

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4751493号  
(P4751493)

(45) 発行日 平成23年8月17日(2011.8.17)

(24) 登録日 平成23年5月27日(2011.5.27)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
請求項の数 20 (全 28 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願平9-533601  
 (86) (22) 出願日 平成9年3月20日(1997.3.20)  
 (65) 公表番号 特表2001-518066(P2001-518066A)  
 (43) 公表日 平成13年10月9日(2001.10.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US1997/004248  
 (87) 国際公開番号 W01997/034633  
 (87) 国際公開日 平成9年9月25日(1997.9.25)  
 審査請求日 平成15年12月26日(2003.12.26)  
 (31) 優先権主張番号 60/013,751  
 (32) 優先日 平成8年3月20日(1996.3.20)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 398035028  
 ブリストル・マイヤーズ スクイップ カ  
 ンパニー  
 アメリカ合衆国 08543-4000  
 ニュージャージー州 プリンストン ロー  
 レンスヴィループリンストン ロード  
 (73) 特許権者 504391260  
 エモリー ユニバーシティー  
 アメリカ合衆国 ジョージア 30322  
 , アトランタ, クリフトン ロード  
 1599, エヌイー, 4ティーエイ  
 チ フロア  
 (74) 代理人 100070024  
 弁理士 松永 宣行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GP39/CD40およびCTLA4/CD28/B7経路のブロックによって免疫反応を阻止する方法およびそれに使用する組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

CTLA4 - 陽性、CD28 - 陽性、およびgp39 - 陽性細胞とB7 - 陽性およびCD40 - 陽性細胞との相互作用を介する移植拒絶反応を阻止するための薬剤の製造のために、CTLA4 - 陽性細胞上のCTLA4抗原及び/又はCD - 28陽性細胞上のCD28抗原がB7抗原と結合することを防止する第1の可溶性リガントと、gp39 - 陽性細胞上のgp39抗原がCD40抗原と結合することを防止する第2の可溶性リガントとの組み合わせであって、該移植は血管柄付移植であり、該第1の可溶性リガントは、可溶性CTLA4、可溶性CD28、可溶性B7、CTLA4に結合する抗体、CD28に結合する抗体及びB7に結合する抗体からなる群より選ばれ、更に第2の可溶性リガントは、可溶性CD40、可溶性gp39、CD40に結合する抗体およびgp39に結合する抗体からなる群より選ばれる、該第1の可溶性リガントと該第2の可溶性リガントとの組み合わせの有効量の使用。

【請求項2】

CTLA4 - 陽性、CD28 - 陽性、およびgp39 - 陽性細胞とB7 - 陽性およびCD40 - 陽性細胞との相互作用を介する移植拒絶反応を阻止するための薬剤の製造のために、CTLA4 - 陽性細胞上のCTLA4抗原及び/又はCD - 28陽性細胞上のCD28抗原がB7抗原と結合することを防止する第1の可溶性リガントと、CD40抗原およびCD40 - 陽性細胞がgp39抗原と結合することを防止する第2の可溶性リガントとの組み合わせであって、該移植は血管柄付移植であり、該第1の可溶性リガントは、可溶性

CTL A 4、可溶性CD 2 8、可溶性B 7、CTL A 4に結合する抗体、CD 2 8に結合する抗体及びB 7に結合する抗体からなる群より選ばれ、更に第2の可溶性リガントは、可溶性CD 4 0、可溶性gp 3 9、CD 4 0に結合する抗体およびgp 3 9に結合する抗体からなる群より選ばれる、該第1の可溶性リガントと該第2の可溶性リガントとの組み合わせの有効量の使用。

【請求項3】

CTL A 4 - 陽性、CD 2 8 - 陽性、およびgp 3 9 - 陽性細胞とB 7 - 陽性およびCD 4 0 - 陽性細胞との相互作用を介する移植拒絶反応を阻止するための薬剤の製造のために、B 7 - 陽性細胞上のB 7抗原がCTL A 4 - 陽性細胞上のCTL A 4抗原及び/又はCD - 2 8陽性細胞上のCD 2 8抗原と結合することを防止する第1の可溶性リガントと、gp 3 9 - 陽性細胞上のgp 3 9抗原がCD 4 0抗原と結合することを防止する第2の可溶性リガントとの組み合わせであって、該移植は血管柄付移植であり、該第1の可溶性リガントは、可溶性CTL A 4、可溶性CD 2 8、可溶性B 7、CTL A 4に結合する抗体、CD 2 8に結合する抗体及びB 7に結合する抗体からなる群より選ばれ、更に第2の可溶性リガントは、可溶性CD 4 0、可溶性gp 3 9、CD 4 0に結合する抗体およびgp 3 9に結合する抗体からなる群より選ばれる、該第1の可溶性リガントと該第2の可溶性リガントとの組み合わせの有効量の使用。

10

【請求項4】

CTL A 4 - 陽性、CD 2 8 - 陽性、およびgp 3 9 - 陽性細胞とB 7 - 陽性およびCD 4 0 - 陽性細胞との相互作用を介する移植拒絶反応を阻止するための薬剤の製造のために、B 7 - 陽性細胞上のB 7抗原がCTL A 4 - 陽性細胞上のCTL A 4抗原及び/又はCD - 2 8陽性細胞上のCD 2 8抗原と結合することを防止する第1の可溶性リガントと、CD 4 0抗原およびCD 4 0 - 陽性細胞がgp 3 9抗原と結合することを防止する第2の可溶性リガントとの組み合わせであって、該移植は血管柄付移植であり、該第1の可溶性リガントは、可溶性CTL A 4、可溶性CD 2 8、可溶性B 7、CTL A 4に結合する抗体、CD 2 8に結合する抗体及びB 7に結合する抗体からなる群より選ばれ、更に第2の可溶性リガントは、可溶性CD 4 0、可溶性gp 3 9、CD 4 0に結合する抗体およびgp 3 9に結合する抗体からなる群より選ばれる、該第1の可溶性リガントと該第2の可溶性リガントとの組み合わせの有効量の使用。

20

【請求項5】

CTL A 4 - 陽性細胞上のCTL A 4抗原及び/又はCD 2 8 - 陽性細胞上のCD 2 8抗原がB 7抗原と結合することを防止する第1の可溶性リガントは、CTL A 4と結合する抗体、CD 2 8と結合する抗体または可溶性B 7である、請求項1又は2記載の使用。

30

【請求項6】

B 7 - 陽性細胞上のB 7抗原がCD - 2 8陽性細胞上のCD 2 8抗原及び/又はCTL A 4 - 陽性細胞上のCTL A 4抗原と結合することを防止する第1の可溶性リガントは、B 7と結合する抗体、可溶性CTL A 4又は可溶性CD 2 8である、請求項3又は4記載の使用。

【請求項7】

前記可溶性CTL A 4は、CTL A 4の細胞外ドメインの少なくとも一部を有する組み換え結合分子である、請求項6に記載の使用。

40

【請求項8】

前記CTL A 4の細胞外ドメインは非CTL A 4タンパク質配列に結合する、請求項7に記載の使用。

【請求項9】

前記非CTL A 4タンパク質配列は免疫グロブリン分子の少なくとも一部である、請求項8に記載の使用。

【請求項10】

前記可溶性CTL A 4は、CTL A 4 Ig融合タンパク質である、請求項6に記載の使用。

50

## 【請求項 11】

前記 C T L A 4 I g 融合タンパク質は A T C C 6 8 6 2 9 と命名される C T L A 4 I g である、請求項 10 に記載の使用。

## 【請求項 12】

前記可溶性 C T L A 4 は C D 2 8 I g / C T L A 4 I g 融合タンパク質ハイブリッドである、請求項 6 に記載の使用。

## 【請求項 13】

前記 C D 2 8 I g / C T L A 4 I g 融合タンパク質ハイブリッドは、C T L A 4 受容体の細胞外ドメインの一部に対応する第 2 のアミノ酸配列に融合した C D 2 8 受容体の細胞外ドメインの一部に対応する第 1 のアミノ酸配列と、ヒト免疫グロブリン C (ガンマ) 1 のヒンジ、C H 2 および C H 3 に対応する第 3 のアミノ酸配列とを有する C D 2 8 I g / C T L A 4 I g 融合タンパク質ハイブリッドである、請求項 12 に記載の使用。

10

## 【請求項 14】

可溶性 C D 2 8 は、C D 2 8 の細胞外ドメインの少なくとも一部を有する組み換え結合分子である、請求項 6 に記載の使用。

## 【請求項 15】

前記可溶性 C D 2 8 は C D 2 8 I g / C T L A 4 I g 融合タンパク質ハイブリッドである、請求項 6 に記載の使用。

## 【請求項 16】

g p 3 9 - 陽性細胞上の g p 3 9 抗原が C D 4 0 抗原と結合することを防止する第 2 の可溶性リガントは、g p 3 9 と結合する抗体または可溶性 C D 4 0 である、請求項 1 又は 3 記載の使用。

20

## 【請求項 17】

C D 4 0 - 陽性細胞上の C D 4 0 抗原が g p 3 9 抗原と結合することを防止する第 2 の可溶性リガントは、C D 4 0 と結合する抗体または可溶性 g p 3 9 である、請求項 2 又は 4 記載の使用。

## 【請求項 18】

g p 3 9 と結合する抗体は M R 1 モノクローナル抗体である、請求項 16 に記載の使用

## 【請求項 19】

自己移植片、同系移植片、アログラフト及び異種グラフトの拒絶を阻止する、請求項 1 ~ 18 いずれかの項記載の使用。

30

## 【請求項 20】

慢性的な移植後血管障害を阻止する、請求項 19 記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

本出願全体に種々の公報類が参照されている。これらの公報類の開示はそのまま本出願に参考として組み込まれ、本発明が関係する技術の状況をより完全に説明するものとする。

## 発明の背景

C D 2 8 は大部分の T 系列細胞および形質細胞に発現する (ジューン (June, C.H.) ら、Immunol. Today、11 巻、211 - 16 ページ (1990) ; ダムル (Damle) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 78 巻 : 5096 - 6001 (1981) )。C D 2 8 のリガンドは B 7 であり、それは活性化された B 細胞上に発現する (リンスレイ (Linsley, P.S.) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 87 巻、5031 - 35 ページ (1990) ; リンスレイら、J. Exp. Med. 173 巻、721 - 730 ページ (1991) )。

40

C D 4 0 はタイプ I 膜結合シグナル化受容体類の腫瘍壊死因子受容体 (T N F R ) ファミリーのメンバーである。最初は B 細胞抗原として確認されたとはいえ、C D 4 0 は、樹状細胞、単球および B 細胞を含むすべての抗原提示細胞 (A P C ) によって発現される。

C D 4 0 のリガンドは g p 3 9 である ; これは C D 4 0 に結合し、それによって B 細胞を活性化することができる。g p 3 9 は C D 4 0 L、T R A P および T - B A M としても知られている。g p 3 9 は T N F と顕著な相同性を有するタイプ II 細胞表面タンパク質であり、活性化された T 細胞によって一時的に発現される。T 細胞の他に、g p 3 9 は好塩基

50

球、肥満細胞、および好酸球によって発現される。

CD28およびCD40経路はT依存性免疫反応の開始および増幅に重要な役割を演ずる (ブルーストン (Bluestone, J.A.) *Immunity* 2巻、555 - 9ページ (1995) ; バンケロー (Banchereau J.) ら、*Own.Rev.Immunol.* 12巻、881 - 922ページ (1994) ; ドュリー (Durie, F.H.) ら、*Science* 261巻、1328 - 30ページ (1993) ; フォイ (Foy, T.M.) ら、*J.Exp.Med* 178巻、1567 - 75ページ (1993) ; ヴァン・デン・アートウェー (Van den Eertwegh, A.J.M.) ら、*J.Exp.Med.* 178巻、1555 - 65ページ (1993) )。

CD28 / B7相互作用は最適T細胞活性化、およびIL-2産生のために必要な、重要な“第二シグナル”を提供する (ジェンキンス (Jenkins, M.K.) ら、*J.Immunol.* 147巻、2461 - 6ページ (1991) ; シュワルツ (Schwartz, R.H.) *Cell* 71巻、1065 - 8ページ (1992) ; ブッシオティス (Boussiotis, V.A.) ら、*J.Exp.Med.* 178巻、1753 - 1763 (1993) )、一方CD40 / gp39シグナルはB細胞、マクロファージ、内皮細胞、およびT細胞の活性化のためのコスティミュレーションを提供する (グレワル (Grewal, I.S.) ら、*Nature* 378巻、617 - 620ページ (1995) ; ヴァン・エッセン (van Essen, D.) ら、*Nature* 378巻、620 - 623ページ (1995) ; ホレンボーク (Hollenbaugh, D.) ら、*J.Exp.Med.* 182巻、33 - 40ページ (1995) ; アルミテイジュ (Armitage, R.J.) ら、*Nature* 357巻、80 - 82ページ (1992) ; カヤビヤブ (CaYabyab, M.) ら、*J.Immunol.* 152巻、1523 - 31ページ (1994) ; ノエル (Noelle, R.) ら、*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89巻、6550 - 6554ページ (1992) ; アルダソン (Alderson, M.) ら、*J.Exp.Med.* 178巻、669 - 674ページ (1993) )。

宿主免疫反応はしばしば移植組織および臓器の拒絶反応を起こす。そこでこれらの免疫反応の阻害は組織移植の成功のために重要である。CD28またはCD40経路どちらかのブロック (閉鎖、ブロック) を目的とする諸研究が行われているが、これらの経路のどちらか一方だけのブロックは、高度に免疫原性のアログラフト (同種異型植接用片) を生着させるには不十分であった (ターカ (Turka, L.A.) ら、*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89巻、11102 - 11105ページ (1992) ; パーカー (Parker, D.C.) ら、*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92巻、9560 - 9564ページ (1995) ; ラーゼン (Larsen, C.P.) ら、*Transplantation* 61巻、4 - 9ページ (1996) )。CD28またはCD40いずれかの経路をブロックする単独治療は移植組織を最良の一時に、時には比較的長期間生存させるに過ぎない。どちらのブロックも単独ではグラフト (植接用片) の生存を一様に促進することはなかった。

異種臓器移植に対する激しい免疫反応は、臨床的移植にこの技術を適用することの強力な障壁となっている (プラット (Platt J.L.) *Curr.Opin.Imm.* 8巻、721 - 728ページ (1996) )。異種皮膚グラフトを長持ちさせるこれまでの実験的試みは、全身照射後、混合異種 / 同系再構成 (アイルシュタット (Ildstad S.T.)、サクス (Sachs D.H.)、*Nature* 307巻：168 - 170ページ (1984) ) か、胸腺摘出術と抗T細胞抗体除去との組み合わせによるきびしいプレコンディショニング (ピエルソン (Pierson III R.N.)、ウィン (Winn H.J.)、ラッセル (Russell P.S.)、オーチンクロス (Auchincloss Jr.H.)、*J.Exp.Med.* 170巻：991 - 996ページ (1989) ; およびシャラビ (Sharabi Y.)、アクセンチジェヴィッチ (Aksentjevich I.)、サンド (Sundt III T.M.)、サクス (Sachs D.H.)、サイクス (Sykes M.) *J.Exp.Med.* 172巻：195 - 202ページ (1990) ) のどちらかを必要とする。最近これらの戦略は、調和しない異種障壁を介する皮膚グラフトの受け入れを促進するために用いられている (ザオ (Zhao Y.)、スウェンソン (Swenson K.)、セルジオ (Sergio J.)、アーン (Arn J.S.)、サクス、サイクス、*Nat.Med.* 2 (11) 巻：1211 - 1216ページ (1996) )。しかし、細胞傷害性 (シトアブラティブ) 治療法に関連して病的状態がおきる可能性があるために、臨床的充実性臓器移植における使用にこれらの戦略を導入することは阻止される。そこで異種グラフトの生存期間を長くする非細胞傷害性戦略が開発されるならば、こ

10

20

30

40

50

れら戦略の臨床的適用は非常に容易になるであろう。

現在、ホストによる移植組織の長期受容性をもたらす方法を提供し、それによって移植の生存率を高める必要がある。そのためには、移植片受容体において十分な免疫不応答を確実にすることが必要である。

我々は、CD28またはCD40シグナルいずれかのブロックによるT依存性免疫反応阻止が、強力ではあるが不完全であることを見出した。本明細書に示すデータは、これら経路の同時ブロックが、思いがけずインビボにおける移植組織の急性および慢性拒絶反応を阻止することを示した。可溶性CTLA4分子または、gp39を認識して、これに結合する抗体類を用いるこれら経路の独立的ブロックは、一次皮膚移植組織の生存を短期間延ばすこともできなかった。

10

本発明は、CD28およびCD40シグナルの同時ブロックが、完全な異型、並びに異種の皮膚グラフトの長期生存を促進することの発見を含める。皮膚アログラフト生存期間の延長はシクロスポリンA(CyA)によって消失する；これは、それがTCR/CD3複合体および/またはその他のCyA感受性経路による完全なシグナル化を必要とする活性プロセスであることを示唆する。その上、CTLA4Ig/MR1は本来血管化した心臓グラフト組織の長期受容を促進し、慢性血管性拒絶反応の発生を阻止した。

本明細書の2つの移植モデルで示された効果は、CD28およびCD40が、効果的なT細胞反応の発生のために必要な、相関性はあるが独立したシグナル化経路を提供することを示す。この発見は、グラフトの拒絶反応の抑制を含む免疫反応操作のための新しい、より効果的戦略となる方法を提供する。

20

#### 発明の概要

本発明は移植組織の拒絶反応を阻止する方法を提供する。この方法は、gp39およびCD40からなる群から選択される細胞上の内因性分子(例えば抗原)がその内因性リガンドと結合するのを阻止し、CTLA4、CD28、およびB7からなる群から選択される細胞上の内因性分子がその内因性リガンドと結合するのを阻止することを含んでなる。このような分子とそれらのリガンドとの結合の阻止は、2つの独立的シグナル経路をブロックし、移植組織拒絶反応を起こす免疫反応を阻止する。

さらに、本発明は、移植組織拒絶反応と関係する免疫反応を阻止するための反応であって、B7-陽性細胞を、B7抗原を認識しこれに結合する第1の可溶性リガンドと接触させ、gp39-陽性細胞を、gp39を認識しこれに結合する第2の可溶性リガンドと接触させることを含む方法を提供する。B7-陽性細胞と第1の可溶性リガンドとの結合はB7抗原と内因性CTLA4またはCD28との反応をブロックする。さらにgp39抗原と第2の可溶性リガンドとの結合はgp39抗原と内因性CD40との反応をブロックする。このgp39およびB7両経路のブロックは免疫反応を阻止する。

30

出願人の発見は、ある対象におけるgp39およびB7経路を介する免疫反応を阻止する方法を含む。この方法は、その対象に、B7抗原を認識しこれに結合する第1の可溶性リガンドと、gp39を認識しこれに結合する第2の可溶性リガンドとを投与することを含んでなる。

第1および第2両方の可溶性リガンドとそれらの受容体との結合は、gp39およびCD40抗原からなる群から選択される細胞上の内因性分子がその内因性リガンドに結合することを防止し、CTLA4、CD28、またはB7からなる群から選択される細胞上の内因性分子がそのリガンドと結合することを防止し、それによってgp39およびB7経路によって介される免疫反応を阻止する。

40

本発明はある対象における移植片の拒絶反応を阻止するための方法をも提供する。この方法はその対象に、B7-陽性細胞上のB7抗原を認識しこれに結合する第1の可溶性リガンドと、gp39-陽性細胞上のgp39抗原を認識しこれに結合する第2の可溶性リガンドとの組み合わせを有効量投与することを含んでなる。

B7-陽性細胞と第1の可溶性リガンドとの結合、およびgp39-陽性細胞と第2の可溶性リガンドとの結合は、内因性CTLA4-、CD28-、およびgp39-陽性細胞とB7-陽性細胞およびgp39-陽性細胞との相互作用を破壊し、移植片の拒絶反応は

50

阻止される。

図の簡単な説明

図1は、インビボにおいてCD28およびCD40シグナルの同時ブロックが膝窩リンパ節同種異型免疫反応を除去することを示す棒グラフである。

図2Aは、CTLA4Ig/MR1投与が、CTLA4IgまたはMR1単独と比較して心臓アログラフトの生存を延長することを示す線グラフである。

図2Bは、広範囲のリンパ球浸潤、間質性線維症、および慢性拒絶反応に一致する重度冠状動脈内膜肥厚および線維症を示す62日目のCTLA4Ig投与 - 心臓アログラフトの組織学的切片の写真である(左側倍率100;右側倍率400)。

図2Cは、リンパ球浸潤および間質性線維症はより軽度であるが、慢性拒絶反応の特徴である重度冠状血管異常を示す62日目のMR1 - 投与心臓アログラフトの組織学的切片の写真である(左側倍率100;右側倍率400)。

図2Dは、リンパ球浸潤も線維症も冠状動脈内膜損傷もない、58日目のCTLA4Ig/MR1 - 投与心臓アログラフトの組織学的切片の写真である(左側倍率100;右側倍率400)。

図2Eは、正常な、移植していないBALB/c心臓を示す組織学的切片の写真である(左側倍率100;右側倍率400)。

図3Aは、未投与、MR1投与、CTLA4Ig投与、およびMR1/CTLA4Ig投与心臓アログラフトにおける、RT-PCRを用いた免疫メディエーター転写物のグラフト内発現を示す臭化エチジウム染色ゲルストリップの写真である。

図3Bは、平均PCR生成物バンド強度±標準偏差を示す棒グラフである。

図4Aは、MR1のみ、CTLA4Igのみ、およびMR1とCTLA4Igとの組み合わせを投与したマウスのデータを示す線グラフである。

図4Bは、CyA、CyAとCTLA4Ig、およびCyAとMR1を投与したマウスのデータを示す線グラフである。

図4Cは、一次皮膚アログラフトにおけるYTS191のみ、MR1のみ、MR1とCTLA4Ig、およびYTS191とCTLA4Igの手術時投与の効果を示す線グラフである。

図4Dは、CTLA4Ig/MR1投与受容体におけるBALB/c皮膚グラフトの健康な外観を示す写真である。

図4Eは、拒絶反応を受けるコントロール - アログラフトを示す写真である。

図4Fは、移植後100日目の生着したグラフトの、十分に保存された表皮毛包および付属構造を有する健康な外観を示す皮膚グラフトの組織学的切片の写真である。

図4Gは、未投与受容体に移植後8日目の、BALB/c皮膚グラフトを示す写真である。

図5Aは、インビトロにおけるMR1のみ、CTLA4Igのみ、およびMR1/CTLA4Ig組み合わせを投与した異なる3細胞集団に与える効果を示す線グラフである。

図5Bは、MR1のみ、CTLA4Igのみ、およびMR1/CTLA4Ig組み合わせ使用のインビボ効果を示す棒グラフである。

図6Aは、照射した(2000RADS)ラット(スプラグ-ダウレイ)脾細胞による足免疫に反応したC3Hマウスにおける、免疫された膝窩リンパ節の重量と反対側リンパ節の重量との比を示す棒グラフである。ヒトIgG(点斑)、CTLA4-Ig(灰色)、MR1(白)、CTLA4-Ig/MR1(黒)、免疫していない正常リンパ節(斜線)。

図6Bは、免疫後5日目に膝窩リンパ節を収穫した後のリンパ節細胞のインビトロ増殖を示す線グラフである。ヒトIgG(斜線)、CTLA4-Ig(灰色)、MR1(白色)、CTLA4-Ig/MR1(黒)、免疫していない正常リンパ節(斜線)。

図6Cは、CD40およびCD28経路の同時ブロックがIL-2のサイトカイン産生を著しく阻止することを示す棒グラフである。ヒトIgG(斜線)、CTLA4-Ig(灰色)、MR1(白色)、CTLA4-Ig/MR1(黒)、免疫していない正常リンパ節

10

20

30

40

50

(斜線)。

図6Dは、CD40およびCD28経路の同時ブロックがINF $\gamma$ のサイトカイン産生を著しく阻止することを示す棒グラフである。ヒトIgG(斜線)、CTLA4-Ig(灰色)、MR1(白色)、CTLA4-Ig/MR1(黒)、免疫していない正常リンパ節(斜線)。

図7Aは、0、2、4および6日目のMR1(500 $\mu$ g)投与と組み合わせて0、2、4および6日目にCTLA4-Ig(500 $\mu$ g)を投与したC3H受容体が、スプラグ-ダウレイラット心臓アログラフトの生存期間を延長したことを示す線グラフである。

図7Bは、広がった組織破壊を示す6日目の未投与心臓異種グラフトの写真である(400 $\times$ )。

図7Cは、リンパ球侵潤、単球破壊および冠状動脈血管症を示す20日目のCTLA4-Ig投与心臓異種グラフトの写真である(400 $\times$ )。

図7Dは、リンパ球侵潤、単球破壊および冠状動脈血管症を示す20日目のMR1投与心臓異種グラフトの写真である(400 $\times$ )。

図7Eは、正常な、移植されていないスプラグ-ダウレイラット心臓の写真である(400 $\times$ )。

図7Fは、リンパ球侵潤および線維症がほとんどない、20日目のCTLA4-Ig/MR1投与心臓異種グラフトの写真である(400 $\times$ )。

図7Gは、単球および血管構造が両方ともよく保存されていることを示す、122日目のCTLA4-Ig/MR1投与心臓異種グラフトの写真である(400 $\times$ )。

図8Aは、手術時にMR1およびCTLA4-Igを同時投与したC3Hマウスのスプラグ-ダウレイラット皮膚異種グラフトの生存が、MR1のみまたはCTLA4-Igのみを投与した受容体および未投与コントロールの異種グラフトの生存と比較して長くなることを示す一連の線グラフである。

図8Bは、CTLA4-Ig/MR1組み合わせ、またはMR1のみを長期投与(標準的4投与体系後に開始)した場合、この両投与間では異種グラフト生存に顕著な変化がないことを示す一連の線グラフである。

図8Cは、移植後100日目の、CTLA4-Ig/MR1投与C3H受容体のラット皮膚グラフトの健康な外観を示す写真である。

図8Dは、移植後10日目に拒絶反応を受けたコントロール皮膚異種グラフトを示す写真である。

図8Eは、移植後50日目のよく保存された組織学的構造を示す、受容されたCTLA4-Ig/MR1投与グラフトのヘマトキシリン-エオシン染色組織学的切片の写真である(400 $\times$ )。

図8Fは、投与しなかったC3H受容体における移植後8日目のスプラグ-ダウレイラット皮膚グラフトのヘマトキシリン-エオシン染色組織学的切片の写真である(400 $\times$ )。

図9Aは、スプラグ-ダウレイドナーからの皮膚異種グラフト移植後55日目に、C3H受容体から集めた血清における誘発異種抗体反応の減少を示す散乱プロットである。投与を受けなかったコントロール・マウスは容易に検出できるIgG異種抗体を有した。CTLA4-IgまたはMR1単独投与は異種抗体反応を部分的にブロックした。CTLA4-IgとMR1との組み合わせは誘発異種抗体反応を実質上除去した。各データ点は個々の受容体の分析を表す。

図9Bは、スプラグ-ダウレイドナーからの心臓異種グラフト移植後20日目にC3H受容体から集めた血清中の誘発異種抗体反応の減少を示す散乱プロットである。

発明の詳細な説明

定義

本出願に用いたすべての科学的および技術的用語は、特に記載しない限り、この分野で一般的に用いられる意味を有する。本出願に用いる下記の単語または語句は特殊の意味を有する。

10

20

30

40

50

本明細書に用いる“gp39に対するモノクローナル抗体”または“抗-gp39”はMR1を含める。抗-gp39は文献では抗CD40リガンドとしても知られている。MR1の例は、マウスから得たgp39に対するモノクローナル抗体を含めるが、これに制限されるものではない；他の種、例えばサル、ヒツジ、ヒトなどからのgp39に対する抗体も含まれる。その上、“gp39に対するモノクローナル抗体”または“抗-gp39”は、gp39を認識しこれに結合するあらゆる抗体分子、それらの断片、または組換え結合タンパク質を含める。

本明細書に用いる“投与する（アドミニスタリング）”は、経口投与、坐薬としての適用、局所的接触、静脈内、筋肉内、または皮下投与、またはミニ浸透圧ポンプなどの除放性デバイスの対象への埋め込みを意味する。

10

本明細書に用いる“薬学的に容認される担体”とは、抗体と組み合わせたときに抗体の免疫原性を保持し、対象の免疫系と反応しない物質を含める。例としては、これに制限されるものではないが、リン酸緩衝食塩液、水、例えば水中油滴型エマルジョン等のエマルジョン、種々のタイプの湿潤剤など、あらゆる標準的薬学的担体を含む。その他の担体には、滅菌溶液、上衣錠剤を含める錠剤類、およびカプセル類も含む。

典型的にはこのような担体は、賦形薬、例えば澱粉、ミルク、砂糖、ある種の粘土、ゼラチン、ステアリン酸またはそれらの塩類、ステアリン酸マグネシウムまたはカルシウム、タルク、植物脂肪または油、ガム類、グリコール類またはその他の公知の賦形薬類も含む。このような担体は香料および色素添加物またはその他の成分も含むことができる。このように担体を含んでなる組成物は公知の一般的方法によって処方される。

20

本明細書に用いる“移植組織（トランスプランティドティッシュ）”とは、自己移植片、同系移植片、アログラフトおよび異種グラフトを含める。移植組織の例は、これに制限されるものではないが、例えば心臓、肝臓または腎臓の充実性器官移植組織、皮膚グラフト、膵島細胞、骨髄グラフトまたは細胞懸濁液などを含む。

ここに用いる“B7”とは、B7-1（CD80とも呼ばれる）、B7-2（CD86とも呼ばれる）、B7-3およびB7ファミリー、例えばB7-1、B7-2および/またはB7-3の組み合わせを含む。

ここに記載の発明をより完全に理解するために下記の説明を記す。

ここに記載の発見は移植組織の拒絶反応を阻止する方法に関するものである。1実施態様において、本発明の方法はgp39およびCD40からなる群から選択される細胞上の内因性分子の、その内因性リガンドとの結合を防止することを含む。本発明の方法はCTLA4、CD28、およびB7からなる群から選択される細胞上の内因性分子の、その内因性リガンドとの結合を防止することを提供する。これらの分子をそれらの内因性リガンドとの結合から防止すると、2つの独立的シグナル経路がブロックされる。これら2つの独立的シグナル経路のブロックは、移植組織の拒絶反応をおこす免疫反応を阻止する。

30

本発明の1例において、内因性gp39抗原はその内因性リガンドとの結合が防止される。この例は、gp39-陽性細胞を、gp39抗原を認識しこれに結合する可溶性リガンドと接触させる工程を含む。（例えば、MR1、またはgp39と結合するその他の抗体類などの可溶性リガンド、および可溶性CD40分子類を用いる）

この例は、内因性CTLA4抗原のその内因性リガンドとの結合を防止する付加的工程を含む。これは、B7-陽性細胞を、B7抗原を認識しこれに結合する可溶性リガンド、例えばCTLA4Ig（1995年7月18日発行の米国特許第5,434,131号）、BB-1モノクローナル抗体またはその他のB7に対する抗体と接触させる付加的工程を含む。

40

gp39-陽性細胞とその可溶性リガンドとの結合は、内因性gp39抗原と内因性CD40との反応をブロックする。B7-陽性細胞とその可溶性リガンドとの結合は、内因性B7抗原と内因性CTLA4およびCD28との反応をブロックする。この両ブロックの組み合わせは免疫反応を阻止する。

また別の例において、内因性CD40抗原はその内因性リガンドとの結合が防止される。この例は、CD40-陽性細胞を、CD40抗原を認識しこれに結合する可溶性リガンド

50



と接触させる工程を含む。適したリガンドは、CD40または可溶性gp39 (sgp39) に対する抗体を含む。

この例は、内因性CTLA4抗原とその内因性リガンドとの結合を防止する付加的工程を含む。この工程はB7-陽性細胞を、B7抗原を認識しこれに結合する可溶性リガンドと接触させることを含む。この可溶性リガンドの例は、CTLA4Ig、可溶性CD28分子、およびB7に対する抗体を含む。

CD40-陽性細胞とその可溶性リガンドとの結合はCD40抗原と内因性gp39との反応をブロックする。B7-陽性細胞とその可溶性リガンドとの結合はB7抗原と内因性CTLA4との反応をブロックする。このブロックの組み合わせは免疫反応を阻止する。もう一つの例においては、内因性gp39抗原は上記のようにその内因性リガンドとの結合が防止される。この例は、さらに内因性CD28抗原のその内因性リガンドとの結合を防止する付加的工程も含む。この工程はB7-陽性細胞を、B7抗原を認識しこれに結合する可溶性リガンドと接触させることを含む。例としてはCTLA4Ig、可溶性CD28分子、およびBB-1などのB7に対する抗体が含まれる。

gp39-陽性細胞とその可溶性リガンドとの結合はgp39抗原と内因性CD40との反応をブロックする。B7-陽性細胞とその可溶性リガンドとの結合はB7抗原と内因性CD28との反応をブロックする。このブロックの組み合わせは免疫反応を阻止する。

もう一つの例においては、上記のように内因性CD40抗原のその内因性リガンドとの結合を防止される。この例は、さらに内因性B7抗原のその内因性リガンドとの結合を防止する付加的工程をも提供する。これはCD28-陽性細胞を、CD28抗原を認識しこれに結合する可溶性リガンドと接触させることを含んでなる。このような可溶性リガンド類の例は、可溶性B7分子およびCD28に対する抗体を含む。

CD40-陽性細胞とその可溶性リガンドとの結合はCD40抗原と内因性gp39との反応をブロックする。CD28-陽性細胞とその可溶性リガンドとの結合はB7抗原と内因性CD28との反応をブロックする。このブロックの組み合わせは免疫反応を阻止する。

もう一つの例において、上記のように内因性CD40抗原はそのリガンドに結合することを防止される。この例は、CTLA4-陽性細胞を、CTLA4抗原を認識しこれに結合する可溶性リガンドと接触させることを含んでなる、内因性B7抗原のその内因性リガンドとの結合を防止する付加的工程を提供する。このような可溶性リガンドの例は可溶性B7分子およびCTLA4に対する抗体を含む。

CD40-陽性細胞のその可溶性リガンドへの結合は、CD40抗原と内因性gp39との反応をブロックする。その上、CTLA4-またはCD28-陽性細胞のその可溶性リガンドへの結合は、CTLA4抗原と内因性B7との反応をブロックする。このブロックの組み合わせは免疫反応を阻止する。

その他の例において、内因性CD40抗原は上記のようにそのリガンドとの結合を防止される。この例は、CD28-陽性細胞を、CD28抗原を認識しこれに結合する可溶性リガンドと接触させることを含んでなる、内因性B7抗原のその内因性リガンドとの結合を防止する付加的工程を提供する。このような可溶性リガンドの例は可溶性B7分子およびCD28に対する抗体を含む。

CD40-陽性細胞とその可溶性リガンドとの結合はgp39抗原と内因性CD40との反応をブロックする。さらに、CD28-陽性細胞と可溶性リガンドとの結合はCD28抗原と内因性B7との反応をブロックする。このブロックの組み合わせは免疫反応を阻止する。

またその他の例において、内因性CD40抗原は上記のようにそのリガンドとの結合が防止される。この例は、CTLA4-陽性細胞を、CTLA4を認識しこれに結合する可溶性リガンドと接触させることを含んでなる、内因性B7抗原のその内因性リガンドとの結合を防止する付加的工程を提供する。

CD40-陽性細胞と可溶性リガンドとの結合はgp39抗原と内因性CD40との反応をブロックする。その上、CTLA4-陽性細胞と可溶性リガンドとの結合はCTLA4

10

20

30

40

50

抗原と内因性 B 7 との反応をブロックする。このブロックの組み合わせは免疫反応を阻止する。

その上、本発明はグラフトの拒絶反応を起こす免疫反応を阻止する方法のもう一つの実施態様を提供する。この実施態様は B 7 - 陽性細胞を、B 7 抗原を認識しこれに結合する第 1 の可溶性リガンドと接触させ、g p 3 9 - 陽性細胞を、g p 3 9 抗原を認識しこれに結合する第 2 の可溶性リガンドと接触させることを含む。

B 7 - 陽性細胞と第 1 の可溶性リガンドとの結合は B 7 抗原と内因性 C T L A 4 または C D 2 8 との反応をブロックする。さらに、g p 3 9 抗原と第 2 の可溶性リガンドとの結合は g p 3 9 抗原と内因性 C D 4 0 との反応をブロックする。このブロックの組み合わせは免疫反応を阻止する。

10

その上、本発明は対象における C T L A 4 / C D 2 8 / B 7 および g p 3 9 / C D 4 0 経路を介する免疫反応を阻止する方法を提供する。本発明の実施によると、対象はヒト、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウマ、マウス、ブタ、またはウシ等の動物対象であってもよい。

この方法は対象に、B 7 抗原を認識しこれに結合する第 1 の可溶性リガンド（例えば可溶性 C T L A 4 または C D 2 8 分子、例えば、ブダペスト条約の規定により 1 9 9 1 年 5 月 3 1 日にロックヴィル、マリーランドのアメリカンタイプ培養コレクション（A T C C）に寄託された、それぞれ A T C C 受入れ番号 6 8 6 2 9 および 6 8 8 2 8 の C T L A 4 I g および C D 2 8 I g 融合タンパク質）および g p 3 9 抗原を認識しこれに結合する第 2 の可溶性リガンド（例えば g p 3 9 に対するモノクローナル抗体（M R 1）または可溶性 C D 4 0 分子）を投与することを含む。第 1 および第 2 のリガンドとそれらの受容体との結合は C T L A 4 - 、C D 2 8 - 、および g p 3 9 - 細胞と B 7 - および C D 4 0 - 陽性細胞との相互作用によって仲介される免疫反応を阻止する。

20

また、本発明は対象における移植片の拒絶反応を阻止する方法を提供する。この方法は対象に、B 7 - 陽性細胞上の B 7 抗原を認識しこれに結合する第 1 の可溶性リガンドと、g p 3 9 - 陽性細胞上の g p 3 9 抗原を認識しこれに結合する第 2 の可溶性リガンドとの組み合わせを有効量投与することを含んでなる。B 7 - 陽性細胞と第 1 の可溶性リガンドとの結合および g p 3 9 - 陽性細胞と第 2 の可溶性リガンドとの結合は内因性 C T L A 4 - 、C D 2 8 - 、および g p 3 9 - 細胞と B 7 - 陽性細胞および g p 3 9 - 陽性細胞との相互作用を破壊し、それによって移植片拒絶反応は阻止される。

本発明の実施によると、第 1 の可溶性リガンドは、C T L A 4 の細胞外ドメインの少なくとも一部を有する組換え結合分子であってもよく、C T L A 4 の細胞外ドメインは非 C T L A 4 タンパク質配列に結合する。非 C T L A 4 タンパク質配列は免疫グロブリン分子の少なくとも一部であってもよい。

30

発明の 1 つの特別な例において、リガンドは C T L A 4 I g 融合タンパク質である；それは例えば、1 9 9 1 年 5 月 3 1 日のブダペスト条約の規定により、ロックヴィル、マリーランドのアメリカンタイプ培養コレクション（A T C C）に寄託された、A T C C 受入れ番号：6 8 6 2 9 をもつ C T L A 4 I g 融合タンパク質である。あるいは、そのリガンドは C D 2 8 I g / C T L A 4 I g 融合タンパク質ハイブリッドでもよい（1 9 9 5 年 7 月 1 8 日発行の米国特許第 5 , 4 3 4 , 1 3 1 号）。

また別の実施態様では、第 1 の可溶性リガンドは B 7 抗原と反応するモノクローナル抗体でもよい、例えばその抗体は抗 B B 1 モノクローナル抗体でもよい（クラーク（Clerk）ら、Human Immunol. 1 6 巻：1 0 0 - 1 1 3 ページ（1 9 8 6）；ヨコチら、J. Immunol. 1 2 8 巻：8 2 3 ページ（1 9 8 1）；フリーマン（Freeman）ら J. Immunol. 1 4 3（8）巻：2 7 1 4 - 2 7 2 2 ページ（1 9 8 9）；およびフリードマンら、J. Immunol. 1 3 9 巻：3 2 6 0 ページ（1 9 8 7））。

40

もう一つの実施態様において、リガンドは、C T L A 4 受容体の細胞外ドメインの一部に対応する第 2 のアミノ酸配列に融合した C D 2 8 受容体の細胞外ドメインの一部に対応する第 1 のアミノ酸配列と、ヒト免疫グロブリン C g 1 のヒンジ、C H 2 および C H 3 領域に対応する第 3 アミノ酸配列とを有する C D 2 8 I g / C T L A 4 I g 融合タンパク質ハイブリッドでもよい。

50

本発明の1実施態様において、gp39抗原の第2の可溶性リガンドはgp39抗原と反応するモノクローナル抗体、例えばMR1抗ネズミモノクローナル抗体または抗ヒトgp39抗体でもよい(1995年12月12日発行の米国特許第5,474,771号)。本発明のまた別の実施態様では、この方法は対象に可溶性融合タンパク質、第1の結合ドメインと第2の結合ドメインを含む可溶性融合タンパク質、を投与することを含む。

1例において、第1の結合ドメインは、gp39抗原を認識しこれに結合するリガンドである。幾つかの例はgp39に対するCD40およびモノクローナル抗体を含む。その他の例では、第1の結合ドメインはCD40抗原を認識しこれに結合するリガンドである。幾つかの例はCD40に対するgp39およびモノクローナル抗体を含む。

1例において、第2の結合ドメインは、CTLA4を認識しこれに結合するリガンドである。幾つかの例はCTLA4に対するB7およびモノクローナル抗体を含む。その他の例では、第2の結合ドメインはCD28抗原を認識しこれに結合するリガンドである。幾つかの例は、CD28に対するB7およびモノクローナル抗体を含む。その他の例では、第2の結合ドメインは、B7抗原を認識しこれに結合するリガンドである。幾つかの例はB7に対するCTLA4、CD28およびモノクローナル抗体を含む。

可溶性リガンドは移植中、移植前または移植後に投与することができる。可溶性リガンドは経口的、経皮的、静脈内、筋肉内、腹腔内または皮下投与によって投与できる。

本発明の最も有効な投与方法および用量範囲は治療すべき組織または疾患の部位、病気のきびしさおよび経過、対象の健康および治療に対する反応、および治療医の判断による。よって、これら分子の用量は個々の対象ごとに決めるべきである。

例として、 $\text{mg}/\text{m}^2$ 表面積に基づく種々の大きさおよび種類の動物およびヒトの用量の相互関係をフライライヒ(Freireich, E.J.)らが報告している(Cancer Chemother., Rep. 50(4)巻: 219-244(1966))。用量体系の調節を行い、グラフトの拒絶反応を起こす免疫反応の抑制を最適化することができる; 例えば用量を分割し、1日ベースで投与してもよいし、状態によって比例的に用量を減らすこともできる(例えば1日に数回に分割した量を与えるかまたは特殊な治療の状態によっては比例的に減らすこともできる)。

適切な臨床的結果を得るのに必要な本発明の組成物の用量はスケジュールの最適化とともにさらに減らすことができることは明らかである。

本発明はグラフトの拒絶反応の阻止または免疫反応の阻止に有効な薬学的組成物をも提供する。1実施態様において、これらの組成物は(a)CTLA4、CD28、およびB7抗原のいずれかを認識しこれに結合する可溶性リガンドと、(b)gp39およびCD40抗原のいずれかを認識しこれに結合する可溶性リガンドとの組み合わせの有効量、並びに容認される担体を含んでなる。その他の実施態様において、これらの組成物は、第1の結合ドメインおよび第2の結合ドメインを含んでなる可溶性融合タンパク質の有効量を含み、ここで第1の結合ドメインはgp39またはCD40抗原のいずれかを認識しこれに結合するリガンドであり、第2の結合ドメインは、CTLA4、CD28およびB7抗原のいずれかを認識しこれに結合するリガンドである。

本発明の利点: 臨床的免疫抑制における多くの進歩にもかかわらず、慢性血管性拒絶反応は移植失敗の主な原因であり、その有効治療はまだない。以下に述べる実験は、CD28/CTLA4/B7およびgp39/CD40経路のブロックが移植組織における慢性移植組織血管症の発生を阻止することを示す。これらのデータは、異型および異種グラフトに対する免疫反応が細胞の破壊なしに阻止されることを示す。可溶性CTLA4分子のみに使用に比較して、可溶性CTLA4分子を、gp39を認識しこれに結合する可溶性リガンドとともに使用すると免疫抑制期間は劇的に延長する。

下記の例は、本発明を説明し、これを作成し、使用する当業者を助けるために示される。これらの例は決して本発明の範囲を制限するものではない。

#### 例1

この例のデータは、インビボにおいてCD28およびCD40シグナルの同時ブロックが膝窩リンパ節同種異型免疫反応を除去することを示す。

10

20

30

40

50

## 方法

雄C3H/HeJ(ジャクソン研究所、パールハーバー、ME)マウスに、0日目に左足に滅菌正常生理食塩液50ml中、 $2 \times 10^6$  BALB/c脾細胞を皮下注射することによって免疫し、右足には滅菌正常生理食塩液50mlを注射した。そして0、2および4日目にMR1(250mg)、CTLA4Ig(250mg)またはこれら両試薬を腹腔内に注射した。

マウスを5日目に殺し、手術用顕微鏡(倍率20x)を用いて膝窩リンパ節を収穫し、各々のリンパ節の新鮮重量を分析秤(A-160型、デンバー・インスツルメント・カンパニー、アルヴァダ、CO)でほぼ0.1mgまで測定した。

## 検討

異型脾細胞による皮下免疫後5日目に、未治療コントロール・マウスでは、抗原攻撃側の排水(ドレイン)膝窩リンパ節の重量は反対側リンパ節と比べて5倍を超えた。CTLA4IgまたはMR1の投与はその反応を50-60%阻止し、一方CTLA4IgとMR1との同時投与は抗原攻撃に反応したリンパ節膨張を除去した。結果は、各群の3匹づつのマウスの平均値±標準偏差を示す。3回の独立した実験でも同様な結果が得られた。

コントロール・マウスでは免疫した足の排水したリンパ節の重量が、滅菌生理食塩液を注射した反対側の足と比較して4~6倍増加することがわかった(図1)。この重量増加は富リンパ球-傍皮質(T細胞)および皮質(B細胞)領域の著しい膨張を伴う。単独で投与したとき、CTLA4IgおよびMR1はそれぞれ、この反応を部分的に阻止した(それぞれ57%および56%)。CTLA4Ig/MR1の組み合わせはリンパ節膨張を除去し(98%阻止、図1)、傍皮質およびリンパ濾胞の膨張を防止した。

## 例2

この例は、心臓アログラフトの生存の延長および慢性拒絶反応に関する血管症の阻止を示す。

## 方法

齢8~12週の雄C3H/HeJマウスに一次血管化BALB/c心臓アログラフトをマイクロサージカル法を用いて移植した(コリー(Corry,R.J.)、ウィン(Winn,H.J.)、ラッセル(Russel,P.S.)、Transplantation 16巻、343-350ページ(1973))。

拒絶反応は、触診可能の心臓収縮の消失と開腹して直接目で見て確認することによって決定した。移植後の特定時に移植心臓を摘出し、ホルマリン固定し、パラフィンに埋封した。組織切片(5mm)をマッソンのトリクロームまたはヘマトキシリン-エオシンで染色した。各組織学的試料を治療法にはブラインド(盲検)である心臓移植病理学者(KJW)が検査した。

## 検討

図2Aにおいて、C3H/HeJ受容体を0、2、4および6日目のCTLA4Ig(200mg/投与)と0、2、および4日目のMR1(250mg/投与)の組み合わせで治療し、BALB/c心臓アログラフトの長期生存を達した(メジアン生存期間(MST)>70日、n=7)。対照群は:CTLA4Igのみ(MST=50日、n=12);MR1のみ(MST=70日、n=12);投与せず(MST=12日、n=7)を含めた。

各実験群で、生きている移植臓器を有する3匹のマウスを除いて(これらのマウスは組織学的分析のために移植後58~63日目に殺した)、すべての受容体を70日間追跡した;

図2Bにおいて、62日目のCTLA4Ig投与心臓アログラフトは広範囲のリンパ球浸潤、間質性線維症および、慢性拒絶反応に一致するひどい冠状動脈内膜肥厚および線維症を示す。

図2Cにおいて、62日目のMR1投与心臓アログラフトはより少ないリンパ球浸潤および間質性線維症を示すが、慢性拒絶反応に特徴的な冠状血管異常はよりひどい。

10

20

30

40

50

図 2 D において、58 日目の C T L A 4 I g / M R 1 投与心臓アログラフトは上記とは非常に対照的に、リンパ球浸潤、線維症は顕著に消失し、冠状動脈内膜損傷が最も顕著になくなっていった。これらのグラフトの実質（パレンキマ）および血管は正常な、移植されていない B A L B / c 心臓とはほとんど見分けがつかなくなった。

図 2 E には、正常な移植されていない B A L B / c 心臓が示される。

各実験群で 3 種類のアログラフトから同様な組織学的結果が得られた。C T L A 4 I g のみ、M R 1 のみ、または C T L A 4 I g / M R 1 を投与した C 3 H / H e J ( H - 2 k ) 受容体において、B A L B / c ( H - 2 d ) 心臓アログラフトの生存は未投与コントロールに比べればすべて延長を示した（図 2 A）。だが移植後 58 ~ 62 日後の組織学的検査では、顕著な差が明らかになった。

C T L A 4 I g 投与受容体からのアログラフトは広範囲のリンパ球浸潤、間質性線維症、および慢性拒絶反応に一致する重度冠状動脈内膜肥厚および線維症を示した（図 2 B）。M R 1 投与アログラフトはより少ないリンパ球浸潤および間質性線維症を示したが、慢性拒絶反応の特徴である重度の冠状血管異常が見られた（図 2 C）。

これらとは非常に対照的に、C T L A 4 I g / M R 1 投与受容体からのアログラフトにはリンパ球浸潤、線維症がほとんどなく、最も重要なことに、冠状動脈内膜損傷がなかった（図 2 D）。実際、これらのグラフトの実質および血管は正常な B A L B / c 心臓に見られるものとほとんど区別できなかつた（図 2 E）。

### 例 3

この例は T 細胞サイトカインおよびコストимулятор分子転写物の発現のブロックを示す。

#### 方法

移植後 8 日目に、心臓グラフトを取り出し、T R I z o l 試薬（ジブコBRL、ガイザースバーグ、MD）を用いて組織からすべての R N A を調製した。スーパースクリプトリアンプリフィケーションシステム（ジブコBRL、ガイザースバーグ、MD）で、総 R N A 鋳型 5 m g を用いて c D N A を合成した：最終的容量 20 m l。P C R 反応を行った。P C R 生成物を臭化エチジウムで染色した 1 % アガロース（バイオ-ラッド、ハーキュルス、C A）、2 % ヌシーブ（NuSieve G T G アガロース（F M C バイオプロダクト、ロックランド、M E）ゲル上で可視化した。U V P ゲルドキュメンテーションシステム 5000 を用いてゲル画像を保存した。バンドの強度をゲルリーダー分析ソフトウェア（ナショナルセンター フォー スーパーコンピューティング アプリケーションズ、アーバン、I L）を用いて測定した。

図 3 A において、未投与、M D 投与、C T L A 4 I g 投与、および M R 1 / C T L A 4 I g 投与心臓アログラフトで、免疫メディエーター転写物のグラフト内発現を、R T - P C R を用いて評価した。

各投与群および対照群からの 3 つづつのアログラフトを移植後 8 日目に分析した。移植後 8 日目の正常心臓組織（N）および同系の心臓グラフト（S）を比較のために含めた。

図 3 B には、平均 P C R 生成物バンド強度 ± 標準偏差をグラフによって示す。

#### 検討

対照アログラフト（図 3 A、未投与）と M R 1 - 投与アログラフト（図 3 A）との間には、I L - 2、I L - 4、I L - 10、および I F N g のための T 細胞サイトカイン転写物、またはコストимулятор分子転写物（B 7 - 1 および B 7 - 2）の発現の首尾一貫した差は認められなかったが、C T L A 4 I g は I L - 4 転写物の発現を部分的に阻止した。

C T L A 4 I g / M R 1 投与受容体からのアログラフトは、T h 1 サイトカイン（I L - 2 および I F N g）および T h 2 サイトカイン（I L - 4、および I L - 10）転写物両方の発現の著しい減少を示した。しかしグラフト内 B 7 - 1 および B 7 - 2 コストимулятор分子転写物は C T L A 4 I g / M R 1 投与受容体ではほんの少しだけ減少した。逆転写酵素なしで作成した鋳型を用いる P C R 反応は、イントロンのない G A D P H 遺伝子でさえ生成物を与えなかった（図 3 A、G A D P H、N O R T）；これは混入ゲノム D

10

20

30

40

50

NAが存在しないことを確認するものである。

グラフト内B7-1およびB7-2コストимулятор分子転写物はCTLA4Ig/MR1投与受容体ではほんのわずかに減少し(図3)、CD28/B7-非依存性またはCD40/gp39-非依存性因子、例えばGMCSF(ラーセン(Larsen,C.P.)ら、J.Immunol.152巻、5208-5219ページ(1994))がグラフト内B7発現の重要な調節物質であることを示唆する。こうして、CD40経路のMR1仲介性ブロックはエフェクターAPCのためのT細胞系の助けを阻止するのみならず、CTLA4Igの、アログラフト内におけるT細胞活性化転写物発現阻止能力を高める。これらのデータは、我々のインビトロ研究からのデータMR1は単独投与では同種異型混合白血球反応における細胞増殖にわずかな負の効果を与えるに過ぎないが、MR1は最適以下の濃度のCTLA4Igの阻止効果を増強することを示したデータと一致する。

10

#### 例4

この例は、BALB/cマウスからの全厚皮膚アログラフトを移植したC3H/HeJマウスを用いて、ネズミのアログラフトの生存期間の延長を証明する。

#### 方法

全厚尾-または耳皮膚の約1平方cmの切片を受容体マウスの後外側胸壁に移植し、周囲バンドエイド(登録商標)で固定した。グラフトをその後毎日、目で検査した。拒絶反応は、目に見える表皮グラフト組織の完全な喪失と定義された。MR1およびCTLA4Igの投与プロトコルは、図1に心臓移植組織受容体に関して詳述した。50mg/ml濃度のCyA(サンド社、イーストハノーバー、NJ)を浸透圧ポンプ(アルツェット(Alzet)2002型、アルツァ、パルトアルト、CA)によって0.5ml/hrの速度で(~20mg/kg/日)14日間投与した。浸透圧ポンプは皮膚移植時に受容体の背中部分の皮下に埋め込まれ、移植後21日目に除去された(ペリーラ(Pereira,G.M.)、ミラー(Miller,J.F.)&シェヴァック(Shevach,E.M.)J.Immunol.144巻、2109-2116ページ(1990))。殺した後、皮膚グラフトを切り取り、ホルマリン固定し、パラフィンに埋封した。組織切片(5mm)をヘマトキシリン-エオシンで染色した。

20

図4Aにおいて、MR1のみ(MST=13日、n=5)、またはCTLA4Igのみ(MST=12日、n=7)を投与したC3H/HeJ受容体は未投与対照群(MST=13日、n=5)と同じ速度で、MHC-非相対性BALB/c皮膚グラフトを完全に拒絶反応した。それとは対照的に、MR1とCTLA4Igとを手術時に同時に投与した場合にはアログラフトは著しく長い生存期間を享受した(MST>50、n=15)。

30

図4Bにおいて、CyAのみ(MST=30日、n=4)、CyAプラスCTLA4Ig(MST=30日、n=5)、またはCyAおよびMR1(MST=32日、n=4)を投与したマウスはすべて、同様に少し長い皮膚グラフト生存を示した。驚いたことに、CTLA4Ig/MR1が皮膚グラフト生存に与える好都合な効果は、シクロスポリンの同時投与によって完全に消失した(MST=34日、n=4)。

図4Cにおいて、BALB/c皮膚グラフトのC3H受容体は治療を受けないか(MST=10日、n=3)またはMR1(MST=13日、n=3)、YTS191.1(MST=14日、n=6)、YTS191.1およびMR1(MST=16日、n=6)、YTS191.1およびCTLA4Ig(MST=19日、n=5)、またはCTLA4IgおよびMR1(MST>50日、n=22)で治療した。こうしてこれまでに53匹を超えるマウスがCTLA4Ig/MR1を受けた。この群のなかで2匹は13日目および21日目に死んだ。すべての他のマウスは実験期間中、体重喪失、感染症または悪性腫瘍の兆候もなく、健康であった。

40

CTLA4Ig/MR1投与C3H/HeJ受容体の、移植後50日目のBALB/c皮膚グラフトの健康な外観は(図4D)、拒絶反応を受けたコントロール-アログラフト(図4E)とはっきり対比される。ヘマトキシリン-エオシン染色切片で、受容されたグラフトは移植後100日目によく保存された表皮、毛包および付属構造を示し(図4F)、それは未投与C3H/HeJ受容体の移植後8日目のBALB/c皮膚グラフトとは対照

50

的である；後者は広範囲のリンパ球浸潤を示す（図4G）。

#### 検討

マウスの一次皮膚アログラフト生存に対するCTLA4IgおよびMR1、単独および併用の効果を試験した（図4）。比較のために、受容体をCyA単独、またはCyAとCTLA4IgまたはMR1どちらかとの組み合わせでも治療した。MR1のみまたはCTLA4Igのみを投与したC3H/HeJ受容体はMHC-非相対性BALB/c皮膚グラフトを未投与コントロールと同じ速度で完全に拒絶反応した（図4A）。

CyAのみ、CyAプラスCTLA4Ig、またはCyAおよびMR1はすべて、皮膚グラフト生存期間を少し長くした（図4B）。しかし、これらのアログラフトのすべては結局は拒絶反応され、薬剤とCyAとの間で明らかな効果は示されなかった。

CD40/CD28ブロックの異型免疫反応阻止能を測定する厳密な試験として、我々はマウスにおける一次皮膚アログラフト生存期間に与えるCTLA4IgおよびMR1、単独および組み合わせの手術時投与の効果を研究した。比較のために、受容体にCyA、抗-CD4mAbYTS191.1、またはこれら作用物質をCTLA4IgかまたはMR1のいずれかと組み合わせた治療をほどこした（図4Bおよび4C）。MR1、CTLA4Ig、またはYTS191.1のみを投与したC3H/HeJ受容体は未投与コントロールとほぼ同じ速度でMHC-非相対性BALB/c皮膚グラフトを完全に拒絶反応した（図4Bおよび4C）。YTS191.1およびMR1、YTS191.1およびCTLA4Ig、CyAのみ、CyAプラスCTLA4Ig、またはCyAおよびMR1を投与したマウスは皮膚グラフト生存期間を少し延長した（図4Bおよび4C）。しかしこれらのアログラフトはすべて結局は拒絶反応された。

これらとは対照的に、MR1とCTLA4Igの両方を手術時に投与した受容体では皮膚アログラフトは生存期間の著しい延長を示した。移植後50日目のこれらアログラフトの肉眼による検査では、そのグラフトは見たところ健康で、よく血管化し、しなやかで、短い白い毛が生えていた（図4D）。組織学的にはこの受容されたグラフトはよく保存された表皮、毛包および付属構造を示した（図4F）。驚いたことに、CTLA4Ig/MR1の、皮膚グラフト生存期間に対する好都合な効果はシクロスポリンの同時投与によって完全に消失した（図4B）。

この効果の目だった効力は一次皮膚アログラフトモデルにおいて最も明らかに示された。CTLA4Ig/またはMR1のみ、またはCyAとの併用は皮膚アログラフトの生存期間を顕著には延長しなかった。CTLA4IgとMR1との併用のみが完全-MHC不一致皮膚アログラフトの50日を超える生存をもたらした。この厳しい同種異型免疫反応阻止試験における（生存の）同様な延長は、以前、重度細胞傷害性および/または血液生成性キメリズム-ベース戦略を用いて観察された（マユミ（Mayumi,H.）およびグッド（Good,R.A.）J Exp Med；169巻、213-238ページ、（1990）；（イルシュタット（Ildstad,S.T.）およびサックス（Sachs,D.H.）Nature307巻：168-170ページ（1984）；イルシュタットら、J Exp Med；62巻、231-44ページ（1985）；コッボルド（Cobbold,S.P.）、マーチン（Martin,G.）ら、Nature323巻、164-166ページ（1986）；キン（Qin,S.）ら、Science259巻、974-977ページ（1993））。

#### 例5

CD28およびCD40経路のブロックがT細胞増殖に与える効果を探查するために、Iekが制限されたハトシクロームc-反応性（pcc-TCRTg）およびLd-異型反応性（2C）T細胞受容体トランスジェニックマウス（REFHEDおよびLOH）両方からのT細胞を用いて一次同種異型混合白血球反応を研究した。CTLA4Ig、CD28およびその相同体CTLA4のリガンドに結合する融合タンパク質は3つのT細胞集団すべての増殖を効果的に阻止した（図5A）。

対照的に、CD40経路のハムスター抗-gp39mAb、MR1、によるブロックは、BALB/c樹状細胞に反応するC3H/HeJ T細胞増殖を若干（～50%）阻止し、シクロームcに反応するpcc-TCRTg T細胞を劇的に阻止した（<sup>3</sup>85%）、し

10

20

30

40

50

かしLd-担持BALB/c樹状細胞に反応した2CT細胞の増殖にはごくわずかの効果しか与えなかった(図5A)。

さらに、これらの作用物質による同時ブロックは、同種異型混合白血球反応におけるT細胞増殖およびpcc-TCRTgT細胞を協力的に阻止し、一方CTLA4Igと併用した時、MR1は2CT細胞の増殖に効果を与えないか、またはわずかに増加させた(図5A)。これらの結果は、すべてのT細胞がクローン拡張のためのCD40シグナルに依存するわけではないことを示唆し、CD40のブロックがアログラフト拒絶反応を完全には阻止できないことを説明するかも知れない。

インビボT細胞反応に関するCD28およびCD40ブロックの影響を、足をDBA/2(H-2d、MMTV-7+)脾細胞で免疫したC3H/HeJ(H-2k、MMTV-7-)において評価した。免疫後5日目に、ヒトIgGを投与したコントロール・マウスの排液膝窩リンパ節は4~6倍の重量増加を示した(図5B)。これは、MMTV-7-スーパー抗原反応性Vb+CD+4T細胞数の30倍の増加および膝窩リンパ節内のVb+CD+T細胞数の90倍を超える増加を伴った。単独ではCTLA4IgまたはMR1はこれらの反応を部分的に阻止した。対照的にCTLA4Ig/MR1併用は、リンパ節の大きさの増加、Vb+CD4+T細胞の膨張および芽球化をほとんど消失させた(図5B)。

これらのデータは、CD28およびCD40経路の同時ブロックはインビトロおよびインビボにおける複雑なT依存性免疫反応を阻止することを示している。

#### 例6

この例は、CD28およびCD40経路の同時ブロックが、細胞傷害性コンディショニング治療を必要とすることなく、異種抗原に対する細胞-および抗体反応の顕著な阻止、並びに異種(ラット対マウス)心臓-および皮膚グラフトの長期受容性をもたらすことを示す。

#### 方法

リンパ節検定。雄C3H(ジャクソン研究所、パールハーバー、ME)マウスを、50μl滅菌正常生理食塩液中2×10<sup>6</sup>雄スプラグ-ダウレイ(ハーラン、インディアナポリス、IN)照射(2000RADS)ラット脾細胞で足を免疫し、それから0、2および4日目にMR1(500μg)、CTLA4-Ig(500μg)またはそれら両試薬(各々500μg)を腹腔内(i.p.)注射した。5日目に膝窩リンパ節を摘出し、秤量し、それから細かくちぎり、洗い、その後10%FBSを含むRPMI1640の600μl(メディアテック、ハーンドン、VA)に再懸濁した。各再懸濁したリンパ節をその後等しい4部分(各150μl)に分けた。3部分は96ウェルプレートに培養した。37で24時間インキュベーション後、3H-チミジン(1μCi/ウェル)(アマーシャム、アーリントンハイツ、IL)挿入を測定した。そこで、各個々の動物の結果は1リンパ節あたり3つのウェルの平均値をあらわす。第4の部分は37で24時間インキュベートし、ELISA法によるサイトカイン分析のための上澄液を作るために用いた。グラフのすべてにある各点は、1群あたり5匹のマウスの平均値±標準偏差をあらわす。実験を繰り返し、同様な結果を得た。

サイトカインELISA。一对の抗体類{抗IL-2、抗-IFN-ガンマ、抗-IL-2ビオチン、抗-IL-4-ビオチン、抗-INF-ガンマビオチン(ファーミンゲン、サンジエゴ、CA)、抗IL4(ピータージェンセンからの寄贈)}およびストレプトアビジン-HRP(ピエス、ロックフォード、IL)を用いてサンドイッチELISAを行った。TMB基質(ピエス)を用いて比色検定した。データをスペクトラマックスプレートリーダーを用いて集め、吸光度(370nm)+/-セムとしてプロットした。各サイトカインの標準曲線を組換えサイトカインを用いて作成した(rIL2、ベーリンガーマンハイム、インディアナポリス、IN; rIL4、R&Dシステムズ、ミネアポリス、MN; およびrIFN-ガンマ、ピオソースインターナショナル、カマリコ、CA)。マウス。雄C3H/HeJ(H-2k)およびDBA/2(H-2d)マウスおよびスプラグ-ダウレイラットはジャクソン研究所(パールハーバー、ME)から購入し、齢8~

10

20

30

40

50



12週で使用した。

心臓移植。ラーゼン、アレキサンダー (Alexander D.Z.)、ホレンボーら、Transplantation、61(1)巻、4-9ページ(1996)およびコリー、ウィン、ラッセル、Transplantation、16(4)巻、343-350ページ(1973)に記載されているように、C3H/HeJまたはDBAマウスに、一次血管化スプラグ-ダウレイラット心臓異種グラフトを移植し、拒絶反応をモニターした。受容体に0、2、4および6日目に500mg CTLA4-Igと500mg MR1との組み合わせを投与した。対照群はCTLA4-Igのみ、MR1のみ、またはヒトIgを投与した受容体を含めた。パラフィン埋封組織切片(5μm)をマッソンのトリクロームまたはヘマトキシリン-エオシンで染色した。組織学的試料を治療法にはブラインドの心臓移植病理学者(KJW)が検査した。皮膚移植。スプラグ-ダウレイラットからの全厚皮膚グラフト(~1平方センチメートル)をC3H受容体マウスの背側胸部に移植し、その後の生存期間、毎日肉眼による検査を行った。拒絶反応は、目に見える表皮グラフト組織の完全な消失と定義した。対照群はCTLA4-Igのみ;MR1のみ;およびヒトIgを投与した受容体を含めた。各実験群で2匹の付加的マウスを移植後20日目に殺し、組織学的分析を行った。異種抗体検定。麻酔動物の尾から血清を集めた。スプラグ-ダウレイラットのリンパ節からの単一細胞懸濁液を標的細胞として用い、受容体マウスの血清と4で20分間インキュベートした。細胞を洗い、IgG異種抗体をロバ抗マウスIgGビオチン(ジャクソンイムノリサーチ、ウェストグローブ、PA)で、その後ストレプトアビジン-PE(サザーンバイオテック、バーミンガム、AL)で検出した。細胞をベクトン-ジキンソンFA Cスキャンで、セルクエストソフトウェアを用いて分析した。

#### 結果

インビボ異種抗原攻撃に対する反応にCD28およびCD40ブロックが与える効果を測定する最初のアプローチとして、我々はラーゼン、エルウッド(Elwood E.T.)、アレキサンダーら、Nature、381巻:434-438ページ(1996)に記載されている膝窩リンパ節検定を用いた。C3H/HeJ(H-2k)マウスに照射スプラグ-ダウレイ(SD)ラット脾細胞を注射した。足免疫後5日目、ヒトIgGを投与したコントロールマウスの排液膝窩リンパ節は、滅菌生理食塩液を注入した反対側リンパ節に比較して5.2倍増加した重量を示した(図6A)。CTLA4-Igはリンパ節膨張を部分的に阻止した。MR1も同様にこの反応を部分的に阻止した。これに対して、CTLA4-Ig/MR1併用は異種抗原誘起性リンパ節膨張を実質上消失させた(図6A)。その後異種抗原プライムド-マウスの種々の群からのリンパ節細胞の生体外増殖を比較した。いずれの治療も単独では増殖を部分的にブロックするに過ぎなかったが(図6B)、CTLA4-Ig/MR1の併用は増殖反応性反応を実質上除去した(併用では302+/235CPMであるのに対し、正常な刺激しないリンパ節では143+/145)。さらに、併用治療はTh1サイトカイン(IL-2およびIFNγ)を正常な刺激していない細胞のレベルにまで抑制した(図6Cおよび6D)。Th2サイトカインIL-4のレベルは全サンプルにおいて検出限界値より低かった。

この強力な免疫調節が細胞欠失の結果ではないことを認めることは重要である。投与マウスの末梢血液のフローサイトメトリー分析は、CD4+またはCD8+T細胞、B細胞、またはNK細胞の欠失を示さなかった。これらのデータは、方法の部に記載したように、CTLA4-IgまたはMR1どちらかを、またはこれらを組み合わせ投与した群につき3匹づつのマウスの、0、2、4および6日目の個々の分析結果である。末梢血液は6および20日目に尾を出血させて集めた。

リンパ節検定の結果、B7/CD28およびCD40/gp39経路の同時ブロックは異種グラフト拒絶反応を阻止することが示唆された。この仮説を調べるために、我々はSDラットをドナーとし、C3H/HeJマウスを受容体として用いる血管化心臓異種グラフトモデルを研究した。CTLA4-Ig(MST=33日)またはMR1(MST=51日)のみの投与は異種グラフトの生存期間を、未投与コントロール(MST=6日)に比較して延長した(図7A)。しかしCTLA4-Ig/MR1の組み合わせは生存期間を著

10

20

30

40

50

しく延長した (MST = 104.5 日)。

移植後 20 日目に組織学的研究を行ったとき、CTLA4-Ig のみ (図 7C) または MR1 のみ (図 7D) を投与した異種グラフトはひどいリンパ球浸潤を示し、同時に中程度～重度細胞拒絶反応に一致する筋細胞破壊および血管異常の証拠を示した。明らかに対照的に、CTLA4-Ig / MR1 投与受容体からの異種グラフトにはリンパ球浸潤、間質性線維症、および冠状動脈内膜損傷はほとんどなかった (図 7F)。CTLA4-Ig / MR1 投与心臓異種グラフトは、122 日目に筋細胞および血管構造両方ともよく保存されていることを示した (図 7G)。未投与異種グラフトは 6 日目に広範囲の組織破壊を示した (図 7B)。正常な移植していないスプラグ-ダウレイラット心臓を図 7E に示す。CD40 / CD28 ブロックの、異種免疫反応阻止能を調べる厳密な試験として、マウスにおいて、短期間の CD28 および / または CD40 ブロックが一次皮膚異種グラフトの生存期間に与える影響を研究した。

MR1 (MST = 11.5 日、n = 4) または CTLA4-Ig (MST = 12 日、n = 4) のみのどちらかを投与した C3H 受容体はスプラグ-ダウレイラットからの全厚皮膚グラフトを、未投与コントロールと同じ速度で拒絶反応した (未投与コントロール MST = 11.5 日、n = 8) (図 8A)。これに対し、手術時に MR1 および CTLA4-Ig を同時に投与した受容体の皮膚異種グラフトは著しく延長された生存期間を示した (MST = 53 日、n = 25) (図 8A)。合計 25 匹のマウスが異種グラフトおよび CTLA4-Ig / MR1 投与を受けた。4 日目に死んだ 1 匹のマウスを除いて、すべての他のマウスは実験期間中、体重喪失、感染症または悪性腫瘍の兆候もなく健康であった。

慢性投与 (標準的 4 投与体系後に開始) を CTLA4-Ig / MR1 併用 (両作用物質とも 1 週 500 μg づつ 100 日間または拒絶反応まで (早く到来した方) 投与) または MR1 (100 日間または拒絶反応まで 1 週 500 μg MR1 を投与) で行った場合は、異種グラフト生存期間に顕著な変化はなかった (図 8B)。

同時 MR1 / CTLA4-Ig 治療後の異種グラフト生存率は 50 日および 100 日でそれぞれ 52% および 21% であった。移植後 50 日目 (図 8E) および 100 日目 (図 8C) に生き残っている異種グラフトは外観的に健康で、よく保存された組織学的構造を示した。併用治療を行わない未投与コントロールでは、拒絶反応が速やかに起こり、これらの異種グラフトは著しい炎症性浸潤を示した (図 8D および 8F)。

DBA [H-2d] 受容体でも同様なスプラグ-ダウレイ皮膚異種グラフトの生存延長が認められた (未投与コントロール MST = 14 日 (n = 5) 対 CTLA4-Ig / MR1 MST = 86 日、n = 5)、これは併用治療の強力な効果が単一の受容体マウス種に限られないことを示唆している。

手術後 25 日から 75 日までの間の皮膚異種グラフト喪失の進行は、遅い時期のグラフト失敗が CTLA4-Ig および / または MR1 の治療量以下の濃度によるらしいことを示唆している。この可能性に取り組むために、標準的 4 - 投与組み合わせ法による治療後に、マウスに 100 日間またはグラフト喪失が起きるまで、CTLA4-Ig / MR1 の組み合わせまたは MR1 のみを毎週投与した。これらの慢性治療法のどちらも皮膚異種グラフト生存率を目立っては改善しなかった；これは CTLA4-Ig / MR1 投与マウスのグラフト失敗が不十分な薬剤効力以外の要因に起因すること、および CTLA4-Ig / MR1 によって完全には阻止されない、代替りの経路が亜急性異種グラフト喪失に重要な役割を演ずるらしいことを示唆するものである。

細胞を介するエフェクターメカニズムに加えて、誘発される異種抗体反応が、調和する異種グラフトの血管性拒絶反応の促進に重要な役割を演ずるらしい (アクセンチジェヴィッチ (Aksentijevich I.)、サクス (Sachs D.H.)、サイクス (Sykes M.) Transplantation、53 (5) 巻：1108 - 14 ページ (1992))。誘発される異種抗体反応に対する同時ブロックの影響を試験するために、C3H / HeJ マウスからの血清サンプル中の抗ラット抗体を、スプラグ-ダウレイラット皮膚グラフト移植後 55 日目 (図 9A) およびスプラグ-ダウレイラット心臓グラフト移植後 20 日目 (図 9B) に分析した。CTLA4-Ig または MR1 のみの投与は IgG 抗体反応を減少させ、一方同時組み合わ

10

20

30

40

50

せCD28/CD40ブロックはラット異種抗原に対する誘発抗体反応を実質上排除した。そこで、T細胞活性化および抗体産生両方の阻止が、B7/CD28およびCD40/gp39経路の同時ブロック後の異種グラフト生存に機能的に重要であると考えられる。

#### 検討

CD28およびCD40経路の組み合わせブロックは異種抗原に対する免疫反応を顕著に阻止する。この組み合わせ治療の効力が特に一次皮膚異種グラフトモデルにおいて示された。どの作用物質も単独では皮膚異種グラフト生存期間を延長しないが、CTLA4-IgとMR1の同時投与は協力的に異種拒絶反応を阻止した。この知見の特異性は、皮膚グラフトモデルの厳しさにある、なぜならばCTLA4-Igのみでマウスモデルの異種脾島の生存を延長できることがすでに示されているからである(レンスコウ(Lenschow D. )、ツェング(Zeng Y.)、シスレスウエイト(Thistleswait J.)ら、Science 257巻:789-792ページ(1992))。異種皮膚グラフトの長期生存はこれまでも強力な細胞傷害性および/または血液生成性キメリズムに基づく戦略を用いて認められている(イルシュタット(Ildstad S.T.)、サックス(Sachs D.H.)Nature 307巻:168-170ページ(1984)、ザオ(Zhao Y.)、スウェンソン(Swenson K.)、セルジオ(Sergio J.)、アーン(Ahn J.S.)、ザックス、サイクス、Nat.Med.2(11)巻:1211-1216ページ(1996)、マユミ、グッド、J.Exp.Med.169(1)巻:213-238ページ(1990)、コッポルト(Cobbold S.P.)、マーチン、チン(Zin S.)、ワルドマン、Nature 323巻:164-166ページ(1986)、キン(Qin S.)、コッポルト、ベンジャミン(Benjamin R.)、ワルドマン、J.Exp.Med.169巻:779-794ページ(1989))。

同時CD28/CD40ブロックが異種グラフト生存を劇的に延長するという観察は、異種グラフト破壊のための抗体および細胞仲介性メカニズム両方がこの戦略によって効果的に阻止されることを示唆する。急性血管性異種グラフト拒絶反応の原因は完全には明らかになっていないが、少なくとも一部は異種反応性抗体によって起きるとい証拠がある(コッターレル(Cotterell A.H.)、コリンズ(Collins B.H.)、パーカー(Parker W.)、ハーランド(Harland R.C.)、プラット(Platt J.L.)、Transplantation、60(8)巻:861-868ページ(1995))。我々のモデルにおける未投与コントロール心臓異種グラフトの、細胞侵潤のない急速な破壊は、抗体仲介性拒絶反応の役割を示唆している。この考察およびその他の考察(アクセンチジェヴィッチ、サックス、サイクス、Transplantation、53(5)巻:1108-14ページ(1992))は、CD28およびCD40経路のブロック後の誘発異種抗体反応の劇的阻止の証拠(図9Aおよび図9B)とともに、異種反応がこれらの経路の阻止によって十分にコントロールされ、不一致種の組み合わせにおける異種移植のための細胞非傷害性戦略の開発が可能となることを示唆する。

CD28およびCD40経路の組み合わせブロックは異種グラフト拒絶反応を顕著に阻止する一方、我々の実験系ではこのブロックは一樣な無制限の心臓または皮膚グラフト生存には達しなかった。投与期間は延長してもグラフト生存率は改善されなかったという観察は驚くべきである。これは、これら経路の不十分なブロックが“遅発性”グラフト失敗の原因ではないことを示唆し、代替の経路、例えばNK細胞、またはCD28/CD40同時刺激を必要としないその他の細胞が遅発性異種グラフト拒絶反応を促進する可能性が持ち上がる。異種グラフト拒絶反応にNK細胞が関与しているという示唆的証拠はこの可能性を裏付ける(ザオ、スウェンソン、セルジオ、アーン、サックス、サイクス、Nat.Med.、2(11)巻:1211-1216ページ(1996)、マリギン(Marlyguine A.M.)、サーディ(Saadi S.)、プラット(Platt J.L.)、ドーソン(Dowson J.R.)Transplantation 61(1)巻:161-164ページ(1996))。その上我々は調和した心臓および皮膚異種グラフト拒絶反応の、CD40およびCD28経路の同時ブロックによる阻止が誘発異種反応性抗体反応の“遅い”発生の予防と関係することを示した(図9Aおよび9B);抗体反応の発生が、遅発性グラフト喪失と関係する可能性は排除されない。

10

20

30

40

50

CTLA4-Ig/MR1併用投与が心臓異種グラフトにおける移植組織血管症の発生を阻止し、皮膚異種グラフトを長持ちさせることができることは、臨床的に重要な意味をもつ。天然にあらかじめ形成された異種反応性抗体の効果を阻止する技術の研究とともにCD28およびCD40経路ブロックのさらなる研究によって、臨床的異種グラフト移植を容易にする新しい効果的戦略の可能性が約束される。

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。  
\_\_\_\_\_ 頁、 \_\_\_\_\_ 行

10

B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている

寄託機関の名称  
アメリカンタイプカルチャーコレクション

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）  
アメリカ合衆国  
メリーランド州 20852 ロックビル  
パークローン ドライブ 12301

寄託の日付 1991年5月31日	受託番号 68629
---------------------	---------------

20

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

30

E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

受理官庁記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日
権限のある職員

40

【 図 1 】

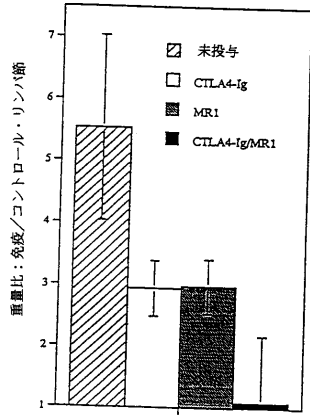


Figure 1

【 図 2 a 】

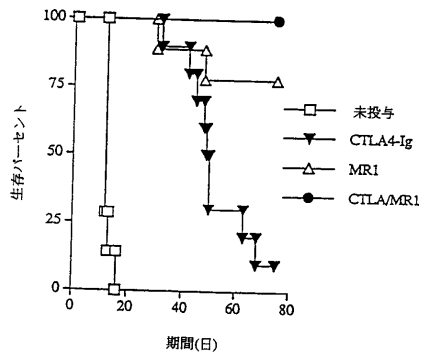


Figure 2a

【 図 2 B 】

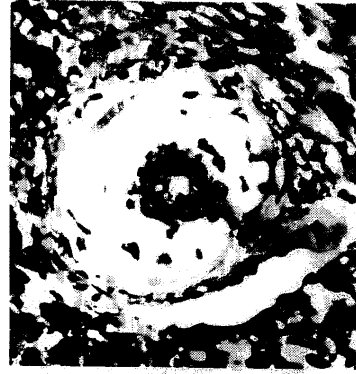


FIG. 2B



【 図 2 C 】



FIG. 2C



【 図 2 D 】



FIG. 2D



【 図 2 E 】



FIG. 2E

【 図 3 a 】

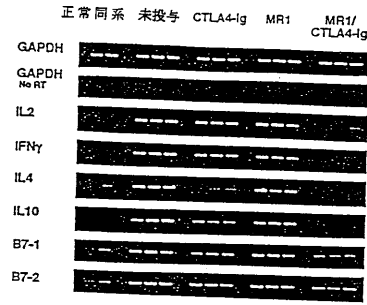


Figure 3a

【 図 3 b 】

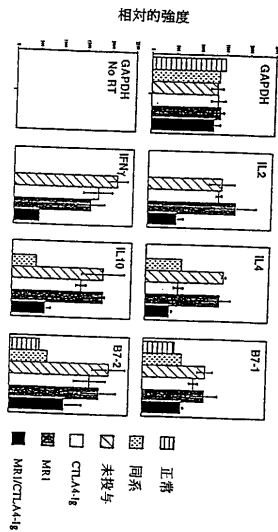


Figure 3b

【 図 4 a 】

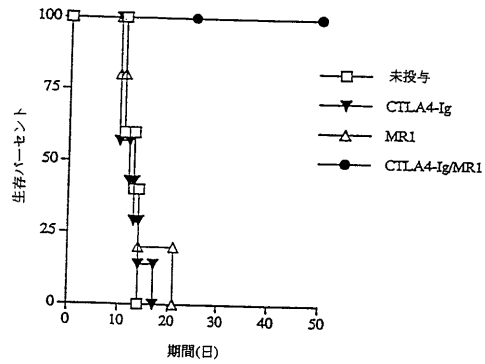


Figure 4a

【 図 4 b 】

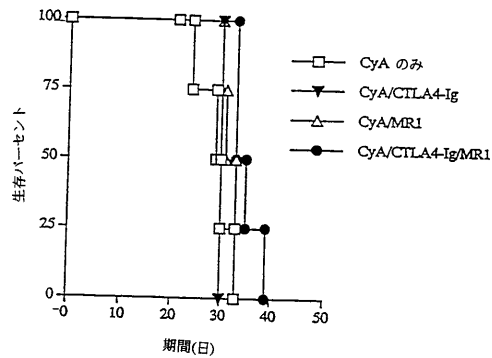


Figure 4b

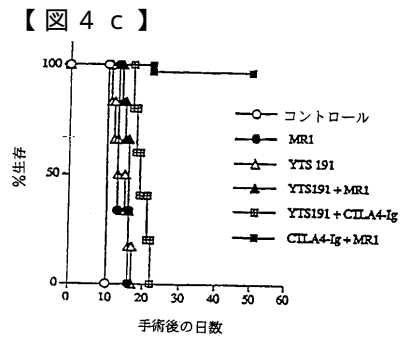


Figure 4c



FIG. 4D

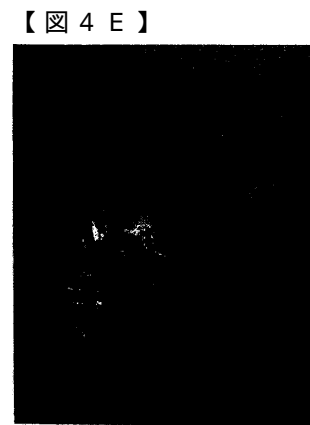


FIG. 4E



FIG. 4F

【 4 G 】



FIG. 4G

【 5 】

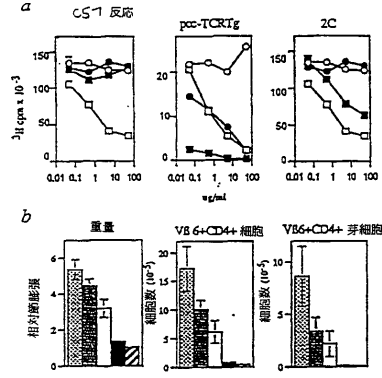


Figure 5

【 6 a - 6 d 】

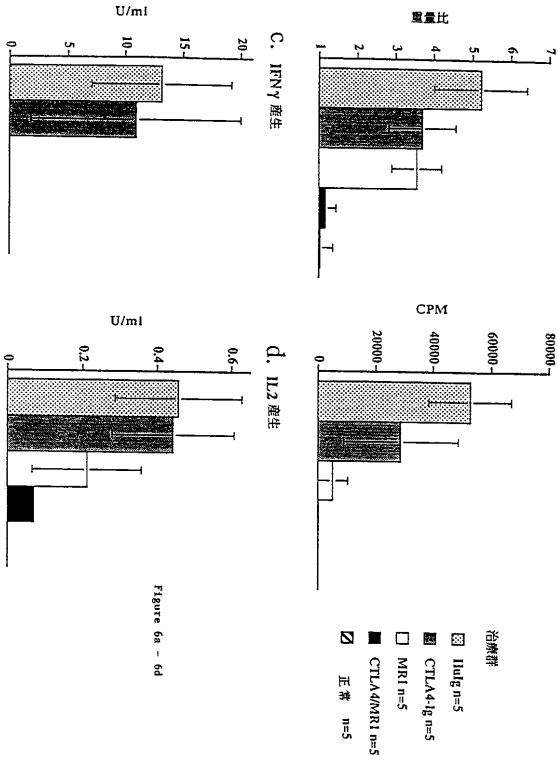


Figure 6a - 6d

【 7 a 】

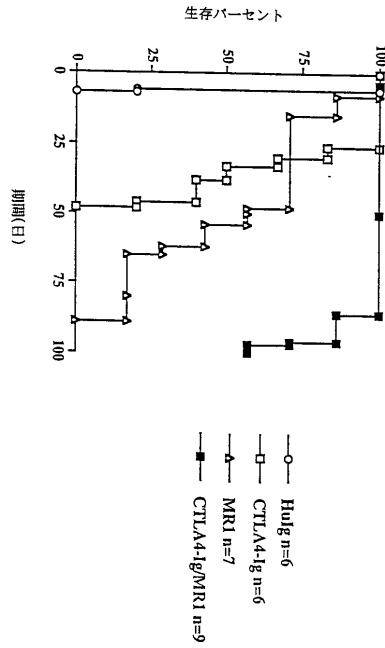


Figure 7a



【図 7 B】



FIG. 7B

【図 7 C】

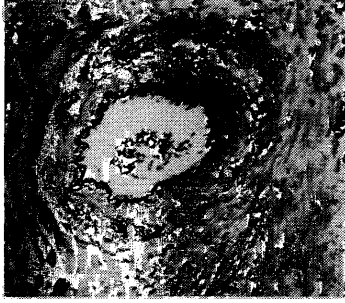


FIG. 7C

【図 7 F】

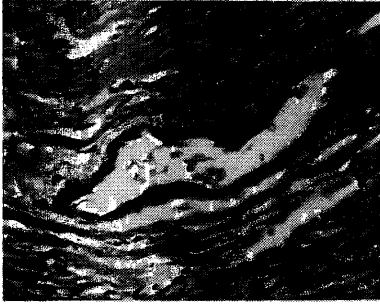


FIG. 7F

【図 7 G】

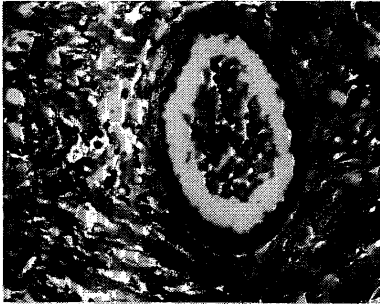


FIG. 7G

【図 7 D】

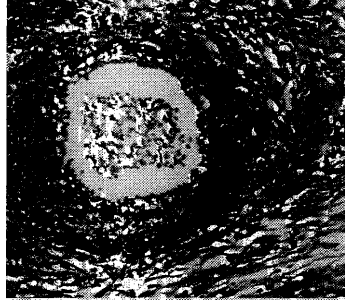


FIG. 7D

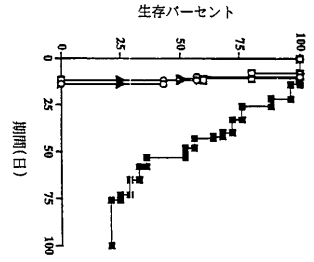
【図 7 E】



FIG. 7E

【図 8 a - 8 b】

○ 対照 n=8  
 □ CTLA4+g/MRI n=4  
 △ MRI n=4  
 ■ CTLA4+g/MRI n=25



○ 対照 n=8  
 □ CTLA4+g/MRI n=25  
 △ 長期 CTLA4+g/MRI n=1  
 ■ CTLA4+g/MRI+ 長期 MRI n=10

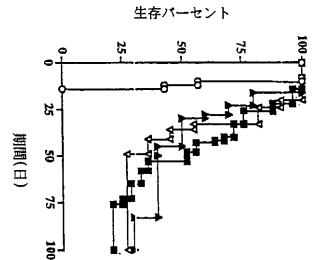


Figure 8a - 8b

a

b

【 8 C 】

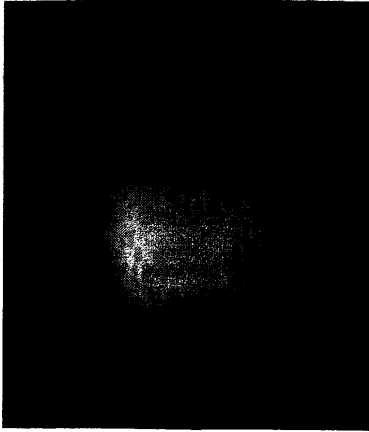


FIG. 8C

【 8 D 】

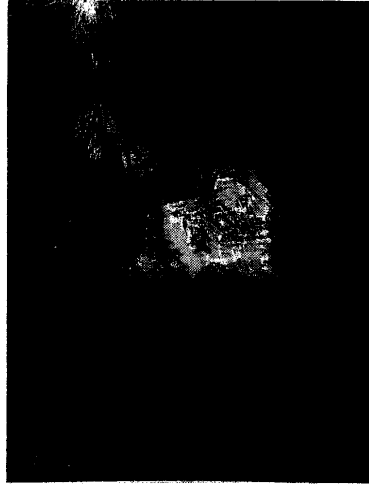


FIG. 8D

【 8 E 】

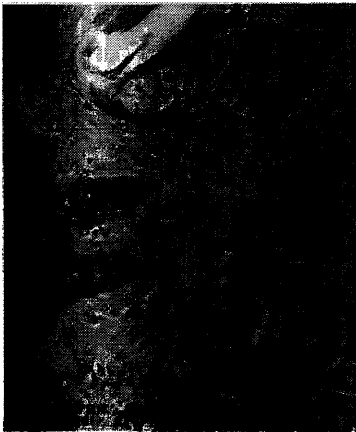


FIG. 8E

【 8 F 】



FIG. 8F

【 9 a - 9 b 】

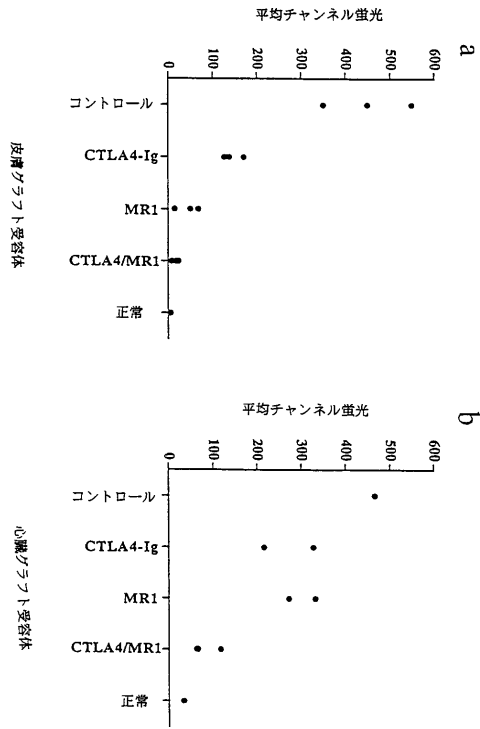


Figure 9a - 9b

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I  
**G 0 1 N 33/53 (2006.01)** G 0 1 N 33/53 D
- (72)発明者 ラーセン、 クリスチャン ピー  
 アメリカ合衆国 3 0 3 4 5 ジョージア州 アトランタ ブライアーレイク ウッズ ウェイ  
 2 7 2 7
- (72)発明者 アルフォ、 アルジャンドロ エイ  
 アメリカ合衆国 9 8 0 2 0 ワシントン州 エドモンズ スブルース 1 0 1 2
- (72)発明者 ホレンボウ、 ダイアン エル  
 アメリカ合衆国 9 8 1 1 9 ワシントン州 シアトル トゥエルフス エヌダブリュー 9 6 1  
 2
- (72)発明者 リンズレイ、 ピーター エス  
 アメリカ合衆国 9 8 1 1 9 ワシントン州 シアトル ナインス アヴェニュー ウェスト 2  
 4 3 0
- (72)発明者 レッドベター、ジェフリー エイ  
 アメリカ合衆国 9 8 1 1 7 ワシントン州 シアトル エヌダブリュー ワンハンドレッドサー  
 ティーンズ プレイス 3 0 6
- (72)発明者 ピアソン、トマス シー  
 アメリカ合衆国 3 0 3 0 7 ジョージア州 アトランタ クリフトン ロード エヌイー 1 1  
 9 8

審査官 福井 美穂

(56)参考文献 国際公開第95/034320(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 45  
 A61K 38  
 A61K 39  
 A61P 37  
 A61P 43  
 G01N 33  
 MEDLINE