

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4746552号
(P4746552)

(45) 発行日 平成23年8月10日 (2011. 8. 10)

(24) 登録日 平成23年5月20日 (2011. 5. 20)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	39/395	(2006. 01)	A 6 1 K	39/395	Z N A N
A 6 1 P	37/06	(2006. 01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	37/02	(2006. 01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	13/12	(2006. 01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	19/02	(2006. 01)	A 6 1 P	19/02	

請求項の数 34 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-538513 (P2006-538513)
 (86) (22) 出願日 平成16年11月4日 (2004. 11. 4)
 (65) 公表番号 特表2007-510666 (P2007-510666A)
 (43) 公表日 平成19年4月26日 (2007. 4. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/036957
 (87) 国際公開番号 W02005/044306
 (87) 国際公開日 平成17年5月19日 (2005. 5. 19)
 審査請求日 平成19年9月28日 (2007. 9. 28)
 (31) 優先権主張番号 60/517, 337
 (32) 優先日 平成15年11月4日 (2003. 11. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/525, 579
 (32) 優先日 平成15年11月26日 (2003. 11. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 591076811
 ノバルティス バクシンズ アンド ダイ
 アグノスティックス、インコーポレーテッ
 ド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 946
 08, エミリービル, ホートン ストリー
 ト 4560
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患および炎症性疾患ならびに臓器移植拒絶の処置のためのアンタゴニスト抗CD40
 抗体の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

炎症性疾患または自己免疫疾患についてヒト被験体を処置するための組成物であって、該組成物は、ヒトCD40発現細胞の表面に発現されるヒトCD40抗原に特異的に結合し得るヒト抗CD40モノクローナル抗体の有効量を含み、該モノクローナル抗体は、該細胞の表面に発現された該CD40抗原に結合される場合に有意なアゴニスト活性を有さず、該ヒト抗CD40モノクローナル抗体は、以下：

a) 特許受託番号PTA-5542としてATCCに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CHIR-5.9または特許受託番号PTA-5543としてATCCに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CHIR-12.12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10または配列番号12に示されるヒトCD40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；

c) 配列番号10または配列番号12に示されるヒトCD40配列の残基82～89を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体；

d) 競合結合アッセイにおいて、特許受託番号PTA-5542としてATCCに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CHIR-5.9または特許受託番号PTA-5543としてATCCに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CHIR-12.12と競合するモノクローナル抗体；

ならびに

10

20

e) 前述の項目 a) ~ d) のいずれか 1 項の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であって、該フラグメントは該ヒト CD 40 抗原に特異的に結合する能力を保持する、モノクローナル抗体からなる群より選択される、組成物。

【請求項 2】

前記炎症性疾患または自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデス (SLE)、円板状狼瘡、ループス腎炎、サルコイドーシス、若年性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、ライター症候群、強直性脊椎炎、痛風関節炎、器官移植もしくは組織移植の拒絶、対宿主性移植片病、多発性硬化症、高 IgE 症候群、結節性多発性動脈炎、原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患、クローン病、セリアック病 (グルテン過敏性腸疾患)、自己免疫性肝炎、悪性貧血、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、強皮症、重症筋無力症、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス病、橋本甲状腺炎、免疫複合体病、慢性疲労免疫機能障害症候群 (CFIDS)、多発性筋炎および皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、血栓崩壊、心筋症、尋常性天疱瘡、肺間質性線維症、サルコイドーシス、I 型および II 型真性糖尿病、1 型、2 型、3 型および 4 型遅延型過敏症、アレルギーもしくはアレルギー性障害、喘息、チャーグ-ストラウス症候群 (アレルギー性肉芽腫症)、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎および刺激性接触皮膚炎、じんま疹、IgE 媒介性アレルギー、アテローム性動脈硬化症、脈管炎、特発性炎症性ミオパシー、溶血性疾患、アルツハイマー病、ならびに慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパシーからなる群より選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

移植拒絶についてヒト被験体を処置するための組成物であって、該組成物は、ヒト CD 40 発現細胞の表面に発現されるヒト CD 40 抗原に特異的に結合し得るヒト抗 CD 40 モノクローナル抗体の有効量を含み、該モノクローナル抗体は、該細胞の表面に発現される該 CD 40 抗原に結合される場合に有意なアゴニスト活性を有さず、該ヒト抗 CD 40 モノクローナル抗体は、以下：

a) 特許受託番号 PTA - 5542 として ATCC に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 CHIR - 5.9 または特許受託番号 PTA - 5543 として ATCC に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 CHIR - 12.12 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 10 または配列番号 12 に示されるヒト CD 40 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；

c) 配列番号 10 または配列番号 12 に示されるヒト CD 40 配列の残基 82 ~ 89 を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体；

d) 競合結合アッセイにおいて、特許受託番号 PTA - 5542 として ATCC に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 CHIR - 5.9 または特許受託番号 PTA - 5543 として ATCC に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 CHIR - 12.12 と競合するモノクローナル抗体；
ならびに

e) 前述の項目 a) ~ d) のいずれか 1 項の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であって、該フラグメントは該ヒト CD 40 抗原に特異的に結合する能力を保持する、モノクローナル抗体からなる群より選択される、組成物。

【請求項 4】

前記組成物が、薬学的に受容可能な賦形剤中の免疫抑制剤と組み合わせて投与される、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記免疫抑制剤が、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、コルチコステロイド、CTL A4 - Ig および抗 B リンパ球刺激抗体からなる群より選択される、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

関節リウマチについてヒト被験体を処置するための組成物であって、該組成物は、ヒト CD 4 0 発現細胞の表面に発現されるヒト CD 4 0 抗原に特異的に結合し得るヒト抗 CD 4 0 モノクローナル抗体の有効量を含み、該モノクローナル抗体は、該細胞の表面に発現される該 CD 4 0 抗原に結合される場合に有意なアゴニスト活性を有さず、該ヒト抗 CD 4 0 モノクローナル抗体は、以下：

a) 特許受託番号 P T A - 5 5 4 2 として A T C C に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 または特許受託番号 P T A - 5 5 4 3 として A T C C に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 CD 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 CD 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；

d) 競合結合アッセイにおいて、特許受託番号 P T A - 5 5 4 2 として A T C C に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 または特許受託番号 P T A - 5 5 4 3 として A T C C に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；

ならびに

e) 前述の項目 a) ~ d) のいずれか 1 項の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であって、該フラグメントは該ヒト CD 4 0 抗原に特異的に結合する能力を保持する、モノクローナル抗体からなる群より選択される、組成物。

【請求項 7】

前記組成物が、薬学的に受容可能な賦形剤中の免疫抑制剤と組み合わせて投与される、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記免疫抑制剤が、シクロスポリン、F K 5 0 6、ラパマイシン、コルチコステロイド、C T L A 4 - I g、抗 CD 2 0 抗体および抗 B リンパ球刺激抗体からなる群より選択される、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記抗体は、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るモノクローナル抗体であるか、あるいは、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

10

20

30

40

50

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 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 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、組成物。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物であって、前記抗体は、以下：

10

i) 配列番号 2 の相補性決定領域 (CDR) 残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 4 の CDR 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 残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 5 の CDR 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 残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 7 の CDR 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 残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 8 の CDR 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、組成物。

【請求項 11】

20

請求項 9 または請求項 10 に記載の組成物であって、前記抗体は、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、組成物。

【請求項 12】

請求項 9 または請求項 10 に記載の組成物であって、前記抗体は、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、組成物。

【請求項 13】

前記抗体が、少なくとも 10^{-6} M の親和性 (K_D) でヒト CD40 抗原に結合する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記抗体が、少なくとも 10^{-8} M の親和性 (K_D) でヒト CD40 抗原に結合する、請求項 13 に記載の組成物。

40

【請求項 15】

前記抗体が、特許受託番号 PTA - 5542 として ATCC に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生された抗体 CHIR - 5.9 または特許受託番号 PTA - 5543 として ATCC に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生された抗体 CHIR - 12.12 からなる群より選択される、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記フラグメントが、Fab フラグメント、F(ab')₂ フラグメント、Fv フラグメント、および単鎖 Fv フラグメントからなる群より選択される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の組成物。

50

【請求項 17】

前記モノクローナル抗体がCHO細胞株において産生される、請求項1～16のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 18】

炎症性疾患または自己免疫疾患についてヒト被験体を処置するための医薬の製造における、ヒトCD40発現細胞の表面に発現されるヒトCD40抗原に特異的に結合し得るヒト抗CD40モノクローナル抗体の有効量の使用であって、該モノクローナル抗体は、該細胞の表面に発現された該CD40抗原に結合される場合に有意なアゴニスト活性を有さず、該ヒト抗CD40モノクローナル抗体は、以下：

a) 特許受託番号PTA-5542としてATCCに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CHIR-5.9または特許受託番号PTA-5543としてATCCに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CHIR-12.12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10または配列番号12に示されるヒトCD40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；

c) 配列番号10または配列番号12に示されるヒトCD40配列の残基82～89を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体；

d) 競合結合アッセイにおいて、特許受託番号PTA-5542としてATCCに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CHIR-5.9または特許受託番号PTA-5543としてATCCに寄託されたハイブリドーマ細胞株から得ら

ならびに

e) 前述の項目a)～d)のいずれか1項の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であって、該フラグメントは該ヒトCD40抗原に特異的に結合する能力を保持する、モノクローナル抗体からなる群より選択される、使用。

【請求項 19】

前記炎症性疾患または自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデス(SLE)、円板状狼瘡、ループス腎炎、サルコイドーシス、若年性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、ライター症候群、強直性脊椎炎、痛風関節炎、器官移植もしくは組織移植の拒絶、対宿主性移植片病、多発性硬化症、高IgE症候群、結節性多発性動脈炎、原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患、クローン病、セリアック病(グルテン過敏性腸疾患)、自己免疫性肝炎、悪性貧血、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、強皮症、重症筋無力症、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス病、橋本甲状腺炎、免疫複合体病、慢性疲労免疫機能障害症候群(CFIDS)、多発性筋炎および皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、血栓崩壊、心筋症、尋常性天疱瘡、肺間質性線維症、サルコイドーシス、I型およびII型真性糖尿病、1型、2型、3型および4型遅延型過敏症、アレルギーもしくはアレルギー性障害、喘息、チャージ-ストラウス症候群(アレルギー性肉芽腫症)、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎および刺激性接触皮膚炎、じんま疹、IgE媒介性アレルギー、アテローム性動脈硬化症、脈管炎、特発性炎症性ミオパシー、溶血性疾患、アルツハイマー病、ならびに慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパシーからなる群より選択される、請求項18に記載の使用。

【請求項 20】

移植拒絶についてヒト被験体を処置するための医薬の製造における、ヒトCD40発現細胞の表面に発現されるヒトCD40抗原に特異的に結合し得るヒト抗CD40モノクローナル抗体の有効量の使用であって、該モノクローナル抗体は、該細胞の表面に発現される該CD40抗原に結合される場合に有意なアゴニスト活性を有さず、該ヒト抗CD40モノクローナル抗体は、以下：

a) 特許受託番号PTA-5542としてATCCに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CHIR-5.9または特許受託番号PTA-5543

10

20

30

40

50

として A T C C に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；

d) 競合結合アッセイにおいて、特許受託番号 P T A - 5 5 4 2 として A T C C に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 または特許受託番号 P T A - 5 5 4 3 として A T C C に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；

10

ならびに

e) 前述の項目 a) ~ d) のいずれか 1 項の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であって、該フラグメントは該ヒト C D 4 0 抗原に特異的に結合する能力を保持する、モノクローナル抗体
からなる群より選択される、使用。

【請求項 2 1】

前記処置が、薬学的に受容可能な賦形剤中の免疫抑制剤を投与することをさらに包含する、請求項 2 0 に記載の使用。

【請求項 2 2】

前記免疫抑制剤が、シクロスポリン、F K 5 0 6、ラパマイシン、コルチコステロイド、C T L A 4 - I g および抗 B リンパ球刺激抗体からなる群より選択される、請求項 2 1 に記載の使用。

20

【請求項 2 3】

関節リウマチについてヒト被験体を処置するための医薬の製造における、ヒト C D 4 0 発現細胞の表面に発現されるヒト C D 4 0 抗原に特異的に結合し得るヒト抗 C D 4 0 モノクローナル抗体の有効量の使用であって、該モノクローナル抗体は、該細胞の表面に発現される該 C D 4 0 抗原に結合される場合に有意なアゴニスト活性を有さず、該ヒト抗 C D 4 0 モノクローナル抗体は、以下：

a) 特許受託番号 P T A - 5 5 4 2 として A T C C に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 または特許受託番号 P T A - 5 5 4 3 として A T C C に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；

30

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；

d) 競合結合アッセイにおいて、特許受託番号 P T A - 5 5 4 2 として A T C C に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 または特許受託番号 P T A - 5 5 4 3 として A T C C に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；

40

ならびに

e) 前述の項目 a) ~ d) のいずれか 1 項の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であって、該フラグメントは該ヒト C D 4 0 抗原に特異的に結合する能力を保持する、モノクローナル抗体
からなる群より選択される、使用。

【請求項 2 4】

前記処置が、薬学的に受容可能な賦形剤中の免疫抑制剤を投与することをさらに包含する、請求項 2 3 に記載の使用。

【請求項 2 5】

前記免疫抑制剤が、シクロスポリン、F K 5 0 6、ラパマイシン、コルチコステロイド、

50

C T L A 4 - I g、抗 C D 2 0 抗体および抗 B リンパ球刺激抗体からなる群より選択される、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 6】

請求項 1 8 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、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るモノクローナル抗体であるか、あるいは、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 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；ならびに

i v) 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 8 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；

からなる群より選択されるモノクローナル抗体である、使用。

【請求項 2 7】

請求項 1 8 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の使用であって、前記抗体は、以下：

i) 配列番号 2 の相補性決定領域 (C D R) 残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 4 の C D R 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 C D R 残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 5 の C D R 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 C D R 残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 7 の C D R 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；および

i v) 配列番号 6 の C D R 残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 8 の C D R 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、使用。

【請求項 2 8】

請求項 2 6 または請求項 2 7 に記載の使用であって、前記抗体は、以下：

i) 配列番号 2 の残基 2 1 ~ 1 3 2 および配列番号 4 の残基 2 0 ~ 1 3 9 ；

i i) 配列番号 2 の残基 2 1 ~ 2 3 9 および配列番号 4 の残基 2 0 ~ 4 6 9 ；

i i i) 配列番号 2 の残基 2 1 ~ 2 3 9 および配列番号 5 の残基 2 0 ~ 4 6 9 ；

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、使用。

【請求項 2 9】

10

20

30

40

50

請求項 26 または請求項 27 に記載の使用であって、前記抗体は、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；
- ii) 配列番号 6 の残基 21 ~ 239 および配列番号 7 の残基 20 ~ 474；
- iii) 配列番号 6 の残基 21 ~ 239 および配列番号 8 の残基 20 ~ 474；
- iv) 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、使用。

【請求項 30】

前記抗体が、少なくとも 10^{-6} M の親和性 (K_D) でヒト CD40 抗原に結合する、請求項 18 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の使用。

10

【請求項 31】

前記抗体が、少なくとも 10^{-8} M の親和性 (K_D) でヒト CD40 抗原に結合する、請求項 30 に記載の使用。

【請求項 32】

前記抗体が、特許受託番号 PTA - 5542 として ATCC に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生されたモノクローナル抗体 CHIR - 5.9 または特許受託番号 PTA - 5543 として ATCC に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生されたモノクローナル抗体 CHIR - 12.12 からなる群より選択される、請求項 18 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 33】

前記フラグメントが、Fab フラグメント、F(ab')₂ フラグメント、Fv フラグメント、および単鎖 Fv フラグメントからなる群より選択される、請求項 18 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の使用。

20

【請求項 34】

前記モノクローナル抗体が CHO 細胞株において産生される、請求項 18 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、アンタゴニスト抗 CD40 モノクローナル抗体を用いる自己免疫疾患および炎症性疾患に対する処置のための方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

CD40 は、正常なヒト B 細胞および腫瘍性のヒト B 細胞、樹状細胞、他の抗原提示細胞 (APC)、内皮細胞、単球細胞 CD8⁺ T 細胞ならびに上皮細胞に存在する 55 kDa の細胞表面抗原である。CD40 抗原はまた、活性化 T 細胞、活性化血小板、炎症性の血管平滑筋細胞、好酸球、関節リウマチの滑膜、真皮線維芽細胞および他の非リンパ系細胞型で発現される。CD40 を発現する細胞の型に依存して、連結が細胞内接着、分化、活性化、および増殖を誘導し得る。例えば、CD40 のその同族のリガンドである CD40L (CD154 と表される) に対する結合は、B 細胞増殖および形質細胞への分化、抗体産生、アイソタイプ転換、ならびに B 細胞記憶生成を刺激する。B 細胞分化の間、CD40 は前 B 細胞で発現されるが、形質細胞への分化の際に失われる。

40

【0003】

CD40 リガンドは、活性化 T 細胞の細胞表面で同定されている (非特許文献 1；非特許文献 2；非特許文献 3) が、一般的に静止ヒト T 細胞では発現されない。CD40L は、TNF- α に対する相同性を有する II 型膜貫通糖タンパク質である (非特許文献 4 および非特許文献 5)。CD40L の細胞外ドメインは、膜貫通領域に対して近位の 2 つのアルギニン残基を含み、そのリガンドの可溶性形態 (sCD40L) を生じる潜在的なタ

50

ンパク質分解性切断部位を提供する。CD40Lの過剰発現は、齧歯動物モデルにおいて全身性エリテマトーデスと類似の自己免疫疾患を引き起こす（非特許文献6）。対照的に、活性化T細胞における機能的なCD40Lの欠如は、X連鎖高IgM症候群を引き起こす（非特許文献7；および非特許文献8）。さらに、CD40/CD40L相互作用をブロックすることは、非ヒト霊長類モデルにおける移植拒絶を予防し得る。例えば、非特許文献9を参照のこと。

【0004】

APCにおけるCD40発現は、これらの細胞の活性化において重要な同時刺激性の役割を果たす。例えば、アゴニスト性の抗CD40モノクローナル抗体（mAb）は、B細胞活性化におけるTヘルパー細胞の効果を模倣することが示されている。FcγRIIを発現する接着細胞で提示される場合、これらの抗体はB細胞増殖を誘導する（非特許文献10）。さらに、アゴニスト性の抗CD40mAbは、IL-4の存在下でのIgM、IgGおよびIgEの分泌のためのTヘルパーシグナルを置き換え得る（非特許文献11）。さらに、アゴニスト性の抗CD40mAbは、リンパ節から単離されたB細胞のプログラム細胞死（アポトーシス）を妨げ得る。

【0005】

これらの観察および他の観察は、CD40およびCD40Lが体液性免疫応答および細胞媒介性免疫応答の両方を調節することにおいて中心的な役割を果たすという現在の理論を支持する。より最近の研究は、多様な生理学的プロセスおよび病理学的プロセスにおけるCD40/CD40L相互作用の非常に広範な役割を明らかにしている。

【0006】

CD40シグナル伝達経路は、多くの細胞内因子の協働的調節に依存する。TNFレセプターファミリーの他のメンバーのように、CD40は、TRAF2およびTRAF3のようなTRAFタンパク質（TNFレセプター因子関連タンパク質）と反応し、このことは、CD40L（固相CD40Lまたは可溶性CD40Lのいずれか）とのCD40の結合後の細胞内シグナルを媒介する。TRAFは、MAPキナーゼ（例えば、NIK（NF-κB誘発キナーゼ）およびIκBキナーゼ（IKK / ））を介してシグナルを核内に伝達し、最終的に転写因子NF-κBを活性化する（非特許文献12）。RasおよびMEK/ERK経路を介するシグナル伝達もまた、B細胞のサブセットにおいて示されている。CD40細胞シグナル伝達に関連するさらなる経路としては、PI3K/Akt経路およびp38 MAPK経路が挙げられる（非特許文献13）。

【0007】

CD40を介するシグナル伝達は、アポトーシスからの細胞死を妨げることが示されている（非特許文献14）。アポトーシスシグナルは、協働的な様式でプログラム細胞死が誘導されることが必要である。細胞死シグナルとしては、細胞内からの内因性刺激（例えば、小胞体応力）または外因性刺激（例えば、FasLもしくはTHFのレセプター結合）が挙げられ得る。シグナル伝達経路は複雑であり、カスパーゼ（例えば、カスパーゼ3およびカスパーゼ9）ならびにポリ（ADPリボース）ポリメラーゼ（PARP）の活性化に関連する。カスケードの間、抗アポトーシスシグナル伝達タンパク質（例えば、Mcl-1およびBclx）ならびにIAPファミリータンパク質のメンバー（例えば、アポトーシスのX連鎖インヒビター（XIAP））がダウンレギュレートされる（非特許文献15）。例えば、樹状細胞において、CD40細胞シグナル伝達は、FasLによって伝達されたアポトーシスシグナルをブロックし得る（非特許文献16）。

【0008】

従って、CD40LによるCD40結合およびその後のCD40シグナル伝達の活性化は、正常な免疫応答のために必要な工程である；しかし、CD40シグナル伝達の調節不全は疾患をもたらし得る。CD40シグナル伝達経路は、自己免疫疾患に関連することが示されている（非特許文献17および非特許文献18）。さらに、CD40/CD40L相互作用は、炎症過程において重要な役割を果たす。例えば、CD40およびCD40リガンドの両方が、ヒトおよび実験的なアテローム性動脈硬化症の病変において観察される

10

20

30

40

50

。CD40刺激は、マトリックス分解酵素の発現およびアテロームに関連する細胞型（例えば、内皮細胞、平滑筋細胞およびマクロファージ）における組織因子発現を誘導する。さらに、CD40刺激は、炎症誘発性のサイトカイン（例えば、IL-1、IL-6およびIL-8）ならびに接着分子（例えば、ICAM-1、E-セレクトリンおよびVCAM）の産生を誘導する。CD40/CD40L相互作用の阻害は、動物モデルにおけるアテローム発生を防ぐ。移植モデルでは、CD40/CD40L相互作用をブロックすることが、炎症を防ぐ。CD40/CD40L結合が、アルツハイマーアミロイドペプチドに相乗的に作用して小グリア活性化を促進し、それゆえに神経毒性をもたらすことが示されている。

【0009】

10

関節リウマチ（RA）を有する患者において、CD40発現が関節軟骨細胞で増加され、それゆえに、CD40シグナル伝達が有害なサイトカインおよびマトリックスメタロプロテイナーゼの産生に寄与するようである。非特許文献19を参照のこと。さらに、滑膜炎炎症応答の増幅が、RA患者由来のCD14⁺滑膜細胞でのCD40の連結によるマイトジェン活性化タンパク質（MAP）キナーゼおよび核因子B（NF- κ B）の活性化を通じて生じることが示されている（非特許文献20）。RAの実験モデルにおいて、抗CD40L抗体処置が、疾患の誘発、関節の炎症および抗コラーゲン抗体の産生を防いだ（非特許文献21）。最後に、臨床試験において、RITUXAN（登録商標）（一般的にB細胞リンパ腫に用いられる）を投与することによりRA患者のCD20⁺陽性B細胞が枯渇することが、症状を改善することが示されている。（非特許文献22）。

20

【0010】

T細胞に対する抗原提示の間にCD40/CD40L相互作用をブロックすることは、T細胞耐性を誘導することが示されている。従って、CD40/CD40L相互作用をブロックすることは、初期T細胞活性化を妨げ、抗原への再暴露に対して長期の耐性を誘導する。

【非特許文献1】Fenslowら、J. Immunol.、1992年、149、p. 655

【非特許文献2】Laneら、Eur. J. Immunol.、1992年、22、p. 2573

【非特許文献3】Noelleら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1992年、89、p. 6550

30

【非特許文献4】Armitageら、Nature、1992年、357、p. 80

【非特許文献5】Spriggsら、J. Exp. Med.、1992年、176、p. 1543

【非特許文献6】Higuchiら、J. Immunol.、2002年、168、p. 9-12

【非特許文献7】Allenら、Science、1993年、259、p. 990

【非特許文献8】Korthauerら、Nature、1993年、361、p. 539

【非特許文献9】Weeら、Transplantation、1992年、53、p. 501-7

40

【非特許文献10】Banchereauら、Science、1989年、251、p. 70

【非特許文献11】Gascanら、J. Immunol.、1991年、147、p. 8

【非特許文献12】Youngら、Immunol. Today、1998年、19、p. 502-06

【非特許文献13】Craxtonら、J. Immunol.、1998年、5、p. 439-447

【非特許文献14】Makusら、J. Immunol.、2002年、14、p. 97

50

3 - 9 8 2

【非特許文献15】Budi hardjo R、Annu . Rev . Cell Dev . Biol .、1999年、15、p . 269 - 90

【非特許文献16】Bjorck R、Int 'l Immunol .、1997年、9、p . 365 - 372

【非特許文献17】Ichikawa R、J . Immunol .、2002年、169、p . 2781 - 7

【非特許文献18】Moore R、J . Autoimmun .、2002年、19、p . 139 - 45

【非特許文献19】Gotoh R、J . Rheumatol .、2004年、31、p . 1506 - 12 10

【非特許文献20】Harigai R、Arthritis . Rheum .、2004年、50、p . 2167 - 77

【非特許文献21】Durie R、Science、1993年、261、p . 1328

【非特許文献22】Shaw R、Ann . Rheum . Dis .、2003年、62、p . ii55 - ii59

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

正常な免疫の維持におけるCD40L媒介性CD40シグナル伝達の重要な役割を考えると、調節不全が生じた場合にこのシグナル伝達経路への介入のための方法が必要とされる。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

(発明の要旨)

自己免疫疾患および/または炎症性疾患を有するヒト被験体を処置するための方法が提供され、この方法は、ヒトCD40発現細胞のCD40抗原に結合される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をその被験体に投与する工程を包含する。CD40抗原を発現する細胞の応答を阻害するための方法もまた提供される。本発明の方法での使用に適切なアンタゴニスト抗CD40抗体は、CD40 30 に対して強力な親和性を有する。これらの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、ヒト細胞の表面に発現されるヒトCD40抗原に対して特異的に結合し得る。これらは、有意なアゴニスト活性を有さないが、ヒト細胞におけるCD40抗原に結合される場合に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、B細胞のような抗原提示細胞におけるCD40抗原に結合される場合にアンタゴニスト活性を示す。

30

【0013】

アンタゴニスト抗体は、自己免疫要素および/または炎症性要素を含む疾患を予防、改良または処置するのに特に有用である。これらの疾患としては、全身性エリテマトーデス(SLE)、円板状狼瘡、ループス腎炎、サルコイドーシス、炎症性関節炎(若年性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、ライター症候群、強直性脊椎炎、および痛風関節炎が挙げられるが、これらに限定されない)、器官移植もしくは組織移植の拒絶、超急性拒絶、急性拒絶もしくは慢性拒絶および/または対宿主性移植片病、多発性硬化症、高IgE症候群、結節性多発性動脈炎、原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患、クローン病、セリアック病(グルテン過敏性腸疾患)、自己免疫性肝炎、悪性貧血、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、強皮症、重症筋無力症、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス病、橋本甲状腺炎、免疫複合体病、慢性疲労免疫機能障害症候群(CFIDS)、多発性筋炎および皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、血栓崩壊、心筋症、尋常性天疱瘡、肺間質性線維症、サルコイドーシス、I型およびII型真性糖尿病、1型、2型、3型 50 および4型遅延型過敏症、アレルギー障害もしくはアレルギー性障害、治療タンパク質に

に対する望ましくない／意図されない免疫応答、喘息、チャージ - ストラウス症候群（アレルギー性肉芽腫症）、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎および刺激性接触皮膚炎、じんま疹（urticaria）、IgE媒介性アレルギー、アテローム性動脈硬化症、脈管炎、特発性炎症性ミオパシー、溶血性疾患、アルツハイマー病、ならびに慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパシーなどのような自己免疫疾患および炎症性疾患が挙げられるが、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】

【0014】

（発明の詳細な説明）

本発明は、CD40細胞表面抗原に対して強力な親和性を有する抗体を用いる、自己免疫疾患および炎症性疾患を処置するための方法に関する。これらの抗CD40抗体およびそれらの抗原結合フラグメントは、有意なアゴニスト活性を有さず、CD40発現細胞におけるCD40に結合される場合にアンタゴニスト活性を示す。

【0015】

「抗体」および「免疫グロブリン」（Ig）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。

【0016】

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、Fab'、F'(ab)₂、Fv、単鎖抗体、二重特異性抗体（diabody））および上記のものを含む組換えペプチドを包含する。

【0017】

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。

【0018】

「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150,000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_H）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_L）を有し、その他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（場合によってはシート構造の一部を形成する）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、他の鎖由来のCDRと共にFR領域によって近接して一緒に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabata（1991）NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, 647-669頁を参照のこと）。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合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。

【 0 0 2 1 】

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。

10

【 0 0 2 2 】

「フレームワーク」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。

20

【 0 0 2 3 】

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

30

【 0 0 2 4 】

「Fv」は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。2本の鎖（two-chain）のFv種では、この領域は、固く非共有結合した1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとのダイマーからなる。単鎖のFv種では、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとが、その軽鎖と重鎖とが2本の鎖（two-chain）のFv種における構造に類似する「ダイマーの」構造に会合し得るように、フレキシブルなペプチドリンカーによって共有結合される。この構成において、各々の可変ドメインの3つのCDRが相互作用して、V_H-V_Lダイマーの表面における抗原結合部位を規定する。合わせて、6つのCDRが抗体に対する抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変ドメイン（または抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分）でも、抗原を認識し結合する能力を有するが、完全な結合部位よりは親和性は低い。

40

【 0 0 2 5 】

Fab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一の定常ドメイン（CH1）を含む。Fabフラグメントは、抗体のヒンジ領域由来の1以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端において、いくつかの残基が付加されている点でFab'フラグメントと異なる。Fab'-SHは、本明細書中で、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を有するFab'についての呼称である。F(ab')₂

50

抗体フラグメントは、もともと、それらの間にヒンジ領域を有する F a b ' フラグメントの対として生成された。抗体フラグメントの他の化学結合もまた公知である。

【 0 0 2 6 】

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（ ）およびラムダ（ ）と呼ばれる）の一方に割り当てられ得る。

【 0 0 2 7 】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンが異なるクラスに割り当てられ得る。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、そしてこれらの中に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）に分けられるものがある。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。

10

【 0 0 2 8 】

語句「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組成物の化学的变化を触媒し得る。

20

【 0 0 2 9 】

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 3 0 】

「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（アルコー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）；単糖類、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、E D T A）；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、T W E E N、ポリエチレングリコール（P E G）および P l u r o n i c s）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（s i m u l t a n e o u s（c o n c u r r e n t））投与および任意の順序での連続投与を包含する。

30

40

【 0 0 3 1 】

「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、形態またはゲノムもしくは全D N A 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。

【 0 0 3 2 】

50

「ヒト効果細胞」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、その細胞は、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、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、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、抗体のIgG1アイソタイプまたはIgG3アイソタイプである。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IgG1アイソタイプもしくはIgG3アイソタイプ定常領域に対する可変領域フラグメントを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。

10

【0033】

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表すために使用される。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のスプライス形態を含む)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、類似のアミノ酸配列を有し、その細胞質ドメインが主に異なる。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)Immunomethods4:25-34;およびdeHaas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)が、本明細書中の用語「FcR」に包含される。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の胎児への転移を担う(Guyerら(1976)J.Immunol.117:587およびKimら(1994)J.Immunol.24:249(1994))。

20

30

【0034】

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、わずかに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.Methods100:5-40)。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。そのような可能性は、H-rasのSV40の大きな腫瘍性タンパク質および発癌性対立遺伝子ととも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(1999)Nature400:464-468)。現在、免疫の際に外因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体のレパートリーを産生し得るトランスジェニック動物(例えば、マウス)を産生することが可能である(Jakobovitsら(1993)Nature362:255-258;LongbergおよびHuszar(1995)Int.Rev.Immunol.13:65-93;Fishwildら(1996)Nat.Biotechnol.14:845-851;Mendezら(1997)Nat.Genet.15:146-156;Green(1999)J.Immunol.Methods231:11-23;Tomizukaら(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA97:722-727;Littleら(2000)Immunol.Today21:364-370に概説される)。例えば、キメラマウスおよび生殖細胞

40

50

胞変異マウスにおける抗体重鎖連結領域 (joining region) (J_H) 遺伝子のホモ接合欠失が外因性抗体産生の完全な阻害を生じることが記載されている (Jakobovitsら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551-2555)。このような生殖細胞変異マウスにおけるヒト生殖細胞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抗体の産生を生じる (Jakobovitsら (1993) Nature 362: 255-258)。Mendezら (1997) (Nature Genetics 15: 146-156) 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産生した。これは、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、外因性 J_H セグメントへの欠失を有するマウスに生殖細胞統合することによって達成された。これらのマウス (XenoMouse (登録商標) II 技術 (Abgenix; Fremont, California)) は、約 66 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 1,020 kb のヒト重鎖遺伝子座を含み、また、32 の V 遺伝子、 J セグメントおよび C 遺伝子を含む 800 kb のヒト 遺伝子座を含む。これらのマウスで産生される抗体は、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外因性セグメントにおける欠失に起因して、外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。

10

【0035】

20

そ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、そしてさらに CD138 陰性細胞および CD19 陽性細胞に対して選択することによって B 細胞に対して選択され得る。一局面において、そのような B 細胞培養物 (BCC) は、骨髓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。

【0036】

別の局面において、そのような 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。そ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 ELISA、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、および一過性にトランスフェクトされた CHO もしくは標的抗原を発現する他の細胞に対するインビトロ結合を含む。

30

【0037】

本発明は、自己免疫疾患および / または炎症性疾患を有するヒト被験体を処置するための組成物および方法に関する。その方法は、本明細書中に記載される抗 CD40 抗体またはその抗原結合フラグメントによる処置を含み、ここで、その抗体またはその抗原結合フラグメントの投与はこの治療方法を受ける被験体内のポジティブな治療応答を促進する。その方法および組成物は、疾患を処置するのに特に有用であり、その疾患としては、全身性エリテマトーデス (SLE)、円板状狼瘡、ループス腎炎、サルコイドーシス、炎症性関節炎 (若年性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、ライター症候群、強直性脊椎炎、および痛風関節炎が挙げられる)、器官移植もしくは組織移植の拒絶、超急性拒絶、急性拒絶もしくは慢性拒絶および / または対宿主性移植片病、多発性硬化症、高 IgE 症候群、結節性多発性動脈炎、原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患、クローン病、セリアック病 (グルテン過敏性腸疾患)、自己免疫性肝炎、悪性貧血、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、強皮症、重症筋無力症、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス病、橋本甲状腺炎、免疫複合体病、慢性疲労免疫機能障害症候群 (CFIDS)、多発性筋炎および皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、血栓崩壊、心筋症、尋常性天疱瘡、肺間質性線維症、I 型および II 型真性糖尿病などが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、これらのアンタゴニスト抗 CD40 抗体およびその抗原結合フラグメントは、炎症に関連する疾患 (1 型、2 型、3 型および 4 型遅延型過敏症、アレルギー障害もしくはアレルギー性障害、治療タンパク質に対する望ましくない / 意図されない免疫応答 (例え

40

50

ば、米国特許第出願第US2002/0119151号およびKorenら(2002) Curr. Pharm. Biotechnol. 3:349-60を参照のこと)、喘息、チャージ-ストラウス症候群(アレルギー性肉芽腫症)、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎および刺激性接触皮膚炎、じんま疹(urticaria)、IgE媒介性アレルギー、アテローム性動脈硬化症、脈管炎、特発性炎症性ミオパシー、溶血性疾患、アルツハイマー病、慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパシーなどが挙げられるが、これらに限定されない)を処置するのに特に有用である。

【0038】

本発明の方法において使用するのに適切な抗CD40抗体は、ヒト細胞の表面に発現されるヒトCD40抗原に特異的に結合し、有意なアゴニスト活性を有さないが、ヒトCD40発現細胞におけるCD40抗原に結合される場合に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、本明細書中で「アンタゴニスト抗CD40抗体」と称される。そのような抗体としては、以下に記載される完全なモノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12、ならびに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の結合特性を有するモノクローナル抗体(これもまた以下に記載される)が挙げられるが、これらに限定されない。組換え的に産生され得るこれらのモノクローナル抗体は、以下で議論され、そして発明の名称「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」である、2003年11月4日、2003年11月26日および2004年4月27日に出願され、それぞれ、米国特許出願番号第60/517,337号(代理人事件番号PP20107.001(035784/258442))、同第60/525,579号(代理人事件番号PP20107.002(035784/271525))、および同第60/565,710号(代理人事件番号PP20107.003(035784/277214))と割り当てられた同時係属中の仮特許出願で開示されており、その各々の内容はその全体が参考として本明細書中に援用される。

【0039】

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の結合特性を有する抗体としては、CD40の結合と競合的に干渉し、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が挙げられる。当業者は、当該分野で公知の標準的な方法を用いて、抗体がCHIR-5.9またはCHIR-12.12と競合的に干渉するかどうかを決定し得る。

【0040】

これらの抗体がヒト細胞(例えば、ヒトB細胞、T細胞、樹状細胞、内皮細胞、活性化血小板、炎症性血管平滑筋細胞、好酸球、滑膜、皮膚線維芽細胞など)の表面に提示されたCD40に結合する場合、その抗体は有意なアゴニスト活性を有さない。いくつかの実施形態において、ヒト細胞の表面に提示されるCD40に対するそれらの結合は、これらのヒト細胞の活性化および分化の阻害を生じる。従って、本発明の方法において使用するのに適切なアンタゴニスト抗CD40抗体は、細胞表面CD40抗原を発現する正常なヒト細胞および異常なヒト細胞に対するアンタゴニスト活性を示し得るモノクローナル抗体を含む。

【0041】

(アンタゴニスト抗CD40抗体)

モノクローナル抗体CHIR-5.9およびモノクローナル抗体CHIR-12.12は、本発明の方法において使用するのに適切なアンタゴニスト抗CD40抗体を示す。CHIR-5.9抗体およびCHIR-12.12抗体は、ハイブリドーマ細胞株131.2F8.5.9(本明細書中で細胞株5.9と称される)および153.8E2.D10.D6.12.12(本明細書中で細胞株12.12と称される)から産生されるIgG₁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IgG₁重鎖遺伝子座およびヒトK鎖遺伝子座を含む免疫異種マウス(Xenomou

se (登録商標) 技術 (Abgenix; Fremont, California)) 由来の脾細胞を用いて作製された。その脾臓細胞は、マウス骨髄腫 SP2/0 細胞と融合された (Sierra BioSource)。得られたハイブリドーマは数回サブクロニングされて、安定なモノクローナル細胞株 5.9 およびモノクローナル細胞株 12.12 が作製された。本発明の他の抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座についてトランスジェニックであるマウスを用いてか、または当該分野で公知および/もしくは本明細書中に記載される他の方法によって同様に調製され得る。

【0042】

CHIR-12.12 抗体の可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列、ならびに CHIR-5.9 の可変領域のアミノ酸配列は、発明の名称「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」である、2003 年 11 月 4 日、2003 年 11 月 26 日および 2004 年 4 月 27 日に出願され、それぞれ、米国特許出願番号第 60/517,337 号 (代理人事件番号 PP20107.001 (035784/258442))、同第 60/565,710 号 (代理人事件番号 PP20107.002 (035784/271525))、および同第 60/525,579 号 (代理人事件番号 PP20107.003 (035784/277214)) と指定された同時係属中の仮特許出願に開示され、その各々の内容はその全体が参考として本明細書中に援用される。mAb

CHIR-12.12 の軽鎖ならびに重鎖についてのリーダー領域、可変領域および定常領域のアミノ酸配列は、それぞれ、本明細書中で図 1A および図 1B に示される。また、配列番号 2 (mAb CHIR-12.12 の軽鎖についての完全配列)、配列番号 4 (mAb CHIR-12.12 の重鎖についての完全配列)、および配列番号 5 (配列番号 4 に示される mAb CHIR-12.12 の重鎖の改変体についての完全配列、ここで、この改変体は配列番号 4 の位置 153 においてアラニン残基に対するセリン置換を含む) を参照のこと。mAb CHIR-12.12 について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、本明細書中で図 2A および図 2B に示される。また、配列番号 1 (mAb CHIR-12.12 の軽鎖についてのコード配列)、および配列番号 3 (mAb CHIR-12.12 の重鎖についてのコード配列) を参照のこと。CHIR-5.9 mAb の軽鎖ならびに重鎖についてのリーダー領域、可変領域および定常領域のアミノ酸配列は、それぞれ、本明細書中で図 3A および図 3B に示される。また、配列番号 6 (mAb CHIR-5.9 の軽鎖についての完全配列)、配列番号 7 (mAb CHIR-5.9 の重鎖についての完全配列)、および配列番号 8 (配列番号 7 に示される mAb CHIR-5.9 の重鎖の改変体についての完全配列、ここで、配列番号 7 の位置 158 においてアラニン残基に対するセリン置換を含む) を参照のこと。さらに、CHIR-5.9 抗体および 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 の特許寄託表示で ATCC に寄託されている。

【0043】

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は、ELISA 型アッセイにおいて可溶性 CD40 に結合し、フローサイトメトリーアッセイによって決定されるように細胞表面 CD40 に対する CD40 リガンドの結合を妨げ、予め結合した CD40 リガンドを置き換える。抗体 CHIR-5.9 および抗体 CHIR-12.12 は、互いに CD40 に対する結合のために競合するが 15B8 とは競合せず、この 15B8 は、発明の名称「Human Anti-CD40 Antibodies」である、2000 年 10 月 2 日に出願された米国仮特許出願番号第 60/237,556 号および発明の名称「Human Anti-CD40 Antibodies」である、2001 年 10 月 2 日に出願された PCT 国際出願番号第 PCT/US01/30857 (代理人事件番号 PP16092.003) に記載される抗 CD40 モノクローナル抗体であり、これらの両方が参考としてその全体が本明細書中で援用される。健常なヒト被験体由来の B 細胞の増殖における効果についてインビトロで試験される場合、CH

IR-5.9およびCHIR-12.12は、アンタゴニスト抗CD40抗体として作用する。さらに、CHIR-5.9およびCHIR-12.12は、健常な被験体由来のヒトリンパ球の強力な増殖を誘導しない。BiacoreTMアッセイによって決定されるように、ヒトCD40に対するCHIR-5.9の結合親和性は 1.2×10^{-8} Mであり、CHIR-12.12の結合親和性は 5×10^{-10} Mである。

【0044】

本発明の方法において使用するのに適切なアンタゴニスト抗CD40抗体は、CD40細胞表面抗原に対して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、少なくとも 10^{-5} M、少なくとも 3×10^{-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 10^{-8} M ~ 約 10^{-12} MのCD40に対する解離平衡定数(K_D)を示し、これはBiacoreTMのような標準的なアッセイを用いて測定される。Biacore分析は当該分野で公知であり、詳細は「BIA applications handbook」に提供されている。WO 01/27160に記載される方法が結合親和性を調節するために使用され得る。

【0045】

「CD40抗原」、「CD40細胞表面抗原」、「CD40レセプター」または「CD40」によって、腫瘍壊死因子(TNF)レセプターファミリーに属する膜貫通糖タンパク質が意図される(例えば、米国特許第5,674,492号および同第4,708,871号; Stamenkovicら(1989)EMBO 8:1403; Clark(1990)Tissue Antigens 36:33; Barclayら(1997)The Leucocyte Antigen Facts Book(第2版; Academic Press, San Diego)を参照のこと)。ヒトCD40の2つのアイソフォーム(この遺伝子の代替スプライス転写産物改変体によってコードされる)が同定されている。第1のアイソフォーム(「長いアイソフォーム」または「アイソフォーム1」としてもまた公知である)は、277個のアミノ酸の前駆ポリペプチド(配列番号12(GenBankアクセッション番号CAA43045として最初に報告され、GeneBankアクセッション番号NP_001241においてアイソフォーム1として同定された)、配列番号11(GenBankアクセッション番号X60592およびNM_001250を参照のこと)によってコードされる)として発現され、これは最初の19残基によって表されるシグナル配列を有する。第2のアイソフォーム(「短いアイソフォーム」または「アイソフォーム2」としてもまた公知である)は、203個のアミノ酸の前駆ポリペプチド(配列番号10(GenBankアクセッション番号NP_690593)、配列番号9(GenBankアクセッション番号NM_152854)によってコードされる)として発現され、これも最初の19残基によって表されるシグナル配列を有する。ヒトCD40のこれら2つのアイソフォームの前駆ポリペプチドは、共通してその最初の165残基(すなわち、配列番号10および配列番号12の残基1~165)を共有する。短いアイソフォームの前駆ポリペプチド(配列番号10に示される)は、コードセグメントを欠失する転写産物改変体(配列番号9)(これは、翻訳のフレームシフトをもたらす)によってコードされ、得られるCD40アイソフォームは、CD40の長いアイソフォームに含まれるもの(配列番号12の残基166~277に示されるC末端)とは異なる、より短いC末端(配列番号10の残基166~203)を含む。本発明の目的のために、用語「CD40抗原」、「CD40細胞表面抗原」、「CD40レセプター」または「CD40」は、CD40の短いアイソフォームおよび長いアイソフォームの両方を包含する。本発明の抗CD40抗体は、本明細書中で以下に示されるようにヒトCD40のエピトープに結合し、このヒトCD40は、この細胞表面抗原の短いアイソフォームまたは長いアイソフォームのいずれかのうちの同じ位置に存在する。

【0046】

CD40抗原は、本明細書中で他の部分に記載されるように、種々の細胞型の表面に提示される。「表面に提示される」および「表面に発現される」により、CD40抗原のうちのすべてまたは一部が、細胞の外側に曝露されることが意図される。提示または発現さ

10

20

30

40

50

れたCD40抗原は、完全にまたは部分的にグリコシル化され得る。

【0047】

「アゴニスト活性」により、その物質がアゴニストとして機能することが意図される。アゴニストは細胞上のレセプターと結合し、レセプターの天然のリガンドにより惹起されるものと類似または同じ反応もしくは活性を惹起する。例えば、CD40のアゴニストは、以下の応答のうちのいずれかまたはすべてを誘導するが、これらに限定されない：細胞増殖および/または分化；ICAM-1、E-セレクトイン、VCAMなどのような分子を介する細胞間接着のアップレギュレーション；IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNFなどのような炎症誘発性サイトカインの分泌；TRAF（例えば、TRAF2および/またはTRAF3）、MAPキナーゼ（例えば、NIK（NF- κ B誘導キナーゼ）、I- κ Bキナーゼ（IKK / ）、転写因子NF- κ B、RasおよびMEK/ERK経路、PI3K/Akt経路、p38 MAPK経路などのような経路によるCD40レセプターを通じたシグナル伝達；XIAP、Mcl-1、Bcl-xなどのような分子による抗アポトーシスシグナルの伝達；B細胞および/またはT細胞記憶生成；B細胞抗体産生；B細胞アイソタイプ転換、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など。「アンタゴニスト活性」により、その物質がアンタゴニストとして機能することが意図される。例えば、CD40のアンタゴニストは、CD40レセプターのアゴニストリガンド（特に、CD40L）に対する結合により誘導される応答のうちのいずれかの誘導を妨げるかまたは減少させる。アンタゴニストは、アゴニスト結合に対する応答のうちのいずれか1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%減少させ得る。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、当業者に公知であり、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ためのアッセイ、B細胞増殖アッセイ、Banchereau様B細胞増殖アッセイ、抗体産生についてのT細胞ヘルパーアッセイ、B細胞増殖の同時刺激アッセイ、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ついてのアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、WO 00/75348、米国特許第6,087,329、ならびに発明の名称「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」である、2003年11月4日、2003年11月26日および2004年4月27日に出願され、それぞれ、米国特許出願番号第60/517,337号（代理人事件番号PP20107.001（035784/258442））、同第60/525,579号（代理人事件番号PP20107.002（035784/271525））、および同第60/565,710号（代理人事件番号PP20107.003（035784/277214））と指定された同時係属中の仮特許出願（これらの各々の内容はその全体が参考として本明細書中に援用される）に開示されるアッセイを参照のこと。

【0048】

「有意な」アゴニスト活性により、B細胞応答アッセイのようなバイオアッセイで測定されるように、中性物質またはネガティブコントロールによって誘導されるアゴニスト活性を少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%上回るアゴニスト活性が意図される。好ましくは、「有意な」アゴニスト活性は、B細胞応答アッセイのようなバイオアッセイで測定されるように、中性物質またはネガティブコントロールにより誘導されるアゴニスト活性より少なくとも2倍もしくは少なくとも3倍上回るアゴニスト活性である。従って、例えば、B細胞応答が目的のものである場合、B細胞増殖アッセイが使用され、「有意な」アゴニスト活性は中性物質またはネガティブコントロールにより誘導されるB細胞増殖レベルよりも少なくとも2倍上回るかまたは少なくとも3倍上回るB細胞増殖レベルの誘導である。1つの実施形態において、CD40に結合しない非特異的免疫グロブリン（例え

10

20

30

40

50

ば、IgG1)は、ネガティブコントロールとしての役割を果たす。「有意なアゴニスト活性を有さない」物質は、B細胞応答アッセイのようなバイオアッセイで測定されるように、中性物質またはネガティブコントロールにより誘導されるアゴニスト活性よりも高く約25%上回るアゴニスト活性、好ましくは、中性物質またはネガティブコントロールにより誘導されるアゴニスト活性よりも高く約20%上回る、約15%上回る、約10%上回る、約5%上回る、約1%上回る、約0.5%上回る、または高く約0.1%上回る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、ヒト細胞上のCD40抗原に結合される場合に、上記のように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、アンタゴニスト抗CD40抗体は、1つの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、1より多い細胞応答(例えば、増殖および分化、または増殖、分化、ならびにB細胞に対する抗体産生)のアッセイにおいて有意なアゴニスト活性を有さない。

10

【0049】

本明細書中で使用される場合、「抗体CD40抗体」は、CD40抗原を特異的に認識する任意の抗体(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、Fab、F(ab')₂、F_vおよび親の抗CD40抗体の抗原結合機能を保持する他のフラグメント)が挙げられる)を包含する。本発明の方法に対して特に重要であるのは、上記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アンタゴニスト抗CD40抗体である。

20

【0050】

従って、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に加えて、本明細書中に記載される本発明の方法を実行するのに有用である他の抗体としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:(1)131.2F8.5.9(本明細書中で細胞株5.9と称される)および153.8E2.D10.D6.12.12(本明細書中で細胞株12.12と称される)(それぞれ、特許受託番号PTA-5542および特許受託番号PTA-5543としてATCCに受託された)で表されるハイブリドーマ細胞株によって産生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と配列番号4とに示される両方の配列、および配列番号2と配列番号5と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と配列番号7とに示される両方の配列、および配列番号6と配列番号8と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と配列番号3とに示される両方の配列からなる群より選択される核酸配列を含む核酸分子によって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またはハイブリドーマ細胞株12.12によって産生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10または配列番号12に示されるアミノ配列の残基82~87を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体;(7)競合結合アッセイにおいてモノクローナル抗体CHIR-5.9または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;ならびに(8)CHIR-12.12モノクローナル抗体またはCHIR-5.9モノクローナル抗体の抗原結合フラグメントまたは上述の項目(1)~(7)のモノクローナル抗体の抗原結合フラグメントであって、ここで、このフラグメントはヒトCD40抗原に対して特異的に結合する能力を保持する。当業者は、本明細書中に開示される方法において使用するために適切であるアンタゴニスト抗CD40抗体およびこれらの抗体の抗原結合フラグメントは、当該分野で周知でありかつ本明細書中の以下に記載される方法を使用して組換え的に産生されるアンタゴニスト抗CD40抗体および抗原結合フラグメントを含むこ

30

40

50

と、および例えば、組換え的に産生されたモノクローナル抗体 C H I R - 5 . 9 およびモノクローナル抗体 C H I R - 1 2 . 1 2 を含むことを認識する。

【 0 0 5 1 】

(抗 C D 4 0 抗体の作製)

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、当業者に周知の任意の方法を使用して作製され得る。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。

10

【 0 0 5 2 】

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、生理的食塩水（好ましくは、フロイント完全アジュバントのようなアジュバント）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 μ 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バントを使用して、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トロの免疫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、免疫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 で 1 時間インキュベートし、次いで 4 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。

20

【 0 0 5 3 】

S f 9 (S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a) 細胞の作製は、米国特許第 6 , 0 0 4 , 5 5 2 号によって開示され、本明細書中に参考として援用される。手短に言えば、ヒト C D 4 0 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結合 (r e c o m b i n e) させた。上記プラスミドを、野生型バキュロウイルス D N A を用いて S f 9 細胞に同時トランスフェクトした。バキュロウイルスに感染した組換え S f 9 細胞を同定して、クローン的に精製した。

30

【 0 0 5 4 】

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、上記集団を含む個々の抗体は、微量に存在し得る天然に生じる変異体についての可能性を除いて、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 F a b 、 F (a b ') 2 、 F v のようなフラグメント、および抗体の抗原結合機能を保持する他のものを包含する。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 C D 4 0 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、K o h l e r ら (1 9 7 5) N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 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 D N A 方法（例えば、米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 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、C l a c k s o n ら (1 9 9 1) N a t u r e

40

50

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。

【0055】

「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、直鎖状様式で互いに連続して配置される)、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。

【0056】

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疫反応をし得る三次元の分子構造(直鎖状またはコンホメーションの構造のいずれか)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、本発明の目的を別にすると、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。

【0057】

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、生理的食塩水(好ましくは、フロイント完全アジュバントのようなアジュバント)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、1または数個の大きなリンパ節)が除かれ、そして単一の細胞に解離される。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。膜に結合された上記抗原に特異的な免疫グロブリンを発現するB細胞は、プレートに結合し、リンスで除かれず。得られたB細胞、または全ての解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、連続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(secret)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繊維反応器において)、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。

【0058】

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、かつ配列決定される。本明細書において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、別に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、または骨髓腫細胞)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、Skerraraら(1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256およびPhickthun(1992) Immunol. Revs. 130:151が挙げられる。ハイブリドーマの使用に代わるものとして、抗体は、米国特許第5,545,403号

10

20

30

40

50

；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。

【0059】

いくつかの実施形態において、上記アンタゴニスト抗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、グルタミン合成をマーカーとして使用するGS遺伝子発現系（Lonza Biologicals, 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号もまた参照のこと；これらの内容は、その全体が参考として援用される。

【0060】

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照のこと：McMichael（編）（1987；1989）Leukocyte Typing II 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。

【0061】

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の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。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。本発明の目的のために、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）および非ヒト霊長類（例えば、旧世界サル、サルなど；例えば、

10

20

30

40

50

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。

【0062】

ヒト化抗CD40抗体は、本発明の方法における使用に適切な、さらなる抗CD40抗体を表す。「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)からの残基は、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、または非ヒト霊長類)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天然のFv領域の結合親和性および結合特異性を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. Dept. 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来した。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した結合特性を有する。

【0063】

ヒト化は、本質的に、Winterおよび共同研究者の方法(Jonesら(1986)Nature 321:522-525; Riechmannら(1988)Nature 332:323-327; Verhoeyenら(1988)Science 239:1534-1536)に従って、げっ歯類もしくは変異体げっ歯類のCDRまたはげっ歯類もしくは変異体げっ歯類のCDR配列を、ヒト抗体の対応する配列と置換することによって実施され得る。米国特許第5,225,539号;同第5,585,089号;同第5,693,761号;同第5,693,762号;および同第5,859,205号もまた参照のこと;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5,585,089号;同第5,693,761号;同第5,693,762号;および同第6,180,370号を参照のこと)。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体においては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(Fc)(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、Jonesら(1986)Nature 331:522-525; Riechmannら(1988)Nature 332:323-329;およびPresta(1992)Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596を参照のこと;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領域が、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CDR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るヒト抗体である。例えば、米国特許第5,225,539号；同第5,585,089号；同第5,693,761号；同第5,693,762号；同第5,859,205号を参照のこと。米国特許番号6,180,370および国際公開第01/27160号もまた参照のこと。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。

【0064】

用語抗CD40抗体によって、不活化された内因性免疫グロブリン(Ig)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)において産生される異種抗CD40抗体または改変抗CD40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の発現に対して免疫応答を起こし得る内因性遺伝子は、非機能的になり、アナログのヒト免疫グロブリン座で置換される。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ない場合に、ヒト抗体を産生する。例えば、米国特許第5,877,397号および同第5,939,598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。

【0065】

好ましくは、トランスジェニックマウスを免疫化することによって、CD40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、Xenomouse(登録商標)技術(Abgenix; Fremont, California)を使用して得られ、米国特許第6,075,181号、同第6,091,001号および同第6,114,598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IgG₁重鎖遺伝子座およびヒトK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。

【0066】

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、CD40 B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。

【0067】

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')₂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')₂によって、両方の軽鎖と両方の重鎖の一部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」または「sFv」抗体フラグメントによって、抗体のV_HドメインおよびV_L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提示され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

10

20

30

40

50

HドメインとV_L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カーをさらに含む。sFvの概要については、Pluckthun(1994)、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、第113巻、Rosenburg and Moore(編)(Springer-Verlag, New York)、pp. 269-315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細胞の殺傷を達成し得る。

【0068】

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戦略としての、組み合わせ感染およびインビボの再組換え(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案である。

【0069】

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産生され得る。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ラ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。

【0070】

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、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て、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いか、または免疫原性が低いようにする。ここで、このような活性は、本明細書の他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。

【0071】

本発明の抗体は、例えば欧州特許出願公開第0983303A1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、上記抗体の結合活性は保持させるが、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、本明細書中で他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。

【0072】

本発明の実施において有用な抗CD40抗体は、1つまたは多くの機構の作用を有し得る。上記に記載された任意の方法、または本明細書において開示されていない任意の他の方法によって作製された抗体は、インビボおよび/またはインビトロで、以下の生物学的活性のうちの少なくとも1つを有する場合、本発明の範囲内である：T細胞によって刺激された正常ヒト末梢B細胞による免疫グロブリン分泌の阻害；CD40L発現細胞または可溶化CD40リガンド（sCD40L）によって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；ジャーカットT細胞によって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または固相CD40Lによって刺激された任意の細胞における「生き残った」の抗アポトーシス性細胞内シグナルの阻害；ならびにsCD40Lまたは固相CD40Lとのライゲーションに対する任意の細胞におけるCD40シグナル伝達の阻害、CD40を保有する標的細胞またはCD40に対する同族リガンドを保有する細胞（T細胞およびB細胞が挙げられるが、これらに限定されない）の欠失（deletion）、アネルギーおよび/または耐性の導入、CD4⁺CD25⁺調節T細胞の増殖（expansion）または活性化の導入（例えば、CD40-CD40L干渉を介したドナー同種抗原特異的組織拒絶（van Maurikら（2002）J. Immunol. 169:5401-5404）を参照のこと）、任意の機構を介した細胞傷害性（抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）、補体依存性細胞傷害性（CDC）、増殖のダウンレギュレーション、および/または標的細胞中のアポトーシスが挙げられるが、これらに限定されない）、標的細胞のサイトカイン分泌の調節および/または細胞表面分子の発現、ならびにこれらの組み合わせ。このような生物学的活性についてのアッセイは、本明細書および同時継続中の仮出願（両方ともに、発明の名称「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」であり、それぞれ、2003年11月4日、2003年11月26日、および2004年4月27日出願、割り当てられた米国特許出願番号第60/517,337号（代理人事件整理番号：PP20107.001（035784/258442））、同第60/525,579号（代理人事件整理番号：PP20107.002（035784/271525））、および同第60/565,710号（代理人事件整理番号：PP20107.003（035784/277214））において記載されるように実施され得る。これらの特許文献の各々の内容は、その全体が、本明細書中に参考として援用される。Schultzら（1998）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8200-8204；Dentonら（1998）Pediatr. Transplant. 2:6-15；Evansら（2000）J. Immunol. 164:688-697；Noelle（1998）Agents Actions Suppl. 49:17-22；Ledermanら（1996）Curr. Opin. Hematol. 3:77-86；Coliganら（1991）Current Protocols in Immunology 1

10

20

30

40

50

3:12; Kwekkeboomら(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(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アッセイもまた参照のこと。

【0073】

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、未知のものが検出されて、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4B(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4A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4D(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4Cに記載される配列(配列番号11; GenBank登録番号X60592およびNM_001250もまた参照のこと)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。

【0074】

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る; 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(西洋ワサビ)ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -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、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H 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。

【0075】

任意の以前に記載され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は、本発明の方法において使用される前に結合体化され得る。結合体化された抗体を作製するための方法は、当該分野で公知である。従って、上記抗CD40抗体は、間接的標識ま

10

20

30

40

50

たは間接的標識アプローチを使用して標識され得る。適切な標識としては、発蛍光団、発色団、放射活性原子（特に、 ^{32}P および ^{125}I ）、高電子密度試薬、酵素、および特異的結合パートナーを有するリガンドが挙げられる。酵素は、代表的に、それらの活性によって検出される。例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼは、通常、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）を青色色素に変換する能力によって検出され、分光光度計で定量可能である。「特異的結合パートナー」とは、例えば、抗原およびその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タンパク質をいう。他の特異的な結合パートナーとしては、ビオチンとアビジンまたはストレプトアビジン、IgGとタンパク質A、および当該分野で公知の多くのレセプター-リガンド対が挙げられる。同じ標識は1または数種の異なる様式において機能し得るので、上記の説明は、種々の標識を別個のクラスに分類することを意味しないことが理解されるべきである。例えば、HRPは、酵素としてか、またはmAbに対する抗原として機能し得る。さらに、所望の効果のために種々の標識を組み合わせることもできる。例えば、mAbおよびアビジンもまた、本発明の実施において標識を必要とする：従って、ビオチンでmAbを標識し、 ^{125}I で標識したアビジンまたはHRPで標識した抗ビオチンmAbを用いて、その存在を検出し得る。他の交換および可能性は、当業者には容易に明らかであり、本発明の範囲内の等価物として考えられる。

【0076】

さらに、抗体（またはそのフラグメント）は、例えば、治療剤のような治療部分に結合体化され得る。この薬物部分は、所望の生物学的活性を保有するタンパク質であってもポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質としては、例えば、以下が挙げられる：CTLA4-Igのようなタンパク質、抗体もしくは任意の他のタンパク質；または、生物学的反応修飾物質（例えば、リンフォカイン、腫瘍壊死因子、インターフェロン-、インターフェロン-、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン賦活剤、BlyS（Bリンパ球刺激物質）、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、または他の成長因子）。

【0077】

抗体に対するこのような治療部分を結合体化するための技術は、周知である。例えば、Arnonら（1985）Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeldら（編）（Alan R. Liss, Inc.）, pp. 243 - 256; Hellstromら（編）（1987）, Controlled Drug Delivery, Robinsonら（編）（第2版; Marcel Dekker, Inc.）, pp. 623 - 653; Thorpe（1985）Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pincheraら（編）pp. 475 - 506（Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985）; Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwinら（編）（Academic Press, New York, 1985）, pp. 303 - 316; およびThorpeら（1982）Immunol. Rev. 62: 119 - 158を参照のこと。

【0078】

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4,676,980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（例えば、米国特許第4,831,175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、直接的に標識されてもよいし、間接的に標識されてもよい（米国特許第5,595,721号）。処置は、同時または引き続いて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 00/52031およびWO 00/524

10

20

30

40

50

73)。

【0079】

(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。

【0080】

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ン化された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してのガイダンスは、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。

【0081】

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。欧州特許出願公開第75,444号を参照のこと。

【0082】

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。

【0083】

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。

10

【0084】

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)。

【0085】

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この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も、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。

20

30

【0086】

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。

40

【0087】

(本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体を使用する治療の方法)

本発明の方法は、自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患を有するか、または自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患を発症する素因を有する被験体(すなわち、患者)を処置するためのアンタゴニスト抗CD40抗体の使用に関し、ここで上記疾患および/または炎症は、CD40抗原を発現する細胞上のCD40リガンド媒介性のCD40シグナ

50

ル伝達によって媒介される。用語「CD40発現細胞」によって、CD40抗原を発現する細胞が意図される。細胞中のCD40発現を検出するための方法は、当該分野で周知であって、このような方法としては、PCR技術、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット、ELISAなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0088】

本発明の方法は、CD40L媒介性CD40刺激が関連する炎症および/または自己免疫疾患を処置するために特に有用である。本発明の組成物は、予防的もしくは治療的に、またはその組み合わせで投与され得る。

【0089】

炎症性疾患は、炎症および組織破壊、またはその組み合わせによって特徴付けられる。「炎症性疾患」は、免疫応答の開始現象または標的が、非自己抗原（このような抗原としては、例えば、同種抗原、異種抗原（*xenoantigen*）、ウイルス抗原、細菌抗原、未知の抗原、またはアレルゲンが挙げられる）に関連する、任意の炎症性免疫媒介性プロセスを包含する。

【0090】

さらに、本発明の目的に関して、用語「免疫性疾患」は、「自己免疫疾患」を包含する。本明細書において使用される場合、用語「自己免疫」は、一般的に、「自己」抗原に関連する炎症性免疫媒介性プロセスを包含することが理解される。自己免疫疾患において、自己抗原は、宿主免疫応答を誘発する。

【0091】

また、本発明は、組織移植の拒絶に関連する炎症の処置を包含する。「移植片拒絶（*transplant rejection*）」または「拒絶片移植（*graft rejection*）」とは、HLA抗原、血液群抗原を含む移植片（これらに限定されない）に対する任意の宿主に備わる免疫応答をいう。

【0092】

本発明はまた、対宿主性移植片病（例えば、骨髄移植に関連する疾患）を処置するために使用され得る。このような対宿主性移植片病において、ドナー骨髄としては、リンパ球およびリンパ球に成熟する細胞が挙げられる。このドナーリンパ球は、レシピエントの抗原を非自己として認識し、そして炎症性免疫応答を起こす。それ故、本明細書において使用される場合、「対宿主性移植片病」または「対宿主性移植片反応」とは、ドナーリンパ球が宿主抗原に対して反応する任意のT細胞媒介性免疫応答をいう。

【0093】

本明細書において記載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は、本発明の方法に従って自己免疫障害および/または炎症性障害を処置するために使用され得る。これらの障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：全身性エリテマトーデス（SLE）、円板状狼瘡、ループス腎炎、サルコイドーシス、炎症性関節炎（若年性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、ライター症候群、強直性脊椎炎、および痛風関節炎が挙げられる）、器官移植もしくは組織移植の拒絶、超急性、急性、もしくは慢性の拒絶および/または対宿主性移植片病、多発性硬化症、高IgE症候群、結節性多発性動脈炎、原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患、クローン病、セリアック病（グルテン過敏性腸疾患）、自己免疫性肝炎、悪性貧血、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、強皮症、重症筋無力症、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブス病、橋本甲状腺炎、免疫複合体病、慢性疲労免疫機能障害症候群（CFIDS）、多発性筋炎および皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、血栓崩壊、心筋症、尋常性天疱瘡、肺間質性線維症、I型およびII型真性糖尿病、1型、2型、3型および4型遅延型過敏症、アレルギー障害もしくはアレルギー性障害、治療のタンパク質に対する好ましくない/意図されない免疫応答（例えば、米国特許出願番号第2002/0119151号およびKorenら（2002）*Curr. Pharm. Biotechnol.* 3:349-60を参照のこと）、喘息、チャージ-ストラウス症候群（アレルギー性肉芽腫症）、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎および刺激性接触皮膚炎、じんま疹、IgE媒介

10

20

30

40

50

性アレルギー、アテローム性動脈硬化症、脈管炎、特発性炎症性ミオパシー、溶血性疾患、アルツハイマー病、慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパシーなど。いくつかの他の実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体は、肺炎症の処置において有用である。肺炎症としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：肺移植片拒絶、喘息、サルコイドーシス、気腫、嚢胞性線維症、特発性肺線維症、慢性気管支炎、アレルギー性鼻炎および肺のアレルギー性疾患（例えば、過敏性肺炎）、好酸球性肺炎、骨髄および/もしくは肺移植片または他の原因に起因する閉塞性細気管支炎、移植片アテローム性動脈硬化症/移植片静脈硬化症、ならびにコラーゲン、脈管および自己免疫疾患（例えば、慢性関節リウマチおよびエリテマトーデス）から生じる肺線維症。

【0094】

「処置」は、本明細書において、アンタゴニスト抗CD40抗体もしくはその抗原結合フラグメントの被験体への適用または投与、あるいはアンタゴニスト抗CD40抗体もしくはその抗原結合フラグメントの被験体からの単離された組織または細胞株への適用または投与として定義され、ここで上記被験体は、自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患、自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患に関連する症状、または自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患の発症に対する素因を有しており、その目的は、上記自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患、上記自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患の任意の関連する症状、または上記自己免疫疾患および/または炎症性疾患の発症に対する素因を、治療(cure)、治癒(heal)、緩和(alleviate)、軽減(relieve)、変更(alter)、治療(remedy)、改良(ameliorate)、改善(improve)、あるいは影響する(affect)ことである。「処置」によって、アンタゴニスト抗CD40抗体もしくはその抗原結合フラグメントを含有する薬学的組成物の被験体への適用または投与、あるいはアンタゴニスト抗CD40抗体もしくはその抗原結合フラグメントを含有する薬学的組成物の被験体から単離された組織または細胞株への適用または投与もまた意図され、ここで上記被験体は、自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患、自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患に関連する症状、または自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患の発症に対する素因を有しており、その目的は、上記自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患、上記自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患の任意の関連する症状、または上記自己免疫疾患および/または炎症性疾患の発症に対する素因を、治療、治癒、緩和、軽減、変更、治療、改良、改善、あるいは影響する

【0095】

「抗炎症活性」によって、炎症の減少または防止が意図される。本明細書中の他の部分で定義されるように、少なくとも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）を用いた治療は、CD40抗原を発現する細胞に関連する自己免疫疾患および/または炎症性疾患の処置に関して有益である生理学的応答を引き起こす。本発明の方法は、細胞の増殖、活性化などのような表現型変化を防止する際に有用であり得ることが認識される。

【0096】

本発明の方法に従って、本明細書の他の部分で定義されたように、少なくとも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）は、自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患の処置または防止に関して、ポジティブな治療応答を促進するために使用される。自己免疫疾患および/または炎症性疾患に関する「ポジティブな治療応答」によって、これらの抗体もしくはその抗原結合フラグメントの抗免疫活性に関連する疾患の改善、および/または上記疾患に関連する症状の改善が意図される。すなわち、抗増殖効果、CD40発現細胞のさらなる増殖の防止、炎症応答の減少（炎症性のサイトカイン、接着分子、プロテアーゼ、免疫グロブリン（上記CD40保有細胞は、B細胞である例において）、これらの組み合わせの分泌の減少などが挙げられるが、これらに限定されない）、抗炎症タンパク質の産生増加、自己反応性細胞数の減少、免疫寛容の増大、自己反応性細胞の生存の阻害、および/またはCD40発現細胞の刺激によって媒介される

1以上の症状の減少が、観察され得る。このようなポジティブな治療応答は、投与の経路に限定されず、そしてドナー、ドナー組織（例えば、器官灌流）、宿主、その任意の組み合わせなどへの投与を包含し得る。

【0097】

臨床的応答は、磁気共鳴画像法（MRI）スキャン、X線撮影画像化法、コンピュータ断層撮影（CT）スキャン、フローサイトメトリーまたは蛍光活性化細胞分離装置（FACS）分析、組織学、肉眼病理学、および血液化学（ELISA、RIA、クロマトグラフィーなどによって検出可能な変化が挙げられるが、これらに限定されない）などのスクリーニング技術を使用して評価され得る。これらのポジティブな治療応答に加えて、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用いた治療を受ける被験体は、上記疾患に関連する症状において改善の有益な効果を経験し得る。

10

【0098】

「治療有効用量または量」または「有効量」によって、投与された場合に、自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患を有する被験体の処置に関してポジティブな治療応答を引き起こす、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が意図される。本発明のいくつかの実施形態において、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40mg/kg、約0.01mg/kg～約30mg/kg、約0.1mg/kg～約30mg/kg、約1mg/kg～約30mg/kg、約3mg/kg～約30mg/kg、約3mg/kg～約25mg/kg、約3mg/kg～約20mg/kg、約5mg/kg～約15mg/kg、または約7mg/kg～約12mg/kgの範囲である。処置の方法は、上記アンタゴニスト抗CD40抗体もしくはその抗原結合フラグメントの、治療有効用量の一回投与または治療有効用量の複数回投与を包含し得ることが認識される。

20

【0099】

本発明のさらなる実施形態は、臨床的な試験手順の一部として、例えば、与えられた処置レジメンの効能を決定するために、組織中のタンパク質レベルを診断的にモニタリングするためのアンタゴニスト抗CD40抗体を使用することある。検出は、上記抗体を検出可能な基質に結合させることによって容易にされ得る。検出可能な基質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、ルミネセンス物質、生物ルミネセンス物質、および放射性物質が挙げられる。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、 α -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としては、ルミノールが挙げられる；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；そして適切な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H が挙げられる。

30

【0100】

上記アンタゴニスト抗CD40抗体および適切なその抗原結合フラグメントは、自己免疫疾患および炎症性疾患に対する任意の公知の治療と組み合わせて使用され得、これらの治療としては、自己免疫疾患および炎症性疾患の処置について、有用であることが公知であるか、または使用されてきたか、または現在使用されている、任意の薬剤あるいはそれらの薬剤の組み合わせが挙げられる。このような治療および治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：外科手術または外科的手順（例えば、脾臓摘出術、リンパ節切除術、甲状腺摘出術、血漿フォレーシス、白血球フォレーシス、細胞、組織または器官の移植、腸手順、器官灌流など）、放射線療法、ステロイド療法および非ステロイド療法のような治療、ホルモン療法、サイトカイン療法、皮膚科用薬剤（例えば、アレルギー、接触性皮膚炎、および乾癬のような皮膚の状態を処置するために使用される局所用薬剤）での治療、免疫抑制療法、および他の抗炎症性モノクローナル抗体療法など。この

40

50

様式において、本明細書において記載されるアンタゴニスト抗CD40抗体またはその結合フラグメントは、少なくとも1種の他の治療と組み合わせて投与される。他の治療としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：外科手術、器官灌流、放射線療法、ステロイド療法、非ステロイド療法、抗生物質療法、抗真菌療法、ホルモン療法、サイトカイン療法、皮膚科用薬剤（例えば、アレルギー、接触性皮膚炎、および乾癬のような皮膚状態を処置するために使用される局所用薬剤）での治療、免疫抑制療法、他の抗炎症性モノクローナル抗体療法、これらの組み合わせなど。従って、この組み合わせられた治療が、別の治療剤（1つの例として、例えば、ステロイド）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包含する場合、本発明の方法は、別個の処方物または1個の薬学的処方物を使用した同時投与、およびいずれかの順番での連続投与を包含する。

10

【0101】

本発明の方法が、組み合わせられた治療レジメンを含んでいる場合、これらの治療は、同時に与えられ得る。すなわち、上記アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、同時に、または他の治療として同じ期間内に投与される（すなわち、上記治療は同時に行われるが、抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、他の治療として正確に同時には投与されない）。あるいは、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また、他の治療の前に投与されてもよいし、他の治療に続いて投与されてもよい。異なる治療の連続投与は、処置された被験体の応答が、第1のクールの治療に対して寛解または再発の可能性を減少させるか否かに関わらず、実施され得る。

20

【0102】

本発明のいくつかの実施形態において、本明細書において記載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、免疫抑制薬または抗炎症薬と組み合わせ投与され、ここで上記抗体および上記治療剤は、いずれかの順番で連続的に投与されてもよいし、同時に（すなわち、同時または同じ期間内）投与されてもよい。本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体と組み合わせ投与され得る適切な免疫抑制薬の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：メトトレキサート、シクロホスファミド、ミゾリピン、クロラムブシル、シクロスポリン（例えば、エアロゾル化されたシクロスポリン（本明細書においてその全体が参考として援用される、米国特許出願公開番号第US20020006901号を参照のこと）、タクロリムス（FK506；PrografTM）、ミコフェノール酸モフェチル、およびアザチオプリン（6-メルカプトプリン）、シロリムス（ラパマイシン）、デオキシスベルグアリン、レフルノミドおよびそのマロノニトリロアミド（malononitriloamide）アナログ；ならびに免疫抑制タンパク質（このようなタンパク質としては、例えば、抗CTLA4抗体、Ig融合体、抗Bリンパ球刺激抗体（例えば、LYMPHOSTAT-BTM）およびIg融合体（BlyS-Ig）、抗CD80抗体およびエタネルセプト（Enbrel（登録商標））、ならびに抗T細胞抗体（例えば、抗CD3（OKT3）、抗CD4）などが挙げられる）。適切な抗炎症剤の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：コルチコステロイド（例えば、クロベタゾール、ハルベタゾール、ヒドロコルチゾン、トリアムシノロン、ベタメタゾン、フルオシノール（fluocinole）、フルオシノニド、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン）；非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）（例えば、スルファサラジン、メサラミンを含有した薬物（5-ASA剤として公知）、セレコキシブ（celecoxib）、ジクロフェナク、エトドラク、フェンプロフェン（fenpropfen）、フルルビプロフェン、イブプロフェン、ケトプロフェン、メクロファメート（meclofenamate）、メロキシカム、ナブメトン、ナプロキセン、オキサプロジン、ピロキシカム、ロフェコキシブ（rofecoxib）、サリチレート、スリンダク、およびトルメチン）；抗炎症性抗体（例えば、アダリムマブ（HUMIRA（登録商標））、TNF-アンタゴニスト）およびインフィリキシマブ（Remicade（登録商標））、TNF-アンタゴニスト）など。

30

40

50

【0103】

移植片拒絶および対宿主性移植片病は、超急性（体液性）、急性（T細胞媒介性）、もしくは慢性（未知の病因）、またはこれらの組み合わせであり得る。従って、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体は、いくつかの実施形態において、超急性、急性、および/もしくは慢性の任意の組織の移植片拒絶に関連する拒絶ならびに/または症状を、防止ならびに/または改良するために使用される。これらの組織としては、肝臓、腎臓、脾臓、ランゲルハンス島細胞、小腸、肺、心臓、角膜、皮膚、血管、骨、異種または自己の骨髄などが挙げられるが、これらに限定されない。移植片組織は、任意のドナーから得られ得、そして任意のレシピエント宿主に移植され得る。従って、上記移植手順は、動物組織をヒトに移植すること（例えば、異種移植片）、あるヒトからの組織を別のヒトに移植すること（例えば、同種移植片）、および/またはヒトの身体のある部分からの組織を別の部分に移植すること（例えば、自己移植片）を包含し得る。本発明の抗体での処置はまた、移植後遺症（例えば、熱、食欲不振、血行力学的異常、白血球減少症、移植された器官/組織の白血球浸潤、および日和見感染）を減少し得る。

10

【0104】

いくつかの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体は、単独または免疫抑制薬と組み合わせて使用され、超急性、急性、および/もしくは慢性の拒絶、ならびに/または対宿主性移植片病のような移植片拒絶を処置および/または防止し得る。従って、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体が移植片拒絶を処置するために使用されるいくつかの実施形態において、上記抗体は、適切な免疫抑制薬と組み合わせて使用され得る。この免疫抑制薬としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：メトトレキサート；シクロホスファミド；ミゾリピン；クロラムブシル；シクロスポリン（例えば、エアロゾル化されたシクロスポリン（例えば、米国特許出願公開第US20020006901号（本明細書において、参考として援用される））、タクロリムス（FK506；PrografTM）、ミコフェノール酸モフェチル、およびアザチオプリン（6-メルカプトプリン）、シロリムス（ラパマイシン）、デオキシスベルグアリン、レフルノミドおよびそのマロノニトリロアミドアナログ；ならびに免疫抑制タンパク質（例えば、抗CTL A4抗体、Ig融合体、抗Bリンパ球刺激抗体（例えば、LYMPHOSTAT-BTM）およびIg融合体（BlyS-Ig）、抗CD80抗体およびエタネルセプト（Enbrel（登録商標））、ならびに抗T細胞抗体（例えば、抗CD3（OKT3）、抗CD4）などが挙げられる）。

20

30

【0105】

従って、本発明の組成物および方法は、他の薬物と組み合わせて使用されて、移植片レシピエント（例えば、肺移植片を受け入れたレシピエント）において症状および転帰をさらに改善することが、特に企図される。従って、いくつかの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体は、移植片拒絶（例えば、肺移植片レシピエントにおける超急性、急性、および/もしくは慢性の拒絶、または対宿主性移植片病）を処置するために、単独または経口投与および/もしくは非経口投与されたシクロスポリン（例えば、経口用シクロスポリン、注射可能なシクロスポリン、エアロゾル化された（例えば、吸入）シクロスポリン、およびこれらの組み合わせが挙げられる）と組み合わせて使用される。上記治療の少なくとも1つの構成要素がエアロゾル化されたシクロスポリンであるいくつかの実施形態において、このシクロスポリンは、例えば、加圧型送達デバイスまたは噴霧器を使用して、エアロゾルスプレー形態のシクロスポリンの吸入によって、レシピエントの肺に送達される。このシクロスポリンは、乾燥粉末または湿性形態のいずれで投与されてもよい。

40

【0106】

いくつかの他の実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体は、単独もしくは免疫抑制薬と組み合わせて使用されて、慢性関節リウマチを処置および/または防止し得る。従って、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体が慢性関節リウマチを処置するために使用されるいくつかの実施形態において、上記抗体は、適切な免疫抑制薬と組み

50

合わせて使用され得る。この免疫抑制薬としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：メトトレキサート、シクロホスファミド、ミゾリピン、クロラムビシル、シクロスポリン、タクロリムス（FK506；PROGRAFTM）、ミコフェノール酸モフェチル、およびアザチオプリン（6-メルカプトプリン）、シロリムス（ラパマイシン）、デオキシスベルグアリン、レフルノミドおよびそのマロノニトリロアミドアナログ；ならびに免疫抑制タンパク質（例えば、抗CTLA4抗体、Ig融合体、抗Bリンパ球刺激抗体（例えば、LYMPHOSTAT-BTM）およびIg融合体（BLyS-Ig）、抗CD20抗体（例えば、RITUXAN（登録商標））が挙げられる）；完全ヒト抗体HuMax-CD20、R-1594、IMMU-106、TRU-015、AME-133、トシツモマブ（tositumomab）/I-131、トシツモマブ（Bexxar（登録商標））、イブリツモマブチツキセタン（ibritumomab tituxetan）（Zevalin（登録商標））；抗CD80抗体およびエタネルセプト（ENBREL（登録商標））、ならびに抗T細胞抗体（例えば、抗CD3（OKT3）、抗CD4）など。上記に議論されたように、処置の有効性は、任意の手段によって評価され得、処置の有効性としては、アメリカリウマチ学会（American College of Rheumatology）の診断基準、ヨーロッパ連盟（European League）のリウマチ診断基準、または任意の他の診断基準によって定義された臨床応答によって測定される有効性が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Felsonら（1995）Arthritis Rheum. 38：727-35およびvan Gestelら（1996）Arthritis Rheum. 39：34-40を参照のこと。

【0107】

さらに他の実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体は、多発性硬化症を処置および/もしくは防止するために、単独または免疫抑制薬と組み合わせて使用され得る。従って、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体が多発性硬化症を処置するために使用されるいくつかの実施形態において、上記抗体は、適切な免疫抑制薬と組み合わせて使用され得る。この免疫抑制薬としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：メトトレキサート、シクロホスファミド、ミゾリピン、クロラムビシル、シクロスポリン、タクロリムス（FK506；PROGRAFTM）、ミコフェノール酸モフェチル、およびアザチオプリン（6-メルカプトプリン）、シロリムス（ラパマイシン）、デオキシスベルグアリン、レフルノミドおよびそのマロノニトリロアミドアナログ；ならびに免疫抑制タンパク質（例えば、抗CTLA4抗体、Ig融合体、抗Bリンパ球刺激抗体（例えば、LYMPHOSTAT-BTM）およびIg融合体（BLyS-Ig）、抗CD20抗体（例えば、RITUXAN（登録商標））が挙げられる）；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））、イブリツモマブチツキセタン（Zevalin（登録商標））；抗CD80抗体およびエタネルセプト（ENBREL（登録商標））、ならびに抗T細胞抗体（例えば、抗CD3（OKT3）、抗CD4）など。

【0108】

（薬学的処方物および投与の様式）

本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体は、治療上有効である濃度において投与されて、自己免疫疾患および/もしくは炎症性疾患を防止または処置する。この目的を達成するために、上記抗体は、当該分野で公知の種々の受容可能な賦形剤を使用して処方され得る。代表的には、上記抗体は、例えば、静脈内注射、腹腔内注射、または皮下注射のいずれかの注射によって投与される。この投与を達成するための方法は、当業者に公知である。局所投与もしくは経口投与され得る組成物、または粘膜を通過して透過し得る組成物を得ることもまた可能であり得る。

【0109】

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～約10時間に

10

20

30

40

50

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、なおより好ましくは約 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れ、続く注入はより迅速に送達される。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。

【0110】

本発明の薬学的組成物は、意図される投与の経路と適合するように処方される。可能な投与の経路の例としては、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）、生理的食塩溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、ポリピレング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、および張度調節のための薬剤（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）で調節され得る。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。

【0111】

上記アンタゴニスト抗 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、滅菌生理的食塩水、滅菌緩衝水、ポリピレングリコール、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 WO 98/56418 もまた参照のこと。

【0112】

投与される少なくとも 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、治療を受ける特定の疾患、上記疾患の重症度、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薬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、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、治療を受ける患者の体重の増加に関して好ましい。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 0.003 mg/kg～約 50 mg/kg の範囲であり、好ましくは、0.01 mg/kg～約 40 mg/kg の範囲である。従って、例えば、用量は、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、または 50 mg/kg であり得る。

【0113】

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する。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に実験なしに容易に決定され得る。さらに、治療有効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1~10週間の間、好ましくは約2~8週間の間、よりこのましくは約3~7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を生じ得、そしてそのアッセイの結果から明らかになり得る。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年離れていてもよい。

【0114】

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25mg/kg、約3mg/kg~約20mg/kg、約5mg/kg~約15mg/kg、または約7mg/kg~約12mg/kgであり得る。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、0.003mg/kg、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、50mg/kg、または約0.003mg/kg~約50mg/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、抗体投薬の各週を通じて、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。

【0115】

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0.003mg/kg~約20mg/kg）であり得、引き続き用

10

20

30

40

50

量は、より高い用量範囲（すなわち、約 20 mg / kg ~ 約 50 mg / kg）になり得る。

【0116】

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 CD 40 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 20 mg / kg ~ 約 50 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 20 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 CD 40 抗体またはその抗原結合フラグメントは、約 20 mg / kg ~ 約 35 mg / kg（約 20 mg / kg、約 25 mg / kg、約 30 mg / kg、および 35 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 CD 40 抗体またはその抗原結合フラグメントは、約 5 mg / kg ~ 約 15 mg / kg（約 5 mg / kg、約 8 mg / kg、約 10 mg / kg、約 12 mg / kg、および約 15 mg / kg を含む）である。

10

【0117】

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 CD 40 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 CD 40 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 20 mg / kg ~ 約 50 mg / kg）にある、上記被験体に投与されるアンタゴニスト抗 CD 40 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 CD 40 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 20 mg / kg）内にある。

20

30

【0118】

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 CD 40 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 CD 40 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ヶ月離れて投与される）で投与される場合、より高い投薬範囲（すなわち、約 20 mg / kg ~ 約 50 mg / kg）である。

40

【0119】

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 CD 40 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、霊長類、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

50

胞株からの組換えヒトタンパク質である。

【 0 1 2 0 】

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CD40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效果を有するように、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CD40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CHIR-5.9またはCHIR-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上活性な成分として機能する。改変体抗CD40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的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。

10

【 0 1 2 1 】

治療的に活性な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CD40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CD40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CD40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CD40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、この被験体内の疾患もしくは状態の、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。

20

【 0 1 2 2 】

処方用物質（formulant）が、本発明のアンタゴニスト抗CD40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（amine acid）、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。糖類またはグリカンとしては、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、プルラン、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C₄～C₈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。

30

40

【 0 1 2 3 】

50

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： $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ 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。

【0124】

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、必ずしも身体において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、いずれも、その全体が本明細書により参考として援用される。

【0125】

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 42:4734；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。

【0126】

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「生き残った」抗アポトーシス細胞内シグナルの阻害；sCD40Lまたは固相CD40Lとのライゲーションに対する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

10

20

30

40

50

に限定されない)) を有するべきである。

【 0 1 2 7 】

タンパク質の安定性をモニターするための方法は、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 CD 40 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、少なくとも 9 ヶ月、少なくとも 12 ヶ月、少なくとも 18 ヶ月、少なくとも 24 ヶ月、安定である。

10

【 0 1 2 8 】

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、目に見える徴候 (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) 測定可能な徴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ーするための方法は、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。

20

【 0 1 2 9 】

薬学的組成物中に処方される場合、アンタゴニスト抗 CD 40 抗体、またはその抗原結合フラグメントは、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、そ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、所定の時点において所望の生物学的活性を保持すると考えられる。本明細書中に開示されるアンタゴニスト抗 CD 40 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して実施され得る。また、Schultz ら (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8200 - 8204 ; Denton ら (1998) Pediatr. Transplant. 2: 6 - 15 ; Evans ら (2000) J. Immunol. 164: 688 - 697 ; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49: 17 - 22 ; Lederman ら (1996) Curr. Opin. Hematol. 3: 77 - 86 ; Coligan ら (1991) Current Protocols in Immunology 13: 12 ; Kwekkeboom ら (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 号に記載されるアッセイもまた参照のこと (これらは、本明細書中に参考として援用される) 。

30

40

【 0 1 3 0 】

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 CD 40 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

50

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産生される。

【0131】

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。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は、投与経路および所望の投薬用量を考慮に入れる。

【0132】

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50mg/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15.0～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40.0～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、およびこの処方物のpHをpH約5.0～pH約7.0の範囲（pH約5.0、pH約5.1、pH約5.2、pH約5.3、pH約5.4、pH約5.5、pH約5.6、pH約5.7、pH約5.8、pH約5.9、pH約6.0、pH約6.1、pH約6.2、pH約6.3、pH約6.4、pH約6.5、pH約6.6、pH約6.7、pH約6.8、pH約6.9、pH約7.0、およびpH約5.0～pH約7.0の範囲内の他のこ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pHを、pH約5.0～pH約6.5、pH約5.0～pH約6.0、pH約5.0～pH約5.5、pH約5.5～pH約7.0、pH約5.5～pH約6.5、またはpH約5.5～pH約6.0の範囲に維持する。

【0133】

液体抗CD40抗体処方物のpHをpH約5.0～pH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、クエン酸またはクエン酸塩、酢酸または酢酸塩

、酒石酸または酒石酸塩、リン酸またはリン酸塩、グルコン酸またはグルコン酸塩、グルタミン酸またはグルタミン酸塩、アスパラギン酸またはアスパラギン酸塩、マレイン酸またはマレイン酸塩、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ような値を含む) であり得る。

10

【0134】

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、治療有効量のアンタゴニスト抗 CD 40 抗体 (たとえば、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、およびこの処方物の pH を pH 約 5 . 0 ~ pH 約 7 . 0、好ましくは、pH 約 5 . 0 ~ pH 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、緩衝液は、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) であり得る。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 CD 40 抗体 (例えば、CHIR - 12 . 12 モノクローナル抗体、もしくは

20

30

【0135】

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、治療有効量のアンタゴニスト抗 CD 40 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、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するために十分な量の等張化剤を含み得る。「等張付近 (near isotonic)」により、水溶性処方物が、約 240 mmol / kg ~ 約 360 mmol / kg、好ましくは約 240 mmol / kg ~ 約 340 mmol / kg、より好ましくは約 250 mmol / kg ~ 約 330 mmol / kg、なおより好ましくは約 260 mmol / kg ~ 約 320 mmol / kg 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、Setnikar ら (1959) J . Am . Pharm . Assoc . 48 : 628 を参照のこと。

40

【0136】

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

50

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節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、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。

【0137】

いくつかの好ましい実施形態において、治療有効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、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50mM～約300mM、約50mM～約250mM、約50mM～約200mM、約50mM～約175mM、約50mM～約150mM、約75mM～約175mM、約75mM～約150mM、約100mM～約175mM、約100mM～約200mM、約100mM～約150mM、約125mM～約175mM、約125mM～約150mM、約130mM～約170mM、約130mM～約160mM、約135mM～約155mM、約140mM～約155mM、または約145mM～約155mMである。1つのこのような実施形態において、塩化ナトリウムの濃度は、約150mMである。他のこのような実施形態において、塩化ナトリウムの濃度は、約150mMであり、緩衝液は、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、この液体薬学的処方物は、治療有効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、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、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、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。

【0138】

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。

【0139】

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、Brij 35）；シメチコン；ポリエチレングリコール（例えば、PEG400）；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ましい界面活性剤は、ポリソルベートである。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0.03%（w/v）～約0.3%（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。

【0140】

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、約pH5.0～pH約5.5、pH約5.5～pH約6.5、または約pH5.5～pH約6.0のpHを有する。

【0141】

液体薬学的処方物は、本質的に、保存料、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記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。

10

【0142】

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。再構成の際に、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。

【0143】

（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、被験体における自己免疫疾患および/または炎症性疾患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、ここで、この医薬は、少なくとも1種の他の治療を伴う処置と共働する。「共働する（coordinated）」により、その医薬が、少なくとも1種の他の治療を用いる被験体の処置の、前、間または後のいずれかに使用されることが意図される。他の治療の例としては、本明細書において上記されたもの、すなわち、外科手術または外科的手順（例えば、脾臓摘出術、リンパ節切除術、甲状腺摘出術、血漿フォレーシス、白血球フォレーシス、細胞、組織もしくは器官の移植、器官の灌流、腸手順（intestinal procedure）など）、放射線療法、ステロイド療法および非ステロイド療法、ホルモン療法、サイトカイン療法のような療法、皮膚科用薬剤（例えば、アレルギー、接触性皮膚炎および乾癬のような皮膚の症状を処置するために使用される局所用薬剤）を用いる治療、免疫抑制療法、ならびに他の抗炎症性モノクローナル抗体療法などが挙げられるがこれらに限定されず、ここで、さらなる治療または複数のさらなる治療を伴う処置は、本明細書において上記したような、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を含む医薬を用いる被験体の処置の、前、間または後に起こる。1つのこのような実施形態において、本発明は、被験体における自己免疫疾患または炎症性疾患を処置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またはモノクローナル抗体CHIR-5.9の使用を提供し、ここで、この医薬は、本明細書において上記したように、少なくとも1種の他の治療を伴う処置と共働する。

20

30

【0144】

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、本明細書中に開示されるモノクローナル抗体CHIR-12.12また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を含む医薬は、2種の他の治療を伴う処置と共働する。アンタゴニスト抗CD40抗体を含む医薬は、2種の他の治療と共働する場合、この医薬の使用は、複数の他の治療のいずれか、または両方を用いる被験体の処置の、前、間または後であり得る。

40

【0145】

本発明はまた、被験体における自己免疫疾患および/または炎症性疾患の処置の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、本明細書中に開示されるモノクローナル抗体CHIR-12.12また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使用を提供し、ここで、この医薬は、少なくとも1種の他の治療で事前に処置された被験体において使用される。「事前に処置された（pre

50

treated)」または「事前の処置 (pretreatment)」により、被験体が、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受容する前に、1種以上の他の治療で処置されていることが意図される。「事前に処置された」または「事前の処置」は、アンタゴニスト抗CD40抗体 (例えば、本明細書中で開示されるモノクローナル抗体CHIR-12.12また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を含む医薬での処置の開始前、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1日以内に、1種の他の治療、または複数の他の治療で処置された被験体を含む。被験体は、前の治療での事前処置に対する応答者であった必要はない。従って、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受容する被験体は、前の治療での事前処置に、または、事前処置が、複数の処置から構成される、複数の前の処置の1種以上に対して、応答していても、応答し損なっているもよい。

10

【0146】

以下の実施例は、限定する目的ではなく、例示の目的で提供される。

【実施例】

【0147】

(導入部)

以下の実施例で使用されるアンタゴニスト抗CD40抗体は、CHIR-5.9およびCHIR-12.12である。CHIR-5.9抗CD40抗体およびCHIR-12.12抗CD40抗体は、ヒトIgG₁重鎖座およびヒトK軽鎖座を有するトランスジェニックマウス (Xenomouse (登録商標) 技術 (Abgenix; Fremont, California)) の免疫により作製されるヒトIgG₁サブタイプ抗ヒトCD40モノクローナル抗体 (mAb) である。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。

20

【0148】

簡単に述べると、免疫したマウスに由来する脾臓細胞を、de Boerら (1988) J. Immunol. Meth. 113: 143により以前に記載されたとおりに、50% ポリエチレングリコールを使用して、10:1の比で、SP2/0マウス骨髄腫細胞またはP3x63Ag8.653マウス骨髄腫細胞と融合させた。融合した細胞を、ヒポキサンチン (0.1mM)、アミノプテリン (0.01mM)、チミジン (0.016mM) および0.5ng/mlのhIL-6 (Genzyme, Cambridge, Massachusetts) を補充した完全IMDM培地中に再懸濁した。この融合した細胞を、次いで、各ウェルが、平均して1つの増殖するハイブリドーマを含むように、96ウェル組織培養プレートのウェル間に分配した。

30

【0149】

10~14日後、ハイブリドーマ集団の上清を、特異的抗体の産生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の産生をスクリーニングするために、各ウェルからの上清を、プールし、まず、ELISAによって、抗CD40活性の特異性について試験した。次いで、陽性のものを、標準的なFACSアッセイを用いる、EBV-形質転換B細胞の蛍光細胞染色のために使用した。陽性のハイブリドーマ細胞を、0.5ng/mlのhIL-6を含有するIMDM/FBS中で限界希釈することによって、2回クローン化した。

40

【0150】

合計31匹のマウスの脾臓を、マウス骨髄腫SP2/0細胞と融合させて、ELISAにおいて組換えCD40を認識する895の抗体を作製した。平均して、Abgenix Xenomouse (登録商標) 技術 (Abgenix; Fremont, California) を使用して産生されたハイブリドーマの約10%が、ヒト軽鎖の代わりにマウス軽鎖を含み得る。これらのマウス軽鎖を含有する抗体を選択した。細胞表面CD40への結合もまた示す260の抗体のサブセットを、さらなる分析のために選択した。

50

一連のサブクローニング手順の間に選択された安定なハイブリドーマを、結合アッセイおよび機能アッセイにおけるさらなる特徴付けに使用した。選択プロセスのさらなる詳細については、同時継続中の仮出願（両方ともに、発明の名称「Angtagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」であり、それぞれ、2003年11月4日および2003年11月26日出願、割り当てられた米国特許出願番号第60/517,337号（代理人事件整理番号：PP20107.001(035784/258442)）および同第60/525,579号（代理人事件整理番号：PP20107.002(035784/271525)）を参照のこと。これらの特許文献の両方の内容は、その全体が、本明細書中に参考として援用される。

10

【0151】

7つの他のハイブリドーマからのクローンを、アンタゴニスト活性を有するものとして同定した。その相対アンタゴニスト能およびADCC活性に基づいて、2つのハイブリドーマクローンを、さらなる評価のために選択した（表1、以下）。これらを、131.2F8.5.9(5.9)および153.8E2.D10.D6.12.12(12.12)と名付けた。

【0152】

【表1】

表1. 抗CD40 IgG1抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12の初期データセットのまとめ

20

母親のハイブリドーマ	ハイブリドーマクローン	細胞表面結合	アンタゴニスト	ADCC	CDC	CMCC#	V領域のDNA配列
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	はい
153.8E2	153.8E2D10D6.12.12	+++	+++	+++	-	12056	はい

マウスハイブリドーマ株131.2F8.5.9(CMCC#12047)およびハイブリドーマ株153.8E2.D10.D6.12.12(CMCC#12056)は、それぞれ、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の下、寄託されている。

30

【0153】

候補抗体の可変領域をコードするcDNAを、PCRにより増幅し、クローン化し、そして、配列決定した。CHIR-12.12抗体の軽鎖および重鎖についてのアミノ酸配列を、それぞれ、図1Aおよび1B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)もまた参照のこと。mAb CHIR-12.12の重鎖の改変体を、図1Bに示す（配列番号5もまた参照のこと）。この改変体は、配列番号4の第153位のアラニン残基の代わりにセリン残基を有するという点で配列番号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2Aおよび2Bに示す。配列番号1(mAb CHIR-12.12の軽鎖のコード配列)および配列番号3(mAb CHIR-12.12の重鎖のコード配列)もまた参照のこと。CHIR-5.9抗体の軽鎖および重鎖についてのアミノ酸配列を、それぞれ、図3Aおよび3B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)もまた参照のこと。mAb CHIR-5.9の重鎖の改変体を、図3Bに示す（配列番号8もまた参照のこと）。この改変体は、配列番号7の第158位のアラニン残基の代わりにセリン残基を有するという点で配列番号7と異なる。

40

【0154】

個々のハイブリドーマに由来する抗体について予測されるとおり、相補性決定領域(CDR)内のヌクレオチド配列に実質的なバリエーションが存在する。V_HのCDR3領域

50

内の多様性は、抗体特異性を最も有意に決定するものと考えられる。

【0155】

FACS分析により示されるように、CHIR-5.9およびCHIR-12.12は、ヒトCD40に特異的に結合し、そして、CD40-リガンド結合を妨げ得る。両方のmAbが、細胞表面のCD40に予め結合したCD40リガンドと競合し得る。CHIR-5.9のヒトCD40への結合親和性は、 1.2×10^{-8} Mであり、CHIR-12.12のヒトCD40への結合親和性は、 5×10^{-10} Mである。

【0156】

CHIR-12.12モノクローナル抗体およびCHIR-5.9モノクローナル抗体は、強力なアンタゴニストであり、正常なB細胞のインビトロCD40リガンド媒介性の増殖を阻害する。これらの結果、およびこれらの結果を得るために使用したアッセイのより詳細な説明については、同時継続中の仮出願（両方ともに、発明の名称「Angtagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」であり、それぞれ、2003年11月4日および2003年11月26日出願、割り当てられた米国特許出願番号第60/517,337号（代理人事件整理番号：PP20107.001（035784/258442））および同第60/525,579号（代理人事件整理番号：PP20107.002（035784/271525）））を参照のこと。これらの特許文献の両方の内容は、その全体が、本明細書中に参考として援用される。

【0157】

（実施例1：CHIR-12.12は、CD40Lが媒介する細胞のシグナル伝達をブロックする）

可溶性CD40リガンド（CD40L）は、B細胞を活性化し、機能的な応答の種々の局面（生き残りおよび増殖の増強、ならびにNF- κ B、ERK/MAPK、PI3K/Akt、およびp38シグナル伝達経路の活性化を含む）を誘導する。さらに、CD40L媒介性のCD40刺激は、正常なB細胞における切断型PARPの減少および抗アポトーシスタンパク質XIAPおよびMcl-1の誘導により、生き残りシグナルを与える。CD40L媒介性のCD40刺激はまた、TRAF2およびTRAF3を補充して、CD40の細胞質ドメインに結合する。

【0158】

以下の研究は、CHIR-12.12が、正常なヒトB細胞へのこれらの刺激効果の全てを直接阻害したことを実証する。例えば、CHIR-12.12処理により、時間依存的かつ用量依存的な様式でのカスパーゼ-9、カスパーゼ-3、およびPARPの切断の増加、ならびに、XIAPおよびMcl-1の減少を生じ、B細胞のアポトーシスを修復した。CHIR-12.12での処理はまた、CD40L媒介性のCD40刺激に応答して、IKKおよびそのリン酸化（NF- κ B経路）、ERK、Aktおよびp38も阻害した。さらに、CHIR-12.12が、最初のCD40L媒介性のCD40刺激なしではこれらのアポトーシス効果を誘発しなかったことが見出された。

【0159】

（CHIR-12.12は、PARPの切断を誘導することにより、CD40リガンドにより媒介される生き残りを阻害した）

これらの実験において、健康なドナーからの 0.6×10^6 個の正常なヒトB細胞（85%～95%の間の純度（%））を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のsCD40L（Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK）で刺激した。次いで、CHIR-12.12（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）およびコントロールのIgGを添加した。細胞を、0分、20分、2時間、6時間、18時間および26時間で回収した。切断型カスパーゼ-9、切断型カスパーゼ-3、切断型PARPおよび-アクチンコントロールを、細胞溶解物において、ウェスタンブロットにより検出した。

【0160】

簡単に述べると、CD40L媒介性のCD40刺激は、切断型カスパーゼ-9、切断型

10

20

30

40

50

カスパーゼ - 3、または切断型 P A R P の経時的な増加を生じなかったので、生き残りシグナルを提供したことが観察され、これらの細胞は、アポトーシスを受けなかったことを示した。しかし、C H I R - 1 2 . 1 2 での処理は、これらの切断生成物の増加をもたらした。C H I R - 1 2 . 1 2 処理が、C D 4 0 L 刺激した正常な B 細胞における生き残りシグナル伝達に対する C D 4 0 L 結合の効果を抑止し、B 細胞アポトーシスを修復したことを示した（データ示さず）。

【 0 1 6 1 】

（ C H I R - 1 2 . 1 2 は、「生き残った」抗アポトーシスタンパク質の発現を阻害した）

これらの実験において、健康なドナーからの 0.6×10^6 個の正常なヒト B 細胞（85% ~ 95% の間の純度（%））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。次いで、C H I R - 1 2 . 1 2（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）およびコントロールの I g G を添加した。細胞を、0 分、2 0 分、2 時間、6 時間、1 8 時間および 2 6 時間で回収した。M c l - 1、X I A P、C D 4 0 および - アクチンコントロールを、細胞溶解物において、ウェスタンブロットにより検出した。

【 0 1 6 2 】

簡単に述べると、s C D 4 0 L 刺激は、M c l - 1 および X I A P の持続的な発現を生じた。しかし、s C D 4 0 L で刺激した細胞の C H I R 1 2 . 1 2 での処理は、これらのタンパク質の発現の経時的な減少を生じた（データ示さず）。M c l - 1 および X I A P は、アポトーシス経路をブロックし得る「生き残り」シグナルであるので、これらの結果は、C H I R - 1 2 . 1 2 処理が、s C D 4 0 L で刺激した正常な B 細胞におけるアポトーシスに対する障壁を取り除くことを示す。

【 0 1 6 3 】

（ C H I R - 1 2 . 1 2 での処理は、正常な 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）のリン酸化を阻害した）

これらの実験において、健康なドナーからの 1×10^6 個の正常なヒト B 細胞（85% ~ 95% の間の純度（%））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。次いで、C H I R - 1 2 . 1 2（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）およびコントロールの I g G を添加した。細胞を、0 分および 2 0 分で回収した。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）および総 I K K コントロールを、細胞溶解物において、ウェスタンブロットにより検出した。

【 0 1 6 4 】

簡単に述べると、s C D 4 0 L による刺激は、I K K（S e r 1 8 0）および I K K（S e r 1 8 1）の経時的なリン酸化を生じた；しかし、C H I R - 1 2 . 1 2 での処理は、正常な B 細胞における s C D 4 0 L 刺激に対するこの応答を抑止した（データ示さず）。

【 0 1 6 5 】

（ C H I R - 1 2 . 1 2 での処理は、C D 4 0 リガンドにより媒介される生き残りを、容量依存性の様式で阻害した）

これらの実験において、健康なドナーからの 0.6×10^6 個の正常なヒト B 細胞（85% ~ 95% の間の純度（%））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。C H I R - 1 2 . 1 2（ $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）およびコントロールの I g G を添加した。細胞を、2 4 時間で回収した。切断型 P A R P および アクチンコントロールを、細胞溶解物において、ウェスタンブロットにより検出した。

【 0 1 6 6 】

簡単に述べると、C H I R - 1 2 . 1 2 処理は、s C D 4 0 L 刺激した細胞において、

用量依存性の様式で、P A R P の切断の増加を生じ、それゆえ、s C D 4 0 L で刺激した正常な B 細胞において、生き残りシグナル伝達経路を抑止した（データ示さず）。

【 0 1 6 7 】

（ C H I R - 1 2 . 1 2 は、「生き残った」抗アポトーシスタンパク質の発現を、容量依存性の様式で阻害した）

これらの実験において、健康なドナーからの 0.6×10^6 個の正常なヒト B 細胞（85% ~ 95% の間の純度（%））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。C H I R - 1 2 . 1 2（ $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）およびコントロールの I g G を添加した。細胞を、22 時間で回収した。M c l - 1、X I A P、切断型 P A R P および アクチンコントロールを、細胞溶解物において、ウェスタンブロットにより検出した。

10

【 0 1 6 8 】

簡単に述べると、C H I R - 1 2 . 1 2 処理は、s C D 4 0 L で刺激した細胞において、用量依存性の様式で、M c l - 1 および X I A P の発現を減少し、そして、切断型 P A R P の発現を増加し、従って、s C D 4 0 L で刺激した正常な B 細胞におけるアポトーシス経路に対するこれらの障壁を抑止した（データ示さず）。

【 0 1 6 9 】

（ 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では、抗アポトーシスタンパク質、切断型 P A R P および X I A P の発現に影響を及ぼさなかった）

20

これらの実験において、健康なドナーからの 1×10^6 個の正常なヒト B 細胞（85% ~ 95% の間の純度（%））を、C H I R - 1 2 . 1 2（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）およびコントロールの I g G のみで処理した（すなわち、細胞は、抗体を添加する前に、s C D 4 0 L で事前に刺激されなかった）。細胞を、0 時間、4 時間、14 時間および 16 時間で回収した。X I A P、切断型 P A R P および アクチンコントロールを、細胞溶解物において、ウェスタンブロットにより検出した。

【 0 1 7 0 】

簡単に述べると、これらの結果は、s C D 4 0 L 刺激なしでは、細胞は、I g G 処理コントロール細胞および C H I R - 1 2 . 1 2 細胞の両方において、増加する濃度の切断型 P A R P を発現したが、X I A P の発現は一定のままであったことを示す（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 刺激なしで、正常なヒト B 細胞においてアポトーシスを誘導しないことを示す。

30

【 0 1 7 1 】

（ C H I R - 1 2 . 1 2 は、正常な 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 ならびに p 3 8 のリン酸化を阻害する）

これらの実験において、健康なドナーからの 1.0×10^6 個の正常なヒト B 細胞（85% ~ 95% の間の純度（%））を、1% F B S 含有培地中で血清飢餓状態にし、そして、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 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。この培養物を、C H I R - 1 2 . 1 2（ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）およびコントロールの I g G で処理した。細胞を、0 分および 20 分で回収した。ホスホ - I K K、ホスホ - I K K、総 I K K、ホスホ - E R K、総 E R K、ホスホ - A k t、総 A k t、ホスホ - p 3 8、および総 p 3 8 を、細胞溶解物において、ウェスタンブロットにより検出した。

40

【 0 1 7 2 】

簡単に述べると、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 のリン酸化の増加を生じ、従って、細胞の生き残りおよびまたは増殖をもたらした。C H I R - 1 2 . 1 2 での細胞の処理は、s C D 4 0 L 刺激の、正常な B 細胞におけるこれらのシグナル伝達経路に対する効果を抑止した（データ示さず）。

【 0 1 7 3 】

50

(CHIR-12.12は、CD40シグナル伝達カスケードにおけるPI3KおよびMEK/ERKのような複数のシグナル伝達経路を阻害する)

これらの実施形態において、健康なドナーからの 1.0×10^6 個の正常なヒトB細胞(85%~95%の間の純度(%))を、1% FBS含有培地中で血清飢餓状態にし、そして、 $1 \mu\text{g/ml}$ のsCD40L(Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)で刺激した。この培養物をまた、CHIR-12.12($1 \mu\text{g/ml}$ および $10 \mu\text{g/ml}$)、Wortmanin(一種のPI3K/Aktインヒビター; $1 \mu\text{M}$ および $10 \mu\text{M}$)、LY294002(一種のPI3K/Aktインヒビター; $10 \mu\text{M}$ および $30 \mu\text{M}$)およびPD98095(一種のMEKインヒビター; $10 \mu\text{g/ml}$ および $30 \mu\text{g/ml}$)で処理した。細胞を、0分および20分
10
分で回収した。ホスホ-ERK、ホスホ-Akt、総Akt、ホスホ-IKK / 、および合計を、細胞溶解物において、ウェスタンブロットにより検出した。

【0174】

簡単に述べると、これらの結果は、CHIR-12.12が、これらのシグナル伝達分子の全てのリン酸化を抑止したことを示す一方で、シグナル伝達インヒビターは、特定のシグナル伝達の抑止のみを示し、CHIR-12.12が、CD40L刺激により媒介されるこれらのシグナル伝達分子の上流を阻害するようであることを示した(データ示さず)。

【0175】

(CHIR-12.12は、正常なB細胞において、シグナル伝達分子であるTRAF2およびTRAF3の、CD40の細胞質ドメインへの結合を阻害する)
20

これらの実験において、健康なドナーからの 4×10^6 個の正常なヒトB細胞(85%~95%の間の純度(%))を、1% FBS含有培地中で血清飢餓状態にし、そして、 $1 \mu\text{g/ml}$ のsCD40L(Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)で20分間刺激した。細胞を、0分および20分で回収した。CD40を、ポリクローナル抗CD40(Santa Cruz Biotechnology, CA)を用いて免疫沈降させ、そして、ウェスタンブロットにおいて、抗TRAF2 mAb(Santa Cruz Biotechnology, CA)、抗TRAF3 mAb(Santa Cruz Biotechnology, CA)および抗CD40 mAb(Santa Cruz Biotechnology, CA)を用いて、プローブした。
30

【0176】

簡単に述べると、結果は、TRAF2およびTRAF3が、sCD40L刺激の後に、CD40と共沈殿したことを示す。対照的に、CHIR-12.12での処理は、sCD40Lで刺激した正常なB細胞において、CD40-TRAF2/3シグナル伝達複合体の形成を抑止した。CD40の発現には変化はなかった(データ示さず)。

【0177】

理論に束縛されないが、これらの実験の結果、および上に概説した実施例の結果は、CHIR-12.12抗体が、固有の特性の組み合わせを有する二重作用(dual action)アンタゴニスト抗CD40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細胞の生き残りおよび増殖のためのCD40L媒介性のCD40シグナル伝達経路をブロックする;このアンタゴニスト性は、最終的に細胞死をもたらす。CHIR-12.12はまた、エフェクター細胞による認識および結合を媒介し、抗体依存性の細胞傷害性(ADCC)を開始する。CHIR-12.12がいったんエフェクター細胞に結合すると、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。CHIR-12.12は、より前臨床の腫瘍モデルで比較した場合、リツキシマブよりも強力な抗腫瘍抗体である。
40

【0178】

(実施例2:CHIR-5.9およびCHIR-12.12は、CD40上で15B8とは異なるエピトープに結合する)
50

候補モノクローナル抗体であるCHIR-5.9およびCHIR-12.12は、CD40への結合については互いに競合するが、15B8(IgG₂抗CD40 mAb)への結合については競合しない(国際公開第WO02/28904号を参照のこと)。Biacoreを用いた抗体の競合結合研究を、アミンカップリングによりプロテインAが固定化されたCM5バイオセンサチップを用いて設計し、このプロテインAを用いて、抗CD40、CHIR-12.12または15B8のいずれかを捕捉した。種々の濃度のCD40-hisで、標準の会合/解離結合曲線を観察する(データ示さず)。競合研究のために、CHIR-12.12または15B8のいずれかを、プロテインAの表面上で捕捉した。引き続いて、種々の濃度のCD40-his/CHIR-5.9 Fab複合体(100nM CD40:1μM CHIR-5.9 Fab)を、修飾した表面を横切って流した。CHIR-12.12の場合、複合体の会合は観察されず、CHIR-5.9が、CHIR-12.12のCD40-hisへの結合をブロックすることを示す。15B8については、Fab CHIR-5.9複合体の会合が観察され、CHIR-5.9は、15B8のCD40結合部位への結合をブロックしないことを示す。しかし、複合体が解離する速度(off rate)は、劇的に増加した(データ示さず)。

10

【0179】

15B8およびCHIR-12.12は、CD40-his結合と競合しないことがまた決定された。この実験は、プロテインAバイオセンサチップ上にCHIR-12.12を捕捉し、コントロールhIgG₁で残留のプロテインAの部位をブロックし、CD40-hisを結合させ、次いで、15B8を修飾された表面上を流すことによって構成された。15B8は、これらの条件下では結合せず、CHIR-12.12は、15B8がCD40に結合することをブロックしないことを示した。

20

【0180】

(実施例3:CHIR-12.12 mAbおよびCHIR-5.9 mAb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バイオセンサチップ上に固定化した。ヒト抗CD40モノクローナル抗体(1.5μg/ml)を、この固定化したバイオセンサの表面に10μl/mlで、1.5分間捕捉した。組換え可溶性CD40-hisを、種々の濃度で、バイオセンサの表面上に流した。抗体および抗原を、0.01M HEPES(pH7.4)、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% S

30

【0181】

以下の表2に示すように、CHIR-5.9とCHIR-12.12の解離する速度には121倍の差があり、結果として、CHIR-12.12について親和性が24倍高かった。

【0182】

【表 2】

表2. CHIR-5.9およびCHIR-12.12抗CD40抗体の結合特性のまとめ

抗体	K_a ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	k_d (sec^{-1})	KD (μM)
抗CD40, CHIR-5.9	$(12.35 \pm 0.64) \times 10^5$	$(15.0 \pm 1.3) \times 10^{-3}$	12.15 ± 0.35
抗CD40, CHIR-12.12	$(2.41 \pm 0.13) \times 10^5$	$(1.24 \pm 0.06) \times 10^{-4}$	0.51 ± 0.02

10

(実施例4:モノクローナル抗体CHIR-12.12およびモノクローナル抗体CHIR-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CHIR-12.12およびモノクローナル抗体CHIR-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およびウェスタンブロット分析を実施した。精製したCD40 ($0.5 \mu g$)を、還元条件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、 $10 \mu g/ml$ 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^R安定化基質(Promega)を用いて発色させた。

20

【0183】

結果は、抗CD40モノクローナル抗体CHIR-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3;プロットは示さず)。認識が、CD40の両方の形態について陽性であるという事実は、この抗体が、線形配列であるエピトープのコンホメーションの一部と相互作用することを示す。モノクローナル抗体CHIR-5.9は、主に、CD40の非還元型形態を認識し、この抗体が、一次コンホメーションのエピトープと相互作用することを示唆する(表3;プロットは示さず)。

30

【0184】

【表3】

表3. 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 CHIR-12.12	-	+	-	-
mAb CHIR-5.9	-	+	-	-
mAb 15B8	+	-	-	-

40

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、GP67分泌シグナルで確認した。昆虫細胞の上清を、SDS-PAGEおよびウェスタンブ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。

50

【 0 1 8 5 】

モノクローナル抗体 C H I R - 1 2 . 1 2 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 4；プロットは示さず）。対照的に、モノクローナル抗体 C H I R - 5 . 9 は、ドメイン 2 に対して、非常に弱い認識を示す（表 4；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、3 または 4 は認識しない。

【 0 1 8 6 】

【表 4】

表4. ドメイン2の分析

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

10

m A b C H I R - 1 2 . 1 2 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、ペプチドを、C D 4 0 の細胞外ドメイン 2 から合成し、これは、配列 P C G E S E F L D T W N R E T H C H Q H K Y C D P N L G L R V Q Q K G T S E T D T I C T（配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に示される配列の残基 6 1 ~ 1 0 4）に対応する。1 アミノ酸が相殺された（o f f s e t）3 5 の 1 0 マーペプチドを含む S P O T メンブレン（S i g m a）を作製した。m A b C H I R - 1 2 . 1 2 および抗ヒト I g G - ガラクトシダーゼを二次抗体として用いるウェスタンブロット分析を実施した。このプロットを、細片に分け、m A b C H I R - 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。

20

【 0 1 8 7 】

1 0 μ g / m l の抗 C D 4 0 モノクローナル抗体 C H I R 1 2 . 1 2 でプローブする S P O T 分析では、スポット 1 8 ~ 2 2 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 5 に示す。

【 0 1 8 8 】

【表 5】

表5. 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12の残基78-87)
19	QHKYCDPNLG (配列番号10または12の残基79-88)
20	HKYCDPNLGL (配列番号10または12の残基80-89)
21	KYCDPNLGLR (配列番号10または12の残基81-90)
22	YCDPNLGLRV (配列番号10または12の残基82-91)

30

40

これらの結果は、以下の線形エピトープに対応する：Y C D P N L（配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に示す配列の残基 8 2 ~ 8 7）。このエピトープは、Y 8 2、D 8 4 および N 8 6 を含み、これらは、C D 4 0 - C D 4 0 リガンドの相互作用に関与すると予測されている。

【 0 1 8 9 】

m A b C H I R - 5 . 9 を用いる S P O T 分析は、表 6 に示されるスポット 2 0 ~ 2 2 により表されるペプチドの弱い認識を示し、これは、その C D 4 0 への結合において、

50

領域 Y C D P N L G L (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。C H I R - 12 . 12 および C H I R - 5 . 9 は、B I A C O R E 分析において C D 40 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。

【0190】

【表6】

表6. 抗CD40モノクローナル抗体CHIR-5.9でプローブした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12の残基80-89)
21	KYCDPNLGLR (配列番号10または12の残基81-90)
22	YCDPNLGLRV (配列番号10または12の残基82-91)

10

S P O T 分析により同定した線形エピトープは、C D 40 B1モジュールの内部である。C D 40 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。

20

【0191】

線形エピトープ内でC H I R - 12 . 12 について同定されたのはC 83 である。このシステイン残基がC 103 とジスルフィド結合を形成することは公知である。C H I R - 12 . 12 m A b のエピトープは、このジスルフィド結合 (C 82 - C 103) および / またはC 103 にコンホメーション的に近い周囲のアミノ酸を含むようである。

【0192】

(実施例5: 自己免疫疾患および炎症性疾患モデルにおける試験)

(全身性エリテマトーデス (S L E) モデル)

C H I R - 12 . 12 を、ヒト全身性エリテマトーデス (S L E) のモデルにおいて試験する。このモデルでは、S L E 患者に由来する末梢血単核細胞 (P M B C) が、S C I D マウスに移植されている。例えば、D u c h o s a l ら (1990) J . E x p . M e d . 172 : 985 - 8 に記載されるモデルを参照のこと。

30

【0193】

S L E 患者に由来する P B M C を S C I D マウスに移した後、C H I R - 12 . 12 処置が、自家抗原に対するTリンパ球の応答、および自家抗体の産生、ならびに疾患の徴候 (例えば、糸球体腎炎) に影響を及ぼすか否かが決定される。研究の第1のセットは、C H I R - 12 . 12 を、単剤として試験し、その後、C T L A 4 - I g のような他の薬剤と組み合わせた効果を試験した。

【0194】

(多発性硬化症モデル)

マーモセットサルの実験的自己免疫性脳炎 (e x p e r i m e n t a l a u t o i m m u n e e n c e p h a l i t i s) (E A E) は、ヒト多発性硬化症のためのモデルである。例えば、R a i n e ら (1999) A n n . N e u r o l . 46 : 144 - 60 および H a r t ら (2004) L a n c e t N e u r o l . 3 : 588 - 97 に記載されるモデルを参照のこと。C H I R - 12 . 12 は、マーモセットのC D 40 に結合し、このモデルにおける効率について試験される。

40

【0195】

(炎症およびアテローム性動脈硬化症)

C H I R - 12 . 12 を、マトリクス分解酵素のC D 40 L 誘導性の産生、組織因子の発現、炎症誘発性サイトカイン、および接着分子のアップレギュレーションを阻害する能

50

力について、インビトロで試験する。その後の研究は、ヒトCD40分子を発現するトランスジェニックマウスを用いて、CHIR-12.12のインビボで抗炎症活性を示す能力を試験する。例えば、Yasui (2002) Int. Immunol. 14:319-29に記載されるモデルを参照のこと。

【0196】

(移植)

CHIR-12.12を、非ヒト霊長類モデルにおいて移植拒絶を回避する能力について試験する。カニクイザルの腎臓同種移植レシピエントを、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、コルチコステロイド、CTLA4-Igおよび抗Bリンパ球刺激抗体などのようなさらなる免疫抑制薬を伴ってか、または伴わずに、移植片に対する効果を実証するために、CHIR12.12抗体で処置する。Weeら(1992) Transplantation 53:501-7に記載されるモデルを参照のこと。

10

【0197】

(アルツハイマー病)

CHIR-12.12を、小グリア活性化をブロックする能力について、まずインビトロで試験する。CHIR-12.12によるインビボでの効率研究を、ヒトCD40を発現し、アミロイドペプチドを過剰産生する二重トランスジェニックマウスにおいて行う。例えば、Tanら(2002) Nat. Neurosci. 5:1288-93に記載されるモデルを参照のこと。

20

【0198】

(実施例6: CHIR-5.9およびCHIR-12.12を用いる臨床研究)

(臨床の目的)

全体的な目的は、細胞をアンタゴニスト性の抗CD40 IgG₁で標的化することにより、関節リウマチ(RA)のための効果的な治療を提供することである。活性のいくつかの基準が、第I相において得られ得るにもかかわらず、この疾患についてのシグナルが、第I相において決定される。最初は、薬剤を単剤として試験するが、開発が進むにつれ、他の治療剤と組み合わせられる。

【0199】

(第I相)

- ・安全性および薬物動態学を評価する - RAを有する被験体における用量の段階的拡大。
- ・安全性、許容性、およびCD40の血清マーカーにおける変化に基づいて、用量を選択する。一般に、MTDが求められるが、他の効能の指標(CD40⁺を有する細胞の枯渇など)が、用量決定に適切であり得る。
- ・2以上の用量を考える。なぜならば、第II相では、いくつかの用量決定が必須であり得るからである。
- ・患者に、毎週投薬し、リアルタイム薬物動態学(Pk)のサンプリングをする。最初の4週のサイクルは、最大投薬を可能とする。Pkは、疾患の状態、CD40の密度などに依存して大きく変動し得る。
- ・この試験は、RAを有する被験体に対して公開される。
- ・研究を中止するかまたは継続するかの決定は、安全性、用量、および治療活性の予備的な評価に基づく。
- ・応答速度により決定された薬物の活性は、第II相で決定される。
- ・第II相のための用量を特定する。

30

40

【0200】

(第II相)

1回または数回の試験を、RAを有する被験体において開始する。2以上の用量、および2以上の計画が、無作為化された第II相の設定において試験され得る。

- ・現行の標準的な医療が機能しない(非ステロイド抗炎症薬(NSAID)および疾患修飾抗リウマチ薬(DMARD; 例えば、金およびペニシラミン)による治療が機能しない) RAの集団を対象とする

50

* 研究を中止するかまたは継続するかの決定は、第ⅠⅠ相における治療概念の証明に基づく

* 臨床上的効果の早期の指標として、代理マーカーが使用され得るか否かを決定する

* 第ⅠⅠⅠ相のための用量を特定する。

【0201】

(第ⅠⅠⅠ相)

第ⅠⅠⅠ相は、第ⅠⅠ相においてシグナルがどこで検出されるか、そして、どのような競合する治療が、標準的なものと考えられるかに依存する。標準的な治療が存在しない疾患の段階にシグナルがある場合、単群の、十分に制御された研究が、中心的な治験として機能し得る。標準的であると考えられる競合薬剤が存在する場合は、直接比較する研究が行なわれる。

10

【0202】

(実施例7：アンタゴニスト抗CD40抗体のための液体薬学的処方物)

本研究の目的は、この抗体についての最適な溶液環境を選択するために、生物物理学的方法および生化学的方法の両方により、アンタゴニスト抗CD40抗体CHIR-12.12の安定性に対する溶液のpHの効果を調べることであった。示差走査熱量測定法(DSC)の結果は、CHIR-12.12のコンホメーションの安定性が、pH5.5~6.5を有する処方物において最適であることを示した。SDS-PAGE、サイズ排除HPLC(SEC-HPLC)、およびカチオン交換HPLC(CEX-HPLC)分析の組み合わせに基づくと、CHIR-12.12の物理化学的な安定性は、pH約5.0~5.5において最適である。これらの結果を鑑みて、この抗体を含有する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処方された約20mg/mlのCHIR-12.12を含有し、pH約5.5のpHを有する処方物である。

20

【0203】

(材料および方法)

処方物の研究において使用されるCHIR-12.12抗体は、CHO細胞培養手順により作製されたヒトモノクローナル抗体である。このMAbは、150kDaの分子量を有し、ジスルフィド結合により互いに連結された2つの軽鎖および2つの重鎖から構成される。この抗体は、種々の癌および自己免疫性/炎症性疾患の処置のために、CD40を発現する細胞(正常および悪性のB細胞を含む)上のCD40細胞表面レセプターに対して標的化される。

30

【0204】

この研究のために使用される抗CD40薬物原料(drug substance)は、CHOに由来する精製抗CD40(CHIR-12.12)のバルクロットであった。この薬物原料の組成は、10mMのクエン酸ナトリウム、150mMの塩化ナトリウム(pH6.5)中9.7mg/mlのCHIR-12.12抗体であった。この研究におけるコントロールサンプルは、一般に認められた薬物原料であり、その後、-60℃にて凍結し、RTで融解し、そして、所定の時点において、安定性サンプルとともに試験した。この安定性サンプルは、異なるpH溶液に対する薬物原料の透析により調製したものであり、そして、各サンプルにおけるCHIR-12.12の濃度を、表7に示すように、UV280により測定した。

40

【0205】

【表 7】

表7. CHIR-12. 12処方物

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

10

種々の処方物におけるCHIR-12.12抗体の物理化学的安定性を、以下のプロトコールを用いてアッセイした。

【0206】

(示差走査熱量測定法(DSC))

異なる処方のサンプルのコンホメーションの安定性を、1 /分で、15 から90まで加熱しながら、MicroCal VP-DSCを用いてモニターした。

【0207】

20

(SDS-PAGE)

分解(fragmentation)および凝集を、非還元条件および還元条件下で、4~20%のTris-グリシンゲルを用いて評価した。タンパク質を、Coomassieブルー染色により検出した。

【0208】

(サイズ排除クロマトグラフィー(SEC-HPLC))

タンパク質の分解および凝集をまた、0.7ml/分の流速で、100mMリン酸ナトリウム(pH7.0)を移動相として用いて、Tosoh Haas TSK-GEL 3000SWXLカラムを備えるWater Alliance HPLCにより測定した。

【0209】

30

(カチオン交換クロマトグラフィー(CEX-HPLC))

分解に関連する電荷の交換を、0.5ml/分の流速で、50mMのHEPES(pH7.3)を移動相Aとして、そして、500mMのNaClを含有する50mM HEPES(pH7.3)を移動相Bとして用いて、Dionex Propac WCX-10カラムを備える、Waters 600s HPLCシステムを使用して測定した。

【0210】

(結果および考察)

(コンホメーション安定性研究)

CHIR-12.12の熱によるアンフォールディングは、少なくとも2つの熱遷移(thermal transition)を明らかにし、おそらく、それぞれ、FabドメインおよびFcドメインのアンフォールディング融解を表す。高温では、タンパク質は、おそらく凝集して、DSCシグナルの喪失をもたらした。処方物のスクリーニングの目的で、最も低い熱遷移温度を、この研究において、融点Tmとして規定した。図5は、処方物のpHの関数としての熱融点を示す。pH5.5~6.5の処方物は、より高い熱融点により実証されるように、より高いコンホメーション安定性を有する抗CD40を提供した。

40

【0211】

(SDS-PAGE分析)

pH4.5~9.0のCHIR-12.12処方物サンプルを、40 にて2ヶ月インキュベートし、SDS-PAGE分析に供した(データ示さず)。非還元条件下では、p

50

H 5 . 5 を上回る処方物において、23 kDa および 27 kDa の分子量 (MW) を有する種が観察され、そして、全ての処方物において、51 kDa の MW を有する種が観察されたが、pH 5 . 0 ~ 5 . 5 においては少ないようであった。100 kDa の MW を有する種が、pH 7 . 5 および pH 9 . 0 において見られ得た。

【0212】

還元条件下では、CHIR - 12 . 12 は、それぞれ、50 kDa の MW および 24 kDa の MW を有する、遊離重鎖および遊離軽鎖に還元された。100 kDa の種は、完全には還元性ではなく、そして、溶液の pH の増加に伴って増加するようであり、非ジスルフィド共有結合が、この分子において生じている可能性を示唆する。SDS - PAGE において未知の正体を有する他の種が存在しなかったため、各処方物の安定性の比較は、残

10

【0213】

(SEC - HPLC 分析)

SEC - HPLC 分析は、主ピーク種としてインタクトな CHIR - 12 . 12 を、主ピーク種とは別個の前ピーク種として凝集種を、主ピーク種の後にあるショルダー状のピークとして大きなフラグメントの種を検出し、そして、小さなフラグメントの種が、主ピーク後の種として検出された。5 および 25 で3ヶ月インキュベートした後、無視できる量 (< 1 . 0 %) のタンパク質のフラグメントおよび凝集が、上記処方物中で検出され、そして、CHIR - 12 . 12 主ピーク種は、99 % 以上純粋なままであった (データ示さず)。しかし、タンパク質のフラグメントは、40 で保存すると、次第に進展し、表8に示すように、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。CHIR - 12 . 12 処方物を40 にて3ヶ月間インキュベートした後、約2 ~ 3 % の凝集が、pH 7 . 5 および pH 9 . 0 において検出されたが、他の pH の処方物においては、1 % 未満の凝集が検出された (データ示さず)。SEC - HPLC の結果は、CHIR - 12 . 12 が、pH 約 5 . 0 ~ 6 . 0 においてより安定であることを示す。

20

【0214】

【表8】

30

表8. リアルタイムおよび加速された (accelerated) 保存条件下での CHIR-12.12 安定性サンプルの SEC-HPLC による結果

サンプル	主ピーク %				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
コントロール	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

40

(CEX - HPLC 分析)

CEX - HPLC 分析は、インタクトな CHIR - 12 . 12 を主ピーク種として検出し、酸性改変体は、主ピーク種よりも速く溶出し、そして、C 末端リジン付加改変体は、主ピーク後の種として溶出した。表9は、残存する主ピーク CHIR - 12 . 12 種および酸性改変体の百分率の、溶液の pH に対する依存性を示す。コントロールサンプルは、

50

すでに、高い度合の酸性種（約 33 %）を含んでおり、おそらくこれは、初期段階での発酵および精製のプロセスに起因するものである。より高い pH 溶液に対する CHIR - 12.12 の感受性は、2 つの事実により証明される。第一に、pH 9.0（t = 0）の最初の処方物サンプルは、すでに、コントロールよりも 12 % 多い酸性種を生じていた。第二に、酸性種の百分率は、pH の増加に伴って急に増加した。電荷の変化に関連する分解は、脱アミノ化に起因するようである。上記のデータは、CHIR - 12.12 のこの型の分解が、pH 約 5.0 ~ 5.5 において最小であったことを示す。

【0215】

【表 9】

表9. リアルタイムおよび加速された保存条件下での、異なる pH 処方物における CHIR-12.12 についての CEX-HPLC によるピーク面積の百分率

サンプル	主ピーク %					酸性改変体 %				
	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
コントロール	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 のコンホメーションおよび物理化学的な安定性に有意な効果を有する。電荷の変化に関連する分解は、CHIR - 12.12 についての主な分解経路であると決定され、これは、pH 5.0 ~ 5.5 において最小であった。全体的な安定性のデータに基づいて、この抗体を含有する 1 つの推奨される液体薬学的処方物は、約 10 mM のコハク酸ナトリウム、約 150 mM の塩化ナトリウム中に処方された約 20 mg / ml の CHIR - 12.12 を含有し、pH 約 5.5 の pH を有する処方物である。

【0216】

本明細書中に示される本発明の多くの改変および他の実施形態は、上述の明細書および添付の図面に提示される教示を利用して、本発明が属する分野の当業者に想到される。従って、本発明は、開示される特定の実施形態に限定されないこと、そして、改変および他の実施形態が、添付の特許請求の範囲および本明細書中に開示される実施形態一覧の範囲内に含まれることが意図されることが理解されるべきである。特定の用語が本明細書において使用されるが、これらは、一般的かつ説明的な意味のみで使用されているのであり、制限する目的で使用されているわけではない。

【0217】

明細書中で言及された全ての刊行物および特許出願は、本発明が属する分野の当業者の技術水準を示している。全ての刊行物および特許出願は、あたかも各個々の刊行物または特許出願が、具体的かつ個別に参考として援用されることが示されるのと同じ程度まで、本明細書中に参考として援用される。

【0218】

【表 10 - 1】

出願人または代理人のファイル参照	PP23725.001	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16頁、第27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。		10
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	20
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20頁、第27行；第66頁、第4行；第87頁、第22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）		
		30
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

<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理された	
認定官	06 JAN 2005

国際事務局記入欄

<input type="checkbox"/> 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	

【表 10 - 2】

出願人または代理人のファイル参照	PP23725.001	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16頁、第28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。		10
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	20
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20頁、第27行；第66頁、第4行；第87頁、第23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）		
		30
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	
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理された	
認定官	06 JAN 2005

国際事務局記入欄	
<input type="checkbox"/> 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）

【0220】

【表 10 - 3】

ATCCバージニア 20110-2209, マナサス, ユニバーシティー プールーバード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

10

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-S542

マウス ハイブリドーマ 153.8E2D10D6.12.12: CMCC#12056

PTA-S543

20

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。

30

上記培養物の生存を2003年9月23日に試験した。その当日に、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:



日付: 2003年10月02日

マリー ハリス, ATCC特許寄託局長

cc: リサ アレキサンダー

(参照: 事件番号: P20107.001)

40

B249

Received Nov-03-03 03:20pm

From-610 923 4766

To-Intellectual Property Page 002

【図面の簡単な説明】

【0221】

【図1】図1は、mAb CHIR-12.12の軽鎖および重鎖についてのアミノ酸配列を示す。軽鎖のリーダー領域(配列番号2の残基1~20)、可変領域(配列番号2の残基21~132)および定常領域(配列番号2の残基133~239)は図1Aに示される。重鎖のリーダー領域(配列番号4の残基1~19)、可変領域(配列番号4の残基

50

10

20

20

20

20

20

【 図 2 】

FIGURE 2A

CHIR-12.12の軽鎖のDNA配列:

[illegible]

FIGURE 2B

CHTR-12.12の重鎖のDNA配列(イントロンを含む):

5'atgaggttggcgtgacgtcgggtttccctgtgcttattaaagagctgctcaggttcaggtgcaggtggtggtgagctgggggagcgt
gggtcgacgtgggtgagctcctgacgtctctgtcgaacctgtgttaccatgtgtatgctagctgacgtgacgtgctccgacgtc
ggcagcgggggtgggtggtggtggtggtgacgtgattatagcgaagaaataatgatactgacgtggaagcgtgcgtgacatca
tccagacgaacattcagatgacgtgctgtatcgcgaattgaagacgcagatgagggacacggctgtgttacttactgctggagagt
gggtgtatgacgacacgtgcgctgtaactctggcgtggaagacctgtctacccgtctctcagatgtaacgaagggccatcc
gttccctccgtccgcgtcgtacgaagcagacgtctggggcagacggccctgggtgctggttcgaagcagatctcccgaaacg
tgacgtgcttggggacacgtggcgccgtgcagcggctggcgacaaactcccgctgtactaagcttctcaggactcaactctcc
gttggctgtgctgctgcgtccctcagcagctgggtcggcaccagacatcatctgacgtgcatgacacgcacccagacacgtgg
caagagaggtgttggcggcgcacgacgagcgggggtgtctgtggaagcagcgtcagcgtctcagctcagctgacgtccgac
gctatgacgtccctcagcggcagcgaagcggccctgtcgtcttccacggcgctcgtgccgcgcacatcatgtcagg
gtggcgtgtctgtgttttccacagcttggggcagcgaagctggtgtggtccctacgtgcccctacgtgacacaaagggcagc
gtgggtccagctgacgtgcgaagcagccatctcgggagagacgtgcccctgactaaagccacccccaaggccgaacatctccac
tctgcgttcgacacgtctctccagactcagatctcagatcccaactctctctctcgaagcccaatctgtgacaaacatcacatc
ccacgtgcccagtgaaagcagccacggctcctccctccagctcaagcggggagcgtgctcagatgacgtcgtcgtcagcagac
agcccccagccgggtgtgacgtctccacgtccatctcttccagacatgactgtctggggagcagtgatctctctccccc
aaaacccagccacacccatcagctcctccacccctgaggttcacgtcagctggtctggagcgtgagccacgaagcctgagctca
gtttcaactgtgtgtggcagcgggtggtggtgactaaagtcgaacacaaaagccggggagagctgacacacagcagctggt
ggttcagcgtccctcagctctgcagcaggaagctgctgaaaggcaggaagtacagatcagctgacgttccaaagccctccaccc
cctcagagaacaaacatccaaagcgaaggtggcggcagcgggtgggtggggccatcagacagaggtgctgctgccaccc
tctcgtcagtagtgacgtctgaccacagctgtctccatcagccgcccgccagacacagagcttaccctgtgccctccctcc
gagagagatgacacgaacagcgtcagcgtcagctgtcttcaagacgttctccagcagatcctggcgggtggtggagagaga
ggcggcggcggcggacacacaaacacaaacagcgtccctgtgtgctcagcgtctctctctatagacacacacgtgac
gaagcagcaggtgtgacggcggagcagcgtcttctcgtcctcgtgatcgtagcgtctgcaacacacacacacgagagacgtcc
ctctctcctccgaatga3'

FIGURE 2B

CHTR-12.12の重鎖のDNA配列(イントロンを含む):

[illegible]

【図 3】

FIGURE 3A

CHIR-5.9 軽鎖：

リーダー：

MALLAQLLGLLMLWVPGSSG

可変：

AIVMTQPPPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWLQQRPGQPPRLLIYKFFRRLSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCMQVTQFPHTFGQSTRLEIK

定常：

RTVAAPSVFIFPPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURE 3B

CHIR-5.9 重鎖：

リーダー：

MGSTAILALLLAVLQGVCA

可変：

EVQLVQSGAEVKKPESGLKISKKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMMGIYPGDSDTTRYSP
SFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTHAMYYCARGTAAGRDIYIYGMVWGQGTITVTVSS

定常：

ASTKGPSPVFLPASPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTFLVHQLDNLNGKEYKCKVSKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSRREMTKNQVSL
TCLVKGFTYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNNHYTKSLSLSPGK

代替定常領域：

ASTKGPSPVFLPASPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTFLVHQLDNLNGKEYKCKVSKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSRREMTKNQVSL
TCLVKGFTYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNNHYTKSLSLSPGK

【図 4 - 1】

FIGURE 4A

ヒトCD40の短いアイソフォームについてのコード配列：

```
1 atgggtcgtc tgccctgcga gtgcgtccfc tggggctgct tgctgaccgc tgtccatcca
61 gaaccaccca ctgcctgcag agaaaaacag tacctaataa acagtacgtg ctgttcttgg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcactgaac ggaatgcttt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggacacag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggcctggcac tftacagagt aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctgccc cggcttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tftcatctgc ttctgaanaa
481 tftcaccctt ggacaaggtc cccaggatcg gctgagagcc ctggtgtgtga tcccctcat
541 ctccgggcat ctgtttgcca tctcttgggt gctgtcttt atcaaaaagg tggccaagaa
601 gccaaccaat aa
```

FIGURE 4B

ヒトCD40のコードされた短いアイソフォーム：

```
1 mvrplqcvl wgciltavhp epptacrekq ylnsqccsl cpggqklvsd cteftetecl
61 pcgesefldt wnrethchqh kyedpnlgtr vqkgtsed tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgr fsnvssafek chpwtrspgs aespqgdphh
181 lrdpvchplg aglyqkggqe anq
```

【図 4 - 2】

FIGURE 4C

ヒトCD40の長いアイソフォームについてのコード配列：

```
1 atgggtcgtc tgccctgcga gtgcgtccfc tggggctgct tgctgaccgc tgtccatcca
61 gaaccaccca ctgcctgcag agaaaaacag tacctaataa acagtacgtg ctgttcttgg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcactgaac ggaatgcttt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggacacag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggcctggcac tftacagagt aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctgccc cggcttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tftcatctgc ttctgaanaa
481 tftcaccctt ggacaaggtg ttagaccaaa gaactgggtg tgcacacagg aggcacaaac
541 aagactgatg ttgtgtgtgg tcccaggat cggctgagag cccgtgtgtg gatcccatc
601 atctcgggga tctgttttgc catctctgt gtcgtgtct ttatcaaaa gctggcacaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccaccccaag caggaaaccc aggalcalaa ttitcccgac
721 gatcttctgt gctccaacac tctgtctcca gtgcaggaga ctttcatgg atgccaacog
781 gtcacccagg aggatggcaa agagagtcgc atctcagtcg aggagagaca gtga
```

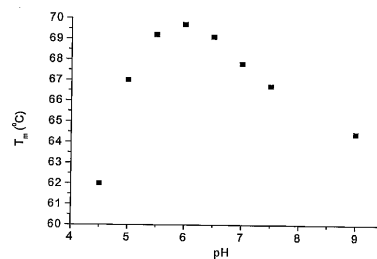
FIGURE 4D

ヒトCD40のコードされた長いアイソフォーム：

```
1 mvrplqcvl wgciltavhp epptacrekq ylnsqccsl cpggqklvsd cteftetecl
61 pcgesefldt wnrethchqh kyedpnlgtr vqkgtsed tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgr fsnvssafek chpwtsctek dlrvvqqagtn
181 ktdvvcgpd rlravvipi ifglfaill vlvfklvak kptnkaphpk qepqeinfpd
241 dlpgsntaap vqethgcqp vltgdgksr isvqerq
```

【図 5】

FIGURE 5



【配列表】

0004746552000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	19/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/06	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	9/14	(2006.01)	A 6 1 P	9/14	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	7/02	(2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	

(31)優先権主張番号 60/565,710

(32)優先日 平成16年4月27日(2004.4.27)

(33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-5542

微生物の受託番号 ATCC PTA-5543

(72)発明者 ロン, リ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, カイロン コーポレーション

(72)発明者 ルクマン, モハンマド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, カイロン コーポレーション

(72)発明者 ヤバンナバー, アシャ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, カイロン コーポレーション

(72)発明者 ザロー, イザベル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, カイロン コーポレーション

審査官 安居 拓哉

(56)参考文献 国際公開第03/045978(WO, A1)

国際公開第99/042075(WO, A1)

国際公開第02/088186(WO, A1)

国際公開第01/083755(WO, A1)

Boon, L. et al., Journal of Immunology, 2001年, Vol.167, No.5, pp.2942-2949

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/395

C07K 16/00-46

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

UniProt/GeneSeq