

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4765038号
(P4765038)

(45) 発行日 平成23年9月7日 (2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月24日 (2011.6.24)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 Z N A T

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

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

請求項の数 41 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-538511 (P2006-538511)
 (86) (22) 出願日 平成16年11月4日 (2004.11.4)
 (65) 公表番号 特表2007-526908 (P2007-526908A)
 (43) 公表日 平成19年9月20日 (2007.9.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/036955
 (87) 国際公開番号 W02005/044305
 (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
 (73) 特許権者 506233391
 ゴーマ テクノロジー リミテッド
 イギリス領バミューダ エイチエム11
 ハミルトン、チャーチ ストリート 2
 , クラレンドン ハウス
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD4 O細胞表面抗原を発現する固形腫瘍の治療方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

CD4 O 抗原を発現する癌細胞を含む固形腫瘍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、該CD4 O 抗原に特異的に結合し得るヒト抗CD4 O 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、CD4 O 抗原に結合した場合に有意なアゴニスト活性を有さず、該抗体は、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ることができ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ることができ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CD4 O 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CD4 O 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；および

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ることができる該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ることができる該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と競合するモノクローナル抗体；

10

20

からなる群より選択される、組成物。

【請求項 2】

C D 4 0 抗原を発現する癌細胞を含む固形腫瘍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、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、C D 4 0 抗原に結合した場合に有意なアゴニスト活性を有さず、該抗体は、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ることができ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ることができ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；および

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ることができる該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ることができる該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と競合するモノクローナル抗体；

からなる群より選択される、使用。

【請求項 3】

C D 4 0 抗原を発現する癌細胞を含む固形腫瘍の増殖を阻害するための組成物であって、該組成物は、該 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を含み、該モノクローナル抗体は、C D 4 0 抗原に結合した場合に有意なアゴニスト活性を有さず、該抗体は、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ることができ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ることができ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；および

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ることができる該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ることができる該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と競合するモノクローナル抗体；

からなる群より選択される、組成物。

【請求項 4】

C D 4 0 抗原を発現する癌細胞を含む固形腫瘍の増殖を阻害するための医薬の製造における、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、C D 4 0 抗原に結合した場合に有意なアゴニスト活性を有さず、該抗体は、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ることができ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ることができ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 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；および

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ることができる該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ることができる該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と競合するモノクローナル抗体；

からなる群より選択される、使用。

【請求項 5】

CD40 抗原を発現する癌細胞を含む固形腫瘍の増殖を阻害するインビトロでの方法であって、該方法は、該細胞と、該 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とを接触させる工程を包含し、該モノクローナル抗体は、CD40 抗原に結合した場合に有意なアゴニスト活性を有さず、該抗体は、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ることができ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ることができ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；および

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ることができる該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ることができる該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と競合するモノクローナル抗体；

からなる群より選択される、方法。

【請求項 6】

前記抗体が、

i) 配列番号 2 の残基 44-54、70-76、および 109-117 を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 4 の残基 50-54、69-84、および 114-121 を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体；

ii) 配列番号 2 の残基 44-54、70-76、および 109-117 を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 5 の残基 50-54、69-84、および 114-121 を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体；

iii) 配列番号 6 の残基 44-54、70-76、および 109-117 を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 7 の残基 50-54、69-84、および 114-121 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

iv) 配列番号 6 の残基 44-54、70-76、および 109-117 を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 8 の残基 50-54、69-84、および 114-121 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、または

i) 配列番号 2 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 4 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；

ii) 配列番号 2 の残基 46-52、70-72、および 111-116 を含む軽鎖可変

10

20

30

40

50

ドメインと、配列番号5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；

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；および

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

からなる群より選択されるモノクローナル抗体である、請求項1または3に記載の組成物。

10

【請求項7】

前記抗体が、

i) 配列番号2の残基44-54、70-76、および109-117を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号4の残基50-54、69-84、および114-121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44-54、70-76、および109-117を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号5の残基50-54、69-84、および114-121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44-54、70-76、および109-117を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号7の残基50-54、69-84、および114-121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

20

i v) 配列番号6の残基44-54、70-76、および109-117を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号8の残基50-54、69-84、および114-121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、または

i) 配列番号2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4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；

i i) 配列番号2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5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；

30

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；および

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

からなる群より選択されるモノクローナル抗体である、請求項2または4に記載の使用。

【請求項8】

前記抗体が、

40

i) 配列番号2の残基44-54、70-76、および109-117を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号4の残基50-54、69-84、および114-121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44-54、70-76、および109-117を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号5の残基50-54、69-84、および114-121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44-54、70-76、および109-117を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号7の残基50-54、69-84、および114-121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の残基44-54、70-76、および109-117を含む軽鎖可変

50

ドメインと、配列番号 8 の残基 50-54、69-84、および 114-121 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、または

i) 配列番号 2 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 4 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；

i i) 配列番号 2 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 5 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；

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；および

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

からなる群より選択されるモノクローナル抗体である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体が、

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；および

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、請求項 1 または 3 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記抗体が、

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；および

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、請求項 2 または 4 に記載の使用。

【請求項 11】

前記抗体が、

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；および

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、請求項 5 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

前記抗体が、

- i) 配列番号 2 の残基 2 1－1 3 2 と、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 と、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 と、配列番号 5 の残基 2 0－4 6 9；
- i v) 配列番号 2 と配列番号 4；および
- v) 配列番号 2 と配列番号 5

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体である、請求項 6 または 9 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

前記抗体が、

- i) 配列番号 2 の残基 2 1－1 3 2 と、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 と、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 と、配列番号 5 の残基 2 0－4 6 9；
- i v) 配列番号 2 と配列番号 4；および
- v) 配列番号 2 と配列番号 5

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体である、請求項 7 または 1 0 に記載の使用。

【請求項 1 4】

前記抗体が、

- i) 配列番号 2 の残基 2 1－1 3 2 と、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 と、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 と、配列番号 5 の残基 2 0－4 6 9；
- i v) 配列番号 2 と配列番号 4；および
- v) 配列番号 2 と配列番号 5

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体である、請求項 8 または 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記抗体が、

- i) 配列番号 6 の残基 2 1－1 3 2 と、配列番号 7 の残基 2 0－1 4 4；
- i i) 配列番号 6 の残基 2 1－2 3 9 と、配列番号 7 の残基 2 0－4 7 4；
- i i i) 配列番号 6 の残基 2 1－2 3 9 と、配列番号 8 の残基 2 0－4 7 4；
- i v) 配列番号 6 と配列番号 7；および
- v) 配列番号 6 と配列番号 8

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体である、請求項 6 または 9 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記抗体が、

- i) 配列番号 6 の残基 2 1－1 3 2 と、配列番号 7 の残基 2 0－1 4 4；
- i i) 配列番号 6 の残基 2 1－2 3 9 と、配列番号 7 の残基 2 0－4 7 4；
- i i i) 配列番号 6 の残基 2 1－2 3 9 と、配列番号 8 の残基 2 0－4 7 4；
- i v) 配列番号 6 と配列番号 7；および
- v) 配列番号 6 と配列番号 8

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体である、請求項 7 または 1 0 に記載の使用。

【請求項 1 7】

前記抗体が、

- i) 配列番号 6 の残基 2 1－1 3 2 と、配列番号 7 の残基 2 0－1 4 4；
- i i) 配列番号 6 の残基 2 1－2 3 9 と、配列番号 7 の残基 2 0－4 7 4；
- i i i) 配列番号 6 の残基 2 1－2 3 9 と、配列番号 8 の残基 2 0－4 7 4；

10

20

30

40

50

i v) 配列番号 6 と配列番号 7 ; および

v) 配列番号 6 と配列番号 8

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体である、請求項 8 または 11 に記載の方法。

【請求項 18】

前記抗体が、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によって産生される抗体 C H I R - 5 . 9、および特許受託番号 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によって産生される抗体 C H I R - 1 2 . 1 2 からなる群より選択される、請求項 1、3、6、9、12 および 15 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 19】

前記抗体が、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によって産生される抗体 C H I R - 5 . 9、および特許受託番号 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によって産生される抗体 C H I R - 1 2 . 1 2 からなる群より選択される、請求項 2、4、7、10、13 および 16 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 20】

前記抗体が、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によって産生される抗体 C H I R - 5 . 9、および特許受託番号 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によって産生される抗体 C H I R - 1 2 . 1 2 からなる群より選択される、請求項 5、8、11、14 および 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記モノクローナル抗体が、少なくとも 10^{-6} M の親和性 (K_D) で前記ヒト C D 4 0 抗原に結合する、請求項 1、3、6、9、12、15 および 18 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 22】

前記モノクローナル抗体が、少なくとも 10^{-6} M の親和性 (K_D) で前記ヒト C D 4 0 抗原に結合する、請求項 2、4、7、10、13、16 および 19 のいずれか 1 項に記載の使用。

30

【請求項 23】

前記モノクローナル抗体が、少なくとも 10^{-6} M の親和性 (K_D) で前記ヒト C D 4 0 抗原に結合する、請求項 5、8、11、14、17 および 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記モノクローナル抗体が、少なくとも 10^{-8} M の親和性 (K_D) で前記ヒト C D 4 0 抗原に結合する、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記モノクローナル抗体が、少なくとも 10^{-8} M の親和性 (K_D) で前記ヒト C D 4 0 抗原に結合する、請求項 22 に記載の使用。

40

【請求項 26】

前記モノクローナル抗体が、少なくとも 10^{-8} M の親和性 (K_D) で前記ヒト C D 4 0 抗原に結合する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

前記モノクローナル抗体が、前記抗 C D 4 0 モノクローナル抗体の抗原結合フラグメントであって、該フラグメントは前記ヒト C D 4 0 抗原に特異的に結合する能力を保持している、請求項 1、3、6、9、12、および 15 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 28】

前記モノクローナル抗体が、前記抗 C D 4 0 モノクローナル抗体の抗原結合フラグメントであって、該フラグメントは前記ヒト C D 4 0 抗原に特異的に結合する能力を保持してい

50

る、請求項 2、4、7、10、13、および 16 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 29】

前記モノクローナル抗体が、前記抗 CD40 モノクローナル抗体の抗原結合フラグメントであって、該フラグメントは前記ヒト CD40 抗原に特異的に結合する能力を保持している、請求項 5、8、11、14、および 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

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 27 に記載の組成物。

【請求項 31】

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 28 に記載の使用。

【請求項 32】

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 29 に記載の方法。

【請求項 33】

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、3、6、9、12、15、18、21、24、27、および 30 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【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 2、4、7、10、13、16、19、22、25、28、および 31 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 35】

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 5、8、11、14、17、20、23、26、29、および 32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 36】

前記固形腫瘍が、肺癌、乳癌、卵巣癌、皮膚癌、結腸癌、膀胱癌、肝臓癌、胃癌、前立腺癌、腎細胞癌、鼻咽腔癌、扁平上皮癌、甲状腺乳頭状癌、子宮頸癌および肉腫からなる群より選択される、請求項 1、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、および 33 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 37】

外科手術、放射線治療、化学療法、サイトカイン治療および前記固形腫瘍の処置での使用を目的とする他のモノクローナル抗体からなる群より選択される少なくとも 1 つの他の癌治療プロトコルが行われることをさらに特徴とする、請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記固形腫瘍が、肺癌、乳癌、卵巣癌、皮膚癌、結腸癌、膀胱癌、肝臓癌、胃癌、前立腺癌、腎細胞癌、鼻咽腔癌、扁平上皮癌、甲状腺乳頭状癌、子宮頸癌および肉腫からなる群より選択される、請求項 2、4、7、10、13、16、19、22、25、28、31、および 34 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 39】

外科手術、放射線治療、化学療法、サイトカイン治療および前記固形腫瘍の処置での使用を目的とする他のモノクローナル抗体からなる群より選択される少なくとも 1 つの他の癌治療プロトコルが行われることをさらに特徴とする、請求項 38 に記載の使用。

【請求項 40】

前記固形腫瘍が、肺癌、乳癌、卵巣癌、皮膚癌、結腸癌、膀胱癌、肝臓癌、胃癌、前立腺癌、腎細胞癌、鼻咽腔癌、扁平上皮癌、甲状腺乳頭状癌、子宮頸癌および肉腫からなる群より選択される、請求項 5、8、11、14、17、20、23、26、29、32、および 35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

外科手術、放射線治療、化学療法、サイトカイン治療および前記固形腫瘍の処置での使用を目的とする他のモノクローナル抗体からなる群より選択される少なくとも 1 つの他の癌

10

20

30

40

50

治療プロトコルが行われることをさらに特徴とする、請求項40に記載の方法。

【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ヒト抗体を使用する、固形腫瘍についての治療方法に関し、ここで、この固形腫瘍は、CD40細胞表面抗原を発現する癌細胞を含む。

【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細胞の両方、樹状細胞、抗原提示細胞(APC)、内皮細胞、単球細胞および、上皮細胞、いくつかの上皮癌、ならびに多くの固形腫瘍(肺癌、乳癌、卵巣癌、および結腸癌を含む)の表面上に存在する55kDaの細胞表面抗原である。軽度および重度のB細胞リンパ腫、B細胞急性リンパ芽球白血病、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病、およびホジキン病を有する患者由来の変換された細胞は、CD40を発現する。CD40発現はまた、急性骨髄腫白血病的症例の3分の2において、そしてAIDS関連リンパ腫の50%において検出される。B細胞系列のいくつかの腫瘍由来の悪性B細胞は、多量のCD40を発現し、そして生存および増殖のためのCD40シグナル伝達に依存するようである。CD40を発現する癌としては、膀胱癌(非特許文献1;非特許文献2)、乳癌(非特許文献3;非特許文献4);前立腺癌(非特許文献5)、腎細胞癌(非特許文献6)、未分化鼻咽腔癌(UNPC)(非特許文献7)、扁平上皮癌(SCC)(非特許文献8;非特許文献9)、甲状腺乳頭状癌(非特許文献10)、皮膚悪性骨髄腫(非特許文献11)、多発性骨髄腫(非特許文献12)、ホジキン細胞およびリードスターンバーク細胞(初回抗原刺激を与えた細胞)(非特許文献13)、胃癌(非特許文献14)、肉種(例えば、ヒト骨肉種およびユーイング肉腫を考察している非特許文献15を参照のこと)、および肝臓癌(例えば、ヒト肝細胞癌を考察している非特許文献16を参照のこと)が挙げられる。

【0003】

CD40抗原は、ヒト神経発育因子(NGF)レセプター、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)レセプター、およびFasに関連し、このことは、CD40が、B細胞の活性化において重要な機能を有するリガンドに対するレセプターであることを示唆する。それは、正常なB細胞の発生および機能において重大な役割を果たすことが示されてきた。APC上のCD40発現は、Tヘルパーと細胞傷害性Tリンパ球との両方の活性化において重要な同時刺激性の役割を果たす。このCD40レセプターは、活性化T細胞、活性化血小板、および炎症をおこした血管平滑筋細胞で発現される。CD40レセプターはまた、好酸球、関節リウマチにおける滑膜、皮膚繊維芽細胞、および他の非リンパ系細胞型に見出され得る。CD40レセプターへのCD40Lの結合は、B細胞の増殖および分化、抗体産生、アイソタイプ変換、およびB細胞記憶生成を刺激する。いくつかの癌細胞は、高レベルのCD40発現を表すが、これらの癌細胞上のCD40発現との関係におけるCD40シグナル伝達の役割は、十分に理解されていない。

【非特許文献1】Pauliera、「J. Immunol.」1989年、142号、p. 590-595

【非特許文献2】Braesch-Andersen et al.「J. Immunol.」1989年、142号、p. 562-567

【非特許文献3】Hiranoら、「Blood」1999年、93号、p. 2999-3007

【非特許文献4】Wingettら、「Breast Cancer Res. Treat.」1998年、50号、p. 27-36

【非特許文献5】Rokhlinら、「Cancer Res.」1997年、57号、p. 1758-1768

【非特許文献6】Kluthら、「Cancer Res.」1997年、57号、p. 891-899

【非特許文献7】Agathangelouら、「Am. J. Pathol.」1995年、147号、p. 1152-1160

【非特許文献8】Amorら、「Eur. J. Dermatol.」2000年、10号、p. 438-442

【非特許文献9】Posnerら、「Clin. Cancer Res.」1999年、5号、p. 2261-2270

【非特許文献10】Smithら、「Thyroid」1999年、9号、p. 749-755

10

【非特許文献11】van den Oordら、「Am. J. Pathol.」1996年、149号、p. 1953-1961

【非特許文献12】Maloneyら、「Semin. Hematol.」1999年、36号(1補遺3)、p. 30-33

【非特許文献13】Grussら、「Blood」1994年、84号、p. 2305-2314

【非特許文献14】Yamaguchiら、「Int. J. Oncol.」2003年、23巻、6号、p. 1697-702

【非特許文献15】Lolliniら、「Clin. Cancer Res.」1998年、4巻、8号、p. 1843-849

20

【非特許文献16】Sugimotoら、「Hepatology」1999年、30巻、4号、p. 920-26

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

大部分の癌の症例は、いわゆる固形腫瘍によって代表される。それらの高い発生率を考えると、これらの癌を処置するための方法が必要とされる。

【課題を解決するための手段】

【0005】

(発明の要旨)

30

固形腫瘍について被験体を処置するための方法が提供され、ここで、この固形腫瘍の癌細胞は、CD40細胞表面抗原を発現する。この方法は、ヒトCD40発現細胞上のCD40抗原に結合する場合に、有意なアゴニスト活性を有さない、アンタゴニスト抗CD40モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントで、被験体を処置する工程を包含する。このアンタゴニスト抗CD40モノクローナル抗体(またはそのアンタゴニスト抗CD40抗体のFc部分を含むその適切な抗原結合フラグメント)の、癌細胞上に発現するCD40抗原への結合は、これらの癌細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)依存性の死滅をもたらす。いくつかの実施形態において、このアンタゴニスト抗CD40抗体は、1つ以上の他の癌治療プロトコルと組み合わせて投与され、他の癌治療プロトコルとしては、外科手術、放射線治療、化学療法、サイトカイン治療、または固形腫瘍の処置での使用を目的とする他のモノクローナル抗体が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の方法によって処置され得るかまたは予防され得る固形腫瘍としては、卵巣癌、肺癌(例えば、扁平上皮癌の非小細胞肺癌、腺癌、および大細胞癌型、および小細胞肺癌)、乳癌、結腸癌、腎臓癌(例えば、腎細胞癌が挙げられる)、膀胱癌、肝臓癌(例えば、肝細胞癌が挙げられる)、胃癌、子宮頸癌、前立腺癌、鼻咽腔癌、甲状腺癌(例えば、甲状腺乳頭状癌)、および皮膚癌(例えば、黒色腫)、および肉腫(例えば、骨肉腫およびユーイング肉腫)が挙げられるが、これらに限定されない。CD40発現癌細胞を含む固形腫瘍の成長を阻害するための方法もまた、提供される。

40

【0006】

本発明の方法での使用に適切な抗体は、本明細書において記載されるモノクローナル抗

50

体を含み、この抗体は、CD40に対する強い親和性を有し、そして少なくとも 10^{-6} M、好ましくは少なくとも約 10^{-7} M～約 10^{-8} M、より好ましくは少なくとも約 10^{-8} M～約 10^{-12} Mの解離平衡定数によって特徴付けられる。本発明の方法での使用に適切な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（特に、固形腫瘍のヒト癌細胞）の表面上に発現されるヒトCD40抗原に特異的に結合し得る。CD40を発現する正常なヒトB細胞および腫瘍性のヒトB細胞について実証されたように、これらは、有意なアゴニスト活性を有さないが、ヒト細胞のCD40抗原に結合する場合、アンタゴニスト活性を表す。適切なモノクローナル抗体は、ヒト定常領域を有する；好ましくは、これらはまた、完全なまたは部分的なヒト化フレームワーク領域を有する；そして、最も好ましくは、完全なヒト抗体であるか、またはその抗原結合フラグメントである。

10

【0007】

そのようなモノクローナル抗体の例としては、本明細書中でCHIR-5.9およびCHIR-12.12と命名され、組換え産生され得る抗体；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）から産生されるモノクローナル抗体；配列番号6に示される配列、配列番号7に示される配列、配列番号8に示される配列、配列番号6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；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；配列番号1に示される配列、配列番号3に示される配列、および配列番号1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ヌクレオチド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；ならびに、これらのモノクローナル抗体の抗原結合フラグメントであって、ヒトCD40に特異的に結合する能力を保持し、そしてCD40を発現する正常なヒトB細胞および腫瘍性のヒトB細胞について実証されたように、有意なアゴニスト活性を有さないが、ヒト細胞のCD40抗原に結合する場合、アンタゴニスト活性を表す、上記モノクローナル抗体の抗原結合フラグメントがある。そのようなモノクローナル抗体の例としてはまた、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またはハイブリドーマ細胞株5.9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；配列番号10または配列番号12に示されるアミノ酸配列の残基82～87を含むエピトープに結合するモノクローナル抗体；競合結合アッセイにおいてモノクローナル抗体CHIR-12.12またはCHIR-5.9と競合するモノクローナル抗体；ならびに、モノクローナル抗体CHIR-12.12または任意の前述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、ここで、このフラグメントは、ヒトCD40抗原に特異的に結合する能力を保持し、そしてCD40を発現する正常なヒトB細胞および腫瘍性のヒトB細胞について実証されたように、この抗原に結合する場合、アンタゴニスト活性を表す、モノクローナル抗体が挙げられる。

20

30

40

【0008】

本発明の1つの実施形態において、処置方法は、適切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有する、薬学的組成物の治療有効用量を、患者に投与する工程を包含する。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の範囲内である。処置方法が、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の治療有効用量の単回投与またはアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原

50

結合フラグメントの治療有効用量の複数回投与を含み得ることが認識される。

【0009】

本発明の方法での使用に適切であると本明細書において同定されたアンタゴニスト抗CD40抗体は、改変され得る。これらのアンタゴニスト抗CD40抗体の改変体としては、免疫学的に活性なキメラ抗CD40抗体、ヒト化抗CD40抗体、および免疫学的に活性なマウス抗CD40抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

(発明の詳細な説明)

本明細書において使用される場合、「腫瘍」とは、悪性であろうとまたは良性であろうと、全ての新生細胞成長および増殖、ならびに全ての前癌細胞、全癌組織および癌細胞、癌組織をいう。用語「固形腫瘍」とは、血液、骨髄、およびリンパ系以外の体組織の癌または癌腫をいう。

10

【0011】

用語「癌」および「癌の」とは、代表的に調節されない細胞成長によって特徴付けられる哺乳動物における生理学的条件をいうかまたはそれを示す。固形腫瘍として分類される癌の例としては、肺癌、乳癌、卵巣癌、結腸癌、肝臓癌、胃癌、前立腺癌、および皮膚癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0012】

「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。

20

【0013】

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(dibody))および上記のものを含む組換えペプチドを包含する。

【0014】

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。

30

【0015】

「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(intrachain)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。

40

【0016】

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βシート配置を

50

とり、 β シート構造に結合する（場合によっては β シート構造の一部分を形成する）ループを形成する3つのCDRによって結合される。各々の鎖におけるCDRは、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（Kabatra（1991）NIH Publ. No. 91-3242, Vol. 1, 647-669頁を参照のこと）。

【0017】

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。

【0018】

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）；Kabatra（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest（第5版、Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD））ならびに／あるいは「超可変ループ」に由来するアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメインにおける残基26～32（L1）、残基50～52（L2）および残基91～96（L3）、ならびに重鎖可変ドメインにおける残基26～32（H1）、残基53～55（H2）および残基96～101（H3）；ClothiaおよびLesk（1987）J. Mol. Biol. 196:901-917）を含む。「フレームワーク」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。

【0019】

「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。

【0020】

「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。

【0021】

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（C_H1）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

10

20

30

40

50

む重鎖 C_H1 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 F a b ' フラグメントと異なる。F a b ' - S H 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 F a b ' についての呼称である。F (a b ')² 抗体フラグメントは、もともと、それらの間にヒンジシステインを有する 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。

【0022】

任意の脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、2つの明らかに異なる型（カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる）の一方に割り当てられ得る。

【0023】

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。

【0024】

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。

【0025】

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。

【0026】

「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、pH 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。

【0027】

「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

10

20

30

40

50

図的な変異に起因して、形態またはゲノムもしくは全DNA相補体において元の親と必ずしも完全に同一でなくてもよいことが理解される。

【0028】

「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FcγRIII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

10

【0029】

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(γレセプター)であり、FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIII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選択的スプライス形態を含む)が挙げられる。FcγRIIレセプターとしてはFcγRIIA(「活性化レセプター」)およびFcγRIIB(「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FcγRIIA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FcγRIIB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(Daer

20

30

【0030】

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. Methods 100:5-40)。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、SV40の大きな腫瘍性タンパク質およびH-rasの発癌性対立遺伝子とともにテロメラ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)Nature 400:464-468)。現在、免疫の際に内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)Nature 362:255-258; 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. Methods

40

50

231:11-23; Tomizukaら(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727; Littleら(2000) Immunol. Today 21:364-370に概説される)。例えば、キメラマウスおよび生殖細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内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(Jakovovits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(Jakovovits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、内因性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1,020kbのヒト重鎖遺伝子座を含み、また、32のV_κ遺伝子、J_κセグメントおよびC_κ遺伝子を含む800kbのヒトκ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内因性セグメントにおける欠失に起因して、内因性抗体よりも優先的に発現される。このようなマウスは、特定の目的の抗原で免疫され得る。

【0031】

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、骨髄腫細胞に融合されて上で詳述されるようなハイブリドーマを生成し得る。

【0032】

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。

【0033】

本発明は、CD40発現癌細胞を含む固形腫瘍を有するヒト被験体を処置するための方法に関し、このCD40発現癌細胞としては、卵巣癌、肺癌(例えば、扁平上皮癌の非小細胞肺癌、腺癌、および大細胞癌型、および小細胞肺癌)、乳癌、結腸癌、腎臓癌(例えば、腎細胞癌が挙げられる)、膀胱癌、肝臓癌(例えば、肝細胞癌が挙げられる)、胃癌、子宮頸癌、前立腺癌、鼻咽腔癌、甲状腺癌(例えば、甲状腺乳頭状癌)、および皮膚癌(例えば、黒色腫)、および肉種(例えば、骨肉腫およびユーイング肉腫)が挙げられるが、これらに限定されない。この方法は、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を用いる処置に関し、ここで、こ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ている被験体内の正の治療応答を促進する。本発明の方法での使用に適切な抗CD40抗体は、ヒト癌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、CD40を発現する正常なヒトB細胞および腫瘍性のヒトB細胞について実証されたように、これらは、ヒトCD40発現細胞上のCD40抗原に結合する場合、アンタゴニスト活性を表す。これらの抗CD40抗体およびその抗原結合フラグメントは、本明細書においてアンタゴニスト抗CD40抗体と呼ばれる。そのような抗体としては、以下に記載される完全なヒトモノク

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CHIR-12.12の結合特徴を有するモノクローナル抗体が挙げられるが、これらに限定されない。組換え産生され得るこれらのモノクローナル抗体は、以下に記載され、そして、それぞれ、2003年11月4日、2003年11月26日、および2004年4月27日に出願され、そして、米国特許出願番号第60/517,337号（代理人事件番号第PP20107.001号（035784/258442））、同第60/525,579号（代理人事件番号第PP20107.002号（035784/271525））、および同第60/565,710号（代理人事件番号第PP20107.003号（035784/277214））として割り当てられた、発明の名称「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」である、同時係属中の仮出願中に開示される。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。

10

【0034】

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への結合を競合的に妨害し、そして／またはCHIR-5.9およびCHIR-12.12と同じエピトープに結合する抗体が挙げられる。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。

【0035】

20

これらの抗体が、固形腫瘍のCD40発現細胞（本明細書においてCD40発現癌細胞とも呼ばれる）の表面上に示されるCD40に結合する場合、この抗体は、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、CD40発現癌細胞の表面上に示されたCD40へのそれらの結合は、これらの癌細胞のADCC依存性の死滅をもたらし、それゆえ、腫瘍容積の減少をもたらす。したがって、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を発現する正常なヒトB細胞および腫瘍性のヒトB細胞について実証されたように、細胞表面CD40抗原を発現するヒト細胞に対してアンタゴニスト活性を表し得るモノクローナル抗体を含む。

【0036】

（アンタゴニスト抗CD40抗体）

30

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κ鎖遺伝子座を含む免疫した異種マウス（Xenomouse（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ーニングされて、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。

40

【0037】

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/

50

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(035784/277215))および同第60/565, 710号(代理人事件番号PP20107.003(035784/271524))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。

【0038】

アンタゴニスト活性に加えて、本発明の方法での使用に適切な抗CD40抗体が、腫瘍細胞に対する作用に関して別の機構を有することが好ましい。例えば、天然のCHIR-5.9およびCHIR-12.12抗体は、ADCC活性を有する。あるいは、このCHIR-5.9およびCHIR-12.12抗体の可変領域は、ADCC活性を有する別の抗体アイソタイプで発現され得る。CHIR-5.9またはCHIR-12.12の天然の形態、組換え形態、または抗原結合フラグメントを、細胞毒へ結合させることもまた可能である。

【0039】

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に対する結合について競合するが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に援用される。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、CHIR-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。

【0040】

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。

【0041】

「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(この遺伝子の選択的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、GneBank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のエピトープは、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。

【0042】

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、細胞の外側に露出されることが意図される。提示または発現されたCD40抗原は、完全にまたは部分的にグリコシル化され得る。

【0043】

「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：B細胞の増殖および分化、抗体生成、細胞間接着、B細胞記憶生成、アイソタイプスイッチング、MHC クラスIIおよびCD80/86の細胞表面発現のアップレギュレーション、ならびに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。「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、アゴニストリガンド（特に、CD40L）に対するCD40レセプターの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ー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日に出版され、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。

【0044】

「有意な」アゴニスト活性により、B細胞応答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、目的のB細胞応答がB細胞増殖である場合、「有意な」アゴニスト活性は中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B細胞応答において有意なアゴニスト活性を有さない。本発明の別の実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体は、1より多いB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。

【0045】

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-12.12二より示される結合特性である。このような抗体としては、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アンタゴニスト抗体およびこれらの抗体の抗原結合フラグメントは、当該分野で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抗体およびその抗原結合フラグメントを含み、そして例えば、組換え的に産生された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を含むことを認識する。

【0046】

（アンタゴニスト抗CD40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CD40抗体は、当業者に公知の任意の抗体生成方法を使用して作製され得る。従って、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、CD40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することに起因して、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。

【0047】

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、CD40を発現するSf9細胞が、免疫原として使用される。免疫はまた、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（般的には、皮下または筋肉内）に射することによって、実施され得る。1回の注射あたり50～200 μgの用量は、代表的に十分である。免疫は、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ボでの免疫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での免疫によって、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25℃で1時間インキュベートし、次いで4℃で2～18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、1,000×gで10分間）によって回収される。1回の採血あたり約20～50mlが、ウサギから得られ得る。

【0048】

Sf9 (Spodoptera frugiperda) 細胞の作製は、米国特許第6,004,552号（本明細書中に参考として援用される）によって開示される。手短に言えば、ヒトCD40をコードする配列を、輸送ベクターを使用してバキュロウイルスに再結合（recombine）させた。上記プラスミドを、野生型バキュロウイルスDNAを用いてSf9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Sf9細胞を同定して、クローンの的に精製した。

【0049】

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Fab、F(ab')₂、Fv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CD40細胞表面抗原）に対して指向する。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して指向する異なる抗体を代表的に包含する従来の（ポリクローナル）抗体の調製とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向する。修飾語句「モノクローナル」は、実質的に同質である抗体の集団から得られる場合の抗体の性質を示し、いずれかの特定の方法による抗体の作製を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら（1975）Nature 256:495によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作製されても、または組換えDNA方法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと）によって作製されてもよい。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clacksonら（1991）Nature 352:624-628; Marksら（1991）J. Mol. Biol. 222:581-597; および米国特許第5,514,548号において記載される技術を使用したファージ抗体ライブラリーから単離され得る。

【0050】

「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。

【0051】

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される。免疫は、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）中に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）が取り出され、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、リンスで除かれない。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。

【0052】

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DNAを細菌で組換え発現すること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；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。手短かに言えば、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。

【0053】

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、グルタミンシンターゼをマーカーとして使用するGS遺伝子発現系（Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire）を使用してCHO細胞中で産生され得る。米国特許第5,122,464号；同第5,591,639号；同第5,658,759号；同第5,770,359号；同第5,827,739号；同第5,879,936号；同第5,891,693号；および同第5,981,216号もまた参照のこと；これらの内容は、その全体が参考として援用される。

【0054】

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 III and IV（Oxford University Press, New York）；米国特許第5,674,492号；同第5,874,082号；同第5,677,165号；同第6,056,959号；WO 00/63395；国際公開第02/28905号および国際公開第02/28904号；Gordonら（1988）J. Immunol. 140:1425；Valleら（1989）Eur. J. Immunol. 19:1463；Clarkら（1986）PNAS 83:4494；Paulieら（1989）J. Immunol. 142:590；Gordonら（1987）Eur. J. Immunol. 17:1535；Jabaraら（1990）J. Exp. Med. 172:1861；Zhangら（1991）J. Immunol. 146:1836；Gascanら（1991）J. Imm

10

20

30

40

50

unol. 147:8; Bancheureauら(1991) Clin. Immunol. Spectrum 3:8; および Bancheureau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。本発明に対して特に重要なのは、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。

【0055】

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」とは、CD40抗原それ自体を除いた、本発明の抗CD40モノクローナル抗体と免疫反応し得る分子をいう。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、本発明の目的として最も一般的には、タンパク質、短いオリゴペプチド、オリゴペプチド模倣体（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。

【0056】

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

【0057】

キメラ抗CD40抗体およびヒト化抗CD40抗体もまた、本明細書において使用される場合の用語、抗CD40抗体によって包含される。キメラ抗体は、様々な種由来の抗体のセグメントを含む。Rituxan（登録商標）（IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California）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。

【0058】

「ヒト化」によって、非ヒト免疫グロブリン配列由来の最小限の配列を含む抗CD40抗体の形態が意図される。大抵、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、ここで、そのレシピエントの超可変領域（相補性決定領域またはCDRとしても公知である）由来の残基が、非ヒト種（ドナー抗体）（例えば、マウス、ラット、ウサギ、または所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト霊長類）の超可変領域由来の残基によって置換される。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特異性を共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) U. S. Dept. of Health and Human Services, NIH Publication No. 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一部をいう。ヒト疾患の治療での使用のための非免疫性抗体を産生することに向けられた以前の研究において、マウス定常領域が、ヒト定常領域によって置き換えられた。被験体をヒト化抗体の定常領域は、ヒト免疫グロブリン由来であった。しかし、これらのヒト化抗体はさらに、ヒトにおいて、望ましくない潜在的な危険性を有する免疫応答を誘発し、そして親和性の損失が存在した。本発明の方法での使用のためのヒト化抗CD40抗体は、本明細書において記載されるCHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗体によって表される結合特性と類似の結合特性を有する。

【0059】

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類似の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。

【0060】

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の能力がある内因性遺伝子は、非機能的にされ、類似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。

【0061】

好ましくは、トランスジェニックマウスを免疫することによって、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κ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。

10

【0062】

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、ヒト細胞上で発現されるCD40細胞表面抗原（特に、固形腫瘍のCD40発現癌腫細胞上のCD40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。抗体の適切な抗原結合フラグメントは、全長抗体の一部（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_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。

20

30

40

【0063】

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

50

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での組換え (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。

【0064】

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。

【0065】

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、本明細書の他に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。

【0066】

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。

【0067】

上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産生された抗体は、それが以下の生物学的活性の少なくとも1つを有する場合、本発明の範囲内にある：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；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細胞の増殖の阻害；CD40L発現細胞または可溶性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「生存した」の抗アポトーシス性細胞内シグナルの阻害；sCD40Lまたは固相CD40Lとのライゲーシオ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、以下に記載されるようなヒト悪性B細胞の増殖の阻害。これらのアッセイは、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、そして、それぞれ、米国特許出願番号第60/517,337号（代理人事件番号第PP20107.001号（035784/258442））、同第60/525,579号（代理人事件番号第PP20107.002号（035784/271525））、および同第60/565,710号（代理人事件番号第PP20107.003号（035784/277214））として割り当てられた、発明の名称「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」である、同時係属中の仮出願中に記載されるように行われ得る。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。Schultze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（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。

【0068】

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、「競合結合アッセイ」である。競合結合アッセイは、そのアッセイにおいて、未知のものが検出されて、標識された既知のリガンドのその特異的な抗体に対する結合を阻害する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、競合阻害アッセイともいわれる。代表的な競合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得る。

【0069】

このような免疫アッセイで使用される抗体は、標識されていても標識されていなくてもよい。標識されていない抗体は、凝集反応において使用され得；標識された抗体は、多種

10

20

30

40

50

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、 β -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。

【0070】

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、間接的標識または間接的標識アプローチを使用して標識され得る。「間接標識」または「間接標識アプローチ」とは、キレート剤が抗体に共有結合され、そして少なくとも1つの放射性核種がキレート剤に挿入されると解釈される。例えば、SrivagtaおよびMease（1991）Nuc l. Med. Bio. 18:589-603（本明細書に参考として援用される）に記載されるキレート剤および放射性核種を参照のこと。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、この能力は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とプロテイン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、 ^{125}I は、放射活性標識として、または高電子密度試薬として機能し得る。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。

【0071】

あるいは、抗CD40抗体は、「直接標識」または「直接標識アプローチ」を使用して標識され得、ここで、放射性核種が、直接抗体に（代表的にアミノ酸残基を介して）共有結合される。好ましい放射性核種は、SrivagtaおよびMease（1991）前出に提供される。間接的な標識アプローチが特に好ましい。例えば、国際公開番号WO 00/52031およびWO 00/52473（リンカーが、放射活性標識を抗体

に結合するために使用される) ; ならびに米国特許第6, 015, 542号に記載される抗CD40抗体の標識化形態もまた参照のこと(これらは、本明細書において参考として援用される)。

【0072】

さらに、抗体(またはそのフラグメント)は、例えば、治療剤である細胞毒のような治療部分、放射活性金属イオンまたは放射性同位体に結合体化され得る。細胞毒または細胞傷害性薬剤としては、細胞に対して有害な任意の薬剤が挙げられる。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラセンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにこれらのアナログもしくはホモログが挙げられる。治療剤としては、代謝拮抗物質(例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルビシン(以前のダウノマイシン)およびドキシソルビシン)、および抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前のアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン(AMC))、ならびに抗有糸分裂性因子(例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン)が挙げられる。放射性同位体としては、I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、Bi-213、Pd-109、Tc-99、In-111などが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の結合体は、所定の生物学的応答を改変するために使用されうる; この薬物部分は、従来からのkg悪療法剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、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: 毒素(例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素); タンパク質(例えば、腫瘍壊死因子、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、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); または生物学的応答の改変因子(例えば、リンホカイン、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)。

【0073】

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 for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeldら(編)(Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-256; Hellstromら(編)(1987), 「Antibodies for Drug Delivery」、Controlled Drug Delivery, Robinsonら(編)(第2版; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-653; Thorpe(1985)「Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review」、Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pincheraら(編) pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); 「Analysis, Result, and Future O

10

20

30

40

50

risoective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy」、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。

【0074】

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、放射活性ヨウ素、インジウム、イットリウム、または当該分野で公知の他の放射活性粒子(米国特許第5,595,721号)で直接的に標識され得る。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 00/52473)。

【0075】

(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。

【0076】

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Gaastra(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 $\rightleftharpoons$ Ala、Val $\rightleftharpoons$ Ile $\rightleftharpoons$ Leu、Asp $\rightleftharpoons$ Glu、Lys $\rightleftharpoons$ Arg、Asn $\rightleftharpoons$ Gln、およびPhe $\rightleftharpoons$ Trp $\rightleftharpoons$ Tyrが挙げられるが、これらに限定されない。

【0077】

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。

【0078】

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。

【0079】

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。

【0080】

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）。

【0081】

特に、悪性B細胞または固形腫瘍のCD40発現細胞上の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プロセッシング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。

【0082】

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。

【0083】

(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、CD40細胞表面抗原を発現する細胞を含む固形腫瘍を有する被験体(すなわち、患者)を処置するためのアンタゴニスト抗CD40抗体の使用に関する。「CD40発現癌腫細胞」によって、CD40細胞表面抗原を発現する固形腫瘍の任意の悪性(すなわち、新生物)細胞または前悪性細胞が意図される。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。本発明の方法を使用して処置され得る固形腫瘍としては、卵巣癌、肺癌(例えば、扁平上皮癌の非小細胞肺癌、腺癌、および大細胞癌型、および小細胞肺癌)、乳癌、結腸癌、腎臓癌(例えば、腎細胞癌が挙げられる)、膀胱癌、肝臓癌(例えば、肝細胞癌が挙げられる)、胃癌、子宮頸癌、前立腺癌、鼻咽腔癌、甲状腺癌(例えば、甲状腺乳頭状癌)、および皮膚癌(例えば、黒色腫)、および肉腫(例えば、骨肉腫およびユースティング肉腫が挙げられる)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

「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、固形腫瘍、固形腫瘍に関連する症状、または固形腫瘍の発症に対する素因を有しており、その目的は、上記固形腫瘍、上記固形腫瘍の任意に関連する症状、または上記固形腫瘍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)、あるいはその素因に影響を及ぼす(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、固形腫瘍、固形腫瘍に関連する症状、または固形腫瘍の発症に対する素因を有しており、その目的は、上記固形腫瘍、上記固形腫瘍の任意に関連する症状、または上記固形腫瘍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、あるいはこれに影響を及ぼすことである。

【0085】

「抗腫瘍活性」によって、CD40発現細胞の増殖または蓄積の速度の低下、従って、治療の間に生じる、既に存在していた腫瘍の成長速度の減少または腫瘍の減少、ならびに/または既に存在していた新生物(腫瘍)細胞または新たに形成された新生物細胞の破壊、よって、治療の間の腫瘍のサイズ全体の減少が意図される。少なくとも1種のアンタゴニスト抗CD40抗体(またはその抗原結合フラグメント)を用いた治療は、ヒトにおける固形腫瘍(ここでこの固形腫瘍は、CD40抗原を発現する癌腫細胞を含む)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、治療の間に生じるさらなる腫瘍の増殖を防止する際に有用であり得ることが認識される。

【0086】

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

10

20

30

40

50

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、固形腫瘍に関して、ポジティブな治療応答を促進するために使用される。癌処置に関する「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腫瘍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、さらなる腫瘍増殖の防止、腫瘍サイズの縮小、癌細胞の数の減少、および／またはCD40発現細胞の刺激により媒介される1以上の症状の減少が、観察され得る。従って、例えば、疾患における改善は、完全な応答であると分類されうる。「完全な応答」とは、任意の以前の異常なX線撮影研究の正規化により臨床的に検出可能な疾患が意図される。骨髄、脳脊髄液（CSF）。このような応答は、本発明の方法に従う処置の少なくとも1ヶ月後まで持続しなければならない。あるいは、疾患における改善は、部分的

10

【0087】

腫瘍応答は、磁気共鳴画像法（MRI）スキャン、X線撮影画像化法、コンピューター断層撮影（CT）スキャン、生物発光画像化（例えば、ルシフェラーゼ画像化、骨スキャン画像化、および骨髄吸引（BMA）を包含する腫瘍生検サンプリング）などのスクリーニング技術を用いて、腫瘍形態（すなわち、腫瘍組織量全体、腫瘍サイズなど）における変化について評価され得る。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

20

【0088】

「治療有効用量または治療有効量」または「有効量」によって、投与された場合に、CD40発現細胞癌腫細胞を含む固形腫瘍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。

30

【0089】

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

40

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、β-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。

【0090】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明の抗CD40抗体および適切なその抗原結合フラグメントは、少なくとも1種の癌治療（手術、放射線治療、化学療法、サイトカイン療法、または他の目的の腫瘍の処置における使用が意図されたモノクローナル抗体が挙げられるが、これらに限定されない）と組み合わせて投与される。ここでさらなる癌治療は、抗CD40抗体治療の前、その間またはその後に投与される。従って、併用療法は、化学療法、サイトカイン療法または他のモノクローナル抗体を用いるような、別の治療剤の投与と組み合わせた、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。ここで好ましくは、両方または全ての活性薬剤がそれらの治療活性を発揮する期間が存在する。本発明の方法が、組み合わさ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、同時か、または他の癌治療と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、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。異なる癌治療の連続投与は、処置された被験体の応答が、第1のク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。

【0091】

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、化学療法またはサイトカイン療法と組み合わせて投与され、ここで上記抗体および上記化学療法剤またはサイトカインは、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。適切な化学療法剤の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：例えば、結腸直腸癌および非小細胞肺癌を処置する際に使用され得るCPT-11（イリノテカン）；例えば、肺癌、乳癌および上皮性卵巢癌（epithelial ovarian cancer）を処置する際に使用されうるゲムシタビン；ならびに固形腫瘍の処置に適した他の化学療法剤。重要なサイトカインとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない： α インターフェロン、 γ インターフェロン、インターロイキン-2（IL-2）、IL-12、IL-15、およびIL-21、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（CM-SCF）、またはこれらサイトカインの生物学的に活性な改変体。

【0092】

本発明の他の実施形態において、本明細書において記載される抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、固形腫瘍の処置のために意図される他のモノクローナル抗体と組み合わせて投与される。したがって、例えば、被験体が、CD40発現癌細胞を含む乳癌の処置を受けている場合、治療は、Her2+乳癌細胞のHer2レセプタータンパク質を標的にする、ハーセプチン（登録商標）（Genentech, Inc., San Francisco, California）の有効量の投与と組み合わせて、本明細書中に記載のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの有効量の投与を含み得る。同様に、被験体が、CD40発現癌細胞を含む結腸直腸癌の処置を受けている場合、治療は、血管内皮成長因子（VEGF）（腫瘍新脈管形成において重要な役割を果たすタンパク質）に結合して阻害する、ヒト化モノクローナル抗体アバスタチンTM（ベバシズマブとしても公知である；Genentech, Inc., San Francisco, California）の有効量の投与と組み合わせて、本明細書中に記載のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの有効量の投与を含み得る。本発明の抗CD40抗体と組み合わせて使用され得る固形腫瘍の処置のために意図されるモノクローナル抗体の他の例としては、表皮成長因子レセプターを標的とする、抗EGFR抗体（例えば、IMC-C225（ImClone Systems, New York, New York）（例えば、MendelsohnおよびBaselga（

2000) Oncogene 19:6550-6565、およびSolbachら、(2002) Int. J. Cancer 101:390-394を参照のこと) ; IGF-1レセプタータンパク質を標的とする、抗IGF-1レセプター抗体(例えば、Maloneyら、(2003) Cancer Res. 63:5073-5083およびHaleyら、(2002) Mol. Cancer. Ther. 1:1349-1353を参照のこと) ; 腫瘍結合抗原MUCIを標的とする、抗MUCI抗体 ; 抗 $\alpha 5 \beta 1$ 、抗 $\alpha v \beta 5$ 、および抗 $\alpha v \beta 3$ (細胞付着ならびに細胞増殖および細胞生存に関与するシグナル伝達プロセスを調節するこれらのそれぞれのインテグリンを標的とする)(例えば、Laidlerら、(2000) Acta Biochimica Polonica 47(4):1159-1170およびCruet-Hennequartら、(2003) Oncogene 22(11):1688-1702を参照のこと) ; 抗P-カドヘリン抗体(このカドヘリンファミリーメンバーを標的とする)(例えば、同時係属中の米国特許出願第20030194406号を参照のこと) ; ならびに、抗VEカドヘリン抗体(この内皮細胞特異性付着分子の新脈管形成関連機能を標的とする)(例えば、Liaoら、(2002) Cancer Res. 62:2567-2575を参照のこと) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0093】

本発明の抗CD40抗体および他のモノクローナル抗体は、いずれかの順で、または同時に(すなわち、共にかまたは同じ時間枠内で)連続投与され得る。1種より多いモノクローナル抗体が投与される場合、本発明の方法はさらに、処置を受ける癌について保証されるように、かつ監督している医療実施者によって推奨されるように、放射線および/または化学療法への曝露を含み得る。

【0094】

(薬学的処方物および投与の様式)

本発明の方法での使用のための抗CD40抗体は、CD40発現癌細胞(卵巢癌、肺癌(例えば、扁平上皮癌の非小細胞肺癌、腺癌、および大細胞癌型、および小細胞肺癌)、乳癌、結腸癌、腎臓癌(例えば、腎細胞癌が挙げられる)、膀胱癌、肝臓癌(例えば、肝細胞癌が挙げられる)、胃癌、子宮頸癌、前立腺癌、鼻咽腔癌、甲状腺癌(例えば、甲状腺乳頭状癌)、および皮膚癌(例えば、黒色腫)、および肉腫(例えば、骨肉腫およびユーイング肉腫が挙げられる)が挙げられる)を含む固形腫瘍を予防するかまたは処置するのに治療的に有効である濃度で投与される。この目標を達成するために、当該分野において公知の種々の受容可能な賦形剤を使用して、この抗体は処方され得る。代表的には、この抗体は、静脈内注射、腹腔内注射、または腫瘍内注射のいずれかによって投与される。この投与を達成する方法は、当業者に公知である。局所投与または経口投与され得る組成物、あるいは粘膜を通じた透過が可能であり得る組成物を得ることも可能である。

【0095】

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。

【0096】

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。

【0097】

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WO98/56418もまた参照のこと。

【0098】

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0.003mg/kg～約50mg/kgの範囲であり、好ましくは、0.01mg/kg～約40mg/kgの範囲である。従って、例えば、用量は、0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、2.5mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、7mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、または50mg/kgであり得る。

【0099】

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

10

20

30

40

50

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。

10

【0100】

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。

20

30

【0101】

他の実施形態において、本明細書の他の部分で規定されたような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、より少ない用量範囲（すなわち、約0.003mg/kg～約20mg/kg）であり得、その後の用量は、より多い用量範囲（すなわち、約20mg/kg～約50mg/kg）となり得る。

【0102】

代替的な実施形態において、本明細書の他の部分で定義されるように、最初の治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、より高い用量範囲（すなわち、約20mg/kg～約50mg/kg）であり得、引き続く用量は、より低い用量範囲（すなわち、0.003mg/kg～約20mg/kg）になり得る。従って、1つの実施形態において、上記最初の治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、約20mg/kg～約35mg/kg（約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、および35mg/kgを含む）であり、そして引き続く治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、約5mg/kg～約15mg/kg（約5mg/kg、約8mg/kg、約10mg/kg、約12mg/kg、および約15mg/kgを含む）である。

40

【0103】

50

本発明のいくつかの実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体療法は、「ローディング用量（loading dose）」の抗体またはその抗原結合フラグメントを、アンタゴニスト抗CD40抗体療法を必要としている被験体に投与することによって開始される。「ローディング用量」によって、投与される抗体または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20mg/kg～約50mg/kg）にある、上記被験体に投与されるアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの最初の用量が意図される。上記「ローディング用量」は、完全な「ローディング用量」が約24時間の期間内に投与される限り、一回投与（例えば、抗体またはその抗原結合フラグメントがIV投与される一回注入）としてか、または複数投与（例えば、抗体またはその抗原結合フラグメントがIV投与される複数注入）として投与され得る。「ローディング用量」の投与に続いて、次いで上記被験体は、1以上のさらなる治療有効用量のアンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを投与される。引き続き治療有効用量は、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、上記引き続き治療有効用量は、一般的により低い用量範囲（すなわち、0.003mg/kg～約20mg/kg）内にある。

【0104】

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、上記引き続き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、「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CD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、特に引き続き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、0.003mg/kg～約20mg/kg）であるか、または特に引き続き用量がより頻繁でない間隔（例えば、引き続き用量が約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20mg/kg～約50mg/kg）である。

【0105】

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CD40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胞株からの組換えヒトタンパク質である。

【0106】

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。

【0107】

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。

【0108】

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、 α および β シクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、ならびにカルボキシメチルセルロース、またはこれらの混合物が挙げられ得る。「糖アルコール」は、ヒドロキシル基を有する $C_4 \sim C_8$ 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itol、イノシitol、マンニtol、キシリtol、ソルビtol、グリセロールおよびアラビitol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。

【0109】

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。

【0110】

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。

10

【0111】

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。

20

【0112】

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を提供するべきである。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に限定されない）を有するべきである。

30

【0113】

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CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの安定性を提供し、そして／あるいは、2～8℃において、少なくとも6ヶ月、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。

40

【0114】

50

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。

10

【0115】

薬学的組成物中に処方される場合、アンタゴニスト抗CD40抗体、またはその抗原結合フラグメントは、所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CD40抗体およびその抗原結合フラグメントの所望の生物学的活性を測定するためのアッセイは、本明細書中の実施例に記載されるようにして実施され得る。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）。

20

30

【0116】

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

40

【0117】

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、 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 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。

【0118】

50

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。

【0119】

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1mM～約50mM（約1mM、約2mM、約5mM、約8mM、約10mM、約15mM、約20mM、約25mM、約30mM、約35mM、約40mM、約45mM、約50mM、または約1mM～約50mM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5mM～約15mM（約5mM、約6mM、約7mM、約8mM、約9mM、約10mM、約11mM、約12mM、約13mM、約14mM、約15mM、または約5mM～約15mMの範囲内の他のこのような値を含む）であり得る。

【0120】

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CD40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1mM～約50mM（約1mM、約2mM、約5mM、約8mM、約10mM、約15mM、約20mM、約25mM、約30mM、約35mM、約40mM、約45mM、約50mM、または約1mM～約50mM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5mM～約15mM（約5mM、約6mM、約7mM、約8mM、約9mM、約10mM、約11mM、約12mM、約13mM、約14mM、または約15mM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、0.1mg/ml～約50.0mg/ml、または約5.0mg/ml～約25.0mg/mlの濃度で、そして、コハク酸緩衝液またはクエン酸緩衝液（例えば、コハク酸ナトリウム緩衝液またはクエン酸ナトリウム緩衝液）を、約1mM～約20mM、約5mM～約15mM、好ましくは、約10mMの濃度で含む。

【0121】

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、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240mmol/kg～約360mmol/kg、好ましくは約240mmol/kg～約340mmol/kg、より好ましくは約250mmol/kg～約330mmol/kg、なおより好ましくは約260mmol/kg～約320mmol/kg、なおより好ましくは約270mmol/kg～約310mmol/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。

【0122】

当業者は、薬学的組成物に等張性を提供するのに有用な、種々の薬学的に受容可能な溶質に精通している。等張化剤は、本発明の液体薬学的処方物の浸透圧を、体液の浸透圧にほぼ等しい値に調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。

【0123】

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。

【0124】

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。

【0125】

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-tert-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。

【0126】

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。

【0127】

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。

【0128】

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

10

20

30

40

50

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。

【0129】

（医薬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、CD40 抗原発現癌細胞を含む固形腫瘍について被験体を処置するための医薬製造における、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種の他の癌治療を伴う処置と共働される。そのような腫瘍の例としては、卵巣癌、肺癌（例えば、扁平上皮癌の非小細胞肺癌、腺癌、および大細胞癌型、および小細胞肺癌）、乳癌、結腸癌、腎臓癌（例えば、腎細胞癌が挙げられる）、膀胱癌、肝臓癌（例えば、肝細胞癌が挙げられる）、胃癌、子宮頸癌、前立腺癌、鼻咽腔癌、甲状腺癌（例えば、甲状腺乳頭状癌）、および皮膚癌（例えば、黒色腫）、および肉腫（例えば、骨肉腫およびユーイング肉腫が挙げられる）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0130】

「共働する (coordinate)」により、その医薬が、少なくとも1種の他の癌治療を用いる被験体の処置の前、処置の間または処置後のいずれかに使用されることが意図される。他の癌治療の例としては、外科手術；放射線治療；化学療法が挙げられるが、これらに限定されず、ここで、適切な化学療法剤としては、フルダラビンまたはリン酸フルダラビン、クロラムブシル、ビンクリスチン、ペントスタチン、2-クロロデオキシアデノシン（クラドリビン）、シクロホスファミド、ドキソルビシン、プレドニゾン、およびこれらの組み合わせ（例えば、アントラサイクリンを含むレジメン（例えば、CAP（シクロホスファミド、ドキソルビシンおよびプレドニゾン）、CHOP（シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾンおよびドキソルビシン）、VAD（ビンクリスチン、ドキソルビシン、およびデキサメタゾン）、MP（メルファランおよびプレドニゾン））、および化学治療で使用される他の細胞傷害性因子および／または治療因子（例えば、ミトザントロン、ダウノルビシン、イダルビシン、アスパラギナーゼ）および抗代謝産物（シタラビン、メトトレキサート、5-フルオロウラシルデカルバジン (decarbazine)、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、およびネルアラビンが挙げられるが、これらに限定されない)；サイトカイン療法 (α-インターフェロン療法、γ-インターフェロン療法、インターロイキン-2 (IL-2)、IL-12、IL-15、およびIL-21を用いる治療)、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)、またはこれらのサイトカインの生物学的活性改変体；あるいは、目的の固形腫瘍の処置での使用のために意図された他のモノクローナル抗体（例えば、Her2+乳癌細胞のHer2レセプタータンパク質を標的とするハーセプチン（登録商標）(Genentech, Inc., San Francisco, California)；血管内皮成長因子 (VEGF) に結合して阻害し、結腸癌の処置での用途を有する、ヒト化モノクローナル抗体アバスタチンTM（ベパシズマブとしても公知である；Genentech, Inc., San Francisco, California)；表皮成長因子レセプターを標的とする、抗EGFR抗体（例えば、IMC-C225 (ImClone Systems, New York, New York)；IGF-1レセプタータンパク質を標的にする、抗IGF-1レセプター抗体；腫瘍結合抗原MUC1を標的とする、抗MUC1抗体；抗α5β1、抗αvβ5、および抗αvβ3（細胞付着ならびに細胞増殖および細胞生存に関与するシグナル伝達プロセスを調節する、これらのそれぞれのインテグリンを標的とする)；抗P-カドヘリン抗体（このカドヘリンファミリーメンバーを標的にする）（例えば、同時係属中の米国特許出願公開番号第20030194406号を参照のこと)；ならびに、抗VEカドヘリン抗体（この内皮細胞特異性付着分子の新脈管形成関連機能を標的とする）が挙げられるが、これらに限定されず；ここで、さらなる癌治療または複数のさらなる癌治療を伴う処置は、本明細書において上記のような、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、処置の間または処置後に行われる。

10

20

30

40

50

【0131】

したがって、例えば、いくつかの実施形態において、本発明は、CD40抗原を発現する癌細胞を含む固形腫瘍について被験体を処置するための医薬製造における、モノクローナル抗体CHIR-12.12またはCHIR-5.9、またはその抗原結合フラグメントの使用を提供し、ここで、この医薬は、化学療法での処置と共働し、ここで、化学療法剤は、例えば、結腸直腸癌および非小細胞肺癌を処置する場合に使用され得るCPT-11（イリノテカン）；例えば、肺癌、乳癌および表皮卵巣癌を処置する場合に使用され得るゲムシタビン；ならびに、固形腫瘍の処置に適切である他の化学療法剤からなる群より選択され、ここで、さらなる癌治療または複数のさらなる癌治療を伴う処置は、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、処置の間または処置後に行われる。

10

【0132】

他の実施形態において、本発明は、CD40抗原を発現する癌細胞を含む固形腫瘍を用いて被験体を処置するための医薬製造における、モノクローナル抗体CHIR-12.12またはCHIR-5.9、またはその抗原結合フラグメントの使用を提供し、ここで、この医薬は、Her2+乳癌細胞のHer2レセプタータンパク質を標的とするハーセプチン（登録商標）（Genentech, Inc., San Francisco, California）；血管内皮成長因子（VEGF）に結合しそして阻害し、および結腸癌の処置での用途を有する、ヒト化モノクローナル抗体アバスタチンTM（ベバシズマブとしても公知である；Genentech, Inc., San Francisco, California）；表皮成長因子レセプターを標的にする、抗EGFR抗体（例えば、IMC-C225（ImClone Systems, New York, New York）；IGF-1レセプタータンパク質を標的にする、抗IGF-1レセプター抗体；腫瘍結合抗原MUC1を標的にする、抗MUC1抗体；抗 $\alpha 5 \beta 1$ 、抗 $\alpha v \beta 5$ 、および抗 $\alpha v \beta 3$ （細胞付着ならびに細胞増殖および細胞生存に関与するシグナル伝達プロセスを調節するこれらのそれぞれのインテグリンを標的とする）；抗P-カドヘリン抗体（このカドヘリンファミリーメンバーを標的にする）（例えば、同時係属中の米国特許出願第20030194406号を参照のこと）；ならびに、抗VEカドヘリン抗体（この内皮細胞特異性付着分子の新脈管形成関連機能を標的とする）からなる群より選択される少なくとも1種の他の抗癌抗体を用いた処置と共働し；さらなる癌治療または複数のさらなる癌治療を伴う処置は、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、処置の間または処置後に行われる。

20

30

【0133】

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（pretreated）」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。したがって、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け

40

50

る被験体は、前の癌治療での前処置に対してまたは1つ以上の前の癌治療に対して応答し得たかまたは応答し得ず（すなわち、癌が難治性であった）、ここで、前処置は、複数の癌治療を含んでいた。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ける前に前処置を受け得た他の癌治療の例としては、外科手術；放射線治療；化学療法（ここで、適切な化学療法剤としては、本明細書において上に列挙されたものを含むがこれらに限定されない）；他の抗癌モノクローナル抗体治療（本明細書において上に列挙された抗癌抗体が挙げられるが、これらに限定されない）；サイトカイン療法（本明細書において上で列挙されたサイトカイン療法が挙げられる）；あるいは、それらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0134】

10

1つ以上の他の癌治療を用いた、本明細書中に記載された医薬の共働する使用に関連して、「処置」とは、本明細書において、医薬もしくは他の癌治療の被験体に対する適用または投与、あるいは、医薬もしくは他の癌治療の被験体からの単離された組織または細胞株に対する適用または投与として定義され、ここで上記被験体は、CD40抗原を発現する癌細胞を含む固形腫瘍、そのような癌に関連する症状、またはそのような癌の発生に対する素因を有し、ここで、その目的は、癌、任意の癌に関連する症状、または癌の発生に対する素因を治療するか、治癒するか、緩和するか、軽減するか、変えるか、治療するか、寛解するか、改善するか、あるいは影響を及ぼすことである。

【0135】

以下の実施例が、説明の方法として提供され、限定の方法としては提供されない。

20

【実施例】

【0136】

（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（XenomMouse（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。

30

【0137】

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マウス骨髓腫細胞またはP3x63Ag8.653マウス骨髓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。

40

【0138】

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。

【0139】

合計31匹のマウスの脾臓を、マウス骨髓腫SP2/0細胞と融合させて、ELISA

50

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κ鎖の代わりにマウスλ軽鎖を含み得る。これらのマウスλ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。一連のサブクロ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「Antagonist 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。

【0140】

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。

【0141】

【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

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	あり
153.8E2	153.8E2D10D6.12.12	+++	+++	++++	-	12056	あり

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。

【0142】

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。

【0143】

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。

【0144】

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。

10

【0145】

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))および同第60/565,710(代理人事件整理番号:PP20107.003(035784/277214))を参照のこと。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。

20

【0146】

(実施例1:CD40を、固形腫瘍の多くの部分で発現する)

種々の固形腫瘍由来の培養された癌細胞株および患者生検が、CD40を発現することを見出した。乳癌患者、肺癌患者、卵巣癌患者、および皮膚癌患者からの高率の生検されたサンプルが、CD40を発現することを見出した。

30

【0147】

(実施例2:候補モノクローナル抗体CHIR-12.12の、いくつかのヒト癌で発現されたCD40に結合する能力)

癌組織サンプルを、卵巣癌、肺癌、乳癌、または結腸癌を有する個体(N=10)から得、そして免疫組織化学を使用する抗体結合についてのその後の分析のために冷凍した。CHIR-12.12 mAbに結合し得る種々のヒト癌における新生細胞の割合を決定した。表2から観察され得るように、60%の卵巣癌サンプルおよび肺癌サンプルは、結合の最も高い割合のカテゴリーにあった(すなわち、これらのサンプル中の50~100%の細胞は、CHIR-12.12 mAbに結合し得た)。30%の乳癌および10%の結腸癌サンプルが、結合の最も高い割合のカテゴリーにあった。

40

【0148】

(表2. 数種のヒト癌に結合するCHIR-12.12 mAbの能力)

【0149】

【表 2】

癌	CHIR-12.12 mAb に結合する新生細胞 の割合				
	ネガティブ	<5%	5-25%	25-50%	50-100%
卵巣癌 <i>n=10</i>	0 %	0 %	30%	10%	60%
肺癌 <i>n=10</i>	0 %	20%	20%	0 %	60%
乳癌 <i>N=10</i>	0 %	30%	20%	20%	30%
結腸癌 <i>N=10</i>	0 %	70 %	10%	10%	10%

(実施例 3：CHIR-5.9 および CHIR-12.12 は、ADCC によって CD 40 保有標的細胞を死滅させ得る)

候補抗体は、ADCC 機構によって CD 40 保有標的細胞（リンパ腫細胞株および固形腫瘍細胞株）を死滅させ得る。CHIR-5.9 と CHIR-12.12 との両方は、Ig G 1 アイソタイプの完全なヒト抗体であり、そして ADCC 機構によって標的細胞の死滅を誘導する能力を有すると予測される。それらを、インビトロアッセイにおいて癌細胞株を死滅させるそれらの能力について試験した。2つのヒトリンパ腫細胞株（Ramos および Daudi）および1つのヒト結腸癌細胞株（HCT 116）を、始めにこれらのアッセイのための標的細胞として選択した。8人の正常なボランティアドナーからの PBMC または豊富な NK 細胞を、これらのアッセイにおいてエフェクター細胞として使用した。結腸癌細胞株よりも、リンパ腫細胞株に対する高い ADCC を観察した。より強力な ADCC 応答を、CHIR-5.9 と比較して、CHIR-12.12 を用いた場合に、リンパ腫細胞株標的細胞と結腸癌細胞株標的細胞との両方に対して観察した。リンパ腫細胞株はまた、CD 20（リツキシマブ（Rituxan（登録商標）；IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California）に対する標的抗原）を発現し、リツキシマブ ADCC 活性を有するこれらの2つの候補 mAb の ADCC 活性の比較について可能にした。リンパ腫細胞株標的について、1 μg/ml 濃度にて使用した場合、特異的溶解の平均の 35%、59%、および 47% を、それぞれ、CHIR-5.9、CHIR-12.12 およびリツキシマブについて観察した。結腸癌細胞株標的について、特異的溶解の平均の 20% および 39% を、それぞれ、CHIR-5.9 および CHIR-12.12 について観察した。以下の表 3 を参照のこと。これらの2つの抗体は、補体依存性細胞傷害性（CDC）アッセイにおいて多くの活性を示さなかった。

【0150】

（表 3. ADCC によるリンパ腫細胞株および結腸癌細胞株の抗 CD 40 mAb 依存性死滅）

【0151】

【表 3】

ADCC によるリンパ腫細胞株および結腸癌の抗 CD40 mAb 依存性死滅															
実験番号	効果細胞	E:T 比	標的細胞 : ヒトリンパ腫細胞株 (Ramos または Daudi)					標的細胞 : ヒト結腸癌 (HCT116)					mAbs の濃度の 1 µg/ml における平均 % 溶解		
			5.9		12.12		Rituxan		5.9		12.12				
			% 溶解 IgG1	Abs 濃度 (µg/ml)	% 溶解 IgG1	% 溶解 - % 溶解 IgG1	% 溶解 IgG1	% 溶解 IgG1	% 溶解 IgG1	Abs 濃度 (µg/ml)	% 溶解 IgG1	% 溶解 - % 溶解 IgG1		% 溶解 IgG1	% 溶解 IgG1
ADCC-005	huNK	3	17.05	5	30.75	13.70	65.22	48.17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.12
Alarmon Blue	huNK	3	40.81	5	58.62	17.81	87.87	47.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22.46
ADCC-006	huNK	2	-3.09	10	3.50	6.59	43.71	46.8	34.82	37.91	11.14	10	12.78	1.64	8.39
Alarmon Blue			-8.62	1	-10.10	-1.48	45.13	53.75	37.07	45.69	13.6	1	8.921	-4.68	26.16
			-11	0.1	-14.80	-3.80	39.82	50.82	33.61	44.61	15.49	0.1	8.82	-6.67	10.66
			-4.54	0.01	2.53	7.07	50.07	54.61	28.49	33.03	13.62	0.01	17.24	3.62	14.45
51Cr	huNK	5	1.5	10	32.09	30.59	47.24	45.742	ND	ND	33.1	10	120.02	86.92	137.31
			2.4	1	18.01	15.61	37.42	35.022	ND	ND	23.1	2	138.4	115.3	143.52
			2.5	0.1	14.67	12.17	37.63	35.131	ND	ND	46.4	0.4	141.41	95.01	113.05
ADCC-009	huNK	10	2.32	5	66.20	63.88	97.70	95.38	86.2	83.88	26.4	5	41.3	14.9	35.9
Calcien AM			0.48	1	67.20	66.72	123.00	122.52	88.2	87.72	32.8	1	43.8	11	73.8
			-1.43	0.2	78.40	79.83	118.00	119.43	88.8	90.23	33.5	0.2	42.6	9.1	37.9
			3.39	0.04	69.10	65.71	109.00	105.61	84.9	81.51	26	0.04	54.8	28.8	40
ADCC-011	huNK	8	3.18	1	15.36	12.19	51.59	48.42	22.44	19.27	11.63	1	6.31	-5.32	8.33
Calcien AM			4.58	0.01	7.39	2.81	46.80	42.22	14.68	10.10	5.885	0.01	-0.05	-5.94	15.25
			5.41	0.002	6.35	0.94	5.10	-0.31	9.58	4.16	4.379	0.002	3.96	-0.42	-5.13
			7.03	0.0004	7.76	0.73	5.99	-1.04	5.99	-1.04	1.883	0.0004	5.13	3.25	0.94
ADCC-012	huNK	10	13.34	10	73.31	59.97	117.80	104.46	60.75	37.41	0.132	10	18.42	18.29	35.97
Calcien AM			13.50	1	74.76	61.26	88.64	75.14	65.97	52.47	11.15	1	28.60	17.45	31.07
			12.27	0.01	58.52	46.25	72.88	60.61	50.16	37.89	10.89	0.01	15.51	4.62	20.18
			13.61	0.005	57.50	43.89	69.45	55.84	39.28	25.67	14.01	0.005	23.31	9.3	13.54
			11.95	0.001	56.81	44.86	65.17	53.22	33.07	21.12	14.63	0.001	24.68	10.05	17.9
ADCC-013	PBMC	100	2.54	1	21.03	18.49	37.94	35.40	32.28	29.74	13.53	1	22.04	8.51	30.45
51Cr			2.45	0.1	15.50	13.05	30.82	28.37	27.18	24.73	15.88	0.1	21.89	6.01	27.26
			2.92	0.01	14.53	11.61	22.59	19.67	12.79	9.87	16.85	0.01	19.75	2.9	20.31
			2.78	0.001	3.90	1.12	8.99	6.21	3.13	0.35	15.45	0.001	14.36	-1.09	3.77
ADCC-014	PBMC	100	4.64	10	53.54	48.90	56.12	51.48	ND	ND	24.12	10	25.24	1.12	43.09
51Cr			4.64	1	46.84	42.20	43.00	38.36	ND	ND	24.12	1	22.68	-1.44	8
			4.64	0.1	45.63	40.99	39.94	35.30	ND	ND	24.12	0.1	24.95	0.83	31.48
			4.64	0.01	7.73	3.09	9.79	5.15	ND	ND	24.12	0.01	23.67	-0.45	26.14
			4.64	0.001	8.83	4.19	10.81	6.17	ND	ND	24.12	0.001	21.55	-2.57	21.84
						35.31		59.03		47.23				20.12	38.68

これらの2つのモノクローナル抗CD40抗体のADCC活性のさらなる試験を、上に略述された手順を使用して、結腸癌細胞株HCT116および7つの他の癌細胞株（卵巣癌細胞株SKOV3およびHEY、扁平上皮癌細胞株A431、乳癌細胞株MDA-MB231およびMDA-MB435、および肺癌細胞株NCI-H460およびSK-MES-1を含む）で実行した。図5A～Dおよび図6A～Dに示すように、CHIR-12.12モノクローナル抗体は、概して、任意の所定の濃度にておよび試験された任意の所定の細胞株について、CHIR-5.9モノクローナル抗体よりも多くのADCC活性を表した。

10

20

30

40

50

【0152】

(実施例4：CHIR-5.9およびCHIR-12.12は、動物モデルにおいて抗腫瘍活性を示す)

(薬理学／インビボ効果)

候補mAbは、2つの抗腫瘍機構（増殖／生存シグナルの遮断およびADCCの誘導）のいずれか／両方によって腫瘍負荷を減少するために、所望の薬理学的効果を生成すると予測される。現在入手可能な異種移植片ヒトリンパ腫モデルは、初代癌細胞とは対照的に、それらの成長および生存のためにCD40刺激に依存しない長期リンパ腫細胞株を使用する。それゆえ、腫瘍増殖／生存シグナルの遮断に基づく、これらのmAbの抗腫瘍活性の構成要素が、これらのモデルにおける抗腫瘍効果に寄与するとは予測されない。これらのモデルの効果は、ADCC（CHIR-5.9およびCHIR-12.12 mAbに関連する第二の抗腫瘍機構）に依存する。

10

【0153】

(異種移植片ヒトB細胞リンパ腫モデル)

NamalwaおよびDaudi細胞株に基づく2つの異種移植片ヒトリンパ腫モデルを、候補mAbの抗腫瘍活性について評価した。これらの治療活性をさらに実証するために、これらの候補mAbを、Daudi細胞株に基づく非病期の（すなわち、予防的）および病期の（すなわち、治療的）異種移植片ヒトリンパ腫モデルにおいて評価した。この結果およびこれらの異種移植片ヒトリンパ腫モデルについての実験分析の詳細を、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、そして、それぞれ、米国特許出願番号第60/517,337号（代理人事件番号第PP20107.001号（035784/258442））、同第60/525,579号（代理人事件番号第PP20107.002号（035784/271525））、および同第60/565,710号（代理人事件番号第PP20107.003号（035784/277214））として割り当てられた、発明の名称が「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」である、同時係属中の仮特許出願中に開示される；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。

20

【0154】

まとめると、T細胞欠失ヌードマウスを、3 Gyにて全身放射し、腫瘍接種の1日前に免疫系をさらに抑制した。腫瘍細胞を、1匹のマウスにつき右腹に 5×10^6 細胞で皮下接種した。処置を、腫瘍移植の1日後（非病期の（予防的）皮下異種移植片ヒトB細胞リンパ腫モデル、NamalwaおよびDaudi）かまたは腫瘍容積が 200 mm^3 に達した場合（病期の（治療的）Daudiモデル、通常腫瘍移植の15日後）のいずれかに開始した。腫瘍保有マウスを、抗CD40 mAbで腹腔内に（i.p.）1週間に1度注射した。非病期のNamalwaモデルの投与量は以下の通りであった：0.01 mg/kg、0.03 mg/kg、0.1 mg/kg、1 mg/kgおよび10 mg/kg（mAb CHIR-12.12）；1 mg/kg（mAb CHIR-5.9）；および10 mg/kg（リツキシマブ）。非病期のDaudiモデルの投与量は以下の通りであった：0.01 mg/kg、0.1 mg/kgおよび1 mg/kg（mAb CHIR-12.12およびmAb CHIR-5.9）；1 mg/kg（リツキシマブ）。非病期のDaudiモデルの投与量は以下の通りであった：0.01 mg/kg、0.1 mg/kg、1 mg/kgおよび10 mg/kg（mAb CHIR-12.12）；1 mg/kg（mAb CHIR-5.9）；および1 mg/kg（リツキシマブ）。腫瘍容積を1週間に2度記録した。任意の群の主要体積が、 2500 mm^3 に到達した場合、研究を終了した。病期のDaudiモデルにおいて、腫瘍容積データを36日目まで分析したのは、その日後に何匹かのマウスの死に起因したことに注意すること。完全な退行（CR）を、研究の終わりまで数えた。データを、分散分析またはクラスカルウォリステストおよび複数群の比較のために対応する試験後のデータを使用して分析した。

30

40

【0155】

50

非病期のN a m a l w aモデルにおいて、リツキシマブではなく、抗C D 4 0 m A b C H I R - 1 2 . 1 2が、有意に ($p < 0.01$) N a m a l w a腫瘍の成長を阻害した (腫瘍容積の減少の60%、対するリツキシマブについては25%、 $n = 10$ マウス/群) (データ示さず)。したがって、このモデルにおいて、抗C D 4 0 m A b C H I R - 1 2 . 1 2は、リツキシマブよりも強力であった。第二の候補m A bであるC H I R - 5 . 9が、リツキシマブの投与量の10分の1で少なくともリツキシマブと同じくらい効果的であったことが注目に値する。抗C D 4 0 m A b C H I R - 1 2 . 1 2とリツキシマブとの両方が、非病期のD a u d i腫瘍モデルにおいて、有意に腫瘍の発生を防いだ (腫瘍提示に対して14/15耐性) (データ示さず)。

【0156】

皮下腫瘍が明白であった場合に処置を開始し、これらの抗C D 4 0モノクローナル抗体を、病期の異種移植片D a u d iモデルにおいてさらに比較した場合、1mg/kgの抗C D 4 0 m A b C H I R - 1 2 . 1 2は、有意な腫瘍減少 ($p = 0.003$) をもたらし、60%の完全な退行を有したが (6/10)、一方、同じ用量のリツキシマブは、腫瘍成長を有意に阻害せず、それは完全な退行ももたらさなかった (0/10) (データ示さず)。

【0157】

まとめると、抗C D 4 0 m A b C H I R - 1 2 . 1 2は、実験リンパ腫モデルにおいて有意に腫瘍成長を阻害した。同じ用量およびレジメンにおいて、m A b C H I R - 1 2 . 1 2は、R i t u x a n (登録商標) (リツキシマブ) がしたよりも良好な抗癌活性を示した。さらに、毒性の臨床上の兆候は、この用量およびレジメンにおいて観察しなかった。これらのデータは、抗C D 4 0 m A b C H I R - 1 2 . 1 2が、インビトロでおよび異種移植片モデルにおいて、強力な抗ヒトリンパ腫活性を有し、そしてリンパ腫の処置について臨床効果的であり得ることを示唆する。

【0158】

(異種移植片ヒト結腸癌モデル)

これらの候補m A bを、固形腫瘍モデルにおけるそれらの治療的抗腫瘍活性についてさらに評価した。多くのヒト固形腫瘍に類似して、ヒト結腸癌細胞株H C T 1 1 6は、C D 4 0を発現し、そして異種移植片結腸癌モデルのために選択した。腫瘍細胞を、T細胞欠失ヌードマウス右腹に1匹のマウスにつき5×10⁶細胞で皮下接種した (この腫瘍は、先の照射がなくともヌードマウスにおいて成長し得る)。腫瘍接種の1日後、マウスに、抗C D 4 0 m A bの腹腔内 (i . p .) 注射を1週間に1度、全体で5回の投与を与えた。

【0159】

抗C D 4 0 m A bでの処置は、2つの反復研究において腫瘍成長阻害に対する再現可能な傾向を示した。これらの2つの研究の1つのデータを、図7に示す。興味深いことに、抗腫瘍活性の逆転をこのモデルの最も多い用量において (10mg/kg) 観察し、最適な用量/レジメンが、最良の腫瘍成長阻害を達成するために必要とされ得ることを示唆した。インビトロでより高いA D C C活性およびリンパ腫モデルにおいてより高い抗腫瘍効果を示したモノクローナル抗体C H I R - 1 2 . 1 2を、結腸癌モデルにおいて1mg/kgの1回の投与においてのみ試験した。C H I R - 1 2 . 1 2の用量滴定を、この異種移植片ヒト結腸癌モデルにおいてその抗腫瘍効果の完全な可能性を決定するために実行した。

【0160】

(非病期の (予防的) 同所性卵巣癌モデル)

C H I R - 1 2 . 1 2 m A bをまた、卵巣癌細胞株S K O V 3 i / p . 1を使用して、卵巣癌の非病期の (予防的) 同所性マウスモデルにおいて、その治療的抗腫瘍活性について評価した。腫瘍細胞を、T細胞欠失ヌードマウス中に1匹のマウスにつき2×10⁶細胞で腹腔内 (i . p .) 接種した。腫瘍接種後の1日目に始まって、マウスに、卵巣癌の処置についての臨床検査下にあるC H I R - 1 2 . 1 2 m A bまたはハーセプチン

10

20

30

40

50

(登録商標) (Genentech, Inc., San Francisco, California) の種々の用量の i. p. 注射を与えた。抗体を1週間に1度、全体で6回の投与をした。パーセント生存を、長期間計算した。

【0161】

CHIR-12.12 mAbでの処置は、用量依存性様式において生存期間を延長した(図8)。腫瘍接種の54日後、パーセント生存は、未処置コントロール群についてよりも30mg/kgのCHIR-12.12 mAbを受けている群についてより有意に高かった。ハーセプチン(登録商標)の類似の投与量は、延長した生存に向かう傾向を示したが、接種後の54日目のパーセント生存は、未処置のコントロール群について観察されたものよりも有意に大きくはなかった。

10

【0162】

図9は、抗体を腹腔内(i. p.) 対 静脈内(i. v.) に投与する場合、卵巢癌のこの非病期の同所性マウスモデルにおけるパーセント生存に対するCHIR-12.12 mAbの効果の比較を示す。処置プロトコルは、上に記載したとおりであった。この図において観察され得るように、CHIR-12.12 mAbのi. p. 注射は、この抗体のi. v. 投与で観察されたパーセント生存と比較して、改善したパーセント生存を生じた。

【0163】

(卵巢癌の病期の(治療的)マウスモデル)

CHIR-5.9およびCHIR-12.12 mAbを、卵巢癌細胞株SKOV3 i. p. 1を使用して卵巢癌の病期の(治療的)マウスモデルにおけるそれらの治療用抗腫瘍活性についてさらに評価した。この研究について、腫瘍細胞を、T細胞欠失ヌードマウスの右腹中に、1匹のマウスにつき 5×10^6 細胞で、10%のマトリゲルとともに皮下接種した。腫瘍接種6日後に開始して(腫瘍容積が $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ に到達した場合)、マウスに、これらのmAbの注射を腹腔内に1週間に1度、全体で4回の投与を与えた。腫瘍容積を、抗体投与の初日後、1週間に2度測定した。

20

【0164】

試験されたより高い抗体濃度にて(CHIR-5.9 mAbについて1mg/kg、およびCHIR-12.12 mAbについて10mg/kg)未処置コントロール群(図10)について観察した腫瘍成長と比較して、2つの候補mAbは有意に腫瘍成長を阻害した。CHIR-12.12 mAbについて(用量を変動した唯一の抗体)、腫瘍成長の阻害は、用量依存性の様式で発生し、最も大きな腫瘍減少は、最も高い用量(すなわち、10mg/kg)の場合に発生した。この最も高い用量において、CHIR-12.12 mAbは、等用量のハーセプチン(登録商標)と同程度効果的であった。

30

【0165】

(実施例5: CHIR-5.9およびCHIR-12.12は15B8と、CD40上の異なるエピトープに結合する)

候補モノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12は、CD40への結合のために相互に競合するが、15B8(IgG₂抗CD mAb(国際公開番号WO 02/28904を参照のこと)とは競合しない。Biacoreを使用した抗体競合的結合研究を、抗CD40、CHIR-12.12、または15B8のいずれかを捕捉するために使用した、アミン共役を介して固定されたプロテインAとともにCM5バイオセンサーチップを使用して示した。正常な会合/解離結合曲線を種々の濃度のCD40-his(データ示さず)を用いて観察する。競合的研究について、CHIR-12.12または15B8のいずれかを、プロテインA表面上に捕捉した。その後、種々の濃度のCD40-his/CHIR-5.9 Fab複合体(100nM CD40: 1μM CHIR-5.9 Fab)を、改変された表面にわたって流した(flow)。CHIR-12.12の場合において、観察された複合体の会合は存在せず、CHIR-5.9がCD40-hisへのCHIR-12.12の結合を遮断することを示した。15B8について、Fab CHIR-5.9複合体の会合を観察し、CHIR-5.9は、15B8

40

50

のCD40結合部位への結合を遮断しないことを示した。しかし、複合体の流失（off-rate）が劇的に増加した（データ示さず）。

【0166】

15B8およびCHIR-12.12がCD40-his結合について競合しないこともまた決定した。この実験を、プロテインAバイオセンサーチップ上にCHIR-12.12を捕捉することによって、残基プロテインA部位をコントロールhIgG₁で遮断することによって、CD40-hisを結合することによって、次いで、改変された表面上で15B8を流すことによって設定した。15B8は、これらの条件下で結合し、CHIR-12.12は、15B8をCD40へ結合することから遮断しないことを示した。

【0167】

（実施例6：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バイオセンサーチップ上に固定化した。ヒト抗CD40モノクローナル抗体（1.5 μg/ml）を、この固定化したバイオセンサの表面に10 μl/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% Surfactant P20（HBS-EP）中に希釈した。動力学定数および親和性定数を、1:1の相互作用モデル/全体的なフィットを用いて、Biaevaluationソフトウェアを使用して決定した。

【0168】

以下の表4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。

【0169】

【表4】

抗体	K _a (M ⁻¹ sec ⁻¹)	k _d (sec ⁻¹)	KD (nM)
抗CD40, CHIR-5.9	(12.35 ± 0.64) × 10 ⁵	(15.0 ± 1.3) × 10 ⁻³	12.15 ± 0.35
抗CD40, CHIR-12.12	(2.41 ± 0.13) × 10 ⁵	(1.24 ± 0.06) × 10 ⁻⁴	0.51 ± 0.02

（実施例7：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 μg）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 μg/ml濃度のモノクローナル抗体でプローブした。ブロットを、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。

【0170】

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5；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5；プロットは示さず）。

【0171】

【表5】

10

表5. 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	+	-	-	-

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。

20

【0172】

モノクローナル抗体CHIR-12.12は、還元条件および非還元条件の両方の下で、ドメイン2上のエピトープを認識する（表6；プロットは示さず）。対照的に、モノクローナル抗体CHIR-5.9は、ドメイン2に対して、非常に弱い認識を示す（表6；プロットは示さず）。これらの抗体のいずれもが、この分析において、ドメイン1、3または4は認識しない。

【0173】

30

【表6】

表6. ドメイン2の分析

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

mAb CHIR-12.12により認識されるエピトープをより正確に規定するために、ペプチドを、CD40の細胞外ドメイン2から合成し、これは、配列PCGESEFLDTWNRETHCHQHKEYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICT（配列番号10または配列番号12に示される配列の残基61～104）に対応する。1アミノ酸が相殺された（offset）35の10マーペプチドを含むSPOTメンブレン（Sigma）を作製した。mAb CHIR-12.12および抗ヒトIgGβ-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、mAb CHIR-5.9で再度プローブして、この抗体により認識される領域を決定した。

40

【0174】

10μg/mlの抗CD40モノクローナル抗体CHIR12.12でプローブするSPOT分析では、スポット18～22の反応が陽性であった。これらのペプチドによりカ

50

バーされる配列領域を、表 7 に示す。

【0175】

【表 7】

表 7. 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)

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

【0176】

mAb CHIR-5. 9 を用いる SPOT 分析は、表 8 に示されるスポット 20～22 により表されるペプチドの弱い認識を示し、これは、その CD40 への結合において、領域 YCDPNLGL (配列番号 10 または配列番号 12 に示す配列の残基 82～89) が関与することを示唆した。CHIR-12. 12 および CHIR-5. 9 は、BIACORE 分析において CD40 への結合に関して、互いに競合することに注意すべきである。

【0177】

【表 8】

表 8. 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)

SPOT 分析により同定した線形エピトープは、CD40 B1 モジュールの内部である。CD40 B1 モジュールの配列は、HKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTIC (配列番号 10 または配列番号 12 の残基 80～103) である。

【0178】

線形エピトープ内で CHIR-12. 12 について同定されたのは C83 である。このシステイン残基が C103 とジスルフィド結合を形成することは公知である。CHIR-12. 12 mAb のエピトープは、このジスルフィド結合 (C82-C103) および／または C103 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。

【0179】

(実施例 8：CHIR-12. 12 は、正常ヒト B 細胞の CD40 L が媒介する CD4

10

20

30

40

50

0の生き残りおよび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NFκB、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。

【0180】

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キナーゼ(IKK)αおよびβのリン酸化(NFκB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。

【0181】

(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、 $1 \mu\text{g/ml}$ のsCD40L(Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)で刺激した。次いで、CHIR-12.12($10 \mu\text{g/ml}$)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β-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。

【0182】

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、切断型カスパーゼ3、または切断型PARPの経時的な増加を生じなかったのも、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、CHIR-12.12での処理は、これらの切断生成物の増加をもたらした。CHIR-12.12処理が、CD40L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CD40L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)。

【0183】

(CHIR-12.12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、 $1 \mu\text{g/ml}$ のsCD40L(Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)で刺激した。次いで、CHIR-12.12($10 \mu\text{g/ml}$)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。Mcl-1、XIAP、CD40およびβ-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。簡単に述べると、sCD40L刺激は、Mcl-1およびXIAPの持続的な発現を生じた。しかし、sCD40Lで刺激した細胞のCHIR12.12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)。Mcl-1およびXIAP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、CHIR-12.12処理が、sCD40L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。

【0184】

(CHIR-12. 12での処理は、正常なB細胞において、IKK α (Ser180) およびIKK β (Ser181) 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分および20分で回収した。リン酸化IKK α (Ser180) およびIKK β (Ser181) および総IKK β 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

【0185】

簡単に述べると、sCD40Lによる刺激は、IKK α (Ser180) およびIKK β (Ser181) の経時的なリン酸化を生じた；しかし、CHIR-12. 12での処理は、正常なB細胞におけるsCD40L刺激に対するこの応答を抑止した(データ示さず)。

【0186】

(CHIR-12. 12での処理は、CD40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sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)で刺激した。CHIR-12. 12($0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$)およびコントロールのIgGを添加した。細胞を、24時間で回収した。切断型PARPおよび β 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。

20

【0187】

簡単に述べると、CHIR-12. 12処理は、sCD40L刺激した細胞において、用量依存性の様式で、PARPの切断の増加を生じ、それゆえ、sCD40L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)。

【0188】

(CHIR-12. 12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sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK)で刺激した。CHIR-12. 12($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)およびコントロールのIgGを添加した。細胞を、22時間で回収した。Mc1-1、XIAP、切断型PARPおよび β 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。

30

【0189】

簡単に述べると、CHIR-12. 12処理は、sCD40Lで刺激した細胞において、用量依存性の様式で、Mc1-1およびXIAPの発現を減少し、そして、切断型PARPの発現を増加し、従って、sCD40L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)。

40

【0190】

(CHIR-12. 12は、可溶性CD40L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PARPおよびXIAPの発現に影響を及ぼさなかった)

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、CHIR-12. 12($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)およびコントロールのIgGのみで処理した(すなわち、細胞は、抗体を添加する前に、sCD40L

50

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 β 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。

【0191】

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。

【0192】

(C H I R-1 2. 1 2は、正常なB細胞において、I K K α (S e r 1 8 0) およびI K K β (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 α 、ホスホ-I K K β 、総I K K β 、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。

【0193】

簡単に述べると、s C D 4 0 L刺激は、I K K α/β 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)。

【0194】

(C H I R-1 2. 1 2は、C D 4 0シグナル伝達カスケードにおけるP I 3 KおよびM E K/E R Kのような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% 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。この培養物をまた、C H I R-1 2. 1 2 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)、W o r t m a n i n (一種のP I 3 K/A k tインヒビター; $1 \mu\text{M}$ および $10 \mu\text{M}$)、L Y 2 9 4 0 0 2 (一種のP I 3 K/A k tインヒビター; $10 \mu\text{M}$ および $30 \mu\text{M}$) およびP D 9 8 0 9 5 (一種のM E Kインヒビター; $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $30 \mu\text{g}/\text{ml}$)で処理した。細胞を、0分および20分で回収した。ホスホ-E R K、ホスホ-A k t、総A k t、ホスホ-I K K α/β 、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。

【0195】

簡単に述べると、これらの結果は、C H I R-1 2. 1 2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、C H I R-1 2. 1 2が、C D 4 0 L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)。

【0196】

(C H I R-1 2. 1 2は、正常なB細胞において、シグナル伝達分子であるT R A F 2およびT R A F 3の、C D 4 0の細胞質ドメインへの結合を阻害する)

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% F B S含有培地中で血清飢餓状態にし、そして、

10

20

30

40

50

1 μ 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。

【0197】

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)。

【0198】

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、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。

【0199】

(実施例 9：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、pH 5.5 ~ 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、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 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。

【0200】

(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、150 kDa 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。

【0201】

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、10 mM のクエン酸ナトリウム、150 mM の塩化ナトリウム (pH 6.5) 中 9.7 mg/ml の CHIR-12.12 抗体であった。この研究にお

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°C 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9に示すように、UV280により測定した。

【0202】

【表9】

表9. CHIR-12.12処方物

緩衝液の組成	pH	CHIR-12.12 濃度 (mg/ml)
10 mM ケン酸ナトリウム, 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 ケン酸ナトリウム, 150 mM 塩化ナトリウム	6.0	9.7
10 mM ケン酸ナトリウム, 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

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、以下のプロトコルを用いてアッセイした。

【0203】

(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、 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で、 15°C から 90°C まで加熱しながら、MicroCal VP-DSCを用いてモニターした。

【0204】

(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、クーマシーブルー染色により検出した。

【0205】

(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、 $0.7\text{ ml}/\text{分}$ の流速で、 100 mM リン酸ナトリウム(pH7.0)を移動相として用いて、Tosohas TSK-GEL 3000 SWXLカラムを備えるWater Alliance HPLCにより測定した。

【0206】

(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、 $0.5\text{ ml}/\text{分}$ の流速で、 50 mM のHEPES(pH7.3)を移動相Aとして、そして、 500 mM のNaClを含有する 50 mM 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。

【0207】

(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 T_m 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

10

20

30

40

50

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。

【0208】

(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、pH5.5を上回る処方物において、23kDaおよび27kDa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、51kDaのMWを有する種が観察されたが、pH5.0～5.5においては少ないようであった。100kDaのMWを有する種が、pH7.5およびpH9.0において見られ得た。

10

【0209】

還元条件下では、CHIR-12.12は、それぞれ、50kDaのMWおよび24kDaのMWを有する、遊離重鎖および遊離軽鎖に還元された。100kDa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ので、各処方物の安定性の比較は、残存するCHIR-12.12の純度に基づく。pH5.0～6.0の処方物は、CHIR-12.12により安定な環境を提供した。SDS-PAGEによって、わずかな凝集が検出された(データ示さず)。

【0210】

(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10に示すように、pH4.5およびpH6.5～9.0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、pH7.5およびpH9.0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

30

【0211】

【表 10】

表10. 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

(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11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、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、pH9.0 (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。

【0212】

【表 11】

表11. 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、pH5.0~5.5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。

【0213】

(実施例10：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、CD40発現癌腫細胞を含む固形腫瘍のための効果的な治療を提供することである。これらの腫瘍は、肺、乳房、結腸、卵巣および皮膚の癌腫を包含する。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、化学療法剤、および他の抗体と組み合わせられる。

10

【0214】

(第I相)

・安全性および薬物動態学を評価する—上記の固形腫瘍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⁺腫瘍細胞の枯渇など)が、用量決定に適切であり得る。

・特に種々の適応症について2以上の用量を考える(例えば、乳癌用の用量は、卵巣癌用の用量とは異なりうる)。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。

20

・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。

・この治験は、CD40発現固形腫瘍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、および抗腫瘍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

【0215】

(第II相)

数回の治験を、肺癌、卵巣癌および乳癌に焦点を合わせて上記の腫瘍型において開始する。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。

【0216】

各疾患において、以下の現行の標準的な医療が機能しない集団を対象とする。

- ・肺：手術、放射線治療、化学療法
- ・卵巣：手術、放射線治療、化学療法
- ・乳房：手術、放射線治療、化学療法、ホルモン療法

40

*研究を中止するかまたは継続するかの決定は、第II相における治療構想の吟味に基づく

*临床上の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。

【0217】

(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

50

行なわれる。

【0218】

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。

【0219】

10

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。

【0220】

【表 1 2 - 1】

出願人または代理人のファイル参照	PP21566.002	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16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。 ☒		
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 ☐		
第20頁、第17行；第65頁、第23行；第96頁、第10行；第100頁、第1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

☐ この用紙は国際出願とともに受理された
認定官

国際事務局記入欄

☐ この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官

10

20

30

40

【表 1 2 - 2】

出願人または代理人のファイル参照	PP21566.002	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16行で言及された、寄託された微生物または他の生物材料に関してなされた。	
B. 寄託物の表示	その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。 ☐
寄託機関の名称 American Type Culture Collection	
寄託機関の住所（郵便番号および国を含む） アメリカ合衆国 バージニア 20110-2209、マナサス ユニバーシティ ブールバード 10801	
寄託日 2003年9月17日	受託番号 PTA-5543
C. 追加の表示（なければ空白のまま） この情報は追付の用紙に続く ☐	
第20頁、第17行；第65頁、第23行；第96頁、第10行；第100頁、第1行	
D. 表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）	
E. 別に添付する表示物（なければ空白のまま）	
下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）	

受理官庁記入欄
☐ この用紙は国際出願とともに受理された
認定官

国際事務局記入欄
☐ この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官

【表 1 2 - 3】

ATCCバージニア 20110-2209, マナサス, ユニバーシティ, ブルーバード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-5542

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

PTA-5543

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: X 30年間にわたり、本株の分譲請求があれば、これを通知する。

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

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

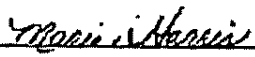
本株は寄託の日から少なくとも30年間、または最新の分譲請求後5年のいずれか長い方にわたり保管される。合衆国および多くの他の国々がブダペスト条約に加盟している。

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

30

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

ATCC 代表責任者の署名:


マリー ハリス, ATCC特許寄託局長

日付: 2003年10月2日

cc: リサ アレキサンダー

(参照: 事件番号: P20107.001)

40

【図面の簡単な説明】

【0 2 2 3】

【図1A】図1は、mA b 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

50

の残基 21～132) および定常領域 (配列番号 2 の残基 133～239) は図 1 A 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 20～139) および定常領域 (配列番号 4 の残基 140～469) は図 1 B に示される。図 1 B に示される mAb CHIR-12. 12 の重鎖についての代替定常領域は、配列番号 4 の位置 153 におけるアラニン残基に対するセリン残基の置換を反映する。この mAb CHIR-12. 12 の重鎖の改変体についての完全配列は、配列番号 5 に示される。

【図 1 B】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 1 A 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 20～139) および定常領域 (配列番号 4 の残基 140～469) は図 1 B に示される。図 1 B に示される mAb CHIR-12. 12 の重鎖についての代替定常領域は、配列番号 4 の位置 153 におけるアラニン残基に対するセリン残基の置換を反映する。この mAb CHIR-12. 12 の重鎖の改変体についての完全配列は、配列番号 5 に示される。

10

【図 2 A】図 2 は、mAb CHIR-12. 12 に関する軽鎖についてのコード配列 (図 2 A; 配列番号 1) および重鎖についてのコード配列 (図 2 B; 配列番号 3) を示す。

【図 2 B】図 2 は、mAb CHIR-12. 12 に関する軽鎖についてのコード配列 (図 2 A; 配列番号 1) および重鎖についてのコード配列 (図 2 B; 配列番号 3) を示す。

20

【図 3 A】図 3 は、mAb CHIR-5. 9 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 6 の残基 1～20)、可変領域 (配列番号 6 の残基 21～132) および定常領域 (配列番号 6 の残基 133～239) は図 3 A に示される。重鎖のリーダー領域 (配列番号 7 の残基 1～19)、可変領域 (配列番号 7 の残基 20～144) および定常領域 (配列番号 7 の残基 145～474) は図 3 B に示される。図 3 B に示される mAb CHIR-5. 9 の重鎖についての代替定常領域は、配列番号 7 の位置 158 におけるアラニン残基に対するセリン残基の置換を反映する。この mAb CHIR-5. 9 の重鎖の改変体についての完全配列は、配列番号 8 に示される。

【図 3 B】図 3 は、mAb CHIR-5. 9 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 6 の残基 1～20)、可変領域 (配列番号 6 の残基 21～132) および定常領域 (配列番号 6 の残基 133～239) は図 3 A に示される。重鎖のリーダー領域 (配列番号 7 の残基 1～19)、可変領域 (配列番号 7 の残基 20～144) および定常領域 (配列番号 7 の残基 145～474) は図 3 B に示される。図 3 B に示される mAb CHIR-5. 9 の重鎖についての代替定常領域は、配列番号 7 の位置 158 におけるアラニン残基に対するセリン残基の置換を反映する。この mAb CHIR-5. 9 の重鎖の改変体についての完全配列は、配列番号 8 に示される。

30

【図 4 A】図 4 は、ヒト CD40 の短いアイソフォームについてのコード配列 (図 4 A; 配列番号 9) (アミノ酸配列は図 4 B; 配列番号 10 に示される)、およびヒト CD40 の長いアイソフォームについてのコード配列 (図 4 C; 配列番号 11) (アミノ酸配列は図 4 D に示される) を示す。

40

【図 4 B】図 4 は、ヒト CD40 の短いアイソフォームについてのコード配列 (図 4 A; 配列番号 9) (アミノ酸配列は図 4 B; 配列番号 10 に示される)、およびヒト CD40 の長いアイソフォームについてのコード配列 (図 4 C; 配列番号 11) (アミノ酸配列は図 4 D に示される) を示す。

【図 4 C】図 4 は、ヒト CD40 の短いアイソフォームについてのコード配列 (図 4 A; 配列番号 9) (アミノ酸配列は図 4 B; 配列番号 10 に示される)、およびヒト CD40 の長いアイソフォームについてのコード配列 (図 4 C; 配列番号 11) (アミノ酸配列は図 4 D に示される) を示す。

【図 4 D】図 4 は、ヒト CD40 の短いアイソフォームについてのコード配列 (図 4 A; 配列番号 9) (アミノ酸配列は図 4 B; 配列番号 10 に示される)、およびヒト CD40

50

の長いアイソフォームについてのコード配列（図4C；配列番号11）（アミノ酸配列は図4Dに示される）を示す。

【図5】図5は、卵巣癌細胞株SKO3（図5A）およびHey（図5B）、扁平上皮癌細胞株A431（図5C）、および結腸癌細胞株HCT116（図5D）に対する、モノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12の抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC）活性を示す。

【図6】図6は、乳癌細胞株MDA-MB231（図6A）およびMDA-MB435（図6B）、および肺癌細胞株NCI-H460（図6C）およびSK-MES-1（図6D）に対する、モノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12の抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC）活性を示す。

10

【図7】図7は、ヒト結腸癌細胞株HCT116に基づく異種移植片結腸癌モデルを使用して、モノクローナル抗体CHIR-5.9（図において5.9と示される）およびCHIR-12.12（図において12.12と示される）のインビボでの抗腫瘍活性を実証する。

【図8】図8は、ヒト卵巣癌細胞株SKOV3i.p.1を使用した卵巣癌の非病期の同所性マウスモデルにおける生存率に対する、腹腔内に投与された抗CD40モノクローナル抗体CHIR-12.12（図において12.12と示される）または抗HER2モノクローナル抗体ハーセプチン（登録商標）の効果を示す。

【図9】図9は、ヒト卵巣癌細胞株SKOV3i.p.1を使用した卵巣癌の非病期の同所性マウスモデルにおける生存率に対する、腹腔内 対 静脈内に投与されたモノクローナル抗体CHIR-12.12（図において12.12と示される）またはハーセプチン（登録商標）の効果を比較する。

20

【図10】図10は、ヒト卵巣癌細胞株SKOV3i.p.1に基づく卵巣癌の病期のマウスモデルを使用して、ハーセプチンについて観察されたインビボでの抗腫瘍活性に対する、モノクローナル抗体CHIR-12.12（図において12.12と示される）およびCHIR-5.9（図において5.9と示される）のインビボでの抗腫瘍活性を実証する。

【図11】図11は、示差走査熱量測定法（DSC）によって測定された異なるpH処方物におけるCHIR-12.12の熱融解温度を示す。

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSLTLLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC*

ASTKSGVSVPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVGLVPEPPTVSWNSGALTSVGTITFAVSGK
 BGLYSLSVVSVTPVSSSLGTLYICNVKNGKTVKDKVKECKDKCTKTPCCPAPELIL
 GSPSVLFPFKPKDITLMLSRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRRE
 QYNSTTRVVVGLTVLQHWDLNGEKVSGSKNALPAPTEKTSKARGQPREPQVYTLPE
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEKESGQPNENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
 DKSRWQGGNVFSCVNHIALHNYTKQKLSLSLSPGK

定常: RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

ASTKGSVFPLPAPASKSSTGGTAALGLCNVDYFPFEVTVSWNSGALTSGVHTFPVAVLQGS
 SGLYSLSVVTVVSSSLGTQVTVICNVNKKVPNTKVDKRVKSCDKTHTCPCPAPELLG
 GSVPLFPLPPKPDLTMLISTPTVEVHVVDVSHDEPKEVFWVWQVGEVNHNAKPPAREEE
 QYNSTYRVVSVLTVLQDWLNGKEYKCKPKSNKALPAIEKTSISKAKGQPREPQVYTLPP
 SREMTTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLLTV
 DRRWQQGNTPVSCVNHGALHNPYSQKLSLSLSPG*

ASTKGPSVFPLA¹PSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQ²
SGLSSELSVVITVSSGLSEGLYFLI³CNVNKKRPTKVKRVEPKDKTHTKCP⁴PPAEAL⁵
GGSYFLFPEPKPDKDTLMLSTPTVEYCVVVDVSDPEDEKRVNVEGVHNAKTPKEE⁶
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTL⁷ISKAKQGP⁸REPQVYTL⁹LP¹⁰
SREEMTKNQVSLTCLVKGLYIPPSDAVEENSGNQ¹¹PKPKYTK¹²PPVLDSDGSFFLYSKLL¹³TV¹⁴
DKSRWOOGNVYFSCSMEHAHLHPSNIT¹⁵TKSLEGLSPGK¹⁶

5' atggcgtctcctgcctgactcgtctcgtgggtgctgttaagcttggctctggatcagctggatgttgatgactgctccat
tctccgactgactcaccctggagcggcctgctctctcctcagcttcagacagcctctgatatgattatgatacactcat
ttggatgttgtaacctgcagagcagcggcgactccacaggctcgtgatctctttgggttataatcgggctctcgggtccctgacag
gttgcgtggcggtggatgcacggcagattttacacatgaaacacgacagctggagctcggatgttgggttttataatcagcag
cctgcacaaactcacttcaatttcggcctggctggatggatggatggatgatacagcgaactgttggtgcaccactctgtctcaatcc
cgccatctgagtgcagcttgaatctggatcctctcttcttgcgtgcgtgcataactctatccagagacggcgaacaaactcag
cgtgaagctggatacgcctccatactggctgaactccaggagatgttcacacagcaggacagacgacagacacacacagcc
tcagcagccacactgacgtgcagaaacagcagctacacagcaacaaacaaagtctcacgctgcggaagtcaccatcaccctgcag
ctcggccctgcacaaagctcagacacggggagagctgttg3'

[illegible]

1 atggctctgc tgcctcga gtcgctctc tggggctctg tgcctgacgc tgcctatca
61 gaaccaccca ctgtacgcag agaaaacag taccataaa acagtctggt cttgttctg
121 tgcagacaga gacagaacat gctggaglcg tgcacagagt tcaclgaac ggaatgcct
181 ccttggctgg aagaagaatt ctctagacac tggaaacaga gacacacg cccagcac
241 aaatactcgc accccaactt agggctctgg ctacacgaga aggggaacct agaaacaga
301 aacatlcga ccttgaaga agctctgac ctgacagctt aggccttga cgtgctgtc
361 ctgacacgtt catgtctgc cggcttgg ctcaacaga tgcctacag gcttcttg
421 aacatctgc agcctgcac agctgccttc ttctcaatg tgcctcgcg ttctgaaaaa
481 tgccttgga cagaaagtc cccagctatc gctgacagac ctgtgtgtga tcccatcat
541 cttcggtgac cttgttga tcccttgg tctgttctt atcaaaaagg tggcaacaga
601 gcaacaactt aa

1 mvrplqqlv wgciltavhp epptacrekq ylnsqccsl cqpqgklvsd cftetecf
61 pgesefidit wnrethchqh kyodpnlgf vqkqktsed tictceegwh ctseacescv
121 llrscspgfg vkqialgvsd ticepcpvf fsnvssafek chipwtrspgs aespqgdphh
181 lrdpvhplg aglyqkggqe anq

【図 4 C】

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 atggttctgc tgcctctgca gtcgtctc tggggtctgt tgcagccgc tgcctatoca
61 gaaccacca ctgcacgag agaaaaacag taactaataa acagtcagtg ctgttttg
121 tgcagccag gacagaaact gglgagtgac tgcacagagt taactgaac ggaatgctt
181 ccttgoggig aaagogaatt cctagacac tgaacacag agacacactg ccaacagcac
241 aaatactgag acccaact agggcttcgg tgcacgaga agggcacctc agaaacagac
301 accactgca cctgtgaaga aggtggcac tgaacagtg aggccttga gagctgtgc
361 ctgcacgct catgctggc cggcttggg gtcaagcaga ttgtacagg ggtttctgat
421 accactgag agccctggcc agtcggcttc ttctcaatg tgcactctgc ttctgaaaaa
481 tgcacccct ggacaagctg tgagaccaaa gaacctgttg tgcaacagg aggcacaaac
541 aagactgat ttgtctgtg tcccaaggat cggctgagag ccttggtgt gatcccatc
601 atcttggga tctgtttgc catctcttg tgcctgtgt ttatcaaaa ggtggccaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccacccaag caggaacccc aggagatcaa ttctccgac
721 gatctctcg gctcaacac tgcctctca tgcaggaga ctttactgg atgcaaacg
781 gtacaccag aggatggcaa agagagtcgc atctagtcg aggagagaca glga
  
```

【図 4 D】

FIGURE 4D

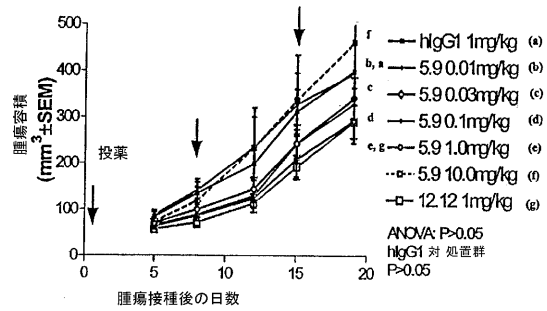
ヒトCD40のコードされた長いアイソフォーム:

```

1 mvrplqcvl wgtltavhp epptacrekq ylinsqcsli cpggqkvsd clefieted
61 pcgesefidt wnrethchqh kyedpnlgir vqkgktsetd tictceegwh ctseaoescv
121 lhrscspgfg vkqiatgved ticepvgvf fsmvssafek chpwtsocet dlrvqqagln
181 ktdvvcpgpd rlrhvvipi ifglfaiil vivfikkvak kptnkaphk qepqelnfnd
241 dlpgsntaap vqellhgoap vtqedgkesr isvqerq
  
```

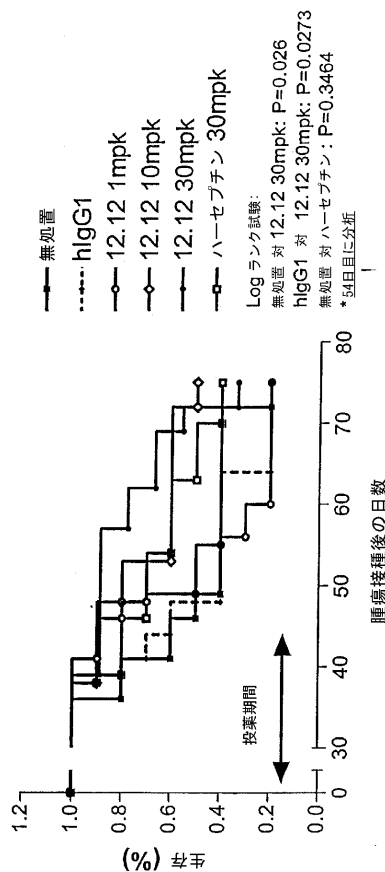
【図 7】

FIGURE 7



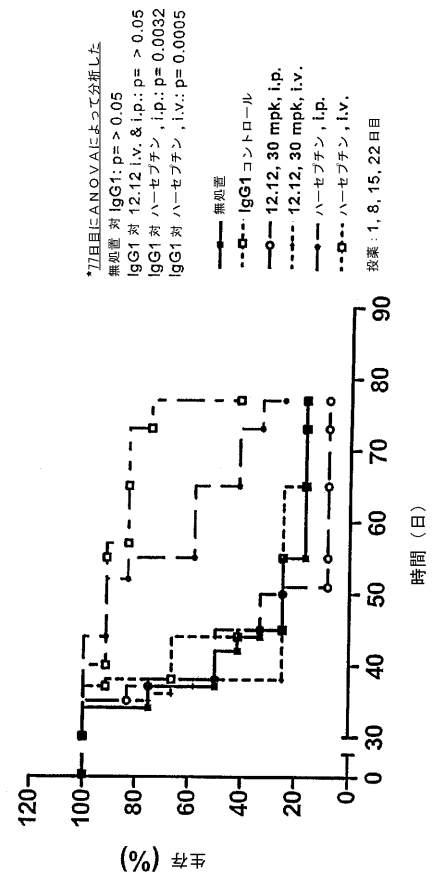
【図 8】

FIGURE 8

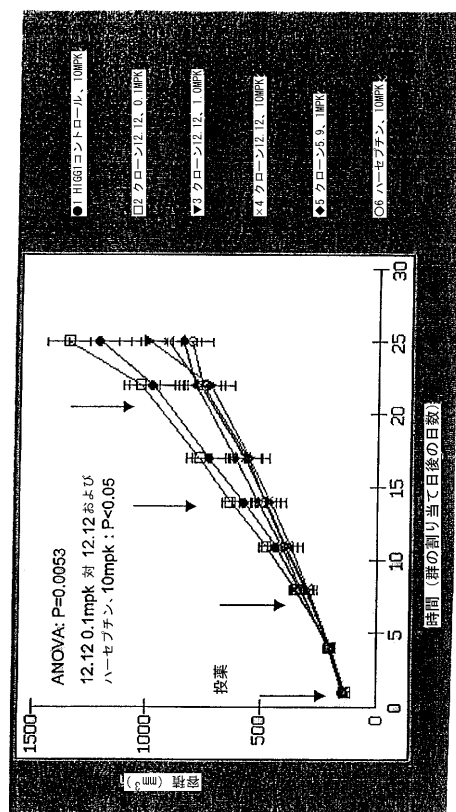
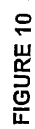


【図 9】

FIGURE 9

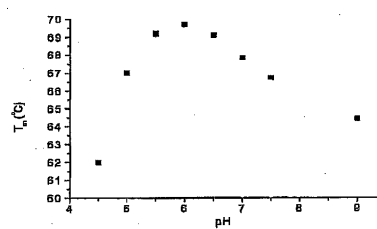


【図 10】



【図 1 1】

FIGURE 11



【図 5】

FIGURE 5B

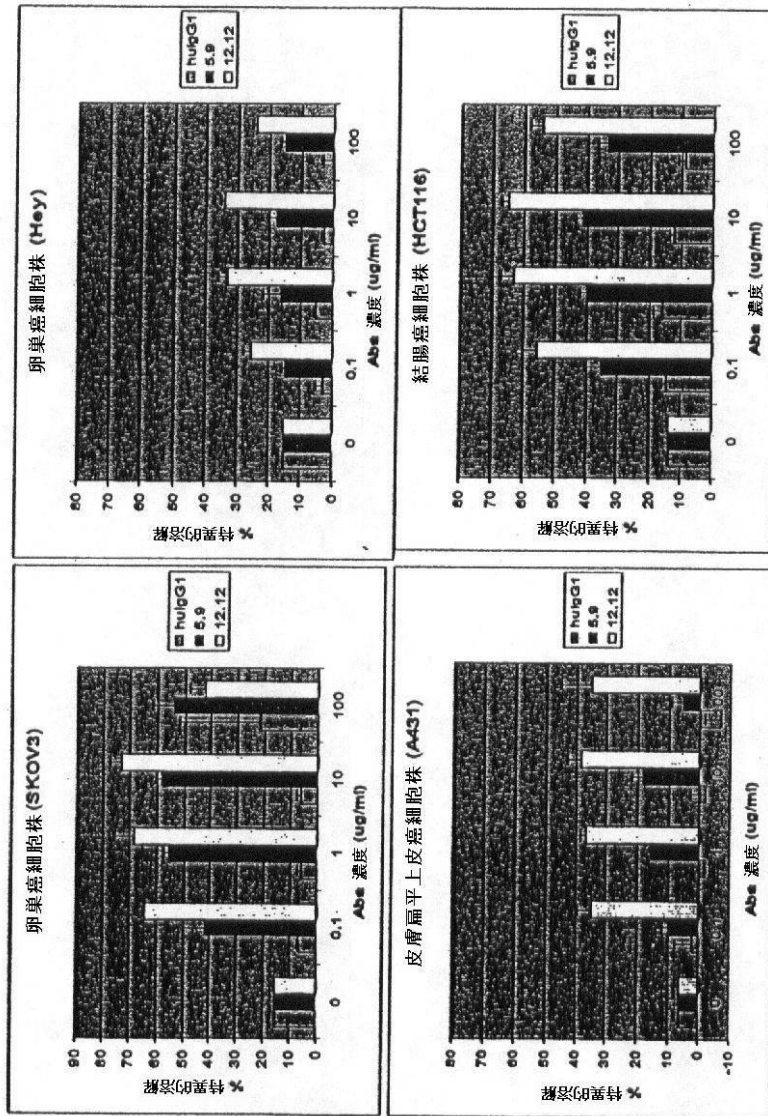


FIGURE 5D

FIGURE 5C

【図 6】

FIGURE 6B

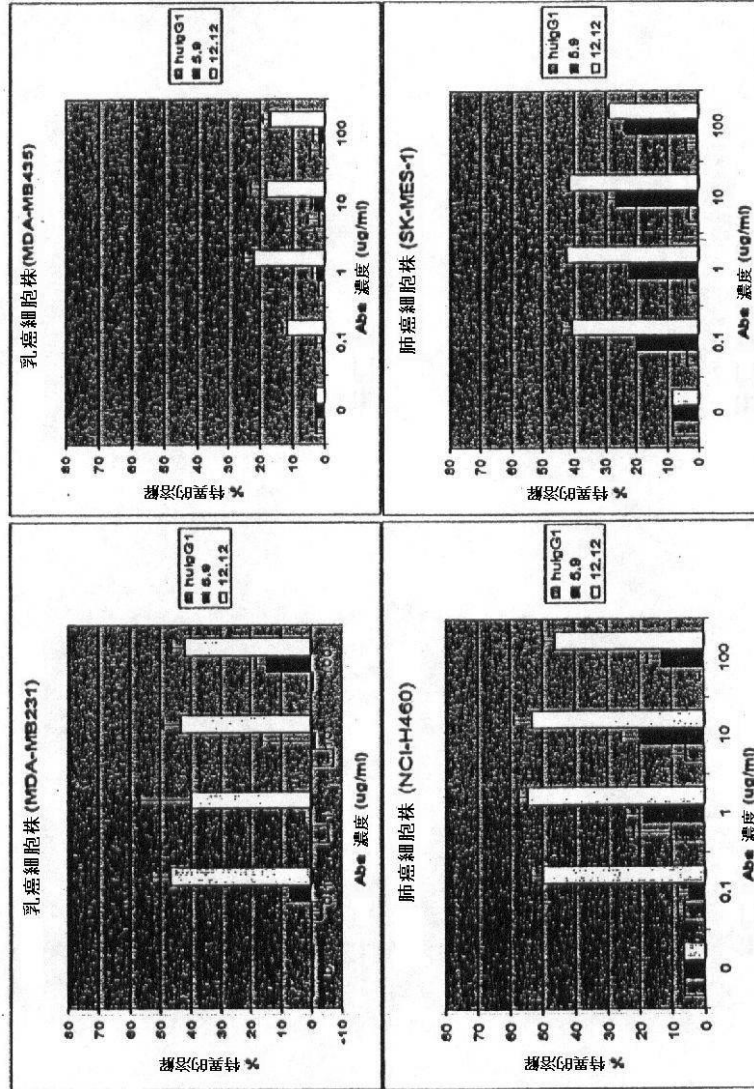


FIGURE 6D

FIGURE 6C

【配列表】

0004765038000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C O 7 K 16/28 (2006.01) C O 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)
(31)優先権主張番号 60/565,634
(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

(74)代理人 100062409
弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ロン, リ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94662-8097, エミリービル, ピー.オー. ボ
ックス 8097, カイロン コーポレイション 気付

(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 94662-8097, エミリービル, ピー.オー. ボ
ックス 8097, カイロン コーポレイション 気付

(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 94662-8097, エミリービル, ピー.オー. ボ
ックス 8097, カイロン コーポレイション 気付

(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 94662-8097, エミリービル, ピー.オー. ボ
ックス 8097, カイロン コーポレイション 気付

審査官 安居 拓哉

(56)参考文献 国際公開第02/060485 (WO, A1)
米国特許第05801227 (US, A)
国際公開第95/017202 (WO, A1)
米国特許第05874082 (US, A)
国際公開第96/018413 (WO, A1)
国際公開第02/028480 (WO, A1)

(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