

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-531699

(P2008-531699A)

(43) 公表日 平成20年8月14日(2008.8.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 7 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/675 (2006.01)	A 6 1 K 31/675	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/198 (2006.01)	A 6 1 K 31/198	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/42 (2006.01)	A 6 1 K 31/42	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-558120 (P2007-558120)	(71) 出願人	596168317
(86) (22) 出願日	平成18年2月28日 (2006.2.28)		ジェネンテック・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成19年10月18日 (2007.10.18)		GENENTECH, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/006998		アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
(87) 国際公開番号	W02006/093923		0-4990・サウス・サン・フランシス
(87) 国際公開日	平成18年9月8日 (2006.9.8)		コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(31) 優先権主張番号	60/656, 943	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成17年2月28日 (2005.2.28)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨障害の治療

(57) 【要約】

有効量のB細胞表面マーカー(CD20抗体など)に結合するアンタゴニストを、任意選択的に、有効量のこのような障害を治療する薬剤などの別の薬物と共に投与する、哺乳動物における種々の骨の適応症(骨粗鬆症など)の治療方法を提供する。製品も提供する。さらに、B細胞表面マーカーに結合する抗体をコードする核酸を含む単離された歯骨前駆細胞(odontoprogenitor)または前骨芽細胞を哺乳動物に導入する工程を含む、哺乳動物の骨溶解を阻害する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物において骨障害を治療する方法であって、有効量の C D 2 0 抗体を該哺乳動物に投与する工程を含む、方法。

【請求項 2】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記抗体がリツキシマブを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗体が、配列番号 2 および 8 中の可変ドメイン配列を含むヒト化 2 H 7 である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体が、配列番号 8 の N 1 0 0 A または D 5 6 A、N 1 0 0 A の変化を有する重鎖可変ドメイン、および配列番号 2 の M 3 2 L、S 9 2 A、または M 3 2 L、S 9 2 A の変化を有する軽鎖可変ドメインを含むヒト化 2 H 7 である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体が、配列番号 3 0 の軽鎖可変領域 (V_L) 配列、および配列番号 8 の重鎖可変領域 (V_H) 配列を含むヒト化 2 H 7 であり、前記抗体が、VH - CDR 2 中の D 5 6 A のアミノ酸置換をさらに含み、VH - CDR 3 中の N 1 0 0 が Y または W に置換されている、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗体が、配列番号 3 1 の v 5 1 1 軽鎖配列、および配列番号 3 2 の v 5 1 1 重鎖配列を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体が、裸の抗体である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体が別の分子と結合体化している、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗体が、骨ターゲティング薬に共有結合している、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗体が、前記哺乳動物への投与の際に主な臨床応答を誘導する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗体が、約 1 ヶ月の期間内に約 1 ~ 4 回の頻度にて約 4 0 0 m g ~ 1 . 3 g の用量で投与される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

各用量が約 5 0 0 m g ~ 1 . 2 g である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

各用量が約 7 5 0 m g ~ 1 . 1 g である、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記抗体が、2 ~ 4 回投与される、請求項 12 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記抗体が、2 ~ 3 回投与される、請求項 12 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記抗体が、約 2 ~ 3 週間の期間内に投与される、請求項 12 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記期間が約 2 週間である、請求項 17 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記抗体が、関節に局所投与される、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記抗体が、骨欠損部位に局所投与される、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記骨欠損が、骨折、骨移植片部位、インプラント部位、または歯周ポケットである、請求項 21 に記載の方法。

10

【請求項 23】

前記抗体が全身投与される、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記抗体が静脈内投与される、請求項 1 ~ 19 または 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記抗体が皮下投与される、請求項 1 ~ 19 または 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

第 2 薬物が有効量で投与され、前記 CD 20 抗体が第 1 薬物である、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 27】

前記第 2 薬物が 1 種以上の薬物である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記第 2 薬物が、破骨細胞関連障害の治療薬、免疫抑制薬、疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARD)、細胞傷害薬、インテグリンアンタゴニスト、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID)、ホルモン、またはその組み合わせを治療する薬剤である、請求項 26 または 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 2 薬物が、破骨細胞関連障害の治療薬、免疫抑制薬、またはその両方である、請求項 28 に記載の方法。

30

【請求項 30】

前記第 2 薬物が免疫抑制薬である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記免疫抑制薬が、シクロホスファミド、クロラムブシル、レフルノミド、アザチオプリン、またはメトトレキサートである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記免疫抑制薬が、シクロホスファミドまたはメトトレキサートである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記第 2 薬物が、破骨細胞関連障害の治療薬である、請求項 29 に記載の方法。

40

【請求項 34】

前記薬剤が、オステオプロテジェリン、インターロイキン、MMP インヒビター、グルカン、インテグリンアンタゴニスト、カルシトニン、プロトンポンプインヒビター、プロテアーゼインヒビター、ビスホスホネート、インスリン様増殖因子 - 1、血小板由来増殖因子、上皮増殖因子、トランスフォーミング増殖因子 のインヒビター、トランスフォーミング増殖因子、骨形成タンパク質、副甲状腺ホルモン、線維芽細胞増殖因子、ビタミン D、カルシウム、フッ化物、マグネシウム、ホウ素、ビトロネクチン、プラスミノゲン活性化因子インヒビター、またはプロテアーゼインヒビターである、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

50

前記薬剤がサイトカインまたはビスホスホネートである、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記薬剤が、該薬剤で処置された哺乳動物に C D 2 0 抗体を投与しない場合に使用される量よりも少ない量で投与される、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記哺乳動物は、以前に C D 2 0 抗体で処置されることがない、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記骨障害が、骨粗鬆症、骨粗鬆症性骨折、限局的骨量減少、骨欠損、幼児期特発性骨量減少、歯槽骨量減少、下顎骨量減少、歯槽骨量減少、歯周炎に関連する骨量減少、多発性骨髄腫における骨疾患、マクログロブリン血症、または単クローン性 グロブリン血症である、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記骨障害が、限局的骨量減少、多発性骨髄腫における骨疾患、マクログロブリン血症、単クローン性 グロブリン血症、または骨粗鬆症である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記骨障害が、続発性骨粗鬆症に関連する骨量減少である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記骨障害が、限局的骨量減少である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記 C D 2 0 抗体の量が、炎症性関節炎におけるびらん性骨疾患の予防に有効である、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記炎症性関節炎が関節リウマチである、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記骨障害が、関節リウマチにも関節リウマチの発症リスクにも関連しない、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記抗体が、送達ビヒクルで投与される、請求項 1 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記送達ビヒクルが、骨粉、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリメタクリレート、生分解性ポリエステル、水性重合ゲル、またはフィブリンシーラントである、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

哺乳動物の骨障害を治療する方法であって、B 細胞表面マーカーに結合する有効量の抗体を該哺乳動物に投与する工程を含む、方法。

【請求項 4 8】

哺乳動物の骨障害を治療する方法であって、B 細胞表面マーカーに結合する有効量のアンタゴニストを該哺乳動物に投与する工程を含む、方法。

【請求項 4 9】

製品であって、

i . C D 2 0 抗体を含む容器と、

i i . 哺乳動物における骨障害の治療のための説明書を含む添付文書と

を含み、該説明書が有効量の C D 2 0 抗体が該哺乳動物に投与されることを示す、製品。

【請求項 5 0】

第 2 薬物を含む容器をさらに含み、前記 C D 2 0 が第 1 薬剤であり、該第 2 薬剤を使用する哺乳動物の治療についての添付文書に関する説明書をさらに含む、請求項 4 9 に記載の製品。

【請求項 5 1】

前記第 2 薬物が、破骨細胞関連障害の治療薬、免疫抑制薬、細胞傷害薬、細胞傷害薬、インテグリンアンタゴニスト、またはホルモンである、請求項 50 に記載の製品。

【請求項 52】

前記第 2 薬物が、破骨細胞関連障害の治療薬、免疫抑制薬、またはその両方である、請求項 50 または請求項 51 に記載の製品。

【請求項 53】

哺乳動物において骨溶解を阻害する方法であって、B 細胞表面マーカーに結合する抗体をコードする核酸を含む単離した歯骨前駆細胞または前骨芽細胞を該哺乳動物に導入する工程を含む、方法。

【請求項 54】

10

前記細胞が歯骨前駆細胞である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

前記哺乳動物が、歯周炎を罹患しているかまたは歯周炎の発症リスクがある、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記哺乳動物が、歯周疾患に起因する歯槽骨量減少を罹患しているかまたは歯周疾患に起因する歯槽骨量減少の発症リスクがある、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 57】

前記細胞が、下顎部分の歯周靱帯に投与される、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 58】

20

前記細胞が前骨芽細胞である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 59】

前記細胞が、前記哺乳動物の結合関節に移植される、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記細胞が脛骨内投与される、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 61】

前記細胞が大腿骨内投与される、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 62】

前記抗体の発現が、抗生物質の化合物によって調節される、請求項 53 ~ 61 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 63】

前記抗生物質の化合物が、テトラサイクリンまたはテトラサイクリンアナログである、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

前記哺乳動物にミノサイクリンを投与する工程をさらに含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

前記抗生物質の化合物が全身投与される、請求項 62 ~ 64 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 66】

40

破骨細胞関連障害の治療薬を投与する工程をさらに含む、請求項 53 ~ 65 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 67】

前記薬剤が、インターロイキン - 4 または腫瘍壊死因子 - のインヒビターである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

前記哺乳動物が、関節リウマチを罹患しているかまたは関節リウマチの発症リスクがある、請求項 53 ~ 67 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 69】

前記哺乳動物が、関節リウマチを罹患しておらず、関節リウマチの発症リスクもない、

50

請求項 53 ~ 67 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 70】

前記哺乳動物が、根尖周囲または軟骨内の骨量減少、人工関節粒子誘導性骨溶解、または骨溶解性骨転移を罹患しているか、あるいは根尖周囲または軟骨内の骨量減少、人工関節粒子誘導性骨溶解、または骨溶解性骨転移の発症リスクがある、請求項 53 または請求項 58 ~ 69 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 71】

前記抗体が CD20 抗体である、請求項 53 ~ 70 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本願は、米国特許法第 119 条 (e) のもとに米国仮特許出願第 60 / 656 , 943 号 (2005 年 2 月 28 日出願) からの優先権を主張する。この仮特許出願の全内容は参考として援用される。

【0002】

発明の分野

本発明は、B 細胞表面マーカー (CD20 または CD22 など) に結合するアンタゴニスト (例えば、CD20 に結合する抗体) を使用した骨障害の治療に関する。

【背景技術】

【0003】

20

発明の背景

骨障害

骨再形成は、組織量および骨構造が維持される動的過程である。この過程は、骨吸収と骨形成との間の平衡であり、2 つの細胞型 (破骨細胞および骨芽細胞) が主に作用すると考えられている。骨芽細胞は、新規の骨を合成し、破骨細胞によって掘削された空洞にこの骨を沈着させる。骨芽細胞および破骨細胞の活動は、全身および局所的な多くの因子 (増殖因子が含まれる) によって調節される。

【0004】

骨は、以下の機能を果たす分化した動的結合組織である (a) 機械的機能 (移動運動のための筋肉付着のための支持体および部位)、(b) 重要臓器および骨髄の防御機能、(c) 生命に不可欠な血清ホメオスタシスの維持のためのイオン (詳細には、カルシウムイオンおよびリン酸イオン) の貯蔵所としての代謝的機能。骨は連続的な吸収および更新を受け、この過程は、集合的に再形成として公知である。したがって、骨の機械的および生物学的完全性は、何百万もの微視的部位でのその連続的な破壊 (吸収) および連続的再構築 (形成) に依存する。成人期において、骨の再形成は構造的に破壊した骨または老化した骨を排除して、構造的に新規の健康な骨に置換するのに極めて重要である。適切な骨量を維持するために、吸収および形成が完全な均衡で維持される。加齢と共に、吸収と形成との間の均衡が変化し、しばしば吸収が優先され、その結果、骨量が減少し、骨構造が劣化し、ストレス耐性が減少し、骨が脆弱になり、骨折しやすくなる。これらの症状をまとめて骨粗鬆症という。

30

40

【0005】

破骨細胞は、骨基質を侵食するように機能する巨大な多核細胞である。これらは、単球から発生するマクロファージおよび他の細胞に関連する。マクロファージのように、破骨細胞は、造血前駆細胞に由来する。破骨細胞は、全身および局所的骨量減少の両方を媒介する。

【0006】

骨基質の侵食は、骨基質形成 (骨芽細胞が関連する過程) と調和して起こる正常な過程である。本質的に、骨芽細胞は、骨基質を侵食して骨に穴をあけ、骨芽細胞があとに続いてトンネル壁を裏打ちし、新規の骨基質を形成する。典型的には、正常な成人では、年間約 5 ~ 10 % の骨がこれらの過程によって置換される。

50

【 0 0 0 7 】

西洋社会における主な健康上の問題である骨粗鬆症は、最も一般的な疾患であり、最も医療費がかかる。骨粗鬆症のリスクは、45歳を超える女性の85%、男性の15%と推定されている。米国では、1700万人の閉経後の女性がピーク骨量の10%を喪失し、940万人が25%を喪失し、500万人が骨粗鬆症の結果として骨折していると推定されている。合衆国での脊椎骨折および股関節部骨折に由来する骨粗鬆症にかかる医療費は年間140億ドルを超え、しばしば、これらの骨折は診断されないままである場合の疾患の最初の徴候である。

【 0 0 0 8 】

骨粗鬆症は、典型的には、骨吸収が骨形成を超える骨の代謝回転の不均衡を反映する。骨吸収は破骨細胞の特定の機能であり、破骨細胞は、造血区画、より正確には、顆粒球 - マクロファージコロニー形成単位 (GM - CFU) 由来の単核前駆体の融合によって形成された多核化された特定の骨細胞である。破骨細胞は、骨吸収するための主な細胞型であり、骨形成細胞 (骨芽細胞) と共に、骨量、骨の形状、および骨構造が決定される。骨形成骨芽細胞の活性または数に対する破骨細胞の活性および / または数の増加により、骨粗鬆症および他の骨量減少疾患の発症が決定される。

【 0 0 0 9 】

パジェット病は40歳を超える集団の3%、80歳を超える集団の10%が罹患し、骨粗鬆症ほど一般的でも費用もかからないにもかかわらず、骨折の原因であることに加えて、重症変形性関節症および重症神経障害を引き起こし得るので、重要な疾患である。パジェット病は、急速な骨代謝回転、それによる線維性骨 (最初に胚および成長中に形成され、成体骨格で実質的に存在しない組織型) の形成によって特徴づけられる。線維性骨は、脆弱性を特徴とし、したがって、骨折および湾曲する傾向がある。骨は、拡大するようになり、しばしば、血流を妨害して神経を収縮させ、それにより、パジェット病に関連する神経症状が多数起こる。

【 0 0 1 0 】

推定上異常に高レベルで破骨細胞が骨を吸収し、且つ骨芽細胞が正常レベルで骨を形成する疾患 (骨粗鬆症) について、合理的な治療標的は破骨細胞であろう。破骨細胞の数および / または機能の減少により、骨の吸収と形成との間の均衡が修復され得る。実際、現在利用可能な骨粗鬆症の治療は、骨吸収の抑制を意図する。

【 0 0 1 1 】

破骨細胞は、単球 - マクロファージファミリーに由来する。マクロファージコロニー刺激因子 (M - CSF) でのCFU - GMの刺激の際、単核食細胞および破骨細胞の非接着性前駆体である前単球を形成する。前単球は、マクロファージ経路に沿って増殖および分化することができ、最終的に組織マクロファージを形成するか、破骨細胞経路によって分化することができ、これは、曝されることになるサイトカインに依存する。例えば、受容体アクチベーターNF - B リガンド (RANKL) (Simonetら、Cell 89: 309 - 319 (1997)) (骨芽細胞膜表面上に発現されるサイトカイン) は、マクロファージよりもむしろ破骨細胞に分化するように前単球に影響を与える一方で、M - CSFでの処置は、前単球をマクロファージに発達させるように駆動する。RANKLの発現を支持するM - CSFおよび他のサイトカイン (例えば、インターロイキン - 1またはTNF -) はマクロファージの生成物であり、これらのサイトカインおよび増殖因子の発現を変化させる免疫調整物質はマクロファージだけでなく破骨細胞にも影響を与え得ると推測し得る。

【 0 0 1 2 】

多数の骨粗鬆症の治療方法が存在し、ビスホスホネート (Fleisch H, "Development of biphosphonates," Breast Cancer Res. 4: 30 - 34 (2002)、Spencer, C P, Stevenson, J C "Oestrogen and anti - oestrogen for the prevention and treatment of osteopor

10

20

30

40

50

osis.” In Osteoporosis: Diagnosis and Management, Martin Muniz, England, 1998, pp 111-123)、または“Selective Estrogen Receptor Modulators”(SERMS)が含まれる。

【0013】

骨芽細胞、破骨細胞、およびその前駆体の増殖、分化、および活性に影響を与えるタンパク質の多くが、軟骨細胞(軟骨の形成(軟骨)を担う細胞)におけるこれらの過程にも影響を与える。これらのタンパク質には、血小板由来増殖因子(PDGF)、インスリン様増殖因子(IGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、トランスフォーミング増殖因子(TGF-)、骨形成タンパク質(BMP)、および軟骨由来増殖因子(CDGF)が含まれる。

10

【0014】

「zveg f3」として公知のPDGFホモログが最近同定され、「VEGF-R」とも命名された(WIPO公開WO99/37671号)。Zveg f3/VEGF-Rは、増殖因子のPDGF/VEGFファミリーと有意に相同なマルチドメインタンパク質である。Zveg f3は、骨粗鬆症などの一定の骨障害の治療で有用であることが見出された(US2004/0043031号および米国特許第6,663,870号を参照のこと)。

【0015】

生きている前骨芽細胞または歯骨前駆細胞(odontoprogenitor)から産生された組成物は、骨組織を構築または再構築するために抗炎症性ポリペプチド(例えば、ヒトインターロイキン-4)を送達させることが開示されている(US2004/0126364号を参照のこと)。

20

【0016】

腫瘍壊死因子(TNF)ファミリーの受容体およびリガンドは、破骨細胞の分化および活性において不可欠な役割を果たし、したがって、骨吸収で役割を果たすことが最近示されている。TNF- は、破骨細胞形成(破骨細胞の生成)を促進することが公知である。破骨細胞および間質細胞上に存在し、そして/またはこれらによって分泌されるTNF様分子は、本分野および本明細書中で、交換可能に、「NF- Bリガンドの受容体アクチベーター」(RANKL)、「破骨細胞分化因子」(ODF)、「オステオプロテゲリンリガンド」(OPGL)、および「TNF関連活性化誘導サイトカイン」(TRANCE)と呼ばれ、破骨細胞形成および成熟破骨細胞の吸収活性と無関係に、破骨細胞前駆体および成熟破骨細胞の膜中に存在する本分野および本明細書中で「NF- Bリガンドの受容体アクチベーター」(RANK)と呼ばれるTN受容体様分子と相互作用する。抗体などのTNFインヒビターを使用して、関節リウマチを使用する。Sudaら(Endocrine Reviews 20(3):345-357(1999))は、破骨細胞の分化および機能を記載している。Filvaroff and Derynck(Curt: Biol. 8:R679-R682(1998))は、骨再造形および破骨細胞調節のためのシグナル伝達系について言及している。Goldring, Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions, 3(4):287-289(2003); Goldring, Rheumatology, 42 Suppl 2, pii 1-6(May 2003); Goldring and Goldring, Current Opinion in Orthopaedics, 13(5):351-362(2002); および Goldring, Current Opinion in Rheumatology 14(4)406-10(2002)も参照のこと。さらに、マウスが発症し得る関節炎は炎症性が高いが、RANKL/ODFノックアウトマウスは、骨侵食を起こさない(Gravallese, “Bone destruction in arthritis” Ann. Rheum. Dis. 61(suppl II):ii84-6(2002)に概説)。

30

40

【0017】

50

US 2004/0058889号は、骨量減少または低骨密度に関連する容態を治療するための - グルカンの使用方法および骨成長の増強が望ましい状況での骨成長の促進方法を開示している。

【0018】

CD20抗体およびこれを用いた治療法

リンパ球は、造血過程に骨髄で産生される多くの白血球型の1つである。2つの主な白血球集団（Bリンパ球（B細胞）およびTリンパ球（T細胞））が存在する。本明細書中ではB細胞が特に重要である。

【0019】

B細胞は骨髄内で成熟し、骨髄から遊離して、その細胞表面上に抗原結合抗体を発現する。ナイーブB細胞が最初にその膜結合抗体が特異的である抗原と遭遇した場合、細胞は急速に分裂し始め、その子孫が記憶B細胞および「形質細胞」と呼ばれるエフェクター細胞に分化する。記憶B細胞は、より寿命が長く、元の親細胞と同一の特異性を有する膜結合抗体を発現し続ける。形質細胞は膜結合抗体を産生しないが、その代わりに、分泌することができる形態の抗体を産生する。分泌抗体は、体液性免疫の主なエフェクター分子である。

10

【0020】

CD20抗原（ヒトBリンパ球制限分化抗原（Bp35）とも呼ばれる）は、分子量が約35kDのプレBリンパ球および成熟Bリンパ球上に存在する疎水性膜貫通タンパク質である。Valentineら、J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287(1989)およびEinfieldら、EMBO J. 7(3):711-717(1988)。抗原は、90%を超えるB細胞ホジキンリンパ種（NHL）でも発現されるが（Andersonら、Blood 63(6):1424-1433(1984)）、造血幹細胞、プロB細胞、正常な形質細胞、または他の正常組織では見出されない（Tedderら、J. Immunol. 135(2):973-979(1985)）。CD20は、細胞周期の開始および分化のための活性化過程の初期段階を調節し（Tedderら、上記）、これはおそらくカルシウムイオンチャネルとして機能する。Tedderら、J. Cell. Biochem. 14D:195(1990)。

20

【0021】

B細胞リンパ腫でCD20が発現と仮定すると、この抗原は、このようなリンパ球の「ターゲティング」の候補としての役割を果たすことができる。本質的に、このようなターゲティングを、以下のように一般化することができる：B細胞のCD20表面抗原に特異的な抗体を患者に投与する。これらの抗CD20抗体は、正常および悪性のB細胞の両方のCD20抗原に（表向きは）特異的に結合し、CD20表面抗原に結合した抗体により、新生物性B細胞の破壊および枯渇をもたらす。さらに、腫瘍を破壊する能力を有する化学薬品または放射性標識を、この薬剤が新生物性B細胞に特異的に「送達される」ように、抗CD20抗体に結合体化することができる。アプローチにかかわらず、主な目的は、腫瘍を破壊することであり、特定のアプローチを、使用される特定のCD20抗体によって決定することができ、したがって、利用可能なCD20抗原のターゲティングアプローチを大幅に変更することができる。

30

40

【0022】

リツキシマブ抗体（米国でRITUXAN（登録商標）、他でMABRA（登録商標）として販売されている製品中の活性成分（active agent））は、CD20抗原に指向する遺伝子操作されたキメラマウス/ヒトモノクローナル抗体である。リツキシマブは、1998年4月7日発行の米国特許第5,736,137号（Andersonら）で「C2B8」と呼ばれる抗体である。リツキシマブは、再発性または無反応性の低悪性度または濾胞性リンパ腫、CD20陽性リンパ腫、B細胞非ホジキンリンパ腫患者の治療が示されている。インビトロでの作用機構研究により、リツキシマブがヒト補体に結合し、補体依存性細胞傷害性（CDC）によってリンパ様B細胞株を溶解することが証明されている。Reffら、Blood 83(2):435-445(1994)。さら

50

に、リツキシマブは、抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) アッセイで有意な活性を有する。より最近では、リツキシマブは、トリチウム化チミジン組み込みアッセイで抗増殖効果を有し、且つアポトーシスを直接誘導する一方で、他の抗CD19および抗CD20抗体はそうではないことが示されている。Maloneyら Blood 88(10): 637a(1996)。リツキシマブと化学療法薬との間の相乗効果も実験的に認められている。特に、リツキシマブは、薬物耐性ヒトB細胞リンパ腫細胞株を、ドキソルビシン、CDDP、VP-16、ジフテリア毒素、およびリシンの細胞傷害効果に対して感受性にする。(Demidemら、Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3): 177-186(1997))。インビボでの前臨床研究では、リツキシマブは、おらく補体および細胞媒介過程によってカニクイザルの末梢血、リンパ節、および骨髄からB細胞を枯渇させることが示されている。Reffら、Blood 83: 435-445(1994)。

【0023】

リツキシマブは、再発性または無反応性の低悪性度または濾胞性CD20⁺B細胞NHL患者の治療において1997年11月に米国で承認され、毎週375mg/m²の用量で4回投与される。2001年には、食品医薬品局(FDA)は、低悪性度NHLの治療、再治療(1週間毎に計4回)、およびさらなる投与レジメン(1週間毎に計8回)のさらなる適用を承認した。300,000人を超える患者が、単剤療法または免疫抑制薬もしくは化学療法薬と組み合わせてリツキシマブに曝露されている。患者はまた、2年までの維持療法としてリツキシマブで治療されている。Hainsworthら、J. Clin. Oncol. 21: 1746-1751(2003); Hainsworthら、J. Clin. Oncol. 20: 4261-4267(2002); Edwardsら "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis" N. Engl. J. Med. 350: 2572-82(2004)。

【0024】

リツキシマブは、種々の非悪性自己免疫障害でも研究されており、B細胞および自己抗体が疾患の病態生理学で役割を果たすようである。Edwardsら、Biochem Soc. Trans. 30: 824-828(2002)。リツキシマブは、例えば、関節リウマチ(RA)(Leandroら、Ann. Rheum. Dis. 61: 883-888(2002); Edwardsら、Arthritis Rheum., 46(Suppl. 9): S46(2002); Stahlら、Ann. Rheum. Dis., 62(Suppl. 1): OP004(2003); Emeryら、Arthritis Rheum. 48(9): S439(2003))、狼瘡(Eisenberg, Arthritis. Res. Ther. 5: 157-159(2003); Leandroら、Arthritis Rheum. 46: 2673-2677(2002); Gormanら、Lupus, 13: 312-316(2004))、免疫性血小板減少性紫斑(D'Arenaら、Leuk. Lymphoma 44: 561-562(2003); Stasiら、Blood, 98: 952-957(2001); Salehら、Semin. Oncol, 27(Suppl. 12): 99-103(2000); Zaiiaら、Haematologica, 87: 189-195(2002); Ratanaatha Rathornら、Ann. Int. Med., 133: 275-279(2000))、新生赤血球性無形成症(Aunerら、Br. J. Haematol, 116: 725-728(2002))、自己免疫性貧血症(Zajalら、Haematologica 87: 189-195(2002)(Haematologica 87: 336(2002)の記載は誤植のようである)、寒冷凝集素病(Layiosら、Leukemia, 15: 187-8(2001); Berentsenら、Blood, 103: 2925-2928(2004); Berentsenら、Br. J. Haematol, 115: 79-83(2001); Bauduer, Br. J. Haematol., 112: 1083-1090(2001); Damianiら、Br. J. Haematol

10

20

30

40

50

、114:229-234(2001))、重症インスリン抵抗性のB型症候群(Collinsら、N. Engl. J. Med.、350:310-311(2004))、混合性クリオグロブリン血症(Devitaら、Arthritis Rheum. 46 Suppl. 9:S206/S469(2002))、重症筋無力症(Zajackら、Neurology、55:1062-63(2000))；Wyllamら、J. Pediatr.、143:674-677(2003))、ウェゲナー肉芽腫症(Specksら、Arthritis & Rheumatism 44:2836-2840(2001))、無反応性尋常性天疱瘡(Dupuyら、Arch Dermatol、140:91-96(2004))、皮膚筋炎(Levine、Arthritis Rheum.、46(Suppl. 9):S1299(2002))、シェーグレン症候群(Somerら、Arthritis & Rheumatism、49:394-398(2003))、活性II型混合性クリオグロブリン血症(Zajackら、Blood、101:3827-3834(2003))、尋常性天疱瘡(Dupuyら、Arch. Dermatol、140:91-95(2004))、自己免疫性神経障害(Pestronkら、J. Neurol Neurosurg. Psychiatry)74:485-489(2003))、腫瘍随伴性眼球クローヌス-ミオクローヌス症候群(Pranzatelliら、Neurology 60(Suppl. 1)PO5.128:A395(2003))、再発-寛解型多発性硬化症(RRMS)(Crossら(abstract)“Preliminary Results from a Phase II Trial of Rituximab in MS” Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis、20-21(2003)の徴候および症状を潜在的に緩和することが報告されている。

【0025】

関節リウマチ(RA)患者で第2相試験(WA16291)を行い、リツキシマブの安全性および有効性に関する48週間の追跡データが得られている。Emeryら、Arthritis Rheum 48(9):S439(2003)；Szczepanskiら、Arthritis Rheum 48(9):S121(2003)。全部で161人の患者を、無作為に以下の4つの治療群に均等に分けた：メトトレキサートのみ、リツキシマブのみ、リツキシマブ+メトトレキサート、リツキシマブ+シクロホスファミド(CTX)。リツキシマブの処置レジメンは、1日目および15日目に1gを静脈投与するものであった。ほとんどのRA患者におけるリツキシマブの注入は、ほとんどの患者で十分に許容され、36%の患者がその最初の注入時に少なくとも1つの副作用を経験した(偽薬を投与した患者の30%と比較した場合)。概して、有害事象の大部分は、軽度から中等度の重症度であると見なされ、全治療群を通して十分にバランスがとれていた。4群で48時間にわたって全部で19人の重篤な有害事象が認められ、これは、リツキシマブ/CTX群よりもわずかに頻繁であった。感染症の発生率は、全群を通して十分にバランスがとれていた。このRA患者集団における重篤な感染症の平均比率は、年間で100人の患者あたり4.66人であり、これは、地域ベースの疫学的研究で報告されたRA患者における入院が必要な感染症の比率よりも低い(年間で100人の患者あたり9.57人)。Doranら、Arthritis Rheum. 46:2287-2293(2002)。

【0026】

少数の神経障害患者(自己免疫性神経障害(Pestronkら、上記)、眼球クローヌス-ミオクローヌス症候群(Pranzatelliら、上記)、およびRRMS(Crossら、上記)が含まれる))における報告されたリツキシマブの安全性プロファイルは、癌またはRAで報告されたものと類似していた。RRMS患者(Crossら、上記)におけるインターフェロン-(IRN-)または酢酸ガラティラメルと組み合わせたリツキシマブについての進行中の研究者委託型試験(investigator-sponsored trial)では、10人の処置患者のうちの1人がリツキシマブの

最初の注入後の中等度の発熱および硬直後に一晚観察するために入院し、他の9人の患者はいかなる報告される有害事象をも引き起こすことなく4回の注入レジメンを完了した。

【0027】

C D 2 0 抗体およびC D 2 0 結合分子に関する特許および特許公報には、以下が含まれる：米国特許第5,776,456号、同第5,736,137号、同第5,843,439号、同第6,399,061号、および同第6,682,734号ならびにUS2002/0197255号、US2003/0021781号、US2003/0082172号、US2003/0095963号、US2003/0147885号(Ander sonら)；米国特許第6,455,043号およびWO2000/09160号(G r i l l o - L o p e z , A .) ；WO2000/27428号(G r i l l o - L o p e z and White)；WO2000/27433号(G r i l l o - L o p e z and Leonard)；WO2000/44788号(B r a s l a w s k y ら) ；WO2001/10462号(R a s t e t t e r , W .) ；WO01/10461号(R a s t e t t e r and White)；WO2001/10460号(W h i t e and Grillo-Lopez)；US2001/0018041号、US2003/0180292号、WO2001/34194号(H a n n a and H a r i h a r a n) ；US2002/0006404号およびWO2002/04021号(H a n n a and H a r i h a r a n) ；US2002/0012665号およびWO2001/74388号(H a n n a , N .) ；US2002/0058029号(H a n n a , N .) ；US2003/0103971号(H a r i h a r a n and H a n n a) ；US2002/0009444号およびWO2001/80884号(G r i l l o - L o p e z , A .) ；WO2001/97858号(W h i t e , C) ；US2002/0128488号およびWO2002/34790号(R e f f , M .) ；WO2002/060955号(B r a s l a w s k y ら) ；WO2002/096948号(B r a s l a w s k y ら) ；WO2002/079255号(R e f f and D a v i e s) ；米国特許第6,171,586号およびWO1998/56418号(L a m ら) ；WO1998/58964号(R a j u , S .) ；WO1999/22764号(R a j u , S .) ；WO1999/51642, 米国特許第6,194,551号、米国特許第6,242,195号、米国特許第6,528,624号、および米国特許第6,538,124号(I d u s o g i e ら) ；WO2000/42072号(P r e s t a , L .) ；WO2000/67796号(C u r d ら) ；WO2001/03734号(G r i l l o - L o p e z ら) ；US2002/0004587号およびWO2001/77342号(M i l l e r and Presta)；US2002/0197256号(G r e w a l , L) ；US2003/0157108号(P r e s t a , L .) ；米国特許第6,565,827号、同第6,090,365号、同第6,287,537号、同第6,015,542号、同第5,843,398号、および同第5,595,721号(K a m i n s k i ら) ；米国特許第5,500,362号、同第5,677,180号、同第5,721,108号、同第6,120,767号、および同第6,652,852号(R o b i n s o n ら) ；米国特許第6,410,391号(R a u b i t s c h e k ら) ；米国特許第6,224,866号およびWO00/20864号(B a r b e r a - G u i l l e m , E .) ；WO2001/13945号(B a r b e r a - G u i l l e m , E .) ；WO2000/67795号(G o l d e n b e r g) ；US2003/0133930号およびWO2000/74718号(G o l d e n b e r g and Hansen)；US2003/0219433号およびWO2003/68821号(H a n s e n ら) ；WO2004/058298号(G o l d e n b e r g and Hansen)；WO2000/76542号(G o l a y ら) ；WO2001/72333号(W o l i n and Rosenblatt)；米国特許第6,368,596号(G h e t i e ら) ；米国特許第6,306,393号およびUS2002/0041847号(G o l d e n b e r g , D .) ；US2003/0026801号(W e i n e r and Hartmann)；WO2002/102312号(E n g l e

10

20

30

40

50

man, E.) ; US 2003/0068664号 (Albitarら) ; WO 2003/002607号 (Leung, S.) ; WO 2003/049694号、US 2002/0009427号、およびUS 2003/0185796号 (Wolinら) ; WO 2003/061694号 (Sing and Siegal) ; US 2003/0219818号 (Bohenら) ; US 2003/0219433号およびWO 2003/068821号 (Hansenら) ; US 2003/0219818号 (Bohenら) ; US 2002/0136719号 (Shenoyら) ; WO 2004/032828号 (Wahlら) ; ならびにWO 2002/56910号 (Hayden - Ledbetter)。米国特許第5,849,898号および欧州特許第330,191号 (Seedら) ; 欧州特許第332,865A2号 (Meyer and Weiss) ; 米国特許第4,861,579号 (Meyerら) ; US 2001/0056066号 (Bugelskiら) ; WO 1995/03770号 (Bhatら) ; US 2003/0219433A1号 (Hansenら) ; WO 2004/035607号 (Teelingら) ; WO 2004/056312号 (Lowmanら) ; US 2004/0093621号 (Shitaraら) ; WO 2004/103404号 (Watkinsら) ; WO 2005/000901号 (Tedderら) ; およびUS 2005/0025764号 (Watkinsら) も参照のこと。

【0028】

リツキシマブを使用した治療に関する刊行物には、以下が含まれる：Perotta and Abuel, "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to rituximab" Abstract #3360 Blood 10(1)(part 1-2): p.88B (1998) ; Perottaら "Rituxan in the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)", Blood, 94:49 (abstract) (1999) ; Matthews, R., "Medical Heretics" New Scientist (2001年4月7日) ; Leandroら "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" Ann Rheum Dis, supra ; Leandroら "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response" Arthritis and Rheumatism 44(9): S370 (2001) ; Leandroら "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", Arthritis and Rheumatism, 46:2673-2677 (2002) (2週間の間に、各患者に500mgのリツキシマブを2回注入し、750mgのシクロホスファミドを2回注入し、高用量の経口コルチコステロイドを注入し、2人の患者が7ヶ月後および8ヶ月後にそれぞれ再発し、再処置するが異なるプロトコールである) ; "Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy" Weideら、Lupus, 12:779-782 (2003) (患者をリツキシマブ(375mg/m² × 4、1週間間隔で繰り返す)で処置し、5~6ヶ月毎にリツキシマブをさらに適用し、次いで、3ヶ月毎に375mg/m²のリツキシマブを使用して維持治療を行い、第2の無反応性SLE患者をリツキシマブで首尾よく処置し、3ヶ月毎に維持療法を行い、両患者はリツキシマブ両方に対して十分に応答した) ; Edwards and Cambridge, "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" Rheumatology 40

10

20

30

40

50

: 205 - 211 (2001); Cambridge "B lymphocyte depletion in patients with rheumatoid arthritis: serial studies of immunological parameters" *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9): S1350 (2002); Edwards "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" *Biochem Soc. Trans.*, 上記; Edwards "Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 46 (9): S197 (2002); Edwards "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis," *N. Engl J. Med.* 350: 2572 - 82 (2004); Pavelka, Ann. Rheum. Dis. 63: (S1): 289 - 90 (2004); Emery, *Arthritis Rheum.* 50 (S9): S659 (2004); Levine and Pestronk, "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab" *Neurology* 52: 1701 - 1704 (1999); DeVita "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheum* 46: 2029 - 2033 (2002); Hida "Treatment of DMARD-refractory rheumatoid arthritis with rituximab." Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; Oct 24 - 29; New Orleans, LA 2002; Tusciano, J. "Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; Oct 24 - 29; New Orleans, LA 2002; "Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic" Martin and Chan, *Immunity* 20: 517 - 527 (2004); Silverman and Weisman, "Rituximab Therapy and Autoimmune Disorders, Prospects for Anti-B Cell Therapy", *Arthritis and Rheumatism*, 48: 1484 - 1492 (2003); Kazkaz and Isenberg, "Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases", *Current opinion in pharmacology*, 4: 398 - 402 (2004); Virgolini and Vanda, "Rituximab in autoimmune diseases", *Biomedicine & pharmacotherapy*, 58: 299 - 309 (2004); Klemmer "Treatment of antibody mediated autoimmune disorders with a AntiCD20 monoclonal antibody Rituximab", *Arthritis And Rheumatism*

m, 48: (9) 9, S (SEP), page: S 624 - S 624 (2003); Kn
eitzら "Effective B cell depletion with ri
tuximab in the treatment of autoimmune d
iseases", Immunobiology, 206: 519 - 527 (2002)
; Arzooら "Treatment of refractory antibody
mediated autoimmune disorders with an a
nti-CD20 monoclonal antibody (rituximab)"
Annals of the Rheumatic Diseases, 61 (10),
p922 - 4 (2002) Comment in Ann Rheum Dis. 61:
863 - 866 (2002); "Future Strategies in Immu
notherapy" by Lake and Dionne, in Burger's
Medicinal Chemistry and Drug Discovery (2003 by John Wiley & Sons, Inc.) Article O
nline Posting Date: January 15, 2003 (Chap
ter 2 "Antibody-Directed Immunotherapy"); L
iang and Tedder, Wiley Encyclopedia of Mo
lecular Medicine, Section: CD20 as an Immu
notherapy Target, article online posting
date: 2002年1月15日、タイトル「CD20」; Appendix 4A、タ
イトル "Monoclonal Antibodies to Human Cell
Surface Antigens" by Stockingerら、eds: Coli
ganら、in Current Protocols in Immunology (2003 John Wiley & Sons, Inc) Online Postin
g Date: May, 2003; Print Publication Date: 2
003年2月; Penichet and Morrison, "CD Antibod
ies/molecules: Definition; Antibody Engine
ering" in Wiley Encyclopedia of Molecular
Medicine Section: Chimeric, Humanized and
Human Antibodies; 2002年1月15日、オンライン投稿; Spe
cksら "Response of Wegener's granulomatosis
to anti-CD20 chimeric monoclonal antib
ody therapy" Arthritis & Rheumatism 44: 28
36 - 2840 (2001); online abstract submission
and invitation Koeghら "Rituximab for Rem
ission Induction in Severe ANCA-Associat
ed Vasculitis: Report of a Prospective Op
en-Label Pilot Trial in 10 Patients", Amer
ican College of Rheumatology, Session Num
ber: 28 - 100, Session Title: Vasculitis, Sess
ion Type: ACR Concurrent Session, Primary
Category: 28 Vasculitis, Session 10/18/2004
([www.abstractsonline.com/viewer/SearchR
esults.asp](http://www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp)); Eriksson, "Short-term outcom
e and safety in 5 patients with ANCA-posi
tive vasculitis treated with rituximab",
Kidney and Blood Pressure Rese

arch, 26: 294 (2003); Jayneら "B-cell depletio
n with rituximab for refractory vasculit

is "Kidney and Blood Pressure Research, 26: 294 (2003); Jayne, poster 88 (11th International Vasculitis and ANCA workshop), 2003 American Society of Nephrology; Stone and Specks, "Rituximab Therapy for the Induction of Remission and Tolerance in ANCA-associated Vasculitis", in the Clinical Trial Research Summary of the 2002-2003 Immune Tolerance Network, <www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html>. Leandroら "B cell repopulation occurs mainly from naive B cells in patient with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus" Arthritis Rheum., 48 (Suppl 9): S1160 (2003) も参照のこと。

10

【0029】

破骨細胞形成におけるBリンパ球の役割は、破骨細胞形成および寿命に対するB系統細胞の刺激効果および阻害効果の両方が報告されているので、議論の余地がある。Bリンパ系細胞は、2つの方法（破骨細胞分化を支持し、破骨細胞前駆体としての機能を果たすためのODF/RANKLの発現）で破骨細胞形成に関与し得る（Manabeら、J. Immunol., 167 (5): 2625 - 2631 (2001)）。オステオプロテゲリンは、B細胞成熟および骨代謝を調節する（Yunら、J. Immunol., 166 (3): 1482 - 1491 (2001)）。B細胞は、トランスフォーミング増殖因子-（TGF-）（これらの細胞中でアポトーシスを誘導する因子）の分泌によって破骨細胞の形成を阻害し、成熟破骨細胞形成の寿命を短くすることが示されている（Weitzmannら、J. Cell. Biochem., 78: (2): 318 - 324 (2000)）。Bリンパ球前駆体は、機能的破骨細胞を生成し得る（Grcevicら、Croatian Medical Journal, 42 (4): 384 - 392 (2001)）。

20

【0030】

ラットアジュバント関節炎研究におけるビスホスホネートには、エトリドロネート（etidronate）およびクロドロネートが体重減少、足の炎症、および骨吸収を減少させることが含まれる（非特許文献1）。NE58095は、骨侵食を予防し、実験関節炎における関節構造を保存するジホスフェートである（非特許文献2）。ゾレドロネートは、実験炎症性関節炎における骨幹端皮質内欠損から防御する（非特許文献3）。クロドロネートの20mg/kg/日のiv注入により、足の炎症および骨吸収が減少するが、骨形成も阻害される。非特許文献4。

30

【0031】

全ての承認されているビスホスホネート（プアミドロネート（pamidronate）、アレンドロネート、リセドロネート、ゾレドロネート）が、骨吸収の生化学的測定量を改善し（全身骨量減少を減少させ）、限局性骨侵食の進行を阻害する。Gravalliese, 上記。ビスホスホネートが関節リウマチの構造変化を遅延させる潜在的療法として見なされ得るにもかかわらず、有効性、長期許容性、および毒性は知られておらず、さらなる試験が必要である。

40

【0032】

組織の成長および修復における増殖因子の役割についての知識は増加しているにもかかわらず、骨、靱帯、および軟骨の成長促進のための材料および方法が当該分野で依然として必要である。破骨細胞形成を調節し、成熟破骨細胞の活性を吸収する方法も必要である。骨量減少を防止し、骨疾患を治療する方法も必要である。

【非特許文献1】Floraら、Arthritis Rheum., 22: 340 - 3

50

46 (1978)

【非特許文献2】Francisら、Int J. Tiss. Res., 11: 239 - 252 (1989)

【非特許文献3】Pyskiewiczら、J. Orthop. Res., 15: 858 - 861 (1997)

【非特許文献4】Oelznerら、Inflamm. Res., 49: 424 - 433 (2000)

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0033】

10

発明の要旨

したがって、本発明は、特許請求の範囲に記載の通りである。本発明は、骨障害を有する被験体に安全且つ有効な治療レジメンを提供するB細胞表面マーカーに結合するアンタゴニストの投与を含む。

【0034】

第1態様では、本発明は、有効量のCD20抗体を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物の骨障害の治療方法に関する。

【0035】

別の態様では、本発明は、B細胞表面マーカーに結合する有効量の抗体を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物の骨障害の治療方法に関する。

20

【0036】

さらに別の態様では、本発明は、B細胞表面マーカーに結合する有効量のアンタゴニストを哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物の骨障害の治療方法に関する。

【0037】

さらなる態様では、本発明は、CD20抗体またはB細胞表面マーカーに結合する抗体もしくはアンタゴニストを含む容器および哺乳動物の骨障害の治療のための説明書を含む添付文書を含み、説明書がCD20抗体またはB細胞表面マーカーに結合する抗体もしくはアンタゴニストを有効量で哺乳動物に投与することを示す製品を提供する。好ましい実施形態では、製品は、治療のための抗体以外の薬剤を含む容器をさらに含み、このような薬剤での哺乳動物の治療についての指示をさらに含む。

30

【0038】

上記発明の好ましい実施形態では、骨障害は、骨粗鬆症または限局性骨侵食（辺縁関節侵食および軟骨下骨侵食（骨髄）が含まれる）、骨欠損、小児期特発性骨量減少、歯槽骨量減少、骨折、もしくは関節近接骨減少症などの骨減少症であるか、または関節リウマチなどの自己免疫疾患に関連する骨量減少である。なおさらなる実施形態では、本発明は、関節リウマチなどの炎症性関節炎におけるびらん性骨障害を予防する方法であって、有効量のCD20抗体をこのような障害を罹患した哺乳動物に投与する工程を含む方法を提供する。自己免疫疾患（特に、関節リウマチ）または自己免疫疾患の発症リスクに関連しない骨障害の治療方法も本発明の範囲内である。

【0039】

40

別の好ましい態様では、第2薬物を有効量で哺乳動物に投与し、CD20抗体またはB細胞表面マーカーに結合する抗体もしくはアンタゴニストは第1薬物である。このような薬物は、1つまたは複数の薬物であり得る。より好ましくは、このような第2薬物は、破骨細胞関連障害の治療薬（オステオプロテゲリン、MMPインヒビター、IL-4などのサイトカイン、グルカン、インテグリンアンタゴニスト、カルシトニン、プロトンポンプインヒビター、プロテアーゼインヒビター、またはビスホスホネート（リセドロネート、エチドロネート、クロドロネート、NE-58095、ゾレンドロネート、パミドロネート、またはアレンドロネートなど）、免疫抑制薬、疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARD）、細胞傷害薬、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、ホルモン、またはその組み合わせなど）である。さらに別の好ましい実施形態では、哺乳動物はヒトである。抗体を

50

、静脈内または皮下に投与することが好ましい。

【0040】

これらの最後の態様のさらに別の好ましい実施形態では、哺乳動物は、CD20抗体などのB細胞表面マーカーに結合する抗体で以前に処置されたことがなく、そして/またはB細胞表面マーカーに結合する抗体(CD20抗体が含まれる)以外の骨障害を治療するための薬物を哺乳動物に投与しない。

【0041】

さらなる態様では、本発明は、B細胞表面マーカーに結合する抗体(好ましくは、CD20抗体)をコードする核酸を含む単離した歯骨前駆細胞または前骨芽細胞を前記哺乳動物に導入する工程を含む、哺乳動物の骨溶解を阻害する方法を提供する。細胞が歯骨前駆細胞である場合、哺乳動物は、歯周炎を罹患しているか発症リスクがあり得るか、歯周疾患に起因する歯槽骨量減少を罹患しているか発症リスクがあり得る。別の実施形態では、歯骨前駆細胞を、下顎部分の歯周靱帯に投与することができる。

10

【0042】

別の実施形態では、細胞が前骨芽細胞である場合、これを哺乳動物の結合関節に移植することができるか、脛骨内または大腿骨内に投与することができる。さらに、抗体の発現を、抗生物質(antibiotic compound)(テトラサイクリンまたはテトラサイクリンアナログなど)によって調節することができ、さらに、ミノサイクリンを哺乳動物に投与することができる。このような抗生物質を、好ましくは、全身投与する。

20

【0043】

インターロイキン-4または腫瘍壊死因子-(TNF-)のインヒビターを、このような状況で哺乳動物にさらに投与することができる。さらに、このような哺乳動物は、関節リウマチ、根尖周囲または軟骨内の骨量減少、人工関節粒子誘導性骨溶解、または骨溶解性骨転移を罹患しているか、発症リスクがあり得る。

【0044】

骨成長の促進が有利である条件には、例えば、骨移植片の強化(脊椎骨癒合症が含まれる)、長骨伸長の強化、脊椎動物(例えば、哺乳動物(ヒトが含まれる))の顔面再建術、上顎骨再建術、および/または下顎骨再建術後の骨治癒の強化などが含まれる。

【0045】

本発明の方法(いずれかの理論に制限されない)によって達成される破骨細胞活性の阻害は、破骨細胞の吸収機構の阻害活性の結果であり得るか、前駆細胞から採用された破骨細胞数の阻害の結果であり得るか、両方の組み合わせであり得る。ほとんどの高齢の個体、特に閉経後の女性が罹患する骨粗鬆症では、骨芽細胞による骨形成が遅延し、且つ骨吸収が増加する(通常は加齢過程によって起こる現象)。本明細書中に記載の方法は、特に、骨芽細胞形成を増強し、従って、骨形成も増加させることを意図する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0046】

好ましい実施形態の詳細な説明

I. 定義

「B細胞」は、骨髓内で成熟するリンパ球であり、ナイーブB細胞、記憶B細胞、またはエフェクターB細胞(形質細胞)が含まれる。本明細書中に記載のB細胞は、正常または非悪性B細胞であり得る。

40

【0047】

本明細書中の「B細胞表面マーカー」または「B細胞表面抗原」は、B細胞に結合するアンタゴニストを使用してターゲティングすることができるB細胞の表面上で発現する抗原である。例示的B細胞表面マーカーには、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、およびCD86白血球表面マーカーが含まれる(説明については、The Leukocyte Antig

50

en Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay
ら、Academic Press, Harcourt Brace & Co., New Yorkを参照のこと)。他のB細胞表面マーカーには、RP105、FcRH2、B細胞CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、Bt ig、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA、および239287が含まれる。特に重要なB細胞表面マーカーは、哺乳動物の他の非B細胞組織と比較してB細胞上に優先して発現し、前駆B細胞および成熟B細胞の両方に発現することができる。本明細書中の好ましいB細胞表面マーカーは、CD20およびCD22である。

【0048】

10

「CD20」抗原または「CD20」は、末梢血またはリンパ器官由来の90%を超えるB細胞表面上で見出される約35kDaの非グリコシル化リンタンパク質である。CD20は、正常なB細胞および悪性B細胞の両方に存在するが、幹細胞上で発現しない。文献中でのCD20の別名には、「Bリンパ球制限抗原」および「Bp35」が含まれる。CD20抗原は、例えば、Clarkら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82: 1766 (1985)に記載されている。

【0049】

BL-CAMまたはLyb8としても公知の「CD22」抗原または「CD22」は、分子量が約130(還元型)~140kD(非還元型)の1型内在性膜糖タンパク質である。これは、Bリンパ球の細胞質および細胞膜の両方で発現する。CD22抗原は、CD19抗原とほぼ同一の段階でB細胞リンパ球分化の初期に出現する。他のB細胞マーカーと異なり、CD22膜発現は、成熟B細胞(CD22+)と形質細胞(CD22-)との間に含まれる後期分化段階に制限される。CD22抗原は、例えば、Wilsonら、J. Exp. Med. 173: 137 (1991)およびWilsonら、J. Immunol. 150: 5013 (1993)に記載されている。

20

【0050】

「アンタゴニスト」は、B細胞上のCD20への結合の際に、例えば、B細胞によって誘発される液性応答の減少または防止によって哺乳動物中のB細胞を破壊または枯渇し、そして/または1つもしくは複数のB細胞機能を妨害する分子である。アンタゴニストは、好ましくは、アンタゴニストで処置された哺乳動物中のB細胞を枯渇させる(すなわち、循環B細胞レベルを減少させる)ことができる。このような枯渇を、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)、B細胞増殖の阻害および/またはB細胞死の誘導(例えば、アポトーシスによる)等の種々の機構を介して行うことができる。本発明の範囲内に含まれるアンタゴニストには、CD20に結合し、任意選択的に細胞傷害薬と結合体化するか融合した抗体、合成配列または天然配列のペプチド、イムノアドヘシン、および小分子アンタゴニストが含まれる。好ましいアンタゴニストは、抗体を含む。

30

【0051】

本明細書中の「抗体アンタゴニスト」は、B細胞表面マーカーへの結合の際に、例えば、B細胞によって誘発される液性応答の減少または防止によって哺乳動物中のB細胞を破壊または枯渇し、そして/または1つもしくは複数のB細胞機能を妨害する分子である。抗体アンタゴニストは、好ましくは、抗体アンタゴニストで処置された哺乳動物中のB細胞を枯渇させる(すなわち、循環B細胞レベルを減少させる)ことができる。このような枯渇を、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)、B細胞増殖の阻害および/またはB細胞死の誘導(例えば、アポトーシスによる)等の種々の機構を介して行うことができる。

40

【0052】

本明細書中の用語「抗体」を、最も広い意味で使用し、具体的には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成された多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、および抗体フラグメント(これらが所望の生物活性を

50

示す場合に限る)を対象とする。半減期が増加し、胎児への母性IgGの移入を担う新生児Fc受容体(FcRn)への結合が改善された抗体(Guyerら、J. Immunol. 117:587(1976) and Kimら、J. Immunol. 24:249(1994))は本定義に含まれ、WO00/42072号およびUS2005/0014934A1号に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合が改善される1つまたは複数の置換を含むFc領域を含む。FcRn結合が改善された好ましいFc領域含有抗体変異型(variant)は、そのFc領域の1つ、2つ、または3つの位置においてアミノ酸置換を含む。

【0053】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部、好ましくは、その抗原結合領域を含む。抗体フラグメントの例には、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメント、ダイアボディ(diabody)、線状抗体、単鎖抗体分子、および抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体が含まれる。

【0054】

本明細書中の目的のために、「インタクトな抗体」は、重鎖および軽鎖の可変ドメインならびにFc領域を含むものである。

【0055】

「B細胞表面マーカーに結合する抗体」は、B細胞表面マーカーへの結合の際に、例えば、B細胞によって誘発される液性応答の減少または防止によって哺乳動物中のB細胞を破壊または枯渇し、そして/または1つもしくは複数のB細胞機能を妨害する分子である。抗体は、好ましくは、抗体で処置された哺乳動物中のB細胞を枯渇させる(すなわち、循環B細胞レベルを減少させる)ことができる。このような枯渇を、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)、B細胞増殖の阻害および/またはB細胞死の誘導(例えば、アポトーシスによる)等の種々の機構を介して行うことができる。1つの好ましい実施形態では、抗体は、主な臨床応答を誘導する。別の好ましい実施形態では、B細胞表面マーカーは、CD20またはCD22であり、その結果、B細胞表面マーカーに結合する抗体は、CD20またはCD22にそれぞれ結合する抗体、すなわち、それぞれ「CD20抗体」または「CD22抗体」である。CD22抗体の例には、欧州特許第1,476,120号(Tedder and Tuscano)、欧州特許第1,485,130号(Tedder)、および欧州特許第1,504,035号(Popplewellら)に記載のもの、ならびにUS2004/0258682号(Leungら)に記載のものが含まれる。なおさらに好ましい実施形態では、抗体はCD20抗体である。特に好ましい実施形態は、主な臨床応答を誘導するCD20抗体またはCD22抗体、好ましくは、CD20抗体である。本明細書中の目的のために、「主な臨床応答」は、米国リウマチ学会の70%改善(ACR70)の6ヶ月間にわたる達成と定義する。ACR応答スコアを、ACR20、ACR50、およびACR70と分類し、ACR70はこの評価システムで最も高い徴候および症状の制御レベルである。ACR応答スコアは、関節リウマチ疾患の活性(関節の腫脹および圧痛、痛み、障害レベル、ならびに全体的な患者の評価および医師の評価)の改善を測定する。FDAによって認識されており、本明細書中で定義される主な臨床応答を誘導する異なる抗体型の例は、エタネルセプト(ENBREL(登録商標))である。

【0056】

CD20抗体の例には、以下が含まれる:現在、「リツキシマブ」(RITUXAN(登録商標)/MABTHERA(登録商標))(米国特許第5,736,137号)と呼ばれている「C2B8」;「Y2B8」と呼ばれるイットリウム90標識2B8マウス抗体またはBiogen Idec Inc.から市販されている「Ibritumomab Tiuxetan」(ZEVALIN(登録商標))(米国特許第5,736,137号);2B8(1993年6月22日にATCCアクセッション番号HB11388で寄託された);任意選択的に、¹³¹Iで標識して「131I-B1」または「ヨウ素I 131トシツモマブ」抗体(Corixaから市販されているBEXXAR(商標))が

10

20

30

40

50

生成されるマウスIgG2a「B1」(「トシツモマブ」とも呼ばれる)(米国特許第5,595,721号も参照のこと);マウスモノクローナル抗体「1F5」(Pressら、Blood 69(2):584-591(1987))およびその変異型(「フレームワークパッチ(framework patched)」またはヒト化1F5(WO2003/002607号、Leung, S.;ATCC寄託番号HB-96450)が含まれる);マウス2H7抗体およびキメラ2H7抗体(米国特許第5,677,180号);ヒト化2H7(WO2004/056312号(Lowmanら)および下記);B細胞の細胞膜中のCD20分子をターゲティングするHUMAX-CD20(商標)全ヒト高親和性抗体(Genmab, Denmark;例えば、Glennie and van de Winkel, Drug Discovery Today 8:503-510(2003)およびCraggら、Blood 101:1045-1052(2003)を参照のこと);WO2004/035607号(Teelingら)に記載のヒトモノクローナル抗体;US2004/0093621号(Shitaraら)に記載のFc領域に結合した複雑なN-グリコシド結合糖鎖を有する抗体;CD20に結合するモノクローナル抗体および抗原結合フラグメント(WO2005/000901, Tedderら)(HB20-3、HB20-4、HB20-25、およびMB20-11など);CD20結合抗体(AME抗体シリーズ(例えば、WO2004/103404号(Watkinsら、Applied Molecular Evolution)に記載のAME-33(商標)抗体)など);CD20結合分子(US2005/0025764号(Watkinsら)に記載のものなど);A20抗体またはその変異型(キメラまたはヒト化A20抗体(それぞれ、cA20、hA20))(US2003/0219433, Immunomedics);ならびにInternational Leukocyte Typing Workshop(Valentineら、In:Leukocyte Typing III(McMichael, Ed., p.440, Oxford University Press(1987))から市販されているモノクローナル抗体L27、G28-2、93-1B3、B-C1、またはNU-B2。本明細書中の好ましいCD20抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒトCD20抗体、より好ましくは、リツキシマブ、ヒト化2H7、キメラまたはヒト化A20抗体(Immunomedics)、およびHUMAX-CD20(商標)ヒトCD20抗体(Genmab)である。

【0057】

本明細書中の用語「リツキシマブ」または「RITUXAN(登録商標)」は、CD20抗原に指向する遺伝子操作されたキメラマウス/ヒトモノクローナル抗体をいい、米国特許第5,736,137号で「C2B8」と命名され、CD20に結合する能力を保持するそのフラグメントが含まれる。

【0058】

単に本明細書の目的のためであり、且つ他で示さない限り、「ヒト化2H7」は、ヒト化CD20抗体またはその抗原結合フラグメントをいい、この抗体は、インビボで霊長類B細胞を枯渇させるのに有効であり、そのH鎖可変領域(V_H)中に抗ヒトCD20抗体由来の配列番号12(図1B)の少なくとも1つのCDRH3配列および実質的にヒト重鎖サブグループIII(V_H III)のヒトコンセンサスフレームワーク(FR)残基を含む。好ましい実施形態では、この抗体は、配列番号10のH鎖CDRH1配列をさらに含み、より好ましくは、配列番号4のL鎖CDRL1配列、配列番号5のCDRL2配列、配列番号6のCDRL13配列、および実質的にヒト軽鎖サブグループI(V_L)のヒトコンセンサスフレームワーク(FR)をさらに含み、 V_H 領域をヒトIgG鎖定常領域に連結することができ、この領域は、IgGまたはIgG3で有り得る。WO2004/056312号(Lowmanら)も参照のこと。

【0059】

好ましい実施形態では、このような抗体は、配列番号8の V_H 配列(図1Bに示すv16)、任意選択的に、配列番号2の V_L 配列(図1Aに示すv16)も含み、H鎖中にD

56AおよびN100Aのアミノ酸置換ならびにL鎖中にS92Aの置換を有し得る(v96)。好ましくは、抗体は、配列番号13および14の軽鎖および重鎖のアミノ酸をそれぞれ含むインタクトな抗体2H7・v16である。別の好ましい実施形態は、抗体が配列番号13および15の軽鎖および重鎖のアミノ酸をそれぞれ含む抗体2H7・v31である場合である。本明細書中の抗体は、Fc領域中にADCCおよび/またはCDC活性を改善する少なくとも1つのアミノ酸置換をさらに含み得る(アミノ酸置換がS298A/E333A/K334Aである抗体、より好ましくは、配列番号15の重鎖アミノ酸配列を有する2H7・v31など)。別の好ましい実施形態は、図2および3にそれぞれ示すように、抗体が、配列番号28および29の軽鎖および重鎖アミノ酸配列を含む2H7・v138であり、これらの配列と2H7・v16の対応する軽鎖および重鎖アミノ酸配列とのアラインメントである場合である。あるいは、このような好ましいインタクトなヒト化2H7抗体は、N434Wのアミノ酸置換以外は2H7・v138の軽鎖配列および重鎖配列を有する2H7・v477である。これらの抗体のいずれかは、Fc領域中にCDC活性を減少させる少なくとも1つのアミノ酸置換(例えば、少なくとも置換K322Aを含む)をさらに含み得る。米国特許第6,528,624B1号(Indusogieら)を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0060】

いくつかの好ましいヒト化2H7変異型は、配列番号2の軽鎖可変ドメインおよび配列番号8の重鎖可変ドメインを有するもの(すなわち、Fc領域が置換されているか置換されていないもの)および配列番号8中にN100AまたはD56AおよびN100Aの変化を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号2中にM32L、S92A、またはM32LおよびS92Aの変化を有する軽鎖可変ドメインを有するもの(すなわち、Fc領域が置換されているか置換されていないもの)である。Fc領域が置換されている場合、これらは、好ましくは、以下の表に記載の置換の1つである。

【0061】

本発明のいくつかの種々の好ましい実施形態のまとめでは、2H7バージョン16に基づいた変異型のV領域は、以下の表中に示すアミノ酸置換の位置を除いて、v16のアミノ酸配列を有する。他で示さない限り、2H7変異型は、v16と同一のL鎖を有する。

【0062】

【化1】

2H7 バージョン	重鎖 (V _H) 変化	軽鎖 (V _L) 変化	Fc 変化
16			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L

特に好ましいヒト化2H7は、軽鎖可変配列：

【 0 0 6 3 】

【 化 2 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (配列番号 2)

および重鎖可変配列

【 0 0 6 4 】

【 化 3 】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQ
KFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSS
(配列番号 8)

10

を含むインタクトな抗体または抗体フラグメントである。

【 0 0 6 5 】

ヒト化 2 H 7 抗体がインタクトな抗体である場合、好ましくは、軽鎖アミノ酸配列：

【 0 0 6 6 】

【 化 4 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 13)

20

および重鎖アミノ酸配列：

【 0 0 6 7 】

【 化 5 】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQ
KFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 14)

30

または重鎖アミノ酸配列

【 0 0 6 8 】

40

【化 6】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQ
 KFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPFVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号15)

10

を含む。

【0069】

別の好ましい実施形態では、インタクトなヒト化2H7抗体は、軽鎖アミノ酸配列：

【0070】

【化 7】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAFSNLASGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号28)

20

および重鎖アミノ酸配列：

【0071】

【化 8】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQ
 KFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSASYWFYFDVWGQGTLVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPFVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号29)

30

40

を含む。

【0072】

別の好ましい実施形態では、ヒト化2H7抗体は、配列番号30の軽鎖可変領域(V_L)配列および配列番号8の重鎖可変領域(V_H)配列を含み、この抗体は、V_H-CDR2中にD56Aのアミノ酸置換をさらに含み、V_H-CDR3中のN100がYまたはWで置換され、配列番号30が配列：

【0073】

【化 9】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (配列番号30)

を有する。

【0074】

この最後のヒト化 2 H 7 抗体の 1 つの実施形態では、N 1 0 0 は、Y で置換されている。別の実施形態では、N 1 0 0 は、W で置換されている。さらに、さらなる実施形態では、抗体は、V H - C D R 3 中に置換 S 1 0 0 a R を含み、好ましくは、F c 領域中に A D C C および / または C D C 活性を改善する少なくとも 1 つのアミノ酸置換をさらに含む (アミノ酸置換 S 2 9 8 A、E 3 3 3 A、K 3 3 4 A、K 3 2 6 A を含む I g G 1 F c を含むものなど)。あるいは、抗体は、V H - C D R 3 中に置換 S 1 0 0 a R を含み、好ましくは、F c 領域中に、A D C C 活性を改善するが C D C 活性を減少させる少なくとも 1 つのアミノ酸置換をさらに含む (少なくともアミノ酸置換 K 3 2 2 A を含むものおよびアミノ酸置換 S 2 9 8 A、E 3 3 3 A、K 3 3 4 A をさらに含むものなど)。

10

【0075】

1 つの特に好ましい実施形態では、抗体は、2 H 7 . v 5 1 1 軽鎖：

【0076】

【化 1 0】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTTL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号31)

20

および 2 H 7 . v 5 1 1 重鎖：

【0077】

【化 1 1】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSY
 NQKFQGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWGQGTLLTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号32)

30

を含む。

40

【0078】

「抗体依存性細胞傷害性」および「A D C C」は、F c 受容体 (F c R) を発現する非特異的細胞傷害性細胞 (例えば、ナチュラルキラー (N K) 細胞、好中球、およびマクロファージ) が標的細胞上の結合抗体を認識し、その後に標的細胞を溶解させる細胞媒介反応をいう。A D C C 媒介のための初代細胞 (N K 細胞) は F c R I I I のみを発現するのに対して、単球は、F c R I、F c R I I、および F c R I I I を発現する。まとめた造血細胞上での F c R 発現は、R a v e t c h a n d K i n e t, A n n u . R e v . I m m u n o l . 9 : 4 5 7 - 4 9 2 (1 9 9 1) の 4 6 4 頁の表 3 である。対象の分子の A D C C 活性を評価するために、米国特許第 5, 5 0 0, 3 6 2 号または同第 5, 8 2 1, 3 3 7 号などに記載のインビトロ A D C C アッセイを行うことができる。こ

50

のようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（P B M C）およびナチュラルキラー（N K）細胞が含まれる。あるいはまたはさらに、目的の分子のA D C C活性を、例えば、C l y n e s ら、P N A S（U S A）95：652 - 656（1998）などに開示の動物モデルで評価することができる。

【0079】

「ヒトエフェクター細胞」は、1つまたは複数のF c Rを発現する白血球であり、エフェクター機能を果たす。好ましくは、細胞は、少なくともF c R I I I Iを発現し、A D C Cエフェクター機能を果たす。A D C Cを媒介するヒト白血球の例には、末梢血単核細胞（P B M C）、ナチュラルキラー（N K）細胞、単球、細胞傷害性T細胞、および好中球が含まれ、P B M CおよびN K細胞が好ましい。

10

【0080】

用語「F c 受容体」または「F c R」を、抗体のF c領域に結合する受容体を説明するために使用する。好ましいF c Rは、未変性配列のヒトF c Rである。さらに、好ましいF c Rは、I g G抗体（受容体）に結合し、F c R I、F c R I I、およびF c R I I Iサブクラスの受容体（対立遺伝子変異型、あるいはこれらの受容体のスプライシング形態が含まれる）を誘導するF c Rである。F c R I I I受容体には、F c R I I A（「活性化受容体」）およびF c R I I B（「阻害受容体」）が含まれ、これらは、類似のアミノ酸配列を有するが、主にその細胞質ドメインが異なる。活性化受容体F c R I I Aは、その細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（I T A M）を含む。阻害受容体F c R I I Bは、その細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（I T I M）を含む（D a e r o n, A n n u . R e v . I m m u n o l . 15：203 - 234（1997）を参照のこと）。F c Rは、R a v e t c h a n d K i n e t, A n n u . R e v . I m m u n o l 9：457 - 492（1991）；C a p e l ら、I m m u n o m e t h o d s 4：25 - 34（1994）；およびd e H a a s ら、J . L a b . C l i n . M e d . 126：330 - 341（1995）に概説されている。他のF c R（今後同定されるものが含まれる）は、本明細書中の用語「F c R」に含まれる。この用語には、成熟I g Gの胎児への移動を担う新生児受容体（F c R）も含まれる（G u y e r ら、J . I m m u n o l . 117：587（1976）およびK i m ら、J . I m m u n o l . 24：249（1994））。

20

【0081】

「補体依存性細胞傷害性」または「C D C」は、補体の存在下で標的を溶解する分子の能力をいう。補体活性化経路は、補体系の第1の成分（C 1 q）の、同族抗原と複合体化した分子（例えば、抗体）への結合によって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、G a z z a n o - S a n t o r o ら、J . I m m u n o l M e t h o d s 202：163（1996）に記載のC D Cアッセイを行うことができる。

30

【0082】

「成長阻害性」抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞の増殖を防止または減少させる抗体である。例えば、この抗体は、インビトロおよび/またはインビボでB細胞増殖を防止または減少させることができる。

【0083】

「アポトーシスを誘導する」抗体は、標準的なアポトーシスアッセイ（アネキシンV、DNAの断片化、細胞の収縮、小胞体の希釈、細胞の断片化、および/または膜小胞（アポトーシス小体と呼ばれる）の形成など）によって決定される、例えば、B細胞のプログラム細胞死抗体である。

40

【0084】

「未変性抗体」は、通常、2つの同一の軽（L）鎖および2つの同一の重（H）鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体の糖タンパク質である。各軽鎖は、1つの共有結合性ジスルフィド結合によって重鎖に連結され、ジスルフィド結合数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各重鎖および軽鎖はまた、均一に間隔をあけた鎖内ジスルフィド結合を有する。各重鎖は、一方の末端に可変ドメイン（V_H）

50

を有し、その後多数の定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の末端に可変ドメイン (V_L) および他の末端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインが重鎖の第1定常ドメインと並列し、軽鎖可変ドメインが重鎖の可変ドメインと並んでいる。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に界面 (interface) を形成すると考えられている。

【0085】

用語「可変」は、抗体の間で可変ドメインの一定の部分の配列がかなり異なるという事実をいい、各抗体のその特定の抗原への結合および特異性において使用される。しかし、可変性は、抗体の可変ドメインに均一に分布していない。可変性は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメイン中に超可変領域と呼ばれる3つのセグメント中に集中している。より高度に保存された可変ドメイン部分を、フレームワーク領域 (FR) という。未変性の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、4つのFRを含み、このFRの大部分はシート立体配置を採用し、3つの超可変領域によって連結され、ループ連結部を形成し、いくつかの場合、シート構造の一部を形成する。各鎖中の超可変領域は、FRによって他の鎖由来の超可変領域と極めて接近してまとめられ、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する (Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991) を参照のこと)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、種々のエフェクター機能 (抗体の抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) への関与など) を示す。

10

20

【0086】

抗体のパパイン消化により、「Fab」フラグメントとよばれる2つの同一の抗原結合フラグメント (それぞれ1つの抗原結合部位を有する) および残存する「Fc」フラグメント (その名称が容易に結晶化する能力を反映する) が産生される。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、且つ依然として抗原に架橋することができる $F(a b')_2$ フラグメントが得られる。

【0087】

「Fv」は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。この領域は、強固に非共有結合した1つの重鎖および1つの軽鎖の可変ドメインの二量体からなる。この立体配置では、各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用して、 $V_H - V_L$ 二量体表面上の抗原結合部位が明らかになる。集合的に、6つの超可変領域は、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、1つの可変ドメイン (または抗原に特異的なたった3つの超可変領域しか含まないFvの半分) は、全結合部位よりも親和性が低いにもかかわらず、抗原を認識して結合する能力を有する。

30

【0088】

Fabフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1定常ドメイン (CH1) を含む。Fab'フラグメントは、重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端にいくつかの残基が付加されている点で (抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステインが含まれる) Fabフラグメントと異なる。Fab' - SHは、本明細書中で、定常ドメインのシステイン残基が少なくとも1つの遊離チオール基を保有するFab'を意味する。F(a b')₂ 抗体フラグメントは、最初に、その間にヒンジシステインを有するFab'フラグメント対として産生される。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも公知である。

40

【0089】

任意の脊椎動物種由来の抗体 (免疫グロブリン) の「軽鎖」を、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ () およびラムダ () と呼ばれる2つの明らかに異なる型のうちの1つに割り当てることができる。

【0090】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、抗体を、異なるクラスに割り当て

50

ることができる。インタクトな抗体には以下の5つの主なクラスが存在する：Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、およびIg M。これらのうちのいくつかを、サブクラス（アイソタイプ）（例えば、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A、およびIg A 2）にさらに分類することができる。異なる抗体クラスに対応する重鎖定常ドメインを、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 、および μ と呼ぶ。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および三次元立体配置は周知である。

【0091】

「単鎖Fv」または「scFv」抗体フラグメントは、抗体の V_H ドメインおよび V_L ドメインを含み、これらのドメインが1つのポリペプチド鎖中に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、 V_H ドメインと V_L ドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、これにより、scFvが抗原結合に望ましい構造を形成することができる。scFvの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照のこと。

【0092】

用語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を有する小抗体フラグメントをいい、このフラグメントは、同一のポリペプチド鎖（ $V_H - V_L$ ）中の軽鎖可変ドメイン（ V_L ）に連結した重鎖可変ドメイン（ V_H ）を含む。短すぎて同一鎖上の2つのドメインの間を対合することができないリンカーの使用によって、ドメインの別の鎖の相補ドメインとの対合を強いて2つの抗原結合部位を作製する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号；WO93/11161号；およびHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)により完全に記載されている。

【0093】

本明細書中で使用される、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体集団由来の抗体をいう。すなわち、モノクローナル抗体の産生中に惹起し得る可能性のある変異型（一般にこのような変異型が少量存在する）を除き、集団を含む各抗体が同一であり、そして/または同一のエピトープに結合する。このようなモノクローナル抗体は、典型的には、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、この標的結合ポリペプチド配列を、複数のポリペプチド配列からの1つの標的結合ポリペプチドの選択を含む過程によって得た。例えば、選択過程は、複数のクローン（ハイブリドーマクローンのプール、ファージクローン、または組換えDNAクローンなど）からの固有のクローンの選択であり得る。例えば、標的に対する親和性を改善するため、標的結合配列をヒト化するため、細胞培養物中でのその産生を改善するため、インビボでのその免疫原性を減少させるため、多重特異性抗体を産生するために、選択された標的結合配列をさらに変化させることができ、変化した標的結合配列を含む抗体も本発明のモノクローナル抗体であると理解すべきである。異なる決定基（エピトープ）に指向する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物と対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の1つの決定基に指向した。その特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、これらが典型的には他の免疫グロブリンによって汚染されていないという点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られた抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生が必要であると解釈されない。例えば、本発明で使用するべきモノクローナル抗体を、種々の技術（例えば、ハイブリドーマ法（例えば、Kohlerら、Nature, 256: 495 (1975)；Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)；Hammerlingら、in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)）、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567を参照のこと）、ファ

10

20

30

40

50

ージディスプレイテクノロジー（例えば、Clacksonら、Nature, 352: 624-628 (1991); Marksら、J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991); Sidhuら、J. Mol. Biol. 338 (2): 299-310 (2004); Leeら、J. Mol. Biol. 340 (5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101 (34): 12467-12472 (2004); および Leeら、J. Immunol. Methods 284 (1-2): 119-132 (2004) を参照のこと）およびヒト免疫グロブリン遺伝子座またはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部または全部を有するヒトまたはヒト様抗体を動物中に産生するためのテクノロジー（例えば、WO 1998/24893号; WO 1996/34096号; WO 1996/33735号; WO 1991/10741号; Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovitsら、Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemannら、Year in Immunol., 7: 33 (1993); 米国特許第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,591,669号（全て GenPharm）; 同第5,545,807号; WO 1997/17852; 米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; および同第5,661,016号; Marksら、Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonbergら、Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-813 (1994); Fishwildら、Nature Biotechnology, 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996); および Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995) を参照のこと）によって作製することができる。

【0094】

本明細書中のモノクローナル抗体には、具体的には、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の種に由来するか特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか相補的である一方で、残りの鎖が別の種に由来するか別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか相補的である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）ならびに、所望の生物活性を示す限り、このような抗体のフラグメントが含まれる（米国特許第4,816,567号; Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)）。本明細書中の目的のキメラ抗体には、非ヒト霊長類（オナガザル、例えば、ヒヒ、アカゲザル、またはカニクイザル）およびヒトの定常領域配列由来の可変ドメイン抗原結合配列を含む「霊長類化」抗体が含まれる（米国特許第5,693,780号）。

【0095】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの部分について、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）（マウス、ラット、または非ヒト霊長類など）の超可変領域由来の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの場合、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基が対応する非ヒト残基に置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体やドナー抗体で見出されない残基を含み得る。抗体の能力をさらに洗練させるためにこれらの修飾を行う。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含み、全てまたは実質的に全ての超可変ループは非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、全てまたは実質的に全てのFRは、上記のFR置換を除き、ヒト免疫グロブリン配列のFRである。ヒト化抗体はまた、任意選択的に、免疫グロブリン、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細については、Jonesら、Nature 321:

522 - 525 (1986); Riechmannら、Nature 332:323 - 329 (1988); および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593 - 596 (1992) を参照のこと。

【0096】

用語「超可変領域」は、本明細書中で使用する場合、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基（例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基24～34（L1）、50～56（L2）、および89～97（L3）ならびに重鎖可変ドメイン中の残基31～35（H1）、50～65（H2）、および95～102（H3）；Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）および/または「超可変ループ」由来の残基（例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基26～32（L1）、50～52（L2）、および91～96（L3）および重鎖可変ドメイン中の26～32（H1）、53～55（H2）、および96～101（H3）；Chothia and Lesk J. Mol Biol. 196:901 - 917 (1987)）を含む。「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書中で定義の超可変領域の残基以外の可変ドメイン残基である。

10

【0097】

「裸の抗体」は、細胞傷害性部分または放射性標識などの異種分子に結合体化していない（本明細書中で定義の）抗体である。

20

【0098】

「単離」抗体は、その自然環境の成分から同定され、分離され、そして/または回収された抗体である。その自然環境の汚染成分は、抗体の診断または治療上の使用を妨げると考えられる物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質が含まれ得る。好ましい実施形態では、抗体を、（1）ローリー法で決定した場合、抗体の95重量%超、最も好ましくは、99重量%超まで、（2）スピニングカップシークエネーターの使用によってN末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、または（3）クーマシーブルー染色または好ましくは銀染色を使用した還元または非還元条件下でのSDS - PAGEによって均一になるまで精製する。抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないので、単離抗体には、組換え細胞内でインサイチュの抗体が含まれる。しかし、通常、単離抗体を、少なくとも1つの精製工程によって調整する。

30

【0099】

治療のための「哺乳動物」は、哺乳動物として分類される任意の動物（ヒト、家畜、およびイヌ、ウマ、ネコ、ウシなどが含まれる）をいう。好ましくは、哺乳動物はヒトである。このような哺乳動物は、1つまたは複数の徴候、症状、または骨障害の他の指標を経験しているか既に経験し、骨障害と診断されたか（例えば、新規に診断されたか以前に診断され、新規に回帰または再発を経験する）、骨障害の発症リスクがある骨障害の治療にふさわしい被験体（患者が含まれる）である。哺乳動物は、以前にCD20抗体で治療されていても治療されていなくても良い。骨障害治療にふさわしい哺乳動物を、血液などのCD20細胞の浸潤レベルの増加についてスクリーニングした哺乳動物として最適に同定することができる。

40

【0100】

本明細書中の哺乳動物の「治療」は、治療上の処置および予防手段または防止手段をいう。治療が必要な者には、既に骨障害を罹患している者および食障害を防止すべき者が含まれる。したがって、哺乳動物を、骨障害を有すると診断されたか、骨障害に罹りやすいか感受性を示し得る。本明細書中で使用される、用語「治療（treating）」、「治療（treat）」、または「治療（treatment）」には、防止的（例えば、予防的）、姑息的、および治癒的治療が含まれる。本発明の方法によって骨が形成され、

50

それにより、骨折率が減少する。本発明は、骨形成を増加させ、それにより、骨粗鬆症および関連骨障害が防止、遅延、および/または抑制される方法を提供することによって当該分野に有意に寄与する。

【0101】

骨障害の「症状」は、哺乳動物が経験し、疾患を示す任意の病的徴候または正常な構造、機能、もしくは感覚からの逸脱（上記など）である。

【0102】

句「破骨細胞関連障害の治療薬」は、本明細書中に定義の骨障害の症状を阻害、防止、治療、または低減するために使用することができる任意の分子をいう。例には、骨および結合組織の成長に好ましい効果を示す増殖因子および他の治療薬（増殖因子（インスリン様増殖因子1（IGF-1）、PDGF、トランスフォーミング増殖因子（TGF-）のインヒビター、トランスフォーミング増殖因子（TGF-）、上皮増殖因子（RGF）、骨形成タンパク質、白血病阻害因子、線維芽細胞増殖因子、サイトカイン（インターロイキン-4（IL-4）、およびIL-4の変異体（US2004/0126364号に記載）、zvegf3タンパク質（US2004/0043031号および米国特許第6,663,870号に記載）、およびzvegf4タンパク質）が含まれる）など）および他の治療薬（ビタミンD、ビスホスホネート、カルシトニン、エストロゲン、副甲状腺ホルモン、オステオゲニン、NaF、オステオプロテゲリン、スタチン、米国特許第6,682,739B1号および同第6,673,771B1号に記載の破骨細胞骨侵食活性を阻害するのに効果的なTRANCE/RANKインヒビター、US20040058889号に記載の骨粗鬆症および他の骨吸収疾患の治療のためのグルカン、骨形成に有益であることが当該分野で公知の1つまたは複数の化合物（カルシウム、フッ化物、マグネシウム、ホウ素、またはその組み合わせなど）、骨吸収のインヒビターとしてのチエニル置換アシルグアニジン、および米国特許第6,660,728号に記載のピオネクチン受容体アンタゴニスト、米国特許第6,602,878号に記載のアシルグアニジン誘導体、グリコール酸、乳酸、コラーゲン、脱灰骨、またはその組み合わせからなる群から選択されるマトリックスが含まれる）が含まれる。フィブロネクチンを含む第1生物活性分子をマトリックスに結合させて、骨芽細胞活性を促進し、骨形成の増加を促進する。US2003/0219429号に記載のように、破骨細胞を引き付けて破骨細胞活性に対する阻害効果を得、それにより、骨吸収を減少させる能力について選択されたピトロネクチンを含む第2生物活性分子を、マトリックスの一部に付着させる（プラスミノゲンアクチベーターインヒビター（2つのクラスが存在する））。これら2つのクラスは、SERPIN（セリンプロテアーゼインヒビター）およびネキシニンIである。SERPINクラス内に2つのインヒビター型（すなわち、PAI-1およびPAI-2）が存在する。PAI-1は、潜在形態および活性形態の両方で存在する（プロテオグリカン；フィブロネクチンおよびフィブロネクチンフラグメント；ピトロネクチンおよびピトロネクチンフラグメント；コラーゲンおよびコラーゲンフラグメント；ヘパリンおよびヘパリンフラグメント；フォンウィルブランド因子；骨シアロタンパク質；オステオポンチン；オステオネクチン；オステオカルシン；セレクチンおよびセレクチンフラグメント；細胞接着を容易にするタンパク質およびペプチド（環状バージョンが含まれる）；RGD型（Arg-Gly-Asp）およびGPR（Gly-Pro-Arg）など）；GHK型（Gly-His-Lys）など）；ラミニンまたはラミニンフラグメントなど；EIL型（Glu-Ile-Leu）など）；LDV型（Leu-Asp）、LDV-NH2（Leu-Asp-Val-NH2）など）；アミノ酸のRGDまたはGHK配列を含む合成ペプチド；オステオネクチンおよびSPARC（システインに富む酸性分泌タンパク質）；オステオポンチン；コラーゲン（I型およびII型）；フォンウィルブランド因子（構造への細胞の接着を容易にする糖タンパク質。これは、細胞に結合する能力を有し、したがって、骨芽細胞の細胞表面受容体のリガンドである可能性がある）；骨シアロタンパク質；トロンボスポンジン；オステオカルシン；サイトモジュリン（cytomodulin）；骨形成タンパク（BMP）；テネイシン；線維素溶解阻害因子；増殖因子（例えば、

10

20

30

40

50

血小板由来増殖因子 (PDGF)、インスリン様増殖因子 (IGF) など) ; 細胞表面成分 (例えば、 α -1) に対する抗体 ; インテグリン抗体 ; プラスミノージェンアクチベーターインヒビター (PAI) ; プロテアーゼインヒビター ; およびメタロプロテアーゼインヒビター) (上記説明では、以下の従来の表記法に従う : R = Arg、G = Gly、D = Asp、S = Ser、C = Cys、V = Val、E = Glu、A = Ala、P = Pro、K = Lys、T = Thr、Y = Tyr、Q = Gln、H = His、L = Leu、I = Ile、および F = Phe)。オステオプロテジェリン、インターロイキン、MMPインヒビター、グルカン、インテグリンアンタゴニスト、カルシトニン、プロトンポンプインヒビター、プロテアーゼインヒビター、ビスホスホネート、インスリン様増殖因子-1、血小板由来増殖因子、上皮増殖因子、トランスフォーミング増殖因子のインヒビター、トランスフォーミング増殖因子、骨形成タンパク質、副甲状腺ホルモン、オステオプロテジェリン、線維芽細胞増殖因子、ビタミンD、カルシウム、フッ化物、マグネシウム、またはホウ素、ビトロネクチン、プラスミノージェン活性化因子インヒビター、またはプロテアーゼ阻害薬 (メタロプロテアーゼ阻害剤など) が好ましい。薬剤がサイトカインまたはビスホスホネートであることがより好ましい。

【0103】

本明細書中で補助療法について使用される、用語「免疫抑制薬」は、本明細書中の治療をうける哺乳動物の免疫系を抑制またはマスキングするように作用する物質をいう。これには、サイトカイン産生を抑制し、自己抗原発現を下方制御するか抑制し、MHC抗原をマスキングする物質が含まれるであろう。このような薬剤の例には、2-アミノ-6-ア

20

リアル-5置換ピリジン (米国特許第4,665,077を参照のこと) ; 非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) ; ガンシクロビル、タクロリムス、糖質コルチコイド (コルチゾールまたはアルドステロンなど)、抗炎症薬 (シクロオキシゲナーゼインヒビター、5-リボキシゲナーゼインヒビター、またはロイコトリエン受容体アンタゴニスト ; プリン

30

アンタゴニスト (アザチオプリンまたはミコフェノール酸モフェチル (MMF) など) ; アルキル化薬 (シクロホスファミドなど) ; プロモクリプチン ; ダナゾール ; ダブソン ; グルタルアルデヒド (米国特許第4,120,649号に記載のようにMHC抗原をマスキングする) ; MHC抗原およびMHCフラグメントの抗イディオタイプ抗体 ; シクロスポリンA ; ステロイド (副腎皮質ステロイド、糖質コルチコイド、または糖質コルチコイドアナログ (例えば、プレドニゾン、メチルプレドニゾロン (SOLU-MEDROL (登録商標) メチルプレドニゾロンコハク酸ナトリウムが含まれる)、およびデキサメサゾンなど) ; ジヒドロ葉酸還元酵素インヒビター (メトトレキサート (経口または皮下) など) ; 抗マラリア薬 (クロロキンおよびヒドロキシクロロキンなど) ; スルファサラジン ; レフルノミド ; サイトカインまたはサイトカイン受容体抗体 (抗インターフェロン、

40

、または抗体が含まれる)、抗腫瘍壊死因子 (TNF) 抗体 (インフリキシマブ (REMICADE (登録商標)) またはアダリムマブ)、抗-TNF イムノアドヘシン (エタネルセプト)、抗TNF-抗体、抗インターロイキン2 (IL-2) 抗体および抗IL-2受容体抗体、ならびに抗-インターロイキン6 (IL-6) 受容体抗体およびアンタゴニスト ; 抗LFA-1抗体 (抗-CD11aおよび抗-CD18抗体が含まれる) ; 抗L3T4抗体 ; 異種抗リンパ球グロブリン ; pan-T抗体 (好ましくは、抗CD3または抗CD4/CD4a抗体) ; LFA-3結合ドメインを含む可溶性ペプチド (7/26/90に公開のWO90/08187号) ; ストレプトキナーゼ ; トランスフォーミング増殖因子 (TGF-) ; ストレプトドルナーゼ ; 宿主由来のRNAまたはDNA ; FK506 ; RS-61443 ; クロラムブシル ; デオキシスベルグアリン (deoxy spergualin) ; ラバマイシン ; T細胞受容体 (Cohenら、米国特許第5,114,721号) ; T細胞受容体フラグメント (Offnerら、Science, 251:430-432 (1991) ; WO90/11294号 ; Ianevay, Nature, 341:482 (1989) ; およびWO91/01133号) ; BAFFアンタゴニスト (BAFF抗体、BR3抗体、およびzTNF4アンタゴニスト (概説については、Mackay and Mackay, Trends Immunol., 2

50

3 : 1 1 3 - 5 (2 0 0 2) を参照のこと、以下の定義も参照のこと) ; T細胞ヘルパーシグナルを妨害する生物学的作用物質 (抗 C D 4 0 受容体または抗 C D 4 0 リガンド (C D 1 5 4) (C D 4 0 - C D 4 0 リガンドに対する遮断抗体が含まれる) など) (例えば、Durieら、Science, 261 : 1328 - 30 (1993) ; Mohanら、J. Immunol, 154 : 1470 - 80 (1995))、および C T L A 4 - I g (Finckら、Science, 265 : 1225 - 7 (1994)) ; ならびに T細胞受容体抗体 (欧州特許第 3 4 0 , 1 0 9 号) (T 1 0 B 9 など) が含まれる。本明細書中のいくつかの好ましい免疫抑制薬には、シクロホスファミド、クロラムブシル、アザチオプリン、レフルノミド、ミコフェノール酸モフェチル、またはメトトレキサートが含まれる。

10

【 0 1 0 4 】

本明細書中で使用される、用語「細胞傷害薬」は、細胞の機能を阻害または防止し、そして/または細胞の破壊を生じさせる物質をいう。この用語は、放射性同位体 (例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、および Lu の放射性同位体)、化学療法薬、および毒素 (細菌、真菌、植物もしくは動物起源、またはそのフラグメントの小分子毒素または酵素活性毒素など) が含まれることが意図される。

【 0 1 0 5 】

「化学療法薬」は、癌治療で有用な化合物である。化学療法薬の例には、アルキル化薬 (チオテパおよびシクロホスファミド (C Y T O X A N (登録商標)) ; スルホン酸アルキル (プスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファン (p i p o s u l f a n) ; アジリジン (ベンゾドーパ (b e n z o d o p a)、カルボコン、メツレドーパ (m e t u r e d o p a)、およびウレドーパ (u r e d o p a) ; エチレンイミンおよびメチルアメラミン (アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド (t r i e t h y l e n e p h o s p h o r a m i d e)、トリエチレンチオホスホルアミド (t r i e t h i y l e n e t h i o p h o s p h o r a m i d e)、およびトリメチロールオメラミン (t r i m e t h y l o l o m e l a m i n e) が含まれる) ; アセトゲニン (特に、プラタシン (b u l l a t a c i n) およびプラタシノン (b u l l a t a c i n o n e)) ; - 9 - テトラヒドロカンナビノール (ドロナビノール、M A R I N O L (登録商標)) ; - ラパコン ; ラパコール ; コルヒチン ; ベツリン酸 ; カンプトテシン (合成アナログであるトボテカン (H Y C A M T I N (登録商標) が含まれる)、C P T - 1 1 (イリノテカン、C A M P T O S A R (登録商標))、アセチルカンプトテシン (a c e t y l c a m p t o t h e c i n)、スコボレクチン (s c o p o l e c t i n)、および 9 - アミノカンプトテシンが含まれる) ; プリオスタチン ; カリスタチン (c a l l y s t a t i n) ; C C - 1 0 6 5 (そのアドゼレシン、カルゼレシン (c a r z e l e s i n)、およびピセレシン合成アナログが含まれる) ; ポドフィロトキシシン ; ポドフィリン酸 (p o d o p h y l l i n i c a c i d) ; テニボシド ; クリプトフィシン (c r y p t o p h y c i n) (特に、クリプトフィシン 1 およびクリプトフィシン 8) ; ドラストアチン ; デュオカルマイシン (合成アナログである K W - 2 1 8 9 および C B 1 - T M 1 が含まれる) ; エリュテロピン ; パンクラチスタチン (p a n c r a t i s t a t i n) ; サルコジクチン (s a r c o d i c t y i n) ; スポンギスタチン (s p o n g i s t a t i n) ; ナイトロジェンマスタード (クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド (c h o l o p h o s p h a m i d e)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビキン (n o v e m b i c h i n)、フェネステリン (p h e n e s t e r i n e)、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなど) ; ニトロソ尿素 (n i t r o s u r e a s) (カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムヌスチン (r a n i m n u s t i n e) など) ; 抗生物質 (エンジン抗生物質 (例えば、カリチアマイシン、特に、カリチアマイシン I I およびカリチアマイシン I 1 (例えば、Angew, Chem Int'l. Ed. E

20

30

40

50

ngl, 33:183-186(1994)を参照のこと);ジネマイシン(dynem
ic in)(ジネマイシンAが含まれる);エスペラミシン;およびネオカルチノスタチ
ン発色団および関連色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン、
アクチノマイシン、オースラマイシン(authr amycin)、アザセリン、ブレオ
マイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabi
cin)、カルミノマイシン(carminomycin)、カルジノフィリン(car
zinophilin)クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビ
シン(detorubicin)6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソ
ルビシン(ADRIAMYCIN(登録商標)、モルフォリノ-ドキシソルビシン、シアノモ
ルホリノ-ドキシソルビシン、2-ピロリノ-ドキシソルビシン、ドキシソルビシンHClリボ
ソーム注射液(DOXIL(登録商標))、およびデオキシドキシソルビシンが含まれる)
、エビルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダルビシン、マルセロマイ
シン(marcellomycin)、マイトマイシン(マイトマイシンCなど)、ミコ
フェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン
(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシ
ン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン
など);代謝拮抗薬(メトトレキサート、ゲムシタピン(GEMZAR(登録商標))、
テガフル(UFTORAL(登録商標))、カベシタピン(XELODA(登録商標))
、エボシロン、および5-フルオロウラシル(5-FU)など);葉酸アナログ(デノ
プテリン(denopter in)、メトトレキサート、プテロプテリン(pterop
ter in)、トリメトレキセートなど);プリンアナログ(フルダラビン、6-メルカ
プトプリン、チアミプリン(thiamiprine)、チオグアニンなど);ピリミジ
ンアナログ(アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビ
ン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジンなど);
抗副腎薬(アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど);葉酸補給薬(repl
enisher)(フロリン酸(frolinic acid);アセグラトン;アルド
ホスファミド配糖体;アミノレプリン酸;エニルラシル(eniluracil);アム
サクリン;ベストラブシル(bestrabucil);ビスアントレン(bisantr
ene);エダトラキサート(edatraxate);デホファミン(defofam
ine);デメコルチン;ジアジクオン(diaziquone);エルホルニチン(e
lfor nithine);酢酸エリプチニウム(elliptinium acetate);
エトグルシド;硝酸ガリウム;ヒドロキシ尿素;レンチナン;ロニダニン(lon
idainine);メイタンシノイド(メイタンシン(maytansine)およ
びアンサミトシン(ansamitocins);ミトグアゾン;ミトキサントロン;モ
ピダンモール(mopidanmol);ニトラエリン(nitraerine);ペン
トスタチン;フェナメット(phenamet);ピラルビシン;ロソキサントロン(los
oxantrone);2-エチルヒドラジン;プロカルバジン;PSK(登録商標)
ポリサッカリド複合体(JHS Natural Products, Eugene,
OR);ラゾキサン(razoxane);リゾキシン;シゾフィラン;スピロゲルマニ
ウム;テヌアゾン酸;トリアジコン;2,2',2"-トリクロロトリエチルアミン;ト
リコテシン(特に、T-2毒素、ベラクリンA(verracur in A)、ロリジン
A、およびアングイジン(anguidine));ウレタン;ビンデシン(ELDIS
INE(登録商標)、FILDESIN(登録商標));ダカルバジン;マンノムスチン
(mannomustine);ミトプロニトール;ミトラクトール(mitolact
ol);ピボプロマン;ガシトシン(gacytosine);アラビノシド(「Ara
-C」);チオテパ;タキソイド(例えば、パクリタキセル(TAXOL(登録商標))
、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子処方物(ABRAXANE(商標))、およ
びドキシタキセル(doxetaxel)(TAXOTERE(登録商標));クロラム
ブシル;6-チオグアニン;メルカプトプリン;メトトレキサート;白金アナログ(シス

10

20

30

40

50

プラチンおよびカルボプラチンなど)；ビンブラスチン(V E L B A N (登録商標))；白金；エトポシド(V P - 1 6)；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン(O N C O V I N (登録商標))；オキサリプラチン；ロイコボビン(l e u c o v o v i n)；ピノレルビン(N A V E L B I N E (登録商標))；ノバントロン；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼインヒビターR F S 2 0 0 0；ジフルオロメチルオルニチン(D M F O)；レチノイド(レチノイン酸など)；上記のいずれかの薬剂的に容認可能な塩、酸、または誘導体、ならびに2つまたはそれを超える上記の組み合わせ(C H O P (シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、およびプレドニゾロンの併用療法の略語)およびF O L F O X (5 - F Uおよびロイコボビンと組み合わせたオキサリプラチン(E L O X A T I N (商標))を使用した治療レジメンの略語)など)が含まれる。

10

【0106】

癌の成長を促進することができるホルモンの影響を調節、減少、遮断、または阻害するように作用する抗ホルモン薬も本定義に含まれ、これは、しばしば全身(すなわち、身体全体の)治療形態である。これらは、ホルモン自体であり得る。例には、抗エストロゲン薬および選択的エストロゲン受容体調節物質(S E R M) (例えば、タモキシフェン(N O L V A D E X (登録商標)タモキシフェンが含まれる)、ラロキシフェン(E V I S T A (登録商標))、ドロキシフェン、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストン(o n a p r i s t o n e)、およびトレミフェン(F A R E S T O N (登録商標)が含まれる)；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体下方制御因子(E R D)；エストロゲン受容体アンタゴニスト(フルベストラント(F A S L O D E X (登録商標)など)；卵巣を抑制するか遮断するように機能する薬剤(例えば、黄体形成(l e u t i n i z i n g)ホルモン放出ホルモン(L H R H)アゴニスト(酢酸リュープロリド(L U P R O N (登録商標)およびE L I G A R D (登録商標))、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン、およびトリプテレリン(t r i p t e r e l i n)；抗アンドロゲン(フルタミド、ニルタミド、およびビカルタミドなど)；ならびに酵素アロマターゼを阻害し、副腎におけるエストロゲン産生を調節するアロマターゼインヒビター(例えば、4 (5)イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール(M E G A S E (登録商標))、エキセメスタン(A R O M A S I N (登録商標))、ホルメスタニイ(f o r m e s t a n i e)、ファドロゾール、ボロゾール(R I V I S O R (登録商標))、レトロゾール(F E M A R A (登録商標))、およびアナストロゾール(A R I M I D E X (登録商標)など)が含まれる。さらに、化学療法薬のこのような定義には、ビスホスホネート(クロドロネ酸(例えば、B O N E F O S (登録商標)またはO S T A C (登録商標))、エチドロネート(D I D R O C A L (登録商標))、N E - 5 8 0 9 5、ゾレドロネ酸/ゾレドロネート(Z O M E T A (登録商標))、アレンドロネート(F O S A M A X (登録商標))、パルミドロネート(A R E D I A (登録商標))、チルドロネート(S K E L I D (登録商標))、またはリセドロネート(A C T O N E L (登録商標))など)；ならびにトロキサシタビン(t r o x a c i t a b i n e) (1, 3 - ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ)；アンチセンスオリゴヌクレオチド(特に異常な細胞増殖に関与するシグナル伝達経路中の細胞発現を阻害するもの(例えば、P K C - 、R a f、H - R a s、および上皮増殖因子受容体(E G F - R)など)；ワクチン(T H E R A T O P E (登録商標)ワクチンおよび遺伝子治療ワクチン(例えば、A L L O V E C T I N (登録商標)ワクチン、L E U V E C T I N (登録商標)ワクチン、およびV A X I D (登録商標)ワクチンなど)；トポイソメラーゼ1インヒビター(例えば、L U R T O T E C A N (登録商標))；r m R H (例えば、A B A R E L I X (登録商標))；ジトシル酸ラパチニブ(E r b B - 2およびG W 5 7 2 0 1 6としても公知のE G F R二重チロシンキナーゼ小分子インヒビター)；上記のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸、または誘導体が含まれる。

20

30

40

【0107】

用語「サイトカイン」は、ある細胞集団によって放出される細胞間メディエーターとし

50

て別の細胞に作用するタンパク質の一般名である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、インターロイキン（IL）（IL - 1、IL - 1_α、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 11、IL - 12、IL - 15（PROLEUKIN（登録商標）rIL - 2、ヒトIL - 4、ヒトIL - 4の変異体（例えば、IL - 2R_βへの結合に關与するIL - 4領域が変異した（例えば、Arg 21がGlu残基に変化する）変異体など）が含まれる）、腫瘍壊死因子（TNF - αまたはTNF - β など）、ならびに他のポリペプチド因子（LIFおよびキットリガンド（KL）が含まれる）である。本明細書中で使用される、用語「サイトカイン」には、天然供給源または組換え細胞培養物由来のタンパク質および未変性配列サイトカインの生物学的に活性な等価物（合成によって産生された小分子構成要素（e n t i t y）およびその薬学的に許容可能な誘導体および塩が含まれる）が含まれる。

10

【0108】

用語「ホルモン」は、一般に、管を有する腺器官によって分泌されるポリペプチドホルモンをいう。そのうち、例えば、ホルモン（成長ホルモン（ヒト成長ホルモン、N - メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンなど）；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインシュリン；リラキシン；エストラジオール；ホルモン補充療法薬；アンドロゲン（カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、またはテストラクトンなど）；プロレラキシン（prorelaxin）；糖タンパク質ホルモン（卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、および黄体形成ホルモン（LH）など）；プロラクチン、胎盤ラクトゲン、マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド、性腺刺激ホルモン放出ホルモン；インヒビン；アクチビン；ミューラー管阻害物質；およびトロノボポエチン）が含まれる。本明細書中で使用される、用語「ホルモン」には、天然供給源または組換え細胞培養物由来のタンパク質および未変性配列サイトカインの生物学的に活性な等価物（合成によって産生された小分子構成要素およびその薬学的に許容可能な誘導体および塩が含まれる）が含まれる。

20

【0109】

用語「増殖因子」は、成長を促進するタンパク質をいい、例えば、肝臓増殖因子；線維芽細胞増殖因子；血管内皮増殖因子；神経増殖因子（NGF - α など）；血小板由来増殖因子；トランスフォーミング増殖因子（TGF）（TGF - α およびTGF - β など）；インスリン様増殖因子 - Iおよび - II；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン（インターフェロン α、β、γ、およびδ など）；およびコロニー刺激因子（CSF）（マクロファージ - CSF（M - CSF）など）；顆粒球 - マクロファージ - CSF（GM - CSF）；および顆粒球 - CSF（G - CSF）が含まれる。本明細書中で使用される、用語「増殖因子」には、天然供給源または組換え細胞培養物由来のタンパク質および未変性配列サイトカインの生物学的に活性な等価物（合成によって産生された小分子構成要素およびその薬学的に許容可能な誘導体および塩が含まれる）が含まれる。

30

【0110】

用語「インテグリン」は、細胞を細胞外基質に結合して応答させる受容体タンパク質をいい、種々の細胞機能（創傷治癒、細胞の分化、腫瘍細胞の帰巢（homing）、およびアポトーシスなど）に關与する。これらは、細胞 - 細胞内基質相互作用および細胞 - 細胞相互作用に關与する巨大な細胞接着受容体ファミリーの一部である。機能的インテグリンは、α および β と呼ばれる非共有結合した2つの膜貫通糖タンパク質サブユニットからなる。サブユニットは、全て、互いにいくらかの相同性を共有し、サブユニットも同様である。受容体は、常に、1つの α 鎖および1つの β 鎖を含む。例には、α₆β₁、α₃β₁、α₇β₁、LFA - 1などが含まれる。本明細書中で使用される、用語「インテグリン」には、天然供給源または組換え細胞培養物由来のタンパク質および未変性配列サイトカインの生物学的に活性な等価物（合成によって産生された小分子構成要素およびその薬学的に許容可能な誘導体および塩が含まれる）が含まれる。

40

【0111】

本明細書中の目的のために、「腫瘍壊死因子（TNF - α）」は、P e n n i c a ら

50

、Nature, 312:721 (1984) または Aggarwal ら、JBC, 260:2345 (1985) に記載のアミノ酸配列を含むヒトTNF- α をいう。本明細書中の「TNF- α インヒビター」は、一般に、TNF- α への結合およびその活性の中和によってTNF- α の生物学的機能をいくらかの範囲で阻害する薬剤である。本明細書中で特に意図されるTNFインヒビターの例には、エタネルセプト(ENBREL (登録商標))、インフリキシマブ(REMICADE (登録商標))、およびアダリムマブ(HUMIRA (商標))が含まれる。

【0112】

「疾患修飾性抗リウマチ薬」または「DMARD」の例には、ヒドロキシクロロキン(hydroxychloroquine)、スルファサラジン、メトトレキサート、レフルノミド、エタネルセプト、インフリキシマブ(+経口および皮下メトトレキサート)、アザチオプリン、D-ペニシラミン、金塩(経口)、金塩(筋肉内)、ミノサイクリン、シクロスポリ(シクロスポリンAおよび局所シクロスポリンが含まれる)、ブドウ球菌タンパク質A(Goodyear and Silverman, J. Exp. Med., 197, (9), p1125-39 (2003)) (その塩および誘導体が含まれる)が含まれる。

【0113】

「非ステロイド性抗炎症薬」または「NSAID」の例には、アスピリン、アセチルサリチル酸、イブプロフェン、ナプロキセン、インドメタシン、スリダク、トルメチン、COX-2インヒビター(セレコキシブ(CELEBREX (登録商標)); 4-(5-(4-メチルフェニル)-3-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾール-1-イル)ベンゼンスルホンアミドおよびバルデコキシブ(BEXTRA (登録商標)など)、およびメロキシカム(MOBIC (登録商標)) (その塩および誘導体など)が含まれる。好ましくは、これらは、アスピリン、ナプロキセン、イブプロフェン、インドメタシン、またはトルメチンである。

【0114】

本明細書中の「インテグリンアンタゴニストまたは抗体」の例には、LFA-1抗体(Genentechから市販されているエファリズマブ(RAPTIVA (登録商標)など)、Biogen Idecから市販されている4インテグリン抗体(ナタリズマブ(TYSABRI (登録商標)など)、またはジアザ環状フェニルアラニン誘導体(WO 2003/89410号)、フェニルアラニン誘導体(WO 2003/70709号、WO 2002/28830、WO 2002/16329号、およびWO 2003/53926)、フェニルプロピオン酸誘導体(WO 2003/10135号)、エナミン誘導体(WO 2001/79173号)、プロパン酸誘導体(WO 2000/37444号、アルカン酸誘導体(WO 2000/32575号)、置換フェニル誘導体(米国特許第6,677,339号および同第6,348,463号)、芳香族アミン誘導体(米国特許第6,369,229号)、ADAMディスプレインテグリンドメインポリペプチド(US 2002/0042368号)、3インテグリンに対する抗体(欧州特許第633945号)、アザ架橋二環式アミノ酸誘導体(WO 2002/02556号)などが含まれる。

【0115】

「コルチコステロイド」は、ステロイドの一般的な化学構造を有し、天然に存在するコルチコステロイドの効果を模倣するか増大させるいくつかの合成または天然に存在する物質のいずれか1つをいう。合成コルチコステロイドの例には、プレドニゾン、プレドニゾン(メチルプレドニゾン(SOLU-MEDROL (登録商標)コハク酸ナトリウムメチルプレドニゾンなどが含まれる)、デキサメサゾンまたはデキサメサゾントリウムシノロン、ヒドロコルチゾン、およびベタメタゾンが含まれる。本明細書中の好ましいコルチコステロイドは、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、ヒドロコルチゾン、またはデキサメサゾンである。

【0116】

用語「BAFF」、「BAFFポリペプチド」、「TALL-1」、または「TALL

10

20

30

40

50

「１ポリペプチド」、および「B L y S」は、本明細書中で使用する場合、「未変性配列 B A F F ポリペプチド」および「B A F F 変異型」を含む。「B A F F」は、以下に示すアミノ酸配列のいずれか１つを有するポリペプチドに与えられた名称である。

【 0 1 1 7 】

【 化 1 2 】

ヒト BAFF 配列 (配列番号16) :

```

1
MDDSTEREQSRLTSCCLKREEMKLKECVSILPRKESPSVRSSKDGKLLAATLLLLALLSCC
61
LTVVSFYQVAALQGD LASLRAELQGHHA EKLPAGAGAPKAGLEEAPAVTAGLKIFEPPAP
121
GEGNSSQNSRNKRAVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAL EE
181
KENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGH LIQRKKVHVFGDELSLVTLFR CIQNMPETL
241
PNNSCYSAGIAKLEEGDELQ LAIPRENAQISLDG DVTFFGALKLL

```

10

マウス BAFF 配列 (配列番号17) :

```

1
MDESAKTLPPFCLFCFCSEKGEDMKVGYDPITPQKEEGAWFGICRDGRLLAATLLLLALLSS
61
SFTAMSLYQLAALQADLMNLRMELQSYRGSATPAAAGAPELTAGVKLLTPAAPRPHNSSR
121
GHRNRRAFQGPETE QDVDLSAPPAPCLPGCRHSQHDDNGMNLRNIIQDCLQLIADSDTP
181
TIRKGTYTTFVPWLLSFKRGNAL EEKENKIVVRQTGYFFIYSQVLYTDPIFAMGHV IQRKK
241
VHVFGDELSLVTLFR CIQNMPKTL PNNSCYSAGIARLEEGDEIQLAIPRENAQISRNGDD
301
TFFGALKLL

```

20

および未変性の B A F F の生物活性を有するそのホモログ、フラグメント、および変異型。B A F F の生物活性を、B 細胞生存の促進、B 細胞変異の促進、および B R 3 への結合からなる群から選択することができる。B A F F の変異型は、好ましくは、B A F F ポリペプチドの未変性配列と少なくとも 80 % または 100 % まで (100 % を含む) の任意の連続する整数、より好ましくは、少なくとも 90 %、さらにより好ましくは、少なくとも 95 % のアミノ酸配列が同一である。

30

【 0 1 1 8 】

「未変性配列」B A F F ポリペプチドは、天然由来の対応する B A F F ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。例えば、B A F F は、フリン型プロテアーゼによる細胞表面からの切断後の可溶性形態で存在する。このような未変性配列 B A F F ポリペプチドを、自然界から単離するか、組換え手段および/または合成手段によって産生することができる。

40

【 0 1 1 9 】

用語「未変性配列 B A F F ポリペプチド」または「未変性 B A F F」は、特に、天然に存在する短縮形態または分泌形態 (例えば、細胞外ドメイン配列)、天然に存在する変異形態 (例えば、選択的スプライシング形態)、およびポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子変異型を含む。用語「B A F F」には、Shu ら、J . L e u k o c y t e B i o l . , 6 5 : 6 8 0 (1 9 9 9) ; G e n B a n k アクセッション番号 A F 1 3 6 2 9 3 ; 1 9 9 8 年 3 月 7 日公開の W O 1 9 9 8 / 1 8 9 2 1 号 ; 1 9 9 8 年 1 0 月 7 日公開の欧州特許第 8 6 9 , 1 8 0 号 ; 1 9 9 8 年 6 月 2 5 日公開の W O 1 9 9 8 / 2 7 1 1 4 号 ; 1 9 9 9 年 3 月 1 8 日公開の W O 1 9 9 9 / 1 2 9 6 4 号 ; 1 9 9 9 年 7 月 8 日公開の W O 1 9 9 9 / 3 3 9 8 0 号 ; M o o r e ら、S c i e n c e , 2 8 5 : 2 6 0 - 2 6

50

3 (1 9 9 9) ; S c h n e i d e r ら、J . E x p . M e d . , 1 8 9 : 1 7 4 7 - 1 7 5 6 (1 9 9 9)、およびM u k h o p a d h y a y ら、J . B i o l . C h e m . , 2 7 4 : 1 5 9 7 8 - 1 5 9 8 1 (1 9 9 9) に記載のポリペプチドが含まれる。

【 0 1 2 0 】

本明細書中で使用される、用語「B A F F アントゴニスト」を最も広い意味で使用し、(1) 未変性配列B A F F ポリペプチドに結合するかB R 3 の未変性配列に結合してB A F F ポリペプチドとのB R 3 の相互作用を部分的または完全に遮断し、(2) 未変性配列B A F F 活性を部分的または完全に遮断、阻害、または中和する任意の分子が含まれる。1 つの好ましい実施形態では、遮断すべきB A F F 受容体は、B R 3 受容体である。未変性のB A F F 活性は、特に、B 細胞の生存および/またはB 細胞の成熟を促進する。1 つの実施形態では、B A F F の阻害、遮断、または中和により、B 細胞数が減少する。本発明のB A F F アントゴニストは、B A F F ポリペプチドの1 つまたは複数の生物活性を、インビトロおよび/またはインビボで部分的または完全に遮断、阻害、または中和する。1 つの実施形態では、生物活性B A F F は、以下の事象のいずれか1 つまたは組み合わせをインビトロおよび/またはインビボで強化する：B 細胞生存の増加、I g G および/またはI g M レベルの増加、形質細胞数の増加、および脾臓B 細胞中でのN F - κ b 2 / 1 0 0 のp 5 2 N F - κ b へのプロセッシング(例えば、B a t t e n ら、J . E x p . M e d . 1 9 2 : 1 4 5 3 - 1 4 6 5 (2 0 0 0) ; M o o r e ら、S c i e n c e 2 8 5 : 2 6 0 - 2 6 3 (1 9 9 9) ; K a y a g a k i ら、I m m u n i t y 1 7 : 5 1 5 - 5 2 4 (2 0 0 2))。

10

20

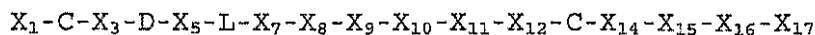
【 0 1 2 1 】

上記のように、B A F F アントゴニストは、B A F F シグナル伝達をインビトロまたはインビボで部分的または完全に遮断、阻害、または中和するための直接的または間接的様式で機能することができる。例えば、B A F F アントゴニストは、B A F F に直接結合することができる。例えば、抗体がB R 3 へのB A F F 結合を立体障害するような残基1 6 2 ~ 2 7 5 および/またはヒトB A F F の1 6 2、1 6 3、2 0 6、2 1 1、2 3 1、2 3 3、2 6 4、および2 6 5 からなる群から選択される残基の隣接残基を含むヒトB A F F 領域内で結合するB A F F 抗体が意図され、このような残基番号を配列番号1 6 という。別の例では、直接的な結合剤(b i n d e r) は、未変性のB A F F に結合するB A F F 受容体の細胞外ドメインまたはそのフラグメントおよび変異型などのB A F F に結合するB A F F 受容体の任意の部分を含むポリペプチドである。別の例では、B A F F アントゴニストには、式 I :

30

【 0 1 2 2 】

【 化 1 3 】



(式 I) (配列番号18)

(式中、X 1、X 3、X 5、X 7、X 8、X 9、X 1 0、X 1 1、X 1 2、X 1 4、X 1 5、およびX 1 7 は、システイン以外の任意のアミノ酸であり、X 1 6 は、L、F、I、およびV からなる群から選択されるアミノ酸であり、ポリペプチドは、式 I の最もN 末端側のシステインC に対してN 末端側および最もC 末端側のシステインC に対してC 末端側の7 つのアミノ酸残基内にシステインを含まない) の配列を含むポリペプチド配列を有するポリペプチドが含まれる。

40

【 0 1 2 3 】

1 つの実施形態では、式 I の配列を含むポリペプチドは、ジスルフィド結合によって連結した2 つのC を有し、X 5 L X 7 X 8 は、L とX 7 との間にターンの中心を有するI 型ターン構造の高次構造を形成し、X 8 の二面角 ϕ が正の数値を有する。1 つの実施形態では、X 1 0 は、W、F、V、L、I、Y、M、および非極性アミノ酸からなる群から選択される。別の実施形態では、X 1 0 は、W である。別の実施形態では、X 3 は、M、V、L、I、Y、F、W、および非極性アミノ酸からなる群から選択される。別の実施形態で

50

は、 X_5 は、V、L、P、S、I、A、および R からなる群から選択される。別の実施形態では、 X_7 は、V、T、I、および L からなる群から選択される。別の実施形態では、 X_8 は、R、K、G、N、H、および D 型アミノ酸からなる群から選択される。別の実施形態では、 X_9 は、H、K、A、R、および Q からなる群から選択される。別の実施形態では、 X_{11} は、I または V である。別の実施形態では、 X_{12} は、P、A、D、E、および S からなる群から選択される。別の実施形態では、 X_{16} は、L である。1 つの特定の実施形態では、式 I の配列は、E C F D L L V R A W V P C S V L K (配列番号 19)、E C F D L L V R H W V P C G L L R (配列番号 20)、E C F D L L V R R W V P C E M L G (配列番号 21)、E C F D L L V R S W V P C H M L R (配列番号 22)、E C F D L L V R H W V A C G L L R (配列番号 23)、および Q C F D R L N A W V P C S V L K (配列番号 24) からなる群から選択される。好ましい実施形態では、B A F F アンタゴニストは、配列番号 19、20、21、22、および 23 からなる群から選択されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含む。

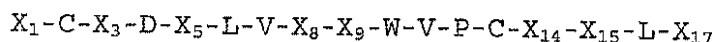
10

【0124】

さらに別の実施形態では、B A F F アンタゴニストには、以下の式 I I :

【0125】

【化14】



(式 II) (配列番号 25)

20

(式中、 X_1 、 X_3 、 X_5 、 X_8 、 X_9 、 X_{14} 、 X_{15} 、および X_{17} は、システイン以外の任意のアミノ酸であり、ポリペプチドは、式 I I の最も N 末端側のシステイン C に対して N 末端側および最も C 末端側のシステイン C に対して C 末端側の 7 つのアミノ酸残基内にシステインを含まない) の配列を含むポリペプチドの配列を有するポリペプチドが含まれる。

【0126】

1 つの実施形態では、式 I I の配列を含むポリペプチドは、2 つの C の間にジスルフィド結合を有し、 X_5 L X_7 X_8 は、L と X_7 との間にターンの中心を有する I 型 ターン構造の高次構造を形成し、 X_8 の二面角 が正の数値を有する。式 I I の別の実施形態では、 X_3 は、M、A、V、L、I、Y、F、W、および非極性アミノ酸からなる群から選択される。式 I I の別の実施形態では、 X_5 は、V、L、P、S、I、A、および R からなる群から選択される。式 I I の別の実施形態では、 X_8 は、R、K、G、N、H、および D 型アミノ酸からなる群から選択される。式 I I の別の実施形態では、 X_9 は、H、K、A、R、および Q からなる群から選択される。

30

【0127】

さらなる実施形態では、細胞外ドメインまたはその B A F F 結合フラグメントもしくは B A F F 結合変異型が由来する B A F F 受容体は、T A C I、B R 3、または B C M A である。あるいは、B A F F アンタゴニストは、その B A F F 結合領域で未変性配列 B R 3 の細胞外ドメインに結合して、インビトロ、インサイチュ、またはインビボで B R 3 を部分的または完全に遮断、阻害、または中和することができる。例えば、このような間接的アンタゴニストは、ヒト B R 3 の B A F F への結合が立体障害されるように、下記に定義のヒト B R 3 (配列番号 26) の残基 23 ~ 38 を含む B R 3 領域またはこれらの残基の隣接領域中に結合する抗 B R 3 抗体である。

40

【0128】

いくつかの実施形態では、本発明の B A F F アンタゴニストには、B A F F 受容体の細胞外ドメインを含む B A F F タンパク質およびイムノアドヘシンまたは未変性の B A F F に結合するそのフラグメントおよび変異型が含まれる。さらなる実施形態では、細胞外ドメインまたはその B A F F 結合フラグメントもしくは B A F F 結合変異型が由来する B A F F 受容体は、T A C I、B R 3、または B C M A である。さらに別の実施形態では、イムノアドヘシンは、上記の式 I または式 I I のアミノ酸配列を含む (配列番号 19、20

50

、21、22、23、および24からなる群のいずれか1つから選択されるアミノ酸配が含まれる)。

【0129】

1つの実施形態によれば、BAFFアンタゴニストは、100nMまたはそれ未満の結合親和性でBAFFポリペプチドまたはBR3ポリペプチドに結合する。別の実施形態によれば、BAFFアンタゴニストは、10nMまたはそれ未満の結合親和性でBAFFポリペプチドまたはBR3ポリペプチドに結合する。さらに別の実施形態によれば、BAFFアンタゴニストは、1nMまたはそれ未満の結合親和性でBAFFポリペプチドまたはBR3ポリペプチドに結合する。

【0130】

用語「BR3」、「BR3ポリペプチド」、または「BR3受容体」は、本明細書中で使用する場合、「未変性配列BR3ポリペプチド」および「BR3変異型」を含む(本明細書中でさらに定義する)。「BR3」は、以下のアミノ酸配列およびそのホモログを含むポリペプチドおよび未変性BAFFに結合するその変異型またはフラグメントに与えられた名称である。

【0131】

【化15】

ヒトBR3配列(配列番号26)：

```
1
MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQ
61
ESVGAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLALVLVGLVSWRRRQRRLRGASSAEAPDGD
121
KDAPEPLDKVILSPGISDATAPAWPPPGEDPGTTPPGHSVPVPATELGSTELVTTKTAG
181
PEQQ
```

本発明のBR3ポリペプチドを、種々の供給源(ヒト組織型など)または別の供給源から単離するか、組換え法および/または合成法によって調製することができる。用語BR3には、WO2002/24909号およびWO2003/14294号に記載のBR3ポリペプチドが含まれる。

【0132】

「未変性配列」BR3ポリペプチドまたは「未変性BR3」は、天然由来の対応するBR3ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。このような未変性配列BR3ポリペプチドを、自然界から単離するか、組換え手段および/または合成手段によって産生することができる。用語「未変性配列BR3ポリペプチド」は、特に、天然に存在する短縮形態または分泌形態(例えば、細胞外ドメイン配列)、天然に存在する変異形態(例えば、選択的スプライシング形態)、およびポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子変異型を含む。本発明のBR3ポリペプチドには、ヒトBR3(配列番号26)のアミノ酸残基1~184の連続配列を含むか、これらからなるBR3ポリペプチドが含まれる。

【0133】

BR3「細胞外ドメイン」または「ECD」は、本質的に膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含まないBR3ポリペプチド形態をいう。BR3のECD形態には、ヒトBR3のアミノ酸1~77、2~62、2~71、1~61、7~71、23~38、および2~63からなる群から選択されるアミノ酸配列のいずれか1つを含むポリペプチドが含まれる。本発明は、未変性BAFFに結合するヒトBR3の上記のECD形態ならびにその変異形およびフラグメントのいずれか1つを含むポリペプチドであるBAFFアンタゴニストを意図する。

【0134】

ミニBR3は、BR3のBAFF結合ドメインの26残基コア領域である(すなわち、

10

20

30

40

50

アミノ酸配列：T P C V P A E C F D L L V R H C V A C G L L R T P R (配列番号 27)。

【0135】

「BR3変異型」は、未変性配列、全長BR3、またはBR3ECDのアミノ酸配列と少なくとも80%のアミノ酸が同一であるBR3ポリペプチドを意味する。任意選択的に、BR3変異型は、1つのシステインリッチドメインを含む。このようなBR3変異型ポリペプチドには、例えば、全長アミノ酸配列のN末端および/またはC末端ならびに1つまたは複数の内部ドメイン内で1つまたは複数のアミノ酸残基が付加または欠失されたBR3ポリペプチドが含まれる。未変性配列BAFFポリペプチドに結合するBR3ECDのフラグメントも意図される。1つの実施形態によれば、BR3変異ポリペプチドは、ヒトBR3ポリペプチドまたはその特定のフラグメント(例えば、ECD)と少なくとも約80%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約81%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約82%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約83%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約84%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約85%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約86%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約87%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約88%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約89%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約90%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約91%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約92%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約93%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約94%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約95%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約96%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約97%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約98%のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約99%のアミノ酸配列が同一である。BR3変異ポリペプチドは、未変性BR3ポリペプチド配列を含まない。別の実施形態によれば、BR3変異ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸長、少なくとも約20アミノ酸長、少なくとも約30アミノ酸長、少なくとも約40アミノ酸長、少なくとも約50アミノ酸長、少なくとも約60アミノ酸長、または少なくとも約70アミノ酸長である。

【0136】

1つの好ましい実施形態では、本明細書中のBAFFアンタゴニストは、BAFFに結合するBR3、TACI、またはBCMAの一部またはBAFFに結合するその変異型を含むイムノアドヘシンである。他の実施形態では、BAFFアンタゴニストは、BAFF抗体である。「BAFF抗体」は、BAFFに結合し、好ましくは、本明細書中の「BAFF」の定義で開示のヒトBAFF配列(配列番号16)の残基162~275を含むヒトBAFF領域内のBAFFに結合する抗体である。別の実施形態では、BAFFアンタゴニストは、BR3抗体である。「BR3抗体」は、BR3に結合し、好ましくは、本明細書中の「BAFF」の定義で開示のヒトBR3配列(配列番号26)の残基23~38を含むヒトBR3領域内のBR3に結合する抗体である。一般に、本明細書中で言及したヒトBAFFおよびヒトBR3のアミノ酸の位置は、本明細書中の「BAFF」および「BR3」の定義に開示のヒトBAFFおよびヒトBR3の配列番号付け(それぞれ、配列番号16および26)に従う。

【0137】

BAFF結合ポリペプチドまたはBAFF抗体の他の例を、例えば、WO2002/092620号、WO2003/014294号、Gordonら、Biochemist ry 42(20):5977-5983(2003)、Kelleyら、J. Biol. Chem., 279(16):16727-16735(2004)、WO1998/18921号、WO2001/12812号、WO2000/68378号、およびWO2000/40716号に見出すことができる。

【0138】

「リポソーム」は、哺乳動物への薬物(本明細書中に開示のアンタゴニストなど)の送達に有用な種々の脂質型、リン脂質型、および/または界面活性剤型から構成される小胞

10

20

30

40

50

である。リボソーム成分は、一般に、生体膜の脂質配置に類似の二重層形態で配置されている。

【0139】

本明細書中で使用される、用語「骨障害」は、骨量減少によって特徴づけられる疾患（すなわち、症状または病状として骨量または骨密度が減少する疾患、容態、障害、または症状）をいう。骨量減少によって特徴づけられる疾患の例には、骨溶解（骨の転移、非感染性の人工関節のゆるみ（aseptic prosthetic loosening）、歯周炎、骨粗鬆症、パジェット病、転移性骨疾患、および関節リウマチが含まれるが、これらに限定されない。このような骨障害には、狼瘡および関節リウマチなどの自己免疫疾患に関連する骨障害が含まれる。SLEは、従来のコルチコステロイド使用状態と無関係に、SLE疾患の損傷が増加していない女性よりも骨ミネラル濃度Tスコアが有意に低いことが見出されている。このような骨障害には、低骨量に関連する容態（骨量レベルが、World Health Organization "Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis (1994). Report of a World Health Organization Study Group. World Health Organization Technical Series 843" によって標準と定義された年齢別正常値未満である容態が含まれる）も含まれる。原発性および続発性骨粗鬆症が低骨量に関連する容態に含まれる。歯周病、歯槽骨喪失、骨切り術後および幼児期特発性骨量減少、ならびに骨粗鬆症の長期合併症（脊椎の湾曲、身長損失、および補綴手術も含まれる。このような骨障害は、上記などの疾患（骨粗鬆症が含まれる）の平均的発症率を有意に高いことが公知の低骨量の者（脊椎動物（例えば、哺乳動物）など）（例えば、閉経後の女性、50歳を超える男性）に影響を与え得る。この障害を、骨量増加法または骨量増強法（骨吸収、骨折治癒速度の増加、完全な置換骨移植片手術、首尾に良い骨移植率の増加、顔面再建術、上顎骨再建術、下顎骨再建術、補綴内方成長（prosthetic ingrowth）、椎骨融合症、または長骨伸長後の骨治癒が含まれる）を使用して治療することができる。当業者は、用語骨量が実際に単位面積あたりの骨量をいい、時折（厳密には正確ではないが）、骨ミネラル濃度をいうと認識している。

10

20

30

【0140】

本明細書中に開示の骨障害の例には、骨粗鬆症（原発性および続発性骨粗鬆症など、糖質コルチコイド誘導性骨粗鬆症が含まれる）、限局性骨侵食または骨疾患（関節リウマチ由来のものなど、辺縁性継手びらんおよび肋軟骨下骨侵食（骨髄）が含まれる）、パジェット病、骨欠損、骨代謝回転の異常な増加、歯周病、歯牙欠損、人工挿入物周囲骨溶解、骨形成不全症、転移性骨疾患、悪性高カルシウム血症、幼児期特発性骨量減少、歯槽骨喪失、骨折、骨減少症（関節近接骨減少症など）、多発性骨髄腫における骨疾患および関連容態（ワルデンシュトレームマクログロブリン血症および/または単クローン性 グロブリン血症など）が含まれる。本明細書中の好ましい骨障害は、多発性骨髄腫における骨疾患、マクログロブリン血症（macroglobulinemia）、単クローン性 グロブリン血症、および骨粗鬆症、より好ましくは、続発性骨粗鬆症、さらにより好ましくは、炎症時の骨量減少である。悪性疾患に関連しない骨障害も本発明の範囲内に含まれる。

40

【0141】

「続発性骨粗鬆症」には、脊椎動物（例えば、哺乳動物（ヒトが含まれる））における炎症時の骨量減少炎症、糖質コルチコイド誘導性骨粗鬆症、甲状腺機能亢進症誘導性骨粗鬆症、不動誘導性骨粗鬆症、ヘパリン誘導性骨粗鬆症、および免疫抑制性誘導性骨粗鬆症が含まれる。本明細書中で使用される、用語「骨吸収」は、少なくとも一部が破骨細胞活性によって生じる望ましくない骨量減少をいう。

【0142】

「骨溶解」は、破滅的骨量減少（すなわち、一定範囲の病状（関節リウマチ、骨の転移、非感染性の人工関節のゆるみ、および歯周炎が含まれる）の消耗性の病的結果）をいう

50

。関節リウマチ（ＲＡ）は、慢性炎症性疾患であり、しばしば、長期能力障害および死亡率上昇がおこる。

【０１４３】

「前骨芽細胞」は、骨間質細胞由来の分化した骨前駆細胞をいう。

【０１４４】

「歯骨前駆細胞」は、歯周靱帯由来の分化した骨前駆細胞をいう。

【０１４５】

本明細書中で使用される、用語「阻害する」は、特定の活性の量、質、または効果を減少させることを意味し、用語「減少させる」、「最小にする」、および「低下させる」と交換可能に使用され、例えば、治療有効量の本発明の化合物の哺乳動物への投与によって生じる破骨細胞の骨侵食活性の減少をいう。本明細書中に定義の骨障害の治療には、骨吸収、破骨細胞形成、または破骨細胞機能の阻害、および骨量減少によって特徴づけられる疾患の治療が含まれる。

10

【０１４６】

本明細書中で使用される、用語「有効量」は、骨障害の治療に有効な抗体またはアンタゴニストの量をいうことを意味する。したがって、１つの態様では、骨障害に関連する容態または骨成長の促進が有利な容態の治療で使用される組成物の「有効量」は、骨量減少の阻害および／または骨形成の増加または破骨細胞活性の阻害に有効な量である。より詳細な態様または別の態様では、有効量の化合物により、治療有効量の化合物を骨量減少によって特徴づけられる疾患に感受性を示すか罹患している個体に投与した場合に個体の骨量減少速度の減少として認められる医学的效果が得られる。有効量を、典型的には、有効成分を含まない組成物（すなわち、コントロール）を類似の状況の個体に投与した場合に認められた効果との比較によって決定する。さらに、組成物の「有効量」は、統計的に有意な効果（骨折修復速度の統計的に有意な増加、骨粗鬆症における骨量減少の逆転、関節損傷治癒速度の増加、軟骨欠損の逆転の増加、人工器官への骨成長の増加または加速、歯欠損修復の改善など）が得られる量である。

20

【０１４７】

「添付文書」を、通例、治療薬の商業包装（commercial package）中に含まれ、適応症、使用法、投薬量、投与、矛盾（contradiction）、包装製品と組み合わせるべき他の治療薬、および／またはこのような治療薬の使用に関する警告についての情報を含む説明書をいうために使用する。

30

【０１４８】

「薬物」は、骨障害またはその症状もしくは副作用を治療するのに有効な薬物である。

【０１４９】

ＩＩ．治療法

１つの態様では、本発明は、Ｂ細胞表面マーカーに結合するアンタゴニスト（好ましくは、抗体）（より好ましくは、ＣＤ２０抗体）を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物の骨障害を治療する方法を提供する。

【０１５０】

正確な用量を、治療すべき容態の性質および重症度、アンタゴニストの型、哺乳動物／患者の特徴などを考慮して、許容されている標準にしたがって臨床医によって決定する。用量の決定は、当業者のレベルの範囲内である。投与の経路および方法に応じて、タンパク質を、長期注入によって単回用量で投与するか、長期にわたって間欠的に投与することができる。典型的な１～数時間にわたるボラス注射または注入によって静脈内投与する。徐放性処方物を使用することができる。一般に、治療有効量のＣＤ２０アンタゴニストは、処置した容態の臨床的に有意な変化（骨折修復に必要な時間の臨床的に有意な減少、空洞または他の欠損の体積の有意な減少、骨密度の有意な増加、罹患率の有意な減少、または組織学的スコアの有意な増加など）を得るのに十分な量である。

40

【０１５１】

好ましい実施形態では、用量は、約１ヶ月以内に約１～４回の投与頻度で、約４００ｍ

50

g ~ 1.3 g、より好ましくは、約 500 mg ~ 1.2 g、さらにより好ましくは、約 750 mg ~ 1.1 g である。別の好ましい実施形態では、抗体を、約 2 ~ 4 回、より好ましくは、約 2 ~ 3 回、最も好ましくは、約 2 回投与する。さらに好ましい実施形態では、抗体を、約 2 ~ 3 週間以内、より好ましくは、約 2 週間以内に投与する。

【0152】

使用する特定の用量数（1回、2回、3回、またはそれを超える）は、例えば、処置する骨障害の型、使用される抗体の型、どのような型、どれぐらいの量および数の第2薬物を下記のように使用するのか、ならびに投与の方法および頻度に依存する。1回を超えて投与する場合、より後の投与（例えば、第2または第3投与）を、好ましくは、前の投与から約 1 ~ 20 日目、より好ましくは、約 6 ~ 16 日目、最も好ましくは、約 14 ~ 16 日目に投与する。個別の投与を、好ましくは、約 1 日と 4 週間との間、より好ましくは、約 1 日と 20 日との間の総期間以内に（例えば、6 ~ 18 日以内）投与する。1つのこのような態様では、個別の投与を、ほぼ毎週投与し、第2投与を、第1投与から約 1 週間後に投与し、任意の第3またはその後の投与を、第2投与から約 1 週間後に投与する。抗体のそれぞれのこのような個別の投与は、好ましくは、約 0.5 ~ 1.5 g、より好ましくは、約 0.75 ~ 1.3 g である。

10

【0153】

骨折または他の骨欠損における骨再生などの局所適用のために、タンパク質を、約 0.1 ~ 100 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ の創傷面積の範囲で適用することができる。

20

【0154】

しかし、上記のように、これらの提案したアンタゴニスト量は、非常に多くの治療上の判断に制約される。適切な用量および計画の選択における重要な要因は、上記のように、得られる結果である。例えば、比較的高い用量は、進行性および急性の疾患の治療に最初に必要であり得る。その後の用量は、より早い用量よりも高くてもよい。最も有用な結果を得るために、疾患または障害に応じて、アンタゴニストを、疾患または障害の最初の徴候、診断、外観、または発症にできるだけ近づけて投与するか、疾患または障害の寛解中に投与する。

【0155】

アンタゴニストを、任意の適切な手段（非経口、皮下、腹腔内、吸入、鞘内、関節内、鼻腔内、および病変内投与（局所免疫抑制薬治療が望ましい場合）が含まれる）によって投与する。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。さらに、アンタゴニストを、パルス注入（例えば、低アンタゴニスト用量で）によって適切に投与することができる。好ましくは、注射、最も好ましくは、静脈内または皮下注射によって投与し、これは、投与が短期間または慢性であるかどうかにより一部依存する。

30

【0156】

当業者は、有効量の決定において、哺乳動物の年齢、活性レベル、ホルモンバランス、全体的な健康状態などの要因を考慮し、例えば、低投薬量での開始および有効量を決定するための投薬量の滴定によって哺乳動物毎に調整する。本明細書中に記載の研究により、グルカン濃度の増加は破骨細胞活性の障害を必ずしも増加させず、実際は破骨細胞活性の障害を減少させ得ることが発見された。100 pg の効果は、骨粗鬆症の制御薬として使用されている種々の形態のビスホスホネートを使用して得た効果と類似する。

40

【0157】

アンタゴニスト / 抗体の少なくとも約 2 回の曝露（例えば、約 2 ~ 60 回の曝露、より具体的には、約 2 ~ 40 回の曝露、最も具体的には、約 2 ~ 20 回の曝露）などの 1 回を超える曝露または一連の用量を投与することにより、哺乳動物をアンタゴニスト / 抗体で再治療することができる。このような曝露を、種々の間隔（例えば、約 24 ~ 28 週間、48 ~ 56 週間、またはそれを超える間隔など）で投与することができる。好ましくは、このような曝露を、それぞれ 24 ~ 26 週間、約 38 ~ 42 週間、または約 50 ~ 54 週間の間隔で投与する。1つの実施形態では、各アンタゴニスト / 抗体曝露を、単回用量のアンタゴニスト / 抗体として行う。別の実施形態では、各アンタゴニスト / 抗体曝露を、

50

個別の抗体用量として行う。しかし、全てのアンタゴニスト / 抗体曝露を、単回用量または個別の用量として行う必要はない。

【 0 1 5 8 】

好ましいアンタゴニストは、細胞傷害薬に結合体化していない抗体（例えば、R I T U X A N（登録商標）などの抗体）である。本明細書中に記載の方法では、B細胞表面マーカーまたはC D 2 0抗体は、裸の抗体（n a k e d a n t i b o d y）であり得るか、別の分子と結合体化することができる（骨ターゲティング薬（b o n e t a r g e t i n g a g e n t）への共有結合など）。本明細書中の好ましいC D 2 0抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒトC D 2 0抗体、より好ましくは、リツキシマブ、ヒト化2 H 7（例えば、配列番号2および8中の可変ドメイン配列を含むか、配列番号8中にN 1 0 0 AまたはD 5 6 AおよびN 1 0 0 Aの変化を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号2中にM 3 2 L、S 9 2 A、またはM 3 2 LおよびS 9 2 Aの変化を有する軽鎖可変ドメインを含むか、配列番号30の軽鎖可変領域（V_L）配列および配列番号8の重鎖可変領域（V_H）配列を含み、ここで、抗体は、V H - C D R 2中にD 5 6 Aのアミノ酸置換をさらに含み、V H - C D R 3中のN 1 0 0がYまたはWに置換され、特に、配列番号31のv 5 1 1軽鎖配列および配列番号32のv 5 1 1重鎖配列を含む）、キメラ抗体、またはヒト化A 2 0抗体（I m m u n o m e d i c s）、またはH U M A X - C D 2 0（商標）ヒトC D 2 0抗体（G e n m a b）である。リツキシマブまたはヒト化2 H 7がさらにより好ましい。別の態様では、好ましい抗体は、上記定義の主な臨床応答を誘導する。

10

20

【 0 1 5 9 】

本明細書中の全ての方法のさらなる実施形態では、哺乳動物は、骨障害を治療するため、薬物（破骨細胞関連障害の治療薬または免疫抑制薬など）で以前に処置されたことがなく、そして / またはB細胞表面マーカーに対するアンタゴニストまたは抗体で以前に治療されたことがない（例えば、C D 2 0抗体で以前に治療されたことがない）。なおさらなる態様では、哺乳動物は、上記の任意の方法で治療される前に（最初またはその後の一連の用量の抗体後が含まれる）骨障害が再発しているか、他の組織損傷（腎臓損傷など）を罹患していてもよい。しかし、好ましくは、哺乳動物は、少なくとも最初の治療前にこのような再発をしていない。

【 0 1 6 0 】

ヒトおよび非ヒト動物の両方における産生を刺激することを望むいずれの場所にもB細胞表面マーカーに結合するアンタゴニストを使用することができる。動物への使用には、家畜（家畜類およびコンパニオンアニマル）への使用が含まれる。特定の適用には、骨折（癒着不能骨折および治療に欠陥のある患者（糖尿病、アルコール中毒者、および高齢者など）の骨折が含まれる）、骨移植片、照射誘導性骨壊死後の治療骨、インプラント（関節置換および歯科インプラントが含まれる）、手術から生じた骨欠損の修復（腫瘍除去後の頭蓋または上顎表面修復、外傷後の外科的再建術、遺伝的または他の身体的異常の修復、および形成術における骨治療の促進など）、歯周病の治療および他の歯科欠損の修復、骨の癌の治療上の処置後の骨欠損の治療、仮骨延長術中の骨形成の増加、関節損傷の治療（軟骨および靭帯の修復が含まれる）、骨関節症を罹患している関節の修復、腱の修復および再接合、骨粗鬆症（加齢性骨粗鬆症、閉経後骨粗鬆症、糖質コルチコイド誘導性骨粗鬆症、および廃用性骨粗鬆症が含まれる）および骨量減少または骨形成の減少によって特徴づけられる他の容態の治療、月経前の女性のピーク骨量の上昇、および硬膜に関連する結合組織の治療における使用が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【 0 1 6 1 】

本明細書中の任意の方法では、B細胞表面マーカーに結合するアンタゴニストまたは抗体と共に第2薬物（B細胞表面マーカーに結合するアンタゴニストまたは抗体（例えば、C D 2 0抗体）が第1薬剤である場合）を投与することができる。本発明の方法を、矯正装置（脊椎固定ケージ、脊椎固定ハードウェア、内部および外部骨固定デバイス、螺子、ならびにピンなど）と組み合わせて使用することもできる。第2薬物は、1つまたは複数の薬物であり得、例えば、破骨細胞関連障害の治療薬、細胞傷害薬、免疫抑制薬、疼痛薬

50

、またはその任意の組み合わせが含まれる。当業者に公知の他の種々の治療薬を適用することもできる。このような第2薬物型は、種々の要因（骨障害の型、骨障害の重症度、哺乳動物の状態および年齢、使用した第1薬剤型および用量などが含まれる）に依存する。

【0162】

このようなさらなる薬物の例には、破骨細胞関連障害の治療薬、化学療法薬、インターフェロンクラスの薬物（インターフェロン（例えば、Amarillo Biosciences, Inc.）、IFN- γ （REBIF（登録商標）およびAVONE X（登録商標））またはIFN- β （BETASERON（登録商標））など）、オリゴペプチド（酢酸グラチマー（COPAXONE（登録商標）など）、CD40-CD40リガンド遮断薬、細胞傷害薬または免疫抑制薬（ミトキサントロン（NOVANTRONE（登録商標））、メトトレキサート、シクロホスファミド、クロラムブシル、レフルノミド、およびアザチオプリンなど）、免疫グロブリン静注（グロブリン）、リンパ球枯渇療法（lymphocyte-depleting therapy）（例えば、ミトキサントロン、シクロホスファミド、CAMPATH（商標）抗体、抗-CD4、クラドリビン、自己反応性B細胞のIg受容体によって特異的に認識される脱免疫化自己反応性抗原またはそのフラグメントを含む少なくとも2つのドメインを有するポリペプチド構築物（WO2003/68822号）、全身照射法、骨髄移植、インテグリンアンタゴニストまたは抗体（例えば、LFA-1抗体（Genentechから市販されているエファリズマブ/RAPTIVA（登録商標）など）、 α 4インテグリン抗体（Biogen Idecから市販されているナタリズマブ/TYSABRI（登録商標）など）、または上記の他のもの）、ステロイド（コルチコステロイド（例えば、メチルプレドニゾロン（注射用のSOLU-MEDROL（商標）メチルプレドニゾロンコハク酸ナトリウムなど）、プレドニゾン（低用量プレドニゾンなど）、デキサメサゾン、または糖質コルチコイド（例えば、関節内注入（全身性副腎皮質ステロイド療法が含まれる）による）など）、非リンパ球枯渇免疫抑制療法（例えば、MMFまたはシクロスポリン）、「スタチン」クラスのコレステロール低下薬（セリバスタチン（BAYCOL（商標））、フルバスタチン（LESCOL（商標））、アトルバスタチン（LIPITOR（商標））、ロバスタチン（MEVACOR（商標））、プラバスタチン（PRAVACHOL（商標））、およびシンバスタチン（ZOCOR（商標））が含まれる）、エストラジオール、テストステロン（任意選択的に、高投薬量で使用；Stuveら、Neurology 8:290-301（2002））、アンドロゲン、ホルモン補充療法、TNFインヒビター（TNF- α に対する抗体など）、DMARD、NSAID、プラスマフェレーシス、または血漿交換、トリメトプリムスルファメトキサゾール（BACTRIM（商標）、SEPTRA（商標））、ミコフェノール酸モフェチル、H2遮断薬、またはプロトンポンプインヒビター（潜在的な潰瘍誘発性免疫抑制療法）、レボチロキシン、シクロスポリンA（例えば、SANDIMMUNE（登録商標））、ソマトスタチンアナログ、サイトカイン、代謝拮抗薬、免疫抑制薬、再建手術（rehabilitative surgery）、放射性ヨウ素、甲状腺摘除、BAFFアンタゴニスト（BAFFもしくはBR3抗体またはイムノアドヘシンなど）、抗-CD40受容体または抗-CD40リガンド（CD154）、抗-IL-6受容体アンタゴニスト/抗体、別のB細胞表面アンタゴニストまたは抗体（リツキシマブを含むヒト化2H7抗体、他のヒト化抗体、またはCD20抗体）などが含まれる。

【0163】

好ましいこのような薬物は、破骨細胞関連障害の治療薬、化学療法薬、細胞傷害薬、抗インテグリン、グロブリン、抗CD4、クラドリビン、トリメトプリムスルファメトキサゾール、H2遮断薬、プロトンポンプインヒビター、副腎皮質ステロイド、シクロスポリン、スタチンクラスのコレステロール低下薬、エストラジオール、テストステロン、アンドロゲン、ホルモン補充療法薬、TNFインヒビター、DMARD、NSAID（例えば、筋骨格の症状を治療するため）、レボチロキシン、シクロスポリンA、ソマトスタチンアナログ、BAFFアンタゴニスト（BAFF抗体またはBR3抗体、特に、BAFF

抗体など)、免疫抑制薬、および別のB細胞表面マーカー抗体(リツキシマブとヒト化2H7抗体または他のヒト化CD20抗体との組み合わせなど)である。

【0164】

より好ましいこのような薬物は、破骨細胞関連障害の治療薬(サイトカインなど)、免疫抑制薬(TNF-に対する抗体、CD40-CD40リガンドに対する抗体、およびBAFF抗体またはBR3抗体などのBAFFアンタゴニストが含まれる)、DMARD、細胞傷害薬、インテグリンアンタゴニスト、NSAID、ホルモン、またはその組み合わせである。免疫抑制薬は、例えば、主要器官が関与する非常に活動的な疾患に必要であり得、シクロホスファミド(CYTOXAN(登録商標))、クロラムブシル、レフルノミド、MMF、アザチオプリン(IMURAN(登録商標))、およびメトトレキサートなどの薬剤が含まれる。有効性を高めるための第1薬物と組み合わせたBAFFアンタゴニストが有用であり得る。

10

【0165】

破骨細胞関連障害の治療薬(IL-4などのサイトカイン)、免疫抑制薬、またはその組み合わせがさらにより好ましく、破骨細胞関連障害の治療薬および/または免疫抑制薬が最も好ましくは、ビスホスホネートおよび/またはメトトレキサートとさらに最も好ましい。

【0166】

1つの特に好ましい実施形態では、第2薬物は、1つまたは複数の破骨細胞関連障害の治療薬であるか、これを含む。

20

【0167】

なおさらに特に好ましい態様では、第2薬物は、免疫抑制薬、より好ましくは、シクロホスファミド、MMF、クロラムブシル、アザチオプリン、レフルノミド、またはメトトレキサートであり、好ましくは、少なくとも最初の抗体用量で投与する。1つの実施形態では、アザチオプリン、メトトレキサート、またはMMFを、好ましくは、寛解の維持のためにシクロホスファミドの代わりに使用する。

【0168】

なおさらに好ましい実施形態では、第2薬物は、1つまたは複数の破骨細胞関連障害の治療薬および免疫抑制薬の組み合わせである。

【0169】

全てのこれらの薬物を、互いに組み合わせて使用するか、これらのみを第1薬物と共に使用することができ、その結果、本明細書中で使用される表現「第2薬物」は、第1薬物以外の唯一の薬物であることを意味しない。したがって、第2薬物は、1つの薬物である必要はないが、1つを超えるこのような薬物を構成するか含み得る。

30

【0170】

前述のこれらの第2薬物を、一般に、上文と同一の投薬量および投薬経路またはこれまで使用された投薬量の1~99%で使用する。このような第2薬物を全て使用する場合、好ましくは、これらを、特に、これらによって引き起こされる副作用を排除または減少させるために、第1薬物を使用した最初の投与を超えるその後の投与で、第1薬物が存在しない場合よりも少ない量で使用する。組み合わせ投与には、個別の処方物または1つの薬学的処方物を使用した同時投与およびいずれかの順序での連続投与が含まれ、両方(または全て)の活性成分がその生物活性を同時に発揮する時間が存在することが好ましい。

40

【0171】

本明細書中の再治療法のために、第2薬物を有効量の一連の用量で抗体と共に投与する場合、第2薬物を、任意の一連の用量(例えば、1つの一連の用量または1つを超える一連の用量)で投与することができる。1つの実施形態では、第2薬物を、最初の一連の用量を使用して投与する。別の実施形態では、第2薬物を、最初および第2の一連の用量を使用して投与する。なおさらなる実施形態では、第2薬物を、全ての一連の用量を使用して投与する。

【0172】

50

第2薬物の組み合わせ投与には、個別の処方物または1つの薬学的処方物を使用した同時投与（並行（concurrent）投与）およびいずれかの順序での連続投与が含まれ、両方（または全て）の活性成分（薬物）がその生物活性を同時に発揮する時間が存在することが好ましい。

【0173】

本明細書中の抗体またはアンタゴニストを、任意の適切な手段（非経口、局所、皮下、腹腔内、肺内、鼻腔内、および/または病変内投与が含まれる）によって投与する。非経口注入には、筋肉内、静脈内（i.v.）、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。鞘内投与も意図される（CD20抗体の鞘内送達に関するGrillo-Lopez, A. のUS2002/0009444号を参照のこと）。さらに、抗体またはアンタゴニストを、例えば、漸減用量の抗体またはアンタゴニストを使用したパルス注入によって適切に投与することができる。好ましくは、静脈内または皮下、より好ましくは、静脈内注入によって投与する。

10

【0174】

複数の一連の用量の抗体を投与する場合、各一連の用量を、同一または異なる投与手段を使用して投与する。1つの実施形態では、各一連の用量を、静脈内投与によって投与する。別の実施形態では、各一連の用量を、皮下投与によって投与する。さらに別の実施形態では、複数の一連の用量を、静脈内投与および皮下投与の両方によって投与し、抗体は、同一でも異なってもよい。

20

【0175】

このようなアンタゴニストおよび抗体の産生、修飾、および処方の考察を以下に示す。

【0176】

III. アンタゴニストおよび抗体の産生

本発明の方法および製品は、B細胞表面マーカーに結合するアンタゴニストを使用するか組み込む。したがって、このようなアンタゴニストの生成方法を本明細書中に記載する。

【0177】

アンタゴニストの産生またはスクリーニングのために使用すべきB細胞表面マーカーは、例えば、所望のエピトープを含む抗原またはその一部の可溶性形態であり得る。あるいはまたはさらに、その細胞表面にB細胞表面マーカーを発現する細胞を使用して、アンタゴニストを生成するかスクリーニングすることができる。アンタゴニストの生成に有用なB細胞表面マーカーの他の形態は、当業者に明らかである。好ましくは、B細胞表面マーカーは、CD19またはCD20抗原である。

30

【0178】

好ましいアンタゴニストが抗体である一方で、抗体以外のアンタゴニストが本明細書中で意図される。例えば、アンタゴニストは、任意選択的に、細胞傷害薬（本明細書中に記載のものなど）と融合しているか結合体化している小分子アンタゴニストを含み得る。小分子のライブラリーを、本明細書中の目的のB細胞表面マーカーに対してスクリーニングして、この抗原に結合する小分子を同定することができる。小分子を、さらに、その拮抗特性についてスクリーニングし、そして/または細胞傷害薬と結合体化することができる。

40

【0179】

アンタゴニストはまた、合理的デザインまたはファージディスプレイによって生成されたペプチドであり得る（例えば、1998年8月13日公開のWO98/35036号を参照のこと）。1つの実施形態では、選択の分子は、抗体のCDRに基づいてデザインされた「CDR模倣物」または抗体アナログであり得る。このようなペプチド自体が拮抗性を示す一方で、任意選択的にペプチドを細胞傷害薬と融合して、ペプチドの拮抗特性を付加するか増強することができる。

【0180】

本発明で使用した抗体アンタゴニストの産生のための例示的技術に関する説明を以下に

50

示す。

【0181】

(i) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体を、好ましくは、関連抗原およびアジュバントの複数回の皮下 (s.c.) 注射または腹腔内 (i.p.) 注射によって動物中で惹起する。これは、二官能性薬または誘導体化薬 (例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル (システイン残基による結合体化)、N-ヒドロキシスクシンイミド (リジン残基による)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、 SOCl_2 、または $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (式中、R および R^1 は、異なるアルキル基である)) を使用した免疫化すべき種において免疫原性を示すタンパク質 (例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビター) への関連抗原の結合体化に有用であり得る。

10

【0182】

動物を、例えば、 $100\mu\text{g}$ または $5\mu\text{g}$ のタンパク質または結合体化体 (それぞれ、ウサギまたはマウス) と3倍体積のフロイント完全アジュバントとの組み合わせおよび溶液の複数の部位への皮内注射によって、抗原、免疫原性結合体化体、または誘導体に対して免疫化する。1ヶ月後、動物を、複数の部位への皮下注射によって、元の量の $1/5 \sim 1/10$ のペプチドまたは結合体化体を含むフロイント完全アジュバントで追加免疫する。7~14日後、動物から採血し、抗体力価について血清をアッセイする。動物を、力価がプラトーになるまで追加免疫する。好ましくは、動物を、同一の抗原であるが異なるタンパク質に結合体化した結合体化体および/または異なる架橋剤によって追加免疫する。結合体化体を、タンパク質融合物として組換え細胞培養物中で作製することもできる。また、ミョウバンなどの凝集剤を適切に使用して、免疫応答を増強する。

20

【0183】

(ii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体を、実質的に均一な抗体集団 (すなわち、集団を含む各抗体は、少量で存在し得る天然に存在する変異体を除いて同一である) から得る。したがって、修飾語「モノクローナル」は、個別の抗体の混合物ではない抗体の特徴を示す。

【0184】

例えば、モノクローナル抗体を、Kohlerら、Nature, 256:495 (1975) によって最初に記載されたハイブリドーマ法を使用して作製することができるか、組換えDNA法 (米国特許第4,816,567号) によって作製することができる。

30

【0185】

ハイブリドーマ法では、マウスまたは他の適切な宿主動物 (ハムスターなど) を、上記のように免疫化してリンパ球を誘発し、免疫化のために使用されるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生するか産生することができる。あるいは、リンパ球を、インビトロで免疫化することができる。次いで、リンパ球を、適切な融合剤 (ポリエチレングリコールなど) を使用して骨髓腫細胞に融合して、ハイブリドーマ細胞を形成する (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。

40

【0186】

したがって、ハイブリドーマ細胞を播種し、適切な培養培地中で成長させる。この培地は、非融合親骨髓腫細胞の成長または生存を阻害する1つまたは複数の物質を含むことが好ましい。例えば、親骨髓腫細胞が酵素ヒドロキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT または HPR T) を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は、典型的には、ヒドロキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン (HAT 培地) を含み、これらの物質が HGPRT 欠損細胞の成長を防止する。

【0187】

好ましい骨髓腫細胞は、効率よく融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベル産生を支持し、HAT 培地などの培地に感受性を示すものである。これらのうち

50

、好ましい骨髄腫細胞株は、マウス骨髄腫株 (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA から利用可能な MOPC - 21 および MPC - 11 マウス腫瘍由来のものならびに American Type Culture Collection, Manassas, Virginia USA から利用可能な SP - 2 または X63 - Ag8 - 653 細胞である。ヒト骨髄腫およびマウス - ヒトヘテロミエローム (heteromyeloma) 細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている (Kozbor, J. Immunol, 133: 3001 (1984); Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

10

【0188】

ハイブリドーマ細胞が成長する培養培地を、抗原に指向するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性を、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ (放射免疫アッセイ (RIA) または酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) など) によって決定する。

【0189】

モノクローナル抗体の結合親和性を、例えば、Munsonら、Anal. Biochem., 107: 220 (1980) のスキッチャード分析によって決定することができる。

20

【0190】

所望の特異性、親和性、および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンを、限界希釈手順によってサブクローン化し、標準的な方法によって成長させることができる (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59 - 103 (Academic Press, 1986))。この目的に適切な培養培地には、D-MEM または RPMI - 1640 培地が含まれる。さらに、ハイブリドーマ細胞を、動物の腹水腫瘍としてインビボで成長させることができる。

【0191】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体を、従来の免疫グロブリン精製手順 (例えば、タンパク質 A - SEPHAROSE (登録商標)、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、または親和性クロマトグラフィなど) によって、培養培地、腹水、または血清から適切に分離する。

30

【0192】

モノクローナル抗体を、組換えによって産生することもできる。モノクローナル抗体をコードする DNA を容易に単離し、従来の手順 (例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブの使用による) を使用して配列決定する。ハイブリドーマ細胞は、このような DNA の好ましい供給源としての機能を果たす。一旦単離されると、DNA を発現ベクターに配置し、次いで、宿主細胞 (他で免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、または骨髄腫細胞など) にトランスフェクトして、組換え宿主細胞中にモノクローナル抗体を合成することができる。抗体をコードする DNA の細菌における組換え発現に関する総論には、Skerreraら、Curr. Opinion in Immunol, 5: 256 - 262 (1993) および Pluckthun, Immunol. Revs., 130: 151 - 188 (1992) が含まれる。

40

【0193】

さらなる実施形態では、抗体または抗体フラグメントを、McCaffertyら、Nature, 348: 552 - 554 (1990) に記載の技術を使用して生成した抗体ファージライブラリーから単離することができる。Clacksonら、Nature,

50

352:624-628(1991)およびMarksら、J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)は、ファージライブラリーを使用したマウス抗体およびヒト抗体の単離を記載している。その後の刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性(nM範囲)ヒト抗体の産生(Marksら、Bio/Technology, 10:779-783(1992))ならびに非常に巨大なファージライブラリーの構築戦略としての組み合わせ感染およびインビボ組換え(Waterhouseら、Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266(1993))を記載している。したがって、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術の実行可能な代替法である。

【0194】

DNAを、例えば、ヒト重鎖および軽鎖の定常ドメインのコード配列を相同なマウス配列の代わりにコード配列に置換すること(米国特許第4,816,567号;Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851(1984))または非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部または一部の免疫グロブリンコード配列への共有結合によって修飾することができる。

【0195】

典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドに、抗体の定常領域を置換するか、これらに抗体の1つの抗原組み合わせ部位の可変ドメインを置換して、抗原に特異性を有する1つの抗原組み合わせ部位および異なる抗原に特異性を有する別の抗原組み合わせ部位を含む二価のキメラ抗体を作製する。

【0196】

(iii) ヒト化抗体

非ヒト抗体のヒト化方法は、当該分野で説明されている。好ましくは、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源由来のアミノ酸残基に導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基を、しばしば「移入」残基と呼ばれ、典型的には、「移入」可変ドメインから選択する。ヒト化を、本質的に、Winter and co-workers(Jonesら、Nature, 321:522-525(1986); Riechmannら、Nature, 332:323-327(1988); Verhoevenら、Science, 239:1534-1536(1988))の方法にしたがって、超可変領域配列をヒト抗体の対応する配列に置換することによって行うことができる。したがって、このような「ヒト化」抗体は、実質的にインタクト未満のヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列によって置換されているキメラ抗体である(米国特許第4,816,567号)。実際、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの超可変領域の残基および可能ないくつかのFR残基がげっ歯類黄体中の相同部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。

【0197】

ヒト化抗体の作製で使用するべきヒト可変ドメイン(軽鎖および重鎖の両方)の選択は、抗原性を減少させるために非常に重要である。いわゆる「ベストフィット(best-fit)」法によれば、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列を、公知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングする。次いで、げっ歯類配列に最も近いヒト配列が、ヒト化抗体のヒトフレームワーク領域(FR)として許容されている(Simsら、J. Immunol, 151:2296(1993); Chothiaら、J. Mol. Biol, 196:901(1987))。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定の全ヒト抗体のコンセンサス配列由来の特定のフレームワーク領域を使用する。同一のフレームワークを、いくつかの異なるヒト化抗体のために使用することができる(Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); Prestaら、J. Immunol, 151:2623(1993))。

【0198】

抗原に対する高い親和性および他の好ましい生物学的特性を保持した抗体をヒト化することがさらに重要である。この目的を達成するために、好ましい方法によれば、ヒト化抗

10

20

30

40

50

体を、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用した親配列および種々の概念ヒト化産物の分析過程によって調製する。三次元免疫グロブリンモデルは市販されており、当業者に良く知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元高次構造を図解および表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の検討により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の起こり得る役割を分析する（すなわち、候補免疫グロブリンのその抗原に結合する能力に影響を与える残基を分析する）。この方法では、FR残基を選択し、レシピエント配列および移入配列と組み合わせ、それにより、所望の抗体の特徴（標的抗原に対する親和性の増加など）を得る。一般に、超可変領域の残基は、抗原結合への影響に直接且つ最も実質的に関与する。

【0199】

(iv) ヒト抗体

ヒト化の代替法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在、免疫化の際に内因性免疫グロブリンを産生することなくヒト抗体の全レパートリーを産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を産生することが可能である。例えば、キメラおよび生殖系列変異マウスにおける抗体重鎖連結領域（J_H）遺伝子のホモ接合性欠失によって内因性抗体産生が完全に阻害されることが記載されている。このような生殖系列変異マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移入により、抗原の攻撃誘発の際にヒト抗体が産生される。例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovitsら、Nature, 362: 255 - 258 (1993); Bruggemannら、Year in Immunol., 7: 33 (1993); ならびに米国特許第5, 591, 669号、同第5, 589, 369号、および同第5, 545, 807号を参照のこと。

【0200】

あるいは、ファージディスプレイテクノロジー（McCaffertyら、Nature 348: 552 - 553 (1990)）を使用して、非免疫化ドナー由来の免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーからインビトロでヒト抗体および抗体フラグメントを産生することができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、インフレイムで糸状バクテリオファージ（M13またはfdなど）の主なまたは少数のコートタンパク質遺伝子のいずれかにクローン化し、ファージ粒子の表面に機能的抗体フラグメントをディスプレイする。糸状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能的性質に基づいた選択により、これらの性質を示す抗体をコードする遺伝子も選択される。したがって、ファージは、B細胞のいくつかの性質を模倣する。ファージディスプレイを、種々の形式で行うことができる。その概説については、例えば、Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564 - 571 (1993)を参照のこと。V遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用することができる。Clacksonら、Nature, 352/624 - 628 (1991)は、免疫化マウスの脾臓由来のV遺伝子の小さなランダム組み合わせライブラリーから多様な多数の抗オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナー由来のV遺伝子レパートリーを構築し、多様な多数の抗原（自己抗原が含まれる）に対する抗体を、本質的に、Marksら、J. Mol. Biol. 222: 581 - 597 (1991)またはGriffithsら、EMBO J. 12: 725 - 734 (1993)によって記載された技術にしたがって単離することができる。米国特許第5, 565, 332号および同第5, 573, 905号も参照のこと。

【0201】

インビトロでの活性化B細胞によってヒト抗体を生成することもできる（米国特許第5, 567, 610号および同第5, 229, 275号を参照のこと）。

【0202】

(v) 抗体フラグメント

抗体フラグメント産生のための種々の技術が開発されている。伝統的には、これらのフラグメントを、インタクトな抗体のタンパク質消化を介して誘導した（例えば、Morimotoら、*Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) およびBrennanら、*Science*, 229:81 (1985) を参照のこと）。しかし、現在、これらのフラグメントを、組み合わせ宿主細胞によって直接産生することができる。例えば、抗体フラグメントを、上記で考察した抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Fab'-SHフラグメントを、大腸菌から直接回収し、化学結合させて、F(ab')₂フラグメントを形成することができる（Carterら、*Bio/Technology* 10:163-167 (1992)）。別のアプローチによれば、F(ab')₂フラグメントを、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。抗体フラグメントの他の産生技術は、当業者に明らかである。他の実施形態では、目的の抗体は、単鎖Fvフラグメント(scFv)である。WO93/16185号；米国特許第5,571,894号；および米国特許第5,587,458号を参照のこと。抗体フラグメントはまた、例えば、米国特許第5,641,870号に記載のように、「線状抗体」であり得る。このような線状フラグメントは、単一特異性または二重特異性であり得る。

【0203】

(vi) 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに結合糖異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、B細胞表面マーカーの2つの異なるエピトープに結合することができる。他のこのような抗体は、第1B細胞マーカーに結合し、第2B細胞表面マーカーにさらに結合することができる。あるいは、抗B細胞マーカー結合アームを、白血球上の誘発分子（T細胞受容体分子（例えば、CD2またはCD3）など）またはIgGのFc受容体（FcR（FcRI（CD64）、FcRII（CD32）、およびFcRIII（CD16）など））に結合するアームと組み合わせ、細胞防御機構をB細胞に集中することができる。二重特異性抗体を使用して、細胞傷害薬をB細胞に局在化させることもできる。これらの抗体は、B細胞マーカー結合アームおよび細胞傷害薬（例えば、サポリン、抗インターフェロン- γ 、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサート、または放射性同位体ハプテン）に結合するアームを保有する。二重特異性抗体を、全長抗体または抗体フラグメント（例えば、F(ab')₂二重特異性抗体）として調製することができる。

【0204】

二重特異性抗体の作製方法は、当該分野で公知である。全長二重特異性抗体の伝統的な産生は、2つの鎖が異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づく（Millsteinら、*Nature*, 305:537-539 (1983)）。ランダムな種々の免疫グロブリン重鎖および軽鎖により、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を産生し、これらのうちの1種のみが正確な二重特異性構造を有する。通常、親和性クロマトグラフィ工程によって行われる正確な分子の精製は、むしろ煩雑であり、生成物の収率は低い。類似の手順は、WO93/08829号およびTrauneckerら、*EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) に開示されている。

【0205】

異なるアプローチによれば、所望の結合親和性を有する抗体可変ドメイン（抗体-抗原組み合わせ部位）を、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合する。ヒンジ、CH2、およびCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合が好ましい。少なくとも1つの融合物中に存在する軽鎖結合に必要な部位を含む第1重鎖定常領域（CH1）を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物および（必要に応じて）免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを、個別の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、構築で使用される同等でない比率の3つのポリペプチド鎖によって最適な収率が得られる実施形態で、3つのポリペプチドフラグ

メントの相互比率が非常に柔軟に調整される。しかし、等しい比率の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現によって収率が高い場合または比率が特に有意でない場合に、1つの発現ベクター中で2つまたは3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を挿入することが可能である。

【0206】

このアプローチの好ましい実施形態では、二重特異性抗体は、一方のアーム中の第1結合親和性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖および他方のアーム中のハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対（第2結合特異性が得られる）から構成される。二重特異性分子の片方のみにおける免疫グロブリン軽鎖の存在によって手軽な分離方法が得られるので、この非対称構造によって望ましくない免疫グロブリン鎖組み合わせからの所望の二重特異性化合物の分離が容易になることが見出された。このアプローチは、WO94/04690号に開示されている。二重特異性抗体生成のさらなる詳細については、例えば、Sureshら、Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照のこと。

10

【0207】

米国特許第5,731,168号に記載の別のアプローチによれば、抗体分子対の間の界面を操作して、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の比率を最大にすることができる。好ましい界面は、抗体定常ドメインのC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面由来の1つまたは複数の小アミノ酸側鎖を、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）と置換する。巨大な鎖と同一または類似のサイズの補償的「空洞」を、巨大なアミノ酸側鎖のより小さなアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはチロシン）への置換によって第2抗体分子の界面に作製する。これにより、ホモ二量体などの他の望ましくない末端産物を超えるヘテロ二量体の収率を増加させるための機構が得られる。

20

【0208】

二重特異性抗体には、架橋または「ヘテロ結合体化体」抗体が含まれる。例えば、ヘテロ結合体化体中の抗体の一方をアビジンとカップリングし、他方をビオチンとカップリングすることができる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞の望ましくない細胞へのターゲティング（米国特許第4,676,980号）およびHIV感染の治療（WO91/0036号、WO92/200373号、および欧州特許第03089号）が提案されている。ヘテロ結合体化体抗体を、任意の都合の良い架橋法を使用して作製することができる。適切な架橋剤は、当該分野で周知であり、多数の架橋技術と共に、米国特許第4,676,980号に開示されている。

30

【0209】

抗体フラグメントからの二重特異性抗体の生成技術は、文献にも記載されている。例えば、二重特異性抗体を、化学結合を使用して調製することができる。Brennanら、Science, 229:81 (1985)は、インタクトな抗体をタンパク質分解してF(ab')₂フラグメントを生成する手順を記載している。これらのフラグメントを、ジチオール錯化剤である亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近傍ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を防止する。次いで、生成されたF(ab')₂フラグメントを、チオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換する。次いで、F(ab')₂-TNB誘導体の1つを、メルカプトエチルアミンでの還元によってF(ab')₂-チオールに再変換し、等モル量の他のF(ab')₂-TNB誘導体と混合して二重特異性抗体を形成する。産生された二重特異性抗体を、酵素の選択的固定剤として使用することができる。

40

【0210】

大腸菌からのF(ab')₂-SHフラグメントの直接回収が最近進められている。このフラグメントを化学的カップリングして二重特異性抗体を形成することができる。Shalabyら、J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は、完全にヒト化した二重特異性抗体F(ab')₂分子の産生を記載している。各F(ab')₂フラグメントを大腸菌から個別に分泌させ、インビトロで有向(directed)化学的カップリン

50

グに供して二重特異性抗体を形成させる。このようにして形成された二重特異性抗体は、E r b B 2 受容体を過剰発現する細胞および正常なヒト T 細胞に結合し、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発することができた。

【 0 2 1 1 】

組換え細胞培養物に直接由来する二重特異性抗体フラグメントを作製および単離するための種々の技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体を、ロイシンジッパーを使用して産生している。K o s t e l n y ら、J . I m m u n o l , 1 4 8 (5) : 1 5 4 7 - 1 5 5 3 (1 9 9 2) 。 F o s および J u n タンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合によって2つの異なる抗体の F a b ' 部分に連結した。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元して単量体を形成させ、次いで、再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成させる。この方法を、抗体ホモ二量体の産生に使用することもできる。H o l l i n g e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i U S A , 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 (1 9 9 3) によって記載された「ダイアボディ」テクノロジーは、二重特異性抗体フラグメントを作製するための別の機構を提供している。フラグメントは、短すぎて同一鎖上の2つのドメインの間を対合することができないリンカーによって軽鎖可変ドメイン (V _L) に連結した重鎖可変ドメイン (V _H) を含む。したがって、1つのフラグメントの V _H および V _L ドメインに別のフラグメントの相補的 V _L および V _H ドメインとの対合を強いて2つの抗原結合部位を形成させる。単鎖 F v (s F v) 二量体の使用による二重特異性抗体フラグメントを作製するための別の戦略も報告する。G r u b e r ら、J . I m m u n o l , 1 5 2 : 5 3 6 8 (1 9 9 4) を参照のこと。

10

20

【 0 2 1 2 】

2 価を超える抗体が意図される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。T u t t ら、J . I m m u n o l , 1 4 7 : 6 0 (1 9 9 1) 。

【 0 2 1 3 】

I V . アンタゴニストの結合体化体および他の修飾物

本明細書中の方法で使用されるか製品中に含まれるアンタゴニストを、任意選択的に、別の薬剤（骨ターゲティング薬など）と結合体化し、それにより、例えば、本発明の全身投与された組成物の送達を、ターゲティング分子への C D 2 0 アンタゴニストの結合体化によって増強することができる。「ターゲティング分子」は、目的の組織に結合する分子である。例えば、骨ターゲティング分子には、テトラサイクリン、カルセイン、ビスホスホネート、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、アミノホスホ糖 (a m i n o p h o s p h o s u g a r s) 、骨のミネラル相 (m i n e r a l p h a s e) に関連することが公知のペプチド（例えば、オステオネクチン、骨シアロタンパク質、およびオステオポンチン）、骨特異的抗体、骨無機質を有するタンパク質、または骨細胞結合ドメイン（例えば、カルシトニン）などが含まれる。例えば、欧州特許第 5 1 2 , 8 4 4 号；欧州特許第 3 4 1 , 9 6 1 号；および B r i n k l e y , B i o c o n j u g a t e C h e m . 3 : 2 - 1 3 (1 9 9 2) を参照のこと。

30

【 0 2 1 4 】

通常、共有結合によって結合体化し、その正確な性質を、ターゲティング分子および C D 2 0 アンタゴニストポリペプチド上の結合部位によって決定する。典型的には、非ペプチド薬を、化学修飾によって C D 2 0 アンタゴニスト上に導入されたそのアミノ酸側鎖、炭水化物鎖、または反応基を介して C D 2 0 アンタゴニストを結合体化するリンカーの付加によって修飾する。例えば、薬物を、リジン残基の - アミノ基を介するか、遊離 - アミノ基を介するか、システイン残基へのジスルフィド交換によって、または過ヨウ素酸での炭水化物鎖中の 1 , 2 - ジオールの酸化によって結合させて、シッフ塩基結合を介した種々の求核試薬を含む薬物を結合することができる。例えば、米国特許第 4 , 2 5 6 , 8 3 3 号を参照のこと。

40

【 0 2 1 5 】

タンパク質修飾薬には、アミン反応試薬（例えば、反応性エステル、イソチオシアネート、アルデヒド、およびスルホニルハライド）、チオール反応試薬（例えば、ハロアセチ

50

ル誘導体およびマレイミド)、ならびにカルボン酸およびアルデヒド反応試薬が含まれる。二官能性架橋試薬の使用によって、CD20アンタゴニストポリペプチドをペプチド薬に共有結合することができる。ヘテロ二官能性試薬が最も一般的に使用されており、これは、2つの異なる反応部分(例えば、アミン反応部分およびチオール、ヨードアセトアミド、またはマレイミド)の使用によって2つの異なるタンパク質のカップリングを調節する。このような連結剤の使用は、当該分野で周知である。例えば、Brinkley(上記)および米国特許第4,671,958号を参照のこと。ペプチドリinkerを使用することもできる。代替法では、CD20アンタゴニストポリペプチドを、融合ポリペプチドの調製によってペプチド部分に連結することができる。

【0216】

さらなる二官能性タンパク質カップリング剤の例には、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジブイミダート塩酸塩(dimethyl adipimate HCL))、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレートなど)、アルデヒド(グルタレルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソチオシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート)、およびビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)が含まれる。

【0217】

あるいは、アンタゴニストおよび薬剤を含む融合タンパク質を、例えば、組換え技術またはペプチド合成によって作製することができる。

【0218】

アンタゴニストの他の修飾が本明細書中で意図される。例えば、アンタゴニストを、種々の非タンパク質ポリマー(例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとのコポリマー)のうちの1つに連結することができる。

【0219】

本明細書中に開示のアンタゴニストを、リボソームとして処方することもできる。アンタゴニストを含むリボソームを、当該分野で公知の方法(Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688(1985); Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030(1980); 米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号;ならびに1997年10月23日公開のWO97/38731号に記載の方法など)によって調製する。循環時間が増加したリボソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

【0220】

特に有用なリボソームを、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を使用した逆相蒸発法によって生成することができる。リボソームを、定義された孔サイズのフィルターから押し出して、所望の直径のリボソームを得る。本発明の抗体のFab'フラグメントを、Martinら、J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載のようにジスルフィド交換反応によってリボソームに結合体化することができる。化学療法薬は、任意選択的に、リボソーム内に含まれる。Gabizonら、J. National Cancer Inst. 81(19):1484(1989)を参照のこと。

【0221】

本明細書中に記載のタンパク質またはペプチドアンタゴニストのアミノ酸配列の修飾が意図される。例えば、アンタゴニストの結合親和性および/または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。アンタゴニストのアミノ酸配列変異型を、アンタゴニスト核酸への適切なヌクレオチド変化の導入またはペプチド合成によって調製する。この

10

20

30

40

50

ような修飾には、例えば、アンタゴニストのアミノ酸配列の欠失および/または挿入および/または置換が含まれる。最終構築物が所望の特徴を有するという条件で、最終構築物に到達するように欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせを行う。アミノ酸の変化により、アンタゴニストの翻訳後プロセッシングを変化させることもできる（グリコシル化部位の数または位置の変化など）。

【0222】

変異誘発に好ましい位置に存在するアンタゴニストの一定の残基または領域の有用な同定方法は、Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989)に記載のいわゆる「アラニンスキャニング変異誘発」である。ここに、標的残基の残基または基（例えば、Arg、Asp、His、Lys、およびGluなどの荷電残基）を同定し、中性または負電荷のアミノ酸（最も好ましくは、アラニンまたはポリアラニン）と置換して、アミノ酸と抗原との相互作用に影響を与える。次いで、置換基に対する機能的感受性が証明されたアミノ酸の位置を、置換部位での、または置換部位へのさらなる変異型または他の変異型の導入によって改良する。したがって、アミノ酸配列変異を導入するための部位を決定する一方で、変異自体の性質を予め決定する必要はない。例えば、所与の部位での変異能力を分析するために、標的コドンまたは標的領域でalaスキャニングまたはランダム変異誘発を行い、発現したアンタゴニスト変異型を所望の活性についてスクリーニングする。

10

【0223】

アミノ酸配列の挿入物には、1残基から100個またはそれを超える残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノおよび/またはカルボキシル末端融合物ならびに1つまたは複数のアミノ酸残基の配列内挿入物が含まれる。末端挿入物の例には、N末端メチオニル残基を有するアンタゴニストまたは細胞傷害性ポリペプチドに融合したアンタゴニストが含まれる。アンタゴニスト分子の他の挿入変異型には、酵素のアンタゴニストのNBまたはC末端への融合物またはアンタゴニストの血清半減期が増加したポリペプチドが含まれる。

20

【0224】

変異型の別の型は、アミノ酸置換変異型である。これらの変異型は、アンタゴニスト分子中に異なる残基に置換された少なくとも1つのアミノ酸残基を有する。抗体アンタゴニストの置換変異誘発に非常に重要な部位には、超可変領域が含まれるが、FRの変化も意図される。保存的置換を、「好ましい置換」の見出しで表1に示す。このような置換によって生物活性が変化する場合、表1中の「例示的置換」に示すか、アミノ酸クラスに関して以下にさらに記載のより実質的な変化を導入し、産物をスクリーニングすることができる。

30

【0225】

【表 1 - 1】

表 1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノロイシン	Leu
Leu (L)	ノロイシン ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr

【表 1 - 2】

Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノロイシ	Leu

アンタゴニストの生物学的特性の実質的修飾を、(a) 例えば、シートまたはヘリックス高次構造としての置換領域中のポリペプチド骨格の構造、(b) 標的部位での分子の電荷または疎水性、または(c) 側鎖の嵩の維持に対するその影響が有意に異なる置換基の選択によって行う。天然に存在する残基は、共通の側鎖の性質に基づいて以下の群に分類される。

- (1) 疎水性：ノロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性で親水性：Cys、Ser、Thr；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；
- (5) 鎖の配向に影響を与える残基：Gly、Pro；および
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe

非保存的置換は、これらのクラスの1つの別のクラスへのメンバーの効果を伴う。

【0227】

アンタゴニストの適切な高次構造の維持に関与しない任意のシステイン残基を、一般に、セリンと置換して、分子の酸化安定性を改善し、異所性架橋を防止することができる。逆に、システイン結合をアンタゴニストに付加して、その安定性を改善することができる（特に、アンタゴニストがFvフラグメントなどの抗体フラグメントである場合）。

【0228】

置換変異型の特に好ましい型は、親抗体の1つまたは複数の超可変領域の残基の置換を含む。一般に、さらに進歩させるために選択された得られた変異型は、変異型が生成された親抗体と比較して改善された生物学的特性を有する。このような置換変異型の都合の良い生成方法は、ファージディスプレイを使用したアフィニティ変異である。簡潔に述べれば、いくつかの超可変領域部位（例えば、6～7部位）を変異させて、各部位に可能な全てのアミノ酸置換を生成する。このようにして生成された抗体変異型を、1価の様式で、融合物としての糸状ファージ粒子から各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子IIII産物までディスプレイする。次いで、ファージディスプレイされた変異型を、本明細書中に開示のその生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。修飾のための候補超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング変異誘発を行って、抗原結合に有意に寄与する超可変領域の残基を同定することができる。あるいはまたはさらに、抗体と抗原との間の接触点を同定するために、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することが有利であり得る。このような接触残基および隣接残基は、本明細書中に詳述する技術による置換の候補である。一旦このような変異型が生成されると、変異型パネルを、本明細書中に記載のスクリーニングに供し、1つまたは複数の関連アッセイで優れた性質を有する抗体を、さらなる開発のために選択することができる。

【0229】

アンタゴニストのアミノ酸変異型の別の型は、アンタゴニストの元のグリコシル化パターンが変化している。変化は、アンタゴニスト中に見出される1つまたは複数の炭水化物部分の欠失および/またはアンタゴニスト中に存在しない1つまたは複数のグリコシル化部位の付加を意味する。

【0230】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N結合またはO結合のいずれかである。N結合は、アスパラギン残基側鎖への炭水化物部分の結合をいう。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン（式中、Xはプロリン

を除く任意のアミノ酸である)は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。したがって、ポリペプチド中のこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在により、潜在的なグリコシル化部位が作製される。O結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸(最も一般的にはセリンまたはトレオニンであるが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンを使用することもできる)への糖であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの1つの結合をいう。

【0231】

アンタゴニストへのグリコシル化部位の付加を、1つまたは複数の上記のトリペプチド配列(N結合グリコシル化部位のため)を含むようなアミノ酸配列の変化によって都合良く行う。元のアンタゴニスト配列への1つまたは複数のセリンまたはトレオニン残基の付加または置換(O結合グリコシル化部位のため)によって変化させることもできる。

10

【0232】

アンタゴニストのアミノ酸配列変異型をコードする核酸分子を、当該分野で公知の種々の方法によって調製する。これらの方法には、天然供給源からの単離(天然に存在するアミノ酸配列変異型の場合)またはオリゴヌクレオチド媒介(または部位特異的)変異誘発による調製、PCR変異誘発、およびアンタゴニストのより早く調製された変異型または非変異型バージョンのカセット変異誘発が含まれるが、これらに限定されない。

【0233】

例えば、アンタゴニストの抗原依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)を増強するために、エフェクター機能に関して本発明のアンタゴニストを修飾することが望ましい場合がある。抗体アンタゴニストのFc領域中の1つまたは複数のアミノ酸置換の導入によってこれを行うことができる。あるいはまたはさらに、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域中に鎖間ジスルフィド結合を形成することができる。このようにして生成されたホモ二量体抗体は、改善された内在化能力および/または増加した補体媒介性細胞死および抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を有し得る。Caronら、J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)およびShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)を参照のこと。抗腫瘍活性が増強したホモ二量体抗体を、Wolfら、Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載のヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製することもできる。あるいは、二重Fc領域を有し、それにより、補体溶解およびADCC能力が増強された抗体を操作することができる。Stevensonら、Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)を参照のこと。

20

30

【0234】

例えば、米国特許第5,739,277号に記載のように、アンタゴニストの血清半減期を増加させるために、アンタゴニスト(具体的には、抗体フラグメント)にサルベージ受容体結合エピトープを組み込むことができる。本明細書中で使用される、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、IgG分子のインビボ血清半減期の増加を担うIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、またはIgG₄)のFc領域のエピトープをいう。

40

【0235】

V. 薬学的処方物

本発明で使用するアンタゴニストの治療処方物を、所望の純度のアンタゴニストと任意選択的に薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))との混合によって、保存のために凍結乾燥処方物または水溶液の形態で調製する。許容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤は、使用した投薬量および濃度でレシピエントに無害であり、緩衝液(リン酸、クエン酸、および他の有機酸の緩衝液など)、抗酸化剤(アスコルビン酸およびメチオニンが含まれる)、防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベ

50

ンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルアルコール、またはベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチルパラベンまたはプロピルパラベンなど）、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3 - ペンタノール、および m - クレゾールなど）、低分子量（約 10 残基未満）ポリペプチド、タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなど）、親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなど）、モノサッカリド、ジサッカリド、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンが含まれる）、キレート剤（EDTA など）、糖（スクロース、マンノース、トレハロース、またはソルビトールなど）、塩形成対イオン（ナトリウムなど）、錯塩（例えば、Zn - タンパク質複合体）、および / または非イオン性界面活性剤（TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、またはポリエチレングリコール（PEG）など）が含まれる。

10

【0236】

例示的抗 CD 20 抗体処方物は、WO 1998 / 56418 号に記載されている。この公報は、40 mg / mL リツキシマブ、25 mM 酢酸塩、150 mM トレハロース、0.9 % ベンジルアルコール、0.02 % ポリソルベート 20 を含み、2 ~ 8 での最短の有効期限が 2 年間である pH 5.0 の液体複数回投与（multidose）処方物を記載している。対象の別の抗 CD 20 処方物は、10 mg / mL リツキシマブを含む 9.0 mg / mL 塩化ナトリウム、7.35 mg / mL クエン酸ナトリウム二水和物、0.77 mg / mL ポリソルベート 80、および注射用滅菌水（pH 6.5）を含む。

20

【0237】

皮下投与に適合した凍結乾燥処方物は、米国特許第 6,267,958 号（Andy a ら）に記載されている。このような凍結乾燥処方物を、適切な希釈剤で抗タンパク質濃度に再構成し、再構成された処方物を、本明細書中で治療すべき哺乳動物に皮下投与することができる。

【0238】

本明細書中の処方物はまた、必要に応じて、1つを超える活性化合物（上記の第 2 薬物）、好ましくは、互いに悪影響を与えない補助的活性を有する薬物を含み得る。このような薬物の型および有効量は、例えば、処方物中に存在するアンタゴニストの量および治療される哺乳動物の臨床パラメーターに依存する。好ましいこのような薬物を、上に記載する。

30

【0239】

有効成分を、例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって調製したマイクロカプセル（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）を含むコロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンに捕捉することもできる。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示されている。

【0240】

徐放性処方物を調製することができる。徐放性調製物の適切な例には、アンタゴニストを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、マトリックスは、成型物（例えば、フィルム）またはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2 - ヒドロキシエチル - メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリ（ビニルアルコール）、ポリラクチド（米国特許第 3,773,919 号）、L - グルタミン酸とエチル - L - グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン - ビニルアセテート、分解性乳酸 - グリコール酸コポリマー（LUPRON DEPOT J（商標）（乳酸 - グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射用ミクロスフェア）およびポリ - D - (-) - 3 - ヒドロキシ酪酸など）が含まれる。

40

50

【0241】

本明細書中のさらなる薬学的に許容可能な送達ビヒクル (vehicle) には、生体適合性の固体または半固体マトリックス (骨粉、セラミックス、生分解性および非生分解性合成ポリマー、および天然高分子が含まれる)、組織接着剤 (例えば、フィブリンペース)、水性高分子ゲル、水溶液、およびリボソームなどが含まれる。例示的処方物および送達ビヒクルを以下に開示する。この開示は例示であり、当業者は、適切な代替物 (具体的に命名された材料の誘導体および材料の組み合わせが含まれる) を容易に認識する。処方物には、1つまたは複数のさらなる成長因子、賦形剤、防腐剤、可溶化剤、緩衝剤、バイアル表面上のタンパク質の喪失を防止するアルブミンなどがさらに含まれ得る。処方当該分野で周知であり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 19th ed., 1995に開示されている。

10

【0242】

CD20アンタゴニストを、組織接着剤成分として送達させることができる。フィブリンペースの組織接着剤は当該分野で公知であり、血漿または組換え供給源から調製することができる。組織接着剤は、フィブリノゲンおよび第XIII因子を含み、これに架橋を活性化するために使用直前にトロンピンを添加する。例えば、米国特許第4,414,976号;同第4,427,650号;および同第4,928,603号を参照のこと。組織接着剤の使用は、結合組織 (靱帯または腱の裂傷など) を修復しなければならない容態の治療で特に有利であり得る。CD20アンタゴニストを、コラーゲンペースの接着剤と組み合わせることもできる。コラーゲンを、天然および合成の供給源から単離することができる。

20

【0243】

固体および半固体マトリックスは、癒着不能骨折、空洞、および他の骨欠損の充填のための好ましい送達ビヒクルである。これらのマトリックスは、天然の骨の空間充填代替物を提供し、骨置換薬 (bone substituting agent) (リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウムとヒドロキシアパタイトとの組み合わせ、ポリメチルメタクリレート、アルミン酸塩および他のセラミックス、ならびに脱塩凍結乾燥皮膚骨など) が含まれる。固体および半固体のマトリックスを、種々の高分子材料から調製することもできる。半固体マトリックスは、骨欠損に正確に充填されるように成形することができるような展性 (malleability) を示す利点がある。マトリックスには、他の活性または不活性成分が含まれ得る。組織の成長または浸潤を促進する薬剤が特に重要である。骨成長を促進する薬剤には、形態形成タンパク質 (米国特許第4,761,471号およびWO90/11366号)、オステオゲニン (Sampathら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7109-7113 (1987) およびNaF (Tencerら、J. Biomed. Mat. Res. 23:571-589 (1989)) が含まれる。

30

【0244】

生分解性合成ポリマーには、ポリエステル、ポリオルトエステル、ポリアンヒドリド、ポリカーボネート、ポリフマレート、ポリヒドロキシブチレート、およびビニルポリマーなどが含まれる。特定の例には、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリラクチド/ポリグリコリドコポリマー、ポリジオキサノン、ポリグリコリド/トリメチレンカーボネートコポリマー、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリビニルピロリドン、およびポリビニルアルコールが含まれるが、これらに限定されない。このような材料を、骨への付着または挿入のための種々の形状 (フィルム、プレート、ピン、ロッド、ネジ、ブロック、および格子などが含まれる) で調製することができる。例えば、米国特許第5,863,297号およびWO93/20859号を参照のこと。これらの材料には、アルブミン、ポリオキシエチレンソルビタン界面活性剤またはグルタミン酸などのキャリアがさらに含まれ得る。原理上、ポリマー分解を増強するか、マトリックス中に孔を作製するか、マトリッ

40

50

クスへの成長因子の吸着を減少させる任意の物質をキャリアとして使用することができる。キャリアとして有用なポリオキシエチレンソルビタン界面活性剤には、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、およびポリオキシエチレンソルビタントリオレートが含まれる。可塑剤を含むこともできる。

【0245】

一般に、本明細書中に記載のフィルムまたはデバイスを、骨の損傷部位に適用する。一般に、標準的な外科的手順を使用して、骨への移植または表面への付着によって適用する。

10

【0246】

生分解性ポリマーフィルムは、人工器官および外科的インプラントのコーティングとして特に有用である。このようなフィルムで、例えば、手術用のネジ、ロッド、ピン、およびプレートなどの外面を被覆するか、これ自体を巻くか種々の形状に形成することができる。この型の移植可能なデバイスは、整形外科で日常的に使用されている。フィルムを使用して、骨充填材料（ヒドロキシアパタイトブロック、脱灰骨基質栓（plug）、およびコラーゲンマトリックスなど）をコーティングすることもできる。本明細書中で使用される、用語「コポリマー」には、2つまたはそれを超える単量体単位型を含む任意のポリマーが含まれる。

【0247】

20

マトリックスの分解および結果として起こるマトリックスからの増殖因子の放出を、分子量、コポリマーの構造、ポリマーの比率、マトリックスの厚さ、および空隙率などのパラメーターの調整ならびに上記開示のキャリアを含めることによって調整することができる。例えば、PLA/PGAフィルムを一般的に配合して、75:25と25:75との間、より一般的には、65:35と35:65との間のPLA:PGA比を得る。一般に、分子量が10,000ダルトンと200,000ダルトンとの間のコポリマーを使用して、インプラントを調製する。一般に、より低い分子量のコポリマーは、より高い分子量の処方物よりも迅速に分解する。ランダムコポリマーは結晶性が低く、したがって、他のコポリマー型よりも早く分解する。鏡像異性体ラクチドのポリマーは結晶であり、したがって、そのラセミ対応物よりも分解耐性が高い。

30

【0248】

ポリマーマトリックスを、当該分野で公知の手順を使用して調製する。例えば、米国特許第4,902,515号；Gilding and Reed, Polymer 20:1459-1464 (1979)；および米国特許第3,773,919号を参照のこと。例えば、PLA/PGAコポリマーインプラントを、適切な溶媒（例えば、クロロホルムまたは塩化メチレン）中での所望の量のPLA/PGAコポリマー粒子の組み合わせ、得られた溶液を鋳型に注ぐこと、および溶媒の完全な蒸発によって生成する。代替法では、PLA/PGAインプラントを、圧縮成形、押し出し成形、または他の公知の方法によって生成することができる。マトリックスに充填するために、CD20アンタゴニストおよびキャリアを、粉末または液体として適用する。例えば、凍結乾燥CD20アンタゴニストおよびアルブミンを、ポリマーフィルムのある表面上に均一に分散させ、フィルムを折り重ねることができる。この過程の繰り返しにより、ポリマーおよびCD20アンタゴニストの重層化された「サンドイッチ」を構築することができる。代替法では、タンパク質を水溶液（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水または0.1M酢酸）として適用し、乾燥させる。多孔質インプラントを、CD20アンタゴニスト溶液（任意選択的に、他の成分を含む）に浸漬し、液体を蒸発させる。CD20アンタゴニストを、展性ポリマーマトリックスに組み込み、その後、マトリックスを所望の形状に形成し、高温（例えば、60~65）で硬化させる。多孔質インプラントを、真空下でのマトリックスの硬化によって調製することができる。

40

【0249】

50

C D 2 0 アンタゴニストを、生分解性スポンジ（例えば、ゼラチン、コラーゲン、セルロース、またはキチンのスポンジ）と組み合わせて送達させることができる。このようなスポンジは、当該分野で公知である。例えば、米国特許第 2, 4 6 5, 3 5 7 号；米国特許第 4, 2 7 1, 0 7 0 号；および W O 9 0 / 1 3 3 2 0 号を参照のこと。C D 2 0 アンタゴニストおよび任意選択的に 1 つまたは複数のさらなる治療薬の溶液をスポンジに注射し、スポンジを 3 0 ~ 1 0 0 で含水量が 5 0 % 未満、好ましくは 1 0 % 未満まで減少するのに十分な期間風乾させる。

【 0 2 5 0 】

送達ビヒクルとしてゲルを使用することもできる。増殖因子の送達のための水性高分子ゲルは、例えば、米国特許第 5, 4 2 7, 7 7 8 号；同第 5, 7 7 0, 2 2 8 号；同第 4, 7 1 7, 7 1 7 号；および同第 5, 4 5 7, 0 9 3 号に開示されている。ゲルは、水中で粘性溶液を形成する生体適合性の水溶性または水膨潤性ポリマーを含む。このようなポリマーには、ポリサッカリド（メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、デキストラン、デンプン、キトサン、およびアルギン酸が含まれる）、グリコサミノグリカン（ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、およびヘパラン硫酸が含まれる）、タンパク質（コラーゲン、ゼラチン、およびフィブロネクチンが含まれる）、およびアクリルアミド（ポリアクリルアミドおよびポリメタクリルアミドが含まれる）が含まれるが、これらに限定されない。一般に、室温で 2 0 0 c p s ~ 1 0 0, 0 0 0 c p s、より一般的には、約 1 0 0 0 c p s ~ 3 0, 0 0 0 c p s の粘度のゲルを調製し、後者の範囲は、水中で約 0.25 ~ 1 0 % のヒドロキシエチルセルロースに対応する。より高い粘度のゲルが当該分野で公知である（例えば、米国特許第 5, 4 2 7, 7 7 8 号）。粘度を、成分ポリマーの種々の濃度および / または長さの変化によって調整することができる。ゲルを、ポリマーを適切な緩衝液（中性またはわずかに酸性 p H の低イオン強度のクエン酸、リン酸、または酢酸の緩衝液など）と組み合わせることによって調製する。一般に、防腐剤（抗菌薬）（メチルパラベン、プロピルパラベン、またはベンジルアルコールなど）を含める。完全な混合後、溶液を、適切な手段（例えば、加圧滅菌）によって滅菌する。混合物を冷却し、濾過滅菌した C D 2 0 アンタゴニストを添加する。

【 0 2 5 1 】

C D 2 0 アンタゴニストの別の局所送達手段には、浸透圧ミニポンプ（例えば、A L Z E T（登録商標）ミニポンプ；A l z a C o r p o r a t i o n, M o u n t a i n V i e w, C a l i f.）、W O 9 2 / 0 3 1 2 5 号に開示の帯電デキストランビーズ、コラーゲンベースの送達系（K s a n d e r ら（A n n. S u r g. 2 1 1 : 2 8 8 - 2 9 4, 1 9 9 0）に開示のものなど）、E d e l m a n ら（B i o m a t e r i a l s, 1 2 : 6 1 9 - 6 2 6, 1 9 9 1）に開示のアルギン酸塩ベースの系が含まれる。骨への徐放局所送達のための当該分野で公知の他の方法には、治療薬と共に充填することができる多孔質コーティング金属人工挿入物および治療組成物を組み込んだ固体プラスチックロッドが含まれる。

【 0 2 5 2 】

C D 2 0 アンタゴニストをさらに使用して、個体への治療有効量の C D 2 0 アンタゴニストの投与によって骨粗鬆症を治療することができる。インビボ投与アッセイを使用して、C D 2 0 アンタゴニストタンパク質をインタクトな動物で試験することができる。原型的投与を、皮下投与、腹腔内投与、または経口投与によって行うことができ、注射、徐放、または他の送達技術によって行うことができる。C D 2 0 アンタゴニストの投与期間は、変化して良い（例えば、2 8 日および 3 5 日が適切であり得る）。

【 0 2 5 3 】

C D 2 0 アンタゴニストが骨芽細胞と接触するように C D 2 0 アンタゴニストを哺乳動物の体内に移植することができ、それにより、骨芽細胞が増殖して骨成長が刺激される。例えば、C D 2 0 アンタゴニストを、骨形成タンパク質（B M P）と組み合わせてマトリックスに配置することができる。B M P は、間葉骨芽細胞前駆体を部位への移動を誘導し

、さらに、間葉細胞の骨芽細胞への分化を誘導する。次いで、CD20アンタゴニストは、さらに、骨芽細胞の増殖を刺激する。適切なマトリックスは、多孔質材料の粒子で構成されている。孔は、前駆細胞の移動およびその後の分化および増殖が可能な寸法でなければならない、一般に、70~850 μm 、一般に、150 μm ~420 μm である。CD20アンタゴニストを含むマトリックスを、骨欠損を包み込む形状に成形することができる。マトリックス材料の例は、粒子状の、脱灰されグアニジン抽出された種特異的骨である。他の潜在的に有用なマトリックス材料には、コラーゲン、グリコール酸と乳酸とのホモポリマーおよびコポリマー、ヒドロキシアパタイト、リン酸三カルシウム、および他のリン酸カルシウムが含まれる。CD20アンタゴニストを、骨芽細胞の増殖の促進に十分な濃度、好ましくは、少なくとも1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のマトリックスの濃度でマトリックスに適用することができる。CD20アンタゴニスト溶液を、骨折部位に直接注射して、骨折の治癒を促進することができる。BMPおよびその生成のためのマトリックスの使用の例は、WO92/07073号、WO91/05802号、米国特許第5,645,591、および米国特許第5,108,753号に開示されている。

【0254】

インビボ投与のために使用すべき処方物は無菌でなければならない。滅菌濾過膜による濾過によってこれを容易に行う。

【0255】

別の実施形態において、本発明は、インビボで骨形成細胞またはその前駆体の成長および/または分化を刺激する方法を提供する。一般に上記に開示のように、これらの方法を使用して、細胞を患者から採取し、エキソビボで拡大し、患者に戻すことができる。骨髄細胞の成長および/または分化が特に重要であり、骨髄細胞は、分化刺激薬の存在下で培養して、特に、骨芽細胞、破骨細胞、および軟骨細胞に進化することができる。初代培養物内の分化された細胞の同定は、主に表現型による。例えば、骨髄細胞の表現型マーカーには、アルカリホスファターゼの発現(Manducara, J. Bone Min. Res. 8:281(1993))、1型コラーゲン合成(Kurihara, Endocrinol. 118(3):940-947(1986))、オステオカルシンの産生(Yoon, Biochem. 27:8521-8526(1988))、および副甲状腺ホルモンに対する反応性(Aubin, J. Cell Biol. 92:452-461(1982))が含まれる。骨芽細胞を、典型的には、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミン、ミネラル、および一般にウシ胎仔血清によって供給される増殖因子を含む成長培地中にて37、5%CO₂で培養する。種々の適切な培地が当該分野で公知である。CD20アンタゴニストペプチドを、これらの細胞型のための組織培養培地に、約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~約1000ng/mlの濃度で添加する。当業者は、CD20アンタゴニスタンパク質を培養培地中で他の増殖因子と都合良く組み合わせることができると認識する。

【0256】

B細胞表面マーカーの抗体をコードするポリヌクレオチドを患者に投与する遺伝子治療アプローチを使用して、骨欠損を修復することもできる。これに関して有用な遺伝子送達系には、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、および裸のDNAベクターが含まれる。例えば、米国特許第5,399,346号; Mann, Cell 33:153(1983); 米国特許第4,650,764号; 米国特許第4,980,289号; Markowitz, J. Virol. 62:1120(1988); 米国特許第5,124,263号; WO95/07358号; および Ku, Blood 82:845(1993)を参照のこと。罹患組織の局所感染(歯周ポケット、骨折、関節、インプラント部位、または人工器官付着部位へのベクターの局所適用など)が特に重要である。

【0257】

別の遺伝子治療アプローチでは、US2004/0126364号は、生きた前骨前駆細胞または前骨芽細胞(OPC)を使用して骨組織成長を促進するための哺乳動物へのポリペプチドの送達(本明細書中で適用可能な方法)を開示している。細胞を、細胞ベース

のプラットフォームとしての機能を果たすために自己細胞移植または同種細胞移植のための細胞を使用して、部位特異的な調節された様式で本明細書中の抗体を送達させることができる。合成細胞ベースの送達が意図され、骨溶解性病変部位でCD20抗体などのB細胞表面マーカーに結合する細胞ベースの送達も意図される。後者は、炎症エフェクター細胞（例えば、マクロファージ）および骨溶解エフェクター細胞（例えば、破骨細胞前駆細胞）が存在する抗体を炎症部位に濃縮することが可能である。細胞は、一般に、骨溶解を阻害するために骨中の特定の移植部位での抗体の発現を指示するための調節可能な誘導性骨芽細胞特異的プロモーターを含む遺伝子操作されたウイルスまたは非ウイルスプラスミドベクターを含む。

【0258】

10

これらの方法の目的のための細胞は、典型的には、骨芽細胞系譜に委ねられる。例えば、骨間質細胞を、自己または同種歯周靱帯から単離し、レシピエント患者への移植前にエキソビボで操作する。分化状態の骨髄間質細胞または靱帯由来細胞を、細胞外基質（ECM）成分（MATRIGEL（商標）（Becton Dickinson）または他の市販のマトリックス調製物など）の存在下、好ましくは、1つまたは複数の骨形成タンパク質（BMP）（BMP-2、-4、または-6など）の存在下での培養によって誘導する。前駆細胞への分化の誘導を、細胞の遺伝子操作の前後で行う。しかし、この工程を、好ましくは、分化細胞を1つまたは複数の治療抗体をコードする遺伝子を含むレトロウイルス発現ベクターを使用して形質導入する。

【0259】

20

分化した前駆細胞の骨組織を構築する能力を、未分化間質細胞と比較して増強した。OPCまたは歯骨前駆細胞を、アルカリホスファターゼの産生、オステオカルシンの発現、および骨シアロタンパク質の発現（歯骨前駆細胞の場合、象牙質シアロタンパク質発現に加えて）によって骨間質細胞（および脂肪、筋、または軟骨の細胞または組織）と区別する。

【0260】

骨髄吸引物由来の間質細胞からOPCを単離および拡大し、ECMの存在下、エキソビボで分化した。自己骨髄間質細胞を拡大する。細胞を、任意選択的に、凍結し、液体窒素中で長期間保存後、分化および形質導入した。関節リウマチは長年存続し得るので、これらの「保存」自己細胞は、長期間にわたって複数回摂取可能であることは有利である。

30

【0261】

臨床上的利点がこのような細胞の使用によって付与されると予想されるので、さらなる態様では、本発明は、B細胞表面マーカーに結合する抗体（好ましくは、CD20抗体）をコードする核酸を含む単離した歯骨前駆細胞または前骨芽細胞を哺乳動物に導入する工程を含む、哺乳動物の骨溶解を阻害する方法を意図する。哺乳動物は、例えば、歯周炎または骨量減少（歯槽骨量減少）を引き起こし得る他の骨障害を罹患しているか発症リスクがあるヒト患者である。本明細書中に記載の方法はまた、獣医学的使用（例えば、イヌ、ネコ、ウマの治療）にも適用可能である。

【0262】

40

OPCを、骨芽細胞に分化した細胞中に優先的に連結する核酸の転写を指示するプロモーターに作動可能に連結された本明細書中の抗体をコードする核酸を含むように遺伝子改変する。典型的には、レトロウイルス発現ベクターを構築する。このような構築物中の好ましいプロモーターは、骨芽細胞特異的プロモーター（上記で特定した米国特許出願に記載のオステオカルシン、骨シアロタンパク質、または象牙質シアロタンパク質を有するプロモーター配列など）ならびに/または逆トランスアクチベーターであるテトラサイクリンアクチベーター（rtTA）遺伝子（治療抗体の産生も調節する）の転写を開始するためのプロモーターである。さらに、（他の細胞型と比較して）歯骨前駆細胞またはOPC中での転写を優先的に指示するように機能するこのようなプロモーターの短縮フラグメントを使用することができる。好ましくは、OPCを、 α -5インテグリン受容体の発現が増加するように修飾することができる。この修飾により、細胞をインビボで移植した場合

50

に細胞が骨基質タンパク質に接着することが可能となり、例えば、多孔質リン酸カルシウムセラミックキューブまたは他のカプセル化デバイス型への事前のカプセル化を行わずにOPCを骨溶解部位に直接挿入することができるというさらなる利点が付与される。抗体をコードする核酸の発現は、好ましくは、誘導性である。骨芽細胞または歯骨前駆細胞転写調節DNAを使用して、転写単位中での抗体発現を調節することができる。調節配列（例えば、シス活性細胞特異的転写調節エレメント）を、転写単位中の抗体コード核酸配列の5'側に配置することができる。

【0263】

抗体コード配列の発現を、細胞の抗生物質（例えば、テトラサイクリンまたはテトラサイクリンアナログ（例えば、ミノサイクリンまたはドキシサイクリン）など）への接触によって調節することができ、1つの特定の実施形態では、テトラサイクリンを、ミノサイクリンと共に、同時または個別に哺乳動物に投与する。このような抗生物質を、好ましくは、全身投与する。

10

【0264】

例えば、テトラサイクリンを、歯根膜手術の少なくとも2日前（例えば、本発明の細胞を移植する時）ならびに/または手術および/もしくは移植の少なくとも2日後に全身投与する。細胞によって抗体が発現される一方で抗生物質が組織内に存在する（すなわち、一方で抗生物質が細胞移植レシピエントに投与される）。抗体の発現は、抗生物質投与の停止後に減少し、終了する。典型的には、抗生物質を、手術の8~12日前および手術の8~12日後に投与した。同様に、抗生物質を、形成手術（例えば、結合関節（*articulating joint*）からの軟骨の除去手術または転移性骨腫瘍の除去手術（その時に、罹患組織またはその近傍に細胞を移植する））の前後に投与する。

20

【0265】

細胞が歯骨前駆細胞である場合、哺乳動物は、歯周病または歯周疾患に起因する歯槽骨量減少を罹患しているか発症リスクがあり得る。細胞を、歯科形成手術用人工器官の移植前、移植中、または移植後に移植することができる。進行性歯周病治療のために、細胞を、下顎部分の歯周靱帯に局所投与することができる。

【0266】

骨障害の治療のために、歯骨前駆細胞を、レシピエント哺乳動物の骨髓または哺乳動物の結合関節に移植することができる。例えば、細胞を、脛骨内または大腿骨内に投与する。細胞を、例えば、骨量減少部位または部位（例えば、骨髓など）の近傍に局所投与する。

30

【0267】

哺乳動物の骨髓への細胞の移植方法は、当該分野で周知である（例えば、米国特許第4,188,486号）。投与すべき細胞の用量は、移植部位に適切な体積で 1×10 細胞~ 1×10^{10} 細胞の範囲である（大腿骨の骨髓への移植と比較して、下顎組織または歯周靱帯への移植にはより小さな体積を使用する）。このような移植手順の臨床プロトコールは、当該分野で公知である。例えば、 1×10^8 細胞/kg体重の用量を、大腿骨の骨髓に投与することができる。関節リウマチなどの長期疾患には、反復移植が必要であり得る。

40

【0268】

破骨細胞関連障害の治療薬（例えば、IL-4、特に、組換えヒトIL-4またはTNF- α のインヒビターなど）を、任意選択的に、抗体と共に投与する。さらに、任意選択的に、他の第2薬物（NSAIDまたは抗疼痛薬（アスピリン、イブプロフェン、およびインドメタシンが含まれる）ならびにビスアリールCOX-2阻害化合物（例えば、米国特許第5,994,379号）および（メチルスルホニル）-フェニル-2-(5H)-フラノン（例えば、米国特許第6,020,343号）など）を投与することができる。より好ましくは、IL-4またはTNF- α のインヒビターをさらに投与する。

【0269】

単離された遺伝子修飾OPCを使用して、骨量減少障害（関節リウマチ、骨粗鬆症、根

50

尖周囲または軟骨内の骨量減少、人工関節粒子誘導性骨溶解、骨折または骨欠損、原発性または続発性副甲状腺機能亢進症、転移性骨疾患、骨溶解性骨疾患、形成手術後、人工関節手術後など）を罹患しているか発症リスクがある個体を治療する。より好ましくは、このような哺乳動物は、関節リウマチ、根尖周囲または軟骨内の骨量減少、人工関節小片（particle）誘導性骨溶解、または骨溶解性骨転移を罹患しているか発症リスクがあり得る。したがって、例えば、本明細書中の抗体を分泌するように操作されたOPCを、インプラント誘導性骨溶解の発症に起因する人工関節置換の修正を受けた患者ならびに関節リウマチに起因する骨量減少を罹患した患者および重症歯周病に起因する口腔に移植することができる。

【0270】

10

VI. 製品

本発明の別の実施形態では、上記の骨障害の治療に有用な材料を含む製品を提供する。1つの態様では、製品は、（a）B細胞表面マーカーに結合するアンタゴニスト（これに結合する抗体（CD20抗体が含まれる））を含む容器（好ましくは、容器は、容器内にアンタゴニストまたは抗体および薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤を含む）、および（b）哺乳動物（患者など）の骨障害の治療についての説明書（説明書は、アンタゴニストまたは抗体を、有効量（例えば、約400mg～1.3gの用量で1～4回の投与頻度などのアンタゴニストまたは抗体など）で約1ヶ月以内に患者に投与することを示す）を含む添付文書を含む。

【0271】

20

好ましい実施形態では、本明細書中の製品は、第2薬物を含む容器をさらに含み、アンタゴニストまたは抗体は第1薬物である。この製品は、添付文書に有効量の第2薬物での患者の治療についての説明をさらに含む。第2薬物は、上記の任意の薬物であり得、例示的な第2薬物は、破骨細胞関連障害の治療薬、免疫抑制薬、細胞傷害薬、インテグリンアンタゴニスト、またはホルモンである。好ましい第2薬物は、上記の薬物であり、破骨細胞関連障害の治療薬、免疫抑制薬、またはその両方が最も好ましい。

【0272】

別の態様では、本発明は、（a）B細胞表面マーカーに結合する抗体（例えば、CD20抗体）を含む容器（好ましくは、容器は、容器内に抗体および薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤を含む）、および（b）哺乳動物の骨障害の治療についての説明書（説明書は、最初の一連の用量の抗体、その後第2の一連の用量の抗体を得るのに有効な抗体の量を哺乳動物に投与し、最初の一連の用量から約16～54週間まで第2曝露を行わないことを示す）を含む添付文書を含む製品を提供する。

30

【0273】

好ましくは、このような添付文書を、哺乳動物の骨障害の治療についての説明書（説明書は、約0.5g～4gの最初の抗体を曝露し、その後0.5～4gの第2抗体を曝露するのに有効な抗体の量を哺乳動物に投与し、最初の曝露から約16～54週間まで第2曝露を行わず、各抗体曝露を、抗体の約1～4つの用量、好ましくは、単回用量または2～4つの個別の用量として哺乳動物に行うことを示す）と共に提供する。

【0274】

40

本発明の態様の好ましい実施形態では、本明細書中の製品は、さらに、第2薬物を含む容器を含み、抗体は第1薬物であり、製品は、さらに、添付文書に有効量の第2薬物での哺乳動物の治療についての説明書を含む。第2薬物は、上記の任意の薬物であり得、例示的な第2薬物は、破骨細胞関連障害の治療薬、免疫抑制薬、細胞傷害薬、インテグリンアンタゴニスト、またはホルモンであり、破骨細胞関連障害の治療薬、免疫抑制薬、またはその両方が最も好ましい。

【0275】

これら全ての態様では、添付文書は、容器上または容器に付随している。適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジなどが含まれる。容器を、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成することができる。容器は、骨障害の治療に有効な組成

50

物を保持するか含み、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、静脈注射用溶液バッグ、または皮下注射針によって突き刺すことができるストッパーを有するバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1つの活性成分は、アンタゴニストまたは抗体である。ラベルまたは添付文書は、哺乳動物（治療を行うのにふさわしい患者（例えば、本明細書中に列挙した骨疾患などの骨疾患を罹患しているか罹患しやすい患者）など）の治療のために組成物を使用することを示し、アンタゴニストまたは抗体および任意の他の薬物の投与量および投与間隔に関する特定のガイダンスを提供する。製品は、さらに、薬学的許容可能な希釈用緩衝液（注射用静菌水（B W F I）、リン酸緩衝化生理食塩水、リンゲル液、および/またはデキストロース溶液など）を含むさらなる容器を含み得る。製品は、さらに、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料（他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジが含まれる）を含み得る。

10

【0276】

本発明のさらなる詳細を、以下の非限定的な実施例によって例証する。明細書中の全ての引例の開示は、明確に本明細書中で参考として援用される。

【実施例】

【0277】

実施例1

血清生化学マーカーは、リツキシマブでの関節リウマチ治療に対する応答と関連する背景：

リツキシマブ（RTX；Rituxan（登録商標）/ MabThera（登録商標））を有するターゲティングB細胞は、関節リウマチ（RA）の新規の治療アプローチを提供することが見出されている。メトトレキサートが無効な活動性関節リウマチ患者におけるランダムな対照臨床試験は、単独使用またはシクロホスファミドもしくは継続的メトトレキサートと組み合わせたリツキシマブを2回注入する1つの治療単位によって24週間（Edwardsら、N. Engl. J. Med.（2004）上記；Pavelkaら（上記））および48週間（Edwardsら、N. Engl. J. Med.（2004）上記）で疾患活動性が有意に改善され、一部の患者では、2年間持続する（Emeryら（2004）上記）ことを示した。しかし、RAを治療するその作用機構またはRA患者における種々の生物マーカーに対する効果についてはほとんど知られていない。特に、リツキシマブなどのB細胞枯渇療法が破骨細胞の活性に効果があるかどうかは知られていない。

20

30

【0278】

目的：

血清生物マーカーに対するリツキシマブの効果、そしてこのような効果が臨床所見と一致するのかどうかをさらに理解するために、炎症および骨代謝回転の多数の血清学的マーカーを調査した。

【0279】

方法：

メトトレキサート（MTX）のみまたはRAにおけるリツキシマブの第IIa相研究の一部としてリツキシマブの1回の治療単位と組み合わせたMTXのいずれかを投与されたRA + 患者由来の血清サンプルを分析した。以下のマーカーを、ベースラインおよび24週目に測定した：抗CCP、CRP、S100、SAA、P1NP、およびオステオカルシン（OC）。

40

【0280】

結果：

24週目のACR50応答の主要エンドポイントは、MTX投与を継続した2週間間隔のリツキシマブの2回の注入を受けた患者がMTXのみを投与された患者よりも臨床応答が有意に高いことを証明した。生物マーカーデータを、MTX群におけるベースラインからの24週間後の変化率とRTX + MTX群との比較による非パラメータアプローチを使用して分析した。ベースラインからの変化率の中央値を、以下の式を使用してプロット

50

した。

$Pcfb1(\text{マーカー}) = ((\text{勾配}_{lr} * \text{最後の訪問での研究期間}) / \text{切片}_{lr}) * 100$

(式中、勾配_{lr} = 各患者についての線形回帰の勾配

切片_{lr} = 各患者についての線形回帰の切片)

24週目のRTX + MTX群で認められた臨床応答は、分析したマーカーの血清レベルの有意な変化にも付随している。結果を、表2に示す。

【0281】

【表2】

表2

24週目のペーサインからの変化率の中央値

	MTX (n=40)	リツキシマブ [*] + MTX (n=40)	P値 [*]
抗CCP ¹	-21.03	-45.78	0.0012
CRP ²	-22.21	-59.07	0.0087
S100 ³	-14.31	-52.73	0.0004
SAA ⁴	-10.55	-77.02	<0.0001
P-1NP ⁵	-11.78	13.64	0.0119
OC ⁶	1.94	28.76	0.0143

^{*} 両側ウィルコクソン順位和検定によるP値

¹ 抗CCPは抗シトルリン化(anti-citrullinated)ペプチド抗体である

² CRPはC反応性タンパク質である

³ S100は食細胞中のCa⁺⁺結合カルグラニューリンタンパク質である S100 A8 / 9である

⁴ SAAは血清アミロイドAである

⁵ P-1NPはプロコラーゲン1型N末端プロペプチドである、⁶ OCはオステオカルシンである。

【0282】

結論：

分析した全てのマーカーは、MTXのみと比較して、RTX + MTX群で24週目に有意な変化を示した。特に、抗CCP、CRP、S100、およびSAAの血清レベルの変化により、リツキシマブの1回の短期間の治療単位によって炎症および自己抗体に著しい効果があることが示唆され、これは、認められた徴候および症状の実質的改善と一致する。総免疫グロブリンレベルは、リツキシマブでの治療によって有意な影響を受けなかった。さらに、OCおよびP1NP血清レベルは、MTX群と比較してRTX + MTX群で有意に増加し、RAの徴候および症状に対するリツキシマブの効果が骨代謝回転の生物マーカーに対する好ましい効果によって補足されることが示唆され、骨密度および/または構造の損傷に対するリツキシマブの効果を示す。

【0283】

実施例2

動物の骨再成形

リツキシマブの活性を、骨再成形の動物モデルで証明することができる。したがって、Sprague-Dawleyラットの体重を合わせ、各群につき10匹ずつ7つの群に分けた。研究開始時に屠殺するラットのコントロール群、ビヒクルのみを投与するコントロール群、PBS処置コントロール群、および骨成長を促進することが公知の化合物を投与したポジティブコントロール群を含む。3つの投薬量レベルのリツキシマブを、残りの

3 群に投与する。

【0284】

リツキシマブ、ポジティブコントロール化合物、PBS、またはビヒクルのみを、1日に1回を35日間皮下投与する。全動物に、屠殺の9日前および2日前にカルセインを注射する（各指定日にカルセインを2回注射した）。毎週体重を測定した。35日サイクルの最終日に、動物を秤量し、眼窩または心臓穿刺によって採血する。血清カルシウム、リン酸塩、オステオカルシン、およびCBCを決定する。評価のために両脚の骨（大腿骨および脛骨）および腰椎を取り出し、接着した軟組織を除去し、70%エタノール中に保存する。骨再造形に対するリツキシマブの効果を、末梢定量的コンピュータ断層撮影法（pQCT; Ferretti, Bone 17:353S-364S (1995)）、二重エネルギーX線吸収測定法（DEXA; Laval-Jeantetら、Calcif Tissue Intl. 56:14-18 (1995); Casezら、Bone and Mineral 26:61-68 (1994)、および/または組織形態測定によって評価する。

10

【0285】

リツキシマブのインビボでの投与により、破骨細胞形成および関連する骨吸収を阻害し、ヒトにおける骨減少障害を模倣する動物モデルで認められる破骨細胞数および活性の病理学的増加を遮断すると予想される。したがって、リツキシマブ（すなわち、ヒト化2H7）がこの動物モデルにおけるコントロールよりも骨再造形の増強に有効であると予想される。

20

【0286】

実施例3

骨粗鬆症におけるリツキシマブの臨床研究

骨粗鬆症と診断された患者を、リツキシマブで処置することができる。処置された患者を、B細胞悪性疾患を罹患させるために選択する。

【0287】

以下の投与計画にしたがって、リツキシマブを患者に静脈内（IV）投与する。

(A) 50 mg / m² IV (1日目)

150 mg / m² IV (8、15、および22日目)

(B) 150 mg / m² IV (1日目)

375 mg / m² IV (8、15、および22日目)

(C) 375 mg / m² IV (1、8、15、および22日目)

(D) 1 g IV (1および15日目)

30

さらなる補助療法（上記の破骨細胞関連障害の治療薬など）を、リツキシマブ療法と組み合わせることができるが、好ましくは、患者を、治療単位を通して単剤としてリツキシマブで処置する。プラセボ（リツキシマブを含まないリツキシマブ処方物溶液）を使用して、個別の患者群にコントロールを投与する。

【0288】

標準的な化学パラメーターによって決定される骨の骨芽細胞の改善に基づいて、全応答率を決定する。さらに、骨密度計測および骨折率の評価を、生物マーカー（実施例1に記載のものなど）に加えたエンドポイントとして使用する。リツキシマブ（すなわち、ヒト化2H7）の投与により、プラセボコントロールと比較して、上記のように処置した患者において、生物マーカーによって決定した骨の骨芽細胞が改善され、骨密度が改善し、骨折率が減少すると予想される。

40

【0289】

実施例4

インビトロで形成された破骨細胞の同定

TRAPは、破骨細胞様細胞を同定する酒石酸耐性酸ホスファターゼをいう。リツキシマブを、TRAPアッセイのポジティブコントロールとして使用することができる。

【0290】

50

TRAPでの細胞化学的染色は、インビボおよびインビトロでの破骨細胞の同定に広く使用されている。この試験では、ナフトールAS-MXホスフェート5mg (Sigma, St. Louis, MO)を、0.5mlのN,N-ジメチルホルムアミド(Wako)に溶解する。30mgのファーストレッドバイオレットLB塩(Sigma)および50mM酒石酸ナトリウムを含む50mlの0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)を、混合物(TRAP染色液)に添加する。細胞を、3.7%(v/v)ホルムアルデヒドを含む Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まないリン酸緩衝化生理食塩水で10分間固定し、エタノール-アセトン(50:50、v:v)で再度1分間固定し、TRAP染色液と10分間インキュベートする。TRAP陽性破骨細胞は、赤色細胞として認められる。経時的に破骨細胞以外の細胞がわずかに陽性になるので、インキュベーション期間は10分間を超えるべきではない。染色後、細胞を、蒸留水で洗浄し、3つまたはそれを超える核を有するTRAP陽性多核化細胞を、顕微鏡下で破骨細胞として計数する(Nicholsonら、J. Clin. Invest. 78:355(1986))。リツキシマブまたはヒト化2H7がこのTRAPアッセイにおけるポジティブコントロールとして有効であると予想される。

10

【0291】

実施例5

歯周病のためのCD20抗体

リツキシマブを使用して、歯周病で喪失した骨または靱帯を再生することができる。このモデルでは、周囲の顎骨が20%~80%減少した歯を剥がし、次いで、切開によって顎骨および歯根を露呈することによって全層歯肉弁を作製する。歯根を削って歯垢および歯石を除去する。リツキシマブを、2.5%HPMCゲル中にて歯あたり100gの用量で歯周ポケットに適用するか、リツキシマブを含む100mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)を骨粉に添加して、歯あたり100gのリツキシマブの投薬量を得る。材料を完全に混合し、露呈した歯周ポケットに適用する。両方の場合、歯肉弁を閉じ、縫合によって適所に保持する。リツキシマブをよりもむしろプラセボを使用したコントロールと比較して、リツキシマブ(すなわち、ヒト化2H7)を使用したこの歯周炎モデルにおいて周囲の顎骨が少なくとも部分的に再生されると予想される。

20

【0292】

実施例6

歯のインプラント

リツキシマブ活性を、歯インプラントモデルで証明することができる。ポリ乳酸-ポリグリコール酸フィルム(50:50)は、約340mgのポリマー粒子(Poly Sciences, Warrington, PA)を室温で10mlクロロホルムに溶解し、室温でスローエアフローフード(slow air flow hood)にて溶媒を完全に蒸発させることによる溶媒鑄造物(solvent cast)である。フィルムは、10μmの厚さである。それぞれ80mm×40mmのシートに切断し、それにより、約270~290mgのポリマーが残存する。リツキシマブまたはヒト化2H7およびウサギ血清アルブミンの溶液をフィルム上に広げ、液体を蒸発させる。次いで、フィルムを直径0.9mmのKirschnerワイヤの周囲に巻き付けて直径1.5~3.0mmにし、冷エチレンオキシドガスを使用して滅菌する。これらのインプラントを、CD20抗体よりもむしろプラセボを有するインプラントと共にラットに配置する。コントロールインプラントと比較して、リツキシマブまたはヒト化2H7を使用したこのインプラントモデルで骨量減少が予防されると予想される。

40

【0293】

実施例7

OVX動物における骨量減少の予防

コントロールとしてエストロゲン処置群を使用したインビボでの投与アッセイを使用して、リツキシマブ活性を急性卵巣切除動物において証明することができる。この予防モデルでは、Sprague-Dawleyラットの体重を合わせ、8つの群に分ける。これ

50

らの群は、研究開始時に屠殺するラットのコントロール群、3つのコントロール群（偽卵巣切除（偽OVX）+ビヒクルのみ、卵巣切除（OVX）+ビヒクルのみ、PBS処置OVX）、およびエストロゲンを投与したコントロールOVX群を含む。3つの投薬量レベルのリツキシマブを、OVX動物の残りの3群に投与する。卵巣切除術（OVX）が過食症を誘導するので、35日間の研究にわたり、全OVX動物について、摂餌量を偽OVX動物と揃えた（pair-fed）。

【0294】

リツキシマブ、ポジティブコントロール化合物、PBS、またはビヒクルのみを、1日に1回、35日間皮下投与する。あるいは、リツキシマブを、移植可能なペレット中に配合し、35日間移植する。屠殺の9日前および2日前に、全動物（偽OVX/ビヒクルおよびOVX/ビヒクル群が含まれる）にカルセインを腹腔内注射する（新規に形成された骨の適切な標識を確認するために、各指定日にカルセインを2回注射する）。毎週体重を測定した。35日サイクルの最終日に、上記のように動物の血液および組織を処理する。リツキシマブ（すなわち、ヒト化2H7）は、このモデルの骨量減少の予防においてコントロール群よりも有効であると予想される。

10

【0295】

実施例 8

慢性OVX動物における骨への影響

リツキシマブ活性を、慢性OVX動物において証明することができる。このモデルでは、いくつかのSprague-Dawleyラットに、時間0に偽手術（偽OVX）または卵巣切除術（OVX）に供し、ベースラインコントロールとするために10匹のラットを屠殺する。体重を毎週記録する。骨枯渇から6週間後、10匹の偽OVXラットおよび10匹のOVXラットを、枯渇期間コントロールとして屠殺するために無作為に選択する。残りの動物のうち、10匹の偽OVXラットおよび10匹のOVXラットを、プラセボ処置コントロールとして使用する。残りのOVX動物を、3～5回のリツキシマブで5週間処置する。ポジティブコントロールとして、OVX群のラットを、PTH（このモデルで公知の同化剤）などの薬剤で処置する（Kimmelら、Endocrinology 132: 1577-1584 (1993)）。大腿骨、脛骨、および第1～第4腰椎を切り出して回収し、骨形成に対する効果を決定する。左および右脛骨近位をpQCT測定、海綿骨ミネラル濃度（BMD）（重量測定）、および組織学のために使用する一方で、各脛骨の中軸（midshaft）を皮質BMDまたは組織学に供する。生体力学試験前に中軸のpQCTスキニングのための大腿骨を調製する。腰椎（LV）に関して、BMDのためにLV2を処理し、非脱灰骨の組織学のためにLV3を調製し、機械的試験のためにLV4を処理する。リツキシマブまたはヒト化2H7で処置したOVX動物が、骨形成の増強において、1つまたは複数のこれらの試験でプラセボ処置コントロールよりも大腿骨、脛骨、および第1～第4腰椎が改善すると予想される。

20

30

【0296】

実施例 9

細胞送達CD20抗体による歯槽骨量減少の阻害

破骨細胞は、進行性歯周炎時の過剰な骨吸収の媒介を担う。リツキシマブは、破骨細胞の分化および機能を阻害すると予想される。この動物モデルでは、自己細胞を、リツキシマブを発現するように操作し、当該分野で公知の方法を使用して、炎症部位（下顎、罹患歯に隣接する軟組織、または歯周靱帯）に恒久的に移植する。

40

【0297】

歯周病は、臨床的に関連する微生物であるポルフィロモナス・ジンジバリス由来のLPSの反復注射（当該分野で認識されている歯周病モデル）によってC3Hマウス中に誘導する。調節可能な様式でリツキシマブを産生するように遺伝子操作されたC₃H₁₀T1/2マウス線維芽細胞株を使用して、歯周病マウスを試験する。リツキシマブの産生を、例えば、飲料水での抗生物質の経口投与によって調節する。細胞を骨吸収部位に局所的に移植し、それにより、生体活性分子の全身投与または反復局所注射のいずれの必要性も回

50

避される。任意選択的に、抗生物質を、歯周病のための細胞移植後に歯周ポケットに配置する。リツキシマブの局所送達のためのこの細胞ベースのアプローチは、歯槽骨吸収を阻害するように操作した組織を使用する。

【0298】

本明細書中で使用されるモロニーマウスレトロウイルスベクターは十分に特性決定されており、ヒトまたはマウスにおいて非免疫原性を示す。

【0299】

標準的なインサイチュハイブリッド形成 (ISH) を使用して、リツキシマブ産生を検出し、細胞インプラントレシピエントの集合した (populated) 下顎骨または他の骨組織を有する細胞中の破骨細胞表現型を特性決定する。

10

【0300】

上記から、本発明の特定の実施形態を例示の目的のために本明細書中に記載しているが、本発明の精神および範囲を逸脱することなく種々の修正形態を得ることができると認識される。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲以外で制限されない。

【図面の簡単な説明】

【0301】

【図1A】図1Aは、マウス2H7 (配列番号1)、ヒト化2H7.v16変異型 (variant) (配列番号2)、およびヒト軽鎖サブグループI (配列番号3) の軽鎖可変ドメイン (V_L) のアミノ酸配列をそれぞれ比較した配列アラインメントである。2H7およびhu2H7.v16の V_L のCDRは以下である: CDR1 (配列番号4)、CDR2 (配列番号5)、およびCDR3 (配列番号6)。

20

【図1B】図1Bは、マウス2H7 (配列番号7)、ヒト化2H7.v16変異型 (配列番号8)、および重鎖サブグループIIIのヒトコンセンサス配列 (配列番号9) の重鎖可変ドメイン (V_H) のアミノ酸配列をそれぞれ比較した配列アラインメントである。2H7およびhu2H7.v16の V_H のCDRは以下である: CDR1 (配列番号10)、CDR2 (配列番号11)、およびCDR3 (配列番号12)。

【0302】

図1Aおよび図1Bでは、示すように、各鎖中のCDR1、CDR2、およびCDR3をボックスで囲み、フレームワーク領域 (FR1~FR4) に隣接している。2H7は、マウス2H7抗体をいう。配列の2つの矢印の間のアスタリスクは、2つの配列の間で異なる位置を示す。残りの番号は、a、b、c、d、およびeとして示した挿入図を含むKabatら、Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) に従う。

30

【図2】図2は、ヒト化2H7.v16変異型 (配列番号2) およびヒト化2H7.v138変異型 (配列番号28) の軽鎖アミノ酸配列を比較した配列アラインメントである。

【図3】図3は、ヒト化2H7.v16変異型 (配列番号8) およびヒト化2H7.v138変異型 (配列番号29) の重鎖アミノ酸配列を比較した配列アラインメントである。

【図 1 A】

FIG. 1A

軽鎖可変ドメインの配列アラインメント

	FR1	CDR1	
	10	20	30
2H7	QIVLSQSPAILLSASPGKIVIMTC	RASSSVS-YMH	WYQQKP
	* * * *	* * *	
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC	RASSSVS-YMH	WYQQKP
		* * * *	
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC	RASQISINLYA	WYQQKP

	FR2	CDR2	FR3
	50	60	70
2H7	GSSPKPWLY	APSNLAS	GVPARFSGSGSGTYSYSLTISRVEA
	** *	*	*** **
hu2H7.v16	GKAPKPLIY	APSNLAS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
	*	* * *	
hum KI	GKAPKLLIY	AASSLES	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ

	CDR3	FR4
	90	100
2h7	EDAATYYC	QQWSFNPPPT
	*	FGAGTKLELKR
HU2h7.V16	EDPATYYC	QQWSFNPPPT
	**** *	FGQGTKVEIKR
HUM ki	EDPATYYC	QQYNSLFWIT
		FGQGTKVEIKR

【図 1 B】

FIG. 1B

重鎖可変ドメインの配列アラインメント

	FR1	CDR1	
	10	20	30
2H7	QAYLQQSGAELVVRPGASVKMSCKAS	GYTFSTSYNMH	WVKQT
	*** ** *	* * *	
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GYTFSTSYNMH	WVRQA
		* * *	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GYTFSSYAMS	WVRQA

	FR2	CDR2	FR3
	50	60	70
2H7	PRQGLEWIG	AIYPGNGDTSYNQKFKG	KATLTVDKSSSTAYM
	** *	*	*** **
hu2H7.v16	PGKGLEWVG	AIYPGNGDTSYNQKFKG	RFTISVDKSKNTLYL
	*	* * * * *	
hum III	PGKGLEWVA	VISGDGGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYL

	CDR3	FR4
	90	100
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR	VVYYSNSYWFYDV
	** * *	*
hu2H7.V16	QMNSLRAEDTAVYYCAR	VVYYSNSYWFYDV
		***** **
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	GRVGYSLY--DY

【図 2】

FIG. 2

hu2H7.v16 および hu2H7.v138 軽鎖のアラインメント

hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAP
hu2H7.v138	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP

hu2H7.v16	SNLASGVPSPRFGSGSGTDFTLTISLQPEDPATYYCQQWSFNPPPTFGQG
hu2H7.v138	SNLASGVPSPRFGSGSGTDFTLTISLQPEDPATYYCQQWAFNPPTFGQG

hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQMKVD
hu2H7.v138	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQMKVD

hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
hu2H7.v138	NALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL

hu2H7.v16	SSPVTKSFNREGC
hu2H7.v138	SSPVTKSFNREGC

【図 3】

FIG. 3

hu2H7.v16 および hu2H7.v138 重鎖のアラインメント

hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
hu2H7.v138	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA

hu2H7.v16	IYPGNGDTSYNQKFKGRPTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVV
hu2H7.v138	IYPGNGDTSYNQKFKGRPTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVV

hu2H7.v16	YYSNSYWFYDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
hu2H7.v138	YYSASYWFYDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL

hu2H7.v16	VKDYPFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
hu2H7.v138	VKDYPFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT

hu2H7.v16	QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPP
hu2H7.v138	QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPP

hu2H7.v16	KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
hu2H7.v138	KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ

hu2H7.v16	YNSTYRVVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
hu2H7.v138	YNATYRVVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPRE

hu2H7.v16	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
hu2H7.v138	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP

hu2H7.v16	PVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQCSVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
hu2H7.v138	PVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQCSVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK

【配列表】

2008531699000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成20年2月15日(2008.2.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008531699000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/006998

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EMBL, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/056312 A (GENENTECH, INC; ADAMS, CAMELLIA W; CHAN, ANDREW C; CROWLEY, CRAIG W; L) 8 July 2004 (2004-07-08) the whole document	1-52
X	WO 2004/099249 A (XENCOR; LAZAR, GREGORY, ALAN; CHIRINO, ARTHUR, J; DANG, WEI; DESJARLAI) 18 November 2004 (2004-11-18) the whole document	1-52
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search		Date of mailing of the International search report
7 February 2007		19/02/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sommerfeld, Teresa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/006998

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHAW T ET AL: "B cell therapy for rheumatoid arthritis: The rituximab (anti-CD20) experience." ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, vol. 62, no. Supplement 2, November 2003 (2003-11), pages ii55-ii59, XP002401499 ISSN: 0003-4967 the whole document	1-52
X	EDWARDS J C W ET AL: "EFFICACY OF B-CELL-TARGETED THERAPY WITH RITUXIMAB IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, BOSTON, MA, US, vol. 350, 17 June 2004 (2004-06-17), pages 2572-2581, XP008067127 ISSN: 1533-4406 the whole document	1-52
X	LEANDRO M J ET AL: "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON, GB, vol. 61, no. 10, October 2002 (2002-10), pages 883-888, XP002348932 ISSN: 0003-4967 the whole document	1-52
X	WO 00/74718 A (IMMUNOMEDICS INC [US]; GOLDENBERG DAVID M [US]; HANSEN HANS J [US]) 14 December 2000 (2000-12-14) the whole document	1-52
X	WO 00/67796 A (GENENTECH INC [US]; IDEC PHARMACEUTICALS INC [US]) 16 November 2000 (2000-11-16) the whole document	1-52
X	US 2004/185045 A1 (KOENIG SCOTT [US] ET AL) 23 September 2004 (2004-09-23)	1-52
Y		53-71
Y	US 2004/126364 A1 (KEEPING HUGH S [US] ET AL) 1 July 2004 (2004-07-01) the whole document	53-71
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/006998

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARIE P ET AL: "NEW FACTORS CONTROLLING BONE REMODELING" REVUE DU RHUMATISME, EXPANSION SCIENTIFIQUE FRANCAISE, PARIS, FR, vol. 67, no. 3, 2000, pages 150-156, XP009072360 ISSN: 1169-8446 the whole document	1-52
A	MATSUMOTO CHIHO ET AL: "B-LYMPHOCYTES ARE ELEVATED IN MOUSE BONE MARROW BY ESTROGEN DEFICIENCY, AND INDUCE RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR KAPPA B LIGAND (RANKL) EXPRESSION IN OSTEOBLASTS VIA CELL ADHESION" JOURNAL OF HEALTH SCIENCE, NIHON YAKUGAKKAI, TOKYO,, JP, vol. 50, no. 3, June 2004 (2004-06), pages 309-314, XP009072359 ISSN: 1344-9702 the whole document	1-52
A	US 2004/033535 A1 (BOYLE WILLIAM J [US] ET AL) 19 February 2004 (2004-02-19)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/006998

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ on paper
- ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in electronic form
- ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/006998

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-48 and 53-71 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-46, 49-52, and 47, 48 partially

method for treating bone disorder by administration of CD20 antibody

2. claims: 47 and 48, all partially

method for treating a bone disorder by administration of an agent that binds to a B-cell surface marker

3. claims: 53-71

method of inhibiting osteolysis by administering an isolated odontoprogenitor or osteoprogenitor cell comprising nucleic acid encoding antibody that binds to a B-cell surface marker

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/006998

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004056312	A	08-07-2004	AU 2003301079 A1	14-07-2004
			BR 0316779 A	01-11-2005
			CA 2507898 A1	08-07-2004
			EP 1572744 A2	14-09-2005
			HR 20050649 A2	31-12-2005
			JP 2006517399 T	27-07-2006
			KR 20050086913 A	30-08-2005
			MA 27704 A1	02-01-2006
			MX PA05006511 A	17-02-2006
			US 2006024300 A1	02-02-2006
WO 2004099249	A	18-11-2004	AU 2004236160 A1	18-11-2004
			BR PI0410031 A	25-04-2006
			CA 2524399 A1	18-11-2004
			EP 1620467 A2	01-02-2006
			KR 20050116400 A	12-12-2005
WO 0074718	A	14-12-2000	AU 782160 B2	07-07-2005
			AU 5600500 A	28-12-2000
			CA 2375912 A1	14-12-2000
			EP 1194167 A1	10-04-2002
			JP 2003501401 T	14-01-2003
WO 0067796	A	16-11-2000	AT 311199 T	15-12-2005
			AU 777970 B2	04-11-2004
			AU 4714300 A	21-11-2000
			AU 2005200462 A1	03-03-2005
			BR 0011197 A	19-02-2002
			CA 2372603 A1	16-11-2000
			CN 1378459 A	06-11-2002
			DE 60024436 D1	05-01-2006
			DE 60024436 T2	17-08-2006
			DK 1176981 T3	10-04-2006
			EP 1176981 A1	06-02-2002
			EP 1637160 A2	22-03-2006
			ES 2254174 T3	16-06-2006
			HK 1043312 A1	28-07-2006
			HU 0201009 A2	29-07-2002
			JP 2002544174 T	24-12-2002
			MX PA01011279 A	02-07-2002
			NO 20015417 A	07-01-2002
			NZ 514914 A	24-09-2004
			PL 351962 A1	14-07-2003
US 2004185045	A1	23-09-2004	NONE	
US 2004126364	A1	01-07-2004	AU 3684901 A	27-08-2001
			CA 2399705 A1	23-08-2001
			EP 1263933 A2	11-12-2002
			JP 2003529349 T	07-10-2003
			WO 0160983 A2	23-08-2001
US 2004033535	A1	19-02-2004	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/52 (2006.01)		A 6 1 K 31/52	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/519 (2006.01)		A 6 1 K 31/519	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/663 (2006.01)		A 6 1 K 31/663	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)		A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)		A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)		A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)		A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)		A 6 1 P 19/02	
A 6 1 K 47/04 (2006.01)		A 6 1 K 47/04	
A 6 1 K 47/32 (2006.01)		A 6 1 K 47/32	
A 6 1 K 47/34 (2006.01)		A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)		A 6 1 K 47/42	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 35/32 (2006.01)		A 6 1 K 35/32	
A 6 1 K 31/65 (2006.01)		A 6 1 K 31/65	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)		C 0 7 K 16/46	Z N A
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28	

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

(72)発明者 シューエル, ケー. リー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイワン, ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 クワン, ジョアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイワン, ジェネンテック, インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4C076 AA11 BB11 CC27 DD26 EE09 EE24 EE41 FF12
4C084 AA19 MA01 MA17 MA57 MA65 MA66 MA67 NA14 ZA67 ZA96
ZA97 ZB15 ZB26
4C085 AA14 BB01 BB11 CC03 CC05 EE01
4C086 AA01 AA02 BC07 CB07 CB09 DA34 DA35 EA16 MA01 MA02
MA03 MA04 MA57 MA65 MA66 MA67 NA14 ZA67 ZA96 ZA97
ZB15 ZB26
4C087 AA01 AA02 BB46 CA12 MA57 MA67 NA14 ZA67 ZA96 ZA97
ZB15 ZB26
4C206 AA01 AA02 FA31 MA01 MA02 MA03 MA04 MA77 MA85 MA86
MA87 NA14 ZA67 ZA96 ZA97 ZB15 ZB26
4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA75 EA22 EA29 FA72 FA74