体；
- e) 112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の結合特異性を有する抗体；あるいは
- f) OX40との結合について112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体と競合する抗体、を発現する、前記非ヒトトランスジェニック動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2005年11月25日出願の出願第60/739,659号の優先権を主張するものであって、これは明示的に参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

序

免疫系は、感染症を守るために働く多数の細胞種で構成されている。この免疫系は外来抗原の認識と、自己と非自己を区別する能力に依存している。一部の 경우에는、自己と非自己との境界がなくなり、自分自身の免疫系により組織の破壊がもたらされる。このような自己免疫応答は、糖尿病、多発性硬化症、および炎症性腸疾患などの衰弱性疾患を引き起こす可能性がある。このような自己免疫応答の主要メディエーターの1つがTリンパ球またはT細胞である。通常、T細胞は自己抗原に対して寛容であるが、いくつかの自己免疫障

10

20

30

40

50

害ではこの寛容性が失われており、T細胞が健常組織に対する免疫応答を開始する。自己免疫T細胞を除去することまたはそれらの活性化もしくは生存を遮断することで病気の症状は改善する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかしながら、T細胞のこのような一般的な枯渇またはそれらの活性化の抑制により、患者が感染性病原体に非常に感染しやすくなっている場合には、免疫抑制が起こる。エフェクターT細胞を特異的に標的にすることができ、自己反応性T細胞だけを減少させることができる新規療法が必要である。

10

【課題を解決するための手段】

【0004】

概要

本発明は、OX40細胞外ドメインのアミノ酸配列中のエピトープ（例えば、配列番号50）と特異的に結合する単離または精製された抗体を提供する。抗体には、哺乳類（例えば、霊長類またはヒト）OX40配列（例えば、配列番号49）と結合するヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体が含まれる。また、抗体には、OX40アンタゴニスト活性を有するものも含まれる。抗体には、OX40アゴニスト活性を有するものがさらに含まれる。

【0005】

特定の実施形態では、抗体は、OX40アンタゴニスト活性を有し、サイトカインまたはインターフェロンの産生、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の生存または増殖、抗アポトーシスタンパク質またはプロアポトーシスタンパク質の発現を増加または減少させる。非限定的な特定態様では、サイトカインはIL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-14、IL-16、IL-17、IL-23、IL-26、TNF- α 、インターフェロン γ 、およびGM-CSFから選択され；抗アポトーシスタンパク質またはプロアポトーシスタンパク質はBcl-xL、Bcl-2、BadおよびBimから選択される。

20

【0006】

他の特定の実施形態では、OX40抗体は、112F32（ATCC番号PTA-7217、2005年11月17日寄託）、112V8（ATCC番号PTA-7219、2005年11月17日寄託）、112Y55（ATCC番号PTA-7220、2005年11月17日寄託）、112Y131（ATCC番号PTA-7218、2005年11月17日寄託）、および112Z5（ATCC番号PTA-7216、2005年11月17日寄託）として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される。さらなる実施形態では、OX40抗体は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体が結合するアミノ酸配列と結合し；112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約1~5000倍の範囲内でOX40結合親和性を有し；112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体よりも高いまたは低いOX40結合親和性を有し；112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約 10^{-6} M~ 10^{-13} Mの範囲内でOX40結合親和性を有し；112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の結合特異性を有し；OX40との結合について112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体と競合し；ELISAアッセイによって決定されるように、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体のOX40との結合を阻害または阻止し（例えば、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体のOX40との結合の少なくとも50%を阻害する）；あるいは112V8、112Y55およびY131のものと同じエピトープと結合し、OX40リガンド(OX40L)とのOX40の結合を（例えば、85%以上）阻害または阻止する。

30

40

【0007】

抗体には、細胞で発現されるOX40と特異的に結合するものもさらに含まれる。特定の実

50

施形態では、前記抗体は、非T細胞（例えば、ナチュラルキラー細胞、顆粒球、単球、B細胞）、またはOX40でトランスフェクトされた細胞系（例えば、CHO細胞、L929細胞またはH ELA細胞）で発現されるOX40と特異的に結合する。特定の一態様では、前記抗体は、休止T細胞ではなく、活性化ヒトT細胞と特異的に結合する。

【0008】

抗体は、例えば、配列番号7～10および配列番号44～49で示される、成熟重鎖または軽鎖可変領域配列を含む。また、抗体は、例えば、配列番号7～10および配列番号44～49で示される、成熟重鎖または軽鎖可変領域配列についての、抗体定常領域、相補性決定領域(CDR)またはフレームワーク(FR)領域内部または外部での置換物などの修飾形態および変異形態も含む。特定の態様では、置換には保存的アミノ酸置換が含まれる。さらなる特定の態様では、置換には、1～3個、3～5個、5～10個またはそれより多いアミノ酸残基のアミノ酸置換が含まれる。さらなる特定の態様では、抗体は、配列番号7～10および配列番号44～49で示される成熟重鎖または軽鎖可変領域配列の配列に対して、80%～85%、85%～90%、90%～95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い同一性を有する。

10

【0009】

また、抗体は、例えば、配列番号7～10および配列番号44～49で示される、成熟重鎖または軽鎖可変領域配列の部分配列も含む。特定の態様では、部分配列は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、単鎖Fv(scFv)、ジスルフィド結合Fv(sdFv)およびV_LまたはV_Hから選択される。

【0010】

また、抗体は異種ドメインも含む。特定の態様では、異種ドメインにはタグ、検出可能な標識または細胞傷害性薬剤が含まれる。

20

【0011】

置換物、部分配列および付加物などの修飾および変異抗体は、本明細書に記載のOX40抗体の検出可能な活性を保持することができるものである。一実施形態では、修飾抗体は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の検出可能な活性を保持する。別の実施形態では、修飾抗体は、T細胞の増殖または生存、あるいは活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数、あるいは活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞枯渇をモジュレートする。特定の態様では、修飾抗体は、OX40シグナル伝達を阻害しあるいは自己抗原（例えば、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリン突起神経膠細胞糖タンパク質、プロテオリピドタンパク質、コラーゲン、滑膜関節組織抗原、インスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、腸抗原、甲状腺抗原、ヒストンタンパク質、筋肉抗原および皮膚抗原などの自己抗原）に特異的な自己反応性T細胞の数を低減または除去する。

30

【0012】

また、抗体には、抗体L106のOX40との結合と競合するものまたは競合しないものも含まれる。特定の一実施形態では、抗体は、ELISAアッセイによって決定されるように、抗体L106のOX40との結合を阻害または阻止しない。

【0013】

抗体には、OX40の機能または活性に作用するものもさらに含まれる。特定の実施形態では、抗体は、OX40リガンドのOX40との結合を阻害または阻止し；OX40リガンドの活性化T細胞との結合を阻害または阻止し；OX40媒介細胞シグナル伝達をモジュレートし（例えば、阻害または抑制する）；OX40媒介細胞応答をモジュレートし；あるいはOX40媒介細胞シグナル伝達（例えば、阻害または抑制する）。特定の態様では、OX40媒介細胞応答は、リンパ球増殖、サイトカイン発現、リンパ球生存、NF-κBの活性化、PKB(Akt)活性の維持、またはサバイビンのアップレギュレーションを含む。さらなる実施形態では、抗体は、ナチュラルキラー細胞、マクロファージまたは好中球媒介によりEL4-ヒトOX40発現細胞または活性化ヒトT細胞を溶解し、例えば、10 μg/mlの抗体でもたらされる特異的細胞溶解率(%)は、約15～75%、25～65%、または30～60%、または50～100%である。

40

【0014】

50

抗体には、*in vivo*で機能または活性を有するものもさらに含まれる。特定の実施形態では、抗体は、急性または慢性異種移植片宿主病モデル（例えば、抗IL2R 鎖抗体の投与と亜致死線量の照射の後にヒト末梢血単核細胞(PBMC)を受けた免疫不全(SCID)マウス)において移植片対宿主病の症状を軽減、減少または抑制し、あるいは急性または慢性異種移植片宿主病モデルにおいて移植片対宿主病の緩解または退行をもたらす。特定の態様では、移植片対宿主病の症状は、体重減少、脱毛、皮膚発疹、血尿、腹水、および肝臓、腸管、肺、皮膚中への炎症細胞浸潤、または死である。

【0015】

さらなる実施形態では、抗体は、肺、皮膚、または腸における炎症を軽減、減少または抑制し、あるいは自己免疫障害の症状を軽減し、または減少もしくは抑制する。特定の態様では、抗体は、関節リウマチ、多発性硬化症、糖尿病、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、セリアック病、乾癬、増殖性ループス腎炎、肉芽腫性筋疾患、または多発性筋炎の症状を減少または抑制する。

10

【0016】

抗体には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、それらのいずれものイソタイプまたはサブクラスが含まれる。特定の態様では、前記抗体はIgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4）、IgA、IgM、IgE、またはIgDアイソタイプである。

【0017】

抗体は医薬組成物に含めることができる。一実施形態では、抗体は製薬上許容される担体または賦形剤を含む。

20

【0018】

抗体は、核酸配列によってコードされ得る。一実施形態では、核酸は、例えば、配列番号7~10および配列番号44~49で示される、成熟重鎖または軽鎖可変領域配列の配列、あるいはその部分配列をコードする。特定の態様では、前記核酸配列は、配列番号3~6および配列番号38~43、または配列番号3~6および配列番号38~43に関する縮重配列を含む。さらなる特定の態様では、核酸は、配列番号7~10および配列番号44~49で示される重鎖または軽鎖可変領域配列の、1個以上の置換、付加または欠失されたアミノ酸残基を有するアミノ酸配列をコードする。さらなる特定の態様では、配列番号7~10および配列番号44~49で示される重鎖または軽鎖可変領域配列の、1個以上の置換、付加または欠失されたアミノ酸残基を有するアミノ酸配列をコードする核酸は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の活性を有する（例えば、OX40細胞外ドメインのエピトープに対して結合親和性を有する）。さらなる特定の態様では、前記核酸配列は発現制御配列またはベクターを含む。

30

【0019】

抗体は、宿主細胞および単離細胞によって産生され得る。特定の実施形態では、宿主または単離細胞はハイブリドーマ細胞またはCHO細胞である。もう1つの特定の実施形態では、単離細胞は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体としての結合特異性を有する抗体を発現する。

【0020】

本発明は、キットを提供する。特定の実施形態では、キットには、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体と、該抗体による処置を必要とする被験体に該抗体を投与するための使用説明書とが含まれる。

40

【0021】

本発明は、処置および治療法を含む*in vivo*法を提供する。特定の実施形態では、処置を必要とする被験体において慢性または急性免疫疾患または障害、あるいは慢性または急性免疫疾患または障害の症状を治療するための方法は、前記被験体に、前記被験体において該慢性または急性免疫疾患または障害、あるいは該慢性または急性免疫疾患または障害の症状を治療するのに有効な抗体またはその医薬組成物を投与することを含む。特定の態様では、処置は、慢性または急性免疫疾患または障害に関連する1種以上の有害な症状ま

50

たは身体的影響の軽減または改善をもたらす。

【0022】

さらなる特定の実施形態では、移植片対宿主病を治療するための方法は、処置を必要とする被験体に、移植片対宿主病を治療するのに有効な抗体または医薬組成物を投与することを含む。特定の態様では、処置は、移植片対宿主病に関連する1種以上の有害な症状または身体的影響(physical consequence)(例えば、体重減少、脱毛、皮膚発疹、血尿、腹水、肝臓、腸管、肺中への炎症細胞浸潤または死)の発症、頻度、期間または重症度を軽減、減少または抑制し、移植片対宿主病の緩解または退行をもたらす、あるいは移植片対宿主病の予防をもたらす。さらなる態様では、移植片には、骨髄、造血幹細胞、末梢血幹細胞または臍帯血幹細胞が含まれ得る。

10

【0023】

さらなる特定の実施形態では、移植拒絶を治療するための方法は、処置を必要とする被験体に、移植拒絶を治療するのに有効な抗体または医薬組成物を投与することを含む。特定の態様では、処置は、移植拒絶に関連する1種以上の有害な症状または身体的影響(例えば、移植体に対する免疫応答または移植細胞もしくは組織の破壊)の発症、頻度、期間または重症度を軽減、減少または抑制し、移植拒絶の緩解または退行をもたらす、あるいは移植拒絶の予防をもたらす。さらなる態様では、移植体には、腎臓、心臓、肺、皮膚、肝臓または脾臓の細胞、組織または器官が含まれ得る。

【0024】

さらなる特定の実施形態では、炎症を軽減、減少または抑制するための方法は、処置を必要とする被験体に、炎症の発症、頻度、期間または重症度を軽減、減少または抑制するのに有効な抗体または医薬組成物を投与することを含む。特定の態様では、前記炎症は肺、関節、筋肉、皮膚、中枢もしくは末梢神経系、または腸に存在する。さらなる態様では、処置は、炎症に関連する1種以上の有害な症状または身体的影響の発症、頻度、期間または重症度の軽減をもたらす。

20

【0025】

さらなる特定の実施形態では、自己免疫障害を治療するための方法は、処置を必要とする被験体に、自己免疫障害の症状の発症、頻度、期間または重症度を軽減、減少または抑制するのに有効な抗体または医薬組成物を投与することを含む。特定の態様では、前記自己免疫障害には、関節リウマチ、多発性硬化症、糖尿病、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、セリアック病、乾癬、増殖性ループス腎炎、肉芽腫性筋疾患、または多発性筋炎が含まれる。さらなる態様では、処置は、自己免疫障害に関連する1種以上の有害な症状または身体的影響の発症、頻度、期間または重症度の軽減、減少または抑制をもたらす。

30

【0026】

*in vivo*で実施した場合に処置または治療をもたらす得るさらなる方法は、OX40の活性または機能をモジュレートすることを含む。特定の実施形態では、OX40媒介細胞応答を阻害または抑制するための方法は、OX40媒介細胞応答の阻害または抑制を必要とする被験体に、OX40媒介細胞応答(例えば、リンパ球増殖、サイトカイン発現、またはリンパ球生存)を阻害または抑制するのに有効な抗体または医薬組成物を投与することを含む。さらなる実施形態では、活性化T細胞とのOX40リガンドの結合を阻害または遮断するための方法は、活性化T細胞とのOX40リガンドの結合の遮断、阻害または阻止を必要とする被験体に、活性化T細胞とのOX40リガンドの結合を阻害または阻止するのに有効な抗体または医薬組成物を投与することを含む。さらなる実施形態では、OX40媒介細胞シグナル伝達をモジュレートするための方法は、OX40媒介細胞シグナル伝達のモジュレーションを必要とする被験体に、OX40媒介細胞シグナル伝達をモジュレートするのに有効な抗体または医薬組成物を投与することを含む。さらなる特定の実施形態では、活性化T細胞

40

50

、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数を低減するための方法は、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数の低減を必要とする被験体に、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数を低減するのに十分な、ある量の抗体を投与することを含む。

【0027】

さらなる特定の実施形態では、急性または慢性異種移植片宿主病モデルにおいて血液、脾臓、リンパ節、腸、肝臓、肺、または皮膚中の活性化T細胞の数を減少させるための方法は、該急性または慢性異種移植片宿主病モデルに、血液、脾臓、リンパ節、腸、肝臓、肺、または皮膚中の活性化T細胞の数を減少させるのに十分な量の抗体を投与することを含む。

10

【0028】

さらなる特定の実施形態では、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞に起因する疾患または障害を治療するための方法は、被験体に、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞に起因する該疾患または障害の進行を軽減、減少または抑制し、あるいは活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞を枯渇させるのに十分な量の抗体を投与することを含む。特定の態様では、前記疾患または障害には、移植片対宿主病、炎症または自己免疫障害が含まれる。

【0029】

本発明により治療可能な被験体には、哺乳類（例えば、ヒト）が含まれる。特定の実施形態では、慢性または急性免疫疾患または障害の候補であるかあるいは慢性または急性免疫疾患または障害の治療を受けた被験体；移植片対宿主病の候補であるかあるいは移植片対宿主病の治療を受けた被験体；移植拒絶の候補であるかあるいは移植拒絶の治療を受けた被験体；炎症の候補であるかあるいは炎症の治療を受けた被験体；あるいは自己免疫障害の候補であるかあるいは自己免疫障害の治療を受けた被験体；OX40媒介細胞応答の候補であるかあるいはOX40媒介細胞応答の治療を受けた被験体。

20

【0030】

OX40抗体の投与または送達を含む本発明の方法は、任意の許容される方法(any acceptable method)により実施することができる。特定の実施形態では、OX40抗体は被験体に局所的に、局部的に、または全身的に投与される。

【0031】

また、本発明は、OX40アンタゴニスト活性を有するヒトOX40抗体を作製するための方法も提供する。一実施形態では、方法は、ヒトFc組換えタンパク質とコンジュゲートされたヒトOX40細胞外ドメインまたは活性化ヒトT細胞を、ヒト免疫グロブリンを発現可能な動物（例えば、トランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウシ）に投与すること；該動物をヒトOX40抗体の発現についてスクリーニングすること；ヒトOX40抗体を産生する動物を選択すること；選択された動物から抗体を単離すること；該ヒトOX40抗体がOX40アンタゴニスト活性を有するかどうかを判定することを含む。

30

【0032】

本発明はさらに、OX40リガンド(OX40L)とのOX40の結合を阻害または阻止するヒトOX40抗体を作製するための方法を提供する。一実施形態では、方法は、ヒトFc組換えタンパク質とコンジュゲートされたヒトOX40細胞外ドメインまたは活性化ヒトT細胞を、ヒト免疫グロブリンを発現可能な動物（例えば、トランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウシ）に投与すること；該動物をヒトOX40抗体の発現についてスクリーニングすること；ヒトOX40抗体を産生する動物を選択すること；選択された動物から抗体を単離すること；該ヒトOX40抗体がOX40リガンド(OX40L)とのOX40の結合を阻害または阻止するかどうかを判定することを含む。

40

【0033】

さらに、本発明は、OX40抗体を発現する非ヒトトランスジェニック動物を提供する。様々な実施形態では、発現されるOX40抗体は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体と同一であり；112F32

50

、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体が結合するOX40細胞外ドメインのアミノ酸配列中のエピトープと結合し；112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約1～5000倍の範囲内でOX40結合親和性を有し；112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約 10^{-6} M～約 10^{-12} Mの範囲内でOX40結合親和性を有し；112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の結合特異性を有し；あるいはOX40との結合について112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体と競合する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

詳細な説明

本発明は、少なくとも一部、OX40(CD134)と特異的に結合する、例えば、OX40抗体、抗OX40または抗OX40抗体と呼ばれ得る抗体に基づく。OX40と特異的に結合する本発明抗体には、哺乳類（ヒト、霊長類など）抗OX40抗体、ヒト化抗OX40抗体およびキメラ抗OX40抗体が含まれる。OX40と特異的に結合する本発明抗体および抗体部分配列（フラグメント）には、精製および単離抗体、ならびにそれらの医薬製剤が含まれる。

【0035】

OX40は50キログルトン(KDa)の糖タンパク質であり、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRSF)の一メンバーである。OX40のリガンドである、OX40L(TNFSF4、CD252とも呼ばれる)は、内皮細胞、活性化抗原提示細胞(マクロファージ、樹状細胞、B細胞など)およびナチュラルキラー細胞で発現されることが報告されている。特定の理論に縛られるものではないが、抗原提示細胞上のCD40間の結合は、リポ多糖類(LPS)がそうであるように、OX40Lの発現を増加する。T細胞でのOX40の発現は、T細胞抗原受容体を介したシグナル伝達を受けて誘導され得る。例えば、OX40は、炎症部位で活性化されたばかりのT細胞で発現される。CD4およびCD8 T細胞は、炎症状態下でOX40をアップレギュレートし得る。

【0036】

また、OX40は、CD134、TNFRSF4、ACT35およびTXGP1Lとも呼ばれる。OX40には、哺乳類(例えば、霊長類、ヒト)型OX40が含まれる。そのため、本発明OX40抗体には、ヒトOX40などの哺乳類OX40配列と特異的に結合する抗体が含まれる。ヒトOX40などのOX40配列には、多型変異体が含まれる。全長ヒトOX40の非限定的な一例は、

```
MCVGARRLRGPGCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSRQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKP
CKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASN
SSDAICEDRDPPTATQPQETQGPAPRPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAI LGLGLVLGLLGPLA ILLALYLL
RRDQRLPPDAHKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKI (配列番号49)
```

として記載される配列である。

【0037】

OX40抗体、抗OX40および抗OX40抗体とは、OX40と特異的に結合する抗体を指す。特異的結合とは、OX40中に存在するエピトープに対して選択的であるということである。特異的結合は、当技術分野で公知のアッセイ(例えば、免疫沈降、ELISA、フローサイトメトリー、ウエスタンブロッティング)を用いて非特異的結合と区別することができる。

【0038】

OX40抗体が特異的に結合する抗原エピトープの全てまたは一部が異なるタンパク質に存在する場合に、この抗体は異なるタンパク質と結合する可能性がある。そのため、OX40抗体は、OX40エピトープの配列または構造的相同性の程度に応じて、そのOX40エピトープに対して高い配列または構造的相同性を有する別のタンパク質と特異的に結合可能性がある。よって、OX40抗体は、異なるタンパク質に、十分な配列または構造的相同性を有するエピトープが存在する場合に、異なるタンパク質と結合する可能性がある。

【0039】

10

20

30

40

50

本発明OX40抗体には、単離および精製抗体が含まれる。単離または精製OX40抗体を含む本発明の抗体は、ヒトを含まない。

【0040】

組成物の修飾語として用いられる用語「単離(された)」とは、その組成物が人の手で作られるということ、あるいは天然に存在するin vivo環境にある1種以上の他の成分から、一般に、1以上の操作ステップまたはプロセスにより分離されるということの意味する。一般に、そのように分離された組成物は、そのような組成物が通常自然に結合する1種以上の材料、例えば、1種以上のタンパク質、核酸、脂質、炭水化物、細胞膜を実質的に含まない。そのため、単離組成物は、その組成物が自然に発生する生物の細胞中の他の生体成分から、あるいはその組成物が(例えば、合成によりまたは細胞培養により)産生される人工培地から分離されている。例えば、単離OX40抗体は、その抗体が産生される動物(例えば、非トランスジェニック哺乳類またはトランスジェニック哺乳類(齧歯類(マウス)または有蹄類(ウシ)動物などの))から得ることができ、他のポリペプチドおよび核酸から分離されている。よって、その動物から得られる抗体を含有する血清は単離されていると考えられる。用語「単離(された)」は、別の物理的形状を排除するものではなく、例えば、単離抗体には、抗体部分配列、キメラ、マルチマー、または誘導体化された形態が含まれ得る。

10

【0041】

組成物の修飾語として用いられる用語「精製(された)」とは、その組成物が一般に自然に結合する材料のほとんどまたは実質的に全てを含まない組成物を指す。精製抗体は、一般に、抗体環境に通常存在する成分から取り出されている。そのため、抗体産生ハイブリドーマ細胞培養物から分離された抗体上清は精製されていると考えられる。よって、精製(された)は、絶対純度を要求するものではなく、関係上の比(context specific)である。さらに、「精製(された)」組成物は、1種以上の他の分子と組み合わせることができる。そのため、用語「精製(された)」は、組成物の組合せを排除するものではない。純度は、例えば、UV分光法、クロマトグラフィー(例えば、HPLC、気相)、ゲル電気泳動(例えば、銀またはクーマシー染色)および配列解析(ペプチドおよび核酸)などの任意の適切な方法により決定することができる。

20

【0042】

「精製(された)」タンパク質および核酸には、標準的な精製法によって得られるタンパク質および核酸が含まれる。また、この用語には、宿主細胞での組換え発現や化学合成によって得られるタンパク質および核酸も含まれる。また、「精製(された)」は、混入物質のレベルが、ヒトまたは非ヒト動物への投与に関する監督官庁、例えば、食品医薬品局(the Food and Drug Administration)(FDA)に承認されるレベルより低い組成物を指すこともある。

30

【0043】

本発明OX40抗体には、OX40細胞外ドメインのアミノ酸配列中のエピトープと特異的に結合する抗体が含まれる。特定の実施形態では、例示的OX40抗体は、クロスブロッキングアッセイ(a cross-blocking assay)により決定されるように、OX40上の3つの「エピトープ」と特異的に結合する。非限定的な例示的ヒトOX40細胞外ドメイン配列は、MCVGARRLGR G PCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPC TWCNLR SGSERKQLCT ATQDQTVCR CR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQP ASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPS(配列番号50)として記載される。

40

【0044】

ペプチドエピトープは、一般に、短いアミノ酸配列、例えば約5~15アミノ酸長である。エピトープを同定するための技術は当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第4,708,871号に記載されている。簡潔には、OX40ポリペプチドから得られる重複オリゴペプチドセットを合成し、それらをピンの固相アレイに結合し、各ピン上にユニークなオリゴペプチドを存在させ得る。96ウェルマイクロタイタープレートに合うようにピンをアレイす

50

ることにより、96個のオリゴペプチドを同時にアッセイすることが可能になる。不連続エピトープは、膜支持体上に高密度に固定化された異なる長さの高度に重複したペプチドのスキャン（例えば、6量体～15量体）を用いて同様に同定し得る。高抗体濃度を用い、結合は間接免疫検出により検出する。多重結合配列が同定され、それらが介在配列により分離されており、個々のペプチドが認識されない場合に、不連続エピトープが同定された。分離されている配列は、標的タンパク質の表面上に連続領域を形成し、立体構造エピトープとなると思われる(Reineke, ら Protein Sci. 7:951 (1998)。あるいは、エピトープマッピング用にファージディスプレイペプチドライブラリーキット(phage display peptide library kits)(New England BioLabs)も市販されている。これらの方法や他の方法を用いて、連続したアミノ酸の考えられるあらゆるサブセットに対する結合親和性を決定して、特定の抗体が結合するエピトープを同定することができる。エピトープの長さのペプチド配列を用いて、そのペプチド配列と結合する抗体を得る動物を免疫する場合には、推測によってもエピトープを同定し得る。また、連続エピトープもBEPITOPEなどのコンピュータプログラムを用いて予測することができる(Odorico ら, J. Mol. Recognit. 16:20 (2003))。

10

20

30

40

50

【0045】

本発明の抗体は、任意の抗体クラス、例えばIgM、IgG、IgA、IgE、IgD、およびそれらの任意のサブクラスに属するモノクローナルまたはポリクローナル免疫グロブリン分子である。例示的IgGサブクラスはIgG₁、IgG₂、IgG₃およびIgG₄である。「モノクローナル」抗体とは、真核生物クローン、原核生物クローン、またはファージクローンを含む単一クローンに基づき、真核生物クローン、原核生物クローン、またはファージクローンを含む単一クローンから得られあるいは真核生物クローン、原核生物クローン、またはファージクローンを含む単一クローンから誘導される抗体を指す。ゆえに、「モノクローナル」抗体は、構造的に定義されるものであり、それが産生される方法ではない。

【0046】

OX40と特異的に結合する特定の例示的抗体は、112F32(ATCC番号PTA-7217、2005年11月17日寄託)、112V8(ATCC番号PTA-7219、2005年11月17日寄託)、112Y55(ATCC番号PTA-7220、2005年11月17日寄託)、112Y131(ATCC番号PTA-7218、2005年11月17日寄託)、および112Z5(ATCC番号PTA-7216、2005年11月17日寄託)として示され、これらはヒトモノクローナル抗ヒトOX40抗体(ヒトOX40と結合するヒト抗体)である。例示的な本発明OX40抗体112F32、112V8、112Y55、112Y131、および112Z5は、配列番号7～10および配列番号44～49で示される、成熟重鎖または軽鎖可変領域配列を有する。112F32、112V8、112Y55、112Y131、および112Z5の名称は、OX40抗体を産生する抗体または細胞系(例えば、ハイブリドーマ、CHO細胞または他の宿主細胞)のいずれかを指すことができる。

【0047】

例示的な本発明のヒト抗ヒトOX40抗体は、様々な形態の可溶性組換えヒトOX40(OX40-hIgG1)、融合タンパク質(hOX40:hFc)またはOX40を発現する活性化ヒトT細胞で免疫した染色体導入マウス(KM mice(商標))を用いて生産された(WO 02/43478、WO 02/092812、およびIshida, ら, IBC's 11th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2000))。休止T細胞ではなく、活性化ヒトT細胞を特異的に標識した例示的抗体が同定された。例示的抗体は、非形質転換親細胞系ではなく、ヒトOX40安定トランスフェクト細胞系、EL4-OX40およびCHO-OX40を検出可能なように染色し、その抗体がヒトOX40と特異的に結合することを示した。また、例示的抗体は、アカゲザルOX40およびカニクイザルOX40と結合するが、ネズミOX40とは検出可能なように結合しない。

【0048】

本発明の抗体は、軽鎖配列または重鎖配列、天然に存在する抗体にあるような、どちらか一方の全長、それらの混合物(すなわち重鎖配列と軽鎖配列との融合物)、およびそれらの部分配列/フラグメントを有し得る。天然に存在する抗体分子には、2つの重鎖または2つの軽鎖が含まれている。

【0049】

また、本発明OX40抗体には、例えば、112F32 (ATCC番号PTA-7217、2005年11月17日寄託)、112V8 (ATCC番号PTA-7219、2005年11月17日寄託)、112Y131 (ATCC番号PTA-7218、2005年11月17日寄託)、112Y55 (ATCC番号PTA-7220、2005年11月17日寄託)、または112Z5 (ATCC番号PTA-7216、2005年11月17日寄託)として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体が結合するアミノ酸配列と特異的に結合する抗体も含まれる。本発明OX40抗体には、例えば、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体が結合するOX40細胞外ドメインと特異的に結合する抗体がさらに含まれる。本発明OX40抗体には、例えば、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の結合特異性を有する抗体がさらに含まれる。そのようなOX40抗体は、一般に、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5抗体のOX40との結合について部分または完全遮断 (complete blocking)、低減または阻害を示す。

10

【 0 0 5 0 】

112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体が結合するアミノ酸配列と特異的に結合するOX40抗体、および112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5抗体の結合特異性を有する抗体は、競合結合アッセイを用いて同定することができる。112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5抗体のOX40との結合について競合する能力に基づいて抗体を選択することができる。112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5抗体のOX40との結合について競合する抗体の能力、あるいは112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5抗体のOX40との結合を阻害、低減、減少、阻止または遮断する抗体の能力は、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) などの当技術分野で公知の様々なアッセイにより決定することができる。特定の態様では、本発明抗体は、ELISAアッセイによって決定されるように、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体のOX40との結合を阻害または阻止する。さらなる態様では、本発明抗体は、ELISAアッセイによって決定されるように、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体のOX40との結合の少なくとも50%を阻害する。

20

【 0 0 5 1 】

また、本発明OX40抗体には、OX40と特異的に結合し、マウス抗ヒトOX40抗体L106 (Becton Dickinson, カタログ番号340420)のOX40との結合を阻止または遮断しない抗体も含まれる。さらに、OX40と特異的に結合し、抗体L106のOX40との結合を阻害、低減または減少しないOX40抗体も含まれる。抗体L106については、例えば、米国特許第6,277,962号、WO 95/12673およびSchlossmanら編に記載されている (Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens, Oxford: Oxford University Press (1995) 1157-60頁)。

30

【 0 0 5 2 】

本発明OX40抗体には、OX40と特異的に結合する、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体よりも高いまたは低いOX40に対する親和性を有する抗体が含まれる。例えば、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約1~10,000倍の範囲内 (例えば、2~5倍、5~10倍、10~100倍、100~1000倍または1000~10,000倍高いまたは低い親和性、あるいはそのような値の範囲以内での任意の数値または数値域) でOX40結合親和性を有する抗体が提供される。よって、本発明OX40抗体には、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体よりも高いまたは低いOX40結合親和性を有する抗体も含まれる。特定の実施形態では、本発明OX40抗体は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約KD 10^{-6} M ~ 約KD 10^{-13} Mの範囲内、あるいはそのような値の範囲以内での任意の数値または数値域でOX40結合親和性を有する。

40

【 0 0 5 3 】

50

結合親和性は、結合(K_a)および解離(K_d)速度によって決定することができる。平衡親和性定数、KDは K_a/K_d 比である。結合(K_a)および解離(Kd)速度は、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて測定することができる(RichおよびMyszka, Curr. Opin. Biotechnol 11:54 (2000); Englebienne, Analyst. 123: 1599 (1998))。結合速度のリアルタイム検出およびモニタリングについての計装および方法は公知であり、市販されている(BiaCore 2000, Biacore AB, Uppsala, Sweden; およびMalmqvist, Biochem. Soc. Trans. 27:335 (1999))。KD値は、OX40における結合部位の半分(50%)を飽和させるのに必要なOX40抗体濃度として定義することができる。

【0054】

本発明OX40抗体には、1種以上のin vivo細胞上に、初代細胞分離株、継代培養細胞、培養細胞および不死化細胞中に存在するOX40と結合可能な抗体が含まれる。OX40を発現し得る非限定的な特定細胞種には、活性化T細胞および他のT細胞(例えば、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞)ならびに非T細胞が含まれる。非T細胞の例としては、ナチュラルキラー(NK)細胞、顆粒球(好中球)、単球およびB細胞が挙げられる。本来OX40を発現しない細胞では、例えば、OX40をコードする核酸で細胞をトランスフェクトまたは形質転換することによって、OX40を発現させることができる。OX40と結合可能なOX40抗体は、OX40を発現または産生する1種以上のトランスフェクトまたは形質転換細胞と結合することができる。

【0055】

本発明抗体には、OX40と結合し、in vivoでまたはin vitroで(例えば被験体において)OX40機能または活性をモジュレートする抗体が含まれる。本明細書において、OX40の活性または機能に関して用いられる場合の用語「モジュレートする」およびその文法上の変形は、OX40の活性または機能が検出可能なように影響、改変または変更を受けるということを意味する。よって、OX40の活性または機能をモジュレートするOX40抗体は、1種以上のOX40活性または機能を検出可能なように影響、改変または変更を与える抗体であり、そのようなOX40の活性または機能には、例えば、OX40リガンドとのOX40の結合、OX40媒介シグナル伝達またはOX40媒介細胞応答もしくはOX40によりモジュレーション可能な細胞応答、あるいは本明細書に記載されているか、そうでなければ公知であるかもしくは知り得る別のOX40活性または機能を含めることができる。

【0056】

モジュレートすることができる非限定的な様々なOX40活性および機能には、例えば、OX40媒介シグナル伝達またはOX40媒介細胞応答もしくはOX40によりモジュレーション可能な細胞応答、細胞増殖または増加(例えば、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞などのリンパ球)、細胞生存またはアポトーシス(例えば、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞などのリンパ球)、サイトカイン(例えば、Th1、Th2および非Th1/Th2サイトカイン)およびインターフェロンの発現または産生、抗アポトーシスタンパク質またはプロアポトーシスタンパク質の発現または産生、ならびにそれらの障害、疾患、生理学的状態、病状および症状の処置、抑制または改善が含まれる。モジュレートされる特定のサイトカインとしては、限定されるものではないが、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-14、IL-16、IL-17、IL-23、IL-26、TNF- α 、インターフェロン γ 、およびGM-CSF(in vivoまたはin vitro)が挙げられる。特定の抗アポトーシスタンパク質またはプロアポトーシスタンパク質発現としては、限定されるものではないが、Bcl-xL、Bcl-2、BadおよびBimが挙げられる。モジュレートすることができる非限定的な他のOX40活性または機能としては、例えば、NF-kBの活性化、PKB(Akt)活性の維持、およびサバイビンのアップレギュレーションが挙げられている(Ambrosiniら、Nat. Med. 3:917 (1997); およびSongら、Immunity 22:621 (2005))。

【0057】

よって、本明細書に記載の例示的抗体には、1種以上のOX40媒介シグナル伝達またはOX40媒介細胞応答もしくはOX40により誘導される細胞応答、細胞増殖(例えば、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞)、細胞生存またはアポトーシス(

10

20

30

40

50

例えば、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞)、サイトカイン(例えば、Th1、Th2および他の非Th1/Th2サイトカイン、例えば、IL-17、IL-23およびIL-26)およびインターフェロンの発現または産生(Th1、Th2、非Th1/Th2、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-14、IL-16、IL-17、IL-23、IL-26、TNF- α 、インターフェロン γ 、およびGM-CSF(in vivoまたはin vitro)など)、抗アポトーシスタンパク質またはプロアポトーシスタンパク質の発現(例えば、Bcl-xL、Bcl-2、BadまたはBim)、ならびにそれらの障害、疾患、病状および症状の処置、抑制または改善をモジュレートする抗体が含まれる。特定の態様では、本発明抗体は、T細胞の増殖または生存をモジュレートし、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数をモジュレートし、あるいは活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞を枯渇させる。さらなる特定の態様では、本発明抗体は、自己抗原(例えば、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、プロテオリピドタンパク質(PLP)、コラーゲン、滑膜関節組織抗原、インスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、腸抗原、甲状腺抗原、ヒストンタンパク質、筋肉抗原または皮膚抗原)に特異的な自己反応性T細胞の数を低減または除去する。

10

【0058】

OX40抗体に関して用いられる用語「アンタゴニスト」およびその文法上の変形は、OX40リガンドとのOX40の結合を低減、減少、阻害、遅延、阻止または遮断し、あるいはOX40の活性または機能を低減、減少、阻害、遅延、抑制または遮断するOX40抗体を意味する。OX40抗体に関して用いられる用語「アゴニスト」およびその文法上の変形は、OX40リガンドとのOX40の結合を刺激、増加、増強、促進または誘導し、あるいはOX40により誘導される活性または機能を刺激、増加、増強、促進または誘導するOX40抗体を意味する。よって、本発明OX40抗体には、アンタゴニストおよびアゴニスト抗体が含まれる。

20

【0059】

本発明OX40アンタゴニスト抗体は、例えば、in vitroでまたはin vivoで1種以上のOX40活性または機能を遮断、低減、減少、阻害または抑制する。特定の実施形態では、可溶性OX40(CD134)または活性化T細胞の表面で発現されるOX40とのOX40リガンド(OX40L)の結合を遮断、低減、減少、阻害または阻止することができるOX40抗体が提供される。さらなる実施形態では、OX40抗体は溶解エフェクター細胞(例えば、ナチュラルキラー細胞、マクロファージまたは好中球)の存在下でEL4-ヒトOX40発現細胞または活性化ヒトT細胞を溶解する。特定の態様では、10 μ g/mlの抗体でもたらされる特異的細胞溶解率(%)は、研究のバックグラウンドレベルによって、約15~75%、25~65%、または30~60%の間であり、100%という高い場合もある。さらに、例示的OX40抗体を、同種異系ドナー由来のPBMCと共培養したヒト末梢血単核細胞(PBMC)とともにインキュベーションを行うことで、アロ反応性CD4および/またはCD8 T細胞を阻害することにより細胞増殖が低減した。

30

【0060】

本発明OX40抗体には、「変異体」とも呼ばれる置換物(例えば、アミノ酸置換物)、付加物および欠失物(例えば、部分配列またはフラグメント)などの改変形態が含まれる。そのような改変抗体形態および変異体は、参照OX40抗体、例えば、112F32、112V8、112Y55、112Y131、および112Z5として示されるOX40抗体の少なくとも一部の機能または活性、例えばOX40と結合すること、あるいはOX40の活性または機能(例えば、OX40シグナル伝達)をモジュレートすることを保持する。よって、改変OX40抗体は、例えば、少なくとも一部のOX40結合あるいは1種以上のOX40機能または活性(例えば、シグナル伝達、細胞応答など)をモジュレートする能力を保持することができる。

40

【0061】

本明細書において、用語「改変する」(「修飾する」)およびその文法上の変形は、組成物が参照組成物から外れているということを意味する。改変されたタンパク質、核酸および他の組成物は、非改変の参照タンパク質、核酸または他の組成物よりも高いまたは低い活性を有し、あるいは非改変の参照タンパク質、核酸または他の組成物とは異なる機能を有し得る。

50

【0062】

特定の態様では、本発明の改変抗体は、T細胞の増殖または生存をモジュレートし、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数をモジュレートし、あるいは活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞を枯渇させる能力の1種以上を保持する。さらなる特定の態様では、本発明の改変抗体は、自己抗原に特異的な自己反応性T細胞または自己抗原（例えば、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、プロテオリピドタンパク質(PLP)、コラーゲン、滑膜関節組織抗原、インスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、腸抗原、甲状腺抗原、ヒストンタンパク質、筋肉抗原または皮膚抗原）に特異的な抗体産生B細胞の数を低減または除去する能力の1種以上を保持する。

10

【0063】

様々な実施形態では、配列番号7~10および配列番号44~49で示される抗体成熟重鎖または軽鎖可変領域配列は、定常領域、相補性決定領域(CDR)またはフレームワーク(FR)領域の内部または外部に1つ以上のアミノ酸置換を有する。特定の態様では、アミノ酸置換は、定常領域、相補性決定領域(CDR)またはフレームワーク(FR)領域の内部または外部での保存的置換である。さらなる様々な実施形態では、1本発明抗体は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の重鎖または軽鎖配列、配列番号7~10または配列番号44~49と、少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高く同一であり、あるいはそのような百分率値の範囲以内での任意の数値または数値域である。置換残基の典型的な数としては、1~3個、3~5個、5~10個アミノ酸残基、あるいはそのような値の範囲以内での任意の数値または数値域、あるいはそれより多いアミノ酸残基が挙げられる。

20

【0064】

アミノ酸置換を含むそのような抗体は、核酸によってコードされ得る。それゆえ、アミノ酸置換を含む抗体をコードする核酸配列も提供される。

【0065】

用語「同一性」または「同一の」とは、2つ以上の参照される実体が同じであるということの意味する。よって、2つのタンパク質配列（例えば、OX40抗体）が同一である場合、それらは少なくとも参照される領域または部分内で同じアミノ酸配列を有する。「同一性領域」とは、2つ以上の参照される実体の同じである部分を指す。よって、2つのタンパク質配列が1つ以上の配列領域で同一である場合、それらはその領域内で同一性を共有する。「実質的同一性」とは、分子が、1種以上の参照分子機能または活性の少なくとも一部の機能または活性、あるいはその分子が同一性を共有する参照分子の関連/対応領域または部分を有するかあるいは有すると予測されるように、構造的にまたは機能的に保存されているということの意味する。よって、実質的同一性を有するポリペプチド（例えば、OX40抗体）は、参照ポリペプチド（例えば、OX40抗体）としての少なくとも一部の活性または機能を有するかあるいは有すると予測される。例えば、特定の一実施形態では、非改変OX40抗体の少なくとも一部の活性または機能を保持する1種以上の改変（例えば、アミノ酸置換、欠失または付加）を有するOX40抗体は、参照OX40抗体に対して実質的同一性を有すると考えられる。

30

40

【0066】

構造的に関連したタンパク質と機能的に関連したタンパク質との違いから、機能または活性を保持するために必要な配列同一性の量は、タンパク質、領域およびその領域の機能または活性によって異なる。タンパク質ではわずか30%アミノ酸配列同一性が存在するだけで、ある活性または機能を保持することができるが、一般には、参照配列に対してより高い、例えば、50%、60%、75%、85%、90%、95%、96%、97%、98%の同一性が存在する。2配列間の同一性の程度は、当技術分野で公知のコンピュータプログラムや数学アルゴリズムを用いて確かめることができる。配列同一性の割合(相同性)を計算するそのようなアルゴリズムでは、一般に、比較領域にわたる配列ギャップとミスマッチを計上する。例えば、BLAST（例えば、BLAST 2.0）検索アルゴリズム（例えば、Altschulら, J. Mol. Biol.

50

215:403 (1990)参照, NCBIを通じて公的に入手可能)は、以下のような例示的検索パラメーターを有する: ミスマッチ-2; ギャップ開始5; ギャップ伸長2。ポリペプチド配列比較では、BLASTPアルゴリズムを、一般に、PAM100、PAM 250、BLOSUM 62またはBLOSUM 50、FASTA (例えば、FASTA2およびFASTA3)などのスコア行列と組み合わせて用い、SSEARCH配列比較プログラムも同一性の程度を定量するために用いられる(Pearson ら, Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:2444 (1988); Pearson, Methods Mol Biol. 132:185 (2000); およびSmith ら, J. Mol. Biol. 147:195 (1981))。Delaunayに基づく位相マッピングを用いてタンパク質構造的類似性を定量するためのプログラムも開発された(Bostick ら, Biochem Biophys Res Commun. 304:320 (2003))。

【0067】

「保存的置換」は、生物学的に、化学的にまたは構造的に類似した残基による1個のアミノ酸の置換である。生物学的的に類似したとは、置換によって生物活性、例えば、OX40結合活性が破壊されないということの意味する。構造的に類似したとは、アミノ酸が同じくらいの長さの側鎖を有する(例えば、アラニン、グリシンおよびセリン)ということ、または同じくらいのサイズということの意味する。化学的類似性とは、残基が同じ電荷を有するという事あるいは親水性または疎水性であるということの意味する。特定の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンなどの一疎水性残基の別のものとの置換、あるいは一極性残基の別のものとの置換、例えば、アルギニンのリジンとの置換、グルタミン酸のアスパラギン酸との置換、またはグルタミンのアスパラギンとの置換、セリンのトレオニンとの置換などが挙げられる。

【0068】

また、改変抗体には、L-アミノ酸(およびそれらの混合物)と置換された1種以上のD-アミノ酸、構造的および機能的類似体、例えば、合成もしくは非天然アミノ酸またはアミノ酸類似体を有するペプチドミメティクスおよび誘導体化された形態も含まれる。改変には、環状構造、例えばアミノ末端およびカルボキシ末端の分子間の末端間アミド結合または分子内または分子間ジスルフィド結合が含まれる。

【0069】

アミノ酸改変の非限定的なさらなる特定の例としては、OX40の部分配列(subsequence)およびフラグメントが挙げられる。例示的なOX40の部分配列およびフラグメントは、本発明の例示的OX40抗体が結合するOX40配列の一部を含む。また、例示的なOX40の部分配列およびフラグメントは、免疫原性部分、例えば、本発明の例示的OX40抗体が結合する配列を含むOX40の一部も含む。

【0070】

本発明によれば、OX40抗体および非改変または参照OX40抗体の機能または活性の少なくとも一部を保持するOX40抗体部分配列またはフラグメントをコードする核酸が提供される。本明細書において、用語「部分配列」または「フラグメント」とは、全長分子の一部を意味する。OX40抗体をコードするOX40抗体の部分配列は、全長OX40よりも少なくとも1個少ないアミノ酸(例えば、アミノまたはカルボキシ末端のいずれかからの1個以上の内部または末端アミノ酸の欠失)を有する。OX40抗体の部分配列は、全長OX40抗体よりも少なくとも1個少ないアミノ酸を有する。核酸部分配列は、全長比較核酸配列よりも少なくとも1個少ないヌクレオチドを有する。よって、部分配列は、全長天然OX40までの任意の長さであり得る。

【0071】

本発明のOX40抗体部分配列およびフラグメントには、配列番号7~10および配列番号44~49で示される成熟重鎖または軽鎖可変領域配列が含まれる。また、本発明のOX40抗体部分配列およびフラグメントには、Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fv、Fd、単鎖Fv(scFv)、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、V_LおよびV_Hドメインフラグメントも含まれる。

【0072】

OX40抗体部分配列およびフラグメントは、全長抗体としての結合親和性、全長抗体としての結合特異性、または全長抗体としての1種以上の活性または機能、例えば、OX40アン

10

20

30

40

50

タグニストまたはアゴニスト抗体の機能または活性を有し得る。抗体に関する場合の用語「機能的部分配列」および「機能的フラグメント」とは、全長参照抗体としての1種以上の機能または活性、例えば、OX40抗体の機能または活性の少なくとも一部を保持する抗体部分を意味する。例えば、OX40またはOX40の断片と結合する抗体部分配列またはフラグメントは機能的部分配列と考えられる。

【0073】

抗体部分配列およびフラグメントは組み合わせることができる。例えば、 V_L または V_H 部分配列は、リンカー配列によって連結することができ、それによって V_L - V_H キメラを形成することができる。単鎖Fv(scFv)部分配列の組合せは、リンカー配列によって連結することができ、それによってscFv-scFvキメラを形成することができる。OX40抗体部分配列およびフラグメントは、単鎖抗体または可変領域を単独であるいは他のOX40抗体部分配列の全てまたは一部と組み合わせて含む。

10

【0074】

抗体部分配列およびフラグメントは、抗体のタンパク質分解による加水分解、例えば、全抗体のペプシンまたはパイン消化により調製することができる。ペプシンでの酵素的切断によってもたらされた抗体部分配列およびフラグメントは、 $F(ab')_2$ として示される5Sフラグメントを与える。このフラグメントは、チオール還元剤を用いてさらに切断することができ、3.5S Fab'-一価フラグメントを作り出すことができる。あるいは、ペプシンを用いた酵素的切断では、2つの一価Fab'フラグメントとFcフラグメントとが直接もたらされる(例えば、米国特許第4,036,945号および同第4,331,647号; およびEdelman ら, *Methods Enzymol.* 1:422 (1967)参照)。他の抗体切断方法、例えば一価軽鎖-重鎖フラグメントを形成するための重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、または他の酵素的もしくは化学的な方法も使用してよい。

20

【0075】

タンパク質および抗体、ならびにそれらの部分配列およびフラグメントは、遺伝学的方法により作り出すことができる。技術は、タンパク質または抗体をコードする遺伝子の全てまたは一部を、Cos細胞または大腸菌(*E. coli*)などの宿主細胞中で発現させることを含む。組換え宿主細胞は、全長または部分配列、例えば、scFvを合成する(例えば、Whitlow ら, *In: Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97 (1991)、Bird ら, *Science* 242:423 (1988); および米国特許第4,946,778号参照)。単鎖Fvおよび抗体は、米国特許第4,946,778号および同第5,258,498号; Huston ら, *Methods Enzymol* 203:46 (1991); Shu ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7995 (1993); およびSkerra ら, *Science* 240:1038 (1988)に記載のとおり作り出すことができる。

30

【0076】

修飾形態には、誘導体化された配列、例えば、遊離アミノ基がアミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボベンゾキシ基を形成しており;遊離カルボキシ基が塩、メチルおよびエチルエステルを形成しており;遊離ヒドロキシル基(free hydroxyl groups)がO-アシルまたはO-アルキル誘導体を形成しているアミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸誘導体、例えば、4-ヒドロキシプロリン(プロリンの誘導体)、5-ヒドロキシリジン(リジンの誘導体)、ホモセリン(セリンの誘導体)、オルニチン(リジンの誘導体)などが含まれる。修飾は、当技術分野で公知の方法(例えば、PCRに基づく部位特異的、欠失および挿入突然変異誘発、化学修飾および突然変異誘発、架橋など)を用いて行うことができる。

40

【0077】

タンパク質(例えば、抗体)、核酸、および他の組成物の修飾形態には、付加物および挿入物が含まれる。例えば、付加は、いずれもの種類の分子の、タンパク質(例えば、抗体)、核酸または他の組成物との共有または非共有結合であり得る。一般に、付加および挿入は異なる機能または活性を与える。

【0078】

付加物および挿入物には、融合(キメラ)ポリペプチドまたは核酸配列が含まれ、それ

50

らは前記配列と共有結合した参照天然（野生型）配列中には通常存在しない1種以上の分子を有する配列である。特定の例は、多機能タンパク質（例えば、多重特異性抗体）を作り出すための別のタンパク質（例えば、抗体）のアミノ酸配列である。

【0079】

また、本発明の抗体には、異なるまたは補助機能または活性を与えるために、1つ以上の追加ドメインが共有結合しているキメラまたは融合物も含まれる。抗体には、2つ以上のアミノ酸配列が互いに結合されている、自然界では本来存在しないキメラまたは融合物が含まれる。

【0080】

本発明によれば、異種ドメインを含むOX40抗体およびOX40抗体をコードする核酸が提供される。異種ドメインは、アミノ酸付加物または挿入物であり得るが、アミノ酸残基に限定されない。よって、異種ドメインは、種々の異なる種類の小型または大型機能的部分のいずれかからなり得る。そのような部分には、核酸、ペプチド、炭水化物、脂質または小有機化合物、例えば薬物、金属（金、銀）などが含まれる。

10

【0081】

異種ドメインの非限定的な特定例としては、例えば、タグ、検出可能な標識および細胞傷害性薬剤が挙げられる。タグおよび検出可能な標識の特定の例としては、T7-、His-、myc-、HA-およびFLAG-タグ；酵素（セイヨウワサビペルオキシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）；酵素基質；リガンド（例えば、ビオチン）；受容体（アビジン）；放射性核種（例えば、 C^{14} 、 S^{35} 、 P^{32} 、 P^{33} 、 H^3 、 I^{125} および I^{131} ）；電子密度試薬；エネルギー伝達分子；常磁性標識；フルオロフォア（フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン）；発色団；化学発光剤（イミダゾール、ルシフェラーゼ）；および生物発光剤が挙げられる。細胞傷害性薬剤の特定の例としては、ジフテリア毒素(diphtheria, toxin)、コレラ毒素およびリシンが挙げられる。

20

【0082】

タンパク質（例えば、抗体）、核酸、または他の組成物と付加物または挿入物（例えば、異種ドメイン）との間に、2つの実体が異なる機能または活性を少なくとも一部維持するように、リンカー配列を挿入してよい。リンカー配列は、どちらかのドメインを促進することができまたはどちらかのドメインと相互作用することができる1種以上の特性を有してよく、そのような特性には、フレキシブル構造、秩序二次構造が形成不能であることまたは疎水性もしくは荷電性が含まれる。フレキシブルタンパク質領域において一般に見られるアミノ酸には、グリシン、アスパラギンおよびセリンが含まれる。他の中性に近いアミノ酸、例えばトレオニンおよびアラニンもまた、リンカー配列に用いてよい。リンカー配列の長さは変動し得る（例えば、米国特許第6,087,329号参照）。リンカーには、化学架橋剤および結合剤(conjugating agents)、例えばスルホ-スクシンイミジル誘導體（スルホ-SMCC、スルホ-SMPB）、スベリン酸ジスクシンイミジル(DSS)、グルタル酸ジスクシンイミジル(DSG)および酒石酸ジスクシンイミジル(DST)がさらに含まれる。

30

【0083】

付加のさらなる例としては、グリコシル化、脂肪酸、脂質、アセチル化、リン酸化、アミド化、ホルミル化、ユビキチン化、および保護または遮断基による誘導體化ならびに数多くの化学修飾のうちの一つ以上が挙げられる。他の置換および可能性については当業者ならば容易に分かり、本発明の範囲内であると考えられる。

40

【0084】

そのような修飾配列は、細胞発現またはin vitro翻訳を介する組換えDNA技術を用いて作製することができる。ポリペプチドおよび核酸配列は、当技術分野で公知の方法、例えば、自動ペプチド合成装置（例えば、Applied Biosystems, Foster City, CA参照）を用いた化学合成によっても作り出すことができる。

【0085】

抗体作製に適したOX40タンパク質は、種々の標準的なタンパク質精製または組換え発現

50

技術のうちのいずれかによって作り出すことができる。例えば、OX40配列は、標準的なペプチド合成技術、例えば固相合成によって作り出すことができる。タンパク質の一部には、発現または合成されたタンパク質の精製を容易にするために、T7タグまたはポリヒスチジン配列などのアミノ酸配列を含んでよい。そのタンパク質は細胞中で発現され、精製され得る。そのタンパク質は、組換え法によってより大きなタンパク質（例えば、融合物またはキメラ）の一部として発現され得る。

【0086】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する方法は、当技術分野で公知である。例えば、OX40またはその免疫原性フラグメントは、所望により、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)またはオボアルブミン（例えば、BSA）などの担体とコンジュゲートされ、あるいはフロイント完全または不完全アジュバントなどのアジュバントと混合され、動物を免疫するために使用される。ハイブリドーマ技術を用いて、OX40に应答する免疫動物由来の脾細胞を単離し、骨髓腫細胞と融合することができる。ハイブリドーマによって産生されたモノクローナル抗体は、OX40またはその免疫原性フラグメントとの反応性についてスクリーニングすることができる。

10

【0087】

免疫し得る動物には、霊長類、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、またはモルモットが含まれる。初回および任意選択の追加免疫は、静脈内経路、腹腔内経路、筋肉内経路、または皮下経路によるものであってよい。さらに、免疫応答を高めるために、抗原を、オボアルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、チログロブリンおよび破傷風トキソイドなどの別のタンパク質と結合することができ、あるいはフロイント完全または不完全アジュバントなどのアジュバントと混合することができる。初回および任意選択の追加免疫は、腹腔内経路、筋肉内経路、眼球内経路、または皮下経路によるものであってよい。追加免疫は、同じ濃度または異なる濃度のOX40調製物であってよく、規則または不規則な間隔であってよい。

20

【0088】

動物には、ヒト遺伝子座を含むように遺伝子修飾されたものが含まれ、それを用いて、ヒト抗体を作り出すことができる。1種以上のヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニック動物については、例えば、米国特許第5,939,598号、WO 02/43478、およびWO 02/092812に記載されている。従来ハイブリドーマ技術を用いて、抗原に対して高应答物である免疫マウス由来の脾細胞を単離し、骨髓腫細胞と融合することができる。OX40と結合するモノクローナル抗体を得ることができる。

30

【0089】

ヒトポリクローナル抗体およびヒトモノクローナル抗体を作製するためのさらなる方法は記載されている（例えば、Kuroiwa ら, *Nat. Biotechnol.* 20:889 (2002); WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; 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号参照）。

【0090】

抗体に関して用いられる場合の用語「ヒト」とは、抗体のアミノ酸配列が完全にヒトアミノ酸配列、すなわちヒト重鎖およびヒト軽鎖可変領域およびヒト定常領域であるということの意味する。よって、アミノ酸の全ては、ヒトアミノ酸でありまたはヒト抗体中に存在するものである。非ヒト抗体である抗体は、非ヒトアミノ酸残基をヒト抗体中に存在するアミノ酸残基と置き換えることによって完全ヒト抗体にし得る。ヒト抗体中に存在するアミノ酸残基、CDR領域マップおよびヒト抗体コンセンサス残基については、当技術分野で公知である（例えば、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第4版 US Department of Health and Human Services. Public Health Service (1987); ChothiaおよびLesk (1987)参照。22の既知ヒトV_H III配列を対象にした調査に基づいたヒトV_HサブグループIIIのコンセンサス配列、および30の既知ヒト I配列を対象にした調査に基づいたヒトV_L 鎖サブグループIのコンセンサス配列については、Padlan *Mol. Immu*

40

50

mol. 31:169 (1994); およびPadlan Mol. Immunol. 28:489 (1991)に記載されている。よって、ヒト抗体には、1個以上のアミノ酸残基が任意の他のヒト抗体中に存在する1個以上のアミノ酸と置換されている抗体が含まれる。

【0091】

OX40抗体には、例えば、CDRグラフティング(CDR-grafting)(EP 239,400; W091/09967; 米国特許第5,225,539号; 同第5,530,101号; および同第5,585,089号)、ベニヤリング(veneer)またはリサーフェイシング(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunol. 28:489 (1991); Studnicka ら, Protein Engineering 7:805 (1994); Roguska ら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:969 (1994))、およびチェーンシャッフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号)などの当技術分野で公知の技術を用いて作り出すことができるヒト化抗体が含まれる。ヒト化抗体を作り出すには、これまでヒトコンセンサス配列(Padlan, Mol. Immunol. 31:169 (1994); およびPadlan, Mol. Immunol. 28:489 (1991))が用いられてきた(Carter ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); およびPresta ら, J. Immunol. 151:2623 (1993))。

【0092】

抗体に関して用いられる場合の用語「ヒト化」とは、抗体のアミノ酸配列がアクセプターヒト免疫グロブリン分子中に所望の抗原と特異的に結合する1以上の相補性決定領域(CDR)の非ヒトアミノ酸残基(例えば、マウス、ラット、ヤギ、ウサギなど)と、Fvフレームワーク領域(FR)中に1以上のヒトアミノ酸残基(CDRにフランキングするアミノ酸残基である)とを有するということを意味する。「霊長類化」と呼ばれる抗体は、アクセプターヒト免疫グロブリン分子およびフレームワーク領域のアミノ酸残基が任意のヒト残基に加えて、任意の霊長類アミノ酸残基(例えば、サル、テナガザル、ゴリラ、チンパンジー、オランウータン、マカクザル)であり得るということを除けば、「ヒト化」の意味の範囲内である。免疫グロブリンのヒトFR残基は、対応する非ヒト残基と置き換えることができる。よって、例えば、抗原親和性または特異性を改変する、一般には高めるために、CDRまたはヒトフレームワーク領域中の残基を、非ヒトCDRまたはフレームワーク領域ドナー抗体由来の対応する残基と置き換えることができる。ヒト化抗体は、ヒト抗体にもドナーCDRまたはフレームワーク配列にも見られない残基を含み得る。例えば、ヒト抗体またはドナー非ヒト抗体には見られない特定位置でのFR置換は、その位置において結合親和性または特異性ヒト抗体を改善すると予測され得る。分子モデリングに基づく抗体フレームワークおよびCDR置換は、当技術分野では周知であり、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRとフレームワーク残基の相互作用のモデリングや特定位置における異常フレームワーク残基を同定するための配列比較による(例えば、米国特許第5,585,089号; およびRiechmann ら, Nature 332:323 (1988)参照)。

【0093】

OX40抗体にはキメラ抗体が含まれる。本明細書において、抗体に関して用いられる場合の用語「キメラ」およびその文法上の変形は、抗体のアミノ酸配列が、2つ以上の異なる種に由来する、2つ以上の異なる種から得られるまたは単離される、あるいは2つ以上の異なる種に基づく1以上の部分を含有するということを意味する。例えば、抗体の一部はヒト(例えば、定常領域)であり得、抗体の別の部分は非ヒト(例えば、ネズミ重鎖またはネズミ軽鎖可変領域)であり得る。よって、キメラ抗体の例は、抗体の異なる部分が異なる種起源のものである抗体である。キメラ抗体は、ヒト化または霊長類化抗体とは異なり、抗体の任意の領域に異なる種の配列を有し得る。

【0094】

キメラ抗体を作製するための方法は当技術分野で公知である(例えば、Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi ら, BioTechniques 4:214 (1986); Gillies ら, J. Immunol. Methods 125:191 (1989); ならびに米国特許第5,807,715号; 同第4,816,567号; および同第4,816,397号)。例えば、Munro, Nature 312:597 (1984); Neuberger ら, Nature 312:604 (1984); Sharon ら, Nature 309:364 (1984); Morrison ら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984); Boulianne ら, Nature 312:643 (1984); Capon ら, Nature 337

10

20

30

40

50

:525 (1989); およびTraunecker ら, Nature 339:68 (1989)では、ある種の抗体由来の可変領域が別の種の可変領域と置換されているキメラ抗体が記載されている。

【0095】

また、OX40抗体は、ハイブリドーマ技術、組換え技術、およびファージディスプレイ技術、またはそれらの組合せを利用して作製することができる(米国特許第4,902,614号、同第4,543,439号、および同第4,411,993号参照; Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn, およびBechtol (編), 1980年、およびHarlow ら, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 1988年も参照のこと)。

【0096】

さらに抗体法において使用し得る好適な技術には、OX40に基づくアフィニティー精製、非変性ゲル精製、HPLCまたはRP-HPLC、サイズ排除、プロテインAカラムでの精製、あるいはこれらの技術の任意の組合せが含まれる。OX40抗体イソタイプは、ELISAアッセイを用いて決定することができ、例えば、マウスIg吸収抗ヒトIgを用いてヒトIgを同定することができる。

【0097】

抗体作製に適したOX40は、当技術分野で公知の種々の標準的なタンパク質精製または組換え発現技術のいずれかにより作り出すことができる。免疫応答を起こすのに適したOX40の形態には、OX40部分配列、例えば免疫原性フラグメントが含まれる。さらなる形態のOX40としては、OX40発現細胞、OX40含有調製物または細胞抽出物もしくは画分、部分精製OX40が挙げられる。

【0098】

本発明によれば、本発明のOX40抗体、その部分配列およびフラグメント、ならびにOX40抗体、部分配列およびフラグメントをコードする核酸を発現する単離または精製細胞が提供される。一実施形態では、単離細胞は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示される抗体の重鎖または軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗体を発現する。別の実施形態では、単離細胞は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体としての結合特異性を有する抗体を発現する。さらなる一実施形態では、単離細胞は、OX40の結合について112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体と競合する抗体を発現する。もう1つの実施形態では、単離細胞は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体よりも高いまたは低い、OX40に対する結合親和性を有する抗体を発現する。特定の態様では、OX40に対する結合親和性は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約1~5000倍の範囲内である。さらなる特定の態様では、OX40に対する結合親和性は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約KD 10^{-6} M ~ 約KD 10^{-13} Mの範囲内である。本発明のOX40抗体、その部分配列およびフラグメント、ならびにOX40抗体、部分配列およびフラグメントをコードする核酸を発現する単離または精製細胞の非限定的な特定例としては、脾臓細胞、ハイブリドーマ細胞およびCHO細胞が挙げられる。単離または精製細胞は、初代細胞分離株(例えば、脾細胞)、二次細胞または継代培養細胞分離株、あるいは株化細胞または不死化細胞培養物(ハイブリドーマまたはCHO細胞)由来の複数の細胞または細胞集団であってよい。

【0099】

本発明によれば、OX40と特異的に結合する抗体を作製する方法がさらに提供される。一実施形態では、OX40抗体を作製するための方法は、所望により、ヒトFc組換えタンパク質とコンジュゲートされた、ヒトOX40、部分配列またはフラグメント(例えば、OX40細胞外ドメイン)を、ヒト免疫グロブリンを発現可能な動物(例えば、トランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウシ)に投与することと、その動物をヒトOX40抗体の発現についてスクリーニングすることと、ヒトOX40抗体を産生する動物を選択すること、選択さ

10

20

30

40

50

れた動物から抗体を単離することを含む。一態様では、この方法によりヒトOX40抗体がOX40アンタゴニストまたはアゴニスト活性を有するかどうか判定される。

【0100】

本発明によれば、OX40リガンド(OX40L)とのOX40の結合を阻害または阻止するヒトOX40抗体を作製する方法がさらに提供される。一実施形態では、ヒトOX40抗体を作製するための方法は、所望により、ヒトFc組換えタンパク質とコンジュゲートされたOX40、部分配列またはフラグメント(例えば、OX40細胞外ドメイン)を、ヒト免疫グロブリンを発現可能な動物(例えば、トランスジェニックマウスまたはトランスジェニックウシ)に投与することと、その動物をヒトOX40抗体の発現についてスクリーニングすることと、ヒトOX40抗体を産生する動物を選択することと、選択された、ヒトOX40抗体を産生する動物から抗体を単離することを含む。一態様では、この方法によりヒトOX40抗体がOX40リガンド(OX40L)とのOX40の結合を阻害または阻止するかどうか判定される。

10

【0101】

本発明によれば、次の特徴：a)112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体と同一であり；b)112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体が結合するOX40細胞外ドメインのアミノ酸配列中のエピトープと結合し；c)112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約1~5000倍の範囲内でOX40結合親和性を有し；d)112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の約KD 10^{-6} M~約KD 10^{-12} Mの範囲内でOX40結合親和性を有し；e)112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の結合特異性を有し；あるいはf)OX40との結合について112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体と競合する、のうちの1つ以上を有するOX40抗体を発現する非ヒトトランスジェニック動物が提供される。

20

【0102】

本発明によれば、OX40抗体、その部分配列およびフラグメントをコードする単離または精製核酸が提供される。様々な実施形態では、核酸配列は、配列番号7~10および配列番号44~49で示される成熟重鎖または軽鎖可変領域配列の配列、あるいはその部分配列をコードする。さらなる一実施形態では、核酸配列は、配列番号3~6および配列番号38~43のいずれか、ならびにその部分配列を含む。さらなる一実施形態では、核酸配列は、配列番号3~6および配列番号38~43のいずれか、ならびにその部分配列に関する縮重配列を含む。

30

【0103】

核酸は、様々な長さのものであり得る。本発明OX40抗体またはその部分配列をコードする核酸の長さは、一般に、約100個ヌクレオチド~600個ヌクレオチド、あるいはそのような長さの範囲以内での任意の数値または数値域、100~150個、150~200個、200~250個、250~300個、300~350個、350~400個、400~450個、450~500個、500~550個、または約550~600個ヌクレオチド長、あるいはそのような長さの範囲以内での任意の数値または数値域または値(any numerical value or range or value)に及ぶ。本発明OX40抗体またはその部分配列をコードする核酸と特異的にハイブリダイズする核酸の長さは、一般に、約10~20個、20~30個、30~50個、50~100個、100~150個、150~200個、200~250個、250~300個、300~400個、400~500個、500~600個ヌクレオチド、あるいはそのような長さの範囲以内での任意の数値または数値域に及ぶ。

40

【0104】

用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」とは、リン酸エステル結合または同等物によって結合された少なくとも2つ以上のリボ-またはデオキシ-リボ核酸塩基対(ヌクレオチド)を指す。核酸には、ポリヌクレオチドおよびポリヌクレオシドが含まれる。核酸には、単一分子、二重分子または三重分子、環状分子または線状分子が含まれる。例示的な核

50

酸としては、限定されるものではないが：RNA、DNA、cDNA、ゲノム核酸、天然に存在する核酸および非天然核酸、例えば、合成核酸が挙げられる。短い核酸およびポリヌクレオチド（例えば、10～20個、20～30個、30～50個、50～100個ヌクレオチド）は、一般に、「オリゴヌクレオチド」または一本鎖もしくは二本鎖DNAの「プローブ」と呼ばれる。

【0105】

配列番号7～10および配列番号44～49のいずれかで示される重鎖または軽鎖可変領域配列の、1個以上の置換、付加または欠失されたアミノ酸残基を有するアミノ酸配列をコードする核酸が提供される。一実施形態では、前記置換、付加または欠失された重鎖または軽鎖可変領域配列は、OX40細胞外ドメインのエピトープに対して結合親和性を有する。別の実施形態では、前記置換、付加または欠失された重鎖または軽鎖可変領域配列は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の活性、例えば、OX40の機能または活性のモジュレーションを有する。

10

【0106】

本発明は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生されるOX40抗体の全てまたは部分配列をコードする核酸とハイブリダイズする、すなわち、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の全てまたは部分配列もしくはフラグメントをコードする核酸配列と少なくとも80～90%相補的または相同な核酸を提供する。一実施形態では、前記核酸配列は、約10～20個、20～30個、30～50個、50～100個、100～150個、150～200個、200～250個、250～300個、300～400個、400～500個、500～600個ヌクレオチド、あるいはそのような長さの範囲以内での任意の数値または数値域の長さを有する。特定の態様では、前記核酸配列は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体の重鎖または軽鎖可変領域配列、またはその一部（例えば、CDR、FRなど）とハイブリダイズする。

20

【0107】

用語「ハイブリダイズする」およびその文法上の変形は、核酸配列間の結合を指す。ハイブリダイズする配列は、一般に、参照（例えば、OX40抗体）配列のアミノ酸配列をコードする核酸に対して約50%より高い相同性を有する。ハイブリダイズする配列間のハイブリダイゼーション領域は、一般に、少なくとも約12～15個ヌクレオチド、15～20個ヌクレオチド、20～30個ヌクレオチド、30～50個ヌクレオチド、50～100個ヌクレオチド、100～200個、300～400個ヌクレオチドまたはそれより長い、あるいはそのような長さの範囲以内での任意の数値または数値域である。

30

【0108】

核酸配列には、ヌクレオチドおよびヌクレオシド置換物、付加物および欠失物、ならびに誘導体化された形態および（例えば、異種ドメインと融合されたOX40抗体をコードする）融合/キメラ配列がさらに含まれる。例えば、遺伝子コードの縮重により、核酸には、112F32、112V8、112Y131、112Y55、および112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体をコードする核酸に関する縮重配列および縮重部分配列が含まれる。他の例は、112F32、112V8、112Y131、112Y55、または112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される抗体、その部分配列およびフラグメントをコードする配列と相補的である核酸である。

40

【0109】

核酸は、様々な標準的なクローニング技術および化学合成技術を用いて作り出すことができる。技術としては、限定されるものではないが、抗体コード配列とアニーリング可能なプライマー（例えば、縮重プライマー混合物）を用いたゲノムDNAまたはcDNA標的の核酸増幅、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)が挙げられる。また、核酸は、化学合成（例えば、固相ホスホアミダイト合成）または遺伝子からの転写によっても作り出すことができる。作り出された配列は、その後、*in vitro*で翻訳し、またはプラスミドにクローニングし、増殖させた後、細胞（例えば、宿主細胞例えば酵母または細菌、真核生物（動物または哺乳類細胞あるいは植物など））で発現させることができる。

50

【0110】

本発明によれば、ベクターなどの本発明の核酸配列がさらに提供される。一実施形態では、ベクターには、OX40抗体、その部分配列またはフラグメントをコードする核酸配列が含まれる。特定の実施形態では、ベクターには、112F32、112V8、112Y131、112Y55、および112Z5として示されるハイブリドーマ細胞系によって産生される任意の抗体、その部分配列またはフラグメントをコードする核酸配列が含まれる。

【0111】

ベクターは、核酸の挿入または取り込みにより操作することができる媒介物である。ベクターとしては、プラスミドベクター、ウイルスベクター、原核生物（細菌）ベクターおよび真核生物（植物、菌類、哺乳類）ベクターが挙げられる。ベクターは、*in vitro*でまたは*in vivo*での核酸の発現のために用いることができる。そのようなベクターは、「発現ベクター」と呼ばれ、OX40抗体、その部分配列およびフラグメントをコードする核酸をはじめとする核酸の導入や、コードされるタンパク質の*in vitro*で（例えば、溶液中でまたは固相において）、細胞においてまたは*in vivo*で被験体においての発現に有用である。

10

【0112】

また、ベクターは、核酸の操作にも用いることができる。遺伝子操作では、「クローニングベクター」を使用して、*in vitro*で（例えば、溶液中でまたは固相において）、細胞においてまたは*in vivo*で被験体において、挿入された核酸を転写または翻訳することができる。

20

【0113】

ベクターは、一般に、*in vitro*でまたは*in vivo*での細胞における増殖のための複製起点を含む。ベクター内に存在する発現制御エレメントなどの制御エレメントは、必要に応じて、転写および翻訳を容易にするために含めることができる。

【0114】

ベクターは選択マーカを含む場合がある。「選択マーカー」は、遺伝子を含有する細胞の選択を可能にする遺伝子である。「正の選択」とは、正の選択が起こって、選択マーカーを含有する細胞を選択するプロセスを指す。薬剤耐性が正の選択マーカーの一例であり、マーカーを含有する細胞は薬剤含有培養培地中で生存し、マーカーのない細胞は死滅する。選択マーカーとしては、G418耐性を与えるneo；ハイグロマイシン耐性を与えるhygr；およびピューロマイシン耐性を与えるpuroなどの薬剤耐性遺伝子が挙げられる。他の正の選択マーカー遺伝子には、マーカーを含有する細胞の同定またはスクリーニングを可能にする遺伝子が含まれる。これらの遺伝子としては、とりわけ、蛍光タンパク質（GFPおよびGFP様発色団、ルシフェラーゼ）遺伝子、lacZ遺伝子、アルカリ性ホスファターゼ遺伝子、およびCD8などの表面マーカーが挙げられる。「負の選択」とは、適切な負の選択薬剤に暴露して、負の選択マーカーを含有する細胞を死滅させるプロセスを指す。例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（HSV-tk）遺伝子を含有する細胞（Wigler ら、Cell 11 :223 (1977))は薬剤ガンシクロビル(GANC)に対して感受性である。同様に、gpt遺伝子は細胞を6-チオキサンチン感受性にする。

30

【0115】

ウイルスベクターには、レトロウイルス(retroviral)（分裂細胞だけでなく非分裂細胞にも感染させるためのレンチウイルス）、泡沫状ウイルス（米国特許第5,624,820号、同第5,693,508号、同第5,665,577号、同第6,013,516号および同第5,674,703号；WO92/05266およびWO92/14829）、アデノウイルス（米国特許第5,700,470号、同第5,731,172号および同第5,928,944号）、アデノ随伴ウイルス(AAV)（米国特許第5,604,090号）、単純ヘルペスウイルスベクター（米国特許第5,501,979号）、サイトメガロウイルス(CMV)系ベクター（米国特許第5,561,063号）、レオウイルス、ロータウイルスゲノム、シミアンウイルス40(SV40)または乳頭腫ウイルス(Cone ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349 (1984)；Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman 編, 1982年；Sarver ら、Mol. Cell. Biol. 1:486 (1981)；米国特許第5,719,054号)に基づくものが含ま

40

50

れる。アデノウイルスはゆっくりと複製するかつ/または最終分化した細胞に効率よく感染し、このアデノウイルスを用いて、ゆっくりと複製する細胞かつ/または最終分化した細胞を標的にすることができる。発現に有用なさらなるウイルスベクターとしては、パルボウイルス、ノーウォークウイルス、コロナウイルス、パラミクソウイルスおよびラブドウイルス、トガウイルス(例えば、シンドビスウイルスおよびセムリキ森林ウイルス)ならびに水疱性口内炎ウイルス(VSV)が挙げられる。

【0116】

核酸を含むベクターは、その核酸が発現制御エレメントに機能しうる形で連結されている場合に、発現され得る。用語「機能しうる形で連結された」(operably linked)とは、それに関するエレメント間の物理的または機能的関係によりそれらのエレメントが意図されたように機能することが可能になるということを指す。よって、発現制御エレメントに「機能しうる形で連結された」核酸とは、制御エレメントが核酸転写、必要に応じて、その転写物の翻訳をモジュレートするということの意味する。

10

【0117】

「発現制御エレメント」または「発現制御配列」は、機能しうる形で連結された核酸の発現に影響を及ぼすポリヌクレオチドである。プロモーターおよびエンハンサーは、発現制御エレメントおよび配列の非限定的な特定例である。「プロモーター」は、下流(3'方向)核酸配列の転写を開始可能なシス作用DNA調節領域である。プロモーター配列には、転写開始を促進するヌクレオチドが含まれる。エンハンサーも核酸発現を調節するが、それが機能しうる形で連結されている核酸の転写開始部位から離れて作用する。エンハンサーは、核酸の5'または3'末端のいずれかに存在する場合、さらに核酸内(例えば、イントロンまたはコード配列)に存在する場合にも作用する。さらなる発現制御エレメントとしては、リーダー配列および融合パートナー配列、多重遺伝子の作出のための内在性リボソーム結合部位(IRES)エレメント、またはポリシストロン性メッセージ、イントロンのスプライシングシグナル、mRNAのインフレーム翻訳を可能にするための遺伝子の正確なリーディングフレームの維持、目的の転写物の適切なポリアデニル化をもたらすポリアデニル化シグナル、および停止コドンが挙げられる。

20

【0118】

発現制御エレメントには、機能しうる形で連結された核酸の転写がシグナルまたは刺激不在で起こる「構成的」エレメントが含まれる。シグナルまたは刺激に应答して発現を与え、機能しうる形で連結された核酸の発現を増減する発現制御エレメントは、「調節可能である」。シグナルまたは刺激に应答して機能しうる形で連結された核酸の発現を増加する調節可能なエレメントは、「誘導エレメント」と呼ばれている。シグナルまたは刺激に应答して機能しうる形で連結された核酸の発現を減少する調節可能なエレメントは、「抑制エレメント」(すなわち、シグナルは発現を減少し;そのシグナルが除去されまたは存在しない場合に、発現が増加する)と呼ばれている。

30

【0119】

細菌の発現では、構成的プロモーターには、T7、ならびにバクテリオファージのpL、plac、ptrp、ptac(ptrp-lacハイブリッドプロモーター)などの誘導プロモーターが含まれる。昆虫細胞系では、構成的または誘導プロモーター(例えば、エクジソン)が用いられ得る。酵母では、構成的プロモーターには、例えば、ADHまたはLEU2およびGALなどの誘導プロモーターが含まれる(例えば、Ausubelら、In: Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻, 第13章, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience編, 1988年; Grantら、In: Methods in Enzymology, 153:516-544 (1987), Wu & Grossman編, 1987年, Acad. Press, N.Y.; Glover, DNA Cloning, 第II巻, 第3章, IRL Press, Wash., D. C., 1986年; Bitter, In: Methods in Enzymology, 152:673-684 (1987), Berger & Kimmel編, Acad. Press, N.Y.; および, Strathernら, The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces Cold Spring Harbor Press編, 第I巻および第II巻 (1982)参照)。

40

【0120】

哺乳類の発現では、ウイルスまたは他の起源の構成的プロモーターが用いられ得る。例

50

えば、CMV、SV40、またはウイルスの長い末端反復配列(LTR)など、または哺乳類細胞のゲノム(例えば、メタロチオネインIIAプロモーター;熱ショックプロモーター、ステロイド/甲状腺ホルモン/レチノイン酸応答エレメント)もしくは哺乳類ウイルス(例えば、アデノウイルス後期プロモーター;マウス乳癌ウイルスLTR)由来の誘導プロモーターが用いられる。

【0121】

発現制御エレメントには、特定の組織または細胞種において活性なエレメントが含まれ、このようなエレメントは「組織特異的発現制御エレメント」と呼ばれている。組織特異的発現制御エレメントは、一般に、特定の細胞または組織種においてより活性が高いが、これはこの組織特異的発現制御エレメントが、他の細胞または組織種と比べて、その特定の細胞または組織種において活性な転写活性化タンパク質、または他の転写調節因子により認識されるためである。そのような発現制御エレメントの非限定的な特定例は、ヘキソキナーゼII、COX-2、 α -フェトプロテイン、癌胎児性抗原、DE3/MUC1、前立腺特異的抗原、C-erbB2/neu、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド(GIP)、テロメラゼ逆転写酵素および低酸素症-応答性プロモーターなどのプロモーターである。

10

【0122】

本発明によれば、本発明のOX40核酸またはベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞が提供される。宿主細胞としては、限定されるものではないが、原核細胞および真核細胞、例えば細菌、真菌(酵母)、植物、昆虫、および動物(例えば、霊長類およびヒトなどの哺乳類)の細胞が挙げられる。形質転換細胞の非限定的な例としては、組換えバクテリオファージ核酸、プラスミド核酸またはコスミド核酸発現ベクターで形質転換された細菌;組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母;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)に感染させたまたは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;組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染させた昆虫細胞;および組換えウイルス発現ベクター(例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス)に感染させた動物細胞、または安定な発現のために操作された形質転換動物細胞が挙げられる。OX40抗体、その部分配列およびフラグメントを発現する哺乳類宿主細胞の非限定的な例にはCHO細胞がある。宿主細胞は、初代細胞分離株、単離された二次細胞または継代培養細胞、あるいは株化細胞または不死化細胞培養物由来の複数の細胞または細胞集団であってよい。

20

30

【0123】

細胞(例えば、宿主細胞)または生物に関して用いられる場合の用語「形質転換された」または「トランスフェクトされた」とは、外因性分子、例えば、タンパク質または核酸(例えば、トランスジーン)の細胞への取り込み後の細胞における遺伝子変化を意味する。よって、「トランスフェクトされた」または「形質転換された」細胞は、外因性分子が人の手で、例えば、組換えDNA技術により導入されている細胞、またはその後代である。

【0124】

核酸またはタンパク質は、細胞およびその後代において安定にまたは一時的にトランスフェクトまたは形質転換(発現)することができる。細胞を増殖させ、導入したタンパク質を発現させることができ、または核酸を転写することができる。複製中に起こる突然変異が存在する可能性があるため、トランスフェクトまたは形質転換細胞の後代は、親細胞と同一ではない場合がある。

40

【0125】

一般に、細胞トランスフェクションまたは形質転換ではベクターを使用する。ベクターは、ウイルス粒子または小胞内に含めることができ、所望により、標的細胞リガンドまたは受容体と結合するその粒子または小胞表面にタンパク質を含めることによって特定の細胞種に向けることができる。よって、ウイルス粒子または小胞自体、あるいはウイルス表面のタンパク質を作って、in vitroで、ex vivoでまたはin vivoでのトランスフェクションまたは形質転換を目的として細胞を標的にすることができる。従って、in vitroで、in

50

vivoでおよびex vivoでの細胞、組織または器官へのウイルスおよび非ウイルスベクター送達手法が含まれる。

【0126】

また、標的細胞（例えば、宿主細胞）への核酸の導入は、浸透圧衝撃（例えば、リン酸カルシウム）、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合などのような当技術分野で公知の方法によっても行うことができる。in vitroで、ex vivoでおよびin vivoでの核酸およびポリペプチドの導入は、他の技術を用いても行うことができる。例えば、ポリエステル、ポリアミン酸、ヒドロゲル、ポリビニルピロリドン、エチレン-酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミン、またはラクチド/グリコリドコポリマー、ポリラクチド/グリコリドコポリマー、またはエチレン酢酸ビニルコポリマーなどのポリマー物質。核酸は、コアセルベーション技術によりまたは界面重合により、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチン-マイクロカプセル、またはポリ（メチルメタクロレート）(poly(methylmethacrolate))マイクロカプセルを用いて調製したマイクロカプセル中に、あるいはコロイド系中に封入することができる。コロイド分散系には、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、および脂質に基づく系（水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームなど）が含まれる。

10

【0127】

様々な組成物を細胞に導入するためのリポソームは、当技術分野で公知であり、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、リポフェクチンおよびDOTAPが含まれる（例えば、米国特許第4,844,904号、同第5,000,959号、同第4,863,740号、および同第4,975,282号；ならびにGIBCO-BRL, Gaithersburg, Md）。遺伝子療法に有用なピペラジンに基づくアムフィリック陽イオン性脂質(piperazine based amphiphilic cationic lipids)も知られている（例えば、米国特許第5,861,397号参照）。陽イオン性脂質系も知られている（例えば、米国特許第5,459,127号参照）。本明細書において、ポリマー物質、マイクロカプセルおよびコロイド分散系（リポソームなど）をまとめて「小胞」と呼ぶ。

20

【0128】

本発明OX40抗体は、処置、治療用途および診断用途（臨床的および診断的方法など）に有用である。例えば、ヒトPBMCを放射線照射重症複合免疫不全(SCID)マウスに移植した急性および慢性移植片対宿主病(GVHD)のマウスモデルでは、ヒト抗ヒトOX40アンタゴニスト抗体は、疾患発症前後に投与した場合に、ヒトT細胞数および疾患病変を低減した。よって、本発明OX40抗体は、急性または慢性異種移植片対宿主病モデルにおいて移植片対宿主病(GVHD)の症状を軽減、減少または抑制することと；急性または慢性異種移植片対宿主病モデル（例えば、免疫不全(SCID)マウス）において移植片対宿主病の緩解または退行をもたらすことが可能である。また、本発明抗体は、ナチュラルキラー細胞によるOX40発現細胞の溶解も誘導することができた。特定の理論に縛られるものではないが、OX40発現細胞の溶解は、抗体依存性細胞傷害（作用）(ADCC)によるものであり得る。

30

【0129】

よって、本発明OX40抗体は、OX40の活性または機能をモジュレートすることによって影響を受けやすいあるいは好ましく応答し得る障害および疾患の処置または治療に有用である。従って、OX40アンタゴニスト抗体を用いて、OX40の活性または機能の低減、減少、阻害、抑制または遮断の影響を受けやすいあるいはOX40の活性または機能の低減、減少、阻害、抑制または遮断に好ましく応答する可能性があるそれらの障害、疾患、生理学的状態、病状および症状を治療することができ、一方、OX40アゴニスト抗体を用いて、OX40の活性または機能の刺激、増加、増強、促進または誘導の影響を受けやすいあるいはOX40の活性または機能の刺激、増加、増強、促進または誘導に好ましく応答する可能性があるそれらの障害、疾患、生理学的状態、病状および症状を治療することができる。

40

【0130】

本発明によれば、望ましくないまたは異常な免疫応答に関連する障害、疾患、状態、病状および有害な症状または異常を治療する方法が提供される。本明細書において、「望ま

50

しくない免疫応答」または「異常免疫応答」とは、望ましいまたは生理学的に正常なものよりも高いまたは低いいずれもの免疫応答、活性または機能を指す。望ましくない免疫応答、機能または活性は、正常な応答、機能または活性である場合がある。よって、正常な免疫応答でもそれらが望ましくない限り、たとえ異常であるとは考えられないとしても、これらの用語の意味の範囲内に含まれる。望ましくない免疫応答、機能または活性はまた、正常でない応答、機能または活性である場合もある。正常でない（異常な）免疫応答、機能または活性は、正常から逸脱している。望ましくないおよび異常免疫応答は、体液性、細胞性またはそれらの組合せでの、慢性または急性免疫応答であり得る。

【0131】

望ましくないまたは異常な免疫応答の例は、自己免疫障害または疾患の場合などの過応答性である免疫応答（例えば、自己免疫）である。望ましくないまたは異常な免疫応答の別の例は、免疫応答が組織または器官において急性または慢性炎症を引き起こすという場合である。望ましくないまたは異常な免疫応答のさらに別の例は、免疫応答が、移植拒絶、移植片対宿主病(GVHD)、自己免疫障害または疾患、あるいは炎症などの細胞、組織または器官の破壊を引き起こすという場合である。望ましくないまたは異常な免疫応答のさらに別の例は、抗原に対する応答が望ましいものより低い、例えば、寛容が生じている場合など免疫応答が過応答性であるという場合である。

【0132】

よって、望ましくないおよび異常免疫応答には、障害または疾患に応じて、生理学的状態、病状および有害な症状または異常を特徴とする慢性および急性免疫障害および疾患が含まれる。本発明が適用される免疫障害および疾患の非限定的な特定例としては、移植片対宿主病(GVHD)、移植拒絶、自己免疫障害および炎症が挙げられる。

【0133】

本発明によれば、少なくとも一部、OX40の活性または機能をモジュレートするOX40抗体の能力に基づく *in vivo* 処置および治療法が提供される。処置実施形態の特定の方法では、本発明OX40抗体を用いた処置または治療の影響を受けやすいあるいは本発明OX40抗体を用いた処置または治療に応答し得る障害、疾患、生理学的状態、病状および症状には、例えば、慢性または急性免疫疾患または障害が含まれる。処置実施形態のさらなる方法では、本発明OX40抗体を用いた処置または治療の影響を受けやすい障害、疾患、生理学的状態、病状および症状には、例えば、炎症、移植拒絶、移植片対宿主病(GVHD)、自己免疫障害または疾患（関節リウマチ、多発性硬化症、糖尿病（例えば、インスリン依存性糖尿病、IDDM、1型糖尿病）、クローン病(CD)、炎症性腸疾患(IBD)、潰瘍性大腸炎(UC)、セリアック病、乾癬、全身性紅斑性狼瘡(SLE)、増殖性ループス腎炎、肉芽腫性筋疾患、多発性筋炎、およびOX40媒介細胞応答（例えば、望ましくないまたは異常なもの）など）が含まれる。

【0134】

よって、本発明は、OX40抗体、部分配列またはフラグメントが、慢性または急性免疫疾患または障害、炎症、移植拒絶、移植片対宿主病(GVHD)、あるいは自己免疫障害（関節リウマチ、多発性硬化症、糖尿病（例えば、インスリン依存性糖尿病、IDDM、1型糖尿病）、クローン病(CD)、炎症性腸疾患(IBD)、潰瘍性大腸炎(UC)、セリアック病、乾癬、全身性紅斑性狼瘡(SLE)、増殖性ループス腎炎、肉芽腫性筋疾患、多発性筋炎、あるいは望ましくないまたは異常なOX40媒介細胞応答など）の軽減、減少、阻害、抑制および遮断に、気道過反応性/過感受性（例えば、喘息、アレルギー性喘息）におけるおよび他の組織および器官における肺炎症の治療および軽減、減少、阻害、抑制および遮断に用いられる方法を提供する。本発明により治療可能な移植片対宿主病の症状の非限定的な特定例は、体重減少、脱毛、皮膚発疹、血尿、腹水、および肝臓、腸管、肺、皮膚中への炎症細胞浸潤、ならびに死である。

【0135】

OX40抗体はまた、肺、関節、筋肉、皮膚、中枢もしくは末梢神経系または腸に存在する炎症の軽減、減少、阻害、抑制および遮断にも有用である。OX40抗体は、さらに、感染性

10

20

30

40

50

病原体（例えば、細菌、ウイルスまたは寄生虫感染性病原体）に対する被験体の応答によって起こる炎症の軽減、減少、阻害、抑制および遮断にも有用である。

【0136】

OX40抗体を用いた処置または治療の影響を受けやすいさらなる状態には、例えば、変形性関節症、乾癬性関節炎、脳脊髄炎、重症筋無力症、自己免疫性甲状腺炎、アトピー性皮膚炎、湿疹性皮膚炎、乾癬、シェーグレン症候群、アフター性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、皮膚紅斑性狼瘡、強皮症、膣炎、直腸炎、癩性結節性紅斑、自己免疫性ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性出血性脳症、特発性両側性進行性感音難聴、再生不良性貧血、赤芽球癆、特発性血小板減少症（ITP）、多発性軟骨炎、ウェジナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、スティーブンス・ジョンソン症候群、特発性スプルー、扁平苔癬、グレーブス病、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変、後部ブドウ膜炎、間質性肺繊維症、橋本甲状腺炎、自己免疫性多腺症候群、免疫介在性不妊症、自己免疫性アジソン病、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、疱疹状皮膚炎、自己免疫性脱毛症、白斑、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫血小板減少性紫斑病、悪性貧血、ギラン・バレー症候群、スティッフ・マン症候群、急性リウマチ熱、交感性眼炎、グッドパスチャー症候群、全身性壊死性血管炎、抗リン脂質症候群、喘息（例えば、アレルギー性喘息）およびアレルギーが含まれる。

10

【0137】

本明細書において、用語「移植物」、「移植」およびその文法上の変形は、体の一部分から別の部分への、あるいは一個体または動物から別の個体または動物への細胞、組織または器官のグラフト、埋め込み、または移植を意味する。そのため、移植される細胞、組織または器官は、同種移植片または異種移植片であり得る。例示的な移植細胞としては、骨髄、造血幹細胞、末梢血幹細胞または臍帯血幹細胞、同種異系または非同種異系細胞、および神経系細胞が挙げられる。例示的な移植用組織としては、皮膚、血管、眼および骨髄が挙げられる。例示的な移植用器官としては、腎臓、心臓、肺、膵臓および肝臓が挙げられる。この用語はまた、例えば、形質転換細胞、組織および器官が被験体（例えば、ヒトまたは動物）（後に異なる被験体（例えば、ヒトまたは動物）由来の移植物を受ける）から得られるまたは誘導される *ex vivo* 遺伝子療法によって、遺伝子修飾された細胞、組織および器官も包含する。

20

【0138】

本発明により治療可能な炎症には、OX40媒介による炎症応答、あるいはOX40をモジュレートし、次に、リンパ球（例えば、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞）の細胞増殖、生存、死、または活性などの1以上をモジュレートすることができることによりOX40抗体を用いた処置の影響を受けやすい(amendable to)炎症応答が含まれる。方法（例えば、処置）は、炎症の発症、頻度、重症度、進行、または期間の軽減をもたらす得る。炎症の例示的な症状としては、腫脹、疼痛、発疹、頭痛、発熱、悪心、骨格関節硬直、または組織もしくは細胞損傷の1つ以上が挙げられる。

30

【0139】

炎症は、直接または間接的に、複数の細胞、組織または器官への、あるいは単一細胞種、組織種または器官への細胞、組織または器官損傷を引き起こす可能性がある。損傷を示し得る例示的な組織および器官としては、上皮もしくは粘膜組織、消化管、腸、膵臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、皮膚、または骨格関節（例えば、膝、足首、股関節部、肩、手首、手指、足指、または肘）が挙げられる。本発明による処置は、組織損傷の進行または悪化の軽減、阻害または抑制をもたらす、あるいは損傷器官または組織、例えば、皮膚、粘膜、肝臓の再生をもたらす得る。

40

【0140】

本明細書において、用語「治療する」、「治療（すること）」、「処置」およびその文法上の変形は、患者において生理学的効果または転帰を得ることが望ましい各被験体または患者において行われるプロトコール、計画、過程または改善法を意味する。よって、本発明の方法には、とりわけ、特定の被験体の障害、疾患、生理学的状態、病状または症状において測定可能な改善または有益な効果をもたらす処置および治療法が含まれる。測定

50

可能な改善または有益な効果は、障害、疾患、生理学的状態、病状または症状におけるい
ずれもの他覚的もしくは自覚的、過度的、一時的、または長期的改善、あるいはその障害
、疾患、生理学的状態、病状または状態に関連または起因する有害な症状の発症、重症度
、期間または頻度の軽減である。本発明方法では必ずしもすぐに効果が現れず、少し遅れ
て、時間の経過で最終的な改善または有益な効果が認められる可能性があり、特定の被験
体において安定化または改善が起こる。

【0141】

本発明による処置法の満足のいく臨床的エンドポイントは、例えば、障害、疾患、病状
または状態に関連する1種以上の病状、有害な症状または合併症の重症度、期間または頻
度における追加または一部の減少または軽減、あるいは障害、疾患、生理学的状態、病状
または症状（例えば、慢性または急性免疫疾患または障害、GVHD、移植拒絶、炎症、ある
いは自己免疫障害）の1種以上の生理学的な、病理学的な、生化学的なまたは細胞の現象
または特徴の阻害、軽減、抑制または好転が認められる場合に達成される。そのため、治
療的有用性または改善は、必ずしも、障害、疾患、生理学的状態、病状または症状（例え
ば、慢性または急性免疫疾患または障害、GVHD、移植拒絶、炎症、あるいは自己免疫障害
）に関連または起因する大多数または全ての病状、有害な症状または合併症の治癒、ある
いは除去だけではない。よって、治療的有用性または改善によって、必ずしも、障害、疾
患、生理学的状態、または病状（例えば、慢性または急性免疫疾患または障害、GVHD、移
植拒絶、炎症、あるいは自己免疫障害）に関連または起因する任意または全ての病状、有
害な症状または合併症の完全治癒はもたらされない。例えば、障害、疾患、生理学的状態
または病状（例えば、慢性または急性免疫疾患または障害、GVHD、移植拒絶、炎症、ある
いは自己免疫障害）に関連または起因する病状、有害な症状または合併症の一部の軽減、
減少または阻害、あるいは安定化、あるいは進行または悪化の遅延は、ほんの数日間、数
週間または数ヶ月間だけでも、あるいはその疾患、障害、病状または状態に関連または起
因する1種以上の病状、有害な症状または合併症が残っても（例えば、慢性または急性免
疫疾患または障害、GVHD、移植拒絶、炎症、あるいは自己免疫障害）、満足のいく臨床転
帰である。

10

20

【0142】

様々な特定の実施形態では、処置法は、慢性または急性免疫障害または疾患に関連する
1種以上の有害な（身体的）症状または影響を軽減または改善することを含む。様々なさ
らなる特定の実施形態では、処置法は、移植片対宿主病に関連する1種以上の有害な症状
または身体的影響（例えば、体重減少、脱毛、皮膚発疹、血尿、腹水、肝臓、腸管、肺中
への炎症細胞浸潤および死）の発症、頻度、期間または重症度を軽減、減少または抑制す
ることを含み、あるいは移植片対宿主病の緩解または退行をもたらし、あるいは移植片対
宿主病の予防をもたらし。様々なさらなる特定の実施形態では、処置法は、移植片または
移植片拒絶（例えば、移植片または移植片に対する免疫応答、あるいは移植片または移植
片の細胞破壊）に関連する1種以上の有害な症状または身体的影響の発症、頻度、期間ま
たは重症度を軽減、減少または抑制することを含み、あるいは移植片または移植片拒絶の
緩解または退行をもたらし、あるいは移植片または移植片拒絶の予防をもたらし。様々な
さらなる特定の実施形態では、処置法は、関節リウマチ、多発性硬化症、糖尿病（例え
ば、インスリン依存性糖尿病、IDDM、1型糖尿病）、クローン病(CD)、炎症性腸疾患(IBD)、
潰瘍性大腸炎(UC)、セリアック病、乾癬、全身性紅斑性狼瘡(SLE)、増殖性ループス腎炎
、肉芽腫性筋疾患、多発性筋炎、あるいは望ましくないまたは異常なOX40媒介細胞応答に
関連する1種以上の有害な症状または身体的影響の発症、頻度、期間または重症度を軽減
、減少または抑制することを含む。さらなる様々な特定の実施形態では、処置法は、自己
反応性細胞または抗自己タンパク質抗体産生細胞の数または増殖を低減すること、自己反
応性細胞または抗自己タンパク質抗体産生細胞の数、増殖または生存の増加を阻害または
阻止することを含む。

30

40

【0143】

免疫障害または疾患の場合、測定可能な改善または有益な効果は、リンパ球（例えば、

50

活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞)の数、増殖または活性の、生理学的に正常なベースライン値に向かうモジュレーションを含み、それが功を奏する処置成果と考えられる。免疫障害または免疫疾患に関する測定可能な改善または有益な効果のうち1つの例は、免疫障害または疾患に起因または関連する組織病理学的変化の改善である。例えば、骨格関節浸潤または組織破壊、あるいは脾臓、胸腺、腎臓、肝臓、脾臓、上皮(皮膚)もしくは粘膜組織、消化管もしくは腸浸潤または組織破壊の抑制さらにまたは軽減である。

【0144】

本発明によれば、*in vitro*でまたは*in vivo*でOX40リガンド(OX40L)の活性化T細胞またはOX40との結合を遮断、阻害、阻止、低減または減少する方法が提供される。一実施形態では、方法は、活性化T細胞とのOX40リガンドの結合を阻害または阻止するのに有効なOX40抗体と、活性化T細胞を接触させることを含む。別の実施形態では、方法は、OX40とのOX40リガンドの結合を阻害または阻止するのに有効なOX40抗体と、OX40を接触させることを含む。特定の態様では、方法は、活性化T細胞とのOX40リガンド(OX40L)の結合の遮断、低減、減少、阻害または阻止を必要とする被験体で、所望により、OX40医薬組成物を用いて行われる。

10

【0145】

本発明によれば、*in vitro*でまたは*in vivo*でOX40媒介細胞シグナル伝達をモジュレートする方法が提供される。一実施形態では、方法は、OX40媒介細胞シグナル伝達のモジュレーションを必要とする被験体に、OX40媒介細胞シグナル伝達をモジュレートするのに有効なOX40抗体を投与することを含む。

20

【0146】

本発明によれば、*in vitro*でまたは*in vivo*で活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数を低減する方法が提供される。一実施形態では、方法は、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数の低減を必要とする被験体に、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞の数を低減するのに十分な、ある量のOX40抗体を投与することを含む。

【0147】

本発明によれば、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞に起因する疾患または障害を治療する方法が提供される。一実施形態では、方法は、被験体に、活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞に起因する疾患または障害の進行を軽減、減少または抑制し、あるいは活性化T細胞、エフェクターT細胞、記憶T細胞または制御性T細胞を枯渇させるのに十分な量のOX40抗体を投与することを含む。特定の態様では、前記疾患または障害には、移植片対宿主病、炎症または自己免疫障害が含まれる。

30

【0148】

本発明によれば、被験体において血液、脾臓、リンパ節、腸、肝臓、肺、または皮膚中の活性化T細胞の数を減少させる方法が提供される。一実施形態では、方法は、被験体に、血液、脾臓、リンパ節、腸、肝臓、肺、または皮膚中の活性化T細胞の数を減少させるのに十分な、ある量のOX40抗体を投与することを含む。一態様では、血液、脾臓、リンパ節、腸、肝臓、肺、または皮膚中の活性化T細胞の数を減少させる方法は、急性または慢性異種移植片宿主病モデルにおけるものである。

40

【0149】

本発明組成物および方法は、所望の効果を与える任意の他の処置または治療と組み合わせることができる。特に、補完性または相乗作用を有すると位置づけられている処置、および治療が適用可能である。例示的な処置および治療には免疫抑制薬剤または薬物がある。かかる免疫抑制処置および治療は、本発明の任意の他の方法、例えば、処置または治療の前、実質的に同時期に行うことができる。

【0150】

よって、本発明は、本発明の方法を、任意の治療計画、処置プロトコールまたは組成物

50

(本明細書に記載されているか、あるいは当技術分野で公知の免疫抑制プロトコール、薬剤または薬物など)と組み合わせて用いる組合せ方法を提供する。一実施形態では、方法は、OX40抗体、その部分配列またはフラグメントと、免疫抑制処置、薬剤または薬物とを投与することを含む。免疫抑制処置、薬剤または薬物は、OX40抗体、その部分配列またはフラグメントの被験体への投与の前、実質的に同時期または後に投与することができる。

【0151】

本明細書において、処置、治療、薬剤または薬物に関して用いられる場合の用語「免疫抑制」またはその文法上の変形は、その処置、治療、薬剤または薬物が体液性または細胞性免疫応答の減少、低減、阻害または阻止をもたらすということの意味する。そのような治療は、一般にまたは全身的に免疫応答を抑制することができ、あるいは特定領域または位置において免疫応答を抑制することができる。

10

【0152】

免疫抑制薬剤および薬物の非限定的な特定種類には、アルキル化剤、代謝拮抗物質、植物抽出物、植物アルカロイド、ニトロソ尿素、ホルモン(グルココルチコイドなどのステロイド)、ヌクレオシドおよびヌクレオチド類似体が含まれる。免疫抑制薬物の特定の例としては、シクロホスファミド、アザチオプリン、シクロスポリンA、タクロリムス(FK506)、ラパマイシン、メトトレキサート、FTY720、cox-2阻害剤およびインターロイキン(例えば、IL-12)が挙げられる。

【0153】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、免疫抑制処置または治療の特定の例である。免疫抑制抗体には、例えば、インフリキシマブ(Remicade(登録商標))、Rituxan(登録商標)、Atgam(登録商標)、およびThymoglobuline(登録商標)、Xenapax(登録商標)、Simulect(登録商標)、Humira(登録商標)、Raptiva(登録商標)、Tysabri(登録商標)、およびOrthoclone(登録商標)(OKT3)が含まれる。

20

【0154】

また、本発明の方法には、とりわけ、別の処置プロトコールまたは治療計画、過程もしくは改善法の必要性または使用を低減する方法も含まれる。例えば、炎症、GVHDまたは自己免疫障害では、特定の被験体において、結果として、免疫抑制処置または治療の頻度が低くなりあるいは投与量が低減しあるいは免疫抑制処置または治療が不要になるならば、本発明の方法は治療的有用性がある。

30

【0155】

よって、本発明によれば、免疫抑制処置または治療の必要性または使用を低減する方法が提供される。一実施形態では、方法は、免疫抑制治療を受けているまたは受けたことがある被験体に、OX40抗体、そのフラグメントまたは部分配列(subsequent)を投与することを含む。一態様では、方法は、OX40抗体、そのフラグメントまたは部分配列(subsequent)を、炎症、GVHDまたは自己免疫障害の免疫抑制処置または治療の投与量、頻度または期間を低減しあるいは免疫抑制処置または治療を不要にするのに有効な量で投与することを含む。このような方法は、免疫抑制処置または治療の前、実質的に同時期または後に行うことができる。

【0156】

治療的有用性または改善を得ることが望ましい処置または治療法における投与量または「有効な量」または「十分な量」には、例えば、標的疾患、障害、病状または有害な症状あるいは合併症に関連または起因する1種、数種または全ての病状、有害な症状または合併症の、測定可能なまたは検出可能な程度でのいずれもの他覚的または自覚的軽減または改善が含まれる。また、標的疾患、障害、病状または有害な症状あるいは合併症の進行または悪化の抑制、阻害または遅延も満足のいく転帰である。十分な量または有効な量は、被験体群や一般集団ではなく特定の被験体における充足性または有効性を意味する。よって、「有効な量」または「十分な量」は、特定の被験体に治療的有用性を与えるのに十分なものである。

40

【0157】

50

十分な量または有効な量は、必ずしも1回の投与で与えられるだけではなく、必ずしも単独であるいは別の処置プロトコルまたは治療計画と組み合わせて投与されるだけではない。例えば、その量は、被験体の必要性、治療する障害、疾患または状態の現状あるいは処置の副作用によって示されるとおりに、比例的に増加し得る。さらに、第2の処置、プロトコルまたは治療計画を行わない単回または複数回投与で与える場合には、十分な量または有効な量は必ずしも十分または有効なものではなく、これは、特定の被験体において有効または十分であるように、前記投与に加えて、追加投与、量または期間、あるいは追加処置、プロトコルまたは治療計画を含め得るためである。また、有効または十分と考えられる量には、別の処置、治療計画またはプロトコルの使用の低減をもたらす量も含まれる。

10

【0158】

非限定的な例示的量（投与量）は、約0.1mg/kg～約100mg/kgの範囲、およびそのような範囲内の任意の数値または数値域または値(any numerical value or range or value)である。より多いまたはより少ない量（投与量）、例えば、0.01～500mg/kg、およびそのような範囲内の任意の数値または数値域または値(any numerical value or range or value)も投与することができる。非限定的なさらなる例示的量（投与量）は約0.5～50mg/kg、1.0～25mg/kg、1.0～10mg/kg、およびそのような範囲内の任意の数値または数値域または値(any numerical value or range or value)に及ぶ。

【0159】

本発明の方法は、任意の投与様式または送達様式により、あるいは任意の経路、全身的、局所および局所的投与または送達により実施してよい。例示的な投与経路および送達経路には、静脈内、動脈内(intrarterial)、皮内、筋肉内、皮下、胸膜内、経皮(局所)、経粘膜、頭蓋内、髄腔内、眼内、直腸、経口(消化器)および粘膜経路が含まれる。

20

【0160】

本発明の方法は、1日に、1週間に、1ヶ月に、または1年に1回以上(例えば、1～10回、1～5回または1～3回)実施してよい。当業者ならば、投与を遅延または中止するのに適した時期が分かるであろう。非限定的な投与計画は、1週間に1～7回を1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、15週間、20週間またはそれより長く、およびそのような範囲内の任意の数値または数値域または値(any numerical value or range or value)である。

30

【0161】

当然、いかなる処置または治療においても常であるように、異なる被験体は処置に対して異なる応答を示し、一部の被験体は特定の処置プロトコル、計画または過程に対して応答しないかまたは応答が不十分である可能性がある。よって、有効または十分な量は、少なくとも一部、治療する疾患、障害、病状(例えば、炎症、GVHD、移植拒絶、または自己免疫障害、進行する場合には、末期または初期)、望ましい治療効果、ならびに個々の被験体(例えば、被験体内でのバイオアベイラビリティ、性別、年齢など)および一部、遺伝的および後成的変異性(例えば、薬理ゲノミクス)に基づく処置または治療に対する被験体の応答によって決まる。さらに、あらゆる治療施行被験体または患者には特定の処置または治療法、プロトコル、計画、過程または改善法に対して応答しない可能性があるため、この種の治療を受けた被験体または患者一人一人、あるいは特定の集団において特定の測定可能な改善または有益な効果、臨床的エンドポイントまたは望ましい転帰を得るためには、そのような処置または治療法は必要ではない。よって、特定の被験体または患者、あるいは集団は、本発明処置または治療法に対して、応答しないか、応答が不十分であるかまたは望ましくない応答(副作用など)を示す可能性がある。

40

【0162】

用語「被験体」および「患者」は、本明細書において同義的に用いられ、動物、一般に哺乳類、例えばヒト、非ヒト霊長類(ゴリラ、チンパンジー、オランウータン、マカクザル、テナガザル)、愛玩動物(イヌおよびネコ)、家畜(ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ)、研究用および実験用動物(マウス、ラット、ウサギ、モルモット)を指す。被験体

50

には、*in vivo*有効性を研究するための疾患モデル動物（例えば、マウス、ラットおよび非ヒト霊長類など）（例えば、GVHD動物モデル）が含まれる。ヒト被験体には、1～5歳、5～10歳および10～18歳の子供、例えば、新生児、乳児、幼児および十代の若者、18～60歳の成人、ならびに例えば、60～65歳、65～70歳および70～100歳の高齢者が含まれる。

【0163】

被験体には、処置を必要とする哺乳類（例えば、ヒト）が含まれる。すなわち、それらはOX40抗体、部分配列またはフラグメントを用いた処置または治療の影響を受けやすいあるいはOX40抗体、部分配列またはフラグメントを用いた処置または治療に応答し得る疾患、障害、病状またはその症状を有している。被験体には、慢性または急性免疫障害または疾患、炎症、GVHD、移植拒絶、炎症、自己免疫疾患またはOX40媒介細胞応答を有するあるいは有する危険性があるものが含まれる。また、被験体には、慢性または急性免疫障害または疾患、GVHD、移植拒絶、炎症、自己免疫疾患またはOX40媒介細胞応答：の1つ以上の候補であるかあるいは慢性または急性免疫障害または疾患、GVHD、移植拒絶、炎症、自己免疫疾患またはOX40媒介細胞応答：の1つ以上の治療を受けたものも含まれる。よって、細胞、組織または器官移植または移植片（腎臓、心臓、肺、皮膚、眼の血管、肝臓または膵臓移植、あるいは骨髄、造血幹細胞、末梢血幹細胞または臍帯血幹細胞、同種異系または非同種異系細胞、神経系細胞など）の候補であるかあるいは細胞、組織または器官移植または移植片（腎臓、心臓、肺、皮膚、眼の血管、肝臓または膵臓移植、あるいは骨髄、造血幹細胞、末梢血幹細胞または臍帯血幹細胞、同種異系または非同種異系細胞、神経系細胞など）を受けた被験体は、OX40抗体を用いた処置の候補である。

10

20

【0164】

被験体には、免疫抑制処置または治療を、そのような処置を必要とする検査室診断または臨床診断のために必要とするもの、（例えば、移植のために）免疫抑制処置または治療を受けている被験体、および免疫抑制処置または治療を受けた被験体がさらに含まれ、そのような被験体はぶり返しまたは再発の危険性がある。危険性がある被験体には、慢性または急性免疫疾患または障害、炎症、GVHD、移植拒絶、炎症、自己免疫疾患またはOX40媒介細胞応答の家族歴、慢性または急性免疫疾患または障害、炎症、GVHD、移植拒絶、炎症、自己免疫疾患またはOX40媒介細胞応答に対する遺伝的素因を有するか、あるいは以前に慢性または急性免疫疾患または障害、炎症、GVHD、移植拒絶、炎症、自己免疫疾患またはOX40媒介細胞応答に罹患したものが含まれる。そのような危険性がある被験体は、自己反応性T細胞または抗自己タンパク質抗体などのスクリーンを用いて同定することができる。例えば、リウマチ因子を発現する被験体は関節リウマチの危険性がある。MBP、MOGまたはPLPに対する抗体を発現する被験体は多発性硬化症の危険性がある。

30

【0165】

よって、危険性がある被験体は、治療して、慢性または急性免疫疾患または障害、炎症、GVHD、移植拒絶、炎症、自己免疫疾患、またはOX40媒介細胞応答を発現するか、あるいは慢性または急性免疫疾患または障害、炎症、GVHD、移植拒絶、炎症、自己免疫疾患、またはOX40媒介細胞応答をぶり返すまたは再発する可能性を阻害または低減することができる。そのような処置の成果は、慢性または急性免疫疾患または障害、炎症、GVHD、移植拒絶、炎症、自己免疫疾患、またはOX40媒介細胞応答を発現する危険性の低減であり得る。

40

【0166】

抗体、核酸、および他の組成物ならびに本発明の方法は、医薬製剤に含めることができ、または医薬製剤を使用することができる。そのような医薬製剤は、被験体の処置、あるいは被験体への投与または送達に、*in vivo*で局所的に、局部的にまたは全身的に、あるいは*ex vivo*で有用である。

【0167】

医薬製剤は、「製薬上許容される」および「生理学的に許容される」担体、希釈液または賦形剤を含む。用語「製薬上許容される」および「生理学的に許容される」には、医薬投与に適合する溶媒（水性または非水性）、溶液、エマルジョン、分散媒、被覆剤、等張剤および吸収促進剤または吸収遅延剤が含まれる。そのような処方物は、液体；エマルジ

50

ョン、懸濁液、シロップまたはエリキシル、あるいは固形；錠剤（コート錠または素錠、即効型、遅延放出型、持続放出型、またはパルス放出型）、カプセル（硬カプセルまたは軟カプセル、即効型、遅延放出型、持続放出型、またはパルス放出型）、粉末、顆粒、結晶、またはマイクロビーズに含めることができる。補助化合物（例えば、防腐剤、抗菌薬、抗ウイルス薬および抗真菌薬）も処方物に組み込むことができる。

【0168】

医薬製剤は、特定の局所的、局部的または全身投与または送達経路に適合するように作製することができる。従って、医薬製剤は、特定の経路による投与に適した担体、希釈液、または賦形剤を含む。本発明の組成物についての投与経路の非限定的な特定例は、非経口、例えば、静脈内、動脈内(intrarterial)、皮内、筋肉内、皮下、胸膜内、経皮(局所)、経粘膜、頭蓋内、髄腔内、眼内、直腸、経口(消化器)、粘膜投与であり、任意の他の処方物も処置法または投与プロトコールに適している。

10

【0169】

非経口適用に用いられる溶液または懸濁液は、滅菌希釈液（注射水、食塩水、硬化油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶剤など）；抗菌薬（ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなど）；酸化防止剤（アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなど）；キレート化剤（エチレンジアミン四酢酸など）；バッファー（酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩など）および等張性調整のための薬剤（塩化ナトリウムまたはデキストロースなど）：を含んでよい。pHは、酸または塩基（塩酸または水酸化ナトリウムなど）を用いて調整することができる。

20

【0170】

注射用医薬製剤には、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液および注射可能な滅菌溶液または分散液を即時調整するための滅菌粉末が含まれる。静脈内投与の場合、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）(BASF, Parsippany, NJ)またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)が挙げられる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール(liquid polyethylene glycol)など）、およびそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。流動性は、例えば、被覆剤（レシチンなど）を使用することにより、分散液の場合には必要な粒径を維持することにより、そして界面活性剤を使用することにより維持することができる。抗菌薬および抗真菌薬としては、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸およびチメロサルが挙げられる。組成物には、等張剤、例えば、糖、多価アルコール（マンニトール、ソルビトールなど）、塩化ナトリウムを含めることができる。吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチンを含めることで、注射可能な組成物の吸収を延長させることができる。

30

【0171】

注射可能な滅菌処方物は、活性組成物を必要な量で、上記成分の1つまたは組合せとともに適切な溶媒中に含めることによって調製することができる。一般に、分散液は、活性組成物を、基本分散媒と任意の他の成分とを含有する滅菌ビヒクルに含めることによって調製される。注射可能な滅菌溶液を調製するための滅菌粉末の場合、調製方法は、例えば、真空乾燥および凍結乾燥を含み、事前調製した、有効成分と任意の追加の所望の成分の溶液からその粉末を得る。

40

【0172】

経粘膜または経皮投与の場合、浸透させるべきバリアーに適した浸透剤を処方物に用いる。そのような浸透剤は当技術分野で公知であり、例えば、経粘膜投与の場合には、洗剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、鼻腔用スプレー、吸入装置（例えば、吸引器）または坐剤を使用することによって行うことができる。経皮投与の場合、活性化化合物は、軟膏、膏薬、ゲル、クリームまたはパッチに製剤される。

医薬製剤は、体内からの迅速排出を防ぐ担体、例えば、制御放出処方物または時間遅延材料（モノステアリン酸グリセリンまたはステアリン酸グリセリルなど）とともに調製す

50

ることができる。また、処方物は、局所的、局部的または全身送達あるいは制御放出または持続放出を実現するためのインプラントやマイクロカプセル化送達系などの製造品を用いて送達することもできる。

【0173】

エチレン酢酸ビニル、ポリアンヒドリド(polyanhydrides)、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを用いることができる。そのような処方物の調製方法は当業者には公知である。これらの材料は、Alza Corporation (Palo Alto, CA)から商業的に入手することもできる。また、リポソーム懸濁液(抗体またはウイルスコートタンパク質を用いて細胞または組織に向けられるリポソームを含む)を製薬上許容される担体として用いることもできる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるような、公知の方法に従って調製することができる。

10

【0174】

投与に適したさらなる医薬製剤については当技術分野で公知である(例えば、Gennaro(編), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, Lippincott, Williams & Wilkins (2000); Anselら, Pharmaceutical Dosages Forms and Drug Delivery Systems, 第7版, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999); Kibbe(編), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 第3版 (2000); および Remington's Pharmaceutical Principles of Solid Dosages Forms, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993)参照)。

20

【0175】

OX40抗体、核酸、処置、治療、薬剤、薬物および医薬製剤を含む、本発明により用いられる組成物は、投与を容易にしかつ投与量を均一化するために投与単位剤型にパッケージングすることができる。本明細書において「投与単位剤型」とは、単位投与量の処置として適した物理的に不連続な単位を指し;各単位は所望の処置または治療(例えば、有益な)効果をもたらすように算出された、ある量の組成物を、担体、賦形剤、希釈液、またはビヒクルとともに含有する。単位投与剤型は、必ずしも限定されるものではないが、使用する特定の組成物、実現すべき効果、ならびに治療する被験体の薬動学および薬理ゲノミクスを含む種々の因子によって決まる。

【0176】

本発明はさらに、好適なパッケージング材料中に、所望により、キット成分を使用するための使用説明書、例えば、本発明の方法を実施するための使用説明書とともにパッケージングされた、OX40抗体、核酸、薬剤、薬物および医薬製剤を含むキットを提供する。一実施形態では、キットには、OX40抗体、部分配列またはフラグメントと、OX40を検出するための使用説明書とが含まれる。別の実施形態では、キットには、OX40抗体、部分配列またはフラグメントと、そのOX40抗体、部分配列またはフラグメントを用いて、処置を必要とする被験体(例えば、処置または治療の影響を受けやすい(amendable)あるいは処置または治療に応答し得る疾患、障害、病状または状態を有する被験体)を治療するための使用説明書とが含まれる。一態様では、前記使用説明書は、慢性または急性免疫疾患または障害、炎症、GVHD、移植拒絶、炎症、自己免疫疾患またはOX40媒介細胞応答を治療するためのものである。さらなる態様では、キットには免疫抑制処置、治療または薬剤が含まれる。

30

40

【0177】

用語「パッケージング材料」とは、キットの成分を収納する物理的構造を指す。パッケージング材料は、成分を無菌に維持することができ、そのような目的に一般に使用される材料(例えば、紙、波形繊維、ガラス、プラスチック、ホイル、アンブルなど)で作製することができる。ラベルまたはパッケージ挿入物には、適切な指示、例えば、本発明の診断または処置法が記されていてよい。よって、使用説明書には、本明細書に記載の本発明の方法のいずれかを実施するための使用説明書が含まれ得る。従って、様々な実施形態では、キットには、本発明の方法を溶液中で、in vitroで、in vivoで、またはex vivoで実

50

施するための使用説明書を含むラベルまたはパッケージ挿入物が含まれる。一態様では、前記使用説明書には、本発明の処置または治療法においてOX40抗体、部分配列またはフラグメントを被験体に局所的に、局部的にまたは全身的に投与または送達することが記載される。

【0178】

使用説明書には、さらに、満足のいく臨床的エンドポイントまたは起こり得る有害な症状または合併症を表示してよい。使用説明書には、さらに、保存情報、使用期限、またはヒト被験体において使用するために監督官庁、例えば食品医薬品局(the Food and Drug Administration)によって定められた情報を含めてよい。

【0179】

使用説明書は、「印刷物」上に、例えば、キットに入った紙または板紙上に、キットまたはパッケージング材料に貼付されたラベル上にあつてよく、あるいはキットの成分の入ったバイアルまたはチューブに取り付けられていてもよい。使用説明書は、オーディオまたはビデオ媒体を含んでよく、さらに、コンピューター可読媒体、例えばディスク(フロッピーディスクまたはハードディスク)、光学CD(CD-またはDVD-ROM/RAMなど)、磁気テープ、電気記録媒体(RAMおよびROMなど)ならびにこれらのハイブリッド(磁気/光学記録媒体など)に含まれてもよい。

【0180】

本発明キットには、さらに、緩衝剤、防腐剤、または分解防止剤が含まれ得る。キットにはまた、活性についてアッセイするための対照成分、例えば、対照サンプルまたは標準も含まれ得る。キットの各成分は、個別容器中にまたは混合物で封入することができ、様々な容器の全てを1つまたは複数のパッケージ内に納めることができる。

【0181】

本発明によれば、OX40をスクリーニングし、検出し、同定する無細胞方法(例えば、溶液中で、固相で)および細胞に基づいた方法(例えば、in vitroまたはin vivo)がさらに提供される。これらの方法は、溶液中で、in vitroで生体材料またはサンプルを用いて、およびin vivoで、例えば、動物由来の細胞(例えば、リンパ球)のサンプルにおいて実施することができる。一実施形態では、方法は、生体材料またはサンプルを、OX40との抗体の結合を可能にする条件下でOX40と結合する抗体と接触させることと; OX40との抗体の結合についてアッセイすることを含む。抗体をOX40と結合させることによりOX40の存在が検出される。一態様では、OX40は細胞または組織に存在する。別の態様では、前記生体材料またはサンプルは哺乳類被験体から得られる。

【0182】

組成物例えばタンパク質(例えば、OX40抗体)、材料、サンプル、または処置に関して用いられる場合の用語「接触させること」とは、その組成物(例えば、OX40抗体)と他の参照される実体との直接または間接相互作用を意味する。直接相互作用の特定の例は結合である。間接相互作用の特定の例は、組成物が中間分子に作用し、この中間分子が次に参照される実体に作用するという場合である。従って、例えば、細胞(例えば、リンパ球)をOX40抗体と接触させることには、その抗体を(例えば、OX40との結合を通じて)その細胞と結合させること、またはその抗体を中間物に作用させ、この中間物が次にその細胞に作用することが含まれる。

【0183】

用語「アッセイすること」および「測定すること」ならびにその文法上の変形は、本明細書において同義的に用いられ、定性的測定または定量的測定のいずれか、あるいは定性的測定および定量的測定の両方を指す。これらの用語が結合に関して用いられる場合、本明細書に記載されており、当技術分野で公知の様々な方法を含む、相対量、結合の親和性または特異性を評価するいずれもの手段が意図される。例えば、OX40とのOX40抗体の結合は、ELISAアッセイによってアッセイまたは測定することができる。

【0184】

特に断りのない限り、本明細書において用いられる全ての技術用語および科学用語は、

10

20

30

40

50

本発明が関連する技術分野の業者には一般に明らかなものと同じ意味を有する。本発明の実施または試験に、本明細書に記載のものと類似または同等の方法および材料を使用することができるが、本明細書に記載しているものが好適な方法および材料である。

【0185】

本明細書において引用した全ての刊行物、特許、Genbank受託番号および他の参考文献は、参照により本明細書にそのまま組み入れられる。抵触の場合には、定義を含む本明細書により管理する。

【0186】

本明細書において、単数形「1つの(a, andおよびthe)」は、特に文脈上明示されない限り、複数の指示対象を含む。従って、例えば、「1つの抗体」への言及は、複数の抗体を含み、「1つの処置または治療」への言及は、複数の、連続または同時処置または治療などを含み得る。

10

【0187】

本明細書において、全ての数値または数値域は、特に文脈上明示されない限り、そのような範囲以内での完全整数とその値の小数部分または範囲以内での整数を含む。従って、例えば、90~100%の範囲への言及は、91%、92%、93%、94%、95%、95%、97%など、ならびに91.1%、91.2%、91.3%、91.4%、91.5%など、92.1%、92.2%、92.3%、92.4%、92.5%など、その他を含む。別の例では、1~5,000倍の範囲への言及は、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍など、ならびに1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍など、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍など、その他を含む。

20

【0188】

本発明は、数多くの実施形態を記載するために、肯定言語を用いて本明細書において一般に開示されている。本発明はまた、物質または材料、方法ステップおよび条件、プロトコール、手法、アッセイまたは解析などの特定の対象が全てまたは一部において排除される実施形態も具体的に含む。従って、本発明は、本明細書において本発明が含まないことに関して一般に示さなくとも、本発明に明示的に含まれていない態様もやはり開示される。

【0189】

本発明の数多くの実施形態を記載してきたが、本発明の精神および範囲を逸脱することなく様々な修飾を行い得ることは理解されるであろう。従って、次の実施例は、特許請求の範囲に記載した本発明の範囲を限定するためのものではなく、例示するためのものである。

30

【実施例】

【0190】

実施例1

本実施例では様々な材料および方法を記載する。

【0191】

抗原の調製 : Tri Reagent(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)を用いてフィットヘムアグルチニン(phytohemagglutinin)(PHA, Remel, Lenexa, KS)で2日間活性化したヒト末梢血単核細胞からRNAを単離した。ヒトOX40の細胞外ドメインをコードする配列を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応により増幅した。その増幅産物を配列決定し、ヒトOX40の公開配列(W095/12673, 配列番号1)と同一であることを確認した。その産物を、pfastbac-hFcバキュロウイルスドナープラスミドにインフレームでサブクローニングした。このベクターは、pfastbacプラスミド(Invitrogen Corp.)とヒトIgG1のFc部分(「hIgG1」)とから作製した。hIgG1配列をPV111392.fcベクターから切除した。ヒトOX40:hIgG1融合タンパク質(hOX40:hFc)をコードする組換えバキュロウイルスを作製し、タンパク質産生のために、Trichoplusia ni High-Five BTI-TN-5b1-4(「Tn5」)昆虫細胞(Invitrogen Corp.)をhOX40:hFc組換えバキュロウイルスに感染させた。全長OX40配列を増幅し、真核細胞での発現のためにpCDNA3.1ベクター(Invitrogen Corp.)にクローニングした。EL-4(ATCC TIB-39)およびCHO-K1(

40

50

ATCC CCL-61)細胞をlipofectamine 2000(Invitrogen Corp.)を用いてトランスフェクトし、それぞれ、ハイグロマイシンB(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)またはジェネティシン(Invitrogen Corp.)を用いて安定な形質転換体を選択した。hOX40:hFcは、グルタルアルデヒド結合によりオボアルブミンとコンジュゲートした。1mgのhOX40:hFcをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)1ml中オボアルブミン(Pierce, Rockford, EL)0.5mgと混合した。50 μ lの1%EMグレードのグルタルアルデヒド(gluataraldehyde)(Sigma, St. Louis, MO)をゆっくりと加え、5分間穏やかに振盪して溶液を混合した。室温で3時間後、50 μ lの1Mエタノールアミン(pH7)を加え、その溶液をさらに2時間インキュベートし、その後、NAP10カラム(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)についてリン酸緩衝生理食塩水とバッファー交換を行った。

10

【 0 1 9 2 】

開始コドン(ATG)からヒトOX40細胞外ドメインを通してヒトFc配列(下線)の末端に至るヒトOX40:ヒトIgG1融合タンパク質のヌクレオチド配列 配列番号1

【化 1】

ATGTGCGTGG GGGCTCGGCG GCTGGGCCGC GGGCCGTGTG CGGCTCTGCT CCTCCTGGGC 60
 CTGGGGCTGA GCACCGTGAC GGGGCTCCAC TGTGTCGGGG ACACCTACCC CAGCAACGAC 120
 CGGTGCTGCC ACGAGTGCAG GCCAGGCAAC GGGATGGTGA GCCGCTGCAG CCGCTCCCAG 180
 AACACGGTGT GCCGTCCGTG CGGGCCGGGC TTCTACAACG ACGTGGTCAG CTCCAAGCCG 240
 TGCAAGCCCT GCACGTGGTG TAACCTCAGA AGTGGGAGTG AGCGGAAGCA GCTGTGCACG 300 10
 GCCACACAGG ACACAGTCTG CCGCTGCCGG GCGGGCACCC AGCCCCTGGA CAGCTACAAG 360
 CCTGGAGTTG ACTGTGCCCC CTGCCCTCCA GGGCACTTCT CCCCAGGCGA CAACCAGGCC 420
 TGCAAGCCCT GGACCAACTG CACCTTGGCT GGAAGCACA CCCTGCAGCC GGCCAGCAAT 480
 AGCTCGGACG CAATCTGTGA GGACAGGGAC CCCCAGCCA CGCAGCCCCA GGAGACCCAG 540
 GGCCCCCGG CCAGGCCCAT CACTGTCCAG CCCACTGAAG CCTGGCCCAG AACCTCACAG 600
 GGACCCTCCA GATCTTGTGA CAAAATCAC ACATGCCAC CGTGCCAGC ACCTGAACTC 660 20
CTGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTTTCCCC CAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC 720
CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG 780
TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG 840
CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG 900
AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA 960 30
ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCATCC 1020
CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC 1080
AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAACTA CAAGACCACG 1140
CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG 1200
AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC 1260
CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT CCGGGTAAAT GA 1320 40

【 0 1 9 3 】

ヒトIgG1のFc部分（下線）と融合されたヒトOX40細胞外ドメインのアミノ酸配列 配列
番号2

【化2】

MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60
 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120
 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180
 GPPARPITVQ PTEAWPTSQ GPSRSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS 240
RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE OYNSTYRVVS VLTVLHODWL 300
NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGOPR EPOVYTLPPS RDELTKNOVS LTCLVKGFYP 360
SDIAVEWESN GOPENNYKTT PVLDSGSGF FLYSKLTVDK SRWOOGNVFS CSVMEALHN 420
HYTOKSLSLG PGK 433

10

【0194】

マウス：ヒト免疫グロブリン領域をコードするヒト染色体断片を含むヒト染色体導入KM mice (商標) (WO 02/43478、WO 02/092812、Ishida, ら, IBC's 11th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2000); Kataoka, S. IBC's 13th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2002))をKirin Brewery Co., Ltd., Japanから入手し、La Jolla Institute for Allergy and Immunologyの動物施設に収容した。ヒト抗体を作製するための技術の概要はLonbergにより記載されている(Lonberg, ら, *Int Rev Immunol* 13(1):65-93 (1995))。例えば、米国特許第5,939,598号では、内因性免疫グロブリンを発現しない1つ以上のヒト免疫グロブリン遺伝子(または)を有するトランスジェニック動物が記載されている。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さらなる方法も記載されている(例えば、WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; 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5,939,598参照)。ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するウシ、TCウシの開発については、(Kuroiwa, ら, *Nat Biotechnol* 20(9): 889-94 (2002); Kuroiwa, ら, *Nat Genet* 36(7): 775-80 (2004))に記載されている。

20

30

【0195】

免疫：hOX40:hFc組換えタンパク質を、等量の完全フロイントアジュバント(CFA, Sigma)と混合し、エマルジョンを調製した。マウスを、10~25 µgのタンパク質を用いて腹腔内に免疫し、不完全フロイントアジュバント(IFA, Sigma)中に乳化した5~10 µgのタンパク質を用いて、2~4回の追加免疫を2週間間隔で腹腔内に行った。融合の5日前に、アジュバントを用いずに5~10 µgの可溶性hOX40:hFcの最終腹腔内注射を行った。別の群のマウスは、PBS中80 で10分間のインキュベーションにより熱変性し、その後、RIBIアジュバント(Sigma)と1:1で混合したhOX40:hFcを用いて免疫した。マウスは、上記のように免疫した。第3の群のマウスは、オポアルブミンとコンジュゲートされたhOX40:hFcを用いて免疫した。マウスは、RIBI中、30 µgのhOX40:hFc-OVA単独またはhOX40:hFcとの混合物、それぞれ10 µgおよび20 µgを用いて感作した。前者のものは、RIBI中30 µgのhOX40:hFc-OVA、続いて、RIBI中10 µgのhOX40:hFcの追加免疫を2週間間隔で受けた。5週間後にPBS中20 µg hOX40:hFc-OVAの最終追加免疫を行った。後者の群の2回の追加免疫は、2週間間隔でRIBI中5 µg hOX40:hFc-OVA+10 µg hOX40:hFcで構成され、PBS中10 µg hOX40:hFcの最終追加免疫を行った。全ての注射は腹腔内とした。最後の群のマウスは、PHA(1 µg/ml)および組換えヒトインターロイキン2(IL2, 10ng/ml, BD Pharmingen, San Diego, CA)を用いて2日間刺激したCD4+ヒトT細胞を用いて免疫した。CD4+ヒトT細胞は、注射の前に、セシウム源から25Gyの照射を行い、RIBIアジュバントで1:1希釈した。

40

【0196】

50

ハイブリドーマの作製：モノクローナル抗体の作製のため、血清中の抗OX40 IgG特異的抗体の最高力価を有するマウスを選択した。脾臓を摘出し、50%ポリエチレングリコール(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)を用いて単細胞懸濁液を骨髓腫細胞系(SP2/O-Ag14)(ATCC, Rockville, MD)と3:1比で融合した。それらの融合物を96ウェル平底プレートに最適密度でプレATINGし、10%CO₂、37 °Cのインキュベーター内で完全DMEM-10培地(10%ウシ胎児血清(FBS, Invitrogen Corp.)を含有するダルベッコの改変イーグル培地)、1%非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン、100 µg/ml硫酸ストレプトマイシン(全てBioWhittaker, Walkersville, MDのもの)、HATサプリメント(Sigma)、および10%ハイブリドーマクローニングファクター(HCF, Biovaris, San Diego, CA)で培養した。4融合物の約4000ウェルをELISAによりヒト含有OX40特異的抗体についてスクリーニングした。ヒト抗ヒトOX40 IgG抗体は、フローサイトメトリー解析により確認した。陽性のウェルを増殖させ、3~4回の限界希釈クローニングに供して、モノクローナル抗体を得た。

10

【0197】

抗体およびタンパク質の精製：抗体精製のため、ハイブリドーマを2lローラーボトル中350ml~1l/ボトルでまたは1l Integra system(INTEGRA Bioscience, Inc. Ijamsville, MD)中で、超低IgGウシ胎児血清(Invitrogen Corp.)を補給したハイブリドーマ-SFM培地(Invitrogen Corp.)を用いて培養した。1lのTn5細胞を4日間感染させることによってヒトOX40:hFc 組換えタンパク質を生成させた。ヒトモノクローナル抗体およびOX40:hFc を、リコンビナントプロテインA-セファロースファストフローゲル(recombinant Protein A-Sepharose Fast Flow gel)(Amersham Biosciences)を用いて培養培地から精製した。ローラーボトルで得られた馴化培地をまず、Ultrasette 接線流システム(Pall Corp., East Hills, NY)を用いて濃縮した。その馴化培地を、0.22 µm 真空フィルターユニット(Millipore, Bedford, MA)を用いて濾過し、培地中のヒト抗体の量に適したサイズのプロテインA-セファロースファストフローカラム(Amersham Biosciences)に流した。そのカラムを、20カラム容量のPBSを用いて十分に洗浄し、抗体を、0.1M Gly-HCl、pH3.6、0.15M NaClを用いて溶出し、1M-Tris-HCl、pH8.0を用いて中和した。画分をSDS-PAGEにより解析し、陽性画分をプールし、遠心式濃縮機(Vivaspin, 50,000 MWCO: Sartorius, Gettingen, Germany)を用いて濃縮した。PBS、pH7.4へのバッファー交換のため、Sephadex G-25脱塩カラム(NAP, Amersham Biosciences)を用いた。最後に、0.22 µm孔径のシリンジフィルターを用いて抗体を濾過滅菌し、抗体濃度をLowry法により測定した。発熱物質含量はエンドトキシン(Limulus Amebocyte Lysate)(「LAL」)試験(Associates of Cape Cod, Falmouth, MA)を用いて測定した。このアッセイの検出限界は0.06EU/mgである。この試験が陰性の場合には、サンプルはエンドトキシンを含まないとみなした。

20

30

【0198】

ヒトIgG定量ELISA：上清および精製ストック中に存在するヒト抗体の量を決定するために次のプロトコルを用いた。ヤギ抗ヒトFc 特異的抗体(Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA)を96ウェルプレート(Nunc, Denmark)に、炭酸バッファーにより0.5 µg/ウェルにて37 °Cで1時間コーティングした。それらのプレートを、次いで、Superblock(Pierce, Rockford, IL)を用いて30分間遮断し、続いて、そのプレートにサンプルを加えた。標準曲線は、全ヒトIgG(Sigma)あるいは精製ヒトIgG1またはIgG4(Kirin Brewery Co., Ltd)を用いて作成した。プレートを37 °Cで1時間インキュベートし、PBS/1%BSA/0.1%Tween20(Sigma)で洗浄し、結合した抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP, Jackson Immunoresearch)とコンジュゲートされたヤギ抗ヒトFc 特異的抗体を用いて37 °Cで1時間検出した。TMB基質(Sigma)を10分間加え、H₂SO₄(LabChem Inc., Pittsburgh, PA)を用いて反応を停止させた。光学密度(OD)を450nmにおいてマイクロプレートリーダーで測定した。

40

【0199】

OX40特異的抗体検出ELISA：ハイブリドーマによる抗体力価、特異性、および産生をELISAにより決定した。簡単に説明すると、96ウェル平底プレートを50 µlのhOX40:hFcで、炭酸

50

バッファー (pH9.4) 中 $5 \mu\text{g/ml}$ にて 4°C で一晩または 37°C で1時間コーティングした。PBS/0.1% Tween 20を用いて2回洗浄した後、プレートを、PBS/1%BSA/0.1%Tween20を用いて 37°C で1時間遮断した。血清、上清、または精製抗体をブロッキングバッファーで希釈し、ウェルに加え、プレートを 37°C で1時間インキュベートした。それらのプレートを、PBS/0.1% Tween 20を用いて4回洗浄し、ペルオキシダーゼコンジュゲートヒツジ抗ヒト 検出抗体 (The Binding Site, Birmigham, UK) を1:2000希釈で加えた。 37°C で1時間のインキュベーション後、それらのプレートを洗浄し、TMB(Sigma)基質を加え、室温で10~30分間インキュベートした。 H_2SO_4 (LabChem)を用いて反応を停止させ、光学密度を450nmにおいてマイクロプレートリーダーで測定した。

【0200】

フローサイトメトリー：抗体力価、特異性、および相対的結合親和性を、ヒトOX40安定CHO-K1形質転換体または3日PHA+IL2で活性化したヒトPBMCを用いてフローサイトメトリー解析により決定した。細胞を染色バッファー：PBS+2%FBS+0.1% NaN_3 +10mM EDTAで1回洗浄した後、 $50 \mu\text{l}$ 量の血清、上清、または精製抗体に再懸濁した。それらの細胞を抗体とともに氷上で20分間インキュベートし、染色バッファーで2回洗浄した後、抗ヒトIgG-フィコエリトリン標識二次抗体に再懸濁した。2つの異なる抗体を用いた：(1)ヤギ抗ヒトIgG(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)または(2)マウス抗ヒトIgG(BD Pharmingen, San Diego, CA)。氷上で20分のインキュベーション後、細胞を1回洗浄し、1%パラホルムアルデヒドを用いて10分固定した。最終洗浄後、それらの細胞を染色バッファーに再懸濁し、FACScanまたはFACS Calibur フローサイトメーター(Becton Dickinson Biosciences, Palo Alto, CA)を用いてサンプルを得、Cellquest(Becton Dickinson Biosciences)またはFlow Jo(TreeStar, Inc., San Carlos, CA)ソフトウェアを用いてデータを解析した。また、活性化T細胞は、マウス抗ヒトOX40抗体 L106(Becton Dickinson)でも染色した。このマウス抗ヒトOX40抗体 L106を、フィコエリトリンと直接コンジュゲートさせるか、またはその結合を抗マウスIgG-PE(Southern Biotechnology Associates.)を用いて検出した。

【0201】

OX40Lブロッキングアッセイ：抗ヒトOX40抗体が可溶性OX40とのOX40Lの結合を遮断(block)することができるかどうかを判定するために、ELISAプロトコールとフローサイトメトリープロトコールの両方を用いた。ELISAでは、96ウェルNunc社製平底プレートを組換え可溶性hOX40:hFcで、炭酸バッファー (pH9.4) 中 $2 \mu\text{g/ml}$ にて 37°C で1時間コーティングした。それらのプレートを、PBS/0.1% Tween 20を用いて洗浄し、ウェルにSuperblock(Pierce)を加えて、非特異的結合を遮断した。試験抗体をPBS/Tweenで $1 \mu\text{g/ml}$ に希釈し、プレートに加えた。 37°C で1時間のインキュベーション後、適当なウェルにFLAGタグ付き組換え可溶性ヒトOX40L(Alexis Biochemicals, San Diego, CA)を加え、抗OX40抗体を洗い流さなかった。1時間のインキュベーション後、プレートを洗浄し、ウェルに抗FLAG-ペルオキシダーゼコンジュゲート抗体(Sigma)を 37°C で1時間加えた。TMB基質を加え、10分後、 H_2SO_4 を用いて反応を停止させ、その結果を450nmにおいてマイクロプレートリーダーを用いて読み取った。フローサイトメトリーによるアッセイでは、ヒトCD4+T細胞を精製し、PHA+IL2を用いて2日間活性化した。それらの細胞を洗浄し、染色バッファー中に再懸濁した後、漸増量 ($0.005 \sim 50 \mu\text{g/ml}$) のヒト抗ヒトOX40抗体とともに氷上で20分間インキュベートした。次いで、それらの細胞に可溶性組換えOX40L-FLAGを加えた。それらの細胞を洗浄し、抗FLAGコンジュゲートPE(Sigma)とともにインキュベートした。もう1回洗浄した後、それらの細胞を1%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、FACScanまたはFACS Caliburで解析した。阻害率は、次式： $\% \text{阻害率} = 100 - ((\text{サンプル} / \text{最大結合}) * 100)$ によりODまたは陽性率を利用して決定した。

【0202】

抗OX40抗体クロスブロッキングアッセイ：これらの抗体がヒトOX40の同じ「エピトープ」と結合するかどうかを判定するために、ELISAプロトコールを用いた。Nunc社製96ウェル平底ELISAプレートを炭酸バッファー中のヒト抗ヒトOX40抗体で $2 \mu\text{g/ml}$ にて 37°C で1時間

10

20

30

40

50

コーティングした。それらのプレートを洗浄した後、PBS/1%BSA/Tween 20を用いて遮断した。次いで、2~20 µg/mlのヒト抗ヒトOX40抗体およびマウス抗ヒトOX40抗体 L106(BD Biosciences, San Jose, CA)、クローン 315(Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)、またはACT35(BD Pharmingen)を2 µg/ml組換えヒトOX40:mFc融合タンパク質(Alexis Corporation, San Diego, CA)とともに室温で30分間プレインキュベートした。そのプレートに抗体-OX40:mFcタンパク質の組合せを加え、37 °Cで1時間インキュベートした。3回洗浄した後、結合したOX40:mFcを、ペルオキシダーゼコンジュゲートヒツジ抗マウスIg(Amersham Biosciences)を用いて検出した。上記のように、ELISAを完了した。阻害率は、次式： $\%阻害率 = 100 - ((\text{サンプル}/\text{最大結合}) * 100)$ により各サンプルのODを用いて決定した。これらのヒト抗ヒトOX40抗体がマウス抗ヒトOX40抗体を遮断するかどうかを判定するために、このELISAの変形を実施した。その方法は、マウス抗ヒトOX40抗体をプレートにコーティングし、112V8、112F32、112Y131、および112Z5をヒトOX40:hFcタンパク質とともにプレインキュベートしたことを除けば、同じであった。コーティング抗体とのOX40タンパク質の結合は、ヒツジ抗ヒトIgG-セイヨウワサビペルオキシダーゼ二次抗体(Amersham Biosciences)を用いて検出した。

10

【0203】

また、フローサイトメトリーによるアッセイを用いて、抗体が相互にクロスブロックするかどうかを判定した。ヒトCD4 T細胞は、以下に記載するように、末梢血単核細胞から精製し、1 µg/mlフィトヘムアグルチニン(phytohemagglutinin)(Remel, Lenexa, KS)および10ng/ml組換えヒトインターロイキン2(BD Pharmingen)を用いて2~3日間活性化した。それらの細胞を洗浄し、2%ウシ胎児血清、および0.1%アジ化ナトリウムを補給したPBS中10 µg/mlの試験抗体を用いて氷上で30分間標識した。洗浄せずに、それらのウェルにビオチン化型の同じ抗体を10 µg/mlに加え、細胞を氷上でさらに30分間インキュベートした。次いで、それらの細胞を、バッファーを加え、1200RPMにて4 °Cで3分間回転させることにより洗浄した。ビオチン化抗体の結合は、ストレプトアビジン-フィコエリトリン(SA-PE, BD Pharmingen)との20分間のインキュベーションの後に、記載したようにもう1回洗浄することによって検出した。それらの細胞を1%パラホルムアルデヒド(paraformaldehyde)を用いて10分固定した。最終洗浄後、それらの細胞を染色バッファー中に再懸濁し、FACS Calibur フローサイトメーター(Becton Dickinson Biosciences, Palo Alto, CA)を用いてサンプルを得た。データは、Cellquest(Becton Dickinson Biosciences)またはFlow Jo(TreeStar, Inc., San Carlos, CA)ソフトウェアを用いて解析した。試験抗体には、112F32、112V8、112Y55、112Y131、112Z5、抗DNP(ヒトIgG1陰性対照)、マウス抗ヒトOX40抗体、クローン L106 クローン 315、およびクローン ACT35を含めた。阻害率は、次式： $100 - (\text{試験抗体の幾何平均}/\text{最大幾何平均}) * 100$ を利用して決定した。抗体自体の結合だけでなく相互の結合の阻害についても抗体を試験した。

20

30

【0204】

全血からのヒトPBMCの精製：Scripps Green Hospital(La Jolla, CA)において標準血液ドナープログラムにより18~50歳の健康なドナーから全血を採取した。凝固を防ぐために、ヘパリンを加えた。人種、民族性、または性別は指定しなかった。血液をPBSで希釈した後、Ficoll-Plaque Plus(Amersham Biosciences)を下に敷いた。単核細胞を血清および血小板から、1800RPMで遠心分離すること(ブレーキをかけない)により分離した。PBMCを含有する界面を集め、PBSを用いて2回洗浄した。

40

【0205】

CD4+T細胞の精製：ヒトCD4+T細胞を、Miltenyi Biotec.社(Auburn, CA)製のネガティブアイソレーションキット(a negative isolation kit)を用いて精製した。PBMCを、CD8、CD11b、CD16、CD19、CD36、およびCD56に特異的なハプテンコンジュゲート抗体ミックスを用いてPBS/0.5%BSA/2mM EDTA中4 °Cで15分間標識した。2回洗浄した後、それらの細胞を抗ハプテン磁性ビーズ(MACSビーズ)中に再懸濁し、細胞を40 °Cで15分間インキュベートした。次いで、それらの細胞を洗浄し、事前洗浄し磁石中に挿入したLS/VS+カラムにアプライした。そのカラムを、バッファーを用いて3回洗浄する。「付着していない」CD4+細胞は

50

カラムからの素通り中に存在した。純度は、ともに蛍光色素(BD Pharmingen)と直接コンジュゲートされた、ヒトCD3およびヒトCD4に特異的な抗体を用いて、フローサイトメトリー解析により確認した。あるいは、CD4マイクロビーズ(Miltenyi Biotec.)を用いてCD4+細胞に正の選択をもたらした。その手順は、磁石からカラムを外し、プランジャーを用いて5mlのバッファーをカラムに通して送ることによって、カラムに付着した細胞を溶出したことを除けば、上記と類似している。

【0206】

混合リンパ球反応アッセイ：2ドナー由来のPBMCを精製し、各ドナー由来の 1×10^5 細胞を、ヒト抗ヒトOX40抗体または陰性対照ヒトIgG4(抗ヒト血清アルブミン, Kirin Brewery Co., Ltd.) (Ukyo, ら, Immunology 109(2):226 (2003))の存在または不在で96ウェルU底プレートに加えた。研究に応じて、0.005~100 $\mu\text{g/ml}$ の抗体を試験した。複数のドナー対を試験した。用いた培地は、10%ヒトAB血清(MP Biomedical, Irvine, CA)、ペニシリン/ストレプトマイシン、L-グルタミン、および2-メルカプトエタノールを補給したRPMI-1640であった。第6日目、培養の最後の18時間、 $1 \mu\text{Ci}$ トリチウム化チミジン($^3\text{HTdR}$)を各ウェルに加えた。それらの細胞を溶解し、ガラスフィルターマットに移し、それらのガラスフィルターマットをシンチレーションカウンター(Wallac, Turku, Finland)を用いて計数した。

10

【0207】

急性移植片対宿主病 In Vivoモデル：5~10週齢の重症複合免疫不全(SCID)雄マウスに20 μg ラット抗マウスIL2受容体鎖抗体(TM 1, Tanaka, ら, J Exp Med 178(3): 1103-7 (1993))を注射して、内因性ナチュラルキラー細胞を枯渇させた。翌日それらのマウスにセシウム源を用いて2.5Gyの照射を行った。4時間後、それらのマウスに腹腔内注射によりPBS中1000万個の全ヒトPBMCを与え、続いてすぐに100 μl PBS中2 μg 、20 μg 、100 μg 、または200 μg にてヒト抗ヒトOX40または陰性対照ヒトIgG1(抗ジニトロフェノール(抗DNP), Kirin Brewery Co. Ltd.)抗体の静脈内注射を行った。また、抗体処置を第3日または第6日まで遅らせて、抗OX40抗体の治療可能性を試験した。マウスは、3~4日おきに重量を測定し、週に1回、抗IL2R抗体を与えた。第12日目にマウスを殺し、グロス病理について評価した。フローサイトメトリー解析用に脾臓を、組織学用に肝臓および腸を摘出し、ヒトサイトカインおよび抗体解析用に血清を採取した(Watanabe, ら, Clin. Immunol. 120:247 (2006))。

20

30

【0208】

慢性移植片対宿主病 In Vivoモデル：慢性GVHDのモデルは、急性異種GVHDモデルから適合させたものである(Watanabe, ら, Clin. Immunol. 120:247 (2006))。正の選択を受けたヒトCD4 T細胞を、上記と同様に調製したSCIDマウスに移植することにより疾患を誘発した。マウスに第0日目に腹腔内注射により100万個の、正の選択を受けたCD4 T細胞を与え、さらに第0日目から週に1回、静脈内注射により2 μg 、20 μg 、もしくは100 μg 抗OX40または対照抗体を与えた。疾患は30日までにははっきりと表れ、第48日目にマウスを評価した。フローサイトメトリー用に脾臓およびリンパ節を、組織学用に皮膚および肺を摘出し、ヒトサイトカイン解析用に血清を取り出した。

40

【0209】

ヒトサイトカイン解析：マウス血清中の8種のヒトサイトカインのパネルを、複合技術を用い、製造業者の使用説明書(Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)に従って測定した。

【0210】

ヒトナチュラルキラー細胞の精製：ヒトナチュラルキラー(「NK」)細胞を、Miltenyi Biotec.社(Auburn, CA)製のネガティブアイソレーションキットを用いて精製した。PBMCを、T細胞、B細胞、幹細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、および赤血球細胞に特異的なビオチンコンジュゲート抗体ミックスを用いてPBS/0.5%BSA/2mM EDTA中4で15分間標識した。これに続けて、抗ビオチン磁性ビーズ(「MACSビーズ」)を加えた。それらの細胞を4で15分間インキュベートした後、洗浄し、予洗浄し磁石中に挿入しておいたLS/VS+カラムにアプライした。そのカラムを、バッファーを用いて3回洗浄した。「付着していない」CD5

50

6+NK細胞はカラムからの素通り中に存在した。純度は、ともに蛍光色素(BD Pharmingen.)と直接コンジュゲートされた、ヒトCD56およびヒトCD3に特異的な抗体を用いて、フローサイトメトリー解析により確認した。

【0211】

抗体依存性細胞傷害アッセイ(ADCC)：ヒトPBMCからNK細胞を精製し、そのNK細胞を、10%ヒトAB血清(MP Biomedical, Irvine, CA)、ペニシリン/ストレプトマイシン、L-グルタミン、および2-メルカプトエタノールを補給したRPMI-1640中20ng/ml組換えヒトインターロイキン2(BD Pharmingen)とともに48時間培養した。Cytotox 96 non-radioactive cytotoxic assay(Promega Corp., Madison, WI)ではこれらの細胞をエフェクター細胞として使用した。標的細胞は親またはヒトOX40トランスフェクトEL-4細胞とした。5000個の標的細胞を、丸底96ウェル組織培養プレート中で、0.005~10 μg/mlの抗ヒトOX40抗体または対照抗体とともに氷上で30分間インキュベートした。それらのウェルに20倍の数のエフェクターNK細胞を最終容量100 μlで加え、プレートを200xgにて3分間回転させた後、5%CO₂にて37 °Cで4時間のインキュベーションを行った。それらのプレートを250xgにて5分間回転させ、50 μlの上清をELISAプレートに移した。それらのプレートにアッセイバッファーを容量50 μlで加えた。室温で30分間のインキュベーション後、ウェルに50 μlの停止溶液を加え、490nmにおける吸光度を測定した。必要な対照として、標的細胞単独(自然発生)、インキュベーションの最後の45分間溶解バッファーで処置した標的細胞単独(最大)、エフェクター細胞単独、溶解バッファーを加えた(容量補正)および加えない培地単独を入れたウェルを含めた。特異的溶解率は、全てのウェルから培地バックグラウンドを差し引き、標的最大値から容量補正值を差し引いた後に次式を利用して決定される。細胞傷害率(%) = ((実験値 - エフェクター自然発生 - 標的自然発生) / (標的最大 - 標的自然発生)) * 100。

【0212】

ヒト抗OX40抗体遺伝子の単離：112V8抗体(IgG4)を産生する培養ハイブリドーマ細胞(112V8(ATCC番号PTA-7219、2005年11月17日寄託))を遠心分離により集めた。これらの細胞からRNeasy kit(QIAGEN Inc., Valencia, CA)を製造業者の使用説明書に従って用いて全RNAを精製した。全ハイブリドーマ細胞RNAの免疫グロブリン遺伝子可変領域をコードするcDNAのクローニングにはSMART RACE(商標)cDNA Amplification Kit(Clontech Co., Ltd., Palo Alto, CA)を用いた。簡潔には、2 μgのRNAから逆転写酵素により第1鎖cDNAを調製した。このcDNAをポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)の鋳型として用いて、重鎖および軽鎖の可変領域と定常領域の一部(それぞれ「HV」および「LV」)を増幅した。増幅する配列にはリーダー配列も含めた。その反応物は次のとおりであった：2.5U Pfu Ultra DNA polymerase(Stratagene, La Jolla, CA)；0.2 μM 3'Primer(重鎖の場合：IgG1p、軽鎖の場合：hk5、表1)；1X Universal Primer Mix A(5'末端用)(UMP Primer Mix AはSMART RACE Kitに含まれている)；200 μM dNTP mix；1mM MgCl₂；Pfu Ultra Buffer(終濃度は1xである)；およびcDNA鋳型。

【0213】

サーモサイクリングプログラムは、94 °C x30秒、72 °C x3分間：5サイクルとした。94 °C x30秒、70 °C x30秒、72 °C x3分間：5サイクル。94 °C x30秒、68 °C x30秒、72 °C x3分間：20~5サイクルの後、72 °C x7分間で伸長を行った。増幅したDNA断片は、アガロースゲル電気泳動により集め、QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen Co., Ltd., Germany)により精製した。HVおよびLVの精製DNA断片を、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit(Invitrogen Corp.)を用いてpCR4 Blunt-TOPOベクターに組み込み、各構築プラスミドを大腸菌に形質転換した後、クローニングした。構築プラスミド中の各インサート(HVおよびLV)のヌクレオチド配列を、特定のプライマー(M13F、M13R、表1)を用いて解析した。HVおよびLVから得られる配列に基づき、VH(V8H38、V8H39)およびVL(V8L42、V8L43)を増幅するように、オリゴヌクレオチドプライマーを設計した(表1)。

【0214】

112V8 VHおよびVLをIgG1発現ベクターにクローニングした。簡潔には、PCRによりHVの可変領域を増幅するように、5'-SalI制限酵素認識部位および3'-NheI制限酵素認識部位を

含有するオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。PCRは、Pfu Ultra DNA polymeraseにより鑄型としてpTopoV8VH miniprep DNAを、プライマーとしてV8H38およびV8H39(表1)を用いて行った。PCR産物をNheIおよびSallを用いて消化した後、410bp断片を、NheIおよびSallを用いて事前に消化したIgG1発現ベクター(IDE C Pharmaceuticals, San Diego, CA, N5KG1-Val Lark(N5KG1の修飾ベクター、米国特許第6,001,358号))(8.9キロベースのDNA断片)にサブクローニングした。HVの可変領域の存在は制限消化により解析した。

【0215】

第2のステップとして、LVをN5KG1-Val Lark-VHベクターに次のとおり挿入した：DNAベクターを2つのDNA制限酵素、BglIIおよびBsiWIにより消化し、9.1kb DNA断片を単離した。重鎖構築物と同様に、LVのPCR用のプライマーセットを、5'BglIIおよび3'BsiWIの認識部位を含有するように設計した。これらのプライマー、V8L42およびV8L43を用いて、pTopoV8VL miniprep plasmid DNAからVLを増幅した。PCR産物を、BglIIおよびBsiWIを用いて消化し、アガロースゲル電気泳動およびゲル精製により単離した。V8VLを含有するこの断片を、T4 DNAリガーゼを用いて調製した9.1kbベクターと連結し、そのように連結したものを、Top10細胞(Invitrogen Corp.)を形質転換した。陽性大腸菌形質転換体を選択し、この発現ベクター、pG1K112V8を精製し、112V8LV領域と112V8HV領域の両方の存在を制限解析により確認した。

【0216】

同じプロトコルを用いて112Y55(ATCC番号PTA-7220、2005年11月17日寄託)、112Y131(ATCC番号PTA-7218、2005年11月17日寄託)、および112Z5(ATCC番号PTA-7216、2005年11月17日寄託)のHVおよびLV可変領域を単離し、配列決定した。特定のHVおよびLVの増幅に用いたプライマーを表1に挙げている。

【0217】

抗体のサブクラスによって、二次的エフェクター機能、例えば補体活性化またはFc受容体(FcR)結合および抗体依存性細胞傷害(ADCC)はある程度決まる(Huber, ら, Nature 229(5284): 419-20 (1971); Brunhouse, ら, Mol Immunol 16(11): 907-17 (1979))。特定用途に最適な種類の抗体を同定する際には、抗体のエフェクター機能が検討され得る。例えば、hIgG1抗体は、相対的に長い半減期を有し、補体を固定するのに非常に効果的であり、かつそれらの抗体はFcRIおよびFcRIIの両方と結合する。これに対し、ヒトIgG4抗体は、半減期はより短く、補体を固定せず、かつFcRに対する親和性はより低い。IgG4のFc領域においてセリン228がプロリンとの置換(S228P)を受けると、hIgG4で認められる多様性は減少し、血清半減期は伸びる(Kabat, ら, Sequences of proteins of immunological interest 第5版 (1991).; Angal, ら, Mol Immunol 30(1): 105-8 (1993))。ロイシン235がグルタミン酸と置換される第2の突然変異(L235E)により、残るFcR結合活性と補体結合活性は消失する(Alegre, ら, J Immunol 148(11): 3461-8 (1992))。結果として得られた、両方の突然変異を有する抗体はIgG4PEと呼ばれている。hIgG4アミノ酸のナンバリングはKabatによるものである(Kabat, ら, Sequences of proteins of immunological interest 第5版 (1991))。

【0218】

組換え112V8 IgG4PEを発現するベクターは、NheIおよびBglIIを用いてpG1K112V8を消化して、112V8VHおよび112V8VLを含有する断片を放出することにより作製した。これを、同じ酵素を用いて切断したIgG4PE発現ベクター(pN5KG4PE-Lark, IDE C Pharmaceuticals, 米国特許第6,001,358号)と連結した。結果として得られたプラスミド、pG4PEK112V8を制限消化により確認した。

【0219】

同様に、組換え112F32G1および112F32G4抗体を産生するためのベクターを、112F32ハイブリドーマ(ATCC番号PTA-7217、2005年11月17日寄託)由来のRNAを用いて作製し、RACE反応における重鎖および軽鎖遺伝子の増幅に用いた3'プライマーは、それぞれ、HH-2およびHK-2であった。112F32HVの増幅はH725'およびM2H3'を用いて行った。112F32LV増幅プライマーはF32K5'およびK52D3'であった(表1)。IgG4発現ベクター pN5KG4はIDE C Pharmac

euticalsから入手した(米国特許第6,001,358号)。結果として得られたベクター、pKLG1/F32K3HおよびpKLG4/F32K3Hを制限酵素消化および配列決定により確認した。

【0220】

112F32 HVのcDNAのヌクレオチド配列(開始コドン(ATG)から可変領域末端まで) 配列番号3

【化3】

ATGGAGTGGG GGCCGTGCTG GGTTCCTT GTTGTATTTTAGAAGGTGT CCAGTGTGGG 60
 GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG GGGGGTCCCT GAGACTCTCC 120
 TGTGCAGCCT CTGGATTCAC CTTCAGTAGC TATAGCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA 180
 GGAAGGGGC TGGAGTGGGT TTCATACATT AGTAGTAGTA GTAGTACCAT ATACTATGCA 240
 GACTCTGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATG CCAAGAACTC ACTGTATCTG 300
 CAAATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG AGGAGTGTAT 360
 CACAATGGCT GGTCCCTCTT TGACTACTGG GGCCAGGGAA CCCTACTCAC CGTCTCCTCA 420

10

【0221】

112F32 LVのcDNAのヌクレオチド配列(開始コドン(ATG)から可変領域末端まで) 配列番号4

【化4】

ATGGACATGA GGGTCCTCGC TCAGCTCCTG GGGTCCTGC TGCTCTGTTT CCCAGGTGCC 60
 AGATGTGACA TCCAGATGAC CCAGTCCCCA TCCTCACTGT CTGCATCTGT AGGAAACAGA 120
 GTCACCATTA CTTGTGCGGC GAGTCAGGAT ATTAGCAGCT GGTTAGCCTG GTATCAGCAG 180
 AAACCAGAGA AAGCCCCTAA GTCCCTGATC TATGCTGCAT CCAGTTTGCA AAGTGGGGTC 240
 CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG 300
 CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGC CAACAGTATA ATAGTTACCC CCTCACCTTC 360
 GGCCAAGGGA CACGACTGGA GATTAACGA 390

30

【0222】

112V8 HVのcDNAのヌクレオチド配列(開始コドン(ATG)から可変領域末端まで) 配列番号5

【化5】

ATGGACACAC TTTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTTTCATGGGT CTTGTCCCAG 60
 ATCACCTTGA AGGAGTCTGG TCCTACGCTA GTGAAGCCCA AACAGACCCT CACGCTGACC 120
 TGCACCTTCT CTGGATTCTC ACTCAGCACT AGTGGAATGG GTGTGGGCTG GATCCGTCAG 180
 CCCCCAGGAA AGGCCCTGGA GTGGCTTGCA GTCATTTATT GGGATGATCA TCAACTCTAC 240
 AGTCCATCTC TGAAGAGCAG GCTCACCATC ACCAAGGACA CCTCCAAAAA CCAGGTGGTC 300
 CTTACAATGA CCAACATGGA CCCTGTGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC ACACAGACGA 360
 GGGGCCTTCC AGCACTGGGG CCAGGGCACC CTGGTCACCG TCTCCTCAGC TTCCACCAA 419
 GGGC 423

10

【0223】

112V8 LVのcDNAのヌクレオチド配列(開始コドン(ATG)から可変領域末端まで) 配列番号6

【化6】

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCAGA TACCACCGGA 60
 GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC 120
 CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA 180
 CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA 240
 GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG 300
 CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTAGTGTCAG CAGTATGATA GCTCGCTCAC TTTCGGCGGA 360
 GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGAACT 387

20

30

【0224】

112F32 HVのcDNAのアミノ酸配列(リーダー配列(太字)および可変領域) 配列番号7

【化7】

MEWGPCWVFL VVILEGVQCG VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS YSMNWVRQAP 60
 GKGLEWVSYI SSSSSTIYYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRDEDT AVYYCARGVY 120
 HNGWSFFDYW GQGTLLTVSS 140

40

【0225】

112F32 LVのcDNAのアミノ酸配列(リーダー配列(太字)および可変領域) 配列番号8

【化8】

M^{MDMRVLAQLL} GLLLLCFPGA RCDIQMTQSP SLSASVGNR VTITCRASQD ISSWLAWYQQ 60
 KPEKAPKSLI YAASSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC QQYNSYPLTF 120
 GQ^QTRLEIKR 130

50

【 0 2 2 6 】

112V8 HVのcDNAのアミノ酸配列（リーダー配列（太字）および可変領域） 配列番号9

【 化 9 】

MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKESGPTL VKPKQTLTLT CTFSGFSLST SGMGVCWIRQ 60
PPGKALEWLA VIYWDDHQLY SPSLKSRLTI TKDTSKNQVV LTMTNMDPVD TATYYCAHRR 120
GAFQHWGQGT LVTVSSASTK G 141

【 0 2 2 7 】

112V8 LVのcDNAのアミノ酸配列（リーダー配列（太字）および可変領域） 配列番号10

【 化 1 0 】

METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK 60
PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYVCQ QYDSSLTFGG 120
GTKVEIKRT 129

【表 1】

表 1: 合成された DNA プライマー (配列番号 11~37)

番号	名称	配列 5' から 3'	長さ
11	RACEUPS5'	CTAATACGACTCACTATAGGGC	22-マー
12	IgG1p	TCTTGTCCACCTTGGTGTGCTGGGCTTGTG	31-マー
13	HK5	AGGCACACAACAGAGGCAGTTCAGATTTC	30-マー
14	M13F	GTA AACGACGGCCAGTG	18-マー
15	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	17-マー
16	V8H38	GAGAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT	37-マー
17	V8H39	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACACACTTTGCTCCACG	41-マー
18	V8L42	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTC	42-マー
19	V8L43	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC	40-マー
20	HH-2	GCTGGAGGGCACGGTCACCACGCTG	25-マー
21	HK-2	GTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGC	26-マー
22	F725'	ACCGTGTGCGACTGGATTCCAAGGCATTTCCAC	32-マー
23	M2H3'	GGTGCTAGCTGAGGAGACGGTGAC	24-マー
24	F32K5'	AATCAAGATCTGTCAGGACACA	22-マー
25	K52D3'	TATCCCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTC	30-マー
26	Y131HF	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACACACTTTGCTCCACG	41-マー
27	Y131HR	AGAGAGAGA GGCTAGCTG AAGAGA CGGTGA CCATTGT	37-マー
28	Y131LF5	AGAGAGAGA GGTCGACCACCATGG AAACCCAG CGCAGCTT	41-マー
29	Y131LR	AGAGAGAGA GCGTACGTTTGA TTT CCA CCTTGGTCCCTTG	40-マー
30	Y55HF	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACACACTTTGCTCCACG	41-マー
31	Y55HR	AGAGAGAGAGGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCATTGT	37-マー

10

20

30

40

【 0 2 2 8 】

番号	名称	配列 5' から 3'	長さ
32	Y55LF	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTC	42-マー
33	Y55LR	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCCTG	40-マー
34	Z5HF	AGA GAGAGAGGTCGACCACCATGACCATGATTACGCCAAGC	41-マー
35	Z5HR	GAGAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT	37-マー
36	Z5LF	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTC	42-マー
37	Z5LR	AGAGAGAGAGCGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCCTTG	40-マー

10

【 0 2 2 9 】

112Y55 HVのcDNAのヌクレオチド配列 (開始コドン(ATG)から可変領域末端まで) 配列番号38

【 化 1 1 】

ATGGACACAC TTTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTTCATGGGT CTGTGCCAG 60
 ATCACCTTGA AGGAGTCTGG TCCTACGCTG GTGAAACCCA CACAGACCCT CACGCTGTCC 120
 TGCACCTTCT CTGGGTTCTC ACTCAGCACT AGTGGAGTGG GTGTGGGCTG GATCCGTCAG 180
 CCCCAGGAA AGGCCCTGGA ATGGCTTGCA CTCATTCATT GGGATGATGC TGAGCGCTAC 240
 AGTCCATCTC TGAAGAGCAG GCTCACCATC ACCAAGGACA CCTCCAAAAA CCAGGTGGTC 300
 CTTACAATGA CCAACATGGA CCTTGTGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC ACACACCCGG 360
 GGGGCTTTTG ATATCTGGGG CCAAGGGACA ATGGTCACCG TCTCTTCA 408

20

30

【 0 2 3 0 】

112Y55 LVのcDNAのヌクレオチド配列 (開始コドン(ATG)から可変領域末端まで) 配列番号39

【 化 1 2 】

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCAGA TACCACCGGA 60
 GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCATC 120
 CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTTCT TAGCCTGGTA CCAACAGAAA 180
 CCTGGCCAGG CTCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATTTA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA 240
 GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG 300
 CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTAGTGTGAG CAGTATGATA GCTCACGGAC GTTCGGCCAG 360
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA A 381

40

【 0 2 3 1 】

112Y131 HVのcDNAのヌクレオチド配列 (開始コドン(ATG)から可変領域末端まで) 配列番号40

50

【化 1 3】

ATGGACACAC TTTGCTCCAC GCTCCTGCTG CTGACCATCC CTCATGGGT CTTGTCCCAG 60
 ATCACCTTGA AGGAGTCTGG TCCTACGCTG GTGAAACCCA CACAGACCCT CACGCTGACC 120
 TGCACCTTCT CTGGATTCTC ACTCAGCACT AGTGGAGTGG GTGTGGGCTG GATCCGTCAG 180
 CCCCCAGGAA AGGCCCTGGA GTGGCTTGCA CTCATTTATT GGGATGATCA TAGCCCCTAC 240
 AGCCCATCTC TGAAGAGCAG GCTCACCATC ACCAAGGACA CCTCCAAAAA CCAGGTGGTC 300
 CTTACAATGA CCAACATGGA CCCTGTGGAC ACAGCCACAT ATTACTGTGC ACGCACCCGG 360
 GGGGCTTTTG ATATCTGGGG CCAAGGGACA ATGGTCACCG TCTCTTCA 408

10

【 0 2 3 2】

112Y131 LVのcDNAのヌクレオチド配列(開始コドン(ATG)から可変領域末端まで) 配列番号41

【化 1 4】

ATGGAAGCCC CAGCGCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA 60
 GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC 120
 CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GGGTGTTAGC AGCTACTTAG CCTGGTACCA GCAGAAACCT 180
 GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC 240
 AGGTTTCAGTG GCAGTGGGCC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT 300
 GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCATCCGAC GTTCGGCCAA 360
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGAACTGTG GCTGCACCAT C 381

20

30

【 0 2 3 3】

112Z5 LVのcDNAのヌクレオチド配列(開始コドン(ATG)から可変領域末端まで) 配列番号42

【化 1 5】

ATGACCATGA TTACGCCAAG CTTGGTACCG AGCTCGGATC CACTAGTAAC GGCCGCCAGT 60
 GTGCTGGAAT TCGCCCTTCT AATACGACTC ACTATAGGGC AAGCAGTGGT ATCAACGCAG 120
 AGTACGGGGG GAGGCTTGGT ACAGCCTGGC AGGTCCCTGA GACTCTCCTG TGCAGCCTCT 180
 GGATTCACCC TTGATGATTA TGGCATGCAC TGGGTCCGGC AAGCTCCAGG GAAGGGCCTG 240
 GAGTGGGTCT CAGGTATTAG TTGGAATAGT GATAGTATAG GCTATGTGGA CTCTGTGAAG 300
 GGCCGATTCA CCATCTCCAG AGACAACGCC AAGAACTCCC TGTATCTGCA AATGAACAGT 360
 CTGAGAGTTG AGGACACGGC CTTGTATTAC TGTGTA AAAAG ATATTAGTGG CTGGTACAGC 420
 TTTGACTACT GGGGCCAGGG AACCTGGTC ACCGTCTCCT CA 462

40

【 0 2 3 4】

112Z5 LVのcDNAのヌクレオチド配列(開始コドン(ATG)から可変領域末端まで) 配列

50

番号43

【化16】

ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA 60
 GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC 120
 CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG CCTGGTACCA ACAGAAACCT 180
 GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC 240
 AGGTTCAAGTGC GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT 300
 GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCCGATCAC CTTCGGCCAA 360
 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 381

10

【0235】

112Y55 HVのcDNAのアミノ酸配列(リーダー配列(太字)および可変領域) 配列番号4
 4

【化17】

MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKESGPTL VKPTQTLTLS CTFSGFSLST SGVGVGWIRQ 60
 PPGKALEWLA LIHWDDAERY SPSLKSRLTI TKDTSKNQVV LTMTNMDLVD TATYYCAHTR 120
 GAFDIWGQGT MVTVSS 136

20

【0236】

112Y55 LVのcDNAのアミノ酸配列(リーダー配列(太字)および可変領域) 配列番号4
 5

【化18】

METPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPGT LSLSPGERAI LSCRASQSVS SSFLAWYQQK 60
 PGQAPRLLIY GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYDSSRTFGQ 120
 GTKVEIK 127

30

【0237】

112Y131 HVのcDNAのアミノ酸配列(リーダー配列(太字)および可変領域) 配列番号
 46

【化19】

MDTLCSTLLL LTIPSWVLSQ ITLKESGPTL VKPTQTLTLT CTFSGFSLST SGVGVGWIRQ 60
 PPGKALEWLA LIYWDDHSPY SPSLKSRLTI TKDTSKNQVV LTMTNMDPVD TATYYCARTR 120
 GAFDIWGQGT MVTVSS 136

40

【0238】

112Y131 LVのcDNAのアミノ酸配列(リーダー配列(太字)および可変領域) 配列番号
 47

【化20】

MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQGVSYLAWYQQKP 60
 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGPGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWHPTFGQ 120
 GTKVEIK 127

【0239】

112Z5 HVのcDNAのアミノ酸配列(リーダー配列(太字)および可変領域) 配列番号48

【化21】

MTMITPSLVP SSDPLVTAAS VLEFALLIRL TIGQAVVSTQ STGGGLVQPG RSLRLSCAAS 60
 GFTLDDYGMH WVRQAPGKGL EWVSGISWNS DSIGYVDSVK GRFTISRDNA KNSLYLQMNS 120
 LRVEDTALYY CVKDISGWYS FDYWGQGLV TVSS 154

【0240】

112Z5 LVのcDNAのアミノ酸配列(リーダー配列(太字)および可変領域) 配列番号49

【化22】

MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVSYLAWYQQKP 60
 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPITFGQ 120
 GTRLEIK 127

【0241】

CHO細胞からの組換えヒト抗OX40抗体の作製: 組換え抗体を作製するために、抗OX40抗体を含有する各抗体ベクターを宿主細胞 チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞、ATCC番号CRL-9096) dhfr欠損株にエレクトロポレートし、トランスフェクト細胞の上清から組換え抗体を単離した。簡単に説明すると、10 µgの精製DNA発現ベクターをDNA制限酵素、NruIにより線状化し、そのDNAをBio Rad社製エレクトロポレーター(0.8kV、25uF)を用いて 3×10^6 細胞のCHO細胞にトランスフェクトした。上記DNAベクターを含有するCHO細胞を選択するために、トランスフェクト細胞を96ウェル培養プレート内、ペニシリン/ストレプトマイシン(BioWhitaker)、HT(Sigma)、およびジェネティシン(Invitrogen Corp.)を補給したグルタミン含有EX-CELL 325 PF CHO無血清培地(JRH Bioscience、Lenexa、KS)中に播種した。いくつかの安定形質転換体系を選択した後、ELISAによりヒトIgG高産生株を同定し、組換え抗体の作製に用いた。

【0242】

実施例2

本実施例では、ヒトOX40に対するヒトモノクローナル抗体の様々な特徴を記載する。

【0243】

KM mice(商標)を、CFA/IFA中の可溶性組換えhOX40:hFc、RIBI中のhOX40:hFc+hOX40:hFc-ovaコンジュゲート、RIBI中の熱変性hOX40:hFc、またはRIBI中の放射線照射し、活性化させたヒトT細胞を用いて免疫した。マウスのうちの何匹かは、ヒトIgG OX40特異的力価の範囲の抗ヒトOX40特異的抗体を惹起した。最高応答物由来の脾細胞を骨髓腫細胞と融合して、ヒト抗ヒトOX40を産生するハイブリドーマを作製した。抗OX40抗体の産生は、ELISAおよびフローサイトメリーの両方により組換え可溶性hOX40:hFc形質転換体およびCHO-OX40形質転換体それぞれを用いて判定した。陽性ハイブリドーマを制限希釈によりクローニングして、モノクローナルハイブリドーマを得た。(表2)

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2: 抗体作製に用いた抗原

抗体	抗原
112F32	hOX40:hFc
112V8	活性化ヒト T 細胞
112Y55	hOX40:hFc と hOX40:hFc-オボアルブミン
112Y131	hOX40:hFc と hOX40:hFc-オボアルブミン
112Z5	熱変性 hOX40:hFc

10

【 0 2 4 4 】

いくつかの抗体を、ヒトOX40に対する相対的結合親和性、in vitroでヒトOX40リガンド結合を遮断(block)する能力、相互のクロスブロッキング、in vitroでの増殖の遮断、in vivoで炎症を遮断する能力、およびADCCを媒介する能力についてさらに特徴付けた。(表3)。

【 0 2 4 5 】

112F32、112V8、112Y131、112Y55、および112Z5は全て、休止ヒトT細胞ではなく活性化ヒトT細胞と特異的に結合した(図1)。3日間活性化したヒトT細胞を、様々な濃度のヒト抗ヒトOX40抗体を用いて標識し、抗ヒトIgG-PEを用いて検出した。これらのヒト抗ヒトOX40抗体の結合は飽和可能であった。各抗体の最大結合は、活性化ヒトT細胞の標識に必要な抗体の量を漸増することにより決定した(図2)。様々な相対的結合親和性が得られた(KDおよびBMAX、表3)。精製マウス抗ヒトOX40抗体 L106の結合も決定し、112F32、112V8、112Y55、112Y131、および112Z5は全て、活性化T細胞に対してL106より高いBMAXを有していた。

20

【表 3】

表 3: ヒト抗ヒトOX40モノクローナル抗体の特徴

抗体	元のサブクラス	エピトープ	活性化T細胞の標識化		ELISAによるOX40.ブロッキングIC50 ($\mu\text{g/ml}$)	T細胞におけるFACSによるOX40ブロッキングIC50 ($\mu\text{g/ml}$)	in vitro有効性	in vivo有効性	ADCC 10 $\mu\text{g/ml}$ での%溶解率 ^④
			KD μM	BMAX 幾何平均					
112F32	IgG4	A	0.013	103.5	0.650	ni*	+ [^]	IgG1+ [^] IgG4+	IgG1 37% IgG4 NT
112V8	IgG4	B	0.036	180.8	0.051	0.62	+	IgG1+ IgG4+	IgG1 55.6% IgG4 18%
112Y55	IgG1	B	0.014	161.8	0.073	0.90	+	+	54.2%
112Y131	IgG4	B	0.025	170.7	0.069	0.91	+	+	18%
112Z5	IgG1	C	0.011	118.2	0.081	14.65	+	+	35%
L106	マウス IgG1	L	0.001	52.0	0.982	60.91	NT	NT	NT

30

*: ni; 50 $\mu\text{g/ml}$ では阻害性なし

[^]: +: in vitroでの増殖またはin vivoでの疾患を阻害した、定量せず

#: NT; 試験せず

④: 10 $\mu\text{g/ml}$ での無関係の抗体による溶解率は14%であった

40

【 0 2 4 6 】

これらのOX40抗体を、それらが可溶性OX40との結合について互いに競合するかどうかを判定するために、ELISAにより解析した。96ウェルプレートのウェル内に個々のヒト抗体

50

をコーティングした。hOX40:mFcを可溶性抗OX40抗体（ブロッキング抗体）とともにプレインキュベートした後、コーティングしたウェルに加えた。hOX40:mFcとコーティング抗体との結合は抗マウスIgG-HRPを用いて検出した。阻害率は、次式 $(100 - (\text{ODサンプル} / \text{OD最大結合サンプル})) * 100$ を利用して決定した（図3A）。

【0247】

さらに、96ウェルプレートのウェル内にマウス抗体をコーティングし（L106、315、ACT35またはマウスIgG）およびhOX40:hFcをブロッキング抗体とともにプレインキュベートした。hOX40:hFcの結合はヒツジ抗ヒトIgG-HRPを用いて検出した（図3B）。

【0248】

これらのヒト抗ヒトOX40抗体に対して3つの「エピトープ」群が同定された。112V8、112Y55、および112Y131は全て互いにクロスブロックし、一方、112F32および112Z5はそれぞれ独特の結合部位を有している。112V8、112Y131、および112Y55は112Z5の結合を一部低減するが逆の場合はなく、112Z5はそれ自体を遮断(block)するだけである。これは、112Z5は112V8、112Y55、および112Y131とは異なるエピトープを認識し、結合の低減は立体障害によるものであり得ることを示唆している。これらのヒト抗OX40抗体は、OX40とのL106、315またはACT35の結合を遮断せず（図3Aおよび3B）、一方、L106はそれ自体とACT35を遮断し、112V8および112Y131の結合を、OX40とは結合しない対照抗体（実線）と比べて10%低減するだけである。これは、本明細書に記載の抗体はL106とは異なるエピトープを認識することを示している。クローン315は112V8および112Y131の結合を低減するにはしたが、これらの後者の抗体は315の結合を遮断しなかったことから、それらは異なるエピトープと結合するにちがいない。

【0249】

また、活性化ヒトT細胞において表面で発現されるOX40との結合を遮断する抗体の能力を評価するために、フローサイトメトリーによるアッセイも用いた。活性化T細胞を、遮断抗体を用いて染色し、続いて、ビオチン化抗OX40抗体を加えた。さらに、活性化ヒトT細胞を、マウス抗ヒトOX40抗体を用いて標識して、OX40結合を遮断した。ビオチン化抗OX40抗体とこれらの細胞との結合はSA-PEを用いて検出した。それらの細胞をフローサイトメトリーにより解析した。陽性SA-PE染色の幾何平均を用いて、同じ式、すなわち $(100 - (\text{ODサンプル} / \text{OD最大結合サンプル})) * 100$ を用いて阻害率を算出した。これらのデータ（図4Aおよび4B）はELISA解析と関連する。

【0250】

ヒト抗ヒトOX40抗体により3つのエピトープが認識され、1つ目は112F32により、2つ目は112Z5により、3つ目は112V8および112Y131により認識される。ELISAデータの場合もそうであったとおり、112Z5はそれ自体を遮断しただけであるが、その結合は112V8および112Y131によって低減した。112V8および112Y131のL106遮断も同じである。L106がまず細胞と結合しても、112V8および112Y131はヒトOX40と効率よく結合することができる。しかしながら、112V8および112Y131はL106結合を阻害した。これらのデータを総合すれば、抗体はL106が結合するのを立体的に妨げ、同じエピトープを認識しないことが示唆される。112F32および112Z5はL106結合を遮断しない。ACT35は112F32、112V8、112Y131、または112Z5の結合を阻害しなかったが、クローン315は112V8および112Y131の結合を50%低減するにはした。生細胞への抗体の結合および検出は表面分子の内部移行を誘導し得るため、個々の抗体の結合レベルは、全体としてより低いOX40の表面発現によって低減し得るものでありその抗体の結合の遮断にはよらない。より高い親和性の抗体は、より低い親和性の抗体よりも多くの内部移行をもたらし得る。これにより、ELISAとフローサイトメトリーデータとの間の違いだけでなく、遮断に用いる抗体に応じた結果間での違いも説明し得る。

【0251】

コーティングhOX40:hFc融合タンパク質との可溶性hOX40Lの結合を遮断する112F32、112V8、112Y131、112Y55、および112Z5の能力を、ELISAプロトコルを用いて試験した（図5A、表3）。プレートをhOX40:hFcでコーティングし、非特異的部位を遮断した後、抗OX40抗体を結合させた。洗浄せずに、それらのウェルにOX40L-FLAGを加えた。結合したりガン

10

20

30

40

50

ドは抗FLAG-HRP二次抗体を用いて検出した。阻害率は、次式(100-(ODサンプル/OD最大OX40L結合))*100を利用して決定した。112V8、112Y55、および112Y131は、hOX40:hFcとの可溶性OX40Lの結合の85%を阻止した。112F32はhOX40:hFcとの可溶性hOX40Lの結合のおよそ70%を阻止し、112Z5は最大結合の67%を遮断した。これらのデータは、これらのヒト抗ヒトOX40抗体はリガンド結合に関わるOX40の部分と結合することを示唆している。

【0252】

フローサイトメトリーに基づくアッセイを用いて、OX40を発現する活性化ヒトT細胞との可溶性OX40L結合の遮断をモニタリングした場合には、少し異なる結果が得られた(図5B)。活性化ヒトT細胞を抗OX40抗体、続いて、可溶性flagタグ付きヒトOX40Lを用いて標識した。OX40Lの結合は抗FLAG-PE抗体を用いて検出した。阻害率は、同じ式、すなわち(100-(サンプル/最大結合))*100を利用して決定した。この研究では、112F32はOX40L結合を阻止することができず、112Z5による遮断は低減したが、一方、他の抗体、112V8、112Y55、および112Y131は同様の遮断能力を有し続けた。これらの結果における違いは、OX40に対する112F32および112Z5の親和性に左右されているかもしれない。また、可溶性OX40:mFc融合タンパク質の二量化ではなく、細胞表面のOX40タンパク質の三量化に起因している可能性もある。

【0253】

また、活性化T細胞の表面で発現されるOX40は、4-1BB(Ma, ら, Blood 106(6): 2002-10 (2005))、あるいは112F32を阻止し、または112Z5結合を低減するがOX40とのOX40L結合を遮断しないBTLA(Cheung, ら, Proc Natl Acad Sci U S A 102(37): 13218-23 (2005); Co mpaan, ら, J Biol Chem 280(47):39533-6 (2005); Croft, Trends Immunol 26(6): 292-4 (2005); Gonzalez, ら, Proc Natl Acad Sci U S A 102(4): 1116-21 (2005); Sedy, ら, Nat Immunol 6(1): 90-8 (2005))と同様の阻害分子との複合体として存在する可能性がある。最後の3つの可能性から、個々の抗体により結合される特異的エピトープが提示され得る。L106、マウス抗ヒトOX40抗体により認識されるエピトープは、L106は組換えOX40タンパク質とのOX40L結合の95%を遮断したが、活性化T細胞との結合についてはほんの60%しか遮断しなかったように、OX40リガンドおよびOX40の確認にも依存している。これらのデータはOX40上に複数のエピトープが存在し、それらのエピトープのいくつかのものはOX40L結合を完全に阻害し、一方、他のものは相互作用を一部遮断するだけであることを示している。異なるエピトープとのこれらの抗体の結合が独特の機能的結果をもたらすかどうかは分からない。

【0254】

どちらか一方の方法によるリガンド結合の遮断は、特定の抗体によりOX40シグナル伝達が損なわれることを必ずしも決定しない。ヒト抗ヒトOX40抗体がOX40を媒介とするシグナル伝達を阻止することができるかどうかを判定するために、2ウェイ混合リンパ球培養を、同種異系ドナー由来の全PBMCを用いて行った。同種異系ドナー由来の末梢血単核細胞を96ウェルU底プレート中、様々な用量の抗OX40抗体または対照抗体の存在または不在で7日間、三連で共培養した。各ウェル当たり 1×10^5 細胞/ドナーを加えた。それらのプレートに培養の最後の18時間、 $1 \mu\text{Ci}$ /ウェル $^3\text{HTdR}$ を添加した。それらの細胞を回収し、シンチレーションカウンターで計数した。増殖を対照抗体または抗OX40抗体の存在または不在で測定した(図6)。112V8(図6A)、112Y55、および112Z5(図6B)、ならびに112Y55、112Y131、および112F32(図6C)は全て、同種異系細胞によってもたらされる増殖の量を用量依存的に低減することができ、一方、陰性対照hIgG4、抗ヒト血清アルブミンは増殖に作用を及ぼさなかった(図6A)。複数の研究を行い、応答の大きさとなる最大CPM取り込みは、各アッセイに用いたドナーPBMCの組合せに応じたものとなった。混合リンパ球培養では、CD4およびCD8T細胞の両方が同種異系抗原に応答している。ヒト抗ヒトOX40抗体による増殖応答の低減は、CD4およびCD8T細胞の両方の直接阻害によるものである可能性がある。

【0255】

実施例3

10

20

30

40

50

本実施例では、ヒトOX40の直鎖ペプチドを用いたヒト抗ヒトOX40抗体のエピトープのマッピングを記載する。

【0256】

ヒトOX40の細胞外ドメイン内の3つのペプチド(表4)を選択して、112F32、112V8、112Y55、112Y131、および112Z5によって認識されるエピトープのマッピングを開始した。

【表4】

表4: ヒトOX40 ペプチド

ペプチド名	ペプチド配列	抗体				
		112F32	112V8	112Y55	112Y131	112Z5
112A	RPAGPGFYNDVVSSKPC	-	-	-	-	-
112B	RAGTQPLDSYKPGVDC	-	-	-	-	-
112C	LAGKHTLQPASNSSDAIC	-	-	-	-	-

10

【0257】

これらのペプチドは、A & A Lab, LLCにより作製し、製造業者の使用説明書(Pierce)に従ってマレイミドリンカーを用いてキーホールリンペットヘモシアニン(「KLH」)とコンジュゲートしたものである。これらのペプチドを炭酸バッファー中10 µg/mlにて96ウェルMaxisorp ELISAプレート(Nunc)に4で一晚コーティングした。そのプレートを、PBS/0.1%Tween 20を用いて洗浄した後、カゼインバッファー(Pierce)を用いて室温にて3時間ブロックした。候補抗体を、PBS/0.1%Tween 20中10%カゼインで希釈して10 µg/mlで加えた。ELISAの残りの部分は、OX40特異的抗体検出ELISAで記載したとおりに実施した。

20

【0258】

ヒト抗ヒトOX40抗体はどれも、これらのヒトOX40ペプチドと検出可能なように反応しなかったが、一方、それらのペプチドで免疫したマウス由来の血清は適当なペプチドと結合した。これらの結果は、112F32、112V8、112Y55、112Y131、および112Z5は、用いたアッセイ条件下では、ヒトOX40細胞外配列のこれらの短鎖エピトープと検出可能なように結合しないということを示している。これらのデータは、これらの配列がより長いペプチド配列に含まれる場合には、それらがヒト抗ヒトOX40抗体により認識されることを除外しない。

30

【0259】

実施例4

本実施例ではヒト抗ヒトOX40モノクローナル抗体のin vivo機能解析を記載する。

【0260】

急性異種移植片対宿主病(XGVHD)モデルを用いて、in vivoでの112V8G1ヒト抗ヒトOX40抗体の治療可能性を検証した(Watanabe, ら, *Clin Immunol* 120:247-259 (2006))。このモデルの場合、重症複合免疫不全(SCID)マウスにヒト末梢血単核細胞が移植される。移植前に、マウスを抗IL2R鎖抗体を用いて処置して、内因性ネズミナチュラルキラー細胞を枯渇させた後、それらに致死量以下の放射線照射を行って、ヒト細胞を腸管へと移動させた。ヒトT細胞は増加し、移植片対宿主様疾患(a graft versus host like disease)を誘発し、その結果、体重減少、血尿、腹水、肝臓および腸管中への炎症細胞浸潤、最終的には死を引き起こす。精製T細胞の移植により同様の症状が起こるように、この疾患は主としてヒトT細胞により媒介される。

40

【0261】

SCIDマウスを上記のように処置し、さらに112V8G1またはヒトIgG1イソタイプ対照(抗DNP)組換え抗体のいずれかを第0日目に投与して、OX40遮断(blockade)の予防可能性を検証した。第0日目に、マウスに100 µg、20 µg、または2 µgの112V8G1抗体あるいは100 µg

50

抗DNPを静脈内注射により与えた。3~4日おきに体重を測定した。第12日目に、マウスを殺し、疾患の症状について解析し、フローサイトメトリー解析用に脾臓を採取した。第12日目に観察されたグロス病理を、次のとおりスコアをつけた、下痢(0~1)、腸および腹腔腔での出血、ならびに腹膜炎(それぞれ0~5)(数が高くなるほど重症の疾患を示す)。全ての病徴の合計を用いて、総グロス病理スコアを決定した。対照抗体を受けたマウスは全て、XGVHDの症状を示し、112V8G1を受けたマウスよりも高い病理スコアを有していた。試験した112V8G1の全ての用量でこれらの症状が軽減または抑制された(図7A)。

【0262】

脾臓の解析はこの観察に一致していた。脾臓の単細胞懸濁液をヒトT細胞の存在についてフローサイトメトリーにより解析した。ヒトT細胞は対照抗体を用いて処置したマウスの脾臓中に存在したが、112V8G1処置動物におけるヒトT細胞の数は対照動物におけるT細胞の数よりも大幅に少なかった(図7B)。さらに、血清中の炎症性ヒトサイトカイン(インターフェロン- γ 、腫瘍壊死因子、および顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子)を、複合技術を用いて測定した。炎症性ヒトサイトカインは112V8G1処置動物において対照よりも低減していた。最も劇的な影響はインターフェロン γ のレベルにあった(図7C)。同種異系骨髄移植患者の末梢血におけるOX40+T細胞の出現は慢性GVHDの発現と関連していた(Gadisseur, ら, Bone Marrow Transplant 23(10): 1013-7 (1999); Kotani, ら, Blood 98(10): 3162-4 (2001); Sanchez, ら, Br J Haematol 126(5): 697-703 (2004))。

10

【0263】

慢性GVHDの処置におけるOX40遮断の効力を評価するために、慢性異種GVHDの動物モデル系を確立した。このモデルは、全PBMCの代わりに100万個の精製CD4+細胞をSCIDマウスに注射することを除けば、急性異種GVHDモデルと同様である。また照射線量も、腸損傷のレベルを低減するために2.12Gyに下げた。疾患の最初の徴候は脱毛および体重減少であり、その後死に至るが、これは1つには肺中へのT細胞の浸潤が原因である。病徴は第30日目ごろに明らかになる。各5匹のマウス群を、112V8G1組換え抗体を100 μ g、20 μ g、または2 μ gで用いて週に1回5週間、あるいは抗DNP hIgG1対照抗体を100 μ gで用いて週に1回5週間処置した。第7週目に生存しているマウスを解析した。グロス病理スコアは脱毛、出血、および腹膜炎(それぞれ0~5)ならびに下痢(0~1)の程度によって決定した。

20

【0264】

観察された主要な病変は脱毛であり、112V8G1の3用量全てで対照処置マウスよりもこの病徴が軽減していた(図8A)。この観察結果は、CD4 T細胞の移植後48日目の112V8G1処置マウスの脾臓中のヒトT細胞の低減と一致した(図8B)。このモデルでは、ヒトT細胞はリンパ節へ移動し、対照動物ではリンパ節は容易に検出されるが、抗OX40処置動物では大幅に低減しているかまたは見つけれない(図8C)。112V8G1を20 μ gまたは100 μ gで用いて処置した動物ではリンパ節は見つけれないことを記しておく。

30

【0265】

さらに、急性モデルとは異なり、OX40陽性細胞は対照処置マウスの脾臓およびリンパ節中で容易に検出することができ、OX40+細胞の数は112V8G1処置動物において低減していた。(図8Bおよび8C)。炎症性サイトカインはヒトCD4 T細胞を受けたマウスの血清中で検出され、検出されたサイトカインの量は、112V8G1抗ヒトOX40を用いて処置したマウスにおいて対照ヒトIgG1よりも低減していた。この疾患モデルにおいて産生されるサイトカインとしては、限定されるものではないが、インターロイキン2、インターロイキン4、インターロイキン6、インターロイキン8、インターロイキン10、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、インターフェロン γ および腫瘍壊死因子 が挙げられる。インターロイキン6を除く全てのサイトカインは、112V8G1を用いた処置により大幅に低減し、それによって、枯渇および/または遮断によるOX40シグナル伝達障害による抗炎症活性が証明された。

40

【0266】

急性XGVHDモデルにおいて予防計画を用いて112V8G4PEを試験した。この抗体は、補体を固定する能力またはFc受容体と結合する能力がないことから枯渇活性がなく、そのため、

50

疾患の予防はOX40シグナル伝達の遮断またはOX40のダウンモジュレーションによって決まるであろう。第0日目に各群5匹のマウスに112V8G4PEの200 µg、20 µg、または2 µgでの単回注射を行った。対照処置マウスには、第0日目、第3日目、または第6日目に200 µgの抗DNPヒトIgG4抗体を与えた。第12日目にグロス病理と脾臓中のヒトT細胞の数についてマウスを解析した(図9Aおよび9B、表5)。第12日目のグロス病理を、下痢、腹膜出血または腹水、および腸出血について0~3の段階でスコアをつけた(0は病変が観察されなかったということであり、3は重症疾患を表す)。200 µgおよび20 µgの112V8G4PEは両方とも明らかな病変の発生を抑制したが、一方、2 µgの用量は疾患を抑制するには不十分であった。グロス病理の量は、第12日目の脾臓中のヒトT細胞の数と相関性があった。200 µgまたは20 µgの112V8G4PEは、対照処置動物と比べて、脾臓中のヒトT細胞の蓄積を大幅に低減したが、一方、2 µgの用量では効果はなかった。112V8G4PE(図9Aおよび9B)と112V8G1(図7)の力価測定で観察された違いは、112V8G4PE抗体に枯渴活性が存在しないことに起因し得る。

10

【0267】

112V8G4PEの投与を第3日または第6日まで遅らせて、OX40シグナル伝達遮断の治療効力を検証した。ヒトPBMCの移植後第3日目または第6日目のいずれかに200 µgの112V8G4PEまたは対照ヒトIgG4抗体を用いてマウスを処置した。第14日目にグロス病理を評価した。112V8G4PE抗ヒトOX40抗体を第3日目または第6日目のいずれかに与えた場合、OX40シグナル伝達を遮断することにより、対照抗体処置動物で観察される疾患のレベルよりも疾患が改善した(図9C)。また、抗OX40処置マウスの脾臓中のヒトT細胞の数も対照処置マウスよりも大幅に低減した。また、第6日目に投与した場合には、112V8G1も疾患を軽減した。これらのデータは、疾患病変を低減するための治療アプローチとしてのOX40特異的抗体によるOX40遮断の効力を証明している。

20

【0268】

急性および慢性異種移植片対宿主病モデルの両方において、112V8、ヒト抗ヒトOX40抗体は、疾患病変、炎症性サイトカインの産生、および脾臓およびリンパ節中のヒトT細胞の数を対照処置動物よりも大幅に低減した。これらのデータは、OX40陽性細胞を直接標的にすることが、T細胞性疾患の抑制(予防的)および改善(治療的)に適した治療であることを証明している。112F32、112Y55、112Y131、および112Z5を用いた一方または両方のモデルでも同じような結果が得られた(表3)。

30

【0269】

急性GVHDモデルでは、疾患にCD4およびCD8ヒトT細胞の両方が必要である。CD4 T細胞は誘発に必要であるが、一方、CD8 T細胞は発症機序の大部分を媒介する。記載したヒト抗ヒトOX40抗体の1つの投与による疾患の抑制および改善は、CD4およびCD8 T細胞の両方の直接拮抗作用による可能性があると考えられるし、またはCD4の助けを減らすことによるCD8T細胞への間接的影響によるCD4 T細胞の直接遮断によるかもしれない。さらに、OX40抗体は制御性T細胞の生成を促進し得、または制御性T細胞の数を増加させ得る。特定の理論に縛られるものではないが、これらの機構の1つまたは全てが疾患の改善を媒介する可能性がある。

【0270】

特定の理論に縛られるものではないが、これらの抗ヒトOX40抗体の潜在的作用機序は、ナチュラルキラー細胞または好中球エフェクター細胞により抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘導することである。このプロセスは、活性化T細胞で発現されたOX40と結合した抗OX40抗体と結合するエフェクター細胞により発現されるFc受容体の能力に依存する。Fc受容体と結合する免疫グロブリンの能力は、抗体のサブクラスによって、そしてFc受容体のタイプによって決まる。ヒトIgG1抗体はナチュラルキラー細胞および好中球のFc受容体と結合するが、一方、ヒトIgG4抗体は結合しない(Huber, ら, *Nature* 229(5284): 419-20 (1971)); Brunhouse, ら, *Mol Immunol* 16(11): 907-17 (1979))。ヒト抗ヒトOX40抗体 112F32(IgG1)、112V8(IgG1およびIgG4PE)、112Y55(IgG1)、112Y131(IgG4)、および112Z5(IgG1)を、ヒトナチュラルキラー細胞によるOX40発現標的細胞のADCCを媒介する能力について検証

40

50

した。

【0271】

非放射性細胞傷害アッセイを用いて、ヒト抗ヒトOX40抗体およびヒトナチュラルキラー細胞とともに、エフェクター細胞20対標的細胞1の比率で4時間のインキュベーション後の標的細胞の特異的溶解率を決定した(図10)。EL4-ヒトOX40標的細胞を、0.001~10 µg/mlの抗OX40または陰性対照抗体を用いて標識した後、ヒトナチュラルキラー細胞とともにインキュベートした。標的細胞の溶解は、非放射性細胞傷害アッセイにおいてラクトースデヒドロゲナーゼの放出により決定した。特異的溶解率は、上記方法に記載のとおり決定した。ヒトIgG1抗ヒトOX40抗体は、EL4-ヒトOX40標的細胞のADCCを用量依存的に誘導した。ヒトIgG4抗OX40抗体および対照ヒトIgG1抗体は、標的細胞の特異的溶解を誘導しなかった。エピトープ群B(112V8および112Y55)の抗体が両方とも群A(112F32)およびC(112Z5)の抗体よりも高いADCC活性を有していたように、ADCC活性のレベルは、相対的結合親和性およびエピトープ群と相関性がある。

10

【0272】

本明細書に記載した解析の結果は、様々な結合親和性を有する抗体、3つの異なるエピトープ、ならびにOX40リガンド結合の遮断(blocking)、およびT細胞媒介炎症反応の抑制または改善における効力の証明を明らかにしている。増殖、疾患の進行および炎症性サイトカイン産生を低減するこれらのヒト抗ヒトOX40抗体(112F32、112V8、112Y55、112Y131、および112Z5)の能力は、限定されるものではないが、関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、クローン病、移植片対宿主病、および移植拒絶を含むT細胞媒介炎症性疾患または自己免疫疾患を処置するためのアプローチとしての直接的OX40遮断の潜在的能力を示している。抗OX40抗体の枯渇活性は増殖の低減または疾患の改善には必要ないが、T細胞枯渇により潜在的副作用を軽減することができる。

20

【0273】

参考文献

Akiba, H., Y. Miyahira, et al. (2000). "Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis." J Exp Med 191(2): 375-80.

Al-Shamkhani, A., S. Mallett, et al. (1997). "Affinity and kinetics of the interaction between soluble trimeric OX40 ligand, a member of the tumor necrosis factor superfamily, and its receptor OX40 on activated T cells." J Biol Chem 272(8): 5275-82.

30

Alegre, M. L., A. M. Collins, et al. (1992). "Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a "humanized" OK T3 monoclonal antibody." J Immunol 148(11): 3461-8.

Angal, S., D. J. King, et al. (1993). "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody." Mol Immunol 30(1): 105-8.

Bachmann, M. F., M. Barner, et al. (1999). "CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation." J Exp Med 190(10): 1383-92.

40

Bansal-Pakala, P., A. G. Jember, et al. (2001). "Signaling through OX40 (CD134) breaks peripheral T-cell tolerance." Nat Med 7(8): 907-12.

Baum, P. R., R. B. Gayle, 3rd, et al. (1994). "Molecular characterization of murine and human OX40/OX40 ligand systems: identification of a human OX40 ligand as the HTLV-1-regulated protein gp34." Embo J 13(17): 3992-4001.

Baum, P. R., R. B. Gayle, 3rd, et al. (1994). "Identification of OX40 ligand and preliminary characterization of its activities on OX40 receptor." Circ Shock 44(1): 30-4.

Blazar, B. R., A. H. Sharpe, et al. (2003). "Ligation of OX40 (CD134) regulates graft-versus-host disease (GVHD) and graft rejection in allogeneic bone marrow

50

w transplant recipients." Blood 101(9): 3741-8.

Brocker, T., A. Gulbranson-Judge, et al. (1999). "CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles." Eur J Immunol 29(5): 1610-6.

Brugnoni, D., A. Bettinardi, et al. (1998). "CD134/OX40 expression by synovial fluid CD4+ T lymphocytes in chronic synovitis." Br J Rheumatol 37(5): 584-5.

Brunhouse, R. and J. J. Cebra (1979). "Isotypes of IgG: comparison of the primary structures of three pairs of isotypes which differ in their ability to activate complement." Mol Immunol 16(11): 907-17.

Calderhead, D. M., J. E. Buhlmann, et al. (1993). "Cloning of mouse OX40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions." J Immunol 151(10): 5261-71.

Cheung, T. C., I. R. Humphreys, et al. (2005). "Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A 102(37): 13218-23.

Compaan, D. M., L. C. Gonzalez, et al. (2005). "Attenuating lymphocyte activity: The crystal structure of the btlA-hvem complex." J Biol Chem.

Croft, M. (2003). "Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27." Cytokine Growth Factor Rev 14(3-4): 265-73.

Croft, M. (2005). "The evolving crosstalk between co-stimulatory and co-inhibitory receptors: HVEM-BTLA." Trends Immunol 26(6): 292-4.

Evans, D. E., R. A. Prell, et al. (2001). "Engagement of OX40 enhances antigen-specific CD4(+) T cell mobilization/memory development and humoral immunity: comparison of alphaOX-40 with alphaCTLA-4." J Immunol 167(12): 6804-11.

Gadisseur, A. P., J. W. Gratama, et al. (1999). "Expression of T cell activation antigen CD134 (OX40) has no predictive value for the occurrence or response to therapy of acute graft-versus-host disease in partial T cell-depleted bone marrow transplantation." Bone Marrow Transplant 23(10): 1013-7.

Gonzalez, L. C., K. M. Loyet, et al. (2005). "A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator." Proc Natl Acad Sci U S A 102(4): 1116-21.

Gramaglia, I., A. Jember, et al. (2000). "The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion." J Immunol 165(6): 3043-50.

Gramaglia, I., A. D. Weinberg, et al. (1998). "Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses." J Immunol 161(12): 6510-7.

Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1998). "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity." Annu Rev Immunol 16: 111-35.

Higgins, L. M., S. A. McDonald, et al. (1999). "Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein." J Immunol 162(1): 486-93.

Huber, H., S. D. Douglas, et al. (1971). "IgG subclass specificity of human monocyte receptor sites." Nature 229(5284): 419-20.

Humphreys, I. R., G. Walzl, et al. (2003). "A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection." J Exp Med 198(8): 1237-42.

Imura, A., T. Hori, et al. (1996). "The human OX40/gp34 system directly media

10

20

30

40

50

tes adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells." J Exp Med 183 (5): 2185-95.

Imura, A., T. Hori, et al. (1997). "OX40 expressed on fresh leukemic cells from adult T-cell leukemia patients mediates cell adhesion to vascular endothelial cells: implication for the possible involvement of OX40 in leukemic cell infiltration." Blood 89(8): 2951-8.

Ishida and Lonberg (2000). 11th Antibody Engineering Meeting.

Kabat, e. a. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. Fifth Edition.

Kaleeba, J. A., H. Offner, et al. (1998). "The OX-40 receptor provides a potent co-stimulatory signal capable of inducing encephalitogenicity in myelin-specific CD4+ T cells." Int Immunol 10(4): 453-61.

Kjaergaard, J., J. Tanaka, et al. (2000). "Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth." Cancer Res 60(19): 5514-21.

Kotani, A., T. Ishikawa, et al. (2001). "Correlation of peripheral blood OX40+(CD134+) T cells with chronic graft-versus-host disease in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Blood 98(10): 3162-4.

Kuroiwa, Y., P. Kasinathan, et al. (2002). "Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin." Nat Biotechnol 20(9): 889-94.

Kuroiwa, Y., P. Kasinathan, et al. (2004). "Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle." Nat Genet 36(7): 775-80.

Lane, P. (2000). "Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper (Th)1 and Th2 cells." J Exp Med 191(2): 201-6.

Latza, U., H. Durkop, et al. (1994). "The human OX40 homolog: cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the ACT35 antigen." Eur J Immunol 24(3): 677-83.

Linsley, P. S., W. Brady, et al. (1991). "Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation." J Exp Med 173(3): 721-30.

Linton, P. J., B. Bautista, et al. (2003). "Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo." J Exp Med 197(7): 875-83.

Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell 104(4): 487-501.

Lonberg, N. and D. Huszar (1995). "Human antibodies from transgenic mice." Int Rev Immunol 13(1): 65-93.

Ma, B. Y., S. A. Mikolajczak, et al. (2005). "The expression and the regulatory role of OX40 and 4-1BB heterodimer in activated human T cells." Blood 106(6): 2002-10.

Mallett, S., S. Fossum, et al. (1990). "Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor." Embo J 9(4): 1063-8.

Maxwell, J. R., C. Ruby, et al. (2002). "Contrasting the roles of costimulation and the natural adjuvant lipopolysaccharide during the induction of T cell immunity." J Immunol 168(9): 4372-81.

Maxwell, J. R., A. Weinberg, et al. (2000). "Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion

10

20

30

40

50

. " J Immunol 164(1): 107-12.

Pakala, S. V., P. Bansal-Pakala, et al. (2004). "Prevention of diabetes in NOD mice at a late stage by targeting OX40/OX40 ligand interactions." Eur J Immunol 34(11): 3039-46.

Paterson, D. J., W. A. Jefferies, et al. (1987). "Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts." Mol Immunol 24(12): 1281-90.

Rogers, P. R. and M. Croft (2000). "CD28, Ox-40, LFA-1, and CD4 modulation of Th1/Th2 differentiation is directly dependent on the dose of antigen." J Immunol 164(6): 2955-63.

Rogers, P. R., J. Song, et al. (2001). "OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells." Immunity 15(3): 445-55.

Salek-Ardakani, S. and M. Croft (2005). "Regulation of CD4 T cell memory by OX40 (CD134)." Vaccine.

Sanchez, J., J. Casano, et al. (2004). "Kinetic of regulatory CD25^{high} and activated CD134⁺ (OX40) T lymphocytes during acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." Br J Haematol 126(5): 697-703.

Sedy, J. R., M. Gavrieli, et al. (2005). "B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator." Nat Immunol 6(1): 90-8.

Seko, Y., N. Takahashi, et al. (1999). "Expression of tumour necrosis factor (TNF) receptor/ligand superfamily co-stimulatory molecules CD40, CD30L, CD27L, and OX40L in murine hearts with chronic ongoing myocarditis caused by coxsackievirus B3." J Pathol 188(4): 423-30.

Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." Nat Rev Immunol 2(2): 116-26.

Stuber, E., M. Neurath, et al. (1995). "Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells." Immunity 2(5): 507-21.

Sugamura, K., N. Ishii, et al. (2004). "Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40." Nat Rev Immunol 4(6): 420-31.

Takasawa, N., N. Ishii, et al. (2001). "Expression of gp34 (OX40 ligand) and OX40 on human T cell clones." Jpn J Cancer Res 92(4): 377-82.

Tanaka, T., F. Kitamura, et al. (1993). "Selective long-term elimination of natural killer cells in vivo by an anti-interleukin 2 receptor beta chain monoclonal antibody in mice." J Exp Med 178(3): 1103-7.

Taylor, L., M. Bachler, et al. (2002). "In vitro and in vivo activities of OX40 (CD134)-IgG fusion protein isoforms with different levels of immune-effector functions." J Leukoc Biol 72(3): 522-9.

Thompson, C. B., T. Lindsten, et al. (1989). "CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines." Proc Natl Acad Sci U S A 86(4): 1333-7.

Tittle, T. V., A. D. Weinberg, et al. (1997). "Expression of the T-cell activation antigen, OX-40, identifies alloreactive T cells in acute graft-versus-host disease." Blood 89(12): 4652-8.

Totsuka, T., T. Kanai, et al. (2003). "Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF-alpha MAbs in a murine model of chronic colitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284(4): G595-603.

10

20

30

40

50

Tsukada, N., H. Akiba, et al. (2000). "Blockade of CD134 (OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation." Blood 95(7): 2434-9.

Ukyo, N., T. Horii, et al. (2003). "Costimulation through OX40 is crucial for induction of an alloreactive human T-cell response." Immunology 109(2): 226-31.

Walker, L. S., A. Gulbranson-Judge, et al. (1999). "Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers." J Exp Med 190(8): 1115-22.

Watanabe, T., J. Masuyama, et al. (2006). "CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4+ regulatory T cells." Clin Immunol 120:247-259.

Weatherill, A. R., J. R. Maxwell, et al. (2001). "OX40 ligation enhances cell cycle turnover of Ag-activated CD4 T cells in vivo." Cell Immunol 209(1): 63-75.

Weinberg, A. D. (2002). "OX40: targeted immunotherapy--implications for tempering autoimmunity and enhancing vaccines." Trends Immunol 23(2): 102-9.

Weinberg, A. D., M. Lemon, et al. (1996). "OX-40 antibody enhances for autoantigen specific V beta 8.2+ T cells within the spinal cord of Lewis rats with autoimmune encephalomyelitis." J Neurosci Res 43(1): 42-9.

Weinberg, A. D., K. W. Wegmann, et al. (1999). "Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis." J Immunol 162(3): 1818-26.

Zingoni, A., T. Sornasse, et al. (2004). "Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions." J Immunol 173(6): 3716-24.

WO 95/12673、WO 95/21251

【図面の簡単な説明】

【0274】

【図1】ヒト抗ヒトOX40抗体を用いたフローサイトメトリー解析を示す図である。A. PHAおよびIL2での刺激から3日後のヒトCD4 T細胞の前方散乱光(forward scatter)対側方散乱光(side scatter)のグラフ。B~F. ヒト抗ヒトOX40抗体または対照で標識した活性化ヒトT細胞。太線は活性化ゲート内の細胞での染色を示し、一方、細線は休止ゲート内の細胞を示す。ヒストグラムではアイソタイプ対照IgG抗体による活性化細胞の標識を点線で示している。B. 112F32、C. 112V8、D. 112Y55、E. 112Y131、およびF. 112Z5。

【図2】ヒト抗ヒトOX40モノクローナル抗体による活性化ヒトT細胞の染色を示す図である。示した幾何平均蛍光強度データは、図1Aに示したものと同様の活性化T細胞ゲートから得られたものである。これらのデータを用いて、KDおよびBMAXを決定し、それらを表3に示している。

【図3】5つのOX40抗体がOX40との結合について競合することを示す図である。A. 抗マウスIgG-HRPを用いて検出された、コーティング抗体とのhOX40:mFcの結合についての阻害率(%)。B. ヒツジ抗ヒトIgG-HRPを用いて検出された、マウス抗体とのhOX40:hFcの結合についての阻害率(%)。陰性数は示していない。

【図4】5つのOX40抗体がOX40との結合について競合することを示す図である。A. SA-PEを用いて検出された、遮断抗体およびビオチン化抗OX40抗体で染色した活性化T細胞についての阻害率(%)。B. SA-PEを用いて検出された、マウス抗ヒトOX40抗体およびビオチン化抗OX40抗体で標識した活性化ヒトT細胞についての阻害率(%)。陰性数は示していない。

【図5】ELISAおよびフローサイトメトリーにより測定した、OX40とのOX40Lの結合についてのヒト抗ヒトOX40モノクローナル抗体による遮断を示す図である。A. リガンドの結合についての阻害率をELISAにより抗FLAG-HRP二次抗体を用いて検出した。B. OX40Lの結合についての阻害率をフローサイトメトリーにより抗FLAG-PE抗体を用いて検出した。

【図6】パネルA~Cは異なる3ドナー対に関する3実験を示し、T細胞増殖に対する抗OX40抗体の効果を示す図である。

【図7】抗体112V8G1組換え抗体が急性異種移植片対宿主病を改善したことを示す図である。A. 総グロス病理スコア(Total gross pathology score)。B. フローサイトメトリーによりヒトT細胞の存在について解析した脾臓の単細胞懸濁液。T細胞の平均数と各処置群における各集団の標準偏差を示している。C. マウス血清中のヒトインターフェロンを測定した。マウス各群についてのインターフェロンの平均量を標準偏差とともにpg/mlで示している。

【図8】抗体112V8G1が慢性異種移植片対宿主病を改善することを示す図である。A. 各マウスの総グロス病理スコア。B. フローサイトメトリーにより決定した、マウス脾臓中のヒトT細胞の平均数と標準偏差。C. CD4 T細胞の移植後48日目のSCIDマウス末梢リンパ節中のヒトT細胞の平均数。

【図9 A - B】第0日目、第3日目、または第6日目に投与したときに、抗体112V8G4PEが急性異種移植片対宿主病を改善することを示す図である。A. 第0日目に処置した各マウスの総グロス病理スコア。B. 第0日目に処置したマウスの第12日目の脾臓中のヒトT細胞の平均数と群の標準偏差。

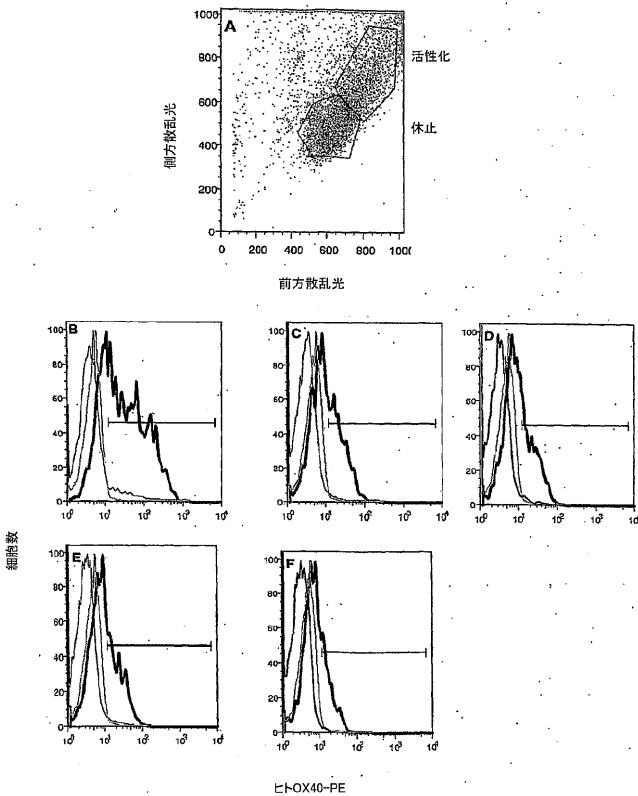
【図9 C】第0日目、第3日目、または第6日目に投与したときに、抗体112V8G4PEが急性異種移植片対宿主病を改善することを示す図である。C. 第3日目または第6日目に処置した各マウスの総グロス病理スコア。

【図10】抗ヒトOX40ヒトIgG1抗体による特異的溶解率を示す図である。抗ヒトOX40ヒトIgG1抗体はEL4-ヒトOX40標的のADCCを媒介する。

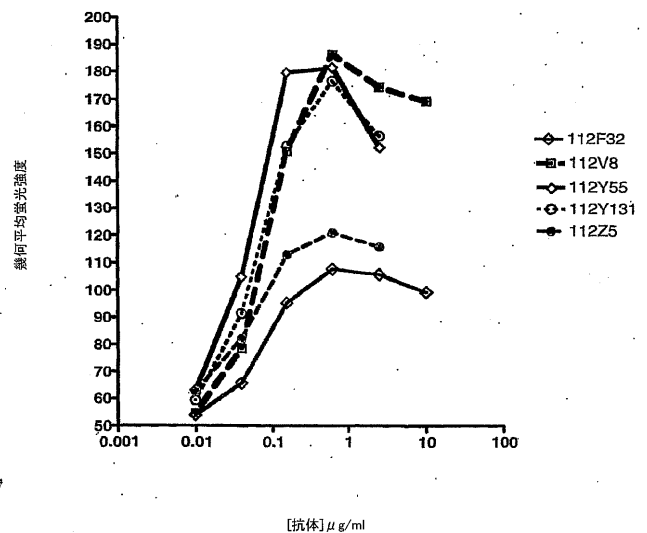
10

20

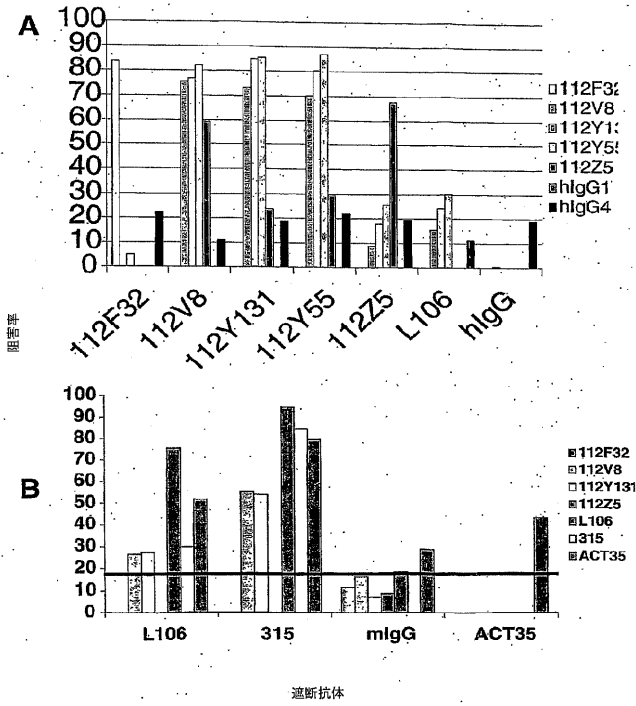
【図1】



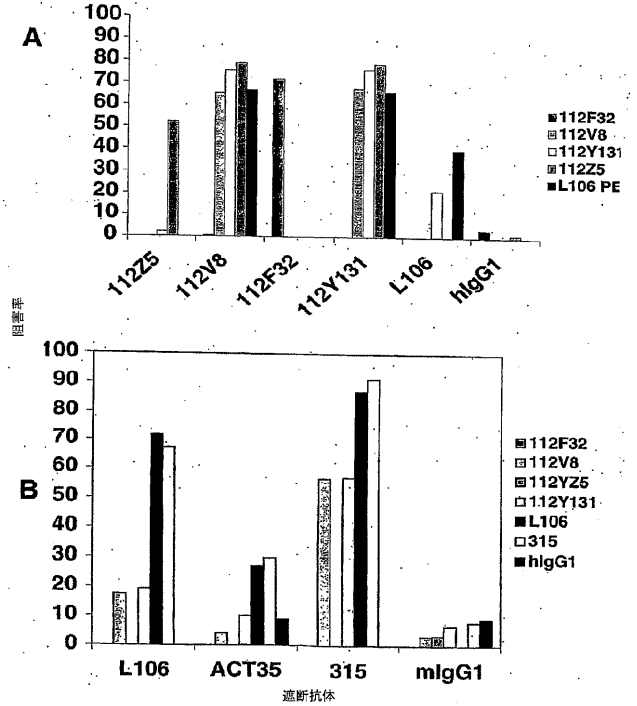
【図2】



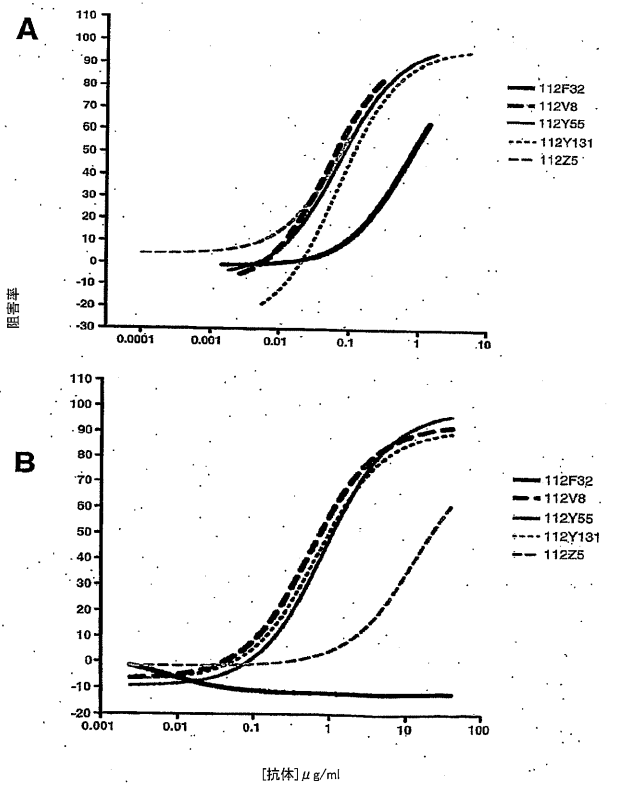
【 図 3 】



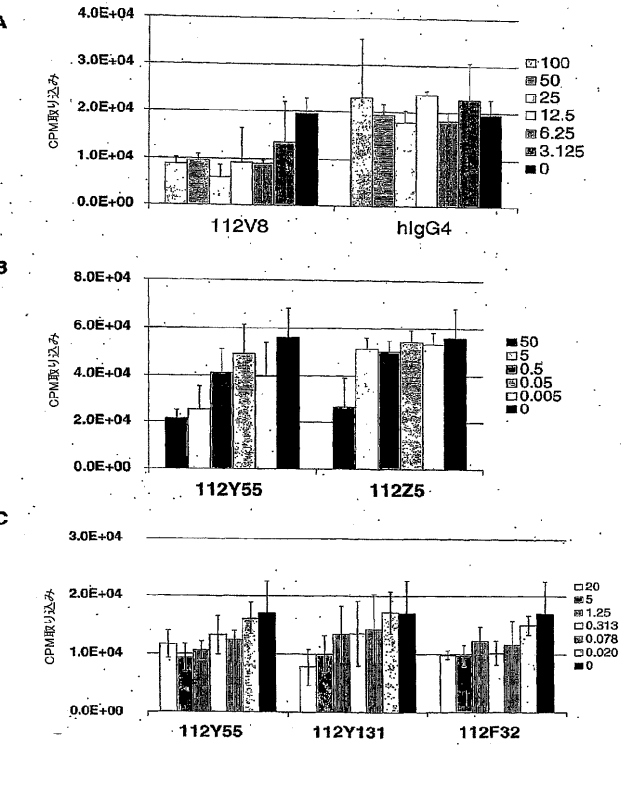
【 図 4 】



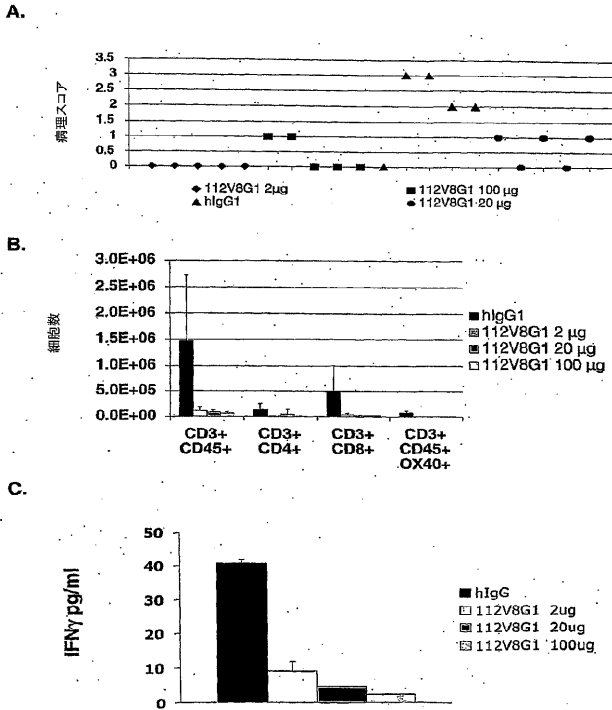
【 図 5 】



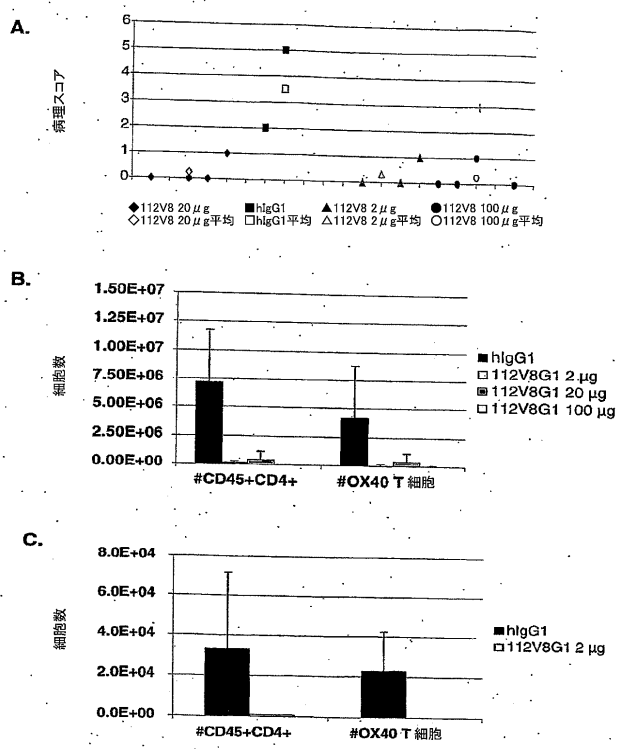
【 図 6 】



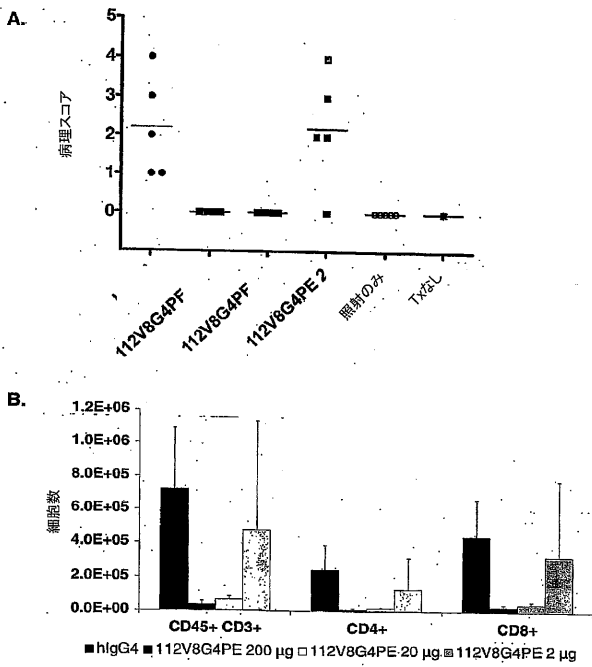
【 図 7 】



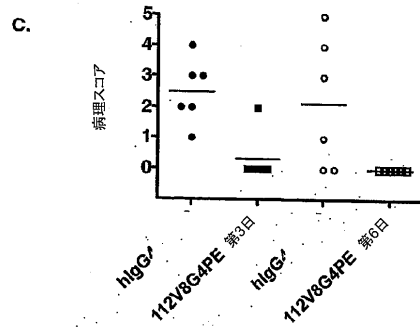
【 図 8 】



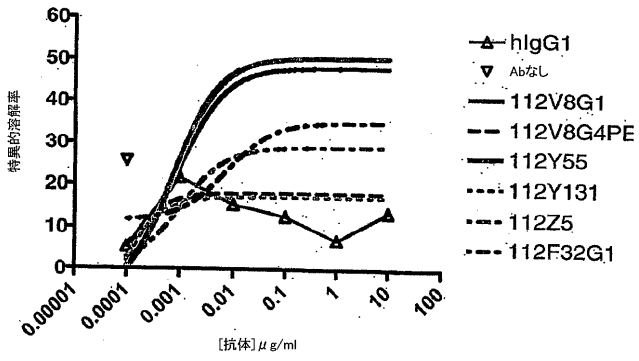
【 図 9 A - B 】



【 図 9 C 】



【 図 1 0 】



【 配 列 表 】

2009518005000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2006/045522
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 C12N5/20 C12N15/13 A61K39/395 A61P37/06		
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 C12N 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, Sequence Search, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/136995 A1 (GODFREY WAYNE [US] ET AL) 15 July 2004 (2004-07-15) abstract paragraphs [0071] - [0089]	1-93
X	WO 2004/019866 A2 (IMMUNEX CORP [US]; BURTON PAUL B [US]; DEISHER THERESA A [US]) 11 March 2004 (2004-03-11) abstract page 19, paragraph 5 - page 22, paragraph 3 page 38, paragraph 3 - page 41, paragraph 3 page 56, paragraph 2 - page 61, paragraph 1 claims 1-11 example 9	1-93
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier 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. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 6 September 2007		Date of mailing of the international search report 13/09/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ferreira, Roger

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/045522

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/035607 A2 (GENMAB AS [DK]; TEELING JESSICA [NL]; RUULS SIGRID [NL]; GLENNIE MARTI) 29 April 2004 (2004-04-29) abstract page 8, line 8 - line 15 page 67, line 7 - line 25 claims 13,61 figure 56	47-51
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, June 2004 (2004-06), pages 420-431, XP009040312 ISSN: 1474-1733 the whole document	1-93
Y	WEINBERG A D: "OX40: targeted immunotherapy - implications for tempering autoimmunity and enhancing vaccines" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 23, no. 2, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 102-109, XP004347862 ISSN: 1471-4906 the whole document	1-93
Y	TAYLOR L ET AL: "Identification of a soluble OX40 isoform: development of a specific and quantitative immunoassay" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 255, no. 1-2, 1 September 2001 (2001-09-01), pages 67-72, XP004274822 ISSN: 0022-1759 the whole document	1-93
Y	AL-SHAMKHANI A ET AL: "OX40 IS DIFFERENTIALLY EXPRESSED ON ACTIVATED RAT AND MOUSE T CELLS AND IS THE SOLE RECEPTOR FOR THE OX40 LIGAND" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 26, no. 8, 1996, pages 1695-1699, XP001042219 ISSN: 0014-2980 the whole document	1-93

4

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/045522

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 312 700 B1 (WEINBERG ANDREW D [US]) 6 November 2001 (2001-11-06) abstract column 2, line 24 - line 63 column 8, line 33 - column 9, line 23 examples 6-9 -----	
A	WO 02/43478 A2 (MEDAREX INC [US]; KIRIN BREWERY [JP]; TOMIZUKA KAZUMA [JP]; ISHIDA ISA) 6 June 2002 (2002-06-06) cited in the application the whole document -----	

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/045522**Box 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)(e) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 56-92 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 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 any additional fee.
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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International application No

PCT/US2006/045522

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004136995 A1	15-07-2004	US 2004265866 A1	30-12-2004
WO 2004019866 A2	11-03-2004	AU 2003259995 A1	19-03-2004
		CA 2496795 A1	11-03-2004
		EP 1545578 A2	29-06-2005
		JP 2006508056 T	09-03-2006
		MX PA05002219 A	05-07-2005
WO 2004035607 A2	29-04-2004	AU 2003301445 A1	04-05-2004
		BR 0315295 A	30-08-2005
		CA 2502552 A1	29-04-2004
		EP 1558648 A2	03-08-2005
		JP 2006507844 T	09-03-2006
		KR 20050049552 A	25-05-2005
		MX PA05004022 A	05-10-2005
US 6312700 B1	06-11-2001	US 2002054873 A1	09-05-2002
WO 0243478 A2	06-06-2002	AU 3942202 A	11-06-2002
		CA 2430013 A1	06-06-2002
		CN 1487996 A	07-04-2004
		EP 1354034 A2	22-10-2003
		JP 3523245 B1	26-04-2004
		JP 2004515230 T	27-05-2004
		MX PA03004793 A	03-12-2004

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
	C 1 2 N 5/00 B	

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. フロッピー

- (72) 発明者 加藤 慎一郎
アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州, サン ディエゴ, コルト アル フレスコ 4 3 3 8
- (72) 発明者 ソロフ ニュージェント, レイチェル
アメリカ合衆国 9 2 1 1 7 カリフォルニア州, サン ディエゴ, ロディ ストリート 5 3 0 1
- (72) 発明者 吉田 均
群馬県高崎市宮原町 3
- (72) 発明者 クロフト, マイケル
アメリカ合衆国 9 2 1 2 8 カリフォルニア州, サン ディエゴ, ウィルミントン ロード 1 1 8 7 8

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA44 CA01 DA02 GA05 HA01 HA20
4B065 AA90X AA93Y AB04 AC14 BA08 CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 BB11 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 CC21 DD62
EE01
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74