

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3845735号

(P3845735)

(45) 発行日 平成18年11月15日(2006.11.15)

(24) 登録日 平成18年9月1日(2006.9.1)

(51) Int. Cl.	F I
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D
<b>A 6 1 P 17/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N
<b>A 6 1 P 37/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 17/00
	A 6 1 P 37/06

請求項の数 1 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2003-583480 (P2003-583480)	(73) 特許権者	899000079 学校法人慶應義塾 東京都港区三田2丁目15番45号
(86) (22) 出願日	平成15年4月2日(2003.4.2)	(73) 特許権者	506137147 エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ ジメント株式会社 東京都文京区小石川四丁目6番10号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2003/004219	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(87) 国際公開番号	W02003/086463	(72) 発明者	天谷 雅行 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大 学医学部内
(87) 国際公開日	平成15年10月23日(2003.10.23)	(72) 発明者	西川 武二 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大 学医学部内
審査請求日	平成18年2月8日(2006.2.8)		
(31) 優先権主張番号	特願2002-101886 (P2002-101886)		
(32) 優先日	平成14年4月3日(2002.4.3)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD40Lアンタゴニストを有効成分とする天疱瘡治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗CD40L抗体を有効成分とする天疱瘡予防剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、天疱瘡を発症した患者に対し、CD40Lアンタゴニストを投与し天疱瘡を治療する治療剤、及び天疱瘡の再燃が予想される患者に対し、CD40Lアンタゴニストを予防的に投与し天疱瘡の発症を予防する予防剤に関する。

【0002】

天疱瘡は、デスモゾームに存在するカドヘリン型の細胞接着因子であるデスモグレイン (Dsg) に対する自己抗体により誘導されることが解明されている (Amagai, M. et al., Cell, 67, 869-877, 1991)。Dsgには、Dsg1, Dsg2, Dsg3のアイソタイプが存在するが、Dsg2が単層上皮・心臓などを含めたデスモゾームを有する全ての組織に発現しているのに対し、Dsg1とDsg3は重層扁平上皮のみに発現が認められる。

【0003】

天疱瘡は尋常性天疱瘡 (pemphigus vulgaris: PV) と落葉状天疱瘡 (pemphigus foliaceus: PF) に大別され、PVは更に粘膜が主に侵される粘膜優位型と、粘膜のみならず皮膚まで広範囲に病変が認められる粘膜皮膚型とに分類される。抗Dsg3抗体が陽性の患者では粘膜優位型PV、Dsg1抗体が陽性の患者ではPF、抗Dsg1抗体・抗Dsg

10

20

g 3 抗体が共に陽性の患者では粘膜皮膚型 P F として臨床型が現れる (天谷ら、実験医学 Vol.19 No.5 (増刊) 2001)。

【 0 0 0 4 】

天疱瘡の治療は、非特異的な免疫抑制剤、多くはステロイド剤によりなされているが、抗原と臨床症状の関連が明確となっている天疱瘡においては、より特異的な免疫抑制療法が求められた。

【 0 0 0 5 】

本発明の課題は、ヒトグリオーマ等の癌の診断や治療に有用な癌抑制遺伝子あるいは癌遺伝子を同定し、ヒトグリオーマ等の癌の診断方法や診断薬、ヒトグリオーマ等の癌の治療方法や治療薬を提供することにある。

10

【 0 0 0 6 】

他方、分子レベルでクローニングされている細胞表面分子 C D 4 0 は未成熟および成熟 B リンパ球の表面上で同定されており、抗体と結合したときに B 細胞の増殖を誘導することが知られている (Eur. J. Immunol., 19, 1463-1467, 1989、J. Immunol., 140, 1425-1430, 1988、J. Immunol., 142, 4144-4152, 1989)。また、C D 4 0 のリガンドである C D 4 0 L もまた分子レベルでクローニングされており (Nature, 357, 80-82, 1992、J. Exp. Med., 175, 1091-1101, 1992、EMBO J., 11, 4313-4319, 1992)、C D 4 0 L 遺伝子でトランスフェクトされ細胞表面上に C D 4 0 L タンパク質を発現する細胞は B 細胞の増殖を誘導することができ、他のシグナル系とともに抗体の産生を誘導することも知られている (Nature, 357, 80-82, 1992)。そして、B 細胞の活性化を阻害して液性免疫を抑制するため、B 細胞を活性化する T 細胞上の C D 4 0 L と B 細胞上の C D 4 0 との間のインビボ相互作用を阻害するアンタゴニスト、例えば抗 C D 4 0 L 抗体を投与して、液性免疫を抑制することも知られている (特許第 2 8 4 0 1 3 1 号、特許第 3 0 0 7 9 7 7 号、第 2 9 7 4 4 1 5 号、第 2 9 9 1 4 9 9 号)。しかし、かかる免疫抑制方法が自己免疫疾患である天疱瘡に有効であることは知られておらず、確認もされていなかった。

20

【 0 0 0 7 】

本発明の課題は、天疱瘡を発症した患者に対し C D 4 0 L アンタゴニストを投与して、天疱瘡を治療する治療剤、及び C D 4 0 L アンタゴニストを予防的に投与して、天疱瘡の発症を予防する予防剤を開発することにある。

30

【 0 0 0 8 】

本発明者らは、P V 抗原である D s g 3 に対する抗体産生を誘導し、天疱瘡を発症するモデル動物を作製することを試みた。しかし野生型マウスに免疫したのでは、D s g 3 に対する免疫寛容が成立しているため、持続的に D s g 3 に対する抗体を産生させることが難しかった。そこで、D s g 3 に対する免疫寛容が成立していない D s g 3 ノックアウトマウス D s g 3<sup>-/-</sup> を組換え D s g 3 で免疫し、その脾細胞を成熟した T 及び B 細胞を持たない免疫不全マウス R a g 2<sup>-/-</sup> に移植した (Amagai M., et al., J. Clin. Invest., 105, 625-631, 2000)。

移植後 4 ~ 7 日後に、移植したマウスの血中に D s g 3 に対する I g G 抗体の産生が認められ、抗体産生は 6 ヶ月以上に亘り持続した。そしてマウスの皮膚・口腔粘膜・食道などの重層扁平上皮の細胞膜には D s g 3 抗体の沈着が確認され、更に表皮および粘膜上皮の細胞間接着が障害されて、天疱瘡に特徴的な基底層直上での裂隙形成が、口腔粘膜・食道上部に認められた。作製されたマウスは、臨床的・病理学的・免疫学的に天疱瘡の特徴的な所見を有するモデルマウスであると結論された。( D s g 3 で免疫していない D s g 3<sup>-/-</sup> マウス脾臓細胞でも天疱瘡を発症することを確認している。)

40

【 0 0 0 9 】

本発明者は、本天疱瘡病態モデルマウスに C D 4 0 L アンタゴニスト、抗 C D 4 0 L 抗体を予防的に投与することにより抗 D s g 3 抗体産生を完全に抑制し、天疱瘡に伴う表皮及び粘膜病変を防止できることを見出した。更に、発症後に抗 C D 4 0 L 抗体を投与した場合にも、抗 D s g 3 抗体産生の抑制に効果を示し、一部のマウスでは表現型も改善され

50

ることが明らかとなり、CD40Lアンタゴニストを天疱瘡治療剤及び予防剤として使用するという本発明を完成するに到った。

【0010】

T細胞表面上の接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する受容体CD40Lと、抗原提示細胞表面上の受容体CD40との間の相互作用を阻害する薬剤は、進行中の免疫反応に抗原特異的に免疫寛容を誘導できることから、非特異的な免疫抑制剤に代わる、天疱瘡の根本的治療薬となることが予想される。

【0011】

すなわち本発明は、抗CD40L抗体を有効成分とする天疱瘡予防剤に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0012】

本発明の種々の側面を以下の項目について詳細に説明する。

1. CD40Lアンタゴニスト：T細胞表面上の接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する受容体CD40Lと、抗原提示細胞表面上の受容体CD40との間の相互作用を阻害する薬剤をCD40Lアンタゴニストと定義する。CD40Lアンタゴニストには、CD40Lと相互作用する薬剤のみならず、CD40と相互作用する薬剤も含まれるものである。CD40LアンタゴニストはCD40Lに対して向けられた抗体（例えばCD40Lに対するモノクローナル抗体）、CD40Lに対して向けられた抗体のフラグメント（例えばFab又は(Fab')<sub>2</sub>フラグメント）、キメラ抗体又はヒト化抗体、可溶性(soluble)CD40又は可溶性CD40L及びそれらのフラグメント、又はその他の

20

【0013】

CD40Lアゴニストの、CD40LとCD40との相互作用を阻害する性質は、例えば、標識可溶性CD40の活性化ヘルパーT細胞への結合を抑制するか否かにより判定することができる。標識可溶性CD40は、可溶性CD40を、例えば特開平6-220096号公報の実施例1の方法により作製し、適当な標識物質、例えば蛍光物質、放射性同位元素等により標識することにより調整できる。標識可溶性CD40の活性化ヘルパーT細胞への結合の評価は、例えば蛍光標識した可溶性CD40を用いて、FACSにより行うことができる。

【0014】

30

2. 抗CD40L抗体：哺乳動物（例えばマウス、ハムスター又はウサギ）は、該哺乳動物において免疫応答を引き起こす免疫原の形態のCD40L蛋白質又は蛋白質断片（例えばペプチド断片）で免疫することができる。

CD40L蛋白質はCD40L cDNA (Armitage et al., Nature, 357, 80-82, 1992, Hollembaugh et al., EMBO J., 11, 4313-4319, 1992) を組み込んだ発現ベクターを宿主細胞、例えば細菌又は哺乳類細胞株中で発現させ、培養液から標準的な方法に従ってCD40L蛋白質を精製することができる。また、例えばGST等との融合蛋白質として発現させ、GSTとの融合蛋白質の場合はグルタチオンカラムにより精製しても構わない。CD40LペプチドはCD40Lのアミノ酸配列 (Armitage et al., Nature, 357, 80-82, 1992, Hollembaugh et al., EMBO J., 11, 4313-4319, 1992) に基づき、公知の方法（例えば、F-moc又はT-boc化学合成）により合成することができ、合成されたペプチドは適当な担体、例えばKLHと結合させることで免疫原性を高めることも許される。

40

【0015】

精製されたCD40L蛋白質又はペプチド断片をアジュバントと共に免疫後、抗血清を得ることができ、所望なら抗血清からポリクローナル抗体を単離することができる。また、モノクローナル抗体を産生するには、抗体産生細胞（リンパ球）を免疫動物より回収し、標準的な細胞融合法によりミエローマ細胞と融合させて細胞を不死化し、ハイブリドーマ細胞を得る。かかる技術は当該技術分野では確立された方法であり、適当なマニュアル (Harlow et al, Antibodies: A Laboratory Manual, 1998, Cold Spring Harbor Laboratory) に準じて行うことができる。更に、モノクローナル抗体はヒトモノクローナル抗

50

体を産生するためのヒトB細胞ハイブリドーマ法 (Kozbar et al., Immunol. Today, 4, 72, 1983)、EBV-ハイブリドーマ法 (Cole et al., Monoclonal Antibody in Cancer Therapy, 1985, Allen R. Bliss, Inc., pages 77-96)、コンビナトリアル抗体ライブラリーのスクリーニング (Huse et al., Science, 246, 1275, 1989) 等の方法により作製しても良い。

#### 【0016】

本明細書における抗体は、CD40Lと特異的に結合する抗体のフラグメント、例えば Fab または (Fab')<sub>2</sub> フラグメントをも包含するものである。

ヒト以外の動物、例えばマウスを免疫動物として作製されたマウスモノクローナル抗体は、ヒトに投与した場合異種蛋白質として認識されて、モノクローナル抗体に対する免疫応答を生じさせてしまうことが多い。この問題点を回避する一つの方法はキメラ抗体、すなわち抗原結合領域がマウスモノクローナル抗体由来、それ以外の領域がヒト抗体由来の抗体である。本発明における抗体はキメラ抗体も含むものである。キメラ抗体としては、抗原結合領域としてマウスモノクローナル抗体の変領域全体を使ったキメラ抗体 (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851, 1985、Takeda et al., Nature, 314, 452, 1985)、また抗原結合領域としてヒト由来のフレームワーク領域とマウスモノクローナル抗体由来の超可変領域を組み合わせて使ったキメラ抗体 (Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7308-12, 1983、Kozbar et al., Immunol. Today, 4, 7279, 1983) が挙げられるが、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 【0017】

本発明の天疱瘡治療剤は、天疱瘡の患者に投与できる。また、本発明の天疱瘡予防剤は、天疱瘡の発症の予防のために、天疱瘡の発症が予想される患者に対して投与できる。

本発明の天疱瘡治療剤及び天疱瘡予防剤の投与は、注射(皮下、静脈など)など常法により行うことができる。

#### 【0018】

天疱瘡治療剤及び天疱瘡予防剤の形態は、投与方法により適宜選択され、例えば、注射用途に適した医薬組成物としては、滅菌水溶液(水溶性の場合)または分散液および滅菌注射溶液または分散液を即座に調整するための滅菌粉末を挙げることができる。注射用途に適した医薬組成物はいずれの場合においても滅菌されていなければならない、容易な注射器操作が可能な程度に流体でなければならない。該組成物は製造及び貯蔵条件下で安定でなければならない、細菌や真菌などの混入微生物の作用から保護されていなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及びポリエチレングリコールなど)、およびこれらの適当な混合物を含む媒体であるかあるいは分散媒体であってよい。適当な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングをしようすることによって、分散液の場合は必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。微生物の作用からの保護は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、たとえばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどにより行うことができる。多くの場合等張剤、例えば糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどが組成物中に含まれているのが好ましいであろう。注射用組成物の持続吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムやゼラチンなどを組成物中に配合することにより行うことができる。

#### 【0019】

注射用溶液の調整は、必要なら上記成分の1またはその組合せとともに所要量の活性化化合物(CD40Lアンタゴニスト等)を適当な溶媒中に配合し、ついで滅菌濾過することにより行うことができる。一般に分散液の調整は、基本的な分散媒体と上記から選ばれた必要な他の成分を含む滅菌媒体中に活性化化合物を配合することにより行う。滅菌注射溶液調整のための滅菌粉末の場合は、好ましい調整法は真空乾燥及び凍結乾燥であり、これにより活性成分と前もって滅菌濾過した所望の追加成分との粉末が得られる。

#### 【0020】

天疱瘡治療剤の投与量は、天疱瘡を治療するのに十分な量であり、患者の年齢、性差、薬剤に関する感受性、投与方法、疾患の履歴などにより変化し得る。また天疱瘡予防剤の投与量は、天疱瘡を予防するのに十分な量であり、患者の年齢、性差、薬剤に関する感受性、投与方法、疾患の履歴などにより変化し得る。

#### 【0021】

本発明を下記実施例により更に詳しく説明するが、本発明はこれに限られるものではない。

以下の実施例で使用した抗CD40L抗体MR1 (Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 6550-54, 1992) は、ハムスターで作製したマウスCD40Lに対するモノクローナル抗体でPharMingen社より入手可能 (Catalog No.: PM-09020D or PM-09021D) である。またMR1産生細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) より入手可能である (ATCC No.: HB-11048)。

10

使用したDsg3<sup>-/-</sup>マウスはThe Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USAより、Rag2<sup>-/-</sup>マウスはTaconic Farms, Germantown, New York, USAより入手可能である。

また実施例中で組換えDsg3 (rDsg3) は、マウスDsg3 (GenBank U86016) の細胞外ドメインを配列番号1及び2に記載の配列のプライマーを用いたPCRにより増幅し、Amagai M., et al., J. Clin. Invest., 94, 59-67, 1994に記載の方法に従って作製した。抗体価は、Amagai M., et al., J. Clin. Invest., 105, 625-631, 2000に記載されたELISA法により測定した。

20

#### 【0022】

##### [実施例1] 天疱瘡病態モデルマウスの作製

Amagaiらの方法 (Amagai M., et al., J. Clin. Invest., 105, 625-631, 2000) に準じて、天疱瘡病態モデルマウスを作製した。

rDsg3で免疫したDsg3<sup>-/-</sup>マウスをエーテル麻酔下で屠殺し脾臓を摘出した。脾臓細胞を無菌的に調整し、 $1 \times 10^8$  / mlにPBSに懸濁後、0.5 ml (細胞数として  $5 \times 10^7$  個) をRag2<sup>-/-</sup>マウス尾静脈に静脈内投与した。

移植後4~7日後に、移植したマウスの血中にDsg3に対するIgG抗体の産生が認められ、抗体産生は6ヶ月以上に亘り持続した。そしてマウスの皮膚・口腔粘膜・食道などの重層扁平上皮の細胞膜にはDsg3抗体の沈着が確認され、更に表皮および粘膜上皮の細胞間接着が障害されて、天疱瘡に特徴的な基底層直上での裂隙形成が、口腔粘膜・食道上部に認められた。

30

#### 【0023】

##### [実施例2] MR1抗体投与による天疱瘡の予防効果

MR1抗体を予防的に投与し、Dsg3に対する免疫応答が惹起される時にCD40Lを存在させた場合、移入した脾臓細胞にDsg3に対して免疫寛容が誘導できるかどうかを検討した。

Dsg3<sup>-/-</sup>マウス脾細胞移植の2日前および移植後0、2、4、7日にMR1抗体とコントロールハムスターIgGを500 µgずつレシピエントマウス (Rag2<sup>-/-</sup>マウス) の腹腔内に投与した (n = 5)。

40

移植14日後にコントロール群では抗Dsg3抗体産生を確認したが、MR1を投与したマウスでは、66日間の観察期間を通じて明らかな抗体産生および表現型を全く認めなかった (図1)。またコントロール群では体重減少、休止期脱毛および病理組織学的にPVに特徴的な基底層直上の棘融解を認めたが、MR1を投与群では、体重減少は見られず、PVの症状も観察されなかった。MR-1抗体には、明らかなPV予防効果が見られた。

#### 【0024】

##### [実施例3] MR1抗体投与による天疱瘡の治療効果

Dsg3<sup>-/-</sup>マウスの脾臓細胞を導入し、Dsg3<sup>-/-</sup>に対する抗体を産生してPVの発症が見られるマウスに対して、MR-1抗体を投与し、治療効果が見られるかどうか

50

かを検討した。

免疫していないDsg3<sup>-/-</sup>マウスの脾臓細胞を導入したレシピエントマウス(Rag2<sup>-/-</sup>マウス)に、MR1とハムスターIgGを、脾臓細胞移植後7週間後から、1mgずつ週2回6週間に亘り計12回投与した(n=10)。通常の抗体価の変動をみるために無治療のPVモデルマウスも同時に観察した(n=5)。

投与開始後、0、2、4及び6週目に採血し、Dsg3に対する抗体価を測定した。投与前に抗体価が高く(>2000倍の抗体titerを示すマウス)、投与中に死亡してしまったマウスを除き、更に治療効果の見込めない投与前から抗体価が低かったマウス(<100倍の抗体titerを示すマウス)を除いて統計処理した。図2に示す通り、MR1抗体投与群では、投与前の30%まで抗体価が低下したが、コントロール群には抗体価の低下が見られなかった。この間、一部のマウスではPVの改善が認められたが、両群の間で、PVの症状に有意な差は観察されなかった。

【産業上の利用可能性】

【0025】

g39アンタゴニストの投与により、抗Dsg抗体の産生が抑制され、天疱瘡に伴う表皮及び粘膜病変が改善されていることが確認されて、CD40Lアンタゴニストが天疱瘡の根本的な治療剤及び予防剤となりうることが示された。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】MR1抗体投与による天疱瘡の予防効果を示す図である。

【図2】MR1抗体投与による天疱瘡の治療効果を示す図である。

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERSITY

EISAI CO., LTD.

<120> THERAPEUTIC AGENT FOR PERMPHIGUS COMPRISING CD40L ANTAGONIST AS AN ACTIVE INGREDIENT

<130> 2003C1593

<150> JP 2002-101886

<151> 2002-04-03

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> NO.1

<400> 1

ccgagatctc ctataaatat gacctgcctc ttccctaga

39

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> NO.2

<400> 2

cgggtcgacc ctccaggatg actccccata

30

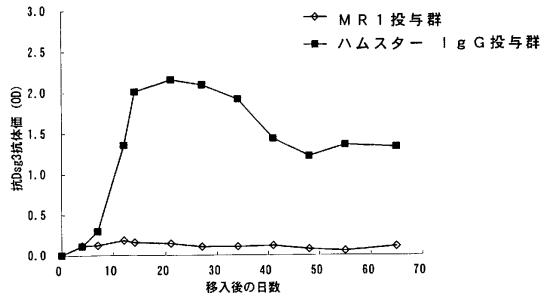
10

20

40

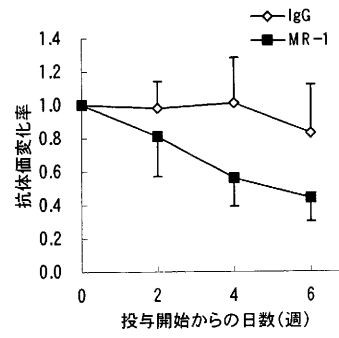
【 図 1 】

第 1 図



【 図 2 】

第 2 図



フロントページの続き

審査官 八原 由美子

(56)参考文献 国際公開第01/015733(WO,A1)  
特表平11-505107(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

A61K 39/395

A61P 17/00

A61P 37/06