

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3914342号  
(P3914342)

(45) 発行日 平成19年5月16日(2007.5.16)

(24) 登録日 平成19年2月9日(2007.2.9)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	

請求項の数 10 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-266452	(73) 特許権者	000002934
(22) 出願日	平成10年9月21日(1998.9.21)		武田薬品工業株式会社
(65) 公開番号	特開平11-180893		大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(43) 公開日	平成11年7月6日(1999.7.6)	(74) 代理人	100081422
審査請求日	平成15年7月14日(2003.7.14)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	特願平9-260278	(74) 代理人	100106518
(32) 優先日	平成9年9月25日(1997.9.25)		弁理士 松谷 道子
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100116311
			弁理士 元山 忠行
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(74) 代理人	100127638
			弁理士 志賀 美苗
		(72) 発明者	菅村 和夫
			宮城県仙台市青葉区旭ヶ丘1丁目27-8
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 g p 3 4 結合阻害物を有効成分として含有する医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

g p 3 4 抗体を有効成分として含有する自己免疫疾患治療用医薬組成物。

【請求項2】

g p 3 4 抗体が、g p 3 4 側に作用してg p 3 4 と O X 4 0 との結合を阻害するものである請求項1に記載の自己免疫疾患治療用医薬組成物。

【請求項3】

自己免疫疾患が、T細胞が関与するものである請求項1に記載の自己免疫疾患治療用医薬組成物。

【請求項4】

自己免疫疾患が、リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、自己免疫性眼疾患、炎症性ボージェル病のうち少なくとも一つである請求項1に記載の自己免疫疾患治療用医薬組成物。

【請求項5】

自己免疫疾患が、多発性硬化症である請求項4に記載の自己免疫疾患治療用医薬組成物。

【請求項6】

自己免疫疾患が、リウマチである請求項4に記載の自己免疫疾患治療用医薬組成物。

【請求項7】

g p 3 4 抗体を有効成分として含有する免疫疾患治療用医薬組成物。

## 【請求項 8】

g p 3 4 抗体が、g p 3 4 側に作用して g p 3 4 と O X 4 0 との結合を阻害するものである請求項 7 に記載の免疫疾患治療用医薬組成物。

## 【請求項 9】

免疫疾患が、T 細胞が関与するものである請求項 7 に記載の自己免疫疾患治療用医薬組成物。

## 【請求項 10】

免疫疾患が、移植片対宿主病である請求項 7 に記載の免疫疾患治療用医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

10

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、免疫細胞を媒介する疾病の治療用医薬組成物に関し、詳しくは、g p 3 4 抗原に対して結合し、g p 3 4 抗原、O X 4 0 抗原膜蛋白質間の有する生物活性を阻害する能力を有する物質を有効成分とする医薬組成物に関するものであり、より詳細には、g p 3 4 を介する細胞情報伝達機構に関与しリウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、自己免疫性眼疾患、炎症性ボージェル病を含む自己免疫疾患および移植片対宿主病に対する治療作用を有する新規な医薬組成物に関するものである。

## 【0002】

## 【従来の技術】

ヒト g p 3 4 抗原は、サイトカインとして分類される腫瘍壊死因子（以下 T N F と称する。）リガンドファミリーに属し、当初ヒト T 細胞白血病ウイルス（以下 H T L V - I と称する。）由来転写活性化因子 p 4 0 T a x により誘導される 3 4 キロダルトンの T 細胞膜糖蛋白質として同定され、現在ではそのアミノ酸配列及び遺伝子の D N A 塩基配列も知られている（Tanakaら：Int. J. Cancer 36, 549(1985), Miuraら：Mol. Cell. Biol. 11, 1313(1991)）。一方、O X 4 0 抗原はラットの活性化 T 細胞抗原として同定された（Pater sonら：Mol. Immunol. 24, 1281(1987)）。その後、この g p 3 4 抗原が、O X 4 0 抗原とリガンドとリセプターの関係にあることがヒト及びマウスにおいて明らかになり、マウスの g p 3 4 のアミノ酸配列及び遺伝子の D N A 塩基配列も知られている（Godfreyら：J. Exp. Med. 180, 757(1994)、Baumら：EMBO J. 13, 3992(1994)）。また、本 O X 4 0 抗原が、多発性硬化症、リウマチ、サルコイドーシス、自己免疫性眼疾患、炎症性ボージェル病を含む自己免疫疾患および移植片対宿主病に含まれる自己免疫として働く活性化 C D 4 陽性 T 細胞に発現しており、これらの O X 4 0 抗原を認識する物質に細胞毒素を結合させてこの自己を攻撃する活性化した状態の C D 4 陽性 T 細胞を特異的に消滅させることにより治療方法として有効であると期待されることが、ラットを用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎（以下 E A E と称する。）実験によって検討され、特許出願及び報告がなされている（CANTAB PHARM. Res. Lim. : W095/21251、Weinbergら：Nature Med. 2, 183(1996)）。当該報告には、C D 4 陽性活性化細胞の中の自己反応性を持つ活性化 C D 4 陽性 T 細胞の中に O X 4 0 陽性細胞群があり、それらに対する抗 O X 4 0 免疫療法が、急性あるいは慢性の C D 4 陽性 T 細胞を媒介する自己免疫疾患に処置することに効果があるだろうと記載されている。しかし、この報告では、この O X 4 0 の発現はあくまでも自己免疫疾患に関係する細胞の目印であり、標的となる活性化 T 細胞を消滅させることによる治療効果を述べている。この治療方法では、g p 3 4 と O X 4 0 の結合のみを阻害することによって炎症状態や、自己免疫の状態が抑制できるかどうかは明らかでなく、細胞毒素を結合しなかった抗 O X 4 0 抗体の単独添加が、病態悪化の原因に係る活性化 C D 4 陽性 T リンパ球細胞の細胞増殖を抑制しなかったことを報告している。また、E A E において、細胞毒素を結合させた抗マウス O X 4 0 ウサギポリクローナル抗体ではその病態評価点数の上昇が阻害されたと報告されているが、同時に検討された抗マウス O X 4 0 ウサギポリクローナル抗体のみの投与群での効果は陰性対照と同様に述べられていない。これらのことから、g p 3 4 と O X 4 0 の結合のみを阻害することによって炎症状態や、自己免疫の状態が抑制できるかどうかは明らかでなかった。また、活性化 T リンパ球細胞による媒介が考

20

30

40

50

えられる疾患について、その患者の生検標本を調べることによる患者の炎症症状を検出する方法についても、特許出願がされている (CANTAB PHARM. Res. Lim.: W095/21251)。

#### 【0003】

以上述べたとおり、g p 3 4 と O X 4 0 の機能は、一部分しか明らかになっておらず、g p 3 4 と O X 4 0 の関係と種々の自己免疫疾患における役割は現在まで全く明らかにされていない。抗ヒト g p 3 4 モノクローナル抗体によりこの2分子間で媒介される機能を g p 3 4 側において特異的に阻害することも全く予測されていない。即ち、リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、自己免疫性眼疾患、炎症性ボーエル病を含む自己免疫疾患および移植片対宿主病の治療に効果があるかどうかと言うことは不明であった。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、リウマチあるいは、多発性硬化症、サルコイドーシス、自己免疫性眼疾患、炎症性ボーエル病を含む自己免疫疾患もしくは移植片対宿主病に対する治療剤としてヒト g p 3 4 結合阻害物、詳しくは抗ヒト g p 3 4 ヒト化モノクローナル抗体を有効成分として含有する新規な医薬組成物、及び g p 3 4 に対する結合、特に O X 4 0 に対する結合を阻害することにより、免疫或いは自己免疫疾患を治療する方法を提供することにある。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、ヒト g p 3 4 に結合するヒト化モノクローナル抗体と同様の性質を有すると考えられる抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体を取得した。そして、倫理上ヒト g p 3 4 を用いてのリウマチ患者及び多発性硬化症での実験は出来ないため、得られた抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体をコラーゲン関節炎惹起モデルマウス及び実験的自己免疫性脳脊髄炎惹起モデルマウスに投与することにより、リウマチモデル及び多発性硬化症モデルでの病態発症が抑制されることを確認した。本知見は、O X 4 0 陽性な活性化 T 細胞上の O X 4 0 と g p 3 4 の結合が、リウマチ等の自己免疫疾患を惹起していることを初めて示すものである。本知見は、マウスを用いた実験により得られたものであるが、g p 3 4 と O X 4 0 とがリガンドとリセプタ - の関係にあることなど、マウス g p 3 4 及びマウス O X 4 0 とヒト g p 3 4 及びヒト O X 4 0 の性質が共通していることからして、マウスでの効果は、ヒトの場合にも当然あるべきものと考え得る。即ち、ヒト g p 3 4 に結合性を有するモノクローナル抗体は、リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、自己免疫性眼疾患、炎症性ボーエル病を含む自己免疫疾患および移植片対宿主病に対する治療剤とし有効であることが、本知見より一義的に導かれる。

#### 【0006】

即ち、本発明は、g p 3 4 結合阻害物を有効成分として含有する自己免疫疾患治療用医薬組成物、或いは g p 3 4 結合阻害物を有効成分として含有する免疫疾患治療用医薬組成物である。

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

g p 3 4 結合阻害物とは、g p 3 4 との結合を阻害しリガンドとリセプタ - の細胞情報伝達を阻害するものであり特に g p 3 4 側に作用し結合を阻害するものである。g p 3 4 に結合するものとしては特に O X 4 0 が代表的である。g p 3 4 結合阻害物とは例えば g p 3 4 に特異的な抗体、特にモノクローナル抗体である。本発明に係るモノクローナル抗体は、例えばラットモノクローナル抗体を含む他種の動物由来で作製した抗ヒト g p 3 4 モノクローナル抗体の抗原結合部位とヒト抗体の定常部位を組み換えて各種公知の方法を用いてキメラ抗体あるいはヒト化抗体を作製することにより取得できる。

#### 【0008】

ヒト及びマウスの g p 3 4 はそのアミノ酸配列、その遺伝子の D N A 塩基配列を含めて公知である。故に、これらに対するモノクローナル抗体を産生する細胞、特にハイブリドー

10

20

30

40

50

マは通常知られている方法により作製することが可能であり、該細胞を用いて抗 g p 3 4 モノクローナル抗体を生産することも可能である。

【 0 0 0 9 】

本発明に係るモノクローナル抗体の生産は、例えば上記の抗ヒト g p 3 4 ヒト化モノクローナル抗体を生産する細胞株を各種公知の方法を用いて培養し、得られた粗抗体を精製すればよく、細胞の増殖及び抗ヒト g p 3 4 ヒト化モノクローナル抗体の生産を阻害しない方法であれば特に制限はない。本発明の組成物は、g p 3 4 モノクローナル抗体等の g p 3 4 結合阻害物を有効成分として含有するものであり、その他医薬的に許容される添加物を含むことができる。

本発明の医薬組成物は、移植片対宿主病等の免疫疾患、リウマチ、多発性硬化症、サルコイドーシス、自己免疫性眼疾患、炎症性ボージェル病等の自己免疫疾患の患者に投与される。

10

【 0 0 1 0 】

【実施例】

以下実施例を示して本発明を説明するが、本発明はこれに限られるものではない。

実施例 1 抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体の作製

a) マウス g p 3 4 の免疫

マウス g p 3 4 遺伝子は、C o n A 刺激を加えたマウス脾臓細胞から抽出した R N A から逆転写酵素を用いクロ - ニングした ( Baumら : EMBO J. 13, pp.3992-4001, (1994) ) 。 このマウス g p 3 4 遺伝子断片を B C M G S N e o プラスミド ( Karasuyamaら : J. Exp. Me 20 d. 172, 969, (1990) ) 中に導入し、B C M G S N e o - m g p 3 4 プラスミドを作製した。次に、このプラスミドを W K A / H o c ラット T 細胞株 T A R T - 1 ( Tatenoら : J. E xp. Med. 159, 1105(1984) ) に、エレクトロポレ - ション法により遺伝子導入した。その後、ネオマイシン耐性により耐性細胞株を選抜した。マウス g p 3 4 遺伝子の発現は選抜した細胞株より抽出した R N A を R T - P C R 法を用いて確認しマウス g p 3 4 発現細胞株 T A R T - m g p 3 4 を得た。本マウス g p 3 4 発現細胞株 T A R T - m g p 3 4 を、8 週齢ウイスタ - ラット ( 日本エス・エル・シ - 社製 ) の後筋肉丘部分に  $1 \times 10^8$  個づつ 2 週間毎に 7 度植え込み免疫した。その後、最終免疫日から 3 日後に、このラットから脾臓を取り出した。取り出した脾臓細胞を R P M I - 1 6 4 0 培地 ( 日水製薬製 ) により 3 度洗浄した。また、マウスミエロ - マ細胞株 S P 2 / 0 - A g 1 4 ( Schulmanら : Natu 30 re 276, 269(1978) ) を対数増殖期になるように細胞増殖させ R P M I - 1 6 4 0 培地により 3 度洗浄した。マウスミエロ - マ細胞株 S P 2 / 0 - A g 1 4 と脾臓細胞を 1 : 3 になるように混和し  $1000 \text{ rpm}$  で 10 分間遠心分離し上清を除いた。沈殿した細胞に、 $37^\circ\text{C}$  に暖めておいた 50% ポリエチレングリコール 4000 ( メルク社製 ) 液 1 m l を 1 分間かけて攪拌しながらゆっくり加え、更に 1 分間ゆっくり攪拌した。さらに  $37^\circ\text{C}$  に暖めておいた R P M I - 1 6 4 0 培地 1 m l を 1 分間かけゆっくりと静かに攪拌しながら加えた。再度、 $37^\circ\text{C}$  に暖めておいた R P M I - 1 6 4 0 培地 1 m l を 1 分間かけゆっくりと静かに攪拌しながら加えた。さらに、 $37^\circ\text{C}$  に暖めておいた R P M I - 1 6 4 0 培地 7 m l を 3 分間かけて静かに攪拌しながら加えた。室温で、 $1000 \text{ rpm}$ 、5 分間遠心沈降し、上清を取り除いた。細胞濃度が、 $5 \times 10^6$  個 / m l になるように  $37^\circ\text{C}$  に暖め 40 ておいた 10% 牛胎児血清 ( 以下、F C S と称する。 ) を含む R P M I - 1 6 4 0 培地を加え、静かに攪拌し細胞を浮遊させた。浮遊細胞を 96 穴の培養プレートに、各ウェルあたり  $50 \mu\text{l}$  ずつ分注し細胞培養装置で一晩培養した。翌日に、H A T 培地 (  $0.1 \text{ mM}$  ヒポキサンチン、 $0.4 \mu\text{M}$  アミノプテリン、 $16 \mu\text{M}$  チミジン、15% F C S を含有する R P M I - 1 6 4 0 培地 ) を  $100 \mu\text{l}$  ずつ添加した。その後、細胞の増殖状態を観察しながら、 $100 \mu\text{l}$  ずつ H A T 培地に交換した。このような中、増殖してくる融合細胞をハイブリドーマとして作製した。

【 0 0 1 1 】

b) 抗体産生の確認

上記 a ) で作製したハイブリド - マを培養し、培養開始から 1 2 日後に全ての培養上清を

50

回収した。その上清中の抗体活性を、マウス g p 3 4 遺伝子を導入し発現させたマウス T 細胞由来細胞株 B W 5 1 4 7 - m g p 3 4 とその親細胞株マウス T 細胞由来細胞株 B W 5 1 4 7 (Kondoら : SCIENCE 262, 1874(1993)) をそれぞれ抗原発現細胞及びその陰性対照細胞として用いラジオイムノアッセイ (以下、R I A と称する。) により測定した。B W 5 1 4 7 - m g p 3 4、B W 5 1 4 7 を培養後、リン酸緩衝液 (P B S (-)) で洗浄し 9 6 穴 U 底プレートにそれぞれ  $1 \times 10^6$  個づつ細胞を播種した。これに、 $40 \mu\text{l}$  のハイブリドーマ培養上清を添加し混合した。この 9 6 穴 U 底プレートを氷上で 3 0 分間保温し抗原とよく反応させた。その後、予め 4 ℃ に保温しておいた冷 P B S (-) を用いて細胞を 2 度洗浄した。遠心分離によりペレットとした細胞塊に I 125 放射性ヨード標識抗マウスイムノグロブリン G ヒツジ抗体 (A m e r s h a m 社製) を  $30 \mu\text{l}$  添加しさらに氷上で 3 0 分間反応させた。その後、予め 4 ℃ に保温しておいた冷 P B S (-) を用いて細胞を 3 度洗浄した。乾燥器を用い 9 0 ℃ で 1 0 分間乾燥させて水分を蒸発させた。その後、9 6 穴 U 底プレートを 1 穴づつハサミにより切り分けてガンマー線測定器 (アロカ社製、A R C 6 0 0) により測定した。ガンマー線検出の値において、B W 5 1 4 7 - m g p 3 4 細胞を用いたもので 1 0 0 0 以上、B W 5 1 4 7 細胞を用いたもので 5 0 前後と差の認められたハイブリドーマ培養上清を陽性穴とし、再現性を確かめた。抗体活性の確認できた細胞については、限界希釈法によるクローニングを行った。その結果、抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株を取得した。

10

得られた抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株のうち代表的な株である T O L - 1 は、受託番号 F E R M B P - 6 5 0 9 にて、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 1 号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づいて、平成 1 0 年 9 月 1 8 日より寄託されている。

20

#### 【 0 0 1 2 】

##### c) 抗体の調製

B A L B / c - n u ヌードマウス (日本エス・エル・シ - 社製) に  $0.5 \text{ ml}$  プリスタン (2, 6, 10, 14 - テトラメチルペンタデカン) を 1 日目と 7 日目の 2 度腹腔内に投与した。2 度目の投与 3 日後に、2 0 % F C S を含有する R P M I - 1 6 4 0 培地で培養した上記取得のハイブリドーマ株 T O L - 1 を一匹当たり  $10^8$  個腹腔内投与した。そして、2 週間後に腹水を回収した。回収した腹水には、終濃度が 0.0 2 % になるようにアジ化ナトリウムを添加し室温で一晩放置した。翌日放置した腹水を 4 ℃、 $3000 \text{ rpm}$  で 2 0 分間遠心分離し上清を回収した。この培養上清を、直径  $0.45 \mu\text{m}$  のフィルターに通した後、プロテイン A カラムキット (バイオラッド社製) にかけるイムノグロブリン画分を回収した。この回収溶液に対し、5 0 % 飽和硫酸アンモニウム (和光純薬社製) 分画を行った後、生理的濃度の P B S (-) に再溶解した。これを、P B S (-) に対して透析処理後、 $0.2 \mu\text{m}$  のフィルターにより濾過し無菌処理した後、以降の実験に使用した。

30

#### 【 0 0 1 3 】

実施例 2 フローサイトメーター解析による抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体のマウス g p 3 4 抗原結合性の確認

40

マウス g p 3 4 抗原に結合するヒト O X 4 0 細胞外領域とヒトイムノグロブリン F c 領域の融合蛋白質 (以下 s h O X 4 0 - F c と称する。米 I m m u n e x 社より供与) を用いてマウス g p 3 4 抗原を発現している B W 5 1 4 7 - m g p 3 4 細胞に対する結合性を検討した。1.5 ml マイクロチューブに  $1 \times 10^6$  個の細胞を回収し  $5000 \text{ rpm}$ 、3 0 秒間遠心分離し細胞を沈殿させた。その沈殿細胞に、0.5 % 仔牛血清アルブミン (以下 B S A と称する。) 含有 P B S (-)  $500 \mu\text{l}$  を添加し洗浄した。再度、 $5000 \text{ rpm}$ 、3 0 秒間遠心分離し細胞を沈殿させた。その後、これらの細胞を  $3 \mu\text{l}$  ヒト血清、 $16 \mu\text{l}$  0.5 % B S A 含有 P B S (-) に懸濁して、4 ℃、3 0 分間保温した。さらに、それらのチューブの一方に s h O X 4 0 - F c ( $2.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ )  $20 \mu\text{l}$  を添加・懸濁し、4 ℃、3 0 分間保温させ、マウス g p 3 4 とヒト O X 4 0 を結合させた。再度、

50

0.5% BSA含有PBS(-) 500  $\mu$ l を添加し 5000 rpm、30 秒間遠心分離により 2 度洗浄した。それらのチューブに Fluorescein isothiocyanate (以下 FITC と称する。) 標識ヤギ抗ヒト IgG (Fc) 抗体 (CAPPEL 社製) (25  $\mu$ g/ml) を 20  $\mu$ l 添加・懸濁し、4、20 分間保温した。そして、0.5% BSA含有PBS(-) 500  $\mu$ l に懸濁し FACScan (ベクトンディッキンソン社製) によりフローサイトメーター解析を行った。

その結果、shOX40-Fc のみがマウス gp34 発現細胞 BW5147-mgp34 細胞に結合した。このことから、BW5147 細胞でのマウス gp34 の発現が確認できた (図 1 (図 1))。

次に、本マウス gp34 発現細胞 BW5147-mgp34 と shOX40-Fc との結合反応系に 10  $\mu$ g/ml となるように実施例 1 で調製された抗マウス gp34 ラットモノクローナル抗体を添加し反応させた。そして、フローサイトメーター解析を行った。その結果、shOX40-Fc と結合することにより標識された BW5147-mgp34 細胞の蛍光強度が抗マウス gp34 ラットモノクローナル抗体の添加により低下した。このことより、BW5147-mgp34 細胞と shOX40-Fc との結合反応が抗マウス gp34 ラットモノクローナル抗体により阻害されることが明らかになった (図 2 (図 2))。

#### 【0014】

実施例 3 抗マウス gp34 ラットモノクローナル抗体のウシタイプ 2 コラーゲン誘導性関節炎モデルに対する有効性の検討

自己免疫疾患の一つであるヒトリウマチのモデル・ウシタイプ 2 コラーゲン誘導性関節炎に対する抗マウス gp34 ラットモノクローナル抗体の効果を検討した。

7 週齢で購入した雄性 DBA/1J マウス (日本エス・エル・シ・社製) を SPF 条件下で飼育し、以下に示すように、コラーゲン関節炎を誘導した。ウシ関節由来 K42 タイプ 2 コラーゲン (コラーゲン技術研修会製) を 0.3% 酢酸水溶液に溶解し 4 mg/ml とした。等量のフロイントコンプリートアジュバント (和光純薬工業社製) を加え水中で超音波破碎装置を用いてミセル化した。このコラーゲン 200  $\mu$ g 当量のコラーゲン液 100  $\mu$ l をマウス尾根部に皮内投与した。さらに、初期感作後 21 日目に再度尾根部に同量のコラーゲン液を投与し追加感作した。

抗マウス gp34 ラットモノクローナル抗体の投与については、追加感作のコラーゲン投与開始後、30 mg/kg 重の抗体量で 1 週間に 5 回ずつ 4 週間腹腔内投与した。病態発症の陽性対照投与群は、ラットイムノグロブリン G (cappel 社製) 画分を同量同様に投与した。試験及びコントロールをそれぞれ 8 個体ずつ供試した。

関節炎症状の評価は、以下のような 5 段階の判定を行い、四肢合わせて最高 16 点として行った。関節炎点数をつけ経時的に行った。

0 点：症状なし

1 点：四肢のうち指などの小関節が 1 本のみ腫脹発赤

2 点：小関節 2 本以上、あるいは手、足首の比較的大きな関節が腫脹発赤

3 点：1 本の手、足全体が発赤腫脹

4 点：さらにその 1 本の手、足の腫脹発赤が最大限に達している

但し、マウスの関節炎の症状は 1 本の手、足の腫脹発赤が最大に達しその後腫脹が徐々に衰退して関節が変形剛直化する場合が多かった。この場合その後の症状の改善を判断できなかったため、評価点数を 3 とした。

その結果、図 3 (図 3) に示すとおり、抗マウス gp34 ラットモノクローナル抗体の投与群では、ラットイムノグロブリン G 投与群に比べコラーゲン関節炎の病態発症が抑制された。

#### 【0015】

実施例 4 抗マウス gp34 ラットモノクローナル抗体のマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する有効性の検討

自己免疫疾患の一つであるヒト多発性硬化症のモデル・実験的自己免疫性脳脊髄炎に対す

10

20

30

40

50

る抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体の効果を検討した。

9 ~ 14 週齢で購入した雌性 S J L / J マウス (ゴキタブリーディングサービス社製) を S P F 条件下で飼育し、以下に示すように、実験的自己免疫性脳脊髄炎を誘導した。150  $\mu$  l P B S ( - ) 中に溶解したプロテオリピッドタンパク質 (以下 P L P と称する。サワディーテクノロジー社製) 200  $\mu$  g と等量のフロイントコンプリートアジュバント (ヤトロン株式会社製) を加え、連結針を用いてミセル化し P L P 乳化液を作製した。この P L P 200 乳化液 300  $\mu$  l を後 2 肢肉丘部分と尾根部 4 箇所試験開始日に皮下投与した。さらに、初期感作 7 日後に再度同量の P L P 乳化液を投与し、追加感作した。この間、200  $\mu$  l P B S ( - ) 中に溶解した百日咳毒素 (*Bordetella pertussis* toxin、Sigma 社製) 300 n g を試験開始日および試験開始 2 日後に腹腔内投与した。実施例 1 で

10

調製された抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体の投与については、5 m g / k g 体重の用量で初回感作の P L P 乳化液投与開始から 2 日毎に 8 回 14 日後まで腹腔内投与した。病態発症の陽性対照投与群は、ラットイムノグロブリン G (c a p p e l 社製) 画分の同量を同様に投与した。試験群及びコントロール群のそれぞれに 4 個体ずつ供試した。

0 点：症状なし

1 点：尾の緊張低下

2 点：軽度な後肢の不全対麻痺および運動失調

3 点：重度な後肢の不全対麻痺および運動失調

4 点：四肢麻痺

5 点：実験的自己免疫性脳脊髄炎による死亡

但し、それぞれの群において実験的自己免疫性脳脊髄炎によって死亡した動物については、試験終了まで評価点数を 5 点とした。

20

その結果を図 4 ( 図 4 ) に示す。各群の評価点数を平均して示した抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体の投与群では、ラットイムノグロブリン G 投与群に比べ実験的自己免疫性脳脊髄炎の病態発症が抑制された。

【 0 0 1 6 】

【発明の効果】

30

本発明により、マウス g p 3 4 に対して結合しマウス O X 4 0 との結合を阻害する抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体がリウマチ疾患のモデルであるウシタイプ 2 コラーゲン関節炎の発症と多発性硬化症の疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を抑制することが明らかになった。そこで、ヒト化した抗ヒト g p 3 4 モノクローナル抗体を用いることにより、少なくとも現在知られている免疫細胞を含めた g p 3 4 と O X 4 0 の両膜結合型蛋白質を通して行う両抗原の細胞情報伝達を阻害することにより、リウマチを含めた多発性硬化症、サルコイドーシス、自己免疫性眼疾患、炎症性ポエル病等の自己免疫疾患、および移植片対宿主病に対する予防、治療効果が期待できる。このような特性から、本発明により提供される抗ヒト g p 3 4 モノクローナルヒト化抗体を含有する医薬組成物は、ヒト自己免疫疾患に対する有用な薬剤となることが期待される。

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】マウス g p 3 4 発現細胞に対する s h O X 4 0 - F c の結合特異性を示す図である。

【図 2】抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体のマウス g p 3 4 と s h O X 4 0 - F c の結合阻害を示す図である。白抜きの部分は、抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体添加前の蛍光強度を、黒塗りの部分は、抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体添加後の蛍光強度を示す。

【図 3】抗マウス g p 3 4 ラットモノクローナル抗体のウシタイプ 2 コラーゲン関節炎発症抑制の有効性を示す図である。コラーゲン関節炎誘導後の個々の検体における関節炎評価点数の経時変化である。図中、各シンボルは一頭一頭の個体を示している。

50

【図4】 抗マウスgp34ラットモノクローナル抗体の実験的自己免疫性脳脊髄炎発症抑制の有効性を示す図である。実験的自己免疫性脳脊髄炎誘導後の各群の検体における実験的自己免疫性脳脊髄炎評価点数の平均値の経時変化である。図中、白抜きの部分は、抗マウスgp34ラットモノクローナル抗体投与群を、黒塗りの部分は、ラットイムノグロブリンG投与群を示す。

【図1】

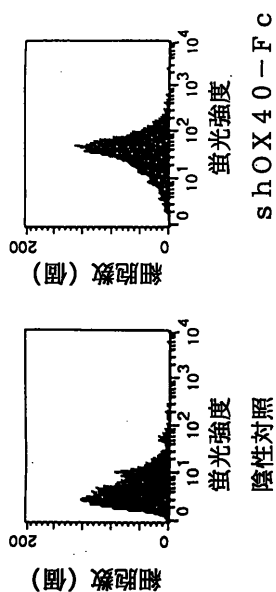


図1 マウスgp34発現細胞に対するshOX40-Fcの結合

【図2】

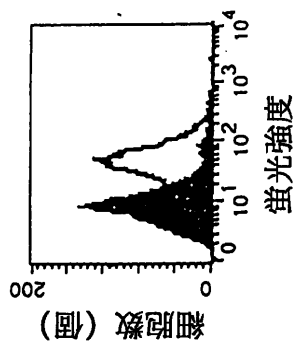


図2 抗マウスgp34ラットモノクローナル抗体によるマウスgp34とshOX40-Fcの結合阻害



【 図 3 】

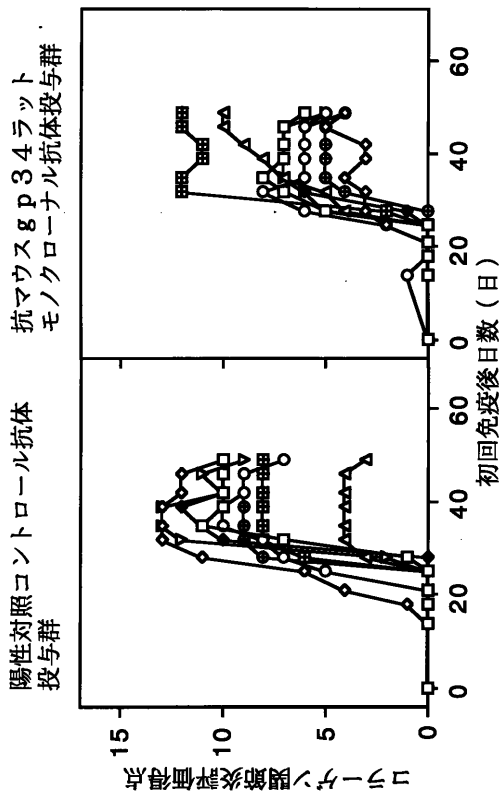


図3 コラーゲン関節炎に対する抗マウスgp34ラットモノクローナル抗体の効果

【 図 4 】

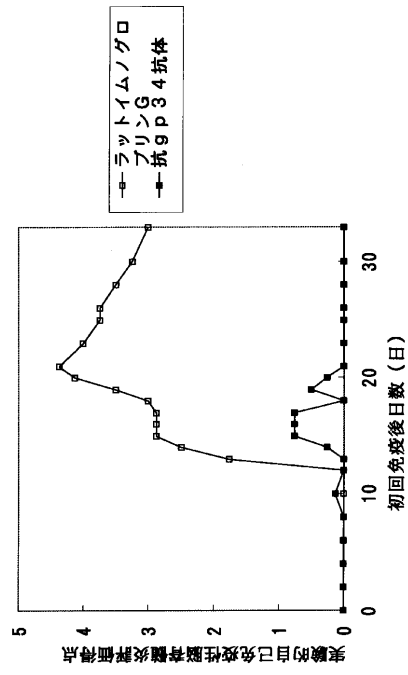


図4 実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する抗マウスgp34ラットモノクローナル抗体の効果

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	
		A 6 1 P 43/00	1 0 1

(72)発明者 村田 和子  
宮城県仙台市泉区長命ヶ丘6丁目13-22

(72)発明者 東村 紀一  
千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式会社内

審査官 長部 喜幸

(56)参考文献 特表平09-509053(JP, A)  
特表平09-509826(JP, A)  
Thomas V. TITTLE, Blood, 1997年, Vol.89, No.12, Pages 4652-4658  
A.D. WEINBERG, Nature Medicine, 1996年, Vol.2, No.2, Pages 183-189  
Durie W. C., FASEB Journal, 1996年, Vol.10, No.6, Page A1435  
Peter R. BAUM, EMBO Journal, 1994年, Vol.13, No.17, Pages 3992-4001

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/395

A61K 45/00

BIOSIS(STN)

CA(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)

JSTPlus(JDream2)

JMEDPlus(JDream2)

JST7580(JDream2)