

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-45832
(P2007-45832A)

(43) 公開日 平成19年2月22日(2007.2.22)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	Z N A N
A 61 P 37/06 (2006.01)	A 61 P 37/06	4 C 085
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A
C 07 K 16/18 (2006.01)	C 07 K 16/18	4 H 045

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2006-248393 (P2006-248393)	(71) 出願人	506277225 ウェインバーグ, アンドリュー デール アメリカ合衆国, オレゴン 97201, ポートランド, サウスウェスト フィアマ ウント ブールバード 3266
(22) 出願日	平成18年9月13日 (2006.9.13)	(71) 出願人	506277236 バンデンパーク, アーサー アレン アメリカ合衆国, オレゴン 97221, ポートランド, サウスウェスト フォーテ ィエイス プレイス 4371
(62) 分割の表示	特願平7-520474の分割	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
原出願日	平成7年2月6日 (1995.2.6)	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	08/192,480		
(32) 優先日	平成6年2月4日 (1994.2.4)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T-細胞抗原、並びにT-細胞介在状態の診断及び処理へのそれらの使用

(57) 【要約】

【課題】ヒト宿主において OX-40抗原を発現するCD4⁺T-細胞の集団を減じるための医薬組成物の提供。【解決手段】配列番号：1に示すアミノ酸配列を有するヒトOX40抗原に特異的に結合することが出来る抗体又は当該結合性を有する当該抗体の断片と細胞毒素との結合体を含んで成る、ヒト宿主において OX-40抗原を発現するCD4⁺T-細胞の集団を減じるための医薬組成物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号：1に示すアミノ酸配列を有するヒトOX40抗原に特異的に結合することが出来る抗体又は当該結合性を有する当該抗体の断片と細胞毒素との結合体を含んで成る、ヒト宿主においてOX-40抗原を発現するCD4⁺T-細胞の集団を減じるための医薬組成物。

【請求項 2】

自己免疫炎症を低下させるためにOX40抗原を発現するCD4⁺T細胞の集団を減少させるための、請求項1に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、活性化されたT-リンパ球、特にCD4⁺サブクラスに属するそれらのT-リンパ球の特異的消耗(depletion)のための方法に関する。そのような活性化されたT-リンパ球、たとえばCD4⁺T-リンパ球は、多発性硬化症及び移植拒絶に関与するヒトにおける多くの状態に関連している。特に、本発明は、活性化されたT-リンパ球、たとえば特定の疾患又は状態に関与するCD4⁺T-細胞が消耗されるが、しかし活性化されていないT-リンパ球、たとえばCD4⁺T-細胞レパートリーは影響されないような処置を提供する。

【背景技術】**【0002】**

CD4⁺T-リンパ球(本明細書においては、CD4⁺T-細胞として言及される)は、感染及び潜在的な癌細胞を退治することにおいて他の白血球に“助け(help)”を与えるので、免疫システムにおいて中心的な役割を演ずる。CD4⁺T-細胞は液性及び細胞介性在免疫の両方において必須の役割を演じ、そしてさらに、それらは寄生体感染の間、好酸球及び肥満細胞の分化を促進するよう作用する。CD4⁺T細胞集団が消耗される場合(AIDS患者における場合のように)、宿主は、宿主に通常は脅威を与えない多くの病原体及び腫瘍に敏感にされる。

【0003】

従って、CD4⁺T-細胞は病気の防止に重要で有益な役割を演じるが、それらの細胞の異常な機能が重大な問題を生む可能性がある。ある個人においては、CD4⁺T-細胞の異常な機能が自己免疫及び他の疾患状態を導く(Swanborg, R.H., 1984; Cush, J.J., and Lipsky, P.E., 1988; Caspi et al., 1988)。CD4⁺T-細胞が関連している自己免疫疾患は、多発性硬化症、リウマチ様関節炎及び自己免疫ブドウ膜炎を包含する(一般的には、Steinman, L., 1933を参照のこと)。

【0004】

本質的には、それらの疾患では、免疫システムが侵入する病原体を攻撃するという通常の役割が破壊され、そして代わりに、宿主本体の組織を攻撃し、病気及び死さえも導びく異常な免疫応答が生ずる。標的にされる宿主組織は、自己免疫疾患の間で異り、たとえば多発性硬化症においては、免疫システムが脳及び脊髄の白質を攻撃し、リウマチ様関節炎においては、免疫システムは関節の滑膜内層を攻撃する。活性化されたCD4⁺T-細胞はまた、他の疾患、たとえば移植組織及び器官の拒絶に並びにCD4⁺T-細胞リンパ腫の増殖に関与している。

【0005】

異常なCD4⁺T-細胞活性により引き起こされる状態の研究は、いく種かの動物モデル及び特に、多くの実験的に誘発された自己免疫疾患に焦点を合わせられている。動物におけるそれらの実験的に誘発された疾患に基づく研究は、それらがその対応するヒト疾患の処置において有用な情報を提供するであろうという考えを前提条件としている。この目的の遂行においては、CD4⁺T-細胞が動物におけるいくつかの実験的に誘発された自己免疫疾患、たとえば実験的な自己免疫性脳脊髄炎(EAE)、コラーゲン誘発性関節炎(CIA)及び実験的な自己免疫性ブドウ膜炎(EAU)を担当していることが示されている。

10

20

30

40

50

【0006】

EAEは、ミエリン塩基性タンパク質(MBP、脳及び脊髄の白質の成分)に対して動物を自己免疫化することによって誘発され、そして多発性硬化症で観察されるのと同じ臨床学的徴候：脱髄及び麻痺を生ぜしめる。多発性硬化症のための比較モデルとしてのEAEモデルの価値の証明は、それらの状態が原因関係を共有することを示す証拠により提供されている：Steinman及び共同研究者は、多発性硬化症患者の脳損傷に見出される優性細胞タイプがCD4⁺T-細胞であり(Oksenberg, J.R., et al., 1990)、そしてそれらの脳損傷における細胞に関連するT-細胞受容体(抗原認識を担当する分子)が実験的な自己免疫脳脊髄炎の原因を担当しているCD4⁺T-細胞上と同様に、抗原認識のための3個のアミノ酸結合モチーフを有する(Oksenberg, J.R., et al., 1993)ことを示した。従って、これらのすべての証拠は、EAEモデルが多発性硬化症のための治療を試験するのに有用であることを示唆する。

10

【0007】

多くの実験的に誘発された自己免疫疾患、たとえばEAE、CIA及びEAUに対する研究は、インビボで注入される場合、CD4⁺T細胞を結合する抗体がそれらの疾患の進行を阻害し、そして移植拒絶を阻害できることを示した(Swanborg, R.H. 1983; Cobbold, S.P. et al., 1984; Steinman, L. 1993)。この抗体介在の効果は身体におけるすべてのCD4⁺細胞を消耗し、そして不活性化する(CD4⁺細胞に結合する抗体はたぶん、細胞の活性を阻止し、そしてまた、免疫システムによる破壊のためにCD4⁺細胞を標的にする。)この方法は、リウマチ様関節炎に関していくらかの好結果を示しており、そして現在、多発性硬化症のために試験されている(一般的には、Steinman, L., 1993を参照のこと)。

20

【0008】

CD4⁺T-リンパ球集団を破壊する治療アプローチはそれらの自己免疫疾患を改善することには効果的であるように見えるが、このアプローチは1つのひじょうに主要な欠点を有する。その処置は、抗原反応性でありそして従って自己免疫過程に関与するそれらのCD4⁺T-細胞の機能を阻害するのみならず、また静止しておりそして疾病に関与していないCD4⁺T-細胞もまた阻害する。CD4⁺T-細胞は一般的な免疫応答(感染性物質に対して身体を保護する)において重要なものであるので、全CD4⁺T-細胞集団の破壊は患者の重度の免疫無防備状態を引き起こし、そして従って、感染に対して高い敏感性の患者をもたらす。好ましいアプローチは、自己免疫応答に活動的に関与するそれらのCD4⁺T-細胞のみを除去し、そして免疫システムにおいてそれらの通常の役割のために利用できるCD4⁺T-細胞集団はそのままに残すことである。

30

【0009】

この処理方法はまだ達成されてはいない。従って、体止しているCD4⁺T-細胞集団には影響を与えないで、患者における活性化されたCD4⁺T-細胞の集団を特異的に消耗する方法を提供することが本発明の目的である。

40

【発明の開示】

【0010】

1つの観点において、本発明は、体止したT-細胞集団、特にたとえば活性化されていないCD4⁺T-細胞を損なわぬで、自己抗原特異的T-細胞、特にたとえば活性化されたCD4⁺T-細胞がインビボで特異的に排除され得る方法を提供する。従って、本発明は、T-細胞介在の、特にたとえば活性化されたCD4⁺T-細胞介在の自己免疫疾患、たとえば多発性硬化症、リウマチ様関節炎、サルコイド-シス及び自己免疫ブドウ膜炎、移植片-対-宿主病(grat versus host disease)(GVHD)及び/又は炎症性腸疾患のために有用な処置法を提供する。

【0011】

本発明はまた、活性化されたT-細胞、特にたとえば活性化されたCD4⁺T-細胞により引き起こされる他の不所望の免疫応答、たとえば移植受容体における移植された組織及び器官の拒絶を排除するための方法も提供する。さらに、本発明は、活性化されたCD4⁺T-細胞リンパ球を身体から特異的に排除する方法を提供する。本発明はまた、自己免疫病変

50

及び潜在的に有害な T - 細胞リンパ腫の部位で自己反応性 T - 細胞の存在を検出することによって、活性化された T - 細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T - 細胞により介在される状態の早期診断のための方法も提供する。この早期診断は、本発明により提供される処理方法が効果的であり、そしてそうでなければ可能であるよりも早い、状態の処置を促進できることを示す。

【 0 0 1 2 】

本発明はまた、OX-40 と称する特定のタンパク質抗原（本明細書においては OX-40抗原として言及される）が抗原活性化された T - 細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T - 細胞の細胞表面上に特異的に発現されるという発見にも基づいている。特に、ラットにおける EAE疾患を用いる場合、この抗原は、炎症の部位（この疾病モデルにおいては脊髄）で存在するが、しかし非炎症部位では存在しない活性化された自己抗原 - 特異的 CD4⁺T - 細胞の表面上で発現されることが示された。さらに、それらの CD4⁺T - 細胞上でこの抗原の最高の発現は自己免疫性の臨床的な徴候の開始の前日に生じることが見出されており；この抗原の発現は、疾患が進行するにつれて減少した。本発明において初めて示される、OX-40抗原の発現の特異性及びこの発現の過渡的な性質は、T - 細胞介在状態の動物、たとえばヒトにおいての活性化された T - 細胞の抗体介在消耗のための可能な標的としてこの抗原の試験を動機付けた。

【 0 0 1 3 】

本発明者は、OX-40抗原をコードするcDNAをクローン化し、そして配列決定した。従つて、本発明は、配列番号 1 に示される配列又は抗原性ポリペプチドをコードする配列番号 1 のサブ配列を有する核酸；又はその変異体又は対立遺伝子；又はそれらのいずれかに対する相補的鎖を提供する。配列番号 1 の特定のサブ配列は、配列番号 1 に示されるヌクレオチド塩基 15 ~ 848 又はその相補的鎖を含んで成る。

【 0 0 1 4 】

さらに、本発明によれば、上記のような核酸又はその誘導体によりコードされるアミノ酸を含んで成るポリペプチドが提供される。適切には、そのポリペプチドは、配列番号 1 に示される配列のサブ配列によりコードされる、そして抗原決定基を含むアミノ酸配列を含んで成る。

【 0 0 1 5 】

本発明により意図される、核酸配列及びポリペプチドの変異体の間には、コードされたアミノ酸配列に変更を付与しない DNA配列変異体が存在する。次に、“保存的”アミノ酸変更、たとえば当業界において良く知られているような、1つの酸性アミノ酸からもう1つの酸性アミノ酸への変更、1つの芳香族アミノ酸からもう1つの芳香族アミノ酸への変更、1つの塩基性アミノ酸からもう1つの塩基性アミノ酸への変更、1つの該脂肪族疎水性側鎖からもう1つの該側鎖への変更を付与する配列変異体が存在する。次に、たとえば、コードされたポリペプチドにおける対立遺伝子変異体に対応する変異体、及び抗原性交差反応性及び / 又は類似する結合特異性のポリペプチドをもたらす他の変異体が存在する。

【 0 0 1 6 】

本明細書に言及されるポリペプチド及び変異体の抗原性は、たとえば配列番号 1 によりコードされるような OX-40抗原と共有するか又は交差反応性の抗原決定基、たとえば OX-40が細胞表面上に存在する場合、特異的結合剤に接近できる OX-40の決定基と共有される決定基を有する抗原性ポリペプチドを包含する。

【 0 0 1 7 】

特定の細胞型に対する標的抗原を単に発見することは、その特定の細胞型の消耗を必要とする治療アプローチのための基礎を提供しない。すなわち、多くの抗原は細胞表面からはなれており、そして治療のための標的として適切ではない。本発明のさらなる観点は、特異的結合剤、たとえば OX-40タンパク質に対して生ぜしめられ、そして細胞毒素に接合された抗体が抗原活性化された CD4⁺T - 細胞のインビトロ増殖を阻害できるという発見である。この発見は、OX-40抗原が CD4⁺T - 細胞により急速にインターナライズされること

10

20

30

40

50

を包含する。

【0018】

この発見に基づくさらなる研究は、本発明の重要な焦点を導びき；抗原活性化された CD4⁺T-細胞の集団が、特異的結合剤、たとえば OX-40抗原に対して生じた抗体と細胞毒素とを接合し、免疫毒素を生成し、そしてこの免疫毒素を宿主に投与することによりインビボで消耗され得る例証を導いた。この場合、抗体は、活性化された CD4⁺T-細胞の表面上の OX-40抗原に結合する。免疫毒素のインターナリゼーションは、細胞の死をもたらす、細胞中に摂取される細胞毒素をもたらす。

【0019】

従って、活性化された T-細胞（たとえば CD4⁺T-細胞）介在炎症を有する宿主へのこの免疫毒素の投与は、炎症の部位又は他の部位で、活性化された T-細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T-細胞を消耗し（又は不活性化し）、続く炎症及び／又は他の疾病的臨床学的徴候の改善を導く。従って、本発明のさらなる観点は、上記のようなポリペプチドに特異的に結合できる特異的結合剤、たとえば細胞毒性剤により接合された抗体（ここで、抗体は T-細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T-細胞の表面上に存在する OX-40抗原を認識し、そしてそれに結合する）の有効量を患者に投与することを含んで成る、活性化された T-細胞、たとえば CD4⁺T-細胞により介在される状態を有する患者を処理するための方法である。

【0020】

本発明の特定の方法は、T-細胞、たとえばヒト宿主において OX-40抗原を発現する CD4⁺T-細胞の集団を減じるための方法及び多発性硬化症を有する患者における自己免疫炎症の再発を阻止するための方法に関し、ここで前記方法は本発明の特異的結合剤の有効量を投与することを含んで成る。

【0021】

特に、それらの方法に使用される特異的結合剤は、細胞毒性物質（免疫毒素）と接合された抗体であり、ここで前記抗体は、T-細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T-細胞の表面上に存在する OX-40抗原を認識し、そしてそれに結合する。あるいは、その方法は、T-細胞の表面上で発現される場合 OX-40抗原を認識できるモノクローナル抗体の Fab、F(ab')₂又はFvフラグメントを含んで成る特異的結合剤を用いることができる。この方法において有用な他の特異的結合剤は、それらの表面上に OX-40を担持する細胞に対して細胞毒性効果を付与できる免疫グロブリン、又は抗体-依存性細胞の細胞毒性を固定でき、補足でき、又は介在できるいすれかの特異的結合剤、たとえばネズミタイプ IgG2a又はヒトタイプ IgG1又は IgG3の免疫グロブリンのFc領域の特性を示す構造体を有するか又はそれに結合される特異的結合剤である。

【0022】

本発明の方法は、活性化された T-細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T-細胞により介在されるいすれかの状態、たとえば多発性硬化症、サルコイド-シス、リウマチ様関節炎、自己免疫ブドウ膜炎、T-細胞リンパ腫及び移植された器官又は組織の拒絶に適用できる。この方法が適用できるさらなる状態は、移植片-対-宿主病又は反応、及び炎症性腸疾患に関する。

T-細胞は、たとえば抗原、超抗原（super antigens）、マイトイジエン又はモノクローナル抗体により活性化され得る。

【0023】

先行する文章に示される処理方法は、好ましくは、本発明のポリペプチドを用いて生じさせることができる、特異的結合剤、たとえばモノクローナル抗体又はそのフラグメントを用いて実施されるであろう。より好ましい態様においては、モノクローナル抗体はヒト化されたモノクローナル抗体であろう。他の態様においては、その方法は、たとえばフラグメント、たとえば細胞毒性剤と接合されたモノクローナル抗体の Fab、F(ab')₂又はFvフラグメントを含んで成る細胞毒性接合体を利用し、ここで前記モノクローナル抗体のフラグメントが OX-40抗原を認識する。

10

20

30

40

50

【0024】

本発明はまた、実質的に抗原活性化されたT-細胞のみ、特にたとえば活性化されたCD4⁺T-細胞に対して、細胞において結合する特異性を有する特異的結合剤、たとえばモノクローナル抗体も包含する。好ましい態様においては、特異的結合剤は本発明のポリペプチドに特異的に結合することができる。特定の特異的結合剤は、配列番号1の核酸配列のコード領域によりコードされるアミノ酸配列のヒトOX-40に対して、そのOX-40が活性化された細胞の表面上に存在する場合に、特異的に結合する。

【0025】

それらの特異的結合剤は適切には、抗体結合ドメインを含んで成り、そして好ましくは、モノクローナル抗体又はその結合フラグメントである。上記で言及されたように、抗体は好ましくは、少なくとも部分的にヒト化され、そして最も好ましくは、ヒト化されたモノクローナル抗体を含んで成る。

10

“特異的結合”とは、特異的な非共有分子結合、たとえば抗体と対応する抗原又はハブテン（その“結合パートナー”）との間の、及びまた、他の特殊化された結合分子とそれらの結合パートナーとの間の結合を言及する。

【0026】

抗体及びそれらの結合ドメインに関しての“少なくとも部分的にヒト化された”とは、たとえば、不变領域(CH及びCL)のみがヒトポリペプチドに対応し、あるいは、不变及び可変領域の両者が“ヒト化され”得る態様が企画されることを意味する。

20

本発明のもう1つの観点は、特異的結合剤、たとえば分子的に結合された、たとえば共有結合された細胞毒素をさらに含んで成る上記のようなモノクローナル抗体を提供する。抗体-細胞毒素接合体（免疫毒素としても知られている）は、上記処理方法への使用のために適切である。そのような特異的結合剤の例は、細胞毒性剤と接合したモノクローナル抗体のFab、F(ab')₂又はFvフラグメントを包含する。

【0027】

治療的な使用のためには、本発明の特異的結合剤は、医薬的に許容できるキャリヤーを含む医薬組成物の形で適切には投与される。前記キャリヤーは、固体又は好ましくは液体キャリヤー、たとえば当業界において知られている水又は塩溶液である。

30

本発明のさらなる観点は、上記特異的結合剤とT-細胞とを接触し、そして活性化されたT-細胞のレベルを定量化することを含んで成る、患者における、活性化されたT-細胞、たとえばCD4⁺T-細胞により介在される状態を検出するための方法を含む。適切には、前記方法は、患者からの生検サンプル、たとえば移植片-対-宿主病を有すると思われる患者からの腸生検サンプル又は血液サンプル、炎症性腸疾患を有すると思われる患者からの腸生検サンプル、又は脳脊髄液のサンプルに対して行なわれる。

【0028】

本発明のさらなる観点は、患者からの適切な生検サンプルを得、そして次に、その生検サンプル中の活性化されたT-細胞、特にたとえば活性化されたCD4⁺T-細胞の百分率を、特異的結合剤、たとえばOX-40抗原に特異的に結合する抗体を用いて定量することによって、患者における活性化されたT-細胞、特にたとえば活性化されたCD4⁺T-細胞により介在される炎症状態を検出するための方法である。本発明の他の観点は、活性化されたT-細胞、特にたとえば活性化されたCD4⁺細胞により介在される状態を検出するための試験キット、及び医薬的に投与できる形での抗体及び適切な賦形剤並びに容器を含んで成る処理用キットを包含する。

40

【0029】

特に、本発明は、ラベルされる上記のような特異的結合剤を含んで成る、患者における活性化されたT-細胞、たとえばCD4⁺T-細胞により介在される状態を検出するためのキットを提供する。好ましくは、本発明は、上記のようなポリペプチド又は特異的結合剤を含んで成る分析物の検出又は定量のための特異的結合アッセイを実施するためのキットを提供し、ここで前記キットは、分析物を認識できる特異的結合剤を含んで成る第1試薬、分析物又は前記第1試薬のいずれかに特異的に結合できる物質を含んで成る第2試薬、及

50

び前記第2試薬のためのラベルを含んで成る。

【0030】

そのようなキットにおいては、第1試薬は分析物に対して特異的な抗体を含んで成り、そして第2試薬は第1試薬に対して特異的なラベルされた抗グロブリンを含んで成る。

他方、第1試薬は分析物のための固定された特異的結合試薬を含んで成り、そして、第2試薬は、分析物がまた第1試薬に結合した場合に、分析物に結合できる特異的結合剤である。

【0031】

さらなる態様においては、第2試薬は、第1試薬への結合に関して分析物と競争できる物質を含んで成る。

この方法に使用するためには、特異的結合剤はさらに、ラベル、たとえば放射性ラベル又は蛍光ラベルを含んで成り、そしてそれらの特異的結合剤は本発明のさらなる観点を形成する。

【0032】

本発明の特異的結合剤は、通常の手段でクローニングされ、そして配列決定され得る。従って、本発明はさらに、上記のような特異的結合剤のアミノ酸配列をコードする核酸配列を提供する。

組換え技法は、本発明のポリペプチド及び特異的結合剤の両者を調製するために使用され得る。従って、適切な発現ベクター、形質転換された宿主生物及び宿主生物の培養を包含する調製方法が、本発明のさらなる観点である。

【0033】

OX40結合剤、たとえば抗-OX40モノクローナル抗体は、活性化されたT細胞により介在される疾患、たとえば移植片-対-宿主病を有するそれらの患者に投与され得る。投与される量は、患者の徴候に一部又は全体的に改善をもたらすのに必要とされる量に依存するであろう。これは病状の重症度及び投与の経路にのみならず、また他の治療剤（たとえばグルココルチコイド、シクロスルホリンA、プレドニゾロン）の投与にも依存するであろう。OX40結合剤は、全身的に（たとえば静脈内）又は局部的に（たとえば筋肉内）投与され得る。他のところで論じたように、OX40結合剤は、最大の治療効果のために毒性物質に結合され得る。

【0034】

OX40及び移植片-対-宿主病（GVHD）

GVHDの場合、ドナー組織又は細胞に由来する免疫担当T細胞が受容体の組織、たとえば皮膚、腸及び肝臓を攻撃し、それらの正常な機能を行うそれらの能力を非労に譲歩させる。そのような攻撃は、制御されなければ、患者の死を導くことがある。本発明の治療剤は、ドナーT細胞の活性化を阻止し、又は排除するために使用され、それによって疾病進行を阻止し、又は停止する。

【0035】

OX-40及びGVHD：診断

本発明はインビトロでの診断試験及び方法に使用され得る。たとえば、OX40結合剤は、患者からの生検サンプルにおけるOX40⁺T細胞の存在を決定するために使用され得る。生検サンプルは組織サンプル又は血液サンプルであり得る。単核細胞が標準的技法に従って血液又は組織から単離され（Practical Immunology, L.Hudson and F.C.Hay, eds, Blackwell Scientific Publications, Oxfordを参照のこと）、そして抗-OX40抗体又はOX40結合剤融合タンパク質により染色される。

【0036】

次に、OX40結合剤の存在が、発色団、たとえばフルオレセインイソチオシアネート又はフィコエリスリンにより結合される抗-グロブリン試薬により検出され、そして陽性細胞の数がフローサイトメトリー又は蛍光顕微鏡により分析される（たとえばPractical Flow Cytometry, Shapiro, H.M., ed. Alan R Liss, New York; Practical Immunology, L.Hudson and F.C.Hay, eds. Blackwell Scientific Publications, Oxfordを参照のこと）。

10

20

30

40

50

他方、組織サンプルは標準的技法により免疫組織化学染色のために処理される（たとえば Immunocytochemistry: Practical Applications in Pathology and Biology, J. Polak and S. van Noorden, eds. John Wright and Sons, Bristolを参照のこと）。

【0037】

OX40⁺ 細胞集団は、2又は3-色フローサイトメトリー又は免疫組織化学によりさらに特徴づけられる（たとえば、Practical Flow Cytometry. Shapiro, H.M., ed. Alan R. Liss, New York; Immunocytochemistry: Practical Applications in Pathology and Biology. J. Polak and S. van Noorden, eds. John Wright and Sons, Bristolを参照のこと）。OX40⁺ 細胞の検出は、活性化されたT-細胞により引き起こされる疾病、たとえば炎症性腸疾患及びGVHDの診断及び処理を助けることができ、そして疾病の進行を追跡するために使用される：OX40⁺ 細胞集団の増加は疾病の悪化を示唆し、投与される治療剤の用量を高める必要性を示し、そしてOX40⁺T細胞集団における低下は改善を示唆し、そして従つて、投与される治療剤の量の低下を示す。

【0038】

GVHDの危険な状態（たとえば同種骨髄移植の後）での患者の血液におけるOX40⁺ 細胞のレベルの決定は、GVHDの切迫した開始の予測を可能にすることができます。GVHDを制御するために免疫抑制剤の初期投与は、好結果をもたらす処理の可能性を改良するであろう。

本発明はインビボでの診断試験及び方法に使用され得る。たとえば、放射性同位体に結合されるOX40結合剤の投与は、イムノシンチグラフィーのために使用され得る。

本発明のそれらの及び他の観点は、次の本発明の図面及び記載から、より容易に明らかになるであろう。

【0039】

図1は、RT7.2及びMRC OX-40抗原の組織特異的二重発現を示す蛍光活性化細胞分類(FACS)装置からのドットプロットを示す。リンパ球は、EAEの開始の間、図に示される種々の組織区画から単離される。細胞はx軸上に示されるフルオレセインイソチオシアネート(FITC)に接合されたOX-40抗体により染色され、そしてy軸上に示されるRT7.2抗体に接合されたR-フィコエリスリン(PE)により対比染色された。イソタイプ調和の対照抗体がFITC及びPE接合Abの両者のクアドラントを描くために使用された。OX-40抗体は、脊髄から単離されたドナーT-細胞に対して50%の陽性であり、そしてそれぞれCSF、脾臓及び血液から単離されたドナー細胞に関しては、8, 2及び1.8%の陽性であった。

【0040】

図2は、EAEを有するラットの脊髄から単離されたドナーT-細胞に基づくOX-40発現の時間の経過を示すFACS装置からのドットプロットを示す。リンパ球は、疾病の時間の経過の間、ラットの脊髄から単離された。細胞はOX-40抗体により染色され(FITC)、そしてPE接合RT7.2抗体により対比染色された。イソタイプ調和の対照抗体がFITC及びPE接合Abの両者のためのクアドラントを描くために使用された。

【0041】

個々のドットプロットのためのEAE時間経過の日時はグラフの上部に示されており、そして疾病の評点（臨床的な徴候及び疾病評点の重症度は“EAEの養子移入”下での方法セクションに提供される）が、疾病の日時の次に括弧で示されている。RT7.2⁺ 細胞の百分率はそれぞれ疾病の開始の後0、1、2、3及び5日目で77、75、81、37及び52%であった。OX-40抗体は、それぞれ、0（開始の前の日）日目でドナーT-細胞について54%の陽性であり、そして1、2、3及び5日目で41、30、18及び12%の陽性であった。5日目で、“+”のEAE評点は、動物が麻痺の最少の臨床学的徴候（1以下）を有するが、しかし完全にはよくないことを意味する。

【0042】

図3は、EAEを有するLewisラットの脊髄から単離されたOX-40陽性及び陰性の分類された集団におけるTCR Vの発現を示す。Lewisラットは、CFAにおけるミエリン塩基性タンパク質により活性に免疫化された。脊髄リンパ球が疾病の開始で単離された。細胞は、OX-40分離の後すぐに溶解され、RNAが単離され、そしてV-T細胞受容体遺伝子使用

10

20

30

40

50

について分析された。底部の2つのパネルにおいては、細胞がFACStar(Becton-Dickenson, San Jose, CA)により分類され、そして上部のパネルは分類されていない集団を比較する。分類されなかった細胞集団はV 8.2-FITC抗体により染色され、そしてパネルAにおけるPCRデータにより観察されるのと同じような陽性の百分率を示した。

【0043】

図4は、脊髄及びリンパ節から単離されたOX-40陽性細胞に対する抗原応答を示す。LewisラットがCFAにおけるMBPにより活性に免疫化され、そして脊髄リンパ球及びリンパ節細胞がEAEの開始で単離された。細胞がOX-40⁺及びOX-40⁻画分に分類され、IL-2中で5日間、培養され、そしてその対応する抗原により刺激された。分類されなかった脊髄集団がIL-2中で5日間、培養され、そして直接的にアッセイされた。細胞は照射された胸腺リンパ球(APC)及び抗原と共にインキュベートされ、そして[³H]-チミジンが48時間後に添加された。三重反復試験用ウェルを、ラベルの添加後18時間で、ガラス纖維フィルター上に収穫した。すべての細胞型(但し、分類されていない集団を除く)が対照としてConAにより刺激され、そして個々のグループに関して約100,000CPMを示した(データは示されていない)。

【0044】

図5は、OX-40-dgA接合体による抗原特異的CD4⁺T-細胞増殖の投与量依存性阻害を示すグラフである。種々の濃度のOX-40免疫毒素が一定量のF1 T-細胞、抗原を表わす細胞(APC)及びMBP(ミエリン塩基性タンパク質抗原)に添加された。白抜きの棒グラフ(グラフの右側)は、免疫毒素を添加しないで、投与を伴って及びそれを伴わないで(それぞれPOS及びNEG)、それらのT-細胞の増殖を示す([³H]-チミジンの組込みにより示される)。アッセイは、200μLの体積で実施された。

【0045】

図6A及び6Bは、OX-40-外毒素接合体による抗原特異的CD4⁺T-細胞増殖の投与量依存性阻害を示す2つのグラフである。種々の濃度のOX-40-外毒素が一定量のF1 T-細胞(図4A)又はLewis T-細胞(図4B)、APC、及びMBPに添加された。白抜きの棒グラフ(グラフの右側)は、抗原を伴って及びそれを伴わないで(それぞれPOS及びNEG)、それらのT-細胞の増殖を示す([³H]-チミジンの組込みにより示される)。アッセイは200μLの体積で実施された。

【0046】

図7は、OX-40-dgA接合体によるPPD抗原特異的CD4⁺T-細胞増殖の投与量依存性阻害を示すグラフである。種々の濃度のOX-40免疫毒素が一定量のF1 T-細胞、抗原表示の細胞(APC)及びPPD(抗原)に添加された。白抜きの棒グラフ(グラフの右側)は、抗原を伴って及びそれを伴わないでの(それぞれPOS及びNEG)、それらのT-細胞の増殖を示す。([³H]-チミジンの取込みにより示される)アッセイは、200μLの体積で実施された。

【0047】

図8A及び8Bは、400μgの用量のOX-40-dgAにより処理されたラット(図6A)又は処理されていないラット(図6B)の脊髄から単離されたリンパ球の特徴を示すFACS装置からの2種のドットプロットである。F1 MBP特異的CD4⁺T-細胞が、照射されたLewis受容体中に転移され、そしてOX-40-dgAがその転移と同じ日に与えられた。その転移集団は、PEに接合されたRT7.2抗体により検出され(y-軸上に示される)、そして対照の抗体抗-ラットIgM-FITCにより対比染色された。

【0048】

図9は疾病開始の初日に投与されるOX-40免疫毒素処理を示す。F1 MBP特異的T-細胞が8匹の照射されたLewisラット中に転移された。疾病開始の初日、4匹の動物が400μgのOX-40免疫毒素により処理され、そして処理されなかった“対照”動物と比較された。処理の後、両グループは、EAEの臨床学的徴候が静まるまで、毎日評価された。グラフ上での個々の点は、処理された及び対照のグループに関して4匹の動物の平均的な臨床学的評点を表わす。その臨床学的評点は、前の図に記載されるのと同じ尺度で処理された。

10

20

30

40

50

【0049】

図10は、OX-40免疫毒素により処理された動物の脊髄から単離されたドナー陽性(MBP特異的)T細胞に対しての効果を示す。照射されたLewisラットが、F1(Lewis x Buffalo)MBP特異的T-細胞(1×10^7 個の細胞/動物)により注射された。パネルA, C及びEにおいては、動物は“対照”として使用され、そして脳炎誘発性細胞のみを受けた。パネルB, D及びFにおいては、動物は脳炎誘発性細胞+単一投与量のOX-40免疫毒素(400 μ g/動物)をi.p.により受けた。

【0050】

パネルBは細胞転移の同じ日に与えられた処理の効果を示し、そしてパネルD及びFは、疾病の開始の前日(細胞転移の4日後)に与えられた処理の効果を示す。パネルD及びFにおいては、すべての動物は、処理の24時間後である、疾病の開始の最初の日に殺された。次に、脊髄リンパ球がRT7.2-PEにより染色され、そして陽性細胞%が上部の右隅に示されている。RT7.2 $^{+}$ 脊髄リンパ球の合計数も示されており、そして脊髄調製物から単離されたリンパ球の合計数によりRT7.2 $^{+}$ 細胞の%を掛け算することによって計算された。

EAE臨床学的評点が上部左隅に示されており、そして次の尺度に従って等級化された: 0、徵候なし; 1、弱々しい尾; 2、後脚の弱体化、運動失調; 3、後部1/4の麻痺; 4、前及び後脚の麻痺、瀕死の状態。この尺度においては、半分の段階(0.5)は、動物が番号を付けられた尺度の重症度の間に存在することを意味する。

【0051】

図11は、ヒトOX-40 cDNAのコード領域のヌクレオチド配列及びヒトOX-40抗原の理論的なアミノ酸配列を示す。それらの配列は、付随する配列列挙に示される配列番号1内に包含される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0052】

本発明は、まず最初に、抗原活性化T-細胞、特にたとえば活性化されたCD4 $^{+}$ T-細胞により引き起こされる不望の免疫応答を排除する方法を提供する。理論的に結びつけることは所望しないが、本発明者は、細胞表面抗原(この後、OX-40抗原と称する)が活性化されたT-細胞、特にたとえば、炎症の部位で見出される活性化されたCD4 $^{+}$ T-細胞上で完全に又は優先的に調節(upregulate)され、そしてこの細胞表面抗原が急速にインターナライズされるよう見える。この発見に基づいて、OX-40抗原を発現する細胞を破壊するために、細胞毒素に結合されたOX-40タンパク質(ここでは、OX-40抗体と称す)に結合する抗体を利用する治療方法が開発された。このタイプの治療は、それが活性化されたT-細胞、特にたとえば活性化されたCD4 $^{+}$ T-細胞のみを標的化し、そして損なわれていない残りのT-細胞レパートリーを残すので、ひじょうに有用であろう。

【0053】

活性化されたT-細胞、特にたとえば活性化されたCD4 $^{+}$ T-細胞は、多くの抗原活性化自己免疫疾患、たとえば多発性硬化症、サルコイドーシス、リウマチ様関節炎及び自己免疫プロドウ膜炎、並びに移植拒絶に関連している(Swanborg, R.H., 1984; Cush, J.J., and Lipsky, P.E., 1988; Caspi et al., 1988; Cobbold, S.P. et al., 1984.)。CD4 $^{+}$ T-細胞リンパ腫はまた、活性化された表現型を有することが示されている(Gootenberg, J.E. et al., 1981)。本発明は、活性化されたT-細胞、特にたとえば活性化されたCD4 $^{+}$ T-細胞により介在されるそれらの及び他の状態の診断方法及び処理方法の両方法を提供する。

【0054】

より具体的には、及び本発明に使用される関連の材料及び方法の記載に従えば、本発明の開発の間に得られた実験データが提供されている。それらのデータは、OX-40タンパク質が、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)により活性化されたCD4 $^{+}$ T-細胞の表面上の、EAEを有するラットにおける自己免疫炎症の部位で独占的に発現されることを示す。MBP活性化されたCD4 $^{+}$ T-細胞の増殖がリシンdgA細胞毒素により接合されたOX-40抗体を用いてインビトロで阻害され得ることがさらに示される。

10

20

30

40

50

【0055】

この阻害活性は、MBP活性化細胞に限定されるのではなく、また、他の抗原、たとえばマイコバクテリウム・ツベルキュロシス (Mycobacterium tuberculosis) に由来する抗原により活性化された CD4⁺T- 細胞の増殖の阻害においても効果的であることが示される。

OX-40抗体 - 細胞毒素接合体はインビボにおいて効果的であることが示されており；その接合体の使用は EAEの臨床的な進行を阻害することが示されている。これに続いて、ヒト OX-40相同体のクローニングが、ヒト OX-40タンパク質に対するモノクローナル抗体の产生と共に示されている。

【0056】

本発明の適用を示す種々の例が示されている。特に、例 1 は本発明により可能にされるヒト OX-40 cDNA の好ましい生成方法を記載する。例 2 は精製されたヒト OX-40タンパク質の生産方法を記載し、そして例 3 はヒトタンパク質を認識するモノクローナル及びポリクローナル抗体の生産を記載する。例 4 は、ヒトにおける治療使用のために適切であるこれらのモノクローナル抗体、及び診断使用のために適切である他の抗体接合体に基づく免疫毒素の製造を記載する。例 5 は、活性化された CD4⁺T- 細胞介在の状態の診断へのヒト OX-40モノクローナル抗体の使用を記載し、そして例 6 は治療用途への免疫毒素の使用を記載する。例 7 は、活性化された CD4⁺T- 細胞介在の状態の診断及び処理のためのキットを記載する。

【0057】

材料及び方法

動物： Lewis 及び Buffalo ラットを、 Haskan Sprague-Dawley, Inc., Indianapolis, IN から得た。生後、12週目の雌の Lewis ラットと、生後12週目の雄の Buffalo ラットとを交配し、 F1 Lewis x Buffalo ハイブリッド動物を生ぜしめた。それらの F1 子孫を、 MBP 免疫化のために生後 8 ~ 12 週目で使用した。ラットは、制度化したガイドラインに従って、 VA Medical Center Animal Care Facility, Portland, OR で、微生物フリー条件下で飼育された。

【0058】

MBP特異的 F1 及び Lewis CD4⁺ リンパ球系の選択： T リンパ球系を、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) による免疫化の後、12日目で選択した。この方法の詳細は、先に記載されている (Vandenbark, A.A., et al., 1985)。手短に言えば、リンパ節細胞懸濁液を、1 % 自己由来のラット血清を含む RPMI 1640 中の MBP (30 μg / ml) と共にインキュベートした。37 °C で 7 % CO₂ 霧囲気下で 3 日間のインキュベーションの後、細胞を、10% 馬血清及び IL-2 を含む RPMI 中で培養した。T - 細胞系を、分割の速度が遅くなるまで、この培地に維持した。この点で (MBP 刺激の後、7 ~ 14 日)、細胞を、照射された Lewis 胸腺細胞により提供される 10 μg / ml の MBP により再刺激し、そして続いて、 IL-2 含有培地においてさらに拡張した。

【0059】

EAEの養子移入： EAE の受動的な移入のための F1 又は Lewis T - 細胞系の活性化を、10 ml の培地における、 5×10^6 個の T - 細胞、 100×10^6 個の照射された APC 及び 10 μg / ml の MBP を用いて 10 cm² 培養皿において実施した。3 日間の活性化の後、芽細胞を計数し、そして $5 \sim 10 \times 10^6$ 個の T - 細胞芽細胞を、関連する APC 集団と共に、照射された (Lewis 移入中への F1 のためには 600 ラド) 又は照射されていない純粋 Lewis ラット中に i.p. 注入した。その純粋な同種受容体を、養子移入の前日に照射した。受容体ラットを毎日調査し、そして疾病の臨床学的徴候を記録し、そして次の通りに EAE 評価した： 0 = 徴候なし； 1 = 弛緩した尾； 2 = 運動失調； 3 = 1 / 4 下半身の麻痺； 4 = 四肢麻痺 / 濕死。

【0060】

細胞収集： 脳脊髄液 (CSF) を、8 つの管を有する 27ga × 3 / 8 針を用いての大槽穿刺の実施により収集した (Abbott Hospitals, Inc., Chicago, IL)。CSF を RPMI に 1 : 4 で希釈し、そして生存細胞数を計数した。平均、100 μl / ラットが収集された。サンプルは、RBC / WBC 比が 2 : 1 を越える場合、除外された。血液を心臓の穿刺により得、そし

10

20

30

40

50

てリンパ球を Kruisbeek, A.M., 1992により記載されているようにしてFicoll-Hypaque上で分離した。脾臓細胞を針金のメッシュスクリーンを通して押し出し、そして RBCを NH 4 Cl法により溶解した(Kruisbeek, A.M., 1992)。

【0061】

脊髄リンパ球の単離：脊髄単核細胞を、公開された方法 (Bourdets, D.N. et al., 1991) の変法に従って単離した。手短に言えば、脊髄をガス注入により単離し、すべての汚染性血液細胞を除去するために RPMIにより 3 度洗浄し、均質化し、そして次に、針金のメッシュスクリーンに通した。次に、細胞を洗浄し、そして等張Percoll(80%)に再懸濁した。それぞれ個々の脊髄のために、10mlの段階グラジエントを、円錐上の15mlの管中に注いだ。個々の段階グラジエントは、100% (2 ml)、80% (4 ml) 及び40% (4 ml) の等張 Percollを有し、そして細胞を80% 画分の部分として溶解した。

【0062】

80 / 40% Percoll段階間の界面を収穫し、そして細胞を直接的に回転沈降し、そして洗浄した。この界面で得られたリンパ球は、前方への散乱により評価されるように、休止及び幼芽集団の両者を含んだ。EAEを有する動物の脊髄から得られたリンパ球の典型的な収量は、通常、 $0.5 \sim 1.5 \times 10^6$ 個の細胞であった。リンパ球回復は疾病時間の間は、明瞭に一貫しており、そして EAEの回復期の最後の日、最大の細胞数の 1 / 2 又は 1 / 3 に低下した。

【0063】

蛍光活性化細胞分別 (FACS) 分析：図 1 及び 2 に示される二重蛍光分析に関しては、使用される抗体は、RT7.2-PE Ab(Pharmingen, La Jolla, CA) 及び MRC OX-40-FITC Ab(Pharmingen, La Jolla, CA) であった。すべての分析は、製造業者の教示に従って操作される FACScan Research Version A (Becton Dickenson, San Jose, CA)による FACScan上で行なわれた。

【0064】

抗原特異的増殖アッセイ：増殖アッセイを、前述のようにして、96 - ウェルプレートで行なった(Vandenbark, A.A. et al., 1985)。手短に言えば、 2×10^4 の CD4+ T - 細胞及び 1×10^6 の照射された胸腺細胞 / ウェルを、MPMI及び 1 % ラット血清、並びに抗原及び種々の濃度の OX-40免疫毒素又は毒素のみを含む $200 \mu l$ の溶液中でインキュベートした。その培養物を72時間インキュベートし、最後の18時間は、 $0.5 \text{Bq} [{}^3\text{H}]$ - チミジンの存在下でインキュベートした。細胞をガラス纖維フィルター上に収穫し、そして $[{}^3\text{H}]$ - チミジン摂取を液体シンチレーションにより評価した。平均 cpmを三重反復試験ウェルから計算した。反復試験ウェルからのSDは、その平均値から10% 以下変化した。

【0065】

EAEの OX-40免疫毒素阻害：純粋な Lewisラットに、1つのフラスコにおける注射される MBP特異的 CD4+T - 細胞の脳炎誘発用量を注射し、そして反対のフラスコにおける免疫毒素を同時に注射した。初め、免疫毒素のための用量曲線を設定し、そして最適な用量は、 $300 \sim 500 \mu \text{g} / \text{生後 8 週目のラット}$ であることが見出された。対照として、同じモル量の毒素のみ(dgA) が同様にして動物に与えられた。

【0066】

実験結果

自己抗原特異的 T - 細胞が自己組織を破壊する機構を理解するための 1 つのキーは、炎症部位対非炎症部位での自己反応性 T - 細胞に関する差異を研究することである。このためには、実験モデルを、インビオで疾病を引き起こす細胞を検出するために EAEにおいて設定した。

【0067】

EAEを、インビオ活性化された MBP特異的 CD4+T - 細胞の純粋な受容体ラット中への養子移入により誘発することができる。その移入の後、4 日で、動物は EAEの麻痺徵候を示し始める。宿主内のドナー集団の検出を可能にするために、MBP特異的F1(Lewis × Buffalo) CD4+T - 細胞を、照射された Lewis受容体中に移入した。Lewis及び Buffaloラット

10

20

30

40

50

は、CD45細胞表面分子のエピトープの対立遺伝子変異体を発現する。それらの対立遺伝子変異体は、RT7.1(Lewis) 及びRT7.2 (Buffalo) と称する。従って、RT7.2対立遺伝子マーカーを用いて、Lewis宿主におけるF1のT-細胞を検出できる。なぜならば、それらの細胞は、その対立遺伝子の両形を発現するが、ところが Lewisラットは対立遺伝子の RT7.1形のみを発現するからである。CD45分子は、白血球上でのみ発現され、そして合計表面タンパク質の約10%を構成する。

【0068】

図1は、疾病の開始の最初の日、MBP特異的移入集団(RT7.2^P)の50%が炎症の部位で活性化マーカーOX-40について陽性であるが(脊髄)、しかし移入された集団は非炎症性部位でこの細胞表面抗原について陰性であった(血液及び脾臓)ことを示す。これは、OX-40抗原がインビボでの抗原認識に基づいて自己反応性CD4⁺T-細胞の細胞表面上で発現され、なぜならば MBP抗原は脊髄におけるT-細胞上に存在するが、しかし血液又は脾臓には存在しないためであることを示唆した。脊髄から単離されたドナー集団上のOX-40抗原の最高の発現は EAEの臨床学的徴候の前日であり、そして疾病が進行するにつれて、この細胞表面分子は消えた(図2)。

【0069】

V 8.2 T細胞受容体(TCR)成分は、Lewisラットにおけるミエリン塩基性タンパク質(MBP)の主要脳炎誘発エピトープに対する抗原特異的CD4⁺T細胞応答に関連する優性V遺伝子生成物であると思われる。Lewisラットを、MBPにより活性に免疫化し、そしてOX-40陽性及び陰性細胞を、抗原反応性及びTCR V利用性について分析した(図3及び4)。脊髄から単離された、分別されたOX-40⁺T細胞を、OX-40⁺又は分別されていない脊髄集団に比較して、V 8.2 T細胞受容体成分の発現のために富化した(図3を参照のこと)。

【0070】

図4は、MBP及びPPD反応性T細胞の両者は流出するリンパ節のOX-40⁺画分において富化された応答を示すが、MBP反応性T細胞のみが炎症を起こされたCNSにおけるOX-40⁺画分に見出されたことを示す。それらのデータは、EAEにおける影響された標的器官内の自己抗原反応性病原性T細胞をマークするOX-40抗体の選択能力を示す。それらのデータは、Ag特異的T細胞がOX-40抗体を有する炎症の部位で単離され、そして特徴づけられ得、それにより、自己抗原認識により引き起こされる炎症に直接的に関与する細胞タイプを診断できることを強く示唆する。データはまた、OX-40⁺細胞の単離が、抗原特異性が知られていない場合でさえ、炎症を起こされた組織内にV バイアス及び自己抗原特異的細胞の同定に有用であろうことも包含する。

【0071】

従って、OX-40抗原は、抗原活性化されたCD4⁺T-細胞上に ex vivo発現されることが示されており、そしてさらに、この抗原は、その抗原が存在する炎症部位で細胞上に独占的に発現されることが示される(OX-40は、抗原の不在下で非炎症性部位で細胞上に発現されない)。それらの結果(OX-40マーカーの過渡的性質及び標的器官発現)は、OX-40が診断マーカー、及び活性化された自己免疫CD4⁺T-細胞の抗体介在消耗のための適切な標的であることを示唆した。

【0072】

リンパ球の選択的サブセットの消耗は、インビボでの抗体又は他の結合タンパク質により介在され得る。これはOX-40を発現する細胞への結合に基づいて、標的細胞を破壊するために免疫システムの他のエフェクター細胞又はタンパク質を活性化するであろう抗体又は他の結合分子を選択することによって; [この例は、補体カスケードの活性化を通して又は抗体依存性細胞毒性(ADCC)の誘発を通しての細胞の溶解を包含する(Hale et al., 1983, *Blood* 62: 873-82; Greenwood et al., 1993, *Eur. J. Immunology* 23: 1098-1104を参照のこと)]; 又は結合及び摂取に基づいて細胞を殺害するであろう毒性物質が結合されるように抗体又は結合分子を変性することによって行なわれ得る。

【0073】

10

20

30

40

50

種々の手段により結合タンパク質、モノクローナル抗体又はそのフラグメントを変性することは可能である。たとえば、毒素である融合タンパク質部分をコードするcDNAを構成することは、標準的分子生物学的技法により可能である(たとえば、Williams et al., 1987, *Protein Engineering* 1: 493-98を参照のこと)。

あるいは、標準的化学カップリング方法、たとえばチオエーテル結合を通して、タンパク質に毒素、薬物又は他の分子を結合できる(Glennie et al., 1987, *J. Immunology* 139: 2367)。

【0074】

毒素分子に連結された抗体(免疫毒素と称する)が適切な抗原を発現する細胞集団を消耗できることを、いくつかのグループは示している(Fulton, R.J., et al. 1988)。免疫毒素の利点は、それらがそれらの標的細胞特異性においてひじょうに選択的であり、そして少量の投与量が不所望の/潜在的に有害な細胞を排除できることである。

種々の細胞毒素が免疫毒素を生成するために使用され得る。リシンA鎖-抗体接合体は、インビボ及びインビトロで、正常な及び腫瘍性のリンパ球を消耗するため使用されて来た(Fulton, R.J. et al., 1988; Street, N.E. et al., 1987)。他の毒素、たとえばプソイドモナス(*Pseudomonas*)外毒素A及びジフテリア毒素はまた、抗体に接合され、そして細胞の特定集団を殺害するために使用されて来た(May, R.D., and Fulton, R.J. 1922)。

【0075】

1980年代後期~90年代の初期において、いくつかのヒトフェースI/II臨床試験が、リシンA鎖に接合された抗体を用いて行なわれた(Weiner, L.M., et al. 1989; Splinter, L.E., et al., 1987; Vitetta, E.S., et al., 1991)。ほとんどの試験は、癌患者における腫瘍の苦しみを低めるために癌抗原に対して特異的な抗体を用いることを含んだ。最近、処理された患者における非特異的な免疫原性及び毒性のいくつかの問題を回避する“第2世代”免疫毒素の開発が存在する。この方法は、腫瘍特異的抗体に接合されたリシンA(dgA)鎖脱グリコシル化された形を使用する。1つのそのようなフェースI研究は、15人の患者においてB細胞リンパ腫に対する免疫毒素のこの変性された形を使用した(Vitetta, E.S., et al., 1991)。約40%の患者が、それらの全体の腫瘍の苦しみが50%又はそれ以上、減じられた部分的な緩解を達成した。腫瘍細胞の死滅は、治療の完結の後、1週間以内で急速に生じた。

【0076】

本明細書に示されるインビボ研究のすべては、OX-40抗体-dgA接合体を使用する。抗体リシンA接合は、May, R.D. and Fulton, R.J. (1992)により記載される方法に従ってヘテロ官能価架橋剤SPDP又はSMPTにより実施された。手短に言えば、OX-40抗体上の遊離アミノ基が架橋剤と反応せしめられ、そして高分子物質が精製された。その精製されたOX-40抗体生成物が還元されたA鎖(1つの遊離システインを有する)と反応せしめられ、そしてハイブリッド分子が精製された。

【0077】

始めに、ラットOX-40抗体を、リシンのdgA形と反応せしめ、そしてこのヘテロ接合体を用いて、抗原特異的CD4⁺T-細胞系のインビトロ増殖を阻害した。使用されるT-細胞系はMBPに対して特異的であり、そして養子移入に基づいて、純粋な受容体にEAEを引き起こした。図5は、OX-40ヘテロ接合体が、約20ng/ウェルで50%の阻害を伴っての投与量依存性態様でMBP特異的T-細胞系の抗原特異的増殖を阻害したことを示す。リシンAのみを用いる対照は、500ng/ウェル及びそれ以上の高い濃度でのみアッセイの阻害を示したが、しかし低い濃度でのアッセイに対しては効果を示さなかった(データは示されていない)。OX-40抗体のみ及びdgAに接合されるイソタイプ-調和された関連しない抗体を用いる対照はまた、阻害を示さなかった(データは示されていない)。

【0078】

次に、OX-40抗体をプソイドモナス外毒素に接合し、そしてこの接合体を、抗原特異的(MBP)CD4⁺T-細胞増殖に対する阻害効果について試験した(図6A及び6B)。このヘテ

10

20

30

40

50

口接合体は、インビトロアッセイの阻害で約4倍以上効果的であり、そして毒素は単独で、いづれの濃度でもアッセイを阻害しなかった。このアッセイが、Lewis MBP特異的系(図6B)及びF1(Lewis×Buffalo) MBP特異的系(図6A)により実施され、これは、増殖の阻害が菌株特異的でなかったことを示す。

【0079】

OX-40-dgAもまた用いて、EAE又は自己免疫性に無関係である抗原により活性化されたCD4⁺T-細胞系のインビトロ増殖を阻害した。使用される抗原は、マイコバクテリウム・ツベルキュロシス(Mycobacterium tuberculosis)からの精製されたタンパク質誘導体(PPD)抗原であった。この抗原を用いて、OX-40抗原がMBP抗原により活性化されたCD4⁺T-細胞に対して特異的であるかどうかを、又はそれがT-細胞受容体特異性にかかわらず、すべての抗原活性化CD4⁺T-細胞の表面上に存在するかどうかを確かめた。図7に示されるように、MBP活性化系に比較して50%の阻害性を伴って、PPD活性化T-細胞系の増殖の用量依存性阻害性が存在した。これは、OX-40免疫毒素が、抗原特異性にかかわらず、あらゆる活性化されたCD4⁺T-細胞系の増殖を阻害するであろうことを示す。

【0080】

OX-40免疫毒素はインビトロでのMBP特異的自己免疫CD4⁺T-細胞の増殖の阻害で効果的であるので、MBP特異的CD4⁺T-細胞をインビボで殺すこの免疫毒素の可能性を決定するための実験を行なった。このためには、照射されたラットが始めに使用され；それらの動物はMBP特異的F1T-細胞の脳炎誘発用量を投与された。同時に、動物は、OX-40-リシンA接合体又はリシンAのみにより注射された。照射の効果は、ラットの免疫システムが対立遺伝子変異体F1ドナーT-細胞を認識せず、そしてそれを消耗しないように、そのラットの免疫システムを消耗することである。照射されたラットの使用は、それらの細胞の移入の後、宿主におけるRT7.2抗体によるドナーT-細胞の検出を促進せしめ、そしてそれらの移入された細胞の運命の決定を可能にする(図1, 2, 8A及び8Bを参照のこと)。

【0081】

表1の実験1及び2に示されるように、OX-40免疫毒素を受ける動物のわずか1/8が疾病的臨床的な徴候を示したが、ところが接合されていないリシンAを受けた8匹のすべての動物はEAEにかかった。免疫毒素の阻害効果は、OX-40抗体により介在されているよう見えた。なぜならば、リシンA鎖のみが、脳炎誘発性CD4⁺T-細胞のみにより注射された動物と比較される場合、同じ疾病評点を示したからである(データは示されていない)。

【0082】

10

20

30

【表1】

表 1

実験的な自己免疫脳脊髄炎に対する OX-40リシンA 免疫毒素の効果

移入用量 ^a	処理 ^b	出現率	開始日	EAE評点 ^c	
実験 1					
6.5×10^6	OX-40-リシンA	1/3	6	0.66	10
6.5×10^6	リシンA	3/3	4	6.33	
実験 2					
10×10^6	OX-40-リシンA	0/5	—	—	
10×10^6	リシンA	5/5	5	4.90	
実験 3					
10×10^6	OX-40-リシンA	0/2	—	—	
10×10^6	処理ナシ	3/3	4	6.50	

a : MBP特異的 CD4⁺ T-細胞が、抗原及び抗原提示細胞によりインビトロで3日間刺激され、そして純粋な受容体中に移入された。

20

b : 細胞が移入されるのと同時に、400 μg の OX-40-リシンA 又は同じモル量のリシンAのみが注射された。

c : 値は個々のグループのための平均累積 EAE評点を表わす。

0、徴候なし；1、弱々しい尾；2、後脚の弱体化；3、後部1/4の麻痺；4、瀕死状態。

【0083】

表1に御けるデータは、EAEモデルを用いて得られており、ここでF1 MBP T-細胞系(Lewis x Buffalo)を、照射されたLewis(親宿主)受容体中に注射した。従って、移入されたT-細胞集団は、RT7.2 (Buffalo) 抗体によりそれらの動物の脊髄に検出され得る。図8 A及び8 Bは、疾病開始の最初の日、処理された(臨床的には良好である)グループ及び対照のグループ(麻痺している)の脊髄から単離されたドナー細胞の数により評価した場合の OX-40-dgA処理の結果を示す。

30

【0084】

合計 200,000の脊髄リンパ球が対照グループから単離され、そしてその80%がドナー由来であることが見出された。対照的に、80,000の脊髄リンパ球が処理されたグループから単離され、そしてわずか15%がドナー由来であることが見出された。2種のグループ間での脊髄(炎症部位)から単離されたドナー由来の MBP反応性 CD4⁺T-細胞の合計量に対数倍の差異が存在した(160,000対12,000)。これは、OX-40 dgA接合体がインビトロで MBP-反応性 CD4⁺T-細胞を特異的に消耗することを示唆した。

40

【0085】

図9に示されるように、動物は、両グループが1の平均的な臨床学的評点を有する場合、疾病開始の最初の日に OX-40免疫毒素により処理された。処理の後、すべての対照動物は、完全な後脚の麻痺の徴候(評点=3)を示したが、ところが処理された動物はわずかに進行した(評点=1.5)。処理の後の平均累積評点は、対照グループにおいては 8.0であり、そして処理されたグループにおいては3.75であった。

【0086】

別の実験において、動物を疾病の最初の日に処理し、そして24時間後に殺した。次に、リンパ球を脾臓及び脊髄から単離した。3種のグループが、OX-40抗体のインビボラベリ

50

ングのために分析された。対照は処理されず、第2グループは接合されていない OX-40を受け、そして第3グループは OX-40免疫毒素を受けた。類似する数の細胞を脾臓から回収し、そして対照及び接合されていない OX-40により処理されたグループに比較して、脊髄リンパ球の量の半分を OX-40免疫毒素 - 処理グループから回収した。OX-40及び OX-40免疫毒素により処理されたラットの脊髄から単離されたリンパ球の約15~20%が抗 - マウス Ig陽性であった。

【 0 0 8 7 】

対照ラットの脊髄から単離された細胞は、そのリンパ球の18%が OX-40陽性であったとしても、マウス Ig陰性であった(表2)。いづれかのグループにおいて、脾臓から単離されたひじょうに少数の抗 - マウス Ig-FITC陽性細胞が存在した。類似する%の OX-40⁺ 細胞及び抗 - マウス Ig⁺細胞を、OX-40及び OX-40免疫毒素グループの脊髄から単離した。抗 - マウス Ig陽性細胞の大部分は、脊髄から単離されたドナー集団に関連していた(MT7.2⁺ / 抗 - マウス Ig⁺ ; 表2)。それらの結果は、OX-40抗体のインビボ投与が炎症を起された組織から単離された自己抗原特異的細胞の独占的な結合をもたらしたこと示す。

【 0 0 8 8 】

【表2】

表 2
OX-40陽性T細胞のインビボラベリング

処理 ^a	OX-40 ⁺	α-マウスIg ⁺	ドナー ⁺ / ドナー ⁺ α	
細胞の単離 マウスIg ⁺				10
<u>対 照</u>				
脊 髓 0.3%	17.9% ^b	0.2%	54.4%	
脾 腎 0.2%	0.5%	0.3%	2.4%	
<u>OX-40</u>				20
脊 髓 13.5%	17.7%	17.5% ^c	53.2%	
脾 腎 0.3%	0.3%	0.4%	4.6%	
<u>OX-40-リシンA^d</u>				30
脊 髓 18.0%	19.0%	18.1%	50.3%	
脾 腎 0.4%	0.7%	0.5%	2.3%	

a : MBPに対して特異的なF1 T細胞が、照射された Lewis宿主中に移入され、そして 400 μg の OX-40免疫毒素又はOX-40 abのみが、疾病の開始の日にi. p. 投与された。

b : 陽性細胞%のすべては、負の比較のためにクオドラントを描くために、イソタイプ対照抗体を用いての FAC分析により決定された。

c : α-マウスIg⁺ 細胞の平均蛍光強度(MFI) は、OX-40 FITC染色された細胞の MFIにひじょうに類似した。

d : OX-40免疫毒素動物から単離された脊髄リンパ球の合計数は、OX-40及び対照グループの合計数の半分であった。

【0089】

処理の効能を評価するために、脊髄リンパ球を単離し、そして OX-40免疫毒素処理されたラット対照ラットからの RT7.2抗体によるBP反応性ドナー細胞の量を分析した(F1ドナー細胞は、照射された Lewis受容体中へ移入した)。図10A及び10Bは、脊髄から単離されたミエリン反応性ドナーT細胞の数により評価される場合の、細胞移入の同じ日に投与された OX-40免疫毒素の結果を示す。 RT7.2-陽性細胞を、疾病開始の最初の日に分

析し；処理された動物は臨床的に良好であり(EAE評点 = 0、 1.2×10^4 個のドナー脊髄リンパ球による)、ところが対照動物は麻痺された(EAE評点 = 1、 1.6×10^5 個のドナー脊髄リンパ球による)。

【0090】

図10C, D, E及びFにおいては、ラットから単離されたOX-40陽性ドナーT細胞のみが脊髄からである場合、処理は疾病の開始の前日に与えられた(図1)。脊髄及び脾臓リンパ球を、処理の24時間後に単離した。受容体から単離されたドナー由来の脾臓細胞の数は、その処理により影響を受けなかった(データは示されていない)。すべての比較においては、脊髄から単離されたドナー⁺細胞の数は処理された動物において対数的に減少した(図10)。それらのデータは、OX-40免疫毒素がインビポでMBP反応性ドナー細胞を特異的に消耗し、そして結果として、少ない数の脳炎誘発性細胞を処理された動物の脊髄から単離したことを示す。

【0091】

次に、同じインビポ実験を、照射されていない宿主において行なった；Lewis MBP活性化T-細胞系を、Lewis宿主中に移入した。照射されていない宿主が使用された。なぜならば、この宿主は自己免疫疾患のそれらの同じタイプを有するヒト患者に類似する損なわれていない免疫システムを有するからである。それらの実験においては、T-細胞の移入の時点での接合体の単一の注入は疾病の続く進行を単に部分的に阻害したことが初期において観察された。従って、実験は、異なった時点で2回の注射を用いて行なわれた。

【0092】

3匹の動物に、0日目及び3日目に注射し、そして3匹の対照動物と比較した(表II)。それらの結果は、免疫毒素が3日目、炎症の部位で自己免疫T-細胞を認識し、そして殺害することを、次の理由から示唆する：(1)3日目(疾病の開始の前日)、OX-40抗原を発現するドナーT-細胞のみが脊髄区画に存在し(図1)、そして(2)脊髄におけるドナーT-細胞上のOX-40の発現の最高の%は疾病の開始の前日であった(図2)。

【0093】

【表3】

表 3

実験的な自己免疫脳脊髄炎に対するOX-40-リシンA免疫毒素の効果(照射されていない宿主において)

30

移入用量 ^a	処理 ^b	注入の日	開始の後	EAE評点 ^c
9.0×10^6	OX-40-リシンA	0/3	5	1.33
9.0×10^6	ナシ	—	4	8.25

a : Lewis MBP特異的 CD4⁺ T-細胞を、抗原及び抗原提示細胞によりインビトロで3日間刺激し、そしてLewis受容体中に移入した。

40

b : 400 μ gのOX-40-リシンA又は同じモル量のリシンAのみが、細胞が移入されるのと同時に注入された。

c : 値は、3匹の動物の個々のグループについての平均累積EAE評点を表わす。0、徴候なし；1、弱々しい尾；2、後脚の弱体化；3、後部1/4の麻痺；4、瀕死状態。

40

50

【0094】

示されたデータからの結論は、OX-40免疫毒素がインビトロ及びインビボでの抗原特異的 CD4⁺T-細胞機能の殺害／阻害でひじょうに効果的であることである。この特異的免疫毒素の効果は、株又は抗原特異性により制限されるとは思われず、そして広範囲のインビボ適用を有するであろう。

【0095】

上記実験を、ラットモデルシステム及びラット OX-40タンパク質に対する抗体を用いて実施した。しかしながら、ラット OX-40抗体は、ヒト又はネズミ活性化 CD4⁺T-細胞を認識しなかった（データは示されていない）。ヒト治療への使用のために本発明の開発を促進せしめるためには、ヒト OX-40タンパク質に対する抗体を生成することが必要である。

10

【0096】

そのためには、ヒト OX-40相同体をコードするヒトcDNAをクローン化した。初めに、2つのオリゴヌクレオチドプライマーを、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)での使用のために合成した。それらのプライマーは十分な長さのOX-40 cDNA配列を增幅するように企画されており；1つのプライマーはラットcDNA配列の開始コドンの領域においてコード鎖に相同であり、そして他は、ラットcDNA配列の停止コドンの領域においてコード鎖の逆補体であった。驚くべきことには、それらのPCRプライマーがヒトからの活性化された CD4⁺Tリンパ球から単離された RNAと共に使用される場合、生成物は決して得られなかった。

【0097】

ヒトOX-40 cDNAをクローニングするための標準方法は好結果をもたらさなかったので、他のアプローチが必要とされた。まず、PCRプライマーを都合良く使用して、コンカナバリンAにより活性化されたネズミ CD4⁺T-細胞から単離された RNAからの PCRによりネズミOX-40 cDNAをクローン化した（データは示されていない）。次に、ネズミOX-40 cDNAを用いて、ヒト活性化Tリンパ球からのcDNA gt11ライプラリー(Clontech, Palo Alto, CA から得られたNo. HL10316)をプローブした。5種の類似する大きさの陽性クローン（1050 - 1200bp）を得た。それらの5種の組換え クローンを、Bluescriptプラスミド (Stratagene, La Jolla) 中にサブクローン化し、そして次に、自動配列決定機 (Applied Biosystems, Pasadena (A)上で配列決定した。ヒトOX-40 cDNAの配列は、付随する配列表において配列番号1として示されており、そして図11に示されている。

20

【0098】

ヒト OX-40タンパク質の予測されるアミノ酸配列と Genbankデータベースにおけるペプチド配列との比較は、ネズミ OX-40及びラット OX-40配列との高い程度の相同性を示し；配列番号に示されるヒト OX-40タンパク質の予測されるアミノ酸配列がネズミ又はラット OX-40アミノ酸配列に関連していない確立はそれぞれ 3.4×10^{-56} 及び 2.9×10^{-56} であることが予測された。次の最も密接して関連するペプチド配列は、 1.1×10^{-11} の確立を付与した。さらに、ラット配列のアミノ酸31で開始する64個のアミノ酸(192個の塩基対)領域にわたるアミノ酸配列とヒト及びラットOX-40 cDNAとの間の相同性の比較は、62.5%のアミノ酸相同性及び67.5%のヌクレオチド相同性を示した。この64個のアミノ酸内の10個すべてのシステイン残基は保存された。

30

【0099】

GVHDにおける OX-40発現

40

T-細胞上での OX-40の発現を、移植片 - 対 - 宿主病 (GVHD) を有する患者において研究した。

同種骨髄移植を受けた3人の患者はGVHDの病気にかかった。GVHD開始の日は、移植の後7～50日であり、患者間で異なった。表4は、GVHDエピソードの間の OX-40発現の要約を示す。すべての患者は、病気の進行の初期段階の間、OX-40を発現する CD4⁺ 末梢血液細胞の高められた%を示した。すべての患者において、OX-40⁺T-細胞の%は、初期の臨床的なエピソードの後、低下した (GVHDの7～14日後)。このデータは、EAEにおける疾患の進行の初期段階の間に観察される OX-40の一過性発現と矛盾しない (図2)。GVHDにおける OX-40発現は、臨床学的徴候の初期進行と相互関係し、そしてこの及び他のヒト移

50

植 / 自己免疫疾患のための直接的な診断及び治療用途を有する。

【0100】

【表4】

表 4
移植片一対一宿主病を有する骨髄移植患者の PBLにおける
OX-40発現

患者	GVH後の日数	%CD4 ⁺	CD4 ^a の%OX-40 ⁺	重症度 ^b	10
#1	3	5.8 ^c	24.0 ^c	グレード4	20
	7	5.0	0.5		
	14	4.0	1.6		
#2	1	12.1	10.5	グレード2	30
	10	6.6	0.5		
#3	2	41.0	10.0	グレード2	40
	8	8.3	0.5		

a : ドナー及び受容体の末梢血液リンパ球を、移植処理の前、OX-40発現についてスクリーンし、そして CD4⁺ T細胞は1%以下の OX-40⁺ であった。

b : 値は、GVHDの臨床学的徴候（皮膚の関与）の間に得られた個々の患者の最大の重症度を表わす。0、徴候なし；1—関与なし～25%の皮膚関与；2—25%の関与～50%の関与；3—50%以上の関与；4—水疱を伴っての50%以上の関与；5—死を導く。

c : GVHD患者の末梢血液からのリンパ球をHypaque-Ficollにより単離した。サンプルを単離し、そして GVH後の種々の日で分析した。サンプルを、抗ヒトCD4-PE抗体及び抗ヒト OX-40抗体により二重染色した。OX-40抗体を抗マウス IgG₁-FITCにより検出し、そして間接的な抗体のみを負の対照として使用した。

【0101】

OX40及び IBD

OX-40は IBDと関連して使用されるものであることが見出された。

OX40の組織発現を、間接的なアルカリホスファターゼ免疫組織化学染色の標準技法を用いて調査した（たとえば、Immunocytochemistry : Practical Applications in Pathology and Biology. J. Polak and S. van Noorden, eds. John Wright and Sons, Bristolを参照のこと）。潰瘍性大腸炎及び Crohn's病患者の両者からの腸の生検組織サンプルを、抗-OX40抗体により陽的に染色した。OX40⁺細胞群が、炎症の部位で粘膜固有層を浸潤するリンパ様細胞間に見出された。正常な人からの腸組織のサンプル又は患者からの関連しない腸組織のサンプルにおいては、単に、単離され、散乱されたOX40⁺細胞が見出された。

例1.

ヒトOX-40 cDNAの配列が本明細書で提供される場合、当業者は、完全な長さのcDNAクローニングが標準の方法により容易に得られることを理解するであろう。そのような方法は、たとえば、DNA配列が增幅されるポリメラーゼ鎖反応(PCR)を包含する。DNAのPCR增幅のための方法及び条件は、Innis et al., (1990)及びSambrook et al., (1989)に記載され

ている。

【0102】

ヒトOX-40 cDNAの増幅のための PCRプライマーの選択は、増幅されることが所望される、cDNAの一部に従って行なわれるであろう。プライマーは、cDNAの小フラグメント又は完全なcDNA分子を増幅するために製造され得る。増幅条件の変動は、異なった長さのプライマーを提供するために必要とされ；そのような考慮は、当業界においては良く知られており、そして Innis et al. (1990) に論ぜられている。例によれば、ヒトOX-40 cDNAに対応する完全なcDNA分子は次のプライマーを用いて増幅され得る。プライマー1及び2はまた、それぞれ、配列番号2及び3として列挙する添付の配列にも示されている。

【0103】

プライマー1：5 ATGTGCGTGGGGCTCGGCGGCTG 3
 プライマー2：5 TCAGAACTTGACCAGGGTGGAGTG 3

【0104】

ヒトOX-40 cDNAを生成するために PCR増幅のための鑄型 DNAを、 Clontech, Polo Alto, Californiaにより生成されるヒト活性化Tリンパ球からの GTII cDNAライブラリー (カタログNo. HL10316)から抽出できる。

【0105】

他方、ヒトOX-40 cDNAは、逆転写された RNAの PCR増幅 (RT-PCR) により得られる (Veres et al., 1987; Kawasaki et al., 1990)。実質的には、全 RNAが、 Sambrook et al. (1989)及びAusubel et al. (1987)に記載されるような通常、使用される種々の方法のいづれか1つの方法により、活性化されたヒトCD4 T-細胞から抽出される。適切なヒトCD4 T-細胞は、 Gootenberg et al. (1981)により記載されるヒト CD4⁺T-細胞リンパ腫細胞系を包含する。他方、活性化された CD4⁺T-細胞は、 Kruisbeek (1992)により記載されるように、ヒト末梢血液から単離され得る。次に、抽出された RNAは、ヒトOX-40 cDNAの RT-PCR増幅を行なうために鑄型として使用される。

PCR生成物の精製及びクローニングのための標準の方法は当業界において良く知られており、そして Innis et al. (1990) 及び Sambrook et al. (1989)により記載されている。

【0106】

例2.

ヒトOX-40 cDNAの供給により、標準の実験技法によるヒト OX-40タンパク質の発現及び精製が現在、可能にされる。精製されたタンパク質は、抗体産生及び患者の治療のために使用され得る。

【0107】

対象のタンパク質をコードする、部分的な又は完全な長さのcDNA配列を、細菌発現ベクター中に連結する。E.コリ中に導入されるクローニングされた遺伝子からの多量のタンパク質を発現するための方法は、ヒト OX-40タンパク質の精製のために利用され得る。たとえば、ヒト OX-40タンパク質の一部又はすべてに連結されるE.コリ lacZ又はtrpE遺伝子の一部によりコードされるアミノ末端ペプチドから成る融合タンパク質が、ヒト OX-40タンパク質を認識するポリクローナル及びモノクローナル抗体を調製するために使用され得る。損なわれていない純粋なタンパク質はまた、機能的な研究のために多量にE.コリにおいて生成され得る。

【0108】

細菌において融合タンパク質及び損なわれていない純粋なタンパク質を生成するための方法及びプラスミドベクターは、 Sambrook et al. (1989) (引用により本明細書に組込まれる)に記載される。そのような融合タンパク質は、多量に製造され、容易に精製することができ、そして抗体を生成するために使用され得る。純粋なタンパク質は、強い調節されたプロモーター及び効果的なリボソーム結合部位をクローニングされた遺伝子の上流に配置することによって細菌において生成され得る。低レベルのタンパク質が生成される場合、追加の段階がタンパク質生成を高めるために取られ；高レベルのタンパク質が生成される場合、精製は比較的容易である。適切な方法は Sambrook et al. (1989)に示されており

10

20

30

40

50

、そして当業界において良く知られている。

【0109】

しばしば、高レベルで発現されたタンパク質が不溶性封入体に見出される。それらの凝集体からタンパク質を抽出するための方法は、Sambrook et al. (1989) (ch.17)により記載される。lacZ融合遺伝子の発現のために適切なベクターシステムは、pUKシリーズのベクター (Ruther and Muller-Hill, 1983)、pEX1-3 (Stanley and Luzio, 1984)及びpMR100 (Gray et al., 1982)を包含する。損なわれていない純粋なタンパク質の生成のために適切なベクターは、pKC30(Shimatake and Rosenberg, 1981)、pKK177-3 (Amann and Bro sius, 1985)及びpET-3 (Studiar and Moffatt, 1986)を包含する。ヒト OX-40融合タンパク質は、タンパク質ゲルから単離され、凍結乾燥され、粉末に粉碎され、そして抗原調製物として使用され得る。

【0110】

哺乳類細胞での発現のためには、cDNA配列が非相同プロモーター、たとえばpSV2ベクター (Mulligan and Berg, 1981) におけるSV40プロモーターに連結され、そして過渡的な又は長期発現を達成するために、細胞、たとえばモンキー COS-1細胞 (Gluzman, 1981) 中に導入される。cDNA配列 (又はそれに由来する部分) 又はミニ遺伝子 (イントロン及びそれ自体のプロモーターを有するcDNA) が、従来の技法により、真核生物の発現ベクター中に導入される。それらのベクターは、cDNAの転写を開始し、そして増強する調節配列を提供することによってcDNA真核生物細胞の転写を可能にするよう企画される。

【0111】

SV40のプロモーター及びエンハンサー領域又はラウス肉腫ウィルスの長い末端反復体 (LTR) 及びSV40からのポリアデニル化及びスプライシングシグナルを含むベクターは容易に入手できる (Malligen et al., 1981 ; Gorman et al., 1982)。cDNAの発現のレベルは、異なった活性を有するプロモーター (たとえば、バキュロウィルスpAC373はS. frugiperda (S. frugiperda) 細胞において高レベルでcDNAを発現できる (Summers and Smith, 1985)) を用いることによって、又は変性されやすいプロモーター、たとえばマウス乳癌ウィルスからのグルココルチコイド - 応答性プロモーター (Lee et al., 1982) を含むベクターを用いることによって、このタイプのベクターにより操作され得る。

【0112】

さらに、いくつかのベクターは、選択マーカー、たとえばgpt (Mulligan and Berg, 1981) 又はneo (Southern and Berg, 1982) 細菌遺伝子を含む。それらの選択マーカーは、ベクター (及び従ってcDNA) の安定した長期の発現を示す、トランスフェクトされた細胞の選択を可能にする。前記ベクターは、ウィルス、たとえば乳頭腫ウィルス (Sarver et al., 1981) 又はエピスタン - バールウィルス (Sugden et al., 1985) の調節要素を用いることによって、エピソームの自由に複製する存在物として細胞に維持され得る。他方、ゲノム DNA中にベクターを組込んでいない細胞系を生成することもできる。それらの両タイプの細胞系は、遺伝子生成物を連続的に生成する。高レベルの遺伝子生成物を生成できる細胞系を創造するためにベクター (及び従ってcDNA) のコピー数を増幅している細胞系もまた、生成することができる (Alt et al., 1978)。

【0113】

真核生物、特にヒト又は他の哺乳類の細胞中へのDNAの移入は、現在、通常の技術である。ベクターは、たとえばリン酸カルシウム (Graham and Vander Eb, 1973) 又はリン酸ストロンチウム (Brash et al., 1987) による沈殿、エレクトロポレーション (Neumann et al., 1982)、リポフェクション (Felgner et al., 1987)、DEAEデキストラン (McCuthan et al., 1968)、マイクロインジェクション (Mueller et al., 1978)、プロトプラス融合 (Schafner, 1980) 又はペレットガン (Klein et al., 1987) により、純粋なDNAとして受容体細胞中に導入される (トランスフェクション)。他方、cDNAはウィルスベクターによる感染により導入され得る。たとえば、レトロウィルス (Bernstein et al., 1985)、アデノウィルス (Ahmad et al., 1986) 又はヘルペスウィルス (Spaete et al., 1982)を使用するシステムが開発されている。

10

20

30

40

50

【0114】

真核細胞に発現されるヒト OX-40タンパク質は、精製され、そして抗体を生成するために使用される。ヒト OX-40タンパク質は、上清液中へのタンパク質の開放に続いて抽出され得、又はcDNA配列は真核生物の発現ベクター中に組込まれ、そしてたとえば - グロビンを有するキメラタンパク質として発現され得る。 - グロビンに対する抗体を、その後、キメラタンパク質を精製するために使用する。 - グロビン遺伝子とcDNAとの間に構築される対応するプロテアーゼ切断部位を用いて、翻訳の後、お互いから 2 つのポリペプチドフラグメントを分離する。 - グロビンキメラタンパク質を生成するための 1 つの有用な発現ベクターはpSG5 (Stratagene, La Jolla, CA) である。このベクターは、ウサギ - グロビンをコードする。

10

【0115】

本発明は、ヒトOX-40 cDNA配列又はその一部を含む組換えクローニングベクターを包含する。そのヒトOX-40 cDNAは、ヒト OX-40ポリペプチド、又はその一部が発現されるように、組換 DNA分子における発現制御配列にベクターにおいて操作可能的に連結される。その発現制御配列は、原核又は真核細胞及びそれらのウィルス及びそれらの組合せの遺伝子の発現を制御する配列から成る群から選択され得る。発現制御配列は、 lacシステム、 t rpシステム、 tacシステム、 trcシステム、 ファージ の主要オペレーター及びプロモーター領域、 fdコートタンパク質の制御領域、 SV40の早期及び後期プロモーター、 ポリオーマ、 アデノウィルス、 レトロウィルス、 バキュロウィルス及びシミアンウィルスに由来するプロモーター、 3 - ホスホグリセレートのためのプロモーター、 酵母酸性ホスファターゼのプロモーター、 酵母 - 接合因子のプロモーター及びそれらの組合せから成る群から特異的に選択され得る。

20

【0116】

本発明のベクターによりトランスフェクトされ得る宿主細胞は、 E . コリ、 プソイドモナス、 バシラス サブチリス (Bacillus subtilis) 、 バシラス ステアロサーモフィラス (Bacillus stearothermophilus) 又は他のバシラス；他の細菌、 酵母； 真菌； 昆虫； マウス又は他の組織細胞、 たとえばヒト組織培養細胞から成る群から選択され得る。

30

【0117】

本発明の好ましい態様においては、 図 9 (出発コドン～停止コドン) に示されるような完全な長さのヒトOX-40 cDNAを、 バキュロウィルスベクター中に連結し、 そして組換えヒトタンパク質を適切な昆虫細胞において生成する。適切なバキュロウィルス発現システムは、 Clontech (Palo Alto, CA) により生成されるBacPAK T M Baculovirus Expression Systemを含む。従って、 例によれば、 完全な長さのヒトOX-40 cDNAをプラスミドpBacPAK1中に連結し、 そして製造業者の教授に従ってスpodoptera · fugiperda (Spodoptera frugiperda) 細胞において発現する。

40

【0118】

昆虫細胞において生成されるヒト OX-40タンパク質を次に、 標準技法により精製する。組換え生成物を単離する好ましい技法は、 組換えタンパク質に追加の 6 個のヒスチジン残基を付加するベクターを使用することである。融合タンパク質はこの態様において、 タンパク質精製を経済的に促進するキレート金属を生成した。従って、 たとえば、 ポリヒスチジン融合タンパク質は、 高い親和性でもって金属キレートマトリックスに結合し、 ところが大部分の宿主タンパク質はまったく結合しない。低い親和性の結合宿主タンパク質は、 pHを 6.0に下げるによってマトリックスを洗い流され得る。ポリヒスチジン - 含有融合タンパク質の特異的溶離は、 pH 6.0での 300mMのイミダゾール緩衝液により達成され得る。

40

【0119】

例 3 .

治療への使用のために、 ヒト OX-40タンパク質に対するモノクローナル抗体を生成する。免疫原として使用するために適切な実質的に純粋なヒト OX-40タンパク質を、 上記例 2 に記載されるようにしてトランスフェクトされた又は形質転換された細胞から単離する。

50

最終調製物におけるタンパク質の濃度を、Amiconフィルター装置上の濃縮により、数mg/mlのレベルに調節する。次に、前記タンパク質に対するモノクローナル抗体を、次の通りにして調製する：

【0120】

A. ハイブリドーマ融合によるモノクローナル抗体の产生

上記のようにして同定され、そして単離されたヒト OX-40タンパク質のエピトープに対するモノクローナル抗体を、Kohler and Milstein (1975)の従来の方法又はその誘導方法に従ってネズミハイブリドーマから調製する。手短に言えば、マウスを、数μgの選択された精製タンパク質により数週間にわたってくり返して接種する。次にマウスを殺し、そして脾臓の抗体産生細胞を単離する。その脾臓細胞をポリエチレンギリコールにより、マウス骨髄腫細胞により融合し、そして過剰の融合されなかった細胞を、アミノブテリンを含んで成る選択培地(HAT培地) 上でのシステムの増殖により破壊した。

【0121】

都合良く融合された細胞を希釈し、そしてその希釈溶液のアリコートを、培養物の増殖を続けるマイクロタイタープレートのウェルに置いた。抗体産生クローンを、イムノアッセイ方法、たとえばEngvall (1980)により始めに記載されたような ELISA、及びその誘導方法により、ウェルの上清流体における抗体の検出により同定する。選択された陽性クローンを拡張し、そしてそれらのモノクローナル抗体生成物を使用のために収穫する。モノクローナル抗体産生のための詳細な方法は、Harlow and Lane (1988)に記載されている。

B. 合成ペプチドに対して生ぜしめられた抗体

【0122】

ヒト OX-40タンパク質に対する抗体を生ぜしめる他のアプローチは、図11に示されるヒト OX-40タンパク質の推定されるアミノ酸配列に基づいて市販のペプチド合成機上で合成された合成ペプチドを用いることである。

【0123】

本発明の好ましい態様においては、ヒト OX-40タンパク質を認識するモノクローナル抗体が生成される。最適には、ヒト OX-40タンパク質に対して生ぜしめられたモノクローナル抗体は、ヒト OX-40タンパク質を特異的に検出する。すなわち、そのような抗体は、ヒト OX-40タンパク質を認識し、そして結合せしめ、そしてヒト細胞に見出される他のタンパク質を実質的に認識せず又は結合しない。そのような抗体は、実質的にヒト OX-40タンパク質のみに対して及び従って、実質的に活性化された CD4⁺T-細胞のみに対して、ヒトにおいては結合する特異性を有する。

【0124】

抗体がヒト OX-40タンパク質を特異的に検出する決定は、多くの標準的なイムノアッセイ法、たとえばウェスターントロット法(Sambrook et al., 1989) により行なわれる。与えられた抗体調製物(たとえばマウスにおいて生成されたもの)がヒト OX-40タンパク質をウェスターントロットにより特異的に検出することを決定するために、全細胞タンパク質を、OX-40抗原を発現しないヒト細胞、たとえば活性化されていないリンパ球から抽出する。陽性の対照として、全細胞タンパク質をまた、活性化されたT-細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T-細胞から抽出する。次に、それらのタンパク質調製物を、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動する。

【0125】

その後、タンパク質を、ウェスターントロットにより膜(たとえばニトロセルロース)に移し、そして抗体調製物をその膜と共にインキュベートする。非特異的に結合された抗体を除去するために膜を洗浄した後、特異的に結合される抗体の存在を、酵素、たとえばアルカリホスファターゼに接合される抗-マウス抗体の使用により検出し；基質5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウムの適用が、免疫-局在化されたアルカリホスファターゼにより濃ブルー化合物の产生をもたらす。

【0126】

ヒト OX-40タンパク質を特異的に検出する抗体は、ヒト OX-40タンパク質バンド(その

10

20

30

40

50

分子量により決定されるゲル上に一定の位置で局在化される)に結合することが示されるであろう。他のタンパク質への抗体の非特異的結合が生じ、そしてウェスタンプロット上で弱いシグナルとして検出できる。この結合の非特異的性質は、特異的抗体 - ヒト X0-40タンパク質結合から生じる強い主要シグナルに対してウェスタンプロット上で得られた弱いシグナルにより当業者により認識されるであろう。好ましくは、抗体は、活性化されていないT - 細胞、特にたとえば CD4⁺T - 細胞から抽出されるタンパク質に結合することが見出されていない。

【0127】

抽出されたタンパク質を用いての結合アッセイの他に、ヒト OX-40タンパク質に対して生ぜしめられたモノクローナル抗体を試験し、蛍光標識(たとえばFITC)にヒト OX-40抗体を接合し、そして上記のようにしてFACSにより細胞集団を分析することによって、適切な細胞タイプ(活性化されたヒトT - 細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T - 細胞)を認識するそれらの能力を確認する。ヒト OX-40抗体は好ましくは、活性化されたT - 細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T - 細胞を認識するであろう。従って、CD4-PE及びOX-40-FITCによる活性化されたT - 細胞集団の二重染色は、二重陽性である細胞を示すべきである。

【0128】

本発明への使用のためのモノクローナル抗体は一般的に IgM又は IgGイソタイプのものであり、そして好ましくは、マウス、ヒト又は他の哺乳類起源のものであろう。

【0129】

本発明の1つの好ましい態様においては、ヒト OX-40抗原を認識するモノクローナル抗体は、“人体適合化された”マウスモノクローナル抗体である。そのように人体適合化された抗体は、マウス細胞において生成される変性されていないモノクローナル抗体よりもヒト患者により安全に投与され得る。非ヒト細胞、たとえばマウス細胞において生成されるモノクローナル抗体は一般的に、ヒト宿主に投与される場合、免疫応答を発生せしめ、従って、モノクローナル抗体の生物学的効能の持続期間を限定する(一般的には、アメリカ特許第4,731,244号及びWO 89/06976を参照のこと)。

【0130】

人体適合化された抗体は、組換えDNA技法により生成され、そして一般的には、標的抗原(この場合、ヒト OX-40タンパク質)を認識するマウスモノクローナル抗体からの可変(抗原認識)領域と組合される、ヒトモノクローナル抗体からの抗体不变領域を含んで成る。可変領域は単にネズミ起源のものであるので、人体適合化されたモノクローナル抗体は、ヒト患者に投与される場合、免疫応答をほとんど誘発しそうもない。

【0131】

抗体を人体適合化するための方法は、Kiechmann et al. (1988)により記載されている。Riechmannなどは、ヒトリンパ球に対して向けられたヒトIgG1抗体中にラット抗体のH及びL鎖ドメインからの6個の超可変領域を導入した。Riechmannなどは、この“人体適合された”抗体が、抗-免疫グロブリン免疫応答を誘発しないで、その標的抗原をインビボで結合できることを示した。

【0132】

本発明の好ましい態様のためには、損なわれていないモノクローナル抗体が使用される。しかしながら、当業者は、ヒト OX-40タンパク質を認識し、そしてそれに結合できるモノクローナル抗体の一部がまた使用され得ることを認識するであろう。それらの抗体フラグメントは一般的に、ヒト OX-40タンパク質を認識する抗体のFab、F(ab')₂及びFvフラグメントを包含する。抗体フラグメントを含んで成る免疫毒素は、CD4抗原を発現するすべての細胞を認識する抗体を用いてインビボ及びインビトロの両者で CD4⁺T - 細胞を消耗することにおいて効果的であることが示された(Street et al., 1987)。

【0133】

例4.

前記例に示されるように、この発明は、ヒトにおいて、ヒト OX-40タンパク質のみを実

10

20

30

40

50

質的に結合するモノクローナル抗体の生成を可能にする。そのようなモノクローナル抗体は、細胞毒性分子との接合体、たとえば下記に論ぜられるような抗体 - リシン - A - 接合体の形で、治療用途に使用され得る。そのような接合体は通常、免疫毒素として言及されない。免疫毒素は、2種の成分により特徴づけられている：結合され又は吸収される場合、細胞に対して通常致命的である細胞毒性剤、及び標的細胞型に細胞毒素を供給するよう作用する“供給ビークル”。本発明のためには、標的細胞型は、活性化されたT - 細胞、特にたとえば活性化されたCD4⁺T - 細胞であり、そして供給ビークルは下記例8に記載されるように、ヒトOX-40抗原を認識し、そしてそれに結合する抗体又は抗体フラグメントである。

【0134】

10

多くの適切な細胞毒素が当業界において知られている：たとえば、細胞毒性タンパク質、たとえばリシンA鎖、リシンA鎖の脱グリコシル化された形(dgA)、ブソイドモナス外毒素；放射性核種、たとえばヨウ素-131、イットリウム-90、ニレウム-188及びビズマス-212；及び多くの化学療法薬物、たとえばビンデシン、メトトレキセート、アドリアマイシン及びcis-白金を包含する（一般的には、Olsnes and Phil (1982)及びBaldwin and Byers (1985)を参照のこと）。本発明の1つの態様においては、細胞毒素は、アメリカ特許第4,590,071号に記載されるように、リシンA鎖の脱グリコシル化された形である。

【0135】

20

選択された細胞毒素は、本発明で使用するための免疫毒素を生成するために抗 - ヒトOX-40抗体により接合され得る。抗体は、Thorpe et al. (1982)に一般的に記載されているようにして、多くの良く知られた方法により細胞毒素により接合され得る。たとえば、細胞毒性剤がタンパク質（たとえばリシンA鎖）であり、そして供給ビークルが損なわれていないモノクローナル抗体である場合、その連鎖は、ヘテロ官能価の架橋剤、たとえばカルボジイミド又はグルタルアルdehyドを通してである。脱グリコシル化されたリシンA鎖を用いて免疫毒素を生成するための好ましい方法は、アメリカ特許第4,590,071号及びWO 89/06967(引用により本明細書に組込まれる)に提供されている。

【0136】

30

本発明により供給され、そして上記のようにして生成される免疫毒素は、続いて、これらのインビトロ効能を確かめるために試験される。そのようなインビトロ試験は、ヒトCD4⁺T - 細胞及び上記方法を用いて実施される。たとえば、本発明に従って生成される免疫毒素（すなわち、ヒトOX-40タンパク質に対して特異的であることが示されているモノクローナル抗体に接合される細胞毒素）は、多発性硬化症患者からのMBP特異的CD4⁺

T - 細胞系に対するインビトロ阻害研究を用いて試験される。ヒト治療への使用のために潜在的に適切な免疫毒素は、そのような細胞のインビトロ増殖を阻害できるものである。

【0137】

35

これらの免疫毒素は多発性硬化症患者からの活性化されたCD4⁺T - 細胞のインビトロ増殖を阻害できるので、それらは起源にかかわらず、すべての活性化されたCD4⁺T - 細胞の増殖を阻害できるべきである。この結論は、上記に示される証拠により支持され、ここでラットOX-40-dgA免疫毒素がMPB活性化ラットCD4⁺T - 細胞及びPPD活性化ラットCD4⁺T - 細胞に対して効果的であることが示された。ヒトOX-40免疫毒素がこの一般的な活性を有することを確かめるためには、上記のような類似するインビトロ増殖研究がまた、他の抗原（たとえばヘルペス単純ウィルス）に対して特異的なヒトCD4⁺T - 細胞により実施され得る。

【0138】

40

下記例5に記載される本発明の他の態様においては、抗 - ヒトOX-40抗体がまた、活性化されたT - 細胞、特にたとえば活性化されたCD4⁺T - 細胞により介在される状態を診断するために使用され得る。そのような用途のためには、抗体は、抗体の消耗を促進する適切な化学的“標識”に接合されることが好ましい。適切な分子は、本発明で使用されるよ

50

うな、螢光分子フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 及び R - フィコエリトリン (PE) を包含する。

【0139】

例 5.

本発明の 1 つの態様においては、ヒト OX-40タンパク質を特異的に結合するモノクローナル抗体は、活性化された T - 細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T - 細胞により介在される状態を検出するために使用される。そのような目的のためには、ヒト OX-40抗体は、他の分子、たとえば螢光マーカーにより接合される。

【0140】

生検サンプルを、分析のために炎症を起こされた組織から採取する。当業者は、生検サンプルの源は異なった条件間で変化するであろうことを認識するであろう。多発性硬化症の場合、リンパ球は CSF から単離され、ところがリウマチ様関節炎の場合、リンパ球は炎症を起こされた関節の滑液から単離されるであろう。移植拒絶の場合、生検は、拒絶エピソードの間、標的器官から直接的に取られるであろう。

【0141】

好ましい態様においては、患者から採取された生検サンプルはリンパ球画分に分別されるであろう（前述の方法による；材料及び方法のセクションを参照のこと）。精製されたリンパ球は、OX-40-FITC抗体により染色され、そして陽性リンパ球の % が FACScan 装置上で定量化されるであろう。この % を、健康な個人に見出される % と比較する。統計学的に有意な上昇が炎症の出来事の初期徴候を提供し、そして自己免疫疾患の初期診断を導くであろう。

【0142】

例 6.

治療用途、たとえば多発性硬化症に関連する自己免疫炎症の処理のためには、炎症の部位での、活性化された T - 細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T - 細胞の存在が、処理を始める前に確立されることが予期される。それらの細胞の存在は、上記例 5 に記載される診断方法を用いて確立され得る。診断試験が炎症部位での、活性化された T - 細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T - 細胞の存在を示す結果を生ぜしめる場合、免疫毒素の治療的適用が適切である。

【0143】

活性化された T - 細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T - 細胞により介在される状態の処理のためへの免疫毒素の治療的投与のためには、免疫毒素を用いての処理法を示す標準の公開された方法が利用され得る。これらは、Vitetta et al., 1991 及び WO 89 / 06967 に記載される方法を包含する。前記文献は、引用により本明細書に組込まれる。

【0144】

一般的に、抗原 - 活性化 T - 細胞、特にたとえば活性化された CD4⁺T - 細胞により介在される状態を有する患者を処理する方法は、細胞毒性剤により接合される抗体（又は抗体の一部）の有効量を患者に投与することを含んで成り、ここで前記抗体（又はその抗体の一部）はヒト OX-40抗原を認識し、そしてそれに結合する。上記で論ぜられたように、細胞毒性剤により接合される抗体及びその抗体の一部は通常、免疫毒素として言及される。それらの免疫毒素の有効量は一般的に、免疫毒素の適切な用量として言及され得る。

【0145】

当業者は、ゼロ以上の免疫毒素のいずれの用量でも、患者における活性化された CD4⁺T - 細胞集団に対していくらかの効果を有するであろうことを認識するであろう。しかしながら、適切な量は、高い用量の免疫毒素の副作用効果の開始により限定される。WO 89 / 06967 に記載されるように、リシン A 鎮により接合されるモノクローナル抗体を含んで成る免疫毒素に関しては、適切な用量は 14 日までの間、0.05 ~ 1.0 mg / kg · 日の範囲である。Vitetta et al. (1991) により記載されるように、化学的に脱グリコシル化されたリシン A 鎮に連結される抗体フラグメント（たとえば Fab' フラグメント）を含んで成る免疫毒素に関しては、用量は好ましくは、25 ~ 150 mg / m² の範囲であろう。

10

20

30

40

50

【0146】

例7.

本発明の1つの態様は、ヒトOX-40抗原を認識するモノクローナル抗体を含むキットである。そのようなキットは容器を含んで成り、その中に、モノクローナル抗体が含まれている。そのようなキットの1つの態様においては、キットは細胞毒素、たとえばdgAにより接合される形でモノクローナル抗体を含み、それによってキットは活性化されたT-細胞、特にたとえば活性化されたCD4⁺T-細胞により介在される状態を有する患者を処理するために使用される。この抗体-細胞毒素接合体は好ましくは、注射により患者に投与するために適切な形で供給される。従って、キットは抗体-細胞毒素接合体を懸濁された形、たとえば適切な医薬賦形剤に懸濁された形で含むことができる。他方、接合体は認識のために適切な固体形で存在する。

10

【0147】

他の態様においては、キットは、診断使用のために適切な形、たとえば蛍光マーカーに接合された形でモノクローナル抗体を含む。そのようなキットは、活性化されたT-細胞、特にたとえば活性化されたCD4⁺T-細胞により介在される炎症状態の検出に使用される。

前述の例は、本発明を例示するものであって、本発明を限定するものではない。本明細書に示されるように、本発明に基づく多くの変更及び修飾は、本発明の範囲内でもたらされ得る。

【図面の簡単な説明】

20

【0148】

【図1】図1は、RT7.2及びMRC OX-40抗原の組織特異的二重発現を示す蛍光活性化細胞分類(FACS)装置からのドットプロットを示す。

【図2】図2は、EAEを有するラットの脊髄から単離されたドナーT-細胞に基づくOX-40発現の時間の経過を示すFACS装置からのドットプロットを示す。

【図3】図3は、EAEを有するLewisラットの脊髄から単離されたOX-40陽性及び陰性の分類された集団におけるTCR Vの発現を示す。

【図4】図4は、脊髄及びリンパ節から単離されたOX-40陽性細胞に対する抗原応答を示す。

【0149】

30

【図5】図5は、OX-40-dgA接合体による抗原特異的CD4⁺T-細胞増殖の投与量依存性阻害を示すグラフである。

【図6A】図6Aは、OX-40-外毒素接合体による抗原特異的CD4⁺T-細胞増殖の投与量依存性阻害を示す2つのグラフである。種々の濃度のOX-40-外毒素が一定量のF1T-細胞、APC、及びMBPに添加された。

【図6B】図6Bは、OX-40-外毒素接合体による抗原特異的CD4⁺T-細胞増殖の投与量依存性阻害を示す2つのグラフである。種々の濃度のOX-40-外毒素が一定量のLewisT-細胞、APC、及びMBPに添加された。

【図7】図7は、OX-40-dgA接合体によるPPD抗原特異的CD4⁺T-細胞増殖の投与量依存性阻害を示すグラフである。

40

【0150】

【図8A】図8Aは、400μgの用量のOX-40-dgAにより処理されたラットの脊髄から単離されたリンパ球の特徴を示すFACS装置からの2種のドットプロットである。

【図8B】図8Bは、400μgの用量のOX-40-dgAにより処理されていないラットの脊髄から単離されたリンパ球の特徴を示すFACS装置からの2種のドットプロットである。

【図9】図9は疾病開始の初日に投与されるOX-40免疫毒素処理を示す。

【図10】図10は、OX-40免疫毒素により処理された動物の脊髄から単離されたドナー陽性(MBP特異的)T細胞に対しての効果を示す。

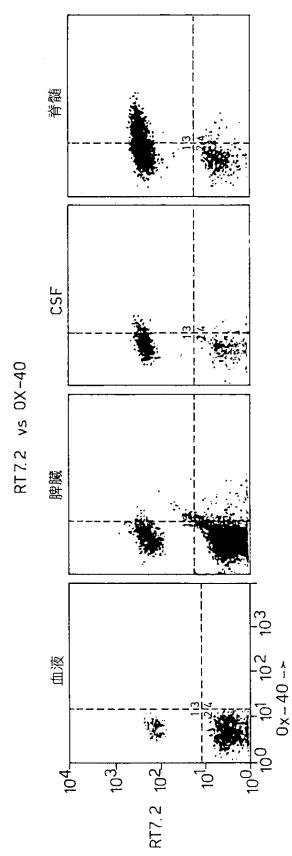
【図11-1】図11-1は、ヒトOX-40 cDNAのコード領域のヌクレオチド配列及びヒトOX-40抗原の理論的なアミノ酸配列を示す。

50

【図11-2】図11-2は、ヒトOX-40 cDNAのコード領域のヌクレオチド配列及びヒトOX-40抗原の理論的なアミノ酸配列を示す。

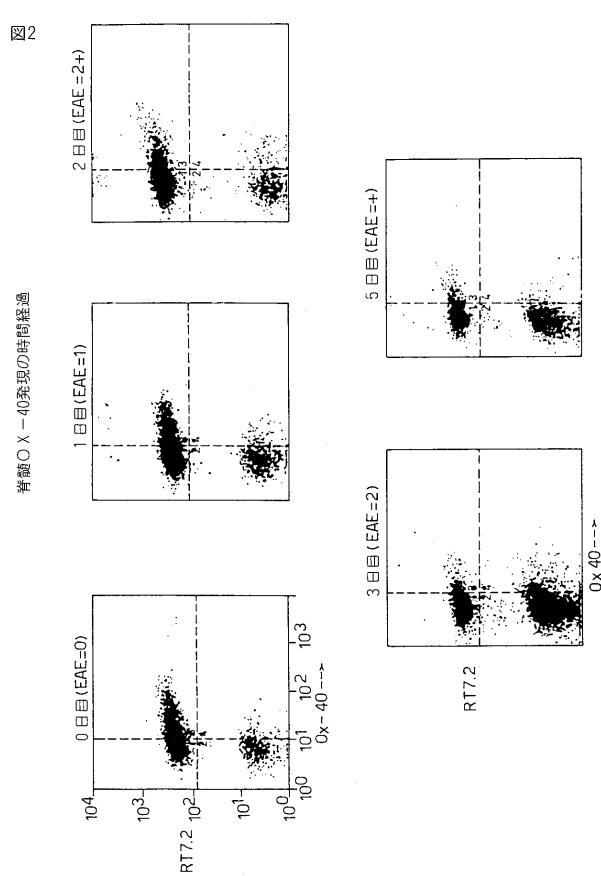
【図1】

図1



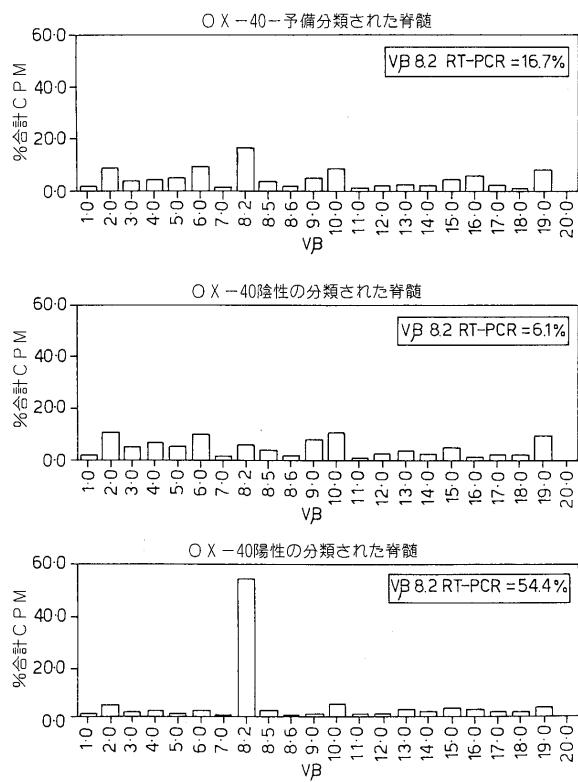
【図2】

図2



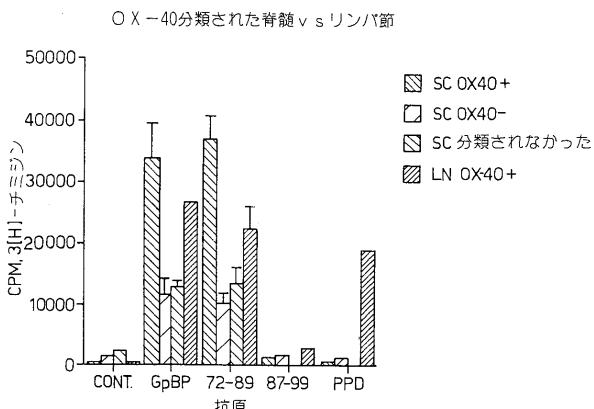
【図3】

図3 EA Eの開始でのOX-40予備分類された陰性及び陽性のV β プロファイル



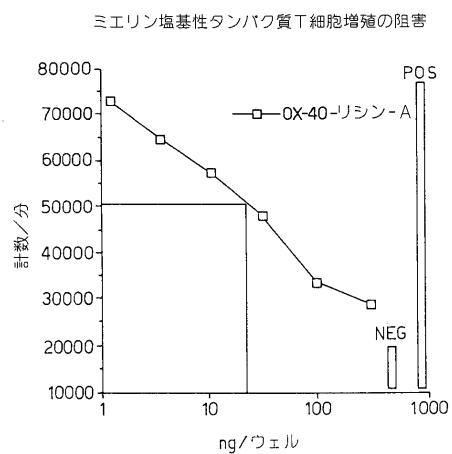
【図4】

図4



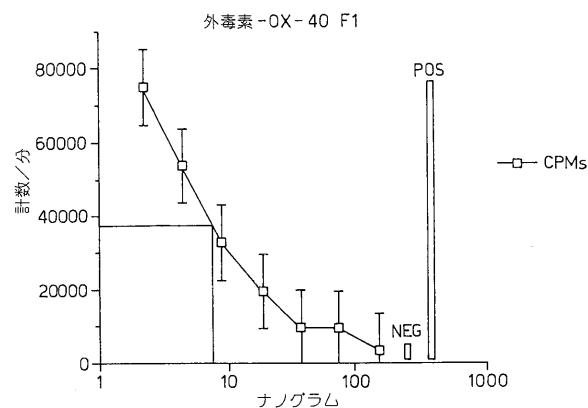
【図5】

図5



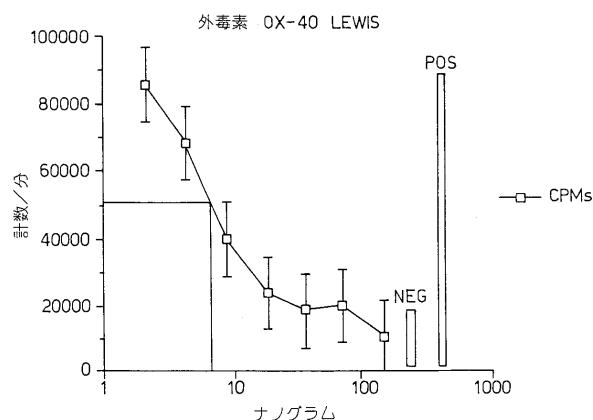
【図6 A】

図6A



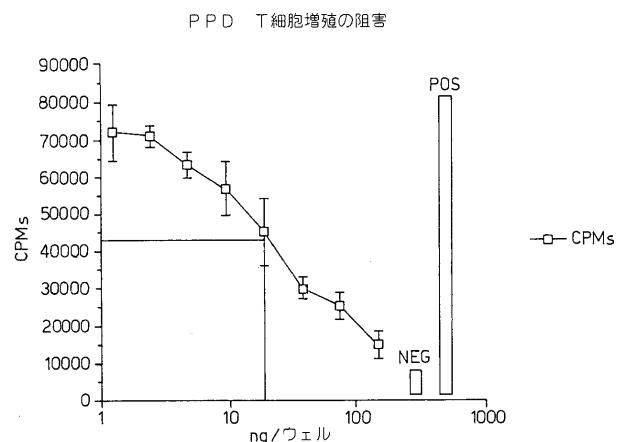
【図6B】

図6B



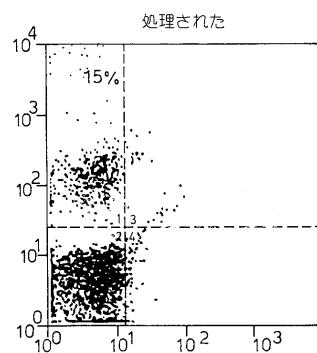
【図7】

図7



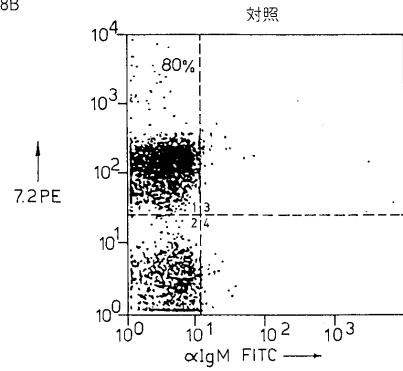
【図8A】

図8A



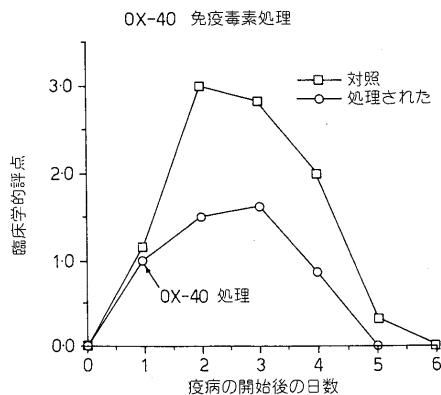
【図8B】

図8B



【図9】

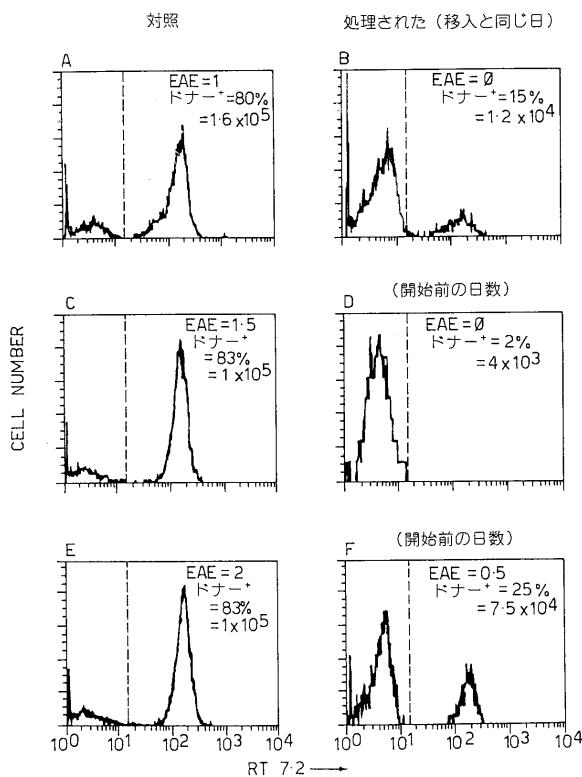
図9



【 図 1 0 】

10

脊髄から単離されたドナー⁺ T-細胞に対するOX-40免疫毒素処理の効果



【 図 1 1 - 1 】

図11-1

【 図 1 1 - 2 】

図11-2

GCG AAC CCC TGG ACC ACC TGT ACC TTG GGG AAG CAC ACC CTG CAG CGG GCG AGT ATT
 lys pro trp thr cys thr leu val gly lys his thr leu glu pro ala ser asn

 AGC TCG GAC GCA ATC TGT GAG GAC AGG GAC CCC CCA GCC ACG CAG CCC CAG GAG ACC CAG
 ser ser asp ala ile cys glu asp arg asp pro pro ala thr gln pro glu thr glu

 CCG GCC AGG CCC ATC ACT GTC CAG CCC ACT GAA GCC TGG CCC AGA ACC TCA CAG
 Ily pro pro ala arg pro ile thr val gln pro thr glu ala trp pro arg thr ser glu

 CGA CCC TCC ACC CGG TCC GAG GTC CCC GGG GGC CGT GCG GAT GCC CCC ATC CTG GGA
 Ily pro ser thr arg ser val glu val pro gly gly arg ala val ala ile leu gly

 CTG GGA CTG GGG CTG CTG GGA CCC CTG GAC ATC CTG CTG GCC CTG TAC CTG ATC
 leu gly leu val leu gly leu leu gly pro leu asp ile leu ala leu tyr leu ile

 CGG AGC CAG AGG CTG CCC CCC GAT GCC CAC AAG CCC CCT CGG GGA GGT AGC TTC CGG
 arg asp glu arg leu pro pro asp ala his lys pro pro gly gly ser phe arg

 ACC CCC ATC CAA GAG GAG CAG CCC GAC GCC CAC TCC ACC CTG GTC AGG TTC TGA
 thr pro ile glu glu glu glu ala asp ala his ser thr leu val lys phe OPA

【配列表】

2007045832000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ウエインバーグ, アンドリュー デール

アメリカ合衆国, オレゴン 97201, ポートランド, サウスウェスト フェアマウント ブールバード 3266

(72)発明者 バンデンパーク, アーサー アレン

アメリカ合衆国, オレゴン 97221, ポートランド, サウスウェスト フォーティエイス ブレイス 4371

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA44 BA53 BA80 CA04 CA07 CA20 DA02

DA06 GA11 HA20

4C085 AA14 CC03

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 DA86 FA74

专利名称(译)	T细胞抗原及其用于诊断和治疗T细胞介导的病症		
公开(公告)号	JP2007045832A	公开(公告)日	2007-02-22
申请号	JP2006248393	申请日	2006-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	温伯格安德鲁·戴尔 范登·伯克亚瑟·亚伦		
申请(专利权)人(译)	温伯格，安德鲁·戴尔 范登·伯克，亚瑟·亚伦		
[标]发明人	ウェインバーグアンドリューデール バンデンバークアーサーアレン		
发明人	ウェインバーグ,アンドリュー デール バンデンバーク,アーサー アレン		
IPC分类号	A61K39/395 A61P37/06 C12N15/09 C07K16/18 G01N33/53 A61K38/00 A61K47/48 A61K49/00 A61K51/00 A61K51/10 A61P29/00 A61P35/02 A61P37/00 C07H21/04 C07K14/705 C07K14/725 C07K14/73 C07K16/28 C12P21/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61K47/6849 A61K49/0058 A61K51/1039 A61P29/00 C07K14/70578 C07K16/2878 C07K2319/00 Y10S530/866 Y10S530/867 Y10S530/868		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.N A61P37/06 C12N15/00.A C07K16/18 A61K39/395.NZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA44 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024 /CA07 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/GA11 4B024/HA20 4C085/AA14 4C085/CC03 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045 /DA76 4H045/DA86 4H045/FA74		
代理人(译)	石田 敬		
优先权	08/192480 1994-02-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于减少人宿主中表达OX-40抗原的CD4 + T细胞群的药物组合物。能够特异性结合具有SEQ ID NO：1所示氨基酸序列的人OX40抗原或具有结合特性和细胞毒素的抗体片段的缀合物的抗体，一种用于减少宿主中表达OX-40抗原的CD4 + T细胞群的药物组合物。

【选择图】无

