

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 5 月 1 日(01.05.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/065402 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/078971
- (22) 国際出願日: 2013 年 10 月 25 日(25.10.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-237148 2012 年 10 月 26 日(26.10.2012) JP
- (71) 出願人: 株式会社ペルセウスプロテオミクス
(PERSEUS PROTEOMICS INC.) [JP/JP]; 〒1530041
東京都目黒区駒場 4 丁目 7 番 6 号 パークビル
Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 細見 直樹(HOSOMI, Naoki); 〒1530041
東京都目黒区駒場 4 丁目 7 番 6 号 パークビル
株式会社ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo
(JP). 石井 敬介(ISHII, Keisuke); 〒1530041 東京都
目黒区駒場 4 丁目 7 番 6 号 パークビル 株式
会社ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP). 甲
田 克志(KOUDA, Katsushi); 〒1530041 東京都
目黒区駒場 4 丁目 7 番 6 号 パークビル 株式
会社ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP). 野村
富美子(NOMURA, Fumiko); 〒1530041 東京都目黒
区駒場 4 丁目 7 番 6 号 パークビル 株式
会社ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP). 勝見
恵子(KATSUMI, Keiko); 〒1530041 東京都目黒
区駒場 4 丁目 7 番 6 号 パークビル 株式
会社ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE
PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT
OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町
1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, 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,
IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(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), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出され
た、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13
の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: ANTI-HUMAN CD40 MONOCLONAL ANTIBODY, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 抗ヒト CD 4 0 モノクローナル抗体及びその利用

(57) Abstract: Provided is a monoclonal antibody exhibiting greater stimulatory activity than conventional anti CD40 monoclonal antibodies. This anti-human CD40 monoclonal antibody, or an antigen binding fragment thereof, which exhibits proliferation-inhibiting activity with respect to human CD40 antigen-expressing cells, in the absence of effector cells, specifically binds to: a) an epitope including amino acid residues 21-37 of a human CD40 amino acid sequence (SEQ ID NO: 1); or b) an epitope including amino acid residues 38-61 of the human CD40 amino acid sequence (SEQ ID NO: 1).

(57) 要約: 従来の抗 CD40 モノクローナル抗体よりも強い刺激活性を有するモノクローナル抗体の提供。ヒト CD40 抗原発現細胞に対してエフェクター細胞非存在下で増殖抑制活性を有する抗ヒト CD40 モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントであって、a) ヒト CD40 アミノ酸配列 (配列番号 1) のアミノ酸残基 21-37 番目を含むエピトープ又は b) ヒト CD40 アミノ酸配列 (配列番号 1) のアミノ酸残基 38-61 番目を含むエピトープに特異的に結合する抗ヒト CD40 モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。



WO 2014/065402 A1

明 細 書

発明の名称：抗ヒトCD40モノクローナル抗体及びその利用 技術分野

[0001] 本発明は、抗腫瘍剤として有用な抗ヒトCD40モノクローナル抗体及びこれを含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] CD40は、ヒトB細胞表面に発現する抗原として同定され(非特許文献1)、アミノ酸配列の相同性から、低親和性NGFレセプターやTNFレセプター、CD27、OX40、CD30などが属しているTNFレセプターファミリーの1つのメンバーである。CD40はタイプIの膜型糖蛋白質であり、Bリンパ球や樹状細胞、単球上皮細胞、線維芽細胞などの多様な細胞タイプや、腫瘍性のヒトB細胞などのある種の腫瘍細胞にも発現していることが知られている。CD40欠損マウスでは、胸腺依存の免疫グロブリンのクラススイッチや胚中心の形成が損なわれ、細胞性と液性の免疫反応でのCD40の重要な役割が実証されている(非特許文献2)。

CD40の生理学的リガンドはCD40のLigand (CD154, gp39) である。活性化したTリンパ球にCD40Lが発現しておりBリンパ球の表面上のCD40との結合によりBリンパ球の分化や増殖、胚中心のBリンパ球の自発的アポトーシスからの回避など重要な調節機構を担っている(非特許文献3)。

[0003] T細胞悪性疾患およびB細胞悪性疾患の双方では、多くの場合、悪性細胞が正常リンパ球の活性化に至る刺激に曝された際に抗腫瘍作用(アポトーシスによる、またはアポトーシスによらない増殖停止)が生じる。この活性化により誘発される増殖抑制は、抗原受容体または共刺激受容体のいずれかを介したシグナルとともに観察されている(非特許文献4-7)。ある種の刺激性CD40抗体または可溶性CD40LによるCD40刺激は直接B細胞リンパ腫の増殖を阻害する(非特許文献8, 9)。

[0004] G28-5 (ATCC No. HB-9110)、S2C6 (ATCC No. PTA-110) 等の刺激性抗CD40抗

体の親和性と抗体による正常B細胞の活性化には相関がないが、抗体によるCD40リガンド阻害能と正常B細胞の活性化には相関があることが知られている。また、これらの抗体はCD40アミノ酸残基の61番目よりN末端側を認識している（非特許文献10）。他に、刺激性抗体ではなく、CD40Lの結合を完全に阻害する抗CD40抗体であるHCD122は、CD40の82-86番目のエピトープを認識することが知られている（特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2005/044294号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Clark et al., PNAS USA 1986; 83:4494-4498

非特許文献2：Kawabe et al., Immunity 1994; 1:167-168

非特許文献3：Kehry, J Immunol 1996; 156:2345-2348

非特許文献4：Ashwell et al., Science 1987; 237:61-64

非特許文献5：Bridges et al., J Immunol 1987; 139:4242-4549

非特許文献6：Page and Defranco, J Immunol 1988; 140:3717-3726

非特許文献7：Beckwith et al., J Natl Cancer Inst 1990; 82:501-509

非特許文献8：Funakoshi et al., Blood 1994; 83:2787-2794

非特許文献9：Francisco et al., Cancer Res 2000; 60:3225-3231

非特許文献10：Hager et al., Scand J Immunol 2003; 57:517-524

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、従来の抗CD40モノクローナル抗体よりも強い刺激性活性を有するモノクローナル抗体を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は、上記の課題を解決するため、ヒトCD40に対する抗体作製を行い、多くの抗CD40モノクローナル抗体を取得した。そして、それらの抗体群

の中に、CD40エピトープ21-37番目または38-61番目のアミノ酸残基と特異的に結合する抗体が存在することが判明した。さらにそのCD40エピトープと結合する抗体が、CD40抗原を発現するがん細胞株に対して強い増殖抑制活性を有することを見出し、本発明を完成した。

[0009] すなわち、本発明は、次の〔1〕～〔16〕を提供するものである。

〔1〕 ヒトCD40抗原発現細胞に対してエフェクター細胞非存在下で増殖抑制活性を有する抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントであって、

a) ヒトCD40アミノ酸配列（配列番号1）のアミノ酸残基21-37番目を含むエピトープ又はb) ヒトCD40アミノ酸配列（配列番号1）のアミノ酸残基38-61番目を含むエピトープに特異的に結合する抗ヒトCD40モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

〔2〕 軽鎖可変領域および重鎖可変領域が下記の1) から16) のいずれかに示されるアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入され、同一性のレベルが少なくとも90%以上であるアミノ酸配列を有する〔1〕に記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

- 1) 配列番号5及び配列番号30、
- 2) 配列番号6及び配列番号31、
- 3) 配列番号9及び配列番号34、
- 4) 配列番号10及び配列番号35、
- 5) 配列番号11及び配列番号36、
- 6) 配列番号14及び配列番号39、
- 7) 配列番号17及び配列番号42、
- 8) 配列番号18及び配列番号43、
- 9) 配列番号19及び配列番号44、
- 10) 配列番号20及び配列番号45、
- 11) 配列番号21及び配列番号46、

- 12) 配列番号22及び配列番号47、
- 13) 配列番号24及び配列番号49、
- 14) 配列番号25及び配列番号50、
- 15) 配列番号26及び配列番号51、及び
- 16) 配列番号27及び配列番号52

〔3〕 軽鎖可変領域及び重鎖可変領域がそれぞれ下記のいずれかに示されるアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加若しくは挿入され、同一性のレベルが少なくとも90%以上であるアミノ酸配列を有する、〔1〕又は〔2〕に記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

- 1) 配列番号9及び34、
- 2) 配列番号10及び35、
- 3) 配列番号11及び36、
- 4) 配列番号14及び39、
- 5) 配列番号17及び42、
- 6) 配列番号19及び44、
- 7) 配列番号20及び45、又は
- 8) 配列番号21及び46

〔4〕 受託番号NITE BP-01436、NITE BP-01437、NITE BP-01438、NITE BP-01716、NITE BP-01439、NITE BP-01440、NITE BP-01441、及びNITE BP-01442としてNITEに寄託されたハイブリドーマ細胞株PPAT-071-06、PPAT-071-07、PPAT-071-08、PPAT-071-11、PPAT-071-14、PPAT-071-16、PPAT-071-17、及びPPAT-071-18のいずれかから得られるモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントである〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

〔5〕 マウス由来である〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

〔6〕 ヒト化抗体である〔1〕に記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又は

その抗原結合フラグメント。

〔 7 〕 〔 1 〕 ～ 〔 5 〕 のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体の相補性決定領域CDRを含むアミノ酸配列とヒトイムノグロブリンのアミノ酸配列を用いてヒト化された抗体である〔 6 〕 に記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

〔 8 〕 軽鎖可変領域及び重鎖可変領域がそれぞれ下記のいずれかに示されるアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において 1 又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入され、同一性のレベルが少なくとも 90% 以上であるアミノ酸配列を有する〔 6 〕 又は〔 7 〕 に記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

- 1) 配列番号58及び59、
- 2) 配列番号60及び61、
- 3) 配列番号62及び59、
- 4) 配列番号63及び64、
- 5) 配列番号65及び66、
- 6) 配列番号60及び67、
- 7) 配列番号68及び61、又は
- 8) 配列番号69及び70

〔 9 〕 細胞傷害薬または薬物を結合させた〔 1 〕 ～ 〔 8 〕 のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

〔 10 〕 放射性同位元素を標識させた〔 1 〕 ～ 〔 8 〕 のいずれかに記載の抗ヒトCD4モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

〔 11 〕 〔 1 〕 ～ 〔 10 〕 のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを含有する医薬組成物。

〔 12 〕 〔 1 〕 ～ 〔 10 〕 のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを有効成分とするヒトCD40抗原を発現する腫瘍に対する抗腫瘍剤。

〔 13 〕 〔 1 〕 ～ 〔 5 〕 のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体

を産生するハイブリドーマ。

〔14〕ヒトCD40抗原を発現する腫瘍を治療するための、〔1〕～〔10〕のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

〔15〕ヒトCD40抗原を発現する腫瘍の治療薬製造のための、〔1〕～〔10〕のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントの使用。

〔16〕〔1〕～〔10〕のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを、必要な患者に投与することを特徴とする、ヒトCD40抗原を発現する腫瘍の治療方法。

発明の効果

[0010] 本発明の抗ヒトCD40モノクローナル抗体は、ヒトCD40の21-37番目または36-61番目のアミノ酸残基をエピトープとする抗体であり、CD40抗原を発現している腫瘍細胞に対して強力な増殖抑制活性を有し、抗がん剤として有用である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の実施例1及び5に係るヒトCD40のアミノ酸配列および作製した部分長CD40のN末端側を示す図である。

[図2]本発明の実施例2及び4に係るヒトCD40とマウスCD40のアミノ酸配列を並列した結果を示す図である。

[図3]本発明の実施例4に係るヒトCD40とカニクイザルCD40のアミノ酸配列を並列した結果を示す図である。

[図4]本発明の実施例5に係る部分長CD40発現CHO細胞でのCD40エピトープ解析の結果を示す図である。

[図5]本発明の実施例6に係る各マウス抗体によるRamos細胞の増殖率を示す図である。

[図6]本発明の実施例7に係るマウス抗体によるRamos細胞の担癌マウスモデルにおける抗腫瘍効果を示す図である。

[図7]本発明の実施例10に係るマウス抗体およびヒト化抗体の濃度変化において、Ramos細胞とM0LP-8細胞の増殖率を示す図である。

[図8]本発明の実施例11に係るヒト化抗体によるRamos細胞の担癌マウスモデルにおける抗腫瘍効果を示す図である。

[図9]本発明の実施例12に係るDM1SHに対するRamos細胞、Raji細胞、M0LP-8細胞の感受性を示す図である。

[図10]本発明の実施例12に係るDM1コンジュゲート抗体（PPAT-071-06）によるRamos細胞、Raji細胞、M0LP-8細胞の増殖率を示す図である。

[図11]本発明の実施例12に係るDM1コンジュゲート抗体（PPAT-071-07）によるRamos細胞、Raji細胞、M0LP-8細胞の増殖率を示す図である。

[図12]本発明の実施例12に係るDM1コンジュゲート抗体（PPAT-071-18）によるRamos細胞、Raji細胞、M0LP-8細胞の増殖率を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、この発明の実施の形態について詳細に説明する。

1. 定義

本明細書で使用する用語の定義は以下のとおりである。

[0013] ヒトCD40の2つのアイソフォーム（この遺伝子の代替スプライス転写産物改変体によってコードされる）が同定されている。第1のアイソフォーム（「長いアイソフォーム」または「アイソフォーム1」としても公知である）は、277個のアミノ酸の前駆ポリペプチド（配列番号1（GenBankアクセッション番号NP_001241においてアイソフォーム1））として発現され、これは最初の20残基によって表されるシグナル配列を有する。第2のアイソフォーム（「短いアイソフォーム」または「アイソフォーム2」としても公知である）は、203個のアミノ酸の前駆ポリペプチドとして発現され、これも最初の20残基によって表されるシグナル配列を有する。ヒトCD40のこれら2つのアイソフォームの前駆ポリペプチドは、共通してその最初の165残基（すなわち、配列番号1の残基1-165）を共有する。短いアイソフォームの前駆ポリペプチドは、コードセグメントを欠失する転写産物改変体（これは、翻訳のフレ

ームシフトをもたらす)によってコードされ、得られるCD40アイソフォームは、CD40の長いアイソフォームに含まれるもの(配列番号1の残基166-277に示されるC末端)とは異なる。本発明では、「CD40抗原」、または「CD40」は、CD40の短いアイソフォームおよび長いアイソフォームの両方を包含する。本発明の抗CD40抗体は、本明細書中で以下に示されるようにヒトCD40のエピトープに結合し、このヒトCD40は、この細胞表面抗原の短いアイソフォームまたは長いアイソフォームのいずれかのうちの同じ位置に存在する。また、「CD40」は、前に付したものがなければ、「ヒトCD40」を意味する。

[0014] CD40抗原は、種々の細胞型の表面に提示される。「発現を特徴付ける」および「発現する」とは、CD40抗原のうちのすべてまたは一部が、細胞の外側に曝露されることを意味する。提示または発現されたCD40抗原は、完全にまたは部分的にグリコシル化されていてもよい。

[0015] 本明細書中で用いる「CD40エピトープ」とは、抗CD40抗体と免疫反応することができる分子(例えば、ペプチド)または該分子の断片を意味し、例えば、モノクローナル抗体により認識されるCD40抗原決定基が含まれる。CD40抗原エピトープはタンパク質、タンパク質断片、ペプチドなどに含まれてよい。エピトープは最も一般的には、タンパク質、短いオリゴペプチド、オリゴペプチド模倣物(すなわち、CD40抗原の抗体結合特性を模倣する有機化合物)、またはそれらの組合せである。

[0016] 「抗体」とは、本明細書では、2本の同一の軽(L)鎖と2本の同一の重(H)鎖からなる、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として定義される。各軽鎖は1つのジスルフィド結合によって重鎖と共有結合で連結されて、ヘテロ二量体を形成している。そのようなヘテロ二量体の2本の同一の重鎖間のジスルフィド共有結合によってヘテロ四量体が形成される。軽鎖と重鎖は1つのジスルフィド結合によって一緒に連結されるが、2本の重鎖間のジスルフィド結合の数は免疫グロブリンのアイソタイプにより変化する。それぞれの重鎖および軽鎖はまた、規則的に間隔をあけて配置された鎖内ジスルフィド橋を有する。各重鎖は、アミノ酸の末端に、可変ドメイン(V_H)、

その後3または4つの定常ドメイン (C_H1 、 C_H2 、 C_H3 、および C_H4) を有し、 C_H1 と C_H2 の間にヒンジ領域が存在する。各軽鎖は2つのドメイン、すなわち、アミノ末端の可変ドメイン(V_L)とカルボキシ末端の定常ドメイン(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で会合しており、一方 C_L ドメインは通常はジスルフィド結合を介して C_H1 ドメインと共有結合で連結されている。特定の amino 酸残基が軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメイン間の界面を形成していると考えられている(Chothia et al., J Mol Biol 1985; 186:651-663)。

[0017] 「可変」とは、可変ドメインの特定の部分が抗体間で広範囲にわたって配列が異なり、その特定の抗原に対する各々の特定の抗体の結合および特異性に使用される事実をいう。しかし、その可変性は、抗体の可変ドメインの全体にわたって均一に分布しない。可変性は、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインの両方で相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) と呼ばれる3つのセグメントに集中する。可変ドメインのうちより高度に保存される部分は、フレームワーク領域 (framework region; FR) と呼ばれる。

[0018] 「相補性決定領域(CDR)」とは、可変ドメイン内のある種の配列が抗体間で配列が大きく異なり、その特異的抗原決定基に対する特定の各抗体の結合および特異性に直接関与するある種の残基を含む領域を示す。軽鎖可変ドメインでも重鎖可変ドメインでも、3つのセグメントに集中している。CDRはKabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, 1993: Bethesda, MD. の配列比較により定義される。Kabatにより定義されているように、CDR-L1は軽鎖可変ドメインの24-34残基付近に、CDR-L2は50-56残基付近に、そしてCDR-L3は89-97残基付近に位置し、CDR-H1は重鎖可変ドメインの31-35付近、CDR-H2は50-65付近、そしてCDR-H3は95-102付近に位置する。

[0019] 重鎖および軽鎖の各々の3つのCDRは、変動が少ない傾向にある配列を含むフレームワーク領域(FR)によって隔てられている。重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのアミノ末端～カルボキシ末端までは、FRとCDRは、FR1、C

DR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4の順で並んでいる。FRの大まかな β -シート配置は各鎖内のCDRを互いに近接させるとともに、互いのCDRと近接させる。この結果生じた配置は抗原結合部位に寄与するが、全てのCDR残基が必ずしも直接抗原結合に関与するわけではない。

[0020] FR残基およびIg定常ドメインは抗原結合には直接関与しないが、抗原結合に寄与し、かつ／または抗体エフェクター機能を媒介する。いくつかのFR残基は、エピトープと直接非共有結合すること、1以上のCDR残基と相互作用すること、また、重鎖と軽鎖の間の境界に影響を及ぼすことによる、少なくとも3つの方法で抗原結合に有意な作用を持ち得る。定常ドメインは抗原結合には直接関与しないが、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)、補体依存性細胞傷害性(CDC)および抗体依存性細胞食作用(ADCP)における抗体の関与など、種々のIgエフェクター機能を媒介する。

[0021] 「抗原結合フラグメント」は、インタクトな抗体の一部、好ましくは、インタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗原結合フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂およびF_vフラグメント；二重特異性抗体；直鎖状抗体(Zapata et. Al., Protein Eng 1995; 8(10):1057-1062)；単鎖抗体分子；ならびに抗原結合フラグメントから形成された多重特異性抗体が挙げられる。抗体のパパイン消化により、各々単一の抗原結合部位を有する2つの同一の抗原結合フラグメント(「Fab」フラグメントと呼ばれる)、および残りの「Fc」フラグメント(この名称は、容易に結晶化する能力を反映する)が生成される。ペプシン処理により、F(ab')₂フラグメントが得られ、これは、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原と架橋結合し得る。

[0022] 「F_v」は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗原結合フラグメントである。2本の鎖(two-chain)のF_v種では、この領域は、固く非共有結合した1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとのダイマーからなる。単鎖のF_v種では、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとが、その軽鎖と重鎖とが2本の鎖のF_v種における構造に類似す

る「ダイマーの」構造に会合し得るように、フレキシブルなペプチドリンカーによって共有結合され得る。この構成において、各々の可変ドメインの3つのCDRが相互作用して、 V_H-V_L ダイマーの表面における抗原結合部位を規定する。合わせて、6つのCDRが抗体に対する抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変ドメイン（または抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分）でも、抗原を認識し結合する能力を有するが、完全な結合部位よりは親和性は低い。

[0023] 任意の脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、2つの明らかに異なる型（カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれる）に分類されている。

[0024] それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンが異なるクラスに分類される。ヒト免疫グロブリンには、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMの5つの主要なクラスが存在する。そしてさらに、サブクラス（アイソタイプ）（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAおよびIgA2）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、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマおよびミューと呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および三次元配置は周知である。異なるアイソタイプは異なるエフェクター機能を有する。例えば、ヒトIgG1アイソタイプおよびIgG3アイソタイプは、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)の活性を媒介する。

[0025] 「細胞傷害薬」とは、細胞の機能を阻害又は抑制し、かつ／または細胞の破壊を生じる物質を指す。この用語は化学療法薬ならびに毒素（細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性な毒素）およびそのフラグメントを含むものとする。このような細胞傷害薬は、既知の標準的手順を用いて例えばヒト化CD40抗体などの抗体とカップリングさせ、例えば抗体による療法が指示される患者の治療に使用することができる。

[0026] 「放射性同位元素」とは、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} および Re^{186} などの放射性核種であり、既知の標準的手順を用いて例えばヒト化CD40抗体などの抗体とカップリン

グさせ、例えば抗体による療法が指示される患者の治療に使用することができる。

[0027] 「CD40を発現する腫瘍」としては、急性リンパ球性白血病、慢性白血病、リンパ腫（例えば、ホジキン病または非ホジキン病）、多発性骨髄腫、癌腫（例えば、大腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、腎癌、肺癌、または食道癌）などが挙げられる。

「エフェクター細胞」とは、細胞性免疫の中でも強い攻撃力や処理能力を持つ細胞のことをいい、例えばキラーT細胞、ヘルパーT細胞、サプレッサーT細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージなどが挙げられる。

[0028] 2. 本発明抗体又はその抗原結合フラグメント

本発明抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒトCD40抗原発現細胞に対して、エフェクター細胞非存在下で増殖抑制活性を有する抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントであって、

a) ヒトCD40アミノ酸配列（配列番号1）のアミノ酸残基21-37番目を含むエピトープ又はb) ヒトCD40アミノ酸配列（配列番号1）のアミノ酸残基38-61番目を含むエピトープに特異的に結合する抗ヒトCD40モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントである。

[0029] 本発明抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒトCD40抗原発現細胞に対してエフェクター細胞非存在下で増殖抑制活性を有する。より具体的には、a. ヒトCD40安定発現細胞に対して反応し、b. ヒトCD40発現がん細胞株に対して反応し、かつc. ヒトCD40発現がん細胞に対して増殖を抑制する作用を有する。

[0030] より詳細には、本発明の抗体は、ヒトCD40安定発現細胞、ヒトCD40発現がん細胞に対して $1.0\mu\text{g/mL}$ 以下の抗体濃度でのFACS解析において、それらの細胞に反応を示す。

また、本発明の抗体は、ヒトCD40発現がん細胞であるRamos細胞（ATCC No. CRL-1596） $1 \times 10^5\text{cells/mL}$ に対して、抗体 $3.0\mu\text{g/mL}$ の存在下での3日間の培養により、Ramos細胞の増殖率が70%以下を示す。

さらに、本発明の抗体は、ヒトCD40のN末端から短くした6種の部分長CD40を発現する細胞に対して $1.0\mu\text{g/mL}$ の抗体濃度でのFACS解析において、CD40アミノ酸残基21番目以降の部分長CD40を発現する細胞には反応する特徴を有する抗体群の内、CD40アミノ酸残基38番目以降の部分長CD40を発現する細胞には反応しない特徴を有する抗体群、または62番目以降の部分長CD40を発現する細胞には反応しない特徴を有する抗体群である。

[0031] 本発明の抗体は、好ましくは、軽鎖可変領域および重鎖可変領域が下記の1) から16) のいずれかに示されるアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入され、同一性のレベルが少なくとも90%以上であるアミノ酸配列を有する。

- 1) 配列番号5及び配列番号30、
- 2) 配列番号6及び配列番号31、
- 3) 配列番号9及び配列番号34、
- 4) 配列番号10及び配列番号35、
- 5) 配列番号11及び配列番号36、
- 6) 配列番号14及び配列番号39、
- 7) 配列番号17及び配列番号42、
- 8) 配列番号18及び配列番号43、
- 9) 配列番号19及び配列番号44、
- 10) 配列番号20及び配列番号45、
- 11) 配列番号21及び配列番号46、
- 12) 配列番号22及び配列番号47、
- 13) 配列番号24及び配列番号49、
- 14) 配列番号25及び配列番号50、
- 15) 配列番号26及び配列番号51、及び
- 16) 配列番号27及び配列番号52

[0032] 本発明の抗体は、より好ましくは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域がそれぞれ下記のいずれかに示されるアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列におい

て1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加若しくは挿入され、同一性のレベルが少なくとも90%以上であるアミノ酸配列を有する。

- 1) 配列番号9及び34、
- 2) 配列番号10及び35、
- 3) 配列番号11及び36、
- 4) 配列番号14及び39、
- 5) 配列番号17及び42、
- 6) 配列番号19及び44、
- 7) 配列番号20及び45、又は
- 8) 配列番号21及び46

[0033] 本発明の抗体のうち、ヒトCD40アミノ酸配列のアミノ酸残基21-37番目を含むエピトープに特異的に結合する抗体としては、下記の1)から8)に示すハイブリドーマが産生する抗体が好ましい。

- 1) PPAT-071-01
- 2) PPAT-071-02
- 3) PPAT-071-18
- 4) PPAT-071-20
- 5) PPAT-071-21
- 6) PPAT-071-22
- 7) PPAT-071-23
- 8) PPAT-071-24

[0034] また、本発明の抗体のうち、ヒトCD40アミノ酸配列のアミノ酸残基38-61番目を含むエピトープに特異的に反応する抗体としては、下記の1)から10)に示すハイブリドーマが産生する抗体が好ましい。

- 1) PPAT-071-03
- 2) PPAT-071-06
- 3) PPAT-071-07
- 4) PPAT-071-08

5) PPAT-071-11

6) PPAT-071-14

7) PPAT-071-15

8) PPAT-071-16

9) PPAT-071-17

10) PPAT-071-19

[0035] さらに、本発明の抗体のうち、受託番号NITE BP-01436、NITE BP-01437、NITE BP-01438、NITE BP-01716、NITE BP-01439、NITE BP-01440、NITE BP-01441、及びNITE BP-01442としてNITEに寄託されたハイブリドーマ細胞株PPAT-071-06、PPAT-071-07、PPAT-071-08、PPAT-071-11、PPAT-071-14、PPAT-071-16、PPAT-071-17、及びPPAT-071-18のいずれかが産生する抗体が好ましい。

[0036] 本発明の抗体のうち、上記ハイブリドーマが産生する抗体はマウス由来であるが、ヒト化抗体とすることもできる。ヒト化抗体としては、例えば、前記のマウス由来の抗ヒトCD40モノクローナル抗体の相補性決定領域CDRを含むアミノ酸配列とヒトイムノグロブリンのアミノ酸配列を用いてヒト化することにより得ることができる。このようなヒト化抗体としては、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域がそれぞれ下記のいずれかに示されるアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入され、同一性のレベルが少なくとも90%以上であるアミノ酸配列を有するものが好ましい。

1) 配列番号58及び59、

2) 配列番号60及び61、

3) 配列番号62及び59、

4) 配列番号63及び64、

5) 配列番号65及び66、

6) 配列番号60及び67、

7) 配列番号68及び61、又は

8) 配列番号69及び70、

[0037] 前記軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を示すアミノ酸配列におけるアミノ酸配列の置換、欠失、付加又は挿入のアミノ酸の数は、1～10個が好ましく、1～8個がより好ましく、1～6個がさらに好ましい。また、アミノ酸配列の同一性のレベルは91%以上が好ましく、93%以上がより好ましく、95%以上がさらに好ましい。

[0038] 3. 抗体の作製方法

本発明において、ヒトCD40に結合する抗体は当業者に公知の方法により作成することができる。例えば、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、CD40タンパク質またはCD40発現細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって哺乳動物を免疫する。得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞を選択することができる。

[0039] 具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。まず、配列番号1に示されるCD40のアミノ酸配列にしたがってCD40タンパク質を取得し、これを抗体取得の感作抗原として使用する。すなわち、ヒトCD40をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞の表面上のCD40安定発現を作製する、または培養上清中から目的のCD40タンパク質を公知の方法で精製する。

[0040] 次に、この精製CD40タンパク質やCD40安定発現細胞を感作抗原として用いる。あるいは、CD40の部分ペプチドを感作抗原として使用することもできる。この際、部分ペプチドはヒトCD40のアミノ酸配列にしたがって化学合成により得ることも可能である。

[0041] 感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。

[0042] 感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例え

ば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

[0043] このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

[0044] 前記免疫細胞と融合すべき親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (Kearney et al., J Immunol 1979; 123:1548-1550)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C Eur J Immunol 1976; 6:511-519)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature 1978; 276:269-270) 等が好適に使用される。

[0045] 前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol 1981;73: 3-46) 等に準じて行うことができる。

[0046] より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

[0047] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FBS) 等の血清補液を併用することもできる。

[0048] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液（例えば平均分子量1000-6000程度）を通常30-60%（w/v）の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

[0049] このようにして得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングを行う。

[0050] スクリーニングは、感作抗原として用いたCD40安定発現細胞やCD40の発現を特徴付けるがん細胞を用いたFACS解析により、CD40に反応する抗体を選抜することができる。また精製CD40タンパク質を用いたELISAによっても、CD40に反応する抗体を選抜することができる。本発明における抗体の好ましい態様として治療に用いる抗体の選抜として有望な方法は、CD40の発現を特徴付けるがん細胞を用いたFACS解析である。

[0051] このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

[0052] 当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法に従って培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

[0053] 4. ヒト以外の動物種に由来する抗原との交差反応試験

本発明において、好ましい態様としてカニクイザルCD40と交差反応する抗体を挙げることができる。抗体がヒト以外の動物種の抗原との交差反応の解析は当業者に公知の方法により行うことが可能であり、ウェスタンブロッティング法や部分長の抗原発現細胞によるFACSなどにより行うことが可能である。具体的には、カニクイザルCD40またはマウスCD40を発現する細胞を用いてFACS解析により判別することが可能である。

[0054] 5. CD40エピトープマッピング

本発明における好ましい態様として次の2つのCD40エピトープ：

1) 21-37番目のCD40アミノ酸残基

2) 38-61番目のCD40アミノ酸残基

と反応する抗体を挙げることができる。

抗体が認識するエピトープの解析は当業者に公知の方法により行うことが可能であり、ウェスタンブロッティング法や部分長の抗原発現細胞によるFACSなどにより行うことが可能である。具体的に、実施例記載のN末端側のアミノ酸残基を除いた6種の部分長CD40を発現させた細胞を用いたFACSにより解析することが可能である。

[0055] 上記の領域をエピトープとして認識する抗体は、当業者に公知の方法により得ることが可能であり、例えば、ヒトCD40のアミノ酸配列を基に目的の領域のアミノ酸配列を含むペプチドを作製し、該ペプチドを免疫原として抗体を作製することにより、または、通常の方法で抗体を作製した後、得られた抗体が認識するエピトープを決定し、目的のエピトープを認識する抗体を選択することにより得ることが可能である。

[0056] 6. 増殖アッセイ

本発明における好ましい態様として、CD40を発現する細胞に刺激を与える、つまりCD40を発現する腫瘍細胞に対して増殖を抑制する抗体を挙げることができる。増殖アッセイの測定は当業者に公知の方法により行うことが可能であり、H3-チミジンの取り込み法やテトラゾリウム塩であるWST-8を用いた発色法などにより行うことが可能である。具体的に、B細胞または腫瘍細胞な

どの細胞表面上に発現するCD40に作用し、CD40発現細胞の増殖に与える影響（抑制または促進）もしくは影響を与えない抗体を選別する。

[0057] 7. 抗ヒトCD40抗体の可変領域のクローニング

本発明におけるヒトCD40に結合する抗体について、可変領域のクローニングは当業者に公知の方法により作成することができる。

[0058] 具体的には、抗ヒトCD40抗体を産生するハイブリドーマから、抗ヒトCD40抗体の可変領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry 1979; 18:5294-5299)、AGPC法 (Chomczynski, P. et al., Anal Biochem 1987; 162:156-159) 等により行ってtotal RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia社) 等を使用して目的のmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia社) を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

[0059] 得られたmRNAから抗体可変領域をコードする遺伝子を増幅させる。抗体可変領域の遺伝子の増幅は、マウスIgGまたはマウス κ 鎖の定常領域配列に相補的なオリゴヌクレオチドを用い、SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社) 等で得られることが知られている。または、得られたmRNAから逆転写酵素 Kit (Invitrogen社) 等を用いてcDNAを合成し、作製したcDNAを鋳型として、degenerate primer等を用いたPCR法により可変領域をコードする遺伝子を増幅することができる。

[0060] 得られたPCR増幅物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認する。

[0061] DNAの塩基配列は公開されているKabat DatabaseやIMGT(ImmunoGeneTics) Database等により、軽鎖可変領域および重鎖可変領域のアミノ酸残基とCDR等を同定することができる。

[0062] 8. 抗CD40抗体のヒト化作製

本発明において抗体の好ましい態様の一つとして、ヒトCD40に結合するマウス抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域にヒト κ 鎖及びヒトIgG1の定常領域を連結させたキメラ抗体を挙げることができる。さらに好ましい態様として、ヒトCD40に結合するヒト化抗体を挙げることができる。ヒト化抗体は既知の方法を用いて製造することができる。

[0063] ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR) をヒト抗体のCDRへ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (WO 96/02576号)。

[0064] 具体的には、例えばCDRがマウス抗体由来である場合には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (FR) とを連結するように設計したDNA配列を、CDRおよびFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成する、または人工的に軽鎖可変領域および重鎖可変領域の遺伝子をコードするDNAを合成することも可能である。

[0065] CDRと連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するもの等が選択される。必要に応じ、ヒト化抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato K et al., Cancer Res 1993; 53:851-856)。

[0066] ヒト化抗体の定常領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えば重鎖では、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を、軽鎖ではC κ 、C λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体の定常領域を修飾してもよい。ヒト化の際に用いられるヒト抗体は、IgG、IgM、IgA、IgE、IgDなど如何なるアイソタイプのヒト抗体でもよいが、本発明においてはIgGを用いることが好ましく、さらにIgG1又はIgG3が好ましく、特にIgG1が好ましい。IgG1は高い細胞傷害活性を有している点で抗体を抗癌剤として利用

する場合に有効である (Clark MR, Chemical immunology 1997; 65:88-110)。
。

[0067] なお、ヒト化抗体を作製した後に、可変領域や定常領域中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換等してもよい。

[0068] さらに、本発明の抗体は細胞障害活性が増強された抗体でもよい。細胞障害活性が増強された抗体としては、例えば、フコースが欠損した抗体、糖鎖にバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が付加した抗体、Fc領域のアミノ酸を置換することによりFc γ 受容体との結合活性を変化させた抗体などを挙げることができる。これら細胞障害活性が増強された抗体は当業者に公知の方法で作製することができる。

[0069] ヒト化抗体におけるCDRの由来は特に限定されず、どのような動物由来でもよい。例えば、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ラクダ抗体などの配列を用いることが可能であるが、好ましくはマウス抗体のCDR配列である。

[0070] 目的とする抗CD40のヒト化抗体の可変領域をコードするDNAを得たのち、これを、所望のヒト抗体定常領域をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込む。

[0071] 本発明で使用する抗CD40抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

[0072] 抗体遺伝子の発現は、軽鎖または重鎖をコードするポリヌクレオチドを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいは軽鎖および重鎖をコードするポリヌクレオチドを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい (WO 94/11523号)。

[0073] 抗体のヒト化において、通常、由来となった抗体の機能活性 (例えば、細胞の増殖に影響を与えない) を維持したままヒト化を行うことは困難であるが、本発明においては、由来となったマウス抗体と同様に機能活性を有するヒト化抗体の取得に成功した。ヒト化抗体はヒト体内における抗原性が低下

しているため、治療目的などでヒトに投与する場合に有用である。

[0074] 9. 細胞傷害薬をコンジュゲートした抗CD40抗体

本発明の別の実施態様として、抗CD40抗体に細胞傷害薬や薬物などの各種分子と結合させた、コンジュゲート抗体を挙げることができる。

[0075] 本発明で用いられる細胞傷害薬の例としては、デュオカルマイシン、デュオカルマイシンのアナログ及び誘導剤、CC-1065、CBIを主成分とするデュオカルマイシンアナログ、MCBIを主成分とするデュオカルマイシンアナログ、CBIを主成分とするデュオカルマイシンアナログ、ドキソルビシン、ドラスタチン、メイタンシン、メイタンシンアナログ、DM1、DM2、DM3、DM4、DMI、アウリスタチンE、アウリスタチンEB(AEB)、アウリスタチンEFP(AEFP)、モノメチルアウリスタチンE(MMAE)、モノメチルアウリスタチンF(MMAF)、メトトレキサート、メトプテリン、ジクロロメトトレキサート、5-フルオロウラシル、マイトマイシンC、マイトマイシンA、カルミノマイシン、アミノプテリン、ビンクリスチン、タキソール、タキソテールレチノイン酸、酪酸、N8-アセチルスペルミジン並びにカンプトセシン等を挙げることができるが、これだけに限定されるわけではない。

[0076] 本発明における細胞傷害薬をコンジュゲートした抗CD40抗体は、前記の薬剤と抗CD40抗体と結合し、公知の方法により作製できる。抗体と薬剤は、それら自身が有する連結基などを介して直接結合されてもよいし、また、リンカーや他の物質を介して間接的に結合されてもよい。

[0077] 薬剤が直接結合される場合の連結基は、例えばSH基を用いたジスルフィド結合やマレイミドを介する結合が挙げられる。例えば、抗体のFc領域の分子内ジスルフィド結合と、薬剤のジスルフィド結合を還元して、両者をジスルフィド結合にて結合する。また、マレイミドを介する方法もある。また別の方法として、抗体内にシステインを遺伝子工学的に導入する方法もある。

[0078] 抗体と薬剤を、他の物質（リンカー）を介して間接的に結合することも可能である。リンカーには、抗体または薬剤または両方と反応する官能基を1

または2種類以上有することが望ましい。官能基の例としてはアミノ基、カルボキシ基、メルカプト基、マレイミド基、ピリジニル基等を挙げることができる。

[0079] リンカーの例としては、スルフォスクシイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート(Sulfo-SMCC)、N-スクシイミジル-4-(マレイミドメチル)シクロヘキサノカルボキシレート(SMCC)、 γ -マレイミド酪酸N-スクシイミジルエステル(GMBS)、 ϵ -マレイミドカプロン酸N-ヒドロキシスクシイミドエステル(EMCS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシイミドエステル(MBS)、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシイミドエステル(AMAS)、N-スクシイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート(SMPB)、およびN-(p-マレイミドフェニル)イソシアネート(PMPI)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(PAB)、N-スクシイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(SPP)及びN-スクシイミジル-(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(SIAB)等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、このリンカーは例えば、バリニン-シトルリン(Val-Cit)、アラニン-フェニルアラニン(Ala-Phe)のようなペプチドリンカーであってもよいし、上記にあげたリンカーをそれぞれ適時組み合わせて使用しても良い。

[0080] 薬剤と抗体との結合方法に関しては、例えば、Cancer Research ;68 (22) 9280(2008)、Nature Biotechnology;26(8) 925(2008)、Bio Conjugate Chemistry;19、1673(2008)、Cancer Research ;68 (15) 6300(2008)、又は特表2008-516896号公報などに記載の方法に準じて行うことができる。

[0081] 10. 放射性同位元素をコンジュゲートした抗CD40抗体

本発明の別の実施態様として、抗CD40抗体に放射性同位元素を標識させたコンジュゲート抗体を挙げることができる。抗腫瘍剤として用いる場合には、細胞傷害性放射性金属元素が好ましい。このような細胞傷害性放射性金属元素としては、例えばイットリウム90 (90Y)、レニウム186 (186Re)、レニウム188 (188Re)、銅67 (67Cu)、鉄59 (

59 Fe)、ストロンチウム89 (89 Sr)、金198 (198 Au)、水銀203 (203 Hg)、鉛212 (212 Pb)、ジスプロシウム165 (165 Dy)、ルテニウム103 (103 Ru)、ビスマス212 (212 Bi)、ビスマス213 (213 Bi)、ホルミウム166 (166 Ho)、サマリウム153 (153 Sm)、ルテチウム177 (177 Lu)などを挙げることができる。これらの放射性金属元素の中でも、90 Y、153 Sm、177 Luが、半減期、放射線エネルギー、容易な標識反応、標識率、錯体の安定性等の点から好ましい。

[0082] これらの放射性金属を抗CD40抗体に結合させるには、該抗体に金属キレート試薬を反応させ、これに放射性金属元素を反応させて錯体とするのが好ましい。このようにして得られたコンジュゲート抗体は、放射性金属元素が金属キレート試薬を介して抗CD40抗体に結合している。

[0083] このような錯体形成に用いられる金属キレート試薬の例としては、例えば(1) 8-ヒドロキシキノリン、8-アセトキシキノリン、8-ヒドロキシキナルジン、キノリン骨格を有するキノロン系化合物であるノルフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシン等のキノリン誘導体；(2) クロラニル酸、アルミノン、チオ尿素、テトラフェニルアルソニウムクロライド等の化合物；(3) エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)およびこれらに類似した骨格を有するジヒドロキシエチルグリシン、エチレンジアミン二酢酸、エチレンジアミンニプロピオン酸塩酸塩、イソチオシアノベンジルEDTA、イソチオシアノベンジルDTPA、メチルイソチオシアノベンジルDTPA、シクロヘキシルイソチオシアノベンジルDTPA、マレイミドプロピルアミドベンジルEDTA、マレイミドデシルアミドベンジルDTPA；(4) 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸(DOTA)、イソチオシアノベンジルDOTA等を挙げることができるが、これだけに限定されるわけではない。

[0084] これらの金属キレート試薬のうち、イソチオシアノベンジルDOTA、メチルイソチオシアノベンジルDTPA、シクロヘキシルイソチオシアノベンジルDTPA

が金属キレートの容易な抗体への導入反応、標識率、錯体の安定性等の点で好ましい。

[0085] 抗CD40抗体への放射性金属元素の結合は、常法に従って行うことができる。例えば抗CD40抗体に金属キレート試薬を反応させ、予め標識前駆体を調製しておき、次いで放射性金属元素を反応させることにより行うことができる。

[0086] 11. 医薬組成物

本発明において、CD40を発現する腫瘍に対する医薬組成物として、前記抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗体結合フラグメントを含有する組成物を挙げることができる。このような医薬組成物は、好ましくは、抗体に加えて、薬学的に許容され得る希釈剤またはキャリアを含んでおり、他の抗体または抗生物質のような他の薬剤との混合物であってもよい。適切なキャリアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、および緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。投与経路は、経口ルート、並びに静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内の注射または配薬を含む非経腸的ルートである。

[0087] この場合、本発明の抗体の有効量と適切な希釈剤及び薬学的に使用し得るキャリアとの組合せとして投与される有効量は、1回につき体重1kgあたり0.1mg～100mgであり、2日から8週間間隔で投与される。

実施例

[0088] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に技術的範囲が限定されるものではない。

[0089] 実施例 1

ヒトCD40のアミノ酸情報 配列番号1 (Genbankアクセッション番号NP_001241、図1) を参照として、全長とアミノ酸残基1-173番目までの可溶性CD40をコードする遺伝子を人工的に合成した。全長CD40に関して、pCXN3ベクターに挿入した。可溶性CD40-Fcを作製するために、マウスIgG2a由来のFc領域の遺伝子が組み込まれたpCXN3ベクターに、アミノ酸残基1-173番目のCD40をコー

ドする遺伝子をFc遺伝子の直前に挿入した。全長CD40をコードする遺伝子を挿入したベクターは293T/17(ATCC No.CRL-11268)、BA/F3 (DSMZ No.ACC-300)、またはNIH/3T3 (ATCC No.CRL-1658)細胞に導入し、G418の薬剤存在下で培養することにより、安定発現株を得た。全長CD40発現株は、PE標識抗ヒトCD40抗体 (Santa Cruz社) を用いて、FACS解析により発現を確認した。可溶性CD40-Fcのベクターは293T/17に一過性で導入した。その培養上清をサンプルとしHRP標識マウスFc抗体 (Jackson ImmunoResearch社) を用いて、上清中に可溶性CD40-Fc蛋白質が分泌されていることを確認した。その後、Protein G sepharoseカラム (GE社) に通すことにより精製し、可溶性CD40-Fc蛋白質はPBSに置換した。SDS-PAGEおよび抗ヒトCD40抗体 (BD社) を使ったウェスタンブローディング法により、可溶性CD40-Fcが精製されたことを確認した。

[0090] 実施例 2

マウスへの免疫およびハイブリドーマの選抜を説明する。ヒトCD40とマウスCD40との相同性は図2に示すように高くなく、マウスに免疫することでヒトCD40に対する抗体が得られると考えられる。Balb/cマウスを免疫動物として、6~8週令より免疫を開始した。免疫方法は3つの免疫原 1) 全長CD40の安定発現株である293T/17または2) NIH/3T3、3) 可溶性CD40-Fcを使い分けて実施した。

[0091] 細胞を使った免疫では、初回免疫はアジュバントとして百日咳毒素 100ng/headと共に、全長CD40発現株293T/17またはNIH/3T3を 1×10^7 細胞/headを腹腔内に投与した。2週間後に、アジュバントはない条件下で初回免疫と同じ細胞を 1×10^6 細胞/headで免疫をした。以降1週間間隔で、計4回投与した。可溶性CD40-Fcは初回免疫では、CD40-Fcは50 μ g/headと百日咳毒素100ng/headおよびフロイト完全アジュバントでエマルジョン化したものを腹腔内に投与した。2週間後に、CD40-Fc 25 μ g/headをフロイト不完全アジュバントでエマルジョン化したもので追加免疫した。以降1週間間隔で、計4回投与した。細胞融合を行う3日前に、全長CD40発現株BA/F3を 1.5×10^6 細胞/head、またはPBS中の可溶性CD40-Fc 25 μ g/headで最終免疫を施した。

[0092] 細胞融合は脾臓細胞を摘出し、マウスミエローマP3-X63Ag8U1を混合し、PEG1500（ロッシュ・ダイアグノスティック社）を使用説明書に従って実施した。RPMI1640培地を加えPEG1500を希釈し、遠心操作によりPEG1500を除去した。細胞ペレットを慎重に10%FBS/RPMI1640培地にて懸濁したものを100 μ L/wellで96wellプレートに播種し、一晩培養した。翌日、10%FBS/1x HAT media supplement/1x BM-conditioned H1 Hybridoma cloning supplementを含むRPMI1640培地（HAT培地）を100 μ L/wellで添加した。融合日から2,4日後に培養液の半分を新しいHAT培地に交換し、8日後にその培養上清を用いて、スクリーニングを実施した。

[0093] スクリーニングはCD40安定発現細胞株やCD40抗原の発現を特徴づけるがん細胞IM-9(ATCC No. CCL-159)やRaji(ATCC No. CCL-86)を用いたFACS解析、CD40-Fcを固相したELISAにより多数のハイブリドーマを得た。陽性クローンについては限界希釈法によりモノクローン化した。

[0094] 実施例3

ヒトCD40に対するモノクローナル抗体の調製を説明する。各モノクローナル抗体を得るために、マウス腹水化を実施した。モノクローン化したハイブリドーマを培養した後、遠心して回収した。回収したハイブリドーマはPBSで2回洗浄した。ハイブリドーマ投与1~2週間前にアジュバントしてプリスタンを与え投与したBalb/cマウスに、ハイブリドーマ 1×10^7 個/headを投与して3週間から1.5ヶ月間ほど腹水が十分に溜まった時点で、腹水を回収した。腹水に含まれる抗体は50%硫酸沈殿で沈殿させた。沈殿はPBSに溶解し、Protein G SepharoseカラムにてIgG精製を実施した。抗体は0.1M Glycine-HCl pH2.7で溶出させ、中和BufferでpHを中性化した。その後、PBSに置換してIso Strip マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（ロッシュ・ダイアグノスティック社）を用いてIgGサブクラスを同定した。取得したハイブリドーマクローン25株（PPAT-071-01~25）に関する免疫原と抗体サブクラスを表1に示す。

[0095]

[表1]

抗体	配列番号		免疫原		サブクラス	異種抗原との交差反応	
	軽鎖可変領域	重鎖可変領域	抗原	Boost		カニクイザルCD40	マウスCD40
PPAT-071-01	4	29	CD40/HEK	CD40/BA/F3	IgG2b	○	×
PPAT-071-02	5	30			IgG2a	○	×
PPAT-071-03	6	31			IgG1	○	×
PPAT-071-04	7	32			IgG2a	○	×
PPAT-071-05	8	33	CD40/NIH3T3	可溶性CD40-Fc	IgG2a	○	×
PPAT-071-06	9	34			IgG1	○	×
PPAT-071-07	10	35			IgG1	○	×
PPAT-071-08	11	36			IgG1	○	×
PPAT-071-09	12	37			IgG2a	○	×
PPAT-071-10	13	38			IgG1	○	×
PPAT-071-11	14	39			IgG1	○	×
PPAT-071-12	15	40			IgG1	×	×
PPAT-071-13	16	41			IgG3	○	×
PPAT-071-14	17	42			IgG1	○	×
PPAT-071-15	18	43			IgG1	○	×
PPAT-071-16	19	44			IgG1	○	×
PPAT-071-17	20	45			IgG1	○	×
PPAT-071-18	21	46			IgG1	○	×
PPAT-071-19	22	47			IgG1	○	×
PPAT-071-20	23	48	可溶性CD40-Fc		IgG1	○	×
PPAT-071-21	24	49			IgG1	○	×
PPAT-071-22	25	50			IgG1	○	×
PPAT-071-23	26	51			IgG1	○	×
PPAT-071-24	27	52			IgG1	×	×
PPAT-071-25	28	53			IgG1	○	×

[0096] なお、本実施例を含め以下のいずれの実施例中、並びに実施例における試験結果として示した表または図中においては、各々の本発明のヒト抗ヒトCD40モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンは記号を用いて命名

した。また、当該記号の次に「抗体」を付したものは、それぞれのハイブリドーマにより産生される抗体、または当該ハイブリドーマから単離された抗体遺伝子を保持する宿主細胞により生産された組換え抗体を意味する。また文脈上明らかな範囲において、ハイブリドーマクローンの名称が抗体の名称をあらわす場合がある。

[0097] 実施例 4

カニクイザルCD40とマウスCD40発現細胞での交差性分類を説明する。各種の抗CD40モノクローナル抗体が、異種のCD40に対して交差反応を調べるために、カニクイザルとマウスのCD40を発現する細胞株を作製した。カニクイザルCD40の遺伝子のアミノ酸残基（配列番号2、図3）およびマウスCD40のアミノ酸残基（配列番号3、図2）の情報より、それぞれの遺伝子をコードするDNAを人工的に合成した。これらの遺伝子をpCXN3ベクターに挿入したものをCHO細胞（ATCC No. CCL-61）に導入し、G418の薬剤存在下で培養することにより安定発現株を得た。カニクイザルCD40発現のCHO細胞に対してはカニクイザルCD40と交差反応すると報告されている5D12抗体を、マウスCD40発現のCHO細胞に対しては抗マウスCD40抗体（eBioscience社）を使用して、FACS解析により発現していることを確認した。それぞれのCD40発現CHO細胞を抗体と反応させて、FACS解析により交差反応の有無を調べた。

その結果を表1に示す。すべての抗体はマウスCD40とは交差反応を示さなかった。PPAT-071-12及びPPAT-071-25以外において、カニクイザルCD40とは交差反応を示した。

[0098] 実施例 5

CD40エピトープ発現細胞によるエピトープ分類を説明する。各種の抗CD40モノクローナル抗体がCD40上のどのエピトープを認識するかの調べるために、Ellmarkら（Immunology 2002;106:456-463）が公知したCD40のN末端から短くした6種の部分長CD40(D1, D1B2, D2, D2B1, D3, D4, 図3に示す)にVSV-GタグをC末端付加した遺伝子をコードするDNAを人工的にそれぞれ合成した。これらの遺伝子をpCXN3ベクターに挿入し、293T細胞にそれぞれのベクターを導入し

、一過性で発現させた。6種の部分長CD40の発現は、細胞のライセートをサンプルとした抗VSV-G抗体を用いたウエスタンブロッティング法により確認された。それぞれの部分長CD40発現293T細胞は、抗体濃度1 μ g/mLと反応させてFACS解析をした。図4に示すように、抗体が認識するCD40エピトープを含まない部分長CD40発現細胞には反応しなくなった。各抗体のCD40エピトープのまとめた結果を表2に示す。D1（CD40の21番目のアミノ酸（マチュアなCD40）から発現する293T）にのみ反応したのは、下記の1）から8）に示す抗体であった。

- 1) PPAT-071-01
- 2) PPAT-071-02
- 3) PPAT-071-18
- 4) PPAT-071-20
- 5) PPAT-071-21
- 6) PPAT-071-22
- 7) PPAT-071-23
- 8) PPAT-071-24

D1B2（CD40の38番目のアミノ酸から発現する293T）にまで反応したのは、下記の1）から10）に示す抗体であった。

- 1) PPAT-071-03
- 2) PPAT-071-06
- 3) PPAT-071-07
- 4) PPAT-071-08
- 5) PPAT-071-11
- 6) PPAT-071-14
- 7) PPAT-071-15
- 8) PPAT-071-16
- 9) PPAT-071-17
- 10) PPAT-071-19

[0099] 選抜したハイブリドーマのうち、PPAT-071-06(NITE BP-01436)、PPAT-071-07(NITE BP-01437)、PPAT-071-08(NITE BP-01438)、PPAT-071-11(NITE BP-01716)、PPAT-071-14(NITE BP-01439)、PPAT-071-16(NITE BP-01440)、PPAT-071-17(NITE BP-01441)及びPPAT-071-18(NITE BP-01442)、を独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に寄託した（寄託日：NITE BP-01436～NITE BP-01442は2012年10月18日、NITE BP-01716は2013年10月10日）。

[0100] [表2]

抗体	認識エピトープ	mature CD40				部分長CD40発現細胞でのFACSでの反応性			
		DI 21-277aa	D1B2 38-277aa	D2 62-277aa	D2B1 78-277aa	D3 105-277aa	D4 146-277aa		
PPAT-071-01	21-37	○	×	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-02	21-37	○	×	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-03	38-61	○	○	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-04	105-145	○	○	○	○	○	×	×	×
PPAT-071-05	105-145	○	○	○	○	○	×	×	×
PPAT-071-06	38-61	○	○	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-07	38-61	○	○	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-08	38-61	○	○	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-09	62-77	○	○	○	×	×	×	×	×
PPAT-071-10	62-77	○	○	○	×	×	×	×	×
PPAT-071-11	38-61	○	○	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-12	105-145	○	○	○	○	○	×	×	×
PPAT-071-13	105-145	○	○	○	○	○	×	×	×
PPAT-071-14	38-61	○	○	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-15	38-61	○	○	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-16	38-61	○	○	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-17	38-61	○	○	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-18	21-37	○	×	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-19	38-61	○	○	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-20	21-37	○	×	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-21	21-37	○	×	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-22	21-37	○	×	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-23	21-37	○	×	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-24	21-37	○	×	×	×	×	×	×	×
PPAT-071-25	62-77	○	○	○	×	×	×	×	×

[0101] 実施例6

マウス抗体のヒトCD40発現細胞(Ramos)に対する増殖アッセイを説明する。CD40を発現するB細胞リンパ腫であるRamos細胞(ATCC No. CRL-1596)を用いて、抗体存在下で細胞の増殖に影響を与えるかを調べた。2%FBS/RPMI1640培地中にRamos細胞 2.2×10^6 cells/mLで調製し、24wellsプレートに $900 \mu\text{L}$ (2×10^5 cells)/wellで播種した。このwellに同じ培地で調製した抗体溶液 $10 \mu\text{g/mL}$ を $100 \mu\text{L/well}$ で添加した。その後、増殖アッセイ用に $200 \mu\text{L}$ 分を96well plateへ $100 \mu\text{L/well}$ ($n=2$)で写し、 37°C 5% CO_2 で培養した。抗体のない培地を $10 \mu\text{L/well}$ 添加したRamos細胞だけのwellと培地のみのwellを、コントロールとして施した。3日後、96well plateはcell counting Kit-8 (同仁化学)を用いて増殖アッセイを実施した。Ramosだけの抗体添加のない培養wellを100%の増殖率として、それぞれの抗体添加wellの増殖率を求めた。その結果を図5に示す。増殖率70%以下を示したwell (CD95発現が2倍以上)の抗体について、増殖を抑制させる抗体と見なした。CD40の21-37番目のアミノ酸残基または38-61番目のアミノ酸残基をCD40エピトープとする抗体の多くは、増殖を抑制することが分かった。また刺激性CD40抗体であるG28-5よりも強くRamos細胞の増殖を抑制する抗体が数多く取得できていることが明らかになった。

[0102] 実施例 7

抗ヒトCD40抗体によるRamos移植モデルにおける抗腫瘍効果を説明する。生後6週齢のC. B. 17/Icr-scidJc1マウス(日本クレア)に腫瘍細胞としてRamos細胞をマウス1匹当たり 5×10^6 個を皮下へ注射した。腫瘍形が平均 230mm^3 に達した日に、PPAT-071-06、またはPPAT-071-18を静脈注射した。投与量は抗CD40抗体をマウス1匹当たり 10mg/kg をそれぞれ5個体のマウスに週1回で2回投与した。腫瘍形の大きさの平均値を図6に示す。抗CD40抗体 10mg/kg を投与された群では5匹すべて腫瘍形の大きさが初回抗体投与時よりも縮小しており、PPAT-071-06及びPPAT-071-18において抗腫瘍効果が確認された。

[0103] 実施例 8

抗ヒトCD40 抗体の可変領域のクローニングを説明する。培養した各ハイブリドーマから調製したtotal RNAを鋳型として、のSuperScript III First St

rand Synthesis System (invitrogen社) を用いて添付説明書に従ってcDNAを合成した。重鎖可変領域の増幅は、重鎖シグナル配列をコードする核酸の縮重配列を含むフォワードプライマーと重鎖定常領域特異的なリバースプライマーを用いてExTag polymerase (タカラバイオ) によりcDNAを鋳型としてPCRした。軽鎖可変領域の増幅は、軽鎖シグナル配列をコードする核酸の縮重配列を含むフォワードプライマーと軽鎖定常領域特異的なリバースプライマーを用いてExTag polymeraseによりcDNAを鋳型としてPCRした。増幅したPCR産物をQIAquick Gel Extraction Kit(キアゲン社)を用いて、アガロースゲル電気泳動のシングルバンドから精製した後、pGEM-T easyベクター(プロメガ社)へクローニングして塩基配列の決定を行い、重鎖可変領域と軽鎖可変領域のアミノ酸残基およびCDRを同定した。CD40の21-37番目のアミノ酸残基または38-61番目のアミノ酸残基をCD40エピトープとする抗体の軽鎖および重鎖の各CDR配列を、表3および表4に示す。

[0104] [表3]

抗体	軽鎖 CDR1	軽鎖 CDR2	軽鎖 CDR3
	sequence	sequence	sequence
PPAT-071-01	KASQSVINDVA	YASDRYT	QQDYSSPWT
PPAT-071-02	RASQSISDYLE	YASRSIS	QNGHSSPYT
PPAT-071-03	HASQNINVLN	KASKLHT	QQGQSYPYT
PPAT-071-06	RSSQSLENIINGNTYLN	RVSRRFS	LQVTHVPYT
PPAT-071-07	RSSQSLENSNGNTYLS	RVSNRFS	LQVTHVPYT
PPAT-071-08	RSSQSLENIYGNNTYLN	RVSNRFS	LQVTHVPYT
PPAT-071-11	RSSQNLENSNGNTYLN	RVSRRFS	LQVTHVPYT
PPAT-071-14	RSSQSLENSNGNTYLN	RVSNRFS	LQVTHVPYT
PPAT-071-15	SASSSVDYMF	TTSNLAS	HQRSSYPLT
PPAT-071-16	RSSQSLENSNGNTYLS	RVSNRFS	LQVTHVPYT
PPAT-071-17	RSTQSLENIINGNTYLN	RVSKRLS	LQVTHVPYT
PPAT-071-18	KASQDINTYLS	RVNSLVD	QQYDEFPYT
PPAT-071-19	RASKSVSTSGYSYIH	LASNLGS	QHSRELPWT
PPAT-071-20	SASSSVSYMH	DTSKLAS	QQWRSNPLT
PPAT-071-21	RASESVDSGNSFMH	RASDLES	QQSYEDPYT
PPAT-071-22	RASDSVDSSGNSFMH	RASNLES	QQSYEDPYT
PPAT-071-23	RSSQSLVHSNGNTYLE	KVSNRFS	SQSKHVPWT
PPAT-071-24	RSSQSLVHSNGNTYLE	KVSNRFS	SQSLHVPWT

[0105] [表4]

抗体	重鎖 CDR1	重鎖 CDR2	重鎖 CDR3
	sequence	sequence	sequence
PPAT-071-01	EYTMH	GINNTGGETNYNQKFTG	CDYHRVFYALDY
PPAT-071-02	DYSMH	WINAGTGEATYADDFKG	STGYGYGMEY
PPAT-071-03	DYNID	DINPNNGIP IYNQKFKD	RFAY
PPAT-071-06	NYAMS	SLSSGGYTSYPDSVKG	EFVY
PPAT-071-07	SYAVS	YLSRGGSTIYPDSVKG	EFAY
PPAT-071-08	NYAMS	SLSSGGYTSYPDSVKG	EFVY
PPAT-071-11	DYVVS	SISVGGITSYPDSVKG	EFVY
PPAT-071-14	NYAVS	SISVGGITYYPDSVKG	EFVY
PPAT-071-15	DYYMS	FIRNKANGYTTEYSASVKG	LYYGNHVDYAMDY
PPAT-071-16	NYAVS	YISVGGTTYYPDSVKG	EFVY
PPAT-071-17	SYAVS	YLSRGGSTIYPDSVKG	EFAY
PPAT-071-18	NYMMH	FIYPSIGYIEYNQKFKD	SRTTATSFAY
PPAT-071-19	DYYMS	FIRNKANGYTTEYSASVKG	LYYGNHVDYAMDY
PPAT-071-20	RDYAWN	NIDYSGNTNYPNLSLKS	YFYGRSYFDF
PPAT-071-21	NYLIE	IINPGSGGSNYNEKFKG	RLGNY
PPAT-071-22	NYLIE	IINPGSGGSNYNEKFKG	RLGDY
PPAT-071-23	GYNMN	NINPYNDNTSYNQKFKG	LGLLLYAMDY
PPAT-071-24	GYNMN	NIDPYHGDTTYNQKFKG	LGLLLHAMDY

[0106] 実施例 9

抗CD40ヒト化抗体の作製を説明する。IMGTより公開されているヒト抗体の配列データ入手し、軽鎖可変領域、重鎖可変領域に分けてコンセンサス配列を同定した。その結果の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号54、重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号55に示す。これらのヒト抗体コンセンサス配列のフレームワーク領域のアミノ酸残基を参照として、下記の1) から7) に示す抗体の各CDRを含むアミノ酸残基を移植して、ヒト化抗体を設計した。

- 1) PPAT-071-06
- 2) PPAT-071-07
- 3) PPAT-071-08
- 4) PPAT-071-11
- 5) PPAT-071-14

6) PPAT-071-16

7) PPAT-071-17

また別に公開されているNCBIのProtein BLASTより、PPAT-071-17の軽鎖可変領域、重鎖可変領域に分けてPPAT-071-17抗体のホモロジー検索を行った。その結果、軽鎖可変領域は1UJ3（配列番号56）と、重鎖可変領域は3NFP（配列番号57）と高い相同性を持つことが分かった。これらのヒト抗体のフレームワーク領域のアミノ酸残基を参照として、PPAT-071-17の各CDRを含むアミノ酸残基を移植して、ヒト化抗体を設計した。設計したそれぞれのヒト化抗体について、それぞれの軽鎖可変領域および重鎖可変領域のアミノ酸配列を表5-1及び表5-2に示す。

[0107]

[表5-1]

ヒト化 haPPAT-071-08		アミノ酸配列	
軽鎖 可変領域	配列番号 58	DIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQSLKNTNTYLNW YQKPKGKAPKLLIYRVENLT SGVPSRFSGSGSDFTLTIT SSLQPEDFATYYCLOVTHVP YTFGGGKIKVEIK	
		EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSNYMNSWVRQA PGKGLEWVAISLSSGGITSLA DSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRRAEDTAVYYCARETV YWGQGTLVTVSS	
重鎖 可変領域	配列番号 59		

ヒト化 haPPAT-071-08		アミノ酸配列	
軽鎖 可変領域	配列番号 62	DIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQSLKNTNTYLNW YQKPKGKAPKLLIYRVENLT SGVPSRFSGSGSDFTLTIT SSLQPEDFATYYCLOVTHVP YTFGGGKIKVEIK	
		ヒト化 haPPAT-071-06の 重鎖可変領域と同じ	
重鎖 可変領域	配列番号 59		

ヒト化 haPPAT-071-07		アミノ酸配列	
軽鎖 可変領域	配列番号 60	DIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQSLKNTNTYLNW YQKPKGKAPKLLIYRVENLT SGVPSRFSGSGSDFTLTIT SSLQPEDFATYYCLOVTHVP YTFGGGKIKVEIK	
		EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSNYMNSWVRQA PGKGLEWVAISLSSGGITSLA DSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRRAEDTAVYYCTREFA YWGQGTLVTVSS	
重鎖 可変領域	配列番号 61		

ヒト化 haPPAT-071-11		アミノ酸配列	
軽鎖 可変領域	配列番号 63	DIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQSLKNTNTYLNW YQKPKGKAPKLLIYRVENLT SGVPSRFSGSGSDFTLTIT SSLQPEDFATYYCLOVTHVP YTFGGGKIKVEIK	
		EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSNYMNSWVRQA PGKGLEWVAISLSSGGITSLA DSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRRAEDTAVYYCARETV YWGQGTLVTVSS	
重鎖 可変領域	配列番号 64		

[0108] [表5-2]

ヒト化 haPPAT-071-14	アミノ酸配列	ヒト化 haPPAT-071-16	アミノ酸配列
軽鎖 可変領域 配列番号 65 DIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQSLKNGNTYLNW YQKPGKAPKLLIYKVSALF SGVPSRFSGSGSDTFLTI SSLQPEDFAIYYCLOVTHVP YTFGGGTKVEIK	重鎖 可変領域 配列番号 66 EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSNYAVSWVRQA PGKGLEWVASISVGGITTYA DSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREFV YWGQGTLVTVSS	軽鎖 可変領域 配列番号 60 ヒト化 haPPAT-071-07の 軽鎖可変領域と同じ	重鎖 可変領域 配列番号 67 EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSNYAVSWVRQA PGKGLEWVASISVGGITTYA DSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAREFV YWGQGTLVTVSS
軽鎖 可変領域 配列番号 68 DIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQSLKNGNTYLNW YQKPGKAPKLLIYKVSALL SGVPSRFSGSGSDTFLTI SSLQPEDFAIYYCLOVTHVP YTFGGGTKVEIK	重鎖 可変領域 配列番号 61 ヒト化 haPPAT-071-07の 重鎖可変領域と同じ	軽鎖 可変領域 配列番号 69 DIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQDINTYLSWYQKP EKAPKLLIYKVNSLVDGVPS RFSGSGGQDYSLTISLQF EDFATYYCQDDEFFPTFGG GTKVEIK	重鎖 可変領域 配列番号 70 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFINYNMHWRQA PGQGLEWIGFIYPSIGILTY NQKPKDKAIIADKSTISAY MELSSLRSEDTAVYYCAREH TTATSTAYWGQGLTVTVSS

[0109] 設計したそれぞれのヒト化抗体の軽鎖可変領域と重鎖可変領域の遺伝子をコードするDNAは人工的に合成した。ヒトIgG1由来の定常領域の遺伝子が組み込まれたpCXN3ベクターに重鎖可変領域の遺伝子を、ヒト κ 鎖由来の定常領域の遺伝子が組み込まれたpCXN3ベクターに軽鎖可変領域の遺伝子をそれぞれ挿入した発現ベクターをFreeStyle-293F細胞（in vitrogen社）に導入して、それぞれのヒト化抗体を産生させた。産生したそれぞれのヒト化抗体は、培養上清中に存在しており、Ramos細胞上のCD40と特異的に結合することが確認された。hsPPAT-071-06、hsPPAT-071-07、hsPPAT-071-14、及びhsPPAT-071-18のヒト化抗体をさらに産生させ、Protein Gカラムで精製し、さらに陰イオンカラムまたはゲル濾過カラムにより精製し、PBSに置換した。精製したそれぞれのヒト化抗体は、実施例4,5のように、CD40エピトープや異種動物のCD40の交差性が元のマウス抗体と同じ特性であることが確認された。

[0110] 実施例 1 0

ヒト化抗体での増殖アッセイを説明する。CD40を発現するRamos細胞とCD40を発現していない多発性骨髄腫であるMOLP-8（DSMZ No. ACC-569）を用いて、マウス抗体およびヒト化抗体存在下で細胞の増殖に影響を与えるかを調べた。2%FBS/RPMI1640培地中にRamos細胞とMOLP-8細胞共に 3.3×10^6 cells/mLで調製し、96wellsプレートに90 μ L (3×10^5 cells)/wellで播種した。このwellに、同じ培地で調製した抗体溶液を最終濃度0.01~3.0 μ g/mLになるように10 μ L/wellで添加し、37°C 5%CO₂で培養した。抗体のない培地を10 μ L/well添加した細胞だけのwellと培地だけのwellを、コントロールとして施した。3日後、cell counting Kit-8を用いて増殖アッセイを実施した。細胞だけの抗体添加のないwellを100%の増殖率として、それぞれの抗体添加濃度に対してwellの増殖率を示した結果を図7にまとめた。マウス抗体、ヒト化抗体共に濃度依存性が確認され、ヒト化抗体の増殖率はマウス抗体よりも少し上昇を示す抗体もあったが、抑制することが示された。

[0111] 実施例 1 1

抗CD40ヒト化抗体によるRamos移植モデルにおける抗腫瘍効果を説明する。

生後6週齢のC.B. 17/Icr-scidJc1マウス（日本クレア）に腫瘍細胞としてRamos細胞をマウス1匹当たり 5×10^6 個を皮下へ注射した。腫瘍形が平均 270 mm^3 に達した日に、hsPPAT-071-06、hsPPAT-071-14、またはhsPPAT-071-18のヒト化抗体を静脈注射した。投与量は抗CD40抗体をマウス1匹当たり 10 mg/kg をそれぞれ5個体のマウスに週1回で2回投与した。腫瘍形の大きさの平均値を図8に示す。ヒト化抗CD40抗体 10 mg/kg を投与された群では5匹すべてにおいて、PBS投与群より腫瘍形の肥大度合は遅延しており、ヒト化抗体の抗腫瘍効果があることが確認された。

[0112] 実施例 1 2

細胞傷害薬をコンジュゲートさせた抗体による抗腫瘍効果を説明する。マウス抗体に細胞傷害薬を化学的に架橋させて、細胞に対して抗腫瘍効果があるか調べた。Singhら (Methods Mol Biol 2009;525:445-467) の架橋方法を参考にし、抗CD40モノクローナル抗体は、細胞傷害薬であるメイタンシノイド類(maytansinoids)の一つであるDM1SHを架橋させて、in vitroでのRamos細胞に対する増殖アッセイを行った。Sulfo-SMCC (Sulfo-Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)Cyclohexane-1-Carboxylate、pierce社) と抗体 1 mg/mL をモル比 30:1で室温1時間反応させた。その後、未修飾のsulfo-SMCCを取り除くために簡易脱塩カラム (Thermo社) に通して、MCC架橋の抗体を得た。MCC架橋した抗体は、A280の吸光度と4PSDにより導入マレイミド基の個数を求めた。その後、DM1SHをマレイミド基に対して1.7倍のモル数で室温一晩反応させた。フリーのDM1SHは簡易脱塩カラムに2回通すことによりできるだけ除去した。A254とA223の吸光度測定により、最終物のDM1-MCC-抗体のDM1濃度と抗体濃度を求めた。

[0113] CD40を発現する細胞に対しての細胞傷害性を調べるために、CD40抗原の発現を特徴づけるRamos細胞とRaji細胞、ネガティブコントロールとしてCD40の発現が認められないMOLP-8を標的細胞に選んだ。細胞は10%FBS/RPMI1640培地にて $3.3 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ (Ramos), $5.5 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ (Raji), $11 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ (MOLP-8)を調製し、96well plateに $90 \mu\text{L/well}$ に播種した。培地で調製したDM1-MC

C-抗体を、最終濃度 $0.0001 \sim 3 \mu\text{g/mL}$ になるように $10 \mu\text{L/well}$ で添加して3日間培養した。その後、cell counting Kit-8を用いて増殖アッセイを実施した。細胞だけの抗体添加のないwellを100%の増殖率として、DM1-MCC-抗体濃度 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 時のwellの各細胞の増殖率を表6に示す。なお、この培養条件ではインタクトな抗体は増殖の抑制を示さない。また各細胞のDM1に対する感受性は、ほぼ同等であった（図9）。PPAT-071-06, PPAT-071-07, PPAT-071-18について、添加したDM1-MCC-抗体濃度に対して細胞増殖率を図10～12に示す。増殖にDM1-MCC-抗体溶液にまだ未架橋のDM1SHが含有のためか、MOLP-8での細胞傷害活性が高濃度量で見られるが、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ ではMOLP-8には傷害活性が見られず、CD40を発現するRamosとRajiに対して細胞傷害活性が認められた。すなわち、細胞傷害薬をコンジュゲートさせた抗CD40抗体はCD40発現細胞を特異的に殺傷することができることが示された。

[0114]

[表6]

抗体	DM1-MCC-McAb濃度	DM1分子数/抗体	DM1-McAb 0.1ug/mL時の増殖率		
	ug/mL	DAR	標的細胞		
			Ramos	Raji	MOLP-8
PPAT-071-01	127	3.8	99%	86%	108%
PPAT-071-02	508	3.1	103%	82%	107%
PPAT-071-03	536	2.2	101%	81%	112%
PPAT-071-04	502	3.2	98%	94%	105%
PPAT-071-05	359	2.6	100%	94%	104%
PPAT-071-06	224	5.3	2%	14%	105%
PPAT-071-07	574	3.0	24%	20%	104%
PPAT-071-08	113	4.0	12%	16%	102%
PPAT-071-09	305	3.2	101%	86%	97%
PPAT-071-10	509	3.7	103%	85%	95%
PPAT-071-11	650	4.5	14%	17%	98%
PPAT-071-12	151	4.7	101%	102%	93%
PPAT-071-13	118	6.9	103%	93%	94%
PPAT-071-14	456	4.9	0%	15%	96%
PPAT-071-15	389	2.8	98%	44%	98%
PPAT-071-16	439	7.4	0%	13%	94%
PPAT-071-17	575	3.5	1%	15%	100%
PPAT-071-18	591	4.5	1%	15%	103%
PPAT-071-19	421	3.0	92%	38%	102%
PPAT-071-20	370	3.0	98%	99%	101%
PPAT-071-21	705	3.5	102%	77%	99%
PPAT-071-22	793	3.2	108%	86%	99%
PPAT-071-23	292	4.1	96%	98%	102%
PPAT-071-24	181	3.1	102%	90%	99%
PPAT-071-25	402	3.5	106%	84%	105%

産業上の利用可能性

[0115] 本発明の抗体は、抗腫瘍剤として利用することができる。

請求の範囲

[請求項1] ヒトCD40抗原発現細胞に対してエフェクター細胞非存在下で増殖抑制活性を有する抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントであって、

a) ヒトCD40アミノ酸配列（配列番号1）のアミノ酸残基21-37番目を含むエピトープ又はb) ヒトCD40アミノ酸配列（配列番号1）のアミノ酸残基38-61番目を含むエピトープに特異的に結合する抗ヒトCD40モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

[請求項2] 軽鎖可変領域および重鎖可変領域が下記の1) から16) のいずれかに示されるアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入され、同一性のレベルが少なくとも90%以上であるアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

- 1) 配列番号5及び配列番号30、
- 2) 配列番号6及び配列番号31、
- 3) 配列番号9及び配列番号34、
- 4) 配列番号10及び配列番号35、
- 5) 配列番号11及び配列番号36、
- 6) 配列番号14及び配列番号39、
- 7) 配列番号17及び配列番号42、
- 8) 配列番号18及び配列番号43、
- 9) 配列番号19及び配列番号44、
- 10) 配列番号20及び配列番号45、
- 11) 配列番号21及び配列番号46、
- 12) 配列番号22及び配列番号47、
- 13) 配列番号24及び配列番号49、
- 14) 配列番号25及び配列番号50、
- 15) 配列番号26及び配列番号51、及び

16) 配列番号27及び配列番号52

[請求項3]

軽鎖可変領域及び重鎖可変領域がそれぞれ下記のいずれかに示されるアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加若しくは挿入され、同一性のレベルが少なくとも90%以上であるアミノ酸配列を有する、請求項1又は2に記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

- 1) 配列番号9及び34、
- 2) 配列番号10及び35、
- 3) 配列番号11及び36、
- 4) 配列番号14及び39、
- 5) 配列番号17及び42、
- 6) 配列番号19及び44、
- 7) 配列番号20及び45、又は
- 8) 配列番号21及び46

[請求項4]

受託番号NITE BP-01436、NITE BP-01437、NITE BP-01438、NITE BP-01716、NITE BP-01439、NITE BP-01440、NITE BP-01441、及びNITE BP-01442としてNITEに寄託されたハイブリドーマ細胞株PPAT-071-06、PPAT-071-07、PPAT-071-08、PPAT-071-11、PPAT-071-14、PPAT-071-16、PPAT-071-17、及びPPAT-071-18のいずれかから得られるモノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントである請求項1～3のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

[請求項5]

マウス由来である請求項1～4のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

[請求項6]

ヒト化抗体である請求項1に記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

[請求項7]

請求項1～5のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体の相補性決定領域CDRを含むアミノ酸配列とヒトイムノグロブリンのア

ミノ酸配列を用いてヒト化された抗体である請求項6に記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

[請求項8] 軽鎖可変領域及び重鎖可変領域がそれぞれ下記のいずれかに示されるアミノ酸配列、又は当該アミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入され、同一性のレベルが少なくとも90%以上であるアミノ酸配列を有する請求項6又は7に記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

- 1) 配列番号58及び59、
- 2) 配列番号60及び61、
- 3) 配列番号62及び59、
- 4) 配列番号63及び64、
- 5) 配列番号65及び66、
- 6) 配列番号60及び67、
- 7) 配列番号68及び61、又は
- 8) 配列番号69及び70

[請求項9] 細胞傷害薬または薬物を結合させた請求項1～8のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

[請求項10] 放射性同位元素を標識させた請求項1～8のいずれかに記載の抗ヒトCD4モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメント。

[請求項11] 請求項1～10のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを含有する医薬組成物。

[請求項12] 請求項1～10のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを有効成分として含むヒトCD40抗原を発現する腫瘍に対する抗腫瘍剤。

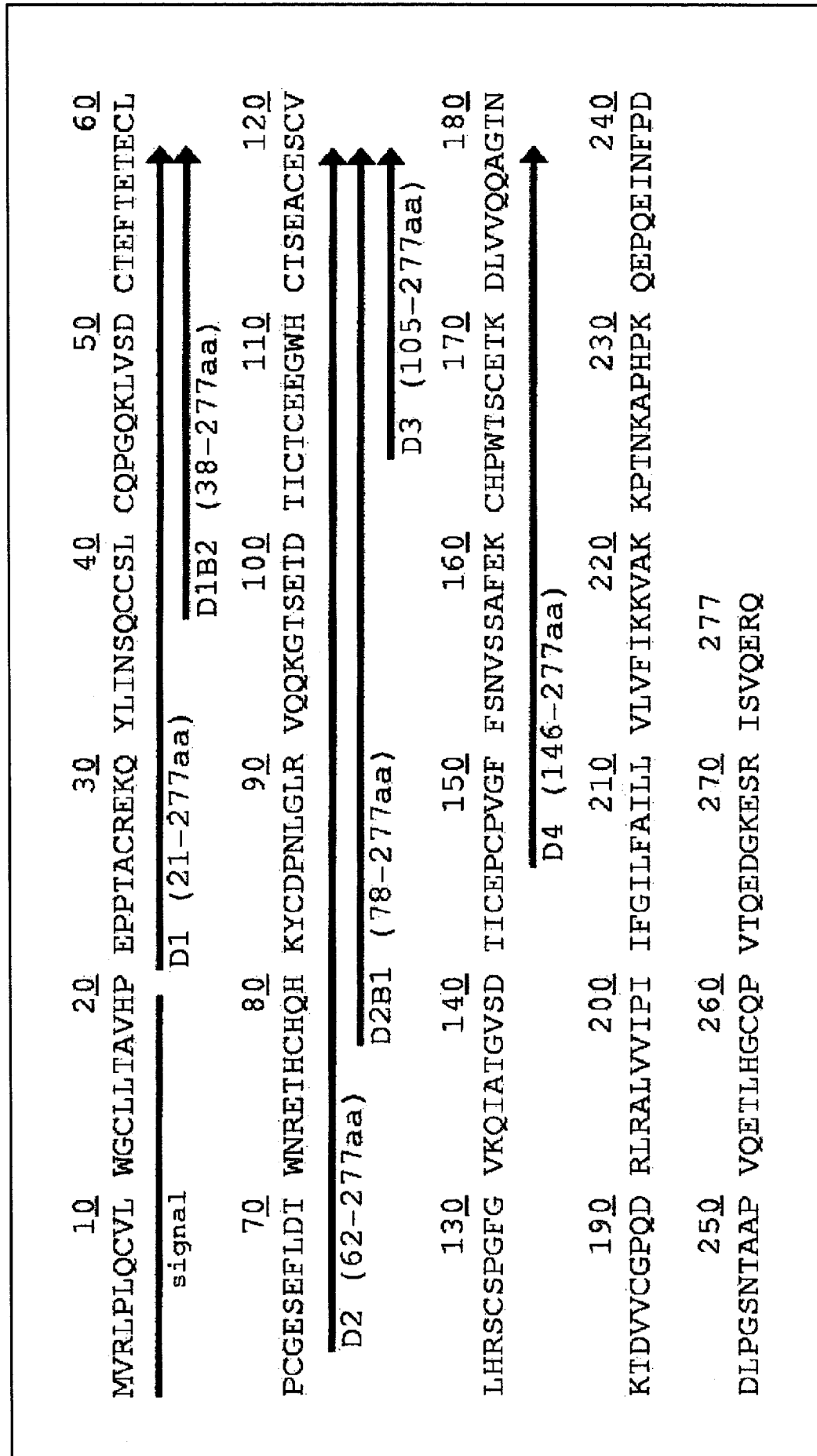
[請求項13] 請求項1～4のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

[請求項14] ヒトCD40抗原を発現する腫瘍を治療するための、請求項1～10のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フ

ラグメント。

- [請求項15] ヒトCD40抗原を発現する腫瘍の治療薬製造のための、請求項1～10のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントの使用。
- [請求項16] 請求項1～10のいずれかに記載の抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントを、必要な患者に投与することを特徴とする、ヒトCD40抗原を発現する腫瘍の治療方法。

[図1]



```

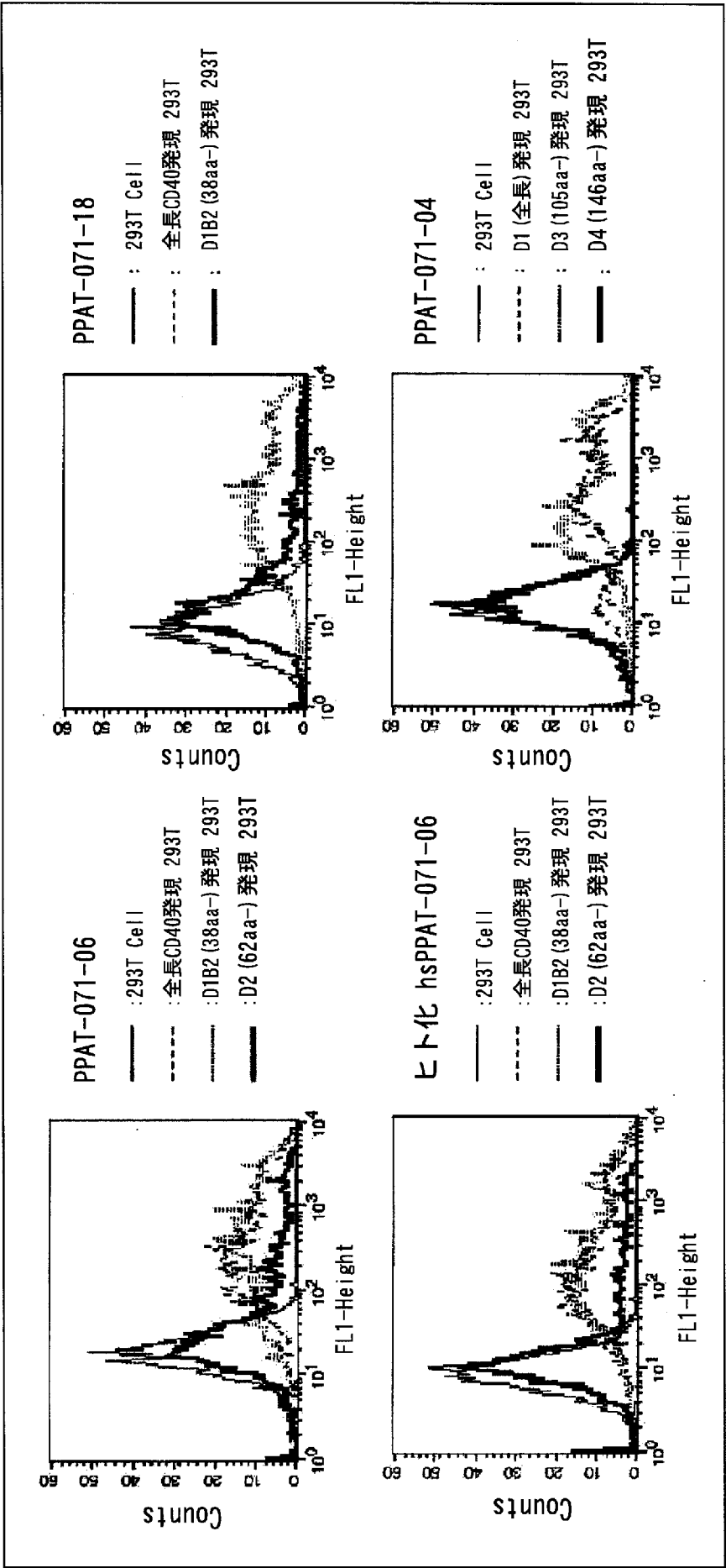
human CD40      MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLYNSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECL 60
mouse CD40      MVS LPR L CALWGCLLTAVHLGQCVCSDKQY LHDGQCCLDLCQPGSRLTSHCTALEKTOCH 60
** ** *.***** .: * :***** :.***.*****.:**.*.*** : :*:**
human CD40      PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDICTCEEGWHTSEACESCV 120
mouse CD40      PCDSGEESAQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGTAESDVTCTCKEGQHCTSKDCEACA 120
**..** *** :****:****:****:****:****:****:****:****:****:****:
human CD40      LHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQOAGTN 180
mouse CD40      QHTPCIPGFGVMEMATEITDITVCHPCPVGFFSNQSSLFCKCYPWTSCEDKNLEVLQKGTIS 180
*.*.***** :*:***.:***:*.***** ** * * * * * * * * * * * * * * *
human CD40      KTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFALLVLVFIKKVAKKPTNKAPH-----KQEPQEI 236
mouse CD40      QTNVICGLKSRMRALLVIPVVMGILITIFGVFLYIKVVKKKPKDNEILPPAARQDPQEM 240
*:*** :*:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
human CD40      NEPDDLPGSNTAAPVQETLHGCPVTQEDGKESRISVQERQ----- 277
mouse CD40      ---EDYPGHNTAAPVQETLHGCPVTQEDGKESRISVQERQVTD SIALRPLV 289
*:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:

```

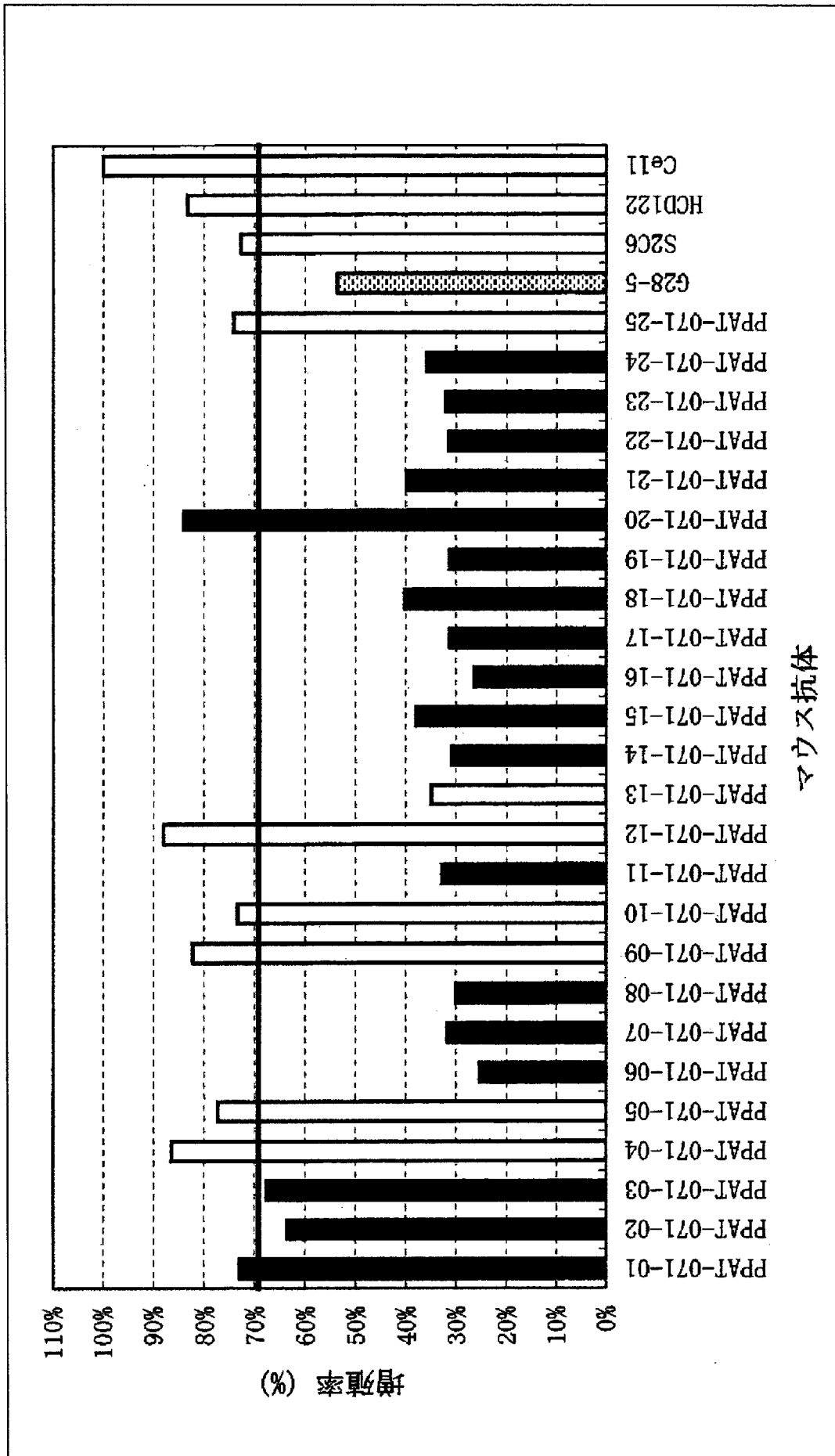
[3]

human CD40	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTETETEC	60
cynomolgus CD40	MVRLPLQCVLWGCLLTAVYPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTETETEC	60
	*****;*****	
human CD40	PCGESEFLDTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEHGHCTSEACESCV	120
cynomolgus CD40	PCGESEFLDTWNRETRCHQHXYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEHGHCTSEACESCV	120
	.****;*****;*****	
human CD40	LHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFKCHPWTSCETKDLVVQQAGTN	180
cynomolgus CD40	PHRSCLPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFKCHPWTSCETKDLVVQQAGTN	180
	**** *****;*****	
human CD40	KTDVVCGPQDRRLRALVVIPIIFGILFALL-VLVFIKKVAKKPTNKAPHKQEPQEI	239
cynomolgus CD40	KTDVVCGPQDRQRALVVIPIICLGILFVILLVLVFIKKVAKKPNDKVPHPKQEPQEI	240
	***** *****;*****;*****	
human CD40	DDLPGSNTAAPVQETLHGCPVTQEDGKESRISVQERQ	277
cynomolgus CD40	DDLPGSNPAAPVQETLHGCPVTQEDGKESRISVQERQ	278
	*****.*****	

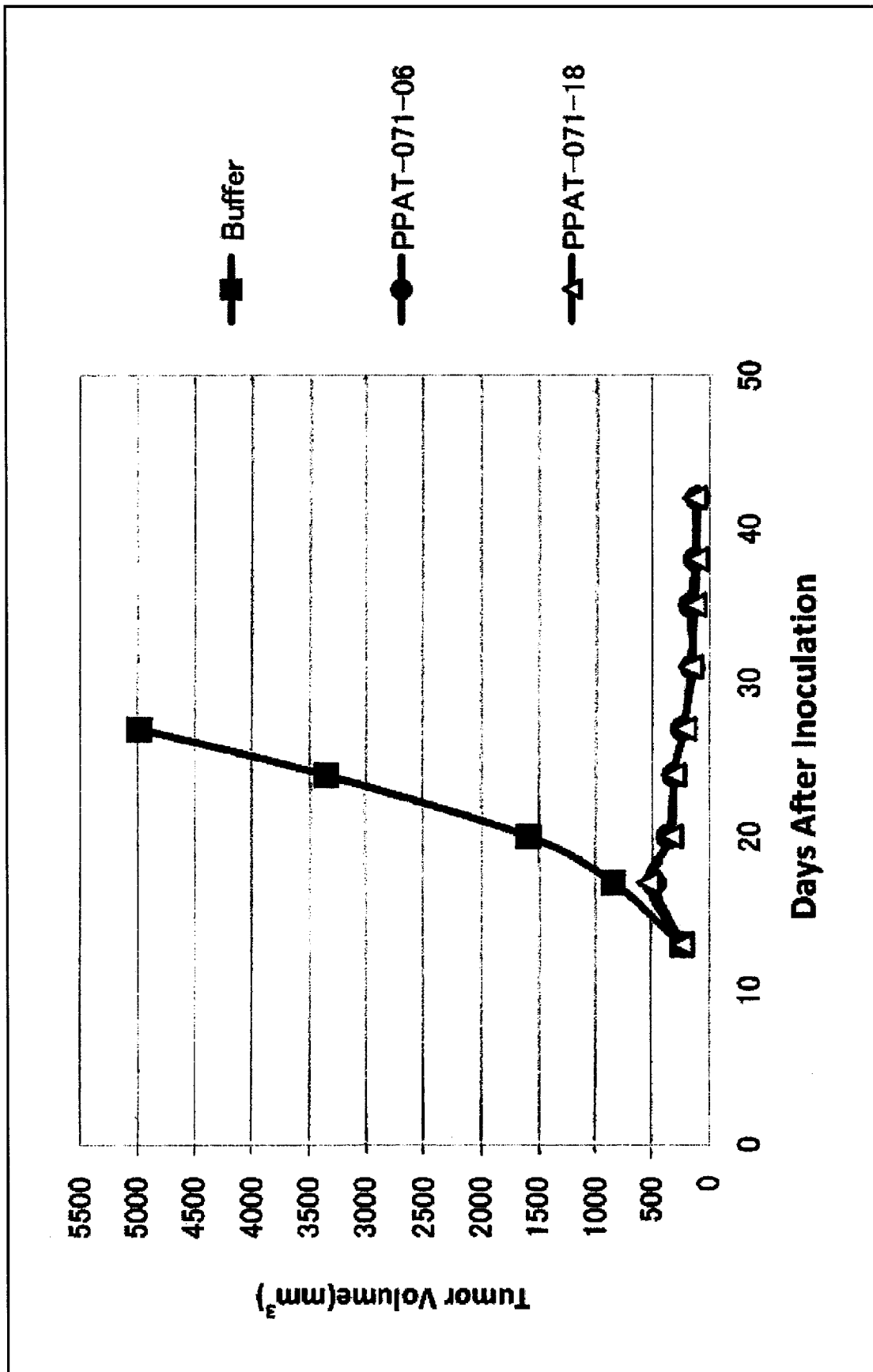
[図4]



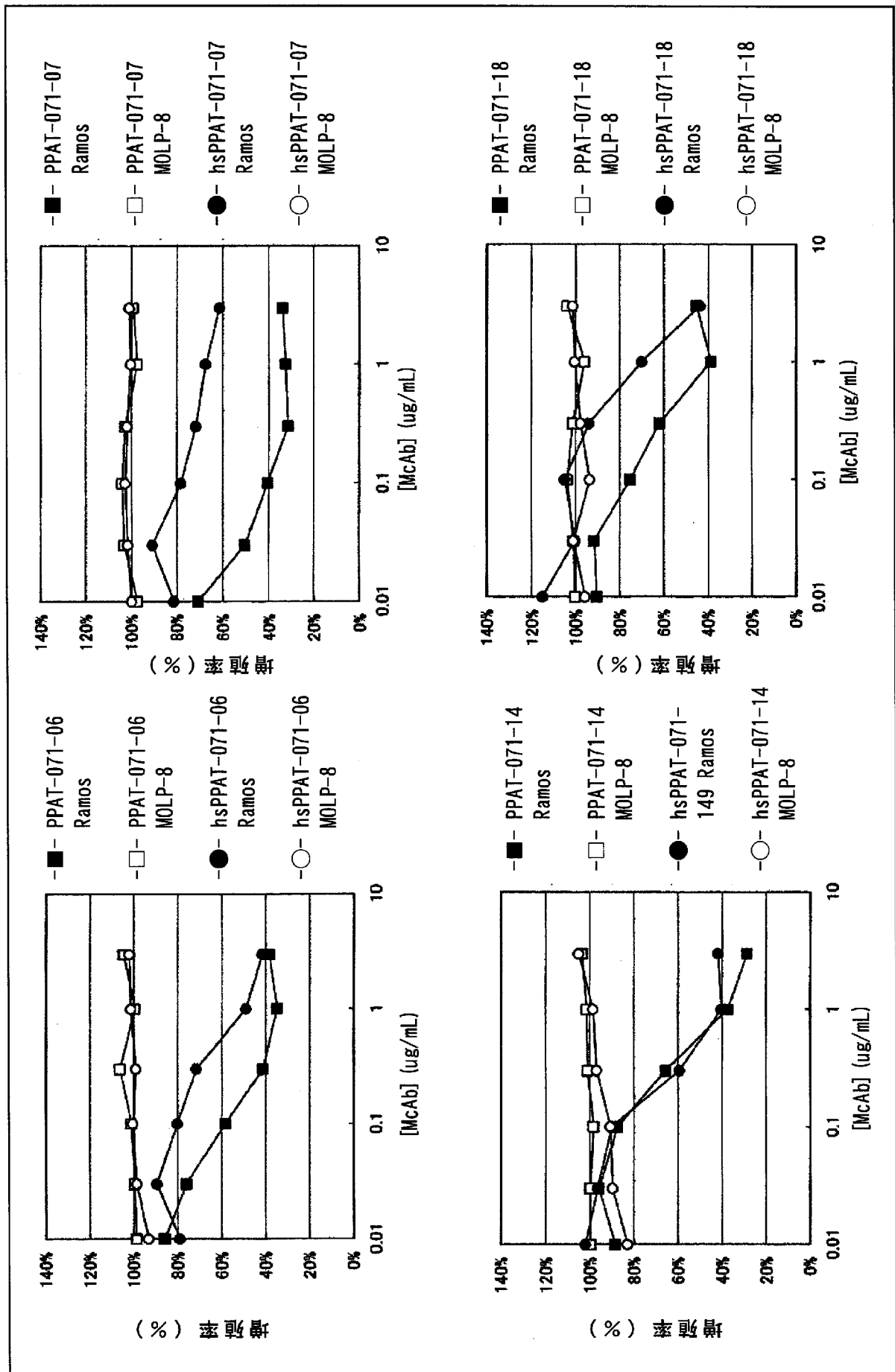
[図5]



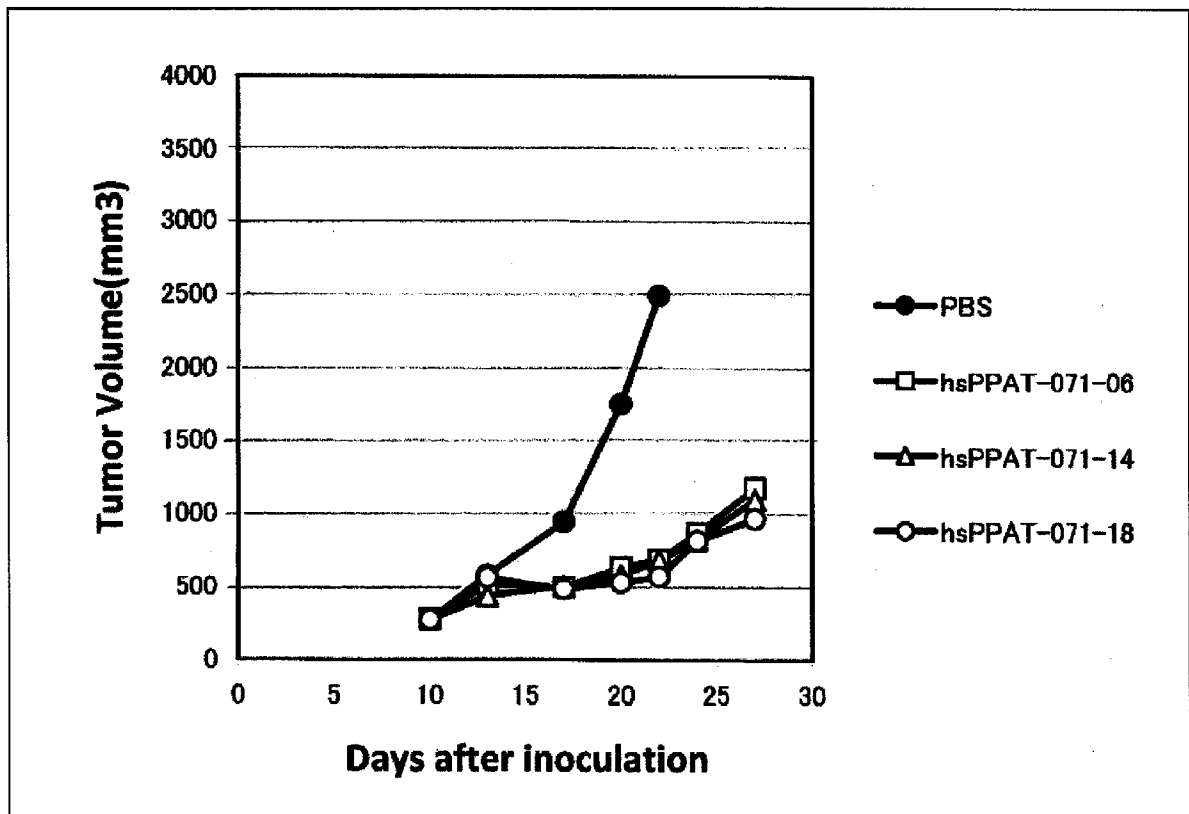
[図6]



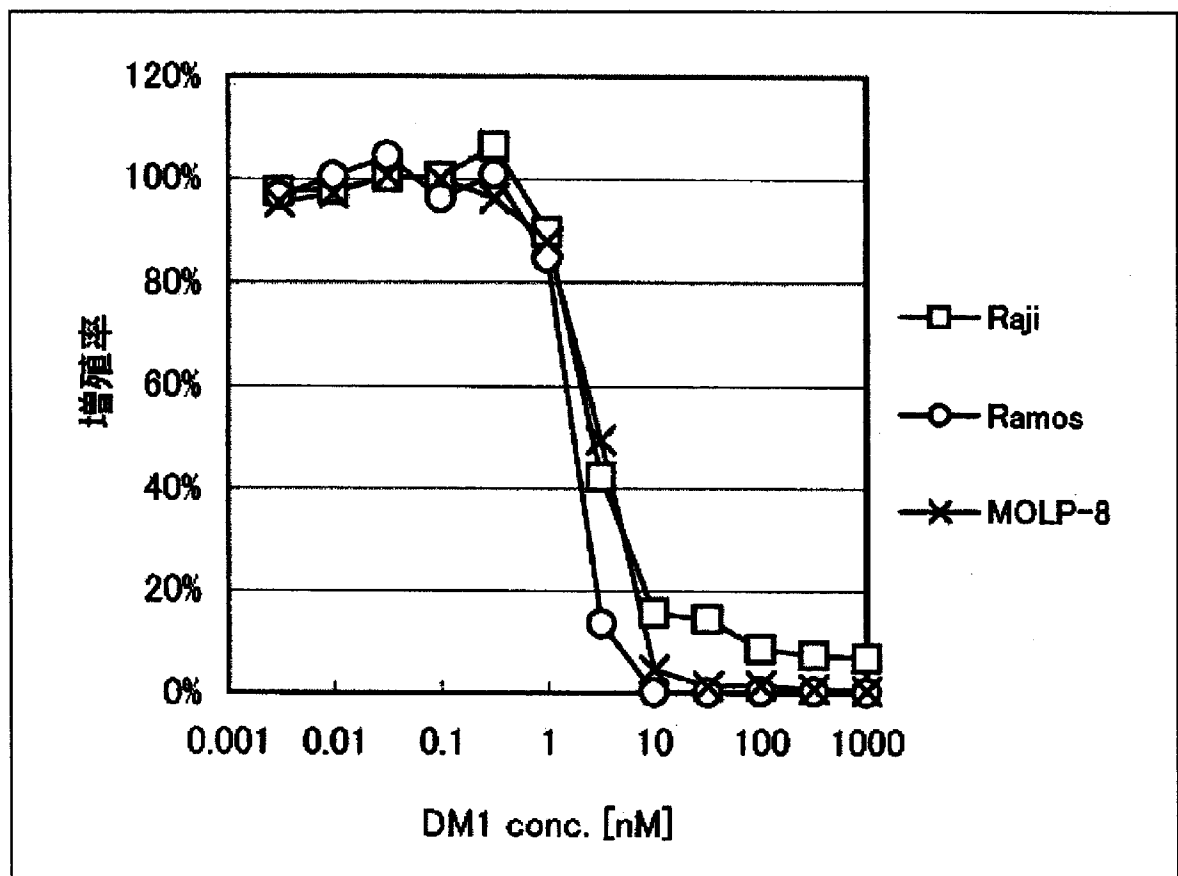
[図7]



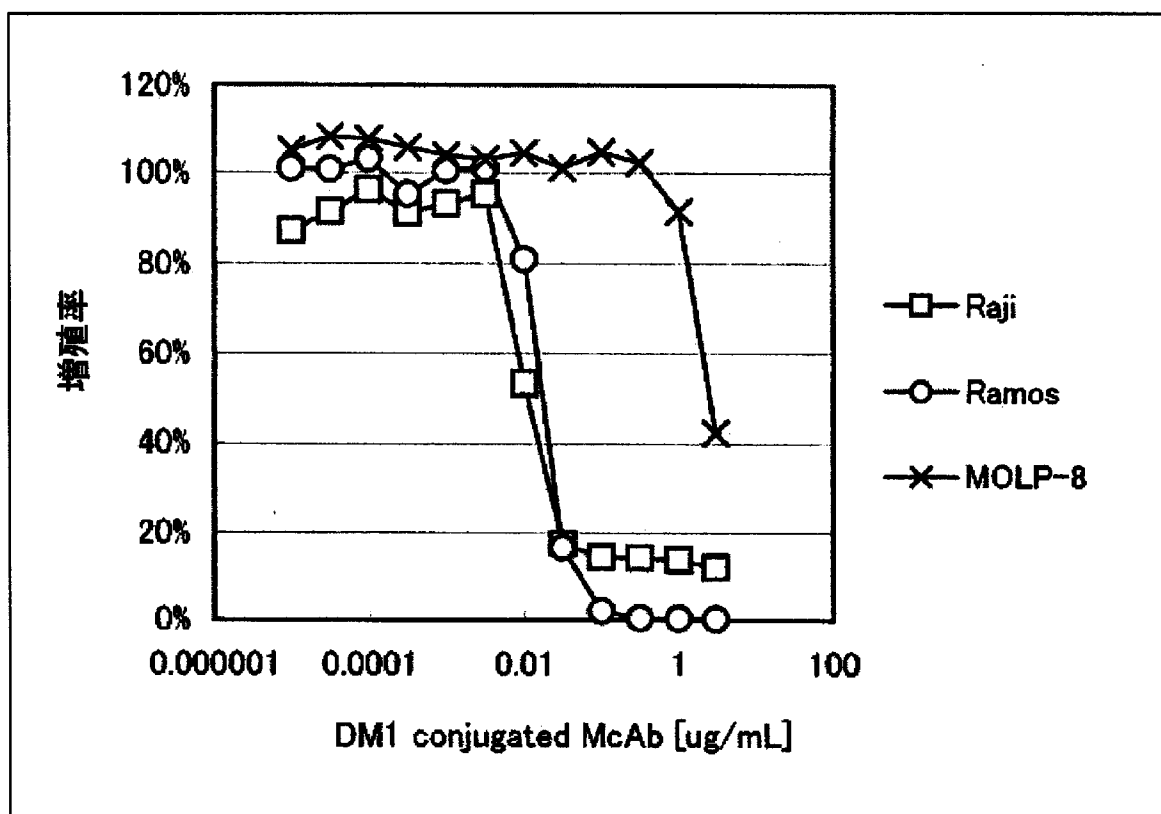
[図8]



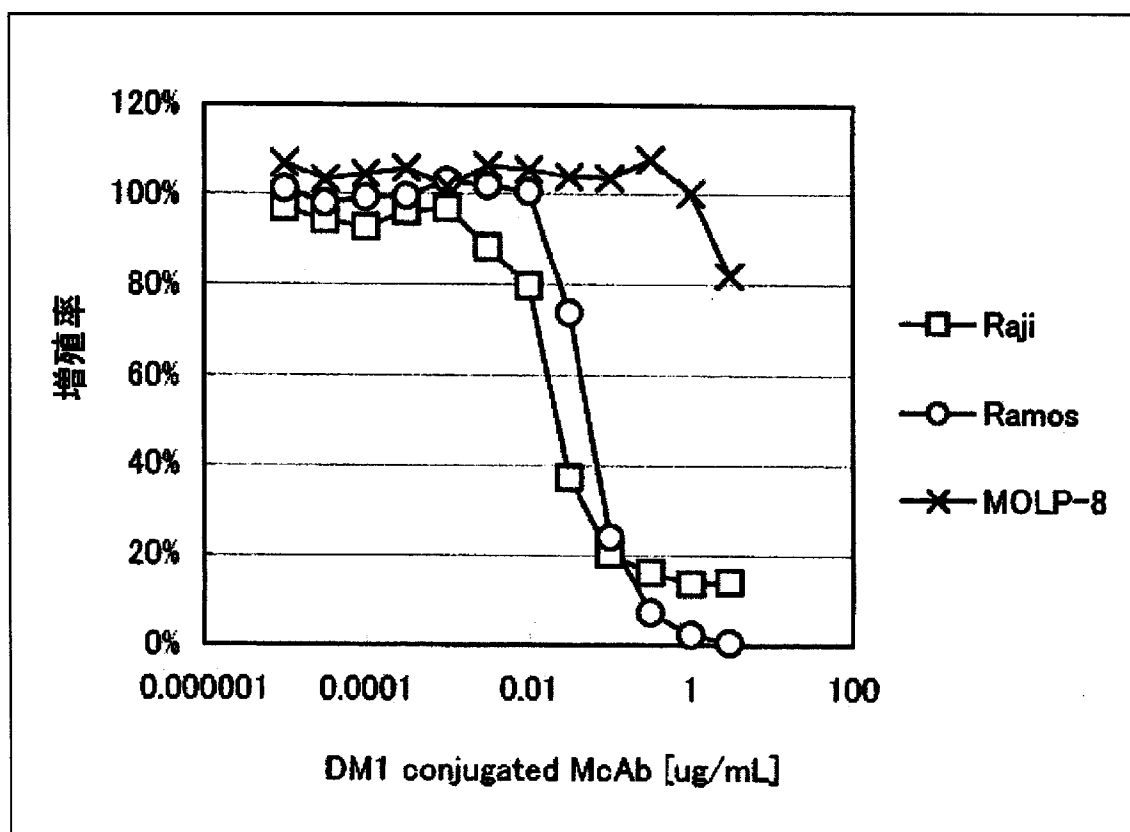
[図9]



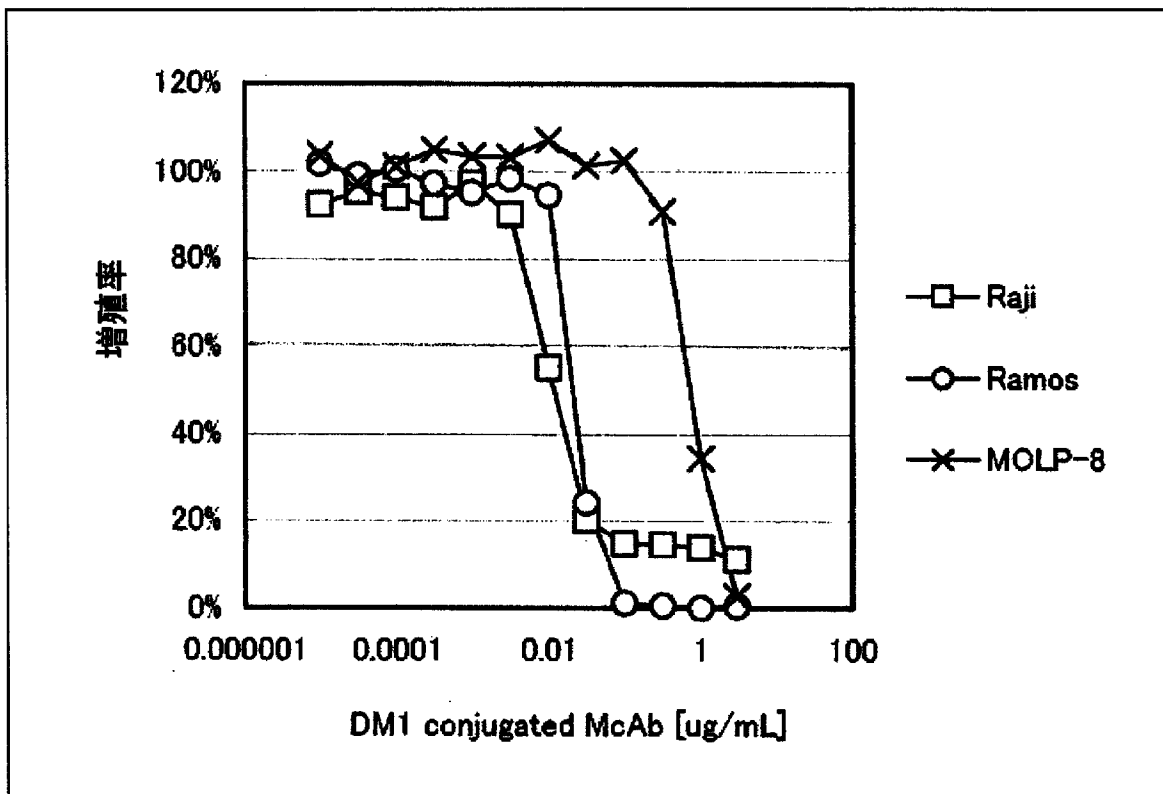
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/078971

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n

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)

C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/46, C12P21/08

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	A.-C. Malmberg Hager et al., Affinity and Epitope Profiling of Mouse Anti-CD40 Monoclonal Antibodies., Scandinavian Journal of Immunology, 2003, 57(6), pp.517-524	1, 5/1-3, 5-15/4
Y/A	S. Funakoshi et al., Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation., Blood, 1994, 83(10), pp.2787-2794	1-3, 5-15/4
Y/A	Joseph A. Francisco et al., Agonistic Properties and in Vivo Antitumor Activity of the Anti-CD40 Antibody SGN-14., Cancer Research, 2000, 60(12), pp.3225-3231	1-3, 5-15/4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent 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

15 January, 2014 (15.01.14)

Date of mailing of the international search report

28 January, 2014 (28.01.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/078971

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Timothy S. Lewis et al., Distinct Apoptotic Signaling Characteristics of the Anti-CD40 Monoclonal Antibody Dacetuzumab and Rituximab Produce Enhanced Antitumor Activity in Non-Hodgkin Lymphoma., Clinical Cancer Research, 2011, 17(14), pp.4672-4681	1-15
A	Joel G. Turner et al., Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells., J. Immunol., 2001, 166(1), pp.89-94	1-15
A	Alison L. Tutt et al., Monoclonal antibody therapy of B cell lymphoma: signaling activity on tumor cells appears more important than recruitment of effectors., J. Immunol., 1998, 161(6), pp.3176-3185	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/078971

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.: 16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 16 pertains to method for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
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 extra 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 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.:

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 SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/078971

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Claim 1 includes two inventions respectively relating to two anti-human CD40 monoclonal antibodies or antigen-binding fragments thereof, each of which is specified by an epitope capable of binding specifically thereto, and these inventions share a common technical feature, i.e., a matter that each of the anti-human CD40 monoclonal antibodies and antigen-binding fragments thereof "exhibits a proliferation-inhibiting activity on a cell capable of expressing a human CD40 antigen in the absence of an effector cell".

However, in light of a fact that an anti-human CD40 monoclonal antibody which "exhibits a proliferation-inhibiting activity on a cell capable of expressing a human CD40 antigen in the absence of an effector cell" is disclosed in a document (Scandinavian Journal of Immunology, 2003, 57(6), pp.517-524) that is known before the priority date of the present application, the above-stated technical feature does not make a contribution over the prior art. Therefore, the technical feature cannot be regarded as a special technical feature.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

Further, as a result of the search which has been carried out with respect to the other invention, it is not substantially possible to carry out a search on the one invention said above without an additional prior-art search and judgment, and there is no other reason for that it can be considered that it is efficient to carry out a search on these inventions altogether.

Accordingly, claims are classified into two inventions each of which has a special technical feature indicated below.

A. Parts of the inventions described in claims 1-16, which relate to an anti-human CD40 monoclonal antibody or an antigen-binding fragment thereof which can bind specifically to "(a) an epitope containing amino acid residues lying between position-21 and position-37 in the amino acid sequence for human CD40 (SEQ ID NO: 1)".

B. Parts of the inventions described in claims 1-16, which relate to an anti-human CD40 monoclonal antibody or an antigen-binding fragment thereof which can bind specifically to "(b) an epitope containing amino acid residues lying between position-38 and position-61 in the amino acid sequence for human CD40 (SEQ ID NO: 1)".

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/46, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y/ A	A.-C. Malmberg Hager et al., Affinity and Epitope Profiling of Mouse Anti-CD40 Monoclonal Antibodies., Scandinavian Journal of Immunology, 2003, 57(6), pp.517-524	1, 5/ 1-3, 5-15/ 4
Y/ A	S. Funakoshi et al., Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation., Blood, 1994, 83(10), pp.2787-2794	1-3, 5-15/ 4

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 5 . 0 1 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 8 . 0 1 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

伊藤 佑一

4 N

3 8 4 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/ A	Joseph A. Francisco et al., Agonistic Properties and in Vivo Antitumor Activity of the Anti-CD40 Antibody SGN-14., Cancer Research, 2000, 60(12), pp.3225-3231	1-3, 5-15/ 4
A	Timothy S. Lewis et al., Distinct Apoptotic Signaling Characteristics of the Anti-CD40 Monoclonal Antibody Dacetuzumab and Rituximab Produce Enhanced Antitumor Activity in Non-Hodgkin Lymphoma., Clinical Cancer Research, 2011, 17(14), pp.4672-4681	1-15
A	Joel G. Turner et al., Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells., J. Immunol., 2001, 166(1), pp.89-94	1-15
A	Alison L. Tutt et al., Monoclonal antibody therapy of B cell lymphoma: signaling activity on tumor cells appears more important than recruitment of effectors., J. Immunol., 1998, 161(6), pp.3176-3185	1-15

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項16は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項1には、抗ヒトCD40モノクローナル抗体又はその抗原結合フラグメントとして、特異的に結合するエピトープにより特定された2種類の発明が包含されており、それら発明は「ヒトCD40抗原発現細胞に対してエフェクター細胞非存在下で増殖抑制活性を有する」という点で共通する技術的特徴を有している。しかしながら、本願優先日前に公知の文献(Scandinavian Journal of Immunology, 2003, 57(6), pp.517-524)において、「ヒトCD40抗原発現細胞に対してエフェクター細胞非存在下で増殖抑制活性を有する」抗ヒトCD40モノクローナル抗体が記載されていることを参酌すると、上記技術的特徴は先行技術に対する貢献をもたらすものではないことから、当該技術的特徴は特別な技術的特徴とは言えない。

また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。さらに、他方の発明について調査した結果、実質的に追加的な先行技術調査や判断を必要とすることなくもう一方の発明について調査を行うことが可能であるわけではなく、それら発明をまとめて調査を行うことが効率的であるといえる他の事情もない。

よって、請求の範囲は、各々下記の特別な技術的特徴を有する2の発明に区分される。

- A. 請求項1-16に係る発明のうち「a) ヒトCD40アミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸残基21-37番目を含むエピトープ」に特異的に結合する部分
- B. 請求項1-16に係る発明のうち「b) ヒトCD40アミノ酸配列(配列番号1)のアミノ酸残基38-61番目を含むエピトープ」に特異的に結合する部分