

(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2008-512995

(P2008-512995A)

(43) 公表日 平成20年5月1日(2008.5.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-531688 (P2007-531688)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成17年9月16日 (2005.9.16)		エフ・ホフマンーラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成19年5月18日 (2007.5.18)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/009968		E AKTIENGESSELLSCHAF
(87) 国際公開番号	W02006/029879		T
(87) 国際公開日	平成18年3月23日 (2006.3.23)		スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・
(31) 優先権主張番号	04022158.2		グレンツアーヘルストラツセ１２４
(32) 優先日	平成16年9月17日 (2004.9.17)	(74) 代理人	100078662
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	04030546.8	(74) 代理人	100113653
(32) 優先日	平成16年12月23日 (2004.12.23)		弁理士 東田 幸四郎
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100116919
			弁理士 齋藤 房幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗OX40L抗体

(57) 【要約】

本発明は、抗OX40L抗体、特にヒト起源に由来するFc部分を含有しそして補体因子C1qに結合しない抗OX40L抗体およびその変異体に関する。これらの抗体は、炎症性疾患に罹っている患者に有益な新規で発明的な性質を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

OX40Lに結合し、ヒト起源に由来するFc部分を含有しそして補体因子C1qに結合しないことを特徴とする抗体。

【請求項 2】

前記抗体は、NK細胞上のヒトFcγレセプターに結合しないことを特徴とする、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体は、ヒト抗体であることを特徴とする、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗体は、キメラ抗体又はヒト化抗体であることを特徴とする、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗体は、 10^{-8} M未満の K_D 値でOX40Lに結合する、請求項1～4のいずれかに記載の抗体。

【請求項 6】

K_D の範囲が 10^{-12} ～ 10^{-9} Mである、請求項5に記載の抗体。

【請求項 7】

前記抗体が、PVA236、GLPSS331および／またはL234A／L235A（EUインデックスに従う番号付け）からの1つ以上の突然変異を含むヒトサブクラスIgG1の抗体であることを特徴とする、請求項1～6のいずれかに記載の抗体。

【請求項 8】

前記抗体が、ヒトサブクラスIgG4の抗体であることを特徴とする、請求項1～6のいずれかに記載の抗体。

【請求項 9】

突然変異S228Pを含有することを特徴とする、請求項8に記載の抗体。

【請求項 10】

突然変異L235Eを含有することを特徴とする、請求項8または9に記載の抗体。

【請求項 11】

補体因子C3を活性化しないことを特徴とする、請求項1～10のいずれかに記載の抗体。

【請求項 12】

前記抗体が補体依存性細胞傷害（CDC）を誘発しないことを特徴とする、請求項1～11のいずれかに記載の抗体。

【請求項 13】

前記抗体が抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）を誘発しないことを特徴とする、請求項1～12のいずれかに記載の抗体。

【請求項 14】

前記抗体が、 1 nM ～ 4 nM の範囲のIC50値で $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ OX40Lのコーティング濃度で可溶性OX40と固定化されたOX40Lとの相互作用をブロックすることにより、ELISAアッセイにおいて阻害を示すことを特徴とする、請求項1～13のいずれかに記載の抗体。

【請求項 15】

抗体であって、該抗体がOX40Lに結合することを特徴とし、そして該抗体が、下記の組合せ、

a) 配列番号1のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号2により規定された重鎖可変ドメイン、

b) 配列番号3のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号4により規定された重鎖可変ドメイン、

c) 配列番号5のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号6に

10

20

30

40

50

より規定された重鎖可変ドメイン、

d) 配列番号7のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号8により規定された重鎖可変ドメイン、

e) 配列番号9のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号10により規定された重鎖可変ドメイン、

f) 配列番号11または16のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号12により規定された重鎖可変ドメイン、

g) 配列番号1のアミノ酸配列により規定された軽鎖 (V_L) 可変ドメインおよび配列番号17により規定された重鎖 (V_H) 可変ドメイン、

h) 配列番号18のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号19により規定された重鎖可変ドメイン、 10

i) 配列番号1のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号20により規定された重鎖可変ドメイン、

からなる群より独立に選ばれる可変領域組合せを含むことを特徴とする抗体。

【請求項16】

ヒト軽鎖可変領域が、配列番号1、3、5、7、9、11、16および18からなる群より独立に選ばれるアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項1～15のいずれかに記載の抗体。

【請求項17】

ヒト重鎖可変領域が、配列番号2、4、6、8、10、12、17、19および20からなる群より独立に選ばれるアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項1～16のいずれかに記載の抗体。 20

【請求項18】

前記抗体が、配列番号1のアミノ酸配列により規定される軽鎖可変ドメインおよび配列番号2、17または20により規定された重鎖可変ドメインを含むことを特徴とする、請求項1～16のいずれかに記載の抗体。

【請求項19】

前記抗体が、補体因子C1qへの非結合を引き起こすFc部分における少なくとも1つのアミノ酸突然変異を含むことを特徴とする、請求項1～18のいずれかに記載の抗体。

【請求項20】

前記抗体が、配列番号13により規定されたκ軽鎖定常領域または配列番号61、65もしくは69の軽鎖定常領域を含むことを特徴とする、請求項1～19のいずれかに記載の抗体。 30

【請求項21】

前記抗体が、配列番号14または配列番号15により規定された重定常領域または配列番号58の重鎖定常領域を含むことを特徴とする、請求項1～20のいずれかに記載の抗体。

【請求項22】

可変軽鎖および可変重鎖を含む、OX40Lに結合する抗体であって、該可変重鎖が配列番号33～38から選ばれるCDR3を含むこと、および／または該可変軽鎖が、配列番号51～57から選ばれるCDR3を含むことを特徴とする抗体。 40

【請求項23】

可変重鎖が、配列番号21～25から選ばれるCDR1および配列番号26～32から選ばれるCDR2を含むこと、および／または可変軽鎖が、配列番号39～44から選ばれるCDR1および配列番号45～50から選ばれるCDR2を含むことを特徴とする、請求項22に記載の抗体。

【請求項24】

細胞系、

hu-Mab<hOX40L>LC.001、

hu-Mab<hOX40L>LC.005、hu-Mab<hOX40L>LC.0 50

10、hu-Mab<hOX40L>LC. 019、hu-Mab<hOX40L>LC. 029、およびhu-Mab<hOX40L>LC. 033

からなる群より選ばれる細胞系により産生されることを特徴とする抗体。

【請求項25】

前記抗体が、Fab、F(ab')₂、または一本鎖フラグメントであることを特徴とする、請求項1～24のいずれかに記載の抗体。

【請求項26】

請求項1～25に記載の抗体の産生方法であって、 10^{-8} M未満のK_D値でOX40Lに結合する抗体の重鎖をコードする第1核酸の配列を、改変された抗体が補体因子C1qおよび／またはNK細胞上のヒトFcγレセプターに結合しないような方式で改変し、
該改変された第1核酸および該抗体の軽鎖をコードする第2核酸を発現ベクターに挿入し、
該ベクターを原核生物宿主細胞もしくは真核生物宿主細胞に挿入し、該宿主細胞を該抗体の合成を可能とする条件下に培養し、そして該抗体をこの培養物から回収することを特徴とする方法。

10

【請求項27】

前記抗体の重鎖をコードする前記第1核酸の配列が、請求項22に記載の抗体の重鎖をコードすることを特徴とする、請求項26に記載の抗体の産生方法。

【請求項28】

請求項1～25のいずれかの抗体分子をコードする核酸分子。

【請求項29】

請求項28の核酸分子を含むベクター。

20

【請求項30】

請求項29のベクターを含む宿主細胞。

【請求項31】

請求項12～25のいずれかに記載の抗体分子の製造方法であって、該抗体分子の合成を可能とする条件下に請求項30の宿主細胞を培養し、そして該抗体分子をこの培養物から回収することを含む方法。

【請求項32】

請求項1～25のいずれかに記載の抗体分子又は請求項26もしくは27の方法により産生された抗体分子を含む組成物。

30

【請求項33】

医薬組成物又は診断組成物である、請求項32に記載の組成物。

【請求項34】

請求項1～25のいずれかの抗体と少なくとも1種の薬学的に許容されうる賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項35】

治療を必要としている患者に、治療的に有効量の請求項1～23のいずれかに記載の抗体を投与することを特徴とする、治療を必要としている患者の処置方法。

【請求項36】

治療のための請求項1～23に記載の抗体の使用。

40

【請求項37】

炎症性疾患の予防及び処置のための請求項1～23のいずれかに記載の抗体の使用。

【請求項38】

炎症性疾患の予防及び処置用の医薬の製造のための請求項1～23のいずれかに記載の抗体の使用。

【請求項39】

請求項1～25のいずれかの抗体分子、請求項28の核酸分子、請求項29のベクターまたは請求項30の宿主細胞を含むキット。

【請求項40】

配列番号21～38からなる群より選ばれる親抗体重鎖CDRおよび／または配列番号

50

39～57からなる群より選ばれる親抗体軽鎖CDRの最初のアミノ酸配列を改変する方法であって、該最初のアミノ酸配列をコードする核酸を提供し、1つのアミノ酸が重鎖CDR1において改変され、1～2つのアミノ酸が重鎖CDR2において改変され、1～2つのアミノ酸が重鎖CDR3において改変され、1～3つのアミノ酸が軽鎖CDR1において改変され、1～3つのアミノ酸が軽鎖CDR2において改変されおよび／または1～3つのアミノ酸が軽鎖CDR3において改変されるように、該核酸を改変し、該改変されたCDRアミノ酸配列を抗体構造において発現し、該抗体が 10^{-8} M未満の K_D でOX40Lに結合するかどうかを測定し、そしてもしも該抗体が 10^{-8} M未満の K_D でOX40Lに結合するならば、該改変されたCDRを選ぶことを特徴とする方法。

【請求項41】

抗体であって、該抗体がOX40Lに結合し、ヒトIgG1クラスでありそして γ 重鎖として配列番号58、62又は66を含むことを特徴とする抗体。

【請求項42】

- a) γ 重鎖として配列番号58および κ 軽鎖として配列番号61、
- b) γ 重鎖として配列番号62および κ 軽鎖として配列番号65、または
- c) γ 重鎖として配列番号66および κ 軽鎖として配列番号69、

を含む請求項41に記載の抗体。

【請求項43】

抗体であって、該抗体が、OX40Lに結合し、突然変異L234A/L235Aを含有するIgG1クラスであり、そして γ 重鎖として配列番号59、63または67を含むことを特徴とする抗体。

【請求項44】

- a) γ 重鎖として配列番号59および κ 軽鎖として配列番号61、
- b) γ 重鎖として配列番号63および κ 軽鎖として配列番号65、または
- c) γ 重鎖として配列番号67および κ 軽鎖として配列番号69、

を含む、請求項43に記載の抗体。

【請求項45】

抗体であって、該抗体が、OX40Lに結合し、突然変異S228Pを含有するIgG4クラスであり、そして γ 重鎖として配列番号60、64または68を含むことを特徴とする抗体。

【請求項46】

- a) γ 重鎖として配列番号60および κ 軽鎖として配列番号61、
- b) γ 重鎖として配列番号64および κ 軽鎖として配列番号65、または
- c) γ 重鎖として配列番号68および κ 軽鎖として配列番号69、

を含む、請求項45に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗OX40L抗体、特に、補体因子C1qに結合しない抗OX40L抗体、その医薬組成物および使用に関する。好ましくは、これらの抗体はヒト抗体又はヒト化抗体である。

【0002】

ヒトOX40L (gp34、SwissProt P23510) は、CD40/CD40Lライゲーションすると活性化されたB細胞および樹状細胞に発現されそして炎症性組織において内皮細胞に発現される (Review: Weinberg, A.D., Trends Immunol. 23(2002)102-109)。それは、HTLV-1感染したヒト白血病細胞 (OX40を有するオートクリンループの発生によりこれらのT細胞の不死化) から単離された。OX40Lおよび対する抗体は、例えば、WO 95/12673; WO 95/21915; WO 99/15200; Baum, P.R., et al., EMBO J. 13(1994)3992-4001; Imura, A., et al., Blood 89(1997)2951-2958; Imura, A., et al., J. Exp. Med. 183(1996)2185-2195; Kjaergaard, J., et al., I. Immunol. 167(2001)6669-6677; L

10

20

30

40

50

ane, P., J.Exp. Med. 191(2000)201-206; Mallett, S., and Barclay, A. N., Immunol. Today 12(1991)220-223; Mallett, S., et al., EMBO J. 9(1990)1063-1068; Ndhlovu, L.C., et al., J.Immunol. 167(2001)2991-2999; Ohshima, Y., et al., J.Immunol. 159(1997)3838-3848; Rogers, P.R., et al., Immunity 15(2001)445-455; Stueber, E., and Strober, W., J. Exp.Med. 183(1996)979-989; Stueber, E., et al., Gastroenterology 115(1998)1205-1215; Takahashi, Y., et al., J.Virol. 75(2001)6748-6757; Takasawa, N., et al., Jpn. J.Cancer Res. 92(2001)377-382; Taylor, L., and Schwarz, H., J.Immunol. Meth. 255(2001)67-72; Weinberg, A.D., et al., Nature Medicine 2(1996) 183-189; Weinberg, A.D., et al., Semin. Immunol. 10(1998) 471-480; Weinberg, A.D., Trends Immunol. 23(2002) 102-109; Wu, T., et al., Transplant. Proc. 33(2001) 217-218; Higgins, L.M., et al., J. Immunol. 162(1999) 486-493; and Yoshioka, T., et al., Eur. J. Immunol. 30(2000) 2815-2823)に記載されている。ヒトOX40Lは、活性化されたCD4+T細胞上に一過性に発現されるヒトOX40(CD134)に対するリガンドである。そのリガンドによるOX40のエンゲージメントは、T細胞活性化のための共刺激性シグナルをもたらす。OX40/OX40L相互作用は、両方向性シグナルを創り出すことが記載されている(Matsumura, Y., et al., J. Immunol. 163(1999) 3007-3011; Kotani, A., et al., Immunol. Lett. 84(2002) 1-7)。さらにOX40/OX40L相互作用は、炎症性組織における内皮細胞への活性化されたT細胞の付着を媒介する。OX40Lは、活性化されたB細胞、DCおよび内皮細胞上に一過性的にのみ発現されるので、OX40Lに対する抗体は炎症性応答期間中T細胞活性化および内皮細胞付着を選択的にブロックするであろうが、不活性化されていない末梢T細胞を変化させない。Yoshioka, A等(Eur. J. Immunol. 30(2000)2815-2823)は、慢性関節リウマチのマウスモデルにおける中和性抗mOX40L mAbの治療的潜在力を証明した。その投与は、疾患の重度を劇的に軽減した。この抗体は、他の関連した疾患モデル、例えば、炎症性皮膚疾患、実験的自己免疫疾患(EAE)、GVHD、尿炎症性腸疾患における同様な活性を示した(Yoshioka, A., et al., Eur. J. Immunol 30(1999) 2815-2823; Salek-Ardakani, S., et al., J.Exp.Med. 198(2003) 315-324; Burgess, J.K., et al., J. Allergy Clin. Immunol. 113(2004) 683-689; Hoshino, A., et al., Eur. J. Immunol. 33(2003) 861-869; Arestides, R.S., et al., Eur. J. Immunol. 32(2002) 2874-2880; Nozaki, C., et al., J. Immunol. 166(2001) 2108-2115; Weinberg, A. D., et al., J. Immunol. 162(1999)1818-1826; Higgins, L.M., et al., J. Immunol. 162(1999) 486-493; Humphreys, I.R., et al., J.Exp.Med. 198(2003) 1237-1242; Akiba, H. et al., J. Exp. Med. 191(2003) 375-380; Ishii, N., et al., Eur. J. Immunol. 33(2003) 2372-2381; Blazar, B. R., et al., Blood 101(2003) 3741-3748; Tsukada, N., et al., Blood 95(2000) 2434-2439; Akiba, H., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 251(1998) 131-136。

【0003】

OX40Lに対する抗体は種々の疾患モデルにおけるそれらの抗炎症性効果について調べられた(Sugamura, K., et al., Nat. Rev. Immunol;. 4(2004)420-431)。

【0004】

Tanaka, Y., et al, Int. J. Cancer 36, (1985)549-555; Tozawa, H., et al., Int. J. Cancer 41(1998)231-238; and Miura, S., et al., Mol. Cell. Biol. 11(1991) 1313-1325は、ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-I)を有するヒトリンパ球の系統の表面抗原と反応するTARM-34およびTAG-34と名づけられたマウスモノクローナル抗体を記載している。TAG-34抗体は、MBL International Corporationから市販されている。TAG-34はOX40Lにも結合する。

【0005】

本発明の要約

本発明は、抗体、好ましくはモノクローナル抗体であって、該抗体は、OX40Lに結合し、ヒト起源のFc部分を含有しそしてヒト補体因子C1qおよび/またはNK細胞上

のヒト F c γ レセプターに結合しないことを特徴とする抗体、好ましくはモノクローナル抗体に関する。

【0006】

本発明は、更に、抗体、好ましくはモノクローナル抗体であって、該抗体は、ヒト起源の F c 部分を含有し、100ngの抗体濃度で O X 4 0 L に結合しそして変性された O X 4 0 L に結合する（ウエスタンブロットにおいて）ことを特徴とする抗体、好ましくはモノクローナル抗体に関する。この抗体は、モノクローナル抗体 L C . 0 0 1 が結合するエピトープと同じ O X 4 0 L ポリペプチドエピトープに結合する。このような抗体は、例えば、L C . 0 0 1、L C . 0 3 3 および L C . 0 6 0 である。これらの抗体は、好ましくはヒト I g G 1 型（野生型）であるか、またはヒト補体因子 C 1 q および／または N K 細胞上のヒト F c γ レセプターに結合しない。

10

【0007】

本発明は、さらに可変軽鎖および可変重鎖を含むことを特徴とし、該可変重鎖は C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含むことを特徴とし、該 C D R 3 は配列番号 3 3 ～ 3 8 から選ばれることを特徴とする O X 4 0 L に結合する抗体に関する。C D R 1 が配列番号 2 1 ～ 2 5 から選ばれ、C D R 2 が配列番号 2 6 ～ 3 2 から選ばれそして C D R 3 が配列番号 3 3 ～ 3 8 から選ばれることは特に好ましい。

【0008】

本発明に従う抗体は、好ましくは、可変軽鎖および可変重鎖を含むことを特徴とし、該可変軽鎖は C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含むことを特徴とし、該 C D R 3 は配列番号 5 1 ～ 5 7 から選ばれることを特徴とする。C D R 1 が配列番号 3 9 ～ 4 4 から選ばれ、C D R 2 が配列番号 4 5 ～ 5 0 から選ばれそして C D R 3 が配列番号 5 1 ～ 5 7 から選ばれることが特に好ましい。

20

【0009】

本発明に従う抗体は、好ましくは、可変重鎖および可変軽鎖を含むことを特徴とし、該可変重鎖は C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含むことを特徴とし、重鎖の C D R 3 は配列番号 3 3 ～ 3 8 から選ばれそして軽鎖の C D R 3 は配列番号 5 1 ～ 5 7 から選ばれることを特徴とする。可変重鎖は、配列番号 2 1 ～ 2 5 から選ばれる C D R 1、配列番号 2 6 ～ 3 2 から選ばれる C D R 2 および配列番号 3 3 ～ 3 8 から選ばれる C D R 3 を含み、そして可変軽鎖は、配列番号 3 9 ～ 4 4 から選ばれる C D R 1、配列番号 4 5 ～ 5 0 から選ばれる C D R 2 および配列番号 5 1 ～ 5 7 から選ばれる C D R 3 を含むことが特に好ましい。

30

【0010】

すべての C D R s は互いに独立に、しかし当然のこととして、抗体が O X 4 0 L に結合するような方法で選ばれる。したがって、同じ L C 抗体の軽鎖及び重鎖の C D R s を組み合わせることができ、または L C . 0 0 1 の軽鎖 C D R s は L C . 0 0 1、L C . 0 5 9 または L C . 0 6 3 の重鎖 C D R s と組み合わせることができる。各鎖上の C D R s はフレームワークアミノ酸により分離されている。

【0011】

本発明に従う抗体は、好ましくは、抗体が、

40

a) 配列番号 1 のアミノ酸配列の軽鎖 (V _L) 可変 C D R s および配列番号 2 の重鎖 (V _H) 可変 C D R s、

b) 配列番号 3 のアミノ酸配列の軽鎖可変 C D R s および配列番号 4 の重鎖可変 C D R s、

c) 配列番号 5 のアミノ酸配列の軽鎖可変 C D R s および配列番号 6 の重鎖可変 C D R s、

d) 配列番号 7 のアミノ酸配列の軽鎖可変 C D R s および配列番号 8 の重鎖可変 C D R s、

e) 配列番号 9 のアミノ酸配列の軽鎖可変 C D R s および配列番号 10 の重鎖可変 C D R s、

50

f) 配列番号 11 または 16 のアミノ酸配列の軽鎖可変 CDRs および配列番号 12 の重鎖可変 CDRs、

g) 配列番号 1 のアミノ酸配列により規定された軽鎖 (V_L) 可変ドメインおよび配列番号 17 により規定された重鎖 (V_H) 可変ドメイン、

h) 配列番号 18 のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号 19 により規定された重鎖可変ドメイン、

i) 配列番号 1 のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号 20 により規定された重鎖可変ドメイン、または

その OX40L に結合性のフラグメント

からなる群より独立に選ばれる CDRs を含むことを特徴とする。

10

【0012】

本発明に従う抗体は、好ましくは、該抗体が、

a) 配列番号 1 のアミノ酸配列により規定された軽鎖 (V_L) 可変ドメインおよび配列番号 2 により規定された重鎖 (V_H) 可変ドメイン、

b) 配列番号 3 のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号 4 により規定された重鎖可変ドメイン、

c) 配列番号 5 のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号 6 により規定された重鎖可変ドメイン、

d) 配列番号 7 のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号 8 により規定された重鎖可変ドメイン、

20

e) 配列番号 9 のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号 10 により規定された重鎖可変ドメイン、

f) 配列番号 11 または 16 のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号 12 により規定された重鎖可変ドメイン、

g) 配列番号 1 のアミノ酸配列により規定された軽鎖 (V_L) 可変ドメインおよび配列番号 17 により規定された重鎖 (V_H) 可変ドメイン、

h) 配列番号 18 のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号 19 により規定された重鎖可変ドメイン、

i) 配列番号 1 のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号 20 により規定された重鎖可変ドメイン、

30

またはその OX40L に結合性のフラグメント、

からなる群より独立に選ばれる可変領域を含むことを特徴とする。

【0013】

本発明に従う抗体は、好ましくは、ヒト軽鎖可変領域が、配列番号 1、3、5、7、9、11、16 および 18 からなる群より独立に選ばれるアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【0014】

本発明に従う抗体は、好ましくは、ヒト重鎖可変領域が、配列番号 2、4、6、8、10、12、17、19 および 20 からなる群より独立に選ばれるアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

40

【0015】

重鎖および軽鎖の CDR 領域は配列番号 21～38 および 39～57 に示される。

【0016】

本発明に従う抗体は、好ましくは、該抗体が配列番号 1 のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号 2、17 または 20 により規定された重鎖可変ドメインを含むことを特徴とする。

【0017】

本発明に従う抗体は、好ましくは、ヒト重鎖定常領域が配列番号 14 および 15 からなる群より独立に選ばれるアミノ酸配列または配列番号 58 の重鎖定常領域を含むことを特徴とする。

50

【0018】

本発明に従う抗体は、好ましくは、該抗体が配列番号13のκ軽鎖定常領域または配列番号61、65もしくは69の軽鎖定常領域を含むことを特徴とする。

【0019】

好ましくは、本発明に従う抗体は、OX40Lに結合することおよびヒトIgG1クラス（野生型）であることにより特徴付けられそしてγ重鎖として配列番号58、62または66を含む。特に好ましいのは、

- a) γ重鎖として配列番号58およびκ軽鎖として配列番号61、
- b) γ重鎖として配列番号62およびκ軽鎖として配列番号65、または
- c) γ重鎖として配列番号66およびκ軽鎖として配列番号69、

を含む抗体である。

10

【0020】

本発明の更なる態様は、OX40Lに結合する抗体であって、細胞系hu-Mab<hOX40L>LC. 001、hu-Mab<hOX40L>LC. 005、hu-Mab<hOX40L>LC. 010、hu-Mab<hOX40L>LC. 019、hu-Mab<hOX40L>LC. 029、またはhu-Mab<hOX40L>LC. 033により産生されることを特徴とする抗体である。

【0021】

本発明に従う抗体は、好ましくはキメラ抗体、ヒト抗体またはヒト化抗体である。

【0022】

本発明に従う抗体は、BIACoreアッセイにおいて 10^{-8} M未満（ 10^{-12} ～ 10^{-8} M）の K_D 値でOX40Lに結合することにより特徴付けられ、更に好ましくは、BIACoreアッセイにおいて 10^{-12} ～ 10^{-9} Mの K_D 範囲により特徴付けられる。

20

【0023】

本発明に従う抗体は、好ましくは、4nM以下のIC50値で0.5 μg/mlのコーティング濃度で固定化されたOX40L（好ましくはストレプトアビジン表面に固定化されたビオチニル化OX40L）を使用するELISAにおいてOX40LのOX40との相互作用を阻害する。さらに好ましくは、IC50値は1～4nMの範囲にある。

【0024】

本発明に従う抗体は、好ましくは、補体因子C1qへの抗体の非結合（non-binding）は、C1qに対する10 μg/mlの濃度での抗体の最大結合（Bmax）が抗体LC. 001のBmaxに比較して30%以下、好ましくは20%以下であるELISAアッセイ測定値を指すことを特徴とする。

30

【0025】

好ましくは、抗体は、ヒトFcγRI、FcγRIIAおよび／またはFcγRIIAに結合しない。特に好ましくは、抗体はNKエフェクター細胞上のヒトFcγレセプターに結合しない。

【0026】

本発明に従う抗体は、好ましくは、NK細胞上のFcγレセプターへの抗体の非結合は、NK細胞に対する20 μg/mlの濃度での抗体の最大結合（Bmax）が抗体LC. 001のBmaxに比較して20%以下、好ましくは10%以下である、アッセイを指すことを特徴とする。

40

【0027】

本発明に従う抗体は、好ましくは、それがFcγRIに結合しないことを特徴とする。これは、FcγRIIAおよびFcγIIBを欠いているガリコンビナントFcγRIを発現しているB細胞リンパ腫細胞に対する0.078～10 μg/mlの範囲の濃度の抗体の結合を試験するアッセイで測定されるとき、LC. 001のEC50値に比べて5倍以上、好ましくは7倍以上、例えば8倍以上であるEC50により抗体が特徴付けられることを意味する。

【0028】

50

本発明に従う抗体は、好ましくは、補体因子 C 1 q への非結合および／または N K 細胞上のヒト F c γ レセプターへの非結合を引き起こす、好ましくはヒト F c 部分における少なくとも 1 つのアミノ酸突然変異を含む I g G 4 抗体または I g G 1 抗体であるとして特徴付けられる。

【0029】

本発明に従う抗体は、好ましくは、それが補体因子 C 3 を活性化しないことを特徴とする。

【0030】

本発明に従う抗体は、好ましくは、ヒトサブクラス I g G 4 であることにより特徴付けられる。本発明のさらなる好ましい態様では、抗体は、E 2 3 3、L 2 3 4、L 2 3 5、G 2 3 6、D 2 7 0、N 2 9 7、E 3 1 8、K 3 2 0、K 3 2 2、A 3 2 7、A 3 3 0、P 3 3 1 および／または P 3 2 9 (E U インデックスに従う番号付け) における少なくとも 1 つの突然変異を含む、任意の I g G クラス、好ましくは I g G 1 または I g G 4 であることにより特徴付けられる。特に好ましいのは、I g G 1 突然変異 P V A 2 3 6、L 2 3 4 A / L 2 3 5 A および／または G L P S S 3 3 1 ならびに I g G 4 突然変異 L 2 3 5 E である。I g G 4 サブクラスの抗体が、突然変異 S 2 2 8 P または突然変異 S 2 2 8 P および L 2 3 5 E を含有することが更に好ましい (Ang al, S., et al., Mol. Immunol. 30 (1993) 105-108)。

10

【0031】

したがって、本発明に従う抗体は、好ましくは、P V A 2 3 6、G L P S S 3 3 1 および／または L 2 3 4 A / L 2 3 5 A (E U インデックスに従う番号付け) からの 1 つ以上の突然変異を含む、ヒトサブクラス I g G 1 の抗体である。

20

【0032】

好ましくは、本発明に従う抗体は、O X 4 0 L に結合すること、突然変異 L 2 3 4 A / L 2 3 5 A を含有する I g G 1 クラスであることにより特徴付けられ、そして γ 重鎖として配列番号 5 9、6 3 または 6 7 を含む。

【0033】

特に好ましいのは、

- a) γ 重鎖として配列番号 5 9 および κ 軽鎖として配列番号 6 1、
- b) γ 重鎖として配列番号 6 3 および κ 軽鎖として配列番号 6 5、または
- c) γ 重鎖として配列番号 6 7 および κ 軽鎖として配列番号 6 9、

を含む抗体である。

30

【0034】

好ましくは、突然変異 S 2 2 8 P を含有する I g G 4 クラスであることにより特徴付けられる本発明に従う抗体は、γ 重鎖として配列番号 6 0、6 4 または 6 8 を含む。

【0035】

特に好ましいものは、

- a) γ 重鎖として配列番号 6 0 および κ 軽鎖として配列番号 6 1、
- b) γ 重鎖として配列番号 6 4 および κ 軽鎖として配列番号 6 5、または
- c) γ 重鎖として配列番号 6 8 および κ 軽鎖として配列番号 6 9、

を含む抗体である。

40

【0036】

本発明に従う抗体は、好ましくは、それが補体依存性細胞傷害 (C D C) を誘発しないことを特徴とする。

【0037】

本発明に従う抗体は、好ましくは、それが抗体依存性細胞性細胞傷害 (A D C C) を誘発しないことを特徴とする。

【0038】

したがって、本発明は、抗 O X 4 0 L 抗体または単一重鎖もしくは単一軽鎖であって、それらの C D R s、可変領域、完全アミノ酸配列またはハイブリドーマにより特徴付けら

50

れ、そしてF c 部分を含まないか、または任意の型のF c 部分を含み、好ましくは、ヒト起源の改変されていないまたは上記した突然変異により改変されている、ヒトI g G 1 F c もしくはヒトI g G 4 F c を含む、抗O X 4 0 L 抗体または単一重鎖もしくは単一軽鎖を含む。

【0039】

したがって、本発明は、抗体、好ましくはモノクローナル抗体であって、該抗体は、O X 4 0 L に結合し、ヒト由来のF c 部分を含有しそしてヒト補体因子C 1 q および／またはN K 細胞上のヒトF c γ レセプターに結合せず、ヒトI g G 4 型であるかまたは上記した突然変異により改変されたヒトI g G 1 もしくはヒトI g G 4 であることを特徴とする抗体、好ましくはモノクローナル抗体も含む。

10

【0040】

従って、本発明は、抗体、好ましくはモノクローナル抗体であって、該抗体は、1 0 0 ngの抗体濃度で、O X 4 0 L におよび変性されたO X 4 0 L に結合する（ウエスタンブロットにおいて）ことを特徴とする抗体、好ましくはモノクローナル抗体も含む。この抗体は、モノクローナル抗体L C . 0 0 1 が結合するエピトープと同じO X 4 0 L ポリペプチドエピトープに結合する。抗体は、F c 部分含まないか、または任意の型のF c 部分を含み、好ましくは、野生型もしくは上記した突然変異により修飾されたヒトI g G 1 もしくはヒトI g G 4 を含む。

【0041】

本発明に従う抗体は、O X 4 0 L に対する抗体による治療を必要としている患者、特に炎症性疾患、特に慢性関節リウマチ、アレルギー性喘息および移植におけるG v H D （Sugamura, K., et al., Nat. Rev. Immunol. 4(2004)420-431も参照）に罹患している患者に有益な新規で発明的な性質を有する。

20

【0042】

本発明のさらなる態様は、本発明に従う抗体分子、その可変鎖またはそのC D R ドメインをコードする核酸分子である。

【0043】

本発明の好ましい態様では、抗体は、F a b、F (a b ')₂、または一本鎖フラグメントである。

【0044】

30

本発明のさらなる態様は、本発明に従う核酸分子を含むベクターである。

【0045】

本発明のさらなる態様は本発明に従うベクターを含む宿主細胞である。

【0046】

本発明のさらなる態様は、本発明に従う抗体の製造方法であって、該抗体分子の合成を可能とする条件下に本発明に従う宿主細胞を培養し、そしてこの培養物から該抗体分子を回収することを含む方法である。

【0047】

本発明のさらなる態様は、本発明に従う抗体の組成物、好ましくは医薬組成物または診断組成物である。

40

【0048】

本発明のさらなる態様は、本発明に従う抗体および少なくとも1種の薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。

【0049】

本発明のさらなる態様は、本発明に従う治療的に有効量の抗体を患者に投与することを特徴とする治療を必要としている患者の処置のための方法である。

【0050】

本発明のさらなる態様は、治療、好ましくは炎症性疾患の処置のための、特に慢性関節リウマチ、喘息およびG v H D （宿主に対する移植片疾患）の処置および／または予防のための本発明に従う抗体の使用である。

50

【0051】

本発明のさらなる態様は、炎症性疾患の予防および／または処置のための、好ましくは慢性関節リウマチ、喘息およびG v H Dの処置用の医薬の製造のための本発明に従う抗体の使用である。

【0052】

本発明のさらなる態様は、本発明に従う抗体、本発明に従う核酸分子、本発明に従うベクターまたは本発明に従う宿主細胞を含む診断キットである。

【0053】

発明の詳細な説明

用語「OX40L」は、TNFリガンドファミリーに属するII型膜タンパク質を指す。更なる名称は、ACT-4レセプター、CD134L、g34またはTNF4__Humanである。それは34kDaの分子量を有しそしてアクセッションナンバーP23510でSwissProtに保存されている。

【0054】

用語「OX40」は、OX40Lに結合するレセプターを指す。それはTNFレセプターファミリーに属するI型膜タンパク質である。さらなる名称は、ACT-4、OX40Lレセプター、CD134抗原、ACT35抗原、TNR4__Humanである。それは50kDaの分子量を有しそしてアクセッションナンバーP43489でSwissProtに保存されている。

【0055】

用語「抗体」は、種々の形態の抗体、好ましくは、完全抗体、抗体フラグメント、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体(humanized antibodies)および本発明に従う特性が保持されている限り、遺伝子工学的に作成された抗体(変異体または突然変異体抗体)を含むが、それらに限定されない種々の形態の抗体、好ましくはモノクローナル抗体を包含する。特に好ましいのは、ヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体、特にリコンビナントヒト抗体である。

【0056】

本明細書で使用された用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、単一のアミノ酸組成の抗体分子の調製物を指す。

【0057】

用語「キメラ抗体」は、通常リコンビナントDNA技術により作成された、1種のソースもしくは種からの可変領域、即ち結合領域および異なるソースもしくは種に由来する定常領域の少なくとも一部を含むモノクローナル抗体を指す。マウス可変領域およびヒト定常領域を含むキメラ抗体が好ましい。本発明により包含される他の好ましい形態の「キメラ抗体」は、定常領域を元の抗体の定常領域から改変または変化させて、特にC1q結合および／またはFcレセプター(FcR)結合に関して、本発明に従う性質を発生させたキメラ抗体である。このようなキメラ抗体は「クラススイッチ抗体(class-switched antibodies)」とも呼ばれる。キメラ抗体は、免疫グロブリン可変領域をコードするDNAセグメントおよび免疫グロブリン定常領域をコードするDNAセグメントを含む発現された免疫グロブリン遺伝子の産物である。キメラ抗体を産生するための方法は、慣用のリコンビナントDNAを含みそして遺伝子トランスフェクション技術は当技術分野で周知されている。例えば、Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(1984)6851-6855; US Patent Nos. 5,202,238 and 5,204,244参照。

【0058】

用語「ヒト化抗体」は、フレームワークまたは「相補性決定領域」(CDR)が改変されて親免疫グロブリンの特異性と比較して異なる特異性の免疫グロブリンのCDRを含む抗体を指す。好ましい態様では、マウスCDRを、ヒト抗体のフレームワーク領域に移植させて「ヒト化抗体」を調製する。例えば、Riechmann, L., et al., Nature 332(1988)323-327; and Neuberger, M.S., et al., Nature 314(1985)268-270参照。特に好ましいCDRsは、キメラおよび二官能性抗体について上記した抗原を認識する配列を示すCDR

sに相当する。本発明により包含された他の形態の「ヒト化抗体」は、定常領域を元の抗体の定常領域からさらに改変もしくは変化させて、特にC1q結合および／またはFcレセプター（FcR）結合に関して、本発明に従う性質を発生させたヒト化抗体である。

【0059】

本明細書で使用された用語「ヒト抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有する抗体を含むことを意図する。ヒト抗体は、当技術水準で周知されている（van Dijk, M. A., and van de Winkel, J. G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5(2001)368-374）。ヒト抗体は、免疫感作されると、内因性免疫グロブリン産生の不存在的下にヒト抗体のフルレパートリーまたは選択を生じさせることができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）において産生させることもできる。このような生殖系列突然変異体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ーのトランスファーは、抗原チャレンジによるヒト抗体の産生をもたらすであろう（例えば、Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(1993)2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362(1993)255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7(1993)33-40参照）。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーにおいて産生させることもできる（Hoogenboom, H. R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227(1992)381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222(1991)581-597）。Cole et al. and Boerner et al.,の技術も、ヒトモノクローナル抗体の産生のために利用可能である（Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985); and Boerner, P., et al., J. Immunol. 147(1991)86-95）。本発明に従うキメラ抗体およびヒト化抗体について既に述べたとおり、本明細書で使用された用語「ヒト抗体」は、定常領域において改変されて特にC14q結合および／またはFcR結合に関して、例えば「クラススイッチ」、即ちFc部分の変化または突然変異（IgG1からIgG4へのおよび／またはIgG1/IgG4突然変異）により、本発明に従う性質を発生させたこのような抗体も含む。さらに、本発明は、C1qおよび／またはFcRに結合するOX40Lに対するモノクローナルヒト抗体を含む。このようなヒト抗体は、マウスOX40Lと比較してヒトOX40Lについて高い選択性により特徴付けられ（ヒトOX40Lへの結合よりもマウスOX40Lへの結合が>30倍低い）そして500nMの濃度のまでTNFαまたはCD40Lへの非特異的結合を示さない。このような抗体は、C1qおよび／またはFcRに結合しない抗体の発生のために有用である。

【0060】

本明細書で使用された用語「リコンビナントヒト抗体」は、リコンビナント手段により調製され、発現され、創生されまたは単離されるすべてのヒト抗体、例えばNSOもしくはCHO細胞などの宿主細胞からまたはヒト免疫グロブリン遺伝子用のトランスジェニック動物（例えばマウス）から単離された抗体、または宿主細胞にトランスフェクションされたリコンビナント発現ベクターを使用して発現された抗体を含むことを意図する。このようなリコンビナントヒト抗体は、再配列された形態において可変領域と定常領域を有する。本発明に従うリコンビナントヒト抗体は、in vivo体細胞超突然変異を受けている。したがって、リコンビナント抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列VHおよびVL配列に由来するおよび関連するが、in vivoでヒト抗体生殖系列レパートリーの範囲内に天然に存在しないことがありうる配列である。

【0061】

本明細書で使用された「可変領域」（軽鎖の可変領域（VL）、重鎖の可変領域（VH））は、抗体を抗原に結合させることに直接関与する軽鎖および重鎖のペアーの各々を示す。可変ヒト軽鎖および重鎖のドメインは、同じ一般的構造を有しそして各ドメインは、3つの「超可変領域」（または相補性決定領域、CDRs）により接続された、その配列が広く保存されている4つのフレームワーク（FR）領域を含む。フレームワーク領域は、βシートコンフォメーションを採用しておりそしてCDRsはβシート構造を接続するループを形成することができる。各鎖におけるCDRsは、フレームワーク領域によりそれらの三次元構造に保持されそして他の鎖からのCDRsと共に抗原結合部位を形成する

。抗体重鎖および軽鎖 C D R 3 領域は、本発明に従う抗体の結合特異性／アフィニティーにおいて特に重要な役割を演じ、したがって本発明のさらなる目的を与える。

【0062】

本明細書で使用されるとき用語「超可変領域」または「抗体の抗原結合部分」は、抗原結合の責任を担う抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「相補性決定領域」または「C D R s」からのアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」または「F R」領域は、本明細書で定義されたとおりの超可変領域残基以外のこれらの可変ドメイン領域である。したがって、抗体の軽鎖および重鎖は、N末端からC末端までドメインF R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3およびF R 4を含む。各鎖上のC D R sは、このようなフレームワークアミノ酸により分離されている。特に、重鎖のC D R 3は、抗原結合に最も寄与する領域である。C D RおよびF R領域は、Kabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)の標準定義に従って決定される。

【0063】

本明細書で使用された用語「核酸または核酸分子」は、D N A分子およびR N A分子を含むことを意図する。核酸分子は一本鎖または二本鎖であることができるが、好ましくは二本鎖D N Aである。

【0064】

核酸は、それが他の核酸配列との機能的関係に置かれているとき「作用可能に連結されている (operably linked)」。例えば、プレ配列又は分泌リーダーのためのD N Aは、もしもそれがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現されるならば、ポリペプチドのためのD N Aに作用可能に連結されており；プロモーターまたはエンハンサーはもしもそれが配列の転写に影響を与えるならば、コード化配列に作用可能に連結されており；またはリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を促進するように位置しているならば、コード化配列に作用可能に連結されている。一般に、「作用可能に連結された」とは、連結されるD N A配列が連続的であり (contiguous) そして分泌リーダーの場合には、連続的でありそしてリーディングフレームにあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、連続的である必要はない。連結は都合の良い制限部位においてライゲーションにより達成される。このような部位が存在しないならば、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが慣用の実施に従って使用される。

【0065】

本明細書に使用された、「細胞」、「細胞系」および「細胞培養物」という表現は、交換可能に使用されそしてすべてのこのような命名は子孫を含む。従って、語「トランスフォーマント」および「トランスフォーメーションされた細胞」は、トランスファーの数に関係なく初代対象細胞 (primary subject cell) およびそれに由来する培養物を含む。すべての子孫は、意図的な突然変異または故意でない突然変異により、D N A内容において正確に同一でなくてもよいことも理解される。最初にトランスフォーメーションされた細胞においてスクリーニングされたのと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫は含まれる。別の命名が意図される場合には、それは状況から明らかであろう。

【0066】

「定常ドメイン」は、抗体を抗原に結合することに直接関与していないが、種々のエフェクター機能を示す。抗体または免疫グロブリンは、それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に依存して、クラス：I g A、I g D、I g E、I g GおよびI g Mに分けられ、そしてこれらのいくつかはサブクラス (アイソタイプ)、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4、I g A 1およびI g A 2に更に分けられうる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常領域は、それぞれ α 、 ϵ 、 γ および μ と呼ばれる。本発明に従う抗体は好ましくはI g G型である。

【0067】

本発明に従う抗体は、F c部分として、好ましくはヒト起源に由来するF c部分および好ましくはヒト定常領域のすべての他の部分を含有する。抗体のF c部分は、補体活性化

10

20

30

40

50

、C 1 q 結合、C 3 活性化および F c レセプター結合に直接関与している。補体系に対する抗体の影響はある条件に依存するが、C 1 q への結合は F c 部分における規定された結合部位により引き起こされる。このような結合部位は、当技術分野の技術水準で知られておりそして例えば、Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127(1981)2555-2560; Brunhouse, R., and Cebra, J. J., Mol. Immunol. 16(1979)907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288(1980)338-344; Thommesen, J. E., et al., Mol. Immunol. 37(2000)995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 264(2000)4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75(2001)12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86(1995)319-324; および EP 0 307 434 により記載されている。このような結合部位は、例えば L 2 3 4、L 2 3 5、D 2 7 0、N 2 9 7、E 3 1 8、K 3 2 0、K 3 2 2、P 3 3 1 および P 3 2 9 (K a b a t の E U インデックスに従う番号付け、下記参照) である。サブクラス I g G 1、I g G 2 および I g G 3 の抗体は、通常補体活性化、C 1 q 結合および C 3 活性化を示すが、これに対して I g G 4 は補体系を活性化せず、C 1 q に結合せずそして C 3 を活性化しない。本明細書で使用された用語「ヒト起源由来のそしてヒト補体因子 C 1 q および／または N K 細胞上のヒト F c $\square$ レセプターに結合しない F c 部分」は、サブクラス I g G 4 のヒト抗体の F c 部分、または下記に定義された C 1 q 結合、C 3 活性化および／または F c R 結合が検出できないような方法で改変されているサブクラス I g G 1、I g G 2 および I g G 3 のヒト抗体の F c 部分である、F c 部分を示す。「抗体の F c 部分」は、当業者に周知のそして抗体のパバイン開裂に基づいて定義された用語である。好ましくは、F c 部分はヒト F c 部分でありそしてヒト I g G 4 サブクラスからの、好ましくはヒンジ領域において突然変異した(例えば、S 2 2 8 P および／または L 2 3 5 E) F c 部分またはヒト I g G 1 サブクラスからの突然変異した F c 部分である。最も好ましいのは、配列番号 1 4 および 1 5 に示された領域あるいは配列番号 5 8、5 9、6 0、突然変異 L 2 3 4 A および L 2 3 5 A を有する配列番号 1 4 または突然変異 S 2 2 8 P もしくは突然変異 S 2 2 8 P および L 2 3 5 E を有する配列番号 1 5 に含まれる領域から選ばれる重鎖定常領域を含む F c 部分である。

【0068】

本発明は、O X 4 0 L に結合しそして補体因子 C 1 q および／または F c レセプターに結合しない抗体を指す。本発明の好ましい態様では、これらの抗体は、補体依存性細胞傷害(C D C) および／または抗体依存性細胞性細胞傷害(A D C C) を誘発しない。好ましくは、この抗体は、それが O X 4 0 L に結合し、ヒト起源に由来する F c 部分を含有しそして補体因子 C 1 q に結合しないことを特徴とする。さらに好ましくは、この抗体はヒトまたはヒト化モノクローナル抗体である。

【0069】

抗体 F c 領域の F c 部分により媒介されるエフェクター機能は、抗体の抗原への結合の後に作動するエフェクター機能を指す(これらの機能は、F c レセプターによる補体カスケードの活性化および／または細胞活性化を含む)。

【0070】

補体カスケードの機能は、C H 5 0 アッセイにより評価されうる。抗赤血球抗体(E A) で感作されたヒツジ赤血球を試験血清に加えて溶血をもたらす古典的経路を活性化する。赤血球の 5 0 % を溶解するのに必要な血清の容積は、C H 5 0 単位を決定する。A P - C H 5 0 は、代替経路(alternative pathway) およびターミナル経路(terminal pathway) を測定する。手順はウサギ赤血球を使用することを除いては同様である。代替経路は試験血清を添加すると活性化される。

【0071】

C 1 q および 2 つのセリンプロテアーゼ、C 1 r および C 1 s は、複合体 C 1、補体依存性細胞傷害(C D C) 経路の第 1 成分を形成する。補体カスケードを活性化するために、C 1 q は、抗原性標的に結合された I g G 1 の少なくとも 2 つの分子または I g M の 1 つの分子に結合する(Ward, E. S., and Ghetie, V., Ther. Immunol. 2(1995)77-94)。Burton, D. R., は、アミノ酸残基 3 1 8 ~ 3 3 7 を含む重鎖領域が、補体結合反応(comp

lement fixation) に関与していると述べている (Mol. Immunol. 22(1985)161-206)。Duncan, A. R., および Winter, G. (Nature 332(1988)738-740) は、部位特異的突然変異誘発を使用して、G l u 3 1 8、L y s 3 2 0 および L y s 3 2 2 が C 1 q への結合部位を形成することを報告した。C 1 q の結合における G l u 3 1 8、L y s 3 2 0 および L y s 3 2 2 残基の役割は、これらの残基を含有する短い合成ペプチドの補体媒介溶解を阻害する能力により確かめられた。

【0072】

用語「補体依存性細胞傷害 (C D C)」は、補体の存在下に本発明に従う抗体による、O X 4 0 L 発現ヒト内皮細胞の溶解を指す。C D C は、好ましくは、補体の存在下に本発明に従う抗体による O X 4 0 L 発現ヒト内皮細胞の処理により測定される。細胞は、好ましくはカルセインで標識される。もしも抗体が 3 0 μg/ml の濃度で標的細胞の 2 0 % 以上の溶解を誘導するならば、C D C が見出される。本発明者は、本発明に従う抗体の性質について、E L I S A アッセイにおける補体因子 C 1 q への減少した結合が必須であることを見出した。このようなアッセイにおいて、一般に、E L I S A プレートにある濃度範囲の抗体でコーティングし、それに精製されたヒト C 1 q またはヒト血清を加える。C 1 q 結合は、C 1 q に対して指向された抗体により、続いてペルオキシダーゼで標識されたコンジュゲートにより検出される。結合の検出 (最大結合 B m a x) は、ペルオキシダーゼ基質、A B T S (登録商標) (2, 2'-アジノージ- [3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホネート (6)] について 4 0 5 nm における光学濃度 (O D 4 0 5) として測定される。したがって、本発明は、補体因子 C 1 q への抗体の非結合は、1 0 μg/ml の抗体の濃度での本発明に従う抗体への C 1 q の最大結合 (B m a x) が抗体 L C . 0 0 1 で観察された B m a x の 2 0 % 以下、好ましくは 1 0 % 以下である、このような E L I S A アッセイ測定値を指す。

【0073】

本発明に従う抗体は、E L I S A アッセイにおける補体因子 C 3 の減少した活性化を示すことが更に好ましい。このアッセイは C 1 q アッセイと同じ方式で行われる。このようなアッセイにおいて、一般に E L I S A プレートを所定の濃度範囲の抗体でコーティングし、それにヒト血清を加える。C 3 結合は、C 3 に対して指向された抗体により、次いでペルオキシダーゼで標識されたコンジュゲートにより検出される。結合 (最大結合 B m a x) の検出は、ペルオキシダーゼ基質 A B T S (登録商標) について 4 0 5 nm における光学濃度 (O D 4 0 5) として測定される。したがって、本発明は、補体因子 C 3 への抗体の非結合は、1 0 μg/ml の抗体の濃度で抗体への C 3 の最大結合 (B m a x) が抗体 L C . 0 0 1 の B m a x の 1 0 % 以下、好ましくは 5 % 以下である、このような E L I S A アッセイ測定値を指す。

【0074】

用語「抗体依存性細胞性細胞傷害 (A D C C)」は、F c レセプター結合により媒介される機能であり、そしてエフェクター細胞の存在下に本発明に従う抗体による O X 4 0 L 発現標的細胞の溶解を指す。A D C C は、好ましくは、エフェクター細胞、例えば単離されたばかりの P B M C (末梢血単核細胞) またはパフィーコートから精製されたエフェクター細胞、例えば単球または N K (ナチュラルキラー) 細胞の存在下に、本発明に従う抗体による O X 4 0 L 発現赤血球系細胞 (例えばリコンビナントヒト O X 4 0 L を発現する K 5 6 2 細胞) の調製物の処理により測定される。標的細胞を、⁵¹C r で標識し、次いで抗体と共にインキュベーションする。標識された細胞をエフェクター細胞と共にインキュベーションし、そして上清を放出された ⁵¹C r について分析する。コントロールは、抗体なしで標的細胞のエフェクター細胞とのインキュベーションを含む。A D C C を媒介する最初の段階を誘導する抗体の能力を、F c γ レセプター発現細胞、例えば F c γ R I および/または F c γ R I I A をリコンビナント的に発現する細胞または N K 細胞 (本質的に F c γ R I I I A を発現する) へのそれらの結合を測定することにより調べた。好ましくは N K 細胞上の F c γ R への結合を測定する。

【0075】

Fcレセプター結合性エフェクター機能は、造血細胞上の特殊化された細胞表面レセプターであるFcレセプター(FcRs)と抗体のFc領域の相互作用により媒介されうる。Fcレセプターは免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、そして抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)を介して、免疫複体のファゴサイトーシスによる抗体でコーティングされた病原体の除去ならびに、対応する抗体でコーティングされた赤血球および種々の他の細胞標的(例えば腫瘍細胞)の溶解の両方を媒介することが示された。Van de Winkel, J. C., and Anderson, C. L., J. Leukoc. Biol. 49(1991)511-524)。FcRsは、免疫グロブリンアイソタイプに対するそれらの特異性により定義され; IgG抗体に対するFcレセプターは、FcγRと呼ばれ、IgEに対してはFcεRと呼ばれ、IgAに対してはFcαRと呼ばれる等である。Fcレセプター結合は、例えば、Ravetch, J. V., and Kinet, J. P., Annu. Rev. Immunol. 9(1991)457-492; Capel, P. J., et al., Immunomethods 4(1994)25-34; de Haas, M., et al., J. Lab. Clin. Med. 126(1995)330-341; and Gessner, J. E., et al., Ann. Hematol. 76(1998)231-248に記載されている。

【0076】

IgG抗体のFcドメインに対するレセプター(FcγR)の架橋は、ファゴサイトーシス、抗体依存性細胞性細胞傷害および炎症性メディエーターの放出、ならびに免疫複体クリアランスおよび抗体産生の調節を含む広範な種類のエフェクター機能をトリガーする。ヒトでは、3つのクラスのFcγRが特徴付けられており、それらは、FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)およびFcγRIII(CD16)であり、

—FcγRI(CD64)は、高いアフィニティーで一量体IgGに結合し、そしてマクロファージ、単球、好中球および好酸球上に発現される。E233~G236、P238、D265、N297、A327およびP329の少なくとも1つのIgGにおける改変は、FcγRIへの結合を減少させる。IgG1およびIgG4中に置換された位置233~236におけるIgG2残基はFcγRIへの結合を10³倍減少させそして抗体感作された赤血球に対するヒト単球応答を排除した(Armour, K.L., et al., Eur. J. Immunol. 29(1999)2613-2624)。

—FcγRII(CD32)は、複合体化されたIgGに中~低アフィニティーで結合しそして広く発現される。これらのレセプターは2つの重要なタイプ、FcγRIIAおよびFcγRIIBに分けることができる。FcγRIIAは、キリング(killing)に関与する多くの細胞(例えばマクロファージ、単球、好中球)上に見出されそしてキリングプロセスを活性化することができると思われる。FcγRIIBは、阻害プロセスにおいて役割を演じると思われる、そしてB細胞、マクロファージおよびマスト細胞および好酸球上に見出される。B細胞上では、それはさらなる免疫グロブリン産生および例えばIgEクラスへのアイソタイプスイッチを抑制するように機能すると思われる。マクロファージ上では、FcγRIIBは、FcγRIIAにより媒介されるファゴサイトーシスを抑制するように作用する。好酸球およびマスト細胞上では、該b形態は、その別のレセプターへのIgE結合を通じてこれらの細胞の活性化を阻害するのを助けることができる。FcγRIIAに対する減少した結合は、例えば、E233~G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、R292およびK414の少なくとも1つのIgG突然変異で見出される。

—FcγRIII(CD16)は、IgGに中~低アフィニティーで結合しそして2つのタイプとして存在する。FcγRIIIAは、NK細胞、マクロファージ、好酸球およびいくつかの単球およびT細胞上に見出され、そしてADCCを媒介する。FcγRIIBは、好中球上に高度に発現される。FcγRIIIAへの減少した結合は、例えば、E233~G236、P238、D265、N297、A327、P329、D270、Q295、A327、S239、E269、E293、Y296、V303、A327、K338およびD376の少なくとも1つの突然変異で、見出される。

【0077】

Fcレセプターに対するヒトIgG1上の結合部位のマッピング、上記した突然変異部位およびFcγRIおよびFcγRIIAへの結合を測定するための方法は、Shields, R

.L., et al. JBC276(2001)6591-6604に記載されている。

【0078】

本明細書で使用する用語「Fcレセプター」は、該レセプターと会合した (associated) 細胞質ITAM配列の存在により特徴付けられた活性化レセプターを指す (例えば、Ravetch, J. V., and Bolland, S., Annu. Rev. Immunol. 19(2001)275-290)。このようなレセプターは、FcγRI、FcγRIIAおよびFcγRIIIAである。本発明に従う抗体は、好ましくは、Fcγレセプター、好ましくはFcγIIIAへの減少した結合を示す。好ましくは、用語「FcγRの非結合」は、10 μg/mlの抗体濃度においてNK細胞への本発明に従う抗体の結合が抗体LC. 001について見出された結合の10%以下であることを意味する。

10

【0079】

IgG4は減少したFcR結合を示すが、他のIgGサブクラスの抗体は強い結合を示す。しかしながら、Pro238、Asp265、Asp270、Asn297 (Fc炭水化物の損失)、Pro329および234、235、236および237 Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434およびHis435も、もし変えられるならば減少したFcR結合を与える残基である (Shields, R. L., et al. J. Biol. Chem. 276(2001)6591-6604; Lund, J., et al. FASEB J. 9(1995)115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86(1995)319-324; およびEP 0 307 434)。好ましくは、IgG1またはIgG2サブクラスの本発明に従う抗体は、突然変異PVA236、GLPSS331および／またはL234A／L235Aを含む。IgG4サブクラスの本発明に従う抗体は、好ましくは突然変異L235Eを含む。さらなる好ましいIgG4突然変異はS228PまたはL235EおよびS228Pである (表1参照)。

20

【0080】

本明細書で使用する用語「OX40Lへの結合」は、BIACoreアッセイにおけるヒトOX40Lへの抗体の結合を意味する (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden)。更なる確認のために、OX40Lへの結合は、精製されたOX40LがマイクロタイタープレートにコーティングされているELISAまたは直接もしくは間接に標識された抗体を、OX40Lを発現するK562細胞に結合させるFACSアッセイにおいて決定することもできる。

30

【0081】

BIACoreアッセイにおいては、抗体を表面に結合させそしてOX40Lの結合は、表面プラズモン共鳴 (SPR) により測定される。結合のアフィニティーは、用語ka (抗原への抗体の会合にたいする速度定数)、kd (解離に対する速度定数) およびK_D (kd/ka) により定義される。本発明に従う抗体は、10⁻⁸以下、好ましくは約10⁻¹²~10⁻⁹MのK_Dを示す (実施例参照)。したがって、本発明は、抗体がBIACoreアッセイにおいて10⁻⁸M未満のK_D値でOX40Lに結合する、好ましくは、K_D範囲は10⁻¹²~10⁻⁹Mである、上記した抗体を指す。

【0082】

OX40L特異的結合ELISAにおいて、OX40Lをマイクロタイタープレート上にコーティングし、そしてOX40Lへの抗体の結合は、HRPをコンジュゲーションした抗ヒトIgGおよびELISAの通常の段階により検出される。このアッセイにおけるEC₅₀値は、好ましくは3nM~8nMの範囲にある。

40

【0083】

本明細書で使された「OX40LへのOX40の結合を阻害する」という用語は、ヒトOX40Lに本発明に記載の抗体を結合させ、それによりOX40/OX40L相互作用を阻害し、それによりOX40Lで誘導されるシグナル伝達を阻害することを指す。

【0084】

本発明の抗体は、hOX40L/OX40相互作用を、好ましくは、

i) 1nM~4nMの範囲のIC₅₀値で0.5 μg/mlのビオチニル化OX40Lの (固相

50

）コーティング濃度で抗体により可溶性 O X 4 0 とビオチニル化され固定化された O X 4 0 L との相互作用をブロッキングすることにより E L I S A アッセイにより示された *i n v i t r o* レベルにおいて、

ii) 1 nM ～ 1 0 nM の範囲の I C 5 0 値で 0 . 7 8 ～ 1 0 0 nM の抗体濃度で抗体により可溶性 O X 4 0 L (1 0 nM 、好ましくは h O X 4 0 L - H i s として) と固定化された O X 4 0 との相互作用をブロッキングすることにより B i a c o r e アッセイにより示された *i n v i t r o* レベルにおいて、

iii) 抗体が、4 ～ 2 0 nM の範囲の I C 5 0 値で O X 4 0 と 2×10^5 細胞 / サンプルの濃度の O X 4 0 L を発現する K 5 6 2 細胞 (K 5 6 2 _ O X 4 0 L) との相互作用をブロッキングする、F A C S アッセイにより示された細胞レベルにおいて、

iv) 抗体が、1 ～ 5 nM の範囲の I C 5 0 で N F κ B 活性化のブロッキングをもたらす、サンプル当たり 3×10^4 個の O X 4 0 を発現する H e L a 細胞への、K 5 6 2 _ O X 4 0 L により誘導される O X 4 0 シグナル伝達をブロッキングする、O X 4 0 シグナル伝達アッセイにより、

v) 抗体が、1 nM ～ 1 0 nM の範囲の I C 5 0 値で 1.5×10^5 細胞 / サンプルの濃度および 0 . 7 5 μ g/ml の P H A 濃度で K 5 6 2 _ O X 4 0 L による O X 4 0 L で誘導される T 細胞活性化をブロッキングする、T 細胞活性化アッセイにより、および / または

v i) 抗体が、1 0 μ g/ml の抗体濃度で活性化された B 細胞または樹状細胞による O X 4 0 L で誘導される T 細胞活性化をブロッキングする、T 細胞活性化アッセイ (Tetanus assay) により、阻害し、4 0 % ～ 6 0 % の阻害が得られた。

【 0 0 8 5 】

1 nM ～ 4 nM の範囲の I C 5 0 値で 0 . 5 μ g/ml O X 4 0 L のコーティング濃度で可溶性 O X 4 0 と固定化された O X 4 0 L との相互作用をブロッキングすることにより E L I S A アッセイにおいて阻害を示す抗体が好ましい。

【 0 0 8 6 】

したがって、本発明の更なる好ましい態様は、O X 4 0 / O X 4 0 L 相互作用を阻害し、それにより O X 4 0 L で誘導されるシグナル伝達を阻害することを特徴とする抗体を指す。

【 0 0 8 7 】

本発明に従う抗体は、T N F α または C D 4 0 L 5 0 0 nM の濃度まで T N F α および C D 4 0 L への非特異的結合を示さないことが更に好ましい。

【 0 0 8 8 】

本発明に従う抗体はヒト O X 4 0 L に比較してマウス O X 4 0 L への少なくとも 3 0 倍低い結合を示すことが更に好ましい。

【 0 0 8 9 】

1 0 μ g/ml の濃度の本発明に従う抗体は、H U V E C 細胞上の O X 4 0 L 発現のダウンレギュレーションを誘導しないことが更に好ましい。

【 0 0 9 0 】

さらなる好ましい態様では、本発明の抗体は、それらが組合せ、

a) 配列番号 1 のアミノ酸配列により規定された抗体 L C . 0 0 1 の軽鎖可変ドメイン および配列番号 2 により規定された抗体 L C . 0 0 1 の重鎖可変ドメイン；

b) 配列番号 3 のアミノ酸配列により規定された抗体 L C . 0 0 5 の軽鎖可変ドメイン および配列番号 4 により規定された抗体 L C . 0 0 5 の重鎖可変ドメイン；

c) 配列番号 5 のアミノ酸配列により規定された抗体 L C . 0 1 0 の軽鎖可変ドメイン および配列番号 6 により規定された抗体 L C . 0 1 0 の重鎖可変ドメイン；

d) 配列番号 7 のアミノ酸配列により規定された抗体 L C . 0 2 9 の軽鎖可変ドメイン および配列番号 8 により規定された抗体 L C . 0 2 9 の重鎖可変ドメイン；

e) 配列番号 9 のアミノ酸配列により規定された抗体 L C . 0 1 9 の軽鎖可変ドメイン および配列番号 1 0 により規定された抗体 L C . 0 1 9 の重鎖可変ドメイン；

f) 配列番号 1 1 または 1 6 のアミノ酸配列により規定された抗体 L C . 0 3 3 の軽鎖

10

20

30

40

50

可変ドメインおよび配列番号 12 により規定された抗体 LC. 033 の重鎖可変ドメイン；

g) 配列番号 1 のアミノ酸配列により規定された軽鎖 (V_L) 可変ドメインおよび配列番号 17 により規定された重鎖 (V_H) 可変ドメイン；

h) 配列番号 18 のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号 19 により規定された重鎖可変ドメイン；

i) 配列番号 1 のアミノ酸配列により規定された軽鎖可変ドメインおよび配列番号 20 により規定された重鎖可変ドメイン；

からなる群より独立に選ばれる可変ドメインの組合せを含むことを特徴とする。

【0091】

さらなる好ましい態様では、本発明の抗体は、それらが、

k) 配列番号 13 の配列により規定された軽 κ 鎖；

l) L234A および L235A、PVA236 または GLPSS331 から選ばれる 1 つ以上の突然変異を有する IgG1 アイソタイプ配列番号 14 の重 γ 鎖；

m) IgG4 アイソタイプ配列番号 15 の重 γ 鎖；

n) 突然変異 S228P または突然変異 S228P および L235E を有する IgG4 アイソタイプ配列番号 15 の重 γ 鎖；

o) 配列番号 61、65 または 69 に含まれる軽定常鎖 (light constant chain)、

p) 配列番号 58、59、60、62、63、64、66、67 または 68 に含まれる重定常鎖 (heavy constant chain)、

からなる群より独立に選ばれる定常領域を含むことを特徴とする。

【0092】

更に好ましいのは、各可変抗体ドメイン組合せ a) ~ i) と γ 鎖 l)、m)、n) または p) および好ましくは κ 鎖 k) または o) とのすべての組合せである。特に好ましいのは、抗体 LC. 001、LC. 005、LC. 010、LC. 019、LC. 029、LC. 033、LC. 059、LC. 060 または LC. 063 の可変鎖を、各々、配列番号 13 の配列により規定された κ 鎖または配列番号 61、65 もしくは 69 に含まれる軽定常鎖および突然変異 L234A および L235A を有する IgG1 アイソタイプ配列番号 14 の重 γ 鎖または配列番号 59、63 もしくは 67 に含まれる重定常鎖と共に含む抗体；抗体 LC. 001、LC. 005、LC. 010、LC. 019、LC. 029、LC. 033、LC. 059、LC. 060 または LC. 063 の可変鎖を、各々、配列番号 13 の配列により規定された κ 鎖または配列番号 59、63 もしくは 67 に含まれる重定常鎖および IgG4 アイソタイプ配列番号 15 の重 γ 鎖または配列番号 60、64 もしくは 68 (3 つのすべてが S228P 突然変異を有していない) に含まれる重定常鎖と共に含む抗体；抗体 LC. 001、LC. 005、LC. 010、LC. 019、LC. 029、LC. 033、LC. 059、LC. 060 または LC. 063 の可変鎖を、各々、配列番号 13 の配列により規定された κ 鎖または配列番号 61、65 もしくは 69 に含まれる軽定常鎖および突然変異 S228P を有する IgG4 アイソタイプ配列番号 15 の重 γ 鎖または配列番号 60、64 もしくは 68 に含まれる重定常鎖と共に含む抗体である。

【0093】

好ましくは、抗体は、配列番号 1 のアミノ酸配列の軽鎖可変 CDR および配列番号 2、17 もしくは 20 の重鎖可変 CDR、または配列番号 18 のアミノ酸配列の軽鎖可変 CDR および配列番号 19 の重鎖可変 CDR を含む。

【0094】

好ましい抗体は、該抗体が、補体因子 C1q への非結合および／または FCR 結合の損失を引き起こす少なくとも 1 つのアミノ酸突然変異を含むヒト IgG4 サブクラスまたは他のヒトサブクラス (好ましくは IgG1) であることを特徴とする。このような好ましい変異体抗体は、例えば、突然変異 L234A および L235A を有する配列番号 14 のアミノ酸配列または突然変異 S228P を有するもしくは有さない配列番号 15 を含む。

【0095】

本発明に従う好ましい抗体は、IgG1v1 (E233P; L234V; L235A; ΔG236; A327G; A330S; P331Sにより特定されたPVA-236; GLPSS331)、IgG1v2 (L234A; L235A)およびIgG4v1 (S228P; L235E)およびIgG4x (S228P)として定義された抗体である。

【0096】

本発明に従うハイブリドーマ細胞系hu-Mab<hOX40L>LC. 001は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の下に、寄託番号DSM ACC 2672の下に2004年7月27日にDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ)、Germanyに寄託された。

10

【0097】

本発明に従うハイブリドーマ細胞系hu-Mab<hOX40L>LC. 005 (DSM ACC 2685)、hu-Mab<hOX40L>LC. 010 (DSM ACC 2686)、hu-Mab<hOX40L>LC. 019、hu-Mab<hOX40L>LC. 029 (DSM ACC 2688)およびhu-Mab<hOX40L>LC. 033 (DSM ACC 2689)は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の下に、2004年9月2日にDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ)、Germanyに寄託された。

【0098】

前記細胞系から得られうる抗体は、本発明の好ましい態様でありそして補体因子C1qに結合しないおよび／またはヒトFcγレセプターに結合しない本発明に従う抗体の発生のための中間物質として特に有用である。

20

【0099】

本発明の更なる好ましい態様は、OX40Lに結合し、そして寄託されたハイブリドーマ細胞系により産生されたモノクローナル抗体LC. 005、LC. 010またはLC. 029も結合する同じOX40Lエピトープに結合する、単離された抗OX40L抗体である。

【0100】

本発明の更なる態様は、補体因子C1qおよび／またはヒトFcγレセプターに結合しない、OX40Lに対する抗体の産生方法であって、 10^{-8} M未満のKD値でOX40Lに結合する抗体の重鎖をコードする核酸の配列を、改変された抗体が補体因子C1qおよび／またはNK細胞上のヒトFcγレセプターに結合しないような方式で改変し、該改変された核酸および該抗体の軽鎖をコードする核酸を発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物もしくは真核生物宿主細胞に挿入し、コードされたタンパク質を発現しそして宿主細胞または上清から回収することを特徴とする方法である。

30

【0101】

本発明のさらなる態様は、補体因子C1qに結合しないおよび／またはヒトFcγレセプターに結合しない本発明に従う抗体の産生方法であって、前記細胞系の1つから得られうる抗体を、「クラススイッチ」、即ち、好ましくは、IgG1v1 (E233P; L234V; L235A; ΔG236; A327G; A330S; P331Sにより特定されたPVA-236; GLPSS331)、IgG1v2 (L234A; L235A)およびIgG4v1 (S228P; L235E)およびIgG4x (S228P)として定義されたFc部分の変化または突然変異 (例えばIgG1からIgG4へのおよび／またはIgG1/IgG4突然変異)により改変することを特徴とする方法である。

40

【0102】

更なる好ましい態様では、これらの抗体は、Fab、(Fab')₂および一本鎖フラグメントからなる群より選ばれる抗体フラグメントも含む。

【0103】

したがって、「変異体」抗OX40L抗体は、本明細書では、親抗体配列における1つ以上のアミノ酸残基の付加、欠失および／または置換により「親」抗OX40L抗体アミ

50

ノ酸配列とはアミノ酸配列において異なる分子を指す。好ましい態様では、変異体は、親抗体の1つ以上の定常領域もしくは可変領域における、好ましくは定常領域における1つ以上のアミノ酸置換を含む。例えば、変異体は、親抗体の1つ以上の可変領域における少なくとも1つ、例えば約1～約10、好ましくは約2～約5の置換を含むことができる。通常、変異体は、親抗体定常および／または可変ドメイン配列との少なくとも90%、更に好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するであろう。

【0104】

本発明は、配列番号21～38からなる群より選ばれる親抗体重鎖CDRおよび／または配列番号39～57からなる群より選ばれる抗体軽鎖CDRの最初のアミノ酸配列を改変する方法であって、該最初のアミノ酸配列をコードする核酸を提供し、該核酸を、1つのアミノ酸が重鎖CDR1において改変され、1～2つのアミノ酸が重鎖CDR2において改変され、1～2つのアミノ酸が重鎖CDR3において改変され、1～3つのアミノ酸が軽鎖CDR1において改変され、1～3つのアミノ酸が軽鎖CDR2において改変されおよび／または1～3つのアミノ酸が軽鎖CDR3において改変されるように改変し、該改変されたCDRアミノ酸配列を抗体構造において発現し、該抗体が 10^{-8} M未満の K_D でOX40Lに結合するかどうかを測定し、そしてもしも該抗体が 10^{-8} M未満の K_D でOX40Lに結合するならば、該改変されたCDRを選ぶことを特徴とする方法を含む。好ましくは、このような改変は保存的配列改変である。

【0105】

配列に関する同一性又は相同性は、本明細書では、配列をアラインメントしそして必要ならばギャップを導入して、最大百分率配列同一性を達成した後に、親抗体残基と同一である候補配列におけるアミノ酸残基の百分率として定義される。抗体配列におけるN末端、C末端もしくは内部の延長、欠失または挿入のどれも配列同一性または相同性に影響を与えるものとみなすべきではない。変異体は、ヒトOX40Lに結合する能力を保持し、そして好ましくは親抗体の性質より優れた性質を有する。例えば、変異体は、慢性関節リウマチおよび喘息の処置期間中減少した副作用を有することができる。何故ならば、OX40Lは、B細胞、樹状細胞およびマクロファージ上に一過性に発現されるのみならず内皮細胞 (Kotani, A., et al., Immunol. Lett. 84(2002)1-7)、気道平滑筋細胞 (= ASM) (Burgess, J. K., J. Allergy Clin. Immunol. 113(2004)683-689) およびミクログリア細胞 (Weinberg, A.D., et al., J. Immunol. 162(1999)1818-1826) 上にも一過性に発現されるからである。内皮細胞、ASMおよびミクログリア細胞へのOX40Lに対する抗体の結合は、血管漏洩をもたらす内皮細胞の細胞損傷、肺破壊をもたらすASM細胞の細胞損傷、ミクログリアの損傷をもたらすミクログリア細胞の細胞損傷をもたらすことがある。

【0106】

本明細書における「親」抗体は、変異体の調製のために使用されるアミノ酸配列によりコードされている親抗体である。好ましくは、親抗体は、ヒトフレームワーク領域を有し、そしてもし存在するならば、ヒト抗体定常領域 (1つまたは複数) を有する。例えば親抗体は、好ましくはIgG1型のヒト化抗体またはヒト抗体であることができる。

【0107】

本発明に従う抗体は、更に、本発明に従う抗体の上記した特徴に影響を与えないまたは該特徴を変えない、「保存性配列改変」、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列改変を有するこのような抗体を含む。改変は、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介突然変異誘発などの当技術分野で知られている標準技術により導入することができる。保存性アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同様な側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているアミノ酸置換を含む。同様な側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖 (例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、電荷のない極性側鎖 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリ

プトファン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、 β -分岐状側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸を含む。したがって、ヒト抗OX40L抗体における予想される非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置き換えることができる。

【0108】

アミノ酸置換は、Riechmann, L., et al., Nature 332(1988)323-327 and Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(1989)10029-10033により記載された分子モデル化に基づく突然変異誘発により達成されうる。

10

【0109】

本発明は、抗体の産生方法であって、 10^{-8} M未満のKD値でOX40Lに結合する抗体の重鎖をコードする第1核酸の配列を、改変された抗体が補体因子C1qおよび/またはNK細胞上のヒトFc γ レセプターに結合しないような方法で改変し、該改変された第1核酸および該抗体の軽鎖をコードする第2核酸を発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物宿主細胞に挿入し、該抗体の合成を可能とする条件下に該宿主細胞を培養し、そしてこの培養物から該抗体を回収することを特徴とする方法を更に含む。

【0110】

本発明は、本発明に従うそしてヒト起源に由来するFc部分を含む抗体の産生方法であって、a)本発明に従う親ヒト抗体の軽鎖をコードする第1核酸配列およびFc部分が補体因子C1qおよび/またはFcレセプターに結合しないようにFc部分が改変されている該親ヒト抗体の重鎖をコードする第2DNA配列で宿主細胞をトランスフォーメーションし;b)該第1DNA配列及び第2DNA配列を、該抗体重鎖および軽鎖が産生されるように発現しそしてc)該抗体を宿主細胞または宿主細胞培養物から回収する段階を含む方法を更に含む。

20

【0111】

本発明は、上記した抗体をコードする核酸分子、これらの核酸を含む対応するベクターおよびこれらのベクターのための対応する宿主細胞も含む。本発明は、抗体の製造方法であって、該抗体分子の合成を可能とする条件下に対応する宿主細胞を培養しそしてこの培養物から該抗体を回収することを含む、例えば、原核生物または真核生物宿主細胞において重鎖をコードする核酸および軽鎖をコードする核酸を発現しそしてこのポリペプチドを該細胞から回収することによる、抗体の製造方法を包含する。

30

【0112】

抗体の診断的使用及び治療的使用が包含される。1つの診断用途では、本発明は、OX40Lを含有する疑いのあるサンプルを抗OX40L抗体に曝露しそしてサンプルへの抗体の結合を決定することを含む、OX40Lタンパク質の存在を決定する方法を提供する。OX40Lタンパク質は、OX40L発現細胞の細胞膜中にその膜貫通ドメインにより挿入されることができ、またはシェディング(shedding)もしくはタンパク質分解放出のような機構により放出された体液中の可溶性細胞外ドメインとして存在することができる。この使用のために、本発明は、抗体を使用してOX40Lタンパク質を検出するための抗体および指示を含むキットを提供する。

40

【0113】

本発明の抗体は、哺乳動物、好ましくは炎症性疾患を有するまたは炎症性疾患に罹っている疑いがある患者における炎症性疾患の予防および/または処置のために有用である。このような疾患は、アレルギー反応、例えば喘息を含む。他の適応は慢性関節リウマチを含む自己免疫疾患の処置である。

【0114】

本発明は、上記した炎症性疾患、特に喘息および慢性関節リウマチに罹っている哺乳動物を処置する方法を提供する。

【0115】

50

好ましくは、本発明の抗体は、その症状が吸入されたコルチコステロイドで十分にコントロールされない患者における重い持続性喘息の処置のために使用することができる。患者集団は、不十分にコントロールされた重い持続性喘息を有する成人および青年（12歳以上）を含む。抗体は、1月に1回または2回好ましくは皮下に送達されるであろう。主要な最終目標は、好ましくは急性増悪の減少であろう。他の最終目標は、ピークフロー、日中の喘息症状、夜間の目覚め、クオリティーオブライフ、救急室診察、喘息のない日、 β -2アゴニスト使用、ステロイド減少または漸減および過敏性（hyper-responsiveness）に対する効果を含む。

【0116】

中程度～重度の活性慢性関節リウマチを有する成人の処置のために単独療法のためまたはメトレキセートもしくは他のDMARDs（Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs）との併用において本発明に従う抗体を使用することは更に好ましい。それは2または4週間毎に皮下注射として投与されるであろう。それは、1種以上のDMARDsが効かなかった患者における慢性の治療であろう。最終目標は、活性な慢性関節リウマチを有する成人患者における兆候及び症状の減少および構造的損傷の進行の抑制を含むであろう。ACR基準により測定された障害の防止、兆候及び症状の改善（ACR20>60%、ACR50>35%、ACR70>15%；米国リウマチ学会からのインデックス；www.rheumatology.com）。

【0117】

本発明の更なる態様は、これらの疾患の処置用の医薬の製造のための本発明に従う抗体の使用である。

【0118】

本発明は、医薬組成物の製造のために上記に定義した抗体の使用にも関しそして薬学的有効量で本発明に従う抗体を、場合により緩衝液および／または薬学的目的での抗体の処方のために有用な佐剤と共に含有する医薬組成物を含む。

【0119】

本発明は、薬学的に許容されうる担体中にこのような抗体を含む医薬組成物を更に提供する。1つの態様では、医薬組成物は、製造物又はキットに含ませることもできる。

【0120】

本発明に従う抗体は好ましくはリコンビナント手段により産生される。このような方法は、当技術分野の技術水準で広く知られておりそして抗体ポリペプチドのその後の単離および通常薬学的に許容されうる純度への精製を伴う原核細胞及び真核細胞におけるタンパク質発現を含む。タンパク質発現のために、軽鎖および重鎖またはそのフラグメントをコードする核酸を標準方法により発現ベクターに挿入する。発現は、CHO細胞、NSO細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、酵母またはE. coli細胞などの適切な原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞において行われ、そして抗体は細胞（溶解後の上清または細胞）から回収される。

【0121】

抗体のリコンビナント産生は、当技術分野の技術水準でよく知られておりそして例えば Makrides, S. C., Protein Expr. Purif. 17(1999)183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8(1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16(2000) 151-161; Werner, R.C., et al., Arzneimittelforschung 48(1998)870-880の概説論文に記載されている。

【0122】

抗体は、完全細胞中に、細胞溶解物中にまたは部分的に精製された形態もしくは実質的に純粋な形態で存在することができる。精製は、他の細胞成分または他の汚染物、例えば他の細胞核酸もしくはタンパク質を除去するために、アルカリ/SDS処理、カラムクロマトグラフィー、および当技術分野で周知の他の技術を含む標準技術により行われる。Ausubel, F., et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)参照。

【0123】

N S O細胞における発現は、例えば、Barnes, L. M., et al., Cytotechnology 32(2000) 109-123; and Barnes, L. M., et al., Biotech. Bioeng. 73(2001) 261-270により記載されている。一過性発現は、例えば、Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30(2002) E 9により記載されている。可変ドメインのクローニングは、Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(1989)3833-3837; Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(1992) 4285-4289; およびNorderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204(1997)77-87により記載されている。好ましい一過性発現系 (H E K 2 9 3) は、Schlaeger, E-J., and Christensen, K., in Cytotechnology 30(1999) 71-83 および Schlaeger, E-J., in J. Immunol. Methods 194(1996) 191-199により記載されている。

10

【0124】

原核生物に適当なコントロール配列は、例えばプロモーター、場合によりオペレーター配列およびリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、エンハンサーおよびポリアデニル化シグナルを利用することが知られている。

【0125】

核酸は、それが他の核酸配列と機能的に関連させられているとき、「作用可能に連結されている」。例えば、プレ配列または分泌リーダーのためのDNAは、もしもそれがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現されるならば、ポリペプチドのためのDNAに作用可能に連結されており；プロモーターまたはエンハンサーは、それが配列の転写に影響を与えるならばコード化配列に作用可能に連結されており；またはリボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するように配置されているならばコード化配列に作用可能に連結されている。一般に、「作用可能に連結されている」とは、連結されているDNA配列が連続的であり (contiguous) そして分泌リーダーの場合には、連続的であり且つリーディングフレーム内にある。しかしながら、エンハンサーは、連続的である必要はない。連結は、都合の良い制限部位におけるライゲーションにより達成される。もしもこのような部位が存在しないならば、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが慣用の実施に従って使用される。

20

【0126】

モノクローナル抗体は、慣用の免疫グロブリン精製手順、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティークロマトグラフィーにより培養培地から適当に分離される。モノクローナル抗体をコードするDNA及びRNAは、容易に単離されそして慣用の手順を使用して配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAおよびRNAのソースとして役立つことができる。一旦単離されると、DNAを発現ベクターに挿入することができ、次いでこれを、宿主細胞、例えば他の場合には免疫グロブリンタンパク質を産生しないH E K 2 9 3細胞、C H O細胞またはミエローマ細胞にトランスフェクションして、宿主細胞においてリコンビナントモノクローナル抗体の合成を達成する。

30

【0127】

ヒトO X 4 0 L抗体のアミノ酸配列変異体 (または突然変異体) は、抗体DNAに適当なヌクレオチド変化を導入することまたはヌクレオチド合成により調製される。しかしながら、このような改変は、例えば上記した非常に限られた範囲においてのみ行うことができる。例えば、改変は、上記した抗体の特性、例えばI g Gアイソタイプ及びエпитープ結合を変えないが、リコンビナント産生の収率、タンパク質安定性を改良することができるまたは精製を容易にすることができる。

40

【0128】

抗O X 4 0 L抗体の特有のコンフォメーションを維持するのに関与しないいかなるシステイン残基も、一般にセリンにより置換することができ、それにより分子の酸化安定性を改良しそして異常な架橋を防止することができる。反対に、システイン結合 (1つまたは複数) を抗体に加えて、その安定性 (特に、抗体がF vフラグメントの如き抗体フラグメントである場合) を改良することができる。

50

【0129】

抗OX40L抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当技術分野で知られている種々の方法により調製される。これらの方法は、天然のソース（天然に存在するアミノ酸配列変異体の場合に）からの単離、またはオリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）突然変異誘発、PCR突然変異誘発およびヒト化抗OX40L抗体の以前に調製された変異体または非変異体バージョンのカセット突然変異誘発による調製を含むが、それらに限定されない。

【0130】

本発明は、化学療法剤、毒素（例えばバクテリア、真菌、植物もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素またはそのフラグメント）、放射性同位元素（即ち、放射性コンジュゲート）、などの細胞傷害剤にコンジュゲーションされた本発明に従う抗体を含む免疫コンジュゲートにも関する。抗体と細胞傷害剤とのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば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)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体（例えばジメチルアジピミデートHCL）、活性エステル（例えばジスクシンイミジルスベレート）、アルデヒド（例えばグルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えばビス-(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えばビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン）、ジイソシアナート（例えばトリエン2, 6-ジイソシアナート）およびビス-活性フッ素化合物（例えば1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン）を使用して製造される。例えばリシンイムノトキシンは、Vitetta, E.S., et al., Science 238(1987) 1098-1104)に記載のとおり製造することができる。炭素14で標識された1-イソチオシアナートベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)は、抗体への放射性ヌクレオチドのコンジュゲートのための例示的キレート剤である。WO 94/11026参照。

【0131】

別のタイプの抗体の共有結合改変は、US Patent Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192または4,179,337に記載された方法において、種々の非タンパク質性ポリマー、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またはポリオキシアルキレンの1つに抗体を連結することを含む。

【0132】

なお別の局面では、本発明は、ヒト抗OX40L抗体（本発明に従う抗体を産生するハイブリドーマ細胞からなる群より選ばれる細胞系により産生された親抗体）を発現するトランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスからの単離されたB細胞を提供する。好ましくは、単離されたB細胞は、精製されたもしくはリコンビナント形態のOX40L抗原および／またはOX40Lを発現する細胞で免疫感作されたトランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られる。好ましくは、トランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスは、本発明の抗体のすべてもしくは一部をコードするヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する。単離されたB細胞を次いで不死化してヒト抗OX40L抗体のソース（例えばハイブリドーマ）を提供する。したがって、本発明は、本発明に従うヒトモノクローナル抗体を産生することができるハイブリドーマも提供する。1つの態様では、ハイブリドーマは、不死化された細胞に融合された、本発明の抗体のすべてもしくは一部をコードするヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られるB細胞を含む。

【0133】

特定の態様では、トランスジェニック非ヒト動物は、本発明の抗体のすべてもしくは一部をコードするヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスである。トランスジェニック非ヒト動物は、OX40L抗原の精製されたもしくは濃縮された調製物および／またはOX40Lを発現する細胞で免疫感作されうる。好ましくは、トランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウス

は、OX40Lに対するヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを産生することができる。

【0134】

本発明に従うヒトモノクローナル抗体は、本発明の抗体のすべてもしくは一部をコードするヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスを、OX40L抗原の精製されたもしくは濃縮された調製物および／またはOX40Lを発現する細胞で免疫感作させることにより産生することができる。次いで動物のB細胞（例えば、脾臓B細胞）を得そしてミエローマ細胞と融合して、OX40Lに対するヒトモノクローナル抗体を分泌する不死のハイブリドーマ細胞を形成する。

【0135】

好ましい態様では、OX40Lに対して指向されたヒトモノクローナル抗体は、マウス系よりはむしろヒト免疫系の一部を有するトランスジェニックマウスを使用して発生させることができる。本明細書で「HuMa b」マウスと呼ばれるこれらのトランスジェニックマウスは、内在性 μ および κ 鎖ローカスを不活性化するターゲティングされた突然変異と共に、重（ μ および γ ）鎖および κ 軽鎖（定常領域遺伝子）を含む再配列されていないヒト免疫グロブリン遺伝子をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニローカスを含有する（Lonberg, N., et al., Nature 368(1994) 856-859）。したがって、このマウスは、マウスIgMまたはKの減少した発現を示し、そして免疫感作に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチおよび体細胞突然変異を受けて、高アフィニティーヒトIgGモノクローナル抗体を発生する（Lonberg, N., et al., Nature 368(1994)856-859; Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113(1994)49-101に概説されている; Lonberg, N., and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25(1995)65-93; およびHarding, F., and Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764(1995) 536-546）。HuMa bマウスの調製は、Taylor, L., et al., Nucleic Acids Res. 20 (1992) 6287-6295; Chen, J., et al., Int. Immunol. 5(1993) 647-656; Tuaillon, N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(1993) 3720-3724; Choi, T. K., et al., Nat. Genet. 4(1993)117-123; Chen, J., et al., EMBO J. 12(1993) 821-830; Tuaillon, N., et al., J. Immunol. 152(1994) 2912-2920; Lonberg, N., et al., Nature 368(1994) 856-859; Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113(1994)49-101; Taylor, L., et al., Int. Immunol. 6(1994) 579-591; Lonberg, N., and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25(1995)65-93; およびHarding, F., and Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764(1995) 536-546; Fishwild, D. M., et al., Nat. Biotechnol. 14(1996) 845-851; に記載されており、それらのすべての内容はそのまま参照により本明細書に組み込まれる。更に、US Patent Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 5,545,807; 5,770,429; WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/1227; WO 92/22645; and WO 92/03918を参照のこと。

【0136】

OX40Lに対するヒトモノクローナル抗体を完全に発生させるために、HuMa bマウスを、Lonberg, N., et al., Nature 368(1994)856-859; Fishwild, D. M., et al., Nat. Biotechnol. 14(1996) 845-851およびWO 98/24884により記載のとおり、一般的方法に従ってOX40L抗原の精製されたもしくは濃縮された調製物および／またはOX40Lを発現する細胞で免疫感作させることができる。好ましくは、マウスは、最初の免疫感作時に6～16週齢であろう。例えば、KLHにカップリングされたもしくはPBS中の可溶性OX40L抗原の精製されたもしくは濃縮された調製物（例えば、OX40L発現細胞から精製された）を使用して、HuMa bマウスを腹腔内に免疫感作させることができる。これは、単離されたOX40Lタンパク質による免疫感作とOX40Lを発現する細胞、例えば腫瘍細胞系による免疫感作を交互に行うことにより組み合わせ、免疫応答を促進させることができる。種々の抗原による累積した経験は、完全フロイントアジュバント中の抗原で腹腔内に（i p）最初に免疫感作され、次いで不完全フロイントアジュバ

ント中の抗原で隔週毎に i p 免疫感作（例えば、総計 6 回まで）されると、H u M A b トランスジェニックマウスは最善に応答することを示した。免疫応答は、眼窩後方の出血（retroorbital bleeds）により得られる血漿サンプルにより、免疫感作プロトコールの経過にわたって監視することができる。血漿は、E L I S A によりスクリーニングすることができ、そして十分な力価の抗 O X 4 0 L ヒト免疫グロブリンを有するマウスを、対応する B 細胞の不死化のために使用することができる。マウスを抗原で 3 ～ 4 日静脈内に追加抗原刺激した後殺し、そして脾臓およびリンパ節を除去することができる。いくつかのマウスは、各抗原について免疫感作されるであろう。例えば、H C o 7 および H C o 1 2 系統の総計 1 2 匹の H u M A b マウスを免疫感作させることができる。

【0137】

H C o 7 マウスは、それらの内在性軽鎖（ κ ）遺伝子における J K D 破壊（JKD disruption）(Chen, J., et al., EMBO J. 12(1993)821-830)、それらの内在性重鎖遺伝子における C M D 破壊（WO 01/14424 の実施例 1 に記載のとおり）、K C o 5 ヒト κ 軽鎖導入遺伝子（Fishwild, D. M., et al., Nat. Biotechnol. 14(1996) 845-851 に記載のとおり）および H C o 7 ヒト重鎖導入遺伝子（US Patent No.5,770,429 に記載のとおり）を有する。

【0138】

H C o 1 2 マウスは、それらの内在性軽鎖（ κ ）遺伝子における J K D 破壊（Chen, J., et al., EMBO J. 12(1993)821-830）、それらの内在性重鎖遺伝子における C M D 破壊（WO 01/14424 の実施例 1 に記載のとおり）、K C o 5 ヒト κ 軽鎖導入遺伝子（Fishwild, D. M., et al., Nat. Biotechnol. 14(1996) 845-851 に記載のとおり）および H C o 1 2 ヒト重鎖導入遺伝子（WO 01/14424 の実施例 2 に記載のとおり）を有する。マウスリンパ球を単離しそして標準プロトコールに基づいて P E G を使用してマウスミエローマ細胞系と融合させてハイブリドーマを発生させることができる。得られるハイブリドーマを、次いで抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングする。例えば免疫感作されたマウスからの脾臓およびリンパ節由来のリンパ球の単一細胞懸濁液を、50% P E G により S P 2 / 0 非分泌マウスミエローマ細胞（A T C C、C R L 1 5 8 1）の数の 6 分の 1 に融合させる。細胞を平底マイクロタイタープレート中に約 2×10^5 でプレートし、続いて選択培地中で約 2 週間インキュベーションする。

【0139】

次いで個々のウェルをヒト抗 O X 4 0 L モノクローナル I g M および I g G 抗体について E L I S A によりスクリーニングする。一旦多量のハイブリドーマ増殖が起こると、培地を通常 10 ～ 14 日後に分析する。抗体分泌ハイブリドーマを再びプレートし、再びスクリーニングし、そしてもしもヒト I g G について依然としてポジティブであるならば、抗 O X 4 0 L モノクローナル抗体を限界希釈により少なくとも 2 回サブクロニングすることができる。次いで安定なサブクローンを i n v i t r o で培養して特徴付けのために組織培養培地中で抗体を産生させる。

【0140】

アッセイツリー（assay tree）は、主として、I g G に関する非特異的アッセイ（「I g G - E L I S A」）、次いで精製された O X 4 0 L タンパク質または O X 4 0 L 発現細胞への抗原結合の決定のための特異的 E L I S A および見かけの F A C S アッセイからなる。次の段階は、抗 O X 4 0 L 抗体の、精製された O X 4 0 L または細胞上に発現された O X 4 0 L に対するその天然の相互作用パートナー、例えば可溶性の精製された O X 4 0 との競合を決定する機能的アッセイ、例えば競合 E L I S A または F A C S を含む。次の段階は、O X 4 0 シグナル伝達の抗 O X 4 0 L 抗体の阻止能力を決定する機能的アッセイ、例えば N F κ B 活性化（＝「N F κ B アッセイ」）を含む。次の段階は、T 細胞活性化に関する抗 O X 4 0 L 抗体の阻止能力を決定する機能的アッセイ（「T 細胞活性化アッセイ」および「T T アッセイ」）を含む。

【0141】

C D R 配列は抗体－抗原相互作用について責任を担っているので、異なるヒト抗体からのフレームワーク配列上に本発明に従う C D R 配列を含む発現ベクターを構築することに

10

20

30

40

50

より本発明に従うリコンビナント抗体を発現することが可能である（例えば、Riechmann, L., et al., Nature 332(1998) 323-327; Jones, P., et al., Nature 321(1986) 522-525; and Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(1989)10029-10033参照）。このようなフレームワーク配列は、生殖系列ヒト抗体遺伝子配列を含む公のDNAデータベースから得ることができる。これらの生殖系列配列は、成熟抗体遺伝子配列とは異なるであろう。何故ならば、それらはB細胞成熟期間中にV(D)J結合により形成される完全にアセンブリーされた可変遺伝子を含まないからである。生殖系列遺伝子配列は、各々可変領域にまんべんなく、高アフィニティー二次レパートリー抗体の配列とも異なるであろう。

【0142】

本発明は、好ましくはサンプルのOX40L（可溶性または膜に結合した）と本発明に従う抗体との結合を決定する免疫学的アッセイにより、*in vitro*でのOX40Lの診断のための本発明に従う抗体の使用をさらに含む。

【0143】

他の局面では、本発明は、薬学的に許容されうる担体と共に処方された、本発明のヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分の1つまたは組合せを含有する組成物、例えば医薬組成物を提供する。更に詳しくは、組成物は、医薬組成物または診断組成物であり、なおさらに詳しくは、医薬組成物は、上記に定義した抗体と少なくとも1種の薬学的に許容されうる賦形剤を含む。組成物は無菌でなければならず、そして組成物が注射器により送達可能である程度に流動性でなければならない。

【0144】

本明細書で使用された、「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合性の、いかなるおよびすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗バクテリア剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤等を含む。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与（例えば、注射または注入（infusion）により）のために適当である。好ましくは、このような担体は、好ましくは、等張性であり、好ましくは更に無機塩、糖、ポリオールおよび／または界面活性剤を含有する、水性のpH緩衝化された溶液（例えば酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩またはヒスチジン）である。薬学的に許容されうる担体は、Remington's Pharmaceutical Science, 16th edition, Osol, A. Ed.(1980)に記載されたようなものでもある。

【0145】

抗体濃度は、好ましくは0.1mg/ml～50mg/mlである。好ましくは、緩衝化された溶液のpH値は、1mM～200mMの緩衝剤濃度で4.0～8.0の範囲にある。好ましい塩は、1mM～200mMの範囲にある塩化ナトリウムおよび／またはリン酸ナトリウムである。好ましい糖は、1%～15%（重量／容積）の範囲にあるスクロースおよび／またはトレハロースである。好ましいポリオールは、1%～15%（重量／容積）の範囲にあるグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールおよび／または同様なものである。界面活性剤は、好ましくは、0.001%～0.5%（重量／容積）の範囲のポリソルベート（例えばポリソルベート20または80）および／またはポロキサマー（poloxamere）である。このましい医薬組成物は、0.1mg/ml～50mg/mlの抗体と1mM～200mMのリン酸緩衝化生理食塩水pH4.0～8.0を含有する。

【0146】

本発明の組成物は、それを必要としている患者に当技術分野で知られている多様な方法により投与することができる。当業者により認識されたとおり、投与の経路および／または方式は所望の結果に依存して変わるであろう。

【0147】

薬学的に許容されうる賦形剤または担体は、無菌の水性溶液剤または無菌の注射可能な溶液剤もしくは分散液剤の処方に応じて調合される製剤用の無菌の散剤を含む。このような媒体および薬学的有効物質のための作用物質の使用は当技術分野で知られている。

【0148】

【 0 1 4 9 】

10

20

40

50

配列番号 63 LC. 005 の γ 重鎖 (L234A、L235A ヒト IgG1 突然変異体)

配列番号 64 LC. 005 の γ 重鎖 (S228P ヒト IgG4 突然変異体)

配列番号 65 LC. 005 の κ 軽鎖

配列番号 66 LC. 060 の γ 重鎖 (ヒト IgG1 型)

配列番号 67 LC. 060 の γ 重鎖 (L234A、L235A ヒト IgG1 突然変異体)

配列番号 68 LC. 060 の γ 重鎖 (S228P ヒト IgG4 突然変異体)

配列番号 69 LC. 060 の κ 軽鎖

【0152】

10

略号

アミノ酸は、3文字コード (Leu) または1文字コード (L) において略記される。

S228Pは、IgG4重鎖の位置228におけるセリンのプロリンへの交換を意味する。

L234は、EU番号付け (Kabata) に従う位置234におけるアミノ酸ロイシンを意味する。

L234Aは、位置234におけるアミノ酸ロイシンがアラニンに変えられていることを意味する。

L235Aは、位置235におけるアミノ酸ロイシンがアラニンに変えられていることを意味する。

20

PVA236は、236領域において、IgG1のELLGまたはIgG4のEFLGがPVAに修正されていることを意味する。

GLPSS331は、331領域において、IgG1のALPAPまたはIgG2のGLPAPがGLPSSに変えられていることを意味する。

Δ G236は、位置236におけるアミノ酸が欠失していることを意味する。

IgG4xは、IgG4における突然変異S228Pを意味する。

LC2010-001は、LC. 001と同義である。

Fcgは、Fcガンマ (Fc γ) の同義語である。

【0153】

抗体の他の配列修正は、同様に命名される。

30

ヒスチジntagに融合されたリコンビナント可溶性ヒトOX40L

hOX40L-His

ヒスチジntagに融合されたリコンビナント可溶性マウスOX40L

mOX40L-His

フラグtagに融合されたリコンビナント可溶性ヒトOX40L

hOX40L-Flag

フラグtagに融合されたリコンビナント可溶性マウスOX40L

mOX40L-Flag

ヒトFc γ に融合されたリコンビナント可溶性ヒトOX40

hOX40-hFc

40

ウサギ抗マウスFc γ モノクローナル抗体 Ant i-mFc

ヤギ抗ヒトFc γ モノクローナル抗体 Ant i-hFc

マウス抗ヒスチジンモノクローナル抗体 Ant i-His

マウスFc γ に融合されたリコンビナント可溶性ヒトOX40

hOX40-mFc

マウス抗TNF α モノクローナル抗体 Ant i-TNF α

マウス抗CD40Lモノクローナル抗体 Ant i-CD40L

腫瘍壊死因子アルファ TNF α

CD40リガンド CD40L

ラット抗ヒトOX40Lモノクローナル抗体 TAG34

50

フィトヘマグルチニン

实施例

抗OX40L抗体を産生するハイブリドーマ細胞系の発生

HuMAbハイブリドーマを、IMDM (Cambrex)、胎仔クローン1ウシ血清 (Perbi Science)、起源ハイブリドーマクロニング因子 (igen)、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン/ストレプトマイシン、2-メルカプトエタノール、HAT (Sigma-Aldrich) およびカナマイシン (Invitrogen) 中で37℃で、5% CO₂において培養した。

トランスジェニックマウスの免疫感作手順

LC. 2010-001: 6匹のHC07 (2匹のオスと4匹の雌)、系統GG2201 (Medarex, San Jose, CA, USA) および4匹のHC012 (4匹の雄)、系統GG2198 (Mesarex, San Jose, CA, USA) を、ヒトOX40L (hOX40L) のための発現ベクターで一過性にトランスフェクションされた1×106 HEK293細胞、およびhOX40Lの可溶性細胞外ドメイン20 μgで交互に免疫感作させた。8回の免疫感作を、hOX40L発現細胞による総計4回の腹腔内 (i. p) 免疫感作およびリコンビナントタンパク質による尾基部 (tail base) での4回の皮下 (s. c) 免疫感作により行った。最初の免疫感作では、1×106 HEK293-hOX40L細胞100 μlを完全フロイントアジュバント (CFA; Difco Laboratories, Detroit, USA) 100 μlと混合した。すべての他の免疫感作では、PBS中の細胞100 μlを使用するかまたはリコンビナントタンパク質を不完全フロイントアジュバント (ICFA; Difco) 100 μlと混合した。

抗hOX40Lの血清力価が十分であることが見出されると、マウスを、融合の4日および3日前にPBS200 μ l中のhOX40L細胞外ドメイン15 μ gで静脈内に(i.v)2回さらに追加抗原刺激した。

LC. 2010-001、LC. 059、LC. 060およびLC. 063はHC o 1
2マウスに由来していた。

LC. 2010-005、-010、-019、-029および-033:5匹のHC
o7 (4匹の雄と1匹の雌)、系統GG2201 (Medarex, San Jose, CA, USA)を、h
OX40Lの可溶性細胞外ドメイン20 µgで免疫感作させた。7回の免疫感作を、総計
4回の腹腔内 (i. p) 免疫感作および尾基部での3回の皮下 (s. c) 免疫感作により
行った。最初の免疫感作では、リコンビナントタンパク質100 µlを、完全フロイント
アジュバント (CFA; Difco Laboratories, Detroit, USA) 100 µlと混合した。すべての
他の免疫感作では、リコンビナントタンパク質100 µlを不完全フロイントアジュバ
ント (ICFA; Difco) 100 µlと混合した。

抗hOX40Lの血清力価が十分であることが見出されると、マウスを、融合の4日および3日前にPBS 200 μ l中のhOX40L細胞外ドメイン15 μ gで静脈内に(i.v.)2回さらに追加抗原刺激した。

10

20

30

40

50

ハイブリドーマ発生

マウスを殺しそして脾臓および腹大動脈と大静脈をフランキングする (flanking) リンパ節を採集した。脾臓細胞およびリンパ節細胞の融合パートナー S P 2 . 0 細胞との融合は、標準操作手順に従って行った。

【0161】

抗原特異的 E L I S A

免疫感作されたマウスの血清における抗 O X 4 0 L 力価を、抗原特異的 E L I S A により決定した。プレート (96 平底 E L I S A プレート、Greiner) を、P B S 中に溶解した精製された O X 4 0 L 0 . 1 μ g/ml でコーティングしそして室温で一夜コーティングした。次いで、ウェルを、P B S T C (Tween 20、0.05%(Sigma-Aldrich Chemie BV) およ

10

【0162】

試験した血清タップ (serum taps) を、P B S T C 中に 1 : 5 0 に希釈しそしてウェルに加えた。免疫感作の前にマウスから得られた血清を P B S T C 中に 1 : 1 0 0 で溶解しそしてネガティブコントロールとして使用した。ヒト O X 4 0 L に対して指向されたマウス抗体を P B S T C 中に 1 : 5 0 で溶解しそしてポジティブコントロールとして使用した。プレートを室温で 1 時間インキュベーションした。次いで、プレートを P B S T (T w e e n 2 0、0 0 5 % を含有する P B S) を使用して 2 回洗浄した。G t - α - h u l g G - H R P (Jackson) を P B S T C 中に 1 : 5 0 0 0 に希釈しそして試験されたタップおよびネガティブコントロールを含有するウェルに加えた。R b - α - m I g G (Jack

20

【0163】

κ - E L I S A

融合から生じたハイブリドーマがヒト抗体を発生するかどうかを決定するために、 κ - E L I S A を行った。E L I S A プレートを、P B S 中に 1 / 1 0 0 0 0 に希釈したラット抗ヒト I g G κ 軽鎖抗体 (D A K O) で、4 $^{\circ}$ C での一夜のインキュベーションによりコーティングした。ウェルを捨てた後に、プレートを、P B S T C (T w e e n - 2 0、0 . 0 5 % を補充した P B S C (P B S T C)) との室温で 1 時間のインキュベーションによりブロッキングした。次いでウェルを P B S T C 中に 1 / 2 に希釈したハイブリドーマ培養上清とインキュベーションした。P B S T C 中に 1 / 2 に希釈した培養培地をネガティブコントロールとして使用し、P B S T C 中に 1 / 1 0 0 に希釈した κ 鎖ポジティブマウス血清をポジティブコントロールとして使用した。次いで、ウェルを 3 回洗浄しそして P B S T C 中に 1 / 2 0 0 0 に希釈した H R P をコンジュゲーションしたラット抗ヒト I g G F (a b ') ₂ (D A K O) と 3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションした。ウェルを 3 回洗浄しそしてアッセイを、調製されたばかりの A B T S (登録商標) 溶液 (1 mg/ml) で暗所で室温 (R T) で 3 0 分間発色させた。吸光度を E L I S A プレートリーダーにお

30

40

【0164】

実施例 2

抗 O X 4 0 L H u M a b 可変ドメインのクローニングおよび配列分析

(κ 軽鎖および γ 1 重鎖)

O X 4 0 L H u M a b s の軽鎖可変領域 V_L および重鎖可変領域 V_H をコードするヌクレオチド配列を、標準 c D N A 合成 / P C R 法により単離した。

【0165】

トータル R N A を、GeneRacer (商標) K i t (Invitrogen) を使用して $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ ハイブリドーマ細胞から調製した。ハイブリドーマ由来の R N A を、第 1 鎖 c D

50

NA合成およびGeneRacer（商標）O l i g o - d Tプライマーのライゲーションのためのテンプレートとして使用した。第2鎖cDNA合成およびV_LおよびV_Hコード化cDNAフラグメントのさらなるPCR増幅を、それぞれ、カップ軽鎖およびγ1重鎖定常領域のヌクレオチド配列に相補性のリバース軽鎖及び重鎖プライマーならびに5'-特異的GeneRacer（商標）プライマーにより行った。PCR産物を、Invitrogen（商標）Life TechnologiesからのTOPO（商標）TAクローニングキットおよびクローニングベクターとしてpCR4-TOPO（商標）を使用してクローニングした。クローニングされたPCR産物を、消化のためのEcoRIを使用して適切なプラスミドの制限マッピングにより同定し、そして、それぞれ、V_LおよびV_Hのための約740および790bpのDNAフラグメントサイズを予測／計算した。

10

【0166】

クローニングされたPCRフラグメントのDNA配列を二本鎖配列決定により決定した。

【0167】

GCG（Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin）ソフトウェアパッケージバージョン10.2およびVector-NTI8（InforMax, Inc）を一般的データプロセッシングのために使用した。DNAおよびタンパク質配列を、GCGモジュールCLUSTALWを使用してアライメントさせた。配列アライメントは、プログラムGENEDOC（バージョン2.1）を使用して作成された。

20

【0168】

実施例3

抗OX40L I g G 1 HuMa bのための発現プラスミドの構築

抗OX40L HuMa b軽鎖及び重鎖コード化遺伝子を哺乳動物細胞発現ベクター中に別々にアセンブリーした。

【0169】

それにより、抗OX40L HuMa b軽鎖可変領域（V_L）およびヒトκ軽鎖定常領域（C_L、配列番号13、または配列番号61、65もしくは69からの）をコードする遺伝子セグメントを、抗OX40L HuMa b重鎖可変領域（V_H）およびヒトγ1重鎖定常領域（C_{H1}-Hinge-C_{H2}-C_{H3}、配列番号14または配列番号58、62もしくは66からの）のための遺伝子セグメントが接合されたと同様に、接合させた。

30

【0170】

コドン使用頻度を推定することができるヒト軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的情報は、Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, fifth ed., NIH Publication No.91-3242(1991)に与えられる。

【0171】

抗OX40L HuMa bκ軽鎖の転写単位は、下記のエレメント：

- ーヒトサイトメガロウイルス（HCMV）からの前初期（immediate early）エンハンサーおよびプロモーター
 - ーコザック配列を含む合成5'-UT、
 - ーシグナル配列イントロンを含むマウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
 - ー5'端部における独特のBsmI制限部位およびスプライスドナー部位および3'端部における独特のNotI制限部位を持って配列された（arranged）クローニングされた抗OX40L HuMa b可変軽鎖cDNA、
 - ーイントロン2マウスI g - κエンハンサーを含むゲノムヒトκ遺伝子定常領域 [Picard, D., and Schaffner, W., Nature 307(1984)80-82] および
 - ーヒト免疫グロブリンκポリアデニル化（「ポリA」シグナル配列、
- からなる。

40

【0172】

抗OX40L HuMa bγ1重鎖の転写単位は、下記のエレメント：

- ーヒトサイトメガロウイルス（HCMV）からの前初期エンハンサーおよびプロモーター

50

ー

ーコザック配列を含む合成 5' - U T、
ーシグナル配列イントロンを含む改変されたマウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
ー 5' における独特の B s m I 制限部位およびスプライスドナー部位および 3' 端部における独特の N o t I 制限部位を持って配列されたクローニングされた抗 O X 4 0 L H u M a b 可変重鎖 c D N A、
ーマウス I g μ エンハンサーを含むゲノムヒト γ 1 重遺伝子定常領域 (Neuberger, M.S., EMBO J.2(1983)1373-1378)、
ーヒト γ 1 免疫グロブリンポリアデニル化 (「ポリ A」シグナル配列、
からなる。

10

【0173】

抗 O X 4 0 L H u M a b κ 軽鎖および γ 1 重鎖発現プラスミドの機能的エレメント：
抗 O X 4 0 L H u M a b κ 軽鎖または γ 1 重鎖発現カセットの外に、これらのプラスミドは、

ーヒグロマイシン耐性遺伝子
ーエプスタインバーウイルス (E B V) の複製の起点、o r i P
ー E . c o l i においてこのプラスミドの複製を可能とするベクター p U C 1 8 からの複製の起点および

E . c o l i におけるアンピシリン耐性を与える β - ラクタマーゼ遺伝子
を含有する。

20

【0174】

実施例 4

抗 O X 4 0 L I g G 4 H u M a b のための発現プラスミドの構築

抗 O X 4 0 L γ 4 重鎖プロトタイプ発現プラスミドは、ヒトゲノム γ 1 定常領域および γ 1 免疫グロブリンポリアデニル化 (「ポリ A」) シグナル配列をヒトゲノム γ 4 定常領域 (配列番号 1 5、または配列番号 6 0、6 4 もしくは 6 8 からの突然変異していない γ 4 定常領域からの) および γ 4 免疫グロブリンポリアデニル化シグナル配列により置き換えることにより、抗 O X 4 0 L γ 1 重鎖発現プラスミドから誘導された。

【0175】

抗 O X 4 0 L H u M a b κ 軽鎖の発現のために、同じ発現プラスミドを、I g G 1 について説明したとおりに使用した (上記参照)。

30

【0176】

実施例 5

L C . 0 0 1 に基づく突然変異体 (変異体) 抗 O X 4 0 L I g G 1 および I g G 4 のための発現プラスミドの構築

突然変異体抗 O X 4 0 L γ 1 - および γ 4 - 重鎖をコードする発現プラスミドは、Q u i c k C h a n g e (商標) 部位特異的突然変異誘発キット (Stratagene) を使用する野生型発現プラスミドの部位特異的突然変異誘発により創生された。アミノ酸は、E U 番号付けに従って番号を付けられた (Edelman, G. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda, MD (1991))。

40

【0177】

【表 1】

表 1

アイソタイプ	略号	突然変異	説明
IgG1	IgG1v1	E233P; L234V; L235A; ΔG236; A327G; A330S; P331S により 特定される PVA-236; GLPSS331	ヒトγ1重鎖のアミノ酸配列 Glu ₂₃₃ Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ Gly ₂₃₆ は、 ヒトγ2重鎖のアミノ酸配列 Pro ₂₃₃ Val ₂₃₄ Ala ₂₃₅ により置換されている。 ヒトγ1重鎖のアミノ酸配列 Ala ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ala ₃₃₀ Pro ₃₃₁ は、 ヒトγ4重鎖のアミノ酸配列 Gly ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ser ₃₃₀ Ser ₃₃₁ of the により置換されている。
IgG1	IgG1v2	L234A; L235A	ヒトγ1重鎖のアミノ酸配列 Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ は、アミノ酸配列 Ala ₂₃₄ Ala ₂₃₅ により置換されている。
IgG4	IgG4v1	S228P; L235E	ヒトγ4重鎖の Ser ₂₂₈ は、 Pro ₂₂₈ により置換されており、そして ヒトγ4重鎖の Leu ₂₃₅ は、 Glu ₂₃₅ により置換されている。
IgG4	IgG4x	S228P	ヒトγ4重鎖の Ser ₂₂₈ は、 Pro ₂₂₈ により置換されている。

【0178】

実施例 6

リコンビナント抗OX40L HuMabsの産生

10%超低IgG FCS (Gibco)、2mMグルタミン (Gibco)、1%容積/容積非必須アミノ酸 (Gibco) および250 μg/ml G418 (Roche) を補充されたDMEM (Gibco) 中で培養された付着HEK293-E BNA細胞 (ATTC CRL-10852) の一過性トランスフェクションによりリコンビナントHuMabsを発生させた。トランスフェクションのために、Fugene (商標) 6 (Roche) トランスフェクション試薬を3:1~6:1の範囲の試薬 (μl) 対DNA (μg) の割合で使用した。免疫グロブリン軽鎖および重鎖を、1:2~2:1の軽鎖対重鎖コード化プラスミドのモル比を使用して2つの異なるプラスミドから発現させた。HuMab含有細胞培養上清を、トランスフェクションの4~11日後に回収した。上清を精製まで-20℃に保存した。

【0179】

例えば、HEK293におけるヒト抗体のリコンビナント発現に関する一般的情報は、Meissner, P., et al., Biotechnol. Bioeng. 75(2001)197-203に与えられる。

【0180】

実施例 7

抗体TAG-34、LC. 001、LC. 005、LC. 010、LC. 019、LC

． 0 2 9、L C． 0 3 3 のアフィニティー分析

機器：Biacore 3000、ランニングバッファーおよび反応バッファー：H B S - P（1 0 mM H E P E S、1 5 0 mM N a C l、0． 0 0 5 % T w e e n 2 0、p h 7． 4）、2 5 °C。アナライトの注射は、0． 7 8 nM～1 0 0 nMの7つの濃度で3分間行いそしてH B S - Pで5分間洗浄した。表面（カルボキシメチル化されたデキストラン表面、C M）の再生は、1 0 mMグリシン p H 2． 0の各々1分間の2回の注射により行った。チップ、アッセイフォーマットおよび注射のシーケンスおよび速度論的データは、下表における説明に対応する。速度論的データは、1：1 ラングミュア結合モデルに速度論的データを適合させることにより計算された。

【 0 1 8 1 】

【表 2】

表 2

チップ	捕捉	リガンド	アナライト	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
CM5	Anti-mFcγ	TAG34	hOX40L-His	8.84x10 ⁴	3.32x10 ⁻⁵	3.75x10 ⁻¹⁰
CM5	Anti-hFcγ	LC.001	hOX40L-His	9.01x10 ⁴	7.16x10 ⁻⁹	<1.1x10 ⁻¹¹
CM5	Anti-hFcγ	LC.005	hOX40L-His	6.84 x10 ⁴	2,02x10 ⁻⁷	<1.5x10 ⁻¹¹
CM5	Anti-hFcγ	LC.010	hOX40L-His	6.25 x10 ⁴	2.5x10 ⁻⁵	3.99x 10 ⁻¹⁰
CM5	Anti-hFcγ	LC.019	hOX40L-His	7.89 x10 ⁴	7.53x10 ⁻⁸	<1.2x10 ⁻¹¹
CM5	Anti-hFcγ	LC.029	hOX40L-His	1,41 x10 ⁵	2,4x10 ⁻⁸	< 7,1x10 ⁻¹²
CM5	Anti-hFcγ	LC.033	hOX40L-His	7.01 x10 ⁴	2.09x10 ⁻⁷	<1.4x10 ⁻¹¹

T A G 3 4 と m O X 4 0 L との相互作用は測定できなかった。

【 0 1 8 2 】

すべての B i a c o r e アッセイについてのデータ評価およびデータ寄託

ネガティブコントロールデータ（例えば、緩衝曲線）は、システム固有のベースラインドリフトの補正およびノイズシグナル減少のためにサンプル曲線から差し引いた。BiaEvaluationバージョン4． 0 1 をセンサーグラムの解析およびアフィニティーデータの計算のために使用した。

【 0 1 8 3 】

実施例 8

h O X 4 0 L の固定化された h O X 4 0 との相互作用を阻害する抗 h O X 4 0 L 抗体の阻害競合アッセイ

機器：Biacore 3000、ランニングバッファーおよび反応バッファー：H B S - P（1 0 mM H E P E S、1 5 0 mM N a C l、0． 0 0 5 % T w e e n 2 0、p h 7． 4）、2 5 °C。注射の前に、アナライト（1 0 mM）および競合剤（0． 7 8 nM～1 0 0 nMの8つの濃度）を2 2 °Cで少なくとも2 0 分間プレインキュベーションした。アナライト+／－競合剤の注射を3分間行いそしてH B S - Pで3分間洗浄した。表面の再生は、1 0 mMグリシン p H 2． 0の各1分の2回の注射により行った。チップ、アッセイフォーマットおよ

び注射のシーケンスおよび速度論的データは、下表 3 における説明に対応する。

【0184】

【表 3】

表3

チップ	リガンド	アナライト	競合剤	IC50 (M)
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	TAG34	7×10^{-9}
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	LC.001	4×10^{-9}
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	LC.005	3×10^{-9}

10

【0185】

すべての抗体は、溶液中のOX40へのOX40Lの結合を阻害する（溶液アフィニティー）。LC. 001およびLC. 005は、TAG34よりも低いIC50値を示す。

【0186】

20

実施例 9

抗OX40L抗体TAG34、LC. 001、LC. 005、LC. 010、LC. 019、LC. 029、LC. 033、LC. 060のエピトープ特徴付け

機器：Biacore 3000、ランニングバッファーおよび反応バッファー：HBS-P（10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.005% Tween 20、pH 7.4）、25℃。エピトープグループを、列挙された抗体間の交差競合（cross competition）により決定した。注射の前に、アナライト（50 mM）および競合剤（100 nM）を22℃で少なくとも20分間プレインキュベーションした。アナライト+／-競合剤の注射を2分間行いそしてHBS-Pで3分間洗浄した。表面の再生は、10 mMグリシン pH 2.0の各1分の2回の注射により行った。チップ、アッセイフォーマットおよび注射のシーケンスおよび速度論的データは、下表 4 における説明に対応する。

30

【0187】

【表 4】

表 4

チップ	捕捉	リガンド	アナライト	競合剤	エピトープ
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	TAG34	A
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.001	A
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.005	B
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.010	B
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.019	A/B
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.029	B
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.033	A
CM5	Anti-hFcγ	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.060	A

【0188】

TAG34により認識されたOX40Lエピトープは、エピトープAとして定義された。しかしながら、TAG34は、100ngの抗体濃度において変性されたOX40Lに結合しない（ウエスタンブロットにおいて）。1つのエピトープグループ（AまたはB）内の抗体は、交差阻害活性（cross inhibitory activity）を示すが、異なるグループからの抗体は、相加結合シグナル（additive binding signal）を示す。LC.019は、グループAからおよびグループBからの他の抗体を中和する。

【0189】

実施例10

TAG34、LC.001およびLC.005のCD40LおよびTNFαへの結合特性

機器：Biacore 3000、ランニングバッファーおよび反応バッファー：HBS-P（10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.005% Tween 20、pH 7.4）、25℃。アナライトの注射は、100 nMおよび500 nMで3分間行いそしてHBS-Pで2分間洗浄した。表面の再生は、100 mM HClの各々1分間の2回の注射により行った。チップ、アッセイフォーマットおよび注射のシーケンスおよび速度論的データは、下表5

【0190】

【表 5】

表5

チップ	捕捉	リガンド	アナライト
CM5	Anti-mFcγ Anti-hFcγ	TAG34 LC.001 LC.005 Anti-TNFα Anti-CD40L	TNFα CD40L OX40L

10

【0191】

このアッセイにおいて、CD40Lは、すべての抗体に対するまたはチップ表面に対するいくつかの非特異的結合を示したが、バックグラウンドシグナルを差し引いた後にこのアッセイは、固定化された抗体TAG34、LC.001およびLC.005に対するTNFαおよびCD40L（500nMまで）の非特異的結合がないことを示した。

【0192】

実施例 11

抗体LC.001-IgG1およびLC.001-IgG4xのアフィニティー分析
機器：Biacore 3000、ランニングバッファーおよび反応バッファー：HBS-P（10mM HEPES、150mM NaCl、0.005% Tween 20、pH 7.4）、25℃。アナライトの注射は、0.78nM～100nMの8つの濃度で3分間行いそしてHBS-Pで5分間洗浄した。表面の再生は、100mM HClの各々1分間の2回の注射により行った。チップ、アッセイフォーマットおよび注射のシーケンスおよび速度論的データは、下表における説明に対応する。速度論的データは、1:1ラングミュア結合モデルに速度論的データを適合させることにより計算された。

20

【0193】

【表 6】

30

表6

チップ	捕捉	リガンド	アナライト	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
CM5	Anti-mFcγ	LC.001	hOX40L-His	4.27x10 ⁴	3.46x10 ⁻⁸	<2,3x10 ⁻¹¹
CM5	Anti-mFcγ	LC.001-IgG4x	hOX40L-His	4.85x10 ⁴	7.72x10 ⁻⁸	<2,06x10 ⁻¹¹

【0194】

LC.001およびLC.001-IgG4xは、hOX40L-Hisに対する同じアフィニティーを示す。

40

【0195】

実施例 12

OX40Lに結合する抗体の検出のためのELISAアッセイ

SAコーティングしたプレート（96平底ELISAプレート、Microcoat）をインキュベーションバッファー（IB=0.1% Tween 20（Serva）および1%遮断タンパク質を含有するPBS）中に溶解された0.5μg/mlビオチニル化OX40Lで室温で1時間コーティングした。次いでプレートを洗浄バッファー（WB=0.1% Tween 20を含有する生理食塩水）を使用して2回洗浄した。

50

【0196】

サンプル（細胞培養上清または精製した抗体）をI B中に段階希釈しそしてウエルに加えた。プレートを室温で1時間インキュベーションした。次いで、プレートをWBを使用して2回洗浄した。次いで、ヒトIgGに対するヤギ抗体とPOD（Dianova）のコンジュゲートをI B中に50ng/mlに希釈しそしてウエルに加えた。プレートを室温で1時間インキュベーションした。最後に、プレートをWBを使用して2回洗浄しそしてすぐ使用できるABTS（登録商標）溶液（Roche）で暗所で室温（RT）で発色させた。最も高い濃度の吸光度が十分なODに達した後に、405nmで吸光度を測定した（図1a）。3nM～8nMの範囲のEC50値が得られた。

【0197】

10

実施例13

ヒトOX40／ヒトOX40Lの相互作用を阻害する抗体の検出のためのELISAアッセイ

SAコーティングしたプレート（96平底ELISAプレート、Microcoat, Germany）をI B中に溶解された0.5μg/mlビオチニル化OX40Lで室温で1時間コーティングした。次いでプレートをWB（PBS緩衝液、0.1%（重量／容量）Tween（商標）20）を使用して2回洗浄した。

【0198】

サンプルをI B中に1μg/mlの濃度に希釈しそして段階希釈物においてウエルに加えた。OX40LへのOX40の最大結合を達成するために、いくつかのウエルにおいてI Bのみを加えた。次いで各ウエルに、0.2μg/mlの濃度の、Digoxigenin(Roche Diagnostics GmbH, DE)とコンジュゲーションされたヒトOX40の溶液を加えた。プレートを室温で1時間インキュベーションした。次いで、プレートをWBを使用して2回洗浄した。ヒッジ<Digoxigenin>-POD（Roche）をI B中に50mU/mlに希釈しそしてウエルに加えた。プレートを室温で1時間インキュベーションした。最後に、プレートをWBを使用して2回洗浄しそしてすぐ使用できるABTS（登録商標）溶液（Roche）により暗所で室温（RT）で発色させた。吸光度を、10～20分後に405nmで測定した（図1b）。1nM～4nMの範囲のIC50を得た。

20

【0199】

実施例14

30

K562細胞（K562__OX40L細胞）上に発現されたヒトOX40LとヒトOX40の相互作用を阻害するHuMab sの検出のためのFACSアッセイ

目的：Dig標識されたhOX40：hFc融合タンパク質のhOX40L発現細胞系K562__hOX40Lとの相互作用をブロックするためのHuMab hOX40Lの性質の決定のためのアッセイ

【0200】

手順：このアッセイは、「アッセイ試薬」としてDig標識されたhOX40：hFcおよび「競合剤」としてHuMab hOX40Lを使用して行われた。

【0201】

アッセイ試薬：ストック0.5μg/μl-PBS中に1：10に希釈された）、100μl抗ジオキシゲニンFLUOS、PBS／0.5%BSA／1%ブロック試薬中に1：25に希釈された（Roche Diagnostics GmbH, DE）。

40

【0202】

2×10⁵K562__OX40L細胞（ISF-0中で成長させた）を、PBS2ml中で洗浄しそしてPBS100μl中に再懸濁させた。この後PBS中の競合剤（0：1／1：1／1.5：1／2：1／2.5：2／5：1競合剤／試薬関係）を添加した。次いで室温で日光において30分間インキュベーションした。次いで試薬（PBS中の）を加えた；インキュベーション時間：30分、室温および日光。細胞をPBS2mlで洗浄しそして遠心によりペレット化した。染色用の二次抗体（抗ジゴキシゲニン-フルオレセイン）、Fabフラグメント（Roche, 1207741）を加えそして暗所で4℃で30分間インキュ

50

ベーションした。細胞をPBS 2mlで洗浄しそして遠心によりペレット化した。その後細胞をPBS 0.5ml中に再懸濁させた。サンプルの測定をFACS-Scanにおいて行った(図2)。

【0203】

実施例15

hOX40/hOX40Lシグナリングについての抗体の阻害能力の決定のための機能的アッセイ(「NFκBアッセイ」)

HeLa野生型(wt)およびヒトOX40を発現するHeLa細胞(HeLa__OX40)を、最小必須培地(MEM)、1×ピルビン酸Na、1×非必須アミノ酸(Gibco)、10%FCSにおいてそしてリコンビナント細胞の場合には+600μg/mlG418において成長させた。K562およびOX40Lを発現するK562をISF-O培地中で成長させそしてリコンビナント細胞の場合には、200μg/mlG418を加えた。

【0204】

HeLa__wtまたはHeLa__OX40細胞を、96ウェルプレートw/oG418中に 3×10^4 細胞/100μlの細胞密度で播種しそしてCO₂インキュベータ中で一夜インキュベーションした。K562__wtまたはH562__OX40L細胞を1:1の細胞対細胞関係において加えた。OX40を発現するホルマリン固定された又はホルマリン固定されていないK562(-70℃で凍結された)を解凍しそしてMEM/10%FCS中で1:1に希釈し;K562__OX40L細胞を、OX40Lに対する抗体と共に室温で30分間プレインキュベーションした。K562__OX40L細胞による刺激時間は30分~150分であった。細胞核からのタンパク質抽出をActive MotifからのNE-Kitにより供給者の指示に従って行った。Active MotifからのTransAM NFκB-ELISA(供給者の指示に従ってアッセイを行った)を使用して、NFκB活性化をもたらす、OX40シグナリングを決定した。Tecan MTP-Readerにおいて波長450/620nmで吸光度の測定を行った(図3)。すべてのLC抗体について0.6~5nMの範囲のIC50値を得た。

【0205】

実施例16

T細胞活性化アッセイ

アッセイ原理

ヒト末梢血単核細胞(PBL)を、最適より低い濃度のT細胞マイトジェンフィトヘマグルチニン(PHA)で活性化し、そしてOX40Lを過発現するK562細胞で共刺激する(co-stimulated)。アッセイ条件下に、活性化されたT細胞を37℃で24時間インキュベーションして、IL-2を産生させる。ELISAアッセイを使用して上清中のサイトカインを測定する。Mabのブロック効果を決定するために、K562__OX40L細胞をPBLとの共培養の前に抗体の適切な希釈物と1時間プレインキュベーションした。

【0206】

手順

Histopaque(登録商標)-1077(Sigma)における密度勾配遠心によりヘパリンを添加された全血から、ヒト末梢血単核細胞(PBL)を分離する。Hanksで洗浄した後に、細胞をTurkの溶液を使用して係数し、そして細胞を、ペニシリン、ストレプトマイシンおよびグルタミン(Gibco 10378-016)および10%FBSを補充されたRPMI 1640(Gibco)中に 10^6 /mlの濃度で再懸濁させる。K562コントロール細胞(野生型)を上記したとおりに補充された同じRPMI培地中に維持する。OX40LによりトランスフェクションされたK562細胞をGeneticin(G418、Gibco)を補充された同じ培地中に50mg/mlの最終濃度に維持する。K562細胞(WTまたはOX40L+)を、 1.5×10^5 細胞/mlに同じ培地で希釈しそして50μl/ウェル(0.75×10^4 /ウェル)において96ウェル組織培養プレートの各ウェルに分配する。Mabの適切な希釈物を20μl/ウェルの容積において細胞に加えそして37℃で1時間インキュベーションする

。各希釈物を二重測定ウェル (duplicate wells) において試験する。PBLを、 $100 \mu\text{l}$ / ウェル (10^5 細胞 / ウェル) の容積で加える。PBL対K562細胞の最終比は $\sim 13:1$ である。PHA ($10\times$) (Sigma L-9132) を $20 \mu\text{l}$ / ウェルで加える (最終濃度 $0.75 \mu\text{g/ml}$)。ウェル当たりの総容積はRPMI / 10% FCSで $200 \mu\text{l}$ にする。プレートを $5\% \text{CO}_2$ - 給湿されたインキュベータ中で 37°C で 24 時間インキュベーションする。プレートの遠心の後、上清を集めそして製造者の指定に従ってELISA (BD, San Diego, CA, Cat No2627K1) によりIL-2を試験する (図4)。IC₅₀ (OX40Lで刺激されたPBLによるIL-2放出の50%を阻止するMab濃度) を計算するために、コントロール培養物 (PBL + PHA + K562WT) において産生されたバックグラウンドIL-2濃度を、K562 x OX40L + 細胞により刺激されたPBLにより産生された総IL-2から差し引いた (図5)。IC₅₀ TAG34: $0.07 \mu\text{M}$; LC: $0.01:2 \text{ nM}$; LC: $0.05:10 \text{ nM}$ 。IC₅₀値は $2 \sim 10 \text{ nM}$ の範囲にある。

10

【0207】

実施例17

破傷風トキソイドにより刺激された末梢血リンパ球に対する抗体の阻害効果を試験する破傷風アッセイ「TT-アッセイ」)

末梢血単核細胞 (PBMC) をFicoll Hypaqueにより、ヘパリンを添加された血液から単離した。大部分の場合に、単離されたばかりのPBMCをこのアッセイのために使用した。ある場合には冷凍保存されたPBMCも使用した。このアッセイのための培地は、 10% ヒト男性AB血清 (Sigma-Aldrich); 2 mM グルタミンおよびPen/Strep (抗生物質ペニシリンおよびストレプトマイシンのすぐ使用できる混合物 (Roche Diagnostics GmbH DE)); 20 ml に再構成された凍結乾燥物; 1000 ml 培地当たり 2 ml の使用) を含有するRPMIであった。

20

【0208】

プラスチックに付着させるために、ウェル当たり $300,000$ PBMCを、 96 ウェル平底プレートにおいて一夜プレインキュベーションした。

【0209】

次の日に破傷風トキソイド (TT) (Chiron Behring) を $2 \sim 5 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度でウェルに加えた。ポジティブコントロールウェル (最大増殖 / 刺激) はTTのみを含有しており、すべての他のウェルに、抗体 (精製されたIgG) を $10 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度になるように加えた。マウスMabTAG34は、このアッセイにおいて含まれた (最終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$)。非刺激性バックグラウンドとして、コントロール培地のみを使用した。すべてのアッセイは三重測定するように (in triplicates) セットアップされた。

30

【0210】

6日のさらなるインキュベーション (37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 95% 湿度) の後、 ^3H チミジンを $1 \mu\text{Ci/ml}$ の最終濃度となるように加え、 16 時間の追加のインキュベーション期間の後に、プレートを回収しそして取り込まれた ^3H チミジンを β 計数器において決定した (図6)。

【0211】

実施例18

OX40L抗体のマウスOX40Lとの交差反応性

本発明の抗体のマウスOX40Lと交差反応する能力を決定するために、段階的に希釈した抗体およびコントロール抗体を、mOX40Lを安定に発現するK562-mOX40L細胞と共にインキュベーションした。K562-WT細胞およびhOX40Lを安定に発現するK562-hOX40L細胞への結合も評価した。ネガティブコントロールとして、スカシ貝ヘモシアニン (Keyhole Limpet Hemocyanin) (α -KLH) に対して指向されたHuMab抗体を使用した。抗体RM134L、ラット抗mOX40L (eBioscience, San Diego, CA) が、mOX40L発現のためのポジティブコントロールとして含まれた。抗体TAG-34、マウス抗hOX40L (MBL, Nagoya, Japan) がhOX40

40

L発現のためのポジティブコントロールとして含まれた。結合したヒト抗体の検出のために、フルオレセイン（F I T C）コンジュゲーションされたヤギ抗ヒト I g G抗体を使用した。結合したR M I 3 4 Lの検出のために、ビオチニル化ウサギ抗ラット I g G抗体（DAKO、Glostrup, Denmark）を、フィコエリトリン（P E）（D A K O）とコンジュゲーションされたストレプトアビジンと組み合わせて使用した。結合したT A G-3 4の検出のために、F I T Cコンジュゲーションされたウサギ抗マウス I g G抗体を使用した。E C 5 0値または試験したH u M a bの2 0 μg/mlでの最大結合（B m a x）に関する計算を、Graphpad Prismソフトウェアを使用する非線形回帰（可変スロープを有するS字状用量-応答）を使用して決定した。

【0212】

結果：

本発明に従うL C. 0 0 1は、5. 1 6 ± 2. 9 3 μg/mlのE C 5 0値および3 8 5. 2 2のB m a x（M F I）値により示されたとおりh O X 4 0 Lに結合することができたが、それぞれ1 1. 4 1および9. 6 7のB m a x（M F I）値により示されたとおりm O X 4 0 LまたはW T細胞に結合することができなかった。さらに、本発明に従うL C. 0 0 1（I g G 4）は、8. 1 9 ± 1. 0 5 μg/mlのE C 5 0値および3 1 1. 3 0のB m a x（M F I）値により示されたとおりh O X 4 0 Lにも有効に結合することができたが、それぞれ1 3. 4 7および9. 5 8のB m a x（M F I）により示されたとおりm O X 4 0 LまたはW T細胞に結合することができなかった。予想されたとおり、ネガティブコントロールα-K L Hはいかなる細胞にも結合しなかった（図7）。したがって、本発明に従うO X 4 0 L抗体は、ヒトO X 4 0 Lと比較してマウスO X 4 0 Lへの少なくとも3 0倍低い結合を示す。

【0213】

実施例 1 9

O X 4 0 L H u M a bの補体系を活性化する潜在力

C 1 qおよびC 3 c結合E L I S A

本発明の抗体のC 1 q結合およびC 3活性化を誘導する能力を決定するために、E L I S Aプレートを段階的に希釈した抗体およびコントロール抗体でコーティングした。ネガティブコントロールとして、C 1 qに非常に弱く結合するヒト I g G 4（The Binding Site, Birmingham, England）を使用した。ヒト I g G 1（The Binding Site）およびα-K L H（I g G 1）は、ポジティブコントロールとして含まれた。次いで、コーティングされた抗体を、リコンビナントC 1 qおよびC 3のソースとしてヒトのプールされた血清と共にインキュベーションした。結合したC 1 qの検出のために、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（H R P）とコンジュゲーションされたブタ抗ウサギ I g G抗体（D A K O）と組み合わせたC 1 qに対して指向されたウサギ抗体（D A K O）を使用した。活性化されたC 3 c（C 3の活性化により発生した）の検出のために、H R Pとコンジュゲーションしたウサギ抗マウス I g G抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA）と組み合わせてマウス抗ヒトC 3 c抗体（D A K O）を使用した。コーティング有効性の差を評価するために、コーティングされた抗体を、H R Pとコンジュゲーションされたヤギ抗ヒト I g G抗体で可視化した。E C 5 0値または試験されたH u M a b 1 0 μg/mlにおける最大結合（B m a x）に関する計算を、Graphpad Prismソフトウェアを使用する非線形回帰（可変スロープを有するS字状用量-応答）を使用して決定した。

【0214】

結果：

本発明に従うL C. 0 0 1は、2. 1 9 ± 0. 4 2 μg/mlのE C 5 0値および3. 0 8 9のB m a x（O D 4 0 5）値により示されたとおり、C 1 qに有効に結合することができた。さらに、両ポジティブコントロールヒト I g G 1および抗K L Hは、それぞれ4. 1 7 ± 1. 0 8 μg/mlおよび2. 5 7 ± 1. 5 1 μg/mlのE C 5 0値、ならびにそれぞれ2. 6 8 5および3. 3 0 6のB m a x（O D 4 0 5）値により示されたとおり、C 1 qに有効に結合することができた。予想されたとおり、ネガティブコントロールヒト I g G

4は、0.353のOD405Bmax値により示されたとおり、C1qに結合しなかった。さらに、本発明に従うLC.001IgG4xは、0.357のOD405Bmax値により示されたとおり、C1qに結合する能力を失っていた。

【0215】

C1q結合能力と一致して、LC.001によるC3c沈着（deposition）が、 $2.67 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$ のEC50値および2.614のBmax（OD405）値で、抗体濃度依存性方式で起こった。さらに、両ポジティブコントロールヒトIgG1および抗KLHは、それぞれ $5.45 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ および $2.16 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$ のEC50値、ならびにそれぞれ2.543および2.633のBmax（OD405）値により示されたとおり、C3cを有効に沈着することができた。予想されるとおり、ネガティブコントロールヒトIgG4は、0.095のOD405Bmax値により示されたとおり、C3cを沈着しなかった。さらに、本発明に従うLC.001IgG4xは、0.090のOD405Bmax値により示されたとおり、C3cを沈着する能力を失っていた（図8および図9）。

【0216】

実施例20

OX40L HuMabsのFcγレセプターI、IIaおよびIIbに結合する潜在力

IgGで誘導される抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）は、エフェクター細胞に対するFcγレセプター（FcγR）により媒介される。本発明の抗体のFcγRsに結合する能力を決定するために、ヒトFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIbで安定にトランスフェクションされたIIA1.6細胞（IIA1細胞から限界希釈により誘導された；Jones, B., et al., J. Immunol. 136(1986) 348-356）および野生型細胞を、段階希釈された抗体およびコントロール抗体と共にインキュベーションした。ネガティブコントロールとして、FcγRIに結合しないヒトIgG2（The Binding Site Ltd）およびFcγRIIに結合しないヒトIgG4（The Binding Site）を使用した。ヒトIgG1（The Binding Site）は、FcγRI結合のためのポジティブコントロールとして含まれ、そしてヒトIgG3（The Binding Site）はFcγRII結合のためのポジティブコントロールとして含まれた。結合した抗体を、フィコエリトリン（PE）とコンジュゲーションされたヒトIgGに対して指向された抗体を使用するFACS分析により検出した。EC50値または試験されたHuMab10μg/mlにおける最大結合（Bmax）に関する計算を、Graphpad Prismソフトウェアを使用する非線形回帰曲線適合（可変スロープ）を使用して決定した。

【0217】

LC.001は、 $0.11 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ のEC50値および8041.54のBmax（MFI）値により示されたとおりFcγRIに有効に（コントロールIgG1抗体に匹敵しうる）結合することができたが、それぞれ25.06および21.18のBmax（MFI）により示されたとおりFcγRIIaおよびFcγRIIbに結合することができなかった。

【0218】

LC.001IgG4xは、 $0.86 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$ のEC50値および6030.07のBmax（MFI）で、LC.001と比較してFcγRIへの結合においてより少なく有効でありそしてコントロールIgG4抗体に匹敵していた。LC.001IgG4xのFcγRIIaおよびFcγRIIbへの結合は観察されなかったが（それぞれ21.40および19.27のBmax（MFI）値）、これに対してコントロールIgG3抗体は、結合することができた（それぞれ536.65および418.59のBmax（MFI）値）（図10）。したがって、FcγRIへの結合のEC50値は、抗体LC.001のEC50値に比較してLC.001IgG4xでは8倍である。

【0219】

実施例21

O X 4 0 L H u M a b s の N K 細胞上の F c γ R I I I a に結合する潜在力

本発明の抗体のナチュラルキラー（NK）細胞上の F c γ R I I I a（C D 1 6）に結合する能力を決定するために、末梢血単核細胞（P B M C s）を単離しそして、F c γ R I I I a に対するブロッキングマウス抗体（抗 C D - 1 6、クローン 3 G 8、R D I、F l a n d e r s, N J）2 0 μ g/ml の存在下または不存在下に H u M a b 抗体およびコントロール抗体 2 0 μ g/ml とインキュベーションして、F c γ R I I I a を介する結合を証明した。ネガティブコントロールとして、F c γ R I I I a に結合しないヒト I g G 2 および I g G 4（The Binding Site）を使用した。ヒト I g G 1 および I g G 3（The Binding Site）は、F c γ R I I I a 結合のためのポジティブコントロールとして含まれた。NK 細胞上の結合した抗体を、P E 標識されたマウス抗ヒト C D 5 6（NK 細胞表面マーカー）抗体（BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA）を、F I T C 標識されたヤギ F（a b）₂ 抗ヒト I g G（F c）抗体（Protos immunoresearch, Burlingame, CA）と組み合わせて使用する F A C S により検出した。試験された H u M a b 2 0 μ g/ml における最大結合（B m a x）を決定した。

【0220】

L C. 0 0 1 は、6 4 1. 3 7 の B m a x（M F I）値により示されたとおり、F c γ R I I I a に有効に（コントロール I g G 1 抗体に匹敵しうる）結合することができた。F c γ R I I I a に対するブロッキング抗体の添加は、NK 細胞への L C. 0 0 1 の結合を無効にした（1 4 5. 3 8 のバックグラウンド染色に比較して 1 9 4. 6 1 の B m a x（M F I）値）。L C. 0 0 1 I g G 4 x は、F c γ R I I I a に結合せずそして 1 7 0. 5 2 の B m a x（M F I）値で、コントロール I g G 4 抗体に匹敵しうる挙動をして、L C. 0 0 1 の B m a x の約 1 0 % にすぎない L C. 0 0 1 I g G 4 x の B m a x をもたらした。F c γ R I I I a に対するブロッキング抗体の添加は、L C. 0 0 1 I g G 4 x 結合に対する効果を示さなかった（1 7 4. 2 6 の B m a x（M F I）値）（図 1 1）。

【0221】

実施例 2 2

H U V E C（初代ヒト臍帯静脈内皮細胞／Promo Cell）への h M a b __ h O X 4 0 L および M a b T A G 3 4 結合の効果

内皮細胞は、h O X 4 0 L を発現することが記載されている（Kotani, A., et al., Immunol. Lett. 84(2002)1-7）。ヒト臍帯静脈内皮細胞（H U V E C）は、当然 h O X 4 0 L を発現し、したがって「内皮細胞モデル」として使用することができる。このアッセイの目的は、抗体 T A G - 3 4 および L C. 0 0 1 への結合後の H U V E C 細胞上の h O X 4 0 L の運命を決定することであった。

【0222】

H U V E C を解凍しそして T 1 7 5 フラスコ（Sarstedt）中で E C G - M 培地 + 2 % F C S 中で 4 日間増大させた。細胞を 2 4 ウエルプレート中にプレートした（1 0. 0 0 0 細胞／ウエル）。

【0223】

3 日後、培地を E C G - M 培地 + 0. 5 % F C S に変えた。1 0 μ g/ml の抗体（< K L H >（スカシ貝ヘモシアニンに対する抗体）、ダウンモデュレーション（down-modulation）の誘導のための T A G - 3 4 または L C. 0 0 1）の添加および 2, 5 時間または 2 4 時間のインキュベーション。T A G - 3 4 または L C. 0 0 1 による H U V E C 細胞の再染色。A l e x a 4 8 8（=< m >）で標識されたマウス I g G に対する二次抗体または A l e x a 4 8 8（=< h >）で標識されたヒト I g G に対する二次抗体、各々 1 0 μ g/ml による F A C S 染色。F A C S 測定は、F A C S - s c a n（Becton Dickinson）において行いそして平均蛍光強度（M F I）を計算した。

【0224】

前記 < K L H > 抗体を非特異的ネガティブコントロールとして使用した。

【0225】

表 7 は、L C . 0 0 1 の添加は、2 . 5 時間後も 2 4 時間後も H U V E C 細胞上の O X 4 0 L のダウンモデュレーションをもたらさない（ライン 4 をライン 5 および 6 と比較する）ことを示す。しかしながら、T A G 3 4 の添加は、2 . 5 時間後、そして 2 4 時間後に H U V E C 細胞上の h O X 4 0 L の強い（約 3 倍）ダウンモデュレーションを示す（ライン 1 0 をライン 1 1 および 1 2 と比較する）。

【 0 2 2 6 】

1 0 μ g/ml の濃度の本発明に従う抗体は、H U V E C 細胞上の O X 4 0 L 発現のダウンレギュレーションを誘導しない。

【 0 2 2 7 】

【表 7】

10

表 7

ダウンモデュレーション のために 使用されたMab	染色のために 使用されたMab	FACSのための 二次Mab	MFI	
			2.5 h	24 h
1. 培地コントロール	-	<h>	5.17	5.39
2. 培地コントロール	LC.001	<h>	28.52	24.99
3. <KLH>	-	<h>	4.76	4.74
4. <KLH>	LC.001	<h>	31.44	23.07
5. LC.001	-	<h>	36.52	30.78
6. LC.001	LC.001	<h>	38.58	38.69
7. 培地—コントロール	-	<m>	3.66	3.18
8. 培地—コントロール	TAG-34	<m>	31.81	25.32
9. <KLH>	-	<m>	3.68	3.43
10. <KLH>	TAG-34	<m>	30.79	31.58
11. TAG-34	-	<m>	9.44	7.39
12. TAG34	TAG-34	<m>	8.97	14.89

20

30

【 0 2 2 8 】

実施例 2 3

T A G 3 4、L C . 0 0 1 および L C . 0 0 5 のウエスタンブロット分析

4 0 および 1 0 0 n g h O x 4 0 L - H i s （R&D Systems, 28~34kDa の理論的サイズ）および分子量マーカー Magik Mark XP （Invitrogen; 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 220 kDa）をゲル電気泳動のために調製した。したがって、x μ l タンパク質、2 . 5 μ l NuPage LDS （ドデシルサルフェートのリチウム塩）サンプルバッファー（4 x）、1 μ l NuPage 還元剤（10 x）および 1 0 μ l とする量の H₂O を一緒にしそ

40

【 0 2 2 9 】

ゲルを半乾燥チャンバ中で 1 時間 / 5 0 m A、1 $\times$ NuPage トランスファーバッファー（1 $\times$ バッファー、0 . 1 % Antioxidance、1 0 % メタノール）を使用して P V D F 膜（Millipore; メタノール中の 5 分間のインキュベーションおよび 1 $\times$ トランスファーバッファー中の 1 0 分のインキュベーションによる膜の活性化）上に半乾燥ブロットによりブロッティングした。膜を、室温で 1 時間振とう下に 1 $\times$ P B S / 5 % ミルク / 0 . 5 % Tween 中でブロッキングした。一次抗体（p A B）を 1 $\times$ P B S / 1 % ミルク / 0 .

50

5 % T w e e n 中に希釈し、加え、4 °C で一夜インキュベーションした。

L C . 0 0 1 : 全容積 4 ml 中の 1 . 9 μ l (1 . 6 μ g)

L C . 0 0 5 : 1 . 1 μ l (1 . 6 μ g) / 4 ml

T A G 3 4 : 1 . 6 μ l (1 . 6 μ g) / 4 ml

【 0 2 3 0 】

膜を 1 × P B S / 0 . 5 % T w e e n 中で 1 0 分間 3 回洗浄した。二次抗体を (s A B) を 1 × P B S / 1 % ミルク / 0 . 5 % T w e e n 中に希釈し、加えそして室温で 1 . 5 時間インキュベーションした。L C . 0 0 1 および L C . 0 0 5 については、1 : 1 0 0 0 0 希釈におけるヒト I g G に対するポリクローナル抗体 (Pierce) を s A B として使用し ; T A G 3 4 では、1 : 4 0 0 希釈における Lumi Light Western Blotting Kit (Roche) からのマウス I g G に対するポリクローナル抗体を s A B として使用した。膜を 1 × P B S / 0 . 5 % T w e e n で 3 0 分間 2 回洗浄した。検出のために、Lumi Light Western Blotting Kit (Roche) を、製造者の指示に従って使用した。ウエスタンブロットからの結果を図 1 2 に示す。L C . 0 0 1 は (ドデシルサルフェート) 変性された O X 4 0 L を検出することができるが、これに対して L C . 0 0 5 および T A G 3 4 は変性された O X 4 0 L に結合しない。

10

【 0 2 3 1 】

【表 8】

参考文献

- Akiba, H., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (1998) 131-136
- Akiba, H., et al., *J. Exp. Med.* 191 (2000) 375-380
- Angal, S., et al., *Mol. Immunol.* 30 (1993) 105-108
- Aplin, J.D., and Wriston, J.C. Jr., *CRC Crit. Rev. Biochem.* 10 (1981) 259-306
- Arestides, R.S., et al., *Eur. J Immunol.* 32 (2002) 2874-2880 10
- Armour, K.L., et al., *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624
- Ausubel, F., et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)
- Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270
- Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123
- Baum, P.R., et al., *EMBO J.* 13 (1994) 3992-4001
- Blazar, B.R., et al., *Blood* 101 (2003) 3741-3748
- Boerner, P., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95 20
- Bruggemann, M., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40
- Brunhouse, R., and Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917
- Burgess, J.K., et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 113 (2004) 683-689
- Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344
- Burton, D.R., *Mol. Immunol.* 22 (1985) 161-206
- Capel, P.J., et al., *Immunomethods* 4 (1994) 25-34
- Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289
- Chen, J., et al., *EMBO J.* 12 (1993) 821-830 30
- Chen, J., et al., *Int. Immunol.* 5 (1993) 647-656
- Choi, T.K., et al., *Nat. Genet.* 4 (1993) 117-123
- Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985)
- de Haas, M., et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341
- Duncan, A.R., and Winter, G., *Nature* 332 (1988) 738-740
- Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9
- Edelman, G.M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969) 78-85
- Edge, A.S., et al., *Anal. Biochem.* 118 (1981) 131-137 40
- EP 0 307 434
- Fishwild, D.M., et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851
- Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282
- Gessner, J.E., et al., *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248
- Harding, F., and Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci.* 764 (1995) 536-546
- Hezareh, M., et al., *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168

- Higgins, L.M., et al., *J. Immunol.* 162 (1999) 486-493
- Hoogenboom, H.R., and Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388
- Hoshino, A., et al., *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 861-869
- Humphreys, I.R., et al., *J. Exp. Med.* 198 (2003) 1237-1242
- Idusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184
- Imura, A., et al., *Blood* 89 (1997) 2951-2958
- Imura, A., et al., *J. Exp. Med.* 183 (1996) 2185-2195
- Ishii, N., et al., *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 2372-2381 10
- Jakobovits, A., et al., *Nature* 362 (1993) 255-258
- Jakobovits, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555
- Jones, B., et al., *J. Immunol.* 136 (1986) 348-356
- Jones, P., et al., *Nature* 321 (1986) 522-525
- Kabat, E.A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)
- Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161
- Kjaergaard, J., et al., *J. Immunol.* 167 (2001) 6669-6677 20
- Kotani, A., et al., *Immunol. Lett.* 84 (2002) 1-7
- Lane, P., *J. Exp. Med.* 191 (2000) 201-206
- Lonberg, N., and Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 25 (1995) 65-93
- Lonberg, N., et al., *Nature* 368 (1994) 856-859
- Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113 (1994) 49-101
- Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560
- Lund, J., et al. *FASEB J.* 9 (1995) 115-119
- Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202 30
- Mallett, S., and Barclay, A.N., *Immunol. Today* 12 (1991) 220-223
- Mallett, S., et al., *EMBO J.* 9 (1990) 1063-1068
- Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597
- Matsumura, Y., et al., *J. Immunol.* 163 (1999) 3007-3011
- Meissner, P., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203
- Miura, S., et al., *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 1313-1325
- Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324
- Morrison, S.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855 40
- Ndhlovu, L.C., et al., *J. Immunol.* 167 (2001) 2991-2999
- Neuberger, M.S., *EMBO J.* 2 (1983) 1373-1378
- Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270
- Nohara, C., et al., *J. Immunol.* 166 (2001) 2108-2115
- Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87

- Ohshima, Y., et al., *J. Immunol.* 159 (1997) 3838-3848
- Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837
- Picard, D., and Schaffner, W., *Nature* 307 (1984) 80-82
- Queen, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033
- Ravetch, J.V., and Bolland, S., *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 275-290
- Ravetch, J.V., and Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492
- Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327
- Rogers, P.R., et al., *Immunity* 15 (2001) 445-455 10
- Salek-Ardakani, S., et al., *J. Exp. Med.* 198 (2003) 315-324
- Schlaeger, E.-J., and Christensen, K., *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83
- Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199
- Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604
- Sojahn, H.T., and Bahl, O.P., *Arch. Biochem. Biophys.* 259 (1987) 52-57
- Stüber, E., and Strober, W., *J. Exp. Med.* 183 (1996) 979-989
- Stüber, E., et al., *Gastroenterology* 115 (1998) 1205-1215
- Sugamura, K., et al., *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 420-431 20
- Takahashi, Y., et al., *J. Virol.* 75 (2001) 6748-6757
- Takasawa, N., et al., *Jpn. J. Cancer Res.* 92 (2001) 377-382
- Tanaka, Y., et al., *Int. J. Cancer* 36 (1985) 549-555
- Taylor, L., and Schwarz, H., *J. Immunol. Meth.* 255 (2001) 67-72
- Taylor, L., et al., *Int. Immunol.* 6 (1994) 579-591
- Taylor, L., et al., *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 6287-6295
- Thommesen, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004
- Thotakura, N.R., and Bahl, O.P., *Meth. Enzymol.* 138 (1987) 350-359 30
- Tozawa, H., et al., *Int. J. Cancer* 41 (1988) 231-238
- Tsukada, N., et al., *Blood* 95 (2000) 2434-2439
- Tuaillon, N., et al., *J. Immunol.* 152 (1994) 2912-2920
- Tuaillon, N., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 3720-3724
- US 4,179,337
- US 4,301,144
- US 4,496,689
- US 4,640,835 40
- US 4,670,417
- US 4,791,192
- US 5,202,238
- US 5,204,244
- US 5,545,806

US 5,545,807

US 5,569,825

US 5,625,126

US 5,633,425

US 5,661,016

US 5,770,429

US 5,789,650

US 5,814,318

10

US 5,874,299

US 5,877,397

van de Winkel, J.G., and Anderson, C.L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524

van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374

Vitetta, E.S., et al., Science 238 (1987) 1098-1104

Ward, E.S., and Ghetie, V., Ther. Immunol. 2 (1995) 77-94

Weinberg, A.D., et al., J. Immunol. 162 (1999) 1818-1826

Weinberg, A.D., et al., Nature Medicine 2 (1996) 183-189

20

Weinberg, A.D., et al., Semin. Immunol. 10 (1998) 471-480

Weinberg, A.D., Trends Immunol. 23 (2002) 102-109

Werner, R.G., et al., Arzneimittelforschung 48 (1998) 870-880

WO 01/14424

WO 87/05330

WO 92/03918

WO 92/22645

WO 93/1227

30

WO 94/11026

WO 94/25585

WO 95/12673

WO 95/21915

WO 98/24884

WO 99/15200

Wu, T., et al., Transplant. Proc. 33 (2001) 217-218

Yoshioka, T., et al., Eur. J. Immunol. 30 (2000) 2815-2823

40

【図面の簡単な説明】

【0232】

【図1a】TAG-34、LC. 001、LC. 005、LC. 010、LC. 019、LC. 029、LC. 033についての「結合ELISA」を示す。

【図1b】TAG-34、LC. 001、LC. 005、LC. 010、LC. 019、LC. 029、LC. 033についての「阻止ELISA」+IC50データを示す。

【図2】TAG-34、LC. 001、LC. 005についての「阻止FACS」を示す。

【図3】TAG-34、LC. 001、LC. 019およびLC. 024についての「NFκB-アッセイ」を示す（非結合抗体）。

50

【図 4】TAG-34、LC.001およびLC.005についての「T細胞活性化アッセイ」およびIC50値（図4：IL-2放出、図5：阻害）を示す。

【図 5】TAG-34、LC.001およびLC.005についての「T細胞活性化アッセイ」およびIC50値（図4：IL-2放出、図5：阻害）を示す。

【図 6】TAG-34、LC.001およびLC.033についての「TTーアッセイ」データを示す。

【図 7】本発明の抗体のマウスOX40Lとのクロス反応性を示す。A) トランスフェクションされた細胞上の及びWT細胞上のhOX40L発現のためのコントロール、B) hOX40L発現K562細胞への抗体の結合、C) トランスフェクションされた細胞およびWT細胞上のmOX40L発現のためのコントロール、D) mOX40L発現K562細胞への抗体の結合、およびE) WT K562細胞への抗体の結合（n=3）。

【図 8】本発明の抗体のC1qに結合する能力を示す（n=3）。

【図 9】本発明の抗体のC3cを活性化する能力を示す（n=3）。

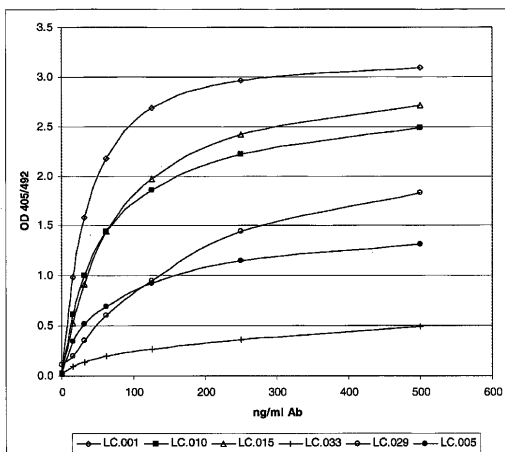
【図 10】本発明の抗体のFcγRI（n=4）、FcγRIIa（n=4）およびFcγRIIB（n=4）に結合する能力を示す。

【図 11】本発明の抗体のNK細胞上のFcγRIIIA（CD16）に結合する能力を示す（6つのドナーの平均±SEM）。

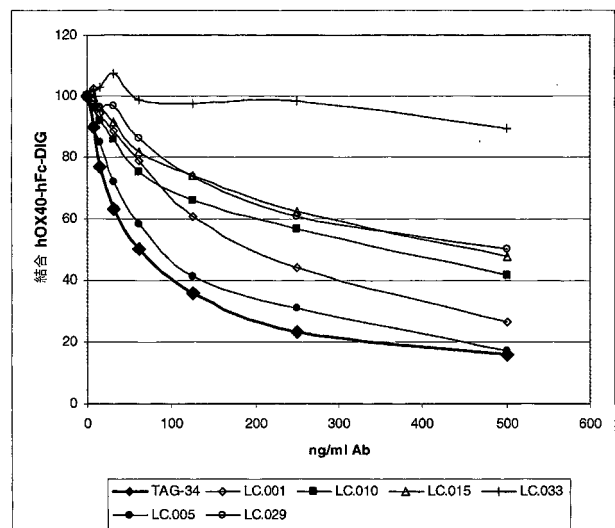
【図 12】ウェスタンブロット；レーン1、4、7：マーカー；レーン2、5、8：100ngOX40L；レーン3、6、9：40ngOX40L。

【図 1 a】

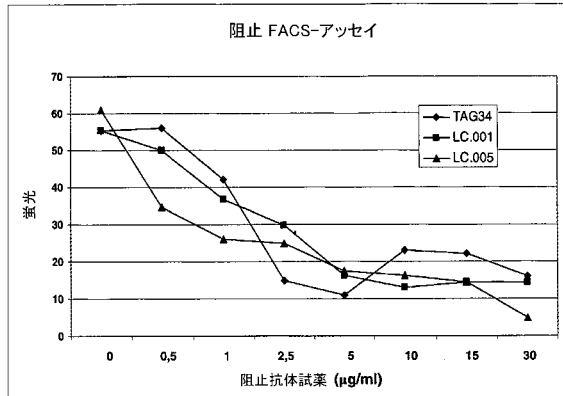
Fig. 1a



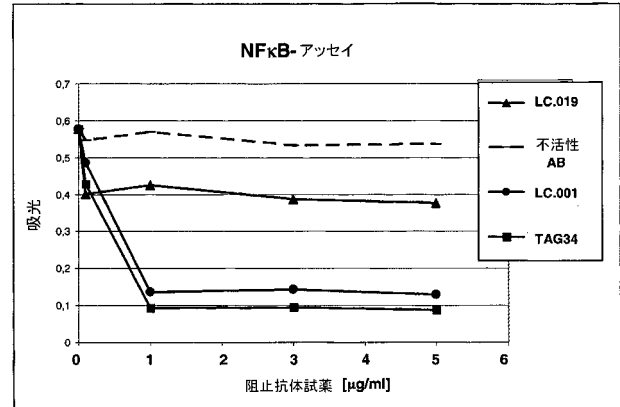
【図 1 b】



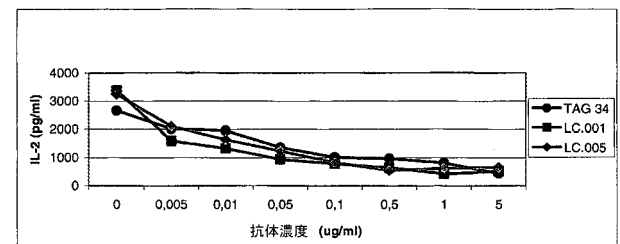
【図 2】



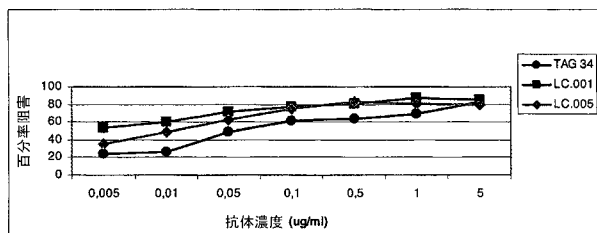
【図 3】



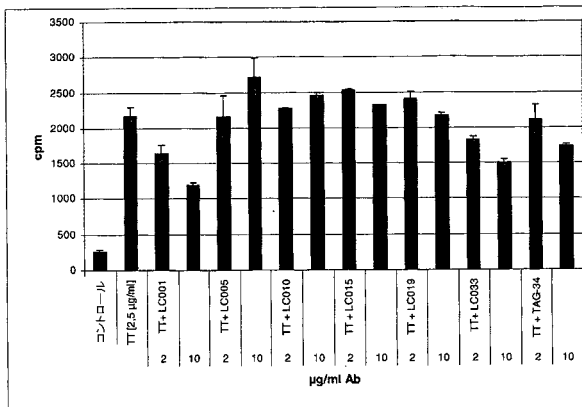
【図 4】



【図 5】

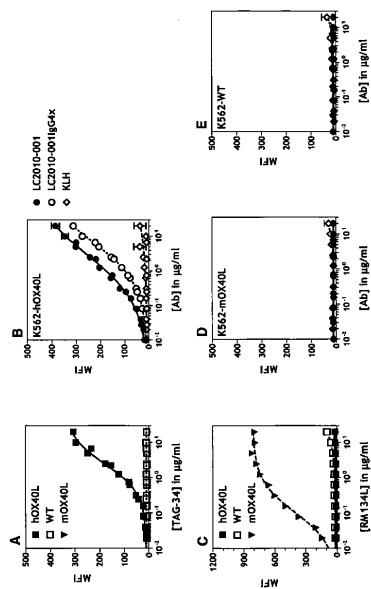


【図 6】



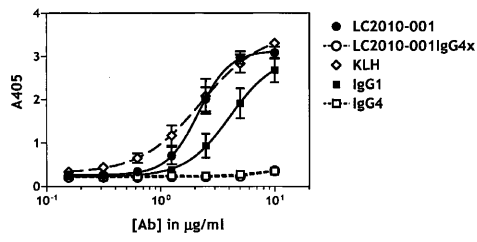
【図 7】

Fig. 7



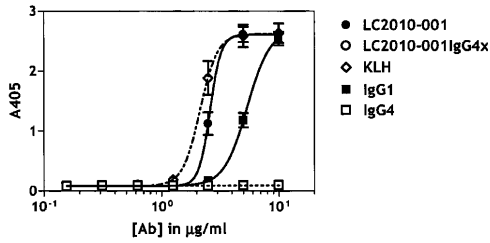
【 図 8 】

Fig. 8



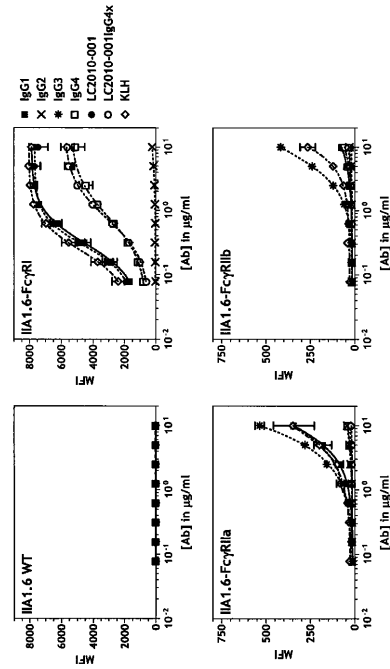
【 図 9 】

Fig. 9

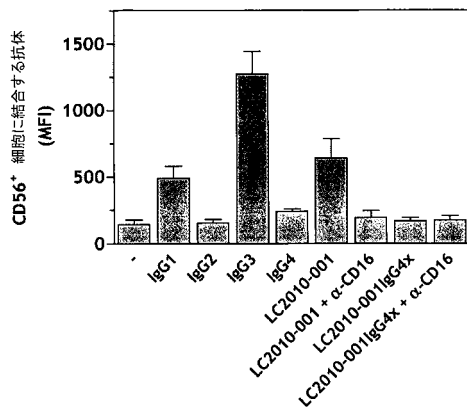


【 図 10 】

Fig. 10

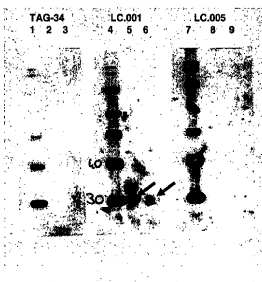


【 図 11 】



【 図 12 】

Fig. 12



【配列表】

2008512995000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/009968

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/46

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 C12N

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, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NOHARA C ET AL: "Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: a critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 FEB 2001, vol. 166, no. 3, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 2108-2115, XP002360582 ISSN: 0022-1767 abstract	1-8, 10-14, 16-21, 25-39, 43-46
X	----- -/-	15-18, 20-23, 32-39

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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.
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 May 2006

Date of mailing of the international search report

21/06/2006

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlean 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Celler, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/009968

C/(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WANG Q ET AL: "Characterization and functional study of five novel monoclonal antibodies against human OX40L highlight reverse signalling: enhancement of IgG production of B cells and promotion of maturation of DCs." TISSUE ANTIGENS. NOV 2004, vol. 64, no. 5, November 2004 (2004-11), pages 566-574, XP002360583 ISSN: 0001-2815 the whole document	1-46
X	WO 95/05468 A (LYNXVALE LIMITED; CLARK, MICHAEL, RONALD) 23 February 1995 (1995-02-23)	1-8, 10-14, 16-21, 25-46
Y	abstract	15, 22-24
Y	page 25, line 9 - line 11 page 25, line 25 - page 26, line 5 page 6, line 3 - line 6 page 7, line 10 - line 13 page 11, line 19 - line 25 page 12, line 10 - line 13 page 15, line 20 - line 23 page 18, line 22 - line 25 page 32 - page 33; claims 1, 10, 11, 13	7, 8, 10-13, 19, 40-42
X	WO 99/58572 A (CAMBRIDGE UNIVERSITY TECHNICAL SERVICES LIMITED; ARMOUR, KATHRYN, LESL) 18 November 1999 (1999-11-18)	1-8, 10-14, 16-21, 25-39, 43-46
Y	abstract page 4, line 1 - line 6 page 5, line 3 - line 4 page 6, line 14 - line 18 page 7, line 15 - line 24 page 9, line 10 - line 13 page 10, line 15 page 10, line 29 - line 31 page 24, line 19 - line 23 page 56; claims 1, 10	7, 8, 10-13, 19, 40-42

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/009968

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HEZAREH M ET AL: "Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1." JOURNAL OF VIROLOGY. DEC 2001, vol. 75, no. 24, December 2001 (2001-12), pages 12161-12168, XP002339184 ISSN: 0022-538X abstract	1-8, 10-14, 16-21, 25-39, 43-46
Y	GRAM H ET AL: "In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. 15 APR 1992, vol. 89, no. 8, 15 April 1992 (1992-04-15), pages 3576-3580, XP002379926 ISSN: 0027-8424 abstract	40
Y	SATAKE Y ET AL: "Characterization of rat OX40 ligand by monoclonal antibody." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. 21 APR 2000, vol. 270, no. 3, 21 April 2000 (2000-04-21), pages 1041-1048, XP002379927 ISSN: 0006-291X abstract	1-15, 22-46
X		15-18, 20-24
Y	TOTSUKA T ET AL: "Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF-alpha MAb in a murine model of chronic colitis." AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY. APR 2003, vol. 284, no. 4, April 2003 (2003-04), pages G595-G603, XP002379928 ISSN: 0193-1857 abstract	1-15,19, 22-46
X		1-15, 22-46
A	WO 01/94586 A (IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION) 13 December 2001 (2001-12-13) Discloses present SEQ ID NO:52 the whole document	1-46
A	WO 01/25492 A (BIOSITE DIAGNOSTICS INC; GENPHARM INTERNATIONAL A SUBSIDIARY OF MEDARE) 12 April 2001 (2001-04-12) Discloses present SEQ ID NO: 53 the whole document	1-46

5

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/009968**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 claim 35 is 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.

International Application No. PCT/EP2005 /009968

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-14,16-21(partly), 25-39(partly),43-46

characterised by the common subject matter of claims 1, i.e. an antibody characterised in that it binds OX40L, contains a Fc part derived from human origin and does not bind complement factor Clq,
characterised by the common subject matter of claim 43, i.e. an antibody that binds OX40L, is of human IgG1 class and contains mutation L234A/L235A and comprises as gamma heavy chain SEQ ID NOS: 59,63 or 67,
characterised by the common subject matter of claim 45, i.e. an antibody that binds OX40L, is of human IgG4 class and contains mutation S228P and comprises as gamma heavy chain SEQ ID NOS: 60,64 or 68,

2. claims: 15,16-21(partly),25-39(partly)

characterised by the common subject matter of claims 15, i.e. an antibody characterised in that said antibody binds OX40L and comprises a variable region combination independently selected from the groups of sequences of variable regions provided in the list under points a-I. which relate to SEQ ID NOS: 1-12,16-20

3. claims: 22,23,25-39(partly)

characterised by the common subject matter of claims 22, i.e. an antibody binding OX40L comprising a variable light chain and variable heavy chain, characterised in that the variable heavy chain comprises CDR3 selected from a list of SEQ ID NOS: 33-38 and/or the variable light chain comprises CDR3 selected from SEQ ID NOS: 51-57

4. claims: 24-35(partly),39(partly)

characterised by the common subject matter of claim 24, i.e. an antibody that is produced by a cell line selected from the group provided in the claim.

5. claim: 40

International Application No. PCT/EP2005 /009968

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

directed to a method of modifying the initial amino acid sequence of an parent antibody heavy chain CDR characterised by SEQ ID NOS: 21-38 and/or an parent antibody light chain CDR characterised by SEQ ID NOS: 39-57, by modifying encoding nucleic acid sequence so as to modify 1 amino acid in heavy chain CDR, 1-2 amino acids in heavy chain CDR2, 1-2 amino acids in heavy chain CDR3, 1-3 amino acids in light chain CDR1, 1-3 amino acids in light chain CDR2 and/or 1-3 amino acids in light chain CDR3, expressing said modified sequences in an antibody structure and measuring whether said antibody binds to OX40L with a given value of KD.

6. claims: 41,42

characterised by the common subject matter of claim 42, i.e. an antibody that binds OX40L, is of human IgG1 class and comprises gamma heavy chain SEQ ID NOS: 58,62 or 66.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2005/009968

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9505468	A	23-02-1995	NONE	
WO 9958572	A	18-11-1999	AU 752185 B2	12-09-2002
			AU 3837399 A	29-11-1999
			BR 9910281 A	02-01-2001
			CA 2326501 A1	18-11-1999
			CN 1308637 A	15-08-2001
			EE 200000643 A	15-04-2002
			EP 1075496 A1	14-02-2001
			HU 0101915 A2	28-09-2001
			JP 2002514406 T	21-05-2002
			NO 20005612 A	29-12-2000
			NZ 507694 A	25-07-2003
			PL 343931 A1	10-09-2001
			RU 2226196 C2	27-03-2004
			TR 200003292 T2	21-03-2001
			ZA 200005870 A	25-10-2002
WO 0194586	A	13-12-2001	AU 7522401 A	17-12-2001
			CA 2410188 A1	13-12-2001
			EP 1299542 A2	09-04-2003
			JP 2003535592 T	02-12-2003
WO 0125492	A	12-04-2001	AU 783276 B2	06-10-2005
			AU 7849600 A	10-05-2001
			CA 2385709 A1	12-04-2001
			EP 1222314 A1	17-07-2002
			JP 2003527832 T	24-09-2003
			US 2003091995 A1	15-05-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
	A 6 1 P 37/06	
	G 0 1 N 33/53	D

(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,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 エンドル, ヨーゼフ
ドイツ国、8 2 3 6 2 ヴァイルハイム、ウルメンシュトラッセ 1 2
- (72)発明者 エウギ, エルジー
アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 4 0 0 2、ベルモント、ヘイスティングス・ドライブ 2 5
1 3
- (72)発明者 フェンテス, マリア
アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 4 0 8 7、サニーベイル、ビターン・ドライブ 1 4 9 0
- (72)発明者 グラウス, イヴォ
オランダ国、エンエルー 3 9 8 4 ピーエル・オディク、ヴェルドルペルヴァールト 3
- (72)発明者 ラブレイン, アラン
オランダ国、エンエルー 1 0 7 4 イックスウェー・アムステルダム、ヤン・ファン・デル・ヘイ
デンストラート 2 エー 6 6-3 エル
- (72)発明者 ランツェンドアフェル, マルティン
ドイツ国、8 2 3 2 7 トッツィング、ホフマイアーシュトラッセ 2 5 アー
- (72)発明者 パーレン, パウル
オランダ国、エンエルー 3 9 8 4 ピーエル・オディク、ヴェルドルパーヴァールト 1 7
- (72)発明者 レベルス, フランク
オランダ国、エンエルー 3 5 5 4 セーテ・ユトレヒト、アドリアーン・メニンククアルティール 3 4
- (72)発明者 シューマッハー, ラルフ
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、ホーホフェルトシュトラッセ 7 8
- (72)発明者 ゼーバー, シュテファン
ドイツ国、8 2 3 7 7 ペンツベルク、プロイネッツリーダー・ヴェーク 2 2
- (72)発明者 ファン・デ・ヴィンケル, ヤン
オランダ国、エンエルー 3 7 0 7 セーカー・ザイスト、ヴェルレンジ・スロトラーン 8 0
- (72)発明者 ファン・フースト, マルティーン
オランダ国、エンエルー 3 9 9 4 カーエル・ホーテン、フルウィールモス 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 BA61 CA01 DA02 EA04 GA01 GA11

4B064	AG26	CA10	CA19	CA20	CC24	DA01	DA13			
4B065	AA01X	AA57X	AA87X	AA90X	AA90Y	AB01	AB02	BA02	BA08	BA16
	CA24	CA25	CA44	CA46						
4C085	AA13	AA14	BB36	BB41	BB42	BB43	CC03	DD62	EE01	
4H045	AA10	AA20	AA30	BA09	CA40	DA75	DA76	EA20	FA74	