(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2013-523130
(P2013-523130A)
(43)公表日　平成25年6月17日(2013.6.17)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	N	4B064
A61P 37/06	(2006.01)	A61P	37/06		4C084
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	29/00		4C085
A61P 25/00	(2006.01)	A61P	29/00	101	4H045

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 92 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-502780 (P2013-502780)
(86)(22)出願日　平成23年3月30日 (2011.3.30)
(85)翻訳文提出日　平成24年11月26日 (2012.11.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2011/030427
(87)国際公開番号　WO2011/123489
(87)国際公開日　平成23年10月6日 (2011.10.6)
(31)優先権主張番号　61/319,574
(32)優先日　平成22年3月31日 (2010.3.31)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　503385923
ベーリンガー　インゲルハイム　インターナショナル　ゲゼルシャフト　ミット　ベシュレンクテル　ハフツング
ドイツ連邦共和国　５５２１６　インゲルハイム　アム　ライン　ビンガー　シュトラーセ　１７３
(74)代理人　110001508
特許業務法人　津国
(74)代理人　100078662
弁理士　津国　肇
(74)代理人　100131808
弁理士　柳橋　泰雄
(74)代理人　100119079
弁理士　伊藤　佐保子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＣＤ４０抗体

(57)【要約】
本発明は、新たなヒト化アンタゴニスト抗ＣＤ４０抗体ならびに同を使用するための治療的及び診断的方法と組成物に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗体が重鎖及び軽鎖を含み、重鎖配列及び軽鎖配列が以下：
ａ）配列番号９～配列番号１１からなる群より選択される重鎖ＣＤＲ１配列、配列番号１２～配列番号１５からなる群より選択される重鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号１６～配列番号１７からなる群より選択される重鎖ＣＤＲ３配列；ならびに
ｂ）軽鎖ＣＤＲ１配列が配列番号１８～配列番号２１からなる群より選択される配列を有し、配列番号２２～配列番号２３の軽鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号２４～配列番号２５からなる群より選択される軽鎖ＣＤＲ３配列
からなる群より選択されるヒト化抗体。
【請求項２】
抗体が、配列番号１０の重鎖ＣＤＲ１配列、配列番号１３の重鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号１６の重鎖ＣＤＲ３配列を含み；ならびに、抗体が、配列番号１９の軽鎖ＣＤＲ１配列、配列番号２２の軽鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号２４の軽鎖ＣＤＲ３配列を含む、請求項１記載の抗体。
【請求項３】
抗体が、配列番号９の重鎖ＣＤＲ１配列、配列番号１４の重鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号１６の重鎖ＣＤＲ３配列を含み；ならびに、抗体が、配列番号２０の軽鎖ＣＤＲ１配列、配列番号２２の軽鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号２４の軽鎖ＣＤＲ３配列を含む、請求項１記載の抗体。
【請求項４】
抗体が、配列番号１１の重鎖ＣＤＲ１配列、配列番号１５の重鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号１７の重鎖ＣＤＲ３配列を含み；ならびに、抗体が、配列番号２１の軽鎖ＣＤＲ１配列、配列番号２３の軽鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号２５の軽鎖ＣＤＲ３配列を含む、請求項１記載の抗体。
【請求項５】
それぞれ配列番号２７及び配列番号２６；それぞれ配列番号２８及び配列番号２６；それぞれ配列番号２９及び配列番号２６；それぞれ配列番号３０及び配列番号２６；それぞれ配列番号３２及び配列番号３１；それぞれ配列番号３３及び配列番号３１；それぞれ配列番号３４及び配列番号３１；それぞれ配列番号３５及び配列番号３１；それぞれ配列番号３７及び配列番号３６；それぞれ配列番号３８及び配列番号３６；それぞれ配列番号３９及び配列番号３６；それぞれ配列番号４０及び配列番号３６のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化モノクローナル抗体又は抗体フラグメント。
【請求項６】
ヒトＣＤ４０に特異的に結合する単離抗体又は抗原結合フラグメントであって、以下：
ａ）配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、又は配列番号３５のヒト可変ドメイン重鎖アミノ酸配列のフレームワーク領域のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を有するフレームワーク領域を含むヒト化重鎖可変ドメイン、及び、配列番号３１の対応する軽鎖可変と少なくとも９０％同一である軽鎖アミノ酸配列を含む；又は
ｂ）配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、又は配列番号４０のヒト可変ドメイン重鎖アミノ酸配列のフレームワーク領域のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を有するフレームワーク領域を含むヒト化重鎖可変ドメイン、及び、配列番号３６の対応する軽鎖と少なくとも９０％同一である軽鎖アミノ酸配列を含む
を含む、単離抗体又は抗原結合フラグメント。
【請求項７】
抗体又は抗体の抗原結合フラグメントが、１ｎＭ未満のアンタゴニスト活性ＩＣ５０を有し、かつＢ細胞増殖において１００μg/mLまでアゴニズムを有さずにヒトＣＤ４０に特異的に結合し、及び、該抗体又は抗体の抗原結合フラグメントは抗体又は抗体の抗原結合フラグメントが、少なくとも１０日間の非ヒト霊長類におけるインビボでの半減期を有す

ることをさらに特徴とし；ならびに、該抗体又は抗体の抗原結合フラグメントが、場合により、３０mg/kg未満の用量で８日より多いカニクイザルにおける半減期を有する、ヒト化モノクローナル抗体又は抗体の抗原結合フラグメント。

【請求項８】

哺乳動物に、該哺乳動物においてＣＤ４０媒介性の免疫応答を遮断するために十分な量の請求項１～７のいずれか一項記載の抗体を含む組成物を投与することを含む、哺乳動物においてヒトＣＤ４０の機能を遮断する方法。

【請求項９】

哺乳動物に、哺乳動物において疾患又は障害の症状の１つ又は複数を減少させるために十分な量の請求項１～７のいずれか一項記載の抗体を含む組成物を投与することを含む、哺乳動物において疾患又は障害を処置又は寛解する方法。

【請求項１０】

疾患又は障害が、移植片対宿主疾患、自己免疫性又は炎症性疾患、及びＣＤ４０関連障害からなる群より選択される、請求項９記載の方法。

【請求項１１】

自己免疫性又は炎症性疾患が、関節リウマチ、多発性硬化症、増殖性ループス糸球体腎炎、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、乾癬、特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、クローン病及び全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症／グレーブス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性心炎、アジソン病、早発閉経、１型糖尿病、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、特発性白血球減少症、原発性胆汁性肝硬変、活動性慢性肝炎（ＨＢｓ　Ａｇ陰性）、原因不明肝硬変、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、強皮症、混合性結合組織疾患、円板状エリテマトーデス、及び全身性血管炎からなる群より選択される、請求項１０記載の方法。

【請求項１２】

選択された第２の治療用薬剤を投与することをさらに含む、請求項８～１１のいずれか一項記載の方法。

【請求項１３】

抗体を、投与の非経口経路、静脈内経路、又は皮下経路により投与する、請求項８～１２のいずれか一項記載の方法。

【請求項１４】

抗体又はその抗原結合フラグメントを、場合により、第２の薬剤に共役させる、（ｉ）請求項１～７のいずれか一項記載の抗体；及び（ｉｉ）医薬的に許容可能な賦形剤を含む医薬的組成物。

【請求項１５】

重鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号１～４、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４２、配列番号４４、配列番号４６、配列番号４８、配列番号５０、配列番号５３、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、又は配列番号７３のいずれかを含み；及び、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が、配列番号５～配列番号８、配列番号２６、配列番号３１、配列番号３６、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４５、配列番号４７、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号７４、配列番号７５、又は配列番号７６のいずれかを含む、重鎖可変領域のアミノ酸配列又は軽鎖可変領域をコードする単離ポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、一般的に、診断的及び治療的使用のためのヒト化抗ＣＤ４０抗体に関する。

より具体的には、ヒト化抗ＣＤ４０抗体及びＣＤ４０を発現する細胞により特徴付けられる種々の疾患又は障害の処置のための使用の方法を開示する。医薬的組成物及びヒト化抗ＣＤ４０抗体を含むキットも開示する。

【０００２】

発明の背景

ＣＤ４０は、４８kDaのＩ型内在性膜糖タンパク質であり、そして腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）受容体スーパーファミリーのメンバーである。ＣＤ４０は、種々の細胞型（正常及び腫瘍性Ｂ細胞、指状嵌入細胞、癌腫、上皮細胞（例、ケラチノサイト）、線維芽細胞（例、滑膜細胞）、ならびに血小板を含む）上で発現している。それは、また、単球、マクロファージ、一部の内皮細胞、及び濾胞樹状細胞上に存在する。ＣＤ４０はＢ細胞の個体発生において初期に発現され、ＣＤ１０及びＣＤ１９の出現に続いて、しかし、ＣＤ２１、ＣＤ２３、ＣＤ２４の発現、及び表面免疫グロブリンＭ（ｓＩｇＭ）の出現の前にＢ細胞前駆体上に出現する（Uckun et al., 1990, Blood 15: 2449）。ＣＤ４０は、また、扁桃及び骨髄由来の形質細胞上で検出されている（Pellat-Decounynck et al., 1994, Blood 84: 2597）。

【０００３】

ＣＤ４０のリガンドは、ＣＤ４０Ｌ（また、ＣＤ１５４、ｇｐ３９、及びＴＲＡＰとして言及される）であり、ＴＮＦスーパーファミリーのメンバーである。ＣＤ４０Ｌは、活性化ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞で主に発現し、そしてＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の小さなサブセットで発現する膜貫通タンパク質である（（Van Kooten C. and Banchereau, 2000）により概説される）。

【０００４】

ＣＤ４０とＣＤ４０Ｌの相互作用は、体液性及び細胞性免疫応答の両方を誘導する。ＣＤ４０は、このリガンド－受容体対を調節し、Ｂ細胞及び樹状細胞（ＤＣ）を含む他の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を活性化する（（Toubi and Shoenfeld, 2004);(Kiener, et al., 1995）により概説される）。Ｂ細胞上でのＣＤ４０の機能が、広範に試験されている。Ｂ細胞上でのＣＤ４０の活性化は、二次リンパ器官の胚中心における増殖、抗体分泌細胞への分化、及びアイソタイプスイッチを誘導する。インビトロでの試験では、サイトカイン産生（ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＴＮＦ－α、ＬＴ－α）、接着分子及び共刺激受容体の発現（ＩＣＡＭ、ＣＤ２３、ＣＤ８０、及びＣＤ８６）、ならびにＢリンパ球によるＭＨＣクラスＩ、ＭＨＣクラスＩＩ、及びＴＡＰトランスポーターの増加発現に対するＣＤ４０活性化の直接的な効果が示されている（Liu, et al., 1996）。これらのプロセスの大部分について、ＣＤ４０は、サイトカイン又は他の受容体－リガンド相互作用のいずれかと協調して作用する。

【０００５】

単球及びＤＣ上でのＣＤ４０シグナル伝達は、増強された生存ならびにサイトカイン（ＩＬ－１、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＴＮＦ－α、及びＭＩＰ－１α）の分泌をもたらす。これらＡＰＣ上でのＣＤ４０連結は、また、共刺激分子（例えばＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－３、ＣＤ８０、及びＣＤ８６など）の上方調節に導く。ＣＤ４０受容体の活性化は、Ｔ細胞の活性化を駆動する効率的なＡＰＣへのＤＣの完全な成熟を許す決定的なシグナルの１つである（Banchereau and Steinman, 1998）（Van Kooten C. and Banchereau, 2000）。

【０００６】

マウスモデルにおける最近の試験では、樹状細胞上のＣＤ４０シグナル伝達が、また、Ｔｈ１７細胞の生成において重要な役割を果たすことが示されたが、それは、疾患（例えば関節炎及び多発性硬化症など）における自己免疫のメディエーターとして考えられる（Iezzi, et al., 2009）（Perona-Wright, et al., 2009）。

【０００７】

ＣＤ４０及びＣＤ４０Ｌノックアウトマウスならびにアゴニスト及びアンタゴニスト抗マウス抗体の可用性は、いくつかの疾患モデルにおいてＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌ相互作用の

役割を試験する可能性を提供した。遮断性抗ＣＤ４０Ｌの投与は、ＳＮＦ１マウスにおけるループス腎炎などの自然疾患又はＮＯＤマウスにおける糖尿病又はコラーゲン誘導関節炎（ＣＩＡ）もしくは実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）などの実験的に誘導した形態の疾患を含む自己免疫のいくつかのモデルにおいて有益であることが実証されている（Toubi and Shoenfeld, 2004）。マウスにおけるＣＩＡは抗ＣＤ４０Ｌ　ｍＡｂにより阻害され、それは、軟骨及び骨の浸食に加えて、関節炎症の発生、コラーゲンに対する血清抗体価、滑膜下組織中への炎症細胞の浸潤を遮断した（Durie, et al., 1993）。ループス腎炎及びＥＡＥの両方について、抗ＣＤ４０Ｌは、また、進行中の疾患を緩和することができることが実証されており、疾患のエフェクター相におけるＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌの役割が確認された（Kalled, et al., 1998）；（Howard, et al., 1999）。

【０００８】

ＥＡＥの発生におけるＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌ相互作用についての役割が、また、ミエリン塩基性タンパク質について特異的なトランスジェニックＴ細胞受容体を保有するＣＤ４０Ｌ欠損マウスにおいて試験された。これらのマウスは、抗原を用いたプライミング後にＥＡＥを発生せず、ＣＤ４＋Ｔ細胞は静止状態のままであり、ＩＦＮ－γを産生しなかった（Grewal, et al., 1996）。

【０００９】

さらに、ＣＤ４０に対して向けられた阻害抗体は、炎症性疾患モデル（例えばＥＡＥなど）において有益な効果を示した。Lamann及び同僚は、拮抗的なマウス抗ヒトＣＤ４０　ｍＡｂ　ｍｕ５Ｄ１２及びこのｍＡｂのキメラバージョンが、非近交系マーモセットサルにおいて慢性脱髄ＥＡＥの臨床的発現を効果的に防止することを実証した（Laman, et al., 2002）；（Boon, et al., 2001）。追跡試験では、キメラ抗ヒトＣＤ４０抗体を用いた治療的処置が、ＭＲＩで検出可能な炎症を低下させ、マーモセットＥＡＥモデルにおいて既存の脳病変の拡大を遅延させることが示された（Hart, et al., 2005）。

【００１０】

アゴニスト活性を伴う抗ＣＤ４０抗体が、関節炎のマウスモデルにおいてテストされたところ、ある矛盾する結果を伴った。免疫刺激薬剤について予測される通り、アゴニスト（作用的な）抗マウスＣＤ４０　ｍＡｂ　ＦＧＫ４５は、ＣＩＡのＤＢＡ／１マウスモデルにおいて疾患を悪化させることが示された（Tellander, et al., 2000）。しかし、別の慢性ＣＩＡモデルにおいてＦＧＫ４５および、別のアゴニスト抗マウスＣＤ４　ｍＡｂ３／２３の両方がポジティブな治療的効果を示した（Mauri, et al., 2000）。この治療的処置計画におけるアゴニスト抗体が、Ｔｈ２応答に向かう免疫偏差（ＩＦＮ－γの減少レベルならびにＩＬ－４及びＩＬ－１０の増加レベルを伴う）を誘導することにより有益な効果を有することが、このグループにより推論された（Mauri, et al., 2000）。

【００１１】

ＣＤ４０／ＣＤ１５４相互作用を遮断することによる移植拒絶の防止も記述されている。アカゲザルにおける同種腎移植試験におけるｃｈ５Ｄ１２（キメラ抗ＣＤ４０アンタゴニスト）の使用は、ＣＤ４０のアンタゴニズムが疾患修飾及び１００日を過ぎて平均生存時間を長くするために十分であることを示す。ｃｈ５Ｄ１２を抗ＣＤ８６抗体と組み合わせ、シクロスポリンを用いた長期処置に続く同種移植試験の開始時にだけ与えられた場合、４年を超える平均生存時間が達成され、この組み合わせが耐性を潜在的に誘導することができることを示す（Haanstra, et al., 2005）。

【００１２】

このように、効率的なＴ細胞依存性免疫応答を駆動する際でのＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌ二分子の決定的な役割についての証拠を提供する十分な前臨床試験がある。ＣＤ４０シグナル伝達の遮断は、従って、疾患（例えばＲＡ、多発性硬化症、又は乾癬など）における病原性自己免疫応答を抑制するための適した必要とされる治療戦略として認識されている。しかし、今日まで、以前に開発中であった抗ＣＤ４０抗体が重大な副作用を有することが示されたという知見のため、そのような障害の治療的介入のために承認されているＣＤ４０抗体はない。このように、ＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌの作用において介入し、ＣＤ４０シグ

ナル伝達を遮断するために使用することができる治療用薬剤についての重大な必要性が残る。この必要性は、ＣＤ４０に特異的に結合し、ＣＤ４０に基づく障害の治療的介入におけるその使用を許す抗原結合特異性、親和性、ならびに薬物動態及び薬力学的特性を示す、新たなヒト化抗ＣＤ４０抗体により対処することができる。

【００１３】

発明の簡単な要約

本発明はヒト化モノクローナル抗体を提供し、それにおいて、前記抗体は、１nM未満のアンタゴニスト活性ＩＣ５０を有してヒトＣＤ４０に特異的に結合し、かつＢ細胞増殖において１００μg/mLまでアゴニズムを有さず、及び、前記抗体は、さらに、抗体が、非ヒト霊長類におけるインビボでの少なくとも１０日間の半減期を有することを特徴とする。

【００１４】

ヒト化モノクローナル抗体は、さらに、抗体が、３０mg/kg未満の用量で８日より多いカニクイザルにおける半減期を有することを特徴としうる。

【００１５】

例示的な実施態様において、本発明の抗体は、配列番号１～配列番号４のいずれかからなる群より選択される重鎖配列及び配列番号５～配列番号８のいずれかからなる群より選択される軽鎖配列を含む。

【００１６】

他の実施態様において、抗体は、配列番号１～４、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４２、配列番号４４、配列番号４６、配列番号４８、配列番号５０　配列番号５３、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、又は配列番号７３のいずれかの重鎖可変領域のアミノ酸配列を有するヒト化抗体又は抗体の抗原結合フラグメントである。

【００１７】

他の実施態様において、抗体は、配列番号５～配列番号８、配列番号２６、配列番号３１、配列番号３６、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４５、配列番号４７、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号７４、配列番号７５、又は配列番号７６のいずれかの軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含むヒト化抗体又は抗体の抗原結合フラグメントである。

【００１８】

特定の実施態様において、本明細書に記載するモノクローナル抗体は、それが重鎖及び軽鎖を含むことを特徴とし、それにおいて、重鎖ＣＤＲ１配列が配列番号９～配列番号１１からなる群より選択され、重鎖ＣＤＲ２配列が配列番号１２～配列番号１５からなる群より選択され、及び重鎖ＣＤＲ３配列が配列番号１６～配列番号１７からなる群より選択される；ならびに、本願モノクローナル抗体において、軽鎖ＣＤＲ１配列が配列番号１８～配列番号２１からなる群より選択される配列を有し、配列番号２２～配列番号２３の軽鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号２４～配列番号２５からなる群より選択される軽鎖ＣＤＲ３配列を有する。

【００１９】

特定の実施態様において、本明細書に記載するモノクローナル抗体は、それが、配列番号１０の重鎖ＣＤＲ１配列、配列番号１３の重鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号１６の重鎖ＣＤＲ３配列を含むことを特徴とし、ならびに、それにおいて、前記抗体が、配列番号１９の軽鎖ＣＤＲ１配列、配列番号２２の軽鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号２４の軽鎖ＣＤＲ３配列を含む。

【００２０】

他の特定の実施態様において、本明細書に記載するモノクローナル抗体は、それが、配列番号９の重鎖ＣＤＲ１配列、配列番号１４の重鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号１６の重

鎖ＣＤＲ３配列を含むことを特徴とし、ならびに、それにおいて、前記抗体が、配列番号２０の軽鎖ＣＤＲ１配列、配列番号２２の軽鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号２４の軽鎖ＣＤＲ３配列を含む。

【００２１】

別の特定の実施態様において、本明細書に記載するモノクローナル抗体は、それが、配列番号９の重鎖ＣＤＲ１配列、配列番号１４の重鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号１６の重鎖ＣＤＲ３配列を含むことを特徴とし、ならびに、それにおいて、前記抗体が、配列番号２０の軽鎖ＣＤＲ１配列、配列番号２２の軽鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号２４の軽鎖ＣＤＲ３配列を含む。

【００２２】

別の特定の実施態様において、本明細書に記載するモノクローナル抗体は、それが、配列番号１１の重鎖ＣＤＲ１配列、配列番号１５の重鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号１７の重鎖ＣＤＲ３配列を含むことを特徴とし、ならびに、それにおいて、前記抗体が、配列番号２１の軽鎖ＣＤＲ１配列、配列番号２３の軽鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号２５の軽鎖ＣＤＲ３配列を含む。

【００２３】

また、本発明の好ましい抗体の重鎖についての個々の配列が本明細書に記載される。本発明は、例えば、配列番号１～４のいずれか１つの重鎖可変ドメイン配列を含む抗ＣＤ４０抗体に関する。抗ＣＤ４０抗体は、さらに、配列番号５～配列番号８のいずれか１つの軽鎖可変ドメイン配列を含むとして特徴付けられる。

【００２４】

また、それぞれ配列番号２７及び配列番号２６；それぞれ配列番号２８及び配列番号２６；それぞれ配列番号２９及び配列番号２６；それぞれ配列番号３０及び配列番号２６；それぞれ配列番号３２及び配列番号３１；それぞれ配列番号３３及び配列番号３１；それぞれ配列番号３４及び配列番号３１；それぞれ配列番号３５及び配列番号３１；それぞれ配列番号３７及び配列番号３６；それぞれ配列番号３８及び配列番号３６；それぞれ配列番号３９及び配列番号３６；それぞれ配列番号４０及び配列番号３６のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントが考えられる。

【００２５】

別の実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号２７及び配列番号２６のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントに関する。

【００２６】

別の実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号２８及び配列番号２６のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントに関する。

【００２７】

別の実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号２９及び配列番号２６のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントに関する。

【００２８】

別の実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号３０及び配列番号２６のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントに関する。

【００２９】

別の実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号３２及び配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントに関する。

【００３０】

別の実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号３３及び配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントに関する。

【００３１】

別の実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号３４及び配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントに関する。

【００３２】

別の実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号３５及び配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントに関する。

【００３３】

別の実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号３７及び配列番号３６のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントに関する。

【００３４】

別の実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号３８及び配列番号３６のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントに関する。

【００３５】

別の実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号３９及び配列番号３６のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントに関する。

【００３６】

別の実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号４０及び配列番号３６のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントに関する。

【００３７】

別の実施態様は、ヒトＣＤ４０に特異的に結合する単離抗体又は抗原結合フラグメントに関し、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、又は配列番号３０のヒト可変ドメイン重鎖アミノ酸配列のフレームワーク領域のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を有するフレームワーク領域を含むヒト化重鎖可変ドメインを含み、及び、配列番号２６の対応する軽鎖可変ドメインと少なくとも９０％同一である軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３８】

別の実施態様は、ヒトＣＤ４０に特異的に結合する単離抗体又は抗原結合フラグメントに関し、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、又は配列番号３５のヒト可変ドメイン重鎖アミノ酸配列のフレームワーク領域のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を有するフレームワーク領域を含むヒト化重鎖可変ドメインを含み、及び、配列番号３１の対応する軽鎖可変ドメインと少なくとも９０％同一である軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３９】

別の局面において、本発明は、直ぐ上の実施態様に記載する単離抗体又は抗原結合フラグメントに関し、それにおいて、重鎖アミノ酸配列は配列番号３２である；別の実施態様において、重鎖アミノ酸配列は配列番号３３である；別の実施態様において、重鎖アミノ酸配列は配列番号３４である；及び、別の実施態様において、重鎖アミノ酸配列は配列番号３５である。

【００４０】

また、ヒトＣＤ４０に特異的に結合する単離抗体又は抗原結合フラグメントが考えられ、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、又は配列番号４０のヒト可変ドメイン重

鎖アミノ酸配列のフレームワーク領域のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を有するフレームワーク領域を含むヒト化重鎖可変ドメインを含み、及び、配列番号３６の対応する軽鎖と少なくとも９０％同一である軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００４１】

別の局面において、本発明は、直ぐ上の実施態様に記載する単離抗体又は抗原結合フラグメントに関し、それにおいて、重鎖アミノ酸配列は配列番号３７である；別の実施態様において、重鎖アミノ酸配列は配列番号３８である；別の実施態様において、重鎖アミノ酸配列は配列番号３９である；及び、別の実施態様において、重鎖アミノ酸配列は配列番号４０である。

【００４２】

本発明の抗体は、さらに、前記抗体がＣＤ４０Ｌのその非存在においてＢ細胞からのサイトカインの産生を刺激しないことを特徴としうる。

【００４３】

本発明の抗体は、さらに、前記抗体が、２倍未満の比率の低下を伴い、５０％ヒト血清の存在においてヒトＣＤ４０に結合することを特徴としうる。

【００４４】

本発明の抗体は、さらに、前記抗体が哺乳動物において濃度１㎎/kgでＩｇＭ及びＩｇＧ産生の阻害を産生することを特徴としうる。

【００４５】

本発明の抗体を、種々の治療的、予防的、診断的、及び他の方法において使用してもよい。例えば、本発明は、哺乳動物においてヒトＣＤ４０の機能を遮断する方法を記載し、前記哺乳動物においてＣＤ４０媒介性の免疫応答を遮断するために十分な量の本発明の抗体を含む組成物を前記哺乳動物に投与することを含む。

【００４６】

また、哺乳動物において移植片対宿主疾患を処置又は寛解する方法であって、前記哺乳動物において移植片対宿主疾患の症状の１つ又は複数を減少させるために十分な量の本発明の抗体を含む組成物を前記哺乳動物に、投与することを含む。

【００４７】

例として、自己免疫性又は炎症性疾患は、しかし、限定しないが、以下を含みうる：関節リウマチ、多発性硬化症、増殖性ループス糸球体腎炎、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、乾癬、特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、クローン病及び全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症／グレーブス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性心炎、アジソン病、早発閉経、１型糖尿病、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、特発性白血球減少症、原発性胆汁性肝硬変、活動性慢性肝炎（ＨＢｓ抗原陰性）、原因不明肝硬変、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、強皮症、混合性結合組織疾患、円板状エリテマトーデス、及び全身性血管炎。例示的な実施態様において、哺乳動物は関節リウマチを有する。

【００４８】

本発明の方法は、さらに、ＴＮＦアンタゴニスト、疾患修飾抗リウマチ薬、ＣＴＬＡ４アンタゴニスト、抗ＩＬ－６受容体ｍＡｂ、及び抗ＣＤ２０　ｍＡｂからなる群より選択される第２の治療用薬剤を投与することを含みうる。

【００４９】

特定の実施態様において、炎症性疾患又は自己免疫性疾患は、ＣＤ４０及びＣＤ２０の両方を発現している細胞に関連付けられる炎症性疾患又は自己免疫性疾患である。

【００５０】

特定の方法において、処置は、非経口の投与経路により抗体組成物を投与することを含む。

【００５１】

特定の方法において、処置は、抗体組成物を静脈内又は皮下投与することを含む。

【００５２】

本発明の追加の方法は、ヒト患者においてＢ細胞による抗体産生を阻害することを含み、本発明の抗ＣＤ４０抗体の効果的な量を前記ヒト患者に投与することを含む。

【００５３】

より具体的には、ヒト患者は、ＣＤ４０発現細胞に関連付けられる炎症性疾患又は自己免疫性疾患を有する。

【００５４】

例示的な実施態様において、ヒト患者は、以下からなる群より選択される自己免疫性又は炎症性疾患からなる群より選択される自己免疫性疾患に苦しんでいる：関節リウマチ、多発性硬化症、増殖性ループス糸球体腎炎、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、乾癬、特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、クローン病及び全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症／グレーブス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性心炎、アジソン病、早発閉経、１型糖尿病、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、特発性白血球減少症、原発性胆汁性肝硬変、活動性慢性肝炎（ＨＢｓ抗原陰性）、原因不明肝硬変、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、強皮症、混合性結合組織疾患、円板状エリテマトーデス、及び全身性血管炎。

【００５５】

本発明の別の方法は、ヒトＣＤ４０抗原を発現する細胞の成長を阻害することに関し、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントを細胞に投与することを含み、その抗体又は抗原結合フラグメントはヒト細胞表面ＣＤ４０抗原に特異的に結合し、それにおいて、ＣＤ４０抗原への抗体又は抗原結合フラグメントの結合は、細胞の成長又は分化を阻害する。

【００５６】

また、ＣＤ４０関連障害を有する被験体を処置する方法が考えられ、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントを被験体に投与することを含み、その抗体又は抗原結合フラグメントはヒトＣＤ４０に特異的に結合し、それにおいて、ＣＤ４０への抗体又は抗原結合フラグメントの結合は、ＣＤ４０関連障害の細胞の成長又は分化を阻害する。細胞は、しかし、限定しないが、Ｂリンパ芽球様細胞、膵臓細胞、肺細胞、乳腺細胞、卵巣細胞、結腸細胞、前立腺細胞、皮膚細胞、頭頸部細胞、膀胱細胞、骨細胞、又は腎臓細胞でありうる。

【００５７】

細胞の成長又は分化を阻害するための処置方法は、慢性リンパ性白血病、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、Ｔ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、又はカポジ肉腫のための処置において有用でありうる。

【００５８】

また、末梢Ｂ細胞の枯渇を誘導するための方法が考えられ、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントを細胞に投与することを含み、その抗体又は抗原結合フラグメントはヒト細胞表面ＣＤ４０抗原に特異的に結合し、それにおいて、ＣＤ４０抗原への抗体又は抗原結合フラグメントの結合は、細胞の枯渇を誘導する。

【００５９】

特定の実施態様において、抗体又は抗原結合フラグメントを、免疫障害を有する被験体に投与する。例えば、免疫障害は関節リウマチ又は全身性エリテマトーデスである。

【００６０】

また、被験体において関節リウマチを処置する方法が考えられ、本発明の抗体を前記被験体に投与することを含み、それにおいて、前記抗体は、前記被験体においてＣＤ４０の機能を遮断するアンタゴニスト抗体である。

【００６１】

好ましくは、抗体を、前記被験体においてＢ細胞分化及び抗体アイソタイプスイッチを阻害するために効果的な量で投与する。

【００６２】

他の実施態様において、抗体を、前記被験体におけるＴ細胞及びマクロファージ中でのサイトカイン及びケモカイン産生ならびに付着分子の上方調節を阻害するために効果的な

量で投与する。好ましくは、抗体を、前記被験体において樹状細胞の活性化を阻害するために効果的な量で投与する。

【００６３】

他の実施態様において、方法は、さらに、抗体を、前炎症性サイトカイン、ケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ、プロスタグランジンの産生を阻害し、前記被験体において非免疫細胞中の付着分子を下方調節するために効果的な量で投与することを特徴とする。

【００６４】

特定の実施態様において、抗体を、メトトレキサート投与及び／又はエンブレル／ヒュミラの投与を含む計画との組み合わせで投与する。

【００６５】

治療を受けるための被験体は、関節リウマチを有し、メトトレキサート処置単独に非応答性であった被験体である。

【００６６】

特定の実施態様において、方法は、メトトレキサート投与及び／又はエンブレル／ヒュミラの投与を含む計画を用いて前記被験体を処置することを含む。

【００６７】

本発明の方法は、さらに、それにおいて、前記アンタゴニスト抗ＣＤ４０抗体を用いた前記被験体の処置が、メトトレキサート単独、エンブレル単独、エンブレル＋メトトレキサートの組み合わせを用いた処置よりも優れた効力を有することを特徴としうる。

【００６８】

本発明の方法は、さらに、それにおいて、前記アンタゴニスト抗ＣＤ４０抗体を用いた前記被験体の処置が、メトトレキサートに対する不適当な応答を有した患者においてエンブレル＋ＭＴＸを用いた処置よりも優れた効力を有することを特徴としうる。

【００６９】

特定の実施態様において、抗体を、抗ＴＮＦ薬剤を含む計画との組み合わせで投与する。

【００７０】

特定の実施態様において、被験体は、関節リウマチを有し、抗ＴＮＦ薬剤単独を用いた処置に非応答性であった被験体として特徴付けられる。そのような実施態様において、方法は、前記アンタゴニスト抗ＣＤ４０抗体と組み合わせた抗ＴＮＦ薬剤を用いた処置を含む計画を用いて前記被験体を処置することを含みうる。

【００７１】

特定の実施態様において、前記アンタゴニスト抗ＣＤ４０抗体を用いた前記被験体の処置は、抗ＴＮＦ薬剤を用いた処置よりも優れた効力を有する。

【００７２】

さらに他の実施態様において、方法は、前記アンタゴニスト抗ＣＤ４０抗体を用いた前記被験体の処置が、抗ＴＮＦ薬剤単独に対する不適当な応答を有した患者においてオレンシア又はリツキサンを用いた処置よりも優れた効力を有することを特徴とする。

【００７３】

本発明では、さらに、（ｉ）本明細書に記載する抗体又は抗原結合フラグメント；及び（ｉｉ）医薬的に許容可能な賦形剤を含む医薬的組成物が考えられる。そのような組成物において、その抗体又は抗原結合フラグメントは、有利には、第２の薬剤（例えば、細胞傷害性薬剤、ＰＥＧ担体、酵素、又はマーカーなど）に共役させてもよい。

【００７４】

また、本明細書において考慮されるのは、配列番号１～４、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４２、配列番号４４、配列番号４６、配列番号４８、配列番号５０、配列番号５３，配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号

６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、又は配列番号７３のいずれかの重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする単離ポリヌクレオチドである。

【００７５】

また、本明細書において考慮されるのは、配列番号５～配列番号８、配列番号２６、配列番号３１、配列番号３６、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４５、配列番号４７、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号７４、配列番号７５、又は配列番号７６のいずれかの軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする単離ポリヌクレオチドである。

【００７６】

本発明は、さらに、哺乳動物におけるヒトＣＤ４０の機能を遮断するための薬物の製造のための本明細書に記載する抗体の使用に関し、それにおいて、薬物は、前記哺乳動物においてＣＤ４０媒介性の免疫応答を遮断する。

【００７７】

一実施態様において、本発明は、哺乳動物において移植片対宿主疾患を処置又は寛解するための薬物の製造に関する。

【００７８】

例示的な実施態様において、薬物は、関節リウマチ、多発性硬化症、増殖性ループス糸球体腎炎、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、乾癬、特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、クローン病及び全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症／グレーブス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性心炎、アジソン病、早発閉経、１型糖尿病、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、特発性白血球減少症、原発性胆汁性肝硬変、活動性慢性肝炎（ＨＢｓ抗原陰性）、原因不明肝硬変、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、強皮症、混合性結合組織疾患、円板状エリテマトーデス、及び全身性血管炎からなる群より選択される自己免疫性又は炎症性疾患の処置のために製造される。

【００７９】

一部の実施態様において、薬物は、さらに、ＴＮＦアンタゴニスト、疾患修飾抗リウマチ薬、ＣＴＬＡ４アンタゴニスト、抗ＩＬ－６受容体ｍＡｂ、及び抗ＣＤ２０ｍＡｂからなる群より選択される第２の治療用薬剤を含みうる。

【００８０】

薬物は、非経口の投与経路における使用のために製造されうる。薬物は、静脈内又は皮下での使用のために製造されうる。

【００８１】

別の実施態様では、ヒト患者におけるＢ細胞による抗体産生の阻害のための薬物の製造のための本明細書に記載する抗体の使用が考えられる。

【００８２】

別の実施態様では、ヒトＣＤ４０抗原を発現する細胞の成長及び／又は分化を阻害するための薬物の製造のための本明細書に記載する抗体の使用が考えられる。

【００８３】

別の実施態様では、ＣＤ４０関連障害を有する被験体の処置のための薬物の製造のための本明細書に記載する抗体の使用が考えられ、それにおいて、ＣＤ４０への前記薬物中の抗体又は抗原結合フラグメントの結合は、ＣＤ４０関連障害の細胞の成長又は分化を阻害する。

【００８４】

薬物は、Ｂリンパ芽球様細胞、膵臓細胞、肺細胞、乳腺細胞、卵巣細胞、結腸細胞、前立腺細胞、皮膚細胞、頭頸部細胞、膀胱細胞、骨細胞、又は腎臓細胞より選択されるＣＤ４０関連障害の細胞の処置における使用のために製造されうる。

【００８５】

薬物は、慢性リンパ性白血病、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、Ｔ細胞リンパ腫、

非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、又はカポジ肉腫の処置における使用のために製造されうる。

【００８６】

別の実施態様では、末梢Ｂ細胞の枯渇を誘導するための薬物の製造における本発明の抗体の使用が考えられ、それにおいて、薬物の抗体又は抗原結合フラグメントはヒト細胞表面ＣＤ４０抗原に特異的に結合し、それにおいて、ＣＤ４０抗原への抗体又は抗原結合フラグメントの結合は、細胞の枯渇を誘導する。

【００８７】

薬物は、免疫障害を有する被験体の処置における使用のために製造されうる。

【００８８】

薬物は、関節リウマチ又は全身性エリテマトーデスの処置における使用のために製造されうる。

【００８９】

別の実施態様では、被験体における関節リウマチの処置のための薬物の製造における本発明の抗体の使用が考えられる。

【００９０】

薬物は、前記被験体におけるＢ細胞分化及び抗体アイソタイプスイッチの阻害における使用のために製造されうる。

【００９１】

薬物は、前記被験体におけるＴ細胞及びマクロファージ中でのサイトカイン及びケモカイン産生ならびに付着分子の上方調節の阻害における使用のために製造されうる。

【００９２】

薬物は、前記被験体における樹状細胞の活性化の阻害における使用のために製造されうる。

【００９３】

薬物は、前炎症性サイトカイン、ケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ、プロスタグランジンの産生の阻害、及び前記被験体における非免疫細胞中での付着分子の下方調節における使用のために製造されうる。

【００９４】

特定の実施態様において、薬物は、メトトレキサート投与及び／又はエンブレル／ヒュミラの投与を含む計画との組み合わせで投与される組み合わせ薬物として製造される。

【００９５】

他の実施態様において、薬物は組み合わせ薬物として製造され、薬物は、本発明の抗体を含むことに加えて、抗ＴＮＦ薬剤をさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【００９６】

【図１Ａ】Ａ．フローサイトメトリーにより測定したＣＤ４０トランスフェクトＨＥＫ－２９３細胞上でのヒト化抗体の結合曲線及び対応するＥＣ５０値。

【図１Ｂ】Ｂ．フローサイトメトリーにより測定したＣＤ４０トランスフェクトＨＥＫ細胞上での抗体Ａ、抗体Ｂ、及び抗体Ｃの結合の比較。１つの実験についての代表的なデータを示す。

【図２】フローサイトメトリーにより測定したＲＡＭＯＳ細胞上でのヒト化抗体の結合曲線及び対応するＥＣ５０値。１つの実験についての代表的なデータを示す。

【図３Ａ】ヒト初代Ｂ細胞増殖アッセイにおけるアンタゴニスト活性についてのマウス及びヒト化抗体のテスト。（Ａ）代表的な抗体滴定曲線及び結果として得られるＩＣ５０値を、各々のマウス前駆体抗体について描写する。１つのドナーについての代表的なデータを示す。

【図３Ｂ】ヒト初代Ｂ細胞増殖アッセイにおけるアンタゴニスト活性についてのマウス及びヒト化抗体のテスト。（Ｂ）４Ｄ１１と比較した種々のヒト化抗ＣＤ４０抗体のアンタゴニズムを描写する阻害曲線のオーバーレイ。

【図４】ヒト初代Ｂ細胞増殖アッセイにおけるアンタゴニスト（ＩＣ５０）及びアゴニスト（ＳＩ＝刺激指数）活性についてヒト化抗体をテストした結果の要約。種々の抗ＣＤ４０抗体４Ｄ１１、Ｇ２８．５、及び５Ｄ１２を比較のために示す。
【図５】ヒト全血アッセイでのＣＤ４０誘導性ＣＤ８６上方調節の阻害についての抗体Ｂ、抗体Ａ、及び抗体Ｃのテスト。４Ｄ１１抗ＣＤ４０抗体を比較のために示す。ＩｇＧ１アイソタイプコントロールは、このアッセイにおいて効果を示さなかった。１つのドナーについての代表的なデータを示す。
【図６Ａ】ヒト精製Ｂ細胞及びヒト全血でのＣＤ４０誘導性ＣＤ８６上方調節の阻害についての抗体Ｂのテストの結果の要約。（Ａ）ＩＣ５０及び（Ｂ）ＩＣ９０の両方の点でのデータを描写する。ＩｇＧ１アイソタイプコントロールはいずれのアッセイでも効果を示さなかった。複数のドナー（ｎ＝４－５）についてのデータを表に要約する。
【図６Ｂ】ヒト精製Ｂ細胞及びヒト全血でのＣＤ４０誘導性ＣＤ８６上方調節の阻害についての抗体Ｂのテストの結果の要約。（Ａ）ＩＣ５０及び（Ｂ）ＩＣ９０の両方の点でのデータを描写する。ＩｇＧ１アイソタイプコントロールはいずれのアッセイでも効果を示さなかった。複数のドナー（ｎ＝４－５）についてのデータを表に要約する。
【図７】カニクイザル全血アッセイにおけるＣＤ４０誘導性ＣＤ８６上方調節の阻害についての抗体Ｂ、抗体Ａ、及び抗体Ｃのテスト。ＩｇＧ１アイソタイプコントロールはこのアッセイにおいて効果を示さなかった。１つのドナーについての代表的なデータを示す。
【図８】１及び１０mg/kgの各抗体の投与に続く、カニクイザルにおける抗体Ａ（左パネル）及び抗体Ｂ（右パネル）についての血漿濃度時間曲線。データは、各抗体についての３匹の動物中への投与の要約である。
【図９】各抗体を用いた処置後の３つの時間点での（抗体Ｂ）及び（抗体Ａ）の投与前でのカニクイザルからのＣＤ８６陽性Ｂ細胞のパーセンテージの変化。抗体Ｂ（上パネル）及び抗体Ａを、各々、１mg/kg（左パネル）又は１０mg/kg（右パネル）を用いて３匹の動物に投与した。
【図１０Ａ】１．２５×10^6個のヒトＰＢＭＣの注射後２週目でのＮＳＧマウスにおける（Ａ）ヒトＩｇＧ及び（Ｂ）ヒトＩｇＭレベル。マウスを、ヒトＰＢＭＣのトランスファーの１日前に用量１mg/kgで賦形剤、アイソタイプコントロール、ならびに抗体Ａ、抗体Ｂ、及び抗体Ｃを用いて処置する。
【図１０Ｂ】１．２５×10^6個のヒトＰＢＭＣの注射後２週目でのＮＳＧマウスにおける（Ａ）ヒトＩｇＧ及び（Ｂ）ヒトＩｇＭレベル。マウスを、ヒトＰＢＭＣのトランスファーの１日前に用量１mg/kgで賦形剤、アイソタイプコントロール、ならびに抗体Ａ、抗体Ｂ、及び抗体Ｃを用いて処置する。
【図１１】ヒト血小板への種々のマウス抗ヒトＣＤ４０抗体の結合。
【図１２】全血中のヒトＢ細胞及び血小板上の抗ＣＤ４０　ｍＡｂ４Ｄ１１に対する抗体Ｂの結合比較の結果の要約。
【図１３】野生型及びノックアウトＩｇＧ１コンストラクトを用いたＡＤＣＣ活性。
【００９７】
発明の詳細な説明
ＣＤ４０媒介性シグナル伝達は、現在、種々の標的障害に関与するものとして認識されている。これらの障害における介入が治療的に有益でありうることを示す種々の前臨床データの可用性にもかかわらず、自己免疫性疾患の処置において使用することができるアンタゴニスト抗ＣＤ４０抗体についての必要性が残る。本発明は、好ましい実施態様において、ＣＤ４０を認識するヒト化抗体に関する。
特定の実施態様において、これらのヒト化抗体の配列は、特定のリードマウス抗体の配列に基づいて同定されている。
【００９８】
用語「ＣＤ４０」及び「ＣＤ４０表面抗原」は、正常及び腫瘍性Ｂ細胞の表面上に発現される約４８kDの糖タンパク質を指し、細胞増殖及び分化に関与するシグナルのための受容体として機能する（Ledbetter et al., 1987, J. Immunol. 138: 788-785）。ＣＤ４０

をコードするｃＤＮＡ分子が、バーキットリンパ腫細胞株Ｒａｊｉから調製されたライブラリーから単離されている（Stamenkovic et al., 1989, EMBO J. 8: 1403）。

【００９９】

本明細書において使用する通り、ＣＤ４０を内因的に発現する細胞は、ＣＤ４０の表面発現により特徴付けられる任意の細胞（しかし、限定しないが、正常及び腫瘍性Ｂ細胞、指状細胞、基底上皮細胞、癌細胞、マクロファージ、内皮細胞、濾胞樹状細胞、扁桃細胞、ならびに骨髄由来の形質細胞を含む）である。一部の実施態様において、ＣＤ４０分子はヒトＣＤ４０分子である。

【０１００】

本発明の抗体は、ヒト組換え及び天然ＣＤ４０に特異的に結合する。ヒト化モノクローナル抗体であって、前記抗体は、１nM未満のアンタゴニスト活性ＩＣ５０を有してヒトＣＤ４０に特異的に結合し、Ｂ細胞増殖において１００μg/mLまでアゴニズムを有さず、及び、それにおいて、前記抗体は、さらに、抗体が、非ヒト霊長類におけるインビボでの少なくとも１０日間の半減期を有することを特徴とする。

【０１０１】

好ましくは、抗体は、１nM未満のＥＣ５０を伴いＣＤ４０－Ｆｃ複合体中のＣＤ４０に、２．５nM未満のＥＣ５０を伴いＣＤ４０発現細胞中のＣＤ４０に特異的に結合する。抗体のアンタゴニスト特性は、それが１nM未満のＢ細胞又は樹状細胞のアンタゴニスト活性ＩＣ５０を有する点で定義される。抗体は、さらに、他の抗ＣＤ４０抗体（例、抗ＣＤ４０抗体４Ｄ１１）と比較して、増加したインビボ半減期を有する優れた薬物動態特性を有する。

【０１０２】

本明細書において使用する通り、ＣＤ４０を発現する細胞は、ＣＤ４０の表面発現により特徴付けられる任意の細胞（しかし、限定しないが、正常及び腫瘍性Ｂ細胞、指状細胞、基底上皮細胞、癌細胞、マクロファージ、内皮細胞、濾胞樹状細胞、扁桃細胞、ならびに骨髄由来の形質細胞を含む）である。一部の実施態様において、ＣＤ４０分子はヒトＣＤ４０分子である。

【０１０３】

本発明の抗体は、特定の「ＣＤ４０抗原エピトープ」及び「ＣＤ４０エピトープ」を認識する。本明細書に記載する通り、これらの用語は、抗ＣＤ４０抗体との免疫反応が可能な分子（例、ペプチド）又は分子のフラグメントを指し、及び、例えば、軽鎖配列番号２６と重鎖配列番号２７、２８、２９、もしくは３０のいずれか；又は軽鎖配列番号３１と重鎖配列番号３２、３３、３４、もしくは３５のいずれか；又は軽鎖配列番号３６と重鎖配列番号３７、３８、３９、もしくは４０のいずれかの重鎖／軽鎖配列の組み合わせを有する抗体のいずれかにより認識されるＣＤ４０抗原決定基を含む。ＣＤ４０抗原エピトープは、タンパク質、タンパク質フラグメント、ペプチドなどの中に含まれうる。エピトープは、最も一般的なタンパク質、短いオリゴペプチド、オリゴペプチド模倣物（即ち、ＣＤ４０抗原の抗体結合特性を模倣する有機化合物）、又はそれらの組合せである。

【０１０４】

抗体又は免疫グロブリンの一般化構造は、当業者に周知であり、これらの分子は、典型的には、約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、２つの同一の軽（Ｌ）鎖及び２つの同一の重（Ｈ）鎖で構成される。各々の軽鎖は、１つのジスルフィド結合により重鎖に共有結合的に連結されてヘテロ二量体を形成し、ヘテロ四量体分子は、ヘテロ二量体の２つの同一の重鎖間の共有結合的ジスルフィド連結を通じて形成される。軽鎖及び重鎖は１つのジスルフィド結合により連結されるが、２つの重鎖間のジスルフィド連結の数は免疫グロブリンアイソタイプにより変動する。各々の重鎖及び軽鎖は、また、規則的間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有する。各々の重鎖はアミノ末端に可変ドメイン（V_H）を有し、３つ又は４つの定常ドメイン（C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}、及びC_{H4}）、ならびにC_{H1}及びC_{H2}の間のヒンジ領域が続く。各々の軽鎖は２つのドメイン、アミノ末端可変ドメイン（V_L）及びカルボキシ末端定常ドメイン（C_L）を有する。V_L

ドメインはV_Hドメインと非共有結合的に会合するのに対し、C_Lドメインは、一般に、ジスルフィド結合を介してC_{H1}ドメインに共有結合的に連結される。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられる（Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186: 651-663.）。

【０１０５】

可変ドメイン内の特定のドメインは、異なる抗体間で広範に異なり、即ち、「超可変」である。これらの超可変ドメインは、その特定の抗原決定基についての各々の特定の抗体の結合及び特異性に直接的に関与する残基を含む。超可変性は、軽鎖及び重鎖可変ドメインの両方において、相補性決定領域（ＣＤＲ）又は超可変ループ（ＨＶＬ）として公知である３つのセグメント中に集中している。ＣＤＲが、Kabat et al., 1991, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.における配列比較により定義されるのに対し、ＨＶＬは、Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917により記載される通りに、可変ドメインの三次元構造に従って構造的に定義される。これら２つの方法がＣＤＲのわずかに異なる同定をもたらす場合、構造的な定義が好ましい。Kabatにより定義される通り、ＣＤＲ－Ｌ１は軽鎖可変ドメイン中のおよそ残基２４～３４、ＣＤＲ－Ｌ２はおよそ残基５０～５６、及びＣＤＲ－Ｌ３はおよそ残基８９～９７に位置付けられる；ＣＤＲ－Ｈ１は重鎖可変ドメイン中のおよそ残基３１～３５、ＣＤＲ－Ｈ２はおよそ残基５０～６５、及びＣＤＲ－Ｈ３はおよそ残基９５～１０２に位置付けられる。重鎖及び軽鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３は、従って、所与の抗体について特異的な独特の機能的な特性を定義する。

【０１０６】

重鎖及び軽鎖の各々の内の３つのＣＤＲは、フレームワーク領域（ＦＲ）により分離され、それらはあまり変動しない傾向にある配列を含む。重鎖及び軽鎖可変ドメインのアミノ末端からカルボキシ末端に、ＦＲ及びＣＤＲが以下の順番で配置されている：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、及びＦＲ４。ＦＲの大部分でのβシートの配置によって、鎖の各々の内のＣＤＲを、互いの近接近中に、ならびに、他の鎖からのＣＤＲにもたらす。結果として得られる立体構造は抗原結合部位に寄与するが（Kabat et al., 1991, NIH Publ. No.91-3242, Vol.I, pages 647-669を参照のこと）、全てのＣＤＲ残基が必ずしも抗原結合に直接的に関与するわけではない。

【０１０７】

ＦＲ残基及びＩｇ定常ドメインは抗原結合に直接的に関与しないが、しかし、抗原結合に寄与する、及び／又は、抗体エフェクター機能を媒介する。一部のＦＲ残基は、少なくとも３つの方法で抗原結合に対して有意な効果を有すると考えられる：直接的にエピトープへ非共有結合的に結合することにより、１つ又は複数のＣＤＲ残基と相互作用することにより、及び、重鎖と軽鎖の間の界面に影響を及ぼすことにより。定常ドメインは、抗原結合に直接的に関与しないが、しかし、種々のＩｇエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、及び抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）における抗体の関与などを媒介する。

【０１０８】

脊椎動物の免疫グロブリンの軽鎖は、定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、２つの明らかに異なるクラス、カッパ（κ）及びラムダ（λ）の１つに割り当てられる。比較により、哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖は、定常ドメインの配列に従って、５つの主要なクラスの１つに割り当てられる：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭ。ＩｇＧ及びＩｇＡは、さらに、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1、及びIgA_2に分けられる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれα、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。天然免疫グロブリンのクラスのサブユニット構造及び三次元構造は周知である。

【０１０９】

用語「抗体」、「抗ＣＤ４０抗体」、「ヒト化抗ＣＤ４０抗体」、及び「変異体ヒト化

抗ＣＤ４０抗体」は、本明細書において最も広い意味で使用され、具体的には、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多特異的抗体（例、二重特異的抗体）、及び抗体フラグメント、例えば、所望の生物学的活性（例、ＣＤ４０結合）を示す抗体の可変ドメイン及び他の部分などを包含する。

【０１１０】

用語「モノクローナル抗体」（ｍＡｂ）は、実質的に均質な抗体の集団の抗体を指す；すなわち、その集団における個々の抗体は、少量で存在しうる自然発生する変異を除き、同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原決定基「エピトープ」に対して向けられる。従って、修飾語「モノクローナル」は、同一のエピトープに向けられる実質的に均一な抗体の集団を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を要求とするものとして解釈すべきではない。モノクローナル抗体は、当技術分野において公知の任意の技術又は方法論により作製することができることを理解すべきである；例えば、ハイブリドーマ方法（Kohler et al., 1975, Nature 256: 495）、又は当技術分野において公知の組換えＤＮＡ方法（例、米国特許第４，８１６，５６７号を参照のこと）、又はファージ抗体ライブラリーを使用して組換え産生されたモノクローナル抗体の単離方法（Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-628及びMarks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597に記載される技術を使用する）を含む。

【０１１１】

キメラ抗体は、１つの種（例、非ヒト哺乳動物、例えばマウスなど）からの抗体の重鎖及び軽鎖可変領域ならびに別の種（例、ヒト）の重鎖及び軽鎖定常領域からなり、第１の種（例、マウス）からの抗体の可変領域をコードするＤＮＡ配列を、第２の（例、ヒト）種からの抗体の定常領域についてのＤＮＡ配列に連結し、連結配列を含む発現ベクターを用いて宿主を形質転換し、それがキメラ抗体を産生することを許すことにより得ることができる。あるいは、キメラ抗体は、また、重鎖及び／又は軽鎖の１つ又は複数の領域又はドメインが、別の免疫グロブリンクラス又はアイソタイプからの、あるいはコンセンサス又は生殖系列配列からのモノクローナル抗体における対応する配列と同一である、相同である、又はその変異体である。キメラ抗体は、そのような抗体のフラグメントを含むことができる（抗体フラグメントが、その親抗体の所望の生物学的活性、例えば、同じエピトープへの結合を示すことを条件とする）（例、米国特許第４，８１６，５６７号；及びMorrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855）。

【０１１２】

用語「抗体フラグメント」、「抗ＣＤ４０抗体フラグメント」、「ヒト化抗ＣＤ４０抗体フラグメント」、「変異体ヒト化抗ＣＤ４０抗体フラグメント」は、全長抗ＣＤ４０抗体の部分を指し、それにおいて可変領域又は機能的能力が保持される（例えば、特定のＣＤ４０エピトープ結合）。抗体フラグメントの例は、しかし、限定しないが、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、及びｓｃＦｖ－Ｆｃフラグメント、ダイアボディ、直鎖抗体、一本鎖抗体、ミニボディ、抗体フラグメントから形成されたダイアボディ、及び抗体フラグメントから形成された多特異的抗体を含む。

【０１１３】

全長抗体は、酵素（例えばパパイン又はペプシンなど）を用いて処理し、有用な抗体フラグメントを生成することができる。パパイン消化を使用し、「Ｆａｂ」フラグメントと呼ばれる２つの同一の抗原結合抗体フラグメント（各々が単一の抗原結合部位を伴う）及び残りの「Ｆｃ」フラグメントを産生する。Ｆａｂフラグメントは、また、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖のC_{H1}ドメインを含む。ペプシン処理は、２つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋することが可能であるＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントをもたらす。

【０１１４】

Ｆａｂ’フラグメントは、C_{H1}ドメインのＣ末端に抗体ヒンジ領域からの１つ又は複数のシステインを含む、追加の残基の存在によりＦａｂフラグメントとは異なる。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体フラグメントは、ヒンジ領域中のシステイン残基により連結されたＦａｂ’フラグメントの対である。抗体フラグメントの他の化学結合も公知である。

【０１１５】
「Ｆｖ」フラグメントは、堅固な非共有結合的な会合における１つの重鎖及び１つの軽鎖の可変ドメインの二量体からなる完全な抗原認識及び結合部位を含む。この配置において、各々の可変ドメインの３つのＣＤＲが相互作用し、V_H-V_L二量体の表面上に抗原結合部位が定められる。集合的に、６つのＣＤＲが抗体に抗原結合特異性を付与する。
【０１１６】
「一本鎖Ｆｖ」又は「ｓｃＦｖ」抗体フラグメントは、抗体のV_H及びV_Lドメインを含む一本鎖Ｆｖ変異体であり、そこで、ドメインが単一のポリペプチド鎖中に存在する。一本鎖Ｆｖは、抗原を認識及び結合することが可能である。ｓｃＦｖポリペプチドは、また、場合により、ｓｃＦｖによる抗原結合のための所望の三次元構造の形成を促進するために、V_HとV_Lドメインの間に位置付けられるポリペプチドリンカーを含みうる（例、Pluckthun, 1994, In The Pharmacology of monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp.269-315を参照のこと）。
【０１１７】
他の認識された抗体フラグメントは、タンデムＦｄセグメント（$V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$）の対を含むものを含み、抗原結合領域の対を形成する。これらの「直鎖抗体」は、例えば、Zapata et al.1995, Protein Eng. 8(10): 1057-1062において記載される通り、二重特異的又は単一特異的でありうる。
【０１１８】
ヒト化抗体又はヒト化抗体フラグメントは、免疫グロブリンのアミノ酸配列変異体又はそのフラグメント（所定の抗原に結合することが可能である）を含み、実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する１つ又は複数のＦＲ及び実質的に非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する１つ又は複数のＣＤＲを含む、特定の型のキメラ抗体である。この非ヒトアミノ酸配列は、しばしば「インポート」配列として言及され、典型的には、「インポート」抗体ドメイン、特に可変ドメインから取られる。一般的に、ヒト化抗体は、ヒト重鎖又は軽鎖可変ドメインのＦＲの間に挿入された非ヒト抗体の少なくともＣＤＲ又はＨＶＬを含む。本発明は、ヒト生殖系列配列の重鎖及び軽鎖可変ドメインのＦＲの間に挿入された、表３及び表４に示すマウスモノクローナル抗体に由来するＣＤＲを含む特定のヒト化抗ＣＤ４０抗体を記載する。特定のマウスＦＲ残基がヒト化抗体の特定の機能に重要でありうるが、従って、ヒト生殖系列配列の重鎖及び軽鎖可変ドメイン残基のいくつかが、対応するマウス配列のものと同じになるように改変されることが理解されるであろう。
【０１１９】
別の局面において、ヒト化ＣＤ４０抗体は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメイン（例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab')_2$、Ｆａｂｃ、及びＦｖフラグメント中に含まれる）の実質的に全てを含み、それにおいて、ＣＤＲの全て、又は実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、具体的には、本明細書において、ＣＤＲの全てが、本明細書における以下の表１から４において詳述される通りのマウス配列であり、あるいは、ＦＲの全て、又は実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス又は生殖系列配列のものである。別の局面において、ヒト化抗ＣＤ４０抗体は、また、免疫グロブリンＦｃ領域の少なくとも部分、典型的にはヒト免疫グロブリンの部分を含む。通常、抗体は、軽鎖ならびに重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含む。抗体は、また、適切な場合、重鎖のC_{H1}、ヒンジ、C_{H2}、C_{H3}、及び／又はC_{H4}領域の１つ又は複数を含みうる。
【０１２０】
ヒト化抗ＣＤ４０抗体は、免疫グロブリンの任意のクラス（ＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＥを含む）及び任意のアイソタイプ（IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1、及びIgA_2を含む）より選択することができる。例えば、定常ドメインは補体固定定常ドメインでありうるが、そこでは、ヒト化抗体は細胞傷害活性を示すことが望ましく、アイソタイプは典型的にはIgG_1である。そのような細胞傷害活性

が望ましくない場合、定常ドメインは、別のアイソタイプ（例、ＩｇＧ$_2$）でありうる。代替のヒト化抗ＣＤ４０抗体は、１を上回る免疫グロブリンクラス又はアイソタイプからの配列を含むことができ、特定の定常ドメインを選択し、所望のエフェクター機能を最適化することは当技術分野の通常の技能内にある。特定の実施態様において、本発明は、ＩｇＧ１抗体であり、特に、エフェクター機能のノックアウトがあるＩｇＧ１抗体である抗体を提供する。

【０１２１】

ヒト化抗ＣＤ４０抗体のＦＲ及びＣＤＲ、又はＨＶＬは、親配列に正確に対応する必要はない。例えば、インポートＣＤＲ、又はＨＶＬ、又はコンセンサスもしくは生殖系列ＦＲ配列中の１つ又は複数の残基を、置換、挿入、又は欠失により変化（例、変異誘発）させてもよく、結果として得られるアミノ酸残基は、親配列のいずれかにおける対応する位置における本来の残基ともはや同一ではなく、しかし、抗体は、しかしながら、ＣＤ４０への結合の機能を保持する。そのような変化は、典型的には、広範ではなく、保存的な変化でありうる。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも７５％が、親コンセンサス配列又は生殖系列ＦＲ配列及びインポートＣＤＲ配列のものに対応しうる（よりしばしば少なくとも９０％、最も頻繁には９５％超、又は９８％超又は９９％超）。

【０１２２】

重鎖及び軽鎖可変領域の間の界面（「V_L-V_H界面」）に影響を及ぼす免疫グロブリン残基は、互いに関して、２つの鎖の近接性及び方向に影響を及ぼすものである。鎖間相互作用に関与しうる特定の残基は、V_L残基３４、３６、３８、４４、４６、８７、８９、９１、９６、及び９８ならびにV_H残基３５、３７、３９、４５、４７、９１、９３、９５、１００、及び１０３（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987）に示されるナンバリングシステムを利用する）を含む。米国特許第６，４０７，２１３号では、また、残基（例えばV_L残基４３及び８５ならびにV_H残基４３及び６０など）がこの相互作用に関与しうることが考察される。これらの残基はヒトＩｇＧだけについて示されているが、それらは種をわたり適用可能である。鎖間相互作用に関与することが合理的に予測される重要な抗体残基が、コンセンサス配列への置換のために選択される。

【０１２３】

用語「コンセンサス配列」及び「コンセンサス抗体」は、任意の特定のクラス、アイソタイプ、又はサブユニット構造、例えば、ヒト免疫グロブリン可変ドメインの全ての免疫グロブリンにおける各位置で最も頻繁に発生するアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を指す。コンセンサス配列は、特定の種の又は多くの種の免疫グロブリンに基づきうる。「コンセンサス」配列、構造、又は抗体は、特定の実施態様において記載する通り、コンセンサスヒト配列を包含し、任意の特定のクラス、アイソタイプ、又はサブユニット構造の全てのヒト免疫グロブリン中の各位置で最も頻繁に発生するアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を指すと理解される。このように、コンセンサス配列は、各々の位置に、１つ又は複数の公知の免疫グロブリンに存在するアミノ酸を有するアミノ酸配列を含むが、しかし、任意の単一の免疫グロブリンのアミノ酸配列全体を正確に複製しないことがある。可変領域のコンセンサス配列は、任意の自然に産生される抗体又は免疫グロブリンから得られない。Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md、及びその変異体。重鎖及び軽鎖コンセンサス配列のＦＲ、ならびにそのバリアントは、ヒト化抗ＣＤ４０抗体の調製のために有用な配列を提供する。例えば、米国特許第６，０３７，４５４号及び第６，０５４，２９７号を参照のこと。

【０１２４】

ヒト生殖系列配列は、ヒト集団において自然に見出される。それらの生殖系列遺伝子の組み合わせは、抗体多様性を生成する。抗体の軽鎖についての生殖系列の抗体配列は、保存されたヒト生殖系列カッパ又はラムダｖ遺伝子及びｊ遺伝子から来る。同様に、重鎖配列は生殖系列ｖ、ｄ、及びｊ遺伝子から来る（LeFranc, M-P, and LeFranc, G, “The Im

munoglobulin Facts Book” Academic Press, 2001）。

【０１２５】

本明細書において使用する通り、「変異体」、「抗ＣＤ４０変異体」、「ヒト化抗ＣＤ４０変異体」、又は「変異体ヒト化抗ＣＤ４０」は、各々、配列番号１～４の配列のいずれかからの少なくとも重鎖可変マウスＣＤＲ又は配列番号５～配列番号８のいずれかにおいて示すマウスモノクローナル抗体に由来する軽鎖マウスＣＤＲ配列及びヒトコンセンサス配列に由来するＦＲ配列を有するヒト化抗ＣＤ４０抗体を指す。変異体は、アミノ酸変化がＣＤ４０への抗体の結合を実質的に損なわないという条件で、１つ又は両方の軽鎖又は重鎖可変ドメインにおいて１つ又は複数のアミノ酸変化を有するものを含む。本明細書において産生される例示的なヒト化抗体は、抗体Ａ、抗体Ｂ、及び抗体Ｃとして指定されるものを含み、それらの種々の重鎖及び軽鎖配列を配列番号２６～配列番号４０に示す。

【０１２６】

「単離」抗体は、その自然環境の成分から同定ならびに分離及び／又は回収されたものである。抗体の自然環境での夾雑物質成分は、抗体の診断的又は治療的使用に干渉しうる物質であり、酵素、ホルモン、又は他のタンパク質性のもしくは非タンパク質性の溶質でありうる。一局面において、抗体は、抗体の重量で少なくとも９５%超の単離まで精製されうる。

【０１２７】

単離抗体は、それが産生された組換え細胞内でインサイツの抗体を含む。なぜなら、抗体の自然環境での少なくとも１つの成分が存在しないからである。通常、しかし、単離抗体は、組換え細胞物質が除去される少なくとも１つの精製工程により調製される。

【０１２８】

用語「抗体性能」は、抗体の抗原認識又はインビボでの抗体の有効性に寄与する因子を指す。抗体のアミノ酸配列における変化は、抗体の特性（例えばフォールディングなど）に影響を及ぼしうる、及び、物理的因子（例えば抗原への抗体結合の初速度（ｋａ）、抗原からの抗体の解離定数（ｋｄ）、抗原についての抗体の親和性定数（Ｋｄ）、抗体の立体構造、タンパク質の安定性、及び抗体の半減期など）に影響しうる。

【０１２９】

用語「エピトープタグ」は、本明細書において使用される場合、「エピトープタグ」に融合された抗ＣＤ４０抗体を指す。「エピトープタグ」は、抗体生産のためのエピトープを提供するための十分な数のアミノ酸を有するポリペプチドであるが、しかし、それがヒト化抗ＣＤ４０抗体の所望の活性に干渉しないように設計される。エピトープタグは、通常は、十分に独特であり、エピトープタグに対して産生された抗体は、他のエピトープと実質的に交差反応しない。適したタグポリペプチドは、一般的に、少なくとも６つのアミノ酸残基を含み、通常は、約８～５０アミノ酸残基、又は約９～３０残基を含む。エピトープタグ及びエピトープに結合する抗体の例は、インフルエンザＨＡタグポリペプチド及びその抗体１２ＣＡ５（Field et al., 1988 Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165）；ｃ－ｍｙｃタグならびにそれに対する８Ｆ９、３Ｃ７、６Ｅ１０、Ｇ４、Ｂ７、及び９Ｅ１０抗体（Evan et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5(12): 3610-3616）；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄ（ｇＤ）タグ及びその抗体（Paborsky et al. 1990, Protein Engineering 3(6): 547-553）を含む。特定の実施態様において、エピトープタグは「サルベージ受容体結合エピトープ」である。本明細書において使用する通り、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、ＩｇＧ分子のインビボでの血清半減期の増加に関与するＩｇＧ分子（例えばIgG_1、IgG_2、IgG_3、又はIgG_4など）のＦｃ領域のエピトープを指す。

【０１３０】

一部の実施態様において、本発明の抗体は、細胞傷害性薬剤に共役させてもよい。これは、細胞の機能を阻害又は防止する及び／又は細胞の破壊を起こす任意の物質である。この用語は、放射活性アイソトープ（例えばI^{131}、I^{125}、Y^{90}、及びRe^{186}など）、化学療法薬剤、ならびに毒素（例えば、細菌、真菌、植物、又は動物由来の酵素

活性毒素など）、及びそれらの断片を含むことを意図する。そのような細胞傷害性薬剤は、標準的な手順を使用して、本発明のヒト化抗体に結合させ、例えば、抗体を用いた治療について適応される患者を処置するために使用することができる。

【０１３１】

「化学療法薬剤」は、癌の処置において有用な化合物である。

本発明の治療用抗体と共役させることができうる化学療法薬剤の多数の例がある。

そのような化学療法薬剤の例は以下を含む：アルキル化薬剤（例えばチオテパ及びシクロホスファミドなど）；アルキルスルホネート（例えばブスルファン、インプロスルファン、及びピポスルファなど）；アジリジン（例えばベンゾドーパ、カルボコン、メチュアドーパ（meturedopa）、及びウレドパなど）；エチレンイミン及びメチルアメラミン（methylamelamine）（アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、及びトリメチルオロメラミン（trimethylolomelamine）を含む）；アセトゲニン（特に、ブラタシン及びブラタシノン）；カンプトテシン（合成アナログトポテカンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；ＣＣ－１０６５（そのアドゼレシン、カルゼレシン、及びビゼレシン合成アナログを含む）；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン１及びクリプトフィシン８）；ドラスタチン、アウリスタチン（アナログモノメチル－アウリスタチンＥ及びアナログモノメチル－アウリスタチンＦを含む）；デュオカルマイシン（合成アナログＫＷ－２１８９及びＣＢＩ－ＴＭＩを含む）；エレウセロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；ナイトロジェンマスタード（例えばクロランブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、酸化塩酸メクロレタミン、メルファラン、ノベムビチン、フェネステリン、プレドニムスチンなど）；トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソ尿素（例えばカルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなど）；抗生物質（例えばエンジイン抗生物質（例、カリケアミシン、特に、カリキアミシンガンマ１Ｉ及びカリキアミシンｐｈｉＩ１、例えば、Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33: 183-186(1994)を参照のこと））；ダイネミシン（ダイネミシンＡを含む）；ビスホスホネート（例えばクロドロネートなど）；エスペラミシン；ならびにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパク質エンジイン抗生物質色素体）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（ａｕｔｈｒａｍｙｃｉｎ）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、ドキソルビシン（Adriamycin（商標））（モルホリノ－ドキソルビシン、シアノモルフォリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシン、及びデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン（例えばマイトマイシンＣなど）、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、プロマイシン、ケラマイシン（quelamycin）、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン）；代謝拮抗剤（例えばメトトレキサート及び５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）など）；葉酸アナログ（例えばデノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサートなど）；プリンアナログ（例えばフルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなど）；ピリミジンアナログ（例えばアンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなど）；アンドロゲン（例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど）；抗副腎物質（例えばアミノグルテチミド、ミトーテン、トリロスタンなど）；葉酸補充薬（例えばフロリン酸；アセグラトン；アルドフォスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル（bestrabucil）；ビサントレン；エデトラキサート；デホファミン；デメコルチン；ジアジクオン；エフロルニチン；酢酸エリプチニウム；エポシロン；エトグルシド；硝酸ガリ

ウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；メイタンシノイド（例えばメイタンシン及びアンサミトシンなど）；ミトグアゾン、ミトザントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）；ラゾキサン；リゾキシン（rhizoxin）；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；２，２’，２’’－トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特に、Ｔ－２トキシン、ベラクリンＡ、ロリジンＡ、及びアンギジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミタブロニトール（mitabronitol）；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ａｒａ－Ｃ」）；シクロフォスファミド；チオテパ；タキソイド、例、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton, NJ）及びドキサタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhone-Poulenc Rorer,Antony, France）；クロラムブシル；ゲムシタビン（Gemzar（商標））；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金アナログ（例えばシスプラチン及びカルボプラチンなど）；ビンブラスチン；白金；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；ミトザントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン（Ｎａｖｅｌｂｉｎｅ（商標））；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；キセローダ；イバンドロネート；ＣＰＴ－１１；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＭＦＯ）；レチノイド（例えばレチノインなど）；カペシタビン；ならびに上のいずれかの医薬的に許容可能な塩、酸、又は誘導体。また、この定義において以下が含まれる：腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように作用する抗ホルモン薬剤、例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体修飾物質（例えば、タモキシフェン（Nolvadex（商標）を含む）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、４－ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、ＬＹ１１７０１８、オナプリストン、及びトレミフェン（Fareston（商標））を含む）；酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、それらは副腎におけるエストロゲン産生を調節する。例えば、４（５）－イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール（Megace（商標））、エキセメスタン、フォルメスタン、ファドロゾール、ボロゾール（Rivisor（商標））、レトロゾール（Femara（商標））、及びアナストロゾール（Arimidex（商標））など；ならびに抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリン；ならびに上のいずれかの医薬的に許容可能な塩、酸、又は誘導体。これらの薬剤の任意の１つ又は複数を本発明のヒト化抗体に共役させ、種々の障害の処置のための有用な治療用薬剤を提供してもよい。

【０１３２】

抗体は、また、プロドラッグに共役させてもよい。「プロドラッグ」は、親薬物と比較して、腫瘍細胞に対する細胞傷害性が少ない医薬的に活性な物質の前駆体又は誘導体形態であり、酵素的に活性化される又はより活性な形態に変換されることが可能である。例えば、Wilman, 1986, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", In Biochemical Society Transactions, 14, pp.375-382, 615th Meeting Belfast and Stella et al., 1985, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, In: "Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp.247-267, Humana Press.を参照のこと。有用なプロドラッグは、しかし、限定しないが、リン酸含有プロドラッグ、チオホスフェート含有プロドラッグ、硫酸含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、Ｄアミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、βラクタム含有プロドラッグ、場合により、置換フェノキシアセトアミド含有プロドラッグ、及び場合により置換フェニルアセトアミド含有プロドラッグ、５フルオロシトシン、及びより活性な細胞傷害性遊離薬物に変換することができる他の５フルオロウリジンプロドラッグを含む。プロドラッグ形態に誘導体化することができる細胞傷害性薬物の例は、しかし、限定しないが、上に記載するそれらの化学療法薬剤を含む。

【０１３３】

診断的ならびに治療的モニタリングの目的のために、本発明の抗体は、また、標識、標

識単独又は標識及び追加の第２の薬剤（プロドラッグ、化学療法薬剤など）のいずれかに結合させてもよい。標識は、他の第２の薬剤と区別され、検出可能な化合物又は組成物である薬剤を指し、それは、本発明のヒト化抗体に直接的又は間接的に共役させてもよい。標識はそれ自体が検出可能でありうる（例、ラジオアイソトープ標識又は蛍光標識）、又は、酵素標識の場合において、検出可能である基質化合物又は組成物の化学変化を触媒しうる。標識したヒト化抗ＣＤ４０抗体を調製し、種々の適用（インビトロ及びインビボでの診断を含む）において使用することができる。

【０１３４】

本発明の抗体は、インビボでのその送達をもたらすために、リポソーム調製物の一部として製剤化してもよい。「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質、及び／又は界面活性剤で構成される小さな小胞である。リポソームは、化合物又は製剤（例えば本明細書に開示するヒト化抗ＣＤ４０抗体など）の哺乳動物への送達のために有用であり、場合により、１つ又は複数の医薬的に活性な薬剤及び／又は標識に共役する又は組み合わせる。リポソームの成分は、一般に、二重層形成で配置され、生体膜の脂質配置と同様である。

【０１３５】

本発明の特定の局面は、本発明のヒト化抗体の１つ又は複数のドメインをコードする単離核酸に関する。「単離」核酸分子は、抗体核酸の天然供給源において通常は関連付けられる少なくとも一つの夾雑核酸分子から同定及び分離された核酸分子である。単離核酸分子は、天然細胞中に存在するような核酸分子から区別される。

【０１３６】

本発明の種々の局面において、ヒト化抗体の１つ又は複数のドメインを組換え発現させる。そのような組換え発現では、１つ又は複数の制御配列、即ち、特定の宿主生物において動作可能に連結したコード配列の発現のために必要なポリヌクレオチド配列を用いてもよい。原核細胞における使用のために適した制御配列は、例えば、プロモーター、オペレーター、及びリボソーム結合部位配列を含む。真核生物の制御配列は、しかし、限定しないが、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを含む。これらの制御配列は、原核生物及び真核生物の宿主細胞におけるヒト化抗ＣＤ４０抗体の発現及び産生のために利用することができる。

【０１３７】

核酸配列は、それが別の核酸配列と機能的な関係に置かれている場合、「動作可能に連結」されている。例えば、核酸プレ配列又は分泌リーダーは、それがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、ポリペプチドをコードする核酸に動作可能に連結されている；プロモーター又はエンハンサーは、それが配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に動作可能に連結されている；又は、リボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するように位置付けられている場合、コード配列に動作可能に連結されている。一般的に、「動作可能に連結される」は、連結されているＤＮＡ配列が、近接している、分泌リーダーの場合において、近接し、リーディングフレーム中にあることを意味する。しかし、エンハンサーは、場合により、近接している。連結は、便利な制限部位でのライゲーションにより達成することができる。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーを使用することができる。

【０１３８】

本明細書において使用する通り、表現「細胞」、「細胞株」、及び「細胞培養」は互換的に使用され、全てのそのような命名はその子孫を含む。このように、「形質転換体」及び「形質転換細胞」は、トランスファーの数に関わらず、初代被験細胞及びそれに由来する培養物を含む。

【０１３９】

処置の目的のための用語「哺乳動物」は、哺乳動物（ヒトを含む）、家畜及び農場動物、ならびに動物園、スポーツ、又はペット動物（例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシなど）として分類される任意の動物を指す。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【０１４０】

「障害」は、本明細書において使用する通り、本明細書に記載するヒト化抗ＣＤ４０抗体を用いた処置から利益を得うる任意の状態である。これは、慢性及び急性障害又は疾患（哺乳動物を問題の障害に罹りやすくするそれらの病理学的状態を含む）を含む。本明細書において処置される障害の非限定的な例は、癌、血液悪性腫瘍、良性及び悪性腫瘍、白血病及びリンパ系悪性腫瘍、ならびに炎症性、血管新生、自己免疫性、及び免疫学的障害を含む。

【０１４１】

用語「癌」及び「癌性」は、無秩序な細胞成長により典型的に特徴付けられる、哺乳動物における生理学的状態を指す又は記載する。癌の例は、しかし、限定しないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病を含む。

【０１４２】

本明細書に使用する通り、用語「ＣＤ４０関連障害」又は「ＣＤ４０関連疾患」は、ＣＤ４０を発現している細胞の修飾又は除去が示されている状態を指す。これらは、異常増殖を示すＣＤ４０発現細胞又は癌性もしくは悪性成長に関連するＣＤ４０発現細胞を含む。ＣＤ４０抗原の異常発現を示す癌のより特定の例は、Ｂリンパ芽球様細胞、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、Ｔ細胞リンパ腫、カポジ肉腫、骨肉腫、上皮及び内皮腫瘍、膵臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、結腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、皮膚癌（黒色腫）、膀胱癌、及び腎臓癌を含む。そのような障害は、しかし、限定しないが、白血病、リンパ腫（Ｂ細胞リンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含む）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症；固形腫瘍（肉腫、例えば骨肉腫、ユーイング肉腫など、悪性黒色腫を含む）、腺癌（卵巣腺癌を含む）、カポジ肉腫／カポジ腫瘍、及び扁平上皮癌を含む。

【０１４３】

ＣＤ４０関連障害は、また、免疫系の疾患及び障害（例えば自己免疫障害及び炎症性障害など）を含む。そのような状態は、しかし、限定しないが、関節リウマチ（ＲＡ）、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、強皮症、シェーグレン症候群、多発性硬化症、乾癬、炎症性腸疾患（例、潰瘍性大腸炎及びクローン病）、肺炎症、喘息、及び特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）を含む。

【０１４４】

語句「成長を停止する」又は「成長阻害的」は、本明細書において使用する場合、細胞、特に、ＣＤ４０抗原を発現する腫瘍細胞型の成長又は増殖を阻害すること指す。このように、成長阻害は、例えば、Ｓ期中の腫瘍細胞のパーセンテージを有意に低下させる。

【０１４５】

用語「静脈内注入」は、約１５分超、一般的には約３０～９０分の間の期間にわたる動物又はヒト患者の静脈中への薬剤の導入を指す。

【０１４６】

用語「静脈内ボーラス」又は「静脈内プッシュ」は、身体が約１５分又はそれ以下で、一般的には５分又はそれ以下で薬物を受けるような、動物又はヒトの静脈中への薬物投与を指す。

【０１４７】

用語「皮下投与」は、動物又はヒト患者の皮膚下に、好ましくは皮膚と下層組織の間のポケット内に、薬物レセプタクルから比較的遅い持続性送達により薬剤を導入することを指す。下層組織から上に及び離れて皮膚を挟む又は引くことによって、ポケットを作ってもよい。

【０１４８】

用語「皮下注入」は、動物又はヒト患者の皮膚下に、好ましくは、皮膚と下層組織の間のポケット内に、薬物レセプタクルからの比較的遅い持続性送達により、しかし、限定しないが、３０分又はそれ以下、あるいは９０分又はそれ以下を含む期間にわたり薬物を導入することを指す。場合により、注入は、動物又はヒト患者の皮膚下に移植された薬物送達ポンプの皮下移植により作製してもよく、それにおいて、ポンプは、所定の期間（例えば３０分、９０分、又は処置計画の長さにわたる期間など）にわたり、所定量の薬物を送

達する。

【０１４９】

用語「皮下ボーラス」は、動物又はヒト患者の皮膚下への薬物投与を指し、ここで、ボーラス薬物送達は約１５分未満；別の局面において、５分未満、さらに別の局面において、６０秒未満である。さらに別の局面において、投与は、皮膚と下層組織の間のポケット内にあり、ここで、ポケットは、下層組織から上に及び離れて皮膚を挟む又は引くことにより作製されうる。

【０１５０】

用語「治療的に効果的な量」を使用し、処置されている障害の症状の１つ又は複数を軽減又は寛解する活性薬剤の量を指す。そのようにする際、その量こそが、有益な患者転帰、例えば、成長停止効果を有し、又は、細胞の欠失を起こす。一局面において、治療的に効果的な量は、アポトーシス活性を有する、又は細胞死を誘導することが可能である。別の局面において、治療的に効果的な量は、例えば、疾患進行を遅くする際に効果的であることが示されている目標血清濃度を指す。効力は、処置する状態に依存して、従来の方法で測定することができる。例えば、ＣＤ４０を発現する細胞により特徴付けられる腫瘍性疾患又は障害において、効力は、疾患進行までの時間を評価する、又は応答率を決定することにより測定することができる。

【０１５１】

用語「処置」又は「治療」などは、本明細書において使用する通り、任意の臨床的に望ましい又は有益な効果（しかし、限定しないが、１つ又は複数の症状の緩和又は軽減、疾患又は障害の進行の退行、減速、又は休止を含む）に導く、治療的、ならびに予防的、又は抑制的な対策を含むことを意味する。このように、例えば、用語「処置」は、疾患又は障害の症状の発症の前又はそれに続く薬剤の投与を含み、それにより、疾患又は障害の１つ又は複数の徴候を防止又は除去する。別の例として、この用語は、疾患の症状と戦うための疾患の臨床所見後の薬剤の投与を含む。さらに、発症後及び臨床症状が発生した後での薬剤の投与は、ここでは、投与が疾患又は障害の臨床パラメーター（例えば組織損傷の程度又は転移の量もしくは範囲など）に影響を及ぼし（処置が疾患の寛解に導くか否かに関わらず）、本明細書において使用する「処置」又は「治療」を含む。さらに、本発明の組成物は、単独又は別の治療用薬剤との組み合わせのいずれかで、ヒト化ＣＤ４０抗体組成物の使用の非存在におけるその症状と比較して、処置されている障害の少なくとも１つの症状を緩和又は寛解させる限り、結果は、障害の全ての症状が緩和されるか否かに関わらず、基礎障害の効果的な処置と考えるべきである。

【０１５２】

用語「添付文書」を使用し、治療用産物の市販パッケージに習慣的に含まれる説明書を指し、そのような治療用産物の使用に関する適応症、使用法、投与、禁忌、及び／又は警告に関する情報が含まれる。

【０１５３】

抗体

【０１５４】

本明細書に記載及び開示するのは、ヒト化抗ＣＤ４０抗体、ならびに本発明の１つ又は複数のヒト化抗ＣＤ４０抗体を含む組成物及び製品である。また、記載するのは、ヒト化抗ＣＤ４０抗体の抗原結合フラグメントを含む結合薬剤である。ヒト化抗ＣＤ４０抗体及び結合薬剤は、細胞の成長を停止させ、ＣＤ４０を発現する細胞の欠失を起こし、又は、別の面では、標的細胞に対する細胞傷害性又は細胞分裂停止効果を誘導する又は起こすことができる。ヒト化抗ＣＤ４０抗体及び結合薬剤は、ＣＤ４０表面抗原を発現する細胞の増殖により特徴付けられる種々の疾患又は障害の処置において使用することができる。ヒト化抗ＣＤ４０抗体及びＣＤ４０結合薬剤は、各々が、ＣＤ４０エピトープ（即ち、抗原結合フラグメント）を特異的に認識する少なくとも部分を含む。

【０１５５】

初期の特徴付けにおいて、マウス抗体をＣＤ４０結合の特徴付けに基づいて選択した。

【０１５６】
これらの初期の試験から、表１に示す以下の重鎖可変領域及び表２に示す軽鎖可変領域を有するマウス抗体を選択した：
【０１５７】
【表１】

表 1: CD40 マウスリード - VH 配列

2H11	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYYVHWVKQRPEKGLEWIGR IDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSEDTAVYYCTTSY YVGTYGYWGQGTTLTVSS (配列番号 1)
10F2	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYYIHWVKQRPEKGLEWIGR IDPEDGDTKYDPKFQGKATMTADTSSNTAYLHLSSLTSEDTAVYYCTTSY YVGTYGYWGQGTTLTVSS(配列番号 2)
19B10	EVQLQQSGAELVRPGASVQLSCTASGFNIKDYYVHWVKQRPEKGLEWIGR IDPEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSSNTVYLHLSSLTSEDTAVYYCTTSY YVGTYGYWGQGTTLTVSS(配列番号 3)
20E2	EVQLVESGGGLVKPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLEWVAY ISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTALYYCARQD GYRYAMDYWGQGTSVTVSS(配列番号 4)

【０１５８】
【表２】

表 2: CD40 マウスリード - VK 配列

2H11	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGTSPKLWIYST SNLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRTFYPYTFGGG TKLEIK (配列番号 5)
10F2	QIVLTQSPTIMSASPGEKVIITCSATSSVSYILWFQQKPGTSPKLWIYST SNLASGVPARFSGSGSGASYSLTISRMEAEDAATYYCQQRTFYPYTFGGG TKLEIK (配列番号 6)
19B10	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGTSPKLWIYST SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRTFYPYTFGGG TKLEIK (配列番号 7)
20E2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPP KLLIYWTSTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNLQAEDLAVYYCQNDYTY PLTFGAGTKLELK (配列番号 8)

【０１５９】
ヒトフレームワーク配列を、フレームワーク相同性、ＣＤＲ構造、保存された基準残基、保存された界面充填残基、及び他のパラメーターに基づいてマウスリードの各々について選択した。
【０１６０】
選択した種々のマウス抗体のマウス重鎖及び軽鎖ＣＤＲを、それぞれ表３及び表４に示す：
【０１６１】

【表３】

表 3:
重鎖 CDR 配列

コンストラクトの名称	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
2H11	GFNIK*DYYVH*	*RIDPEDGDSKYAPKFQG*	*SYYVGTYGY*
	配列番号 9	配列番号 12	配列番号 16
10F2	GFNIK*DYYIH*	*RIDPEDGDTKYDPKFQG*	*SYYVGTYGY*
	配列番号 10	配列番号 13	配列番号 16
19B10	GFNIK*DYYVH*	*RIDPEDGDTKFAPKFQG*	*SYYVGTYGY*
	配列番号 9	配列番号 14	配列番号 16
20E2	GFTFS*DYGMH*	*YISSGNRIIYYADTVKG*	*QDGYRYAMDY*
	配列番号 11	配列番号 15	配列番号 17

【０１６２】

上に列挙するＨ－ＣＤＲ１では、Chothiaナンバリングシステム（Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948）を使用した配列を使用している。配列についてのＫａｂａｔｓナンバリングを太字イタリックのテキストにより表示し、ＩＭＧＴナンバリングを、ＣＤＲ１及びＣＤＲ２について上の表において残基の下線を付けたテキストにより示す。２Ｈ１１、１０Ｆ２、及び１９Ｂ１０の各々についてのＨ－ＣＤＲ３についての配列は、ＴＴＳＹＹＶＧＴＹＧＹ（配列番号７７）であり、２０Ｅ２についてはＡＲＱＤＧＹＲＹＡＭＤＹ（配列番号７８）である。

【０１６３】

【表４】

表 4:
軽鎖 CDR 配列

コンストラクトの名称	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
2H11	*SASSSVSYML*	*STSNLAS*	*QQRTFYPYT*
	配列番号 18	配列番号 22	配列番号 24
10F2	*SATSSVSYIL*	*STSNLAS*	*QQRTFYPYT*
	配列番号 19	配列番号 22	配列番号 24
19B10	*SASSSVSYML*	*STSNLAS*	*QQRTFYPYT*
	配列番号 20	配列番号 22	配列番号 24
20E2	*KSSQSLLNSGNQKNYLT*	*WTSTRES*	*QNDYTYPLT*
	配列番号 21	配列番号 23	配列番号 25

【０１６４】

再び、Chothiaナンバリングシステムを表４において使用し、配列についてのKabatsナンバリングを太字イタリックのテキストにより表示している。ＩＭＧＴナンバリングを、下線を引いたテキストにより示す。

【０１６５】

キメラ親Ｆａｂと比較して、より良好な又は等しい結合を示したＦａｂを、ＩｇＧへの変換のために選択した。２０Ｅ２シリーズからのクローンを、２つの異なるＩｇＧフォーマットに変換した：ａ）ＩｇＧ４ＤＭ（二重変異体）は、Ｆｃ／ヒンジ領域において２つの変異を有する：Ｓｅｒ２２８Ｐｒｏ（半分子形成を低下させる）及びＬｅｕ２３５Ｇｌ

ｕ（ＦｃγＲ結合をさらに低下させる）。ｂ）ＩｇＧ１ＫＯ（エフェクター機能のノックアウト）は、Ｆｃ領域において２つの変異を有する：Ｌｅｕ２３４Ａｌａ及びＬｅｕ２３５Ａｌａ（エフェクター機能、例えばＦｃγＲ及び補体結合などを低下させる）。両方のＩｇＧフォーマットが文献中に記載されている。実施例１は、３つの候補のヒト化をさらに詳細に記載する。そのようなヒト化の結果は、ヒト化抗体配列をもたらしたが、それらは、以下に示す重鎖及び軽鎖配列を有する：

【０１６６】

【表５】

識別	配列	配列番号
抗体Ａ（軽鎖）	**DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTW** **HQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS** **SLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIKR**TVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	26
抗体Ａ（重鎖，IgG1KO）	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP** **GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ** **MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
抗体Ａ（重鎖，IgG1）	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP** **GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ** **MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	28
抗体Ａ（重鎖，IgG4DM）	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP** **GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ** **MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK	29

	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
抗体A (重, IgG1KOb)	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E**L**TKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
抗体(軽鎖)	**DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTINCKSSQSLLNSGNQKNYL TWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIKR**TVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
抗体B (重鎖, IgG1KO)	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
抗体B (重鎖, IgG1)	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	33
抗体B (重鎖,IgG4 DM)	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	34

抗体Ｂ (重鎖, IgG1KOb)	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**D**E**L**TKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	35
抗体Ｃ (軽鎖)	**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQ QKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIKR**T VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
抗体Ｃ (重鎖, IgG1KO)	**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYYVHWVKQAP GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS**ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	37
抗体Ｃ (重鎖, IgG1)	**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYYVHWVKQAP GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS**ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	38
抗体Ｃ (重鎖,IgG4 DM)	**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYYVHWVKQAP GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS**ASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	39

抗体Ｃ（重鎖，IgG1KOb）	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYYVHWVKQAP GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	40

【０１６７】

一部の実施態様において、抗原結合フラグメントは、例えば、増殖を遮断し、又はそうでなければ、細胞の成長を停止し、又は、例えば、ＣＤ４０表面抗原の結合を通じてその枯渇、死亡、もしくはそうでなければ、その欠失を起こすことができる。例えば、Ｔ細胞及びＢ細胞悪性腫瘍において、悪性細胞が、正常リンパ球の活性化に導く刺激に曝露された場合、抗腫瘍効果（例、細胞欠失又はアポトーシスを伴う又は伴わない成長停止）をしばしばもたらす。この活性化誘導性の成長停止は、抗原受容体又は共刺激受容体のいずれかを通じたシグナルと共に観察されている（例、Ashwell et al., 1987, Science 237: 61;Bridges et al., 1987, J. Immunol.139: 4242; Page and Defranco, 1988, J. Immunol. 140: 3717;及びBeckwith et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82: 501を参照のこと）。ＣＤ４０刺激は、抗体又は可溶性リガンドのいずれかによる特異的結合の結果として、Ｂ細胞リンパ腫の成長を阻害する（例、Funakoshi et al., 1994, Blood 83: 2787-2794を参照のこと）。この方法で悪性細胞の成長を阻害し、ＣＤ４０表面抗原に対して向けられる薬剤は、適切な薬剤の例である。

【０１６８】

ＣＤ４０特異的な薬剤は、ＣＤ４０（例、ヒトＣＤ４０又はその変異体）に結合するヒト化抗ＣＤ４０抗体の抗原結合フラグメントを含む。ＣＤ４０特異的な薬剤及び抗体は、場合により、細胞傷害性又は化学療法薬剤に共役又は融合させることができる。ヒト化抗体がＣＤ４０表面抗原に結合し、ＣＤ４０を発現する細胞型の枯渇を起こす局面において、結合は、一般的に、インビボでのＣＤ４０表面抗原細胞へのホーミングにより特徴付けられる。適した結合薬剤は、十分な親和性及び／又はアビディティーでＣＤ４０抗原に結合し、ＣＤ４０特異的な薬剤は、抗原を発現する細胞を特異的に標的化することにより治療用薬剤として有用である。

【０１６９】

一部の局面において、ヒト化抗体は、少なくとも４５％だけ、少なくとも５０％だけ、少なくとも６０％だけ、又は、少なくとも７５％、もしくは少なくとも８０％、もしくは少なくとも９０％、もしくは少なくとも９５％だけ、ＣＤ４０へのＣＤ４０リガンドの結合を減少させる。

【０１７０】

一部の実施態様において、ヒト化抗ＣＤ４０抗体（その抗原結合フラグメント、例えば重鎖及び軽鎖可変ドメインなどを含む）は、抗体Ａ（重鎖配列＝配列番号２７；配列番号２８；配列番号２９又は配列番号３０；軽鎖配列＝配列番号２６）、抗体Ｂ（重鎖配列＝配列番号３２；配列番号３３；配列番号３４；又は配列番号３５；軽鎖配列＝配列番号３１）及び抗体Ｃ（重鎖配列＝配列番号３７；配列番号３８；配列番号３９又は配列番号４０；軽鎖配列＝配列番号３６）のＣＤＲに由来する残基のアミノ酸配列（本明細書において上に記載する）ならびにヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域に由来するアミノ酸残基を含む。ヒト化抗ＣＤ４０抗体は、場合により、コンセンサス又は生殖系列フレームワーク領域において特定のアミノ酸置換を含む。

【０１７１】

これらのフレームワーク位置におけるアミノ酸残基の特定の置換は、抗体性能の種々の局面（結合親和性及び／又は安定性を含む）を改善し、それにＣＤＲ又はＨＶＬのヒト生殖系列フレームワーク領域中への「直接スワップ」により形成されたヒト化抗体において実証されたものを上回る（以下の実施例において示す通り）。

【０１７２】

一部の実施態様において、本発明は、配列番号１～配列番号４の重鎖（V_H）配列及び配列番号５～配列番号８の軽鎖（V_L）配列を伴う他のモノクローナル抗体を記載する（上の表１及び２を参照のこと）。これらのマウス抗体のＣＤＲ配列を表３及び表４に示し、そのようなＣＤＲをヒトコンセンサス重鎖及び軽鎖可変ドメインのＦＲ中に配置することによって、本発明の有用なヒト化抗体をもたらす。

【０１７３】

一部の特定の実施態様において、本明細書に開示するヒト化抗ＣＤ４０抗体は、マウスモノクローナル抗体のＣＤＲ又はＨＶＬを含む少なくとも重鎖又は軽鎖可変ドメイン（上の表１～４に示す）ならびにヒト生殖系列重鎖及び軽鎖可変ドメインのＦＲを含む。例示的な実施態様において、本明細書において作製したヒト化抗体は、抗体Ａ、抗体Ｂ、及び抗体Ｃであり、それらの種々の重鎖及び軽鎖配列を配列番号２６～配列番号４０に示す。

【０１７４】

特定の実施態様において、配列番号２６の軽鎖配列と組み合わせた、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、又は配列番号３０のいずれかの重鎖配列を有する抗体が考えられる。代替の抗体は、配列番号３１の軽鎖配列と組み合わせた、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、又は配列番号３５の重鎖配列を有するものを含む。さらなる追加の実施態様において、配列番号３６の軽鎖配列と組み合わせた、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、又は配列番号４０の重鎖配列を有するヒト化抗体を提供する。

【０１７５】

これらの配列のＣＤＲを表３及び４に示す。特定の実施態様において、これらの例示的な免疫グロブリンの間のスイッチしたＣＤＲ領域（即ち、例えば、抗体Ａの１つ又は２つのＣＤＲと抗体Ｃからの類似のＣＤＲとのスイッチング）を伴うキメラ抗体が有用な抗体をもたらしうると考えられる。

【０１７６】

特定の実施態様において、ヒト化抗ＣＤ４０抗体は抗体フラグメントである。種々の抗体フラグメントを、一般的に、上に考察しており、抗体フラグメントの産生のために開発されてきた技術がある。フラグメントは、インタクトな抗体のタンパク分解性消化を介して由来しうる（例、Morimoto et al., 1992, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117;及びBrennan et al., 1985, Science 229: 81を参照のこと）。あるいは、フラグメントは、組換え宿主細胞において直接的に産生することができる。例えば、Ｆａｂ’－ＳＨフラグメントを、大腸菌から直接的に回収し、化学的に結合させてＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを形成することができる（例、Carter et al., 1992, Bio/Technology 10: 163-167を参照のこと）。別のアプローチにより、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントを組換え宿主細胞培養から直接的に単離することができる。抗体フラグメントの産生のための他の技術が、当業者に明らかであろう。

【０１７７】

特定の実施態様は、配列番号２６の軽鎖配列と組み合わせた、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、又は配列番号３０のいずれかの重鎖配列を含むヒト化抗ＣＤ４０抗体のＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを含む。代替の抗体は、配列番号３１の軽鎖配列と組み合わせた、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、又は配列番号３５の重鎖配列を有するものを含む。さらなる追加の実施態様において、配列番号３６の軽鎖配列と組み合わせた、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、又は配列番号４０の重鎖配列を有するヒト化抗体を提供する。そのような実施態様は、そのようなＦ（ａｂ’）$_2$を含むインタクトな抗体を含むことができる。

【０１７８】

一部の実施態様において、抗体又は抗体フラグメントは、エフェクター機能を媒介する定常領域を含む。定常領域は、ＣＤ４０発現標的細胞に対する抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）、及び／又は補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）の応答を提供することができる。エフェクタードメインは、例えば、Ｉｇ分子のＦｃ領域でありうる。典型的には、ＣＤ４０結合薬剤は、細胞傷害性白血球細胞（例、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、貪食細胞（例、マクロファージ）、及び／又は血清補体成分）を動員及び／又は活性化する。

【０１７９】

抗体のエフェクタードメインは、任意の適した脊椎動物種及びアイソタイプからでありうる。異なる動物種からのアイソタイプは、エフェクター機能を媒介する能力において異なる。例えば、ヒト免疫グロブリンがＣＤＣ及びＡＤＣＣ／ＡＤＣＰを媒介する能力は、一般的に、それぞれＩｇＭ　ＩｇＧ$_1$　ＩｇＧ$_3$＞ＩｇＧ$_2$＞ＩｇＧ$_4$及びＩｇＧ$_1$　ＩｇＧ$_3$＞ＩｇＧ$_2$／ＩｇＭ／ＩｇＧ$_4$の順番である。マウス免疫グロブリンは、ＣＤＣ及びＡＤＣＣ／ＡＤＣＰを、一般的に、それぞれマウスＩｇＭ　ＩｇＧ$_3$＞＞ＩｇＧ$_2$ｂ＞ＩｇＧ$_2$ａ＞＞ＩｇＧ$_1$及びＩｇＧ$_2$ｂ＞ＩｇＧ$_2$ａ＞ＩｇＧ$_1$＞＞ＩｇＧ$_3$の順番で媒介する。別の例において、マウスＩｇＧ$_2$ａはＡＤＣＣを媒介し、マウスＩｇＧ$_2$ａ及びＩｇＭの両方はＣＤＣを媒介する。

【０１８０】

抗体修飾

【０１８１】

ヒト化抗ＣＤ４０抗体及び薬剤は、ヒト化抗ＣＤ４０抗体又はその抗原結合フラグメントの修飾を含むことができる。例えば、癌の処置における抗体の有効性を増強するように、エフェクター機能に関して抗体を修飾することが望ましいであろう。１つのそのような修飾はＦｃ領域中へのシステイン残基の導入であり、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合形成を許す。このようにして生成されたホモ二量体抗体は、改善された内在化能力及び／又は増加した補体媒介細胞死滅及び／又は抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を有しうる。例えば、Caron et al., 1992, J. Exp Med.176: 1191-1195;及びShopes, 1992, J. Immunol.148: 2918-2922.を参照のこと。増強された抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体を、また、Wolff et al., 1993, Cancer Research 53: 2560-2565に記載する通りに、ヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製することができる。あるいは、抗体を操作し、二重Ｆｃ領域を含むことができ、抗体の補体溶解及びＡＤＣＣ能力を増強する。Stevenson et al., 1989, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230を参照のこと。

【０１８２】

ＡＤＣＣを支持する改善された能力を伴う抗体が、それらのＦｃ領域のグリコシル化パターンを修飾することにより生成されてきた。これは、Ｃ$_{H2}$ドメイン中のアスパラギン残基Ｎ２９７での抗体グリコシル化が、ＡＤＣＣに必須のＩｇＧ及びＦｃγ受容体の間での相互作用に関与するために可能である。宿主細胞株を操作し、変化したグリコシル化（例えば増加した分岐Ｎアセチルグルコサミン又は低下したフコースなど）を伴う抗体を発現させている。フコース低下は、分岐Ｎアセチルグルコサミンの存在を増加させるより、ＡＤＣＣ活性のより大きな増強を提供する。さらに、低フコース抗体によるＡＤＣＣの増強はＦｃγＲＩＩＩＡ　Ｖ／Ｆ多型に非依存的である。

【０１８３】

抗体のＦｃ領域のアミノ酸配列を修飾することは、ＡＤＣＣ活性を増強するためのグリコシル化操作に代わるものである。Ｆｃγ受容体についてのヒトＩｇＧ$_1$上の結合部位が、広範な変異解析により決定されている。これは、ＦｃγＲＩＩＩＡについての結合親和性を増加させ、インビトロでＡＤＣＣを増強させるＦｃ変異を伴うヒト化ＩｇＧ１抗体の生成に導いた。加えて、Ｆｃ変異体は、結合特性の多くの異なる置換（例、他のＦｃγＲ受容体への不変の又は減弱した結合を伴う特定のＦｃγＲ受容体への改善された結合）を伴い得られている。

【０１８４】

別の局面は、細胞傷害性薬剤、例えば化学療法薬剤、毒素（例、細菌、真菌、植物、もしくは動物由来の酵素活性毒素又はそのフラグメント）、又はラジオアイソトープ（即ち、放射性複合体）などに結合したヒト化抗体又はそのフラグメントを含む免疫複合体を含む。

【０１８５】

そのような免疫複合体の生成において有用な化学療法薬剤が上に記載されている。有用な免疫複合体を形成するために使用することができる酵素活性毒素及びそれらの断片は、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素Ａ鎖（緑膿菌から）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシンＡ鎖、アルファ－サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、及びＰＡＰ－Ｓ）、ツルレイシ阻害剤、クルシン、クロチン、サパオナリオア・オフィシナリス阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、トリコテセなどを含む。種々の放射性核種が、放射線複合ヒト化抗ＣＤ４０抗体の産生のために利用可能である。例は、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙ、及び^{186}Ｒｅを含む。

【０１８６】

ヒト化抗ＣＤ４０抗体及び細胞傷害性又は化学療法薬剤の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング薬剤、例えばＮ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオール）プロピオン酸（ＳＰＤＰ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えばジメチルアジピミダートＨＣＬなど）、活性エステル類（例えばスベリン酸ジスクシンイミジルなど）、アルデヒド（例えばグルタルアルデヒド（ｇｌｕｔａｒｅｌｄｅｈｙｄｅ）など）、ビス－アジド化合物（例えばビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミンなど）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えばビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）エチレンジアミンなど）、ジイソシアネート（例えばトルエン２，６－ジイソシアネートなど）、及びビス活性フッ素化合物（例えば１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼンなど）を使用して、公知の方法により作製することができる。例えば、リシン免疫毒素を、Vitetta et al., 1987, Science 238: 1098に記載されている通りに調製することができる。炭素１４標識１－イソチオシアナートベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、抗体への放射性ヌクレオチドの結合のための例示的なキレート薬剤である。複合体は、また、開裂可能なリンカーを用いて形成することができる。

【０１８７】

別の実施態様において、抗体を、腫瘍前標的化（プレターゲッティング）における利用のための「受容体」（例えばストレプトアビジンなど）に結合してもよい。この手順において、抗体－受容体複合体を患者に投与し、清浄剤（クリアリング剤）を使用した循環からの非結合複合体の除去及び次に受容体に選択的に結合する「リガンド」（例、アビジン）の投与が続き、リガンドを細胞傷害性薬剤（例、放射性核種）に共役させる。

【０１８８】

本明細書に開示するヒト化抗ＣＤ４０抗体を、また、免疫リポソームとして製剤化することができる。抗体を含むリポソームを、当技術分野において公知の、例えばEpstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688; Hwang et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030;ならびに米国特許第４，４８５，０４５号及び第４，５４４，５４５号に記載される方法により調製する。増強された循環時間を有するリポソームが、例えば、米国特許第５，０１３，５５６号に開示されている。

【０１８９】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及びＰＥＧ誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発方法により生成することができる。リポソームを、定められた孔径のフィルターを通して押出し、所望の直径を伴うリポソームをもたらす。本明細書に開示する抗体のＦａｂ’フラグメントを、Martin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288に記載される通りに

、ジスルフィド交換反応を介して、リポソームに共役させることができる。化学療法薬剤（例えばドキソルビシンなど）は、場合により、リポソーム内に含まれる。例えば、Gabizon et al., 1989, J. National Cancer Inst.81(19): 1484を参照のこと。

【０１９０】

本明細書に記載及び開示する抗体は、また、当該抗体にプロドラッグ（例、ペプチジル化学療法薬剤）を活性抗癌薬に変換するプロドラッグ活性化酵素を結合させることにより、ＡＤＥＰＴ（抗体指向酵素プロドラッグ治療）手順において使用することができる。例えば、ＷＯ　８１／０１１４５、ＷＯ　８８／０７３７８、及び米国特許第４，９７５，２７８号を参照のこと。ＡＤＥＰＴのために有用な免疫複合体の酵素成分は、それをそのより活性な細胞傷害形態に変換するような方法でプロドラッグに作用することが可能な酵素である。ＡＤＥＰＴにおいて有用である特定の酵素は、しかし、限定しないが、リン酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するためのアルカリホスファターゼ；硫酸塩含有プロドラッグを遊離薬物に変換するためのアリールスルファターゼ；非毒性５フルオロシトシンを抗癌薬５フルオロウラシルに変換するためのシトシンデアミナーゼ；ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するための、プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、及びカテプシン（例えばカテプシンＢ及びＬなど）など；Ｄ－アミノ酸置換基を含むプロドラッグを変換するためのＤ－アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグを遊離薬物に変換するための糖切断酵素、例えばβ－ガラクトシダーゼ及びノイラミニダーゼなど；β－ラクタムを用いて誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するためのβ－ラクタマーゼ；及び、それぞれフェノキシアセチル基又はフェニルアセチル基を用いてそれらのアミン窒素で誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するためのペニシリンアミダーゼ、例えばペニシリンＶアミダーゼ又はペニシリンＧアミダーゼなどを含む。あるいは、酵素活性を有する抗体（「アブザイム」）を使用して、プロドラッグを遊離活性薬物に変換することができる（例えば、Massey, 1987, Nature 328: 457-458を参照のこと）。抗体－アブザイム複合体を、腫瘍細胞集団へのアブザイムの送達のための公知の方法により、例えば、上に考察するヒト化抗ＣＤ４０抗体／ヘテロ二官能性架橋試薬に酵素を共有結合することにより調製することができる。あるいは、上に記載する酵素の少なくとも機能的に活性な部分に連結された、本明細書に開示する抗体の少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質を、組換えＤＮＡ技術を使用して構築することができる（例、Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604-608を参照のこと）。

【０１９１】

特定の実施態様において、インタクトな抗体よりむしろ、ヒト化抗ＣＤ４０抗体フラグメントを使用し、例えば、腫瘍浸潤を増加させることが望ましいであろう。その血清半減期を増加させるために、抗体フラグメントを修飾することが望ましいであろう。これは、例えば、抗体フラグメント中へのサルベージ受容体結合エピトープの取り込みにより達成することができる。１つの方法において、抗体フラグメントの適切な領域を変化（例、変異）させることができる、又は、エピトープをペプチドタグ中に取り込ませることができ、それは、次に、いずれかの末端で、もしくは中央で、例えば、ＤＮＡもしくはペプチド合成により抗体フラグメントに融合させる。例えば、ＷＯ　９６／３２４７８を参照のこと。

【０１９２】

他の実施態様において、ヒト化抗ＣＤ４０抗体の共有結合的な修飾も含まれる。共有結合的な修飾は、システイニル残基、ヒスチジル残基、リジニル及びアミノ末端残基、アルギニル残基、チロシル残基、カルボキシル側基（アスパルチル又はグルタミル）、グルタミニル及びアスパラギニル残基、又はセリル、又はスレオニル残基の修飾を含む。共有結合的な修飾の別の型は、抗体に化学的又は酵素的に結合するグリコシドを含む。そのような修飾は、適用可能な場合、抗体の化学合成により又は酵素的もしくは化学的切断により作製してもよい。抗体の共有結合的な修飾の他の型は、抗体の標的アミノ酸残基を、選択した側鎖又はアミノもしくはカルボキシ末端残基と反応することが可能である有機誘導体

化薬剤と反応させることにより分子中に導入することができる。

【０１９３】

抗体上に存在する任意の炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に達成することができる。化学的な脱グリコシル化が、Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52により及びEdge et al., 1981, Anal. Biochem., 118: 131により記載されている。抗体上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol 138: 350に記載される通りに、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼの使用により達成することができる。

【０１９４】

有用な共有結合的な修飾の別の型は、抗体を、種々の非タンパク質性ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンなどの１つに、米国特許第４，６４０，８３５号、米国特許第４，４９６，６８９号、米国特許第４，３０１，１４４号、米国特許第４，６７０，４１７号、米国特許第４，７９１，１９２号、及び米国特許第４，１７９，３３７号の１つ又は複数において示された方法で連結することを含む。

【０１９５】

ヒト化及びアミノ酸配列変異体

【０１９６】

抗ＣＤ４０抗体のアミノ酸配列変異体は、抗ＣＤ４０抗体ＤＮＡ中に適切なヌクレオチド変化を導入することにより、又はペプチド合成により調製することができる。そのような変異体は、例えば、本明細書における実施例の抗ＣＤ４０抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び／又はその中への挿入、及び／又はその置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせを、最終コンストラクトが所望の特徴を有するという条件で、最終構築物に達するまで作られる。アミノ酸変化は、また、ヒト化又は変異体抗ＣＤ４０抗体の翻訳後プロセスを変化させうる（例えばグリコシル化部位の数又は位置の変化など）。

【０１９７】

変異誘発のための好ましい位置である、抗ＣＤ４０抗体の特定の残基又は領域の同定のための有用な方法は、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれ、Cunningham and Wells（Science, 244: 1081-1085 (1989)）により記載される通りである。ここで、残基又は標的残基の群を同定し（例、荷電残基、例えばａｒｇ、ａｓｐ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、及びｇｌｕなど）、中性又は陰性荷電アミノ酸（典型的にはアラニン）により置換され、アミノ酸とＣＤ４０抗原との相互作用に影響を及ぼす。置換に対する機能的感受性を示すそれらのアミノ酸位置は、次に、置換の部位で又はそれについてさらなる又は他の変異体を導入することにより洗練される。このように、アミノ酸配列変異を導入するための部位は予め決定されるが、変異自体の性質を予め決定する必要はない。例えば、所与の部位での変異の性能を分析するために、アラニンスキャンニング又はランダム変異誘発を標的コドン又は領域で行い、発現された抗ＣＤ４０抗体変異体を所望の活性についてスクリーニングする。

【０１９８】

アミノ酸配列挿入は、長さが１残基から１００又はそれ以上の残基を含むポリペプチドの範囲のアミノ及び／又はカルボキシル末端融合、ならびに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例は、エピトープタグと融合した抗ＣＤ４０抗体を含む。抗ＣＤ４０抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を増加させる酵素又はポリペプチドの抗ＣＤ４０抗体のＮ又はＣ末端への融合を含む。

【０１９９】

変異体の別の型は、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、少なくとも１つのアミノ酸残基が抗ＣＤ４０抗体分子において除去され、異なる残基がその場所に挿入されている。置換変異誘発のための最も大きな関心部位は、超可変領域を含むが、しかし、ＦＲ変化も考慮される。保存的置換を表５において「好ましい置換」の見出しの下に示す。

そのような置換が生物学的活性において変化をもたらす場合、次に、より実質的な変化、表示される「例示的な置換」、又は、アミノ酸分類を参照して以下にさらに記載される通り、導入し、産物をスクリーニングしてもよい。

【０２００】

【表６】

表 5:

本来の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	**val**
Arg (R)	lys; gln; asn	**lys**
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	**gln**
Asp (D)	glu; asn	**glu**
Cys (C)	ser; ala	**ser**
Gln (Q)	asn; glu	**asn**
Glu (E)	asp; gln	**asp**
Gly (G)	ala	**ala**
His (H)	arg; asn; gln; lys;	**arg**
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	**leu**
Leu (L)	ile; norleucine; val; met; ala; phe	**ile**
Lys (K)	arg; gln; asn	**arg**
Met (M)	leu; phe; ile	**leu**
Phe (F)	tyr; leu; val; ile; ala;	**tyr**
Pro (P)	ala	**ala**
Ser (S)	thr	**thr**
Thr (T)	ser	**ser**
Trp (W)	tyr; phe	**tyr**
Tyr (Y)	phe;trp; thr; ser	**phe**
Val (V)	leu; ile; met; phe ala; norleucine;	**leu**

【０２０１】

タンパク質化学において、抗体の生物学的特性が、（ａ）置換のエリアにおけるポリペプチド骨格の構造（例えば、シート又はらせん形立体構造として）、（ｂ）標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、又は（ｃ）側鎖の原体の維持に対するそれらの効果において有意に異なる置換基を選択することにより達成することができることが一般的に受け入れ

られている。自然発生する残基は、共通の側鎖特性に基づいて以下の群に分けられる：

【０２０２】

（１）疎水性：ノルロイシン、ｍｅｔ、ａｌａ、ｖａｌ、ｌｅｕ、ｉｌｅ；

【０２０３】

（２）中性親水性：ｃｙｓ、ｓｅｒ、ｔｈｒ；

【０２０４】

（３）酸性：ａｓｐ、ｇｌｕ；

【０２０５】

（４）塩基性：ａｓｎ、ｇｌｎ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、ａｒｇ；

【０２０６】

（５）鎖配向に影響を及ぼす残基：ｇｌｙ、ｐｒｏ；及び

【０２０７】

（６）芳香族：ｔｒｐ、ｔｙｒ、ｐｈｅ。

【０２０８】

非保存的置換は、これらのクラスの１つのメンバーを別のクラスについて交換することを伴いうる。

【０２０９】

ヒト化又は変異体抗ＣＤ４０抗体の適当な立体構造の維持に関与しない任意のシステイン残基は、また、一般的に、セリンと置換してもよく、分子の酸化安定性を改善させる、異常な架橋を防止する、又は細胞傷害性もしくは細胞分裂停止化合物との結合の確立点を提供する。逆に、システイン結合を抗体に加えてもよく、その安定性（特に、抗体が抗体フラグメント、例えばＦｖフラグメントなどである場合）を改善する。

【０２１０】

置換変異体の型は、親抗体（例、ヒト化又はヒト抗体）の１つ又は複数の超可変領域残基を置換することを含む。一般的には、さらなる開発のために選択された変異体は、それらが生成された親抗体と比べて、改善した生物学的特性を有しているであろう。そのような置換変異体を生成するための便利な方法は、ファージディスプレイを使用した親和性成熟である。簡単には、いくつかの超可変領域部位（例、６－７部位）を変異させ、各部位での全ての可能なアミノ酸置換を生成する。このように生成された抗体変異体は、各粒子内にパッケージされたＭ１３の遺伝子ＩＩＩ産物への融合体として、繊維状ファージ粒子から一価様式でディスプレイされる。ファージディスプレイされた変異体を、次に、その生物学的活性（例、結合親和性）についてスクリーニングする。修飾のための候補の超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基を同定することができる。あるいは、又は、加えて、抗原－抗体複合体の結晶構造を分析し、抗体とヒトＣＤ４０との接触点を同定することが有益でありうる。そのような接触残基及び隣接残基は、本明細書において詳述する技術に従った置換のための候補である。一旦、そのような変異体が生成されれば、変異体のパネルを本明細書に記載する通りにスクリーニングを供し、１つ又は複数の関連アッセイにおける優れた特性を伴う抗体をさらなる開発のために選択してもよい。

【０２１１】

抗体のアミノ酸変異体の別の型は、抗体の本来のグリコシル化パターンを変化させる。「変化する」により、抗体中で見出される１つ又は複数の糖類部分を欠失すること、及び／又は、抗体中に存在しない１つ又は複数のグリコシル化部位を加えることを意味する。

【０２１２】

一部の実施態様において、本発明の抗体を修飾し、グリコシル化部位を加えることが望ましいであろう。抗体のグリコシル化は、典型的には、Ｎ連結又はＯ連結のいずれかである。Ｎ連結は、アスパラギン残基の側鎖への糖類部分の付着を指す。トリペプチド配列アスパラギン－Ｘ－セリン及びアスパラギン－Ｘ－スレオニン（ここでＸはプロリンを除く任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖への糖類部分の酵素的付着のための認識配列である。このように、ポリペプチド中でのこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在

は、潜在的なグリコシル化部位を作製する。Ｏ連結グリコシル化は、糖、Ｎアセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの１つの、ヒドロキシアミノ酸、最も一般にはセリン又はスレオニンへの付着を指すが、５ヒドロキシプロリン又は５ヒドロキシリジンも使用してもよい。このように、所与のタンパク質（例、抗体）をグリコシル化するために、タンパク質のアミノ酸配列を操作し、上に記載するトリペプチド配列の１つ又は複数を含む（Ｎ連結グリコシル化部位について）。変化は、また、本来の抗体の配列への１つ又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加、又はそれによる置換により作られうる（Ｏ連結グリコシル化部位について）。

【０２１３】

抗ＣＤ４０抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当技術分野において公知の種々の方法により調製される。これらの方法は、しかし、限定しないが、天然供給源からの単離（自然発生するアミノ酸配列変異体の場合において）又はオリゴヌクレオチド媒介（又は部位特異的）変異誘発、ＰＣＲ変異誘発、抗ＣＤ４０抗体の以前に調製した変異体又は非変異体バージョンのカセット変異誘発による調製を含む。

【０２１４】

ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、及び組換え方法

【０２１５】

他の実施態様は、ヒト化抗ＣＤ４０抗体をコードする配列を含む単離ポリヌクレオチド、ベクター、及びポリヌクレオチドを含む宿主細胞、ならびにヒト化抗体の産生のための組換え技術を包含する。単離ポリヌクレオチドは、抗ＣＤ４０抗体の任意の所望の形態（例えば、全長モノクローナル抗体、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、及びＦｖフラグメント、ダイアボディ、直鎖抗体、一本鎖抗体分子、ならびに抗体フラグメントから形成された多特異的抗体を含む）をコードすることができる。

【０２１６】

一部の実施態様は、配列番号１～４、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、又は配列番号４０のいずれかの重鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗体又は抗体フラグメントをコードする配列を含む単離ポリヌクレオチドを含む。一部の実施態様は、配列番号２６、配列番号３１、又は配列番号３６の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体又は抗体フラグメントをコードする配列を含む単離ポリヌクレオチドを含む。

【０２１７】

一局面において、単離ポリヌクレオチド配列は、以下のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有する抗体又は抗体フラグメントをコードする：それぞれ配列番号２７及び配列番号２６；それぞれ配列番号２８及び配列番号２６；それぞれ配列番号２９及び配列番号２６；それぞれ配列番号３０及び配列番号２６；それぞれ配列番号３２及び配列番号３１；それぞれ配列番号３３及び配列番号３１；それぞれ配列番号３４及び配列番号３１；それぞれ配列番号３５及び配列番号３１；それぞれ配列番号３７及び配列番号３６；それぞれ配列番号３８及び配列番号３６；それぞれ配列番号３９及び配列番号３６；それぞれ配列番号４０及び配列番号３６。

【０２１８】

ヒト化抗ＣＤ４０抗体又はそのフラグメントもしくはその鎖をコードする配列を含むポリヌクレオチドは、当技術分野において公知の通りに、１つ又は複数の調節又は制御配列に融合することができ、当技術分野において公知の通りに、適した発現ベクター又は宿主細胞に含むことができる。重鎖又は軽鎖可変ドメインをコードするポリヌクレオチド分子の各々は、非依存的に、定常ドメイン（例えばヒト定常ドメインなど）をコードするポリヌクレオチド配列に融合させることができ、インタクトな抗体の産生を可能にする。あるいは、ポリヌクレオチド、又はその部分を一緒に融合することができ、一本鎖抗体の産生のための鋳型を提供する。

【０２１９】

組換え生産のため、抗体をコードするポリヌクレオチドを、クローニング（ＤＮＡの増幅）のため又は発現のために複製可能なベクター中に挿入する。組換え抗体を発現させるための多くの適したベクターが利用可能である。ベクター成分は、一般的に、しかし、限定しないが、以下の１つ又は複数を含む：シグナル配列、複製起点、１つ又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列。

【０２２０】

ヒト化抗ＣＤ４０抗体は、また、融合ポリペプチドとして産生することができ、それにおいて、抗体を異種ポリペプチド（例えば成熟タンパク質又はポリペプチドのアミノ末端に特定の切断部位を有するシグナル配列又は他のポリペプチドなど）と融合する。選択された異種シグナル配列は、典型的には、宿主細胞により認識及びプロセシングされる（即ち、シグナルペプチダーゼにより切断される）ものである。ヒト化抗ＣＤ４０抗体シグナル配列を認識及びプロセシングしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は原核生物シグナル配列により置換することができる。シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、リポタンパク質、熱安定性エンテロトキシンＩＩのリーダーなどを含む。酵母の分泌のために、天然シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼアルファ因子（サッカロミセス及びクルイベロミセスα因子リーダーを含む）、酸性ホスファターゼ、Ｃ．アルビカンスグルコアミラーゼから得られたリーダー配列、又はＷＯ９０／１３６４６に記載されるシグナルを用いて置換することができる。哺乳動物細胞において、哺乳動物シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスｇＤシグナルを使用することができる。そのような前駆体領域のためのＤＮＡを、ヒト化抗ＣＤ４０抗体をコードするＤＮＡにリーディングフレーム中で連結する。

【０２２１】

発現ベクター及びクローニングベクターは、ベクターが１つ又は複数の選択された宿主細胞において複製することを可能にする核酸配列を含む。一般的に、クローニングベクターにおいて、この配列は、ベクターが宿主染色体ＤＮＡに非依存的に複製することを可能にし、複製起点又は自己複製配列を含むものである。そのような配列は、種々の細菌、酵母、及びウイルスについて周知である。プラスミドｐＢＲ３２２からの複製起点は大半のグラム陰性細菌について適しており、２－μプラスミド起点は酵母について適しており、種々のウイルス起点（ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、ＶＳＶ、及びＢＰＶ）は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターのために有用である。一般的には、複製起点成分は、哺乳動物の発現ベクター（ＳＶ４０起点を典型的に使用することができる。だた、なぜなら、それが初期プロモーターを含むからである）のために必要とされない。

【０２２２】

発現ベクター及びクローニングベクターは、発現の同定を促進するための選択可能なマーカーをコードする遺伝子を含みうる。典型的な選択可能なマーカー遺伝子は、抗生物質又は他の毒素（例、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、又はテトラサイクリン）に対する耐性を付与するタンパク質をコードする、又は、あるいは、栄養要求性欠陥を補完する、又は、他の選択肢において、複雑な培地中に存在しない特定の栄養素（例、バシラスについてのＤ－アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）を供給する。

【０２２３】

選択スキームの一例では、宿主細胞の成長を停止するための薬物が利用される。異種遺伝子を用いて成功裏に形質転換されたそれらの細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を産生し、このように、選択レジメンを生き延びる。そのような優性選択の例では、薬物ネオマイシン、ミコフェノール酸、及びハイグロマイシンが使用される。哺乳動物細胞のための一般的な選択可能なマーカーは、ヒト化抗ＣＤ４０抗体をコードする核酸を取り込む能力がある細胞の同定を可能にするもの、例えばＤＨＦＲ（ジヒドロ葉酸還元酵素）、チミジンキナーゼ、メタロチオネインＩ及びＩＩ（例えば霊長類メタロチオネイン遺伝子など）、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどである。ＤＨＦＲ選択遺伝子を用いて形質転換された細胞を、最初に、メトトレキサート（ＭＴＸ）、ＤＨＦＲの競合的アンタゴニストを含む培養培地中で形質転換体の全てを培養することにより同

定する。野生型ＤＨＦＲを用いた場合での適切な宿主細胞は、ＤＨＦＲ活性を欠損するチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞株（例、ＤＧ４４）である。

【０２２４】

あるいは、抗ＣＤ４０抗体、野生型ＤＨＦＲタンパク質、及び別の選択可能なマーカー（例えばアミノグリコシド３’－ホスホトランスフェラーゼ（ＡＰＨ）など）をコードするＤＮＡ配列を用いて形質転換又は同時形質転換された宿主細胞（特に、内因性ＤＨＦＲを含む野生型宿主）を、選択可能なマーカーについての選択薬剤、例えばアミノグリコシド系抗生物質（例、カナマイシン、ネオマイシン、又はＧ４１８）などの選択薬剤を含む培地中での細胞成長により選択することができる。例えば、米国特許第４，９６５，１９９号を参照のこと。

【０２２５】

組換え産生を宿主細胞としての酵母細胞において実施する場合、酵母プラスミドＹＲｐ７（Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39）中に存在するＴＲＰ１遺伝子を選択可能なマーカーとして使用することができる。ＴＲＰ１遺伝子は、トリプトファン中で成長する能力を欠く酵母の変異株（例えば、ＡＴＣＣ番号４４０７６又はＰＥＰ４－１）のための選択マーカーを提供する（Jones, 1977, Genetics 85: 12）。酵母宿主細胞ゲノム中のｔｒｐ１破壊の存在は、次に、トリプトファンの非存在における成長により形質転換を検出するための効果的な環境を提供する。同様に、Ｌｅｕ２ｐ欠損酵母株（例えばＡＴＣＣ２０６２２及び３８６２６など）は、ＬＥＵ２遺伝子を持つ公知のプラスミドにより補完される。

【０２２６】

また、１．６μｍの環状プラスミドｐＫＤ１に由来するベクターを、クルイベロミセス酵母の形質転換のために使用することができる。あるいは、組換えウシキモシンの大規模産生のための発現系が、Ｋ．ラクティスについて報告された（Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8: 135）。クルイベロミセスの工業株による成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌のための安定したマルチコピー発現ベクターも開示されている（Fleer et al., 1991, Bio/Technology 9: 968-975）。

【０２２７】

発現ベクター及びクローニングベクターは、通常、宿主生物により認識され、抗ＣＤ４０抗体又はそのポリペプチド鎖をコードする核酸分子に動作可能に連結されたプロモーターを含む。原核生物宿主を用いた使用のために適したプロモーターは、ｐｈｏＡプロモーター、βラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系、及びハイブリッドプロモーター（例えばｔａｃプロモーターなど）を含む。他の公知の細菌プロモーターも適する。細菌系における使用のためのプロモーターは、また、ヒト化抗ＣＤ４０抗体をコードするＤＮＡに動作可能に連結されたシャイン・ダルガノ（ＳＤ）配列を含む。

【０２２８】

多くの真核生物プロモーター配列が公知である。実質的に、全ての真核生物の遺伝子は、転写が開始される部位から約２５～３０塩基上流に位置付けられるＡＴリッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写の開始から７０～８０塩基上流で見出される別の配列は、ＣＮＣＡＡＴ領域であり、ここでＮは任意のヌクレオチドである。大半の真核生物遺伝子の３’末端には、コード配列の３’末端へのポリＡテールの付加のためのシグナルでありうるＡＡＴＡＡＡ配列がある。これらの配列の全てが、真核生物の発現ベクター中に適切に挿入される。

【０２２９】

酵母宿主を用いた使用のための適したプロモーター配列の例は、３－ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の解糖酵素（例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース－６－リン酸イソメラーゼ、３ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキ

ナーゼなど）のためのプロモーターを含む。

【０２３０】

誘導プロモーターは、成長条件により制御される転写の追加の利点を有する。これらは、アルコールデヒドロゲナーゼ２、イソチトクロームＣ、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する誘導体酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ、ならびにマルトース及びガラクトース利用に関与する酵素のための酵母プロモーター領域を含む。酵母発現における使用のための適したベクター及びプロモーターが、ＥＰ　７３，６５７にさらに記載されている。酵母エンハンサーが、また、酵母プロモーターと有利に使用される。

【０２３１】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからのヒト化抗ＣＤ４０抗体の転写は、例えば、ウイルス、例えばポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えばアデノウイルス２）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、及びシミアンウイルス４０（ＳＶ４０）などのゲノムから、異種性哺乳動物プロモーター（例、アクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター）から、又は、熱ショックプロモーターから得られるプロモーターにより制御される（そのようなプロモーターが宿主細胞系と適合するという条件で）。

【０２３２】

ＳＶ４０ウイルスの初期及び後期プロモーターは、ＳＶ４０ウイルスの複製起点も含むＳＶ４０制限断片として便利に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、ＨｉｎｄＩＩＩ　Ｅ制限断片として便利に得られる。ベクターとしてウシパピローマウイルスを使用した哺乳動物宿主においてＤＮＡを発現するためのシステムが、米国特許第４，４１９，４４６号に開示されている。このシステムの改変が、米国特許第４，６０１，９７８号に記載されている。また、Reyes et al., 1982, Nature 297: 598-601を参照のこと（単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒトｐインターフェロンｃＤＮＡの発現を開示する）。あるいは、ラウス肉腫ウイルスの長い末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【０２３３】

組換え発現ベクターにおいて使用することができる別の有用なエレメントは、エンハンサー配列であり、それを使用し、高等真核生物によるヒト化抗ＣＤ４０抗体をコードするＤＮＡの転写を増加させる。多くのエンハンサー配列が、現在、哺乳動物遺伝子（例、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、αフェトプロテイン、及びインシュリン）から公知である。典型的には、しかし、真核細胞ウイルスからのエンハンサーが使用される。例は、複製起点の後期側のＳＶ４０エンハンサー（１００－２７０bp）、サイトメガロウイルスの初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーを含む。真核生物プロモーターの活性化のための増強エレメントの説明については、Yaniv, 1982, Nature 297: 17-18も参照のこと。エンハンサーは、ヒト化抗ＣＤ４０抗体をコードする配列に対する位置５’又は３’でベクター中にスプライシングされうるが、好ましくはプロモーターから５’部位に位置付けられる。

【０２３４】

真核生物の宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物からの有核細胞）において使用される発現ベクターは、また、転写の終結のために及びｍＲＮＡの安定化のために必要な配列を含むことができる。そのような配列は、一般に、真核生物又はウイルスのＤＮＡもしくはｃＤＮＡの５’及び、時折３’非翻訳領域から利用可能である。これらの領域は、抗ＣＤ４０抗体をコードするｍＲＮＡの非翻訳部分においてポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。１つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。ＷＯ９４／１１０２６及びそれにおいて開示される発現ベクターを参照のこと。一部の実施態様において、ヒト化抗ＣＤ４０抗体は、ＣＨＥＦシステムを使用して発現することができる。（例えば、米国特許第５，８８８，８０９号を参照のこと；その開示は参照により本明細書に組み入れられる）

【０２３５】
本明細書におけるベクター中でＤＮＡをクローン化又は発現するための適した宿主細胞は、原核生物細胞、酵母細胞、又は上に記載する高等真核細胞である。この目的のための適した原核生物は、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性菌、例えば、腸内細菌、例えばエシェリヒア、例、大腸菌、エンテロバクター、エルビニア、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例、サルモネラ・チフィリウム、セラチア、例、セラチア・マルセスセンス、及びシゲラなど、ならびにバシラス、例えばＢスブチリス及びＢリケニホルミスなど（例、ＤＤ２６６７１０に開示され、１９８９年４月１２日に公開されたＢリケニホルミス４１Ｐ）、シュードモナス、例えばＰエルジノーサなど、及びストレプトミセスを含む。１つの好ましい大腸菌クローニング宿主は大腸菌２９４（ＡＴＣＣ　３１，４４６）であるが、他の株、例えば大腸菌Ｂ、大腸菌Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ　３１，５３７）、及び大腸菌Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ　２７，３２５）なども適する。これらの例は、限定的よりむしろ例示的である。
【０２３６】
原核生物に加えて、真核微生物、例えば糸状菌又は酵母などが、ヒト化抗ＣＤ４０抗体をコードするベクターのための適したクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレビシエ、又は一般的なパン酵母は、下等真核宿主微生物の間で最も一般に使用される。しかし、多数の他の属、種、及び株が一般に利用可能であり、本明細書において有用である：例えばシゾサッカロミセス・ポンベなど；クルイベロミセス宿主、例えばＫ．ラクティス、Ｋ．フラジリス（ＡＴＣＣ　１２，４２４）、Ｋ．ブルガリ（ＡＴＣＣ　１６，０４５）、Ｋ．ウイッケルハミイ（ｗｉｃｋｅｒａｍｉｉ）（ＡＴＣＣ　２４，１７８）、Ｋ．ワルチイ（ＡＴＣＣ　５６，５００）、Ｋ．ドロソフィラルム（ＡＴＣＣ　３６，９０６）、Ｋ．サーモトレランス、及びＫ．マルキシアナスなど；ヤロウィア（ＥＰ４０２，２２６）；ピキア・パストリス（ｐａｓｔｏｒｓ）（ＥＰ　１８３，０７０）；カンジダ；トリコデルマ・レーシア（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｉａ）（ＥＰ２４４，２３４）；アカパンカビ；シュワンニオミセス、例えばシュワンニオミセス・オシデンタリスなど；及び糸状菌、例えばニューロスポラ、ペニシリウム、トリポクラジウム、ならびにアスペルギルス宿主、例えばＡ．ニジュランス及びＡ．ニガーなど。
【０２３７】
グリコシル化されたヒト化抗ＣＤ４０抗体の発現のための適した宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例は、植物及び昆虫細胞を含み、例えば、多数のバキュロウイルス株及び変異体ならびに宿主、例えばスポドプテラ・フルギペルダ（毛虫）、ネッタイシマカ（蚊）、ヒトスジシマカ（蚊）、キイロショウジョウバエ（ショウジョウバエ）、及びカイコガ（カイコ）などからの対応する許容昆虫宿主細胞を含む。トランスフェクションのための種々のウイルス株が公的に利用可能であり、例えば、オートグラファ・カリフォルニカＮＰＶのＬ－１変異体及びカイコガＮＰＶのＢｍ－５株であり、そのようなウイルスは、特にスポドプテラ・フルギペルダ細胞のトランスフェクションのために使用してもよい。
【０２３８】
綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコの植物細胞培養物も宿主として利用することができる。
【０２３９】
別の局面において、ヒト化抗ＣＤ４０の発現は、脊椎動物細胞において行われる。培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は通常の手順となっており、技術を広く利用可能である。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、ＳＶ４０により形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）、ヒト胎児腎臓株（２９３細胞又は浮遊培養中での成長のためにサブクローン化された２９３細胞（Graham et al., 1977, J. Gen Virol. 36: 59））、ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１０）、チャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ１（ＣＨＯ、Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216；例、ＤＧ４４）、マウスセルトリ細胞（ＴＭ４

, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23: 243-251）、サル腎臓細胞（ＣＶ１　ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７０）、アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８７）、ヒト子宮頚癌細胞（ＨＥＬＡ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２）、イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ３４）、バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ　３Ａ、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１４４２）、ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７５）、ヒト肝臓細胞（Ｈｅｐ　Ｇ２、ＨＢ　８０６５）、マウス乳腺腫瘍（ＭＭＴ　０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）、ＴＲ１細胞（Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68）、ＭＲＣ５細胞、ＦＳ４細胞、及びヒト肝癌株（ＨｅｐＧ２）である。

【０２４０】

宿主細胞は、ヒト化抗ＣＤ４０抗体産生のために、上に記載する発現又はクローニングベクターを用いて形質転換し、プロモーターを誘導する、形質転換体を選択する、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために、適宜改変された従来の栄養培地中で培養される。

【０２４１】

本明細書に記載するヒト化抗ＣＤ４０抗体を産生するために使用される宿主細胞は、種々の培地中で培養されうる。商業的に利用可能な培地、例えばハムＦ１０（Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.）、最小必須培地（（ＭＥＭ）（Sigma-Aldrich Co.）、ＲＰＭＩ－１６４０（Sigma-Aldrich Co.）、及びダルベッコ改変イーグル培地（（ＤＭＥＭ）、Sigma-Aldrich Co.）などが、宿主細胞を培養するために適している。また、Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102: 255、米国特許第４，７６７，７０４号、米国特許第４，６５７，８６６号、米国特許第４，９２７，７６２号、米国特許第４，５６０，６５５号、米国特許第５，１２２，４６９号、ＷＯ　９０／１０３４３０、及びＷＯ　８７／００１９５の１つ又は複数において記載される培地のいずれかを、宿主細胞のための培養培地として使用してもよい。これらの培地のいずれかを、必要に応じて、ホルモン及び／又は他の成長因子（例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子など）、塩（例えば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸など）、緩衝剤（例えばＨＥＰＥＳなど）、ヌクレオチド（例えばアデノシン及びチミジンなど）、抗生物質（例えばゲンタマイシンなど）、微量元素（通常、最終濃度がマイクロモル範囲で存在する無機化合物として定義される）、及びグルコース又は等価のエネルギー供給源を用いて添加してもよい。他のサプリメントは、また、当業者に公知でありうる適切な濃度で含まれうる。培養条件、例えば温度、ｐＨなどは、発現のために選択された宿主細胞を用いて以前に使用されたものであり、当業者に明らかであろう。

【０２４２】

組換え技術を使用する場合、抗体を、細胞内若しくは細胞膜周辺腔において産生させる、又は培地中に直接分泌させることができる。抗体が細胞内で産生される場合、細胞を、最初の段階として、破壊してタンパク質を放出してもよい。粒子状デブリ（宿主細胞又は溶解断片のいずれか）を、例えば遠心分離又は限外濾過により除去することができる。Carter et al., 1992, Bio/Technology 10: 163-167には、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順が記載されている。簡単には、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム（ｐＨ３．５）、ＥＤＴＡ、及びフェニルメチルスルホニルフルオリド（ＰＭＳＦ）の存在において約３０分にわたり解凍する。細胞デブリを遠心分離により除去することができる。抗体が培地中に分泌される場合、そのような発現系からの上清を、一般的には、最初に、商業的に利用可能なタンパク質濃縮フィルター、例えば、Amicon又はMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用して濃縮する。プロテアーゼ阻害剤（例えばＰＭＳＦなど）が先の工程のいずれかに含まれ、タンパク質分解を阻害しうる。抗生物質が含まれ、外来性の汚染物質の成長を防止しうる。種々の方法を使用して、宿主細胞から抗体を単離することができる。

【０２４３】

細胞から調製した抗体組成物を、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、

ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製することができ、アフィニティークロマトグラフィーが典型的な精製技術である。アフィニティーリガンドとしてのプロテインＡの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンＦｃドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインＡを使用して、ヒトガンマ１、ガンマ２、又はガンマ４重鎖に基づく抗体を精製することができる（例、Lindmark et al., 1983 J. Immunol. Meth. 62: 1-13を参照のこと）。プロテインＧが、全てのマウスアイソタイプについて及びヒトガンマ３について推奨される（例、Guss et al., 1986 EMBO J. 5: 1567-1575を参照のこと）。アフィニティーリガンドが付着しているマトリックスは、最もしばしばアガロースであるが、しかし、他のマトリックスを利用可能である。機械的に安定なマトリックス、例えば孔制御ガラス又はポリ（スチレンジビニル）ベンゼンなどは、アガロースを用いて達成できるものより速い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_{H3}ドメインを含む場合、Bakerbond ABX（商標）樹脂（J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.）が精製のために有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えばイオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカ上でのクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換樹脂（例えばポリアスパラギン酸カラムなど）上でのヘパリンSEPHAROSE（商標）クロマトグラフィー上でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、及び硫酸アンモニウム沈殿なども、回収すべき抗体に依存して利用可能である。

【０２４４】

任意の予備的な精製工程に続き、目的の抗体及び汚染物質を含む混合物を、約２．５～４．５の間のｐＨの溶出緩衝液を使用する、典型的には低塩濃度（例、約０～０．２５Ｍ塩）で実施する、低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーに供してもよい。

【０２４５】

また、含まれるのは、以下のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有する抗体又は抗体フラグメントをコードする単離ポリヌクレオチド配列により表されるヌクレオチド配列の全部又は部分（例、可変領域をコードする部分）に、本明細書において定義する通り、低、中、及び高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸である：それぞれ配列番号２７及び配列番号２６；それぞれ配列番号２８及び配列番号２６；それぞれ配列番号２９及び配列番号２６；それぞれ配列番号３０及び配列番号２６；それぞれ配列番号３２及び配列番号３１；それぞれ配列番号３３及び配列番号３１；それぞれ配列番号３４及び配列番号３１；それぞれ配列番号３５及び配列番号３１；それぞれ配列番号３７及び配列番号３６；それぞれ配列番号３８及び配列番号３６；それぞれ配列番号３９及び配列番号３６；それぞれ配列番号４０及び配列番号３６。ハイブリダイズする核酸のハイブリダイズ部分は、典型的には、少なくとも１５（例、２０、２５、３０、又は５０）ヌクレオチド長である。ハイブリダイズする核酸のハイブリダイズ部分は、抗ＣＤ４０ポリペプチド（例、重鎖又は軽鎖可変領域）、又はその相補体をコードする核酸の部分又は全部の配列と、少なくとも８０%、例えば、少なくとも９０%、少なくとも９５%、又は少なくとも９８%同一である。本明細書に記載する型のハイブリダイズ核酸を、例えば、クローニングプローブ、プライマー（例、ＰＣＲプライマー）、又は診断プローブとして使用することができる。

【０２４６】

一部の実施態様は、配列番号１～４、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、又は配列番号４０のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも８０%、少なくとも９０%、少なくとも９５%、少なくとも９８%、又は少なくとも９９%同一である重鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗体又は抗体フラグメントをコードする配列を含む単離ポリヌクレオチドを含む。一部の実施態様は、配列番号５～８、配列番号２６、配列番号３１、又は配列番号３６のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも８０%、少なくとも９０%、少なくとも９５%、少なくとも９８%、又は少なくとも９９%同一である軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体又は抗体フラグメントをコードする配列を

含む単離ポリヌクレオチドを含む。

【０２４７】

一局面において、単離ポリヌクレオチド配列は、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有する抗体又は抗体フラグメントをコードし、各々が、以下のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有する抗体又は抗体フラグメントのアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む：それぞれ配列番号２７及び配列番号２６；それぞれ配列番号２８及び配列番号２６；それぞれ配列番号２９及び配列番号２６；それぞれ配列番号３０及び配列番号２６；それぞれ配列番号３２及び配列番号３１；それぞれ配列番号３３及び配列番号３１；それぞれ配列番号３４及び配列番号３１；それぞれ配列番号３５及び配列番号３１；それぞれ配列番号３７及び配列番号３６；それぞれ配列番号３８及び配列番号３６；それぞれ配列番号３９及び配列番号３６；それぞれ配列番号４０及び配列番号３６。

【０２４８】

別の局面において、本発明は、直ぐ上に記載する実施態様におけるポリヌクレオチドに関し、それにおいて、コードされる抗体又は抗体フラグメントの重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域は、以下のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有する抗体又は抗体フラグメントのアミノ酸配列と少なくとも９５％、少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む：一実施態様において、それぞれ配列番号２７及び配列番号２６；別の実施態様において、それぞれ配列番号２８及び配列番号２６；別の実施態様において、それぞれ配列番号２９及び配列番号２６；別の実施態様において、それぞれ配列番号３０及び配列番号２６；別の実施態様において、それぞれ配列番号３２及び配列番号３１；別の実施態様において、それぞれ配列番号３３及び配列番号３１；別の実施態様において、それぞれ配列番号３４及び配列番号３１；別の実施態様において、それぞれ配列番号３５及び配列番号３１；別の実施態様において、それぞれ配列番号３７及び配列番号３６；別の実施態様において、それぞれ配列番号３８及び配列番号３６；別の実施態様において、それぞれ配列番号３９及び配列番号３６；ならびに、別の実施態様において、それぞれ配列番号４０及び配列番号３６。

【０２４９】

本明細書において使用する通り、「同一」又は「パーセント同一性」という用語は、２つ又はそれ以上の核酸配列又はポリペプチド配列の文脈において、最大の対応について比較及び整列させた場合に、同じである、あるいは、同じであるヌクレオチド又はアミノ酸残基の特定のパーセンテージを有する２つ又はそれ以上の配列又は部分配列を指す。パーセント同一性を決定するために、配列を、最適な比較の目的のために整列させる（例えば、ギャップを、第２のアミノ酸配列又は核酸配列との最適な整列化のために第１のアミノ酸配列又は核酸配列の配列中に導入することができる）。対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置のアミノ酸残基又はヌクレオチドを次に比較する。第１の配列中の位置が、第２の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドにより占められる場合、次に、分子はその位置で同一である。２つの配列の間のパーセント同一性は、配列により共有される同一位置の数の関数である（即ち、％同一性＝同一位置の＃／位置の合計＃（例、重複する位置）×１００）。一部の実施態様において、比較される２つの配列は、適切な場合、ギャップを配列内に導入した後に同じ長さである（例、比較されている配列を越えて伸長する追加配列を除く）。例えば、可変領域配列を比較する場合、リーダー及び／又は定常ドメイン配列は考慮されない。２つの配列間での配列比較のために、「対応する」ＣＤＲは、両方の配列の同じ位置におけるＣＤＲを指す（例、各配列のＣＤＲ－Ｈ１）。

【０２５０】

２つの配列間でのパーセント同一性又はパーセント類似性の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。２つの配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci

. USA 87: 2264-2268のアルゴリズムであり、Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877において改変されている。そのようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410のＮＢＬＡＳＴ及びＸＢＬＡＳＴプログラム中に組み入れられる。ＢＬＡＳＴヌクレオチド検索を、ＮＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝１００、ワード長＝１２を用いて実施し、目的のタンパク質をコードする核酸に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。ＢＬＡＳＴタンパク質検索を、ＸＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝５０、ワード長＝３を用いて実施し、目的のタンパク質に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較の目的のためのギャップ付き整列化を得るために、Ｇａｐｐｅｄ　ＢＬＡＳＴを、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res.25:3389-3402に記載される通りに利用することができる。あるいは、ＰＳＩ－Ｂｌａｓｔを使用し、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施することができる（同上）。ＢＬＡＳＴ、ギャップ付きＢＬＡＳＴ、及びＰＳＩ－Ｂｌａｓｔプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例、ＸＢＬＡＳＴ及びＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトパラメータを使用することができる。配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Myers and Miller, CABIOS (1989)のアルゴリズムである。そのようなアルゴリズムはＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）中に組み入れられ、それはＧＣＧ配列整列化ソフトウェアパッケージの一部である。アミノ酸配列を比較するためにＡＬＩＧＮプログラムを利用する場合、ＰＡＭ１２０重量残基表、ギャップ長ペナルティー１２、及びギャップペナルティー４を使用することができる。配列分析のための追加アルゴリズムが当技術分野において公知であり、Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10: 3-5において記載されるＡＤＶＡＮＣＥ及びＡＤＡＭを含む；ＦＡＳＴＡは、Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-8に記載されている。ＦＡＳＴＡ内で、ｋｔｕｐは、検索の感度及びスピードを設定する制御オプションである。ｋｔｕｐ＝２の場合、比較されている２つの配列における類似の領域が、整列残基の対を見ることにより見出される；ｋｔｕｐ＝１の場合、単一の整列アミノ酸を検証する。ｋｔｕｐは、タンパク質配列について２又は１に、あるいはＤＮＡ配列について１～６に設定することができる。ｋｔｕｐが特定されていない場合のデフォルトは、タンパク質についての２及びＤＮＡについての６である。あるいは、タンパク質配列の整列化は、Higgins et al., 1996, Methods Enzymol.266:383-402により記載される通り、ＣＬＵＳＴＡＬＷアルゴリズムを使用して行ってもよい。

【０２５１】

非治療的な使用

【０２５２】

本明細書に記載する抗体は、アフィニティ精製薬剤として有用である。このプロセスにおいて、抗体を、当技術分野において周知の方法を使用して、固相（例えばプロテインＡ樹脂など）上に固定化する。固定化抗体を、精製するＣＤ４０タンパク質（又はそのフラグメント）を含むサンプルと接触させ、その後、支持体を、ＣＤ４０タンパク質（固定化抗体に結合されている）を除く、サンプル中の実質的に全ての材料を除去する適した溶媒を用いて洗浄する。最後に、支持体を、ＣＤ４０タンパク質を抗体から放出する別の適した溶媒を用いて洗浄する。

【０２５３】

ヒト化抗ＣＤ４０抗体は、また、ＣＤ４０タンパク質を検出及び／又は定量化するための診断アッセイ、例えば、特定の細胞、組織、又は血清においてＣＤ４０発現を検出する際に有用である。

【０２５４】

一部の実施態様において、例えば、診断目的のために、検出可能な成分を用いて抗体を標識することが有利であろう。多数の検出可能な標識を利用可能である（ラジオアイソトープ、蛍光標識、酵素基質標識などを含む）。標識を、種々の公知の技術を使用して、間接的に抗体と結合させてもよい。例えば、抗体をビオチンと結合させることができ、上に言及する標識の３つの広いカテゴリーのいずれかをアビジンと結合させることができる（

逆もまた同様）。ビオチンはアビジンに選択的に結合し、このように、標識は、この間接的な様式で抗体と結合させることができる。あるいは、標識と抗体との間接的な結合を達成するために、抗体を、小さなハプテン（例えばジゴキシンなど）と結合させることができ、上に言及する異なる型の標識の１つを、抗ハプテン抗体（例、抗ジゴキシン抗体）と結合させる。このように、標識と抗体との間接的な結合を達成することができる。

【０２５５】

例示的なラジオアイソトープ標識は、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、及び^{131}Ｉを含む。抗体は、例えば、Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, 1991, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubsに記載されている技術を使用して、ラジオアイソトープを用いて標識することができる。放射活性は、例えば、シンチレーション計数により測定することができる。

【０２５６】

例示的な蛍光標識は、希土類キレート（ユーロピウムキレート）に由来する標識を含み、又は、フルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリトリン、及びテキサスレッドが利用可能である。蛍光標識は、公知の技術、例えば、Current Protocols in Immunology（上記）に開示されているものなどを介して抗体に結合させることができる。蛍光は、蛍光光度計を使用して定量化することができる。

【０２５７】

当技術分野において公知である種々の十分に特徴付けられた酵素－基質標識がある（例、総説については、米国特許第４，２７５，１４９号を参照のこと）。酵素は、一般的に、種々の技術を使用して測定することができる発色基質の化学変化を触媒する。例えば、変化は、分光光度法で測定することができる基質における色の変化でありうる。あるいは、酵素は、基質の蛍光又は化学発光を変化させうる。蛍光における変化を定量化するための技術を上に記載している。化学発光基質は化学反応により電子的に励起され、次に、化学発光計を使用して測定することができる光を放出しうる、例えば、又はエネルギーを蛍光アクセプターに供与する。

【０２５８】

酵素標識の例は、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第４，７３７，４５６号）、ルシフェリン、２，３ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰＯ）など、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ（例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼなど）、複素環（heterocydic）オキシダーゼ（例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなど）、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼなどを含む。酵素を抗体に共役させるための技術が、例えば、O'Sullivan et al., 1981, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (J. Langone & H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N.Y., 73: 147-166に記載されている。

【０２５９】

酵素－基質の組み合わせの例は、例えば、以下を含む：基質として水素ペルオキシダーゼを伴う西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰＯ）、それにおいて水素ペルオキシダーゼは色素前駆体、例えばオルトフェニレンジアミン（ＯＰＤ）又は３，３’，５，５’テトラメチルベンジジン塩酸塩（ＴＭＢ）などを酸化する；発色基質としてパラニトロフェニルリン酸を伴うアルカリホスファターゼ（ＡＰ）；及び、発色基質、例えばｐ－ニトロフェニル－β－Ｄ－ガラクトシダーゼなど又は蛍光発生基質４メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－ガラクトシダーゼを伴うβ－Ｄ－ガラクトシダーゼ（β－Ｄ－Ｇａｌ）。

【０２６０】

多数の他の酵素－基質の組み合わせが、当業者に利用可能である。これらの一般的な総

説については、米国特許第４，２７５，１４９号及び米国特許第４，３１８，９８０号を参照のこと。

【０２６１】

別の実施態様において、ヒト化抗ＣＤ４０抗体は非標識で使用され、ヒト化抗ＣＤ４０抗体に結合する標識抗体を用いて検出される。

【０２６２】

本明細書に記載する抗体を、任意の公知のアッセイ方法、例えば競合結合アッセイ、直接及び間接サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイなどにおいて用いてもよい。例えば、Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc.1987)を参照のこと。

【０２６３】

診断キット

【０２６４】

ヒト化抗ＣＤ４０抗体は、診断キット、即ち、所定量の試薬と診断アッセイを実施するための指示とのパッケージ化された組み合わせにおいて使用することができる。抗体が酵素を用いて標識される場合、キットは、酵素により要求される基質及び補因子、例えば、検出可能な発色団又はフルオロフォアを提供する基質前駆体などを含んでもよい。また、他の添加剤を含んでもよい（例えば安定化剤、緩衝剤（例えば、ブロック緩衝剤又は溶解緩衝剤）など）。種々の試薬の相対量を広く変動させ、アッセイの感度を実質的に最適化する試薬の溶液中での濃度を提供しうる。試薬は、乾燥粉末（通常は凍結乾燥されており、溶解時に適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む）として提供してもよい。

【０２６５】

治療的な使用

【０２６６】

別の実施態様において、本明細書に開示するヒト化抗ＣＤ４０抗体は、本明細書に記載する通り、ＣＤ４０の発現に関連する種々の障害の処置において有用である。

【０２６７】

ヒト化抗ＣＤ４０抗体又は薬剤は、任意の適した手段（非経口、皮下、腹腔内、肺内、及び鼻腔内を含む）、局所の免疫抑制処置のために望ましい場合、病巣内投与（移植前に移植片と抗体を灌流又はそうでなければ接触させることを含む）により投与される。ヒト化抗ＣＤ４０抗体又は薬剤は、例えば、注入として又はボーラスとして投与することができる。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与を含む。また、ヒト化抗ＣＤ４０抗体は、特に減少用量の抗体を用いて、パルス注入により適切に投与する。一局面において、服用は、投与が短時間又は慢性であるかに部分的に依存して、注射により、最も好ましくは静脈内又は皮下注射により与える。

【０２６８】

疾患の防止又は処置のために、抗体の適切な投与量は、種々の因子、例えば処置すべき疾患の型（上に定義する）、疾患の重症度及び経過、抗体が防止的又は治療的な目的のために投与されるか否か、以前の治療、患者の病歴及び抗体への応答、ならびに主治医の判断に依存する。抗体は、１回又は一連の処置にわたり患者に適切に投与される。

【０２６９】

疾患の型及び重症度に依存して、抗体の約１μg/kg～２０mg/kg（例、０．１～１５mg/kg）は、例えば、１つ又は複数の別々の投与による又は連続注入によるかを問わず、患者に投与するための初期候補投与量である。典型的な１日投与量は、上に言及する因子に依存して、約１μg/kg～１００mg/kg又はそれ以上の範囲でありうる。数日間にわたり又はそれより長い反復投与のために、状態に依存して、処置は、疾患症状の所望の抑制が発生するまで持続される。しかし、他の投与計画も有用でありうる。この治療の進行は、従来の技術及びアッセイによって簡単にモニターされる。例示的な服用計画はＷＯ　９４／０４１８８に開示されるものである。

【０２７０】
用語「抑制」は、「寛解」及び「緩和」と同じ文脈で本明細書において使用され、疾患の１つ又は複数の特徴の軽減を意味する。
【０２７１】
抗体組成物は、良好な医療行為と一致する様式で製剤化、服用、及び投与される。この文脈における考慮のための因子は、処置されている特定の障害、処置されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール、及び医療従事者に公知の他の因子を含む。投与される抗体の「治療的に効果的な量」は、そのような考慮により支配され、ＣＤ４０発現に関連する障害を防止、寛解、又は処置するために必要な最小量である。
【０２７２】
抗体は、問題の障害を防止又は処置するために現在使用される１つ又は複数の薬剤を用いて製剤化する必要はないが、しかし、場合による。そのような他の薬剤の効果的な量は、製剤中に存在するヒト化抗ＣＤ４０抗体の量、障害又は処置の型、及び上で考察する他の因子に依存する。これらは、一般的に、同じ投与量で、上文に使用された投与経路を用いて、又は、先に用いられた投与量の約１～９９％で使用される。
【０２７３】
ＣＤ４０関連障害
【０２７４】
抗ＣＤ４０抗体又は薬剤は、例えば、免疫細胞（例、リンパ球又は樹状細胞）の不適切な活性化により、ＣＤ４０を発現する癌又はＣＤ４０の発現により特徴付けられる免疫学的障害を処置又は防止するために有用である。そのようなＣＤ４０の発現は、例えば、細胞表面上での増加したＣＤ４０タンパク質レベル及び／又は発現したＣＤ４０の変化した抗原性に起因しうる。免疫学的障害の処置又は予防は、本明細書に記載する方法に従い、そのような処置又は防止を必要とする被験体に、抗ＣＤ４０抗体又は薬剤の効果的な量を投与することにより達成され、それにより、抗体は（ｉ）ＣＤ４０を発現する、疾患状態に関連付けられる活性化した免疫細胞に結合し、（ｉｉ）活性化された免疫細胞に対する細胞傷害性、細胞分裂停止、又は免疫抑制効果を発揮する。
【０２７５】
免疫細胞の不適切な活性化により特徴付けられ、本明細書に記載する方法により処置又は防止することができる免疫学的疾患は、例えば、疾患の基礎となる過敏反応の型により分類することができる。これらの反応は、典型的には、４つの型に分類される：アナフィラキシー反応、細胞傷害性（細胞溶解性）反応、免疫複合体反応、又は細胞媒介性免疫（ＣＭＩ）反応（また、遅延型過敏（ＤＴＨ）反応として言及される）。（例、Fundamental Immunology (William E. Paul ed., Raven Press, N.Y., 3rd ed.1993)を参照のこと）
【０２７６】
そのような免疫学的疾患の特定の例は、以下を含む：関節リウマチ、自己免疫脱髄性疾患（例、多発性硬化症、アレルギー性脳脊髄炎）、内分泌眼症（endocrine opthalmopathy）、網膜ブドウ膜炎、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、グレーブス病、糸球体腎炎、自己免疫肝臓疾患、炎症性腸疾患（例、クローン病又は潰瘍性結腸炎）、アナフィラキシー、アレルギー反応、シェーグレン症候群、Ｉ型糖尿病、原発性胆汁性肝硬変、ウェゲナー肉芽腫症、線維筋痛症、多発性筋炎、皮膚筋炎、炎症性筋炎、多発性内分泌不全、シュミット症候群、自己免疫性ブドウ膜炎、アジソン病、副腎炎、甲状腺炎、橋本甲状腺炎、自己免疫甲状腺疾患、悪性貧血、胃萎縮、慢性肝炎、ルポイド肝炎、アテローム性動脈硬化症、亜急性皮膚エリテマトーデス、副甲状腺機能低下症、ドレスラー症候群、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少性紫斑、溶血性貧血、尋常性天疱瘡、天疱瘡、疱疹状皮膚炎、脱毛症アルカタ、類天疱瘡、強皮症、進行性全身性硬化症、ＣＲＥＳＴ症候群（石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症（sclerodactyl））、及び毛細血管拡張）、男性と女性の自己免疫性不妊症、強直脊椎炎（ankylosing spondolytis）、潰瘍性大腸炎、混合性結合組織病、結節性多発動脈炎（polyarteritis nedosa）、全身性壊

死性血管炎、アトピー性皮膚炎、アトピー性鼻炎、グッドパスチャー症候群、シャーガス病、サルコイドーシス、リウマチ熱、喘息、再発性流産、抗リン脂質症候群、農夫肺、多形性紅斑、心切開術後症候群、クッシング症候群、自己免疫性慢性活動性肝炎、トリ愛好者肺、中毒性表皮壊死症、アルポート症候群、肺胞炎、アレルギー性肺胞炎、線維性肺胞炎、間質性肺疾患、結節性紅斑、壊疽性膿皮症、輸血反応、高安動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、側頭動脈炎、住血吸虫症、巨細胞性動脈炎、回虫症、アスペルギルス症、サムター症候群（Sampter's syndrome）、湿疹、リンパ腫様肉芽腫症、ベィ症候群、フィラリア症、毛様体炎、慢性毛様体炎、異時性毛様体炎、フックス毛様体炎、ＩｇＡ腎症、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、移植片対宿主疾患、移植拒絶反応、心筋症、イートン・ランバート症候群、再発性の多発性軟骨炎、クリオグロブリン血症、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、エヴァン症候群、急性呼吸窮迫症候群、肺炎症、骨粗鬆症、遅延型過敏症、及び自己免疫性腺機能不全。

【０２７７】

したがって、本明細書に記載する方法は、Ｂリンパ球（例、全身性エリテマトーデス、グッドパスチャー症候群、関節リウマチ、及びＩ型糖尿病）、Ｔｈ１リンパ球（例、関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、シェーグレン症候群（Sjogren's syndrome）、橋本甲状腺炎、グレーブス病、原発性胆汁性肝硬変、ウェゲナー肉芽腫症、結核、又は移植片対宿主疾患）、又はＴｈ２リンパ球（例、アトピー性皮膚炎、全身性エリテマトーデス、アトピー性喘息、鼻結膜炎、アレルギー性鼻炎、Ｏｍｅｎｎ症候群、全身性硬化症、又は慢性移植片対宿主疾患）の障害の処置を包含する。一般的には、樹状細胞を含む障害は、Ｔｈ１リンパ球又はＴｈ２リンパ球の障害を含む。

【０２７８】

関節リウマチ（ＲＡ）は、人口の約１％に影響する最も一般的な炎症性自己免疫性疾患の１つである。有効な処置（例、ＭＴＸ及び抗ＴＮＦ薬剤）を利用可能であるが、特に抗ＴＮＦ治療に適切に応答しない患者（患者の約３０％）について、満たされていない大きな医学的ニーズが存在する。また、患者の最高５０％が、主に有害事象のために５年以内にＴＮＦアンタゴニスト処置を中止する。しかし、また、なぜなら、ますます認識される多くの患者が治療的利益を失うからである。このように、ＲＡにおいて炎症及び関節破壊を標的化するが、しかし、ＴＮＦの直接阻害にだけ頼らない効果的な治療を確立することが重要である。非常に魅力的なアプローチは、同時刺激細胞経路を標的化することである。同時刺激における主要な受容体－リガンドの対の１つはＣＤ４０／ＣＤ４０Ｌである。このシステムは、免疫細胞の間、免疫細胞及び非免疫細胞間の相互作用を許し、その全てがＲＡの病因において重要である。本発明のアンタゴニスト抗体を用いたＣＤ４０の遮断は、ＲＡにおいて以下の効果の１つ又は複数を有しうる：

【０２７９】

１）Ｂ細胞分化及び抗体アイソタイプスイッチを阻害する；

【０２８０】

２）Ｔ細胞及びマクロファージ中でのサイトカイン及びケモカイン産生ならびに接着分子の上方調節を阻害する；

【０２８１】

３）樹状細胞の活性化を阻害する、及び

【０２８２】

４）前炎症性サイトカイン、ケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ、プロスタグランジンの産生を阻害し、非免疫細胞（例、上皮細胞、内皮細胞、及び間葉細胞）において接着分子を下方調節する。

【０２８３】

上の効果の１つ又は複数を達成する方法を、本明細書において明確に熟慮する。ＲＡに加えて、本発明の組成物は、多発性硬化症、乾癬（乾癬性関節炎を含む）、若年性関節リウマチ、炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデス、及び固形臓器移植の処置の方法において特に有用であろう。

【０２８４】
関節リウマチ（ＲＡ）は慢性の全身性自己免疫性疾患であり、成人における約１％の有病率を伴う。疾患は、有意な罹患率及び早期死亡率を起こし続ける（死亡率は、加速された心血管疾患に主に起因する）。現在、関節損傷が、診断時に骨浸食のＸ線検査での証拠を示す患者の最高３０％での疾患の経過における非常に早期に発生し、１年後に６０％に増加することが確認されている。現在のガイドラインでは、確定診断が確立された後３ヶ月以内に従来の疾患修飾抗リウマチ薬物（ＤＭＡＲＤ）を用いた治療を開始することが推奨されている。ＤＭＡＲＤは、関節損傷を低下又は防止し、関節機能を保存する潜在力を有する。現在、リウマチ専門医は、大半の患者について初期ＤＭＡＲＤ治療としてメトトレキサート（ＭＴＸ）を選択する。

【０２８５】
ＴＮＦアンタゴニストエタネルセプト（エンブレル（登録商標））、インフリキシマブ（レミケード（登録商標））、アダリムマブ（ヒュミラ（登録商標））、ＣＴＬＡ４アンタゴニストアバタセプト（オレンシア（登録商標））、抗ＩＬ－６受容体ｍＡｂトシリズマブ、及び抗ＣＤ２０　ｍＡｂリツキシマブ（リツキサン（登録商標））が、ＲＡの処置において有効である。現在のガイドラインでは、一般的に、従来のＤＭＡＲＤに対する不適切な応答後の活動性ＲＡの処置のために、生物学的ＤＭＡＲＤを使用することが推奨されている。

【０２８６】
以前のＭＴＸ処置を伴わない早期の侵襲性のＲＡを伴う患者における最近の試験では、単剤療法として使用した場合、ＭＴＸとＴＮＦアンタゴニストとの組み合わせが各々よりも優れていることが示された。最も顕著な結果は、組み合わせ治療の有意な放射線学的利益であった。このように、ＭＴＸ及びＴＮＦ阻害剤の組み合わせは、侵襲性の疾患及び侵襲性の表現型（例、高い活動性スコア、機能障害、リウマチ因子（ＲＦ）又は抗環状シトルリン化ペプチド抗体（ＣＣＰ）の血清反応陽性、ＣＲＰ上昇、Ｘ線検査での浸食）の最も大きなリスクのある患者において使用すべきである。しかし、本発明者らは、臨床診療において、ＴＮＦアンタゴニストが一次治療として使用されることが稀であると予測する。米国のリウマチ専門医の調査が２００５年４月に行われ、ＴＮＦアンタゴニストを使用する決断に最も影響を及ぼす因子が、ＭＴＸの失敗又は複数のＤＭＡＲＤ、医師のグローバルアセスメント、機能障害、及びＸ線検査での悪化又は浸食であることを示した。現在、ＲＡを伴う患者の推定２０％が、米国においてＴＮＦ阻害剤治療を受ける。

【０２８７】
ＲＡ患者の実質的なパーセンテージが、薬物不耐性及び毒性又は応答の欠如のいずれかのため、現在の処置（生物学的治療を含む）を用いて適切に助けられていない。患者の最高５０％が、主に有害事象のために５年以内にＴＮＦアンタゴニスト処置を中止する。しかし、また、ますます認識される多くの患者が応答を失うからである。

【０２８８】
一部の実施態様において、免疫学的障害は、Ｔ細胞媒介性免疫学的障害、例えば障害に関連する活性化Ｔ細胞がＣＤ４０を発現するＴ細胞障害などである。抗ＣＤ４０抗体又は薬剤を投与し、そのようなＣＤ４０を発現する活性化Ｔ細胞を枯渇させることができる。特定の実施態様において、抗ＣＤ４０抗体又は薬剤の投与は、ＣＤ４０を発現する活性化Ｔ細胞を枯渇することができ、休止Ｔ細胞は抗ＣＤ４０又は薬剤により実質的に枯渇されない。この文脈において、「実質的に枯渇していない」は、休止Ｔ細胞の約６０％未満、又は約７０％未満、又は約８０％未満が枯渇されていないことを意味する。

【０２８９】
本明細書に記載する抗ＣＤ４０抗体及び薬剤は、また、ＣＤ４０を発現する癌を処置又は防止するために有用である。ＣＤ４０を発現する癌の処置又は防止は、本明細書に記載する方法に従い、そのような処置又は防止を必要とする被験体に、抗ＣＤ４０抗体又は薬剤の効果的な量を投与することにより達成され、それにより抗体又は薬剤は（ｉ）ＣＤ４０を発現する癌細胞に結合し、（ii）ＣＤ４０を発現する癌細胞の増殖を枯渇又は阻害す

る細胞傷害性又は細胞分裂停止効果を発揮する。

【０２９０】

本明細書に記載する方法により処置又は防止することができるＣＤ４０を発現する癌は、例えば、白血病、例えば急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（例、骨髄芽球、前骨髄球、骨髄単球、単球、又は赤白血病）、慢性白血病、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、又は慢性リンパ性白血病など；真性多血症；リンパ腫（例、ホジキン病又は非ホジキン病）；多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症；重鎖病；固形腫瘍、例えば肉腫及び癌腫（例、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頚癌、子宮癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫（meningioma）、黒色腫、神経芽腫、網膜芽腫、上咽頭癌、又は食道癌）を含む。

【０２９１】

医薬的組成物及びその投与

【０２９２】

ＣＤ４０結合薬剤（例、抗ＣＤ４０抗体）を含む組成物を、免疫学的障害又はＣＤ４０を発現する癌を有する又は有するリスクのある被験体に投与することができる。本発明は、さらに、ＣＤ４０を発現する癌又は免疫学的障害の防止又は処置のための薬物の製造におけるＣＤ４０結合薬剤（例、抗ＣＤ４０抗体）の使用を提供する。用語「被験体」は、本明細書において使用する通り、ＣＤ４０結合薬剤を投与することができる任意の哺乳動物患者を意味し、例えば、ヒト及び非ヒト哺乳動物、例えば霊長類、齧歯類、及びイヌなどを含む。本明細書に記載する方法を使用した処置について具体的に意図される被験体は、ヒトを含む。抗体又は薬剤は、免疫学的障害又はＣＤ４０を発現する癌の防止又は処置において、単独で、あるいは、他の組成物と組み合わせて投与することができる。

【０２９３】

そのような医薬組成物に使用するための好ましい抗体は、配列番号１～４、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、又は配列番号４０のいずれかの重鎖可変領域のアミノ酸配列を有するヒト化抗体又は抗体フラグメントを含むものである。

【０２９４】

いくつかの実施態様は、配列番号２６、配列番号３１、又は配列番号３６の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体又は抗体フラグメントをコードする配列を含む単離ポリヌクレオチドを含む。特に好ましいのは、ヒト化抗体組成物は、以下のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有する抗体又は抗体フラグメントを含む：それぞれ配列番号２７及び配列番号２６；それぞれ配列番号２８及び配列番号２６；それぞれ配列番号２９及び配列番号２６；それぞれ配列番号３０及び配列番号２６；それぞれ配列番号３２及び配列番号３１；それぞれ配列番号３３及び配列番号３１；それぞれ配列番号３４及び配列番号３１；それぞれ配列番号３５及び配列番号３１；それぞれ配列番号３７及び配列番号３６；それぞれ配列番号３８及び配列番号３６；それぞれ配列番号３９及び配列番号３６；それぞれ配列番号４０及び配列番号３６。本発明内で熟慮するのは、以下の重鎖配列のいずれかをコードする単離ポリヌクレオチドである：配列番号１～４、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４２、配列番号４４、配列番号４６、配列番号４８、配列番号５３、配列番号５７，配列番号５８，配列番号５９，配列番号６０，配列番号６１、配列番号６２、配

列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、又は配列番号７３。他の実施態様は、以下の配列のいずれかの軽鎖配列をコードする単離核酸に向けられる：配列番号５～配列番号８、配列番号２６、配列番号３１、配列番号３６、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４５、配列番号４７、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号７４、配列番号７５、又は配列番号７６。

【０２９５】

特定の実施態様において、ＲＡの処置が行われる場合、本発明の組成物を、ＭＴＸ単独に適切に応答しない中程度から重度の活動性ＲＡを伴う患者において、徴候及び症状を低下させ、主要な臨床応答を誘導し、構造的損傷の進行を低下させるための方法において使用してもよい。現在の例示的なそのような治療は、エンブレル／ヒュミラである（ヒュミラ及びエンブレルを用いたデータは、２つの異なる患者集団において得られた）。本発明の組成物は、エンブレル／ヒュミラ治療の代わりに、又はＭＴＸ単独に応答しない被験体のためにエンブレル／ヒュミラ治療との組み合わせで使用してもよい。好ましくは、そのような実施態様において、本発明の組成物は、例えば以下により決定される、メトトレキサートに対する不適切な応答を有した患者においてエンブレル＋ＭＴＸよりも優れた効果を有するであろう：化合物＋ＭＴＸについての６ヵ月でのＡＣＲ２０＞８５％（ＧＳ：エンブレル＋ＭＴＸ７１％対プラセボ＋ＭＴＸ２７％、ヒュミラ＋ＭＴＸ（１２ヶ月）５９％対プラセボ＋ＭＴＸ２４％）＊。本発明の組成物の優れた効力についての追加基準は、エンブレルと同様の、１年間の期間にわたる構造的損傷の進行の阻害を含みうる（５２週間後、平均改変Ｓｈａｒｐスコア、ヒュミラ＋ＭＴＸ０．１対プラセボ＋ＭＴＸ２．７）＊。さらに他の実施態様において、組成物は、ＡＣＲ７０により測定される、メトトレキサートに対する不適切な応答を有した患者においてエンブレルよりも優れた「主要臨床応答」を産生する（ヒュミラ＋ＭＴＸについて２０％、プラセボ＋ＭＴＸについて４％）＊。

【０２９６】

他の実施態様において、本発明の組成物を、抗ＴＮＦ薬剤に対する不適切な応答を有した中程度から重度の活動性ＲＡを伴う患者において、徴候及び症状を低下させ、主要臨床応答を誘導し、構造的損傷の進行を低下させるために適応してもよい。現在のゴールドスタンダード：非抗ＴＮＦ生物学的治療。好ましくは、そのような被験体において、本発明の組成物は、抗ＴＮＦ薬剤に対して不適切な応答を有した患者における履歴比較により、非抗ＴＮＦ生物製剤（例、オレンシア、リツキサン）と比較して劣らない効力を持つ：化合物＋ＤＭＡＲＤについての６ヵ月でのＡＣＲ２０＞５０％（ＧＳ：オレンシア＋ＤＭＡＲＤ５０％対プラセボ＋ＤＭＡＲＤ２０％）。さらに他の実施態様において、本発明の組成物は、リツキサンと同様に、関節浸食及び関節腔狭小化について受け入れられているＸ線スコアリング方法により評価される、１年の期間にわたる構造的損傷の進行を阻害する（５２週間後、平均改変Ｓｈａｒｐスコア、リツキサン＋ＭＴＸ１．０対プラセボ＋ＭＴＸ２．３１）。

【０２９７】

種々の送達系が公知であり、ＣＤ４０結合薬剤を投与するために使用することができる。導入方法は、しかし、限定しないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、及び経口経路を含む。ＣＤ４０結合薬剤は、例えば、注入、ボーラス、又は注射により投与することができ、他の生物学的に活性な薬剤（例えば化学療法薬剤など）と一緒に投与することができる。投与は全身的又は局所的でありうる。好ましい実施態様において、投与は皮下注射による。そのような注射用製剤は、例えば、隔週１回投与されうるプレフィルドシリンジ中で調製してもよい。

【０２９８】

本発明の抗体の安全特徴が決定され、好ましくは、以下のような１つ又は複数の特色を含む：関節リウマチを処置するために一般に使用される他の薬物（例、ＤＭＡＲＤ、ステロイド、ＮＳＡＩＤ）と臨床的に有意な有害な相互作用がない；エンブレルと比較した、

安全性又は耐容性の問題に起因するより大きな中止率はない；抗ＴＮＦ薬剤又は他の一般に使用される生物学的製剤より大きくない重大な感染率；エンブレルと同様の、注射部位反応及び注入反応の頻度及び／又は重症度；治療の反復サイクル時に薬物耐性の発生がない又は最小限である（５％未満）；中和抗体がない又は最小限；出血に導きうる、インビボの血栓塞栓事象又は血小板／内皮機能不全に導きうる増強された血小板凝集／活性化の証拠はない。

【０２９９】

特定の実施態様において、ＣＤ４０結合薬剤の組成物は、注射により、カテーテルを用いて、座剤を用いて、又はインプラントを用いて（インプラントは多孔性、非多孔性、又はゼラチン状材料であり、膜（例えばシラスティック膜（sialastic membrane）など）又は繊維を含む）投与する。典型的には、組成物を投与する場合、抗ＣＤ４０抗体又は薬剤が吸収しない材料を使用する。

【０３００】

他の実施態様において、抗ＣＤ４０抗体又は薬剤は制御放出システムにおいて送達される。一実施態様において、ポンプを使用してもよい（例、Langer, 1990, Science 249: 1527-1533; Sefton, 1989, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.14: 201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88: 507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574を参照のこと）。別の実施態様において、ポリマー材料を使用することができる。（例、Medical Applications of Controlled Release (Langer and Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., Wiley, New York, 1984); Ranger and Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61を参照のこと。また、Levy et al., 1985, Science 228: 190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25: 351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71: 105を参照のこと）他の制御放出システムが、例えば、Langer（上記）で考察されている。

【０３０１】

ＣＤ４０結合薬剤（例、抗ＣＤ４０抗体）を、治療的に効果的な量の結合薬剤及び１つ又は複数の医薬的に適合する成分を含む医薬的組成物として投与することができる。

【０３０２】

典型的な実施態様において、医薬的組成物は、ヒトへの静脈内又は皮下投与に適合させた医薬的組成物として、通常の手順に従って製剤化される。典型的には、注射による投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要な場合、医薬品は、また、可溶化剤及び局所麻酔薬（例えば注射部位での疼痛を和らげるためのリグノカインなど）を含むことができる。一般的に、成分は、例えば、活性薬剤の量を示す密閉容器（例えばアンプル又はサッシェなど）内の凍結乾燥粉末又は水を含まない濃縮物として、別々に供給する、又は、単位投与形態で一緒に混合する。医薬品が注入により投与される場合、それは、滅菌医薬品グレード水又は生理食塩水を含む注入ボトルを用いて調剤することができる。医薬品が注射により投与される場合、注射用滅菌水又は生理食塩水のアンプルを提供し、成分を投与前に混合することができるようにする。

【０３０３】

さらに、医薬的組成物は、（ａ）凍結乾燥形態のＣＤ４０結合薬剤（例、抗ＣＤ４０抗体）を含む容器及び（ｂ）注射用の医薬的に許容可能な希釈剤（例、滅菌水）を含む第２の容器を含む、医薬的キットとして提供することができる。医薬的に許容可能な希釈剤を、凍結乾燥した抗ＣＤ４０抗体又は薬剤の再構成又は希釈のために使用することができる。場合により、そのような容器に関連するのは、医薬品又は生物学的産物の製造、使用、又は販売を規制する政府機関により規定された形式の通知でありうるが、その通知はヒトへの投与のための製造、使用、又は販売の機関による承認を反映する。

【０３０４】

免疫学的障害又はＣＤ４０を発現する癌の処置又は防止において効果的であるＣＤ４０結合薬剤（例、抗ＣＤ４０抗体）の量は、標準的な臨床技術により決定することができる

。また、インビトロアッセイを場合により用いて、最適な投与量の範囲を特定することを助けてもよい。製剤中に用いられる正確な用量は、また、投与経路、及び免疫学的障害又はＣＤ４０を発現する癌のステージに依存し、開業医の判断及び各患者の状況に従って決定すべきである。効果的な用量は、インビトロ又は動物モデルテストシステムに由来する用量反応曲線から外挿してもよい。

【０３０５】

例えば、抗ＣＤ４０抗体又は薬剤の毒性及び治療的効力は、ＥＤ５０（集団の５０％において治療的に効果的な用量）を決定するための標準的な医薬的手順により、細胞培養又は実験動物において決定することができる。大きな治療指数を示すＣＤ４０結合薬剤（例、抗ＣＤ４０抗体）が好ましい。ＣＤ４０結合薬剤が有毒な副作用を示す場合、ＣＤ４０結合薬剤を罹患組織の部位に標的化する送達システムを使用して、非ＣＤ４０発現細胞の潜在的な損傷を最小限にし、それにより、副作用を低下することができる。

【０３０６】

細胞培養アッセイ及び動物試験から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投与量の範囲を製剤化する際に使用することができる。ＣＤ４０結合薬剤の投与量は、典型的には、ほとんど又は全く毒性を伴わないＥＤ５０を含む循環濃度の範囲内にある。投与量は、用いられる投与形態及び利用される投与経路に依存して、この範囲内で変動しうる。この方法において使用される任意のＣＤ４０結合薬剤について、治療的に効果的な用量は、細胞培養アッセイから最初に推定することができる。用量を動物モデルにおいて製剤化することができ、細胞培養において決定されたＩＣ５０（即ち、症状の最大阻害の半分を達成するテスト化合物の濃度）を含む循環血漿濃度の範囲を達成することができる。そのような情報を使用し、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィー、ＥＬＩＳＡなどにより測定することができる。

【０３０７】

一般的には、免疫学的障害又はＣＤ４０を発現する癌を伴う患者に投与される抗ＣＤ４０抗体又はＣＤ４０結合薬剤の投与量は、典型的には、被験体の体重の約０．１mg/kg～約１００mg/kgである。被験体に投与される投与量は、被験体の体重の約０．１mg/kg～約５０mg/kg、約１mg/kg～約３０mg/kg、約１mg/kg～約２０mg/kg、約１mg/kg～約１５mg/kg、又は約１mg/kg～約１０mg/kgである。

【０３０８】

例示的な用量は、しかし、限定しないが、１ng/kg～１００mg/kgを含む。一部の実施態様において、用量は、約０．５mg/kg、約１mg/kg、約２mg/kg、約３mg/kg、約４mg/kg、約５mg/kg、約６mg/kg、約７mg/kg、約８mg/kg、約９mg/kg、約１０mg/kg、約１１mg/kg、約１２mg/kg、約１３mg/kg、約１４mg/kg、約１５mg/kg、又は約１６mg/kgである。用量を、例えば、毎日、週１回（毎週）、週２回、週３回、週４回、週５回、週６回、隔週又は毎月、２ヶ月毎、又は３ヶ月毎投与することができる。特定の実施態様において、用量は、約０．５mg/kg／週、約１mg/kg／週、約２mg/kg／週、約３mg/kg／週、約４mg/kg／週、約５mg/kg／週、約６mg/kg／週、約７mg/kg／週、約８mg/kg／週、約９mg/kg／週、約１０mg/kg／週、約１１mg/kg／週、約１２mg/kg／週、約１３mg/kg／週、約１４mg/kg／週、約１５mg/kg／週、又は約１６mg/kg／週である。一部の実施態様において、用量は約１mg/kg／週～約１５mg/kg／週の範囲である。

【０３０９】

一部の実施態様において、ＣＤ４０結合薬剤を含む医薬的組成物は、さらに、結合薬剤に結合させた又は結合させていない、治療用薬剤を含むことができる。抗ＣＤ４０抗体又はＣＤ４０結合薬剤は、免疫学的障害又はＣＤ４０を発現する癌の処置又は防止のための１つ又は複数の治療用薬剤と組み合わせて同時投与することができる。例えば、組み合わせ治療は、細胞分裂停止、細胞傷害性、又は免疫抑制薬剤を含むことができる。組み合わせ治療は、また、例えば、活性化リンパ球、樹状細胞、又はＣＤ４０を発現する癌細胞の表面上の受容体又はＣＤ４０以外の受容体複合体を標的化する薬剤の投与を含むことがで

きる。そのような薬剤の例は、活性化リンパ球、樹状細胞、又はＣＤ４０を発現する癌細胞の表面で分子に結合する第２の非ＣＤ４０抗体を含む。別の例は、そのような受容体又は受容体複合体を標的化するリガンドを含む。典型的には、そのような抗体又はリガンドは、活性化リンパ球、樹状細胞、又はＣＤ４０を発現する癌細胞上の細胞表面受容体に結合し、活性化リンパ球、樹状細胞、又はＣＤ４０を発現する癌細胞に細胞分裂停止又は細胞傷害性シグナルを送達することにより、抗ＣＤ４０抗体の細胞傷害性又は細胞分裂停止効果を増強する。

【０３１０】

そのような組み合わせ治療の投与は、疾患パラメーター（例、症状の重症度、症状の数、又は再発の頻度）に相加的又は相乗的効果を有しうる。

【０３１１】

組み合わせ投与のための治療計画に関して、特定の実施態様において、抗ＣＤ４０抗体又はＣＤ４０結合薬剤は治療用薬剤と同時に投与される。別の特定の実施態様において、治療用薬剤は、抗ＣＤ４０抗体又はＣＤ４０結合薬剤の投与前又は投与に続き、少なくとも１時間及び最大数ヶ月、例えば、抗ＣＤ４０抗体又はＣＤ４０結合薬剤の投与前又は投与に続き、少なくとも１時間、５時間、１２時間、１日、１週、１ヶ月、又は３ヶ月目に投与される。

【０３１２】

細胞傷害性又は免疫抑制薬剤の有用なクラスは、例えば、抗チューブリン薬剤、アウリスタチン（例、ＭＭＡＥ、又はＭＭＡＦ）、ＤＮＡ副溝結合剤、ＤＮＡ複製阻害剤、アルキル化薬剤（例、白金錯体、例えばシスプラチン、モノ（白金）、ビス（白金）及び三核白金錯体など、ならびにカルボプラチン）、アントラサイクリン、抗生物質、抗葉酸剤、代謝拮抗剤、化学療法増感剤、デュオカルマイシン、エトポシド、フッ化ピリミジン、イオノフォア、レキシトロプシン、ニトロソウレア、プラチノール、前形成化合物、プリン代謝拮抗剤、ピューロマイシン、放射線増感剤、ステロイド、タキサン、トポイソメラーゼ阻害剤、ビンカアルカロイドなどを含む。

【０３１３】

個々の細胞傷害性及び免疫抑制薬剤は、例えば、アンドロゲン、アントラマイシン（ＡＭＣ）、アスパラギナーゼ、５－アザシチジン、アザチオプリン、ブレオマイシン、ブスルファン、ブチオニンスルホキシミン、カンプトテシン、カルボプラチン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）、ＣＣ－１０６５、クロラムブシル、シスプラチン、コルヒチン、シクロホスファミド、シタラビン、シチジンアラビノシド、サイトカラシンＢ、ダカルバジン、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、ダウノルビシン、デカルバジン、ドセタキセル、ドキソルビシン、エストロゲン、５－フルオロデオキシウリジン（5-fluordeoxyuridine）、５－フルオロウラシル、グラミシジンＤ、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、イリノテカン、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、メクロレタミン、メルファラン、６－メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトラマイシン、マイトマイシンＣ、ミトキサントロン、ニトロイミダゾール、パクリタキセル、プリカマイシン、プロカルバジン（procarbizine）、ストレプトゾトシン、テニポシド（tenoposide）、６－チオグアニン、チオテパ、トポテカン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、ＶＰ－１６、及びＶＭ－２６を含む。

【０３１４】

一部の典型的な実施態様において、治療用薬剤は細胞傷害性薬剤である。適した細胞傷害性薬剤は、例えば、ドラスタチン（例、アウリスタチンＥ、ＡＦＰ、ＭＭＡＦ、ＭＭＡＥ、ＡＥＢ、又はＡＥＶＢ）、ＤＮＡ副溝結合剤（例、エンジイン及びレキシトロプシン）、デュオカルマイシン、タキサン（例、パクリタキセル及びドセタキセル）、ピューロマイシン、ビンカアルカロイド、ＣＣ－１０６５、ＳＮ－３８、トポテカン、モルホリノ－ドキソルビシン、リゾキシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、エキノマイシン、コンブレタスタチン、ネトロプシン、エポチロンＡ及びＢ、エストラムスチン、クリプトフィシン（cryptophysin）、セマドチン、メイタンシノイド、ディスコデルモ、エリュテ

ロビン、又はミトキサントロンを含む。

【０３１５】

一部の実施態様において、細胞傷害性薬剤は、従来の化学療法剤、例えば、ドキソルビシン、パクリタキセル、メルファラン、ビンカアルカロイド、メトトレキサート、マイトマイシンＣ、又はエトポシドなどである。また、強力な薬剤（例えばＣＣ－１０６５アナログ、カリケアマイシン、メイタンシン、ドラスタチン１０のアナログ、リゾキシン、及びパリトキシンなど）は、抗ＣＤ４０抗体又はその薬剤に連結することができる。

【０３１６】

特定の実施態様において、細胞傷害性又は細胞分裂停止薬剤は、アウリスタチンＥ（また、当技術分野においてドラスタチン１０として公知である）又はその誘導体である。典型的には、アウリスタチンＥ誘導体は、例えば、アウリスタチンＥとケト酸との間に形成されるエステルである。例えば、アウリスタチンＥはパラアセチル安息香酸又はベンゾイル吉草酸と反応し、それぞれＡＥＢ及びＡＥＶＢを産生することができる。他の典型的なアウリスタチン誘導体は、ＡＦＰ、ＭＭＡＦ、及びＭＭＡＥを含む。オーリスタチンＥ及びその誘導体の合成及び構造は、例えば、以下に記載されている：米国特許出願公開第２００４－０１５７７８２　Ａ１号及び第２００５－０２３８６４９号；国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ０３／２４２０９号、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ０２／１３４３５号、及び米国特許第６，８８４，８６９号；第６，３２３，３１５号；第６，２３９，１０４号；第６，０３４，０６５号；第５，７８０，５８８号；第５，６６５，８６０号；第５，６６３，１４９号；第５，６３５，４８３号；第５，５９９，９０２号；第５，５５４，７２５号；第５，５３０，０９７号；第５，５２１，２８４号；第５，５０４，１９１号；第５，４１０，０２４号；第５，１３８，０３６号；第５，０７６，９７３号、第４，９８６，９８８号；第４，９７８，７４４号；第４，８７９，２７８号；第４，８１６，４４４号；及び第４，４８６，４１４号；それらの開示が本明細書において参照により組み入れられる。

【０３１７】

特定の実施態様において、細胞傷害性薬剤はＤＮＡ副溝結合薬剤である。（例、米国特許第６，１３０，２３７号を参照のこと）。例えば、一部の実施態様において、副溝結合薬剤はＣＢＩ化合物である。他の実施態様において、副溝結合薬剤はエンジイン（例、カリケアマイシン）である。

【０３１８】

抗チューブリン薬剤の例は、しかし、限定しないが、タキサン（例、タキソール（登録商標）（パクリタキセル）、タキソテール（登録商標）（ドセタキセル））、Ｔ６７（Tularik）、ビンカアルカロイド（vinca alkyloid）（例、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、及びビノレルビン）、及びドラスタチン（例、アウリスタチンＥ　ＡＥＶＢ　ＡＦＰ、ＭＭＡＦ、ＭＭＡＥ、ＡＥＢ）を含む。他の抗チューブリン薬剤は、例えば、バッカチン誘導体、タキサンアナログ（例、エポチロンＡ及びＢ）、ノコダゾール、コルヒチン及びコルセミド（colcimid）、エストラムスチン、クリプトフィシン（cryptophysin）、セマドチン、メイタンシノイド、コンブレタスタチン、ディスコデルモライド、ならびにエリュテロビンを含む。

【０３１９】

一部の実施態様において、細胞傷害性薬剤はメイタンシノイド、抗チューブリン薬剤の別のグループである。例えば、特定の実施態様において、メイタンシノイドはメイタンシン又はＤＭ－１である（ImmunoGen, Inc.；また、Chari et al., 1992, Cancer Res. 52: 127-131を参照のこと）。

【０３２０】

一部の実施態様において、治療用薬剤はラジオアイソトープではない。

【０３２１】

一部の実施態様において、細胞傷害性又はや免疫抑制薬剤は代謝拮抗剤である。代謝拮抗剤は、例えば、プリンアンタゴニスト（例、アザチオプリン（azothioprine）又はミコ

フェノール酸モフェチル）、ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤（例、メトトレキサート）、アシクロビル、ガンシクロビル（gangcyclovir）、ジドブジン、ビダラビン、リバビリン（ribavarin）、アジドチミジン、シチジンアラビノシド、アマンタジン、ジデオキシウリジン、イドクスウリジン、ポスカメット（poscamet）、又はトリフルリジンでありうる。

【０３２２】

他の実施態様において、細胞傷害性又は免疫抑制薬剤はタクロリムス、シクロスポリン、又はラパマイシンである。さらなる実施態様において、細胞傷害性薬剤は、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アリトレチノイン、アロプリノール、アルトレタミン、アミホスチン、アナストロゾール、三酸化ヒ素、ベキサロテン、ベキサロテン、カルステロン、カペシタビン、セレコキシブ、クラドリビン、ダルベポエチンアルファ、デニロイキンジフチトクス、デクスラゾキサン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピルビシン、エポエチンアルファ、エストラムスチン、エキセメスタン、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルダラビン、フルベストラント、ゲムシタビン、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、ゴセレリン、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロンアルファ２ａ、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、レバミゾール、メクロレタミン（mechlorethamine）又はナイトロジェンマスタード、メゲストロール、メスナ、メトトレキサート、メトキサレン、マイトマイシンＣ、ミトタン、ナンドロロンフェンプロピオネート、オプレルベキン、オキサリプラチン、パミドロネート、ペガデマーゼ、ペガスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、ペントスタチン、ピポブロマン、プリカマイシン、ポルフィマーナトリウム、プロカルバジン、キナクリン、ラスブリカーゼ、レブリミド、サルグラモスチム、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、ウラシルマスタード、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、及びゾレドロネートである。

【０３２３】

追加の実施態様において、薬物はヒト化抗ＨＥＲ２モノクローナル抗体である；リツキサン（リツキシマブ；Genentech, Inc., South San Francisco, Calif.）；キメラ抗ＣＤ２０モノクローナル抗体；OVAREX（AltaRex Corporation, MA）；PANOREX（Glaxo Wellcome, NC；マウスＩｇＧ２ａ抗体）；セツキシマブアービタックス（Imclone Systems Inc., NY；抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧキメラ抗体）；Vitaxin（MedImmune, Inc., MD）；Campath I/H（Leukosite, MA；ヒト化ＩｇＧ１抗体）；Smart MI95（Protein Design Labs, Inc., CA；ヒト化抗ＣＤ３３　ＩｇＧ抗体）；LymphoCide（Immunomedics, Inc., NJ；ヒト化抗ＣＤ２２　ＩｇＧ抗体）；Smart ID10（Protein Design Labs, Inc., CA；ヒト化抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体）；Oncolym（Techniclone, Inc., CA；放射標識マウス抗ＨＬＡ－Ｄｒ１０抗体）；Allomune（BioTransplant, CA；ヒト化抗ＣＤ２　ｍＡｂ）；アバスチン（Genentech, Inc., CA；抗ＶＥＧＦヒト化抗体）；エプラツズマブ（Ｅｐｒａｔｕｚａｍａｂ）（Immunomedics, Inc., NJ及びAmgen, CA；抗ＣＤ２２抗体）；及びCEAcide（Immunomedics, NJ；ヒト化抗ＣＥＡ抗体）。

【０３２４】

他の適した抗体は、しかし、限定しないが、以下の抗原に対する抗体を含む：ＣＡ１２５、ＣＡ１５－３、ＣＡ１９－９、Ｌ６、ルイスＹ、ルイスＸ、アルファフェトプロテイン、ＣＡ２４２、胎盤アルカリホスファターゼ、前立腺特異抗原、前立腺酸性ホスファターゼ、上皮成長因子、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－２、ＭＡＧＥ－３、ＭＡＧＥ－４、抗トランスフェリン受容体、Ｐ９７、ＭＵＣ１－ＫＬＨ、ＣＥＡ、ｇｐ１００、ＭＡＲＴ１、前立腺特異抗原、ＩＬ－２受容体、ＣＤ２０、ＣＤ５２、ＣＤ３３、ＣＤ２２、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ＣＤ３８、ムチン、Ｐ２１、ＭＰＧ、及びＮｅｕ癌遺伝子産物。

【０３２５】

一部の実施態様において、治療用薬剤は免疫抑制薬剤である。免疫抑制薬剤は、例えば、ガンシクロビル、エタネルセプト、タクロリムス、シクロスポリン、ラパマイシン、シクロホスファミド、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル、又はメトトレキサー

トでありうる。あるいは、免疫抑制薬剤は、例えば、グルココルチコイド（例、コルチゾール又はアルドステロン）又はグルココルチコイドアナログ（例、プレドニゾン又はデキサメタゾン）でありうる。

【０３２６】

適したシクロオキシゲナーゼ阻害剤は、メクロフェナム酸、メフェナム酸、カルプロフェン、ジクロフェナク、ジフルニサル、フェンブフェン、フェノプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、ナブメトン、ナプロキセン、スリンダク、テノキシカム、トルメチン、及びアセチルサリチル酸を含む。

【０３２７】

適したリポキシゲナーゼ阻害剤は、レドックス阻害剤（例、カテコールブタン誘導体、ノルジヒドログアイアレチン酸（ＮＤＧＡ）、マソプロコール、フェニドン、イアノパレン（Ianopalen）、イミダゾリノン、ナファザトロム（naphazatrom）、ベンゾフラノール、アルキルヒドロキシルアミン）、及び非レドックス阻害剤（例、ヒドロキシチアゾール、メトキシアルキルチアゾール、ベンゾピラン及びその誘導体、メトキシテトラヒドロピラン　、ボスウェリア酸及びボスウェリア酸のアセチル化誘導体、ならびにシクロアルキルラジカルを用いて置換されたキノリンメトキシフェニル酢酸）、及びレドックス阻害剤の前駆体を含む。

【０３２８】

他の適したリポキシゲナーゼ阻害剤は、酸化防止剤（例、フェノール、没食子酸プロピル、フラボノイド及び／又はフラボノイドを含む自然発生する基質、フラボンのヒドロキシル化誘導体、フラボノール、ジヒドロケルセチン、ルテオリン、ガランギン、オロボール、カルコンの誘導体、４，２’，４’トリヒドロキシカルコン、オルト－アミノフェノール、Ｎヒドロキシウレア、ベンゾフラノール、エブセレン及び還元セレン酵素の活性を増加させる種）、鉄キレート剤（例、ヒドロキサム酸及びその誘導体、Ｎヒドロキシウレア、２－ベンジル－１－ナフトール、カテコール、ヒドロキシルアミン、カルノソールトロロックスＣ、カテコール、ナフトール、スルファサラジン、チロイトン（zyleuton）、５ヒドロキシアントラニル酸及び４－（オメガ－アリールアルキル）フェニルアルカン酸）、イミダゾール含有化合物（例、ケトコナゾール及びイトラコナゾール）、フェノチアジン、及びベンゾピラン誘導体を含む。

【０３２９】

さらに他の適したリポキシゲナーゼ阻害剤は、エイコサノイド（例、オクタデカテトラエン酸、エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサヘキサエン酸、及びドコサヘキサエン酸ならびにそのエステル、ＰＧＥ１（プロスタグランジンＥ１）、ＰＧＡ２（プロスタグランジンＡ２）ビプロストール、１５モノヒドロキシエイコサテトラエン酸、１５モノヒドロキシ－エイコサトリエン酸及び１５モノヒドロキシエイコサペンタエン酸、ならびにロイコトリエンＢ５、Ｃ５、及びＤ５）の阻害剤、カルシウム流に干渉する化合物、フェノチアジン、ジフェニルブチルアミン、ベラパミル、フスコシド、クルクミン、クロロゲン酸、カフェイン酸、５，８，１１，１４エイコサテトラエン酸（eicosatetrayenoic acid）（ＥＴＹＡ）、ヒドロキシフェニルレチナミド、ロナパレン（lonapalen）、エスクリン、ジエチルカルバマジン、フェナントロリン、バイカレイン、プロキシクロミル、チオエーテル、硫化ジアリル、及びジ－（１プロペニル）スルフィドを含む。

【０３３０】

ロイコトリエン受容体アンタゴニストは、カルシトリオール、オンタゾラスト、Bayer Bay-x-1005、Ciba-Geigy CGS-25019C、エブセレン、Leo Denmark ETH-615、Lilly LY-293111、Ono ONO-4057、Terumo TMK-688、Boehringer Ingleheim BI-RM-270、Lilly LY 213024、Lilly LY 264086、Lilly LY 292728、Ono ONO LB457、Pfizer 105696、Perdue Frederick PF 10042、Rhone-Poulenc Rorer RP 66153、SmithKline Beecham SB-201146、SmithKline Beecham SB-201993、SmithKline Beecham SB-209247、Searle SC-53228、Sumitamo SM 15178、American Home Products WAY 121006、Bayer Bay-o-8276、Warner-Lambert CI-987、Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982、Lilly LY 233569、Lilly LY-255283、M

acroNex MNX-160、Merck and Co. MK-591、Merck and Co. MK-886、Ono ONO-LB-448、Purdue Frederick PF-5901、Rhone-Poulenc Rorer RG 14893、Rhone-Poulenc Rorer RP 66364、Rhone-Poulenc Rorer RP 69698、Shionoogi S-2474、Searle SC-41930、Searle SC-50505、Searle SC-51146、Searle SC-52798、SmithKline Beecham SK及びF-104493、Leo Denmark SR-2566、Tanabe T-757及びTeijin TEI-1338を含む。

【０３３１】

製造品

【０３３２】

別の局面において、上に記載する障害の処置のために有用な材料を含む製造品が含まれる。製造品は容器及びラベルを含む。適した容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、及び試験管を含む。容器は、種々の材料（例えばガラス又はプラスチックなど）から形成されうる。容器は、状態を処置するために効果的である組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有しうる。例えば、容器は、皮下注射針により貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルでありうる。組成物中の活性薬剤はヒト化抗ＣＤ４０抗体である。容器上の又は容器に関連するラベルは、組成物が、選んだ状態を処置するために使用されることを示す。製造品は、さらに、医薬的に許容可能な緩衝液（例えばリン酸緩衝生理食塩水、リンゲル溶液、及びデキストロース溶液など）を含む第２の容器を含みうる。それは、さらに、商業的及び使用者の見地から望ましい他の材料（他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用のための指示を伴う添付文書を含む）を含んでもよい。

【０３３３】

本発明は、さらに、以下の実施例に記載しており、それらは本発明の範囲を限定することを意図しない。

【０３３４】

実施例

【０３３５】

実施例１：ヒト化抗ＣＤ４０抗体の産生

【０３３６】

マウス抗体２０Ｅ２及び２Ｈ１１を、本明細書において上の表１及び２に示している。２０Ｅ２及び２Ｈ１１クローンのヒト化が完了している。ライブラリーを作り、そこではヒト及びマウス残基を変動させ、任意の所与の位置にヒト又はマウスのいずれかの残基がありうるようにした。そのようなライブラリーを、ヒト生殖系列とマウス抗体の間で異なっていたそれらのアミノ酸について作った。親マウス抗体の機能を保持するクローンだけを選択した。

【０３３７】

この様式において、抗体Ａ、抗体Ｂ、及び抗体Ｃは、マウス抗体２０Ｅ２（抗体Ａ及び抗体Ｂ）又はヒトＩｇＧ１ＫＯ（ＫＯ＝ノックアウト）／カッパ骨格中にクローン化した２Ｈ１１（抗体Ｃ）に由来するヒト化抗体であった。ＩｇＧ１ＫＯはＦｃ領域中に２つの変異（Ｌｅｕ２３４Ａｌａ及びＬｅｕ２３５Ａｌａ）を有し、ＦｃγＲを低下させ、結合を補完する。

【０３３８】

そのようなヒト化の結果は、以下に示す種々のヒト化重鎖及び軽鎖可変配列をもたらした：

【０３３９】

【表７】

配列番号41（可変軽鎖配列）:

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIK

配列番号42（可変重鎖配列）:

EVQLVKSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS

配列番号43（可変軽鎖配列）

DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIK

配列番号44（可変重鎖配列）

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS

配列番号45（可変軽鎖配列）

DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTMNCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK

配列番号46（可変重鎖配列）

EVQLVESGGGLVKPGGSRRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS.

配列番号47（可変軽鎖配列）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIK

配列番号48（可変重鎖配列）

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS

配列番号49（可変軽鎖配列）

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK

配列番号50（可変軽鎖配列）

EVQLVESGGGLVKPGGSRRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS

配列番号51（可変軽鎖配列）

DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTMNCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDLAVYYCQNDYTYPLTFGAGTKVEIK.

配列番号52（可変軽鎖配列）

DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDF
TLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIK

配列番号53（可変重鎖配列）

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKN
SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS

配列番号54（可変軽鎖配列）

QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIK

配列番号55（可変軽鎖配列）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIK

配列番号56（可変軽鎖配列）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIK

配列番号57（可変重鎖配列）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS.

配列番号58（可変重鎖配列）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS

配列番号59（可変重鎖配列）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKVTMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS.

配列番号60（可変重鎖配列）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYYVHWVKQAPGQGLEWIGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS

配列番号61（可変重配列）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS

配列番号62（可変重配列）:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS

配列番号63（可変重配列）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQRPGQGLEWMGRIDPEDGDTKFAPKFQGKVTMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS

配列番号64（可変重配列）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYYVHWVKQAPGQGLEWIGRIDPEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS

配列番号65（可変重配列）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS

配列番号66（可変重配列）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNITDYYVHWVKQAPGQGLEWMGRIDPEDGDTKFAPKFQGKATMTADTSTS
TVYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS

配列番号67（可変重配列）

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYIHWVKQRPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTD
TAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVTVSS

配列番号68（可変重配列）

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYYIHWVKQRPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTD
TAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVTVSS

配列番号69（可変重配列）

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYYIHWVKQRPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGKVTMTADTSTD
TAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVTVSS

配列番号70（可変重配列）

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYYIHWVKQAPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGKATMTADTSTD
TAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVTVSS

配列番号71（可変重配列）

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYYIHWVKQRPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGKATMTADTSTD
TAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVTVSS

配列番号72（可変重配列）

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCTVSGFNIKDYYIHWVKQAPGKGLEWIGRIDPEDGDTKYDPKFQGKATMTADTSTD
TAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVTVSS

配列番号73（可変重配列）

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYIHWVQQAPGKGLEWMGRIDPEDGDTKYDPKFQGRVTMTADTSTD
TAYMELSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTTVTVSS

抗体10F2Humからの配列番号74（可変軽配列）1：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYILWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIK

抗体10F2Humからの配列番号75（可変軽配列）2：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYILWFQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIK

配列番号76（可変軽配列）

QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYILWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIK

【０３４０】

本発明の例示的なヒト化抗体は、以下の表中に示す重鎖及び軽鎖配列を有するものである。以下の表中の太字の下線付き配列が可変ドメインであるのに対し、通常の下線のない配列は定常ドメインである：

【０３４１】

【表８】

識別	配列	配列番号
抗体Ａ（軽鎖）	**DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTW** **HQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS** **SLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIKR**TVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	26
抗体Ａ（重鎖，IgG1KO）	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP** **GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ** **MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
抗体Ａ（重鎖，IgG1）	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP** **GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ** **MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	28
抗体Ａ（重鎖，IgG4DM）	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP** **GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ** **MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP	29

	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
抗体A (Heavy, IgG1KOb)	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTALYYCARQDGYRYAMDYWAQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
抗体B (軽鎖)	**DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTINCKSSQSLLNSGNQKNYL TWHQQKPGQPPKLLIYWTSTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGGGTKVEIKR**TVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	31
抗体B (重鎖, IgG1KO)	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
抗体B (重鎖, IgG1)	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	33
抗体B (重鎖,IgG4 DM)	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK	34

	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
抗体Ｂ (重鎖, IgG1KOb)	**EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSGNRIIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARQDGYRYAMDYWGQGTLVTVSS**ASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	35
抗体Ｃ (軽鎖)	**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMLWFQ QKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQRTFYPYTFGGGTKVEIKR**T VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36
抗体Ｃ (重鎖, IgG1KO)	**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYYVHWVKQAP GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS**ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	37
抗体Ｃ (重鎖, IgG1)	**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYYVHWVKQAP GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS**ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	38
抗体Ｃ (重鎖,IgG4 DM)	**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYYVHWVKQAP GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS**ASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV	39

	DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
抗体Ｃ（重鎖，IgG1KOb)	**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCTASGFNIKDYYVHWVKQAP GQGLEWMGRIDPEDGDSKYAPKFQGKATMTADTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTTSYYVGTYGYWGQGTLVTVSS**ASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	40

【０３４２】

可変領域を、１つ又は２つの異なる適したＩｇＧ発現ベクター中にサブクローニングした：

【０３４３】

Ａ）エフェクター機能（例えばＦｃγＲなど）を低下させ、結合を補完する、Ｆｃ領域におけるＬｅｕ２３４Ａｌａ、Ｌｅｕ２３５Ａｌａ二重変異を伴うヒトＩｇＧ１ＫＯ（ノックアウト）／カッパフォーマット。

【０３４４】

Ｂ）ＩｇＧ４半分子の発生を低下させるヒンジ領域におけるＳｅｒ２２８Ｐｒｏ変異及びＦｃγＲ結合をさらに低下させるＬｅｕ２３５Ｇｌｕ変異を伴うヒトＩｇＧ４ＤＭ（二重変異体）／カッパフォーマット。

【０３４５】

２つの候補である抗体Ａ及び抗体Ｂを精製し、以下の基準により評価した：

－　ＣＣＦの外観（濁度）
－　ＣＣＦの濾過特性
－　ｒＰｒｏｔｅｉｎＡの収率
－　溶出及び中和時の濁度
－　可溶性凝集物（ＳＥＣ）
－　純度／汚染パターン（ＳＤＳ）
－　電荷パターン（ＩＥＦ）

【０３４６】

実施例２：インビトロデータ

【０３４７】

抗体Ａ、抗体Ｂ、及び抗体Ｃを、公表された配列に基づいて産生された抗体４Ｄ１１（Kirin／Astellas）及びＰＧ－１０２（PanGenetics）と共に特徴付けた。抗体Ａ、抗体Ｂ、抗体Ｃ、及び４Ｄ１１についてのデータを下に示す。ＰＧ－１０２はアゴニスト活性及びＢ細胞増殖の不完全な阻害だけを示した（表示せず）。

表２．２に得られたデータを要約する。データのより詳細な説明は、表２．２に従う。

【０３４８】

【表９】

表 2.2. 抗体 A、抗体 B、及び抗体 C ならびに Kirin の 4D11 抗 CD40 抗体のインビトロデータの要約

パラメーター／アッセイ	抗体 A	抗体 B	抗体 C	4D11
Kd +/- ヒト血清	<100 pM	<100pM	<100pM	<100pM
細胞結合 (EC50/nM ± SD	1.2 (±0.28)	1.5 (±0.68)	1.7 (±0.28)	0.9 (±0.3)
B 細胞増殖:アンタゴニズム (IC50/nM±SD)	0.3 (±0.13)	0.2 (±0.10)	0.1 (±0.004)	0.03 (±0.02)
B 細胞増殖:アゴニズム (SI*) (IC50/nM±SD)	アゴニズムなし (SI <2)	アゴニズムなし (SI <2)	アゴニズムなし (SI <2)	アゴニズムなし (SI <2)
樹状細胞/IL-12/23p40 アンタゴニズム (IC50/nM ± SD)	< 1nM	< 1nM	< 1nM	< 1nM
樹状細胞/IL-12/23p40 アゴニズム	アゴニズムなし	アゴニズムなし	アゴニズムなし	アゴニズムなし
種 交差反応.: Hu/Cyno 結合 (EC50 比率**)	3	2	1	テストしていない

* SI, 刺激指数; ** 比率 > 1 は、ヒトと比較した、カニクイザルへの増加した結合を意味する

【０３４９】

Ａ．細胞ＣＤ４０及び組換えＣＤ４０タンパク質へのヒト化抗体の結合

【０３５０】

細胞ＣＤ４０へのヒト化抗体の特異的結合を、ヒトＣＤ４０トランスフェクトＨＥＫ２９３細胞を使用したフローサイトメトリーにより分析した。抗体Ａ、抗体Ｂ、及び抗体Ｃの濃度依存的な結合が観察された。抗体は、図１Ｂに示す同様の結合プロファイルを表示した。本発明の抗体及びKirinの抗体４Ｄ１１のＥＣ５０値は全て～１nMの同じ範囲にあり、これは、トランスフェクト細胞における高レベルのＣＤ４０に起因する、アッセイの感度の限界である可能性が最も高い。ヒトＲａｍｏｓ細胞上の細胞ＣＤ４０へのヒト化抗体の特異的結合は、また、濃度依存的な結合を実証した。抗体は、わずかに異なる結合プロファイル（図２に示す）及びＥＣ５０値０．２１～１．２２nMを表示した。結合は、ＣＤ４０陰性細胞（例えば非トランスフェクトＨＥＫ２９３細胞又はＴ細胞株ＨＳＢ－２など）では検出されず、このように、ＣＤ４０への選択的結合が確認された（データ示さず）。

【０３５１】

ヒトＣＤ４０－Ｆｃタンパク質に結合する抗体Ａ、抗体Ｂ、及び抗体Ｃの親和性を、ForteBio Octetを介して測定し、解離定数（ＫＤ）＜１００pMが明らかになった。抗体及びＣＤ４０－Ｆｃの二価性の結合力（アビディティー）効果のため、Ｋｄを１００ｐＭ未満に正確に決定することができない。また、ＣＤ４０－Ｆｃへの結合を、５０％ヒト血清の非存在及び存在において分析し、結合に対する血清の有意な効果は観察されなかった（データ示さず）。

【０３５２】

Ｂ．Ｂ細胞の活性化／増殖アッセイにおけるヒト化抗体の活性

【０３５３】
ヒト化抗体の活性を、末梢血に由来するヒトＢ細胞を、ＩＬ－２及びＩＬ－４の存在において組換えＣＤ４０Ｌを用いて刺激されたＢ細胞増殖アッセイにおいてテストした。抗体Ａ、抗体Ｂ、及び抗体Ｃは、Ｂ細胞の増殖の強力な阻害を示した（図３Ａ及び図３Ｂに示す）。ＢＩ（本願出願人）の抗体及びKirinの抗体４Ｄ１１の阻害曲線とＩＣ５０値との比較では、複数のドナーにわたりテストした場合、４Ｄ１１抗体がより高い効力を有することを示す（図３Ｂ及び４）。ＣＤ４０Ｌの非存在におけるアゴニスト活性についてテストした場合、抗体Ｂ、抗体Ａ、及び抗体Ｃの抗体は、最高１０μg/mL（６７nM）の濃度でバックグラウンドレベルを上回る任意のＢ細胞増殖を誘導しなかった（図４に示す）（４Ｄ１１抗体と同様である）。

【０３５４】
競合抗体４Ｄ１１はわずかにより強力であるように見え、平均ＩＣ５０が約０．０２nM及びアゴニスト効果の非存在を伴った。３つのＢＩ抗体及び４Ｄ１１についてのデータを、上の図４及び表２．２に要約する。別の競合抗体ＰＧ－１０２（クローン５Ｄ１２に由来する）を、また、このアッセイにおいてテストし、ＣＤ４０Ｌの非存在においてＢ細胞増殖を刺激する有意なアゴニスト効果が表示された（図４）。従って、本発明者らのリード候補のアゴニスト活性の欠如は、明らかにＰＧ－１０２からそれらを区別する。

【０３５５】
第２のアッセイにおいて、抗体を、ヒトＢ細胞におけるＣＤ８６発現上昇の阻害について評価した。この例において、アッセイは、ヒト全血を用いて又は精製Ｂ細胞中で実施することができる（両方が外因性ＣＤ４０Ｌの存在において）。Ｂ細胞増殖のデータに一致して、抗体Ｂ、抗体Ａ、及び抗体Ｃをヒト全血においてテストし、フローサイトメトリーにより測定された通り、ＣＤ４０媒介性のＣＤ８６発現上昇の強力な阻害が示された（図５に示す）。抗体Ｃは、このアッセイにおいて４Ｄ１１と同様の効力を表示し、抗体Ｂ及び抗体Ａの効力がいくらか弱かった。精製Ｂ細胞上又は全血中の抗体Ｂと４Ｄ１１との比較では、抗体Ｂの効力（ＩＣ５０及びＩＣ９０値）は、細胞又は血清を持つ他のＣＤ４０の存在において、Ｂ細胞と比較して、精製Ｂ細胞について比較的不変であることが示され、４Ｄ１１は、全血状態における効力において劇的なシフトを受ける（図６に示す）。

【０３５６】
同様のデータが、全血サンプルを用いて抗体Ｂ、抗体Ａ、及び抗体Ｃをカニクイザル細胞上のＣＤ８６発現上昇の阻害について評価した場合、得られた（図７に示す）。カニクイザル全血中でテストした抗体Ｂ、抗体Ａ、及び抗体Ｃは、フローサイトメトリーにより測定した通り、ＣＤ４０媒介性のＣＤ８６発現上昇の強力な阻害を示した。従って、これらの抗体全てが、ヒトＣＤ４０と同様の効力でカニクイザルＣＤ４０と機能的な交差反応性を示した。

【０３５７】
抗体Ｂ　ＩｇＧ１ＫＯｂ及び抗体Ｂ　ＩｇＧ１ＷＴの活性を、抗体依存性細胞傷害を媒介する能力について評価した（図１３）。このアッセイにおいて、ＲＡＭＯＳ細胞をヒトＰＢＭＣと、エフェクター対標的細胞比率５０：１でインキュベートした。抗体Ｂ　ＩｇＧ１ＫＯｂ及び抗体Ｂ　ＩｇＧ１ＷＴを２０μg/mLから滴定し、細胞死の範囲をＬＤＨの放出によりモニターする。示したデータは１つの代表的な実験からである。データは、抗体Ａ　ＩｇＧ１Ｗｔ２０Ｅ２－１２－ＲＩｇＧ１ＷＴがＡＤＣＣの効果的なメディエーターであること、及び、エフェクター機能を除外する変異を含む抗体Ｂ　ＩｇＧ１ＫＯｂがＡＤＣＣ活性を有さないことを示す。

【０３５８】
実施例３：薬物動態／薬力学試験

【０３５９】
Ａ．カニクイザルにおける１又は１０mg/kgでの抗体Ａ及び抗体Ｂの単回静脈内投与。

【０３６０】
抗体Ａ及び抗体Ｂを、各々、雄のカニクイザル（Ｎ＝３）／用量に１及び１０mg/kgで

静脈内投与した。血液サンプルを０～５０４時間（３週間）から収集し、血清を回収し、サンプルを分析まで－２０℃で保存した。サンプルを、上に記載する通り、サンドイッチＥＬＩＳＡにより分析した。両方の抗体の両方の静脈内用量投与後のサルにおける血清中濃度－時間プロファイル及び薬物動態パラメーターを、図８ならびに表２．７．１（抗体Ａ）及び２．７．２（抗体Ｂ）に要約する（下に示す）。両方の抗体が用量依存的な薬物動態を示したが、低用量では、クリアランスが主に標的媒介動態に起因し、それと一致しているのに対し、より高い用量では、抗体は主に異化により排除されることを示唆する。同様の用量依存的な薬物動態プロファイルが、膜関連標的（例、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＥＧＦＲ、及びＨＥＲ２　ＣＤ１４６）を標的化する他のｍＡｂについて観察されている。抗体Ａについてのクリアランスは、１及び１０mg/kg用量についてそれぞれ０．８及び０．１mL/h/kgであった。抗体Ｂについてのクリアランスは、１及び１０mg/kg用量についてそれぞれ０．７及び０．１mL/h/kgであった。同様に、抗体Ａの半減期は１及び１０mg/kg用量についてそれぞれ１及び１３日であり、抗体Ｂの半減期は同じそれぞれの用量についてそれぞれ２及び１３日であった。抗体Ｂは、抗体Ａについての同じ用量と比べて、より低い用量でわずかに長い半減期を有したが、この差は、慢性投与時でのより持続的な暴露につながることは期待されないであろう。両方の化合物についてのＡＵＣは超比例的であり、両方の化合物についての分布容積（Ｖｓｓ）は、血漿容積（～４０mL/kg）のそれに近似したが、大きな極性タンパク質治療薬について典型的に見られる限られた組織分布を示す。全体的に、２つの抗体間の薬物動態パラメーターにおいて認識できる差はなかった。

【０３６１】

【表１０】

表 2.7.1: 単回 1 及び 10 mg/kg 静脈内用量後の雄のカニクイザル(N=3)／用量における抗体 A の薬物動態パラメーター

用量 (mg/kg)	CLp (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC (μM.hr)	T1/2 (日)	MRT (日)
1	0.8 ± 0.03	41 ± 6	8.0 ± 0.3	0.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2
10	0.10 ± 0.02	42 ± 6	660 ± 92	12.6 ± 0.5	17.5 ± 0.3

【０３６２】

【表１１】

表 2.7.2: 単回 1 及び 10 mg/kg 静脈内用量後の雄のカニクイザル(N=3)／用量における抗体 B の薬物動態パラメーター

用量 (mg/kg)	CLp (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC (μM.hr)	T1/2 (日)	MRT (日)
1	0.7 ± 0.16	40 ± 2	10.1 ± 2.7	1.5± 0.2	2.6 ± 0.8
10	0.09 ± 0.01	41 ± 6	744 ± 55	13.3 ± 3.0	19.3 ± 4.2

【０３６３】

Ｂ．エクスビボの薬力学的試験

【０３６４】

上に記載するＰＫ試験の一部として、本発明者らは、抗ＣＤ４０抗体の薬力学的効果を分析した。この目的のために、全血サンプルを組換えＣＤ４０Ｌと一晩インキュベートし、Ｂ細胞上のＣＤ８６発現の増加をフローサイトメトリーにより決定した。サンプルを、服用後０日（処置前）、２、７、及び１４日目に分析した。ＣＤ８６発現における増加は比較的小さいが（～５－２０％）、用量依存的効果が観察された（図９に示す）。１０mg/kgの抗体Ａ及び抗体Ｂを用いて投与した動物の群において、ＣＤ８６誘導は２、７、及び１４日目に完全に阻害され、この用量での持続的な暴露と一致した。１mg/kgを用いて投

与した動物は、２日目に完全阻害を、７日目に部分阻害を、及び１４日目に無阻害を示した。経時的な薬力学的効果の喪失は、低用量群における抗体のより速いクリアランスと相関する。

【０３６５】

実施例４：試験に関連する毒性学：血小板上のＣＤ４０

【０３６６】

ＣＤ４０はヒト血小板上で構成的に発現されており（Henn, et al., 2001）及び（Inwald, et al., 2003）、ＣＤ４０Ｌは活性化血小板の細胞表面上で迅速かつ一過性に発現される（Henn, et al., 2001）。ＦｃγＲ結合を伴わない抗ＣＤ４０抗体は、血小板に対する効果を有することが期待されないであろうが、これがそうであることを直接的に実証することが重要である。フローサイトメトリー試験を実施し、ヒト及びカニクイザル血小板への抗ＣＤ４０リード候補の結合を実証した。

【０３６７】

以前に、Ｇ２８．５及びｍＡｂ　８９抗ＣＤ４０　ｍＡｂが休止ヒト血小板に結合することがフローサイトメトリーにより実証されている（Henn, et al., 2001）。これは、ＦＩＴＣ標識Ｇ２８．５抗体を使用して確認された。Ｇ２８．５の５倍希釈物を調製し、０．３２ng/ml～０．５μg/mLの範囲を、ヒト（２ドナー）及びカニクイザル（３ドナー）から得られた血小板１００μl中で３０分間にわたり室温でインキュベートした。また、ＡＰＣ標識抗ＣＤ４５　ｍＡｂを使用し、他のＣＤ４０＋細胞型に結合した血小板を同定し、分析からこれらの細胞を除外するようにした。抗体染色後、血小板を洗浄し、Optilyse Cを用いて固定し、フローサイトメトリーを実施した。平均蛍光強度（ＭＦＩ）を、ＣＤ４５－血小板への抗体結合の測定値として決定した。

【０３６８】

商業的に利用可能な５ｃ３及び本発明の選択された抗体（抗ＣＤ４０マウスｍＡｂ）をＦＩＴＣ標識した。Ｒａｍｏｓ細胞への結合を確認した。抗体１分子当たりのＦＩＴＣ分子の数は、抗体１分子当たり２～４ＦＩＴＣの範囲であった。商業的及び候補抗ＣＤ４０ｍＡｂの５倍連続希釈物を０．５μg/mL～０．３２ng/mlの範囲で調製し、ヒト（３ドナー）及びカニクイザル（２ドナー）血小板を用いて３０分間にわたり室温でインキュベートした。

【０３６９】

ヒト血小板へのマウス候補抗ＣＤ４０　ｍＡｂの結合を実証する代表的なグラフを図１１に示す。４つの候補モノクローナル抗体は、ＦＩＴＣ標識アイソタイプコントロール抗体と比較して、ヒト血小板への特異的結合を表示した。１０Ｆ２、２Ｈ１１、１９Ｂ１０、及び２０Ｅ２は血小板への同程度の結合を実証した。同様の傾向がカニクイザル血小板について観察された（データ示さず）。

【０３７０】

これらの試験に加えて、直接標識抗体Ｂ及び４Ｄ１１を、ヒト及びカニクイザルの全血サンプル中で血小板及びＢ細胞に結合する能力について比較した（図１２に示す）。４Ｄ１１は、ヒト及びカニクイザル血液サンプル中のＢ細胞及び血小板の両方に同様の結合を表示した（ＥＣ５０により例示する通り）。抗体Ｂは同様のパターンを示したが、しかし、ずっと弱い結合能を伴った。

【０３７１】

実施例５：ＮＳＧマウスモデルにおけるインビボ薬理学試験

【０３７２】

ヒト化抗体（抗体Ａ）の効力を抗体産生モデルにおいて評価したが、そこでは、ヒトＰＢＭＣを、移植片対宿主応答を生成するために、免疫不全ＮＳＧマウス中に注射した。ヒトＩｇＭ（ｈＩｇＭ）及びＩｇＧ（ｈＩｇＧ）の有意な産生が、移植後２週目から開始し、検出することができる。用量５及び１mg/kgでの抗体Ａを用いた処置は、移植後２及び３週目にｈＩｇＧ及びｈＩｇＭ応答を有意に阻害した。比較抗体（４Ｄ１１）を単回５mg/kg用量で評価し、また、応答の抑止を実証した。第２の試験において、全ての抗体（抗

体Ａ、抗体Ｂ、及び抗体Ｃ）を１mg/kgの単回用量でテストし、２週目でのＩｇＭ及びＩｇＧ応答の完全な阻害を示した（図１０）。

【０３７３】

実施例６：バイオマーカー分析

【０３７４】

受容体の発現増加：受容体のＣＤ４０Ｌ誘導性発現増加をフローサイトメトリーにより測定することができる。ヒト全血を、可溶性ＣＤ４０Ｌの最適化濃度を用いて刺激することができ、ＣＤ２０＋受容体＋細胞の完全なパーセンテージをフローサイトメトリーにより測定することができる。ＣＤ２０陽性細胞上でのＣＤ８６発現のパーセンテージにおける変化を、抗体Ａ及びＢを評価するカニクイザルｐｋ試験と並行して測定した（図９）。データは、抗体の曝露と一致した時間点でのＣＤ８６発現増加の阻害を示す。

【０３７５】

標的化プロテオミクス：全血中のＣＤ４０刺激時での増加したタンパク質分泌を潜在的なバイオマーカーとして使用することができる。可溶性ＣＤ４０Ｌの最適化濃度及び刺激時間を、ＭＤＣ／ＣＣＬ２２及びいくつかの他の分泌タンパク質を検出するＬｕｍｉｎｅｘマルチプレックスビーズプラットフォームを使用して確立した。臨床サンプルを、ヒト全血から、抗ＣＤ４０　ｍＡｂの完全な用量範囲において評価する。

【０３７６】

受容体占有：ＣＤ４０受容体占有は、ヒト全血中のＢ細胞のフローサイトメトリー分析に基づき、インビトロ又はエクスビボアッセイにおいて測定することができる。本発明における例の現在の候補抗体及び非競合抗ＣＤ４０抗体５Ｃ３を使用して、受容体占有アッセイを定量化する。

【０３７７】

実施例７：ヒト化抗ＣＤ４０抗体の抗腫瘍活性

【０３７８】

一部の例において、本発明の抗体の抗腫瘍特性を決定することが望ましいであろう。そのような決定は、ＳＣＩＤマウスのリンパ腫異種移植モデルにおけるヒト化抗ＣＤ４０抗体の抗腫瘍活性をアッセイすることにより作られうる。そのようなＳＣＩＤモデルに癌細胞を用いて注入し、腫瘍を提示することができる。例えば、５×１０^{6}百万個の腫瘍細胞を、薬物処置を開始する１３日前に、ＳＣＩＤマウス（１０匹／群）中に皮下注射することができる。本発明のマウス抗ＣＤ４０抗体又は比較物（例、コントロール又は他のヒト化抗体）を週３回（４mg/kg／用量）腹腔内に与え、８又は５用量を投与する。腫瘍の発生及び成長をマウスにおいてモニターし、腫瘍容積を、選択した試験期間（例、１４日間の試験期間）の間に毎週測定しうる。好ましくは、結果は、本発明の抗体を用いて処置されたマウスと比較して、コントロールマウスにおける腫瘍の成長における２、３、４、５、６、７、８、９、１０倍又はそれ以上の増加を示す。好ましくは、処置期間にわたり、本発明の抗体を用いて処置されたマウスにおける腫瘍成長は無視できる。そのようなデータは、テストされているヒト化抗体が、このＢリンパ腫異種移植モデルにおいて腫瘍成長を抑制する際に効果的であることを確証することができる。

【０３７９】

実施例８：ヒト化ＣＤ４０抗体による長期生存

【０３８０】

腫瘍を持つマウスの生存に対するヒト化抗ＣＤ４０抗体の効力（例えば上に記載するものなど）を、ＳＣＩＤマウスのリンパ腫異種移植モデルにおいてアッセイすることができる。ＳＣＩＤマウス（１０匹／群）に、抗体処置の３日前に１×１０^{6}百万個の腫瘍細胞を静脈内に接種する。マウスを、次に、本発明のマウスもしくはヒト化抗ＣＤ４０抗体又はＩｇコントロールを用いて処置し、腹腔内に週２回（４mg/kg投与／用量）合計５用量について投与した。マウスケージを次に死亡数について毎日検証し、癌を有する被験体の生存を延長する際の抗体の効力のレベルを決定することができる。

【０３８１】

種々の参考文献（特許出願、特許、及び科学的な刊行物を含む）が、本明細書において引用され、その開示はその全体において参照により本明細書に組み入れられる。本明細書における任意の参考文献の引用又は特定は、そのような参考文献が本発明に対する先行技術として利用可能であるという承認として解釈してはならない。

【０３８２】

本発明の好ましい局面が、以下のパラグラフにおける実施態様に従って記載されうる：

【０３８３】

パラグラフ１．ヒト化モノクローナル抗体であって、それにおいて、前記抗体は、１ｎＭ未満のＩＣ５０アンタゴニスト活性を有して、ヒトＣＤ４０に特異的に結合し、Ｂ細胞増殖において１００μg/mLまでアゴニズムを有さず、及び、それにおいて、前記抗体は、さらに、抗体が、少なくとも１０日である、非ヒト霊長類におけるインビボでの半減期を有することを特徴とする。

【０３８４】

パラグラフ２．パラグラフ１のヒト化モノクローナル抗体であって、それにおいて、前記抗体がカニクイザルにおいて３０mg/kg未満の用量で８日より長い半減期を有する。

【０３８５】

パラグラフ３．パラグラフ１の抗体であって、それにおいて、抗体は、配列番号１～配列番号４のいずれかからなる群より選択される重鎖配列及び配列番号５～配列番号８のいずれかからなる群より選択される軽鎖配列を含む。

【０３８６】

パラグラフ４．パラグラフ１の抗体であって、それにおいて、前記抗体は、配列番号１～４、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４２、配列番号４４、配列番号４６、配列番号４８、配列番号５０、配列番号５３、配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、又は配列番号７３のいずれかの重鎖可変領域のアミノ酸配列を有するヒト化抗体又は抗体の抗原結合フラグメントである。

【０３８７】

パラグラフ５．パラグラフ１の抗体であって、それにおいて、前記抗体は、配列番号５～配列番号８、配列番号２６、配列番号３１、配列番号３６、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４５、配列番号４７、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号７４、配列番号７５、又は配列番号７６の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を含むヒト化抗体又は抗体の抗原結合フラグメントである。

【０３８８】

パラグラフ６．パラグラフ１のモノクローナル抗体であって、それにおいて、前記抗体は重鎖及び軽鎖を含み、それにおいて、重鎖ＣＤＲ１配列は配列番号９～配列番号１１からなる群より選択され、重鎖ＣＤＲ２配列は配列番号１２～配列番号１５からなる群より選択され、及び、重鎖ＣＤＲ３配列は配列番号１６～配列番号１７からなる群より選択される；ならびに、それにおいて、軽鎖ＣＤＲ１配列が配列番号１８～配列番号２１からなる群より選択される配列を有し、配列番号２２～配列番号２３の軽鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号２４～配列番号２５からなる群より選択される軽鎖ＣＤＲ３配列。

【０３８９】

パラグラフ７．パラグラフ１のモノクローナル抗体であって、それにおいて、前記抗体は、配列番号１０の重鎖ＣＤＲ１配列、配列番号１３の重鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号１６の重鎖ＣＤＲ３配列を含み、ならびに、それにおいて、前記抗体は、配列番号１９の軽鎖ＣＤＲ１配列、配列番号２２の軽鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号２４の軽鎖ＣＤＲ３配列を含む。

【０３９０】
パラグラフ８．パラグラフ１のモノクローナル抗体であって、それにおいて、前記抗体は、配列番号９の重鎖ＣＤＲ１配列、配列番号１４の重鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号１６の重鎖ＣＤＲ３配列を含み、ならびに、それにおいて、前記抗体は、配列番号２０の軽鎖ＣＤＲ１配列、配列番号２２の軽鎖ＣＤＲ２配列、及び配列番号２４の軽鎖ＣＤＲ３配列を含む。
【０３９１】
パラグラフ９．配列番号１～４のいずれか１つの重鎖可変ドメイン配列を含む抗ＣＤ４０抗体。
【０３９２】
パラグラフ１０．配列番号５～配列番号８のいずれか１つの軽鎖可変ドメイン配列を含む抗ＣＤ４０抗体。
【０３９３】
パラグラフ１２．それぞれ配列番号２７及び配列番号２６；それぞれ配列番号２８及び配列番号２６；それぞれ配列番号２９及び配列番号２６；それぞれ配列番号３０及び配列番号２６；それぞれ配列番号３２及び配列番号３１；それぞれ配列番号３３及び配列番号３１；それぞれ配列番号３４及び配列番号３１；それぞれ配列番号３５及び配列番号３１；それぞれ配列番号３７及び配列番号３６；それぞれ配列番号３８及び配列番号３６；それぞれ配列番号３９及び配列番号３６；それぞれ配列番号４０及び配列番号３６のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変領域を有するヒト化抗体又は抗体フラグメント。
【０３９４】
パラグラフ１３．ヒトＣＤ４０に特異的に結合する単離抗体又は抗原結合フラグメントであって、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、又は配列番号３０のヒト可変ドメイン重鎖アミノ酸配列のフレームワーク領域のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を有するフレームワーク領域を含むヒト化重鎖可変ドメインを含み、及び、配列番号２６の対応する軽鎖可変ドメインと少なくとも９０％同一である軽鎖アミノ酸配列を含む。
【０３９５】
パラグラフ１４．ヒトＣＤ４０に特異的に結合する単離抗体又は抗原結合フラグメントであって、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、又は配列番号３５のヒト可変ドメイン重鎖アミノ酸配列のフレームワーク領域のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を有するフレームワーク領域を含むヒト化重鎖可変ドメインを含み、及び、配列番号３１の対応する軽鎖可変ドメインと少なくとも９０％同一である軽鎖アミノ酸配列を含む。
【０３９６】
パラグラフ１５．ヒトＣＤ４０に特異的に結合する単離抗体又は抗原結合フラグメントであって、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、又は配列番号４０のヒト可変ドメイン重鎖アミノ酸配列のフレームワーク領域のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を有するフレームワーク領域を含むヒト化重鎖可変ドメインを含み、及び、配列番号３６の対応する軽鎖可変ドメインと少なくとも９０％同一である軽鎖アミノ酸配列を含む。
【０３９７】
パラグラフ１６．パラグラフ１の抗体であって、それにおいて、前記抗体は、ＣＤ４０Ｌの非存在においてＢ細胞からのサイトカインの産生を刺激しない。
【０３９８】
パラグラフ１７．パラグラフ１の抗体であって、それにおいて、前記抗体は、２倍未満の比率の低下を伴い、５０％ヒト血清の存在においてヒトＣＤ４０に結合する。
【０３９９】
パラグラフ１８．パラグラフ１の抗体であって、それにおいて、前記抗体は、哺乳動物

において濃度１mg/kgでＩｇＭ及びＩｇＧ産生を阻害する。

【０４００】

パラグラフ１９．哺乳動物においてヒトＣＤ４０の機能を遮断する方法であって、前記哺乳動物に、前記哺乳動物においてＣＤ４０媒介性の免疫応答を遮断するために十分な量のパラグラフ１の抗体を含む組成物を投与することを含む。

【０４０１】

パラグラフ２０．哺乳動物において移植片対宿主疾患を処置又は寛解する方法であって、前記哺乳動物に、前記哺乳動物において移植片対宿主疾患の症状の１つ又は複数を減少させるために十分な量のパラグラフ１の抗体を含む組成物を投与することを含む。

【０４０２】

パラグラフ２１．パラグラフ２０の方法であって、それにおいて、前記哺乳動物は、関節リウマチ、多発性硬化症、増殖性ループス糸球体腎炎、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、乾癬、特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、クローン病及び全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症／グレーブス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性心炎、アジソン病、早発閉経、１型糖尿病、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、特発性白血球減少症、原発性胆汁性肝硬変、活動性慢性肝炎（ＨＢｓ　Ａｇ陰性）、原因不明肝硬変、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、強皮症、混合性結合組織疾患、円板状エリテマトーデス、及び全身性血管炎からなる群より選択される自己免疫性又は炎症性疾患を有する。

【０４０３】

パラグラフ２２．パラグラフ１９の方法であって、それにおいて、前記哺乳動物は関節リウマチを有する。

【０４０４】

パラグラフ２３．パラグラフ２０の方法であって、ＴＮＦアンタゴニスト、疾患修飾抗リウマチ薬、ＣＴＬＡ４アンタゴニスト、抗ＩＬ－６受容体ｍＡｂ、及び抗ＣＤ２０　ｍＡｂからなる群より選択される第２の治療用薬剤を投与することをさらに含む。

【０４０５】

パラグラフ２４．パラグラフ２０の方法であって、それにおいて、前記の炎症性疾患又は自己免疫性疾患は、ＣＤ４０及びＣＤ２０の両方を発現している細胞に関連付けられる炎症性疾患又は自己免疫性疾患である。

【０４０６】

パラグラフ２５．パラグラフ１９の方法であって、それにおいて、前記の抗ＣＤ４０抗体は非経口の投与経路により投与される。

【０４０７】

パラグラフ２６．パラグラフ１９の方法であって、それにおいて、前記の抗ＣＤ４０抗体は静脈内又は皮下投与される。

【０４０８】

パラグラフ２７．ヒト患者においてＢ細胞による抗体産生を阻害する方法であって、パラグラフ１の抗ＣＤ４０抗体の効果的な量を前記ヒト患者に投与することを含む。

【０４０９】

パラグラフ２８．パラグラフ２７の方法であって、それにおいて、前記ヒト患者は、ＣＤ４０発現細胞に関連付けられる炎症性疾患又は自己免疫性疾患を有する。

【０４１０】

パラグラフ２９．パラグラフ２７の方法であって、前記ヒト患者が、関節リウマチ、多発性硬化症、増殖性ループス糸球体腎炎、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、乾癬、特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、クローン病及び全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症／グレーブス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性心炎、アジソン病、早発閉経、１型糖尿病、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、特発性白血球減少症、原発性胆汁性肝硬変、活動性慢性肝炎（ＨＢｓ　Ａｇ陰性）、原因不明肝硬変、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、強皮症

、混合性結合組織疾患、円板状エリテマトーデス、及び全身性血管炎からなる群より選択される自己免疫性又は炎症性疾患からなる群より選択される自己免疫性疾患に苦しんでいる。

【０４１１】

パラグラフ３０．ヒトＣＤ４０抗原を発現する細胞の成長を阻害するための方法であって、パラグラフ１の抗体又は抗原結合フラグメントを細胞に投与することを含み、その抗体又は抗原結合フラグメントはヒト細胞表面ＣＤ４０抗原に特異的に結合し、それにおいて、ＣＤ４０抗原への抗体又は抗原結合フラグメントの結合は、細胞の成長又は分化を阻害する。

【０４１２】

パラグラフ３１．ＣＤ４０関連障害を有する被験体を処置するための方法であって、パラグラフ１の抗体又は抗原結合フラグメントを被験体に投与することを含み、その抗体又は抗原結合フラグメントはヒトＣＤ４０に特異的に結合し、それにおいて、ＣＤ４０への抗体又は抗原結合フラグメントの結合は、ＣＤ４０関連障害の細胞の成長又は分化を阻害する。

【０４１３】

パラグラフ３２．パラグラフ３１の方法であって、それにおいて、ＣＤ４０関連障害の細胞は、Ｂリンパ芽球様細胞、膵臓細胞、肺細胞、乳腺細胞、卵巣細胞、結腸細胞、前立腺細胞、皮膚細胞、頭頸部細胞、膀胱細胞、骨細胞、又は腎臓細胞である。

【０４１４】

パラグラフ３３．パラグラフ３１の方法であって、それにおいて、ＣＤ４０関連障害は、慢性リンパ性白血病、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、Ｔ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、又はカポジ肉腫である。

【０４１５】

パラグラフ３４．末梢Ｂ細胞の枯渇を誘導するための方法であって、パラグラフ１の抗体又は抗原結合フラグメントを細胞に投与することを含み、その抗体又は抗原結合フラグメントはヒト細胞表面ＣＤ４０抗原に特異的に結合し、それにおいて、ＣＤ４０抗原への抗体又は抗原結合フラグメントの結合は、細胞の枯渇を誘導する。

【０４１６】

パラグラフ３５．パラグラフ３４の方法であって、それにおいて、抗体又は抗原結合フラグメントを、免疫障害を有する被験体に投与する。

【０４１７】

パラグラフ３６．パラグラフ３４の方法であって、それにおいて、免疫障害は関節リウマチ又は全身性エリテマトーデスである

【０４１８】

パラグラフ３７．被験体において関節リウマチを処置する方法であって、パラグラフ１の抗体を前記被験体に投与することを含み、それにおいて、前記抗体は、前記被験体においてＣＤ４０の機能を遮断するアンタゴニスト抗体である。

【０４１９】

パラグラフ３８．パラグラフ３７の方法であって、それにおいて、前記抗体を、前記被験体においてＢ細胞分化及び抗体アイソタイプスイッチを阻害するために効果的な量で投与する。

【０４２０】

パラグラフ３９．パラグラフ３７の方法であって、それにおいて、前記抗体を、前記被験体におけるＴ細胞及びマクロファージ中でのサイトカイン及びケモカイン産生ならびに付着分子の発現増加を阻害するために効果的な量で投与する。

【０４２１】

パラグラフ４０．パラグラフ３７の方法であって、それにおいて、前記抗体を、前記被験体において樹状細胞の活性化を阻害するために効果的な量で投与する。

【０４２２】
パラグラフ４１．パラグラフ３７の方法であって、それにおいて、前記抗体を、前炎症性サイトカイン、ケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ、プロスタグランジンの産生を阻害し、前記被験体において非免疫細胞中の付着分子の発現を低下させるために効果的な量で投与する。
【０４２３】
パラグラフ４２．パラグラフ３７の方法であって、それにおいて、前記抗体を、メトトレキサート投与及び／又はエンブレル／ヒュミラの投与を含む計画との組み合わせで投与する。
【０４２４】
パラグラフ４３．パラグラフ３７の方法であって、それにおいて、前記被験体は、関節リウマチを有し、メトトレキサート処置単独に非応答性であった被験体である。
【０４２５】
パラグラフ４４．パラグラフ４３の方法であって、それにおいて、前記方法は、メトトレキサート投与及び／又はエンブレル／ヒュミラの投与を含む計画を用いて前記被験体を処置することを含む。
【０４２６】
パラグラフ４５．パラグラフ３７の方法であって、それにおいて、前記アンタゴニスト抗ＣＤ４０抗体を用いた前記被験体の処置が、メトトレキサート単独、エンブレル単独、エンブレル＋メトトレキサートの組み合わせを用いた処置よりも優れた効力を有する。
【０４２７】
パラグラフ４６．パラグラフ４３の方法であって、それにおいて、前記アンタゴニスト抗ＣＤ４０抗体を用いた前記被験体の処置が、メトトレキサートに対する不適当な応答を有した患者においてエンブレル＋ＭＴＸを用いた処置よりも優れた効力を有する。
【０４２８】
パラグラフ４７．パラグラフ３７の方法であって、それにおいて、前記抗体を、抗ＴＮＦ薬剤を含む計画との組み合わせで投与する。
【０４２９】
パラグラフ４８．パラグラフ３７の方法であって、それにおいて、前記被験体は、関節リウマチを有し、抗ＴＮＦ薬剤単独を用いた処置に非応答性であった被験体である。
【０４３０】
パラグラフ４９．パラグラフ４８の方法であって、それにおいて、前記方法は、前記アンタゴニスト抗ＣＤ４０抗体と組み合わせた抗ＴＮＦ薬剤を用いた処置を含む計画を用いて前記被験体を処置することを含む。
【０４３１】
パラグラフ５０．パラグラフ３７の方法であって、それにおいて、前記アンタゴニスト抗ＣＤ４０抗体を用いた前記被験体の処置は、抗ＴＮＦ薬剤を用いた処置よりも優れた効力を有する。
【０４３２】
パラグラフ５１．パラグラフ４８の方法であって、それにおいて、前記アンタゴニスト抗ＣＤ４０抗体を用いた前記被験体の処置が、抗ＴＮＦ薬剤単独に対する不適当な応答を有した患者においてオレンシア又はリツキサンを用いた処置よりも優れた効力を有する。
【０４３３】
パラグラフ５２．（ｉ）パラグラフ８の抗体又は抗原結合フラグメント；及び（ｉｉ）医薬的に許容可能な賦形剤を含む医薬的組成物。
【０４３４】
パラグラフ５３．パラグラフ５２の医薬的組成物であって、それにおいて、前記抗体又はその抗原結合フラグメントを第２の薬剤に共役する。
【０４３５】
パラグラフ５４．パラグラフ５２の医薬的組成物であって、それにおいて、前記の第２

の薬剤が、細胞傷害性薬剤、ＰＥＧ担体、酵素、又はマーカーである。

【０４３６】

パラグラフ５５．配列番号１～４、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３２、配列番号３３、配列番号３４、配列番号３５、配列番号３７、配列番号３８、配列番号３９、配列番号４０、配列番号４２、配列番号４４、配列番号４６、配列番号４８、配列番号５０、配列番号５３，配列番号５７、配列番号５８、配列番号５９、配列番号６０、配列番号６１、配列番号６２、配列番号６３、配列番号６４、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、配列番号７２、又は配列番号７３のいずれかの重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする単離ポリヌクレオチド。

【０４３７】

パラグラフ５６．配列番号５～配列番号８、配列番号２６、配列番号３１、配列番号３６、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４５、配列番号４７、配列番号４９、配列番号５０、配列番号５１、配列番号５２、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号７４、配列番号７５、又は配列番号７６のいずれかの軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする単離ポリヌクレオチド。

【０４３８】

パラグラフ５７．哺乳動物におけるヒトＣＤ４０の機能を遮断するための薬物の製造におけるパラグラフ１の抗体の使用であって、それにおいて、薬物は、前記哺乳動物においてＣＤ４０媒介性の免疫応答を遮断する。

【０４３９】

パラグラフ５８．哺乳動物において移植片対宿主疾患を処置又は寛解するための薬物の製造のためのパラグラフ１の抗体の使用。

【０４４０】

パラグラフ５９．パラグラフ５８の使用であって、前記薬物を、関節リウマチ、多発性硬化症、増殖性ループス糸球体腎炎、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、乾癬、特発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、クローン病及び全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺中毒症／グレーブス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性心炎、アジソン病、早発閉経、１型糖尿病、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、特発性白血球減少症、原発性胆汁性肝硬変、活動性慢性肝炎（ＨＢｓ　Ａｇ陰性）、原因不明肝硬変、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、強皮症、混合性結合組織疾患、円板状エリテマトーデス、及び全身性血管炎からなる群より選択される自己免疫性又は炎症性疾患の処置のために製造する。

【０４４１】

パラグラフ６０．パラグラフ５８の使用であって、それにおいて、前記薬物が、ＴＮＦアンタゴニスト、疾患修飾抗リウマチ薬、ＣＴＬＡ４アンタゴニスト、抗ＩＬ－６受容体ｍＡｂ、及び抗ＣＤ２０　ｍＡｂからなる群より選択される第２の治療用薬剤をさらに含む。

【０４４２】

パラグラフ６１．パラグラフ５７の使用であって、それにおいて、前記薬物が、非経口の投与経路の使用のために製造される。

【０４４３】

パラグラフ６２．パラグラフ５７の使用であって、それにおいて、前記薬物が、静脈内又は皮下での使用のために製剤化される。

【０４４４】

パラグラフ６３．ヒト患者におけるＢ細胞による抗体産生の阻害のための薬物の製造におけるパラグラフ１の抗体の使用。

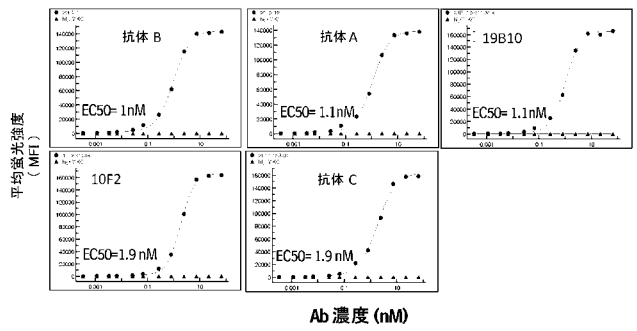
【０４４５】

パラグラフ６４．ヒトＣＤ４０抗原を発現する細胞の成長及び／又は分化を阻害するための薬物の製造のためのパラグラフ１の抗体の使用。

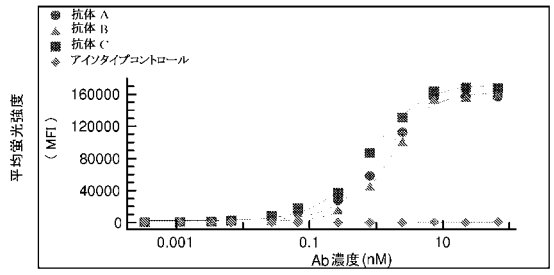
【０４４６】
パラグラフ６５．ＣＤ４０関連障害を有する被験体の処置のための薬物の製造のためのパラグラフ１の抗体の使用であって、それにおいて、ＣＤ４０への前記薬物中の抗体又は抗原結合フラグメントの結合は、ＣＤ４０関連障害の細胞の成長又は分化を阻害する。
【０４４７】
パラグラフ６６．パラグラフ６５の使用であって、それにおいて、薬物が、Ｂリンパ芽球様細胞、膵臓細胞、肺細胞、乳腺細胞、卵巣細胞、結腸細胞、前立腺細胞、皮膚細胞、頭頸部細胞、膀胱細胞、骨細胞、又は腎臓細胞より選択されるＣＤ４０関連障害の細胞の処置のために使用される。
【０４４８】
パラグラフ６７．パラグラフ６５の使用であって、それにおいて、薬物が、慢性リンパ性白血病、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、Ｔ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、又はカポジ肉腫の処置のために使用される。
【０４４９】
パラグラフ６８．末梢Ｂ細胞の枯渇を誘導するための薬物の製造におけるパラグラフ１の抗体の使用であって、それにおいて、薬物の抗体又は抗原結合フラグメントはヒト細胞表面ＣＤ４０抗原に特異的に結合し、それにおいて、ＣＤ４０抗原への抗体又は抗原結合フラグメントの結合は、細胞の枯渇を誘導する。
【０４５０】
パラグラフ６９．パラグラフ６８の使用であって、それにおいて、薬物は、免疫障害を有する被験体の処置のためである。
【０４５１】
パラグラフ７０．パラグラフ６８の使用であって、それにおいて、薬物は、関節リウマチ又は全身性エリテマトーデスの処置のためである。
【０４５２】
パラグラフ７１．被験体における関節リウマチの処置のための薬物の製造のためのパラグラフ１の抗体の使用。
【０４５３】
パラグラフ７２．パラグラフ７１の使用であって、それにおいて、薬物は、前記被験体におけるＢ細胞分化及び抗体アイソタイプスイッチの阻害のためである。
【０４５４】
パラグラフ７３．パラグラフ７１の使用であって、それにおいて、薬物は、前記被験体におけるＴ細胞及びマクロファージ中でのサイトカイン及びケモカイン産生ならびに付着分子の発現増加の阻害のためである。
【０４５５】
パラグラフ７４．パラグラフ７１の使用であって、それにおいて、薬物は、前記被験体における樹状細胞の活性化の阻害のためである。
【０４５６】
パラグラフ７５．パラグラフ７１の使用であって、それにおいて、薬物は、前炎症性サイトカイン、ケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ、プロスタグランジンの産生の阻害、及び前記被験体における非免疫細胞中での付着分子の発現低下のためである。
【０４５７】
パラグラフ７６．パラグラフ７１の使用であって、それにおいて、薬物は、メトトレキサート投与及び／又はエンブレル／ヒュミラの投与を含む計画との組み合わせで投与される組み合わせ薬物である。
【０４５８】
パラグラフ７７．パラグラフ７１の使用であって、それにおいて、薬物は抗ＴＮＦ薬剤をさらに含む。
【０４５９】

本明細書に開示する教示の適用は、本明細書に記載する特定の実施態様による範囲において限定されない。実際に、種々の改変が、本明細書に含まれる教示及び添付の実施例に照らして、当業者の能力の範囲内でありうる。そのような改変は、添付の請求項の範囲内に入ることが意図される。

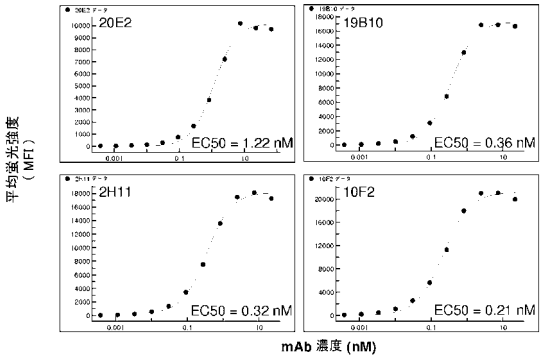
【図１Ａ】



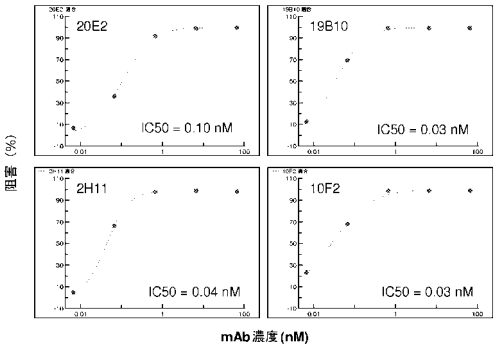
【図１Ｂ】



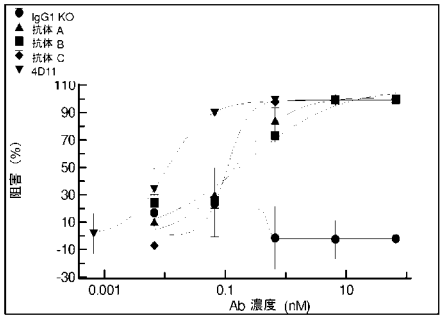
【図２】



【図３Ａ】



【図３Ｂ】

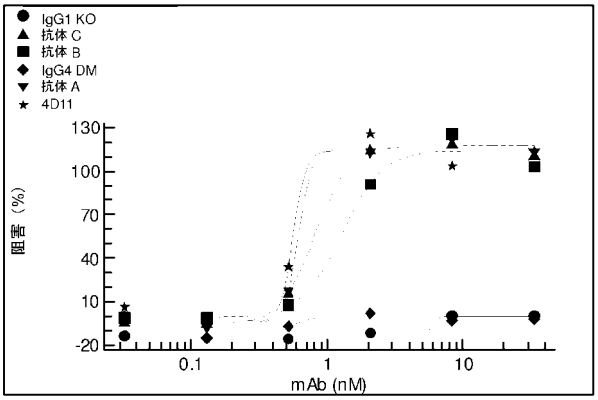


【図４】

	ヒトB細胞増殖アッセイ		
		アンタゴニズム	アゴニズム
抗体名	アイソタイプ	平均 IC50 nM ±SEM (n)	SI ±SEM (n)
抗体 B	hIgG1KO	0.2±0.09 (n=3)	1±0.3 (n=3)
抗体 A	hIgG1KO	0.3±0.03 (n=3)	1±0.13 (n=3)
抗体 C	hIgG1KO	0.1±0.01 (n=3)	1±0.06 (n=3)
10F2	hIgG1KO	0.8±0.11 (n=3)	1±0.09 (n=3)
4D11	hIgG4DM	0.02±0.01 (n=3)	1±0.11 (n=3)
G28.5	mIgG1	NT	7±1.94 (n=3)
mu5D12	hIgG4Pro	67nMまで阻害なし	18±3.1 (n=3)

NT=テストせず

【図５】



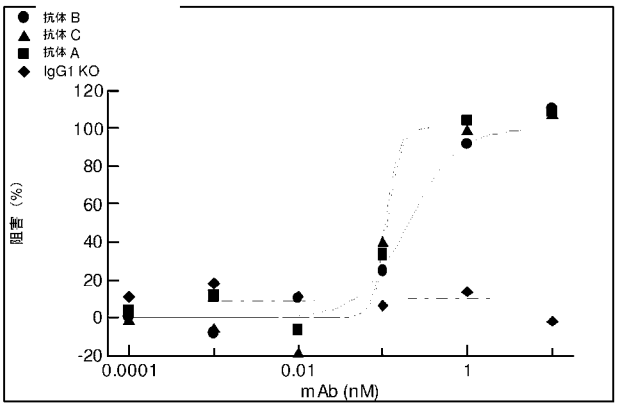
【図６Ａ】

mAb (アイソタイプ)	IC50 (nM +/- SEM)		変化（倍）
	精製B細胞	HWB	
抗体 B	0.6 +/- 0.3 (n=4)	1.3 +/- 0.7(n=4)	2.2
4D11 (hIgG4 DM)	0.03 +/- 0.01 (n=5)	0.6 +/- 0.3 (n=4)	20.0

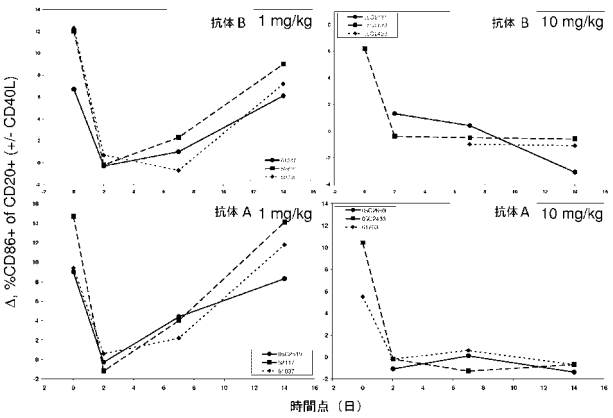
【図６Ｂ】

mAb (アイソタイプ)	IC90 (nM +/- SEM)		変化（倍）
	精製B細胞	HWB	
抗体 B	5.3 +/- 2.4 (n=4)	4.3 +/- 2.1 (n=4)	0.8
4D11 (hIgG4 DM)	0.05 +/- 0.02 (n=5)	1.3 +/- 0.64 (n=4)	26

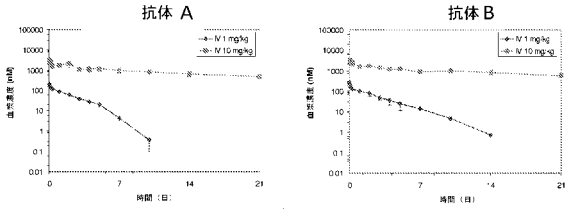
【図７】



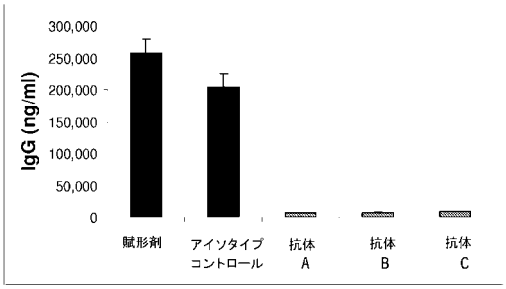
【図９】



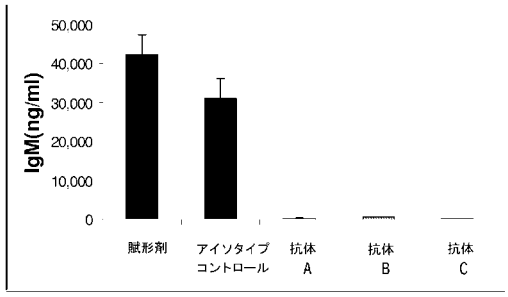
【図８】



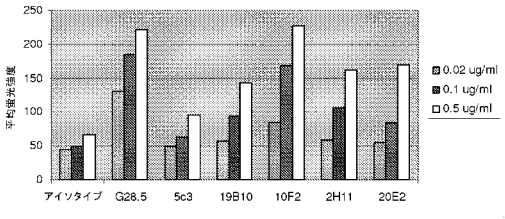
【図１０Ａ】



【図１０Ｂ】



【図１１】



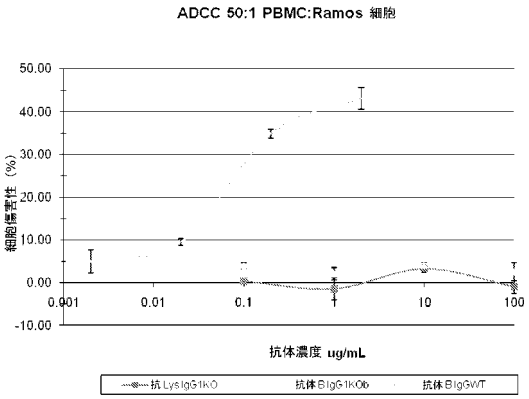
【図１２】

	EC50 nM (範囲)	
	抗体 B	4D11
B 細胞		
ヒト (n = 6)	1.8 (1.2 ～ 2.3)	0.3 (0.1 ～ 0.3)
カニクイザル (n = 5)	2.1 (1.4 ～ 2.9)	0.7 (0.6 ～ 0.8)
血小板		
ヒト (n = 5)	4.6 (2.5 ～ 5.8)	0.7 (0.4 ～ 0.9)
カニクイザル (n = 5)	3.9 (2.7 ～ 6.2)	1.2 (0.9 ～ 1.7)

【配列表】

2013523130000001.app

【図１３】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/030427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395 C12N15/13 A61P27/00 A61P37/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/124299 A2 (NOVARTIS AG [CH]; XOMA TECHNOLOGY LTD [US]; LU XIAOFENG [US]; CHEN BAO) 1 November 2007 (2007-11-01) page 45, line 31 - page 47, line 16; claims 1,43	1,5-15
X	US 2003/165499 A1 (CHU KETING [US] ET AL) 4 September 2003 (2003-09-04) claims 1,6	1,5-15
X	WO 2007/129895 A2 (PANGENETICS B V [NL]; DEN HARTOG MARCEL THEODORUS [NL]; VAN NEERVEN RU) 15 November 2007 (2007-11-15) the whole document	1,5-15
X	US 2004/120948 A1 (MIKAYAMA TOSHIFUMI [JP] ET AL) 24 June 2004 (2004-06-24) example 3; table 2	1,5-15

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 July 2011	29/09/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Weikl, Martina

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/030427

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALMAGRO JUAN C ET AL: "Humanization of antibodies", FRONTIERS IN BIOSCIENCE (LANDMARK EDITION), FRONTIERS IN BIOSCIENCE, US, vol. 13, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1619-1633, XP002614477, ISSN: 1093-4715 the whole document -----	1,5-15

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/030427

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

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

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1, 5-15(all partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2011/030427

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1, 5-15(all partially)

Claims relating to humanized antagonistic CD-40 antibodies with CDR regions derived from murine lead antibody 2H11, i.e. antibodies having the heavy chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 9, 12 and 16 and having the light chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 18, 22 and 24 or antibodies having the light chain sequence represented by SEQ ID No 36 and one of the heavy chain sequences represented by SEQ ID Nos 37-40 (Antibody C); nucleic acids encoding such antibodies and therapeutic methods employing such antibodies

---

2. claims: 2(completely); 1, 7-15(partially)

Claims relating to humanized antagonistic CD-40 antibodies with CDR regions derived from murine lead antibody 10F2, i.e. antibodies having the heavy chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 10, 13 and 16 and having the light chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 19, 22 and 24; nucleic acids encoding such antibodies and therapeutic methods employing such antibodies

---

3. claims: 3(completely); 1, 7-15(partially)

Claims relating to humanized antagonistic CD-40 antibodies with CDR regions derived from murine lead antibody 19B10, i.e. antibodies having the heavy chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 9, 14 and 16 and having the light chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 20, 22 and 24; nucleic acids encoding such antibodies and therapeutic methods employing such antibodies

---

4. claims: 4(completely); 1, 5-15(partially)

Claims relating to humanized antagonistic CD-40 antibodies with CDR regions derived from murine lead antibody 20E2, i.e. antibodies having the heavy chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 11, 15 and 17 and having the light chain CDR regions represented by SEQ ID Nos 21, 23 and 25 or antibodies having the light chain sequence represented by SEQ ID No 26 and one of the heavy chain sequences represented by SEQ ID Nos27-30 (Antibody A) or antibodies having the light chain sequence represented by SEQ ID No 31 and one of the heavy chain sequences represented by SEQ ID Nos 32-35 (Antibody B); nucleic acids encoding such antibodies and therapeutic methods employing such antibodies

---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2011/030427

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007124299 A2	01-11-2007	AR 060487 A1	18-06-2008
		AU 2007240507 A1	01-11-2007
		BR PI0710826 A2	23-08-2011
		CA 2649907 A1	01-11-2007
		CN 101426817 A	06-05-2009
		CR 10379 A	07-01-2009
		EA 200802135 A1	28-04-2009
		EC SP088903 A	27-02-2009
		EP 2019841 A2	04-02-2009
		JP 2009534401 A	24-09-2009
		KR 20090009204 A	22-01-2009
		MA 30470 B1	01-06-2009
		SM AP200800064 A	26-11-2008
		SV 2008003071 A	01-02-2010
		US 2009304706 A1	10-12-2009
US 2003165499 A1	04-09-2003	US 2011091472 A1	21-04-2011
WO 2007129895 A2	15-11-2007	AR 060998 A1	30-07-2008
		AU 2007249031 A1	15-11-2007
		CA 2651565 A1	15-11-2007
		CN 101490086 A	22-07-2009
		EP 1854810 A1	14-11-2007
		EP 2019840 A2	04-02-2009
		JP 2009536522 A	15-10-2009
		KR 20090029203 A	20-03-2009
		RU 2008148303 A	20-06-2010
		US 2008085531 A1	10-04-2008
		ZA 200810381 A	31-03-2010
US 2004120948 A1	24-06-2004	AT 374214 T	15-10-2007
		AU 2009200017 A1	05-02-2009
		CA 2658221 A1	07-11-2002
		CN 101508734 A	19-08-2009
		DK 1391464 T3	14-01-2008
		EP 2009027 A1	31-12-2008
		EP 2011802 A2	07-01-2009
		PT 1391464 E	15-11-2007
		US 2009123466 A1	14-05-2009
		US 2010234578 A1	16-09-2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*13/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｐ	*1/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12	
Ａ６１Ｐ	*17/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04	
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06	
Ａ６１Ｐ	*1/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02	
Ａ６１Ｐ	*7/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/00	
Ａ６１Ｐ	*7/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/10	
Ａ６１Ｐ	*15/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/06	
Ａ６１Ｐ	*3/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	15/12	
Ａ６１Ｐ	*21/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ａ６１Ｐ	*7/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/04	
Ａ６１Ｐ	*1/16*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	7/00	
Ａ６１Ｐ	*19/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16	
Ａ６１Ｐ	*9/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/04	
Ａ６１Ｐ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00	
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00	
Ｃ０７Ｋ	*16/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28	ＺＮＡ
			Ｃ１２Ｐ	21/08	

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

(74)代理人 100135873
弁理士 小澤 圭子
(74)代理人 100116528
弁理士 三宅 俊男
(74)代理人 100122736
弁理士 小國 泰弘
(74)代理人 100122747
弁理士 田中 洋子
(74)代理人 100132540
弁理士 生川 芳徳
(74)代理人 100146031
弁理士 柴田 明夫
(72)発明者 バレット，レイチェル
アメリカ合衆国、コネチカット ０６８７７－０３６８、リッジフィールド、リッジベリー・ロード ９００、ピー・オー・ボックス ３６８、ベーリンガー・インゲルハイム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド
(72)発明者 ブロデューア，スコット
アメリカ合衆国、コネチカット ０６８７７－０３６８、リッジフィールド、リッジベリー・ロード ９００、ピー・オー・ボックス ３６８、ベーリンガー・インゲルハイム・ファーマシューテ

ィカルズ・インコーポレーテッド
(72)発明者　カナダ，キース・エイ
アメリカ合衆国、コネチカット　０６８７７－０３６８、リッジフィールド、リッジベリー・ロード　９００、ピー・オー・ボックス　３６８、ベーリンガー・インゲルハイム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド
(72)発明者　リッツェンブルガー，トビアス
ドイツ国、５５２１６　インゲルハイム・アム・ライン、ビンガー・シュトラーセ　１７３、ベーリンガー・インゲルハイム・ゲーエムベーハー、コーポレート・パテンツ
(72)発明者　シン，サンジャヤ
アメリカ合衆国、コネチカット　０６８７７－０３６８、リッジフィールド、リッジベリー・ロード　９００、ピー・オー・ボックス　３６８、ベーリンガー・インゲルハイム・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA07 HA01
4B064 AG27 CA19 DA01
4C084 AA19 MA02 MA55 MA63 MA66 NA14 ZA011 ZA361 ZA511 ZA551
ZA661 ZA751 ZA811 ZA941 ZA961 ZB071 ZB081 ZB151 ZC351
4C085 AA14 AA16 BB11 CC23 DD62 EE01 EE03 GG02 GG04
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74