

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-523514

(P2024-523514A)

(43)公表日 令和6年6月28日(2024.6.28)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全71頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-579198(P2023-579198)	(71)出願人	516174219
(86)(22)出願日	令和4年6月28日(2022.6.28)		江蘇恒瑞医薬股 ぶん 有限公司
(85)翻訳文提出日	令和5年12月22日(2023.12.22)		中華人民共和国 2 2 2 0 4 7 江蘇省連雲
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/101780		港市経済技術開発区昆侖山路7号
(87)国際公開番号	WO2023/274201	(71)出願人	520392096
(87)国際公開日	令和5年1月5日(2023.1.5)		上海盛迪医薬有限公司
(31)優先権主張番号	202110722124.0		SHANGHAI SHENGDI PH
(32)優先日	令和3年6月28日(2021.6.28)		ARMACEUTICAL CO., L
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		T D
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東 新区張江鎮海科路1 2 8 8号 No. 1 2 8 8 Ha i k e R o a d , Z h a n g j i a n g T o w n , P u d o n g N e w D i s t r i c t , S h a n g h a i 2 0 1 2 1 0 , C h 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗 C D 4 0 抗体、その抗原結合断片及び医薬用途

(57)【要約】

抗 C D 4 0 抗体、その抗原結合断片と医薬用途、及び抗 C D 4 0 抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物、並びに疾患を治療・予防する方法、特に自己免疫疾患を治療する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重鎖可変領域（VH）と軽鎖可変領域（VL）を含む抗CD40抗体又はその抗原結合断片であって、

a - 1) 前記VHは配列番号67又は68の何れか1つで示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号63～66の何れか1つで示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、

a - 2) 前記VHは配列番号1で示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号2で示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、

a - 3) 前記VHは配列番号3で示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号4で示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、

a - 4) 前記VHは配列番号5で示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号6で示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、

b - 1) 前記VHは配列番号81又は82の何れか1つで示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号77～80の何れか1つで示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、

b - 2) 前記VHは配列番号7で示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号8で示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、

b - 3) 前記VHは配列番号9で示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号10で示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、

b - 4) 前記VHは配列番号11で示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号12で示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、

b - 5) 前記VHは配列番号13で示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号14で示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、

b - 6) 前記VHは配列番号15で示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号16で示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、

b - 7) 前記VHは配列番号17で示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号18で示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、

c) 前記VHは配列番号19で示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号20で示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、或いは

d) 前記VHは配列番号21で示されるVH中のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3を含み、前記VLは配列番号22で示されるVL中のLC DR 1、LC DR 2、LC DR 3を含み、

ここで、前記CDRはKabat、IMGT、Chothia、AbM又はContact番号付けシステムに従って定義され、好ましくはKabat番号付けシステムによって定義される、

抗CD40抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2】

1) それぞれ配列番号23、24、25で示される配列を含む重鎖HC DR 1、HC DR 2、HC DR 3と、それぞれ配列番号74、75、76で示される配列を含む軽鎖LC

10

20

30

40

50

D R 1、L C D R 2、L C D R 3と、

2)それぞれ配列番号88、89、90で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、それぞれ配列番号91、37、92で示される配列を含む軽鎖L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3と、

3)それぞれ配列番号51、52、53で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、それぞれ配列番号54、55、56で示される配列を含む軽鎖L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3と、或いは

4)それぞれ配列番号57、58、59で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、それぞれ配列番号60、61、62で示される配列を含む軽鎖L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3と、を含み、

好ましくは、1)中の抗CD40抗体又はその抗原結合断片は、

1-1)それぞれ配列番号23、24、25で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、それぞれ配列番号29、30、73で示される配列を含む軽鎖L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3と、

1-2)それぞれ配列番号23、24、25で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、それぞれ配列番号26、27、28で示される配列を含む軽鎖L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3と、

1-3)それぞれ配列番号23、24、25で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、それぞれ配列番号29、27、32で示される配列を含む軽鎖L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3と、を含み、

好ましくは、2)中の抗CD40抗体又はその抗原結合断片は、

2-1)それぞれ配列番号39、47、49で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、それぞれ配列番号87、50、48で示される配列を含む軽鎖L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3と、

2-2)それぞれ配列番号33、34、35で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、それぞれ配列番号36、37、38で示される配列を含む軽鎖L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3と、

2-3)それぞれ配列番号39、40、41で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、それぞれ配列番号42、37、43で示される配列を含む軽鎖L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3と、

2-4)それぞれ配列番号39、44、35で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、それぞれ配列番号45、37、46で示される配列を含む軽鎖L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3と、

2-5)それぞれ配列番号39、47、41で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、それぞれ配列番号36、37、48で示される配列を含む軽鎖L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3と、を含み、

より好ましくは、1-1)中の抗CD40抗体又はその抗原結合断片は、

それぞれ配列番号23、24、25で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、配列番号29で示される配列を含む軽鎖L C D R 1と、配列番号30で示される配列を含む軽鎖L C D R 2と、配列番号69~72の何れか1つで示される配列を含む軽鎖L C D R 3と、を含み、

より好ましくは、2-1)中の抗CD40抗体又はその抗原結合断片は、

それぞれ配列番号39、47、49で示される配列を含む重鎖H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3と、配列番号83~86の何れか1つで示される配列を含む軽鎖L C D R 1と、配列番号50で示される配列を含む軽鎖L C D R 2と、配列番号48で示される配列を含む軽鎖L C D R 3と、を含む、

請求項1に記載の抗CD40抗体又はその抗原結合断片。

【請求項3】

組換え抗体、ウサギ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体又はその抗原結合断片である、請求項1又は2に記載の抗CD40抗体又はその抗原結合断片。

10

20

30

40

50

【請求項 4】

前記ヒト化抗体又はその抗原結合断片の重鎖フレームワーク領域はIGHV2-26*01、IGHV4-30-4*02、IGHV4-4*08、IGHJ1*01に由来し、且つ/又は、軽鎖フレームワーク領域はIGKV1-13*02、IGKV1-9*01、IGKV1-6*01、IGKJ4*01に由来し、

好ましくは、重鎖フレームワーク領域のFR1~FR3はIGHV2-26*01、IGHV4-30-4*02、IGHV4-4*08に由来し、重鎖フレームワーク領域のFR4はIGHJ1*01に由来し、軽鎖フレームワーク領域のFR1~FR3はIGKV1-13*02、IGKV1-9*01、IGKV1-6*01に由来し、軽鎖フレームワーク領域のFR4はIGKJ4*01に由来する、

10

【請求項 5】

A-1) VHのアミノ酸配列は配列番号67で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号63~66の何れか1つで示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

A-2) VHのアミノ酸配列は配列番号68で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号63~66の何れか1つで示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

A-3) VHのアミノ酸配列は配列番号1で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号2で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

20

A-4) VHのアミノ酸配列は配列番号3で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号4で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

A-5) VHのアミノ酸配列は配列番号5で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号6で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

B-1) VHのアミノ酸配列は配列番号81で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号77~80の何れか1つで示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

30

B-2) VHのアミノ酸配列は配列番号82で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号77~80の何れか1つで示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

B-3) VHのアミノ酸配列は配列番号7で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号8で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

B-4) VHのアミノ酸配列は配列番号9で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号10で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

B-5) VHのアミノ酸配列は配列番号11で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号12で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

40

B-6) VHのアミノ酸配列は配列番号13で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号14で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

B-7) VHのアミノ酸配列は配列番号15で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号16で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

B-8) VHのアミノ酸配列は配列番号17で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号18で示されるか又はそれと少なくとも

50

90%の同一性を有し、

C) V Hのアミノ酸配列は配列番号19で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、V Lのアミノ酸配列は配列番号20で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、或いは

D) V Hのアミノ酸配列は配列番号21で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、V Lのアミノ酸配列は配列番号22で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有する、

請求項1～4の何れか一項に記載の抗CD40抗体又はその抗原結合断片。

【請求項6】

I g G抗体のF c領域を更に含み、好ましくは、前記I g G抗体はI g G 1、I g G 2 又はI g G 4抗体であり、より好ましくは、前記F c領域はN 2 9 7 A変異を含むI g G 1のF c領域であり、又はL 2 3 4 A、L 2 3 5 A、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、T 2 5 6 Eの何れか1つ又は複数の変異を有するI g G 1のF c領域である、前記請求項の何れか一項に記載の抗CD40抗体又はその抗原結合断片。 10

【請求項7】

前記抗原結合断片はs c F v、F v、F a b又はF a b'断片である、前記請求項の何れか一項に記載の抗CD40抗体又はその抗原結合断片。

【請求項8】

重鎖全長のアミノ酸配列は配列番号93若しくは97で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、軽鎖全長のアミノ酸配列は配列番号94で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、或いは 20

重鎖全長のアミノ酸配列は配列番号95若しくは98で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、軽鎖全長のアミノ酸配列は配列番号96で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有する、

前記請求項の何れか一項に記載の抗CD40抗体又はその抗原結合断片。

【請求項9】

i) 10^{-n} M以下の K_D でヒトCD40に結合することと、

ii) 明らかなアゴニスト活性がないことと

の少なくとも一項を有する、

請求項1～8の何れか一項に記載の抗CD40抗体又はその抗原結合断片。 30

【請求項10】

請求項1～9の何れか一項に記載の抗CD40抗体又はその抗原結合断片をコードする、単離したポリヌクレオチド。

【請求項11】

請求項10に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項12】

請求項10に記載のポリヌクレオチド又は請求項11に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項13】

請求項1～9の何れか一項に記載の抗CD40抗体又はその抗原結合断片を含む、CD 40 結合分子。 40

【請求項14】

請求項1～9の何れか一項に記載の抗CD40抗体又はその抗原結合断片と、少なくとも1種の薬用可能な賦形剤、希釈剤又はベクターとを含む、医薬組成物。

【請求項15】

タクロリムスを更に含む、請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項16】

自己免疫疾患を治療する方法であって、

必要とする対象に治療有効量の請求項1～9の何れか一項に記載の抗CD40抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項14に記載の医薬組成物を投与することを含み、 50

前記自己免疫疾患は、シェーグレン症候群、多発性硬化症又はエリテマトーデスが好ましく、全身性エリテマトーデスがより好ましい、方法。

【請求項 17】

自己免疫疾患を治療する薬剤の調製に用いられる、請求項 1 ~ 9 の何れか一項に記載の抗 CD 40 抗体又はその抗原結合断片の用途であって、

前記自己免疫疾患は、シェーグレン症候群、多発性硬化症又はエリテマトーデスが好ましく、全身性エリテマトーデスがより好ましい、用途。

【請求項 18】

移植片対宿主病を治療するか又は移植拒絶反応を緩和する方法であって、

必要とする対象に治療有効量の請求項 1 ~ 9 の何れか一項に記載の抗 CD 40 抗体又はその抗原結合断片、或いは請求項 14 ~ 15 中の何れか一項に記載の医薬組成物を投与することを含み、

前記移植は、固形臓器移植が好ましく、肝、腎、心臓、肺の移植がより好ましい、方法。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 9 の何れか一項に記載の抗 CD 40 抗体又はその抗原結合断片をタクロリムスと組み合わせて、移植片対宿主病を治療するか又は移植拒絶反応を緩和する薬剤の調製に用いる用途であって、

前記移植は、固形臓器移植が好ましく、肝、腎、心臓、肺の移植がより好ましい、用途。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2021年6月28日に提出された出願番号が202110722124.0である中国特許出願の優先権を主張する。

【0002】

本開示は、バイオ医薬分野、特に CD 40 / CD 40 L シグナル伝達経路に関連する疾患を治療又は介入する分野に関する。具体的には、本開示は CD 40 抗体、その抗原結合断片及びその医薬組成物、並びに自己免疫疾患を治療するための方法及び関連する製薬用途に関する。

【背景技術】

【0003】

CD 40 は、腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) スーパーファミリーに属し、細胞膜表面に位置する I 型膜貫通糖タンパク質であり、分子量が約 48 kDa で、免疫系において重要な役割を果たしている。CD 40 は、B 細胞、樹状細胞、単核細胞とマクロファージなどの種々の免疫細胞に発現され、血小板にも発現され、条件によっては、好酸球と実質細胞に発現され得る。CD 40 の天然リガンドは CD 154 又は CD 40 L であり、活性化した CD 4 + T 細胞、NK 細胞、血小板と B 細胞を含む様々な細胞種類において発現を誘導可能な II 型膜貫通タンパク質である (Pucino V et al., 2020)。

【0004】

CD 40 L は CD 40 に結合した後、TRAF を動員し、NF-κB、JNK と MAPK 経路を介して下流シグナル伝達を媒介し、免疫細胞の活性化と増殖、炎症性因子とケモカインの分泌などを含む様々な細胞種類依存的活性化結果を果たすことができる (Vonderheide RH et al., 2007)。例えば、前記経路を介するシグナル伝達は、適応免疫系の幾つかの重要なエフェクター機能に必要であり、原発性 T 細胞依存性抗体応答 (TDAR)、B 細胞増殖、胚中心 (GC) 形成、免疫グロブリン (Ig) のアイソタイプの変換、体細胞変異、及び記憶 B 細胞とプラズマ細胞の分化が含まれる (Foy TM et al., 1993; Foy TM et al., 1994)。B

10

20

30

40

50

細胞に影響を及ぼす以外、CD40経路の活性化は、DCの成熟と機能及び単核細胞とマクロファージの生存とサイトカインの分泌に重要なシグナルを提供する(Caux, C et al., 1994)。

【0005】

CD40シグナル伝達経路の機能調節障害は、自己免疫疾患をもたらすことができる(Karnell JL et al., 2018)。CD40-CD40Lシグナル伝達経路は、炎症組織における実質細胞の機能に関与することが見出された：腎、唾液腺及び皮膚などの部位に由来し、ケモカインを分泌できる活性化した上皮細胞はCD40に応答することが可能である。更に、CD40又はCD40Lは、アテローム性動脈硬化患者及び前臨床アテローム性動脈硬化モデルの病変部位における発現レベルが何れも上昇される。CD40は、マトリックス分解酵素の発現を刺激・誘導し、アテローム性動脈硬化の病原性に関連する細胞種類、例えば、内皮細胞、平滑筋細胞とマクロファージなどにおける組織因子の発現を促進することができる(Michel NA et al., 2017)。

CD40経路は、IL-1、IL-6とIL-8などの炎症性因子、及び細胞間接着分子-1(ICAM-1)、E-セレクトイン(E-selectin)と血管細胞接着分子(VCAM)などの接着分子の生成をアップレギュレートする。CD40/CD40Lの相互作用は、更に移植拒絶の予防に使用され、アカゲザルの腎臓同種移植研究にキメラ抗CD40拮抗薬ch5D12を使用することにより、CD40の拮抗作用は、病状の改善に十分であるとともに、平均生存期間を100日間以上延長することが明らかになる。ch5D12を抗CD86抗体と組み合わせ、同種移植研究の開始時のみに投与し、その後シクロスポリンで延長治療を行う場合、4年を超える平均生存期間が実現され、これにより、この組み合わせは、免疫寛容を潜在的に誘導し得ることが示されている(Haanstra et al., 2005)。

10

20

【0006】

多くの前臨床研究により、T細胞依存性免疫応答の促進におけるCD40/CD40Lの相互作用の重要な役割の証拠が提供されている。従って、CD40シグナル伝達の遮断は、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群などの疾患において病原性自己免疫応答を阻害するために適切且つ必要な治療戦略であると考えられている。現在、そのような疾患を治療するために何れの抗CD40抗体も承認されていない。従って、この分野では、CD40-CD40Lの相互作用に介入し、CD40シグナル伝達を遮断するために使用可能な治療剤が依然として切望されている。本開示は、そのような治療用ヒト化抗CD40抗体を提供し、それは、CD40に特異的に結合可能であり、CD40シグナル伝達経路関連疾患、特に自己免疫疾患への介入又は治療のための優れた抗原結合特異性、親和性、薬学動態と薬力学的特性を有する。また、治療用ヒト化抗CD40抗体とタクロリムスを組み合わせて移植片対宿主病の治療又は移植拒絶反応の緩和に用いることを提供する。

30

【発明の概要】

【0007】

本開示は、ポリヌクレオチドをコードする抗CD40抗体とその抗原結合断片、上記ポリヌクレオチドを含むベクター、宿主細胞、上記抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物、それらの自己免疫疾患(移植片対宿主病、移植拒絶を含む)への治療又は介入のための方法及び関連する製薬用途を提供する。

40

【0008】

抗CD40抗体、その抗原結合断片

一態様によれば、幾つかの実施形態において、本開示は、
配列番号23で示される配列を含む重鎖HCDR1と、
配列番号24で示される配列を含む重鎖HCDR2と、
配列番号25で示される配列を含む重鎖HCDR3と、

QX₁SEDISSNLX₂(配列番号74)で示される配列を含み、そのうち、X₁がA又はSから選ばれ、X₂がA又はSから選ばれる、軽鎖LCDR1と、

50

X₃ A S N L A S (配列番号 75) で示される配列を含み、そのうち、X₃ が A 又は P から選ばれる、軽鎖 L C D R 2 と、

Q G X₄ Y W X₅ X₆ X₇ S X₈ F G X₉ X₁₀ (配列番号 76) で示される配列を含み、そのうち、X₄ が A 又は G から選ばれ、X₅ が S 又は T から選ばれ、X₆ が S 又は G から選ばれ、X₇ が T 又は S から選ばれ、X₈ が N 又は Y から選ばれ、X₉ が N、S、T 又は Q から選ばれ、X₁₀ が V 又は G から選ばれる、軽鎖 L C D R 3 と、を含む、抗 C D 40 抗体及びその抗原結合断片を提供する。

【0009】

幾つかの具体的な実施形態において、

それぞれ配列番号 23、24、25 で示される配列を含む重鎖 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、及び / 又は、それぞれ配列番号 26、27、28 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、

それぞれ配列番号 23、24、25 で示される配列を含む重鎖 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、及び / 又は、配列番号 29 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 1、配列番号 30 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 2、Q G G Y W T S T S N F G X₉ X₁₀ (配列番号 73) で示される配列を含み、そのうち、X₉ が N、S、T 又は Q から選ばれ、X₁₀ が V 又は G から選ばれる軽鎖 L C D R 3、

それぞれ配列番号 23、24、25 で示される配列を含む重鎖 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、及び / 又は、それぞれ配列番号 29、27、32 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、

を含む、抗 C D 40 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0010】

幾つかの具体的な実施形態において、

それぞれ配列番号 23、24、25 で示される配列を含む重鎖 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 と、配列番号 29 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 1 と、配列番号 30 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 2 と、配列番号 69 ~ 72 の何れか 1 つで示される配列を含む軽鎖 L C D R 3 と、

を含む、抗 C D 40 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0011】

幾つかの具体的な実施形態において、本開示は、上記 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 の何れか 1 つ、又はそれらの任意の組み合わせを含む、抗 C D 40 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0012】

別の態様によれば、幾つかの実施形態において、本開示は、

S Y G V X₁₁ (配列番号 88) で示される配列を含み、そのうち、X₁₁ が S 又は T から選ばれる重鎖 H C D R 1 と、

X₁₂ I X₁₃ S X₁₄ G X₁₅ X₁₆ Y Y A X₁₇ W A X₁₈ S (配列番号 89) で示される配列を含み、そのうち、X₁₂ が A 又は G から選ばれ、X₁₃ が G 又は A から選ばれ、X₁₄ が T、S 又は D から選ばれ、X₁₅ が T 又は S から選ばれ、X₁₆ が T 又は A から選ばれ、X₁₇ が S、N から選ばれ、X₁₈ が K 又は R から選ばれる重鎖 H C D R 2 と、

G G I T X₁₉ Y A X₂₀ (配列番号 90) で示される配列を含み、そのうち、X₁₉ が A 又は V から選ばれ、X₂₀ が I 又は M から選ばれる重鎖 H C D R 3 と、

Q A S X₂₁ X₂₂ I X₂₃ X₂₄ X₂₅ L A (配列番号 91) で示される配列を含み、そのうち、X₂₁ が Q 又は E から選ばれ、X₂₂ が S 又は D から選ばれ、X₂₃ が S 又は T から選ばれ、X₂₄ が N、Q、S 又は T から選ばれ、X₂₅ が V 又は G から選ばれる軽鎖 L C D R 1 と、

配列番号 37 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 2 と、

Q S Y X₂₆ X₂₇ S X₂₈ X₂₉ T X₃₀ (配列番号 92) で示される配列を含み、そのうち、X₂₆ が F 又は Y から選ばれ、X₂₇ が S、D 又は N から選ばれ、X₂₈ が S 又

10

20

30

40

50

は F から選ばれ、 X_{29} が S、T 又は Y から選ばれ、 X_{30} が V 又は I から選ばれる軽鎖 L C D R 3 と、
を含む、抗 C D 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 1 3 】

幾つかの具体的な実施形態において、

それぞれ配列番号 3 3、3 4、3 5 で示される配列を含む重鎖 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、及び / 又は、それぞれ配列番号 3 6、3 7、3 8 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、

それぞれ配列番号 3 9、4 0、4 1 で示される配列を含む重鎖 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、及び / 又は、それぞれ配列番号 4 2、3 7、4 3 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、

それぞれ配列番号 3 9、4 4、3 5 で示される配列を含む重鎖 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、及び / 又は、それぞれ配列番号 4 5、3 7、4 6 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、

それぞれ配列番号 3 9、4 7、4 1 で示される配列を含む重鎖 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、及び / 又は、それぞれ配列番号 3 6、3 7、4 8 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、

それぞれ配列番号 3 9、4 7、4 9 で示される配列を含む重鎖 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、及び / 又は、Q A S Q S I S X_{24} X_{25} L A (配列番号 8 7) で示される配列を含み、そのうち、 X_{24} が N、Q、S 又は T から選ばれ、 X_{25} が V 又は G から選ばれる軽鎖 L C D R 1、配列番号 5 0 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 2、配列番号 4 8 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 3、

を含む、抗 C D 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 1 4 】

幾つかの具体的な実施形態において、

それぞれ配列番号 3 9、4 7、4 9 で示される配列を含む重鎖 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 と、配列番号 8 3 ~ 8 6 の何れか 1 つで示される配列を含む軽鎖 L C D R 1 と、それぞれ配列番号 5 0、4 8 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 2 及び軽鎖 L C D R 3 と、

を含む、抗 C D 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 1 5 】

幾つかの具体的な実施形態において、本開示は、上記 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 の何れか 1 つ、又はそれらの任意の組み合わせを含む、抗 C D 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 1 6 】

別の態様によれば、幾つかの実施形態において、本開示は、それぞれ配列番号 5 1、5 2、5 3 で示される配列を含む重鎖 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、及び / 又は、それぞれ配列番号 5 4、5 5、5 6 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、を含む抗 C D 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 1 7 】

幾つかの実施形態において、本開示は、それぞれ配列番号 5 7、5 8、5 9 で示される配列を含む重鎖 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、及び / 又は、それぞれ配列番号 6 0、6 1、6 2 で示される配列を含む軽鎖 L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、を含む抗 C D 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 1 8 】

幾つかの具体的な実施形態において、本開示は、上記 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 の何れか 1 つ、又はそれらの任意の組み合わせを含む、抗 C D 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 1 9 】

別の態様において、本開示は、重鎖可変領域 (V H) と軽鎖可変領域 (V L) を含み、

10

20

30

40

50

そのうち、

a - 1) 上記 V H は配列番号 1 で示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、上記 V L は配列番号 2 で示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、

a - 2) 上記 V H は配列番号 3 で示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、上記 V L は配列番号 4 で示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、

a - 3) 上記 V H は配列番号 5 で示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、上記 V L は配列番号 6 で示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、

a - 4) 上記 V H は配列番号 6 7 又は 6 8 の何れか 1 つで示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、上記 V L は配列番号 6 3 ~ 6 6 の何れか 1 つで示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、

b - 1) 上記 V H は配列番号 7 で示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、上記 V L は配列番号 8 で示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、

b - 2) 上記 V H は配列番号 9 で示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、上記 V L は配列番号 1 0 で示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、

b - 3) 上記 V H は配列番号 1 1 で示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、上記 V L は配列番号 1 2 で示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、

b - 4) 上記 V H は配列番号 1 3 で示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、上記 V L は配列番号 1 4 で示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、

b - 5) 上記 V H は配列番号 1 5 で示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、上記 V L は配列番号 1 6 で示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、

b - 6) 上記 V H は配列番号 1 7 で示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、上記 V L は配列番号 1 8 で示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、

b - 7) 上記 V H は配列番号 8 1 又は 8 2 の何れか 1 つで示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、上記 V L は配列番号 7 7 ~ 8 0 の何れか 1 つで示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、

c) 上記 V H は配列番号 1 9 で示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、前記 V L は配列番号 2 0 で示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、或いは

d) 上記 V H は配列番号 2 1 で示される V H 中の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 を含み、上記 V L は配列番号 2 2 で示される V L 中の L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3 を含み、

そのうち、上記 C D R は、K a b a t、I M G T、C h o t h i a、A b M 又は C o n t a c t 番号付けシステムによって定義される、抗 C D 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。幾つかの具体的な実施形態において、C D R は、K a b a t 番号付けシステムによって定義される。

【 0 0 2 0 】

幾つかの実施形態において、上記抗 C D 4 0 抗体又はその抗原結合断片は組換え抗体である。

【 0 0 2 1 】

幾つかの実施形態において、上記抗 C D 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、ウサギ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体又はその抗原結合断片である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片は、ヒト化抗体である時に、重鎖フレームワーク領域がIGHV2-26*01、IGHV4-30-4*02、IGHV4-4*08、IGHJ1*01に由来し、且つ/又は、軽鎖フレームワーク領域がIGKV1-13*02、IGKV1-9*01、IGKV1-6*01、IGKJ4*01に由来する。例えば、重鎖フレームワーク領域のFR1~FR3はIGHV2-26*01、IGHV4-30-4*02、IGHV4-4*08、重鎖フレームワーク領域のFR4がIGHJ1*01に由来し、軽鎖フレームワーク領域のFR1~FR3はIGKV1-13*02、IGKV1-9*01、IGKV1-6*01、軽鎖フレームワーク領域のFR4がIGKJ4*01に由来する。

10

【 0 0 2 3 】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片はVHとVLを含み、そのうち、

A-1) VHのアミノ酸配列は配列番号1で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号2で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

A-2) VHのアミノ酸配列は配列番号3で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号4で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

A-3) VHのアミノ酸配列は配列番号5で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号6で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

20

A-4) VHのアミノ酸配列は配列番号67で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号63~66の何れか1つで示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

A-5) VHのアミノ酸配列は配列番号68で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号63~66の何れか1つで示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

B-1) VHのアミノ酸配列は配列番号7で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号8で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

30

B-2) VHのアミノ酸配列は配列番号9で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号10で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

B-3) VHのアミノ酸配列は配列番号11で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号12で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

B-4) VHのアミノ酸配列は配列番号13で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号14で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

40

B-5) VHのアミノ酸配列は配列番号15で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号16で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

B-6) VHのアミノ酸配列は配列番号17で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号18で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

B-7) VHのアミノ酸配列は配列番号81で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、VLのアミノ酸配列は配列番号77~80の何れか1つで示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

B-8) VHのアミノ酸配列は配列番号82で示されるか又はそれと少なくとも90%

50

の同一性を有し、V Lのアミノ酸配列は配列番号77～80の何れか1つで示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、

C) V Hのアミノ酸配列は配列番号19で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、V Lのアミノ酸配列は配列番号20で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、或いは

D) V Hのアミノ酸配列は配列番号21で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、V Lのアミノ酸配列は配列番号22で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有する。

【0024】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片は、IgG抗体又はその抗原結合断片であり、例えば、IgG1、IgG2、IgG2、IgG4抗体又はその抗原結合断片であり、例えばN297A変異を有するIgG1抗体又はその抗原結合断片であり、例えばL234A、L235A、M252Y、S254TとT256Eのうちの1つ若しくはそれらの任意の組み合わせを有するIgG1抗体又はその抗原結合断片である。

10

【0025】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体の抗原結合断片は、Fab、Fv、sFv、Fab'、F(ab')₂、線形抗体、単鎖抗体、scFv、sdAb、sdFv、ナノ抗体、ペプチド抗体peptibody、ドメイン抗体及び多重特異性抗体(二重特異性抗体、diabody、triabodyとtetraabody、タンデムジ-scFv、タンデムトリ-scFv)であり、例えば、scFv、Fv、Fab又はFab'断片である。

20

【0026】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体の抗原結合断片の重鎖全長のアミノ酸配列は配列番号93若しくは97で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、軽鎖全長のアミノ酸配列は配列番号94で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、或いは

重鎖全長のアミノ酸配列は配列番号95若しくは98で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有し、軽鎖全長のアミノ酸配列は配列番号96で示されるか又はそれと少なくとも90%の同一性を有する。

30

【0027】

上述したような「少なくとも90%の同一性」は、例えば、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の同一性を含む。

【0028】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片の重鎖可変領域は、0～10個(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個)のアミノ酸変化を有し、軽鎖可変領域は0～10個(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個)のアミノ酸変化を有する。幾つかの具体的な実施形態において、上記アミノ酸変化は、保存的取替、置換若しくは修飾、及び/又は機能に影響を及ぼさない欠失、追加である。

40

【0029】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又は抗原結合断片と同じエピトープに結合するか又は競合して結合する抗CD40抗体又は抗原結合断片を提供する。

【0030】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片のCD40(例えば、ヒトCD40)との結合を遮断する抗CD40抗体又は抗原結合断片を提供する。

【0031】

幾つかの実施形態において、CD40(例えば、ヒトCD40)との結合が上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片によって遮断される抗CD40抗体又は抗原結合断片を提供する。

50

【 0 0 3 2 】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又は抗原結合断片は、

(i) 10^{-n} M以下の K_D でヒトCD40に結合することと、

(i i) 明らかなアゴニスト活性がないことと

の少なくとも一項を有する。

【 0 0 3 3 】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又は抗原結合断片は、CD40リガンドとCD40の結合を少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%若しくは少なくとも95%低減させる。

10

【 0 0 3 4 】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又は抗原結合断片は、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M以下の K_D でヒトCD40に結合する。

【 0 0 3 5 】

幾つかの実施形態において、上記の何れかの抗CD40抗体又はその抗原結合断片を含むCD40結合分子を提供する。

【 0 0 3 6 】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片を含む複合体を提供する。例えば、上記複合体は、抗体薬物複合体である。

20

【 0 0 3 7 】

ポリヌクレオチド及びベクター

本開示は、本開示の抗CD40抗体又はその抗原結合断片をコードする、単離したポリヌクレオチドを提供する。上記単離したポリヌクレオチドは、RNA、DNA又はcDNAであってもよい。本開示の幾つかの実施形態によれば、本開示のポリヌクレオチドは単離したポリヌクレオチドである。

【 0 0 3 8 】

本開示は、上記の本開示の何れかの抗CD40抗体又はその抗原結合断片をコードするDNA分子を更に提供する。

【 0 0 3 9 】

本開示のポリヌクレオチドは、ベクターの形態であってもよく、ベクター中に存在してもよく、及び/又はベクターの一部であってもよく、当該ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、YAC又はウイルスベクターである。ベクターは、特に発現ベクター、即ち、VEGF結合分子又はその複合体のインビトロ及び/若しくはインビボで(即ち、適切な宿主細胞、宿主生物、及び/若しくは発現系で)の発現を提供可能なベクターであってもよい。当該発現ベクターは通常、少なくとも1つの本開示のポリヌクレオチドを含み、それは、1つ又は複数の適切な発現調節要素(例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターなど)に操作可能に連結される。特定の宿主における発現に対して上記要素及びその配列を選択することは、当業者の常識である。本開示の抗CD40抗体又はその抗原結合断片の発現に有用又は必要な調節要素及び他の要素は、例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、組み込み因子、選択マーカー、リーダー配列、レポーター遺伝子である。

30

40

【 0 0 4 0 】

本開示のポリヌクレオチドは、本開示のポリペプチドのアミノ酸配列についての情報に基づき、既知の方法(例えば、自動DNA合成及び/又は組換えDNA技術)により調製若しくは取得されてもよく、及び/又は適切な天然源から単離されてもよい。

【 0 0 4 1 】

宿主細胞

本開示は、本開示の抗CD40抗体又はその抗原結合断片若しくは複合体、或いは本開示のポリヌクレオチド又はベクターを含む組換え宿主細胞を提供する。幾つかの実施形態

50

において、宿主細胞は細菌細胞、真菌細胞又は哺乳動物細胞である。

【0042】

細菌細胞は、例えば、グラム陰性菌株（例えば、大腸菌（*Escherichia coli*）菌株、プロテウス属（*Proteus*）菌株及びシュードモナス属（*Pseudomonas*）菌株）とグラム陽性菌株（例えば、バチルス属（*Bacillus*）菌株、ストレプトミセス属（*Streptomyces*）菌株、ブドウ球菌属（*Staphylococcus*）菌株及びラクトコッカス属（*Lactococcus*）菌株）の細胞を含む。

【0043】

真菌細胞は、例えば、トリコデルマ属（*Trichoderma*）、アカパンカビ属（*Neurospora*）及びアスペルギルス属（*Aspergillus*）の種の細胞を含み、又はサッカロミセス属（*Saccharomyces*）（例えば、サッカロミセスセレイシエ（*Saccharomyces cerevisiae*））、シゾサッカロミセス属（*Schizosaccharomyces*）（例えば、シゾサッカロミセスポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*））、ピキア属（*Pichia*）（例えば、ピキアパストリス（*Pichia pastoris*）及びピキアメタノリカ（*Pichia methanolic*））及びハンゼヌラ属（*Hansenula*）の種の細胞を含む。

10

【0044】

哺乳動物細胞は、例えば、HEK293細胞、CHO細胞、BHK細胞、HeLa細胞、COS細胞などを含む。

20

【0045】

しかしながら、本開示は、両生類細胞、昆虫細胞、植物細胞及びこの分野における異種タンパク質を発現するための任意の他の細胞を使用してもよい。

【0046】

一実施形態において、本開示に使用される宿主細胞は、完成した植物又は動物個体に発達することができない。

【0047】

調製方法

本開示は、本開示の抗CD40抗体又はその抗原結合断片を調製する方法を提供し、それは、

30

- 本開示の抗CD40抗体又はその抗原結合断片の発現を可能にする条件下で、本開示の宿主細胞を培養することと、
- 培養物から、宿主細胞によって発現された抗CD40抗体又はその抗原結合断片を回収することと、を含み、且つ
- 任意選択的に、本開示の抗CD40抗体又はその抗原結合断片を更に精製及び/又は修飾することを含む。

【0048】

本開示は、薬物を本開示の抗CD40抗体又はその抗原結合断片に複合又は修飾することを含む、複合体の調製方法を提供する。

40

【0049】

本開示の抗CD40抗体又はその抗原結合断片は、上記のような細胞において細胞内方式で（例えば、細胞質において、ペリプラズムにおいて、又は封入体において）産生され、次に宿主細胞から単離され、そして任意選択的に更に精製されてもよく、或いは、細胞外方式で（例えば、宿主細胞を培養する培地において）産生され、次に培地から単離され、そして任意選択的に更に精製されてもよい。例えば、調整された緩衝液を含むA又はG Sepharose FFカラムで精製し、非特異的に結合した成分を洗い流し、更にPH勾配法により、結合した抗体を溶出し、SDS-PAGEにより検出して収集する。選択的に、通常の方法により過して濃縮する。可溶性の混合物及び多量体は、分子ふるい、イオン交換などの通常の方法により除去されてもよい。得られた生成物は、直ちに - 7

50

0などで凍結し、又は凍結乾燥する。

【0050】

組換えてポリペプチドを産生するための方法及び試薬、例えば、特定の好適な発現ベクター、形質転換又はトランスフェクション方法、選択マーカー、タンパク質発現を誘導する方法、培養条件などは、この分野において既知のものである。同様に、本開示の抗CD40抗体又はその抗原結合断片若しくは複合体を製造する方法に適用されるタンパク質の単離・精製技術は、当業者に周知のものである。

【0051】

組成物

本開示は、上記の抗CD40抗体又はその抗原結合断片を含む組成物を提供する。例えば、治療若しくは緩和有効量の上記のような抗CD40抗体又はその抗原結合断片と、少なくとも1種の薬用可能な賦形剤、希釈剤又はベクターとを含む医薬組成物を提供する。 10

【0052】

幾つかの具体的な実施形態において、上記医薬組成物の単位用量には、0.01~99wt%の抗CD40抗体又はその抗原結合断片を含んでもよく、或いは、医薬組成物の単位用量における抗CD40抗体又はその抗原結合断片の含有量は0.1~2000mgであり、幾つかの具体的な実施形態では1~1000mgである。

【0053】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片と、1種若しくは複数種の別の免疫抑制剤との組み合わせ又は組成物を提供する。上記組成物は、例えば、医薬組成物である。選択的に、上記医薬組成物は、薬学可能な賦形剤、希釈剤又はベクターを更に含んでもよい。 20

【0054】

本開示の一実施形態において、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片、タクロリムス、及び薬学可能な賦形剤、希釈剤又はベクターを含む医薬組成物を提供する。

【0055】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片を含む製品を提供する。選択的に、製品は、容器及びラベルを含む。容器は、例えば、バイアル、注射器及び試験管である。容器は、病状の治療に有効な組成物を収容する。容器における又は容器につながるラベルは、上記組成物が選択された病状の治療に使用されることを示す。組成物には、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片が含まれている。上記製品は、疾患の治療に有効なタクロリムスを収容する第2の容器を更に含んでもよい。 30

【0056】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片及びタクロリムスを含む製品を提供する。

【0057】

治療方法及び製薬用途

本開示は、疾患若しくは病状の治療・介入・予防・診断に用いられる上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片の方法を提供する。

【0058】

具体的に、幾つかの実施形態において、本開示は、自己免疫疾患、移植片対宿主病を治療若しくは緩和するか又は移植拒絶反応を緩和するための薬剤の調製における、本開示によって記載される抗CD40抗体又はその抗原結合断片の用途を提供する。 40

【0059】

更に、幾つかの実施形態において、本開示は、自己免疫疾患、移植片対宿主病を治療若しくは緩和するか又は移植拒絶反応を緩和するための薬剤の調製における、本開示によって記載される抗CD40抗体又はその抗原結合断片と1種若しくは複数種の他の免疫抑制剤との組み合わせの用途を提供する。

【0060】

本開示の実施形態において、本開示によって記載される抗CD40抗体又はその抗原結 50

合断片は、1種又は複数種の他の免疫抑制剤と個別に、連続的に、又は同時に投与することができる。

【0061】

本開示の実施形態において、本開示によって記載される抗CD40抗体又はその抗原結合断片は、1種又は複数種の他の免疫抑制剤の前に、後に又は同時に投与することができる。

【0062】

具体的に、本開示は、自己免疫疾患、移植片対宿主病を治療若しくは緩和するか又は移植拒絶反応を緩和するための薬剤の調製における、本開示によって記載される抗CD40抗体又はその抗原結合断片とタクロリムスとの組み合わせの用途を提供する。幾つかの実施形態において、移植片対宿主病、臓器移植拒絶を改善又は治療する方法及び関連する製薬用途を提供し、対象に改善又は治療有効量の上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片

10

【0063】

幾つかの実施形態において、自己免疫性疾患、炎症疾患を改善又は治療する方法及び関連する製薬用途を提供し、対象に改善又は治療有効量の上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片

【0064】

幾つかの実施形態において、CD40関連障害疾患を治療する方法及び関連する製薬用途を提供し、幾つかの実施形態において、CD40関連障害細胞の成長又は分化を阻害する方法及び関連する製薬用途を提供し、幾つかの実施形態において、ヒトCD40抗原を発現する細胞の成長及び/又は分化を阻害する方法及び関連する製薬用途を提供し、幾つかの実施形態において、対象におけるB細胞による抗体の産生を阻害する方法及び関連する製薬用途を提供し、幾つかの実施形態において、免疫障害疾患を治療する方法及び関連する製薬用途を提供する。上記方法は、何れも、対象又は細胞に治療若しくは阻害有効量の上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片

20

【0065】

幾つかの実施形態において、末梢B細胞の枯渇を誘導する方法及び関連する製薬用途を提供し、対象に誘導有効量の上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片

30

【0066】

幾つかの実施形態において、疾患又は病状を治療・緩和する方法及び関連する製薬用途を提供し、必要とする対象に有効量の上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片を投与することを含み、上記疾患又は病状はCD40に関連してもしなくてもよく、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、自己免疫性脱髄疾患（例えば、多発性硬化症、アレルギー性脳脊髄炎）、内分泌性眼疾患、ブドウ膜網膜炎、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、グレーブス病、糸球体腎炎、自己免疫性肝疾患、炎症性腸疾患（例えば、クローン病又は潰瘍性結腸炎）、過敏症、アナフィラキシー反応、シェーグレン症候群、1型糖尿病、原発性胆汁性肝硬変、ウェゲナー肉芽腫症、線維筋痛症、多発性筋炎、皮膚筋炎、炎症性筋炎、多発性内分泌不全、シュミット症候群（Schmidt's syndrome）、自己免疫性ブドウ膜炎、アジソン病、副腎炎、甲状腺炎、橋本甲状腺炎、自己免疫性甲状腺疾患、悪性貧血、胃萎縮、慢性肝炎、ループス肝炎、アテローム性動脈硬化症、亜急性皮膚エリテマトーデス、副甲状腺機能低下症、ドレスラー症候群（Dressler's syndrome）、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、尋常性天疱瘡、疱疹状皮膚炎、円形脱毛症（alopecia areata）、類天疱瘡、強皮症、全身性進行性硬化症、CREST症候群（石灰沈着、レイノー現象（Raynaud's phenomenon）、食道蠕動障害、手指硬化症と毛細血管拡張症）、男性と女性の自己免疫性不妊症、強直性脊椎炎（ankylosing spondylitis）、潰瘍性結腸炎、混合性結合組織病、結節性多発動脈炎

40

50

、全身性壊死性血管炎、アトピー性皮膚炎、アトピー性鼻炎、グッドパスチャー症候群 (Good pasture ' s syndrome)、シャーガス病 (Chagas ' disease)、サルコイドーシス、リウマチ熱、喘息、反復流産、抗リン脂質症候群、農夫肺、多形性紅斑、心術後症候群、クッシング症候群 (Cushing ' s syndrome)、自己免疫性慢性活動性肝炎、鳥飼育者肺、中毒性表皮壊死症、アルポート症候群 (Alport ' s syndrome)、肺炎、アレルギー性肺炎、線維化性肺炎、間質性肺疾患、結節性紅斑、壊疽性膿皮症、輸血反応、高安動脈炎 (Takayasu ' s arteritis)、リウマチ性多発筋痛、側頭動脈炎、住血吸虫症、巨細胞動脈炎、回虫症、アスペルギルス症、サムプター症候群 (Sampter ' s syndrome)、湿疹、リンパ腫様肉芽腫症、ベーチェット病 (Behcet ' s disease)、カプラン症候群 (Caplan ' s syndrome)、川崎病 (Kawasaki ' s disease)、デング熱、脳脊髄炎、心内膜炎、心内膜心筋線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、乾癬、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎、シャルマン症候群 (Shulman ' s syndrome)、フェルティ症候群 (Felty ' s syndrome)、糸状虫症、毛様体炎、慢性毛様体炎、異色性毛様体炎、フックス毛様体炎 (Fuchs ' cyclitis)、IgA腎症、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病 (Henoch - Schonlein purpura)、移植片対宿主病、移植拒絶反応、心筋症、イートン・ランバート症候群 (Eaton - Lambert syndrome)、再発性多発性軟骨炎、クリオグロブリン血症、ワルデンストレームマクログロブリン血症、エバンズ症候群 (Evans ' s syndrome)、急性呼吸促進症候群、肺炎症、骨粗鬆症、遅延型過敏反応及び自己免疫性腺機能不全を含む。例えば、シェーグレン症候群、多発性硬化症及び全身性エリテマトーデスである。

10

20

【 0 0 6 7 】

幾つかの実施形態において、Bリンパ球 (例えば、全身性エリテマトーデス、グッドパスチャー症候群、関節リウマチ及び1型糖尿病)、Th1リンパ球 (例えば、関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、シェーグレン症候群、橋本病、グレープス病、原発性胆汁性肝硬変、ウェゲナー肉芽腫症、結核症又は移植片対宿主病)、又はTh2リンパ球 (例えば、アトピー性皮膚炎、全身性エリテマトーデス、アトピー性喘息、鼻結膜炎、アレルギー性鼻炎、オーメン症候群 (Omen ' s syndrome)、全身性硬化症又は慢性移植片対宿主病)に関連する疾患を治療する方法及び関連する製薬用途を提供し、必要とする対象に有効量の上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片を投与することを含む。

30

【 0 0 6 8 】

幾つかの実施形態において、腫瘍又は癌を治療する方法及び関連する製薬用途を提供し、必要とする対象に有効量の上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片を投与することを含み、上記腫瘍又は癌は、CD40の発現に関連してもしなくてもよい。

【 0 0 6 9 】

幾つかの実施形態において、移植片対宿主病又は移植拒絶反応を治療又は緩和する方法を提供し、必要とする対象に上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片及びタクロリムスを投与することを含む。

【 0 0 7 0 】

幾つかの実施形態において、移植片対宿主病又は移植拒絶反応を治療又は緩和する薬剤の調製における上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片の用途を提供し、それはタクロリムスとの併用を含む。幾つかの実施形態において、タクロリムスの、移植片対宿主病又は移植拒絶反応を治療又は緩和する薬剤の調製に用いられる用途を提供し、それは上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片との併用を含む。

40

【 0 0 7 1 】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片とタクロリムスを組み合わせて移植片対宿主病又は移植拒絶反応の治療又は緩和に用いる方法、及び組み合わせて移植片対宿主病又は移植拒絶反応を治療又は緩和する薬剤の調製に用いる用途を提供する。

50

【0072】

幾つかの実施形態において、上記移植は、固形臓器移植、例えば、腎臓移植、肝臓移植、心臓移植、肺移植、膵臓移植、小腸移植又は複合組織移植である。

【0073】

幾つかの実施形態において、上記移植は、同種細胞、異種細胞、同種組織、異種組織、同種臓器及び異種臓器からなる群より選ばれる1つを移植することを意味する。

【0074】

幾つかの実施形態において、上記抗CD40抗体又はその抗原結合断片は、移植レシピエントの組織移植片に基づく拒絶反応を阻害又は逆転し、或いは移植レシピエントに移植した組織の機能を延長又は維持し、或いは移植レシピエント中の損傷移植組織の機能を回復させる。

10

【0075】

検出

本開示は、CD40を検出する組成物を提供し、上記組成物は本開示による抗CD40抗体又はその抗原結合断片を含む。本開示は、インビボ又はインビトロでCD40を検出する方法、システム又は装置を更に提供し、それは、本開示の抗CD40抗体又はその抗原結合断片で試料を処理することを含む。

【0076】

幾つかの実施形態において、インビトロ検出方法、システム又は装置は、例えば、

(1) 試料を抗CD4抗体又はその抗原結合断片に接触させること、

20

(2) CD40結合抗体若しくはその抗原結合断片と試料との間で形成された複合物を検出すること、及び/又は

(3) 参照試料(例えば、対照試料)を抗体に接触させること、及び

(4) 参照試料との比較により、複合体の形成程度を確定すること、

を含み得る。例えば、対照試料又は対象におけるものと比べ、試料又は対象における複合物形成の変化(例えば、統計学的に有意な変化)は、試料にCD40があることを示す。

【0077】

別の幾つかの実施形態において、インビボ検出方法、システム又は装置は、

(1) 対象に抗CD40の抗体又はその抗原結合断片を投与することと、

(2) 抗CD40の抗体又はその抗原結合断片と対象との間での複合物の形成を検出することと、

30

を含んでもよい。

【0078】

検出は、複合物を形成する位置又は時間を確定することを含んでもよい。検出可能な物質でCD40抗体を標識し、上記標識を検出することにより、CD40抗体に結合する物質(例えば、CD40)への検出が実現される。好適な検出可能な物質は、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質及び放射性物質を含む。CD40に結合するか又は結合しない抗体を測定したり、それを可視化したりすることにより、CD40結合抗体又はその抗原結合断片とCD40との間での複合物の形成を検出することができる。通常の見出しアッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)又は組織免疫組織化学を使用することができる。検出のために、本開示の抗CD40抗体又はその断片は、フルオロフォア発色団で標識されてもよい。

40

【0079】

幾つかの実施形態において、試薬キットを更に提供し、上記試薬キットは抗CD40抗体又はその抗原結合断片を含み、診断マニュアルを更に含んでもよい。試薬キットは、少なくとも1つの付加的な試薬、例えば、マーカーや付加的な診断剤を更に含んでもよい。インビボでの使用に対して、抗体は、医薬組成物として調製することができる。

【0080】

用語の定義

本開示が更に容易に理解されるように、以下、幾つかの技術・科学用語を具体的に定義

50

する。本明細書で別途明確に定義しない限り、本明細書に使用される他の技術・科学用語の全ては、当業者に通常理解されている意味を持っている。

【0081】

文脈で特に明記のない限り、明細書及び特許請求の範囲の全体において、「含有する」、「有する」、「含む」などの言葉は、排他的又は網羅的な意味ではなく、包括的な意味、即ち、「含むが、これらに限定されない」という意味を持っていると理解すべきである。

【0082】

本開示に使用されるアミノ酸の3文字コードと1文字コードは、*J. biol. chem.*, 243, p 3558 (1968)に記載された通りである。

10

【0083】

「CD40」及び「CD40抗原」は、正常と腫瘍性B細胞の表面に発現された約48 kDの糖タンパク質を指し、それは、細胞の増殖と分化に関与するシグナルの受容体として作用する(Ledbetter et al., 1987, *J. Immunol.* 138:788-785)。パーキットリンパ腫細胞株Rajiにより調製されたライブラリーから、CD40をコードするcDNA分子を単離した(Stamenkovic et al., 1989, *EMBO J.* 8:1403)。配列情報は、本開示の表2を参照してよい。CD40を内因的に発現する細胞は、表面でのCD40の発現を特徴とする任意の細胞であり、正常と腫瘍性B細胞、指状突起細胞、基底上皮細胞、がん細胞、マクロファージ、内皮細胞、濾胞性樹状細胞、へんとう腺細胞及び骨髓由来形質細胞を含むが、これらに限定されない。

20

【0084】

「抗体」は、所望の抗原結合活性を示せば、最も広い意味で使用され、種々の抗体構造をカバーしており、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単一特異性抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、全長抗体と抗体断片(又は抗原結合断片、又は抗原結合部分)を含むが、これらに限定されない。抗体は、2本の同じ重鎖と2本の同じ軽鎖が鎖間ジスルフィド結合で連結してなるテトラペプチド鎖構造である免疫グロブリンを指してもよい。免疫グロブリンは、重鎖定常領域のアミノ酸組成と配列順序が異なるので、その抗原性も異なる。これにより、免疫グロブリンは、5種類、又は、免疫グロブリンのアイソタイプと呼ばれるIgM、IgD、IgG、IgA及びIgEに分けることができ、その対応する重鎖は、それぞれ μ 鎖、 δ 鎖、 γ 鎖、 α 鎖及び ϵ 鎖である。同一種類のIgは、そのヒンジ領域のアミノ酸組成及び重鎖ジスルフィド結合の数と位置の違いによって、更に異なるサブクラスに分けることができ、例えば、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4に分けることができる。軽鎖は、定常領域によって、 κ 鎖又は λ 鎖に分けられる。5種類のIgのそれぞれは、何れも κ 鎖又は λ 鎖を有してもよい。抗体重鎖及び軽鎖は、N末端に近い約110個のアミノ酸の配列が大きく変化され、可変領域(V領域)となり、C末端に近い残りのアミノ酸配列が比較的に安定的で、定常領域(C領域)となる。可変領域は、3つの超可変領域(CDR)と、配列が比較的に保存的な4つのフレームワーク領域(FR)とを含む。3つの超可変領域は、抗体の特異性を決定し、相補性決定領域(CDR)とも称される。それぞれの軽鎖可変領域(VL)及び重鎖可変領域(VH)は、3つのCDR領域と、4つのFR領域とからなり、アミノ末端からカルボキシ末端へ、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順に配列される。軽鎖の3つのCDR領域はLCDR1、LCDR2及びLCDR3を指し、重鎖の3つのCDR領域はHCDR1、HCDR2及びHCDR3を指す。

30

40

【0085】

CDRについての確定又は定義は、抗体の構造を解明し、及び/又は抗体-リガンド複合物の構造を解明することにより、CDRの確実な描写及び抗体の結合部位を含む残基の同定を達成することができる。これは、当業者に知られている種々の技術の何れか1つ、例えば、X線結晶学によって実現することができる。種々の分析方法は、CDRの同定に使用することができ、Kabata番号付けシステム、Chothia番号付けシステム、

50

AbM番号付けシステム、IMGT番号付けシステム、接触定義、立体配座定義を含むが、これらに限定されない。

【0086】

Kabat番号付けシステムは、抗体における残基に番号を付けるための基準であり、一般的にCDR領域の同定に使用される（例えば、Johnson & Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.*, 28:214-8を参照）。Chothia番号付けシステムは、Kabat番号付けシステムと類似するが、Chothia番号付けシステムは、ある構造ループ領域の位置を考慮に入れた。（例えば、Chothia et al., 1986, *J. Mol. Biol.*, 196:901-17、及びChothia et al., 1989, *Nature*, 342:877-83を参照）。AbM番号付けシステムは、抗体構造をモデリングしたOxford Molecular Group製のコンピュータプログラム統合スイートを使用する（例えば、Martin et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 86:9268-9272、“AbMTM, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies,” Oxford, UK, Oxford Molecular, Ltdを参照）。AbM番号付けシステムは、知識データベース及びab initio法の組み合わせを用いて、基本配列から抗体の三次構造をモデル化する（Samudrala et al., 1999, *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3:194-198における「Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach」に記載されたものを参照）。接触定義は、利用できる複雑な結晶構造の分析に基づくものである（例えばMacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 5:732-45を参照）。立体配座の定義において、CDRの位置は、抗原結合にエンタルピー的寄与をする残基として同定することができる（例えば、Makabe et al., 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166を参照）。なお、他のCDRの境界の定義は、上記方法の1つに厳密に従うとは限らないが、特定の残基又は残基群が抗原結合に顕著に影響しないという予測又は実験結果によって、それらは短縮又は延長可能であるとはいえ、依然としてKabat CDRの少なくとも一部と重複する。本明細書に使用されるように、CDRは、この分野における既知の任意の方法（方法の組み合わせを含む）によって定義されるCDRを指すことができる。各番号付けシステムの対応関係は、当業者によく知られているものであり、例示的に、下記の表1に示す通りである。

【0087】

【表1】

表1. CDR番号付けシステム間の関係

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

【0088】

本開示に係る抗体又は抗原結合断片のVL領域とVH領域のCDRアミノ酸残基は、数

量と位置において既知の K a b a t 番号付けシステムに合致する。

「モノクローナル抗体」又は「単クローン抗体」とは、基本的に同質の抗体集団から得られた抗体であり、即ち、少量で天然に存在し得る変異を除き、集団に含まれる各抗体は同じである。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一抗原部位に対するものである。更に、通常、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体製剤とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。「モノクローナル」という修飾語は、例えば、基本的に同質の抗体集団から得られた抗体の特徴を示し、何れかの特定の方法により抗体を産生する必要があると解釈されない。

【 0 0 8 9 】

「ウサギ抗体」という用語は、本開示において、この分野での知識と技術により調製されたヒト C D 4 0 又はそのエピトープに対するモノクローナル抗体である。調製時に C D 4 0 抗原を試験ウサギに注射した後、所望の配列又は機能特性を持つ抗体を発現した抗体を単離する。本開示の一具体的な実施形態において、上記ウサギ抗ヒト C D 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、ウサギ、鎖若しくはその変異体の軽鎖定常領域を更に含み、或いは、ウサギ I g G 1、I g G 2、I g G 3 若しくは I g G 4 又はその変異体の重鎖定常領域を更に含んでもよい。

10

【 0 0 9 0 】

「完全ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列の可変と定常領域を有する抗体を含む。本開示に係る完全ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列でコードされていないアミノ酸残基（例えば、インビトアのランダム若しくは部位特異的な変異誘発、又はインビボの体細胞変異により導入された変異）を含むことができる。しかし、「完全ヒト抗体」という用語は、別種の哺乳動物種（例えば、ウサギ）の生殖細胞系から誘導された C D R 配列をヒト骨格配列に移植した抗体（即ち、「ヒト化抗体」）を含まない。

20

【 0 0 9 1 】

「ヒト化抗体（humanized antibody）」という用語は、C D R 移植抗体（C D R - g r a f t e d a n t i b o d y）とも呼ばれ、非ヒト C D R 配列をヒトの抗体可変領域フレームワークに移植して産生された抗体を指す。キメラ抗体が大量の非ヒトタンパク質成分を持つことにより誘導された強い免疫応答反応を克服することができる。免疫原性の低下に伴う活性の低下を回避するために、上記完全ヒト抗体可変領域に対して最も少ない逆変異を行うことにより、活性を維持することができる。

30

【 0 0 9 2 】

「キメラ抗体（chimeric antibody）」という用語は、第 1 の種の抗体の可変領域を第 2 の種の抗体の定常領域と融合してなる抗体であり、第 1 の種の抗体により誘発される免疫応答反応を低減することができる。一例として、キメラ抗体を作成するには、まず、ウサギ特異的単クローン抗体を分泌するウサギを作成し、上記抗体を単離し、そして必要に応じて完全ヒト抗体の定常領域遺伝子をクローニングし、ウサギ可変領域遺伝子とヒト定常領域遺伝子とをキメラ遺伝子になるように連結した後、ヒトベクターに挿入し、最後に真核細胞系又は原核細胞系においてキメラ抗体分子を発現しなければならない。完全ヒト抗体の定常領域は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 若しくは I g G 4 又はその変異体の重鎖定常領域から選ばれてもよく、好ましくはヒト I g G 1 若しくは I g G 4 重鎖定常領域を含み、又はアミノ酸変異した後に A D C C (a n t i b o d y - d e p e n d e n t c e l l - m e d i a t e d c y t o t o x i c i t y、抗体依存性の細胞仲介性の細胞傷害作用) 毒性のない I g G 1 を使用する。

40

【 0 0 9 3 】

「抗原結合断片」という用語は、単鎖抗体（即ち、全長重鎖と軽鎖）、F a b、修飾された F a b、F a b'、修飾された F a b'、F (a b')₂、F v、F a b - F v、F a b - d s F v、単ドメイン抗体（例えば、V H 又は V L 又は V H H）、s c F v、2 価又は 3 価又は 4 価抗体、B i s - s c F v、d i a b o d y、t r i b o d y、t r i a b o d y、t e t r a b o d y 及び上記の何れか 1 つのエピトープ結合断片を含む（例え

50

ば、Holliger and Hudson、2005、Nature Biotech
 h. 23 (9) : 1126 - 1136、Adair and Lawson、2005、
 Drug Design Reviews - Online 2 (3)、209 - 217を
 参照)。これらの抗体断片を産生・調製する方法は、この分野において公知のものである
 (例えば、Verma et al.、1998、Journal of Immunolo
 gical Methods、216、165 - 181を参照)。Fab - Fv形態
 は、WO2009/040562に初めて開示され、そのジスルフィド結合の安定化形態
 であるFab - dsFvが、WO2010/035012に初めて開示された。本開示に
 係る抗原結合断片は、WO2005/003169、WO2005/003170とWO
 2005/003171に記載されたFab及びFab'断片を更に含む。多価抗体は、
 多重特異性、例えば、二重特異性のものを含んでもよく、又は単一特異性のものであってもよく(例えば、WO92/22583とWO05/113605を参照)、後者の一例
 としては、WO92/22583に記載されたTri - Fab(又はTFM)である。

10

【0094】

「CD40に結合する」という用語は、CD40又はそのエピトープと相互作用できる
 ことを意味し、上記CD40又はそのエピトープは、ヒト由来のものであってもよい。本
 開示の「抗原結合部位」という用語は、抗原において連続しておらず、本開示の抗体又は
 抗原結合断片により認識される3次元空間部位を指す。

【0095】

「抗原」という用語は、免疫適格性脊椎動物を免疫化して、抗原を認識する抗体を産生
 し、又は発現ライブラリー(例えば、特にファージ、サッカロミセス又はリボソームディ
 スプレイライブラリー)をスクリーニングするための分子を指す。本開示において、抗原
 はより広義に定義されており、抗体により特異的に認識される標的分子を含み、且つ抗体
 を産生するための免疫化プロセス又は抗体を選択するためのライブラリーの選別に使用さ
 れる分子の一部又は模倣体を含む。本開示のヒトCD40結合抗体に対して、ヒトCD4
 0の単量体と多量体(例えば、二量体、三量体など)、及びヒトCD40の欠失変異体と
 他の変異体は、何れも抗原と称される。

20

【0096】

「エピトープ」という用語は、抗原における免疫グロブリン又は抗体に結合する部位を
 指す。エピトープは、隣接するアミノ酸から、又はタンパク質の三次折畳により並列して
 隣接しないアミノ酸から形成されてもよい。隣接するアミノ酸により形成されたエピト
 ープは、通常、変性溶媒に暴露された後に保持されるが、三次折畳により形成されたエピト
 ープは通常、変性溶媒で処理された後に無くなる。エピトープは、通常、独特の空間配座
 で、少なくとも3~15個のアミノ酸を含む。何のエピトープが所定の抗体により結合さ
 れるかを決定する方法は、この分野でよく知られているもので、ウエスタンブロット法と
 免疫沈降検出分析などを含む。エピトープの空間配座を決定する方法は、この分野におけ
 る技術と本開示に記載される技術、例えば、X線結晶分析法と2次元核磁気共鳴などを含
 む。

30

【0097】

「特異的結合」、「選択的結合」という用語は、抗体の所定の抗原におけるエピトープ
 との結合を指す。通常、ヒトCD40又はそのエピトープを分析物として使用するととも
 に、抗体をリガンドとして使用し、機器において表面プラズモン共鳴(SPR)技術によ
 って測定する場合、抗体は、約 10^{-7} M未満若しくはそれよりも小さい平衡解離定数
 (K_D)で所定の抗原又はそのエピトープに結合し、且つ所定の抗原又はそのエピト
 ープに対する結合親和性が、所定の抗原(又はそのエピトープ)又は密接に関連する抗原以外
 の非特異的抗原(例えば、BSAなど)に対する結合親和性の少なくとも2倍である。「
 抗原を識別する抗体」という用語は、本開示において「特異的に結合する抗体」という用
 語と互いに交換して使用されてもよい。

40

【0098】

「結合親和性」又は「親和性」は、本開示において、2つの分子(例えば、抗体又はそ

50

の一部と抗原)間の非共有相互作用の強度の目安として使用される。2つの分子間の結合親和性は、解離定数(K_D)を決定することにより定量化することができる。 K_D は、例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)法(Biacore)で複合物の形成と解離の動態を測定することにより決定することができる。一価複合物の結合と解離に対応する速度定数は、それぞれ結合速度定数 k_a (又は k_{on})と解離速度定数 k_d (又は k_{off})と呼ばれる。 K_D は、 $K_D = k_d / k_a$ という方程式によって k_a 及び k_d に関連する。解離定数の値は、周知の方法により直接決定することができ、且つ、例えばCaceci et al. (1984, Byte 9:340-362)に記載されたような方法により、複雑な混合物に対しても算出することができる。 K_D は、例えばWong & Lohman (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5428-5432)に開示されたような二重過ニトロセルロースフィルター結合アッセイにより決定することができる。標的抗原に対する抗体の結合能力を評価する他の標準的なアッセイは、この分野で既知のものであり、例えば、ELISA、ウエスタンブロット、RIA及びフローサイトメトリー分析、及び本開示の他所で挙げられた他のアッセイを含む。抗体の結合動態と結合親和性は、この分野で知られている標準的なアッセイ、例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)により、例えばBiacoreTMシステム又はKinExAにより評価されてもよい。各抗体/抗原複合物の K_D 値を比較することにより、異なる分子との相互作用に関連する結合親和性を比較し、例えば、異なる抗体による所定の抗原への結合親和性を比較することができる。同様に、相互作用の特異性は、目的相互作用(例えば、抗体と抗原の間の特異的相互作用)の K_D 値と非目的相互作用(例えば、CD40に結合しない既知の対照抗体)の K_D 値を決定して比較することで評価することができる。

【0099】

「保存(的)置換」という用語は、元のアミノ酸残基と類似の特性を有する別のアミノ酸残基に置換されることを指す。例えば、リジン、アルギニンとヒスチジンは、塩基性側鎖を持つことにおいて類似の特性を有し、また、アスパラギン酸とグルタミン酸は、酸性側鎖を持つことにおいて類似の特性を有する。更に、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システインとトリプトファンは、電荷をもたない極性側鎖を持つことにおいて類似の特性を有し、また、アラニン、バリン、ロイシン、トレオニン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニンとメチオニンは、非極性側鎖を持つことにおいて類似の特性を有する。更に、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンとヒスチジンは、芳香族側鎖を持つことにおいて類似の特性を有する。従って、上記のような類似の特性を示す群におけるアミノ酸残基が置換される場合にも、それは特性の特定の変化を示さないことが当業者に明らかである。

【0100】

「阻害」又は「遮断」は交換して使用されてもよく、部分的と完全な阻害/遮断の両方をカバーする。CD40に対する阻害/遮断は、阻害や遮断のない場合にCD40の結合が発生される時に活性が現れる正常なレベル又は種類を低減又は変更することが好ましい。阻害と遮断は、抗CD40抗体と接触した場合、抗CD40抗体と接触していないCD40に比べて、何れの測定可能なCD40結合親和性も低下することを含むことも意図する。

【0101】

「成長の阻害」(例えば、細胞について)は、細胞成長の任意の測定可能な低下も含むことを意図する。

【0102】

「アゴニスト活性」、「アゴニスト活性」又は「アゴニスト性」は、アゴニストとしての機能を指す。アゴニストと細胞受容体の結合により、当該受容体の天然リガンドによるものと類似若しくは同様の反応又は活性が引き起こされる。例えば、CD40アゴニストは、細胞の増殖及び/又は分化、例えば、ICAM-1、E-セレクトリン、VCAMなどの分子による細胞間の接着のアップレギュレート、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNFなどの炎症促進性サイトカインの分泌、CD40受容体を介するTRAF

(例えば、TRAF2及び/又はTRAF3)、MAPキナーゼ、例えばNIK(NF-B誘導キナーゼ)、1-Bキナーゼ(IKK /)、転写因子NF-B、RasとMEK/ERK経路、PI3K/Akt経路、P38MAPK経路などの経路によるシグナルの伝達、XIAP、Mcl-1、Bclxなどの分子による抗-アポトーシスシグナルの伝達、B及び/又はT細胞記憶の産生、B細胞抗体の産生、B細胞のアイソタイプの変換、クラスII MHCとCD80/86の細胞表面発現のアップレギュレートなどの応答の何れか又は全てを誘導することができる。「拮抗活性」、「拮抗薬活性」又は「拮抗性」は、拮抗薬となり得る物質の機能を指す。例えば、CD40の拮抗薬は、CD40受容体とアゴニスト性リガンド、具体的にCD40Lとの結合によって誘導される任意の応答を防止又は低減することができる。拮抗薬は、アゴニスト結合によって誘導される1種又は複数種の応答を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%、且つ最も好ましくは90%、95%、99%又は100%低下させることができる。抗CD40抗体のCD40リガンドへの結合特異性及び拮抗活性を検出する方法は、当業者に知られているものであり、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の分泌をモニターするアッセイ、B細胞増殖アッセイ、Bancheureau様B細胞増殖アッセイ、抗体産生のT細胞補助アッセイ、B細胞増殖の共刺激アッセイ、及びB細胞活性化マーカーをアップレギュレートするアッセイを含むが、これらに限定されない。

【0103】

抗体及び抗原結合断片を産生・精製する方法は、従来技術でよく知られており、且つ、例えば冷泉港の抗体実験技術マニュアル(5~8章及び15章)で見出すことができる。例えば、ヒトCD40又はその断片をマウスに免疫することができ、得られた抗体は復元、精製されることができるとともに、通常の方法によりアミノ酸シーケンシングを行うことができる。抗原結合断片は、同じく通常の方法により調製することができる。本開示に記載される抗体又は抗原結合断片は、遺伝子工学的方法により、非ヒト由来のCDR領域に1つ又は複数のヒト由来のFR領域が加えられる。ヒトFR生殖細胞系列配列は、ImmunoGenetics(IMG T)のウェブサイトから入手可能である。

【0104】

当業者に知られている通常の方法により、同じエピトープに対する結合で抗体を競合的にスクリーニングすることができる。例えば、競合及び交差競合研究を行うことにより、互いに競合したり、交差競合したりして抗原に結合する抗体を得ることができる。それらの交差競合によって同じエピトープと結合する抗体を得るハイスループット方法は、国際特許公開W003/48731に記載されている。従って、当業者に知られている通常の方法により、本開示にかかる抗体分子と競合してCD40における同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合断片を得ることができる。

【0105】

「障害」という用語は、本開示のヒト化抗CD40抗体を用いた治療から利益が得られる任意の病状である。それは、慢性及び急性の障害又は疾患を含む。本開示の治療すべき障害の非限定的な例としては、がん、血液悪性腫瘍、良性と悪性腫瘍、白血病及びリンパ性悪性腫瘍、並びに炎症性障害、血管新生障害、自己免疫障害と免疫学的障害が含まれる。

【0106】

「CD40関連障害」又は「CD40関連疾患」という用語は、CD40を発現する細胞の修飾又は除去を示す病状を指す。これらの細胞は、異常増殖を示すCD40発現細胞、又は癌性若しくは悪性増殖に関連するCD40発現細胞を含む。CD40抗原の発現異常を示す癌のより具体的な例としては、Bリンパ芽球性腫瘍、パーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、T細胞リンパ腫、カポジ肉腫、骨肉腫、表皮と内皮腫瘍、膵臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、結腸癌、前立腺癌、頭頸部癌、皮膚癌(黒色腫)、膀胱癌及び腎臓癌が含まれる。このような障害は、白血病、リンパ腫(B細胞リンパ腫及び非ホジキンリンパ腫を含む)、多発性骨髄腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、例えば骨肉腫、ユーイ

ング肉腫のような肉腫、悪性黒色腫、腺癌（卵巣腺癌を含む）、カポジ肉腫／カポジ腫瘍及び扁平上皮癌を含む固形腫瘍を含むが、これらに限定されない。「CD40関連障害」は、免疫系の疾患及び障害、例えば、自己免疫障害及び炎症性障害を更に含む。このような病状は、関節リウマチ（RA）、全身性エリテマトーデス（SLE）、強皮症、シェーグレン症候群、多発性硬化症、乾癬、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性結腸炎及びクローン病）、肺炎症、喘息、及び特発性血小板減少性紫斑病（ITP）を含むが、これらに限定されない。

【0107】

「...の成長を妨げる」又は「成長阻害」という用語は、細胞、特にCD40抗原を発現する腫瘍性細胞種類の成長又は増殖を阻害することを指す。従って、成長阻害は、例えば、S期の腫瘍性細胞の百分率を顕著に低減する。

10

【0108】

「与える」、「投与」及び「処理」は、動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、臓器や生物流体に適用される場合に、外因性薬剤、治療剤、診断薬又は組成物の、動物、ヒト、対象、細胞、組織、臓器や生物流体との接触を意味する。「与える」、「投与」及び「処理」は例えば、治療、薬物動態、診断、研究と実験方法を意味してもよい。細胞の処理は、試薬の細胞との接触、及び試薬の流体との接触を含み、ここで、上記流体は細胞と接触する。「与える」、「投与」及び「処理」は、また、試薬、診断、結合組成物により、又は別種の細胞を通じて、体外及びインビトロで例えば細胞を処理することを意味する。「処理」はヒト、獣医学又は研究対象に適用される場合に、治療的処理、予防又は予防的措置、研究と診断的応用を意味する。

20

【0109】

「治療」は、対象に内用又は外用の治療剤、例えば、本開示の何れか1つの抗体又はその抗原結合断片或いはそれを含む組成物を投与することを意味し、上記対象は、1つ若しくは複数の疾患又はその症状を患っており、患っている恐れがあり、又は患う傾向があるが、上記治療剤は、これらの症状に対して治療作用を有することが知られている。通常、このような症状の退行を誘導することによるにせよ、臨床的に測定可能な任意の程度まで進行しないようにこのような症状を阻害することによるにせよ、治療される対象又は集団に、1種又は複数種の疾患症状を効果的に緩和する量で治療剤を与える。何れかの具体的な疾患症状を効果的に緩和する治療剤の量（「治療有効量」とも呼ばれる）は、対象の疾患状態、年齢と体重、及び薬剤の対象に必要な治療効果を生じさせる能力などの複数の要因によって、変化することができる。当該症状の重症度や進行状況の評価に医者や他のプロのヘルスケアプロバイダによく用いられる任意の臨床的検出方法により、疾患症状が低減されたか否かを評価することができる。本開示の実施形態（例えば、治療方法又は製品）は、ある対象における目標疾患症状の緩和に無効であり得るが、例えばStudent t検定、カイ二乗検定、Mann及びWhitneyによるU検定、Kruskal-Wallis検定（H検定）、Jonckheere-Terpstra検定とWilcoxon検定のようなこの分野で知られている任意の統計学的検定方法により、統計学的に有意な数の対象において目標疾患症状を軽減するはずであることが確認された。

30

【0110】

「有効量」は、医学障害の症状又は病状を改善又は予防するために十分な量を含む。有効量は、更に、診断の許容又は促進に十分な量を指す。特定の対象又は獣医学的对象に使用される有効量は、例えば、治療すべき病状、対象の全体的健康状態、投与の方法や経路と用量、及び副作用の重症度といった要因によって変化することができる。有効量は、顕著な副作用又は毒性作用を回避する最大用量又は投与計画であってもよい。

40

【0111】

「相同性」又は「同一性」とは、2つのポリヌクレオチド配列間又は2つのポリペプチド間の配列の類似性を指す。2つの比較される配列における位置が何れも同じヌクレオチド又はアミノ酸モノマーサブユニットに占められる場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれの位置が同じヌクレオチドに占められると、上記分子は当該位置で相同である。2

50

つの配列間の相同性百分率は、2つの配列の共有するマッチング又は相同位置数を比較される位置数で割って100%をかける関数である。例えば、配列が最適にアラインメントされる場合、2つの配列における10個の位置のうち6個がマッチングするか又は相同である場合、2つの配列は60%相同である。一般的には、2つの配列をアラインメントして最大の相同性百分率が得られる場合に比較する。

【0112】

「細胞」、「細胞系」及び「細胞培養物」は、互いに交換して使用されてもよく、このような名称は何れもその子孫を含む。また、意図するかしないかの変異のために、あらゆる子孫は、DNA含有量において精確に同じであり得ないと理解すべきである。最初の形質転換細胞からスクリーニングされたものと同様の機能又は生物学的活性を有する変異子孫が含まれる。

10

【0113】

「任意選択的」又は「任意選択的に」とは、その後説明される事象又は状況が生じてもよいが、生じなくてもよいことを意味し、この説明は、当該事象又は状況が生じる場合と生じない場合を含む。例えば、「任意選択的に1~3個の抗体重鎖可変領域を含む」とは、特定の配列の抗体重鎖可変領域が存在してもよいが、必ずしも存在しなくてもよいことを意味する。

【0114】

本開示の「CD40結合分子」は、最大限に解釈すると、本開示の抗CD40抗体又はその抗原結合断片を含み、CD40への結合を実現可能なタンパク質であれば、何れも当該用語の範囲にある。例えば、CD40結合タンパク質は、例えば複合で、1つ又は複数のエフェクター分子を含んでもよい。上記「エフェクター分子」は、単独で治療活性を有する(例えば、抗腫瘍活性又は免疫活性化若しくは阻害活性を有する)か又は検出機能を有することができ、例えば、生理活性タンパク質(例えば、酵素)、他の抗体若しくは抗体断片、合成若しくは天然に存在するポリマー、ポリヌクレオチドとその断片、例えば、DNA、RNAとその断片、放射性核種(特に、放射性ヨウ化物)、放射性同位体、キレート金属、ナノ粒子及びレポーター基(例えば、蛍光化合物)、又はNMR若しくはESR分光分析によって検出可能な化合物などの任意の形態であってもよい。エフェクター分子と本開示の抗CD40抗体又はその抗原結合断片との複合方式は、通常の方法により達成することができる。

20

30

【0115】

「抗体薬物複合体」は、薬物(例えば、抗腫瘍剤、毒素)を抗体に連結してなる複合体を指し、上記複合体は、通常の方法によって、例えば、切断可能又は切断不可能なリンカーによって連結することができる。

【図面の簡単な説明】

【0116】

【図1A-B】CD40拮抗型抗体のレポーター遺伝子システムにおける活性結果であり、図1Aと図1Bはそれぞれ9E6-L4H2と2F12-L4H2に関連する結果であり、図1Aと図1Bは両方ともヒトIgG1アイソタイプを陰性対照、CFZ533を陽性対照として使用している。

40

【図2A-B】CD40拮抗型抗体のB細胞活性化実験系における阻害活性結果であり、図2Aは9E6-L4H2と2F12-L4H2のCD19+CD69+の細胞百分率阻害結果であり、図2Bは9E6-L4H2と2F12-L4H2のCD19+CD69+の細胞MFI阻害結果であり、図2A~図2Bは両方ともヒトIgG1アイソタイプを陰性対照として、CFZ533を陽性対照として使用している。

【図3A-D】CD40拮抗型抗体のDC細胞活性化実験系における阻害活性結果であり、図3Aは9E6-L4H2と2F12-L4H2のCD11C+CD80+の細胞MFI阻害結果であり、図3Bは9E6-L4H2と2F12-L4H2のCD11C+CD86+の細胞MFI阻害結果であり、図3Cは9E6-L4H2と2F12-L4H2のIL-12/23 p40を阻害する結果であり、図3Dは9E6-L4H2と2F12

50

- L 4 H 2 の T N F を阻害する結果であり、図 3 A ~ 3 D は何れもヒト I g G 1 アイソタイプを陰性対照として、C F Z 5 3 3 を陽性対照として使用している。

【図 4】C D 4 0 拮抗型抗体 9 E 6 - L 4 H 2、2 F 1 2 - L 4 H 2 の B 細胞活性化実験系における内因性アゴニスト活性結果であり、ヒト I g G 1 アイソタイプ、C F Z 5 3 3、アゴニスト抗 C D 4 0 抗体 9 E 5 - S E L F N S を対照として使用している。

【図 5 A - B】C D 4 0 拮抗型抗体のマウス T 細胞依存性の体液性免疫反応モデルにおける活性結果であり、図 5 A はフローチャートであり、図 5 B は 7、14、21、28 日目の検出結果図である。

【図 6 A - B】C D 4 0 拮抗型抗体のマウス皮膚移植拒絶モデルにおける活性結果であり、図 6 A はフローチャートであり、図 6 B は皮膚移植片の生存率 (%) 及び皮膚移植片の採点結果である。

【図 7】マウス皮膚移植拒絶モデルにおける C D 4 0 拮抗型抗体とタクロリムス (F K 5 0 6) との併用の活性結果であり、図 7 の A は 9 E 6 - L 4 H 2 (1 0 m p k) 及びそれとタクロリムス (F K 5 0 6) との併用の皮膚移植片生存率 (%) の結果であり、図 7 の B は 2 F 1 2 - L 4 H 2 (1 0 m p k) 及びそれとタクロリムス (F K 5 0 6) との併用の皮膚移植片生存率 (%) の結果であり、図 7 の C は 9 E 6 - L 4 H 2 (1 0 m p k) 及びそれとタクロリムス (F K 5 0 6) との併用の皮膚移植片採点結果であり、図 7 の D は 2 F 1 2 - L 4 H 2 (1 0 m p k) 及びそれとタクロリムス (F K 5 0 6) との併用の皮膚移植片採点結果である。

【図 8】C D 4 0 拮抗型抗体 9 E 6 - L 4 H 2、2 F 1 2 - L 4 H 2 のヒト C D 4 0 トランスジェニックマウスにおける P K 検出結果であり、C F Z 5 3 3 を対照として使用している。

【図 9 A - B】F c 変異した C D 4 0 拮抗型抗体の B 細胞活性化実験系における阻害活性結果であり、図 9 A は 9 E 6 - L 4 H 2 と 9 E 6 - L 4 H 2 - A A Y T E の C D 1 9 + C D 6 9 + の細胞 M F I 阻害結果であり、図 9 B は 2 F 1 2 - L 4 H 2 と 2 F 1 2 - L 4 H 2 - A A Y T E の C D 1 9 + C D 6 9 + の細胞 M F I 阻害結果である。

【図 10 A - D】F c 変異した C D 4 0 拮抗薬の D C 細胞活性化実験系における阻害活性結果であり、図 10 A は 9 E 6 - L 4 H 2 と 9 E 6 - L 4 H 2 - A A Y T E の I L - 1 2 / 2 3 p 4 0 を阻害する結果であり、図 10 B は 9 E 6 - L 4 H 2 と 9 E 6 - L 4 H 2 - A A Y T E の T N F を阻害する結果であり、図 10 C は 2 F 1 2 - L 4 H 2 と 2 F 1 2 - L 4 H 2 - A A Y T E の I L - 1 2 / 2 3 p 4 0 を阻害する結果であり、図 10 D は 2 F 1 2 - L 4 H 2 と 2 F 1 2 - L 4 H 2 - A A Y T E の T N F を阻害する結果である。

【発明を実施するための形態】

【0117】

以下、実施例に合わせて本開示を更に説明するが、これらの実施例は、本開示の範囲を制限するものではない。

【0118】

本開示の実施例又は試験例において具体的な条件が明記されていない実験方法は、一般的に通常の条件、又は原料や商品のメーカーにより推奨された条件に従う。S a m b r o o k ら、分子クローニング、実験室マニュアル、コールド・スプリング・ハーバー研究所、及び現代分子生物学方法、A u s u b e l ら著、G r e e n e 出版協会、W i l e y I n t e r s c i e n c e、N Y が参照される。具体的な供給源が明示されていない試薬は、市販される通常の試薬である。

【0119】

実施例 1 . C D 4 0 免疫抗原、抗原をスクリーニングする配列及び調製

h i s タグ付きのヒト C D 4 0 (h - C D 4 0 - h i s) 組換えタンパク質 (製品番号 C D 0 - H 5 2 2 8)、マウス F c タグ付きのヒト C D 4 0 (h - C D 4 0 - m F c) 組換えタンパク質 (製品番号 C D 0 - H 5 2 5 a)、h i s タグとビオチンタグ付きのヒト C D 4 0 (h C D 4 0 - h i s - a v i) 組換えタンパク質 (製品番号 C D 0 - H 8 2 E

10

20

30

40

50

8) 及び h i s タグ付きのカニクイザル C D 4 0 (c y n o - C D 4 0 - h i s) 組換えタンパク質 (製品番号 C D 0 - C 5 2 H 6) は、何れも A c r o b i o s y s t e m s 社から購入された精製市販タンパク質試薬であり、それぞれの配列の由来は表 2 に示されている。上記タンパク質試薬は、次の各実施例の実験に使用することができる。

【 0 1 2 0 】

【表 2】

表 2. 組換えタンパク質アミノ酸配列の由来

名称	アミノ酸配列の開始点と終了点	GenBank登録番号
h-CD40-his	G l u 2 1 - A r g 1 9 3	P 2 5 9 4 2 - 1
h-CD40-mFc	G l u 2 1 - A r g 1 9 3	P 2 5 9 4 2 - 1
h-CD40-his-avi	G l u 2 1 - A r g 1 9 3	P 2 5 9 4 2 - 1
cyno-CD40-his	G l u 2 1 - A r g 1 9 3	G 7 P G 3 8

10

【 0 1 2 1 】

実施例 2 . 抗 C D 4 0 ウサギモノクローナル抗体のスクリーニング及びヒト - ウサギキメラ抗体の調製

抗ヒト C D 4 0 モノクローナル抗体は、2匹のニュージーランドホワイトラビットを免疫することにより産生された。免疫抗原は、His タグ付きのヒト C D 4 0 組換えタンパク質である (h - C D 4 0 - h i s で、リン酸塩緩衝液により 1 μ g / μ L に調製した) 。フロイントアジュバントによる乳化：最初は完全フロイントアジュバント (C F A) を使用し、残りの追加免疫化は、不完全フロイントアジュバント (I F A) を使用した。各回の免疫は、抗原 4 0 0 μ g の多点皮下注射を採用した。免疫注射時間は 0、7、20、41 日目である。27 と 48 日目に採血して血液検出を行い、E L I S A 及び F A C S 方法によりウサギ血清における抗体価を検出した。血清中の抗体価が高くて安定する傾向があるウサギを選択した：63 日目に追加免疫を行い、400 μ g / 匹でリン酸緩衝液から調製された抗原溶液を静脈内注射し、67 日目に当該ウサギの脾臓を収集し、ピオチンタグ付きの C D 4 0 抗原を加え、標識されたモノクローナル B 細胞をフローサイトメーターにより選別して 96 ウェルプレートに入れた。14 日間培養後に、上清を収集し、E L I S A 及び F A C S の方法により、ヒト C D 4 0、カニクイザル C D 4 0 及び R a j i 細胞 (ヒト C D 4 0 を発現した腫瘍細胞株) に結合可能なクローンをスクリーニングし、合計 28 株の B 細胞モノクローンを得た。これらのモノクローナル細胞から R N A を抽出し、逆転写し、P C R 増幅した後、シーケンシングのためにシーケンシング会社へ送付し、最終的にウサギ抗体 28 株の配列を取得し、親和性・活性同定実験 (方法は実施例 2 ~ 3 を参照) でスクリーニングして 11 株の単クローン抗体を得て、重鎖及び軽鎖可変領域の配列は表 3 に、C D R の配列は表 4 に示されている。

20

30

【 0 1 2 2 】

40

50

【表 3 - 1】

表 3. 抗CD40ウサギモノクローナル抗体の可変領域配列

番号	重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の配列	
5A9	VH	<u>QSVKESEGG</u> <u>LFKPTD</u> <u>TLTLTCTASR</u> <u>FSLSSYDM</u> <u>SWVRQAPGN</u> <u>GLEWIGA</u> <u>IIGGAGGT</u> <u>YYASWAKSRS</u> <u>TI</u> <u>TRNTNLNT</u> <u>LTLKMTSL</u> <u>TAADTATYFC</u> <u>ARGWT</u> <u>RLDLWGQGT</u> <u>LVTVSS</u> (配列番号1)
	VL	<u>ADIVLTQT</u> <u>ASPVSGAV</u> <u>GGTVTINC</u> <u>QSSSEDI</u> <u>SSN</u> <u>LSWYQQK</u> <u>PGQPPKLL</u> <u>IYAASN</u> <u>LASGVPSR</u> <u>FKGS</u> <u>GSGTEFT</u> <u>LTISDLE</u> <u>CADAATYYC</u> <u>QGGYWSG</u> <u>ISN</u> <u>FGNGF</u> <u>GGGTEV</u> <u>VVK</u> (配列番号2)
9E6	VH	<u>QSVRESEGG</u> <u>LVKPTD</u> <u>TLTLTCTV</u> <u>SGFSLSSYDM</u> <u>SWVRQAPGN</u> <u>GLEWIGA</u> <u>IIGGAGGT</u> <u>YYASWAKSRS</u> <u>TI</u> <u>TRNTNLNT</u> <u>VTLKMS</u> <u>SLTAADTATYFC</u> <u>ARGWT</u> <u>RLDLWGQGT</u> <u>LVTVSS</u> (配列番号3)
	VL	<u>ADIVLTQT</u> <u>PSPVSGAV</u> <u>GGTVTIKC</u> <u>QASEDI</u> <u>SSN</u> <u>LAWYQQK</u> <u>PGQPPKLL</u> <u>IFPASN</u> <u>LASGVSSR</u> <u>FKGS</u> <u>GSGTEFT</u> <u>LTISDLE</u> <u>CADAATYYC</u> <u>QGGYWT</u> <u>STSN</u> <u>FGNGF</u> <u>GGGTEV</u> <u>VVK</u> (配列番号4)
9F10	VH	<u>QSVKESEGG</u> <u>LFKPTD</u> <u>TLTLTCTV</u> <u>SGFSLSSYDM</u> <u>SWVRQAPGN</u> <u>GLEWIGA</u> <u>IIGGAGGT</u> <u>YYASWAKSRS</u> <u>TI</u> <u>TRNTNLNT</u> <u>VTLKMT</u> <u>SLTAADTATYFC</u> <u>TRGWT</u> <u>RLDLWGQGT</u> <u>LVTVSS</u> (配列番号5)

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

	VL	<u>ADIVLTQTESPVS</u> <u>GPVGGT</u> <u>VTINCQASEDI</u> <u>SSN</u> <u>LAWYQQKPGQP</u> <u>PKLLIYAASN</u> <u>LASGVPSRFKGS</u> <u>GSGTEFTLTI</u> <u>SDLECADAA</u> <u>TYYCQGAYWS</u> <u>SSTSY</u> <u>FGNGF</u> <u>GGGTQVVVK</u> (配列番号6)
4F6	VH	<u>QSVKESE</u> <u>GGLFKPAD</u> <u>TLTLTCTV</u> <u>SRFSLSS</u> <u>YGV</u> <u>TWVRQAPGN</u> <u>LEWIGAIG</u> <u>STGSAYYAS</u> <u>WAKSRS</u> <u>TITRDTNLN</u> <u>TVTLKMT</u> <u>SLTAADT</u> <u>ATYFCAR</u> <u>GGI</u> <u>TAYAIWGP</u> <u>GTLLVTVSS</u> (配列番号7)
	VL	<u>AFELTQT</u> <u>PSSVEAA</u> <u>VGGT</u> <u>VTIKCQAS</u> <u>QSI</u> <u>SNGL</u> <u>AWYQQKPG</u> <u>QPPKLLI</u> <u>AGASN</u> <u>LASGVSS</u> <u>RFKGS</u> <u>GSGIEFIL</u> <u>TISDLE</u> <u>CADAAT</u> <u>TYYCQSY</u> <u>NSFTTVF</u> <u>GGGTEV</u> <u>VVK</u> (配列番号8)
5B8	VH	<u>QSVKESE</u> <u>GGLFKPTD</u> <u>TLTLTCTV</u> <u>SGFSLNS</u> <u>YGV</u> <u>SWVRQAPGN</u> <u>LEWIGAIG</u> <u>SSGSAYYAS</u> <u>WARSR</u> <u>TITRDTNLN</u> <u>TVTLKMT</u> <u>SLTAADT</u> <u>ATYFCAR</u> <u>GGI</u> <u>TVYAIWGP</u> <u>GTLLVTVSS</u> (配列番号9)
	VL	<u>AFELTQT</u> <u>PSPVSA</u> <u>AVGGT</u> <u>VTIKCQAS</u> <u>QSI</u> <u>TNGL</u> <u>AWYQQKPG</u> <u>QPPKLLI</u> <u>AGASN</u> <u>LASGVSS</u> <u>RFKGS</u> <u>GSGTEFTL</u> <u>TISDLE</u> <u>CDDAAT</u> <u>TYYCQSY</u> <u>YSSSYTIF</u> <u>GGGTEV</u> <u>VVK</u> (配列番号10)
8G10	VH	<u>QSVKESE</u> <u>GGLFKPTA</u> <u>TTLTLTCTV</u> <u>SGFSLSS</u> <u>YGV</u> <u>SWVRQAPGS</u> <u>GLEWIGGI</u> <u>ASTGTTYAN</u> <u>WAKSRS</u> <u>TITRDTNLK</u> <u>TVTLKMT</u> <u>SLTAADT</u> <u>ATYFCAR</u> <u>GGI</u> <u>TAYAIWGP</u> <u>GTLLVTVSS</u> (配列番号11)
	VL	<u>AFELTQT</u> <u>PSSVEAA</u> <u>VGGT</u> <u>VTIKCQAS</u> <u>QSI</u> <u>TNGL</u> <u>AWYQQKPG</u> <u>QPPKLLI</u> <u>AGASN</u> <u>LASGVSS</u> <u>RFKGS</u> <u>GSGTEFTL</u> <u>TISDLE</u> <u>CADAAT</u> <u>TYYCQSY</u> <u>YDSSSTVF</u> <u>GGGTEV</u> <u>VVK</u> (配列番号12)
8C12	VH	<u>QSVKESE</u> <u>GGLFKPTD</u> <u>TLTLTCTV</u> <u>SGFSLSS</u> <u>YGV</u> <u>SWVRQAPGN</u> <u>LEWIGGI</u> <u>IGSDGSAYYAS</u> <u>WAKSRA</u> <u>TITRDTNLK</u> <u>TVTLEM</u> <u>SLTVADT</u> <u>ATYFCAR</u> <u>GGI</u> <u>TVYAIWGP</u> <u>GTLLVTVSS</u> (配列番号13)
	VL	<u>AFELTQT</u> <u>PSPVSA</u> <u>AVGGT</u> <u>VTIKCQAS</u> <u>QSI</u> <u>SNGL</u> <u>AWYQQKPG</u> <u>QPPKVLIV</u> <u>GASN</u> <u>LASGVSS</u> <u>RFKGS</u> <u>GSGTEFTL</u> <u>SISDLE</u> <u>CADGAT</u> <u>TYYCQSY</u> <u>FSSSSTVF</u> <u>GGGTEV</u> <u>VVK</u> (配列番号14)
4D4	VH	<u>QSVKESE</u> <u>GGLFKPTD</u> <u>TLTLTCTV</u> <u>SGFSLSS</u> <u>YGV</u> <u>SWVRQAPGN</u> <u>LEWIGGI</u> <u>IGSDGSAYYAS</u> <u>WAKSRA</u> <u>TITRDTNLK</u> <u>TVTLEM</u> <u>SLTAADT</u> <u>ATYFCAR</u> <u>GGI</u> <u>TVYAIWGP</u> <u>GTLLVTVSS</u> (配列番号15)

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

	VL	<u>AFELTQTPSPVSAAVGGTVTIKCCQASQSISNGL</u> <u>AWYQQKPGQPPKVLIVGASNLASGVSSRFKGS</u> <u>SGTEFTLSISDLECADGATYYCQSYFSSSSTVF</u> GGGTEVVVK (配列番号16)	
2F12	VH	<u>QSVKESEGGLFKPKDTLTLTCTVSGFSLSSYG</u> <u>SWVRQAPNGLEWIGGIGSDGSAYYASWAKSRA</u> <u>TITRDTNLKTVTLEMTSLTAADTATYFCARGGI</u> <u>TVYAMWGPGLVTVSS</u> (配列番号17)	10
	VL	<u>AFELTQTPASVEAAMGGTVTIKCCQASQSISNGL</u> <u>AWYQQKPGQPPKLLIVGASNLASGVSSRFKGS</u> <u>SGTEFTLSISDLECADGATYYCQSYFSSSSTVF</u> GGGTEVVVK (配列番号18)	
3F6	VH	<u>QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSYAI</u> <u>SWVRQAPNGLEWIGAIDRYGTTYATWAKSRS</u> <u>TITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCARGPW</u> <u>YYGGDVAWTGSFDPWGPGLVTVSS</u> (配列番号19)	
	VL	<u>AQVLTQTASPVSAAVGGTVTISCQSSQSVANND</u> <u>FLSWYQQKPGQPPKLLIYGASTLASGVPSRFRG</u> <u>NGSGTQFTLITGMQCDDAATYFCTGGYAGPIY</u> <u>IFGGGTEVVVK</u> (配列番号20)	20
10A4	VH	<u>QSLEESGGRLVTPGGSLLTCTVSGIDL SRNAI</u> <u>SWVRQSPNGLEWIGGIGSSGSAYYASWAKSRS</u> <u>TITRDTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARDGY</u> <u>AGSSWGIYYGMDPWGPGLVTVSS</u> (配列番号21)	
	VL	<u>AIEMTQSPPSLSASVGETVRIRCLASEDIYRGI</u> <u>SWYQQKPGKPTLLIYGASTLQSGVPPRFSGSG</u> <u>SGTDYTLTIGGVQAEDAATYYCLGGHSYSSAGL</u> <u>TFGAGTKVEIK</u> (配列番号22)	30

(注：下線部は、K a b a t 番号付け規則によって決定された重鎖鎖可変領域のCDR領域である)

【0123】

【表 4 - 1】

表 4. 抗CD40ウサギモノクローナル抗体のCDR領域 (K a b a t 番号付け規則)

番号	重鎖CDR		軽鎖CDR	
5A9	HCDR1	SYDMS (配列番号23)	LCDR1	QSSEDISSNLS (配列番号26)
	HCDR2	AIGGAGGTYYA SWAKS (配列番号24)	LCDR2	AASNLAS (配列番号27)

40

50

【表 4 - 2】

	HCDR 3	GWTRLDL (配列番号 25)	LCDR 3	QGGYWSG I SNFG NG (配列番号 28)	
9 E 6	HCDR 1	SYDMS (配列番号 23)	LCDR 1	QASEDISSNLA (配列番号 29)	
	HCDR 2	AIGGAGGTYYA SWAKS (配列番号 24)	LCDR 2	PASNLAS (配列番号 30)	
	HCDR 3	GWTRLDL (配列番号 25)	LCDR 3	QGGYWTSTSNFG NG (配列番号 31)	10
9 F 10	HCDR 1	SYDMS (配列番号 23)	LCDR 1	QASEDISSNLA (配列番号 29)	
	HCDR 2	AIGGAGGTYYA SWAKS (配列番号 24)	LCDR 2	AASNLAS (配列番号 27)	
	HCDR 3	GWTRLDL (配列番号 25)	LCDR 3	QGAYWSSTSYFG NG (配列番号 32)	
4 F 6	HCDR 1	SYGVT (配列番号 33)	LCDR 1	QASQSI SNGLA (配列番号 36)	
	HCDR 2	AIGSTGSAYYA SWAKS (配列番号 34)	LCDR 2	GASNLAS (配列番号 37)	20
	HCDR 3	GGITAYAI (配列番号 35)	LCDR 3	QSYYNSTFTTV (配列番号 38)	
5 B 8	HCDR 1	SYGVS (配列番号 39)	LCDR 1	QASEDITNGIA (配列番号 42)	
	HCDR 2	AIGSSGSAYYA SWARS (配列番号 40)	LCDR 2	GASNLAS (配列番号 37)	
	HCDR 3	GGITVYAI (配列番号 41)	LCDR 3	QSYSSSYTI (配列番号 43)	
8 G 10	HCDR 1	SYGVS (配列番号 39)	LCDR 1	QASQSI TNGLA (配列番号 45)	30
	HCDR 2	GIASTGTTYA NWAKS (配列番号 44)	LCDR 2	GASNLAS (配列番号 37)	
	HCDR 3	GGITAYAI (配列番号 35)	LCDR 3	QSYDSSSTV (配列番号 46)	
8 C 12	HCDR 1	SYGVS (配列番号 39)	LCDR 1	QASQSI SNGLA (配列番号 36)	
	HCDR 2	GIGSDGSAYYA SWAKS (配列番号 47)	LCDR 2	GASNLAS (配列番号 37)	
	HCDR 3	GGITVYAI (配列番号 41)	LCDR 3	QSYFSSSTV (配列番号 48)	40

【表 4 - 3】

4D 4	HCDR 1	SYGVS (配列番号 39)	LCDR 1	QASQSI SNGLA (配列番号 36)
	HCDR 2	GIGSDGSAYYA SWAKS (配列番号 47)	LCDR 2	GASNLAS (配列番号 37)
	HCDR 3	GGITVYAI (配列番号 41)	LCDR 3	QSYFSSSSTV (配列番号 48)
2F 12	HCDR 1	SYGVS (配列番号 39)	LCDR 1	QASQSI SNGLA (配列番号 36)
	HCDR 2	GIGSDGSAYYA SWAKS (配列番号 47)	LCDR 2	GASNLAS (配列番号 50)
	HCDR 3	GGITVYAM (配列番号 49)	LCDR 3	QSYFSSSSTV (配列番号 48)
3F 6	HCDR 1	SYAIS (配列番号 51)	LCDR 1	QSSQSVANNDFL S (配列番号 54)
	HCDR 2	AIDRYGTTYA TWAKS (配列番号 52)	LCDR 2	GASTLAS (配列番号 55)
	HCDR 3	GPWYYGGDVAW TGSFDP (配列番号 53)	LCDR 3	TGGYAGPIYI (配列番号 56)
10 A4	HCDR 1	RNAIS (配列番号 57)	LCDR 1	LASEDIYRGIS (配列番号 60)
	HCDR 2	GIGSSGSAYYA SWAKS (配列番号 58)	LCDR 2	GASTLQS (配列番号 61)
	HCDR 3	DGYAGSSWGIY YGMDP (配列番号 59)	LCDR 3	LGGHSYSSAGLT (配列番号 62)

10

20

30

【0124】

得られた可変領域配列をそれぞれヒトの抗体 IgG1 定常領域 (N297A 変異付き、Eu 番号付けシステム) 配列とヒト kappa 鎖定常領域配列に連結してヒト - ウサギのキメラ抗体配列を取得し、分子クローニング技術により、キメラ抗体の配列を発現ベクターに挿入し、HEK293 細胞発現系を利用すれば、ヒト - ウサギキメラ抗体を得ることができる。

【0125】

実施例 3 . ヒト - ウサギキメラ抗 CD40 抗体 Raji 細胞結合実験

Raji 細胞は、ヒト CD40 を過剰発現する腫瘍細胞株である。2E5 個の Raji 細胞を 96 ウェルプレートに接種した。100 μ L の測定待ちの抗体を加え、最高終濃度が 100 nM で、5 倍希釈し、合計 8 個の濃度にして、4 で 1 時間インキュベートした。洗浄液で 1 回洗浄し、1 : 500 の希釈度で、AF647 に複合した抗ヒト IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories、製品番号 205 - 609 - 088) を加え、4 で 30 分間インキュベートした。洗浄液で 1 回洗浄し、フローサイトメーターで蛍光強度を読み取った。CD40 に対する抗 CD40 抗体の結合 EC₅₀ 値を算出した。抗 CD40 拮抗型抗体 CFZ533 (即ち、IscaIimab、Nova) を陽性対照として使用し、重鎖と軽鎖可変領域の配列は、それぞれ US8277810B の配列 5 と配列 2 に由来した。

40

【0126】

表 5 の結果から、2F12、3F6、4F6、5A9、5B8、9E6、10A4 は、

50

何れもCFZ533より強い結合EC₅₀を有するが、8E1（配列が示されていない）を例とする他の抗体はCFZ533よりもEC₅₀が弱いことが示されている。

【0127】

【表5】

表5. Raji細胞に対するヒトウサギキメラ抗CD40抗体のFACS結合EC₅₀ (nM)

番号	結合EC ₅₀ (nM)
2F12	0.412
3F6	1.506
4F6	0.258
5A9	0.671
5B8	0.435
8E1	2.511
9E6	0.608
10A4	0.467
CFZ533	2.410

10

20

【0128】

実施例4 ヒト-ウサギキメラ抗CD40抗体のレポーター遺伝子細胞活性実験

HEK-Blue CD40L細胞は、InvivoGen (Cat# hkb-cd40) から購入され、当該細胞は、ヒトCD40遺伝子及びNF-κB仲介性のSEAPゲノムを安定トランスフェクションしたもので、SEAP基質であるQUANTI-Blueにより上清において分泌されたSEAPを検出することでCD40シグナル伝達経路の活性化レベルを表現することができる。この実験は、CD40Lによる細胞HEK-Blue CD40Lの活性化を検出することにより、IC₅₀の大きさに基づいて抗CD40抗体のインビトロ拮抗薬活性を評価した。細胞HEK-Blue CD40Lを10%のFBS、100 μg/mLのZeocinと30 μg/mLのBlasticidinを含むDMEM培地に培養し、1:5又は1:10の継代比率で1週間に2~3回継代した。継代時に、培地を吸引除去し、0.25%のトリプシン5 mLで細胞層をすすいだ後、トリプシンを吸引除去し、細胞をインキュベーターに入れて3~5分間消化し、新鮮な培地を加えて細胞を再懸濁した。96ウェル細胞培養プレートに100 μLの細胞懸濁液を加え、密度が5×10⁵細胞/mLで、培地が10%のFBS、100 μg/mLのZeocinと30 μg/mLのBlasticidinを含むDMEMであり、96ウェルプレートの外周に100 μLの滅菌水のみを加えた。培養プレートをインキュベーターにおいて24時間培養した(37 °C、5%のCO₂)。細胞が壁に付着した後、各ウェルに100 μLの勾配希釈した測定待ちの抗体を加え、37 °Cで30分間インキュベートした。25 ng/mLのCD40L (R&D、製品番号2706-CL)と2 μg/mLのanti-His抗体 (R&D、製品番号MAB050)を加え、培養プレートをインキュベーターで20~24時間インキュベートした(37 °C、5% CO₂)。各ウェルから20 μLの細胞上清を取って新しい96ウェルフラットプレートに入れ、180 μLのQUANTI-Blue基質溶液を加え、培養プレートをインキュベーターにて暗所で1~3時間インキュベートした。マイクロプレートリーダー (Thermo MultiSkaf)により630 nmでの吸光度を測定し、IC₅₀値を算出して抗CD40抗体のインビトロ細胞活性を評価した。表6を参照すると、その結果から、2F12、3F6、4D4、4F6、5A9、5B8、8C12、8G10、9E6、9F10、10A4は、何れもCFZ533に相当するか又はそれよりやや強

30

40

50

いレポーター遺伝子細胞阻害活性 IC₅₀を有するが、2F1（配列が示されていない）を例とする他の抗体は、CFZ533よりもIC₅₀が弱いことが示されている。

【0129】

【表6】

表6. 抗CD40抗体のレポーター遺伝子細胞活性 IC₅₀ (nM)

番号	IC ₅₀ (nM)
2F12	0.1717
3F6	0.3778
4D4	0.197
4F6	0.1823
5A9	0.3173
5B8	0.2033
8C12	0.1729
8G10	0.1556
9E6	0.2206
9F10	0.2171
10A4	0.2172
2F1	0.6849
CFZ533	0.2715

10

20

【0130】

実施例5. 抗CD40抗体のヒト化

ウサギ抗体2F12、3F6、9E6及び10A4の重・軽鎖可変領域の配列を抗体Germlineデータベースと比較して、相同性の高いヒト生殖細胞系列テンプレートを得た。最終抗体をヒト化するヒト生殖細胞系列テンプレートの情報は表7を参照する。

30

【0131】

【表7】

表7. 抗体ヒト化プロセスのヒト生殖細胞系列テンプレートの情報

番号	重鎖可変領域		軽鎖可変領域	
	FR1-FR3	FR4	FR1-FR3	FR4
2F12	IGHV2-26 *01	IGHJ1 *01	IGkV1-13 *02	IGKJ4* 01
3F6	IGHV4-30 -4*02		IGkV1-13 *02	
9E6	IGHV4-30 -4*02		IGkV1-9* 01	
10A4	IGHV4-4* 08		IGkV1-6* 01	

40

【0132】

ウサギ抗体のCDR領域を、選択されたヒト生殖細胞系列テンプレートに移植して、ヒト生殖細胞系列可変領域を置き換え、対応するヒトIgG定常領域（好ましくは、重鎖はN297A変異付きのIgG1で、軽鎖は である）と組換えを行った。その後、ウサギ抗体の3次元構造に基づき、埋め込まれた残基、CDR領域と直接相互作用する残基、及びVLとVHの立体配座に重要な影響を与える残基を復帰変異させるとともに、潜在的な

50

翻訳後修飾リスク部位を変異させて、最終的なヒト化分子を得た。例示的に、2 F 1 2 及び 9 E 6 に対応するヒト化軽・重鎖可変領域の配列が示されており（表 8、表 9 参照）、ここで、L は軽鎖、H は重鎖を表し、L 及び H に続く数字は、異なる復帰変異を含む異なるバージョンのヒト化配列を表す。

【 0 1 3 3 】

【 表 8 】

表 8. ヒト化の 9 E 6 の重・軽鎖可変領域の配列

	重・軽鎖可変領域の配列	配列番号
9 E 6 - L 1	<u>DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCQASED</u> <u>ISSNLAWYQQKPKPKLLIFPASNLAS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQGGYWTSTSNFGNVFGGGTKVEIK	配列番号 6 3
9 E 6 - L 2	<u>DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCQASED</u> <u>ISSNLAWYQQKPKPKLLIFPASNLAS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQGGYWTSTSNFGSGFGGGTKVEIK	配列番号 6 4
9 E 6 - L 3	<u>DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCQASED</u> <u>ISSNLAWYQQKPKPKLLIFPASNLAS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQGGYWTSTSNFGTGFGGGTKVEIK	配列番号 6 5
9 E 6 - L 4	<u>DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCQASED</u> <u>ISSNLAWYQQKPKPKLLIFPASNLAS</u> GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQGGYWTSTSNFGQFGGGTKVEIK	配列番号 6 6
9 E 6 - H 1	<u>EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFS</u> <u>LSSYDMSWIRQPPGKGLEWIGAI GGAGG</u> <u>TYIASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLS</u> VTAADTAVYYCARGWTRLDDLWGQGLVT VSS	配列番号 6 7
9 E 6 - H 2	<u>QVQVQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFS</u> <u>LSSYDMSWIRQPPGKGLEWIGAI GGAGG</u> <u>TYIASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLS</u> VTAADTAVYYCARGWTRLDDLWGQGLVT VSS	配列番号 6 8

(下線部は K a b a t 番号付け規則の CDR である。)

【 0 1 3 4 】

9 E 6 は、ヒト化の過程において、以下の L C D R 3 を得た：

> 9 E 6 - L 1 の L C D R 3

Q G G Y W T S T S N F G N V (配列番号 6 9)

> 9 E 6 - L 2 の L C D R 3

Q G G Y W T S T S N F G S G (配列番号 7 0)

> 9 E 6 - L 3 の L C D R 3

Q G G Y W T S T S N F G T G (配列番号 7 1)

> 9 E 6 - L 4 の L C D R 3

Q G G Y W T S T S N F G Q G (配列番号 7 2)

> 9 E 6 - L の L C D R 3 一般式

Q G G Y W T S T S N F G X₉ X₁₀ (配列番号 7 3) で、そのうち、X₉ は N、S、T 又は Q から選ばれ、X₁₀ は V 又は G から選ばれる。

【 0 1 3 5 】

5 A 9、9 E 6、9 F 1 0 は、次のような一般式の構造を有する：

H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3 は、それぞれ S Y D M S (配列番号 2 3)、A I G G A G G T Y Y A S W A K S (配列番号 2 4)、G W T R L D L (配列番号 2 5) で示され、

10

20

30

40

50

LCDR1は、QX₁SEDISSNLX₂(配列番号74)で示され、そのうち、X₁はA又はSから選ばれ、X₂はA又はSから選ばれ、

LCDR2は、X₃ASNLAS(配列番号75)で示され、そのうち、X₃はA又はPから選ばれ、

LCDR3は、QGX₄YWX₅X₆X₇SX₈FGX₉X₁₀(配列番号76)で示され、そのうち、X₄はA又はGから選ばれ、X₅はS又はTから選ばれ、X₆はS又はGから選ばれ、X₇はT又はSから選ばれ、X₈はN又はYから選ばれ、X₉はN、S、T又はQから選ばれ、X₁₀はV又はGから選ばれる。

【0136】

【表9】

表9. ヒト化の2F12の重・軽鎖可変領域の配列

重・軽鎖可変領域の配列		配列番号
2F12-L1	<u>AFQLTQSPSSLSASVGD</u> <u>RV</u> <u>ITCQASQS</u> <u>ISNVLAWYQQKPGKPPKLLIVGASNLAS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISS</u> <u>LQPEDFA</u> <u>TYYCQSYFSSSSSTVFGGGTKVEIK</u>	配列番号77
2F12-L2	<u>AFQLTQSPSSLSASVGD</u> <u>RV</u> <u>ITCQASQS</u> <u>ISQGLAWYQQKPGKPPKLLIVGASNLAS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISS</u> <u>LQPEDFA</u> <u>TYYCQSYFSSSSSTVFGGGTKVEIK</u>	配列番号78
2F12-L3	<u>AFQLTQSPSSLSASVGD</u> <u>RV</u> <u>ITCQASQS</u> <u>ISSGLAWYQQKPGKPPKLLIVGASNLAS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISS</u> <u>LQPEDFA</u> <u>TYYCQSYFSSSSSTVFGGGTKVEIK</u>	配列番号79
2F12-L4	<u>AFQLTQSPSSLSASVGD</u> <u>RV</u> <u>ITCQASQS</u> <u>ISTGLAWYQQKPGKPPKLLIVGASNLAS</u> <u>GVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISS</u> <u>LQPEDFA</u> <u>TYYCQSYFSSSSSTVFGGGTKVEIK</u>	配列番号80
2F12-H1	<u>EVT</u> <u>LKESGPV</u> <u>LVKP</u> <u>TETL</u> <u>TLTCTV</u> <u>SGFS</u> <u>LSSYG</u> <u>VS</u> <u>WIRQ</u> <u>PPGK</u> <u>ALEW</u> <u>LAGIGSDGS</u> <u>AYYASWAKS</u> <u>R</u> <u>LT</u> <u>ISR</u> <u>DTN</u> <u>LKQV</u> <u>VTMTN</u> <u>MDP</u> <u>VDTAT</u> <u>YYC</u> <u>ARGG</u> <u>ITVY</u> <u>AMWG</u> <u>QGT</u> <u>LV</u> <u>TVSS</u>	配列番号81
2F12-H2	<u>EVT</u> <u>VKESGPV</u> <u>LVKP</u> <u>TETL</u> <u>TLTCTV</u> <u>SGFS</u> <u>LSSYG</u> <u>VS</u> <u>WIRQ</u> <u>PPGK</u> <u>ALEW</u> <u>LGGIGSDGS</u> <u>AYYASWAKS</u> <u>R</u> <u>LT</u> <u>ISR</u> <u>DTN</u> <u>LKQV</u> <u>VTMTN</u> <u>MDP</u> <u>VDTAT</u> <u>YYC</u> <u>ARGG</u> <u>ITVY</u> <u>AMWG</u> <u>QGT</u> <u>LV</u> <u>TVSS</u>	配列番号82

(下線部はKabat番号付け規則のCDRである。)

【0137】

2F12は、ヒト化の過程において、以下のLCDR1を得た：

> 2F12-L1のLCDR1

QASQSISNVLA (配列番号83)

> 2F12-L2のLCDR1

QASQSISQGLA (配列番号84)

> 2F12-L3のLCDR1

QASQSIS SGLA (配列番号85)

> 2F12-L4のLCDR1

QASQSISTGLA (配列番号86)

> 2F12-L的LCDR1一般式

QASQSISX₂₄X₂₅LA(配列番号87)で、そのうち、X₂₄はN、Q、S又はTから選ばれ、X₂₅はV又はGから選ばれる。

【0138】

10

20

30

40

50

4 F 6、5 B 8、8 G 1 0、8 C 1 2、4 D 4、2 F 1 2は、次のような一般式の構造を有する：

H C D R 1はS Y G V X_{1 1} (配列番号88)で示され、そのうち、X_{1 1}はS又はTから選ばれ、

H C D R 2はX_{1 2} I X_{1 3} S X_{1 4} G X_{1 5} X_{1 6} Y Y A X_{1 7} W A X_{1 8} S (配列番号89)で示され、そのうち、X_{1 2}はA又はGから選ばれ、X_{1 3}はG又はAから選ばれ、X_{1 4}はT、S又はDから選ばれ、X_{1 5}はT、Sから選ばれ、X_{1 6}はT、Aから選ばれ、X_{1 7}はS、Nから選ばれ、X_{1 8}はK又はRから選ばれ、

H C D R 3はG G I T X_{1 9} Y A X_{2 0} (配列番号90)で示され、そのうち、X_{1 9}はA又はVから選ばれ、X_{2 0}はI又はMから選ばれ、

L C D R 1はQ A S X_{2 1} X_{2 2} I X_{2 3} X_{2 4} X_{2 5} L A (配列番号91)で示され、そのうち、X_{2 1}はQ又はEから選ばれ、X_{2 2}はS又はDから選ばれ、X_{2 3}はS又はTから選ばれ、X_{2 4}はN、Q、S又はTから選ばれ、X_{2 5}はV又はGから選ばれる。

【0139】

L C D R 2はG A S N L A S (配列番号37)で示され、

L C D R 3はQ S Y X_{2 6} X_{2 7} S X_{2 8} X_{2 9} T X_{3 0} (配列番号92)で示され、そのうち、X_{2 6}はF又はYから選ばれ、X_{2 7}はS、D又はNから選ばれ、X_{2 8}はS又はFから選ばれ、X_{2 9}はS、T又はYから選ばれ、X_{3 0}はV又はIから選ばれる。

【0140】

各ウサギ抗体のヒト化の各バージョンの軽鎖同士を2つずつ組み合わせ、発現・精製した。命名規則は、重鎖と軽鎖可変領域番号の組み合わせであり、例えば、「2 F 1 2 - L 1 H 1」とは、VHとして配列番号63、VLとして配列番号67が選ばれた抗体である。軽・重鎖定常領域は、それぞれヒトIgG1定常領域(N297A変異付き、Eu番号付けシステム)配列とヒトkappa鎖定常領域の配列が採用された。

【0141】

例示的なヒト化分子2 F 1 2 - L 4 H 2 (2 F 1 2 - L 4軽鎖と2 F 1 2 - H 2重鎖を使用した)及び9 E 6 - L 4 H 2 (9 E 6 - L 4軽鎖と9 E 6 - H 2重鎖を使用した)の配列は次の通りであり、その軽・重鎖定常領域はそれぞれヒトIgG1定常領域(N297A変異付き、Eu番号付けシステム)配列とヒトkappa鎖定常領域の配列が採用された。

【0142】

> 9 E 6 - L 4 H 2 H C :

Q V Q V Q E S G P G L V K P S D T L S L T C T V S G F S L S S Y D M S W I R Q
P P G K G L E W I G A I G G A G G T Y Y A S W A K S R V T I S V D T S L N Q V S
L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R G W T R L D L W G Q G T L V T V S S A S T K
G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G
A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N
V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G
V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D
G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
S L S P G K

配列番号93

> 9 E 6 - L 4 H 2 L C :

D I Q L T Q S P S F L S A S V G D R V T I T C Q A S E D I S S N L A W Y Q Q K
P G K P P K L L I F P A S N L A S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C Q G G Y W T S T S N F G Q G F G G G T K V E I K R T V A A P S
V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L

50

Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C
E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

配列番号 9 4

> 2 F 1 2 - L 4 H 2 H C :

E V T V K E S G P V L V K P T E T L T L T C T V S G F S L S S Y G V S W I R Q
P P G K A L E W L G G I G S D G S A Y Y A S W A K S R L T I S R D T N L K Q V V
L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R G G I T V Y A M W G Q G T L V T V S S A S T
K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S
G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V
F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D
G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K
N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
L S L S P G K

10

配列番号 9 5

> 2 F 1 2 - L 4 H 2 L C :

A F Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C Q A S Q S I S T G L A W Y Q Q K
P G K P P K L L I V G A S N L A S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C Q S Y F S S S S T V F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F
P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N
S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H
Q G L S S P V T K S F N R G E C

20

配列番号 9 6

【 0 1 4 3 】

上記抗体の重鎖定常領域を改変し、抗体には、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 TとT 2 5 6 E (E u 番号付けシステム) という5つの部位変異を有するヒト I g G 1 定常領域が採用され、軽鎖定常領域及び軽・重鎖可変領域が変更されなかった。新たに産生された抗体は、2 F 1 2 - L 4 H 2 - A A Y T E 及び 9 E 6 - L 4 H 2 - A A Y T E であり、その完全な重鎖配列は以下の通りである :

30

> 9 E 6 - L 4 H 2 - A A Y T E H C :

Q V Q V Q E S G P G L V K P S D T L S L T C T V S G F S L S S Y D M S W I R Q
P P G K G L E W I G A I G G A G G T Y Y A S W A K S R V T I S V D T S L N Q V S
L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R G W T R L D L W G Q G T L V T V S S A S T K
G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G
A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N
V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F
L F P P K P K D T L Y I T R E P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G
V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D
G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
S L S P G K

40

配列番号 9 7

> 2 F 1 2 - L 4 H 2 - A A Y T E H C :

E V T V K E S G P V L V K P T E T L T L T C T V S G F S L S S Y G V S W I R Q
P P G K A L E W L G G I G S D G S A Y Y A S W A K S R L T I S R D T N L K Q V V
L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R G G I T V Y A M W G Q G T L V T V S S A S T
K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S

50

G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V
F L F P P K P K D T L Y I T R E P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D
G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K
N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
L S L S P G K

配列番号 9 8

上記の下線領域は、重鎖又は軽鎖定常領域である。

10

【 0 1 4 4 】

例示的な I g G F c は以下の通りである：

> I g G 1 - F c (N 2 9 7 A)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q
T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G
G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N
W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G
K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E
E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y
T Q K S L S L S P G K

20

配列番号 9 9

> I g G 1 - F c (A A Y T E)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q
T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G
G P S V F L F P P K P K D T L Y I T R E P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N
W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G
K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E
E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y
T Q K S L S L S P G K

30

配列番号 1 0 0

【 0 1 4 5 】

実施例 6 . ヒト化抗 C D 4 0 抗体の R a j i 細胞結合実験

R a j i 細胞の表面でのヒト C D 4 0 の高発現は、細胞表面のヒト C D 4 0 に対する C D 4 0 拮抗型抗体の結合特性の検出に使用することができる。

【 0 1 4 6 】

R a j i を 1 . 5 E 5 / ウェルでプレートに播き、様々な濃度の C D 4 0 拮抗型抗体を加え、4 で 1 時間インキュベートした。F A C S 緩衝液 (P B S + 2 % F B S) で 2 回洗淨した後、二次抗体 (A l e x a F l o u r 4 8 8 に複合した抗ヒト I g G (H + L) 抗体) を加え、4 で 0 . 5 時間インキュベートした。F A C S 緩衝液で 2 回洗淨した後、フローサイトメーター (B D F A C S C e l e s t a) により細胞表面の蛍光強度を検出した。

40

【 0 1 4 7 】

その結果、表 1 0 に示すように、そのうち 2 F 1 2 - L 4 H 2 、 9 E 6 - L 4 H 2 と C F Z 5 3 3 とは、R a j i 表面のヒト C D 4 0 に対して類似の結合能力を有する。

【 0 1 4 8 】

50

【表 10】

表 10. R a j i 細胞に対するヒト化抗CD40抗体のFACS結合EC₅₀の結果

抗体番号	結合EC ₅₀ (nM)	抗体番号	結合EC ₅₀ (nM)
2F12	0.479	9E6	0.895
2F12-L1H1	0.549	9E6-L1H1	1.083
2F12-L1H2	0.469	9E6-L1H2	1.048
2F12-L2H1	0.516	9E6-L2H1	1.993
2F12-L2H2	0.516	9E6-L2H2	1.660
2F12-L3H1	0.456	9E6-L3H1	1.065
2F12-L3H2	0.762	9E6-L3H2	1.148
2F12-L4H1	0.508	9E6-L4H1	0.928
2F12-L4H2	0.589	9E6-L4H2	0.870
CFZ533	1.009		

10

【0149】

20

実施例 7. ヒトCD40及びカニクイザルCD40に対する抗CD40抗体の親和性アッセイ

測定待ちの抗体を抗ヒトFcのチップヘアフィニティー捕捉した後、一連の濃度勾配でのHisタグ付きのヒト又はカニクイザルCD40抗原をチップ表面に流し、Biacore機器により反応シグナルをリアルタイムで検出して結合・解離曲線を得た。実験に使用された緩衝液は、D.I.Waterで1x(pH7.4)に希釈されたHBS-EP+10x緩衝溶液(Cat.#BR-1006-69、GE)である。実験から得られたデータを(1:1)Bindingモデルでフィッティングし、表11に示すように、親和性の値を得た。

【0150】

30

9E6-L4H2、2F12-L4H2はCFZ533に比べてヒトCD40に対して類似の結合定数を有するが、9E6-L4H2のカニクイザルCD40への結合親和性が比較的強く、2F12-L4H2のカニクイザルCD40への結合親和性がやや弱い。

【0151】

【表 11】

表 11. 異なる生殖細胞系列CD40に対するCD40拮抗型抗体のSPR親和性

移動相	固定相	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	KD (M)
ヒトCD40	2F12-L4H2	7.58E+05	2.06E-03	2.71E-09
	9E6-L4H2	4.13E+05	2.21E-04	5.36E-10
	CFZ533	6.88E+05	1.41E-04	2.05E-10
カニクイザルCD40	2F12-L4H2	1.17E+07	4.14E-01	3.53E-08
	9E6-L4H2	5.14E+05	6.23E-05	1.21E-10

40

【0152】

実施例 8. 抗CD40抗体のレポーター遺伝子細胞活性実験

HEK-Blue CD40L細胞は、InvivoGen(Cat#hkb-cd40)から購入され、当該細胞は、ヒトCD40遺伝子及びNF-kB仲介性のSEAPゲノムを安定トランスフェクションしたもので、SEAP基質であるQUANTI-Blue

50

eにより上清において分泌されたSEAPの含有量を検出することでCD40シグナル伝達経路の活性化レベルを表現することができる。この実験は、CD40L誘導性のHEK-Blue CD40L細胞の活性化に対するCD40拮抗型抗体の阻害作用を検出することにより、IC₅₀の大きさに基づいてCD40拮抗型抗体のインビトロ細胞活性を評価した。

【0153】

HEK-Blue CD40L細胞を10%のFBS、100 µg/mLのNormocin、100 µg/mLのZeocinと30 pg/mLのBlasticidinを含むDMEM培地において培養し、1週間に2~3回継代した。HEK-Blue CD40L細胞を5E4/ウェルで96ウェル細胞培養プレートに播き(培地はDMEM、10%のFBS、100 µg/mLのNormocinである)、一晩培養した。細胞が壁に付着した後、各ウェルに100 µLの勾配希釈した測定待ちの抗体を加え、37 °Cで1時間インキュベートした。CD40L-his (R&D、2706-CL-025)及び抗His抗体(R&D、MAB050-500)を加え、一晩培養した。細胞を遠心分離し、20 µLの細胞上清を新しい96ウェルホワイトプレートに移し、180 µLのQUANTI-Blue基質溶液を加え、暗所で15分間インキュベートし、Envisionマイクロプレートリーダーにより620 nmでの吸光度を測定し、IC₅₀値を算出してCD40拮抗型抗体のインビトロ細胞活性を評価した。

10

【0154】

その結果、表12及び図1A~1Bに示すように、9E6-L4H2とCFZ533とはレポーター遺伝子システムに対して類似の阻害活性を有するが、2F12-L4H2はCFZ533よりも阻害活性が優れている。

20

【0155】

【表12】

表12. 抗CD40抗体によるCD40レポーター遺伝子細胞活性阻害IC₅₀

	抗体番号	IC ₅₀ (nM)
実験1	2F12-L4H2	0.18
	CFZ533	0.36
実験2	9E6-L4H2	0.50
	CFZ533	0.35

30

【0156】

実施例9. 抗CD40抗体のB細胞活性化実験系における阻害活性

CD40はB細胞に高く発現され、CD40LはCD40に結合すると、B細胞の活性化を誘導し、一連の活性化マーカーの発現をアップレギュレートすることができる。CD40拮抗型抗体は、CD40LとCD40の結合を遮断することにより、B細胞の免疫活性化過程を解除する。

【0157】

ヒトPBMCを2E5/ウェル、50 µL/ウェルで96ウェル細胞培養プレートに播いた(培地はRPMI-1640、10%のFBS、1%のペニシリン-ストレプトマイシンである)。各ウェルに勾配希釈した測定待ちの抗体50 µLを加え、37 °C、5%のCO₂の条件で0.5時間共インキュベートした。各ウェルにCD40L-his及び抗His抗体を加え、一晩刺激した。翌日、遠心分離して上清を除去し、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、100 µLの1:1000で希釈したFixable viability dye EF780 (Invitrogen、65086514)を加えて室温で15分間染色した。細胞を2回洗浄した後、100 µLの1:200で希釈したヒトFcブロック剤(Fc blocker、BD、564220)を加えて室温で10分間ブロックした。細胞を遠心分離した後、1:200で希釈したフロー抗体

40

50

(PerCP/Cyanine 5.5 anti-human CD19 (Biolegend、302230)、APC anti-human CD69 (Biolegend、310910))を加え、4で0.5時間インキュベートした。遠心分離して上清を除去し、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄した後、200 μ LのPBSで細胞を再懸濁し、フローサイトメーター(BD FACS Celesta)により細胞表面の蛍光強度を検出した。

【0158】

その結果、表13及び図2A~2Bに示すように、9E6-L4H2はCFZ533に比べて類似のB細胞活性化阻害活性を有する。2F12-L4H2は、B細胞阻害活性がCFZ533よりも強い。

【0159】

【表13】

表13. ヒト化抗CD40抗体のB細胞活性化実験系における阻害活性

抗体番号	CD19+CD69+%		CD19+CD69+ MFI	
	IC ₅₀ (nM)	最大阻害率 (%)	IC ₅₀ (nM)	最大阻害率 (%)
CFZ533	0.14	95%	0.07	110%
9E6-L4 H2	0.14	98%	0.07	110%
2F12-L 4H2	0.04	93%	0.03	111%

【0160】

抗体を加えた後、CD19+CD69+シグナルはバックグラウンド値を下回ったが、これはおそらくB細胞のバックグラウンド活性化がある程度阻害されたためであろう(CD40L誘導性のシグナルの阻害以外)。

【0161】

実施例10. 抗CD40抗体のDC細胞活性化実験系における阻害活性

CD40は樹状細胞(Dendritic Cell、DC)に高く発現され、CD40LはCD40に結合すると、DC活性化を誘導し、DC細胞表面での複数の活性化マーカーの発現をアップレギュレートするとともに、複数種の炎症性因子が分泌されるようにDCを促進し、免疫反応を更に拡大することができる。CD40拮抗型抗体は、CD40LとCD40の結合を遮断することにより、DC細胞の免疫活性化過程を解除する。

【0162】

Essay Sept MヒトCD14選別試薬キット(Stemcell、19359)により新鮮な初代ヒト末梢血PBMCから単核細胞を選別して富化し、RPMI-1640培地(10%のFBS、1%のペニシリン-ストレプトマイシン)、50 ng/mLのIL-4(PeproTech、200-04)及び50 ng/mLのGM-CSF(PeproTech、300-03)により6日間分化した。7日目に、分化済みのDC細胞を、1E5/ウェルで96ウェル細胞培養プレートに播いた。各ウェルに勾配希釈した測定待ちの抗体を加え、37、5%のCO₂の条件で0.5時間共インキュベートした。各ウェルに最終濃度であるCD40L-hisと抗His抗体を更に加えた。48時間培養した後、DC細胞の活性化レベルをフローサイトメトリーで検出した：遠心分離して上清を除去し、細胞をFACS緩衝液(PBS+2%のFBS)で2回洗浄し、100 μ Lの1:1000で希釈したFixable viability dye EF780(Invitrogen、65086514)を加えて室温で15分間染色した。細胞を2回洗浄した後、100 μ Lの1:200で希釈したヒトFcブロッキング剤(BD

10

20

30

40

50

、564220)を加えて室温で10分間ブロッキングした。細胞を遠心分離した後、1:200で希釈したフロー抗体(Alexa Fluor(登録商標)700 anti-human CD11c(Biolegend、337220)、Brilliant Violet 421^{商標} anti-human CD80(Biolegend、305221)、APC anti-human CD86(Biolegend、305412))を加え、4で0.5時間インキュベートした。遠心分離して上清を除去し、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄した後、200 μ LのPBSで細胞を再懸濁し、フローサイトメーター(BD FACS Celesta)により細胞表面の蛍光強度を検出した。

【0163】

更に、それぞれ24時間(TNF、Cisbio、62HTNFAPEG)と48時間(IL-12/23 p40、Novus、VAL121)培養した後、上清におけるサイトカインの分泌レベルを検出した。

【0164】

実験の結果は表14及び図3A~3Dに示すように、9E6-L4H2及び2F12-L4H2が対照抗体CFZ533と類似のDC細胞阻害活性を有する。

【0165】

【表14】

表14. ヒト化抗CD40抗体のDC細胞活性化実験系における阻害活性

抗体番号	DC細胞活性化実験系のIC ₅₀ (nM)			
	CD80 MFI	CD86 MFI	IL-12/23 p40	TNF α
CFZ533	1.19	1.93	0.68	0.35
9E6-L4H2	3.44	3.72	1.85	0.7
2F12-L4H2	0.78	0.52	0.68	0.30

【0166】

実施例11. ヒト化抗CD40抗体のB細胞活性化実験系におけるアゴニスト活性
CD40はTNFスーパーファミリー受容体に属し、リガンドCD40Lに結合するか又は抗体により架橋されると、下流シグナル伝達経路の特異的と非特異的活性化を媒介することができるので、CD40Lを加えない条件でCD40拮抗型抗体のB細胞へのバックグラウンドアゴニスト活性を検出することができる。

【0167】

ヒトPBMCを2E5/ウェル、100 μ L/ウェルで96ウェル細胞培養プレートに播いた(培地はRPMI-1640、10%のFBS、1%のペニシリン-ストレプトマイシンである)。各ウェルに100 μ Lの勾配希釈した測定待ちの抗体を加え、37、5%のCO₂で一晩培養した。翌日、遠心分離して上清を除去し、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、100 μ Lの1:1000で希釈したFixable viability dye EF780を加えて室温で15分間染色した。細胞を2回洗浄した後、100 μ Lの1:200で希釈したヒトFcブロッキング剤を加えて室温で10分間ブロッキングした。細胞を遠心分離した後、1:200で希釈したフロー抗体(PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD19(Biolegend、302230)、APC anti-human CD69(Biolegend、310910))を加え、4で0.5時間インキュベートした。遠心分離して上清を除去し、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄した後、200 μ LのPBSで細胞を再懸濁し、フローサイトメーター(BD FACS Celesta)により細胞表面の蛍光強度を検出した。

10

20

30

40

50

【0168】

その結果、図4に示すように、CD40アゴニスト抗体9E5-SELFNS(WO2020108611A1)はB細胞を用量依存的に活性化しているが、9E6-L4H2及び2F12-L4H2は2.5 nMでも明らかなB細胞アゴニスト活性を示していない。

【0169】

実施例12. マウスT細胞依存性の体液性免疫応答(TDAR)モデル

雌のヒトCD40トランスジェニックマウスは、6~7週齢で、Biocytogen Jiangsu Co., Ltd.から購入された。飼育環境：SPF、生産ライセンス：SCXK(蘇)-2016-0004、ヒトCD40トランスジェニックマウスの合格証明書番号：320726200100167773。動物が到着した後、7日間適応的に飼育し、ランダムに群分けした。実験の0日目に、各群のマウスから1匹を取って採血した後、腹腔内注射で投与した。1日目にマウスに50 µgのKLH(KLH：完全フロイントアジュバントCFA=1：1乳化免疫複合物)/匹で腹腔内注射して免疫した。実験の15日目に、50 µgのKLH(KLH：不完全フロイントアジュバントIFA=1：1乳化免疫複合物)/匹で腹腔内注射して二次免疫した。各群の薬剤を週2回腹腔内注射し、それぞれ7、14、21と28日目に眼窩静脈叢から~150 µL採血した。全血を室温で1~4時間静置し、7000 rpmの速度で4分で10分間遠心分離して血清を分離し、-80℃で保存して使用に備えた。具体的な実験プロセスは図5に示されている。

【0170】

具体的な投与計画は表15に示すように、マウス血清を週ごとに分離して抗KLHの特異的IgGレベルをELISAにより検出した。

【0171】

【表15】

表15. マウスTDARモデル実験の投与計画

	群分け	投与	N	用量	頻度
hCD40 トランス ジェニック マウス	1	IgG1	5	1 mg/kg	BIW
	2	CFZ533	5	1 mg/kg	BIW
	3	CFZ533	5	0.3 mg/kg	BIW
	4	9E6-L4H2	5	1 mg/kg	BIW
	5	9E6-L4H2	5	0.3 mg/kg	BIW
	6	2F12-L4H2	5	1 mg/kg	BIW
	7	2F12-L4H2	5	0.3 mg/kg	BIW

【0172】

その結果、図5B及び表16に示すように、1 mg/kgのCD40拮抗型抗体は、2回免疫後の抗KLHの特異的IgGの産生を顕著に阻害している。低用量である0.3 mg/kgの9E6-L4H2及び2F12-L4H2は、同用量CFZ533に比べて、2回免疫後の抗KLHのIgGの産生に対してより優れた阻害作用を有する。

【0173】

10

20

30

40

50

【表 16】

表 16. 免疫後の I g G 産生に対する抗 CD 4 0 抗体の阻害作用 (0. 3 mp k)

	7日目	14日目	21日目	28日目
投与前	0	0	0	0
I g G 1	1. 5 ± 0. 4	2 4 7. 4 ± 3 3. 1	2 1 8 7 ± 1 2 4 8	4 7 7 3 ± 2 2 8 0
C F Z 5 3 3 (0. 3 mp k)	0. 0 4 ± 0. 0 1	3 0. 9 ± 1 0. 8	8 4 5 ± 4 2 3	3 0 4 3 ± 1 6 0 0
9 E 6 - L 4 H 2 (0. 3 mp k)	0. 0 0 2 ± 0. 0 0 1	0. 0 2 ± 0. 0 1	0	1 8. 2 5 ± 8. 9
2 F 1 2 - L 4 H 2 (0. 3 mp k)	0. 2 2 ± 0. 1 4	3 3. 4 ± 2 5. 8	1 7 5. 5 ± 1 0 3	8 0 5. 7 ± 4 1 5. 6

10

【0 1 7 4】

実施例 1 3 . マウス皮膚移植拒絶モデル

6 週齢で雄の b a l b / c マウスは、上海市計画生育科学研究所実験動物経営部から購入された。飼育環境：S P F、合格証番号：2 0 1 8 0 0 0 6 0 2 3 3 9 3。

【0 1 7 5】

雌のヒト CD 4 0 トランスジェニックマウスは、6 ~ 7 週齢で、B i o c y t o g e n J i a n g S u C o . , L t d . から購入された。飼育環境：S P F、合格証明書番号：3 2 0 7 2 6 2 0 0 1 0 0 1 7 9 7 7 8。

【0 1 7 6】

動物が到着した後、7 日間適応的に飼育し、ランダムに群分けした。実験の 2 日前に、マウスにタクロリムス F K 5 0 6 又は CD 4 0 拮抗型抗体を腹腔内注射した。実験の 0 日目に、4 % の抱水クロラルでドナー B a l b / C マウス及び C 5 7 B L 6 / J マウスを麻酔し、ドナーのマウスの尾を取り除き、全周の長さが 1 c m の尾部皮膚を分離した。レシピエントマウスの背部を除毛し、皮膚層に沿って切開し、背部の脂肪及び結合組織を保持しながら等面積の皮膚を除去し、ドナー皮膚をレシピエントマウスの切開部に置き、接着剤で辺縁皮膚を縫合し、ケージに入れて回復させた。具体的な実験プロセスは図 6 A に示されている。

20

【0 1 7 7】

表 1 7 の投与計画によってマウスに投与し、マウスを 7 日間回復させた後、毎日マウスの皮膚の生存状態を観察し、拒絶採点に従って拒絶スコアを記録した。採点システムは以下の通りである：3：皮膚は赤みが認められず、滑らかであること、2：皮膚の一部は赤みが出て、光沢が失われ、乾燥していること、1：皮膚の殆どは赤くなり、縞模様がなく、縮んでいること、0：移植拒絶により皮膚の 8 0 % が壊死したこと。

30

【0 1 7 8】

【表 1 7 - 1】

表 1 7. マウス皮膚移植拒絶モデルの投与計画

	群分け	投与	N	用量	投与経路
ドナー：B a l b / c	1	対照群 (同種移植)	2	I g G 1 1 0 m g / k g	i p

40

50

【表 17 - 2】

レシピエント：h CD40トランス ジェニックマウスC 57BL6/1	2	モデル群（異種移植）	7	IgG1 10 mg/kg	ip
	3	CFZ533	7	3 mg/kg	ip
	4	CFZ533	7	10 mg/kg	ip
	5	9E6-L4H2	7	3 mg/kg	ip
	6	9E6-L4H2	7	10 mg/kg	ip
	7	2F12-L4H2	7	3 mg/kg	ip
	8	2F12-L4H2	7	10 mg/kg	ip
	9	タクロリムス	6	3 mg/kg	ip
	10	9E6-L4H2+タ クロリムス	6	10 mg/kg + 3 mg/kg	ip
	11	2F12-L4H2+ タクロリムス	6	10 mg/kg + 3 mg/kg	ip

10

【0179】

その結果、図6B及び表18～20に示すように、CD40拮抗型抗体は、モデル群に比べて何れもマウス皮膚移植片の採点を顕著に改善し、皮膚移植片の生存期間を延長することができる。皮膚移植片を採点する過程では、それまでに相違が見られなかったため、8日目から採点した。9E6-L4H2及び2F12-L4H2は、対照抗体CFZ533よりも優れた抗移植拒絶活性を示している。

【0180】

20

【表 18】

表18. 抗CD40抗体の15日目の皮膚移植片生存率 (%)

	皮膚移植片 生存率 (%)		皮膚移植片 生存率 (%)
対照 (control)	100%	対照 (control)	100%
モデル (model)	0%	モデル (model)	0%
CFZ533 (3mpk)	0%	CFZ533 (10mpk)	0%
9E6-L4H2 (3mpk)	28.5%	9E6-L4H2 (10mpk)	14.3%
2F12-L4H2 (3mpk)	28.5%	2F12-L4H2 (10mpk)	42.9%

【0181】

30

【表 19】

表19. 抗CD40抗体の皮膚移植片の採点 (3 mpk)

	8日	10日	15日	20日
対照 (control)	3	3	3	3
モデル (model)	0.7	0	0	0
CFZ533 (3mpk)	2.7	2.1	0	0
9E6-L4H2 (3mpk)	3	2.7	0.6	0
2F12-L4H2 (3mpk)	2.9	2.4	0.6	0.1

【0182】

40

【表 20】

表20. 抗CD40抗体の皮膚移植片の採点 (10 mpk)

	8日	10日	15日	20日
対照 (control)	3	3	3	3
モデル (model)	0.7	0	0	0
CFZ533 (10mpk)	2.9	2.1	0	0
9E6-L4H2 (10mpk)	3	2.7	0.3	0
2F12-L4H2 (10mpk)	2.7	2.4	0.9	0.4

【0183】

50

また、図7と表21～表23に示すように、9E6-L4H2及び2F12-L4H2はタクロリムスと併用した後、抗マウス皮膚移植拒絶に対する効果が更に向上している。

【0184】

【表21】

表21. 抗CD40抗体とタクロリムスとの併用による15日目の皮膚移植片生存率

	皮膚移植片生存率 (%)		皮膚移植片生存率 (%)
対照 (control)	100%	対照 (control)	100%
モデル (model)	0%	モデル (model)	0%
FK506 (3mpk)	16.7%	FK506 (3mpk)	16.7%
9E6-L4H2 (10mpk)	14.3%	2F12-L4H2 (10mpk)	42.9%
9E6-L4H2 (10mpk) +FK506	33.3%	2F12-L4H2 (10mpk) +FK506	83.3%

10

【0185】

【表22】

表22. 抗CD40抗体とタクロリムスとの併用による皮膚移植片の採点

	8日	10日	15日	20日
対照 (control)	3	3	3	3
モデル (model)	0.7	0	0	0
FK506 (3mpk)	2.5	1.5	0.5	0
9E6-L4H2 (10mpk)	3	2.7	0.3	0
9E6-L4H2 (10mpk) +FK506 (3mpk)	2.3	1.5	0.7	0.7

20

【0186】

【表23】

表23. 抗CD40抗体とタクロリムスとの併用による皮膚移植片の採点

	8日	10日	15日	20日
対照 (control)	3	3	3	3
モデル (model)	0.7	0	0	0
FK506 (3mpk)	2.5	1.5	0.5	0
2F12-L4H2 (10mpk)	2.7	2.4	0.9	0.4
2f12-L4H2 (10mpk) +FK506 (3mpk)	2.7	2.3	1.5	0.8

30

【0187】

実施例14. ヒト化抗CD40抗体のヒトCD40トランスジェニックマウスにおけるPK検出

雌のヒトCD40トランスジェニックマウスは、6～7週齢で、Biocytogen Jiangsu Co., Ltd. から購入された。飼育環境：SPF、生産ライセンス：SCXK(蘇)-2016-0004、ヒトCD40トランスジェニックマウスの合格証明書番号：320726200100154632。動物が到着した後、7日間適応的に飼育し、ランダムに群分けした。実験の0日目に、各群のマウスに10 mg/kgで抗CD40抗体を腹腔内注射し、投与後の15分間、4時間、8時間、1日間、2日間、4日間、7日間、10日間と14日間に、それぞれ100～150 μL採血し、10 μLのEDTA-K2(0.1 M)により抗凝固し、氷上で保存した。ELISAにより異なる時点でのマウス血漿中の抗体濃度を検出した。具体的な検出方法は以下の通りである：ヤギ抗ヒトIgG Fc抗体(Rockland, Cat#609-101-017)をPBSで2.5 μg/mLに希釈し、50 μL/ウェルで96ウェルプレート

40

50

に加え、4 で一晩インキュベートした。洗浄液で3回洗浄した後、各ウェルに50 μ Lのブロッキング溶液を加え、37 で1時間インキュベートした。マウス血漿と検出待ちの抗体の検量線を加え、37 で2時間インキュベートした。洗浄液で3回洗浄し、50 μ L/ウェルで抗hlgG Fab - HRP (Sigma、Cat # A0293、1 : 10000)を加え、室温で1時間インキュベートした。洗浄液で3回洗浄した。各ウェルに100 μ LのTMBを加え、暗所で5分間反応させた。各ウェルに100 μ Lの0.16 Mの硫酸を加えた。Envisionマイクロプレートリーダーにより450 nmのOD値を読み取り、CD40拮抗型抗体の濃度を算出した。

【0188】

その結果、表24及び図8に示すように、9E6-L4H2、2F12-L4H2と対照分子CFZ533とは、ヒトCD40トランスジェニックマウスにおいて類似のPK特性を有する。

【0189】

【表24】

表24. CD40拮抗型抗体のhCD40トランスジェニックマウスにおけるPKデータ

	CFZ533	9E6-L4H2	2F12-L4H2
T1/2 (h)	214.8	226.8	257.1
Cmax (mg/L)	75.95	85.8	88.78
AUC _(0-d14) ((h) * (mg/L))	12655	13439	12014

【0190】

実施例15. ヒト化抗CD40抗体のヒトFcRnへの親和性測定

測定待ちの抗体を抗ヒトFabのチップヘアフィニティー捕捉した後、一連の濃度勾配でのヒトFcRn抗原(AcroBiosystemから購入)をチップ表面に流し、Biacore機器により、反応が定常状態になった時のシグナルをリアルタイムで検出した。実験に使用された緩衝液は、D.I.Waterで1x(pH7.4)に希釈されたHBS-EP+10x緩衝溶液(Cat.#BR-1006-69、GE)である。実験から得られたデータを定常状態結合(Steady State Binding)モデルでフィッティングし、表25に示すように、親和性の値を得た。親抗体に比べて、AAYTE変異を持つ抗CD40抗体は、ヒトFcRnとの結合親和性がより高い。

【0191】

【表25】

表25. ヒト化抗CD40抗体のヒトFcRnへの親和性測定

移動相	固定相	KD (M)
ヒトFcRn	2F12-L4H2	2.79E-07
	2F12-L4H2-AAYTE	4.42E-08
	9E6-L4H2	2.93E-07
	9E6-L4H2-AAYTE	3.98E-08

【0192】

実施例16. FcにAAYTE変異が持たれた抗CD40抗体のB細胞活性化実験系における阻害活性

実施例10中の方法を参照して、FcにAAYTE変異が持たれた抗CD40抗体2F12-L4H2-AAYTE、9E6-L4H2-AAYTEのB細胞活性化実験系における阻害活性を検出した。その結果、図9A~図9Bに示すように、Fc変異した抗CD40抗体は、親抗CD40抗体と類似のB細胞阻害活性を有する。

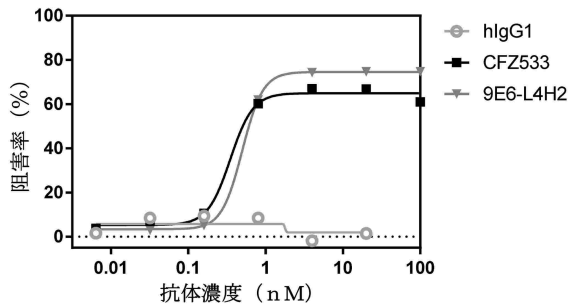
【 0 1 9 3 】

実施例 1 7 . F c に A A Y T E 変異がもたれた抗 C D 4 0 抗体の D C 細胞活性化実験系における阻害活性

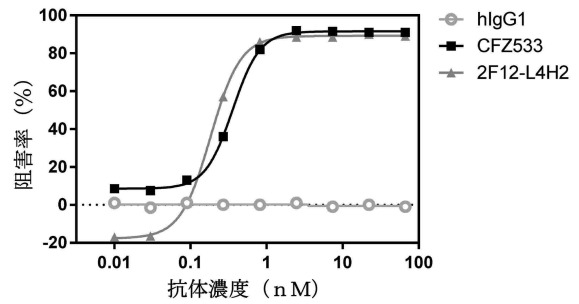
実施例 1 1 中の方法を参照して、F c に A A Y T E 変異がもたれた抗 C D 4 0 抗体 2 F 1 2 - L 4 H 2 - A A Y T E、9 E 6 - L 4 H 2 - A A Y T E の D C 細胞活性化実験系における阻害活性を検出した。その結果、図 1 0 A ~ 図 1 0 D に示すように、F c 変異した抗 C D 4 0 抗体は、親抗 C D 4 0 抗体と類似の D C 細胞阻害活性を有する。

【 図 面 】

【 図 1 A 】



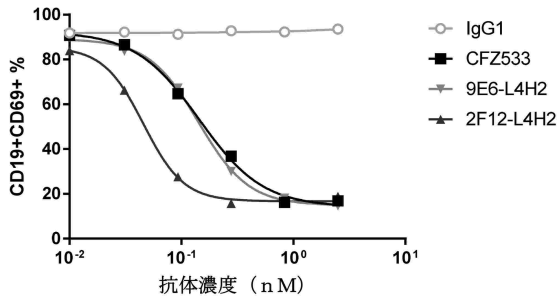
【 図 1 B 】



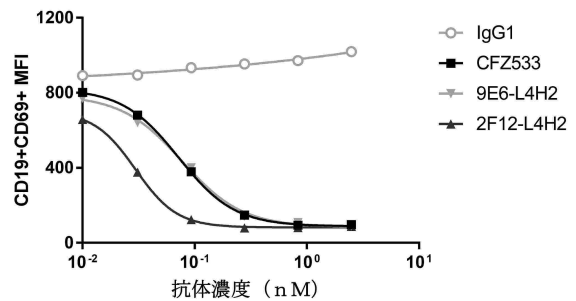
10

20

【 図 2 A 】



【 図 2 B 】

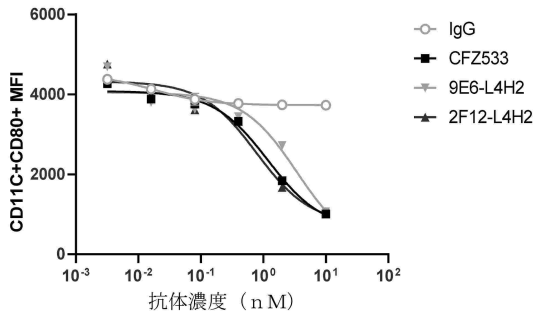


30

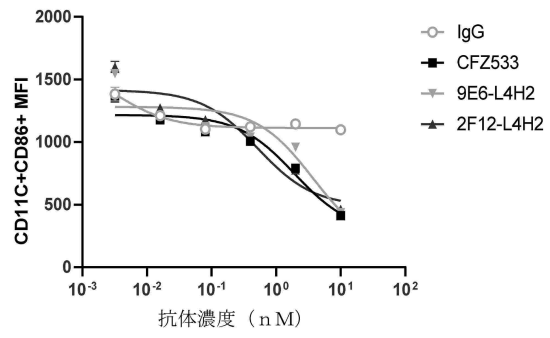
40

50

【 図 3 A 】

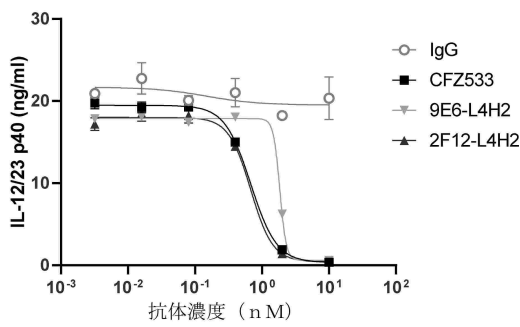


【 図 3 B 】

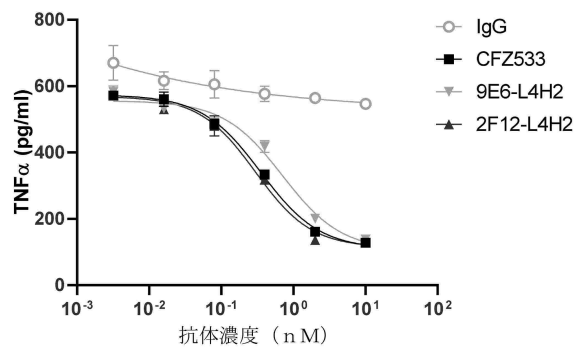


10

【 図 3 C 】

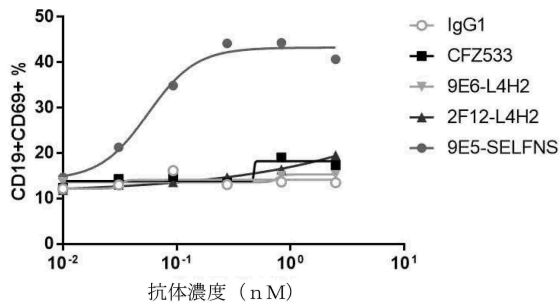


【 図 3 D 】

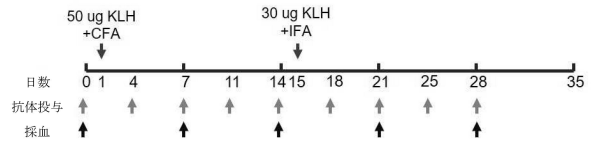


20

【 図 4 】



【 図 5 A 】

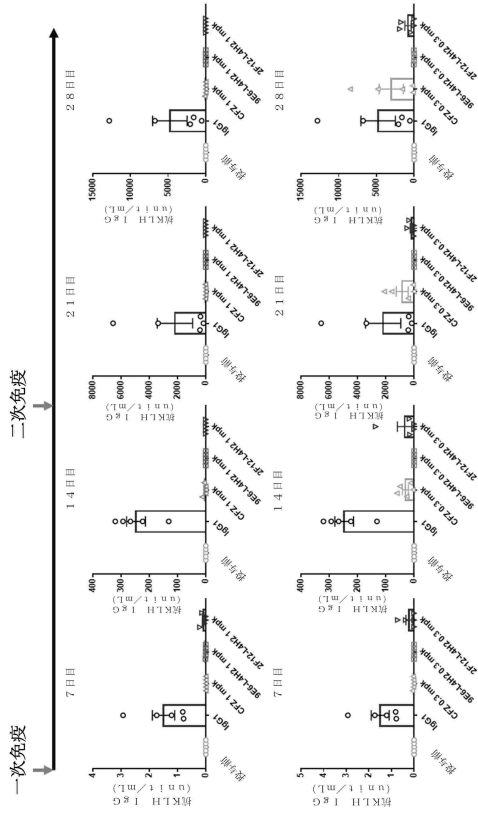


30

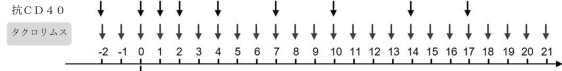
40

50

【 図 5 B 】



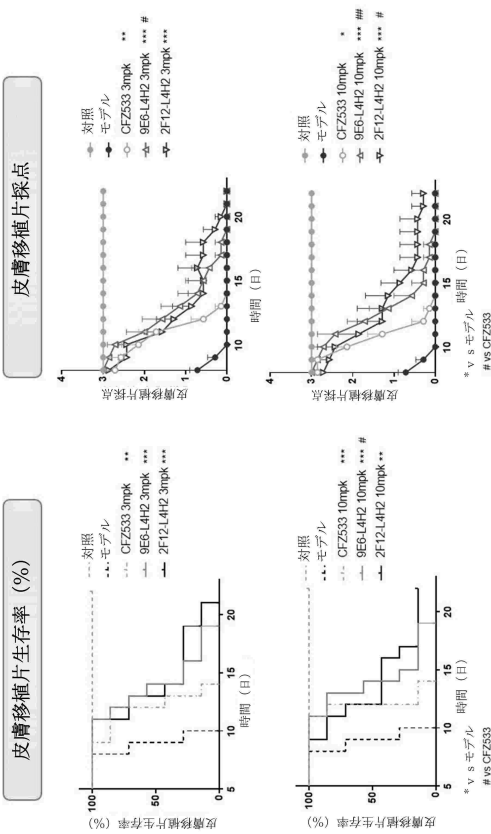
【 図 6 A 】



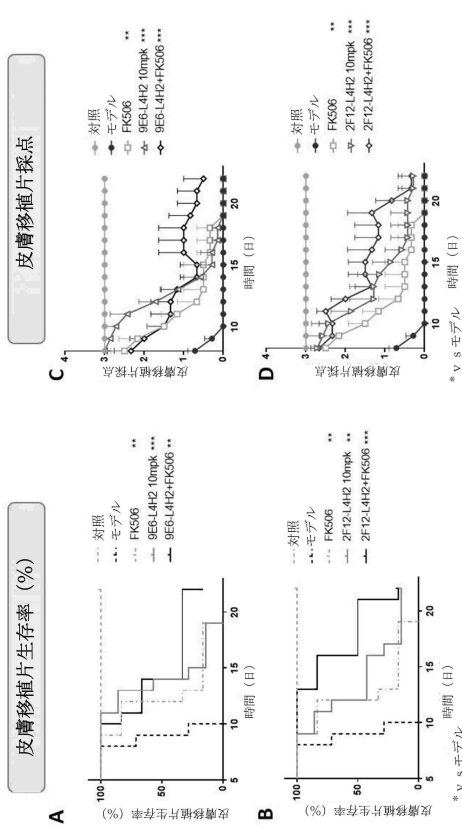
10

20

【 図 6 B 】



【 図 7 】

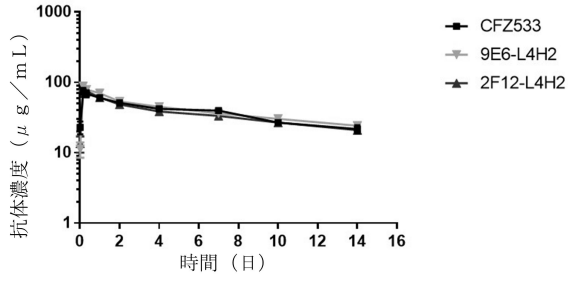


30

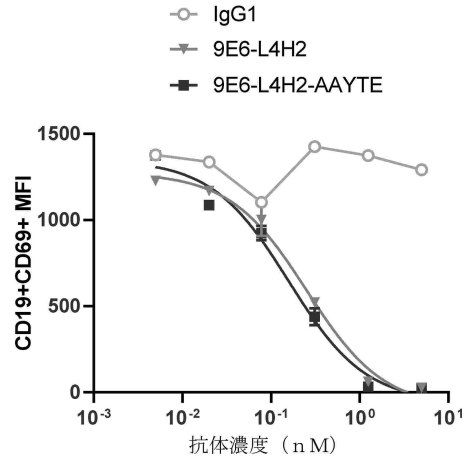
40

50

【 図 8 】

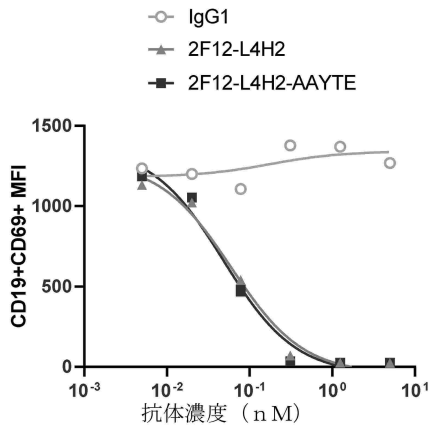


【 図 9 A 】

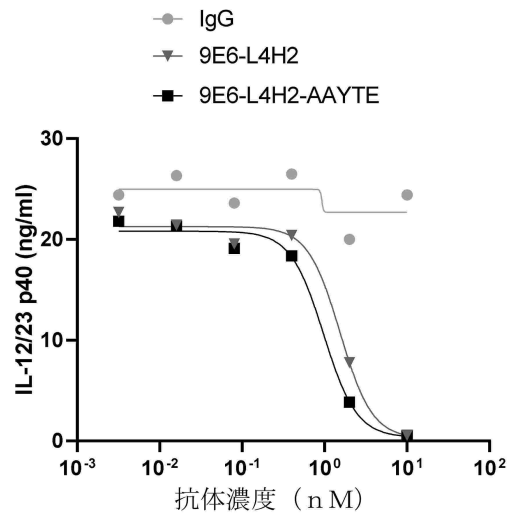


10

【 図 9 B 】



【 図 10 A 】



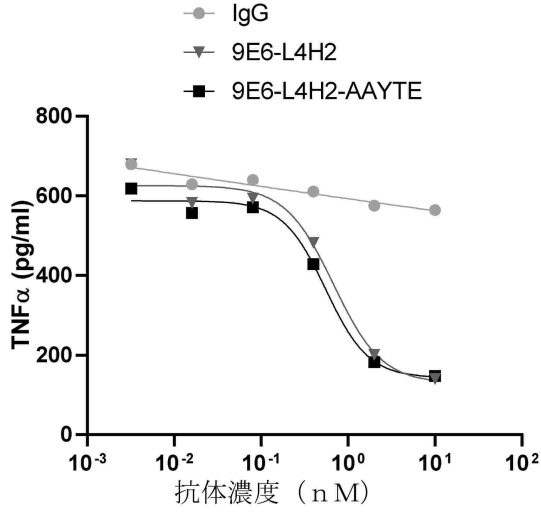
20

30

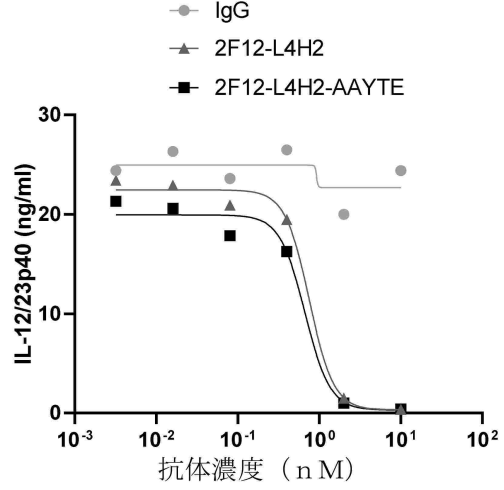
40

50

【 図 1 0 B 】

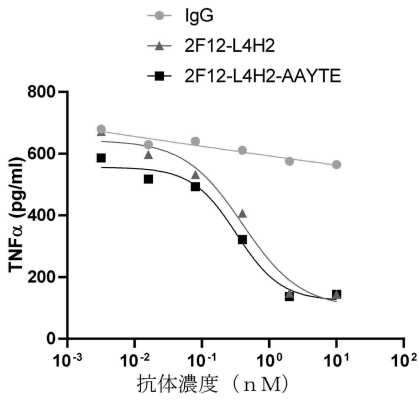


【 図 1 0 C 】



10

【 図 1 0 D 】



20

30

【 配列表 】

[2024523514000001.app](#)

40

50

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/101780
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DWPI, SIPOABS, CNABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, CNKI, PubMed, ISI web of Knowledge, Elsevier Science Direct, GenBank, EBI, STN, 万方数据库, WANFANG DATABASE, 百度, BAIDU: CD40, 抗体, antibody, HV, LV, CDR, SEQ ID NOs: 1-100, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 上海盛迪医药有限公司		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 202006347 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 02 January 2020 (2020-01-02) entire document	1-19
A	CN 103209996 A (NOVARTIS AG) 17 July 2013 (2013-07-17) entire document	1-19
A	WO 2017059196 A2 (JANSSEN BIOTECH INC.) 06 April 2017 (2017-04-06) entire document	1-19
A	CN 109912717 A (BEIJING MABWORKS BIOTECH CO., LTD.) 21 June 2019 (2019-06-21) entire document	1-19
A	CN 103450360 A (PFIZER PRODUCTS INC. et al.) 18 December 2013 (2013-12-18) entire document	1-19
A	WO 2018088850 A2 (DINONA) 17 May 2018 (2018-05-17) entire document	1-19
A	CN 1522264 A (KIRIN BREWERY CO., LTD.) 18 August 2004 (2004-08-18) entire document	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 05 September 2022		Date of mailing of the international search report 26 September 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/101780

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103930442 A (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB et al.) 16 July 2014 (2014-07-16) entire document	1-19
A	张界等 (ZHANG, Jie et al.). "CD40单克隆抗体的制备、筛选及功能鉴定 (The Screen and Functional Study of CD40 Monoclonal Antibody)" <i>现代免疫学 (Current Immunology)</i> , Vol. 37, No. 5, 31 December 2017 (2017-12-31), pp. 353-359	1-19
A	PERPER, S. J. et al. "Treatment with a CD40 Antagonist Antibody Reverses Severe Proteinuria and Loss of Saliva Production and Restores Glomerular Morphology in Murine Systemic Lupus Erythematosus" <i>The Journal of Immunology</i> , Vol. 203, No. 1, 20 May 2019 (2019-05-20), pp. 58-75	1-19

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/101780

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/101780

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

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

- 1. Claims Nos.: **16,18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claims 16 and 18 relate to a treatment method, relating to the subject matter as defined in PCT Rule 39.1 that does not warrant a search conducted by the international searching authority: (4) methods for the treatment of a human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods implemented on a human or animal body. An international search was conducted on the basis of a use of the anti-CD40 antibody or an antigen-binding fragment thereof or the pharmaceutical composition in the preparation of a drug for treating autoimmune diseases, or treating graft-versus-host diseases, or alleviating graft rejection reaction.
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/101780

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)				
WO	2020006347	A1	02 January 2020	JP	2021529754	A	04 November 2021				
				BR	112020024078	A2	17 February 2021				
				CN	112334195	A	05 February 2021				
				US	2021261678	A1	26 August 2021				
				EP	3813950	A1	05 May 2021				
				PH	12020552235	A1	28 June 2021				
				KR	20210027436	A	10 March 2021				
				CA	3101469	A1	02 January 2020				
				EA	202190094	A1	21 April 2021				
				AU	2019291890	A1	17 December 2020				
				CL	2020003348	A1	19 July 2021				

				CN	103209996	A	17 July 2013	US	2018118843	A1	03 May 2018
BR	112013011644	A2	02 August 2016								
PE	20140979	A1	09 August 2014								
JP	2014500720	A	16 January 2014								
SI	2640749	T1	31 July 2017								
MA	34654	B1	02 November 2013								
EP	2640749	A1	25 September 2013								
KR	20130080856	A	15 July 2013								
ES	2633817	T3	25 September 2017								
IL	225719	D0	27 June 2013								
US	2014341898	A1	20 November 2014								
UY	33728	A	29 June 2012								
PT	3502138	T	06 April 2022								
HU	E034203	T2	29 January 2018								
EP	4023676	A1	06 July 2022								
US	2022204635	A1	30 June 2022								
SI	3502138	T1	31 May 2022								
HR	P20220413	T1	27 May 2022								
RS	56153	B1	30 November 2017								
HR	P20171084	T1	06 October 2017								
DK	3502138	T3	19 April 2022								
CU	20130071	A7	27 September 2013								
PL	3502138	T3	02 May 2022								
CL	2013001124	A1	04 July 2014								
CR	20130222	A	28 June 2013								
US	2016152721	A1	02 June 2016								
MX	2013005477	A	12 June 2013								
LT	2640749	T	10 July 2017								
US	2017267772	A1	21 September 2017								
SG	189928	A1	28 June 2013								
UA	112417	C2	12 September 2016								
NZ	609549	A	29 May 2015								
TW	201305208	A	01 February 2013								
TW	201623335	A	01 July 2016								
EP	3502138	A1	26 June 2019								
EP	3222636	A1	27 September 2017								
US	2020087409	A1	19 March 2020								
ES	2911460	T3	19 May 2022								
AR	083847	A1	27 March 2013								

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/101780

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)	
						US	2012121585	A1	17 May 2012	
						PT	2640749	T	25 July 2017	
						AU	2011331288	A1	02 May 2013	
						UY	39292	A	30 July 2021	
						HU	E058015	T2	28 June 2022	
						WO	2012065950	A1	24 May 2012	
						RS	63094	B1	29 April 2022	
						CO	6801629	A2	29 November 2013	
						CN	105949314	A	21 September 2016	
						CY	1119097	T1	10 January 2018	
				<hr/>						
WO	2017059196	A2	06 April 2017	JP	2018529351	A	11 October 2018			
				US	2019048089	A1	14 February 2019			
				MA	43055	A	08 August 2018			
				KR	20180053738	A	23 May 2018			
				US	2017088624	A1	30 March 2017			
				EC	SP18033227	A	31 May 2018			
				MA	43053	A	08 August 2018			
				ES	2906823	T3	20 April 2022			
				CR	20180177	A	22 June 2018			
				WO	2017059243	A2	06 April 2017			
				EP	3356532	A2	08 August 2018			
				PE	20181367	A1	27 August 2018			
				KR	20180054837	A	24 May 2018			
				CA	3000396	A1	06 April 2017			
				AU	2016329057	A1	12 April 2018			
				CL	2018000833	A1	22 February 2019			
				CA	3000400	A1	06 April 2017			
				MX	2018003905	A	06 September 2018			
				NI	201800044	A	24 August 2018			
				CN	108368510	A	03 August 2018			
				PH	12018500684	A1	01 October 2018			
				AU	2016331819	A1	12 April 2018			
				SV	2018005659	A	28 March 2019			
				EP	3355921	A2	08 August 2018			
				BR	112018006251	A2	16 October 2018			
				EA	201890834	A1	28 December 2018			
				IL	258268	A	31 May 2018			
				BR	112018006360	A2	09 October 2018			
				JP	2018533360	A	15 November 2018			
				CN	109069622	A	21 December 2018			
				CO	2018003436	A2	20 June 2018			
				<hr/>						
CN	109912717	A	21 June 2019	CN	111454363	A	28 July 2020			
				CN	111454362	A	28 July 2020			
				CN	111454361	A	28 July 2020			
				CN	111454364	A	28 July 2020			
				<hr/>						
CN	103450360	A	18 December 2013	IL	161823	A	27 February 2014			
				US	2012225014	A1	06 September 2012			
				SI	1476185	T1	31 December 2013			
				PE	20030846	A1	11 October 2003			
				EP	1476185	A2	17 November 2004			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/101780

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 2010213704 A	30 September 2010
		ES 2432968 T3	05 December 2013
		TW 200306204 A	16 November 2003
		UY 27537 A1	28 February 2003
		ME 00503 B	10 October 2011
		CU 23745 A3	31 January 2012
		BR 0214137 A	14 September 2004
		JP 2005508176 A	31 March 2005
		MA 27139 A1	03 January 2005
		PL 370514 A1	30 May 2005
		IN 566KOLNP2004 A	21 April 2006
		EG 25801 A	08 August 2012
		IS 7253 A	06 May 2004
		US 2016152713 A1	02 June 2016
		MY 137641 A	27 February 2009
		HU 0402247 A2	28 January 2005
		CY 1115675 T1	25 January 2017
		EP 2343086 A2	13 July 2011
		EA 200400654 A1	30 December 2004
		IN 1202KOL2007 A	18 April 2008
		PL 392809 A1	14 March 2011
		MX PA04004467 A	16 May 2005
		OA 12725 A	28 June 2006
		KR 20050063749 A	28 June 2005
		US 2007190051 A1	16 August 2007
		AU 2002356926 C1	19 May 2003
		US 2003211100 A1	13 November 2003
		AP 200403034 D0	30 June 2004
		AP 200403034 A0	30 June 2004
		NI 200200128 A	11 January 2010
		EC SP045093 A	23 July 2004
		TN SN04078 A1	01 June 2006
		HR P20040525 A2	30 April 2005
		TW 201034686 A	01 October 2010
		NZ 533180 A	28 March 2008
		PA 8557701 A1	19 December 2003
		US 2013024956 A1	24 January 2013
		ZA 200404207 B	31 August 2005
		GE P20074222 B	25 October 2007
		BR PI0214137 B1	19 March 2019
		CR 10878 A	12 January 2011
		DO P2002000507 A	15 May 2003
		PT 1476185 E	05 November 2013
		CR 7343 A	28 October 2004
WO 2018088850 A2	17 May 2018	KR 20180053255 A	21 May 2018
		CN 110546164 A	06 December 2019
CN 1522264 A	18 August 2004	US 2003059427 A1	27 March 2003
		JP WO2002088186 A1	19 August 2004
		WO 02088186 A1	07 November 2002
		CN 101289510 A	22 October 2008

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/101780

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				EP	1391464	A1	25 February 2004
				AU	2002251562	B2	14 December 2006
				ES	2292746	T3	16 March 2008
				DE	60222658	D1	08 November 2007
				EP	1914243	A2	23 April 2008
CN	103930442	A	16 July 2014	HU	E036538	T2	30 July 2018
				RU	2014113304	A	20 October 2015
				ES	2658157	T3	08 March 2018
				HR	P20180269	T1	23 March 2018
				EP	2753646	A1	16 July 2014
				US	2014348836	A1	27 November 2014
				PT	2753646	T	07 February 2018
				CY	1119925	T1	12 December 2018
				AU	2012306071	A1	20 March 2014
				KR	20140066213	A	30 May 2014
				DK	2753646	T3	02 January 2018
				RS	56868	B1	30 April 2018
				NO	2753646	T3	21 April 2018
				CA	2860406	A1	14 March 2013
				US	2017240642	A1	24 August 2017
				GB	201115280	D0	19 October 2011
				EP	3323834	A1	23 May 2018
				PL	2753646	T3	30 May 2018
				SI	2753646	T1	30 April 2018
				LT	2753646	T	26 February 2018
				JP	2014531201	A	27 November 2014
				WO	2013034904	A1	14 March 2013

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/101780

A. 主题的分类		
C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K; A61K		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
DWPI, SIPOABS, CNABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, CNKI, PubMed, ISI web of Knowledge, Elsevier Science Direct, GenBank, EBI, STN, 万方数据库, 百度:CD40, 抗体, antibody, HV, LV, CDR, SEQ ID N0s:1-100, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 上海盛迪医药有限公司		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2020006347 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 2020年1月2日 (2020 - 01 - 02) 全文	1-19
A	CN 103209996 A (诺瓦提斯公司) 2013年7月17日 (2013 - 07 - 17) 全文	1-19
A	WO 2017059196 A2 (JANSSEN BIOTECH, INC.) 2017年4月6日 (2017 - 04 - 06) 全文	1-19
A	CN 109912717 A (北京天广实生物技术股份有限公司) 2019年6月21日 (2019 - 06 - 21) 全文	1-19
A	CN 103450360 A (辉瑞产品公司等) 2013年12月18日 (2013 - 12 - 18) 全文	1-19
A	WO 2018088850 A2 (DINONA) 2018年5月17日 (2018 - 05 - 17) 全文	1-19
A	CN 1522264 A (麒麟麦酒株式会社) 2004年8月18日 (2004 - 08 - 18) 全文	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2022年9月5日		2022年9月26日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		武雪梅
传真号 (86-10)62019451		电话号码 86-(10)-53961961

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/101780

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103930442 A (鳄鱼生物科学公司等) 2014年7月16日 (2014 - 07 - 16) 全文	1-19
A	张界等. "CD40单克隆抗体的制备、筛选及功能鉴定" 现代免疫学, 第37卷, 第5期, 2017年12月31日 (2017 - 12 - 31), 第353-359页	1-19
A	PERPER, S.J. 等. "Treatment with a CD40 Antagonist Antibody Reverses Severe Proteinuria and Loss of Saliva Production and Restores Glomerular Morphology in Murine Systemic Lupus Erythematosus" The Journal of Immunology, 第203卷, 第1期, 2019年5月20日 (2019 - 05 - 20), 第58-75页	1-19

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/101780

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

a. 作为国际申请的一部分提交的:

附件C/ST.25文本文件形式

纸件或图形文件形式

b. 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

附件C/ST.25文本文件形式(细则13之三.1(a))

纸件或图形文件形式(细则13之三.1(b)和行政规程第713段)

2. 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

10

20

30

40

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/101780

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

- 1. 权利要求: 16, 18 10
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
[1] 权利要求16、18涉及一种治疗方法, 涉及PCT细则39.1定义的不要求国际检索单位检索的主题:
(4) 通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法及在人体或动物体上实施的诊断方法。国际检索基于所述抗CD40抗体或其抗原结合片段或所述药物组合物在制备治疗自身免疫疾病或治疗移植物抗宿主病或缓解移植排斥反应的药物中的用途作出。
- 2. 权利要求:
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:
- 3. 权利要求: 20
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

30

40

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/101780

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)				
WO	2020006347	A1	2020年1月2日	JP 2021529754 A	2021年11月4日				
				BR 112020024078 A2	2021年2月17日				
				CN 112334195 A	2021年2月5日				
				US 2021261678 A1	2021年8月26日				
				EP 3813950 A1	2021年5月5日				
				PH 12020552235 A1	2021年6月28日				
				KR 20210027436 A	2021年3月10日				
				CA 3101469 A1	2020年1月2日				
				EA 202190094 A1	2021年4月21日				
				AU 2019291890 A1	2020年12月17日				
				CL 2020003348 A1	2021年7月19日				

				CN	103209996	A	2013年7月17日	US 2018118843 A1	2018年5月3日
BR 112013011644 A2	2016年8月2日								
PE 20140979 A1	2014年8月9日								
JP 2014500720 A	2014年1月16日								
SI 2640749 T1	2017年7月31日								
MA 34654 B1	2013年11月2日								
EP 2640749 A1	2013年9月25日								
KR 20130080856 A	2013年7月15日								
ES 2633817 T3	2017年9月25日								
IL 225719 DO	2013年6月27日								
US 2014341898 A1	2014年11月20日								
UY 33728 A	2012年6月29日								
PT 3502138 T	2022年4月6日								
HU E034203 T2	2018年1月29日								
EP 4023676 A1	2022年7月6日								
US 2022204635 A1	2022年6月30日								
SI 3502138 T1	2022年5月31日								
HR P20220413 T1	2022年5月27日								
RS 56153 B1	2017年11月30日								
HR P20171084 T1	2017年10月6日								
DK 3502138 T3	2022年4月19日								
CU 20130071 A7	2013年9月27日								
PL 3502138 T3	2022年5月2日								
CL 2013001124 A1	2014年7月4日								
CR 20130222 A	2013年6月28日								
US 2016152721 A1	2016年6月2日								
MX 2013005477 A	2013年6月12日								
LT 2640749 T	2017年7月10日								
US 2017267772 A1	2017年9月21日								
SG 189928 A1	2013年6月28日								
UA 112417 C2	2016年9月12日								
NZ 609549 A	2015年5月29日								
TW 201305208 A	2013年2月1日								
TW 201623335 A	2016年7月1日								
EP 3502138 A1	2019年6月26日								
EP 3222636 A1	2017年9月27日								
US 2020087409 A1	2020年3月19日								
ES 2911460 T3	2022年5月19日								
AR 083847 A1	2013年3月27日								

10

20

30

40

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/101780

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利		公布日 (年/月/日)	
				US	2012121585	A1	2012年5月17日		10
				PT	2640749	T	2017年7月25日		
				AU	2011331288	A1	2013年5月2日		
				UY	39292	A	2021年7月30日		
				HU	E058015	T2	2022年6月28日		
				WO	2012065950	A1	2012年5月24日		
				RS	63094	B1	2022年4月29日		
				CO	6801629	A2	2013年11月29日		
				CN	105949314	A	2016年9月21日		
				CY	1119097	T1	2018年1月10日		
WO	2017059196	A2	2017年4月6日	JP	2018529351	A	2018年10月11日		20
				US	2019048089	A1	2019年2月14日		
				MA	43055	A	2018年8月8日		
				KR	20180053738	A	2018年5月23日		
				US	2017088624	A1	2017年3月30日		
				EC	SP18033227	A	2018年5月31日		
				MA	43053	A	2018年8月8日		
				ES	2906823	T3	2022年4月20日		
				CR	20180177	A	2018年6月22日		
				WO	2017059243	A2	2017年4月6日		
				EP	3356532	A2	2018年8月8日		30
				PE	20181367	A1	2018年8月27日		
				KR	20180054837	A	2018年5月24日		
				CA	3000396	A1	2017年4月6日		
				AU	2016329057	A1	2018年4月12日		
				CL	2018000833	A1	2019年2月22日		
				CA	3000400	A1	2017年4月6日		
				MX	2018003905	A	2018年9月6日		
				NI	201800044	A	2018年8月24日		
				CN	108368510	A	2018年8月3日		
				PH	12018500684	A1	2018年10月1日		40
				AU	2016331819	A1	2018年4月12日		
				SV	2018005659	A	2019年3月28日		
				EP	3355921	A2	2018年8月8日		
				BR	112018006251	A2	2018年10月16日		
				EA	201890834	A1	2018年12月28日		
				IL	258268	A	2018年5月31日		
				BR	112018006360	A2	2018年10月9日		
				JP	2018533360	A	2018年11月15日		
				CN	109069622	A	2018年12月21日		
				CO	2018003436	A2	2018年6月20日		
CN	109912717	A	2019年6月21日	CN	111454363	A	2020年7月28日		40
				CN	111454362	A	2020年7月28日		
				CN	111454361	A	2020年7月28日		
				CN	111454364	A	2020年7月28日		
CN	103450360	A	2013年12月18日	IL	161823	A	2014年2月27日		50
				US	2012225014	A1	2012年9月6日		
				SI	1476185	T1	2013年12月31日		
				PE	20030846	A1	2003年10月11日		
				EP	1476185	A2	2004年11月17日		

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/101780

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		JP 2010213704 A	2010年9月30日
		ES 2432968 T3	2013年12月5日
		TW 200306204 A	2003年11月16日
		UY 27537 A1	2003年2月28日
		ME 00503 B	2011年10月10日
		CU 23745 A3	2012年1月31日
		BR 0214137 A	2004年9月14日
		JP 2005508176 A	2005年3月31日
		MA 27139 A1	2005年1月3日
		PL 370514 A1	2005年5月30日
		IN 566KOLNP2004 A	2006年4月21日
		EG 25801 A	2012年8月8日
		IS 7253 A	2004年5月6日
		US 2016152713 A1	2016年6月2日
		MY 137641 A	2009年2月27日
		HU 0402247 A2	2005年1月28日
		CY 1115675 T1	2017年1月25日
		EP 2343086 A2	2011年7月13日
		EA 200400654 A1	2004年12月30日
		IN 1202KOL2007 A	2008年4月18日
		PL 392809 A1	2011年3月14日
		MX PA04004467 A	2005年5月16日
		OA 12725 A	2006年6月28日
		KR 20050063749 A	2005年6月28日
		US 2007190051 A1	2007年8月16日
		AU 2002356926 C1	2003年5月19日
		US 2003211100 A1	2003年11月13日
		AP 200403034 DO	2004年6月30日
		AP 200403034 AO	2004年6月30日
		NI 200200128 A	2010年1月11日
		EC SP045093 A	2004年7月23日
		TN SN04078 A1	2006年6月1日
		HR P20040525 A2	2005年4月30日
		TW 201034686 A	2010年10月1日
		NZ 533180 A	2008年3月28日
		PA 8557701 A1	2003年12月19日
		US 2013024956 A1	2013年1月24日
		ZA 200404207 B	2005年8月31日
		GE P20074222 B	2007年10月25日
		BR PI0214137 B1	2019年3月19日
		CR 10878 A	2011年1月12日
		DO P2002000507 A	2003年5月15日
		PT 1476185 E	2013年11月5日
		CR 7343 A	2004年10月28日
WO 2018088850 A2	2018年5月17日	KR 20180053255 A	2018年5月21日
		CN 110546164 A	2019年12月6日
CN 1522264 A	2004年8月18日	US 2003059427 A1	2003年3月27日
		JP W02002088186 A1	2004年8月19日
		WO 02088186 A1	2002年11月7日
		CN 101289510 A	2008年10月22日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/101780

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				EP	1391464	A1	2004年2月25日
				AU	2002251562	B2	2006年12月14日
				ES	2292746	T3	2008年3月16日
				DE	60222658	D1	2007年11月8日
				EP	1914243	A2	2008年4月23日
CN	103930442	A	2014年7月16日	HU	E036538	T2	2018年7月30日
				RU	2014113304	A	2015年10月20日
				ES	2658157	T3	2018年3月8日
				HR	P20180269	T1	2018年3月23日
				EP	2753646	A1	2014年7月16日
				US	2014348836	A1	2014年11月27日
				PT	2753646	T	2018年2月7日
				CY	1119925	T1	2018年12月12日
				AU	2012306071	A1	2014年3月20日
				KR	20140066213	A	2014年5月30日
				DK	2753646	T3	2018年1月2日
				RS	56868	B1	2018年4月30日
				NO	2753646	T3	2018年4月21日
				CA	2860406	A1	2013年3月14日
				US	2017240642	A1	2017年8月24日
				GB	201115280	DO	2011年10月19日
				EP	3323834	A1	2018年5月23日
				PL	2753646	T3	2018年5月30日
				SI	2753646	T1	2018年4月30日
				LT	2753646	T	2018年2月26日
				JP	2014531201	A	2014年11月27日
				WO	2013034904	A1	2013年3月14日

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 31/706 (2006.01)	A 6 1 K 31/706	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,J
O,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,M
Z,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,
TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

i n a

- (74)代理人 100145403
弁理士 山尾 憲人
- (74)代理人 100106518
弁理士 松谷 道子
- (74)代理人 100138911
弁理士 櫻井 陽子
- (72)発明者 林 源
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江鎮海科路 1 2 8 8 号
- (72)発明者 粟 ルウ
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江鎮海科路 1 2 8 8 号
- (72)発明者 林 侃
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江鎮海科路 1 2 8 8 号
- (72)発明者 廖 成
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江鎮海科路 1 2 8 8 号

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25
CA44
4C085 AA13 AA14 BB11 BB36 BB41 BB42 CC23 EE01 EE03 GG01
GG06
4C086 AA01 AA02 EA04 MA02 MA04 MA17 MA66 NA05 ZA01 ZB07
ZB08 ZC75
4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 FA74 GA26