

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7271666号  
(P7271666)

(45)発行日 令和5年5月11日(2023.5.11)

(24)登録日 令和5年4月28日(2023.4.28)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
請求項の数 40 (全59頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-527208(P2021-527208)	(73)特許権者	391015708
(86)(22)出願日	令和1年11月18日(2019.11.18)		ブリistol - マイヤーズ スクイブ カン
(65)公表番号	特表2022-507741(P2022-507741		パニー
	A)		B R I S T O L - M Y E R S S Q U I
(43)公表日	令和4年1月18日(2022.1.18)		B B C O M P A N Y
(86)国際出願番号	PCT/US2019/062011		アメリカ合衆国08543ニュージャー
(87)国際公開番号	WO2020/106620		ジー州 プリンストン、ルート206ア
(87)国際公開日	令和2年5月28日(2020.5.28)		ンド・プロビンス・ライン・ロード
審査請求日	令和4年10月24日(2022.10.24)	(74)代理人	100145403
(31)優先権主張番号	62/769,514		弁理士 山尾 憲人
(32)優先日	平成30年11月19日(2018.11.19)	(74)代理人	100122301
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 富田 憲史
早期審査対象出願		(74)代理人	100157956
			弁理士 稲井 史生
		(74)代理人	100170520
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 アンタゴニストCD40モノクローナル抗体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトCD40に特異的に結合する単離抗体またはその抗原結合部位であって、該抗体は重鎖可変領域を含む第1ポリペプチド部位、および軽鎖可変領域を含む第2ポリペプチド部位を含み、ここで、

該重鎖可変領域は(i)配列番号1を含むCDR1、配列番号2を含むCDR2、配列番号3を含むCDR3、または(ii)配列番号1を含むCDR1、配列番号12を含むCDR2、配列番号3を含むCDR3、の1つを含む、ならびに

該軽鎖可変領域は配列番号7を含むCDR1、配列番号8を含むCDR2、および配列番号9を含むCDR3を含む、

単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項2】

重鎖可変領域が、配列番号1を含むCDR1、配列番号2を含むCDR2、および配列番号3を含むCDR3を含む；ならびに

軽鎖可変領域が配列番号7を含むCDR1、配列番号8を含むCDR2、および配列番号9を含むCDR3を含む、請求項1に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項3】

抗体またはその抗原結合部位がCD40活性に拮抗する、請求項2に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項4】

重鎖可変領域が配列番号 1 からなる C D R 1、配列番号 2 からなる C D R 2、および配列番号 3 からなる C D R 3 を含む；ならびに

軽鎖可変領域が配列番号 7 からなる C D R 1、配列番号 8 からなる C D R 2、および配列番号 9 からなる C D R 3 を含む、請求項 2 に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項 5】

重鎖可変領域が配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、および軽鎖可変領域が配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項 6】

第 1 ポリペプチド部位がヒト重鎖定常領域を含む；および第 2 ポリペプチド部位がヒト軽鎖定常領域を含む、請求項 2 に記載の単離抗体またはその抗原結合部位

10

【請求項 7】

ヒト重鎖定常領域が、Fc - ガンマ - 受容体 ( F c R ) への結合を低減する K a b a t の 2 3 8 位における変異を含むヒト I g G 1 F c ドメインであって、ここでプロリン 2 3 8 ( P 2 3 8 ) がリジン、セリン、アラニン、アルギニンおよびトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸で置換され、ここで抗体またはその抗原結合部位が低減された F c R 結合を有する、請求項 6 に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項 8】

置換されるアミノ酸がリジンである、請求項 7 に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項 9】

20

F c ドメインが、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、または配列番号 2 9 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項 1 0】

重鎖可変領域が配列番号 1 からなる C D R 1、配列番号 2 からなる C D R 2、および配列番号 3 からなる C D R 3 を含む；ならびに

軽鎖可変領域が配列番号 7 からなる C D R 1、配列番号 8 からなる C D R 2、および配列番号 9 からなる C D R 3 を含む、請求項 7 に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項 1 1】

ヒト I g G 1 F c ドメインが配列番号 2 2 または配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 0 に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

30

【請求項 1 2】

第 1 ポリペプチド部位が、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 3 0、および配列番号 3 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる；ならびに第 2 ポリペプチド部位が配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、請求項 2 に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項 1 3】

第 1 ポリペプチド部位が、配列番号 5 のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる；および

第 2 ポリペプチド部位が配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、請求項 2 に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

40

【請求項 1 4】

単離抗体またはその抗原結合部位がヒト化されている、請求項 2 に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項 1 5】

抗原結合部位が s c F v - F c である、請求項 2 に記載の抗体またはその抗原結合部位。

【請求項 1 6】

抗体またはその抗原結合部位が治療剤と連結される、請求項 2 に記載の抗体またはその抗原結合部位。

【請求項 1 7】

50

抗体またはその抗原結合部位が、該抗体またはその抗原結合部位とは異なる結合特異性を持つ第2の機能部分と連結される、請求項2に記載の抗体またはその抗原結合部位。

【請求項18】

さらに追加の部分を含む、請求項2に記載の抗体またはその抗原結合部位。

【請求項19】

a) 請求項2～18の何れか1項に記載の抗体またはその抗原結合部位、およびb) 医薬的に許容できる担体、を含む医薬組成物。

【請求項20】

重鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸配列を含む、および軽鎖可変領域が配列番号16のアミノ酸配列を含む、請求項2に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

10

【請求項21】

対象における免疫応答の処置または予防における使用のための、請求項2～18の何れか1項に記載の抗体またはその抗原結合部位を含む組成物。

【請求項22】

対象における自己免疫疾患または炎症性疾患の処置または予防における使用のための、請求項2～18の何れか1項に記載の抗体またはその抗原結合部位を含む組成物。

【請求項23】

抗体またはその抗原結合部位が免疫抑制剤、免疫調節剤および/または抗炎症剤と共に投与される、請求項2.2に記載の組成物。

【請求項24】

免疫抑制剤、免疫調節剤および/または抗炎症剤がCTLA4変異分子L104EA2.9Y-Ig(ベラタセプト)である、請求項2.3に記載の組成物。

20

【請求項25】

対象が、アジソン病、アレルギー、アナフィラキシー、強直性脊椎炎、喘息、動脈硬化、アトピー性アレルギー、耳の自己免疫疾患、目の自己免疫疾患、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、気管支喘息、冠状動脈性心臓病、クローン病、糖尿病、精巣上体炎、糸球体腎炎、バセドウ病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、炎症性腸疾患、遺伝子組み換え医薬品に対する免疫反応、ループス腎炎、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スポンディ関節症、甲状腺炎、移植拒絶反応、血管炎、および潰瘍性大腸炎、からなる群より選択される疾患を有する、請求項2.2に記載の組成物。

30

【請求項26】

対象がシェーグレン症候群を有する、請求項2.2に記載の組成物。

【請求項27】

重鎖可変領域が、配列番号1を含むCDR1、配列番号12を含むCDR2、および配列番号3を含むCDR3を含む；ならびに軽鎖可変領域が配列番号7を含むCDR1、配列番号8を含むCDR2、および配列番号9を含むCDR3を含む、請求項1に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項28】

抗体またはその抗原結合部位がCD40活性に拮抗する、請求項2.7に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

40

【請求項29】

重鎖可変領域が配列番号13のアミノ酸配列を含む、および軽鎖可変領域が配列番号16のアミノ酸配列を含む、請求項2.7に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項30】

第1ポリペプチド部位がヒト重鎖定常領域を含む；および第2ポリペプチド部位がヒト軽鎖定常領域を含む、請求項2.7に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項31】

ヒト重鎖定常領域が、(1)Fc-ガンマ-受容体(FcR)への結合を低減するK

50

a b a tの238位における変異であって、ここでプロリン238 ( P 2 3 8 ) がリジン、セリン、アラニン、アルギニンおよびトリプトファンからなる群より選択される1つの残基へと変異し、ここで抗体またはその抗原結合部位が低減されたFc R結合を有する、変異；または

(2) K a b a tの297位において置換されたアラニン、のどちらかを含むヒトI g G 1 F cドメインである、請求項30に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項32】

ヒトI g G 1 F cドメインが、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、および配列番号29からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項31に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項33】

ヒトI g G 1 F cドメインが配列番号22または配列番号23のアミノ酸配列を含む、請求項32に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項34】

単離抗体またはその抗原結合部位がヒト化されている、請求項27に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項35】

抗原結合部位がs c F v - F cである、請求項27に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項36】

抗体またはその抗原結合部位が、  
治療剤と連結される；  
該抗体またはその抗原結合部位とは異なる結合特異性を持つ第2の機能部分と連結される；

さらに追加の部分を含む；または  
その任意の組合せ、である請求項27に記載の単離抗体またはその抗原結合部位。

【請求項37】

a) 請求項27～36の何れか1項に記載の抗体またはその抗原結合部位、およびb) 医薬的に許容できる担体、を含む医薬組成物。

【請求項38】

抗体またはその抗原結合部位を投与する事を含む、対象における免疫応答、自己免疫疾患または炎症性疾患の少なくとも1つの処置または予防における使用のための、請求項27～36の何れか1項に記載の抗体またはその抗原結合部位を含む組成物。

【請求項39】

抗体またはその抗原結合部位が免疫抑制剤、免疫調節剤および/または抗炎症剤と共に投与される、請求項38に記載の組成物。

【請求項40】

対象が、アジソン病、アレルギー、アナフィラキシー、強直性脊椎炎、喘息、動脈硬化、アトピー性アレルギー、耳の自己免疫疾患、目の自己免疫疾患、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、気管支喘息、冠状動脈性心臓病、クローン病、糖尿病、精巣上体炎、糸球体腎炎、パセドウ病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、炎症性腸疾患、遺伝子組み換え医薬品に対する免疫反応、ループス腎炎、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スポンディ関節症、甲状腺炎、移植拒絶反応、血管炎、および潰瘍性大腸炎からなる群より選択される疾患を有する、請求項38に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

### 関連出願の相互参照

本願は2018年11月19日出願の米国仮特許出願第62/769,514号の利益を主張するものであり、仮出願はあらゆる目的のためにその全体が本明細書中に組み込まれている。

#### 【0002】

##### 配列表

本願はASCIIフォーマットで電子提出された配列表を含み、これは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。2019年11月13日に作成された該ASCIIの複製は、200896-0015-00-WO-592417\_\_SL.txtというファイル名で、サイズは170,111バイトである。

10

#### 【0003】

本開示はCD40に結合する抗体を提供する。該抗体ポリペプチドはCD40に結合するが、CD40アゴニスト活性を示さない。該抗体は修飾IgG1 Fcドメインを含む、および最小限の未成熟な樹状細胞の活性化を示し得る。抗体を含む組成物、CD40活性に関与する疾患の処置のための使用の方法、CD40活性に関連する疾患の処置のための医薬品の調製における使用を提供する。

#### 【背景技術】

#### 【0004】

CD40は樹状細胞、B細胞、およびマクロファージを含む抗原提示細胞(APC)に提示される腫瘍壊死因子(TNF)受容体スーパーファミリーに属する副刺激分子である。APCはCD40がそのリガンド、CD154(CD40L)にT<sub>H</sub>細胞上で結合した際に活性化される。CD40を介したAPCの活性化はサイトカイン産生、副刺激分子(例えば、CD86)の増加、および抗原提示の増強およびB細胞の増殖を含む様々な免疫反応に関与する。CD40はまた、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、および上皮細胞においても発現し得る。

20

#### 【0005】

CD40の活性化はまた、例えば自己免疫、移植拒絶反応またはアレルギー反応に関連する様々な望ましくないT細胞反応に関与する。望ましくないT細胞反応を制御する1つの戦略はCD40をアンタゴニスト抗体の標的とすることである。例えば、以前はChiron1212として知られていたモノクローナル抗体HCD122(ルカツムマブ)は現在、特定のCD40介在性炎症性疾患の処置のための臨床試験段階にある。インターネット上のハイパーテキスト転送プロトコル:[clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT01275209](https://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT01275209)(最終更新日2011年1月11日)の“Study of HCD122 (Lucatumumab) and Bendamustine Combination Therapy in CD40<sup>+</sup> Rituximab-Refractory Follicular Lymphoma”, Clinical Trials Feeds)を参照。しかし、モノクローナル抗体はアゴニスト活性を示し得る。例えば、抗CD40抗体であるCh220の有用性はその弱い刺激性能によって制限されている。Adams, et al., “Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival” J. Immunol. 174: 542-50 (2005)を参照。

30

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

最初の実施形態では、本発明はヒトCD40に特異的に結合する、単離された抗体、またはその抗原結合部位を提供し、ここで、該抗体は、重鎖可変領域を含む第1ポリペプチド部位および軽鎖可変領域を含む第2ポリペプチド部位を含み、ここで、

該重鎖可変領域は(i)SYWMH(配列番号1)を含むCDR1、QINPTTGRSQYNEKFKT(配列番号2)を含むCDR2、WGLQPFAY(配列番号3)を含むCDR3;ならびに(ii)SYWMH(配列番号1)を含むCDR1、QINPSQGRSQYNEKFKT(配列番号12)を含むCDR2、WGLQPFAY(配列番号3)を含むCDR3の内一つを含む;および

該軽鎖可変領域はKASQDVSTAVA(配列番号7)を含むCDR1、SASYR

50

Y T (配列番号 8) を含む C D R 2、Q Q H Y S T P W T (配列番号 9) を含む C D R 3 を含む。

【 0 0 0 7 】

本発明はさらにヒト C D 4 0 に特異的に結合する単離された抗体、またはその抗原結合部位を提供し、ここで、該抗体は、重鎖可変領域を含む第 1 ポリペプチド部位および軽鎖可変領域を含む第 2 ポリペプチド部位を含み、ここで、

該重鎖可変領域は ( i ) S Y W M H (配列番号 1) からなる C D R 1、Q I N P T T G R S Q Y N E K F K T (配列番号 2) からなる C D R 2、W G L Q P F A Y (配列番号 3) からなる C D R 3 ; ならびに ( i i ) S Y W M H (配列番号 1) からなる C D R 1、Q I N P S Q G R S Q Y N E K F K T (配列番号 1 2) からなる C D R 2、W G L Q P F A Y (配列番号 3) からなる C D R 3 の内一つを含む ; および

該軽鎖可変領域は K A S Q D V S T A V A (配列番号 7) からなる C D R 1、S A S Y R Y T (配列番号 8) からなる C D R 2、Q Q H Y S T P W T (配列番号 9) からなる C D R 3 を含む。

【 0 0 0 8 】

本発明はさらにヒト C D 4 0 に特異的に結合する単離された抗体、またはその抗原結合部位を提供し、ここで、該抗体は、重鎖可変領域を含む第 1 ポリペプチド部位および軽鎖可変領域を含む第 2 ポリペプチド部位を含み、ここで、

該重鎖可変領域は S Y W M H (配列番号 1) からなる C D R 1、Q I N P T T G R S Q Y N E K F K T (配列番号 2) からなる C D R 2、W G L Q P F A Y (配列番号 3) からなる C D R 3 を含む ; および

該軽鎖可変領域は K A S Q D V S T A V A (配列番号 7) からなる C D R 1、S A S Y R Y T (配列番号 8) からなる C D R 2、Q Q H Y S T P W T (配列番号 9) からなる C D R 3 を含む。

【 0 0 0 9 】

本発明はさらにヒト C D 4 0 に特異的に結合する単離された抗体、またはその抗原結合部位を提供し、ここで、該抗体は、重鎖可変領域を含む第 1 ポリペプチド部位および軽鎖可変領域を含む第 2 ポリペプチド部位を含み、ここで、

該重鎖可変領域はアミノ酸配列 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G Y A F T S Y W M H W V R Q A P G Q G L E W M G Q I N P T T G R S Q Y N E K F K I R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R W G L Q P F A Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 4) を含む、

および該軽鎖可変領域はアミノ酸配列 D I Q M T Q S P S F L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y S T P W T F G G G T K V E I K (配列番号 1 0) を含む。

【 0 0 1 0 】

本発明はさらにヒト C D 4 0 に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合部位を提供し、ここで、該抗体は、重鎖可変領域を含む第 1 ポリペプチド部位および軽鎖可変領域を含む第 2 ポリペプチド部位を含み、ここで、該重鎖可変領域はアミノ酸配列

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G Y A F T S Y W M H W V R Q A P G Q G L E W M G Q I N P S Q G R S Q Y N E K F K T R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R W G L Q P F A Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 1 3) を含む、

および該軽鎖可変領域はアミノ酸配列

E I V M T Q S P A T L S V S P G E R A T L S C K A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y S A S Y R Y T G I P A R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q S E D F A V Y Y C Q Q H Y S T P W T F G G G T K V E I K (配列番号 1 6) を含む。

【 0 0 1 1 】

本発明はさらにヒト C D 4 0 に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合部

10

20

30

40

50

位を提供し、ここで、該抗体は、重鎖可変領域を含む第1ポリペプチド部位および軽鎖可変領域を含む第2ポリペプチド部位を含み、ここで、該重鎖可変領域はアミノ酸配列

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWVRQ  
APGQGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRVTITADKSTSTA  
YMEISSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWGQGTLLVTVSS (配  
列番号4)を含む、

および該軽鎖可変領域はアミノ酸配列

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVSTAVAWYQQK  
PGQAPRLLIYSASRYTGI PARFSGSGSGTEFTLTISSLQ  
SEDFAVYYCQQHYSYTPWTFGGGTKVEIK (配列番号16)を含む。

10

【0012】

特定の実施形態では、単離された抗体またはその抗原結合部位はヒト重鎖定常領域を含む第1ポリペプチド部位；およびヒト軽鎖定常領域を含む第2ポリペプチド部位を含む。本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位は(1)Fc-ガンマ-受容体(Fc R)への結合を低減するkabatの238位の変異であって、ここでプロリン238(P238)がリジン、セリン、アラニン、アルギニン、トリプトファンからなる群より選択された一つの残基への変異であって、およびここで、抗体またはその抗原結合部位が低減されたFc R結合を有する、変異；または(2)kabatの297位におけるアラニン置換、の何れかを含むヒトIgG1 Fcドメインを含み得る。

【0013】

20

本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位はFc-ガンマ-受容体(Fc R)への結合を低減するkabatの238位の変異であって、ここでプロリン238(P238)がリジン、セリン、アラニン、アルギニン、トリプトファンからなる群より選択された一つの残基への変異であって、およびここで、抗体またはその抗原結合部位が低減されたFc R結合を有する変異を含むヒトIgG1 Fcドメインを含み得る。特定の実施形態では、P238はリジンに変異される。

【0014】

本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位は以下より選択されたアミノ酸配列を含むFcドメインを含み得る。

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMIS  
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK  
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号22；  
IgG1-P238K(-C末端リジン))、

30

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMIS  
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK  
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号23  
；IgG1-P238K)、

40

【化1】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP  
 APELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG  
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号24; CH1 -  
 IgG1-P238K (-C末端リジン))、

10

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP  
 APELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  
 SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQG  
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号25; CH  
 1-IgG1-P238K)、

20

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMIS  
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK  
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDK  
 SRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号26;  
 IgG1f-P238K(-C末端リジン))、

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMIS  
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK  
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDK  
 SRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号27  
 ; IgG1f-P238K)、

30

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ  
 TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
 GKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE  
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP  
 VLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHY  
 TQKSLSLSPG (配列番号28; CH1-IgG1f-P238K(-C末端リジ  
 ン))、

40

または

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ  
 TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
 GKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

50

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE  
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP  
 VLDS DGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY  
 TQKSLSLSPGK (配列番号 29 ; CH1 - I g G 1 f - P 2 3 8 K)。

## 【0015】

特定の実施形態では、本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位は、  
 (1) Fc - ガンマ - 受容体 (Fc R) への結合を低減する k a b a t の 2 3 8 位の変異であって、ここで、2 3 8 位のプロリン (P 2 3 8) のリジン、セリン、アラニン、アルギニン、トリプトファンからなる群より選択された一つの残基への変異であって、およびここで、抗体またはその抗原結合部位が低減された Fc R 結合を有する変異；または  
 (2) k a b a t の 2 9 7 位におけるアラニン置換、の何れかを含む、ヒト I g G 1 Fc ドメインを含み、SYWMH (配列番号 1) を含む CDR 1、QINPTTGRSQYNEKFKT (配列番号 2) を含む CDR 2、WGLQPFAY (配列番号 3) を含む CDR 3 を含む、重鎖可変領域；および KASQDVSTAVA (配列番号 7) を含む CDR 1、SASYRYT (配列番号 8) を含む CDR 2、QQHYSTPWT (配列番号 9) を含む CDR 3 を含む軽鎖可変領域、を含む。

10

## 【0016】

単離された抗体およびその抗原結合部位は配列番号 2 2 または配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含むヒト I g G 1 Fc ドメインを含み得る。

20

## 【0017】

本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位についてのいくつかの実施形態においては、第 1 ポリペプチド部位は以下からなる群より選択されたアミノ酸配列を含むか、または、それからなる：

30

40

50

【化2】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWV  
 RQAPGGGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRVTITADKS  
 TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWGQGLV  
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP  
 EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP  
 PCPAPPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKG  
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号5; HC  
 \_Y12XX-hz28-CH1-IgG1-P238K-末端リジン無し)、

10

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWV  
 RQAPGGGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRVTITADKS  
 TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWGQGLV  
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP  
 EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP  
 PCPAPPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKG  
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号6; H  
 C\_Y12XX-hz28-CH1-IgG1-P238K-末端リジン有り)、

20

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWV  
 RQAPGGGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRVTITADKS  
 TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWGQGLV  
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP  
 EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP  
 PCPAPPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKG  
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号30;  
 HC\_Y12XX-hz28-CH1-IgG1f-P238K-末端リジン無し)

30

、および

40

50

【化3】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWV  
 RQAPGGGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRVTITADKS  
 TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWGQGLV  
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP  
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP  
 PCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号31 ;  
 HC\_Y12XX-hz28-CH1-IgG1f-P238K-末端リジン有り)

10

; および

第2ポリペプチド部位は以下のアミノ酸配列を含むか、または、それからなる:

DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPK  
 GKAPKLLIYSASRYRTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQP  
 EDFATYYCQQH YSTPWT FGGGTKVEIKRTVAAPS VFI FPP  
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
 ESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
 LSSPVTKSFNRGEC (配列番号11 ; LC\_Y12XX-hz28-CL)。

20

【0018】

本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位についてのいくつかの実施形態においては、第1ポリペプチド部位は以下のアミノ酸配列を含むか、または、それからなる:

【化4】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWMHWV  
 RQAPGGGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRVTITADKS  
 TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGLQPFAYWGQGLV  
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP  
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP  
 PCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD  
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV  
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号5 ; HC  
 \_Y12XX-hz28-CH1-IgG1-P238K-末端リジン無し);

30

40

および

第2ポリペプチド部位は以下のアミノ酸配列を含むか、または、それからなる:

50

## 【化5】

DIQMTQSPSFLSASVGRVTITCKASQDVSTAVAWYQ  
 QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTI  
 SSLQPEDFATYYCQQHYSTPWFPGGGTKVEIKRTVAAP  
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD  
 NALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYERH  
 KVVACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号11; LC\_Y1  
 2XX-hz28-CL)。

## 【0019】

10

特定の実施形態では、本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位はkabatの297位におけるアラニン置換を含むヒトIgG1Fcドメインを含むヒトIgG1Fcドメインを含む。

## 【0020】

本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位はCD40の活性に拮抗し得る。本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位はキメラ抗体であり得る。本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位はヒト化抗体であり得る。本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位はヒト重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域を含み得る。

## 【0021】

20

本明細書で開示される抗体およびその抗原結合部位は、Fv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)<sub>2</sub>、二重抗体、およびscFv-Fcからなる群より選択された抗原結合部位である。本明細書で開示される抗体およびその抗原結合部位は、scFv-Fcである。

## 【0022】

本明細書で開示される抗体およびその抗原結合部位は治療剤と連結し得る。

## 【0023】

本明細書で開示される抗体およびその抗原結合部位は、該抗体および抗原結合部位とは異なる結合特異性を有する第2の機能部分と連結し得る。

## 【0024】

30

本明細書で開示される抗体およびその抗原結合部位はさらに追加の部分を含み得る。

## 【0025】

単離された抗体またはその抗原結合部位をコードする核酸分子は本明細書で開示される。該核酸分子を含む発現ベクターは本明細書で開示される。該発現ベクターによって形質転換した細胞についてもまた考慮する。抗ヒトCD40抗体またはその抗原結合部位を調製する方法であって、

a) 本明細書で開示される抗体またはその抗原結合部位をコードする核酸分子を含む発現ベクターで形質転換された細胞において、抗体またはその抗原結合部位を発現すること；および

b) 細胞から抗体またはその抗原結合部位を単離すること、  
 を含む方法についてもまた開示する。

40

## 【0026】

以下を含む医薬品組成物もまた提供される：a) 本明細書で開示される抗体またはその抗原結合部位；およびb) 医薬的に許容できる担体。

## 【0027】

本明細書で開示される抗体、またはその抗原結合部位の対象への投与を含む、対象における免疫反応を処置または予防する方法を提供する。さらに本明細書で開示される抗体、またはその抗原結合部位の対象への投与を含む、対象における自己免疫または炎症性疾患を処置または予防する方法を提供する。任意に、抗体、またはその抗原結合部位は、免疫抑制剤/免疫調節剤および/または抗炎症剤と共に投与される。投与は同時または逐次的

50

であってよい。例となる薬剤は、L104EA29Y-Ig(ベラタセプト)などのCTLA4変異分子である。対象における免疫反応を処置または予防するかかる方法において、およびこのような対象における自己免疫または炎症性疾患を処置または予防する方法において、好ましくは、対象は以下からなる群より選択された疾患を有する：アジソン病、アレルギー、アナフィラキシー、強直性脊椎炎、喘息、動脈硬化、アトピー性アレルギー、耳の自己免疫疾患、目の自己免疫疾患、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、気管支喘息、冠状動脈性心臓病、クローン病、糖尿病、精巣上体炎、糸球体腎炎、パセドウ病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、炎症性腸疾患、遺伝子組み換え医薬品に対する免疫反応(例えば、血友病患者における第VII因子)、ループス腎炎、ループス腎炎、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スポンディ関節症、甲状腺炎、移植拒絶反応、血管炎、および潰瘍性大腸炎。

10

## 【0028】

医薬品としての使用のための本明細書で開示される抗体またはその抗原結合部位についても考慮する。さらに、それを必要とする対象における処置に使用するための本明細書で開示される抗体、もしくはその抗原結合部位、または抗体、もしくはその抗原結合部位を含む医薬品についても考慮する。さらに、免疫反応の処置または予防に使用するための、治療有効量の本明細書で開示される抗体またはその抗原結合部位であって、それを必要とする患者への投与のための抗体またはその抗原結合部位についても考慮する。

## 【図面の簡単な説明】

20

## 【0029】

【図1A】図1は図1A-1Dを含み、抗体のヒトFcRに対する結合のSPRセンサーグラムデータを示す。図1Aはコントロール抗体、コントロールIgG1のデータを示す。図1BはY12XX-hx28-IgG1-P238K、コントロールIgG1のデータを示す。図1Cはコントロール抗体、抗体Bのデータを示す。図1Dは抗体/FcR相互作用のKD値をまとめた表である。KD値は1:1ラングミュア適合(hCD64)または1:1定常状態適合(hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158、およびhCD16a-F158)のどちらかから得た。

## 【図1B】同上

30

## 【0030】

【図2A】図2は図2A-2Cを含み、CD32aを発現するCHO細胞を添加、または非添加の場合において、iDCをヒト化Y12XX抗体またはコントロール抗体で処置した際のiDCの活性化データを示す。細胞培養液由来のIL-6(インターロイキン-6)の増加、および抗CD86抗体および抗CD54抗体を用いて染色した、フローサイトメトリー蛍光平均値で示される細胞表面マーカーの発現を評価した。図2AはIL-6のデータを示す。図2BはCD86のデータを示す。図2CはCD54のデータを示す。平均蛍光強度(MFI)を測定し、図2Bおよび図2Cで両方のY軸に示す。各シンボルは個人ドナー由来のiDCのデータを表す。Y12XX-hz42-P238Kは4人のドナー由来の細胞において試験し、Y12XX-hz40-P238Kは6人のドナー由来の細胞で試験し、およびY12XX-hz28-P238Kは10人のドナー由来の細胞で試験した。抗体の濃度を $\mu\text{g}/\text{ml}$ で示した(10、30、または100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。本アッセイにおけるCHO-32a細胞の含有はFcRを介してクロスリンクまたはクラスタリングを仲介することを示す。Ly6-IgGはネガティブコントロールとして用いた。パーシャルCD40アゴニスト2141およびBMS986090-100はポジティブコントロールとして用いた。

## 【図2B】同上

## 【図2C】同上

## 【0031】

【図3】図3は図3Aおよび図3Bを含み、ヒト化Y12XX抗体、CD40抗体、およ

50

びコントロール抗体の補体依存細胞毒性（CDC）解析から得た例示的データを示す。CDCアッセイは2度行った。2回目のアッセイでは新鮮に解凍されたヒト補体血清を用いた。図3Aはアッセイの第1反復のデータを示し、図3Bはアッセイの第2反復のデータを示す。

【0032】

【図4】図4は図4Aおよび図4Bを含み、2人の異なるドナー由来のCD14+単球をエフェクター細胞として使用し、ヒト化Y12XX抗体またはコントロール抗体の抗体依存細胞貪食（ADCP）解析から得た例示的データを示す。図4Aはドナー#8のCD14+単球をエフェクター細胞として用いることで得たデータを示す。図4Bはドナー#65のCD14+単球をエフェクター細胞として用いることで得たデータを示す。

10

【0033】

【図5】図5は図5Aおよび5Bを含み、2人の異なるドナー由来のNK細胞をエフェクター細胞として使用し、ヒト化Y12XX抗体またはコントロール抗体の抗体依存細胞毒性（ADCC）解析から得た例示的データを示す。図5Aはドナー#38のNK細胞をエフェクター細胞として用いることで得たデータを示す。図5Bはドナー#55のNK細胞をエフェクター細胞として用いることで得たデータを示す。

【0034】

【図6A】図6は図6A、6B、6C、および6Dを含み、異なる抗CD40抗体で刺激した際のRamos Blues細胞におけるNF- $\kappa$ B/AP-1誘導性SEAP活性を評価するように設計されたアッセイから得たデータを示す。CD40mAbsの活性に関する3つの独立した研究からの代表的な結果を図6Aおよび6Bに示す。図6Cおよび6Dは、ポジティブコントロールであるCD40L-IZのデータを示す。AIMV：AIMV（商標）培地（1x）（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA）。

20

【図6B】同上

【発明を実施するための形態】

【0035】

本開示は抗CD40抗体、および特にアンタゴニスト抗CD40抗体に関する。CD40などの治療標的においては、Fc $\gamma$ Rを介した抗CD40抗体のクロスリンクは望まぬアゴニスト性シグナル伝達および毒性の可能性をもたらす可能性を有する。本開示はまた、「低親和性」Fc $\gamma$ R：hCD32a/Fc $\gamma$ RIIa、hCD32b/Fc $\gamma$ RIIbおよびhCD16a/Fc $\gamma$ RIIIaと低減した会合を有し、および「高親和性」のFc $\gamma$ RhCD64とも低減した会合を有するアンタゴニスト抗CD40抗体について記載する。低親和性Fc $\gamma$ Rとの会合の低減は望ましくないアゴニスト性シグナル伝達および望ましくない毒性の可能性の見込みを低減することが期待される。

30

【0036】

定義および略語

さらに略語と定義を以下に示す。

40

50

## 【表 A】

APC	抗原提示細胞	
CD54	別名ICAM-1	
CDR	相補性決定領域	
C <sub>H</sub> またはCH	定常重鎖	
C <sub>L</sub> またはCL	定常軽鎖	
CHO 細胞	チャイニーズハムスター卵巣細胞	
dAb	ドメイン抗体	10
DC	樹状細胞	
FcγR	FcγRと互換的	
FcγR	Fcガンマ受容体	
FR	フレームワーク領域	
GM-CSF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	
HC	重鎖	
ICAM-1	細胞内接着分子1	
iDC	未成熟樹状細胞	20
IFN	インターフェロン	
IgG	免疫グロブリンG	
IL-6	インターロイキン-6	
LC	軽鎖	
mAb	モノクローナル抗体	
mg	ミリグラム	
mlまたはmL	ミリリットル	
ng	ナノグラム	
nM	ナノモラー	30
pI	等電点	
SPR	表面プラズモン共鳴	
TNF	腫瘍壊死因子	
μg	マイクログラム	
μM	マイクロモラー	
V <sub>L</sub> またはVL	可変軽鎖ドメイン	
V <sub>K</sub> またはVK	カッパ可変軽鎖ドメイン	
V <sub>H</sub> またはVH	可変重鎖ドメイン	40

## 【0037】

この詳細な記載に従って、以下の略語と定義が適用される。本明細書で使用される限り、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈で明確に別段の指示がない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。よって、たとえば、「抗体 (antibody)」への言及は複数のそのような抗体が含まれ、および「その用量 (the dosage)」への言及は1以上の投与量および当業者に公知の均等物への言及を含む。

## 【0038】

ここで使用する場合、「約」という用語は、当業者に理解される、および、使用される

文脈によってある程度変化するものである。一般に、「約」は、本明細書で別段の指示がない限り、参照値のプラス/マイナス10%の値の範囲を包含する。

【0039】

設定された範囲の間の何れかのおよびすべての全整数または部分整数が本明細書に含まれることが理解される。

【0040】

CD40はB細胞表面抗原CD40、Bp50、CD40L受容体、CDw40、CDW40、MGC9013、p50、TNFRSF5、および腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー5としても知られる、および言及されている。「ヒトCD40」とは以下のアミノ酸配列を含むCD40のことを指す：

MVRLPLQCVL WGCLLTAVHP EPPTACREKQ YLINSQCC  
SL CQPGQKLVSD CTEFTETECL PCGESEFLDT WNRET  
HCHQH KYCDPNLGLR VQQKGTSETD TICTCEEGWH CT  
SEACESCV LHRSCSPGFG VKQIATGVSD TICEPCPVGF  
FSNVSSAFEK CHPWTSCETK DLVVQQAGTN KTDVVCGP  
QD RLRALVVIPI IFGILFAILL VLVFIKKVAK KPTNK  
APHPK QEPQEINFPD DLPGSNTAAP VQETLHGCQP VT  
QEDGKESR ISVQERQ (配列番号20)。

【0041】

本明細書で使用する場合、「可変ドメイン」という用語はKabat, et al., Sequences of Immunological Interest、第五版、U.S. Dept. Health & Human Services、Washington、D.C. (1991)において定義される免疫グロブリン可変ドメインを指す。可変ドメイン内のCDRアミノ酸残基のナンバリングおよびポジショニングはよく知られたKabatのナンバリング規則に則る。VH、「可変重鎖」および「可変重鎖ドメイン」は重鎖の可変ドメインを指す。VL、「可変軽鎖」および「可変軽鎖ドメイン」は軽鎖の可変ドメインを指す。

【0042】

「ヒト」という用語は、抗体において適用される場合は、抗体がヒト免疫グロブリン由来の配列、例えば、FRおよび/または、CHドメインを持つことを意味する。配列がヒト免疫グロブリンコーディング配列に「由来する」とは、該配列が以下の何れかの場合である：(a)ヒト個人からもしくはヒト個人から得た細胞または細胞株から単離された；(b)クローン化されたヒト抗体遺伝子配列またはヒト抗体可変ドメイン配列のライブラリーから単離された；または(c)1以上の上記のポリペプチドから、変異および選別によって多様化された。

【0043】

本明細書で使用する「単離された」化合物とは化合物が天然に関連している少なくとも1つの成分から取り除かれていることを意味する。

【0044】

本開示の抗CD40抗体は可変重鎖および可変軽鎖を含み、このそれぞれが3つの相補性決定領域(CDR)および4つのフレームワーク領域(FR)を含有し、アミノ末端からカルボキシル末端へと以下の順番で並べられている：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。CDRは抗原と特異的な相互作用を形成する残基のほとんどを含有し、抗原認識に主として関与する。

【0045】

本開示の抗CD40抗体にはヒト化抗体Y12XX-hz28(Vh-hz14;Vk-hz2)、Y12XX-hz40(Vh-hz12;Vk-hz3)、またはY12XX-hz42(Vh-hz14;Vk-hz3)のCDRを含み得る。重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列の概観を表1に提示する。この表は、各アミノ酸配列の短縮名と詳細名、および配列識別子を含む。

10

20

30

40

50

## 【表 1】

表1

抗体	HC可変領域	LC可変領域
Y12XX-hz28	Vh-hz14 (Y1268_JGHV1.6908-S54T-N55T-Vh) (配列番号4)	Vk-hz2 (Y1258_JGKV1.3902-Vk) (配列番号10)
Y12XX-hz40	Vy-hz12 (Y1268_JGHV1.6908-N55Q-Vh) (配列番号13)	Vk-hz3 (Y1258_JGKV3.1501-Vk) (配列番号16)
Y12XX-hz42	Vh-hz14 (Y1268_JGHV1.6908-S54T-N55T-Vh) (配列番号4)	Vk-hz3 (Y1258_JGKV3.1501-Vk) (配列番号16)

10

## 【0046】

特定の実施形態において、本開示の抗CD40抗体はヒト化抗体Y12XX-hz28 (Vh-hz14; Vk-hz2)のCDRを含む。Y12XX-hz28のアミノ酸配列の詳細を表2に示す。

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表2 Y12XX-hz28配列(Vh-hz14; Vk-hz2)

重鎖可変領域	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWM HWVRQAPGQGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRV TITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGLQPF AYWGQGLTVTVSS(配列番号4)	Vh-hz14 (配列番号4; CDRに 下線)
VH-CDR1	SYWMH (配列番号1)	配列番号4の31-35 アミノ酸
VH-CDR2	QINPTTGRSQYNEKFKT (配列番号2)	配列番号4の50-66 アミノ酸
VH-CDR3	WGLQPFAY (配列番号3)	配列番号4の99-106 アミノ酸
HC_Y12XX-hz2 8-CH1-IgG1-P 238K (C末端リジン を持つ、および 持たない)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWM HWVRQAPGQGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRV TITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGLQPF AYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号5)	CDRに下線; CH1=ア ミノ酸 118-215 (斜 体); IgG1-P238K=ア ミノ酸216-446; P23 8Kに下線; C末端リ ジンを持たない。
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSYWM HWVRQAPGQGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRV TITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGLQPF AYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号6)	CDRに下線; CH1=ア ミノ酸 118-215 (斜 体); IgG1-P238K=ア ミノ酸216-447; P23 8Kに下線; C末端リ ジンを持つ。

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

軽鎖可変領域	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTTITC <u>KASQDVSTAVAWYQ</u> QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYC <u>QQHYSTPWTFGGG</u> TKVEIK (配列番号10)	Vk-hz2 (配列番号10;CDR に下線)
VL-CDR1	KASQDVSTAVA (配列番号7)	配列番号10のアミノ 酸24-34
VL-CDR2	SASYRYT (配列番号8)	配列番号10のアミノ 酸50-56
VL-CDR3	QQHYSTPWT (配列番号9)	配列番号10のアミノ 酸89-97
LC_ Y12XX- hz28	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTTITC <u>KASQDVSTAVAWYQ</u> QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYC <u>QQHYSTPWTFGGG</u> TKVEIK <i>RTVAA</i> <i>PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWK</i> <i>VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTTLTKADYE</i> <i>KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC_</i> (配列番号11)	CDRに下線 ; CL=アミノ酸108-21 4 (斜体)

10

20

## 【0047】

特定の実施形態において、本開示の抗CD40抗体はヒト化抗体Y12XX-hz40 (Vh-hz12; Vk-hz3)のCDRを含む。Y12XX-hz40のアミノ酸配列を表3に示す。

30

40

50

【表 3 - 1】

表3 Y12XX-hz40配列(Vh-hz12;Vk-hz3)

重鎖可変領域	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMH WVRQAPGQGLEWMGQINPSQGRSQYNEKFKTRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGLQPFAYW GQGTLVTVSS (配列番号13)	Vh-hz12 (配列番号13;CDRに下線)
VH-CDR1	SYWMH (配列番号1)	配列番号13のアミノ酸31-35
VH-CDR2	QINPSQGRSQYNEKFKT (配列番号12)	配列番号13のアミノ酸50-66
VH-CDR3	WGLQPFAY (配列番号3)	配列番号13のアミノ酸99-106
C末端リジンを持つ、および持たないHC <sub>Y12XX-hz40</sub> -P238K -IgG1a	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMH WVRQAPGQGLEWMGQINPSQGRSQYNEKFKTRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGLQPFAYW GQGTLVTVSS <i>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</i> (配列番号14)	CDRに下線; CH1=アミノ酸 118-215 (斜体); IgG1-P238K=アミノ酸216-446; P238Kに下線;C末端リジンを持たない。
C末端リジンを持つ、および持たないHC <sub>Y12XX-hz40</sub> -P238K -IgG1a	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMH WVRQAPGQGLEWMGQINPSQGRSQYNEKFKTRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGLQPFAYW GQGTLVTVSS <i>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</i> (配列番号15)	CDRに下線; CH1=アミノ酸 118-215 (斜体); IgG1-P238K=アミノ酸216-447; P238Kに下線;C末端リジンを持つ。

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

軽鎖可変領域	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>KASQDVSTAVAWYQ</u> QKPGQAPRLLIYSASRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYC <u>QQHYSTPWTFGGG</u> TKVEIK (配列番号16)	Vk-hz3 (配列番号16; CDRに下線)
VL-CDR1	KASQDVSTAVA (配列番号7)	配列番号16のアミノ 酸24-34
VL-CDR2	SASYRYT (配列番号8)	配列番号16のアミノ 酸50-56
VL-CDR3	QQHYSTPWT (配列番号9)	配列番号16のアミ ノ酸89-97
LC_ Y12XX- hz40	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>KASQDVSTAVAWYQ</u> QKPGQAPRLLIYSASRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYC <u>QQHYSTPWTFGGG</u> TKVEIK <i>RTVAA</i> <i>PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK</i> <i>VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE</i> <i>KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</i> (配列番号17)	CDRに下線;CH1=ア ミノ酸 108-214 (斜 体)

10

20

## 【 0 0 4 8 】

特定の実施形態において、本開示の抗CD40抗体はヒト化抗体Y12XX-hz42 (Vh-hz14; Vk-hz3)のCDRを含む。Y12XX-hz42のアミノ酸配列の詳細を表4に示す。

30

40

50

【表 4 - 1】

表4 Y12XX-hz42配列(Vh-hz14;Vk-hz3)

重鎖可変領域	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMH WVRQAPGQGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGLQPFAYW GQGTLVTVSS (配列番号 4)	Vh-hz14 (配列番号4;CDRに下線)
VH-CDR1	SYWMH (配列番号1)	配列番号4のアミノ酸31-35
VH-CDR2	QINPTTGRSQYNEKFKT (配列番号2)	配列番号4のアミノ酸50-66
VH-CDR3	WGLQPFAY (配列番号3)	配列番号4のアミノ酸99-106
C末端リジンを 持つ、および 持たないH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMH WVRQAPGQGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGLQPFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSL SLSPG (配列番号5)	CDRに下線; CH1=アミノ酸 118-215 (斜体); IgG1-P238K=アミノ酸216-446; P238Kに下線;C末端リジンを持たない。
C_Y12XX-hz4 2-P238K -Ig G1a	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMH WVRQAPGQGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGLQPFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSL SLSPGK (配列番号6)	CDRに下線; CH1=アミノ酸 118-215 (斜体); IgG1-P238K=アミノ酸216-447; P238Kに下線;C末端リジンを持つ。

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

軽鎖可変領域	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>KASQDVSTAVAWYQ</u> QKPGQAPRLLIYSASRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYC <u>QQHYSTPWT</u> FGGGTKVEIK (配列番号16)	Vk-hz3 (配列番号16; CDRに下線)
VL-CDR1	KASQDVSTAVA (配列番号7)	配列番号16のアミノ酸24-34
VL-CDR2	SASRYT (配列番号8)	配列番号16のアミノ酸50-56
VL-CDR3	QQHYSTPWT (配列番号9)	配列番号16のアミノ酸89-97
LC_ Y12XX-hz42	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>KASQDVSTAVAWYQ</u> QKPGQAPRLLIYSASRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTIS SLQSEDFAVYYC <u>QQHYSTPWT</u> FGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号17)	CDRに下線; CH1=アミノ酸 108-214 (斜体)

10

20

## 【0049】

一つの実施形態において本開示の抗体はヒト化Y12XX-hz28可変重鎖および軽鎖配列のCDR1、CDR2、およびCDR3領域のアミノ酸配列を含み得る(例えば、それぞれ配列番号4および10)。モノクローナル抗体は6つすべてのCDR(V<sub>H</sub>に3つおよびV<sub>L</sub>に3つ)を含有する、例えば、可変重鎖CDR1-3としてそれぞれSYWMH(配列番号:1)、QINPTTGRSQYNEKFKT(配列番号2)、およびWGLQPFAY(配列番号3)、および可変軽鎖CDR1-3としてそれぞれKASQDVSTAVA(配列番号7)、SASRYT(配列番号8)、およびQQHYSTPWT(配列番号9)。

## 【0050】

一つの実施形態において、本開示の抗体はヒト化Y12XX-hz40可変重鎖および軽鎖配列のCDR1、CDR2、およびCDR3のアミノ酸配列を含み得る(例えば、それぞれ配列番号13および16)。モノクローナル抗体は6つすべてのCDR(V<sub>H</sub>に3つおよびV<sub>L</sub>に3つ)を含有する、例えば、可変重鎖CDR1-3としてそれぞれSYWMH(配列番号:1)、QINPSQGRSQYNEKFKT(配列番号12)、およびWGLQPFAY(配列番号3)、および可変軽鎖CDR1-3としてそれぞれKASQDVSTAVA(配列番号7)、SASRYT(配列番号8)、およびQQHYSTPWT(配列番号9)。

30

## 【0051】

一つの実施形態において、本開示の抗体はヒト化Y12XX-hz42可変重鎖および軽鎖配列のCDR1、CDR2、およびCDR3のアミノ酸配列を含み得る(例えば、それぞれ配列番号4および16)。モノクローナル抗体は6つすべてのCDR(V<sub>H</sub>に3つおよびV<sub>L</sub>に3つ)を含有する、例えば、可変重鎖CDR1-3としてそれぞれSYWMH(配列番号:1)、QINPTTGRSQYNEKFKT(配列番号2)、およびWGLQPFAY(配列番号3)、および可変軽鎖CDR1-3としてそれぞれKASQDVSTAVA(配列番号7)、SASRYT(配列番号8)、およびQQHYSTPWT(配列番号9)。

40

## 【0052】

「抗体」には、限定されないが、特異的に抗原と結合する、およびジスルフィド結合で内部が結合している少なくとも2つの重(H)鎖と2つの軽(L)鎖、またはその抗原結

50

合部位を含む免疫グロブリンを含むべきである。各H鎖は重鎖可変領域（本明細書ではV<sub>H</sub>と略す）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は3つの定常ドメイン、C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、およびC<sub>H3</sub>を含む。各軽鎖は軽鎖可変領域（本明細書ではV<sub>L</sub>と略す）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は一つの定常ドメイン、C<sub>L</sub>を含む。V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域はさらに分割でき、相補性決定領域（CDR）とよばれる超可変性の領域が、フレームワーク領域（FR）とよばれる比較的保存された領域に点在する。各V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>は3つのCDRおよび4つのFRを含み、アミノ末端からカルボキシル末端へと以下の順番に並んでいる：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。

【0053】

A bの「抗原結合部位」（「抗原結合フラグメント」とも呼ばれる）またはその抗原結合部位とは、抗体の全長が結合する抗原に特異的に結合する能力を保持した抗体の1つ以上の配列（全長または全長抗体のフラグメント）を指す。抗原結合フラグメントの例にはF a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>、s c F v（一本鎖可変フラグメント）、F a b '、d s F v、s c ( F v )<sub>2</sub>、およびs c F v - F cを含む。

【0054】

「ヒト化」抗体とは、非ヒトA bのCDRドメインの外側の一部、ほとんど、またはすべてのアミノ酸配列が対応するヒト免疫グロブリン由来のアミノ酸配列と置き換えられたA bを指す。A bのヒト化形成の一つの実施形態としては、CDRドメイン外側にある一部、ほとんど、またはすべてのアミノ酸配列はヒト免疫グロブリン由来のアミノ酸配列と入れ替わるが、1つ以上のCDR領域の内側の一部、ほとんど、またはすべてのアミノ酸配列は不変である。アミノ酸の小規模な付加、欠失、挿入、置換または修飾は、それらがA bの特異的抗原への結合能を損なわない限りにおいては許容される。「ヒト化」A bは元のA bと近い抗原特異性を保持する。

【0055】

「キメラ抗体」は可変領域が一つの種に由来している、および定常領域が他の種に由来するA b、例えば、可変領域がマウスA b由来である、および定常領域がヒトA b由来であるA b、を指す。

【0056】

本明細書で使用する場合、「特異的な結合」とは、例えば表面プラズモン共鳴（SPR）によって測定される解離定数（K<sub>d</sub>）が約1 μMまたはそれ以下である、抗体による抗原への結合を指す。適切なアッセイシステムとしては、B I A c o r e（商標）（G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e s、M a r l b o r o u g h、M A）表面プラズモン共鳴システム、およびB I A c o r e（商標）動態評価ソフトウェア（例えばバージョン2.1）を含む。

【0057】

本抗体のCD40への結合は少なくとも一つのCD40の活性に拮抗的に働く。「CD40活性」には、限定されないが、T細胞の活性化（例えば、T細胞増殖またはサイトカイン分泌の誘導）、マクロファージの活性化（例えば、マクロファージ内での活性酸素種および酸化窒素の誘導）、およびB細胞の活性化（例えば、B細胞増殖、抗体アイソタイプ切り替え、または形質細胞への分化）を含む。CD40の活性は他の分子との相互作用によって仲介され得る。「CD40活性」にはCD40および、そのUniprot識別番号が括弧内に記載された以下の分子との間の機能的な相互作用を含む。

C A L R （ P 2 7 7 9 7 ） ;  
 E R P 4 4 （ Q 9 B S 2 6 ） ;  
 F B L （ P 2 2 0 8 7 ） ;  
 P O L R 2 H （ P 5 2 4 3 4 ） ;  
 R F C 5 （ P 4 0 9 3 7 ） ;  
 S G K 1 （ O 0 0 1 4 1 ） ;  
 S L C 3 0 A 7 （ Q 8 N E W 0 ） ;

10

20

30

40

50

S L C 3 9 A 7 ( Q 9 2 5 0 4 ) ;  
 T R A F 2 ( Q 5 T 1 L 5 ) ;  
 T R A F 3 ( Q 1 3 1 1 4 ) ;  
 T R A F 6 ( Q 9 Y 4 K 3 ) ;  
 T X N ( Q 5 T 9 3 7 ) ;  
 U G G T 1 ( Q 9 N Y U 2 ) ; および  
 U S P 1 5 ( Q 9 Y 4 E 8 ) 。

## 【 0 0 5 8 】

例えば、C D 4 0 「 活 性 」 に は T R A F 2 と の 相 互 作 用 を 含 む 。 C D 4 0 / T R A F 2 相 互 作 用 は N F - B お よ び J N K を 活 性 化 す る 。 Davies ら、Mol.Cell Biol.25:9806-19(2005)を参照。したがって、このC D 4 0 活 性 は、参 照 と 比 較 し て、C D 4 0 依 存 性 の 細 胞 N F - B お よ び J N K の 活 性 化 に よ っ て 決 定 さ れ 得 る 。

10

## 【 0 0 5 9 】

本明細書で使用する場合、「活性化」、「活性化する」、および「活性化された」という用語は測定可能なC D 4 0 の 活 性 が 参 照 に 比 し て 少 なく とも 1 0 % の 増 加 であ っ て、例 えば、少 なく とも 1 0 %、2 5 %、5 0 %、7 5 %、ま た は 1 0 0 %、ま た は そ れ 以 上 の 増 加 を 指 す。C D 4 0 活 性 が 「 拮 抗 さ れ る 」 と は、C D 4 0 の 活 性 が ア ン タ ゴ ニ ス ト 非 存 在 下 に 比 し て 少 なく とも 1 0 % 低 減 す る、例 示 的 な 実 施 形 態 に お い て は 少 なく とも 約 2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、ま た は 1 0 0 % ( す な わ ち 活 性 が 検 出 さ れ ない ) 低 減 す る 場 合 である。例 えば、抗 体 は C D 4 0 を 活 性 化 せ ず に、一 部 の ま た は 全 て の C D 4 0 活 性 と 拮 抗 す る 可 能 性 が 有 る。例 えば、該 抗 体 は B 細 胞 の 増 殖 を 活 性 化 し な く て も よ い。該 抗 体 は T 細 胞 に よ る サ イ ト カ イ ン 分 泌 を 活 性 化 し な く て も よ い、こ こ で、サ イ ト カ イ ン は I L - 2、I L - 6、I L - 1 0、I L - 1 3、T N F - 、お よ び I N F - から なる 群 より 選 択 さ れ た 少 なく とも 一 つ の サ イ ト カ イ ン である。

20

## 【 0 0 6 0 】

可 変 ド メ イ ン に は 対 応 す る ヒ ト 生 殖 系 列 型 抗 体 遺 伝 子 部 分 に コ ー ド さ れ た フ レ ー ム ワ ー ク 領 域 と 同 じ ア ミ ノ 酸 配 列 を 持 つ 1 つ 以 上 の フ レ ー ム ワ ー ク 領 域 ( F R ) を 含 ん で よ い。本 明 細 書 に 記 載 の 抗 体 に 使 用 す る た め に 好 ま し い フ レ ー ム ワ ー ク 配 列 は 本 明 細 書 に 記 載 の 抗 体 に 使 用 さ れ る フ レ ー ム ワ ー ク 配 列 に 構 造 的 に 近 い 配 列 である。V<sub>H</sub>C D R 1、2、お よ び 3 配 列、な ら び に V<sub>L</sub>C D R 1、2、お よ び 3 配 列 は、フ レ ー ム ワ ー ク 配 列 の 由 来 と な る 生 殖 系 列 型 免 疫 グ ロ ブ リ ン 遺 伝 子 内 に 見 つ か る 配 列 と 一 致 し た 配 列 を 有 す る フ レ ー ム ワ ー ク 領 域 内 に 融 合 さ れ 得 る、ま た は C D R 配 列 は 生 殖 系 列 の 配 列 と 比 し て 2 0 ま だ の、好 ま し く は 保 存 的 である、ア ミ ノ 酸 置 換 を 含 有 す る フ レ ー ム ワ ー ク 領 域 に 融 合 さ れ 得 る。例 えば、あ る 特 定 の 例 に お い て は フ レ ー ム ワ ー ク 領 域 内 の 残 基 の 変 異 が 抗 体 の 抗 原 結 合 能 の 維 持 ま た は 増 強 に 有 益 である こと が 見 出 さ れ た。(例 えば Q u e e n ら に 対 す る 米 国 特 許 第 5, 5 3 0, 1 0 1 号 ; 同 第 5, 5 8 5, 0 8 9 号 ; 同 第 5, 6 9 3, 7 6 2 号 ; 同 第 6, 1 8 0, 3 7 0 号 を 参 照 ) 。

30

## 【 0 0 6 1 】

例 示 的 な フ レ ー ム ワ ー ク 領 域 内 と し て 以 下 の 表 5 お よ び 表 6 を 含 む が、以 下 に 限 定 す る も の で は ない。

40

【表 5】

表5

重鎖フレームワーク領域	配列
FR1	実施例における表8 (配列番号53-75) または表 10 (配列番号4、13、および99-113) 中の任意のVH配列のアミノ酸残基1-30
FR2	実施例における表8 (配列番号53-75) または表 10 (配列番号4、13、および99-113) 中の任意のVH配列のアミノ酸残基36-49
FR3	実施例における表8 (配列番号53-75) または表 10 (配列番号4、13、および99-113) 中の任意のVH配列のアミノ酸残基67-98
FR4	実施例における表8 (配列番号53-75) または表 10 (配列番号4、13、および99-113) 中の任意のVH配列のアミノ酸残基107-117

10

【表 6】

表6

軽鎖フレームワーク領域	配列
FR1	実施例における表8 (配列番号76-98) または表10 (配列番号10、16、114-116) 中の任意のVL配列のアミノ酸残基1-23
FR2	実施例における表8 (配列番号76-98) または表10 (配列番号10、16、114-116) 中の任意のVL配列のアミノ酸残基35-49
FR3	実施例における表8 (配列番号76-98) または表10 (配列番号10、16、114-116) 中の任意のVL配列のアミノ酸残基57-88
FR4	実施例における表8 (配列番号76-98) または表10 (配列番号10、16、114-116) 中の任意のVL配列のアミノ酸残基98-107

20

【0062】

バリエーション可変ドメインはヒト化 Y 1 2 X X - 2 8、Y 1 2 X X - h z 4 0、または Y 1 2 X X - h z 4 2 配列の可変ドメインと、最大 1 0 アミノ酸、またはその間の何れかの整数値で異なってもよいが、ここで、該バリエーション可変ドメインは C D 4 0 に特異的に結合する。あるいは、バリエーション可変ドメインは、ヒト化 Y 1 2 X X - 2 8、Y 1 2 X X - h z 4 0、または Y 1 2 X X - h z 4 2 配列それぞれと比して少なくとも 9 0 % の配列同一性 (例えば、少なくとも 9 2 %、9 5 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性) を有し得る。非同一的なアミノ酸残基または二つの配列間で異なるアミノ酸はアミノ酸の置換、付加、または欠失を示す。二つの配列間で異なる残基は、B L A S T (登録商標) (米国国立医学図書館の登録商標) などの適切なアミノ酸配列アライメントアルゴリズムによって二つの配列を整列させたときに、非同一的な位置として現れる。

30

【0063】

例示的な本発明の C D 4 0 抗体はヒト C D 4 0 に特異的に結合する単離された抗体、またはその抗原結合部位を含み、ここで、該抗体は重鎖可変領域を含む第 1 ポリペプチド部位および軽鎖可変領域を含む第 2 ポリペプチド部位を含み、ここで、

40

該重鎖可変領域は ( i ) S Y W M H (配列番号 1) を含む C D R 1、Q I N P T T G R S Q Y N E K F K T (配列番号 2) を含む C D R 2、W G L Q P F A Y (配列番号 3) を含む C D R 3 ; ならびに ( i i ) S Y W M H (配列番号 1) を含む C D R 1、Q I N P S Q G R S Q Y N E K F K T (配列番号 1 2) を含む C D R 2、W G L Q P F A Y (配列番号 3) を含む C D R 3、の内の一つを含む ; および

該軽鎖可変領域は K A S Q D V S T A V A (配列番号 7) を含む C D R 1、S A S Y R Y T (配列番号 8) を含む C D R 2、Q Q H Y S T P W T (配列番号 9) を含む C D R 3

50

を含む。

【0064】

単離された抗体またはその抗原結合部位は1以上のCD40の活性に拮抗し得る。単離された抗体またはその抗原結合部位はキメラ抗体であり得る。例示的なキメラ抗体のための可変重鎖および可変軽鎖は実施例の表8に示す。単離された抗体またはその抗原結合部位はヒト化抗体であり得る。例示的なヒト化可変重鎖および可変軽鎖を実施例の表10に示す。単離された抗体またはその抗原結合部位はヒト重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域を含み得る。

【0065】

Fcドメインおよび定常領域

重鎖のカルボキシル末端側の「半分」は定常領域(Fc)と定義されており、エフェクター機能に主に関与する。本明細書で使用する場合、「Fcドメイン」という用語はKabatt, et al., Sequences of Immunological Interest、第5版、U.S. Dept. Health & Human Services、Washington、D.C. (1991)において定義されたCH2およびCH3定常ドメインを含む定常領域抗体配列を指す。Fc領域はヒトIgG由来であってもよい。例えばFc領域はヒトIgG1またはヒトIgG4Fc領域に由来してもよい。重鎖可変ドメインはFcドメインと融合し得る。可変ドメインのカルボキシル末端はFcCH2ドメインのアミノ末端と連結または融合してもよい。あるいは、可変ドメインのカルボキシル末端は、それ自身がFcドメインのアミノ末端と融合するリンカーアミノ配列のアミノ末端と連結または融合してもよい。あるいは可変ドメインのカルボキシル末端は、それ自身がFcCH2ドメインと融合するCH1ドメインのアミノ末端と連結または融合してもよい。任意には、タンパク質は、CH1ドメインの後にヒンジ領域の全体または一部を含んでいてもよい。任意にはアミノ酸リンカー配列は可変ドメインおよびFcドメインの間に存在している。軽鎖可変ドメインのカルボキシル末端はCLドメインのアミノ末端と連結または融合してもよい。

【0066】

重鎖CH1の例示的な配列は配列番号5の118-215のアミノ酸である(ASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKRV; 配列番号18)。

軽鎖CLの例示的な配列は配列番号11の108-214のアミノ酸である(RTVAA P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C ; 配列番号19)。

【0067】

抗体はヒトCD40に特異的に結合する第1可変ドメイン、およびFcドメインを含む第2ドメインを含む融合抗体であり得る。

【0068】

融合タンパク質に使用される例示的なFcドメインにはヒトIgGドメインを含み得る。例示的なヒトIgGFcドメインにはIgG4FcドメインおよびIgG1Fcドメインを含む。ヒトIgG重鎖遺伝子はC末端にリジンをコードしているが、血液循環中の切断の結果として内在性抗体からはこのリジンはしばしば消失している。哺乳類培養細胞で発現した場合には、C末端リジンを含むIgG重鎖を有する抗体も、C末端リジンの存在は変化的なレベルであり得る(Cai et al., 2011, Biotechnol Bioeng. 108(2): 404-12)。したがって、本明細書で開示される何れのIgG重鎖FcドメインのC末端リジンも除外され得る。

【0069】

本明細書に記載の単離された抗体または抗原結合部位は以下のアミノ酸配列を含むFcドメインを含み得る。

E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G ( P / K ) S V F L F P P K P K D T

LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQY(N/A)STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
 ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR(D/E)E(L/M)  
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV  
 L DSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ  
 KSLSLSLSPG(K/非存在)(Fcコンセンサス; 配列番号21)。括弧内の表記は  
 その位置であり得るアミノ酸の識別子を示す。例えば、kabatの238位は(P/K)  
 )と記載されており、プロリン(P)またはリジン(K)何れかであり得る。付加的な例  
 として、非制限コンセンサス配列を配列番号118-120に示す。

【0070】

本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位は、Fcガンマ受容体(FcR)に結合する残基であるkabatの238位に変異を含むヒトIgG1Fcドメインを含み得る、ここで、プロリン238(P238)はリジン(K)、セリン(S)、アラニン(A)、アルギニン(R)、およびトリプトファン(W)からなる群より選択された残基の一つに変異しており、およびここで、抗体またはその抗原結合部位は低減したFcRとの結合を有する。本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位はヒトIgG1Fcドメイン中にP238のリジンへの変異を有し得る。

【0071】

単離された抗体またはその抗原結合部位は配列番号22-29から選択されたアミノ酸配列を含むFcドメインを含む。

【0072】

上記IgG1Fcドメインを含む例示的な配列は：配列番号5、配列番号6、配列番号30、および配列番号31を含む。

【0073】

本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位はkabatの297位にアラニンの置換を含むヒトIgG1Fcドメインを含み得る。例えば、単離された抗体またはその抗原結合部位は配列番号32-39から選択されたアミノ酸配列を含むFcドメインを含む。

【0074】

本明細書に記載の単離された抗体またはその抗原結合部位は、(1)実施例中の表8もしくは表10から選択された可変重鎖(VH)、またはそのCDR、および/または(2)実施例中の表8もしくは表10から選択された可変軽鎖(VL)、またはそのCDRを、含んでもよい。

【0075】

本明細書で開示される単離された抗体またはその抗原結合部位はVh-hz12(配列番号13)およびVh-hz14(配列番号4)から選択される重鎖アミノ酸配列を含んでもよい。

【0076】

本明細書で開示される単離された抗体またはその抗原結合部位はVk-hz2(配列番号10)およびVk-hz3(配列番号16)から選択される軽鎖アミノ酸配列を含んでもよい。

【0077】

本明細書で開示される単離された抗体またはその抗原結合部位は以下からなる群より選択された抗体であってもよい：

- a) 配列番号5または6の重鎖および配列番号11の軽鎖を有するY12XX-hz28-P238K;
- b) 配列番号14または15の重鎖および配列番号17の軽鎖を有するY12XX-hz40-P238K; および
- c) 配列番号5または6の重鎖および配列番号17の軽鎖を有するY12XX-hz42-P238K。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 8 】

抗原結合部位が F v、F a b、F ( a b ' ) 2、F a b '、d s F v、s c F v、s c ( F v ) 2、ダイアボディ、および s c F v - F c からなる群より選択された、本明細書で開示される単離された抗体またはその抗原結合部位。

## 【 0 0 7 9 】

本明細書で開示される抗体またはその抗原結合部位は、抗体またはその抗原結合部位が治療剤と連結する、免疫コンジュゲートであり得る。

## 【 0 0 8 0 】

本明細書で開示される抗体またはその抗原結合部位は二重特異性抗体であり得、ここで、抗体またはその抗原結合部位が、抗体またはその抗原結合部位と異なる結合特異性を有する第2の機能部分と連結する。

## 【 0 0 8 1 】

本明細書で開示される抗体またはその抗原結合部位はさらに付加的な部分を含み得る。

## 【 0 0 8 2 】

本抗体の可変領域は「アミノ酸リンカー」、または「リンカー」によって F c ドメインと任意に連結してもよい。例えば、可変重鎖ドメインの C 末端はアミノ酸リンカーの N 末端と融合してもよく、および F c ドメインはリンカーの C 末端と融合してもよい。アミノ酸リンカーは任意の長さおよび、任意のアミノ酸の組み合わせの構成からなり得るが、連結したドメイン間の相互作用を低減するためには、リンカー長は比較的短くてもよい（例えば 5 またはそれ以下のアミノ酸）。リンカーのアミノ酸組成もまた、かさの大きい側鎖をもつアミノ酸、または二次構造をとりやすいアミノ酸の数を減らすために調節されてよい。適切なアミノ酸リンカーには長さが 3、4、5、6、7、10、15、20、または 25 アミノ酸までのものが含まれるが、これらに限定されない。代表的なアミノ酸リンカー配列には、G G G G S（配列番号 40）、および G G G G S の 2、3、4、または 5 コピー（配列番号 41 ~ 44 それぞれ）を含むリンカーが含まれる。表 7 に本開示における使用に適したリンカーの配列を示す。

## 【 表 7 】

表7 代表的なリンカーの配列

GGGGS	配列番号40
(GGGGS) <sub>2</sub>	配列番号41
(GGGGS) <sub>3</sub>	配列番号42
(GGGGS) <sub>4</sub>	配列番号43
(GGGGS) <sub>5</sub>	配列番号44
AST	配列番号45
TVAAPS	配列番号46
TVA	配列番号47
ASTSGPS	配列番号48

## 【 0 0 8 3 】

## 抗体の調製

抗体は通常の技術を用いて、CHO、293、COS、NSOなどの適切な哺乳類の宿主細胞株で生産、および精製し、その後プロテインAアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換、逆相技術などを含む方法の一つ、または組み合わせを用いて精製され得る。

## 【 0 0 8 4 】

当業者によく知られているように、複数のコドンが同じアミノ酸をコードし得る。よってタンパク質をコードする核酸はコドンの縮退を有する核酸を含む。本明細書で開示するポリペプチド配列は様々な種類の核酸でコードされ得る。遺伝暗号は世界的に共通でありよく知られている。本明細書で開示される任意のポリペプチド配列をコードする核酸は当

分野の従来知識に基づいて容易に着想および生産のために最適化され得る。該ポリペプチドをコードする可能性のある核酸の数は多いものの、遺伝子暗号の標準的な表と、コンピュータの補助があれば、通常の技術をもつ技術者は該ポリペプチドをコードする核酸配列のあり得るすべての組み合わせを容易に生成し得る。

【0085】

定常領域CH1およびFcドメインIgG1-P238Kを含むY12XX-hz28のY12XX重鎖可変ドメインをコードする代表的な核酸配列は以下である：

```

A T G A G G G C T T G G A T C T T C T T T C T G C T C T G C C T G G C C G G G A
G A G C G C T C G C A C A G G T G C A G C T G G T G C A G T C T G G T G C C G A
G G T C A A A A A G C C A G G C T C C A G C G T G A A G G T G A G C T G C A A G
G C C T C T G G C T A C G C T T T C A C C T C T T A T T G G A T G C A C T G G G
T G A G A C A G G C T C C T G G A C A G G G C C T G G A G T G G A T G G G C C A
G A T C A A C C C A A C C A C C G G C A G A A G C C A G T A C A A T G A G A A G
T T T A A G A C C C G C G T G A C C A T C A C A G C C G A C A A G T C C A C C A
G C A C A G C T T A T A T G G A G C T G T C T T C C C T G A G G T C C G A G G A
T A C A G C C G T G T A C T A T T G C G C T C G G T G G G G C C T G C A G C C T
T T C G C T T A C T G G G G C C A G G G C A C C C T G G T G A C A G T G A G C T
C T G C T A G C A C C A A G G G C C C A T C G G T C T T C C C C C T G G C A C C
C T C C T C C A A G A G C A C C T C T G G G G G C A C A G C G G C C C T G G G C
T G C C T G G T C A A G G A C T A C T T C C C C G A A C C G G T G A C G G T G T
C G T G G A A C T C A G G C G C C C T G A C C A G C G G C G T G C A C A C C T T
C C C G G C C G T C C T A C A G T C C T C A G G A C T C T A C T C C C T C A G C
A G C G T G G T G A C C G T G C C C T C C A G C A G C T T G G G C A C C C A G A
C C T A C A T C T G C A A C G T G A A T C A C A A G C C C A G C A A C A C C A A
G G T G G A C A A G A G A G T T G A G C C C A A A T C T T G T G A C A A A A C T
C A C A C A T G C C C A C C G T G C C C A G C A C C T G A A C T C C T G G G G G
G A A A G T C A G T C T T C C T C T T C C C C C A A A A C C C A A G G A C A C
C C T C A T G A T C T C C C G G A C C C C T G A G G T C A C A T G C G T G G T G
G T G G A C G T G A G C C A C G A A G A C C C T G A G G T C A A G T T C A A C T
G G T A C G T G G A C G G C G T G G A G G T G C A T A A T G C C A A G A C A A A
G C C G C G G G A G G A G C A G T A C A A C A G C A C G T A C C G T G T G G T C
A G C G T C C T C A C C G T C C T G C A C C A G G A C T G G C T G A A T G G C A
A G G A G T A C A A G T G C A A G G T C T C C A A C A A A G C C C T C C C A G C
C C C C A T C G A G A A A A C C A T C T C C A A A G C C A A A G G G C A G C C C
C G A G A A C C A C A G G T G T A C A C C C T G C C C C C A T C C C G G G A T G
A G C T G A C C A A G A A C C A G G T C A G C C T G A C C T G C C T G G T C A A
A G G C T T C T A T C C C A G C G A C A T C G C C G T G G A G T G G G A G A G C
A A T G G G C A G C C G G A G A A C A A C T A C A A G A C C A C G C C T C C C G
T G C T G G A C T C C G A C G G C T C C T T C T T C C T C T A C A G C A A G C T
C A C C G T G G A C A A G A G C A G G T G G C A G C A G G G G A A C G T C T T C
T C A T G C T C C G T G A T G C A T G A G G C T C T G C A C A A C C A C T A C A
C G C A G A A G A G C C T C T C C C T G T C T C C G G G T T G A (配列番号49)

```

。この配列内において、核酸1~51はシグナルペプチド(任意)をコードし、核酸52~402は重鎖可変領域をコードする、このうち、核酸141~155、核酸198~249、および核酸346~369は、重鎖のY12XX可変ドメインのCDR1、CDR2、CDR3をコードする。核酸403~696はCH1ドメインをコードし、および核酸697~1399はIgG1-P238Kをコードする。核酸1400~1402は終止コドンである。

【0086】

定常領域CLを含むY12XX-hz28のY12XX軽鎖可変ドメインをコードする

10

20

30

40

50

代表的な核酸配列を以下に示す：

A T G A G G G C T T G G A T C T T C T T T C T G C T C T G C C T G G C C G G G C  
 G C G C C T T G G C C G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C C C C T C C T T  
 C C T G T C T G C C T C C G T G G G C G A C A G A G T G A C C A T C A C C T G T  
 A A G G C T T C C C A G G A T G T G A G C A C A G C C G T G G C T T G G T A C C  
 A G C A G A A G C C A G G C A A G G C C C C A A G C T G C T G A T C T A T T C  
 C G C C T C T T A C A G G T A T A C C G G C G T G C C C T C T C G G T T C T C C  
 G G C A G C G G C T C T G G C A C A G A C T T T A C C C T G A C A A T C T C C A  
 G C C T G C A G C C T G A G G A T T T C G C C A C C T A C T A T T G C C A G C A  
 G C A C T A C T C C A C C C C A T G G A C A T T T G G C G G C G G C A C C A A G  
 G T G G A G A T C A A G C G T A C G G T G G C T G C A C C A T C T G T C T T C A  
 T C T T C C C G C C A T C T G A T G A G C A G T T G A A A T C T G G A A C T G C  
 C T C T G T T G T G T G C C T G C T G A A T A A C T T C T A T C C C A G A G A G  
 G C C A A A G T A C A G T G G A A G G T G G A T A A C G C C C T C C A A T C G G  
 G T A A C T C C C A G G A G A G T G T C A C A G A G C A G G A C A G C A A G G A  
 C A G C A C C T A C A G C C T C A G C A G C A C C C T G A C G C T G A G C A A A  
 G C A G A C T A C G A G A A A C A C A A A G T C T A C G C C T G C G A A G T C A  
 C C C A T C A G G G C C T G A G C T C G C C C G T C A C A A A G A G C T T C A A  
 C A G G G G A G A G T G T T A G (配列番号50)。この配列において、核酸1～51  
 はシグナルペプチド(任意)をコードし、核酸52～372は軽鎖可変領域をコードする  
 、このうち核酸121～153はCDR1、核酸199～219はCDR2、核酸316  
 ～342はCDR3をコードする。核酸373～693はCLをコードする。核酸694  
 ～696は終止コドンである。

10

20

【0087】

重鎖および/または軽鎖のコーディング配列はコーディング配列の5'末端に、例えばM  
 R A W I F F L L C L A G R A L A (配列番号51)などのシグナルペプチドを任意にコ  
 ードしてもよい。上記のように、このシグナルペプチドの例示的な核酸コーディング配列  
 はA T G A G G G C T T G G A T C T T C T T T C T G C T C T G C C T G G C C G G G  
 A G A G C G C T C G C A (配列番号52)である。

【0088】

したがって、本明細書で開示される抗体をコードする核酸についてもまた考慮する。か  
 かる核酸はベクター、例えば、p H E N - 1 (Hoogenboom et al. (1991) Nucleic Aci  
 ds Res. 19: 4133-4137) などの、適切な発現ベクターに挿入されてよい。該ベクター  
 および/または該核酸を含む単離された宿主細胞をさらに提供する。

30

【0089】

本開示の抗体は、適切な哺乳類の宿主細胞株、例えば、C H O (チャイニーズハムスタ  
 ー卵巣細胞)、293 (ヒト胎児腎293細胞)、C O S 細胞、N S O 細胞など、におい  
 て通常の技術のみを用いて生産および精製され、その後プロテインAアフィニティークロ  
 マトグラフィー、イオン交換、逆相技術などを含む方法の一つ、または組み合わせを用い  
 て精製され得る。

40

【0090】

医薬組成物および処置方法

医薬組成物は治療有効量の1以上の抗体および任意の医薬的に許容できる担体を含む。  
 医薬的に許容できる担体は、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキスト  
 ロース、グリセロール、エタノールなど、およびその組み合わせが含まれる。医薬的に許  
 容できる担体はさらに微量の補助物質、例えば、融合タンパク質の保存性や有効性を高め  
 る湿潤剤、乳化剤、保存剤、または緩衝剤を含み得る。組成物は投与後に活性のある成分  
 の迅速な、持続的な、または遅延した放出を提供するために製剤化され得る。適切な医薬  
 組成物およびそれらを調製する工程は当業者に知られている。例えば、Remington、THE  
 SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY、A. Gennaro、et al.、eds.、21st ed.、M

50

ack Publishing Co. (2005)を参照。

【0091】

医薬組成物は単独で、または併用治療において（すなわち同時に、または順次に）、免疫抑制剤/免疫調節剤および/または抗炎症剤と共に、投与されてよい。例示的な薬剤の種類の一つは細胞毒性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA4）変異分子である。CTLA4変異分子の1例が修飾したCTLA4-IgであるL104EA29Y-Ig（ペラタセプト）である。異なる免疫疾患は、患者ごとの基準に基づいて決定される免疫疾患の治療に有効な特異的な補助化合物の使用を要求し得る。例えば、医薬組成物は1以上の適切なアジュバント、例えば、サイトカイン（例えば、IL-10およびIL-13）または他の免疫刺激物質、例えば、ケモカイン、腫瘍関連抗原、およびペプチドとの併用によって投与されてよい。適切なアジュバントは当業者に知られている。

10

【0092】

かかる処置を必要とする患者における免疫疾患を処置する方法は治療有効量の本明細書で記載する抗体、またはその抗原結合部位の患者への投与を含み得る。さらに、治療有効量の本明細書で記載する抗体、またはその抗原結合部位の患者への投与を含む、かかる処置を必要とする患者における自己免疫疾患または炎症性疾患を処置または予防する方法を提供する。かかる処置を必要とする患者における免疫疾患の処置のための、および/または、かかる処置を必要とする患者における自己免疫疾患もしくは炎症性疾患の処置または予防のための、本開示の抗体またはその抗原結合部位、または医薬品として許容できるその塩の使用をまた提供し、その使用には治療有効量の抗体またはその抗原結合部位の患者への投与を含んでもよい。CD40を介したT細胞活性化への拮抗は、例えば自己免疫反応、移植拒絶反応、またはアレルギー反応の間に発生する望ましくないT細胞の反応を阻害し得るだろう。CD40を介したT細胞活性化の阻害はこれらの疾患の進行および/または重症度を緩和し得るだろう。

20

【0093】

かかる処置を必要とする患者における免疫疾患の処置のための、および/または、自己免疫疾患もしくは炎症性疾患の処置または予防のための、本開示の抗体およびその抗原部位、または医薬的に許容できるその塩の医薬品の調製における使用をまた、提供する。該医薬品は例えば免疫抑制剤/免疫調節剤、および/または抗炎症剤と併用して投与され得る。

【0094】

本明細書で使用する場合、「患者」とは動物、例えば哺乳類を意味し、ヒトを含む。患者は免疫疾患を持つと診断され得る。「処置」または「処置する」または「処置の」とは症状、障害、状態、または疾患の進行または重症度の軽減に関連する工程を指す。「免疫疾患」とは、細胞性および/または液性免疫反応を含む、個体における免疫反応の発生に関連する任意の疾患を指す。免疫疾患の例には、炎症、アレルギー、自己免疫疾患、または移植片関連疾患を含むが、これらに限定しない。よって患者は自己免疫疾患または炎症性疾患を持つと診断され得る。「自己免疫疾患」とは細胞性および/または液性の免疫反応を含む、個体における自己免疫反応の発生に関連する任意の疾患を指す。自己免疫疾患の例として潰瘍性大腸炎やクローン病を含む炎症性腸疾患（IBD）があるが、これらに限定しない。その他の自己免疫疾患には、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、関節リウマチ、糖尿病、乾癬、強皮症、およびアテローム性動脈硬化症を含む。移植片関連疾患には、移植片対宿主病（GVHD）、急性移植拒絶反応、および慢性移植拒絶反応を含む。

30

40

【0095】

本開示の抗体の投与によって処置され得る疾患は、アジソン病、アレルギー、アナフィラキシー、強直性脊椎炎、喘息、アテローム性動脈硬化症、アトピー性アレルギー、耳の自己免疫疾患、目の自己免疫疾患、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、気管支喘息、冠状動脈性心臓病、クローン病、糖尿病、精巣上体炎、糸球体腎炎、パセドウ病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、炎症性腸疾患、組換え医薬品に対する免疫反応（例えば、血友病患者の第VII因子）、ループス腎炎、全身

50

性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、移植拒絶反応、血管炎、および潰瘍性大腸炎からなる群より選択され得る。

【0096】

医薬組成物は単独で、または併用治療として（すなわち同時にまたは順次に）、免疫抑制剤/免疫調節剤および/または抗炎症剤と共に、投与されてよい。異なる免疫疾患は、患者ごとの基準に基づいて決定される免疫疾患の処置に有効な特異的な補助化合物の使用を要求し得る。例えば、医薬組成物は1以上の適切なアジュバント、例えば、サイトカイン（例えば、IL-10およびIL-13）または他の免疫刺激物質、例えば、ケモカイン、腫瘍関連抗原、およびペプチドの併用によって投与されてよい。適切なアジュバントは当業者に知られている。

10

【0097】

抗体、またはその抗原結合部位、または医薬品組成物を投与するために、任意の適切な方法または経路が使用され得る。投与経路としては、例えば、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、筋肉内投与を含む。抗体の治療有効投与用量は、非常に多くの要因に依存しており、例えば、処置される免疫疾患の種類や重症度、併用治療の使用、抗体またはその抗原結合部位または医薬品組成物の投与経路、および患者の体重、を含む。ドメイン抗体の治療有効量の非制限範囲は患者の体重に対して、0.1 - 20ミリグラム/キログラム（mg/kg）であり、一態様では、1 - 10mg/kgである。

【0098】

キット

ヒト患者の免疫疾患の処置に有用なキットが提供される。ヒト患者の自己免疫疾患または炎症性疾患の処置または予防に有用なキットもまた提供される。該キットは（a）本開示の抗体、またはその抗原結合部位の投与量、および（b）抗体またはその抗原結合部位を免疫疾患の処置方法において使用するための説明書、もしくは抗体またはその抗原結合部位を患者の自己免疫疾患や炎症性疾患の治療または予防方法において使用するための説明書を含む。

20

【0099】

本明細書で使用する「説明書」という用語は、キットにおいて、本発明の組成物および/または化合物の有用性を伝達するために使用され得る、出版物、録画、図、その他任意の表現媒体を含む。キットの説明書は、例えば、本発明の化合物および/または組成物を含む容器に貼付するか、または化合物および/または組成物を含む容器と一緒に出荷することができる。あるいは、受領者が説明書および化合物を共同で使用することを意図して、説明書を容器とは別に出荷してもよい。説明書の配達は、例えば、キットの有用性を伝達する出版物または他の表現媒体を物理的に配送する方法であってよい、もしくは、その代わりに電子的な送信、例えば、コンピューターを用いた電子メールまたはウェブサイトからのダウンロードによって取得されてもよい。

30

【実施例】

【0100】

実施例1：マウス抗ヒトCD40抗体のヒトCD40への結合

40

マウスの抗ヒトCD40抗体を生産し、ヒトCD40との結合を表面プラズモン共鳴（SPR）によって試験した。各抗体のVhおよびVk配列を表8に示す。

50

【表 8 - 1】

表8 マウス抗ヒトCD40可変重鎖および軽鎖の配列

ID	VH配列	VL配列
	ADX_Y1060.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1060.ZZ0-1-Vk
ADX_Y106 0.ZZ0-1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG YTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWI NPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGY CTNGVCSYFDYWGQGLTVTVSS (配列番号53)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTTCRASQGI YSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQANIFPLTFGGGKVEIK (配列番号76)
	ADX_Y1072.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1072.ZZ0-1-Vk
ADX_Y107 2.ZZ0-1	QVQFQQSGAELARPGASVKLSCKASG YTFTSYWMQWVKQRPGQGLEWIGTIY PGDGDSRYNQKFKGKALLTADKSSSIA YMQNLNLSAEDSAVYFCARFSLYDGYF YYFDYWGQGTTLTVSS (配列番号54)	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSL VHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DLGIYFCSQSTHFPYTFGGGKLEIK (配列番号77)
	ADX_Y1234.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1234.ZZ0-1-Vk
ADX_Y123 4.ZZ0-1	EVQLVESGGGLVKGPGSLKLSAASGF AFSSYDMSWVRQTPEKRLWVAYINSG VGNTYYPDTVKGFRFTISRDNKNTLYL QMSSLKSEDTAMYICARHGNYAWFAF WGQGLTVTVSA (配列番号55)	DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQSIG TSIHWYQQRTIGSPRLLIKYASESISGIPSR FSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQI NSWPLTFGAGTKLELK (配列番号78)

10

20

【表 8 - 2】

	ADX_Y1236.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1236.ZZ0-1-Vk
ADX_Y123 6.ZZ0-1	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASG FTFSSFGMHWRQAPEKGLEWVAYISS GSSTIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFL QMTSLRSEDAMYICARYGNAMDY WGQGTSVTVSS (配列番号56)	DIVMTQSQKFMSTSVGDRISITCKASQNV RTAVAWYQQKPGQSPKALIYLASNHT GVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEAAAT YYCQQRSSYPLTFGAGTKLELK (配列番号79)
	ADX_Y1238.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1238.ZZ0-1-Vk
ADX_Y123 8.ZZ0-1	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASG YAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINP GSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSDDSAVYFCARSQLGRRFDY WGQGTTLTVSS (配列番号57)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VRTGVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRNT GVPDRFTGSRSGTDFTFIISVQAEDLA VYCCQQHYSPPYTFGGGKLEIK (配列番号80)
	ADX_Y1241.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1241.ZZ0-1-Vk
ADX_Y124 1.ZZ0-1	EFQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASG YTFTNYIIQWVKKQPGQGLEWIGYINP YSSETNYNEKFKGKATLTSDKSSSTAY MELSSLTSEDSAIYFCARDLIGNYWGQ GTTLTVSS (配列番号58)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRH TGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDL ADYFCQQYSSYPLTFGAGTKLELK (配列番号81)

30

40

50

【表 8 - 3】

	ADX_Y1242.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1242.ZZ0-1-Vk
ADX_Y124 2.ZZ0-1	EFQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASG YSFTSYVMHWVKQKPGQALEWIGYINP SNDGSEYNERFKGKATLTSDKSSTTAY MELSSLTSEDSAVYYCARWAPYPFAYW GQGTLVTVSA (配列番号59)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLA VYYCQQHYSTPYTFGGGTKLEIK (配列番号82)
	ADX_Y1249.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1249.ZZ0-1-Vk
ADX_Y124 9.ZZ0-1	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASG YTFTSYTMHWVKQRPGQGLEWIGYID PSSHYTNYNQKFKGTATLTADKSSNTA YMQSSLTSEDSAVYYCARDYRYAYWY FDVWGAGTTLTVSS (配列番号60)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (配列番号83)
	ADX_Y1256.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1256.ZZ0-1-Vk
ADX_Y125 6.ZZ0-1	QVQLQQSGAELAKPGSSVKMSCKASG YAFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGYIN PTTGYSAYNQKFKDKATLTADKSSSTA YLQLTSLTSEDSAVYFCSRWGLPPFAY WGQGTLVTVSA (配列番号61)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (配列番号84)
	ADX_Y1257.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1257.ZZ0-1-Vk
ADX_Y125 7.ZZ0-1	QVQLQQSGAELAKPGSSVKMSCKASG YAFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGYIN PTTGYSAYNQKFKAKTTLTADKSSSTA YMQLSLTFEDSAVYFCSRWGLPPFAY WGQGTLVTVSA (配列番号62)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (配列番号85)
	ADX_Y1258.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1258.ZZ0-1-Vk
ADX_Y125 8.ZZ0-1	QVQLQQSGAELAKPGSSVKMSCKASG YAFTSYWMHWIKQRPGQGLEWIGFINP TTGYSEYNQKFKDKATLTADKSSSTAY MQLNSLTSEDSAVYFCARWGLPPFAY WGQGTLVTVSA (配列番号63)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (配列番号86)
	ADX_Y1259.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1259.ZZ0-1-Vk
ADX_Y125 9.ZZ0-1	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKTSG YSFTSYWMHWIKQRPGQGLEWIGFINP TTGYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTAY MQLSSLSEDSAVYYCSRWGLPPFAYW GQGTLVTVSA (配列番号64)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (配列番号87)

10

20

30

40

【表 8 - 4】

	ADX_Y1260.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1260.ZZ0-1-Vk
ADX_Y126 0.ZZ0-1	QVQLQQSGAELTKPGASVKMSCKASG YSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGSIN PSTGYTEDNQKFKDKATLTADKSSTTA YMQLSLTSSEDSAVYYCARWGLPPFAY WGQGTLVTVSA (配列番号65)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (配列番号88)
	ADX_Y1261.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1261.ZZ0-1-Vk
ADX_Y126 1.ZZ0-1	QVQLQQSGAERAKPGASVKMSCKASG YSFTSYWMHWIKQRPGQGLEWIGFINP NTGHTDYNQKFKDKATLTADKSSSTA YMQLSLTSSEDSAVYFCRWGLPPFAY WGQGTLVTVSA (配列番号66)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (配列番号89)
	ADX_Y1262.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1262.ZZ0-1-Vk
ADX_Y126 2.ZZ0-1	QVQLQQSGAELAKPGSSVKMSCKASG YAFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGYIN PTTGYSAYNQKFKDKATLTADKSSSTA YMQLSLTSSEDSAVYYCARWDPRPFAY WGQGTLVTVSA (配列番号67)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGYGTDFFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (配列番号90)
	ADX_Y1263.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1263.ZZ0-1-Vk
ADX_Y126 3.ZZ0-1	QVQLQQSGAELAKPGTSVKMSCKASG YSFTSYVHWVKERPGQGLEWIGHTN PNTGYTEYNQKFKDKATLTVDRSSSTA YMQLSLTSSEDSAVYYCARWDPRPFAY WGQGTLVTVSA (配列番号68)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (配列番号91)
	ADX_Y1264.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1264.ZZ0-1-Vk
ADX_Y126 4.ZZ0-1	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCRASG YSFSSYWMHWVKQRPGQGLEWIGSINP GNSDAFYNNQKFKGKAKLTAVTSASTA YMESSLTNEEDSAVYYCTRWGLPPFAY WGQGTLVTVSA (配列番号69)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLA VYYCHQHYSTPWTFGGGTKLEIK (配列番号92)
	ADX_Y1265.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1265.ZZ0-1-Vk
ADX_Y126 5.ZZ0-1	EVQLQQSGTVLAGPGASVKMSCKASG YSFTSYWMHWVKQRPGQDLEWIGTIN PGKGDSNYNQKFKGKAKLTAVTSAST AYMELSSLTNEEDSAVYYCTRWGLPPFA YWGQGTLVTVSA (配列番号70)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (配列番号93)

10

20

30

40

【表 8 - 5】

	ADX_Y1266.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1266.ZZ0-1-Vk	
ADX_Y126 6.ZZ0-1	QVQLQQPGAELVKPGASVRLSCKASG YSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGQIN PSNGRTQYNEKFKSMATLTVDKSSSTA YIQLSSLTSEDSAVYYCARWGLQPFAY WGQGTLVTVSA (配列番号71)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFTGGGTTKLEIK (配列番号94)	
	ADX_Y1267.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1267.ZZ0-1-Vk	10
ADX_Y126 7.ZZ0-1	QVQLQQPGAELVKPGASVRLSCEASG YSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGQIN PSNGRTQYNEKFKSMATLTVDKSSSTA YIQLNSLTSEDSAVYYCARWGLQPFAY WGQGTLVTVSA (配列番号72)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLA VYYCLQHYTTPWTFTGGGTTKLEIK (配列番号95)	
	ADX_Y1268.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1268.ZZ0-1-Vk	20
ADX_Y126 8.ZZ0-1	QVQLQQPGAELVKPGASVRLSCKASG YAFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGQIN PSNGRSQYNEKFKTMATLTVDKSSSTA YIQLSSLTSEDSAVYYCARWGLQPFAY WGQGTLVTVSA (配列番号73)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLA VYYCQQHYSTPWTFTGGGTTKLEIK (配列番号96)	
	ADX_Y1269.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1269.ZZ0-1-Vk	30
ADX_Y126 9.ZZ0-1	QVQLQQSGAELPRPGASVKMSCKASG YTFTDYTVHWVKQRPGQGLEWIGYIN PSSSYTSYDQKFKDKATVTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARRTMYWYFDI WGAGTTVTVSS (配列番号74)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQD VSPNVAWYQQKPGQSPKLLIYSTSYRYT GVPDRFTGSRSGTDFTFITSSVQAEDLAI YYCQQHYSTPLTFGAGTKLELK (配列番号97)	
	ADX_Y1297.ZZ0-1-Vh	ADX_Y1297.ZZ0-1-Vk	40
ADX_Y129 7.ZZ0-1	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASG YTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEID PSDSYTNYNQNFKGKATLTVDKSSSTA YMQSSLTSEDSAVYYCARETYYYGSR FPYWGQGTLVTVSA (配列番号75)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSVTCKASQ NVRINVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRY SGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDL AEYFCQQYNTYPLTFGAGTKLELK (配列番号98)	

## 【 0 1 0 1 】

ヒトCD40モノマーの、プロテインAセンサーチップ表面に捕捉化されたマウス抗ヒトCD40抗体への結合における、CD40の動態および親和性のデータをSPRによって評価した。データを表9に示す。示されたデータは、CD40アナライトの単一濃度(1 μM)におけるものであり、よって見かけの値(app)として報告する。

40

50

## 【表 9】

表9 SPR動態/親和性データ

抗体	$K_{a,app}$ (1/Ms)	$K_{d,app}$ (1/s)	$KD_{,app}$ (M)
ADX_Y1072.ZZ0-1	7.7E+04	9.2E-03	1.2E-07
ADX_Y1238.ZZ0-1	5.5E+04	1.2E-04	2.2E-09
ADX_Y1258.ZZ0-1	1.7E+04	1.3E-04	7.9E-09
ADX_Y1260.ZZ0-1	5.2E+04	2.1E-04	4.0E-09
ADX_Y1262.ZZ0-1	3.7E+05	2.5E-03	6.6E-09
ADX_Y1264.ZZ0-1	1.4E+04	2.3E-04	1.7E-08
ADX_Y1267.ZZ0-1	3.7E+05	4.1E-04	1.1E-09
ADX_Y1268.ZZ0-1	3.2E+05	4.6E-04	1.4E-09

10

## 【0102】

SPRデータおよび配列データに基づいて、3つの抗体、ADX\_Y1258.ZZ0-1、ADX\_Y1262.ZZ0-1、およびADX\_Y1268.ZZ0-1をヒト化のために選択した。

## 【0103】

実施例2：ヒト化およびY12XXヒト化バリエーションの選択

20

ヒト化の背景/手順はWO2017004006内のセクションII「改変および修飾抗体」で議論されており、それは参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。この解析に基づいて、9つのヒト化Vh配列(Vh-hz1、Vh-hz2、Vh-hz3、Vh-hz4、Vh-hz5、Vh-hz6、Vh-hz9、Vh-hz10、およびVh-hz11)および3つのヒト化Vk配列(Vk-hz1、Vk-hz2、およびVk-hz3)、が試験のために選択された。さらに、5つのヒト化Vh配列(Vh-hz7、Vh-hz8、Vh-hz12、Vh-hz13、Vh-hz14)は、設計された化学物質の責任リスクの軽減を意図した変異を含むように設計された。そのような変異には、Y1262\_\_IGHV1.6908における潜在的な加水分解のリスクを軽減するためのD100Q(Y1262\_\_IGHV1.6908-D100Q)およびP101A変異(Y1262\_\_IGHV1.6908-P101A)を含む。そのような変異はまた、Y1268\_\_IGHV1.6908における潜在的な脱アミド化リスクを軽減するためのN55Q(Y1268\_\_IGHV1.6908-N55Q)、G56A(Y1268\_\_IGHV1.6908-G56A)、およびS54T-N55T2重変異(Y1268\_\_IGHV1.6908-S54T-N55T)を含む。S54T-N55T2重変異はADX\_Y1262.ZZ0-1-Vhのこれらの位置において見つかる対応するアミノ酸残基に基づいて設計された。表10を参照。

30

## 【0104】

これらのバリエーションの配列を表10に示した。

40

50

【表 1 0 - 1】

表 1 0			
ID	可変Hz#	配列番号	配列
Y1258-Vh	Vh-C1	99	QVQLQQSGAELAKPGSSVKMSCKASGYAFTSYWMHW IKQRPGQGLEWIGFINPTTGYSEYNQKFKDKATLTADK SSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARWGLPPFAYWGQGT LVTVSA
Y1258_IGHV1.690 8-Vh	Vh-hz1	100	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMHW VRQAPGQGLEWMGFINPTTGYSEYNQKFKDRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGLPPFAYWGQG TLVTVSS
Y1258_IGHV1.690 8_A40R-Vh	Vh-hz2	101	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMHW VRQRPQGQGLEWMGFINPTTGYSEYNQKFKDRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGLPPFAYWGQG TLVTVSS
Y1258_IGHV1.690 8_ A40R-M48I-S8 4N-Vh	Vh-hz3	102	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMHW VRQRPQGQGLEWIGFINPTTGYSEYNQKFKDRVTITADK STSTAYMELNSLRSED TAVYYCARWGLPPFAYWGQGT LVTVSS
Y1262-Vh	Vh-C2	103	QVQLQQSGAELAKPGSSVKMSCKASGYAFTSYWMHW VKQRPGQGLEWIGYINPTTGYSAYNQKFKDKATLTAD KSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARWDPRPFAYWGQG TLVTVSA
Y1262_IGHV1.690 8-Vh	Vh-hz4	104	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMHW VRQAPGQGLEWMGYINPTTGYSAYNQKFKDKATLTA DKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDPRPFAYWGQ GTLVTVSS
Y1262_IGHV1.690 8_A40R-Vh	Vh-hz5	105	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMHW VRQRPQGQGLEWMGYINPTTGYSAYNQKFKDKATLTA DKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDPRPFAYWGQ GTLVTVSS
Y1262_IGHV1.690 8_A40R-M48I-S84 N-Vh	Vh-hz6	106	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMHW VRQRPQGQGLEWIGYINPTTGYSAYNQKFKDKATLTAD KSTSTAYMELNSLRSED TAVYYCARWDPRPFAYWGQG TLVTVSS
Y1262_IGHV1.690 8-D100Q-Vh	Vh-hz7	107	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMHW VRQAPGQGLEWMGYINPTTGYSAYNQKFKDKATLTA DKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWQPRPFAYWGQ GTLVTVSS
Y1262_IGHV1.690 8-P101A-Vh	Vh-hz8	108	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFTSYWMHW VRQAPGQGLEWMGYINPTTGYSAYNQKFKDKATLTA DKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWDARPFAYWGQ GTLVTVSS

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 2】

Y1268-Vh	Vh-C3	109	QVQLQQPGAELVKPGASVRLSCKASGYAFTSYWMHW VKQRPGQGLEWIGQINPSNGRSQYNEKFKTMATLTVD KSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCARWGLQPFAYWGQGT LVTVSA
Y1268_IGHV1.690 8-Vh	Vh-hz9	110	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFTSYWMHW VRQAPGQGLEWMGQINPSNGRSQYNEKFKTRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWGLQPFAYWGQG TLVTVSS
Y1268_IGHV1.690 8_A40R-Vh	Vh-hz10	111	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFTSYWMHW VRQRPQGQGLEWMGQINPSNGRSQYNEKFKTRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWGLQPFAYWGQG TLVTVSS
Y1268_IGHV1.690 8_ A40R-M48I-Vh	Vh-hz11	112	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFTSYWMHW VRQRPQGQGLEWIGQINPSNGRSQYNEKFKTRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWGLQPFAYWGQGT LVTVSS
Y1268_IGHV1.690 8-N55Q-Vh	Vh-hz12	13	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFTSYWMHW VRQAPGQGLEWMGQINPSQGRSQYNEKFKTRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWGLQPFAYWGQG TLVTVSS
Y1268_IGHV1.690 8-G56A-Vh	Vh-hz13	113	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFTSYWMHW VRQAPGQGLEWMGQINPSNARSQYNEKFKTRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWGLQPFAYWGQG TLVTVSS
Y1268_IGHV1.690 8-S54T-N55T-Vh	Vh-hz14	4	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFTSYWMHW VRQAPGQGLEWMGQINPTTGRSQYNEKFKTRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARWGLQPFAYWGQG TLVTVSS

10

20

30

【表 1 0 - 3】

Y1258-Vk	Vk-C1	114	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQ QKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFFTIS SVQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGKLEIK
Y1262-Vk	Vk-C2	115	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQ QKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTIS SVQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGKLEIK
Y1258_IGKV1.330 1-Vk	Vk-hz1	116	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFFTISSL QPEDIATYYCQQHYSTPWTFGGGKVEIK
Y1258_IGKV1.390 2-Vk	Vk-hz2	10	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGKVEIK
Y1258_IGKV3.150 1-Vk	Vk-hz3	16	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQDVSTAVAWYQ QKPGQAPRLLIYSASYRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYCQQHYSTPWTFGGGKVEIK

40

50

## 【0105】

表10はBIAcore(商標)表面プラズモン共鳴(SPR)を用いたCD40結合能解析およびオクテットBLI力価解析(後述)のためのヒト化抗体の構築およびキメラ抗体コントロールの構築に使用する重鎖および可変軽鎖ドメインの配列を提供する。

## 【0106】

Vh配列はIgG1-p238Kアイソタイプ(CH1-IgG1-P238K;配列番号25)でフォーマットされた。V配列は全長軽鎖として共通のCL配列(配列番号11の108~214アミノ酸)でフォーマットされた。表11において、「Y1258」および「Y1262」はマウス可変領域およびヒト定常領域を含むキメラ分子を指す。ヒト化HC構築物およびLC構築物、ならびにキメラY1258およびY1262分子の様々な異なる組み合わせは、力価解析およびCD40結合能解析のために3ミリリットル(ml)の上清として発現された。この分子ファミリーは、異なる重鎖/軽鎖ペアを一意に識別するために、「Y12XX」という接頭語と「hz#」という接尾語でまとめて識別された。

10

## 【0107】

力価解析は、上清からプロテインAセンサーチップを用いて抗体を捕捉する、および捕捉反応を測定し、コントロール抗体サンプルを用いて得られた標準曲線と比較することによる、バイオレイヤー干渉法(BLI)を用いて、OctetRED装置(ForteBio)上で行った。SPRデータは、プロテインA表面上に抗体を捕捉、ならびに500nMおよび50nM注入したヒトCD40アナライトの結合を試験することで、BIAcore(商標)T200装置(GEHealthcare)を用いて取得した。2つの濃度のhCD40モノマーの動態データに1:1ラングミュアモデルを適合させ、これらの相互作用の動態および親和性の値の推定値を算出し、異なる分子の比較を行った。

20

## 【0108】

オクテット力価およびBIAcore(商標)SPR CD40結合データを表11に提供した。上清(「sup」)サンプルの試験に加えて、ヒト野生型IgG1fアイソタイプ【化6】

```
(ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVKRVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK;配列番号117)
```

30

を含む精製キメラY1258、Y1262およびY1268抗体をコントロールとしてSPRで試験した;これらは表11中で「Y1258-hIgG1f」、「Y1632-hIgG1f」、および「Y1268-hIgG1f」と名付け、ならびにVhおよびVk鎖を「Chim-P」として表示した。

40

【表 1 1 - 1】

表 1 1 オクテット力価およびBIAcore<sup>(商標)</sup> SPR CD40結合データ

抗体ID	Vh	Vk	サンプル	力価 ( $\mu\text{g/ml}$ )	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)
Y1258-hIgG1f	Chim-P	Chim-P	精製	n/a	5.8E+04	5.9E-07	1.0E-11
Y1258	Vh-C1	Vk-C1	上清	54.2	5.6E+04	3.8E-06	6.7E-11
Y12XX-hz1	Vh-hz1	Vk-hz1	上清	3.8	1.5E+04	1.6E-05	1.1E-09
Y12XX-hz15	Vh-hz1	Vk-hz2	上清	34.6	1.6E+04	1.3E-04	8.0E-09
Y12XX-hz29	Vh-hz1	Vk-hz3	上清	56.7	3.7E+04	2.6E-06	6.9E-11
Y12XX-hz2	Vh-hz2	Vk-hz1	上清	4.5	1.7E+04	7.1E-05	4.1E-09
Y12XX-hz16	Vh-hz2	Vk-hz2	上清	58.6	2.0E+05	6.4E-04	3.2E-09
Y12XX-hz30	Vh-hz2	Vk-hz3	上清	82.6	4.1E+04	7.3E-07	1.8E-11
Y12XX-hz3	Vh-hz3	Vk-hz1	上清	6.4	1.5E+04	6.7E-05	4.5E-09
Y12XX-hz17	Vh-hz3	Vk-hz2	上清	50.7	3.7E+05	7.7E-02	2.1E-07
Y12XX-hz31	Vh-hz3	Vk-hz3	上清	93.9	4.1E+04	2.9E-07	7.0E-12
Y1262-hIgG1f	Chim-P	Chim-P	精製	n/a	4.8E+05	5.5E-03	1.2E-08
Y1262	Chim	Chim	上清	92.2	3.5E+05	2.8E-03	8.0E-09
Y12XX-hz4	Vh-hz4	Vk-hz1	上清	4.7	4.6E+05	2.2E-03	4.7E-09
Y12XX-hz18	Vh-hz4	Vk-hz2	上清	73.6	3.5E+05	2.4E-03	7.1E-09
Y12XX-hz32	Vh-hz4	Vk-hz3	上清	104.3	2.9E+05	3.0E-03	1.0E-08
Y12XX-hz5	Vh-hz5	Vk-hz1	上清	4.5	3.5E+05	2.5E-03	7.2E-09
Y12XX-hz19	Vh-hz5	Vk-hz2	上清	56.7	3.8E+05	2.3E-03	6.2E-09
Y12XX-hz33	Vh-hz5	Vk-hz3	上清	85.5	2.9E+05	3.3E-03	1.1E-08
Y12XX-hz6	Vh-hz6	Vk-hz1	上清	6.7	3.8E+05	2.4E-03	6.4E-09
Y12XX-hz20	Vh-hz6	Vk-hz2	上清	50.3	3.1E+05	2.5E-03	8.2E-09
Y12XX-hz34	Vh-hz6	Vk-hz3	上清	93.7	3.7E+05	2.8E-03	7.6E-09
Y12XX-hz8	Vh-hz8	Vk-hz1	上清	11.2	7.2E+05	1.5E-01	2.1E-07
Y12XX-hz22	Vh-hz8	Vk-hz2	上清	49.1	3.7E+05	7.9E-02	2.1E-07
Y12XX-hz36	Vh-hz8	Vk-hz3	上清	136.7	3.9E+05	1.0E-01	2.5E-07

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

Y1268-hIgG1f	Chim-P	Chim-P	精製	n/a	4.0E+05	1.3E-03	3.2E-09
Y12XX-hz9	Vh-hz9	Vk-hz1	上清	5.1	2.0E+05	8.9E-04	4.6E-09
Y12XX-hz23	Vh-hz9	Vk-hz2	上清	59.4	2.0E+05	6.4E-04	3.2E-09
Y12XX-hz37	Vh-hz9	Vk-hz3	上清	138.4	2.6E+05	8.4E-04	3.3E-09
Y12XX-hz10	Vh-hz10	Vk-hz1	上清	8.6	2.0E+05	7.3E-04	3.6E-09
Y12XX-hz24	Vh-hz10	Vk-hz2	上清	48.1	1.9E+05	8.2E-04	4.4E-09
Y12XX-hz38	Vh-hz10	Vk-hz3	上清	185.5	2.5E+05	8.8E-04	3.6E-09
Y12XX-hz11	Vh-hz11	Vk-hz1	上清	7.5	1.8E+05	8.8E-04	5.0E-09
Y12XX-hz25	Vh-hz11	Vk-hz2	上清	55.4	1.9E+05	6.4E-04	3.4E-09
Y12XX-hz39	Vh-hz11	Vk-hz3	上清	134.2	2.4E+05	8.4E-04	3.5E-09
Y12XX-hz12	Vh-hz12	Vk-hz1	上清	2.7	1.7E+05	1.4E-03	8.3E-09
Y12XX-hz26	Vh-hz12	Vk-hz2	上清	36.8	1.6E+05	1.2E-03	7.5E-09
Y12XX-hz40	Vh-hz12	Vk-hz3	上清	99.8	2.4E+05	1.1E-03	4.7E-09
Y12XX-hz13	Vh-hz13	Vk-hz1	上清	3.0	2.1E+05	8.3E-04	3.9E-09
Y12XX-hz27	Vh-hz13	Vk-hz2	上清	49.5	1.9E+05	8.8E-04	4.7E-09
Y12XX-hz41	Vh-hz13	Vk-hz3	上清	52.7	2.5E+05	9.4E-04	3.8E-09
Y12XX-hz14	Vh-hz14	Vk-hz1	上清	5.0	1.7E+05	8.3E-04	5.0E-09
Y12XX-hz28	Vh-hz14	Vk-hz2	上清	70.1	1.8E+05	6.2E-04	3.5E-09
Y12XX-hz42	Vh-hz14	Vk-hz3	上清	100.0	2.4E+05	8.3E-04	3.5E-09

10

20

## 【0109】

ある重鎖構築物において、力価は一般的にV k - h z 3（配列番号18）を含む軽鎖と対にした際に最も高く、V k - h z 2（配列番号10）を含む軽鎖と対にした重鎖においてはより低く、軽鎖を含むV k - h z 1（配列番号116）と対にした重鎖においては最も低くなった。

## 【0110】

S P R 解析データは抗体が様々な親和性でC D 4 0 と結合することを示し、K D 値は1 E - 0 7 よりも大きい値から、1 E - 0 9 よりも小さい値の範囲をとった。いくつかの抗体では、解離速度が測定するには遅すぎたために、その親和性は本アッセイにおいて信頼を持って正確に決定するには強すぎた。表中ではイタリック体で示したこれらの値は、本アッセイの正確な定量限界を超えている。

30

## 【0111】

より大きな規模での発現、精製、およびさらなる評価を行うために、抗体は配列、力価、およびS P R 結合データに基づいて選択された。精製抗体を用いたS P R 解析は、プロテインA上に抗体を捕捉し、25 または37 のどちらかでP B S - T p H 7 . 1 緩衝液中において、5 0 0 - 3 . 9 n M ( 2 : 1 ) 希釈系列のヒトC D 4 0 モノマーと結合させることで実行し、力価データは1 : 1 ラングミュアモデルに適合させた。このデータを表12に提供する。

40

## 【表 1 2】

表12 SPR動態/親和性 データ

リガンド	サンプル	25 ° C			37 ° C		
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
Y12XX-hz28	hCD40	2.2E+05	6.9E-04	3.1	4.4E+05	3.7E-03	8.5
Y12XX-hz40	hCD40	2.9E+05	1.3E-03	4.4	5.2E+05	5.7E-03	10.9
Y12XX-hz42	hCD40	3.1E+05	7.3E-04	2.3	6.3E+05	3.4E-03	5.5
抗体B		6.1E+04	2.3E-03	37			

10

## 【 0 1 1 2】

これらのデータは、選択した Y 1 2 X X 抗体が高い親和性で結合し、25 ° C において KD = 1 E - 9 M の範囲の KD 値で結合することを示す。結合を他の抗 CD 4 0 抗体、抗体 B I - m A b - B (米国特許第 9 , 0 9 0 , 6 9 6 号、重鎖配列番号 3 2 および軽鎖配列番号 3 1 ; 本明細書で「抗体 B」および「B I - L A L A」と称する)の結合と比較する。表 1 2 のデータに示すように、抗体 B はヒト化 Y 1 2 X X 分子よりもかなり低い親和性で CD 4 0 と結合する。

## 【 0 1 1 3】

3つのヒト化版 Y 1 2 X X 抗体は全て、CD 4 0 - I Z 三量体アゴニストによって刺激される B 細胞増殖に対する強力なアンタゴニストであった。表 1 3 を参照。

20

## 【表 1 3】

表13 可溶性CD40L三量体に誘導されるB細胞増殖の阻害

	平均(IC50 ng/ml)	標準偏差(STDEV)	ドナー数
抗体B	9.4	3.9	6
Y12XX-hz28-P238K	6.7	3.6	8
Y12XX-hz40-P238K	6.0	4.7	2
Y12XX-hz42-P238K	12.1	2.3	2

30

## 【 0 1 1 4】

Y 1 2 X X - h z 2 8 - P 2 3 8 K はまた、CD 4 0 L 発現 CHO 細胞由来の細胞性 C D 4 0 L で刺激される B 細胞増殖に対する強力なアンタゴニストであった。表 1 4 を参照。

40

## 【表 1 4】

表14 CD40L発現CHO細胞によるB細胞増殖刺激の阻害への効力

	効力(IC50 ng/ml of % 阻害)	標準偏差	ドナー数
抗体B	62% *	25%	6
Y12XX-hz28-P238K	38.1	9.8	8

10

\*最高投与量試験 ( 1 - 3  $\mu$ g/ml ) における阻害率 %

## 【 0 1 1 5】

ヒト化 Y 1 2 X X 抗体におけるデータと抗体 B のデータを比較すると、抗体 B は可溶性 CD 4 0 L シグナルに駆動される B 細胞増殖の強力な阻害を示したが、細胞性 CD 4 0 L ( CHO 細胞が過剰発現する CD 4 0 L ) に駆動される B 細胞増殖の阻害においては大きく効果が低かった。対照的に、ヒト化 Y 1 2 X X 抗体は細胞表面 CD 4 0 L 刺激の阻害における効力に 1 0 倍未満のシフトのみを示し、CD 4 0 L に対する B 細胞応答のより強力な遮断を提供した。

20

## 【 0 1 1 6】

F c R への結合親和性を低減する、および F c R 介在性シグナル伝達を低減するために、ヒト化 Y 1 2 X X 抗体を I g G 1 - P 2 3 8 K アイソタイプ ( C H 1 - I g G 1 - P 2 3 8 K ; 配列番号 2 5 ) でフォーマットした。この I g G - P 2 3 8 K アイソタイプを持つ代表的なヒト化 Y 1 2 X X 抗体 ( Y 1 2 X X - h z 2 8 - I g G 1 - P 2 3 8 K ) の F c R 結合を、野生型 I g G 1 アイソタイプでフォーマットされたコントロール抗体 ( コントロール - I g G 1 ) および L 2 3 4 A - L 2 3 5 A 変異を含む I g G 1 アイソタイプを持つ抗体 B の結合と比較した。これらの L 2 3 4 A - L 2 3 5 A 変異もまた F c R 結合の低減を誘導する。

## 【 0 1 1 7】

F c R 結合 S P R の研究は、プロテイン A センサーチップ表面上に抗体を捕捉し、精製した H i s タグ融合ヒト F c R をアナライトとして結合させることで行った。h C D 6 4 結合は 1 0  $\mu$ M - 1 . 5 nM h C D 6 4 ( 2 : 1 希釈系列 ) の滴定からなり、一方で低い親和性の F c R h C D 3 2 a - H 1 3 1、h C D 3 2 a - R 1 3 1、h C D 3 2 b、h C D 1 6 a - V 1 5 8、および h C D 1 6 a - F 1 5 8 におけるデータは 1 0  $\mu$ M - 1 3 . 7 nM F c R タンパク質の滴定からなった。

30

## 【 0 1 1 8】

コントロール I g G 1 抗体は試験されたすべての F c R との結合を示した。図 1 A を参照。野生型と比較して、Y 1 2 X X - h z 2 8 - I g G 1 - P 2 3 8 K 抗体は、h C D 6 4 と 1 2 5 倍弱い結合を示し、および試験した低い親和性の F c R h C D 3 2 a - H 1 3 1、h C D 3 2 a - R 1 3 1、h C D 3 2 b、h C D 1 6 a - V 1 5 8、および h C D 1 6 a - F 1 5 8 の何れとも検出可能な結合がないことを示した。図 1 B を参照。抗体 B もまた野生型 I g G 1 よりも弱い h C D 6 4 との結合を示し、しかしまた、h C D 1 6 a - V 1 5 8 と明らかな結合 ( K D = 7  $\mu$ M ) を示し、ならびに h C D 3 2 a - H 1 3 1 および h C D 3 2 - R 1 3 1 といくらか弱い結合を示した。図 1 C を参照。K D 値を図 1 D に提供する。

40

## 【 0 1 1 9】

F c 領域に P 2 3 8 K の変異を持つヒト化版の抗体 Y 1 2 X X についてさらに任意のアゴニスト活性を試験した。単球由来の未成熟樹状細胞 ( i D C ) は CD 4 0 活性化に非常に敏感であり、CD 4 0 刺激でサイトカイン産生 ( I L - 6 ) が増加し、および活性化の

50

細胞表面マーカー（CD86およびCD54）の発現を促進する。よって最も有望なヒト化Y12XX抗体について、そのiDC刺激能力を評価するために試験した。CD40抗体のCD40作動能力は該分子のFc部分の細胞表面のFcRへのクラスタリングまたはクロスリンク結合によって増強され得る。低親和性FcRであるCD32aを高く過剰発現するCHO細胞の添加は、FcRを介したクラスタリング/クロスリンクの可能性を評価するために使用された。これらの実験におけるCHO細胞とiDCの比は1:6であり、クラスタリング/クロスリンクのレベルが誇張されている可能性がある。BMS-986090および2141をポジティブコントロールとして用いた。BMS-986090はIgG4Fcと融合した抗CD40アンタゴニストドメイン抗体である（WO2012/145673の配列番号1287を参照）。2141（mAb134-2141）はパーシャルCD40アゴニストである（Robert Vonderheide et al., 2007, J. Clin. Oncol. 25(7): 876-883を参照）。L6-IgG4はCD40結合能を持たない融合タンパクであり、ネガティブコントロールとして用いた。

10

#### 【0120】

図2のデータに示すように、パーシャルアゴニスト2141またはBMS-986090どちらを添加しても、ドナーのサブセットにおいてiDCの弱い活性化が生じるのみであった。しかし、CD32a発現CHO細胞を2141またはBMS-986090のどちらかに添加すると、試験したほとんどすべてのドナーにおいて、強いIL-6産生の増加（図2B）ならびにCD86およびCD54の発現の促進（それぞれ、図2Bおよび図2C）が起こり、これらの分子のFc部分を介したFcR介在性クラスタリングがCD40を活性化する事と一致する。一方で、Y12XX-hz28-P238KおよびY12XX-hz40-P238Kの単独またはCD32依存クラスタリングのいずれも、6から10ドナー由来のiDC細胞を用いたネガティブコントロールにおいて観察される信号を超えるいかなるiDC活性化の信号も示さなかった。Y12xx-hz42-P238Kは4ドナー由来の細胞で試験し、4ドナーのうちの唯一つにおいてIL-6の産生ならびにCD86およびCD54の発現促進を含む弱い活性化の信号を示したが、2141またはBMS-986090で見られた活性化とは異なり、CD32aを発現するCHO細胞の添加に依存しなかった。

20

#### 【0121】

実施例1および2のための材料と方法

30

FcR結合SPR：FcR結合は*in vitro*で精製FcRを使用し、BIAcore（商標）表面プラズモン共鳴（SPR）などの方法を用いて測定され得る。1つの方法は、精製Hisタグ融合FcRタンパク質（FcR-His）の、標準的なエチル（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）/N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）化学とエタノールアミンのブロッキングを用いて固定化されたプロテインAを含むセンサー表面に捕捉される抗体への結合を試験する事である。これらの実験はBIAcore（商標）T200（GE Healthcare, Marlborough, MA）装置を用いて、25で行われた。例えば、はじめに3μg/mlの濃度の精製抗体のサンプルを、10μL/minの流速で、15秒間の接触時間において、固定化プロテインA表面上に捕捉した。この次に様々な濃度、例えば10μM-1.5nM（2:1希釈系列）または10μM-13.7nM（2:1希釈系列）の精製FcR-Hisタンパク質を、30μL/minの流速で、120秒間の結合時間および解離時間を用いて結合させた。全行程は10mM NaPO<sub>4</sub>、130mM NaCl、0.05% p20（PBS-T）pH7.1からなる泳動緩衝液中で行った。これらの研究で試験したFcRタンパク質には、「高親和性」FcRであるCD64（hFcRI）、および「低親和性」FcRであるCD32a-H131（FcRIIa-H131）、CD32a-R131（FcRIIa-R131）、CD32b（FcRIIb）、CD16a-V158（FcRIIIa-V158）、およびCD16a-F158（FcRIIIa-F158）が含まれ、これらは社内で発現、精製された。結合速度定数（K<sub>a</sub>）、解離速度定数（K<sub>d</sub>）、および解離定数（K<sub>D</sub>）値を取得するために、BIAcor

40

50

e (商標) T200 評価ソフトウェアを用いて、SPR データに 1 : 1 ラングミュアモデル、または 1 : 1 定常状態モデルのどちらかを適合させた。

【0122】

異なる  $F_c$  R の結合応答を比較するために、SPR データは、最大結合応答を、以下の等式を用いて理論的な最大結合応答の割合 (% R max) として計算することにより解析され得る：

【数 1】

等式 1 :

$$\%R \max = \left( \frac{\text{結合応答アナライト}}{\left( \frac{M_w \text{ アナライト}}{M_w \text{ リガンド}} \right) \times (\text{応答リガンド}) \times (\text{アナライト : リガンド化学量論})} \right)$$

10

ここで「アナライト」は  $F_c$  R であり、「リガンド」は捕捉された抗体である。この解析は、抗体または  $F_c$  g R のグリコシル化の質量を考慮しておらず、捕捉されたりガンドの 100% の分画活性率を仮定している。 $F_c$  R はグリコシル化されるため、典型的には、飽和状態において % R max 値は 100% よりも大きくなる。

【0123】

CD40 結合動態および親和性：

抗体分子の 1 価 CD40 結合親和性を、表面プラズモン共鳴 (SPR) によって、25 または 37 で、BiAcCore (商標) T200 装置 (GE Healthcare Life Sciences) 上で測定したが、これは固定化プロテイン A センサーチップ表面に抗体を捕捉し、そしてヒト CD40 モノマータンパク質 (社内で生産) を、例えば 180 秒の結合時間および 180 秒または 360 秒の解離時間を用いて、流速 30  $\mu$ L / min の PBS - T、pH 7.1 中において結合させることによる。SPR データは結合速度定数 (Ka)、解離速度定数 (Kd)、および解離定数 (KD) 値を取得するために、BiAcCore (商標) T200 評価ソフトウェアを用いて、1 : 1 ラングミュアモデルに適合させた。

20

【0124】

力価解析：力価解析は 25、Octet (登録商標) RED 装置 (ForteBio, Fremont, CA) 上で、バイオレイヤー干渉法 (BLI) を用いて行った。抗体はプロテイン A センサーチップを用いて 120 秒の結合時間を用いて上清から捕捉され、結合応答は計測され、および上清中の抗体濃度を決定するためにコントロール抗体サンプルを用いて取得された標準曲線と比較される。

30

【0125】

初代細胞単離及び培養：末梢血単核細胞 (PBMC) は Ficoll 密度勾配分離法によってヘパリン化ヒト血液から単離された。単球は Manual Easy Sep (商標) プロトコル (STEMCELL, Vancouver, Canada) に従って PBMC から単離された。100 万個の単離された単球を 6 ウェルプレートの各ウェルに対して IL-4 (100 ng / ml) および GM-CSF (100 ng / ml) を含む 6 ml ずつの完全培地中 (RPMI - 1640、10% 熱不活性化ウシ胎児血清、100 ユニット / ml ペニシリン-ストレプトマイシン) に播種し、37 / 5% CO<sub>2</sub> で、培地を 1 日おきに取り換え、同濃度のサイトカインを含む新鮮な培地と交換し、6 日間インキュベートした。iDC (未成熟樹状細胞) は 6 日目に採取し、十分に洗浄した後、完全培地中に再懸濁した。

40

【0126】

$F_c$  R クラスタリング / クロスリンクの存在または非存在下における iDC の抗 CD40 抗体処置：種々の生物学的薬剤の滴定を完全培地中で行い、96 ウェルプレートに 2 重に添加した。クロスリンクの場合、抗体を細胞に 30 分間添加し、その後 CD32a 発現 CHO 細胞を 1 : 6 の割合で添加した。細胞は 37 / 5% CO<sub>2</sub> において約 18 - 2

50

0時間インキュベートし、各ウェルから回収した150 $\mu$ Lの上清を、1:5の割合で希釈し、そしてIL-6、TNF、IL-12のタンパク質濃度を、製造者の指示を参照して市販のELISAキット(R&D Systems, Minneapolis, MN)を用いて評価した。上清を回収したプレートに残った細胞は、2重の処置サンプルを1サンプルにまとめ、新しい丸底(RB)96ウェルプレートに移し、4においた。細胞はCA++およびMg++無添加のD-PBSで洗浄され、細胞の生存率を測定するためにLIVE/DEAD(登録標章)固定可能近赤外線死細胞染色キット(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて氷上で30分間染色された。細胞はCA++およびMg++無添加のD-PBS、2%FBS、0.1%NaH<sub>3</sub>(染色緩衝液)で洗浄および再懸濁され、染色緩衝液中に添加した5 $\mu$ L/ウェルのHuman TruStain FcX(商標)(Fc受容体ブロッキング溶液、Biolegend, San Diego, CA)でブロッキングされた。

10

## 【0127】

DCは以下を用いて免疫染色され、4で45分間インキュベートされた: PerCp Cy5.5を標識したCD3、CD19、CD14(Lin<sup>-</sup>); BUV395を標識したCD11c(BD Biosciences, San Diego, CA); APCを標識したCD86(Biolegend, San Diego, CA); PEを標識したCD83(eBioscience, San Diego, CA); FITCを標識したCD54(Biolegend, San Diego, CA)。細胞は染色緩衝液で2回洗浄され、100 $\mu$ LのBD Cytotfix固定化緩衝液(BD Bioscience, San Diego, CA)を添加することで固定された(室温で15分間、遮光)。LSRII-fortessaフローサイトメーター(BD Biosciences, San Diego, CA)およびFlowJo解析ソフトウェア(TreeStar, Ashland, OR)を用いて、DCのCD86、ICAM-1およびCD83の発現を評価した。

20

## 【0128】

CD40L誘導性のヒトB細胞増殖の阻害: 通常の扁桃摘出術中に小児患者からヒト扁桃B細胞を取得し、組織を細かく刻み、穏やかにすりつぶし、細胞をスクリーンに通し、ヒトLympholyte(登録商標)-H分離用培地(Cedarlane Labs, Burlington, ON)を用いた密度勾配分離により単核細胞を単離することによって単離した。単核細胞を界面から回収し、洗浄し、および羊の赤血球細胞(SRBC, Colorado Serum Company; Denver, CO)を用いて4で1時間口ゼット形成し、その後T細胞を除去するために密度勾配分離をおこなった。細胞は再度洗浄され、10%FBSを含むRPMI(完全培地)に再懸濁された。抗体の滴定は完全培地中で、96ウェル丸底(RB)プレートに3重で添加された。1 $\times$ 10<sup>5</sup>個のヒト扁桃B細胞を添加し、可溶性IZ-hCD40L(2 $\mu$ g/mL)、または10,000radで照射し、ヒトCD40Lを安定にトランスフェクトしたチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-hCD40L)のいずれかで刺激し、各ウェルの最終容量が200 $\mu$ Lとなるように2 $\times$ 10<sup>3</sup>細胞/ウェルで播種した。プレートを37および5%CO<sub>2</sub>で72時間インキュベートし、ウェルあたり0.5 $\mu$ Ciの<sup>3</sup>[H]-チミジンで最後の6時間標識し、採取し、液体シンチレーションで計数した。B細胞増殖をチミジンの取り込みに基づいて定量化した。

30

40

## 【0129】

実施例3: In Vitro Fc受容体アッセイ。

抗体はFc領域が、免疫細胞表面上でFcガンマ受容体(FcR)と結合する、または補体因子と結合することで、補体依存性細胞毒性(CDC)および抗体依存性細胞傷害(ADCC)などのエフェクター機能を示し得る。抗体依存性細胞貪食は他の潜在的なFcエフェクター機能である。ヒト化Y12XX抗体の性能をさらに評価するために、抗体の補体依存性細胞毒性(CDC)、抗体依存性細胞貪食(ADCP)、抗体依存性細胞傷害(ADCC)についてアッセイした。表15はこの実施例でアッセイした抗体を示す。

50

## 【表 15】

表15

	名称	参照
1	BMS-986291 (Y1238-hz1-P238K)	WO 2018/217976を参照
2	15B5-hz61-P238K	抗CD40抗体 (社内で生産)
3	5F11-45-P238K	WO 2018/217976を参照
4	Y12XX-hz28-P238K	
5	Y12XX-hz40-P238K	
6	Y12XX-hz42-P238K	
7	抗体C	抗CD40抗体40 ( Ristov et al. (2018) Am J Transplant. 18(12):2895-2904. Epub 2018 May 24. を参照)
8	BI-LALA	米国特許第9,090,696号における配列番号32の重鎖配列、および配列番号31の軽鎖配列;I L234A-L235A変異を含むIgGアイソタイプを参照
9	BMS-986090	CD40 ドメイン抗体(BMS3h-56-269-IgG <sub>4</sub> Fc 融合ポリペプチド);例えば、WO2012/145673を参照
10	TT hIgG1	ヒト抗破傷風毒素抗体、IgGアイソタイプ(社内で生産)(アイソタイプコントロール)
11	CD20 hIgG1	ヒト抗CD20、IgG2アイソタイプ(社内で生産)(ポジティブコントロール)

10

20

## 【0130】

CDCアッセイは以下のようにして行われた。「CDCアッセイ培地」は0.1% BSA (Sigma)、および1%ペニシリン-ストレプトマイシン (Life Technologies) を追加した、L-グルタミン添加、フェノールレッド無添加 (Hyclone) のロズウェルパーク記念研究所培地 (RPMI) - 1640 (Hyclone) を指す。50  $\mu$ Lの標的細胞 (5  $\times$  10<sup>5</sup>細胞/mL、CDCアッセイ培地中) を96ウェルアッセイプレートに添加した。標的細胞は内因的にCD40を発現するRaji細胞である (ATCCより取得)。試験する抗体ごとに希釈系列 (133から0.002 nM) を調製し、25  $\mu$ Lの各濃度の抗体を各ウェルに添加した。25  $\mu$ Lのヒト補体 (Quidelより取得、CDCアッセイ培地で1:3に希釈) を各ウェルに添加した。アッセイプレートは湿潤なインキュベーター内において37  $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートされた。インキュベート後、100  $\mu$ LのCellTiter-Glo (登録商標) (Promega, Madison, WI) を各ウェルに添加した。そして、PerkinElmer EnVision (登録商標) プレートリーダー (PerkinElmer, Waltham, MA) を用いて蛍光データを取得した。生存率をアイソタイプコントロール (100%生存) と比較して計算した。抗体濃度に対する結果の値をプロットした。GraphPad Inc. のPrism v5.01ソフトウェアを用いて細胞生存率を各抗体に対してプロットした。

30

40

## 【0131】

CDCアッセイは2回行った。2回目のアッセイにおいて新鮮に解凍されたヒト補体血清を使用した。この結果を図3に示す。図3Aはアッセイの1度目の繰り返しを示し、図3Bはアッセイの2度目の繰り返しを示す。CD20 hIgG1はポジティブコントロ

50

ールであり細胞毒性を示す。アッセイした抗CD40抗体に対して検出できるCDC活性は存在せず、特に、アッセイしたヒト化Y12XX抗体では補体依存性細胞毒性を誘導するものはなかった。

#### 【0132】

ADCPアッセイは以下のように行われた。「ADCPアッセイ培地」は10%超低濃度IgG FCS (Gibco)を追加したL-グルタミン、フェノールレッド無添加(hyclone)のRPMI-1640培地を指す。エフェクター細胞は2人の異なる健康なヒトドナー由来の新鮮なPBMCから精製した初代ヒトCD14+単球細胞を用いた。標的細胞は再度Raji細胞であった。Raji細胞は $2.0 \mu\text{M}$  PKH26 (赤色蛍光色素; Sigma)で標識され、ADCPアッセイ培地中に濃度が $4 \times 10^6$ 細胞/mlになるように調製された。50  $\mu\text{L}$ /ウェルの試験またはコントロール抗体を含むV字底96ウェルプレートに標識した標的細胞(50  $\mu\text{L}$ /ウェル)を添加することで標識した標的細胞を抗体で事前に被覆し、氷上で30分間インキュベートした。標的細胞を洗浄し、そしてエフェクター細胞(CD14+単球細胞)を、最終的なエフェクター細胞と標的細胞の比(E:T)が1:4になる、および最終的な抗体の濃度が30 nMから0.1 nMの範囲になるように添加した(100  $\mu\text{L}$ /ウェル)。そしてプレートは湿潤な37インキュベーター内に1時間おいた。細胞をAPC-抗CD89 (BioLegend)を用いて氷上で30分間染色し、フローサイトメーター(BD Cantor (商標), BD Bioscience, San Jose, CA)で解析した。細胞はCD89+細胞および、その後染色された食作用のあるエフェクター細胞(CD89+、PKH26+)に選別された。貪食の割合を、全CD89+細胞中のCD89+、PKH26+細胞数として計算した。最終的な貪食の割合を得るためにアイソタイプのコントロールから算出したバックグラウンドの値を減算した。データをFlowJoソフトウェアおよびGraphpad Inc.のPrism v5.01ソフトウェアを用いて解析した。

#### 【0133】

2人の異なるドナー由来のCD14+単球細胞を用いた例示的なデータを図4に示した。CD20 hIgG1はポジティブコントロールであり、期待されるようにRaji細胞の貪食を誘導する。BMS-986090も同様に貪食を誘導する。対照的に、本開示のヒト化Y12XX抗CD40抗体を含む、試験した他の抗体で、このアッセイにおいて検出可能な貪食を誘導する抗体はなかった。

#### 【0134】

ADCCアッセイは以下のように行われた。「ADCCアッセイ培地」は10%超低濃度IgG FBS (Gibco)、および1 mM ピルビン酸ナトリウム(Life Technologies)を追加したL-グルタミン、フェノールレッド無添加のRPMI-1640培地(hyclone)を指す。初代ヒトNK(Natural kill)細胞を2人の異なる社内のドナー由来の新鮮なPBMCから精製し、エフェクター細胞として用いた。PBMCはヘパリン化された全血液サンプルから密度勾配遠心分離によって精製し、2% FBS (Hyclone)添加PBSで洗浄した。NK細胞を、磁気ビーズを用いた分離キット(Miltenyi Biotec)を用いたネガティブセレクションによってPBMCから単離した。NK細胞を活性化するために、精製NK細胞を $1 \mu\text{M}$ ヒドロコルチゾン(StemCell Technologies)および500 IU/ml組み換えヒトIL-2 (PeproTech)を追加したMyeloCult H5100培地(StemCell Technologies)中に $1 \times 10^6$ 細胞/mlで再懸濁し37で一晩インキュベートした。次の日、活性化NKエフェクター細胞をADCCアッセイ培地で2回洗浄し、その濃度をADCCアッセイ培地で $5 \times 10^5$ 細胞/mlになるよう調製した。Raji細胞(標的細胞)を以下のようにカルセインで標識した。カルセインAM(Life Technologies)試薬を、50  $\mu\text{g}$ の乾燥凍結した試薬が入った試薬チューブに20  $\mu\text{L}$ の超高純度DMSOを加えることで調製した。懸濁させたRaji細胞、容量1 mlあたりに2  $\mu\text{L}$ の再調製したカルセインAMを加えた;細胞をボルテックスし、湿潤なインキュベーターに30分間置いた。インキュベ

10

20

30

40

50

ション時間終了後、標識した標的細胞をADCCアッセイ培地で3回洗浄し、ADCC培地で濃度を $10^5$ 細胞/mlに調整した。標識した標的細胞(50 $\mu$ L/ウェル)を50 $\mu$ L/ウェルの試験またはコントロール抗体を含むV字底96ウェルプレートに添加した。そして、活性化NK細胞を最終的なエフェクター細胞と標的細胞の比(E:T)が10:1となる、および最終的な抗体の濃度が0.0002から1 $\mu$ g/mlの範囲になるように添加した(100 $\mu$ L/ウェル)。そして、プレートを湿潤な37 $^{\circ}$ Cのインキュベーターに2時間置いた。上清(50 $\mu$ L/ウェル)を光学96ウェル黒色プレートに移し、カルセイン放出を485の励起光と535nmの放出光のフィルターをセットしたEnVision(登録商標)プレートリーダー(PerkinElmer, Waltham, MA)を用いて蛍光強度を読み取ることで計測した。

10

【0135】

このアッセイにおいて、抗体の非存在下でエフェクター細胞と共にインキュベートした標的細胞は、抗体非依存溶解(自発的な溶解)のバックグラウンドとしてのコントロールを提供し、一方で20 $\mu$ L/ウェルの10% Tween-20溶解緩衝液で溶解させた標的細胞は、最大放出を表す。

【0136】

抗体依存細胞溶解の割合を以下の式による平均蛍光強度(MFI)に基づいて計算した。

【数2】

等式2:

$$\left( \frac{\text{試験MFI} - \text{平均バックグラウンド}}{\text{平均最大値} - \text{平均バックグラウンド}} \right) \times 100$$

20

標的細胞溶解割合を、GraphPad, IncのPrism v5.01ソフトウェアを用いて抗体ごとにプロットした。

【0137】

2人の異なるドナー由来のNK細胞を用いた例示的なデータを図5に示した。標的細胞はポジティブコントロールの抗CD20抗体によって殺された。一方で、全ての抗CD40抗体においてADCCは低い値から負の値をとり、これらの抗体がRaji細胞の抗体依存細胞毒性を誘導しないことを示し、これらの抗体がCD40のアンタゴニストであることを証明する。

30

【0138】

まとめとして、この実施例において、本開示のヒト化Y12XX抗CD40抗体、具体的には、Y12XX-hz28-P238K、Y12XX-hz40-P238K、およびY12XX-hz42-P238KのADCC(抗体依存細胞毒性)、ADCP(抗体依存細胞貪食)、またはCDC(補体依存細胞毒性)を仲介する可能性を、内在性CD40発現Raji細胞を標的として用いて試験した。抗CD20抗体をポジティブコントロールとして用いた。ADCCについて、NK細胞をエフェクター細胞として用いて、異なるドナー由来のエフェクター細胞を用いて2つの実験を行った。どちらの場合でも、Y12XX-hz28-P238K、Y12XX-hz40-P238K、およびY12XX-hz42-P238Kの何れもRaji細胞の溶解を誘導しなかった。ヒトIgG1アイソタイプコントロールの影響下で、Y12XX-hz28-P238K、Y12XX-hz40-P238K、およびY12XX-hz42-P238Kの何れもRaji細胞のCDCを誘導しなかった。ADCPについて、CD14+単球細胞をエフェクター細胞として用いて、このシステムにおいて、Y12XX-hz28-P238K、Y12XX-hz40-P238K、およびY12XX-hz42-P238Kの何れも細胞貪食を促進しなかった。一方で、BMS-986090は細胞貪食を示した。

40

【0139】

実施例4: NF- $\kappa$ B/AP-1シグナル伝達アッセイ

50

この実施例の目的は、抗CD40抗体による刺激の結果、Ramos - Blue (商標) 細胞 (InvivoGen) におけるNF- $\kappa$ B/AP-1誘導性SEAP (分泌胚性アルカリフォスファターゼ) の活性を評価することであった。

【0140】

Ramos - Blue (商標) 細胞は、NF- $\kappa$ B/AP-1誘導性の分泌胚性アルカリフォスファターゼ (SEAP) レポーター遺伝子を発現するヒトBリンパ球レポーター細胞株である。Ramos - Blue (商標) 細胞株はNF- $\kappa$ B/AP-1シグナル伝達およびToll-like受容体 (TLR) シグナル伝達経路のために用いられ、Ramos - Blue (商標) 細胞は内因性にCD40を発現し、CD40およびTLR感受性である。Ramos - Blue (商標) 細胞株が刺激されると、それらは細胞培養上清中にSEAPを生産する。SEAPはQUANTI - Blue (商標) 検出培地 (InvivoGen, San Diego, CA) を用いて検出することができる。SEAPのレベルは視覚的に、または620nmにおける分光光度計を用いて観察し得る。Ramos - Blue (商標) 細胞はCD32 (FcRII) を発現しない。

10

【0141】

表16にこの実施例でアッセイした試験物質 (抗体および他のポリペプチド) を示した。全ての試験物質はBMS社内で調製された。

【表16】

試験物質	記載
BMS-986325	Y12XX-hz28-P238K (完全ヒト抗CD40アイソタイプhIgG (P238K) mAb)
BMS-986090	完全ヒト抗CD40ドメイン抗体IgG4Fc融合タンパク質
mAb 134-2142 (CD40-2142 (hIgG2-Fc))	完全ヒト抗CD40モノクローナル抗体 (アゴニスト)
抗DT1D12-B16F7-hIgG1.3f mAb	ネガティブコントロール
CD40L-IZ	ヒトCD40L三量体 (h-IZ-hCD40L-三量体)

20

30

【0142】

Ramos - Blue (商標) 細胞はInvivoGenから購入した。このアッセイのために、本明細書でRamos - Blue細胞#4として示す形質転換細胞株を、Ramos - Blue (商標) 細胞にヒトCD32 (FcRII) を形質転換することで調製した。両タイプのRamos - Blue (商標) 細胞をRamos細胞培養培地中 (イスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM) に10%ウシ胎児血清 (FBS)、2mM L-グルタミン、ペニシリンおよびストレプトマイシン (100U/ml, -100 $\mu$ g/ml)、100 $\mu$ g/mlのノルモシン、および薬剤選択のためにゼオシン (100 $\mu$ g/ml) を添加) で培養した。細胞を37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>で培養した。両タイプの細胞は3日おきに継代し、0.5 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞/mlの細胞密度で維持した。細胞は細胞継代回数#21 (P21) まで使用した。P21以降、細胞を破棄した。

40

【0143】

アッセイは以下のように行った。「AIM V (商標) 培地」はL-グルタミン、50 $\mu$ g/mlストレプトマイシン硫酸塩、10 $\mu$ g/mlゲンタマイシン硫酸塩を添加した血清無添加の培地 (Thermo Fisher Scientific) を指す。Ramos - Blue (商標) 細胞#4における、NF- $\kappa$ B/AP-1活性に対するCD40アゴニスト抗体を用いたCD40アゴニスト活性を評価するために、細胞を抗生物質ノルモシン/ゼオシンの入っていないAIM V (商標) 培地で2回洗浄した。そして細胞を室温、2000rpmで10分間遠心分離した。細胞ペレットを損なわないように慎重に培地を吸い取った。1mlのAIM V (商標) を細胞ペレットに加え、細胞ペレットを再懸

50

濁し、追加の9 mlのAIM V (商標)を再懸濁後に加えた。20  $\mu$ L ViaStain (商標) AOP1 (アクリジンオレンジ/ヨウ化プロピジウム) 染色溶液 (Nexcelom Bioscience, LLC, Lawrence, MA) および、20  $\mu$ LのRamos - Blue (商標) 細胞懸濁液を加え、セルカウンターを用いて細胞を数えた。

【0144】

Ramos - Blue (商標) 細胞はAIM V (商標) 血清無添加培地中に  $4 \times 10^6$  細胞/mlとなるように調整した。平底組織培養プレートに1ウェル当たり40万個、100  $\mu$ LのRamos - Blue (商標) 細胞を添加した。そして、100  $\mu$ LのBMS - 986325, BMS - 986090, mAb134 - 2141 (CD40 - 2142)、  
10

【0145】

プレートを37、5%CO<sub>2</sub>のインキュベーター内で20時間インキュベートした。20時間の細胞培養後、プレートを2000 rpmで10分間遠心分離した。

【0146】

刺激されたRamos細胞から採取した40  $\mu$ Lの細胞培養上清を平底プレートのウェルに添加した。そして、160  $\mu$ LのQUANTI - Blue (商標) 溶液を各ウェルに添加した。最終容量は200  $\mu$ L/ウェルであった。  
20

【0147】

プレートを37、5%CO<sub>2</sub>のインキュベーター内で1~6時間インキュベートした。SEAPレベルをEnVision (登録商標) 光学リーダー (OD: 620 nm) を用いて、620 nmで60分ごとに測定した。

【0148】

例示的なデータを図6に示す。この実施例において、CD32欠損Ramos - Blue (商標) 細胞またはCD32形質転換Ramos - Blue (商標) 細胞 (Ramos - Blue #4) に対して、抗CD40モノクローナル抗体を試験し、抗CD40抗体で刺激されたRamos - Blue (商標) 細胞におけるNF - B/AP - 1誘導性のSEAP活性を評価した。  
30

【0149】

このアッセイにおいてCD40 - 2142の添加は顕著なシグナル応答を誘導した (図6Aおよび6B)。これらの結果は、CD40 - 2142はこのアッセイシステムにおける完全アゴニストであることを示唆する。Ramos - Blue (商標) 細胞 (-CD32) (図6A) を用いたBMS - 986090の添加では応答が見られなかったが、Ramos - Blue細胞#4 (CD32形質転換Ramos - Blue (商標) 細胞) (図6B) を用いたアッセイでは部分的なアゴニスト性が見られた。この結果はBMS - 986090の添加によって誘導されるアゴニスト性応答がFcR依存的に仲介されることを示唆する。図6Cおよび図6Dに反映されるように、コントロールのポリペプチド、CD40L - IZ 3量体はどちらのアッセイにおいても応答を誘導した。  
40

【0150】

一方で、BMS - 986325の添加は、Ramos - Blue (商標) 細胞 (CD32<sup>-</sup>) (図6A) またはRamos #4 (CD32<sup>+</sup>) (図6B) のどちらを用いても、顕著なNF - B/AP - 1応答を誘導しなかった。これらのデータは、BMS - 986325がCD40を作動させない、およびCD32 (FcR) と会合しないことを示唆する。これらのデータは低親和性FcR、例えば、CD32 (FcRII) との会合を低減すると、望ましくないアゴニストシグナル伝達の可能性および望ましくない細胞毒性の可能性を低減することを補助する。

【0151】

10

20

30

40

50

### 実施例 7 : BMS - 986325 の非臨床的薬物動態評価のまとめ

マウスおよびカニクイザルにおける BMS - 986325 ( Y 1 2 X X - h z 2 8 - P 2 3 8 K ) の薬物動態 ( P K ) を評価した。BMS - 986325 はマウスの CD 4 0 受容体とは交差反応しないため、マウスにおいて評価された P K は内因的または非特異的な P K であった。BMS - 986325 はサル CD 4 0 受容体と交差反応するため、サルにおいて全 P K ( 特異的および非特異的な P K ) を評価した。マウスに BMS - 986325 ( 単回 1 - および 1 0 - m g / k g 投与量 ) を静脈 ( I V ) 投与した後、BMS - 986325 は 0 . 5 から 1 . 0 2 m l / d / k g と低い総血清クリアランス「CLT」、0 . 1 2 から 0 . 1 9 L / k g と限られた定常状態分布容積「Vss」、および 1 1 8 から 1 8 3 時間 ( ~ 5 から 8 日 ) と長い見かけの消失半減期「T - H A L F」を示した。

10

#### 【 0 1 5 2 】

サルにおいて、BMS - 986325 の単回皮下 ( S C ) 容量を投与した。投与量は、特異的なクリアランス ( 標的介在性薬物配置「TMDD」) が飽和しないような投与量である。単回 S C 投与後、BMS - 986325 は絶対生物学的利用能が 7 0 . 4 % と、十分に吸収された ( 同じ I V 用量での曝露との比較 ) 。サルへ BMS - 986325 の I V 投与後 ( 1 0 m g / k g 単回用量 ) 、BMS - 986325 は 0 . 4 1 m l / d / k g の CLT、0 . 0 5 L / k g の限られた V s s 、および 1 0 0 時間 ( 約 4 日 ) の T - H A L F を示した。サルへの BMS - 986325 の単回 S C 投与 ( 用量 1、1 0、および 1 0 0 m g / k g で投与 ) による最大血漿濃度到達時間「Tmax」は 2 4 から 5 4 時間であった。用量に比例する以上に曝露量が増加し ( 最大濃度「Cmax」および時間ゼロから無限大に外挿した濃度対時間曲線下面積「AUC [ I N F ]」) 、および用量に応じて T - H A L F が増加した ( 1、1 0、1 0 0 m g / k g でそれぞれ約 3 1 時間、約 1 1 9 時間、約 1 9 7 時間 ) 。これらのデータは非線形の P K およびクリアランス機構の飽和を示唆している；これは TMDD を反映した、標的 ( CD 4 0 ) 介在性クリアランスの結果だと思われる。この単回用量 P K 研究では、抗薬物抗体 ( A D A ) の形成は ~ 5 0 % のサルで検出されたが、P K パラメーター全体に明らかな影響はなかった。

20

#### 【 0 1 5 3 】

薬物動態学 / 薬物力学モデリング ( 準定常状態を仮定した TMDD モデル [ TMDD - Q s s ] ) はサルで見られた非線形 P K の記述や、血清中の薬物曝露と CD 4 0 受容体占有率 ( R O ) との関係を確認すること、およびその後のヒトへの投与量予測に用いた。

30

#### 【 0 1 5 4 】

上記のように実施例を参照して本実施形態を詳細に記載してきたが、これらの実施形態の精神から逸脱することなく、様々な変更がなされ得ること、および当業者には容易に知られ得ることが理解される。

#### 【 0 1 5 5 】

例示的な特定の処置方法、医薬品および本明細書に示す使用を含む、本明細書で開示されるこれらおよびその他の態様は本明細書に含まれる教示から明らかであるだろう。

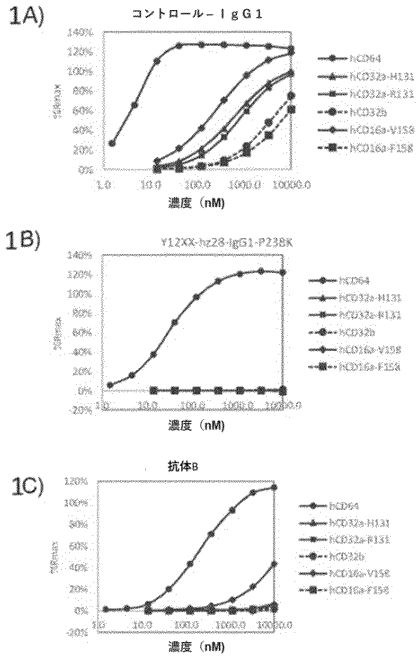
40

50

【 図 面 】

【 図 1 A 】

FIGURE 1



【 図 1 B 】

FIGURE 1 cont.

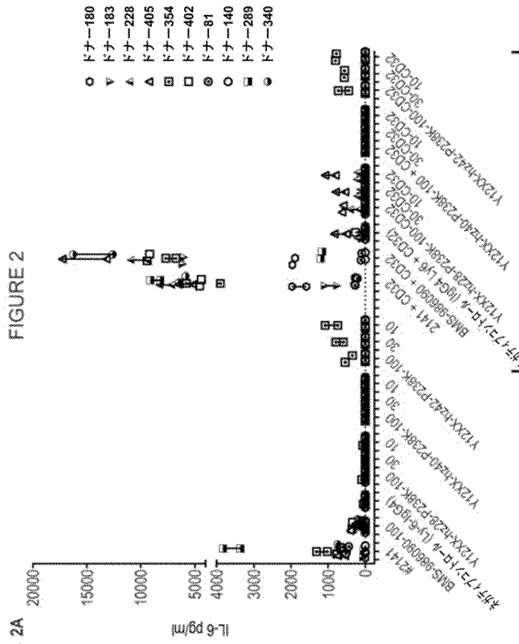
1D) 抗体ごとのKD値 / FcγR 相互作用:

サンプル	コントロール-IgG1	Y12XX-hz28-IgG1-P238K	抗体B
hCD64	0.2 nM	25 nM	150 nM
hCD32a-H131	600 nM	>50 uM	>50 uM
hCD32a-R131	840 nM	>50 uM	>50 uM
hCD32b	3.9 uM	>50 uM	>50 uM
hCD16a-V158	270 nM	>50 uM	7 uM
hCD16a-F158	11 uM	>50 uM	>50 uM

10

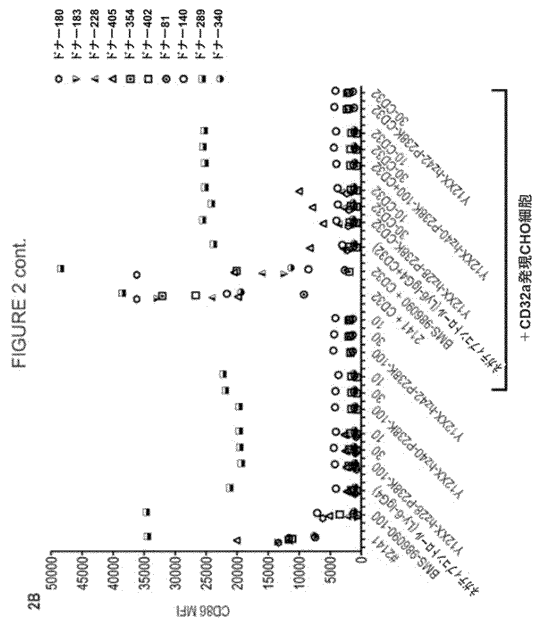
20

【 図 2 A 】



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【 図 2 B 】



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

30

40

50

【 図 2 C 】

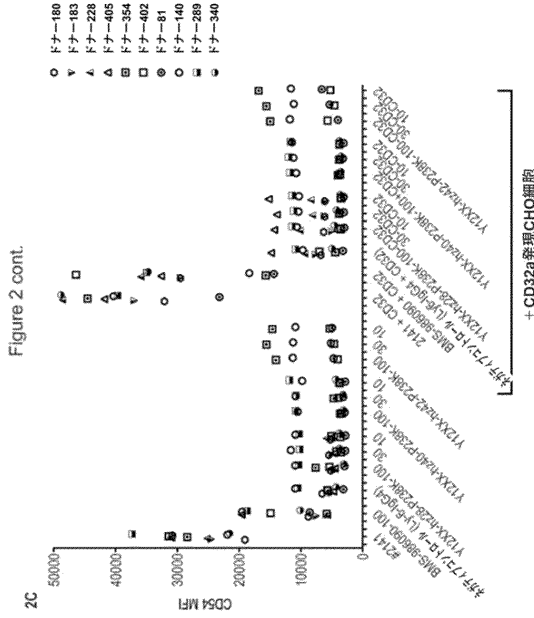


Figure 2 cont.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【 図 3 】

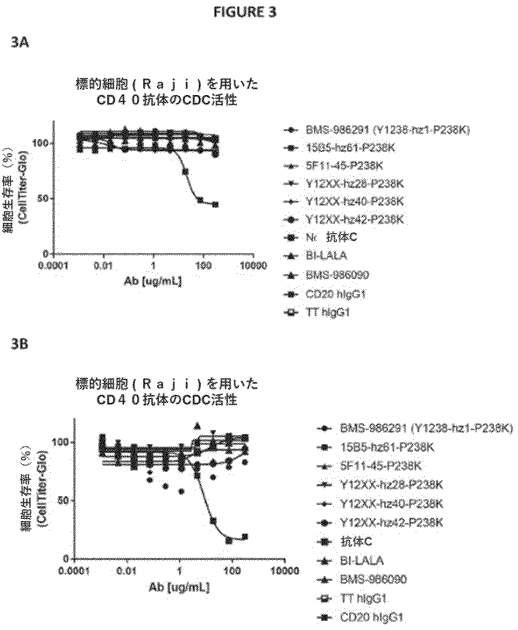


FIGURE 3

10

20

【 図 4 】

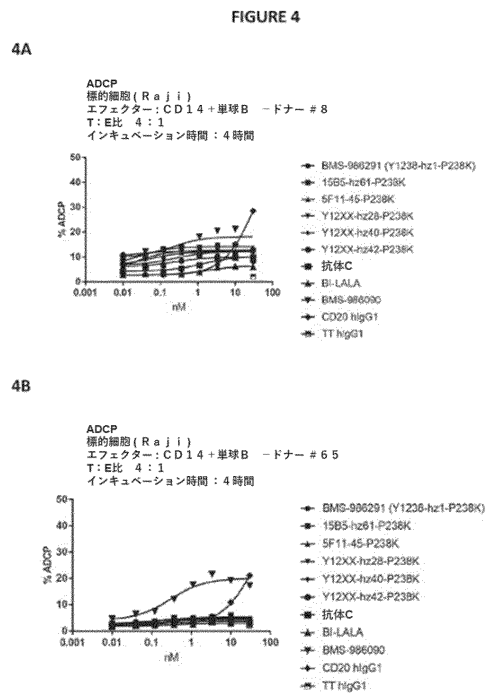


FIGURE 4

【 図 5 】

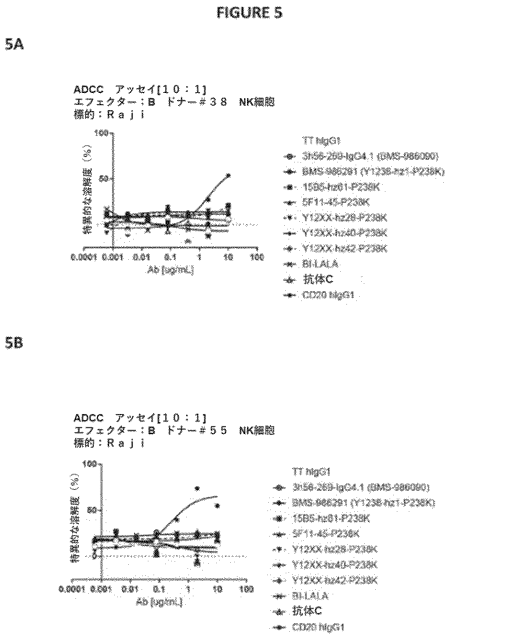


FIGURE 5

30

40

50

【 図 6 A 】

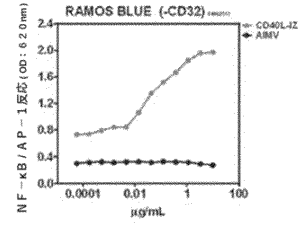
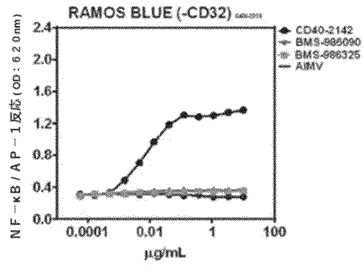
【 図 6 B 】

FIGURE 6

FIGURE 6 cont.

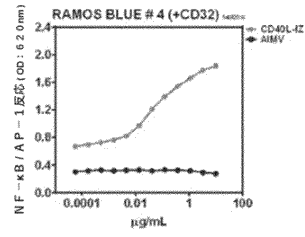
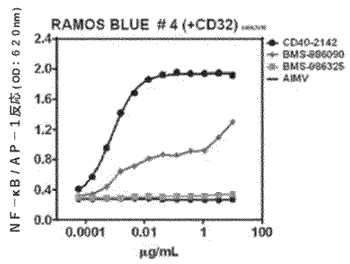
6A

6C



6B

6D



10

20

【 配列表 】

0007271666000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N 1/19 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)  
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)  
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)  
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 37/08 (2006.01)  
 A 6 1 P 11/06 (2006.01)  
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)  
 A 6 1 P 1/16 (2006.01)  
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)  
 A 6 1 P 27/16 (2006.01)  
 A 6 1 P 1/04 (2006.01)  
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)  
 A 6 1 P 13/12 (2006.01)  
 A 6 1 P 21/04 (2006.01)  
 A 6 1 P 17/06 (2006.01)  
 A 6 1 P 17/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)

## F I

C 1 2 N 1/19  
 C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 N 5/10  
 A 6 1 K 39/395 N  
 A 6 1 K 39/395 D  
 A 6 1 P 37/02  
 A 6 1 P 29/00  
 A 6 1 P 37/08  
 A 6 1 P 11/06  
 A 6 1 P 9/10  
 A 6 1 P 1/16  
 A 6 1 P 27/02  
 A 6 1 P 27/16  
 A 6 1 P 1/04  
 A 6 1 P 3/10  
 A 6 1 P 13/12  
 A 6 1 P 21/04  
 A 6 1 P 17/06  
 A 6 1 P 29/00 1 0 1  
 A 6 1 P 17/00  
 A 6 1 K 45/00  
 A 6 1 P 9/00

弁理士 笹倉 真奈美

## (72)発明者

ヤムニウク, アーロン

カナダ、ブイ6アール・2エイ7、プリティッシュ・コロンビア、バンクーバー、ウエスト・エイ  
ス・アベニュー4680

## (72)発明者

ストラザーズ, メアリー

アメリカ合衆国08543ニュージャージー州プリンストン、ルート206アンド・プロビン  
ス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

## (72)発明者

クリステック, スタンリー アール, ジュニア

アメリカ合衆国08543ニュージャージー州プリンストン、ルート206アンド・プロビン  
ス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

## (72)発明者

ナイーム, アクバル

アメリカ合衆国08543ニュージャージー州プリンストン、ルート206アンド・プロビン  
ス・ライン・ロード、プリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

## (72)発明者

レイクストロー, ジンジャー

アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリート100、プリ  
ストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

審査官 福澤 洋光

## (56)参考文献

特表2018-520654(JP, A)

特表2018-526978(JP, A)

特表2018-526977(JP, A)

国際公開第2016/028810(WO, A1)

AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION, 2018年05月, Vol.18, pp.2895-2904

## (58)調査した分野

(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 15/90

C07K 1/00 - 19/00

C12P 1/00 - 41/00

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

UniProt/GeneSeq

P u b M e d