

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3616091号
(P3616091)

(45) 発行日 平成17年2月2日(2005.2.2)

(24) 登録日 平成16年11月12日(2004.11.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/519	A 6 1 K 31/519	
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 29/00	I O I
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 K 37/02	

請求項の数 10 (全 14 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平6-509733</p> <p>(86) (22) 出願日 平成5年10月6日(1993.10.6)</p> <p>(65) 公表番号 特表平8-505365</p> <p>(43) 公表日 平成8年6月11日(1996.6.11)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/GB1993/002070</p> <p>(87) 国際公開番号 W01994/008619</p> <p>(87) 国際公開日 平成6年4月28日(1994.4.28)</p> <p>審査請求日 平成12年10月4日(2000.10.4)</p> <p>(31) 優先権主張番号 07/958, 248</p> <p>(32) 優先日 平成4年10月8日(1992.10.8)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(73) 特許権者 ザ ケネディー インスティテュート オブ リューマトロジー 英国, ロンドン ダブリュー6 7ディー ダブリュー, ハマースミス, ビュート ガーデنز 6</p> <p>(74) 代理人 弁理士 細田 芳徳</p> <p>(72) 発明者 フェルドマン, マーク 英国, ロンドン エヌ6 4キューティー 、ハムステッド, チャーチ ロード 2</p> <p>(72) 発明者 マイニ, ラビンダー ナス 英国, ロンドン エスタブリュー13 9 イーダブリュー, バーンズ, キャステルノ ー 151</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患および炎症性疾患の治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物における自己免疫疾患または炎症性疾患の治療のための、抗CD4抗体と抗腫瘍壊死因子(TNF)抗体を含む組成物。

【請求項2】

抗CD4抗体および抗TNF抗体が、同時あるいは連続投与される請求項1の組成物。

【請求項3】

抗CD4抗体および抗TNF抗体が、皮下、静脈内、あるいは筋肉内投与される請求項1の組成物。

【請求項4】

さらに薬学的に許容されるピーイクルを含む請求項1の組成物。

【請求項5】

さらに抗炎症剤を含む請求項1又は請求項4の組成物。

【請求項6】

哺乳動物における自己免疫疾患または炎症性疾患の治療のための治療薬剤を製造するための抗CD4抗体および抗腫瘍壊死因子(TNF)抗体の使用方法。

【請求項7】

抗CD4抗体および抗TNF抗体が、同時あるいは連続投与される請求項6の方法。

【請求項8】

抗CD4抗体および抗TNF抗体が、皮下、静脈内、あるいは筋肉内投与される請求項6の方法

【請求項 9】

薬学的に許容されるビーイクルをさらに使用する請求項 6 の方法。

【請求項 10】

抗炎症剤をさらに使用する請求項 6 又は請求項 9 の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

自己免疫疾患の原因となっている自己抗原の性質については不明であり、自己免疫応答を引き起こす作用についても知られていない。ウイルスタンパク質が自己抗原と類似性を有しているため自己反応性 T 細胞や B 細胞が自己抗原を認識するようになるという説が広く支持されている。B リンパ球が抗体を産生するのに対し、胸腺由来細胞、すなわち「T 細胞」は細胞性免疫機能と関連がある。T 細胞は、細胞表面提示される抗原を認識し、これらの「抗原提示」細胞とともにその機能を発現する。

ヒト T 細胞群を判定するために様々なマーカーが使われている。たとえば CD4 は、免疫グロブリンと配列が部分的に同一の非多形性表面糖タンパク質受容体である。CD4 受容体は、明確な成熟末梢 T 細胞サブセットを定義づける。一般に、ヘルパー機能や調節機能を発現する CD4 T 細胞は免疫応答において B 細胞と相互作用を示すが、CD8 表面抗原発現 T 細胞は細胞傷害性 T 細胞として機能し、免疫応答を調節する作用を示す。T 細胞受容体は、T 細胞応答を強化または調節する刺激の経路となっているので、免疫介入の標的となりうる

細胞相互作用のうち、CD4 + T 細胞と抗原提示細胞 (APC) の相互作用は免疫応答の根源に位置するものである。自己免疫応答は多くの点で正常免疫応答と本質的に同様である。したがって、CD4 + 自己免疫反応性 T 細胞は、結合グループに自己抗原と結合したクラス II を発現する APC によって再刺激される。ある種のヒトの疾患においてこの現象が起きることを示す証拠が示されている。たとえば、甲状腺のグレーブズ病では、難治の場合に摘出される甲状腺にイン・ビボ活性化 T 細胞が存在し、これらの細胞の多くがクローニング後に、外部からいかなる抗原も付与されていない自己甲状腺細胞 (APC として)、あるいは甲状腺特異抗原である甲状腺ペルオキシダーゼやサイログロブリンが付与されている APC を認識することを示すことができる [ロンデイら (Londei, M. et al.)、Science 228:85 - 89 (1985) ; デイアンら (Dayan, C. M. et al.)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7415 - 7419 (1991)]。同様に、リウマチ様関節炎 (RA) では、3 年の経過期間中の連続 3 回の手術において RA 患者の間接からコラーゲン II 型を認識するイン・ビボ活性化 T 細胞が単離されている [ロンデイら (Londei, M. et al.)、Proc. Natl. Acad. Sci. 86:636 - 640 (1989)]。自己免疫特性を示すその他のヒトの疾患においては、重症筋無力症におけるアセチルコリン受容体 [ホホルフェルドら (Hohlfeld, R. et al.)、Nature 310:224 - 246 (1984)]、多発性硬化症におけるミエリン基礎タンパク質 [ハフラーら (Hafler, D. A. et al.)、J. Immunol. 139:68 - 72 (1987)]、またはインスリン依存性糖尿病における膵島細胞膜 [デ・ベラルディニスら (De Berardinis, P. et al.)、Lancet II:823 - 824 (1988) ; コンティアイネンら (Kontinen, S. et al.)、Autoimmunity 8:193 - 197 (1991)] を認識する CD4 + 細胞などの血液由来 CD4 + T 細胞がクローン化されている。

CD4 特異性抗体による処理は様々な実験誘導自己免疫疾患および自然発生自己免疫疾患の両者の予防に有効である。たとえば、抗 CD4 または抗 MHC クラス II 抗体による処理は、ネズミのコラーゲン誘導関節炎ならびにネズミの連鎖球菌細胞壁誘導関節炎を有効に予防することがわかった [ランゲスら (Ranges, G. E. et al.)、J. Exp. Med. 162:1105 - 1110 (1985) ; ホムら (Hom, J. T. et al.)、Eur. J. Immunol. 18:881 - 888 (1988) ; ウーリーら (Woolley, P. H. et al.)、J. Immunol. 134:2366 - 2374 (1985) ; クーパーら (Cooper, S. M. et al.)、J. Immunol. 141:1958 - 1962 (1988) ; パン・デン・ブロエクら (Van den Broek, M. F. et al.)、Eur. J. Immunol. 22:57 - 61 (1992)]。抗 CD4 処理は、NZB/NZW F1 (B/W) マウスおよび BXSB マウスの全身性紅斑性狼瘡も予防した [ウォフシーら (Wofsy, D. et al.)、J. Immunol. 134:852 - 857 (1985) ; ウォフシーら (Wofsy, D. et al.)、J. Immunol. 136:

4554 - 4560 (1986) ; エルマークら (Ermak, T.J. et al.)、Laboratory Investigation 61:447 - 456 (1989)]。ところが、抗T細胞/APC処理は確定した疾患(すなわち発症後)の重症度を下げる効果が低いか全く無効である。たとえば、抗CD4処理と抗MHCクラスII処理はいずれも、マウスの確定したコラーゲン誘導関節炎の重症度を下げる効果がなかった [ホムら (Hom, J.T. et al.)、Eur. J. Immunol. 18:881 - 888 (1988) ; クーパーら (Coope r, S.M. et al.)、J. Immunol. 141:1958 - 1962 (1988)]。ヒトにおける実際の治療で求められるのは発症後の治療と予防である。したがって、CD4T細胞/APC相互作用をブロックすること自体は最適な治療法ではないかもしれず、他の手段によってその効果を増強することができる可能性が示唆されている。

CD4以外の因子も細胞性免疫応答に影響を及ぼす。サイトカインの1種である腫瘍壊死因子 - (TNF、カケクチンともいう)は、炎症、組織傷害、免疫応答、および病変部への細胞侵入に多様な影響を及ぼすので、リウマチ様関節炎をはじめとする炎症性関節疾患の発生に何らかの役割を果たしている [ブレナンら (Brennan, F.M. et al.)、Lancet 11, 244 - 247 (1989) ; フェルドマンら (Feldmann, M. et al.)、Ann. Rheumatic Dis. 51:480 - 486 (1990)]。TNFは、エンドトキシンやその他の刺激に反応して主に単核球とマクロファージによって17kDのタンパク質サブユニットの可溶性ホモトリマーとして分泌されるタンパク質である [スミスら (Smith, R.A. et al.)、J. Biol. Chem. 262:6951 - 6954 (1987)]。膜に結合した26kDのTNF前駆体も記載されている [クリーグラーら (Kriegler, M. et al.)、Cell 53:45 - 53 (1988)]。TNFをコードする遺伝子の発現は単核球/マクロファージファミリーの細胞に限定されない。TNFはCD4+ およびCD8+ の末梢血Tリンパ球や様々な培養T細胞系およびB細胞系によっても産生される [クチュリら (Cuturi, M.C. et al.)、J. Exp. Med. 165:1581 (1987) ; スングら (Sung, S. - S.J. et al.)、J. Exp. Med. 168:1539 (1988) ; ターナーら (Turner, M. et al.)、Eur. J. Immunol. 17:1807 - 1814 (1987)]。最近の証拠から、自己免疫病理および移植片対宿主病理におけるTNFの関与が示唆されている [ピグエットら (Piguet, P. - F. et al.)、J. Exp. Med. 166:1280 (1987)]。TNFと反応し、TNFとも反応すると考えられるハムスター抗TNFモノクローナル抗体TN3.19.2は、処理を関節炎発症前に開始するか後に開始するかに関わらず、DBA/1マウスの関節破壊の程度を顕著に低下させるとともに、コラーゲンII型誘導関節炎に伴う炎症を軽減しうることが証明されている [ウィリアムスら (Williams, R.O. et al.)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9784 - 9788 (1992)]。ところが、抗TNF療法は関節炎を完全には除去しなかったことから、TNF以外の因子の病理への関与が示唆される。

WO 89/08460は、ショック関連状態を予防または治療する、抗TNF抗体と抗リンパ球抗体の混合物を記載している。

これらをはじめとする進歩にも関わらず、依然として自己免疫疾患および炎症性疾患のより良い治療が大いに求められている。

発明の概要

本発明は、自己免疫疾患や炎症性疾患、とくにリウマチ様関節炎の治療において、抗CD4抗体と抗TNF抗体を組み合わせる併用療法が、各薬剤を単独で使用する場合よりはるかに優れた結果が得られるという発見に関する。抗CD4抗体は、抗TNF抗体と同時または連続的に対象に投与される。抗体は薬学的に許容されるピークルとともに投与することができ、投与は単回投与でもよいし、数日ないし数週の間隔をおいて連続的に投与してもよい。

併用療法は、CD4+細胞の活性化や抗原提示細胞との相互作用に影響を及ぼす抗CD4抗体以外の薬剤を、抗TNF抗体以外の炎症メディエーターとともに組み合わせることもできる。

抗CD4抗体と抗TNF抗体の併用療法の利点としては、各治療薬を別々に使用する治療の効果より優れた結果が得られることなどが挙げられる。また、同程度の免疫応答および炎症応答の低下をもたらすのに用量が少なく済むので、治療ウィンドウ(therapeutic window)が広がる。用量が少なく済むということは、患者の出費を減らし、副作用の発現も減る可能性がある。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

図1は、それぞれ図1Aおよび図1Bとした1組のグラフであり、50 μ gの抗TNF（ハムスターTN3.19.2）および200 μ gの抗CD4をDBA/1雄性マウスに投与後の臨床スコア（図1A）および足蹠腫大測定値（図1B）によって関節炎抑制を評価した実験結果を示す。白抜き四角 = 対照、ダイヤモンド = 抗CD4、三角 = 抗TNF（50 μ g）、黒塗り四角 = 抗CD4/抗TNF（50 μ g）。

図2は、それぞれ図2A、図2B、図2C、および図2Dとした一連のグラフであり、臨床スコアおよび足蹠腫大測定値に対する低用量（50 μ g）抗TNFまたは高用量（300 μ g）抗TNFによる抗CD4の作用の強化を評価した第2の実験結果を示す。図2Aは低用量抗TNFの場合の臨床スコアであり、図2Bは高用量抗TNFの場合の臨床スコア、図2Cは低用量抗TNFの場合の足蹠腫大測定値、図2Dは高用量抗TNFの場合の足蹠腫大測定値である。白抜き四角 = 対照、ダイヤモンド = 抗CD4、三角 = 抗TNF（50 μ g）、黒塗り四角 = 抗CD4/抗TNF（50 μ g）。

発明の詳細な説明

本発明は、抗CD4抗体を抗TNF抗体と併用投与することによるリウマチ様関節炎などの自己免疫疾患または炎症性疾患の治療に関する。抗体という用語は、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両者を包含するものとする。抗体という用語は、CD4またはTNFと反応する2つ以上の抗体の混合物（たとえば異なるタイプのCD4またはTNF反応性モノクローナル抗体の混合物）を包含するものである。さらに、抗体という用語は、抗体全体、それらの生物学的機能を持つ断片、および2つ以上の種、二重機能性抗体などの一部分を含んでなるキメラ抗体を包含する。使用可能な生物学的機能を持つ抗体断片とは、CD4またはTNFへの抗体断片の結合に十分な断片である。

キメラ抗体は、2つの異なる種（たとえばヒトの定常領域とネズミの変異または結合領域）に由来する部分からなるものであってよい。2つの異なる種に由来する部分は、従来の方法によって化学的に結合させてもよいし、遺伝子操作技術を用いて単一の連続タンパク質として調製してもよい。キメラ抗体の軽鎖と重鎖の両部分のタンパク質をコードするDNAを連続タンパク質として発現させることができる。

体細胞ハイブリダイゼーション技術[ケーラーとミルスタイン(Kohler and Milstein)、*Nature* 256:495 - 497 (1975)]やその他の技術により、CD4またはTNFと反応するモノクローナル抗体を製造することができる。代表的なハイブリダイゼーション法では、少なくともCD4またはTNFの一部分からなる粗製または精製タンパク質またはペプチドを免疫原として使うことができる。動物に免疫原を接種して、抗CD4抗体または抗TNF抗体産生脾臓細胞を得る。免疫される動物の種類は、目的のモノクローナル抗体の種類によって異なる。抗体産生細胞を不滅化細胞（たとえば黒色腫細胞）と融合させて、抗CD4抗体または抗TNF抗体を分泌する能力を有するハイブリドーマを作成する。融合しなかった残りの抗体産生細胞と不滅化細胞は除去される。目的の抗体を産生するハイブリドーマを従来の方法を用いて選択し、選んだハイブリドーマをクローン化し、培養する。

動物に少なくともCD4またはTNFの一部分からなる粗製または精製タンパク質またはペプチドを免疫投与することによって、ポリクローナル抗体を製造することができる。動物は、CD4またはTNFと反応する抗体が産生される条件下で飼育される。目標の抗体値に達したら、動物から採血する。ポリクローナル抗体含有血清（抗血清）を他の血液成分から分離する。ポリクローナル抗体含有血清をさらに分離して、特定タイプの抗体（たとえばIgG、IgM）の画分に分けることができる。

抗CD4抗体およびそれらの疾患治療用途に関するさらに詳細な説明が下記文献に記載されており、それらの記載内容は引例として本発明に含まれるものとする。[米国特許出願第07/867,100号、1992年6月25日出願；グレイヘブラ(Grayheb, J. et al.)、*J. of Autoimmunity* 2:627 - 642 (1989)；ランゲスラ(Ranges, G. E. et al.)、*J. Exp. Med.* 162:1105 - 1110 (1985)；ホムラ(Hom, J. T. et al.)、*Eur. J. Immunol.* 18:881 - 888 (1988)；ウーリーラ(Wooley, P. H. et al.)、*J. Immunol.* 134:2366 - 2374 (1985)；クーパーラ(Cooper, S. M. et al.)、*J. Immunol.* 141:1958 - 1962 (1988)；パン・デン・ブロエクラ(Van den Broek, M. F. et al.)、*Eur. J. Immunol.* 22:57 - 61 (1992)；ウォフシーラ(Wofsy, D. et al

10

20

30

40

50

.)、J.Immunol.134:852 - 857 (1985) ; ウォフシーら (Wofsy,D.et al.)、J.Immunol.136:4554 - 4560 (1986) ; エルマークら (Ermak,T.J.et al.)、Laboratory Investigation 61:447 - 456 (1989) ; レイテルら (Reiter,C.et al.)、34:525 - 532 (1991) ; ヘルゾーグら (Herzog,C.et al.)、J.Autoimmun.2:627 (1989) ; オウヤンら (Ouyang,Q.et al.)、Dig.Dis.Sci.33:1528 - 1536 (1988) ; ヘルトゾーグら (Hertzog,C.et al.)、Lancet,p.1461 (December 19,1987) ; エムリッヒら (Emrich,J.et al.)、Lancet 338:570 - 571 (August 31,1991)]。

抗TNF抗体およびそれらの疾患治療用途に関するさらに詳細な説明が下記文献に記載されており、それらの記載内容は引例として本発明に含まれるものとする。[米国特許出願第 07/943,852号、1992年9月11日出願 ; ルビンら (Rubin et al.)、EPO特許公開第0218868号、1987年4月22日公開 ; ヨネら (Yone et al.)、EPO特許公開第0288088号、1988年10月26日公開 ; リアングら (Liang,C. - M.et al.)、Biochem.Biophys.Res.Comm.137:847 - 854 (1986) ; ミーガーら (Meager,A.et al.)、Hybridoma 6:305 - 311 (1987) ; フェンドリーら (Fendly et al.)、Hybridoma 6:359 - 369 (1987) ; ブリングマンら (Bringman,T.S.et al.)、Hybridoma 6:489 - 507 (1987) ; ブリングマンら (Bringman,T.S.et al.)、Hybridoma 6:489 - 507 (1987) ; ヒライら (Hirai,M.et al.)、J.Immunol.Meth.96:57 - 62 (1987) ; モラーら (Moller,A.et al.)、Cytokine 2:162 - 169 (1990) ; マテイソンら (Mathison,J.C.et al.)、J.Clin.Invest.81:1925 - 1937 (1988) ; ベウトラーら (Beutler,B.et al.)、Sciences 229:869 - 871 (1985) ; トレーシーら (Tracey,K.J.et al.)、Nature 330:662 - 664 (1987) ; シマモトら (Shimamoto,Y.et al.)、Immunol Lett.17:311 - 318 (1988) ; シルバら (Silva,A.T.et al.)、J.Infect.Dis.162:421 - 427 (1990) ; オパールら (Opal,S.M.et al.)、J.Infect.Dis.161:1148 - 1152 (1990) ; ヒンショーら (Hinshaw,L.B.et al.)、Circ.Shock 30:279 - 292 (1990)]。

抗体は、従来の無毒の薬学的に許容される担体、アジュバント、およびビーイクルを含む処方として、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、局所投与、経口投与、直腸内投与、経鼻的投与、経類的投与、経腔的投与、吸入噴霧投与、または留置片 (implanted reservoir) 投与することができる。抗体が投与される剤形 (たとえばカプセル、錠剤、溶液、乳剤) は、少なくとも部分的には投与経路によって決まる。

抗CD4抗体と抗TNF抗体を組み合わせたものの治療有効量とは、ある自己免疫疾患または炎症性疾患に伴う症状を有意に抑制または除去するのに要する量をいう。好ましい治療有効量とは、各抗体について投与1回あたり0.1~10mg/kgである。治療有効量は個体ベースで決定され、少なくとも一部はその個体のサイズ、治療しようとする症状の程度、目標とする効果などを考慮して決められる。したがって、治療有効量は、通常の技術を有する者であれば上記因子を用いて常法による実験を行なうことによって決定することができる。

治療有効量は、単回投与または数日ないし数週の間隔を置いて連続投与することができる。治療有効量を投与したら、維持量の抗CD4抗体または抗TNF抗体または抗CD4抗体と抗TNF抗体の組み合わせを投与することができる。維持量とは、治療有効量によって達成された症状の抑制または除去を維持するのに要する抗CD4抗体、抗TNF抗体、または抗CD4抗体と抗TNF抗体の組み合わせの量をいう。この維持量は、単回投与または数日ないし数週の間隔を置いて連続投与することができる。治療有効量と同様に、維持量も個体ベースで決定される。

抗リウマチ薬のメトトレキサートやシクロスポリンAなどその他の抗炎症薬を抗CD4抗体または抗TNF抗体と併用投与することができる。

本明細書で検討する実験データは抗CD4抗体と抗TNF抗体の組み合わせに関するが、抗CD4抗体以外の薬剤でCD4+細胞の活性化または抗原提示細胞 (APC) との相互作用に影響を及ぼすものあるいはこれをさらに抗CD4抗体に加えて、抗TNF抗体以外の炎症メディエーターあるいはこれを抗TNF抗体にさらに加えたものと組み合わせ使用併用療法も、自己免疫疾患や炎症性疾患の治療に使うことができる。

CD4+に影響を及ぼす薬剤としては、抗CD4、抗CD28、抗CD52 (たとえばCAMPATH-1H)、抗IL-2RなどT細胞またはそれらの受容体に対する抗体 ; 抗クラスII、抗ICAM-1、抗LF

10

20

30

40

50

A - 3、抗LFA - 1 などAPCまたはそれらの受容体に対する抗体；シクロスポリンやFK - 506 などHLAクラスIIグループをブロックするかT細胞活性化におけるシグナル伝達をブロックするものをはじめとするT細胞/APC相互作用をブロックするペプチドおよび小型分子；およびCD19、20、21、23、およびBB/7またはB1、CD28リガンドなどのCD5+ B細胞などのB細胞に対する抗体が挙げられる。CD5+ B細胞などのB細胞は、疾患進行において重要なタイプのAPCであると考えられている [プラター - ザイベルクラ (Plater - Zyberk, C. et al.)、*Ann. N. Y. Acad. Sci.* 651:540 - 555 (1992)]。したがって、本発明においては抗B細胞抗体がとくに有用である。

炎症メディエーターとしては、TNFを阻害する抗TNF抗体、可溶性TNF - R (モノマー性、IgG融合タンパク質など)、ペントキシフィリンやサリドマイドなどTNF受容体シグナル化またはTNF合成を阻害するブロッキングペプチドおよび小型分子；IL - 1を阻害する抗IL - 1抗体、可溶性IL - 1R、IL - 1受容体拮抗剤、またはIL - 1合成またはIL - 1受容体シグナル化に影響を及ぼすブロッキングペプチドおよび小型分子；IL - 6を阻害する抗IL - 6抗体、抗gp130、またはIL - 6の合成または受容体シグナル化に影響を及ぼすブロッキングペプチドおよび小型分子；GM - CSFおよびヘモカイン (IL - 8) ファミリーのメンバーなどその他の炎症メディエーターに影響を及ぼす薬剤；およびIL - 4、IL - 10、TGF など抗炎症性を有するサイトカインなどが挙げられる。

したがって、本発明の併用療法はヒトおよび動物の多くの自己免疫疾患や炎症性疾患の治療に有用である。ヒトにおいては、本療法が適している疾患としては、リウマチ様関節炎 (RA) および若年性慢性関節炎 (JCA) などが挙げられる。併用療法に適したその他の疾患としては、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、炎症性腹症関連関節炎などの脊椎関節症；結節性多発性動脈炎、ベーゲナー肉芽腫症、巨細胞性動脈炎、ヘーノホ - シェーンライン紫斑病、腎臓の顕微脈管炎などの脈管障害；シェーグレン症候群；全身性狼瘡；クローン病および潰瘍性大腸炎などの炎症性腹症；慢性滑動性肝炎；原発性胆汁性肝硬変；原因不明繊維形成肺胞炎およびその他の繊維形成肺疾患；ブドウ膜炎；多発性硬化症；重症筋無力症；溶血性貧血；強皮症；移植片対宿主疾患 (graft versus host disease)；アレルギー；および腎臓、肝臓、心臓、肺、骨髄、皮膚、その他器官の移植などが挙げられる。

以下、実施例により本発明をさらに詳細かつ具体的に説明する。

実施例：ネズミモデルにおける誘導関節炎の治療

コラーゲンII型誘導関節炎のネズミモデルは、顕著なMHCクラスII素因、ならびに組織学的特徴、免疫組織学的特徴、軟骨および骨の侵食、および抗TNF療法応答性の点でリウマチ様関節炎 (RA) と類似性がある。したがって、この動物モデルはヒトの疾患によく近似したモデルとして使用することができる。本実施例で使用したリウマチ様関節炎モデルは、ウィリアムスら [(Williams, R. O. et al.)、*PNAS* 89:9784 - 9788 (1992)] によって記載されているDBA/1マウスのコラーゲンII型誘導関節炎である。II型コラーゲンは、ミラーが述べるように [Miller、*Biochemistry* 11:4903 - 4909 (1972)]、限定的ペプシン可溶化と塩分画法によってウシ関節軟骨から精製した。

試験 1

8 ~ 12週齢の雄性DBA/1マウスに、フロインドの完全アジュバントに乳化した100 μ g のウシII型コラーゲンを免疫投与し、21日後に100 μ g のコラーゲンを腹腔内 (i.p.) に免疫投与した。最初の注射から約35日目に臨床的に明白な関節炎症状 (1肢以上に赤変と腫脹の両方または一方が見られる) が発現した直後に、マウスに抗CD4、抗TNF、抗CD4と抗TNFの両方、またはイソタイプ対照をi.p.注射した。関節炎の臨床スコアと足蹠腫大測定値を10日間モニターした。抗体投与は1日目 (発症時)、4日目、および7日目に行なった。2つの実験を行ない、臨床スコアと足蹠腫大を評価した。各実験では、注射1回あたり200 μ g の抗CD4 (ラットYTS191およびYTA3.1) を使用した。臨床スコアは以下の基準で評価した。0 = 正常、1 = 軽度の腫大と紅斑の両方または一方、2 = 顕著な水腫、3 = 関節硬直。各肢について等級評価し、マウス1匹あたり最高12点のスコアを与えた。足蹠腫脹は、障害を有する後足蹠の厚みをキャリパーで測定することによってモニターした。結果は、関節炎発症前の足蹠幅に対する足蹠幅の増大率で示した。

10

20

30

40

50

第1の実験では、注射1回あたり50 μ gの抗TNF(ハムスターTN3.19.2)を1群あたり5匹のマウスそれぞれに単回投与した。抗CD4または抗TNF(TN3.19を50 μ g/マウスの用量で3回投与)の有意な作用はみられなかった。臨床スコアと足蹠腫脹のいずれについても併用療法の利点が明白に認められる(図1Aと図1B参照)。

第2の実験では、50 μ gまたは300 μ gの抗TNFを1群あたり7匹のマウスそれぞれに投与した。抗CD4と低濃度(50 μ g)の抗TNFはいずれもいくらかの作用を示し、この2つの濃度の併用療法の利点は、足蹠腫脹については認められたが、臨床スコアでは認められなかった。しかし、抗TNFを300 μ g/マウスの用量で投与したところ、抗CD4との併用療法の利点が臨床スコアと足蹠腫脹の両方で見られ、足蹠腫脹でより明白であった(図2A、図2B、図2C、図2D参照)。

上記実験の結果は、抗TNF抗体と抗CD4抗体を組み合わせる併用療法は臨床スコアと足蹠腫脹で評価できる明白な利点があることを示すものである。

試験2

8~12週齢の雄性DBA/1マウスに、フロインドの完全アジュバントに乳化した100 μ gのII型コラーゲンを皮内免疫投与した。1肢以上で紅斑と腫脹の両方または一方が初めて見られた日を関節炎発症1日目とした。関節炎は、II型コラーゲン免疫後30日目ごろに臨床的に明白となった。各マウスにつき、関節炎が初めて見られた日に処理を開始し、10日にわたり処理を続け、その後マウスを屠殺し、関節を組織検査用に処理した。1日目、4日目、および7日目にモノクローナル抗体処理を行なった。まず、50 μ gという最適用量以下(sub-optimal dose)の抗TNF(TN3-19.12、ハムスターIgG1抗TNF / mAb)を単独で

投与した場合を、同用量で200 μ gの抗CD4(ラットIgG2b、YTS191.1.2とYTA3.1.2の混合物)と併用投与した場合と比較した。結果を確認するために、上記と同一内容の2つの実験を別に行なった(それぞれマウス11~12匹/群および7~8匹/群)。抗CD4単独でも最適用量以下の抗TNF単独でも、足蹠腫大を有意に低下させることはできなかった(データは示さない)。抗TNFと抗CD4の併用処理は、対照mAbを投与された群と比べて、足蹠腫大が一貫して統計的に有意な低下を引き起こした($P < 0.001$)。さらに、いずれの実験においても、抗TNF/抗CD4併用処理(本明細書では抗CD4/抗TNF処理ともいう)は、抗CD4単独および抗TNF単独と比べて足蹠腫大を有意に低下させた($P < 0.05$)。次に、最適用量の抗TNF(300 μ g)を単独投与した場合と、同用量で抗CD4と併用投与した場合を、同一内容の別の2つの実験(それぞれマウス7~7匹/群およびマウス6~7匹/群)と比較した。前記試験同様、抗TNF/抗CD4併用処理は、対照mAbを投与された群と比べて足蹠腫大を有意に低下させた($P < 0.005$ 、データは示さない)。第1の実験では、抗CD4単独または抗TNF単独を投与された群と比べても、足蹠腫大は抗CD4/抗TNF併用処理群で有意に低下した($P < 0.05$)。有意差はなかったが、抗TNF単独または抗CD4単独の投与を受けたマウスで足蹠腫大がある程度低下したが、これはおそらく群サイズが小さいことによるものであろう(1群あたり6匹)。第2の実験では、抗CD4/抗TNF併用投与は抗CD4単独投与と比べて足蹠腫大を有意に低下させたが($P < 0.05$)、抗TNF単独と比べると有意な低下はなかった。これは、過去の研究[ウィリアムスら(Williams, R.O. et al.)、PNAS 89:9784-9788(1992)]から予想されたように、抗TNF自体が足蹠腫大の有意な低下を引き起こしたからである。実験では、抗TNF単独に起因する足蹠腫大低下率はそれぞれ23%と33%であった。したがって、抗TNF処理による足蹠腫脹低下は、TN3-119.12(300 μ g/マウス)による処理が処理期間を通じて対照と比べて平均約34%の足蹠腫大測定値の低下をもたらした既報の知見にほぼ匹敵するものである[ウィリアムスら(Williams, R.O. et al.)、PNAS 89:9784-9788(1992)]。

四肢への影響

コラーゲン誘導関節炎では、RAの場合と同様に、臨床疾患が最初に発現してから新たに別の四肢が影響を受けるのが普通であり、新たな四肢への影響はこの疾患の進行の重要な指標である。新たな四肢への影響に及ぼす抗CD4抗TNF処理の影響を調べるために、10日間の処理期間の最終日に臨床的に検出可能な関節炎を有する四肢の数を処理前の関節炎四肢数と比較した。対照mAbを投与されたマウスでは、症状を有する肢が10日間に約50%増加

10

20

30

40

50

した。上記2つの実験の結果をまとめて表1に示す。

表1： 抗CD4/抗TNFの併用は関節炎の臨床症状の進行を抑制する

処置	症状を示す四肢の数 (平均±SEM)		増加 (%)
	1日目	10日目	
最適用量以下の抗TNF (50 μg)			
抗CD4 (n=18)	1.30±0.10	1.90±0.13	46.1
抗TNF (n=19)	1.20±0.09	1.65±0.17	37.5
抗CD4/TNF (n=18)	1.40±0.09	1.45±0.22	3.4 ¹
対照mAb (n=18)	1.43±0.15	2.24±0.18	56.6
最適用量の抗TNF (300 μg)			
抗CD4 (n=12)	1.27±0.10	1.80±0.14	42.0
抗TNF (n=11)	1.50±0.17	1.64±0.20	9.5 ²
抗CD4/TNF (n=13)	1.25±0.11	1.25±0.11	0 ³
対照mAb (n=12)	1.53±0.19	2.27±0.25	47.8

1 p<0.05 (抗CD4/TNF vs 対照mAb)

2 p<0.05 (抗TNF vs 対照mAb)

3 p<0.005 (抗CD4/TNF vs 対照mAb)

抗CD4単独および最適用量以下の抗TNF単独の投与を受けた群において四肢への新たな影響が減ったが、その差は有意でなかった。最適用量の抗TNFを投与された群では、四肢への影響の増加率は10%未満であった (P<0.05)。しかし、さらに注目すべき点は、抗CD4/抗TNFの併用投与を受けた群で四肢への新たな影響がほとんどなかったことである。新たな四肢への影響の増加は、抗CD4と最適用量以下の抗TNFの投与を受けたマウスではわずか3%であり (P<0.05)、抗CD4と最適用量の抗TNFの投与を受けたマウスでは0% (P<0.005)であった。

組織学的特徴

10日後、マウスを屠殺し、最初に関節炎の臨床症状を示した四肢を各マウスから切除し、ホルマリン固定し、脱カルシウム化し、ワックス埋入した後、切片を作成し、ヘマトキシリンとエオジンで染色した。中指近位指節間 (PIP) 関節の矢状切片について、軟骨と骨のいずれかに侵食があるかどうかを盲検的に調べた (炎症組織が充満した軟骨または骨の分界欠損 (demarcated defects) として判定)。比較は同一関節についてのみ行ない、関節炎は同一継続期間のものとした。侵食は対照群のPIP関節のほぼ100%で見られ、抗CD4単独または最適用量以下の抗TNF単独の投与を受けた関節の約70~80%で見られた。上記2つの実験の結果をまとめ、表2に示す。

表2： 軟骨及び/又は骨に顕著な侵食を示すPIP関節の割合

処置	侵食を示す関節
最適用量以下の抗TNF (50 μ g)	
抗CD4	13/18 (72%)
抗TNF	14/19 (74%)
抗CD4/TNF	4/18 (22%) ¹
対照mAb	17/18 (94%)
最適用量の抗TNF (300 μ g)	
抗CD4	10/12 (83%)
抗TNF	6/11 (54%) ²
抗CD4/TNF	4/13 (31%) ³
対照mAb	12/12 (100%)

- 1 p < 0.01 (抗CD4/TNF vs 抗CD4単独、
抗TNF単独及び対照mAb)
2 p < 0.01 (抗TNF単独 vs 対照mAb)
3 p < 0.01 (抗CD4/TNF vs 抗CD4単独、
及び対照mAb)

最適用量の抗TNF単独を投与した場合、既報 [ウィリアムスら (Williams, R.O. et al.)、PNAS 89:9784 - 9788 (1992)] の通り病変が有意に低下した。したがって、最適用量の抗TNF単独の投与を受けたマウスでは、侵食変化を示した関節の割合は54%に低下し (P < 0.001)、抗CD4と最適用量以下または最適用量の抗TNFを投与された群ではそれぞれ関節の22% (P < 0.01) と31% (P > 0.01) のみが侵食された。このように、300 μ gの抗TNF単独投与により関節侵食からある程度保護されたが、抗CD4/抗TNFを併用投与すると保護の程度が有意に高くなった。

CD4 + T細胞の減少

抗CD4処理がどの程度まで末梢CD4 + T細胞を減少させるかをフローサイトメトリー法によって測定した。解離脾臓細胞または末梢血におけるCD4 + リンパ球の比率を計算するために、細胞をフィコエリスリン - コンジュゲート化抗CD4 (Becton Dickinson, Oxford, UK) とともにインキュベーションした後、リンパ球画分上にスクッターゲートを設定するフローサイトメトリー法 (FACSscan, Becton Dickinson) によって分析した。抗CD4処理によって、脾臓のCD4 + 細胞は98% (\pm 1%) 減少し、血液中のCD4 + T細胞は96% (\pm 3%) 減少した。

免疫組織化学

末梢CD4 + T細胞が実質的に全て除去されても関節内にCD4 + T細胞が残存している可能性があるかどうか、処理済み関節炎マウスから採取した切片の免疫組織化学的分析によって調べた。ワックス埋入切片を脱ワックス処理し、トリプシン消化した後、抗CD4mAb (YTS191.1.2/YTA3.1.2) とともにインキュベーションした。CD4 + 細胞のT細胞同一性 (T cell identity) を確認するために、一連の切片を抗Thy - 1mAb (YTS154.7) で染色した [コップボルドら (Cobbold, S.P. et al.)、Nature 312:548 - 551 (1984)]。対照切片は、HRP N11/12aとともにインキュベーションした。結合抗体の検出は、既報 [デレウランら (Del 50

euran, B.W. et al.), *Arthritis & Rheumatism* 34:1125 - 1132 (1991)] に従い、アルカリホスファターゼ/ラット抗アルカリホスファターゼ複合体 (APAAP, Dako, High Wycombe, UK) および高速赤色基質 (fast red substrate) によっておこなった。対照mAb投与マウスだけでなく、抗CD4処理マウスの関節からも少数のCD4+細胞が検出された(データは示さない)。さらに、調べた少数のマウス(1処理群あたり4匹)の範囲内では、抗CD4単独投与または抗CD4と抗TNFの併用投与を受けた群にCD4+T細胞数の有意な減少は見られなかった(データは示さない)。したがって、抗CD4処理は関節からCD4+T細胞を除去しなかったことになる。

抗コラーゲンIgG値

酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によって血清抗コラーゲンIgG値を測定した。マイクロタイタープレートにウシII型コラーゲン(2 μ g/ml)を被覆し、ブロックした後、段階的に希釈した一連の試験血清とともにインキュベーションした。結合IgGの検出は、アルカリホスファターゼ-コンジュゲート化ヤギ抗マウスIgGとともにインキュベーションし、次いで基質(ジニトロフェニルホスフェート)を加えることによって行なった。405nmで光学密度を読み取った。アフィニティー精製マウス抗II型コラーゲン抗体からなる参照試料を各プレートに加えた。抗CD4単独、抗TNF単独、あるいは抗CD4と抗TNFを組み合わせたものを投与しても、10日間の処理期間中に抗II型コラーゲンIgGの血清値は有意な変化を示さなかった(表3)。

表3: 抗II型コラーゲンIgGの血清レベル

処置	抗コラーゲンIgG (平均 \pm SEM) (μ g/ml)
最適用量以下の抗TNF (50 μ g)	
抗CD4 (n=18)	285 \pm 37
抗TNF (n=19)	208 \pm 29
抗CD4/TNF (n=18)	208 \pm 34
対照mAb (n=18)	238 \pm 36
最適用量の抗TNF (300 μ g)	
抗CD4 (n=12)	288 \pm 39
抗TNF (n=11)	315 \pm 49
抗CD4/TNF (n=13)	203 \pm 33
対照mAb (n=12)	262 \pm 47

グロブリン応答

抗CD4処理が抗TNFmAbに対する中和性抗グロブリン応答を防止するかどうかを調べるために、ELISAで測定した10日目のIgM抗TN4-19.12値を比較した。この時点では、IgG抗TN3-19.12応答は検出されなかった。マイクロタイタープレートにTN3-19.12(5 μ g/ml)を被覆し、ブロックした後、一連の希釈試験血清とともにインキュベーションした。ヤギ抗マウスIgMアルカリホスファターゼコンジュゲートを加え、次いで基質を加えることによって、結合IgMを検出した。その結果、抗CD4は、抗TN3-19.12抗体応答の発現の防止に非常に有効であることがわかった(表4)。次に、抗CD4処理が循環抗TNF-値の上昇をもたらす(ハムスター抗TNFに対する抗体応答を低下させることによって)かどうかを調べるために、実験10日目に組替えネズミTNF-を用いて、マウス血清中遊離TN3-19.12を

検出するELISAを行なった。マイクロタイタープレートに組替えネズミTNF- α を被覆し、ブロックした後、試験血清とともにインキュベーションした。次いで、ヤギ抗ハムスターIgGアルカリホスファターゼコンジュゲート（ネズミIgGに吸着させたもの）を加え、次いで基質を加えた。既知濃度のTN3-19.12試料と比較することで定量を行なった。TN3-19.12値は、抗TNF単独投与の場合と比べて、抗CD4と抗TNFを併用投与した群でやや上昇したが、その差は統計的に有意ではなかった（表4）。

表4： IgM抗TN3値と非結合TN3レベル

処置	抗TN3値の 逆数(平均)	非結合TN3 (平均 \pm SEM) (μ g/ml)
最適用量以下の抗TNF (50 μ g)		
抗TNF (n=12)	242	8.6 \pm 2.0
抗CD4/TNF (n=12)	84 ¹	12.1 \pm 1.9
最適用量の抗TNF (300 μ g)		
抗TNF (n=12)	528	90.7 \pm 11.9
抗CD4/TNF (n=12)	91 ¹	102.7 \pm 12.5

1 有意に減少した抗TN3値 ($p < 0.005$)

産業の利用分野

本発明は、特にリウマチ様関節炎のような自己免疫疾患あるいは炎症性疾患の治療における併用療法に有用な物質および薬剤に主として利用される。

10

20

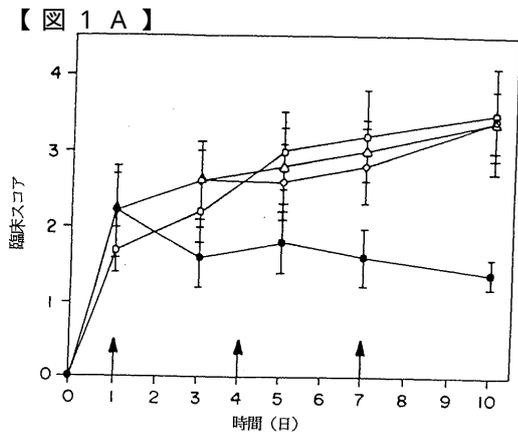


FIG. 1A

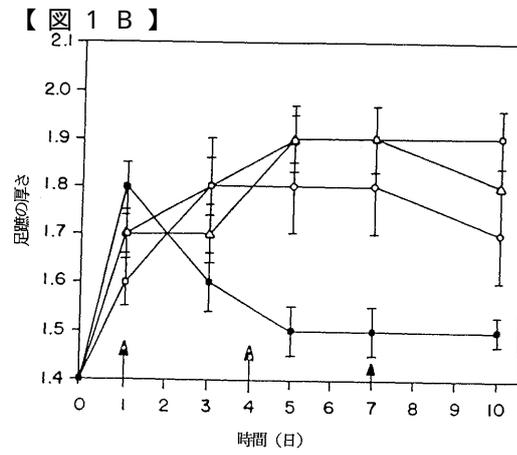


FIG. 1B

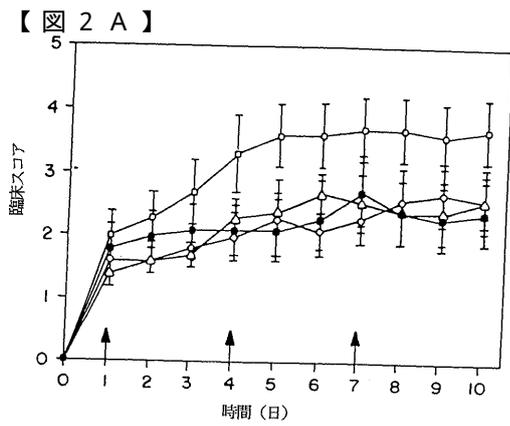


FIG. 2A

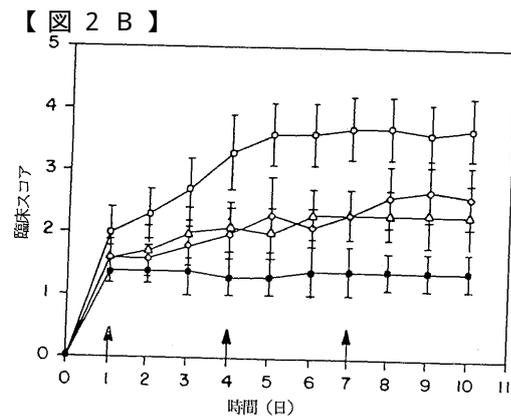


FIG. 2B

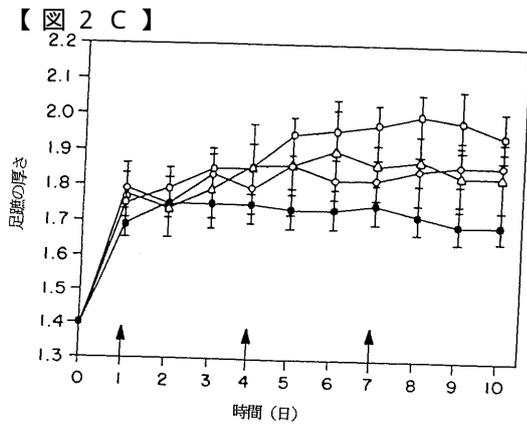


FIG. 2C

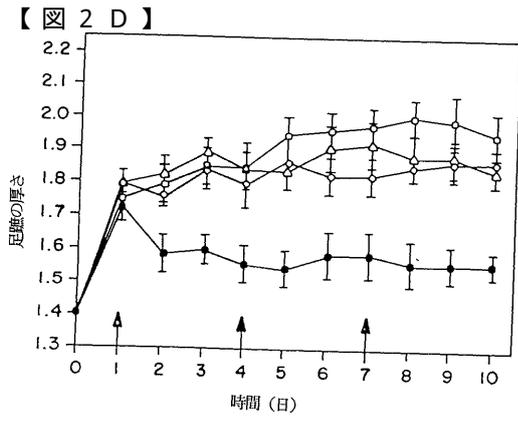


FIG. 2D

フロントページの続き

(72)発明者 ウィリアムス, リチャード オーエン
英国, ロンドン イー2 9 ビーエヌ プリチャーズ ロード, シェベレル ハウス 60

審査官 内田 俊生

(56)参考文献 Br. J. Rheumatol., 1992, Vol.31, No.5, pp.293-298
Clin. Exp. Rheumatol., 1992, Vol.10, No.4, pp.325-326

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B 名)
A61K 39/00 - 39/44