

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成23年2月10日(2011.2.10)

【公表番号】特表2008-502309(P2008-502309A)

【公表日】平成20年1月31日(2008.1.31)

【年通号数】公開・登録公報2008-004

【出願番号】特願2006-538540(P2006-538540)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 0 7 K	16/28	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)
C 1 2 N	15/02	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/02	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 P	37/02	(2006.01)
A 6 1 P	17/00	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
A 6 1 P	21/04	(2006.01)
G 0 1 N	33/50	(2006.01)
G 0 1 N	33/577	(2006.01)
G 0 1 N	33/15	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 0 7 K	16/28	
C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	15/00	C
C 1 2 N	5/00	B
A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	21/04	
G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/577	B
G 0 1 N	33/15	Z

【誤訳訂正書】

【提出日】平成22年12月13日(2010.12.13)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト C D 4 0 発現細胞の表面上に発現されるヒト C D 4 0 抗原に特異的に結合し得るヒトモノクローナル抗体であって、該モノクローナル抗体は、有意なアゴニスト活性を有さず、これにより、該モノクローナル抗体が該細胞の表面上に発現された該 C D 4 0 抗原に結合した場合、該細胞の増殖または分化が阻害され、ここで該抗体は、

a ) A T C C に特許寄託番号 P T A - 5 5 4 2 として寄託されたハイブリドーマ細胞株から得られるモノクローナル抗体 C H I R - 5 . 9 または A T C C に特許寄託番号 P T A - 5 5 4 3 として寄託されたハイブリドーマ細胞株から得られるモノクローナル抗体 C H I R - 1 2 . 1 2 に結合し得るエピトープに結合するモノクローナル抗体；

b ) 配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に示されるヒト C D 4 0 配列の残基 8 2 ~ 8 7 を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体；

c ) 配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に示されるヒト C D 4 0 配列の残基 8 2 ~ 8 9 を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体；ならびに、

d ) 競合結合アッセイにおいて、A T C C に特許寄託番号 P T A - 5 5 4 2 として寄託されたハイブリドーマ細胞株から得られるモノクローナル抗体 C H I R - 5 . 9 または A T C C に特許寄託番号 P T A - 5 5 4 3 として寄託されたハイブリドーマ細胞株から得られるモノクローナル抗体 C H I R - 1 2 . 1 2 と競合するモノクローナル抗体  
からなる群より選択される、モノクローナル抗体。

【請求項 2】

前記抗体が、A T C C に特許寄託番号 P T A - 5 5 4 2 として寄託されたハイブリドーマ細胞株から得られるモノクローナル抗体 C H I R - 5 . 9 、および、A T C C に特許寄託番号 P T A - 5 5 4 3 として寄託されたハイブリドーマ細胞株から得られるモノクローナル抗体 C H I R - 1 2 . 1 2 からなる群より選択される、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

前記抗体が、以下：

i ) 配列番号 2 の残基 4 4 ~ 5 4 、 7 0 ~ 7 6 および 1 0 9 ~ 1 1 7 を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 4 の残基 5 0 ~ 5 4 、 6 9 ~ 8 4 および 1 1 4 ~ 1 2 1 を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体；

i i ) 配列番号 2 の残基 4 4 ~ 5 4 、 7 0 ~ 7 6 および 1 0 9 ~ 1 1 7 を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 5 の残基 5 0 ~ 5 4 、 6 9 ~ 8 4 および 1 1 4 ~ 1 2 1 を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体；

i i i ) 配列番号 6 の残基 4 4 ~ 5 4 、 7 0 ~ 7 6 および 1 0 9 ~ 1 1 7 を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 7 の残基 5 0 ~ 5 4 、 6 9 ~ 8 4 および 1 1 4 ~ 1 2 1 を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体；ならびに、

i v ) 配列番号 6 の残基 4 4 ~ 5 4 、 7 0 ~ 7 6 および 1 0 9 ~ 1 1 7 を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 8 の残基 5 0 ~ 5 4 、 6 9 ~ 8 4 および 1 1 4 ~ 1 2 1 を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体  
からなる群より選択されかかるモノクローナル抗体であるか、または、

以下：

i ) 配列番号 2 の残基 4 6 ~ 5 2 、 7 0 ~ 7 2 および 1 1 1 ~ 1 1 6 を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 4 の残基 4 5 ~ 5 1 、 7 2 ~ 7 4 および 1 1 5 ~ 1 2 0 を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体；

i i ) 配列番号 2 の残基 4 6 ~ 5 2 、 7 0 ~ 7 2 および 1 1 1 ~ 1 1 6 を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 5 の残基 4 5 ~ 5 1 、 7 2 ~ 7 4 および 1 1 5 ~ 1 2 0 を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体；

i i i ) 配列番号 6 の残基 4 6 ~ 5 2 、 7 0 ~ 7 2 および 1 1 1 ~ 1 1 6 を含む軽鎖可

変ドメインと、配列番号 7 の残基 45～51、72～74 および 115～120 を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体；ならびに、

i v ) 配列番号 6 の残基 46～52、70～72 および 111～116 を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 8 の残基 45～51、72～74 および 115～120 を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体

からなる群より選択されるモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 4】**

前記抗体が、以下：

i ) 配列番号 2 の相補性決定領域 (CDR) の残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 4 の CDR の残基を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体；

i i ) 配列番号 2 の CDR の残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 5 の CDR の残基を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体；

i i i ) 配列番号 6 の CDR の残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 7 の CDR の残基を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体；ならびに、

i v ) 配列番号 6 の CDR の残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 8 の CDR の残基を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体

からなる群より選択されるモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 5】**

前記抗体が、以下：

i ) 配列番号 2 の残基 21～132 および配列番号 4 の残基 20～139；

i i ) 配列番号 2 の残基 21～239 および配列番号 4 の残基 20～469；

i i i ) 配列番号 2 の残基 21～239 および配列番号 5 の残基 20～469；

i v ) 配列番号 2 および配列番号 4；ならびに、

v ) 配列番号 2 および配列番号 5

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 6】**

前記抗体が、以下：

i ) 配列番号 6 の残基 21～132 および配列番号 7 の残基 20～144；

i i ) 配列番号 6 の残基 21～239 および配列番号 7 の残基 20～474；

i i i ) 配列番号 6 の残基 21～239 および配列番号 8 の残基 20～474；

i v ) 配列番号 6 および配列番号 7；ならびに、

v ) 配列番号 6 および配列番号 8

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 7】**

前記モノクローナル抗体が、少なくとも  $10^{-6}$  M の親和性 ( $K_D$ ) で、前記ヒト CDR 0 抗原に結合する、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 8】**

前記モノクローナル抗体が、少なくとも  $10^{-8}$  M の親和性 ( $K_D$ ) で、前記ヒト CDR 0 抗原に結合する、請求項 6 に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 9】**

前記モノクローナル抗体が、モノクローナル抗体の抗原結合フラグメントであり、該フラグメントが、前記ヒト CDR 0 抗原に特異的に結合する能力を保持する、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 10】**

前記フラグメントが、Fab フラグメント、F(ab')<sub>2</sub> フラグメント、Fv フラグメントおよび单鎖 Fv フラグメントからなる群より選択される、請求項 9 に記載の抗原結合

フラグメント。

【請求項 1 1】

前記モノクローナル抗体がCHO細胞株において生産される、請求項1～10のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 1 2】

請求項1～11のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子。

【請求項 1 3】

請求項1～8のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を生産し得るハイブリドーマ細胞株。

【請求項 1 4】

正常ヒトB細胞の増殖または分化を阻害するための医薬の製造における、有効量の請求項1～11のいずれか1項に記載の抗CD40モノクローナル抗体の使用。

【請求項 1 5】

正常ヒトB細胞の増殖または分化を阻害するための、請求項1～11のいずれか1項に記載の抗CD40モノクローナル抗体を含む組成物。

【請求項 1 6】

正常ヒトB細胞の増殖または分化を阻害するためのインビトロでの方法であって、該方法は、

有効量の請求項1～11のいずれか1項に記載の抗CD40モノクローナル抗体に該B細胞を接触させる工程

を包含する、方法。

【請求項 1 7】

正常ヒトB細胞の増殖を阻害するための医薬の製造における、有効量の請求項1～11のいずれか1項に記載の抗CD40モノクローナル抗体の使用であって、該増殖は、該B細胞の表面上に発現されるCD40抗原とのCD40リガンドの相互作用によって増強される、使用。

【請求項 1 8】

正常ヒトB細胞の増殖を阻害するための、請求項1～11のいずれか1項に記載の抗CD40モノクローナル抗体を含む組成物であって、該増殖は、該B細胞の表面上に発現されるCD40抗原とのCD40リガンドの相互作用によって増強される、組成物。

【請求項 1 9】

正常ヒトB細胞の増殖を阻害するためのインビトロでの方法であって、ここで該増殖は、該B細胞の表面上に発現されるCD40抗原とのCD40リガンドの相互作用により増強され、該方法は、

有効量の請求項1～11のいずれか1項に記載の抗CD40モノクローナル抗体に該B細胞を接触させる工程

を包含する、方法。

【請求項 2 0】

ヒト患者においてB細胞による抗体生産を阻害するための医薬の製造における、有効量の請求項1～11のいずれか1項に記載の抗CD40モノクローナル抗体の使用。

【請求項 2 1】

ヒト患者においてB細胞による抗体生産を阻害するための、請求項1～11のいずれか1項に記載の抗CD40モノクローナル抗体またはそのフラグメントを含む組成物。

【請求項 2 2】

B細胞系統の癌細胞の増殖を阻害するための医薬の製造における、有効量の請求項1～11のいずれか1項に記載の抗CD40モノクローナル抗体の使用。

【請求項 2 3】

B細胞系統の癌細胞の増殖を阻害するための、請求項1～11のいずれか1項に記載の抗CD40モノクローナル抗体を含む組成物。

**【請求項 2 4】**

B 細胞系統の癌細胞の増殖を阻害するためのインピトロでの方法であって、該方法は、  
有効量の請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 0 モノクローナル抗体に該癌  
細胞を接触させる工程  
を包含する、方法。

**【請求項 2 5】**

C D 4 0 の発現によって特徴付けられる癌を処置するための医薬の製造における、有効量  
の請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 0 モノクローナル抗体の使用。

**【請求項 2 6】**

C D 4 0 の発現によって特徴付けられる癌を処置するための、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか  
1 項に記載の抗 C D 4 0 モノクローナル抗体を含む組成物。

**【請求項 2 7】**

ヒト C D 4 0 発現細胞において C D 4 0 リガンド媒介性 C D 4 0 シグナル伝達経路を阻害  
するための医薬の製造における、有効量の請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の抗 C D  
4 0 モノクローナル抗体の使用。

**【請求項 2 8】**

ヒト C D 4 0 発現細胞において C D 4 0 リガンド媒介性 C D 4 0 シグナル伝達経路を阻害  
するための、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 0 モノクローナル抗体を含  
む組成物。

**【請求項 2 9】**

ヒト C D 4 0 発現細胞において C D 4 0 リガンド媒介性 C D 4 0 シグナル伝達経路を阻害  
するためのインピトロでの方法であって、該方法は、

有効量の請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 0 モノクローナル抗体に該細  
胞を接触させる工程  
を包含する、方法。

**【請求項 3 0】**

前記ヒト C D 4 0 発現細胞が、正常ヒト B 細胞または悪性ヒト B 細胞であり、そして前記  
C D 4 0 シグナル伝達経路が、B 細胞生存性である、請求項 2 7 に記載の使用、請求項 2  
8 に記載の組成物、または請求項 2 9 に記載の方法。

**【請求項 3 1】**

C D 4 0 発現細胞に対してアンタゴニスト活性を有する抗体を同定するためのインピトロ  
での方法であって、該方法は、

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体との競合結合アッセイを実  
施する工程  
を包含する、方法。

**【請求項 3 2】**

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 0 抗体と薬学的に受容可能なキャリアを  
含む、薬学的組成物。

**【請求項 3 3】**

前記組成物が、該組成物の pH を、pH 5.0 ~ pH 7.0 の範囲に維持するための量の  
緩衝剤を含む、請求項 3 2 に記載の薬学的組成物。

**【請求項 3 4】**

前記組成物が、該組成物を等張付近にするための量の等張化剤をさらに含む、請求項 3 3  
に記載の薬学的組成物。

**【請求項 3 5】**

前記等張化剤が、塩化ナトリウムであり、該塩化ナトリウムは、50 mM ~ 300 mM の  
濃度で前記組成物中に存在する、請求項 3 4 に記載の薬学的組成物。

**【請求項 3 6】**

前記塩化ナトリウムが、150 mM の濃度で前記組成物中に存在する、請求項 3 5 に記載  
の薬学的組成物。

**【請求項 3 7】**

前記緩衝剤が、コハク酸塩、クエン酸塩およびリン酸塩の緩衝剤からなる群より選択される、請求項3 3～3 6のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

**【請求項 3 8】**

前記組成物が、1 m M～5 0 m Mの濃度で前記緩衝剤を含む、請求項3 7に記載の薬学的組成物。

**【請求項 3 9】**

前記緩衝剤が、5 m M～1 5 m Mの濃度のコハク酸ナトリウムまたはクエン酸ナトリウムである、請求項3 8に記載の薬学的組成物。

**【請求項 4 0】**

前記組成物が、0 . 0 0 1 %～1 . 0 %の量で界面活性剤をさらに含む、請求項3 3～3 9のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

**【請求項 4 1】**

前記界面活性剤が、ポリソルベート80であり、該ポリソルベート80は、0 . 0 0 1 %～0 . 5 %の量で前記組成物中に存在する、請求項4 0に記載の薬学的組成物。

**【誤訳訂正 2】**

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】アンタゴニスト抗CD40モノクローナル抗体およびそれらを使用するための方法

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本発明はCD40に結合できるヒト抗体、抗体の使用方法、および、CD40発現細胞上のCD40シグナル伝達の刺激により媒介される疾患の処置方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

(発明の背景)

B細胞は正常なインビボの免疫応答の間に重要な役割を果たす。外来抗原は特定のB細胞上の表面免疫グロブリンに結合し、エンドサイトシス、プロセシング、MHC-クラスI分子上へのプロセシングされたペプチドの提示、およびB細胞表面上のB7抗原のアップレギュレーションを含む事象の連鎖をトリガーする。次に特定のT細胞がMHC-クラスII分子上の提示されたプロセシングされた抗原のT細胞受容体(TCR)認識を介してB細胞に結合する。TCRを介した刺激はT細胞を活性化し、そしてT細胞のサイトカイン生産を開始させる。更にT細胞を活性化させる第2のシグナルはT細胞上のCD28抗原とB細胞上のB7抗原の間の相互作用である。上記したシグナルを受け取ると、静止期のヒトT細胞上には発現されないCD40リガンド(CD40LまたはCD154)がT細胞表面上でアップレギュレートされる。B細胞表面上のCD40抗原へのCD40リガンドの結合はB細胞を刺激し、B細胞を可溶性免疫グロブリンの高水準を分泌するプラズマ細胞へとB細胞を成熟させる。

【0 0 0 3】

CD40は正常および新生物性のヒトB細胞の両方、樹状細胞、抗原提示細胞(APC)、内皮細胞、単球および上皮細胞の表面上に存在する55kDaの細胞表面抗原である。軽度悪性および高度悪性のB細胞リンパ腫、B細胞急性リンパ芽球性白血病、多発性骨髓腫、慢性リンパ性白血病およびホジキン病を有する患者に由来する形質転換細胞はCD40を発現する。CD40発現はまた急性骨髓芽球性白血病症例の三分の二およびエイズ関連リンパ腫の50%において検出される。B細胞系統の数種の腫瘍に由来する悪性B細

胞は高度のCD40を発現し、そして生存および増殖のためにはCD40シグナル伝達に依存していると考えられる。

#### 【0004】

免疫芽球性B細胞リンパ腫は免疫無防備状態の個体、例えば同種移植片のレシピエントおよび他の長期免疫抑制療法を受けているもの、エイズ患者および一次免疫不全症候群、例えばX連鎖リンパ増殖症候群またはWiscott-Aldrich症候群を有する患者において生じる場合が多い(非特許文献1;非特許文献2)。

#### 【0005】

CD40抗原はヒト神経成長因子(NGF)受容体、腫瘍壞死因子-(TNF-)受容体およびFasに関連しており、CD40がB細胞の活性化における重要な機能を有するリガンドに対する受容体であることを示唆している。APC上のCD40の発現はTヘルパーおよび細胞毒性Tリンパ球の両方の活性化において重要な同時刺激性の役割を果たしている。CD40受容体は活性化T細胞、活性化血小板、および、炎症状態の血管平滑筋細胞上に発現される。CD40受容体は好酸球、慢性関節リウマチの滑膜、皮膚線維芽細胞および他の非リンパ様細胞型の上にも検出される。CD40LのCD40受容体への結合はB細胞の増殖および分化、抗体生産、アイソタイプ切り替えおよびB細胞記憶形成を刺激する。

【非特許文献1】Thomasら「Adv. Cancer Res.」1991年, 第57巻: 329

【非特許文献2】Straussら「Ann. Intern. Med.」1993年, 第118巻: 45

#### 【発明の開示】

##### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

##### (発明の要旨)

リンパ腫、自己免疫疾患および移植片拒絶反応を含むCD40発現細胞上のCD40シグナル伝達の刺激により媒介される疾患を処置するための組成物および方法が提供される。組成物はヒトCD40発現細胞の表面上に位置するヒトCD40抗原に結合し得るモノクローナル抗体を包含し、ここで結合は細胞の増殖および分化を防止する。組成物はまたヒトCD40発現細胞の表面上に発現するヒトCD40抗原に特異的に結合し得るモノクローナル抗体を包含し、該モノクローナル抗体は有意なアゴニスト活性を有さず、ここで、該モノクローナル抗体の投与はDaudиヒトB細胞リンパ腫細胞株を用いた段階型(staged)ヌードマウス異種移植片腫瘍モデルにおいてキメラ抗CD20モノクローナル抗体IDEC-C2B8の同じ濃度よりも有意に低値の腫瘍体積をもたらす。組成物はまた、これらのモノクローナル抗体の抗原結合フラグメント、これらの抗体を生産するハイブリドーマ細胞株、および、これらのモノクローナル抗体のアミノ酸配列をコードする単離された核酸分子も包含する。本発明は更に薬学的に許容しうる担体中にこれらの抗CD40抗体を含む薬学的組成物を包含する。

#### 【0007】

CD40シグナル伝達の刺激により媒介される疾患を予防または処置するための方法が提供され、これは、ヒトCD40発現細胞上のCD40抗原と結合した場合に有意なアゴニスト活性を有さない抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントにより患者を処置することを含む。CD40発現細胞の刺激により媒介される疾患には自己免疫疾患、癌および臓器および組織の移植拒絶反応が包含される。本発明の方法により処置または予防できるリンパ腫は非ホジキンリンパ腫(高度悪性リンパ腫(high-grade lymphomas)、中等度悪性リンパ腫(intermediate-grade lymphomas)および軽度悪性リンパ腫(low-grade lymphomas))、ホジキン病、急性リンパ球性白血病、骨髄腫、慢性リンパ性白血病および骨髄芽球性白血病を包含する。

#### 【0008】

本発明の方法を用いた処置で意図される特定の自己免疫疾患は全身性エリテマトーデス(SLE)、慢性関節リウマチ、クローン病、乾癬、自己免疫性血小板減少性紫斑病、多発性硬化症、強直性脊椎炎、重症筋無力症および尋常性天疱瘡を包含する。このような抗体はまた自己免疫応答を抑制することにより臓器および組織の移植片の拒絶反応を防止するため、CD40により与えられる活性化シグナルを悪性Bリンパ球から奪うことによりリンパ腫を処置するため、および、特異的な態様においてCD40担持細胞に毒素を送達するためにも使用できる。

#### 【0009】

ヒトB細胞の成長、分化および/または増殖を抑制するため、および、ヒト患者におけるB細胞による抗体の生産を抑制するための方法、並びに、B細胞系統の癌細胞の成長を抑制するための方法も提供される。CD40発現細胞に対してアンタゴニスト活性を有する抗体を同定するための方法も提供される。

#### 【0010】

本明細書に開示されたモノクローナル抗体はCD40に対して強力な親和性を有し、そして少なくとも $10^{-6}$ M、好ましくは少なくとも $10^{-7}$ M~約 $10^{-8}$ M、より好ましくは少なくとも $10^{-8}$ M~約 $10^{-12}$ Mの解離平衡定数( $K_D$ )を特徴とする。本発明の方法において使用するのに適するモノクローナル抗体およびその抗原結合フラグメントはヒト細胞の表面上に発現されるヒトCD40抗原に特異的に結合できる。それらは有意なアゴニスト活性は有さないが、ヒト細胞上のCD40抗原に結合するとアンタゴニスト活性を示す。1つの実施形態において、抗CD40抗体またはそのフラグメントは正常ヒトB細胞上のCD40抗原に結合した場合にアンタゴニスト活性を示す。別の実施形態においては、抗CD40抗体またはそのフラグメントは悪性ヒトB細胞上のCD40抗原に結合した場合にアンタゴニスト活性を示す。適当なモノクローナル抗体は、ヒト定常領域を有し；好ましくはそれらは全体的または部分的にヒト化されたフレームワーク領域も有し；そして最も好ましくは完全ヒト抗体またはその抗原結合フラグメントである。このようなモノクローナル抗体の例は、CHIR-5.9およびCHIR-12.12と本明細書において命名した抗体；131.2F8.5.9(本明細書においては細胞株5.9と称する)および153.8E2.D10.D6.12.12(本明細書においては細胞株12.12と称する)と命名されるハイブリドーマ細胞株により生産されるモノクローナル抗体；配列番号6に示される配列、配列番号7に示される配列、配列番号8に示される配列、配列番号6および配列番号7に示される両方の配列および配列番号6および配列番号8に示される両方の配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体；配列番号2に示される配列、配列番号4に示される配列、配列番号5に示される配列、配列番号2および配列番号4に示される両方の配列および配列番号2および配列番号5に示される両方の配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体；配列番号1に示される配列、配列番号3に示される配列および配列番号1および配列番号3に示される両方の配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体；およびヒトCD40に特異的に結合する能力を保有しており、そして有意なアゴニスト活性を有さないが、ヒト細胞上のCD40抗原に結合した場合はアンタゴニスト活性を示すこれらのモノクローナル抗体の抗原結合フラグメントである。このようなモノクローナル抗体の例はまたハイブリドーマ細胞株12.12により生産されるモノクローナル抗体に結合し得るエピトープに結合するモノクローナル抗体；配列番号10または配列番号12に示すアミノ酸配列の残基82~87を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体；競合結合アッセイにおいてモノクローナル抗体CHIR-12.12と競合するモノクローナル抗体；およびCHIR-12.12モノクローナル抗体または上記したモノクローナル抗体のいずれかの抗体結合フラグメントであるモノクローナル抗体、ただしフラグメントはヒトCD40抗原に特異的に結合する能力を保有するもの、を包含する。当業者の知る通り、本明細書に開示したアンタゴニスト抗体およびこれらの抗体の抗原結合フラグメントは、当該分野でよく知られ、本明細書において後述する方法を用いて組み換え生産された抗体およびそ

の抗原結合フラグメントを包含し、そして、例えば組み換え生産されたモノクローナル抗体 C H I R - 5 . 9 および C H I R - 1 2 . 1 2 を包含する。

#### 【 0 0 1 1 】

本発明の 1 つの実施形態において、処置方法は適當なアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントを含む薬学的組成物の治療有効用量を患者に投与することを含む。抗 C D 4 0 抗体またはそのフラグメントの治療有効用量は約 0 . 0 1 m g / k g ~ 約 4 0 m g / k g 、約 0 . 0 1 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g 、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g 、約 1 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g 、約 3 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g 、約 3 m g / k g ~ 約 2 5 m g / k g 、約 3 m g / k g ~ 約 2 0 m g / k g 、約 5 m g / k g ~ 約 1 5 m g / k g 、または、約 7 m g / k g ~ 約 1 2 m g / k g の範囲である。処置の方法はアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントの治療有効用量の単回投与または複数回投与を包含することが認識される。

#### 【 0 0 1 2 】

本発明の方法において使用するのに適するものとして本発明において同定されたアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体は修飾してよい。これらのアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体の修飾の例としては、免疫学的に活性なキメラ抗 C D 4 0 抗体、ヒト化抗 C D 4 0 抗体、および、免疫学的に活性なネズミ抗 C D 4 0 抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 発明を実施するための最良の形態 】

#### 【 0 0 1 3 】

( 発明の詳細な説明 )

「腫瘍」とは本明細書においては悪性または良性に関わらず全ての新生物性の細胞の成長および増殖および全ての前癌性および癌性の細胞および組織を指す。

#### 【 0 0 1 4 】

「癌」および「癌性」という用語は、未調節の細胞生育を典型的特徴とする哺乳類における生理学的状態を指すか、これを説明するものである。癌の例はリンパ腫および白血病を包含するが、これに限定されない。

#### 【 0 0 1 5 】

「抗体」および「免疫グロブリン」( I g )は、同一の構造的特徴を有する糖タンパク質である。抗体が抗原に対する結合特異性を示す一方で、免疫グロブリンは抗体および抗原特異性を欠く他の抗体様分子の両方を包含する。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系によって低いレベルで産生され、骨髄腫によって増加したレベルで産生される。

#### 【 0 0 1 6 】

用語「抗体」は、最も広範な意味で使用され、完全に組み立てられた抗体、抗原に結合し得る抗体フラグメント( 例えば、 F a b ' 、 F ' ( a b )<sub>2</sub> 、 F v 、单鎖抗体、二重特異性抗体( d i a b o d y ) ) および上記のものを含む組換えペプチドを包含する。

#### 【 0 0 1 7 】

用語「モノクローナル抗体」とは、本明細書中で使用される場合、実質的に同質の抗体( すなわち、微量に存在し得る可能性のある天然に存在する変異を除いて、集団を構成する個々の抗体が同一である ) の集団から得られる抗体をいう。

#### 【 0 0 1 8 】

「天然の抗体」および「天然の免疫グロブリン」は、通常は、 2 つの同一の軽( L )鎖と 2 つの同一の重( H )鎖とからなる、約 1 5 0 , 0 0 0 ダルトンのヘテロ四量体の糖タンパク質である。各々の軽鎖は、 1 つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結されるが、ジスルフィド連結の数は様々な免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で変わる。各々の重鎖および軽鎖はまた、規則的に間隔の空いた鎖内ジスルフィド架橋を有する。各々の重鎖は、一端に可変ドメイン( V<sub>H</sub> )を有し、次にいくつかの定常ドメインが続く。各々の軽鎖は、一端に可変ドメイン( V<sub>L</sub> )を有し、もう一端に定常ドメインを有する；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一の定常ドメインと整列され、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列される。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメイン

との間で界面を形成すると考えられる。

【0019】

用語「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は分布しない。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）または超可変領域と呼ばれる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（FR）領域と呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、各々、4つのFR領域を含み、これらの領域は、大部分はシート配置をとり、シート構造に結合する（そして、場合によってはシート構造の一部分を形成する）ループを形成する3つのCDRによって結合される。各々の鎖におけるCDRは、FR領域によって近接して一緒に保持され、そして、他の鎖由来のCDRと共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabatら（1991）NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, 647-669頁を参照のこと）。

【0020】

定常ドメインは、抗原に抗体を結合させることに直接的に関連しないが、種々のエフェクター機能（例えば、Fcレセプター（FcR）結合、抗体依存性の細胞の毒性における抗体の関与、オプソニン作用、補体依存性細胞毒性の惹起、および肥満細胞脱顆粒）を示す。

【0021】

用語「超可変領域」は、本明細書中で使用される場合、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」に由来するアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメインにおける残基24～34（L1）、残基50～56（L2）および残基89～97（L3）、ならびに重鎖可変ドメインにおける残基31～35（H1）、残基50～65（H2）および残基95～102（H3）；Kabatら（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest（第5版、Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD））ならびに/あるいは「超可変ループ」に由来するアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメインにおける残基26～32（L1）、残基50～52（L2）および残基91～96（L3）、ならびに重鎖可変ドメインにおける残基26～32（H1）、残基53～55（H2）および残基96～101（H3）；ClothiaおよびLesk（1987）J. Mol. Biol. 196: 901-917）を含む。「フレームワーク」残基または「FR」残基は、超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0022】

「抗体フラグメント」とは未損傷の抗体の部分、好ましくは、未損傷の抗体の抗原結合または可変領域を含む。抗体フラグメントの例は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>およびFvフラグメント；ダイアボディー；直鎖抗体（Zapata et al.（1995）Protein Eng. 8(10): 1057-1062）；単鎖抗体分子；および抗体フラグメントから形成した多重特異性抗体を包含する。抗体のパパイン消化により各々が単一の抗原結合部位を有する「Fab」フラグメントと称される2つの同一の抗原結合フラグメント、および名称が容易に結晶化するその能力を反映している残余の「Fc」フラグメントが生成する。ペプシン処理により2つの抗原複合化部位を有し、なお抗原に交差結合できるF(ab')<sub>2</sub>フラグメントが形成する。

【0023】

「Fv」とは完全な抗原認識結合部位を含有する最小の抗体フラグメントである。2鎖Fv種においては、この領域は、堅固な非共有結合の会合における1重鎖1軽鎖可変ドメインの2量体よりなる。単鎖Fv種においては、1重鎖1軽鎖可変ドメインは可撓性のペプチドリンカーにより共有結合でき、これにより軽鎖および重鎖は2鎖Fv種の場合と同様に「2量体」構造において会合できる。この配置にあるものは、各可変ドメインの3つ

の C D R が相互作用して  $V_H$  -  $V_L$  2 量体の表面上の抗原結合部位を定義する場合である。集合的に 6 つの C D R は抗体に対して抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（または抗原に対して特異的な C D R を僅か 3 つしか含まない F v の半分）であっても、完全な結合部位よりは低い親和性とはいえ、なお抗原を認識して結合する能力を有する。

#### 【 0 0 2 4 】

F a b フラグメントはまた軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第 1 の定常ドメイン（ C H 1 ）も含有する。F a b フラグメントは抗体ヒンジ領域由来のシステイン 1 つ以上を含む重鎖 C H 1 ドメインのカルボキシ末端において数個の残基が付加されていることにより F a b ' フラグメントとは異なる。F a b ' - S H は本明細書においては定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を担持しているような F a b ' に関する表記である。F ( a b ' ) 2 抗体フラグメントは当初は間にヒンジシステインを有する対となった F a b ' フラグメントとして形成された。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも知られている。

#### 【 0 0 2 5 】

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（  $\kappa$  ）およびラムダ（  $\lambda$  ）と呼ばれる）の一方に割り当てられ得る。

#### 【 0 0 2 6 】

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、免疫グロブリンは異なるクラスに割り当てられ得る。ヒト免疫グロブリンの 5 つの主要なクラスが存在する：I g A 、 I g D 、 I g E 、 I g G および I g M 、そしてこれらの中の数種は、さらにサブクラス（アイソタイプ）（例えば、I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4 、 I g A および I g A 2 ）に分けられ得る。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 I g G 1 アイソタイプおよび I g G 3 アイソタイプは、抗体依存性の細胞媒介性細胞毒性（A D C C ）の活性を媒介する。

#### 【 0 0 2 7 】

語「標識」とは、本明細書中で使用される場合、「標識された」抗体を生成するように抗体に直接的または間接的に結合体化される検出可能な化合物または組成物をいう。標識は、それ自体で検出可能である（例えば、放射性同位体標識もしくは蛍光標識）か、または酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物もしくは基質組成物の化学的变化を触媒し得る。検出可能な標識として機能し得る放射性核種としては、例えば、I - 131 、 I - 123 、 I - 125 、 Y - 90 、 R e - 188 、 R e - 186 、 A t - 211 、 C u - 67 、 B i - 212 、および P d - 109 が挙げられる。この標識は、毒素のような検出できない実体であってもよい。

#### 【 0 0 2 8 】

用語「アンタゴニスト」は、最も広い意味で使用され、本明細書中に開示される天然の標的の生物学的活性またはその転写もしくは翻訳を、部分的もしくは完全にブロック、阻害、または中和する任意の分子を包含する。

#### 【 0 0 2 9 】

「キャリア」は、本明細書中で使用される場合、使用される投薬量および濃度でそのキャリアに曝露される細胞または哺乳動物に対して非毒性である、薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤または安定剤を包含する。多くの場合、生理学的に受容可能なキャリアは、p H 緩衝化水溶液である。生理学的に受容可能なキャリアの例としては、緩衝液（例えば、リン酸、クエン酸、コハク酸および他の有機酸）；抗酸化物質（アスコルビン酸が挙げられる）；低分子量（約 10 残基未満）ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジ

ン) ; 单糖類、二糖類および他の炭水化物(グルコース、マンノースまたはデキストリンが挙げられる) ; キレート剤(例えば、EDTA) ; 糖アルコール(例えば、マンニトールまたはソルビトール) ; 塩を形成する対イオン(例えば、ナトリウム) ; ならびに / あるいは非イオン性界面活性剤(例えば、TWEEN、ポリエチレングリコール(PEG)およびPluronics)が挙げられる。1以上のさらなる治療剤と「併用して」投与することは、同時(simultaneous)(同時(concurrent))投与および任意の順序での連続投与を包含する。

#### 【0030】

「宿主細胞」とは、本明細書中で使用される場合、組換えベクターまたは他の転移ポリヌクレオチドのためのレシピエントとして使用され得るかもしくは使用される単細胞性実体として培養された微生物または真核細胞もしくは真核生物細胞株をいい、トランスフェクトされた元の細胞の子孫を包含する。単一の細胞の子孫は、天然の変異、偶発的な変異または意図的な変異に起因して、形態またはゲノムDNA相補体もしくは全DNA相補体において元の親と必ずしも完全に同一でなくてもよいことが理解される。

#### 【0031】

「ヒトエフェクター細胞」は、1以上のFcRを発現し、かつエフェクター機能を果たす白血球である。好ましくは、この細胞は、少なくともFcRIIIを発現し、抗原依存性の細胞媒介性細胞毒性(ADCC)のエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例としては、末梢血单核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、单球、マクロファージ、好酸球および好中球が挙げられ、PBMCおよびNK細胞が好ましい。ADCC活性を有する抗体は、代表的には、IgG1アイソタイプまたはIgG3アイソタイプのものである。IgG1抗体およびIgG3抗体を単離することに加えて、このようなADCCを媒介する抗体は、非ADCC抗体由来の可変領域または可変領域フラグメントをIgG1アイソタイプもしくはIgG3アイソタイプの定常領域に対し操作することによって作製され得ることに注意すること。

#### 【0032】

用語「Fcレセプター」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを説明するために使用される。好ましいFcRは、天然配列のヒトFcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体に結合するもの(レセプター)であり、FcRI、FcRIIおよびFcRIIIサブクラスのレセプター(これらのレセプターの対立遺伝子改変体および代替的スプライシング形態を含む)が挙げられる。FcRIIレセプターとしてはFcRIIA(「活性化レセプター」)およびFcRIIB(「阻害レセプター」)が挙げられ、これらは、その細胞質ドメインが主に異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化レセプターFcRIIAは、その細胞質ドメインに免疫レセプターチロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含む。阻害レセプターFcRIIBは、その細胞質ドメインに免疫レセプターチロシンベース阻害モチーフ(ITIM)を含む(Daeron(1997)Annu. Rev. Immunol. 15:203-234を参照のこと)。FcRは、RavetchおよびKinet(1991)Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991); Capelら(1994)Immunol. Methods 4:25-34; およびde Haasら(1995)J. Lab. Clin. Med. 126:330-341で概説される。他のFcR(将来同定されるものを含む)は、本明細書中の用語「FcR」によって包含される。この用語はまた、新生児レセプターであるFcRnを包含し、これは、母性IgGの胎児への伝達を担う(Guyerら(1976)J. Immunol. 117:587およびKimら(1994)J. Immunol. 152:249(1994))。

#### 【0033】

ヒト抗体を作製するための多くの方法が存在する。例えば、分泌細胞は、エプスタイン-バーウイルス(EBV)による感染によって不死化され得る。しかし、EBVに感染した細胞は、クローニングするのが困難であり、通常は、比較的低い収量の免疫グロブリンしか産生しない(JamesおよびBell(1987)J. Immunol. Meth.

o d s 1 0 0 : 5 - 4 0 )。将来、ヒト B 細胞の不死化は、形質転換遺伝子の規定された組み合わせを導入することによって達成される可能性がある。このような可能性は、S V 4 0 ラージ腫瘍性タンパク質およびH - r a s の発癌性対立遺伝子と一緒にテロメラーゼ触媒サブユニットの発現が、正常なヒト上皮細胞および線維芽細胞の腫瘍変換を生じたという最近の実証によって強調されている ( Hahnら ( 1 9 9 9 ) N a t u r e 4 0 0 : 4 6 4 - 4 6 8 )。現在、免疫の際に、内因性免疫グロブリン産生の非存在下においてヒト抗体のレパートリーを產生し得るトランスジェニック動物 ( 例えは、マウス ) を作製することが可能である ( Jakobovitsら ( 1 9 9 3 ) N a t u r e 3 6 2 : 2 5 5 - 2 5 8 ; Lonberg および Huszar ( 1 9 9 5 ) I n t . R e v . I m m u n o l . 1 3 : 6 5 - 9 3 ; F i s h w i l d ら ( 1 9 9 6 ) N a t . B i o t e c h n o l . 1 4 : 8 4 5 - 8 5 1 ; M e n d e z ら ( 1 9 9 7 ) N a t . G e n e t . 1 5 : 1 4 6 - 1 5 6 ; Green ( 1 9 9 9 ) J . I m m u n o l . M e t h o d s 2 3 1 : 1 1 - 2 3 ; Tomizuka ら ( 2 0 0 0 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 7 : 7 2 2 - 7 2 7 ; Little ら ( 2 0 0 0 ) I m m u n o l . T o d a y 2 1 : 3 6 4 - 3 7 0 に概説される )。例えは、キメラマウスおよび生殖細胞系変異マウスにおける抗体重鎖の連結領域 ( J H ) 遺伝子のホモ接合欠失が内因性抗体產生の完全な阻害を生じることが記載されている ( Jakobovits ら ( 1 9 9 3 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 2 5 5 1 - 2 5 5 5 )。このような生殖細胞系変異マウス中へのヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの転移は、抗原チャレンジの際にヒト化抗体の產生を生じる ( Jakobovits ら ( 1 9 9 3 ) N a t u r e 3 6 2 : 2 5 5 - 2 5 8 )。M e n d e z ら ( 1 9 9 7 ) ( N a t u r e G e n e t i c s 1 5 : 1 4 6 - 1 5 6 ) は、抗原でチャレンジされる場合に高親和性の完全ヒト抗体を生成するトランスジェニックマウスの系統を作出した。これは、内因性 J H セグメント中に欠失を有するマウスに、上で記載されるように、メガベースのヒト重鎖遺伝子座およびヒト軽鎖遺伝子座を生殖細胞系に組み込むことによって達成された。これらのマウス ( X e n o M o u s e ( 登録商標 ) I I 技術 ( A b g e n i x ; F r e m o n t , C a l i f o r n i a ) ) は、約 6 6 の V H 遺伝子、完全な D H 領域および J H 領域、ならびに 3 つの異なる定常領域を含む 1 , 0 2 0 k b のヒト重鎖遺伝子座を提供し、そしてまた、3 2 の V 遺伝子、 J セグメントおよび C 遺伝子を含む 8 0 0 k b のヒト 遺伝子座を提供する。これらのマウスで產生される抗体は、あらゆる点 ( 遺伝子再配列、組立て、レパートリーを含む ) で、ヒトで見られるものと酷似する。ヒト抗体は、マウス遺伝子座において遺伝子再配列を妨げる内因性セグメントにおける欠失に起因して、内因性抗体よりも優先的に発現される。このようなマウスは、特定の目的の抗原で免疫され得る。

#### 【 0 0 3 4 】

このような免疫動物由来の血清は、初期抗原に対する抗体反応性についてスクリーニングされ得る。リンパ球は、リンパ節または脾臓細胞から単離され得、そして C D 1 3 8 隆性細胞および C D 1 9 隆性細胞に対して選択することによって B 細胞に対してさらに選択され得る。一局面において、このような B 細胞培養物 ( B C C ) は、骨髄腫細胞に融合されて上で詳述されるようなハイブリドーマを生成し得る。

#### 【 0 0 3 5 】

別の局面において、このような B 細胞培養物は、好ましくは、初期抗原に対する反応性についてさらにスクリーニングされ得る。このようなスクリーニングは、標的 / 抗原タンパク質を用いる E L I S A 、目的の抗原に結合する公知の抗体を用いる競合アッセイ、および標的抗原を発現する、一過性にトランスフェクトされた C H O 細胞もしくは他の細胞に対するインビトロ結合を含む。

#### 【 0 0 3 6 】

本発明は C D 4 0 発現細胞上の C D 4 0 シグナル伝達の刺激により媒介される疾患を有するヒト患者を処置するための組成物および方法に関する。方法は本発明の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントを用いた処置を包含し、ここで抗体またはその抗原結

合フラグメントの投与はこの処置方法を受けている患者における正の処置応答を促進する。本発明の方法において使用するのに適する抗CD40抗体はヒト細胞の表面上に発現されたヒトCD40抗原に特異的に結合し、該抗体は有意なアゴニスト活性を有さないが、ヒトCD40発現細胞上のCD40抗原に結合した場合にはアンタゴニスト活性を示す。これらの抗CD40抗体およびその抗原結合フラグメントは本明細書においてはアンタゴニスト抗CD40抗体と称する。このような抗体の例は、後述する完全なヒトモノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12およびモノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12の結合特性を有するモノクローナル抗体を包含するが、これらに限定されない。当業者の知る通り、本明細書に記載したアンタゴニスト抗体およびそのような抗体の抗原結合フラグメントは当該分野でよく知られ、そして後述するような方法を用いて組み換えにより生産された抗体およびそのような抗体の抗原結合フラグメントを包含し、そして、例えば、組み換え生産されたモノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12を包含する。

#### 【0037】

モノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12の結合特性を有する抗体は結合CD40を競合的に妨害し、そして/または、CHIR-5.9およびCHIR-12.12と同じエピトープに結合する抗体を包含する。当業者は標準的な方法を用いながら抗体がCHIR-5.9またはCHIR-12.12を競合的に妨害するかどうかを調べることができる。

#### 【0038】

これらの抗体がヒトB細胞のようなヒト細胞の表面上にディスプレイされたCD40に結合する場合、抗体は有意なアゴニスト活性を有さず；一部の実施形態においては、ヒト細胞の表面上にディスプレイされたCD40へのその結合はこれらのヒト細胞の増殖および分化の抑制をもたらす。即ち、本発明の方法において使用するのに適するアンタゴニスト抗CD40抗体は、細胞表面CD40抗原を発現する正常および悪性のヒト細胞に対するアンタゴニスト活性を示すことができるモノクローナル抗体を包含する。

#### 【0039】

一部の実施形態においては本発明の抗CD40抗体はキメラ抗CD20モノクローナル抗体IDE-C-C2B8と相対比較して増大した抗腫瘍活性を示し、ここで抗腫瘍活性はヒトリンパ腫細胞株を用いたヌードマウス異種移植片腫瘍モデルにおいてこれらの抗体の等量を用いて試験される。IDE-C-C2B8 (IDECA Pharmaceuticals Corp., San Diego, California; Rituxan (登録商標)の商品名で市販、リツキシマブとも称する)はネズミ抗CD20モノクローナル抗体、IDE-C-2B8から単離されたネズミ可変領域と共にヒトIgG1およびカッパ定常領域を含有するキメラ抗CD20モノクローナル抗体である (Reff et al., (1994) Blood 83:435-445)。Rituximab (登録商標)は再発B細胞軽度悪性または濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)の処置のために認可されている。Rituximab (登録商標)と比較した場合により優れた抗腫瘍活性を有する抗体の発見はB細胞リンパ腫、特にB細胞非ホジキンリンパ腫のための癌治療の方法を極端に向上させると考えられる。

#### 【0040】

適当なヌードマウス異種移植片腫瘍モデルはNamalwaおよびDaudiとして知られているヒトバーキットリンパ腫細胞株を用いるものを包含する。好ましい実施形態は実施例17において後述するとおり、Daudiヒトリンパ腫細胞株を用いた段階型(staged)ヌードマウス異種移植片腫瘍モデルの抗腫瘍活性を試験する。Daudiリンパ腫細胞株を用いた段階型ヌードマウス異種移植片腫瘍モデルは非段階型モデルから所定の抗体の治療効果を判別する場合により効果的であるが、その理由は段階型モデルにおいては、抗体の投与は腫瘍が測定可能な大きさに到達した後にのみ開始されるためである。非段階型モデルにおいては、抗体の投与は腫瘍の接種後約1日以内、そして触診可能な腫瘍が存在する前に一般的には開始される。段階型モデルにおいてRituxan (登録

商標)より高性能となる(即ち増大した抗腫瘍活性を示す)抗体の能力は、抗体がRituxan(登録商標)よりも治療上有効であることを強力に示している。更にまた、Daudiモデルにおいては、Rituxan(登録商標)の標的である抗CD20はCD40よりも高水準で細胞表面上に発現される。

#### 【0041】

本発明の抗CD40抗体およびRituxan(登録商標)の「等価な量」とは重量基準において同じmg用量を投与することを意図している。即ち、本発明の抗CD40抗体を腫瘍モデルにおいて使用されるマウスのkg体重当たり0.01mgで投与した場合、Rituxan(登録商標)もまたマウスのkg体重当たり0.01mgで投与される。同様に、本発明の抗CD40抗体を腫瘍モデルにおいて使用されるマウスのkg体重当たり0.1、1または10mgで投与した場合、Rituxan(登録商標)もまたマウスのkg体重当たりそれぞれ0.1、1または10mgで投与される。

#### 【0042】

ヌードマウス異種移植片腫瘍モデルにおいて投与する場合、本発明の一部の抗体は等量のRituxan(登録商標)よりも有意に低値の腫瘍体積をもたらす。即ち、例えば、完全ヒトモノクローナル抗体CHIR-12.12は、本明細書において後述する実施例に記載した態様でDaudiヒトリンパ種細胞株を用いた段階型ヌードマウス異種移植片腫瘍モデルにおいて試験した場合、等量の用量のRituxanで観察されるものと相対比較して少なくとも20%増大した抗腫瘍活性を示し、またこの試験では50から60%程度増大した抗腫瘍活性を示すことができる。この増大した抗腫瘍活性はRituxan(登録商標)の等用量と比較した場合に本発明の抗CD40抗体で観察される腫瘍体積のより大きい低減において反映される。即ち、例えば、腫瘍接種後の時間経過に応じて、モノクローナル抗体CHIR-12.12はRituxan(登録商標)の等用量で観察されるものの約三分の一から約二分の一である腫瘍体積を示すことができる。

#### 【0043】

抗体の薬効の別の相違点は、NK細胞の存在下、インピトロの腫瘍細胞の最大溶解を得るために必要な抗体の濃度をインピトロで測定する点である。例えば、本発明の抗CD40抗体はRituxan(登録商標)の濃度の1/2、好ましくは1/4、最も好ましくは1/10未満のEC50においてDaudi細胞の最大溶解に到達する。

#### 【0044】

モノクローナル抗体CHIR-12.12のほかに、上記した試験においてRituxan(登録商標)の等量よりも有意に高値の薬効を有するという特徴を共有している他の抗CD40抗体は、例えば、(1)ハイブリドーマ細胞株12.12により生産されるモノクローナル抗体；(2)配列番号2に示される配列、配列番号4に示される配列、配列番号5に示される配列、配列番号2および配列番号4に示される両方の配列および配列番号2および配列番号5に示される両方の配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体；(3)配列番号1に示されるヌクレオチド配列、配列番号3に示されるヌクレオチド配列および配列番号1および配列番号3に示される両方の配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体；(4)ハイブリドーマ細胞株12.12により生産されるモノクローナル抗体に結合し得るエピトープに結合するモノクローナル抗体；(5)配列番号10または配列番号12のアミノ酸配列の残基82～87を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体；(6)競合結合アッセイにおいてモノクローナル抗体CHIR-12.12と競合するモノクローナル抗体；および(7)CHIR-12.12モノクローナル抗体または前述の項目(1)～(6)の上記モノクローナル抗体の抗原結合フラグメントであるモノクローナル抗体、ここでフラグメントはヒトCD40抗原に特異的に結合する能力を保持しているもの、を包含するが、これに限定されない。

#### 【0045】

(アンタゴニスト抗CD40抗体)

モノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12は本発明の方法にお

いて使用するための適当なアンタゴニスト抗CD40抗体を示す。CHIR-5.9およびCHIR-12.12抗体はハイブリドーマ細胞株131.2F8.5.9(本明細書においては細胞株5.9と称する)および153.8E2.D10.D6.12.12(本明細書においては細胞株12.12と称する)により生産されるIgG<sub>1</sub>アイソタイプの完全ヒト抗CD40モノクローナル抗体である。これらの細胞株はヒトIgG<sub>1</sub>重鎖遺伝子座およびヒト重鎖遺伝子座を含有する免疫化されたxenotypicなマウスの脾細胞を用いて作成されている(Xenomouse(登録商標)technology; Abgenix; Fremont, California)。脾細胞をマウスミエローマSP2/0細胞と融合させた(Sierra Biosource)。得られたハイブリドーマを数回サブクローニングして安定なモノクローナル細胞株5.9および12.12を作成した。本発明の他の抗体はヒト免疫グロブリン遺伝子座に関してトランスジェニックであるマウスを用いて同様に、或いは、当該分野で知られるか、本発明に記載した他の方法により製造してよい。

#### 【0046】

CHIR-12.12抗体の可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列、および、CHIR-5.9抗体の可変領域のアミノ酸配列を開示する。より特定すれば、mAb CHIR-12.12の軽鎖および重鎖のリーダー、可変および定常領域のアミノ酸配列はそれぞれ図9Aおよび9Bに示す通りである。さらにまた配列番号2(mAb CHIR-12.12の軽鎖の完全配列)、配列番号4(mAb CHIR-12.12の重鎖の完全配列)および配列番号5(配列番号4に示すmAb CHIR-12.12の重鎖の変異体の完全配列、ここで変異体は配列番号4の153位のアラニン残基に対するセリン置換を含む)も参照できる。mAb CHIR-12.12の軽鎖および重鎖をコードするヌクレオチド配列はそれぞれ図11Aおよび11Bに示す。更にまた配列番号1(mAb CHIR-12.12の軽鎖のコーディング配列)および配列番号3(mAb CHIR-12.12の重鎖のコーディング配列)も参照できる。mAb CHIR-5.9の軽鎖および重鎖のリーダー、可変および定常領域のアミノ酸配列はそれぞれ図10Aおよび10Bに示す通りである。さらにまた配列番号6(mAb CHIR-5.9の軽鎖の完全配列)、配列番号7(mAb CHIR-5.9の重鎖の完全配列)および配列番号8(配列番号7に示すmAb CHIR-5.9の重鎖の変異体の完全配列、ここで変異体は配列番号7の158位のアラニン残基に対するセリン置換を含む)も参照できる。更にまたCHIR-5.9およびCHIR-12.12抗体を発現するハイブリドーマはそれぞれPTA-5542およびPTA-5543の特許寄託名称でATCCに寄託されている。

#### 【0047】

アンタゴニスト活性のほかに、本発明の抗CD40抗体は腫瘍細胞に対する別の作用機序を有することが好ましい。例えばネイティブのCHIR-5.9およびCHIR-12.12抗体はADCC活性を有する。或いは、CHIR-5.9およびCHIR-12.12抗体の可変領域はADCC活性を有する別の抗体アイソタイプの上に発現させることができる。更にまた、本明細書において後述する通り、ネイティブの形態、組み換え形態またはCHIR-5.9またはCHIR-12.12の抗原結合フラグメントを細胞毒素、治療薬または放射性金属イオンまたは放射性同位体に結合体化することも可能である。

#### 【0048】

CHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗体はELISA型の試験において可溶性CD40に結合し、細胞表面CD40へのCD40リガンドの結合を防止し、そしてフローサイトメトリー試験により測定される通り、予備結合したCD40リガンドを排除する。抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12はCD40への結合に関しては相互に競合するが、15B8、即ち、参照により全体が本明細書に組み込まれる2000年10月2日出願の「ヒト抗CD40抗体」と題された米国暫定出願60/237,556および2001年10月2日に出願された「ヒト抗CD40抗体」とやはり題されたPCT国際出願PCT/US01/30857(代理人Docket No.

PP16092.003)に記載された抗CD40モノクローナル抗体とは競合しない。正常ヒト由来のB細胞の増殖に対する作用についてインビトロで試験したところ、CHIR-5.9およびCHIR-12.12はアンタゴニスト抗CD40抗体として機能する。更にCHIR-5.9およびCHIR-12.12は正常対象由来のヒトリンパ球の強力な増殖を誘導しない。これらの抗体は抗体依存性細胞毒性(ADCC)によりCD40発現標的細胞を殺傷することができる。Biacore<sup>TM</sup>試験により測定した場合、ヒトCD40に対するCHIR-5.9の結合親和性は $1.2 \times 10^{-8}$  Mであり、そしてCHIR-12.12の結合親和性は $5 \times 10^{-10}$  Mである。

#### 【0049】

本発明の方法で使用するための適当なアンタゴニスト抗CD40抗体はCD40細胞表面抗原に対する強力な単一部位結合親和性を示す。本発明のモノクローナル抗体はBiacore<sup>TM</sup>試験のような標準的な試験を用いて測定した場合、少なくとも $10^{-5}$  M、少なくとも $3 \times 10^{-5}$  M、好ましくは少なくとも $10^{-6}$  M~ $10^{-7}$  M、より好ましくは少なくとも $10^{-8}$  M~約 $10^{-12}$  MのCD40に対する解離平衡定数( $K_D$ )を示す。Biacore分析は当該分野で知られており、詳細は「BIA applications handbook」に記載されている。WO01/27160に記載されている方法は結合親和性をモジュレートするために使用できる。

#### 【0050】

「CD40抗原」、「CD40細胞表面抗原」、「CD40受容体」または「CD40」とは、腫瘍壞死因子(TNF)受容体ファミリーに属する膜貫通糖蛋白を意図している(例えば米国特許5,674,492および4,708,871;Stamenkovic et al.(1989)EMBO 8:1403;Clark(1990)Tissue Antigens 36:33;Barclay et al.(1997)The Leucocyte Antigen Facts Book(2d ed.; Academic Press, San Diego)を参照できる)。この遺伝子の選択的にスプライシングされた転写物の変異体によりコードされるヒトCD40の2アイソフォームが同定されている。第1のアイソフォーム(「長アイソフォーム」または「アイソフォーム1」としても知られている)は最初の19残基により表わされるシグナル配列を有する277アミノ酸前駆体ポリペプチド(配列番号11(GenBank Accession No.X60592およびNM\_001250参照)によりコードされる配列番号12(当初、GenBank Accession No.CAA43045として報告され、そしてGenBank Accession No.NP\_001241においてアイソフォーム1として同定された))として発見される。第2のアイソフォーム(「短アイソフォーム」または「アイソフォーム2」としても知られている)は最初の19残基により表わされるシグナル配列を有する203アミノ酸前駆体ポリペプチド(配列番号9(GenBank Accession No.NM\_152854)によりコードされる配列番号10(GenBank Accession No.NP\_690593))として発見される。ヒトCD40のこれらの2種のアイソフォームの前駆体ポリペプチドはその最初の165残基(即ち配列番号10および配列番号12の残基1~165)を共有している。短アイソフォームの前駆体ポリペプチド(配列番号10)は翻訳フレームシフトをもたらすコーディングセグメントの欠如した転写産物の変異体(配列番号9)によりコードされ;その結果として生じるCD40アイソフォームはCD40の長アイソフォーム(配列番号12の残基166~277に示されるC末端)に含有されるものより、短くかつそれとは異なるC末端(配列番号10の残基166~203)を含有する。本発明の目的のためには、「CD40抗原」、「CD40細胞表面抗原」、「CD40受容体」または「CD40」という用語はCD40の短および長アイソフォームの両方を包含する。本発明の抗CD40抗体は後述する通りこの細胞表面抗原の短アイソフォームまたは長アイソフォームのいずれかの内部の同じ位置に存在するヒトCD40のエピトープに結合する。

#### 【0051】

CD40抗原は本明細書に記載する通り種々の細胞型の表面上にディスプレイされる。「表面上にディスプレイされる」および「表面上に発現される」とは、CD40抗原の全体または部分が細胞の外部に曝露されることを意図している。ディスプレイまたは発現されたCD40抗原は完全または部分的にグリコシル化されていてよい。

#### 【0052】

「アゴニスト活性」とは物質がアゴニストとして機能することを意図する。アゴニストは細胞上の受容体と組み合わさって受容体の天然のリガンドにより開始されるものと同様または同一の反応または活性を開始させる。CD40のアゴニストは例えば以下の応答、即ち、B細胞の増殖および分化、抗体生産、細胞間付着、B細胞記憶形成、アイソタイプスイッチング、MHCクラスIIおよびCD80/86の細胞表面発現のアップレギュレーション、および、IL-8、IL-12およびTNFのようなプロ炎症サイトカインの分泌のいずれかまたは全てを誘導するが、これらに限定されない。「アンタゴニスト活性」とは拮抗剤として物質が機能することを意図している。CD40のアンタゴニストはCD40受容体のアゴニストリガンド、特にCD40Lへの結合により誘導される応答のいずれかの誘導を防止または低減する。アンタゴニストはアゴニスト結合への応答のいずれかの1つ以上の誘導を5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、好ましくは40%、45%、50%、55%、60%、より好ましくは70%、80%、85%、そして最も好ましくは90%、95%、99%または100%低減してよい。抗CD40抗体およびCD40リガンドの結合特異性およびアンタゴニスト活性を測定するための方法は当該分野で知られており、例えば標準的な競合結合アッセイ、B細胞による免疫グロブリン分泌をモニタリングする試験、B細胞増殖試験、Banchereau様B細胞試験、抗体生産に関するT細胞ヘルパー試験、B細胞増殖試験の同時刺激、およびB細胞活性化マーカーのアップレギュレーションに関する試験が含まれるが、これに限定されない。例えば参照により本明細書に組み込まれるWO00/75348および米国特許6,087,329に開示されているもののような試験を参照できる。

#### 【0053】

「有意な」アゴニスト活性とは、B細胞応答の試験において測定した場合に中立的な物質または陰性対照により誘導されるアゴニスト活性よりも少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%高値のアゴニスト活性を意図する。好ましくは、「有意な」アゴニスト活性とはB細胞応答の試験において測定した場合に中立的な物質または陰性対照により誘導されるアゴニスト活性よりも少なくとも2倍高値、または少なくとも3倍高値のアゴニスト活性である。即ち、例えば目的のB細胞応答がB細胞増殖である場合、「有意な」アゴニスト活性は中立的な物質または陰性対照により誘導されるB細胞増殖の水準よりも少なくとも2倍高値、または少なくとも3倍高値であるB細胞増殖の水準の誘導である。1つの実施形態においては、CD40に結合しない非特異的な免疫グロブリン、例えばIgG1は陰性対象として機能する。「有意なアゴニスト活性を有さない」物質とは、中立的な物質または陰性対照により誘導されるアゴニスト活性より約25%超の高値ではない、好ましくはB細胞応答の試験において測定した場合に中立的な物質または陰性対照により誘導されるアゴニスト活性より約20%超、15%超、10%超、5%超、1%超、0.5%超、更には約0.1%超の高値ではないアゴニスト活性を示す。本発明の方法において有用なアンタゴニスト抗CD40抗体は上記の通り、ヒト細胞上でCD40抗原に結合する場合、有意なアゴニスト活性を有さない。本発明の1つの実施形態においては、アンタゴニスト抗CD40抗体は、1つのB細胞応答において、有意なアゴニスト活性を有さない。本発明の別の実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体は、2つ以上のB細胞応答試験（例えば、増殖および分化、または増殖、分化および抗体生産）において、有意なアゴニスト活性を有さない。

#### 【0054】

本明細書で使用される場合「抗CD40抗体」はCD40B細胞表面抗原を特異的に認識するいずれかの抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体およ

びそれらのフラグメント、例えば F a b 、 F ( a b ' )<sub>2</sub> 、 F v および親抗 C D 4 0 抗体の抗原結合機能を保持している他のフラグメントを包含する。本発明において特に有利なものは、上記したモノクローナル抗体 C H I R - 5 . 9 および C H I R - 1 2 . 1 2 の結合特性を共有している本明細書に開示したアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体である。このような抗体は例えば以下のもの、即ち、(1)特許寄託番号 P T A - 5 5 4 2 および特許寄託番号 P T A - 5 5 4 3 でそれぞれ A T C C に寄託されている 1 3 1 . 2 F 8 . 5 . 9 (本明細書においては細胞株 5 . 9 と称する) および 1 5 3 . 8 E 2 . D 1 0 . D 6 . 1 2 . 1 2 (本明細書においては細胞株 1 2 . 1 2 と称する) と命名されたハイブリドーマ細胞株により生産されるモノクローナル抗体；(2)配列番号 2 に示される配列、配列番号 4 に示される配列、配列番号 5 に示される配列、配列番号 2 および配列番号 4 に示される両方の配列および配列番号 2 および配列番号 5 に示される両方の配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体；(3)配列番号 6 に示される配列、配列番号 7 に示される配列、配列番号 8 に示される配列、配列番号 6 および配列番号 7 に示される両方の配列および配列番号 6 および配列番号 8 に示される両方の配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体；(4)配列番号 1 に示される ヌクレオチド 配列、配列番号 3 に示される ヌクレオチド 配列および配列番号 1 および配列番号 3 に示される両方の配列からなる群より選択される ヌクレオチド 配列を含む核酸分子によりコードされるアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体；(5)ハイブリドーマ細胞株 5 . 9 または 1 2 . 1 2 により生産されるモノクローナル抗体に結合し得るエピトープに結合するモノクローナル抗体；(6)配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列の残基 8 2 ~ 8 7 を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体；(7)競合結合アッセイにおいてモノクローナル抗体 C H I R - 5 . 9 または C H I R - 1 2 . 1 2 と競合するモノクローナル抗体；および(8) C H I R - 1 2 . 1 2 または C H I R - 5 . 9 モノクローナル抗体または前述の項目(1)~(7)の上記モノクローナル抗体の抗原結合フラグメントであるモノクローナル抗体、ここでフラグメントはヒト C D 4 0 抗原に特異的に結合する能力を保持しているもの、を包含するが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 5 5 】

##### (アンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体の作製)

本明細書において開示され、そして本発明の方法において使用するためのアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体は、当業者に公知の任意の抗体作製方法を使用して作製され得る。例えば、ポリクローナル血清は、従来の方法によって調製され得る。一般的に、 C D 4 0 抗原を含む溶液が最初に使用されて、適切な動物（好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、またはヤギ）を免疫化する。入手可能な血清の量、および標識された抗ウサギ抗体および抗ヤギ抗体が利用できることに起因して、ウサギまたはヤギが、ポリクローナル血清の調製に好ましい。

#### 【 0 0 5 6 】

ポリクローナル血清は、トランスジェニック動物（好ましくは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するマウス）において調製され得る。好ましい実施形態において、 C D 4 0 を発現する S f 9 細胞が、免疫原として使用される。免疫化はまた、生理食塩水（好ましくは、フロイント完全アジュvant のようなアジュvant ）中の抗原を含む溶液を混合または乳化し、そしてその混合物またはエマルジョンを非経口的（一般的には、皮下または筋肉内）に注射することによって、実施され得る。1回の注射あたり 5 0 ~ 2 0 0  $\mu$  g の用量は、代表的に十分である。免疫化は、一般的に、生理的食塩水中のタンパク質の1回以上の注射によって、好ましくはフロイント不完全アジュvant を使用して、2 ~ 6 週間後にブーストされる。あるいは、本発明の目的がインビボの免役化と等しいと考えられる場合、当該分野で公知の方法を使用したインビトロの免疫化によって、抗体が作製され得る。ポリクローナル抗血清は、免役化された動物の血液をガラスまたはプラスチックの容器に採取し、その血液を 2 5 度で1時間インキュベートし、次いで 4 度で 2 ~ 1 8 時間インキュベートすることによって得られる。この血清は、遠心分離（例えば、 1 , 0 0 0  $\times$  g で 1 0 分間）によって回収される。1回の採血あたり約 2 0 ~ 5 0 m l が、ウサギから得

られ得る。

【0057】

Sf9 (Spodoptera frugiperda) 細胞の作製は、米国特許第6,004,552号において開示され、本明細書中に参考として援用される。手短に言えば、ヒトCD40をコードする配列を、輸送ベクターを使用してバキュロウイルスに再組換えさせた。上記プラスミドを、野生型バキュロウイルスDNAと共にSf9細胞に同時トランスフェクトした。組換えバキュロウイルスに感染したSf9細胞を同定して、クローン的に精製した。

【0058】

好ましくは、上記抗体は、本質的にモノクローナル抗体である。「モノクローナル抗体」によって、実質的に同質な抗体の集団から得られた抗体が意図される。すなわち、上記集団を構成する個々の抗体は、微量に存在し得る、天然に存在する可能性のある変異を除いて、同一である。この用語は、抗体の種または供給源に関して限定されない。この用語は、全ての免疫グロブリン、ならびにFab、F(ab')2、Fvおよび抗体の抗原結合機能を保持する他のもののようなフラグメントを包含する。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一の抗原部位（すなわち、本発明におけるCD40細胞表面抗原）に対して指向する。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して指向する異なる抗体を代表的に包含する従来の（ポリクローナル）抗体の調製とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向する。修飾語句「モノクローナル」は、実質的に同質である抗体の集団から得られる場合の抗体の性質を示し、いずれかの特定の方法による抗体の作製を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら(1975) Nature 256:495によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作製されても、または組換えDNA方法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと）によって作製されてもよい。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clacksonら(1991) Nature 352:624-628; Marksら(1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; および米国特許第5,514,548号において記載される技術を使用したファージ抗体ライブラリーから単離され得る。

【0059】

「エピトープ」によって、抗体が作製され、そしてその抗体が結合する抗原分子の部分が意図される。エピトープは、直鎖状のアミノ酸残基（すなわち、エピトープ内の残基が、直鎖状様式で連続して順々に配置される）、非直鎖状のアミノ酸残基（本明細書において「非直鎖状エピトープ」といわれ；これらのエピトープは、連続的には配置されない）、または直鎖状アミノ酸残基と非直鎖状アミノ酸残基との両方を含み得る。

【0060】

モノクローナル抗体は、Kohlerら(1975) Nature 256:495-496の方法、またはその改変を使用して調製され得る。代表的には、マウスが、抗原を含む溶液を使用して免疫化される。免疫化は、生理食塩水（好ましくは、フロイント完全アジュvantのようなアジュvant）中の抗原を含む溶液を混合または乳化し、そしてその混合物またはエマルジョンを非経口的に注射することによって実施され得る。当該分野で公知の任意の免疫化方法は、本発明のモノクローナル抗体を得るために使用され得る。動物を免疫化した後、脾臓（そして必要に応じて、数個の大きなリンパ節）が取り出され、そして単一の細胞に分離される。上記脾臓細胞は、目的の抗原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を適用することによって、スクリーニングされ得る。上記抗原に特異的な膜結合型免疫グロブリンを発現するB細胞は、プレートに結合し、リンスで除かれない。得られたB細胞、または全ての分離された脾臓細胞は、次いでミエローマ細胞との融合が誘導されてハイブリドーマを形成し、そして選択培地中で培養される。得られた細胞は、系列希釈によってプレートされ、そして目的の抗原に特異的に結合する（かつ、無関係の抗原に結合しない）抗体の産生についてアッセイされる。選択されたモノクローナル抗体(mAb)を分泌するハイブリドーマは、次いでインビトロ（例えば、

組織培養ボトルまたは中空纖維反応器において)、またはインビボ(例えば、マウスの腹水)のいずれかで培養される。

#### 【0061】

本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体が、組換えDNA方法を使用して調製される場合、モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)を使用して容易に単離され、そして配列決定される。本明細書におい記載されるハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として機能する。一旦単離されると、上記DNAは、発現ベクター中に配置され得、次いでこの発現ベクターは、それ以外では免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞(例えば、E.coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髄腫細胞)にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得る。抗体をコードする細菌のDNAにおける組換え発現に関する概説の論文としては、Skerraら(1993)Curr. Opinion in Immunol. 5:256およびPhickthun(1992)Immunol. Revs. 130:151が挙げられる。あるいは、抗体は、米国特許第5,545,403号；同第5,545,405号；および同第5,998,144号(これらは、本明細書において参考として援用される)に開示されるように、CHO細胞株のような細胞株において産生され得る。手短に言えば、上記細胞株は、それぞれ軽鎖および重鎖を発現し得るベクターを用いてトランスフェクトされる。別個のベクター上の2つのタンパク質をトランスフェクトすることによって、キメラ抗体が産生され得る。別の利点は、上記抗体の正しいグリコシル化である。

#### 【0062】

いくつかの実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体(例えば、CHIR-12.12抗体またはCHIR-5.9抗体)またはその抗原結合フラグメントは、グルタミンシンターゼをマーカーとして使用するGS遺伝子発現系(Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire)を使用してCHO細胞中で産生され得る。米国特許第5,122,464号；同第5,591,639号；同第5,658,759号；同第5,770,359号；同第5,827,739号；同第5,879,936号；同第5,891,693号；および同第5,981,216号もまた参考のこと；これらの内容は、その全体が本明細書において参考として援用される。

#### 【0063】

CD40に対するモノクローナル抗体は、当該分野で公知である。例えば、以下におけるB細胞抗原のための節を参考のこと：McMichael(編)(1987；1989)Leukocyte Typing III and IV(Oxford University Press, New York)；米国特許第5,674,492号；同第5,874,082号；同第5,677,165号；同第6,056,959号；WO 00/63395；国際公開第02/28905号および国際公開第02/28904号；Gordonら(1988)J. Immunol. 140:1425；Valleら(1989)Eur. J. Immunol. 19:1463；Clarkら(1986)PNAS 83:4494；Paulieら(1989)J. Immunol. 142:590；Gordonら(1987)Eur. J. Immunol. 17:1535；Jabaraら(1990)J. Exp. Med. 172:1861；Zhangら(1991)J. Immunol. 146:1836；Gascanら(1991)J. Immunol. 147:8；Banchereauら(1991)Clin. Immunol. Spectrum 3:8；およびBanchereauら(1991)Science 251:70；これらの全ては、本明細書において参考として援用される。本発明に対する特有の目的は、上記に記載のモノクローナル抗体CHIR-5.9およびモノクローナル抗体CHIR-12.12の結合特性を共有する、本明細書において開示されるアンタゴニスト抗CD40抗体である。

## 【0064】

本明細書において使用される場合、用語「CD40抗原エピトープ」は、本発明の抗CD40モノクローナル抗体と免役反応をし得る分子をいい、CD40抗原それ自身は除く。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、炭水化物、脂質、および他の分子を含み得るが、本発明の目的に關しては、最も一般的なタンパク質、短いオリゴペプチド、オリゴペプチドの模倣体(mimic)(すなわち、CD40抗原の抗体結合特性を模倣する有機化合物)、またはそれらの組み合わせである。適切なオリゴペプチド模倣体は、特に、PCT出願US 91/04282に記載される。

## 【0065】

さらに、用語「抗CD40抗体」は、本明細書において使用される場合、キメラ抗CD40抗体を包含する；本発明の方法で使用するためのこのようなキメラ抗CD40抗体は、本明細書において記載されるCHIR-5.9モノクローナル抗体およびCHIR-12.12モノクローナル抗体の結合特性を有する。「キメラ」抗体によって、最も好ましくは組換えデオキシリボ核酸技術を使用して誘導され、そしてヒト(免疫学的に「関連した」種(例えば、チンパンジー)を含む)と非ヒトの両方の構成要素を含む抗体が意図される。従って、上記キメラ抗体の定常領域は、最も好ましくは、天然のヒト抗体の定常領域と実質的に同一であり；上記キメラ抗体の可変領域は、最も好ましくは非ヒト供給源に由来し、そしてCD40細胞表面抗原に対して所望の抗原特異性を有する。上記非ヒト供給源は、ヒトCD40細胞表面抗原またはヒトCD40細胞表面抗原を含む物質に対する抗体を作製するために使用され得る任意の脊椎動物供給源であり得る。このような非ヒト供給源としては、げっ歯類(例えば、ウサギ、ラット、マウスなど；例えば、米国特許第4,816,567号(本明細書において、参考として援用される)を参照のこと)および非ヒト靈長類(例えば、旧世界サル、サルなど；例えば、米国特許第5,750,105号および同第5,756,096号(本明細書において、参考として援用される)を参照のこと)が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書において使用される場合、語句「免疫学的に活性」とは、キメラ抗CD40抗体をいう際に使用される場合、ヒトCD40に結合するキメラ抗体を意味する。

## 【0066】

キメラ抗CD40抗体およびヒト化抗CD40抗体はまた、本明細書において使用される場合、用語抗CD40抗体によって包含される。キメラ抗体は、異なる種に由来する抗体のセグメントを含む。Rituxan(登録商標)は、マウス可変領域およびヒト定常領域を有するキメラ抗体の例である。

## 【0067】

「ヒト化」によって、非ヒト免疫グロブリン配列に由来する最小の配列を含む抗CD40抗体の形態が意図される。大部分については、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリンであり(レシピエント抗体)、このヒト化抗体において、レシピエントの超可変領域(相補性決定領域またはCDRとしても公知)由来の残基は、非ヒト種(例えば、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト靈長類)の超可変領域に由来する残基によって置換される(ドナー抗体)。語句「相補性決定領域」とは、天然の免疫グロブリン結合部位のうちの天然のFv領域の結合親和性および結合特異性と一緒に規定するアミノ酸配列をいう。例えば、Chothiaら(1987)J.Mol.Biol.196:901-917; Kabatら(1991)米国保健省(U.S.Ddept.of Health and Human Services)、NIH公開番号91-3242を参照のこと。語句「定常領域」とは、エフェクター機能を与える抗体分子の部分をいう。ヒト疾患の治療において使用するための非免疫原性抗体の作製に関する先行する研究において、マウスの定常領域は、ヒト定常領域によって置換された。この対象のヒト化抗体の定常領域は、ヒト免疫グロブリンに由來した。しかしながら、これらのヒト化抗体は、ヒトにおいて好ましくなく、かつ危険な可能性のある免疫応答を依然として誘発し、そして親和性が喪失した。本発明の方法において使用するためのヒト化抗CD40抗体は、本明細書中に記載されたCHIR-5.9モノクローナル抗体およびCH

I R - 1 2 . 1 2 モノクローナル抗体によって示される結合特性と類似した結合特性を有する。

#### 【 0 0 6 8 】

ヒト化は、本質的に、W i n t e r および共同研究者の方法 ( J o n e s ら ( 1 9 8 6 ) N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 ; R i e c h m a n n ら ( 1 9 8 8 ) N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 7 ; V e r h o e y e n ら ( 1 9 8 8 ) S c i e n c e 2 3 9 : 1 5 3 4 - 1 5 3 6 ) に従って、げっ歯類もしくは変異体げっ歯類の C D R またはげっ歯類もしくは変異体げっ歯類の C D R 配列を、ヒト抗体の対応する配列の代わりに置換することによって実施され得る。米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号；同第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号；同第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 号；同第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号；同第 5 , 8 5 9 , 2 0 5 号もまた参考のこと；これらは、本明細書において参考として援用される。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンの 1 以上の可変領域のフレームワーク領域内の残基は、対応する非ヒト残基によって置換される（例えば、米国特許第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号；同第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 号；同第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号；および同第 6 , 1 8 0 , 3 7 0 号を参考のこと）。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含み得る。これらの改変は、抗体性能をさらに洗練させるため（例えば、所望の親和性を得るために）になされる。一般的に、上記ヒト化抗体は、少なくとも 1 つの、そして代表的には 2 つの可変領域の全てを実質的に含み、この抗体において、非ヒト免疫グロブリンの超可変領域に対応する超可変領域の全てまたは実質的に全て、ならびに上記フレームワーク領域の全てまたは実質的に全ては、ヒト免疫グロブリン配列のものである。上記ヒト化抗体はまた、必要に応じて、免疫グロブリン定常領域 ( F c ) ( 代表的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域 ) の少なくとも一部分を含む。さらなる詳細については、J o n e s ら ( 1 9 8 6 ) N a t u r e 3 3 1 : 5 2 2 - 5 2 5 ; R i e c h m a n n ら ( 1 9 8 8 ) N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 9 ; および P r e s t a ( 1 9 9 2 ) C u r r . O p . S t r u c t . B i o l . 2 : 5 9 3 - 5 9 6 を参考のこと；これらは、本明細書において参考として援用される。従って、このような「ヒト化」抗体は、実質的に決してインタクトでないヒト可変ドメインが、非ヒト種からの対応する配列によって置換されている抗体を包含し得る。実際には、ヒト化抗体は、代表的に、いくつかの C D R 残基およびおそらくいくつかのフレームワーク残基が、げっ歯類抗体におけるアナログ部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。例えば、米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号；同第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号；同第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 号；同第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号；同第 5 , 8 5 9 , 2 0 5 号を参考のこと。米国特許番号 6 , 1 8 0 , 3 7 0 および国際公開第 0 1 / 2 7 1 6 0 号もまた参考のこと。ここで、ヒト化抗体および所定の抗原に対して改善された親和性を有するヒト化抗体を作製するための技術が、開示される。

#### 【 0 0 6 9 】

用語抗 C D 4 0 抗体によって、不活化された内因性免疫グロブリン ( I g ) 遺伝子座によって特徴付けられる非ヒト哺乳動物宿主（より具体的には、トランスジェニックマウス）において產生される異種抗 C D 4 0 抗体または改変抗 C D 4 0 抗体もまた包含される。このようなトランスジェニック動物において、宿主免疫グロブリンの軽鎖サブユニットおよび重鎖サブユニットを発現し得る内因性遺伝子は、非機能性にされ、アナログのヒト免疫グロブリン遺伝子座で置換される。これらのトランスジェニック動物は、軽鎖または重鎖の宿主の免疫グロブリンサブユニットが実質的に存在せずに、ヒト抗体を產生する。例えば、米国特許第 5 , 8 7 7 , 3 9 7 号および同第 5 , 9 3 9 , 5 9 8 号（本明細書において参考として援用される）を参考のこと。

#### 【 0 0 7 0 】

好みしくは、トランスジェニックマウスを免疫化することによって、 C D 4 0 に対する完全ヒト抗体が得られる。このようなマウスの 1 つは、 X e n o M o u s e ( 登録商標 ) 技術 ( A b g e n i x ; F r e m o n t , C a l i f o r n i a ) を使用して得られ、そして米国特許第 6 , 0 7 5 , 1 8 1 号、同第 6 , 0 9 1 , 0 0 1 号および同第 6 , 1 1 4

, 598号(これらの全ては、本明細書において参考として援用される)に開示される。本明細書において開示される抗体を作製するために、ヒトIgG<sub>1</sub>重鎖遺伝子座およびヒト軽鎖遺伝子座についてのトランスジェニックマウスを、ヒトCD40を発現するSf9細胞で免疫化した。マウスはまた、他のアイソタイプについてのトランスジェニックであってもよい。本発明の方法において有用な完全ヒト抗体は、本明細書において開示されるCHIR-5.9モノクローナル抗体およびCHIR-12.12モノクローナル抗体によって示される結合特性と類似の結合特性によって特徴付けられる。

#### 【0071】

上記抗CD40抗体のフラグメントは、それらが全長抗体の所望される親和性を保持する限り、本発明の方法においての使用に適切である。従って、抗CD40抗体のフラグメントは、CD40B細胞表面抗原に結合する能力を保持する。このようなフラグメントは、対応する全長のアンタゴニスト抗CD40抗体に類似の特性によって特徴付けられる。すなわち、このフラグメントは、ヒト細胞の表面上に発現されたヒトCD40抗原に特異的に結合し、そして有意なアゴニスト活性を有さないが、ヒトCD40発現細胞上のCD40抗原に結合された場合、アンタゴニスト活性を示す。このようなフラグメントは、本明細書において「抗原結合」フラグメントといわれる。

#### 【0072】

抗体の適切な抗原結合フラグメントは、全長抗体の一部分(一般的には、抗原結合領域またはその可変領域)を含む。抗体フラグメントの例としては、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、およびFvフラグメント、ならびに単鎖抗体分子が挙げられるが、これらに限定されない。「Fab」によって、軽鎖と重鎖の一部とからなる免疫グロブリンの一価の抗原結合フラグメントが意図される。F(ab')<sub>2</sub>によって、両方の軽鎖と両方の重鎖の一部とを含む免疫グロブリンの二価の抗原結合フラグメントが意図される。「単鎖Fv」抗体フラグメントまたは「sFv」抗体フラグメントによって、抗体のV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインを含み、これらのドメインが一本のポリペプチド鎖中に存在するフラグメントが意図される。例えば、米国特許第4,946,778号、同第5,260,203号、同第5,455,030号および同第5,856,456号(これらは、本明細書において参考として援用される)を参照のこと。一般的に、上記Fvポリペプチドは、V<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインとの間に、sFvが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にするためのポリペプチドリンクーをさらに含む。sFvの概要については、Pluckthun(1994)、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、第113巻、RosenburgおよびMoore(編)(Springer-Verlag, New York)、269-315頁を参照のこと。本明細書において開示されるアンタゴニスト抗CD40抗体の抗原結合フラグメントはまた、本明細書の以下に記載されるように、細胞毒と結合体化されて標的癌細胞の殺傷を達成し得る。

#### 【0073】

抗体または抗体フラグメントは、例えば、McCaffertyら(1990)Nature 348:552-554(1990)および米国特許第5,514,548号において記載される技術を使用して作製された抗体ファージライブラリーから単離され得る。Clacksonら(1991)Nature 352:624-628およびMarksら(1991)J.Mol.Biol.222:581-597は、それぞれ、ファージライブラリーを使用したマウス抗体およびヒト抗体の単離を記載する。以下の刊行物は、鎖の混合(shuffling)による高親和性(nM範囲)のヒト抗体の作製(Marksら(1992)Bio/Technology 10:779-783)、および非常に広範なファージライブラリーを構築するためのストラテジーとしての、組み合わせ感染およびインビオの再組換え(Waterhouseら(1993)Nucleic Acids Res.21:2265-2266)を記載する。従って、これらの技術は、モノクローナル抗体を単離するための伝統的なモノクローナル抗体のハイブリドーマ技術に対する実行可能な代替物である。

## 【0074】

種々の技術が、抗体フラグメントの作製のために開発されている。伝統的には、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解性消化を介して得られた（例えば、Morimotoら（1992）Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24：107-117（1992）およびBrennanら（1985）Science 229：81を参照のこと）。しかし、これらのフラグメントは、現在は、組換え宿主細胞によって直接的に產生され得る。例えば、この抗体フラグメントは、上記に記載の抗体ファージライブリーから単離され得る。あるいは、Fab'-SHフラグメントは、E. coliから直接回収され得、化学的に結合されて $F(ab')_2$ フラグメントを形成する（Carterら（1992）Bio/Technology 10：163-167）。別のアプローチに従って、 $F(ab')_2$ フラグメントは、組換え宿主細胞の培養物から直接単離され得る。抗体フラグメントを作製するための他の技術は、当業者には明らかである。

## 【0075】

本発明の方法において有用なアンタゴニスト抗CD40抗体としては、本明細書において開示されたCHIR-5.9モノクローナル抗体およびCHIR-12.12モノクローナル抗体、ならびにこれらの抗体とは異なるが、そのCDRを保持している抗体；ならびに1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換を有する抗体が挙げられる。ここで、上記アンタゴニスト活性は、B細胞の増殖および/または分化の阻害によって測定される。本発明はまた、脱免疫化された（de-immunized）アンタゴニスト抗CD40抗体を包含する。この抗体は、例えば、国際公開第98/52976号および同第0034317号（本明細書において参考として援用される）に記載されたとおりに作製され得る。この様式において、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体内の残基が改変され、ヒトCD40発現細胞に対するアンタゴニスト活性を保持しながら、抗体を、ヒトに対して免疫原性がなくさせるか、または免疫原性を低くさせる。ここで、このような活性は、本明細書の他の部分で記述されるアッセイによって測定される。特許請求の範囲の範囲内には、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体またはそのフラグメントを含む融合タンパク質もまた包含され、この融合タンパク質は、当該分野で公知のように、合成されても、対応するポリヌクレオチドベクターから発現されてもよい。このような融合タンパク質は、以下に記述される抗体の結合体化への参照とともに記載される。

## 【0076】

本発明の抗体は、例えば欧州特許出願公開第0 983 303 A1号、国際公開第00/34317号および同第98/52976号（本明細書において参考として援用される）において記載される方法を使用して作製される配列のバリエーションを有し得る。例えば、CDR内の配列は、抗体をMHCクラスIIに結合させ、好ましくないヘルパーT細胞応答を誘発し得ることが示されている。保存的置換は、上記抗体に結合活性を保持させるが、好ましくないT細胞応答を誘発するその能力を失わせ得る。任意のこのような保存的置換または非保存的置換は、当該分野で認められた方法（例えば、本明細書中の別の部分に記載される方法）を使用して作製され得、そして生じた抗体は、本発明の範囲内である。この改変抗体は、本明細書において記載された方法を使用して、通常、アンタゴニスト活性、親和性、および特異性について試験され得る。

## 【0077】

上記した方法のいずれか、または本明細書に開示しないいいずれか別の方法により生産される抗体または、それが以下の生物学的活性、即ち、T細胞により刺激される正常ヒト末梢B細胞による免疫グロブリン分泌の抑制；Jurkat T細胞により刺激される正常ヒト末梢B細胞の生存および/または増殖の抑制；CD40L発現細胞または可溶性CD40リガンド（sCD40L）により刺激される正常ヒト末梢B細胞の生存および/または増殖の抑制；sCD40Lまたは固相CD40Lにより刺激されるいの細胞における「生存」抗アポトーシス細胞内シグナルの抑制；sCD40Lまたは固相CD40Lとのライゲーションによるいの細胞におけるCD40シグナル伝達の抑制；および

後述するヒト悪性B細胞の増殖の抑制の少なくともいずれか1つを有している場合に本発明の範囲に包含される。これらの試験は本明細書の実施例に記載する通り実施できる。また、参照により本明細書に組み込まれるSchultze et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8200-8204; Denton et al., (1998) Pediatr. Transplant., 2: 6-15; Evans et al. (2000) J. Immunol. 164: 688-697; Noel1le (1998) Agents Actions Suppl. 49: 17-22; Lederman et al. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3: 77-86; Coligan et al. (1991) Current Protocols in Immunology 13: 12; Kwekkeboom et al. (1993) Immunology 79: 439-444; および米国特許5,674,492および5,847,082に記載の試験法も参照される。

#### 【0078】

本明細書において同定されるCD40抗原エピトープに特異的なアンタゴニスト抗CD40抗体を検出するための代表的なアッセイは、「競合的結合アッセイ」である。競合的結合アッセイは、そのアッセイにおいて、未知のものが、特異的な抗体に対する標識された既知のリガンドの結合を阻害するその能力によって検出されて定量される、血清学的アッセイである。これはまた、競合的阻害アッセイともいわれる。代表的な競合的結合アッセイにおいて、標識されたCD40ポリペプチドは、例えば、本発明のモノクローナル抗体の1つ以上のエピトープに対して惹起されたモノクローナル抗体と組み合わせて、サンプル中の候補抗体によって沈殿される。目的のエピトープと特異的に反応する抗CD40抗体は、CD40タンパク質または目的のCD40タンパク質の特定のエピトープを含むタンパク質のフラグメントに対して調製された一連の抗体をスクリーニングすることによって同定され得る。例えば、ヒトCD40について、目的のエピトープとしては、図12B(配列番号10)に記載されたヒトCD40の短いアイソフォーム(GenBank登録番号NP\_690593を参照のこと)(図12Aに記載される配列(配列番号9; GenBank登録番号NM\_152854もまた参照のこと)によってコードされる)、もしくは図12D(配列番号12)に記載されたヒトCD40の長いアイソフォーム(GenBank登録番号CAA43045およびNP\_001241を参照のこと)(図12Cに記載される配列(配列番号11; GenBank登録番号X60592およびNM\_001250を参照のこと)によってコードされる)の直鎖状アミノ酸残基および/または非直鎖状アミノ酸残基を含むエピトープが挙げられる。あるいは、以前に同定された適切なアンタゴニスト抗CD40抗体を用いた競合的結合アッセイは、以前に同定された抗体に匹敵するモノクローナル抗体を選択するために使用される。

#### 【0079】

このような免疫アッセイで使用される抗体は、標識されていても標識されていなくてもよい。標識されていない抗体は、凝集反応において使用され得; 標識された抗体は、多種多様の標識を使用して、多種多様のアッセイにおいて使用され得る。抗CD40抗体と目的のエピトープとの間の抗体-抗原複合体の形成の検出は、上記抗体に検出可能な物質を結合させることによって容易にされ得る。適切な検出手段としては、放射性核種、酵素、補酵素、蛍光剤、化学ルミネセンス、色素体、酵素基質または補因子、酵素インヒビター、補欠分子族複合体、フリーラジカル、粒子、色素などのような標識の使用が挙げられる。適切な酵素の例としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる; 適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる; 適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられる; ルミネセンス物質の例は、ルミノールである; 生物ルミネセンス物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられる; そして適切な放射活性物質の例としては、<sup>125</sup>I、<sup>13</sup>C

<sup>1</sup> I、<sup>3</sup> <sup>5</sup> S、または<sup>3</sup> Hが挙げられる。このような標識された試薬は、種々の周知のアッセイ（例えば、放射免疫アッセイ、酵素免疫アッセイ（例えば、ELISA）、蛍光免疫アッセイなど）において使用され得る。例えば、米国特許第3,766,162号；同第3,791,932号；同第3,817,837号；および同第4,233,402号を参照のこと。

#### 【0080】

以前に記載したアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗体フラグメントのいずれかを結合体化した後に本発明の方法において用いてよい。結合体化した抗体を製造するための方法は当該分野で知られている。即ち、抗CD40抗体は間接的な標識または間接的な標識方法により標識してよい。「間接的な標識」または「間接的な標識方法」とはキレート剤を抗体に共有結合させ、そして少なくとも1つの放射性核種をキレート剤に挿入することを意図する。例えば参照により本明細書に組み込まれるSrivagta and Mease (1991) Nuc1. Med. Bio. 18: 589-603に記載されているキレート剤および放射性核種を参照できる。適当な標識は蛍光団、発色団、放射性原子（特に<sup>3</sup> <sup>2</sup> Pおよび<sup>1</sup> <sup>2</sup> <sup>5</sup> I）、電子稠密試薬、酵素および特異的結合相手を有するリガンドを包含する。酵素は典型的にはその活性により検出される。例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼは通常は分光光度計により定量可能な青色色素に3,3',5,5'-テトラメチルベンジン(TMB)を変換するその能力により検出される。「特異的結合相手」とは抗原とそれに特異的なモノクローナル抗体の場合のように、高い特異性でリガンド分子に結合し得る蛋白を指す。他の特異的な結合相手はビオチンとアビジンまたはストレプトアビジン、IgGとプロテインA、および当該分野で知られている多くの受容体リガンド対を包含する。上記した説明は種々の標識を個々のクラスに分類することを意味せず、同じ標識が数種の異なる様式で作用してよい。例えば<sup>1</sup> <sup>2</sup> <sup>5</sup> Iは放射性標識として、または電子稠密試薬として作用してよい。HRPは酵素として、またはmAbに対する抗原として作用してよい。更にまた、種々の標識を所望の作用のために組み合わせてもよい。例えば、mAbおよびアビジンは本発明の実施においてやはり標識を必要とし；即ち、mAbをビオチンで標識し、その存在は、<sup>1</sup> <sup>2</sup> <sup>5</sup> Iで標識したアビジンを用いて、または、HRPで標識した抗ビオチンmAbを用いて検出する場合がある。他の順序および可能性は当業者が容易に知りえるものであり、本発明において等価であるとみなされる。

#### 【0081】

或いは、抗CD40抗体は「直接の標識」または「直接の標識方法」を用いて標識してよく、この場合、放射性核種は抗体に直接共有結合される（典型的にはアミノ酸残基を介する）。好ましい放射性核種は上出のSrivagta and Mease (1991)に記載されている。間接的な標識方法が特に好ましい。例えば参照により本明細書に組み込まれる抗体に放射性標識を結合するためにリンカーを使用している国際特許公開WO00/52031およびWO00/52473、および、米国特許6,015,542に記載されている抗CD40抗体の標識された形態を参照できる。

#### 【0082】

更にまた、抗体（またはそのフラグメント）を細胞毒、治療薬または放射性金属イオンまたは放射性同位体のような治療部分に結合体化してよい。細胞毒または細胞毒性薬剤には細胞に有害であるいすれかの物質が包含される。例としては、タキソール、サイトカリンB、グラミシジンD、臭化工チジウム、エメチン、マイトイシン、エトポシド、テノボシド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、マイトイサントロン、ミスラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンおよびこれらの類縁体または相同体が挙げられる。治療薬としては例えば代謝拮抗物質（例えばメトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えばメクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラ

ン、カルムスチン (B S N U ) およびロムスチン (C C N U ) 、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C およびシスジクロロジアミン白金 (I I ) (D D P ) シスプラチニン) 、アントラサイクリン類 (例えばダウノルビシン (以前のダウノマイシン) およびドキソルビシン) 、抗生物質 (例えばダクチノマイシン (以前のアクチノマイシン) 、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン (A M C ) ) および抗有糸分裂剤 (例えばビンクリスチンおよびビンブラスチン) が挙げられる。放射性同位体には例えば I - 1 3 1 、 I - 1 2 3 、 I - 1 2 5 、 Y - 9 0 、 R e - 1 8 8 、 R e - 1 8 6 、 A t - 2 1 1 、 C u - 6 7 、 B i - 2 1 2 、 B i - 2 1 3 、 P d - 1 0 9 、 T c - 9 9 、 I n - 1 1 1 等が包含される。本発明の結合体は所定の生物学的応答を修飾するために使用でき ; 薬剤部分は伝統的な化学療法剤に限定されない。例えば薬剤部分は所望の生物学的活性を有する蛋白またはポリペプチドであってよい。このような蛋白は例えば毒素、例えばアブリン、リシン A 、シュードモナスの外毒素またはジフテリア毒素 ; 蛋白、例えば腫瘍壊死因子、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、神経生育因子、血小板誘導成長因子、組織プラスミノーゲン活性化物質 ; または、生物学的応答モディファイアー、例えばリンホカイン、インターロイキン - 1 (「 I L - 1 」 ) 、インターロイキン - 2 (「 I L - 2 」 ) 、インターロイキン - 6 (「 I L - 6 」 ) 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「 G M - C S F 」 ) 、顆粒球コロニー刺激因子 (「 G - C S F 」 ) または他の成長因子を包含する。

#### 【 0 0 8 3 】

このような治療薬を抗体に結合体化する手法はよく知られている。例えば Arnon et al . , (1985) 「 Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy 」 , Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy , ed . Reisfeld et al . (Alan R. Liss, Inc . ) , pp . 2 4 3 - 2 5 6 ; ed . Hellstrom et al . (1987) 「 Antibodies for Drug Delivery 」 , Controlled Drug Delivery , ed . Robinson et al . (2d ed ; Marcel Dekker , Inc . ) , pp . 6 2 3 - 6 5 3 ; Thorpe (1985) 「 Antibody Carries of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy : A Review 」 , Monoclonal Antibodies ' 84 : Biological and Clinical Applications , ed . Pinchera et al . pp . 4 7 5 - 5 0 6 (Editrice Kurtis , Milano , Italy , 1985) ; 「 Analysis , Results , and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy 」 , Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy , ed . Baldwin et al . (Academic Press , New York , 1985) , pp . 3 0 3 - 3 1 6 ; および Thorpe et al . (1982) Immuno1 . Rev . 6 2 : 1 1 9 - 1 5 8 を参照できる。

#### 【 0 0 8 4 】

あるいは、抗体は、第 2 の抗体に結合体化されて、米国特許第 4 , 6 7 6 , 9 8 0 号に記載されるような抗体ヘテロ結合体 (heteroconjugate) を形成し得る。さらに、リンカーが、上記標識と本発明の抗体との間に使用され得る (米国特許第 4 , 8 3 1 , 1 7 5 号を参照のこと)。抗体またはその抗原結合フラグメントは、放射活性なヨウ素、インジウム、イットリウムまたは当該分野で公知の他の放射活性粒子を用いて直接的に標識され得る (米国特許第 5 , 5 9 5 , 7 2 1 号)。処置は、同時または引き続いで投与される結合体化抗体および非結合体化抗体を用いた、処置の組み合わせからなり得る (WO 00 / 5 2 0 3 1 および WO 00 / 5 2 4 7 3 )。

#### 【 0 0 8 5 】

## (アンタゴニスト抗CD40抗体の改変体)

上記アンタゴニスト抗CD40抗体の生物学的に活性な適切な改変体が、本発明の方法において使用され得る。このような改変体は、親のアンタゴニスト抗CD40抗体の所望の結合特性を保持する。抗体改変体を作製するための方法は、当該分野で一般的に利用可能である。

## 【0086】

例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体（例えば、本明細書において記載されるCHIR-5.9モノクローナル抗体またはCHIR-12.12モノクローナル抗体）のアミノ酸配列の改変体は、目的の抗体をコードするクローニングされたDNA配列中の変異によって調製され得る。変異誘発およびヌクレオチド配列変更についての方法は、当該分野で周知である。例えば、以下を参照のこと：WalkerおよびGaaststra（編）（1983）*Techniques in Molecular Biology*（Macmillan Publishing Company, New York）；Kunkel（1985）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492；Kunkelら（1987）*Methods Enzymol.* 154:367-382；Sambrookら（1989）*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*（Cold Spring Harbor, New York）；米国特許第4,873,192号；およびこれらにおいて引用される参考文献（これらは、本明細書において参考として援用される）。目的のポリペプチドの生物学的活性に影響しない適切なアミノ酸置換基に関するガイドンスは、Dayhoffら（1978）、*Atlas of Protein Sequence and Structure*（Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.）（本明細書において参考として援用される）のモデルにおいて見出され得る。1つのアミノ酸を類似の特性を有する別のアミノ酸で交換するような、保存的置換が好まれ得る。保存的置換の例としては、Gly Ala、Val Ile Leu、Asp Glu、Lys Arg、Asn Gln、およびPhe Trp Tyrが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0087】

目的のアンタゴニスト抗CD40抗体ポリペプチドの改変体の構築において、改変は、改変体が所望の活性（すなわち、類似の結合親和性）を保有し続け、そしてヒト細胞の表面上に発現されたヒトCD40抗原に特異的に結合することができ、そして有意なアゴニスト活性を有さないが、ヒトCD40発現細胞上のCD40抗原に結合された場合に、アンタゴニスト活性を示すようになされる。明らかに、上記改変ポリペプチドをコードするDNA中に作製された任意の変異は、リーディングフレームの外の配列に位置してはならず、そして好ましくは、2次mRNA構造を生じ得る相補的領域を作製しない。歐州特許出願公開第75,444号を参照のこと。

## 【0088】

さらに、アンタゴニスト抗CD40抗体の定常領域が変異されて、多くの方法でエフェクター機能を変更し得る。例えば、米国特許第6,737,056B1号および米国特許出願公開第2004/0132101A1号を参照のこと。これらは、Fcレセプターへの抗体結合を最適化するFc変異体を開示する。

## 【0089】

好ましくは、参照アンタゴニスト抗CD40抗体の改変体は、参照アンタゴニスト抗CD40抗体分子（例えば、本明細書において記載されるCHIR-5.9モノクローナル抗体またはCHIR-12.12モノクローナル抗体）についてのアミノ酸配列に対してか、あるいは参照抗体分子のより短い部分に対して、少なくとも70%もしくは75%の配列同一性、好ましくは少なくとも80%もしくは85%の配列同一性、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%または95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。より好ましくは、上記分子は、少なくとも96%、97%、98%または99%の配列同一性を共有する。本発明の目的のために、アフィンギャップサー

チを使用した Smith - Waterman ホモロジーサーチアルゴリズム (12のギャップオープンペナルティおよび2のギャップ伸長ペナルティ、62のBLOSUMマトリックスを使用) を使用して、配列同一性%が決定される。この Smith - Waterman ホモロジーサーチアルゴリズムは、Smith および Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482 - 489において教示される。改変体は、例えば、わずか1~15アミノ酸残基、わずか1~10アミノ酸残基(例えば、6~10)、わずか5、わずか4、3、2、またはさらに1アミノ酸残基だけ上記参照アンタゴニスト抗CD40抗体と異なる。

#### 【0090】

2つのアミノ酸配列の最適アラインメントに関して、上記改変アミノ酸配列の隣接するセグメントは、上記参照アミノ酸配列について、アミノ酸残基の付加またはアミノ酸残基の欠失を有し得る。上記参照アミノ酸配列を比較するために使用される隣接するセグメントは、少なくとも20個の連続するアミノ酸残基を含み、そして30個、40個、50個またはそれ以上のアミノ酸残基であり得る。保存的な残基置換またはギャップに関連する配列同一性に対する補正が、なされ得る (Smith - Waterman ホモロジーサーチアルゴリズムを参照のこと)。

#### 【0091】

特に、悪性B細胞上のCD40抗原に結合された場合、CD40を特異的に結合し、かつアンタゴニスト活性を保持し得るポリペプチドの正確な化学的構造は、多くの因子に依存する。イオン化可能なアミノ基およびカルボニル基が分子中に存在する場合、特定のポリペプチドは、酸性塩もしくは塩基性塩として、または中性形態で得られ得る。適切な環境状態に配置された場合に、その生物学的活性を保持するような調製物の全ては、本明細書において使用されるアンタゴニスト抗CD40抗体の定義の中に含まれる。さらに、上記ポリペプチドの一次アミノ酸配列は、糖部分を使用した誘導体化(グリコシル化)または他の補助的な分子(例えば、脂質、リン酸、アセチル基など)によって増加され得る。上記ポリペプチドの一次アミノ酸配列は、糖類との結合体化によってもまた増加され得る。このような増加の特定の局面は、産生する宿主の翻訳後の処理システムを通じて達成され；他のこのような改変は、インビトロで導入され得る。とにかく、このような改変は、上記抗CD40抗体のアンタゴニスト特性が破壊されない限り、本明細書において使用される抗CD40抗体の定義の中に含まれる。このような改変体は、種々のアッセイにおいて、上記ポリペプチドの活性を増強させるか、または弱めるかのいずれかによって、その活性に量的または質的に影響し得ることが予想される。さらに、上記鎖中の個々のアミノ酸残基は、酸化、還元、または他の誘導体化によって改変され得、そして上記ポリペプチドは、活性を保持するフラグメントを得るために切断され得る。アンタゴニスト活性を破壊しないこのような変更は、本明細書において使用される目的の抗CD40抗体の定義から上記ポリペプチド配列を除かない。

#### 【0092】

当該分野は、ポリペプチド改変体の調製および使用に関する実質的なガイダンスを提供する。抗CD40抗体改変体の調製において、当業者は、天然のタンパク質ヌクレオチドまたはアミノ酸配列に対するどの修飾が、本発明の方法において使用される薬学的組成物の治療上活性な成分として使用するために適切である改変体を生じるかを容易に決定し得る。

#### 【0093】

(本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体を使用する処置方法)

本発明の方法はCD40発現細胞上のCD40シグナル伝達の刺激により媒介される疾患有する患者を処置するためのアンタゴニスト抗CD40抗体の使用に関する。「CD40発現細胞」とは、CD40抗原を発現する正常および悪性のB細胞を意図している。細胞におけるCD40発現を検出するための方法は当該分野で知られており、例えばPCR法、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウエスタンプロット、ELISA等を包含するが、これに限定されない。「悪性」B細胞とは、いずれかの新生物性のB細胞、例え

ばリンパ腫から誘導されたB細胞、例えば軽度-、中等度-、および高度-悪性B細胞リンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、エプスタイン-バーウィルス(EBV)誘導リンパ腫、および、エイズ関連リンパ腫、並びにB細胞急性リンパ芽球性白血病、骨髄腫、慢性リンパ性白血病、急性骨髄芽球性白血病等を意図しているが、これに限定されない。

#### 【0094】

「処置」とは、本明細書においては、患者へのアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの適用または投与、または、患者に由来する単離された組織または細胞へのアンタゴニスト抗CD40抗体またはそのフラグメントの適用または投与として定義され、ここで患者は疾患、疾患の症状、または疾患の罹患し易さを有しており、ここで、目的は疾患、疾患の症状または疾患の罹患し易さに対し、完治、治癒、緩和、緩解、改変、軽快、軽減、改善または影響をもたらすことである。「処置」とはまた疾患、疾患の症状、または疾患の罹患し易さを有している患者へのアンタゴニスト抗CD40抗体またはそのフラグメントを含む薬学的組成物の適用または投与、または、患者に由来する単離された組織または細胞へのアンタゴニスト抗CD40抗体またはそのフラグメントを含む薬学的組成物の適用または投与を意図しており、ここで、目的は疾患、疾患の症状または疾患の罹患し易さに対し、完治、治癒、緩和、緩解、改変、軽快、軽減、改善または影響をもたらすことである。

#### 【0095】

「抗腫瘍活性」とは悪性のCD40発現細胞の増殖または蓄積の速度の低減、即ち、既存の腫瘍の生育速度、または、治療中に生じた腫瘍の低減、および/または、既存の新生物(腫瘍)細胞または新しく形成した新生物細胞の破壊、即ち治療中の腫瘍の全体的大きさの減少を意図している。少なくとも1つの抗CD40抗体(またはその抗原結合フラグメント)を用いた治療はヒトにおけるCD40発現細胞上のCD40シグナル伝達の刺激に伴う疾患状態の治療に関連して有益である生理学的応答を誘発する。

#### 【0096】

本発明の方法は異常な制御不能なB細胞の増殖または蓄積に関連する非ホジキンリンパ腫の治療において使用できる。本発明の目的のためには、このようなリンパ腫はWorking Formulation分類スキームに従って、軽度悪性、中等度悪性、および高度悪性に分類されるB細胞リンパ腫であるものを指す(「The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project」, Cancer 49 (1982): 2112-2135参照)。即ち、軽度悪性B細胞リンパ腫は小型のリンパ球の濾胞性の小分裂の細胞、および、濾胞性の混合型小分裂および大細胞のリンパ腫を包含し; 中等度悪性のリンパ腫は濾胞性の大細胞、散在小分裂細胞、散在混合型小および大細胞、および散在大細胞リンパ腫を包含し; そして高度悪性リンパ腫はバーキットおよび非バーキット型の大細胞免疫芽性、リンパ芽性および小型非分裂細胞リンパ腫を包含する。

#### 【0097】

本発明の方法はRevised European and American Lymphoma Classification(REAL)システムに従って分類されるB細胞リンパ腫の治療処置において有用である。このようなB細胞リンパ腫は、例えば、前駆体B細胞新生物として分類されるリンパ腫、例えばBリンパ芽球性白血病/リンパ腫; 末梢B細胞新生物、例えばB細胞慢性リンパ性白血病/小型リンパ球リンパ腫、リンパプラズマ細胞様リンパ腫/免疫担当細胞腫、マントル細胞リンパ腫(MCL)、小胞中心リンパ腫(濾胞性)(例えば散在性小細胞、散在性混合型大小細胞、および散在性大細胞リンパ腫)、辺縁帶B細胞リンパ腫(例えば結節外、結節性および脾型)、ヘアリー細胞白血病、プラズマ細胞腫/骨髄腫、サブタイプ一次縦隔(胸腺性)の散在性大細胞B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫およびバーキット様高度悪性B細胞リンパ腫( high-grade B cell lymphoma); 急性白血病; 急性リンパ球性白血病; 骨髓芽球性白血病; 急性骨髓球性白血病; 前骨髓球性白血病; 骨髓单球性白血病; 单球

性白血病；赤白血病；顆粒球性白血病（慢性骨髓球性白血病）；慢性リンパ球性白血病；真性赤血球増加症；多発性骨髓腫；ヴァルデンストレームマクログロブリン血症；重鎖疾患；および未分類の軽度悪性または高度悪性のB細胞リンパ腫を包含するが、これらに限定されない。

#### 【0098】

本発明の方法は治療の間に更に生じる腫瘍の派生を防止する場合に有用である。本発明の方法は軽度悪性B細胞リンパ腫を有する対象、特に標準的な化学療法の後の再発を有する対象において特に有用である。軽度悪性B細胞リンパ腫は中等度および高度悪性のB細胞リンパ腫よりも無痛性であり、再発／弛張の経過を特徴とする。即ち、これらのリンパ腫の治療は、本発明の方法を用いれば、再発のエピソードが回数および重症度において低減するため、改善されるのである。

#### 【0099】

本明細書に記載したアンタゴニスト抗CD40抗体はまた炎症性疾患および免疫系の不全または障害、例えば全身性エリテマトーデス、乾癬、硬皮症、CREST症候群、炎症性筋炎、シェーグレン症候群、混合型結合組織疾患、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、炎症性腸疾患、急性呼吸窮迫症候群、肺炎症、特発性肺線維症、骨粗鬆症、遅延型過敏症、喘息、原発性胆汁性肝硬変および特発性血小板減少性紫斑病の治療において有用であるが、これらに限定されない。

#### 【0100】

本発明の方法によれば、本明細書において定義した少なくとも1つのアンタゴニスト抗CD40抗体（またはその抗原結合フラグメント）を用いて悪性ヒトB細胞に関する正の治療応答を促進する。癌の治療に関する「正の治療応答」とは、これらの抗体またはそのフラグメントの抗腫瘍活性に伴う疾患の改善、および／または、疾患に関連する症状の改善を意図している。即ち、抗増殖作用、腫瘍が更に派生することの防止、腫瘍の大きさの低減、癌細胞の数の低減、および／または、CD40発現細胞の刺激により媒介される症状1つ以上の低減が観察され得る。即ち、例えば、疾患の改善は完全な応答として特徴付けられる場合がある。「完全な応答」とはいずれかの以前の異常な放射線撮影試験、骨髄および脳脊髄液（CSF）の正常化を伴う臨床的に検知可能な疾患の非存在を意図している。このような応答は本発明の方法による治療の後少なくとも1ヶ月継続しなければならない。或いは、疾患の改善は部分的応答として分類してよい。「部分的応答」とは、新しい患部の非存在下において、そして、少なくとも1ヶ月持続的する、全ての測定可能な腫瘍負荷（即ち対象に存在する腫瘍細胞の数）の少なくとも約50%低減を意図している。このような応答は測定可能な腫瘍のみに適用される。

#### 【0101】

腫瘍の応答はスクリーニング手法、例えば磁気共鳴画像化（MRI）走査、X線撮影、コンピューター断層撮影（CT）走査、生体発光画像化、例えばルシフェラーゼ画像化、骨走査画像化および腫瘍生検試料採取、例えば骨髄吸引（BMA）を用いた腫瘍形態（即ち全体的腫瘍負荷、腫瘍サイズ等）における変化に関して試験できる。これらの正の治療応答のほかに、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを用いた治療を受けている対象は疾患に関連する症状の改善の有利な作用を経験してよい。即ち、B細胞腫瘍については、対象は所謂B症状、即ち寝汗、発熱、体重減少および／または蕁麻疹の低減を経験してよい。

#### 【0102】

「治療有効な用量または量」または「有効量」とは、投与された場合にCD40発現細胞の刺激を含む疾患有する患者の治療に関して正の治療応答をもたらすようなアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの量を意図する。本発明の一部の実施形態においては、抗CD40抗体またはそのフラグメントの治療有効用量は約0.01mg/kg～約4.0mg/kg、約0.01mg/kg～約3.0mg/kg、約0.1mg/kg～約3.0mg/kg、約1mg/kg～約3.0mg/kg、約3mg/kg～約3.0mg/kg、約3mg/kg～約2.5mg/kg、約3mg/kg～約2.0mg/kg

$\text{kg}$ 、約 $5\text{ mg}/\text{kg}$ ～約 $15\text{ mg}/\text{kg}$ または約 $7\text{ mg}/\text{kg}$ ～約 $12\text{ mg}/\text{kg}$ の範囲である。処置方法はアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの治療有効用量の単回投与または治療有効用量の複数回投与を包含する。

#### 【0103】

本発明の別の実施形態は例えばある治療レジメンの有効性を測定するための臨床試験の操作法の一部としての組織中の蛋白レベルの診断的モニタリングのためのアンタゴニスト抗CD40抗体の使用である。検出は検出可能な物質に抗体をカップリングさせることにより容易にすることができます。検出可能な物質の例は、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生体発光物質および放射性物質を包含する。安定な酵素にはセイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼを包含し；適当な補欠分子族複合体の例はストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンを包含し；適当な蛍光物質の例はウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンを包含し；発光物質の例はルミノールを包含し；生体発光物質の例はルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンを包含し；そして適当な放射性物質の例は $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^{3}\text{H}$ を包含する。

#### 【0104】

本明細書に記載した抗CD40抗体は更に、例えば試薬、例えばCD40を発現する細胞を同定するために使用できる標識された抗体を得るために使用できる。これは未知試料の細胞型を決定する場合に極めて有用である。モノクローナル抗体のパネルを使用して種および／または臓器の型により組織を同定することができる。同様の態様において、これらの抗CD40抗体を用いて組織培養細胞を汚染に関してスクリーニング（即ち培養物中のCD40発現および非CD40発現細胞の混合物の存在についてスクリーニング）することができる。

#### 【0105】

アンタゴニスト抗CD40抗体は刺激されたCD40発現細胞を含む疾患状態の治療のための既知の化学療法剤およびサイトカインと組み合わせて使用できる。例えば、本発明の抗CD40抗体をインターロイキン-2のようなサイトカインと組み合わせて使用できる。別の実施形態においては、本発明の抗CD40抗体をリツキシマブ（IDEC-C2B8：Rituxan（登録商標）；IDEC Pharmaceuticals Corp.，San Diego，California）と組み合わせて使用できる。

この態様において、本明細書に記載したアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくとも1つの他の癌の治療、例えば手術または外科的処置（例えば脾臓切除、肝切除、リンパ節切除、白血球搬出、骨髄移植など）；放射線療法；場合により自己骨髄移植と組み合わせた化学療法、ここで適当な化学療法剤は例えばフルダラビンまたはリン酸フルダラビン、クロラムブシル、ビンクリスチン、ペントスタチン、2-クロロデオキシアデノシン（クラドリビン）、シクロホスファミド、ドキソルビシン、プレドニゾンおよびこれらの組合せ（これらに限定されない）、例えばアントラサイクリン含有レジメン、例えばCAP（シクロホスファミド、ドキソルビシン+プレドニゾン）、CHOP（シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン+ドキソルビシン）、VAD（ビンクリスチン、ドキソルビシン+デキサメタゾン）、MP（メルファラン+プレドニゾン）および化学療法に使用する他の細胞毒性および／または治療薬、例えばミトキサンtron、ダウノルビシン、イダルビシン、アスパラギナーゼ、および、代謝拮抗物質、例えば、シタラビン、メトトレキセート、5-フルオロウラシルデカルバジン、6-チオグアニン、6-メルカブトプリンおよびネララビンを包含するもの（これらに限定されない）；他の抗癌モノクローナル抗体療法（例えば、アルメツズマブ（Campath（登録商標））または悪性B細胞上のCD52細胞表面糖蛋白をターゲティングした他の抗CD52抗体；リツキシマブ（Rituxan（登録商標））、完全ヒト抗体HuMax-CD20、R-1594、IMMU-106、TRU-015、AME-133、ト

シツモマブ / I - 131トシツモマブ (Bexxar (登録商標))、イブリツモマブチウキセタン (Zevalin (登録商標)) または悪性B細胞上のCD20抗原をターゲティングするいずれかの他の治療用抗CD20抗体；抗CD19抗体 (例えばMT103、二重特異性抗体)；抗CD22抗体 (例えばヒト化モノクローナル抗体エプラツズマブ)；ベバシズマブ (Avastin (登録商標)) またはヒト血管内皮成長因子をターゲティングする他の抗癌抗体；悪性B細胞上のCD22抗原をターゲティングする抗CD22抗体 (例えばモノクローナル抗体BL-22、アルファCD22毒素)；マクロファージコロニー刺激因子をターゲティングする - M - CSF抗体；多発性骨髓腫において過剰発現される核因子-カッパBの受容体活性化剤 (RANK) およびそのリガンド (RANKL) をターゲティングする抗体；悪性B細胞上のCD23抗原をターゲティングする抗CD23抗体 (例えばIDE-C-152)；CD80抗原をターゲティングする抗CD80抗体 (例えばIDE-C-114)；悪性B細胞上のCD38抗原をターゲティングする抗CD38抗体；悪性B細胞上に発現される主要組織適合複合体クラスII受容体をターゲティングする抗体 (抗MHC抗体)；悪性B細胞上のCD40抗原をターゲティングする他の抗CD40抗体 (例えばSGN-40)；および固形腫瘍および造血起源の腫瘍の多くにおいて発現される腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド受容体1 (TRAIL-R1) (例えばアゴニスト性ヒトモノクローナル抗体HGS-ETR1) およびTRAIL-R2をターゲティングする抗体)；小分子系癌療法、例えば微小管および/またはトポイソメラーゼ阻害剤 (例えば有糸分裂抑制剤ドラスタチンおよびドラスタチン類縁体；チブリシン結合剤T900607；XL119；およびトポイソメラーゼ阻害剤アミノカンプトテシン)、SDX-105 (塩酸ベンダムスチン)、イキサベピロン (エポチロン類縁体、別名BMS-247550)、蛋白キナーゼC阻害剤、例えばミドスタウリン ((PKC-412, CGP41251、N-ベンゾイルスタウロスボリン)、ピキサントロン、エロキサチン (抗新生物剤)、ガナイト (硝酸ガリウム)、Thalomid (登録商標) ((登録商標)サリドマイド)、サリドマイドの免疫モジュレート誘導体 (例えばレブリミド (以前は、レブミド))、Affinitak<sup>TM</sup> (蛋白キナーゼC-アルファのアンチセンス抑制剤)、SDX-101 (R-エトドラック、悪性リンパ球のアポトーシスを誘導)、第2世代のプリンヌクレオシド類縁体、例えばクロファラビン、癌細胞による蛋白Bcl-2の生産の抑制剤 (例えばアンチセンス剤であるオブリメルセンおよびGenasense (登録商標))、プロテオソーム抑制剤 (例えばVelcade<sup>TM</sup> (ボルテゾミブ))、小分子キナーゼ阻害剤 (例えばCHIR-258)、小分子VEGF阻害剤 (例えばZD-6474)、熱ショック蛋白 (HSP) 90の小分子阻害剤 (例えば17-AAG)、ヒストンデアセチラーゼの小分子阻害剤 (例えばハイブリッド/極性細胞分化HPC) 剤、例えばスペラニロヒドロキサム酸 (SAHA) およびFR-901228) およびアポトーシス剤、例えばTrisenoX (登録商標) (3酸化砒素) およびXcytrin (登録商標) (モテキサフィンガドリニウム)；ワクチン/免疫療法系癌治療法、例えばワクチン法 (例えば、Id-KLH、オンコファージ、ビタレチン)、個人別免疫療法または能動的イディオタイプ免疫療法 (例えばMyVax (登録商標) Personalized Immunotherapy、以前の名称GTOP-99)、Promune (登録商標) (CpG7909、tolll-like受容体9 (TLR9) の合成アゴニスト)；インターフェロン-アルファ療法、インターロイキン-2 (IL-2) 療法、IL-12療法、IL-15療法、およびIL-21療法；ステロイド療法；または他の癌療法と組み合わせて (これらに限定されない) 投与され；ここで付加的な癌療法はアンタゴニスト抗CD40抗体療法の前、最中、または後に投与してよい。即ち、化学療法、放射線療法、他の抗癌抗体療法、小分子系癌療法またはワクチン/免疫療法系癌療法の場合のように複合療法が他の治療薬の投与と組み合わせたアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの投与を含む場合は、本発明の方法は別々の処方物または単一の処方物を用いた同時投与、またはいずれかの順序における連続的投与を包含する。本発明の方法が組み合わせた治療レジメンを含む場合は、これらの療法は同時にを行うことができ、即ち、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗

原結合フラグメントは他の癌療法と同時に、または同じ時間枠内で投与される（即ち、治療は同時進行してよいが、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは他の癌療法と厳密に同時に投与されない）。或いは、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは他の癌療法の前または後に投与してもよい。異なる癌療法の逐次的投与は、投与された患者が治療の第1の過程に応答して寛解または再発の可能性が低減するか否かに関わらず実施してよい。複合療法が細胞毒性薬の投与と組み合わせたアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの投与を含む場合、好ましくはアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは細胞毒性薬の投与の前に投与する。

#### 【0106】

本発明の一部の実施形態においては、本明細書に記載したアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは化学療法と組み合わせて、そして場合により自己骨髄移植と組み合わせて投与され、ここで抗体および化学療法剤は逐次的にいずれかの順序において、または、同時に（即ち同一時点において、または同じ時間枠内において）投与してよい。適當な化学療法剤の例はフルダラビンまたはリン酸フルダラビン、クロラムブシル、ビンクリスチン、ペントスタチン、2-クロロデオキシアデノシン（クラドリビン）、シクロホスファミド、ドキソルビシン、プレドニゾンおよびこれらの組合せ、例えばアントラサイクリン含有レジメン、例えばCAP（シクロホスファミド、ドキソルビシン+プレドニゾン）、CHOP（シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン+ドキソルビシン）、VAD（ビンクリスチン、ドキソルビシン+デキサメタゾン）、MP（メルファラン+プレドニゾン）および化学療法に使用する他の細胞毒性および/または治療薬、例えばミトキサントロン、ダウノルビシン、イダルビシン、アスピラギナーゼ、および、代謝拮抗物質、例えば、シタラビン、メトトレキセート、5-フルオロウラシルデカルバジン、6-チオグアニン、6-メルカプトプリンおよびネララビンを包含するが、これらに限定されない。一部の実施形態においては、アンタゴニスト抗CD40抗体、例えばモノクローナル抗体CHIR-12.12またはCHIR-5.9またはその抗原結合フラグメントは化学療法剤の投与の前に投与する。別の実施形態においてはアンタゴニスト抗CD40抗体は化学療法剤の投与の後に投与する。更に別の実施形態においては、化学療法剤はアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントと同時に投与する。

#### 【0107】

即ち、例えば、一部の実施形態においては、アンタゴニスト抗CD40抗体、例えばモノクローナル抗体CHIR-12.12またはCHIR-5.9またはその抗原結合フラグメントはフルダラビンまたはリン酸フルダラビンと組み合わせて投与してよい。1つのそのような実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントはフルダラビンまたはリン酸フルダラビンの投与の前に投与する。別の実施形態においては、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントはフルダラビンまたはリン酸フルダラビンの投与の後に投与する。更に別の実施形態においては、フルダラビンまたはリン酸フルダラビンはアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントと同時に投与する。

#### 【0108】

本発明の別の実施形態においては、クロラムブシル、即ちアルキル化剤を本明細書に記載したアンタゴニスト抗CD40抗体、例えばモノクローナル抗体CHIR-12.12またはCHIR-5.9または抗原結合フラグメントと組み合わせて投与する。1つのそのような実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントはクロラムブシルの投与の前に投与する。別の実施形態においては、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントはクロラムブシルの投与の後に投与する。更に別の実施形態においては、クロラムブシルはアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントと同時に投与する。

#### 【0109】

本発明の別の実施形態においては、アントラサイクリン含有レジメン、例えばC A P (シクロホスファミド、ドキソルビシン+プレドニソン) およびC H O P (シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニソン+ドキソルビシン) を本明細書に記載したアンタゴニスト抗C D 4 0 抗体、例えばモノクローナル抗体C H I R - 1 2 . 1 2 またはC H I R - 5 . 9 またはその抗原結合フラグメントと組み合わせて投与してよい。1つのそのような実施形態において、アンタゴニスト抗C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントはアントラサイクリン含有レジメンの投与の前に投与する。別の実施形態においては、アンタゴニスト抗C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントはアントラサイクリン含有レジメンの投与の後に投与する。更に別の実施形態においては、アントラサイクリン含有レジメンはアンタゴニスト抗C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントと同時に投与する。

#### 【 0 1 1 0 】

別の実施形態においては、本明細書に記載したアンタゴニスト抗C D 4 0 抗体、例えばモノクローナル抗体C H I R - 1 2 . 1 2 またはC H I R - 5 . 9 またはその抗原結合フラグメントはアレムツズマブ (Campath (登録商標) ; Berlex Laboratories, Richmond, Californiaにより販売) と組み合わせて投与する。アレムツズマブは悪性B細胞上に発現されるC D 5 2 抗原をターゲティングする組み換えヒト化モノクローナル抗体 (Campath - 1 H) である。1つのそのような実施形態において、アンタゴニスト抗C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントはアレムツズマブの投与の前に投与する。別の実施形態においては、アンタゴニスト抗C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントはアレムツズマブの投与の後に投与する。更に別の実施形態においては、アレムツズマブはアンタゴニスト抗C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントと同時に投与する。

#### 【 0 1 1 1 】

別の実施形態においては、本明細書に記載したアンタゴニスト抗C D 4 0 抗体、例えばモノクローナル抗体C H I R - 1 2 . 1 2 またはC H I R - 5 . 9 またはその抗原結合フラグメントは悪性B細胞上のC D 2 0 抗原をターゲティングする治療用抗C D 2 0 抗体、例えばリツキシマブ (Rituxan (登録商標) ) 、完全ヒト抗体HuMax - C D 2 0 、R - 1 5 9 4 、IMMU - 1 0 6 、TRU - 0 1 5 、AME - 1 3 3 、トシツモマブ / I - 1 3 1 トシツモマブ (Bexxar (登録商標) ) またはイブリツモマブチウキセタン (Zevalin (登録商標) ) と組み合わせて投与する。1つのそのような実施形態において、アンタゴニスト抗C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントは抗C D 2 0 抗体の投与の前に投与する。別の実施形態においては、アンタゴニスト抗C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントは抗C D 2 0 抗体の投与の後に投与する。更に別の実施形態においては、抗C D 2 0 抗体はアンタゴニスト抗C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントと同時に投与する。

#### 【 0 1 1 2 】

別の実施形態においては、本明細書に記載したアンタゴニスト抗C D 4 0 抗体、例えばモノクローナル抗体C H I R - 1 2 . 1 2 またはC H I R - 5 . 9 またはその抗原結合フラグメントは小分子系癌療法、例えば微小管および/またはトポイソメラーゼ阻害剤 (例えば有糸分裂抑制剤ドラスタチンおよびドラスタチン類縁体; チュブリン結合剤T 9 0 0 6 0 7 ; X L 1 1 9 ; およびトポイソメラーゼ阻害剤アミノカンプトテシン) 、S D X - 1 0 5 (塩酸ベンダムスチン) 、イキサベピロン (エポチロン類縁体、別名B M S - 2 4 7 5 5 0 ) 、蛋白キナーゼC阻害剤、例えばミドスタウリン ((P K C - 4 1 2 , C G P 4 1 2 5 1 、N - ベンゾイルスタウロスポリン) 、ピキサントロン、エロキサチン (抗新生物剤) 、ガナイト (硝酸ガリウム) 、Thalomid (登録商標) (サリドマイド) 、サリドマイドの免疫モジュレート誘導体 (例えばレブリミド (以前は、レブミド) ) 、Affinitak<sup>TM</sup> (蛋白キナーゼC - アルファのアンチセンス抑制剤) 、S D X - 1 0 1 (R - エトドラック、悪性リンパ球のアポトーシスを誘導) 、第2世代のプリンヌクレオシド類縁体、例えばクロファラビン、癌細胞による蛋白B c 1 - 2 の生産の抑制剤

( 例えばアンチセンス剤であるオブリメルセンおよび *G en a s e n s e* (登録商標) ) 、プロテオソーム抑制剤 ( 例えば *V elcade<sup>TM</sup>* (ボルテゾミブ) ) 、小分子キナーゼ阻害剤 ( 例えば *C H I R - 2 5 8* ) 、小分子 *V E G F* 阻害剤 ( 例えば *Z D - 6 4 7 4* ) 、熱ショック蛋白 (*H S P*) 9 0 の小分子阻害剤 ( 例えば *1 7 - A A G* ) 、ヒストンデアセチラーゼの小分子阻害剤 ( 例えばハイブリッド / 極性細胞分化 *H P C* ) 剤、例えばスペラニロヒドロキサム酸 (*S A H A*) および *F R - 9 0 1 2 2 8* ) およびアポトーシス剤、例えば *T r i s e n o x* (登録商標) ( 3 酸化砒素 ) および *X c y t r i n* (登録商標) ( モテキサフィンガドリニウム ) と組み合わせて投与する。1つのそのような実施形態において、アンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体またはその抗原結合フラグメントは小分子系癌療法の投与の前に投与する。別の実施形態においては、アンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体またはその抗原結合フラグメントは小分子系癌療法による処置の後に投与する。更に別の実施形態においては、小分子系癌療法はアンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体またはその抗原結合フラグメントと同時に投与する。

#### 【 0 1 1 3 】

別の実施形態においては、本明細書に記載したアンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体、例えばモノクローナル抗体 *C H I R - 1 2 . 1 2* または *C H I R - 5 . 9* またはその抗原結合フラグメントはワクチン / 免疫療法系癌治療法、例えばワクチン法 ( 例えば、 *I d - K L H* 、オンコファージ、ビタレチン ) 、個人別免疫療法または能動的イディオタイプ免疫療法 ( 例えば *M y V a x* (登録商標) *P e r s o n a l i z e d I m m u n o t h e r a p y* 、以前の名称 *G T O P - 9 9* ) 、 *P r o m u n e* (登録商標) ( *C p G 7 9 0 9* 、 *t o 1 1 - 1 i k e* 受容体 9 (*T L R 9*) の合成アゴニスト ) 、インターフェロン - アルファ療法、インターロイキン - 2 (*I L - 2*) 療法、 *I L - 1 2* 療法、 *I L - 1 5* 療法、および *I L - 2 1* 療法またはステロイド療法と組み合わせて 使用され得る。1つのそのような実施形態において、アンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体またはその抗原結合フラグメントはワクチン / 免疫療法系癌療法の投与の前に投与する。別の実施形態においては、アンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体またはその抗原結合フラグメントはワクチン / 免疫療法系癌療法による処置の後に投与する。更に別の実施形態においては、ワクチン / 免疫療法系癌療法はアンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体またはその抗原結合フラグメントと同時に投与する。

#### 【 0 1 1 4 】

1つのそのような実施形態において、本明細書に記載したアンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体、例えばモノクローナル抗体 *C H I R - 1 2 . 1 2* または *C H I R - 5 . 9* またはその抗原結合フラグメントは *I L - 2* と組み合わせて 使用され得る。 *I L - 2* 、即ち 処置された 患者におけるナチュラルキラー (*N K*) エフェクター細胞の数を増大させることができている物質を本発明のアンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体またはその抗原結合フラグメントの前またはこれと同時に投与することができる。この増大した *N K* エフェクター細胞数は投与されたアンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体またはその抗原結合フラグメントの増強された *A D C C* 活性をもたらす。別の実施形態においては、 *I L - 2 1* は本明細書に記載したアンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体、例えばモノクローナル抗体 *C H I R - 1 2 . 1 2* または *C H I R - 5 . 9* またはその抗原結合フラグメントと組み合わせて投与された場合、 *N K* 細胞活性を刺激する免疫療法剤として作用する。

#### 【 0 1 1 5 】

更にまた、2種以上の治療薬と本明細書に記載したアンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体の複合療法もまた刺激された *C D 4 0* 発現細胞を含む疾患状態、例えば *B* 細胞関連癌、および自己免疫および / または炎症性の障害の治療のために使用できる。例えば2種の化学療法剤を本明細書に記載したアンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体と組み合わせて投与する、そして、化学療法剤と別の抗癌モノクローナル抗体 ( 例えばアレムツズマブ、リツキシマブまたは抗 *C D 2 3* 抗体 ) を本明細書に記載したアンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体と組み合わせて投与する、3種複合療法も包含されるが、これに限定されない。このような組合せの例は、フルダラビン、シクロホスファミドおよびアンタゴニスト抗 *C D 4 0* 抗体、例えばモノクローナル抗体 *C H I R - 1 2 . 1 2* または *C H I R - 5 . 9* またはその抗原結合フラグ

メントの組合せ；およびフルダラビン、抗CD20抗体、例えばリツキシマブ(Rituxan(登録商標)；IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California)およびアンタゴニスト抗CD40抗体、例えばモノクローナル抗体CHIR-12.12またはCHIR-5.9またはその抗原結合フラグメントの組合せを包含する。

#### 【0116】

(薬学的処方物および投与様式)

本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体はCD40発現細胞媒介疾患、例えばSLE、PBC、ITP、多発性硬化症、乾癬、クローン病、移植片拒絶反応およびB細胞リンパ腫を防止または治療するために治療上有効である濃度において投与する。この目的を達成するためには、抗体は当該分野で知られている許容される賦形剤種々を使用して処方してよい。典型的には抗体は静脈内または腹腔内のいずれかの注射により投与される。この投与を達成するための方法は当該分野で知られている。局所または経口投与してよい、または粘膜を通過する伝達が可能な、組成物を得ることも可能である。

#### 【0117】

静脈内投与は、投与される抗CD40抗体に依存して、好ましくは約1時間～約10時間にわたる期間、より好ましくは約1時間～約8時間にわたる期間、さらにより好ましくは約2時間～7時間にわたる期間、なにより好ましくは約4時間～6時間にわたる期間の注入によって起こる。薬学的組成物による最初の注入は、約4時間～約6時間の期間にわたって行わ得れ、続く注入はより迅速に送達され得る。続く注入は、約1時間～約6時間(例えば、約1時間～約4時間、約1時間～約3時間、または約1時間～約2時間を含む)の期間にわたって投与され得る。

#### 【0118】

本発明の薬学的組成物は、意図される投与経路と適合するように処方される。可能な投与経路の例としては、非経口投与(例えば、静脈内(IV)、筋肉内(IM)、皮内、皮下(SC)、または注入)、経口投与および肺投与(例えば、吸入)、鼻投与、経皮(局所)投与、経粘膜投与ならびに直腸投与が挙げられる。非経口適用、皮内適用、もしくは皮下適用に使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：滅菌希釈液(例えば、注射用水)、生理食塩溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、ポリピレンギリコールまたは他の合成溶媒；抗菌剤(例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン)；抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム)；キレート剤(例えば、エチレンジアミン四酢酸)；緩衝剤(例えば、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩、および張度調整のための薬剤(塩化ナトリウムまたはブドウ糖))。pHは、酸または塩基(例えば、塩酸または水酸化ナトリウム)で調整され得る。この非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、またはガラス製もしくはプラスチック製の複数用量バイアルの中に封じ込められ得る。

#### 【0119】

上記抗CD40抗体は、代表的には、標準的技術によって、薬学的に受容可能な緩衝剤(例えば、滅菌生理食塩水、滅菌緩衝水、ポリピレンギリコール、前述のものの組み合わせなど)内に提供される。非経口的に投与可能な薬剤を調製するための方法は、Remington's Pharmaceutical Sciences(第18版；Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990)(本明細書において参考として援用される)において記載される。例えば、本発明の方法において使用するために適切な安定化抗体の薬学的処方物を記載するWO98/56418もまた参照のこと。

#### 【0120】

投与される少なくとも1種の抗CD40抗体またはそのフラグメントの量は、当業者によって過度の実験なしに容易に決定される。投与の様式および少なくとも1種のアンタゴニスト抗CD40抗体(またはそのフラグメント)のそれぞれの量に影響する因子としては、上記疾患の重篤度、上記疾患の病歴、ならびに治療を受ける個体の年齢、身長、体重

、健康状態、および生理学的状態が挙げられるが、これらに限定されない。同様に、投与されるアンタゴニスト抗CD40抗体またはそのフラグメントの量は、投与の様式およびその被験体がこの抗腫瘍剤の一回用量または複数用量のどちらを受けるかに依存する。一般的に、治療を受ける被験体の体重の増加につれて、抗CD40抗体またはそのフラグメントの投薬量をより高くすることが好ましい。投与される抗CD40抗体またはそのフラグメントの用量は、約0.003mg/kg～約50mg/kgの範囲であり、好ましくは、0.01mg/kg～約40mg/kgの範囲である。従って、例えば、用量は、0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、2.5mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、7mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、または50mg/kgであり得る。

【 0 1 2 1 】

本発明の別の実施形態において、上記方法は、複数用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはそのフラグメントの投与を包含する。上記方法は、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、15回、20回、25回、30回、35回、40回、もしくはそれ以上の治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはそのフラグメントを含有する薬学的組成物の投与を包含し得る。抗CD40抗体またはそのフラグメントを含有する薬学的組成物の複数用量の投与の頻度および期間は、当業者によって過度の実験なしに容易に決定され得る。さらに、治療有効用量の抗体を用いた被験体の処置は、一回の処置を包含し得るか、または好ましくは一連の処置を包含し得る。好ましい例において、被験体は、約0.1～20mg/kg体重の間の範囲のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて、約1週間～10週間の間、好ましくは約2週間～8週間の間、より好ましくは約3週間～7週間の間、そしてさらにより好ましくは約4週間、5週間、または6週間の間に週に1回処置される。処置は、再発を防止するためか、または再発の徴候に対して、毎年行われ得る。処置に使用される抗体またはその抗原結合フラグメントの有効な投薬量は、特定の処置のクールにわたって増加されても減少されてもよいこともまた、認識される。投薬量の変化は、本明細書において記載される診断アッセイの結果から生じ得、そしてそのアッセイの結果から明らかになり得る。

【 0 1 2 2 】

従って、1つの実施形態において、その投薬レジメンは、処置期間の1日目、7日目、14日目、および21日目での治療有効用量の少なくとも1種の抗CD40抗体またはそのフラグメントの第1の投与を含む。別の実施形態において、上記投薬レジメンは、処置期間の1週の1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、6日目、および7日目での治療有効用量の少なくとも1種の抗CD40抗体またはそのフラグメントの第1の投与を含む。さらなる実施形態は、処置期間の1週の1日目、3日目、5日目、および7日目での治療有効用量の少なくとも1種の抗CD40抗体またはそのフラグメントの第1の投与を有する投薬レジメン；処置期間の1週の1日目および3日目での治療有効用量の少なくとも1種の抗CD40抗体またはそのフラグメントの第1の投与を含む投薬レジメン；および処置期間の1週の1日目での治療有効用量の少なくとも1種の抗CD40抗体またはそのフラグメントの第1の投与を含む好ましい投薬レジメンを包含する。この処置期間は、1週、2週、3週、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、または1年を含み得る。処置期間は、続いてよいし、互いに1日、1週、2週、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、または1年離れていてよい。

【 0 1 2 3 】

いくつかの実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの治療上有効な用量の範囲は、約0.003mg/kg～約50mg/kg、約0.01mg/kg～約40mg/kg、約0.01mg/kg～約30mg/kg、約0.1mg/kg～約30mg/kg、約0.5mg/kg～約30mg/kg、約1mg/kg～約30mg/kg、約3mg/kg～約30mg/kg、約3mg/kg～約

2.5 mg / kg、約3 mg / kg～約2.0 mg / kg、約5 mg / kg～約1.5 mg / kg、または約7 mg / kg～約1.2 mg / kgである。従って、例えば、任意の1種のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント（例えば、抗CD40モノクローナル抗体CHIR-12.12もしくはモノクローナル抗体CHIR-5.9）またはその抗原結合フラグメントの用量は、0.003 mg / kg、0.01 mg / kg、0.03 mg / kg、0.1 mg / kg、0.3 mg / kg、0.5 mg / kg、1 mg / kg、1.5 mg / kg、2 mg / kg、2.5 mg / kg、3 mg / kg、5 mg / kg、7 mg / kg、10 mg / kg、15 mg / kg、20 mg / kg、25 mg / kg、30 mg / kg、35 mg / kg、40 mg / kg、45 mg / kg、50 mg / kg、または約0.003 mg / kg～約50 mg / kgの範囲にある他のそのような用量である得る。同じ治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、抗体投薬の各々の週を全体にわたって、投与され得る。あるいは、異なる治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、処置期間のクールにわたって使用され得る。

#### 【0124】

いくつかの実施形態において、本明細書の他の部分で定義されるように、最初の治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、より低い用量範囲（すなわち、約0.003 mg / kg～約2.0 mg / kg）であり得、引き続く用量は、より高い用量範囲（すなわち、約2.0 mg / kg～約5.0 mg / kg）になり得る。

#### 【0125】

代替的な実施形態において、本明細書の他の部分で定義されるように、最初の治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、より高い用量範囲（すなわち、約2.0 mg / kg～約5.0 mg / kg）であり得、引き続く用量は、より低い用量範囲（すなわち、0.003 mg / kg～約2.0 mg / kg）になり得る。従って、1つの実施形態において、上記最初の治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、約2.0 mg / kg～約3.5 mg / kg（約2.0 mg / kg、約2.5 mg / kg、約3.0 mg / kg、および3.5 mg / kgを含む）であり、そして引き続く治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、約5 mg / kg～約1.5 mg / kg（約5 mg / kg、約8 mg / kg、約1.0 mg / kg、約1.2 mg / kg、および約1.5 mg / kgを含む）である。

#### 【0126】

本発明のいくつかの実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体療法は、「ローディング用量（loading dose）」の抗体またはその抗原結合フラグメントを、アンタゴニスト抗CD40抗体療法を必要としている被験体に投与することによって開始される。「ローディング用量」によって、投与される抗体またはその抗原結合フラグメントの用量がより高い用量範囲（すなわち、約2.0 mg / kg～約5.0 mg / kg）にある、上記被験体に投与されるアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの最初の用量が意図される。上記「ローディング用量」は、完全な「ローディング用量」が約24時間の期間内に投与される限り、一回投与（例えば、抗体またはその抗原結合フラグメントがIV投与される一回注入）としてか、または複数投与（例えば、抗体またはその抗原結合フラグメントがIV投与される複数注入）として投与され得る。「ローディング用量」の投与に続いて、次いで上記被験体は、1以上のさらなる治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを投与される。引き続く治療有効用量は、例えば、毎週の投薬スケジュールに従ってか、または2週間に一度、3週間に一度、もしくは4週間に一度、投与され得る。このような実施形態において、上記引き続く治療有効用量は、一般的により低い用量範囲（すなわち、0.003 mg / kg～約2.0 mg / kg）内にある。

#### 【0127】

あるいは、いくつかの実施形態において、「ローディング用量」に続いて、上記引き続

く治療有効用量のアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントは、「維持スケジュール」に従って投与される。このスケジュールにおいて、上記治療有効用量の抗体またはその抗原結合フラグメントは、1ヶ月に1回、6週間に1回、2ヶ月に1回、10週間に1回、3ヶ月に1回、14週間に1回、4ヶ月に1回、18週間に1回、5ヶ月に1回、22週間に1回、6ヶ月に1回、7ヶ月に1回、8ヶ月に1回、9ヶ月に1回、10ヶ月に1回、11ヶ月に1回、または12ヶ月に1回、投与される。このような実施形態において、上記治療有効用量のアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントは、特に引き続く用量がより頻繁な間隔（例えば、2週間に1回～1ヶ月に1回）で投与される場合、より低い用量範囲（すなわち、0.003 mg / kg～約20 mg / kg）であるか、または特に引き続く用量がより頻繁でない間隔（例えば、引き続く用量が約1ヶ月～約12ヶ月隔て投与される）で投与される場合、より高い投薬範囲内（すなわち、約20 mg / kg～約50 mg / kg）である。

#### 【 0 1 2 8 】

本発明の方法において使用するための、本明細書において記載される薬学的組成物中に存在するアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体は、天然のものであっても、組換え技術によって得られても良いし、そして任意の供給源（例えば、マウス、ラット、ウサギ、靈長類、ブタおよびヒトのような哺乳動物供給源が挙げられる）に由来してもよい。好ましくは、このようなポリペプチドは、ヒト供給源に由来し、そしてより好ましくはハイブリドーマ細胞株からの組換えヒトタンパク質である。

#### 【 0 1 2 9 】

本発明の方法において有用な薬学的組成物は、本発明のアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体の生物学的に活性な改変体を包含し得る。このような改変体は、被験体に投与されたときに、改変体ポリペプチドを含有する薬学的組成物が、天然のポリペプチドを含有する薬学的組成物と同じ治療的効果を有するように、上記天然ポリペプチドの所望の生物学的活性を保持するべきである。すなわち、上記改変体の抗 C D 4 0 抗体は、天然のアンタゴニスト抗体（例えば、それぞれハイブリドーマ細胞株 5.9 またはハイブリドーマ細胞株 12.12 によって発現される C H I R - 5.9 または C H I R - 12.12 ）について観察されるものと類似した様式において、薬学的組成物中の治療活性成分として機能する。改変体抗 C D 4 0 抗体が、所望の生物学的活性を保持し、それ故、薬学的組成物中の治療活性成分として機能するか否かを決定するための方法は、当該分野で利用可能である。抗体改変体の生物学的活性は、天然のアンタゴニスト抗体の活性を測定するために特異的に設計されたアッセイ（本発明において記載されるアッセイを含む）を使用して測定され得る。

#### 【 0 1 3 0 】

治療活性成分として本明細書中に記載される結合特性を有するアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体を含有する、あらゆる薬学的組成物が、本発明の方法において使用され得る。従って、1種以上の本発明のアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体を含有する液体、凍結乾燥または噴霧乾燥した組成物は、本発明の方法に従う、その後の被験体への投与のために、水系もしくは非水系の溶液または懸濁液として調製され得る。これらの組成物の各々は、治療的または予防的に活性な成分として、少なくとも1種の本発明のアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体を含有する。「治療的または予防的に活性な成分」により、抗 C D 4 0 抗体が、組成物中に特異的に組み込まれて、薬学的組成物が被験体に投与されるときに、この被験体内で疾患または状態の処置、予防または診断に関して、所望の治療的または予防的な応答をもたらすことが意図される。好ましくは、薬学的組成物は、適切な安定化剤、充填剤、またはこれらの両方を含有し、調製および保存の間の、タンパク質の安定性および生物学的活性の喪失に伴う問題を最小限にする。

#### 【 0 1 3 1 】

処方用物質（ f o r m u l a n t ）が、本発明のアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体を含有する薬学的組成物に添加され得る。これらの処方用物質としては、油、ポリマー、ビタミン、炭水化物、アミン酸（ a m i n e a c i d ）、塩、緩衝液、アルブミン、界面活性

剤、または充填剤が挙げられ得るがこれらに限定されない。好ましくは、炭水化物としては、糖または糖アルコール（例えば、単糖類、二糖類、もしくは多糖類、または水溶性グリカン）が挙げられる。糖類またはグルカンとしては、フルクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、スクロース、デキストラン、ブルラン、デキストリン、シクロデキストリンおよびシクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、ならびにカルボキシメチルセルロース、またはこれらの混合物が挙げられ得る。「糖アルコール」は、ヒドロキシル基を有するC<sub>4</sub>～C<sub>8</sub>炭化水素として定義され、そして、糖アルコールとしては、ガラクトール、イノシトール、マンニトール、キシリトール、ソルビトール、グリセロールおよびアラビトールが挙げられる。これらの糖または糖アルコールは、個別または組み合わせで使用され得る。糖または糖アルコールの濃度は、1.0%w/vと7%w/vとの間であり、より好ましくは、2.0%w/vと6.0%w/vとの間である。好ましくは、アミノ酸としては、左旋（L）形態のカルニチン、アルギニンおよびベタインが挙げられる；しかし、他のアミノ酸も添加され得る。好ましいポリマーとしては、2,000と3,000との間の平均分子量を有するポリビニルピロリドン（PVP）、または、3,000と5,000との間の平均分子量を有するポリエチレングリコール（PEG）が挙げられる。処方物中に添加され得る界面活性剤としては、欧州特許第270,799号および同第268,110号に示される。

### 【0132】

さらに、抗体は、例えば、その循環半減期を増加させるために、ポリマーへの共有結合によって化学修飾され得る。好ましいポリマー、およびこのポリマーをペプチドに結合させる方法は、米国特許第4,766,106号；同第4,179,337号；同第4,495,285号；および同第4,609,546号（これらは、全て、その全体が本明細書中に参考として援用される）に示される。好ましいポリマーは、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリエチレングリコール（PEG）である。PEGは、室温で水溶性であり、一般式：R(O---CH<sub>2</sub>---CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O---Rを有する。この式において、Rは、水素、またはアルキル基もしくはアルカノール基のような保護基であり得る。好ましくは、この保護基は、1個と8個の間の炭素を有し、より好ましくは、この保護基はメチルである。記号nは、正の整数であり、好ましくは、1と1,000との間、より好ましくは、2と500との間である。PEGは、1,000と40,000との間、より好ましくは、2,000と20,000との間、最も好ましくは、3,000と12,000との間の好ましい平均分子量を有する。好ましくは、PEGは、少なくとも1つのヒドロキシ基を有し、より好ましくは、それは、末端のヒドロキシ基である。好ましくはインヒビター上の遊離アミノ基と反応するように活性化されるのは、このヒドロキシ基である。しかし、反応基の型および量は、本発明の共有結合化PEG/抗体を達成するために変動し得ることが理解される。

### 【0133】

水溶性のポリオキシエチル化ポリオールもまた、本発明において有用である。これらとしては、ポリオキシエチル化ソルビトール、ポリオキシエチル化グルコース、ポリオキシエチル化グリセロール（POG）などが挙げられる。POGが好ましい。1つの理由は、ポリオキシエチル化グリセロールのグリセロール骨格が、例えば、動物およびヒトのモノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリドにおいて天然に存在するものと同じ骨格であるからである。従って、この分枝形成は、必ずしも体内で外来因子として認識されない。POGは、PEGと同じ範囲の好ましい分子量を有する。POGの構造は、Knaufら（1988）J.Bio.Chem.263:15064-15070に示され、POG/IL-2結合体の考察については、米国特許第4,766,106号に見られ、これらは、両方とも、その全体が本明細書により参考として援用される。

### 【0134】

循環半減期を増加するための別の薬物送達系は、リポソームである。リポソーム送達系を調製する方法は、Gabizonら（1982）Cancer Research 4

2 : 4 7 3 4 ; Cafiso (1981) Biochem Biophys Acta 649 : 129 ; および Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Eng. 9 : 467 において議論されている。他の薬物送達系が当該分野で公知であり、例えば、Poznanskyら (1980) Drug Delivery Systems (R. L. Juliano 編, Oxford, N. Y.) pp. 253 - 315 ; Poznansky (1984) Pharm Revs 36 : 277 に記載される。

#### 【0135】

薬学的組成物に組み込まれる処方用物質は、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの安定性のために提供されるべきである。すなわち、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、その物理的および/または化学的安定性を保持し、そして、所望の生物学的活性（すなわち、本明細書において上で定義される1種以上のアンタゴニスト活性（T細胞により刺激された正常なヒト末梢B細胞による免疫グロブリン分泌の阻害；Jurkat T細胞により刺激された正常なヒト末梢B細胞の生存および/または増殖の阻害；CD40L発現細胞もしくは可溶性CD40リガンド（sCD40L）により刺激された正常ヒト末梢B細胞の生存および/または増殖の阻害；sCD40Lもしくは固相CD40Lにより刺激された、あらゆる細胞における「生存」抗アポトーシス細胞内シグナルの阻害；sCD40Lまたは固相CD40Lとの連結の際の任意の細胞におけるCD40シグナル伝達の阻害；ならびに、本明細書中の他の部分で言及した、ヒト悪性B細胞の増殖の阻害が挙げられるがこれらに限定されない））を有するべきである。

#### 【0136】

タンパク質の安定性をモニタリングするための方法は、当該分野で周知である。例えば、Jones (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10 : 29 - 90 ; Lee 編 (1991) Peptide and Protein Drug Delivery (Marcel Dekker, Inc., New York, New York) ; および本明細書中、以下に開示される安定性アッセイを参照のこと。一般に、タンパク質の安定性は、特定の時間の間にわたって、選択された温度において測定される。好ましい実施形態において、安定な抗体の薬学的処方物は、室温（約25）において、少なくとも1ヶ月、少なくとも3ヶ月、もしくは少なくとも6ヶ月保存した場合に、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの安定性を提供し、そして/あるいは、2~8において、少なくとも6ヶ月間、少なくとも9ヶ月間、少なくとも12ヶ月間、少なくとも18ヶ月間、少なくとも24ヶ月間、安定である。

#### 【0137】

薬学的組成物中に処方される場合、抗体のようなタンパク質は、その薬学的組成物中で、沈殿、凝集および/または変性の、目に見える徵候（すなわち、変色または透明度の喪失）または（例えば、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）またはUV光散乱を使用して）測定可能な徵候を示さない場合に、所定の時点において、その物理的安定性を保持すると考えられる。化学的安定性に関して、薬学的組成物中に処方される場合、抗体のようなタンパク質は、その薬学的組成物中で、化学的安定性の測定が、そのタンパク質（すなわち、抗体）が、目的の生物学的活性を保持することを暗示する場合に、所定の時点において、その化学的安定性を保持すると考えられる。化学的安定性の変化をモニタリングするための方法は、当該分野で周知であり、この方法としては、例えば、SDS-PAGE、SECおよび/またはマトリックス支援レーザー脱離イオン化/飛行時間質量分析を使用する、タンパク質の化学的に変更された形態（例えば、クリッピングからの結果）を検出するための方法；および、例えば、イオン交換クロマトグラフィーを使用する、分子の電荷の変化に伴う分解（例えば、脱アミドに伴う分解）を検出する方法が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、本明細書中で、以下に開示される方法を参照のこと。

#### 【0138】

薬学的組成物中に処方される場合、アンタゴニスト抗CD40抗体、またはその抗原結合フラグメントは、所定の時点での所望の生物学的活性が、その薬学的組成物が調製され

た時点で所望の生物学的活性に適切なアッセイにおいて測定されるときに示される所望の生物学的活性の、約30%以内、好ましくは、約20%以内である場合に、その時点において所望の生物学的活性を保持するとみなされる。本明細書中に開示されるアンタゴニスト抗CD40抗体およびその抗原結合フラグメントの所望の生物学的活性を測定するためのアッセイは、本明細書中の実施例に記載されるように実施され得る。また、Schultz et al (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8200-8204; Denton et al (1998) Pediatr. Transplant. 2: 6-15; Evans et al (2000) J. Immunol. 164: 688-697; Neele et al (1998) Agents Actions Suppl. 49: 17-22; Ledermann et al (1996) Curr. Opin. Hematol. 3: 77-86; Coligan et al (1991) Current Protocols in Immunology 13: 12; Kwekkeboom et al (1993) Immunology 79: 439-444; ならびに米国特許第5,674,492号および同第5,847,082号(これらは、本明細書中に参考として援用される)に記載されるアッセイもまた参照のこと。

#### 【0139】

本発明のいくつかの実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体(例えば、CHIR-12.12モノクローナル抗体、もしくはCHIR-5.9モノクローナル抗体)、またはその抗原結合フラグメントは、液体薬学的処方物中に処方される。アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、当該分野で公知の任意の方法を使用して調製され得、これらの方法としては、本明細書において上で開示された方法が挙げられる。1つの実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体(例えば、CHIR-12.12モノクローナル抗体、もしくはCHIR-5.9モノクローナル抗体)、またはその抗原結合フラグメントは、CHO細胞株において組換え的に產生される。

#### 【0140】

その調製および精製の後、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、本明細書中に示される様式で液体薬学的処方物として処方され得る。アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントが、その処方前に保存される場合、これらは、例えば、-20において凍結され、次いで、さらなる処方のために、室温にて融解され得る。この液体薬学的処方物は、治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。投与経路および所望の投薬容量を考慮に入れて、この処方物中に存在する抗体またはその抗原結合フラグメントの量が採用される。

#### 【0141】

この様式において、液体薬学的組成物は、アンタゴニスト抗CD40抗体(例えば、CHIR-12.12抗体もしくはCHIR-5.9抗体)またはその抗原結合フラグメントを、約0.1mg/ml~約50.0mg/ml、約0.5mg/ml~約40.0mg/ml、約1.0mg/ml~約30.0mg/ml、約5.0mg/ml~約25.0mg/ml、約5.0mg/ml~約20.0mg/ml、または約15.0mg/ml~約25.0mg/mlの濃度で含む。いくつかの実施形態において、この液体薬学的組成物は、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを、約0.1mg/ml~約5.0mg/ml、約5.0mg/ml~約10.0mg/ml、約10.0mg/ml~約15.0mg/ml、約15.0mg/ml~約20.0mg/ml、約20.0mg/ml~約25.0mg/ml、約25.0mg/ml~約30.0mg/ml、約30.0mg/ml~約35.0mg/ml、約35.0~約40.0mg/ml、約40.0mg/ml~約45.0mg/ml、または約45.0mg/ml~約50.0mg/mlの濃度で含む。他の実施形態において、この液体薬学的組成物は、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを、約15.0mg/ml、約16.0mg/ml、約17.0mg/ml、約18.0mg/ml、約19.0mg/ml、約20.0mg/ml、約21.0mg/ml、約22.0mg/ml、約23.0mg/ml、約24.0mg/ml、または約25.0mg/mlの濃度で含む

。この液体薬学的組成物は、アンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体（例えば、C H I R - 1 2 . 1 2 抗体もしくはC H I R - 5 . 9 抗体）またはその抗原結合フラグメント、およびこの処方物のp Hをp H約5 . 0 ~ p H約7 . 0の範囲（p H約5 . 0、p H約5 . 1、p H約5 . 2、p H約5 . 3、p H約5 . 4、p H約5 . 5、p H約5 . 6、p H約5 . 7、p H約5 . 8、p H約5 . 9、p H約6 . 0、p H約6 . 1、p H約6 . 2、p H約6 . 3、p H約6 . 4、p H約6 . 5、p H約6 . 6、p H約6 . 7、p H約6 . 8、p H約6 . 9、p H約7 . 0、およびp H約5 . 0 ~ p H約7 . 0の範囲内の他のこののような値が含まれる）に維持する緩衝液を含む。いくつかの実施形態において、緩衝液は、処方物のp Hを、p H約5 . 0 ~ p H約6 . 5、p H約5 . 0 ~ p H約6 . 0、p H約5 . 0 ~ p H約5 . 5、p H約5 . 5 ~ p H約7 . 0、p H約5 . 5 ~ p H約6 . 5、またはp H約5 . 5 ~ p H約6 . 0の範囲に維持する。

#### 【0142】

液体抗 C D 4 0 抗体処方物のp Hをp H約5 . 0 ~ p H約7 . 0の範囲に維持する任意の適切な緩衝液は、その抗体の物理化学的安定性および所望の生物学的活性が本明細書において上に言及されたように維持される限り、処方物において使用され得る。適切な緩衝液としては、従来の酸およびその塩が挙げられるがこれらに限定されず、ここで、対イオンは、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、またはマグネシウムであり得る。薬学的な液体処方物を緩衝化するために使用され得る従来の酸およびその塩の例としては、コハク酸またはコハク酸塩の緩衝液、クエン酸またはクエン酸塩の緩衝液、酢酸または酢酸塩の緩衝液、酒石酸または酒石酸塩の緩衝液、リン酸またはリン酸塩の緩衝液、グルコン酸またはグルコン酸塩の緩衝液、グルタミン酸またはグルタミン酸塩の緩衝液、アスパラギン酸またはアスパラギン酸塩の緩衝液、マレイン酸またはマレイン酸塩の緩衝液、およびリンゴ酸またはリンゴ酸塩の緩衝液が挙げられるがこれらに限定されない。処方物内の緩衝液の濃度は、約1 mM ~ 約50 mM（約1 mM、約2 mM、約5 mM、約8 mM、約10 mM、約15 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM、約50 mM、または約1 mM ~ 約50 mMの範囲内の他のこののような値を含む）であり得る。いくつかの実施形態において、処方物内の緩衝液の濃度は、約5 mM ~ 約15 mM（約5 mM、約6 mM、約7 mM、約8 mM、約9 mM、約10 mM、約11 mM、約12 mM、約13 mM、約14 mM、約15 mM、または約5 mM ~ 約15 mMの範囲内の他のこののような値を含む）であり得る。

#### 【0143】

本発明のいくつかの実施形態において、液体薬学的処方物は、治療有効用量のアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体（例えば、C H I R - 1 2 . 1 2 モノクローナル抗体もしくはC H I R - 5 . 9 モノクローナル抗体）またはその抗原結合フラグメント、およびこの処方物のp Hをp H約5 . 0 ~ p H約7 . 0、好ましくは、p H約5 . 0 ~ p H約6 . 5の範囲に維持する濃度のコハク酸緩衝液またはクエン酸緩衝液を含む。「コハク酸緩衝液」または「クエン酸緩衝液」によって、それぞれ、コハク酸の塩またはクエン酸の塩を含む緩衝液が意図される。好ましい実施形態において、コハク酸またはクエン酸の対イオンは、ナトリウムカチオンであり、従って、緩衝剤は、それぞれ、コハク酸ナトリウムまたはクエン酸ナトリウムである。しかし、任意のカチオンが、有効であると予想される。他の可能なコハク酸カチオンまたはクエン酸カチオンとしては、カリウム、アンモニウム、カルシウム、およびマグネシウムが挙げられるがこれらに限定されない。上記のように、処方物内のコハク酸緩衝液またはクエン酸緩衝液の濃度は、約1 mM ~ 約50 mM（約1 mM、約2 mM、約5 mM、約8 mM、約10 mM、約15 mM、約20 mM、約25 mM、約30 mM、約35 mM、約40 mM、約45 mM、約50 mM、または約1 mM ~ 約50 mMの範囲内の他のこののような値を含む）であり得る。いくつかの実施形態において、処方物内の緩衝液の濃度は、約5 mM ~ 約15 mM（約5 mM、約6 mM、約7 mM、約8 mM、約9 mM、約10 mM、約11 mM、約12 mM、約13 mM、約14 mM、または約15 mMを含む）である。他の実施形態において、液体薬学的処方物は、アンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体（例えば、C H I R - 1 2 . 1 2 モノクローナル抗体、もしくはC H

I R - 5 . 9 モノクローナル抗体)、またはその抗原結合フラグメントを、0 . 1 m g / m l ~ 約 5 0 . 0 m g / m l、または約 5 . 0 m g / m l ~ 約 2 5 . 0 m g / m l の濃度で、そして、コハク酸緩衝液またはクエン酸緩衝液(例えば、コハク酸ナトリウム緩衝液またはクエン酸ナトリウム緩衝液)を、約 1 m M ~ 約 2 0 m M、約 5 m M ~ 約 1 5 m M、好ましくは、約 1 0 m M の濃度で含む。

【 0 1 4 4 】

液体薬学的処方物が等張付近であることが望ましい場合、治療有効用量のアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体(例えば、C H I R - 1 2 . 1 2 モノクローナル抗体、もしくはC H I R - 5 . 9 モノクローナル抗体)、またはその抗原結合フラグメント、およびこの処方物のpHをpH約5 . 0 ~ pH約7 . 0の範囲内に維持するための緩衝液を含む液体薬学的処方物は、さらに、この処方物を等張付近にさせるために十分な量の等張化剤を含み得る。「等張付近(near isotonie)」により、水溶性処方物が、約 2 4 0 m m o l / k g ~ 約 3 6 0 m m o l / k g、好ましくは約 2 4 0 m m o l / k g ~ 約 3 4 0 m m o l / k g、より好ましくは約 2 5 0 m m o l / k g ~ 約 3 3 0 m m o l / k g、なおより好ましくは約 2 6 0 m m o l / k g ~ 約 3 2 0 m m o l / k g、なおより好ましくは約 2 7 0 m m o l / k g ~ 約 3 1 0 m m o l / k g の浸透圧を有することが意図される。溶液の等張度を測定する方法は、当業者に公知である。例えば、S e t n i k a r l ( 1 9 5 9 ) J . A m . P h a r m . A s s o c . 4 8 : 6 2 8 を参照のこと。

【 0 1 4 5 】

当業者は、薬学的組成物に等張性を提供するのに有用な、種々の薬学的に受容可能な溶質に精通している。等張化剤は、本発明の液体薬学的処方物の浸透圧を、体液の浸透圧にほぼ等しい値に調整し得る任意の試薬であり得る。生理学的に受容可能な等張化剤の使用が望ましい。従って、治療有効用量のアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体(例えば、C H I R - 1 2 . 1 2 モノクローナル抗体、もしくはC H I R - 5 . 9 モノクローナル抗体)、またはその抗原結合フラグメント、およびこの処方物のpHをpH約5 . 0 ~ pH約7 . 0の範囲内に維持するための緩衝液を含む液体薬学的処方物は、さらに、等張性を提供するために使用され得る成分(例えば、塩化ナトリウム；アミノ酸(例えば、アラニン、バリンおよびグリシン)；糖類および糖アルコール(ポリオール)(グルコース、デキストロース、フルクトース、スクロース、マルトース、マンニトール、トレハロース、グリセロール、ソルビトールおよびキシリトールが挙げられるがこれらに限定されない)；酢酸、他の有機酸またはその塩、および比較的少量のクエン酸またはリン酸)を含み得る。当業者は、液体処方物の最適な張度を提供するために適切なさらなる薬剤を知っている。

【 0 1 4 6 】

いくつかの好ましい実施形態において、治療有効用量のアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体(例えば、C H I R - 1 2 . 1 2 モノクローナル抗体、もしくはC H I R - 5 . 9 モノクローナル抗体)、またはその抗原結合フラグメント、およびこの処方物のpHを、pH約5 . 0 ~ pH約7 . 0の範囲内に維持するための緩衝液を含む液体薬学的処方物は、さらに、等張化剤として塩化ナトリウムを含む。処方物中の塩化ナトリウムの濃度は、張度に対する他の成分の寄与に依存する。いくつかの実施形態において、塩化ナトリウムの濃度は、約 5 0 m M ~ 約 3 0 0 m M、約 5 0 m M ~ 約 2 5 0 m M、約 5 0 m M ~ 約 2 0 0 m M、約 5 0 m M ~ 約 1 7 5 m M、約 5 0 m M ~ 約 1 5 0 m M、約 7 5 m M ~ 約 1 7 5 m M、約 7 5 m M ~ 約 1 5 0 m M、約 1 0 0 m M ~ 約 1 7 5 m M、約 1 0 0 m M ~ 約 2 0 0 m M、約 1 0 0 m M ~ 約 1 5 0 m M、約 1 2 5 m M ~ 約 1 7 5 m M、約 1 2 5 m M ~ 約 1 5 0 m M、約 1 3 0 m M ~ 約 1 7 0 m M、約 1 3 0 m M ~ 約 1 6 0 m M、約 1 3 5 m M ~ 約 1 5 5 m M、約 1 4 0 m M ~ 約 1 5 5 m M、または約 1 4 5 m M ~ 約 1 5 5 m Mである。1つのこの実施形態において、塩化ナトリウムの濃度は、約 1 5 0 m Mである。他のこの実施形態において、塩化ナトリウムの濃度は、約 1 5 0 m Mであり、緩衝液は、約 5 m M ~ 約 1 5 m Mの濃度のコハク酸ナトリウム緩衝液またはクエン酸ナトリウム緩衝液であり、この液体薬学的処方物は、治療有効用量のアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体(例えば、C H I R - 1 2 . 1 2 モノクローナル抗体、もしくはC H I R - 5 . 9 モノクロ

ーナル抗体)、またはその抗原結合フラグメントを含み、そして、この処方物は、pH約5.0～pH約7.0、pH約5.0～pH約6.0、またはpH約5.5～pH約6.5のpHを有する。他の実施形態において、液体薬学的処方物は、pH約5.5のpHにおいて、約0.1mg/ml～約50.0mg/ml、または約5.0mg/ml～約25.0mg/mlの濃度のアンタゴニスト抗CD40抗体(例えば、CHIR-12.12モノクローナル抗体、もしくはCHIR-5.9モノクローナル抗体)、またはその抗原結合フラグメント、約150mMの濃度の塩化ナトリウム、および約10mMのコハク酸ナトリウムまたはクエン酸ナトリウムを含む。

#### 【0147】

本発明の液体薬学的処方物の処理の間の凍結融解または機械的なせん断に起因するタンパク質の分解は、溶液-空気界面における表面張力を低下させるために、処方物内に界面活性剤を組み込むことによって阻害され得る。こうして、いくつかの実施形態において、液体薬学的処方物は、治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体(例えば、CHIR-12.12モノクローナル抗体もしくはCHIR-5.9モノクローナル抗体)またはその抗原結合フラグメント、処方物のpHをpH約5.0～pH約7.0の範囲内に維持するための緩衝液を含み、そしてさらに、界面活性剤を含む。他の実施形態において、液体薬学的処方物は、治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体(例えば、CHIR-12.12モノクローナル抗体、もしくはCHIR-5.9モノクローナル抗体)、またはその抗原結合フラグメント、処方物のpHをpH約5.0～pH約7.0の範囲内に維持するための緩衝液、約50mM～約300mMの濃度の等張化剤(例えば、塩化ナトリウム)を含み、そしてさらに、界面活性剤を含む。

#### 【0148】

使用される代表的な界面活性剤は、非イオン性界面活性剤であり、これらとしては、以下が挙げられる：ポリオキシエチレンソルビトールエステル(例えば、ポリソルベート80(Tween 80)およびポリソルベート20(Tween 20))；ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンエステル(例えば、Pluronic F68)；ポリオキシエチレンアルコール(例えば、Brig 35)；シメチコン；ポリエチレングリコール(例えば、PEG 400)；リゾホスファチジルコリン；およびポリオキシエチレン-p-t-オクチルフェノール(例えば、Triton X-100)。界面活性剤または乳化剤による医薬の伝統的な安定化については、例えば、Levineら(1991)J. Parenteral Sci. Technol. 45(3):160-165(本明細書中に参考として援用される)に記載される。本発明を実施する際に使用される好みしい界面活性剤は、ポリソルベート80である。界面活性剤が含まれる場合、界面活性剤は、代表的に、約0.001%(w/v)～約1.0%(w/v)、約0.001%(w/v)～約0.5%(w/v)、約0.001%(w/v)～約0.4%(w/v)、約0.001%(w/v)～約0.3%(w/v)、約0.001%(w/v)～約0.2%(w/v)、約0.005%(w/v)～約0.5%(w/v)、約0.005%(w/v)～約0.2%(w/v)、約0.01%(w/v)～約0.5%(w/v)、約0.01%(w/v)～約0.2%(w/v)、約0.03%(w/v)～約0.5%(w/v)、約0.05%(w/v)～約0.5%(w/v)、または約0.05%(w/v)～約0.2%(w/v)の量で添加される。

#### 【0149】

こうして、いくつかの実施形態では、液体薬学的処方物は、治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体(例えば、CHIR-12.12モノクローナル抗体、もしくはCHIR-5.9モノクローナル抗体)、またはその抗原結合フラグメントを含み、緩衝液は、約1mM～約50mM、約5mM～約25mM、または約5mM～約15mMの濃度のコハク酸ナトリウム緩衝液またはクエン酸ナトリウム緩衝液であり；この処方物は、pH約5.0～pH約7.0、pH約5.0～pH約6.0、またはpH約5.5～pH約6.5のpHを有し；そして、この処方物は、さらに、約0.001%～約1.0%、また

は約0.001%～約0.5%の量の界面活性剤（例えば、ポリソルベート80）を含む。このような処方物は、必要に応じて、約50mM～約300mM、約50mM～約200mMまたは約50mM～約150mMの濃度の等張化剤（例えば、塩化ナトリウム）を含み得る。他の実施形態において、液体薬学的処方物は、約0.1mg/ml～約50.0mg/ml、または約5.0mg/ml～約25.0mg/ml（約20.0mg/mlを含む）の濃度のアンタゴニスト抗CD40抗体（例えば、CHIR-12.12モノクローナル抗体、もしくはCHIR-5.9モノクローナル抗体）、またはその抗原結合フラグメント；約50mM～約200mMの塩化ナトリウム（約150mMの塩化ナトリウムを含む）；約5mM～約20mMのコハク酸ナトリウムまたはクエン酸ナトリウム（約10mMのコハク酸ナトリウムまたはクエン酸ナトリウムを含む）；約50mM～約200mM（約150mMを含む）の濃度の塩化ナトリウム；および必要に応じて、約0.001%～約1.0%（約0.001%～約0.5%を含む）の量の界面活性剤（例えば、ポリソルベート80）；を含み、ここで、この液体薬学的処方物は、pH約5.0～pH約7.0、pH約5.0～pH約6.0、pH約5.0～pH約5.5、pH約5.5～pH約6.5、またはpH約5.5～pH約6.0のpHを有する。

#### 【0150】

液体薬学的処方物は、本質的に、保存剤、および本明細書において上記された他のキャリア、賦形剤または安定化剤を含まなくてもよい。あるいは、この処方物は、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの物理化学的安定性に悪影響を及ぼさないという条件で、1種以上の保存剤（例えば、抗細菌剤）、本明細書において上に記載される薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤を含み得る。受容可能なキャリア、賦形剤および安定化剤の例としては、さらなる緩衝化剤、共溶媒、界面活性剤、抗酸化剤（アスコルビン酸およびメチオニンを含む）、キレート化剤（例えば、EDTA）、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）、および生分解性ポリマー（例えば、ポリエステル）が挙げられるがこれらに限定されない。薬学的に受容可能なキャリア、安定化剤、および等モル化剤（isomolyte）の処方および選択の詳細な議論は、Remington's Pharmaceutical Sciences（第18版；Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990）（本明細書中に参考として援用される）に見出され得る。

#### 【0151】

本明細書中に記載される液体薬学的処方物または他の薬学的組成物が調製された後、これらは、分解を防ぐために凍結乾燥され得る。液体組成物を凍結乾燥するための方法は、当業者に公知である。使用の直前に、組成物は、さらなる成分を含み得る滅菌希釈剤（例えば、Ringer溶液、蒸留水または滅菌生理食塩水）で再構成され得る。再構成後、組成物は、好ましくは、当業者に公知の方法を使用して、被験体に投与される。

#### 【0152】

（医薬の製造におけるアンタゴニスト抗CD40抗体の使用）

本発明はまた新生物B細胞生育を特徴とする癌に関して患者を処置するための医薬の製造におけるアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの使用を提供し、この場合、医薬は少なくとも1種の他の癌療法での処置と協調させる。新生物B細胞生育を特徴とする癌は例えば上記したB細胞関連癌、例えば非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、B細胞リンパ腫、高度悪性B細胞リンパ腫、中等度悪性B細胞リンパ腫、軽度悪性B細胞リンパ腫、B細胞急性リンパ芽球性白血病、骨髄芽球性白血病およびホジキン病、プラズマ細胞腫、濾胞性リンパ腫、濾胞性小分裂リンパ腫、濾胞性大細胞リンパ腫、濾胞性混合型小分裂リンパ腫、散在小分裂細胞リンパ腫、散在小リンパ球性リンパ腫、プロリンパ球性白血病、リンパプラズマ細胞様リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、粘膜関連リンパ様組織リンパ腫、単球性B細胞リンパ腫、脾型リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、散在性大細胞リンパ腫、縦隔大B細胞リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症、血管内リンパ腫、散在混合型細胞リンパ腫、散在性大細胞リンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、エイズ関連リンパ腫およびマントル細胞リンパ腫を包含するが、これら

に限定されない。

【 0 1 5 3 】

「協調させる」とは少なくとも1つの他の癌療法での被験体の処置の前、最中または後のいずれかにおいてアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬を使用することを意図している。他の癌療法は例えば手術；放射線療法；場合により自己骨髄移植と組み合わせた化学療法、ここで適当な化学療法剤は例えばフルダラビンまたはリン酸フルダラビン、クロラムブシリ、ビンクリスチン、ペントスタチン、2-クロロデオキシアデノシン（クラドリビン）、シクロホスファミド、ドキソルビシン、プレドニゾンおよびこれらの組合せ、例えばアントラサイクリン含有レジメン、例えばCAP（シクロホスファミド、ドキソルビシン+プレドニゾン）、CHOP（シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン+ドキソルビシン）、VAD（ビンクリスチン、ドキソルビシン+デキサメタゾン）、MP（メルファラン+プレドニゾン）および化学療法に使用する他の細胞毒性および/または治療薬、例えばミトキサントロン、ダウノルビシン、イダルビシン、アスピラギナーゼ、および、代謝拮抗物質、例えば、シタラビン、メトトレキセート、5-フルオロウラシルデカルバジン、6-チオグアニン、6-メルカプトプリンおよびネララビンを包含するもの（これらに限定されない）；他の抗癌モノクローナル抗体療法（例えば、アルメツズマブ（CamPATH（登録商標））または悪性B細胞上のCD52細胞表面糖蛋白をターゲティングした他の抗CD52抗体；リツキシマブ（Rituxan（登録商標））、完全ヒト抗体HuMax-CD20、R-1594、IMMU-106、TRU-015、AME-133、トシツモマブ/I-131トシツモマブ（Bexxar（登録商標））、イブリツモマブチウキセタン（Zevalin（登録商標））または悪性B細胞上のCD20抗原をターゲティングするいずれかの他の治療用抗CD20抗体；抗CD19抗体（例えばMT103、二重特異性抗体）；抗CD22抗体（例えばヒト化モノクローナル抗体エプラツズマブ）；ベバシズマブ（Avastin（登録商標））またはヒト血管内皮成長因子をターゲティングする他の抗癌抗体；悪性B細胞上のCD22抗原をターゲティングする抗CD22抗体（例えばモノクローナル抗体BL-22、アルファCD22毒素）；マクロファージコロニー刺激因子をターゲティングする-M-CSF抗体；多発性骨髄腫において過剰発現される核因子-カッパBの受容体活性化剤（RANK）およびそのリガンド（RANKL）をターゲティングする抗体；悪性B細胞上のCD23をターゲティングする抗CD23抗体（例えばIDE-C-152）；悪性B細胞上のCD38抗原をターゲティングする抗CD38抗体；悪性B細胞上に発現される主要組織適合複合体クラスII受容体をターゲティングする抗体（抗MHCI抗体）；悪性B細胞上のCD40抗原をターゲティングする他の抗CD40抗体（例えばSGN-40）；および固形腫瘍および造血起源の腫瘍の多くにおいて発現される腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド受容体1（TRAIL-R1）（例えばアゴニスト性ヒトモノクローナル抗体HGS-ETR1）をターゲティングする抗体）；小分子系癌療法、例えば微小管および/またはトポイソメラーゼ阻害剤（例えば有糸分裂抑制剤ドラスタチンおよびドラスタチン類縁体；チュブリン結合剤T900607；XL119；およびトポイソメラーゼ阻害剤アミノカンプトテシン）、SDX-105（塩酸ベンダムスチン）、イキサベピロン（エポチロン類縁体、別名BMS-247550）、蛋白キナーゼC阻害剤、例えばミドスタウリン（（PKC-412, CGP41251、N-ベンゾイルスタウロスボリン）、ピキサントロン、エロキサチン（抗新生物剤）、ガナイト（硝酸ガリウム）、Thalomid（登録商標）（サリドマイド）、サリドマイドの免疫モジュレート誘導体（例えばレブリミド（以前は、レブミド））、Affinitak<sup>TM</sup>（蛋白キナーゼC-アルファのアンチセンス抑制剤）、SDX-101（R-エトドラック、悪性リンパ球のアポトーシスを誘導）、第2世代のプリンヌクレオシド類縁体、例えばクロファラビン、癌細胞による蛋白Bcl-2の生産の抑制剤（例えばアンチセンス剤であるオブリメルセンおよびGenasense（登録商標））、プロテオソーム抑制剤（例えばVelcade<sup>TM</sup>（ボルテゾミブ））、小分子キナーゼ阻害剤（例えばCHIR-258）、小分子VEGF阻害剤（例えばZD-6474）、熱ショック蛋白（

HSP) 90 の小分子阻害剤 (例えば 17 - AAG) 、ヒストンデアセチラーゼの小分子阻害剤 (例えばハイブリッド / 極性細胞分化HPC) 剤、例えばスペラニロヒドロキサム酸 (SAHA) および FR - 901228 ) およびアポトーシス剤、例えば Trisenox (登録商標) (3酸化砒素) および Cyclostatin (登録商標) (モテキサフィンガドリニウム) ; ワクチン / 免疫療法系癌治療法、例えばワクチン法 (例えば、Id - KLH 、オンコファージ、ビタレチン) 、個人別免疫療法または能動的イディオタイプ免疫療法 (例えば MyVax (登録商標) Personalized Immunotherapy 、以前の名称 GTOP - 99 ) 、 Promune (登録商標) (CpG7909 、 tolle - like 受容体 9 (TLR9) の合成アゴニスト) ; インターフェロン - アルファ療法、インターロイキン - 2 (IL - 2) 療法、IL - 12 療法、IL - 15 療法、および IL - 21 療法 ; ステロイド療法 ; または他の癌療法が挙げられ ; ここで付加的な癌療法での処置は上記した通りアンタゴニスト抗 CD40 抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬での対象の処置の前、最中、または後に行われる。

#### 【0154】

一部の実施形態においては、本発明は対象における B 細胞リンパ腫、例えば非ホジキンリンパ腫を治療するための医薬の製造における抗 CD40 抗体、例えばモノクローナル抗体 CHIR - 12.12 または CHIR - 5.9 またはその抗原結合フラグメントの使用を提供し、この場合、医薬は化学療法、抗癌抗体療法、小分子系癌療法およびワクチン / 免疫療法系の癌療法からなる群より選択される少なくとも 1 種の他の癌療法での処置と協調させ、ここで、医薬は他の癌療法での対象の処置の前、最中または後のいずれかにおいて、または、多重複合療法の場合は、他の癌療法群での対象の処置の前、最中または後のいずれかにおいて、使用する。

#### 【0155】

即ち、例えば一部の実施形態においては、本発明は対象における B 細胞リンパ腫、例えば非ホジキンリンパ腫を治療するための医薬の製造におけるモノクローナル抗体 CHIR - 12.12 または CHIR - 5.9 またはその抗原結合フラグメントの使用を提供し、ここで医薬は化学療法での処置と協調させ、ここで、化学療法剤はサイトキサン、ドキソルビシン、ビンクリスチシン、プレドニゾンおよびこれらの組合せ、例えば CHOP からなる群より選択される。他の実施形態においては、本発明は対象における B 細胞リンパ腫、例えば非ホジキンリンパ腫を治療するための医薬の製造におけるモノクローナル抗体 CHIR - 12.12 または CHIR - 5.9 またはその抗原結合フラグメントの使用を提供し、ここで医薬はアルメツズマブ (Campath (登録商標) ) または悪性 B 細胞上の CD52 細胞表面糖蛋白をターゲティングした他の抗 CD52 抗体 ; リツキシマブ (Rituxan (登録商標) ) 、完全ヒト抗体 HuMax - CD20 、 R - 1594 、 IMMU - 106 、 TRU - 015 、 AME - 133 、トシツモマブ / I - 131 トシツモマブ (Bexxar (登録商標) ) 、イブリツモマブチウキセタン (Zevalin (登録商標) ) または悪性 B 細胞上の CD20 抗原をターゲティングするいずれかの他の治療用抗 CD20 抗体 ; 抗 CD19 抗体 (例えば MT103 、二重特異性抗体) ; 抗 CD22 抗体 (例えばヒト化モノクローナル抗体エプラツズマブ) ; ベバシズマブ (Avastin (登録商標) ) またはヒト血管内皮成長因子をターゲティングする他の抗癌抗体およびこれらのいずれかの組み合わせからなる群より選択される少なくとも 1 つの他の抗癌抗体での処置と協調させ、ここで、医薬は他の癌療法での対象の処置の前、最中または後のいずれかにおいて、または、多重複合療法の場合は、他の癌療法群での対象の処置の前、最中または後のいずれかにおいて、使用する。

#### 【0156】

更に別の実施形態においては、対象における B 細胞リンパ腫、例えば非ホジキンリンパ腫を治療するための医薬の製造におけるモノクローナル抗体 CHIR - 12.12 または CHIR - 5.9 またはその抗原結合フラグメントの使用を提供し、ここで医薬は微小管および / またはトポイソメラーゼ阻害剤 (例えば有糸分裂抑制剤 ドラスタチンおよびドラスタチン類縁体 ; チュブリン結合剤 T900607 ; XL119 ; およびトポイソメラ-

ゼ阻害剤アミノカンプトテシン)、SDX-105(塩酸ベンダムスチン)、イキサベピロン(エポチロン類縁体、別名BMS-247550)、蛋白キナーゼC阻害剤、例えばミドスタウリン((PKC-412, CGP41251、N-ベンゾイルスタウロスボリン)、ピキサントロン、エロキサチン(抗新生物剤)、ガナイト(硝酸ガリウム)、Thalomid(登録商標)(サリドマイド)、アポトーシス剤、例えばXcytrin(登録商標)(モテキサフィンガドリニウム)、癌細胞による蛋白Bcl-2の生産の抑制剤(例えばアンチセンス剤であるオブリメルセンおよびGenasense(登録商標))、ネララビンおよびこれらのいずれかの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つの他の小分子系癌療法での処置と協調させ、ここで、医薬は他の癌療法での対象の処置の前、最中または後のいずれかにおいて、または、多重複合療法の場合は、他の癌療法群での対象の処置の前、最中または後のいずれかにおいて、使用する。

#### 【0157】

更に別の実施形態においては、対象におけるB細胞リンパ腫、例えば非ホジキンリンパ腫を治療するための医薬の製造におけるモノクローナル抗体CHIR-12.12またはCHIR-5.9またはその抗原結合フラグメントの使用を提供し、ここで医薬はワクチン法(例えば、Id-KLH、オンコファージ、ビタレチン)、個人別免疫療法または能動的イディオタイプ免疫療法(例えばMyVax(登録商標)Personalized Immunotherapy、以前の名称GTOP-99)、Promune(登録商標)(CpG7909、tolle-1ike受容体9(TLR9)の合成アゴニスト)、インターロイキン-2(IL-2)療法、IL-12療法、IL-15療法、およびIL-21療法ならびにこれらのいずれかの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つの他のワクチン/免疫療法系癌治療法での処置と協調させ、ここで、医薬は他の癌療法の対象への投与の前、最中または後のいずれかにおいて、または、多重複合療法の場合は、他の癌療法群の対象への投与の前、最中または後のいずれかにおいて、使用する。

#### 【0158】

一部の実施形態においては、本発明は、対象におけるB細胞関連白血病、例えばB細胞急性リンパ球性白血病(B-ALL)を治療するための医薬の製造における抗CD40抗体、例えばモノクローナル抗体CHIR-12.12またはCHIR-5.9またはその抗原結合フラグメントの使用を提供し、ここで医薬は化学療法および代謝拮抗剤療法からなる群より選択される少なくとも1つの他の癌療法での処置と協調させ、ここで、医薬は他の癌療法での対象の処置の前、最中または後のいずれかにおいて、または、多重複合療法の場合は、他の癌療法群での対象の処置の前、最中または後のいずれかにおいて、使用する。このような実施形態の例は、アンタゴニスト抗CD40抗体、例えばモノクローナル抗体CHIR-12.12またはCHIR-5.9またはその抗原結合フラグメントを含む医薬を、サイトキサン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾン、シタラビン、ミトキサントロン、イダルビシン、アスピラギナーゼ、メトトレキセート、6-チオグアニン、6-メルカプトブリンおよびこれらの組合せからなる群より選択される化学療法剤または代謝拮抗剤での処置と協調させる場合を含む(これらに限定されない);ここで医薬は他の癌療法での対象の処置の前、最中または後のいずれかにおいて、または、多重複合療法の場合は、他の癌療法群での対象の処置の前、最中または後のいずれかにおいて、使用する。1つのこのような例においては、医薬はシタラビン+ダウノルビシン、シタラビン+ミトキサントロン、および/または、シタラビン+イダルビシンの投与と協調され;ここで、医薬は他の癌療法でのB-ALL対象の処置の前、最中または後のいずれかにおいて、または、多重複合療法の場合は、他の癌療法群での対象の処置の前、最中または後のいずれかにおいて、使用する。

#### 【0159】

本発明はまた上記したB細胞関連癌を含む新生物B細胞生育を特徴とする癌に関して患者を処置するための医薬の製造におけるアンタゴニスト抗CD40抗体、例えばモノクローナル抗体CHIR-12.12またはCHIR-5.9またはその抗原結合フラグメントの使用を提供し、ここで医薬は少なくとも1種の他の癌療法で予備処置されている対象

において使用する。「予備処置されている」または「予備処置」とは、対象がアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬を与えられるよりも前に、1種以上の他の癌療法を与えられている（即ち少なくとも1種の他の癌療法で処置されている）ことを意図している。「予備処置されている」または「予備処置」は、アンタゴニスト抗CD40抗体、例えば本明細書に記載したモノクローナル抗体CHIR-12.12またはCHIR-5.9またはその抗原結合フラグメントを含む医薬での処置の開始に先立って、2年以内、18ヶ月以内、1年以内、6ヶ月以内、2ヶ月以内、6週間以内、1ヶ月以内、4週間以内、3週間以内、2週間以内、1週間以内、6日以内、5日以内、4日以内、3日以内、2日以内、または、さらには1日以内に少なくとも1種の他の癌療法で処置されている対象を包含する。対象が以前の癌療法または以前の癌療法群での予備処置に対して応答していたことは必須ではない。即ち、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬を与えられる対象は以前の癌療法の予備処置に対し、または、予備処置が複数の癌療法を含む以前の癌療法群の1つ以上に対し、応答できいても、または、応答に失敗していてもよい。アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬を与えられるよりも前に対象が予備処置されていることができる他の癌療法の例は、手術；放射線療法；場合により自己骨髄移植と組み合わせた化学療法、ここで適当な化学療法剤は、先に列挙したもの；上記した抗癌抗体を包含するが、これらに限定されない他の抗癌モノクローナル抗体療法；上記した小分子を包含するが、これらに限定されない小分子系癌療法；上記したものと包含するが、これらに限定されないワクチン／免疫療法系の癌療法；ステロイド療法；他の癌療法；またはこれらのいずれかの組み合わせを包含するが、これらに限定されない。

#### 【0160】

他の癌療法1つ以上との本明細書に記載した医薬の協調使用の内容における「処置」とは、本明細書においては、対象への医薬または他の癌療法の適用または投与、または対象由来の単離組織または細胞株への医薬または他の癌療法の適用または投与として定義され、ここで、対象は新生物B細胞生育、そのような癌に関連する症状、またはそのような癌の発症し易さを特徴とする癌を有しており、ここで、目的は癌、癌に関連するいずれかの症状または癌の発症し易さに対し、完治、治癒、緩和、緩解、改変、軽快、軽減、改善または影響をもたらすことである。

#### 【0161】

以下の実施例は説明として提示するものであり、限定ではない。

#### 【実施例】

#### 【0162】

以下の実施例において使用したアンタゴニスト抗CD40抗体はCHIR-5.9およびCHIR-12.12である。CHIR-5.9およびCHIR-12.12抗CD40抗体はヒトIgG<sub>1</sub>重鎖の遺伝子座およびヒト軽鎖の遺伝子座を担持したトランスジエニックマウスの免疫化により作成したヒトIgG<sub>1</sub>サブタイプの抗ヒトCD40モノクローナル抗体(mAb)である(Xenomouse(登録商標)technology; Abgenix; Fremont, California)。FACS分析から解るとおり、CHIR-5.9およびCHIR-12.12はヒトCD40に特異的に結合し、CD40リガンド結合を防止できる。両方のmAbは細胞表面CD40に予備結合したCD40リガンドを競合排除することができる。両抗体とも強力なアンタゴニストであり、正常B細胞並びにNHLおよびCLL患者由来の癌細胞のインビトロCD40リガンド媒介増殖を抑制する。インビトロにおいて、両抗体は癌細胞株並びにNHL患者由来の原発癌細胞をADCCにより殺傷する。用量依存性の抗腫瘍活性が異種移植片のヒトリンパ腫モデルにおいて観察されている。CHIR-5.9のヒトCD40に対する結合親和性は $1.2 \times 10^{-8}$  Mであり、そして、CHIR-12.12のヒトCD40に対する結合親和性は $5 \times 10^{-10}$  Mである。

#### 【0163】

マウスハイブリドーマ系統131.2F8.5.9(CMCC#12047)およびハ

イブリドーマ系統 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC #12056) は American Type Culture Collection [ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (USA)] に特許寄託番号 PTA-5542 および PTA-5543 のもとに寄託されている。

#### 【0164】

以下に記載する実施例においては以下のプロトコルを用いた。

#### 【0165】

##### (免疫グロブリン定量のためのELISA試験)

ヒト IgM および IgG の濃度は ELISA で推定した。96穴の ELISA プレートを 4 度で 16 時間インキュベートすることにより 0.05M 炭酸塩緩衝液 (pH 9.6) 中の 2 µg/mL ヤギ抗ヒト IgG MAb (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) または 2 µg/mL ヤギ抗ヒト IgM MAb 4102 (Bio Source International, California) でコーティングした。プレートを PBS-0.05% Tween-20 (PBS-Tween) で 3 回洗浄し、そして 1 時間 BSA で飽和させた。2 回洗浄後、プレートを被験試料の種々の希釈物により 37 度で 2 時間インキュベートした。3 回洗浄後、1 µg/mL ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG MAb または ヤギ抗ヒト IgM MAb と共に 37 度で 2 時間インキュベートすることにより結合 Ig を検出した。プレートを 4 回洗浄し、結合ペルオキシダーゼ活性を基質として O-フェニレンジアミンを添加することにより明らかにした。ヒト IgG または IgM 標準物質 (Caltaq, Burlingame, California) を用いて各試験の標準曲線を求めた。

#### 【0166】

##### (ヒト末梢血からの末梢血単核細胞 (PBMC) の単離)

血液添加前 30 分に、50 mL ポリスチレン試験管当たり 20 mL の Ficoll-Paque 溶液 (低内毒素; Pharmacia) を 3 試験管に添加した。Ficoll-Paque 溶液を室温に加温した。1:10 希釈度で 3 L のブリーチ液を調製し、血液に接触した全部の試験管およびピペットを洗浄するために使用した。血液を Ficoll-Paque 溶液の上面に Ficoll 層を攪乱させずに 1.5 mL 血液 / Ficoll-Paque 1 mL となるように層化した。遠心分離機のブレーキをオフにしたまま、室温で 30 分間 1700 rpm で試験管を遠心分離した。上層 (血漿) を可能な限り大量に除去し、溶液の第 2 層を除去することのないよう吸引を最小限とした。B および T リンパ球を含有する第 2 層を滅菌バスツールピペットを用いて採取し、2 本の 50 mL 容量のポリスチレン試験管内に入れた。採取物を 3 倍容量の無添加冷 RPMI で希釈し、試験管を 10 分間 1000 RPM で遠心分離した。培地を吸引除去し、両方の 50 mL 試験管の細胞を合計 10 mL の冷 RPMI (添加剤含有) 中に再懸濁し、15 mL の試験管に移した。細胞を血球計で計数し、次に 10 分間 1000 RPM で遠心分離した。培地を除去し、細胞を 4 mL RPMI 中に再懸濁した。この画分は PBMC を含有していた。

#### 【0167】

##### (PBMC からの B 細胞の単離)

ダイナビーズ (抗 hCD19) 100 µL を 5 mL プラスチック試験管に入れた。滅菌 PBS 3 mL をビーズに添加して混合し、磁気ホルダー内にいれ、次に 2 分間静置させた。溶液をバスツールピペットを用いて除去した。滅菌 PBS 3 mL を添加し、混合し、磁気ホルダー内にいれ、次に 2 分間静置させた。滅菌 PBS を用いたこの操作を再度反復して合計 3 洗浄とした。PBMC をビーズに添加し、混合しながら 40 度で 30 分間インキュベートした。PBMC およびビーズを含有する試験管を磁気ホルダー中に 2 分間入れ、次に溶液を磁気ホルダー中の新しい 5 mL 試験管に移した。2 分後、溶液を新しい 15 mL 試験管に移した。この工程を更に 4 回反復し、最初の 4 回の溶液を 15 mL 試験管に収集し、次に 5 分間 1000 RPM で遠心分離した。この工程により T 細胞分離のためのペレットが得られた。

## 【0168】

100  $\mu$  L RPMI (添加物含有) を添加してビーズを採取し、溶液を0.7 mL 試験管に移した。Dyna1 Detach Beads 10  $\mu$  L を室温で懸濁液に添加し、そして45分間回転した。懸濁液を新しい5 mL 試験管に移し、3 mL のRPMI (添加物含有) を添加した。試験管を2分間磁気ホルダーに入れた。溶液をホルダー中の新しい5 mL 試験管に2分間、次に15 mL 試験管に移した。前の工程を更に3回反復して溶液を15 mL 試験管に採取した。15 mL 試験管を10分間1000 RPMで遠心分離し、細胞を10 mL RPMI に再懸濁した。洗浄工程を更に2回反復し、合計3洗浄とした。細胞を最終遠心分離の前に計数した。この工程によりB細胞の精製が終了した。細胞を90% FCS および10% DMSO 中に保存し、-80°で凍結した。

## 【0169】

## (T細胞の単離)

10 X カラム洗浄緩衝液 2 mL および滅菌蒸留水 18 mL を混合することにより 1 X カラム洗浄緩衝液 20 mL を用いてヒトT細胞エンリッチメントカラム (R & D systems、抗hCD3 カラムキット) を調整した。カラムを70%エタノールで清浄化し、15 mL 試験管の最上部に置いた。カラムの上蓋をまず外すことにより、カラムの底部に空気が引き込まれないようにした。次に、下蓋を外し、先端を70%エタノールで清浄化した。カラム内の流体を15 mL 試験管に流した。カラム緩衝液が白色フィルターの高さまで流れた後に、新しい滅菌 15 mL 試験管をカラム下に置いた。B細胞枯渇 PBMC 画分を緩衝液 1 mL に懸濁し、カラム最上部に添加した。細胞を10分間室温でカラムと共にインキュベートした。1 X カラム洗浄緩衝液各々 2 mL の4つのアリコートでカラムからT細胞を溶離させた。収集したT細胞を5分間1000 RPMで遠心分離した。上澄みを除去し、細胞を10 mL RPMI 中に再懸濁した。細胞を計数し、再度遠心分離した。上澄みを除去し、T細胞の精製を終了した。細胞を90% FCS および10% DMSO 中に保存し、-80°で凍結した。

## 【0170】

上記操作法に関しては、RPMI組成物は10% FCS (45分間56°で不活性化)、1% Pen/Strep (100 u/mL ペニシリン、0.1  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン)、1% グルタメート、1% ナトリウムプラベート、50  $\mu$ M 2-MEを含有するものであった。

## 【0171】

## (フローサイトメトリー試験)

Ramos 細胞 (106 細胞 / 試料) を4°で20分間一次抗体 (PBS - BSA 中 10  $\mu$ g / mL) 100  $\mu$  L 中でインキュベートした。PBS - BSA またはHBSS - BSA で3回洗浄した後、細胞を4°で20分間ヤギ抗 (ヒト IgG) 抗体の FITC 標識 F(ab')2 フラグメント (Caltag) 100  $\mu$  L 中でインキュベートした。PBS - BSA で3回洗浄、そしてPBSで1回洗浄の後、細胞をPBS 0.5 mL 中に再懸濁した。分析はFACSCAN V (Becton Dickinson, San Jose, California) を用いて実施した。

## 【0172】

## (ハイブリドーマクローンの作成)

de Boer et al. (1988) J. Immunol. Meth. 113: 143 の記載に従って、50% ポリエチレンリコールを用いて 10:1 の比で免疫化されたマウス由来の脾細胞を SP2/0 または P3x63 Ag8.653 ネズミエローマ細胞と融合させた。融合細胞をヒポキサンチン (0.1 mM)、アミノブテリン (0.01 mM)、チミジン (0.016 mM) および 0.5 ng / mL hIL-6 (Genzyme, Cambridge, Massachusetts) を添加した完全 IMDM 培地に再懸濁した。次に融合細胞を 96 穴組織培養プレートのウェル間に分配し、各ウェルが平均 1 個の成長ハイブリドーマを含むようにした。

## 【0173】

10～14日後、ハイブリドーマの集団の上澄みを特異的抗体生産の有無についてスクリーニングした。ハイブリドーマクローンによる特異的抗体生産のスクリーニングのためには、各ウェルの上澄みをあわせ、まずELISAにより抗CD40活性特異性について試験した。次に陽性試料を用いて上記FACS試験について記載したとおりEBV形質転換B細胞の蛍光細胞染色のために使用した。陽性ハイブリドーマ細胞は0.5ng/mLのhIL-6を含有するIMDM/FBS中の限界希釈により2回クローニングした。

## 【0174】

## (実施例1：抗CD40抗体の製造)

IgG1アイソタイプの数種の完全ヒトアンタゴニスト抗CD40モノクローナル抗体を作成した。ヒトIgG1重鎖遺伝子座およびヒト鎖遺伝子座を担持したトランスジェニックマウス( Abgenix - 1 Xenomouse (登録商標) technology (Abgenix; Fremont, California) )を用いてこれらの抗体を作成した。CD40細胞外ドメインを発現するSF9昆虫細胞を免疫原として使用した。合計31マウス脾臓をマウスミエローマSP2/0細胞と融合させることによりELISAにおいて組み換えCD40を認識する895個の抗体を作成した(表1Aおよび1B)。Abgenix Xenomouse (登録商標) technologyを用いて製造したハイブリドーマの平均約10%がヒト鎖の代わりにマウスラムダ軽鎖を含み得る。マウスラムダ軽鎖を含有する抗体を選抜した。やはり細胞表面CD40への結合を示した260個の抗体のサブセットを更に分析するために選択した。一連のサブクローニング操作の間に選択された安定なハイブリドーマを結合および機能の試験におけるその後の特性化のために使用した。

## 【0175】

## 【化1】

表1A. 典型的な融合

融合番号	抗CD40力値 (1:100K)	融合効率	スクリーニング ウェル数	ELISA+ の数	細胞表面陽性数
153	3	100%	960	123	33
154	4.67	15%	140	0	0
155	6	~40%	960	3	3
156	3.17	~25%	220	1	0
157	4.67	90%	960	32	6
158	4.4	90%	960	23	8
159	1.17	100%	960	108	18
160	1.78	90%	960	30	5
Total			6120	320	73

表1B. 融合の4個のセットの要約

マウス数	ELISA陽性 ハイブリドーマ	細胞表面陽性ハイ ブリドーマ
31	895	260

## 【0176】

## 【化2】

表 2. 抗CD40 IgG1抗体を用いたデータの初期セットのまとめ

母ハイブリドーマ	ハイブリドーマクローニン	細胞表面結合	アンタゴニスト	ADCC	CDC	CMCC#	V領域DNA配列
	131.2F5.8.5.1	+++	++	ND	ND	ND	
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	有り
	131.2F5.8.5.11	+++	+++	++	-	12055	有り
	153.3C5D8D7.8.4.7.1	++	ND	ND	ND	ND	
153.3C5	153.3C5D8D7.8.4.7.8	++	ND	ND	ND	ND	
	153.3C5D8D7.8.4.7.11	+++	+++	+	ND	ND	
	153.1D2.9.1	+++	ND	ND	ND	12067	
153.1D2	153.1D2.9.8	+++	+++	++	-	12057	
	153.1D2.9.12	+++	ND	ND	ND	12068	
	158.6F3.5.1	+++	+++	++	-	12054	有り
158.6F3	158.6F3.5.7	+++	ND	ND	ND	12061	
	158.6F3.5.10	+++	ND	ND	ND	12062	
	153.8E2D10D6.12.7	+++	ND	ND	ND	12075	
153.8E2	153.8E2D10D6.12.9	+++	ND	ND	ND	12063	
	153.8E2D10D6.12.12	+++	+++	+++	-	12056	有り
	155.2C2E9F12.2.10.4	+++	+/-	ND	ND	12064	
155.2C2	155.2C2E9F12.2.10.5	+++	ND	ND	ND	12065	
	155.2C2E9F12.2.10.6	+/-	ND	ND	ND	12066	
	166.5E6G12.1	+++	ND	ND	ND	12069	
166.5E6	166.5E6G12.3	+++	ND	ND	ND	12070	
	166.5E6G12.4	+++	+	ND	ND	12071	
177.8C10	177.8C10B3H9	+++	++	ND	ND	ND	
	183.4B3E11.6.1.5	++	ND	ND	ND	ND	
183.4R3	183.4B3E11.6.1.9	++	ND	ND	ND	ND	
	183.4B3E11.6.1.10	+++	++	ND	ND	ND	
	183.2G5D2.8.7	+++	+/-	ND	ND	ND	
183.2G5	183.2G5D2.8.8	+++	ND	ND	ND	ND	
	183.2G5D2.8.9	+++	ND	ND	ND	ND	
	184.6C11D3.2	++	ND	ND	ND	12078	
184.6C11	184.6C11D3.3	++	ND	ND	ND	12080	
	184.6C11D3.6	+/-	+/-	ND	ND	12079	
	185.3E4F12.5.6	+++	ND	ND	ND	12072	
185.3E4	185.3E4F12.5.11	+++	ND	ND	ND	12073	
	185.3E4F12.5.12	+++	+	ND	ND	12074	
	185.1A9E9.6.1	+	ND	ND	ND	ND	
185.1A9	185.1A9E9.6.6	+++	++	+	ND	ND	
	185.9F11E10.3B5.1	+++	ND	ND	ND	ND	
185.9F11	185.9F11E10.3B5.8	+++	ND	ND	ND	ND	
	185.9F11E10.3B5.12	+++	+++	ND	ND	ND	

7個の母ハイブリドーマ由来のクローニンはアンタゴニスト活性を有するものとして同定された。その相対的拮抗力値およびADCC活性に基づいて、2ハイブリドーマクローニンを選択した。その名称は131.2F8.5.9(5.9)および153.8E2.D10.D6.12.12(12.12)である。

他の7個のハイブリドーマ由来のクローニンがアンタゴニスト活性を有するものとして同定された(上記表2)。その相対的アンタゴニスト力値およびADCC活性に基づいて、2個のハイブリドーマクローニンを選択してその後の評価に付した。それらを131.2F8.5.9(5.9)および153.8E2.D10.D6.12.12(12.12)と命名した。これらの2抗体のCD40+リンパ腫細胞株への結合の特徴を図1におけるフローサイトメトリーヒストグラムとして示す。

## 【0177】

(実施例2:ヒト抗CD40抗体のポリヌクレオチドおよびアミノ酸配列)

候補抗体の可変領域をコードするcDNAをPCR増幅し、クローニングし、そして配

列決定した。CHIR-12.12抗体の軽鎖および重鎖のアミノ酸配列をそれぞれ図9Aおよび9Bに示す。配列番号2(mAb CHIR-12.12の軽鎖)および配列番号4(mAb CHIR-12.12の重鎖)も参照できる。mAb CHIR-12.12の重鎖の変異体は図9B(配列番号5も参照)に示す通りであり、これは配列番号4の153位のアラニン残基に対するセリン残基の置換を有する点において配列番号4と異なる。CHIR-12.12.抗体の軽鎖および重鎖をコードするヌクレオチド配列をそれぞれ図10Aおよび10Bに示す。配列番号1(mAb CHIR-12.12の軽鎖のコーディング配列)および配列番号3(mAb CHIR-12.12の重鎖のコーディング配列)も参照できる。CHIR-5.9抗体の軽鎖および重鎖のアミノ酸配列をそれぞれ図11Aおよび11Bに示す。配列番号6(mAb CHIR-5.9の軽鎖)および配列番号7(mAb CHIR-5.9の重鎖)も参照できる。mAb CHIR-5.9の重鎖の変異体は図11B(配列番号8も参照)に示す通りであり、これは配列番号7の158位のアラニン残基に対するセリン残基の置換を有する点において配列番号7と異なる。

#### 【0178】

独立したハイブリドーマから誘導した抗体について予測される通り、相補性決定領域(CDR)におけるヌクレオチド配列にはかなりの変異がある。V<sub>H</sub>のCDR3領域の多様性は最も顕著に抗体特異性を決定すると考えられる。

#### 【0179】

(実施例3:インビトロのCD40/CD40L相互作用に対するCHIR-5.9およびCHIR-12.12の作用)

候補抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12は細胞表面CD40へのCD40リガンドの結合を防止し、そして予備結合したCD40リガンドを置き換える。リンパ腫細胞株(Ramos)の細胞表面CD40へのCD40リガンドの結合を防止する抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12の能力を調べた。両方の抗体(未標識)の結合はフローサイトメトリー試験により測定した場合PE-CD40リガンドのその後の結合を防止した(図2A)。試験の第2のセットにおいて、細胞表面CD40に予備結合したCD40リガンドを置き換える能力について2抗体を試験した。両抗体とも予備結合CD40リガンドを競合排除するために有効であり、CHIR-5.9がCHIR-12.12より僅かにより有効であった(図2B)。

#### 【0180】

(実施例4:CHIR-5.9およびCHIR-12.12は15B8とは異なるCD40上のエピトープに結合する)

候補モノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12はCD40との結合については相互に競合するが、IgG<sub>2</sub>抗CD40mAbである15B8とは競合しない(国際出願WO02/28904参照)。Biacoreを用いた抗体競合結合試験をアミンカップリングを介して固定したプロテインAを有するCM5バイオセンサーを用いて設計し、これを用いて抗CD40、CHIR-12.12または15B8のいずれかをキャプチャーした。通常の会合/解離の結合曲線がCD40-hisの種々の濃度において観察された(データ示さず)。競合試験のためには、CHIR-12.12または15B8のいずれかをプロテインAの表面上にキャプチャーした。その後、CD40-his/CHIR-5.9Fab複合体(100nM CD40:1μM CHIR-5.9Fab)の種々の濃度のものを修飾された表面を通過させて流動させた。CHIR-12.12の場合は複合体の会合は観察されず、CD40-hisへのCHIR-12.12の結合をCHIR-5.9がブロックすることを示していた。15B8については、Fab CHIR-5.9複合体の会合が観察され、CD40結合部位への15B8の結合をCHIR-5.9がブロックしないことを示していた。しかしながら、複合体のオフ速度は劇的に上昇した(データ示さず)。

#### 【0181】

15B8およびCHIR-12.12はCD40-his結合と競合しないことも明らか

かになった。この実験はプロテインAのバイオセンサーチップ上にCHIR-12.12をキャプチャーし、残存するプロテインA部位を対照hIgG<sub>1</sub>でブロッキングし、CD40-hisを結合させ、そして次に修飾した表面に15B8を流動させることによりセットアップした。15B8はこの条件下で結合し、CHIR-12.12が15B8のCD40への結合をブロッキングしないことを示していた。

## 【0182】

(実施例5：選択されたハイブリドーマの結合特性)

プロテインAをアミンカップリングによりCM5バイオセンサーチップに固定化した。10 μL/分の速度で1.5分間修飾バイオセンサーチップ上にヒト抗CD40モノクローナル抗体を1.5 μg/mLでキャプチャーさせた。組み換え可溶性CD40-hisを種々の濃度でバイオセンサー表面上に流動させた。抗体および抗原を0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3 mM EDTA、0.005% Surfactant P20 (HBS-EP)中に希釈した。速度定数および親和性定数はBiadevaluationソフトウェアおよび1:1相互作用モデル/グローバルフィットを用いて求めた。

## 【0183】

以下の表3に示す通り、CHIR-5.9およびCHIR-12.12のオフ速度には121倍の差が有り、CHIR-12.12について24倍高値の親和性が示された。

## 【0184】

## 【化3】

抗体	ka (M <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> )	kd (sec <sup>-1</sup> )	KD (nM)
抗CD40, CHIR-5.9	(12.35 ± 0.64) × 10 <sup>5</sup>	(15.0 ± 1.3) × 10 <sup>-3</sup>	12.15 ± 0.35
抗CD40, CHIR-12.12	(2.41 ± 0.13) × 10 <sup>5</sup>	(1.24 ± 0.06) × 10 <sup>-4</sup>	0.51 ± 0.02

(実施例6：CHIR-5.9およびCHIR-12.12は正常対象由来のヒトリンパ球のCD40媒介増殖の強力なアンタゴニストである)

CD40リガンドによるCD40の捕獲はヒトB細胞の増殖を誘導する。アンタゴニスト抗CD40抗体はこの増殖を抑制すると期待される。2種の候補抗体(CHIR-5.9およびCHIR-12.12)の正常ヒト対象由来のPBMCのCD40リガンド誘導増殖を抑制する能力について試験した。ホルムアルデヒド固定CHO細胞トランスフェクト体発現CD40リガンド(CD40L)をCD40リガンドの原料として使用した。ヒトPBMCは抗CD40mAb CHIR-5.9またはCHIR-12.12の種々の濃度の存在下においてCD40リガンドを発現するホルムアルデヒド固定CHO細胞と共に4日間培養した。増殖はトリチウム化チミジンの取り込みにより測定した。細胞を14~18時間37度でトリチウム化標識チミジンでパルシングした。

## 【0185】

両抗体ともヒトPBMCのCD40リガンド誘導増殖の抑制において極めて効果的であることがわかった(表4A、mAb CHIR-5.9、表4B、mAb CHIR-12.12)。実験はPBMCの複数ドナー(CHIR-5.9についてはn=12、CHIR-12.12についてはn=2)を用いて実施することにより観察された抑制が単一のドナー由来の細胞の特殊性ではないことを保証した。更に4PBMCドナーのフォロー

アップ評価をmAb CHIR-12.12について実施したところ同様の傾向が観察された。これらの試験では広範な範囲の抗体濃度(0.01 μg/mL ~ 100 μg/mL)を用いた。CD40リガンド誘導増殖のほぼ完全な抑制が大部分の例において0.1 μg/mLの濃度の抗体において達成できた。6ドナー由来のリンパ球についてCD40リガンド誘導リンパ球増殖を50%抑制するための抗体濃度(pM)(IC50)は平均で47のIC50(pM)であり(SD = 21; ドナー1、24; ドナー2、66; ドナー3、45; ドナー4、84; ドナー5、30; ドナー6、35)、これらは表4Bに示す49.65の平均IC50(pM)と良好な一致を示す。現在のデータセットに基づけば、両方の候補抗体は正常PBMCのCD40リガンド誘導増殖の抑制に関してはその力値は同様であると考えられる。

【0186】

【化4】

表4A. CD40L誘導PBMC増殖に対するmAb CHIR-5.9の作用

実験番号	PBMC単独	CHO-CD40L	PBMC+ CHO-CD40L	Abs濃度 (μg/ml)	hulgG1		CHIR-5.9	
		単独			阻害の%	阻害の%	阻害の%	
PBMC-010	1851	121	4436	1	5080	-26	2622	74
	1851	121	4435	0.25	5498	-43	2907	62
	1851	121	4435	0.0625	6029	-65	2619	74
	1851	121	4435	0.0156	5814	-56	1199	131
PBMC-011 ドナー#1	2162	178	8222	10	13137	-84	2252	101
	2162	178	8222	1	11785	-61	1438	115
	2162	178	8222	0.1	10758	-43	1249	119
	2162	178	8222	0.01	11322	-53	4705	60
ドナー#2	2216	294	7873	10	16679	-164	2362	103
	2216	294	7873	1	14148	-117	1202	124
	2216	294	7873	0.1	12422	-85	755	133
	2216	294	7873	0.01	13870	-112	6606	24
ドナー#3	2396	241	11021	10	11641	-7	2631	100
	2396	241	11021	1	13528	-30	1450	114
	2396	241	11021	0.1	12176	-14	990	120
	2396	241	11021	0.01	11895	-10	5357	68
ドナー#4	4552	133	15301	10	22098	-64	3768	109
	4552	133	15301	1	19448	-39	2040	125
	4552	133	15301	0.1	18398	-29	1728	128
	4552	133	15301	0.01	22767	-70	9481	55
PBMC-012	777	117	6041	10	7327	-25	2150	76
	777	117	6041	1	6212	-3	1550	87
	777	117	6041	0.1	7006	-19	828	101
	777	117	6041	0.01	7524	-29	1213	94
PBMC-014	1857	73	7889	100	9399	-25	3379	76
	1857	73	7889	20	8120	-4	3870	67
	1857	73	7889	4	8368	-8	2552	90
	1857	73	7889	0.8	9564	-28	1725	103
PBMC-015 ドナー#1	3203	127	10485	100	15425	-69	1497	126
	3203	127	10485	20	11497	-14	1611	124
	3203	127	10485	4	11641	-16	1359	128
	3203	127	10485	0.8	12807	-32	1490	126
ドナー#2	3680	175	15145	100	21432	-56	1792	118
	3680	175	15145	20	16998	-16	1779	118
	3680	175	15145	4	17729	-23	1965	117
	3680	175	15145	0.8	17245	-19	2217	115
ドナー#3	2734	152	19775	100	22967	-19	1664	107
	2734	152	19775	20	21224	-9	1848	106
	2734	152	19775	4	20658	-5	1534	108
	2734	152	19775	0.8	18923	5	1262	110
PBMC-016	1118	36	13531	0.1	10928	21	745	103
	1118	36	13531	0.05	11467	17	962	102
	1118	36	13531	0.01	11942	13	3013	85
PBMC-017	962	75	12510	1	13597	-9	258	107

【0187】

【化5】

表4A. CD40L誘導PBMC増殖に対するmAb CHIR-5.9の作用(続き)

100 µg/ml におけるヒトPBMCの平均阻害%	-42	107
10 µg/ml におけるヒトPBMCの平均阻害%	-69	98
1 µg/ml におけるヒトPBMCの平均阻害%	-41	107
0.1 µg/ml におけるヒトPBMCの平均阻害%	-28	117
0.01 µg/ml におけるヒトPBMCの平均阻害%	-44	64
ヒトPBMCの平均阻害%	-35	101

阻害% :

100 - (Abs - PBMC単独 - CHO-CD40L単独のCPM) / (PBMC + CHO-CD40L - PBMC単独 - CHO-CD40L単独のCPM)  
\* 100 %

【0188】

【化6】

表4B. CD40L誘導PBMC増殖に対するmAb CHIR-12.12の作用

Exp#	PBMC 単独	CHO-CD40L 単独	PBMC+ CHO-CD40L	Abs濃度 (µg/ml)	Hu IgG1		CHIR-12.12	
					CPM	阻害の%	CPM	阻害の% IC50(nM)
PBMC-025	ドナー#1	4051	32	42292	0.1	33354	23	440 110
		4051	32	42292	0.01	37129	14	8696 88
		4051	32	42292	0.001	40271	5	32875 25
		4051	32	42292	0.0001	40034	6	37261 13 24.22
	ドナー#2	2260	31	14987	0.1	15767	-6	365 115
		2260	31	14987	0.01	17124	-17	6734 65
		2260	31	14987	0.001	20142	-41	16183 -9
		2260	31	14987	0.0001	17847	-23	16187 -9 65.96
PBMC-026	ドナー#1	2039	35	19071	0.1	17136	11	624 109
		2039	35	19071	0.01	16445	15	6455 74
		2039	35	19071	0.001	16195	17	17833 7
		2039	35	19071	0.0001	16192	5	17924 7 45
	ドナー#2	2016	64	17334	0.1	17161	4	2078 100
		2016	64	17334	0.01	16757	7	10946 44
		2016	64	17334	0.001	18613	-5	17924 -1
		2016	64	17334	0.0001	17169	4	18569 -5 84
PBMC-028	ドナー#1	4288	45	22547	1	18204	24	2098 112
		4288	45	22547	0.1	20679	10	1827 114
		4288	45	22547	0.01	22799	-1	6520 88
		4288	45	22547	0.001	23547	-5	22327 1
		4288	45	22547	0.0001	24778	-12	24124 -9 30.07
	ドナー#2	2148	58	54394	1	48545	12	5199 94
		2148	58	54394	0.1	45708	17	5091 95
		2148	58	54394	0.01	51741	6	18890 68
		2148	58	54394	0.001	52421	5	50978 7
PBMC-029	ドナー#1	609	69	10054	0.1	11027	-10	2098 85
		609	69	10054	0.01	10037	0	1827 88
		609	69	10054	0.001	10222	-2	6520 38
		609	69	10054	0.0001	11267	-13	22327 -131 28.06
	ドナー#2	7737	57	23132	0.1	21254	12	2536 134
		7737	57	23132	0.01	21726	9	10249 84
		7737	57	23132	0.001	22579	4	23380 -2
		7737	57	23132	0.0001	22491	4	23183 0 55.35
PBMC-030	ドナー#1	2739	47	53426	0.1	60116	-13	2132 101
		2739	47	53426	0.01	56411	-6	14297 77
		2739	47	53426	0.001	59167	-11	55868 -5
		2739	47	53426	0.0001	59290	-12	60865 -15 35.52
	ドナー#2	4310	50	53781	0.1	52881	2	3208 102
		4310	50	53781	0.01	51741	4	30716 47
		4310	50	53781	0.001	53072	1	53628 0
		4310	50	53781	0.0001	58045	-9	54343 -1 102.88
PBMC-032	ドナー#1	2458	42	14058	0.1	16579	-22	636 116 40.36
		2458	42	14058	0.01	19250	-45	3358 93

【0189】

【化7】

2458	42	14058	0.001	19852	-50	20639	-57
2458	42	14058	0.0001	10161	-44	18007	-42
0.1 $\mu$ g/ml におけるヒトPBMCの平均阻害%					3	107	
0.01 $\mu$ g/ml におけるヒトPBMCの平均阻害%					-1	74	
0.001 $\mu$ g/ml におけるヒトPBMCの平均阻害%					-7	0	
0.0001 $\mu$ g/ml におけるヒトPBMCの平均阻害%					-6	-17	49.65
阻害% : $100 - (A_{bs} - PBMC\text{単独} - CHO - CD40L\text{単独のCPM}) / (PBMC + CHO - CD40L - PBMC\text{単独} - CHO - CD40L\text{単独のCPM}) * 100\%$							

B細胞のほかに、ヒトPBMCはまた抗体依存性細胞毒性(ADCC)を媒介できるナチュラルキラー細胞を含有する。増殖の抗体媒介抑制の機序を明確化するために、ヒトPBMCから精製したB細胞を用いて試験を実施した。PBMCで得られた結果と同様、両方の抗体とも精製B細胞のCD40リガンド誘導増殖を強力に抑制した(表5、n=3)。これらのデータはADCCの機序ではなく候補抗体のアンタゴニスト活性がこれらの試験の増殖抑制の原因であることを示している。

【0190】

【化8】

表5. 精製ヒトB細胞のCD40リガンド誘導増殖に対する抗CD40抗体の作用

実験番号	ドナ	#	B細胞	CPM		Abs濃度( $\mu$ g/ml)	HuIgG1		CHIR-5.9		CHIR-12.12	
				CHO- CD40L	B細胞+ CHO- CD40L		CPM	% 阻害	CPM	% 阻害	CPM	% 阻害
B細胞	-004	1	418	89	3132	100	429	103	271	109	152	114
			418	89	3132	20	3193	-2	316	107	222	111
			418	89	3132	4	3175	-2	144	114	235	110
			418	89	3132	0.8	6334	-122	245	110	63	117
	2	81	73	27240	100	28311	-4	85	100	77	100	
			81	73	27240	20	24707	9	65	100	94	100
			81	73	27240	4	23081	15	108	100	68	100
			81	73	27240	0.8	26252	4	87	100	77	100
B細胞	-005	3	267	75	24552	1	25910	-6	291	100	102	101
			267	75	24552	0.1	28447	-16	259	100	108	101
			267	75	24552	0.01	26706	-9	2957	89	4922	81
平均 % 阻害							-3	103		103		

阻害% :  $100 - (A_{bs} - B\text{細胞単独} - CHO - CD40L\text{単独のCPM}) / (B\text{細胞とCHO-CD40L-B細胞単独} - CHO - CD40L\text{単独のCPM}) * 100\%$

(実施例7: CHIR-5.9およびCHIR-12.12は正常対象由来ヒトB細胞の強力な増殖を誘導しない)

CD40リガンドは正常B細胞およびB細胞リンパ腫細胞を活性化して増殖させる。一部の抗CD40抗体(アゴニスト)の結合は正常および癌B細胞の増殖のための同様の刺激シグナルを与えることができる。強力なB細胞刺激活性を有する抗体はB細胞リンパ腫の治療的処置のための適当な候補ではない。2種の候補抗体が正常ボランティアドナー由来のB細胞の増殖を誘導する能力について試験した。正常ドナーPMBC由来のFicoll-Hypaque Plus勾配遠心分離により精製したB細胞を合計4日間種々の濃度の候補抗体(0.001~100  $\mu$ g/mlの範囲)と共に96穴プレート中で培養した。陽性対照群においては、PBMCをCD40リガンドを発現するホルムアルデヒド固定CHO細胞と共に培養した。B細胞の増殖は14~18時間37でトリチウム化標識チミジンの取り込みにより測定した。CHO細胞上に提示されるCD40リガンドは145の平均刺激指数(SI)をもたらすB細胞の旺盛な増殖を誘導したが、候補抗体はCHIR-12.12およびCHIR-5.9についてそれぞれ2.89および5.08の刺激指数で弱い増殖を誘導したのみであった(n=3)(表6)。

【0191】

## 【化9】

表 6. 候補抗CD40mAbに応答した正常ヒト対象から精製したB細胞の増殖

実験番号	ドナー#	B細胞 CPM	B細胞+CHO-CD40L CPM	Abs濃度 (μg/ml)	B細胞+CHIR-5.9 B細胞+CHIR-12.12			
					B細胞+huIgG1 CPM	S.指数(1)	S.指数(2)	CPM S.指数(2)
B細胞 -004	1	418	3132	7.49	100	498	1.19	401
		418	3132		20	245	0.59	232
		418	3132		4	241	0.58	232
		418	3132		0.8	376	0.90	298
凍結	2	81	27240	336.30	100	34	0.42	454
		81	27240		20	48	0.59	706
		81	27240		4	41	0.51	567
		81	27240		0.8	34	0.42	736
B細胞 -005	3	267	24552	91.96	1	691	2.59	2101
		267	24552		0.1	686	2.57	2267
		267	24552		0.01	808	3.03	2203
		267	24552		0.001	567	2.12	846
平均刺激指数 (SI)				145.25		1.29	5.08	2.88
S.指数(1):=CPM (B細胞+CHO-CD40L) / CPM (B細胞単独)								
S.指数(2):=CPM (B細胞+Ab) / CPM (PBMC単独)								

B細胞のほかに、ヒトPBMCはB細胞上のCD40に結合した抗CD40抗体の交差結合をもたらすことができるIgG1分子に対するFc受容体(FcR)を担持した細胞型を含有する。この交差結合は潜在的に抗CD40抗体の刺激活性を増強する。交差結合細胞の存在下のCHIR-5.9およびCHIR-12.12抗体のB細胞刺激活性の欠如を確認するために、B細胞並びにFcR+細胞を含有する全PBMCを用いて増殖実験を実施した。これらの実験のデータ(表7A、mAb CHIR-5.9;表7B、mAb CHIR-12.12)によれば、これらの候補抗体はFcR担持細胞の存在下であっても全体として対照ヒトIgG1により誘導されたバックグラウンド増殖より高値の増殖をもたらすようにはB細胞を刺激しないことが確認される(n=10)。CD40リガンドは7.41の平均刺激指数(SI)を誘導した。候補抗体の場合の平均SIはCHIR-12.12およびCHIR-5.9についてそれぞれ0.55および1.05であった。試験した10ドナーPBMCの1検体のみがCHIR-5.9抗体に対してある程度の刺激応答を示した(表7のドナー2)。候補mAbによる刺激活性が無いことは、更に、培養ウェルのプラスチック表面上に固定化した候補抗CD40抗体に応答したPBMC増殖を測定することにより確認した(n=2)。CD40リガンド、CHIR-12.12およびCHIR-5.9刺激を用いた場合の平均のSIはそれぞれ2.2、0.67および1.2であった(表8)。総括すると、これらのデータは候補抗CD40抗体が強力なB細胞刺激特性を有していないことを示している。

【0192】

【化10-1】

表 7A. mAb CHIR-5.9に応答した正常ヒト対象由來のPBMCの増殖

実験番号	PBM C	CPM	PBMC+CHO-CD40L	Abs濃度(μg/ml)	PBMC+huigG1	PBMC+CHIR-5.9	
			指數(1)		CPM	指數(2)	CPM
PBMC-010	1417 5279	3.73	1	1218	0.86	3	4.22
	1417 5279		0.25	1712	1.21	5	481
			0.002			364	
	1417 5279		5	1449	1.02	2	2.57
			0.015			324	
	1417 5279		6	1194	0.84	2	2.29
PBMC-011	2138 8247	3.86	10	3047	1.43	7	317
	2138 8247		1	2726	1.28	7	361
	2138 8247		0.1	2026	0.95	1	201
	2138 8247					186	
ドナー#2	1156	4.87	10	4966	2.09	3	452
	2374 1		1			244	
	1156			2544	1.07	5	1.03
	2374 1					146	
	1156		0.1	2177	0.92	2	0.62
	2374 1					189	
ドナー#3	1156	4.87	0.01	4672	1.97	6	0.87
	2374 1					211	
	3229 7956	2.46	10	5035	1.56	9	0.66
	3229 7956		1	2826	0.88	9	109
ドナー#4	3229 7956		0.1	2277	0.71	2	105
	3229 7956					189	
	1431	3.41	0.01	3078	0.95	9	0.59
	4198 4					517	
PBMC-014	1431	3.41	10	5012	1.19	6	1.23
	1431					470	
	4198 4		1	3592	0.86	2	1.12
	1431					431	
	4198 4		0.1	5298	1.26	9	1.03
	1431					540	
PBMC-015	4198 4		0.01	5758	1.37	0	1.29
	1293	3.94	100	3598	1.10	2	168
	3284 6					156	
	1293		20	2751	0.84	2	0.48
ドナー#1	3284 6					110	
	1293		4	3135	0.95	5	0.34
	3284 6					141	
	1293		0.8	4027	1.23	9	0.43
ドナー#2	1912	3.14	100	2999	0.49	4	510
	6099 1					0.84	

【0193】

## 【化10-2】

6099	1	1912		20	4025	0.66	391	0.64
		1912					334	
6099	1		4	4496	0.74	1	0.55	
		1912					413	
6099	1		0.8	3834	0.63	9	0.68	
		1982					120	
ドナー#3	2479	6	8.00	100	3564	1.44	4	0.49
		1982						
2479	6		20	1874	0.76	782	0.32	
2479	6	1982		4	1779	0.72	634	0.26
2479	6	1982		0.8	2274	0.92	937	0.38
PBMC-016		1578					103	
		1148	9	13.75	0.1	1255	1.09	6
		1578						0.90
		1148	9		0.05	1284	1.12	871
		1578						0.76
		1148	9		0.01	1446	1.26	952
		PBMCの平均SI		5.09			1.06	1.03

指数 (1): =(PBMC+CHO-CD40L)/PBMC

指数 (2): =(PBMC+Abs)/PBMC

## 【0194】

## 【化11】

表 7B.mAb CHIR-12.12に応答した正常ヒト由来のPBMCの増殖

実験番号	PBMC	PBMC+CHO-CD40L		Abs 濃度 (μg/ml)	PBMC+huIgG1		PBMC+CHIR-12.12	
		CPM	指数(1)		CPM	指数(2)	CPM	指数(2)
PBMC-025	ドナー#1	4051	42292	10.44	0.1	2909	0.72	2451
		4051	42292		0.01	4725	1.17	8924
		4051	42292		0.001	8080	1.99	8782
		4051	42292		0.0001	4351	1.07	4342
	ドナー#2	2260	14987	6.63	0.1	2538	1.12	6741
		2260	14987		0.01	3524	1.56	8921
		2260	14987		0.001	3159	1.40	4484
		2260	14987		0.0001	2801	1.24	2533
PBMC-026	ドナー#1	2085	18313	8.78	0.1	1386	0.66	2761
		2085	18313		0.01	2871	1.38	3162
		2085	18313		0.001	2602	1.25	3233
		2085	18313		0.0001	1709	0.82	1766
	ドナー#2	676	18054	26.71	0.1	660	0.98	2229
		676	18054		0.01	2864	4.24	1238
		676	18054		0.001	693	1.03	1507
		676	18054		0.0001	984	1.46	811
PBMC-027	ドナー#1	2742	13028	4.75	0.1	4725	1.72	2795
		2742	13028		0.01	4575	1.67	5353
		2742	13028		0.001	3218	1.17	3501
		2742	13028		0.0001	5107	1.86	4272
	ドナー#2	1338	11901	8.89	0.1	1633	1.22	1943
		1338	11901		0.01	1520	1.14	5132
		1338	11901		0.001	1517	1.13	2067
		1338	11901		0.0001	1047	0.78	2076
PBMC-028	ドナー#1	4288	22547	5.26	0.1	3686	0.86	2525
		4288	22547		0.01	3113	0.73	2047

## 【0195】

## 【化12】

	4288	22547		0.001	4414	1.03	3515	0.82	
	4288	22547		0.0001	2452	0.57	4189	0.98	
PBMC-029	ドナー#2	2148	54894	25.56	0.1	9127	4.25	5574	2.59
		2148	54894		0.01	4566	2.13	6515	3.03
		2148	54894		0.001	5285	2.46	5919	2.76
		2148	54894		0.0001	4667	2.17	4298	2.00
PBMC-029	ドナー#1	609	10054	16.51	0.1	359	0.59	363	0.60
		609	10054		0.01	473	0.78	956	1.57
		609	10054		0.001	461	0.76	1159	1.90
		609	10054		0.0001	625	1.03	558	0.92
PBMC-030	ドナー#2	7737	23132	2.99	0.1	4940	0.64	3493	0.45
		7737	23132		0.01	6041	0.78	3644	0.47
		7737	23132		0.001	5098	0.66	5232	0.68
		7737	23132		0.0001	5135	0.66	5241	0.68
PBMC-030	ドナー#1	4164	57205	13.74	10	2713	0.65	1046	0.25
		4164	57205		1	3627	0.37	1576	0.38
		4164	57205		0.1	4590	1.10	1512	0.36
		4164	57205		0.01	4384	1.05	2711	0.65
PBMC-032	ドナー#2	3324	53865	16.20	10	6376	1.92	4731	1.42
		3324	53865		1	4720	1.42	5219	1.57
		3324	53865		0.1	3880	1.17	5869	1.77
		3324	53865		0.01	3863	1.16	5657	1.70
PBMC-032	ドナー#1	1808	15271	8.45	10	2349	1.30	4790	2.65
		1808	15271		1	3820	2.11	5203	2.08
		1808	15271		0.1	2098	1.16	6332	3.50
		1808	15271		0.01	1769	0.99	5005	2.77
PBMCの平均SI				11.92			1.30	1.62	

指標(1): = (PBMC+CHO-CD40L)のCPM / PBMCのCPM

指標(2): = (PBMC+Abs)のCPM / PBMCのCPM

培養ウェルの表面( $n = 2$ )。CD40リガンド、CHIR-12.12、およびCHIR-5.9の刺激での平均SIは、それぞれ2.2、0.67、および1.2であった(表8)。これらのデータと一緒に考えて、候補抗CD40抗体は、強力なB細胞刺激特性を持っていないことを示す。

## 【0196】

## 【化13】

表8. 固定化抗CD40抗体に応答した正常ヒト対象由来のPBMCの増殖

実験番号	PBMC	PBMC+CHO-CD40L		Abs濃度: ( $\mu$ g/ml)	PBMC+huIgG1		PBMC+CHIR-5.9		PBMC+CHIR-12.12	
		CPM	CPM	S.指標(1)	CPM	S.指標(2)	CPM	S.指標(2)	CPM	S.指標(2)
PBMC-012	225	6808	30.26	10	279	1.24	734	3.26	200	0.89
	225	6808		1	175	0.78	178	0.79	161	0.72
	225	6808		0.1	156	0.69	226	1.00	249	1.11
	225	6808		0.01	293	1.30	232	1.03	254	1.13
固定化-004	857	11701	13.65	1000	479	0.56	1428	1.67	384	0.45
	857	11701		100	543	0.63	839	0.98	265	0.31
	857	11701		10	487	0.57	411	0.48	262	0.31
	857	11701		1	632	0.74	372	0.43	376	0.44
PBMCの平均SI				21.96		0.81	1.21		0.67	

S.指標(1): = CPM(PBMC+CHO-CD40L)/CPM(PBMC)

S.指標(2): = CPM(PBMC+Abs)/CPM(PBMC)

(実施例8: CHIR-5.9およびCHIR-12.12はADC CによりCD40担持標的細胞を殺傷することができる)

候補抗体はADC Cの機序によりCD40担持標的細胞(リンパ腫系統)を殺傷することができる。CHIR-5.9およびCHIR-12.12の両方はIgG1アイソタイプ

の完全ヒト抗体であり、そして、ADCCの機序により標的細胞の殺傷を誘導する能力を有することが期待される。それらがインビトロの試験において癌細胞株を殺傷する能力があるかどうか調べた。2種のヒトリンパ腫細胞株 (Ramos およびDauidi) をこれらの試験の標的細胞として選択した。8正常ボランティア由来のPBMCまたはリッチ化NK細胞をこれらの試験のエフェクター細胞として使用した。リンパ腫細胞株と標的細胞の両方に対してCHIR-5.9と比較してCHIR-12.12の場合により強力なADCC応答が観察された。リンパ腫細胞株はリツキシマブ (Rituxan (登録商標)) に対する標的抗原であるCD20も発現し、これにより、リツキシマブADCC活性にこれら2種の候補mAbのADCC活性を比較する事が可能となった。リンパ腫細胞株標的については、1 μg/mlの濃度で使用した場合、CHIR-5.9、CHIR-12.12およびリツキシマブについてそれぞれ35%、59%および47%の平均の特異的溶解は観察された (表9)。2種の抗体は補体依存性細胞毒性 (CDC) 試験においてはそれほど活性を示さなかった。

【0197】

【化14】

表9. ADCCによるリンパ腫細胞株の抗CD40mAb依存性殺傷

実験番号	エフェクター細胞	E:T比	標的細胞: ヒトリンパ腫細胞株 (Ramos またはDauidi)							
			% 溶解 IgG1	Abs 濃度 (μg/ml)	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituxan	
					% 溶解	% 溶解 - % 溶解 IgG1	% 溶解	% 溶解 - % 溶解 IgG1	% 溶解	% 溶解 - % 溶解 IgG1
ADCC-005	huNK	3	17.05	5	30.75	13.70	65.22	48.17	ND	ND
アラマーブルー	huNK	3	40.81	5	58.62	17.81	87.87	47.06	ND	ND
ADCC-006	huNK	2	-3.09	10	3.50	6.59	43.71	46.8	34.82	37.91
アラマーブルー			-8.62	1	-10.10	-1.48	45.13	53.75	37.07	45.69
			-11	0.1	-14.80	-3.80	39.82	50.82	33.61	44.61
			-4.54	0.01	2.53	7.07	50.07	54.61	28.49	33.03
51Cr	huNK	5	1.5	10	32.09	30.59	47.24	45.742	ND	ND
			2.4	1	18.01	15.61	37.42	35.022	ND	ND
			2.5	0.1	14.67	12.17	37.63	35.131	ND	ND
ADCC-009	huNK	10	2.32	5	66.20	63.88	97.70	95.38	86.2	83.88
カルセインAM			0.48	1	67.20	66.72	123.00	122.52	88.2	87.72
			-1.43	0.2	78.40	79.83	118.00	119.43	88.8	90.23
			3.39	0.04	69.10	65.71	109.00	105.61	84.9	81.51
ADCC-011	huNK	8	3.18	1	15.36	12.19	51.59	48.42	22.44	19.27
カルセインAM			4.58	0.01	7.39	2.81	46.80	42.22	14.68	10.10
			5.41	0.002	6.35	0.94	5.10	-0.31	9.58	4.16
			7.03	0.0004	7.76	0.73	5.99	-1.04	5.99	-1.04
ADCC-012	huNK	10	13.34	10	73.31	59.97	117.80	104.46	50.75	37.41
カルセインAM			13.50	1	74.76	61.26	88.64	75.14	65.97	52.47
			12.27	0.01	53.52	46.25	72.88	60.61	50.16	37.89
			13.61	0.005	57.50	43.89	69.45	55.84	39.28	25.67
			11.95	0.001	56.81	44.86	65.17	53.22	33.07	21.12
ADCC-013	PBMC	100	2.54	1	21.03	18.49	37.94	35.40	32.28	29.74
51Cr			2.45	0.1	15.50	13.05	30.82	28.37	27.18	24.73
			2.92	0.01	14.53	11.61	22.59	19.67	12.79	9.87
			2.78	0.001	3.90	1.12	8.99	6.21	3.13	0.35
ADCC-014	PBMC	100	4.64	10	53.54	48.90	56.12	51.48	ND	ND
51Cr			4.64	1	46.84	42.20	43.00	38.36	ND	ND
			4.64	0.1	45.63	40.99	39.94	35.30	ND	ND
			4.64	0.01	7.73	3.09	9.79	5.15	ND	ND
			4.64	0.001	8.83	4.19	10.81	6.17	ND	ND
mAb 1 μg/ml 濃度における平均%溶解					35.31		59.03		47.23	
* 100%殺傷より高値は100%殺傷対照に使用した洗剤による不完全な殺傷に起因する										

(実施例9: CD40はリンパ節生検患者由来のNHL細胞の表面に存在する)

NHL細胞を患者の生検リンパ節から単離し、使用時まで液体窒素中に保存した。分析

の時点における細胞の生存性は 90 % を超過していた。2人のリツキシマブ感受性および3人のリツキシマブ抵抗性の患者（合計5患者）に由来する細胞を直接標識 15B8 - FITC または 15B8 + 抗 hu IgG<sub>2</sub> - FITC のいずれかで染色し、フローサイトメトリーで分析した。全患者由来の NHL 細胞は CD40 を発現することが判明した。表10 は NHL 細胞の 平均 76 % が CD40 を発現することを示している（範囲 60 ~ 91 %）。

【0198】

【化15】

表 10.

患者 ID <sup>a</sup>	患者の型 <sup>b</sup>	%陽性 <sup>c</sup>	
		MS81 <sup>d</sup>	15B8 <sup>e</sup>
B	CR	n.d. <sup>f</sup>	91.02
J	CR	n.d.	60.36
H	NR	n.d.	85.08
H	NR	72.24	81.19
K	NR	n.d.	70.69
L	NR	n.d.	66.82

平均%陽性

76

<sup>a</sup> 抗 CD20 mAb で処置した NHL 患者

<sup>b</sup> 抗 CD20 mAb への患者応答； CR = 完全応答者； NR = 非応答者

<sup>c</sup> 染色が陽性であったリンパ球ゲート内の%細胞

<sup>d</sup> MS81, アゴニスト抗 CD40 mAb

<sup>e</sup> 15B8, アンタゴニスト抗 CD40 mAb

<sup>f</sup> n.d., 実施せず

（実施例10：CHIR-5.9 および CHIR-12.12 は NHL 患者のリンパ節由来の癌細胞の増殖を刺激しない）

CD40 リガンドは NHL 患者由来のリンパ腫細胞の生存および増殖のための刺激シグナルを与えることが知られている。一部の抗 CD40 抗体（アゴニスト）の結合は患者の癌細胞の増殖に対して同様の刺激シグナルを与えることができる。強力な B 細胞刺激活性を有する抗体は B 細胞リンパ腫の 治療処置のための 適当な候補ではない。2種の候補抗体が 3 患者由来の NHL 細胞の増殖を誘導する能力について試験した。リンパ節（LN）生検から単離された細胞を種々の濃度の候補抗体（範囲 0.01 ~ 300 μg / mL）と共に合計 3 日間培養した。細胞の増殖はトリチウム化チミジンの取り込みにより測定した。2種の候補 mAb の何れも試験した何れの濃度においても癌細胞の増殖を誘導しなかった（表11）。外部から添加した B 細胞成長因子である IL-4 の存在下であっても抗体は NHL 細胞の増殖を誘導しなかった（3 患者細胞の 1 つにおいて試験）。これらの結果は CHIR-5.9 および CHIR-12.12 はアゴニスト抗 CD40 抗体ではなく、そして患者由来の NHL 細胞のインビトロ 増殖を刺激しないことを示している。

【0199】

## 【化16】

表 11. 候補抗CD40mAbに応答したNHL患者のLN由来癌細胞の増殖

ドナー 番号	Abs濃度(ug/ml)	CPM		S. 指数	CPM 細胞+ CHIR- 12.12	S. 指数	CPM 細胞+MS81	S. 指数
		細胞+ CHIR- 5.9	CHIR- -5.9					
		細胞+ IgG1	CHIR- 12.12					
PP	0.01	180	203	1.23	133.67	0.74	ND	ND
	0.1	107.5	151.67	1.41	136	1.27	ND	ND
	1	130.67	206.67	1.58	197.33	1.51	179	1.37
	10	152.5	245	1.61	137.33	0.90	871.67	5.71
	100	137.67	332.33	2.41	157.33	1.14	ND	ND
	300	137.67	254.33	1.85	100.67	0.73	ND	ND
MM	0.01	165	180.33	1.09	124	0.75	ND	ND
	0.1	180.5	149.67	0.83	111.33	0.62	ND	ND
	1	62	109.67	1.77	104.67	1.69	ND	ND
	10	91.5	93.33	1.02	100	1.09	763	8.34
	100	123	173	1.41	105.33	0.86	ND	ND
	300	109	183.67	1.69	157	1.44	ND	ND
BD (IL-4)	0.01	1591.5	1623.67	1.02	1422	0.89	ND	ND
	0.1	1405	1281	0.91	1316.33	0.94	ND	ND
	1	1526	1352.33	0.89	1160	0.76	1508.33	0.99
	10	1450	1424	0.98	1244	0.86	4146.67	2.86
	100	1406.67	1497.67	1.06	1255.33	0.89	ND	ND
	300	1410.33	1466.67	1.04	1233	0.87	ND	ND

(実施例11: CHIR-5.9およびCHIR-12.12は非ホジキンリンパ腫患者由来の癌細胞のCD40リガンド媒介増殖をブロックできる)

CD40リガンドによるCD40の係留はNHL患者由来の癌細胞の増殖を誘導する。アンタゴニスト抗CD40抗体はこの増殖を抑制することが期待される。2種の候補抗CD40抗体を種々の濃度(0.01  $\mu$ g/ml ~ 100  $\mu$ g/ml)において、それらが患者由来のNHL細胞のCD40リガンド誘導増殖を抑制する能力を有するかどうか調べた。患者由来のNHL細胞をIL-4の存在下CD40L発現フィーダー上で懸濁液中培養した。NHL細胞の増殖は<sup>3</sup>H-チミジン取り込みにより測定した。両方の抗体ともNHL細胞のCD40リガンド誘導増殖の抑制において極めて効果的であることがわかった(表12、n=2)。CD40リガンド誘導増殖のほぼ完全な抑制が抗体濃度1.0~10  $\mu$ g/mlで達成される。

【0200】

## 【化17】

表 12. NHL 患者の LN 由来の癌細胞の CD40 リガンド誘導増殖の阻害

患者	Abs 濃度 (ug/ml)	CPM	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituximab	
			IgG1	CPM	% 阻害	CPM	% 阻害	CPM
BD	0.01	29525.5	25369	14	24793	16	29490.3	0
	0.1	29554	20265.33	31	13671	54	29832.7	-1
	1	29486.67	6785.33	77	453	98	26355.3	11
	10	29710	506.33	98	371	99	29427.3	1
	100	29372.33	512.33	98	386.67	99	ND	ND
PP	0.01	23572	23229.33	1	23666	0	25317.3	-7
	0.1	22520	19092.33	15	17197	24	26349.7	-17
	1	23535.67	1442.33	94	802.67	97	26515.7	-13
	10	23101.5	608.67	97	221.33	99	25478.3	-10
	100	23847.33	ND	ND	252	99	ND	ND

%阻害 : 100 - (被験AbのCPM / 対照AbのCPM) × 100%

(実施例 12 : CD40 リガンド担持細胞と共に培養した場合の生存 NHL 細胞の数に対する CHIR-5.9 の作用)

長時間 (7、10 および 14 日) に渡り CD40 リガンド担持細胞と共に培養した場合の生存 NHL 細胞数に対する CHIR-5.9 の作用を調べた。CD40 を介した CD40 リガンド媒介シグナル伝達は B 細胞の生存のために重要である。この実験セットでは 7、10 および 14 日における NHL 細胞数に対する抗 CD40 抗体の作用を評価した。5 患者由来の NHL 細胞を IL-4 の存在下 CD40 L 発現照射フィーダー細胞上で懸濁液中培養した。対照ヒト IgG および CHIR-5.9 抗体は第 0 日および第 7 日に 10 μg / mL の濃度で添加した。各条件下の生存細胞を特定の日に計数した。対照群 (IgG) の細胞数は予測どおり時間に従って増大していた。対照群と比較して CHIR-5.9 处理培養物では減少した数の細胞が回収された。CHIR-5.9 抗体による細胞数の低減の最大水準は第 14 日に観察され、アイソタイプ対照と比較して平均 80.5% (範囲 49 ~ 94%) であった (n = 5)。これらのデータを表 13 にまとめる。

## 【0201】

## 【化18】

表 13. 長時間培養(7, 10 および 14 日)に渡るNHL 患者細胞数に対する抗CD40 抗体 (CHIR-5.9/5.11) の作用

患者	培養日数	生存細胞数		IgG 対照と比較した場合の%低下
		IgG	mAb CHIR-5.9/5.11	
PS	0	100000	1000000	0.00
	7	935000	447500	52.14
	10	127090	504100	60.34
	14	102910	525000	48.98
MT	0	100000	1000000	0.00
	7	267600	182500	31.80
	10	683400	191600	71.96
	14	145000	225000	84.48
BRF	0	250000	250000	0.00
	7	145000	86667	40.23
	10	207500	65000	68.67
	14	570500	33330	94.16
DP	0	250000	250000	0.00
	7	188330	136670	27.43
	10	235000	128330	45.39
	14	428330	58330	86.38
PP	0	250000	250000	0.00
	7	270000	176670	34.57
	10	311670	128330	58.83
	14	458330	53330	88.36

\* 対照Abs と比較した%低下 = 100 - (被験Abs / 対照Abs) × 100

(実施例13: CHIR-5.9 および CHIR-12.12 は ADCCC により NHL 患者のリンパ節由来の癌細胞を殺傷することができる)

CHIR-5.9 および CHIR-12.12 は両方とも IgG<sub>1</sub> アイソタイプの完全ヒト抗体であり、そして ADCCC の機序によりインピトロでリンパ腫細胞株の殺傷を誘導することがわかっている(表9)。これらの単一のNHL 患者由来の癌細胞を殺傷する能力についてインピトロの試験で調べた。正常ボランティア由来のリッチ化NK細胞を単離直後または37 一夜培養後にこの試験のエフェクター細胞として使用した。単離直後のNK細胞および一夜培養後に使用したNK細胞の両方で同様の結果が得られた。患者由来のNHL細胞に対してはCHIR-5.9 と比較してCHIR-12.12 で高値のADC CC 水準が観察された。NHL細胞はリツキシマブ(Rituximab(登録商標))に対する標的抗原であるCD20も発現し、これにより、リツキシマブにこれら2種の候補mAb のADC CC 活性を比較する事が可能となった。抗体CHIR-12.12 およびリツキシマブは同様の水準のADC CC 活性を示し、CHIR-5.9 はこの試験では低値であった。これらのデータは図3A および3B に示す。

## 【0202】

(実施例14: CHIR-5.9 および CHIR-12.12 は CLL 患者由来の癌細胞のCD40 媒介生存および増殖をブロックできる)

候補抗体はCLL 患者由来の癌細胞のCD40 媒介生存および増殖をブロックできる。患者由来のCLL 細胞を2つの異なる条件下、即ち、ヒトアイソタイプ抗体IgG(対照)添加; およびCHIR-5.9 またはCHIR-12.12 モノクローナル抗体のいずれか添加において、CD40L 発現ホルムアルデヒド固定CHO細胞上で懸濁液中培養し

た。全ての抗体は I L - 4 の非存在下 1、10 および 100  $\mu$ g / mL の濃度で添加した。細胞計数は M T S 試験により 24 および 48 時間に実施した。細胞の低減数は対照群と比較した場合に C H I R - 5.9 (n = 6) および C H I R - 12.12 (n = 2) 処理 培養物から回復した。抗 C D 4 0 m A b 処理 および 対照抗体 処理 の培養物の間の細胞数のより大きい差が 48 時間の時点において観察された。データは表 14 にまとめた。

【0203】

【化19】

表 14. 培養開始後 48 時間に測定した C L L 患者由来の癌細胞の C D 4 0 誘導生存および増殖に対する候補抗体の作用

患者#	Ab 濃度 ( $\mu$ g/ml)	相対細胞数			細胞数の%減少	
		IgG1	CHIR-5.9/5.11	CHIR-12.12	CHIR-5.9/5.11	CHIR-12.12
1	1	269.3 1	25.27	ND	<b>90.62</b>	ND
	10	101.5 8	33.07	ND	<b>67.44</b>	ND
	100	130.7 1	40.16	ND	<b>69.28</b>	ND
2	1	265.5 5	75.8	ND	<b>71.46</b>	ND
	10	227.5 7	128.5	ND	<b>43.53</b>	ND
	100	265.9 9	6.4	ND	<b>97.59</b>	ND
3	1	85.9	35.39	ND	<b>58.80</b>	ND
	10	70.44	39.51	ND	<b>43.91</b>	ND
	100	77.65	20.95	ND	<b>73.02</b>	ND
4	1	80.48	15.03	ND	<b>81.32</b>	ND
	10	63.01	19.51	ND	<b>69.04</b>	ND
	100	55.69	3.65	ND	<b>93.45</b>	ND
5	1	90.63	91.66	89.59	<b>-1.14</b>	<b>1.15</b>
	10	78.13	82.28	60.41	<b>-5.31</b>	<b>22.68</b>
	100	63.53	86.47	39.59	<b>-36.11</b>	<b>37.68</b>
6	1	130.2 1	77.6	71.88	<b>40.40</b>	<b>44.80</b>
	10	131.7 7	78.13	73.96	<b>40.71</b>	<b>43.87</b>
	100	127.0 8	76.56	82.29	<b>39.75</b>	<b>35.25</b>

\* 対照 A b s と比較した場合の%低下 = 100(被験 A b s / 対象 A b s)  $\times 100$

(実施例 15 : C H I R - 5.9 および C H I R - 12.12 は動物モデルにおいて抗腫瘍活性を示す)

(薬理学的 / インビボの薬効)

候補 m A b は 2 つの抗腫瘍機序、即ち増殖 / 生存シグナルの遮断、および、A D C C の誘導のいずれか / 両方により腫瘍負荷を低減する望ましい薬理学的作用をもたらすことが期待される。現在入手可能なヒトリンパ腫異種移植片モデルは原発癌細胞とは対照的にその生育および生存を C D 4 0 刺激に依存していない長期リンパ腫細胞株を使用している。従って、腫瘍増殖 / 生存シグナルの遮断に基づいたこれらの m A b の抗腫瘍活性の要素はこれらのモデルにおいて抗腫瘍薬効に寄与するとは期待されない。これらのモデルにおける効力は A D C C、即ち C H I R - 5.9 および C H I R - 12.12 m A b に関する第 2 の抗腫瘍機序に依存している。N a m a l w a および D a u d i 細胞株に基づいた 2 種の異種移植片ヒトリンパ腫モデルを、候補 m A b の抗腫瘍活性に関して評価した。その治療活性を更に明らかにするために、これらの候補 m A b を D a u d i 細胞株に基づいた段階型および非段階型の異種移植片ヒトリンパ腫モデルにおいて評価した。

【0204】

## (インビボの薬効データのまとめ)

合計3投薬において一週間に1回腹腔内(i.p.)投与した場合、2つの候補mAbの1つであるCHIR-12.12は用量依存性の態様で攻撃的な非段階型B細胞リンパ腫(Namalwa)の生育を顕著に抑制した(図4)。第2の候補mAbであるCHIR-5.9は本試験では単一の用量においてのみ試験したが、同じ用量のCHIR-12.12よりも有効性が低値であった。興味深いことに、CHIR-12.12はリツキシマブよりも本モデルにおいてより有効であることが解った。リツキシマブの低有効性はNamalwaリンパ腫細胞株上の低いCD20発現に起因する可能性がある。候補mAbで観察された薬効は、2つの癌細胞殺傷機序のうち1つ(ADC)のみが現在の異種移植片リンパ腫モデルにおいて効力を有することから、より大きい重要性を有する。2つの殺傷機序、即ちADCおよび生存シグナルの遮断はヒトリンパ腫患者における抗腫瘍活性に寄与することが期待される。これはヒトリンパ腫患者における薬効を達成する機会を増大させると考えられる。候補抗CD40mAbはまた、第2のB細胞リンパ腫における腫瘍生育の抑制の傾向も示している(非有効化Daudиモデル、データ示さず)。フォローアップ試験において、2つの候補抗体は非段階型および段階型のDaudиリンパ腫モデルの両方において用量依存的抗腫瘍薬効を有することが示された(それぞれ図5および6)。段階型Daudиモデルにおいて、CHIR-12.12mAbはRituxan(登録商標)の同用量よりも腫瘍体積の低減においてより有効であった。

## 【0205】

## (異種移植片ヒトB細胞リンパ腫モデル)

一貫した腫瘍生育を確保するために、T細胞欠損ヌードマウスを3Gyで全身照射することにより腫瘍接種1日前に免疫系を更に抑制した。腫瘍細胞はマウス当たり $5 \times 10^6$ 個で右体側部に皮下接種した。処置は腫瘍移植後1日(非段階皮下異種移植片ヒトB細胞リンパ腫モデル、NamalwaおよびDaudи)または腫瘍体積が200~400mm<sup>3</sup>に達した時点(段階型Daudиモデル、通常は腫瘍接種の15日後)のいずれかに開始した。腫瘍担持マウスに所定用量において一週間に1回腹腔内(i.p.)に抗CD40mAbを注射した。腫瘍体積は一週間に2回記録した。腫瘍体積が任意の群において2500mm<sup>3</sup>に達した時点で、試験を終了した。段階型Daudиモデルにおいては腫瘍体積データは第36日まで分析したが、これは一部のマウスがこの日以降に死亡したためである。完全な退縮(CR)は試験終了時まで計数した。データはANOVAまたはKruskall-Wallis検定および多群比較のための相当する後検定を用いて分析した。

## 【0206】

非段階型Namalwaモデルにおいて、抗CD40mAb CHIR-12.12はRituxan(登録商標)(リツキシマブ)とは異なり、Namalwa腫瘍の生育を有意に(p=0.01)抑制した(腫瘍体積減少60%に対しリツキシマブでは25%、n=10マウス/群)(図4)。即ち本モデルにおいては、抗CD40mAb CHIR-12.12はリツキシマブより強力であった。第2の候補mAbであるCHIR-5.9はリツキシマブの10分の1の用量において少なくともリツキシマブと同様に有効であった。両方の抗CD40mAb CHIR-12.12およびRituxanは非段階化Daudи腫瘍モデルにおいて腫瘍の発達を有意に防止した(腫瘍攻撃に14/15の抵抗性)(図5)。

## 【0207】

皮下腫瘍が触診可能になった時点で処置を開始した段階型異種移植片Daudиモデルにおいてこれらの抗CD40モノクローナル抗体を更に比較したところ、1mg/kgの抗CD40mAb CHIR-12.12は60%の完全退縮(6/10)で有意な腫瘍減少(p=0.003)をもたらしたが、同じ用量のリツキシマブは腫瘍生育の有意な抑制はもたらさず、また完全退縮ももたらさなかった(0/10)。図6を参照されたい。

## 【0208】

総括すると、抗CD40mAb CHIR-12.12は実験的リンパ腫モデルにおいて腫瘍の生育を有意に抑制した。同じ用量およびレジメンにおいて、mAb CHIR-

12.12はRituxan（登録商標）（リツキシマブ）よりも良好な抗癌活性を示した。更にまた、毒性の臨床兆候はこの用量およびレジメンにおいて観察されなかった。これらのデータは抗CD40mAb CHR-12.12は強力なインビトロおよび異種移植片モデルにおいて抗ヒトリンパ腫活性を有しており、そして、リンパ腫の処置のために臨床的に有効であることを示唆している。

## 【0209】

（実施例16：CHR-5.9およびCHR-12.12の薬物動態）

抗CD40mAbのマウスにおける薬物動態を単回IVおよびIP用量投与の後に試験した。抗CD40mAbはIP投与後に高い全身生体利用性および延長された終末半減期(>5日)を示した(データ示さず)。このパイロット試験は薬理学的試験の設計において利用するために実施したが、この完全ヒトmAbはマウスCD40とは交差反応しないため、このmAbの生成活性に関しては殆ど、または全く重要性を有さなかった。

## 【0210】

（実施例17：モノクローナル抗体CHR-12.12およびモノクローナル抗体CHR-5.9についてのエピトープの特徴づけ）

モノクローナル抗体CHR-12.12およびモノクローナル抗体CHR-5.9により認識されるCD40上のエピトープの位置を決定するために、SDS-PAGEおよびウェスタンプロット分析を実施した。精製したCD40(0.5μg)を、還元条件下および非還元条件下で、4~12%のNUPAGEゲル上で分離し、PVDFメンブレンに移し、そして、10μg/ml濃度のモノクローナル抗体でプローブした。プロットを、アルカリホスファターゼ結合体化抗ヒトIgGでプローブし、そして、アルカリホスファターゼについてのWestern Blue<sup>®</sup>安定化基質(Promega)を用いて発色させた。

## 【0211】

結果は、抗CD40モノクローナル抗体CHR-12.12が、CD40の非還元型形態および還元型形態の両方の上にあるエピトープを認識し、CD40の非還元型形態が、CD40の還元型形態よりも高い強度を示すことを示す(表15；プロットは示さず)。CD40の両方の形態についての認識が、陽性であるという事実は、この抗体が、直鎖状配列である立体配座のエピトープ部分と相互作用することを示す。モノクローナル抗体CHR-5.9は、主に、CD40の非還元型形態を認識し、この抗体が、本来の立体配座のエピトープと相互作用することを示唆する(表15；プロットは示さず)。

## 【0212】

## 【化20】

表15. ドメインの同定

	ドメイン1	ドメイン2	ドメイン3	ドメイン4
mAb CHR-12.12	-	+	-	-
mAb CHR-5.9	-	+	-	-
mAb 15B8	+	-	-	-

CD40上の抗原性領域をマッピングするために、CD40の4つの細胞外ドメインをクローニングし、そして、GST融合タンパク質として昆虫細胞において発現させた。4つのドメインの分泌を、GFP分泌シグナルで確認した。昆虫細胞の上清を、SDS-PAGEおよびウェスタンプロット分析により分析し、エピトープを含むドメインを同定した。

## 【0213】

モノクローナル抗体CHR-12.12は、還元条件および非還元条件の両方の下で、ドメイン2上のエピトープを認識する(表16；プロットは示さず)。対照的に、モノクローナル抗体CHR-5.9は、ドメイン2に対して、非常に弱い認識を示す(表1

6 ; プロットは示さず）。これらの抗体のいずれもが、この分析において、ドメイン1、ドメイン3またはドメイン4は認識しない。

【0214】

【化21】

表16. ドメイン2の分析

	還元	非還元
mAb CHIR-12.12	++	+++
mAb CHIR-5.9	+	+

mAb CHIR-12.12により認識されるエピトープをより正確に規定するためには、ペプチドを、CD40の細胞外ドメイン2から合成した。これは、配列PCGSEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICT（配列番号10または配列番号12に示される配列の残基61～104）に対応する。1アミノ酸がオフセット（offset）された10マークペプチド35種を含むSPOTメンブレン（Spotma）を作製した。mAb CHIR-12.12および抗ヒトIgG-ガラクトシダーゼを二次抗体として用いるウェスタンプロット分析を実施した。このプロットを、細片に分け、mAb CHIR-5.9で再度プローブして、この抗体により認識される領域を決定した。

【0215】

10 μg/mlの抗CD40モノクローナル抗体CHIR-12.12でプローブするSPOT分析では、スポット18～22の反応が陽性であった。これらのペプチドによりカバーされる配列領域を、表17に示す。

【0216】

【化22】

表17. 抗CD40モノクローナル抗体CHIR-12.12でプローブしたSPOT分析の結果

スポット番号	配列領域
18	HQHKYCDPNL（配列番号10または配列番号12の残基78-87）
19	QHKYCDPNLGL（配列番号10または配列番号12の残基79-88）
20	HKYCDPNLGL（配列番号10または配列番号12の残基80-89）
21	KYCDPNLGLR（配列番号10または配列番号12の残基81-90）
22	YCDPNLGLRV（配列番号10または配列番号12の残基82-91）

これらの結果は、以下の直鎖状エピトープに対応する：YCDPNL（配列番号10または配列番号12に示す配列の残基82～87）。このエピトープは、Y82、D84およびN86を含み、これらは、CD40-CD40リガンドの相互作用に関与すると予測されている。

【0217】

mAb CHIR-5.9を用いるSPOT分析は、表18に示されるスポット20～22により表されるペプチドの弱い認識を示し、これは、そのCD40への結合において、領域YCDPNLGL（配列番号10または配列番号12に示す配列の残基82～89）が関与することを示唆した。mAb CHIR-12.12およびmAb CHIR-5.9は、BIACORE分析においてCD40への結合に関して、互いに競合することに注意すべきである。

【0218】

【化23】

表18. 抗CD40モノクローナル抗体CHIR-5.9でプロープしたSPOT分析の結果

スポット番号	配列領域
20	HKYCDPNLGL (配列番号10または配列番号12の残基80-89)
21	KYCDPNLGLR (配列番号10または配列番号12の残基81-90)
22	YCDPNLGLRV (配列番号10または配列番号12の残基82-91)

SPOT分析により同定した直鎖状エピトープは、CD40 B1モジュールの内部である。CD40 B1モジュールの配列は、H K Y C D P N L G L R V Q Q K G T S E T D T I C (配列番号10または配列番号12の残基80～103)である。

【0219】

直鎖状エピトープ内でCHIR-12.12について同定されたのはC83である。このシステイン残基がC103とジスルフィド結合を形成することは公知である。CHIR-12.12 mAbの立体配座のエピトープ(conformational epitope)は、このジスルフィド結合(C83-C103)および/またはC103にコンホーメーション的に近い周囲のアミノ酸を含むようである。

【0220】

(実施例18: NamalwaおよびDaud i細胞上のCD20およびCD40分子の数)

NamalwaおよびDaud i細胞上のCD20およびCD40分子の数を図7に示す通り0.01、0.1、1、10および100 μg/mLの抗体濃度を用いて測定した。図7から解るとおり、CD20分子(リツキシマブの標的)の平均数はCD40分子(mAb CHIR-12.12の標的)の数よりもNamalwaおよびDaud i細胞株の両方において高値であった。

【0221】

(実施例19:mAb CHIR-12.12およびリツキシマブのDaud iリンパ腫細胞に対するADCc)

リツキシマブおよび候補mAb CHIR-12.12のADCc活性を標的(T)細胞としてのリンパ腫細胞株Daud iおよびエフェクター(E)細胞としての健常者ボランティア由来精製NK細胞に対して種々の濃度においてインビトロで試験した。新しく単離したヒトNK細胞をカルセイン標識Daud iリンパ腫細胞とE:T比1:10で混合した。細胞混合物をmAb CHIR-12.12またはリツキシマブのいずれかの所定濃度の存在下に37℃で4時間インキュベートした。上澄み中の溶解した標的細胞から放出されたカルセイン濃度を任意蛍光単位(Arbitrary Fluorescent Units: AFU)として測定した。パーセント特異的溶解は $100 \times (AFU_{試験} - AFU_{自発}) / (AFU_{最大} - AFU_{自発})$ として計算し、式中AFU自発的放出は抗体またはNK細胞の非存在下で標的細胞により放出されたカルセインであり、そしてAFU最大放出は洗剤による溶解で標的細胞から放出されたカルセインである。

【0222】

抗体濃度依存性Daud i細胞溶解が観察された(図8;下記表19)。抗CD40 mAbにより誘導された標的リンパ腫細胞の最大特異的溶解はリツキシマブにより誘導された溶解と比較して高値であった(63.6% vs 45.9%, n=6; mAb CHIR-12.12対リツキシマブの対応のあるt検定、p=0.0002)。更にまた、リツキシマブのED50は平均(n=6)で51.6 Mでありこれは本活性に関する抗CD4

0 mAb CHIR-12.12 の ED50 より 13 倍高値であった。

【0223】

【化24】

表 19. Daudi リンパ腫細胞に対する mAb CHIR-12.12 およびリツキシマブの比較 ADC

NK 細胞 ドナー	最大殺傷 (%)		ED50 (pM)	
	mAb CHIR-12.12	Rituximab	mAb CHIR-12.12	Rituximab
1	50.2	34.9	3.2	14.2
2	83.1	68.6	2.2	27.2
3	64.2	36.9	4.1	66.9
4	53.3	39.5	2.4	47.6
5	74.8	56.6	2.8	24.1
6	56.2	38.9	7.9	129.5
平均	63.6	45.9	3.8	51.6

(実施例 20 : CHIR-12.12 は正常ヒト B 細胞における CD40L 媒介 CD40 生存およびシグナル伝達経路をブロックする)

可溶性 CD40 リガンド (CD40L) は B 細胞を活性化し、そして、生存および増殖の増強および NF-B、ERK / MAPK、PI3K / Akt および p38 シグナル伝達経路の活性化を含む機能的応答の種々の特徴を含む。加えて、CD40L 媒介 CD40 刺激は、正常 B 細胞における分解 PARP の低下および抗アポトーシス蛋白、XIAP および Mc1-1 の誘導により生存シグナルを提供する。CD40L 媒介 CD40 刺激はまた TRAF2 および TRAF3 を動員して CD40 細胞質ドメインに結合させる。

【0224】

次の研究により、CHIR-12.12 は、正常ヒト B 細胞におけるこれらの全ての刺激効果を直接抑制したことがわかる。例えば CHIR-12.12 の処理はカスパーゼ-9、カスパーゼ-3 および PARP の増大した分解並びに XIAP および Mc1-1 の減少を時間および用量依存的な態様でもたらし、B 細胞アポトーシスを再開させる。CHIR-12.12 の処理はまた CD40L 媒介 CD40 刺激に応答した IKK (IKK) および (NF-B 経路)、ERK、Akt および p38 のリン酸化を抑制している。さらにまた、CHIR-12.12 は初期 CD40L 媒介 CD40 刺激の非存在下ではこれらのアポトーシス作用をトリガーしなかったことがわかった。

【0225】

(CHIR-12.12 は PARP の分解を誘導することにより CD40 リガンドにより媒介される生存を抑制する)

これらの実験においては、健常者ドナー由来の  $0.6 \times 10^6$  の正常ヒト B 細胞 (パーセント純度 85 ~ 95 %) を  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の sCD40L (Alexis, Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK) で刺激した。次に CHIR-12.12 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) および対照 IgG を添加した。細胞を 0、20 分、2 時間、6 時間、18 時間および 26 時間で収集した。分解カスパーゼ-9、分解カスパーゼ-3、分解 PARP および - アクチン対照をウエスタンプロットにより細胞溶解物中で検出した。

【0226】

簡潔に言えば、CD40L 媒介 CD40 刺激は経時的に分解カスパーゼ-9、分解カスパーゼ-3 または分解 PARP の増大をもたらさなかつたことから、生存シグナルを与えたことが観察され、細胞がアポトーシスを起こしていないことが示された。しかしながら

、 C H I R - 1 2 . 1 2 の 処理 はこれらの分解産物の増大をもたらし、 C H I R - 1 2 . 1 2 の 処理 が s C D 4 0 L 刺激正常 B 細胞における生存シグナル伝達に対する C D 4 0 L 結合の作用を排除し、 B 細胞アポトーシスを再開させたことを示していた（データ示さず）。

#### 【 0 2 2 7 】

（ C H I R - 1 2 . 1 2 は「生存」抗アポトーシス蛋白の発現を抑制した）

これらの実験においては、健常者ドナー由来の  $0.6 \times 10^6$  の正常ヒト B 細胞（パーセント純度 85 ~ 95 %）を  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の s C D 4 0 L ( A l e x i s , C o r p . , B i n g h a m , N o t t i n g h a m s h i r e , U K ) で刺激した。次に C H I R - 1 2 . 1 2 (  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  ) および対照 I g G を添加した。細胞を 0 、 20 分、 2 時間、 6 時間、 18 時間および 26 時間で収集した。 M c 1 - 1 、 X I A P 、 C D 4 0 および - アクチン対照をウエスタンプロットにより細胞溶解物中で検出した。

#### 【 0 2 2 8 】

簡潔に言えば s C D 4 0 L 刺激は経時的な M c 1 - 1 および X I A P の持続的発現をもたらした。しかしながら、 s C D 4 0 L 刺激細胞に C H I R - 1 2 . 1 2 を 処理 したところ経時にこれらの蛋白の発現が低減した（データ示さず）。 M c 1 - 1 および X I A P はアポトーシス経路をブロックすることができる「生存」シグナルであるため、これらの結果は C H I R - 1 2 . 1 2 処理 は s C D 4 0 L 刺激正常 B 細胞におけるアポトーシスのプロッキングを解除することを示している。

#### 【 0 2 2 9 】

（ C H I R - 1 2 . 1 2 処理 は正常 B 細胞における I K K ( S e r 1 8 0 ) および I K K ( S e r 1 8 1 ) の リン酸化 を抑制した）

これらの実験においては、健常者ドナー由来の  $1.0 \times 10^6$  の正常ヒト B 細胞（パーセント純度 85 ~ 95 %）を  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の s C D 4 0 L ( A l e x i s , C o r p . , B i n g h a m , N o t t i n g h a m s h i r e , U K ) で刺激した。次に C H I R - 1 2 . 1 2 (  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  ) および対照 I g G を添加した。細胞を 0 および 20 分に収集した。 リン酸化 I K K ( S e r 1 8 0 ) および I K K ( S e r 1 8 1 ) および 全 I K K 対照はウエスタンプロットにより細胞溶解物中で検出した。

#### 【 0 2 3 0 】

簡潔に言えば s C D 4 0 L による刺激は経時的な I K K ( S e r 1 8 0 ) および I K K ( S e r 1 8 1 ) の リン酸化 をもたらしたが、 C H I R - 1 2 . 1 2 の 処理 は正常 B 細胞において s C D 4 0 L 刺激へのこの応答を排除した（データ示さず）。

#### 【 0 2 3 1 】

（ C H I R - 1 2 . 1 2 投与は用量依存的に C D 4 0 リガンドにより媒介される生存を抑制した）

これらの実験においては、健常者ドナー由来の  $0.6 \times 10^6$  の正常ヒト B 細胞（パーセント純度 85 ~ 95 %）を  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の s C D 4 0 L ( A l e x i s , C o r p . , B i n g h a m , N o t t i n g h a m s h i r e , U K ) で刺激した。次に C H I R - 1 2 . 1 2 (  $0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$  ) および対照 I g G を添加した。細胞を 24 時間で収集した。分解 P A R P および アクチン対照はウエスタンプロットにより細胞溶解物中で検出した。

#### 【 0 2 3 2 】

簡潔に言えば C H I R - 1 2 . 1 2 処理 は用量依存的な態様で s C D 4 0 L 刺激細胞において P A R P 分解の増大をもたらし、従って、 s C D 4 0 L 刺激正常 B 細胞における 生存シグナル伝達経路を排除した（データ示さず）。

#### 【 0 2 3 3 】

（ C H I R - 1 2 . 1 2 は用量依存的な態様で「生存」抗アポトーシス蛋白の発現を抑制する）

これらの実験においては、健常者ドナー由来の  $0.6 \times 10^6$  の正常ヒト B 細胞（パーセント純度 85 ~ 95 %）を  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  の s C D 4 0 L ( A l e x i s , C o r p . ,

B i n g h a m , N o t t i n g h a m s h i r e , U K ) で刺激した。次に C H I R - 1 2 . 1 2 ( 0 . 5 、 2 および 1 0  $\mu$  g / m L ) および対照 I g G を添加した。細胞を 2 2 時間で収集した。 M c l - 1 、 X I A P 、 分解 P A R P および アクチン対照はウエスタンプロットにより細胞溶解物中で検出した。

## 【 0 2 3 4 】

簡潔に言えば C H I R - 1 2 . 1 2 处理は用量依存的な態様で s C D 4 0 L 刺激細胞において低減した M c l - 1 および X I A P の発現および増大した 分解 P A R P 発現をもたらし、従って s C D 4 0 L 刺激正常 B 細胞におけるアポトーシス経路へのこれらのプロッキングを排除した（データ示さず）。

## 【 0 2 3 5 】

（ C H I R - 1 2 . 1 2 は可溶性 C D 4 0 L シグナル伝達の非存在下において抗アポトーシス蛋白、分解 P A R P および X I A P の発現に影響しなかった）

これらの実験においては、健常者ドナー由来の  $1 . 0 \times 1 0 ^ 6$  の正常ヒト B 細胞（パーセント純度 85 ~ 95 %）に C H I R - 1 2 . 1 2 ( 1 0  $\mu$  g / m L ) および対照 I g G のみを 处理 した（即ち抗体添加前に s C D 4 0 L による予備刺激を細胞に与えなかった）。細胞は 0 , 4 , 1 4 および 1 6 時間で収集した。 X I A P 、 分解 P A R P および アクチン対照はウエスタンプロットにより細胞溶解物中で検出した。

## 【 0 2 3 6 】

簡潔に言えば、結果は s C D 4 0 L 刺激の非存在下においては、 I g G 处理対照細胞および C H I R - 1 2 . 1 2 細胞の両方において、細胞は 分解 P A R P の増大した濃度を発現したのに対し、 X I A P の発現は一定のままであったことを示している（データ示さず）。これらのデータは C H I R - 1 2 . 1 2 が C D 4 0 L 刺激非存在下においては正常ヒト B 細胞のアポトーシスをトリガーしないことを示している。

## 【 0 2 3 7 】

（ C H I R - 1 2 . 1 2 は正常 B 細胞において I K K ( S e r 1 8 0 ) および I K K ( S e r 1 8 1 ) 、 A k t 、 E R K および p 3 8 の リン酸化を抑制する）

これらの実験においては、健常者ドナー由来の  $1 . 0 \times 1 0 ^ 6$  の正常ヒト B 細胞（パーセント純度 85 ~ 95 %）を 1 % F B S 含有培地で血清枯渇させ、そして 1  $\mu$  g / m L の s C D 4 0 L ( A l e x i s , C o r p . , B i n g h a m , N o t t i n g h a m s h i r e , U K ) で刺激した。培養物に C H I R - 1 2 . 1 2 ( 1 および 1 0  $\mu$  g / m L ) および対照 I g G で 处理 した。細胞を 0 および 2 0 分間で収集した。ホスホ - I K K 、ホスホ - I K K 、全 I K K 、ホスホ E R K 、全 E R K 、ホスホ - A k t 、全 A k t 、ホスホ - p 3 8 および全 p 3 8 はウエスタンプロットにより細胞溶解物中で検出した。

## 【 0 2 3 8 】

簡潔に言えば、 s C D 4 0 L 刺激は I K K / の リン酸化、 E R K の リン酸化、 A k t の リン酸化および p 3 8 の リン酸化の増大をもたらし、すなわち、細胞の生存および/または増殖をもたらした。 C H I R - 1 2 . 1 2 の細胞への 处理 は正常 B 細胞におけるこれらのシグナル伝達経路に対する s C D 4 0 L 刺激の作用を排除した（データ示さず）。

## 【 0 2 3 9 】

（ C H I R - 1 2 . 1 2 は C D 4 0 シグナル伝達カスケードにおける P I 3 K および M E K / E R K のような多重シグナル伝達経路を抑制する）

これらの実験においては、健常者ドナー由来の  $1 . 0 \times 1 0 ^ 6$  の正常ヒト B 細胞（パーセント純度 85 ~ 95 %）を 1 % F B S 含有培地で血清枯渇させ、そして 1  $\mu$  g / m L の s C D 4 0 L ( A l e x i s , C o r p . , B i n g h a m , N o t t i n g h a m s h i r e , U K ) で刺激した。培養物にはまた C H I R - 1 2 . 1 2 ( 1 および 1 0  $\mu$  g / m L ) 、 W o r t m a n i n ( P I 3 K / A k t 阻害剤； 1 および 1 0  $\mu$  M ) 、 L Y 2 9 4 0 0 2 ( P I 3 K / A k t 阻害剤； 1 0 および 3 0  $\mu$  M ) および P D 9 8 0 9 5 ( M E K 阻害剤、 1 0 および 3 0  $\mu$  g / m L ) を 处理 した。細胞を 0 および 2 0 分間で収集した。ホスホ - E R K 、ホスホ - A k t 、全 A k t 、ホスホ - I K K / および全体をウエスタンプロットにより細胞溶解物中で検出した。

## 【0240】

簡潔に言えば、結果は C H I R - 1 2 . 1 2 がこれらのシグナル導入分子の全てのリン酸化を排除したが、シグナル導入阻害剤はシグナル伝達の特定の排除のみを示しており、C H I R - 1 2 . 1 2 は C D 4 0 L 刺激により媒介されるこれらのシグナル導入分子の上流を阻害すると考えられる（データ示さず）。

## 【0241】

（C H I R - 1 2 . 1 2 は正常B細胞における C D 4 0 の細胞質ドメインへのシグナル伝達分子 T R A F 2 および T R A F 3 の結合を抑制する）

これらの実験においては、健常者ドナー由来の  $4.0 \times 10^6$  の正常ヒトB細胞（パーセント純度 85 ~ 95 %）を 1 % F B S 含有培地内で 4 時間血清枯渇させ、そして 1  $\mu$  g / mL の s C D 4 0 L (A l e x i s , C o r p . , B i n g h a m , N o t t i n g h a m s h i r e , U K ) で 20 分間刺激した。細胞を 0 および 20 分間で収集した。 C D 4 0 はポリクローナル抗 C D 4 0 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y , C A ) で免疫沈降させ、抗 T R A F 2 m A b (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y , C A ) 、抗 T R A F 3 m A b (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y , C A ) および抗 C D 4 0 m A b (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y , C A ) を用いたウエスタンプロットにおいてプロービングした。

## 【0242】

簡潔に言えば、結果は T R A F 2 および T R A F 3 が s C D 4 0 L 刺激後に C D 4 0 で同時沈降されたことを示している。一方、C H I R - 1 2 . 1 2 の処理は s C D 4 0 L 刺激正常B細胞における C D 4 0 - T R A F 2 / 3 シグナル伝達複合体の形成を排除した。 C D 4 0 発現には変化は無かった（データ示さず）。

## 【0243】

理論に制約されないが、これらの実験の結果および上記した実施例の結果は C H I R - 1 2 . 1 2 抗体が独特の組合せの属性を有する二重作用のアンタゴニスト抗 C D 4 0 モノクローナル抗体であることを示している。この完全ヒトモノクローナル抗体は B 細胞の生存および増殖のための C D 4 0 L 媒介 C D 4 0 シグナル伝達経路をブロックし；このアンタゴニスト活性は究極的な細胞の死をもたらす。C H I R - 1 2 . 1 2 はまたエフェクター細胞による認識および結合も媒介し、抗体依存性の細胞毒性 (A D C C) を開始させる。C H I R - 1 2 . 1 2 がエフェクター細胞に結合すれば、細胞溶解酵素が放出され、B 細胞のアポトーシスおよび溶解をもたらす。C H I R - 1 2 . 1 2 は前臨床腫瘍モデルにおいて比較した場合にリツキシマブよりも強力な抗腫瘍抗体である。

## 【0244】

（実施例 2 1 : N H L 、 C L L および N M 患者由来の原発癌細胞に対するアゴニストおよびアンタゴニスト活性）

臨床研究者等との共同作業により、候補 m A b を N H L および C L L および多発性骨髄腫患者由来の原発癌細胞に対する種々の活性（下記に列挙）について試験する。

## 【0245】

- ・増殖試験におけるアゴニスト作用（8 N H L 患者、8 C L L 患者および8 M M 患者）
- ・増殖試験におけるアンタゴニスト活性（8 N H L 患者、8 C L L 患者および8 M M 患者）
- ・アネキシン V 試験によるアポトーシス作用（3 ~ 4 N H L 患者、4 C L L 患者および4 M M 患者）
- ・アネキシン V 試験による生存シグナルの逆行（3 N H L 患者、3 C L L 患者および3 M M 患者）
- ・補体依存性細胞毒性（4 N H L 患者、4 C L L 患者および4 M M 患者）
- ・抗体依存性細胞毒性（6 N H L 患者、6 C L L 患者および6 M M 患者）

（実施例 2 2 : 毒性試験のための該当動物種の発見）

これらの 2 候補抗体はげっ歯類 C D 4 0 と交差反応しないため、毒性学的作用を試験するためには他の種を発見しなければならない。

## 【0246】

2候補抗CD40抗体が動物CD40と交差反応する能力は、フローサイトメトリーで試験される。ラット、ウサギ、イヌ、カニクイザルおよびマーモセットサルをこの試験のために調べる。

## 【0247】

候補抗体はヒトB細胞上のCD40への結合においてアンタゴニスト活性を示す。候補抗体に対して同様の応答を有する動物種を発見するために、候補抗体への結合を示す種由来のリンパ球をアンタゴニスト活性に関する増殖試験において試験する。候補抗体のアンタゴニスト活性性結合に関して選択された種由来のリンパ球は更に、ADCCの機序を介してCD40発現リンパ腫細胞株を殺傷するためのエフェクター細胞として作用するその能力について試験する。最後に選択された動物種を候補抗体の組織結合パターンに関するIHC試験において試験する。ヒト細胞について観察されたものと同様の態様においてこれらの試験で候補抗体に応答する動物種を毒性学的試験のために選択する。

## 【0248】

初回の試験は候補抗CD40mAbがカニクイザルCD40と交差反応することを示している。

## 【0249】

(実施例23:CHIR-5.9およびCHIR-12.12の腫瘍ターゲティングプロファイル)

CHIR-12.12およびCHIR-5.9mAbの相対的腫瘍ターゲティングプロファイルを調べるために、蛍光標識候補mAbおよびアイソタイプ対照抗体を腫瘍担持マウスに投与する。腫瘍標本および正常臓器を投与後種々の時点で採取する。腫瘍および正常臓器内の標識抗体の蓄積を分析する。

## 【0250】

(実施例24:CHIR-5.9およびCHIR-12.12の作用機序)

CHIR-5.9およびCHIR-12.12mAbによる腫瘍生育抑制を媒介する機序を解明するために、以下の試験を行う。

## 【0251】

Fc-受容体ノックアウトまたはブロックモデル: ADCCはFc受容体を介した抗体のFc部分へのNK、マクロファージおよび単球のようなエフェクター細胞の結合により媒介される。Fc受容体の活性化において不全であるマウス並びにこれらの受容体へのFc結合を妨害するように操作された抗体はADCC媒介腫瘍生育抑制をブロックする。このモデルにおける腫瘍抑制の消失または有意な減少はこれらの2候補mAbによる腫瘍増殖の抑制がADCC機序により主に媒介されていることを示唆している。

## 【0252】

(実施例25:アンタゴニスト抗CD40抗体のための液体薬学的処方物)

本試験の目的は生物物理学的および生物化学的な方法の両方によりアンタゴニスト抗CD40抗体CHIR-12.12の安定性に対する溶液pHの影響を検討することによりこの抗体のための至適な溶液環境を選択することであった。示差走査熱量分析(DSC)の結果によれば、CHIR-12.12のコンホーメーション安定性はpH5.5~6.5を有する処方物において至適となった。SDS-PAGE、サイズエクスクルージョンHPLC(SEC-HPLC)およびカチオン交換HPLC(CEX-HPLC)分析の組合せに基づけばCHIR-12.12の物理化学的安定性は約5.0~5.5のpHにおいて至適である。これらの結果に基づけば、この抗体を含む1つの推奨される液体薬学的処方物は約10mMのコハク酸ナトリウム、約150mMの塩化ナトリウム中に製剤され、約5.5のpHを有する約20mg/mLのCHIR-12.12を含む処方物である。

## 【0253】

(材料および方法)

処方物試験に使用したCHIR-12.12抗体はCHO細胞培養方法により生産した

ヒトモノクローナル抗体である。このmAbは分子量150kDaを有し、そして、ジスルフィド結合により連結された2つの軽鎖および2つの重鎖よりなる。これを種々の癌および自己免疫/炎症性疾患の処置のために、正常および悪性のB細胞を含むCD40発現細胞上のCD40細胞表面受容体に対してターゲティングさせる。

## 【0254】

本試験のために使用した抗CD40薬剤物質はCHO誘導精製抗CD40(CHIR-12.12)バルクロットであった。薬剤物質の組成は10mMクエン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH6.5中9.7mg/mlCHIR-12.12抗体であった。試験における対照試料は受領した薬剤物質であり、その後-60で凍結し、室温で解凍し、そして所定時点において安定性試料と共に試験した。安定性試料は種々のpHの溶液に対して薬剤物質を透析することにより調製し、そして各試料のCHIR-12.12濃度は表20に示す通りUV280により測定した。

## 【0255】

## 【化25】

表20. CHIR-12.12処方物

緩衝液の組成	pH	CHIR-12.12濃度 (mg/ml)
10mMクエン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム	4.5	9.0
10mMコハク酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム	5.0	9.3
10mMコハク酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム	5.5	9.2
10mMクエン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム	6.0	9.7
10mMクエン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム	6.5	9.4
10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム	7.0	9.4
10mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム	7.5	9.5
10mMケルシン、150mM塩化ナトリウム	9.0	9.5

種々の処方物におけるCHIR-12.12抗体の物理化学的安定性は以下のプロトコルを用いて試験した。

## 【0256】

## (示差走査熱量分析(DSC))

種々の処方物試料のコンホーメーション安定性は1/分で15から90まで加熱しながらMicro Cal VP-DSCを用いてモニタリングした。

## 【0257】

## (SDS-PAGE)

フラグメント化および凝集は非還元および還元条件下において4~20%トリスグリシンゲルを用いて推定した。蛋白はクーマシーブルーカラム、移動相として100mMリン酸ナトリウム、pH7.0を用いながら0.7mL/分の流量で測定した。

## 【0258】

## (サイズエクスクルージョンクロマトグラフィー(SEC-HPLC))

蛋白のフラグメント化および凝集は更にWater Alliance HPLCによりToso hass TSK-GEL 3000SWXLカラム、移動相として100mMリン酸ナトリウム、pH7.0を用いながら0.7mL/分の流量で測定した。

## 【0259】

## (カチオン交換クロマトグラフィー(CEX-HPLC))

電荷変化関連の分解はWaters 600s HPLCシステムによりDionex Propac WCX-10カラム、移動相Aとして50mM HEPES、pH7.3および移動層Bとして500mM NaCl含有50mM HEPES、pH7.3を用いながら0.5/分の流量で測定した。

## 【0260】

## (結果および考察)

## (コンホーメーション安定性試験)

C H I R - 1 2 . 1 2 の熱による展開 (u n f o l d i n g) は少なくとも 2 種の熱遷移を示しており、恐らくはそれぞれ F a b および F c ドメインの展開と融解を表わしていると考えられた。より高温においては、蛋白は凝集し、D S C シグナルは消失すると推定された。処方物スクリーニング目的のために、本試験においては最低熱遷移温度を融点、即ち T m と定義した。図 13 は処方物の pH の関数として熱融解温度を示す。pH 5 . 5 ~ 6 . 5 の処方物はより高い熱融解温度により明らかにされる通り、より高いコンホーメーション安定性を有する抗 C D 4 0 をもたらした。

## 【0261】

## (S D S - P A G E 分析)

pH 4 . 5 ~ 9 . 0 の C H I R - 1 2 . 1 2 処方物試料を 2 ヶ月 4 0 でインキュベートし、S D S - P A G E 分析に付した(データ示さず)。非還元条件下では、pH 5 . 5 より高値の処方物においては 23 kDa および 27 kDa の分子量 (M W) を有する物質種が観察され、全ての処方物において 51 kDa の M W を有する物質種が観察されたが、pH 5 . 0 ~ 5 . 5 ではより少量であった。100 kDa の M W を有する物質種が pH 7 . 5 および pH 9 . 0 で観察された。

## 【0262】

還元条件下では C H I R - 1 2 . 1 2 はそれぞれ 50 kDa および 24 kDa の M W を有する遊離の重鎖および軽鎖に還元された。100 kDa の物質種は完全に還元可能とは考えられず、溶液 pH の上昇に伴って増大し、非ジスルフィドの共有結合的会合が分子内に起こっていると考えられた。S D S - P A G E では実体未知である他の物質種が存在したため、各処方物の安定性の比較は C H I R - 1 2 . 1 2 の残存純度に基づいている。pH 5 . 0 ~ 6 . 0 の処方物は C H I R - 1 2 . 1 2 に対してより安定な環境をもたらした。S D S - P A G E では凝集は殆ど検出されなかった(データ示さず)。

## 【0263】

## (S E C - H P L C 分析)

S E C - H P L C 分析は主要ピーク物質種として未損傷の C H I R - 1 2 . 1 2 を、主要ピーク物質種から分離した前ピーク物質種として凝集物質種を、主要ピーク物質種の後方のショルダーピークとして大型フラグメント物質種を検出し、そして小型フラグメント物質種が主要ピーク物質種後方に検出された。5 および 25 で 3 ヶ月インキュベートした後、蛋白フラグメントおよび凝集物の無視できる量 (< 1 . 0 %) が上記処方物中に検出され、そして C H I R - 1 2 . 1 2 の主要ピーク物質種は 99 % 純度より高値のままであった(データ示さず)。しかしながら、表 21 に示す通り、40 で保存すると蛋白フラグメントが徐々に形成され、そして pH 4 . 5 および pH 6 . 5 ~ 9 . 0 においてはより多くのフラグメントが形成された。3 ヶ月 40 で C H I R - 1 2 . 1 2 処方物をインキュベートした後、約 2 ~ 3 % の凝集物が pH 7 . 5 および pH 9 . 0 で検出されたが、他の pH の処方物では 1 % 未満の凝集塊が検出された(データ示さず)。S E C - H P L C 結果は C H I R - 1 2 . 1 2 が pH 約 5 . 0 ~ 6 . 0 でより安定であることを示している。

## 【0264】

## 【化26】

表 21. リアルタイムおよび加速保存条件下のCHIR-12.12 安定性  
試料のSEC-HPLC結果

サンプル	主要ピーク %				フラグメント %			
	t=0	40°C 1 m	40°C 2 m	40°C 3 m	t=0	40°C 1 m	40°C 2 m	40°C 3 m
対照	99.4	99.2	99.9	99.5	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
pH 4.5	99.4	93.2	86.0	81.3	<1.0	6.4	13.2	18.1
pH 5.0	99.8	98.7	91.3	89.2	<1.0	<1.0	7.8	10.2
pH 5.5	99.8	98.9	91.4	90.6	<1.0	<1.0	7.6	8.8
pH 6.0	99.6	97.7	90.4	87.3	<1.0	1.9	8.2	11.7
pH 6.5	99.3	93.4	89.0	86.9	<1.0	5.6	9.9	12.4
pH 7.0	99.2	93.9	87.4	85.1	<1.0	5.5	11.1	13.5
pH 7.5	99.1	92.8	84.4	81.9	<1.0	6.4	12.9	16.2
pH 9.0	99.3	82.4	61.6	50.6	<1.0	15.4	36.2	47.6

## (CEX-HPLC分析)

CEX-HPLC分析は主要ピーク物質種としての未損傷のCHIR-12.12、主要ピーク物質種より早く溶離する酸性変異体、および主要ピーク物質種より後方に溶離するC末端リジン付加変異体を検出した。表22は残存主要ピークCHIR-12.12物質種および酸性変異体のパーセンテージの溶液pHへの依存性を示す。対照試料は既に高水準の酸性物質種(約33%)を含有しており、これはおそらくは早期の醜酵および精製工程によるものと考えられる。より高いpHの溶液に対するCHIR-12.12の感受性は2つの事実により顕在化する。第1に、pH9.0の初期処方物試料(t=0)は既に対照より12%多い酸性物質種を形成した。第2に、酸性物質種のパーセンテージはpH上昇に伴って急激に増大したが、電荷変化関連分解は脱アミド化に起因すると考えられる。上記したデータはこの型のCHIR-12.12の分解はpH約5.0~5.5において最小限となったことを示している。

## 【0265】

## 【化27】

表 22. リアルタイムおよび加速保存条件下の種々のpHの処方物中のCHIR-12.12のCEX-HPLCピーク面積のパーセンテージ

サンプル	主要ピーク %					酸性変異体 %				
	t=0	5°C 3m	25°C 3 m	40°C 1 m	40°C 2 m	t=0	5°C 3m	25°C 3 m	40°C 1 m	40°C 2 m
対照	49.2	49.8	49.8	49.2	50.3	32.0	33.7	33.7	32.0	33.6
pH 4.5	48.5	49.7	43.7	39.7	30.0	32.5	32.6	38.0	44.2	56.4
pH 5.0	49.6	49.8	48.3	40.6	31.4	32.7	31.8	35.0	44.3	57.1
pH 5.5	50.7	50.3	48.1	40.0	30.2	32.6	31.8	37.8	48.9	63.3
pH 6.0	50.2	49.9	47.9	37.4	23.9	33.1	33.6	38.5	54.9	72.7
pH 6.5	49.4	49.9	42.3	29.7	14.6	33.3	33.6	47.7	65.2	84.6
pH 7.0	49.7	49.9	21.9	-	-	34.4	36.4	64.4	-	-
pH 7.5	49.3	48.3	12.7	-	-	35.5	40.1	79.2	-	-
pH 9.0	41.3	31.8	-	-	-	44.7	59.9	-	-	-

## (結論)

pHはCHIR-12.12のコンホーメーションおよび物理化学的安定性に対して重要な作用を有している。電荷変化関連分解はCHIR-12.12の主要分解経路であると判明し、これはpH5.0~5.5で最小限となった。全体的な安定性のデータに基づけば、この抗体を含む1つの推奨される液体薬学的処方物は約10mMのコハク酸ナトリウム、約150mMの塩化ナトリウムを中に製剤され、約5.5のpHを有する約20m

g / mL の CHIR - 12.12 を含む処方物である。

【0266】

(実施例26: CHIR - 5.9 および CHIR - 12.12 を用いた臨床試験)

(臨床目標)

全体的な臨床目標は B 細胞腫瘍の効果的な処置を、抗 CD40 IgG1 でそれらをターゲティングすることにより行うことである。これらの腫瘍は B 細胞リンパ腫、慢性リンパ性リンパ腫 (CLL)、急性リンパ球性白血病 (ALL)、多発性骨髄腫 (MM)、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症および全身キャッスルマン病を包含する。これらの疾患に関するシグナルは、第 I 相において活性の一部の尺度が得られると考えられるが、第 II 相において決定される。当初は薬剤を単一剤として検討するが、開発が進行するに従って 他の薬剤、化学療法剤 および他の抗体と組み合わせられる。

【0267】

(第 I 相)

- ・安全性と薬物動態を評価 - B 細胞悪性疾患を有する対象における用量漸増
- ・安全性、耐容性および CD40 の 血清マーカー の変化に基づいて用量を選択。一般的に MTD を調べるが、薬効の他の指標 (CD40 + B 細胞の枯渇等) も用量設定のために十分であり得る。
- ・特に異なる適応症に対して 1 用量より多くを検討、例えば CLL 用量は NHL 用量と異なってよい。即ち第 II 相においては何らかの用量設定が必要となる場合がある。
- ・患者はリアルタイム薬物動態 (Pk) サンプリングとともに毎週投与する。初期は 4 週間のサイクルが可能な最大投薬である。Pk は検討する疾患、CD40 の密度等に応じて大きく変動する場合がある。
- ・本治験は B 細胞リンパ腫、CLL および潜在的に他の B 細胞悪性疾患を有する対象に対してオープンとする。
- ・試験の中止または継続の判断は安全性、用量および抗腫瘍活性の 予備的証拠 に基づく。
- ・応答率により測定された薬剤の活性を第 II 相において測定する。
- ・第 II 相の用量の発見。

【0268】

(第 II 相)

B 細胞リンパ腫、CLL および多発性硬化症 (MM) を集中的に上記した腫瘍型において数種の治験を開始する。軽度悪性および中等度 / 高度悪性の NHL においては、CD40 はリンパ腫の グレード に応じて異なる機能を有する場合があるため別の治験が必要となる場合がある。軽度悪性疾患の場合は CD40 は生存因子としてより機能し、アポトーシスを防止する。より高度な悪性の疾患の場合は CD40 シグナル伝達の中止は細胞死をもたらす場合がある。1 種より多い用量、および 1 種より多いスケジュールを無作為第 II 相設定において試験してよい。

【0269】

各疾患において、現在の標準的療法が失敗している集団をターゲティングする。

- ・ CLL : Campath (登録商標) および化学療法に対して抵抗性であった患者。
- ・ 軽度悪性 NHL : Rituxan (登録商標) または CHOP - R 不成功例。
- ・ 中等度悪性 NHL : CHOP - R 不成功例。
- ・ 多発性骨髄腫 : 化学療法不成功例。

\* 試験の中止または継続の判断は第 II 相における処置コンセプトの証明に基づく。

\* 代用マーカーを臨床薬効の早期指標として使用できるかどうか判断する。

\* 第 III 相の用量を発見。

【0270】

(第 III 相)

第 III 相は第 II 相においてどこでシグナルを検出したか、およびどのような競合的治療法が標準と考えられるかによる。シグナルが処置の標準がないような疾患の段階にあ

る場合、シングルアームの十分コントロールされた試験を中核的治験として使用する。標準と考えられる競合薬剤がある場合は、head-to-headの試験を実施する。

【0271】

本明細書に記載した発明の多くの変形例および他の実施形態は本発明が上記説明および添付図面において提示した教示内容の利点を有する本発明の関わる分野の当業者には自明である。従って、本発明は開示した特定の実施形態に限定されるものではなく、そして変形例および他の実施形態は添付の請求項および本明細書に開示した実施形態の範囲に包含されるものとする。本明細書においては特定の用語を使用したが、それらは包括的および説明用途の意味においてのみ使用されており、限定を意図しない。

【0272】

本明細書において言及した全ての公開物および特許出願は本発明が関わる分野の当業者の技術水準を示している。全ての公開物および特許出願は各々の公開物または特許出願が特定的および個々に参照により本明細書に組み込まれる場合と同様の程度にまで参照により本明細書に組み込まれる。

【0273】

【化28】

出願人または代理人のファイル参照 PP20107.004	国際出願番号 PCT/US2004/
---------------------------------	-----------------------

## 寄託された微生物または他の生物材料に関する表示

## (PCT規則 第13規則の2)

A 表示は明細書中第18頁、第25行で言及された、寄託された微生物または他の生物材料に関してなされた。	
B. 寄託物の表示 その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 <input checked="" type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 American Type Culture Collection	
寄託機関の住所（郵便番号および国を含む） アメリカ合衆国 バージニア 20110-2209、マナサス ユニバーシティ ブールバード 10801	
寄託日 2003年9月17日	受託番号 PTA-5542
C. 追加の表示（なければ空白のまま） この情報は追付の用紙に続く <input type="checkbox"/>	
第22頁、第20行；第75頁、第11行；第142頁、第9行	
D. 表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）	
E. 別に添付する表示物（なければ空白のまま） 下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的な性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）	

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理された	この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官 	認定官

PCT/R0/134様式（1998年7月）

【0274】

【化29】

出願人または代理 人のファイル参照 PP20107.004	国際出願番号 PCT/US2004/
-------------------------------------	-----------------------

## 寄託された微生物または他の生物材料に関する表示

## (PCT規則 第13規則の2)

A. 表示は明細書中第18頁、第25行で言及された、寄託された微生物または他の生物材料に関してなされた。	
B. 寄託物の表示 その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 American Type Culture Collection	
寄託機関の住所（郵便番号および国を含む） アメリカ合衆国 バージニア 20110-2209、マナサス ユニバーシティ ブールバード 10801	
寄託日 2003年9月17日	受託番号 PTA-5543
C. 追加の表示（なければ空白のまま） この情報は追付の用紙に続く <input type="checkbox"/> 第22頁、第20行；第75頁、第11行； 第127頁、第15行；第142頁、第10行	
D. 表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）	
E. 別に添付する表示物（なければ空白のまま） 下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）	

受理官庁記入欄

この用紙は国際出願とともに受理された

認定官  


国際事務局記入欄

この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

認定官

PCT/R0/134様式（1998年7月）

【0275】

【化30】

**ATCC**

バージニア 20110-2209, マナサス, ユニバーシティー, ブールーバード10801  
電話番号: 703-365-2700・ファックス: 703-365-2745

**特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関する  
ブダペスト条約**

**国際様式**

規則7.3に基づく原寄託についての受託証  
および規則10.に基づく生存に関する証明書

宛先: (寄託者または代理人の氏名および住所)

カイロン コーポレーション  
カレン ヴァン ノート 殿  
カリフォルニア 94608, エミリービル  
ホートン ストリート 4560

寄託者: カイロン コーポレーション

寄託者による識別のための表示:

特許受託記号

マウス ハイブリドーマ 131.2F8.5.9: CMCC#12047 PTA-5542  
マウス ハイブリドーマ 153.8E2D10D6.12.12: CMCC#12056 PTA-5543

寄託物には科学的性質上記分類学上の位置が記載されていた。寄託物は2003年9月17日付で、当該国際寄託当局によって受け付けられ、受理された。

要請により:  30年間にわたり、本株の分譲請求があれば、これを通知する。

ブダペスト条約に加盟している国の工業所有権庁が、その株を受ける権利を保証するか、もしくは本株を記載した米国特許が発行されれば、本株は分譲可能となる。そしてATCCは、米国特許商標庁または寄託者により指示を受けて、本株を分譲する。

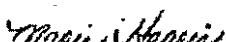
寄託有効期間中において培養物が死滅するか、もしくは破壊された場合には、生存している同一の培養物を補充するのは、寄託者の責任である。

本株は寄託の日から少なくとも30年間、または最新の分譲請求後5年のいずれか長い方にわたり保管される。合衆国および多くの他の国々がブダペスト条約に加盟している。

上記培養物の生存を2003年9月23日に試験した。その日に、培養物は生存していた。

国際寄託当局: **American Type Culture Collection**, アメリカ合衆国 バージニア 20110-2209, マナサス

ATCC 代表責任者の署名:

  
マリー・ハリス, ATCC特許寄託局長

日付: 2003年10月02日

cc: リサ アレキサンダー  
(参照: 事件番号: P20107.001)

【画面の簡単な説明】

【0276】

【図1】図1はリンパ腫細胞株(Ramos)の表面上のCD40へのCHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗体の結合を示す。

【図2A】図2Aおよび2BはCD40リガンドと相対比較した場合のCHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗CD40抗体の結合特性を示す。図2Aは

Received Nov-03-02 03:20pm From=510 923 4766 To=Intellectual Property Page 002

8049

細胞表面 CD40へのCHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗体の結合がその後のCD40リガンド結合を防止することを示している。図2BはCHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗体が細胞表面CD40に予備結合したCD40リガンドを競合排除できることを示している。

【図2B】図2Aおよび2BはCD40リガンドと相対比較した場合のCHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗CD40抗体の結合特性を示す。図2Aは細胞表面CD40へのCHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗体の結合がその後のCD40リガンド結合を防止することを示している。図2BはCHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗体が細胞表面CD40に予備結合したCD40リガンドを競合排除できることを示している。

【図3A】図3Aおよび3Bは非ホジキンリンパ腫(NHL)患者のリンパ節由来の癌細胞に対する候補モノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12のADCC活性を示す。単離直後(図3A)または37一夜培養後(図3B)のいずれかの正常なボランティアドナー由来のリッチ化NK細胞をこの試験のエフェクター細胞として使用した。NHL細胞はリツキシマブ(Rituximab(登録商標))の標的抗原であるCD20も発現するため、候補mAbのADCC活性はリツキシマブのものと比較した。

【図3B】図3Aおよび3Bは非ホジキンリンパ腫(NHL)患者のリンパ節由来の癌細胞に対する候補モノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12のADCC活性を示す。単離直後(図3A)または37一夜培養後(図3B)のいずれかの正常なボランティアドナー由来のリッチ化NK細胞をこの試験のエフェクター細胞として使用した。NHL細胞はリツキシマブ(Rituximab(登録商標))の標的抗原であるCD20も発現するため、候補mAbのADCC活性はリツキシマブのものと比較した。

【図4】図4は非段階型(unstaged)ヌードマウス異種移植片B細胞リンパ腫(Namalwa)モデルを用いてリツキシマブと比較したモノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12のインビボの抗腫瘍活性を示す。

【図5】図5は非段階型(unstaged)ヌードマウス異種移植片B細胞リンパ腫(Daudi)モデルを用いてリツキシマブと比較したモノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12のインビボの抗腫瘍活性を示す。RC、腫瘍攻撃に対する耐性。

【図6】図6は段階型(staged)ヌードマウス異種移植片B細胞リンパ腫(Daudi)モデルを用いてリツキシマブと比較したモノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12のインビボの抗腫瘍活性を示す。CR、完全な後退。

【図7】図7はNamalwaおよびDaudi細胞上のCD20およびCD40分子の数を測定するために使用したプロトコルを示す。

【図8】図8はDaudiリンパ腫細胞に対するmAb CHIR-12.12およびリツキシマブの比較ADCCを示す。

【図9】図9はmAb CHIR-12.12の軽鎖および重鎖に関するアミノ酸配列を示す。軽鎖のリーダー(配列番号2の残基1~20)、可変(配列番号2の残基21~132)および定常(配列番号2の残基133~239)領域を図9Aに示す。重鎖のリーダー(配列番号4の残基1~19)、可変(配列番号4の残基20~139)および定常(配列番号4の残基140~469)領域を図9Bに示す。図9Bに示すmAb CHIR-12.12の重鎖に関する代替の定常領域は配列番号4の153位のアラニン残基に対するセリン残基の置換を反映している。mAb CHIR-12.12の重鎖のこの変異体の完全な配列は配列番号5に示す。

【図10】図10はmAb CHIR-12.12に関する軽鎖(図10A;配列番号1)および重鎖(図10B;配列番号3)に関するコーディング配列を示す。

【図11】図11はmAb CHIR-5.9の軽鎖および重鎖に関するアミノ酸配列を示す。軽鎖のリーダー(配列番号6の残基1~20)、可変(配列番号6の残基21~132)および定常(配列番号6の残基133~239)領域を図11Aに示す。重鎖のリーダー(配列番号7の残基1~19)、可変(配列番号7の残基20~144)および定

常（配列番号7の残基145～474）領域を図11Bに示す。図11Bに示すmAb CHIR-5.9の重鎖に関する代替の定常領域は配列番号7の158位のアラニン残基に対するセリン残基の置換を反映している。mAb CHIR-5.9の重鎖のこの変異体の完全な配列は配列番号8に示す。

【図12-1】図12はヒトCD40の短アイソフォーム（図12Bのアミノ酸配列；配列番号10）のコーディング配列（図12A；配列番号9）およびヒトCD40の長アイソフォーム（図12Dのアミノ酸配列）のコーディング配列（図12C；配列番号11）を示す。

【図12-2】図12はヒトCD40の短アイソフォーム（図12Bのアミノ酸配列；配列番号10）のコーディング配列（図12A；配列番号9）およびヒトCD40の長アイソフォーム（図12Dのアミノ酸配列）のコーディング配列（図12C；配列番号11）を示す。

【図13】図13は示差走査熱分析（DSC）により測定した異なるpHの処方物におけるCHIR-12.12の熱溶融温度を示す。

【誤訳訂正3】

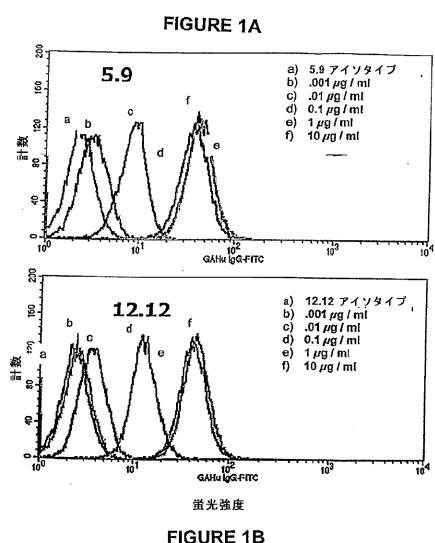
【訂正対象書類名】図面

【訂正対象項目名】全図

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【図1】



【図2A】

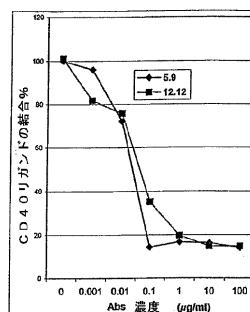


FIGURE 2A

【図2B】

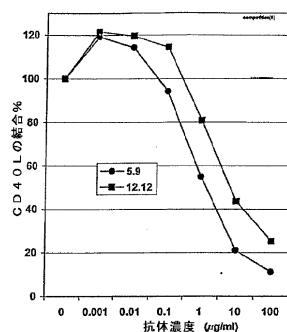


FIGURE 2B

【図3A】

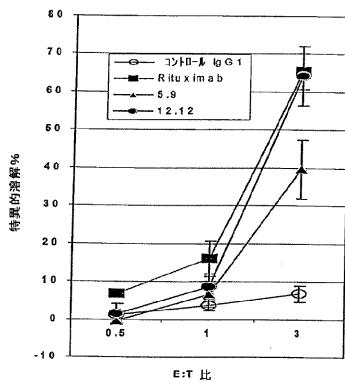


FIGURE 3A

【図3B】

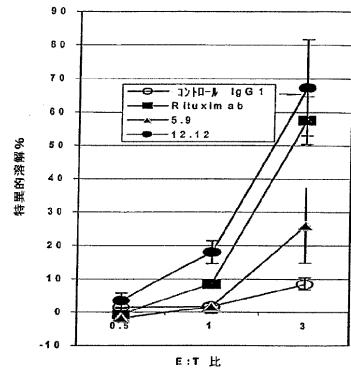


FIGURE 3B

【図6】

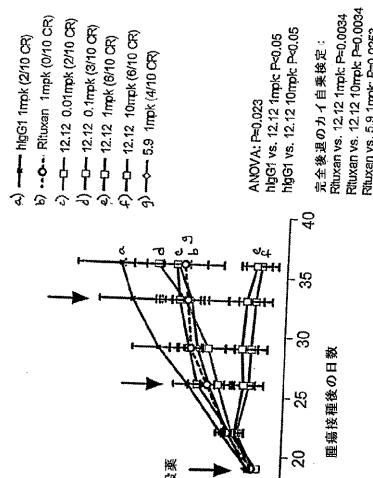


FIGURE 6

(91)

【図4】

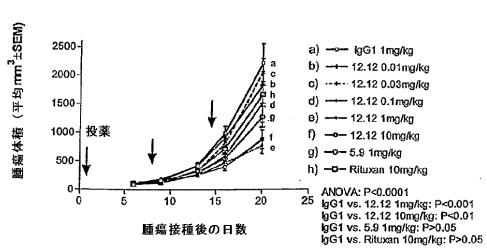


FIGURE 4

【図5】

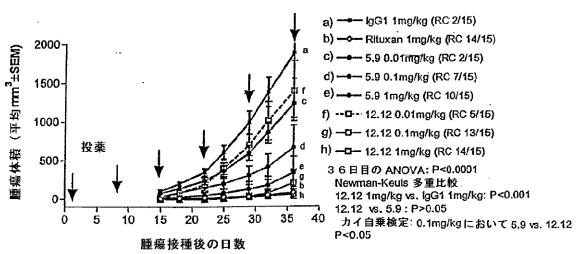


FIGURE 5

【図7】

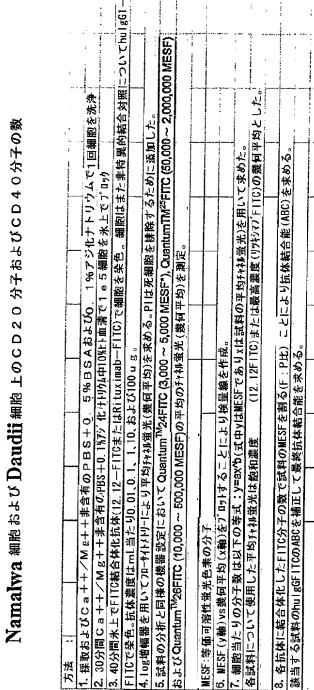
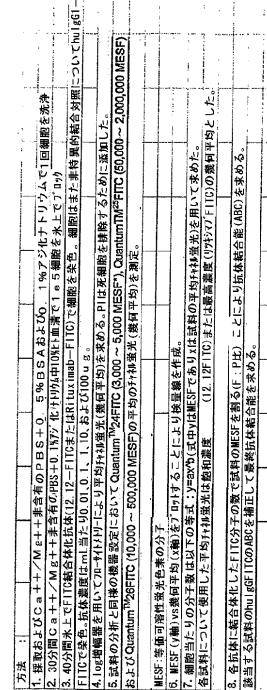


FIGURE 7

Namalwa細胞およびDaudi細胞上のCD20分子およびCD40分子の数



実験	Daudi	CD40	CD20	Namalwa
E090403	14403.0	33676.5	32964	CD20
E091003	13214.9	108438.5	3081.5	4788.2
E091103	13702.6	100509.1	3165.7	3988.3
E091203	13278.9	128158.3	3164.9	4618.0
平均	13,669.9	107,695.6	3,177.1	4,898.7
標準偏差	546.7	14915.9	88.8	933.4

FIGURE 7



## 【図 12-1】

FIGURE 12A

ヒトCD40の短いアイソフォームについてのコード配列：

```

1 atggtcgc tgcctcgca gtggcgtc tggggcgtcgtgtacccgc tgcctccca
61 gaaaccacca ctgcgtcgg agaaaaacag tacatataa acgttcgtc ctgtttttc
121 tgcacccatcg gatcgtatctt ggtgtgtac (gtacatgt) ttcgtgtatc ggtatgtt
181 ctgggggtt aaaggatatt cttagacaccc tggacagag agacacactt ccacccacac
241 aaatctcgg accccaactt aggccgttgg gttccacaga agggcaccc agaaacacac
301 accatctgg ctgttggaa aggttgcgtc tgcacgtt aggttcgtt gacgttgc
361 tgcacccatcg calgttcgg cgtcgttgg gttccacaga tttgtatgtt ggttgcgtt
421 accatctgg accgttgcgg aatggccgtc ttccatgtt tgcacatgc tttgtatgtt
481 tgcacccatcg tttttccca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
541 atggatgtt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
601 gtcacccatcg aaatggccca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt

```

FIGURE 12B

ヒトCD40のコードされた短いアイソフォーム：

```

1 mvrplqcwl wgcilavhp epttacrekq ylinsqccsl cpggkivsd ctetctcc
61 pgccesfdit wnrthchqk kycdpnlgr vqkqgtseid tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vqkqatgvsd ticecpvfg fsvnssafek chpwtrspgs aespqgdphh
181 hrpvcphlg aglyqkkgqk anq

```

## 【図 12-2】

FIGURE 12C

ヒトCD40の長いアイソフォームについてのコード配列：

```

1 atggtcgc tgcctcgca gtggcgtc tggggcgtcgtgtacccgc tgcctccca
61 gaaaccacca ctgcgtcgg agaaaaacag tacatataa acgttcgtc ctgtttttc
121 tgcacccatcg gatcgtatctt ggtgtgtac (gtacatgt) ttcgtgtatc ggtatgtt
181 ctgggggtt aaaggatatt cttagacaccc tggacagag agacacactt ccacccacac
241 aaatctcgg accccaactt aggccgttgg gttccacaga agggcaccc agaaacacac
301 accatctgg ctgttggaa aggttgcgtc tgcacgtt aggttcgtt gacgttgc
361 tgcacccatcg calgttcgg cgtcgttgg gttccacaga tttgtatgtt ggttgcgtt
421 accatctgg accgttgcgg aatggccgtc ttccatgtt tgcacatgc tttgtatgtt
481 tgcacccatcg tttttccca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
541 atggatgtt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
601 gtcacccatcg aaatggccca tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt

```

FIGURE 12D

ヒトCD40のコードされた長いアイソフォーム：

```

1 mvrplqcwl wgcilavhp epttacrekq ylinsqccsl cpggkivsd ctetctcc
61 pgccesfdit wnrthchqk kycdpnlgr vqkqgtseid tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vqkqatgvsd ticecpvfg fsvnssafek chpwtrspgs aespqgdphh
181 ktdvvcgpqd hravvpi ifgulfail vlflikvka kpinckphpk qepqemnfpd
241 dlpqsnataap vqetlhccp vqedgkkesr isvqerq

```

## 【図 13】

FIGURE 13

